Ružičkini dani : Međunarodni znanstveno-stručni skup 17. Ružičkini dani „Danas znanost - sutra industrija“ : zbornik radova

Andrejaš, Martina; Anđić, Martina; Avdić, Gordan; Barbaro, Tea; Bašić, Anita; Budim, Barbara; Buhin Šturlić, Zrinka; Cvetnić, Matija; Čelan, Antonija; Čikanović, Dora; ...

Edited book / Urednička knjiga

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Publication year / Godina izdavanja: **2019**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:392844

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

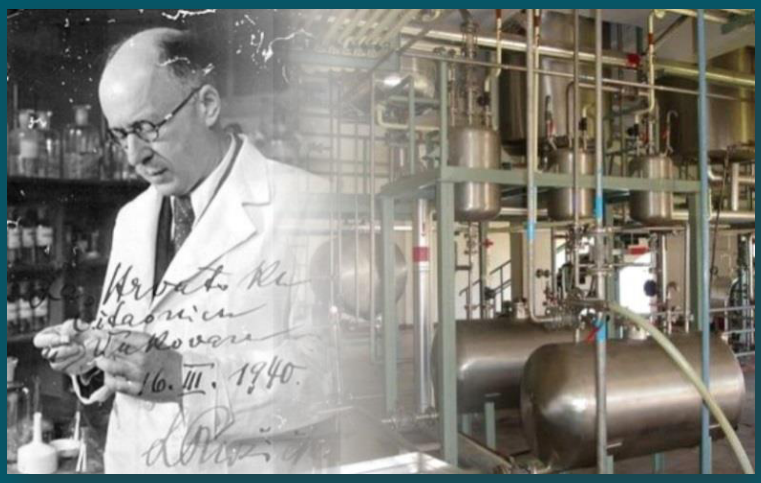
ISSN 2671-0668 (Online)
ISSN 2459-9387 (Tisak)

Croatian Society of Chemical Engineers
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
International Union of Food Science and Technology
European Association for Chemical and Molecular Sciences
European Hygienic Engineering & Design Group

International conference

17th Ružička days

"TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY"



September 19–21, 2018
Vukovar, Croatia

PROCEEDINGS

Osijek, 2019

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Croatian Society of Chemical Engineers / Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa
International Union of Food Science and Technology
European Hygienic Engineering & Design Group / Europsko udruženje za higijensko inženjerstvo i dizajn
European Association for Chemical and Molecular Sciences (EuCheMS)

International Conference 17th Ružička Days
"Today Science – Tomorrow Industry"

Vukovar, Croatia, September 19th – 21st 2018

PROCEEDINGS

ZBORNIK RADOVA

Međunarodni znanstveno-stručni skup 17. Ružičkini dani
„Danas znanost – sutra industrija"

Vukovar, Hrvatska, 19. – 21. rujna 2018.

Osijek, 2019.

PROCEEDINGS	*17th Ružička Days "Today Science – Tomorrow Industry"*
ZBORNIK RADOVA	17. Ružičkini dani „Danas znanost – sutra industrija"
***Published by*/Izdavači**	*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek* *Faculty of Food Technology Osijek and* *Croatian Society of Chemical Engineers (CSCE)* Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek i Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa
***Editors*/Urednici**	Srećko Tomas, Đurđica Ačkar
***Executive Editor*/Izvršni urednik**	Antun Jozinović
***Technical Editor*/Tehnički urednik**	Ante Lončarić
***Editorial Bord /* Urednički odbor**	Jurislav Babić, Dajana Gašo-Sokač, Ljubica Glavaš-Obrovac, Stela Jokić, Ante Jukić, Maja Molnar, Vesna Ocelić Bulatović, Valentina Pavić
***Cover page design*/Dizajn naslovnice**	Zdenko Blažeković
***Scientific and Organising Committee/* Znanstveno-organizacijski odbor**	Srećko Tomas (chairman) Ante Jukić (vice-chairman) Jurislav Babić (vice-chairman) Đurđica Ačkar, Vesna Ocelić Bulatović, Mladen Brnčić, Daniela Čačić Kenjerić, Dajana Gašo-Sokač, Ljubica Glavaš-Obrovac, Ivan Hubalek, Lidija Jakobek Barron, Stela Jokić, Antun Jozinović, Nada Knežević, Ante Lončarić, Marijana Marinović, Borislav Miličević, Ivanka Miličić, Maja Molnar, Valentina Pavić, Anita Pichler, Mirela Samardžić, Gordana Šelo, Drago Šubarić, Ivana Vranić, Krunoslav Zmaić
***Honorary Committee/*Počasni odbor**	Vladimir Andročec, Ivan Anušić, Luka Burilović, Blaženka Divjak, Božo Galić, Vlado Guberac, Darko Horvat, Vlado Horvat, Marin Hraste, Zvonimir Janović, Leo Klasinc, Filip Kljajić, Ivan Krešić, Zvonko Kusić, Ruža Marić, Gordana Odor, Ivan Penava, Vlasta Piližota, Ivan Sarić, Damir Skender, Tomislav Tolušić, Nenad Trinajstić, Alen Varenina, Ivan Vrkić, Gabrijela Žalac
***Comittee of Young Chemists Meeting/* Odbor za Susret mladih kemičara**	Antun Jozinović (predsjednik), Mario Komar, Ante Lončarić, Ivanka Miličić, Vesna Ocelić Bulatović

Osijek and/i Zagreb, 2019.

A CIP catalogue record of this publication is available from the City and University Library Osijek under 141118094

CIP zapis dostupan je u računalnom katalogu Gradske i sveučilišne knjižnice Osijek pod brojem 141118094

Acknowledgement to reviewers

The Editors of the *Proceedings* of the *17th Ružička days* extend their deepest gratitude to the following manuscript reviewers who maintained the professional standards of our *Proceedings* of the 17th *Ružička days*:

Tomislav Balić, Valentina Bušić, Mirjana Čačković, Sandra Ećimović, Zoran Glavaš, Ljubica Glavaš Obrovac, Mirna Habuda Stanić, Jasmina Hadžiabdić, Lidija Jakobek Barron, Marko Jukić, Mario Komar, Elvira Kovač Andrić, Ivana Leščić Ašler, Ante Lončarić, Ksenija Markov, Borislav Miličević, Katarina Mišković Špoljarić, Maja Molnar, Teuta Opačak-Bernardi, Goran Palijan, Jovana Petrović, Valentina Pavić, Anita Pichler, Jelena Rogan, Mirela Samardžić, Aleksandra Sander, Filip Stević, Marija Stjepanović, Ivica Strelec, Anita Štrkalj, Ivana Tomac, Davor Valinger, Mirna Velki, Elvira Vidović, Domagoj Vrsaljko, Marijana Zovko Končić

All pieces of information provided in this PROCEEDINGS are the sole responsibility of the authors of the manuscripts Publishers are not responsible for any use that might be made of the data appearing in this document. Also, publishers shall not be liable for any errors, language mistakes and the like, that are found in the works of authors.
Sadržaj radova u ovom *ZBORNIKU RADOVA* isključiva je odgovornost autora. Izdavač nije odgovoran za upotrebu podataka objavljenih u radovima, greške i sl.

Under the Auspice of:	***Pokrovitelj:***
Croatian Academy of Sciences and Arts	***Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti***
Supported by:	***Uz potporu:***
Ministry of Science and Education of the Republic of Croatia	Ministarstvo znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske
Ministry of Agriculture of the Republic of Croatia	Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske
Ministry of Regional Development and EU Funds	Ministarstvo regionalnoga razvoja i fondova Europske unije
Ministry of Economy, Enterpreneurship and Crafts	Ministarstvo gospodarstva, poduzetništva i obrta
Ministry of Environment and Energy	Ministarstvo zaštite okoliša i energetike
Croatian Academy of Engineering	Akademija tehničkih znanosti Hrvatske
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek	Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Osijek-Baranja County	Osječko-baranjska županija
Vukovar-Srijem County	Vukovarsko-srijemska županija
City of Osijek	Grad Osijek
City of Vukovar	Grad Vukovar
Croatian Chamber of Economy	Hrvatska gospodarska komora
Croatian Employers' Association	Hrvatska udruga poslodavaca

Dear colleagues,

In front of you are the Proceedings of the International Conference 17th Ružička days: „Today Science – Tomorrow Industry“ that was held in Vukovar, Croatia at September 19-21, 2018. The main goal of this interdisciplinary conference is to promote excellence in science and engineering as well as application of up-to-date research results and technological achievements in industry. In its fifth issue (2011, 2013, 2015, 2017, 2019) the Proceedings continues with publishing of quality scientific and professional full papers in sections Chemical Analysis and Synthesis (2), Chemical and Biochemical Engineering (3), Food Technology and Biotechnology (4), Medical Chemistry and Pharmacy (2), Environmental Protection (9) and Meeting of Young Chemists (4). All the papers were thoroughly reviewed from respectable evaluators, to whom we express our gratitude. We are also thankful to all the authors and participants of the Ružička days, and to all that support and contribute in its organization; especially our international coorganizers EuCheMS, EFFoST and EHEDG, the members of organizing and scientific committee, plenary and invited lecturers, sponsors, and of course our highly skilled and committed associates, which put a lot of effort in preparation of this book.

We are looking forward to meeting you all again in Vukovar, in 2020.

Srećko Tomas

Đurđica Ačkar

Editors

Sadržaj / *Contents*

Sekcija: Kemijska analiza i sinteza
Session: Chemical Analysis and Synthesis

Zrinka Buhin Šturlić, Sanja Lučić Blagojević, Mirela Leskovac, Josip Miklečić
UTJECAJ DODATKA TiO_2 PUNILA I UV ZRAČENJA NA SVOJSTVA POLIAKRILATA
INFLUENCE OF THE TiO_2 FILLER ADDITION AND UV RADIATION ON THE PROPERTIES OF POLYACRYLATE 1-11

Anamarija Mitar, Tea Barbaro, Jasna Prlić Kardum
STABILNOST NANOSUSPENZIJA PRIPREMLJENIH IZ NISKOTEMPERATURNIH EUTEKTIČKIH OTAPALA
STABILITY OF NANOSUSPENSIONS PREPARED WITH DEEP EUTECTIC SOLVENTS 12-23

Sekcija: Kemijsko i biokemijsko inženjerstvo
Session: Chemical and Biochemical Engineering

Anita Bašić, Sandra Svilović, Renato Stipišić, Nenad Kuzmanić
OPTIMIZACIJA HIDRODINAMIČKIH UVJETA ZA IZMJENU BAKRA NA NaX TAGUCHIJEVOM METODOM
TAGUCHI OPTIMIZATION OF HIDRODINAMIC CONDITIONS FOR COPPER EXCHANGE ON NaX 24-33

Marija Ćosić, Bruno Čizmić, Antonija Čelan, Nenad Kuzmanić
PRIMJENA TURBIDIMETRIJSKE METODE PRI ODREĐIVANJU ŠIRINE METASTABILNE ZONE BORAKSA U ŠARŽNOM KRISTALIZATORU
APPLICATION OF TURBIDIMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF METASTABLE ZONE WIDTH OF BORAX IN BATCH CRYSTALLIZER 34-45

Marija Vuković Domanovac, Martina Miloloža, Josip Leko, Monika Šabić, Martina Sudar, Zvjezdana Findrik Blažević
UTJECAJ ERITROMICINA NA BAKTERIJSKU KULTURU *Pseudomonas putida*
IMPACT OF ERYTHROMYCIN ON *Pseudomonas putida* BACTERIAL CULTURE 46-57

Sekcija: Prehrambena tehnologija i biotehnologija
Session: Food Technology and Biotechnology

Martina Andrejaš, Dijana Miličević, Gordan Avdić
IMPACT OF THE QUANTITY AND TYPES OF ADDED MATERIALS ON BISCUITS RICE FLOUR PROPERTIES 58-62

Nebojša Kojić, Lidija Jakobek
CHEMICAL AND SENSORY PROPERTIES OF RED WINES FROM BARANJA VINEYARDS 63-71

Petra Matić, Lidija Jakobek
ADSORPTION OF DIHYDROCHALCONES ONTO β-GLUCAN 72-81

Benjamin Muhamedbegović, Midhat Jašić, Drago Šubarić, Zoran Iličković, Faik Uzunović, Adnan Ćehajić
INTERACTIONS FOOD-METAL PACKAGING 82-96

Sadržaj / *Contents*

Sekcija: Medicinska kemija i farmacija
Session: Medical Chemistry and Pharmacy

Irena Landeka Jurčević, Tajana Frančić, Irena Fabijančić, Verica Dragović-Uzelac, Domagoj Đikić
UTJECAJ POLIFENOLA IZ EKSTRAKTA CVIJETA TRNINE NA DIJABETES TIPA 2 U C57BL/6 MIŠA
INFLUENCE OF PRUNUS SPINOSA L. FLOWER EXTRACT POLYPHENOLS ON TYPE-2 DIABETES MELLITUS IN C57BL/6 MOUSE 97-111

Vesna Pehar, Davor Oršolić, Višnja Stepanić
DRUG-LIKENESS, HERBICIDE-LIKENESS AND TOXICITY OF HERBICIDAL COMPOUNDS – IN SILICO ANALYSIS 112-123

Sekcija: Zaštita okoliša
Session: Environmental Protection

Tomislav Domanovac, Dajana Kučić Grgić, Monika Šabić, Marija Vuković Domanovac
BIOLOŠKA OBRADA BIORAZGRADIVE FRAKCIJE IZ MIJEŠANOG KOMUNALNOG OTPADA
BIOLOGICAL TREATMENT OF BIODEGRADABLE FRACTION FROM MIXED MUNICIPAL WASTE 124-133

Ivana Jakovljević, Ranka Godec, Zdravka Sever Štrukil, Iva Šimić, Gordana Pehnec
MASENE KONCENTRACIJE PAU, OC I EC U PM1 FRAKCIJI LEBDEĆIH ČESTICA
MASS CONCENTRATIONS OF PAH, OC AND EC IN PM1 PARTICLE FRACTION 134-142

Dajana Kučić Grgić, Antonija Kovačević, Ema Lovrinčić, Matija Cvetnić, Vesna Ocelić Bulatović, Marija Vuković Domanovac
BIORAZGRADNJA BISFENOLA A BAKTERIJAMA *Pseudomonas aeruginosa* BSW I *Streptomyes sp.*
BIODEGRADATION OF BISPHENOL A WITH BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa* AND *Streptomyes sp.* 143-154

Dijana Grgas, Tea Štefanac, Neven Marković, Toni Šipalo, Sanja Radman, Tibela Landeka Dragičević
DENITRIFICIRAJUĆA DEFOSFATACIJA PREKO NITRITA
DENITRIFYING DEPHOSPHATATION VIA NITRITE 155-164

Tea Štefanac, Dijana Grgas, Nikolina Pavković, Sanja Radman, Tibela Landeka Dragičević
UČINAK KONCENTRACIJE OTOPLJENOG KISIKA NA AUTOTROFNU NITRIFIKACIJU
THE EFFECT OF DISSOLVED OXYGENCONCENTRATION ON AUTOTROPHIC NITRIFICATIONU 165-175

Ana Mihaljević, Silva Žužul
UTJECAJ VRSTE FILTARSKOG MEDIJA NA GRANICE DETEKCIJE ELEMENATA U ANALIZI LEBDEĆIH ČESTICA U ZRAKU
INFLUENCE OF FILTER MEDIA TYPE ON LIMITS OF DETECTION FOR AIR PARTICULATE MATTER ELEMENTAL ANALYSIS 176-185

Sadržaj / *Contents*

Marina Palfi, Jasenka Ćosić, Nada Knežević
ANTIFUNGALNO DJELOVANJE ETERIČNIH ULJA KLINČIĆEVCA I KADULJE NA RAST MICELIJA *Colletotrichum coccodes*
ANTIFUNGAL ACTIVITY OF CLOVE AND SAGE ESSENTIAL OILS ON THE GROWTH OF MYCELIUM *Colletotrichum coccodes* 186-192

Zdravka Sever Štrukil, Ivana Jakovljević, Gordana Pehnec
PROCJENA IZVORA ONEČIŠĆENJA ZRAKA PAU U ZAGREBU KORIŠTENJEM DIJAGNOSTIČKIH OMJERA
USING OF PAHs DIAGNOSTIC RATIOS FOR THE ASSESSMENT OF AIR POLLUTION SOURCES IN ZAGREB 193-204

Monika Šabić, Mateja Novak, Dajana Kučić Grgić, Marija Vuković Domanovac
BIOSTIMULACIJA PRIRODNO PRISUTNE MIKROBIOLOŠKE ZAJEDNICE U PROCJEDNOJ VODI IZ BIOOTPADA
BIOSTIMULATION OF NATIVE MICROBIAL COMMUNITY IN BIOWASTE LEACHATE 205-214

Susret mladih kemičara
Meeting of Young Chemists

Boris Mikulić, Stjepan Jozinović, Slavica Jukić
DOBIVANJE ALUMINIJEVOG ALAUNA IZ LIMENKE
OBTAINING POTASSIUM ALUM FROM CANS 215-221

Lucija Vrbić, Ana Miškić, Marija Jukić, Slavica Jukić
PEROKSIDNI BROJ LIPIDA U PRIRODNIM BALZAMIMA
PEROXIDE VALUE OF LIPIDS IN NATURAL BALMS 222-230

Dora Čikanović, Petra Mutavdžija, Martina Anđić, Marta Martini, Ivan Kolar, Matija Hardi, Kristina Kristek, Karolina Dvojković, Sanja Pavlović Šijanović
UTJECAJ VIDLJIVE SVJETLOSTI NA RAST ŠPINATA (*Spinacia oleracea* L. cv. *Matador*)
THE EFFECT OF VISIBLE LIGHT ON SPINACH GROWTH (*Spinacia oleracea* L. cv. *Matador*) 231-238

Barbara Budim, Barbara Lukić, Maja Stojanović
SADRŽAJ SUMPOROVOG DIOKSIDA U BIJELIM VINIMA S PODRUČJA OPĆINE ŽEPČE (BOSNA I HERCEGOVINA)
THE SULFUR DIOXIDE CONTENT IN WHITE WINES FROM THE DISTRICT OF ŽEPČE MUNICIPALITY (BOSNIA AND HERZEGOVINA) 239-249

Kazalo autora
Author Index 250-251

Sponzori, donatori i izlagači
Sponsors, donors and exhibitors 252-260

Sekcija: Kemijska analiza i sinteza
Session: Chemical Analysis and Synthesis

Stručni rad

Utjecaj dodatka TiO_2 punila i UV zračenja na svojstva poliakrilata

Zrinka Buhin Šturlić[1*], Sanja Lučić Blagojević[1], Mirela Leskovac[1], Josip Miklečić[2]

[1]*Sveučilište u Zagrebu/Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije/ Zavod za inženjerstvo površina polimernih materijala, Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Hrvatska*
[2]*Sveučilište u Zagrebu/Šumarski fakultet/ Zavod za namještaj i drvne proizvode, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska*
[*]*Dopisni autor: zbuhin@fkit.hr*

Sažetak

Dodatak punila u polimernu matricu može značajno poboljšati njena mehanička, optička, električna, magnetska i kemijska svojstva. U ovom radu pripravljeni su poliakrilatni (PAK) sustavi s dodatkom nanopunila titanijevog dioksida (TiO_2) (0,7 % masenih) postupcima *in situ* emulzijske polimerizacije i *ex situ* načinom priprave. Za pripravu nanokompozita korištene su dvije vrste TiO_2 nanopunila (CCR 200 Mn i CCR 150) u obliku vodenih suspenzija. Površina punila CCR 150 je modificirana s Al_2O_3 i Fe_2O_3. CCR 200 Mn je TiO_2 punilo modificirano manganom koji je ugrađen u kristalnu rešetku TiO_2 s ciljem smanjenja katalitičke aktivnosti TiO_2 i poboljšanja UV apsorpcije. Iz PAK+TiO_2 emulzija su pripravljeni filmovi i izloženi UV zračenju. Morfologija filmova istražena je optičkim mikroskopom, a toplinska svojstva prije i nakon izlaganja UV zračenju diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) i termogravimetrijskom analizom (TGA). Mehanička svojstva filmova određena su rasteznim ispitivanjem. Dobiveni rezultati pokazali su da dodatak punila povećava toplinsku stabilnost i mehanička svojstva poliakrilatne matrice. Značajan utjecaj na morfologiju ima način priprave nanokompozita; sitnija morfologija vidljiva je kod sustava pripravljenih *in situ* emulzijskom polimerizacijom. UV zračenje uzrokuje povišenje stakliśta PAK matrice i PAK+TiO_2 filmova. Nakon UV zračenja filmovi postaju izrazito krti te stoga nije bilo moguće pripraviti uzorke za mehanička ispitivanja, a jedini film koji je pokazao zadovoljavajuća mehanička svojstva nakon UV zračenja bio je PAK+0,7 % CCR 200 Mn *in situ.* UV zračenje uzrokuje smanjenje toplinske stabilnosti PAK matrice i PAK+TiO_2 filmova.

Ključne riječi: nanokompozit, *in situ* emulzijska polimerizacija, poliakrilat, titanijev dioksid, UV zračenje

Uvod

Poliakrilati (PAK) pripravljeni procesima emulzijske polimerizacije imaju široku upotrebu u proizvodnji adheziva, boja i premaza. Najznačajniji poliakrilati su polimeri estera akrilne kiseline s alkilnim skupinama (R): metil, etil, *n*-butil i 2-etil-heksil. Poli(metil-metakrilat) je amorfan polimer velike prozirnosti. Ima visoku tvrdoću i čvrstoću, dobre je preradljivosti i postojanosti oblika, postojan na djelovanje atmosferilija, svjetla i kisika kao i prema mikrobiološkoj razgradnji (Doran, 2013). Poli(butil-akrilat) je elastičan i mekan polimer, velike rastezljivosti, male čvrstoće, proziran i otporan na lom, često se koristi u industriji adheziva (Van Herk, 2013).
Polimerni nanokompoziti su materijali čija je matrica polimer, a dispergirana faza punilo ili ojačavalo nanometarskih dimenzija (Kurajica, 2017). Svojstva kompozita ovise o omjeru komponenata i njihovoj kompatibilnosti, dispergiranosti punila u matrici, geometriji punila te o raspodjeli veličina čestica punila. Nanokompoziti se mogu pripraviti postupcima miješanja, u otopini ili talini, te *in situ* polimerizacijom.
Punila se danas koriste kao dodatak polimerima u svrhu poboljšanja njihovih svojstava. Zbog svog visokog difrakcijskog indeksa i sposobnosti reflektiranja svjetlosti, TiO_2 je najviše istraživani UV apsorber za premaze (Miklečić, 2013).
Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj dodatka dvije vrste TiO_2 nanopunila te načina priprave nanokompozita i UV zračenja na svojstva poliakrilata. Istraživanje je usmjereno na primjenu PAK+TiO_2 sustava kao premaza za drvo koji štiti drvo u eksterijeru od UV zračenja.

Materijali i metode

Materijali

Za sintezu poliakrilat+TiO_2 emulzija iz kojih su pripravljeni filmovi korišteni su monomeri metil-metakrilat (MMA) proizvođača Acros Organics i butil-akrilat (BA) proizvođača Sigma Aldrich. Kao emulgator korišten je natrijev lauril sulfat komercijalnog naziva DISPONIL FES 77 proizvođača BASF, te inicijator amonijev persulfat, APS, 98 %, proizvođača Acros Organics. Za pripravu PAK+TiO_2 emulzija korištene su dvije vrste TiO_2 suspenzija komercijalnog naziva CCR 150 i CCR 200 Mn proizvođača „Cinkarna Celje" (Tablica 1).

Postupci priprave PAK+TiO_2 sustava

PAK+TiO_2 emulzije pripravljene su postupkom *in situ* emulzijske polimerizacije i postupkom *ex situ*. Omjer monomera monomera metil-metakrilata i butil-akrilata u PAK emulzijama bio je 1:1, a koncentracija TiO_2 nanopunila u 0,7 %, u odnosu na masu monomera. Iz dobivenih emulzija pripravljeni su filmovi.

Tablica 1 Karakteristike TiO_2 suspenzija

Table 1 Characteristics of TiO_2 suspensions

Punilo	Količina TiO_2	Gustoća	pH	Veličina kristala (Scherrer metoda)	Površinska obrada
CCR 150	min 15%	~ 1,2 g/cm³	6 8	~ 10 nm	Al_2O_3, Fe_2O_3
CCR 200 Mn	min 20%	~ 1,2 g/cm³	6 8	~ 30 nm	/

Polimerizacija je provedena aparaturom koja se sastoji od trogrlog reaktora zapremnine 250 mL, povratnog hladila, miješala, cijevi za uvođenje inertnog plina, uljne kupelji, osjetila temperature te lijevka za dokapavanje. Reaktor je zagrijavan pomoću silikonskog ulja koje struji kroz plašt reaktora. Kod postupka *in situ* emulzijske polimerizacije u reaktor je dodana TiO_2 suspenzija i voda te je sustav uz miješanje zagrijavan na temperaturu 80-85 °C. Kad je postignuta željena temperatura dodana je predemulzija kap po kap kroz tri sata. Predemulzija se sastoji od emulgatora (Disponil FES 77), vode, monomera i inicijatora (APS). Nakon dodatka predemulzije dodaje se inicijator APS (10 % ukupne količine inicijatora) i reakcija se još dodatno provodi 45 min na temperaturi 80-85 °C kako bi polimerizacija u potpunosti završila.
Postupkom emulzijske polimerizacije pripravljena je i čista poliakrilatna emulzija istim postupkom kao što je prethodno opisano, uz razliku što je na početku postupka priprave u reaktor dodana samo voda.
Ex situ način pripreme PAK+TiO_2 emulzija zasniva na miješanju PAK emulzije pripravljene emulzijskom polimerizacijom s TiO_2 suspenzijom. Miješanje je provedeno na magnetskoj miješalici, 1h na 250 min^{-1} .

Priprava filmova

Filmovi PAK+TiO_2 sustava pripravljeni su nanošenjem emulzija pomoću izvlakivača (80 μm) na staklenu podlogu i potom sušenjem u komori za sušenje 24h pri 60 °C.

Izlaganje filmova UV zračenju

Nakon sušenja filmovi su skinuti s podloge i zalijepljeni na metalne držače. Uzorci su izlagani UV fluorescentnim lampama u QUV uređaju tvrtke Q-Panel. Uređaj je opremljen s osam UVA-340 fluorescentnih lampi koje simuliraju sunčevo UV zračenje s najvećim intenzitetom zračenja na 340 nm. Izlaganje je trajalo 504 sata.

Karakterizacija filmova

Morfologija filmova ispitana je optičkim mikroskopom Axio Zoom.V16 tvrtke Zeiss pri povećanju od 100 x. Diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC) određena je temperatura staklastog prijelaza (T_g) filmova prije i nakon izlaganja UV zračenju iz drugog ciklusa zagrijavanja (Tablica 2). Mjerenje je provedeno od temperature -30 °C do 50 °C, brzinom 10 °C/min u struji dušika protoka 50 ml/min. Toplinska stabilnost filmova ispitana je termogravimetrijskom analizom (TGA) zagrijavanjem od sobne temperature do 500 °C, brzinom 10 °C/min u struji dušika. Rastezano ispitivanje provedeno je na univerzalnoj mehaničkoj kidalici proizvođača Zwick. Početni razmak između čeljusti bio je 50 mm, a brzina kidanja 100 mm/min.

Tablica 2 Vrijednosti temperatura staklastog prijelaza (T_g)

Table 2 Glass transition temperature (T_g)

	T*g* / °C	**T*g* / °C**
	prije UV	**nakon UV**
PAK	18,0	37,2
PAK+CCR 200 Mn *in situ*	17,1	31,4
PAK+CCR 200 Mn *ex situ*	16,4	31,1
PAK+CCR 150 *in situ*	15,5	25,8
PAK+CCR 150 *ex situ*	17,3	29,8

Rezultati i rasprava

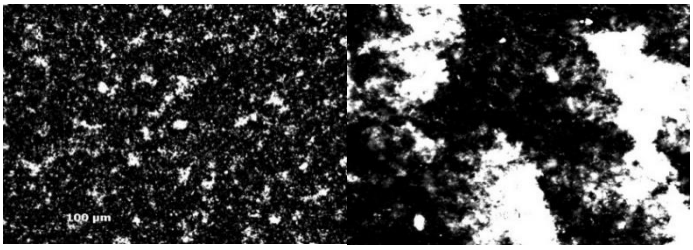
Morfologija

Iz mikrografija čiste PAK matrice (Slika 1) i PAK+TiO_2 filmova prikazanih na slikama 2-3 vidljiva je značajna razlika veličine, oblika i raspodjele punila ovisno o načinu priprave emulzija i vrsti TiO_2 punila. Bolja raspodjela punila i sitnija morfologija vidljiva je u sustavima PAK+CCR 150 (Slika 3) neovisno o načinu priprave emulzija (*in situ* i *ex situ*) u usporedbi sa sustavima PAK+CCR 200 Mn (Slika 2). S obzirom da zbog velike specifične površine i površinske energije TiO_2 ima veliku sklonost aglomeraciji te je nekompatibilan s organskim polimerima, s ciljem poboljšanja dispergiranosti i kompatibilnosti potrebno ga je površinski modificirati. CCR 150 je površinski modificiran s Al_2O_3 i Fe_2O_3 te to može biti razlog sitnije morfologije sustava s navedenim punilom u odnosu na sustave s punilom CCR 200 Mn čija površina nije modificirana. Prednost CCR 200 Mn punila je to što je modificirano manganom koji je ugrađen u kristalnu rešetku TiO_2 radi

smanjenja katalitičke aktivnosti TiO_2 i poboljšanja UV apsorpcije. Značajnije sitnija morfologija i bolja raspodijeljenost punila, neovisno o vrsti punila, vidljiva je za sustave pripravljene *in situ* načinom priprave. Usporedbom filmova prije i nakon UV zračenja nije vidljiva razlika u njihovoj morfologiji te se može zaključiti da UV zračenje ne utječe na mikroskopski izgled filmova. Iz literature je poznato da UV zračenje utječe na vanjski izgled filma posebice na boju i sjaj (Miklečić, 2013), (Zhang, 2009) i (Goncalves Bardi, 2012).

Slika 1. PAK matrica

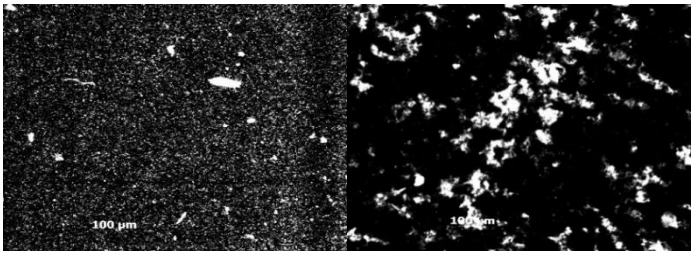
Fig. 1. PAK matrix



a) b)

Slika 2. a) PAK+CCR 200 Mn *in situ* i b) PAK+CCR 200 Mn *ex situ*

Fig. 2. a) PAK+CCR 200 Mn *in situ* i b) PAK+CCR 200 Mn *ex situ*



a) b)

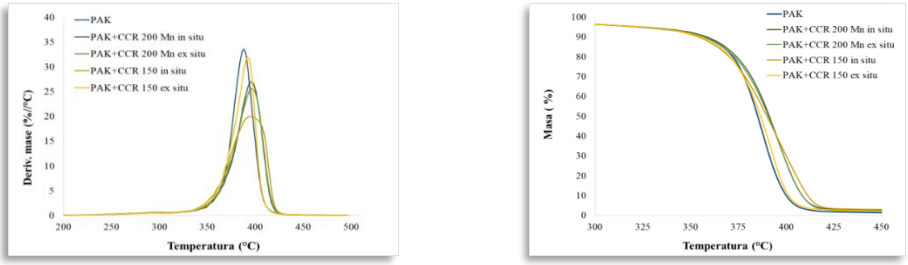
Slika 3. a) PAK+CCR 150 *in situ* i b) PAK+CCR 150 *ex situ*

Fig. 3. a) PAK+CCR 150 *in situ* i b) PAK+CCR 150 *ex situ*

Toplinska svojstava PAK+TiO_2 filmova

Prije izlaganja UV zračenju svi PAK+TiO_2 sustavi imaju vrijednosti stakliśta bliske staklištu čiste poliakrilatne matrice. Može se pretpostaviti da je to rezultat male količine TiO_2 nanopunila (0,7 %) i velike fleksibilnosti poliakrilatne matrice ili slabih interakcija između matrice i punila (Jadhav, 2009), (Kashfipour, 2018) i (González-Irún, 2007) . Nakon izlaganja UV zračenju dolazi do značajnog porasta stakliśta čiste PAK matrice i to za 20 °C. U PAK+TiO_2 sustavima također dolazi do povećanja stakliśta nakon UV zračenja, međutim to povećanje stakliśta nije tako veliko kao kod čiste PAK matrice. Manje izraženo povećanje stakliśta nakon UV zračenja imaju sustavi koji sadrže punilo CCR 150. Ako se usporede dva načina sinteze nanokompozita, vidljivo je da je u sustavima pripravljenim *in situ* metodom došlo do manjeg porasta stakliśta što je moguća posljedica izraženije apsorpcije UV zračenja uslijed bolje raspodjele punila (Slika 2a i 3a). Istraživanje kojim je praćen utjecaj TiO_2 nanopunila na svojstva vodenih poliakrilatnih premaza (Miklečić, 2013) pokazalo je različite rezultate vrijednosti stakliśta uzoraka s obzirom na količinu punila i vrstu izlaganja (prirodno ili ubrzano izlaganje). Ubrzanim izlaganjem UV zračenju došlo je do porasta stakliśta svih uzoraka uključujući i osnovni premaz bez nanopunila. Prijašnja istraživanja (Aloui, 2006) i (Sung, 2004) u kojima je istraživan utjecaj UV apsorbera u premazima na vrijednosti stakliśta, pripisuju povećanje stakliśta nakon djelovanja UV zračenja povećanju stupnja umreženosti komponenti premaza koje smanjuju pokretljivost makromolekula polimera te gubitku komponenti premaza male molekulske mase.
Rezultati TG analize uzoraka prije UV zračenja (slika 4) pokazuju da se razgradnja odvija u dva stupnja, prvi stupanj s vrlo malim gubitkom mase u temperaturnom području od oko 250 do 325 °C i drugi stupanj razgradnje od 350 do 425 °C. Prvi stupanj razgradnje odgovara uklanjanju neizreagiranog monomera, emulgatora te adsorbirane vode iz filma (Tao, 2006). Dodatak TiO_2 punila neovisno o vrsti kao i o načinu priprave nanosustava, na početku procesa toplinske razgradnje nema znatniji utjecaj na toplinsku stabilnost PAK matrice. Prilikom razgradnje uzorka $\geq$ 50% vidljivo je povećanje temperatura razgradnje dodatkom TiO_2 za sve sustave izuzev PAK+CCR 150 *ex situ*. Pri gotovo svim stupnjevima razgradnje uzorak PAK+CCR 150 *ex situ* ima gotovo istu toplinsku stabilnost kao i čista PAK matrica (slika 4b). Ako se usporede sustavi s dvije vrste punila CCR 150 i CCR 200 Mn vidljivo je da uzorci s punilom CCR 200 Mn pokazuju bolju toplinsku stabilnost. Nakon izlaganja UV zračenju, toplinska razgradnja PAK matrice počinje na nižim temperaturama u odnosu na temperature prije provedbe tretmana zračenja. Čista PAK matrica nakon UV zračenja ima T_{95} (temperaturu pri kojoj uzorak izgubi 5 % mase) nižu za 17 °C. PAK+TiO_2 sustavi s punilom CCR 200 Mn imaju početne temperature razgradnje nešto više u odnosu na PAK matricu, a u kasnijim stupnjevima razgradnje ponašaju se gotovo identično kao i PAK matrica. Sustavi s punilom CCR 150 koje je površinski obrađeno s Fe_2O_3 i Al_2O_3, nakon izlaganja UV

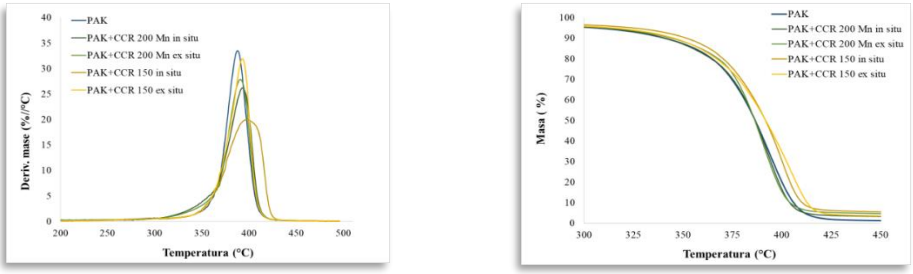
zračenju pokazuju veću toplinsku stabilnost od čiste PAK matrice tijekom cijelog razgradnog procesa (slika 5). U prethodnim istraživanjima (Sabzi, 2008), ispitivana su toplinska svojstva sustava kod kojih je površina TiO_2 punila modificirana s različitim vrstama silana i uspoređivana su sa sustavima s nemodificiranim TiO_2 punilom. Rezultati ispitivanja pokazali su da modifikacija punila i vrsta modifikatora utječu na toplinsku stabilnost u smislu poboljšanja iste. Do povećanja toplinske stabilnost polimerne matrice dodatkom nanopunila može doći zbog sniženja propusnosti plinova (kisika) što uzrokuje smanjenje mogućnosti oksidacije ili anorganska faza može djelovati kao terminator radikala, što sprječava raspad polimernih lanaca (Ajayan, 2003). Značajno povećanje temperatura na početku toplinske razgradnje za 19 °C u odnosu na čistu PAK matricu vidljivo je kod sustava PAK+CCR 150 *in situ*. Ako se usporede temperature razgradnje za sustav PAK+TiO_2 CCR 150 pripravljen *in situ* metodom prije i nakon zračenja, vidljivo je da su temperature razgradnje vrlo slične neovisno o provedenom tretmanu zračenja te se stoga može zaključiti da kod sustava PAK+CCR 150 *in situ* zračenje nema utjecaja na toplinsku stabilnost.



a) **b)**

Slika 4. a) DTG i b) TG krivulje PAK+TiO_2 prije izlaganja UV zračenju

Fig. 4. a) DTG and b) TG curves of PAK+TiO_2 before UV radiation



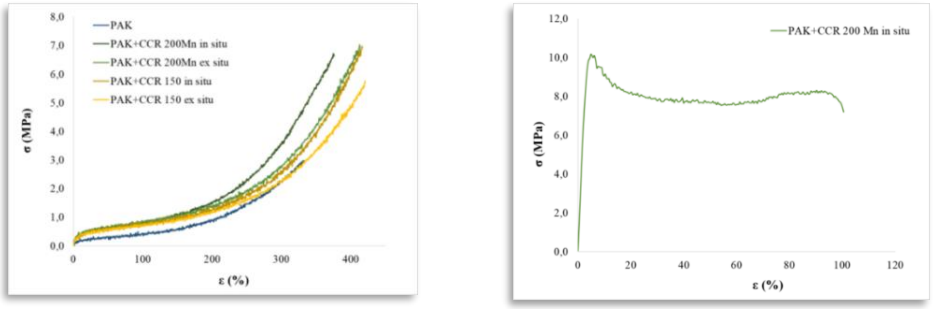
a) **b)**

Slika 5. a) DTG i b) TG krivulje PAK+TiO_2 nakon izlaganja UV zračenju

Fig. 5. a) DTG and b) TG curves PAK+TiO_2 after UV radiation

Mehanička svojstva PAK+TiO_2 filmova

Obzirom na izgled krivulja PAK+TiO_2 filmovi prije UV zračenja imaju svojstva elastomera. Odlikuje ih mali modul elastičnosti, veliko prekidno istezanje i velika prekidna čvrstoća. Dodatkom TiO_2 punila dolazi do povećanja prekidne čvrstoće u odnosu na čistu poliakrilatnu matricu (slika 6a). Prekidna čvrstoća za čisti PAK je 3,84 MPa dok za sustave s punilom ta vrijednost varira od 4,86 MPa do 7 MPa. Usporedbom vrijednosti za sustave s različitom vrstom TiO_2 punila vidljivo je da je prekidna čvrstoća veća kod uzoraka s TiO_2 CCR 200 Mn. Prekidno istezanje (ε_B) čistog PAK iznosi oko 350 % te ta vrijednost raste dodatkom obje vrste TiO_2 punila. Punilo često povećava prekidnu čvrstoću polimerne matrice, ali i snižava prekidno istezanje (Kurajica, 2017) i (Miklečić, 2015). Međutim, PAK+TiO_2 sustavi uz povećanje prekidne čvrstoće imaju i visoke vrijednosti prekidnog istezanja. To je vjerojatno posljedica velike fleksibilnosti poliakrilatne matrice i male količine (0,7 %) punila. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se dodatkom TiO_2 poboljšavaju mehanička svojstva PAK matrice.
Poznato je da se *in situ* načinom priprave nanokompozita postiže najbolja dispergiranost punila unutar polimerne matrice te se stoga navedenim načinom priprave mogu očekivati bolja mehanička svojstva u odnosu na sustave pripravljene *ex situ* načinom. Međutim, rezultati ovog istraživanja pokazali su različiti učinak načina priprave nanokompozita na mehanička svojstva PAK matrice ovisno o vrsti TiO_2 punila.



a) **b)**

Slika 6. Ovisnost naprezanje/istezanje PAK+TiO_2 filmova
a) prije i b) nakon izlaganja UV zračenju

Fig. 6. Stress/strain curves of PAK+TiO_2 samples
a) before and b) after UV radiation

Nakon izlaganja filmova UV zračenju rastezno ispitivanje uspješno je provedeno samo za uzorak PAK+CCR 200 Mn *in situ.* Svi ostali filmovi su već na dodir pucali što je posljedica porasta krtosti filmova te stoga nije bilo moguće mjeriti mehanička svojstva. U usporedbi s uzorcima prije UV zračenja (*slika 6a*) vidljivo je da se nakon UV zračenja (*slika 6b)* promijenio izgled krivulje što znači da PAK+TiO_2 film više nema svojstva elastomera nego tvrdih i žilavih materijala. Ima izraženu granicu razvlačenja nakon koje slijedi veliko istezanje pri gotovo konstantnom naprezanju. Nakon UV zračenja došlo je do povećanja vrijednosti prekidne čvrstoće u odnosu na vrijednost prije UV zračenja te smanjenja vrijednosti prekidnog istezanja s oko 400 % na 100 %.
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da UV zračenje kao i način priprave (*in situ* i *ex situ*) PAK+TiO_2 sustava te vrsta TiO_2 punila značajno utječu na mehanička svojstva materijala. Dobiveni rezultati su u skladu s činjenicom da UV zračenje uzrokuje degradaciju materijala, a posljedica je promjena mehaničkih svojstava materijala (Marston, 2019).

Zaključci

PAK+TiO_2 sustavi pripravljeni *in situ* emulzijskom polimerizacijom imaju sitniju morfologiju i bolju raspodijeljenost punila u matrici. Na mikroskopski izgled PAK+TiO_2 filmova UV zračenje nema utjecaja. Prije izlaganja UV zračenju gotovo svi PAK+TiO_2 sustavi imaju staklište slično staklištu čiste poliakrilatne matrice. Nakon izlaganja UV zračenju dolazi do porasta staklišta čiste PAK matrice (za 20 °C) i svih pripravljenih PAK+TiO_2 sustava. Pozitivan učinak dodatka punila kao i načina priprave vidljiv je kod sustava PAK+CCR 150 *in situ* koji nakon UV zračenja pokazuje najmanje povećanje staklišta. Prije UV zračenja svi sustavi s TiO_2 punilom pokazuju bolju toplinsku stabilnost od PAK matrice, a UV zračenje uzrokuje smanjenje toplinske stabilnosti i PAK matrice i PAK+TiO_2 sustava, osim kod sustava PAK+CCR 150 *in situ* na koji UV zračenje nema utjecaj. Dodatkom TiO_2 punila u PAK matricu povećava se prekidna čvrstoća i prekidno istezanje. UV zračenje ima značajan utjecaj na mehanička svojstva materijala; nakon UV zračenja zadovoljavajuća mehanička svojstva ima samo film PAK+CCR 200 Mn *in situ*.

Literatura

Aayan P.M., Schadler L.S., Braun P.V. (2003): Nanocomposite Science and Technology, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim

Aloui F., Ahajji A., Irmouli Y., George B., Charrier B., Merlin A. (2006): Photostabilisation of the „wood-clearcoatings"systems with UV absorbers: correlation with their effect on the glass transition temperature, *Journal of Physics*: Conference Series 40, 118-123.

Doran, D., Cather, B. (2013): Construction Materials, Routledge, New York, Second Edition, pp. 223.

Goncalves Bardi M.A., Brocardo Machado L.D. (2012): Accompanying of arameters of color,gloss and hardness on polymeric films coated with pigmented inks cured by different radiation doses of ultraviolet light, *Radiation Physics and Chemistry* 81, 1332–1335.

González-Irún Rodríguez J., Carreira P., García-Diez A., Hui D., Artiaga R., Liz-Marzán L. M. (2007): Nanofiller effect on the glass transition of a polyurethane, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 87 (1), 45–47.

Jadhav N.R., Gaikwad V.L., Nair K.J., Kadam H.M. (2009): Glass transition temperature: Basics and application in pharmaceutical sector. *Asian J Pharm* 3 82-89.

Kashfipour M.A., Mehra N., Zhu J. (2018): A review on the role of interface in mechanical, thermal, and electrical properties of polymer composites, *Advanced Composites and Hybrid Materials*, 1 (3), 415–439.

Kurajica S., Lučić Blagojević S. (2017): Uvod u nanotehnologiju, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Zagreb.

Marston N.J., Effects of UV Radiation on Building Materials, BRANZ Ltd, https://www.niwa.co.nz/sites/niwa.co.nz/files/import/attachments/Marston.pdf (pristupljeno dana 25. ožujka 2019.)

Miklečić J. (2013): Postojanost poliakrilatnih nanopremaza na toplinski modificiranom drvu, Doktorski rad, Šumarski fakultet, Zagreb.

Miklečić J., Lučić Blagojević S., Petrič M., Jirouš-Rajković V. (2015): Influence of TiO_2 and ZnO nanoparticles on properties of waterborne polyacrylate coating exposed to outdoor conditions, *Progress in Organic Coatings* 89, 67-74,

Sabzi, M., Mirabedini, S. M., Atai, M. (2008): Surface modification of TiO_2 nano particles with silane coupling agent and investigation of its effect on the properties of polyurethane composite coating, *Progress In Organic Chemistry*., 65, 222-228.

Sung L-P., Vicini S., Ho D.L., Hedhli L., Olmstead C., Wood K.A. (2004.): Effect of microstructure of fluotinated acrylic coatings on UV degradation testing, *Polymer* 45 (19) 6639-6646.

Tao W., Fei F., Yue-Chuan W. (2006): Structure and thermal properties of titanium dioxide-polyacrylate nanocomposites, *Polymer Bulletin*, 56, 413-426.

Van Herk A. M. (2013): Chemistry and Technology of Emulsion Polymerisation, John Wiley & Sons, West Sussex

Zhang W., Zheng J., Huang G., Li G. (2009): Effect of Vinyl Acetate on Aging Mechanism of Polyacrylate Under UV Light, *Journal of Applied Polymer Science*, 114, 1717–1724.

Professional paper

Influence of the TiO_2 filler addition and UV radiation on the properties of polyacrylate

Zrinka Buhin Šturlić[1*], Sanja Lučić Blagojević[1], Mirela Leskovac[1], Josip Miklečić[2]

[1] *University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Croatia*
[2] *University of Zagreb, Faculty of Forestry, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Croatia*
[*]*Corresponding author: zbuhin@fkit.hr*

Summary

Addition of nanofillers can significantly improve mechanical, optical, electrical, magnetic and chemical properties. Polyacrylate (PAK) systems with the addition of nano TiO_2 (0.7 % mass) were prepared by *in situ* emulsion polymerization and by *ex situ* procedure. To prepare PAK+TiO_2 emulsions two types of TiO_2 suspension were used (CCR 200 Mn and CCR 150). The surface of CCR 150 is modified with Al_2O_3 and Fe_2O_3 while CCR 200 Mn has no surface modification. CCR 200 Mn is TiO_2 doped with manganese which is incorporated into the TiO_2 crystal lattice with the aim to reduce the TiO_2 catalytic activity and improve UV absorption. From the emulsions, films were prepared and exposed to UV radiation. Morphology of the PAK+TiO_2 films was investigated with an optical microscope and thermal properties were investigated with differential scanning calorimetry and thermogravimetric analysis before and after UV radiation. Mechanical properties of the films were determined by tensile test. Given results have shown that addition of the filler increased thermal stability and mechanical properties of PAK matrix. Regarding different type of the TiO_2 filler, finer morphology is visible in systems with CCR 150 and for the same system after UV exposure better thermal stability is obtained. Preparation procedure also has significant influence on the morphology. Finer morphology and better dispersability of the filler in the polymer matrix is obtained for systems prepared by the *in situ* procedure. UV radiation caused an increase in T_g of neat PAK matrix and PAK+TiO_2 films which became extremely brittle and therefore it was not possible to prepare samples for tensile test except for the PAK+0.7 % CCR 200 Mn *in situ* film. After UV radiation PAK matrix and the PAK+TiO_2 systems have lower thermal stability.

Keywords: nanocomposite, *in situ* emulsion polymerization, polyacrylate, titanium dioxide, UV radiation

Izvorni znanstveni rad

Stabilnost nanosuspenzija pripremljenih iz niskotemperaturnih eutektičkih otapala

Anamarija Mitar, Tea Barbaro, Jasna Prlić Kardum*

Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Hrvatska
**Dopisni autor: jprlic@fkit.hr*

Sažetak

Sposobnost nanosuspenzija da poboljšaju transportna svojstva u procesima prijenosa topline i tvari mogu doprinijeti energetskoj učinkovitosti različitih industrijskih procesa. Primarni uvjet za ostvarenje spomenutih poboljšanja je priprema stabilnih nanosuspenzija. Poboljšanje transportnih svojstva primjenom nanosuspenzija može se objasniti teorijom Brownovog nasumičnog gibanja dobro raspršenih nanočestica u kapljevini.
Svojstvo niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvent*, DES) da djelotvorno i selektivno izdvajaju različite komponente u postupcima ekstrakcije i izluživanja potaknulo je istraživanje o mogućnosti priprave stabilnih nanosuspenzija u DES-u, kao baznom fluidu. Stabilnost nanosuspenzija podrazumijeva sposobnost nanočestica da ostanu homogeno dispergirane duže vremensko razdoblje odnosno, da ne dođe do aglomeracije sedimentiranih nanočestica.
Ovo istraživanje je obuhvatilo pripremu nanosuspenzija s različitim DES-ovima i Al_2O_3 nanočesticama te nekoliko metoda ispitivanja stabilnosti: sedimentacija primjenom centrifuge, vizualno opažanje, mikroskopiranje, određivanje raspodjele veličina nanočestica te praćenje promjene toplinskih svojstava kroz određeni vremenski period. Dugotrajna stabilnost nanosuspenzije postignuta je raspršivanjem 0,3 vol% Al_2O_3 u niskotemperaturnom eutektičkom otapalu pripravljenim s jabučnom kiselinom, fruktozom i glicerolom s 30 mas% vode.

Ključne riječi: nanosuspenzije, niskotemperaturna eutektička otapala, stabilnost nanosuspenzija.

Uvod

Niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvent*, DES), koja zadovoljavaju načela „zelene" kemije, pokazala su se kao dobra zamjena za štetna

organska otapala u mnogim procesima (Zhang i sur., 2012, Hadj-Kali i sur., 2017, Jeong i sur., 2015, Yin i sur., 2015). U novije vrijeme se zbog povoljnih fizikalno-kemijskih te „zelenih" svojstva poput, nehlapljivosti, biorazgradivosti i netoksičnosti, ova otapala sve više istražuju radi potencijala primjene u industriji. Primjenom prirodnih metabolita kao što su šećeri, alkoholi, organske kiseline itd. moguće je dobiti prirodna niskotemperaturna eutektička otapala (engl. *Natural Deep Eutectic Solvent*, NADES) koja su u potpunosti sigurna za okoliš i ljudski organizam. Spomenuta otapala pokazuju dobru selektivnost za izdvajanje različitih komponenti te su pronašla svoju primjenu u postupcima ekstrakcije. Eventualno poboljšanje djelotvornosti procesa ekstrakcije, može se postići raspršivanjem nanočestica u otapalu i postizanjem stabilnih nanosuspenzija (NS). Dokazano je da se u stabilnim nanosuspenzijama može postići znatno poboljšanje prijenosa topline i tvari.
Od samih početaka ovih istraživanja pa do danas, moguće je uočiti veliko poboljšanje do kojeg dolazi primjenom stabilnih nanosuspenzija (Krishnamurthy, 2006, Fang i sur., 2016). Međutim, uočava se neusuglašenost znanstvenika oko mehanizma djelovanja prisutnih nanočestica u kapljevini kao i nepostojanje jedinstvenih modela koji bi definirali utjecaj brojnih procesnih parametara (vrsta i koncentracija nanočestica, fizikalna svojstva baznih fluida te hidrodinamički uvjeti i uvjeti pripreme nanosuspenzija) (Turanov i sur., 2009, Feng i sur., 2012). Brownovo gibanje spominje se kao jedan od glavnih i odgovornih čimbenika u poboljšanju prijenosa topline. Za adekvatnu primjenu nanosuspenzija, potrebno je dobro raspršiti nanočestice kako bi se postigla stabilnost nanosuspenzija bez sedimentacije kroz duži period.
Svrha ovog rada bila je ispitati stabilnost i optimizirati postupak pripreme nanosuspenzija budući da nestabilnost nanosuspenzije predstavlja glavnu prepreku kod korištenja nanosuspenzija kao medija u mnogim procesima.
U ovom se radu istražila stabilnost nanosuspenzija pripremljenih raspršivanjem nanočestica Al_2O_3 u tri različita DES-a. Stabilnost je određena vizualnom metodom, sedimentacijom primjenom centrifuge, metodom mikroskopiranja te mjerenjem raspodjele veličina nanočestica. Kao bitno svojstvo nanosuspenzija, izmjerena je i toplinska vodljivost.

Materijali i metode

Sintetizirana su tri DES-a: kolin klorid-etilen glikol (Ch-Eg-0), kolin klorid-jabučna kiselina s 30 % masenog udjela vode (Ch-Ma-30) i jabučna kiselina-fruktoza-glicerol s 30 % masenog udjela vode (Ma-Fru-Gly-30). Sinteza se provela na rotacijskom vakuum isparivaču *IKA RV 10 basic* pri temperaturi od 60 °C. Fizikalno-kemijska svojstva navedenih otapala dana su u tablici 1.
Sintetizirani DES-ovi korišteni su kao bazni fluidi za pripremu nanosuspenzija s 0,3% volumnog udjela nanočestica Al_2O_3 (*AEROXIDE Alu C, Evonik*).

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva DES-ova.

Table 1 Physicochemical properties of DESs.

DES	Molarni odnos	ρ, g/cm	η, Pas	κ, mS/cm	n_D	pH	σ, mN/m
Ch-Eg-0	1:2,5	1,122	0,0356	8,64	1,4652	4,14	71,63
Ch-Ma-30	1:2	1,191	0,0059	19,21	1,4376	0,84	79,62
Ma-Fru-Gly-30	1:1:1	1,295	0,0361	0,37	1,4426	0,92	76,55

ρ – gustoća; η – viskoznost; κ – električna vodljivost; n_D – σ – površinska napetost

Za raspršivanje nanočestica u DES-ovima korištena je sonda TT13 uređaja za ultrazvučno homogeniziranje *Bandelin sonoplus HD 3200* snage 200 W s mogućnošću promjene amplitude u rasponu do 100 %. Raspršivanje se provelo za različita vremena 10, 20, 30 ili 60 minuta s amplitudom 20 ili 50% te uz dodatak stabilizatora (Tween 20, TritonX-100 ili SDS, engl. *Sodium dodecyl sulfate*) (Tablica 2.). Nakon postupka raspršivanja provedena su daljnja mjerenja. Ispitana je stabilnosti dobivenih nanosuspenzija sedimentacijom primjenom centrifuge, vizualnom metodom, metodom mikroskopiranja i određivanjem raspodjele veličina čestica te je izmjerena toplinska vodljivost pripremljenih nanosuspenzija.

Tablica 2. Popis oznaka za pripremljene nanosuspenzije.

Table 2 List of label for prepared nanosuspension.

Oznaka	Vrijeme raspršivanja, min
1	10
2	20
3	30
4	60
	Amplituda,%
20%	20
50%	50
	Stabilizatori
S1	*Tween 20*
S2	*TritonX-100*
S3	*SDS*

Za određivanje stabilnosti nanosuspenzija metodom centrifugiranja uzorak je centrifugiran 10 minuta uz 5000 okretaja u minuti na centrifugi *Centric 322A* (*Tehnica*). Za vizualnu metodu određivanja stabilnosti pratila se sedimentacija nanočestica uz fotografiranje uzoraka na dan pripreme nanosuspenzija te kroz 21 dan. Za metodu mikroskopiranja uzorak se promatrao na mikroskopu *Motic BA 200* uz povećanje 400x. Zabilježene su slike nanosuspenzija 1. dan, a 21. dan nakon eksperimenta samo za,

vizualno određene, stabilne uzorke. Određena je i raspodjela veličina nanočestica Al_2O_3 u pojedinom DES-u na uređaju *Zetasizer Nano ZSP*, *Malvern* .
Za mjerenje toplinske vodljivosti baznih fluida i dobivenih nanosuspenzija korišten je uređaj *Transient Hot Bridge* (*THB*) *Thermal Conductivity Meter* sa sondom za kapljevine koja se uronila u pojedini uzorak. Najprije se mjerila toplinska vodljivost čistog DES-a, a zatim nanosuspenzija pripremljenih s DES-om kao baznim fluidom. Osim na dan pripreme nanosuspenzije, mjerenja su ponovljena i nakon 7 dana.

Rezultati i rasprava

Nanosuspenzije su od samog početka svoje primjene pokazale veliki potencijal za daljnji napredak tehnologije i mogućnosti poboljšanja transportnih svojstava u procesima prijenosa tvari i energije te eventualnu primjenu u industriji. Da bi se mogle primijeniti u procesima, potrebno ih je pripremiti na odgovarajući način kako bi bile stabilne tijekom korištenja, a time i učinkovite. Za pripremu nanosuspenzija korištena su tri sintetizirana DES-a, a za ispitivanje njihove stabilnosti primijenjene su četiri metode ispitivanja stabilnosti: sedimentacija primjenom centrifuge, vizualna metoda, metoda mikroskopiranja, te mjerenje raspodjele veličina nanočestica. Osim toga, ispitana je i toplinska vodljivost čistih eutektičkih otapala te pripremljenih nanosuspenzija.
Nakon sinteze DES-ova, a zatim i raspršivanja nanočestica ultrazvučnim homogenizatorom dobivene su nanosuspenzije čije su fizikalne karakteristike definirane u tablici 3. Iz rezultata je vidljivo da dodatak nanočestica neznatno mijenja gustoću, pH vrijednosti i električnu vodljivost nanosuspenzija u odnosu na čiste DES-ove. Pri tome, vrijednosti gustoće i pH blago rastu za sva otapala, a električna vodljivost se smanjuje, osim za Ch-Eg-0. S druge strane, razlika u viskoznosti i površinskoj napetosti je značajnija, pa tako nanosuspenzije imaju veću viskoznost i manju površinsku napetost od DES-ova od kojih su pripremljene upravo zbog dodatka nanočestica.

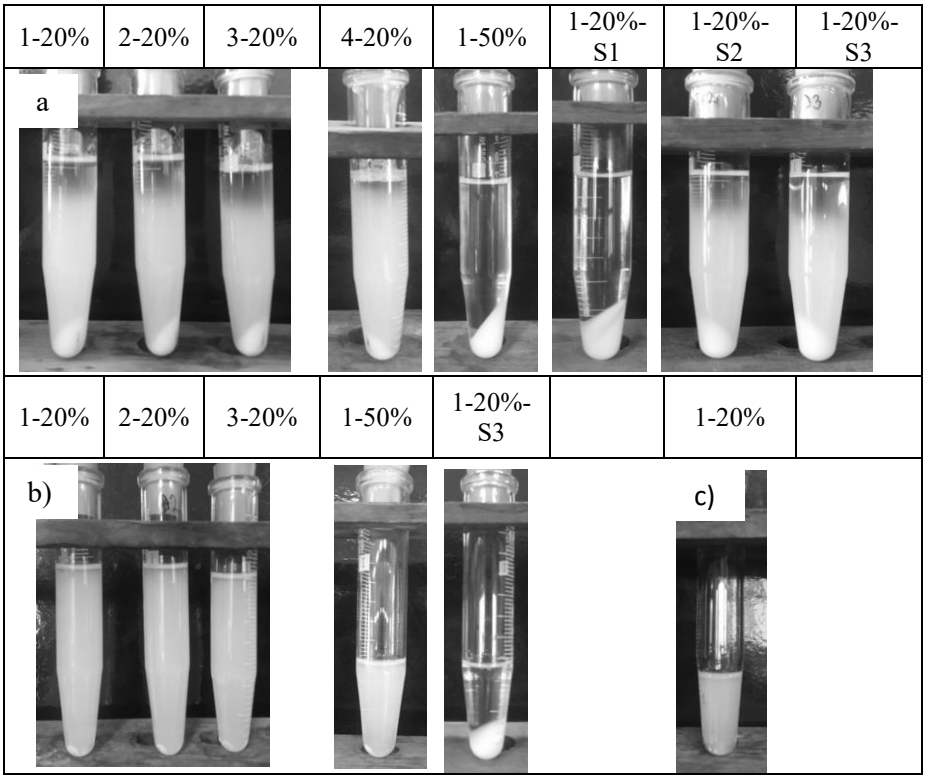
Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih nanosuspenzija.

Table 3 Physicochemical properties of prepared nanosuspensions.

NS	Molarni odnos	ρ, g/cm^3	η, Pas	κ, mS/cm	pH	σ, m/Nm
Ch-Eg-0+Al_2O_3	1:2,5	1,125	0,0483	8,73	4,16	70,55
Ch-Ma-30+Al_2O_3	1:2	1,195	0,0063	19,08	0,91	79,14
Ma-Fru-Gly-30+Al_2O_3	1:1:1	1,299	0,0424	0,32	0,97	70,02

Stabilnost pripremljenih nanosuspenzija ispitana je sa četiri metode. Praćenje sedimentacije uz centrifugiranje bila je prva metoda određivanja stabilnosti suspenzija. Ovom metodom određen je utjecaj centrifugiranja na sedimentaciju, budući da u normalnoj industrijskoj praksi kapljevine često postižu velike brzine protjecanja i pri tome dolazi do nastanka velikog smičnog naprezanja. Odabir DES-a utječe na stabilnost

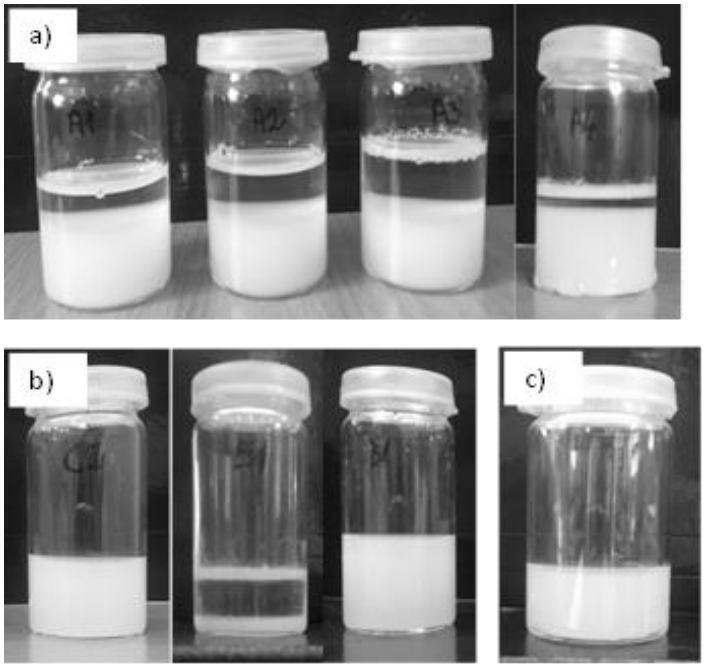
dobivene nanosuspenzije, pa se rezultati dobiveni centrifugiranjem znatno razlikuju za različite DES-ove. Tako je u pripremljenim nanosuspenzijama u Ch-Eg-0 (slika 1. a)) nakon centrifugiranja došlo do stvaranja taloga nanočestica i bistrenja suspenzije pri vrhu bez obzira na vrijeme djelovanja ultrazvuka (UZV) pri pripremi suspenzija. Može se zaključiti da vrijeme raspršivanja ne utječe na poboljšanje stabilnosti nanosuspenzija. Stoga su se ostali uzorci, pripremljeni s DES-om Ch-Eg-0, raspršivali samo 10 minuta. Nadalje, ispitao se utjecaj promjene amplitude na uzorak Ch-Eg-0-1-50% koji je pokazao da povećanje amplitude negativno utječe na stabilnost suspenzija te do sedimentacije nanočestica dolazi brže. Razlog ovog, neočekivanog rezultata, može biti pregrijavanje DES-a što može negativno utjecati na raspršivanje nanočestica. Niti dodatak stabilizatora u uzorke Ch-Eg-0-1-20%-S1, Ch-Eg-0-1-20%-S2 i Ch-Eg-0-1-20%-S3 nije uzrokovalo bolju stabilnost nanosuspenzija.



Slika 1. Ispitivanje stabilnosti metodom centrifugiranja nanosuspenzija pripremljenih s DES-ovima a) Ch-Eg-0, b) Ch-Ma-30 i c) Ma-Fru-Gly-30

Fig. 1. Stability test with centrifugation method of nanosuspensions prepared with DESs a) Ch-Eg-0, b) Ch-Ma-30 i c) Ma-Fru-Gly-30

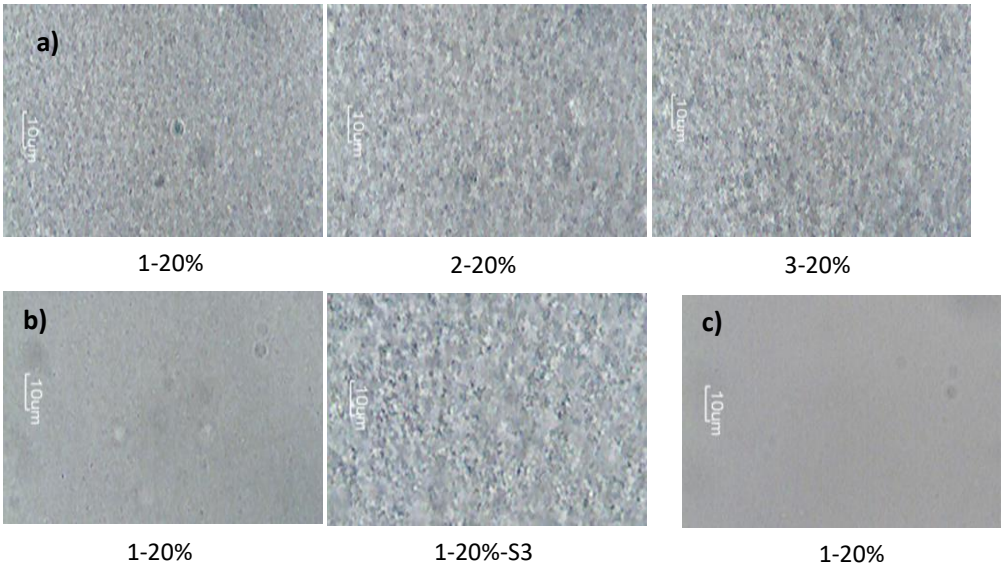
Nanosuspenzije pripremljene sa Ch-Ma-30 (slika 1. b)) su nakon centrifugiranja uspoređene s prethodno dobivenim uzorcima (Ch-Eg-0, slika 1. a). Može se uočiti da su ove nanosuspenzije stabilnije, jer je nastao manji talog nakon centrifugiranja, kao i manja zona bistrenja. Dulje vrijeme raspršivanja, ali i povećana amplituda UZV valova (uzorak Ch-Ma-30-1-50%) nisu pospješili stabilnost nanosuspenzija, jer je vidljivo da je također došlo do sedimentiranja. Dodatak stabilizatora SDS (Ch-Ma-30-1-20%-S3) negativno je utjecao na stabilnost zbog prisutnosti vode u DES-u koja je dovela do pjenjenja nanosuspenzije.
Metoda centrifugiranja nanosuspenzija pokazala je da je uzorak pripremljen s DES-om Ma-Fru-Gly-30 najstabilniji, budući da nije došlo do sedimentacije nanočestica nakon centrifugiranja (slika 1. c). Veća stabilnost nanosuspenzija pripremljnih s DES-ovima Ch-Ma-30 i Ma-Fru-Gly-30 može se objasniti jačim vodikovim vezama između DES-a i nanočestica zbog prisutnosti vode u DES-ovima (30 mas% vode), odnosno većeg broja hidroksilnih skupina koje doprinose vodikovoj vezi (Fang i sur., 2016).



Slika 2. Vizualna metoda ispitivanja stabilnosti nanosuspenzija pripremljenih s DES-ovima nakon 7 dana a) Ch-Eg-0, b) Ch-Ma-30 i c) Ma-Fru-Gly-30.

Fig. 2. Visual method for stability of nanosuspensions prepared with DESs a) Ch-Eg-0, b) Ch-Ma-30 i c) Ma-Fru-Gly-30.

Druga metoda za ispitivanje stabilnosti nanosuspenzija bila je vizualna metoda gdje se pratila pojava bistre zone. Kod svih uzoraka pripremljenih u DES-u Ch-Eg-0 došlo je do potpune sedimentacije nanočestica 7 dana nakon pripreme nanosuspenzija (slika 2.) gdje je granica između bistre i kompresijske zone potpuno uočljiva. Time je i ovom metodom, kao i prethodnom, potvrđena nestabilnost nanosuspenzija pripremljenih sa Ch-Eg-0. Kod nanosuspenzije pripremljena iz DES-a Ch-Ma-30 (slika 4. a) nije došlo do bistrenja uzoraka ni 21 dan nakon raspršivanja nanočestica. Jedina promjena odnosno, potpuna sedimentacija 7 dana nakon eksperimenta dogodila se za uzorak Ch-Ma-30-1-20%-S3. Razlog je isti kao i kod prethodne metode odnosno, zbog vode prisutne u DES-u što je dovelo do stvaranja pjene u nanosuspenziji prilikom raspršivanja nanočestica, a time i do destabilizacije suspenzije. Nanosuspenzija pripremljena iz DES-a Ma-Fru-Gly-30-1-20% i ovom se metodom pokazala kao najstabilnija budući da se i nakon 21 dan pokazala jednako stabilna kao i na dan raspršivanja nanočestica (slike 3. c i 4. b).

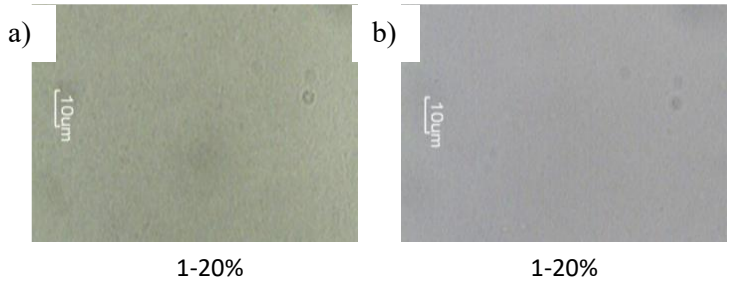


Slika 3. Ispitivanje stabilnosti metodom mikroskopiranja nanosuspenzija pripremljenih s DES-ovima 1. dan a) Ch-Eg-0, b) Ch-Ma-30 i c) Ma-Fru-Gly-30.

Fig. 3. Stability test with microscopic method of nanosuspensions prepared with DESs a) Ch-Eg-0, b) Ch-Ma-30 i c) Ma-Fru-Gly-30.

Pripremljene nanosuspenzije ispitane su i metodom mikroskopiranja uz uvećanje od 400x. Budući da su se uzorci nanosuspenzija mikroskopirali na svjetlosnom mikroskopu, mjerenjem se ne može odrediti točna veličina čestica u nanosuspenziji, ali se može dobiti dojam te kvalitativno procijeniti veličina čestica, odnosno uočiti

nastanak aglomerata za pojedini uzorak nanosuspenzije. Slika 3. a) prikazuje disperziju uzoraka pripremljenih s DES-om Ch-Eg-0 gdje se može primijetiti da se ne radi o fino raspršenim česticama nano veličina već o nešto većim česticama i aglomeratima što će se kasnije i potvrditi određivanjem raspodjele veličina čestica za svaku nanosuspenziju pripremljenu iz ovog DES-a. Na slici 3 b) prikazani su rezultati dobiveni mikroskopiranjem raspršenih nanočestica u Ch-Ma-30 otapalu, na njima je vidljiva dobra disperzija finih čestica nano veličina. Jedina nestabilna nanosuspenzija pripremljena sa Ch-Ma-30 je uzorak pripremljen sa stabilizatorom SDS (Ch-Ma-30-1-20%-S3), što je potvrđeno i prethodnim metodama gdje se vidi da je došlo do pjenjenja i sedimentacije taloga, uslijed nastanka aglomerata nanočestica. Općenito, može se zaključiti da do poboljšanja stabilnosti nanosuspenzija dodatkom sufraktanata nije postignuto, jer nije došlo do očekivane steričke stabilizacije koja je rezultat pravilne pripreme nanosuspenzija i površinski aktivnih tvari.

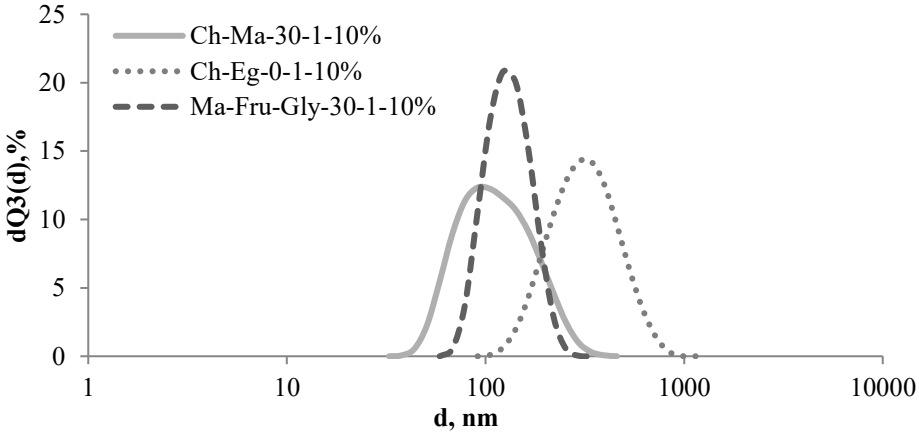


Slika 4. Ispitivanje stabilnosti metodom mikroskopiranja stabilnih nanosuspenzija pripremljenih s DES-ovima nakon 21 dan a) Ch-Ma-30 i b) Ma-Fru-Gly-30.

Fig. 4. Stability test with microscopic method of nanosuspensions prepared with DESs after 7 days a) Ch-Ma-30 i b) Ma-Fru-Gly-30.

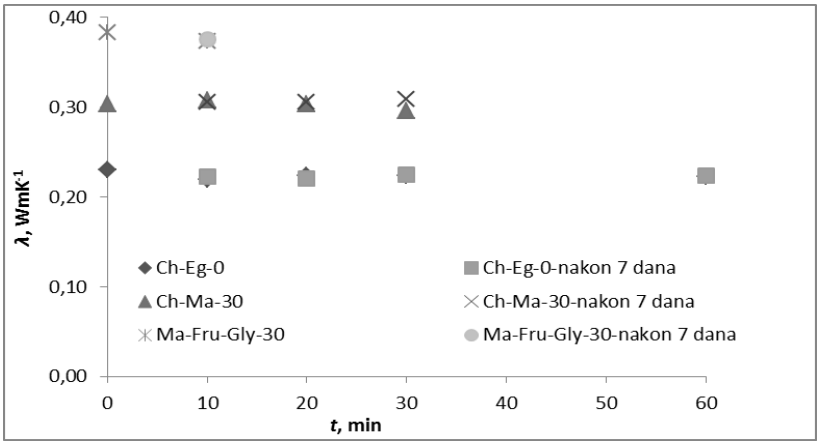
Rezultati mikroskopiranja 21 dan nakon pripremanja nanosuspenzije Ch-Ma-30-1-20% ne pokazuju promjene u stabilnosti (Slika 4. a)). Osim uzoraka pripremljenih sa Ch-Ma-30, uzorci pripremljeni s Ma-Fru-Gly-30 DES-om ispitani ovom metodom pokazuju stabilnost na dan pripreme nanosuspenzije (Slika 3. c)) kao i 21 dan nakon pripreme (Slika 4. b)) te se prema ovoj metodi stabilne nanosuspenzije mogu smatrati one pripremljene u DES-u Ch-Ma-30 bez dodatka stabilizatora te u DES-u Ma-Fru-Gly-30. Raspodjela veličina nanočestica u nanosuspenzijama pripremljenih iz sva tri DES-a ispitana je kako bi se utvrdilo jesu li nanočestice u potpunosti dispergirane u baznim fluidima (Slika 5.). Rezultati su pokazali kako se u nijednom DES-u nisu nalazile čestice isključivo nano veličina (< 100 nm) što se posebno odnosi na DES Ch-Eg-0 u kojem je udio čestica u nano području gotovo zanemariv, pa se pojave poput potpune sedimentacije raspršenih čestica u kratkom vremenskom periodu mogu

objasniti činjenicom da se u njemu nisu nalazile čestice nano veličina već su prisutni aglomerati čestica. S druge strane, nanosuspenzije pripremljene iz Ch-Ma-30 i Ma-Fru-Gly-30 DES-ova sadržavale su veće udjele nanočestica i pokazale se stabilnijima. DES Ch-Ma-30 je imao najveći udio čestica veličine 91,8 nm što je na samom rubu raspona nano veličina, dok je raspodjela čestica nanosuspenzije pripremljene iz Ma-Fru-Gly-30 dala najužu raspodjelu u rasponu veličina 70-130 nm te se zbog toga pokazala kao najstabilnija.



Slika 5. Raspodjela veličina nanočestica Al_2O_3 u nanosuspenzijama.

Fig. 5. Particles size distribution of nanoparticles Al_2O_3 in nanosuspensions.



Slika 6. Utjecaj vremena raspršivanja na koeficijent toplinske vodljivosti nanosuspenzija.

Fig. 6. Influence of dispersion time on thermal conductivity of nanosuspensions.

Kao bitno svojstvo nanosuspenzija mjerila se promjena koeficijenta toplinske vodljivosti, λ, odnosno, ispitivao se da li je dodatak nanočestica Al_2O_3 poboljšalo toplinske karakteristike korištenih DES-ova kako se očekivalo prema teoriji (Saidur i sur., 2011). Za očekivati je bilo kako će toplinska vodljivost čistih DES-ova biti manja od pripremljenih nanosuspenzija. Međutim, rezultati mjerenja toplinske vodljivosti (slika 6.) prikazuju suprotan rezultat. Uzorci pripremljeni Ch-Eg-0 i Ma-Fru-Gly-30 DES-ovima su imali manju toplinsku vodljivost što se nije očekivalo pogotovo za Ma-Fru-Gly-30 otapalo koje se metodama za određivanje stabilnosti nanosuspenzija pokazalo kao najpovoljnijim otapalom za dobivanje stabilnih nanosupenzija. Brojna istraživanja pokazala su da se dodatkom i raspršivanjem nanočestica u konvencionalnim medijima za hlađenje postiže znatno povećanje koeficijenta toplinske vodljivosti (Krishnamurthy, 2006, Fang i sur., 2016). Ova pojava se objašnjava prisutnim Brownovim gibanjem u stabilnim nanosuspenzijama. Niskotemperaturna eutektična otapala imaju izrazito veliku gustoću i viskoznost te nisku toplinsku vodljivost, što vjerojatno utječe na toplinsku vodljivost pripremljenih nanosuspenzija. S druge strane, niti jedan uzorak nije pokazao znatne promjene toplinske vodljivosti 7 dana nakon mjerenja.

Zaključak

Priprema nanosuspenzija i održavanje njihove stabilnosti važni su koraci za dobivanje medija koji se može kao takav koristiti u procesima. Važno je koje se otapalo kao bazni fluid koristi u pripremi nanosuspenzija budući da su rezultati pokazali da je ključno za stabilnost nanosuspenzija upravo odabir odgovarajućeg DES-a za pripremu nanosuspenzija. Prema metodama određivanja stabilnosti, nanosuspenzije pripremljene u DES-u Ma-Fru-Gly-30 su najstabilnije, a u Ch-Eg-0 najmanje stabilne. Nanosuspenzije dobivene raspršivanjem u DES-u Ch-Ma-30 su također pokazale stabilnost, ali sve dok se na njih ne djeluje jakim silama poput centrifugalnih. Može se zaključiti kako vrijeme raspršivanja i povećanje amplitude ne utječu na stabilnost nanosuspenzija. Osim toga, dodatak stabilizatora u bazne fluide negativno utječe na poboljšanje stabilnosti nanosuspenzija. Očekivano povećanje toplinske vodljivosti nanosuspenzija nije se postiglo bez obzira na stabilnost nanosuspenzija. Suspenzija pripremljena u Ma-Fru-Gly-30 stabilna je kroz najduže vremensko razdoblje.

Literatura

Fang, Y. K., Osama , M., Rashmi , W., Shahbaz , K., Khalid, M., Mjalli, F. S., Farid, M. M. (2016): Synthesis and thermo-physical properties of deep eutectic solvent-based graphene nanofluids, *Nanotech.* 27, 1-10.

Feng, X., Johnson, D.W. (2012): Mass transfer in SiO_2 nanofluids: a case against purported nanoparticle convection effects, *Int. J. Heat Mass Transfer* 55, 3447-3453.

Hadj-Kali, M. K., Salleh, Z., Ali E., Khan, R., Hashim, M. A. (2017): Separation of aromatic and aliphatic hydrocarbons using deep eutectic solvents: A critical review, *Fluid Phase Equilib.* 448, 152-167.

Jeong, K. M., Zhao, J., Jin, Y. Heo, S. R., Han, S. Y., Yoo, D. E., Lee, J. (2015): Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media, *Arch. Pharmacal. Res.* 38, 2143-2152.

Krishnamurthy, S., Bhattacharya, P., Phelan, P. E., Prasher, R. S., (2006): Enhanced mass transport in nanofluids, *Nano Lett.* 6, 419-423.

Saidur, R., Leong, K.Y., Mohammad, H.A. (2011): A review on applications and challenges of nanofluids, *Renew. Sust. Energ. Rev.* 15, 1646-1668.

Turanov, A. N., Tolmachev, Y.V. (2009): Heat- and mass-transport in aqueous silica nanofluids, *Heat. Mass. Transfer.* 45, 1583-1588.

Yin, J., Wang, J., Li, Z., Li, D., Yang, G., Cui, Y., Wang, A., Li, C. (2015): Deep desulfurization of fuels based on an oxidation/extraction process with acidic deep eutectic solvents, *Green Chem.* 17, 4552-4559.

Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., Jerome F. (2012): Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.* 41, 7108-7146.

Original research paper

Stability of nanosuspensions prepared with deep eutectic solvents

Anamarija Mitar, Tea Barbaro, Jasna Prlić Kardum*

University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Croatia
**Correspoding author: jprlic@fkit.hr*

Summary

The ability of nanosuspensions to improve heat and mass transfer can contribute to the efficiency of different industrial processes. Preparation of a stable suspension is the primary requirement for the improvement. The improvement of transport properties in heat and mass transfer can be explained by the theory of Brownian motion of well-suspended nanoparticles in a base liquid.
The characteristic of deep eutectic solvents (DES) to selectively extract different compounds in liquid–liquid or solid–liquid systems, initiate the research for preparation of stable nanosuspensions in DES as a base fluid.
The stability of the nanosuspension depends on the suspension's ability to remain homogeneous for some time and to avoid agglomeration and consequent sedimentation of nanoparticles.
The purpose of this study is to research the stability of nanosuspensions prepared by dispersing Al_2O_3 nanoparticles in different deep eutectic solvents. The stability has been evaluated using several methods like sedimentation caused by centrifuge, visual and microscope observation, determination of nanoparticle size distribution, and monitoring of thermal conductivities over a certain period. Good stability over a longer period was achieved by dispersing 0.3 vol% of Al_2O_3 in deep eutectic solvent which was prepared from malic acid, fructose and glycerol and with the addition of 30 w/w % of water.

Keywords: deep eutectic solvents, nanosuspensions, stability of nanosuspension

Sekcija: Kemijsko i biokemijsko inženjerstvo
Session: Chemical and Biochemical Engineering

Original research paper

Taguchi optimization of hidrodinamic conditions for copper exchange on NaX

Anita Bašić*, Sandra Svilović, Renato Stipišić, Nenad Kuzmanić

Faculty of Chemistry and Technology, Department of Chemical Engineering, Ruđera Boškovića 35, Split, Croatia
**Corresponding author: abasic@ktf-split.hr*

Summary

In heterogeneous solid-liquid systems mixing needs to ensure complete solid suspension and optimal hydrodynamic conditions regarding product properties and power consumption. In order to find optimal hydrodynamic conditions for copper exchange on zeolite NaX under isothermal conditions (303 K) Taguchi L8 ($4^1 2^3$) method was used. Experiments were carried out in a glass reactor, V = 1.3 dm^3. Suspension height, H = 0.12 m was equal to reactor diameter, d_T. Mixing was performed using pitched blade turbine with four blades (D = 0.05 m). Size of zeolite particles used was in the range from 0.063 - 0.071 mm. Solutions containing copper were prepared by dissolving $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ or $CuCl_2 \cdot 2H_2O$. In the first part of this work the impeller speed that ensures the state of complete suspension (N_{JS}) was determined by Zwietering's visual method 1 s at 0.33 impeller off-bottom clearances (C/H) and zeolite mass m = 6.5 g in a reactor with and without baffles. Also, at all examined mixing conditions torque was measured by Lightnin LabMaster LB2 and the power consumption was determined as well. The N_{JS} obtained was used as one of four factors for Taguchi L8 statistical method. Along with N_{JS}, as factors, presence and absence of baffles in the reactor, blade angle of pitched blade turbine (30° and 70°) and two different solutions containing copper, were used. For experimental results obtained, Signal to Noise ratio (S/N – larger the better) were calculated and used to evaluate optimal experimental conditions. Results of Taguchi analysis showed that the most influential factor is anion (copper solution), then blade angle, impeller speed and presence of baffles as last. At optimal conditions kinetic experiment was performed and data obtained were tested with two kinetic models: Morris-Weber (diffusion based model) and Ritchie (reaction based model).

Keywords: Taguchi optimization, pitch blade turbine, kinetic, ion exchange.

Introduction

Contamination by heavy metals is considered as one of the most harmful ways of pollution of the environment because heavy metals do not degrade and cause intoxication when accumulates in living organisms. Thus, it is important to remove heavy metals from all types of wastewater. Conventional treatment methods for heavy metal removal from wastewaters include chemical precipitation, ion-exchange, coagulation, activated carbon adsorption, evaporation, solvent extraction, chemical reduction, flocculation, filtration cementation, complexation electrodialysis and membrane separation processes. Ion-exchange process is a physical separation process in which the ions exchanged are not chemically altered. This process seems to be very effective for the removal of various heavy metals and the ion exchangers can be easily recovered and reused by regeneration operation (Zewail and Yousef; 2015; Gunatilake, 2015). As ion exchangers zeolites are often used. Zeolites are a group of microporous, polyhedron alumosilicates whose primary structure consists of aluminum (AlO4-) and silicon (SiO4) tetrahedral; firstly linked by oxygen atoms in secondary structures and then connect in tertiary structure. It may be represented by the general formula: $MaMb0,5[(Al_2O_3)x(SiO_2)y(H_2O)z]$, where Ma and Mb are elements of the first and second groups of periodic element systems, x and y are aluminum and silicon oxide respectively, and z number of water molecules. Besides being used as ion exchangers (sorbents), zeolites are used as catalysts (heterogeneous catalysts with shape/size-selective character) and as molecular sieves (Yilmaz and Müller, 2009).
Ion exchange process may be affected by hydrodynamics of the system, thus finding optimal hydrodynamics conditions are of great importance. In this work the Taguchi method for process optimization was used. Taguchi method is statistical, noise insensitive method which uses precisely designed orthogonal arrays that consist of process variables and their variations to optimize the process fast (Yen and Li, 2015). Taguchi's method accelerates and improves the research process and leads to better quality products with lower costs. With classical experimentation, only one parameter varies, while others are kept constant, and Taguchi's method allows the analysis of number of different variables at the same time, from which using mathematical analysis their impact on the process could be found (Dharmadhikari, 2018). There are three different conditions for calculating (S/N) (DEE-IITB, 2018):
a) smaller the better - used when the minimum response value is to be obtained
b) larger the better - used when the maximum response value is to be obtained.
c) nominal the best - used when the mean response value is to be obtained.
The goal of this work was to design an experiment using the Taguchi method, which will aid in testing the influence of different process variables on the exchange of copper ions on zeolite 13X, and to determinate the optimal values of process variables for this process. Various kinetic models were used to test the experimental data to get better understanding of designed process.

Materials and Methods

Materials

Crushed zeolite NaX (Alfa Aesar) was sieved and particles in the range from 0.063 to 0.071 mm were obtained. Solutions containing copper were prepared by dissolving the appropriate weight of $Cu(NO_3)2{\cdot}3\ H_2O$ (Kemika) and $CuCl_2{\cdot}2\ H_20$ (Kemika) in ultrapure water. The initial concentrations of copper solutions, 5 mmol dm-3 Cu_2+, were checked by Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer.

Experimental procedure

Glass batch reactor was used in all experiments. Baffled reactor was equipped with four baffles placed around the vessel periphery at 90°. Baffles width, Rv, was equal 1/10 dT. Suspension height, H = 0.12 m was equal to reactor diameter, dT. The suspension, 1.3 dm3 of copper solution and 6.5 g of zeolite, was stirred using four blade 30° or 70° - pitched blade turbine. Impeller off-bottom clearance (C/H) was 0.33 and impeller diameter was D = 0.05 m. (Figure 1).

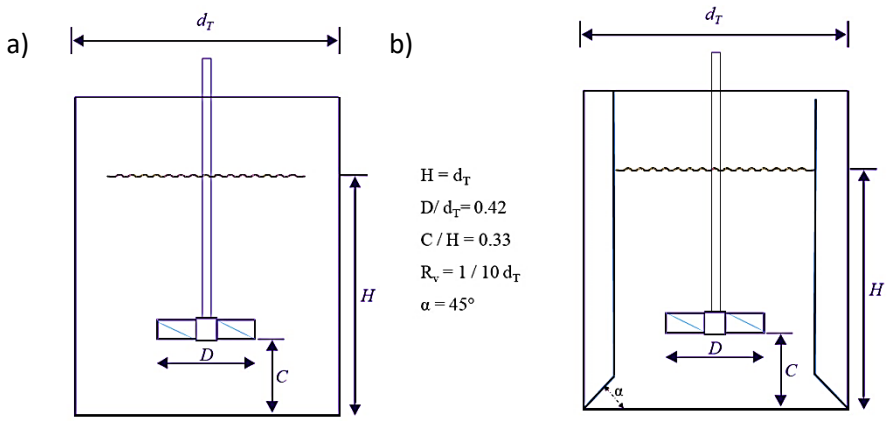


Fig. 1. Design details of a) baffled batch reactor, b) unbaffled batch reactor.

Mixing was performed by Lightnin LabMaster LB2 mixer which allows impeller speed regulation and torque measurement over process time. Just suspended impeller speed, NJS, was determined by visual method applying Zweitering criterion 1 s (Zwietering, 1958). Vessel base was illuminated from all directions by placing a mirror below the reactor bottom while finding the critical impeller speed. Impeller speed was moderately increased up till all particles of zeolite were in motion and no one remained on the reactor bottom for more than 1 second.

The values of NJS determined, in baffled and unbaffled reactor for two different pitched blade turbine impellers, were used as one of four factors for Taguchi L8 statistical method (4123). Along with NJS, as factors, presence and absence of baffles in the reactor, blade angle of pitched blade turbine (30° and 70°) and two different solutions containing copper, were used. The Taguchi method uses orthogonal matrices that allow the mathematical analysis of experimental data. The core of orthogonal method lies in selecting a combination of the input design variables for every experiment (Karna and Sahai, 2012).
The L8 method (4123) used in this work implies 8 experiments and 4 process variables whose impact on the process is observed (Table 1). One of process variables has four, while others have two levels.

Table 1. Experiment plan (Taguchi L8)

Experiment number	A	B	C	D
1.	1	1	1	1
2.	1	2	2	2
3.	2	1	1	2
4.	2	2	2	1
5.	3	1	2	1
6.	3	2	1	2
7.	4	1	2	1
8.	4	2	1	1

Samples of slurry were withdrawn from the reactor after 20 minutes, centrifuged and filtrated. Concentration of the copper in the solution was analyzed by UV/Vis spectrophotometer and the amount of copper retained on the zeolite, q_t, was calculated as:

$$q_t = \frac{(c_0 - c_t)V}{m} \qquad (1)$$

where c_0 is the initial concentration of copper solution (mmol dm^{-3}), c_t is the concentration of copper solution at time t (mmol dm^{-3}), V is the volume of solution (dm^3) and m is the mass of zeolite (g).
For experimental results obtained, in this work S/N_{LB} (Signal to Noise ratio – larger the better) were calculated and used to evaluate optimal experimental conditions.
After finding optimal experimental condition, for tested variables, the kinetic experiment was conducted. For this experiment samples of slurry were withdrawn from the reactor in define process times and also centrifuged, filtrated and analyzed

by UV/Vis spectrophotometer (Perkin Elmer Lambda 25) to determine the concentration of the copper in the solution.

Kinetic models

Overall rate for heterogeneous reactions, like ion exchange, may be controlled by film diffusion, particle diffusion and reaction itself. The possibility that the slowest step is film or particle diffusion was explored by using the Weber–Morris model, and that is a reaction by Ritchie model. Ritchie model, kinetic reaction based model, is expressed as (Martins et al., 2014):

$$q_t = q_e \left[1 - \frac{1}{1+kt}\right] \quad (2)$$

where qt is amount of copper ions exchanged after time t (mmol g^{-1}), qe is maximum amount of copper ions exchanged at equilibrium i.e. equilibrium capacity (mmol g^{-1}), t is time (min) and k is the rate constant of the second order kinetic model (g $mmol^{-1}$ min^{-1}).
Morris-Weber model, diffusion based model, is presented as (Tsibranska and Hristova, 2011):

$$q_t = k_d\sqrt{t} + I \quad (3)$$

where q_t is amount of copper ions exchanged after time t (mmol g^{-1}), k_d is the rate constant (mmol g^{-1} $min^{-1/2}$), t is time (min) and I is the intercept (mmol g^{-1}).

Results and discussion

Before determining the optimum process variable values that makes the maximal exchange of the copper ions on zeolite 13X using Taguchi's method, it was essential to determine NJS. NJS is minimum impeller speed at which all the particles in the vessel are completely suspended. Complete suspension is the state of suspension characterized by the complete motion of all particles. No particle remains on the base of the vessel for more than 1 to 2 s at this state (Paul et.al, 2004).
For both impellers in baffled and unbaffled reactor NJS measurements were repeated ten times and arithmetic value of it was calculated. The torque (τ) was determined to calculate the mixing power (PJS). The results obtained are shown by Figure 2.
From the results shown, it is easy to notice that with the increase of the blades slope the NJS and PJS values are reduced and that these values are lower in unbaffled reactor Considering the power consumption at the tested hydrodynamics conditions

it can be said that best energy-efficient option would be to use the impeller with higher blades slope in unbaffled reactor since at higher values of NJS aeration occurs, interferes with ion exchange and increases power consumption.

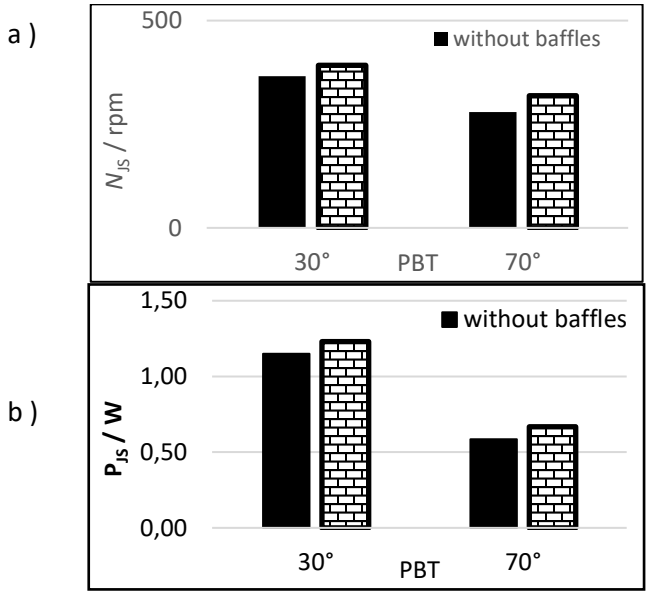


Fig. 2. a) Dependence of N_{JS} on presence of baffles and PBT blade slope
b) Dependence of P_{JS} on presence of baffles and PBT blade slope

The NJS obtained (factor A), presence and absence of baffles in the reactor (factor B), blade slope of pitched blade turbine - 30° and 70° (factor C) and two different solutions containing copper – copper (II) nitrate and copper (II) chloride (factor D) were used as four factors for Taguchi L8 statistical method (4123). For experimental results obtained, Signal to Noise ratio – larger the better S/NLB were calculated (Table 2) and used to evaluate optimal experimental conditions.

Table 2. Taguchi method results

Experiment number	N / rpm	Baffles	PBT	Anion	q_e / mmol g^{-1}	S/N$_{LB}$
1.	279	Yes	30°	NO_3^-	0.9647	-0.3128
2.	279	No	70°	Cl^-	0.8678	-1.2349
3.	319	Yes	30°	Cl^-	0.8707	-0.9086
4.	319	No	70°	NO_3^-	0.9563	-0.3390
5.	366	Yes	70°	NO_3^-	0.9627	-0.3407
6.	366	No	30°	Cl^-	0.8689	-1.1049
7.	392	Yes	70°	Cl^-	0.8684	-1.2322
8.	392	No	30°	NO_3^-	0.9741	-0.2288

The next step in Taguchi method is calculation of average S/N_{LB} ratio of each controllable factor at level, denoted as S/N_{FL}, in order to determine the optimal conditions. The S/N_{FL} ratio for each parameter and one's importance (rank) for this process are shown in Table 3 and in Figure 3.

Table 3. Optimal process conditions

Level	N / o min^{-1}	Baffles	PBT	anion
1.	-0.7739	-0.6986	-0.6388	-0.3204
2.	-0.6538	-0.7419	-0.8017	-1.1201
3.	-0.7228			
4.	-0.7305			
Delta	0.1201	0.0433	0.1629	0.7998
Rank	3	4	2	1

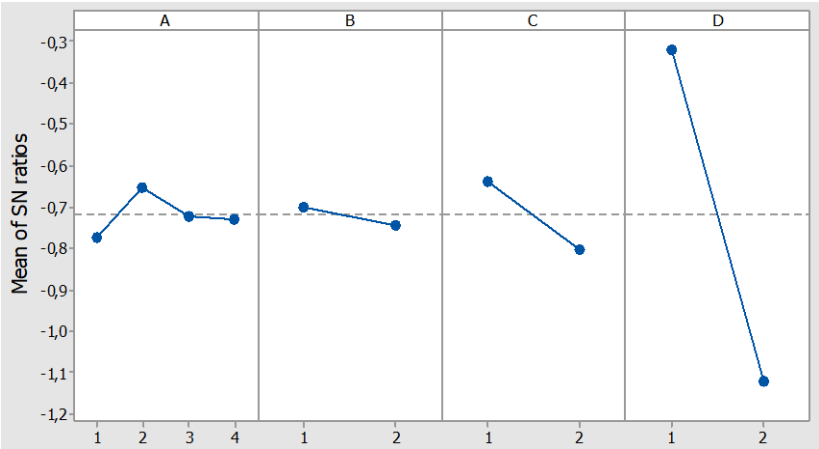


Fig. 3 Optimal process conditions

Based on the results shown in Table 3 and in Figure 3 it may be concluded that the optimum conditions for the experiments are 319 rpm, baffled reactor, 30° pitched blade turbine, and $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ solution. Results of Taguchi analysis showed that the most influential factor is anion (copper solution), then blade slope, impeller speed and presence of baffles as last.

Absence of the baffles in the reactor results in tangential flow pattern - and creates two dimensional, circular flow. The ensured top to bottom motion in baffled reactor probably causes more uniform distribution of particles inside suspension what eventually reflected on the amount of copper exchanged, but as it has been said at higher values of N_{JS} aeration occurs and interferes with ion exchange. An increase of impeller blade angle also causes change at flow pattern of the liquid. When

impeller blade angle is 30° it directs suspension toward reactor bottom. An increase of impeller blade angle to 70° results in flow of the suspension toward reactor wall. Taguchi optimization was implemented and at optimum experimental conditions the kinetics data of the ion exchange was obtained. The results are shown by Figure 4.

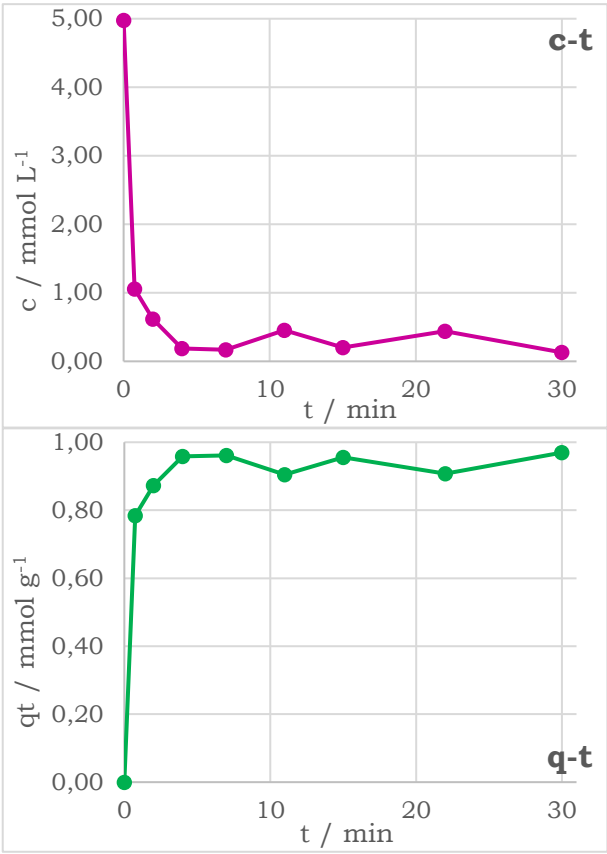


Fig. 4. Experimental kinetic data

It is clear that the differences in amount of copper exchanged has tendency to decrease over time until equilibrium. Obtained kinetic results were fitted to the Ritchie model - kinetic model of the second order and to the Morris-Weber - diffusion based model. The results of kinetic analysis are presented in the Table 4. The reaction rate constant, k, were determinate by the nonlinear regression method and the rate constant kd were determinate by the linear regression method. Error, i.e. the difference between the experimental data and the Ritchie model or Weber-Morris model was determined by calculating root-mean-square error (RMSE) which is expressed as:

$$RMSE = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}\left(y_e - y_t\right)^2} \qquad (4)$$

where n is number of experimental points, y_e – experimental value and y_t predicted value. The obtained RMSE value of 0.028 indicates a good correlation of Ritchie model and experimental data. So, it can be concluded that the investigated process is conducted in the kinetic region.

Table 4. The parameters of Ritchie and Morris-Webber model

Model	Parametar	PBT – 30° Baffles 319 rpm $Cu(NO_3)_2$
Ritchie mode	q_e, mmol g^{-1}	0.944
	k, mmol g^{-1} min^{-1}	6.371
	RMSE	0.028
Weber-Morirsov model	k_d, mmol g^{-1} min$^{-1/2}$	0.109
	I, mmol g^{-1}	0.510
	RMSE	0.252

Conclusions

With the increase of the blades slope the N_{JS} and P_{JS} values reduces. These values are lower in unbaffled reactor than baffled. Considering the power consumption at the tested hydrodynamics conditions it can be concluded that the most energy-efficient option would be to use the impeller with higher blades slope in unbaffled reactor.

The value of the N_{JS}, presence and absence of baffles in the reactor, blade slope of pitched blade turbine (30° and 70°) and two different solutions containing copper were used as four factors for Taguchi L8 statistical method to determinate the optimal hydrodynamics condition of copper ions exchange of on zeolite 13X in small batch reactor. Signal to Noise ratio – larger the better (S/N_{LB}) was calculated. Results of Taguchi analysis showed that the most influential factor is anion (copper solution), then blade slope, impeller speed and presence of baffles as last. The results of the kinetic part of the study show that the reaction for the given experimental conditions

takes place in the kinetic region. It should be noted that obtained results may be optimal regarding to the copper exchange, but not when it comes to the power consumption. Kinetic analysis data tested by Ritchie model showed good agreement with the experimental data and confirmed that studied reaction is the second-order reaction.

References

DEE-IITB: Department of electrical enginering Indian institute of Technology Bombay https://www.ee.iitb.ac.in/~apte/CV_PRA_TAGUCHI_INTRO.htm (21.7.2018)

Dharmadhikari, M ,Advantages and disvantages an advantage of the taguchi method, (www.coursehero.com/file/p19cvisg/Advantages-and-Disadvantages -An-advantage-of-the-Taguchi-method-is-that-it/ 21.7.2018.)

Gunatilake S.K. (2015): Methods of Removing Heavy Metals from Industrial Wastewater, *Journal of Multidisciplinary Engineering Science Studies (JMESS),* 1 (1), 2912 - 1309.

Karna, K.S., Sahai, R. (2012): An Overview on Taguchi Method, *International Journal of Engineering and Mathematical Sciences*, 1, 11 – 18.

Martins, R. J. E., Vilar, V.J.P., Boaventura, R. A. R.(2014): Kinetic Modeling of cadmium and lead removal by aquatic mosses, *Braz. J. Chem. Eng*. 31, 229-242.

Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A., Kresta, S. (2004): Handbook of Industrial Mixing, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 1027-1029.

Tsibranska, I., Hristova, E. (2011): Comparison of different kinetic models for adsorption of heavy metals onto activated carbon from apricot stones, *Bulg. Chem. Commun.* 43, 370-377.

Yen, H. Y., Li, J. Y. (2015): Process optimization for Ni (2) removal from wastewater by calcined oyster shell powders using Taguchi method, *Journal of Environment Management* 161, 344-349.

Yilmaz, B., Müller, U. (2009): Catalytic Applications of Zeolites in Chemical Industry, *Topics in Catalysis*, 52: 888-895.

Zewail, T.M., Yousef, N.S. (2015): Kinetic study of heavy metal ions removal by ion exchange in batch conical air spouted bed, *Alexandria Engineering Journal,* 55 (1), 83 - 90.

Zwietering, T. N. (1958): Suspending of solid particles in liquid by agitatiors, *Chem. Eng. Sci*, 8, 224-253.

Izvorni znanstveni rad

Primjena turbidimetrijske metode pri određivanju širine metastabilne zone boraksa u šaržnom kristalizatoru

Marija Ćosić*, Bruno Čizmić, Antonija Čelan, Nenad Kuzmanić

Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Zavod za kemijsko inženjerstvo, R. Boškovića 35, 21 000 Split, Hrvatska
**Dopisni autor: akrap@ktf-split.hr*

Sažetak

Širina metastabilne zone predstavlja bitan parametar za procjenu dominantnog nukleacijskog mehanizma te za određivanje brzine nukleacije. Granica ove zone predstavlja koncentracijske i temperaturne uvjete pri kojima započinje nukleacija, a koja uzrokuje promjene fizikalnih karakteristika sustava, između ostalih i zamućenje matične otopine. Stoga se često početak nukleacije detektira upravo vizualnom metodom temeljenom na promatranju stanja kristalizirajućeg sustava. Međutim, korištenje ove metode ograničeno je na laboratorijske kristalizatore s prozirnom stijenkom, dok je u industrijskim neprozirnim kristalizatorima potrebno primijeniti neku od tzv. *in situ* metoda među koje se svrstava i turbidimetrijska metoda.
U ovom radu sagledana je mogućnost primjene turbidimetrijske metode za određivanje širine metastabilne zone boraksa u šaržnom kristalizatoru s hlađenjem. Ispitivanja su provedena u kristalizatoru volumena 2,14 dm^3 opremljenom razbijalima virova te radijalnim turbinskim miješalom čija je brzina vrtnje bila konstantna (N = 300 o./min). Kako bi se dobio što potpuniji uvid u o osjetljivost primijenjene metode, ispitivanja su se provodila u otopinama boraksa zasićenim u temperaturnom području od 35 do 17 °C te hlađenim istom linearnom brzinom. Također, početak nukleacije u sustavu određivan je i vizualnom te potenciometrijskom metodom. Rezultati mjerenja ukazali su na vrlo visoku osjetljivost turbidimetrijske metode u odnosu na ostale korištene metode.

Ključne riječi: širina metastabilne zone, turbidimetrija, šaržni kristalizator

Uvod

Kristalizacija je operacija separcije koja se provodi u svrhu izdvajanja čvrste faze u kristalnoj formi iz čvrste, kapljevite ili plinovite smjese. Pokretačka sila ove operacije je prezasićenost otopine pri kojoj kristalizacija započinje nukleacijom, a nastavlja se rastom nukleusa, odnosno kristala (Myerson 2002). U kemijskoj

industriji kristalizacija se primjenjuje za dobivanje brojnih kemikalija i to često u velikim količinama. Kako bi se zadovoljili brojni zahtjevi tržišta, pri provedbi kristalizacije naglasak se stavlja na dobivanje produkta definiranih karakteristika s obzirom na čistoću kristala, njihov oblik, veličinu te raspodjelu veličina. Dobivanje kristala željenih karakteristika moguće je ukoliko se odaberu odgovarajući uvjeti provedbe procesa zbog čega je neophodno prethodno sagledati njihov utjecaj na kinetiku ovog procesa (Mullin, 2001). Pri ispitivanju utjecaja procesnih veličina na kinetiku kristalizacije obično se prvo analizira njihov utjecaj na širinu metastabilne zone. Ova zona predstavlja područje prezasićenosti matične otopine u kojem je spontana nukleacije malo vjerojatna. Širina metastabilne zone je proporcionalna brzini nukleacije ali i mehanizam rasta kristala može također značajno ovisiti o ovoj veličini. Konačno, svojstva produkta kristalizacije kao direktan rezultat nukleacije i rasta kristala mogu se dovesti u odnos sa širinom metastabilne zone (Urlich and Strege, 2002). Pri određivanju širine metastabilne zone u ispitivanom sustavu vrlo je bitno primijeniti onu metoda koja će omogućiti što točnije određivanje početka nukleacije. U laboratorijskoj praksi nukleacija se uglavnom detektira vizualno, no zbog njezine neprimjenjivosti u neprozirnim kristalizatorima koriste se metoda osjetljive na promjene uzrokovane početkom nukleacije. Jedna od često korištenih metoda je turbidimetrijska.
U ovom radu sagledana je mogućnost primjene turbidimetrijske metode za određivanju početka nukleacije dinatrijevog tetraborata dekahidrata (boraksa) u šaržnom kristalizatoru s hlađenjem. Kako bi se sagledala osjetljivost i pouzdanost turbidimetrijske metode početak nukleacije određivan je također vizualnom te potenciometrijskom metodom. Radi što potpunije usporedbe navedenih metoda analizirala se nukleacija nastala uslijed hlađenja matičnih otopina zasićenih pri pet različitih temperatura. Osim širine metastabilne zone u radu su također određeni i analizirani mehanizmi i brzine nukleacije.

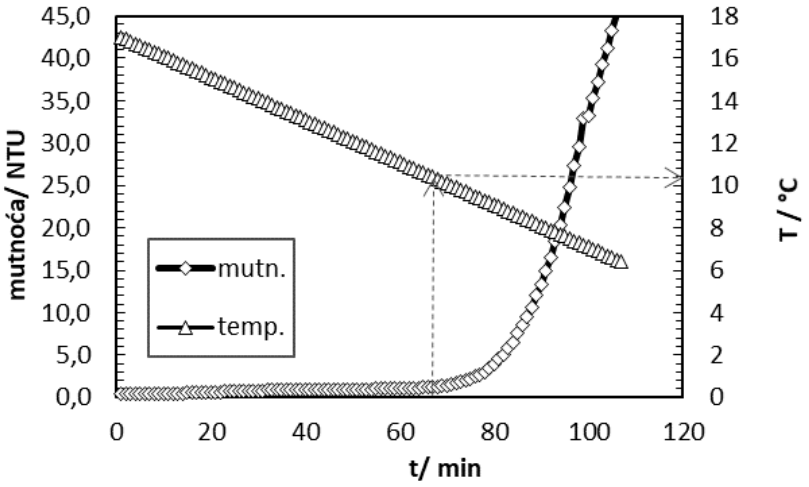
Materijali i metode

Sva ispitivanja u ovom radu provodila su se u šaržnom kristalizatoru s hlađenjem prikazanom u prethodno objavljenom radu (Akrap et al., 2010). Kristalizator izrađen od bezbojnog stakla bio je promjera, d_T, 0,14 m i sadržavao je četiri razbijala virova standardnih dimenzija ($B = d_T/10$). Visina stupca kapljevine, H, bila je jednaka promjeru kristalizatora. Kristalizator je bio uronjen u vodenu kupelj, a linearno hlađenje otopine i kontinuirano mjerenje temperature u kristalizatoru regulirano je programibilnim uređajem tipa *Huber CC3* s točnošću od ± 0.01 °C. Miješanje otopine provodilo se uz uporabu miješalice *Lightnin Labmaster* i turbinskog miješala s četiri ravne lopatice (tzv. *SBT* miješalo) čija je brzina vrtnje pri svim ispitivanjima *N, i*znosila 300 okr. min^{-1}. Aparatura je sadržavala i sustav za mjerenje koncentracije sastavljen od polimerne natrijeve ion-selektivne (Na-ISE) elektrode u kombinaciji s

referentnom Ag/AgCl elektrodom spojenih na milivoltmetar *Metrohm.* Zamućenje otopine praćeno je turbidimetrom tipa *Multi 3630 IDS-WTW* i senzorom *VisoTurb* 900-*P*. Zasićena otopina boraksa hlađena je od temperature zasićenja, konstantnom brzinom od 6 °C/h. Temperature zasićenja matičnih otopina iznosile su 17, 20, 25, 30 i 35 °C. Određivanje temperature nukleacije turbidimetrijskom, potenciometrijskom te vizualnom metodom izvršeno je istodobno, a sva mjerenja ponovljena su najmanje 5 puta.

Određivanje temperature nukleacije turbidimetrijskom metodom

Pri primjeni turbidimetrijske metode temperaturom nukleacije smatrala se ona pri kojoj je uočen nagli porast vrijednosti zamućenja izraženog *NTU* jedinicama. Na Slici 1. grafički su predočene istodobne promjene zamućenja i temperature matične otopine boraksa tijekom procesnog vremena te je označena temperatura nukleacije, odnosno ona pri kojoj je utvrđen nagli porast zamućenja.



Slika. 1. Primjer određivanja temperature nukleacije turbidimetrijskom metodom.

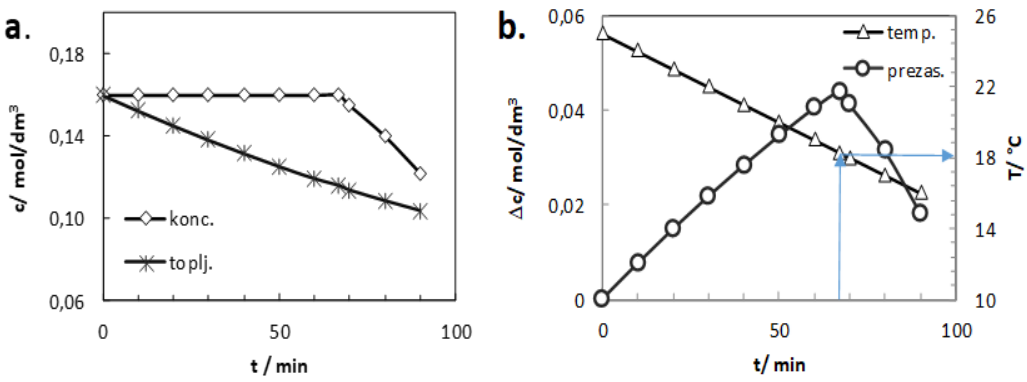
Fig. 1. Example of determination of nucleation temperature by turbidimetric method.

Određivanje temperature nukleacije vizualnom metodom

Određivanje temperature nukleacije vizualnom metodom temeljilo se na promatranju stanja unutar matične otopine od temperature zasićenja, T_s. Temperatura nukleacije, T^*, predstavljala je onu temperaturu pri kojoj su uočeni prvi vidljivi nukleusi.

Određivanje temperature nukleacije potenciometrijskom metodom

Određivanje temperature nukleacije potenciometrijskom metodom temeljilo se na analizi promjene koncentracije matične otopine boraksa određene ovom metodom. Naime, tijekom hlađenja zasićene otopine kontinuirano su praćene vrijednosti potencijala Na-ISE i temperature otopine iz kojih je kasnije određena koncentracija otopine pomoću baždarnih krivulja. Baždarne krivulje predstavljaju ovisnost potencijala elektrode o logaritmu koncentracije Na^+ iona pri konstantnoj temperaturi. Tako je za svaku cjelobrojnu vrijednost temperature u ispitivanom temperaturnom području određena baždarna krivulja. Postupak baždarenja ion selektivne elektrode u svrhu njene primjene u kristalizatoru s hlađenjem detaljno je objašnjen u radu Akrap et al. (2010). Prilikom primjene potenciometrijske metode temperatura nukleacije određena je iz promjene koncentracije matične otopine tijekom vremena (slika 2a.) odnosno iz promjene apsolutne prezasićenosti, Δc (slika 2b). Ova prezasićenost predstavlja razliku između koncentracije matične otopine, c, i koncentracije zasićene otopine, tj. topljivosti, c^* ($\Delta c = c - c^*$). Temperaturom nukleacije smatrala se ona pri kojoj postignuta maksimalna vrijednost prezasićenosti, Δc_{max} (Slika 2b).



Slika 2. a. Promjene koncentracije matične otopine izmjerene potenciometrijskom metodom i topljivosti boraksa tijekom vremena; b. Primjer određivanja temperature nukleacije iz promjene prezasićenosti matične otopine.

Fig. 2. a. Changes of concentrations determined by potenciometric method and simultinious changes of solubility; b. Determination of nucleation temperature from the absolute supersaturaton.

Rezultati i rasprava

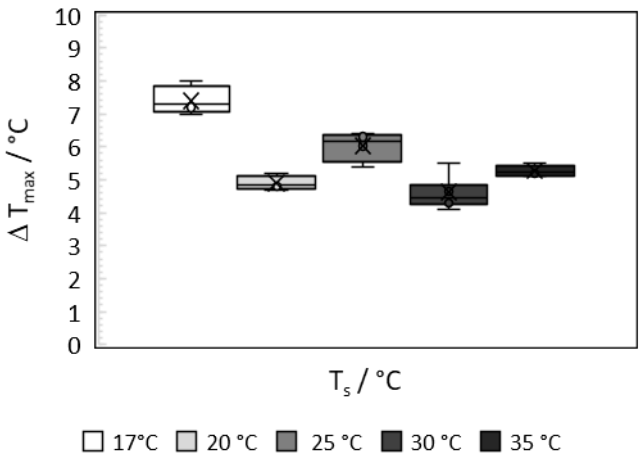
Širina metastabilne zone predstavlja područje prezasićenosti matične otopine između temperature (krivulje) topljivosti i temperature (krivulje) nukleacije. Može se izraziti maksimalno postignutom pothlađenosti otopine ΔT_{max} (Mullin, 2001):

$$\Delta T_{max} = T_s - T^* \quad (1)$$

gdje je T_s temperatura zasićene otopine, dok je T^* temperatura nukleacije.
Širina metastabilne zone može se također izraziti i kao maksimalno postignuta prezasićenost otopine, Δc_{max}:

$$\Delta c_{max} = c_s - c^* \quad (2)$$

gdje je c_s koncentracija zasićene otopine, dok je c^* koncentracija otopine zasićene pri temperaturi nukleacije.

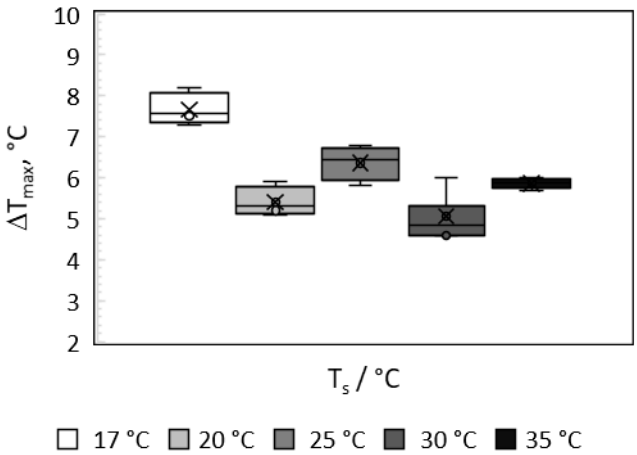


Slika 3. Vizualnom metodom određena ovisnost širine metastabilne zone boraksa, ΔT_{max}, o temperaturi zasićenosti matične otopine.

Fig. 3. Metastable zone width determined by visual method vs. saturation temperatures

Na slici 3 prikazane su širine metastabilnih zona u ovisnosti o temperaturi zasićenja matične otopine određene na temelju rezultata vizualne metode prema jednadžbi (1). Iz prikazanih rezultata uočava se da se širina metastabilne zone povećava sa smanjenjem temperature zasićene otopine. Naime, prilikom hlađenja otopina konstantnom brzinom prezasićenost se više akumulira u otopini zasićenoj na većoj

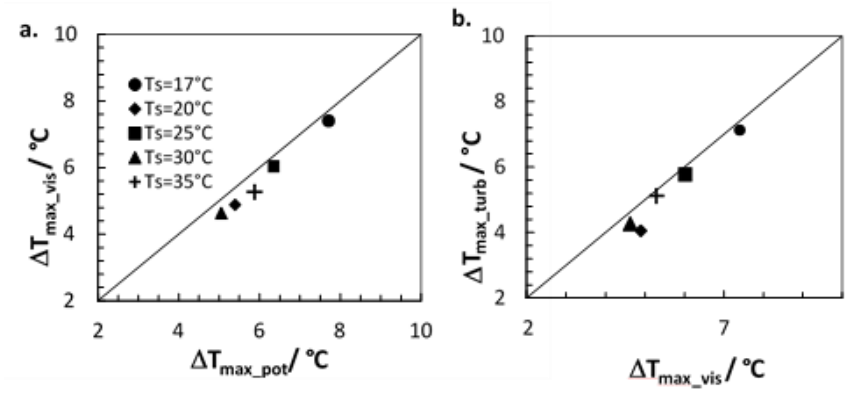
temperaturi, jer je pri većoj temperaturi veći i nagib krivulje topljivosti u radnom temperaturnom području (slika 2a). Stoga će u otopinama zasićenim pri višim temperaturama i nukleacija započeti pri manjoj pothlađenosti otopine, ΔT_{max}. Iz prikazanih rezultat također se uočava da je odstupanje rezultata mjerenja značajnije pri nižim temperaturama otopine.



Slika 4. Potenciometrijskom metodom određena ovisnost širine metastabilne zone boraksa, ΔT_{max}, o temperaturi zasićenosti matične otopine.

Fig. 4. Metastable zone width determined by visual method vs. saturation temperatures

Nakon vizualne metode, analizirani su rezultati ovisnosti širine metastabilne zone određene na temelju potenciometrijskih mjerenja u ovisnosti o temperaturama zasićenosti matične otopine (slika 4).
Primjena i ove metode rezultirala je gotovo identičnim trendom promjene širine metastabilne zone s temperaturom zasićenosti. Ovo se moglo očekivati s obzirom da su se i mjerenja svim primijenjenim metodama za svaku temperaturu zasićenja provodila istodobno i u identičnim procesnim uvjetima. U odnosu na rezultate dobivene vizualnom metodom kod potenciometrijske metode uočena su veća odstupanja mjerenih rezultata od srednje vrijednosti. Kako je vizualna metoda subjektivna, očekivalo se veće odstupanje upravo primjenom ove metode. Međutim kako bi se osigurala što veća osjetljivost, mjerenja su se provodila u zatamnjenoj prostoriji, uz crni zaslon postavljen uz stražnju vanjsku stjenku kristalizatora te uz odgovarajuću reflektorsku rasvjetu. U svrhu usporedbe osjetljivost vizualne i potenciometrijske metode vrijednosti ΔT_{max} uspoređene su na slici 5a.



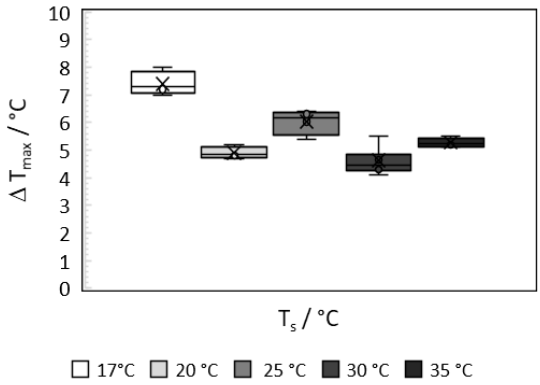
Slika 5. Usporedba širina metastabilnih zona boraksa određenih ***a.*** vizualnom i potenciometrijskom metodom. b. turbidimetrijskom i vizualnom metodom.

Fig. 5 Comparison of the metstable zone width determined by a. visual vs. potentiometric method; b. Turbidimetric vs. visual method.

Usporedba rezultata (slika 5a) ukazala je da su pri svim ispitivanim temperaturama zasićenosti matične otopine širine matastabilnih zona određenih vizualnom metodom uže od onih određenih potenciometrijskom metodom. Uža metastabilna zona ukazuje na veće temperature nukleacije odnosno ranije određenu nukleaciju vizualnom metodom. Dakle, vizualna metoda osim što je okarakterizirana manjim odstupanjima izmjerenih podataka pokazuje i primjetno veću osjetljivost od potenciometrijske. U prethodnim istraživanjima kristalizacije boraksa uočeno je da se na samom početku nukleacije, utroši jako mala količina prezasićenosti matične otopine te da se ona intenzivnije troši tek naknadno pri rastu kristala (Ćosić et al., 2016). Upravo male koncentracijske promjene izazvane početkom nukleacije mogu se smatrati razlogom slabije osjetljivosti Na-ISE.

Na slici 6 prikazana je širina metastabilnih zona određenih na temelju mjerenja temperature nukleacije turbidimetrijskom metodom. Iz slike je uočena prisutnost istovjetnog trenda promjene ΔT_{max} s temperaturom zasićenja kao i kod prethodnih rezultata mjerenja vizualnom i potenciometrijskom metodom. Nadalje, uočavaju se odstupanja promatrane veličine oko prosječne vrijednost, ali nešto manje izraženih u odnosu na vizualnu metodu. Usporedba širina metastabilnih zona određenih na temelju turbidimetrijskih i vizualnih mjerenja, koja su se pokazala osjetljivijima od potenciometrijskih, prikazana je na slici 5b. Usporedba rezultata ukazala je da su širine metastabilnih zona nešto uže ako se temperatura nukleacije određuje turbidimetrijskom metodom, što zapravo ukazuje na njezinu veću osjetljivost u odnosu na vizualnu metodu. Na temelju izvedenih usporedbi može se zaključiti da se potenciometrijska metoda pokazala najmanje osjetljivom. Ona definitivno ima

spor odziv tj. sporo reagira na početne male promjene koncentracije *Na*–iona pri nukleaciji, što se reflektira na širinu metastabilnog područja. Najosjetljivijom metodom pokazala se turbidimetrijska metoda i to osobito pri nižim temperaturama zasićenja (T_z < 25°C).

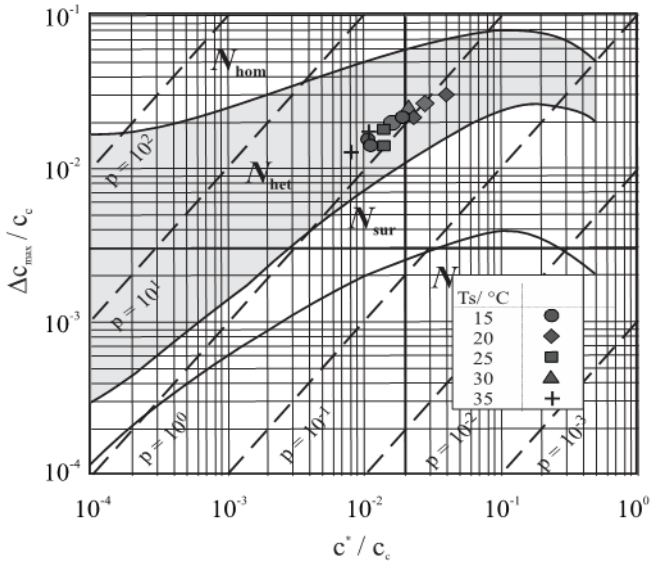


Slika 6. Turbidimetrijskom metodom određena ovisnost širine metastabilne zone boraksa, ΔT_{max}, o temperaturi zasićenosti matične otopine.

Fig. 6. Metastable zone width determined by visual method vs. saturation temperatures

Analizirajući odstupanja od srednje vrijednosti ΔT_{max} za ove metode (slika 4, 5 i 7*),* uočljivo je da su odstupanja najmanja kod turbidimetrijske metode. Međutim i za ostale dvije metode ta odstupanja tj. reproducibilnost rezultata je sasvim zadovoljavajuća. Vizualna metoda, premda najjednostavnija za izvedbu, ima evidentnih nedostataka kao što su: subjektivnost metode, ograničenje na isključivo jednu osobu koja provodi mjerenje te posebno potrebna konstrukcija reaktorske posude i termostatskog uređaja. U koliko reaktor i termostat nisu prozirni, metoda je apsolutno neprimjenjiva. Ona može biti korisna u laboratorijskim uvjetima, ali ne i u pogonskim. U svakom slučaju, prednost pri određivanju početka nukleacije u šaržnom postupku kristalizacije bi se trebala dati turbidimetrijskoj metodi.
Odziv ispitivanih metoda reflektira se konačno i na numeričke vrijednosti nukleacije. Da bi se odredile brzine nukleacije, izražene kao broj nukleusa nastalih u jedinici volumena i vremena, *B* (br./m^3 s), neophodno je definirati mehanizam kojim se ovaj proces odvija. Postoje četiri različita nukleacijska mehanizma, odnosno vrste nukleacije koje se definiraju kao homogena, heterogena, površinska i nukleacija uslijed loma kristala. Da bi se za provedene nukleacije boraksa, odredio dominantan mehanizam, korišten je tzv. Mersmannov nukleacijski kriterij. Taj kriterij predstavljen je dijagramom u kojem su u odnos postavljene bezdimenzijska

topljivost c^*/c_c i njoj pripadajuća bezdimenzijska širina metastabilne zone, $\Delta c_{max}/c_c$. Na *slici 7* prikazan je Mersmannov dijagram te su na njemu označene pripadajuće vrijednosti, određene različitim metodama.



Slika 7. Mermannov nukleacijski kriterij.

Fig. 7. Mersmann´s nucleation criterion.

Uočljivo je da sve eksperimentalne tehnike potvrđuju da se nukleacija boraksa u šaržnom reaktoru odvijala heterogenim primarnim mehanizmom. Nakon utvrđivanja dominantnog mehanizma nukleacije izračunate su brzine primarne heterogene nukleacije za sve korištene eksperimentalne tehnike primjenom jednadžbe:

$$B_{het} = 0{,}965\varphi_{het}\frac{D_{AB}}{d_m^5}\left(\frac{\Delta C_{max}}{C_c}\right)^{\frac{7}{3}}\sqrt{f_{het}\ln\frac{C_c}{C^*}}\,e^{\left\{-1{,}19\frac{\left(\ln\frac{C_c}{C^*}\right)^3}{(v\ \ln S)^2}\right\}} \qquad (3)$$

U izrazu 3 φ_{he} predstavlja faktor heterogenosti (čija vrijednost za većinu anorganskih soli iznosi 10^{-11}), D_{AB} koeficijent difuzije, c^*, topljivosti soli, c_c, množinsku gustoću kristala te faktor heterogenosti, f_{het}, koji ukazuje na odnos slobodne Gibbsove energije homogene i heterogene primarne nukleacije, a čija vrijednost za većinu anorganskih soli iznosi 0,1. Koeficijent difuzije D_{AB} za ispitivani sustav izračunat je pomoću Einstanovog izraza (Čelan et al., 2017) i iznosio je $4{,}95\cdot10^{-10}$ m²/s, v predstavlja broj iona u kristalizirajućoj molekuli, S je stupanj zasićenosti matične otopine ($S = c/c^*$), dok je d_m promjer molekule koji za boraks iznosi $\approx 7{,}2\cdot10^{-10}$ m.

Tablica 1. Vrijednosti brzina heterogene nukleacije boraksa određenih uz uporabu različitih metoda određivanja širine metastabilne zone.

Table 1. Values of nucleation rates determined by using different methods for metastable zone width determination.

	Brzina nukleacije, br. /m^3 s		
T_Z/ °C	**Vizualna metoda**	**Potenciometrijska metoda**	**Turbidimetrijska metoda**
17	$1{,}15\cdot10^{15}$	$1{,}24\cdot10^{15}$	$1{,}05\cdot10^{15}$
20	$7{,}45\cdot10^{14}$	$8{,}67\cdot10^{14}$	$5{,}32\cdot10^{14}$
25	$2{,}46\cdot10^{15}$	$2{,}83\cdot10^{15}$	$2{,}16\cdot10^{15}$
30	$2{,}47\cdot10^{15}$	$3{,}23\cdot10^{15}$	$2{,}09\cdot10^{15}$
35	$7{,}31\cdot10^{15}$	$8{,}96\cdot10^{15}$	$5{,}87\cdot10^{15}$

Vrijednosti brzina heterogenih nukleacija, prikazanih u tablici 1 ukazuju da su brzine nukleacije pri hlađenju pojedine otopine zasićene u području od 17 do 35 °C proporcionalne širinama metastabilnih zona.
Procijenjeni broj nastalih nukleusa u jediničnom vremenu i volumenu je najveći ukoliko se koristi potenciometrijska metoda. Odnos broja nastalih nukleusa i razine prezasićenosti može se značajno odraziti na karakteristike kristala konačnog produkta. U slučaju kada veliki broj nukleusa započinje svoj rast u prezasićenoj otopini za pretpostavit je da će operacija rezultirati nastajanjem velikog broja malih kristala i obrnuto. Različiti rezultati istih mjerenja mogu uzrokovati odstupanja u procjeni karakteristika produkta. Upravo ova činjenica ukazuje na važnost pouzdanog određivanja širine metastabilne zone kako bi se matematički opis kinetike rasta kristala, koji nastupa nakon nukleacije, mogao što više približiti realnim vrijednostima.

Zaključci

Vizualna, potenciometrijska i turbidimetrijska metoda, omogućuju određivanje početka nukleacije boraksa u procesu njegove šaržne kristalizacije postupkom kontroliranog hlađenja. Međutim, usporedbom rezultata dobivenih primjenjenim metodama pokazalo se da je najosjetljivija turbidimetrijska metoda posebice pri nižim temperaturama zasićenja matične otopine. Ova metoda osim visoke osjetljivosti pokazuje i najmanje odstupanje mjerenih podataka. S obzirom na to da ne zahtjeva česta baždarenja i posebne izvedbe reaktora mogućnost njene primjene u pogonskim uvjetima daje joj dodatnu prednost u odnosu na ostale primijenjene tehnike pri određivanju temperature nukleacije, odnosno širine metastabile zone u procesu šaržne kristalizacije.

Različite metode određivanja širine metastabilne zone uzrokuju i različite vrijednosti brzine nukleacije što se može odraziti na predviđanja karakteristika konačnog produkta kristalizacije. Zbog navedenog svakako treba provjeriti osjetljivost raspoloživih metoda za određivanje temperature nukleacije u kristalizirajućem sustavu.

Literatura

Akrap, M., Bralić, D., Kuzmanić, N.: In-line bulk concentration measurement in batch cooling crystallization of borax decahydrate, Proceedings 13th Ružička days "Today science - tomorrow industry", Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2011., pp. 115-125.

Ćosić, M., Kaćunić, A., Kuzmanić, N. (2016): The Investigation of the Influence of Impeller Blade Inclination on Borax Nucleation and Crystal Growth Kinetics, *Chem. Eng. Comm.*, 203 (11) 1497-1506

Kaćunić, A., Ćosić, M., Rušić, D., Kuzmanić, N. (2017) Effect of impeller off-bottom clearence on crystal growth kinetics of borax in dual-impeller batch cooling crystallizer, *Chemical Engineering Transactions* 57, 787-792.

Mullin, J. W. (2001): Crystallization, 4th ed, Butterworth-Heinemann, Oxford, UK, pp. 86-403.

Myerson, A. (2002): Handbook of industrial crystallization, Butterworth-Heinemann, Boston, USA, pp.1-218.

Urlich, J., Strege, C. (2002): Some aspects of the importance of metastable zone width and nucleation in industrial crystallizer, *J. Crystal Growth* 237-239, 2130-2135.

International Conference *17th Ružička days*
"TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY"
September 19-21, 2018 / Vukovar, Croatia

Original scientific paper

Application of turbidimetric method for determination of metastable zone width of borax in batch crystallizer

Marija Ćosić*, Bruno Čizmić, Antonija Čelan, Nenad Kuzmanić

University of Split, Faculty of Chemistry and Technology, Department for chemical engineering, R. Boškovića 35, 21 000 Split, Hrvatska
**Corresponding author: akrap@ktf-split.hr*

Summary

The width of the metastable zone is an important parameter for estimation of the dominant nucleation mechanism and for nucleation rate determination. The boundary of this zone presents the concentration and temperature conditions at which nucleation starts causing changes in the physical characteristics of the system, among the others, turbidly of the mother liquor. For this reason, the onset of nucleation is often detected by a visual method which is based on the observation of the conditions of the crystallizing system. However, the use of this method is limited to transparent glass crystallizers, whereas in industrial opaque crystallizers one of the so-called *"in situ"* method among which the turbidimetric method need to be applied.
In this paper, the possibility of application of a turbidimetric method for determination of the borax metastable zone width in the batch cooling crystallizer is investigated. The experiments were carried out in a 2.14 dm^3 volume crystallizer equipped with straight blade turbine which rotational speed was constant (N = 300 rpm). In order to obtain a more complete insight into the sensitivity of the applied method, the experiments were carried out in borax solutions saturated in the temperature range from 35 to 17 ° C and cooled at the same linear rate. Also, the onset of nucleation in the system is determined by a visual and potentiometric method. The experimental results indicated a very high sensitivity of the turbidimetric method with respect to the other methods used.

Keywords: metastable zone width, turbidimetry, batch crystallize

Izvorni znanstveni rad

Utjecaj eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida*

Marija Vuković Domanovac*[1], Martina Miloloža[1], Josip Leko[2], Monika Šabić[1], Martina Sudar[2], Zvjezdana Findrik Blažević[2]

[1]Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za industrijsku ekologiju,Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Hrvatska
**Dopisni autor: mvukovic@fkit.hr*
[2]Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, Savska cesta 16, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Aktivne farmaceutske tvari predstavljaju ekološki problem globalnih razmjera. U okoliš dospijevaju isključivo uslijed antropogenih aktivnosti. Prisustvo farmaceutika u okolišu povećava rizik za sve žive organizme zbog njihove sposobnosti bioakumulacije i svojstva ekotoksičnosti. Povećane koncentracije uočene su u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju zbog urbanizacije i industrijalizacije. Koliko su farmaceutici štetni, potvrđuje činjenica da uzrokuju nepovratne promjene za prirodna okruženja. Zabrinutost je sve veća jer su prisutni u pitkim vodama što izravno utječe na ljudsko zdravlje.
U ovom radu istraživan je utjecaj makrolidnog antibiotika eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode. Rezultati testova osjetljivosti pokazuju otpornost bakterijske kulture na koncentracije eritromicina od 0,2 do 2000 mg dm^{-3}. Pri uzgoju *P. putida* u tekućoj hranjivoj podlozi s koncentracijom eritromicina od 200 mg dm^{-3} uočene su značajne promjene u morfologiji stanica. Kako bi se vidjelo inducira li eritromicin proizvodnju enzima u stanicama *P. putida*, tijekom uzgoja u hranjivoj podlozi uz 0,2 i 200 mg dm^{-3} eritromicina, praćena je aktivnost enzima esteraze. Tijekom 72 h uzgoja bakterijske kulture *P. putida* s eritromicinom, zamijećen je porast enzimatske aktivnosti. U trenutku postizanja maksimalne aktivnosti enzima, stanice *P. putida* su razbijene ultrazvukom te je enzimski ekstrakt nakon taloženja s amonijevim sulfatom testiran za razgradnju makrolidnog antibiotika eritromicina.

Ključne riječi: eritromicin, *Pseudomonas putida*, esteraza

Uvod

Ekonomskim napretkom, razvojem industrije te porastom broja stanovnika raste upotreba farmaceutika. Farmaceutici su tvari sa specifičnom biološkom aktivnosti koje se koriste u humane i u veterinarske svrhe za liječenje i prevenciju bolesti te poboljšanje zdravstvenog i fiziološkog stanja tijela (Kümmerer, 2010). Porastom njihove upotrebe i proizvodnje, dolazi do onečišćenja okoliša jer su pronađeni u površinskim, podzemnim, ali i pitkim vodama te sedimentu i tlu (Jones i sur., 2001). Koncentracije farmaceutika u okolišu iznose nekoliko ng dm^{-3} ili μg dm^{-3} (Do Manh i sur., 2011), no uslijed njihovog kontinuiranog dospijevanja u okoliš povećava se izloženost organizama u okolišu zbog čega može doći do ozbiljnih posljedica po ljudsko zdravlje i okoliš. Predviđanje biološkog i ekološkog rizika tj. utjecaja farmaceutika u okolišu vrši se biotestovima. To su brzi standardizirani testovi jednostavne izvedbe, niske osjetljivosti kojima se dobiva koncentracija koja izaziva inhibiciju bioluminiscencije u 50 % populacije *Vibrio fischeri*, EC_{50}, prema kojoj se klasificira toksičnost ispitivanih molekula (Isidori i sur., 2005).
Brojni su izvori dospijevanja farmaceutika u okolišne sastavnice, poput ljudske potrošnje lijekova i dodataka prehrani, upotrebe lijekova u veterinarske svrhe, otpadnih voda iz bolnica, procjednih voda s odlagališta otpada te komunalnog otpada, ali i groblja (Kümmerer, 2010). Najčešće su to kompleksni sustavi, među koje se ubrajaju i otpadne vode iz farmaceutske industrije, koje se najčešće pročišćavaju biološkom obradom s aktivnim muljem (Deegan i sur., 2011). Aktivni mulj je mješovita zajednica mikroorganizama koja se sastoji od oko 95 % bakterija povezanih u pahuljice aktivnoga mulja. Biorazgradnja se smatra najvažnijim procesom uklanjanja najvećeg broja ksenobiotika, uključujući i farmaceutike, a ostvaruje se s obzirom na enzimatsku sposobnost mikroorganizama za razgradnju onečišćujućih tvari.
U ovom je radu ispitana toksičnost makrolidnog antibiotika eritromicina pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* te utjecaj istog antibiotika na bakterijsku kulturu *P. putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode. Nakon uzgoja bakterije u hranjivoj podlozi, praćena je aktivnost enzima esteraze koja bakteriji omogućuje razgradnju makrolida.

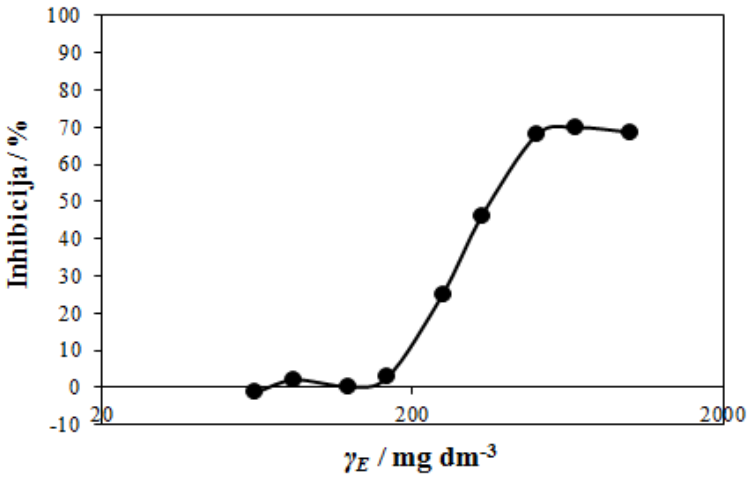
Materijali i metode

U radu su korišteni makrolidni antibiotik eritromicin dobiven iz farmaceutske tvrtke Pliva Hrvatska d.o.o. i bakterijska kultura *Pseudomonas putida* koja je prirodno prisutna te izolirana iz farmaceutske otpadne vode. Masene koncentracije eritromicina označene su s γ_E / mg dm^{-3}, a korištene su radne otopine sljedećih koncentracija: γ_{E01} = 0,2 mg dm^{-3}, γ_{E02} = 2 mg dm^{-3}, γ_{E03} = 20 mg dm^{-3}, γ_{E04} = 200 mg dm^{-3}, γ_{E05} = 2000 mg dm^{-3}. Provedeni su akutni testovi toksičnosti za eritromicin

pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* prema standardnoj metodi koristeći linearni niz (HRN EN ISO 11348-3:2010). Djelovanje eritromicina na *Pseudomonas putida* je istraženo testovima osjetljivosti na raspon koncentracija eritromicina 0,2 - 2000 mg dm^{-3} (EUCAST, 2003). Uzgoj bakterijske kulture u hranjivoj podlozi *Tryptic Soy Broth* proveden je u Erlenmeyerovim tikvicama od 1000 cm^3 pri 125 min^{-1} i 25 °C tijekom 312 sati u šaržnim i submerznim uvjetima u 200 cm^3 otopine bez eritromicina i uz koncentracije γ_{E01} i γ_{E04} eritromicina (Kim i sur., 2002). Tijekom provedbe pokusa praćena je optička gustoća, OG, pri λ = 600 nm, broj živih stanica (CFU cm^{-3}) te je provedena mikroskopska analiza (Olympus BX50, Olympus Optical Co. Ltd., Japan) opremljenog kamerom za snimanje mikrofotografija (Olympus DP 10 kamera)). Uzgojene stanice su razbijene ultrazvučnom sondom (MS 73, Bandelin, promjer sonde 3 mm) tijekom 8 minuta te je u supernatantu nakon centrifugiranja spektrofotometrijski određivana aktivnost enzima esteraze (A) uz supstrat *p*-nitrofenil butirat (Morar i sur., 2012). Koncentracija supstrata *p*-nitrofenil butirata u testu je iznosila 2 mmol dm^{-3}, a test je proveden s 0,01 cm^3 suspenzije enzima. Nakon toga je, radi dodatnog pročišćavanja, provedeno taloženje esteraze u prisustvu amonijevog sulfata. Prvo taloženje je provedeno s 25 % amonijevog sulfata kako bi se taložili nepoželjni proteini, a u preostalom supernatantu nakon prvog taloženja je istaložena esteraza uz dodatak 85 % amonijevog sulfata (Kim i sur., 2002). Talog je korišten kao biokatalizator za razgradnju eritromicina u kotlastom reaktoru volumena 2 cm^3 pri čemu je u reaktor bilo dodano 0,5 cm^3 djelomično pročišćene suspenzije eritromicin esteraze u kojoj je koncentracija proteina bila 9,82 mg cm^{-3}. Koncentracija eritromicina mjerena je na HPLC-u na ZirChrom-PBD koloni. Kao mobilna faza korištena je otopina 20 mmol dm^{-3} fosfatnog pufera i acetonitrila u omjeru 24:76 (v/v) te pH-vrijednost 11. Analiza je provedena izokratnom metodom pri protoku mobilne faze od 1 cm^3 min^{-1} pri temperaturi 45 °C u trajanju od 30 minuta.

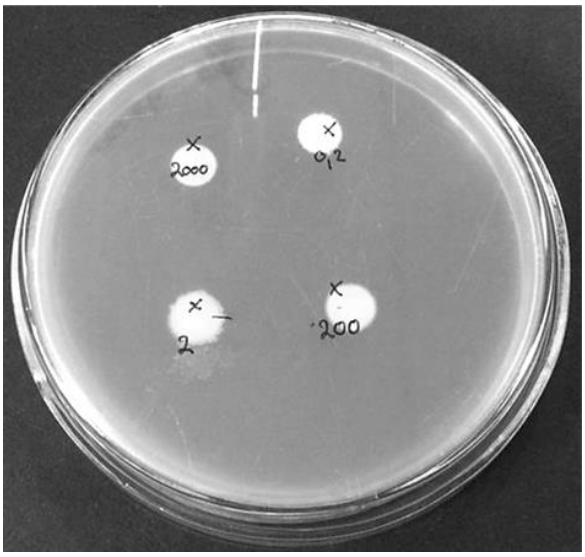
Rezultati i rasprava

Kako bi se odredio utjecaj eritromicina na vodene organizme u okolišu, proveden je test toksičnosti vodene otopine eritromicina koncentracije 2000 mg dm^{-3} pomoću luminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* s vremenom inkubacije od 30 min. Metoda se temelji na procjeni smanjenja fiziološke aktivnosti, tj. luminiscencije, čiste kulture *V. fischeri* u prisutnosti eritromicina. Mjeri se intenzitet luminiscencije na početku testa i nakon 30 min. te instrument očitava efektivnu koncentraciju, EC_{50} koja predstavlja koncentraciju pri kojoj dolazi do 50 %-tnog pada luminiscencije.



Slika 1. Koncentracija-odgovor krivulja za eritromicin provedbom akutnih testova toksičnosti pomoću bakterije *Vibrio fischeri*.

Fig. 1. Dose-response curve for erythromycin of bioassays with *Vibrio fischeri*.



Slika 2. Testovi osjetljivosti bakterijske kulture *P. putida* na koncentracije eritromicina γ_{E01}, γ_{E02}, γ_{E04} i γ_{E05}.

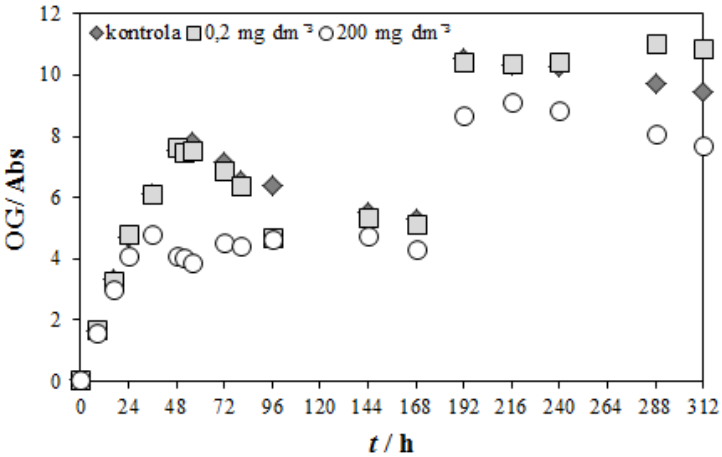
Fig. 2. Susceptibility tests of bacterial culture *P. putida* on erythromycin concentration γ_{E01}, γ_{E02}, γ_{E04} and γ_{E05}.

Na slici 1. prikazana je dobivena koncentracija-odgovor krivulja za eritromicin koja obuhvaća inhibiciju izraženu u postocima u ovisnosti o koncentracijama eritromicina. Pri nižim koncentracijama eritromicina uočava se odstupanje od očekivanog postotka inhibicije jer krivulja kreće od negativne vrijednosti inhibicije što ukazuje na efekt hormeze. Hormezu karakterizira stimulacija za testne organizme pri niskim koncentracijama toksične tvari, a inhibicija pri višim koncentracijama (Ortiz de Garcia i sur., 2015). Daljnjim porastom koncentracija eritromicina, raste i inhibicija, a pri 428,8 mg dm^{-3} inhibirano je 50 % izložene populacije *V. fischeri*. S obzirom na klasifikaciju tvari prema EC_{50} vrijednosti, eritromicin se svrstava kao neštetan za vodene organizme jer je EC_{50}>100 mg dm^{-3}. Izračunata je jedinica toksičnosti (TU) koja je iznosila 0,23 % pri čemu se eritromicin svrstava kao netoksičan (Ledda i sur., 2013). Najniža koncentracija kod koje se uočava utjecaj eritromicina na bakteriju *V. fischeri* je LOEC, a iznosi 166,7 mg dm^{-3} uz inhibiciju od 2,84 %.

Eritromicin djeluje na Gram pozitivne bakterije. *V. fischeri* je Gram negativna bakterija, koja sadrži enzime iz skupine esteraza koji omogućuju potencijalnu razgradnju eritromicina. Time se pretpostavlja otpornost i prilagodljivost bakterije uslijed izloženosti na eritromicin pa se navodi da je potreban duži period izlaganja bakterije *V. fischeri* eritromicinu kako bi se dobio relevantniji podatak o učinku eritromicina (Ortiz de Garcia i sur., 2015; Ranjitha, 2009).

U svrhu procjene utjecaja eritromicina na bakteriju *P. putida*, provedeni su testovi osjetljivosti. Uslijed izlaganja bakterijske kulture *P. putida* koncentracijama eritromicina γ_{E01}, γ_{E02}, γ_{E04} i γ_{E05} nisu uočene zone inhibicije, što se može vidjeti na slici 2. To ukazuje da je *P. putida* otporna na djelovanje eritromicina. Pretpostavlja se otpornost bakterije *P. putida* na ispitivani makrolid zbog prisustva enzima eritromicin esteraze kao i crpke za regulaciju koncentracije antibiotika unutar stanice. Izlučivanjem izvanstanične polimerne tvari, EPS-a, omogućena joj je regulacija koncentracije eritromicina unutar stanice, uslijed smanjene permeabilnosti stanične membrane (Kanoh i sur., 2010).

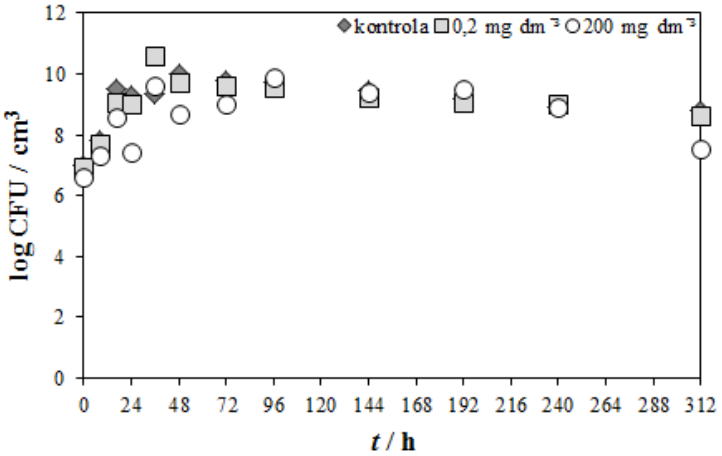
Dobiveni rezultati ukazuju na moguć rast bakterije u prisustvu eritromicina. Proveden je pokus P1 u svrhu dobivanja krivulja rasta bakterije bez i uz dodatak eritromicina. Promjena optičke gustoće i broja živih stanica prate isti trend, što je prikazano na slikama 3. i 4. Nakon 8. sata kreće eksponencijalna faza rasta *P. putida* i rast vrijednosti optičke gustoće do 48. sata. Nadalje, dolazi do pada optičke gustoće do 168. sata te ponovni rast optičke gustoće od 192. sata. Eritromicin je antibiotik koji djeluje na bakterije u njihovoj eksponencijalnoj fazi rasta te nakon te faze dolazi do smanjenja optičke gustoće, što se može protumačiti raspadom biomase. Uspoređujući kontrolu i nižu koncentraciju eritromicina γ_{E01}, uočavaju se vrlo mala odstupanja u vrijednostima optičke gustoće, što ukazuje na to da je γ_{E01} preniska koncentracija eritromicina za toksični utjecaj na bakteriju *P. putida*.



Slika 3. Promjena optičke gustoće bakterijske kulture *P. putida* tijekom 312 sati bez i uz dodatak eritromicina γ_{E01} i γ_{E04} za P1.

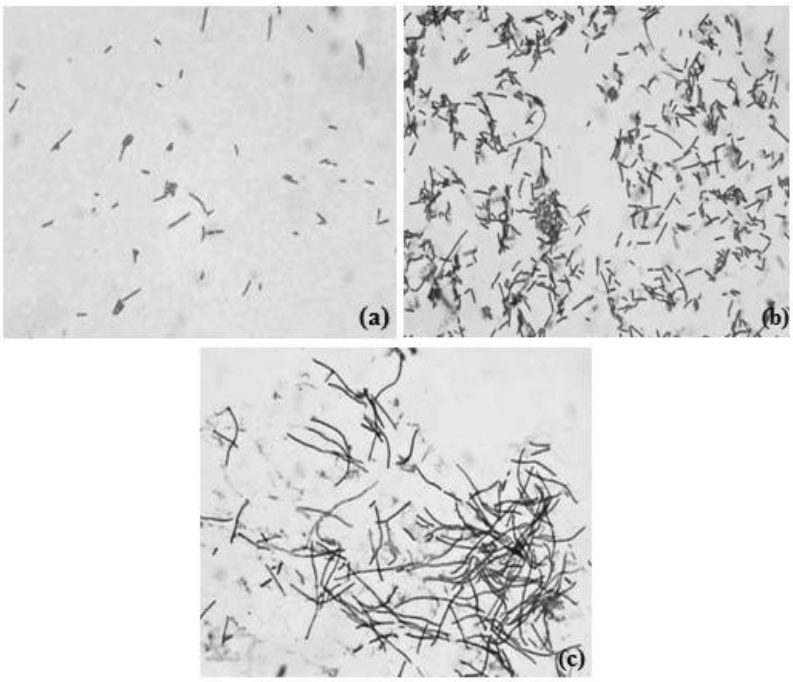
Fig. 3. Changes of optical densities of *P. putida* during 312 hours without and with addition of γ_{E01} and γ_{E04} of erythromycin in P1.

Najniže vrijednosti optičke gustoće vidljive su, prema slici 3., u sustavu s γ_{E04}. Također, bitno je spomenuti da optička gustoća u sustavu s γ_{E04}, raste do 36. sata, dok u druga dva sustava raste do 48. sata. Time eksponencijalna faza traje 24 sata kraće u sustavu pri 2000 mg dm^{-3} eritromicina. Pretpostavlja se toksični utjecaj na *P. putida* pri najvišoj ispitivanoj koncentraciji eritromicina (Kim i sur., 2005).



Slika 4. Promjena logaritamskog broja živih stanica bakterijske kulture *P. putida* tijekom 312 sati bez i uz dodatak eritromicina γ_{E01} i γ_{E04} za P1.

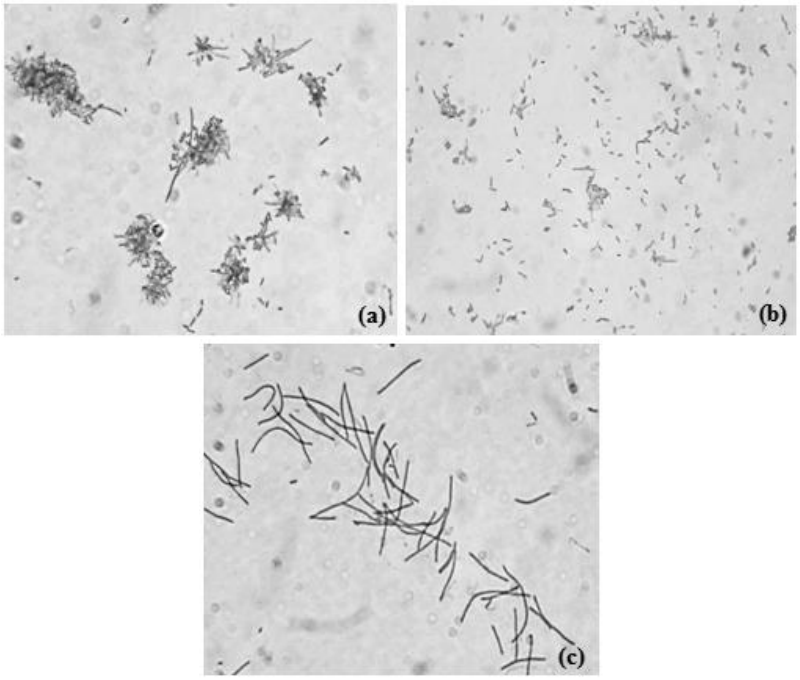
Fig. 4. Changes of logarithmic number of living cells of *P. putida* during 312 hours without and with addition of γ_{E01} and γ_{E04} of erythromycin in P1.



Slika 5. Mikrofotografije bakterijske kulture *P. putida* u 16. satu u uvjetima (a) bez eritromicina, (b) uz γ_{E01} i (c) γ_{E04} eritromicina, P = 1000×.

Fig. 5. Microphotographs of bacterial culture *P. putida* taken in the 16th hour in conditions (a) without erythromycin, (b) with γ_{E01} and (c) γ_{E04} of erythromycin, M = 1000×.

U kontroli tijekom 16. sata (slika 5.a) uočavaju se manje štapićaste stanice, uz prisutnost većih koje nalikuju kao da su spojene u lance, ali su stanice zapravo ometene pri dijeljenju. Takve se stanice nazivaju dimeri. Rezultat toga je filamentacija kulture koja nastaje kada je metabolizam nedovoljan da nadoknadi nedostatak kisika u mediju. U sustavu s γ_{E01}, slika 5.b, vidljivo je povećanje gustoće stanica te uz ponešto manjih štapića, prevladavaju izdužene stanice bakterijske kulture *P. putida*. Na slici 5.c prevladavaju vrlo dugački i tanki štapići koji nalikuju na izdužene stanice pri koncentraciji eritromicina γ_{E04}. Do izduženja bakterijskih stanica dolazi jer eritromicin djeluje na proteine koji reguliraju sastavljanje stanične stijenke bakterija (Cushnie i sur., 2016; Ocampo i sur., 2014).
Početak stvaranja pahuljica zamijećen je u 24. satu provedbe pokusa krivulje rasta. Na slici 6.a prikazane su čvrste i kompaktne pahuljice *P. putida* u sustavu bez dodatka eritromicina. Manji štapići nego u 16. satu vidljivi su na slici 6.b uz sitnije pahuljice bakterijske kulture.

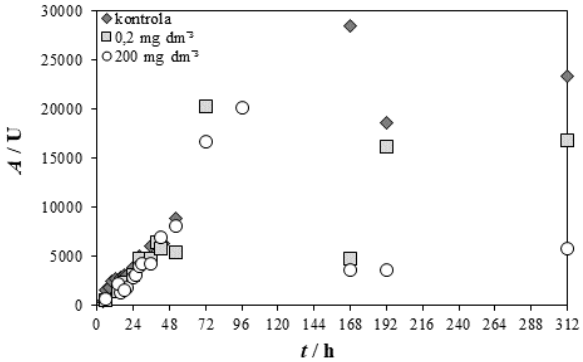


Slika 6. Mikrofotografije bakterijske kulture *P. putida* u 24. satu u uvjetima (a) bez eritromicina, (b) uz γ_{E01} i (c) γ_{E04} eritromicina, P = 1000×.

Fig. 6. Microphotographs of bacterial culture *P. putida* taken in the 24th hour in conditions (a) without erythromycin, (b) with γ_{E01} and (c) γ_{E04} of erythromycin, M = 1000×.

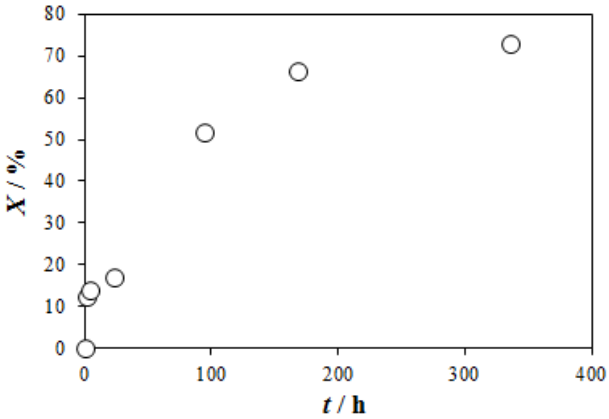
Pri izloženosti *P. putida* najvišoj koncentraciji, slika 6.c, u 24. satu prevladavaju vrlo dugačke i tanke stanice međusobno isprepletene te je zamijećena prisutnost manjeg broja pahuljica bakterijske kulture. Iz slike 6. je vidljivo kako se povećanjem koncentracije eritromicina usporava stvaranje pahuljica. Prisutnost toksičnih tvari u sustavu može utjecati na promjenu površine bakterijskih stanica čime se povećava akumulacija molekula, posljedično tomu se luči EPS (Hansen i sur., 2007; Reardon i sur., 2000), zbog čega ipak dolazi do stvaranja pahuljica u sustavima s eritromicinom.
Provedeni su pokusi uzgoja bakterije bez i uz eritromicin kako bi se odredilo u kojoj fazi rasta *P. putida* ima najveću aktivnost enzima esteraze. U ovoj fazi istraživanja praćena je aktivnost enzima esteraze nespecifičnim testom, odnosno testom koji pokazuje ukupnu aktivnost svih esteraza koje proizvodi *P. putida*. Željelo se odrediti u kojem je satu najveća aktivnost enzima uslijed izloženosti dvjema koncentracijama eritromicina γ_{E01} i γ_{E04}. Uočava se da porastom vremena dolazi do porasta aktivnosti enzima do 72 sata te se daljnjim porastom vremena uočava pad aktivnosti enzima (slika 7.). Aktivnost enzima najviša je za kontrolnu tikvicu u 168. satu. Trend ponašanja aktivnosti enzima

isti je za sva tri sustava, ali najniže vrijednosti aktivnosti enzima, tijekom 312 sati, uočavaju se za sustav s γ_{E04} eritromicina. Iako je moguće da eritromicin utječe na smanjenje aktivnosti nekih drugih esteraza, a ne željene eritromicin esteraze, s obzirom da je aktivnost prikazana na slici 7. praćena nespecifičnim testom, ovaj test korišten je zbog njegove jednostavnosti odnosno zbog složenosti postupka pročišćavanja enzima.



Slika 7. Promjena aktivnosti enzima esteraze bakterijske kulture *P. putida* tijekom 312 sati uzgoja, bez i uz dodatak eritromicina γ_{E01} i γ_{E04}.

Fig. 7. Changes of enzyme estarase activity of bacterial culture *P. putida* during 312 hours of cultivation in conditions without and with addition of γ_{E01} and γ_{E04} of erythromycin.



Slika 8. Razgradnja eritromicina u kotlastom reaktoru uz esterazu dobivenu djelomičnim pročišćavanjem iz bakterijske kulture *P. putida* (50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 7, V_r = 2 cm^3, 25°C, $c_{eritromicin}$ = 1,5 mmol dm^{-3}).

Fig. 8. Erythromycin degradation in the batch reactor catalyzed by partially purified esterase from bacterial culture *P. putida* (50 mmol dm^{-3} phosphate buffer pH 7, V_r = 2 cm^3, 25°C, $c_{erythromycin}$ = 1,5 mmol dm^{-3}).

Proveden je eksperiment razgradnje eritromicina u kotlastom reaktoru koristeći esterazu dobivenu nakon taloženja s amonijevim sulfatom (slika 8.) što je najbolji pokazatelj da *P. putida* proizvodi enzim eritromicin esterazu. Maksimalna dobivena konverzija eritromicina iznosila je 73 % nakon 340 h.

Zaključci

Testovi toksičnosti pomoću bakterije *Vibrio fischeri* klasificiraju eritromicin kao netoksičan prema vrijednostima EC_{50} = 428,8 mg dm^{-3} i TU = 0,23 %. Testovi osjetljivosti ukazuju da eritromicin ne djeluje na izoliranu bakteriju *P. putida*, koja je prirodno prisutna u farmaceutskoj otpadnoj vodi, s obzirom na izostanak zona inhibicija. Pri koncentraciji eritromicina od 200 mg dm^{-3}, dolazi do morfoloških promjena stanica *P. putida*, što je utvrđeno mikroskopskom analizom. Za sustave bez i uz dodatak eritromicina pri uzgoju *P. putida* na *Tryptic Soy Broth*-u, ustanovljena je najveća aktivnost enzima esteraze u 72. satu. Eksperimentom u kotlastom reaktoru uz djelomično pročišćeni enzim pokazano je njegovo djelovanje na razgradnju eritromicina.

Literatura

Cushnie, T.P.T., O'Driscoll, N.H., Lamb, A.J. (2016): Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action, *Cell. Mol. Life Sci.* 18, 1-28.

Deegan, A.M., Shaik, B., Nolan, K., Urell, K., Oelgemoller, M., Tobin, J., Morrissey, A. (2011): Treatment options for wastewater effluents from pharmaceutical companies, *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 8, 649-666.

Do Manh, C., Kim, K., Toan, T.Q., Phu, T.D. (2011): Review: source, fate, toxicological effect and removal technology of pharmaceuticals in the environment, *Geo. Eng.* 14, 35-42.

EUCAST Discussion Document E. Dis 5.1 (2003): Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI 9, 1-7.

Hansen, S.K., Haagensen, J.A.J., Gjermansen, M., Jorgensen, T.M., Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2007): Characterization of a *Pseudomonas putida* rough Variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6, *J. Bacteriol.* 189, 4932-4943.

HRN EN ISO 11348-3:2010, Kvaliteta vode – Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) – 3.dio: Metoda u kojoj se upotrebljavaju liofilizirane bakterije.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Pascarella, L., Parrella, A. (2005): Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms, *Sci. Total Environ.* 346, 87-98.

Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N. (2001): Human pharmaceuticals in the aquatic environment. A review, *Environ. Tech.* 22, 1383-1394.

Kanoh, S., Rubin, B.K. (2010): Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications, *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 590-615.

Kim, Y., Cha, C., Cerniglia, C.E. (2002): Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* sp., *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 239-244.

Kim, D.J., Choi, J.W., Choi, N.C., Mahendran, B., Lee, C.E. (2005): Modeling of growth kinetics for *Pseudomonas putida* during benzene degradation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69, 456-462.

Kümmerer, K. (2010): Pharmaceuticals in the environment, *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35, 57-75.

Ledda, C., Rapisarda, V., Bracci, M., Proietti, L., Zuccarello, M., Fallico, R., Fiore, M., Ferrante, M. (2013): Professional exposure to basaltic rock dust: assessment by the *Vibrio Fischeri* ecotoxicological test, *J. Occup. Med. Toxicol.* 8, 1-5.

Morar, M., Pengelly, K., Koteva, K., Wright, G.D. (2012): Mechanism and diversity of the erythromycin esterase family of enzymes, *Biochem.* 51, 1740-1751.

Ocampo, P.S, Lazar, V., Papp, B., Arnoldini, M., Abel zur Wiesch, P., Busa-Fekete, R., Fekete, G., Pal, C., Ackermann, M., Bonhoeffer, S. (2014): Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevelent, *Antimicrobiol. Agents Chem.* 58, 4573-4582.

Ortiz de Garcia, S., Garcia-Encina, P.A., Irusta-Mata, R. (2015): Dose-response behavior of the bacterium *Vibrio fischeri* exposed to pharmaceuticals and personal care products, *Ecotoxicol.* 23, 1-23.

Ranjitha, P. (2009): Purification and partial characterization of esterase from marine *Vibrio fischeri*, *Modern Appl. Sci.* 3, 73-82.

Reardon, K.F., Mosteller, D.C., Rogers, J.D.B. (2000): Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1, *Biotechnol. Bioeng.* 69, 385-400.

Original scientific paper

Impact of erythromycin on *Pseudomonas putida* bacterial culture

Marija Vuković Domanovac*[1], Martina Miloloža[1], Josip Leko[2], Monika Šabić[1], Martina Sudar[2], Zvjezdana Findrik Blažević[2]

[1]Univerisity of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Department of Industrial Ecology, Marulićev trg 19, 10000 Zagreb, Croatia
**Corresponding author: mvukovic@fkit.hr*
[2]Univerisity of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Department of Reaction Engineering and Catalysis, Savska cesta 16, 10000 Zagreb, Croatia

Summary

Active pharmaceutical compounds are ecological problem worldwide. They enter the environment through human activities. Their environmental occurrence increases risk for all living organisms because of their possibility of bioaccumulation and ecotoxicity. Increased concentrations have been observed in developed countries and transition countries due to urbanization and industrialization. How harmful pharmaceuticals are, confirms the fact that they cause permanent changes for natural environment. Concerns are increasing because they are present in drinking water which directly may have effect on human health.
In this study, assessment of the macrolide antibiotic erythromycin on bacterial culture *Pseudomonas putida* isolated from pharmaceutical wastewater was investigated. Susceptibility tests indicated the resistance of bacterial culture at range of erythromycin concentration from 0.2 to 2000 mg dm^{-3}. During cultivation of *P. putida* in *Tryptic Soy Broth* with 200 mg dm^{-3} of erythromycin, morphological changes of bacterial cells were noticed. To investigate if erythromycin induces production of enzyme in *P. putida*, during cultivation in *Tryptic Soy Broth* with 0.2 mg dm^{-3} and 200 mg dm^{-3}, activity of enzyme esterase was determined. During 72 hours of cultivation of *P. putida* in conditions with erythromycin, increase of enzymatic activity was noticed. When the highest activity of enzyme was achieved, bacterial cells were disrupted by ultrasound and the enzyme solution after ammonium precipitation was used for degradation testing of macrolide antibiotic erythromycin.

Key words: erythromycin, *Pseudomonas putida*, esteras

Sekcija: Prehrambena tehnologija i biotehnologija
Session: Food Technology and Biotechnology

Original scientific paper

Impact of the quantity and types of added materials on biscuits rice flour properties

Martina Andrejaš, Dijana Miličević*, Gordan Avdić

Faculty of Technology, University of Tuzla, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina
**Corresponding author: martina.andrejas@hotmail.com*

Summary

Cookies and crackers have an important role in the food industry, whether they are made of flour or with some other ingredients. Different flours can be used in production of cookies and crackers, such as white wheat flour, dark flour, wholemeal flour, rice flour, etc. In order to improve nutritional properties of food, some other components beside flour are used. Therefore, it is possible to produce the final product for special consumer groups (diabetics, people suffering from celiac disease, or athletes).
This paper is a part of preliminary testing for a doctoral dissertation. Cookies were prepared with rice flour. Almond (previously toasted and milled) and dried fruit mixture (plums, apricots, cranberries and grapes) were added to improve nutritional properties. Basic analyses of flour, dough and the final product were performed. Also, cookies were subjected to sensory evaluation.

Key words: rice flour, cookies

Introduction

Urbanization and lifestyle changes are likely to cause increased consumption of snack foods (Pratima and Yadave, 2000). According to the Wheat Foods Council's definitions (Wheat Food Council, 2007), "Originally called 'little cakes', cookies are made with sweet dough or batter, baked in single-sized servings and eaten out-of-hand. Cookies are most often classified by method of preparation-drop, molded, pressed, refrigerated, bar and rolled." Cookies are almost always small in size and flat. They fall into the category of sweet or low-sweet foods. Usually they are prepared from wheat flour, powdered milk, eggs, sugar, salt, butter or edible oil or shortenings and water (Manley, 1998). Refined wheat flour is a principal ingredient in cookies because it is rich in gluten, as well as in starch, low dietary fibre and minerals (Kent and Evers, 1994, as cited in: Hawa

et al, 2018). To make cookies suitable for various dietary requirements which are also nutritive, wheat flour can be replaced with other flours such as rice flour.
Rice flour is a form of flour made from finely milled rice. Rice flour includes a small amount of water (about 8%), fat (about 1%) and ash (about 1%) (Chun and Yoo, 2004). Rice flour does not contain gluten and can boost the production of bakery products, such as gluten free cookies, that are recommended for individuals with celiac disease.
According to Mayo Clinic Staff (2019) "Celiac disease (gluten-sensitive enteropathy), sometimes called sprue or coeliac, is an immune reaction to eating gluten, a protein found in wheat, barley and rye. The signs and symptoms of celiac disease can vary greatly and are different in children and adults. The most common signs for adults are diarrhea, fatigue and weight loss. Adults may also experience bloating and gas, abdominal pain, nausea, constipation, and vomiting. However, more than half of adults with celiac disease have signs and symptoms that are not related to the digestive system, including: anemia, loss of bone density (osteoporosis) or softening of bone (osteomalacia), itchy, blistery skin rash (dermatitis herpetiformis), damage to dental enamel, mouth ulcers, headaches and fatigue", etc.

Materials and methods

Materials

Materials used for cookies preparation are listed below:
- rice flour
- butter
- sugar
- egg
- baking powder
- vanilla sugar
- almonds
- dried fruit mixture

Methods

Methods used are listed below:
- Preparation of cookies
- Dry matter content in flour, dough and cookies (Kaluđerski, 1998)
- Water holding capacity in flour (Kaluđerski, 1998)
- Acidity in flour, dough and cookies - extraction with 67% ethanol, filtration and titration with NaOH using phenolphtalein as indicator (Kaluđerski, 1998)
- Sensory analysis - DLG method (Radovanović and Popović-Raljić, 2001; Grujić, 2015)

Preparation of cookies

Cookies were made using a formulation described in Table 1. All ingredients were mixed and the dough was shaped into a cylinder, then wrapped into aluminium foil and rested for an hour in a refrigerator. The dough was cut into pieces 0.5 cm in thickness and baked at 150 °C 9-10 minutes. The sensory evaluation was carried out by 30 experienced tasters. The DLG method was used.

Table 1. Formulation for preparation of cookies (water was not added during mixing the dough)

	Control sample	**Sample 1**	**Sample 2**
Rice flour	175 g	175 g	175 g
Butter	55 g	55 g	55 g
Sugar	35 g	35 g	35 g
Egg	1	1	1
Baking powder	3 g	3 g	3 g
Vanilla sugar	5 g	5 g	5 g
Almonds	/	50 g	/
Dried fruit mixture	/	/	50 g

Results

The results obtained by rice flour analysis are shown in Table 2, and they all had appropriate values - in accordance with the nutrition declaration of product.

Table 2. Results obtained by rice flour analysis

Acidity	**Dry matter content (%)**	**Water holding capacity (%)**
1.400	88.823	52.515

The results obtained by analysis of dough and cookie samples are shown in Table 3.

Table 3. Results obtained by analysis of dough and cookie samples

Sample	**Acidity**	**Dry matter content (%)**
Control dough sample	1.0	76.086
Dough sample 1	1.4	79.111
Dough sample 2	1.8	80.247
Control cookie sample	1.2	86.943
Cookie sample 1	0.8	90.987
Cookie sample 2	1.8	87.902

Acidity was changed according to the added components to the dough or cookies, and the results obtained had the appropriate values. The highest acidity was in dough and cookie sample 2 and the lowest acidity was in cookie sample 1.
If we look at the moisture content of the dough and cookie samples, it can be noticed that the highest moisture content was in the control dough and cookie sample, and the lowest was in the dough and cookie sample 2. Accordingly, the dry matter content was the highest in the dough and cookie sample 2, and the lowest in the control dough and cookie sample.
The results obtained by sensory evaluation of cookie samples are shown in Table 4. The control sample was rated best for the properties of hardness and structure. The sample 1 was rated best for chewiness and odour. The sample 2 was rated best for shape, colour, surface and taste. Considering the total score, the best rated sample was the sample 2. The addition of the almonds and dried fruit mixture had the positive effect on sensory properties of the cookies.

Table 4. Results obtained by sensory analysis of cookies samples (DLG method)

Graded property	Control sample	Sample 1	Sample 2
Shape, colour, surface	3.55	3.88	4.13
Hardness, structure	14.04	13.14	13.50
Chewiness	13.08	14.25	14.10
Odour	7.01	7.13	6.94
Taste	5.68	6.00	6.56
Total score	43.36	44.40	45.23

Conclusions

Cookies can be made as gluten-free products by using rice flour. Nutritive and sensory properties of cookies with rice flour can be enriched by using other ingredients such as almonds and dried fruit.
Acidity, moisture content, dry matter content and water holding capacity of rice flour were within the expected range and appropriate values.
Acidity was changed according to the added components to the dough or the cookies, and the results obtained had the appropriate values. The highest acidity was in the dough and cookie sample 2 and the lowest acidity was in the cookie sample 1.
Considering the moisture content of the dough and cookie samples, the highest moisture content was in the control dough and cookie sample, and the lowest was in dough and cookie sample 2. According to that, dry matter content was the highest in the dough and cookie sample 2, and the lowest in the control dough and cookie sample.
The control sample only had the higher score for the sensory properties of hardness, structure and baking; while for all other properties the control sample was rated worse.

The highest total score was in sample 2 (with addition of the mixture of dried fruit). The lowest total score was in the control sample (without other ingredients).
The difference in the final score for all 3 samples was not large, but it showed that the addition of the almonds and dried fruit mixture improved sensory properties.

References

Chun, S.Y., Yoo, B. (2004): Rheological behaviour of cooked rice flour dispersions in steady and dynamic shear, Journal Food Engineering 65:363-370.

Grujić, S. (2015): Senzorna ocjena kvaliteta i prihvatljivosti prehrambenih proizvoda, Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet Banja Luka, Banja Luka, Bosnia and Herzegovina.

Hawa, A., Neela, S., Kumela, D. (2018): Functional, physical and sensory properties of cookies prepared from okara, red teff and wheat flours, Croatian Journal of Food Science and Technology, 10 (1) 23-32.

Kaluđerski, G., Filipović, N. (1998): Metode ispitivanja kvaliteta žita, brašna i gotovih proizvoda, Novi Sad, Serbia.

Kent, N. L., Evers A. D. (1994): Kent's Technology of cereals: An Introduction for Students of Food Science and Agriculture – 4th Edition, Wood head Publishing, England. pp 10-24.

Manley, D. (1998): Biscuit, Cookie and Cracker Manufacturing: Manual 1 Ingredients, Wood head Publishing Limited, England.

Mayo Clinic Staff (2019, February 13): Celiac disease, Retrieved from: https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/celiac-disease/symptoms-causes/syc-20352220.

Pratima, A., and Yadave, M. C. (2000): Effect of incorporation of liquid dairy by-product chemical characteristic of soy fortified biscuits, J. Food Sci. Tech. 37, 158–161.

Radovanović, R. and Popović-Raljić, J. (2001): Senzorska analiza prehrambenih proizvoda, Beograd-Novi Sad, Serbia.

Wheat Foods Council (2007): Grains of truth about cookies – revised 2007, Wheat Foods Council, Parker, CO, USA.

Original sientific paper

Chemical and sensory properties of red wines from Baranja vineyards

Nebojša Kojić[1*], Lidija Jakobek[2]

[1]*Vupik d.d., Sajmište 113c, HR-32000 Vukovar, Croatia*
[2]*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia*
[*]*Corresponding author: nkojic@ptfos.hr*

Summary

The aim of this paper was to compare the chemical and sensory properties of the Cabernet sauvignon, Frankovka, Merlot and Pinot noir wines over a period of one year. The following chemical parameters were examined in wines: alcohol, total acid, volatile acid, total dry extract, specific weight and free and total sulfur dioxide (SO_2). The sensory evaluation was performed by a 100-point method. The results showed that certain chemical parameters such as SO_2 decreased over time, and volatile acids as well as total acids, grow. Measurements showed that alcohol as a quality parameter in a slight decline as well as specific weight, considering that red wines are subject to deposition over time, which has an impact on the content of total dry extract. Also, since red wines evolve over time, all wines have got a bit higher rating than at the beginning. Expressed in points, the wines were rated as quality wines.

Keywords: chemical properties, sensory properties, red wines

Introduction

The quality of wine can be evaluated on the basis of physico-chemical parameters of wine like the amount of alcohol, total acids, volatile acids, total dry extract, specific weight and free and total SO_2 or according to sensory properties of wine (odor, taste, appearance or color). Interconnection between those parameters is also important (Daničić, 1985).

Alcohol content is not always crucial (higher or lower percentage), but its relationship with total acidity, total dry extract and odor can be important. If this relationship is harmonious, wine is harmonious. Total acids play an important role in the formation of a refreshing taste of wine. For wines containing less than 4 g l^{-1} of total acids, there is a suspicion of adulteration. The amount of volatile acids is usually between 0.4 and

0.8 g l^{-1}. Red wines have slightly more volatile acids than white wine. The amount of volatile acids exceeding 0.8 g l^{-1} indicates that the wine might not be for consumption. Wines with a higher amount of total dry extract have rounded taste. The total dry extract and the specific weight are connected: larger amount of total dry extract means higher specific weight. Sulfur in wine can acts as an antiseptic and keeps the wine from degradation. Maximum quantities in the wine must not exceed 30 mg l^{-1} or 160 mg l^{-1} for total sulfur, according to the Guidelines for wine (2005).
Sensory properties including color, clarity, aroma and taste of wine can depend on the amount of alcohol, acids or total dry extract (Daničić, 1985).
The primary objective of packaging is to protect and retain, as much as possible, the initial quality of wine. One of the main parameters affecting wine is the transfer of gases through the packaging material (Fu et al., 2009). The quality and durability of packaged wines may be different, given the different properties of the packaging (inertia, permeation, bending resistance, etc.). The influence of the package on the quality of wine was shown in earlier studies of Ghidossi et al. (2012) and Revi et al. (2014). Glass package is the best package for preserving the quality of wine since oxygen does not permeate through glass.
The aim of this paper was to determine physico-chemical parameters (alcohol, total acid, volatile acid, total dry extract, specific weight and free and total SO_2) and sensory properties of four types of red wines (Cabernet sauvignon, Frankovka, Merlot and Pinot noir) and observe the possible changes in physico-chemical and sensory properties during one year of storage in glass containers.

Materials and methods

Samples

Grapes from *Vitis vinifera* L. (Cabernet sauvignon, Frankovka, Merlot and Pinot noir), were cultivated on the slopes of the Ban's hill, Baranja vineyard county, areas of the wine-growing zone C1 of Republic of Croatia. After producing the wine in a winery, wines were bottled in glass and stored at a temperature of 15 to 18 °C. The wines were analysed after bottling and after a year of storing.
Physico-chemical analysis was performed in the wine laboratory of Vupik d.d., whereby the following parameters were determined: alcohol, total acidity, volatile acidity, total dry extract, specific weight and free and total SO_2. The instruments for measuring alcohol, volatile acidity, total dry extract and specific weight are in conformity with *O.I.V.* methods (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin - International Organization of Vine and Wine) as prescribed by Commission Regulation (European Commission) No 606/2009.

Alcohol in wine

Alcohol in wine was determined by the distillation method based on the specific weight of the distillate at 20 °C compared to the water of the same temperature. A 100 ml of wine was transferred into a 1000 ml distillation flask. The second flask of 100 ml collected the distillate. The distillation was carried out in the water vapor stream. After the distillation was completed, the flask with distillate was filled up to the mark and tempered. After that, the distillate content was slumped into a cylinder set on the Gibertini apparatus and the specific weight of the distillate was read. Based on these data alcohol amount was read.

Total acidity

Total acidity (as tartaric acid) in wine was determined by the neutralization method with 0.1 M NaOH. Shortly, in a 10 ml wine sample, a few bromothymol blue droplets were added, followed by the titration with 0.1 M NaOH with the help of a digital burette. When the sample became blue-green, the titration was completed. The consumption of NaOH in ml was multiplied by 0.75 and the total acidity was expressed as g of tartaric acid per l of wine.

Volatile acidity

Volatile acidity (as acetic acid) in wine, expressed in g l^{-1} of acetic acid, was determined by the neutralization of the sample previously distilled into the water vapor stream, with 0.1 M NaOH and the phenolphthalein (indicator). A 20 ml of the sample was pipetted in a 1000 ml flask in which distillation was carried out in the water vapor stream on Gibertini apparatus. When 250 ml of distillate was collected, a few drops of phenolphthalein were added and titrated with 0.1 M NaOH solution until the solution became pink. The amount of NaOH used was denoted by n. Thereafter, one drop of H_2SO_4 solution (1:4) and 2 ml of 1 % starch solution were added after which a free sulfur dioxide was titrated with a 0.01 M solution of iodine. Used volume is indicated by n'.
After that, a saturated sodium borate solution was then added to reappear the pink color. Total sulfur dioxide was titrated with 0.01 M iodine solution until purple color appeared. Now, used volume was indicated by n". The concentration of volatile acid (A) was calculated according to the equation 1:

$$A = 0.300 \text{ x } (n - 0.1 \text{ x } n' - 0.05 \text{ x } n'') \qquad \text{(Eq. 1)}$$

Total dry extract

The total dry extract was determined densimetric from the remainder of the distillation. The equation 2 for the calculation is shown below:

$$d_r = d_w - d_a + 1 \qquad \text{(Eq. 2)}$$

where, d_r is relative density at 20 °C / 20 °C, d_w is density of wine, d_a is density of the wine distillate.
After d_r was calculated, the result was read based on that data and was shown in g l^{-1}.

Specific weight

Specific weight (or relative density) was determined based on the specific gravity of the wine sample at 20 °C compared to the water at the same temperature. The specific weight of the wine was determined immediately after tempering, and the specific weight of the distillate after distillation and tempering. Specific weight of both wine and distillate were measured when the samples were at 20 °C. At that temperature, the specific weight of the distillate is always lower than the specific weight of the wine.

Free and total SO_2

Free and total sulfur dioxide in wine was determined by iodometric method by Ripper. The free sulfur dioxide determination was based on the addition of 50 ml of wine, 10 ml of H_2SO_4 solution (1:4) and 3 ml of a 1 % starch solution to the Erlenmeyer flask. The mixture was titrated with a 0.01 M solution of iodine to the blue color appearance, stable half a minute. The consumption of iodine solution was multiplied by factor 12.8 and the free SO_2 concentration was expressed in mg l^{-1}.
To determine total sulfur dioxide content, 50 ml of wine and 25 ml of 1 M NaOH were added to the Erlenmeyer flask. The mixture was left to stand for 15 minutes for all SO_2 to move into free form. Then 15 ml of H_2SO_4 solution (1:4) and 3 ml of 1 % starch solution were added. The mixture was titrated with a 0.01 M solution of iodine to the blue color, stable for 30 seconds. The consumption of iodine solution was multiplied by factor 12.8 and the concentration of total SO_2 was expressed in mg l^{-1}.

Sensory evaluation

Six qualified and experienced wine tasters performed sensory evaluation of wine at the time of bottling and after one year of storing. The sensory evaluation was carried out according to the method of 100 positive points. That method is based on the evaluation of individual characteristics of the wine and assigning a certain number of points. On the basis of the number of points, wine categories were formed: at least 65 points - for table wine with controlled geographical origin; at least 72 points - for quality wine with controlled geographic origin; at least 82 points - for top quality wine with controlled geographical origin (Guidelines for wine, 2014).

Results and discussion

Chemical properties

The results of physico-chemical analysis are shown in Table 1. Examined wines contained 13.05 to 13.94 % of alcohol, 4.90 to 5.95 g l^{-1} of total acids, 0.37 to 0.64 g l^{-1} volatile acids, 26 to 29.67 g l^{-1} of total dry extract, and the specific weight was from 0.99215 to 0.99407. The free sulfur content in wines was in the range from 15.36 to 32.44 mg l^{-1}, and total sulfur content from 34.2 to 102.14 mg l^{-1}. Values of physico-chemical parameters are in accordance with amounts prescribed in guidelines for wine (2005) (minimum 10.5 % alcohol, minimum 20 g l^{-1} of sugar-free extract, minimum 4 grams per liter of total acids, maximum 1.2 grams per liter of volatile acids for wines from grapes grown in C1 zone of wine producing area of Republic of Croatia). The results are also in accordance with values in earlier studies (Ergović-Ravančić et al., 2013; Artem et al., 2014; Mesić et al. 2015). All wines showed similar values of physico-chemical parameters. Physico-chemical parameters are mostly stable during one year storage (Table 1).

The content of alcohol is a reflection of the specifics of the vintage for studied wine varieties. Concentration of total acids shows that the grapes were ripe when hand-picked. Content for volatile acids highlights the well-executed vinification and good conditions for the ripening of wine, but also filling the samples up to the top of the bottle. Reduction in specific weight as well as dry extract can be described in the direction of deposition of various compounds from the wine, manifested by lower concentration in specific weight. The difference can be seen only in the decreased amount of free and total SO_2 in all studied wines. This decrease is indicative of oxydation reactions in wines during storage (Lopes et al., 2009).

According to Danilewicz et al. (2008), under wine conditions, sulphur dioxide (SO_2) mainly exists in a form of bisulphite ion which react principally with hydrogen peroxide formed when ethanol and phenolic compounds are oxidised in the presence of iron and copper. The bisulphite may also react with quinones and reduce them to the original

state, thus preventing the oxidation of wine (Oliveira et al., 2011). Further, bisulfite binds with acetaldehyde to reduce some of the oxidized odor, and small quantities of sulfur dioxide added to old, oxidized wines, often makes the wine smell and taste fresher (Wildenradt, Singleton, 1974).
Although the amount of SO_2 decreased, there was still enough free SO_2 that protects the ingredients from oxidative changes in examined wines.

Table 1. Quality parameters of the examined wines measured by *O.I.V.**

Parameter of quality	Cabernet sauvignon		Frankovka		Merlot		Pinot noir	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Alcohol (vol.%)	13.94	13.87	13.34	13.26	13.05	13.17	13.57	13.51
Total acid (g l^{-1})$^{+}$	5.10	5.20	5.40	5.65	5.80	5.95	5.00	4.90
Volatile acid (g l^{-1})$^{-}$	0.50	0.64	0.40	0.46	0.50	0.59	0.37	0.51
Total extract (g l^{-1})	26.54	26.43	29.67	28.00	26.97	26.91	26.98	26.00
Relative density (20/20 °C)	0.99215	0.99222	0.99407	0.99355	0.99336	0.99319	0.99280	0.99257
Free SO_2 (mg l^{-1})	31.80	16.64	28.10	16.24	29.06	15.36	32.44	16.92
Total SO_2 (mg l^{-1})	72.08	53.76	64.20	46.16	88.42	47.36	102.14	34.20

**OIV* is an acronym for the International Organization of Vine and Wine
$^{-}$expressed as acetic acid, $^{+}$expressed as tartaric acid. ^{1}means measuring at the beginning of the experiment, ^{2}means measuring after 12 months of storage

Table 2. The results of sensory evaluation of wines

Parameter of quality	Cabernet sauvignon		Frankovka		Merlot		Pinot noir	
	1	2	1	2	1	2	1	2
A	13.33	13.83	13.83	13.50	13.33	13.50	12.83	13.83
O	23.84	24.00	23.67	23.84	24.00	24.50	24.00	23.34
F	33.50	34.00	33.67	34.33	34.00	33.33	33.00	33.33
H	9.33	9.67	9.33	9.50	9.17	9.50	9.00	9.00
OR	80.00	81.50	80.50	81.17	80.50	80.83	78.83	79.50

A=Appearance, O=Odor, F=Flavor, H=Harmony, OR=Overall rate
Results represent mean values of the total sum of points of all 6 tasters
^{1}means measuring at the beginning of the experiment, ^{2}means measuring after 12 months of storage

Sensory properties

Table 2 presents the results of sensory evaluation. All wines are graded similarly for appearance, odor, flavor and harmony. According to these results, all wines can be classified in the category of quality wines (up to 82 points) (Guidelines for wine, 2014). After one year of storage, a slight increase in the overall rate can be seen for all wines. This could suggest the development of reactions which contribute the better sensory evaluation (Ugliano, 2013; Coetzee, du Toit, 2016).
The evolution of wine post-bottling constitutes a slow and complex process where the wine closures play a fundamental role either as a result of their oxygen permeability or as a consequence of physico-chemical interactions with constituents of wine (Somers, Pocock, 1990; Monagas et al., 2005; Suárez et al., 2007; Caillé et al., 2010).

Conclusions

In this paper were examined chemical and sensory properties of the Cabernet sauvignon, Frankovka, Merlot and Pinot noir wines over a period of one year. All wines showed similar values of physico-chemical parameters. Sulfur content in all wines over a period of one year decreases. The content of total acid in most of the examined wines is slightly increasing, while the volume of volatile acid is slightly increasing for all wines. For most of the examined wines, alcohol concentrations, specific gravity and total dry extract, slightly decreased. All wines, based on the contents of most physico-chemical parameters, according to the current guidelines, can be classified into quality wines. Sensory evaluation showed that all wines are similarly rated in the category of quality wines.

References

Artem, V., Geana, E.-I., Antoce, A.O. (2014): Study of phenolic compounds in red grapes and wines from Murfatlar wine center, *Analele Stiint Univ.* 25 (1), 47-52.

Caillé, S., Samson, A., Wirth, J., Diéval, J.-B., Vidal, S., Cheynier, V. (2010): Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling, *Anal. Chim. Acta*. 660, 35–42.

Coetzee, C., du Toit W. J. (2016)*:* Sauvignon blanc wine: Contribution of ageing and oxygen on aromatic and non-aromatic compounds and sensory composition: A Review, *S. Afr. J. Enol. Vitic*. 36 (3), 347-365.

Commission Regulation (European Commission) No 606/2009 of July 10, 2009 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices

and the applicable restrictions; Official Journal of the European Union: 24 July, 2009; L193/1.

Daničić, M. (1985): Tehnologija vina – praktikum. Poljoprivredni fakultet, Beograd-Zemun.

Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., Whelan, J. (2008): Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine, *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 128-136.

Ergović-Ravančić, M., Obradović, V., Mesić, J., Škrabal, S., Babić, J., Jakobović, S. (2013): Utjecaj ambalaže i vremena skladištenja na boju bijelog vina. In: 48th Croatian & 8th International Symposium on Agriculture Proceedings, Marić S., Lončarić Z. (ed.), Osijek, Poljoprivredni fakultet Osijek, HR, pp. 879-882.

Fu, Y., Lim, L.T., McNicholas, P.D. (2009): Changes on enological parameters of white wine packaged in bag-in-box during secondary shelf life, *J. Food Sci.* 74 (8), C608-C618.

Ghidossi, R., Poupot, C., Thibon, C., Pons, A., Darriet, P., Riquier, L., De Revel, G., Mietton-Peuchot, M. (2012): The influence of packaging in wine conservation, *Food Control*. 23 (2), 302-311.

Guidelines on amendments to the guidelines on organoleptic (sensory) assessment of wine and fruit wines (2014): Narodne novine, number 48, Zagreb, Republic of Croatia. Accessed on: 06.11.2018.

Guidelines on wine production (2005): Narodne novine, number 2, Zagreb, Republic of Croatia. Accessed on: 06.11.2018.

Lopes, P., Silva, M.A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Darriet, P., Teissedre, P.-L., Dubourdieu, D. (2009): Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle storage, *J. Agric. Food Chem.* 57 (21), 10261-10270.

Mesić, J., Obradović, V., Ergović-Ravančić, M., Svitlica, B. (2015): Utjecaj trajanja maceracije na kemijski sastav i organoleptička svojstva vina Cabernet sauvignon. In: 50th Croatian and 10th International Symposium on Agriculture Proceedings, Pospišil, M. (ed.). Zagreb, HR, pp. 539-543.

Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2005): Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle, *Eur. Food Res. Technol.* 220 (3-4), 331-340.

O.I.V. (2007): Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Vol. 1., Paris, France.

Oliveira, C.M., Ferreira A.C.S., De Freitas V., Silva A.M.S. (2011): Oxidation mechanisms occuring in wines, *Food Res. Int*. 44 (5), 1115-1126.

Revi, M., Badeka, A., Kontakos, S., Kontominas, M.G. (2014): Effect of packaging material on enological parameters and volatile compounds of dry white wine, *Food Chem.* 152, 331-339.

Somers, T.C., Pocock. K.F. (1990): Evolution of red wines III. Promotion of the maturation phase, *Vitis.* 29, 109-121.

Suárez, R., Monagas, M., Bartolomé, B., Gómez-Cordovés, C. (2007): Phenolic composition and colour of *Vitis vinifera* L. cv Merlot wines from different vintages and aging time in bottle, *Ciência Téc. Vitiv*. 22 (2), 35-44.

Ugliano, M. (2013): Oxygen contribution to wine aroma evolution during bottle aging, *J. Agric. Food Chem.* 61 (26), 6125–6136.

Wildenradt, H.L., Singleton, V.L. (1974): The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging, *Am. J. Enol. Vitic*. 25, 119-126.

Original scientific paper

Adsorption of dihydrochalcones onto β-glucan

Petra Matić*, Lidija Jakobek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia
**Corresponding author: petra.matic@ptfos.hr*

Summary

Polyphenols shows numerous bioactivities and one of them is interaction with dietary fibers. To obtain more information about these interaction, different adsorption models can be applied. In the present study, the adsorption of dihydrochalcones (phloretin and phloretin-2-glucoside) onto dietary fiber (β-glucan) was evaluated. The adsorption was carried out at 25 °C, 37 °C and 45 °C and pH 5.5 for 16 h. Non-liner Langmuir and Freundlich models were applied in order to obtain the information about adsorption process. It was shown that phloretin and phloretin-2-glucoside adsorbs on the surface of β-glucan. Fitted Langmuir model matched better to experimental data then Freundlich model. Furthermore, a slightly different behavior of the adsorption process between phloretin and phloretin-2-glucoside was found. At all tree temperatures, the β-glucan showed limited adsorption capacity for both dihydrochalcones. The affinity of β-glucan was lower at the beginning of adsorption process for phloretin at 37 °C and phloretin-2-glucoside at 45 °C, but when the sites on the β-glucan surface were covered with dihydrochalcones molecules, other molecules adsorbed more easily. Both dihydrochalones showed maximum adsorption capacity at 37 °C. Floretin showed higher adsorption capacity onto β-glucan than floretin-2-glucoside for which the sugar molecule might lowered the adsorption capacity.

Keywords: adsorption, Langmuir, Freundlich, dihydrochalcones, β-glucan

Introduction

Polyphenols are secondary plant metabolites which can be found in fruit, vegetables and their products (Bravo, 1998). Polyphenols shows many potential benefits for human health and therefore have been studied intensively. Based on their structure, different subgroups of polyphenols can be found. Dihydrochalcones are one of the subgroup of

polyphenols. They differ from other polyphenols by their open structure and different number of carbon skeleton (Tomás-Barberán and Clifford, 2000).
The main source of dihydrochalcones are apples, where dihydrochalcones such as phloretin-2-glucoside and phloretin 2' (2"-xylosyl-glucoside) are most abundant. They are present in apple skin, pulp and seeds (Tomás-Barberán and Clifford, 2000). Apples are present in everyday diet and they can be consumed in combination with cereals. Moreover, by consuming the apples and cereals, polyphenols from apples can come in contact with dietary fiber from cereals. This interaction of polyphenols with other food constituents like proteins, dietary fibers and lipids plays an important role in determining polyphenol bioactivity.
One of water soluble dietary fibers which can be found in cereals is β-glucan (Laroche and Michaud, 2007). β-glucan can interact with polyphenols and possibly carry them to the lower parts of digestive tract (Jakobek, 2015; Quirós-Sauceda et al., 2014).
The information on the interactions between polyphenols and β-glucan can be evaluated by analysing the adsorption isotherms (Babaeivelni and Khodadoust, 2013; Foo and Hameed, 2010; Marsal et al., 2012; Soto et al., 2011).
The objective of present study was to investigate interactions between polyphenols which belongs to the group of dihydrochalcones (phloretin, phloretin-2-glucoside) and β-glucan through adsorption process using non-linear adsorption models like Langmuir and Freundlich model from which adsorption parameters were calculated. Furthermore, through parameters the information about adsorption can be obtained. In addition, adsorption was performed at different temperatures (25 °C, 37 °C, 45 °C) in order to obtain more information about effect of temperature on adsorption process.
To the best of our knowledge, only few papers are describing the adsorption of polyphenols onto β-glucan (Wang et al., 2013; Gao et al., 2012; Simonsen et al., 2009; Veverka et al., 2014).

Materials and methods

Chemicals

The standards of phloretin (≥ 95 % HPLC) and phloretin-2-glucoside (≥ 99 % HPLC) were purchased from Extrasynthese (Genay, France), while barley β-D-glucan from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Methanol of HPLC grade was purchased from Avantor (Arnhem, Netherlands). A Folin–Ciocalteu reagent (p.a.), di-sodium hydrogen phosphate dodecahydrate (p.a.), and sodium dihydrogen phosphate dihydrate (p.a.) were obtained from Kemika (Zagreb, Croatia). Sodium carbonate anhydrous (p.a.) was from Gram-mol (Zagreb, Croatia).

Standards preparation

Stock solutions of 1000 mg/L of phloretin and phloretin-2-glucoside, were prepared by dissolving appropriate amount of related compounds at methanol. Stock solution of β-D-glucan was prepared in concentration of 190 mg/L in distilled water and afterwards heated at 80 °C for 15 minutes (Simonsen et al., 2009). All solutions were stored in a refrigerator at 4 °C.

Spectrophotometric method for total polyphenols (Folin - Ciocalteu method)

Total polyphenols were monitored in the adsorption process by Folin - Ciocaletau method (Singleton et al., 1999). 20 µL of dihydrochalcone standard, 1580 µL distilled water, 100 µL Folin - Ciocalteu reagent and 300 µL Na_2CO_3 (200 g/L) were added into a glass tube. Afterwards, solution was mixed by vortexing and incubated at 40 °C for 30 min in the incubator (IN 30, Memmert, Schwabach, Germany). The absorbance was measured at 765 nm against the blank solution (which contained 20 µL distilled water instead of prepared solution) with a UV-Vis spectrophotometer (Selecta, UV 2005, Barcelona, Spain). Calibration curves of dihydrochalcones were constructed by Folin - Ciocalteu method by preparing concentrations in doublets and each concentration was measured twice.

The study of adsorption between polyphenols and β-glucan

Adsorption process of dihydrochalcones and β-glucan were monitored in plastic tubes in total volume of 500 µL. Solution contained β-glucan, dihydrochalcone and a phosphate buffer (0.13 M, pH 5.5). Appropriate volume of β-glucan was added in plastic tube to produce the final concentration of 5 mg/L, then an appropriate volume of dihydrochalcones (to produce the final concentration of 25, 50, 75, 100 or 150 mg/L), and the remaining volume was from a phosphate buffer (pH 5.5). Additional concentration of phloretin was taken to achieve the adsorption equilibrium like 200 mg/L at 25 °C, and for phloretin and phloretin-2-glucoside 200 and 300 mg/L at 37 °C and 45 °C.
Adsorption was carried out for 16 h at 25°C, 37 °C and 45 °C. After 16 h, the model solutions were centrifuged through polyethersulfon membrane (Sartorius, Vivaspin 500, 10000 MWCO, 100 - 500 µL) in centrifuge (Eppendorf minispin centrifuge, Hamburg, Germany). Unabsorbed polyphenols that passed through the membrane were determined with Folin-Ciocalteau method.
Adsorption capacity was calculated (Eq. 1):

$$q_{\mathrm{e}} = \frac{(c_{\mathrm{o}} - c_{\mathrm{e}}) \cdot V_{\mathrm{m}}}{\gamma_{\mathrm{a}} \cdot V_{\mathrm{a}}} \qquad (1)$$

where:
q_e = dihydrochalcone adsorption capacity on β-glucan (mol/g),
c_o = initial concentration of dihydrochalcones in model solution (mol/L),
c_e = equilibrium concentration of dihydrochalcones in model solution (mol/L),
V_m = volume of model solution (L),
γ_a = mass concentration of β-glucan in its stock solution (g/L) and
V_a = volume of β-glucan that has been added in model solution (L).

Adsorption isotherms

Non-linear Freundlich and Langmuir isotherm model (Marsal et al., 2012; Soto et al., 2011) were applied on experimental data (q_e - dihydrochalcone adsorption capacity on β-glucan (mol/g) and c_e - equilibrium concentration of dihydrochalcones in model solution (mol/L)). Non-linear regressions were performed using MS Excel software (Microsoft Office Professional Plus 2013) and add-in called Solver (Porter et al., 2009).
Parameters of Langmuir model (K_L and q_m) were determined according to Eq. 2:

$$q_e = \frac{q_m K_L c_e}{1 + K_L c_e} \qquad (2)$$

where:
q_e = dihydrochalcone adsorption capacity on β-glucan (mol/g),
q_m = the theoretical maximum adsorption capacity of β-glucan (mol/g),
K_L = the Langmuir equilibrium constant of adsorption (L/mol) and
c_e = equilibrium concentration of dihydrochalcones in model solution (mol/L).

Parameters of Freundlich model (K_F and $1/n$) were determined according to Eq.3:

$$q_e = K_F c_e^{1/n} \qquad (3)$$

where:
q_e = dihydrochalcone adsorption capacity on β-glucan (mol/g),
K_F = the Freundlich constant indicative of relative adsorption capacity of β-glucan [(mol/g) (L/mol)$^{1/n}$],
$1/n$ = the intensity of adsorption and
c_e = equilibrium concentration of dihydrochalcones in model solution (mol/L).

Furthermore, parameters of these models were determined by minimizing the sum of squared errors (*sse* error) using the add-in called Solver, according to the Eq. 4 where $c_{e,i}$ and $q_{e,i}$ are the mean c_e and q_e values and n_i is the number of data points for the ith initial concentration level, and $f(c_e, a, b)$ is the defined non-linear model function with generic parameters a and b.

$$sse = \sum_{i=1}^{n} n_i \left[q_{e,i} - f(c_{e,i}, a, b)\right]^2 \qquad (4)$$

Results and discussion

Adsorption process between dihydrochalcones (phloretin and phloretin-2-glucoside) and dietary fiber (β-glucan) at different temperatures were investigated in this study. During the adsorption process dihydrochalcones adsorbed onto the surface of β-glucan. Adsorption isotherms were constructed by using the experimental results (adsorption capacity (q_e) and not adsorbed dihydrochalcone concentration (c_e) at equilibrium). Also, non-linear Langmuir and Freundlich model (Gao et al., 2012; Wu et al., 2011) were applied in order to obtain the constant of this model. The Freundlich model describes a multilayer adsorption (Wu et al., 2011; Marsal et al., 2012) and constant $1/n$ and K_F can be determined. The constant $1/n$ can describe the intensity of adsorption. The Langmuir model describes a monolayer adsorption at the surface of the adsorbent (Wu et al., 2011; Marsal et al., 2012; Limousin et al., 2007) and due to the Langmuir, the adsorbent has a limited adsorption capacity (Limousin et al., 2007). From Langmuir model constants, q_m and K_L, can be determined, where constant q_m describes a theoretical maximum adsorption capacity. From these models the adsorption of dihydrochalcones onto β-glucan was described.
Figure 1 presents the adsorption isotherms of dihydrochalcones on β-glucan at different temperatures, shown with nonparametric curve fits. The adsorption of phloretin and phloretin-2-glucoside could be best described by L type isotherm at all temperatures, except with S type isotherm on 37 °C for phloretin. This means that when the maximum adsorption capacity is achieved, further adsorption capacity will be the same for any higher initial concentration of polyphenols. Furthermore, the maximum adsorption capacity of β-glucan was shown for both dihydrochalcones on 37 °C.
Fig. 2 and Fig. 3 presents fitted non-linear Langmuir and Freundlich models for phloretin and phloretin-2-glucoside adsorption onto β-glucan. Moreover, both models were good for the description of adsorption process, but between them, Langmuir model gave results that are more consistent.

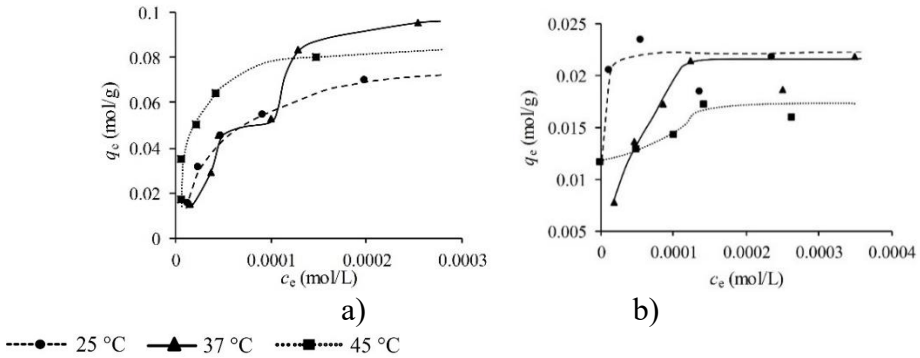


Fig. 1. Adsorption isotherms of: a) phloretin, b) phloretin-2-glucoside (q_e is the amount of dihydrochalcone adsorbed per g of β-glucan at equilibrium (mol/g), c_e is the dihydrochalcone concentration in the solution at equilibrium (mol/L)).

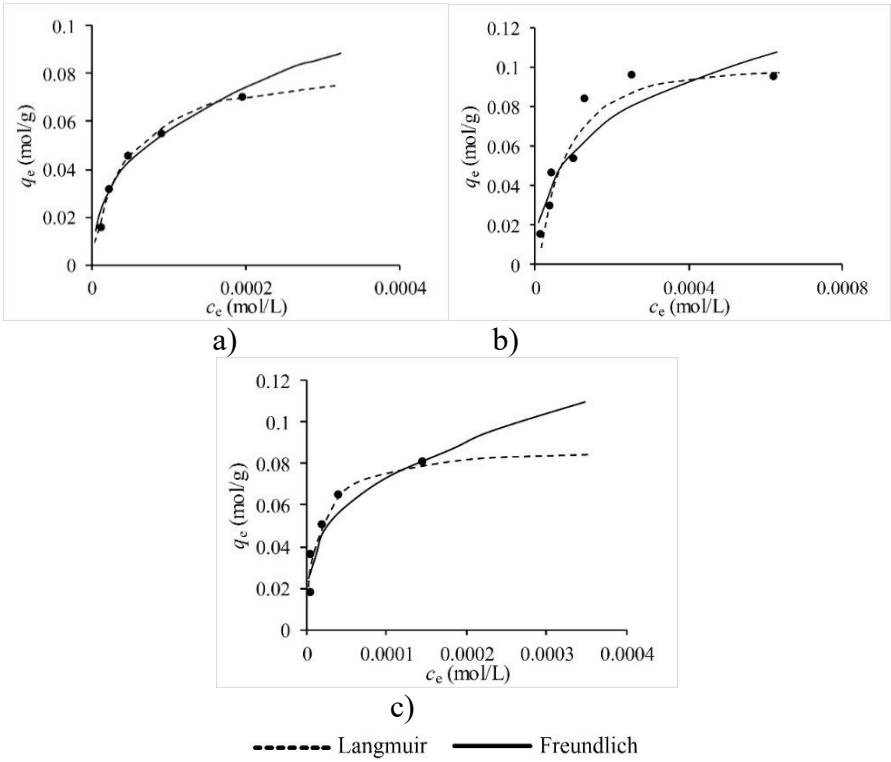


Fig. 2. Non-linear models for phloretin adsorption onto β-glucan at: a) 25 °C, b) 37 °C, c) 45 °C (q_e is the amount of phloretin adsorbed per g of β-glucan at equilibrium (mol/g), c_e is the phloretin concentration in the solution at equilibrium (mol/L)).

Parameters of the corresponding models are presented in Table 1. The sum of squared errors (sse) shows the error that was applied on the experimental data for each model. Constants $1/n$, K_F, q_m and K_L show similar trend at all temperatures: they mostly follow the order: phloretin > phloretin-2-glucoside. Also, constant q_m increased (at 37 °C) and then decreased (at 45 °C) for both dihydrochalcones, showing that the maximum adsorption capacity is on 37 °C. Constant $1/n$ describes the intensity of adsorption.
For both dihydrochalcones the $1/n$ was lower than 1 at all temperatures suggesting that the adsorption was a favourable process (Gao et al., 2013).
Overall, the adsorption intensity and capacity were the strongest for phloretin. Furthermore, the highest adsorption capacity of both dihydrochalcones were on 37 °C.

Table 1. Adsorption parameters[a] of dihydrochalcone adsorption onto β-glucan obtained from non-linear equation of Freundlich and Langmuir model at temperatures of 25 °C, 37 °C and 45 °C and pH 5.5.

	Langmuir model			Freundlich model		
Standard	q_m (mol/g)	K_L (L/mol)	sse $\cdot 10^{-4}$	$1/n$	K_F (mol/g) (L/mol)$^{1/n}$	sse $\cdot 10^{-4}$
25 °C						
phloretin	0.0877	19108.70	0.992	0.4358	2.9711	3.457
phloretin-2-glucoside	0.0208	-69304632.75	0.407	-0.0058	0.0198	0.403
37 °C						
phloretin	0.1153	12187.90	15.024	0.3495	1.4273	39.16
phloretin-2-glucoside	0.0242	28563.43	0.436	0.2342	0.1413	1.024
45 °C						
phloretin	0.0870	68428.56	5.176	0.3132	1.3322	8.940
phloretin-2-glucoside	0.0177	52175.64	0.091	0.1394	0.05267	0.124

[a] results of adsorption parameters are based on one replicates of standard concentration, each measured three times (n=3)

Different behaviour of dihydrochalcones could be connected to their chemical structures which may have influence on the adsorption capacity (Le Bourvellec et al., 2004; Wang et al., 2013). Chemical structures of phloretin and phloretin-2-glucoside are presented in Fig. 4. It is possible that glucose molecule lowered the adsorption capacity of phloretin-2-glucoside. This was also shown in literature where aglycons also adsorbed better than glycosides (Wang et al. 2013, Kammerer et al. 2007).

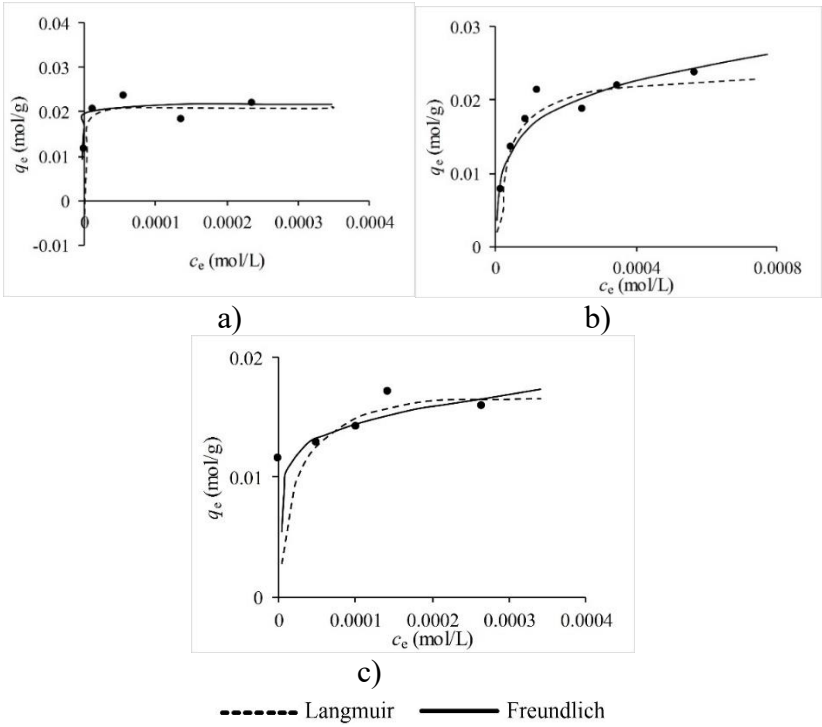


Fig. 3. Non-linear models for phloretin-2-glucoside adsorption onto β-glucan at: a) 25 °C, b) 37 °C, c) 45 °C (q_e is the amount of phloretin-2-glucoside adsorbed per g of β-glucan at equilibrium (mol/g), c_e is the phloretin-2-glucoside concentration in the solution at equilibrium (mol/L)).

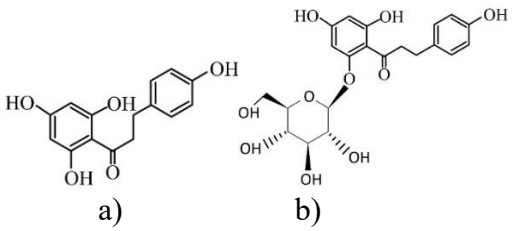


Fig. 4. Chemical structures of dihydrochalcone: a) phloretin, b) phloretin-2-glucoside.

Conclusions

In this study, the adsorption process between dihydrochalcones (phloretin and phloretin-2-glucoside) and dietary fiber (β-glucan) was conducted on different temperatures. Furthermore, dihydrochalcones adsorbed on the surface of β-glucan.

The adsorption could be described with Freundlich and Langmuir mode. Between two dihydrochalcones, phloretin showed greater affinity towards β-glucan. Moreover, it seems that glucose molecule may have an effect on the adsorption capacity of phloretin-2-glucoside. Both dihydrochalones showed maximum adsorption capacity at 37 °C. This study showed that information about interactions between dihydrochalcones and β-glucan could be obtained through adsorption models.

Acknowledgements

This work has been fully supported by Croatian Science Foundation under the project number HRZZ-IP-2016-06-6777, "The influence of dietary fiber on bioaccessibility of polyphenols by studying adsorption and simulated digestion processes, *in vitro*".

References

Bravo, L. (1998): Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr. Rev.* 56, 317-333.

Babaeivelni, K., Khodadoust, A.P. (2013): Adsorption of fluoride onto crystalline titanium dioxide: effect of pH, ionic strength, and co-existing ions, *J. Colloid Interface Sci.* 394, 419-427.

Foo, K.Y., Hameed, B.H. (2010): Insight into the modeling of adsorption isotherm systems, *Chem. Eng. J.* 156, 2-10.

Gao, R., Liu, H., Peng, Z., Wu, Z., Wang, Y., Zhao, G. (2012): Adsorption of (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) onto oat β-glucan, *Food Chem.* 132, 1936-1943.

Gao, Z. P., Yu, Z.F., Yue, L.T., Quek, S.Y. (2013): Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of polyphenols separation from kiwifruit juice using adsorbent resin, *J. Food Eng.* 116, 195-201.

Kammerer, D.R., Saleh, Z.S., Carle, R. & Stanley, R.A. (2007): Adsorptive recovery of phenolic compounds from apple juice, *Eur. Food Res. Technol.* 224: 605-613.

Jakobek L. (2015): Interactions of polyphenols with carbohydrates, lipids and proteins, *Food Chem.* 175:556-567.

Marsal, A., Maldonado F., Cuadros, S., Bautista M.E., Manich, A.M. (2012): Adsorption isotherm, thermodynamics and kinetics studies of polyphenols onto tannery shavings, *Chem. Eng. J.* 183, 21-29.

Laroche, C., Michaud, P. (2007): New developments and prospective applications for β (1,3) glucans, *Recent Pat. Biotechnol.* 1, 59-73.

Le Bourvellec, C., Renard, C.M.G.C. (2012): Interactions between polyphenols and macromolecules: quantifications methods and mechanism, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 52, 213-248.

Limousin, G., Gaudet, J.P., Charlet, L., Szenknect, S., Barthès, V., Krimissa, M. (2007): Sorption isotherms: a review on physical bases, modeling and measurement, *Appl. Geochem.* 22, 249-275.

Quirós-Sauceda, A.E., Palafox-Carlos, H., Sáyago-Ayerdi, S.G., Ayala-Zavala, J.F., Bello-Perez, L.A., Álvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L.A., González-Córdova, A.F., González-Aguilar, G.A. (2014): Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion, *Food Funct.* 5, 1063-1072.

Porter, J.F., Mckay, G., Choy, K.H. (1999): The prediction of sorption from a binary mixture of acidic dyes using single- and mixed-isotherm variants of the ideal adsorbed solute theory, *Chem Eng Sci.* 54, 5863-5885.

Simonsen, H.T., Nielsen, M.S., Christensen, N.J., Christensen, U., La Cour, T.V., Motawia, M.S., Jespersen, B.P.M., Engelsen, S.B., Møller, B.L. (2009): Molecular interactions between barley and oat β-glucans and phenolic derivatives, *J. Agric. Food Chem.* 57, 2056-2064.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M. (1999): Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagens, *Methods Enzymol.* 299, 152-178.

Soto, M.L., Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C. (2011): Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: a review, *J. Food Eng.* 105, 1-27.

Tomás-Barberán, F.A., Cliffors, M.N. (2000): Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.* 80, 1073-1080.

Veverka, M., Dubaj, T., Gallovič, J., Jorík, V., Veverková, E., Mičušík, M., Šimon, P. (2014): Beta-glucan complexes with selected nutraceuticals: synthesis, characterization, and stability, *J. Funct. Foods* 8, 309-318.

Wang, Y., Liu, J., Chen, F., Zhao, G. (2013): Effects of molecular structure of polyphenols on their noncovalent interactions with oat β-glucan, *J. Agric. Food Chem.* 61, 4533-4538.

Wu, Z., Li, H., Ming, J., Zhao, G. (2011): Optimization of adsorption of tea polyphenols onto oat β-glucan using response surface methodology, *J. Agric. Food Chem.* 59, 378-385.

Review paper

Interactions food-metal packaging

Benjamin Muhamedbegović*[1], Midhat Jašić[1], Drago Šubarić,[2]
Zoran Iličković,[1] Faik Uzunović,[3] Adnan Ćehajić [4]

[1]*University of Tuzla, Faculty of Technology, Univerzitetska 8,*
75 000 Tuzla, Bosnia and Herzegovina
**Corresponding author: benjamin.muhamedbegovic@untz.ba*
[2]*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek,*
F. Kuhača 20, 31 000 Osijek, Hrvatska
[3]*University of Zenica, Faculty of Metallurgy and Technology Zenica,*
Travnička cesta 1, 72000 Zenica, Bosna i Hercegovina
[4]*University of Bihać, Faculty of Health Studies Bihać,*
Nositelja hrvatskog trolista br. 4, 37 000 Bihać, Bosna i Hercegovina

Summary

Aluminum and iron, due to their easy forming, are used for making numerous packaging forms in which various types of food are packaged. They are also used to make plugs and lids for glass bottles and jars. Aluminum powder can be used for metallization of polymer films, and aluminum foil is an integral part of many multilayer packaging materials. Under certain conditions, migration of metal packing components into food, and disturbance of its quality in organoleptic and health terms, can occur. Ions of iron and tin can migrate from low-quality coated tin steel into a food by electrochemical corrosion. Plasticizers can migrate from organic coatings to which the plugs and lids are internally coated. Aluminum foil low-quality coated with protective varnish has the potential for migration of aluminum. Multilayer packaging can release the adhesive ingredients used to bond different foils with aluminum foil. The migration of the metals and non-metals from metal packaging into a food is subject to various tests and legislation. Requirements for the quality of materials, coatings and varnishes, as well as technological improvements to production are in continuous increase.

Keywords: metal packaging, food, migration, electrochemical corrosion

Introduction

Metals have significant applications in the food industry as *FCMs* (Food Contact Materials), of which are made various *FCAs* (Food Contact Articles). *FCAs* are for example: packaging, processing equipment, containers, dishes, cutlery, faucets, etc., which are in contact with food during production, packaging, transport, storage and food preparation.
Metals are integral parts of metal packaging such as: food and beverage cans, aerosol bottles, tubes, boxes, containers, but also plugs and lids for closing glass bottles and jars (Oldring and Nehring, 2007).
Al and *Fe* are the two most used metals for the production of metal packaging, while *Sn* and *Cr* are in certainly lesser use, mainly for tinning and chroming of steel sheets (Šumić, 2008; Muhamedbegović et al., 2015). In 2014, globally, 90% of the beverage cans were made from *Al* and the remaining 10% of steel (Rexam, 2015). Due to the difference in density (*Al* - 2.7 g/cm^3, steel - 7.86 g/cm^3), *Al* has the lower transport costs. The heat transfer is 2.4 times faster through *Al* than through steel (AAC, 2018). *Al* is 100% recyclable. Recycling *Al* requires 95% less energy than producing *Al* from its raw materials. According to *CEFLEX*[1] (2014), *Al* is in 2014 occupied 10% of the 4 million tons of flexible food packaging on the European market. *Al* foil thickness from 0.0058 to 0.1524 mm is an integral part of multilayer packaging. *Al* foil itself has a small application, while combined with plastic and paper foils is used for packing dairy products, sweets, coffee, snack products, soups and spices. Polymer films metallized with *Al* powder, enhance their barrier to gases, water vapor and light, and achieve a better aesthetic effect (Muhamedbegović et al., 2015). With 1 kg *Al* it is possible to metalize a surface of 5000 m^2 with an extremely thin layer of coating of 0.00005 mm, while from 1 kg *Al* it is possible to obtain *Al* foil of 41 m^2 and thickness 0.009 mm (Copeland and Astbury, 2010).
Stainless steel is very expensive for making steel packaging of smaller dimensions, and due to its higher strength it is more difficult to form. Therefore, various steel plates, such as tinplate white sheet and tin-free steel, are used for this purpose.
Tinplate white sheet is made of low carbon steel by coating both sides with thin *Sn* layers. *Sn* is resistant to corrosion, amphoteric and relatively non-reactive in neutral solutions (Muhamedbegović et al., 2015). This sheet has excellent barrier properties for gases, water vapor, light and odors. It tolerates high temperature treatments and can be hermetically sealed, which makes it suitable for sterile food. Tin-free steel is a steel sheet that is coated with a thin layer of *Cr*, *Al* or an enamel, instead of *Sn*. It is resistant to corrosion. Its surface has a high metallic glow, which is perfectly adhered to the protective coating. It has a good molding ability, sturdiness and is cheaper than tinplate white sheet (Fellows and Axtell, 2002; Marsh and Bugus, 2007).

[1] Industry Consortium ***Circular Economy of Flexible*** packaging EU

The alloys that come into contact with food can contain only *Al, Cr, Cu, Au, Ag, Fe, Mg, Mn, Mo, Ni, Pt, V, Si, Sn, Ti, Zn, Co* and *C*. The alloys used for soldering, and coming into contact with food, may contain no more than 0.5% *Cd* (Galić, 2010).
Under certain conditions, certain chemical substances, called migrants, can migrate from metal containers into the food. Some migrants from metal packaging are potentially dangerous to human health (Muncke et al., 2017).

Interactions food - metal packaging

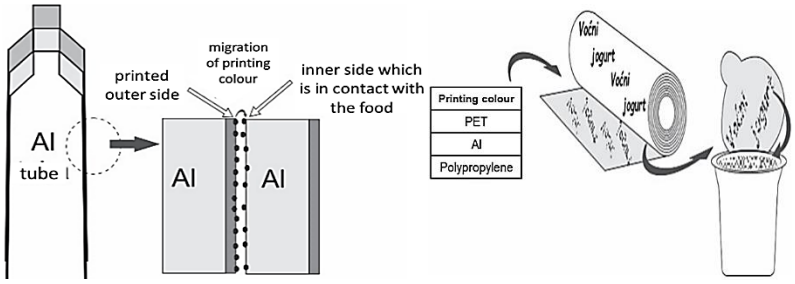
Interactions in the food-packaging-environment system can occur as:

1. Permeation (permeability) that relates to the process of diffusion of chemicals through packaging materials from the environment in food or vice versa,
2. Migration concerning the diffusion of substances from the food packaging and vice versa (Ossberger, 2009).

Castle (2007) classified food packaging materials into three types: impermeable, permeable and porous. Metals belong to impermeable materials for liquids, gases, water vapor, volatile food components, grease and light, and therefore the permeability as a type of interaction in metal packaging is not present.
Two types of migration are recognized in the *EU* legislation: specific and global or total migration. Specific migrations relate to individual migrants, and global ones to all migrating ingredients.
Migration of substances from packaging to food can take place through different mechanisms:

- Migration by diffusion involves the direct transfer of substances from the contact surface of the packaging into food.
- Gas phase migration involves the evaporation of volatile substances from the packaging, the transfer through the airspace between packaging and food, and condensation on the surface of the food, and then the diffusion to the interior of the food.
- Set – off migration of the colour of the printed outer side of the packaging by touching the inside that will later be in contact with the food. For example, in the case of *Al* tubes (Figure 1a) and winding printed multi-layer rolls which contains *Al* (Figure 1b).

This type of corrosion can occur when a layer of organic coat, coated over *Sn* is damaged or has small pores through which it will permeate H^+ from the organic acid in the beverage (citric acid and etc.) during storage, and expose *Sn* to the action of the electrolyte.



a) b)

Fig. 1. Set-off migration[2]

- Migration through electrochemical corrosion occurs if there are two metals of different electrochemical potential and electrolyte. In the case of metal cans, these conditions are met when the protective layer of Sn on the white sheet is damaged so that the electrolyte (food) can reach to the Fe base, then in the sheets joined by rivets made of another metal or in the soldered metal sheets, where the soldering alloy is of a different composition of sheet metal (Jamnički, 2011; İçöz and Eker, 2016; Stipanelov-Vrandečić, 2017; Freire et al. 2016).

Due to electrochemical activity of *Sn* electrochemical corrosion begins. The cathodic reaction is the reduction of *H* at *Sn* coating. The electrons emerge from *Sn*, which serves as an anode (Eq. (1) and (2)) into the area with rich H^+ ion on the surface, which served as a cathode (Eq. (3).

Anodic reaction: $Sn \rightarrow Sn^{2+} + 2e^-$ (1)
$Sn^{2+} \rightarrow Sn^{4+} + 2e^-$ (2)
Cathodic reaction: $2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2$ (3)

When a part of the coating is corroded, carbon steel is exposed to electrolyte and begins to corrode. In addition to reactions (1) and (2), another anode reaction (Eq. (4)) occurs (Figure 2) (Zheng et al., 2013):

$$Fe \rightarrow Fe^{3+} + 3e^- \quad (4)$$

Since large steel surfaces are exposed, *H* is produced faster and accumulates in the canal causing the swelling of the cans. The product is no longer for sale because the content of the metal in the food has reached an unacceptable level (Mannheim and Passy, 1982).

[2] Illustration: B.Muhamedbegović

Because of the reactivity of *Al, Al* cans are protected by the passivation layer on the inner surface, which has the same role as the *Sn* in the white sheet. The possible interactions of *Al* and food are similar to those of white sheet metal with the difference that the *Al* compounds are colourless or white coloured and there is no discoloration of the food (Stipanelov-Vrandečić, 2017).

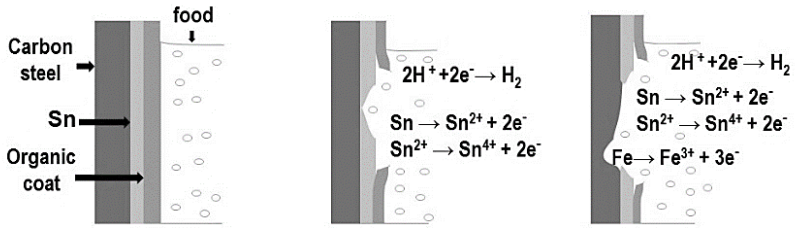


Fig. 2 Electrochemical corrosion[3]

Factors of influence on migration

The scope of migration depends on several factors: storage time and temperature, type and composition of food, surface exposure, presence of certain ions and coating characteristics.

Migration grows over time and increases the storage temperature (Mannheim and Passy, 1982). Page et al. (2003) notes that the migration of *Sn* from the non-coated white tin can of dimension 73 × 111mm filled with peaches in a syrup is relatively slow and amounts to 3 - 4 mg/kg per month, and that it should not be expected to dissolve excessive amounts of *Sn* in the prescribed shelf life. In the migration test with 3% acetic acid, migration *Al* from *Al* foil was approximately 10 times higher at 40 °C than at 5 °C after 24 hours, and after 10 days, the migration was 0.5 mg/dm^2 at 5 °C, respectively 96 mg/dm^2 at 40 °C (Gramiccioni et al., 1989).

The acidity of the food has a direct effect on the speed of migrating *Sn*. Food that have a pH less than 4.5 contain acidic which solvents metals. The final result of these processes is the appearance of "pitting" corrosion, perforation of the can and spoilage of food. In food that have a pH higher than 5 and rich in proteins, there may be an undesirable occurrence of colouration of a can, called marbling (Stipanelov-Vrandečić, 2017). Salas et al. (2012) recognize three categories of food corrosivity: non-corrosive food (milk, meat, fish, oil, fat); slightly corrosive food (food with pH 6 - 7 such as fruit syrups, wine, carbonated soft beverages, beer, soups) and very corrosive food (pH 3-5 foods such as citrus juices, jams and sour preserves, sauces and dressings, vegetables and fish milled in salted water 1 to 3% *NaCl*). Corrosivity decreases with increasing pH.

[3] Illustration: B.Muhamedbegović

The extent of migration increase with exposure of surface to corrosive foods (Dey and Agrawal, 2017; Robertson, 2012).
Nitrates, oxygen and sulphur compounds are accelerators of the process of corrosion of metal cans. They can come from the food itself. So, for example, during the sterilization process, partial degradation of the amino acids and the release of sulphur results in the formation of *Sn* and *Fe* sulphides which cause marbling. Marbling and pitting can be avoided by adequate can coatings with bleaching additives *Zn* and *Ti* oxides (Geueke, 2016). Organic coatings are also used in the production of *Al* packaging (Stipanelov-Vrandečić, 2017). The thickness of the coating from 4 to 6 µm is enough for non-aggressive foods, but for aggressive foods the required thickness is from 8 to 12 µm. Thick coatings have much lower porosity (Robertson, 2012).

Migration groups

Migrants from the packaging in which composition are metals can be, generally, classified into:

- migrants from the metal base cans
- migrants from the coatings of metal cans
- migrants from gaskets of plugs and lids of bottles and jars
- migrants from multilayer packaging which contain *Al* foil
- migrants from printings colours of *Al* tubes and multilayer packaging containing *Al*.

Migrants from the metal base cans

Metals are common migrants from uncoated cans and/or cans with scratched coating. A gradual increase in migration of *Fe* to pineapple juice was recorded in scratched cans to the highest level of 14.4 mg/L after one year of storage at room temperature. Other studies have recorded the migration of *Sn* into various foods, *Pb* and *Fe* into chickpea, *Al* into tea and beer, where *Al* has more migrated into tea due to the acidity of tea (pH 3) compared to beer (pH 4.2) (Verissimo et al., 2016; Perring and Basic-Dvorzak, 2002; Kassouf et al., 2013; Verissimo and Gomes, 2008).
The control of migration of *Fe* from the tin can, made from white sheet is very important, because the extremely low level of *Fe* migrating into the beverage (0.5 ppm) can already endanger the taste of beverages (Buculei et al., 2012).
Some studies suggest that high concentrations of *Sn* in food irritate the gastrointestinal tract and can cause stomach disorders to some people, with symptoms that include nausea, vomiting, diarrhea, abdominal cramps, abdominal overload, fever and headache (Dey and Agrawal, 2017).

The migration of *Al* from coated materials is insignificant. The migration of *Al* from non-coated materials depends on the acidity of the food. The highest migration of *Al* is in acidic food. Alkaline foods (which is less common) and foods with a higher concentrations of salt (over 3.5% *NaCl*) also increase *Al* migration. Metallized polymeric package for the packaging of acidic foods can cause adverse organoleptic changes due to the dissolution of the contact surface (Pennington and Jones, 1989; Galić, 2010).
Pb has very toxic effects on the central nervous system, especially for children. The content of *Pb* in soldered cans, where the lateral seam is formed by the alloy *Pb* and *Sn* alloy, affects on the content of *Pb* in food. The global trend is to no longer use *Pb* for soldering cans, but in some countries it is still used (Pennington and Jones, 1989; Arvanitoyannis and Kotsanopoulos, 2014).
Constituent elements migrate from alloys. The migration of these elements from alloys is generally lower in comparison with the migration of non-alloyed metals, mainly due to the fact that in most alloys the constituent elements are connected by chemical connections and create a new compound at the microstructural level (Galić, 2010).

Migrants from the coatings of metal cans

For interior protection, a large variety of can coatings are commercially available. Coatings must meet certain requirements:

- flexibility (to withstand the forming of cans)
- universality (applicability for all types of food)
- stability at high temperatures and pressure due to sterilization
- not to release own ingredients into the food
- that it does not peel off during the production of cans and shelf life, as well as after unintentional deformation of cans
- withstand aggressive foods and protect metal from corrosion
- ecological acceptability (Geueke, 2016; NAMPA, 2009).

These coatings usually contains a reactive (thermoset) resin (e.g. epoxy or polyester type) or thermosplastic (like polyvinyl chloride PVC) resin as the primary component. Typically, the coating composition contains a hardners like phenolics, anhydrides, isocyanates or amines to develop a stable network during the curing process as well as others additives (Schaefer et al., 2004 Part 1). The high diversity of coatings is caused by variations and combinations of the resins, cross-linking agents and additives (antioxidants, plasticizers, lubricants etc.). The main types of resins are: epoxy, oleoresin, vinyl, phenolic, acrylic resins, polyesters, polyolefins. Epoxy resins, based upon bisphenol A (BPA) and epichlorohydrin, are the single most widely used type of resin in used for metal packaging since 1950s until today.

On the other hand, oleoresinous-based coatings find little general usage today (Oldring and Nehring, 2007). According to the North American Metal Packaging Alliance (NAMPA) 95% of can coatings are epoxy type. Only a very small percentage of epoxy resins do not use BPA. Less than 0.1% of epoxy resins are based on bisphenol F (LaKind, 2013).

All coatings, contain constituents that may migrate into the food (LaKind, 2013). BPA and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) are well-known migrants from epoxy coatings. Goodson (2004) claims that migration of BPA occurs mainly during processing, sealing and sterilization, and less during storage or after damage. BADGE is used as intermediate during the production of epoxy coatings (Biedermann et al., 1997). BADGE and novolac diglycidyl ether (NOGE) have been used as additives to vinyl organosols to scavenge the hydrochloric acid (HCl) formed during heat treatment in the coating procedure and they can migrate into the food during retorting if the curing process is unsuccessful (Robertson, 2012). Ordinarily, the total migration of BADGE and its derivatives was less from epoxy coatings than from organosols because of its different functions in the two materials (Geuke, 2016). Because of opinion of the SCF (EC Scientific Committee on Food), which stated that the use of NOGE in organosols was not appropriate without further toxicological testing, the European metal can industry stopped using NOGE in this type of application (Oldring and Nehring, 2007).

Migrants can also be: cross-linkers, oligomers, lubricants etc. Cross-linkers as trimellitic acid (TMA), melamine and benzoguanamine (BGA) are used in epoxy- and PVC-based coatings. In 2014, migration test showed more than 1 mg TMA and its possible derivatives per kg food from cans bought at the Swiss and Austrian market (Fankhauser-Noti and Grob, 2014). Under standard retorting conditions, melamine migration up to 0.4 mg/kg food was measured from epoxy-based coatings (Magami et al., 2015). BGA migrated from PVC-coated food cans and reached levels up to 84 µg/dm 2 after 1.5 years of storage at 40°C (Vaclavikova et al., 2016).

Cyclic oligoesters have been found to be the main constituents of the overall migrate of polyester coatings (Schaefer et al., 2004 Part 2). The migration of lubricants from epoxy-anhydride coatings was 0.3 mg/dm^2 (Schaefer et al., 2003).

Many migrants from all different can coatings belong to the group of non-intentionally added substances (NIAS), which may be structurally and toxicologically characterized or even completely unknown, even by the manufacturers (Mittag et al., 2006). According to NAMPA, the can manufacturing industry supports over 1700 can coating specifications. Thus, health profiles would need to be developed for hundreds or perhaps thousands of chemicals or mixtures (LaKind, 2013).

Due to the danger of BPA, alternatives to epoxy resins have been research between oleoresin and acrylic resins, BPA free epoxy coatings, baked oleoresin enamel and PET laminates. Development of the new coating usually takes 1 to 3 years, the testing

period lasts for 2-3 years. The new coatings must pass the migration and toxicity evaluation before approval for commercial use. Although there are already several alternative coatings, none of them satisfies all demands for the "ideal" coating. In general, alternative coatings are less universal than epoxy, and many are expensive (LaKind, 2013; Geueke, 2016).

Migrants from gaskets of plugs and lids of bottles and jars

Incident from 1998 referred to the migration of *ESBO* and *ESBO*-derivatives into baby foods packaged in glass jars with metal lids, due to quantities that sometimes exceed the *TDI* (Tolerable Daily Intake). *ESBO* is used as a plasticizer in metal lids. Estimated exposure of infants from 6-12 months to *ESBO* that migrated to baby food can sometimes exceed *TDI* 4 to 5 times. *SML* (Specific Migration Limit) of 30 ppm for *ESBO* in baby food was regulated in the *EU* since November 2006, and *SML* uses 60 ppm for other foods. Semicarbazide as a sealant on press on-twist off lids is also a potential migrant (Robertson, 2012).

Migrants from multilayer packaging which contain Al foil

Adhesives and solvents used in the production of multilayer packaging with *Al* foil have intensive odours and can be felt during use of package. Although they are not in direct contact with food, they can migrate through a layer separating them from food. It is recommended to use multilayer packaging produced by dry lamination without the use of adhesives and solvents (Vujković et al., 2007).

Migrants from printings colours of Al tubes and multilayer packaging containing Al.

The printing ink migrant from multilayer packaging *UV* photoinitiator Isopropyl Thio Xanton *(ITX)* was detected in 2005 in juices containing fruit pulp, fibers and citrus oils. The *ITX* migrated from colour through a *PE* (polyethylene) layer to the inner layer of the wall with which it was in contact. PE film did not serve as an adequate barrier to the migration of *ITX* during the storage of packaging wrapped in rolls (Jamnički, 2011).

Legislation frame

In the *EU*, all *FCMs*, including metals, alloys and coatings, must in general meet the requirements:

- European Framework Regulation EC 1935/2004 on *FCMs*. Article 3 of the Regulation defines that *FCMs* are produced "so as not to transfer their food ingredients in quantities that could endanger human health or lead to an

unacceptable change in food composition or deterioration in organoleptic characteristics" and

- Regulation EC no. 2023/2006 which relates to good manufacturing practice (GMP) for *FCMs* and *FCAs*.

Regulation EC no. 1935/2004 defines a list of materials for which there should be specific directives: active and intelligent materials and articles, adhesives, ceramics, cork, rubber, glass, ion exchange resins, metals and alloys, papers and cartons, plastics, printing inks, regenerated cellulose, silicones, textiles, varnishes and coatings, and waxes and wood. However, specific directives have not yet been adopted for most materials including metals and alloys and coatings (EC Regulation 1935/2004 and EC Regulation 2023/2006).
Council of Europe Resolution CM/Res (2013) 9 recommends to the governments of the Member States to "adopt legal and other measures to reduce the health risks of exposure to certain metal ions that metals and alloys release in food during production, storage and distribution of food." This Resolution is a reference for the application of Article 3 (1) of Regulation EC 1935/2004, the Resolution proposes Specific Release Limit[4] - *SRL* mg/kg food) for metals and alloys, for 15 metals. The following values are proposed for the most used metals for packaging materials: *Al* 5 mg/kg, *Fe* 40 mg/kg, *Cr* 0.250 mg/kg, *Sn* 100 mg/kg, *Pb* 0.010 mg/kg. To facilitate the implementation of the Resolution, the Council of Europe issued a Technical guide on metals and alloys used in *FCMs* and *FCAs*, designed to assist national policy-makers to comply with national regulations. For metals and alloys, there are also standards at the *EU* and national level such as: *ISO*, Codex standard, *DIN* etc. (Commission Regulation (EC) No 1895/2005; Council of Europe Resolution CM / Res (2013) 9; Bolle, 2014).
For can coatings there are acts in several Member States (Netherlands, Belgium, Czech Republic, Greece, Italy, Slovakia, France and Spain) (Geueke, 2016).
Although varnishes and coating for cans, such as metals and alloys, are not regulated by some comprehensive *EU* regulation and are still included in non-harmonized *FCMs*, however, several chemicals from coatings that are known to migrate to food are specially regulated in the *EU*. So, for example, there are:

- Regulation 213/2018 on the use of bisphenol A in food contact lacquers and coatings from February 2018, which limits the use of *BPA* in lacquers and food contact coatings to 0.05 mg/kg of food from the previous 0, 6 mg/kg.

[4]In Resolution, the term "Specific Limit Limits" was used as the term "Specific Limit Limits" with the explanation that metals are released (released) under the laws of electrochemistry which have nothing to do with the migration of plastics, which are transmitted by diffusion-sorption laws. Measurement unit remains the same mg/kg (Bolle, 2014).

- Commission Regulation EC 1895/2005 defines *SML* for *BADGE* and its hydrolysis products *BADGE* · H_2O and *BADGE* · $2H_2O$ of 9 mg/kg of food. *SML* is based on *TDI* of 0.15 mg/kg. The second *SML* group of 1 mg/kg of food refers to the three chlorohydrins of *BADGE* (*BADGE* · *HCl, BADGE* · *2HCl, BADGE* · H_2O · *HCl*). The use of bisphenol F diglycidyl ether (*BFDGE*) and glycidyl ether novel *(NOGE*) in *FCMs* was not authorized due to a lack of toxicological data.

It is also important to mention Regulation EC 466/2001 on the establishment of maximum levels for certain contaminants in food, as amended by Commission Regulation EC 242/2004 on inorganic *Sn* in foods, where *Sn* concentrations of 200, 100 and 50 mg/kg must not be exceeded in preserved foods and beverages, and products for infants and young children (Geueke, 2016).
A study by the European Commission on non-harmonized *FCMs* in the *EU* from 2016 analysed existing regulations at the national or sectoral level. In general, the study has shown that the *FCM* sector sufficiently suffers from the current situation that shows a lack of harmonization at the *EU* level and that it needs to be addressed because regulations in Member States are different for different sectors, which Member States can face with obstacles to product movement in the markets (Simoneau et al., 2016).

Conclusion

Metals and alloys have significant applications in the food industry like *FCMs* and *FCAs*. Since there is no ideally inert *FCM*, metal packaging that comes in direct contact with food must be manufactured according to high hygiene standards and requirements prescribed by the legislation, and in that sense it must not release chemicals in food, nor react with food or affect its sensory properties. Metal packaging, from the aspect of protecting food from all external factors, is one of the safest packages, but it can also release metal from cans in food, as well as other chemicals from can coating and gaskets of metal lids. Because of this, the migration of packaging ingredients in which metals require frequent monitoring and testing of the influence of various factors on their growth, all in the interest of protecting the health of consumers.

References

AAC-Australian Aluminium Counsil https://aluminium.org.au/aluminium/packaging (12.01.2018)

Arvanitoyannis, I. S., Kotsanopoulos, K. V. (2014) Migration Phenomenon in Food Packaging. Food–Package Interactions, Mechanisms, Types of Migrants, Testing and Relative Legislation; *Food and Bioprocess Technology*; Vol. 7, No. 1, pp 21–36

Biedermann, M., Grob, K., Bronz, M., Curcio, R., Huber, M., Lopez-Fabal, F. (1996) Bisphenol-A Diglycidyl Ether (BADGE) in edible-oil-containing canned foods: determination by LC-LC-fluorescence detection. *Mitt Gebiete Lebensm Hyg*. 87

Bolle, F. (2014) Innovative approach to product testing: Metals and alloys in contact with food - How to establish compliance with European regulations and recommendations, https://www.edqm.eu/medias/fichiers/abstracts.pdf (05.01.2018)

Buculei, A., Gutt, G., Amariei, S., Dabija, A., Constantinescu, G. (2012) Study regarding the tin and iron migration from metallic cans into foodstuff during storage *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 18 (4), 299-303

Castle, L. (2007) Chemical migration in food: an overview; *Chemical Migration and Food Contact Materials*, Barnes, K. A.; Sinclair, C. R.; Watson, D. H. Ed: Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England

CEFLEX (2014) The European Food Flexible Packaging Market, https://ceflex.eu/flexible-packaging-in-europe (12.01.2018)

Commission Regulation (EC) No 1895/2005 on the restriction of use of certain epoxy derivatives in materials and articles intended to come into contact with food https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A32005R1895 (12.01.2018)

Copeland, N., Astbury, R. (2010) Evaporated aluminum on polyester: optical, electrical, and barrier properties as a function of thickness and time, AIMCAL Technical Conference 2010 Myrtle Beach, South Carolina, USA

Dey, S., Agrawal, M. K. (2017) Investigation of Corrosion Behavior of Tinplate In Fruit juice, *Int. Journal of Engineering and Technology* Vol 9 No 3, pp. 234-242

Fankhauser-Noti, A., Grob, K. (2004) Migration of trimellitic acid from epoxy anhydride can coatings into foods. Food Addit Contam. 21:711-8.

Fellows, P., Axtell, B. (2002) Appropriate food packaging: materials and methods for small businesses. Essex, U.K.: ITDG, Publishing. p 25–77

Freire, M. T. A. F., Petrus, R. R., Gatti, J. A. B., Leite, M. F. B., Kunitake, M.T., Freire, C. M. A. (2016) Food-packaging interaction on the stability of canned sweetened cupuaçu puree, *Rev. Caatinga, Mossoró*, v. 29, n. 4, p. 1006-1014

Galić, K. (2010) Metali i slitine. U: Kemijske i fzikalne opasnosti u hrani, Hengl, B. (ur.), Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek

Geueke, B. (2016) Can coatings. https://www.foodpackagingforum.org/food-packaging-health/can-coatings (05.01.2018)

Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W., Cooper, I. (2004) Migration of bisphenol A from can coatings - effects of damage, storage conditions and heating. *Food Addit Contam*. 21:1015-26

Gramiccioni, L., Milana, M. R., Maggio, A., Feliciani, R., Gesumundo, C. (1989) An experimental study about aluminium packaged food. In: Nutritional and

Toxicological aspects of food processing. Proceedings of an international symposium, Rome, April 14-16, Walker, R. and Quattrucci Eds.Taylor & Francis, London, p. 331-336.

İçöz, A., Eker, B. (2016) 1st International conference on Quality of Life; June 2016, Center for Quality, Faculty of Engineering, University of Kragujevac

Jamnički, S. (2011) Evaluacija prikladnosti različitih klasa recikliranih papira za izradu zdravstveno ispravne prehrambene ambalaže, Doktorski rad, Grafički fakultet Zagreb

Kassouf, A., Chebib, H., Lebbos, N., Ouaini, R. (2013) Migration of iron, lead, cadmium and tin from tinplate-coated cans into chickpeas, *Food Addit Contam A*. 30:1987-92

LaKind, J.S. (2013) Can coatings for foods and beverages: Issues and options. *Int J Technol Policy Manag*. 13:80-95

Magami, S.M., Oldring, P.K., Castle, L. Guthrie, J.T. (2015) Migration of melamine from thermally cured, amino cross-linked can coatings into an aqueous ethanol food simulant: aspects of hydrolysis, relative reactivity and migration. *Food Addit Contam A*. 32:403-9

Mannheim, C., Passy, N. (1982) Internal corrosion and shelf-life of food cans and methods of evaluation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. & Nutn*. 17: 371-407

Marsh, K., Bugusu, B. (2007) Food Packaging Roles, Materials, and Environmental Issues, *J. of Food Science,* 72(3), 39-55

Mittag, N., Förster, S., Hoppe, S., Simat, T. J., Sehr, A., Renz, S., Vobach, M., Kammann, U. (2006) Bioassay guided analysis of migrants from can coatings. *J Verbrauch Lebensm*.1:345-53

Muhamedbegović, B., Juul, N.V., Jašić, M. (2015) Ambalaža i pakiranje hrane, Tehnološki fakultet Tuzla

Muncke, J., Backhaus, T., Geueke, B., Maffini, M.V., Martin, O.V., Myers, J.P., Soto, A.M., Trasande, L., Trier, X., Scheringer, M. (2017) Scientific Challenges in the Risk Assessment of Food Contact Materials. *Environ Health Perspectv*.125(9); 2017 Sep

NAMPA (2009) Considerations in development of can coatings technologies. http://www.metal-pack.org/docs/pdf/00050231 (05.01.2018)

Oldring, P.K.T., Nehring, U. (2007) Metal Packaging For Foodstuffs; ILSI Europe a.i.s.b.l. Avenue E. Mounier 83, Brussels, Belgium

Ossberger, M. (2009) Migration from Food Contact Materials. In Encyclopedia of Packaging Technology, 3rd edition, ed. K. L. Yam, Willey

Page, B., Edwards, M., May, N. (2003) Metal Cans. *In*: *Food Packaging Technology (Eds: Coles R, Mcdowell D and Kirwan MJ)*, Blackwell Publishing, Oxford, UK

Pennington, J.A.T. and Jone, J.W. (1989) Dietary intake of aluminium. Aluminium and Health –A critical review. Gitelman, p. 67-70

Perring, L., Basic-Dvorzak, M. (2002) Determination of total tin in canned food using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. Anal Bioanal Chem. 374:235-43

Rexam (2015) Rexam Annual Report http://www.rexam.com/files/reports/ (15.12.2017)

Rezolucija Savjeta Evrope CM / Res (2013) 9

Robertson, G.L. (2012) Food Packaging: Principles and Practice, Third Edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA

Salas, B. V., Wiener, M.S., Stoytcheva, M., Zlatev, R., Beltran, M.C. (2012) Corrosion in the Food Industry and Its Control. In: Food Industrial Processes - Methods and Equipment, Salas B. V. (ed); InTech Rijeka; Croatia

Schaefer, A., Kuchler, T., Simat, T.J., Steinhart, H. (2003) Migration of lubricants from food packagings. Screening for lipid classes and quantitative estimation using normal-phase liquid chromatographic separation with evaporative light scattering detection. *J Chromatogr A*. 1017:107-116

Schaefer, A., Maß, S., Simat, T. J., Steinhart, H. (2004) Migration from can coatings: Part 1. A size-exclusion chromatographic method for the simultaneous determination of overall migration and migrating substances below 1000 Da. *Food Additives & Contaminants*, Vol. 21, No. 3, pp. 287-301

Schaefer, A., Ohm, V.A., Simat, T.J. (2004): Migration from can coatings: Part 2. Identification and quantification of migrating cyclic oligoesters below 1000 Da. *Food Additives & Contaminants*, Vol. 21, No. 4, pp. 4, 377-89

Simoneau, C., Raffael, B., Garbin, S., Hoekstra, E., Mieth, A, Lopes, J. A, Reina, V. (2016): Non-harmonised food contact materials in the EU: Regulatory and market situation, European Commission

Stipanelov-Vrandečić, N. (2017) Ambalaža (skripta), Kemijsko tehnološki fakultet, Split

Šumić, Z. (2008): Ambalažni materijali, http://www.tehnologijahrane.com (12.01.2018.)

Uredba 1935/2004/EZ

Uredba o dobroj proizvođačkoj praksi za materijale i predmete koji dolaze u neposredan dodir s hranom (2023/2006/EZ)

Vaclavikova, M., Paseiro-Cerrato, R., Vaclavik, L., Noonan, G. O., DeVries, J., Begley, T. H. (2016): Target and non-target analysis of migrants from PVC-coated cans using UHPLC-Q-Orbitrap MS: evaluation of long-term migration testing. *Food Addit Contam A*. 33:352-63

Verissimo, M.I., and Gomes, M.T. (2008): Aluminium migration into beverages: are dented cans safe? *Sci Total Environ*. 405:3858

Verissimo, M.I., Silva, R.P., and Gomes, M.T. (2016) Iron migration from undamaged and dented juice tinplate cans. *J Sci Food; Agric*. 96:3042-6

Vujković, I., Galić, K. i Vereš, M. (2007): Ambalaža za pakiranje namirnica, Tektus, Zagreb

Zheng, X., Xia, D., Wang, H. and Fu, C. (2013): Detection of the corrosion degree of beverage cans cans using a novel electrochemical sensor, *Anti-Corrosion Methods and Materials.* 60 (3), 2013, 153–159

Sekcija: Medicinska kemija i farmacija
Session: Medical Chemistry and Pharmacy

Izvorni znanstveni rad

Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na dijabetes tipa 2 u C57BL/6 miša

Irena Landeka Jurčević*[1], Tajana Frančić[1], Irena Fabijančić[1], Verica Dragović-Uzelac[1], Domagoj Đikić[2]

[1]*Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia*
**Dopisni autor: ilandeka@pbf.hr*
[2]*Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia*

Sažetak

Brojni dokazi upućuju na to da dijeta bogata polifenolnim spojevima ima sposobnost zaštite od dijabetesa. Istražen je učinak ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa* L.) na lipidnu peroksidaciju i antioksidacijski status kod C57BL/6 miša kod kojih je dijabetes tipa 2 izazvan pomoću aloksana. Istraženi biomarkeri oksidacijskog stresa u organima (jetra, bubreg) bili su malondialdehid (MDA) i reducirani glutation (GSH). Ekstrakt cvijeta trnine u dozi od 25 mg/kg tjelesne mase na C57BL/6 miša s dijabetesom tijekom 10 dana je uzrokovao statistički značajno smanjenje povišenih MDA vrijednosti, istovremeno povećavajući aktivnost antioksidacijskog enzima (GSH). U jetrenom i bubrežnom tkivu miševa s dijabetesom statistički značajno povećanje MDA sugerira da dijabetični miševi imaju povećanu koncentraciju slobodnih radikala u usporedbi sa zdravim miševima. Niže aktivnosti GSH u jetri i bubrezima tijekom dijabetesa mogu biti posljedica inaktivacije ili inhibicije enzima i to zbog povećane proizvodnje aloksan-generiranih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Rezultati ukazuju da ekstrakt cvijeta trnine reducira slobodne radikale povezane s oksidacijskim stresom u eksperimentalno izazvanom dijabetesu.

Ključne riječi: trnina, dijabetes tipa 2, malondialdehid (MDA), glutation (GSH)

Uvod

Trnina (Prunus spinosa L.) je divlji šumski listopadni grm iz porodice ruža (*Rosaceae*). Za trninu je karakteristično da grančice i ogranci završavaju crnim trnovima, dok se cvjetovi trnine, koji su ugodna i blaga mirisa, najčešće javljaju pojedinačno na grančicama. U Europi je ova biljka poznata od davnina, prvo kao

izvor hrane, a potom i zbog terapeutskih i medicinskih svojstava (Poonam i sur., 2011).

Dijabetes tipa 2 jedan je od najznačajnijih javnozdravstvenih problema na svijetu. Uključujući nedijagnosticirane slučajeve dijabetesa, očekuje se da će broj oboljelih dosegnuti 438 milijuna do 2030. godine (oko 7,5% odrasle populacije) (Wild i sur., 2004). Dijabetes je skupina metaboličkih poremećaja koju karakterizira povišena razina glukoze u krvi (hiperglikemija) i nedostatnost proizvodnje ili djelovanja inzulina koje proizvodi gušterača (Maritim i sur., 2003). Uz hiperglikemiju i drugi čimbenici imaju veliku ulogu u patogenezi dijabetesa, poput hiperlipidemije i oksidacijskog stresa (Kangralkar i sur., 2010). Vjeruje se da oksidacijski stres ima važnu ulogu u razvoju vaskularnih komplikacija kod dijabetesa (osobito dijabetesa tipa 2) (Pham-Huy, 2008). Formiranje slobodnih radikala neenzimskom glikacijom proteina, oksidacijom glukoze i povećanom lipidnom peroksidacijom kod dijabetesa dovodi do oštećenja enzima kao i povećane otpornosti na inzulin zbog oksidacijskog stresa (Maritim i sur., 2003).

U mnogim istraživanjima ukazano je na vezu između dijabetesa i oksidacijskog stresa. Vjeruje se da slobodni radikali imaju važnu ulogu u oštećenju lipida, proteina i DNA. Različita patološka stanja su inducirana oksidacijskim stresom kao što su reumatoidni artritis, dijabetes melitus i tumori (El Faramawy i Rizk, 2011). Dijabetes dovodi do poremećaja u lipidnom profilu zbog čega stanice pokazuju veću osjetljivost na peroksidaciju lipida (Patricia, 2009). Kritički biomarker oksidacijskog stresa je lipidna peroksidacija koja se najviše istražuje kada je u pitanju ROS (Pasaoglu i sur., 2004). Dijabetes izaziva promjene u enzimatskim aktivnostima glutation peroksidaze i glutation reduktaze. Svaka promjena u razinama ovih enzima učinit će da stanice postanu sklonije oksidacijskom stresu (Maritim i sur., 2003).

Brojna istraživanja upućuju na to da dijeta bogata polifenolima može spriječiti razvoj dijabetesa, kao i usporavanje komplikacija dijabetesa (Mulvihill i sur., 2011; Zang i sur., 2006). Funkcionalna hrana predstavljaja novi terapijski pristup za sprječavanje ili ublažavanje bolesti uzrokovane prehranom (Magrone i sur., 2013). Liu i sur. (2014) su proveli meta-analizu o povezanosti konzumiranja flavonoida i rizika od dijabetesa tipa 2. Rezultati sugeriraju da je unos ukupnih flavonoida povezan s nižim rizikom od dijabetesa (Liu i sur., 2014). Istraživanje provedeno od strane van Dam i sur. (2010) pokazuje da unos kvercetina i rezveratrola optimizira test tolerancije na glukozu kod štakora, jetrene glukokinaze kao i aktivnost heksokinaze, te lipidni profil. Isto tako, u istraživanju dugotrajne konzumacije čaja u starije populacije (65 do 100 godina), s mediteranskih otoka tijekom 2005.-2007., zaključeno je da je dugotrajna konzumacija čaja povezana s nižom glukozom u krvi i smanjenom prevalencijom dijabetesa (Panagiotakos i sur., 2009). Potrošnja borovnica koje sadrže antocijane također je bila povezana sa smanjenim rizikom od dijabetesa tipa 2 u finskoj kohortnoj studiji (Knekt i sur., 2002).

Ukratko, postoje značajni dokazi koji sugeriraju da bi konzumacija polifenola u hrani mogla smanjiti rizik od dijabetesa tipa 2 i/ili dijabetičkih komplikacija. Međutim, kako dijetetski polifenoli utječu na glavne krajnje točke dijabetesa tipa 2 potrebna su daljnja temeljna i klinička istraživanja za procjenu relevantnosti polifenola u liječenju dijabetesa tipa 2.
Cilj ovog rada bio je ispitati antioksidacijski utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine (*Prunus spinosa L.*) na dijabetes tipa 2 u C57BL/6 miša.

Materijali i metode

Pokusne životinje

Pokusi su provedeni na životinjama iz jedinice za uzgoj laboratorijskih životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu. Pokusne životinje bile su C57BL/6 miševi u dobi od tri mjeseca. Životinje su hranjene tijekom 10 dana. Po osam životinja je bilo smješteno u kavezu, na temperaturi od 22°C, uz neograničen pristup hrani i vodi. Životinje su hranjene komercijalno dostupnom hranom koja je životinjama bila dostupna *ad libitum*. Životinje su držane u slijedećim uvjetima: 12 sati svijetla i 12 sati tame pri 60% vlažnosti. Hrana kojom su hranjeni miševi je standardna hrana za miševe 4RF21 (Mucedola, Italija, oblik 12 mm), a sadrži pšenicu, kukuruz, soju, riblji ekstrakt, dikalcijev fosfat, kalcijev karbonat, natrijev klorid, sojino ulje, kvasac i ljuske lješnjaka. Održavanje i njega svih pokusnih životinja provedena je u skladu sa smjernicama koje su na snazi u Republici Hrvatskoj (Zakon o dobrobiti životinja, NN #135, 2006 i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u pokusima ili druge znanstvene svrhe, NN #47, 2011), a provodi se u skladu s Uputama za njegu i korištenja laboratorijskih životinja, DHHS Publ. #(NIH) 86-123.

Indukcija (izazivanje) dijabetesa sa Aloksan-monohidratom u C57BL/6 miša

Aloksan-monohidrat injektiran je intraperitonealno u dozi od 150 mg/kg tjelesne mase. Indukcija dijabetesa izazvana aloksanom potvrđena je mjerenjem razine glukoze u krvi. Miševi s razinom glukoze iznad 140 mg/dl odabrani su za daljnje istraživanje.

Eksperimentalne grupe životinja

Eksperimentalne grupe su činile četiri grupe životinja (muški miševi tjelesne mase 30±2,51 g; n = 8 životinja po grupi) i to: KO – Kontrolna grupa (0,3 mL fiziološke otopine); ECT – ekstrakt cvijeta trnine – *Prunus spinosa* L. (25 mg/kg/dan); T2DM – dijabetes melitus tip 2; ECT + T2DM – ekstrakt cvijeta trnine + dijabetes melitus

tip 2. Unos ekstrakta cvijeta trnine je životinjama apliciran intraperitonalno (ip). Životinje su žrtvovane 10.-ti dan pokusa te su uzeti organi jetre i bubrega za daljnju analizu. Životinje su anestezirane eterom te su iskrvarene punkcijom iz srca bez antikoagulansa. Bubrezi i jetre su izolirani iz životinja odmah nakon skupljanja uzorka krvi, izvagani te pohranjeni na -80 ºC za daljnju analizu.

Priprema tkiva (jetra i bubreg) za određivanje antioksidacijskih enzima

Tkivo organa homogenizira se u 50 mM fosfatnom puferu pH 7 u omjeru 1:10 (w/v). Organi se potom homogeniziraju na ultrazvučnom homogenizatoru u 3 ciklusa od po 30 sekundi uz stanku od 10 sekundi između ciklusa. Uzorke je potrebno cijelo vrijeme držati na ledu. Homogenate bubrega i jetre potom je potrebno centrifugirati pri 20 000 x g tijekom 15 min na 4 ºC. Homogenizacija tkiva je provedena unutar dva dana od žrtvovanja životinja.

Mjerenje aktivnosti reduciranog glutationa

Postupak određivanja koncentracije GSH se temelji na reakciji GSH i DNTB-a (5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojeva kiselina). DNTB je poznat i kao Ellmanov reagens, a koristi se pri kolorimetrijskom određivanju tiolnih skupina u biološkim uzorcima. Ellmanov reagens uzrokuje oksidaciju GSH pri čemu dolazi do stvaranja veće količine 2-nitro-5-tiobenzoatne kiseline (NTB) i male količine glutation disulfida (GSSG). NTB je žuto obojeni produkt koji se mjeri na Plate Reader-u pri 412 nm, a na temelju čega se indirektno dobiva podatak o koncentraciji GSH (Eyer i sur. 2003). Koncentracija je izračunata prema formuli:

$$C = \Delta A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg/mL) \qquad (1)$$

gdje ε (DTNB) iznosi 8,22/mM cm. Koncentracija proteina u uzorku izmjerena je metodom po Lowryju (Lowry i sur., 1951). Aktivnost enzima reduciranog glutationa (GSH) izražena je kao mU/mg.

Mjerenje lipidne peroksidacije

Lipidna peroksidacija je određena modificiranom metodom po Jayakumar i sur. (2008). Metoda se temelji na mjerenju koncentracije malondialdehida (MDA) koji je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije. Malondialdehid reagira sa tiobarbiturnom kiselinom i stvara kromogen koji je moguće mjeriti spektrofotometrijski. Uzorcima jetre i bubrega mase 100 mg doda se 1 mL 50 mM fosfatnog pufera (pH 7.0) i homogenizira ultrazvučnim homogenizatorom Bandelin Sonoplus HD2070 (Bandelin, Njemačka) upotrebom sonde MS73 (Bandelin,

Njemačka), snagom od 10%. Homogenati su centrifugirani centrifugom Mikro 200R (Hettich, Njemačka) 15 minuta pri brzini od 10 000 rpm. 200 µL supernatanta se pomiješa sa 200 µL 8,1%-tne vodene otopine SDS-a, 1,5 mL 20%-tne vodene otopine octene kiseline (pH 3.5) i 1,5 mL 0.81%-tne vodene otopine tiobarbiturne kiseline. Smjesa se zagrijava 60 minuta pri temperaturi od 95 ºC. Ohlađenim uzorcima izmjeri se apsorbancija pri 532 nm spektrofotometrom Libro S22 (Biochrom, Ujedinjeno Kraljevstvo). Koncentracija je izračunata prema formuli:

$$C\ (MDA) = A \times V_{uzorka}\ (mL) / \varepsilon \times V_{reakcijske\ smjese}\ (mL) \times C_{proteina}\ (mg/mL) \quad (2)$$

gdje: ε iznosi 1,56x105 1/M cm. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao nmol MDA/mg proteina.

Statistička analiza

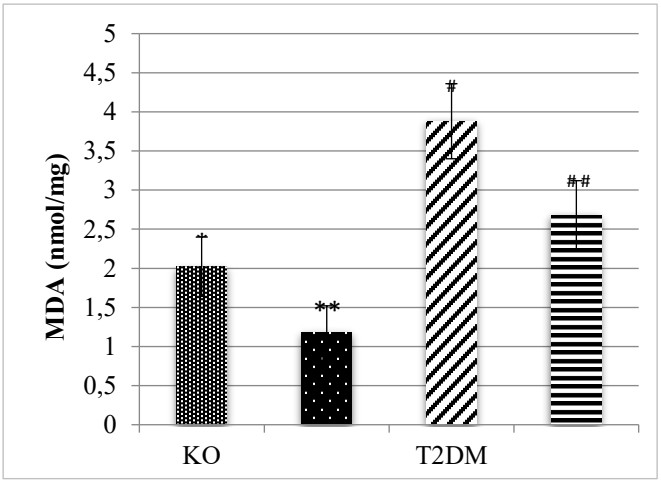
Statistička analiza podataka napravljena je koristeći StatSoft Statistica 7.0 (Tulza, Sjedinjenje Američke Države). Dobiveni podaci izraženi su kao srednja vrijednost ± standardna devijacija srednje vrijednosti. Višestruka usporedba netretiranih i tretiranih skupina miševa napravljena je ANOVA analizom varijance. Interval pouzdanosti podešen je na $p<0,05$. Post-hoc analize su napravljene koristeći Tukey test kako bi ustanovili razlike između pokusnih grupa. Analiza je provedena pomoću SPSS verzija 17 (SPSS Inc, Chicago, IL).

Rezultati i rasprava

Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na lipidnu peroksidaciju u homogenatima tkiva jetre i bubrega u dijabetičnih C57BL/6 miševa

Proces lipidne peroksidacije je oblik oksidacijske promjene polinezasićenih masnih kiselina koji rezultira nastankom citotoksičnih produkata, a jedan od njih je malondialdehid (MDA). MDA je prihvaćeni biljeg lipidne peroksidacije te se koristi u evaluaciji oksidacijskog stresa (Bukan i sur., 2003). Na slici 1. i 2. prikazani su rezultati nefroprotektivnog i hepatoprotektivnog utjecaja polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na aktivnost MDA u homogenatu tkiva bubrega i jetre zdravih i dijabetičnih C57BL/6 miševa.
Analizom podataka zapaženo je statistički značajno smanjenje (ANOVA, $P<0,05$) koncentracije MDA 10. dana tretmana kod skupine tretirane ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u tkivu bubrega (1,18±0,38 nmol/mg) u odnosu na kontrolnu skupinu (2,02±0,41 nmol/mg) (slika 1), kao i jetre (1,89±0,22 nmol/mg) u odnosu na kontrolnu skupinu (2,55±0,32 nmol/mg) (slika 2). Također je zapaženo statistički

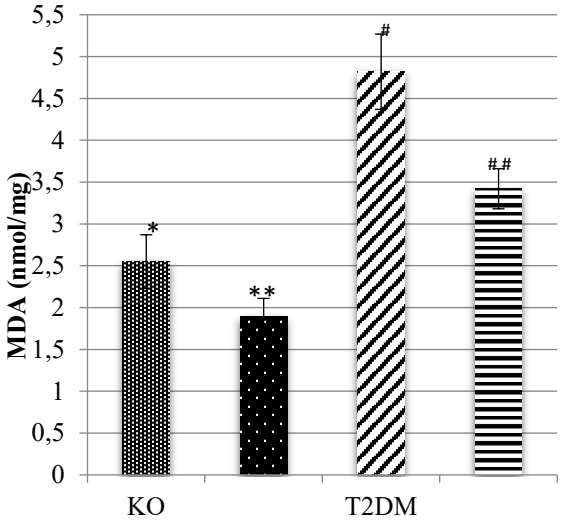
značajano smanjenje koncentracije MDA dijabetičnih miševa tretiranih ekstraktom cvijeta trnine (ECT+T2DM) u tkivu bubrega (2,68±0,46 nmol/mg) u odnosu na dijabetičnu skupinu (3,88±0,42 nmol/mg) (slika 1), kao i jetre (3,42±0,48 nmol/mg) u odnosu na dijabetičnu skupinu (4,82±0,45 nmol/mg) (slika 2).



Slika 1. Koncentracija MDA u tkivu bubrega C57BL/6 miša, zdravih, dijabetičnih i grupa tretiranih trninom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – Srednje vrijednosti su značajno različite; p<0,05 (ANOVA).
KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; T2DM – dijabetes tip 2; ECT+T2DM - ekstrakt cvijeta trnine+dijabetes tip 2.

Fig. 1. MDA concentration in the kidney tissues of C57BL/6 mouse, healthy, diabetic, and trnina treated groups. Results are expressed as mean value±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – The mean values are significantly different; p<0.05 (ANOVA).
KO - control group; ECT - Trnina flower extract; T2DM – type-2 Diabetes Mellitus; ECT+T2DM - Trnina flower extract + type-2 Diabetes Mellitus.

Slobodni radikali, zbog induciranog dijabetesa, izazivaju oksidacijski stres u stanicama. Lipidi koji su prisutni u membrani stanice sadrže veliki broj polinezasićenih masnih kiselina koje su sklone lipidnoj peroksidaciji. Kemijska modifikacija aminokiselina u proteinima tijekom lipidne peroksidacije rezultira formiranjem lipooksidacijskih produkata koji služe kao markeri oksidacijskog stresa *in vivo*. MDA reagira s proteinima krvnih žila npr. s kolagenom i dovodi do promjena u njegovoj strukturi (Tiku i sur., 2003). Mnoge su studije pokazale da je njegova koncentracija znatno viša kod dijabetesa (Slatter i sur., 2000).



Slika 2. Koncentracija MDA u tkivu jetre C57BL/6 miša, zdravih, dijabetičnih i grupa tretiranih trninom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – Srednje vrijednosti su značajno različite; p<0,05 (ANOVA).
KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; T2DM – dijabetes tip 2; ECT+T2DM - ekstrakt cvijeta trnine+dijabetes tip 2.

Fig. 2. MDA concentration in the liver tissues of C57BL/6 mouse, healthy, diabetic, and trnina treated groups. Results are expressed as mean value±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – The mean values are significantly different; p<0.05 (ANOVA).
KO - control group; ECT - Trnina flower extract; T2DM – type-2 Diabetes Mellitus; ECT+T2DM - Trnina flower extract + type-2 Diabetes Mellitus.

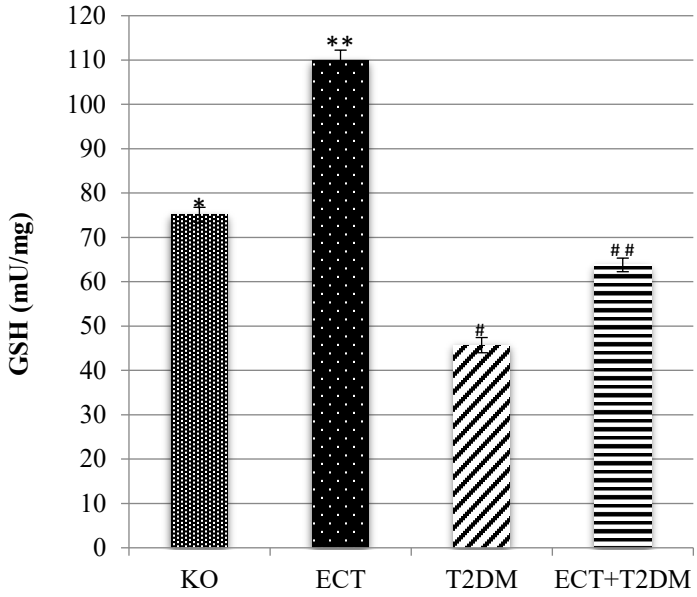
Dugotrajna konzumacija ekstrakta grožđa bogatog rezveratrolom regulira ekspresiju ključnih proinflamatornih citokina kod dijabetičara tipa 2 (Tome-Garniero i sur., 2013). Polifenoli ekstrahirani iz sjemena crnog grožđa mogu poboljšati dislipidemiju i komplikacije očiju u eksperimentalnom dijabetesu (Badescu i sur., 2012). U radu Faure i sur. (1993) opisano je da je kontrola glikemije neophodna za smanjenje lipidne peroksidacije, odnosno koncentracije MDA. Istraživanje Armstronga i suradnika pokazalo je da već i strogo nadziran način prehrane kod osoba sa dijabetesom dovodi do sniženja koncentracije MDA (Armstronga i sur., 1996). Sličan pad MDA u jetri pronađen je i kod zdravih štakora koji su tretirani prehranom bogatom polifenolima iz voća poput jagoda ili šljiva u usporedbi s kontrolnom

grupom životinjama (Mateos i sur., 2005). U istraživanjima kada je MDA mjeren kao biomarker lipidne peroksidacije prije i nakon konzumacije praha pokožice crnog grožđa, prah je uzrokovalo značajan pad aktivnosti MDA što ukazuje na značajno smanjenje lipidne peroksidacije (Rajesh i sur., 2013). Sličan pad MDA u jetri je pronađen u istraživanju Meral i suradnika u kojem je kod zečeva izazvan dijabetes te su trenirani ekstraktom crnog kima (*Nigella sativa).* Zečevi su oralno tetirani ekstraktom kroz 2 mjeseca, nakon izazivanja dijabetesa. Rezultati istraživanju su bila snižena koncentracija MDA, glukoze i povećanje GSH. Zaključak je bio da bi ekstrakt crnog kima mogao spriječiti lipidnu peroksidaciju i povećati antioksidacijsku zaštitu kod dijabetičnih pacijenata zbog svog kemijskog sastavu, u kojem je naglasak stavljen na polifenolne spojeve (Meral i sur., 2001).
U skladu s dosadašnjim istraživanjima, u ovom istraživanju snižena razina MDA u homogenatu tkiva jetre i bubrega kod grupe životinja koja je tretirana ekstraktom cvijeta trnine pokazuje značajan pad lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolnu grupu životinja, što ukazuje na antioksidacijski učinak trnine koja je bogata polifenolima. Kod dijabetične grupe životinja koja je tretirana ekstraktom cvijeta trnine također nije izazvan oksidacijski stres (slike 1 i 2). Ovi se rezultati mogu objasniti činjenicom da polifenoli štite stanice od lipidne peroksidacije, ne samo u situacijama oksidacijskog stresa, nego i u normalnim uvjetima.

Utjecaj polifenola iz ekstrakta cvijeta trnine na aktivnost GSH enzima u homogenatima tkiva bubrega i jetra u dijabetičnih C57BL/6 miševa

Želio se istražiti i potencijalni utjecaj antioksidansa *in vivo* te je zbog toga izmjerena razina reduciranog glutationa (GSH) kao glavnog intracelularnog antioksidansa. Reducirani glutation je jedan od najzastupljenijih antioksidansa u stanici. Njegova zadaća je degradacija vodikovog peroksida uz pomoć glutation peroksidaze. Tom reakcijom dolazi do njegove oksidacije (GSSG), nakon čega se uz pomoć glutation reduktaze ponovo vraća u svoj oksidirani oblik. GSH je glavni topljivi antioksidans u stanicama te je prisutan u velikim količinama u citosolu (1-11 mM), mitohondrijima (5-11 mM) i jezgrama (3-15 mM) (Flohe, 2001). Glutation je izuzetno važan unutarstanični neenzimski antioksidans zahvaljujući aminokiselini cistein koja sadrži tiolnu skupinu. Sadržaj glutationa ovisi o okolišnim čimbenicima i funkcionira kao ravnoteža između sinteze glutationa i njegova iskorištenja. Povećanjem brzine sinteze GSH, kao posljedica izlaganja reaktivnim spojevima kisika/spojevima koji stvaraju ROS, može se povećati sadržaj glutationa (Valko i sur., 2006). Prehrambeni antioksidansi, posebice polifenoli, korisni su u zaštiti protiv štetnog djelovanja reaktivnih kisikovih vrsta te u sprječavanju raznih bolesti povezanih sa oksidacijskim stresom kao što su rak, starenje i neurodegenerativne bolesti (Sanchez-Rodriguez i sur., 2016). Rezultati studije koju su proveli Sanchez-Rodriguez i sur. (2016) pokazuju statistički značajno povećanje aktivnosti

superoksid dismutaze i glutation peroksidaze nakon tretmana polifenolima u štakora. Također, tretman polifenolima smanjio je razine ROS-a i superoksidnih aniona.

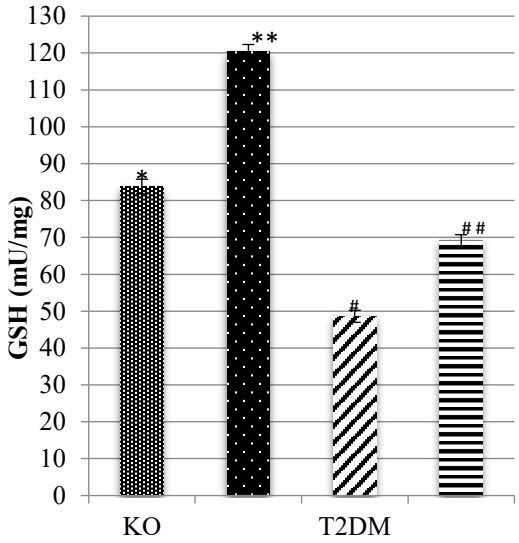


Slika 3. Koncentracija GSH u tkivu bubrega C57BL/6 miša, zdravih, dijabetičnih i grupa tretiranih trninom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – Srednje vrijednosti su značajno različite; p<0,05 (ANOVA).
KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; T2DM – dijabetes tip 2; ECT+T2DM - ekstrakt cvijeta trnine+dijabetes tip 2.

Fig. 3. GSH concentration in the kidney tissues of C57BL/6 mouse, healthy, diabetic, and trnina treated groups. Results are expressed as mean value±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – The mean values are significantly different; p<0.05 (ANOVA).
KO - control group; ECT - Trnina flower extract; T2DM – type-2 Diabetes Mellitus; ECT+T2DM - Trnina flower extract + type-2 Diabetes Mellitus.

Podaci dobiveni analizom uzoraka bubrega pokazuju statistički značajno višu (*P*<0,05) koncentraciju GSH kod ECT skupine (109,9±2,34mU/mg) u odnosu na kontrolnu skupinu (75,1±1,68 mU/mg) (slika 3), i jetre (120,3±2,02 mU/mg) u odnosu na kontrolnu skupinu (83,8±1,98 mU/mg) (slika 4) 10. dana tretmana. Također, statistički značajno povečanje zabilježeno je u grupi ECT+T2DM (bubreg 63,8±1,54 mU/mg; jetra 69,2±1,54 mU/mg) u odnosu na T2DM skupinu

(bubreg 45,7±1,72 mU/mg; jetra 48,6±1,64 mU/mg) nakon 10. dana tretmana (P<0,05) (slike 3 i 4).



Slika 4. Koncentracija GSH u tkivu jetre C57BL/6 miša, zdravih, dijabetičnih i grupa tretiranih trninom. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – Srednje vrijednosti su značajno različite; p<0,05 (ANOVA).
KO – kontrolna grupa; ECT – ekstrakt cvijeta trnine; T2DM – dijabetes tip 2; ECT+T2DM - ekstrakt cvijeta trnine+dijabetes tip 2.

Fig. 4. GSH concentration in the liver tissues of C57BL/6 mouse, healthy, diabetic, and trnina treated groups. Results are expressed as mean value±SD.
*-KO *vs*. ECT; #-T2DM *vs.* ECT+T2DM.
*,# – The mean values are significantly different; p<0.05 (ANOVA).
KO - control group; ECT - Trnina flower extract; T2DM – type-2 Diabetes Mellitus; ECT+T2DM - Trnina flower extract + type-2 Diabetes Mellitus.

Sličan porast GSH u jetri su dobili Sikandar i sur. (1992), u svojem istraživanju u kojem su miševi tretirani zelenim čajem tijekom 30 dana. Rezultati istraživanja su pokazali da konzumacija zelenog čaja, koji je bogat polifenolnim spojevima, povećava razinu GSH i katalaze u koži, tankom crijevu, jetri i plućima u odnosu na kontrolnu skupinu koja je dobivala samo vodu. Znanstvenici su došli do zaključka da se konzumacijom zelenog čaja smanjuje oksidacijski stres, a samim time i vjerojatnost nastanka tumora. Hamden i sur. (2008) proveli su studiju koja je osmišljena kako bi se procijenio antioksidacijski učinak polifenola zelenog čaja na kadmijem induciranu jetrenu disfunkciju i oksidacijski stres u štakora. Kadmij je vrlo

otrovan okolišni i industrijski zagađivač koji negativno utječe na mnoge organe, posebice jetru. Odraslim štakorima oralno je davan kadmij svaka 3 dana tijekom 6 mjeseci. Rezultati studije pokazali su statistički značajno ($p<0,05$) povečanje lipidne peroksidacije i pad funkcije jetre i aktivnosti jetrenih enzima u štakora tretiranih kadmijem u odnosu na kontrolnu grupu štakora. Također, aktivnost antioksidacijskih enzima kao što su superoksid dismutaza (SOD), glutation peroksidaza (GPx) te katalaza bila je značajno ($p<0,05$) smanjena u jetri štakora tretiranih kadmijem. Oralna primjena 5% vodenog esktrakta zelenog čaja, uz oralnu primjenu kadmija tijekom šest mjeseci, rezultirala je statistički značajnim porastom aktivnosti antioksidacijskih enzima (SOD, CAT, GPx). Autori su zaključiti kako je oralna konzumacija polifenola zelenog čaja, uz konzumaciju kadmija, smanjila štetne učinke oksidacijskog stresa (Hamden i sur., 2008). Guilford i Pezzuto (2011) istražili su odnos vino/zdravlje i otkrili da je umjerena i redovita potrošnja crvenog vina povezana s 30%-im smanjenjem rizika za dijabetes tipa 2 (Guilford i sur., 2011). Zaključili su da su antioksidacijska svojstva polifenola crvenog vina, odnosno resveratrol, kvercetin, katehin i antocijan odgovorni za pozitivne reakcije. U radu Shyamala i sur. (2003) istaknuto je da je razlog smanjenja koncentracije GSH u organima kod dijabetičnih životinja vjerojatno zbog povećanog iskorištenja glutationa od strane hepatocita u pokušaju suzbijanja nastanka lipidnih peroksida.
U našem istraživanju koncentracije GSH izražene preko aktivnosti reduciranog glutationa (GSH) u jetri i bubregu statistički su značajno povećane u grupi miševa koji su tretirani sa ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosu na kontrolnu grupu miševa, što ukazuje na antioksidacijski učinak ECT (slike 3 i 4). Uočena je razlika u aktivnosti GSH između grupa životinja koje su hranjene sa ili bez dijete, što je u suglasju sa dosadašnjim istraživanjima u kojima je dokazano da polifenoli potiču stvaranje jetrene GSH (Yeh i Yen, 2006).

Zaključci

U ovom radu promatrao se utjecaj i antioksidacijsko djelovanje ekstrakta cvijeta trnine na C57BL/6 miša kojima je induciran dijabetes tipa 2. Analizom rezultata opaženo je značnajno smanjnje koncentracije MDA u tkivima bubrega i jetre 10. dana tretmana u skupini koja je tretirana ekstraktom cvijeta trnine (ECT) u odnosnu na kontrolnu skupinu (KO). Sukladno tome, zapaženo je statistički značajno smanjenje koncentracije MDA u tkivima jetre i bubrega kod skupine dijabetičnih miševa tretiranih ekstraktom cvijeta trnine (ECT+T2DM) u odnosu na dijabetične miševe (T2DM) (ANOVA, $p<0,05$). Koncentracija glutationa (GSH) u jetri i bubregu životinja je statistički značajno povećana kod ECT skupine u odnosu na zdravu kontrolnu skupinu (KO). Također je statistički značajno povećana koncentracija GSH u ECT+T2DM skupini u odnosu na T2DM skupinu nakon 10. dana tretmana ($p<0,05$). Dobiveni rezultati su potvrdili pretpostavke kako

polifenolni spojevi ekstrakta cvijeta trnine blagotvorno djeluju na dijabetes tipa 2. Zbog svog antioksidacijskog svojstva djeluju kao jaki antioksidans i uvelike smanjuju koncentraciju oksidiranih spojeva u C57BL/6 miša.

Zahvala: Ovo istraživanje financirano je sredstvima znanstvenog projekta Hrvatske zaklade za znanost – HRZZ (2014.-2018.), "Primjena inovativnih tehnologija u proizvodnji biljnih ekstrakata kao sastojaka funkcionalne hrane (IP-PE-FF).

Literatura

Armstrong A.M., Chestnutt J.E., Gormley M., Young I. (1996): The effect of dietary treatment of lipid peroxidation and antioxidant status in newly diagnosed non-insulin dependent diabetes, *Free Radic. Biol. Med.* 21, 719-726.

Badescu L., Badulescu O., Badescu M., Ciocoiu M. (2012): Natural polyphenols improve the dislipidemy and eye complications in the experimental diabetes mellitus, *Roman. Biotechnol. Lett.* 17, 7397-7407.

Bukan N., Sancak B., Yavuz O., Koca C., Tutken F., Ozcelikay A.T., Altan, N. (2003): Lipid peroxidation and scavening enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats, *IJBB.* 40, 447-450.

Drel V.R., Sybirna N. (2010): Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin- diabetic rats, *Cell Biol. Inter*. 34, 1147-1153.

El Faramawy S.M., Rizk R.A. (2011): Spectrophotometric studies on antioxidants-doped liposomes, *J. Am. Sci.* 7, 363–369.

Eyer P., Worek F., Kiderlen D., Sinko G., Stuglin A., Simeon-Rudolf V., Reiner E. (2003): Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment, *Anal. Biochem.* 312, 224-227.

Faure P., Corticelli M. (1993): Lipid peroxidation and trace element status in diabetic ketotic patients: Influence of insulin therapy, *Clinical Chemistry.* 39, 789-793.

Guilford J.M., Pezzuto J.M. (2011): Wine and health: A review, *Am. J. Enol. Vitic.* 62, 471-486.

Hamden K., Carreau S., Marki F.A., Masmoudi H., El Feki A. (2008): Positive effects of green tea on hepatic dysfunction, lipid peroxidation and antioxidant defence depletion induced by cadmium, *Biol. Res.* 41, 331-339.

Jayakumar T., Sakthivel M., Thomas P.A. i Geraldine P. (2008): Pleurotus ostreatus, an oyster mushroom, decreases the oxidative stress induced by carbon tetrachloride in rat kidneys, heart and brain. *Chemico-Biological Interactions.* 176, 108-120.

Kangralkar V.A., Patil S.D., Bandivadekar R.M. (2010): Oxidative stress and diabetes: a review, *Int. J. Pharm.* 1, 38–45.

Knekt P., Kumpulainen J., Jarvinen R., Rissanen H., Heliövaara M., Reunanen A. (2002): Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *Am. J. Clin. Nutr. 76*, 560-568.

Liu Y.J., Zhan J., Liu X.L., Wang Y., Ji J., He Q.Q. (2014): Dietary flavonoids intake and risk of type 2 diabetes: A metaanalysis of prospective cohort studies, Clin. Nutr. 33, 59-63.

Magrone T., de Heredia F.P., Jirillo E., Morabito G., Marcos, A., Serafini, M. (2013): Functional foods and nutraceuticals as therapeutic tools for the treatment of diet-related diseases, *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 91, 387-396.

Maritim A.C., Sanders R.A., Watkins J.B. (2003): Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *J. Biochem. Mol. Toxicol*. 17, 24–38.

Mateos R., Goya L., Bravo L. (2005): Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits, *J. Chrom. B*. 827, 76-82.

Meral I., Yener Z., Kahraman T., Mert N. (2001): Effect of *Nigella sativa* on Glucose Concentration, Lipid Peroxidation, Anti-Oxidant Defense System and Liver Damage in Experimentally – Induces Diabetic Rabbits, *J. veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine*. 48, 593-599.

Mulvihill E.E., Assini J.M., Lee J.K., Allister E.M., Sutherland B.G., Koppes. J.B. (2011): Nobiletin attenuates VLDL overproduction, dyslipidemia, and atherosclerosis in mice with diet-induced insulin resistance, *Diabetes*. 60, 1446–1457.

Panagiotakos D.B. Lionis C. Zeimbekis A. Gelastopoulou K. Papairakleous N. Das U.N. (2009): Long-term tea intake is associated with reduced prevalence of (type 2) diabetes mellitus among elderly people from Mediterranean islands: MEDIS epidemiological study, *Yonsei Med. J.* 50, 31-38.

Pasaoglu H., Sancak B., Bukan N. (2004): Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus, *Tohuku J. Exp. Med*. 203, 211–218.

Patricia P.M. (2009): Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health, *Curr. Opin. Pharmacol*. 9, 771–779.

Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C., (2008): Free radicals, antioxidants in disease and health. *IJBS.* 4, 89–96.

Poonam V., Raunak Kumar G., Reddy L. C. S., Jain R., Sharma S. K., Parmar V. S. (2011): Chemical constituents of the genus *Prunus* and their medicinal properties, *Curr. Med. Chem.* 18, 3758–3824.

Sanchez-Rodriguez C., Martin-Sanz E., Cuadrado E., Granizo J.J., Sanz-Fernandez R. (2016): Protective effect of polyphenols on presbycusis via oxidative/nitrosative stress suppression in rats, *Exp. Gerontol.* 83, 31-36.

Shyamala M.P., Venukumar M.R., Latha M.S. (2003): Antioxidant potential of the syzygium aromaticum (GAERTIN) Linn. (Cloves) in rats fed with high-fat diet, *Indian J. Pharmaco.* 35, 99–103.

Sikandar G.K., Santosh K.K., Rajesh A., Mukhtar H. (1992): Enhancement of Antioxidant and Phase II Enzymes by Oral Feeding of Green Tea Polyphenols in Drinking Water to SKH-1 Hairless Mice: Possible Role in Cancer Chemoprevention, *Cancer Research.* 52, 4050-4052.

Slatter D.A., Bolton C.H., Bailey A.J. (2000): The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus, *Diabetologia.* 43, 550-557.

Tiku M.L., Allison G.T., Naik K., Karry S.K. (2013): Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes, *Osteoarthr. Cartilage.* 11, 159-166.

Tome-Carneiro J., Larrosa M., Yanez-Gascon M.J., Davalos A., Gil-Zamorano J., Gonzalvez M. (2013): One-year supplementation with a grape extract containing resveratrol modulates inflammatory- related microRNAs and cytokines expression in peripheral blood mononuclear cells of type 2 diabetes and hypertensive patients with coronary artery disease, *Pharmacol. Res*. 72, 69-82.

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40.

van Dam R.M., Naidoo N., Landberg R. (2013): Dietary flavonoids and the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases: review of recent findings, *Curr. Opin. Lipidol*. 24, 25-33.

Wild S., Roglic G., Green A., Sicree R., King H. (2000): Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030, *Diabetes Care*. 27, 1047-1053.

Yeh C.T., Yen G.C. (2006): Induction of hepatic antioxidant enzymes by phenolic acids in rats is accompanied by increased levels of multidrug resistanceassociated protein 3 mRNA expression, J. Nutrition. 139, 11–15.

Zang M.W., Xu S.Q., Maitland-Toolan K.A., Zuccollo A., Hou X.Y., Jiang B.B. (2006): Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor–deficient mice, *Diabetes.* 55, 2180- 2191.

Original scientific paper

Influence of P*runus spinosa* L. flower extract polyphenols on type-2 Diabetes mellitus in C57BL/6 mouse

Irena Landeka Jurčević*[1], Tajana Frančić[1], Irena Fabijančić[1], Verica Dragović-Uzelac[1], Domagoj Đikić[2]

[1] *University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Croatia*
**Corresponding author:ilandeka@pbf.hr*
[2] *University of Zagreb, Faculty of Science, Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia*

Summary

Numerous evidence suggests that polyphenol-rich diets have the ability to protect against diabetes. The effect of the trnina (*Prunus spinosa* L.) flower extract on lipid peroxidation and antioxidant status in alloxan-induced diabetic mice C57BL/6 was investigated. Malondialdehyde (MDA) and reduced glutathione (GSH) were the investigated biomarkers of oxidative stress in the organs (kidney and liver). Extract of the trnina flower in a dose of 25 mg/kg body weight in C57BL/6 diabetic mice after 10 days caused a significant reduction of MDA, while increasing of the activity of the antioxidant enzyme (GSH). The statisticaly significant increase of MDA in the liver and kidney tissues of diabetic mice suggests an intensified free radical generation in diabetic mice compared to the normal mice. The lower activity of GSH in the liver and kidney during diabetes may be due to the inactivation or inhibition of the enzyme by an increased production of alloxan-generated reactive oxygen species (ROS). The results indicate that the trnina flower extract reduces free radical mediated oxidative stress in experimentaly caused diabetes mellitus.

Key words: P*runus spinosa* L., type-2 diabetes, malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH)

Original scientific paper

Drug-likeness, herbicide-likeness and toxicity of herbicidal compounds – *in silico* analysis

Vesna Pehar,[1] Davor Oršolić,[2] Višnja Stepanić[*2,3]

[1]*Croatian Defense Academy "Dr. Franjo Tuđman", Ilica 256b, 10000 Zagreb, Croatia*
[2]*Center of Research Excellence for Marine Bioprospecting – BioProCro, Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10002 Zagreb, Croatia*
[3]*Division of molecular medicine, Ruđer Bošković Institute, Bijenička 54, 10002 Zagreb, Croatia*
[*]*Corresponding author: stepanic@irb.hr*

Summary

Instead of conventional process of discovery of novel drugs which is complex, time-consuming and expensive, revealing novel targets and therapeutic applications of existing drugs is an alternative and efficient approach used for increasing productivity in the pharmaceutical industry. We explored the data set of 509 approved herbicides for their use as a chemical library for finding novel lead molecules. Herbicides were analysed in terms of drug-likeness by applying common *in silico* filters for nondrug-like molecules. Descriptors were calculated by the program DataWarrior and analysis was performed by using *R* packages and Excel. The herbicides were compared with 2106 drugs. Most of herbicides are drug-like compounds and the set of structurally diverse herbicides is recommended as a screening library for medicinal chemistry projects. Herbicides are neutral or negatively charged molecules. Their *clogP* and *TPSA* values are mainly in the ranges 0.5-3.5 and (20-100) $Å^2$, respectively, which are possessed by around 1/3 of drugs. However, the successful application of herbicides in medicine may depend upon their toxicity for humans. More than 2/5 of the herbicides are estimated to be mutagenic, carcinogenic, toxic for reproduction and irritant. In comparison, around 1/5 of drugs are estimated to be toxic.

Keywords: drug-likeness, herbicide, herbicide-likeness, screening, toxicology

Introduction

Herbicides are chemical compounds used for selective eradication of weeds. More than five hundred herbicides have been approved for application so far (Gandy et al., 2015; Gong et al., 2013; Kim et al., 2016) In the last two decades, the two global

issues have appeared in connection with the wide use of herbicides: 1) increase in weed resistance and 2) health issues (Forouzesh et al., 2015). Accordingly, there is a search for novel herbicides which have a known and possibly new mechanism of action and no toxic and detrimental effects for humans, animals and environment (Westwood et al., 2018). Many methods and approaches, such as high-throughput screening and various *in vitro* and *ex vivo* mechanistic secondary assays as well as selectivity and liability assays which have been developed as a part of process of rational design of novel drugs (Hughes et al., 2011), are also applied in the design of novel and safe herbicides (Rao et al., 2015). Such approaches are commonly performed by using rationally built chemical libraries. Physicochemical properties of the chemical compounds are commonly used for guiding the design and selection of chemical libraries (Hughes et al., 2011). These properties are primarily associated with absorption, distribution, metabolism and excretion (ADME) features of chemical compounds which largely influence their pharmacokinetic profiles. In the Biopharmaceutics Classification System (BCS), drugs are differentiated on the basis of their physicochemical properties solubility and permeability in order to characterize their oral bioavailability (Benet, 2013). The physicochemical properties are generally associated with the concept of drug-likeness.

Drug-likeness is a qualitative concept used in drug design for estimation how much drug-like a substance is with respect to pharmacokinetics properties like oral bioavailability (Lipinski et al., 2001; Veber et al., 2002; Muegge et al., 2001). It is based on comparison of properties like lipophilicity, solubility and permeability and simple structural features such as numbers of hydrogen bond acceptor (*HBA*) or donor (*HBD*) atoms with those of drugs. Drug-likeness concept is successfully used by medicinal chemists in the early stages of lead and drug discovery as a way to reduce attrition rate in late clinical phases (Waring et al., 2015).

The distributions of physicochemical properties and simple structural parameters have been analysed for various pesticides including various subsets of herbicides (Tice, 2001; Tice, 2002; Clarke et al., 2003; Rao et al., 2015; Zhang et al., 2018). Such analyses have been carried out mainly in order to find herbicide-likeness rules (in analogy with drug-likeness rules) and thus facilitate design and development of novel herbicide molecules.

The main objective of this work is to provide qualitative characterizations of known herbicides in terms of drug-like properties (Delaney et al., 2006). Drug repurposing allows prediction of novel applications of medications or even new therapeutic classes of drugs using gene expression data before and after drug treatment (Aliper et al., 2016). Drug discovery is a complex, time-consuming and expensive process aimed to discovering novel medicines whose potency and selectivity are well balanced against their pharmacokinetic profile (dose and dosing interval) which is mostly determined by their ADME properties (Hughes et al., 2011; Daina et al., 2017). The link between the ADME properties of small compounds with their bulk

physicochemical properties and simple molecular structure features are quite well established. Due to this understanding, during early phase of drug discovery simple *in silico* filters and various *in vitro* assays are commonly performed to efficiently eliminate compounds with properties commensurate with high attrition risks. Our study has provided results of analysis of data set of approved herbicides by using well-known *in silico* filters commonly used for sorting out nondrug-like molecules. The aim of the study was to investigate drug-likeness of herbicides in order to estimate their potential to be used for design of screening library for identification of novel lead molecules for medicinal chemistry projects (Delaney et al., 2006; Mignani et al., 2018). Some of organophosphate herbicides, like non-selective paraquat and round-up (glyphosate), cause the reduction of certain groups of biota in soil medium, like heterotrophic aerobic bacterial count and fungal population, and also suppress the biodiversity of soil microbes (Usman et al., 2017). In addition to potential anti-infective activity, herbicides also modify activity and/or expression of macromolecules within humans (Delaney et al., 2006). Some herbicide compounds have been found to act as endocrine disruptors modulating activity or expression of estrogen, progesterone, pregnane X or androgenic receptors as well as aromatase activity (Mnif et al., 2011).
We present the results of analysis of the comprehensive data set of herbicides from the aspect of drug-likeness. For this purpose, herbicides were compared with the set of approved drugs collected in the database DrugBank (Wishart et al., 2017). The analysis revealed that herbicides are drug-like molecules, but with characteristic, herbicide-like ranges of some properties. The analysis supports the use of the set of structurally diverse herbicides as a valuable screening library for finding novel lead molecules.

Materials and methods

The data set of 509 herbicides has been collected from the literature (Gandy et al., 2015.) and internet database resources (Gong et al., 2013; Kim et al., 2016; http://www.alanwood.net/pesticides/). The dataset of 2106 approved small molecule drugs was downloaded from the database DrugBank (version 5.1.1, released 2018-07-03) (Wishart et al., 2017). The compounds were represented in the SMILES format. Counter-ions and solvent molecules were removed from the structures. A set of 1D and 2D descriptors was calculated by the freely available program DataWarrior (Sander et al., 2015). The calculated descriptors used for the analysis were molecular weight (*MW*), numbers of *HBA* and *HBD* atoms, n-octanol/water partition coefficient (*clogP*), aqueous solubility *clogS*, topological polar surface area (*TPSA*), fragment-based druglikeness (for traded drugs mainly within the range -1 to 4), molecular flexibility (low < 0.5 < high), shape index (spherical < 0.5 <linear), molecular complexity, and numbers of non-H atoms, C-atoms, heteroatoms, stereo

centers, sp^3-atoms, aromatic atoms, rotatable bonds (*RB*), rings and aromatic rings. In addition, numbers of fragments - amide, alkyl- and aromatic amine, aromatic nitrogen, basic nitrogen and acidic oxygen were calculated. Formal charge was calculated as a difference between the numbers of basic nitrogens and acidic oxygens. DataWarrior was also used for predictions of toxicity. DataWarrior outputs risk alerts regarding mutagenic, tumorigenic, reproductive and irritating toxicity with high sensitivity and specificity. The models within DataWarrior are classification ones based on the presence of fragments associated with the corresponding toxicity type (von Korff et al., 2006). The program R (https://www.r-project.org/) was used for statistical analysis and plotting. The histograms were made by Excel.

Results and discussion

Drug-likeness

The set of 509 organic herbicides belong to different chemical classes. However, drug-likeness rules are commonly defined in terms of molecular properties which are independent upon the chemical class. This is because the passage of a compound through intestine and entrance into the blood as well as its further distribution through the body is mainly determined by bulk physicochemical properties, aqueous solubility and permeability. It is well described within BCS that compounds which are highly water soluble and membrane permeable will be highly bioavailable in the blood (Benet, 2013). In opposite, compounds of low solubility and permeability generally have low bioavailability. Both water solubility and membrane permeability depend upon the third physiochemical property – lipophilicity which is usually represented by n-octanol/water partition coefficient log*P*. In general, the aqueous solubility of a compound decreases and its permeability increases with increasing log*P* value.

In the last two decades, numerous rules in terms of physicochemical properties and/or simple structural properties have been set up in order to estimate potential of novel compounds to have adequate, drug-like ADME profile. The corresponding molecular properties are simple conceptually and also computationally. Thus, they have been widely accepted with medicinal chemistry community for filtering out compounds which are likely to be non-bioavailable and nondrug-like. Herein, we have applied the three sets of rules for estimation of drug-likeness of herbicides: four Lipinski's rules of five, two Veber's rules and a set of Muegge's pharmacophore rules (Lipinski et al., 2001; Veber et al., 2002; Muegge et al., 2001).

So far, analyses of physicochemical properties and simple structural features have been performed several times for herbicides. Their aim was mainly to reveal rules for herbicide-likeness in analogy with the drug-likeness concept. Property profiles for herbicides found in this study are consistent with those reported previously. In

difference to previous study focused on the examination of potential usage of herbicides in development of new medicines (Delaney et al., 2006), we compared commercial herbicides with approved small drug molecules downloaded from DrugBank.

The Lipinski rule of 5 (*LR5*) has been widely used in the early phase of virtual screening for filtering out compounds which are likely to be poorly permeable through membrane of the gastrointestinal (GI) tract (Lipinski et al., 2001). The *LR5* was set up by exploration of the Pfizer experimental data collected for drugs. According to the *LR5*, small molecular weight compound which is orally bioavailable, that is present in the blood when it is orally administrated, may violate at most one of the following rules: i) number of *HBD* atoms (OH, NH) is less than or equal to (≤) 5; (ii) number of *HBA* atoms (O,N) is ≤ 10; (iii) *MW* ≤ 500 and (iv) the calculated log*P* value *clogP* ≤ 5. The 99% of all herbicides satisfy *LR5*. Only one of the rules is not met by 41 compounds. The most broken rule is the *HBA* one which is not satisfied by 36 herbicides (Fig. 1). At most two *HBD* atoms, the *clogP* value at most 5 and *MW* as highest as 500 have 94.9%, 99.2% and 98.6% of herbicides, respectively (Table 1). For comparison, 89.6% of drugs satisfy at least three *LR5* rules. Around 14% drugs which do not fit with *LR5*, are generally large molecules with *MW* greater than 500 and more than ten *HBA* O or N atoms. Most of these outliers are natural or semisynhetic derivatives such as macrolactones, macrolactames or steroids.

Table 1. Proportions (%) of herbicides and drugs having specific structural and physicochemical properties defining *LR5* (L), Veber's (V) and Muegge's (M) sets of rules for drug-likeness.

Rule	Herbicides	Drugs
***HBA* (O, N) ≤ 10 ^{L,M}**	92.9	90.3
***HBD* (OH, NH) ≤ 5 ^{L,M}**	100	95.3
***MW* ≤ 500 ^{L} (200 ≤ *MW* ≤ 600)^{,M}**	98.6 (90.4)	88.3 (79.5)
***clogP* ≤ 5^{L}**	99.2	97.2
***TPSA* ≤ 140 Å$^{2\ V}$ (150 Å^{2})^{M}**	90.6 (93.5)	85.0 (87.0)
***RB* ≤ 10 ^{V} (≤ 15) ^{M}**	98.2 (100)	89.6 (97.2)
C-atoms > 4 ^{M}	97.2	97.7
Heteroatoms > 1 ^{M}	99.4	96.9
Rings ≤ 7 ^{M}	100	98.7

The Veber's rules have been discovered by using *in vivo* data collected within GlaxoSmithKline (Veber et al., 2002). Reduced molecular flexibility as measured by the number of rotatable bonds (*RB*) and low polarity as described by total polar surface area (*TPSA*), are found to be important criteria of good oral bioavailability. Reduced *TPSA* correlates better with increased permeation rate, while increased *RB*

count has a negative effect on the permeation rate. According to Veber's rules, a compound with *RB* ≤ 10 and *TPSA* ≤ 140 Å^2 or equivalently 12 or fewer *HBD* and *HBA*, may be expected to be well absorbed or permeable from the GI tract when it is administrated *per os* (Veber et al., 2002). These rules are not met by 10.8% of herbicides of which many (87.3%) have *TPSA* > 140 Å^2 (Fig. 2). The 3/4 of all herbicides has *TPSA* ≤ 100 Å^2 (Fig. 2). For comparison, 21.5% of drugs do not satisfy the two criteria (Table 1). The calculated *TPSA* (Ertl et al., 2000) is correlated closely with the total hydrogen bond (HB) count, the sum of *HBD* and *HBA*. For the herbicide data set, the correlation coefficient *r* is 0.911 and for the drug set *r* is 0.945. For herbicides 6.7% /10.6% compounds have total HB count greater than 12/11, while for drugs the corresponding values are considerably higher 13.5%/20.0%.

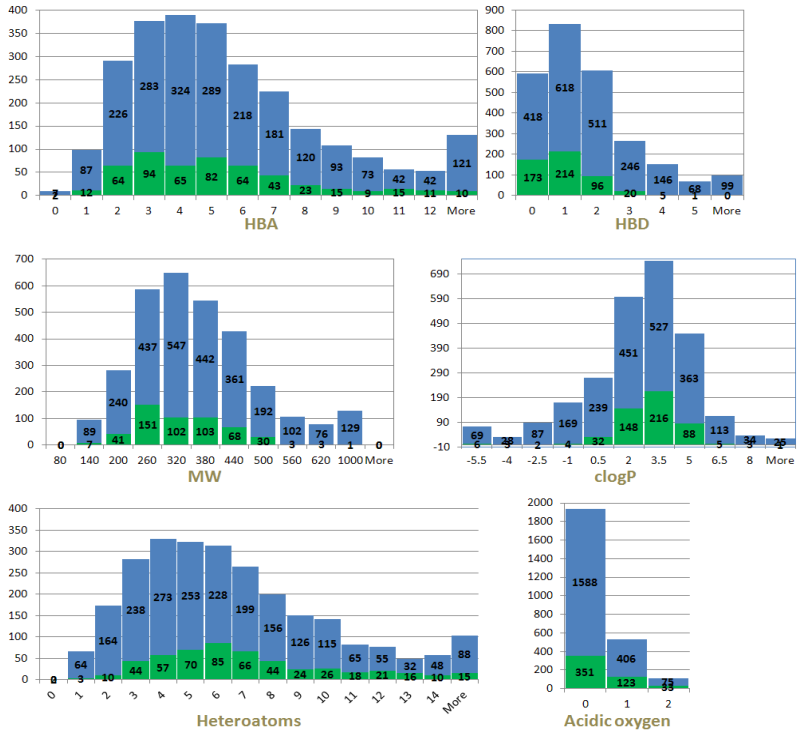


Fig. 1. Distribution of structural parameters (numbers of hydrogen bond acceptors (HBA) and donors (HBD), heteroatoms as well as acidic oxygen atoms, and of molecular weight (MW)) in data sets of herbicides (green) and drugs (blue). Numbers of compounds within each bin are denoted.

Hence, most of herbicides pass through the *LR5* and Veber's filters which are regularly applied in the drug discovery for eliminating non-bioavailable compounds. From this aspect, most of these phytotoxic molecules are probable to pass human GI

tract and enter the blood which may distributes them throughout the body to the place where they may exert either beneficial or adverse action.

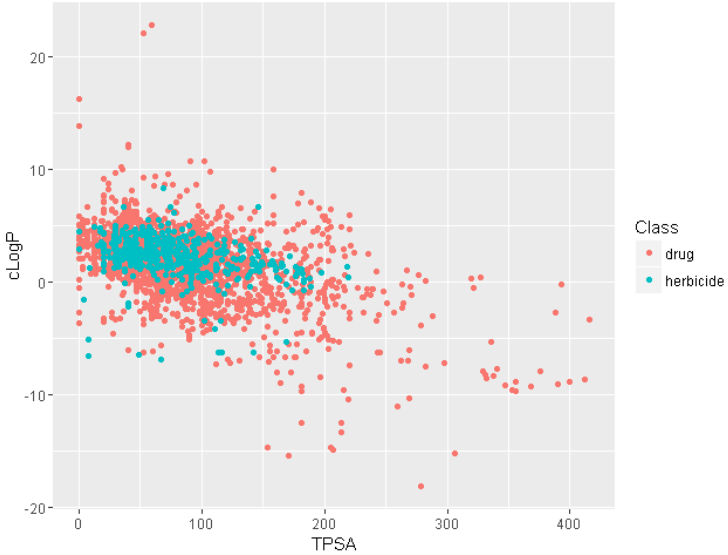


Fig. 2. Distribution of herbicides (cyan) and drugs (red) within physicochemical space defined by calculated parameters *clogP* and *TPSA*.

Muegge's filter is developed by Bayer's scientists by comparing simple structural and physicochemical properties of non-drugs from the database ACD (Available Chemicals Directory) with drugs represented by the CMC (Comprehensive Medicinal Chemistry) and the MDDR (MACCS-II Drug Data Report) databases (Muegge et al., 2001). It is a pharmacophore-like filter developed for the classification of small *MW* molecules as drug-like or nondrug-like. To be classified as a drug-like, a compound should possess a minimum count of drug-like pharmacophore points defined through simple structural rules (Table 1). By applying this filter (Daina et al., 2017), around 93% of herbicides and "only" 80% of the drugs are classified as drug-like molecules (Table 1).

According to the three filters commonly used for elimination of non-drug-like molecules from pipeline, herbicides are drug-like compounds. They are highly probable to exert activity on humans. However, there are some differences in the optimal properties for herbicides and drugs. The most significant difference identified between drugs and herbicides is the lower numbers of *HBD* atom allowed in the latter cases (Fig. 1) (Tice, 2001; Delaney et al., 2006). More than 3/4 of these agrochemicals have no or at most one *HBD* atom OH or NH while the allowed number of *HBA* atoms O or N are considerably higher (Fig. 1). In herbicides, there is a clear bias towards heteroatoms (Clarke et al., 2003). Almost all herbicides

contain at least one N or O atoms as well as other heteroatoms mostly sulphur and/or halogen atoms. There are different classes of herbicides which contain specific heteroatomic groups and/or heterocycles like phenoxy acids, carbamates, dinitroanilines, triazines, triazoles, ureas, sulfonylureas and organophosphorous herbicides. A lower carbon to heteroatom balance in the case of herbicides may be required to achieve acceptable aqueous solubility and lipophilicity for uptake and movement in plants.

Herbicide-likeness

Herbicides differentiate from drugs also in lipophilicity and polarity profiles. Almost 3/4 of herbicides have *TPSA* and *clogP* values within the relatively narrow ranges 20 $Å^2 < TPSA \leq 100$ $Å^2$ and $0.5 < clogP \leq 3.5$, respectively (Fig. 2) (Tice , 2002). In comparison, 1/3 of these properties are met by the drugs. Furthermore, 95.0% of herbicides have *clogP* values ranging from 0.5 to 5 (Fig. 1) in difference to drugs whose lipophilicity coefficient *clogP* spans wider range from very hydrophilic compounds with $clogP < -5$ to highly lipophilic molecules with $clogP > 5$ (Fig. 2).
Furthermore, while drugs are mainly neutral or basic molecules, herbicides are primarily neutral or acidic molecules (Fig. 3). Around 30% of herbicides are negatively charged (Fig. 3) (Clarke et al., 2003). Poor bioavailability is likely only for anions with the polar surface area exceeding 75 $Å^2$ (Martin, 2005). For almost half of anionic herbicides *TPSA* is < 75 $Å^2$, and thus these herbicidal acids may be reasonable starting points for drugs (Delaney et al., 2006).
A charge of a compound considerably influences its distribution properties, either in the case of herbicides or drugs (Trapp, 2009). Anionic character is a desirable herbicidal property for phloem mobility. Phloem transportation is increased by ion trapping when dissociable acid groups are introduced into the molecule. The herbicides are distributed throughout plants from their leaves or roots by plant vascular tissues phloem and xylem (Trapp, 2009). Phloem serves for bidirectional translocation of food and nutrients from leaves to storage organs and growing parts of plant. Xylem has a cell wall built of water resistant lignins and transports water and mineral in one direction from roots up the plant's stem to aerial parts of the plant.

Toxicity

Herbicides are toxic agrochemicals, which are used to fight against the existence of weeds in farms and gardens. Hence, we also evaluated their toxicity for humans. The toxicity of herbicides and drugs are evaluated by using classification models for mutagenic, tumorigenic and irritating effects as well as reproductive toxicity. The models are based on presence of specific structural motifs within a molecule (von Korff et al., 2006). As expected, drugs are predicted to be much less hazardous as

compared with herbicides (Fig. 4). Almost half of herbicides are estimated to have mutagenic activity and reproductive toxicity. The toxic effects are significantly associated with decreasing of *TPSA*.

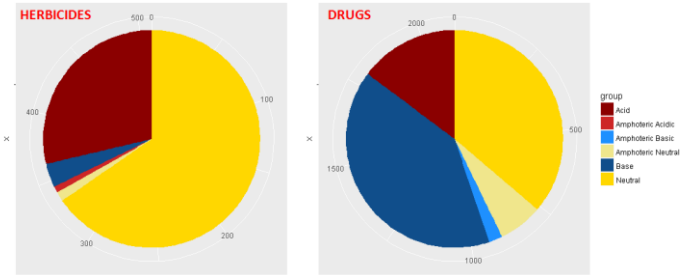


Fig. 3. Distributions of herbicides and drugs with regard to their net molecular charge. Acids and amphoteric acidic compounds have negative net charge, while bases and amphoteric basic molecules have positive net charge. The net charge of neutral molecules and zwitter ions is zero.

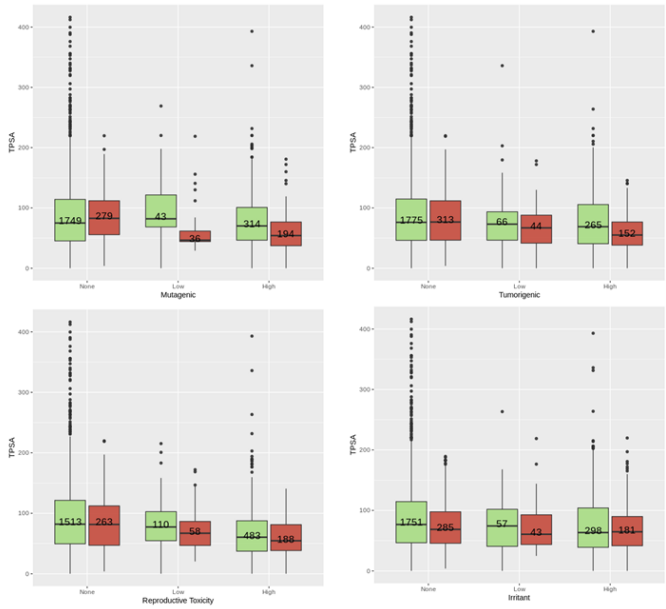


Fig. 4. Dependence of four types of toxicity - mutagenic, tumorigenic and irritating effects as well as reproductive toxicity, upon *TPSA* for herbicides (red) and drugs (green).

Conclusions

The data set of herbicides has been compared *in silico* with the data set of approved drugs downloaded from DrugBank, from the aspects of drug-likeness, herbicide-likeness and toxicity. The three sets of rules which have been developed for the purpose of discriminating between drug-like and nondrug-like molecules within the high-throughput screening (HTS) approach, were applied. According to Lipinski rule of 5, Veber's rules and Muegge's filter, 99%, 89% and 93% of herbicides, respectively, are classified as drug-like molecules what is significantly higher than the corresponding proportions of already approved drugs, 89.6%, 78.5% and 80%, respectively. Although herbicides are drug-like, their properties span specific herbicide-like ranges. Most herbicides are neutral or negatively charged species. They have no or one *HBD* atom, low C-atom to heteroatom ratio and *clogP* and *TPSA* within the lead-like ranges 0.5-3.5 and 20-100 $Å^2$, respectively. Hence, a set of synthetic accessible herbicides correspond to a reasonable chemical library for either *in vitro* or *in silico* HTS. A chance that some of herbicides will be identified as lead molecules is quite high. However, the serious issue that may raised is toxicity.

Acknowledgment

The research was supported by the basic funding of the Croatian Ministry of Science and Education and the program of the Centre of Excellence for Bioprospecting of Adriatic sea (European Regional Development Fund KK.01.1.1.01).

References

Aliper, A., Plis, S., Artemov, A., Ulloa, A., Mamoshina, P., Zhavoronkov, A. (2016): Deep learning applications for predicting pharmacological properties of drugs and drug repurposing using transcriptomic data, *Mol. Pharm.* 13 (7), 2524-2530.

Benet, L.Z. (2013): The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development, *J. Pharm. Sci.* 102 (1), 34-42.

Clarke, D.E., Delaney J.S. (2003): Physical and molecular properties of agrochemicals: An analysis of screen inputs, hits, leads, and products, *CHIMIA* 57 (11), 731-734.

Daina, A., Michielin, O., Zoete, V. (2017): SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7, 42717.

Delaney, J., Clarke, E., Hughes, D., Rice M. (2006): Modern agrochemical research: a missed opportunity for drug discovery? *Drug Discov. Today* 11 (17-18), 839–845.

Ertl, P., Rohde, B., Selzer, P. (2000): Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties, *J. Med. Chem.* 43 (20), 3714-3717.

Forouzesh, A., Zand, E., Soufizadeh, S., Samadi Foroushani, S. (2015): Classification of herbicides according to chemical family for weed resistance management strategies – an update, *Weed Res.* 55 (4), 334-358.

Gandy M.N., Corral M.G., Mylne J.S., Stubbs K.A. (2015): An interactive database to explore herbicide physicochemical properties, *Org. Biomol. Chem*. 13(20), 5586-5590.

Gong, J., Liu, X., Cao, X., Diao, Y., Gao, D., Li, H., Qian, X. (2013): PTID: an integrated web resource and computational tool for agrochemical discovery. *Bioinformatics*. 29(2), 292-294. http://lilab.ecust.edu.cn/ptid/

Hughes J.P., Rees S., Kalindjian S.B., Philpott K.L. (2011): Principles of early drug discovery, *Br. J. Pharmacol.* 162(6), 1239-1249.

Kim, S., Thiessen, P.A., Bolton, E.E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Han, L., He, J., He, S., Shoemaker, B.A., Wang, J., Yu, B., Zhang, J., Bryant, S.H. (2016): PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 44(D1), D1202-D1213. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. (2001): Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev*. 46(1-3), 3-26.

Martin, Y.C. (2005): A bioavailability score, *J. Med. Chem*. 48 (9), 3164–3170.

Mignani, S., Rodrigues, J., Tomas, H., Jalal, R., Singh, P. P., Majoral, J.-P., Vishwakarma, R. A. (2018): Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified?, *Drug Discov. Today* 23(3), 605–615.

Mnif, W., Hassine, AI., Bouaziz, A., Bartegi, A., Thomas, O., Roig, B. (2011): Effect of endocrine disruptor pesticides: a review, *Int. J. Environ. Res. Public. Health* 8(6), 2265-2303.

Muegge, I., Heald, S.L., Brittelli, D. (2001): Simple selection criteria for drug-like chemical matter, *J. Med. Chem.* 44 (12), 1841-1846.

Rao, H., Huangfu, C., Wang, Y., Wang, X., Tang, T., Zeng, X., Li, Z., Chen, Y. (2015): Physicochemical profiles of the marketed agrochemicals and clues for agrochemical lead discovery and screening library development, *Mol. Inform.* 34(5), 331–338.

Sander, T., Freyss, J., von Korff, M., Rufener, C. (2015): DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis, *J. Chem. Inf. Model.* 55 (2), 460-473.

Tice, C.M. (2001): Selecting the right compounds for screening: does Lipinski's Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals?, *Pest. Manag. Sci.* 57(1), 3-16.

Tice, C.M. (2002): Selecting the right compounds for screening: use of surface-area parameters, *Pest. Manag. Sci.* 58(3), 219-233.

Trapp, S. (2009): Ecotoxicology modeling, emerging topics in ecotoxicology: Principles, approaches and perspectives, Springer Science+Business Media, Dordrecht, NL, pp. 299-353.

Usman S., Kundiri A., Nzamouhe M. (2017): Effects of organophosphate herbicides on biological organisms in soil medium - A mini review, *J. Ecol. Toxicol.* 1 (1), 102.

Veber, D.F., Johnson, S.R., Cheng, H.Y., Smith, B.R., Ward, K.W., Kopple, K.D. (2002): Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates, *J. Med. Chem.* 45(12), 2615-2623.

von Korff, M., Sander, T. (2006): Toxicity-indicating structural patterns, *J. Chem. Inf. Model.* 46 (2), 536-544.

Waring, M.J., Arrowsmith, J., Leach, A.R., Leeson, P.D., Mandrell, S., Owen, R.M., Pairaudeau, G., Pennie, W.D., Pickett, S.D., Wang, J., Wallace, O., Weir, A. (2015): An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies, *Nat. Rev. Drug Discov*. 14 (7), 475-486.

Westwood, J., Charudattan, R., Duke, S., Fennimore, S., Marrone, P., Slaughter, D., Swanton, C., Zollinger, R. (2018): Weed Management in 2050: Perspectives on the future of weed science, *Weed Sci*. 66 (3), 275-285.

Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Guo, A.C., Lo, EJ., Marcu, A., Grant, J.R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C., Wilson, M. (2017): DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018, *Nucleic Acids Res*. 46(D1), D1074-D1082.

Zhang, Y., Lorsbach, B.A., Castetter, S., Lambert, W.T., Kister, J., Wang, N.X., Klittich, C.J.R., Roth, J., Sparks, T.C., Loso, M.R. (2018): Physicochemical property guidelines for modern agrochemicals, *Pest. Manag. Sci*. 74(9), 1979-199

Sekcija: Zaštita okoliša
Session: Environmental Protection

Stručni rad

Biološka obrada biorazgradive frakcije iz miješanog komunalnog otpada

Tomislav Domanovac*[1], Dajana Kučić Grgić[2], Monika Šabić[2], Marija Vuković Domanovac[2]

[1]*IPZ Uniprojekt TERRA, Voćarska cesta 68, HR-10000 Zagreb*
[2]*Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za industrijsku ekologiju, Marulićev trg 19, HR-10000 Zagreb*
**Dopisni autor: tomislav@ipz-uniprojekt.hr*

Sažetak

Ljudi svojim aktivnostima, kojim zadovoljavaju svoje društvene i gospodarske potrebe, stalno djeluju na okoliš. Gospodarenje otpadom ima za svrhu smanjenje količina otpada bez uporabe rizičnih postupaka po ljudsko zdravlje i okoliš. Ovisno o vrsti otpada, ekonomskoj isplativosti te načelima zaštite okoliša, čvrsti otpad je moguće obraditi na više načina. Biološki postupci obrade otpada uključuju aerobnu i anaerobnu razgradnju. Kompostiranje je kontrolirani biokemijski proces pretvorbe organske tvari u aerobnim uvjetima u stabilan produkt kompost koji se može koristiti kao organsko gnojivo ili za oplemenjivanje tla. U ovom radu provedena je aerobna obrada biorazgradive frakcije iz miješanog komunalnog otpada u reaktorskom sustavu pri različitim protocima zraka od 0,05; 0,075; 0,1 i 0,125 L/min u pokusima B1-B4. Konverzija hlapive tvari iznosila je do 58,8 %.

Ključne riječi: aerobna obrada otpada, biorazgradiva frakcija, miješani komunalni otpad

Uvod

Narušavanje prirodne ravnoteže i uništavanje pojedinih ekosustava posljedica je ljudske aktivnosti vezane uz industriju, intenzivnu poljoprivredu, graditeljstvo, promet itd. Ishod navedenih djelatnosti dovodi do onečišćenja tla, podzemnih i površinskih voda, mora, zraka, uništavanja šuma, promjene klime, smanjivanja ozonskog sloja u atmosferi te smanjivanja biološke raznolikosti (Briški, 2016). Kako bi se negativni utjecaji na okoliš sveli na najmanju moguću mjeru, potrebno je otpadnim tokovima gospodariti na odgovarajući način poštivajući hijerarhiju gospodarenja otpadom (Diaz et al., 2007; Fiustein et al., 1983). Hijerarhijski pristup upravljanja otpadom nalaže redom: smanjivanje otpada na izvoru nastanka, ponovnu uporabu, recikliranje i kompostiranje, energijska oporaba te na samom kraju

odlaganje. Vrsta otpada, načela zaštite okoliša i ekonomska isplativost uvjetuju odabir načina obrade otpada (Briški, 2016; Komilis et al., 2003; Kučić, 2014).
Otpad se prema Zakonu o održivom gospodarenju otpadom (NN 94/13, 73/17) definira kao svaka tvar ili predmet koje posjednik odbacuje, namjerava ili mora odbaciti. Prema podacima Ministarstva zaštite okoliša i energetike, procijenjeno je kako u Republici Hrvatskoj otpad iz kućanstava sadrži oko 40 % biootpada iz kuhinja i vrtova, odnosno više od 60 % biorazgradivog čvrstog otpada. Zbog ispunjavanja ciljeva gospodarenja otpadom, biootpad je potrebno izdvajati i reciklirati čime se smanjuje utjecaj na okoliš, odnosno emisije stakleničkih plinova koje nastaju na odlagalištima. U Republici Hrvatskoj u 2013. godini odloženo je 870.434 tona biorazgradivog otpada. Prema Direktivi 2008/98/EZ Europskog parlamenta i Vijeća od 19. studenoga 2008. o otpadu i stavljanju izvan snage određenih direktiva te Zakonu o održivom gospodarenju otpadom, cilj je do kraja 2020. godine smanjiti količinu ovakvog otpada na odlagalištima za 70 %.
Ekološki prihvatljivim načinom obrade biorazgradivog otpada smatra se proces kompostiranja. Kompostiranje dolazi od latinske riječi *compostium* što u prijevodu znači mješavina, a odnosi se na raznolikost supstrata kojeg zajednice mikroorganizama u aerobnim uvjetima prevode u stabilan produkt-kompost uz oslobađanje plinova (ugljikov dioksid, amonijak), topline i vode. Kompostiranje je kontrolirani biokemijski proces čiji supstrati su najčešće materijali biljnog, životinjskog ili mikrobiološkog podrijetla (Kader et al., 2007). Udio biljnih supstrata je najveći, dok životinjska tkiva i mikrobne komponente čine manje frakcije bilo koje mješavine (Diaz et al., 2007). Tijekom kompostiranja izmjenjuju se četiri faze ovisno o promjeni temperature: mezofilna faza (25 – 45 °C), termofilna faza (45 – 65 °C), faza hlađenja (druga mezofilna faza) i faza zrenja. Uspješnost procesa kompostiranja ovisi o različitim fizikalnim, kemijskim i biološkim čimbenicima kao što su: omjer C/N, sadržaj vlage, odgovarajući sadržaj kisika, temperatura, raspon pH-vrijednosti, veličina čestica te broj i vrsta mikroorganizama (Briški, 2016; Diaz et al., 2007; Kader et al., 2007).
Jedan od najznačajnijih čimbenika u procesu kompostiranja je sadržaj kisika u kompostnoj masi, a uvjetovan je tehnologijom i sustavom provođenja procesa (Diaz et al., 2007; Guo et al., 2012). Aeracija u sustavima može biti prirodna, pasivna ili prisilna (Boulter et al., 2000). Potrebno je aeriranjem osigurati više od 15 mas% kisika u plinovitoj fazi unutar kompostne hrpe za održavanje aerobnih uvjeta. Preintenzivno aeriranje je također nepoželjno za uspješno provođenje procesa jer uzrokuje isušivanje kompostne mase i samim time smanjenje mikrobne aktivnosti. Zrak se nalazi u međuprostorima kompostne mase te zbog mikrobne aktivnosti mijenja se njegov sastav, odnosno koncentracija ugljikovog dioksida postupno se povećava, a koncentracija kisika smanjuje. Upravo zbog toga važno je da mikroorganizmi imaju stalnu opskrbu kisikom kako bi njihove

metaboličke aktivnosti bile nepromijenjene (Briški, 2016; Diaz et al., 2007; Epstein, 2011).
Proces kompostiranja može se provesti u otvorenim i zatvorenim (reaktorskim) sustavima. Odabir sustava za kompostiranje ovisi o vrsti i količini otpada, ekonomskoj isplativosti, zakonskim propisima, lokaciji te zahtjevima vezanim za kvalitetu konačnog produkta.
U ovom radu ispitan je utjecaj protoka na proces kompostiranja biorazgradive frakcije iz miješanog komunalnog otpada. Proces kompostiranja provodio se u adijabatskom reaktoru radnog volumena 1,0 L s prisilnom aeracijom tijekom 21 dana.

Materijali i metode

U ovom radu je kao supstrat za kompostiranje korištena biorazgradiva frakcija iz miješanog komunalnog otpada Grada Zagreba. Pokusi kompostiranja provedeni su u adijabatskim reaktorima radnog volumena V=1,0 L. Reaktori su napunjeni svježim supstratom veličina čestica < 40 mm. Provedena su četiri pokusa, pri kojima je ispitivan utjecaj različitih protoka zraka na proces kompostiranja: 0,05 L/min, 0,075 L/min, 0,1 L/min i 0,125 L/min, označenih s B1 do B4. Prozračivanje kompostne mase unutar reaktora omogućeno je pomoću aeracijske pumpe, a protok ulaznog zraka reguliran je pomoću rotametra. Izlaz iz rotametra spojen je na bocu ispiralicu koja je postavljena prije ulaza u reaktor. Na izlazu iz reaktora sakupljan je kondenzat, a izlazni plinovi, CO_2 i NH_3, apsorbirani su u 1 mol/L NaOH, odnosno 4 % H_3BO_3. Temperatura se svakodnevno mjerila u sredini kompostne mase ubodnim termometrom.
Na početku i kraju procesa kompostiranja analizirani su sljedeći pokazatelji: udio suhe tvari, vlage i hlapive tvari, udio ugljika i dušika i pH-vrijednost. Svakodnevno određivana je koncentracija amonijaka i ugljikovog dioksida u struji zraka na izlazu iz reaktora, mjerena je temperatura te volumen nastalog kondenzata. Maseni udio suhe tvari određivan je sušenjem uzorka pri 105 °C do konstantne mase, a udio hlapive tvari (HT) određivan je žarenjem suhog uzorka pri 500 °C. Maseni udio hlapive tvari (HT) te pH-vrijednost supstrata određivani su prema standardnoj metodi (Austrian standard S 2023). Vrijednost pH je izmjerena pomoću prijenosnog mjerača WTW Multi 340i. Udio dušika određivan je kao ukupni dušik prema Kjeldahlu, standardnoj metodi za određivanje dušika u tlu (Bremner, 1996). Plinovi NH_3 i CO_2, nastali tijekom procesa kompostiranja, apsorbirani su u otopini 4 % H_3BO_3 s indikatorima, odnosno u otopini 1 mol/L NaOH, te je titrimetrijski s 0,1 mol/L HCl, odnosno s 1 mol/L HCl (dodatak fenoftaleina kao indikatora) određena njihova koncentracija i izračunata masa u odnosu na početnu vrijednost hlapive tvari (Kolthoff, 1951). U tablici 1. prikazani su početni uvjeti procesa kompostiranja za pokuse B1-B4.

Tablica 1. Početni uvjeti procesa kompostiranja za pokuse B1-B4

Table 1. Initial working conditions for composting proces in experiments B1-B4

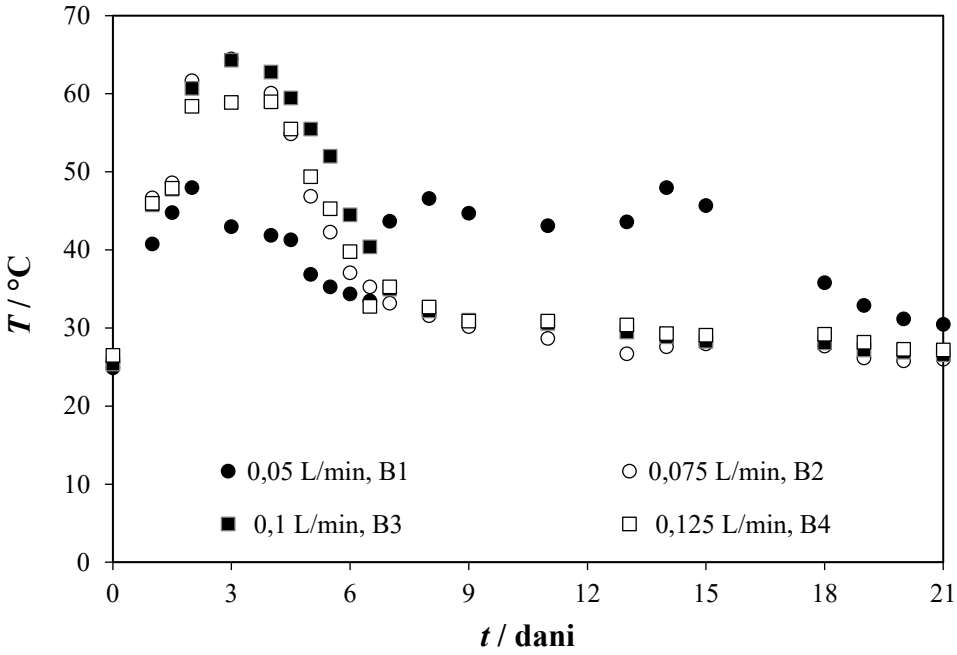
Pokus #	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**
Q_z / L/min	0,05	0,075	0,1	0,125
V (reaktora) / L	1,0			
m (supstrata) / kg	0,45			
ω_0 (H_2O) / %	56,5			
ω_0 (HT) / %	54,6			
pH (supstrata) / -	6,6			
omjer C/N / -	21,3			

Za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija i gljiva priređivane su hranjive podloge prema uputama proizvođača (Biolife Manual, Second Edition, Ingraf, Milano, Italija, 1991.). Ukupan broj živih stanica bakterija i funga, CFU, određivan je nacjepljivanjem 1 mL homogeniziranih decimalnih razrjeđenja na hranjive podloge u Petrijevim zdjelicama. Petrijeve zdjelice su inkubirane pri 37 i 50 °C za bakterije, odnosno pri 28 i 50 °C za gljive. Izravnim brojanjem izraslih kolonija određen je ukupan broj živih stanica mikroorganizama u 1,0 g uzorka. Prema standardnoj metodi EN 12457-4:2002 priređen je eluat iz supstrata. U eluatu su određivani pH-vrijednost, kemijska potrošnje kisika (KPK), biokemijska potrošnja kisika (BPK_5), ukupna suha tvar (TS) i udio hlapive tvari (VS) prema standardnim metodama (APHA, 1998.). Test toksičnosti je proveden pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri*. Inhibicija bioluminiscencije izmjerena je nakon inkubacije od 30 min prema standardnoj metodi EN ISO 11348-3, 1998. i izražava se kao efektivna koncentracija (EC_{50}). Iz dobivene vrijednosti EC_{50} izračunava se indeks utjecaja toksičnosti $TII_{50} = 1/EC_{50} \times 100$ %. Prema definiranoj skali uzorci se klasificiraju kao 'netoksični' (0), 'blago toksični' (<1), 'toksični' (1–10), 'vrlotoksični' (11–100), i 'ekstremno toksični' (>100) (Günes et al., 2008).

Rezultati i rasprava

Aerobna razgradnja je egzoterman proces kojim nastaje relativno velika količina energije. Dio nastale energije koriste mikroorganizmi, a ostatak energije se oslobađa u obliku topline. Učinkovitost biorazgradnje ovisi o tvari koja se razgrađuje. Kod kompostiranja supstrata s većim udjelom jednostavnih organskih molekula najveća brzina biorazgradnje ostvaruje se pri temperaturama između 30 i 45 °C, a kada su temperaturne vrijednosti iznad 45 °C dolazi do razgradnje složenijih organskih molekula te uništavanja patogenih mikroorganizama.

Na slici 1. tijekom procesa kompostiranja, ovisno o početnom protoku, mogu se vidjeti temperaturne promjene u kompostnoj masi. Unutar 24 sata u svim reaktorima temperatura je u prosjeku iznosila je 44,8 °C. U bioreaktoru B1 s protokom 0,05 L min^{-1} u 2. danu postignuta je najviša vrijednost temperature od 48 °C. Nadalje, najviša vrijednost temperature u B2 i B3 postignuta je u 3. danu i iznosi oko 65 °C te u 4. danu od 59 °C u B4. Nakon 6. dana u B2-B4 temperatura se lagano smanjuje do kraja procesa. U B1 temperatura se od 2. do 6. dana smanjuje do 34 °C nakon čega se povećava i u 14. danu dostiže ponovno 48 °C i ponovno se počinje smanjivati do 21. dana. Porast temperature posljedica je topline oslobođene mikrobnom aktivnošću (Haug, 1993).



Slika 1. Promjena temperature tijekom 21 dana kompostiranja za pokuse B1-B4

Fig. 1. Temperature change during 21 days of composting for experiments B1-B4

Različite grupe mikroorganizama prevladavaju tijekom pojedinih faza kompostiranja. Razgradnju biorazgradive tvari u procesima kompostiranja provode aerobni mikroorganizmi (Briški et al., 2003; Diaz et al., 2007). U tablici 2. prikazane su vrijednosti ukupnog broja živih stanica mikroorganizama (CFU) sadržanih u biorazgradivoj frakciji iz miješanog komunalnog otpada. Dobivena vrijednost CFU za mezofilne mikroorganizme inkubirane pri 28 i 37 °C je za dvije

potencije veća u odnosu na CFU za termofilne mikroorganizme inkubirane pri 50 °C.
Tijekom procesa supstrat mijenja svoja kemijska i fizikalna svojstva što je rezultat biorazgradnje (Haug, 1993). U svrhu karakterizacije utjecaja supstrata na okoliš koristi se laboratorijska simulacija procjeđivanja voda. Proizvod laboratorijske simulacije je procjedna voda, odnosno eluat koji se sastoji od desorbiranih, dispergiranih i otopljenih tvari iz uzorka otpada. Rezultati procesa kompostiranja i analize eluata prikazani su tablicama 3. i 4.

Tablica 2. Ukupan broj živih stanica mikroorganizama u svježem supstratu

Table 2. Total number of viable cells of microorganisms in a fresh substrate

Mikroorganizmi	CFU, 1/g uzorka		
	T = 28 °C	T = 37 °C	T = 50 °C
Bakterije	-	$1{,}5 \cdot 10^9$	$5{,}7 \cdot 10^7$
Gljive	$1{,}1 \cdot 10^7$	-	$1{,}4 \cdot 10^5$

Tablica 3. Rezultati kompostiranja na kraju procesa u 21. danu

Table 3. Results of composting at the end of the process in 21st day

Pokus #	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**
pH (supstrata) / -	8,8	8,1	8,2	7,9
m (supstrata) / kg	0,31	0,30	0,30	0,32
ω (H_2O) / %	65,5	58,9	63,3	60,3
ω (hlapiva tvar) / %	56,1	43,2	40,1	51,7
omjer C/N / -	20,4	16,5	14,5	16,9
m (CO_2) / g/kg	560	410	431	434
m (NH_3) / mg/kg	0	1012	1905	1272
Konverzija / %	44,1	50,0	58,8	39,8

U tablici 3. prikazani su rezultati kompostiranja u bioreaktorima B1-B4 ovisno o početnom protoku. Vrijednost pH se povećala u prosjeku za 1,65 i vlažnost za 5,5 %, u svim pokusima. Udio hlapive tvari (HT) u odnosu na masu supstrata u 21. danu smanjio se na vrijednost od 47,0±7,4 kao i omjer C/N se s početne vrijednosti od 21,3 do 14,5 u odnosu na B1-B4. Masa supstrata se do 21. dana smanjila za 32 % pri čemu je nastalo u prosjeku 460 g/kg CO_2 i 1047 mg/kg NH_3. Pretpostavlja se da je niska vrijednost protoka zraka od 0,05 L/min u B1 utjecala na zadržavanje dušika u supstratu i zbog čega u izlaznim plinovima nije detektiran NH_3. Konverzija hlapive tvari na kraju procesa kompostiranja se kreće od 39,8 do 58,8 %.

Rezultati analize eluata prikazani su u tablici 4. Vrijednost pH eluata se povećala u prosjeku za 2,9 tijekom kompostiranja za B1-B4. Određivanje vrijednosti KPK i BPK_5 značajno je za procjenu biorazgradivosti organskih tvari u otpadnim vodama (Vuković et al., 2012). Vrijednost KPK se u prosjeku smanjila na 5060±507 mg O_2/L u odnosu na početnu vrijednost, a omjer BPK_5/KPK za 73,7 % što ukazuje na visoku biorazgradivost prisutnih organskih tvari. Prema TII_{50} nastali eluat produkta dobivenog kompostiranjem je iz *vrlo toksičnog*, kako je prema skali klasificiran, prešao u *toksično* područje (Farre et al., 2008). U 21. danu vrijednost TS se smanjila za 45,6 % u kojoj udio hlapive tvari (VS) iznosi 0,629.

Tablica 4. Rezultati analize eluata u procesu kompostiranja

Table 4. Results of eluate analysis in the composting process

Pokus P1 #	**B1**	**B2**	**B3**	**B4**
pH (0. dan) / -	5,36			
pH (21. dan) / -	8,8	8,1	8,1	8,0
KPK (0. dan) / mg O_2/L	10612			
KPK (21. dan) / mg O_2/L	4771	4513	5339	5617
BPK_5/KPK (0. dan) / -	0,967			
BPK_5/KPK (21. dan) / -	0,219	0,216	0,335	0,246
TII_{50} (0 dan) / %	20,66			
TII_{50} (21. dan) / %	3,66	2,08	1,99	3,04
TS (0. dan) / g/L^-	11,40			
TS (21. dan) / g/L	5,50	5,90	6,47	6,92
VS/TS (0. dan) / -	0,626			
VS/TS (21. dan) / -	0,642	0,595	0,631	0,649

Zaključci

Kompostiranjem biorazgradive frakcije iz miješanog komunalnog otpada u reaktorskom sustavu tijekom 21 dana, najviša vrijednost konverzije organske tvari od 58,8 % i najniži omjer C/N koji iznosi 14,5, postignuti su pri protoku zraka 0,1 L/min. Vrijednosti temperatura kretale su se do 65 °C što ukazuje na aktivnost termofilnih mikroorganizama koje razgrađuju teže razgradive organske molekule. Rezultati TII_{50} ukazuju na smanjenje toksičnosti produkta dobivenog kompostiranjem. Prema testu biorazgradivosti, procesom kompostiranja u trajanju 21 dan, biorazgradivost se smanjila za 73,7 %.

Literatura

APHA, Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed., American Water Works Association, Washington, (1998).

Austrian Standards Institute (1986). Austrian standard: Analytical methods and quality control for waste compost. ÖNORM S 2023, Vienna, Austria.

Boulter, J. I., Boland, G.J., Trevors, J.T., Compost: A study of the development process and end-product potential for suppression of turfgrass disease, *World J. Microb. Biot*. 16 (2000) 115 - 134.

Bremner J. M., Nitrogen-total, in: D. L. Sparks, A. L. Page, P. A. Helmke, R. H. Loeppert, P. N. Soltanpour, M. A. Tabatabai, C. T. Johnston, M. E. Sumner (Eds.), Methods of soil analysis. Part 3 – chemical methods., American Society of Agronomy, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin (1996) str. 1089-1108.

Briški F, Gomzi Z., Hublin A., Vuković, M., Aerobno kompostiranje otpadaka voća i povrća: modeliranje procesa, *Kem. Ind*. 52 (2003) 95–102.

Briški, F., Zaštita okoliša, Element, Zagreb, 2016.

Diaz, L. F., de Bertoldi, M., Bidlingmaier, W., (Eds.) Compost Science and technology, Elsevier, Amsterdam, 2007.

El Kader, N. A., Robin, P., Paillat, J.-M., Leterme, P., Turning, compacting and the addition of water as factors affecting gaseous emissions in farm manure composting, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2619 – 2628

EN 12457-4:2002, Characterization of waste – Leaching; Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges – Part 4: One-stage batch test at a liquid to solids ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 10 (without or with size reduction), European Committee for Standardization.

Epstein, E., Industrial composting Enviromental Engineering and Facilities Management, Taylor & Francis Group, 2011., USA

Farre, M., Asperger, D., Kantiani, L., Gonzalez, S., Petrović, M., Barceló, D., Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminiscence inhibition of *Vibrio fischeri*, *Anal. Bioanal. Chem*., 390 (2008) 1999-2007.

Finstein, M. S., Miller, F. C., Strom, P.F., MacGregor, S. T., Psarianos, K. M., Composting ecosystem management for waste treatment, *Biotechnol.* 1 (1983) 347 – 353.

Günes, E. H., Günes, Y., Talınıe, İ., Toxicity evaluation of industrial and land base sources in a river basin, *Desalination* 226 (2008) 348-356.

Guo, R., Li, G., Jiang, T., Schuchardt, F., Chen, T., Zhao, Y., Shen, Y., Effect of aeration rate, C/N ratio and moisture content on the stability and maturity of compost, *Bioresour. Technol*. 112 (2012) 171 – 178.

Haug R.T., The practical handbook of compost engineering, Lewis, Boca Raton, Florida, 1993.

Kolthoff, I. M., Sandel E. B., Inorganic quantitative analysis, *Školska knjiga*, Zagreb, (1951) 347-352.

Komilis, D. P., Ham, R. K., The effect of lignin and sugars to the aerobic decomposition of solid wastes, *Waste Manag.* 23 (5) (2003) 419 - 423.

Kučić, D., Integracija procesa kompostiranja i adsorpcije, Doktorski rad. Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2010

Pravilnik o katalogu otpada, NN 90/15.

Vuković, M., Ćosić, I., Kolačko, K., Briški, F., Kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi iz duhanskog otpada, *Kem .Ind*., 61 (2012) 417-425.

Zakon o održivom gospodarenju otpadom, NN 94/13, 73/17.

Professional paper

Biological treatment of biodegradable fraction from mixed municipal waste

Tomislav Domanovac[1*], Dajana Kučić Grgić[2], Monika Šabić[2], Marija Vuković Domanovac[2]

[1]IPZ Uniprojekt TERRA, Voćarska cesta 68, HR-10000 Zagreb
[2]Univerisity of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Department of Industrial Ecology, Marulićev trg 19, HR-10000 Zagreb
[*]Corresponding author: tomislav@ipz-uniprojekt.hr

Summary

People with their activities that meet their social and economic needs constantly influence the environment. Waste management has the purpose of reducing the amount of waste without the use of risky procedures for human health and the environment. Depending on the type of waste, economic viability and the principles of environmental protection, solid waste can be processed in several ways. Biological waste treatment processes include aerobic and anaerobic degradation. Composting is a controlled biochemical process under aerobic conditions where organic matter is transformed into a stable product – compost that can be used as an organic fertilizer or for soil replenishment. In this paper an aerobic treatment of biodegradable fraction from mixed municipal waste in the reactor system was carried out at different air flow rates of 0.05; 0.075; 0.1 and 0.125 L/min in experiments B1-B4. Conversion of volatiles amounted up to 58.8 %.

Key words: aerobic waste treatment, biodegradable fraction, mixed municipal waste

Stručni rad

Masene koncentracije PAU, OC I EC U PM_1 frakciji lebdećih čestica

Ivana Jakovljević*, Ranka Godec, Zdravka Sever Štrukil, Iva Šimić, Gordana Pehnec

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb, Hrvatska
**Corresponding author:ijakovljevic@imi.hr*

Sažetak

Povišene masene koncentracije lebdećih čestica u zraku imaju velik utjecaj na zdravlje ljudi. Dosadašnja istraživanja u svijetu, a tako i u Hrvatskoj, bila su usmjerena na proučavanje frakcija lebdećih čestica PM_{10} i $PM_{2,5}$, dok su čestice aerodinamičkog promjera manjeg od 1 µm (PM_1) još uvijek nedovoljno istražene. Istraživanja su dokazala da takve čestice prodiru dublje u dišni sustav te kao takve imaju štetan utjecaj na zdravlje ljudi. Cilj ovoga rada bio je odrediti koncentracije policikličkih aromatskih ugljikovodika (PAU), elementnog ugljika (EC) i organskog ugljika (OC), vezanih na PM_1 čestice, na jednoj lokaciji u Zagrebu. Uzorkovanje je provedeno tijekom 65 dana u zimskom periodu godine. Koncentracije PAU određene su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s fluorescentnim detektorom (HPLC/FLD), a sadržaj OC i EC u PM_1 frakciji određen je metodom termičko - optičke transmisije (TOT). Koncentracije PAU zabilježene su u rasponu od 0,16 ng/m^3 za fluoranten do 5,10 ng/m^3 za benzo(b)fluoranten. Koncentracije elementnog i organskog ugljika bile su od 0,3 µg/m^3 do 2,0 µg/m^3 za EC i 3,2 µg/m^3 – 19,9 µg/m^3 za OC. Srednja vrijednost OC/EC omjera iznosila je 8,6. Visoka vrijednost OC/EC omjera ukazuje na postojanje velike količine sekundarnog organskog ugljika (SOC). Zabilježene niske vrijednosti PAU s malim brojem prstenova (fluoranten i piren), a visoke vrijednosti masenih koncentracija PAU s pet i više aromatskih prstenova ukazuju na promet kao dominantan izvor PAU u PM_1 frakciji lebdećih čestica.

Ključne riječi: OC/EC, lebdeće čestice, HPLC/FLD, promet

Uvod

Pod pojmom lebdeće čestice ili aerosola podrazumijeva se raspršena tekuća i/ili kruta faza u zraku. Čestice aerodinamičkog promjera manjeg od 10 µm mogu ostati u zraku nekoliko dana te se pod utjecajem vjetra mogu raspršivati i na veće udaljenosti.

Veličina čestica određuje njihovu depoziciju u respiratornom traktu ljudi. Lebdeće čestice aerodinamičkog promjera manjeg od 10 µm (PM_{10}) talože se uglavnom u gornjem dijelu dišnog trakta, sitnije čestice aerodinamičkog promjera manjeg od 2,5 µm ($PM_{2,5}$) talože se u plućnim alveolama, dok čestice promjera manjeg od 1 µm (PM_1) mogu prodrijeti iz plućnih alveola u krvotok. Istraživanja su pokazala da su sitnije čestice opasnije od većih čestica po pitanju štetnog utjecaja na respiratorni i kardiovaskularni sustav u ljudi (Kampa i Castanas, 2008; Fernandez i sur., 2003). Dosadašnja istraživanja u svijetu, a tako i u Hrvatskoj (Li i sur., 2009; Šišović i sur., 2008; Possanzini i sur., 2004; Šišović i sur., 1991), bila su usmjerena na proučavanje PAU u frakcijama lebdećih čestica PM_{10} i $PM_{2,5}$, dok su čestice aerodinamičkog promjera manjeg od 1 µm (PM_1) još uvijek nedovoljno istražene. Toksičnost čestica znatno ovisi i o koncentraciji štetnih tvari koje su vezane na same čestice (npr. PAU, EC, OC, metali i dr.).

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAU) su spojevi s dva i više aromatska prstena. U okoliš mogu dospjeti prirodnim putem (veliki šumski požari, vulkanske erupcije (Li i sur., 2009)), te utjecajem ljudske aktivnosti. Prisutni su i u ispušnim plinovima motornih vozila. Izgaranjem goriva kod dizelskih motora uglavnom nastaju PAU s manjim brojem aromatskih prstenova (manjih molekulskih masa), dok kod benzinski motora nastaju uglavnom PAU s većim brojem aromatskih prstenova (većih molekulskih masa) kao što je npr. benzo[ghi]perilen (Šišović i sur., 2005). Jedan od većih izvora PAU su kućna ložišta ako se kao sredstvo za grijanje domova koristi drvo ili ugljen (Wenger i sur., 2009).

PAU s dva ili tri benzenska prstena, postojani su u plinovitoj fazi te njihova raspodjela između čestične i plinovite faze ovisi o temperaturi. Koncentracije tih PAU u plinovitoj fazi rastu s porastom temperature. PAU s pet ili više benzenskih prstenova u zraku se uglavnom nalaze vezani na lebdeće čestice (Lee i sur., 1981).

Ugljik je poznat od davnih vremena, njegova prisutnost u zraku ima učinak na globalno zagrijavanje te smanjenu vidljivost. Pod pojmom ukupni ugljik (eng. *Total Carbon*, TC) u zraku podrazujevaju se svi oblici ugljika prisutni u uzorcima lebdećih čestica u zraku. U ovom istraživanju ukupni ugljik se sastoji od dva glavna oblika: elementni ugljik (eng. *Elemental Carbon*, EC) i organski ugljik (eng. *Organic Carbon*, OC). Elementni ugljik je vidljiva komponenta lebdećih čestica u zraku, još se naziva i čađa. Porijeklo EC je iz prirodnih i antropogenih izvora (Lin i Tai, 2001; Castro i sur., 1999). Nastaje kao primarna onečišćujuća tvar kod nepotpunog izgaranja fosilnih i biljnih goriva, biomasa, šumskih požara, industrijskih procesa (Han i sur., 2007; Bae i sur., 2007; Chen i sur., 2004; Lin i Tai, 2001; Castro i sur., 1999). Organska tvar u atmosferi je složena i sadržava stotine organskih spojeva (Chen i sur., 2004; Wilson i sur., 2002; Castro i sur., 1999). OC je samo jedna od frakcija organske tvari (Chen i sur., 2004). Potječe iz primarnih (emisije biljnih spora, peludi, šumski požari, vulkanske erupcije) i sekudarnih izvora (izgaranje fosilnih goriva i biomasa, mehanički procesi) (Castro i sur., 1999). Sekudarni

organski ugljik (SOC) nastaje pretvorbom plinovitih onečišćujućih organskih tvari u zraku (Castro i sur., 1999).
Cilj ovoga rada bio je odrediti masene koncentracije lebdećih čestica PM_1 te sadržaj PAU, EC i OC vezanih na PM_1 čestice na jednoj lokaciji u Zagrebu, a u svrhu utvrđivanja njihove međusobne povezanosti te procjene mogućih izvora onečišćenja zraka na navedenoj lokaciji.

Materijali i metode

Uzorkovanje

24-satni uzorci PM_1 frakcije lebdećih čestica sakupljani su tijekom 65 dana (1. siječnja – 6. ožujka 2018.) na jednoj lokaciji u sjevernom stambenom dijelu Zagreba kojeg karakterizira umjerena gustoća prometa i umjerena naseljenost stanovništva. Uzorci su sakupljani na filtre od kvarcnih vlakana (Pall).

Analiza

Masena koncentracija PM_1 frakcije lebdećih čestica u zraku određena je gravimetrijski na način opisan u normi HRN EN 12341:2014. Sakupljeni uzorci lebdećih čestica (filtarski medij) dijeli se na dva dijela; jedan dio se koristio za analizu PAU, drugi dio za analizu EC i OC. Određeno je 11 PAU: fluoranten (Flu), benzo[a]piren (BaP), benzo[a]antracen (BaA), krizen (Kri) benzo[k]fluoranten (BkF), benzo[j]fluoranten (BjF), piren (Pir), benzo[b]fluoranten (BbF), indeno[1,2,3-cd]piren (IP), benzo[ghi]perilen (BghiP) i dibenzo[a,h]antracen (DahA). Određivanje PAU provedeno je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s fluorescentnim detektorom promjenjivih valnih duljina ekscitacije i emisije (HPLC/FLD). Prije same analize uzorci lebdećih čestica ekstrahirani su u ultrazvučnoj kupelji 1 sat, u smjesi otapala cikloheksan : toluen (3:7). Nakon ekstrakcije otapalo je upareno do suha u struji dušika te su takvi uzorci otopljeni u acetonitrilu. Analiza na HPLC uređaju rađena je pri protoku mobilne faze (acetonitril : voda 60:40) od 1 mL/min.
Za analizu EC i OC u uzorcima lebdećih čestica izrezan je alikvot filtra pomoću rezača dimenzije 1x1,5 cm. Sadržaj OC i EC u PM_1 frakciji lebdećih čestica određen je metodom termičko-optičke transmisije (TOT) uporabom uređaja Carbon aerosol analyser (Sunset Laboratory inc.) uz korištenje „Quartz" protokola.

Rezultati i rasprava

U ovom istraživanju sakupljeni su 24-satni uzorci PM_1 frakcije lebdećih čestica tijekom 65 dana na jednoj lokaciji u gradu Zagrebu u zimskom periodu godine. Osim

masene koncentracije sakupljene frakcije lebdećih čestica PM_1, određivan je sadržaj PAU, EC, OC i ukupnog ugljika (TC), te OC/EC omjer. Masene koncentracije mjerenih PAU, OC, EC, TC i PM_1 frakcije prikazane su u Tablici 1. Masena koncentracija PM_1 frakcije kretala se od 7,3 do 58,9 μg/m^3, s prosječnom vrijednosti od 21,4 μg/m^3. Između 11 mjerenih PAU najvišu prosječnu vrijednost masenih koncentracija imao je BbF (2,32 ng/m^3), dok je najnižu prosječnu vrijednost imao DahA (0,20 ng/m^3). Najviše istraživani i najčešće mjereni PAU je BaP. Masena koncentracija BaP kretala se od 0,53 do 4,49 ng/m^3, s prosječnom vrijednosti od 1,71 ng/m^3. Masene koncentracije elementnog, organskog i ukupnog ugljika kretale su se od 3,2 do 19,9 μg/m^3 za OC, od 0,3 do 2,0 μg/m^3 za EC te od 3,9 μg/m^3 do 21,2 μg/m^3 za TC, a srednje vrijednosti za cijelo razdoblje mjerenja bile su 8,1 μg/m^3 za OC, 1,0 μg/m^3 za EC, te za TC 9,1 μg/m^3.

Tablica 1. Masene koncentracije PAU (ng/m^3), OC, EC, TC (μg/m^3) i PM_1 (μg/m^3)

Table 1. Mass concentrations of PAHs (ng/m^3), OC, EC, TC (μg/m^3) and PM_1 (μg/m^3)

	N	raspon	γ	γ_{50}	STD
Flu	65	0,16-3,72	0,90	0,62	0,79
Pir		0,20-2,90	0,88	0,63	0,64
BaA		0,27-2,99	1,06	0,92	0,65
Kri		0,59-4,83	1,94	1,71	1,05
BjF		0,51-3,23	1,38	1,27	0,64
BbF		0,85-5,10	2,32	2,10	1,02
BkF		0,34-2,04	0,94	0,86	0,41
BaP		0,53-4,49	1,71	1,62	0,91
BghiP		0,59-4,01	1,78	1,50	0,78
IP		0,67-3,93	1,79	1,62	0,76
DahA		0,07-0,49	0,20	0,19	0,10
OC		3,2-19,9	8,1	6,9	3,9
EC		0,3-2,0	1,0	1,0	0,4
TC		3,9-21,2	9,1	8,0	4,1
PM		7,3-58,9	21,4	17,8	11,7
OC/EC		3,3-18,4	8, 6	8,1	3, 6

γ - srednja vrijednost masene koncentracije
γ_{50} - median
STD – standardna devijacija
N – broj uzorka

Vrijednost OC/EC omjera kretala se od 3,3 do 18,4 dok je srednja vrijednost iznosila 8,6. Visoka vrijednost OC/EC omjera ukazuje na postojanje velike količine sekundarnog organskog ugljika (SOC). Zabilježene niske vrijednosti PAU s malim brojem prstenova (fluoranten 0,90 ng/m^3, i piren 0,88 ng/m^3), a visoke vrijednosti

masenih koncentracija PAU s većim brojem aromatskih prstenova (benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(j)fluoranten, benzo(ghi)perilen i indeno(1,2,3-cd)piren) ukazuju na promet kao dominantan izvor onečišćenja zraka PAU u PM_1 frakciji lebdećih čestica.
Dijagnostički omjeri masenih koncentracija upotrebljavaju se za kvalitativnu identifikaciju izvora onečišćenja. Ovu metodu određivanja izvora onečišćenja prvi put su primijenili Daisey i suradnici (1979), a poslije su je koristili mnogi drugi autori. Da bi se izbjegao utjecaj pojedinih faktora, npr. različite hlapljivosti, različite topivosti u vodi i adsorpcije određivani su omjeri između PAU sličnih molekulskih masa (Dvorská i sur. 2011). Rezultati masenih omjera pojedinih PAU-a te pregled literaturnih vrijednosti istih omjera prikazani su u Tablici 2. Prema vrijednostima izračunatih diagnostičkih omjera: Flu/(Flu+Pir) = 0,49, IP/BghiP = 1,01, IP/(IP+BghP) = 0,5, BaA/(BaA+Kri) = 0,34 i BaP/(BaP+Kri) = 0,47 ukazuju na promet odnosno dizel kao dominantni izvor onečišćenja zraka PAU u PM_1 frakciji lebdećih čestica, što dodatno potvrđuje i omjer OC/EC, koji je relativno visok i karakterističan za ispušne plinove automobila.

Tablica 2. Usporedba izračunatih diagnostičkih omjera pojedinih PAU s literaturnim podatcima

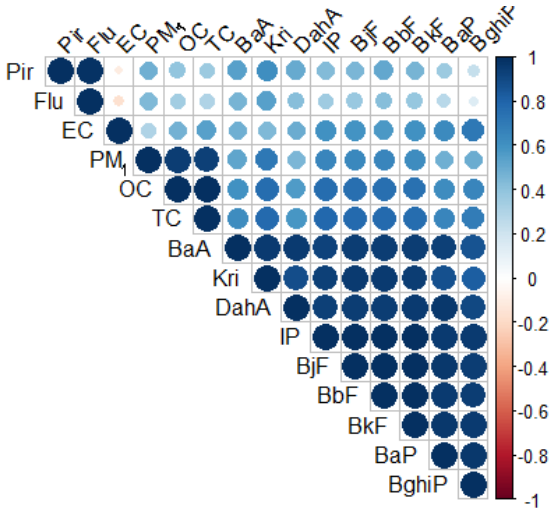
Table 2. Comparisson of diagnostic ratios of some PAHs, and review main emission sources from literature

	Dijagnostički omjer	Izvor	Referenca
Flu/(Flu+Pir)	0,2-0,5	dizel	Teixeira i sur.,. 2012
	0,4-0,5	tekuća fosilna goriva	Yunker i sur., 2002
	>0,5	drvo	Zhang i sur., 2004
	0,49	dizel	*Ovo istraživanje*
BaP/BghiP	0,3-0,4	automobili	Agudelo-Castañeda i sur., 2014
	0,46-0,81	dizela	Hanedar i sur., 2014
	0,9-6,6	ugljen	Fu i sur., 2010
	0,93	ugljen	*Ovo istraživanje*
IP/BghiP	1	dizel	Hanedar i sur., 2014
	0,4	benzin	Caricchia i sur., 1999
	1,01	dizel	*Ovo istraživanje*
BaP/(BaP+Kri)	<0,5	dizel	Teixeira i sur.,. 2012
	>0,5	benzin	Agudelo-Castañeda i sur., 2014
	0,47	dizel	*Ovo istraživanje*
BaA/(BaA+Kri)	0,38-0,65	dizel	Yunker i sur., 2002
	0,33-0,38	benzin	Mantis i sur., 2005
	0,34	benzin	*Ovo istraživanje*
IP/(IP+BghiP)	<0,5	nafta	Yunker i sur., 2002
	>0,7	drvo	Šišović i sur., 2012
	0,50	nafta	*Ovo istraživanje*

Linearna regresijska analiza rađena je u statističkom *R* programu za koncentracije pojedinačnih PAU, EC, OC, TC i PM_1 čestica (Slika 1). Pozitivna korelacija je prikazana plavom bojom, dok je negativna korelacija obojena crveno. Intezitet boje i veličina kruga proporcionalni su korelacijskom koeficijentu. Regresijska analiza pokazala je dobru korelaciju između PAU većih molekulskih masa (korelacijski koeficijenti (r) kretali su se između 0,82 i 0,99; $p<0,05$), dok su kod PAU manjih molekulskih masa korelacijski koeficijenti bili nešto niži, ali još uvijek značajni (r između 0,28 i 0,54; $p<0,05$). Značajna pozitivna korelacija nađena je između svih mjerenjih tvari (PAU; OC; EC) i masene koncentracije PM_1 lebdećih čestica. Korelacije između EC, OC, TC i PAU također su bile značajne te su se korelacijski koeficijenti kretali između 0,44 i 0,78; $p<0,05$. Negativna korelacija nađena je jedino između Pir i EC, Flu i EC, ali nije bila statistički značajna. Negativna korelacija dobivena je vjerojatno zbog toga jer prisustvo EC u PM_1 česticama dolazi od ispušnih plinova automobila, a za Flu i Pir kao dominantni izvor je izgaranje biomase i drva te kao takvi se više vežu na čestice većeg aerodinamičkog promjera.

Slika 1. Linearni korelacijski koeficijenti između PAU, EC, OC, TC i PM_1 lebdećih čestica

Fig. 1. Linear correlation coefficients between PAH, EC, OC, TC and PM_1 particle matter



Zaključak

Tijekom promatranog zimskog razdoblja 24-satne masene koncentracije PAU kretale su se u rasponu od 0,16 ng/m^3 za fluoranten do 5,10 ng/m^3 za benzo(b)fluoranten. Koncentracije elementnog i organskog ugljika kretale su se od

0,3 μg/m^3 do 2,0 μg/m^3 za EC i 3,2 μg/m^3 do 19,9 μg/m^3 za OC. Srednja vrijednost omjera OC/EC iznosila je 8,6. Viša vrijednost omjera koncentracija OC/EC može biti posljedica veće gustoće prometa, što ujedno potvrđuju i zabilježene niske vrijednosti masenih koncentracija PAU s malim brojem prstenova (fluoranten i piren), a visoke vrijednosti masenih koncentracija PAU s većim brojem aromatskih prstenova (BbF, BkF, BjF, BghiP i IP) te dijegnostički omjeri pojedinih PAU ukazuju na promet kao dominantan izvor onečišćenja zraka s PAU u PM_1 frakciji lebdećih čestica.

Literatura

Bae, M.S., Hong, C.S., Kim, Y.J., Han, J.S., Moon, K.J., Kondo, Y., Komazaki, Y., Miyazaki, Y. (2007): Intercomparison of two different thermal – optical elemental carbons and optical black carbon during ABC-EAREX2005, *Atmos. Environ.* 41, 2791-2803.

Castro, L.M., Pio, C.A., Harrison, R.M., Smith, D.J.T (1999): Carbonaceous aerosol in urban and rural European atmospheres: estimatin of secondary organic carbon concentrations, *Atmos. Environ.* 33, 2771-2781.

Chen, L.-W.A, Chow, J.C., Watson J.G., Moosmüller, H., Arnott, W.P. (2004): Modeling reflectance and transmittance of quartz-fiber filter samples containing element carbon particles: Implications for thermal/optical analysis, *Aerosol. Sci*. 35, 765-780.

Daisey, J.M. Leyko, M.A. Kneip, T.J. (1979): Source identification and allocation of polynuclear aromatic hydrocarbon compounds in the New York City aerosol: Methods and applications, In polynuclear aromatic hydrocarbons; Jones, P.W.; Leber, P., Eds; Ann Arbor 201-215.

Dvorská, A. Lammel, G. Klánová, J. (2011): Use of diagnostic ratio for studying source apportionment and reactivity of ambient polycyclic aromatic hydrocarbons over Central Europe, *Atmos. Environ*. 45, 420-427.

Fernandez, A., Wendt, J.O.L., Wolski, N., Hein, K.R.G., Wang, S., Witten, M.L. (2003): Inhalation health effects of fine particles from the co-combustion of coal and refuse derived fuel, *Chemosphere* 51, 1129-1137.

Han, Y., Cao, J., Chow, J.C., Watson J.G., An, Z., Jin, Z., Fung, K., Liu, S. (2007): Evaluation of the thermal/optical reflectance method for discrimination between char- and soot-EC, *Chemosphere* 69, 569-574.

Kampa, M., Castanas, E. (2008): Human health effects of air pollution, *Environ. Pollut.* 151, 362-367.

Lee, L. M., Novotny, V. M., Bartle, D. K. (1981): Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic compounds. New York (NY): Academic Press.

Li, Z., Porter, E. N., Sjodin, A., Needham, L. L., Lee, S., Russell, A. G., Mulholland, J. A. (2009): Characterization of PM2.5-bound polycyclic aromatic

hydrocarbons in Atlanta - Seasonal variations at urban, suburban, and rural ambient air monitoring sites, *Atmos. Environ.* 43, 4187-4193.

Lin, J.J., Tai, H.S. (2001): Concentrations and distributions of carbonaceous species in ambient particles in Kaohsiung City, Taiwan, *Atmos. Environ*. 35, 2627-2636.

Possanzini, M., Di Palo, V., Gigliucci, P., Tomasi Scianò, M.C., Cecinato, A. (2004): Determination of phase-distributed PAH in Rome ambient air by denunder / GC-MS method, *Atmos. Environ.* 38, 1727-1734.

Šišović, A., Bešlić, I., Šega, K., Vađić, V. (2008): PAH mass concentrations measured in PM_{10} particle fraction, *Environ. Int.* 34, 580-584.

Šišović, A., Fugaš, M. (1991): Comparative evaluation of procedures for the determination of PAH in low-volume samples, *Environ. Monit.* 18, 235-241.

Šišović, A., Vađić, Z., Šega, K., Bešlić, I., Vađić, V. (2005): Comparison between PAH mass concentrations measured in PM10 and PM2,5 particle fractions, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 121-126.

Wenger, D., Gerecke, A. C., Heeb, N. V., Hueglin, C., Seiler, C., Haag, R., Naegeli, H., Zenobi, R. (2009): Aryl hydrocarbon receptor–mediated activity of atmospheric particulate matter from an urban and a rural in Switzerland, *Atmos. Environ.* 34, 3556-3562.

Wilson, W.E., Chow, J.C., Claiborn C., Fusheng, W., Engelbrecht, J., Watson, J.G. (2002): Monitoring of particulate matter outdoors, *Chemosphere* 49, 1009-1043.

Professional paper

Mass concentrations of PAH, OC AND EC IN PM_1 particle fraction

Ivana Jakovljević*, Ranka Godec, Zdravka Sever Štrukil, Iva Šimić, Gordana Pehnec

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska c, 2, 10000 Zagreb, Croatia
**Corresponding author: ijakovljevic@imi.hr*

High values of mass concentrations of particle matter in the air have great impact on human health. Previous studies on both the global level and in Croatia focused on investigating only PM_{10} or $PM_{2.5}$ particles matter, while particles with an aerodynamic diameter less than 1 µm (PM_1) are still poor. Studies have shown that PM_1 particles penetrate deeper into the respiratory system and can have adverse effects. The aim of this paper was to determine the concentrations of PAHs, EC and OC bounded to PM_1 particles at one location in Zagreb. Samples were collected during 65 days in the winter period. Concentrations of the PM_1 fraction were determined gravimetrically. PAHs concentrations were determined using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector (FLD). The EC and OC mass concentrations were determined by thermal-optical transmission (TOT). PAH concentrations ranged from 0.16 ng/m^3 for fluoranthene to 5.10 ng/m^3 for benzo(b)fluoranthene. The concentrations of elemental and organic carbon ranged from 0.3 µg/m^3 to 2.0 µg/m^3 for EC and 3.2 µg/m^3 to 19.9 µg/m^3 for OC. The average value of their OC/EC ratio was 8.6. The high ratio value of the OC/EC suggests a large amount of secondary organic carbon (SOC). The measured low values of PAHs with small molecular weight (fluoranthene and pyrene) and a high value of PAH concentrations with high molecular weight indicate traffic as the dominant source of the PM_1 particle fraction.

Keywords: OC/EC, particle fraction, HPLC/FLD, traffic

Izvorni znanstveni rad

Biorazgradnja bisfenola A bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyes* sp.

Dajana Kučić Grgić*, Antonija Kovačević, Ema Lovrinčić, Matija Cvetnić, Vesna Ocelić Bulatović, Marija Vuković Domanovac

Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za industrijsku ekologiju, Marulićev trg 19, 10000 Zagreb
**Dopisni autor: dkucic@fkit.hr*

Sažetak

Bisfenol A (BPA) je sveprisutni organski spoj koji se primjenjuje u proizvodnji polikarbonata, epoksi smola i raznih drugih materijala. Polikarbonati se koriste u proizvodnji plastičnih ambalaža za hranu i piće, bočica za djecu, kuhinjskih pomagala, pakiranju lijekova, elektroničke opreme. BPA dospijeva u okoliš, odnosno u tlo i vode, tijekom kemijske proizvodnje, transporta ili prerade te neispravnim odlaganjem proizvoda koji ga sadržavaju. Zanimljiv je zbog štetnog utjecaja na ljudsko zdravlje, životinjski svijet i okoliš te ga je potrebno ukloniti. Biorazgradnja BPA u vodi je jedan od mogućih načina uklanjanja BPA iz okoliša. U ovom radu provedena je biorazgradnja bisfenolom A u vodi bakterijskim kulturama *Pseudomonas aeruginosom* BSW i *Streptomycesom* sp. Pokusima su ispitani različiti čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje BPA, poput pH-vrijednosti (5, 6 i 7), koncentracije biomase *P. aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. (optička gustoća 0,1; 0,2; 0,3), koncentracije BPA (od 0 do 15 mg dm^{-3}) i temperature (25, 35 i 40°C). Prema dobivenim rezultatima *Pseudomonas aeruginosa* BSW najviše BPA razgradila je pri temperaturi od 35 °C, pH-vrijednosti 7 i optičkoj gustoći od 0,3. *Streptomyces* sp. najviše BPA razgradio je pri temperaturi od 35 °C, pH-vrijednosti 7 i optičkoj gustoći 0,2. Pri ispitivanju utjecaja različitih početnih koncentracija BPA na njegovu biorazgradnju, *Pseudomonas aeruginosa* BSW pokazala je najbolje rezultate pri početnoj koncentraciji BPA od 5 mg dm^{-3}, a *Streptomyces* sp. pri 7,5 mg dm^{-3}. Uspoređujući rezultate pokusa s modelom može se ustanoviti da Monodov model dobro opisuje kinetiku procesa.

Ključne riječi: Bisfenol A, Plastika, Biorazgradnja, *Pseudomonas aeruginosa BSW*, *Streptomyces* sp., Monod model

Uvod

Na svojstva raznih materijala koji se primjenjuju u svakodnevnom životu utječe se dodatkom raznih anorganskih i organskih tvari. Jedan od njih je i toksični organski spoj, bisfenol A (BPA), koji je svoju primjenu našao uglavnom u polikarbonatima i epoksi smolama (Mandić, 2006). BPA se nalazi u raznim proizvodima kao što su ambalaže za hranu i piće, kuhinjska pomagala, elektronička oprema, boje te metalne konzerve za hranu i piće s kojima su ljudi u svakodnevnom doticaju (Kang et al., 2006). Epoksi smole koriste se u industriji umjetnih materijala, boja i adheziva, te kao razne vrste zaštitnih prevlaka, osobito kod metalnih konzervi koje sadrže hranu i piće, bačvi za vino, dok se u stomatologiji koriste kao ispuna za zube (Mandić, 2006). Polikarbonati se koriste zbog svoje lakoće, izdržljivosti, velikog modula elastičnosti te visokog tališta. Najviše se koristi u proizvodnji plastike i time ulazi u život svakog čovjeka. BPA može prijeći iz ambalaže u hranu ili piće koje se nalazi unutar nje. Glavni uzrok, koji potiče prijenos BPA iz ambalaže je zagrijavanje proizvoda prilikom proizvodnje ili tijekom visokih ljetnih temperatura (Kang et al., 2006).
U posljednjih osamdeset godina ispitivalo se djelovanje BPA na ljude, životinje i okoliš. Krajem dvadesetog stoljeća otkriven je njegov negativan utjecaj na zdravlje ljudi te je 1996. godine proglašen supstancom opasnom po ljudsko zdravlje (Rykowska et al., 2006). Izloženost BPA može dovesti do povećanja ili smanjenja broja kromosoma kod fetusa što dovodi do pobačaja ili genetskog poremećaja djeteta (npr. Downov sindrom), a uzrok tomu je nedostatak povratne regulacije aktivnosti, sinteze i eliminacije hormona (Rykowska et al., 2006). Zbog toga se označava oznakom opasnosti Xn (štetno). Svrstan je u treću skupinu prema reproduktivnoj toksičnosti.
Povećanom upotrebom proizvoda koji sadržavaju BPA, povećava se i njegova koncentracija u okolišu. Iako mu je kratki životni vijek, BPA predstavlja problem zbog konstantnog otpuštanja u okolinu. U tlo i vode dospijeva tijekom kemijske proizvodnje, transporta ili prerade te nepravilnim odlaganjem plastičnog otpada. Razni mikroorganizmi, *Pseudomonas* sp. (Kang et al, 2002a), *Streptomyces* sp. (Kang et al, 2004; Sashi et al., 2005) , *Aspergillus* sp. (Yim et al., 2003; Chai et al., 2005), *Chlorella fusca* var. *vacuolata* (Hirooka et al., 2003), koji se nalaze u tlu i vodi imaju sposobnost razgraditi BPA. Mnogi čimbenici poput temperature, vlage, pH-vrijednosti i koncentracije kisika utječu na proces biorazgradnje (Raičević et al., 2007 Svi mikroorganizmi najbolje rastu pri optimalnim uvjetima, tj. uvjetima okoliša kojima su oni prilagođeni.
U ovom radu provelo se istraživanje uklanjanja BPA iz vodene otopine procesom biorazgradnje bakterijskim kulturama *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. Navedene kulture izolirane su iz okoliša, odnosno biootpada i tla. Ispitani su različiti čimbenici koji utječu na proces biorazgradnje BPA poput

temperature, pH-vrijednosti, optičke gustoće bakterijske suspenzije i početne koncentracije BPA. Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni kao ovisnost brzine potrošnje supstrata (BPA) o koncentraciji supstrata (BPA), procijenjeni su parametri modela te se može na temelju regresijskog koeficjentaustanoviti da Monod model dobro opisuje kinetiku procesa.

Materijali i metode

Bisfenol A i bakterijske kulture

Korišten je bisfenol A čistoće 97 % proizvođača Acros Organics. Otopine BPA su se pripremale u MiliQ vodi.
Bakterijske kulture *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. koji su korišteni u eksperimentima pohranjeni su u zbirci mikroorganizama u Zavodu za industrijsku ekologiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. izolirani su iz biootpada koji je korišten u procesu kompostiranja.

Određivanje BPA tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Tijekom eksperimenata u određenim intervalima izuzimano je 500 µL uzorka i profiltrirano kroz filter, Chromafil xtra CA-45/25, promjera pora 0,45 µm, injektirano u viale i analizirano na uređaju HPLC-MS, Shimadzu, Japan, koji je opremljen s detektorima UV-DAD („Diode Array Detector"), SPD-20 AV i LCMS 2020 (Liquid Chromatograph Mass Spectrometer). Dvije pume korištene su za podešavanje protoka mobilne faze (0,1 % mravlje kiseline i 99 % metanola) koji je podešen na 0,3 cm^3 min^{-1} i 0,2 cm^3 min^{-1}. Volumen injektiranog uzorka iznosio je 20 µL. Intenzitet BPA mjeren je pri dvije valne duljine 220 nm i 254 nm te je maksimalna apsorpcija postignuta pri valnoj duljini 220 nm. Retencijsko vrijeme BPA bilo je u 4 minuti. Kromatografske analize provedene su na koloni Phenomenex Gemini 3u C18 110A (150 × 4,6 mm) koja je bila termostatirana na temperaturi od 40 °C.

Određivanje optičke gustoće, pH-vrijednosti i koncentracije kisika

Optička gustoća određivala se pri λ = 600 nm (Ronen et al., 2000) na spektrofotometru Hach, Model DR/2400, USA u staklenim kivetama visine 5 cm. Koncentracija kisika i pH-vrijednost određene su kisikovom elektrodom i pH elektrodom koje su bile spojene na uređaj Multi 340i, WTW, USA.

Utjecaj pH vrijednosti na biorazgradnju BPA

U pokusu P1 ispitao se utjecaj pH-vrijednosti (pH = 5, 6 i 7) na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyce*s sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW. Svi pokusi provodili su se na rotacijskoj tresilici Heidolph Unimax 1010, Njemačka, pri 160 o/min, pri temperaturi od 25 °C i početnoj OG = 0,2 i koncentraciji BPA od 15 mg L^{-1} tijekom četiri sata. pH- vrijednost otopina podešena je dodatkom otopina 0,1 mol dm^{-3} NaOH, i 0,1 mol dm^{-3} HCl. U određenim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika. Postotak biorazgradnje izračunat je prema jednadžbi 1:

$$\% \text{ Biorazgradnje} = (\gamma(\text{BPA})_0 - \gamma(\text{BPA})_t) / \gamma(\text{BPA})_0 \qquad (1)$$

gdje je γ_0 početna koncentracija BPA, a γ_t koncentracija BPA u vremenu *t*.

Utjecaj optičke gustoće na biorazgradnju BPA

U pokusu P2 ispitao se utjecaj optičke gustoće (OG = 0,1; 0,2 i 0,3) na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyce*s sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW. Svi pokusi provodili su se na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min, pri temperaturi od 25 °C i početnoj pH-vrijednosti 7 i koncentraciji BPA od 15 mg L^{-1} tijekom četiri sata. U određenim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika.

Utjecaj koncentracije BPA na biorazgradnju BPA

U pokusu P3 ispitao se utjecaj početne koncentracije BPA (4 - 15 mg L^{-1}) na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyce*s sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW. Svi pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min, pri temperaturi od 25 °C i početnoj OG = 0,2 i pH-vrijednosti 7 tijekom četiri sata. U određenim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika.

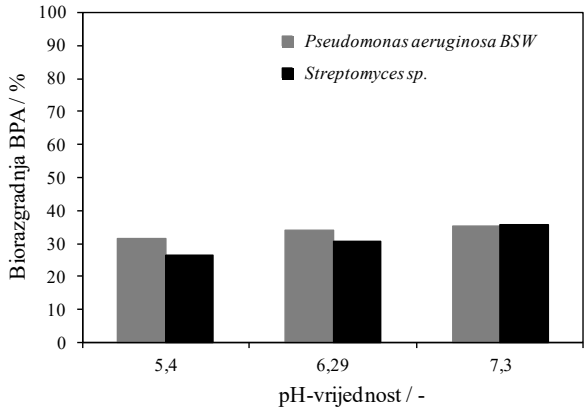
Utjecaj temperature na biorazgradnju BPA

U pokusu P4 ispitao se utjecaj početne temperature (25, 35 i 45 °C) na biorazgradnju BPA bakterijskim kulturama *Streptomyce*s sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW. Svi

pokusi su se provodili na rotacijskoj tresilici pri 160 o/min, pri pH-vrijednosti 7 i početnoj OG = 0,2 i koncentraciji BPA od 15 mg L^{-1} tijekom četiri sata. U određenim intervalima izuzimao se uzorak za određivanje koncentracije BPA i optičke gustoće. Tijekom cijelog perioda procesa mjerila se pH-vrijednost i koncentracija kisika.

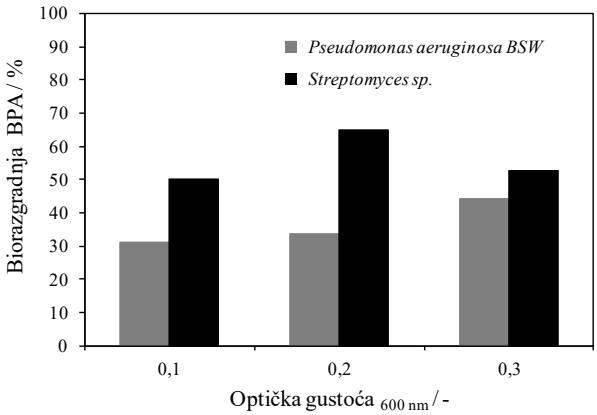
Rezultati i rasprava

U poslijednjih nekoliko godina sve je više pažnje posvećeno BPA i njegovom štetnom djelovanju na ljude i okoliš budući da je otkriveno njegovo prisutstvo u rijekama, morima i tlu. Zbog povećanja svijesti o njegovom štetnom djelovanju sve više organizacija promovira pravilno zbrinjavanje otpada čiji je BPA jedan od glavnih sastojaka. BPA u okoliš najčešće dospijeva razgradnjom nepravilno odloženog plastičnog otpada gdje se zbog svoje strukture teško uklanja (Mandić, 2006; Kang et al., 2006; Rykowska et al., 2006; Flint et al., 2012; Eio et al., 2014).
Na slici 1 prikazan je utjecaj pH-vrijednosti na proces biorazgradnje BPA bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. Vidljivo je smanjenje koncentracije BPA pri svim pH-vrijednostima. Koncentracija BPA najviše se smanjila pri pH-vrijednosti 7,3 (35 %) što je u skladu s literaturom (Kamaraj et al., 2014). Pri pH-vrijednostima 5 i 6 u pokusima biorazgradnje BPA sa *Streptomyces* sp. koncentracija se smanjila za 26 % odnosno 30 %, a u pokusima sa *Pseudomonas aeruginosa* BSW 31 % odnosno 33 % Nadalje, najintenzivnija biorazgradnja bila je unutar 30 minuta što se i slaže sa padom koncentracije kisika u pokusu P1. U pokusu sa *Pseudomonas aeruginosa* BSW pad koncentracije kisika je pri svim pH-vrijednostima jednak što se vidi iz neznatne razlike u postotku biorazgradnje BPA. Naime, *Pseudomonas aeruginosa* BSW je specifičan mikroorganizam koji uspješno razgrađuje organske tvari pri širokom rasponu pH-vrijedosti i temperature.
Na slici 2 prikazan je utjecaj optičke gustoće na biorazgradnje BPA bakterijama *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. U pokusu P2 (*Streptomyces* sp.) najviše BPA se biorazgradilo pri optičkoj gustoći 0,2 (65 %), a najmanje pri 0,1 (50 %). Razlog tome može biti što pri većoj optičkoj gustoći dolazi do kompeticije za supstratom odnosno BPA-om. Pri nižoj optičkoj gustoći koncentracija BPA je ista, no broj stanica bakterija je manji i više supstrata je dostupno za razgradnju(Herner et al., 2017) U pokusu s *Pseudomonas aeruginosom* BSW najviše BPA (44 %) se razgradilo pri najvećoj optičkoj gustoći od 0,3, a najmanje pri najmanjoj optičkoj gustoći od 0,1 31 %. Prema navedenom može se zaključiti da svaki mikroorganizam drugačije funkcionira u nekom sustavu, odnosno da na njihovu sposobnost biorazgradnje utječu mnogi čimbenici te da ne postoji pravilo po kojem će svi mikroorganizmi pri istim uvjetima dati podjednaki trend rezultata. Tijekom procesa optička gustoća *Streptomyces* sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW je rasla što ukazuje na povećanje biomase.



Slika 1. Utjecaj pH-vrijednosti na proces biorazgradnje BPA u vodi.

Fig.1. Influence of pH-value on biodegradation process of BPA in water.

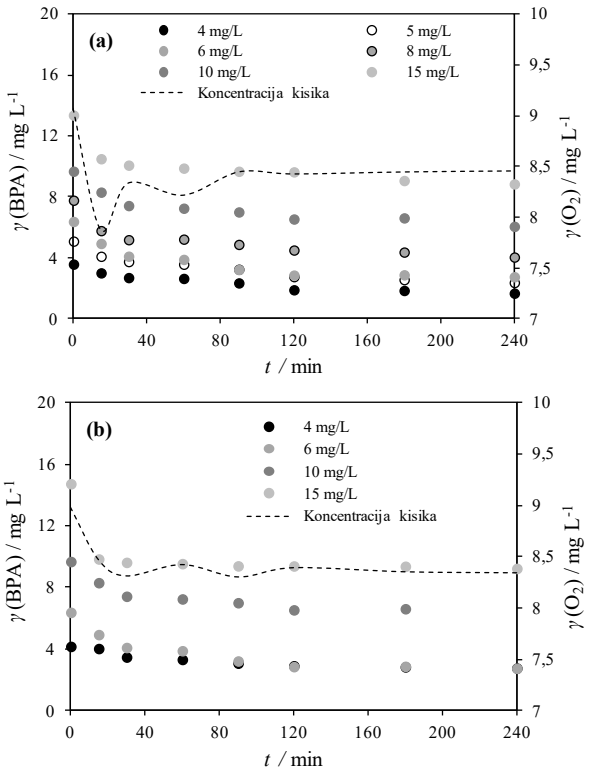


Slika 2. Utjecaj optičke gustoće na proces biorazgradnje BPA u vodi.

Fig. 2. Influence of optical density on biodegradation process of BPA in water.

Provedbom pokusa P3 dobiveni su rezultati biorazgradnje BPA sa *Streptomyces* sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW pri različitim početnim koncentracijama BPA. Iz slike 3 (a) i (b) vidljivo je smanjenje koncentracije BPA u vremenu za sve početne koncentracije BPA te da je najintenzivnija biorazgradnja bila u prvih 30 minuta, što pokazuje i pad koncentracije kisika. Najveći pad koncentracije kisika zabilježen je u oba pokusa u 30 minuti i to pri najnižim koncentracijama BPA. Pri većim koncentracijama BPA nije zabilježen takav pad kisika. Nakon 60 minuta procesa, koncentracija BPA u svim pokusima se nije značajno mijenjala, a pH-vrijednost je bila konstantna tijekom cijelog procesa u oba pokusa. Prema istraživanju (Kang et al., 2004) *Streptomyces* sp. pri temperaturi od 30 °C i početnoj koncentraciji BPA od 1 mg dm^{-3} može razgraditi više od 90 % BPA unutar 10 dana. U ovom pokusu unutar

četiri sata *Streptomyces* sp. (pri γ_0 (BPA) = 1 mg dm^{-3}) razgradio je oko 50 % BPA iz čega možemo pretpostaviti da se većina biorazgradnje BPA *Streptomyces* sp. događa unutar prvih 24 sata. S obzirom da se većina istraživanja temelji na mogućnosti uklanjanja BPA bakterijskom kulturom *Pseudomonas aeruginosa* (Kang et al., 2016; Cydzik et al., 2017), ovaj pokus vrlo je važan kako bi se pokazalo da i *Streptomyces* sp., koji je prisutan u sastavu tla, dobro razgrađuje BPA svih početnih koncentracija. Prema istraživanju (Kang et al., 2002a), gram negativne bakterije, izolirane iz rijeka, *Pseudomonas* sp. i *Pseudomonas putida* pri γ_0 (BPA) = 1 mg dm^{-3} te 30 °C unutar 10 dana mogu razgraditi do 91% BPA. Najveće smanjenje koncentracije BPA, odnosno najbrža biorazgradnja događa se unutar prvih 72 sata. S obzirom na razna istraživanja (Kang et al., 2016; Cydzik et al., 2017) i na temelju dobivenih rezultata može se reći da sve bakterije roda *Pseudomonas* dobro razgrađuju BPA bez obzira iz koje okoline su izolirane.



Slika 3. Utjecaj početne koncentracije BPA na proces biorazgradnje BPA bakterijskim kulturama *Pseudomonas aeruginosa* BSW (a) i *Streptomyces* sp. (b).

Fig. 3. Influence of initial concentration of BPA on biodegradation process of BPA with bacterial culture *Pseudomonas aeruginosa* BSW (a) and *Streptomyces* sp. (b).

Mikrobna razgradnja definira se kao biološki katalizirano smanjenje kemijske složenosti organskih tvari. U prirodnom okolišu uvjeti za biorazgradnju su vrlo složeni te brzina i stupanj biorazgradnje ovise o različitim čimbenicima ovisno o ekosustavu. Iako su mikrobni procesi vrlo kompleksni, pojedina procesna zbivanja ili skupine tih zbivanja mogu se predstaviti pomoću modela. Najpoznatiji model postavio je Monod (jed. 2) (Agarry et al., 2009):

$$r_s = r_{s,\max}(S/(K_s + S) \tag{2}$$

gdje je S koncentracija supstrata [mg L^{-1}], rs_{max} maksimalna specifična brzina potrošnje supstrata [mg L^{-1} min^{-1}], a K_s [mg dm^{-3}] konstanta zasićenja supstratom, koja je definirana kao koncentracija supstrata pri vrijednosti polovine maksimalne specifične brzine rasta.
Numeričke vrijednosti parametara modela dobivene su uspoređivanjem modela i rezultata pokusa korištenjem MS Solver programskog paketa (Vuković et al., 2012). U tablici 1 dobivene vrijednosti za rs_{max} su približne za ispitivane kulture, dok vrijednost *K*s ukazuje da veći afinitet prema supstratu pokazuje bakterijska kultura *Pseudomonas aeruginosa* BSW. Slika 4 prikazuje ovisnost brzine potrošnje supstrata o početnim koncentracijama supstrata u procesu biorazgradnje. Uspoređujući rezultate pokusa s modelom, može se ustanoviti da Monodov model (jed. (2), tab. 1), u rasponu početnih koncentracija za provedene pokuse, dobro opisuje kinetiku procesa, uz visoku vrijednost R^2.

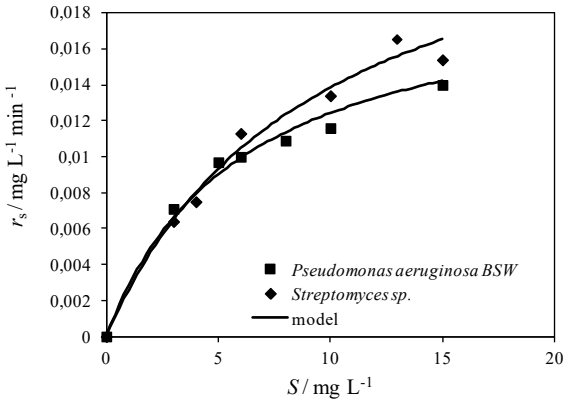
Tablica 1. Biokinetički parametri.

Table 1. Biokinetic parameters.

	***Streptomyces* sp.**	***Pseudomonas aeruginosa* BSW**
$rs_{,max}$ / $mgL^{-1}min^{-1}$	0,03	0,02
***K*s/mg L^{-1}**	9,5	6,1
R^2	0,941	0,900

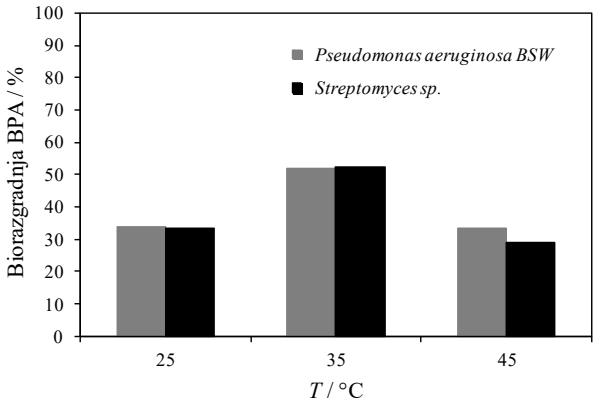
Prema dobivenim rezultatima iz pokusa P4 vidljivo je da bakterijskim kulturama, *Streptomyces* sp. i *Pseudomonas aeruginosa* BSW, najviše pogoduje temperatura od 35 °C za biorazgradnju BPA. Za rast i razvoj mikroorganizama optimalni su uvjeti između 20 °C i 45 °C, odnosno uvjeti sobne ili blago povišene temperature (Bertović et al., 2016; Vijayalakshmi et al., 2017). Obje bakterijske kulture podjednako su razgradile BPA pri temperaturi od 25 °C i 35 °C dok je pri temperaturi od 45 °C *Pseudomonas aeruginosa* BSW bolje razgradio prisutan BPA od *Streptomycesa* sp. Kao što je već spomenuto *Pseudomonas aeruginosa* je specifičan mikroorganizam koji ima široki raspon područja djelovanja te je korišteni *Pseudomonas aeruginosa*

u ovome pokusu izoliran tijekom procesa kompostiranja biootpada u termofilnoj fazi.



Slika 4. Utjecaj početnih koncentracija supstrata na brzinu potrošnje supstrata. Usporedba rezultata pokusa i modela.

Fig. 4. Influence of initial concentrations of substrate on consumption rate of substrate. Comparison of experimental results and model.



Slika 5. Utjecaj temperature na proces biorazgradnje BPA u vodi.

Fig. 5. Influence of temperature on biodegradation process of BPA in water.

Zaključci

Pseudomonas aeruginosa BSW i *Streptomyces* sp. najbolje su razgradile BPA u vodi pri pH vrijednosti 7,3. Biorazgradnja BPA sa oba mikroorganizma pri toj pH-vrijednosti iznosila je 35%. Optička gustoća u vrijednosti 0,2 odnosno 0,3 najbolje je pogodovala biorazgradnji BPA u vodi sa *Streptomyces* sp. odnosno *Pseudomonas*

aeruginosa BSW i iznosila je 65 % odnosno 44 %. Najučinkovitija biorazgradnja BPA u vodi s *Pseudomonas aeruginosa* BSW odnosno *Streptomyces* sp. bila je pri početnoj koncentraciji BPA od 5 mg dm^{-3} odnosno 7,5 mg dm^{-3} i iznosila je u oba slučaja 57 %. Pri temperaturi od 35 °C postignuto je najučinkovitije uklanjanje BPA u vodi sa *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. Biorazgradnja BPA iznosila je 52 %. Biorazgradnja BPA u vodi sa *Pseudomonas aeruginosa* BSW i *Streptomyces* sp. najveća je u prvih 30 do 60 minuta provođenja pokusa. Uspoređujući rezultate pokusa s modelom može se ustanoviti da Monodov model dobro opisuje kinetiku procesa.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge the financial support from Croatian Science Foundation through project entitled Modelling of Environmental Aspects of Advanced Water Treatment for Degradation of Priority Pollutants (MEAoWT) (IP-09-2014-7992).

Literatura

Agarry, S. E., Audu, T. O. K., Solomon, B. O., Substrate inhibition kinetics of phenol degradation by Pseudomonas fluorescence from steady state and wash-out dana, International Journal of Enviornmental Science and Technology, Vol. 6, No. 3, Summer, 2009, pp. 443-450

Bertović, B., Bioremedijacija zemlje onečišćene naftnim ugljikovodicima, Goriva i maziva, 55(4) (2016) 295-305

Chai, W., Handa, Y., Suzuki, M., Saito, M., Kato, N., Horiuchi, C.A., Biodegradation of bisphenol A by fungi, Appl. Biochem. Biotechnol. 120 (2005) 175–182.

Cydzik – Kwiatkowska, A., Zielinska, M., Microbial composition of biofilm treating wastewater rich in bisphenol A, J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng, 53(4) (2017) 385-392

Eio, E.J., Kawai, M., Tsuchiya, K.,Yamamoto, S., Toda, T., Biodegradation of bisphenol A by bacterial consortia, Int. Biodeterior. Biodegradation, 96 (2014) 166-173

Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E., Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective, J Environ Manage., 104 (2012) 19–34

Herner, Ž., Kučić, D., Zelić, B., Biodegradation of imidacloprid by composting process, Chem. Pap., 71 (2017) 13–20

Hirooka, T., Akiyama, Y., Tsuji, N., Nakamura, T., Nagase, H., Hirata, K., Miyamoto, K., Removal of hazardous phenols by microalgae under photoautotrophic conditions, J. Eiosci. Bioeng., 95 (2003) 200–203.

Kamaraj, M., Sivaraj, R., Venckatesh, R., Biodegradation of bisphenol A by the tolerant bacterial species isolated from coastal regions of Chennai, Tamil Nadu, India, Int. Biodeterior. Biodegradation, 93 (2014) 216 - 222

Kang, J., Katayama, Y., Kondo, F., Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals, Toxicology, 217 (2006) 81–90

Kang, J.-H., Kondo, F., Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water, Arch. Environ. Contam. Toxicol, 43 (2002a) 265-269

Kang, J.-H., Ri, N., Kondo, F., Streptomyces sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability, Lett. Appl. Microbiol., 39 (2004) 178–180

Mandić, D., Toksikološke značajke bisfenola A, Osijek, 2006.

Raičević, V., Lalević, B., Dabić, D.,Kiković, D., Jovanović, LJ., Nikšić M., Mikroorganizmi u bioremedijaciji zemljišta i voda, Zaštita materijala , 48(2) (2007) 49-52

Ronen, Z., Abelovich, A., Anaerobic-aerobic process for microbial degradation of tetrabromobisphenol A, Appl Environ Microbiol., 66(6) (2000) 2372–2377

Rykowska, I., Wasiak, W., Properties, Threats, and methods of analysis of bisphenol A and its derivates, Acta chromatogr, 16 (2006)

Sasaki, M., Maki, J., Oshiman, K., Matsumura, Y., Tsuchido, T., Biodegradation of bisphenol A by cells and cell lysate from *Sphingomonas* sp strain AO1, Biodegradation 16, 2005.,449-459.

Vijayalakshmi, V., Senthilkumar, P., Mophin – Kani, K., Sivamani, S., Sivarajasekar, N., Vasantharaj, S., Bio-degradation od bisphenol A by Pseudomonas aeruginosa Pab1 isolated from effluent of thermal paper industry: Kinetic modeling and process optimization, J Radiat Res Appl Sci, (2017) 1 - 10

Vuković, M., Ćosić, I., Kolačko K., Briški, F., Kinetika biorazgradnje organskih tvari, Kem. Ind. 61 (9-10) 417–425 (2012)

Yim, S.H., Kim, H.J., Lee, I.S., Microbial metabolism of the environmental estrogen bisphenol A, Arch. Pharm. Res. 10 (2003) 805–808.

Original scientific paper

Biodegradation of bisphenol A with bacteria *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptomyes* sp.

Dajana Kučić Grgić*, Antonija Kovačević, Ema Lovrinčić, Matija Cvetnić, Vesna Ocelić Bulatović, Marija Vuković Domanovac

University of Zagreb, Faculty of chemical engineering and technology, Department of industrial ecology, Marulićev trg 19, 10000 Zagreb
**Corresponding author: dkucic@fkit.hr*

Bisphenol A (BPA) is ubiquitous organic compound which is present in polycarbonates, epoxy resins and various other materials manufacture. Polycarbonates are used for food and beverage packaging, baby bottles, kitchen tools, medicine packaging and electronic components. Release of BPA in environment can occur during chemical manufacture, transport, processing and improper disposal of the products which contains it. BPA has toxic effect on ecosystem, it is harmful for human health and animal world and because of that it has to be removed from environment. In water systems, biodegradation of BPA occurs with several microorganisms capable of its biodegradation. In this paper was conducted biodegradation of BPA in water with bacterial cultures Pseudomonas aeruginosa BSW and Streptomyces sp. Experiments were performed under different pH-values (5, 6, 7), temperatures (25, 35 and 40 °C), different BPA concentration (0 - 15 mg dm-3) and different biomass concentration of P. aeruginosa BSW and Streptomyces sp. (0,1; 0,2; 0,3). According to obtained results the optimal conditions for biodegradation of BPA with Pseudomonas aeruginosa BSW and Streptomyces sp. was at temperature of 35 °C, pH value 7 and at optical density of 0.3 and 0.2, respectively. Among various initial BPA concentrations, Pseudomonas aeruginosa BSW showed the best results at initial BPA concentration of 5 mg dm^{-3} and Streptomyces sp. at 7,5 mg dm^{-3}. By comparing the obtained experiments results with the model, it can be concluded that Monod's model describes well the kinetics of the process.

Keywords: Bisphenol A, Plastics, Biodegradation process, Pseudomonas aeruginosa BSW, Streptomyces sp., Monod model

Izorni znanstveni rad

Denitrificirajuća defosfatacija preko nitrita

Dijana Grgas[1], Tea Štefanac[1], Neven Marković[1], Toni Šipalo[1], Sanja Radman[2], Tibela Landeka Dragičević[*1]

[1]*Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska*
[2]*MedILS, Šetalište Ivana Meštrovića 45, 21000, Split*
[*]*Dopisni autor: tlandekadragicevic@pbf.hr*

Sažetak

Istražena jedenitrificirajuća defosfatacija preko nitrita pri omjeru N/P 2,1 uz početnu koncentraciju 24,5±1,3 mg NO_2-N/L i 11,2±0,8 mg PO_4-P/L. Kao izvor ugljika uporabljen je natrijev acetat u omjeru C/N 1, 2, 3, 4 i 7.Uklanjanje P od 72,1% i potpuno uklanjanje NO_2-N (100%) je postignuto pri omjeru C/N 4, u anoksičnim uvjetima pri koncentraciji otopljenog kisika (engl. *Dissolved Oxygen*, DO) DO≤0,4 mg/L, omjeru N/P 2,1 i omjeru C/P 9,6.Potpuno uklanjanje NO_2-N i uklanjanje PO_4-P od 71,6% se postiže pri omjeru C/N 7 (C/P 16,1), pri čemu su organski sastojci dodani u suvišku i preostaju u obrađenoj vodi.

Ključne riječi: denitrificirajuća defosfatacija, DPAOs, NO_2-N, PO_4-P, C/N, C/P, N/P

Uvod

U svrhu prevencije eutrofikacije, uklanjanje nutrijenata (N i P) iz otpadne vode predstavlja ključnu strategiju.Biološko uklanjanje nutrijenata je ekonomična i održiva metoda uklanjanja N i P, a provodi se pomoću mikroorganizama u različitim okolišnim uvjetima u procesu obrade (Henze i sur., 2008; Metcalf & Eddy, 2003). Zakonom su definirane dopuštene količine N i P u obrađenoj vodi za ispust u okoliš (NN 3/16; NN 80/13).
Biološko uklanjanje dušika uključuje aerobnu nitrifikaciju (oksidaciju amonijaka preko nitrita do nitrata), i anoksičnu ili anaerobnu denitrifikaciju (redukcija nitrata preko nitrita do plinovitog dušika) (Henze i sur, 2008; Zhu i sur., 2008; Metcalf & Eddy, 2003).
Biološko uklanjanje fosfora postiže se EPBR procesom (engl. *Enhanced Biological Phosphorus Removal*, napredno biološko uklanjanje fosfora), koji se temelji na aktivnosti fosfat akumulirajućih organizama (PAO, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*). PAOs mogu unutarstanično akumulirati rezerve polifosfata (poliP) unosom ortofosfata u stanice znatno više od svojih anaboličkih potreba u naizmjeničnim

anaerobnim i aerobnim/anoksičnim uvjetima (Seviour i McIlroy, 2008; Henze i sur., 2008; Metcalf & Eddy, 2003; van Loosdrecht i sur., 1997)
U anaerobnim uvjetima PAOs uzimaju izvore ugljika poput hlapivih masnih kiselina (VFA, engl. *Volatile Fatty Acids*) i pohranjuju ih kao unutarstanične rezerve u obliku polihidroksialkanoata (PHA, engl. *polyhydroxyalkanoates*). Energiju potrebnu za taj proces dobiju razgradnjom glikogena, ali puno više hidrolizom unutarstanično pohranjenog poliP što rezultira otpuštanjem ortofosfata iz stanice u otopinu. Pri aerobnim/anoksičnim uvjetima PAOs koriste pohranjene PHAs kao izvor energije za unutarstanični unos fosfata i formiranje poliP, za rast stanica i obnovu zaliha glikogena, s kisikom/nitritom i/ili nitratom kao akceptorom elektrona (Wang i sur., 2012; Pijuan i sur., 2005; Metcalf & Eddy, 2003; Lee i sur., 2001; van Loosdrecht i sur., 1997; Kuba i sur., 1994; Mino i sur., 1994, 1998).
Neto uklanjanje fosfora se ostvaruje odvođenjem viška aktivnog mulja obogaćenog sa poliP.
U novije vrijeme sve se više pažnje posvećuje novom pristupu u biološkom uklanjanju N i P, nitritaciji (oksidacija amonijaka do nitrita) - denitritaciji (redukcija nitrita do plinovitog dušika), kao i EBPR procesu s nitritom kao akceptorom elektrona (Lv i sur., 2014; Zeng i sur., 2013; Carvalho i sur., 2007; Zhou i sur., 2007; Hu i sur., 2002; van Loosdrecht i sur., 1997; Kerrn Jespersen i Henze, 1993).
S druge strane, brojna istraživanja ističu inhibicijski učinak NO_2-N i FNA na bakterijski metabolizam, uključujući PAOs, nitrifikante i denitrifikante (Zeng i sur., 2013; Hu i sur., 2012; Zhou i sur., 2007; Vadivelu i sur., 2006; Pijuan i sur., 2005; Kuba i sur., 1994; Anthonisen i sur., 1976).
Stoga, u procesima koji uključuju uklanjanje dušika preko nitritnog puta, akumulacija NO_2-N vjerojatno ima štetan učinak na biološko uklanjanje nutrijenata.Istaknuto je da NO_2-N ima negativan učinak na EBPR proces jer inhibira metabolizam PAOs, ali dPAOs mogu koristiti NO_2-N kao elektron akceptor do koncentracije 5-10 mg NO_2-N/L nakon aklimatizacije (Lee i sur., 2001).
Anoksični unos fosfata se zbivao pri koncentraciji NO_2-N<5 mg/L, a više koncentracije NO_2-N su inhibirale proces (Coma i sur., 2012).
Aerobni unos fosfata je osjetljiviji na NO_2-N od anoksičnog unosa (Freitas i sur., 2009).Nitritna inhibicija je reverzibilna, a brzina obnove ovisi o koncentraciji kojoj je biomasa bila izložena.
Uporabom acetata kao jedinog izvora ugljika u EBPR sustavu, pri temperaturi 28-32ºC dokazano je da da niži omjer KPK/P (C/P=3) više pogoduje uklanjanju fosfora nego veći omjer od C/P=10 (Ong i sur., 2013).
Aktivnost denitrificirajuće defosfatacije pripisuje se DPAOs vrstama.
U anoksičnim uvjetima denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (DPAO, eng. *Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms*) unose fosfor u svoje stanice, pri čemu kao elektron akceptore koriste nitrate i/ili nitrite (Lv i sur., 2014;

Henze i sur., 2008; Carvalho i sur., 2007; Hu i sur., 2002; Kerrn-Jespersen i Henze, 1993; Kuba i sur., 1994).
DPAOs imaju sposobnost simultane denitrifikacije i uklanjanja fosfora u anoksičnim uvjetima. DPAOs u anaerobnim uvjetima pohranjuju VFA kao rezerve poli-β-hidroksialkanoata, a zatim ih u anoksičnim uvjetima oksidiraju da bi osigurali energiju za nakupljanje fosfora uz nitrat (NO_3^-) i/ili nitrit (NO_2^-) kao akceptore elektrona, umjesto kisika. DPAOs istovremenom denitrifikacijom i uklanjanjem fosfora troše manje ugljika, proizvode 20-30% manje biomase što rezultira manjim količinama nastalog mulja i koriste potencijalno inhibirajuće nitrate/nitrite kao akceptore elektrona te tako smanjuju potrebu za aeracijom.
U ovom radu istražit će se proces denitrificirajuće defosfatacije 24,5±1,3 mg NO_2-N/L i 11,2±0,8 mg PO_4-P/L uz natrijev acetat kao izvor ugljika priomjeru C/N 1, 2, 3, 4 i 7, pri DO≤0,4 mg/L.

Materijali i metode

Aktivni mulj

Aktivni mulj s uređaja za obradu otpadne vode grada uporabljen je za istraživanje procesa denitrificirajuće defosfatacije. U laboratorijskim uvjetima, u SBR reaktoru aktivni mulj je obogaćem DPAOs vrstama.

Mineralna podloga sa NO_2-N, PO_4-P i KPK

Odabrana početna koncentracija NO_2-N i PO_4-P u pokusima osigurana je dodatkom odgovarajuće količine priređenih vodenih otopina KH_2PO_4 i $NaNO_2$.Natrijev acetat ($NaC_2H_3O_2$) je uporabljen kao izvor ugljika, dodan u odgovarajućoj količini prema odabranoj vrijednosti C/N. Eksperimentalno je određeno da 1 g natrijeva acetata odgovara 0,55 g KPK.Sve kemikalije su p.a., proizvod tvrtke Merck.

Dizajn pokusa – aparatura i procesni uvjeti

Pokusi denitrificirajuće defosfatacije provedeni su u laboratorijskim čašama volumena 600 mL, radnog volumena 500 mL. Za postizanje anoksičnih uvjeta laboratorijske čaše su postavljene na magnetske miješalice pri 100 o/min. U svim pokusima izmjerena koncentracija otopljenog kisika bila je DO≤0,4 mg/L. Stalno je motrena koncentracija otopljenog kisika, pH vrijednost i temperatura tako što su u čaše postavljene kisikova i pH elektroda. Pokusi su provedeni pri ambijentalnim uvjetima temperature.

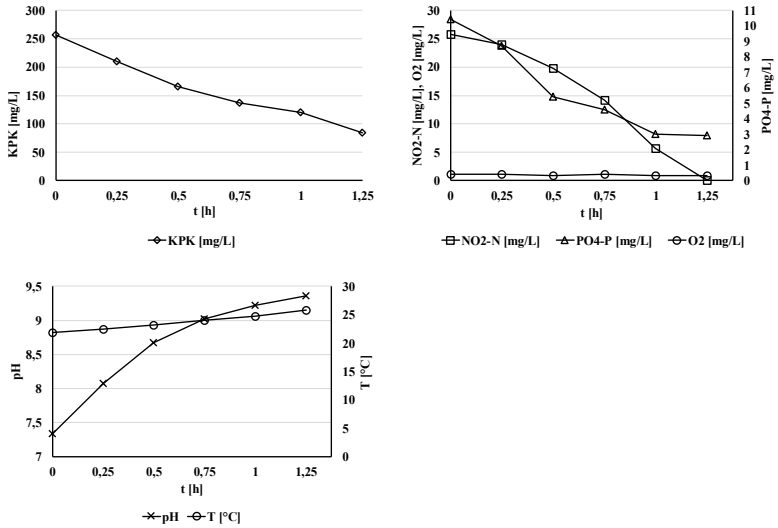
Za analitičko određivanje tijeka procesa denitrificirajuće defosfatacije u određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci, filtrirani i analitičkije određena koncentracija NO_2-N, PO_4-P i KPK.
Svi pokusi načinjeni su u 3 ponavljanja, a prikazani rezultati čine srednju vrijednost ± standardna devijacija.Rezultati su statistički analizani pomoću Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjenje Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Višestruka usporedba je određena ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdanosti $p \leq 0,05$.

Analitičke metode

KPK, NO_2-N iPO_4-Psu određivani prema Standardnim metodama (APHA, 2005).

Rezultati i rasprava

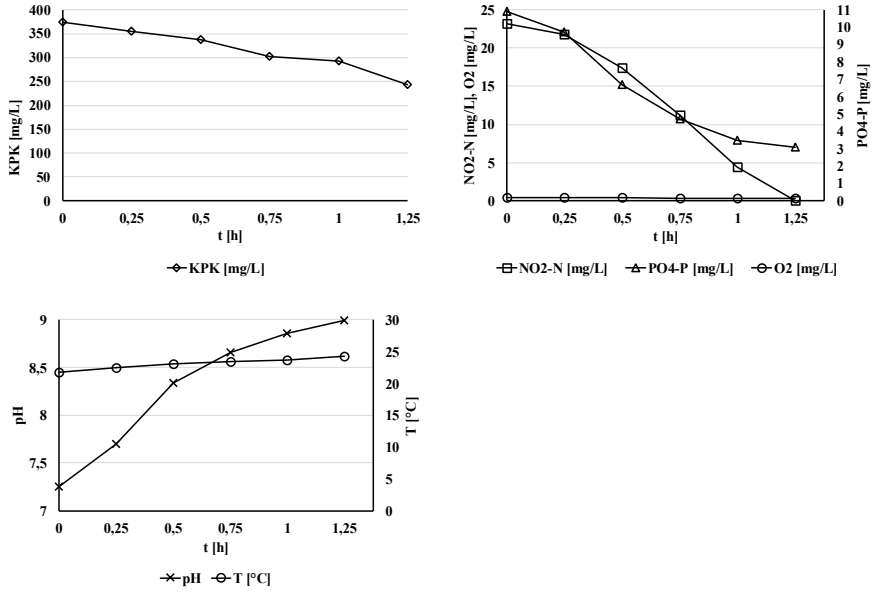
Rezultati procesa denitrificirajuće defosfatacije pri omjeru N/P 2,1 pokazali su da je omjer C/N 1, 2 i 3 nedovoljan izvor ugljika za proces denitrificirajuće defosfatacije. Postignuti su rezultirali uklanjanja od: 28,6% PO_4-P i 21,9% NO_2-N pri C/N 1; 61,7% PO_4-P i 64% N pri C/N 2 i 66,7% PO_4-P i 71,8% NO_2-N pri C/N 3. U tim pokusima potpuno je uklonjen raspoloživi izvor ugljika (KPK) (rezultati nisu prikazani).
U pokusima denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita, pri odabranom omjeru N/P 2,1 i pri omjeru C/N 4 i C/N 7 što odgovara omjeru KPK/N 9,9, odnosno 16,2 postiže se istovremeno uklanjanje KPK, N i P.
Uklanjanje P od 72,1% i potpuno uklanjanje NO_2-N (100%) je postignuto pri omjeru C/N 4, u anoksičnim uvjetima pri koncentraciji otopljenog kisika (engl. *Dissolved Oxygen*, DO) DO≤0,4 mg/L, omjeru N/P 2,1 i omjeru C/P 9,6 (Slika 1).
Potpuno uklanjanje NO_2-N i uklanjanje PO_4-P od 71,6% se postiže pri omjeru C/N 7 (C/P 16,1), pri čemu su organski sastojci dodani u suvišku i preostaju u obrađenoj vodi (Slika 2).
Pokusi denitrificirajuće defosfatacije pri C/N 7 (Slika 2) provedeni su s ciljem dase istraži učinak veće raspoložive količine organskih sastojaka na metabolizam DPAOs.U tom pokusu od početnih 23,2 mg NO_2-N/L i 10,9 mg PO_4-P/L u kojima je dodan natrijev acetat pri omjeru C/N 7 postignuto je uklanjanje PO_4-P od 71,6% i potpuno uklanjanje NO_2-N.Na kraju pokusa preostalo je 243,6 mg KPK/L. Uklonjeno je 7,8 mg PO_4-P/L. Brzine uklanjanja N i P su iznosile 18,6 mg NO_2-N/Lh i 6,2 mg PO_4-P/Lh. Vrijednost pH porasla je od početne pH=7,25 na pH=9 (Slika 2).



Slika 1. Promjene KPK, NO_2-N i PO_4-P, kao i pH, DO i temperature tijekom denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita pri DO≤0,4 mg/L, pri C/N 4, N/P 2,1 i C/P 9,6 odnosno KPK/N 9,9

Fig. 1. Variation of COD, NO_2-N, PO_4-P, as well as pH, DO and temperature during the denitrification dephosphatation process over nitrite at DO≤0.4 mg/L, C/N 4, N/P 2.1, and C/P 9.6 and COD/N 9.9.

U nagibu pravca uklanjanja PO_4-P, pri omjeru C/N 7 (Slika 2), kao i u pokusu pri omjeru C/N 4 (Slika 1), vidljive su dvije brzine procesa. U pokusu pri C/N 7 tijekom prvih 45 minuta postignuta je brzina uklanjanja PO_4-P od 8,3 mg PO_4-P/Lh, a tijekom narednih 30 minuta 3,2 mg PO_4-P/Lh (Slika 2).
Profili pH su u svim pokusima denitrificirajuće defosfatacije (C/N 1, 2, 3, 4 i 7) imali karakteristične promjene porasta pH tijekom oksidacije KPK, a kada je sav KPK utrošen vidljiv je blagi pad pH vrijednosti. Tako se u pokusima denitrificirajuće defosfatacije u kojima nije bilo dovoljno KPK, pri omjerima C/N 1, 2 i 3 u profilu pH jasno vidi točka kada je utrošen sav KPK. Profil pH može se koristiti kao neizravan pokazatelj tijeka denitrificirajuće defosfatacije.
Povećanjem omjera C/N povečavala se i količina uklonjenog N i iznosila je 21,9%, 64%, 71,8%, 100% i 100% (pri C/N 1, 2, 3, 4 i 7).
Za potpuno uklanjanje 24,5±1,3 mg NO_2-N/L, pri omjeru N/P 2,1 potrebno je osigurati prisustvo organskih sastojaka u količini koja odgovara omjeru 3<C/N<4. To se vidi iz KPK vrijednosti preostale na kraju pokusa pri omjeru C/N 4 od 84,6 mg KPK/L, što ukazuje na eventualno nešto manju potrebnu organskih sastojaka od one ostvarene omjerom C/N 4, a koja bi predstavljala minimalnu potrebnu količinu C.



Slika 2. Promjene KPK, NO_2-N i PO_4-P, kao i pH, DO i temperature tijekom denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita pri DO≤0,4 mg/L, pri C/N 7, NO_2-N/PO_4-P 2,1 i C/P 16,1 odnosno KPK/N 16,2

Fig. 2. Variation of COD, NO_2-N, PO_4-P, as well as pH, DO and temperature during the denitrification dephosphatation process over nitrite at DO≤0.4 mg/L, C/N 4, N/P 2.1, and C/P 16.1 and COD/N 16.2.

Također, povećanje omjera C/N rezultiralo je povećanjem učinka uklanjanja PO_4-P za istražene omjere C/N 1, 2, 3, 4 i iznosilo je 28,6%, 61,7%, 66,7%, 72,1% a povećanjem C/N≥7 učinak izvora ugljika dodanog u suvišku daje nešto manju učinkovitost u uklanjanju PO_4-P od 71,6% (Slike 1 i 2).
Povećanje raspoložive količine organskih sastojaka više od minimalne potrebne koncentracije za potpunu denitrifikaciju NO_2-N, rezultiralo je laganim - neznatnim smanjenjem učinka uklanjanja PO_4-P, kako je istaknuto i u literaturi da uporabom acetata kao jedinog izvora ugljika u EBPR sustavu pri temperaturi 28-32°C niži omjer KPK/P (C/P=3) je više pogodan za uklanjanje fosfora nego veći omjer od C/P=10 (Ong i sur., 2013).Organski sastojci preostali nakon procesa denitrificirajuće defosfatacije pri C/N 7, kada je izvor ugljika dodan u suvišku, zahtijevaju daljnju obradu za uklanjanje preostalog KPK, što predstavlja dodatan trošak procesa.
U ovim pokusima denitrificirajuće defosfatacije, u uklanjanju 24,5±1,3 mg NO_2-N/L, pri N/P omjeru 2,1 pokazalo se da odabrani omjeri C/N 1, 2 i 3 čine limitacijski učinak C na proces, dok je pri omjerima C/N 4 i 7 postignuto 100% uklanjanje N i nepotpuno uklanjanje PO_4-P uz raspoložive organske sastojke.

Uklanjanje PO_4-P raslo je s povećanjem KPK, odnosno s povećanjem omjera C/N do omjera C/N 4.
Kako je u pokusima pri omjeru C/N≥4isključena limitacija procesa s ugljikom (Slike 1 i 2), moguće je da su DPAOs bili limitirani raspoloživom količinom elektron akceptora, odnosno raspoloživom količinom NO_2-N, a koja je u ovim pokusima iznosila u omjeru N/P 2,1.
Iako se u literaturi ističe da dPAOs mogu koristiti NO_2-N kao elektron akceptor do koncentracije 5-10 mg NO_2-N/L nakon aklimatizacije (Lee i sur., 2001), u ovom radu nije bilo inhibicije sa NO_2-N. Također, u literaturi se navodi da seanoksični unos fosfata zbiva pri koncentraciji NO_2-N<5 mg/L, a više koncentracije NO_2-N inhibiraju proces (Coma i sur., 2012).

Zaključci

DPAOs su pri odabranim uvjetima vođenja procesa denitrificirajuće defosfatacije preko nitrita, pri N/P 2,1 i DO≤0,4 mg/L pri C/N 4 i 7 ostvarili potpuno uklanjanje NO_2-N (100%) i uklanjanje PO_4-P od 72,1% odnosno 71,6%.Pokus pri C/N 4 je odgovarao omjeru KPK/N 9,9 odnosno omjeru C/P 9,6, a pokus pri omjeru C/N 7 je odgovarao omjeru KPK/N 16,2 odnosno omjeru C/P 16,1. U pokusu pri C/N 7 organski sastojci su dodani u suvišku i preostali su u obrađenoj vodi, a u pokusu pri C/N 4 KPK zadovoljava koncentracijom za ispust u okoliš.Pokusi denitrificirajuće defosfatacije pri N/P 2,1 i pri C/N 1, 2 i 3 su rezultirali potpunim uklanjanjem KPK i uklanjanjem: 28,6% PO_4-P i 21,9% NO_2-N pri C/N 1; 61,7% PO_4-P i 64% N pri C/N 2 i 66,7% PO_4-P i 71,8% NO_2-N pri C/N 3.
U budućim istraživanjim bilo bi korisno istražiti proces denitrificirajuće defosfatacije uz veći omjer NO_2-N/PO_4-P, da se isključi eventualna limitiranost procesa raspoloživim akceptorom elektrona (NO_2-N) koji je ovdje iznosio N/P 2,1 te odrediti kapacitet mikrobne kulture za akumulaciju PO_4-P.

Literatura

Anthonisen, A.C., Loehr, R.C., Prakasam, T.B., Srinath, E.G. (1976) Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Water Pollut. Con. F.*48, 835-852.

APHA (2005) Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 21th ed., American Public Health Association, Washington, DC.

Carvalho, G., Lemos, P.C., Oehmen, A., Reis, M.A.M. (2007) Denitrifying phosphorus removal: linking the process performance with the microbial community structure. *Water Res*. 41(19), 4383–4396.

Coma, M., Verawaty, M., Pijuan, M., Yuan, Z., Bond, P.L. (2012) Enhancing aerobic granulation for biological nutrient removal from domestic wastewater. *Bioresource Technol.*103 (1), 101-108.

Freitas, F., Temudo, M.F., Carvalho, G., Oehmen, A., Reis, M.A. (2009) Robustness of sludge enriched with short SBR cycles for biological nutrient removal. *Bioresource Technol.*100, 1969-1976.

Henze, M., van Loosdrecht, M., Ekama, G., Brdjanovic, D. (2008) Biological wastewater treatment. IWA Publishing London. ISBN: 1843391880.

Hu, Z.R., Wentzel, M.C., Ekama, G.A. (2002) Anoxic growth of phosphate-accumulating organisms (PAOs) in biological nutrient removal activated sludge systems. *Water Res.*36, 4927-4937.

Kerrn Jespersen, J. P., Henze, M. (1993) Biological phosphorus uptake under anoxic and aerobic conditions. *Water Res.*27 (4), 617-624.

Kuba, T., Wachameister, A., van Loosdrecht, M.C.M. (1994) Effect of nitrate on phosphorus release in biological phosphorus removal system. *Water Sci. Technol.* 30 (6), 263-269.

Lee, D.S., Jeon, C.O., Park, J.M. (2001) Biological nitrogen removal with enhanced phosphate uptake in a sequencing batch reactor using single sludge system. *Water Res.*35, 3968-3976.

Lv, X.M., Shao, M.F., Li, C.L., Li, J., Xia, X., Liu, D.Y. (2014) Bacterial diversity and community structure of denitrifying phosphorus removal sludge in strict anaerobic/anoxic systems operated with different carbon sources. J Chem. Technol. Biot. 89 (12), 1842-1849

Metcalf & Eddy (2003) Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4th Ed, McGraw Hill Inc., New York, NY.

Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T. (1994) Metabolisms of different bacterial populations in enhanced biological phosphorus removal processes. *Water Sci. Technol.*29 (7), 67-70.

Mino, T., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (1998) Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process. *Water Res.*32, 3139-3207.

Ong, Y.H., Chua, A.S.M., Lee, B.P., Ngoh, G.C. (2013) Long-term performance evaluation of EBPR process in tropical climate: start-up, process stability, and the effect of operational pH and influent C:P ratio. *Water Sci. Technol.*67 (2), 340-346.

Pijuan, M., Giusasola, A., Baeza, J.A., Carrera, J., Casas, C., Lafuente, J. (2005) Aerobic phosphorus release linked to acetate uptake: Influence of PAO intracellular storage compounds. *Biochem. Eng.J.26*, 184-190.

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013) *Narodne novine* 80, Zagreb

Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2016) *Narodne Novine*3, Zagreb

Seviour, R.J., McIlroy, S. (2008) The microbiology of phosphorus removal in activated sludge process – the current state of play. *J. Microbiol.*46, 115-124.

Vadivelu, V.M., Yuan, Z.G., Fux, C., Keller, J. (2006) The inhibitory effects of free nitrous acid on the energy generation and growth processes of an enriched nitrobacter culture. *Environ. Sci. Technol.*40, 4442-4448.

van Loosdrecht, M.C.M., Smolders, G.J., Kuba. T., Heijnen, J.J. (1997) Metabolism of microorganisms responsible for enhanced biological phosphorus removal from wastewater. *Anthonie van Leewenhock*71, 109-116.

Wang, D.B., Li, X.M., Yang, Q., Zeng, G.M., Liao, D.X., Zhang, J. (2008) Biological phosphorus removal in sequencing batch reactor with single-stage oxic process. *Bioresour. Technol.*99, 5466-5473.

Zeng, W., Li, B., Yang, Y., Wang, X., Li, L., Peng, Y. (2013) Impact of nitrite on aerobic phosphorus uptake by poly-phosphate accumulating organisms in enhanced biological phosphorus removal sludges. *Bioprocess Biosyst. Eng*. 23, 1-11.

Zhou, Y., Ganda, L., Lim, M., Yuan, Z., Kjelleberg, W.J. (2010) Free nitrous acid (FNA) inhibition on denitrifying poly-phosphate accumulating organisms (DPAOs). Appl. Microbiol. Biotechnol. 88, 359-369.

Zhou, Y., Pijuan, M., Yuan, Z.G. (2007) Free nitrous acid inhibition on anoxic phosphorus uptake and denitrification by poly-phosphate accumulating organisms. Biotechnol. Bioeng. 98, 903-912.

Zhu, G.B., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S. (2008) Biological removal of nitrogen from wastewater. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 159-195.

Original scientific paper

Denitrifying dephosphatation via nitrite

Dijana Grgas[1], Tea Štefanac[1], Neven Marković[1], Toni Šipalo[1], Sanja Radman[2], Tibela Landeka Dragičević[*1]

[1]*University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierotti Str. 6, 10000 Zagreb, Croatia*
[2]*MedILS, Šetalište Ivana Meštrovića 45, 21000, Split*
[*]*Corresponding author: tlandekadragicevic@pbf.hr*

Abstract

Denitrifying dephosphatation via nitrite was investigated. The experiments were carried out at a ratio of N/P 2.1 with an initial concentration of 24.5 ± 1.3 mg NO_2-N/L and 11.2 ± 0.8 mg PO_4-P/L. As a carbon source, sodium acetate in a ratio of C/N 1, 2, 3, 4 and 7 was used. The removal of PO_4-Pof 72.1% and complete removal of NO_2-N (100%) was achieved at a C/N 4 ratio in anoxic conditions at a dissolved oxygen concentration (Dissolved Oxygen, DO) DO≤ 0.4 mg/L, a ratio N/P 2.1, and a C/P ratio of 9.6. Complete removal of NO_2-N and removal of PO_4-P of 71.6% is achieved at a C/N ratio 7 (C/P 16.1), whereby the organic ingredients are added to the excess and remain in the treated water.

Keywords: denitrifying dephosphatation, DPAOs, NO_2-N, PO_4-P, C/N, C/P, N/P

Izorni znansteni rad

Učinak koncentracije otopljenog kisika na autotrofnu nitrifikaciju

Tea Štefanac[1], Dijana Grgas[1], Nikolina Pavković[1], Sanja Radman[2], Tibela Landeka Dragičević[*1]

[1]*Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska*
[*]*Dopisni autor: tlandekadragicevic@pbf.hr*
[2]*MedILS, Šetalište Ivana Meštrovića 45, 21000, Split*

Sažetak

Istražen je učinak koncentracije otopljenog kisika na brzinu autotrofne nitrifikacije u ovisnosti o koncentraciji NH_4-N (30-80 mg/L) i pH vrijednosti. Pokusi su provedeni pri odabranim vrijednostima DO 2 mg/L, DO<1 mg/L i DO>3 mg/L, i pri pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0. Provedeni su diskontinuirani pokusi nitrifikacije 30±2 mg NH_4-N/L, 50±5 mg NH_4-N/L i 80±3 mg NH_4-N/L. S porastom koncentracije NH_4-N raste brzina autotrofne nitrifikacije za oba odabrana raspona pH (pH 7,3-7,4 i pri pH 7,9-8,0). Veća brzina autotrofne nitrifikacije se postiže pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s pH 7,3-7,4, neovisno o DO.

Ključne riječi: autotrofna nitrifikacija, DO, pH

Uvod

Proces nitrifikacije je aerobna oksidacija amonijaka (NH_4-N) do nitrata (NO_3-N) kojeg provode nitrificirajuće bakterije. Nitrifikacija se odvija u dva koraka: nitritacija – oksidacija amonijaka do nitrita (NO_2-N) pomoću amonijak oksidirajućih bakterija (AOB, engl. *Ammonium Oxidizing Bacteria*), initratacija – oksidacija nitrita do nitrata pomoću nitrit oksidirajućih bakterija (NOB, engl. *Nitirite Oxidizing Bacteria*) (Zhu i sur., 2008; Metcalf & Eddy, 2003; Henze i sur., 2002).
Otopljeni kisik (DO, engl. *Dissolved Oxygen*) je jedan od ključnih čimbenika i kontrolni parametar procesa nitrifikacije jer je nitrifikacija aeroban proces u kojem nitrificirajuće bakterije koriste kisik kao akceptor elektrona. Nitrifikacija se gotovo ne odvija pri koncentraciji DO<0,5 mg/L. Tako niska koncentracija DO ima veći utjecaj na aktivnost NOB nego AOB, te dolazi do nepotpune nitrifikacije i posljedično porasta koncentracije nitrita. Povećanjem DO s 0,5 mg/L na 1,9 mg/L proces nitrifikacije se ubrzava, što je posebno značajno u rasponu DO 2-2,9 mg/L, a

pri koncentraciji DO 3 mg/L brzina nitrifikacije dostiže maksimalnu vrijednost (Metcalf & Eddy, 2003).
Kako je aeracija visokoenergetski zahtjevan proces, te se utrošak energije za aeraciju u postrojenjima procjenjuje na 45% do 75% od ukupnog utroška energije (Reardon, 1995), cilj je kontrolirano minimizirati aeraciju kako bi se smanjili troškovi rada sustava, a istovremeno ispunili zakonom definirani zahtjevi za kakvoćom obrađene vode (NN 3/2016; NN 80/2013). Potrebu na kisiku u biološkom procesu definira količina onečišćenja i proizvedene mikrobne biomase (Metcalf & Eddy, 2003). Također, u literaturi se navodi da je za proces nitrifikacije potrebno osigurati DO 2 mg/L (Metcalf & Eddy, 2003).
Bitan čimbenik procesa nitrifikacije je i pH vrijednost koja značajno utječe na rast nitrifikanata, na kiselinsko-baznu ravnotežu NO_2^-/HNO_2 i NH_4^+/NH_3, te time na dostupnost supstrata za AOB i NOB (Jiménez i sur., 2011). Optimalna pH vrijednost za aktivnost AOB je pH 8,1, a pH 7,9 za NOB (Grunditz i Dalhammar, 2001). Niske vrijednosti pH inhibiraju enzimsku aktivnost nitrifikanata. Pri vrijednosti pH>6,7 ubrzava se proces nitrifikacije, dok se raspon pH 7,2-8,0 navodi kao optimalan jer je u njemu brzina nitrifikacije konstantna (Metcalf & Eddy, 2003). U provođenju biološkog procesa uklanjanja dušika, i učinkovitost procesa i troškovi obrade ovise o odabranim procesnim čimbenicima, vođenju sustava kao i okolišnim čimbenicima (Jaramillo i sur., 2018).
U sustavima za obradu otpadnih voda heterotrofi koriste kisik za oksidaciju organskih sastojaka i odvija se kompeticija za kisik između heterotrofa i nitrifikanata. Kako učinkovitost vođenja procesa biološke obrade otpadne vode ovisi između ostalog i o poznavanju metabolizma mikroorganizama koji provode biološke procese, istraživanje učinka koncentracije otopljenog kisika na autotrofnu nitrifikaciju čini doprinos i u smanjenju troškova energije za prozračivanje sustava.
Cilj ovog rada je istražiti učinak koncentracije otopljenog kisika na aktivnost nitrifikanata provođenjem autotrofne nitrifikacije pri DO 2 mg/L, DO<1 mg/L i DO>3 mg/L u ovisnosti o pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0) i koncentraciji amonijakalnog dušika (30±2 mg NH_4-N/L, 50±5 mg NH_4-N/L i 80±3 mg NH_4-N/L).

Materijali i metode

Sintetska otpadna voda

Sintetska otpadna voda za pokuse nitrifikacije je pripremljena kao vodena otopina soli (Merck, Njemačka): 2 mg/L $(NH_4)_2SO_4$, 1 mg/L KH_2PO_4, 0,4 mg/L $FeSO_4$, 0,5 mg/L $MgSO_4$, 0,4 mg/L NaCl, 1 mg/L $MgCO_3$, 1 mg/L $CaCO_3$, te je nakon 24 sata stajanja na sobnoj temperaturi filtrirana kroz grubi filter papir (0,45 µm) i čuvana na

sobnoj temperaturi tijekom provođenja pokusa. Na početku pokusa sintetska otpadna voda dodana je u odgovarajućoj količini za željenu početnu vrijednost NH_4-N.

Procesni uvjeti

U laboratorijskom bioreaktoru radnog volumena 2 L provedeni su diskontinuirani pokusi s aktivnim muljem u kojem su namnožene nitrificirajuće/denitrificirajuće vrste uzgojem u SBR reaktoru. Aktivni mulj je uzet s uređaja za obradu otpadne vode grada Velika Gorica. Postavljanjem u bioreaktor DO i pH elektroda (DurOx i SenTix41) putem mjernih aparata (WTW Oxi3210 i WTW 330i) kontinuirano su motreni DO, pH, i temperatura. Odabrana vrijednost DO osigurana je upuhivanjem zraka iz kompresora (HIBLOW HP 40; Hagen Model40 A-10011) preko filtera za zrak i difuzora smještenog na dno bioreaktora. Odabrana pH vrijednost je održavana u odabranom rasponu pomoću 2M NaOH. Pokusi su vođeni pri 3,8 g MLSS/L.
Pokusi su provedeni u 3 ponavljanja, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Rezultati su statistički analizirani pomoću Microsoft Excel 2011 (Redmond, Sjedinjenje Američke Države) i StatSoft Statistica 7.0 (Tulsa, Sjedinjene Američke Države). Višestruka usporedba je određena ANOVA analizom varijance s određenim intervalom pouzdanosti $p \leq 0,05$.

Analitičke metode

Koncentracija NH_4-N, NO_3-N i NO_2-N određena je primjenom spektrofotometra (Spectroquant VEGA 400 Merck) i fotometra (Photometer SQ 200 Merck), a koncentracija MLSS primjenom sustava za vakuum filtraciju (Sartorius) i vlagomjera (Kern MLS-D), prema Standardnim metodama (APHA, 2005).

Rezultati i rasprava

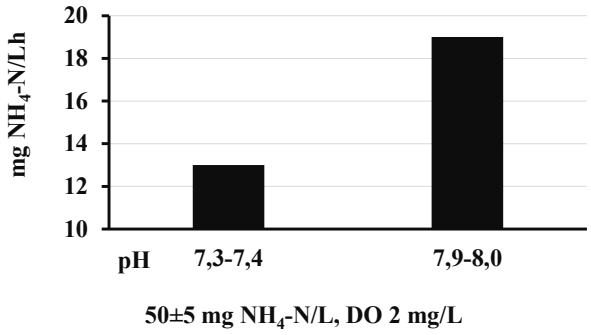
Pokusi autotrofne nitrifikacije odabrane početne koncentracije NH_4-N (30±2 mg NH_4-N/L, 50±5 mg NH_4-N/L i 80±3 mg NH_4-N/L) pri odabranom rasponu pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0) provedeni su s ciljem određivanja učinka koncentracije otopljenog kisika na brzinu nitrifikacije, pri DO 2 mg/L, DO<1 mg/L i DO>3 mg/L. U literaturi se navodi da je za proces nitrifikacije potrebno osigurati DO 2 mg/L (Metcalf & Eddy, 2003). Također, u literaturi se navodi da je optimalna pH vrijednost za provođenje procesa nitrifikacije u rasponu 7,2-8,5 (Metcalf & Eddy, 2003). Vrijednost pH utječe na aktivnost prisutnih mikrobnih vrsta u aktivnom mulju, tako je pri pH 7,8-8,0 povećana aktivnost *Nitrosomonas* vrsta, dok pH 7,3-7,5 pogoduje *Nitrobacter* vrstama (Le i sur., 2018).

Brzina nitrifikacije je određivana preko brzine prvog stupnja nitrifikacije, oksidacije amonijaka do nitrita prema jednadžbi (1) (Münch i sur., 1996):

$$r_N = -\frac{dC(NH_4-N)}{dt} \text{ [mgN/Lh]} \qquad (1)$$

Ukoliko je prvi stupanj sporiji, amonijak će se u potpunosti prevoditi do nitrata, ne u nitrit (Münch i sur., 1996).

Rezultati autotrofne nitrifikacije pri pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0 odabranog ciljanog pokusa početne koncentracije 50±5 mg NH_4-N/L, pri DO 2 mg/L pokazuju veću brzinu nitrifikacije pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s pH 7,3-7,4 (Slika 1).

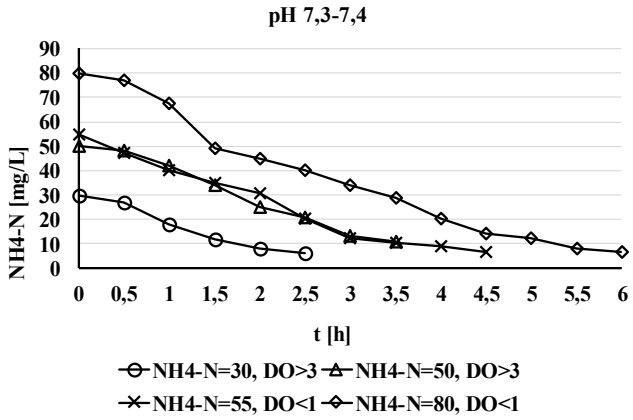


Slika 1. Brzina autotrofne nitrifikacije 50±5 mg NH_4-N/L u ovisnosti o pH, pri DO 2 mg/L

Fig. 1. Autotrophic nitrification rate of 50±5 mg NH_4-N/L depending on pH, at DO 2 mg/L

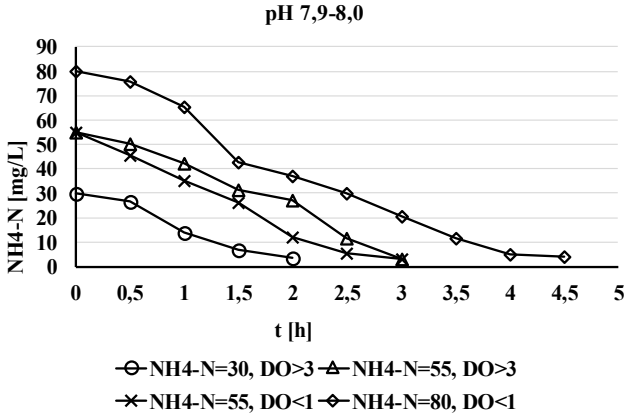
Nitrifikacija početnih 50±5 mg NH_4-N/L pri DO 2 mg/L rezultirala je potpunim prevođenjem NH_4-N u NO_3-N + NO_2-N u gotovo ekvivalentnoj količini. Brzina nitrifikacije 50±5 mg NH_4-N/Lh pri pH 7,3-7,4 i pri DO 2 mg/L iznosi 13 mg NH_4-N/Lh, dok pri pH 7,9-8,0 iznosi 19 mg NH_4-N/Lh. Peng i Zhu (2006) su istaknuli da je za uspješnu nitrifikaciju pogodna koncentracija otopljenog kisika iznad 1,7 mg/L. Münch i sur. (1996) su objavili da se nitrit akumulira dok u reaktoru prevladavaju niske koncentracije DO, međutim nitrit se ne nakuplja kada je koncentracija DO značajno viša od konstante poluzasićenja za kisik za *Nitrobacter*.
Pokusi autotrofne nitrifikacije koji su vođeni pri DO<1 mg/L i DO>3 mg/L su provedeni s ciljem da se odredi aktivnost mikrobne biomase u uvjetima niske koncentracije DO čime se ostvaruje manji utrošak energije (redukcija aeracije) i u uvjetima veće koncentracije DO koja znači veće troškove vođenja procesa.

Rezultati vremenskog tijeka mikrobnog procesa nitrifikacije prikazani su kao usporedne vrijednosti promjena koncentracije NH_4-N (30-80 mg NH_4-N/L) pri DO<1 mg/L i DO>3 mg/L pri pH 7,3-7,4 slikom 2, a pri pH 7,9-8,0 slikom 3.



Slika 2. Usporedne vrijednosti promjena koncentracije NH_4-N u autotrofnoj nitrifikaciji 30-80 mg NH_4-N/L pri DO<1 mg/L i DO>3 mg/L i pri pH 7,3-7,4

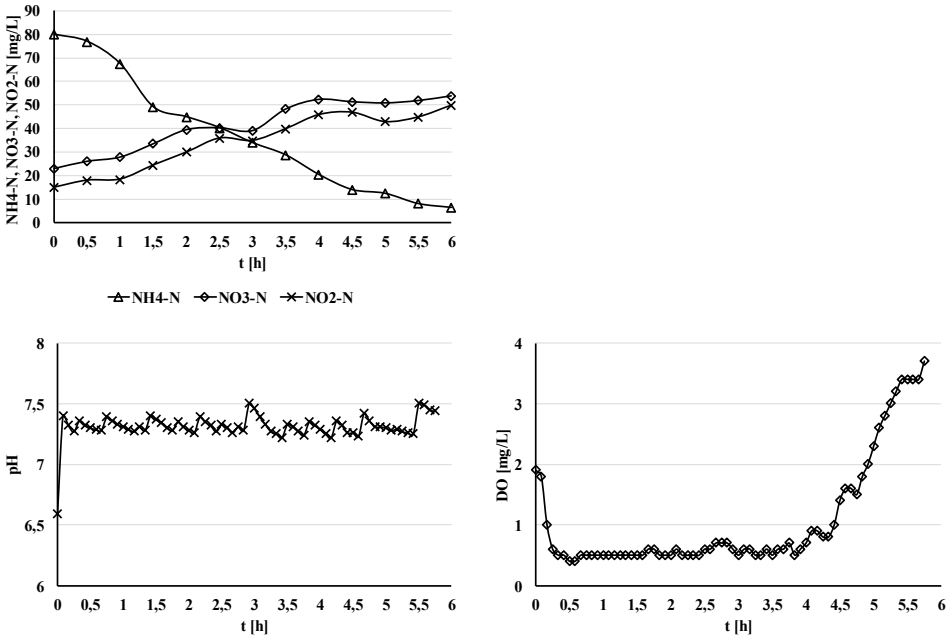
Fig. 2. Comparative values of NH_4-N concentration change in autotrophic nitrification 30-80 mg NH_4-N/L at DO<1 mg/L and DO>3 mg/L and under pH 7.3-7.4



Slika 3. Usporedne vrijednosti promjena koncentracije NH_4-N u autotrofnoj nitrifikaciji 30-80 mg NH_4-N/L pri DO<1 mg/L i DO>3 mg/L i pri pH 7,9-8,0

Fig. 3. Comparative values of NH_4-N concentration change in autotrophic nitrification 30-80 mg NH_4-N/L at DO<1 mg/L and DO>3 mg/L and under pH 7.9-8.0

Autotrofna nitrifikacija traje duže s povećanjem koncentracije NH_4-N pri oba odabrana raspona pH, a veća brzina procesa nitrifikacije se postiže pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s rezultatima pri pH 7,3-7,4 (Slike 2 i 3).
Vremenski tijek odabranog ciljanog pokusa nitrifikacije 80±3 mg NH_4-N/L, pri DO<1 mg/L i pH 7,3-7,4 prikazan je slikom 4, a odabranog ciljanog pokusa nitrifikacije 50±5 mg NH_4-N/L, pri DO>3 mg/L i pH 7,9-8,0 prikazan je slikom 5.
Da bi se istaknuli učinci odabranih procesnih čimbenika na proces nitrifikacije i vidjele promjene motrenih pokazatelja kakvoće a nastali kao rezultat mikrobnih reakcija, prikazani su rezultati odabranih pokusa nitrifikacije 80±3 mg NH_4-N/L, pri DO<1 mg/L, i pH 7,3-7,4 (Slika 4) i 50±5 mg NH_4-N/L, pri DO>3 mg/L i pH 7,9-8,0 (Slika 5).

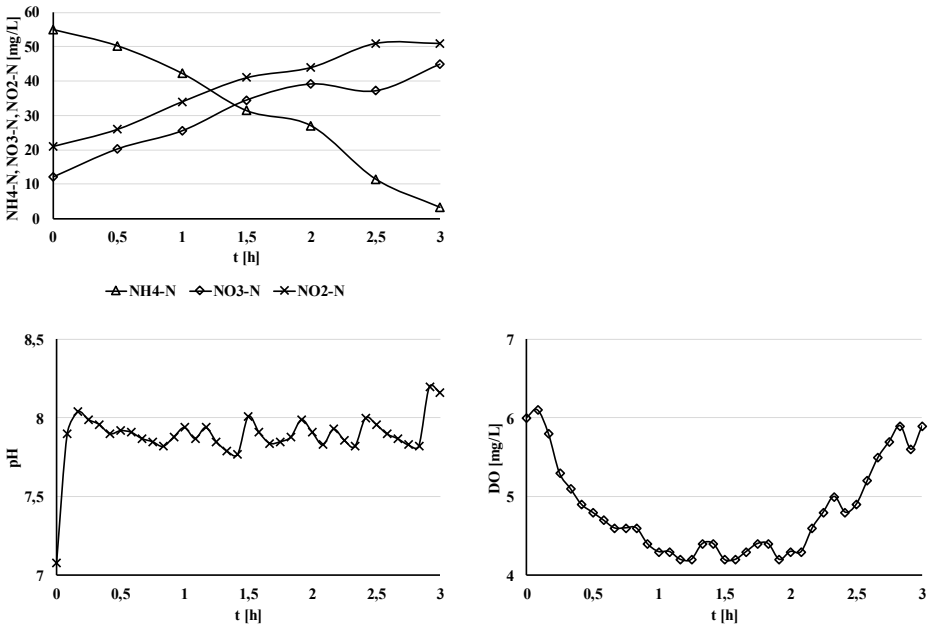


Slika 4. NH_4-N, NO_3-N i NO_2-N, pH i DO u procesu autotrofne nitrifikacije 80±3 mg NH_4-N/L, pri DO<1 mg/L i pH 7,3-7,4

Fig. 4. NH_4-N, NO_3-N and NO_2-N, pH and DO in autotrophic nitrification process of 80±3 mg NH_4-N/L, at DO<1 mg/L and pH 7.3-7.4

Autotrofna nitrifikacija 80±3 mg NH_4-N/L pri DO<1 mg/L (Slika 4) provedena je tijekom 5,5 sati uz korekciju pH na pH 7,3-7,4. Niska koncentracija otopljenog kisika (DO<1 mg/L) se reflektira na proces u ustaljenoj brzini uklanjanja NH_4-N, koji se tijekom 5,5 sati prevodi u NO_3-N i NO_2-N. Nakupljeno je cca 30 mg NO_3-N/L i cca 25 mg NO_2-N/L (Slika 4). Odabrani raspon pH 7,3-7,4 u kombinaciji s DO<1 mg/L

u provođenju ovog pokusa se reflektira u većem prevođenju NH_4-N u NO_3–N nego u NO_2-N. Münch i sur. (1996) sugeriraju da niske koncentracije DO inhibiraju *Nitrobacter.*

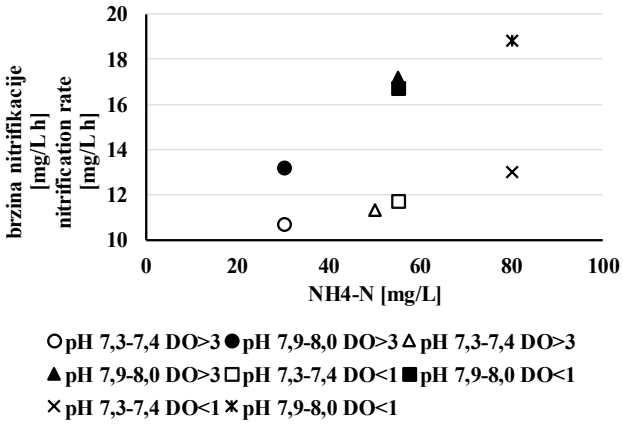


Slika 5. NH_4-N, NO_3-N i NO_2-N, pH i DO u procesu autotrofne nitrifikacije 50±5 mg NH_4-N/L, pri DO>3 mg/L i pH 7,9-8,0

Fig. 5. NH_4-N, NO_3-N and NO_2-N, pH and DO in autotrophic nitrification process of 50±5 mg NH_4-N/L, at DO>3 mg/L and pH 7.9-8.0

Nitrifikacija se neometano zbivala pri DO<1 mg/L iako se u literaturi navodi da je potrebno osigurati DO 2 mg/L za proces nitrifikacije kao i da se pri DO<0,5 mg/L ne zbiva nitrifikacija (Metcalf & Eddy, 2003).
Pokus autotrofne nitrifikacije 50±5 mg NH_4-N/L, pri DO>3 mg/L i pH 7,9-8,0 je tijekom 3 sata rezultirao potpunim prevođenjem NH_4-N u NO_3-N i NO_2-N (Slika 5). Nešto je više nakupljenog NO_2-N (nakupljeno je 30 mg NO_3-N/L i 36 mg NO_2-N/L) što se može pripisati odabranom pH 7,9-8,0. Tijekom cijelog procesa održavan je odabrani raspon pH. Rezultati su u suglasju s literaturom, u kojoj je istaknuto da je optimalan pH 8,1 za aktivnost AOB, dakle proces nitritacije, odnosno pH 7,9 za aktivnost NOB, odnosno proces nitratacije (Grunditz i Dalhammar, 2001). Alleman (1984) je istaknuo da su *Nitrobacter* vrste osjetljivije od *Nitrosomonas* na povišene pH vrijednosti. Visoke vrijednosti DO

usporavaju proces nitrifikacije (EPA, 2003) jer odstupaju od optimalnih vrijednosti DO 2-3 mg/L.
Iz provedenih pokusa izračunate su brzine autotrofne nitrifikacije i prikazane u ovisnosti o pH, DO i koncentraciji NH_4-N (Slika 6).



Slika 6. Brzine autotrofne nitrifikacije u ovisnosti o pH (pH 7,3-7,4 i pH 7,9-8,0), DO (DO<1 mg/L i DO>3 mg/L) i koncentraciji NH_4-N (30±2 mg NH_4-N/L, 50±5 mg NH_4-N/L i 80±3 mg NH_4-N/L)

Fig. 6. Autotrophic nitrification rates depending on pH (pH 7.3-7.4 and pH 7.9-8.0), DO (DO<1 mg/L and DO>3 mg/L) and NH_4-N concentration (30±2 mg NH_4-N/L, 50±5 mg NH_4-N/L and 80±3 mg NH_4-N/L)

Može se opaziti trend povećanja brzine nitrifikacije s povećanjem koncentracije NH_4-N. Također, učinak odabranog raspona pH na brzinu nitrifikacije se manifestira većom brzinom nitrifikacije pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s pH 7,3-7,4, neovisno o odabranom DO.
U razmatranju smanjenja utroška energije i provođenjem pokusa pri DO<1 mg/L provodi se nitrifikacija ali uz nešto manju brzinu procesa u usporedbi s DO 2 mg/L koja se pokazala kao najpovoljniji DO. Vrijednosti DO>3 mg/L imaju učinak na nitrifikaciju smanjenjem brzine u usporedbi s DO 2 mg/L, kao što je istaknuto i u literaturi kako visoke vrijednosti DO usporavaju proces nitrifikacije (EPA, 2003) (Slike 1 i 6).
Najveća brzina nitrifikacije je postignuta pri DO 2 mg/L, najmanja brzina autotrofne nitrifikacije od 10,7 mg NH_4-N/Lh je postignuta u nitrifikaciji 30±2 mg NH_4-N/L pri DO>3 mg/L i pH 7,3-7,4, a pri DO<1 mg/L najveća brzina nitrifikacije od 18,8 mg NH_4-N/Lh je postignuta u nitrifikaciji 80±3 mg NH_4-N/L pri pH 7,9-8,0 (Slika 6).

Da bi se istaknuo učinak DO na autotrofnu nitrifikaciju, uspoređeni su rezultati brzina autotrofne nitrifikacije 50±5 mg NH_4-N/L, i navedeni u nizu od najveće brzine autotrofne nitrifikacije prema najmanjoj u ovisnosti o odabranim procesnim čimbenicima, kako slijedi: r_N = 19 mg NH_4-N/Lh (DO 2 mg/L, pH 7,9-8,0) (Slika 1)>17,2 mg NH_4-N/Lh (DO>3 mg/L, pH 7,9-8,0) (Slika 6)>16,7 mg NH_4-N/Lh (DO<1 mg/L, pH 7,9-8,0) (Slika 6)>13 mg NH_4-N/Lh (DO 2 mg/L, pH 7,3-7,4) (Slika 1)>11,7 mg NH_4-N/Lh (DO<1 mg/L, pH 7,3-7,4) (Slika 6)>11,3 mg NH_4-N/Lh (DO>3 mg/L, pH 7,3-7,4) (Slika 6).
Postignuti rezultati u suglasju su s citiranom literaturom (Jaramillo i sur., 2018; Jiménez i sur., 2011; Peng i Zhu, 2006; Metcalf & Eddy, 2003; Grunditz i Dalhammar, 2001).

Zaključci

Utjecaj koncentracije otopljenog kisika na brzinu autotrofne nitrifikacije se očituje u trendu povećanja brzine nitrifikacije s povećanjem koncentracije NH_4-N, izrazito ovisno o odabranom pH. Veća brzina nitrifikacije se postiže pri pH 7,9-8,0 u usporedbi s pH 7,3-7,4, neovisno o odabranom DO. Najveća brzina nitrifikacije od 19 mg NH_4-N/Lh, odnosno 13 mg NH_4-N/Lh je postignuta pri DO 2 mg/L pri pH 7,9-8,0 odnosno pH 7,3-7,4.

Literatura

Alleman, J.E. (1984) Elevated nitrite occurrence in biological wastewater treatment systems. *Water Sci. Technol.* **17**, 409-419.

APHA (2005) Standard Method for the Examination of Water and Wastewater, 2nd Ed., Washington, DC.

EPA (2003): Oxygencontrol. USEPA, Washington, DC.

Gray, N.F. (2004): Biology of Wastewater Treatment. London, England: Imperial College.

Grunditz, C., Dalhammar, G. (2001): Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*, *Water Res.* 35, 433-440.

Henze, M., Harremoes, P., Jansen, J.C., Arvin, E. (2002): Wastewater Treatment: Biological and Chemical Processes, Germany: Springer.

Jaramillo, F., Orchard, M., Munoz, C., Zamorano, M., Antileo, C. (2018): Advanced strategies to improve nitrification process in sequencing batch reactors - A review, *J. Environ. Manage.* 218, 154-164.

Jiménez, E., Giménez, J.B., Ruano, M.V., Ferrer, J., Serralta, J. (2011): Effect of pH and nitrite concentration on nitrite oxidation rate, *Bioresource Technol.* 102, 8741-8747.

Le, T.T.H., Fettig, J., Meon, G. (2018): Kinetics and simulation of nitrification at various pH valuesof a polluted river in the tropics, *Ecohydrol. Hydrobiol.* (in press, DOI: 10.1016/j.ecohyd.2018.06.006).

Metcalf & Eddy (2003): Wastewater Engineering: Treatment and Reuse, 4. izd., New York, USA: McGrawHill Inc.

Münch, E.V., Lant, P., Keller, J. (1996) Simultaneous nitrification and denitrification in bench-scale sequencing batch reactors, *Water Res*. 30, 277-284.

Peng, Y., Zhu, G. (2006): Biological nitrogen removal with nitrification and denitrification via nitrite pathway, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 15-26.

Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2013): *Narodne novine* 80 (NN 80/2013).

Pravilnik o izmjenama i dopunama Pravilnika o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda (2016): *Narodne novine.* 3 (NN 3/2016).

Reardon, D.J. (1995): Turning down the power. *Civil Engineering, ASCE.* 65, 54-56.

Zhu, G., Peng, Y., Li, B., Guo, J., Yang, Q., Wang, S. (2008): Biological removal of nitrogen from wastewater, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 192, 159-195.

Original scientific paper

The effect of dissolved oxygenconcentration on autotrophic nitrification

Tea Štefanac[1], Dijana Grgas[1], Nikolina Pavković[1], Sanja Radman[2], Tibela Landeka Dragičević[*1]
[*]*Corresponding author: tlandekadragicevic@pbf.hr*
[1]*University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierotti Str. 6, 10000 Zagreb, Croatia*
[2]*MedILS, Šetalište Ivana Meštrovića 45, 21000, Split*

Summary

The effect of the dissolved oxygen (DO) concentration on the autotrophic nitrification rate was investigated, depending on NH_4-N concentration (30 -80 mg/L), and the pH value. The experiments were carried out at selected values of DO: DO 2 mg/L, DO<1 mg/L, and DO>3 mg/L, and at pH ranges: 7.3-7.4 and 7.9-8.0. Autotrophic nitrification of 30±2 mg NH_4-N/L, 50±5 mg NH_4-N/L and 80±3 mg NH_4-N/L was performed in the discontinuos experiments. With the increase of NH_4-N concentration, the rate of autotrophic nitrification increases at pH 7.3-7.4 and at pH 7.9-8.0. Greater autotrophic nitrification rates were achieved at pH 7.9-8.0 compared to pH 7.3-7.4, irrespective of DO.

Keywords: autotrophic nitrification, DO, pH

Izvorni znanstveni rad

Utjecaj vrste filtarskog medija na granice detekcije elemenata u analizi lebdećih čestica u zraku

Ana Mihaljević*, Silva Žužul

Institute for Medical Reasearch and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, 10 000 Zagreb, Croatia
**Dopisni autor: ana.mihaljevic9@gmail.com*

Sažetak

Razvoj metode za elementnu analizu lebdećih čestica u zraku uključuje određivanje granice detekcije metode analizom slijepih proba. U ovome radu ispitano je više vrsta filtarskih medija za elementnu analizu lebdećih čestica u zraku. Korišteni su filtri od kvarcnih vlakana, membranski i teflonski filtri promjera 47 mm. Svi filtri pripravljeni su za analizu mikrovalnim razaranjem pod povišenim tlakom u otopini dušične i klorovodične kiseline. Pripravljene otopine analizirane su spektrometrom masa uz induktivno spregnutu plazmu te je određen sadržaj Na, Mg, Al, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Ba, Ce i Pb. Izračunate su granice detekcije metode za svaku vrstu filtarskog medija. Rezultati pokazuju da su kvarcni filtri najmanje prikladni za analizu elemenata u lebdećim česticama zbog visoke zastupljenosti elemenata u filtarskom mediju. Ispitan je utjecaj predobrade filtarskog medija žarenjem na granice detekcije metode. Rezultati dobiveni analizom žarenih i nežarenih kvarcnih filtara proizvođača Pall pokazuje značajnu razliku u sastavu za Na, Al, V, Mn, As, Mo. Rezultati dobiveni analizom kvarcnih filtara proizvođača Whatman pokazuju značajnu razliku za Na, Mg, Al, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Ba, Ce i Pb između žarenih i nežarenih filtara. Najniže koncentracije analiziranih elemenata izmjerene su u membranskim i teflonskim filtrima.

Ključne riječi: lebdeće čestice, filtri, slijepe probe, ICP-MS

Uvod

Lebdeće čestice nastaju u atmosferi fizikalnim i kemijskim procesima iz različitih izvora izgaranjem ili drugim prirodnim i industrijskim procesima. Igraju važnu ulogu u mnogim atmosferskim procesima pa su tako odgovorne za smanjenu vidljivost, proces kiselog taloženja i drugo. Koncentracija i sastav čestica variraju u veličini, lokaciji i jako ovise o udaljenosti od izvora, načinu prijenosa kroz atmosferu i učinkovitosti

mehanizama uklanjanja te meteorološkim parametrima. Dokazano je da štetno djeluju na ljudsko zdravlje. Određivanje elementnog sastava lebdećih čestica u zraku iznimno je važno budući da je velik broj epidemioloških i toksikoloških istraživanja pokazao štetan utjecaj metala i elemenata u tragovima na ljudsko zdravlje. *In vivo* i *in vitro* istraživanja pokazala su da metali generiraju reaktivne radikale oksida koji aktiviraju putove staničnih upalnih odgovora. Metali se u atmosferu otpuštaju izgaranjem fosilnih goriva i drva, industrijskim procesima koji se vrše pod povišenom temperaturom te spaljivanjem otpada. Također, prirodno se emitiraju u atmosferu vulkanskim erupcijama, erozijom tla, vjetrovima, šumskim požarima i isparavanjem iz oceana. (Turšić i sur., 2008, Soleimani i sur., 2018) Metali čine izuzetno mali dio ukupne mase lebdećih čestica. Zbog toga, najizazovniji dio analize metala u lebdećim česticama u zraku je razvoj točne i precizne metode za kvantifikaciju niskih koncentracija metala.
Lebdeće čestice sakupljaju se na različitim vrstama filtarskih medija kao što su filtri od kvarcnih vlakana, teflonski filtri te membranski filtri te ih je prije analize nužno prevesti u otopinu. Najčešće postupci priprave uključuju potpuno razaranje lebdećih čestica, njihovo prevođenje u otopinu te analizu nekom spektroskopskom metodom. (Mihaljević i sur., 2018) Do sada su u literaturi opisani brojni postupci priprave uzoraka i parametri koji utječu na učinkovitost razaranja lebdećih čestica. Važan je izbor oksidirajućeg agensa (HNO_3, HCl, HF, $HClO_4$, H_3BO_3 i H_2O_2), koncentracija i volumen kiseline, parametri mikrovalnog razaranja (temperatura, tlak, duljina razaranja). Variranjem svih navedenih parametara značajno utječemo na otapanje lebdećih čestica u uzorku, što je iznimno važno za analizu. (Kulkarni i sur., 2007) Često se u postupku mikrovalnog razaranja koristi fluorovodična kiselina (Kulkarni i sur., 2007, Swami i sur., 2001, Aldabe i sur., 2013) jer su u atmosferskim uzorcima aerosola zastupljeni silicij i silikati koje nije lako prevesti u vodenu otopinu. Fluorovodična kiselina prevodi silikate u spojeve topljive u vodi. Osim toga, sprječava nastajanje slabo topljivih spojeva nekih metala i povećava njihovu topljivost u vodi. Ipak, korištenje fluorovodične kiseline dovodi do smanjenja intenziteta signala prilikom analize metodom ICP-MS, a ako je dodana u količini većoj od 5 % ubrzava koroziju konusa, raspršivača, komore za raspršivanje kao i plamenika. Za uklanjanje viška fluorovodične kiseline u otopinu uzorka nakon razaranja dodaje se H_3BO_3 koji kompleksira fluoride pa se na taj način štiti kompletan kvarcni sustav instrumenta kao i konusi. Dodatkom svih ovih reagensa povećava se i udio ukupne otopljene tvari što smanjuje sposobnost ionizacije analita u plazmi i rezultira sa više spektralnih interferencija. (Swami i sur., 2001, Aldabe i sur., 2013) U ranijem postupku razrade ove metode ispitana je upotreba različitih reagensa u postupku mikrovalnog razaranja pod povišenim tlakom i temperaturom, uključujući i HF. Rezultati su pokazali da je najprikladnije razaranje lebdećih čestica postignuto kombinacijom dušične kiseline i klorovodične kiseline za većinu analiziranih metala. (Mihaljević i sur., 2018)
Daljnji postupak razrade metode uključuje odabir filtarskog medija pogodnog za analizu što više elemenata. To podrazumijeva određivanje granica detekcije metode analizom

slijepih proba. Izmjerene vrijednosti elemenata u slijepim probama mogu biti rezultat kontaminacije tijekom uzorkovanja, postupka priprave uzoraka u laboratoriju, čistoće korištenih kemikalija ili prisutnosti elemenata u filtarskom mediju. Korištenjem reagensa visoke čistoće i preciznim postupkom priprave dio utjecaja moguće je svesti na minimum. Jedan od glavnih ograničavajućih faktora za točnu i preciznu elementnu analizu lebdećih čestica u zraku je izbor filtarskog medija. (Berg i sur., 1993)
Koncentracija analita u uzorku mora biti dovoljno visoka da bi proizvela analitički signal koji pouzdano možemo razlikovati od „analitičkog šuma" tj. signala u odsutnosti analita. Granica detekcije analita definira se kao najmanja koncentracija analita u uzorku koju je moguće detektirati, ali ne nužno i kvantificirati. (Shrivastava i sur., 2011) Postoji nekoliko načina procjene granice detekcije: izračunom omjera signala i šuma, izračunom standardnog odstupanja slijepih proba ili izračunom iz kalibracijske krivulje pri niskim koncentracijama analita. (Shrivastava i sur., 2011)
Berg i suradnici (Berg i sur., 1993) su metodom ICP-MS analizirali 30 elemenata u 19 različitih vrsta filtara različitih proizvođača, uključujući teflonske filtre, membranske filtre različitog sastava celuloznih estera, filtre od kvarcnih vlakana. Rezultati su pokazali da su za analizu najviše elemenata najprikladniji teflonski filtri. Ipak, u gotovo svim analiziranim vrstama filtara izmjerene su visoke vrijednosti jednog ili više elemenata. To ukazuje da je važno u obzir prilikom izbora filtarskog medija uzeti i druge faktore poput efikasnosti sakupljanja uzorka, korištenog sakupljača i slično. Također, ne preporučuje se odabir filtarskog medija isključivo prema literaturno dostupnim podacima. Potrebno je, ovisno o analitima koje želimo analizirati, prije razvoja metode eksperimentalno odrediti granice detekcije u dostupnim odgovarajućim filtrima. Na taj način moguće je odrediti koja vrsta filtarskog medija je najprikladnija za većinu željenih analita.
U ovome radu analizirani su filtarski mediji najčešće korišteni za sakupljanje lebdećih čestica u svrhu odabira najprikladnijih za elementnu analizu lebdećih čestica u zraku. Granica detekcije metode za svaki analit izračunata je iz rezultata analize slijepih proba.

Materijali i metode

Analizirane su različite vrste filtarskih medija četiriju proizvođača:

1. filtri od kvarcnih vlakana proizvođača Pall (oznaka Pall)
2. filtri od kvarcnih vlakana proizvođača Whatman (oznaka Whatman)
3. membranski celulozno – nitratni filtri veličine pora 3 μm proizvođača Sartorius (oznaka CN-C)
4. membranski celulozno – nitratni filtri veličine pora 3 μm proizvođača Merck Millipore (oznaka CN-D)
5. teflonski filtri (oznaka PTFE) veličine pora 2 μm sa polipropilenskim rubom, proizvođača Whatman.

Dvije skupine od 10 filtara od kvarcnih vlakana proizvođača Whatman i Pall obrađene su žarenjem tri sata na 850 °C u peći za žarenje. Druge dvije skupine od 10 filtara od kvarcnih vlakana proizvođača Whatman i Pall nisu bile obrađene žarenjem. Deset filtara iz svake ranije navedene skupine pod rednim brojevima 1. do 5., uključujući i žarene i nežarene filtre spomenutih proizvođača, pripravljeno je za analizu. Filtri su stavljeni u kvarcne epruvete, dodano im je 3 ml otopine razrijeđene dušične i klorovodične kiseline 25%HNO_3/1%HCl (*v/v*). Epruvete su zatvorene perforiranim teflonskim čepovima i stavljene u uređaj za mikrovalno razaranje uz povišeni tlak Ultraclave IV, Milestone. Maksimalna temperatura tijekom mikrovalnog razaranja bila je 240°C, maksimalni tlak 130 bar, a snaga mikrovalova 1000 W. Nakon mikrovalnog razaranja, uzorci su dopunjeni otopinom klorovodične kiseline 1% (*v/v*) do 10 ml. Svi pripravljeni uzorci analizirani su nerazrijeđeni spektrometrom masa uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-MS) Agilent 7500 cx. Zbog očekivanih interferencija, svi uzorci analizirani su na dva načina; bez upotrebe kolizijsko – reakcijske ćelije i uz dodatak helija u kolizijsko – reakcijsku ćeliju. Prije analize, provedeno je ugađanje instrumentalnih parametara, osjetljivosti mjerenja te provjera i smanjenje utjecaja interferencija otopinom za ugađanje uvjeta analize. Omjer masa oksida ($^{156}CeO^+/^{140}Ce^+$) i dvostruko nabijenih iona ($^{70}Ce^{2+}/^{140}Ce^+$) iznosio je manje od 2 %. Upotrijebljena je metoda dodatka unutarnjih standarda i to: ^{45}Sc, ^{72}Ge, ^{74}Ge, ^{89}Y, ^{103}Rh, ^{193}Ir i ^{175}Lu. U svim uzorcima izmjerene su koncentracije sljedećih izotopa ^{23}Na, ^{24}Mg, ^{27}Al, ^{39}K, ^{43}Ca, ^{44}Ca, ^{51}V, ^{55}Mn, ^{56}Fe, ^{57}Fe, ^{59}Co, ^{60}Ni, ^{63}Cu, ^{65}Cu, ^{66}Zn, ^{75}As, ^{88}Sr, ^{95}Mo, ^{96}Mo, ^{111}Cd, ^{114}Cd, ^{137}Ba, ^{138}Ba, ^{140}Ce, ^{206}Pb i ^{208}Pb.

Granice detekcije metode za svaki analit a (LOD_a) izračunate su prema formuli:

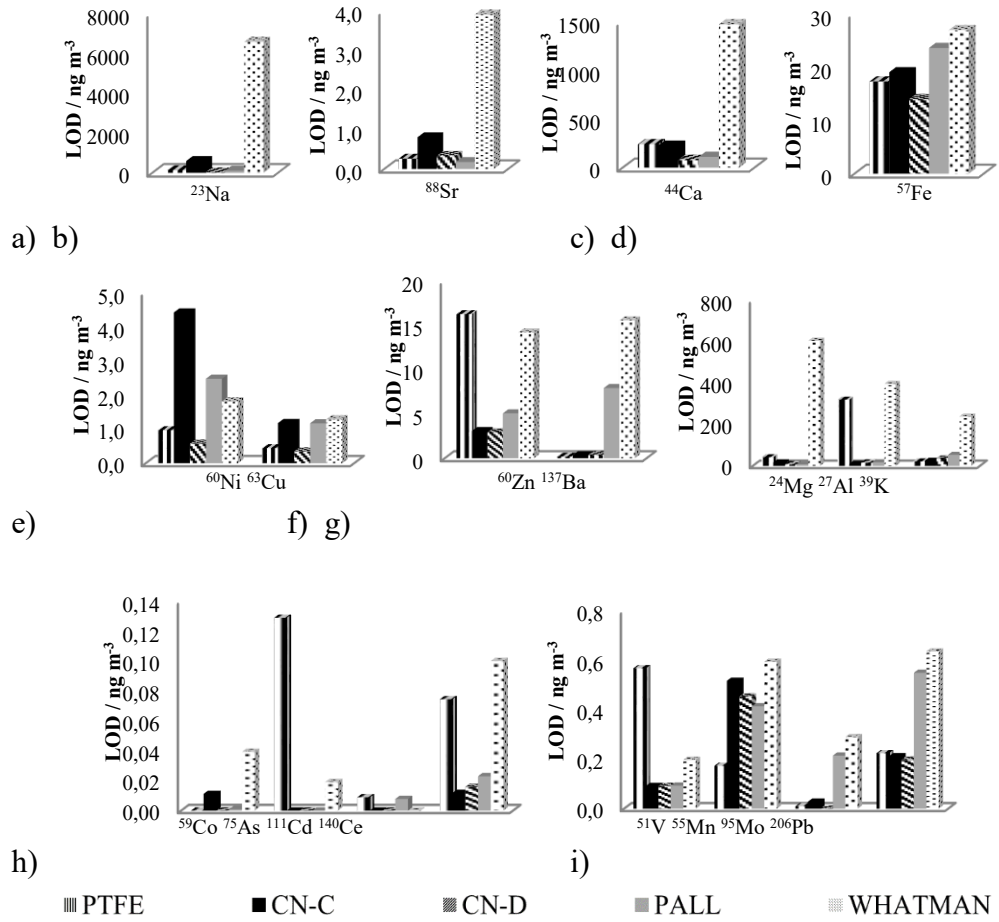
$$LOD_a = \frac{\overline{m_{LSP,a}} + 3\sigma_{LSP,a}}{V}$$

LOD_a – granica detekcije metode za analit a, u ng/m^3
$\overline{m}_{LSP,a}$ – srednja vrijednost mase analita a u laboratorijskim slijepim probama, u ng
$\sigma_{LSP,a}$ – standardno odstupanje laboratorijskih slijepih proba za analit a, u ng
V – volumen zraka za 24-satno vrijeme uzorkovanja, 55 m^3

Rezultati i rasprava

Za svaki izotop u svakoj vrsti filtarskog medija izračunate su granice detekcije metode. Dobivene vrijednosti prikazane su na slikama 1 a do 1 i.
Iz prikazanih rezultata jasno je vidljivo da filtri od kvarcnih vlakana proizvođača Whatman imaju najviše vrijednosti granica detekcije za većinu analiziranih elemenata. To ukazuje da su u slučaju analize navedenih elemenata najmanje

prikladni kvarcni filtri proizvođača Whatman. Posebno visoke vrijednosti granice detekcije Na, Ca, Mg, Al, K, Sr, Zn i Ba uočene su u kvarcnim filtrima proizvođača Whatman što ih čini najmanje prikladnima za analizu istih.

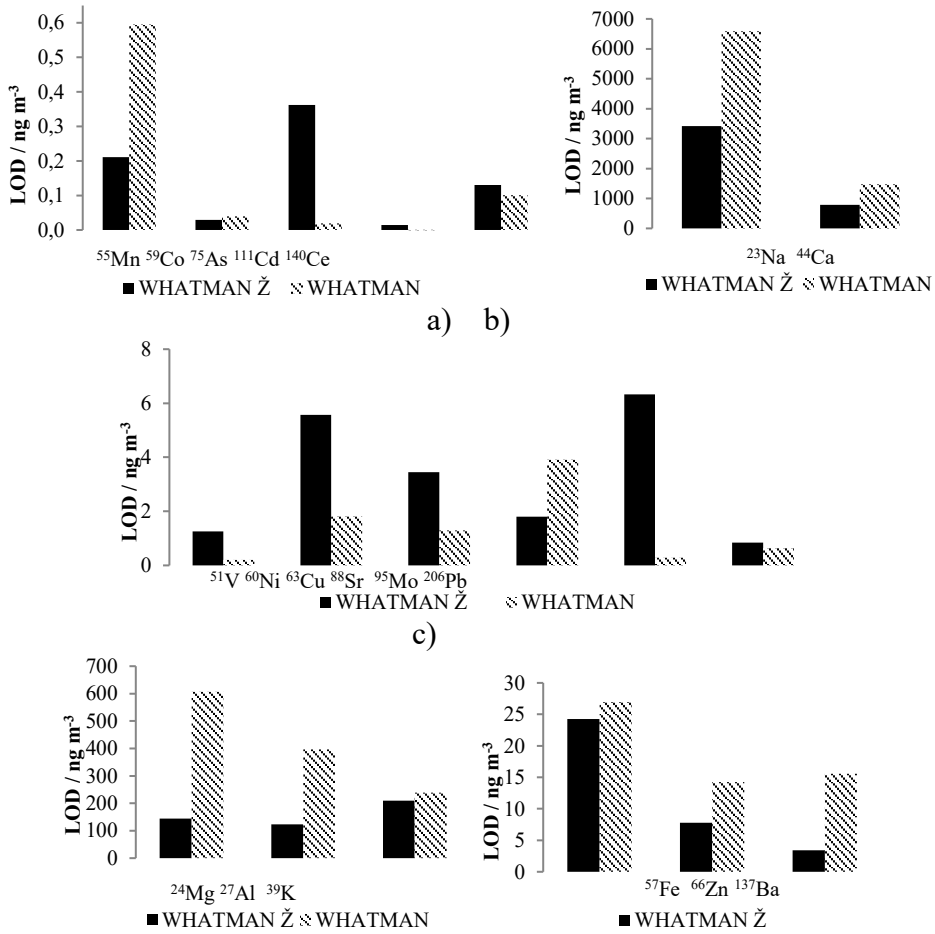


Slika 1. (a – i) Izračunate vrijednosti granice detekcije metode (LOD/ng m^{-3}) za svaki izotop u svakoj vrsti filtarskog medija

Fig. 1. (a – i) Limits of detection (LOD/ng m^{-3}) calculated for each isotope in every filter media type

Uspoređujući isti vrstu filtarskog medija, u ovome slučaju filtre od kvarcnih vlakana, proizvođača Pall i Whatman, rezultati idu u korist proizvođača Pall jer za većinu izotopa ima niske granice detekcije i time je prikladniji za analizu istih. Slične vrijednosti granica detekcije između oba proizvođača dobivene su za metale Fe, Cu, Ni, Mn i Pb. Kod

analize Al, Zn, As, Ce i V teflonski filtri također nisu najprikladniji, dok su granice detekcije u ostalim vrstama analiziranih filtara niske. Također, rezultati pokazuju da su granice detekcije izračunate iz rezultata analize membranskih celulozno – nitratnih filtara oba proizvođača za većinu elemenata niske u odnosu na sve druge vrste filtarskih medija. Izuzetak je Ni u filtrima oznake CN-C proizvođača Sartorius koji sadrži više Ni u svom sastavu od primjerice kvarcnih filtara proizvođača Whatman i PTFE filtara. Usporedbom mebranskih filtara proizvođača Merck (oznaka CN-D) i proizvođača Sartorius (oznake CN-C) uočeno je da su membranski filtri proizvođača Merck prikladniji za analizu većine metala zbog nižih granica detekcije.



Slika 2. (a – e) Izračunate vrijednosti granice detekcije metode (LOD/ng m^{-3}) za svaki izotop u žarenim i nežarenim kvarcnim filtrima istog proizvođača

Fig. 2. (a – e) Limits of detection (LOD/ng m^{-3}) calculated for each isotope in all pre-fired and non pre-fired quartz filters of the same producer

Usporedbom s rezultatima koje su objavili Berg i suradnici (Berg i sur., 1993) vidljivo je da prate sličan trend u analiziranim filtrima iste vrste i istog proizvođača. Membranski filtri izrađeni od celuloza nitrata i drugih celuloznih estera proizvođača Millipore u svome sastavu imali su visoke vrijednosti Na, Cu i Zn, slično kao membranski filtri oznake CN-C proizvođača Sartorius analizirani u ovome radu, dok su drugi elementi pokazali slične vrijednosti kao teflonski filtri. Teflonski filtri različitih proizvođača uključujući i Millipore, sadržavali su niske vrijednosti elemenata, uglavnom niže od granica detekcije za ICP-MS. Kvarcni filtri proizvođača Whatman pokazali su sličan trend usporediv s rezultatima analize u ovome radu, dakle, visoke vrijednosti Na, Mg, Zn, Sr, Mo, Ba i Cu u svome sastavu, dok se drugi elementi nisu bitno razlikovali od rezultata analize teflonskih filtara. (Berg i sur., 1993)

Granice detekcije metode izračunate su za svaki izotop u žarenim i nežarenim filtrima od kvarcnih vlakana istog proizvođača. Na slikama 2 a do 2 e prikazane su izračunate vrijednosti granica detekcije metode za svaki izotop u žarenim i nežarenim kvarcnim filtrima istog proizvođača.

Cesari i suradnici (Cesari i sur., 2018) u svome radu prikazali su rezultate analize uzoraka lebdećih čestica frakcija PM_{10} i $PM_{2,5}$ sakupljenih na filtrima od kvarcnih vlakana proizvođača Whatman. Filtri su prije sakupljanja žareni dva sata na 700 °C. Za analizu metala alikvoti filtara pripravljeni su mikrovalnim razaranjem u teflonskim posudama uz dodatak HF, H_2O_2, HCl i HNO_3. U drugom dijelu razaranja uzoraka dodana je H_3BO_3 u svrhu uklanjanja slobodnih fluoridnih iona u otopini i otapanja fluoridnih taloga. (5) Analizom metala Al, As, Ba, Cd, Ce, Co, Cu, Dy, Fe, La, Li, Mn, Nb, Nd, Pb, Rb, Sb, Se, Sr, Th, Ti, V i Zn u pripravljenim uzorcima metodom ICP-MS dobiveni su povrati metala između 85 % i 112 % uz relativna standardna odstupanja manja od 15 %.

U ovome radu analizom varijanci statistički su još uspoređeni rezultati dobiveni analizom žarenih (oznaka Ž uz oznaku proizvođača) i nežarenih kvarcnih filtara istog proizvođača. Rezultati statističke obrade pokazali su značajnu razliku između žarenih i nežarenih filtara za Na, Al, V, Mn, As, Mo kod proizvođača Pall. Statistička obrada kvarcnih filtara proizvođača Whatman pokazala je značajnu razliku za Na, Mg, Al, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Ba,Ce i Pb između žarenih i nežarenih filtara. Iz priloženih dijagrama koji prikazuju usporedbu granica detekcije žarenih i nežarenih filtara od kvarcnih vlakana proizvođača Whatman vidljivo je da je žarenjem filtara smanjena koncentracija Mn, Co, Sr, Na, Ca, Mg, Al, K, Fe, Zn i Ba. Ipak, analizom žarenih filtara dobivena je viša koncentracija As, V, Ce, Ni, Cu, Mo i Pb nego u istoj vrsti nežarenih filtara proizvođača Whatman. To dokazuje da predobrada filtara žarenjem nije dovoljno dobra metoda priprave uzoraka za analizu većine metala.

Zaključak

Rezultati analize više vrsta filtarskih medija za elementnu analizu lebdećih čestica u zraku pokazali su da su kvarcni filtri najmanje prikladni za analizu elemenata u lebdećim česticama zbog visoke koncentracije elemenata u filtarskom mediju. Usporedba rezultata žarenih i nežarenih kvarcnih filtara proizvođača Pall pokazala je značajnu razliku u sastavu za Na, Al, V, Mn, As, Mo. Rezultati dobiveni analizom kvarcnih filtara proizvođača Whatman pokazuju značajnu razliku za Na, Mg, Al, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Ba, Ce i Pb između žarenih i nežarenih filtara. Najniže koncentracije analiziranih elemenata izmjerene su u membranskim i teflonskim filtrima.

Literatura

Aldabe, J., Santamaria, C., Elustonde, D., Lasheras, E., Santamaria, J. M. (2013): Application of microwave digestion and ICP-MS to simultaneous analysis of major and trace elements in aerosol samples collected on quartz filters, *Anal. Methods*, 5, 554-559.

Berg, T., Royset, O., Steinnes, E. (1993): Blank values of trace elements in aerosol filters determined by ICP-MS, *Atmos. Environ.* 27A (15), 2435-2439.

Cesari, D., De Benedetto, G. E., Bonasoni, P., Busetto, M., Dinoi, A., Merico, E., Chirizzi, D., Christofanelli, P., Donateo, A., Grasso, F. M., Marionon, A., Pnnetta, A., Contini, D. (2018): Seasonal variability of $PM_{2,5}$ and PM_{10} composition and sources in an urban background site in Southern Italy, *Science of the Total Environment*, 612, 202-213.

Kulkarni, P., Chellam, S.,Flanagan, J. B., Jaynty, R. K. M. (2007): Microwave digestion – ICP – MS for elemental analysis in ambient airborne fine particulate matter: Rare earth elements and validation using a filter borne fine particle certified reference material, *Analytica Chimica Acta*, 599, 170-176.

Mihaljević, A., Žužul, S. (2018): Razrada postupka priprave uzoraka za elementnu analizu lebdećih čestica u zraku, *12. susret mladih kemijskih inženjera, Zagreb, Knjiga sažetaka*, 138.

Shrivastava, A., Gupta, VB. (2011): Methods for the determination of limit of detection and limit od quantitation of the analytical methods, *Chron Young Sci*, 2, 21-25.

Soleimani, M., Amini, N., Sadeghian, B., Wang, D., & Fang, L. (2018): Heavy metals and their source identification in particulate matter ($PM_{2.5}$) in Isfahan City, Iran., *J. Environ. Sci.*, https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.01.002

Swami, K., Judd, C. D., Orsini, J., Yang, K. X., Husain, L. (2001): Microwave assisted digestion of atmospheric aerosl samples followed by inductively

coupled plasma mass spectrometry determination of trace elements, *Fresenius J Anal Chem*, 369, 63-70.

Turšić, J., Radić, H., Kovačević, M., Veber, M. (2008): Determination of selected trace elements in airborne aerosol particles using different sample preparation, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 59, 111-116.

Original scientific paper

Influence of filter media type on limits of detection for air particulate matter elemental analysis

Ana Mihaljević*, Silva Žužul

Institute for Medical Reasearch and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, 10 000 Zagreb, Croatia
**Corresponding author: ana.mihaljevic9@gmail.com*

Summary

Development of method for elemental analysis of air particulate matter includes calculation of detection limits by blank analysis. In this paper several types of filter media for elemental analysis of air particulate matter like quartz filters, membrane and teflon filters with 47 mm diameter were analysed. All filters were prepared for analysis by high temperature and pressure microwave digestion in nitric acid and hydrochloric acid solution. The prepared solutions were analysed by inductive coupled plasma mass spectrometry and concentration of Na, Mg, Al, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Ba, Ce i Pb was determined. Limits of detection for every filter media type were calculated.
Results of elemental analysis for different types of filter media used for sampling air particulate matter have shown that quartz filter media are least suitable for analysis of elements because of high concentration of elements in its composition. Comparison of results of pre-fired and nonpre-fired quartz filters produced by Pall have shown significant difference in composition for elements Na, Al, V, Mn, As, Mo. Comparison of results of pre-fired and nonpre-fired quartz filters produced by Whatman have shown significant difference in composition for elements Na, Mg, Al, K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Zn, As, Sr, Mo, Cd, Ba, Ce i Pb. The lowest concentration of analysed elements was measured in membrane and teflon filter media.

Keywords: particulate matter, filters, blank, ICP-MS

Izvorni znanstveni rad

Antifungalno djelovanje eteričnih ulja klinčića i kadulje na rast micelija *Colletotrichum coccodes*

Marina Palfi[1*], Jasenka Ćosić[2], Nada Knežević[1]

[1]*Podravka d.d., Ante Starčevića 32, 48000 Koprivnica, Hrvatska*
[*]*Dopisni autor: marina.palfi@podravka.hr*
[2]*Sveučilište J.J. Strossmayera, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Hrvatska*

Sažetak

Eterična ulja su zbog svoje ekološke prihvatljivosti i niske fitotoksičnosti poželjan izvor alternativnih metoda u zaštiti bilja i kao takva mogu dati važan doprinos smanjenju uporabe sintetičkih fungicida i zaštiti okoliša. U cilju pronalaska novih aktivnih tvari koje bi mogle naći primjenu u biljnoj zaštiti provode se mnoga istraživanja utjecaja različitih eteričnih ulja na rast i razvoj fitopatogenih gljivca. U radu je ispitivan utjecaj eteričnih ulja klinčića (*Eugenia caryophyllus* (Sprengel) Bullock & Harr.) i kadulje (*Salvia officinalis* L.) na rast micelija *Colletotrichum coccodes* u *in vitro* uvjetima primijenjenih u različitim koncentracijama. Mjerenje promjera rasta micelija provedeno je četvrtog, osmog, dvanaestog i petnaestog dana nakon inokulacije micelija. Rezultati mjerenja promjera micelija *C. coccodes* pokazali su smanjenje rasta micelija povećanjem primijenjenih koncentracija eteričnih ulja kao i smanjenje antifungalnog djelovanja eteričnih ulja kroz inkubacijsko vrijeme. Petnaesti dan ispitivanja eterično ulje klinčića potpuno je inhibiralo rast micelija pri koncentraciji od 15 µL/10 mL PDA (krumpir dekstrozni agar). Potpuna inhibicija rasta micelija kod primijene eteričnog ulja kadulje bila je samo četvrtog dana od inokulacije i to pri najvećim primijenjenim koncentracijama od 70 µL/10 mL PDA. Procijenjena vrijednost parametra IC_{50} za eterično ulje klinčića bila je manja kroz cijelo vrijeme ispitivanja.
Istraživanja antifungalnog djelovanja ovih eteričnih ulja na rast micelija *C. coccodes*, naročito eteričnog ulja klinčića, potrebno je nastaviti u in situ uvjetima.

Ključne riječi: Colletotrichum coccodes, klinčić, kadulja, antifungalno djelovanje

Uvod

Fitopatogene gljivice su biljni patogeni koji se još uvijek najučinkovitije suzbijaju sintetičkim fungicidima. Međutim, učestala i neodgovarajuća uporaba fungicida

dovela je do smanjenja njihove učinkovitosti i negativnog utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš (Kim i sur., 2017). Zbog sve većeg pritiska javnosti za smanjenjem uporabe sintetičkih fungicida (Bhagwat i Datar, 2014) postoji potreba za pronalaskom novih i ekološko prihvatljivih aktivnih tvari u zaštiti bilja. Eterična ulja su postala poželjan izvor alternativnih metoda u zaštiti bilja zbog svojih antifungalnih, antibakterijskih, antivirusnih i insekticidnih svojstava (Bassolé i Juliani, 2012). U svrhu pronalaska novih aktivnih tvari koje bi mogle naći primjenu u zaštiti bilja i poljoprivrednih proizvoda provode se mnoga istraživanja utjecaja različitih eteričnih ulja na rast i razvoj fitopatogenih gljivca (Ćosić i sur., 2010; Maqbool i sur., 2011; Elshafie i sur., 2015; López-Meneses i sur., 2017).
Cilj rada bio je ispitati antifungalni utjecaj eteričnih ulja klinčića i kadulje na rast micelija *Colletotrichum coccodes* u in situ uvjetima.

Materijal i metode

U radu je ispitivan utjecaj komercijalnih eteričnih ulja klinčića (*Eugenia caryophyllus* (Sprengel) Bullock & Harr. (porodica Myrtaceae)) i kadulje (*Salvia officinalis* L. (porodica Lamiaceae)) u različitim koncentracijama (3 µL, 5 µL, 7 µL, 9 µL, 15 µL, 30 µL, 50 µL, 70 µL/10 mL PDA) na rast micelija *Colletotrichum coccodes* (porodica Glomerellaceae) u *in vitro* uvjetima. Eterična ulja proizvedena su u Pranarōm International-u (Belgija) i analizirana u laboratoriju Pranarōm upotrebom GC-MC (plinske kromatografije – masene spektrometrije).
Fitopatogena gljivica *Colletotrichum coccodes* izolirana je iz svježeg biljnog materijala rajčice. Izolacija iz biljnog materijala i determinacija gljivica provedena je u laboratoriju Katedre za fitopatologiju Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, a sva ostala istraživanja u laboratorijima Istraživanja i razvoj, Podravka d.d., Koprivnica.
U svaku Petrijevu zdjelicu promjera 90 mm razliveno je 10 mL PDA (krumpirov dekstrozni agar) podloge sterilizirane u autoklavu u koje je dodano pomoćno sredstvo Tween 80 u koncentraciji od 0,05% i planom rada određene koncentracije eteričnih ulja. U kontrolnoj varijanti pokusa korištena je čista PDA podloga. U sredinu svake Petrijeve zdjelice postavljeni su diskovi micelija *C. coccodes* promjera 4 mm stari osam dana. Pokus je proveden za svaku koncentraciju eteričnih ulja i kontrolnu varijantu u četiri ponavljanja u komori za sterilan rad (laminarij). Nakon inokulacije, Petrijeve zdjelice su stavljene na inkubaciju u termostat, na temperaturu 20ºC i svjetlosni režim 12 h svjetlo/12 h tama. Mjerenja promjera rasta micelija provedena su četvrtog, osmog, dvanaestog i petnaestog dana i izražena u mm.
Statistička obrada podataka obavljena je uporabom programa GraphPad Prism verzija 7 (GraphPad Prism).

Rezultati i rasprava

Rezultati mjerenja promjera micelija *C. coccodes* pokazali su smanjenje rasta micelija povećanjem primijenjenih koncentracija eteričnih ulja klinčića (Tablica 1) i kadulje (Tablica 2).

Tablica 1. Odnos između primijenjenih koncentracija (µL) eteričnog ulja *Eugenia caryophyllus* i promjera (mm) rasta micelija *Colletotrichum coccodes* četvrti, osmi, dvanaesti i petnaesti dan nakon nacjepljivanja micelija.

Table 1. The relation between applied concentrations (µL) of Eugenia caryophyllus essential oil and the diameter (mm) of mycelium growth Colletotrichum coccodes on the fourth, eighth, twelfth and fifteenth day after the inoculation of mycelium.

	Eterično ulje (*Eugenia caryophyllus*) *Essential oil (Eugenia caryophyllus)*			
Koncentracija/ *Concentration* (µL/10 mL)	4.dan/ *Day 4*	8.dan/ *Day 8*	12.dan/ *Day 12*	15.dan/ *Day 15*
3	11,8±1,71	26,0±5,35	38,8±4,57	50,8±3,69
5	13,8±1,26	15,5±0,58	15,8±0,50	15,8±0,50
7	15,0±0,82	17,5±1,73	17,8±1,50	17,8±1,50
9	3,5±4,12	4,0±4,62	4,0±4,62	4,0±4,62
15	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
30	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
50	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
70	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00	0,0±0,00
Kontrola (*Control*)	17,8±0,50	28,3±0,50	43,0±0,82	55,3±0,50

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± SD (n=4)/*Results are expressed as mean ± SD (n=4)*

Promjer rasta micelija pri svim primijenjenim koncentracijama eteričnih ulja bio je manji o odnosu na kontrolu osim kod eteričnog ulja kadulje dvanesti i petnaesti dan ipitivanja pri koncentracijama 5 µL/10 mL PDA odnosno 5 µL, 7 µL i 9 µL/10 mL PDA. Petnaesti dan ispitivanja eterično ulje klinčića potpuno je inhibiralo rast micelija pri koncentraciji od 15 µL/10 mL PDA. Potpuna inhibicija rasta micelija kod primjene eteričnog ulja kadulje bila je samo četvrtog dana od inokulacije i to pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji od 70 µL/10 mL PDA. Naši rezultati su u skladu s rezultatima Duduk i sur. (2015) koji navode da aktivnost eteričnih ulja ovisi o primijenjenim količinama odnosno koncentracijama. Bolje djelovanje eteričnog ulja klinčića u odnosu na eterično ulje kadulje zabilježeno je tijekom cijelog vremena ispitivanja (Slika 1). Dobro djelovanje eteričnog ulja klinčića utvrdili su Ćosić i sur. (2010) i navode da su eterična ulja lista cimeta, klinčića i anisa najbolje djelovala na dvanaest ispitivanih fitopatogenih gljivica. Rozwalka i sur. (2010) su utvrdili da eterično

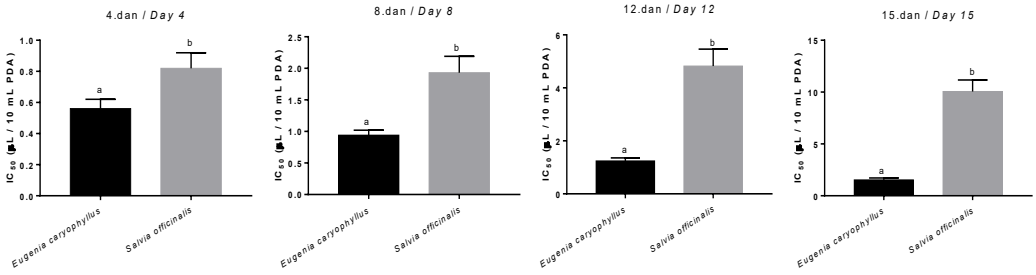
ulje klinčića ima dobro antifungalno djelovanje te da uzrokuje teška oštećenja stanične strukture konidija *C. gloeosporioides* i *C. musae*.

Tablica 2. Odnos između primijenjenih koncentracija (µL) eteričnih ulja *Salvia officinalis* i promjera (mm) rasta micelija *Colletotrichum coccodes* četvrti, osmi, dvanaesti i petnaesti dan nakon nacjepljivanja micelija.

Table 2. The relation between the applied concentrations (µL) of Salvia officinalis essential oil and the diameter (mm) of mycelium growth Colletotrichum coccodes on the fourth, eighth, twelfth and fifteenth day after the inoculation of mycelium.

	Eterično ulje (*Salvia officinalis*) *Essential oil (Salvia officinalis)*			
Koncentracija/ *Concentration* (µL/10 mL)	4.dan/ *Day 4*	8.dan/ *Day 8*	12.dan/ *Day 12*	15.dan/ *Day 15*
3	12,5±3,11	23,3±6,85	36,8±9,85	53,0±5,60
5	16,0±1,41	27,0±0,82	44,5±1,73	58,3±1,71
7	12,8±1,50	23,8±1,26	39,8±2,22	55,5±1,29
9	12,3±0,50	23,5±0,58	39,3±2,06	56,0±1,63
15	15,8±1,26	25,5±1,29	37,8±2,87	43,8±3,76
30	9,5±2,52	21,0±2,94	29,8±2,06	37,5±5,07
50	5,0±3,46	13,8±4,03	24,0±4,08	29,0±5,10
70	0,0±0,00	5,8±6,95	17,8±6,40	24,0±8,12
Kontrola (*Control*)	17,8±0,50	28,3±0,50	43,0±0,82	55,3±0,50

Rezultati su izraženi kao aritmetička sredina ± SD (n=4)/*Results are expressed as mean ± SD (n=4)*



Slika 1. Usporedba IC_{50} eteričnih ulja *Eugenia caryophyllus* i *Salvia officinalis* za *Colletotrichum coccodes* – četvrti, osmi, dvanaesti i petnaesti dan

Fig. 1. The comparison of the IC_{50} Eugenia caryophyllus and Salvia officinalis essential oils for Colletotrichum coccodes - fourth, eighth, twelfth and fifteenth day

Procijenjena vrijednost parametra IC_{50} (95% CI) za eterično ulje klinčića bila je manja kroz cijelo vrijeme ispitivanja i kretala se od 0,56 (0,44-0,69) do 1,53 (1,18 – 1,91) po 10 mL PDA podloge. Povećanje IC_{50} eteričnih ulja klinčića i kadulje kroz inkubacijsko vrijeme (Tablica 3) pokazalo je da se aktivnost eteričnih ulja smanjuje kroz inkubacijsko vrijeme što je u skladu s ispitivanjima Nosrati i sur. (2011).

Tablica 3. Procijenjena vrijednost parametra $\mathbf{IC_{50}}$ za eterična ulja četvrti, osmi, dvanaesti i petnaesti dan nakon nacjepljivanja micelija *Colletotrichum coccodes*. Rezultati su izraženi kao aritmitička sredina, te kao 95 %-tna granica pouzdanosti za IC_{50} (n = 32).

Table 3. The estimated value of the parameter IC_{50} for essential oils on the fourth, eighth, twelfth and fifteenth day after the inoculation of mycelium Colletotrichum coccodes. The results are expressed as the arithmetic mean, and 95 % confidence interval IC_{50} (n = 32).

Eterična ulja (*Essential oils*)	4. dan *Day 4*	8. dan *Day 8*	12. dan *Day 12*	15. dan *Day 15*
	IC_{50} (95 % CI)	IC_{50} (95 % CI)	IC_{50} (95 % CI)	IC_{50} (95 % CI)
Eugenia caryophyllus	0,56 (0,44-0,69)	0,94 (0,79 – 1,10)	1,24 (1,02 – 1,49)	1,53 (1,18 – 1,91)
Salvia officinalis	0,82 (0,61 – 1,04)	1,93 (1,40 – 2,55)	4,82 (3,52 – 6,50)	10,05 (7,80 – 12,95)

Zaključak

Rezultati ispitivanja utjecaja eteričnih ulja klinčića i kadulje na rast micelija *Colletotrichum coccodes* pokazali su da njihova antifungalna aktivnost ovisi o primijenjenim koncentracijama i da se smanjuje kroz inkubacijsko vrijeme. Bolje djelovanje i manji IC_{50} tijekom cijelog ispitivanja imalo je eterično ulje klinčića. Započeta istraživanja antifungalnog djelovanja ovih eteričnih ulja, naročito eteričnog ulja klinčića, potrebno je nastaviti u in situ uvjetima.

Literatura

Bassolé, I.H.N., Juliani, H.R. (2012): Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17, 3989–4006.

Bhagwat, M.K., Datar, A.G. (2014): Antifungal activity of herbal extracts against plant pathogenic fungi. *Arch. Phytopath. Plant Protect.* 47(8), 959-965.

Ćosić, J., Vrandečić, K., Poštić, J., Jurković, D., Ravlić, M. (2010): *In vitro* antifungal activity of essential oils on growth of phytopathogenic fungi. *Poljoprivreda* 16(2), 25-28.

Duduk, N., Markovic, T., Vasic, M., Duduk, B., Vico, I., Obradovic, A. (2015): Antifungal Activity of Thre Essential Oils against *Colletotrichum acutatum*, the Causal Agent of Strawberry Anthracnose. *J. Essent. Oil Bear. Pl. 1*8(3), 529-537.

Elshafie, H. S., Mancini, E., Camele, I., De Martino, L., & De Feo, V. (2015). *In vivo* antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Ind. Crops Prod.* 66, 11-15.

GraphPad Software, San Diego, CA, USA. Dostupno: http://www.graphpad.com/ (pristupljeno 24 svibnja 2017).

Kim, K. H., Kabir, E., Jahan, S. A. (2017): Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Sci. Total Environ.* 575, 525-535.

López-Meneses, A.K., Sánchez-Mariñez, R.I., Quintana-Obregón, E.A., Parra-Vergara, N.V., González-Aguilar, G.A., López-Saiz, C.M., Cortez-Rocha MO. (2017). *In vitro* Antifungal Activity of Essential oils and Major Components against Fungi Plant Pathogens. *J. Phytopathol*. 165(4), 232-237.

Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P. G., Mohamed, M. T. M., Siddiqui, Y., Zahid, N. (2011): Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biol. Technol.* 62(1), 71-76.

Nosrati, S., Esmaeilzadeh-Hosseini, S.A., Sarpeleh, A., Soflaei-Shahrbabak, M., Soflaei-Shahrbabak, Y. (2011): Antifungal activity of (*Mentha spicata* L.) essential oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* the causal agent of stem and crown rot of greenhouse cucumber in Yazd. Iran. In International Conference on Environmental and Agricultural Engineering, Chengdu, China held on, IACSIT Press, Singapore, pp. 52-56.

Rozwalka, L. C., Alves, E., do Amaral, D. C. (2010): Ultrastructural study of conidia of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae* treated with essential oils. *Interciencia* 35(12), 912-915.

Original scientific paper

Antifungal activity of clove and sage essential oils on the growth of mycelium *Colletotrichum coccodes*

Marina Palfi[1*], Jasenka Ćosić[2], Nada Knežević[1]

[1]*Podravka d.d., Ante Starčevića 32, 48000 Koprivnica, Croatia*
[2] *J.J. Strossmayer University, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia*
[*]*Corresponding author: marina.palfi@podravka.hr*

Summary

Due to their ecologic acceptability and low phytotoxicity, essential oils are a desirable source of alternative plant protection methods and as such can make an important contribution to reducing the use of synthetic fungicides and environmental protection. With the aim of finding new active substances that could be found in plant protection, many studies have been carried out to investigate the influence of various essential oils on the growth and development of phytopathogenic fungi. In this paper we investigated the influence of essential oils of clove (*Eugenia caryophyllus* (Sprengel) Bullock & Harr.) and sage (*Salvia officinalis* L.) on the growth of mycelium *Colletotrichum coccodes* in *in vitro* conditions applied in different concentrations. The measurement of the growth of the mycelium was performed on the fourth, eighth, twelfth, and fifteenth days after the micellar inoculation. The results of mycelium diameter measurement *C. coccodes* showed a decrease in micellar growth by increasing the applied concentrations of essential oils as well as reducing the antifungal activity of essential oils during the incubation period. The fifteen day trial of essential oil of clove completely inhibited the growth of mycelium at a concentration of 15 µL/10 mL PDA (Potato Dextrose Agar). The complete inhibition of the growth of the mycelium in the application of sage essential oil was only on the fourth day of inoculation at the highest applied concentrations of 70 µL/10 mL PDA. The estimated value of the IC_{50} parameter for the clove essential oil was smaller throughout the test period. Studies on the antifungal activity of these essential oils on the growth of mycelium *C. coccodes*, especially clove essential oil, should be continued *in situ* conditions.

Keywords: Colletotrichum coccodes, clove, sage, antifungal activity

Stručni rad

Procjena izvora onečišćenja zraka PAU u Zagrebu korištenjem dijagnostičkih omjera

Zdravka Sever Štruki*, Ivana Jakovljević, Gordana Pehnec

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, 10000 Zagreb, Hrvatska
**Corresponding author: zsever@imi.hr*

Sažetak

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAU) ubrajaju se u skupinu najraširenijih organskih onečišćujućih tvari u okolišu. Njihova raspodjela u okolišu uvelike ovisi o vrsti izvora i načinu sagorijevanja što ih čini vrlo korisnim indikatorom potencijalnih izvora onečišćenja. Cilj rada bio je odrediti masene koncentracije PAU u PM_{10} frakciji lebdećih čestica na pet lokacija u Zagrebu s različitim utjecajem izvora onečišćenja (A – industrija; B – promet; C – kućanstva; D – gradska pozadinska postaja; E – promet), te izračunati dijagnostičke omjere PAU. Uzorci PM_{10} frakcije lebdećih čestica sakupljani su 24-satnim prosisavanjem zraka na kvarcne filtre neprekidno 36 dana u sezoni grijanja tijekom 2016. godine. Određivani su: fluoranten (Flu), piren (Pir), benzo(a)antracen (BaA), krizen (Kri), benzo(b)fluoranten (BbF), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(a)piren (BaP), dibenzo(ah)antracen (DahA), benzo(ghi)perilen (BghiP) i indeno(1,2,3-cd)piren (IP). Suma koncentracija deset mjerenih PAU izmjerena je u rastućem rasponu: B < C < E < D < A. Dijagnostički omjer IP/BghiP kretao se od 0,36 na mjernoj postaji A do 0,68 na mjernoj postaji E što ukazuje da je emisija iz ispušnih plinova automobila značajan izvor PAU na svim lokacijama. Omjer IP/(IP+BghiP) je na svim mjernim postajama bio manji od 0,30 (izgaranje benzinskih goriva) dok je na lokaciji u blizini prometnice (mjerna postaja E) značajan izvor PAU dizelsko gorivo, s omjerom IP/(IP+BghiP) 0,31.

Ključne riječi: policiklički aromatski ugljikovodici, lebdeće čestice, dijagnostički omjeri

Uvod

Policiklički aromatski ugljikovodici (PAU) su skupina organskih spojeva s dva ili više međusobno povezana aromatska prstena. Nastaju nepotpunim sagorijevanjem

fosilnih goriva i drugih organskih materijala iz prirodnih i antropogenih izvora. U urbanim i industrijskim sredinama, PAU su gotovo u potpunosti antropogenog porijekla (Jones i sur., 1989). U plinovitoj fazi dominiraju PAU s dva ili tri benzenska prstena, a njihova koncentracija u zraku raste s porastom temperature. Za razliku od njih, PAU s četiri ili više benzenskih prstenova nalaze se vezani na lebdeće čestice u zraku (Bidleman i sur., 1986). Dokazana su kancerogena i mutagena svojstva PAU, kao i njihova toksičnost za sve žive organizme (Møller i sur., 1982; IARC, 1984). PAU iz zraka mogu oslabiti funkciju respiratornih organa i uzrokovati bronhitis (Tsapakis i Stephanou, 2005). Najpoznatiji i najviše proučavan policiklički aromatski ugljikovodik je benzo[a]piren (BaP) koji se ujedno i uzima kao indikator za prisutnost PAU u zraku. Zdravstveni rizici povezani s inhalacijom PAU iz zraka određuju se na temelju koncentracije BaP u zraku kojeg je Međunarodna agencija za istraživanje raka (IARC) svrstala u prvu grupu karcinogena. Kancerogena aktivnost PAU može se odrediti preko ekvivalenta BaP (BaP_{eq}). Ekvivalent BaP dobije se tako što se izmjerena koncentracija pojedinog PAU u vanjskom zraku pomnoži s odgovarajućim toksičnim ekvivalentnim faktorom (TEF) utvrđenim u ranijim pokusima na živim organizmima. PAU se u zrak emitiraju kao smjesa spojeva pri čemu se omjeri pojedinih relativnih molekulskih masa smatraju karakterističnim za određenu vrstu izvora. PAU emisijski profil ne ovisi samo o vrsti izvora, već i o samom procesu sagorijevanja koji vodi do nastanka PAU (Manoli i sur., 2004). Većina dijagnostičkih omjera PAU uključuje parove PAU bliskih molekulskih masa i sličnih fizikalno-kemijskih svojstava (Mackay i sur., 2006), uz pretpostavku da prolaze slične procese pretvorbe u okolišu. Tako se tijekom sagorijevanja pri niskim temperaturama uglavnom formiraju PAU malih molekulskih masa, dok visoko temperaturni procesi poput sagorijevanja goriva pogoduju emisiji PAU većih molekulskih masa (Mostert i sur., 2010). Pomoću PAU dijagnostičkih omjera moguće je razlikovati sagorijevanje dizela od benzina (Ravindra i sur., 2008a) te procese sagorijevanja krutih goriva od gorenja biomase, uključujući gorenje raslinja i trave (Yunker i sur., 2002). Vrlo je važno poznavati koncentracije, specijacije, distribuciju i potencijalne izvore PAU kako bi se onečišćenje zraka uzrokovano PM_{10} frakcijom lebdećih čestica i PAU moglo što učinkovitije kontrolirati.

U ovom radu korišteni su dijagnostički omjeri PAU u svrhu identifikacije mogućih izvora onečišćenja, pri čemu su razmatrani samo dijagnostički omjeri nesuspstituiranih PAU. Mjerenja su provedena u glavnom gradu Hrvatske, Zagrebu, koji je ujedno i najveći grad u Hrvatskoj po broju stanovnika. Prema zadnjoj procjeni iz 2016. godine, broj stanovništva je iznosio 802 338. Ranija istraživanja kvalitete zraka pokazala su da su glavni izvori onečišćujućih tvari ispušni plinovi automobila, industrija i kućna ložišta. U 2011. godini u Zagrebu je registrirano 358 308 vozila na motorni pogon, (http://www1.zagreb.hr/zgstat/index.html). Klima je umjerena kontinentalna sa sezonom grijanja koja traje od listopada do travnja. Na zadnjem službenom popisu Zagreb broji 27 934 nastanjenih stambenih jedinica prema vrsti energenata koje koriste drva i ugljen za grijanje, (https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2016/SI-1586.pdf).

Materijali i metode

Uzorkovanje

Uzorkovanje je provedeno u glavnom gradu Hrvatske, Zagrebu na pet lokacija. Lokacija A je smještena istočnom dijelu grada u blizini industrije, lokacija B se nalazi u neposrednoj blizini veliki gradskih prometnica, lokacije C i D su gradske pozadinske postaje u blizini kućanstava koja koriste plin i drva za grijanje (lokacija D je gušće naseljena), a lokacija E je gradska prometna postaja (Slika 1). Uzorci su sakupljani u hladnijem dijelu godine (sezona grijanja), u razdoblju od 09. studenog do 14. prosinca 2016. godine, pomoću sakupljača LVS 3 i SEQ 47/80 - Sven Leckel. PM_{10} frakcije lebdećih čestica uzorkovane su 24-satnim prosisavanjem približno 55 m^3 zraka na filtre od kvarcnih vlakana, te je sakupljeno ukupno 36 uzoraka na svakoj lokaciji. Iz tehničkih razloga nije bilo moguće provesti duže paralelno uzorkovanje na svim lokacijama.

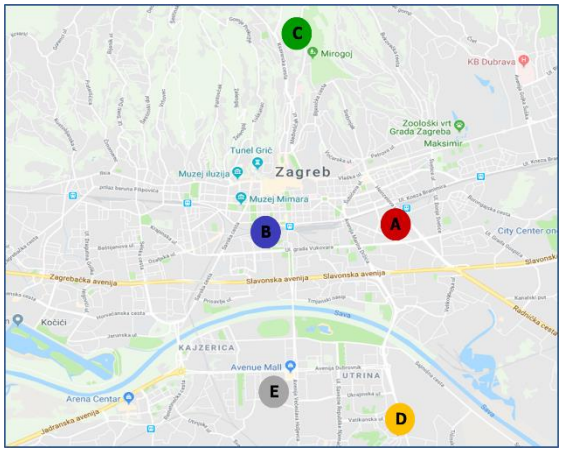
Analiza

Nakon uzorkovanja, filtri s uzorkom su se do analize čuvali zamotani u aluminijske folije u dobro zatvorenoj posudi, na tamnom mjestu na temperaturi ispod 20 °C. Ekstrakcija filtra s uzorkom provedena je u smjesi toluena i cikolheksana (7:3) oko 1 sat u ultrazvučnoj kupelji. Nakon ekstrakcije, uzorak je centrifugiran 10 minuta pri 3000 o/min kako bi se odvojio netopivi dio uzorka, te je zatim uparen u blagoj struji dušika pri 30 °C do suha. Upareni uzorak potom je otopljen u poznatom volumenu acetonitrila. Analiza PAU provedena je na Agilent 1260 Infinity tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC) s fluorescentnim detektorom promjenjivih valnih duljina ekscitacije i emisije. Određivani su sljedeći PAU: fluoranten (Flu), piren (Pir), benzo(a)antracen (BaA), krizen (Kri), benzo(b)fluoranten (BbF), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(a)piren (BaP), dibenzo(ah)antracen (DahA), benzo(ghi)perilen (BghiP) i indeno(1,2,3-cd)piren (IP). Za kromatografsko razdvajanje uzorka korištena je Zorbax Eclipse PAH kolona sa smjesom acetonitrila i vode kao pokretnom fazom pri protoku od 1 mL/min. Laboratorijske slijepe probe i terenske slijepe probe (neizloženi filtar papir) napravljene su za svaku skupinu uzoraka obzirom na lokaciju te su pripravljene i analizirane kao i uzorci.
Za statističku obradu i analiziranje podataka primijenjen je računalni program *Statistica 13.2*.

Rezultati i rasprava

Suma koncentracija deset mjerenih PAU iznosila je: 60,642 ng/m^3 na postaji u neposrednoj blizini industrije (lokacija A), 52,749 ng/m^3 na postaji u blizini kućanstava (lokacija D), 51,751 ng/m^3 na postaji u blizini prometnica (lokacija E), 42,015 ng/m^3 na

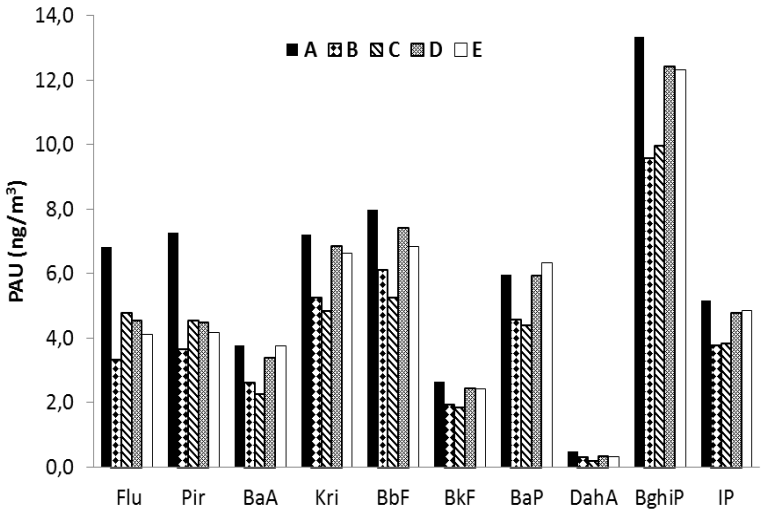
mjernoj postaji C u blizini kućanstava i 41,296 ng/m^3 na lokaciji B. Nije utvrđena statistički značajna razlika između masenih koncentracija pojedinih PAU na mjerenim postajama. Najviše srednje vrijednosti izmjerene su za sve PAU na mjernom mjestu u neposrednoj blizini industrije osim za BaP čija je najveća srednja vrijednost izmjerena na lokaciji E i iznosila je 6,328 ng/m^3. Na mjernom mjestu u neposrednoj blizini kućanstava (lokacija C) je izmjerena najniža srednja vrijednost BaP (4,395 ng/m^3). Također, na istoj su lokaciji izmjerene najniže srednje vrijednosti i ostalih PAU osim za Flu i Pir. Na svim mjernim mjestima najniže srednje masene koncentracije izmjerene su za DahA i kretale su se u rasponu 0,002 – 1,211 ng/m^3 na lokaciji C, do 0,002 – 3,138 ng/m^3 na lokaciji B. Maksimalne srednje vrijednosti na svim lokacijama imao je BghiP. Najviše 24-satne vrijednosti BghiP izmjerene su na mjernim mjestima E, D, B i C (50,586 ng/m^3; 48,309 ng/m^3; 41,321 ng/m^3 i 40,447 ng/m^3) (Slika 2).



Slika 1. Lokacije sakupljanja 24-satnih uzoraka PM_{10} frakcije lebdećih čestica u Zagrebu

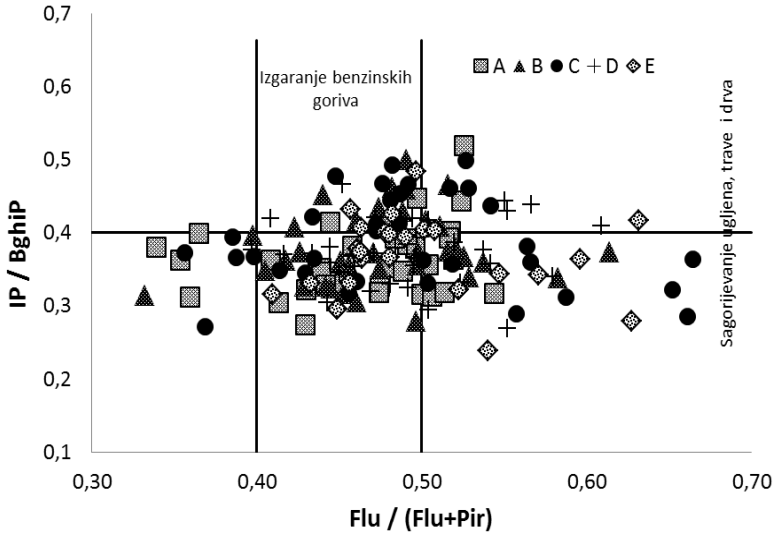
Fig. 1. Sampling site locations of 24-hour PM_{10} particles in Zagreb

Za procjenu mogućih izvora onečišćenja zraka izračunati su dijagnostički omjeri masenih koncentracija pojedinih PAU i uspoređeni s literaturnim podacima. Emisija iz ispušnih plinova automobila značajan je izvor onečišćenja zraka PAU na svih pet lokacija na što ukazuju dijagnostički omjeri IP/BghiP, IP/(IP+BghiP) i BaP/BghiP. Caricchia i sur. (1999) su u svom radu pokazali da omjer IP/BghiP manji od 0,4 ukazuje na emisiju iz benzinskih motora, dok se taj isti omjer približava jedinici za dizelske motore. Za gradsku prometnu postaju (lokacija E) izračunat je najveći omjer IP/BghiP u odnosu na druge postaje i iznosio je 0,68. Na ostalim postajama omjer IP/BghiP kretao se od 0,36 do 0,46 (Slika 3).



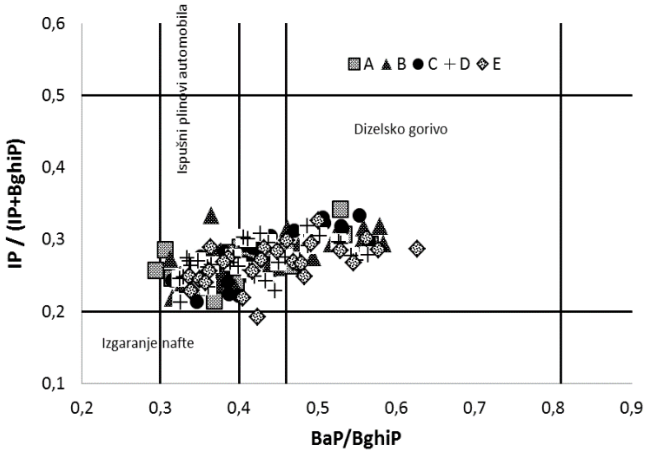
Slika 2. Srednje vrijednosti masenih koncentracija PAU na mjernim mjestima A, B, C, D i E

Fig 2. Average mass concentrations of the measured PAHs at sampling sites A, B, C, D i E



Slika 3. Odnos dijagnostičkih omjera IP/BghiP i Flu/(Flu+Pir) na mjernim mjestima A, B, C, D i E

Fig. 3. Diagnostic ratios IP/BghiP and Flu/(Flu+Pir) at sampling sites A, B, C, D



Slika 4. Odnos dijagnostičkih omjera IP/(IP+BghiP) i BaP/BghiP na mjernim mjestima A, B, C, D i E

Fig. 4. Diagnostic ratios IP/(IP+BghiP) and BaP/BghiP at sampling sites A, B, C, D i E

Srednja vrijednost omjera BaP/BghiP na mjernim mjestima A, B i C bila je manja od 0,42, dok je na mjernim mjestima D i E prosječno iznosila 0,68 (Slika 4). Vrijednost omjera BaP/BghiP između 0,3 i 0,4 je karakteristična za ispušne plinove automobila, a ukoliko je taj omjer između 0,46 – 0,81 tada se radi o izgaranju dizela (Agudelo-Castañeda i Teixeira 2014; Hanedar i sur., 2014; Šišović i sur., 2012). U ranim istraživanjima vrijednosti dijagnostičkog omjera IP/(IP+BghiP) su korištene kako bi se okarakterizirale emisije benzinskih goriva, dizela, ugljena ili drva ovisno o njegovoj vrijednosti (Grimmer i sur., 1983). Međutim, većina kasnijih istraživanja koristi omjer IP/(IP+BghiP) veći od 0,3 kao marker za emisiju dizela (Kavouras i sur., 2001). Srednja vrijednost omjera IP/(IP+BghiP) iznosila je 0,28 na svim mjernim mjestima osim na mjernom mjestu E za koje je izračunata srednja vrijednost omjera od 0,31 (Slika 4). Na mjernom mjestu u stambenom dijelu grada u blizini kućanstava koje uz plin koriste i drva za grijanje (lokacija D) uz promet dominantan izvor PAU je sagorijevanje drva na što ukazuje omjer Flu/(Flu+Pir). Dijagnostički omjer Flu/(Flu+Pir) koristi se kao marker za sagorijevanje drva, ugljena i trave ukoliko je veći od 0,5, dok je omjer u rasponu od 0,2 do 0,5 karakterističan za ispušne plinove motornih vozila (De La Torre-Roche i sur., 2009). Omjer Flu/(Flu+Pir) bio je veći od 0,5 jedino na lokaciji D dok je na ostalim lokacijama njegova srednja vrijednost bila u rasponu od 0,46 – 0,49 (Slika 3).

Izmjerene dnevne vrijednosti masenih koncentracija PAU na svim mjernim mjestima podvrgnute su faktorskoj analizi. Faktorska analiza je provedena u cilju pronalaženja virtualnih varijabli koje bi mogle opisati međusobnu ovisnost PAU.

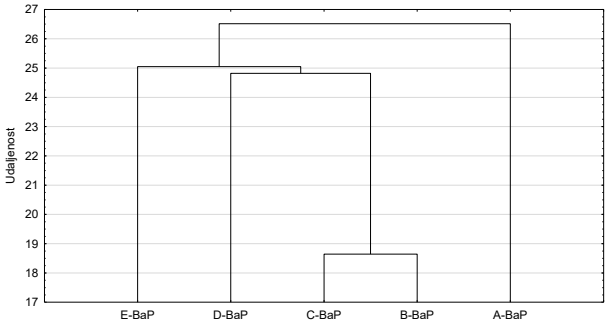
Za koncentracije koje su bile ispod granice detekcije u izračun su uzete vrijednosti koje odgovaraju jednoj polovici granice detekcije. Na svim mjernim mjestima, osim za mjerno mjesto C je izdvojen samo jedan faktor koji je obuhvatio sve PAU zajedno. Ukupna varijanca objašnjena jednim faktorom je iznosila 89,9 % za gradsku prometnu postaju (lokacija E) te više od 90 % za mjerno mjesto u blizini industrije (lokacija A) i za lokaciju B u neposrednoj blizini velikih gradskih prometnica, što je slično rezultatima iz ranijih godina u glavnom gradu Hrvatske (Jakovljević i sur., 2015). Za mjerno mjesto u blizini kućanstava (lokacija C) izdvojena su dva faktora. Ukupna varijanca obuhvaćena s ova dva faktora iznosila je 97,7 %. Prvi faktor je obuhvatio sve PAU osim DahA koji je izdvojen u drugi faktor s 10,4 % varijabilnosti. Izdvajanje DahA vjerojatno je posljedica velikog broja dana s koncentracijama ispod granice detekcije na lokaciji C, Tablica 1.

Tablica 1. Faktorska analiza masenih koncentracija PAU, značajni faktori su podebljani (> 0,7)

Table 1. Factor analysis for PAHs concentrations, significant factors loadings are bold for all extract factors (> 0.7)

	Mjerno mjesto **A**	Mjerno mjesto **B**	Mjerno mjesto **C**		Mjerno mjesto **D**	Mjerno mjesto **E**
	faktor					
	1	*1*	*1*	*2*	*1*	*1*
Flu	**-0,96**	**-0,95**	**-0,95**	0,20	**-0,91**	**-0,95**
Pir	**-0,95**	**-0,96**	**-0,97**	0,14	**-0,94**	**-0,94**
BaA	**-0,99**	**-0,97**	**-0,97**	0,04	**-0,99**	**-0,98**
Kri	**-0,98**	**-0,97**	**-0,98**	-0,01	**-0,97**	**-0,95**
BbF	**-0,99**	**-0,99**	**-0,99**	0,02	**-0,98**	**-0,99**
BkF	**-0,99**	**-0,99**	**-0,99**	-0,03	**-0,99**	**-0,99**
BaP	**-0,99**	**-0,99**	**-0,99**	-0,08	**-0,99**	**-0,99**
DahA	**-0,84**	**-0,75**	-0,21	**-0,97**	**-0,71**	-0,61
BghiP	**-0,99**	**-0,99**	**-0,99**	0,04	**-0,98**	**-0,98**
IP	**-0,99**	**-0,99**	**-0,98**	-0,11	**-0,98**	**-0,99**
Expl.Var	9,44	9,28	8,73	1,04	9,04	8,99

Kako bi se dobila bolja slika o tome postoje li sličnosti između pojedinih mjernih postaja provedena je klaster analiza (Cluster, Euclidean distances) za BaP izmjeren na svim lokacijama. Rezultati su pokazali da između mjernih mjesta B i C postoji najmanja udaljenost što ukazuje da imaju najsličnije značajke. Lokacijama B i C se zatim pridružuje lokacija D, a potom i lokacija E.



Slika 5. Dendrogram za BaP izmjeren na svim mjernim mjestima

Fig. 5. Dendrogram for BaP measured at all sampling sites

Tablica 2. Masene koncentracije PAU izražene kao ekvivalenti BaP (BaP_{eq}) i ukupna kancerogena aktivnost

Table 2. PAHs concentrations at the sampling sites expressed as BaP equivalents (BaP_{eq})

PAU	TEF*	BaP_{eq} ng/m^3				
		Mjerno mjesto **A**	Mjerno mjesto **B**	Mjerno mjesto **C**	Mjerno mjesto **D**	Mjerno mjesto **E**
Flu	0,001	0,007	0,003	0,005	0,005	0,004
Pir	0,001	0,007	0,004	0,005	0,004	0,004
BaA	0,1	0,379	0,264	0,229	0,341	0,377
Kri	0,01	0,072	0,053	0,049	0,069	0,066
BbF	0,1	0,798	0,613	0,527	0,743	0,684
BkF	0,1	0,264	0,196	0,187	0,244	0,242
BaP	1	5,963	4,596	4,395	5,953	6,328
DahA	1	0,476	0,309	0,194	0,354	0,326
BghiP	0,01	0,133	0,096	0,100	0,124	0,123
IP	0,1	0,518	0,379	0,384	0,480	0,485
Ukupna kancerogena aktivnost		**8,617**	**6,513**	**6,073**	**8,318**	**8,639**

*TEF toksični ekvivalentni faktor (Petry i sur., 1996)

Iz dendrograma je vidljivo da se navedenim lokacijama posljednja pridružuje lokacija A, odnosno da postoji najveća razlika između lokacije A u blizini industrije i ostalih mjernih mjesta, što se može objasniti s različitim izvorom onečišćenja zraka benzo(a)pirenom na toj lokaciji u odnosu na sve druge lokacije (Slika 5).
Kancerogena aktivnost PAU određena je preko ekvivalenta BaP (BaP_{eq}), dobivenog na način da se izmjerena koncentracija pojedinog PAU u vanjskom zraku pomnožila

s odgovarajućim toksičnim ekvivalentnim faktorom (TEF), Petry i sur. (1996). Za mjerne postaje E, A i D su izračunate najveće kancerogene aktivnosti (8,64 ng/m^3, 8,62 ng/m^3, 8,32 ng/m^3), dok su za ostale dvije lokacije (B i C) kancerogene aktivnosti bile značajno niže (6,51 ng/m^3, 6,07 ng/m^3), Tablica 2.
Doprinos kancerogene aktivnosti BaP u ukupnoj kancerogenoj aktivnosti iznosio je više od 70 % na svim lokacijama. Uz benzo(a)piren, značajan doprinos imali su benzo(b)fluoranten, indeno(1,2,3-cd)piren, benzo(a)antracen i dibenzo(a,h)antracen.

Zaključak

Nije pronađena statistički značajna razlika u masenim koncentracijama PAU između pojedinih lokacija, premda je suma masenih koncentracija svih mjerenih PAU bila najviša na lokaciji A u blizini industrije, a najniža na lokaciji E u bilizini prometnica. Izračunati dijagnostički omjeri PAU upućuju da je značajan izvor onečišćenja zraka PAU na svim lokacijama emisija iz ispušnih plinova automobila, što je dodatno potvrđeno i faktorskom analizom. Iako je na lokaciji A u blizini industrije zabilježena najviša vrijednost sume PAU, najveća ukupna kancerogena aktivnost procijenjena je za prometnu mjernu postaju E, a najniža za lokaciju u stambenom dijelu grada blizu kućanstava (lokacija C), što pokazuje da kancerogena aktivnost ne ovisi samo o izmjerenim vrijednostima PAU u zraku, već i o njihovim međusobnim omjerima. Tako je na lokaciji E najzastupljeniji bio BaP koji ujedno i najviše doprinosi kancerogenoj aktivnosti, dok je na mjernom mjestu A bila veća zastupljenost PAU slabijih kancerogenih aktivnosti (Flu, Pir, Kri i BghiP).

Literatura

Agudelo-Castañeda, D.M., Teixeira, E.C. (2014): Seasonal changes, identification and source apportionment of PAH in PM10, *Atmos Environ.* 96, 186-200.

Bidleman, T.F., Billings, W.N., Foreman, W.T. (1986): Vapor Particle Partitioning of Semi-volatile Organic Compounds Estimates from Field Collections, *Environ. Sci. Technol*. 20, 1038-1043.

Caricchia, A.M., Chiavarini, S., Cremisini, C., Morabito, R., Perini, A., Pezza, M. (1995): Determination of PAH in atmospheric particulates in the area ofthe Italian base in Antarctica: report on monitoring activities during the last three scientific expeditions. *Environmental Pollution* 87, 345-356.

De La Torre-Roche, R.J., Lee, W.-Y., Campos-Díaz, S.I. (2009): Soil borne polycyclic aromatic hydrocarbons in El Paso, Texas: analysis of a potential problem in the United States/Mexico border region, *Journal of Hazardous Materials* 163, 946-958.

Grimmer, G., Jacob, J., Naujack, K.W. (1983): Profile of the polycyclic aromatic compounds from crude oils – inventory by GC GC-MS. *J Anal Chem* 316, 29-36.

Hanedar, A., Alp, K., Kaynak, B., Avşar, E. (2014): Toxicity evaluation and source apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at three stations in Istanbil, Pturkey, *Sci Total Environ.* 488-489:437-446.

IARC (1984): Polynuclear Aromatic Compound, Part 1. Chemicals, Environmental and Experimental Data. Monograph 32, International Agency for Research on Cancer, Lyon.

IARC (2010): Some non-Heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Hum. 92, Lyon.

Jakovljević, I., Pehnec, G., Vađić, V., Šišović, A., Davila, S., Bešlić, I. (2015): Carcinogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons bounded on particle fraction, *Environ Sci Pollut Res* 22, 15931-15940.

Jones, K.C., Grimmer, G., Jacob, J., Johnston, A.E., (1989): Changes in the polynuclear aromatic hydrocarbon content ofwheat-grain and pasture grassland over the last century from one site in the UK, *Science of the Total Environment* 78, 117-130.

Kavouras, J.G., Lawrence, J., Koutrakis, P., Stephanou, E.G., Oyola, P. (1999): Measurement of particulate aliphatic and polynuclear aromatic hydrocarbons in Santiago do Chile: source reconciliation and evaluation ofsampling artifacts, *Atmospheric Environment* 33, 4977–4986.

Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C., Lee, S.C. (2006): Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. CRC Press.

Manoli, E., Kouras, A., Samara, C. (2004): Profile analysis of ambient and source emitted particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from three sites in northern Greece, *Chemosphere* 56, 867-878.

Møller, M., Alfheim, I., Larssen, S., Mikalsen, A. (1982): Mutagenicity ofairborne particles in relation to traffic and air pollution parameters, *Environmental Science and Technology* 16, 221-225.

Mostert, M.M.R., Ayoko, G.A., Kokot, S. (2010): Application of chemometrics to analysis of soil pollutants, *Trends in Analytical Chemistry* 29, 430-435.

Petry, T., Scmid, P., Schlatter, C. (1996): The use toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixture of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), *Chemosphere* 32, 639-648.

Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R. (2008a): Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation, Atmospheric Environment 42, 2895-2921.

Šišović, A., Pehnec, G., Jakovljević, I., Šilović Hujić, M., Vadjić V., Bešlić I. (2012): Polycyclic aromatic hydrocarbons at different crossroads in Zagreb, Croatia, *Bull Environ Contam Toxicol* 88, 438-442.

Tobiszewski, M., Tsakovski, S., Simeonov, V., Namiesnik, J. (2010): Surface water quality assessment by the use of combination of multivariate statistical classification and expert information, *Chemosphere* 80, 740-746.

Yunker, M.B., Macdonald, R.W., Vingarzan, R., Mitchell, R.H., Goyette, D., Sylvestre, S. (2002): PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAHratios as indicators of PAH source and composition, *Organic Geochemistry* 33, 489-515.

http://www1.zagreb.hr/zgstat/index.html (Pristupljeno: 12.09.2018.)

https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2016/SI-1586.pdf (Pristupljeno: 12.09.2018.)

Professional paper

Using of PAHs diagnostic ratios for the assessment of air pollution sources in Zagreb

Zdravka Sever Štrukil, Ivana Jakovljević, Gordana Pehnec

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska c. 2, HR - 10000 Zagreb, Croatia

Summary

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous environmental pollutants. PAHs distribution in the environment largely depends on the type of emission sources and processes producing the PAHs which makes them very useful for the estimation of possible pollution sources. The aim of the study was to determine PAHs mass concentrations in PM_{10} particle fraction at five locations in Zagreb with potentially different pollution sources (A – industry; B – traffic; C – households; D – background station; E – traffic) and to calculate the PAHs diagnostic ratios. Samples of PM_{10} particles were collected during 24 h in the heating season 2016, continuously for 36 days. Following PAHs were analyzed: fluoranthene (Flu), pyrene (Pyr), benzo(a)anthracene (BaA), chrysene (Kri), benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(k)fluoranthene (BkF), benzo(a)pyrene (BaP), dibenzo(a,h)anthracene (DahA), benzo(ghi)perylene (BghiP), and indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP). Total PAHs concentrations (ten measured compounds) were in the following ascending range: B < C < E < D < A. The PAHs diagnostic ratio IP/BghiP ranged from 0.36 at sampling site A up to 0.68 at sampling site E indicating that car exhausts was significant at all five locations. Ratio IP/(IP+BghiP) lower than 0.30 at all locations was found to be gasoline emissions, except at sampling site E near traffic roads were IP/(IP+BghiP) was 0.31.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, PM_{10} particles, PAHs diagnostic ratios

Stručni rad

Biostimulacija prirodno prisutne mikrobiološke zajednice u procjednoj vodi iz biootpada

Monika Šabić*, Mateja Novak, Dajana Kučić Grgić,
Marija Vuković Domanovac

Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Zavod za industrijsku ekologiju, Marulićev trg 19, HR-10000 Zagreb
**Dopisni autor: msabic@fkit.hr*

Sažetak

Odlagališta otpada predstavljaju potencijalnu opasnost za okoliš zbog odlagališnih plinova i procjednih voda koji nastaju kao posljedica fizikalno-kemijskih i bioloških procesa unutar odlagališta. Procjedne vode su kompleksnog sastava i visoko su opterećene onečišćujućim tvarima te ih je potrebno obraditi kako bi se smanjio njihov negativan utjecaj na okoliš. Biološka obrada je ekonomski učinkovita i ekološki prihvatljiva jer se obrada zasniva na korištenju mikroorganizama koji prevode dio onečišćujućih tvari u ugljikov dioksid i vodu. Procjedne vode iz biootpada su izvor prirodno prisutnih mikroorganizama koje imaju potencijal za razgradnju onečišćujućih tvari zbog prilagođenosti na uvjete navedenog sustava.
U ovom radu je istražena kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi nastaloj iz biootpada. Biostimulacijom prirodno prisutnih mikrobioloških kultura u procjednoj vodi u šaržnim uvjetima potaknut je proces biorazgradnje. Tijekom procesa je praćena kemijska potrošnja kisika, koncentracija otopljenog kisika, pH-vrijednost, toksičnost i koncentracija suspendirane tvari. Mikroskopskom analizom je dobiven uvid u tijek stvaranja aktivnog mulja. Iz eksperimentalnih rezultata izračunate su vrijednosti μ, q_s te $Y_{x/s}$ koje su iznosile 0,04 d^{-1}, 0,19 g/g d te 0,21 g/g. Monodov i Endo-Haldaneov model dobro opisuju kinetiku biorazgradnje pri čemu je R^2 iznosio 0,99.

Ključne riječi: procjedna voda, biootpad, biostimulacija, kinetika

Uvod

Zbog brzog ekonomskog i demografskog rasta, trend stvaranja komunalnog otpada je značajno porastao na globalnoj razini. Svake godine Europljani odbace više od 260 milijuna tona komunalnog otpada od čega 25 % čini organska komponenta

(Romero i sur., 2013). Stanje u Republici Hrvatskoj je također zabrinjavajuće. U 2015. godini ukupno je odloženo 1.318.740 tona komunalnog otpada od toga 828.564 tona čini biorazgradivi komunalni otpad što je 63 % ukupnog komunalnog otpada. Proizvodnja biorazgradivog komunalnog otpada po stanovniku povećana je s 158 kg u 1997. godini na 250 kg u 2015. godini (Plan gospodarenja otpadom u RH, NN 3/17). Biootpad je biološki razgradivi otpad iz vrtova i parkova, hrana i kuhinjski otpad iz kućanstva, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata i slični otpad iz proizvodnje prehrambenih proizvoda (Zakon o održivom gospodarenju otpadom, NN 94/13, 73/17). Odlagališta otpada, posebice ona neuređena, predstavljaju veliku opasnost za sve sastavnice okoliša, a najznačajniji rizik za okoliš su nastali produkti razgradnje otpada – odlagališni plinovi i procjedne vode (Závodská i sur., 2014). Procjedne vode definiraju se kao otpadne vode koje nastaju različitim biokemijskim procesima pri prolasku oborina kroz tijelo odlagališta. Najčešće su smeđe do crne koloidne otopine, a nastaju cirkulacijom oborinske vode kroz tijelo odlagališta i biokemijskim procesima u otpadu tijekom njegove razgradnje (Oreščanin, 2014). Procjedne vode su neugodnog mirisa, visoke vodljivosti i visokog organskog opterećenja. Također mogu imati visoke koncentracije amonijaka koji nastaje razgradnjom proteina. Najčešći pokazatelji koji se odrađuju u procjednim vodama su kemijska potrošnja kisika (KPK), petodnevna biokemijska potrošnja kisika (BPK_5), pH-vrijednost, vodljivost, suspendirane tvari i toksičnost.
Biološka obrada se pokazala kao jednostavna, pouzdana i prije svega isplativa obrada procjednih voda pri čemu mikroorganizmi obavljaju biorazgradnju organskih tvari u aerobnim ili anaerobnim uvjetima (Ghosh i Hasan, 2013; Yahmed i sur., 2009). Mikrobnu biorazgradnju možemo definirati kao biološki katalizirano smanjenje kemijske složenosti organskih tvari. U realnim uvjetima proces biorazgradnje je vrlo složen pa brzina i stupanj biorazgradnje ovise o biološkim, kemijskim i fizikalnim čimbenicima koji su različiti za svaki ekosustav. Unatoč samoj kompleksnosti mikrobnih procesa, povezanost rasta biomase s koncentracijom supstrata može se opisati pomoću različitih modela, a jedan od značajnijih je Monodova jednadžba (Kučić i sur., 2017; Nakhla i sur., 2006). Ova jednadžba je važna zbog svoje jednostavnosti i upotrebljivosti. Monod je definirao funkcijsku ovisnost specifične brzine rasta biomase i koncentracije:

$$\mu = \frac{\mu_{max} * \gamma_S}{K_S + \gamma_S} \qquad (1)$$

gdje je μ – specifična brzina rasta, d^{-1}, μ_{max} – maksimalna specifična brzina rasta, d^{-1}, γ_S – koncentracija supstrata, g/dm^3, K_S – konstanta zasićenja supstratom, g/dm^3,

koja se definira kao koncentracija supstrata pri polovici maksimalne specifične brzine rasta (Balamurugan i sur., 2011; Nakhla i sur., 2006).
Posljedica procesa biorazgradnje je mikrobni rast uz istovremeno uklanjanje supstrata što opisuju sljedeće jednadžbe:

$$r_X = \mu * \gamma_X \tag{2}$$

$$r_S = \mu * \frac{\gamma_X}{Y} \tag{3}$$

gdje su r_X i r_S – brzina rasta biomase odnosno brzina uklanjanja supstrata, g/dm^3 d, γ_X – koncentracija biomase, g/dm^3, t – vrijeme, d, Y – koeficijent iskorištenja, g/g.
Jedan od modela koji također dobro opisuje mikrobne procese i procesna zbivanja je Haldaneov model, prikazan sljedećom jednadžbom:

$$\mu = \frac{\mu_{max} * \gamma_S}{K_S + \gamma_S + \gamma_S{}^2 / K_i} \tag{4}$$

gdje je μ – specifična brzina rasta, d^{-1}, μ_{max} – maksimalna specifična brzina rasta, d^{-1}, γ_S – koncentracija supstrata, g/dm^3, K_S – konstanta zasićenja supstratom, g/dm^3 i K_i – konstanta inhibicije, g/dm^3. Ako u Haldaneov model uključimo konstantu odumiranja biomase, k_d, dobivamo jednadžbu:

$$\mu = \frac{\mu_{max} * \gamma_S}{K_S + \gamma_S + \gamma_S{}^2 / K_i} - k_d \tag{5}$$

Ovako modificirani Haldaneov model poznat je pod nazivom Endo-Haldaneov model (Šabić i sur., 2015).

Materijali i metode

Kao supstrati za pripravu biootpada korišteni su kora luka, pšenična slama, bijeli kruh, kora rajčice, kora banane, kora jabuke, kora krumpira, kora mrkve i kupus. Biootpad je priređen na način da su navedeni supstrati pomiješani u određenim udjelima kako bi se zadovoljili optimalni uvjeti za proces kompostiranja. Početne vrijednosti priređenog biootpada za pH-vrijednost, vlažnost i C/N omjer su iznosile 5,9; 57 % i 34:1. Prema standardnoj metodi (EN 12457-4:2002) pripremljena je procjedna voda iz biootpada.

Pokus biorazgradnje procjedne vode je u šaržnim uvjetima, pri čemu je Erlemeyerova tikvica od 1 dm^3 sadržavala 500 cm^3 procjedne vode dobivene iz biootpada. Pokus je proveden na rotacijskoj tresilici (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & CO., Schwabach, Germany) pri 160 okretaja u minuti i temperaturi od 23±2°C tijekom 10 dana. Tijekom pokusa u procjednoj vodi su praćene koncentracija otopljenog kisika, pH-vrijednost, vodljivost (WTW Multi 340i), kemijska potrošnja kisika, biokemijska potrošnja kisika i suspendirana tvar (APHA, 2012). Test toksičnosti je proveden pomoću bioluminiscentne bakterije *Vibrio fischeri* na uređaju Lumistox 300 (HRN EN ISO 11348-3:2010). Mikroskopskom analizom je praćen tijek stvaranja aktivnog mulja, gdje su pomoću svjetlosnog mikroskopa (Olympus BX50, Olympus Optical Co., Japan) opremljenog kamerom (Olympus DP10), snimane mikrofotografije.
Na temelju rezultata pokusa procijenjeni su kinetički parametri modela. Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijom primjenjujući simpleksnu metodu i metodu najmanjih kvadrata koje su sadržane u programskom paketu Scientist (Scientist Handbook). Rezultati dobiveni simulacijom pomoću matematičkog modela uspoređeni su s eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalno odstupanje između eksperimentalnih podataka i vrijednosti izračunatih pomoću modela. Skup optimalnih parametara modela upotrijebljen je za simulacije koje su uspoređene s rezultatima pokusa.

Rezultati i rasprava

Kao sve veći problem današnjice, otpad veže uz sebe i problem procjednih voda koje nastaju prolaskom vode kroz tijelo odlagališta (El-Gohary i sur., 2016; Romero i sur., 2013). Za obradu procjednih voda sve češće se odabire izrazito učinkovita, a s druge strane jednostavna i ekološki prihvatljiva biološka obrada s aktivnim muljem, koja podrazumijeva uklanjanje organskih tvari iz procjednih voda pomoću mikroorganizama kojima organske tvari služe kao hrana za rast i razmnožavanje.
Monodovom i Endo-Haldaneovom kinetikom (jednadžbe 1. i 5.) procijenjeni su biokinetički parametri. Optimiranjem su dobivene vrijednosti biokinetičkih parametara μ_{max}, K_S, Y, K_i i k_d (Tablica 1.) koje su korištene za simulaciju procesa biorazgradnje procjedne vode iz biootpada u šaržnom reaktoru (Slika 1.). U Tablici 1. dani su biokinetički parametri modela, gdje je Y koeficijent prinosa biomase i predstavlja koncentraciju biomase koja se proizvede po jedinici uklonjenog supstrata te je jednak i za Monodov model i za Endo-Haldanov model te iznosi 0,21 g/g. Konstanta zasićenja suspstratom, K_S, ukazuje na afinitet mikroorganizama prema supstratu. Konstanta inhibicije, K_i, iznosila je 13,82 g/dm^3 i od iznimne je važnosti za daljnji tijek procesa s obzirom da definira razinu koncentracije supstrata koja se ne smije premašiti. Visoke vrijednosti K_i podrazumijevaju da je kultura manje

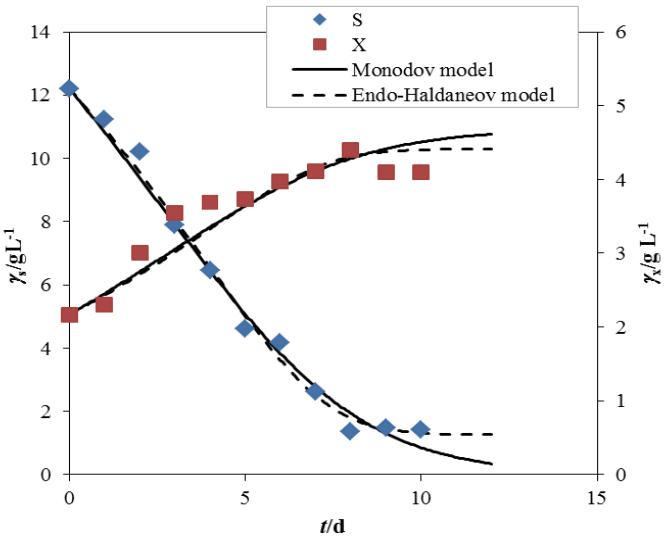
osjetljiva na inhibiciju supstratom te da je učinak inhibicije moguć pri visokim koncentracijama supstrata (Kučić i sur., 2017). Oba modela dobro opisuju promjenu koncentracija supstrata i biomase u procesu biorazgradnje na što ukazuje visoka vrijednosti R^2 od 0,99.

Tablica 1. Biokinetički parametri modela za proces biorazgradnje procjedne vode iz biootpada

Table 1. Biokinetic parameters of models for biowaste leachate biodegradation

Model	μ_{max}, d^{-1}	K_S, g/dm^3	Y, g/g	K_i, g/dm^3	k_d, d^{-1}	R^2, -
Monod	0,24	11,46	0,21	-	-	0,9962
Endo-Haldane	0,40	7,97	0,21	13,82	0,05	0,9978

Na Slici 1. prikazana je promjena koncentracije supstrata i biomase. Tijekom pokusa uočava se rast koncentracije biomase i pad koncentracije supstrata. Vidljivo je da se u 2. danu KPK vrijednost smanjila za 16 %, a nakon toga vrijednost se smanjuje do 8. dana kada je postignuta najveća učinkovitost biorazgradnje od 89 %. Nakon 8. dana KPK vrijednost se ne mijenja značajnije te možemo pretpostaviti da je došlo do inhibicije produktom.



Slika 1. Promjena koncentracija supstrata i biomase tijekom 10 dana. Usporedba rezultata pokusa i kinetičkih modela

Fig. 1. Changes in substrate and biomass concentration during 10 days. Comparison of experimental results and kinetic models

Određivanje vrijednosti BPK_5 uz KPK važno je zbog procjene biorazgradivosti organske tvari u procjednoj vodi. Na početku procesa biorazgradnje vrijednost omjera BPK_5/KPK iznosio je 0,65 (Tablica 2.) što ukazuje na biorazgradivost organskih tvari u procjednoj vodi, odnosno da za obradu možemo primijeniti biološki proces (Renou i sur., 2008). Na kraju procesa omjer BPK_5/KPK se smanjio te je iznosio 0,13 što ukazuje da se organska tvar razgradila za 80 %.
Koncentracije otopljenog kisika na početku procesa biorazgradnje iznosila je 2,52 mg/dm^3 što ukazuje na visoku mikrobiološku aktivnost (Tablica 2.). Na kraju procesa, koncentracija otopljenog kisika iznosila je 6,61 mg/dm^3 što upućuje da se biostimulacijom održavala koncentracija otopljenog kisika potrebna za odvijanje samog procesa biorazgradnje.
Na početku pokusa biorazgradnje provedeno je ispitivanje toksičnosti eluata s bakterijom *Vibrio fischeri* koja se primjenjuje za procjenu ekotoksičnosti procjednih voda s odlagališta, otpadnih voda i industrijskih otpadnih voda (Ghosh i sur., 2017). Indeks utjecaja toksičnosti (TII_{50}) na početku iznosio je 15,5 što ukazuje da je procjedna voda toksična (Güneş i sur., 2008), dok se procesom biorazgradnje ukupna toksičnost smanjila za 74,2 %.
Vrijednost pH važna je za provedbu bioloških procesa jer predstavlja okolišni faktor koji utječe na brzinu i ograničava rast mikroorganizama (Bitton, 2011). U Tablici 2. prikazane su vrijednosti pH na početku i na kraju procesa biorazgradnje gdje se primjećuju da na početku procesa prevladavaju kiseli uvjeti koji pogoduju rastu gljiva. Zbog raspada organskog dušika tijekom procesa biorazgradnje, oslobađa se amonijak zbog čega se povećava koncentracija NH_4^+ te pH-vrijednost raste do lužnatog područja (Kučić i sur., 2017). Vrijednost pH utječe i na enzimske aktivnosti te samim porastom pH-vrijednosti dolazi do poboljšanja biološke obrade (Ghanizadeh i Sarrafpur, 2001).

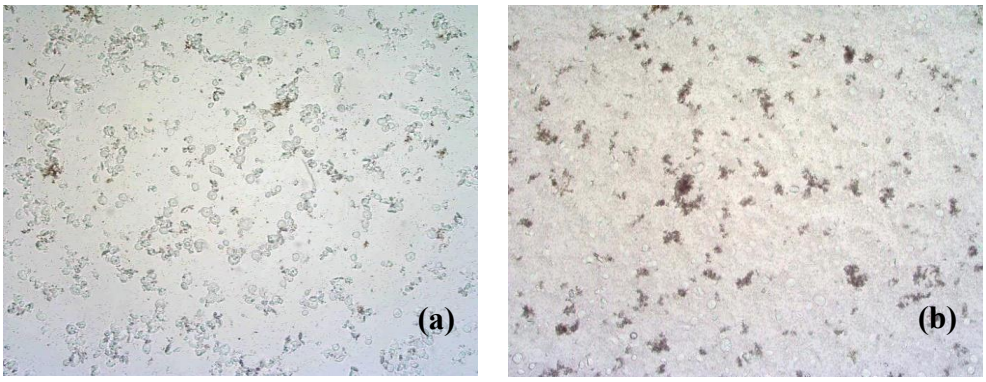
Tablica 2. Karakteristike procjedne vode iz biootpada na početku i na kraju procesa biorazgradnje

Table 2. Characteristics of biowaste leachate at the beginning and at the end of biodegradation process

Procjedna voda iz biootpada	Početak biorazgradnje	Kraj biorazgradnje
BPK_5/KPK, -	0,65	0,13
O_2, mg/dm^3	2,52	6,61
TII_{50}, -	15,5	4,0
pH, -	4,05	8,45

Mikroskopska analiza se provodila kako bi se dobio uvid u tijek procesa stvaranja aktivnog mulja, odnosno odredile karakteristike pahuljica mulja, što omogućuje uvid

u promjene koje se zbivaju u sustavu tijekom procesa. Slika 2a. prikazuje male pahuljice aktivnog mulja, nepravilnog oblika, koje su karakteristične za mladi aktivni mulj (Eikelboom, 2000). U 3. danu procesa biorazgradnje uočavaju se kompaktnije i oblikovanije pahuljice aktivnog mulja (Slika 3b.) koje zbog svoje morfologije i svojstava doprinose većoj učinkovitosti uklanjanja organskih onečišćujućih tvari iz procjedne vode.



Slika 2. Mikrofotografije uzorka aktivnog mulja i procjedne vode u 1. danu (a) i 3. danu (b) procesa biorazgradnje, P=100×

Fig. 2. Microscopic photographs of activated sludge and leachate at 1st day (a) and 3rd day of biodegradation process, M = 100×

Zaključci

Karakteristike procjedne vode nastale iz biootpada su niska pH-vrijednost, toksičnost te visoka vrijednost kemijske potrošnje kisika zbog čega je potrebno takvu otpadnu vodu obraditi prije ispuštanja u okoliš. Vrijednosti BPK_5/KPK od 0,65, ukazuje na mogućnost biološke obrade procjedne vode iz biootpada. Biostimulacijom prirodno prisutnih mikroorganizama, osiguravanjem aerobnih uvjeta, potaknut je proces biorazgradnje uz ukupnu učinkovitost procesa od 89 %. Proces biorazgradnje procjedne vode iz biootpada opisan je Monodovim i Endo-Haldanovim modelom uz vrijednosti R^2 od 0,99.

Literatura

APHA (2012): Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition,Washington

Balamurugan, B., Thirumarimurugan, M., Kannadasan, T. (2011): Anaerobic degradation of textile dye bath effluent using *Halomonas* sp., *Bioresource Technol.* 102, 6365-6369.

Bitton, G. (2011): Wastewater microbiology, New Jersey, John Wiley & Sons

Eikelboom, D.H., Process control of activated sludeg plants by microscopic investigation, London, IWA publishing

El-Gohary, F.A., Kamel, G. (2016): Characterization and biological treatment of pre-treated landfill leachate, *Ecol. Eng.* 94, 268-274.

EN 12457-4:2002, Characterization of waste – Leaching; Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges – Part 4: One-stage batch test at a liquid to solids ratio of 10 l/kg for materials with particle size below 10 (without or with size reduction)

Ghanizadeh, G., Sarrafpur, R. (2001): The effects of temperature and pH on settlabilitiy od activated sludge flocs, *Iran. J. Public Health* 30, 139-142.

Ghosh, P., Thakur, I.S., Kaushik, A. (2017): Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review, *Ecotox. Environ. Safe.* 141, 259-270.

Ghosh, S., Hasan, S.E. (2013): Anaerobic digestion of landfill leachate: A modified approach, *Int. J. Microbi. Immunol. Res.* 2(7), 056-063.

Güneş, E.H., Güneş, Y., Talinli I. (2008): Toxicity evaluation of industrial and land base sources in a riverbasin, *Desalination* 226, 348-356.

HRN EN ISO 11348-3:2010, Kvaliteta vode – Određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije *Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) – 3.dio: Metoda u kojoj se upotrebljavaju liofilizirane bakterije

Kučić, D., Vuković Domanovac, M., Briški, F. (2017): Kinetics of aerobic treatment od two-phase olive-mill waste by actived sludge in sequencing batch reactor, *Holist. Approach Environ*.7, 139-155.

Nakhla, G., Liu, V., Bassi, A. (2006): Kinetic modeling of aerobic biodegradation of high oil and greaserendering wastewater, *Bioresource Technol.* 97, 131-139.

Oreščanin, V. (2014): Procjedne vode odlagališta otpada – kemijski sastav, toksični učinci i metode pročišćavanja, *Hrvatske vode* 22**,** 1-12.

Plan gospodarenja otpadom Republike Hrvatske za razdoblje 2017.-2022. godine, NN 3/17.

Renou, S., Givaudan, J.G., Poulain, S., Dirassouyan, F., Mulin, P. (2008): Landfill leachate treatment: Review and opportunitiy, *J Hazard. Mater.* 150, 468-493.

Romero, C., Ramos, P., Costa, C., Márquez, M.C. (2013): Raw and digested municipal waste compost leachate as potential fertilizer: comparison with a commercial fertilizer, *J. Clean. Prod.* 59, 73-78.

Scientist Handbook, Micromath®, Salt Lake City, 1986-1995.

Šabić, M., Vuković Domanovac, M., Findrik Blažević, Z., Meštrović, E. (2015): Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode, *Kem. Ind,* 64 (5-6) 229-236.

Yahmed, A.B., Saidi, N., Trabelsi, I., Murano, F., Dhaifallah, T., Bousselmi, L., Ghrabi, A. (2009): Microbial characterization during aerobic biological treatment of landfill leachate (Tunisia), *Desalination* 246, 378-388.

Zakon o održivom gospodarenju otpadom, NN 94/13, 73/17.

Závodská, A., Benešová, L., Smyth, B., Morrissey, A.J. (2014): A comparison of biodegradable municipal waste (BMW) management strategies in Ireland and the Czech Republic and lessons learned, *Resour. Conserv. Recycl.* 92, 136-144.

Professional paper

Biostimulation of native microbial community in biowaste leachate

Monika Šabić*, Mateja Novak, Dajana Kučić Grgić,
Marija Vuković Domanovac

University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Department of Industrial Ecology, Marulićev trg 19, HR-10000 Zagreb
**Corresponding author: msabic@fkit.hr*

Summary

Landfills pose potential threat to environmental due to landfill gases and landfill leachate which are the result from physico-chemical and biological processes within the landfill. Leachates are complex and have high organic load, thus they need to be treated in order to reduce their negative impact. Biological treatment is economically efficient and environmentally friendly because treatment is based on the use of microorganisms that metabolize contaminants into carbon dioxide and water. Biowaste leachate is a source of naturally occurring microorganisms that have the potential for contaminants degradation due to their adaptation to the leachate system conditions.

This research is based on the kinetics of biodegradation of organic matter in the leachate generated from biowaste. The process of biodegradation was induced in batch conditions by the biostimulation of natural microbiological cultures present in the leachate. During the experiment chemical oxygen demand, concentration of dissolved oxygen, pH value, toxicity and concentration of suspended solids were monitored. The insight of development of active sludge was gained through microscopic analysis. From the experimental results the values of μ, q_s and $Y_{x/S}$ were calculated and they were 0.04 d^{-1}, 0.19 g/g d and 0.21 g/g. Monod's and Endo-Haldane's model describe well the biodegradation kinetics where R^2 was 0.99.

Key words: leachate, biowaste, biostimulation, kinetics

Susret mladih kemičara
Meeting of Young Chemists

Dobivanje aluminijevog alauna iz limenke

Boris Mikulić, Stjepan Jozinović, Slavica Jukić*

Katolički školski centar "Don Bosco" Žepče, Opća gimnazija, Stjepana Radića bb, 72230 Žepče, Bosna i Hercegovina
**Dopisni autor: slavica.perkovic71@gmail.com*

Sažetak

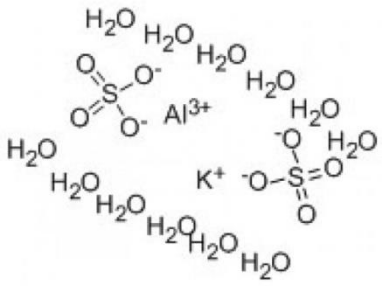
Limenka je pakiranje koje se najviše reciklira. Aluminijske se limenke mogu reciklirati u nove limenke ili neke druge proizvode od aluminija. Unatoč tomu što je recikliranje ključno za očuvanje energije i zaštitu okoliša, u BiH nema organizirane reciklaže. Cilj ovoga rada bio je probuditi svijest o važnosti recikliranja te pokazati kako se jednostavnim postupkom može iz aluminijske limenke dobiti vrijedan spoj poput alauna. Aluminijev alaun, kalijev aluminijev sulfat dodekahidrat, tehnički je najvažniji spoj iz skupine alauna. Ima široku primjenu kao sredstvo za stezanje, lijepljenje i dezinfekciju. Ubraja se u kemikalije bogate ljekovite i kozmetičke vrijednosti. Preparacija iz aluminijske limenke sastoji se od otapanja komadića limenke u kalijevu hidroksidu i taloženju filtrata s otopinom sumporne kiseline. Prekristalizacijom se dobiju bijeli kristali alauna.

Ključne riječi: recikliranje, limenka, alaun.

Uvod

Svijet se danas suočava sve češće s velikim ekološkim problemom zagađivanja okoliša. Sredstva zagađivanja su najčešće ambalaže prehrambenih proizvoda (plastične vrećice, najlonske vrećice, plastične boce, papirnati omoti, limenke, itd.). U ovom radu ćemo se osvrnuti na nepotrebne kontaminacije prirode aluminijskim limenkama koje nam služe svakodnevno kao ambalaža osvježavajućih i/ili alkoholnih napitaka. Recikliranje se čini kao izrazito nov koncept poboljšanja životne sredine, ali zapravo ima jako dugu povijest. U 20. st. reciklaža dobiva novu perspektivu i novi atribut „Izvor bogatstva". Sukladno tomu otvaraju se 1904. godine prva postrojenja reciklaže aluminijskih limenki u Chicagu i Clevelandu. Godine 1964. uveden je aluminijski spremnik. Prepoznavši vrijednost upotrijebljenih aluminijskih limenki kao sirovine za izradu novih limenki, aluminijska će industrija uskoro početi stvarati masivni sustav za recikliranje i iskorištavanje spremnika za piće. Sedamdesete godine su obilježene otvaranjem brojnih postrojenja koja su pospješivala razvoj recikliranja u cijelom svijetu. Limenke aluminija se mogu

reciklirati beskonačno mnogo puta bez ikakvih gubitaka kvalitete. Produkti reciklaže mogu biti nove limenke ili neki drugi proizvodi izrađeni od visokokvalitetnog aluminija. Vrijednost rabljenog aluminija kao energetskog resursa potkrijepljuju brojke koje govore o uštedi energije pri recikliranju. U odnosu na proizvodnju novog aluminija rabljene limenke mogu sačuvati i do 95 % energije u procesu. Količina ispusnih plinova industrijskih jedinica koje prerađuju aluminij iz limenki je oko 86 % manja, a zagađenje voda je manje za oko 76 %. Potreba za vodom u procesu je manja za 40 % nego u proizvodnji novog aluminija. Unatoč tomu, stupanj recikliranja aluminijskih limenki u BiH, ali i susjednim zemljama je izrazito loš. U ovom radu prikazano je kako se recikliranjem limenki aluminija može dobiti alaun u obliku suhih kristala. Ako pomješamo otopine aluminijevog sulfata i kalijevog sulfata, iz zasićenih otopina iskristalizirat će kalijev aluminijev sulfat. Većina alauna kristalizira u obliku oktaedra ili kocke, a u odgovarajućim uvjetima mogu narasti do značajnijih dimenzija. Šest od dvanaest molekula vode po jediničnoj formulskoj masi je čvrsto vezano za trovalentni kation, a ostalih šest je lagano vezano za sulfatni anion i jednovalentni kation. Alaun ima široku primjenu u industriji, primjerice u tekstilnoj i prehrambenoj industriji te industriji papira. Koristi se za pročišćavanju vode. U medicini se koristi jer ima dobra antiseptička svojstva, a u kozmetici kao dezodorans jer usporava razvoj bakterija odgovornih za tjelesne mirise. Smanjuje krvarenje manjih posjekotina i porezotina. Zbog otpornosti prema visokoj temperaturi koristi se i u aparatima za gašenje požara.



Slika 1. Strukturna formula alauna

Fig. 1. Structural formula of alum

Materijali i metode

Postupak

Potrebno je škarama isjeći komad očišćene limenke od aluminija dimenzija 5x7,5 cm. Komad aluminija se isječe u male komadiće, površine oko 0,5 cm^2 (ili sitnije).

Odvagana količina treba iznositi između 0,9 i 1,2 g. Odvagani uzorak se prenese u Erlenmayerovu tikvicu od 250 cm^3 vodeći računa da ga se što manje dotiče prstima. Pokus se izvodi u digestoru. Na komadiće aluminija u tikvici dodaje se 50 cm^3 KOH, koncentracije 1,4 mol/dm^3. Vrlo brzo se mogu uočiti mjehurići vodika kao rezultat reakcije aluminija i baze. Veoma lagano tikvica se zagrije u cilju ubrzavanja reakcije – najbolje na ploči za kuhanje. Smjesa se može zapaliti stoga je nužan veliki oprez. Padne li razina tekućine na polovicu početnog volumena, u tikvicu se dodaje demineralizirana voda da se održi razina na oko 25 cm^3. Kada dođe do izdizanja razine tekućine zbog burne reakcije (reakcija je najburnija na početku otapanja), tikvicu s uzorkom treba skinuti s ploče za kuhanje, pustiti da se malo ohladi te vratiti na ploču. Za potpuno reagiranje nije potrebno više od 30 min. Reakcija je završena kada prestane izdvajanje vodika. Tijekom reakcije, u početku bezbojna smjesa, postaje siva ili crna. Boja vjerovatno potječe od preostalih ostataka boje ili plastike s limenke. Može se uočiti povremeno dizanje i padanje komadića aluminija za vrijeme reakcije. Nakon reakcije mogu preostati i komadići plastike. Vruću smjesu je potrebno filtrirati kako bi se odstranio čvrsti ostatak.
Filtrat treba biti bistar, a svi crni ostaci na filter papiru. Tikvicu se ispire dva puta s po 5 cm^3 demineralizirane vode. Ako se filtrat još nije ohladio (treba biti mlak) posudu se stavi na hladno mjesto (ledena kupelj) ili ohladi mlazom vode. Lagano i pažljivo uz mješanje, dodaje se 20 cm^3 sulfatne kiseline koncentracije 9,0 mol/dm^3 u hladnu otopinu. Moguće je uočiti pojavu bijelog taloga aluminijeva hidroksida. Također i izdvajanje topline zbog reakcije neutralizacije. Nastali talog potrebno je otopiti energičnim miješanjem sa staklenim štapićem. Ako je neophodno, lagano i zagrijati otopinu uz miješanje kako bi se doprinijelo procesu otapanja. Ledena kupelj se pripravlja dodavanjem usitnjenog leda u plastičnu posudu volumena 1 L. Dodaje se toliko vode da prekrije led. Reakcijska posuda se stavi u ledenu kupelj kako bi se ohladila. Kristali alauna bi se trebali formirati unutar 24 sata. U cilju uspješnosti oblikovanja kristala u smjesu se može dodati već formirani kristal alauna. Nakon toga kristali se filtriraju, suše i izvažu. Dobivenim kristalima ispitana je topljivost u vodi, kiselost otopine te utjecaj zagrijavanja na svojstva kristala.

Rezultati i rasprava

Postupak dobivanja alauna temelji se na sljedećim kemijskim reakcijama:
jake kiseline i jake baze djeluju na aluminijev oksid, a nakon razbijanja zaštitnog sloja i na sam aluminij. Reakcija je praćena izdvajanjem vodika u plinovitom stanju što upućuje na vrlo veliku reaktivnost aluminija (Voltin niz metala).

$$Al_2O_3(s) + 6H^+(aq) \rightarrow 2Al^{3+}(aq) + 3H_2O$$
$$2Al(s) + 6H^+(aq) \rightarrow 2Al^{3+}(aq) + 3H_2(g)$$

U eksperimentu se koristi elementarni aluminij, koja se sitno isječen dovodi u kontakt s jakom bazom.

$$Al_2O_3(s) + 2K^+(aq) + 2OH^-(aq) + 3H_2O \rightarrow 2Al(OH)_4^-(aq) + 2K^+(aq)$$
$$2Al(s) + 2K^+(aq) + 2OH^-(aq) + 6H_2O \rightarrow 2Al(OH)_4^-(aq) + 3H_2(g) + 2K^+(aq)$$

Nastali tetrahidroksoaluminatni ion ($Al(OH)_4^-$) je stabilan samo u baznoj sredini. Pažljivim dodavanjem koncentrirane sulfatne kiseline vrši se neutralizacija suviška jake baze i neutralizacija tetrahidroksoaluminata.

$$2K^+(aq) + 2OH^-(aq) + 2H^+(aq) + SO_4^{2-}(aq) \rightarrow 2H_2O + 2K^+(aq) + SO_4^{2-}(aq)$$
$$Al(OH_4)^-(aq) + H^+(aq) + HSO_4^-(aq) \rightarrow Al(OH)_3(s) + H_2O + HSO_4^-(aq)$$

$Al(OH)_3$ se taloži kao bijeli pahuljasti talog. U suvišku sulfatne kiseline talog nestaje jer hidroskid reagira s kiselinom i osigurava prisustvo slobodnih iona Al^{3+}, K^+ i SO_4^{2-}

$$2Al(OH)_3\,(s) + 6H^+(aq) + 3SO_4^{2-}(aq) \rightarrow 6H_2O + 2Al^{3+}(aq) + 3SO_4^{2-}(aq)$$

Hlađenjem se smanjuje topljivost supstanci te dolazi do njihove lagane kristalizacije:

$$Al^{3+}(aq) + K^+(aq) + 2SO_4^{2-}(aq) + 12H_2O \rightarrow KAl(SO_4)_2x12H_2O(s)$$

Ukupna kemijska promjena odgovara sljedećoj kondenziranoj jednadžbi:

$$2Al(s) + 2KOH(aq) + 4H_2SO_4(aq) + 22H_2O(l) \rightarrow 2KAl(SO_4)_2x12H_2O(s) + 3H_2(g)$$

Slika 2. Kristali alauna

Fig. 2. Alum crystals

Rezultati dobivanja alauna iz aluminijske limenke prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Rezultati laboratorijskih vježbi

Table 1. Practice results

Redni broj	masa uzorka (g)	masa alauna (g)	iskorištenje (%)
1.	1,000	17,03	80,55
2.	1,100	17,51	82,82
3.	1,200	18,99	89,82
4.	1,300	18,96	89,68
5.	1,400	19,31	91,34
Prosjek	1,200	18,36	86,84

Kristali alauna imaju bijelo-prozirnu boju te kristaliziraju u manjim kristalima, ali u kontroliranim specifičnim uvjetima mogu narasti do značajnih veličina.
Alaun odlikuju sljedeća svojstva:

- u vodi je lako topljiv
- u prirodi je kiseo te boji lakmus papir u crveno
- pri zagrijavanju dolazi do taljenja u tekućinu, a ako se sol i dalje zagrijava stvara pjenu

Zaključak

Ovim radom nastojalo se ukazati kako otpad poput limenki može biti veliki potencijal u zaštiti okoliša. Ispitivanjem procesa dobivanja alauna recikliranjem limenki od aluminija u laboratorijskim uvjetima zaključeno je kako se ovim postupkom znatno smanjuje količina otpada u okolišu, a iskorištavanjem tog otpada omogućena je značajna ušteda energije. Iskorištenost procesa dobivanja aluminijeva alauna iznosi prosječno na temelju pet laboratorijskih vježbi 87 % što upućuje na zaključak kako je ispitivani proces ekonomski isplativ. Konačni prozvod je višenamjenski uporabljiv, a u kontekstu zaštite okoliša posebno je važna primjena alauna za pročišćavanje otpadnih voda.

Literatura

Ekere, N.R., Ihedioha, J.N., Bright, A.A. (2014): Synthesis of potash alum from waste aluminium foil and aluminium scrap, *Int. J. Chem. Sci.* 12(4), 1145-1152.
Grupa autora (2004): Hrvatski enciklopedijski rječnik, Novi Liber, Zagreb

Stanić, S., Buzov, I. (2009): Recikliranje i zbrinjavanje otpada-stavovi i aktivnosti studenata, *God. Titius*, god. 2, br. 2, 275-296.

Tkalčec, B., Petreski, A. (2015): Kemijski elementi i njihovi spojevi (udžbenik), Školska knjiga, Zagreb

https://www.ekopak.ba/bs/tips/40/recikliranje, pristupljeno 15. 10. 2018.

https://www.buschsystems.com/resource-center/page/a-brief-timeline-of-the-history-of-recycling, pristupljeno 31. 8. 2018.

https://slideplayer.com/slide/10822160/38/images/3/These+are+either+K%2B+or+Al3%2B.jpg4, pristupljeno 15. 9. 2018.

http://www.recan.org.rs/reciklaza-limenki, pristupljeno 7. 8. 2018.

https://www.ball.com/Ball/media/Ball/Global/Page%20Banner%20Images/alum-aerosol-line-1200x399.png?ext=.png, pristupljeno 7. 8. 2018.

https://sciencestruck.com/alum-powder-uses, pristupljeno 31. 8. 2018.

Obtaining potassium alum from cans

Boris Mikulić, Stjepan Jozinović, Slavica Jukić*

Catholic School Centre "Don Bosco", Grammar School, Stjepana Radića bb, 72230 Žepče, B&H
**Corresponding author: slavica.perkovic71@gmail.com*

Tin containers are the most recycled kind of packaging. Aluminium cans can be recycled into new cans or some other aluminium products. Despite the fact that recycling is key to energy conservation and environmental protection, there is no organized recycling in B&H. The purpose of our work was to awaken the awareness of the importance of recycling and to show that a simple process can result in a valuable compound obtained from aluminium cans, such as alum. Aluminium alum, potassium aluminium sulfatedodecahydrate, is technically the most important compound of the alum group. It has wide application as a clamping, bonding and disinfecting agent. Because it is chemically rich, it possesses considerable healing and cosmetic value. The preparation from aluminium cans consists of dissolving pieces of cans in potassium hydroxide and treating filtrates with sulphuric acid solution. By recrystallization, white alum crystals are obtained.

Key words: recycling, tin, alum.

Peroksidni broj lipida u prirodnim balzamima

Lucija Vrbić, Ana Miškić, Marija Jukić, Slavica Jukić*

Katolički školski centar "Don Bosco", Opća gimnazija, S. Radića b.b., Žepče, BiH
**Dopisni autor: slavica.perkovic71@gmail.com*

Sažetak

Za cjelokupno ljudsko zdravlje iznimno je bitna kvaliteta kozmetičkih proizvoda koje nanosimo na najveći organ, kožu. Za njegu suhe i oštećene kože najviše se koriste balzami. Balzami su kozmetički proizvodi čija je uloga stvaranje tankog zaštitnog filma na koži i sluznici koji štiti od isušivanja i hrani kožu. Ovisno o sastavu mogu imati i protuupalno djelovanje. Balzami za ovo istraživanje izrađeni su od biljnih ulja, eteričnih ulja, meda i vitamina E. I prirodna i sintetička kozmetika koristi uljne esencije ljekovitih biljaka, u većem ili manjem postotku. Kvaliteta sirovina, kao i popratne supstance koje su neophodne u kozmetičkim preparatima mogu biti jako štetne ukoliko nisu kvalitetne i prirodne, te one čine osnovnu razliku između prirodne i konvencionalne kozmetike. Prirodne masti, ulja i voskovi poznati su kao jednostavni lipidi, od kojih oksidacijom nastaju lipid peroksidi što često prati pojava užegloga mirisa. Određivanjem peroksidnoga broja jodometrijskom metodom utvrđujen je stupanj oksidacije biljnoga ulja koji je nastao tijekom perioda pohrane. Dobivene su niske vrijednosti peroksidnoga broja što ukazuje na oksidacijsku stabilnost ispitivanih balzama.

Ključne riječi: prirodni balzam, lipidi, peroksidni broj, jodometrijska metoda

Uvod

Upotreba kozmetičkih proizvoda u zadnje vrijeme bilježi sve veći rast, a kako je riječ o tvarima koje preko kože ulaze u naš organizam jako je važno poznavati kvalitetu i biogeni utjecaj istih. Poznato je kako sintetska kozmetika kao zamjenu za biljna ulja i masti često koristi derivate nafte koji ne samo da su loše kvalitete, već su dokazano štetni te mogu izazvati kožna oboljenja i alergijske reakcije (Nohynek i sur., 2009). U ovim se proizvodima kao konzervans često koristi formaldehid za koji je dokazano da je kancerogen (Australian Competition and Consumer Commission, 2014). Za razliku od toga aktivni sastojci organske kozmetike potječu od biljaka i na taj način tijelo dodatno ne opterećuju kemikalijama. Organski sastojci se moraju ekstrahirati na prirodan način uz minimalnu obradu te su zbog toga bogatiji vitaminima, mineralima i drugim biljnim nutrijentima. Zbog toga su se pokazali učinkovitijim za njegu kože. U ovom radu od

raznih vrsta kozmetičkih proizvoda za istraživanje su izabrani prirodni balzami. Balzami su kozmetički proizvodi koji se koriste za njegu suhe i oštećene kože. Njeguju kožu nakon opeklina, uboda insekata te pojave pelenskog osipa ili pomažu pri problemima s dišnim sustavom (Marković S., 2005).
Zbog toga što u svom sastavu sadrže masne komponente teško se upijaju. Tako na koži stvaraju tanki zaštitni ovoj koji štiti od ekstremnih uvjeta kao što su vjetar ili hladnoća. Djelovanje balzama ovisi o izboru sastojaka, a kombinacija je mnogo. Balzami su zbog svoje kremaste teksture puno praktičniji za nošenje i uporabu nego ulja. Gotovo svi sastojci koji čine balzame se ubrajaju u lipide. Lipidi su organske tvari različite kemijske građe. Zajedničko svojstvo svim lipidima je netopljivost u vodi i izuzetno dobra topljivost u organskim otapalima. U lipide ubrajamo masti i ulja, voskove, fosfolipide i steroide. Biljna (bazna) ulja su masna ulja koja njeguju, hrane kosu i tijelo, a služe i kao nositelji eteričnih ulja koja se u njima lako otapaju. S obzirom da ih nanosimo na kožu, bazna ulja trebaju biti iznimno visoke kvalitete, nerafinirana i hladno prešana. Za izradu balzama najčešće se koriste sljedeće masti i ulja: shea maslac, maslinovo ulje, kokosovo ulje, ricinusovo ulje i bademovo ulje. Svojstva ulja pa tako i masti prvenstveno su određena sastavom triglicerida odnosno sastavom masnih kiselina. Peroksidni broj vrlo je važna analiza kojom se utvrđuje stupanj oksidacije biljnog ulja koji je nastao tijekom perioda pohrane. Produkti oksidacije biljnih ulja mogu biti štetni za zdravlje. Vrijednost peroksidnog broja je bitna za sva biljna ulja, a pogotovo za ona koja sadrže visoke razine polinezasićenih masnih kiselina i nisku razinu prirodnih antioksidansa kao što su tokoferoli i tokotrienoli. Peroksidni broj predstavlja miliekvivalente aktivnog kisika iz peroksida sadržanog u 100 g biljnog ulja.

Materijali i metode

Zadatak

Zadatak ovog rada bio je pripremiti različite balzame od potpuno prirodnih sastojaka te im odrediti peroksidni broj neposredno nakon proizvodnje i nakon 3 mjeseca za uzorke koji su bili uskladišteni pri različitim temperaturama, u hladnjaku (oko 5 °C) i na sobnoj temperaturi (oko 25 °C).

Priprema balzama

Postupak izrade balzama za usne

Usitnjeni vosak se rastali u zagrijanom kokosovom ulju (65 °C), nakon što se vosak rastali, smjesa se homogenizira i ukloni s električnog kuhala. Uz konstantno miješanje u smjesu se dodaju med i eterično ulje. Tako pripremljeni topli balzam se ulijeva u odabranu ambalažu Ukoliko se balzam prebrzo ohladi

prije nego se ulije u ambalažu, potrebno ga je ponovo zagrijati. Ambalažu se zatvara nakon što se sadržaj potpuno ohladi.

Tablica 1. Sastojci za izradu balzama

Table 1. Ingredients for production of the balsam

VRSTA BALZAMA	SASTOJCI	KOLIČINA
Balzam za usne od meda	Pčelinji vosak, vlastita proizvodnja, BiH	30 g
	Shea maslac, Jedwards International Inc, Gana	30 g
	Ekstra djevičansko kokosovo ulje, Maya Gold, Nizozemska	30 g
	Med, vlastita proizvodnja, BiH	5 g
	Eterično ulje lavande, Fratelli parodi, Italija	20 kapi
Balzam za usne od kakao maslaca	Pčelinji vosak, vlastita proizvodnja, BiH	4 g
	Ricinusovo ulje, Fratelli parodi, Italija	5 g
	Ekstra djevičansko kokosovo ulje, Maya Gold, Nizozemska	8 g
	Kakao maslac, Nutrimedica, Peru	6-7 g
	Vitamin E, Dietpharm, Hrvatska	2-3
	Eterično ulje eukaliptisa, Fratelli parodi, Italija	10 kapi

Slika 1. Balzami (Izvor: autor)

Fig. 1. Balms (Source: Author)

Priprema macerata

Tablica 2. Sastojci za izradu macerata od gospine trave i smilja

Table 2. Ingredients for production of the macerate of the St. John's wort and immortelle

VRSTA MACERATA	SASTOJCI	KOLIČINA
Macerat od gospine trave	Svježi cvjetovi i vršni dijelovi gospine trave	300 g
	Ekstra djevičansko maslinovo ulje, Zvijezda, Hrvatska	1000 ml
Macerat od smilja	Cvjetovi smilja	300 g
	Nerafinirano maslinovo ulje, BiH	1000 ml

Vršne dijelove biljaka ili cvijetovi se usitne u mužaru kako bi im se smanjio volumen i potaknula ekstrakcija nakon čega se prebace u staklenu posudu u kojoj se provodi maceracija.
Usitnjeni biljni materijal se prelije hladno prešanim i nerafiniranim biljnim uljem tako da je sloj ulja 2-4 cm iznad usitnjenog bilja. Maceracija se provodi na suncu (ne na cjelodnevnom, najbolje samo na jutarnjem suncu) kroz tri do šest tjedna uz svakodnevno protresanje. Nakon maceracije od tri do šest tjedana- macerat se prvo dva puta profiltrira preko više slojeva gaze (nakon toga se profiltrira i preko filter papira) i ostavi se istaložiti još 24 sata. Puni se u tamne boce, čuva na hladnom mjestu, propisno označen.

Tablica 3. Sastojci za izradu balzama od macerata

Table 3. Ingredients for production of the balm from macerate

VRSTA BALZAMA	SASTOJCI	KOLIČINA
Balzam od ulja gospine trave	Macerat gospine trave	1 dl
	Bijeli vosak u granulama, Kemig, Hrvatska	8 g
	Eterično ulje lavande, Fratelli parodi, Italija	10 kapi
Balzam od ulja smilja	Macerat smilja	1 dl
	Bijeli vosak u granulama, Kemig, Hrvatska	8g
	Eterično ulje lavande, Fratelli parodi, Italija	10 kapi

Priprema balzama od macerata

U vodenoj kupelji otopiti vosak u maceratu pazeći da temperatura ne bude veća od 65 °C. Dodati eterično ulje. Preliti u ambalažu. Ohladiti i zatvoriti kutijice.

Slika 2. Izrada balzama (Izvor: autor)
Fig. 2. Production of the balm (Source: author)

Određivanje peroksidnog broja lipida

Određivanje peroksidnog broja provodi se tako da se uzorak otopi u kloroformu i octenoj kiselini i potom se tretira otopinom kalij jodida (KI). Nakon toga se vrši titracija oslobođenog joda standardnom otopinom 0,01 M natrij tiosulfata (Ergović Ravančić, 2017). Oko 5 grama uzorka otopi se u 30 mL smjese ledene octene kiseline i kloroforma (2:3), te se otopini dodaje 0,5 mL zasićene otopine kalij-jodida, nakon čega uzorak poprima žućkastu boju. Nakon 1 minute miješanja dodaje se 30 mL destilirane vode. Zatim se titrira oslobođeni jod sa 0,01 M otopinom natrij tiosulfata ($Na_2S_2O_3$) dok sva boja ne nestane. Nakon toga doda se 5 mL otopine škroba. Dodatkom škroba uzorak potamni. Nastavi se titriranje dok boja ne nestane.

Slika 3. Određivanje peroksidnog broja (Izvor: autor)

Fig. 3. Assessment of the peroxide value (Source: author)

Izračunavanje:

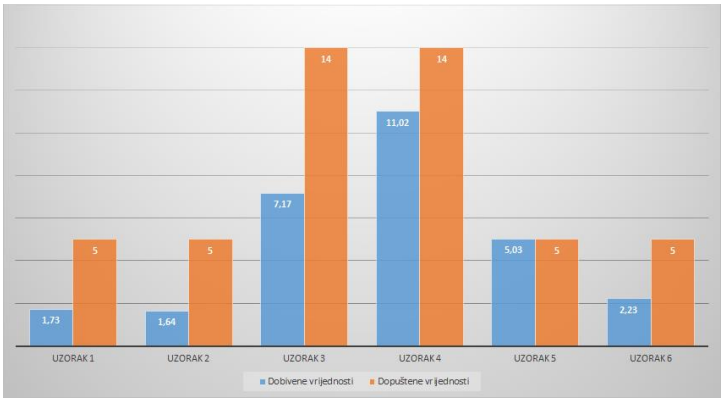
$$\text{Peroksidni broj} = 1000 \cdot (a - b) \cdot c/m$$

Gdje je:
a – utrošak natrij tiosulfata ($Na_2S_2O_3$) za titraciju uzorka, ml
b – utrošak natrij tiosulfata ($Na_2S_2O_3$) za titraciju slijepe probe, ml
c- koncentracija natrij tiosulfata
m – odmjerena masa uzorka, g

Rezultati i rasprava

U ovom radu priređena su četiri različita balzama. Prvi balzam na bazi kokosovog ulja i shea maslaca te s dodatkom meda hrani kožu i čini je elastičnijom i mekšom. Med se u kozmetici koristi od davnina i smatra se potpuno bezopasnim prirodnim proizvodom za njegu kože. Osim što je antiseptičan, med povećava elastičnost kože

jer potiče sintezu kolagena, elastina i lipida te ublažava upalne procese, štiti od slobodnih radikala i hrani kožu (Burlando i Cornara, 2013).
Drugi balzam izrađen je kombiniranjem kokosovog i ricinusovog ulja s kakao maslacem. Posebno je pogodan za njegu osjetljivih usnica. Masne kiseline iz ricinusova ulja lako prodiru u dublje slojeve kože i vlaže je. Kakao maslac je snažni antioksidans, hidratizira kožu te pomaže u obnovi osjetljive kože (Gordon, 2012.).
U ovom radu kao baza za izradu macerata korišteno je maslinovo ulje u kojem su se maceirale latice gospine trave ubrane u okolici Žepča (Bosna i Hercegovina) i cvjetovi smilja uzgojenog kao presadnica u kontinentalnim uvjetima. Za izradu macerata od gospine trave korišteno je ekstra djevičansko maslinovo ulje od tvrtke Zvijezda a za izradu macerata od smilja domaće maslinovo ulje.
Macerat od gospine trave se koristi za zacjeljivanje rana, raznih kožnih tegoba, opeklina i kod bolnih zglobova i mišića. Fototoksičan je i ne smije se nanositi na kožu prije izlaganja sunce.
Macerat od smilja revitalizira, regenerira te pomlađuje suhu i zrelu kožu. Potiče cirkulaciju u koži i pomaže kod zarastanja ožiljaka nakon operacije. Dodatkom pčelinjeg voska u macerate dobiveni su balzami koji su puno praktičniji za upotrebu. Svi balzami izrađeni u ovom radu sadrže vitamin E, prirodni antioksidans koji je osnova za održavanje zdrave kože. Maslinovo ulje je prirodno bogato vitaminom E, dok kokosovo ulje ne sadržava dovoljno istog te je prilikom priprave balzama bilo potrebno dodati vitamin E koji produžuje rok trajnosti proizvoda. Pčelinji vosak u balzamima (prirodni emulgator) posjeduje ublažavajuća, umirujuća svojstva, stvara dodatan filter na koži koji zimi štiti od vjetra i hladnoće.

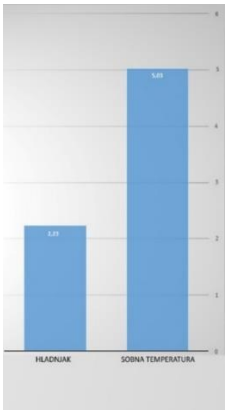


Slika 4. Dobivene i dopuštene vrijednosti peroksidnih brojeva

Fig. 4. Gotten and allowed values of peroxide numbers

Rezultati određivanja peroksidnog broja prikazani su na Slici 4. Vidljivo je kako su dobivene različite vrijednosti peroksidnog broja na koje su najviše utjecali sastav

baznih ulja ali i vrijeme i temperatura skladištenja. Dobivene vrijednosti uspređene su s dopuštenim vrijednostima koje propisuje Pravilnik (Pravilnik o jestivim uljima i mastima, NN 41/2012). Najmanju vrijednost peroksidnog broja imao je uzorak 2 (balzam od kakao maslaca) što potvrđuje činjenicu kako je kakao maslac, jer sadrži visok postotak zasićenih masnih kiselina (oko 60%), teško kvarljiv. Nisku vrijednost peroksidnog broja ima i uzorak 1 (balzam od meda) jer su u njegovom sastavu bazna ulja i masnoće s niskim udjelom polinezasićenih masnih kiselina te su obogaćeni medom i vitaminom E koji djeluju antioksidativno.
Uzorci 3 i 4 su priređeni od macerata gospine trave i smilja. Očekivano imaju više vrijednosti peroksidnog broja u odnosu na prethodna dva uzorka jer sadrže maslinovo ulje koje je stajalo na toplom za vrijeme maceriranja. Vidljivo je, također kako se uzorci međusobno značajno razlikuju po vrijednosti peroksidnog broja jer su za maceriranje korištene različite vrste maslinovog ulja.



Slika 5. Utjecaj temperature skladištenja

Fig. 5. Effect of temperature storaging

Uzorci 5 i 6 po svom su sastavu isti kao i uzorak 2. Nakon tri mjeseca skladištenja ispitan je utjecaj temperature skladištenja na vrijednost peroksidnog broja. Peroksidni broj uzorka 5 nakon tri mjeseca u blagom je porastu (sa 1,64 na 2,23) u odnosu na vrijednost neposredno nakon proizvodnje. Uzorak čuvan na sobnoj temperaturi očekivano je imao značajno viši peroksidni broj u odnosu na uzorak čuvan u hladnjaku (Slika 5).

Zaključci

Na osnovi dobivenih rezultata određivanja peroksidnog broja lipida u prirodnim balzamima moguće je zaključiti da upotrebom kvalitetnih prirodnih sirovina i

izradom u kontroliranim uvjetima moguće je prirediti zdravstveno ispravne balzame bez konzervansa. Peroksidni broj ispitivanih balzama je u skladu s kriterijima Pravilnika o jestivim uljima i mastima. Balzami priređeni od macerata koji sadrže ekstra djevičansko maslinovo ulje imaju značajno niži peroksidni broj od balzama koji sadrže maslinovo ulje slabije kvalitete. Peroksidni broj pravilno uskladištenog prirodnog balzama nakon tri mjeseca je zadovoljavajući. Kozmetičke proizvode izrađene od prirodnih sastojaka bez konzervansa potrebno je čuvati u hladnjaku.

Literatura

Australian Competition and Consumer Commission (2014): Product safety bulletin: Formaldehyde in cosmetics including hair products

Burlando, B., Cornara, L. (2013): Honey in dermatology and skin care, *J Cosmet Dermatol.* 12, 306-313.

Ergović Ravančić, M. (2017): Tehnologija ulja i masti - priručnik za vježbe, Požega: Veleučilište u Požegi

Gordon, M. (2012): Natural home made skin care recipes, Rejuvenating Renewing Masks & Treatments For Beautiful Skin, 91-92

http://www.naturala.hr/ljekovito-kokosovo-ulje/1183/, pristupljeno 2. rujna 2018.

http://www.plantagea.hr/aromaterapija/biljna-ulja-2/kontrola-kvalitete-biljnih-ulja-2/, pristupljeno 20. travnja 2018.

https://distilerija.com/2017/09/kako-napraviti-labelo-najbolji-balzam-za-usne-prirodni-recept/ pristupljeno 20. travnja 2018.

Klarić, I. (2008): Tehnološki procesi organske industrije, interna skripta, Sveučilište u Splitu, Split.

Marković, S. (2005): Fitoaromaterapija – monografije esencijalnih ulja i ljekovitih biljaka temelji fitoaromaterapije, Centar Cedrus, Zagreb

Nohynek G., Antignac E., Re T., Toutain H. (2009.): Safety assessment of personal care products/cosmetics and their ingredients, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*243, 239-259

Omali, I. C. P., Casimir E. G., Abechi S., (2016): „Comparative pysicochemical evaluation of some marketed hair creams in the Nigerian market", *Int J Sci. Techn*. 4(7), 134-134

Petrović Peroković, V., Turčinović D., Halasz I. (2009): Kemija ugljikovih spojeva (udžbenik), Školska knjiga, Zagreb

Pravilnik o jestivim uljima i mastima, NN 41/2012

Stričević, D., Sever, B., (2013): Temelji organske kemije (udžbenik), Profil, Zagreb

Žanetić, M., Gugić, M. (2006): *Zdravstvene vrijednosti maslinovog ulja*, Pomologia Croatica, 12(2).

Peroxide value of lipids in natural balms

Lucija Vrbić, Ana Miškić, Marija Jukić, Slavica Jukić*

Catholic School Centre "Don Bosco", Grammar School, S. Radića b.b., Žepče, B&H
**Corresponding author: slavica.perkovic71@gmail.com*

Summary

It is extremely important for the overall human health to apply only the best quality cosmetic products on the largest organ in a human body, the skin. Balms are the most commonly used cosmetics for healing dry and damaged skin.They should create a thin protective layer on skin and mucous membranes that protect, nourish and prevent the skin from drying out. Depending on the composition, they may also have anti-inflammatory effect. The balms for this study were made using natural oils, essential oils, honey and vitamin E. Natural and synthetic cosmetics use oily essences of medical plants to a greater or lesser extent. The quality of these raw materials as well as the accompanying substances that are essential in cosmetic preparations can be very damaging if they are not high quality natural products and that is the basic difference between natural and synthetic cosmetics. Natural fats, oils and waxes are known as simple lipids, out of which lipid peroxides are created through the process of oxidation, which is often accompanied by the appearance of a rancid smell. Through the determination of the peroxide number by iodometric method the degree of oxidation of the vegetable oil formed during the storage period was established. Low peroxide values were obtained indicating the oxidative stability of the balms tested.

Keywords: natural balm, lipids, peroxide value, iodometric method

Utjecaj vidljive svjetlosti na rast špinata (*Spinacia oleracea L. cv. Matador*)

Dora Čikanović, Petra Mutavdžija, Martina Anđić, Marta Martini, Ivan Kolar, Matija Hardi, Kristina Kristek*, Karolina Dvojković, Sanja Pavlović Šijanović

Gimnazija Vukovar, Šamac 2, 32 000 Vukovar, Hrvatska
**Dopisni autor:kristina.kristek@skole.hr*

Sažetak

U ovom radu ispitivan je utjecaj različitih izvora vidljive svjetlosti na rast biljaka špinata (*Spinacia oleracea L. cv. Matador*). Biljke su uzgajane u kontroliranim uvjetima pod utjecajem svjetlosnih izvora različitih karakteristika. Korištena su četiri svjetlosna izvora (LED crvena, LED plava, LED crvena + plava i fluorescentna žarulja). Biljke špinata prolazile su sve fenološke (vegetativne) faze: sjetvu, nicanje, rast i razvoj. Tijekom vegetacijskoga razdoblja biljke su se bitno razlikovale s obzirom na određene anatomske i fiziološke značajke. Tijekom istraživanja praćena je koncentracija (mg/g svježe tvari) kloroplastnih pigmenata (klorofila a, klorofila b, ukupnih klorofila -a, - b i karotenoida) u acetonskom ekstraktu biljnog materijala. Osim toga rađena je i usporedba broja listova, lisne mase i lisne površine u sva 4 uzorka. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je izbor različitih izvora vidljive svjetlosti i nastalo osvjetljenje značajno utjecao na morfološka i fiziološka obilježja. Ovim se radom pokazuje kako učenici i nastavnici mogu biti suradnici u procesu istraživanja i spoznavanja kroz interdisciplinarni pristup kojim se povezuju znanja iz kemije, biologije, fizike i informatike.

Ključne riječi: izvori svjetlosti, špinat, morfološka, fiziološka obilježja

Uvod

Zahvaljujući Sunčevoj energiji i fotoautotrofnim organizmima koji je mogu iskoristiti u procesu fotosinteze gdje se iz anorganskih tvari primljenih iz okoliša sintetiziraju organske, na Zemlji postoji oblik kemijske energije koji je nužan za život. Fotoautotrofne biljke posjeduju biljna bojila, pigmente, koji apsorbiraju svjetlosnu energiju i pretvaraju ju u kemijsku, koja se pohranjuje u kemijskim vezama šećera i ostalih organskih molekula nastalih iz ugljikova dioksida i vode u procesu fotosinteze. Energija pohranjena u organskim molekulama koristi se u brojnim, životno važnim procesima koji se zbivaju u stanicama biljaka i služi kao izvor energije za sve poznate oblike života (Pevalek – Kozlina, 2003). Djelotvoran

dio spektra za fotosintezu nalazi se u području crvene i plave svjetlosti, dok se središnji dio spektra, koji odgovara zelenoj svjetlosti, zbog svojstva klorofila ne koristi za fotosintezu. Od raznih klorofila pri fotosintezi najveće značenje imaju klorofil a i b. U biljkama apsorbiraju vidljivi dio spektra i imaju maksimume apsorpcije u crvenom (600-700 nm) i plavom (400-500 nm) dijelu spektra. Karotenoidi najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 i 550 nm. Reakcija biljke svojim rastom i razvojem u velikoj će mjeri ovisiti o karakteristikama svjetlosnog izvora (Stryer, 1991; Denffer i Ziegler, 1991). U našem slučaju biljke špinata uzgajane su u kontroliranim uvjetima pod utjecajem svjetlosnih izvora različitih spektralnih karakteristika za koje se pretpostavilo da će polučiti i različiti učinak na biljku koji je moguće determinirati, opisati i mjeriti, što je i bio cilj našeg istraživanja.

Materijal i metode

U eksperimentu je korišten špinat sorte Matador, čije su sjemenke posađene i uzgajane u istovjetnim i kontroliranim uvjetima izvora vidljive svjetlosti, osvijetljenosti površine iznad biljaka, režima dan/noć, temperature zraka i vlage u tlu. Period od sjetve do berbe trajao je 33 dana.

Slika 1. Biljke špinata pod 4 različita osvjetljenja (Photo: K. Kristek)

Fig. 1. Spinach plants under 4 different lighting (Photo: K. Kristek)

U tom su periodu biljke promatrane i analizirane kroz sve vegetativne faze. Za izvor svjetlosti korištene su LED crvena, LED plava, LED crvena i plava zajedno (Bridgelux, General Electrics, Kina) i FLUO žarulja (Philips, Nizozemska) kako bi se utvrdio utjecaj različite svjetlosti na morfološka i fiziološka obilježja biljaka špinata. (Slika 1.) Izvori svjetlosti bili su podvrgnuti režimu paljenja, u 4:00 sata, i gašenja, u 22:00 sata, čime se simulirala smjena dana i noći 18/6. Četiri svjetlosna izvora analizirana su spektrometrom kako bi se mogle usporediti valne duljine koje odašilje pojedina žarulja. Osvijetljenost površine biljaka mjerili smo luksmetrom (Unitrend, Kina) te je prosječna osvijetljenost iznosila oko 7000 lx. Kontrolirana je vlažnost tla pomoću uređaja Micro:bit. Micro:bitni sustav ima vanjski senzor koji prati i signalizira nisku razinu količine vode zahvaljujući senzoru vlažnosti koji mjeri

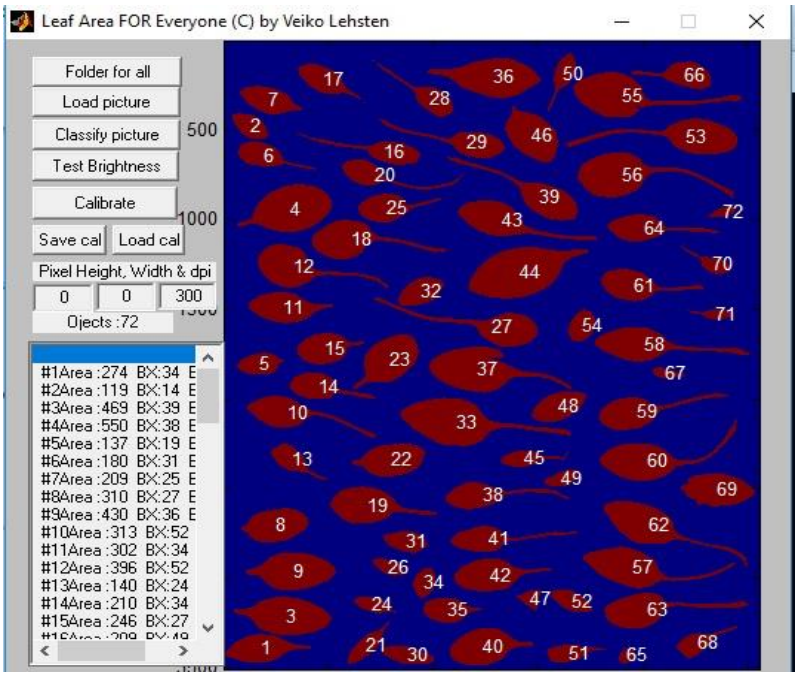
razinu struje koja teče između dviju elektroda uronjenih u tlo [4][5][6]. Nakon 33 dana biljke su podvrgnute detaljnoj analizi. (Slika 2.)

Slika 2. Biljke špinata na dan branja (33. dan od sadnje) (Photo: K. Dvojković)

Fig. 2. Spinach plants on the day of harvest (33rd day of planting) (Photo: K. Dvojković)

Mjereni su sljedeće značajke: broj listova, površina listova, masa listova i korijen. Površina listova mjerena je pomoću programa i skenera LAFORE (Leaf Area For Everyone by Veiko Lehsten, University of Oldenburg, Germany). Ovaj program čita digitalnu fotografiju nastalu skeniranjem listova i zbraja piksele koji su na skeniranoj slici tamniji od referentne zadane vrijednosti (rezolucija skenera). Postupak određivanja površine lista/ova je sljedeći: ako je veličina piksela 0,254 (100 dpi) tada list površine 5 mm x 1 mm/0,254 mm^2 = ima 77,5 piksela. Program daje površinu svakog pojedinog lista kao i broj listova iz čega se izračuna srednja površina lista.

Osim analize morfoloških razlika među biljkama koje su rasle pod različitim osvjetljenjem, provedena je laboratorijska analiza: spektrofotometrijsko određivanje koncentracije (ekstrakcija) pigmenata po Holm i Wettstein metodi (Lisjak i sur., 2009; Krstić, 2016), a što podrazumijeva određivanje koncentracije kloroplastnih pigmenata (klorofila a, klorofila b, ukupnih klorofila i karotenoida), u acetonskom ekstraktu biljnog materijala te preračunavanje koncentracije na mg/g svježe tvari. Spektrofotometrom se očitavala transmisija u dobivenom filtratu na 662 nm, 644 nm i 440 nm koristeći aceton kao slijepu probu.



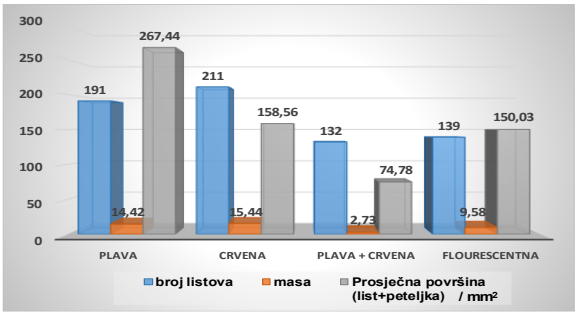
Slika 3. Prikaz rezultata izračuna mase listova u programu LAFORE

Fig. 3. The results of bulk weight calculations in LAFORE

Rezultati

Morfološka obilježja

Utvrđen je značajan utjecaj varijante osvjetljenja na sve mjerene morfološke parametre lista (broj listova, površina listova, masa listova i korijen). Broj listova varirao je ovisno o osvjetljenju od 132 do 211 listova, dok je lisna površina varirala od 74,78 mm^2 do 267,44 mm^2. Prosječna masa listova varirala je od 2,73 g do 15,44 g. (Slika 4.)



Slika 4. Utjecaj osvjetljenja na morfološke osobine špinata (broj listova, površina listova, masa listova)

Fig. 4. Influence of illumination on the morphological characteristics of spinach (number of leaves, leaf area, leaf mass)

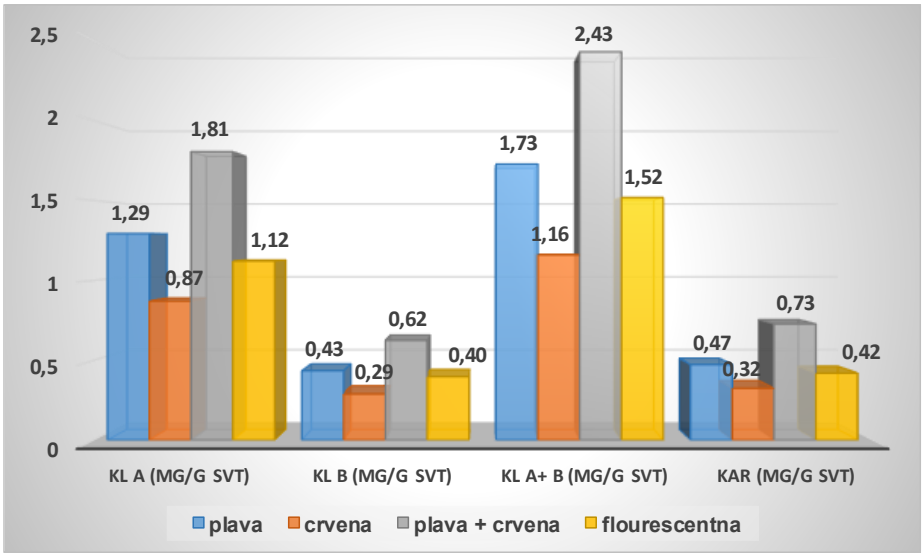
Fiziološka obilježja

Koncentracije klorofila a, klorofila b, klorofila a i b te karotenoida prikazane su u Tablici 1. Pripremljena su po dva uzorka ekstrakta pigmenata iz biljaka za svako osvjetljenje, a njihove srednje vrijednosti prikazane su na Slici 2. Dobivene su najveće vrijednosti svih pigmenata u uzorku dobivenom iz biljaka koje su rasle pod crvenim i plavim osvjetljenjem. Najmanje vrijednosti pigmenata utvrđene su kod biljaka koje su rasle pod crvenim osvjetljenjem.

Tablica 1. Rezultati mjerenja koncentracija pigmenata (klorofila a, klorofila b, klorofila a i b te karotenoida) pomoću spektrofotometra

Table 1. Results of the measurement of pigment concentrations (chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a and b and carotenoids) by spectrophotometer

svjetlo	Br. uz	kl a (mg/dm3)	kl b (mg/dm3)	kl a+b (mg/dm3)	kar (mg/dm3)	kl a (mg/g SvT)	kl b (mg/g SvT)	kl a+ b (mg/g SvT)	kar (mg/g SvT)	kl a/kl b	kl / kar
Plavo	1	10,52	3,75	14,27	3,888	1,32	0,47	1,78	0,49	2,81	3,67
Plavo	2	10,17	3,20	13,37	3,670	1,27	0,40	1,67	0,46	3,18	3,64
Crveno	3	7,16	2,32	9,48	2,685	0,90	0,29	1,19	0,34	3,09	3,53
Crveno	4	6,76	2,31	9,07	2,51	0,85	0,29	1,134	0,31	2,93	3,62
C+P	5	12,31	4,47	16,78	5,12	1,54	0,56	2,097	0,64	2,75	3,28
C+P	6	16,58	5,53	22,11	6,52	2,07	0,69	2,764	0,82	3,00	3,39
Fluo	7	9,83	3,55	13,38	3,69	1,23	0,44	1,672	0,46	2,77	3,62
Fluo	8	8,11	2,81	10,92	3,01	1,01	0,35	1,365	0,38	2,89	3,63



Slika 5. Utjecaj osvjetljenja na koncentracije pigmenata (klorofila a, klorofila b, klorofila a i b te karotenoida)

Fig. 5. Influence of illumination on pigment concentrations (chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a and b and carotenoids)

Rasprava i zaključci

Izbor osvjetljenja značajno je utjecao na morfološka svojstva špinata. Najveća površina listova utvrđena je kod biljaka koje su rasle pod plavim LED svjetlom uz visoke vrijednosti pigmenata. Najmanja površina listova je kod biljaka koje su rasle pod kombiniranim plavim i crvenim LED žaruljama što je posljedica prejakog intenzitet svjetlosti plave i crvene LED žarulje. Listovi biljaka špinata podvrgnuti mješavini plave i crvene LED svjetlosti bili su manji, tamniji i deblji što upućuje da su biljke bile izložene stresu i od njega se zaštitile fotoinhibicijom, uz visoke vrijednosti pigmenata. Pod crvenim LED svjetlom biljke špinata su razvile uske i dugačke listovi uz najniže vrijednosti pigmenata što upućuje na pojačano izduživanje biljaka uslijed „slabe kvalitete" i nedovoljne količine osvjetljenja. Biljke koje su rasle pod fluorescentnim svjetlom brojem listova, površinom i masom slične su biljkama koje su rasle pod crvenim svjetlom uz niske vrijednosti pigmenata. Dodatno LED osvjetljenje koristeći kombinacije svijetlosti iz plavog i crvenog dijela spektra može pozitivno utjecati na rast i razvoj biljke.
Sudjelovanjem u ovom istraživanju učenici su potaknuti na bolje razumijevanje komplementarnosti i sinergije prirodnih znanosti kao i na kritičko promišljanje.

Daljnjim istraživanjima je potrebno utvrditi najpovoljniji omjer valnih duljina iz navedenog dijela spektra u različitim fazama rasta i razvoja.

Literatura

Pevalek – Kozlina, B.(2003): *Fiziologija bilja*, Zagreb, Profil

Stryer, L. (1991): *Biokemija,* Zagreb, Školska knjiga

Denffer, von D., Ziegler, H. (1991): *Udžbenik botanike za visoke škole; morfologija i fiziologija.* Zagreb: Školska knjiga

Lisjak, M., Špoljarević, M., Agić, D., Andrić, L. (2009): *Praktikum iz fiziologije bilja, interna skripta*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

Kristić, M. (2016): *Utjecaj svjetlosti na pokazatelje rasta paprike (Capsicum annuum L.),* Dipolomski rad, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

The effect of visible light on spinach growth (*Spinacia oleracea L. cv. Matador*)

Dora Čikanović, Petra Mutavdžija, Martina Anđić, Marta Martini, Ivan Kolar, Matija Hardi, Kristina Kristek*, Karolina Dvojković, Sanja Pavlović Šijanović

Gimnazija Vukovar, Šamac 2, 32 000 Vukovar, Hrvatska
**Corresponding author:kristina.kristek@skole.hr*

Summary

The aim of this paper was to test the effect of different source of visible light on spinach plant (*Spinacia oleracea L. cv. Matador*) growth. The plants were grown in controlled environment under the effect of light source with different characteristics. Four light sources (LED red, LED blue, LED red + blue and fluorescent light) were used during the research. Spinach plants were passing through vegetative phases: sowing, germination, growth and development. During vegetation development of plants differed significantly given certain anatomical and physiological features. The concentration of chloroplast pigments (chlorophyll a, chlorophyll b, overall concentration of chlorophyll a and b and carotenoids) in acetone extract of plant material was determined. Furthermore, comparation of numbers of leaves, leaves mass and leaves surface in all four examples was made. The results showed that different source of light had a significant influence on morphological and physiological features. This scientific work is showing how students and teachers can be associates in a process of exploring and cognition through interdisciplinary approach that connects knowledge of biology, chemistry physics and IT.

Keywords: source of light, spinach, morphological and physiological properties

Sadržaj sumporovog dioksida u bijelim vinima s područja općine Žepče (Bosna i Hercegovina)

Barbara Budim, Barbara Lukić, Maja Stojanović*

Katolički školski centar „Don Bosco", Tehničko-obrtnička škola, Stjepana Radića bb, 72230 Žepče, Bosna i Hercegovina
**Dopisni autor: majastojanovic1807@gmail.com*

Sažetak

Sumpor i njegovi spojevi su sredstva koja imaju najširu i najstariju primjenu u proizvodnji vina. Izuzev pozitivnog konzervirajućeg djelovanja u vinu, kod osjetljivih pojedinaca spojevi sumpora, osobito sumporov dioksid mogu izazvati napadaje astme ili čak anafilaktički šok.
Dozvoljene količine sumpora u vinu regulirane su odgovarajućim pravilnicima, koji su specifični s obzirom na regiju i državu. Vino je vrlo kompleksan sustav u kojem je količina sumpora važan parametar kvalitete vina jer proizlazi iz ostalih parametra poput količine alkohola, ukupnih kiselina, šećera, hlapljive octene kiseline, stoga je potrebno voditi računa o dodavanju optimalne količine sumpora u vino. Cilj ovog rada je određivanje kvantitativnog sadržaja sumporovog dioksida u različitim uzorcima bijelog vina, proizvedenih od sorti vinove loze s područja općine Žepče. Postupak određivanja sumpora proveden je Ripperovom metodom koja se temelji na jodometrijskoj titraciji. Dobiveni podaci ukazivali su na značajne razlike u sadržaju sumpora u različitim uzorcima vina.

Ključne riječi: bijela vina, sumporov dioksid, Ripperova metoda, općina Žepče

Uvod

Među mlađim granama poljoprivredne proizvodnje na području općine Žepče zadnjih nekoliko godina velik značaj zauzima vinogradarstvo. Proizvodnja vina u Bosni i Hercegovini više je vezana za područje Hercegovine, ali zahvaljujući projektu specijalizirane vinogradarske zadruge VITIS d. o. o. Žepče pokrenuta je i na području općine Žepče. Godine 2014. zasađeni su prvi nasadi vinove loze na površini od 45 000 m^2 na području općine Žepče odnosno sela Viništa koje nosi simbolično ime po vinu. Ukupna površina pod intenzivnim nasadima od početnih 9,5 ha, u 2018. godini je porasla na 40,3 ha. Diljem žepačke regije zasađeno je 12 sorti vinove loze, koje su odabrane na temelju njihovih sortnih karakteristika, opredjeljujući ih ovisno o klimatskim, pedološkim i mikrolokacijskim uvjetima

staništa. Od bijelih sorti vinove loze na žepačkom području prisutne su: *Pinot Grigio, Muller Thurgau, Traminer, Palava, Uni blanc, Malvasia Istria, Lambrusco Salamino*, te crvene sorte: *Anchellota, Merlot, Cabernet Franc, Marsellan, Lambrusco Salamino.*

U 2017. godini započeto je punjenje vina proizvedenog iz grožđa žepačkih vinograda i stavljanje na tržište pod nazivom "Z", "E", "M", "LJ", "A". Kolekcije vina su dizajnirane s fotografijama stvarnih ljudi odnosno prvih žepačkih vinogradara, te simbolično iskazuju viziju ovog projekta odnosno mogućnost opstanka i ostanaka sadašnjim i budućim naraštajima kroz razvoj vinogradarstva. Proces sumporenja koji se obavlja nakon prešanja predstavlja važnu točku u proizvodnji kvalitetnog i zdravog vina.

Sumporov dioksid ima pozitivno fungistatično i baktericidno djelovanje, sprječava oksidaciju mošta i vina, poboljšava antiseptička svojstva, onemogućuje rad nepoželjnih mikroorganizama i kvasaca, pomaže i ubrzava taloženje nečistoća, doprinosi okusu suhoće u bijelim vinima, te utječe na kasniju stabilnost vina. Pored svih pozitivnih učinaka, dodavanje sumpora u većim količinama može negativno utjecati na okus i miris vina, onemogućuje transformaciju jabučne u mliječnu kiselinu, te može izazvati alergije i anafilaktički šok na ljudski organizam.

Jako je važno dodati optimalnu količinu sumpora odnosno smanjiti sumporenje na najmanju moguću mjeru. Zbog negativnih utjecaja većih količina sumporovog dioksida na kvalitetu vina zakonski se propisuju maksimalno dozvoljene količine ovog sredstva u vinima koja se stavljaju na tržište. Zakonska regulativa uzima u obzir da se maksimalne dozvoljene količine sumporovog dioksida povećavaju se sa slašću vina. Također, dozvoljeno je nešto jače sumporenje bijelih vina. Dozvoljene količine sumpora u vinu regulirane su odgovarajućim pravilnicima, koji su specifični s obzirom na regiju i državu. Postoje značajna odstupanja u maksimalno dozvoljenim količinama u različitim državama, ali se može reći da nigdje nije dozvoljen veći sadržaj ukupnog sumpora od 450 mg/L čak i u vinima velike slasti (desertna vina). Maksimalno dozvoljene koncentracije slobodnog sumporovog dioksida u većini zemalja se kreću od 20 do 100 mg/L, odnosno najčešće su to koncentracije u iznosu od 30 do 35 mg/L. Neke države, poput SAD-a zahtijevaju obvezno naznačavanje sumporovog dioksida na deklaraciji proizvoda koji u sebi sadržavaju ovaj konzervans. Primjena obveznog deklariranja sumporovog dioksida na namirnicama je radi zabilježene preosjetljivosti i mogućih alergijskih reakcija kod ljudi. Sumporov dioksid se nalazi na listi alergena koje se, prema direktivi Europskog parlamenta, mora jasno i vidljivo deklarirati kako bi se kupce upozorilo na sastojke hrane koji mogu uzrokovati alergije i/ili intolerancije na hranu, čak i onda kad se u hrani nalaze u vrlo malim količinama (kao npr. sastojci aditiva, pomoćnih tvari u procesu proizvodnje, aroma i sl.). Prihvatljiv dnevni unos ADI (eng *Acceptable Daily Intake*) za sumporov dioksid iznos 0,7 mg/kg tjelesne mase. Međutim,

proizvođači hrane dužni su deklarirati ovaj aditiv kao alergen samo ako je hrani dodano više od 10 mg/kg ili 10 mg/L, iako i značajno manje količine sumpora u pojedinih bolesnika s astmom mogu uzrokovati napadaj astme.
Prema važećem Pravilniku o kvaliteti vina SN 87/08, izdanog od strane Federalnog Ministarstva poljoprivrede, vodoprivrede i šumarstva, maksimalno dozvoljene koncentracije ukupnog sumporovog dioksida u mirnim bijelim i ružičastim vinima ne smiju biti veće od 200 mg/L. Ukoliko se uslijed vremenskih prilika za tim ukaže potreba, moguće je u nekim vinogradarskim područjima odobriti povećanje do najviše 50 mg/L sumporovog dioksida, uz uvjet da uz ovo odobreno povećanje koncentracija ukupnog sumporovog dioksida ne prelazi granicu od 300 mg/L. Sumporov dioksid predstavlja najstarije korišteno i veoma značajno enološko sredstvo, bez kojeg je i danas teško zamisliti proizvodnju vina, te njegova koncentracija predstavlja jednu od osnovnih pokazatelja kvalitete vina. Stoga cilj rada je prikazati kvalitetu vina proizvedenih na području općine Žepče kroz određivanje koncentracije sumporovog dioksida.

Materijali i metode

Za rad u školskom laboratoriju korišten je sljedeći materijal: Erlenmeyerove tikvice od 250 mL, bireta od 50 mL, odmjerna tikvica od 500 mL, tamna staklena boca od 500 mL, stakleni lijevak, stakleni štapić, čaša od 250 mL, pipeta od 25 mL, menzura, digitalna vaga, porculanska lađica za vaganje, kuhalo i bijeli papir kao podloga ispod čaša. Od reagensa su korišteni: standardna otopina joda, razrijeđena sumporna kiselina, otopina natrijeva hidroksida, destilirana voda, 1%-tna otopina škroba, te uzorci bijelih vina proizvedenih s područja Žepča.
Za uzorke vina nije bilo potrebno obavljati posebne pripreme zbog jednostavnosti korištene metode. Analizirana vina, berbe 2017. godine su proizvedena na području općine Žepče u okviru vinarije *Povratak*.
U radu je korištena Ripperova metoda određivanja sumporovog dioksida u vinu preuzeta od Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu. Ripperova metoda pripada kvantitativnoj kemijskoj analizi – titraciji i temelji se na sljedećoj reakciji:

$$SO_2 + I_2 + 2H_2O \rightarrow H_2SO_4 + 2HI$$

Ripperovom metodom količina slobodnog SO_2 u vinu određuje se brzo i jednostavno. SO_2 se u vinu nalazi u vezanom i slobodnom obliku. Ovom se metodom usporedno određuje slobodni i ukupni SO_2 pa se količina vezanog izračuna na temelju njihove razlike. Određivanje se provodi titracijom otopine joda (I_2) pri čemu se jod reducira, a SO_2 oksidira pa se na temelju utroška otopine joda izračuna količina SO_2.

Količina ukupnog i slobodnog SO_2 računa se na sljedeći način:

$$\mathbf{SO_2\ (mg/L) = (Mw * V * N * 1000) / 2 * v}$$

$$SO_2 = \frac{Mw * V * N * 1000}{2 * v} = \frac{64 * V * 0{,}02 * 1000}{2 * 50} = \frac{64 * V * 20}{100} = 12{,}8 * V\ mL$$

Mw- molekularna masa SO_2; V- količina iskorištene otopine joda u mL; N- normalitet korištenja joda; v- mL iskorištenog vina

Priprema potrebnih reagensa za Ripperovu metodu je izvršena prema uputama praktikuma Laboratorija za tehnologiju i analitiku vina.

Postupak određivanja slobodnog SO_2

U Erlenmeyerovu tikvicu ulije se 50 mL vina, 10 mL otopine H_2SO_4 (1:4) i 3 mL 1 %-tne otopine škroba. Titrira se s 0,01 M otopinom I_2 do pojave plave boje koja će se zadržati pola minute.

Postupak određivanja ukupnog SO_2

U Erlenmeyerovu tikvicu ulije se 25 mL 1 M NaOH, 50 mL vina, pri čemu vrh pipete treba biti uronjen u otopinu NaOH. Ostavi se 10 minuta kako bi sav SO_2 prešao u slobodni oblik. Zatim se doda 15 mL otopine H_2SO_4(1:4) i 3 mL 1 %-tne otopine škroba. Titrira se s 0,01 M otopinom I_2do pojave plave boje koja će se održati pola minute.

Slika 1. Određivanje sadržaja SO_2 u vinu titracijom

Fig. 1. Titration for determining SO_2 content in wine

Rezultati i rasprava

Prilikom kemijske analize bijelog vina rađena su tri paralelna mjerenja te su u Tablici 2. prikazani rezultati, tj. srednje vrijednosti kemijskih analiza**.**

Tablica 1. Količina otopine joda za titraciju uzoraka

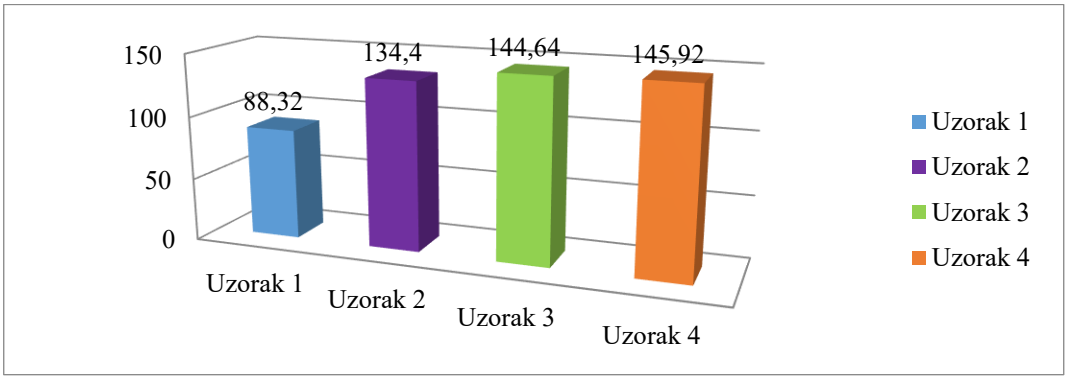
Table 1. The amount of iodine solution for titration

Uzorci	**Utrošeni volumen joda za ukupni SO_2**	**Utrošeni volumen joda za slobodni SO_2**
Uzorak I	6,9 mL	1,7 mL
Uzorak II	10,5 mL	2,1 mL
Uzorak III	11,3 mL	1,4 mL
Uzorak IV	11,4 mL	3,1 mL

Tablica 2. Sadržaj SO_2 u ispitivanim uzorcima vina

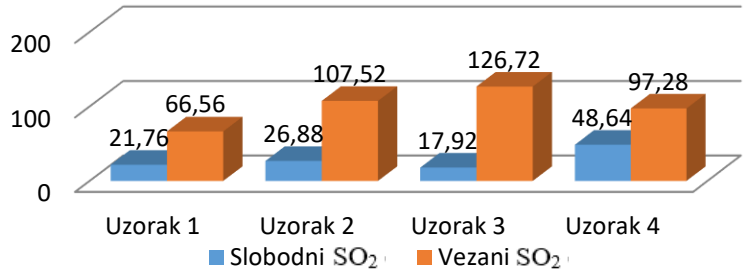
Table 2. SO_2 content in investigated samples

Oznaka uzorka	Sadržaj ukupnog SO_2 (mg/L)	Sadržaj slobodnog SO_2 (mg/L)	Sadržaj vezanog SO_2 (mg/L)
I - Pinot sivi	88,32	21,76	66,56
II - Palava	134,4	26,88	107,52
III - Traminac	144,64	17,92	126,72
IV - Xepcio	145,92	48,64	97,28



Slika 2. Sadržaj ukupnog SO_2 u ispitivanim uzorcima vina

Fig. 2. Total SO_2 content in investigated samples



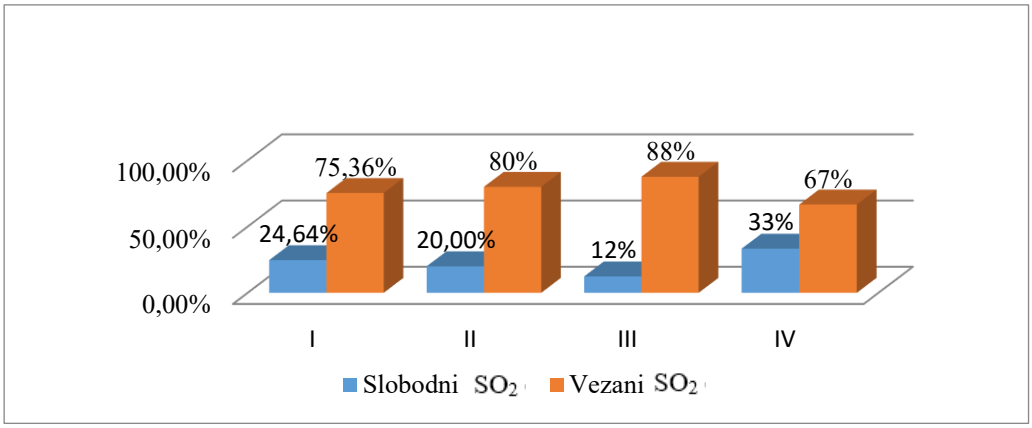
Slika 3. Sadržaj slobodnog i vezanog SO_2 u ispitivanim uzorcima vina

Fig. 3. Free and bound SO_2 content in investigated samples

Tablica 3. Udio slobodnog i vezanog SO_2 u ispitivanim uzorcima

Table 3. Mass percentage of free and bound SO_2 in investigated samples

Oznaka uzorka	Sadržaj slobodnog SO_2 (%)	Sadržaj vezanog SO_2 (%)
Uzorak I - Pinot sivi	24,64	75,36
Uzorak II - Palava	20,00	80,00
Uzorak III - Traminac	12,00	88,00
Uzorak IV - Xepcio	33,00	67,00



Slika 4. Omjer slobodnog i vezanog SO_2 u uzorcima vina

Fig. 4. The ratio of free and bound SO_2 in wine samples

Jedan od bitnih tehnoloških parametara i parametar kakvoće vina čije je praćenje definirano zakonskim propisima jest sadržaj sumporovog dioksida u vinu. Sumpor u vinima nalazimo u slobodnom i vezanom obliku za pojedine sastojke vina kao što su aldehidi, fenoli i šećeri. Slobodni postoji kao molekularni SO_2, bisulfitni i sulfitni ioni, a samo slobodni osobito molekularni SO_2 ima antimikrobno djelovanje. Slobodni SO_2 nalazi se u plinovitom stanju i kao takav je direktan antioksidans i antiseptik. Velike količine plinovitog SO_2 osjete se mirisanjem vina. Njegova količina ovisi o pH vrijednosti, temperaturi i zdravstvenom stanju grožđa. Male količine sumporovog dioksida u vinu se nalaze čak i kad se ne vrši njegovo dodavanje u grožđani ili vinski materijal ili vino. Vinski kvasci, neophodni za provedbu alkoholne fermentacije, proizvode i male količine sumporovog dioksida kao dio svojih metaboličkih produkata. (Singleton, 2013.)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da najveći sadržaj ukupnog sumporovog dioksida ima uzorak IV (vino sorte *Garganega*), te zatim uzorak III (sorte *Rizvanac* i *Traminac*). Vino sorte Pinot sadrži najmanju koncentraciju ukupnog sumporovog dioksida (Graf 1.). Značajno je napomenuti da su koncentracije ukupnog sumporovog dioksida u dopuštenim granicama regulirane važećim Pravilnikom o vinu.

Dodatni pokazatelj kvalitete, sastava i stanja vina je određivanje koncentracije slobodnog sumporovog dioksida. Važeći Pravilnik o vinu ne ograničava količinu slobodnog sumporovog dioksida u vinu, te poziva se na vrijednosti koje propisuje *Međunarodna organizacija vina,* odnosno maksimalne doze u rasponu 30-35 mg/L. Prema dobivenim podacima iz Grafa 2. najmanju koncentraciju slobodnog sumporovog dioksida ima uzorak III (*Traminac*), a najveću uzorak IV (sorta *Garganega*). Samo kod uzorka IV koncentracija slobodnog sumporovog dioksida prelazi preporučanu dozu od 30 mg/L.

Samo mali dio (0,7-7 %) nevezanih sulfita je u vinu prisutan kao plinoviti i on je zapravo ključan za inhibiranje rasta nepoželjnih bakterija u vinu i *Saccharomyce*s kvasaca. Velika većina (93-99 %) sulfita postoje kao ionizirani oblici bisulfita koji mogu dodatno vezati acetaldehide nastale tijekom procesa starenja vina. Također bisulfiti mogu smanjivati količinu vitamina B1 koji je važan za rast *Saccharomyces* kvasaca i određenih vinskih bakterija. Samo odgovarajuće koncentracije slobodnog SO_2 osiguravaju dodatne kapacitete za vezanje produkata oksidativnog starenja, cijepanje vitamina B1 ili inhibiciju neželjenih mikroorganizama.

Brojne studije proučavaju utjecaj koncentracije slobodnog sumporovog dioksida na jabučno-mliječnu fermentaciju u vinu u kojoj se proizvode brojni metabolički produkti koji utječu na pozitivne promjene u senzorskim svojstvima i mikrobiološku stabilnost vina. U procesu jabučno-mliječne fermentacije sudjeluju bakterije mliječne kiseline (BMK) rodova *Lactobacillus, Oenococus i Pediococcu,* te rod *Oenococus* imaju poželjna enološka svojstva. U vinima s niskom pH vrijednošću sumpor je dominantan u obliku slobodnog koji se najviše sastoji od bisufitnih iona i manjim dijelom od sulfitnih ona i molekularnog sumporovog dioksida (Usseglio-Tomasset, 1992.) Molekularni SO_2

može difuzijom proći kroz staničnu stjenku, te reagirati s kofaktorima i na taj način utjecati na rast BMK (Carreté i sur., 2002.).
Carreté i sur., 2002. navode da razina slobodnog SO_2 od 5 mg/L rezultira završetkom jabučno-mliječne fermentacije tek nakon 40-tak dana, te da koncentracija slobodnog SO_2 od 20 mg/L inhibira više od 50 % enzimsku aktivnost kod roda *Oenococus.* Prema znanstvenoj studiji Lafon-Lafourcade iz 1970. godine osim slobodnog i vezani SO_2 smanjuje razgradnju jabučne kiseline i to 20 mg/L za 13 %, 50 mg/L za 50 % i 100 mg/L u potpunosti inhibira jabučno-mliječnu fermentaciju. Vrijednosti slobodnog sumporovog dioksida ovise o pH i kemijskom sastavu vina. Preporučene količine slobodnog molekularnog sumporovog dioksida prikazane su u Tablici 4. u odnosu na pH vrijednost, te se trebaju održavati tijekom cijelog procesa proizvodnje vina i na temelju tih podataka treba pristupiti procesu sumporenja. Vrijednosti slobodnog sumporovog dioksid rastu eksponencijalno s pH vrijednosti vina odnosno što je veći pH potrebno je više slobodnog sumpora. Također etanol ima sinergističko djelovanje na aktivnost molekularnog SO_2 što se tiče inhibicije bakterija tako da vina s višim alkoholima zahtijevaju manji dodatak SO_2.

Tablica 4. Ovisnost koncentracije slobodnog sumporovog dioksida o pH vrijednosti vina[5]

Table 4. Free SO_2 required at wine pH

Free SO_2 (mg/L) required at wine pH																							
3.0		3.1		3.2		3.3		3.4		3.5		3.6		3.7		3.8		3.9	
3.00	13	3.10	16	3.20	20	3.30	25	3.40	32	3.50	40	3.60	50	3.70	63	3.80	79	3.90	100
3.01	13	3.11	16	3.21	20	3.31	26	3.41	32	3.51	41	3.61	51	3.71	64	3.81	81	3.91	102
3.02	13	3.12	17	3.22	21	3.32	26	3.42	33	3.52	42	3.62	52	3.72	66	3.82	83	3.92	105
3.03	13	3.13	17	3.23	21	3.33	27	3.43	34	3.53	43	3.63	54	3.73	68	3.83	85	3.93	107
3.04	14	3.14	17	3.24	22	3.34	28	3.44	35	3.54	44	3.64	55	3.74	69	3.84	87	3.94	110
3.05	14	3.15	18	3.25	22	3.35	28	3.45	35	3.55	45	3.65	56	3.75	71	3.85	89	3.95	112
3.06	14	3.16	18	3.26	23	3.36	29	3.46	36	3.56	46	3.66	57	3.76	72	3.86	91	3.96	115
3.07	15	3.17	19	3.27	23	3.37	29	3.47	37	3.57	47	3.67	59	3.77	74	3.87	93	3.97	117
3.08	15	3.18	19	3.28	24	3.38	30	3.48	38	3.58	48	3.68	60	3.78	76	3.88	95	3.98	120
3.09	15	3.19	19	3.29	25	3.39	31	3.49	39	3.59	49	3.69	62	3.79	78	3.89	98	3.99	123
3.10	16	3.20	20	3.30	25	3.40	32	3.50	40	3.60	50	3.70	63	3.80	79	3.90	100	4.00	126
Molecular SO_2 :				0.85	mg/L	@ 12% alcohol by volume													

Prema literaturi sadržaj potrebnog slobodnog SO_2 za čuvanje vina, između ostalog, u direktnoj je vezi s količinom ostatka reducirajućeg šećera, pri čemu vrijedi pravilo da što je veći ostatak šećera to mora biti više slobodnog SO_2 u vinu. Prema analitičkim podacima dobivenih iz vinarije *Povratak*, najviši pH ima uzorak IV što pretpostavlja

najveću koncentraciju slobodnog SO_2, što su dobiveni rezultati i pokazali. Najnižu pH vrijednost ima uzorak II, ali manju koncentraciju slobodnog SO_2 od uzorka II ima uzorak III. Također analitički podaci iz vinarije pokazuju da najveći sadržaj reducirajućih šećera ima uzorak II, odnosno sorta *Palava* (3,4 g/L), a uzorci III i IV sadrže približno jednaku koncentraciju šećera odnosno 1,2 g/L i 1,1 g/L. Od ove tri sorte, uzorak II odnosno *Palava* i ima najveću koncentraciju slobodnog sumporovog dioksida što je u skladu s preporukama.
Količine slobodnog i vezanog SO_2 u vino nalaze se u stanju dinamičke ravnoteže. Njihov odnos prvenstveno je pod utjecajem temperature vina i njegovog kemijskog sastava. Također što se tiče odnosa vezanog i slobodnog sumporovog dioksida, koncentracija slobodnog sumporovog dioksida u svim ispitivanim uzrocima je manja u odnosu na količinu vezanog (Graf 3.) Ovaj podatak nam govori da su tijekom proizvodnje vina izvršene normalne doze sumporiranja vina.
Analizirana vina na svojim deklaracijama nisu imala naznaku o sadržaju sulfita, te preporuka je zbog moguće preosjetljivosti pojedinaca na sulfite da u budućnosti na deklaracijama vina proizvedenih s područja općine Žepče stoji jasno naznačeno da sadrže sumpor odnosno sulfite.

Zaključak

Svi analizirani uzorci imaju prihvatljiv sadržaj ukupnog sumporovog dioksida u dopuštenim granicama reguliranim važećim Pravilnikom o vinu. Analizirano vino sorte *Garganega* sadrži najveću koncentraciju ukupnog slobodnog sumporovog dioksida, dok sorta *Pinot* sivi sadrži najmanju koncentraciju. Važeći Pravilnik ne ograničava koncentraciju slobodnog sumporovog dioksida u vinima, već se poziva na ograničenja koja nalaže Međunarodna organizacija za vino (OIV). Prema preporukama i zahtjevima za maksimalnim ograničenjem od 30 mg/L za slobodni sumporov dioksid uzorci I, II i III, odnosno vina sorti *Pinot sivi*, *Palava* i *Thurgau-Traminac* ispunjavaju zahtjeve. Vino sorte *Garganega* sadrži veće koncentracije slobodnog sumporovog dioksida. Ovisnost koncentracije slobodnog sumporovog dioksida o pH vrijednost i količini reducirajućih šećera je u skladu s dobivenim analitičkim podacima i znanstvenim preporukama. Tijekom proizvodnje vina s područja Žepča izvršena su normalne doze sumporenja što potvrđuje pravilan odnos vezanog i slobodnog sumpora. Trenutno vina proizvedena u Žepču na deklaraciji nemaju naznaku o sadržaju sulfita, te je preporuka da u budućnosti stoji jasno naznačen sadržaj sumpora zbog moguće preosjetljivosti pojedinaca.

Literatura

Butzke, Christian, *Use of SO_2 in High-pH Wines Sulfur dioxide*, Department of Food Science Purdue University, 2010.

Carreté, R., Vidal, M.T., Bordons, A., Constantí, M. (2002.): Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of Oenococcus oeni. *FEMS Microbiol. Lett*. 211:155-159.

Garcia-Ruiz A., Bartolome, B., Martinez-Rodriguez. A. J., Pueyo, E. ,Martin-Alvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V. (2008): Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine, *Food Control* 19(9):835–841

Iland, Ewart, Sitters, Markides & Bruer, Techinques for Chemical Analysis and Quality Monitoring during Winemaking, 2000.

International Organisation of Vine and Wine, < http://www.oiv.int/>. Pristupljeno 1. 9. 2018.

Plavša, Tomislav, *Jabučno-mliječna fermentacija u vinu,* Glasnik Zaštite Bilja, Vol. **33,** No. 6., str. 70-79, prosinac 2010.

Pravilnik o kakvoći vina, Službene novine br.**87**, 2008.

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb- Laboratorij za tehnologiju i analitiku vina, www.pbf.unizg.hr. Pristupljeno 13. 5. 2018.

Raos, Nenad, *Nove slike iz kemije,* Školska knjiga, Zagreb, 2004.

Usseglio-Tomasset, L. (1992.): Properties and use of sulphur dioxide. Food Additives and Contaminants 9:399-404

Zakon o vinu, rakiji i drugim proizvodima od grožđa, Službeni glasnik BiH br. 25 od 25. ožujka 2008.

The sulfur dioxide content in white wines from the district of Žepče municipality (Bosnia and Herzegovina)

Barbara Budim, Barbara Lukić, Maja Stojanović*

Catholic School Centre "Don Bosco", Tehnical School, S. Radića bb, Žepče, B&H
**Corresponding author: majastojanovic1807@gmail.com*

Summary

Sulfur and its compounds are agents that have the widest and oldest application in wine production. Apart from a positive preservative effect in wine, sulfur compounds - particularly sulfur dioxide can cause asthma attacks or even anaphylactic shock in susceptible individuals.The permitted amounts of sulfur in wine are controled by appropriate regulatives, which are specific to the region and country. Wine is a very complex system in which the quantity of sulphur is an important parameter of wine quality because it is the result of other parameters such as the amount of alcohol, total acids, sugars, volatile (octanoic acids). Therefore it is necessary to be careful with the addition of optimal amounts of sulfur in wine. The aim of this paper is to determine the quantitative content of sulfur dioxide in different samples of white wines produced from grape varieties in the area of Žepče. The sulfur determination procedure was carried out by Ripper's method based on iodometric titration.The obtained data showed significant differences in sulfur content in different wine samples.

Keywords: white wines, sulfur dioxide, the Ripper method, municipality of Žepče

Kazalo autora
Author Indeks

Kazalo autora / *Author Indeks*

A

Andrejaš, Martina, 58
Anđić, Martina, 231
Avdić, Gordan, 58

B

Barbaro, Tea, 12
Bašić, Anita, 24
Budim, Barbara, 239
Buhin Šturlić, Zrinka, 1

C

Cvetnić, Matija, 143

Č

Čelan, Antonija, 34
Čikanović, Dora, 231
Čizmić, Bruno, 34

Ć

Ćehajić, Adnan, 82
Ćosić, Jasenka, 186
Ćosić, Marija, 34

D

Domanovac, Tomislav, 124
Dragović-Uzelac, Verica, 97
Dvojković, Karolina, 231

Đ

Đikić, Domagoj, 97

F

Fabijančić, Irena, 97
Findrik Blažević, Zvjezdana, 46, 57
Frančić, Tajana, 97

G

Grgas, Dijana, 155, 165

H

Hardi, Matija, 231

I

Iličković, Zoran, 82

J

Jakobek, Lidija, 63, 72
Jakovljević, Ivana, 134, 193
Jašić, Midhat, 82
Jozinović, Stjepan, 215
Jukić, Marija, 222
Jukić, Slavica, 215, 222

K

Knežević, Nada, 186
Kojić, Nebojša, 63
Kolar, Ivan, 231
Kovačević, Antonija, 143
Kristek, Kristina, 231
Kučić Grgić, Dajana, 124, 143, 205
Kuzmanić, Nenad, 24, 34

L

Landeka Dragičević, Tibela, 155, 165
Landeka Jurčević, Irena, 97
Leko, Josip, 46, 57
Leskovac, Mirela, 1
Lovrinčić, Ema, 143
Lučić Blagojević, Sanja, 1
Lukić, Barbara, 239

M

Marković, Neven, 155
Martini, Marta, 231
Matić, Petra, 72
Mihaljević, Ana, 176

Miklečić, Josip, 1
Mikulić, Boris, 215
Miličević, Dijana, 58
Miloloža, Martina, 46, 57
Miškić, Ana, 222
Mitar, Anamarija, 12
Muhamedbegović, Benjamin, 82
Mutavdžija, Petra, 231

N

Novak, Mateja, 205

O

Ocelić Bulatović, Vesna, 143
Oršolić, Davor, 112

P

Palfi, Marina, 186
Pavković, Nikolina, 165
Pavlović Šijanović, Sanja, 231
Pehar, Vesna, 112
Pehnec, Gordana, 193
Prlić Kardum, Jasna, 12

R

Radman, Sanja, 155, 165

S

Sever Štruki, Zdravka, 193
Stepanić, Višnja, 112
Stipišić, Renato, 24
Stojanović, Maja, 239
Sudar, Martina, 46, 57
Svilović, Sandra, 24

Š

Šabić, Monika, 46, 57, 124, 205
Šipalo, Toni, 155
Štefanac, Tea, 155, 165
Šubarić, Drago, 82

U

Uzunović, Faik, 82

V

Vrbić, Lucija, 222
Vuković Domanovac, Marija, 46, 57, 124, 143, 205

Ž

Žužul, Silva, 176

Sponzori, donatori i izlagači
Sponsors, donors and exhibitors

Sponzori, donatori i izlagači / *Sponsors, donors and exhibitors*

ZLATNI SPONZOR

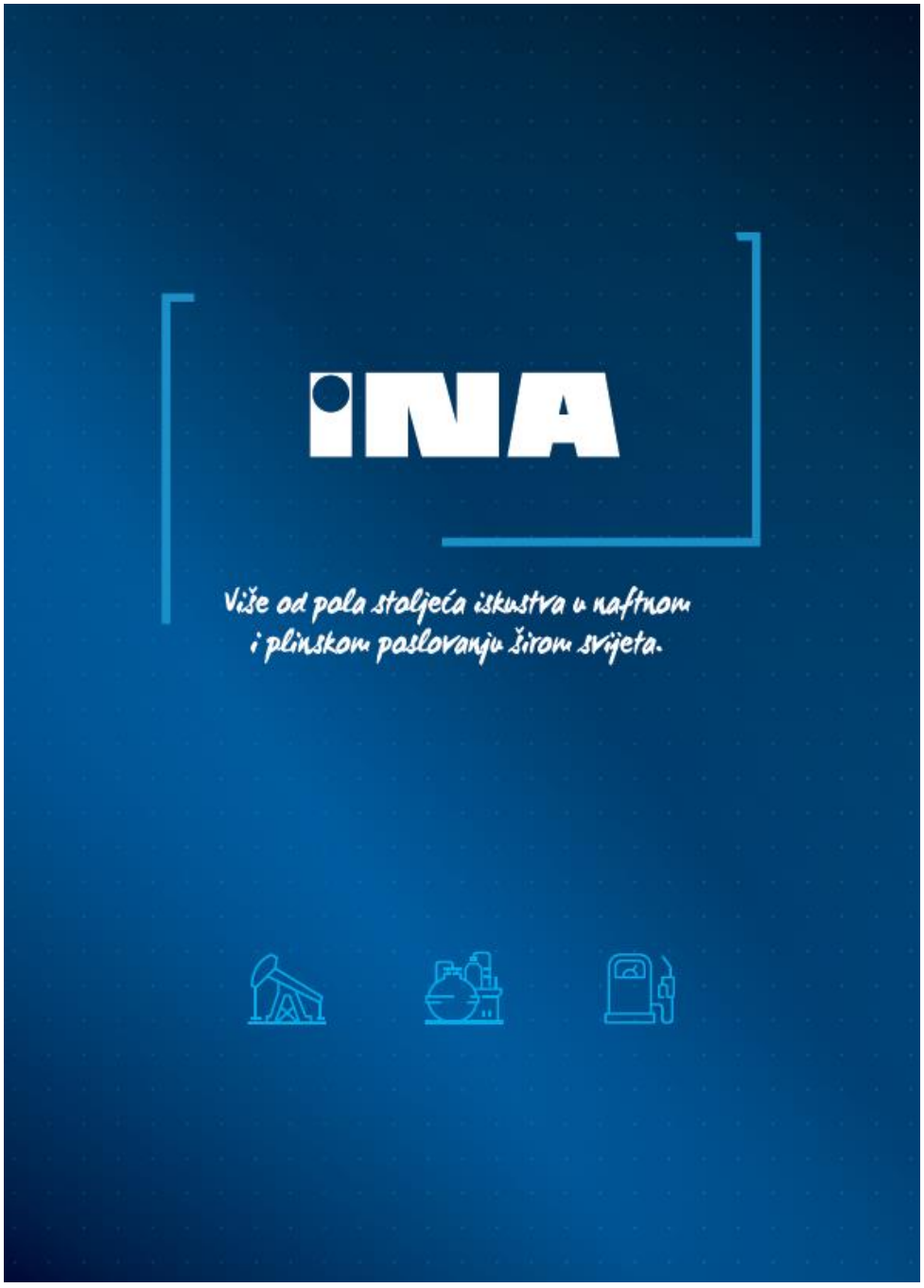
SREBRNI SPONZOR

BRONČANI SPONZORI

SPONZORI, DONATORI, IZLAGAČI

Sponzori, donatori i izlagači / *Sponsors, donors and exhibitors*

ZLATNI SPONZOR



SREBRNI SPONZOR

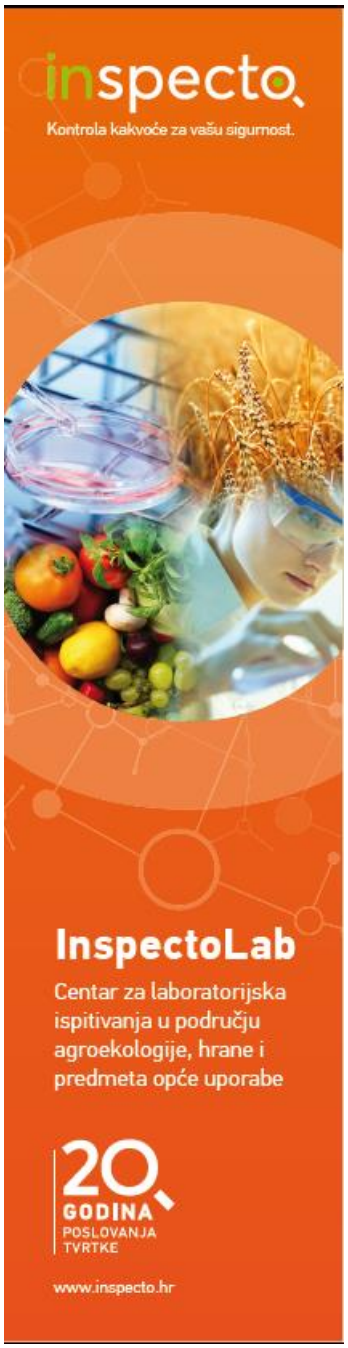
Sponzori, donatori i izlagači / *Sponsors, donors and exhibitors*

BRONČANI SPONZOR

Karolina d.o.o. članica Kraš grupe

Karolina je počela sa proizvodnjom još davne 1909. godine kada je Stjepan Piller kupio mlin za proizvodnju brašna 'Slavonija' i promijenio mu ime u Dragica mlin ili njemački Karolina Mühle.
Bogato dugogodišnje iskustvo i tradicija u proizvodnji dovelo je do stvaranja najpoznatijih Karolininih brandova Jadro i Moto. Već od 1962. godine proizvodi se vafel Jadro koji je svojom kvalitetom i okusom do današnjih dana stekao veliki broj vjernih potrošača, a svojom jedinstvenom kombinacijom dvaju okusa - mlijeka i najfinijeg kakaa u zagrljaju hrskavog vafla bio i ostao pravi doživljaj za ljubitelje poslastica. Osim toga znak «Hrvatske kvalitete», čiji je nositelj, daje kupcu jamstvo da se radi o proizvodima koji predstavljaju sam vrh svjetske ponude u svojoj klasi.
Moto punjeno čajno pecivo prisutno je na tržištu regije od 1972., a poznato je osim po kvaliteti i po obliku: cvijet sa rupicom u sredini, punjen bogatom kremom. U raznim okusima prihvaćen je od potrošača kao domaći proizvod vrhunske kvalitete i u segmentu punjenih čajnih peciva drži lidersku poziciju već dugi niz godina.
U dugoj povijesti tvrtka je promijenila vlasništvo nekoliko puta, pa tako i imena: Karolina, Sloboda, Lura-keksi, opet Karolina (kao članica Lorenz Bahlsen grupe) i konačno je danas članica Kraš grupe.
Zagrebački Kraš, koji je u ožujku 2011. godine preuzeo Tvornicu keksa i vafla Karolina, uložio je značajna sredstva u proširenje proizvodnih kapaciteta, te omogućio i otvaranje novih radnih mjesta. Nastavljajući tradiciju i slijedeći postojeće vrijednosti Karolina je započela s novim razvojnim ciklusom koji je upotpunjen iskustvima najvećeg konditorskog proizvođača u regiji – Kraša. Integracijom Karoline u Kraš grupu, ostvaren je dio vizije gdje Osijek postaje najjači centar za proizvodnju ravnih vafla u regiji. Danas Karolina proizvodi na ukupno 12 proizvodnih linija i zapošljava oko 330 radnika, a rekordnu proizvodnju poslijeratnog razdoblja od 8.800 tona dostigla je 2015. godine.
Suvremena tehnologija, recepture, tradicija, inovativnost i kvaliteta proizvoda osnovni su temelji razvoja i proizvodnje proizvoda u Karolini – to joj je jamstvo egzistencije i prosperiteta na hrvatskom tržištu, ali i širenje na još neosvojena.

BRONČANI SPONZOR



BRONČANI SPONZOR

Genera je kompanija s više od stotinu godina tradicije, čiji se početak povezuje s osnivanjem Kraljevskoga hrvatsko-slavonskog zemaljskog bakteriološkog zavoda 1901 godine. Genera ima široku paletu proizvoda koja, uz veterinarsko-medicinske proizvode, uključuje i vitaminsko-mineralne dodatke prehrani životinja, veterinarske dezinficijense, proizvode za zaštitu bilja, te proizvode za deratizaciju i dezinsekciju. Od 2015. godine Genera d.d. članica je Dechra Grupe.

Dechra je međunarodna kompanija specijalizirana za poslovanje veterinarsko-medicinskim i srodnim proizvodima. Stručni smo u području razvoja, proizvodnje, prodaje i stavljanja na tržište visokokvalitetnih proizvoda za veterinare širom svijeta.

Komunalac d.o.o. za komunalno gospodarstvo tvrtka je iz Vukovara čija je osnovna djelatnosti sakupljanje neopasnog otpada. Osim toga pruža usluge hortikulture i krajobraznog uređenja i pogrebne usluge.
Održava parkirališta u gradu Vukovaru, tržni centar u Borovu Naselju, gradsko i Memorijalnog groblja žrtava iz Domovinskog rata i obavlja djelatnosti graditeljstva.

MISIJA
Naša misija je povezati iskustvo i mladost u donošenju najboljih inženjerskih, ekoloških, ekonomskih i društvenih rješenja, tehnologija i proizvoda, s krajnjim ciljem postizanja najvišeg standarda u mjerilu kvalitete i profesionalnosti u svim segmentima našega poslovanja.

VIZIJA
Naša vizija povezana je s ostvarenjem naših strateških ciljeva: zaposleni stručni ljudi motivirani za usvajanje i razvoj novih znanja i ideja koje kontinuirano doprinose boljitku našeg poslovanja i čine nas najboljim mogućim izborom za naše korisnike i partnere.

KOMUNALAC
VUKOVAR
za komunalno gospodarstvo

Sajmište 174,
32000 Vukovar

Tel.: 032/428-179
Fax.: 032/428-180
E-mail: komunalac-vu@komunalac-vu.hr

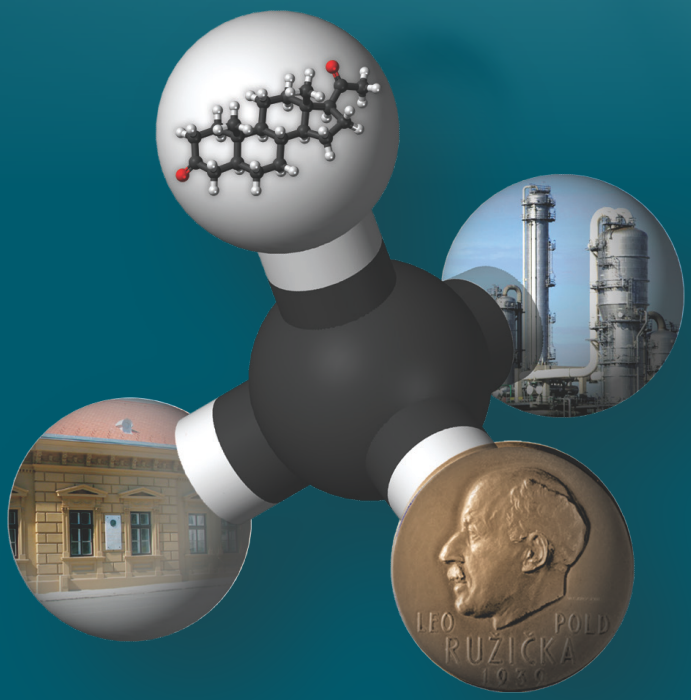
www.komunalac-vu.hr

Sponzori, donatori i izlagači / *Sponsors, donors and exhibitors*

AGROPROTEINKA BIOWATT

PRIJATELJI I ČUVARI ZDRAVLJA I OKOLIŠA!

Agroproteinka, tvrtka sa 60-godišnjom tradicijom u skupljanju i preradi životinjskih nusproizvoda, korača ukorak sa zahtjevima vremena, pa joj je i sa 60 godina lako biti *mlada.* Nove okolnosti i novo vrijeme donose nove izazove, nove tehnologije i nove načine kojima možemo dodatno raditi na očuvanju našega zdravlja. Na nove izazove Agroproteinka je odgovorila novim bioplinskim postrojenjem **BioWatt** koje je u redovnom pogonu od ožujka 2017. Od sada je Agroproteinka u mogućnosti, uz životinjske nusproizvode, sakupljati otpad biljnog podrijetla. Kada izravno želimo reći i odgovoriti *TKO SMO MI!*, krećemo od tri riječi koje opisuju naše tri glavne misije: *zdravlje, okoliš i energija. Zdravlje* ljudi štitimo od negativnih utjecaja koji mogu nastati zbog lošeg postupanja s otpadom i nusproizvodima, a onda od istih dobivamo i nove vrijedne proizvode. *Okoliš* – čuvamo i zdravlje našeg zajedničkog okoliša na isti način, odgovorno i sustavno, na koji čuvamo zdravlje ljudi i životinja. *Energija* – od skupljenog dobivamo nove vrijedne proizvode: komponentu za hranu za kućne ljubimce, energente, komponentu za proizvodnju biodizela i toplinsku i električnu energiju. AGROPROTEINKA je ulaganjem u postojeće pogone i novim projektima zaokružila svoj ZELENI PROSTOR!


LEO POLD
RUŽIČKA