

Influence of corrosive media on elution of titanium alloy metal ions

Jajčinović, Magdalena; Slokar Benić, Ljerka; Štrkalj, Anita; Carek, Andreja

Source / Izvornik: **Proceedings of 19. Ružička days Today science- tomorrow industry, 2023, 20 - 26**

Conference paper / Rad u zborniku

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:115:056473>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-29**



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
METALURŠKI FAKULTET
UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF METALLURGY

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb - Repository of Faculty of Metallurgy University of Zagreb](#)





international conference

19. Ružička days

TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY
September 21–23, 2022 | Vukovar, Croatia



PROCEEDINGS

ISSN 2671-0668 (Online)

www.ruzickadays.eu



međunarodni znanstveno-stručni skup

19. Ružičkini dani

DANAS ZNANOST – SUTRA INDUSTRIJA
21. – 23. rujna 2022. | Vukovar, Hrvatska

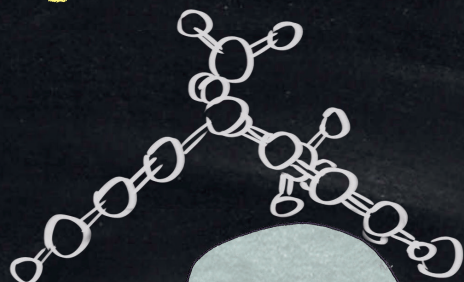


ZBORNİK RADOVA

ISSN 2671-0668 (Online)

8. SUSRET MLADIH KEMIČARA

21. rujna 2022., VUKOVAR, HRVATSKA



$$Re = \frac{vdp}{\eta}$$

ZNAŠ ŠTO
BI SE DOGODILO DA
SE SILVER SURFER
I IRON MAN
UJEDINE?

ZNAM....
POSTALI BI
LEGURA!



**PROCEEDINGS |
ZBORNIK RADOVA**

19th Ružička Days
TODAY SCIENCE – TOMORROW INDUSTRY
19. Ružičkini dani
DANAS ZNANOST – SUTRA INDUSTRIJA

**Published by |
Izdavači**

Faculty of Food Technology Osijek, University of
Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Croatian Society of Chemical Engineers (CSCE)
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI)

**Chief Editors |
Glavni urednici**

Jurislav Babić, Dajana Kučić Grgić, Vesna Očelić Bulatović

**Technical Editor |
Tehnička urednica**

Ivana Lauš

**Text prepared by |
Tekst pripremili**

*AUTHORS, who are fully responsible for the papers and
figures*
AUTORI, koji su odgovorni za tekst rada i slike

**Cover sheet and layout design |
Dizajn naslovnice i prijeloma**

Zdenko Blažeković

**Scientific and Organizing
Committee and Proceedings
Reviewers |
Znanstveno-organizacijski
odbor i recenzenti Zbornika
radova**

Jurislav Babić (*chairman/predsjednik*),
Tomislav Bolanča (*vice-chairman/dopredsjednik*),
Vesna Očelić Bulatović (*vice-chairman/dopredsjednica*),
Ivana Lauš (*secretary/tajnica*),
Dajana Kučić Grgić (*secretary/tajnica*),
Đurđica Ačkar, Daniela Čačić Kenjerić, Ljubica Glavaš Obrovac,
Ivan Hubalek, Stela Jokić, Olgica Martinis, Ivanka Miličić,
Maja Molnar, Ana Mornar-Turk, Drago Šubarić, Artur Gryszkin
(Poland), Anita Ivanković (Bosnia and Herzegovina), Yusuf
Konca (Turkey), Marta Lores (Spain), Biljana Pajin (Serbia),
Miroslav Slouf (Czech Republic), Mojca Škerget (Slovenia)

ISSN 2671-0668 (Online)

Osijek and/i Zagreb, 2023.

***Under the Auspices of* | Pokrovitelj:**

*Croatian Academy of Science and Arts,
Department of Mathematical, Physical and Chemical Science |
Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti,
Razred za matematičke, fizičke i kemijske znanosti*



***Supported by* | Uz potporu:**

*Education and Teacher Training Agency |
Agencija za odgoj i obrazovanje*



Agencija za odgoj i obrazovanje
Education and Teacher Training Agency

*Croatian Academy of Engineering |
Akademija tehničkih znanosti Hrvatske*



*Faculty of Chemical Engineering & Technology Zagreb,
University of Zagreb |
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb
Sveučilišta u Zagrebu*



FKITMCMXIX

*City of Vukovar |
Grad Vukovar*



*Public Institution in Culture Hrvatski dom Vukovar |
Hrvatski dom Vukovar*



*Ministry of Economy and Sustainable Development |
Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja*



REPUBLIKA HRVATSKA
MINISTARSTVO
GOSPODARSTVA
I ODRŽIVOG
RAZVOJA

*Ministry of Agriculture |
Ministarstvo poljoprivrede*



MINISTARSTVO
POLJOPRIVREDE

*Ministry of Science and Education |
Ministarstvo znanosti i obrazovanja*



MINISTARSTVO
ZNANOSTI I
OBRAZOVANJA
Hrvatske Republike

*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek |
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku*



*University of Zagreb |
Sveučilište u Zagrebu*



*Polytechnic Lavoslav Ružička in Vukovar |
Veleučilište Lavoslav Ružička u Vukovaru*



*Polytechnic in Požega |
Veleučilište u Požegi*



*Vukovar-Syrmia County |
Vukovarsko-srijemska županija*



Acknowledgement to manuscript reviewers | Zahvala recenzentima radova:

The Editors of the *Proceedings* of the 19th *Ružička days* extend their deepest gratitude to the following manuscript reviewers who maintained the professional standards of our *Proceedings* of the 19th *Ružička days*:

Đurđica Ačkar, Niko Bačić, Tajana Begović, Mejra Bektašević, Valentina Bušić, Lara Čižmek, Mirjana Čurlin, Ivica Đilović, Lidija Furač, Alenka Gabersčik, Andrea Gross-Bošković, Jasmina Ibrahimpašić, Violeta Ivanova, Miće Jakić, Božica Japundžić Palenkić, Marina Jovanović, Antun Jozinović, Marko Jukić, Ana Jurinjak Tušek, Igor Karlovits, Nemanja Kašiković, Josip Kranjčić, Dajana Kučić Grgić, Mia Kurek, Ante Lončarić, Mario Lovrić, Jasmina Lukinac Čačić, Ivana Martinović, Kristina Mastanjević, Dora Matijašec, Martina Miloloža, Maja Molnar, Dubravka Negovetić Vranić, Ivona Nuić, Marinela Nutrizio, Vesna Ocelić Bulatović, Đurđevka Pecikozić, Sanja Perinović Jozić, Željka Petrović, Anita Pichler, Nada Pitinac, Ivana Plazonić, Jelena Popović Đorđević, Zuzana Redžović, Tomislav Rolich, Sanda Rončević, Mirta Rubčić, Željka Soldin, Raza Sunulahpašić, Goran Šarić, Nikola Španić, Anita Štrkalj, Ana Tutić, Natalija Velić, Ivana Vitasović Kosić

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. The Proceedings has not been proofread by a professional proofreader.

Sadržaj radova u ovom ZBORNIKU RADOVA isključiva je odgovornost autora. Izdavač nije odgovoran za upotrebu podataka objavljenih u radovima, pogreške i sl.



Dear colleagues,

Preface

we are extremely honoured to present to you the Proceedings of the international conference *19th Ružička Days*, which was successfully held on September 21–23, 2022, in Vukovar, Croatia, in the hometown town of our famous Croatian scientist and first Nobel laureate, professor Leopold (Lavoslav) Ružička.

The main goals of the Conference were to promote excellence, originality and innovation of interdisciplinary scientific research as well as the practical application of the obtained results through collaboration with industry, emphasizing thus the recognizable slogan of the *Ružička Days* conference: "*Today Science – Tomorrow Industry*". In addition, the Conference gave the opportunity for meetings, exchanging the ideas, opinions, experiences and cooperation among participants from different working surroundings.

It is also important to point out that since 2008, within the international conference *Ružička Days*, *Meeting of Young Chemists* has also been held, where high school students, with the help of their mentors, present papers in the field of chemistry, with the aim to direct students and young people to the technical and natural sciences, especially chemistry.

In its seventh issue (2011, 2013, 2015, 2017, 2019, 2021) the Proceedings publishes scientific and professional full papers of high quality in the following sections: *Chemical analysis and synthesis* (10), *Chemical and biochemical engineering* (3), *Food technology and biotechnology* (4), *Chemistry in agriculture and forestry* (1), *Environmental protection* (9) and *8th Meeting of Young Chemists* (3). Full-length papers were subjected to an international review procedure done by eminent experts from the corresponding fields, to whom we express our gratitude, but they were not subjected to linguistic proofreading.

On behalf of the Scientific and Organizing Committee of the *19th Ružička Days* we cordially thank all the authors, reviewers, participants, lecturers, organizers, especially the international organizers EuCheMS and EHEDG, auspices and sponsors, and all the others who, in any way, supported the Conference and contributed to the preparation of the Proceedings, especially to our highly skilled and committed associates, who have put a lot of effort in the preparation of these Proceedings.

At the very end, special thanks to our young, future scientists and their mentors who are faithful participants of the *Meeting of Young Chemists* of the *Ružička Days* conference.

Enjoy the extremely interesting scientific and professional papers contained in these Proceedings, until the next 20th jubilee of *Ružička Days* in 2024!

We are looking forward to meeting you again in Vukovar!

Yours sincerely,

Chief Editors
Jurislav Babić
Vesna Ocelić Bulatović
Dajana Kučić Grgić

Sekcija: Kemijska analiza i sinteza
Topic: Chemical analysis and synthesis

Uršula Apalović, Anita Štrkalj, Zoran Glavaš

Migracija nikla iz nakita od čelika

Migration of nickel from steel jewelry 1

Azra Đulović, Luana Grmuša, Ivica Blažević

Utjecaj selenija na profil glukozinolata u klicama rikule

Influence of selenium on glucosinolate profile in rocket sprouts 9

Magdalena Jajčinović, Ljerka Slokar Benić, Anita Štrkalj, Andreja Carek

Utjecaj korozivnog medija na eluciju metalnih iona titanske legure

Influence of corrosive media on elution of titanium alloy metal ions 20

Martina Marić, Anita Štrkalj, Zoran Glavaš

Analiza posuđa od nehrđajućeg čelika

Analysis of stainless steel dishes 27

Ines Martić, Nikola Rimac, Željka Ujević Andrijić

Razvoj softverskih senzora za procjenu mjerenja sadržaja benzena u lakom reformatu primjenom metoda strojnog učenja

Development of soft sensors using machine learning methods 36

Vibor Roje, Ivor Košutić

Ekstrakcija metala i metaloida iz uzoraka tla vodenim otopinama amonijevih soli

Extraction of metals and metalloids from soil samples by

aqueous solutions of ammonium salts 55

Vesna Sokol, Boris-Marko Kukovec, Ante Radoš

Određivanje granice stvaranja trostrukih iona u otopinama kalijevog bromida u 90 %-tnom butan-2-olu

Determination of the triple ions formation limit in solutions of KBr in 90 % butan-2-ol 65

Renato Tomaš, Ivan Pehar, Zdzislaw Kinart, Milan Vraneš,

Snežana Papović, Teona Teodora Borović

Volumetrijska svojstva otopina 1-metilimidazolijevog acetata u vodi,

N,N-dimetilformamidu, *N,N*-dimetilacetamidu i dimetil sulfoksidu

Volumetric properties of solutions of 1-methylimidazolium acetate ionic liquid in water,

N,N-dimethylformamide, *N,N*-dimethylacetamide, and dimethyl sulfoxide 76

Željka Ujević Andrijić, Srećko Herceg, Nenad Bolf
Procjena ključnih procesnih veličina na temelju podataka iz industrijskih procesa
Data-driven estimation of critical quality attributes on industrial processes..... **98**

Hana Zajkić, Milenko Korica, Tomislav Balić
Ekstrakcija metalnih kationa s poroznim oksa-aza makrocikličkim spojevima
Extraction of metal cations with porous oxa-aza macrocyclic compounds..... **112**

Sekcija: Kemijsko i biokemijsko inženjerstvo
Topic: Chemical and biochemical engineering

Anita Bašić, Ana Herceg, Sandra Svilović, Nenad Kuzmanić
Utjecaj brzine vrtnje SBT miješala na sorpciju bakra na zeolite
Impact of SBT impeller speed on copper sorption on zeolite **122**

Andrea Špoljarić, Ante Jukić, Elvira Vidović
Utjecaj željezovih nanočestica na TiO₂ ili SiO₂ nosaču
na primjenska svojstva PLA kompozita
Influence of TiO₂ and SiO₂ as carriers for iron nanoparticles
on application properties of PLA composites **134**

**Marija Vuković Domanovac, Ivana Stojmilović, Martina Trtinjak,
Tomislav Domanovac, Monika Šabić Runjavac**
Kinetika bioremedijacije simulirane procjedne vode iz biootpada
Kinetics of bioremediation of simulated leachate from biowaste **146**

Sekcija: Prehrambena tehnologija i biotehnologija
Topic: Food technology and biotechnology

**Valentina Obradović, Ines Krznarić Došen, Irena Perković,
Maja Ergović Ravančić, Svjetlana Škrabal, Helena Marčetić**
Utjecaj zamrzavanja i mariniranja na nutritivna i mikrobiološka svojstva zelenih šparoga
The influence of freezing and marinating on the nutritional
and microbiological properties of green asparagus **155**

**Mladenka Šarolić, Željana Pavlović, Zvonimir Marijanović,
Ani Radonić, Žana Delić**
Hlapljivi spojevi rakije travarice
Volatile compounds of brandy travarica **164**

**Svjetlana Škrabal, Maja Ergović Ravančić, Valentina Obradović,
 Helena Marčetić, Tanja Abramović**
 Senzorska, fizikalno - kemijska i mikrobiološka kvaliteta svježih sireva na tržištu
 Organoleptic, physical - chemical and microbiological quality
 of fresh cheese on the market 172

**Ajla Avdić, Amela Kusur, Martina Tanović, Amel Selimović,
 Dijana Miličević, Gordana Avdić**
 Voćni žele i snack proizvodi od naranče
 Orange fruit jelly and snack products 180

Sekcija: Kemija u poljoprivredi i šumarstvu
Topic: Chemistry in agriculture and forestry

**Slaven Jurić, Ana Jakoplić, Kristina Vlahoviček Kahlina,
 Marija Sigurnjak Bureš, Mirna Fuka, Luna Maslov Bandić**
 Utjecaj jestivih omotača na kvalitetu svježih borovnica
 The effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries 188

Sekcija: Zaštita okoliša
Topic: Environmental protection

**Irena Bates, Ivana Plazonić, Valentina Radić Seleš,
 Maja Rudolf, Katja Petric Maretić**
 Iskoristivost slame za sekundarnu ambalažu otisnutu ofsetnom
 i bakrotiskarskom tehnikom tiska
 Usability of straw for secondary packaging printed by offset
 and gravure printing techniques 199

**Dijana Grgas, Marija Biškup, Mirjana Galant, Tea Štefanac, Korana Ambrozić, Tibela
 Landeka Dragičević**
 Obrada otpadne vode aerobnim granulama mulja pri različitim omjerima C/N
 Wastewater treatment by aerobic granules at different C/N ratios 210

Karlo Grgurević, Martina Miloloža, Vesna Ocelić Bulatović, Dajana Kučić Grgić
 Ispitivanje ekotoksičnosti diklofenaka i pantoprazole
 Ecotoxicity testing of diclofenac and pantoprazole 220

Ivana Plazonić, Valentina Radić Seleš, Maja Rudolf,

Katja Petric Maretić, Irena Bates

Utjecaj pšenične pulpe u tiskovnoj podlozi na kemijsku stabilnost bakrotiskarskih otisaka

Influence of wheat pulp in printing substrate on the chemical stability of gravure prints ... 233

Ivan Damjanović, Hrvoje Sučić, Danijela Bezik, Mirna Habuda-Stanić,

Dario Kolarić, Zdenka Šušić, Leontina Toth, Barbara Petrovicky Šveiger,

Marika Kralj, Ines Ružkan, Mirna Tokić, Mirta Eberhard, Tanja Marković,

Hrvoje Babić, Nataša Turić, Snježana Benkotić

Prikaz ocjene kemijskog stanja površinskih voda Kopačkog rita na temelju

analize odabranih teških metala kroz jednogodišnje vremensko razdoblje

Evaluation of chemical status of Kopački rit surface water bodies through

analysis of selected heavy metals through one-year period 242

Lucija Kefurt, Vesna Očelić Bulatović, Dajana Kučić Grgić, Anita Štrkalj

Morfologija biorazgradnje polimernih mješavina

Morphology of biodegradation of polymer blends..... 258

Karlo Josić, Martina Miloloža, Vesna Očelić Bulatović, Dajana Kučić Grgić

Automatsko brojanje bakterijskih kolonija

Automated counting of bacterial colonies..... 274

Sara Šušak, Vesna Očelić Bulatović, Dajana Kučić Grgić, Mirela Leskovac

Mehanička i toplinska svojstva biokompozita na bazi pluta i PLA

Mechanical and thermal properties of biocomposites based on cork and PLA..... 283

Siniša Ozimec, Denis Deže, Dragan Prlić

Floristička obilježja Kopačkog rita i delte Dunava

Floristic characteristics of Kopački rit and Danube Delta..... 298

8. Susret mladih kemičara

8th Meeting of Young Chemists

Antonio Mamić, Kale Marković, Dorotea Štefanac, Nika Vitas,

Jasminka Žiža, Ivana Ćosić, Bojan Matijević

Utjecaj različitih temperatura čuvanja na svojstva piva kontaminiranog

s Lactobacillus brevis

Influence of different storage temperatures on the properties of beer contaminated

with *Lactobacillus brevis* 310

Petra Novak Mlinarić, Tamara Tkalec-Car

Praćenje kvalitete vode prirodnog izvora Belski dol

Monitoring the water quality of natural source Belski dol 321

Vanja Perković, Ana Penava, Marko Tomas

Ispitivanje fizikalno-kemijskih parametara maske za lice od zelene gline

Testing of physico-chemical parameters of green clay face mask 327

Kazalo autora

Author index 338

1

Sekcija: KEMIJSKA ANALIZA I SINTEZA

**Topic: CHEMICAL ANALYSIS AND
SYNTHESIS**



Migracija nikla iz nakita od čelika

Uršula Apalović, Anita Štrkalj*, Zoran Glavaš

Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Aleja narodnih heroja 3, 44000 Sisak, Hrvatska

*Dopisni autor: strkalj@simet.unizg.hr

originalni znanstveni rad

Sažetak

Uloga nakita u životu čovjeka vrlo malo se mijenjala kroz povijest. Uglavnom se nakit koristi za ukrašavanje ljudskog tijela, ali i kao statusni simbol ili za izražavanje pripadnosti određenim grupama ili kulturama. Međutim, procesi proizvodnje nakita značajno su napredovali. Istraživanja vezana uz utjecaj pojedinih komponenti iz nakita na zdravlje čovjeka također su značajno napredovala. Poznato je da tijekom nošenja dolazi do interakcije nakita s kožom. Znoj koji se oslobađa na koži utječe na migraciju teških metala. Ova pojava je posebno izražena kod nakita koji je napravljen od neplemenitih metala (npr. od ugljičnog čelika i sl.). U ovom radu istraživana je migracija iona nikla iz nakita napravljenog od različitih vrsta čelika koji je bio u kontaktu s modelnom otopinom znoja. Dobiveni rezultati su pokazali da dolazi do migracije navedenih iona. Koncentracija iona koja migrira uslijed kontakta nakita i modelne otopine znoja ovisi o vremenu kontakta.

Ključne riječi: nakit, nikal, znoj, migracija

Uvod

Najčešće korišteni materijal današnjice je čelik. Ne zna se točno kada je počela njegova proizvodnja, ali smatra se da je to bilo paralelno s proizvodnjom željeza. Postupci proizvodnje kao i svojstva pa i definicija mijenjali su se kroz povijest. Danas se pod pojmom čelika smatra legura željeza i ugljika u kojoj je udio ugljika ≤ 2 mas.% uz prisutnost tzv. pratioća kao što su silicij i mangan, nečistoća kao što su sumpor i fosfor, ali i namjerno dodanih elemenata, tzv. legirajućih elemenata (Filetin i sur., 2002). Legirajući elementi u čeliku su od iznimne važnosti. Ovisno o vrsti i udjelu legirajućih elemenata mijenja se mikrostruktura čelika, a samim time i svojstva. Najčešće se kao legirajući elementi koriste krom, nikal, mangan, silicij, volfram, molibden i vanadij. Također se mogu dodati i kobalt, titan, niobij i dr. što ovisi o svojstvima koja se žele postići (Oruč i sur. 2005).

Unatoč tome, kad god je moguće, odnosno kad nisu potrebni posebni zahtjevi u primjeni i dalje se koristi obični ugljični čelik. Proizvodnja ovog čelika je jednostavnija i daleko jeftinija u odnosu na legirane čelike. S obzirom na udio ugljika u čeliku, čelici se dijele na niskougljične, srednjeugljične i visokougljične. Niskougljični čelici su čelici u kojima je udio ugljika od 0,05 % do 0,25 %. Mikrostruktura im je najčešće feritna, a prema svojstvima su najbliži željezu. Zbog niske cijene najzastupljeniji su na tržištu i obično se koriste za izradu konstrukcija. Srednjeugljični čelici su čelici u kojima je udio ugljika od 0,25 - 0,60 %.

Mikrostruktura im je perlitno - feritna. Imaju veću čvrstoću i manju žilavost i istezljivost od niskougljičnih čelika. Također se koriste za izradu konstrukcija, ali i za izradu raznih strojnih dijelova. Visokougljični čelici imaju sadržaj ugljika od 0,6 % do 1,7 %. Imaju perlitno - cementitnu strukturu. U usporedbi s nisko i srednjeugljičnim čelicima imaju povećanu tvrdoću, ali nižu žilavost i istezljivost. Također se koriste kao konstrukcijski čelici, ali i u izradi alata (Ashby, 1992). Bez obzira o kojoj vrsti ugljičnog čelika se radi, svi imaju zajedničko negativno svojstvo, a to je loša otpornost na koroziju. Korozijska otpornost uvelike ovisi o pH vrijednosti. Pri niskim pH vrijednostima razvijanje vodika eliminira mogućnost stvaranja zaštitnog filma, dok u alkalnim otopinama razvijanje zaštitnog filma uvelike smanjuje brzinu korozije ugljičnog čelika (Stupnišek – Lisac, 2007). Budući da je korozivnost nepoželjno svojstvo čelika često se na površinu materijala nanose različite prevlake. Zaštita od korozije predstavlja primarnu uloga prevlaka, iako se one mogu nanositi i zbog povećanja dimenzija istrošenih dijelova, postizanja određenih fizikalnih svojstava, zaštite od trošenja, a nerijetko imaju i estetsku ulogu kao što je to kod nakita (Juraga i sur. 2005). Upravo je proizvodnja nakita od čelika vrlo interesantna djelatnost na koju se rijetko pomisli kada se govori o proizvodnji i upotrebi čelika. Nakit je prisutan u ljudskoj civilizaciji gotovo oduvijek i smatra se prvim načinom ukrašavanja ljudskog tijela. Još prije 75 000 godina pojavljuje se prvi nakit koji se sastojao od nanizanih školjki i to kod stanovnika današnje Afrike. Čovjek je za izradu nakita koristio kosti, zube, bobice i kamenje, a prva prava proizvodnja nakita od metala (zlata) započinje u Egiptu još prije 3000 – 5000 godina. Tradicija izrade i nošenja nakita zadržala se i do danas. Obično se pod pojmom nakita prvo pomisli na nakit od plemenitih metala (zlata, srebra, platine). Međutim, danas se izrađuje nakit i od neplemenitih metala, poput bakra, ali i od čelika. Koriste se i neki drugi materijali, kao što je keramika, drvo, staklo, polimerni materijali i sl. Pod pojmom bižuterije smatra se nakit od svih ostalih materijala, odnosno nakit koji nije izrađen od plemenitih metala i dragulja (Philips, 1996). Tehnike izrade nakita razlikuju se ovisno o materijalu od kojeg se izrađuje. Izrada nakita od metala može se provoditi lijevanjem, sinteriranjem, strojnom obradom, tzv. kemijskom elektrolizom, odnosno elektroformiranjem itd. Nakit od čelika obično se izrađuje strojnom obradom koja podrazumijeva rezanje silueta u tankim limovima metala, savijanje, glodanje, CNC obradu i slično. Može se koristiti velik broj tehnika i strojeva. Za izradu nakita od čelika može se koristiti legirani čelik, ali i obični ugljični čelik. S obzirom da je obični ugljični čelik podložan koroziji, nakit od ovog materijala se još dodatno zaštićuje prevlakama. Osim što ga prevlake štite od korozije, daju mu sjaj i lijep izgled. Prevlake se nanose obično galvanizacijom. Na ovaj način najčešće se na ugljični čelik nanosi srebro, zlato (žuto i ružičasto), rodij, ali i znatno jeftiniji, ali i dalje estetski primamljivi krom i nikal. Vrlo često se prije nanošenja nikla i kroma nanosi bakar koji osigurava bolje prijanjanje navedenih metala (Philips, 1996). Upravo se u prevlakama krije opasnost za ljudsko zdravlje. Naime, prevlake su obično vrlo tanke i nošenjem nakita na tijelu se uslijed djelovanja znoja ili mehanički prilikom trenja nakita i kože uklanjanju, te pritom ostaju na koži ili preko kože ulaze u organizam. Budući da jeftini

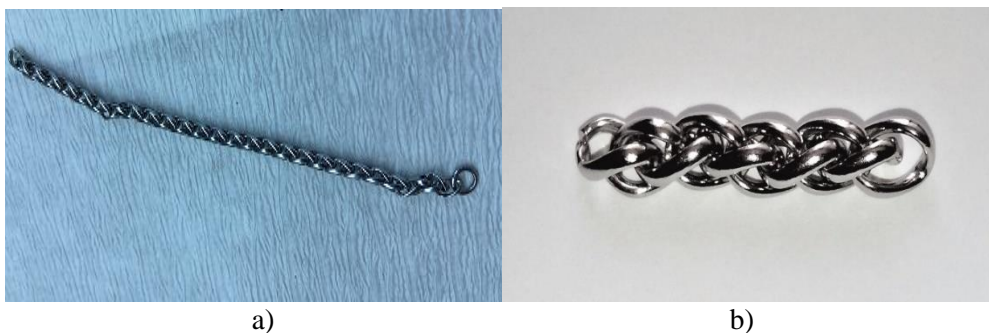
nakit od ugljičnog čelika sadrži obično prevlake od nikla i kroma, još je veće opasnost za zdravlje budući da su oba metala svrstana u skupinu alergena, a krom u skupinu kancerogenih tvari. Sličan problem događa se i kod nakita koji je napravljen od legiranog čelika. Kao legirajući elementi u čeliku za ovu namjenu obično se koriste krom i nikal. Ovi elementi osiguravaju kemijsku postojanost čelika. Međutim, u dodiru ljudskog znoja i nakita izrađenog od čelika legiranog kromom i niklom dolazi do migracije navedenih metala na i u ljudski organizam. Reakcije organizma na nikal i krom su različite. Obično se na mjestima gdje je nakit u dodiru s kožom javlja alergijska reakcija. Osim toga, neka istraživanja su pokazala da se kod osoba koje su bile dermalno izložene spojevima kroma zabilježila njegova prisutnost u sru, želucu, krvi, mišićima i bubrezima, što ukazuje da krom ne ostaje samo na koži već prodire i do određenih organa (Durate i sur., 2018, Dayan i sur., 2001, Hostynek i sur., 2002, Abadin i sur., 2012, Royer i sur. 2022, Adie i sur, 2020). Unatoč štetnom djelovanju oba metala, ipak su češće alergijske reakcije i to obično na nikal.

U ovom radu istraživana je migracija iona nikla iz nakita napravljenog od legiranog (nehrđajućeg) čelika i nakita od običnog ugljičnog čelika koji je prevučen prevlakama od nikla, kroma i bakra ovisno o vremenu kontakta sa tijelom (znojem).

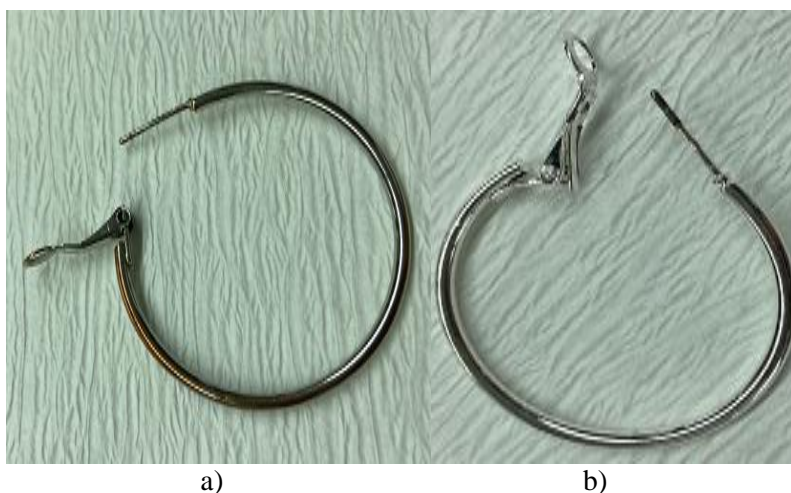
Materijali i metode

U ovom radu su kao uzorci korištene dvije vrste nakita: nakit od nehrđajućeg čelika i nakit od ugljičnog čelika na kojem se nalazila prevlaka od bakra, kroma i nikla.

Obje vrste nakita su stavljane u kontakt s modelnom otopinom znoja. Radi usporedbe rezultata, ispitivanja su provedena na prethodno korištenom i nekorištenom nakitu. Svi uzorci bili su u kontaktu s modelnom otopinom znoja 2, 5 i 24 sata. Nakon isteka vremena kontakta, u modelnim otopinama je određivana koncentracija nikla koji je migrirao iz nakita. Analiza je provedena spektrometrijski pomoću spektrometra s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Osim toga, svi uzorci su prije i nakon eksperimenta pregledavani vizualno da bi se uočile eventualne promjene na površini. Na slikama 1 i 2 prikazani su uzorci korišteni u eksperimentu.



Slika 1. Narukvica od nehrđajućeg čelika: a) prethodno korištena, b) nekorištena
Figure 1. Stainless steel bracelet: a) previously used, b) unused



Slika 2. Naušnice od ugljičnog čelika: a) prethodno korištena, b) nekorištena
Figure 2. Carbon steel earrings: a) previously used, b) unused

Sva mjerenja su provedena pri pH znoja od 2,97 i temperaturi 22 ± 2 °C. Uzorcima je prije provođenja eksperimenta određen kemijski sastav.

Rezultati i rasprava

U tablicama 1 i 2 prikazani su kemijski sastavi uzoraka.

Tablica 1. Kemijski sastav uzoraka od ugljičnog čelika
Table 1. Chemical composition of carbon steel samples

Element	C	Mn	Si	P	S	Ni	Cr	Cu	Al
mas. % (wt.%)	0,08	0,33	0,30	0,002	0,015	0,12	0,63	6,30	0,025

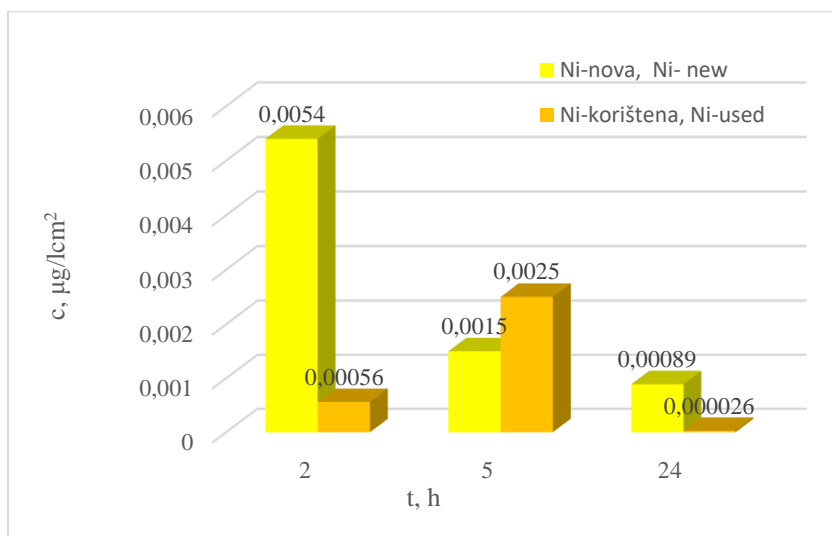
Tablica 2. Kemijski sastav uzoraka od nehrđajućeg čelika
Table 2. Chemical composition of stainless steel samples

Element	C	Mn	Si	P	S	Cr	Ni	Mo
mas. % (wt.%)	0,05	1,00	0,30	0,026	0,018	17,20	11,6	2,00

Uvidom u kemijski sastav (Tablice 1 i 2) vidljivo je da su ispitivani uzorci napravljeni od običnog ugljičnog, odnosno legiranog (nehrđajućeg) čelika. Kod uzoraka od običnog ugljičnog čelika nešto je povećan udio Ni, Cr i Cu u odnosu na uobičajeni sastav ugljičnih čelika što upućuje na činjenicu da se na navedenim uzorcima nalaze

prevlake od spomenutih metala. Osim toga, navedene prevlake su vidljive vizualno na već korištenim uzorcima budući da su na nekim dijelovima oštećene.

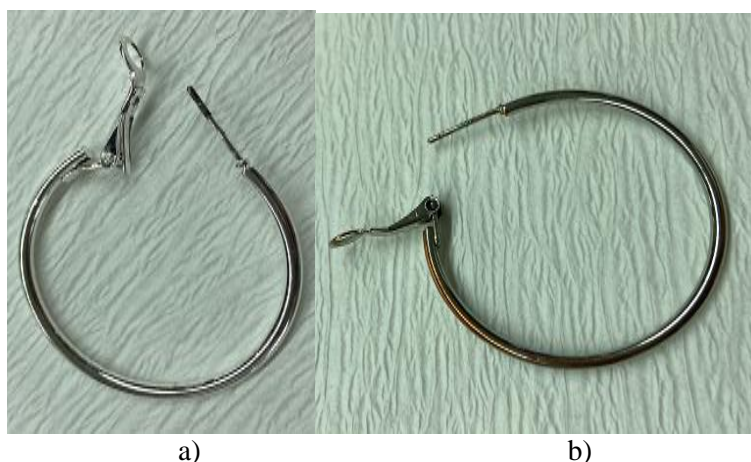
Na slici 3 prikazani su rezultati migracije iona nikla iz novog i prethodno korištenog nakita od običnog ugljičnog čelika koji je bio u kontaktu s modelnom otopinom znoja 2, 5 i 24 sata.



Slika 3. Ovisnost migracije nikla o vremenu kontakta s modelnom otopinom znoja (nova i korištena naušnica)

Figure 3. Dependence of nickel migration on contact time with a model sweat solution (new and used earring)

Iz slike 3 vidljivo je da je u svim slučajevima došlo do otpuštanja nikla i to neovisno o vremenu kontakta uzoraka sa modelnom otopinom znoja. Nove naušnice otpuštaju najviše nikla nakon 2 sata kontakta. Povećanjem vremena kontakta uzoraka sa otopinom znoja migracija nikla se smanjuje. Kod prethodno korištenih naušnica najveće otpuštanje nikla je nakon kontakta od 5 sati. Za očekivati je bilo da će se povećanjem vremena kontakta povećavati koncentracija nikla u otopini. Razlog ovakvom odstupanju može biti u činjenici da je sloj nikla koji je nanesen kao prevlaka vrlo tanak. Budući da se radi o vrlo jeftinim naušnicama postoji mogućnost da postupak nanošenja prevlake nije bio ravnomjerno raspoređen, odnosno da svaka naušnica ne sadrži istu količinu nikla. Osim toga, kod naušnica koje su prethodno korištene vizualno je zamoćeno da je na nekim mjestima sloj nikla već skinut uslijed korištenja nakita (Slika 2), što je u skladu s dobivenim rezultatima. Na slici 4 prikazane su naušnice nakon provedenog eksperimenta.



Slika 4. Izgled naušnica: a) prije i b) nakon eksperimenta, vrijeme kontakta 2 h
Figure 4. Appearance of earrings: a) before and b) after the experiment, contact time 2 h

Iz slike 4 je vidljivo da je na naušnicama tijekom eksperimenta uklonjen sjajni srebrni sloj, odnosno vanjski dio prevlake, što ukazuje na migraciju nikla u otopinu. Osim toga, primijećeno je da je na nakitu koji nije prethodno korišten prisutno oštećenje (na dijelu koji se stavlja u uho), što svakako ukazuje na neravnomjernu migraciju iona nikla, a što je i u skladu sa dobivenim rezultatima.

U tablici 3 prikazani su rezultati migracije nikla iz nakita od legiranog, tj. nehrđajućeg čelika koji je bio u kontaktu s modelnom otopinom.

Tablica 3. Rezultati migracije nikla iz nakita od nehrđajućeg čelika koji je bio u kontaktu s modelnom otopinom

Table 3. Results of nickel migration from stainless steel jewelry that was in contact with the model solution

	ELEMENT	
	novi nakit (new jewelry)	korišteni nakit (used jewelry)
VRIJEME, h (Time, h)	Ni, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Ni, $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
2	ispod granice kvantifikacije (below the quantification limit)	ispod granice kvantifikacije (below the quantification limit)
5	ispod granice kvantifikacije (below the quantification limit)	ispod granice kvantifikacije (below the quantification limit)
24	0,00018 (0.00018)	0,0031 (0.0031)

Iz tablice 3 vidljivo je da nakit od legiranog čelika otpušta nikal tek nakon 24 h kontakta s modelnom otopinom. U slučaju da je do migracije došlo i nakon kontakta od 2 i 5 h, koncentracije migrirajućih elemenata su bile toliko male, odnosno ispod granice kvantifikacije instrumenta.

Unatoč tome što su zabilježene migracije nikla iz obje vrste nakita, njegova koncentracija je relativno niska i kreće se od 0,000026 do 0,0054 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje propisano je da predmeti i proizvodi koji pri uporabi dolaze u neposredan dodir s kožom ili sluznicom, u koje spada i nakit, ne smiju otpuštati nikal u količini većoj od 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{tjedan}$. Budući da su ispitivanja provedena u periodu od 2, 5 i 24 sata, a migracije nisu velike te u većini slučajeva pokazuju tendenciju smanjenja s povećanjem vremena kontakta, za očekivati je da nakon tjedan dana nošenja navedenog nakita neće doći do migracije nikla u koncentracijama većim od 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{tjedan}$. Bez obzira na očekivano, preporuka je da se navedeni nakit koristi što manje, a ako se već i koristi da to bude u kraćim vremenskim intervalima.

Zaključci

Iz provedenih eksperimenata i dobivenih rezultata moguće je zaključiti sljedeće:

- Rezultati kemijske analize upućuju na to da je ispitivani nakit izrađen od dvije vrste čelika: ugljičnog i nehrđajućeg (legiranog) čelika. Dobiveni rezultati ukazuju da je na nakit od ugljičnog čelika nanosena prevlaka od bakra, te nakon toga prevlaka od nikla i kroma.
- Rezultati dobiveni ispitivanjem migracije iona iz nakita od oba materijala ukazuju da dolazi do migracije iona nikla.
- Migracija iona najveća je kod novih naušnica od ugljičnog čelika i to nakon kontakta s modelnom otopinom znoja u vremenu od 2 sata i smanjuje se s povećanjem vremena kontakta.
- Migracija iona kod prethodno korištenih naušnica od ugljičnog čelika ne mijenja se linearno s vremenom, najveća je nakon kontakta s modelnom otopinom u vremenu od 5 sati. Pretpostavlja se da je razlog tome oštećena i nejednako nanosena prevlaka.
- Nakit napravljen od legiranog čelika također pokazuje sklonost ka otpuštanju iona nikla, ali tek nakon kontakta od 24 sata.
- S obzirom na činjenicu da sav ispitivani nakit neovisno o vrsti materijala i vremenu kontakta otpušta ione nikla, preporuka je da se takav nakit ne koristi ili da se korištenje svede na kraći vremenski period.

Literatura

Abadin, W. S., Fay, M. (2012): Toxicological Profile for Chromium, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.

- Adie, G. U. (2020): Preliminary Study of Heavy Metals in Low-Cost Jewelry Items Available in Nigerian Markets, *J Health Pollut* 10, 1-7.
- Ashby, M. F. (1992): Materials Selection in Mechanical Design, Pergamon Press, Oxford.
- Dayan, A. D., Paine, A. J. (2001): Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000, *Hum Exp Toxicol.* 20, 439-51.
- Duarte, I., Korkes, K. L., Hafner, M. F. S., Mendonça, R. F., Lazzarini, R. (2018): Nickel, chromium and cobalt: the relevant allergens in allergic contact dermatitis. Comparative study between two periods: 1995-2002 and 2003-2015, *An Bras Dermatol.* 93, 59-62.
- Filetin, T., Kovačiček, F., Indof, J. (2002): Svojstva i primjena materijala, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet strojarstva i brodogradnje, Zagreb.
- Hostynek, J. J., Maibach, H. I., (2002): Nickel and the skin, CRC Press, London.
- Juraga, I., Šimunović, V. (2005): Polimerne prevlake: osvrt na mnogobrojne mogućnosti i način primjene, *Polimeri.* 1, 12-17.
- Oruč, M., Sunulahpašić, R. (2005): Suvremeni materijali, Fakultet za metalurgiju i materijale Zenica Univerzitet u Zenici, Zenica.
- Philips, C. (1996): Jewelry: From Antiquity to the Present, Thames&Hudson, London.
- Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti predmeta široke potrošnje, Narodne novine 125/2009.
- Royer, A., Sharman, T. (2022): Copper Toxicity, Stat Pearls Publishing, Orlando.
- Stupnišek – Lisac E. (2007): Korozija i zaštita konstrukcijskih materijala. Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb.

Migration of nickel from steel jewelry

Uršula Apalović, Anita Štrkalj*, Zoran Glavaš

University of Zagreb, Faculty of Metallurgy, Aleja narodnih heroja 3, 44000 Sisak, Croatia

*Corresponding author: strkalj@simet.unizg.hr

original scientific paper

Summary

The role of jewelry in human life has changed very little throughout history. Jewelry is mainly used to decorate the human body, but also as a status symbol or to express belonging to certain groups or cultures. However, the processes of jewelry production have advanced significantly. Research related to the influence of individual components from jewelry on human health has also progressed significantly. It is known that jewelry interacts with the skin during wear. Sweat released on the skin affects the migration of heavy metals. This phenomenon is especially pronounced with jewelry made of non-precious metals (e.g. carbon steel, etc.). In this article, the migration of nickel ions from jewelry made of different types of steel that was in contact with a model sweat solution was investigated. The obtained results showed that migration of the mentioned ions occurs. The concentration of ions that migrate due to the contact between the jewelry and the sweat model solution depends on the contact time.

Keywords: jewelry, nickel, sweat, migration

Utjecaj selenija na profil glukozinolata u klicama rikule

Azra Đulović*, Luana Grmuša, Ivica Blažević

*Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Ruđera Boškovića 35,
21000 Split, Hrvatska*

**Dopisni autor: azra@ktf-split.hr*

originalni znanstveni rad

Sažetak

U ovom istraživanju klice rikule uzgajane su hidroponski u otopinama selenija različitih koncentracija (1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm i 10 ppm). Razvoj biljaka praćen je 7 dana, a samo pri najvišoj koncentraciji selenija klice nisu rasle. Glukozinolati su izolirani u odgovarajućem desulfo-obliku te kvalitativno i kvantitativno analizirani pomoću UHPLC-DAD-MS/MS-a. Identificirana su četiri glukozinolata: 4-(metilsulfinil)butil-glukozinolat (glukorafanin), 4-(metilsulfanil)butil-glukozinolat (glukoerucin), dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata koji potječu od metionina te jedini indolni glukozinolat, 4-metoksiindol-3-ilmetil-glukozinolat (4-metoksiglukobrasicin) koji potječe od triptofana. Ukupni sadržaj glukozinolata se dodatkom različitih koncentracija selenija smanjio za 31-75 %, što odgovara smanjenju sadržaja glavnog glukozinolata, glukoerucina.

Cljučne riječi: glukozinolati, desulfoglukozinolati, selenij, UHPLC-DAD-MS/MS

Uvod

Glukozinolati su specijalizirani metaboliti čije su strukture raznolike te se neprestano otkrivaju nove. Pronađeni su u 16 različitih biljnih porodica reda Brassicales, od kojih je najznačajnija porodica Brassicaceae (kupusnjače), kojoj pripadaju kupus, brokula, cvjetača, kelj, rotkva, repa, gorušica i dr. Glukozinolati su vodotopljivi organski anioni koji dijele iste osnovne strukturne značajke koje uključuju β -D-glukopiranoznu jedinicu, *O*-sulfatiranu anomernu (*Z*)-tiohidroksimatnu funkcijsku skupinu te promjenjivi bočni lanac (Blažević i sur., 2017). Broj struktura potvrđenih modernim spektroskopskim tehnikama (MS i NMR), iznosi 90, dok je još 49 glukozinolatnih struktura djelomično okarakterizirano s vrlo varijabilnim dokazima (Blažević i sur., 2020). Na temelju različitih aminokiselinskih prekursora mogu se podijeliti u tri skupine: alifatski glukozinolati koji potječu od metionina, izoleucina, leucina, valina; arilalifatski koji potječu od fenilalanina ili tirozina te indolni od triptofana. Glukozinolati čije je postojanje s varijabilnim dokazima uključuju dva glukozinolata za koje je pretpostavljeno porijeklo od glutaminske kiseline, kao i deset alifatskih glukozinolata nepoznatog porijekla (Blažević i sur., 2020).

Posljednjih godina, mikropovrće, točnije klice postaju sve zastupljenije u pripremi domaće hrane i predmet sve većeg interesa tržišta i industrije dodataka prehrani. Klijanje je jednostavan i brz proces i ne ovisi o specifičnim klimatskim uvjetima (Galieni i sur., 2020). U usporedbi sa sjemenkama ili zrelih biljkama, poznato je da

klice sadrže male količine antinutrijenata, a bogate su aminokiselinama, masnim kiselinama i jednostavnim šećerima, kao i vrlo važnim specijaliziranim metabolitima (terpeni, fenoli, karotenoidi, glukozinolati i sl.) zbog čega se nazivaju fitokemijskim tvornicama. Biljke porodice Brassicaceae, kao što su brokula, hren, kupus, uzgajaju se kao klice i smatraju se najzdravijim vrstama zbog glukozinolata koji su prekursori izotiocijanata s važnim protuupalnim i antikancerogenim svojstvima (Miyahira i sur., 2021). Biljke reda Brassicales su poznate po sposobnosti akumulacije selenija što pruža mogući put do povećanog unosa selenija hranom, koji je često nizak ili ispod preporučenog dnevnog unosa. Ove biljke u svojim tkivima mogu tolerirati koncentracije selenija do 1000 $\mu\text{g/g}$ suhog biljnog materijala (Broadley i sur. 2006). Selenij je analog sumpora i dijeli putove unosa i asimilacije sumpora u biljkama. Unos selenata i selenita u biljci smatra se analognim onom za sulfat, odnosno sulfit. Selenat i sulfat ulaze u epidermalne stanice korijena kroz plazma membranu preko sulfatnog transportera (Gupta i Gupta, 2017, Tian i sur., 2018). Pored glukozinolata, poznati su i selenoglukozinolati koji su prvotno opisani kao spojevi u kojima atom selenija zamjenjuje atom sumpora na anomernoj poziciji. Međutim, ovakvi selenoglukozinolati enzimskom hidrolizom se razlažu na izoselenocijanate te se time ne uklapaju u definiciju glukozinolata (Blažević i sur., 2020).

Matich i sur. (2012) su identificirali razgradne produkte glukozinolata u brokuli i cvjetači zalijevanim otopinama selenija: 4-(metilseleno)butanonitril, 5-(metilseleno)pentanonitril, 3-(metilseleno)propilzotiocijanat, 4-(metilseleno)butilizotiocijanat i 5-(metilseleno)pentilizotiocijanat, a za koje je pretpostavljeno da potječu od hidrolize odgovarajućih selenoglukozinolata. LC-MS/MS analizom utvrđen je položaj atoma selenija u identificiranim selenoglukozinolatima te njegova ugradnja u strukturu preko selenometionina u metilselenilnu skupinu, a ne u sulfatnu ili β -tioglukoznu skupinu (McKenzie i sur., 2019). Ovi glukozinolati sadrže selenij u bočnom lancu su u skladu s općom strukturom glukozinolata te se nazivaju glukozinolatima izvedenim iz selenometionina (Fahey i sur., 2001, Blažević i sur., 2020). U prethodnim istraživanjima u klicama rikule identificirani su glukozinolati biosintetizirani iz metionina, glukorafanin, sinigrin, glukroerucin, te indolni glukozinolati biosintetizirani iz triptofana, glukobrasicin, 4-metoksiglukobrasicin i neoglukobrasicin (Martínez-Zamora i sur., 2022).

Cilj ovog istraživanja uključuje hidroponski uzgoj klica rikule (*Eruca vesicaria* (L.) Cav.) u otopinama selenija različitih koncentracija u svrhu njegova utjecaja na glukozinolatni profil.

Materijali i metode

Kemikalije

U ovom istraživanju za pripremu otopina selenija korišten je standard selenija 1000 $\mu\text{g/mL}$ u 2 % HNO_3 (PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, SAD). Za analizu glukozinolata korišteni su standardi glukorafanin, glukroerucin i 4-

metoksiglukobrasicin (PhytoPlan, Heidelberg, Njemačka). Mirozinaza, sulfataza, dekstran i sinigrin pribavljeni su od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD).

Uzgoj klica rikule

U eksperimentu su korištene sjemenke rikule (Kiepenkerl, Njemačka). Klince su uzgajane hidroponski tijekom sedam dana, referentna biljka u vodovodnoj vodi te ostale u otopinama selenija različitih koncentracija (1 ppm, 2,5 ppm, 5 ppm, 7,5 ppm i 10 ppm). Kljanje i rast klica praćeni su po danima te je biljni materijal posljednji dan sakupljen i liofiliziran (Labconco liofilizator, Kansas, Missouri, SAD).

Izolacija glukozinolata

U svrhu kvalitativne i kvantitativne analize, glukozinolati su izolirani ultrazvučnom ekstrakcijom iz 100 mg suhog biljnog materijala dodatkom 70 %-tnog metanola nakon inaktivacije mirozinaze (kuhanjem pri 90 °C tijekom 5 min). Dobiveni ekstrakt je podvrgnut anionskoj izmjeni u koloni punjenoj dekstranom. Kolone su isprane dodatkom metanola i 20 mM natrijevog acetata (NaOAc), nakon čega je dodano 20 µL otopine sulfataze te 50 µL NaOAc te su kolone ostavljene preko noći kako bi se omogućila enzimaska hidroliza sulfatnih estera u glukozinolatima, pri čemu nastaju nenabijeni desulfoglukozinolati. Isti se potom eluiraju s kolone dodatkom ultračiste vode. Izolirani desulfoglukozinolati analizirani su koristeći UHPLC-DAD-MS/MS.

Ekstrakcija hlapljivih razgradnih produkata glukozinolata

Za kvalitativnu analizu razgradnih produkata glukozinolata odabrane su uzgojene klince rikule tretirane otopinama selenija koncentracija 5 ppm i 7,5 ppm. Nakon autolize uz dodatak enzima mirozinaze tijekom 24 h, hlapljivi spojevi su ekstrahirani diklormetanom te analizirani koristeći GC-MS.

UHPLC-DAD-MS/MS analiza

Korišten je tekućinski kromatograf (Ultimate 3000RS, Thermo Fisher Scientific, SAD) u kombinaciji sa spektrometrom masa u tandemu (kvadrupol-kvadrupol, TSQ Quantis, Thermo Fisher Scientific, SAD) sa kolonom Hypersil GOLD dimenzija 3,0 mm × 100 mm, promjera čestica 3,0 µm (Thermo Fisher Scientific, SAD). Kao mobilna faza korištena su otapala A (50 µM NaCl u H₂O) i otapalo B (acetonitril 30:70 v/v) uz protok od 0,5 mL/min kako slijedi: 0,14 min 96 % A i 4 % B; 7,84 min 14 % A i 86 % B; 8,96 min 14 % A i 86 % B; 9,52 min 5 % A i 95 % B; 13,16 min 5 % A i 95 % B; 13,44 min 96 % A i 4 % B; 15,68 min 96 % A i 4 % B. Temperatura kolone je održavana na 15 °C, a injektirani volumen uzorka je bio 5 µL. Signali su snimani DAD detektorom pri 227 nm, a maseni spektri su snimani u pozitivnom načinu rada pri 350 °C. Za kvantizaciju desulfoglukozinolata je korištena kalibracijska

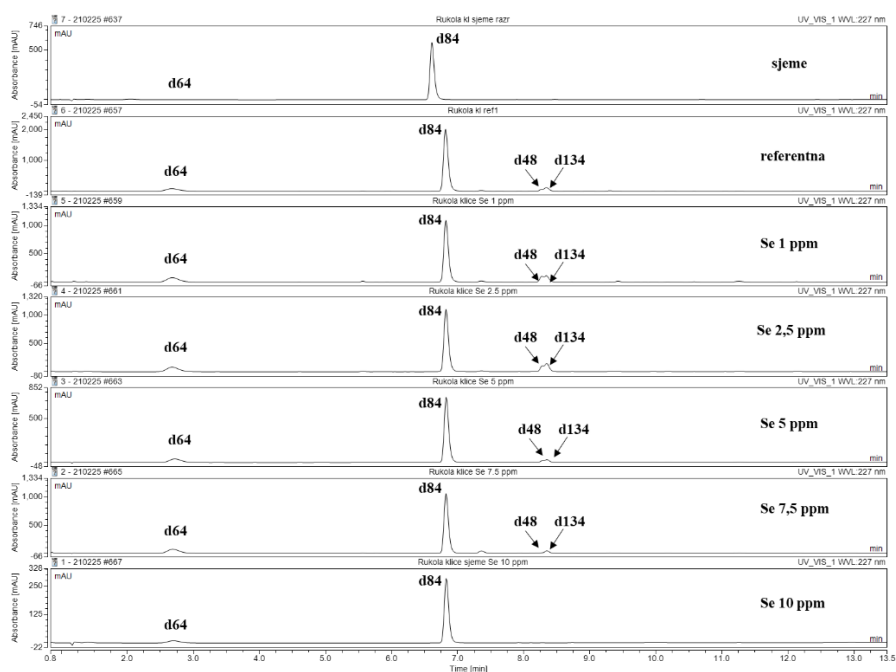
krivulja desulfosinigrina za raspon koncentracija od 13,56 do 542,50 μM . Prilikom izračuna pojedinog dobivenog desulfoglukozinolata korištene su literaturne vrijednosti za faktore odaziva: za 1,07 za glukorafanin, 1,04 za glukoerucin, 0,25 za 4-metoksiglukobrasicin (Clarke, 2010) i 1 (arbitrarno) za dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata.

GC-MS analiza

Uzorci su analizirani pomoću plinskog kromatografa sa spektrometrom masa s trostrukim kvadrupolom (8890 GC-7000D GC/TQ, Agilent Technologies, SAD) na nepolarnoj koloni HP-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , Agilent Inc., SAD). Plin nositelj je helij, protok je postavljen na 1 mL/min, temperatura injektora iznosila je 250 °C te je volumen injektiranog uzorka 1 μL . Temperatura kolone postavljena je 3 min na 60 °C, zatim zagrijavanje na 246 °C brzinom od 3°C / min te se ta temperatura zadržavala 25 min. Energija ionizacije iznosi 70 eV, temperatura izvora iona postavljena je na 200 °C, a m/z raspon je bio postavljen na 40 – 350. Spojevi su identificirani usporedbom njihovih indeksa zadržavanja (u odnosu na C8–C40 *n*-alkane za HP-5MS UI kolonu), kao i usporedbom njihovih masenih spektara s literaturom, bazama podataka Wiley 9N08 MS (Wiley, New York, NY, SAD) i NIST17 (Gaithersburg, MD, SAD).

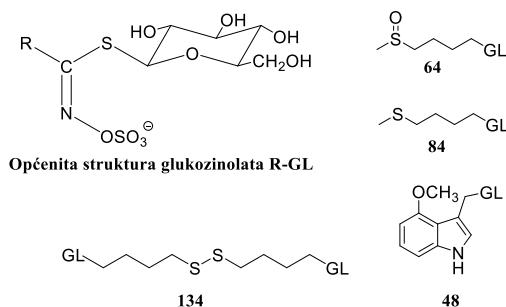
Rezultati i rasprava

Desulfoglukozinolati su izolirani iz sjemena korištenog za uzgoj te klica uzgojenih u vodovodnoj vodi (referentna) i u otopinama selenija različitih koncentracija. Kromatogrami dobiveni korištenjem UHPLC-DAD-MS/MS-a prikazani su na slici 1, čijom je analizom utvrđena prisutnost četiri glukozinolata. Identificirana su tri glukozinolata koji potječu od biosinteze metionina, 4-(metilsulfinil)butil-glukozinolat (glukorafanin, 64), 4-(metilsulfanil)butil-glukozinolat (glukoerucin, 84) i dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata (134) te jedan indolni glukozinolat koji se biosintetizira iz triptofana, 4-metoksiindol-3-ilmetil-glukozinolat (4-metoksiglukobrasicin, 48). Identifikacija se temeljila na vremenima zadržavanja, UV spektrima snimljenih pri 227 nm te MS2 spektrima desulfoglukozinolata (Grmuša, 2021; Đulović, 2022). Strukture svih identificiranih glukozinolata prikazane su na slici 2.



Slika 1. Kromatogrami desulfoglukozinolata izoliranih iz klica *Eruca vesicaria* (L.) Cav. d48 - 4-metoksigliukobrasicin, d64 - desulfoglukorafanin, d84 - desulfoglukoerucin, d134 - dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata. Brojevi odgovaraju brojevima poznatih glukozinolata u revijalnom radu Blažević i sur. 2020.

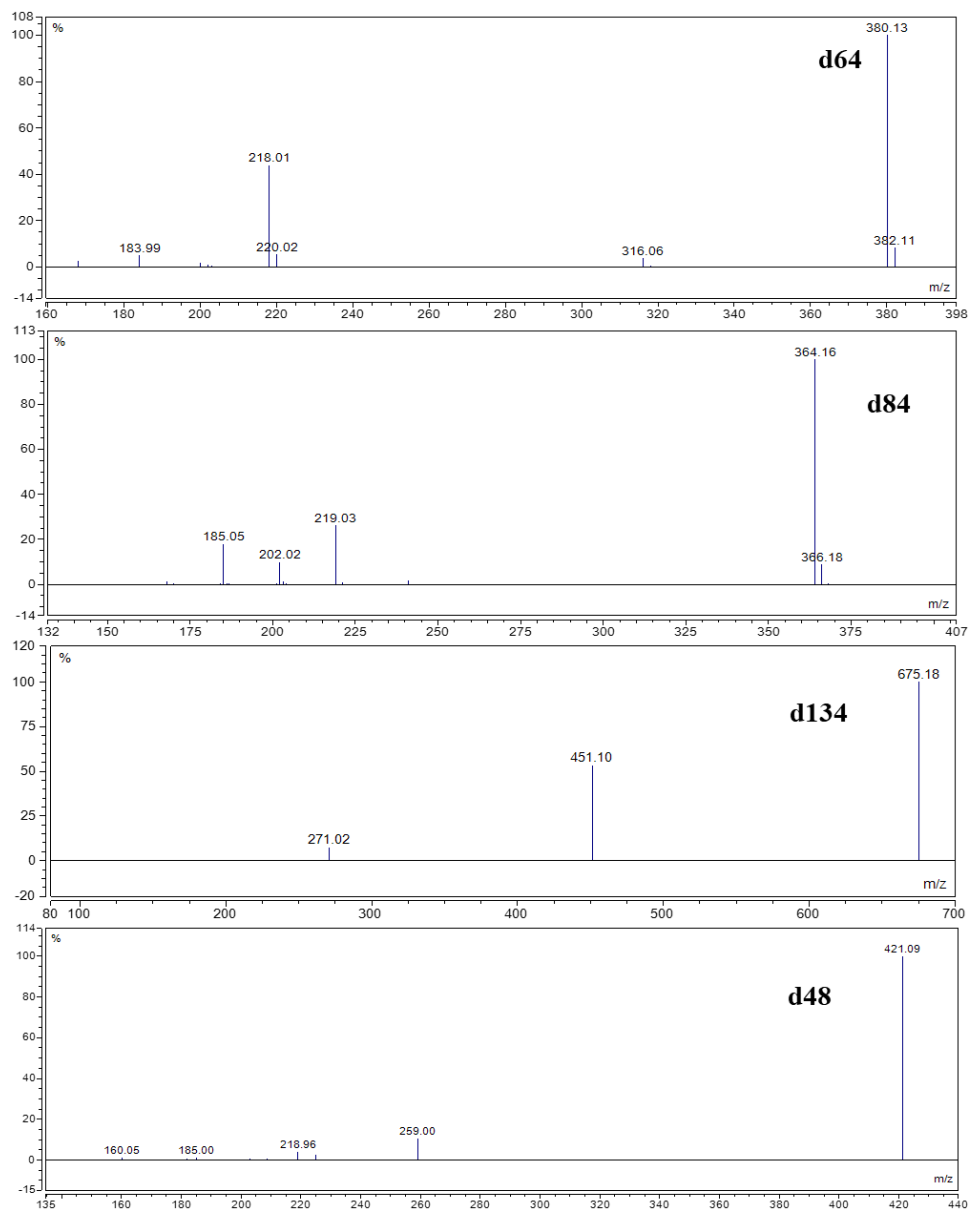
Figure 1. Chromatograms of desulfoglucosinolates isolated from *Eruca vesicaria* (L.) Cav. sprouts. d48 - desulfo-4-methoxyglucobrassicin, d64 - desulfoglucoraphanin, d84 - desulfoglukoerucin, d134 - dimeric 4-mercaptobutyl desulfoglucosinolate. Numbers are related to the numbers of known glucosinolates given in review paper by Blažević et al. 2020



Slika 2. Strukture glukozinolata identificiranih u klicama *Eruca vesicaria* (L.) Cav. Brojevi odgovaraju slici 1

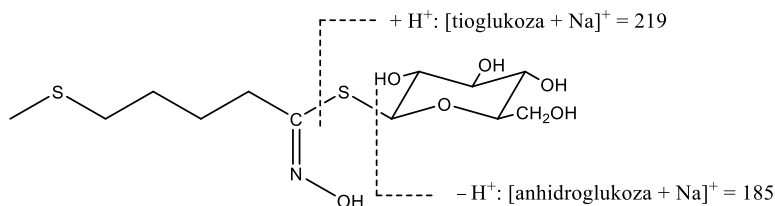
Figure 2. Structures of glucosinolates identified in *Eruca vesicaria* (L.) Cav. sprouts. The numbers correspond to Figure 1

Na slici 3 su prikazani MS2 spektri svih identificiranih desulfoglukozinolata.



Slika 3. MS2 spektri desulfoglukozinolata identificiranih u klicama *Eruca vesicaria* (L.) Cav.
Figure 3. MS2 spectra of desulfoglucosinolates identified in *Eruca vesicaria* (L.) Cav. sprouts

Natrijevi adukti dovode do prepoznatljivih fragmentacija na tioglukozi i ostatak molekule (Slika 4), pri čemu se natrij gotovo uvijek veže na tioglukozi stvarajući karakterističan fragment pri m/z 219. Fragmentacija se odvija i s druge strane sumpora u desulfoglukozinolatima što rezultira nastankom dvaju fragmenata: anhidroglukoza s natrijem pri m/z 185 te ostatni fragment s natrijem ($[M - 162 + Na]^+$).



Slika 4. Karakteristična cijepanja u MS2 spektru desulfoglukoerucina (d84)
Figure 4. Characteristic fragmentation in MS2 spectrum of desulfoglukoerucin (d84)

Za razliku od metilsulfanilnog d84, MS2 spektar natrijeva adukta ω -(metilsulfinil)alkil-desulfoglukozinolata d64 sadržava fragment m/z 316 (Slika 3) koji odgovara neutralnom gubitku od 64 Da (eliminacija CH_3SOH).

U tablici 1 je prikazan sadržaj pojedinih glukozinolata u sjemenu i uzgojenim klicama rikule.

Tablica 1. Sadržaj glukozinolata u sjemenu i uzgojenim klicama *Eruca vesicaria* (L.) Cav.
Table 1. Glucosinolate content in seeds and cultivated sprouts of *Eruca vesicaria* (L.) Cav.

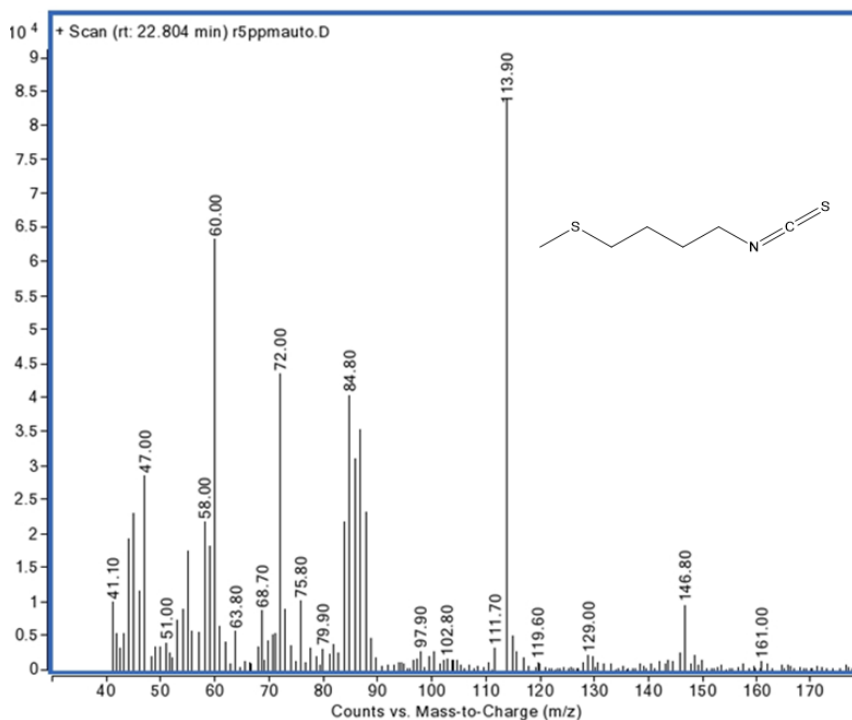
Aminokiselinski prekursor Ime glukozinolata	$[M+Na]^+$	t_R (min)	Sadržaj glukozinolata ($\mu\text{mol} / \text{g}$ suhog biljnog materijala)						
			Sjeme	Ref.	Se 1 ppm	Se 2,5 ppm	Se 5 ppm	Se 7,5 ppm	Se 10 ppm
Prekursor Met									
Glukorafanin (64)	380	2,55	3,57	9,83	6,60	8,76	4,59	7,10	1,42
Glukoerucin (84)	364	6,80	220,79	84,17	38,59	44,36	30,53	38,61	22,85
Dimer 4-merkaptobutil-glukozinolata (134)	675	8,26	n.i.	1,83	2,83	2,79	0,57	0,30	n.i.
Prekursor Trp									
4-Metoksi-glukobrasicin (48)	421	8,40	n.i.	1,13	0,93	1,55	0,34	0,47	n.i.
Ukupno			224,36	96,96	48,95	57,46	36,03	46,48	24,27

t_R – vrijeme zadržavanja, n.i. – nije identificirano, ref. - referentni uzorak. Brojevi odgovaraju brojevima poznatih glukozinolata u revijalnom radu Blažević i sur. (2020)

Glavni glukozinolat u svim uzorcima je bio glukozinolat 84. Sjeme je sadržavalo samo dva alifatska glukozinolata, 64 i vrlo velike količine 84, čak 220,79 $\mu\text{mol/g}$ suhog biljnog materijala (DW). Klice su uz navedene glukozinolate sadržavale i dimerni 134 koji je uobičajen u rikuli i doprinosi cjelokupnoj prepoznatljivosti okusa (Pasini i sur. 2011). Sadržaj jedinog indolnog glukozinolata 48 nije prelazio 1,55 $\mu\text{mol/g}$ DW. Uočava se smanjenje ukupnog sadržaja glukozinolata u svim uzorcima tretiranim otopinama selenija u odnosu na referentnu vrijednost. Klice rikule u otopini selenija koncentracije 10 ppm-a nisu se razvijale, dok je iz glukozinolatnog profila vidljivo smanjenje sadržaja 84 10 puta (Tablica 1). Prethodna istraživanja pokazala su da tretiranje selenijem smanjuje razine glukozinolata kod određenih odraslih *Brassica* vrsta (Robbins i sur., 2005; Brickman i sur., 2013; Schiavon i sur., 2016). U cvjetovima i listovima brokule dodatak selenija negativno je utjecao na ukupni sadržaj glukozinolata, osobito 64. Razine metionina i fenilalanina, aminokiselinskih prekursora glukozinolata, kao i ekspresija gena u biosintezi glukozinolata brokule, znatno su bili smanjeni dodatkom selenija što objašnjava smanjene količine glukozinolata (Tian i sur., 2018). U listovima hidroponski uzgojene odrasle rikule također je uočeno smanjenje sadržaja glukozinolata nakon biofortifikacije otopinom natrijeva selenata (Dall'Acqua i sur., 2019). Geni za koje se smatra da su uključeni u hiperakumulaciju i hipertoleranciju nisu specifični za vrstu, već su drugačije regulirani u usporedbi s vrstama koje nisu hiperakumulatori (Verbruggen i sur., 2009). Usporedne studije o hiperakumulatorima i srodnim neakumulirajućim netolerantnim vrstama identificirale su veliki niz gena koji su visoko izraženi. Geni MYB28 i MYB34 uključeni su u biosintezu alifatskih i indolnih glukozinolata. Prema prethodnim istraživanjima izloženost selenatu je smanjila transkripcijske faktore MYB čime se utjecalo na gene biosintetskog puta na način da je selenij inhibirao iste (Tian i sur., 2018). Sukladno navedenom može se pretpostaviti da je uočeni pad sadržaja glukozinolata posljedica istog utjecaja na gene biosintetskog puta.

Analizom izoliranih desulfoglukozinolata nisu uočeni desulfoselenoglukozinolati kao ni desulfoglukozinolati izvedeni iz selenometionina, koji su prethodno otkriveni u drugim Brassicaceae vrstama. Na ovo je mogao utjecati oblik selenija koji je korišten u istraživanju. Naime, selenij iz selenata se pokazao kao jedini biodostupan za asimilaciju i unos u metabolički put sumpora (Gupta i Gupta, 2017).

U prethodnim istraživanjima, glukozinolati izvedeni iz selenometionina identificirani su neizravnim metodom preko razgradnih produkata. Kako unatoč pretraživanju očekivanih masa, glukozinolati sa selenijem nisu identificirani, izolirani su i razgradni produkti u svrhu dodatne provjere. Korištenjem GC-MS-a, u hlapljivim izolatima identificiran je samo jedan razgradni produkt glukozinolata na 20,50 min, 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanat koji potječe od razgradnje 84 te nijedan razgradni produkt sa selenijem u pokrajnjem lancu.



Slika 5. MS spektar 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanata
Figure 5. MS spectrum of 4-(methylsulfanyl)butyl isothiocyanate

Na slici 5 prikazan je MS spektar 4-(metilsulfanil)butil-izotiocijanata u kojem se uočava molekulski ion M^+ (161) što odgovara tzv. dušikovom pravilu pri čemu je neparan broj dušikovih atoma prisutnih u molekuli odgovoran za neparnu masu spoja. Uočljiv je i m/z 72 koji je karakterističan fragment $[CH_2NCS]^+$ za izotiocijanate, a nastaje cijepanjem C-C veze do NCS metilsulfanil-izotiocijanata.

Zaključci

Biljke hiperakumulatori imaju razvijene fiziološke i biokemijske mehanizme koji omogućavaju toleranciju (ne)metala do visokih koncentracija. Razumijevanje ovih procesa u biljkama hiperakumulatorima mogu se iskoristiti za poboljšanje fitoremedijacije i biofortifikacije selenijem. Selenij je utjecao na metabolizam biljke, ali nije iskorišten u biosintezi glukozinolata izvedenih iz selenometionina. U biofortifikaciji je važan oblik selenija zbog transportera prisutnih u biljkama kojima se unosi u biosintezu. Smanjenje u biomasi, kao i smanjenje ukupnog sadržaja glukozinolata ukazuje na aktivaciju S-gladovanja u biljci. S obzirom da je proces

hipertolerancija/hiperakumulacija složen i uključuje različite procese, u rasponu od unosa i translokacije (ne)metala do signalizacije, potrebno je istražiti njihov utjecaj na odrasle biljke, čiji metabolizam je sposoban odgovoriti na stres.

Zahvala

Rad je nastao u okviru projekata „Biljke kao izvor sumporovih spojeva i njihova hiperakumulacija metala“, BioSMe (IP-2016-06-1316) koji financira Hrvatska zaklada za znanost te HAZU projekta „Biofortifikacija kupusnjača selenom: učinci na glukozinolate i njihove metabolite“.

Literatura

- Barickman, T.C., Kopsell, D.A., Sams, C.E. (2013): Selenium influences glucosinolate and isothiocyanates and increases sulfur uptake in *Arabidopsis thaliana* and rapid-cycling *Brassica oleracea*, *J. Agric. Food Chem.* 61, 202–209.
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Rollin, P. (2017): Glucosinolates: Novel Sources and Biological Potential. In: Reference Series in Phytochemistry, Mérillon J.M., Ramawat K. (eds.), Cham, Switzerland: Springer, pp. 3-60.
- Blažević, I., Montaut, S., Burčul, F., Olsen, C.E., Burow, M., Rollin, P., Agerbirk, N. (2020): Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants, *Phytochemistry* 169, 112100.
- Broadley, M.R., White, P.J., Bryson, R.J., Meacham, M.C., Bowen, H.C., Johnson, S.E., Hawkesford, M.J., McGrath, S.P., Zhao, F.-J., Breward, N., Harriman, M., Tucker, M. (2006): Biofortification of UK food crops with selenium, *Proc. Nutr. Soc.* 65, 169–181.
- Clarke, D.B. (2010): Glucosinolates, structures and analysis in food, *Anal. Method.* 2, 310–325.
- Dall'Acqua, S., Ertani, A., Pilon-Smits, E.A.H., Fabrega-Prats, M., Schiavon, M. (2019): Selenium biofortification differentially affects sulfur metabolism and accumulation of phytochemicals in two rocket species (*Eruca Sativa* Mill. and *Diplotaxis Tenuifolia*) grown in hydroponics, *Plants* 8 (3), 68.
- Đulović A. (2022): Strukturna raznolikost glukozinolata i njihovih razgradnih produkata u različitim biljnim porodicama, doktorska disertacija, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split.
- Fahey, J.W., Zalcman, A.T., Talalay, P. (2001): The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants, *Phytochemistry* 56, 5–51.
- Galieni, A., Falcinelli, B., Stagnari, F., Datti, A., Benincasa, P. (2020): Sprouts and microgreens: Trends, opportunities, and horizons for novel research, *Agronomy* 10, 1424.
- Grmuša, L. (2021): Utjecaj selenija na profil glukozinolata u klicama rikule, diplomski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, Split.
- Gupta, M., Gupta, S. (2017): An overview of selenium uptake, metabolism, and toxicity in plants, *Front. Plant Sci.* 7, 2074.
- Martínez-Zamora, L., Castillejo, N., Artés-Hernández, F. (2022): Ultrasounds and a postharvest photoperiod to enhance the synthesis of sulforaphane and antioxidants in rocket sprouts, *Antioxidants* 11, 1490.
- Matich, A., McKenzie, M., Lill, R., Brummell, D., McGhie, T., Chen, R., Rowan, D. (2012): Selenoglucosinolates and their metabolites produced in *Brassica* spp. fertilised with sodium selenate, *Phytochemistry* 75, 140–152.

- McKenzie, M., Matich, A., Hunter, D., Esfandiari, A., Trolove, S., Chen, R., Lill, R. (2019): Selenium application during radish (*Raphanus sativus*) plant development alters glucosinolate metabolic gene expression and results in the production of 4-(methylseleno)but-3-enyl glucosinolate, *Plants* 8, 427.
- Miyahira, R.F., Lopes, J.d.O., Antunes, A.E.C. (2021): The use of sprouts to improve the nutritional value of food products: A brief review, *Plant Foods Hum. Nutr.* 76, 143–152.
- Pasini, F., Verardo, V., Cerretani, L., Caboni, M.F. and D'Antuono, L.F. (2011): Rocket salad (*Diplotaxis* and *Eruca* spp.) sensory analysis and relation with glucosinolate and phenolic content, *J. Sci. Food Agric.* 91, 2858–2864.
- Robbins, R. J., Keck, A.-S., Banuelos, G., Finley, J.W. (2005): Cultivation conditions and selenium fertilization alter the phenolic profile, glucosinolate, and sulforaphane content of broccoli, *J. Med. Food.* 8, 204–214.
- Schiavon, M., Berto, C., Malagoli, M., Trentin, A., Sambo, P., Dall'Acqua, S., Pilon-Smits, E.A.H. (2016): Selenium biofortification in radish enhances nutritional quality via accumulation of methyl-selenocysteine and promotion of transcripts and metabolites related to glucosinolates, phenolics, and amino acids, *Front. Plant Sci.* 7, 1371.
- Tian, M., Yang, Y., Ávila, F.W., Fish, T., Yuan, H., Hui, M., Pan, S., Thannhauser, T.W., Li, L. (2018): Effects of selenium supplementation on glucosinolate biosynthesis in broccoli, *J. Agric. Food Chem.* 66 (30), 8036–8044.
- Verbruggen, N., Hermans, C., Schat, H. (2009): Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants, *New Phytol.* 181, 759–776.

Influence of selenium on glucosinolate profile in rocket sprouts

Azra Đulović*, Luana Grmuša, Ivica Blažević

*University of Split, Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35,
 21000 Split, Croatia*

**Corresponding author: azra@ktf-split.hr*

original scientific paper

Summary

In this study, rocket sprouts were grown hydroponically in selenium solutions of different concentrations (1 ppm, 2.5 ppm, 5 ppm, 7.5 ppm and 10 ppm). The development of the plants was monitored for 7 days, and only at the highest concentration of selenium, the sprouts did not grow. Glucosinolates were isolated in their desulfo form and qualitatively and quantitatively analysed by UHPLC-DAD-MS/MS. Four glucosinolates were identified: 4-(methylsulfinyl)butyl glucosinolate (glucoraphanin), 4-(methylsulfanyl)butyl glucosinolate (glucoerucin), dimeric 4-mercaptobutyl glucosinolate that originate from methionine and the only indolic glucosinolate 4-methoxyindol-3-ylmethyl glucosinolate (4-methoxyglucobrassicin) which originates from tryptophan. The total content of glucosinolates was reduced by 31–75 % with the addition of different concentrations of selenium, which corresponds to the reduced content of the main glucosinolate, glucoerucin.

Keywords: glucosinolates, desulfoglucosinolates, selenium, UHPLC-DAD-MS/MS

Influence of corrosive media on elution of titanium alloy metal ions

**Magdalena Jajčinović^{1*}, Ljerka Slokar Benić¹,
Anita Štrkalj¹, Andreja Carek²**

¹University of Zagreb, Faculty of Metallurgy, Aleja narodnih heroja, 3, 44000 Sisak, Croatia

²University of Zagreb, School of Dental Medicine, Gundulićeva, 5, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: magdalenaj@simet.unizg.hr

original scientific paper

Summary

The superior mechanical properties of titanium alloys have singled out this type of alloy as an essential material for various applications, especially in the field of biomedicine. Due to the growing demand for permanent implants, it has become necessary to accelerate the growing development research of biomaterials, and thus titanium alloys. In this research, influence of corrosive media on elution of titanium-chromium-niobium alloy of chemical composition Ti-10Cr-10Nb was investigated. It was produced by melting and casting in an electric arc furnace in argon atmosphere. The alloy was tested in three different media (physiological solution, saliva and sweet carbonated beverage) at two temperatures (37 °C and 39 °C) in the same time interval. Concentrations of eluted metal ions were determined by inductively coupled plasma spectroscopy. The surface of the samples was observed by a light microscope and Vickers hardness was measured as well. pH of corrosive media was measured before and after the elution. The obtained results showed dependence of eluted metal ions on temperature as well as on type of corrosive media.

Keywords: titanium alloys, biomedical materials, elution, properties, microstructure

Introduction

Biomaterials research has been on the rise in recent years due to the growing interest of scientists in discovering new and better materials. It is known that biomaterials can be used in different parts of the human body where they are used as stents in blood vessels, replacement implants in hips, knees, dental implants, as artificial valves in the heart, and the like. One of the main demands for the application of biomedical implants is biocompatibility, then high wear resistance, as well as corrosion resistance and good mechanical properties (Zhang, Chen, 2019; de Viteri, Fuentes, 2013; Slokar et al., 2019). Titanium and its alloys possess good mechanical properties such as high strength, good corrosion resistance and biocompatibility, relatively low modulus of elasticity that could be improved by alloying with different elements (Slokar et al., 2012; Rezaie et al., 2015).

After implantation of metallic materials into the human body metal ions are eluted as a result of the corrosion reaction in body fluids. It should be emphasized here that failure of biomedical implants occurs just due to corrosion. Titanium and its alloys

show good resistance to corrosion due to the formation of the protective surface film. Further, it was found that corrosion resistance is improved when content of niobium is between 8 and 16 %. This is because a layer is formed on the substrate, which is a sealing barrier to further corrosion (Ji et al., 2021; Revathi et al., 2016; Hansen, 2008). In this work influence of corrosive media on elution of titanium-chromium-niobium alloy Ti-10Cr-10Nb was investigated.

Materials and methods

Titanium-based alloy with addition of 10 at. % of chromium as well as niobium, Ti-10Cr-10Nb, was prepared and tested in this research. Chromium and niobium have the role of promoting and improving the β -phase. Niobium, as a non-toxic element, does not cause side effects in the human body. It is also a β -stabilizer and forms a homogeneous solid solution with titanium, while chromium reduces the melting temperature of pure titanium (Slokar et al., 2012).

The investigated alloy was produced by melting the pure elements: titanium, chromium and niobium in an electric arc furnace under a protective argon atmosphere. Re-melting was carried out four times with the aim of homogenizing the composition. The alloy was then cast into two moulds made of wax. The moulds were plate-shaped, each measuring 10 x 32 x 1 mm, made according to BS EN ISO standard 9693:2000. Each of the two plates was cut into three approximately equal parts using a diamond saw, and six samples were obtained. Samples were metallographically prepared by grinding and polishing.

Corrosive media used in this work were: physiological solution, saliva and sweet carbonated drink. The test was conducted at two different temperatures, 37 °C and 39 °C, in the same time interval lasting 6 hours. A temperature of 37 °C simulated the normal temperature of the human oral cavity, while a temperature of 39 °C represented an elevated body temperature. The desired temperature (37 °C and 39 °C) was maintained in the water bath. The procedure was carried out by pouring 50 mL of the solution into a 100 ml laboratory beaker in the order (physiological solution, saliva, sweet carbonated drink). Then, one sample each of Ti-10Cr-10Nb alloy was immersed in each of the three different media. The initial pH values of three corrosive media at 23 °C were 6.1, 8.2 and 2.8 respectively.

The concentration of eluted metal ions was determined by testing each corrosive media using an inductively coupled plasma spectroscopy, i.e. the ICP-OES method on the device Optima 2100 DV, Perkin Elmer. pH values of corrosive media were measured before and after elution using the inoLab WTW device.

Microstructure of non-immersed sample of the experimental alloy as well of surface of the samples after immersion, was observed using an Olympus GX51 light microscope with a DP70 digital camera.

Hardness of samples, before and after immersion, was determined by the Vickers method on the Mitutoyo Hardness Testing Machine with load of and 100 N during 10 seconds.

Results and discussion

Concentrations of metal ions of interest (Ti, Cr, Nb) determined by inductively coupled plasma spectroscopy in each initial media were below the quantification limit of the device.

Concentrations of metal ions of interest in solutions after the elution at two temperatures are shown in Table 1.

Table 1. Concentrations of eluted metal ions in three corrosive media

Media	T, °C	pH	$\gamma(\text{Ti})$, mg/Lcm ²	$\gamma(\text{Cr})$, mg/Lcm ²	$\gamma(\text{Nb})$, mg/Lcm ²
physiological solution	37	6.1	0.061	BQL	BQL
	39	6.1	0.067	BQL	BQL
saliva	37	8.3	0.205	0.132	BQL
	39	7.9	0.096	0.127	BQL
sweet carbonated drink	37	2.6	0.562	0.328	BQL
	39	2.8	0.439	0.162	BQL

*BQL below quantification limit

From the obtained results, it is evident that titanium is eluted from the Ti-10Cr-10Nb alloy by changing all parameters (type, pH of the media and temperature). Chromium is eluted in saliva and sweet carbonated drink, while physiological solution has no effect or is very small, since the chromium concentration values are below the limit of quantification (<0.002 mg/5 mL). Temperature and pH have no influence on the elution of niobium or the influence is very small, considering that the concentrations of niobium that has potentially passed into the solution are below the limits of quantification (<0.001 mg/5 mL). From the results given in Table 1, it is evident that titanium is eluted from the tested alloy that was in contact with a physiological solution whose pH is slightly acidic already at 37 °C (0.061 mg/Lcm²). When the temperature increases, the concentration of eluted titanium ions into the solution increases also. As already stated, it is assumed that chromium and niobium are stable in physiological solution since the concentration values of the mentioned ions in the solution after elution are below the limit of quantification.

Furthermore, it can be seen from Table 1 that titanium and chromium ions are released from the investigated alloy by the effect of the saliva as an alkaline medium. As the temperature increases, the elution of both titanium and chromium ions decreases. The results showed that saliva has no influence on the elution of niobium ions. The most corrosive effect was shown by the sweet carbonated drink, since after contact of the

alloy with this media, there was a significant elution of titanium (0.562 mg/Lcm^2 at 37°C , i.e. 0.439 mg/Lcm^2 at 39°C), but also chromium ions (0.328 mg/Lcm^2 at 37°C , or 0.162 mg/Lcm^2 at 39°C). From the obtained results arises that the mentioned alloy is not completely resistant to the effect of alkaline and highly acidic media. Despite this, the alloy is more stable in saliva and carbonated sweet drink at higher temperatures. The decrease in ion concentration with increasing temperature indicates that stable oxides have been formed and prevent further elution of titanium and chromium ions, as well as of niobium, from the experimental alloy into the corrosive media (Suito et al., 2013).

The surface of titanium can be stable thanks to the formation of an oxide layer. Nevertheless, elution of titanium ions in the media and redeposition of ions on the titanium surface occurs again. Since corrosion and elution of metals in given media ultimately means electrode reaction, it is expected that the elution process itself will be affected by the pH value of the medium. It is also expected that there will be a pH value at which the rate of elution increases (Suito et al., 2013).

Considering the measured pH values of tested media and concentrations of eluted ions, it is evident that there were no significant changes that would affect the final state of the tested Ti-10Cr-10Nb alloy.

Although the elution of titanium and chromium ions from the tested alloy occurs due to the effect of different media, the concentrations of eluted ions are very low, therefore the alloy can be considered as safe for use.

The microstructure of the initial as cast alloy after etching in Kroll's reagent was observed using a light microscope, at a magnification at 200x and is shown in Figure 1.

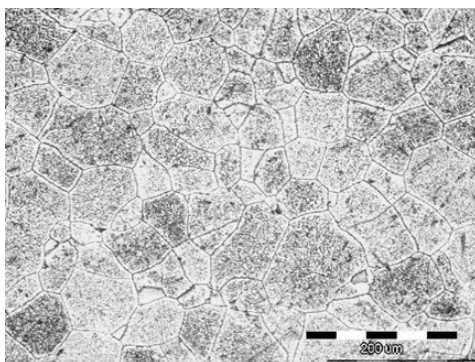


Figure 1. Light micrograph of non-immersed Ti-10Cr-10Nb alloy, 200x

It can be seen typical two-phase microstructure with large β -grains. Surface of alloy samples after immersion in each corrosive media was also observed by light microscope. Micrographs are shown in Figures 2-4.

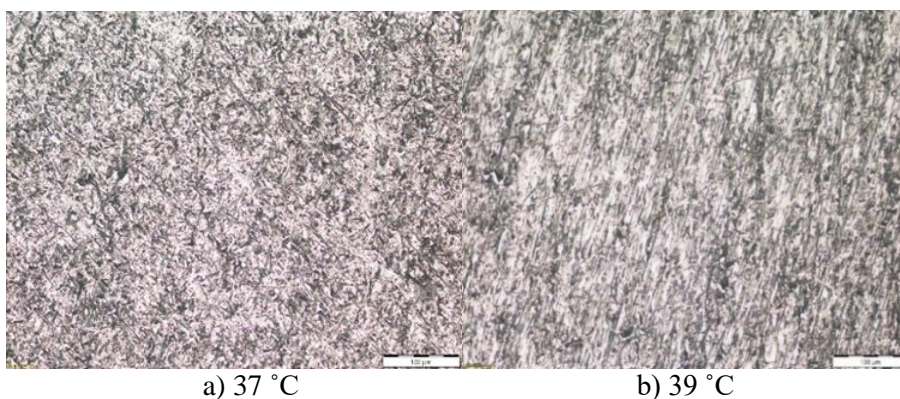


Figure 2. Light micrograph of Ti-10Cr-10Nb alloy immersed in physiological solution, 200x

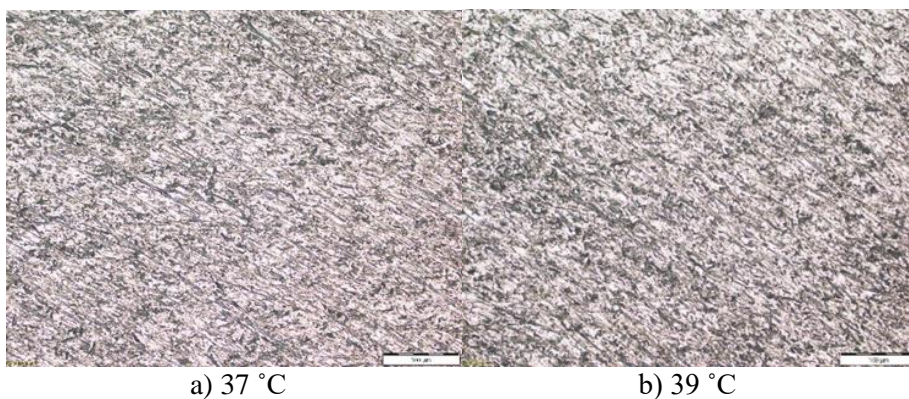


Figure 3. Light micrograph of Ti-10Cr-10Nb alloy immersed in saliva, 200x

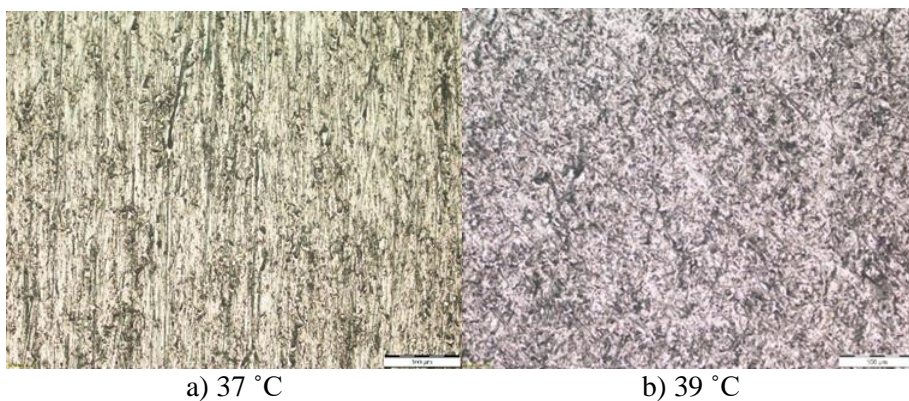


Figure 4. Light micrograph of Ti-10Cr-10Nb alloy immersed in sweet carbonated drink, 200x

These micrographs show that surface of immersed samples is covered by corrosion products, i.e. corresponding oxides. Observing this micrographs, it can be seen that with change in temperature or pH there is no significant change in surface morphology of samples.

The hardness of the samples was measured by the Vickers method at 3 different positions for each sample, and the mean value was calculated. The results are listed in Table 2.

Table 2. Hardness of the measured samples

Media	physiological solution		saliva		sweet carbonated drink	
T, °C	37	39	37	39	37	39
HV10	363	364	360	360	362	364

Hardness of non-immersed sample was 248 HV10. When this value is compared to values of immersed samples it is obvious that there was increase in hardness. Reason for this increase lies in the formation of stable oxides film on the alloy surface.

Hardness values for all six samples given in Table 2 are very similar and within a narrow range of 360-364 HV10. Of all samples, sample 2 showed the lowest hardness value. Regarding the temperature of corrosive media, it is obvious that there is no its significant effect on the hardness values. This also applies to pH effect.

Conclusions

It is evident from the results that the concentration of ions decreased with increasing temperature, which indicated that stable oxides were formed that prevent further elution of titanium and chromium ions, as well as niobium, from the alloy into the corrosive medium. The results of this research show that the process of elution of metal ions of the tested Ti-10Cr-10Nb alloy is influenced by the pH value of the medium, that is, the more acidic the medium, the greater the release of metal ions. Observing the micrograph of the alloy, it can be concluded that with a change in temperature or pH value, there is no significant change in the morphology of the surface of the samples. It is also evident that the temperature or pH had no significant influence on the hardness of the alloy. Finally, this research produced valid results that will certainly contribute to the improvement and research of new alloys applicable in dental medicine, that is, to the production of dental implants made of titanium alloys.

References

- Revathi, A., Magesh, S., Balla, V. K., Das, M., Manivasagam, G. (2016). Current advances in enhancement of wear and corrosion resistance of titanium alloys – a review, *Materials Technology* 31(12), 696–704.

- de Viteri, V. S., Fuentes, E. (2013). Titanium and Titanium Alloys as Biomaterials. In J. Gegner (Ed.), *Tribology*. IntechOpen.
- Hansen, D. C. (2008). Metal Corrosion in the Human Body: The Ultimate Bio-Corrosion Scenario, *The Electrochemical Society Interface* 17(2), 31.
- Ji, H., Zhao, M. C., Xie, B., Zhao, Y. C., Yin, D., Gao, C., Shuai, C., Atrens, A. (2021). Corrosion and antibacterial performance of novel selective-laser-melted (SLMed) Ti-xCu biomedical alloys, *Journal of Alloys and Compounds* 864, 158415.
- Rezaie, H. R., Bakhtiari, L., Öchsner, A. (2015). Introduction. In *Biomaterials and Their Applications* (pp. 1–18). Springer International Publishing.
- Slokar, L., Matković, T., Matković, P. (2012). Alloy design and property evaluation of new Ti–Cr–Nb alloys, *Materials and Design* 33, 26–30.
- Slokar, L., Štrkalj, A., Glavaš, Z. (2019). Synthesis of Ti-Zr alloy by powder metallurgy, *Engineering Review* 39(1), 115–123.
- Suito, H., Iwawaki, Y., Goto, T., Tomotake, Y., Ichikawa, T. (2013). Oral Factors Affecting Titanium Elution and Corrosion: An In Vitro Study Using Simulated Body Fluid, *PLoS ONE* 8(6), 1–7.
- Zhang, L., Chen, L. (2019). A Review on Biomedical Titanium Alloys: Recent Progress and Prospect, *Advanced Engineering Materials* 21.

Analiza posuda od nehrđajućeg čelika

Martina Marić, Anita Štrkalj*, Zoran Glavaš

Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Aleja narodnih heroja 3, 44000 Sisak, Hrvatska

**Dopisni autor: strkalj@simet.unizg.hr*

originalni znanstveni rad

Sažetak

Od prapovijesnih dana pa sve do danas posuđe je korišteno za pripremu, čuvanje i posluživanje hrane. Nekada se izrađivalo od materijala koji su pronađeni u prirodi. Danas nove tehnologije omogućavaju izradu posuda od sofisticiranih materijala koji su otporni na visoke temperature, oštećenja, osiguravaju neprianjanje hrane prilikom termičke obrade i sl. Sve navedeno ujedno donosi i određene opasnosti koje se odnose na migraciju elemenata iz posuda u hranu. U ovom radu istraživana je migracija iona As, Cd, Cr, Ni, Pb i Zn iz posuda od nehrđajućeg čelika u ovisnosti o vremenu, a uslijed kontakta posuda s hranom. Istraživanja su provedena korištenjem dvije modelne otopine koje su simulirale kiselu hranu. Otopine i posuđe bili su u kontaktu 2 h, 24 h, 4 dana i 10 dana pri sobnoj temperaturi. Dobiveni rezultati su pokazali da dolazi do migracije nikla i kroma ovisno o vremenu kontakta posuda s hranom, ali i o starosti posuda.

Koncentracije iona koji su migrirali bile su u rasponu od 0,0040 do 0,0130 mg/l za krom, odnosno od 0,0011 do 0,0372 mg/l za nikal.

Cljučne riječi: teški metali, posuđe, hrana, migracija iona

Uvod

Na samom početku civilizacije čovjek je koristio različite predmete, kao što su školjke, oklopi kornjača, kora drva, a kasnije i glinene posude koji su mu služili za skupljanje, prenošenje, održavanje, pripremu i hranjenje. U početku je konzumirao sirovu hranu, a nakon što je otkrio vatru koristio ju je za pripremu obroka. S razvojem civilizacije te činjenicom da se obroci mogu termički pripremiti, raste i interes za novim vrstama posuda. Najvažnije posude bile su zdjele i vrčevi za prenošenje vode napravljeni od drveta ili zemljanih materijala. Otkrićem i razvojem materijala, za izradu posuda koristi se staklo, porculan i metal, najčešće kositar, bakar i cink. Bogati slojevi društva koristili su posuđe od lijevane bronce, srebra i zlata. Otkrićem aluminijske zlatne posuđe se zamjenjuje aluminijskim jer se smatralo da je vrijednije od zlata. Iako se izgled posuda kroz povijest nije značajnije mijenjao, današnje posuđe je izrađeno od drugačijih materijala. Nedostatak vremena uslijed ubrzanog života, ali i narušavanje zdravlja zahtijeva i nove materijale koji omogućuju brže kuhanje, neprianjanje hrane, upotrebu manje masnoće i sl. Stoga se danas najčešće koristi posuđe izrađeno od različitih legura željeza ili aluminijske. Posuđe na bazi željeza

najčešće se izrađuje od nehrđajućih čelika koji su otporni na korozijsko djelovanje hrane (Parington, 2006).

Za izradu posuđa obično se koristi nehrđajući čelik koji ima minimalno 13 % kroma te može sadržavati i druge legirajuće elemente (najčešće nikel), odnosno koriste se austenitni čelici AISI serije 300 (najčešće 304 i 316) i feritni serije 400 (najčešće 430) (prema Međunarodnom standardu za materijale za prehrambenu opremu Nacionalne sanitarne zaklade (eng. *National Sanitation Foundation, NSF*)) (Parington, 2006, Davis 1992, Jones, 1992, Krauss, 2006).

Tehnološki proces proizvodnje posuđa od čelika započinje rezanjem lima koji je obično debljine 0,5 do 2 mm. Oblikovanje lima u posude provodi se dubokim izvlačenjem u jednoj ili više faza. Nakon toga slijede još dodatna izvlačenja pri kojima se formira rub posuđa. Posuđe dobiveno dubokim izvlačenjem prolazi proces čišćenja, odnosno odmašćivanja. U ovom koraku proizvodnje s posuđa se djelovanjem industrijskih deterdženata uklanjaju ulja zaostala iz postupka dubokog izvlačenja. Slijedi ispiranje u toploj i hladnoj vodi te poliranje. Na ovako pripremljeno posuđe zavrću se ili zavaruju ručke, vizualno se kontrolira, pakira i otprema na tržište.

Unatoč tome što se posuđe od nehrđajućeg čelika pokazalo izuzetno dobro za pripremu i čuvanje hrane, može imati negativan utjecaj na ljudsko zdravlje. Uslijed kiselog ili lužnatog djelovanja hrane legirajući elementi iz posuđa migriraju u hranu i pri tome mijenjaju izgled, organoleptička svojstva, kvalitetu i zdravstvenu ispravnost hrane. S obzirom na činjenicu da veći dio legirajućih elemenata spada u skupinu teških metala koji u povećanim količinama mogu biti štetni za zdravlje, posebnu pozornost treba obratiti na migraciju navedenih elemenata (Barnes i sur., 2006). Međutim ne postoje potpuno inertni materijali koji bi se mogli koristiti za proizvodnju, preradu, pripremu i čuvanje hrane. Stoga je bitno da migracija tvari u hranu iz materijala i predmeta koji su u dodiru s hranom ne smije biti u količinama koje ugrožavaju zdravlje ljudi (Brkić, 2007).

Upravo iz tog razloga zakonski su propisane maksimalne dozvoljene količine navedenih elemenata koje su u hranu dospjele uslijed migracije iz materijala i predmeta koji su bili u dodiru s hranom (Haberle i sur., 1997). U posuđu od nehrđajućeg čelika najčešće se prati migracija iona Pb, Cd, As, Zn, Cr i Ni zbog štetnog djelovanja na ljudski organizam. Prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN, 31/2011), za metalno posuđe, pribor, opremu i uređaje koji dolaze u dodir s hranom propisano je da „ne smiju stajanjem tijekom 1 do 24 sata pri temperaturi od 23 °C odnosno 100 °C u direktnom dodiru s destiliranom vodom ili odgovarajućom modelnom otopinom, otpuštati više od: 0,6 mg/L olova, 0,05 mg/L kadmija, 0,01 mg/L arsena, 50,0 mg/L cinka, 0,1 mg/L kroma niti više od 0,1 mg/L nikla“.

Bez obzira na to što se olovo ne dodaje kao legirajući element u čelik, kao i činjenicu da je otporno na djelovanje kiselina, ono ima vrlo veliku toksičnost te se zbog toga prati njegova mogućnost migracije iz posuđa u hranu. U ljudskom organizmu olovo dovodi do smanjenja količine hemoglobina, uzrokuje i hemolizu, negativno utječe na reproduktivni sustav, oštećenje bubrega i sl. (Makun, 2016). Kadmij se također ne dodaje čeliku radi legiranja, ali

se može koristiti kod lemljenja pojedinih dijelova posuđa. Kao i olovo, ne smatra se esencijalnim elementom. Uzrokuje dijareju i povraćanje i bitno je pratiti migraciju ovog elementa u hranu. Arsen također ne spada u skupinu esencijalnih elemenata, ali se ni ne koristi za legiranje čelika. Međutim izuzetno je otrovan kao i olovo i kadmij te se zbog sigurnosti prati njegova potencijalna migracija u hranu. U slučaju da je prisutan u hrani može izazvati kancerogene promjene u organizmu. Na opasnost olova i arsena ukazuje i činjenica da su oba metala svrstavaju u skupinu endokrinih disruptora što znači da mogu oponašati ili blokirati endogene steroidne hormone (Nordberg i sur., 2015). Cink je prisutan u većini hrane i pića. Spada u skupinu esencijalnih elemenata, ali u povećanim koncentracijama može djelovati toksično. Osobe koje u dužem vremenskom periodu u organizam unose povećane koncentracije cinka, što se između ostalog može dogoditi prilikom duže upotrebe posuđa koje otpušta cink u kontaktu s hranom, mogu imati smanjenu imunološku funkciju, manje količine „dobrog“ kolesterola i sl. (Wani, 2021). Krom i nikal predstavljaju najčešće legirajuće elemente u čeliku. Dodaju se kako bi poboljšali korozivsku otpornost čelika. Oba elementa su u niskim koncentracijama neophodni za normalno funkcioniranje ljudskog organizma, međutim u povećanim koncentracijama su izuzetno štetni. Krom je štetan samo u šesterovalentnom obliku i kao takav je svrstan u skupinu alergena (Abadin i sur., 2012). Unatoč prisutnosti kroma u čeliku, njegova migracija u hranu je vrlo mala. Razlog tome je stvaranje pasivnog filma na čeliku koji ga štiti od daljnje korozije. Vrlo male migracije kroma događaju se kada je posuđe u kontaktu sa hranom čija je pH vrijednost manja od 5. Nikal se smatra najalergenijim elementom. Osim toga njegove soli su svrstane u prvu grupu kancerogena. Nikal je element koji najčešće migrira iz posuđa u hranu, ali obično manje od 0,1 mg/kg (Ceserberg i sur., 2015, Bassioni i sur. 2015, Kamerud i sur., 2013).

U ovom radu praćena je migracija iona Pb, Cd, As, Zn, Cr i Ni iz posuđa napravljenog od nehrđajućeg čelika. Uspoređivane su koncentracije elemenata koji su migrirali iz novog i već korištenog posuđa djelovanjem dvije modelne otopine koje je simuliraju kiselu hranu.

Materijali i metode

U radu je ispitivana migracija iona Pb, Cd, As, Zn, Cr i Ni iz novog i korištenog posuđa izrađenog od nehrđajućeg čelika. Priprema i eksperiment napravljeni su u skladu s Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN, 31/2011). Posuđe je oprano u vodi zagrijanoj na 40 °C uz dodatak kućanskog tekućeg deterdženta, isplahnuto tekućom vodom i ultra čistom vodom, i osušeno na zraku. Očišćene površine za ispitivanje više nisu dodirivane.

Svi uzorci su prije i nakon izvođenja svake serije eksperimenta vizualno pregledani da bi se ustanovilo ima li oštećenje ili drugih promjena na unutrašnjosti uzoraka. Na slici 1 prikazani su uzorci posuđa koji su korišteni za izvođenje eksperimenta.



a)



b)

Slika 1. Posuđe (uzorci) izrađeno od nehrđajućeg čelika: a) novo posuđe, b) korišteno posuđe

Figure 1. Dishes (samples) made of stainless steel: a) new dishes, b) used dishes

Kao otopine koje su simulirale hranu korištene su: modelna otopina A, odnosno ultra čista voda i modelna otopina B, odnosno 4 % (v/v) otopina octene kiseline. Modelna otopina A predstavlja hranu s visokim sadržajem vode ili hranu vlažnu na površini koja ima pH vrijednost 4,5 i više, dok modelna otopina B predstavlja kiselu hranu s visokim sadržajem vode ili hranu vlažnu na površini koja ima pH vrijednost manju od 4,5. Uzorci su napunjeni modelnim otopinama do razine najmanje 1 mm od točke prelijevanja. Ekstrakcija je provedena na sobnoj temperaturi (22 ± 2 °C). Uzorci novog i starog posuđa bili su u kontaktu s modelnim otopinama 2 i 24 h, te 4 i 10 dana. Nakon isteka predviđenog vremena u modelnim otopinama koje su bile u kontaktu s posuđem spektrometrijom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES) određivani su Pb, Cd, As, Zn, Cr i Ni.

Rezultati i rasprava

U tablicama 1 i 2 prikazane su koncentracije ispitivanih iona u modelnim otopinama A i B nakon ekstrakcije, a u ovisnosti o vremenu kontakta posuđa i modelnih otopina.

Tablica 1. Koncentracija iona metala koji su migrirali tijekom ekstrakcije posuđa od nehrđajućeg čelika u modelnoj otopini A ovisno o vremenu ekstrakcije (IGK – ispod granice kvantifikacije)

Table 1. Concentration of metal ions that migrated during the extraction of stainless steel dishes in model solution A depending on the extraction time (BQL – below the quantification limit)

UZORAK (Sample)	VRIJEME KONTAKTA (Contact time)	ELEMENT, mg/l (Element, mg/l)					
		As	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
Staro posuđe (Old dishes)	2 h (2 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Staro posuđe (Old dishes)	24 h (24 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Staro posuđe (Old dishes)	4 dana (4 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0011 (0.0011)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Staro posuđe (Old dishes)	10 dana (10 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0013 (0.0013)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	2 h (2 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	24 h (24 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	4 dana (4 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	10 dana (10 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)

Iz rezultata prikazanih u tablici 1 vidljivo je da su koncentracije iona arsena, kadmija, kroma, olova i cinka u modelnoj otopini A nakon provedenog eksperimenta ispod granice kvantifikacije (IGK) instrumenta (granica kvantifikacije: As < 0,014 mg/l, Cd < 0,0002 mg/l, Pb < 0,005 mg/l, Zn < 0,001 mg/l). Stoga se može zaključiti da do migracije navedenih iona ili uopće ne dolazi ili ako i dolazi migracija je neznatna budući da su koncentracije ispitivanih iona toliko niske da ih nije bilo moguće detektirati spektrometrijom s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Staro posuđe koje je bilo u kontaktu s modelnom otopinom A otpušta nikal nakon kontakta od 4 i 10 dana. Koncentracija nikla koji je migrirao iz posuđa raste s porastom vremena kontakta. Ovakvi rezultati su očekivani budući da je posuđe od nehrđajućeg čelika legirano kromom i niklom radi poboljšanja korozijske otpornosti. Osim toga, staro posuđe je prilikom velikog broja korištenja zadobilo površinska oštećenja koja svakako pridonose migraciji navedenih iona.

Ispitivanja su pokazala da je novo posuđe postojano, odnosno da prilikom kontakta s modelnom otopinom A ne dolazi do migracije ni jednog od ispitivanih iona u vremenskim intervalima od 2 i 24 sata, te 4 i 10 dana.

Tablica 2. Koncentracija iona metala koji su migrirali tijekom ekstrakcije posuđa od nehrđajućeg čelika u modelnoj otopini B ovisno o vremenu ekstrakcije (IGK – ispod granice kvantifikacije)

Table 2. Concentration of metal ions that migrated during the extraction of stainless steel dishes in model solution B depending on the extraction time (BQL – below the quantification limit)

UZORAK (Sample)	VRIJEME KONTAKTA (Contact time)	ELEMENT mg/l (Element, mg/l)					
		As	Cd	Cr	Ni	Pb	Zn
Staro posuđe (Old dishes)	2 h (2 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0329 (0.0329)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Staro posuđe (Old dishes)	24 (24 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0164 (0.0164)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Staro posuđe (Old dishes)	4 dana (4 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0064 (0.0064)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Staro posuđe (Old dishes)	10 dana (10 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0117 (0.0117)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	2 h (2 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0040 (0.0040)	0,0211 (0.0211)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	24 h (24 h)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0080 (0.0080)	0,0226 (0.0226)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	4 dana (4 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0089 (0.0089)	0,0328 (0.0328)	IGK (BQL)	IGK (BQL)
Novo posuđe (New dishes)	10 dana (10 days)	IGK (BQL)	IGK (BQL)	0,0130 (0.0130)	0,0372 (0.0372)	IGK (BQL)	IGK (BQL)

Iz tablice 2 vidljivo je da je djelovanje modelne otopine B nešto agresivnije u odnosu na modelnu otopinu A. U ispitivanim uvjetima dolazi do otpuštanja iona nikla i kod novog i kod starog posuđa. Također dolazi i do migracije kroma, ali samo kod novog posuđa. Migracija nikla kod starog posuđa ne pokazuje linearnu promjenu, odnosno nema linearnog rasta niti linearnog pada koncentracije iona nikla, što se može pripisati oštećenosti unutrašnje strane posuđa (dio posuđa koji je bio u kontaktu s modelnom otopinom), a koje je zamijećeno već prilikom vizualnog pregleda posuđa. Koncentracija nikla i kroma kod novog posuđe raste s porastom vremena kontakta, što je i očekivano. Do migracije iona nikla i kroma iz novog posuđa dolazi zbog agresivnijeg djelovanja modelne otopine B u odnosu na modelnu otopinu A. Također, kao što je već spomenuto nikal i krom su legirajući elementi u čeliku iz kojeg je posuđe napravljeno tako da je očekivana migracija upravo ova dva elementa. Do migracije iona ostalih ispitivanih elemenata vjerojatno nije došlo ni kod novog ni kod starog posuđa, odnosno njihove vrijednosti su ispod granice kvantifikacije. Ispitivanja drugih autora pokazala su vrlo slične rezultate. (Store i sur., 2011) istraživali su migraciju iona nikla i željeza iz posuđa napravljenog od nehrđajućeg čelika koje je bilo u kontaktu s 3 % octenom kiselinom. Rezultati su pokazali da dolazi do migracije oba iona te da je migracija izraženija kada je površina posuđa grublja, odnosno oštećena. Osim toga, slične rezultate dobili su i drugi istraživači (Barnes i sur., 2006, Kamerud i sur., 2013)

U Republici Hrvatskoj zakonskom regulativom su propisni posebni uvjeti vezani uz posuđe i pribor koji dolaze u neposredan dodir s hranom, kao i maksimalna dopuštena količina pojedinih elemenata koji migriraju u hranu, i to Pravilnikom o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom (NN, 31/2011). Prema navedenom Pravilniku “posuđe, pribor, oprema i uređaji koji se koriste u pripremi, proizvodnji, mjerenju, preradi, doradi, prijevozu ili uporabi hrane ne smiju biti izrađeni od materijala koji otpušta sastojke štetne za zdravlje, ili u količinama štetnim za zdravlje, ili nepovoljno utječe na organoleptička, fizikalna ili kemijska svojstva hrane kao i na njeno održavanje u zdravstveno ispravnom stanju. Oni ne smiju biti izrađeni od materijala koji je propustljiv i porozan i koji ne štiti hranu od nepovoljnog vanjskog utjecaja.“ Osim toga, za metalno posuđe je u Pravilniku navedeno sljedeće: „...ne smije stajanjem od 1 do 24 sata pri temperaturi od 23 °C odnosno 100 °C u direktnom kontaktu s destiliranom vodom ili odgovarajućom modelnom otopinom, sve ovisno o namjeni i načinu uporabe otpuštati više od: 0,6 mg/l olova, 0,05 mg/l kadmija, 0,01 mg/l arsena, 50,0 mg/l cinka, 0,1 mg/l kroma niti više od 0,1 mg/l nikla“.

S obzirom na gore navedeno i dobivene rezultate ovog istraživanja koji ukazuju da su migracije iona arsena, olova, kadmija, žive i cinka vrlo male ili ih uopće nema, kao i činjenicu da migracije iona kroma i nikla postoje, ali se njihove vrijednosti kreću od 0,0040 do 0,0130 mg/l za krom, odnosno od 0,0011 do 0,0372 mg/l za nikal, što je ispod dozvoljenih granica propisanih Pravilnikom, može se smatrati da je navedeno posuđe sigurno za upotrebu u uvjetima u kojima je provedeno navedeno ispitivanje. Unatoč tome, preporuka je da se upotreba posuđa od nehrđajućeg čelika svede na što kraći rok budući da do migracije iona nikla i kroma ipak dolazi iako su ispod dopuštenih granica.

Zaključci

Na osnovi provedenih ispitivanja može se zaključiti da iz ispitivanog posuđa od nehrđajućeg čelika ne dolazi do migracije arsena, olova, kadmija i cinka bez obzira na vrijeme kontakta, starost posuđa kao i agresivnost modelnih otopina. Također je vidljivo da je modelna otopina B nešto agresivnija u odnosu na modelnu otopinu A budući da se tijekom 2 i 4 sata, te 4 i 10 dana i iz starog i iz novog posuđa otpušta nikal. Također iz novog posuđa se djelovanjem modelne otopine B otpušta krom. Vrijeme kontakta posuđa s modelnim otopinama nema značajnu ulogu kod starog posuđa jer se nikal otpušta u svim vremenskim intervalima i to nelinearno vjerojatno uslijed prethodnog oštećenja unutrašnjosti posuđa uslijed korištenja. Kod novog posuđa vrijeme kontakta posuđa i modelne otopine B ima utjecaja. Povećanjem vremena kontakta migrira više iona, i to iona nikla i kroma. Vrsta iona koji migriraju je u skladu s očekivanjima budući da su ioni nikla i kroma ujedno i legirajući elementi u čeliku od kojeg je izrađeno posuđe.

Literatura

- Abadin, W. S., Fay, M. (2012): Toxicological Profile for Chromium, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta.
- Barnes, K., Sinclair, R., Watson, D. (2006): Chemical Migration and Food Contact Materials, Woodhead Publishing Limited, Abington Hall, Abington.
- Bassioni, G., Korin, A., Salama, A. E. (2015): Stainless Steel as a Source of Potential Hazard due to Metal Leaching into Beverages, *Int. J. Electrochem. Sci.* 10, 3792-3802.
- Brkić, S. (2007): Nehrđajući čelici u farmaceutskoj prehrambenoj i kemijskoj industriji, priručnik, Hrvatsko društvo za materijale i tribologiju, Zagreb.
- Cederberg, D. L., Christiansen, M., Ekroth, S., Engman, J., Fabech, B., Guðjónsdóttir, K., Håland, J. T., Jónsdóttir, I., Kostaomo, P., Legind, C., Mikkelsen, B., Ólafsson, G., Svensson, K. (2015): Food contact materials – metals and alloys, Nordic guidance for authorities, industry and trade, Nordic Council of Ministers, Copenhagen.
- Davis, J. R. (1992): ASM Specialty Handbook, Stainless Steels, ASM International, Ohio.
- Haberle, V. Pongračić, J., Grgić, J. (1997): Krom, nikal i mangan u posudu od nehrđajućeg čelika i zakonski propisi, *Arh Hig Rada Toksikol.* 48, 235-239.
- Jones, R. H. (1992): Stress Corrosion Cracking, ASM International, Ohio.
- Kamerud, K. L., Hobbie, K. A., Anderson, K. A. (2013): Stainless Steel Leaches Nickel and Chromium into Foods During Cooking, *J. Agric. Food. Chem.* 61, 9495–9501
- Makun, H. (2016): Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases, IntechOpen, London.
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M. (2015): *Handbook on the Toxicology of Metals*, Elsevier, Amsterdam.
- Partington, E. (2006): Stainless Steel in the Food & Beverage Industry Euro Inox Luxembourg. Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti materijala i predmeta koji dolaze u neposredan dodir s hranom, Narodne novine 31/2011
- Stroe, S., Gutt, G., Gutt, S., Poroč-Seritan, M., Severin, T., Maiorescu, M. (2011): Research on iron and nickel migration from austenitic stainless steels into acid food products, In: Proceedings of the 22nd International DAAAM Symposium, Katalinic, B. (ed.) Vienna, Austria, 689.
- Wani, A. L., Shadab, H. A., Afza, M. (2021): Lead and zinc interactions – An influence of zinc over lead related toxic manifestations, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology.* 64, 126702.

Analysis of stainless steel dishes

Martina Marić, Anita Štrkalj*, Zoran Glavaš

University of Zagreb, Faculty of Metallurgy, Aleja narodnih heroja 3, 44000 Sisak, Croatia

**Corresponding author: strkalj@simet.unizg.hr*

original scientific paper

Summary

From prehistoric times until today, dishes have been used to prepare, store and serve food. In the past, it was made from materials found in nature. Today, new technologies make it possible to make dishes from sophisticated materials that are resistant to high temperatures, damage, ensure that food does not stick during heat treatment, and the like. All of the above also brings certain dangers related to the migration of elements from dishes into food. In this article, the migration of As, Cd, Cr, Ni, Pb and Zn ions from stainless steel dishes due to food contact was investigated as a function of contact time. The research was carried out using two model solutions that simulated acidic food. The solutions and dishes were in contact for 2 h, 24 h, 4 days and 10 days at room temperature. The obtained results showed that there is a migration of nickel and chromium, which depends on the contact time of the dishes with food, but also on the age of the dishes. The concentrations of the ions that migrated were in the range from 0.0040 to 0.0130 mg/l for chromium, and from 0.0011 to 0.0372 mg/l for nickel.

Keywords: heavy metals, dishes, food, migration of ions

Razvoj softverskih senzora za procjenu mjerenja sadržaja benzena u lakom reformatu primjenom metoda strojnog učenja

Ines Martić, Nikola Rimac, Željka Ujević Andrijić*

*Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Savska c. 16/5A, 10000, Zagreb, Hrvatska*

**Dopisni autor: zujevic@fkit.hr*

originalni znanstveni rad

Sažetak

Sve stroži ekološki i tehnički zahtjevi kvalitete proizvoda katalitičkog refominga zahtijevaju kontinuirano mjerenje sadržaja benzena u reformatu. Vođenje ovog procesa ovisi o rijetkim i dugotrajnim laboratorijskim analizama sadržaja benzena, dok su troškovi primjene i održavanja *on-line* procesnih analizatora iznimno visoki. S druge strane, moguće je na temelju lako mjerljivih veličina u procesu zaključivati o stanju teško mjerljivih veličina razvojem modela softverskih senzora. U ovome radu prikazan je razvoj modela softverskih senzora za kontinuirano praćenje sadržaja benzena u lakom reformatu. Modeli softverskih senzora razvijeni su primjenom neuronskih mreža i metodom potpornih vektora, a temelje se na realnim mjernim podacima kontinuirano praćenih varijabli te laboratorijskim mjerenjima sadržaja benzena u reformatu. Razvoj modela započeo je predobradom prikupljenih mjernih podataka te su u programskom jeziku Python izrađeni modeli softverskih senzora primjenom metoda umjetnih neuronskih mreža i potpornih vektora. Provedena je statistička analiza rezultata koja pokazuje da obje vrste modela daju visoke vrijednosti korelacija podataka modela sa realnim podacima sadržaja benzena te da se oba modela mogu primijeniti u rafinerijskom informacijskom sustavu. Primjenom softverskih senzora postiže se poboljšanje konačne kvalitete proizvoda te se mogu postići i značajne uštede u proizvodnji kao i zadovoljenja strogih propisa zaštite okoliša.

Ključne riječi: softverski senzor, neuronske mreže, benzen, reformat, metoda potpornih vektora

Uvod

U mnogim procesima i postrojenjima teško je kontinuirano i pouzdano mjeriti ključne procesne veličine i svojstva proizvoda zbog čega se javlja potreba za korištenjem inteligentnih algoritama pomoću kojih bi se pratile različite procesne veličine. Zahvaljujući softverskim sensorima moguće je na temelju lako mjerljivih procesnih veličina, kao što su temperatura, tlak i protok, zaključivati o stanju teško mjerljivih veličina određivanjem njihovih funkcijskih veza (Ujević Andrijić i sur., 2018).

Softverski senzori omogućuju procesnim inženjerima da procijene veličine i stanja koja se ne mogu mjeriti u stvarnom vremenu na postrojenju te ih koristiti za kvalitetnije vođenje procesa. Problem nemjerenja svojstava produkata posljedica je nekoliko razloga poput toga da postrojenja nemaju dovoljno instaliranih *online* procesnih analizatora jer njihova

instalacija kao i održavanje zahtijevaju visoka financijska ulaganja ili uopće ne postoji mogućnost izravnog mjerenja nekih veličina poput konverzija kemijske reakcije. U kemijskom je inženjerstvu stoga vrlo poželjno korištenje softverskih senzora i to u području nadzora i vođenja procesa, kod otkrivanja pogrešaka i dijagnostike procesa, kod instrumentacije i mjerenja gdje se reducira potreba za mjernom opremom i zamjenjuju mjerni uređaji (Fortuna i sur., 2007). U literaturi se mogu naći primjene softverskih senzora u različitim postrojenjima procesne industrije, a u ovom radu se analizira njihova primjena u rafinerijskom postrojenju.

Razvoj modela softverskih senzora temeljen na fundamentalnim zakonima za rafinerijske procese može postati računalno previše složen te se češće primjenjuju metode modeliranja temeljene na podacima. Najpopularnije tehnike modeliranja softverskih senzora koje se temelje na podacima su: analiza glavnih komponenti (PCA) u kombinaciji s regresijskim modelom (Jingjing i sur., 2021), metoda parcijalnih najmanjih kvadrata (PLS), umjetne neuronske mreže (Kurniawan i sur., 2022), neuro-neizrastiti sustavi i metode potpornih vektora (Chitralkha i Shah, 2010, Sharma i sur., 2018).

U rafinerijama nafte neophodno je kontinuirano pratiti sadržaj benzena u katalitičkom reformatu zbog ekoloških i tehničkih razloga. Zbog toksičnosti benzena, zakon o zaštiti zraka ograničava sadržaj benzena u gorivima na maksimalno 1 vol % (NN 131/2021). Čak i s tehničkog gledišta, iako ima vrlo visok oktanski broj i visoku energetska vrijednost, benzen nije poželjna komponenta u lakom reformatu, odnosno daljnjoj sirovini za proces izomerizacije, jer se hidrira u cikloheksan, koji je nepoželjan zbog niskog oktanskog broja (Cerić, 2006). Cilj je stoga razviti model za kontinuiranu procjenu sadržaja benzena u lakom reformatu u rafinerijskom postrojenju frakcionacije. U ovom procesu u rafinerijskom postrojenju ulazne varijable modela, odnosno veličine stanja, se mjere kontinuirano, dok se izlazna varijabla modela, tj. sadržaj benzena u lakom reformatu, određuje pomoću procesnog analizatora svakih 8 sati. Primjenom razvijenih modela softverskih senzora moguće je dobiti kontinuiranu informaciju o vrijednosti sadržaja benzena u lakom reformatu.

Materijali i metode

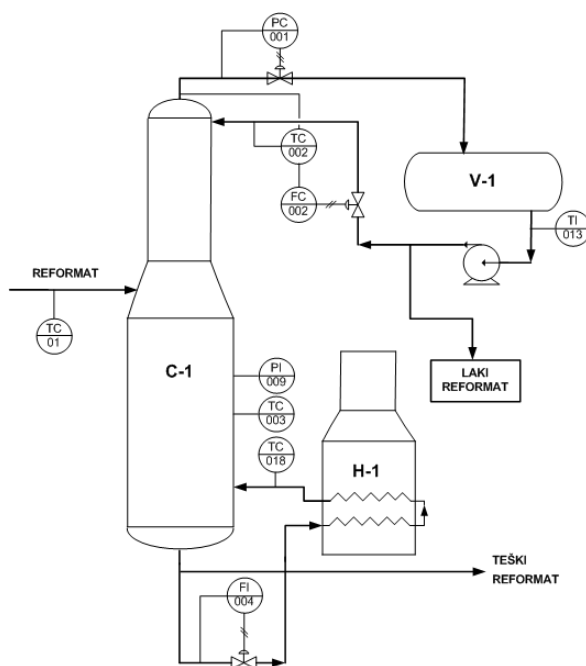
Prikupljanje i predobrada podataka

Iz baze podataka postrojenja prikupljeni su kontinuirano mjereni podaci za procjenu sadržaja benzena u lakom reformatu. Preuzeti podaci sadrže podatke ulaznih varijabli i izlazne varijable izmjerenih u periodu od 17 mjeseci. Uzeto je približno 170.000 podataka s vremenom uzorkovanja od 5 minuta za kontinuirano mjerene ulazne varijable (prikazane u tablici 1), a za izlaznu varijablu (sadržaj benzena u lakom reformatu) prikupljeno je 1380 podataka s vremenom uzorkovanja 8 sati.

Važno je napomenuti da s obzirom da se radi o proizvodnom postrojenju, ulazno/izlazni signali se mjere za vrijeme uobičajenog rada procesa uz korištenje "prirodnih" ispitnih signala, tj. ne koriste se dodatni ili "umjetni" poremećaji kako se ne bi utjecalo na kvalitetu proizvoda. Za što bolju uspješnost modela potrebno je stoga

prikupiti podatke iz što dužeg vremenskog razdoblja rada postrojenja, obuhvaćajući pri tom što je moguće više različitih režima rada.

Nakon prikupljanja podataka sa postrojenja uslijedila je njihova predobrada. Predobrada podataka obuhvatila je vremensko usklađivanje mjerenja ulaznih varijabli sa izlaznom varijablom čime je postignut jednak broj uzoraka svih varijabli, uklanjanje prvih 240 podataka koji su predstavljali početak procesa do postizanja stabilnog stanja (engl. *start-up*), detekciju i uklanjanje ekstremnih vrijednosti (engl. *outliers*) te određivanje korelacija između ulaznih varijabli i izlazne varijable. Otkrivanje ekstremnih vrijednosti se provelo uporabom 3σ metode te vizualnom provjerom budući da vrijednosti koje 3σ detektira kao ekstremne mogu predstavljati dio poremećaja u procesu uslijed dinamičkog vladanja procesa te je takva informacija važna za izradu modela. Korelacija između potencijalnih ulaznih varijabli i izlazne varijable određena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije te je u konačnici odabrano 8 ulaznih varijabli koje najviše utječu na izlaznu. Odabrane ulazne varijable, odnosno one koje utječu na sadržaj benzena u lakom reformatu su: protok ulaznog reformata, temperatura ulaza u kolonu C-1, temperatura na vrhu, sredini i dnu kolone C-1, temperatura izlaza iz peći, temperatura izlaza iz V-1, tlak na sredini i vrhu kolone C-1, ukupni protok kroz peć, protok refluksa iz V-1, te protok lakog reformata. Sve spomenute varijable prikazane su na slici 1, na kojoj je prikazano postrojenje frakcionacije lakog reformata.



Slika 1. Postrojenje frakcionacije lakog reformata
Figure 1. Light reformate fractionation plant

Metodika razvoja modela neuronske mreže

Neuronska mreža je niz povezanih neurona koji međusobno komuniciraju i izmjenjuju informacije. Ideja umjetne neuronske mreže zasniva se na tome da postoje različite težine informacija koje se šalju neuronima te se tim načelom informacije razdvajaju prema važnosti. Uvođenjem aktivacijske funkcije, težine se iterativno prilagođavaju kako bi algoritam postigao željeno rješenje. Ako je signal neurona dovoljno jak da prijeđe određenu graničnu vrijednost (engl. *threshold*), informacija će se slati dalje do idućeg neurona (Rosenblat, 1958).

Struktura umjetne neuronske mreže sastoji se od neurona koji su smješteni u slojeve: ulazni, skriveni i izlazni sloj. Neuron i informacije povezani su vezama koje ovise o težini informacije koju prenose. Aktivacijska funkcija svakog neurona predstavlja se kao suma ulaznih vrijednosti i težina, a matematički je izražena izrazom:

$$a_j = \sum x_i \omega_{ij} + \theta_{ji} \quad (1)$$

gdje je i broj neurona u prethodnom sloju, θ_{ji} prag (engl. *bias*) neurona, a x vrijednost izlaza prošlog neurona. Mreža koja iz skupa ulaznih vrijednosti propagira rezultate do izlaznog sloja naziva se unaprijedna neuronska mreža. Problem učenja mreže leži u podešavanju vrijednosti težina koje će davati odgovarajuće izlazne vrijednosti neurona. Učenje neuronske mreže postavljanjem težina provodi se raznim algoritmima od kojih je najkorišteniji algoritam unatragne propagacije (engl. *backpropagation*). Algoritam traži minimalnu pogrešku sustava te optimalne vrijednosti težina. Pogreška sustava se može izraziti kao srednja kvadratna pogreška (engl. *Mean Square Error, MSE*) prema izrazu:

$$MSE = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (2)$$

Promatrani podaci dijele se na skup za učenje i skup za vrednovanje neuronskih mreža. U postupku vrednovanja mreža uzima ulazne vrijednosti, određuje izlaze za zadane ulaze te se dobivene vrijednosti izlaza uspoređuju s pravim vrijednostima na temelju pogreške *MSE*. Sukladnost dobivenih rješenja s pravim vrijednostima izlazne varijable dokaz je kvalitete neuronske mreže. Set podataka za učenje mora biti dovoljno velik kako bi se osiguralo kvalitetno učenje mreže s različitim vrijednostima ulaza. S druge strane, set podataka za vrednovanje mreže također mora biti dovoljno velik kako bi se provelo ispravno vrednovanje mreže (Lek i sur. 2008).

Prilikom razvoja modela neuronske mreže skup podataka podijeljen je na tri dijela: skup za učenje, skup za testiranje te skup za vrednovanje modela. Skup za učenje iznosio je 80 % podataka dok je skup za vrednovanje iznosio 20 % podataka. Skup za vrednovanje modela je iznosio 20 % od skupa za učenje.

Razvijene su neuronske mreže s jednim skrivenim slojem i s dva skrivena sloja te je provedeno manualno i *k-fold* vrednovanje modela. Manualno vrednovanje modela je

postupak kojim se cjelokupni skup podataka ulaznih i izlaznih varijabli dijeli na skup za učenje i skup za vrednovanje u proizvoljnom omjeru. *K-fold* vrednovanje modela je postupak kojim se cjelokupni skup podataka ulaznih i izlaznih vrijednosti dijeli na *k* jednakih podskupova. Postupak vrednovanja ponavlja se *k* puta pri čemu se svaki od skupova jednom koristi kao skup za vrednovanje dok je ostalih *k*-1 puta korišten kao skup za učenje. Ukupna pogreška modela se računa kao prosječna pogreška svih *k* iteracija (Lyu i sur., 2022).

Prilikom razvoja modela s jednim skrivenim slojem i manualnim vrednovanjem korištene su *tanh*, *sigmoid*, *relu* i *elu* aktivacijske funkcije za skriveni sloj mreže. Najpogodnija aktivacijska funkcija odabrana je na osnovu preliminarnog računalnog eksperimenta kojim je za svaku od aktivacijskih funkcija napravljen grafički prikaz ovisnosti srednje kvadratne pogreške i korelacijskog faktora o broju neurona. Broj neurona u skrivenom sloju je varirao od 1 do 200. Kriterij odabira najbolje aktivacijske funkcije mreže je maksimalan koeficijent korelacije, a srednja kvadratna pogreška modela neuronske mreže.

Pri razvoju modela neuronske mreže korišteni su algoritmi optimizacije koji se temelje na algoritmu gradijentnog spusta kao što su *Adam*, *Nadam*, *Adadelta* i *RMSprop* od kojih se algoritam *Nadam* pokazao najpovoljnijim.

Prilikom razvoja modela s jednim skrivenim slojem i *k-fold* vrednovanjem kao i modela s dva skrivena sloja dalje je korištena samo *tanh* aktivacijska funkcija za skriveni sloj. Maksimalno ispitivani broj neurona po skrivenom sloju je iznosio 20. Odabrana je po jedna najbolja mreža iz svake skupine modela te je u konačnici odabrana ukupna najbolja mreža.

Usporedba razvijenih modela provedena je na temelju iznosa srednje kvadratne pogreške na skupu za učenje i skupu za vrednovanje te na temelju Pearsonovog koeficijenta korelacije između podataka izračunatih modelom i stvarnih podataka. Najbolji modeli dodatno su vrednovani analizom reziduala putem histograma pogreške.

Metodika razvoja modela potpornih vektora

Metoda potpornih vektora (engl. *Support Vector Machine*, SVM) je metoda strojnog učenja namijenjena rješavanju klasifikacijskih i regresijskih problema. SVM rješava probleme binarne klasifikacije definirajući ih kao probleme konveksne optimizacije. Generalizacija SVM na SVR (engl. *Support Vector Regression*) postiže se uvođenjem ε -intenzivnog područja oko funkcije (Slika 2), koje se naziva ε -cijev (engl. *ε -tube*). Ova tzv. cijev omogućava rješavanje problema optimizacije na način da se traži područje koje najbolje opisuje kontinuiranu funkciju, dok se istovremeno balansira složenost modela i vrijednost pogreške predviđanja. Hiperravnina je definirana točkama potpornih vektora podataka skupa za učenje koje leže izvan granica ε -cijevi. Kao i u SVM-u, potporni vektori u SVR-u su najutjecajnije točke koje utječu na oblik ε -cijevi (Awad, i Khanna, 2015). Nelinearni regresijski problem može se procijeniti linearnom aproksimacijom prema jednadžbi (3):

$$f(\mathbf{x}) = (\mathbf{w} \cdot \Phi(\mathbf{x})) + b \quad (3)$$

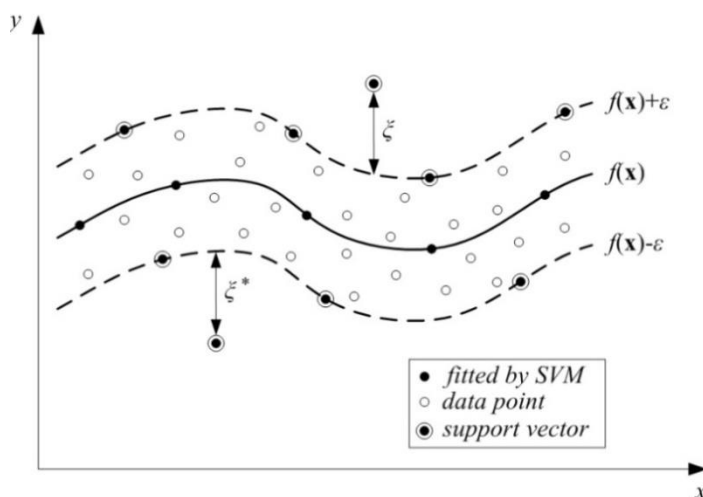
Korištenjem ε -intenzivne funkcije cilja i uvođenjem regularizacijske konstante C , problem optimizacije iz jednadžbe (3) može se napisati jednadžbom (4):

$$\min \frac{1}{2} \|\mathbf{w}\|^2 + C \sum_{i=1}^n (\zeta_i + \zeta_i^*) \quad (4)$$

uz ograničenja:

$$\begin{aligned} (\mathbf{w} \cdot x_i + b) - y_i &\leq \varepsilon + \zeta_i \\ y_i - (\mathbf{w} \cdot x_i + b) &\leq \varepsilon + \zeta_i^* \\ \zeta_i, \zeta_i^* &\geq 0; \quad i = 1, 2, \dots, n \end{aligned} \quad (5)$$

Gdje je C regularizacijska konstanta, tj. penalizirajući faktor složenosti modela izražen kao $\|\mathbf{w}\|^2$, dok je ε parametar preciznosti koji predstavlja radijus ε -cijevi smještene oko regresijske funkcije $f(x)$ (Herceg i sur., 2020, Sharma i sur., 2018) (Slika 2).



Slika 2. Grafička interpretacija SVR metode
Figure 2. Graphical interpretation of the SVR method

Formulacija $C \sum_{i=1}^n (\zeta_i + \zeta_i^*)$ iz jednadžbe (4) predstavlja pogrešku predviđanja korištenjem varijabli ζ i ζ^* , koje su mjera odstupanja izvan područja $[\varepsilon, -\varepsilon]$. Područje od $f(x) + \varepsilon$ do $f(x) - \varepsilon$ predstavlja ε -intenzivno područje i funkcija cilja u tom području poprima nultu vrijednost. Dakle, SVR model sadrži dva parametra, C i ε koji kontroliraju točnost predviđanja i sposobnost generalizacije SVR modela. Parametar C definira veličinu do koje se toleriraju pogreške predviđanja izvan ε -zone. Ako je veličina C prevelika, tada se minimizira samo pogreška predviđanja bez minimiziranja složenosti modela. S druge strane, ako je C parametar premalen, model bi mogao biti prejednostavan. Smanjenjem iznosa parametra ε raste broj podataka skupa za učenje označenih kao potporni vektori čime se povećava složenost modela. Za niže vrijednosti parametra ε postoji rizik od pretreniranja modela i loše generalizacije podataka. S druge strane, za velike vrijednosti ε može se postići relativno bolja generalizacija, uz rizik dobivanja velike pogreške predviđanja (Herceg i sur., 2020, Zhang i sur., 2014).

$$f(x) = \sum_{i=1}^n (a - a^*) K(x, x_i) + b \quad (6)$$

Jednadžba (6) predstavlja rješenje optimizacijskog problema izraženog u jednadžbi (4), gdje $K(x, x_i)$ predstavlja *kernel* funkciju, a a, a^* su Lagrangeovi množitelji. Postoji više različitih *kernel* funkcija kao što su linearna, polinomna, radijalna bazna funkcija (RBF). *Kernel* je funkcija kojom se podaci prenose iz prostora niže dimenzije u prostor više dimenzije. Ono što *kernel* omogućava jest da bilo koja ravnina u trodimenzionalnom prostoru presijeca dvodimenzionalnu ravninu koja sadrži podatke u zakrivljenoj, a ne ravnoj liniji. Najčešće korištena funkcija je radijalna bazna funkcija kojom se formulacija $K(x, x_i)$ izražava kao:

$$K(x, x_i) = \exp(-\gamma \|x - x_i\|^2) \quad (7)$$

gdje je γ parametar RB funkcije. *Gamma* je skalar koji definira koliki utjecaj ima jedan podatak iz skupa za učenje što znači da se može kontrolirati utjecaj pojedinih točaka na cjelokupni algoritam. Što je vrijednost *gamma* veća, druge točke moraju biti bliže da bi utjecale na model. Što je veći γ , to je model složeniji i obrnuto (Herceg i sur., 2020).

Prilikom razvoja modela potpornih vektora skup podataka podijeljen je na dva dijela: skup za razvoj modela te skup za vrednovanje modela. Skup za razvoj modela iznosio je 80 % podataka dok je skup za vrednovanje iznosio 20 % podataka. U ovom radu hiperparametri SVR modela C, ε i γ optimirani su uz pomoć *GridSearchCV* algoritma

(Zhang i sur., 2014). Pored primjene *GridSearchCV* algoritma koji koristi *k-fold* unakrsno vrednovanje modela, vrednovanje modela provedena je i manualno.

Kao i kod modela neuronske mreže modeli potpornih vektora uspoređivani su na temelju srednje kvadratne pogreške na skupu za učenje i vrednovanje modela te na temelju Pearsonovog koeficijenta korelacije između podataka izračunatih modelom i stvarnih podataka, dok su najbolji modeli dodatno vrednovani grafičkom analizom reziduala modela.

Rezultati i rasprava

S postrojenja su prikupljeni podaci od 12 potencijalnih ulaznih varijabli s vremenom uzorkovanja 5 minuta te jedne izlazne varijable, odnosno sadržaja benzena u lakom reformatu, s vremenom uzorkovanja 8 sati. Prikupljeno je približno 170.000 podataka za ulazne varijable, a za izlaznu varijablu 1381 podatak. Usklađivanjem vremena mjerenja ulaznih varijabli sa izlaznom varijablom dobiven je skup podataka od 1381 uzorka. Uklanjanjem prvih 240 podataka koji su predstavljali ustaljivanje procesnih uvjeta preostao je 1141 uzorak od svake varijable. Da bi podaci ulaznih varijabli bili valjani za razvoj modela, trebaju se vremenski uskladiti s vremenom laboratorijskog određivanja sadržaja benzena u lakom reformatu. Iz podataka su dalje uklonjene nedostajuće vrijednosti (engl. *missing data*) dok su pravilom 3σ detektirane ekstremne vrijednosti. Vrijednosti poput 0 i pravih ekstremnih vrijednosti su uklonjene, dok je za jednu ulaznu varijablu, tj. temperaturu izlaza iz V-1, uočen klaster od 110 neprikladnih podataka. Ta skupina odstupajućih podataka bez fizikalnog značenja je deklarirana kao neprikladna za razvoj modela jer na drugim ulaznim varijablama u tom periodu nije uočeno toliko odstupanje od uobičajenog procesnog režima. Taj klaster podataka je stoga uklonjen i nanovo rekreiran razvojem manje neuronske mreže trenirane uz pomoć tlaka na sredini kolone C-1 i protoka refluksa iz V-1. Kreiranom neuronskom mrežom za kompletiranje podataka temperature izlaza iz V-1 sačuvani su podaci za ostale ulazne varijable koje u tom kritičnom periodu poremećaja procesa prenose bitnu informaciju o količini benzena u lakom reformatu. Vizualnom analizom dodatno su pregledane detektirane ekstremne vrijednosti kako bi se prije njihovog uklanjanja izuzeli uzorci koji predstavljaju dinamičko vladanje procesa.

Korelacija između ulaznih varijabli i izlazne varijable određena je pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije. Broj ulaznih veličina mora biti dovoljno velik da obuhvati bitne informacije od svih utjecajnih veličina, ali ne i prevelik zbog potrebe jednostavnosti modela. Na temelju dobivenih korelacija, neke od ulaznih varijabli nisu razmatrane kod daljnjeg razvoja modela. Osam ulaznih varijabli koje su imale izvjesnu korelaciju (iznad 0,1) sa izlazom kao i one koje su međusobno imale nisku korelaciju su odabrane za daljnji razvoj modela (Tablica 1).

Tablica 1. Ulazne varijable odabrane za razvoj modela i njihov koeficijent korelacije s izlaznom varijablom

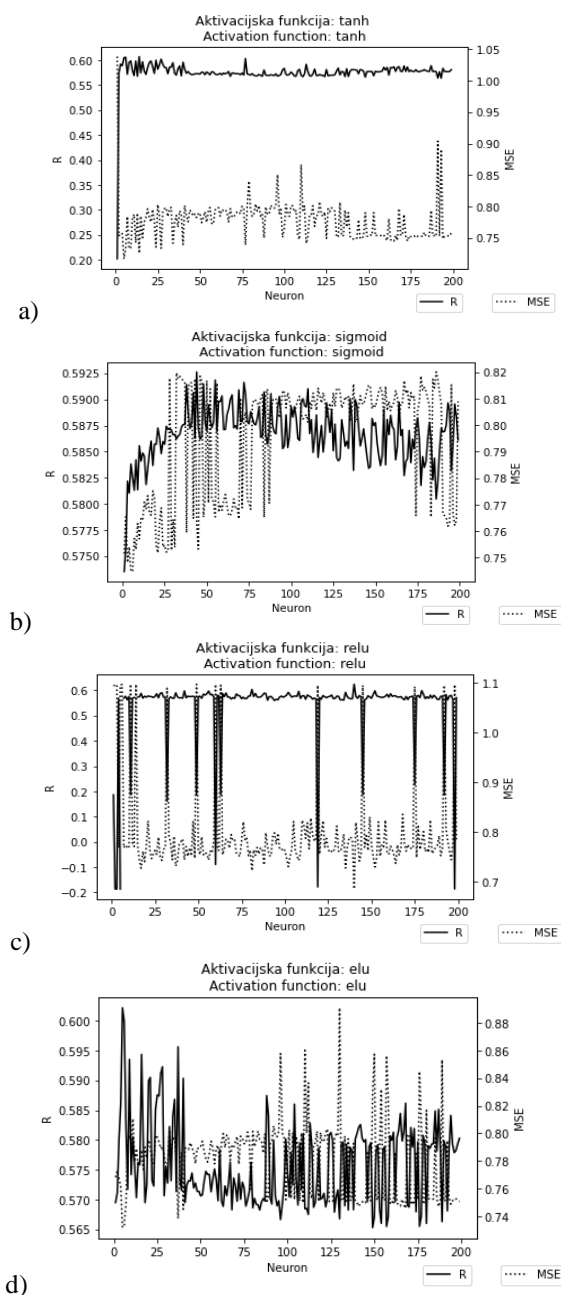
Table 1. Input variables selected for model development and their correlation coefficient with the output variable

Varijable	Pearsonov koeficijent	Poredak
Protok ulaznog reformata	0.179	4
Temperatura na vrhu kolone	0.238	3
Temperatura sredina kolone	0.540	1
Tlak sredina	0.134	7
Temperatura dna izlaz	0.242	2
Temperatura izlaza iz V-1	0.165	5
Protok - refluks iz V-1	0.103	8
Protok - lakog reformata	0.159	6

Razvoj modela neuronskih mreža

Modeli su razvijani uz pomoć programskog jezika Python (verzija *Python 3.9.7*) i njegove distribucije *Anaconda* (verzija *Anaconda Navigator 2.1.1*). Preliminarno je razvijeno preko 1000 modela neuronskih mreža čija se struktura razlikovala s obzirom na hiperparametre modela neuronskih mreža kao što su broj skrivenih slojeva, broj neurona u skrivenim slojevima, postupak vrednovanja modela te korištene aktivacijske funkcije.

Prvo se pristupilo razvoju modela neuronskih mreža s jednim skrivenim slojem i ručnim vrednovanjem. Cjelokupni podaci podijeljeni su na skup za učenje i skup za vrednovanje u omjeru 0.8:0.2. Za svaku od odabranih aktivacijskih funkcija (*tanh*, *sigmoid*, *relu* i *elu*) proveden je računalni eksperiment kojim je određen broj neurona u skrivenom sloju pri kojemu se postiže maksimalan korelacijski faktor i minimalna srednja kvadratna pogreška na skupu podataka za učenje. Osim korelacijskog faktora i srednje kvadratne pogreške, na uspješnost modela utječe i međusobna usklađenost korelacijskih faktora na skupu za učenje i skupu za vrednovanje te na cjelokupnim podacima, jer model sa najvećom korelacijom u skupu za učenje možda neće dati i najveću korelaciju na skupu za vrednovanje i na cjelokupnim podacima. Također, prilikom određivanja uspješnosti modela bitno je pratiti i vrijednost srednje kvadratne pogreške na svim skupovima podataka. Rezultati utjecaja broja neurona u skrivenom sloju na točnost modela prikazani su grafički na slici 3.



Slika 3. Utjecaj broja neurona modela u skrivenom sloju na korelacijski faktor (R) i srednju kvadratnu pogrešku (MSE) za aktivacijske funkcije a) *tanh*, b) *sigmoid*, c) *relu* i d) *elu*
Figure 3. Influence of the number of neurons in the hidden layer on the correlation factor (R) and the mean squared error (MSE) for the activation functions a) *tanh*, b) *sigmoid*, c) *relu* i d) *elu*

Prema rezultatima prikazanim na slici 3 vidljivo je da modeli s aktivacijskom funkcijom *tanh* imaju najstabilniji koeficijent korelacije i srednju kvadratnu pogrešku. Iz tog razloga, za razvoj ostalih vrsta mreža uzeta je u obzir samo aktivacijska funkcija *tanh*. Nakon detaljnije analize dobivenih modela kao najbolji model s obzirom na iznose koeficijenata korelacije i srednje kvadratne pogreške izabran je model s aktivacijskom funkcijom *tanh* i 5 neurona u skrivenom sloju. Za ovu neuronsku mrežu prikazani su rezultati grafičke usporedbe modela i realnih podataka na skupu za učenje, skupu za vrednovanje i cjelokupnim podacima. U tablici 2 prikazane su vrijednosti srednje kvadratne pogreške na skupu za učenje i skupu za vrednovanje te korelacijski faktor na skupu za učenje, skupu za vrednovanje i cjelokupnim podacima. Optimalan model trebao bi imati visoke i ujednačene korelacijske faktore i niske i ujednačene pogreške za sve skupove podataka.

Tablica 2. Rezultati modela mreže s *tanh* funkcijom i 5 neurona u skrivenom sloju
Table 2. Results of a neural network with a *tanh* function and 5 neurons in the hidden layer

Korelacija cjelokupni podaci	0.597
Korelacija na skupu za vrednovanje	0.610
Korelacija, skup za učenje	0.605
Pogreška	
Skup za vrednovanje (<i>MSE</i>)	0.484
Pogreška, skup za učenje (<i>MSE</i>)	0.717

Pri daljnjem razvoju modela provedena je i unakrsna metoda vrednovanja (engl. *cross validation*) podjelom na proizvoljan broj podskupova. Dostupni podaci su podijeljeni na 10 podskupova dok se broj neurona u skrivenom sloju prilikom razvoja mreže kretao od 1 do 20. Za svaki broj neurona u skrivenom sloju razvijeno je po 10 modela pa je tako u konačnici razvijeno 200 modela od kojih je izabran jedan najbolji na temelju vrijednosti korelacijskog faktora i srednje kvadratne pogreške. Kao najbolji model iz skupine modela s unakrsnim vrednovanjem izabran je model s aktivacijskom funkcijom *tanh* i 12 neurona u skrivenom sloju čiji statistički pokazatelji kvalitete su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati za model s *tanh* funkcijom, 12 neurona u skrivenom sloju
Table 3. Results for model with *tanh* function, 12 neurons in hidden layer

Korelacija sve	0.671
<i>MSE</i> skup za vrednovanje	0.353

Kao posljednji ispitivani tip neuronskih mreža razvijani su modeli sa dva skrivena sloja i ručnim vrednovanjem. Pri tome je korištena *tanh* aktivacijska funkcija za skrivene slojeve jer je iz prijašnjeg eksperimenta zaključeno da je *tanh* aktivacijska funkcija najstabilnija. Broj neurona po pojedinom skrivenom sloju iznosio je maksimalno 20. I između modela sa dva skrivena sloja odabrana je ukupna najbolja

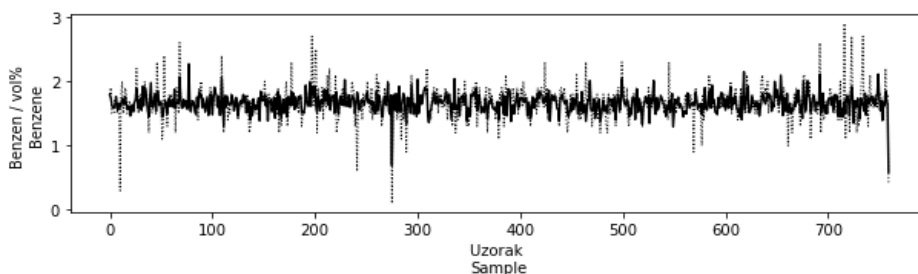
neuronska mreža s obzirom na koeficijent korelacije na skupu za učenje, skupu za vrednovanje i cjelokupnim podacima te s obzirom na vrijednost srednje kvadratne pogreške kao i vizualnom usporedbom grafičkih prikaza pogreške. Najbolji model iz skupine modela sa dva skrivena sloja postignut je s aktivacijskom funkcijom *tanh*, 12 neurona u prvom skrivenom sloju te 11 neurona u drugom skrivenom sloju čiji statistički rezultati su prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Rezultati za model sa *tanh* funkcijom, 12 neurona u prvom skrivenom sloju te 11 neurona u drugom skrivenom sloju

Table 4. Results for model with *tanh* function, 12 neurons in the first hidden layer and 11 neurons in the second hidden layer

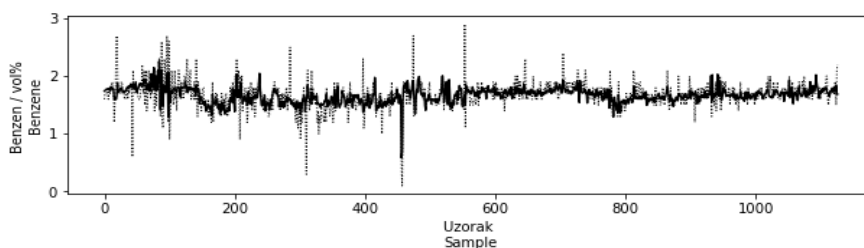
Korelacija sve	0.638
Korelacija, skup za vrednovanje	0.622
Korelacija, skup za učenje	0.647
MSE, skup za vrednovanje	0.461
MSE, skup za učenje	0.656

U konačnici je kao sveukupno najbolji model neuronske mreže u ovom radu odabran model mreže koja sadrži dva skrivena sloja i kod koje je provedeno ručno vrednovanje modela. Mreža kod koje je provedeno ručno vrednovanje je odabrana kao najbolja iako ima nešto više vrijednosti pogreške i niže korelacije od mreže kod koje je provedeno *k-fold* unakrsno vrednovanje. Razlog njezinog odabira je jer kod razvoja mreže s *kfold* vrednovanjem mjerodavna pogreška predstavlja prosječnu pogrešku svih *k* iteracija, a koja je lošija od pogreške za mrežu s dva sloja i ručnim vrednovanjem. Za sveukupno najbolju neuronsku mrežu prikazani su dijagrami usporedbe sadržaja benzena modela i realnih podataka na slikama 4., 5. i 6.



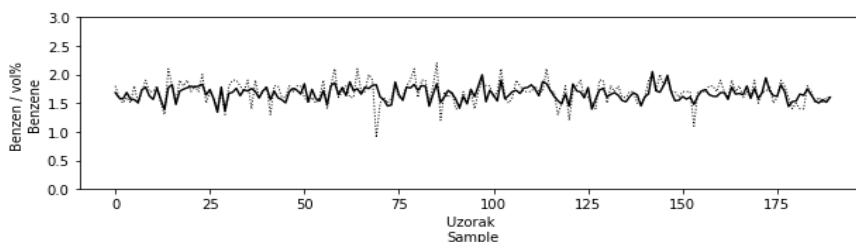
Slika 4. Usporedba između stvarnih podataka benzena (točkasta linija) i vrijednosti dobivenih modelom (puna linija) na podacima za učenje za model *tanh*, 12 neurona u prvom skrivenom sloju i 11 neurona u drugom skrivenom sloju

Figure 4. Comparison between the actual benzene data (dotted line) and the values obtained by the model (solid line) on the training data for the *tanh* model, 12 neurons in the first hidden layer and 11 neurons in the second hidden layer



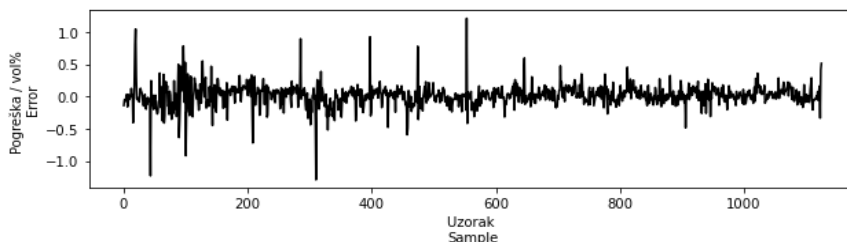
Slika 5. Usporedba između stvarnih podataka benzene (točkasta linija) i vrijednosti dobivenih modelom (puna linija) na cjelokupnim podacima za model *tanh*, 12 neurona u prvom skrivenom sloju i 11 neurona u drugom skrivenom sloju

Figure 5. Comparison between the actual benzene data (dotted line) and the values obtained by the model (solid line) on the entire dataset for the *tanh* model, 12 neurons in the first hidden layer and 11 neurons in the second hidden layer



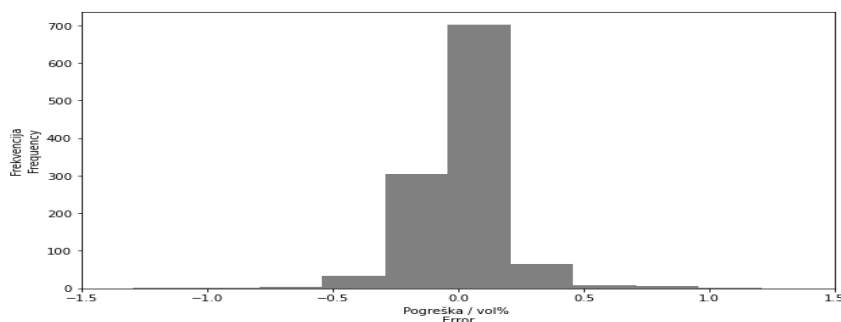
Slika 6. Usporedba između stvarnih podataka benzene (točkasta linija) i vrijednosti dobivenih modelom (puna linija) na skupu za vrednovanje za model *tanh*, 12 neurona u prvom skrivenom sloju i 11 neurona u drugom skrivenom sloju

Figure 6. Comparison between the actual benzene data (dotted line) and the values obtained by the model (solid line) on the test data for the *tanh* model, 12 neurons in the first hidden layer and 11 neurons in the second hidden layer



Slika 7. Grafički prikaz trenda vrijednosti pogreške za model *tanh*, 12 neurona u prvom skrivenom sloju i 11 u drugom skrivenom sloju

Figure 7. Graphical representation of the residual trend for the *tanh* model, 12 neurons in the first hidden layer and 11 in the second hidden layer



Slika 8. Histogram raspodjele vrijednosti pogreške za model *tanh*, 12 neurona u prvom skrivenom sloju i 11 u drugom skrivenom sloju

Figure 8. Histogram of the residual distribution for the *tanh* model, 12 neurons in the first hidden layer and 11 in the second hidden layer

Iz grafičkog prikaza vrijednosti pogreške prikazanog na slici 7 vidljivo je da se velika većina pogrešaka nalazi između ± 0.5 vol %. Detaljnijom analizom pogreške putem histograma pogreške modela prikazanog na slici 8. vidljivo je da je raspodjela pogreške normalna, centrirana oko nule, te da se većina pogrešaka nalazi između ± 0.2 vol % što je zadovoljavajuće za primjenu modela na postrojenju.

Razvoj modela potpornih vektora

Modeli potpornih vektora razvijani su u programskom jeziku *Python*. Optimalni hiperparametri modela procijenjeni su pomoću *GridSearchCV* algoritma. Mreža potencijalnih vrijednosti parametara postavljena je na sljedeći način: parametar *C* je varirao od 0.1 do 10000, parametri *gamma* i *epsilon* od 0.0001 do 1. U prvom slučaju podaci su podijeljeni u 5 podskupova ($k=5$), a u drugom u 10 ($k=10$). U oba slučaja programom su dobiveni isti rezultati hiperparametara. Kao najbolji parametri izabrani su $C=10$, $gamma=0.0001$ te $epsilon=0.01$. Statistički rezultati SVR modela kod kojeg su parametri procijenjeni pomoću *GridSearchCV* algoritma prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Rezultati SVR modela (*kernel*= 'rbf', $C=10$, $epsilon=0.01$, $gamma=0.0001$)
Table 5. SVR model results (*kernel*= 'rbf', $C=10$, $epsilon=0.01$, $gamma=0.0001$)

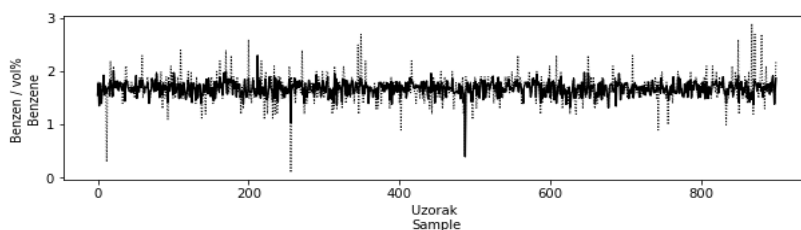
Korelacija na cjelokupnim podacima	0.573
Korelacija na skupu za vrednovanje	0.521
Korelacija na skupu za učenje	0.587
Pogreška na skupu za vrednovanje (<i>MSE</i>)	0.031
Pogreška na skupu za učenje (<i>MSE</i>)	0.037

Podošavanjem vrijednosti hiperparametara pomoću *GridSearch* algoritma s manualnim vrednovanjem, utvrđeno je kako su dobivene kombinacije parametara davale nešto bolje

rezultate od kombinacije parametara vrednovanih *k-fold* metodom, a to su parametri $C=1000$, $\epsilon=0.0001$, $\gamma=0.001$. Manualno vrednovanje provodila se u istom rasponu vrijednosti parametara kao i za *k-fold* algoritam, sa korakom od po jednoga reda veličine. Statistički pokazatelji SVR modela s manualnim vrednovanjem prikazani su u tablici 6. Za taj model dodatno je napravljena analiza reziduala putem histograma pogreške. Grafički rezultati usporedbe najboljeg SVR modela i realnih podataka benzena prikazani su na slikama 9-11.

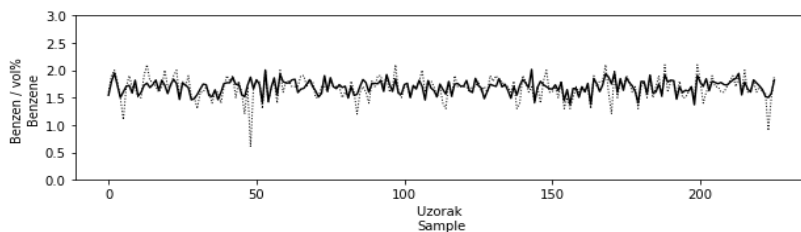
Tablica 6. Rezultati SVR modela ($\text{kernel} = 'rbf'$, $C=1000$, $\epsilon=0.0001$, $\gamma=0.001$)
Tablica 6. SVR model results ($\text{kernel} = 'rbf'$, $C=1000$, $\epsilon=0.0001$, $\gamma=0.001$)

Korelacija na cjelokupnim podacima	0.635
Korelacija, na skupu za vrednovanje	0.604
Korelacija, skup za učenje	0.645
Pogreška na skupu za vrednovanje (<i>MSE</i>)	0.027
Pogreška, skup za učenje (<i>MSE</i>)	0.031



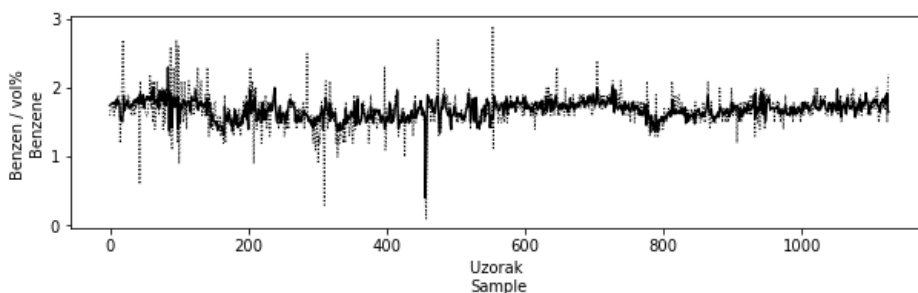
Slika 9. Usporedba između stvarnih podataka benzena (točkasta linija) i vrijednosti dobivenih modelom (puna linija) na podacima na skupu za učenje za model SVR ($\text{kernel} = 'rbf'$, $C=1000$, $\epsilon=0.0001$, $\gamma=0.001$)

Figure 9. Comparison between actual benzene data (dotted line) and values obtained by the model (solid line) on training data for the SVR model ($\text{kernel} = 'rbf'$, $C=1000$, $\epsilon=0.0001$, $\gamma=0.001$)



Slika 10. Usporedba između stvarnih podataka benzena (točkasta linija) i vrijednosti dobivenih modelom (puna linija) na podacima na skupu za vrednovanje za model SVR ($\text{kernel} = 'rbf'$, $C=1000$, $\epsilon=0.0001$, $\gamma=0.001$)

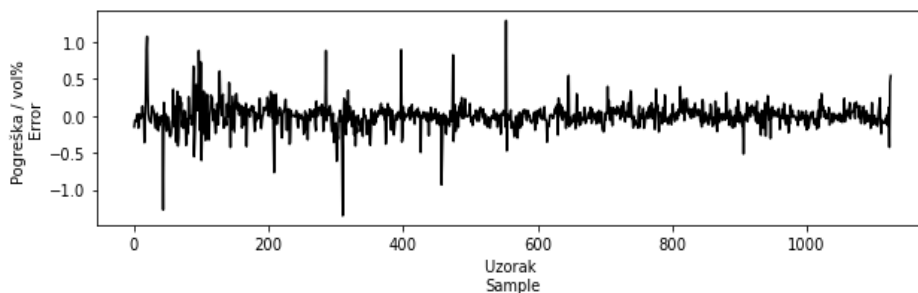
Figure 10. Comparison between actual benzene data (dotted line) and values obtained by the model (solid line) on test data for the SVR model ($\text{kernel} = 'rbf'$, $C=1000$, $\epsilon=0.0001$, $\gamma=0.001$)



Slika 11. Usporedba između stvarnih podataka benzena (točkasta linija) i vrijednosti dobivenih modelom (puna linija) na sveukupnim podacima za model SVR ($kernel = 'rbf'$, $C=1000$, $epsilon=0.0001$, $gamma=0.001$)

Figure 11. Comparison between actual benzene data (dotted line) and values obtained by the model (solid line) on overall data for the SVR model ($kernel = 'rbf'$, $C=1000$, $epsilon=0.0001$, $gamma=0.001$)

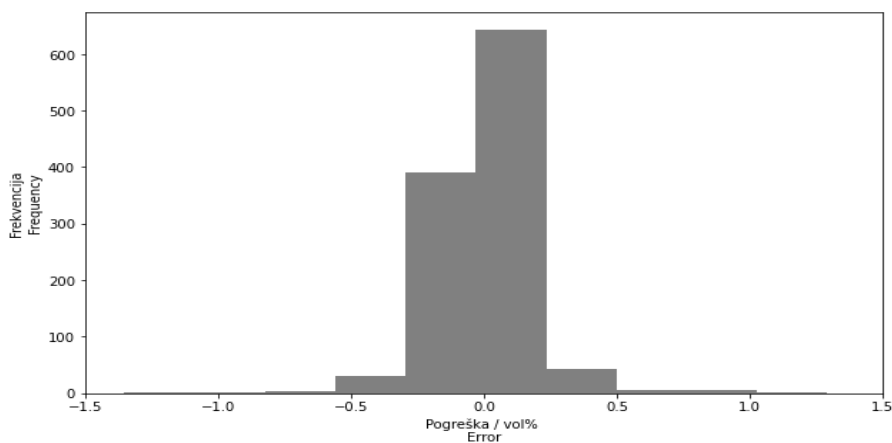
Trend pogreške između stvarnih i predviđenih vrijednosti benzena u lakom reformatu pomoću SVR metode prikazan je na slici 12.



Slika 12. Prikaz trenda vrijednosti pogreške za SVR model ($kernel = 'rbf'$, $C=1000$, $epsilon=0.0001$, $gamma=0.001$)

Figure 12. Trend of residual for SVR model ($kernel = 'rbf'$, $C=1000$, $epsilon=0.0001$, $gamma=0.001$)

Histogram pogreške SVR modela prikazan je na slici 13.



Slika 13. Histogram raspodjele vrijednosti pogreške za SVR model
 (*kernel= 'rbf', C=1000, epsilon=0.0001, gamma=0.001*)

Figure 13. Histogram of the residual distribution for SVR model
 (*kernel= 'rbf', C=1000, epsilon=0.0001, gamma=0.001*)

Iz grafičkog prikaza vrijednosti pogreške prikazane na slici 13 vidljivo je da se većina pogrešaka nalazi između ± 0.5 vol %. Detaljnijom analizom histograma pogreške SVR modela prikazanog na slici 13 vidljivo je da se većina pogrešaka nalazi u rasponu ± 0.2 vol % što je zadovoljavajuće za primjenu razvijenog SVR modela na postrojenju.

Zaključci

Kontinuirano mjerenje količine benzena u produktu procesa katalitičkog reforminga vrlo je važno zbog ekoloških i tehničkih zahtjeva. U tu svrhu razvijeni su modeli softverskog senzora za *on-line* provjeru kvalitete proizvoda čija primjena bi uvelike olakšala i poboljšala vođenje procesa budući da su trenutne analize sadržaja benzena pomoću procesnog analizatora u laboratoriju rijetke (samo 3 puta dnevno). U radu su prikazani razvoj modela neuronskih mreža i modela potpornih vektora u svrhu praćenja sadržaja benzena u lakom reformatu. Od tisuće razvijenih modela softverskih senzora izabran je po jedan najbolji model za neuronske mreže i potporne vektore. Najbolji model neuronske mreže sadržavao je dva skrivena sloja pri čemu je broj neurona u prvom skrivenom sloju bio 12, a u drugom 11. Najbolji model potpornih vektora postignut je uz parametre *C* koji je iznosio 1000, *gamma* 0.001 te *epsilon* 0.0001. Najbolji NN model i najbolji SVR model dali su slične vrijednosti koeficijenta korelacije i pogreške modela (± 0.2 vol %) te se oba modela mogu primijeniti u rafinerijskom informacijskom sustavu. Primjenom razvijenog softverskog senzora informacija o sadržaju benzena postaje trenutna i kontinuirana čime se omogućuje poboljšanje vođenja procesa u vidu pravovremene reakcije na

detektiranu promjenu sadržaja benzena. Na temelju primjene razvijenih softverskih senzora moguće je očekivati poboljšanje konačne kvalitete proizvoda, a time i značajne uštede u proizvodnji kao i zadovoljenje strogih propisa zaštite okoliša.

Literatura

- Awad M., Khanna R. (2015): *Efficient Learning Machines: Theories, Concepts, and Applications for Engineers and System Designers*, New York, USA, Apress Media, pp. 67-72.
- Cerić, E. (2006): Nafta – procesi i proizvodi, Zagreb, HR, INA i Kigen, pp. 169-180.
- Chitralkha, S.B., Shah, S.L. (2010): Application of support vector regression for developing soft sensors for nonlinear processes. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 88 (5), 696-709.
- Fortuna, L., Graziani, S., Rizzo, A., Xibilia, M. G. (2007): *Soft sensors for monitoring and control of industrial processes*, London, Springer, pp. 18-39.
- Herceg, S., Ujević Andrijić, Ž., Bolf, N. (2020): Support Vector Machine-based Soft Sensors in the Isomerisation Process, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 34 (4), 243-255.
- Jingjing, G., Yang, X., Shardt, Y. A. W., Zhang, Y., He, F., Tong, C. (2017) Soft sensor modeling based on PCA and LS-SVM for strip thickness in cold steel rolling mills. In: Chinese Automation Congress, Jinan, CN, pp. 3758-3763
- Kurniawan, E. Effendy, N.I, Arif, A., Dwianto, K., Muddin, N. (2022): Soft sensor for the prediction of oxygen content in boiler flue gas using neural networks and extreme gradient boosting, *International Journal of Artificial Intelligence* 11 (3), 923-929.
- Lek S., Park Y.S. (2008): *Artificial Neural Networks*. In: *Encyclopedia of Ecology*, New York, USA, Elsevier, pp. 237–245.
- Lyu, Z., Yu, Y., Samali, B., Rashidi, M., Mohammadi, M., Nguyen, T. N., Nguyen, A. (2022): Back-Propagation Neural Network Optimized by K-Fold Cross-Validation for Prediction of Torsional Strength of Reinforced Concrete Beam. *Materials* 15 (4), 1447.
- Rosenblatt F. (1958): The Perceptron: A probabilistic model for information storage and organization in the brain, *Psychological Review*, 65 (6), 386-408.
- Sharma, P., Imtiaz, S., Ahmed, S., (2018): A hybrid model for predicting product sulfur concentration of diesel hydrogen desulfurization process, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 182(1), 202 – 215.
- Ujević Andrijić, Ž., Cvetnić, M., Bolf, N., (2018): Soft sensor models for a fractionation reformat plant using small and bootstrapped data sets, *Brazilian Journal of Chemical Engineering* 35(2), 745-756.
- Uredba o kvaliteti tekućih naftnih goriva, NN 131/2021, 2197, ELI: /eli/sluzbeni/2021/131/2197, URL https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2021_12_131_2197.html, (15.10.2022.)
- Zhang, H., Chen, L., Qu, Y., Zhao, G., Guo, Z. (2014): Support Vector Regression Based on Grid-Search Method for Short-Term Wind Power Forecasting, *Journal of Applied Mathematics* 2014(1), 1-11.

Development of soft sensors using machine learning methods

Ines Martić, Nikola Rimac, Željka Ujević Andrijić*

*University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Savska c. 16/5A, 10000, Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: zujevic@fkit.hr*

original scientific paper

Summary

Strict environmental and technical quality requirements of catalytic reforming products require continuous measurement of the benzene content in the reformat. The process control of this process depends on rare and long laboratory analyzes of the benzene content, while the costs of application and maintenance of on-line process analyzers are extremely high. On the other hand, it is possible to conclude about the state of difficult-to-measure quantities on the basis of easily measurable quantities in the process by developing soft sensor models. This paper presents the development of soft sensor models for continuous monitoring of benzene content in light reformat. The soft sensor models were developed using neural networks and the support vector regression method. Developed models are based on real measurement data of continuously monitored process variables and laboratory measurements of the benzene content in the light reformat. The development of the model began with the preprocessing of the collected measurement data. Soft sensor models were created in the Python programming language using the methods of artificial neural networks and support vector machine. A statistical analysis of the results was carried out, which shows that both types of models give high correlation values of model data with real benzene content data, so both models can be applied in the refinery information system. By applying the developed soft sensors, the information about the benzene content becomes immediate and continuous, which enables the improvement of process control in the form of a timely reaction to the detected change in the benzene content. The application of soft sensors improves the final product quality, and significant savings in production can be achieved as well as compliance with strict environmental protection regulations.

Keywords: soft sensor, neural network, benzene, reformat, support vector regression

Ekstrakcija metala i metaloida iz uzoraka tla vodenim otopinama amonijevih soli

Vibor Roje*, Ivor Košutić

Sveučilište u Zagrebu, Fakultet šumarstva i drvne tehnologije, Svetošimunska cesta 23, 10002 Zagreb, Hrvatska

**Dopisni autor: vroje@sumfak.hr*

originalni znanstveni rad

Sažetak

U znanstvenoistraživačkoj i stručnoj praksi i literaturi poznate su mnoge, različite, metode određivanja metala i metaloida u uzorcima tla. Odabir metode ponajprije ovisi o ciljevima istraživanja. Tako je ispitivanje biorasploživosti metala i metaloida u tlima pogodnije izvoditi primjenom nekog blagog ekstrakcijskog sredstva, umjesto provođenja ekstrakcije takvih analita jakim sredstvima (među kojima je zlatotopka najčešće korištena) u žestokim uvjetima. Izlaganjem uzoraka tla blagim uvjetima ekstrakcije nastoji se oponašati uvjete koji vladaju u prirodi te na osnovi dobivenih rezultata zaključiti o mogućoj sudbini takvih zagađivala u tlima nekog područja. U ovom radu opisane su dvije metode analize odabranih kemijskih elemenata u uzorcima tla koje se sastoje od ekstrakcije pomoću jedne od vodenih otopina amonijevih soli međusobno jednakih množinskih koncentracija (NH_4Cl odnosno NH_4NO_3 , $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) te kvantitativnog određivanja odabranih 25 analitâ (Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, Zn) u ekstraktima tehnikom atomske emisijske spektrometrije uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Kao modelni uzorak tla korišten je certificirani referentni materijal Metranal-33.

Cljučne riječi: amonijev klorid, amonijev nitrat, ekstrakcija, elementi u tragovima, ICP-OES, tlo

Uvod

Tlo je dio ekosustava te je ujedno vrlo složen sustav. Kao takvo, tlo je izloženo unosu različitih tvari, među kojima su i za žive organizme potencijalno toksične tvari. Neki autori tlo razumiju i kao spremnik različitih tvari zato što čestice tla imaju sposobnost vezivanja različitih tvari na svojoj površini (Dube i sur., 2001). Tvari koje mogu dospjeti i vezati se na površinu čestica tla su metali i metaloidi.

Među metalima i metaloidima koji su prisutni u tlu razlikuju se:

- 1) prirodno, geogeno, prisutni elementi
- 2) antropogeno unijeti metali i metaloidi.

Nadalje, svrhe analiziranja antropogeno unesenih metala i metaloida u tlo mogu biti (a) procjena biorasploživosti, odnosno mogućnosti njihova ulaska u hranidbeni lanac (Chojnacka i sur., 2005) i (b) procjena prisutnosti metalâ u zraku, tj. zagađenosti u urbanim i industrijskim područjima (Kingston i sur., 1997).

Procjena bioraspoloživosti – tj. mogućnosti da metali, a što se poglavito odnosi na one toksične, iz tla putem biljaka uđu u hranidbeni lanac – zahtijeva primjenu odgovarajućih analitičkih metoda. Te se metode sastoje od dviju glavnih faza:

- (i) prevođenje analitâ u vodenu otopinu, i
- (ii) mjerenje odabranih elemenata u priređenim otopinama (ekstraktima) nekom pogodnom analitičkom tehnikom.

Analitičke tehnike koje se uobičajeno koriste u takvim istraživanjima su atomske spektrometrijske tehnike, najčešće one s induktivno spregnutom plazmom kao sredstvom za pobuđivanje atomâ analita: ICP-AES, odnosno još osjetljivija ICP-MS. Međutim, prilikom planiranja analize potrebno je posebnu pozornost posvetiti izboru metode ekstrakcije (reagensa i reakcijskih uvjeta) za prevođenje analitâ u vodenu otopinu. U analitici kemijskih elemenata u tlu, za prevođenje u otopinu najčešće se koristi zlatotopka i to pri drastičnim reakcijskim uvjetima (Kingston i sur., 1997; Lima i sur., 2016) što su nedvojbeno preagresivni uvjeti za procjenu bioraspoloživosti elemenata u tlu, zato što se čestice tla raščinjavaju na način da se u vodenu otopinu otpušta veća količina metalâ i metaloidâ nego što se to događa u uobičajenim uvjetima u prirodi. Zbog toga, rađena su mnoga istraživanja prevođenja (ekstrakcije) različitih metala i metaloida iz uzoraka tla blagim sredstvima, pri sobnoj temperaturi. U znanstvenoj literaturi postoje opisi brojnih metoda ekstrakcije blagim reagensima u jednom koraku, kao i metoda sekvencijske ekstrakcijske, koje podrazumijevaju primjenu deionizirane vode, nepuferiranih otopina pojedinih soli (npr. $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 , MgCl_2 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, NH_4NO_3 , itd.), ili razrijeđenih jakih ili slabih kiselina (npr. HNO_3 , HCl , CH_3COOH), kompleksirajućih reagensa (EDTA, DTPA) (Novozamsky i sur., 1993; Lebourg i sur., 1996; Sahuquillo i sur., 2003; Rao i sur., 2008).

Ovaj rad nastao je u širem kontekstu naših istraživanja metala i metaloida u tlima uz primjenu blagih sredstava za ekstrakciju (Roje i sur., 2015; Roje i Galinec, 2019; Roje i Grba, 2021.). U tekstu su opisane dvije metode za analizu 25 odabranih kemijskih elemenata u uzorcima tla, a sastoje se od: (i) ekstrakcije vodenom otopinom amonijeve soli – NH_4Cl odnosno NH_4NO_3 – množinske koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, te (ii) kvantifikacije analitâ atomskom emisijskom spektrometrijom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES). Analize su rađene na certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33. Rezultati prikazani u ovom radu pružaju uvid u različite ekstrakcijske moći ispitivanih dvaju reagensa te će ujedno moći poslužiti kao orijentacijske vrijednosti u budućim primjenama ovog certificiranog referentnog materijala u sličnim analizama, posebice zato što su podaci o udjelima elemenata u referentnim materijalima za tla dobiveni nakon ekstrakcije blagim sredstvima malobrojni.

Materijali i metode

Kemikalije i pribor

U ovom istraživanju korišten je certificirani referentni materijal (CRM) za tlo Metranal-33 (Analytika, Prague, Czech Republic).

Otopine za ekstrakciju pripravljene su otapanjem amonijeva klorida (NH_4Cl , *p.a.*, GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska) odnosno amonijeva nitrata (NH_4NO_3 , *p.a.*, GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska).

Za pripremu otopina za kalibraciju ICP-spektrometra korišteni su multielementni standardi:

– *Multi-element Standard Solution* (Al, Ag, As, B, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, V, Zn; 5 % HNO_3), 100 mg/L, Carl Roth, Njemačka

– *Multielement standard solution III for ICP* (Ca, Mg, K, Na; 5 % HNO_3), Fluka, Švicarska.

Provedena je matrici prilagođena eksterna kalibracija, dodavanjem vodene otopine amonijeva klorida odnosno amonijeva nitrata u priređene kalibracijske standardne otopine do konačne koncentracije od $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$.

U radu je korištena ultračista voda ($0.055 \mu\text{S/cm}$, Siemens Ultra clear).

Za zakiseljavanje otopina korištena je ultračista dušična kiselina (HNO_3 , 65 %, *supra pur*, Merck, Njemačka).

Sve korišteno posuđe je od polipropilenske (PP) plastike. Prije upotrebe, posuđe je bilo namočeno u dušičnoj kiselini 10 % (v/v), HNO_3 , 65 %, *p.a.*, Carlo Erba Reagenti, Italija te potom isprano ultračistom vodom.

Ekstrakcija

Uzorci tla (svaki *cca.* 1,0000 g) izvagani su u polipropilenske scintilacijske posudice volumena 20 mL. Kao ekstraktanti korištene su vodene otopine amonijevih soli: amonijeva klorida odnosno amonijeva nitrata, svaka koncentracije $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Omjer (*m/V*) uzorka i ekstrakcijske otopine bio je 1 g / 10 mL. Priređene smjese mućkane su na tresilici 24 h, 200 okr/min. Za mućkanje je korištena tresilica Tehnica VIBROMIX 403 EVT.

Odvajanje ekstrakata od krutih ostataka uzoraka provedeno je filtriranjem (Sartorius, $0,45 \mu\text{m}$) pomoću injekcijskih šprica. Priređene otopine zakiseljene su dušičnom kiselinom (v/v 1 %, *supra pur*).

Paralelno s uzorcima tla, na isti način tretirane su i slijepo probe ($N = 5$). Detekcijske granice metode (MDL) izračunate su kao trostruka standardna devijacija mjerenja proceduralnih slijepih proba, uvažavajući faktor razrjeđenja. Vrijednosti MDL dani su zajedno s rezultatima analiza uzoraka tla (Tablice 2 i 3).

Multielementna analiza tehnikom ICP-AES

Određivanje analitâ u ekstraktima obavljeno je atomskim emisijskim spektrometrom uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) Thermo Fisher iCAP6300 Duo, čiji parametri su bili namješteni sa svrhom osiguravanja stabilnih uvjeta rada instrumenta (Roje i Galinec, 2019; Roje i Grba, 2021). Više podataka o spektrometru navedeno je u tablici 1.

Tablica 1. Glavni radni parametri ICP-spektrometra
Table 1. Main operating parameters of the ICP-spectrometer

Parametar	Vrijednost		
Instrument	Thermo Fisher iCAP6300 Duo		
Snaga RF-a	1150 W		
Protok rashladnog plina	12 L/min		
Protok plina za uzorak	0,65 L/min		
Protok pomoćnog plina	0,5 L/min		
Sustav za uvođenje uzorka	– automatski uzorkivač CETAC ASX-260 – koncentrični raspršivač s vrtložnom komorom za raspršivanje		
Brzina peristaltičke pumpe	45 okr/min		
Cijevčice peristaltičke pumpe	– uzorak: narančasto-bijela – ispiranje: bijelo-bijela		
Vrijeme uvođenja uzorka	45 s		
Vrijeme ispiranja	60 s		
Analiza plazme (Plasma view)	Automatska (Auto View)		
Maksimalno vrijeme mjerenja	– niske valne duljine (160-230 nm): 15 s – visoke valne duljine (230-847 nm): 5 s		
Mjerene linije (nm)	Al – 167,079 As – 189,042 B – 208,959 Ba – 455,403 Be – 234,861 Ca – 393,366 Cd – 214,438 Co – 228,616 Cr – 205,552	Cu – 324,754 Fe – 238,204 K – 766,490 Li – 670,784 Mg – 279,553 Mn – 257,610 Mo – 202,030 Na – 589,592 Ni – 231,604	Pb – 220,353 Sb – 217,581 Se – 196,090 Sr – 407,771 Ti – 334,941 Tl – 190,856 Zn – 213,856
Kalibracijske otopine	– 0; 1; 10; 100 µg/L – 1000 µg/L Na, 200 µg/L K, 400 µg/L Mg, 2000 µg/L Ca – priređene u otopinama za ekstrakciju (matrično prilagođena kalibracija)		
Otopina za ispiranje sustava	Dušična kiselina, HNO ₃ , <i>supra pur</i> , 1 % (v/v)		

Rezultati i rasprava

Rezultati kvantitativne analize odabranih metala i polumetala u certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33, nakon ekstrakcije vodenom otopinom amonijeva klorida (NH_4Cl) odnosno vodenom otopinom amonijeva nitrata (NH_4NO_3) prikazani su u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Rezultati analize odabranih elemenata u certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33 nakon ekstrakcije vodenom otopinom amonijeva klorida, $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ($N = 5$)

Table 2. Results of the analyses of the selected elements in the soil certified reference material Metranal-33, after the extraction performed with aqueous solution of ammonium chloride, $c(\text{NH}_4\text{Cl}) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ($N = 5$)

	Certificirane vrij. - totalni maseni udjeli	MDL*	Određeno		
			sr.vrij.± std.dev.	iscrpak	RSD**
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	%	%
Al	65095	0,016	0,041 ± 0,009	0,00006	22,6
As	16,7	0,020	0,028 ± 0,004	0,17	12,8
B	–	0,012	0,642 ± 0,007	n.d.	1,0
Ba	495	0,030	10,7 ± 0,1	2,16	1,2
Be	2,18 ± 0,16	0,015	< 0,015	n.d.	n.d.
Ca	9860	0,328	n.d.***	n.d.	n.d.
Cd	0,32 ± 0,04	0,001	0,0039 ± 0,0002	1,22	4,4
Co	11,5 ± 0,7	0,001	0,023 ± 0,001	0,20	2,7
Cr	79,8 ± 6,7	0,001	0,004 ± 0,001	0,005	17,9
Cu	29,1 ± 0,8	0,125	0,245 ± 0,058	0,84	23,6
Fe	29030	0,146	< 0,146	n.d.	n.d.
K	18350	1,05	306 ± 3	1,67	1,0
Li	–	0,033	0,242 ± 0,010	n.d.	4,0
Mg	6150	0,236	162 ± 2	2,63	1,4
Mn	600 ± 37	0,032	10,3 ± 0,2	1,72	2,4
Mo	–	0,002	0,055 ± 0,002	n.d.	3,1
Na	5490	1,86	145 ± 6	2,64	4,4
Ni	31,3 ± 1,5	0,005	0,072 ± 0,002	0,23	3,0
Pb	33,5 ± 2,4	0,007	< 0,007	n.d.	n.d.
Sb	–	0,018	0,025 ± 0,009	n.d.	34,3
Se	–	0,018	< 0,018	n.d.	n.d.
Sr	–	0,001	8,18 ± 0,11	n.d.	1,4
Ti	4080	0,033	0,179 ± 0,014	0,004	7,7
Tl	–	0,017	< 0,017	n.d.	n.d.
Zn	81,0 ± 7,6	0,017	< 0,017	n.d.	n.d.

* Detekcijska granica (od engl. *Method detection limit*)

** Relativna standardna devijacija

*** Nije određeno (od engl. *Not determined*)

Ekstrakcija vodenom otopinom amonijeva klorida

Iz podataka prikazanih u tablici 2, razvidno je da je od 25 elemenata, koliko ih je u ovom radu bilo odabrano za analizu, u ekstraktima priređenim vodenom otopinom NH_4Cl kvantificirano njih 18. Elemente Be, Fe, Pb, Se, Tl i Zn ovom metodom nije bilo moguće kvantificirati, jer su u priređenim ekstraktima bili prisutni u koncentracijama koje su niže od njihovih detekcijskih granica. Istodobno, Ca nije bilo moguće kvantificirati zato što se u ekstraktima nalazio u koncentracijama koje su premašivale mjerne mogućnosti instrumenta; za kvantifikaciju tog makro-elementa ekstrakte bi bilo potrebno razrijediti što je izlazilo iz okvira ovog istraživanja (Roje i Grba, 2021).

Detaljnijim uvidom u rezultate navedene u tablici 2, može se uočiti da su elementi B, Ba, Cd, Co, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Sr i Ti mjereni s visokim stupnjem preciznosti; niske vrijednosti ($< 5\%$) relativnih standardnih devijacija (RSD) za te elemente ukazuju na visoku međusobnu podudarnost analiza paralelnih uzoraka ('replika'). Nasuprot tome, vrijednosti RSD za elemente Al, As, Cr, Cu i Sb su mnogo više ($> 10\%$), te ukazuju na mnogo višu mjernu nesigurnost za ove elemente. To se može pripisati razmjerno niskim koncentracijama ovih pet elemenata u priređenim ekstraktima, pri čemu su dobivene vrijednosti istih redova veličina kao i detekcijske granice tih elemenata.

Ekstrakcija vodenom otopinom amonijeva nitrata

Rezultati prikazani u tablici 3 sugeriraju da je u ekstraktima (priređenim vodenom otopinom NH_4NO_3) analiziranog certificiranog referentnog materijala za tla zadovoljavajuće pouzdano (RSD $< 10\%$) kvantificirano sljedećih 15 metala i metaloida: Al, B, Ba, Co, Cu, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Sb, Sr i Ti. Štoviše, za većinu tih elemenata vrijednosti RSD su niže od 5% . Osim navedenog, u frakciji ispitivanog CRM-a za tla zahvaćenoj ekstrakcijom vodenom otopinom amonijeva klorida kvantificirano je i daljnjih 6 elemenata – As, Cd, Cr, Fe, Se, Tl i Zn – no vrijednosti RSD za te elemente su $\geq 10\%$ što upućuje na veću nesigurnost mjerenja tih elemenata ovom metodom. Pri tome, među navedenima se posebno (u negativnom smislu) ističe Zn, čija je kvantifikacija u paralelnim uzorcima bila praćena velikim međusobnim odstupanjima te se može zaključiti da ova metoda nije pogodna za analizu toga elementa u tlima.

Ovom metodom nije bilo moguće kvantificirati Be i Pb, jer se u frakciji ispitivanog tla koju zahvaća navedena ekstrakcijska otopina ta dva metala nalaze u vrijednostima masenih udjela koji su niži od njihovih detekcijskih granica. Najzad, u tablici 3 moguće je uočiti da ovom metodom nije moguće kvantificirati Ca u tlu, jer se taj element u priređenim ekstraktima nalazi u koncentracijama previsokima za detekciju. Kvantifikacija Ca zahtijevala bi daljnje razrjeđivanje ekstrakata (predvidivo od barem $100\times$), no taj bi postupak izlazio izvan okvira ovog istraživanja (Roje i Grba, 2021).

Tablica 3. Rezultati analize odabranih elemenata u certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33 nakon ekstrakcije vodenom otopinom amonijeva nitrata, $c(\text{NH}_4\text{NO}_3) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (N = 5)

Table 3. Results of the analyses of the selected elements in the soil certified reference material Metranal-33, after the extraction performed with aqueous solution of ammonium nitrate, $c(\text{NH}_4\text{NO}_3) = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ (N = 5)

	Certificirane vrij. - totalni maseni udjeli	MDL*	Određeno		
			sr.vrij.± std.dev.	iscrpak	RSD**
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg	mg/kg
Al	65095	0,027	0,038 ± 0,002	0,00006	5,4
As	16,7	0,012	0,036 ± 0,006	0,22	15,7
B	-	0,010	0,677 ± 0,020	n.d.	2,9
Ba	495	0,007	12,5 ± 0,3	2,53	2,2
Be	2,18 ± 0,16	0,009	< 0,009	n.d.	n.d.
Ca	9860	0,299	n.d.***	n.d.	n.d.
Cd	0,32 ± 0,04	0,0005	0,0011 ± 0,0002	0,34	16,4
Co	11,5 ± 0,7	0,002	0,018 ± 0,001	0,16	4,5
Cr	79,8 ± 6,7	0,001	0,005 ± 0,0005	0,006	10,0
Cu	29,1 ± 0,8	0,038	0,256 ± 0,020	0,88	7,8
Fe	29030	0,107	0,131 ± 0,040	0,0005	30,6
K	18350	0,810	327 ± 3	1,78	1,0
Li	-	0,025	0,266 ± 0,009	n.d.	3,4
Mg	6150	0,014	125 ± 2	2,03	1,2
Mn	600 ± 37	0,005	9,07 ± 0,13	1,51	1,4
Mo	-	0,004	0,052 ± 0,002	n.d.	4,7
Na	5490	0,221	39,2 ± 0,4	0,71	1,0
Ni	31,3 ± 1,5	0,003	0,067 ± 0,003	0,21	4,5
Pb	33,5 ± 2,4	0,011	< 0,011	n.d.	n.d.
Sb	-	0,009	0,021 ± 0,001	n.d.	5,7
Se	-	0,009	0,012 ± 0,003	n.d.	26,5
Sr	-	0,003	8,52 ± 0,10	n.d.	1,1
Ti	4080	0,028	0,178 ± 0,011	0,004	6,1
Tl	-	0,007	0,019 ± 0,006	n.d.	30,4
Zn	81,0 ± 7,6	0,008	0,011 ± 0,010	0,014	88,7

* Detekcijska granica (od engl. *Method detection limit*)

** Relativna standardna devijacija

*** Nije određeno (od engl. *Not determined*)

Usporedba ekstrakcijskih moći

Za vodene otopine NH_4Cl odnosno NH_4NO_3 kao sredstava za ekstrakciju metala i metaloida iz uzoraka tla, u literaturi se može naći da ekstrahiraju zamjenjivu (engl. 'exchangeable') frakciju metala i metaloida (Sahuquillo i sur., 2003; Rao i sur., 2008). Preciznije, radi se o elementima koji su za površinu čestica tla vezani slabim

elektrostatskim interakcijama te ih se odande lako istiskuje kationima iz otopina soli. Pritom, utvrđeno je da dvovalentni kationi (primjerice Ca^{2+} ili Mg^{2+}) imaju veću moć istiskivanja kationa s površine čestica soli od monovalentnog kationa NH_4^+ (Lebourg i sur., 1996).

Ovo istraživanje provedeno je na (aliquotnim) uzorcima istog certificiranog referentnog materijala, uz primjenu vodenih otopinama dviju amonijevih soli jednakih množinskih koncentracija i jednakih trajanja procesa ekstrakcije. Slijedom toga dobivene je rezultate moguće uspoređivati, točnije moguće je usporediti ekstrakcijske moći tih dvaju sličnih ekstrakcijskih sredstava. Uvidom u vrijednosti masenih udjela navedenima u tablicama 2 i 3 moguće je uočiti da je usporedba moguća za sljedeće elemente: Al, As, B, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Sb, Sr i Ti. Uspoređivanjem tih vrijednosti, vidljivo je da su za Al, Cr, Ni i Ti s objema metodama ekstrakcije dobivene međusobno jednake ili neznatno različite vrijednosti masenih udjela. Za elemente As, B, Ba, Cu, K, Li i Sr moguće je uočiti da su u većoj mjeri bili ekstrahirani pomoću vodene otopine NH_4NO_3 , dok je suprotan trend uočen za Cd, Co, Mg, Mn, Mo, Na i Sb. Izražena razlika u ekstraktabilnosti Cd, odnosno viša vrijednost masenog udjela toga elementa izmjerena nakon ekstrakcije vodenom otopinom NH_4Cl sa sigurnošću biti pripisana kompleksirajućem djelovanju Cl^- iona (Lebourg i sur., 1996).

Najzad, usporedbom ovih rezultata s rezultatima prethodnog istraživanja provedenog na istom certificiranom referentnom materijalu, ali s razrijeđenim kiselinama (HCl odnosno CH_3COOH) kao ekstraktantima (Roje i Grba, 2021), može se uočiti da je ekstrakcijska moć vodenih otopina amonijevih soli bitno manja od ekstrakcijske moći razrijeđenih kiselina istih koncentracija što je u suglasju s usvojenom i uvriježenom tezom da kiseline 'napadaju' na frakciju čestice tla (karbonatni sloj) za koju su metali i metaloidi jače vezani (Ure, 1996).

Zaključci

U ovom radu istražene su metode multielemente kvantitativne analize tla, koje se sastoje od ekstrakcije vodenom otopinom amonijeve soli (NH_4Cl odnosno NH_4NO_3) u jednom koraku te susljednog kvantitativnog određivanja odabranih metala i metaloida u priređenim ekstraktima pomoću tehnike ICP-AES. Istraživanje je provedeno na certificiranom referentnom materijalu za tlo Metranal-33, koji predstavlja čisto, nezagađeno glineno-ilovasto tlo. Analizirano je 25 odabranih elemenata, što elemenata u tragovima što tzv. glavnih elemenata: Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, Zn. Istraživanjem metodama moguće je pouzdano kvantificirati većinu navedenih elemenata. Niti jednom od metoda nije bilo moguće odrediti masene udjele Be i Pb zbog njihovih masenih udjela koji su niži od detekcijskih granica. Također, niti Ca nije bilo moguće odrediti ovim metodama, uslijed njegovih previsokih masenih koncentracija u ekstraktima.

Obje otopine podjednaku ekstrakcijsku moć demonstrirale su za elemente: Al, Cr, Ni i Ti. Za većinu ostalih elemenata za koje je takva usporedba moguća (As, B, Ba, Cd, Co, Cu, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Sb i Sr) postotak ekstrakcije s oba ovdje testirana ekstrakcijska sredstva podjednak je. Iznimku od prethodno navedenog predstavlja Cd koji je mnogo jače bio ekstrahiran pomoću NH_4Cl , zbog kompleksirajućeg djelovanja iona Cl^- .

Zahvala

Ovo istraživanje nastalo je u sklopu znanstvenoistraživačkog projekta „Procjena mobilnosti elemenata u tragovima u tlu Medvednice“, koji je financirala tvrtka „Hrvatske šume d.o.o.“.

Literatura

- Chojnacka, K., Chojnacki, A., Górecka, H., Górecki, H. (2005): Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants, *Sci. Total Environ.* 337 (1-3), 175-182.
- Dube, A., Zbytniewski, R., Kowalkowski, T., Cukrowska, E., Buszewski, B. (2001): Adsorption and Migration of Heavy Metals in Soil, *Pol. J. Environ. Stud.* 10 (1), 1-10.
- Kingston, H.M., Walter, P.J., Chalk, S., Lorentzen, E., Link, D. (1997): Environmental microwave sample preparation: fundamentals, methods, and applications. In: Microwave-enhanced chemistry – fundamentals, sample preparation, and applications, Kingston, H.M.(Skip), Haswell, S.J. (eds.), Washington DC, USA: American Chemical Society, str. 223-349.
- Lebourg, A., Steckerman, T., Ciesielski, H., Proix, N. (1996): Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux en traces du sol, *Agronomie* 16 (4), 201-215.
- Lima, E.S.A., Sobrinho, N.M.B.d.A., Perez, D.V., Coutinho, I.B. (2016): Comparing methods for extracting heavy metals from histosols for establishing quality reference values, *Rev. Bras. Cienc. Solo* 40, e0150097.
- Novozamsky, I., Lexmond, Th.M., Houba, V.J.G. (1993): A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 51 (1-4), 47-58.
- Rao, C.R.M., Sahuquillo, A., Lopez Sanchez, J.F. (2008): A Review of the Different Methods Applied in Environmental Geochemistry for Single and Sequential Extraction of Trace Elements in Soils and Related Materials, *Water Air Soil Pollut.* 189 (1-4), 291-333.
- Roje, V., Dujmović, M., Perković, I., Bakšić, D., Pernar, N. (2015): Assessment of mobility of the trace elements in soils from the Medvednica mountain forests. U: XXIV. hrvatski skup kemičara i kemijskih inženjera, Zagreb, Hrvatska, 21-24. travnja 2015. – Book of Abstracts, Ukić, Š., Bolanča, T. (eds.), str. 164.
- Roje, V., Galinec, F. (2019): Water as a mild extractant of metals and metalloids from the samples of the selected certified reference materials and subsequent multi-elemental quantification by ICP-AES, *Environ. Monit. Assess.* 191 (9), 534.
- Roje, V., Grba, D., (2021): Ekstrakcija metala i metaloida iz uzoraka tla razrijeđenim kiselinama. In 18th Ružička Days “Today Science – Tomorrow Industry” (Vukovar, Croatia 16-18 September 2020) – Proceedings, Jukić, A., Očelić Bulatović, V., Kučić Grgić, D. (eds.), Zagreb & Osijek, Croatia, pp. 186-196.

- Sahuquillo, A., Rigol, A., Rauret, G. (2003): Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments, *Trends Anal. Chem.* 22 (3), 152-159.
- Ure, A.M. (1996): Single extraction schemes for soil analysis and related applications, *Sci. Total Environ.* 178(1-3), 3-10.

Extraction of metals and metalloids from soil samples by aqueous solutions of ammonium salts

Vibor Roje*, Ivor Košutić

University of Zagreb, Faculty of Forestry and Wood Technology, Svetošimunska cesta 23,
10002 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: vroje@sumfak.hr

original scientific paper

Summary

In research and professional practice there is known a lot of different methods for analysis of metals and metalloids in soil samples. The choice of a method mainly depends on aims and scopes of a research. So, a testing of bioavailability of metals and metalloids in soils is more appropriately performed by applying some mild extraction reagent than by use of a strong reagent (*e.g. aqua regia*) in strong reaction conditions, for extraction of such analytes from soil samples. By exposing the soil samples to mild extraction conditions one tends to arrange such conditions that resemble conditions that exist in the environment; the results that are obtained in such manner allow to draw conclusions about possible fate of such contaminants in the soil of a researched area. Two analytical methods for determination of selected chemical elements in soil samples are described in this paper. The methods consist of the extraction step that implies shaking of the samples with a solution of ammonium salt (NH_4Cl or NH_4NO_3 , 0.1 mol dm^{-3}) and quantification of the selected 25 analytes (Al, As, B, Ba, Be, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Sb, Se, Sr, Ti, Tl, and Zn) in the prepared extract by inductively coupled plasma – atomic emission spectrometry. The tests were performed on the certified reference material for soil Metranal-33.

Keywords: ammonium chloride, ammonium nitrate, extraction, ICP-OES, soil, trace elements

Određivanje granice stvaranja trostrukih iona u otopinama kalijevog bromida u 90 %-tnom butan-2-olu

Vesna Sokol*, Boris-Marko Kukovec, Ante Radoš

Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Ruđera Boškovića 35,
21000 Split, Hrvatska

*Dopisni autor: vsokol@ktf-split.hr

originalni znanstveni rad

Sažetak

U radu je istraživana vodljivost otopina kalijevog bromida u 90 %-tnom butan-2-olu pri pet temperatura u području od 15 do 35 °C. Eksperimentalni podaci su obrađeni kemijskim modelima provodnosti utemeljenim na jednadžbi Fuoss-Hsia. Određene su granične molarne provodnosti elektrolita (Λ_0) i termodinamička konstanta ravnoteže (K_A) pri svim temperaturama, te su izvedene termodinamičke veličine za reakciju asocijacije (ΔG° , ΔH° i ΔS°) kao i aktivacijska entalpija ionskog gibanja (ΔH^\ddagger) pri 25 °C. Procijenjena je granična koncentracija nastajanja trostrukih iona. Reakcija stvaranja trostrukih iona istražena je uz pretpostavku da su ravnotežne konstante trostrukih kationa i aniona jednake $K_T^+ = K_T^- = K_T$. Određene su vrijednosti granične molarne provodnosti trostrukih iona (Λ_0^T) i konstante ravnoteže (K_T) te su izračunate termodinamičke veličine za reakciju nastajanja trostrukih iona.

Ključne riječi: KBr, smjesa butan-2-ola i vode, ionski parovi, trostruki ioni, termodinamičke veličine

Uvod

Izborom specifičnog medija za proučavanje kemijskih procesa moguće je odrediti termodinamička i kinetička svojstva koja ovise o svojstvima medija. Miješana otapala su osobito značajna pa se uglavnom koriste dva otapala u različitim omjerima. Za provođenje eksperimenata najčešće se koristi voda u kombinaciji s nekim organskim otapalom kao što su primjerice alkoholi (Bhat i Shetty, 2010; Borun et al., 2010; Pura i Atun 2003). Spoznaje o karakteristikama otapala dobiju se praćenjem njihova utjecaja na kinetičko i termodinamičko ponašanje otopljenog elektrolita.

U otapalima niske relativne električne permitivnosti dolazi do reakcije ionske asocijacije pri nižim koncentracijama, a kod većih koncentracija dolazi do reakcije asocijacije ionskog para s drugim kationima i anionima, pa nastaju trostruki ioni (Wright, 2007).

U ovom radu ispitano je ponašanje kalijeveg bromida u smjesi butan-2-ola i vode u kojoj je maseni udio alkohola bio 90 %. Iz koncentracijske ovisnosti elektrolitne vodljivosti razrijeđenih otopina izvedene su granična molarna provodnost (Λ_0) i termodinamička konstanta ravnoteže za ionsku asocijaciju (K_A). Interakcije ion-ion opisuje termodinamička konstanta ravnoteže K_A , odnosno veličina ΔG° , a na njih uglavnom utječe relativna permitivnost otapala. Za obradu podataka korišten je kemijski model provodnosti utemeljen na jednadžbi Fuoss-Hsia (Fuoss i Hsia, 1967). Također, kemijskim modelom provodnosti procijenjena je i granična koncentracija nastajanja trostrukih iona. Modelom provodnosti trostrukih iona (Beronius, 1974) određene su vrijednosti granične molarne provodnosti trostrukih iona (Λ_0^T) i konstante ravnoteže (K_T), te su izračunate termodinamičke veličine za reakciju nastajanja trostrukih iona.

Materijali i metode

Za pripremu radnih otopina korišteni su redestilirana voda (električna provodnost $\sim 10^{-6}$ S/cm), butan-2-ol (Merck, p.a.), KBr (Merck, suprapur). Butan-2-ol je destilirana u Vigreuxovoj koloni. Prva i zadnja frakcija destilata su odbačene dok je srednja frakcija korištena za pripremu radnih otopina. KBr je sušen na 105 °C do konstantne mase. Čisto 90 %-tno miješano otapalo pripremljeno je vaganjem butan-2-ola i redestilirane vode. Matična otopina ima najveću koncentraciju elektrolita u miješanom otapalu i koristi se za pripremu radnih otopina manjih koncentracija.

Za mjerenje otpora radnih otopina korišten je LCR-metar Wayne-Kerr 6430 A koji je povezan s uranjajućom konduktometrijskom ćelijom Orion 018001. Točnost mjerenja je 0,02 %, napon se može mijenjati u rasponu od 0 do 2 V, a frekvencija od 20 Hz do 500 kHz. Mjerenja su obavljena pri pet temperatura: 15, 20, 25, 30 i 35 °C. Ćelija je termostatirana u kupelji Thermo Haake DC 10 – V 15/B koja održava temperaturu unutar $\pm 0,01$ °C. Otpori su mjereni pri frekvencijama od 500, 800, 1000 i 2000 Hz pri izlaznom naponu od 400 mV. Ovisnost otpora o recipročnoj vrijednosti frekvencije ($1/f$) može se prikazati pravcem. Otpor radne otopine R_o određuje se ekstrapolacijom pravca na beskonačno veliku frekvenciju ($1/f = 0$). Za homogeniziranje radnih otopina korištena je uronjiva magnetska miješalica HMC Cyclone Power 7. Prije mjerenja otpora radnih otopina određena je konstanta ćelije baždarenjem s razrijeđenim otopinama KCl (Barthel et al., 1980). Srednja vrijednost konstante ćelije iznosi $C = 0,104$ l/cm.

Eksperimentalna molarna provodnost Λ / Scm²/mol radnih otopina računa se prema izrazu:

$$\Lambda = (10^3/c)(C/R_o - L_s) \quad (1)$$

gdje je L_s / S/cm električna provodnost čistog otapala, R_o / Ω otpor radne otopine, a C / l/cm konstanta ćelije. Koncentracija c / mol dm⁻³ određuje se iz molalnosti i gustoće prema izrazu:

$$c = b\rho/(1 + Mb) \quad (2)$$

gdje su b molalnost, ρ / kg/dm³ gustoća otopine, M molarna masa elektrolita ($M_{\text{KBr}} = 0,119$ kg/mol). Gustoća matične otopine određena je mjeračem gustoće Anton Paar DMA 4500M pri 20 °C. Točnost mjerenja gustoće iznosi $\pm 5/10^5$ g cm⁻³. Gradijent gustoće ($D = 0,035$ kg² / (dm³ mol)) određen je uz pretpostavku da gustoća otopine pokazuje linearnu ovisnost o molalnosti. Gustoća otopina KBr (ρ) molalnosti (b) računa se prema izrazu:

$$\rho = \rho_0 + Db \quad (3)$$

gdje je ρ_0 / kg/dm³ gustoća čistog otapala.

Eksperimentalni podaci obrađeni su jednadžbom za provodnost Fuoss-Hsia (Fuoss i Hsia, 1967) u verziji Fernández-Prinia (Fernandez-Prini, 1969):

$$\Lambda = \Lambda_0 - S(c)^{1/2} + E c \ln(c) + J_1(c) - J_2(c)^{3/2} \quad (4)$$

Parametri jednadžbe S , E , J_1 i J_2 ovise o relativnoj permitivnosti (ϵ_r) i viskoznosti (η) otapala, temperaturi, graničnoj molarnoj provodnosti, naboju iona; J_1 i J_2 ovise još i o asocijacijskom razmaku.

Kemijski model provodnosti

Reakcija asocijacije prikazana je izrazom:



Ionskom asocijacijom se smanjuje broj slobodnih iona elektrolita. Povezivanjem jednadžbi za provodnost sa stupnjem disocijacije α i termodinamičkom konstantom asocijacije K_A dobije se izraz za kemijski model provodnosti λ :

$$\lambda = \Lambda_{c\alpha} / (1 + K_A c \alpha \gamma_{\pm}^2) \quad (6)$$

γ_{\pm} srednji koeficijent aktiviteta slobodnih iona koncentracije $c\alpha$. Srednji koeficijent aktiviteta u gore navedenoj jednadžbi računa se prema Debyeu i Hückelu:

$$\gamma_{\pm}^2 = \exp[-2\kappa q / (1 + \kappa R)] \quad (7)$$

gdje asocijacijski razmak R predstavlja udaljenost između centara dvaju suprotno nabijenih iona pri najvećem približenju u slobodnom stanju ili pri najvećoj razdvojenosti u ionskom paru, a κ je Debyeov parametar:

$$\kappa^2 = 16\pi N_A q \alpha c ; \quad q = \frac{e^2}{8\pi\epsilon_0\epsilon_r kT} \quad (8)$$

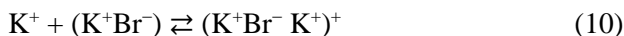
Kao vrijednost $\Lambda_{c\alpha}$ u izrazu (6) uvodi se jednadžba za provodnost jakih elektrolita Fuoss-Hsia (4) koja se tako postavljena odnosi na frakciju $c\alpha$ slobodnih iona slabog elektrolita, (model FHFP):

$$\Lambda_{c\alpha} = \Lambda_0 - S(c\alpha)^{1/2} + E c\alpha \ln(c\alpha) + J_1(c\alpha) - J_2(c\alpha)^{3/2} \quad (9)$$

Rješenja kemijskog modela su granična molarna provodnost Λ_0 i termodinamička konstanta ravnoteže K_A za reakciju asocijacije.

Model provodnosti trostrukih iona

U otopinama simetričnih elektrolita tipa 1:1 kod većih koncentracija dolazi do reakcije asocijacije ionskog para s drugim kationima i anionima, pa nastaju trostruki ioni. Navedene reakcije prikazane su slijedećim ravnotežnim reakcijama:



Obično se pretpostavlja jednaka vjerojatnost formiranja trostrukih kationa i aniona, što ima za posljedicu da su i ravnotežne konstante jednake: $K_T^+ = K_T^- = K_T$ (Barthel et al., 1998). Model provodnosti trostrukih iona dan je izrazom:

$$\lambda = \frac{\Lambda_{ci}}{\Lambda_0} (\alpha\Lambda_0 + \alpha_T\Lambda_0^T) \quad (12)$$

Kao vrijednost Λ_{ci} u izrazu (12) uvodi se jednadžba za provodnost jakih elektrolita Fuoss-Hsia (4) (model TRIPLFHFP); α i α_T označava se dio ionskih parova, odnosno trostrukih iona nastao od 1 mola elektrolita. Rješenja modela su granična molarna provodnost trostrukih iona Λ_0^T i termodinamička konstanta ravnoteže K_T za reakciju nastajanja trostrukih iona.

Standardne termodinamičke veličine

Standardne termodinamičke veličine za reakciju asocijacije dobivene su korištenjem podataka za termodinamičku konstantu ravnoteže K_A pri temperaturama od 15 °C do 35 °C. Standardni prirast entalpije (ΔH°) određuje se iz nagiba pravca prema relaciji (13):

$$\ln K_A = -\Delta H^\circ/(RT) + C \quad (13)$$

Prirast standardne Gibbsove energije (ΔG°) računa se prema relaciji (14):

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_A \quad (14)$$

a prirast entropije (ΔS°) prema relaciji (15):

$$\Delta H^\circ = \Delta G^\circ + T \Delta S^\circ \quad (15)$$

Standardne termodinamičke veličine za reakciju nastajanja trostrukih iona dobivene su preko izraza (13 – 15) korištenjem podataka za termodinamičku konstantu ravnoteže K_T pri temperaturama od 15 °C do 35 °C.

Aktivacijska entalpija ionskog gibanja (ΔH^\ddagger) određuje se iz nagiba pravca prema relaciji (16):

$$\ln A_0 + 2/3 \ln \rho_0 = -\Delta H^\ddagger / RT + B \quad (16)$$

Rezultati i rasprava

Eksperimentalne molarne provodnosti

U tablici 1 prikazana su svojstva 90 %-tnog butan-2-ola. Gustoća (ρ_0) određena je mjerачem gustoće Anton Paar DMA 4500M, a koeficijent viskoznosti (η) Ostwaldovim viskozimetrom. Vrijednosti relativne električne permitivnosti (ϵ_r) preuzete su iz literature (Bald et al., 1992), a vrijednosti vodljivosti (L_s) prosjek su više odvojenih mjerenja.

Tablica 1. Svojstva miješanog otapala 90 %-tnog butan-2-ola

Table 1. Properties of the mixed solvent 90 % butan-2-ol

	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
$\rho_0 / \text{g/cm}^3$	0,8308	0,8262	0,8216	0,8174	0,8131
$10^3 \eta / \text{Pa s}$	4,069	3,363	2,811	2,373	2,027
ϵ_r	17,8	17,2	16,6	16	15,4
$10^8 L_s / \text{S/cm}^1$	1,9	2,1	2,3	2,6	2,8

U tablici 2 prikazane su eksperimentalne molarne provodnosti otopina KBr u 90 %-tnom butan-2-olu pri raznim temperaturama.

Tablica 2. Molarna provodnost ($\Lambda / S \text{ cm}^2/\text{mol}$) otopina KBr molalnosti b u 90 %-tnom butan-2-olu
Table 2. Molar conductivities ($\Lambda / S \text{ cm}^2/\text{mol}$) for KBr in 90 % butan-2-ol mixture

$(b / \text{mol/kg})10^4$	$\Lambda / S \text{ cm}^2/\text{mol}$				
	15 °C	20 °C	25 °C	30 °C	35 °C
1,9971	11,294	13,424	15,854	18,468	21,343
3,279	10,683	12,659	14,864	17,258	19,772
4,564	10,112	11,959	14,011	16,21	18,583
5,8148	9,729	11,478	13,400	15,464	17,664
7,0397	9,364	11,025	12,863	14,814	16,917
8,3305	9,053	10,64	12,387	14,254	16,243
9,6396	8,755	10,274	11,948	13,744	15,646
10,861	8,537	10,011	11,628	13,357	15,161
12,092	8,323	9,762	11,323	12,98	14,748
13,414	8,136	9,517	11,029	12,631	14,332
14,692	7,944	9,302	10,775	12,342	13,975
15,925	7,795	9,111	10,549	12,076	13,67
17,202	7,648	8,926	10,339	11,829	13,385
18,441	7,535	8,797	10,172	11,629	13,123
19,702	7,403	8,633	9,985	11,403	12,904
31,556	6,518	7,577	8,731	9,945	11,225
43,372	5,95	6,901	7,942	9,022	10,151
55,19	5,521	6,403	7,356	8,35	9,383
67,001	5,207	6,024	6,915	7,843	8,81
78,806	4,953	5,733	6,574	7,456	8,372
90,645	4,738	5,48	6,282	7,122	7,974
102,46	4,548	5,259	6,028	6,826	7,638
114,28	4,395	5,079	5,817	6,586	7,383
126,12	4,258	4,921	5,636	6,381	7,135
137,93	4,135	4,778	5,469	6,191	6,933
149,26	4,025	4,651	5,324	6,028	6,744
161,61	3,919	4,531	5,184	5,866	6,565
173,37	3,83	4,426	5,068	5,735	6,423
185,15	3,746	4,329	4,958	5,609	6,271
199,98	3,648	4,213	4,822	5,459	6,103

Granična koncentracija nastajanja trostrukih iona

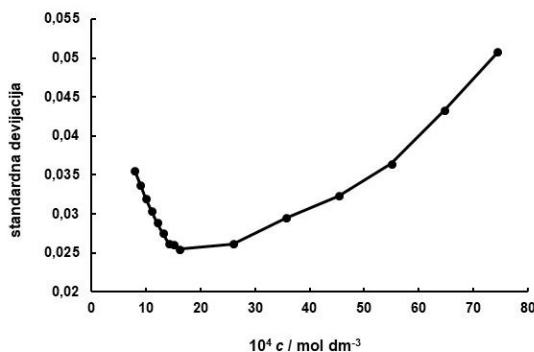
U svrhu procjene granične koncentracije nastajanja trostrukih iona u 90 %-tnom butan-2-olu, kemijskim modelom provodnosti izgrađenim na jednadžbi FHFP obrađene su vrijednosti molarne provodnosti otopina KBr u širokom koncentracijskom području. Preciznost kojom je određen model provodnosti opisuje

standardna devijacija (s_{Λ}^2) koja se određuje iz odstupanja eksperimentalnih molarnih provodnosti (Λ) od modela FHFP (λ):

$$s_{\Lambda}^2 = \frac{\sum(\Lambda - \lambda)^2}{(n - 2)} \quad (17)$$

n je broj koncentracija.

Iz grafičkog prikaza ovisnosti standardne devijacije dobivenih kemijskim modelom o koncentraciji, procijenjena je vrijednost granične koncentracije elektrolita pri kojoj se počinju formirati trostruki ioni. Na slici 1 prikazana je ovisnost standardne devijacije o koncentraciji otopina kalijevog bromida u 90 %-tnom butan-2-olu na 25 °C.



Slika 1. Ovisnost standardne devijacije (s_{Λ}) o koncentraciji ($c / \text{mol dm}^{-3}$) otopina kalijevog bromida u 90 %-tnom butan-2-olu na 25 °C

Figure 1. Dependence of the standard deviation (s_{Λ}) on the concentration ($c / \text{mol dm}^{-3}$) of potassium bromide solutions in 90 % butan-2-ol at 25 °C

Na slici 1 su ispuštene neke najviše točke zbog bolje preglednosti 9 najnižih. Vrijednosti standardne devijacije se smanjuju u području nižih koncentracija što znači da se u tom koncentracijskom području stvaraju samo ionski parovi. Desno od minimuma krivulje (oko $20/10^4 \text{ mol dm}^{-3}$) opaža se postojani porast standardne devijacije. Tu se u znatnoj mjeri počinju stvarati trostruki ioni, situacija u otopini postaje složena i kemijski model provodnosti više je ne može dobro opisati. Minimum krivulje odgovara, dakle, graničnoj koncentraciji trostrukih iona. Granična koncentracija nastajanja trostrukih iona procijenjena je na $0,002 \text{ mol dm}^{-3}$.

Rješenja kemijskih modela provodnosti FHFP i TRIPLFHFP

Eksperimentalni podaci iz tablice 2 (samo koncentracije do granične vrijednosti) obrađeni su kemijskim modelom provodnosti FHFP uz asocijacijski razmak $R = q$ (Justice, 1971). Prema ovom modelu udaljenost središta iona u ionskom paru ovisi samo o fizikalnim svojstvima otapala. Vrijednosti Λ_0 i K_A prikazane su u tablici 3.

Tablica 3. Vrijednosti Λ_0 , K_A za KBr u 90 %-tnom butan-2-olu u temperaturnom području od 15 °C do 30 °C prema modelu FHFP uz $R = q$

Table 3. Λ_0 , K_A for KBr in 90 % butan-2-ol mixture, FHFP model, $R = q$

$T / ^\circ\text{C}$	$\Lambda_0 / \text{S cm}^2/\text{mol}$	K_A	R/nm
15	13,42	1107	1,629
20	16,16	1245	1,657
25	19,33	1413	1,688
30	22,84	1594	1,722
35	26,80	1815	1,760

Povećanje granične molarne provodnosti s porastom temperature uzrokovano je smanjivanjem viskoznosti miješanog otapala.

Vrijednosti standardnih termodinamičkih veličina ΔH° , ΔG° i ΔS° za reakciju asocijacije elektrolita KBr prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Termodinamičke veličine za reakciju ionske asocijacije KBr u 90 %-tnom butan-2-olu pri 25 °C

Table 4. Thermodynamic quantities for the reaction of ionic association KBr in 90 % butan-2-ol mixture at 25 °C

$\Delta H^\circ / \text{kJ/mol}$	$\Delta G^\circ / \text{kJ/mol}$	$\Delta S^\circ / \text{J/Kmol}$	$\Delta H^\ddagger / \text{kJ/mol}$
18,2	-17,9	122	25

Veličine K_A i ΔG° daju uvid u međudjelovanja ion-ion, a najveći utjecaj na te veličine ima relativna električna permitivnost otapala. Preko veličina ΔH° i ΔS° mogu se dobiti saznanja o međudjelovanjima ion-otapalo. Standardni prirast Gibbsove energije je negativan iz čega proizlazi da je reakcija asocijacije spontana. Vrijednosti standardnog prirasta entalpije i entropije su pozitivne. Entropijski član $T\Delta S^\circ$ prevladava u odnosu na ΔH° , a to ukazuje na jake strukturne efekte gdje razgradnja solvacijskog omotača dominira nad izgradnjom strukture otapala i smanjenjem broja slobodnih iona zbog asocijacije. Eyringova aktivacijska entalpija ionskog gibanja

opisuje temperaturnu ovisnost granične molarne provodnosti. Dobivena vrijednost ΔH^\ddagger prikazana je u tablici 4.

Eksperimentalni podaci iz Tablice 2 (samo koncentracije iznad granične vrijednosti) obrađeni su modelom provodnosti trostrukih iona TRIPLFHFP za čvrstu vrijednost omjera $A_0^T/A_0 = 0,67$ (Barthel et al., 1998). Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Vrijednosti A_0^T i K_T za KBr u 90 %-tnom butan-2-olu u temperaturnom području od 15 °C do 30 °C prema modelu TRIPLFHFP za $A_0^T/A_0 = 0,67$

Table 5. A_0^T , K_T for KBr in 90 % butan-2-ol mixture, TRIPLFHFP model, $A_0^T/A_0 = 0,67$

$T / ^\circ\text{C}$	$A_0^T/S \text{ cm}^2/\text{mol}$	K_T
15	8,95	8,62
20	10,78	18,32
25	12,89	30,52
30	15,23	44,52
35	17,87	59,32

Vrijednosti granične molarne provodnosti trostrukih iona (A_0^T) i konstante ravnoteže za reakciju nastajanja trostrukih iona (K_T) ujednačeno rastu s porastom temperature. Vrijednosti standardnih termodinamičkih veličina ΔH° , ΔG° i ΔS° za reakciju nastajanja trostrukih iona prikazane su u tablici 6.

Tablica 6. Termodinamičke veličine za reakciju nastajanja trostrukih iona pri 25 °C

Table 6. Thermodynamic quantities for the triple ion formation at 25 °C

$\Delta H^\circ / \text{kJ/mol}$	$\Delta G^\circ / \text{kJ/mol}$	$\Delta S^\circ / \text{J/(Kmol)}$
50,5	-9,3	200

U odnosu na asocijaciju u parove, entalpijske i entropijske promjene su pozitivnije, najvjerojatnije zbog potpunijeg rušenja solvacijskog omotača u tijeku reakcije.

Zaključci

Granična koncentracija nastajanja trostrukih iona kalijevog bromida u 90 %-tnom butan-2-olu procijenjena je na 0,002 mol/dm³. Povećanje granične molarne provodnosti s porastom temperature uzrokovano je smanjivanjem viskoznosti miješanog otapala. Vrijednosti standardnog prirasta entalpije i entropije za reakcije nastajanja ionskih parova i trostrukih iona su pozitivne. U odnosu na asocijaciju u parove, veličine ΔH° i ΔS° su pozitivnije, što ukazuje da trostruki ioni moguće

zadržavaju tek neznatni dio solvacijskih omotača sastavnih iona. Reakcije nastajanja ionskih parova i trostrukih iona su spontane. Endotermne reakcije mogu biti spontane jedino ako im je entropijski član ($T\Delta S^\circ$) veći od ΔH° kao što je u ispitivanoj smjesi slučaj. Ispituju li se elektroliti sa zajedničkim ionom u istom miješanom otapalu, može se ustanoviti i utjecaj prirode ko-iona na ponašanje elektrolita. U tu svrhu nastavak istraživanja bit će usmjeren prema mjerenju vodljivosti alkalijских bromida u istom miješanom otapalu.

Literatura

- Bald, A., Gregorowicz, J., Szejgis, A. (1992): Conductometric and potentiometric studies of NaI solutions in water + *sec*-butanol mixtures at 298.15 K, *J. Electroanal. Chem.* 340, 153–167.
- Barthel, J.M.G., Feuerlein, F., Neueder, R., Wachter, R. (1980): Calibration of conductance cells at various temperatures, *J. Solution Chem.* 9, 209-219.
- Barthel, J.M.G., Krienke, H., Kunz, W. (1998): Physical Chemistry of Electrolyte Solutions, Darmstadt : Steinkopff : New York: Springer, pp. 8, 72.
- Beronius, P. (1974): Interpretation of kinetic data for reactions involving ions and ion-pairs using an extended conductance equation, *Acta. Chem. Scand. A*, 28, 77-82.
- Bhat, J.A., Shetty, M.K. (2010): Ion Association and Solvation of Sulfathiazole Sodium in Aqueous and Partial Aqueous Media, *J. Chem. Eng. Data* 55 (11), 4721-4724.
- Borun, A., Florczak, A., Bald, A. (2010): Conductance Studies of NaCl, KCl, NaBr, NaI, NaBPh₄, Bu₄NI, and NaClO₄ in Water + 2-Butoxyethanol Mixtures at T = 298.15 K, *J. Chem. Eng. Data* 55 (9), 3725-3730.
- Fernandez-Prini, R. (1969): Conductance of electrolyte solutions. A modified expression for its concentration dependence, *Trans. Faraday Soc.* 65, 3311-3313.
- Fuoss, R.M., Hsia, K.L. (1967): Association of 1-1 salts in water, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 57 (6), 1550-1557.
- Justice, J. C. (1971): An Interpretation for the Distance Parameter of the Fuoss-Onsager Conductance Equation in the Case of Ionic Association, *Electrochim. Acta*, 16, 701–712.
- Pura, S., Atun, G. (2003): Ion Association Between Hexaamminecobalt (III) Ion and Monovalent Anions in Methanol-Water Mixtures from 10 to 50°C, *J. Solution. Chem.* 32, 341-361.
- Wright, M.R. (2007): An Introduction to Aqueous Electrolyte Solutions, Chichester, West Sussex, England: John Wiley and Sons LTD, pp. 17-21.

Determination of the triple ions formation limit in solutions of KBr in 90 % butan-2-ol

Vesna Sokol*, Boris-Marko Kukovec, Ante Radoš

University of Split, Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35,
21000 Split, Croatia

*Corresponding author: vsokol@ktf-split.hr

original scientific paper

Summary

Molar conductivity of potassium bromide in binary mixture of butan-2-ol and water with 90 % alcohol content was investigated at five temperatures in the range from 15 °C to 35 °C. Data were processed using conductivity models based on the Fuoss-Hsia equation. The limiting molar conductivity of electrolyte (Λ_0) and the thermodynamic equilibrium constant for the ion-association reaction (K_A) were derived at each temperature. Thermodynamic quantities of the association reaction (ΔG° , ΔH° and ΔS°), as well as the activation enthalpy of the ionic movement (ΔH^\ddagger) were derived at 25 °C. The limiting concentration for the triple ion formation was estimated. The formation of triple ions was investigated assuming equal equilibrium constants of triple cation and anion, $K_{T^+} = K_{T^-} = K_T$. The limiting molar conductivity of triple ions (Λ_0^T) and the constant K_T were determined, and thermodynamic quantities of the triple ion formation were derived.

Keywords: potassium bromide, butan-2-ol and water mixture, ion pairs, triple ions, thermodynamic quantities

Volumetric properties of solutions of 1-methylimidazolium acetate ionic liquid in water, *N,N*-dimethylformamide, *N,N*-dimethylacetamide, and dimethyl sulfoxide

Renato Tomaš^{1*}, Ivan Pehar¹, Zdzisław Kinart², Milan Vraneš³,
Snežana Papović³, Teona Teodora Borović³

¹University of Split, Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35,
21000 Split, Croatia

²University of Lodz, Faculty of Chemistry, 90-236 Lodz, Pomorska 163/165, Poland

³University of Novi Sad, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 3,
21000 Novi Sad, Serbia

*Corresponding author e-mail: rtomas@ktf-split.hr

original scientific paper

Summary

In this report, we studied the volumetric properties (apparent molar volume, standard partial molar volumes, apparent molar volume at infinite dilution, limiting apparent molar expansibilities and Heppler's coefficient) of 1-methylimidazolium acetate, [Mim][Ac] ionic liquid, IL binary mixtures with two polar aprotic amides: *N,N*-dimethylacetamide (DMA), and *N,N*-dimethylformamide (DMF), and one polar aprotic organosulfur and environmentally-friendly solvent: dimethyl sulfoxide (DMSO). Namely, volumetric parameters are calculated from the experimental densities and reported in the temperature range from (278.15 to 313.15) K in water, DMA and DMF or (293.15 to 318.15) K in DMSO at atmospheric pressure (0.1 MPa) and the molality range from (~0.0050 to ~0.1000) mol kg⁻¹, respectively. The validity of Masson's equation was checked and applied to describe the apparent molar volume dependence on molarity. The apparent molar volume at infinite dilution and interaction coefficient were obtained from this dependence at each temperature. Finally, structure-maker or structure-breaker properties of investigated IL in various solvents are discussed. According to the values of Heppler's coefficients, [Mim][Ac] IL, in DMF, DMA, and DMSO could be described as structure-breakers. Values of the Heppler's coefficient for [Mim][Ac] in water medium is around zero, so this investigated IL is classified as the borderline.

Keywords: 1-methylimidazolium acetate ionic liquid, water, *N,N*-dimethylformamide, *N,N*-dimethylacetamide, dimethyl sulfoxide, Masson's equation, volumetric properties

Introduction

Volumetric analysis is required to elucidate the physicochemical phenomena of solutes in solutions. *E.g.*, the standard partial molal entropy, heat capacity, volume of the solutes are sensitive to the rearrangement of solvent molecules around a solute particle. Various concepts regarding molecular processes in solutions such as, electrostriction, hydrophobic hydration, micellization, and co-sphere overlap during

solute-solute interactions have been mainly derived and interpreted from the partial molar volume data of many compounds (Gurung and Roy, 2010; Chen et al., 2022). Fundamental physicochemical properties for the systems involving ionic liquids (ILs) in different solvents are still necessary, which are associated with applying of ILs. Tomaš (2021) recently published a review paper on imidazolium-based ILs and described in details some research method of investigations, applications and physicochemical properties. In general, we can say that ILs have many significant properties, e.g. high thermal stability, negligible vapor pressures, and high ionic conductivity.

Following our recent systematic reports on volumetric and viscosimetric studies for various imidazolium chloride ILs with different length chain in water (Tomaš et al., 2018), and conductivity and volumetric studies for the same ILs in ethylene glycol (Tomaš et al., 2022), in this work is extended study using synthesized 1-methylimidazolium acetate IL, [Mim][Ac] in water (W), *N,N*-dimethylformamide (DMF), *N,N*-dimethylacetamide (DMA) and dimethyl sulfoxide (DMSO). Namely, by precise density measurement of solutions of [Mim][Ac] in different polar protic or polar aprotic solvents, at temperature range, $T = 278.15 - 313.15$ K or $293.15 - 313.15$ K and different molalities, $m = \sim 0.0050 - \sim 0.1000$ mol kg⁻¹ other fundamental volumetric data were obtained such as apparent molar volume, partial molar volumes for IL and solvents, apparent molar volume at infinite dilution, limiting apparent molar expansibility and Heppler's coefficient.

To our knowledge, these data have not yet been published in literature. Only, physicochemical properties (density and viscosity) of aqueous solutions of [Mim][Ac] at several temperatures are presented (Chen et al., 2014). Similar investigations were performed for pure [Mim][Ac] and its binary mixtures with alcohols, i.e. methanol, ethanol, propan-1-ol and butan-1-ol at different temperatures (Qian et al., 2012). Furthermore, Shekaari et. al. (2008) reported volumetric properties of the ILs, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate, [bmim][BF₄] in different organic solvents (methanol, MeOH, acetonitrile, MeCN, tetrahydrofuran, THF, DMA and DMSO) at 298.15 K. They was found that the strength of interaction between [bmim][BF₄] with the studied organic solvents has the order: DMSO > DMA > MeOH > MeCN > THF. Almeida et. al. (2012) investigated thermophysical properties for five acetate-based ILs, such as, *N,N*-dimethyl-*N*-ethylammonium acetate, 1-ethylimidazolium acetate, 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate, and 1-butyl-1-methylpyrrolidinium acetate. The temperature dependence of the measured properties (density, viscosity, refractive index, surface tension), the surface entropy and enthalpy, and the critical temperature, were estimated. The IL as 1-hexyl-3-methylimidazolium acetate is widely used in chemical and bio-chemical processes (Yang and Feng, 2020). Namely the thermophysical properties of density and viscosity for IL in DMA, DMF and DMSO were measured from 303.15 to 338.15 K. Based on the measurement values, the derived properties of excess molar volumes, thermal expansion coefficient, and the energy barrier were calculated in this work. Yang et. al. (2017) studied densities

and viscosities of binary mixtures of 1-octyl-3-methylimidazolium chloride with aprotic cosolvents, *i.e.*, DMA, DMF, DMSO, and pyridine at temperatures ranging from (303.15 to 353.15) K at atmospheric pressure. The effects of cosolvents on the density and viscosity are discussed. Yan et. al. (2014), measured density, refractive index, and viscosity for different imidazolium chloride ILs in DMF at atmospheric pressure from 288.15 K to 318.15 K. Their results show that DMF can effectively adjust the physicochemical properties of 1-alkyl-3-methylimidazolium ILs. Bešter-Rogač et. al. (2010) in their work characterized 1-butyl-3-methylimidazolium chloride and 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate in MeOH and DMSO by conductometry. Volumetric properties of binary mixtures of 1-butyl-3-methylimidazolium tris(pentafluoroethyl)trifluorophosphate with *N*-methylformamide, *N*-ethylformamide, DMF, *N,N*-dibutylformamide and DMA from 293.15 to 323.15 K were measured by Vraneš et. al. (2014). Stoppa et. al. (2009) reported data at 298.15 K for the conductivity of selected binary mixtures of the ILs [emim][BF₄], [bmim][BF₄], [bmim][PF₆], [bmim][DCA], and [hmim][BF₄] with polar solvents (water, propylene carbonate, DMSO, MeOH, dichloromethane).

Clases of imidazolium-based ILs with acetate anion have received more and more attention and shown a great potential in absorption of acidic gas, dissolution of cellulose and biomass and extractive distillation (Chen et al., 2014).

Experimental section

Materials

Solvents DMF, DMA, and DMSO were purchased from Merck (*p.a.* quality) and were used without further purification. Reagents 1-methylimidazole, 99 mass. %, and acetic acid, ≥ 99.7 mass. % are also used without further purification for synthesis [Mim][Ac]. Demineralized water was distilled two times.

All the solutions of investigated IL in organic solvents and water medium were made by weight using an analytical balance (Sartorius RC 210D with an uncertainty of ± 1 × 10⁻⁵ g. Molalities, *b*, of IL in investigated solvents, were converted into molar concentration, *c*, by using the following standard relation:

$$c = \frac{1000 \cdot \rho \cdot b}{(1000 + b \cdot M_{IL})} \quad (1)$$

where ρ is density of the solutions, and M_{IL} is the molar mass of the investigated IL. Experimental data for density of solutions and for solvents at different temperatures are given in Table 1a) and Table 1b) as functions on temperature and molality. For all tested systems, three times measurements were performed. Therefore, the following

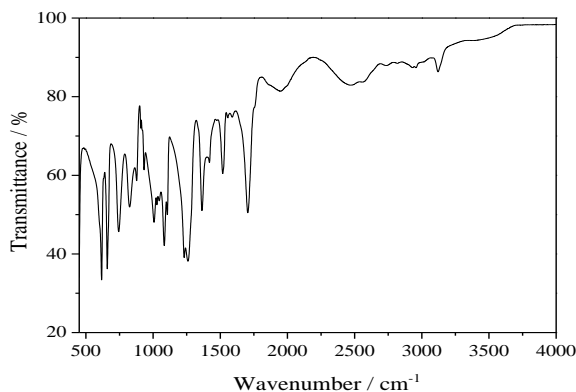
are the average data. Our densities for investigated solvents are in good agreement with literature data.

Synthesis of [Mim][Ac] in our laboratory

[Mim][Ac] was obtained in our laboratory from 1-methylimidazole and acetic acid following the literature method (Qian et. al., 2012) (see Scheme 1), and dried under vacuum at 60 °C for at least 48 h before use. The water content (274 ppm) was determined by Karl Fischer titration, and the structure of [Mim][Ac] was identified by FTIR spectroscopy (see Figure 1).

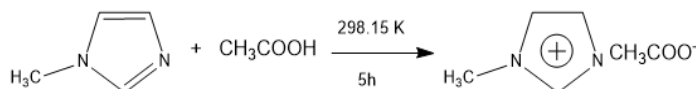
Density measurements

The densities of [Mim][Ac] solutions in water, DMA, DMF and DMSO were measured at atmospheric pressure of 101.3 kPa using fully automated a vibrating tube Anton Paar DMA 4500 M densimeter with a measurement accuracy of $\pm 5 \times 10^{-5}$ g cm⁻³ and repeatability of $\pm 10^{-5}$ g cm⁻³. The thermal control and stability over the entire investigated temperature change are estimated to be 0.01 K. Before each series of measurements, instrument was calibrated at atmospheric pressure using triple-distilled water in the investigated temperature range.



[IR neat: 3120.82 (sym. stretching ν HC((4)C(5)H); 1704.77 (sym. stretching ν of imidazole ring ν CH₃HCH); 1518.20 (asym. stretching ν C-H of -CH₃); 1363.55 (sym. stretching ν CH₃); 1651 (stretching ν C=C); 1455 (C-N-H stretching of imidazole); 1259 (in-plane asymmetric stretching ν of imidazole ring, CCCC stretching); 1105.79 (in-plane ν of imidazolium ring); 1082.99; 1006.97 (CCC in-plane ring bending); 743.84, 732 (out-of-plane C-H bending ν of imidazole ring); 616 (bending ν of imidazole ring)].

Figure 1. FTIR spectrum for ionic liquid 1-methylimidazolium acetate, [Mim][Ac]



Scheme 1. Molecular structure and synthesis of [Mim][Ac]

Results and discussion

A summary of the density values, ρ , as a function on molality, b , and temperature, T , for [Mim][Ac] in water, DMF, DMA, and DMSO solvents are compiled in Tables 1 a) and b). In the same Tables are given density values for investigated solvents, ρ_0 ; these values are in good agreement with the literature values. From the Table 1a) it can be seen that the density for [Mim][Ac] in water, DMF, and DMA increases continuously with IL molality in the mixture. On the other hand, the IL density in DMSO increases, reaches a maximum at $b \approx 0.04 \text{ mol kg}^{-1}$, and then decreases with molality. Densities of all investigated systems in this work decrease with temperature. Regression analysis showed that the second-order polynomial could adequately fit the dependence of ρ on b :

$$\rho = \rho_0 + A_0 \cdot b + A_1 \cdot b^2 \quad (2)$$

where ρ_0 , A_0 and A_1 are polynomial coefficients for investigated systems (IL + solvent). These values are tabulated in Table 2, together with their standard deviations.

The apparent molar volume, V_Φ , can be calculated from the density of the solution using the following expression:

$$V_\Phi = \frac{1000(\rho_0 - \rho)}{b \rho \rho_0} + \frac{M_{\text{IL}}}{\rho} \quad (3)$$

where b is molality of solution, ρ_0 and ρ are the density of solvent and solution, while M_{IL} is the molar mass of IL (solute).

The partial molar volumes of solvents, \bar{V}_1 , and [Mim][Ac] IL, \bar{V}_2 , were calculated using Eqs. (4) and (5) (Dožić et. al. 2014; Vraneš et. al. 2016).

$$\bar{V}_1 = \frac{M_0}{\rho_0} - \frac{M_0 \cdot b^{3/2}}{2000} \left(\frac{\partial V_\Phi}{\partial \sqrt{b}} \right)_{T,p,n} \quad (4)$$

$$\bar{V}_2 = \frac{\sqrt{b}}{2} \left(\frac{\partial V_\Phi}{\partial \sqrt{b}} \right)_{T,p,n_0} + V_\Phi \quad (5)$$

These volumetric data for investigated systems are given in Tables 3 – 6 of this paper. In Table 3 are given, for comparison, V_Φ values for ([Mim][Ac] + water) binary mixture from literature (Chen et. al., 2014). These values are in good agreement with our present study. For molar concentration dependence of partial molar volume of solvent, \bar{V}_1 , and partial molar volume of solute, \bar{V}_2 , at 293.15 K see Figure 4 a) and b). Values \bar{V}_1 do not show significant changes with concentration at a constant temperature. It can also be seen that the \bar{V}_2 values of investigated IL in this study increase significantly with increase of IL concentration in DMA, DMSO, and DMF; in water medium this change is less pronounced.

The V_Φ values are then fitted against square-root of IL molar concentration, $c^{1/2}$, using Masson's equation (Masson D. O., 1929) (see also Figure 2):

$$V_\Phi = V_\Phi^0 + S_V \cdot \sqrt{c} \quad (6)$$

In Eq. (6) V_Φ^0 represents the apparent molar volume of an IL at infinite dilution or intercept, while S_V is the experimental slope, which is a measure of IL-IL interactions. Calculated data for V_Φ^0 and S_V for studied IL in different solvents and different temperatures are summarized in Table 7, together with their standard deviation (σ , \pm) and regression coefficient (R^2). In addition, the temperature dependence of S_V coefficients is presented on Figure 3. The coefficient of S_V gives us valuable information about solute-solute interaction in solution; its negative values indicates weak and positive values strong solute-solute interaction. These interaction increases in the following order: S_V (water) < S_V (DMSO) < S_V (DMF) < S_V (DMA). On the other hand, V_Φ^0 increases in the next order: V_Φ^0 (DMA) < V_Φ^0 (DMF) < V_Φ^0 (water) < V_Φ^0 (DMSO).

In this series, solute-solvent (ion solvation) interactions are strengthened.

Table 1 a). Molalities, b and experimental densities, ρ for solutions of 1-methylimidazolium acetate, [Mim][Ac] in water, DMA and DMF at different temperatures, T at $p = 101,3 \text{ kPa}^a$

$m / \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\rho / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$							
[Mim][Ac] + water								
T / K :	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15
0.0000	0.99989 0.999964 ^b	0.99964 0.999699 ^b	0.99905 0.999099 ^b	0.99815 0.998203 ^b	0.99700 0.997043 ^b	0.99560 0.995645 ^b	0.99399 0.994029 ^b	0.99217 0.992212 ^b
0.0054	1.00003	0.99977	0.99918	0.99828	0.99713	0.99573	0.99411	0.99230
0.0115	1.00020	0.99993	0.99933	0.99843	0.99727	0.99587	0.99426	0.99244
0.0199	1.00040	1.00014	0.99953	0.99863	0.99746	0.99606	0.99444	0.99262
0.0299	1.00065	1.00038	0.99977	0.99886	0.99769	0.99629	0.99466	0.99284
0.0399	1.00092	1.00064	1.00002	0.99911	0.99794	0.99653	0.99490	0.99307
0.0499	1.00118	1.00089	1.00026	0.99934	0.99816	0.99674	0.99512	0.99329
0.0626	1.00150	1.00120	1.00057	0.99965	0.99846	0.99704	0.99540	0.99357
0.0740	1.00179	1.00148	1.00084	0.99991	0.99872	0.99730	0.99566	0.99382
0.0987	1.00241	1.00209	1.00143	1.00049	0.99929	0.99786	0.99621	0.99437
[Mim][Ac] + DMF								
0.0000	0.96309 -	0.95838 0.95896 ^c	0.95362 0.95379 ^d	0.94887 0.94939 ^d	0.94410 0.94426 ^c	0.93933 -	0.93454 0.93469 ^d	0.92974 -
0.0052	0.96328	0.95857	0.95382	0.94905	0.94429	0.93951	0.93473	0.92993
0.0099	0.96345	0.95873	0.95398	0.94922	0.94445	0.93969	0.93489	0.93010
0.0192	0.96376	0.95904	0.95429	0.94953	0.94477	0.94000	0.93521	0.93042
0.0290	0.96407	0.95935	0.95461	0.94985	0.94508	0.94031	0.93553	0.93073
0.0395	0.96438	0.95965	0.95492	0.95016	0.94539	0.94062	0.93584	0.93105
0.0491	0.96464	0.95992	0.95518	0.95042	0.94565	0.94089	0.93611	0.93132
0.0569	0.96484	0.96012	0.95538	0.95063	0.94586	0.94109	0.93631	0.93151
0.0737	0.96522	0.96050	0.95577	0.95101	0.94625	0.94148	0.93670	0.93191
0.0986	0.96569	0.96098	0.95624	0.95148	0.94672	0.94196	0.93717	0.93238
[Mim][Ac] + DMA								
0.0000	0.95459 -	0.95001 -	0.94541 -	0.94090 0.94092 ^e	0.93628 0.93630 ^c	0.93167 0.9316 ^c	0.92705 0.92689 ^e	0.92242 0.9221 ^c
0.0050	0.95500	0.95058	0.94597	0.94137	0.93675	0.93213	0.92752	0.92288
0.0099	0.95542	0.95084	0.94624	0.94163	0.93702	0.93240	0.92778	0.92315
0.0200	0.95598	0.95180	0.94752	0.94292	0.93830	0.93368	0.92906	0.92443
0.0296	0.95652	0.95245	0.94785	0.94324	0.93863	0.93401	0.92939	0.92475
0.0397	0.95704	0.95319	0.94859	0.94398	0.93937	0.93475	0.93013	0.92549
0.0493	0.95747	0.95345	0.94885	0.94425	0.93964	0.93502	0.93039	0.92575
0.0600	0.95787	0.95381	0.94921	0.94460	0.93999	0.93537	0.93074	0.92611
0.0737	0.95826	0.95407	0.94947	0.94447	0.94025	0.93563	0.93101	0.92637
0.0994	0.95875	0.95417	0.94957	0.94479	0.94035	0.93573	0.93111	0.92647

^aStandard uncertainties are: $u(T) = \pm 0.01 \text{ K}$, $u(b) = \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$, $u(\rho) = \pm 0.00005 \text{ g cm}^{-3}$.

^bRef. Spieweck, Bettin (1992), ^cRef. Bernal-Garcia et al. (2008), ^dRef. Yan et al. (2014), ^eRef. Vraneš et al. (2014).

Table 1 b). Molalities, b and experimental densities, ρ for solutions of 1-methylimidazolium acetate, [Mim][Ac] in DMSO at different temperatures, T at $p = 101,3 \text{ kPa}^a$

$m / \text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$	$d / \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$					
	[Mim][Ac] + DMSO					
T / K	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15
0.0000	1.10019	1.09519	1.09018	1.08514	1.08014	1.07512
	1.100424 ^b	1.095448 ^b	1.090467 ^b	1.085281 ^b	1.080490 ^b	1.075393 ^b
0.0057	1.10022	1.09523	1.09021	1.08519	1.08019	1.07518
0.0100	1.10027	1.09528	1.09023	1.08526	1.08025	1.07522
0.0200	1.10029	1.09529	1.09029	1.08528	1.08029	1.07528
0.0300	1.10028	1.09530	1.09030	1.08531	1.08031	1.07531
0.0394	1.10028	1.09532	1.09031	1.08534	1.08032	1.07533
0.0493	1.10027	1.09530	1.09032	1.08534	1.08035	1.07536
0.0584	1.10025	1.09528	1.09030	1.08532	1.08033	1.07535
0.0749	1.10017	1.09523	1.09025	1.08525	1.08028	1.07528
0.0973	1.09999	1.09502	1.09004	1.08506	1.08007	1.07509

^aStandard uncertainties are: $u(T) = \pm 0.01 \text{ K}$, $u(b) = \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mol kg}^{-1}$, $u(\rho) = \pm 0.00005 \text{ g cm}^{-3}$.

^bRef. Bešter-Rogač et. al. (2010).

Table 2. Adjustable coefficients d_0 , A_0 and A_1 of Eq. (2) for [Mim][Ac] in water, DMF, DMA and DMSO at different temperatures

T / K	ρ_0	A_0	A_1	$10^6 s(\rho) / \text{g cm}^{-3}$
[Mim][Ac] + water				
278.15	0.9999	0.0259	-0.0037	7.7
283.15	0.9996	0.0251	-0.0029	4.1
288.15	0.9990	0.0244	-0.0028	3.4
293.15	0.9982	0.0241	-0.0041	4.9
298.15	0.9970	0.0234	-0.0023	5.6
303.15	0.9956	0.0231	-0.0025	5.7
308.15	0.9940	0.0227	-0.0020	5.6
313.15	0.9922	0.0224	-0.0023	4.5
[Mim][Ac] + DMF				
278.15	0.9631	0.0367	-0.1052	3.2
283.15	0.9584	0.0361	-0.0996	3.7
288.15	0.9536	0.0369	-0.1049	4.1
293.15	0.9489	0.0369	-0.1055	4.3
298.15	0.9441	0.0367	-0.1031	3.1
303.15	0.9393	0.0368	-0.1026	4.3
308.15	0.9345	0.0372	-0.1067	3.0
313.15	0.9297	0.0373	-0.1071	3.9
[Mim][Ac] + DMA				
278.15	0.9546	0.0731	-0.3212	3.9
283.15	0.9500	0.0983	-0.5755	9.0
288.15	0.9455	0.0988	-0.5872	9.9
293.15	0.9409	0.0967	-0.5969	9.8
298.15	0.9363	0.0974	-0.5759	9.5
303.15	0.9317	0.0972	-0.5745	9.5
308.15	0.9271	0.0969	-0.5714	9.4
313.15	0.9224	0.0967	-0.5709	9.6

Table 2. (continued)

	[Mim][Ac] + DMSO			
293.15	1.1002	0.0052	-0.0758	10.3
298.15	1.0952	0.0063	-0.0827	10.5
303.15	1.0902	0.0073	-0.0876	12.9
308.15	1.0852	0.0087	-0.0985	14.1
313.15	1.0801	0.0088	-0.0976	16.7
318.15	1.0751	0.0097	-0.1027	10.5

Table 3. Derived values for partial molar volumes for IL (\bar{V}_2), and solvent and apparent molar volume, (V_Φ), of [Mim][Ac] + water mixtures in the temperature range from $T = (278.15$ to $313.15)$ K at $p = 101.3$ kPa

$c / \text{mol dm}^{-3}$	$c^{1/2} / (\text{mol dm}^{-3})^{1/2}$	$V_\Phi / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	$\bar{v}_1 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	$\bar{v}_2 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$
$T = 278.15$ K				
0.00540	0.07348	116.22	18.02	116.29
0.01148	0.10714	116.23	18.02	116.44
0.01985	0.14089	116.24	18.02	116.49
0.02979	0.17260	116.25	18.02	116.52
0.03971	0.19927	116.25	18.02	116.41
0.04961	0.22273	116.25	18.02	116.36
0.06214	0.24928	116.26	18.02	116.48
0.07336	0.27085	116.26	18.02	116.51
0.09757	0.31236	116.27	18.02	116.62
$T = 283.15$ K				
0.00539	0.07348	116.91	18.02	116.84
0.01148	0.10714	116.94	18.02	116.82
0.01985	0.14089	116.95	18.02	116.85
0.02978	0.17257	116.98	18.02	116.85
0.03970	0.19925	117.01	18.02	116.79
0.04959	0.22269	116.99	18.02	116.74
0.06212	0.24924	117.03	18.02	116.81
0.07334	0.27081	117.05	18.02	116.80
0.09754	0.31231	117.08	18.02	116.75
$T = 288.15$ K				
0.00539	0.07348	117.80	18.03	117.96
0.01147	0.10710	117.80	18.03	117.88
0.01983	0.14082	117.82	18.03	117.99
0.02977	0.17254	117.83	18.03	117.76
0.03968	0.19920	117.83	18.03	117.71
0.04956	0.22262	117.84	18.03	117.73
0.06208	0.24916	117.85	18.03	117.68
0.07329	0.27072	117.85	18.03	117.69
0.09747	0.31220	117.86	18.03	117.67
$T = 293.15$ K				
0.00539	0.07348	118.14	18.05	118.16
0.01146	0.10705	118.14	18.05	118.22
0.01982	0.14078	118.16	18.05	118.26
0.02974	0.17245	118.16	18.05	118.31

Table 3. (continued)

<i>T</i> = 293.15 K				
0.03964	0.19910	118.16	18.05	118.35
0.04952	0.22253	118.18 118.227 ^a	18.05	118.44
0.06203	0.24906	118.19	18.05	118.41
0.07322	0.27059	118.19	18.05	118.46
0.09738	0.31206	118.20	18.05	118.49
<i>T</i> = 298.15 K				
0.00538	0.07335	118.35	18.07	118.62
0.01145	0.10700	118.46	18.07	118.88
0.01979	0.14068	118.57	18.07	119.06
0.02970	0.17234	118.68	18.07	119.17
0.03959	0.19897	118.77	18.07	119.23
0.04946	0.22240	118.85 118.884 ^a	18.07	119.19
0.06195	0.24890	118.95	18.07	119.22
0.07314	0.27044	119.00	18.07	119.16
0.09727	0.31188	119.14	18.07	119.15
<i>T</i> = 303.15 K				
0.00537	0.07328	118.49	18.09	119.12
0.01143	0.10691	118.67	18.09	119.18
0.01977	0.14061	118.83	18.09	119.41
0.02966	0.17222	119.00	18.09	119.42
0.03954	0.19885	119.16	18.09	119.39
0.04939	0.22224	119.23 119.518 ^a	18.09	119.42
0.06186	0.24872	119.41	18.09	119.41
0.07303	0.27024	119.40	18.09	119.40
0.09713	0.31166	119.66	18.09	119.42
<i>T</i> = 308.15 K				
0.00536	0.07321	119.03	18.12	120.51
0.01142	0.10686	119.22	18.12	120.24
0.01973	0.14046	119.44	18.12	120.08
0.02961	0.17208	119.63	18.12	120.26
0.03947	0.19867	119.83	18.12	120.02
0.04931	0.22206	119.96 120.148 ^a	18.12	119.96
0.06176	0.24852	120.05	18.12	120.05
0.07291	0.27002	120.22	18.12	119.98
0.09697	0.31140	120.45	18.12	120.00
<i>T</i> = 313.15 K				
0.00535	0.07314	120.19	18.16	118.81
0.01139	0.10672	120.22	18.16	119.40
0.01970	0.14036	120.26	18.16	120.26
0.02956	0.17193	120.28	18.16	120.44
0.03940	0.19849	120.31	18.16	120.26
0.04922	0.22186	120.35 120.773 ^a	18.16	120.35
0.06165	0.24829	120.39	18.16	120.39
0.07278	0.26978	120.43	18.16	120.43
0.09679	0.31111	120.42	18.16	120.37

^aRef. Chen et. al. (2014).

Table 4. Derived values for partial molar volumes for IL (\bar{v}_2), and solvent (\bar{v}_1) and apparent molar volume, (V_Φ), of [Mim][Ac] + DMF mixtures in the temperature range from $T = (278.15$ to $313.15)$ K at $p = 101.3$ kPa

$c / \text{mol dm}^{-3}$	$c^{1/2} / (\text{mol dm}^{-3})^{1/2}$	$V_\Phi / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	$\bar{v}_1 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	$\bar{v}_2 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$
$T = 278.15 \text{ K}$				
0.00501	0.07078	107.47	75.90	109.79
0.00952	0.09757	108.36	75.89	110.57
0.01845	0.13583	109.91	75.89	112.99
0.02784	0.16685	111.06	75.88	114.84
0.03788	0.19463	112.25	75.88	116.66
0.04704	0.21689	113.39	75.87	118.31
0.05446	0.23337	114.24	75.87	119.54
0.07040	0.26533	116.19	75.86	122.22
0.09390	0.30643	117.26	75.84	125.83
$T = 283.15 \text{ K}$				
0.00498	0.07057	108.11	76.26	110.07
0.00948	0.09737	109.29	76.26	111.93
0.01836	0.13550	110.83	76.26	113.79
0.02771	0.16646	111.80	76.26	115.44
0.03769	0.19414	113.18	76.25	117.42
0.04681	0.21636	114.00	76.25	118.73
0.05419	0.23278	114.83	76.24	119.92
0.07005	0.26467	116.63	76.23	122.55
0.09344	0.30568	118.43	76.22	126.00
$T = 288.15 \text{ K}$				
0.00496	0.07043	106.76	76.64	108.53
0.00943	0.09711	108.32	76.64	111.49
0.01827	0.13517	110.25	76.64	114.02
0.02757	0.16604	111.42	76.64	115.60
0.03751	0.19367	112.73	76.63	117.61
0.04657	0.21580	113.95	76.63	119.39
0.05392	0.23221	114.85	76.62	120.70
0.06971	0.26403	116.73	76.61	123.39
0.09298	0.30493	118.83	76.59	127.23
$T = 293.15 \text{ K}$				
0.00493	0.07021	109.28	77.03	112.70
0.00938	0.09685	110.51	77.03	112.37
0.01818	0.13483	111.56	77.02	114.15
0.02743	0.16562	112.17	77.02	115.35
0.03732	0.19318	113.39	77.02	117.10
0.04634	0.21527	114.57	77.01	118.71
0.05366	0.23165	115.25	77.01	119.70
0.06936	0.26336	116.10	77.00	122.37
0.09251	0.30415	117.55	76.99	125.95
$T = 298.15 \text{ K}$				
0.00491	0.07007	107.46	77.42	111.11
0.00934	0.09664	108.88	77.42	113.00
0.01809	0.13450	111.35	77.41	114.32
0.02729	0.16519	112.55	77.41	116.20

Table 4. (continued)

<i>T</i> = 298.15 K				
0.03713	0.19269	113.78	77.41	118.05
0.04611	0.21473	114.97	77.40	119.72
0.05339	0.23106	115.66	77.40	120.77
0.06902	0.26272	117.58	77.39	123.40
0.09205	0.30339	120.43	77.37	127.17
<i>T</i> = 303.15 K				
0.00488	0.06986	108.27	77.81	112.08
0.00929	0.09638	109.62	77.81	110.08
0.01800	0.13416	111.71	77.81	111.70
0.02716	0.16480	112.92	77.81	112.91
0.03695	0.19222	114.17	77.81	114.15
0.04588	0.21419	115.14	77.81	115.12
0.05312	0.23048	116.07	77.81	116.05
0.06867	0.26205	118.00	77.81	117.98
0.09159	0.30264	120.77	77.81	120.74
<i>T</i> = 308.15 K				
0.00486	0.06971	107.83	78.21	110.25
0.00924	0.09612	109.29	78.21	111.59
0.01791	0.13383	111.36	78.21	112.07
0.02702	0.16438	112.91	78.21	112.89
0.03676	0.19173	114.28	78.21	114.26
0.04564	0.21364	115.31	78.21	115.29
0.05285	0.22989	116.28	78.21	116.26
0.06832	0.26138	118.29	78.21	118.26
0.09113	0.30188	121.24	78.21	121.21
<i>T</i> = 313.15 K				
0.00483	0.06950	107.69	78.61	110.60
0.00920	0.09592	109.22	78.61	110.78
0.01782	0.13349	111.85	78.61	111.83
0.02688	0.16395	113.29	78.61	113.27
0.03657	0.19123	114.38	78.61	114.35
0.04541	0.21310	115.48	78.61	115.46
0.05258	0.22930	116.69	78.61	116.67
0.06797	0.26071	118.56	78.61	118.54
0.09066	0.30110	121.58	78.61	121.55

Table 5. Derived values for partial molar volumes for IL (\bar{V}_2), and solvent (\bar{V}_1) and apparent molar volume, (V_ϕ), of [Mim][Ac] + DMA mixtures in the temperature range from $T = (278.15 \text{ to } 313.15) \text{ K}$ at $p = 101.3 \text{ kPa}$

<i>c</i> / mol dm ⁻³	<i>c</i> ^{1/2} / (mol dm ⁻³) ^{1/2}	<i>V</i> _φ / cm ³ mol ⁻¹	\bar{V}_1 / cm ³ mol ⁻¹	\bar{V}_2 / cm ³ mol ⁻¹
<i>T</i> = 278.15 K				
0.00477	0.06907	58.91	91.26	65.52
0.00945	0.09721	64.14	91.26	66.16
0.01907	0.13809	72.55	91.24	85.76
0.02819	0.16790	77.21	91.22	93.29
0.03778	0.19437	80.99	91.20	99.61
0.04687	0.21649	84.56	91.18	105.30

Table 5. (continued)

<i>T</i> = 278.15 K				
0.05699	0.23873	88.63	91.14	111.51
0.06989	0.26437	93.91	91.10	119.28
0.09397	0.30655	102.55	91.10	132.00
<i>T</i> = 283.15 K				
0.00475	0.06892	23.31	91.70	33.02
0.00940	0.09695	33.52	91.70	47.15
0.01898	0.13777	46.85	91.67	69.79
0.02807	0.16754	58.16	91.64	81.77
0.03763	0.19398	65.20	91.61	88.03
0.04668	0.21606	72.06	91.57	102.54
0.05674	0.23820	79.15	91.53	112.77
0.06959	0.26380	88.23	91.47	125.48
0.09352	0.30581	101.73	91.33	146.08
<i>T</i> = 288.15 K				
0.00473	0.06877	25.05	92.14	35.29
0.00935	0.09669	33.11	92.14	52.75
0.01890	0.13748	46.52	92.14	70.93
0.02794	0.16715	57.99	92.09	82.92
0.03745	0.19352	60.55	92.05	89.41
0.04645	0.21552	72.04	92.01	104.20
0.05647	0.23763	79.19	91.97	114.68
0.06925	0.26315	88.36	91.97	127.69
0.09307	0.30507	101.63	91.90	148.77
<i>T</i> = 293.15 K				
0.00470	0.06856	22.86	92.58	53.34
0.00931	0.09649	32.83	92.58	53.83
0.01880	0.13711	47.33	92.56	79.64
0.02780	0.16673	61.64	92.53	82.21
0.03727	0.19305	67.31	92.51	87.07
0.04623	0.21501	74.07	92.48	100.62
0.05621	0.23709	81.11	92.44	110.40
0.06889	0.26247	96.00	92.38	128.47
0.09260	0.30430	106.44	92.27	144.14
<i>T</i> = 298.15 K				
0.00468	0.06841	25.02	93.05	52.68
0.00926	0.09623	34.34	93.04	52.74
0.01871	0.13678	47.92	93.02	77.91
0.02767	0.16634	61.11	93.00	80.82
0.03708	0.19256	62.84	92.97	85.66
0.04600	0.21448	73.82	92.94	99.25
0.05592	0.23647	80.98	92.90	109.03
0.06858	0.26188	90.00	92.85	121.09
0.09217	0.30360	104.67	92.85	140.77
<i>T</i> = 303.15 K				
0.00466	0.06826	25.07	93.51	46.54
0.00922	0.09602	34.43	93.51	36.66
0.01862	0.13646	48.07	93.51	67.53
0.02753	0.16592	61.36	93.51	61.27
0.03690	0.19209	63.00	93.51	62.90
0.04578	0.21396	74.04	93.51	73.93
0.05565	0.23590	81.22	93.50	81.10

Table 5. (continued)

$T = 303.15 \text{ K}$				
0.06824	0.26123	90.30	93.51	90.17
0.09172	0.30285	105.07	93.51	104.92
$T = 308.15 \text{ K}$				
0.00463	0.06804	24.64	93.98	36.23
0.00917	0.09576	34.10	93.98	43.90
0.01853	0.13612	47.87	93.98	61.08
0.02739	0.16550	57.90	93.98	67.42
0.03672	0.19162	62.87	93.98	62.72
0.04555	0.21342	74.25	93.98	74.09
0.05537	0.23531	81.46	93.98	81.29
0.06791	0.26060	90.44	93.98	90.25
0.09126	0.30209	105.36	93.98	105.13
$T = 313.15 \text{ K}$				
0.00461	0.06790	24.65	94.45	35.82
0.00913	0.09555	34.14	94.45	45.91
0.01844	0.13579	47.97	94.45	61.32
0.02726	0.16511	58.04	94.45	67.33
0.03654	0.19115	63.02	94.45	62.87
0.04532	0.21288	74.46	94.45	74.29
0.05510	0.23473	81.51	94.45	81.33
0.06757	0.25994	90.74	94.45	90.53
0.09081	0.30135	105.77	94.44	105.52

Table 6. Derived values for partial molar volumes for IL (\bar{v}_2), and solvent (\bar{v}_1) and apparent molar volume, (V_Φ), of [Mim][Ac] + DMSO mixtures in the temperature range from $T = (293.15 \text{ to } 318.15) \text{ K}$ at $p = 101.3 \text{ kPa}$

$c / \text{mol dm}^{-3}$	$c^{1/2} / (\text{mol dm}^{-3})^{1/2}$	$V_\Phi / \text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\bar{v}_1 / \text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$	$\bar{v}_2 / \text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}$
$T = 293.15 \text{ K}$				
0.00627	0.07918	123.19	71.02	124.14
0.01099	0.10483	123.99	71.02	126.03
0.02194	0.14812	125.07	71.02	127.25
0.03287	0.18130	126.73	71.02	129.40
0.04311	0.20763	127.32	71.02	130.38
0.05387	0.23210	127.86	71.01	131.29
0.06373	0.25245	128.36	71.01	132.08
0.08153	0.28553	129.44	71.00	133.66
0.10557	0.32492	130.80	70.99	135.75
$T = 298.15 \text{ K}$				
0.00624	0.07899	123.68	71.35	123.98
0.01094	0.10459	124.42	71.35	125.23
0.02184	0.14778	125.62	71.35	128.02
0.03272	0.18089	126.73	71.34	129.67
0.04292	0.20717	127.04	71.34	130.40
0.05362	0.23156	127.93	71.33	131.69
0.06344	0.25187	128.51	71.33	132.60
0.08117	0.28490	129.35	71.32	133.99
0.10509	0.32418	130.73	71.32	136.56

Table 6. (continued)

<i>T</i> = 303.15 K				
0.00621	0.07880	123.57	71.68	126.83
0.01089	0.10436	124.37	71.68	127.33
0.02174	0.14744	125.76	71.67	127.38
0.03257	0.18047	127.02	71.67	129.00
0.04272	0.20669	127.61	71.67	129.89
0.05338	0.23104	127.99	71.67	130.54
0.06315	0.25130	128.66	71.66	131.43
0.08080	0.28425	129.61	71.66	132.74
0.10461	0.32343	131.15	71.66	135.21
<i>T</i> = 308.15 K				
0.00618	0.07861	122.93	72.01	122.79
0.01084	0.10412	123.77	72.01	125.05
0.02164	0.14711	125.05	72.00	127.85
0.03242	0.18006	126.17	72.00	129.61
0.04252	0.20620	126.67	72.00	130.61
0.05313	0.23050	127.54	71.99	131.95
0.06286	0.25072	128.37	71.99	133.17
0.08043	0.28360	129.75	71.98	135.18
0.10414	0.32271	130.99	71.96	137.91
<i>T</i> = 313.15 K				
0.00615	0.07842	122.63	72.34	124.07
0.01079	0.10387	123.59	72.34	125.52
0.02154	0.14677	125.17	72.34	127.85
0.03227	0.17964	126.74	72.33	130.02
0.04233	0.20574	127.68	72.33	131.44
0.05289	0.22998	127.94	72.33	132.15
0.06257	0.25014	128.80	72.32	133.38
0.08006	0.28295	129.99	72.31	135.18
0.10366	0.32196	131.78	72.31	138.15
<i>T</i> = 318.15 K				
0.00612	0.07823	123.11	72.68	123.11
0.01074	0.10363	123.56	72.68	123.55
0.02144	0.14642	125.29	72.68	125.28
0.03212	0.17922	126.73	72.68	126.71
0.04213	0.20526	127.59	72.68	127.58
0.05265	0.22946	127.98	72.68	127.97
0.06228	0.24956	128.79	72.68	128.77
0.07969	0.28229	130.36	72.68	130.33
0.10318	0.32122	131.91	72.68	132.48

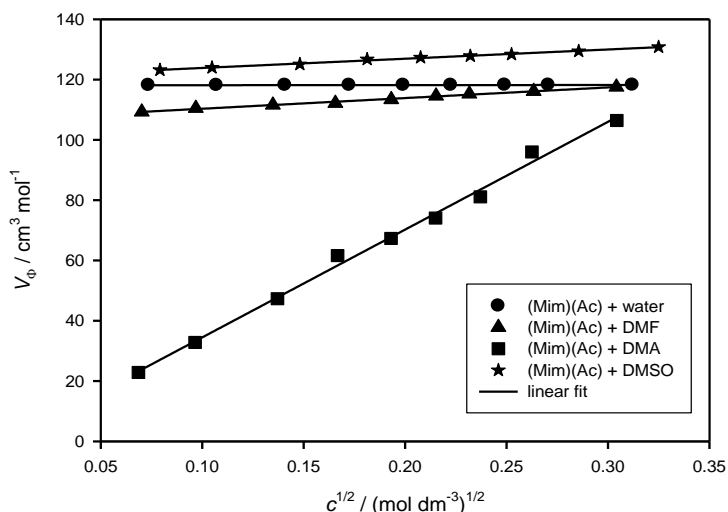


Figure 2. Variation of apparent molar volume, V_{ϕ} , for [Mim][Ac] in investigated solvents, with the second root of molar concentration, $c^{1/2}$, at $T = 293.15$ K (Masson's graph)

Table 7. Parameters of Masson's equation (6), (v_{ϕ}°) and (S_v) for [Mim][Ac] in water medium, DMF, DMA and DMSO with their standard deviation, (s), and correlation coefficient (R^2)

T / K	$v_{\phi}^{\circ} / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	$S_v / \text{cm}^{9/2} \text{mol}^{-3/2}$	R^2
[Mim][Ac] + water			
278.15	116.21 ± 0.05	0.21 ± 0.01	0.9309
283.15	116.87 ± 0.03	0.66 ± 0.09	0.9251
288.15	117.78 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.9844
293.15	118.12 ± 0.02	0.27 ± 0.03	0.9387
298.15	118.10 ± 0.04	3.34 ± 0.03	0.9984
303.15	118.15 ± 0.03	4.83 ± 0.12	0.9923
308.15	118.59 ± 0.03	5.92 ± 0.14	0.9973
313.15	120.11 ± 0.05	1.11 ± 0.07	0.9838
[Mim][Ac] + DMF			
278.15	104.11 ± 0.22	43.3 ± 1.3	0.9931
283.15	104.87 ± 0.21	43.5 ± 1.1	0.9955
288.15	103.21 ± 0.19	50.6 ± 1.0	0.9974
293.15	106.80 ± 0.24	35.3 ± 1.1	0.9921
298.15	103.72 ± 0.30	53.4 ± 1.5	0.9945
303.15	104.52 ± 0.33	51.6 ± 1.6	0.9928
308.15	103.77 ± 0.30	55.8 ± 1.5	0.9949
313.15	103.70 ± 0.34	57.6 ± 1.7	0.9939

Table 7. (continued)

[Mim][Ac] + DMA			
278.15	46.77 ± 0.76	178.7 ± 3.8	0.9967
283.15	1.46 ± 0.74	328.5 ± 3.7	0.9991
288.15	1.83 ± 0.65	325.2 ± 8.2	0.9949
293.15	1.27 ± 0.87	357.5 ± 9.8	0.9947
298.15	2.09 ± 0.76	335.1 ± 8.8	0.9952
303.15	2.04 ± 0.79	337.3 ± 9.0	0.9950
308.15	0.79 ± 0.13	342.7 ± 6.7	0.9975
313.15	0.67 ± 0.13	345.0 ± 6.9	0.9972
[Mim][Ac] + DMSO			
293.15	120.79 ± 0.18	30.6 ± 0.8	0.9944
298.15	121.46 ± 0.13	28.1 ± 0.6	0.9968
303.15	121.30 ± 0.18	29.9 ± 0.9	0.9942
308.15	120.24 ± 0.19	32.8 ± 0.8	0.9950
313.15	119.85 ± 0.22	36.5 ± 1.0	0.9941
318.15	120.02 ± 0.23	36.3 ± 1.1	0.9935

Further, temperature dependence of V_{Φ}^0 can be described by a second-order polynomial function:

$$V_{\Phi}^0 = B_0 + B_1 \cdot T + B_2 \cdot T^2 \quad (7)$$

where B_0 , B_1 and B_2 are fitted coefficients. The values of V_{Φ}^0 from present study can be expressed in dependence on investigated temperature by the following relations:

[Mim][Ac] in water:

$$V_{\Phi}^0 = 108.7851 - 0.0260 \cdot T + 0.0002 \cdot T^2$$

[Mim][Ac] in DMF:

$$V_{\Phi}^0 = -149.7083 + 1.7391 \cdot T - 0.0030 \cdot T^2$$

[Mim][Ac] in DMA:

$$V_{\Phi}^0 = -313.7518 + 2.1431 \cdot T - 0.0036 \cdot T^2$$

[Mim][Ac] in DMSO:

$$V_{\Phi}^0 = -90.4167 + 1.4377 \cdot T - 0.0024 \cdot T^2$$

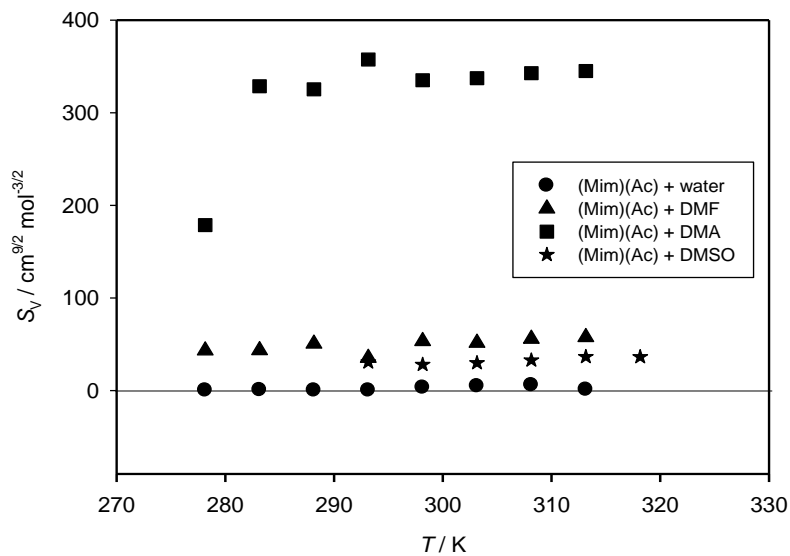
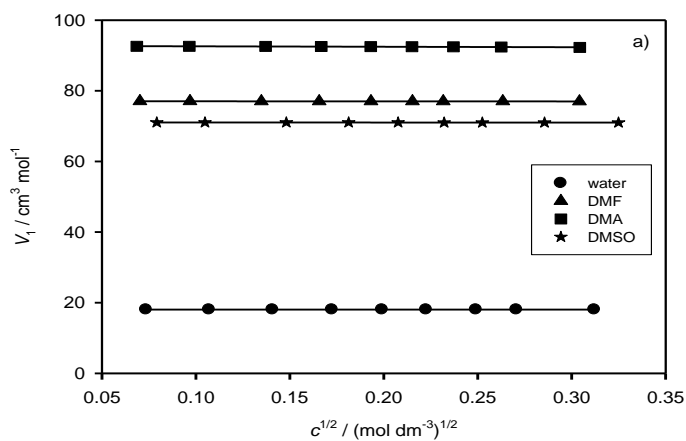


Figure 3. Temperature dependence of S_V coefficient for [Mim][Ac] in investigated solvents



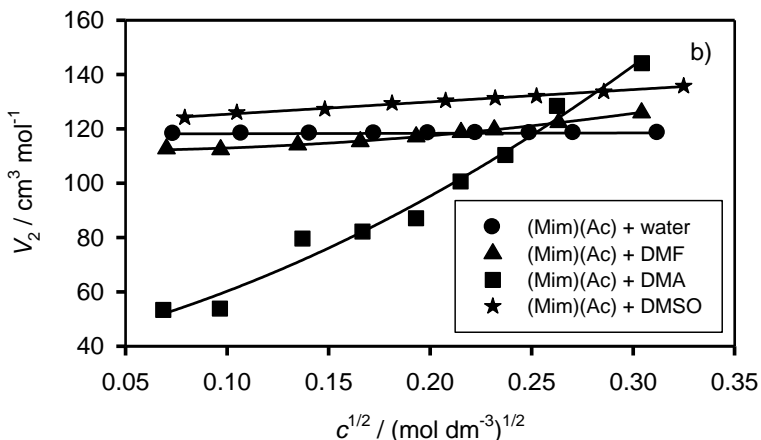


Figure 4. Molar concentration dependence of the a) partial molar volume of solvent, \bar{V}_1 , and the b) partial molar volume of solute, \bar{V}_2 , at 293.15 K

The temperature-dependent limiting apparent molar expansibility, E_{Φ}^0 , can be obtained by differentiating Eq. (7):

$$E_{\Phi}^0 = \left(\frac{\partial V_{\Phi}^0}{\partial T} \right)_p = B_1 + 2 \cdot B_2 \cdot T \quad (8)$$

From Eq. (8) follows expression for Heppler's coefficient (Heppler, 1969):

$$\left(\frac{\partial E_{\Phi}^0}{\partial T} \right)_p = \left(\frac{\partial^2 V_{\Phi}^0}{\partial T^2} \right)_p = 2 \cdot B_2 \quad (9)$$

According to the values of Heppler's coefficients, ILs can be divided into 3 groups: a) structure-breaker with negative Heppler's coefficient, b) structure-maker with positive Heppler's coefficient, and c) borderline with Heppler's coefficient around zero. Calculated values of the limiting molar expansibilities, E_{Φ}^0 , at different temperatures and Heppler's coefficients for investigated systems are compiled in Table 9.

Table 9. Values of the limiting molar expansibilities, E_{Φ}^0 , at different temperatures and Heppler's coefficients for investigated IL in water, DMF, DMA and DMSO

$E_{\Phi}^0 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ za [Mim][Ac] + voda									
T / K	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	$\left(\frac{\partial E_{\Phi}^0}{\partial T}\right)_p$
	0.085	0.087	0.089	0.092	0.093	0.095	0.097	0.099	0.0004
$E_{\Phi}^0 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ za [Mim][Ac] + DMF									
T / K	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	$\left(\frac{\partial E_{\Phi}^0}{\partial T}\right)_p$
	0.070	0.040	0.010	-0.020	-0.050	-0.079	-0.109	-0.140	-0.0060
$E_{\Phi}^0 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ za [Mim][Ac] + DMA									
T / K	278.15	283.15	288.15	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	$\left(\frac{\partial E_{\Phi}^0}{\partial T}\right)_p$
	0.140	0.104	0.007	0.003	-0.004	-0.040	-0.076	-0.112	-0.0072
$E_{\Phi}^0 / \text{cm}^3 \text{mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ za [Mim][Ac] + DMSO									
T / K	293.15	298.15	303.15	308.15	313.15	318.15	-	-	$\left(\frac{\partial E_{\Phi}^0}{\partial T}\right)_p$
	0.031	0.007	-0.017	-0.041	-0.065	-0.089	-	-	-0.0048

Obtained E_{Φ}^0 values decrease with temperature in DMF, DMA, and DMSO, while in water medium slightly increase with temperature. In the case of [Mim][Ac] in DMF, DMA, and DMSO values of the Heppler's coefficient are negative, indicating that this IL in these solvents could be described as structure-breakers. Values of the Heppler's coefficient for [Mim][Ac] in water medium is around zero, so this investigated IL is classified as the borderline.

Conclusions

This work represents the continuation of systematic ionic liquid –solvent system research. A new compound has been synthesized: 1-methylimidazolium acetate, [Mim][Ac] ionic liquid, IL. The IL obtained in our laboratory was thoroughly

analyzed by FTIR spectroscopy, and its water content was determined. In this study, the binary mixtures of [Mim][Ac] IL and W, DMF, DMA, and DMSO were investigated by applying density measurements. The experimental measurements were performed at different molalities of IL and different temperatures. From the density measurements, volumetric properties were calculated, as apparent molar volume, partial molar volumes for IL and solvents, parameters of Masson's equation, V_{ϕ}° and S_V , limiting molar expansibility, and Heppler's coefficient. In the case of [Mim][Ac] in DMF, DMA, and DMSO values of the Heppler's coefficients are negative, indicating that this IL in these solvents could be described as structure-breakers. Values of the Heppler's coefficient for [Mim][Ac] in water medium is around zero, so this investigated IL is classified as the borderline.

Acknowledgments

This work was financially supported by the Ministry of Science and Education of Republic of Croatia, Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (Grant No. 451-03-9/2021-14/200125), the Secretariat for Higher Education and Scientific Research of the Autonomous Province of Vojvodina, Serbia (Grant No. 142-451-2545/2021-01/2), and Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Poland. RT, SP and MV would like to acknowledge the contribution of the COST Action CA18202 - Network for Equilibria and Chemical Thermodynamics Advanced Research (NECTAR) (2019-2023).

References

- Almeida H. F. D., Passos H., Lopes-da-Silva J. A., Fernandes A. M., Freire M. G., Coutinho J. A. P. (2012): Thermophysical Properties of Five Acetate-Based Ionic Liquids, *J. Chem. Eng. Data* 57, 3005–3013.
- Bešter-Rogač M., Hunger J., Stoppa A., Buchner R. (2010): Molar Conductivities and Association Constants of 1-Butyl-3-methylimidazolium Chloride and 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate in Methanol and DMSO, *J. Chem. Eng. Data* 55, 1799–1803.
- Bernal-Garcia J. M., Guzman-Lopez A., Cabrales-Torres A., Estrada-Baltazar A., Iglesias-Silva G. A. (2008): Densities and Viscosities of (N,N-dimethylformamide + Water) at Atmospheric Pressure from (283.15 to 353.15) K, *J. Chem. Eng. Data* 53, 1024–1027.
- Chen B., Liu K., Wang D., Kong Y., Qu K., Zhang X., Liu M. (2022): Volumetric, Viscometric, and Refractive Index Studies of Drug Nicotinic Acid in Aqueous D-Xylose/L-Arabinose Solutions from 293.15 to 313.15 K: Insights into Solute-Solute and Solute-Solvent Interactions, *J. Chem. Eng. Data* 67, 1089–1100.
- Chen J., Chen L., Lu Y., Xu Y. (2014): Physicochemical Properties of Aqueous Solution of 1-Methylimidazolium Acetate Ionic Liquid at Several Temperatures, *J. Mol. Liq.* 197, 374–380.
- Dožić S., Vraneš M., Gadžurić S. (2014): Volumetric properties of ammonium nitrate in N-methylformamide, *J. Mol. Liq.* 193, 189–193.

- Gurung B. B., Roy M. N. (2010): Solute-Solvent Interactions in Industrially Important Solvent Media, VDM Verlag Dr. Müller, Saarbrücken, pp. 13–33.
- Heppler L. G. (1969): Thermal expansion and structure in water and aqueous solutions, *Can. J. Chem.* 47, 4613–4617.
- Masson D. O. (1929): XXVIII. Solute molar volumes in relation to solvation and ionisation, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* 8, 218–235.
- Qian W., Xu Y., Zhu H., Yu C. (2012): Properties of pure 1-Methylimidazolium Acetate ionic Liquid and Its Binary Mixtures with Alcohols, *J. Chem. Thermodynamics* 49, 87–94.
- Stoppa A., Hunger J., Buchner R. (2009): Conductivities of Binary Mixtures of Ionic Liquids with Polar Solvents, *J. Chem. Eng. Data* 54, 472479.
- Shekaari H., Uafarani-Moattar M. T. (2008): Volumetric Properties of the Ionic Liquid, 1-Butyl-3-methylimidazolium Tetrafluoroborate in Organic Solvents at $T = 298.15$ K, *Int. J. Thermophys.* 29, 534–545.
- Spieweck F., Bettin H. (1992): Review: Solid and liquid density determination, *Technisches Messen* 59, 285–292.
- Tomaš R. (2021): Imidazolium-Based Ionic Liquids: Some Research Methods, Applications and Physico-Chemical Properties, *Croat. Chem. Acta* 94, 83–94.
- Tomaš R., Tot A., Kuhar J., Bešter-Rogač M. (2018): Interactions in Aqueous Solutions of Imidazolium Chloride Ionic Liquids [Cnmim][Cl] ($n = 0, 1, 2, 4, 6, 8$) from Volumetric Properties, Viscosity B-coefficients and Molecular Dynamic Simulations, *J. Mol. Liq.* 254, 267–271.
- Tomaš R., Kinart Z., Tot A., Papović S., Borović T. T., Vraneš M. (2022): Volumetric Properties, Conductivity and Computation Analysis of Selected Imidazolium Chloride Ionic Liquids in Ethylene Glycol, *J. Mol. Liq.* 345, 118178.
- Vraneš M., Tot A., Zec N., Papović S., Gadžurić S. (2014): Volumetric Properties of Binary Mixtures of 1-Butyl-3-Methylimidazolium Tris(pentafluoroethyl)trifluorophosphate with *N*-Methylformamide, *N*-Ethylformamide, *N,N*-Dimethylformamide, *N,N*-Dibutylformamide, and *N,N*-Dimethylacetamide from (293.15 to 323.15) K, *J. Chem. Eng. Data* 59, 33723379.
- Vraneš M., Tot A., Armaković S., Armaković S., Gadžurić S. (2016): Structure making properties of 1-(2-hydroxyethyl)-3-methylimidazolium chloride ionic liquid, *J. Chem. Thermodynamics* 95, 174–179.
- Yan X.-J., Li S.-N., Zhai Q.-G., Jiang Y.-C., Hu M.-C. (2014): Physicochemical Properties for the Binary Systems of Ionic Liquids [C_nmim]Cl + *N,N*-Dimethylformamide, *J. Chem. Eng. Data* 59, 1411–1422.
- Yang F., Ma Q., Wang X., Liu Z. (2017): Influence of Aprotic Cosolvents on the Thermophysical Properties of Imidazolium-Based Ionic Liquid, *J. Chem. Eng. Data* 62, 1628–1638.
- Yang F., Feng P. (2020): Densities and Viscosities of Ionic Liquid with Organic Solvents, *Appl. Sci.* 10, 8342.

Data-driven estimation of critical quality attributes on industrial processes

Željka Ujević Andrijić, Srećko Herceg*, Nenad Bolf

University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Savska cesta 16/5a, 10 000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: sherceg@fkit.hr

original scientific paper

Summary

Large data sets generated and stored by continuous monitoring of process variables in process plants enable the development of data-driven mathematical models of a process. While such models do not provide detailed insight into the process, they do provide a feasible description of the nonlinear complex process dynamics. Data-driven models are often used to estimate important process characteristics in real-time. This paper presents an industrial case study of data-driven models based on multilayer perceptron (MLP) artificial neural networks (ANN) for the isomerization process of light naphtha in refineries. Models were developed for estimating critical quality characteristics of the product. Special attention was paid to the selection and analysis of data sets for different time periods to capture different process conditions. Optimal models were achieved by changing the types of learning function and transfer function, as well as the number of neurons in the hidden layer. Models based on MLP neural networks have shown better generalization capabilities compared to previously developed polynomial linear and nonlinear models for isomerization processes. This makes the developed MLP network models suitable for application to such a process, especially in the area of advanced process control.

Keywords: data-driven model, process monitoring, MLP artificial neural network, isomerisation process

Introduction

Process production facilities are large consumers of energy, and efforts are made to reduce their energy consumption as much as possible in order to keep production profitable. At the same time, high demands are placed on product quality, so it is necessary to monitor the most important process variables and react in time when their malfunction occurs. By developing a process model, the most important process states are continuously estimated. In this way, it is possible to react to disturbances at an early stage to avoid unnecessary energy losses and product quality degradation. Such inferential models can be used for advanced process control, diagnostic purposes, and as replacements for failed physical sensors or process analyzers.

In large process plants where a lot of continuous data is stored, it is possible to develop empirical, data-driven models for continuous estimation of important process variables. It is possible to develop fundamental models (first-principal models), but

such models are not practical for complex industrial plants with strong nonlinearity and complex reaction mechanisms.

When creating a data-driven model, it is crucial to choose a set of data, i.e., continuously measured values, usually of temperature, pressure, flow and composition of a product, where the dynamics of the process are emphasized, usually in a period of two to four weeks. In the book by Fortuna et al. (2007), the traditional steps of developing such models are summarized, which include: selection of historical data from plant database, data preprocessing, model structure and regressor selection, model estimation and validation.

Various techniques are used to develop data-driven models, such as regression techniques, principal component analysis (PCA), partial least squares (PLS), support vector machines (SVM) and others. The use of artificial neural networks (ANN) is especially present.

ANN models are the simplification of human neural systems. It comprises of computational units analogous to the neurons of the biological nervous system known as artificial neurons. The ANN models may be useful in solving different engineering and science problems (Jeswal and Chakraverty, 2021). Pirdashti et al. (2013), presented an extensive review of the literature on ANN methodology and its applications in chemical engineering. Panerati et al. (2019), emphasized that ANNs are one of the most powerful and versatile tools exploited by chemical engineers for several decades in countless application. Morlanes et al. (2022) used ANN to improve robustness of kinetic models for steam reforming of hydrocarbons – still leading technology for hydrogen production. Xing et al. (2022) developed data-driven model for fault diagnosis for proton exchange membrane (PEM) fuel cell system. Sildir et al. (2022) applied ANN for modelling an industrial ethylene oxide plant. Lima et al. (2022) used, among other methods, MLP NN for controlling the concentration of a crystallization process.

Papers on the development and application of mathematical models to the isomerisation process are rarely published. Recently, a paper by Khajah and Chehadeh (2022) was published, where an ANN-based model is used to minimize the energy consumption of the isomerisation process.

In this paper, data-driven models based on MLP NN were developed for the continuous estimation of the content of key process attributes (2,3-dimethylbutane (2,3-DMB) and 2-methylpentane (2-MP)) in the product of the refinery light naphtha isomerisation process. The content of these components directly affects the research octane number (RON) of petrol. The models were compared with previously developed dynamic polynomial linear and nonlinear models (Herceg et al., 2018). The developed models will find application related to the advanced control of the isomerisation process.

Materials and methods

This chapter contains a detailed description of the isomerization process with an emphasis on the deisohexanization section, and a methodology for developing a data-driven model for evaluating the key variables that affect the product quality.

Process description

Isomerisation is the catalytic process where the paraffins are converted to the high-octane number branch structures. Basically, normal pentane (nC_5) converts to isopentane (iC_5), and normal hexane (nC_6) to 2,2 and 2,3 dimethylbutane (2,2-DMB and 2,3-DMB). The reactions occur in hydrogen environment on a fix catalyst layer, and at process conditions that promote isomerisation and minimise unfavourable reactions. The main operating conditions are moderate operating pressure, low temperature and low hydrogen partial pressure (Cusher, 2003).

High-octane isomerate is the product of isomerisation that not containing aromatics and olefins, and therefore is an excellent component to meet the required, very rigorous characteristics of petrol (Cerić, 2012).

The process starts by mixing a stream of light naphtha feed with a stream of make-up hydrogen. The streams are then heat-exchanged against reactor effluent and enter the isomerisation reactors. The reactor effluent is cooled before entering a product stabilizer. Finally, the stabilizer overhead gas flows to a fuel gas system, while the stabilized, isomerized liquid product from the bottom of the stabilizer passes to petrol blending. The octane rating shows an increase of some 14 numbers, from ordinarily 60 to 70 RON (research octane number).

The isomerisation process can be improved by the additional separation of the stabilizer bottoms into normal and isoparaffins. It can be achieved by a fractionation, molecular-sieve separation or combination of the two methods to obtain recycle of the normal paraffins and low-octane methylpentanes (MeC_5).

One of the typical recycle flow scheme is a combination of the straight-through isomerisation process with a deisohexanizer fractionation column (Figure 1). The low-octane methylpentanes and normal hexanes are concentrated in the sidecut stream, combine with the fresh feed and enter the reactors to reprocessing. The overhead product (primarily high-octane isopentane, 2,2-DMB and 2,3-DMB) passes to petrol blending, while the bottom product (C_6 naphthene and heptane) is used for petrol blending or as reformer feed.

The typical feed and product octane levels for C_5 - C_6 feedstock depending on various recycle flow schemes are shown in Table 1.

Deisohexanization section

The process flow diagram of an isomerisation unit deisohexanization section is illustrated in Figure 2. As shown in the diagram, stabilized isomerate enters the V17

deisohexanizer column at the 41st tray, reflux flow enters at the 1st tray, while the side product comes out from the deisohexanizer column 90th tray. For heating of the column bottom, the E13 reboiler is used.

The temperatures of the deisohexanizer column are indicated and controlled by several thermocouple positions: TI-045 – side product temperature, TI-046 – overhead column temperature, TIC-047 – 21st column tray temperature, TI-048 – stabilized isomerate at the 41st column tray temperature, TI-049 – bottom temperature. Pressure in the column is indicated and controlled by PIC-025 controller.

The column overhead product – isomerate – is condensed in the EA04 air cooler, and condensed hydrocarbons pass to the V12 reflux drum. The temperature of isomerate downstream of the EA04 outlet is indicated and controlled by TIC-053, changing the rotational speed of the electromotor fans.

The reflux flow rate is indicated and controlled by FIC-029 controller, which is affected by the sum of values from FI-028 reflux flow rate indicator and FIC-027 isomerate discharge flow rate controller. The reflux flow rate is also corrected by the level control of the V12 reflux drum. Isomerate, routed from the unit as the final product, passes cooling at the EA05 air cooler, and finally at the E11 trim water cooler. The side product of the V17 column is sent by the P10A/B pump from the column accumulation (chimney) tray to the EA03 air cooler. The cooled side product flow rate is indicated and controlled by FIC-020 controller with the correction by the column bottom level controller.

The column bottom product – heptane fraction is sent from the column as the product by the P11A/B pump to the EA06 air cooler, and the E14 water cooler. The outlet flow is indicated and controlled by FIC-026 flow controller.

In order to control the conditions in the V17 deisohexanizer column, the pressure and inlet heat parameters are kept constant, and the reflux flow rate is set up by the level of the V12 reflux drum. The final product (isomerate) discharge flow rate is controlled either by a hydrocarbon composition or a temperature at the characteristic tray. The meaning of it is that the amount of isomerate is provided from the following three positions: TIC-047 – 21st column tray temperature, AI-005B – a low-octane mole fraction of 2-MP in the column overhead product (located downstream of the V12 drum and analysed on-line chromatographically), and AI-004B – a high-octane mole fraction of 2,3-DMB in the column side product, analysed on-line chromatographically. Changing between the three positions is done using hand switches (Herceg, 2021).

The goal of the process is to maintain the high-octane 2,3-DMB in the overhead stream, and to maintain the low octane 2-MP in the sidcut stream by controlling the content of these product critical quality attributes (Herceg et al., 2019).

Model development

When developing a data-driven model, it is essential to choose easily to measure influential variables that affect difficult to measure and often unavailable, but

important output variables. In this case, the output variables are product critical quality attributes, i.e., 2,3-DMB and 2-MP.

In order to successfully carry out the selection of input variables, it is important to gain theoretical insight into the process under study, but it is even more important to talk to the operators of the actual plant, who will point out certain influencing variables. After selecting a certain number of influential variables, the final number is reached using various statistical techniques such as correlation analysis or, for example, PCA and PLS methods.

Finally, the following influential variables were selected: TI-046 – deisohexanizer column top stream temperature, TIC-047 – column 21st tray temperature, TI-045 – sidecut stream temperature, TI-049 – bottom stream temperature, FI-028 – reflux flow, FIC-029 – reflux flow and isomerate outlet flow sum, and FIC-026 – bottom stream flow (Herceg et al., 2018). These variables are specially marked and visible on the process flow diagram in Figure 2.

The selection of influential variables is followed by data-collection and preprocessing. For the selected input variables and for the critical outputs (2,3-DMB and 2-MP), a continuous set of data is required for a period of 2 to 3 weeks. It is also important that the selected data belong, if possible, to different process dynamic regime. In the process of searching for a period with emphasized process dynamics two different sets of data were chosen, one for the development of a model for estimating the content of 2,3-DMB, and the other for 2-MP. Regarding the preprocessing of the selected data, it should be emphasized that there were not many missing data, outliers or noise. Although input data were available every minute, the sampling period was set to 3 minutes since the process dynamics of such a large industrial plant allows it. Output variables are determined using on-line chromatographs with a sampling period of 30 minutes. As it is necessary to coordinate the sampling periods of input and output variables, the period of 30 minutes of output data is supplemented with interpolation data using cubic spline interpolation.

Multilayer perceptron (MLP) neural networks (NN) were used to estimate the value of the output variables. MLP is a class of feedforward neural networks. It consists of three types of layers: the input layer, output layer and hidden layer. The input layer receives the input signals (e.g., input variables) to be processed. The required task such as prediction is performed by the output layer. The hidden layer is placed in between the input and output layer and the complete calculation takes place in it. The data flows in the forward direction from input to output layer. The neurons in the MLP are trained with the back propagation learning algorithm. MLPs are designed to approximate any continuous function and can solve problems which are not linearly separable (Abirami and Chitra, 2020).

The structure of the MLP NN model is shown in Figure 3. For 2,3-DMB and 2-MP content NN models, the development data sets consist of 6 667 and 10 078 continuous samples, respectively. A randomized permutation of data was made on the entire data sets and such randomized data were divided into training, validation and test sets in the ratio of 70:15:15. When learning the network and calculating weights, Levenberg-

Marquardt (LMA), Broyden–Fletcher–Goldfarb–Shanno (BFGS) quasi-Newton and scaled conjugate gradient (SCG) learning algorithms were investigated. For the transfer function, tangent-sigmoid (tansig), logarithmic-sigmoid (logsig), positive linear transfer function (poslin) and linear transfer function (purelin) were used. The number of neurons in the hidden layer ranged from 2 to 50. The optimal number of neurons have to be empirically determined in a trade-off manner – too many neurons can lead to overtraining, too few affect generalization capabilities. The network learning algorithm stops in iteration when the error related to the test data set reaches a tolerated value or when the maximum number of predefined iterations is reached. The models were developed using MathWorks MATLAB programming environment, version 2018a.

The evaluation of the developed models was carried out on the training and independent (test) data sets, based on four statistical indicators: Pearson correlation coefficient (R), determination coefficient (R^2), root mean square error ($RMSE$) and mean absolute error (MAE). Eq. (1 – 4).

$$R = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

$$R^2 = 1 - \frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (2)$$

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2 / n} \quad (3)$$

$$MAE = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |\hat{y}_i - y_i| \quad (4)$$

The 2,3-DMB and 2-MP MLP NN model evaluation results are compared with previously developed polynomial linear (finite impulse response – FIR, autoregressive with exogenous inputs – ARX, output error – OE) and nonlinear (nonlinear ARX – NARX, Hammerstein-Wiener – HW) models. The development and results of the polynomial dynamic models are presented in the paper by Herceg et al. (2018).

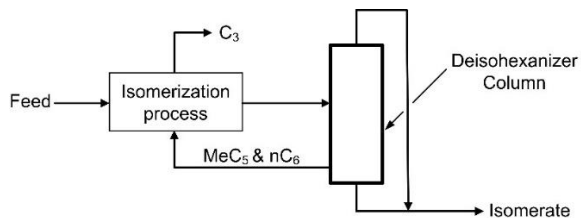


Figure 1. MeC₅ and nC₆ recycle option via deisohexanizer column (Cusher, 2003)

Table 1. Typical feed and product octane levels

		RON
Feed		69
Product	Option 1: no recycle	83
	Option 2 (deisohex. column): recycle of MeC ₅ + nC ₆	88
	Option 3 (molecular sieves): recycle of nC ₅ + nC ₆	89
	Option 4 (combination): recycle of nC ₅ + nC ₆ + MeC ₅	92

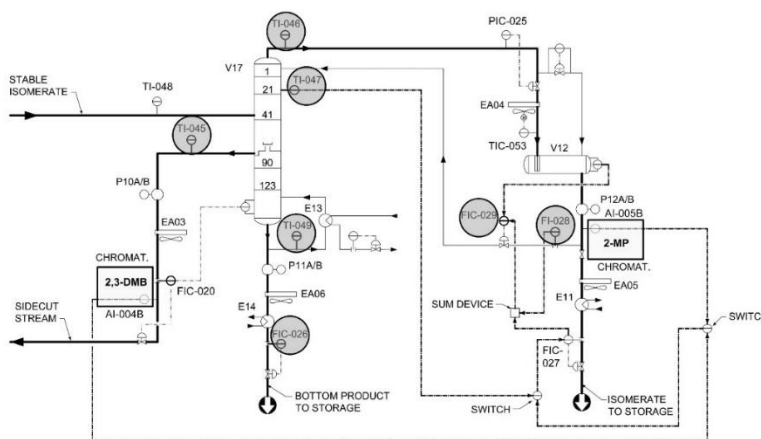


Figure 2. Deisohexanizer section of isomerisation process (Herceg et al., 2018)

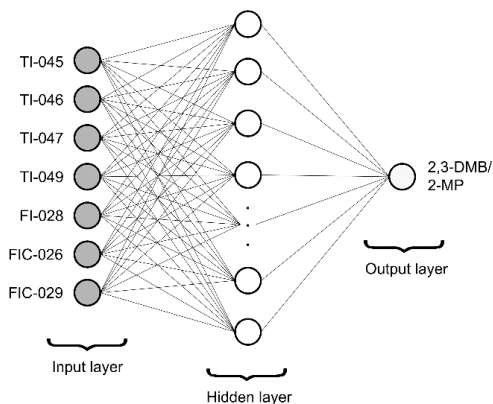


Figure 3. The structure of the MLP neural network model

Results and discussion

Considering the results of the estimation of the 2,3-DMB and 2-MP contents for each combination of learning algorithm, transfer function, and number of neurons in the hidden layer, the top five optimal NN results for training, validation and test data sets are shown in Tables 2 – 7.

Regarding the 2,3-DMB content estimation model, the tangent-sigmoid (tansig) and logarithmic-sigmoid (logsig) transfer functions describe the system of interest much better than the linear functions (poslin and purelin). The tansig transfer function gives slightly better results in combination with the Levenberg-Marquardt (LMA)¹ learning algorithm and the optimal number of neurons in the hidden layer of 15. The results of the estimation of the content of 2,3-DMB considering the training, validation and test sets are presented in Tables 2, 4 and 6, respectively. The high values of the Pearson correlation coefficient (R) and the coefficient of determination (R^2) are evidence of a very good match between the results provided by the model and the real (measured) values. High correlation values and similarity in results on all sets (training, validation and test) are proof of good generalization abilities. Small values of root mean square ($RMSE$) and mean absolute error (MAE) show that the model is reliable enough for application. This is especially important in applications for advanced process control

¹ The Levenberg-Marquardt Algorithm is a technique that uses the Gauss-Newton approach and the steepest descent approach to converge at an optimal solution. The approach is often used to assign the best characteristics of different algorithms to solve a wider range of problems. This technique is effective in solving nonlinear behaviour problems (Wilson and Mantooth, 2013).

where the high accuracy of the model for estimating the 2,3-DMB content is extremely important.

In the case of 2-MP content estimation, tansig and logsig transfer functions also describe the system of interest much better than linear ones. The logsig transfer function proved somewhat better in combination with the LMA learning algorithm and the optimal number of neurons of 15. High correlation values and similarity in results on training, validation and test sets (Tables 3, 5 and 7) proving the good generalization abilities of the model. The good matching of the results provided by the model with the real measurements is reflected in the high values of the Pearson correlation coefficient and the coefficient of determination, as well as in the small values of the root mean square and mean absolute error. This shows that the model is reliable for on-site application, especially for advanced process control.

Diagrams of comparison for the NN model results and real measured data (Figures 4 and 5) show a good match, in accordance with the evaluation results on test data sets from Tables 6 and 7. The Figures 4 and 5 refer to first in a row of neural networks from Tables 6 and 7, respectively.

Comparing the results obtained using MLP neural networks with the results of dynamic polynomial models (Tables 8 and 9) published in the work by Herceg et al. (2018), it is evident that in the case of 2,3-DMB content estimation, MLP NN gives better results, including all four statistical parameters (R , R^2 , $RMSE$ and MAE). It is concluded that even in the data set where the dynamics of the process is not so enhanced (the data set on which the models were developed for the estimation of 2,3-DMB content is slightly less diverse than the data set for the development of the models for the 2-MP content – tables 10 and 11), MLP NN show good generalization abilities. However, in the case of comparing the results of the 2-MP content model based on neural networks with the results of dynamic polynomial models (Table 9), it is evident that the MLP NN give somewhat worse results. Only in comparison with the simple linear dynamic FIR model, the NN model is slightly better. It is concluded that in this case the feed-forward NN network generally describes the complex dynamics of the process worse than dynamic polynomial models. Based on this fact, further research related to the development of dynamic neural networks is suggested.

Table 2. 2,3-DMB content NN model evaluation results on training data set

MLP NN structure	Learning function	Transfer Function	Number of neurons	R (train)	R^2 (train)	$RMSE$ [% mol]	MAE [% mol]
7-15-1	LMA	tansig	15	0.975	0.951	0.171	0.133
7-15-1	LMA	logsig	15	0.974	0.949	0.175	0.136
7-15-1	LMA	tansig	15	0.972	0.945	0.180	0.143
7-10-1	LMA	tansig	10	0.966	0.933	0.201	0.160
7-10-1	LMA	logsig	10	0.965	0.932	0.205	0.163

Table 3. 2-MP content NN model evaluation results on training data set

MLP NN structure	Learning function	Transfer function	Number of neurons	R (train)	R^2 (train)	$RMSE$ [% mol]	MAE [% mol]
6-15-1	LMA	logsig	15	0.963	0.928	0.792	0.600
6-15-1	LMA	logsig	15	0.963	0.928	0.796	0.595
6-15-1	LMA	logsig	15	0.961	0.923	0.819	0.612
6-15-1	LMA	tansig	15	0.960	0.922	0.826	0.623
6-10-1	LMA	tansig	10	0.957	0.915	0.864	0.662

Table 4. 2,3-DMB content NN model evaluation results on validation data set

MLP NN structure	Learning function	Transfer Function	Number of neurons	R (train)	R^2 (train)	$RMSE$ [% mol]	MAE [% mol]
7-15-1	LMA	tansig	15	0.974	0.949	0.172	0.134
7-15-1	LMA	logsig	15	0.973	0.948	0.179	0.142
7-15-1	LMA	tansig	15	0.970	0.941	0.189	0.148
7-10-1	LMA	tansig	10	0.965	0.931	0.212	0.164
7-10-1	LMA	logsig	10	0.962	0.926	0.210	0.162

Table 5. 2-MP content NN model evaluation results on validation data set

MLP NN structure	Learning function	Transfer function	Number of neurons	R (train)	R^2 (train)	$RMSE$ [% mol]	MAE [% mol]
6-15-1	LMA	logsig	15	0.963	0.927	0.812	0.623
6-15-1	LMA	logsig	15	0.962	0.925	0.818	0.613
6-15-1	LMA	logsig	15	0.960	0.921	0.831	0.596
6-15-1	LMA	tansig	15	0.957	0.915	0.860	0.635
6-10-1	LMA	tansig	10	0.952	0.907	0.907	0.680

Table 6. 2,3-DMB content NN model evaluation results on test data set

MLP NN structure	Learning function	Transfer function	Number of neurons	R (test)	R^2 (test)	$RMSE$ [% mol]	MAE [% mol]
7-15-1	LMA	tansig	15	0.974	0.949	0.179	0.141
7-15-1	LMA	logsig	15	0.973	0.946	0.180	0.140
7-15-1	LMA	tansig	15	0.971	0.944	0.194	0.150
7-10-1	LMA	tansig	10	0.964	0.930	0.207	0.170
7-10-1	LMA	logsig	10	0.962	0.925	0.202	0.162

Table 7. 2-MP content NN model evaluation results on test data set

MLP NN structure	Learning function	Transfer function	Number of neurons	R (test)	R^2 (test)	RMSE [% mol]	MAE [% mol]
6-15-1	LMA	logsig	15	0.965	0.932	0.791	0.600
6-15-1	LMA	logsig	15	0.961	0.924	0.796	0.600
6-15-1	LMA	logsig	15	0.960	0.921	0.829	0.622
6-15-1	LMA	tansig	15	0.959	0.920	0.834	0.624
6-10-1	LMA	tansig	10	0.954	0.912	0.865	0.673

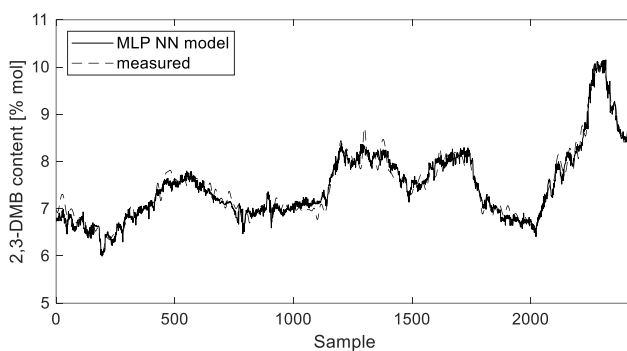


Figure 4. Comparison between measured data and 2,3-DMB content NN model results

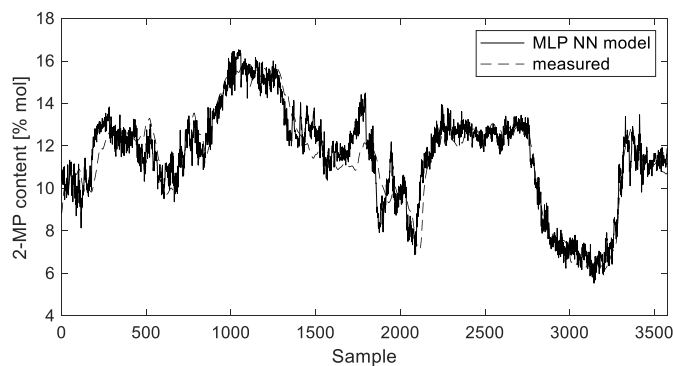


Figure 5. Comparison between measured data and 2-MP content NN model results

Table 8. 2,3-DMB content NN versus dynamic polynomial model evaluation results (Herceg et al., 2018)

Model		R (test)	R^2 (test)	RMSE [% mol]	MAE [% mol]
NN	MLP 7-15-1	0.974	0.949	0.179	0.141
Dynamic polynomial models	FIR	0.948	0.878	0.266	0.213
	ARX	0.963	0.925	0.209	0.163
	OE	0.965	0.928	0.204	0.152
	NARX	0.965	0.927	0.206	0.163
	HW	0.967	0.934	0.196	0.149

Table 9. 2-MP content NN versus dynamic polynomial model evaluation results (Herceg et al., 2018)

Model		R (test)	R^2 (test)	RMSE [% mol]	MAE [% mol]
NN	MLP 6-15-1	0.965	0.932	0.791	0.600
Dynamic polynomial models	FIR	0.932	0.866	0.857	0.681
	ARX	0.988	0.973	0.386	0.320
	OE	0.993	0.987	0.270	0.218
	NARX	0.987	0.973	0.386	0.326
	HW	0.993	0.986	0.277	0.204

Table 10. Descriptive statistics in the case of 2,3-DMB content NN model development (Herceg et al., 2019)

No	Variable	Samples	Mean	Median	Min	Max	Variance	Std. dev.
1	TIR-046	6667	75.43	75.72	72.54	77.57	1.083	1.041
2	TIRC-047	6667	87.29	87.65	82.55	88.40	1.072	1.035
3	TIR-045	6667	97.23	97.26	96.19	98.19	0.072	0.268
4	TIR-049	6667	121.7	121.8	117.4	125.0	1.078	1.038
5	FIR-028	6667	378.2	377.4	360.8	397.5	38.22	6.182
6	FIRC-029	6667	426.2	426.5	404.7	448.9	29.69	5.448
7	FIRC-026	6667	5.534	5.497	2.966	11.00	1.826	1.351
AIR-004B (2,3-DMB)		6667	7.417	7.278	5.871	10.12	0.605	0.778

Table 11. Descriptive statistics in the case of 2-MP content NN model development (Herceg et al., 2019)

No	Variable	Samples	Mean	Median	Min	Max	Variance	Std. dev.
1	TIR-046	10078	75.93	75.99	73.44	77.89	0.804	0.897
2	TIRC-047	10078	87.67	87.76	86.26	88.65	0.175	0.418
3	TIR-045	10078	97.15	97.16	96.21	97.89	0.060	0.245
4	TIR-049	10078	122.7	122.8	119.6	125.3	1.004	1.002
5	FIR-028	10078	372.4	372.2	357.1	386.7	36.67	6.056
6	FIRC-029	10078	422.3	422.6	404.7	439.0	18.19	4.265
AIR-005B (2-MP)		10078	11.05	11.74	4.605	16.91	8.788	2.965

Conclusions

Neural network models were developed for estimating the content of 2,3-DMB and 2-MP as critical quality components of an isomerization process. The models show good generalization capabilities and are able to reliably estimate the content of critical quality attributes. In the case of 2,3-DMB content, the MLP NN model shows slightly better results compared to dynamic polynomial models. However, in the case of the 2-MP content, the dynamic polynomial models have better results, except for the simple model FIR. In this sense, there is room for further development and testing of dynamic neural networks, and it is possible to assume overall results at the level of dynamic polynomial models or better.

References

- Abirami, S., Chitra, P. (2020): Chapter Fourteen – Energy-efficient edge based real-time healthcare support system. In: *Advances in Computers*, Volume 117, Issue 1, Raj, P., Evangeline, P. (ed.), Amsterdam, NL: Elsevier, pp. 339-368.
- Cerić, E. (2012): *Nafta, procesi i proizvodi*, Sarajevo, BiH: IBC d.o.o.
- Cusher, N.A. (2003): UOP Penex Process. In: *Handbook of Petroleum Refining Processes*, third edition, Meyers, R.A. (ed.), New York, USA: McGraw-Hill, pp. 9.15-9.27.
- Fortuna, L., Graziani, S., Rizzo, A., Xibilia, M.G. (2007): *Soft Sensors for Monitoring and Control of Industrial Processes (Advances in Industrial Control)*, London, GB: Springer-Verlag.
- Herceg, S. (2021): Development of soft sensors for advanced control of isomerization process, Zagreb, HR: Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb.
- Herceg, S., Ujević-Andrijić, Ž., Bolf, N. (2019): Development of soft sensors for isomerization process based on support vector machine regression and dynamic polynomial models, *Chem. Eng. Res. Des.* 149, 95-103.
- Herceg, S., Ujević-Andrijić, Ž., Bolf, N. (2018): Continuous estimation of the key components content in the isomerization process products, *Chem. Eng. Trans.* 69, 79-84.
- Jeswal, S.K., Chakraverty, S. (2021): Chapter 10 – Fuzzy eigenvalue problems of structural dynamics using ANN. In: *New Paradigms in Computational Modeling and Its Applications*, Chakraverty, S. (ed.), Cambridge, USA: Academic Press, pp. 145-161.
- Khajah, M., Chehadeh, D. (2022): Modeling and active constrained optimization of C5/C6 isomerization via Artificial Neural Networks, *Chem. Eng. Res. Des.* 182, 395-409.
- Lima, F.A.R.D., de Moraes, M.G.F., Secchi, A.R., de Souza Jr., M.B. (2022): Development of a recurrent neural networks-based NMPC for controlling the concentration of a crystallization process, *Digital Chem. Eng.* 5, 100052.
- Morlanés, N., Lezcano, G., Yerrayya, A., Mazumder, J., Castaño, P. (2022): Improving robustness of kinetic models for steam reforming based on artificial neural networks and ab initio calculations, *Chem. Eng. J.* 433, 133201.
- Panerati, J., Schnellmann, M.A., Patience, C., Giovanni Beltrame, G., Patience, G.S. (2019): EXPERIMENTAL METHODS IN CHEMICAL ENGINEERING: ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS – ANNs, *Can. J. Chem. Eng.* 97, 2372-2382.

- Pirdashti, M., Curteanu, S., Kamangar, M.H., Hassim, M.H., Khatami, M.A. (2013): Artificial neural networks: applications in chemical engineering, *Rev. Chem. Eng.* 29, 205-239.
- Sildir, H., Sarrafi, S., Aydin, E. (2022): Optimal artificial neural network architecture design for modeling an industrial ethylene oxide plant, *Comput. Chem. Eng.* 163, 107850.
- Wilson, P., Mantooth, H.A. (2013): Chapter 10 – Model-Based Optimization Techniques. In: *Model-Based Engineering for Complex Electronic Systems*, Wilson, P., Mantooth, H.A. (ed.), Oxford, GB: Newnes, pp. 347-367.
- Xing, Y., Wang, B., Gong, Z., Hou, Z., Xi, F., Mou, G., Du, Q., Gao, F., Jiao, K. (2022): Data-Driven Fault Diagnosis for PEM Fuel Cell System Using Sensor Pre-Selection Method and Artificial Neural Network Model, *IEEE Trans. Energy Convers.* 37, 1589-1599.

Extraction of metal cations with porous oxa-aza macrocyclic compounds

Hana Zajkić, Milenko Korica, Tomislav Balić*

*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry,
Cara Hadrijana 8/A, 31000 Osijek, Croatia*

*Corresponding author: tombalic@kemija.unios.hr

original scientific paper

Summary

A novel *oxa-aza* macrocycle 1R (1R = 1,6,20,25-tetraaza-2,5:8,9:17,18:21,24:27,28:36,37-hexabenz-10,16,29,35-tetraoxa-cyclooctatriakonta) was prepared by reduction of previously reported porous Schiff base macrocycle 1 (1 = 1,6,20,25-tetraaza-2,5:8,9:17,18:21,24:27,28:36,37-hexabenz-10,16,29,35-tetraoxa-cyclooctatriakonta-1,6,20,25-tetraen) using NaBH_4 . The compound was characterized by FT-IR and NMR spectroscopy. The extractability of metal cation by compounds 1 and 1R indicates that the highest extraction is achieved for Cu^{2+} (87%) in the case of compound 1 and for Au^{3+} (100%), Cu^{2+} (100%) and Fe^{3+} (100%) in the case of compound 2. The composition of extracted species in case of 1R and Cu^{2+} is 1:1 (ligand: metal ratio, $K_{ex} = 11.062$), and 1:1 ratio for 1R and Ag^+ and Au^{3+} ($K_{ex} = 8.7107$ and 17.667 , respectively).

Keywords: metal cation, extraction, oxa-aza macrocycles, porous materials

Introduction

Removal of highly toxic gases, water and soil pollutants from the environment is a major scientific topic. Macrocycles are organic compounds that can bind toxic species and be designed for the extraction of specific metal cations (Morillo et al., 2002; Lindoy et al., 2010). Macrocycles containing oxygen and nitrogen donor atoms in the inner macrocyclic ring (*oxa-aza* macrocycles) have been studied for that purpose (Balić et al., 2016a; Reyes-Marquez et al., 2009). The affinity of an *oxa-aza* macrocycle towards specific cations can be designed by changing several factors: ring size (cavity size), HSAB principle, donor atom properties, planarity of the system (puckering) and orientation of donor atoms (*exodentate* or *endodentate*) (Park et al., 2003; Adam et al. 2003; Hancock et al., 1989). In our previous investigations on *oxa-aza* macrocyclic ligands (Balić et al., 2016a; Paurević et al., 2020) we have found that the reduction of the imine group into secondary amine group increases both the basicity and flexibility of the macrocyclic system. These changes in structural and chemical features dramatically increase the extractability of metal cations.

In this study, we have prepared a novel *oxa-aza* macrocyclic compound 1R by simple reduction of porous imine analogue using NaBH_4 . The synthesized compound was characterized by spectroscopy methods (^1H NMR and FT-IR spectroscopy) and

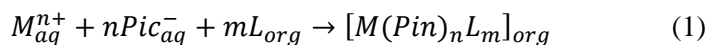
molecular structure was elucidated using these methods. Compounds 1 and 1R were tested for liquid-liquid metal cation extractions and structure-extractability relationship was determined.

Materials and methods

All commercially available chemicals were of reagent grade. IR spectra were recorded on Shimadzu FTIR 8400S spectrophotometer using a DRS 8000 attachment, in the 4000–400 cm^{-1} region. The ^1H NMR spectrum was recorded on Bruker Avance III 500 DMSO- d_6 and TMS as standard. The UV-VIS analyses were done on Shimadzu UV-VIS spectrophotometer UV-1800 at 356 nm.

Extraction experiments

Metal picrate solutions of Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Co^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{3+} , Au^{3+} and Cr^{3+} for extraction experiments were prepared by addition of 5 mL aqueous metal picrate solutions (2.5×10^{-4} M) to 5 mL 2.5×10^{-3} M solution of picric acid. The resulting mixture was diluted to 50 mL. The *oxa-aza* macrocyclic compounds solutions (2.5×10^{-3} M) were prepared by dissolving compounds in 100 mL of dichloromethane. Mixed 5 mL metal picrate solutions were layered on 5 mL dichloromethane solution of the macrocyclic compound in glass vials and vigorously stirred on a mechanical shaker for 3 h at 25 °C. Prior to spectroscopic measurements, the solutions were left to stabilize for 24 h. The spectrophotometric measurements of picrate remaining in the aqueous phase were carried out at 356 nm. For each experiment blank test was performed. To investigate the composition of extracted species ($\log D$ - $\log L$ plot analyses) the dependence of distribution ratio (D) on ligand concentration was examined. The concentration of *oxa-aza* macrocycles solutions used for the experiments were: 1.6×10^{-4} M, 1.2×10^{-4} M, 8×10^{-5} M, 4×10^{-5} M and 2×10^{-5} M and concentrations of Au^{3+} and Ag^+ metal picrate solutions were 1×10^{-4} M. The extraction equilibrium can be determined by Equation 1, and plot of $\log \{D/[\text{Pic}^-]^n\}$ as function of $\log [L]$ gives a straight line with a slope m and K_{ex} . The composition of extracted species can be calculated by Equation 2.



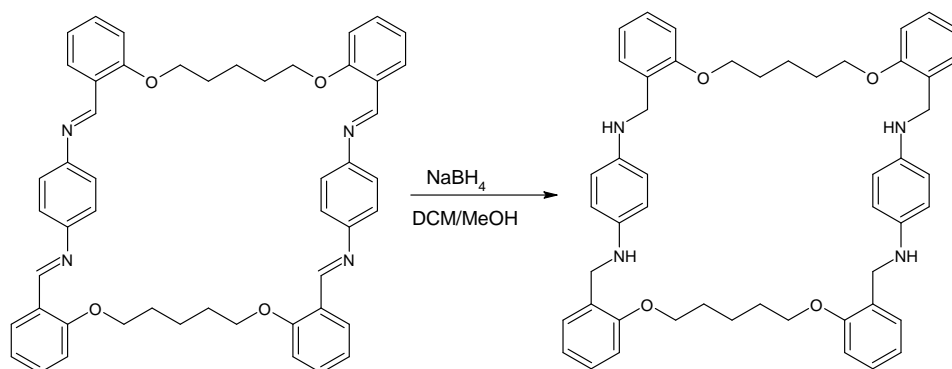
$$\log \left\{ \frac{D}{[\text{Pic}^-]^n} \right\} = \log K_{ex} + m \log [L] \quad (2)$$

Synthesis

Synthesis and crystal structure description of compound 1 was previously reported (Balić et al., 2016b). Synthetic pathway is shown in Scheme 1.

Synthesis of 1R: In a 25 mL round bottom flask, 150 mg of previously prepared Schiff's base analog 1 was dissolved in a solvent mixture of dichloromethane and

methanol in a ratio of 3:1. Sodium borohydride was gradually added to the prepared solution. The mixture was stirred for 24 h, and then 15 mL of deionized water was added. After a few days of the mixture standing at room temperature, yellow product was formed ($m = 0.087$ g, % yield = 23.51%); ν_{\max} (cm^{-1}) 756(m), 860(m), 1010(m), 1047(m), 1122(m), 1250(s), 1600(s), 2850(m), 2950(m), 3230(m), 3345(m).



Scheme 1. Synthetic route for the preparation of compound 1R

Results and discussion

Molecular and crystal structure of 1

The crystal and molecular structure of compound **1** was previously described by Balić et al. 2016b, and herein we present a short overview of the structure of the compound. The compound crystallizes in a monoclinic system and can be described as an N_4O_4 -donor macrocyclic Schiff base with 38 atoms in the inner macrocyclic ring (Figure 1). The compound has a planar structure with the size of the free bonding space in the range of 5.713 – 6.779 Å. The molecules of the compound are connected by weak van der Waals interactions along the a axis, and such stacking of molecules results in the porous channel structure shown in Figure 2. The cavities inside the crystal lattice are 441.8 Å³ per unit cell.

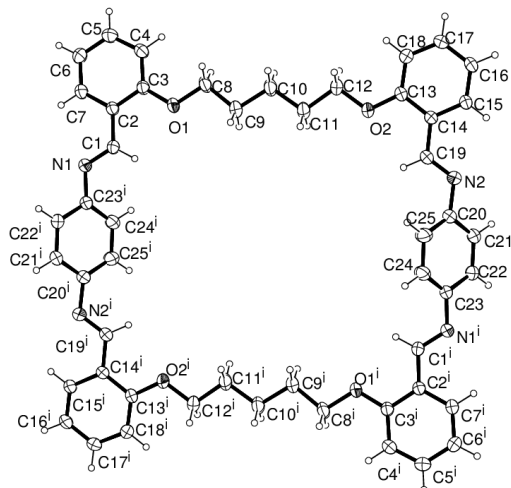


Figure 1. Molecular structure of 1 with displacement ellipsoids of non-hydrogen atoms drawn at the 50% probability level

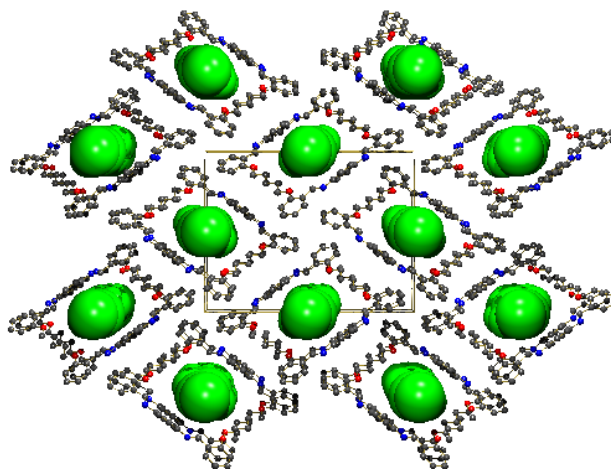


Figure 2. Representation of crystal packing of 1 along *a*-axis. Green spheres represent voids in the crystal structure

FT-IR and ¹H NMR spectra of 1R

The FT-IR spectrum of the 1R sample (Figure 3) shows maxima in the region of 2950–2850 cm^{-1} , which corresponds to C-H stretching. At 1600 cm^{-1} are maxima corresponding to C=C stretching. In the region of 1250 cm^{-1} are maxima corresponding to C-O-C stretching. In the compound, the C=N vibration is not observed and the N-H vibration is present (at 3400 cm^{-1}), which is proof of the reduction of the imine into a secondary amine.

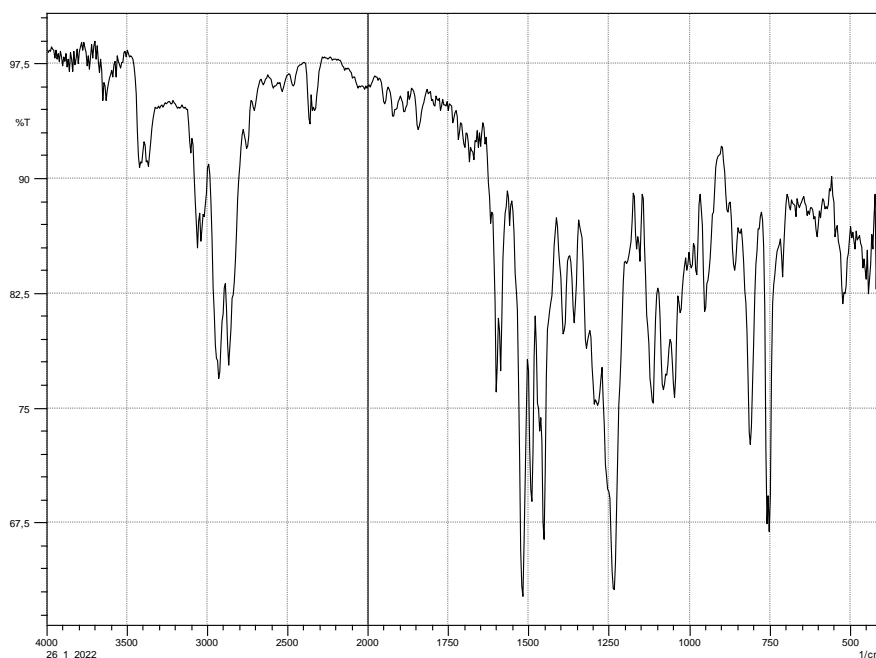


Figure 3. FT-IR spectrum of 1R

In the ¹H NMR spectrum of 1R (Figure 4), maxima in the range 1.5 to 7.5 ppm are observed. The maxima in the range from 1.5 to 2 ppm and in the range from 3.5 to 4.5 are attributed to hydrogen atoms in the aliphatic chain of the molecule. At 4.95 ppm there is a maximum that can be attributed to the resonance of the hydrogen atom attached to the nitrogen atom, which confirms that the initial imine has been reduced to a secondary amine. Resonances in the region of 6 to 7.5 ppm can be attributed to hydrogen atoms attached to aromatic systems. Also, the resonance at 8 to 8.5 ppm typical for the hydrogen atom attached to the imino group is not observed in this spectrum, which is an additional confirmation of the successful reduction of the compound.

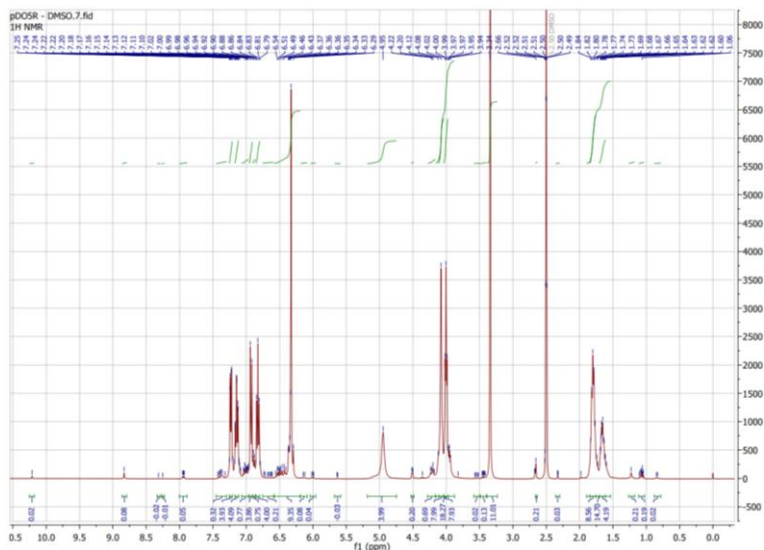


Figure 4. ^1H NMR spectrum of 1R

Metal picrate extraction

The extractability percentages for individual metal ions extracted using compounds 1 and 1R are shown in Table 1. Considering the obtained results, it is possible to make several conclusions related to the extraction abilities of the prepared macrocycles. In the case of compound 1, a distinct tendency towards the extraction of copper (II) cations can be observed (87% extraction). Considering other cations, small percentages of extraction were observed for HAuCl_4 (53%) and Hg^{2+} (19%). It is interesting to note that the compound extracts gold cations when HAuCl_4 was used, while no extraction occurs in the case of AuPIK (the solution with picrate anions). We assume that in the case of HAuCl_4 , the extraction of the anionic species $[\text{AuCl}_4]^{4-}$ occurs, which according to its properties (acidity and size of the anion) corresponds to a macrocyclic compound. Similar results were previously observed for tetraaza macrocyclic compounds in a paper reported by Liu et al. (2018). The obtained result indicates the possibility of selective extraction of Cu^{2+} from aqueous solutions containing a mixture of cations of transition elements of the first period.

Table 1. The extractability of metal cations for compounds 1 and 1R

Metal ion	Extractability (%) ¹	
	1	1R
Fe ³⁺	0	100
Hg ²⁺	19.40	83.28
Ag ⁺	4.94	91.01
Cr ²⁺	5.85	73.21
Cu ²⁺	86.97	100
Ni ²⁺	7.12	49.94
Cd ²⁺	0	29.05
Zn ²⁺	0	63.67
Co ²⁺	11.88	90.61
Mn ²⁺	5.67	52.07
AuPIK	0 (-1.61)	93.1
HAuCl ₄ x 3H ₂ O	52.70	100

¹The extractability was calculated using equation: $E(\%) = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$. A_0 and A is absorbance in absence and presence of the ligand, respectively.

The results of the extraction of metal cations by the reduced compound (1R) show that the compound extracts almost all tested cations in substantial amounts. The compound fully extracts Fe³⁺, Cu²⁺ and HAuCl₄ from aqueous solutions, and very good results were also obtained for Ag⁺, Hg²⁺ and Co²⁺. In relation to the imine analog, this increase in the percentage of extraction is quite surprising and can be explained by the increase in the basicity of the reduced macrocyclic compound. Although this compound shows a drastic increase in the extraction of metal cations, unfortunately, the selectivity towards a specific cation does not exist, which is a problem when extracting a specific cation from a mixture of several metal cations. According to the HSAB (Hard and Soft Acid and Bases) principle, the synthesized secondary amine contains a hard base (ether group) and a semi-hard base (amino group). Considering the above, high extraction percentages should be observed for hard to semi-hard acids (cations with a small radius and high oxidation state), which is somewhat reflected in the fairly good extraction of Fe³⁺, Cu²⁺ and Co²⁺. The compound also extracts the large (by radius) and soft cations, Ag⁺ and Hg²⁺, which contradicts the HSAB principle. As previously explained by Balić et al., 2016a and Paurević et al., 2020 such extraction properties indicate the possibility of the existence of two (or more) binding sites for cations; one site that shows a tendency to bind hard and small cations, and the other to bind soft and large cations.

Further analyses of extraction properties were done for the compound 1 and Cu²⁺ cation and the compound 1R and Co²⁺, Ag⁺, Au³⁺ and Fe³⁺ cations. The measurement was repeated with different concentrations of compounds 1 and 1R. From the measurements, it was possible to determine the composition of the extracted species in relation to the distribution coefficient (D) only for 1R and silver(I) and gold(III) cation. As a final result, it is possible to determine the extraction constant (K_{ex}) and the ligand : metal ratio. The results are shown in Figures 5 and 6.

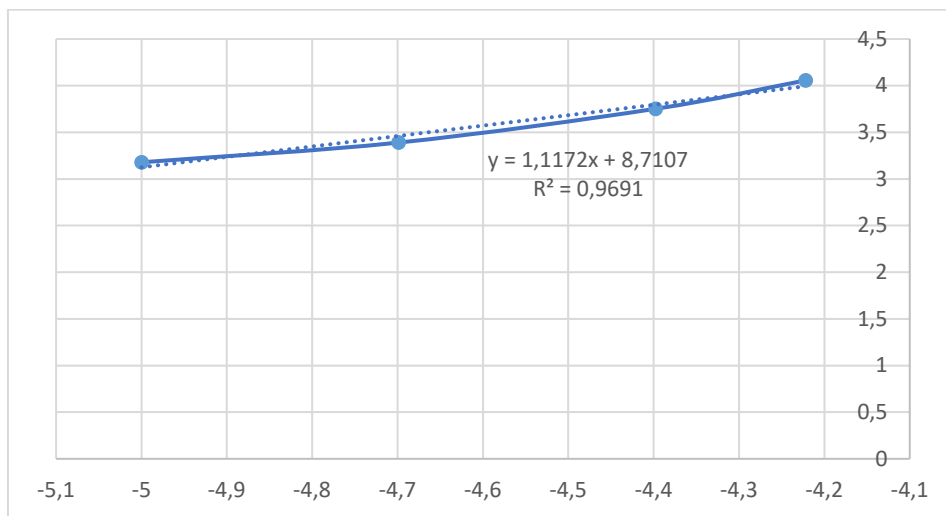


Figure 5. Plot of $\log \left\{ \frac{D}{[pic^-]^n} \right\}$ versus $\log L$ for the extraction of Ag picrate and 1R

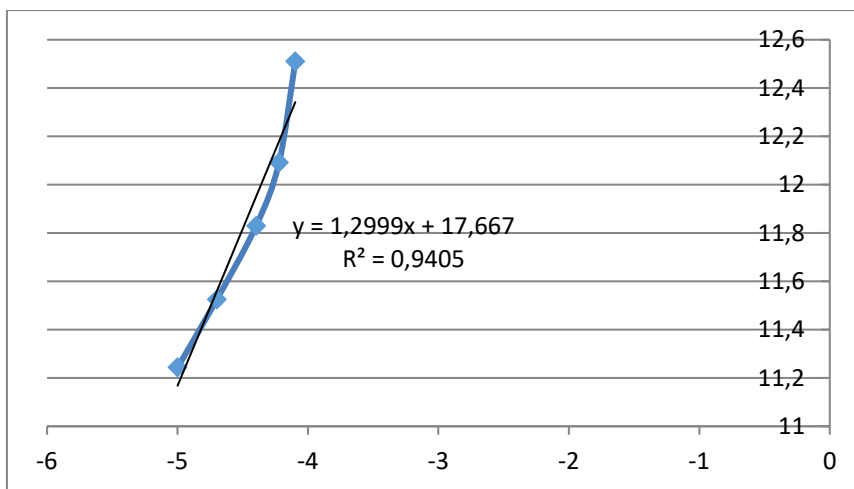


Figure 6. Plot of $\log \left\{ \frac{D}{[pic^-]^n} \right\}$ versus $\log L$ for the extraction of Au³⁺ and 1R

The slope values ($m = 1.1172$ for Ag⁺ and $m = 1.2999$ for Au³⁺) in both cases suggest that the composition of the extracted complex is 1:1. The extraction constants are 8.7107 for Ag⁺ and 17.667 for Au³⁺, which indicates a more effective transport of

Au^{3+} cations from the aqueous phase compared to Ag^+ cations. It can be concluded that the 1R compound extracts gold cations from an aqueous solution better than silver cations, which indicates the possibility of selective extraction of gold cations from aqueous solution containing admixtures of silver cations. Unfortunately, the determination of the extraction constant and the composition of the extracted complex for other ligand-cation systems in the studied concentration range did not give consistent results (graphs show large deviations from linearity) and further research is needed which are beyond the scope of this work.

Conclusions

A novel oxa-aza macrocyclic compound was prepared by simple reduction of imine based analogue. Spectroscopic data have confirmed the formation and molecular structure of 1R compound. Both synthesized compounds show a certain affinity for cation extraction, the reduced form (1R) extracts almost all metal cations in significant percentages, while the imine analogue (1) is specific for copper (II) cations. Based on the obtained results, it is possible to conclude that the synthesized compounds have a potential application for the extraction of copper and cations of precious metals (gold(III) and silver(I)).

Acknowledgments

This work was carried out with financial support from *Josip Juraj Strossmayer University of Osijek* (Project: UNIOS-ZUP 2018-112).

References

- Adam, K. R., Baldwin, D. S., Lindoy, L. F., Meehan, G. V., Vasilescu, I. M., Wei, G. (2003): Metal-ion recognition. Modeling the stability constants of some mixed-donor macrocyclic metal ion complexes—a simple model, *Inorg. Chim. Acta* 352, 46–50.
- Balić, T., Marković, B., Jažwiński, J., Matković-Čalogović, D. (2016b): Synthesis and structural characterization of microporous N_4O_4 -donor Schiff base macrocycle: Study of host–guest interactions and iodine sorption, *Micropor. Mesopor. Mat.* 226, 53–60.
- Balić, T., Matasović, B., Marković, B., Šter, A., Štivojević, M., Matković-Čalogović, D. (2016a): Synthesis, structural characterization and extraction studies of 17-, 18-, 19- and 20-membered N_2O_2 -donor macrocyclic Schiff bases, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 85, 217–226.
- Hancock, R.D., Martell, A.E. (1989): Ligand design for selective complexation of metal ions in aqueous solution, *Chem. Rev.* 89, 1875–1914.
- Lindoy, L. F., Meehan, G. V., Vasilescu, I. M., Kim, H. J., Lee, J.-E., Lee, S. S. (2010): Transition and post-transition metal ion chemistry of dibenzo-substituted, mixed-donor macrocycles incorporating five donor atoms, *Coord. Chem. Rev.* 254, 1713–1725.
- Liu, W., Oliver, A. G., Smith, B. D. (2018): Macrocyclic Receptor for Precious Gold, Platinum, or Palladium Coordination Complexes, *J. Am. Chem. Soc.* 140, 6810–6813.

- Morillo, J., Usero, J., Gracia, I. (2002): Heavy metal fractionation in sediments from the Tinto river (Spain), *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 82, 245–257.
- Park, K-M., Yoon, I., Lee, Y. H., Lee, S. S. (2003): Synthesis and crystal structures of S₂O₂-donor macrocycles and their silver(I) metallopolymers, *Inorg. Chim. Acta* 343, 33–40.
- Paurević, M., Dandić, A., Šrajter Gajdošik, M., Vidović, B., Perdih, F., Balić, T. (2020): Efficient synthesis of new 17-, 18-, 19- and 20-membered N₂O₂-donor macrocycles by NaBH₄ reduction and metal picrate extraction studies, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 97, 87–98.
- Reyes-Márquez, V., Sánchez, M., Höpfl, H., Lara, K.O. (2009): Synthesis and structural characterization of 18-, 19-, 20- and 22-membered Schiff base macrocycles, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.* 65, 305–315.

2

**Sekcija: KEMIJSKO I BIOKEMIJSKO
INŽENJERSTVO**

**Topic: CHEMICAL AND BIOCHEMICAL
ENGINEERING**



Impact of SBT impeller speed on copper sorption on zeolite

Anita Bašić*, Ana Herceg, Sandra Svilović, Nenad Kuzmanić

University of Split, Faculty of Chemistry and Technology,

Ruđera Boškovića 35, 21000 Split, Croatia

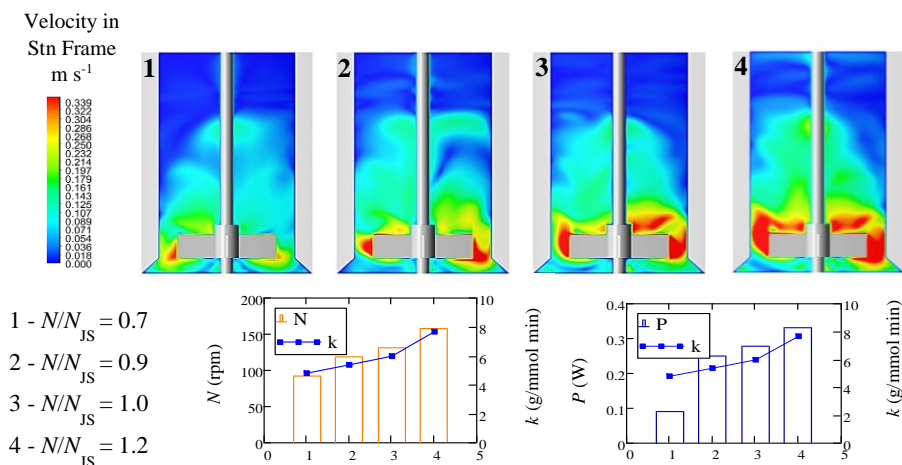
*Corresponding author: abasic@ktf-split.hr

original scientific paper

Summary

The sorption of copper ions on zeolite NaX is a heterogeneous process, and as such dependent on hydrodynamics in a batch reactor. Therefore, this work aimed to study the effect of mixing speed (N/N_{JS} ratio values, i.e. impeller speed/minimum impeller speed for complete suspension) on the kinetics and power consumption of the process examined. The experiments were carried out in a glass batch reactor of nonstandard configuration ($D/d_T = 0.6$, $C/H = 0.1$), equipped with baffles and the SBT impeller. A transient multiphase computational fluid dynamics model was developed to gain valuable insight into complex flow kinetics. The Blanchard model, Mixed surface reaction and diffusion-controlled sorption kinetic model, and Weber-Morris model were used for the kinetic analysis of the experimental kinetic data. According to τ and RMSE values, the reaction is kinetic controlled in all experiments performed.

Keywords: SBT impeller, NaX zeolite, kinetics, Computational fluid dynamics



Introduction

Zeolites are hydrated natural or synthetic aluminosilicate compounds (Król, 2020) characterized by specific 3D network structures built mostly of $[SiO_4]$ and $[AlO_4]^-$

tetrahedra connected via common oxygen atoms forming cavities and channels of shape and size characteristic for each type of zeolite (Subotić et al., 1994) The unique structure of zeolite is the reason for the wide range of specific and diverse zeolite properties, which is the reason why zeolites application as catalysts and sorbents increase, especially in environmental protection. NaX zeolite is a synthetic analogue of natural zeolite faujasite. Because of its wide pores NaX zeolite is commonly used for the purification and separation of gases and organic components (Weber et al., 2008; Narag et al., 2020). The high NaX zeolite exchange capacity enables the sorption of heavy cations and radionuclides (Derkowski, 2007). The development of technology and industry has led to growing interest in sorption processes as a method of water and wastewater treatment (Ankrah et al., 2020; Ezzeddine et al., 2018; Flieger et al., 2020; Taamneh et al., 2017). If the sorption is carried out in a batch reactor, it is necessary to ensure the mixing speed that suspends all particles and ensures maximum contact surface of the phases. This speed is known as just off-bottom suspension speed, N_{JS} (Zwietering, 1958). At speeds lower than the N_{JS} , part of the particles lags at the bottom of the reactor, whereby part of the particle surface is blocked and unavailable for transfer processes. At the same time, at speeds above the N_{JS} even though the level of particles homogeneity is higher the transfer processes are not significantly faster, while energy consumption is increased (Paul et al., 2004). Sorption experiments were conducted at different N/N_{JS} ratios. The goal of this work was to investigate the influence of the mixing speed, i.e. the influence of N/N_{JS} ratio on the kinetics of copper (II) ions sorption on NaX zeolite and mixing power consumption. The work also aimed to test if at defined N/N_{JS} ratios the diffusion affects the overall process rate. The obtained experimental data were analysed by Blanchard model, Mixed surface reaction and diffusion controlled adsorption kinetic model and Weber - Morris kinetic models.

Materials and methods

Materials

Copper (II) ion solution was prepared by dissolving the appropriate weight of copper (II) nitrate trihydrate (Kemika) in ultrapure water and its' initial concentration was checked by Perkin Elmer Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer. NaX zeolite (Alfa Aesar) was crushed and sieved to gain the particles in the range from 50 to 60 μm .

Experimental procedure

The suspension, 10.50 g of zeolite NaX and 2.1 dm^3 of copper (II) ion solution constant initial concentration (5.61 mmol dm^{-3}), was mixed using four straight blade turbine impeller, SBT (Figure 1a) at isothermal conditions (27 $^{\circ}\text{C}$). In all experiments glass batch reactor, equipped with four baffles, placed around the vessel periphery at

90°, was used (Figure 1b). Suspension height, H , and reactor diameter, d_T , were equal. The baffles width, R_V , was equal $1/10 d_T$. Impeller off-bottom clearance, C/H , was 0.1 and impeller diameter batch reactor diameter ratio was, D/d_T , was 0.6.

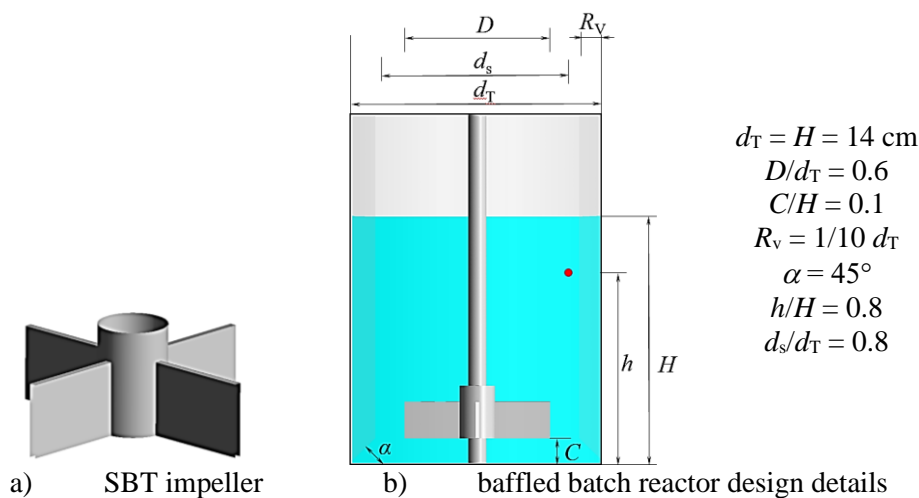


Figure 1. Design details of baffled batch reactor and straight blade turbine impeller

Minimum impeller speed for complete suspension, N_{JS} , was determined by visual method applying Zweitering criterion 1 s as described in detail elsewhere (Zwietering, 1958; Bašić et al., 2021).

At determined N_{JS} and at impeller speeds corresponding to 70%, 90% and 120% of N_{JS} value kinetic experiments were performed for 60 minutes and transient multiphase computational fluid dynamics model was developed using commercial software ANSYS Fluent v17.2 as described in detail elsewhere (Bašić et al., 2022).

The suspension samples were always taken from the same place in the reactor ($h/H = 0.8$, $d_s/d_T = 0.8$) at defined process times during the experiments without stopping the clock or mixing. Centrifuged and then filtered samples were analyzed by UV/Vis spectrophotometer to determine the concentration of the copper (II) ions in the solution. The experimentally obtained values of copper (II) ions concentration in the solution were used to calculate the amount of copper retained on the zeolite, q_t (mmol/g), as:

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

where c_0 is the initial concentration of copper solution (mmol dm^{-3}), c_t is the concentration of copper solution at defined time t (mmol dm^{-3}), V is the volume of solution (dm^3) and m is the mass of zeolite (g).

In addition, for all N/N_{JS} ratios examined, the torque τ (N cm), was measured and used to calculate the mixing power consumption, P (W), as (Yang et al., 2010):

$$P = 2 \cdot \pi \cdot \tau \cdot N \quad (2)$$

Kinetic models

The kinetic model represents the mathematical equation that describes the dependence of the process rate on the process variables and parameters. In this work the experimental kinetic data gained were tested using three different kinetic models; Blanchard model, Mixed surface reaction and diffusion controlled adsorption kinetic model, and Weber-Morris model.

Blanchard kinetic model assumes that the overall sorption rate is controlled by the rate of the reaction that occurs on the surface and is expressed as (Blanchard, 1984):

$$q_t = \frac{q_e^2 k t}{1 + q_e k t} \quad (3)$$

It is reaction based model where q_e is maximum amount of copper ions exchanged at equilibrium i.e. equilibrium capacity (mmol/g), t is time (min) and k is the rate constant of the second order kinetic model (g/mmol min).

The model in which reaction and diffusion are incorporated, i.e. the model that assumes that reaction and diffusion rates are comparable, is the Mixed surface reaction and diffusion controlled adsorption kinetic model (Mixed kinetic model) and is expressed as (Haerifar et al., 2013):

$$q_t = q_e \frac{e^{\left(a t + b \frac{1}{t^2}\right)} - 1}{u_e e^{\left(a t + b \frac{1}{t^2}\right)} - 1} \quad (4)$$

where: $u_e = 1 - \frac{c_e}{c_0}$, $a = k c_0 (u_e - 1)$, $b = 2 k c_0 \psi^{1/2} (u_e - 1)$, c_e is the concentration at equilibrium, ψ is a parameter that defines the contribution of a diffusion process on the rate of the sorption ($\psi > 0$ the diffusion affects the kinetics). A method by which it is possible to prove whether the rate of intraparticle diffusion or the rate of diffusion through film is the slowest step of sorption process is Morris-Weber model. This model is presented as (Weber et al., 1963):

$$q_t = k_d \sqrt{t} + I \quad (5)$$

This model is diffusion based model where k_d is the rate constant (mmol/g min^{1/2}), t is time (min) and I is the intercept (mmol/g).

Results and discussion

From the obtained data shown in Figure 2, it is evident that the amount of copper (II) ions retained on the zeolite increases over the process time. In approximately first four minutes, the increase of the amount of copper (II) ions retained on the zeolite is fast. After the fourth minute, this increase is less pronounced as the amount of copper (II) ions retained onto the zeolite over the process time slows down as the system approaches equilibrium at all examined conditions. It is evident that even though the differences in reaction kinetics could be observed, the defined N/N_{JS} ratios do not significantly affect the maximum amount of copper (II) ions sorbed on NaX zeolite.

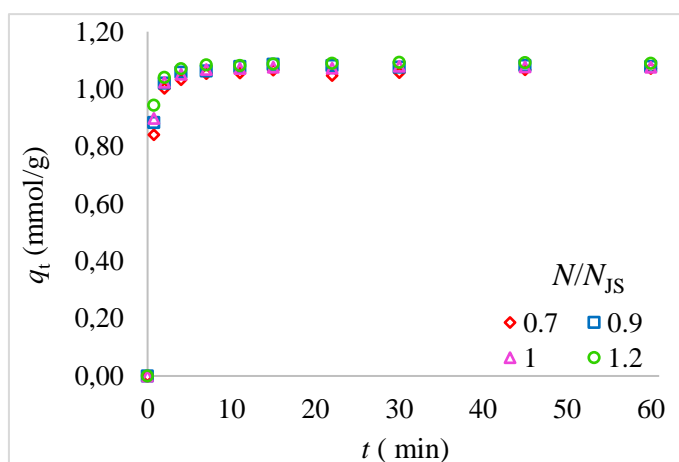


Figure 2. Graphic representation of the dependence of the amount of retained copper (II) ions on the zeolite on time at N/N_{JS} equal to 0.7, 0.9, 1.0 and 1.2

The density of NaX zeolite and the density of the copper (II) ions solution are approximately equal. Therefore, the density of the NaX zeolite used in the experiments does not affect the rheological properties of the copper (II) ions solution. Also, if the mass fraction of solid particles in the system, ω_p , is relatively low (in this paper $\omega_p = 0.5\%$), due to difficulties related to the precise determination of a multiphase system density, it can be assumed the density of the suspension is equal to the density of the solution of copper (II) ions (Kuzmanić, 2003.). Despite this assumption, the system was observed as heterogeneous with two phases of different densities at fluid flow simulations. With this said, in Figure 3 velocity in stationary frame contours and vectors plot show the suspension flow pattern in the reactors at different N/N_{JS} ratios.

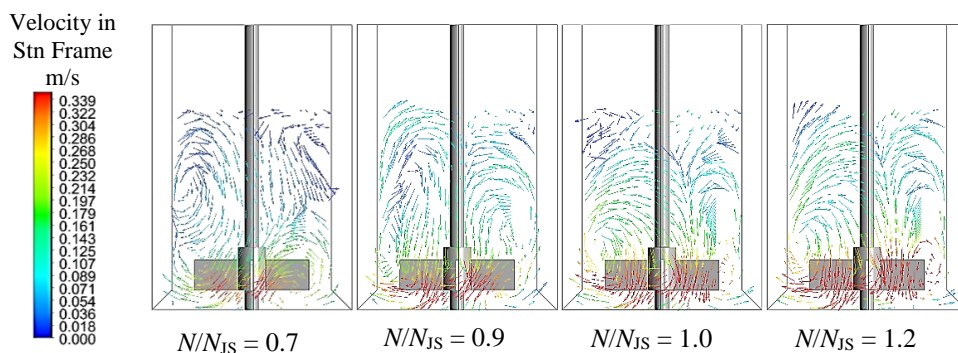


Figure 3. Velocity in stationary frame contours and vector plots

Since the experiments were performed in a batch reactor of nonstandard configuration, the goal of the *computational fluid dynamics* (CFD) simulations was to investigate how the nonstandard system configuration affects the suspension flow. If standard configuration batch reactor with a SBT impeller is used, the suspension is directed towards the reactor wall where the flow is divided into two streams. One stream flows towards the surface, while the other towards the bottom of the vessel, from where they reach the axis of rotation, i.e. the radial suspension flow pattern in the system develops (Doran, 2013). It is known that the impellers' off-bottom clearance, as well as the impellers' diameter, have impact on the fluid flow pattern (Gao et al., 2021). In the nonstandard configuration investigated, the suspension is directed towards the reactor wall, but as the impeller is located close to the bottom of the reactor, the lower circulation loop is suppressed and the characteristic radial flow pattern does not develop.

The kinetic analysis of the obtained experimental data using the mathematical software package MATHCAD 15 aimed to determine the kinetic parameters of the model and to find a kinetic model that most accurately describes the experimental data, i.e. reaction kinetics. To estimate the agreement between the experimental data and the data determined by the kinetic models used in this work, the root-mean-square error, RMSE was calculated.

The agreement of the experimental data with models used and kinetic analysis results are shown in Figures 4–6 and Table 1, respectively.

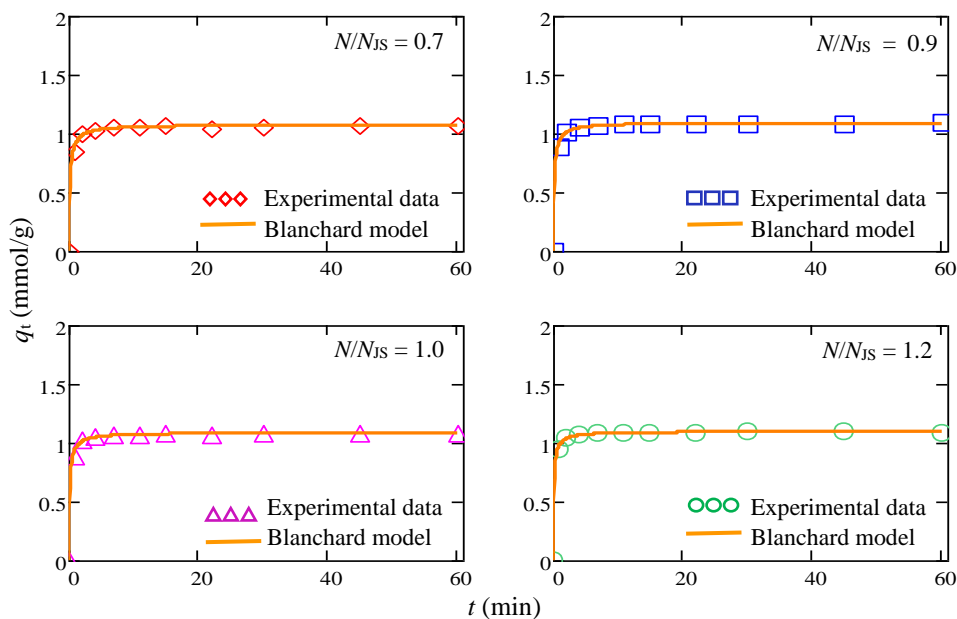


Figure 4. Graphical representation of the agreement of Blanchard model with the experimental data for different N/N_{JS} ratio

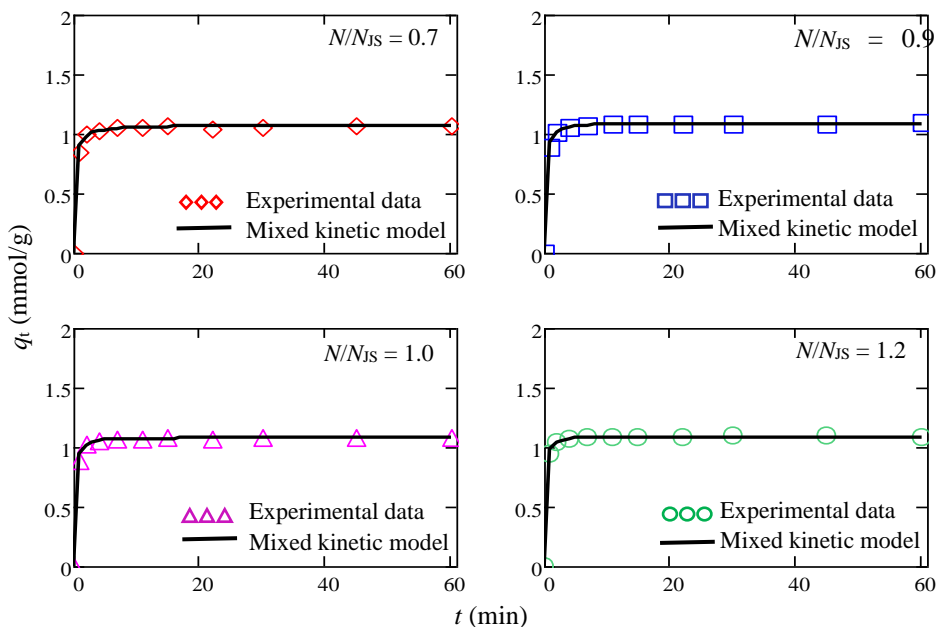


Figure 5. Graphical representation of the agreement of Mixed kinetic model with the experimental data for different N/N_{JS} ratio

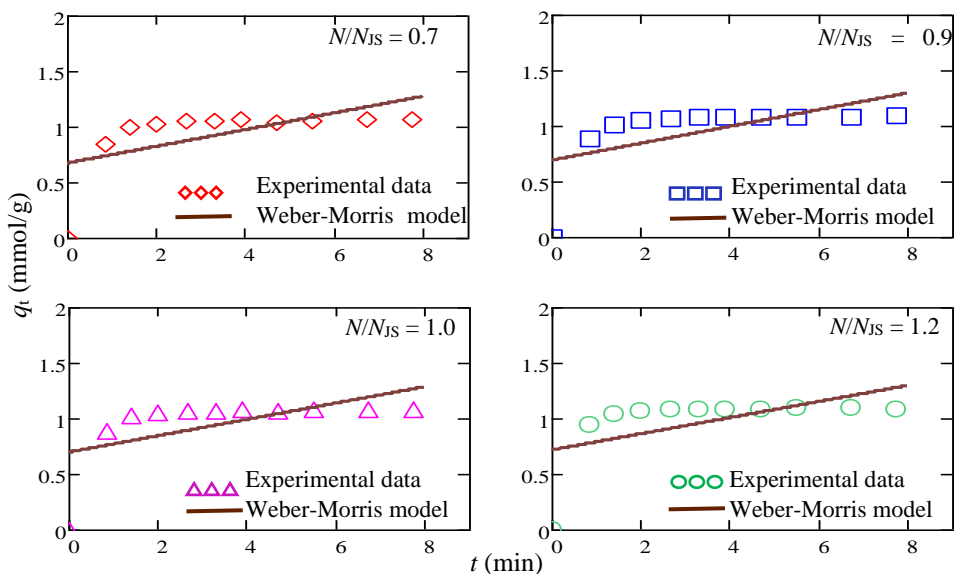


Figure 6. Graphical representation of the agreement of Weber-Morris model with the experimental data for different N/N_{JS} ratio

Table 1. Kinetic analysis results

	N/N_{JS}	0.7	0.9	1.0	1.2
Experimental data	N_{JS} (rpm)	92	119	132	158
	$q_{e,exp}$ (mmol/g)	1.074	1.094	1.080	1.093
	$u_{e,exp}$	0.963	0.966	0.948	0.971
Blanchard model	q_e (mmol/g)	1.075	1.096	1.083	1.097
	k (g/mmol min)	4.814	5.386	5.982	7.670
	RMSE	$12 \cdot 10^{-3}$	$7.8 \cdot 10^{-3}$	$8.2 \cdot 10^{-3}$	$4.0 \cdot 10^{-3}$
Mixed surface reaction and diffusion controlled adsorption kinetic model	q_e (mmol/g)	1.076	1.083	1.075	1.090
	k (L/mmol min)	0.834	0.872	0.893	1.233
	ψ (min)	$1.2 \cdot 10^{-3}$	$0.7 \cdot 10^{-3}$	$1.0 \cdot 10^{-3}$	$1.4 \cdot 10^{-3}$
	u_e	0.996	0.932	0.913	0.960
	RMSE	$13 \cdot 10^{-3}$	$6.4 \cdot 10^{-3}$	$3.7 \cdot 10^{-3}$	$2.6 \cdot 10^{-3}$
Weber-Morris model	k_d (mmol/g min)	0.075	0.076	0.074	0.073
	I (mmol/g)	0.671	0.691	0.694	0.715
	RMSE	0.272	0.278	0.279	0.286

Under the given operating conditions, according to the graphical representations and calculated RMSE values, it can be concluded that the Weber-Morris model doesn't show good agreement with the obtained experimental data. At the same time, it is evident that the Blanchard model shows an excellent agreement between the amount of removed copper (II) ions by mass of NaX zeolite in equilibrium calculated with the experimentally obtained values. The RMSE values calculated for the Blanchard model are almost equal to zero, so it can be concluded that the Blanchard model is an acceptable kinetic model for describing the sorption kinetics of copper (II) ion on NaX zeolite under given reaction conditions. The rate constant for the second order reaction increases with the increasing N/N_{JS} ratio. The reason for the increase in the value of the sorption rate constant for the Blanchard model with the N/N_{JS} ratio increase up to N/N_{JS} equal to 1.0 lies in the fact that at lower N/N_{JS} ratios the maximum contact surface of NaX solid zeolite particles and copper (II) ion solution is not provided. At N/N_{JS} ratios above 1.0 mixing intensity increases, but should not affect the maximum contact surface. But as zeolite have low mechanical resistance, even though the particles used are quite small, their breakage could occur (Rioland et al., 2016, Bašić et al., 2022). It is presumed that due to the increase in the mixing speed and higher velocities in the reactor, especially in the impeller vicinity, the collision of zeolite particles with the SBT impeller blades is more pronounced and the zeolite particles are additionally crushed, which results in a larger surface area. Also, more intensive circulation produces lower mixing times (Čelan et al., 2018). All the above could result in higher reaction rate constants, regardless of already established complete solid suspension. The RMSE values for the Mixed kinetic model are in the same order as those calculated for the Blanchard model. But the Mixed model parameter ψ values are almost equal to zero, so it can be concluded that the diffusion process does not affect the overall rate of copper (II) ion sorption on NaX zeolite for the conditions investigated. The agreement between experimental and calculated u_c values of the Mixed model is mediocre and additionally leads to a conclusion that the diffusion process does not affect the overall rate of the investigated process. Shown confirms that the process takes place in the kinetic domain.

Relationships between impeller speed or power consumption, P , and corresponding second order rate constant are presented in Figure 7.

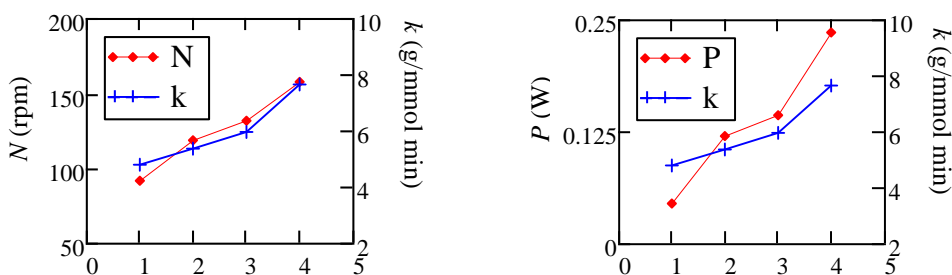


Figure 7. Reaction rate constant - impeller speed / reaction rate constant – power consumption relationship

An almost linear increase of reaction constant rate with N/N_{JS} ratio increase till N/N_{JS} equals 1.0 can be noticed i.e. the same change in rate constant is observed for the change in mixing speed from 0.7 to 0.9 N/N_{JS} ratio as for the change from 0.9 to 1.0 N/N_{JS} . A somewhat more pronounced change in rate constant is observed for change in mixing speed from 1.0 to 1.2 N/N_{JS} ratio. So, the change of the reaction constant rate with the change of the mixing rate (Figure 7), indicates the more notable influence of mixing on the value of the rate constant at higher mixing speeds.

As already stated, for all N/N_{JS} ratios defined, the torque was determined and used to calculate the mixing power consumption. From the obtained values of mixing power consumption, it is evident that the mixing power consumption increases as the N/N_{JS} ratio increases (Figure 7). This was expected according the fact that mixing power consumption is proportional to the impeller speed and the torque (Eq. 2), which also increases as the N/N_{JS} ratio increases. As for relationship between power consumption and rate constant it is noticeable that increase in power consumption is more pronounced in regards to rate constant for the increase in mixing speed from 0.7 to 0.9 N/N_{JS} and from 1.0 to 1.2 N/N_{JS} . While increase of power and rate constant in range from 0.9 to 1.0 N/N_{JS} is comparable.

Conclusions

A series of experiments was conducted in the baffled glass batch reactor of nonstandard configuration ($D/d_T = 0.6$, $C/H = 0.1$) equipped with a SBT impeller at N/N_{JS} ratio values equal 0.7, 0.9, 1.0 and 1.2. It was observed that the amount of copper (II) ions retained on the zeolite increased over the experimental time at all N/N_{JS} ratios examined. The experimental values of q_e obtained for different N/N_{JS} ratios almost coincide leading to a conclusion that the defined N/N_{JS} ratios do not affect significantly the maximum amount of copper (II) ions sorbed on the NaX zeolite. Since the experiments were conducted in a reactor with a nonstandard impeller' clearance, despite the SBT impeller used in all experiments, the characteristic radial suspension flow pattern did not develop.

Under the given operating conditions, of the three tested models, Blanchard's model proved to be the best for describing the copper (II) ions sorption process on NaX zeolite. The RMSE values calculated almost equal to zero for the Blanchard model confirm that the Blanchard model is an acceptable kinetic model for describing the sorption kinetics of copper (II) ions on NaX zeolite under given reaction conditions. Calculated values of Mixed model parameter ψ almost equal to zero and calculated u_e values deviation from experimentally determined ones, confirm that copper (II) ions sorption on NaX zeolite for the conditions investigated takes place in the kinetic domain.

The sorption constant rate increase as the N/N_{JS} ratio increases, uniform till the N/N_{JS} ratio equals 1.0 and then slightly more pronounced to the N/N_{JS} ratio equals 1.2. The rate constant for the second order reaction increases with the N/N_{JS} ratio increase

probably because at lower N/N_{JS} ratios the maximum contact surface of NaX solid zeolite particles and copper ion solution is not provided. At higher N/N_{JS} ratios zeolite particles' collision with the SBT impeller blades results in a larger surface area and lower mixing time resulting in higher reaction rate constants.

The mixing power consumption increases as the N/N_{JS} ratio increases too, but the mixing power consumption increase does not follow the trend of the N/N_{JS} ratio increase. Comparing the change in power consumption and rate constant for corresponding impeller speed it can be concluded that optimal conditions are obtained at N/N_{JS} ratio equals 1.0.

References

- Ankrah, A. F., Tokay, B. & Snape, C. E. (2022): Heavy Metal Removal from Aqueous Solutions Using Fly-Ash Derived Zeolite NaP1, *Int J Environ Res* 16, 17. <https://doi.org/10.1007/s41742-022-00395-9>
- Bašić, A., Svilović, S. (2021): Effect of geometrical and operating mixing parameters on copper adsorption on zeolite NaX, *Desalin. Water Treat.* 209, 197–203. <https://doi.org/10.5004/dwt.2021.26524>
- Bašić, A., Penga, Ž., Mužek, M. N., Svilović, S. (2022) Impact of turbine impeller blade inclination on the batch sorption process, *Results Eng.* 16, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.rineng.2022.100554>
- Blanchard G., Maunage M., Martin M. (1984): Removal of heavy metals from waters by means of natural zeolites, *Water Res.* 18, 1501–1507. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(84\)90124-6](https://doi.org/10.1016/0043-1354(84)90124-6)
- Čelan, A., Čosić, M., Kuzmanić, N. (2018) Borax Crystallization Kinetics in a Pitched-Blade Turbine/Straight-Blade Turbine Dual-Impeller Crystallizer, *Che. Eng. Technol.* 41, 1342–1349. <https://doi.org/10.1002/ceat.201700443>
- Derkowski, A., Franus, W., Waniak-Nowicka, H., Czimerová, A. (2007): Textural properties vs. CEC and EGME retention of Na–X zeolite prepared from fly ash at room temperature, *Int. J. Miner. Process.* 82 (2), 57–68, <https://doi.org/10.1016/j.minpro.2006.10.001>
- Doran, P. M. (2013): *Bioprocess Engineering Principles (Second Edition)*, Academic Press, pp. 255–332, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-220851-5.00008-3>
- Ezzeddine, Z., Batonneau-Gener, I., Pouilloux, Y., Hamad, H., Saad, Z. (2018): Synthetic NaX Zeolite as a Very Efficient Heavy Metals Sorbent in Batch and Dynamic Conditions. *Colloids and Interfaces* 2 (2), 22. <https://doi.org/10.3390/colloids2020022>
- Flieger, J., Kawka, J, Płaziński, W., Panek, R., Madej, J. (2020): Sorption of Heavy Metal Ions of Chromium, Manganese, Selenium, Nickel, Cobalt, Iron from Aqueous Acidic Solutions in Batch and Dynamic Conditions on Natural and Synthetic Aluminosilicate Sorbents, *Materials* 13 (22), 5271. <https://doi.org/10.3390/ma13225271>
- Gao, S.; Meng, L.; Wei, D.; Zhao, Q.; Wang, X.; Hou, D. (2021): Influence of the Impeller Diameter and Off-Bottom Clearance on the Flow Velocity Distribution Characteristics Near the Bottom inside a Flotation Machine, *Minerals* 11, 31. <https://doi.org/10.3390/min11010031>
- Haerifar, M., Azizian, S. (2013): Mixed Surface Reaction and Diffusion-Controlled Kinetic Model for Adsorption at the Solid/Solution Interface, *J. Phys. Chem. C*, 117, 8310–8317. <https://doi.org/10.1021/jp401571m>

- Król, M. (2008): Natural vs. Synthetic Zeolites, *Crystals* 10 (7), 622, <https://doi.org/10.3390/cryst1007062>
- Kuzmanić, N., Žanetić, R. (2003) Vrijeme homogenizacije i utrošak snage miješanja pri suspendiranju plutajućih čestica u miješalici s dva turbinska miješala, *Kem. Ind.* 52 (9), 433–441. <https://doi.org/10.15255/KUI.2003.016>
- Narang, K., Akhtar, F. (2020): Freeze Granulated Zeolites X and A for Biogas Upgrading, *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25 (6), 1378. <https://doi.org/10.3390/molecules25061378>
- Paul, E. L., Atiemo-Obeng, V. A., Kresta, S. (2004): Handbook of Industrial Mixing, New Jersey, John Wiley and Sons, Hoboken, pp. 543–584. <https://doi.org/10.1002/0471451452>
- Rioland, G., Dutournié, P., Faye, D., Daou, T.J., Patarin, J. (2016): Prediction of the mechanical properties of zeolite pellets for aerospace molecular decontamination applications, *Beilstein J. Nanotechnol.* 7, 1761–1771. <https://doi.org/10.3762/bjnano.7.169>
- Subotić, B., Bronić, J., Čizmek, A., Antonić, T., Kosanović, C. (1994): Zeoliti: Svojstva, uporaba, istraživanje, *Kem. Ind.* 43 (12) 475–487.
- Taamneh, Y., Sharadqah, S. (2017): The removal of heavy metals from aqueous solution using natural Jordanian zeolite, *Appl Water Sci* 7, 2021–2028. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0382-7>
- Tran, H., Kuo, M., Xang, W., Huang, Y. (2016): Study on Modification of NaX Zeolites: The Cobalt (II)-Exchange Kinetics and Surface Property Changes under Thermal Treatment, Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry, Article ID 1789680, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1789680>
- Weber, G., Benoit, F., Bellat, J.P., Paulin, C., Mougin, P., Thomas, M. (2008): Selective adsorption of ethyl mercaptan on NaX zeolite, *Microporous Mesoporous Mater.* 109, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2007.04.044>
- Weber, W.J., Morris, J.C. (1963) Kinetics of Adsorption on Carbon from Solutions, *J. Sanit. Eng. Div.*, 89, 31–60. <https://doi.org/10.1061/JSEDAI.0000430>
- Yang, T., Takahashi, K. (2010): Effect of Impeller Blade Angle on Power Consumption and Flow Pattern in Horizontal Stirred Vessel, *J. Chem. Eng. Jpn.*, 43 (8), 635–640. <https://doi.org/10.1252/jcej.10we046>
- Zwietering, T. N. (1958): Suspending of solid particles in liquid by agitations, *Chem. Eng. Sci.*, 8, 224–253. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(58\)85031-9](https://doi.org/10.1016/0009-2509(58)85031-9)

Utjecaj željezovih nanočestica na TiO₂ ili SiO₂ nosaču na primjenska svojstva PLA kompozita

Andrea Špoljarić*, Ante Jukić, Elvira Vidović

*Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska*

**Dopisni autor: aspoljari@fkit.hr*

originalni znanstveni rad

Sažetak

Ispitan je utjecaj različitih oksidnih nosača željezovih nanočestica na krajnja svojstva kompozitnog materijala sa polilaktidnom matricom (PLA). Nanočestice željeza su sintetizirane i modificirane koristeći SiO₂ ili TiO₂ kao njihove nosače u svrhu izrade hibridnog punila. Za pripremu PLA kompozita korištene su različite kombinacije punila. Prvo su pripremljeni kompoziti sa 0,5 % masenog udjela punila oksida. Zatim, pripremljeni su kompoziti s 0,5 % masenih oksida i 0,5 % masenih udjela hibridnog punila. Također, priređeni su kompoziti samo sa 0,5 % masenog udjela hibridnog punila. Pripremljenim kompozitnim materijalima ispitana su različita primjenska svojstva. Toplinska stabilnost praćena je uz pomoć termogravimetrijske analize, toplinska vodljivost ispitana je metodom tzv. „vrućeg mosta“, a volumna električna otpornost pomoću uređaja konstruiranog prema normi ASTM D257. Također je provjeren utjecaj pripremljenih čestica i na mehanička svojstva kompozitnog materijala mehaničkim vlačnim ispitivanjem. Rezultati pokazuju kako korištenje različitih nosača za željezove nanočestice može imati različit utjecaj na primjenska svojstva; primjerice dodatak TiO₂ kao nosača uvelike narušava mehanička svojstva kompozita za razliku od SiO₂. Dodatno, SiO₂ povećava toplinsku vodljivost, dok TiO₂ nema značajan utjecaj na to svojstvo.

Cljučne riječi: kompozit, silicijev dioksid, titanijev dioksid, željezove nanočestice

Uvod

Poli(mliječna kiselina) ili polilaktid (PLA) je najpoznatiji predstavnik biorazgradivih polimera. Kroz zadnjih 10 godina njegova se upotreba u industriji povećala nakon strožih mjera zaštite okoliša i zakonskih direktiva o „zelenoj“ kemiji (Wolf et.al, 2008; Huang et al., 2016; Ebnesajjad, 2012). Prednost PLA u usporedbi sa ostalim konvencionalnim polimerima, primjerice polistirenom (PS) ili polietilenom (PE) jesu njegova mehanička svojstva, točnije njegov Youngov modul i čvrstoća (Hamad et al., 2015). Dodatna prednost PLA je što pokazuje dobru toplinsku otpornost, otpornost na plamen i njegova biokompatibilnost (Yadav, 2015; Pawar et al., 2014; Bleach et al., 2002). Silicijev dioksid, drugog naziva silika (SiO₂), se često koristi kao anorgansko punilo prilikom proizvodnje raznih kompozitnih materijala. Silika doprinosi povećanju kemijske stabilnosti i toplinske otpornosti kompozita. Razlog česte primjene SiO₂ je njegova velika dostupnost u prirodi, jednostavna priprema i povoljna cijena (Bera et al., 2011; Li et al., 2020; Najam et al., 2019). SiO₂ u polimernoj matrici

PLA prema većini radova, poboljšava primjenska svojstva kompozita kao što su mehanička i toplinska te olakšava preradu kompozita utjecajem na viskoznost taline kompozita (Lv et al., 2016; Palma-Ramirez et al., 2021; Kaseem et al., 2021). Titanijev dioksid (TiO_2) je također jedan od čestih anorganskih punila koji se koristi u proizvodnji kompozitnih materijala. Netoksičnost, kemijska stabilnost, antibakterijska i fotokatalitička svojstva su razlog česte uporabe ovog punila u polimernim matricama (Chen et al., 2007; Zapata et al., 2012; Allodi et al., 2016). U biopolimernoj matrici polilaktida, osim navedenih svojstava TiO_2 , prema većini radova, doprinosi poboljšanju mehaničkih svojstava pri čemu povećava Youngov modul i prekidnu čvrstoću kompozita (Alberton et al., 2014). Također djeluje kao centar nukleacije i povećava udio kristalnosti kompozita (Farhoodi et al., 2012). Razvojem nanotehnologije, u industriji se počinju koristiti nanodimenzijske čestice punila u svrhu proizvodnje nanokompozita za razne industrije od biomedicinske do izrade elektronskih dijelova (Abhilash, 2010). Za navedene primjene razne nanočestice željeza i željezova oksida se u industriji koriste kako bi poboljšale ili uvele magnetna, električna ili mehanička svojstva završnom kompozitnom materijalu. Željezova punila koja se navise upotrebljavaju jesu hematit, ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), magnetit (Fe_3O_4) i elementarne čestice željeza (Fe^0) (Džunuzović et al. 2009; Ganapathe et al., 2020; Klekotka et al., 2021). Nanočestice elementarnog željeza mogu se pripremiti na više načina, hidrotermalnom sintezom, usitnjavanjem čiste rude i slično, no uglavnom se koristi metoda kemijske sinteze Fe^0 redukcijom željezovih soli uz pomoć redukcijskog sredstva (Sun et al., 2006; Eljamal et al., 2018; Turabik et al., 2017). Hibridni materijali, također zvani i kompozitima, su oni materijali koji su konstituirani od dvije ili više vrsta materijala (Bouhfid et al., 2019). Interakcije u hibridnom materijalu su na molekularnoj razini u obliku kemijske veze, hibridizacije ili strukturnog povezivanja. Zbog tih interakcija, kao i kod klasičnog primjera kompozita, događaju se promjene u svojstvima materijala (Wintermantel et al., 2001). Hibridni materijali u obliku čestica predmet su istraživanja brojnih radova. Primjer hibrida u radovima su razni hibridi oksidnih punila sa elementarnim česticama željeza primjerice, $\text{TiO}_2@n\text{ZVI}$ (Diao et al., 2022), $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2@n\text{ZVI}$ (Huang et al., 2018), hibridi dva oksida $\text{Fe}_2\text{O}_3@/\text{TiO}_2$ (Mahajan et al., 2018), hibridi čestica srebra i oksida $\text{Ag}@/\text{TiO}_2$ (Gupta et al., 2013) ili čak trokomponentne čestice $n\text{ZVI-g-C}_3\text{N}_4/\text{TiO}_2$ (Wei et al., 2021). Silika/željezo i titanijev dioksid/željezo kompoziti istražuju se primarno za primjenu kao čestice za specifične primjene (Li et al., 2013; Diao et al., 2022). Tako se u oba slučaja SiO_2 i TiO_2 koristi kao zaštitni sloj Fe^0 nanočestica kako ne bi došlo do oksidacije željeza što dovodi do smanjene reaktivnosti Fe^0 nanočestica (Lu et al., 2016; Diao et al., 2022). Hibrid silicijevog dioksida i željezovih nanočestica se prema literaturi istraživao u svrhe uklanjanja teških metala iz otpadnih voda, (Li et al., 2013; Li et al., 2011; Guan et al., 2015) dok je hibrid titanijevog dioksida i željeza pokazao sposobnost uklanjanja farmaceutika iz otpadnih voda te fotokatalitička svojstva (Diao et al., 2022; Kazemi et al., 2020; Ma et al., 2017). Za razliku od toga, dosada nije istražen utjecaj navedenih oksida kao nosača željezovih nanočestica što je bila motivacija ovoga istraživanja. Pregledom dostupne literature nisu pronađena

istraživanja na temu utjecaja ovakve vrste hibridnih punila na mehanička, toplinska i električna svojstva kompozita. Cilj istraživanja je karakterizacija kompozitnog materijala PLA i određivanje utjecaja korištenih punila na primjenska svojstva: mehanička, toplinska i električna, krajnjeg proizvoda.

Materijali i metode

Materijali

PLA granule (NatureWorks, Ingeo 4043D), željezov (III) klorid heksahidrat (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), NaBH_4 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), NaOH granule (Sigma-Aldrich Chemie GmbH), 2,6-piridin-dikarboksilna kiselina (PDCA) (Acros Organics), komercijalno punilo SiO_2 (MKNano) i TiO_2 (Nanografi), tehnički etanol.

Sinteza hibridnog punila TiO_2/Fe i SiO_2/Fe

Procedura pripreme željezovih nanočestica preuzeta je i modificirana prema literaturi. (Rončević et al., 2019) Odvaga komercijalnog punila titanovog dioksida odnosno silicijeva dioksida (0,200 g) raspršena je u 200 ml destilirane H_2O uz pomoć ultrazvučne sonde u trajanju od 5 minuta. U drugoj čaši otopljen je željezov (III) klorid heksahidrat (0,528 g) u 50 ml destilirane vode. Potom su se suspenzija nanočestica oksida i otopina željezove soli zamiješale i stavile na magnetnu miješalicu pri brzini miješanja od 1500 rpm. Pripremi se otopina PDCA (0,355 g) u 150 ml destilirane vode i dodatno se miješana na ultrazvučnoj sondi 5 minuta. PDCA se dodaje u smjesu metalne soli i nanočestica oksida te se miješa 10 minuta. PDCA kiselina kompleksira nastale nanočestice željeza, dodatno ih oksidira, no sprečava aglomeraciju čestica što je bio glavni cilj njene uporabe. Vrijednost pH otopine se uz pomoć dodatka koncentrirane natrijeve lužine namjesti u neutralno područje. Pripremljena je svježa otopina reducensa otapanjem odvage (0,36 g NaBH_4) u 50 ml destilirane vode. Reducirajuće sredstvo se polagano dodaje, kap po kap te se nakon njegovog dodatka reakcijska smjesa miješa 30 minuta. Moguće je zapaziti promjenu boje iz svijetložute u narančasto-crvenu (u slučaju TiO_2), odnosno promjena boje iz svijetložute u smeđu (u slučaju SiO_2). Kod obje je prisutno zamućenje zbog nastalih čestica. Smjesa se nakon reakcije ostavi 1 dan kako bi se čestice istaložile, te se one nakon dekantiranja, centrifugiraju i ispiru 3 puta etanolom. Čestice hibrida su sušene na 50°C , 2 sata pod tlakom od 0,08 MPa u vakuum sušioniku.

Priprema kompozitnog materijala PLA i hibridnog punila

Uzorci kompozita pripremani su zamiješavanjem u Brabender gnjetilici zamiješavanjem PLA granula sa prahom nanočestica pri temperaturi od 180°C . Praškaste nanočestice su dodane pri niskom broju okretaja pužnica Brabendera (10

okretaja u minuti) te nakon njihovog dodavanja smjesa se miješala 5 minuta na brzini od 60 okretaja u minuti. Sljedeći korak u pripremi je prešanje uzoraka u željenom kalupu u vrućoj preši. Izrezani komadi kompozita su postavljeni u kalup te su uneseni u prešu na predgrijavanje u trajanju od 4 minute na 200 °C. Zatim su uzorci prešani pod tlakom od 11 MPa u trajanju od 4 minute pri 200 °C. Uzorci koji sadrže komercijalno punilo silicijeva, odnosno titanijevog dioksida označeni su sa oznakom S, tj. T, dok su hibridi čestica silike, odnosno titanijevog dioksida i željeza označeni sa HSI, tj. HTI. Nazivi, udjeli i mase pojedinih komponenti za pripremu kompozita dane su tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Odvage masa punila (SiO₂, SiO₂/Fe hibrida) i PLA polimera
Table 1. Mass of fillers (SiO₂ and SiO₂/iron hybrid) and PLA polymer granules

Uzorak	Masa punila, g	Masa PLA, g
(PLA + 0,5 S)	0,2	39,8
(PLA + 0,5 S / 0,5 HSI)	0,2 + 0,2	39,6
(PLA + 0,5 HSI)	0,2	39,8

*S-SiO₂; HSI-hibrid SiO₂ i nanočestica željeza

Tablica 2. Odvage masa punila (TiO₂, TiO₂/Fe hibrida) i PLA polimera
Table 2. Mass of fillers (TiO₂ and TiO₂/iron hybrid) and PLA polymer granules

Uzorak	Masa punila, g	Masa PLA, g
(PLA + 0,5 T)	0,2	39,8
(PLA + 0,5 T / 0,5 HTI)	0,2 + 0,2	39,6
(PLA + 0,5 HTI)	0,2	39,8

*T-TiO₂; HTI-hibrid TiO₂ i nanočestica željeza

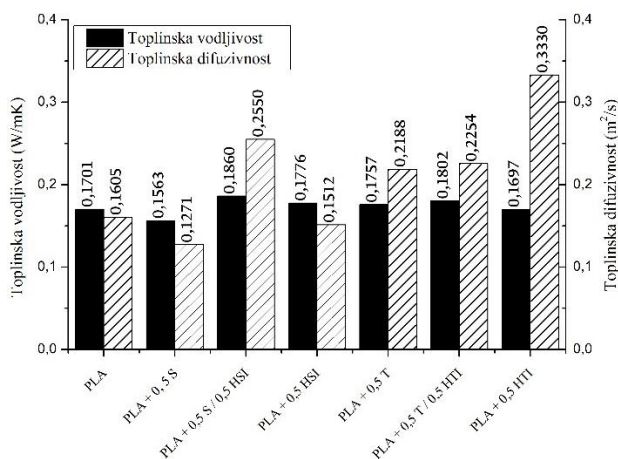
Karakterizacija kompozitnog materijala

Kompozitima PLA sa oksidnim punilima i sa hibridnim punilima ispitana su toplinska, mehanička i električna svojstva. Termogravimetrijskom analizom (TGA) (TA Instruments, TGA Q 500) utvrđena je toplinska stabilnost pripremljenog kompozitnog materijala i određen je utjecaj punila na toplinska svojstva polimerne matrice. Kompoziti su ispitani zagrijavanjem u rasponu od sobne temperature do 600 °C, brzinom zagrijavanja od 10 °C / min u struji dušika. Električna svojstva kompozita određena su pomoću industrijske inačice Ohmmetra konstruiranog za mjerenje otpora izolatora kao što su polimeri (IET Labs 1850+). Mjerenje volumne električne otpornosti kompozitnih uzoraka provedeno je prema ASTM D257 normi. Mjerenje toplinske vodljivosti i toplinske difuzivnosti kompozitnog materijala provedeno je metodom „vrućeg mosta“ (Linseis THB-1). Ispitivanje mehaničkih svojstava izvršeno je standardnom metodom na mehaničkoj kidalici (Zwick).

Rezultati i rasprava

Toplinska vodljivost i difuzivnost kompozita

Rezultati analize toplinskih svojstava PLA homopolimera i njegovih kompozita prikazani su shematskim prikazom na slici 1. Na shematskom prikazu moguće je vidjeti utjecaj punila na vrijednost toplinske vodljivosti i toplinske difuzivnosti punila u PLA kompozitu. Primjećuje se trend poboljšanja toplinske vodljivosti korištenjem komercijalnog punila TiO_2 , dok SiO_2 smanjuje toplinsku vodljivost materijala. Za razliku od toga, njihove hibridne čestice za željezom imaju suprotan utjecaj na toplinska svojstva kompozita. Dodatkom hibrida SiO_2 i željeza sposobnost vođenja topline kompozitnog materijala je bolja. Hibrid TiO_2 i željeza ne pokazuje značajan utjecaj na toplinsku vodljivost kompozita. Vrijednosti toplinske difuzivnosti kompozita u SiO_2 sustavu se mijenjaju nasumično, bez jasnog trenda i utjecaja punila. Na rezultate mogu utjecati razni čimbenici u koje se ubraja i nehomogenost materijala za kojega se smatra da je mogući uzrok. Razlog tome jest način pripreme kompozita iz taline koji može ishoditi dobivanjem nehomogenog materijala, kao što i drugi radovi potvrđuju (Montava-Jorda et Al., 2019). Iako rezultati trenutno nisu u mogućnosti biti razjašnjeni, planirana je nakladna DSC analiza uz pomoć koje se mogu dobiti vrijednosti specifičnog toplinskog kapaciteta koji bi mogao razjasniti rezultate toplinske difuzivnosti. Dodatkom TiO_2 ili hibrida TiO_2 i željeza kao punila poboljšana je toplinska difuzivnost kompozita. PLA + 0,5 HTI kompozit pokazao je najbolje rezultate toplinske difuzivnosti što znači da će taj materijal najbrže disipirati toplinu koja se u njemu akumulira.

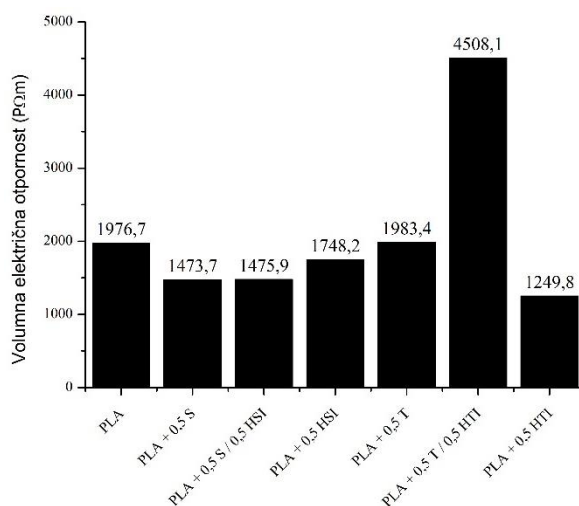


Slika 1. Grafički prikaz trenda vrijednosti toplinske vodljivosti i toplinske difuzivnosti PLA polimera i njegovih kompozita

Figure 1. Results of thermal conductivity and thermal diffusivity of neat PLA and PLA composites

Električna svojstva kompozita

Rezultati mjerenja volumne električne otpornosti uzoraka polimera i kompozita prikazani su shematski na slici 2. Prema dobivenim rezultatima, SiO₂ pospješuje električnu provodnost kompozitnog PLA materijala dok hibrid SiO₂ i željeza nije značajnije promijenio električna svojstva materijala. Prema tome se može zaključiti kako željezo u ovom slučaju ne doprinosi poboljšanju električne provodnosti. Za razliku od toga TiO₂ neznatno povećava vrijednost električnog otpora PLA kompozita. U slučaju kompozita PLA + 0,5 T / 0,5 HTI i PLA + 0,5 HTI rezultati pokazuju suprotne trendove i ne može se jednoznačno odrediti utjecaj hibrida TiO₂ i željeza na električna svojstva materijala.



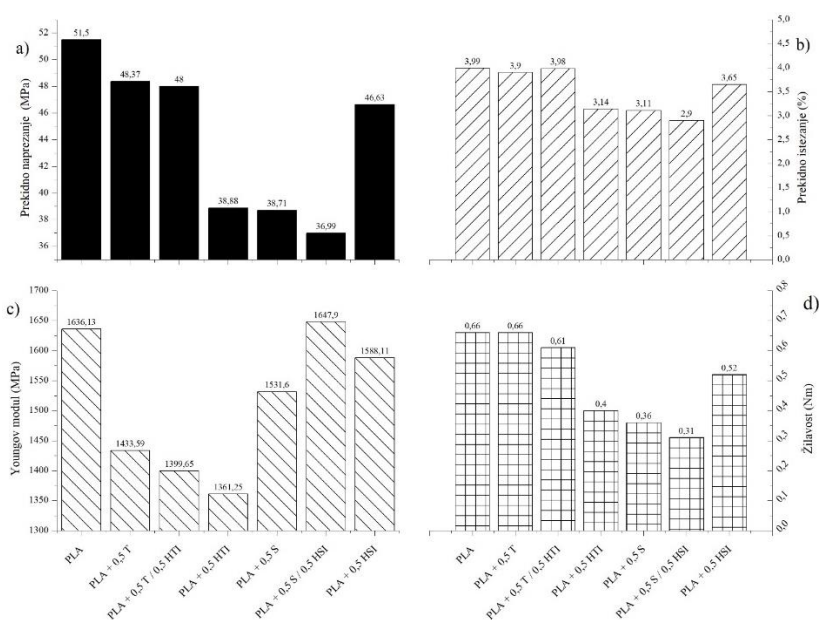
Slika 2. Grafički prikaz trenda volumne električne otpornosti PLA polimera i njegovih kompozita

Figure 2. Results of volume electrical resistance of neat PLA and PLA composites

Ispitivanje mehaničkih svojstava

Rezultati mehaničkog ispitivanja prikazani su shemom trenda vrijednosti prekidnog istezanja, prekidnog naprezanja, Youngovog modula i žilavosti na slici 3. Rezultati mehaničkog ispitivanja pokazali su da dodatak bilo kojeg punila urušava neko od mehaničkih svojstava ovisno o sustavu punila. Kompoziti PLA + 0,5 T i PLA 0,5 T / 0,5 HTI zadržavaju istežljivost, čvrstoća i žilavost materijala no Youngov modul opada. Za razliku od toga, PLA + 0,5 S kompozit ima narušena mehanička svojstva kompozita, dok kod PLA + 0,5 S / 0,5 HSI kompozita je smanjena čvrstoća, žilavost i istežljivost materijala, no povećana vrijednost Youngovog modula. Kada se

izdvojeno usporede hibridna punila, ona pokazuju suprotan učinak na mehanička svojstva (istezljivost, čvrstoća, žilavost i Youngov modul) kompozita, pri čemu je u kompozitu PLA + 0,5 HSI došlo do poboljšanja, a kod PLA + 0,5 HTI do značajnog pogoršanja svojstava.



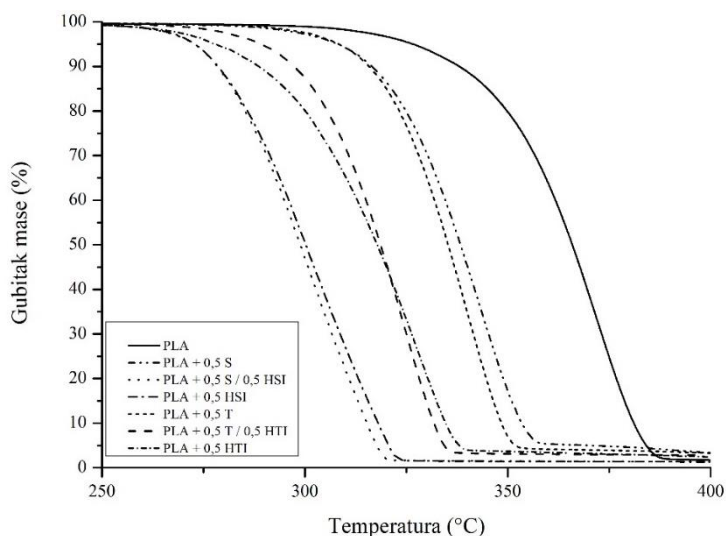
Slika 3. Grafički prikaz rezultata mehaničkog ispitivanja PLA polimera i njegovih kompozita; prekidno naprezanje (a), prekidno istezanje (b), Youngov modul (c) i žilavost (d)
Figure 3. Results of mechanical testing of neat PLA and PLA composites; stress at break (a), strain and break (b), Young modulus (c) and ductility (d)

Termogravimetrijska analiza (TGA)

Rezultati termogravimetrijske analize prikazani su termogravimetrijskom krivuljom (Slika 4), a karakteristične temperature razgradnje dane su u tablici 3.

Rezultati termogravimetrijske analize pokazuju da je toplinska stabilnost PLA polimera narušena dodatkom ovih punila. Dodatak komercijalnog oksidnog punila (SiO_2 odnosno TiO_2) PLA matrici podjednako smanjuju toplinsku stabilnost proizvedenog kompozitnog materijala. Kompoziti u kojima se nalazi hibridno punilo imaju značajan utjecaj na pad toplinske stabilnosti. Primjećuje se ovisnost pada toplinske stabilnosti o sustavu hibrida. Naime, kompoziti PLA + 0,5 HTI i PLA + 0,5 T / 0,5 HTI su toplinski stabilniji nego kompoziti PLA + 0,5 HSI i PLA + 0,5 S / 0,5 HSI. Također, u slučaju sustava sa silicijevim oksidom, dodatkom hibridnog punila u kombinaciji sa komercijalnim značajno se smanjuje temperatura maksimalne brzine

razgradnje. Ovaj fenomen nije toliko izražen u sustavu s titanijevim dioksidom. Usporedbom vrijednosti temperatura maksimalne brzine razgradnje za kompozite koji sadrže samo hibridno punilo dokazano je kako će se maksimalna razgradnja kompozita PLA + 0,5 HTI odvijati pri višim temperaturama nego kompozit PLA + 0,5 HSI. Na ovaj način možemo zaključiti kako modifikacija silicijevog dioksida sa željezovim nanočesticama ima značajan utjecaj na toplinsku stabilnost punila.



Slika 4. Termogravimetrijska krivulja PLA polimera i PLA kompozita.
Figure 4. Thermogravimetric curve of neat PLA and PLA composites

Tablica 3. Vrijednosti karakterističnih temperatura PLA polimera i njegovih kompozita, T_{95} temperatura početka razgradnje, T_{max} temperatura pri najvećoj brzini razgradnje i T_5 temperatura kraja razgradnje

Table 3. Values of characteristic temperatures of neat PLA and PLA composites, T_{95} start of degradation temperature, T_{max} temperature of maximum rate of weight loss and T_5 end of degradation temperature

Uzorak	$T_{95\%}, ^\circ\text{C}$	$T_{max}, ^\circ\text{C}$	$T_5, ^\circ\text{C}$
PLA	326,53	372,33	384,00
PLA + 0,5 S	308,22	343,19	368,38
PLA + 0,5 S / 0,5 HSI	272,75	301,47	317,64
PLA + 0,5 HSI	272,75	301,54	320,54
PLA + 0,5 T	308,30	339,11	351,66
PLA + 0,5 T / 0,5 HTI	289,08	324,83	334,18
PLA + 0,5 HTI	277,75	327,41	337,91

Zaključci

U radu je prikazana priprema hibridnih čestica nanošenjem željezovih nanočestica na oksid silicija i titanija koje su korištene kao punila u PLA polimernoj matrici za pripremu kompozita. Također, pripremljeni su kompoziti PLA sa komercijalnim punilima SiO₂ i TiO₂ te se pokazalo kako ona nemaju značajan utjecaj na električna svojstva, no narušavaju toplinska svojstva PLA. Mehanička svojstva su narušena dodatkom SiO₂ punila, dok dodatak TiO₂ neznatno utječe na njih. Kompoziti sa hibridom SiO₂ i željeza pokazali su lošija toplinska svojstva ali bolja električna i mehanička svojstva i svojstva toplinske vodljivosti u usporedbi sa kompozitom PLA sa SiO₂. Za razliku od toga, kompoziti koji sadrže hibrid TiO₂ i željeza pokazuju narušena mehanička, električna i toplinska svojstva. Rezultati pokazuju kako hibridna punila dvije vrste čestica mogu različito doprinijeti svojstvima krajnjeg materijala.

Literatura

- Abhilash M. (2010): Potential Applications of Nanoparticles, *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 1, 1-12.
- Alberton, J., Martelli, S.M., Fakhouri, F.M., Soldi, V. (2014): Mechanical and moisture barrier properties of titanium dioxide nanoparticles and halloysite nanotubes reinforced polylactic acid (PLA), *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 64, 01201.
- Allodi, V., Brutti, S., Giarola, M., Sgambetterra, M., Navarra, M.A., Panero, S., Mariotto, G. (2016): Structural and spectroscopic characterization of a nanosized sulfated TiO₂ filler and of nanocomposite nafion membranes, *Polymers* 8, 68.
- Bera, O., Pilić, B., Pavličević, J., Jovičić, M., Holló, B., Szécsényi, K. M., Špirkova, M. (2011): Preparation and thermal properties of polystyrene/silica nanocomposites, *Thermochimica Acta.* 515(1-2), 1–5.
- Bleach, N. C., Nazhat, S. N., Tanner, K. E., Kellomäki, M., Törmälä, P. (2002): Effect of filler content on mechanical and dynamic mechanical properties of particulate biphasic calcium phosphate—polylactide composites, *Biomaterials* 23(7), 1579–1585.
- Bouhfid, N., Raji, M., Boujmal, R., Essabir, H., Bensalah, M.-O., Bouhfid, R., Qaiss, A. el kacem. (2019): Numerical modeling of hybrid composite materials. Modelling of Damage Processes in Biocomposites, *Fibre-Reinforced Composites and Hybrid Composites* 57–101.
- Chen, X., Mao, S.S. (2007): Titanium dioxide nanomaterials: Synthesis, properties, modifications, and applications, *Chem. Rev.* 107, 2891–2959.
- Diao Z.H., Jin J.C., Zou M.Y., Liu H., Qin J.Q., Zhou X.H., Qian W., Guo P.R., Kong L.J., Chu W. (2021): Simultaneous degradation of amoxicillin and norfloxacin by TiO₂@nZVI composites coupling with persulfate: Synergistic effect, products and mechanism, *Separ. Purif. Technol.* 278, 119620.
- Džunuzović, E., Marinović-Cincović, M., Jeremić, K., Nedeljković, J. (2009): Influence of cubic α -Fe₂O₃ particles on the thermal stability of poly(methyl methacrylate) synthesized by in situ bulk polymerization, *Polymer Degradation and Stability* 94(4), 701–704.
- Ebnesajjad S. (2012): Handbook of Biopolymers and biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications, Elsevier, poglavlje 3.

- Eljamal R., Eljamal O., Khalil A. M. E Saha., B. B., Matsunaga N. (2018): Improvement of the Chemical Synthesis Efficiency of Nano-scale Zero-valent Iron Particles, *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6(4), 4727-4735.
- Farhoodi, M., Daddashi, S., Mohammad, M.A., Mousavi, A., Djomeh, Z. (2012): Influence of TiO₂ Nanoparticle Filler on the Properties of PET and PLA Nano composites, *Polymer (Korean)*. 36, 745–755.
- Ganapathe, L. S., Mohamed, M. A., Mohamad Yunus, R., Berhanuddin, D. D. (2020): Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles in Biomedical Application: From Synthesis to Surface Functionalisation, *Magnetochemistry* 6(4), 68.
- Guan, Z., Wan, J., Ma, Y., Wang, Y., Shu, Y. (2015): Application of Novel Amino-Functionalized NZVI@SiO₂ Nanoparticles to Enhance Anaerobic Granular Sludge Removal of 2,4,6-Trichlorophenol, *Bioinorganic Chemistry and Applications* 2015, 1–12.
- Gupta, K., Singh, R. P., Pandey, A., Pandey, A. (2013): Photocatalytic antibacterial performance of TiO₂ and Ag-doped TiO₂ against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*, *Beilstein Journal of Nanotechnology* 4, 345–351.
- Hamad, K., Kaseem, M., Yang, H. W., Deri, F., Ko, Y. G. (2015): Properties and medical applications of polylactic acid: A review, *Express Polymer Letter* 9(5), 435–455.
- Huang, Y., Zhang, W., Zhang, M., Zhang, X., Zhao, Y. (2018): Hydroxyl-functionalized TiO₂@SiO₂@Ni/nZVI nanocomposites fabrication, characterization and enhanced simultaneous visible light photocatalytic oxidation and adsorption of arsenite, *Chemical Engineering Journal* 338, 369–382.
- Huang, Y., Ho, S., Lu, Y., Niu, R., Xu, L., Cao, J., Lee, S. (2016): Removal of Indoor Volatile Organic Compounds via Photocatalytic Oxidation: A Short Review and Prospect, *Molecules* 21(1), 56.
- Kaseem, M., Ur Rehman, Z.; Hossain, S.; Singh, A.K., Dikici, B. (2021): A Review on Synthesis, Properties, and Applications of Polylactic Acid/Silica Composites, *Polymers* 13(18), 3036
- Kazemi, M., Peyravi, M., Jahanshahi, M. (2020): Multilayer UF membrane assisted by photocatalytic NZVI@TiO₂ nanoparticle for removal and reduction of hexavalent chromium, *Journal of Water Process Engineering* 37, 101183.
- Klekotka, U., Zambrzycka-Szelewa, E., Satuła, D., Kalska-Szostko, B. (2021): Stability Studies of Magnetite Nanoparticles in Environmental Solutions, *Materials* 14(7), 5069.
- Li, Y., Xu, T., Tu, Z., Dai, W., Xue, Y., Tang, C., ... Lin, C. (2020): Bioactive antibacterial silica-based nanocomposites hydrogel scaffolds with high angiogenesis for promoting diabetic wound healing and skin repair, *Theranostics* 10(11), 4929–4943.
- Li, Y., Li, T., Jin, Z. (2011): Stabilization of Fe⁰ nanoparticles with silica fume for enhanced transport and remediation of hexavalent chromium in water and soil, *Journal of Environmental Sciences* 23(7), 1211–1218.
- Li, Y., Ma, H., Ren, B., Li, T. (2013): Simultaneous Adsorption and Degradation of Cr(VI) and Cd(II) Ions from Aqueous Solution by Silica-Coated Fe⁰Nanoparticles, *Journal of Analytical Methods in Chemistry* 2013, 1–8.
- Lu, H.-J., Wang, J.-K., Ferguson, S., Wang, T., Bao, Y., Hao, H. (2016): Mechanism, synthesis and modification of nano zerovalent iron in water treatment, *Nanoscale* 8(19), 9962–9975.
- Lv, H., Song, S., Sun, S., Ren, L., Zhang, H. (2016): Enhanced properties of poly(lactic acid) with silica nanoparticles, *Polymers for Advanced Technologies* 27(9), 1156–1163.

- Ma, Q., Zhang, H., Deng, X., Cui, Y., Cheng, X., Li, X. (2017): Electrochemical fabrication of NZVI/TiO₂ nano-tube arrays photoelectrode and its enhanced visible light photocatalytic performance and mechanism for degradation of 4-chlorophenol, *Separation and Purification Technology* 182, 144–150.
- Mahajan, J., Jeevanandam, P. (2018): Synthesis of TiO₂@ α -Fe₂O₃ core-shell heteronanostructures by thermal decomposition approach and their application towards sunlight-driven photodegradation of rhodamine B, *New Journal of Chemistry* 42(4), 2616–2626.
- Montava-Jorda, S., Chacon, V., Lascano, D., Sanchez-Nacher, L., Montanes, N. (2019): Manufacturing and Characterization of Functionalized Aliphatic Polyester from Poly(lactic acid) with Halloysite Nanotubes, *Polymers* 11, 1314.
- Najam, M., Hussain, M., Ali, Z., Maafa, I. M., Akhter, P., Majeed, K., Ahmed, A., Shehzad, N. (2019): Influence of silica materials on synthesis of elastomer nanocomposites: A review, *Journal of Elastomers & Plastics* 52(8), 1-25.
- Palma-Ramírez, D., Torres-Huerta, A. M., Domínguez-Crespo, M. A., Ponce-Hernández, J. S., Brachetti-Sibaja, S. B., Rodríguez-Salazar, A. E., Urdapilleta-Inchaurregui, V. (2021): An assembly strategy of polylactic acid (PLA)-SiO₂ nanocomposites embedded in polypropylene (PP) matrix, *Journal of Materials Research and Technology* 14, 2150–2164.
- Pawar R. P., Tekale S. U., Shisodia, S. U., Totre, J. T., Domb, A J. (2014).: Biomedical Applications of Poly(Lactic Acid), *Recent Patents on Regenerative Medicine* 4(1), 40–51.
- Rončević S., Nemet I., Zubin Ferri T., Matković-Čalogović D., (2019): Characterization of nZVI nanoparticles functionalized by EDTA and dipicolinic acid: a comparative study of metal ion removal from aqueous solutions, *RSC Adv.* 9, 31043-31051.
- Sun, Y.-P., Li, X., Cao, J., Zhang, W., & Wang, H. P. (2006): Characterization of zero-valent iron nanoparticles, *Advances in Colloid and Interface Science* 120(1-3), 47–56.
- Turabik M., Simsek U. B. (2017): Effect of synthesis parameters on the particle size of the zero valent iron particles, *Inorganic and Nano-Metal Chemistry* 47(7), 1033-1043.
- Wei, L., Tian, J., Wang, Q., Liu, Y., Yu, Y., Yang, C. (2021): A study on the mechanism and kinetic of nitrate reduction by the nZVI-g-C₃N₄/TiO₂ composite under the simulated sunlight, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics* 32(12), 15864–15881.
- Wintermantel, E., Mayer, J., Goehring, T. N. (2001): Composites for Biomedical Applications, *Encyclopedia of Materials: Science and Technology* 1371–1376.
- Wolf, S., Hirzinger, G. (2008): A new variable stiffness design: Matching requirements of the next robot generation. In: 2008 IEEE International Conference on Robotics and Automation, Pasadena, SAD, pp. 1741-1746.
- Yadav, P. (2015): Biomedical Biopolymers, their Origin and Evolution in Biomedical Sciences: A Systematic Review, *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* 9 (9), 21–25.
- Zapata, P.A., Palza, H., Rabagliati, F.M. (2012): Novel antimicrobial polyethylene composites prepared by metallocenic “in-situ” polymerization with TiO₂ based nanoparticles, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 50, 4055–4062.

Influence of TiO₂ and SiO₂ as carriers for iron nanoparticles on application properties of PLA composites

Andrea Špoljarić, Elvira Vidović, Ante Jukić

University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
 Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: aspoljari@fkit.hr

original scientific paper

Summary

The influence of different oxide carriers of iron nanoparticles on the final properties of composite material with polylactide matrix (PLA) was examined. Iron nanoparticles were synthesized and modified using SiO₂ or TiO₂ as their carriers. Different combinations of fillers were used to prepare PLA composites. First, composites were prepared with 0.5 wt% of pure oxide fillers. Subsequently, 0.5 wt% of hybrid fillers were added to such initial mixture. In addition, composites were prepared with only 0.5 wt% of hybrid filler. Various application properties of the prepared composite materials were tested. Thermal stability was monitored using thermogravimetric analysis, thermal conductivity was tested using the "hot bridge" method, and volume electrical resistance using a device constructed according to the ASTM D257 standard method. Mechanical tensile testing also checked the influence of the prepared particles on the mechanical properties of the composite material. The results show that the use of a different type of carrier for iron nanoparticles can have a different effect on the application properties; for example, the addition of TiO₂ as a carrier greatly impairs the mechanical properties of the composite. In contrast, SiO₂ increases thermal conductivity, while the addition of TiO₂ has no significant effect on it.

Keywords: composite, silicon dioxide, titanium dioxide, iron nanoparticles

Kinetika bioremedijacije simulirane procjedne vode iz biootpada

**Marija Vuković Domanovac^{1*}, Ivana Stojmilović¹, Martina Trtinjak¹,
Tomislav Domanovac², Monika Šabić Runjavec¹**

¹Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

²IPZ Uniprojekt TERRA, Voćarska cesta 68, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Dopisni autor: mvukovic@fkit.hr

originalni znanstveni rad

Sažetak

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, rizici povezani s onečišćenjem procjednim vodama postali su sve očigledniji, kako za okoliš, tako i za zdravlje ljudi. Procjedne vode se mogu kategorizirati kao specifična vrsta otpadnih voda na koju utječe varijabilnost u sastavu otpada i njegovih fizikalnih, kemijskih i bioloških promjena. Kontrola onečišćenja procjednim vodama je globalna briga, a smanjenje izvora onečišćenja i uklanjanje onečišćujućih tvari veliki izazov. Biološka obrada predstavlja potencijalno prihvatljivo rješenje za pročišćavanje procjednih voda s okolišnog i ekonomskog stajališta zahvaljujući djelovanju mikroorganizama.

U ovome radu istraživana je kinetika procesa bioremedijacije pri uklanjanju organskih onečišćujućih tvari iz simulirane procjedne vode iz biootpada u šaržnim uvjetima. Proces je opisan Monodovim i Endo-Haldaneovim modelom. Vrijednosti parametara iznosile su: $\mu_{\max} = 1,04 \text{ d}^{-1}$, $K_s = 36,75 \text{ g dm}^{-3}$ i $Y = 0,20 \text{ g g}^{-1}$ za Monodov model, te $\mu_{\max} = 2,03 \text{ d}^{-1}$, $K_s = 45,07 \text{ g dm}^{-3}$, $Y = 0,24 \text{ g g}^{-1}$, $K_i = 73,08 \text{ g dm}^{-3}$ i $k_d = 0,10 \text{ d}^{-1}$ za Endo-Haldaneov model. Na temelju procijenjenih vrijednosti kinetičkih parametara i ocjene prihvatljivosti predloženih modela, rezultati pokazuju da Endo-Haldaneov model bolje opisuje proces bioremedijacije procjedne vode iz biootpada.

Ključne riječi: bioremedijacija, biootpad, simulirana procjedna voda, kinetika

Uvod

S porastom globalne populacije i sve većom potražnjom za hranom i drugim osnovnim potrebama dolazi do porasta količine otpada koji svakodnevno stvara svako kućanstvo. Ukoliko se njime ne upravlja na odgovarajući način predstavlja izvor onečišćenja. Otpad nakon što se odloži na odlagalište prolazi kroz niz bioloških i fizikalno-kemijskih transformacija pri čemu nastaje visoko opterećena otpadna voda koja se naziva procjedna voda (Mojiri i sur., 2021). Sastav procjednih voda ovisi o više čimbenika, uključujući svojstva otpada, lokaciju, godišnja doba, strukturu, vrijeme zadržavanja u posudama za odlaganje, načine rada pretovarnih stanica, skladištenje u postrojenjima za obradu (mehaničko-biološka ili termička obrada). Neodgovarajućim upravljanjem procjednim vodama može doći do onečišćenja

površinskih i podzemnih voda te tla (Narayanan and Narayan, 2019). Procjedne vode sadrže organske i anorganske spojeve, uključujući organske kiseline, pesticide, hlapljive organske spojeve, farmaceutske proizvode, teške metale itd. (Kumarathilaka i sur., 2016).

Ispuštanje neobrađene otpadne vode u okoliš uzrokuje niz ekoloških, zdravstvenih i sigurnosnih problema. Saznanjima o štetnim učincima neobrađenih otpadnih vodenih tokova razvijaju se različiti postupci i uvode unaprjeđenja u tehnologije za obradu otpadne vode (Davazaraz i sur., 2020). Trenutačno se koriste različiti postupci za obradu procjednih voda, kao što je biološka obrada, fizikalno-kemijska obrada, koagulacija, adsorpcija i ionska izmjena.

Aerobna obrada je najčešće primjenjivan biološki postupak. Proces s aktivnim muljem zahtijeva visoke koncentracije mikroorganizama i može učinkovito ukloniti biorazgradivi organski materijal potpunom transformacijom u ugljikov dioksid i vodu (Yong i sur., 2018). Sve više pozornosti se usmjerava na primjenu mikroorganizama za obradu otpadnih voda i razgradnju onečišćujućih tvari bez nastanka toksičnih nusprodukata (Hamza i sur., 2016). U procjeni rizika utjecaja organskih onečišćenja na okoliš, biorazgradnja ima ključnu ulogu (Dimitrov i sur., 2007).

Bioremedijacija uključuje biološko uklanjanje onečišćenja iz okoliša koristeći okolišno prihvatljive tehnike. Smatra se sigurnom i održivom tehnologijom, jer se oslanja na djelovanje mikroorganizama u uklanjaju onečišćenja, što ju čini i ekonomski prihvatljivom (Dang i sur., 2019). Princip obrade bioremedijacije se zasniva na poboljšanju uvjeta za odvijanje procesa biorazgradnje te održavanju uvjeta za rast i razvoj mikroorganizama. Biostimulacijom se potiče rast i metabolizam mikroorganizama dodavanjem hranjivih tvari poput fosfora, dušika, kisika. Bioaugmentacija uključuje inokulaciju selektivnih mikroorganizama koji imaju sposobnost biorazgradnje ciljanih onečišćujućih tvari (Azubuike i sur., 2018; Moris i sur., 2018).

Za opisivanje rasta mikroorganizama razvijeno je više matematičkih modela različitih razina složenosti. Kinetički modeli omogućuju definiranje optimalnih uvjeta za razgradnju organske tvari mikrobnom aktivnošću u onečišćenom okolišu (Vuković Domanovac i sur., 2013, Hedhili i sur., 2014). Primjena kinetičkih modela ima ključnu ulogu u predviđanju i optimizaciji stupnja bioremedijacije (Dimitrov i sur., 2007).

U ovome radu je istražena bioremedijacija organskih tvari u procjednoj vodi dobivenoj iz biootpada uz biostimulaciju autohtonih i bioaugmentaciju ezogenih mikrobnih kultura u šaržnim uvjetima. Navedeni je proces opisan Monodovim i Endo-Haldaneovim modelima iz kojih su, na temelju rezultata iz provedenih eksperimenata, optimiranjem procijenjeni biokinetički parametri.

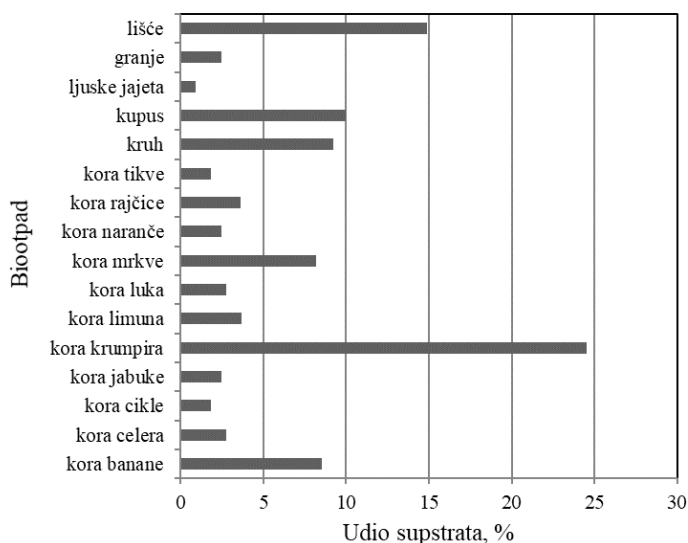
Materijali i metode

Za pripravu biootpada korišteni su supstrati pomiješani u udjelima kako je prikazano na slici 1. Početne vrijednosti priređene mješavine biootpada za pH, vlažnost i C:N

omjer su iznosile 5,5; 64 % i 30:1. Prema standardnoj metodi (EN 12457-4:2002) pripremljena je procjedna voda iz biootpada. Tlo glinaste teksture u okolici Zagreba tretirano je herbicidom STOMP 330E, koji sadrži 330 g/L pendimetalina, te je korišteno za uzgoj mješovite bakterijske kulture.

Proces bioremedijacije procjedne vode dobivene iz biootpada proveden je u šaržnim uvjetima, u Erlenmeyerovoj tikvici od 1 dm³ radnog volumena 0,5 dm³ pri početnoj koncentraciji supstrata $S = 16,20 \text{ g dm}^{-3}$. Provedena su dva eksperimenta; eksperiment biostimulacije i eksperiment bioaugmentacije. Iz tla onečišćenog pendimetalinom uzgojena je mješovita bakterijska kultura na hranjivoj podlozi (Biolife Manual, TS-4018104). Izrasla kultura je korištena za pripremu suspenzije optičke gustoće $OG = 0,6$ ($\lambda = 600 \text{ nm}$) te inokulirana u eksperimentu bioaugmentacije. Održavanjem submerznih uvjeta provedena je biostimulacija. Eksperimenti su provedeni na rotacijskoj tresilici (Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments GmbH & CO., Germany) pri 160 okretaja u minuti i temperaturi od $23 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 10 dana.

Tijekom eksperimenata u procjednoj vodi su određivane kemijska potrošnja kisika (KPK) i suspendirana tvar (APHA, 2012). Koncentracija supstrata (S), koja predstavlja ukupno onečišćenje procjedne vode, izražena je preko vrijednosti kemijska potrošnje kisika. Koncentracija biomase (X) izražena je preko koncentracijske vrijednosti suspendirane tvari.



Slika 1. Udio supstrata u priređenoj mješavini biootpada
Figure 1. Proportion of substrate in the prepared biowaste mixture

Na temelju eksperimentalnih rezultata 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 rezultatima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalno odstupanje između eksperimentalnih rezultata i vrijednosti izračunatih pomoću modela. Skup optimalnih parametara modela upotrijebljen je za simulacije koje su uspoređene s rezultatima eksperimenta.

Rezultati i rasprava

U prirodnom okolišu uvjeti za biorazgradnju su vrlo složeni te brzina i stupanj biorazgradnje ovise o kemijskim, fizikalnim i biološkim čimbenicima, koji mogu biti različiti za različite ekosustave (Vuković i sur., 2012). Mikrobiološka razgradnja onečišćujućih tvari vrlo je kompleksan proces, a za bolje razumijevanje koriste se kinetički modeli. Kao posljedica procesa biorazgradnje dolazi do povećanja koncentracije biomase X , g dm^{-3} i smanjenja koncentracije supstrata, S , g dm^{-3} . Brzine rasta biomase r_x , $\text{g dm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ i potrošnje supstrata r_s , $\text{g dm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ mogu se opisati kinetičkim jednadžbama (Wang i sur., 2009):

$$r_x = \frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

$$r_s = -\frac{dS}{dt} = \frac{\mu X}{Y} \quad (2)$$

gdje je μ specifična brzina rasta biomase, d^{-1} , a Y koeficijent prinosa biomase, g g^{-1} .

Najpoznatiji model koji povezuje rast biomase s koncentracijom supstrata postavio je Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S} \quad (3)$$

gdje su μ_{\max} maksimalna specifična brzina rasta, d^{-1} i K_S konstanta zasićenja, g dm^{-3} , koja je definirana kao koncentracija supstrata pri vrijednosti polovine maksimalne specifične brzine rasta. Mnogi supstrati na kojima mikroorganizmi rastu mogu pri većim koncentracijama djelovati inhibitorno na rast. Poznato je da u procesima obrade otpadnih voda toksične komponente imaju inhibicijski učinak na rast mikroorganizama. Modificiranjem Monodovog modela uključivanjem konstante inhibicije K_i , g dm^{-3} , koja odgovara najvećoj koncentraciji supstrata pri kojoj

specifična brzina rasta biomase μ odgovara polovini maksimalne specifične brzine rasta μ_{\max} bez inhibicije i konstante odumiranja k_d , d^{-1} , dobiva se Endo-Haldaneov model (Okpokwasili i Nweke, 2006):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_S + S + S^2 / K_i} \quad (4)$$

Endo-Haldaneov model se vrlo često koristi pri opisivanju procesa biorazgradnje jer uzima u obzir inhibicijski učinak supstrata na rast mikroorganizama i endogeni metabolizam biomase.

Ocjena prihvatljivosti modela provedena je na temelju srednjeg kvadratnog odstupanja i Fisher-Snedecorovim F-testom (Bronštejn i sur., 2004). Statistička analiza korištena za usporedbu varijanci različitih uzoraka temelji se na jednadžbi:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (5)$$

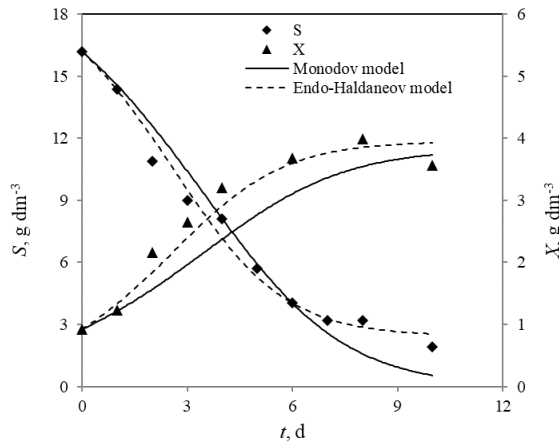
gdje su s_1^2 i s_2^2 varijance koje uspoređujemo.

Monodovom i Endo-Haldaneovom kinetikom (Jednadžbe 3 i 4) 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 (Slike 2 i 3).

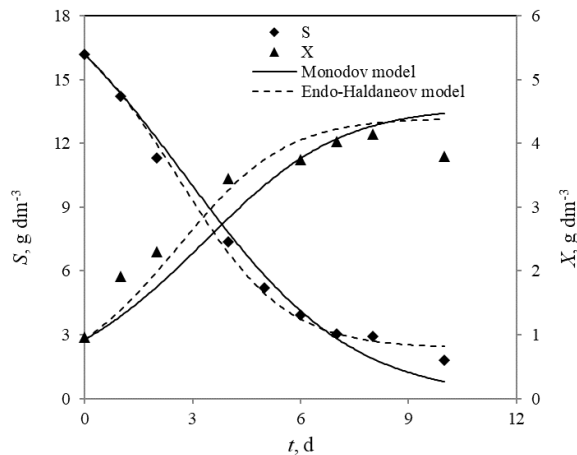
Tablica 1. Biokinetički parametri modela za bioremedijaciju procjedne vode iz biootpada
Table 1. Biokinetic parameters of models for biowaste leachate bioremediation

Model	μ_{\max} , d^{-1}	K_S , $g\ dm^{-3}$	Y , $g\ g^{-1}$	K_i , $g\ dm^{-3}$	k_d , d^{-1}	F-test, -
Monod	1,04	36,75	0,20	-	-	0,74
Endo-Haldane	2,03	45,07	0,24	73,08	0,10	0,88

U tablici 1 prikazani su biokinetički parametri modela. Koeficijent prinosa biomase, Y , izražava koncentraciju biomase koja se proizvede po jedinici uklonjenog supstrata. Konstanta zasićenja supstratom, K_S , ukazuje na afinitet mikroorganizama prema supstratu. Dobivene vrijednosti za Y i K_S su približno jednake za provedene eksperimente i iznose 0,20 i 0,24 $g\ g^{-1}$ odnosno 36,75 i 45,07 $g\ dm^{-3}$ za Monodov model i Endo-Haldanov model. Konstanta inhibicije, K_i , značajna je za procese u kojima je visoke vrijednost početne koncentracije organske tvari i iznosila je 73,08 $g\ dm^{-3}$. Vrijednosti dobivenih biokinetičkih parametara u rasponu su očekivanih vrijednosti za proces biorazgradnje u šaržnim uvjetima (Čosić i sur., 2012; Šabić i sur., 2015).



Slika 2. Promjena koncentracija supstrata i biomase u eksperimentu biostimulacije. Usporedba eksperimentalnih rezultata i kinetičkih modela.
Figure 2. Change in substrate and biomass concentrations in the biostimulation experiment. Comparison of experimental results and kinetic models.



Slika 3. Promjena koncentracija supstrata i biomase u eksperimentu bioaugmentacije. Usporedba eksperimentalnih rezultata i kinetičkih modela.
Figure 3. Change in substrate and biomass concentrations in the bioaugmentation experiment. Comparison of experimental results and kinetic models.

Promjene koncentracije supstrata i biomase u eksperimentima biostimulacije i bioaugmentacije prikazane su na slikama 2 i 3. Tijekom eksperimenta uočava se smanjenje koncentracije supstrata i rast koncentracije biomase. U 2. danu koncentracija supstrata je niža za 31,4 %, a nakon toga se smanjuje do 8. dana kada je vrijednost učinkovitosti bioremedijacije iznosila 81,2 % u oba eksperimenta. Nakon 8. dana vrijednost se značajnije ne mijenja te u 10. danu ukupna učinkovitost bioremedijacije iznosi 88,6 %.

Na temelju ocjene prihvatljivosti predloženih modela iz dobivenih vrijednosti Fisher-Snedecorovim F-testom prikazanih u tablici 1 i slikama 2 i 3 vidljivo je da Endo-Haldaneov model bolje opisuje proces bioremedijacije procjedne vode iz biootpada od Monodovog modela.

Zaključci

U radu je istražena bioremedijacija procjedne vode iz biootpada u šaržnim uvjetima pri visokoj vrijednosti početne koncentracije supstrata od $16,20 \text{ g dm}^{-3}$. Kako bi se dobio uvid u tijek uklanjanja organskih onečišćujućih tvari, provedena je kinetička analiza istraživanog procesa pomoću matematičkih modela. Na temelju procijenjenih vrijednosti kinetičkih parametara i ocjene prihvatljivosti predloženih modela zaključuje se da Endo-Haldaneov model bolje opisuje proces bioremedijacije od Monodovog modela. Učinkovitost procesa bioremedijacije u prosjeku je iznosila 88,6 % za provedene eksperimente. Bioremedijacijske tehnike se mogu primijeniti za poboljšanje učinkovitosti biološke obrade te značajno doprinijeti zaštiti okoliša na jednostavan i ekonomičan te okolišno prihvatljiv način.

Literatura

- APHA, 2012: Standard methods for the examination of water and wastewater, 22nd edition, Washington DC, SAD.
- Bronštejn N., Semendjajev K. A., Musiol G, Mühlig H. (2004): Matematički priručnik, Zagreb, Hrvatska: Golden marketing - Tehnička knjiga, pp. 653-673.
- Ćosić I., Vuković M., Gomzi Z., Briški F. (2012): Comparison of various kinetic models for batch biodegradation of leachate from tobacco waste composting, *Rev. Chim.* 63 (9), 967-971.
- Dangi A. K., Sharma B., Hill R. T., Shukla P. (2019): Bioremediation through microbes: Systems biology and metabolic engineering approach, *Crit. Rev. Biotechnol.* 39 (1), 79-98.
- Davarazar M., Mostafaie A., Jahanianfard D., Davarazar P., Ghiasi S. A. B., Gorchich M., Nemati B., Kamali M., Aminabhavi T. M. (2020): Treatment technologies for pharmaceutical effluents - A scientometric study, *J. Environ. Manage.* 254, 109800.
- Dimitrov S, Pavlov T, Nedelcheva D, Reuschenbach P, Silvani M, Bias R, Comber M, Low L, Lee C, Parkerton T, Mekenyan O. (2007): A kinetic model for predicting biodegradation, *SAR QSAR Environ. Res.* 18 (5-6), 443-57.

- 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.
- Hedhili K, Vauchel P, Dimitrov K, Kriaa K, Chataigné G, Hani K, Dhulster P., Nedjar-Arroume N. (2014): Mechanism and kinetics modeling of the enzymatic hydrolysis of α 1–32 antibacterial peptide, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 1315-1323.
- Kumarathilaka P., Jayawardhana Y. Basnayake B. F. A., Mowjood M. I. M., Nagamori M., Saito T., Kawamoto K., Vithanage M. (2016): Characterizing volatile organic compounds in leachate from Gohagoda municipal solid waste dumpsite, Sri Lanka, *Groundw. Sustain. Dev.* 2-3, 1-6.
- Mojiri A., Zhou J. L., Ratnaweera H., Ohashi A., Ozaki N., Kindaichi T., Asakura H. (2021): Treatment of landfill leachate with different techniques: an overview, *J. Water Reuse Desalin.* 11 (1), 66-96.
- Moris S. Garcia-Cabellos G. Enright D. Ryan D. Enright A. M. (2018): Bioremediation of landfill leachate using isolated bacterial strains, *Int. J. Environ. Bioremed. Biodegrad.* 6 (1), 26-35.
- Narayanan, C. M., Narayan, V. (2019): Biological wastewater treatment and bioreactor design: a review, *Sustain. Environ. Res.* 29 (1), 33.
- Okpokwasili G. C., Nweke C. O. (2006): Microbial growth and substrate utilization kinetics, *Afr. J. Biotechnol.* 5 (4), 305-317.
- Šabić, M., Vuković Domanovac, M., Findrik Blažević, Z., Meštrović, E. (2015): Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode, *Kem. Ind.* 64 (5-6), 229-236.
- Vuković Domanovac, M., Ćosić, I., Sojčić, M., Briški, F. (2013): Treatment of tobacco dust Leachate by activated sludge - Evaluation of biokinetic parameters, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 27 (1), 51-56.
- Vuković M, Ćosić I, Kolačko K., Briški F. (2012): Kinetika biorazgradnje organskih tvari u procjednoj vodi iz duhanskog otpada, *Kem. Ind.* 61 (9-10), 417-425.
- Wang L. K., Pereira N. C., Hung Y.-T. (2009): Biological treatment processes, New York, SAD: Humana Press, pp 207-228.
- Yong Z. J. Bashir M. J. K. Ng C. A. Sethupathi S. Lim J. W. (2018): A sequential treatment of intermediate tropical landfill leachate using a sequencing batch reactor (SBR) and coagulation, *J. Environ. Manage.* 205, 244-252.

Kinetics of bioremediation of simulated leachate from biowaste

Marija Vuković Domanovac^{1*}, Ivana Stojmilović¹, Martina Trtinjak¹,
Tomislav Domanovac², Monika Šabić Runjavec¹

¹University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

²IPZ Uniprojekt TERRA, Voćarska cesta 68, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: mvukovic@fkit.hr

original scientific paper

Summary

In recent decades, the risks associated with leachate pollution have become increasingly evident, both to the environment and to human health. Leachate can be classified as a specific type of wastewater affected by the variability of the waste's composition and its physical, chemical, and biological changes. The control of leachate pollution is a global concern and a major challenge in the reduction of pollutant sources and elimination. Biological treatment, thanks to the action of microorganisms, represents a potentially acceptable solution for the purification of leachate from an environmental and economic point of view.

In this work, the kinetics of the bioremediation process in the removal of organic pollutants from simulated leachate of biowaste under batch conditions was studied. The process is described by the Monod and Endo-Haldane models. The parameter values were: $\mu_{\max} = 1.04 \text{ d}^{-1}$, $K_s = 36.75 \text{ g dm}^{-3}$ and $Y = 0.20 \text{ g g}^{-1}$ for the Monod model and $\mu_{\max} = 2.03 \text{ d}^{-1}$, $K_s = 45.07 \text{ g dm}^{-3}$, $Y = 0.24 \text{ g g}^{-1}$, $K_i = 73.08 \text{ g dm}^{-3}$ and $k_d = 0.10 \text{ d}^{-1}$ for the Endo-Haldane model. Based on the estimated values of the kinetic parameters and the evaluation of the acceptability of the proposed models, the results show that the Endo-Haldane model better describes the process of bioremediation of leachate from biowaste.

Keywords: bioremediation, biowaste, simulated leachate, kinetics

3

**Sekcija: PREHRAMBENA
TEHNOLOGIJA I BIOTEHNOLOGIJA**

**Topic: FOOD TECHNOLOGY AND
BIOTECHNOLOGY**



Utjecaj zamrzavanja i mariniranja na nutritivna i mikrobiološka svojstva zelenih šparoga

Valentina Obradović^{1*}, Ines Krznarić Došen¹, Irena Perković²,
 Maja Ergović Ravančić¹, Svjetlana Škrabal¹, Helena Marčetić¹

¹Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet turizma i ruralnog razvoja,
 Vukovarska 17, 34000 Požega, Hrvatska

²Veterinarski zavod Vinkovci, I. i J. Kozarca 24, 32100 Vinkovci, Hrvatska

*Dopisni autor: vobradovic@vup.hr

originalni znanstveni rad

Sažetak

Zelena šparoga se najčešće prodaje kao svježa uz primjenu konzerviranja hlađenjem. Ipak, relativno kratka sezona berbe, koja tek u trećoj godini uzgoja traje do dva mjeseca, nameće potrebu i za drugim metodama konzerviranja. U ovom radu su zelene šparoge sorte *Asparagus argenteuil* konzervirane pasterizacijom u slano kiselom naljevu (10 uzoraka) i zamrzavanjem (10 uzoraka). Nakon šest mjeseci skladištenja ispitani su sljedeći mikrobiološki parametri: *Enterobacteriaceae*, koagulaza pozitivni stafilokoki/*Staphylococcus aureus*, sulfitoreducirajuće klostridije, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, aerobne mezofilne bakterije, kvasci i plijesni. Određeni su i sljedeći kemijski parametri: udio vode, masti, ugljikohidrata, bjelančevina, pepela, šećera i soli. Šparoge koje nisu bile blanširane prije zamrzavanja nisu zadovoljile mikrobiološke kriterije za zelenu šparogu, upućujući na nužnost pravilne pripreme prije zamrzavanja, dok su svi pasterizirani uzorci imali zadovoljavajuće mikrobiološke parametre. Oba postupka konzerviranja su uzrokovali minimalne promjene kemijskog sastava u odnosu na svježiju zelenu šparogu, uz nešto manje vrijednosti bjelančevina kod mariniranih šparoga zbog denaturacije uslijed termičke obrade.

Ključne riječi: zelena šparoga, zamrzavanje, pasterizacija, nutritivna vrijednost, mikrobiološka analiza

Uvod

Šparoga pripada u rod *Asparagus* koji obuhvaća oko 200 vrsta (Lešić et al., 2002). Uzgaja se u kontinentalnim područjima i u priobalju (Kantoci, 2009). U Hrvatskoj se ozbiljnije počela uzgajati najprije u dolinama Neretve i Raše, no bez značajnijeg komercijalnog uspjeha (Lešić et al., 2002). Posljednjih godina, dolazi do porasta interesa za hranom kojoj se pripisuju pozitivni učinci na ljudsko zdravlje, pri čemu je povrće među vodećim namirnicama koje je potrebno uključiti u svakodnevnu prehranu (Gębczyński, 2007). Zelena šparoga je nutritivno vrijedno povrće bogato antioksidansima kao što su flavonoidi od kojih je najpoznatiji rutin, te kamferol i kvercetin, zatim askorbinska kislina, tokoferoli i drugi (Sun et al., 2007a; Palfi et al., 2017). Šparoge također sadrže i esencijalna ulja, asparagin, arginin, tirozin, resin i tanine (Negi et al., 2010). U skladu s navedenim, trend porasta konzumacije povrća

odrazio se i na porast proizvodnje povrtnih kultura. Prema podacima Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (2021), uzgoj “ostalog lisnatog povrća” u koje se ubrajaju šparoga, blitva, špinat, celer, radić, artičoka i drugi, porastao je sa 143 ha (2.201 t) u 2013. godini na 540 ha (11.709 t) u 2020. godini.

Branje zelene šparoge u prvoj godini traje svega dva tjedna, a u drugoj godini mjesec dana. Početak „prave“ berbe je treća godina nakon sadnje, koja traje od mjesec i pol do dva. Kroz taj period šparoga se bere svaki dan. Berba sorte *Asparagus argenteuil*, korištene u ovom radu, kreće krajem ožujka i početkom travnja. U slučaju nepovoljnih uvjeta prelazi u stanje mirovanja i odbacuje dijelove koji su iznad zemlje. Idealna temperatura zemlje za rast šparoge je od 12 °C do 25 °C, a berba može krenuti kada je šparoga izrasla minimalno deset centimetara iznad tla (Biggs et al., 2005). Dodatno, problem uzgajivačima ovog povrća je činjenica da propada vrlo brzo nakon berbe i teško ju je skladištiti (Sun et al., 2007b). Šparoga se najčešće ne pere, već se klasira po širini i dužini, te slaže u snopiće. Korisnim se pokazalo stavljanje snopića u bazene s 1-2 cm vode na nekoliko sati prije otpreme na tržište, kako bi izboji nadoknadili vodu koju su izgubili nakon berbe ili tzv. vlažno skladištenje na način da se snopići slažu okomito na nekoliko slojeva vlažnog papirnato ručnika. Ipak, dio plodova koje proizvode uzgajivači povrća, ne može se plasirati u svježem stanju jer nije tolika potražnja, te je potrebno primijeniti određene metode konzerviranja. U tu svrhu se najčešće koriste konzerviranje pasterizacijom i zamrzavanjem (Palfi et al., 2014).

Istraživanje u ovom radu provedeno je u suradnji s obiteljskim poljoprivrednim gospodarstvom s područja istočne Slavonije. Navedeno gospodarstvo je višak šparoga koje nisu mogli plasirati na tržište konzervirao pasterizacijom u slano kiselom naljevu, te metodom zamrzavanja. U svrhu kontrole procesa i kakvoće navedenih proizvoda, provedena je mikrobiološka i nutritivna kontrola konzerviranih šparoga. Budući da je na području istočne Slavonije uzgoj šparoga postao sve popularniji, a lokalni proizvođači tek traže najbolje opcije za plasiranje ovog visokovrjednog povrća, kakvoća i zdravstvena ispravnost konzerviranih proizvoda prvi je korak u ostvarivanju dodane vrijednosti kroz nove proizvode i produženo vrijeme plasiranja.

Materijali i metode

Priprema uzoraka

U svrhu konzerviranja pasterizacijom, šparoge su narezane na određenu duljinu, oprane i potom složene u sterilizirane staklenke. Staklenke su se nakon toga punile pripremljenom otopinom (voda, alkoholni ocat, šećer i sol) i pasterizirale 20 minuta na 85 °C. Po završetku pasterizacije i hlađenja, staklenke su složene na tamno i hladno mjesto gdje je temperatura do 15 °C.

U svrhu konzerviranja zamrzavanjem, šparoge su izuzete iz hladnjače (0 - 2 °C) u koju su smještene odmah po berbi. Zmrzavanje je provedeno u komornom zamrzivaču, bez ikakve prethodne obrade plodova.

Mikrobiološka analiza

Preporučeni i obvezni mikroorganizmi prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) i Pravilniku o mikrobiološkim kriterijima za hranu (2008) su određeni prema metodama prikazanima u tablici 1.

Tablica 1. Metode mikrobiološke analize
Table 1. Methods for microbiological analysis

Mikroorganizam	Metoda
Aerobne mezofilne bakterije	HRN EN ISO 4833-1:2013
<i>Salmonella</i> spp.	HRN EN ISO 6579-1:2017
<i>Enterobacteriaceae</i>	HRN ISO 21528-2:2017
Sulfitoreducirajuće klostridije	HRN ISO 15213:2004
Koagulaza pozitivni stafilokoki/ <i>Staphylococcus aureus</i>	HRN EN ISO 6888-1:2004
Kvasci i plijesni	HRN ISO 21527-1:2012 HRN ISO 21527-2:2012
<i>Listeria monocytogenes</i>	HRN EN ISO 11290-2:2017

Provedena je mikrobiološka analiza 10 jedinica zamrznutih i 10 jedinica mariniranih šparoga (po 5 jedinica iz dvije različite šarže) nakon 6 mjeseci skladištenja. Broj jedinica za analizu određen s obzirom na kriterij uzorkovanja pasteriziranih i zamrznutih proizvoda od povrća (Tablice 4 i 5) prema kojem 5 elementarnih jedinica sačinjava uzorak. Različite šarže su iz različitih dana berbe i daljnje obrade.

Nutritivna vrijednost uzoraka

Metode korištene za analizu kemijskih sastojaka uzoraka šparoga prikazane su u tablici 2. Analize su provedene nakon 6 mjeseci skladištenja.

Tablica 2. Metode određivanja kemijskih parametara
Table 2. Methods for chemical parameters determination

PARAMETAR	METODA
Određivanje vode	HRN ISO 6496:2001
Određivanje pepela	HRN ISO 5984:2004
Određivanje masti	HRN ISO 1443:1999 i HRN ISO 6492:2001
Određivanje količine dušika i izračunavanje količine bjelančevina	ISO 1871:2009, HRN ISO 937:1999, HRN ISO 5983-2:2010
Određivanje šećera	Metoda po Luff-Schoorlu (NN 39/09)
Određivanje soli	Metoda po Mohru (Ivandić, 2019)

Rezultati i rasprava

Rezultati mikrobiološke analize marinirane šparoge prikazani su u tablici 3, a kriteriji prema kojima se uzorak može smatrati prihvatljivima u tablici 4. Jedinice 1-1 do 1-5 čine uzorak 1 (5 elementarnih jedinica iz prve šarže), a jedinice 2-1 do 2-5 čine uzorak 2 (5 elementarnih jedinica iz druge šarže).

Tablica 3. Rezultati mikrobiološke analize marinirane šparoge
Table 3. Results of microbiological analysis of marinated asparagus

Oznaka analizirane jedinice	E (cfu/g)	KPS (cfu/g)	SRK (cfu/g)	P (cfu/g)	LM (cfu/25g)
1-1	< 10	< 10	< 10	< 10	0
1-2	< 10	< 10	< 10	< 10	0
1-3	< 10	< 10	< 10	< 10	0
1-4	< 10	< 10	< 10	< 10	0
1-5	< 10	< 10	< 10	< 10	0
2-1	< 10	< 10	< 10	< 10	0
2-2	< 10	< 10	< 10	< 10	0
2-3	< 10	< 10	< 10	< 10	0
2-4	< 10	< 10	< 10	< 10	0
2-5	< 10	< 10	< 10	< 10	0

E - enterobakterije; KPS - koagulaza pozitivni stafilocoki; LM - *Listeria monocytogenes*; SRK - sulfitoreducirajuće klostridije; P – plijesni

Tablica 4. Plan uzorkovanja i kriteriji za pasterizirane proizvode od voća, povrća i gljiva
 (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 2011)

Table 4. Sampling plan and criteria for pasteurized products from fruits, vegetables and mushrooms (Guidance for microbiological criteria for food, 2011)

Preporučeni parametar	Plan uzorkovanja		Kriteriji
	n	c	
Enterobakterije	5	2	m=10 cfu/g; M=10 ² cfu/g
Koagulaza pozitivni stafilocoki	5	1	m=10 cfu/g; M=10 ² cfu/g
Sulfitoreducirajuće klostridije	5	2	m=10 cfu/g; M=10 ² cfu/g
Kvasci i plijesni	5	2	m=10 cfu/g; M=10 ² cfu/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	M=0 cfu/25g

n - broj elementarnih jedinica uzorka koji čine uzorak, c - broj jedinica uzorka, gdje se broj bakterija može nalaziti između "m" i "M", m - granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim, M - granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim

S obzirom na kriterije uzorkovanja i granične parametre prikazane u tablici 4, rezultati mikrobiološke analize svih pasteriziranih uzoraka prikazanih u tablici 3 smatraju se zadovoljavajućima. Dakle, priprema uzoraka, ambalaže, kao i sam proces pasterizacije uspješno su provedeni na obiteljskom poljoprivrednom gospodarstvu.

Rezultati mikrobiološke analize zamrznute šparoge prikazani su u tablici 5, a kriteriji prema kojima se uzorak može smatrati prihvatljivima u tablici 6.

Tablica 5. Rezultati mikrobiološke analize zamrznute šparoge
Table 5. Results of microbiological analysis of frozen asparagus

Oznaka analizirane jedinice	AMB (cfu/g)	E (cfu/g)	S (cfu/25 g)	SRK (cfu/g)
1-1	$8,50 \times 10^4$	$1,30 \times 10^3$	n.n.	< 10
1-2	$1,23 \times 10^4$	$3,50 \times 10^3$	n.n.	< 10
1-3	$2,90 \times 10^5$	$7,25 \times 10^2$	n.n.	< 10
1-4	$8,68 \times 10^3$	$1,85 \times 10^3$	n.n.	$8,0 \times 10^1$
1-5	$1,05 \times 10^4$	$1,50 \times 10^3$	n.n.	< 10
2-1	$2,18 \times 10^4$	$3,90 \times 10^3$	n.n.	< 10
2-2	$2,35 \times 10^4$	$2,60 \times 10^3$	n.n.	$4,0 \times 10^1$
2-3	$3,30 \times 10^4$	$1,40 \times 10^3$	n.n.	< 10
2-4	$1,80 \times 10^4$	$2,50 \times 10^3$	n.n.	< 10
2-5	$1,55 \times 10^5$	$3,90 \times 10^3$	n.n.	< 10

n.n.- nije nađeno; AMB- aerobne mezofilne bakterije; E- enterobakterije; S- *Salmonella* spp.; SRK- sulfitoreducirajuće klostridije

Tablica 6. Plan uzorkovanja i kriteriji za zamrznuto voće, povrće i gljive (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 2011)

Table 6. Sampling plan and criteria for frozen fruits, vegetables and mushrooms (Guidance for microbiological criteria for food, 2011)

Preporučeni parametar	Plan uzorkovanja		Kriteriji
	n	c	
Aerobne mezofilne bakterije	5	2	$m=10^4$ cfu/g; $M=10^5$ cfu/g
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	$M=0$ cfu/25g
<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	$m=10^2$ cfu/g; $M=10^3$ cfu/g
Sulfitoreducirajuće klostridije	5	2	$m=10$ cfu/g; $M=10^2$ cfu/g

n - broj elementarnih jedinica uzorka koji čine uzorak, c - broj jedinica uzorka, gdje se broj bakterija može nalaziti između "m" i "M", m - granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim, M - granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim

Uzorci zamrznutih šparoga ne zadovoljavaju s obzirom na prisutnost aerobnih mezofilnih bakterija (Tablice 5 i 6), budući da je od 10 analiziranih jedinica, čak 2 iznad propisanih "M" graničnih vrijednosti (po jedna u svakom uzorku), a osim toga 7 ostalih uzoraka je između graničnih vrijednosti "m" i "M". Prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011), ukoliko je samo 1 vrijednost (od propisanih 5 koji čine uzorak) iznad "M", uzorak se smatra nezadovoljavajućim. Također su svi uzorci zamrznutih šparoga nezadovoljavajući s obzirom na prisutnost enterobakterija, budući da je čak 9 analiziranih jedinica imalo vrijednosti iznad graničnog "M" (Tablice 5 i 6). *Salmonella* vrste nisu nađene niti u jednom uzorku, dok su rezultati za sulfitoreducirajuće klostridije u skladu s propisanim graničnim vrijednostima

(Tablice 5 i 6). Iz svega navedenog, vidljivo je da proces zamrzavanja uzoraka nije adekvatno proveden, odnosno izostanak pripreme uzoraka koja uključuje pranje i blanširanje je rezultirao neispravnim uzorcima u pogledu mikrobiološke ispravnosti.

Tablica 7. Nutritivna vrijednost zamrznutih i mariniranih uzoraka šparoga
Table 7. Nutritional values of frozen and marinated asparagus

Vrijednosti za zamrznute šparoge izražene na 100 g namirnice		Vrijednosti za marinirane šparoge izražene na 100 g namirnice	
Energetska vrijednost	32,9 kcal/ 138 kJ	Energetska vrijednost	30,0 kcal/ 126 kJ
<i>m</i> (vode)/g	91,3	<i>m</i> (vode)/g	92,19
<i>m</i> (masti)/g	0,3	<i>m</i> (masti)/g	0,37
<i>m</i> (bjelančevina)/g	3,75	<i>m</i> (bjelančevina)/g	2,75
<i>m</i> (ugljikohidrata)/g od kojih šećeri:	3,8 1,49	<i>m</i> (ugljikohidrata)/g od kojih šećeri:	3,9 2,13
<i>m</i> (pepela)/g	0,85	<i>m</i> (pepela)/g	0,77
<i>m</i> (soli)/g	0,04	<i>m</i> (soli)/g	0,52

Šparoga je blago kisela hrana bogata proteinima i vlaknima, ali s malim udjelom kalorija i ugljikohidrata (Hartmann, 2007). Vrijednosti prikazane u tablici 7 u skladnosti su s vrijednostima prikazanim u literaturi (Hartmann, 2007; Palfi et al., 2014). Udio masti, bjelančevina, ugljikohidrata, pepela i soli prikazan u tablici 7, podrazumijeva udjele u 100 g šparoge koja sadržava i vodu u sebi. Hartmann (2007) također navodi kako šparoge sadrže mali udio natrijevog klorida, međutim u slučaju marinirane šparoge udio soli je znatno veći zbog mariniranja u slano kiselom naljevu (Tablica 7). Peng et al. (2017) navode kako termička pasterizacija uzrokuje promjene u teksturi, ali i brojnim nutrijentima porijeklom iz povrća, vitaminima, fenolnim spojevima, a u nekim slučajevima i ugljikohidratima. Pasterizacija u ovom slučaju nije utjecala na udio ugljikohidrata, no pasterizirane šparoge imaju nešto manji udio proteina od zamrznutih kao posljedica denaturacije uslijed povišene temperature.

Zaključci

Primjena jednostavnih i dostupnih metoda konzerviranja povrća za obiteljska poljoprivredna gospodarstva poželjna je u svrhu očuvanja plodova koji se ne mogu plasirati na tržište u vrijeme sezone berbe plodova. Zamrzavanje i pasterizacija u slano kiselom naljevu su primjeri jednostavnih i lako primijenjivih metoda koje gospodarstva mogu implementirati bez posebnih ulaganja u opremu. Ipak, nedostatak vremena i radne snage ne smije rezultirati neadekvatnom pripremom povrća, uz izostanak pranja i blanširanja, budući da dovodi do mikrobiološki, odnosno zdravstveno neispravnih proizvoda koji se u krajnjem slučaju ne mogu plasirati na tržište.

Literatura

- Biggs, M., McVicar, J., Flowerder, B. (2005): Enciklopedija voća, povrća i začinskog bilja. Sorte, uzgoj, ljekovitost, štetnici i bolesti, Rijeka, Hrvatska: Naklada Uliks, pp. 36-37.
- Gębczyński, P. (2007): Content of selected antioxidative compounds in green Asparagus depending on processing before freezing and on the period and conditions of storage, *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 57 (2), 209-214.
- Hartmann, H.D. (2007): Šparoge, Požega, Hrvatska: Itd Gaudeamus d.o.o., pp 1-96.
- Hrvatski zavod za norme (1999) Meso i mesni proizvodi -- Određivanje ukupne količine masti, HRN ISO 1443:1999
- Hrvatski zavod za norme (1999): Meso i mesni proizvodi -- Određivanje količine dušika (Referentna metoda), HRN ISO 937:1999
- Hrvatski zavod za norme (2001) Hrana za životinje -- Određivanje udjela masti, HRN ISO 6492:2001
- Hrvatski zavod za norme (2001): Hrana za životinje -- Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari, HRN ISO 6496:2001
- Hrvatski zavod za norme (2004): Hrana za životinje -- Određivanje pepela, HRN ISO 5984:2004
- Hrvatski zavod za norme (2004): Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalna metoda za brojenje sulfitreducirajućih bakterija u anaerobnim uvjetima, HRN ISO 15213:2004
- Hrvatski zavod za norme (2004): Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilocoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -- 1. dio: Postupak primjene Baird-Parkerove hranjive podloge na agaru, HRN EN ISO 6888-1:2004
- Hrvatski zavod za norme (2010): Hrana za životinje -- Određivanje količine dušika i izračunavanje količine sirovih proteina -- 2. dio: Razaranje u bloku i metoda destilacije parom, HRN ISO 5983-2:2010
- Hrvatski zavod za norme (2012): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni -- 1. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode većim od 0,95, HRN ISO 21527-1:2012
- Hrvatski zavod za norme (2012): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni -- 2. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode manjim ili jednakim 0,95, HRN ISO 21527-2:2012
- Hrvatski zavod za norme (2013): Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za određivanje broja mikroorganizama -- 1. dio: Određivanje broja kolonija pri 30 °C tehnikom zalijevanja podloge, HRN EN ISO 4833-1:2013
- Hrvatski zavod za norme (2017): Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* -- 1. dio: Dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp. HRN EN ISO 6579-1:2017
- Hrvatski zavod za norme (2017): Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i drugih *Listeria* spp. -- 2. dio: Metoda određivanja broja, HRN EN ISO 11290-2:2017
- Hrvatski zavod za norme: (2017): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae -- 2. dio: Metoda određivanja broja kolonija, HRN ISO 21528-2:2017
- International standard organization (2009): Food and feed products — General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldahl method, ISO 1871:2009

- Ivandić, L. (2019): Usporedba konvencionalnih analitičkih metoda za određivanje udjela soli u hrani, Završni rad, Sveučilište u Spliti, Kemijsko tehnološki fakultet.
- Kantoc, D. (2009): Višegodišnje povrće, *Glasnik zaštite bilja* 4, 11-15.
- Lešić, R., Borošić, J., Buturac, I., Čustić, M., Poljak, M., Romić, D. (2002): Povrćarstvo, Čakovec, Hrvatska: Zrinski, pp. 151-167.
- Ministarstvo poljoprivrede (2021): Godišnje izvješće o stanju u poljoprivredi u 2020., Zagreb, Hrvatska: Ministarstvo poljoprivrede, pp. 198.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2008): Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu, Zagreb, Hrvatska: Narodne novine d.d., 74/08.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2009): Pravilnik o šećerima i metodama analiza šećera namijenjenih za konzumaciju, Zagreb, Hrvatska: Narodne novine d.d., 39/09.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. 3. izmijenjeno izdanje, Zagreb, Hrvatska: Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, pp.51-52.
- Negi, J.S., Singh, P., Joshi, G.P., Rawat, M.S., Bisht, V.K. (2010): Chemical constituents of Asparagus, *Pharmacogn. Rev.* 4 (8), 215-220.
- Palfi, M., Jurković, Z., Čosić, J., Tomić-Obrdalj, H., Jurković, V., Knežević, N., Vrandečić, K. (2017): Total polyphenol content and antioxidant activity of wild and cultivated asparagus in Croatia, *Poljoprivreda* 23 (1), 56-62.
- Palfi, M., Tomić-Obrdalj, H., Horvat, D. (2014): Healthy vegetables for healthy heart: asparagus, *Cardiol. Croat.* 9 (3-4), 142-149.
- Peng, J., Tang, J., Barrett, D.M., Sablani, S.S., Anderson, N., Powers, J.R. (2017): Thermal pasteurization of ready-to-eat foods and vegetables: Critical factors for process design and effects on quality, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57 (14), 2970-2995.
- Sun, T., Powers, J.R., Tang, J. (2007b): Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices, *Food Chem.* 105, 101-106.
- Sun, T., Tang, J., Powers, J.R. (2007a): Antioxidant activity and quality of asparagus affected by microwave-circulated water combination and conventional sterilization, *Food Chem.* 100, 813-819.

The influence of freezing and marinating on the nutritional and microbiological properties of green asparagus

Valentina Obradović^{1*}, Ines Krznarić Došen¹, Irena Perković², Maja Ergović Ravančić¹, Svjetlana Škrabal¹, Helena Marčetić¹

¹Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Tourism and Rural Development, Vukovarska 17, 34000 Požega, Croatia

²Veterinary Institute Vinkovci, I. i J. Kozarca 24, 32100 Vinkovci, Croatia

*Corresponding author: vobradovic@vup.hr

original scientific paper

Summary

Green asparagus is most often sold fresh with the application of cold preservation. However, the relatively short harvest season, which only lasts up to two months in the third year of cultivation, imposes the need for other conservation methods. In this work, green asparagus of the variety *Asparagus argenteuil* were preserved by pasteurization in a salty-acidic infusion (10 samples) and by freezing (10 samples). After six months of storage, the following microbiological parameters were tested: Enterobacteriaceae, coagulase-positive staphylococci/*Staphylococcus aureus*, sulfite-reducing clostridia, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, aerobic mesophilic bacteria, yeasts and molds. The following chemical parameters were also determined: the proportion of water, fat, carbohydrates, proteins, ash, sugar and salt. Asparagus samples that were not blanched before freezing did not meet the microbiological criteria for green asparagus, indicating the necessity of proper preparation before freezing, while all pasteurized samples had satisfactory microbiological parameters. Both conservation procedures caused minimal changes in the chemical composition compared to fresh green asparagus, with slightly lower protein values in marinated asparagus due to denaturation due to heat treatment.

Keywords: green asparagus, freezing, pasteurization, nutritional value, microbiological analysis

Hlapljivi spojevi rakije travarice

**Mladenka Šarolić^{1*}, Željana Pavlović¹, Zvonimir Marijanović¹,
Ani Radonić¹, Žana Delić²**

¹*Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet, Ruđera Boškovića 35,
21000 Split, Hrvatska*

²*Veleučilište „Marko Marulić“ u Kninu, Petra Krešimira IV 30, 22300 Knin, Hrvatska*
**Dopisni autor: mladenka.sarolic@ktf-split.hr*

originalni znanstveni rad

Sažetak

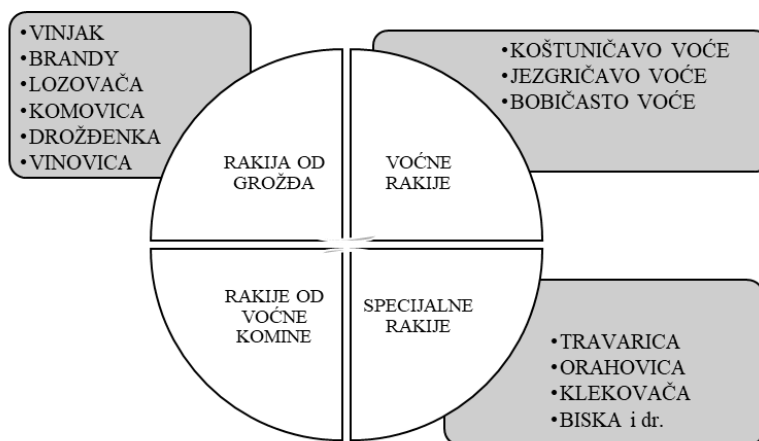
Travarica je jako alkoholno piće koje u Hrvatskoj ima dugu tradiciju proizvodnje, posebice na području Dalmacije, Istre i otoka. Pripada skupini specijalnih rakija te se proizvodi aromatiziranjem vinskog destilata, komovice, lozovače ili voćnih rakija odabranim aromatičnim biljem ili njihovim maceratima. U ovom radu analiziran je aromatični profil rakija travarica kupljenih na tržištu Republike Hrvatske. Hlapljivi spojevi izolirani su pomoću mikroekstrakcije vršnih para na krutoj fazi (HS-SPME) korištenjem (CAR/PDMS) i (DVB/CAR/PDMS) vlakana, te analizirani vezanim sustavom plinska kromatografija-masena spektrometrija (GC-MS). Identificirani hlapljivi spojevi pripadaju sljedećim skupinama spojeva: esteri, alkoholi, ketoni, ugljikovodici, fenoli i eteri. Među hlapljivim spojevima dominantni su bili esteri, a najzastupljeniji spoj u svim uzorcima bio je etil-dekanoat koji je karakteriziran voćnim aromama. Dobiveni rezultati ukazali su na postojanje razlika u aromatičnom profilu rakija travarica, što je bilo i očekivano obzirom da svaki proizvođač ima svoju recepturu i specifičnost u tehnološkom procesu proizvodnje.

Ključne riječi: hlapljivi spojevi, rakija travarica, HS-SPME/GC-MS

Uvod

Jaka alkoholna pića (JAP) su pića namijenjena za ljudsku potrošnju, imaju posebna senzorska svojstva i sadrže minimalno 15 % vol. alkohola. Proizvode se direktno, destilacijom prevrelih sirovina poljoprivrednog podrijetla koje sadrže šećer ili maceracijom aromatičnog bilja i/ili voćnih plodova u etilnom alkoholu (Pravilnik o jakim alkoholnim pićima, NN 61/09).

Prema porijeklu sirovine i načinu proizvodnje jaka alkoholna pića se dijele na: rakije, rakije po posebnim postupcima, jaka alkoholna pića po posebnim postupcima, likere i miješana jaka alkoholna pića (Lučić, 1986). Rakije su alkoholna pića vrlo popularna na našim prostorima i često ukazuju na prepoznatljivost pojedinih regija (Slika 1).



Slika 1. Podjela rakija
Figure 1. Classification of brandies

Kad je riječ o voćnim rakijama, najčešće voće koje se koristi za njihovu proizvodnju su šljive, kruške, dunje, višnje i jabuke. Uz navedeno, visoki udio u proizvodnji rakija imaju rakije od grožđa među kojima su uglavnom prisutna dva tipa: lozovača koja se dobiva fermentacijom groždanog masulja i komovica proizvedena iz komine grožđa nakon proizvodnje vina (Stamenković i Stojanović, 2020). Vrlo često proizvođači u ova dva tipa rakija dodaju različito ljekovito i aromatično bilje, voće, med i druge dodatke. Tako su na prostorima Hrvatske poznate i vrlo cijenjene specijalne rakije travarice koje se proizvode maceriranjem raznog aromatičnog bilja u baznom alkoholu tj. rakiji, a najčešće se koriste rakije od grožđa poput vinskog destilata, lozovače ili komovice.

Za proizvodnju travarice najčešće se koriste rakije od grožđa, različiti macerati, perkolati, infuzije i drugi oblici ekstrakata ljekovitih biljaka. U proizvodnji travarice mogu se koristiti i voćne rakije. Boja rakije dolazi od obojenih tvari iz biljaka koje se izdvajaju maceracijom u otopini alkohola (Mujić, 2010). Za maceraciju se mogu upotrijebiti cijele biljke ili pojedini dijelovi biljke kao što su listovi, plodovi, kora, stabljika, cvjetovi ili korijen. Biljke koje se najčešće koriste za proizvodnju travarice su: pelin, anis, komorač, borovica, kadulja, vrisak, divlji ružmarin, smokva, smrika, smilje, metvica, srčanik, anđelika i mnoge druge (Pavlović, 2019). Svaki proizvođač ima svoju specifičnost u odabiru aromatičnog bilja za izradu macerata pri proizvodnji rakija travarica, no svima je zajedničko da koriste biljne vrste koje su karakteristične za goransko-mediteransko podneblje (Mihaljević Žulj, 2019).

Materijali i metode

Materijal za potrebe istraživanja u ovom radu su rakije travarice, četiri uzorka označena U1 – U4, kupljene na maloprodajnom tržištu u Republici Hrvatskoj.

Izolacija hlapljivih spojeva mikroekstrakcijom vršnih para na krutoj fazi

Hlapljivi spojevi izolirani su pomoću mikroekstrakcije vršnih para na čvrstoj fazi (HS-SPME) pri čemu su korištena dva vlakna: vlakno s ovojnicom karboksen/polidimetilsiloksan (CAR/PDMS) i vlakno s ovojnicom divinilbenzen/karboksen/polidimetilsiloksan (DVB/CAR/PDMS), oba duljine 5 cm. Prije upotrebe vlakna su aktivirana kondicioniranjem u skladu s uputama proizvođača (Supelco Co., SAD), nakon čega su korištena za izolaciju vršnih para uzoraka.

Postupak: 5 mL uzorka stavljeno je u staklenu vialicu od 15 mL. Vialica je hermetički zatvorena PTFE/silikon septom te postavljena u vodenu kupelj pri 60 °C, a sadržaj je miješan pomoću magnetske miješalice (Heidolph MR Hei-Standard, Njemačka) pri 1000 o/min.

Nakon kondicioniranja uzorka (15 min) SPME igla je postavljena u vialicu s uzorkom te je provedena ekstrakcija vršnih para u vremenu od 40 min. Nakon uzorkovanja SPME vlakno je vraćeno u iglu, izvučeno iz vialice i odmah postavljeno u GC injektor (250 °C, 7 min) gdje je došlo do toplinske desorpcije ekstrahiranih spojeva izravno u GC kolonu.

Analiza hlapljivih spojeva – Plinska kromatografija-spektrometrija masa

Analiza hlapljivih spojeva rakija travarica provedena je vezanim sustavom plinska kromatografija-spektrometrija masa (GC-MS) proizvođača Agilent Technologies, SAD (plinski kromatograf model 7829A i maseni spektrometar model 5977E), spojenim na računalo. Temperatura injektora u *splitless* modu bila je 250 °C, a vrijeme desorpcije hlapljivih spojeva 7 minuta. Separacija hlapljivih spojeva izvedena je na HP-5MS nepolarnoj koloni (duljine 30 m, promjera 0,25 mm i debljine sloja stacionarne faze 0,25 µm) sa sljedećim temperaturnim programom: 2 minute izotermno pri 70 °C, zatim od 70 °C do 200 °C s porastom od 3 °C/min. Ukupno vrijeme trajanja programa je bilo 60 min. Uvjeti rada MS: elektronska ionizacija 70 eV, temperatura MS Quada 150 °C, temperatura ionskog izvora 230 °C. Identifikacija hlapljivih spojeva provedena je na temelju njihovih retencijskih vremena (RT) i usporedbom masenih spektara tih spojeva s masenim spektrima iz komercijalnih biblioteka masenih spektara (Wiley 09 i NIST17) i/ili usporedbom s masenim spektrima iz literature.

Rezultati i rasprava

Rezultati ispitivanja hlapljivih spojeva rakija travarica prikazani su kao srednja vrijednost ukupne površine pikova tri ponavljanja. Udio svakog spoja u uzorku (%) predstavlja udio površine pika toga spoja u ukupnoj površini svih pikova. Spojevi su poredani po redoslijedu eluiranja (retencijsko vrijeme) s kolone HP-5MS (Tablica 1). Prema dobivenim rezultatima identificirani hlapljivi spojevi mogu se svrstati u sljedeće skupine spojeva: esteri, alkoholi, ketoni, ugljikovodici, fenoli i eteri. Upravo ovi spojevi doprinose aromi, a time i kvaliteti alkoholnih pića (Raičević i sur., 2022). Iz tablice 1 je vidljivo kako su među identificiranim spojevima esteri najzastupljenija skupina te značajno utječu na aromu jakih alkoholnih pića. Među esterima ističu se etilni esteri masnih kiselina kao što su etil-heksanoat, etil-oktanoat i etil-dekanoat koji nastaju tijekom fermentacije (Lončarić i sur., 2022) i kasnije tijekom dozrijevanja alkoholnih pića (Zhao i sur., 2009). Etil-dekanoat prisutan je u najvećem relativnom udjelu te je identificiran u svim ispitanim uzorcima korištenjem obaju vlakana. Slične rezultate s obzirom na sadržaj estera dobili su i Matijašević i sur. (2019) te Raičević i sur. (2022) koji su istraživali sastav aromatičnih tvari rakije lozovače proizvedene od različitih sorti grožđa. Etilni esteri doprinose aromi destiliranih alkoholnih pića i spadaju u skupinu sekundarnih (fermentacijskih) aroma. Odlikuju se izraženim voćnim i cvjetnim aromama, a njihov se sadržaj u alkoholnim pićima dozrijevanjem i odležavanjem uglavnom povećava (Tešević i sur., 2005). Slično potvrđuju i rezultati istraživanja aromatičnog profila vinskih destilata sorti *Syrah* i *Cabernet Sauvignon* Lončarića i sur. (2022). Etil-oktanoat i etil-dekanoat smatraju se najvećim doprinositeljima arome jakih alkoholnih pića. Uz navedene estere, etil-heksanoat čini aktivnu komponentu arome u destilatima marelice i jabuke (Pavlović, 2020). Od ostalih estera izdvaja se etil-dodekanoat koji je nositelj „svježih“ voćnih mirisa, a najčešće ga se povezuje s mirisom kruške (Raičević i sur., 2022). U skupini alkohola najzastupljeniji u svim uzorcima bio je izoamilni alkohol. Taj alkohol vjerojatno potječe iz vinskog destilata tijekom procesa fermentacije, što pokazuju i rezultati koje su dobili Zhao i sur. (2009) te Lončarić i sur. (2022) koji su istraživali aromatični profil vinskih destilata. U uzorcima 1 i 4 utvrđena je prisutnost heksan-1-ola. Prema literaturi, C6 alkoholi uglavnom potječu iz predfermentativnih procesa tijekom proizvodnje vina i značajne količine ovih spojeva se ekstrahiraju iz pokožice grožđa tijekom maceracije. U alkoholnim pićima heksan-1-ol se povezuje s zelenim i travnatim aromama (Matijašević i sur., 2019) i smatra se tipičnim indikatorom svježe destiliranih destilata (Tian i sur., 2022). Mentol i timol (fenol) identificirani su samo u uzorku 1. Obzirom da navedeni spojevi nisu identificirani u čistim vinskim destilatima (Rodríguez-Solana i sur., 2016), može se zaključiti da su menta i timijan sastavni dio biljnog materijala za maceraciju jer su ti spojevi upravo za njih karakteristični. Linalol je identificiran samo u uzorku 1, a prema Rodríguez-Solana i sur. (2016) karakterističan je za biljku korijandar i koru naranče.

Tablica 1. Hlapljivi aromatični spojevi rakija Travarica
Table 1. Volatile aromatic compounds identified in Travarica brandies

RI	Sastojak	Udio (%) (DVB/CAR/PDMS vlakno)				Udio (%) (CAR/PDMS vlakno)			
		U1	U2	U3	U4	U1	U2	U3	U4
612	Etil-acetat	2,85	4,36	-	-	5,02	4,69	-	-
622	2-Metilpropan-1-ol	0,52	0,92	-	-	1,51	1,62	-	-
714	Etil-propanoat	0,13	-	-	-	0,20	-	-	-
725	Dietil-acetal	0,15	0,63	0,59	1,09	0,83	0,57	0,69	1,66
730	Izoamil-alkohol	5,53	14,37	9,07	23,74	14,84	10,17	7,29	31,79
802	Etil-butanoat	0,21	-	-	-	0,24	-	-	-
867	Heksan-1-ol	0,12	-	-	1,12	-	-	-	1,53
876	Izoamil-acetat	0,22	-	-	0,78	0,24	-	-	0,86
947	1-Butoksipropan-2-ol	-	8,58	-	-	-	-	-	-
996	Etil-heksanoat	0,76	-	0,28	0,85	0,7	-	-	0,91
1031	<i>p</i> -Cimen	0,35	-	-	-	-	-	-	-
1035	Limonen	0,71	-	0,31	-	0,53	-	-	-
1039	1,8-Cineol	0,22	0,61	0,35	-	-	0,64	-	-
1058	Dihidromircenol	-	1,46	-	-	-	-	-	-
1097	3,7-dimetiloktan-3-ol	-	0,51	-	-	-	-	-	-
1103	Linalol	0,34	-	-	-	-	-	-	-
1105	α -Tujon	-	0,73	0,79	0,80	-	-	0,92	-
1105	β -Tujon	0,26	-	0,81	0,72	-	1,19	0,91	-
1160	<i>p</i> -Mentol	0,37	-	0,54	-	-	-	0,57	-
1181	Mentol	0,54	-	-	-	-	-	-	-
1182	Terpinen-4-ol	0,34	-	-	-	-	-	-	-
1191	Dietil-sukcinat	0,21	-	-	-	-	-	-	-
1196	Etil-oktanoat	10,66	5,22	7,17	8,13	9,81	3,51	8,45	7,09
1203	Estragol	-	5,11	14,1	8,24	-	6,15	9,36	4,93
1232	β -Citronelol	-	11,43	-	-	-	-	-	-
1256	Feniletil-acetat	0,33	-	-	-	-	-	-	-
1271	Ciklooktan	-	0,69	-	-	-	-	-	-
1283	<i>trans</i> -Anetol	8,95	5,22	-	20,98	3,18	3,92	-	17,58
1297	Timol	1,01	-	-	-	-	-	-	-
1397	Etil-dekanoat	41,29	22,24	50,21	26,68	39,31	49,73	56,06	26,47
1422	<i>trans</i> - β -Kariofilen	0,32	-	-	-	-	-	-	-
1450	3-metilbutil-oktanoat	0,39	-	0,34	-	-	-	-	-
1456	α -Humulen	0,36	-	-	-	-	-	-	-
1473	Ciklododekan	-	2,35	-	-	-	-	-	-
1526	δ -Kadinen	0,53	-	-	-	0,73	-	-	-
1597	Etil-dodekanoat	16,07	15,50	12,61	5,99	18,38	15,91	13,81	6,39
1641	Izoamil-dekanoat	0,52	-	-	-	0,74	-	-	-
1793	Etil-tetradekanoat	1,00	-	0,47	-	1,53	-	-	-
1993	Etil-heksadekanoat	0,63	-	0,45	-	1,16	0,92	-	-
Broj sastojaka		31	17	15	12	17	12	9	10
Ukupno identificirano		95,89	99,93	98,09	99,12	98,95	99,02	98,06	99,21

RI – retencijski indeks; U1-U4 – uzorci rakija travarica različitih proizvođača; “-” nije detektiran.

RI – retention index; U1-U4 – Travarica brandies samples of different producers; “-” not detected.

Među ketonima identificiranim u rakijama travaricama vrijedi istaknuti α - i β -tujon koji su prisutni u eteričnim uljima gorkog pelina (*Artemisia absinthium* L.) i ljekovite kadulje (*Salvia officinalis* L.) (Ćerić, 2015). Obzirom da su ove dvije biljne vrste

nezaobilazan sastojak rakija travarica, bilo je za očekivati da će se u njima identificirati spomenuti spojevi. U skupini etera značajno mjesto pripada *trans*-anetolu koji je identificiran u tri uzorka (uzorci 1, 2 i 4) te estragolu (*p*-alilanol koji je također identificiran u tri uzorka (uzorci 2, 3 i 4). Anetol je redoviti sastojak eteričnih ulja biljaka anisa i komorača (Damjanović Vratnica i sur., 2005), a odlikuje se izraženom slatkastom aromom. Estragol je karakterističan za eterično ulje klinčića što upućuje na upotrebu ovog biljnog materijala u smjesi bilja za maceraciju (Pavlović, 2020). Dietil-acetal ili, kraće, acetal (1,1-dietoksietan) je također eter, a identificiran je u svim ispitanim uzorcima korištenjem obaju vlakana. 1,8-Cineol, kao predstavnik cikloetera, identificiran je u tri od četiri ispitana uzorka (osim u uzorku 4), a nalazi se u eteričnim uljima mnogih biljnih vrsta poput kadulje, pelina i eukaliptusa (Davis, 2010). U skupini ugljikovodika vrijedno je istaknuti limonen koji je karakterističan sastojak biljnih vrsta iz rodova *Artemisia*, *Mentha* i *Pinus* (Erasto i Viljoen, 2008), što upućuje na korištenje pelina i mente u smjesi biljnog materijala za pripravu travarica.

Zaključci

Na temelju rezultata istraživanja utvrđeno je kako glavni hlapljivi spojevi uzoraka rakija travarica pripadaju sljedećim skupinama spojeva: esteri, alkoholi, ketoni, ugljikovodici, fenoli i eteri. Među hlapljivim spojevima dominantni su bili esteri, i to etilni esteri masnih kiselina. Najzastupljeniji spoj u svim uzorcima bio je etil-dekanoat koji je karakteriziran voćnim aromama. Od ostalih identificiranih hlapljivih spojeva ističu se α - i β -tujon, *p*-menton, *trans*-anetol i estragol koji ukazuju na upotrebu aromatičnog bilja poput anisa, kadulje, pelina, mente i ostalih vrsta u proizvodnji ovih rakija. Utvrđene razlike u aromatičnim profilima ispitanih uzoraka rakija travarica upućuju na zaključak kako svaki proizvođač ima svojstvenu recepturu kao i specifičnost u tehnološkom procesu proizvodnje.

Literatura

- Ćerić, J. (2015): Kemijski sastav i antimikrobno djelovanje eteričnih ulja iz biljnih vrsta rodova *Salvia* L. i *Thymus* L., *Specijalistički rad*, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Damjanović Vratnica, B., Lepojević, Ž., Živković, V., Tolić, A. (2005): Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation, *Food Chem.* 92, 143-149.
- Davis, E.M. (2010): Advances in the Enzymology of Monoterpene Cyclization Reactions. In: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Vol.1, Mander, L., Liu, H.W. (ed.), Oxford, UK: Elsevier Ltd., pp. 585-608.
- Erasto, P., Viljoen, A.M. (2008): Limonene - A Review: Biosynthetic, Ecological and Pharmacological Relevance, *Nat. Prod. Commun.* 3 (7), 1193-1202.

- Lončarić, A., Patljak, M., Blažević, A., Jozinović, A., Babić, J., Šubarić, D., Pichler, A., Flanjak, I., Kujundžić, T., Miličević, B. (2022): Changes in Volatile Compounds during Grape Brandy Production from ‘Cabernet Sauvignon’ and ‘Syrah’ Grape Varieties, *Processes* 10 (5), 988.
- Lučić, R. (1986): Proizvodnja jakih alkoholnih pića, Beograd, Srbija: Nolit.
- Matijašević, S., Popović-Djordjević, J., Ristić, R., Ćirković, D., Ćirković, B., Popović, T. (2019): Volatile Aroma Compounds of Brandy ‘Lozovača’ Produced from Muscat Table Grapevine Cultivars (*Vitis vinifera* L.), *Molecules* 24 (13), 2485.
- Mihaljević Žulj, M. (2019): Aromatične rakije travarice, *Gospodarski list* 8. URL: <https://gospodarski.hr/rubrike/vocarstvo-rubrike/aromaticne-rakije-travarice/> (21. 10. 2022.)
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2009): Pravilnik o jakim alkoholnim pićima, NN 61/09, Narodne novine, Zagreb.
- Mujić, I. (2010): Tehnologija proizvodnje jakih alkoholnih pića, Rijeka, Hrvatska: Veleučilište u Rijeci.
- Pavlović, Ž. (2020): Usporedna ispitivanja hlapljivih spojeva rakije travarice, *Diplomski rad*, Kemijsko-tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu.
- Raičević, D., Popović, T., Jančić, D., Šuković, D., Pajović-Šćepanović, R. (2022): The Impact of Type of Brandy on the Volatile Aroma Compounds and Sensory Properties of Grape Brandy in Montenegro, *Molecules* 27 (9), 2974.
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J.M., Domínguez, J.M., Cortés-Diéguez, S. (2016): Phenolic compounds and aroma-impact odorants in herb liqueurs elaborated by maceration of aromatic and medicinal plants in grape marc distillates: Analytical Profile of Herb Liqueurs, *J. Inst. Brew.* 122 (4), 653-660.
- Stamenković, J., Stojanović, G. (2020): Volatile Compounds of Homemade Grape Brandy Determined by GC-MS Analysis, *Chemia Naissensis* 3 (1), 107-116.
- Tešević, V., Nikićević, N., Jovanović, A., Djoković, D., Vujisić, Lj., Vučković, I., Banić, M. (2005): Volatile Components from Old Plum Brandies, *Food Technol. Biotechnol.* 43 (4), 367-372.
- Tian, T.T., Ruan, S.L., Zhao, Y.P., Li, J.M., Yang, C., Cao, H. (2022): Multi-objective evaluation of freshly distilled brandy: Characterisation and distribution patterns of key odour-active compounds, *Food Chem X* 14 (18), 100276.
- Zhao, Y., Xu, Y., Li, J., Fan, W., Jiang, W. (2009): Profile of Volatile Compounds in 11 Brandies by Headspace Solid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *J. Food sci.* 74 (2), C90-9.

Volatile compounds of brandy travarica

Mladenka Šarolić^{1*}, Željana Pavlović¹, Zvonimir Marijanović¹,
 Ani Radonić¹, Žana Delić²

¹University of Split, Faculty of Chemistry and Technology, Ruđera Boškovića 35,
 21000 Split, Croatia

²Marko Marulić Polytechnic in Knin, Petra Krešimira IV 30, 22300 Knin, Croatia
 *Corresponding author: mladenka.sarolic@ktf-split.hr

original scientific paper

Summary

Travarica is a strong alcoholic beverage that has a long tradition of production in Croatia, especially in Dalmatia, Istria and the islands. It belongs to the group of special brandies and is produced by flavoring grape brandies or fruit brandies with selected aromatic herbs or their macerates. In this paper, the aromatic profile of four Travarica brandies purchased on the domestic market was analyzed. Volatile compounds were isolated by solid phase microextraction (HS-SPME) using CAR/PDMS and DVB/CAR/PDMS fibers, and analyzed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The identified volatile compounds belong to the following chemical groups: esters, alcohols, ketones, hydrocarbons, phenols and ethers. Among the volatile compounds, esters were predominant. The most abundant compound in all samples was ethyl decanoate, which is characterized by fruity aromas. The obtained results indicated the existence of differences in the aromatic profile of Travarica brandies, which was expected considering that each manufacturer has its own recipe and specificity in the technological production process.

Keywords: volatile compounds, Travarica brandy, HS-SPME/GC-MS

Senzorska, fizikalno - kemijska i mikrobiološka kvaliteta svježih sireva na tržištu

**Svjetlana Škrabal*, Maja Ergović Ravančić, Valentina Obradović,
Helena Marčetić, Tanja Abramović**

*Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet turizma i ruralnog razvoja,
Vukovarska 17, 34000 Požega, Hrvatska*

**Dopisni autor: sskrabal@frr.hr*

stručni rad

Sažetak

Svježi sir je visoko vrijedna namirnica. Potrošači u Republici Hrvatskoj ga relativno često konzumiraju u svježem stanju. U ovom radu je analizirano pet uzoraka svježih sireva različitih proizvođača. Uzorci su kupljeni u jednom trgovačkom centru. Cilj istraživanja je bio utvrditi kakvoću svježih sireva na tržištu, te ju usporediti sa zakonskom regulativom. Uzorci sireva su analizirani na kiselost, udio vode, udio masti, senzorska svojstva, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, Koagulaza pozitivni stafilokoke, *Listeria monocytogenes*, te kvasce i plijesni. Rezultati istraživanja su pokazali da su svi analizirani uzorci sireva bili u skladu s mikrobiološkim kriterijima i zahtjevima za fizikalno – kemijskim parametrima kakvoće. Prilikom senzorskog ocjenjivanja dobili su različite ocjene. Upravo njihova senzorska svojstva biti će presudna pri odabiru pojedinog sira za konzumaciju. S obzirom da su svježi sirevi lakao pokvarljiva namirnica specifičnih senzorskih svojstava, njihova proizvodnja je vrlo zahtjevan tehnološki proces u kom se moraju strogo poštivati pravila dobre proizvođačke i higijenske prakse.

Ključne riječi: svježi sir, fizikalno kemijski parametri, mikrobiološka kvaliteta, senzorska svojstva

Uvod

Mlijeko je biološka tekućina vrlo složenog kemijskog sastava koju izlučuje mliječna žlijezda ženki sisavaca određeno vrijeme nakon poroda, žućkasto - bijele je boje, karakterističnog okusa i mirisa (Kalit, 2015). Standardizacija mlijeka je postupak naravnivanja sastojaka mlijeka u proizvodnji sireva kako bi se odnos između kazeina i masti u mlijeku za sirenje doveo u optimalni odnos u omjeru 0,7 : 1, odnosno ukupnih proteina naspram masti u omjeru 0,9 : 1 (Miletić, 1994). Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 141/2013), sirevi su svježi proizvodi ili proizvodi s različitim stupnjem zrelosti koji se proizvode odvajanjem sirutke nakon koagulacije mlijeka (kravljeg, ovčjeg, kozjeg, bivoljeg mlijeka i/ili njihovih mješavina), obranog ili djelomično obranog mlijeka, vrhnja, sirutke, ili kombinacijom navedenih sirovina. Bit proizvodnje sira je sirenje ili grušenje mlijeka odnosno provedba koagulacije proteina (sirutke ili stepke) i oblikovanje sirnoga gruš u sirno zrno uz izdvajanje nastale sirutke i eventualno soljenje sira nakon čega se dobiva svježi ili nezreli sir (Tratinik, 1998). Uslijed homogenizacije mlijeka za proizvodnju svježeg sira, dolazi

do niza fizikalno - kemijskih promjena u mlijeku kao što su: intenzivnija bijela boja, veća viskoznost, lakša probavljivost, veća površinska napetost, smanjuje se leđište mlijeka, smanjuju se sposobnosti grušanja kazeina i stabilnost proteina, te je povećana mogućnost djelovanja lipolize (Tratinik i Božanić, 2012). pasterizaciju mlijeka prije prerade sira preporučuje se ili je zahtjev zakonske regulative mnogih zemlja, jer se time štiti zdravlje potrošača, te se dobiva siguran proizvod ujednačene kvalitete. Međutim, time se uništavaju prirodno sadržani mikroorganizmi, te djelomično ili potpuno inaktiviraju autohtoni enzimi koji doprinose specifičnom okusu sira (Lau i sur., 1991; Mc Sweeney i sur., 1993; Ortigosa i sur., 2001; Fernandez-Garcia, 2002). Svježi sirevi pripadaju kategoriji mekih nezrelih sireva. Sadrže visokovrijedne bjelančevine, lako su probavljivi, imaju nizak udio masti, nemaju dodanih soli, imaju nisku energetska vrijednost, cjenovno su prihvatljivi i odmah spremni za konzumaciju (Barukčić i sur. 2020). Tipičan svježi sir karakterističnog je srednje kiselog, osvježavajućeg okusa, bijele je boje i konzistencije koja se «lista». pH vrijednost svježeg sira iznosi oko 4,8 te je blizu izoelektrične točke kazeina, što konačnom proizvodu daje prepoznatljivu kiselost koja se odražava ne samo u okusu, već i u mirisu (Cindrić, 1997). Nedostatak svježih sireva je kratak rok trajanja i potreba čuvanja na niskim temperaturama (0 – 8 °C). Njihovo kvarenje uzrokuju mikroorganizmi kojima pogoduje niska pH vrijednost svježeg sira (> 5) i visok aktivitet vode ($a_w = 0,95 - 0,97$) (Dermiki i sur., 2008). Mikrobiološko kvarenje sira izazivaju najčešće kvasci uz prisustvo kisika (Ledenbach i Marshall, 2009). S obzirom da svježi sir nema dodanih soli, kvarenje mogu izazvati i patogene bakterije poput koagulaza pozitivnih stafilocoka (*Staphylococcus aureus*) ili gramnegativne psihotrofne bakterije (*Enterobacteriaceae*) (Samardžija i sur., 2012).

Materijali i metode

Priprema uzoraka

U svrhu provedbe ovog istraživanja kupljeno je pet uzoraka svježeg posnog sira i čuvano na temperaturi 4 °C, te su drugi dan započeti svi analitički postupci i provedena senzorska analiza. Svi uzorci su bili u roku trajanja (upotrijebiti do). Uzorci sira su bili različitih proizvođača. Svi uzorci laboratorijski su analizirani na osnovne parametre kvalitete: udio vode, udio mliječne masti i kiselost (pH i °SH), mikrobiološke parametre: *Salmonella* spp., *Enterobacteriaceae*, Koagulaza pozitivni stafilocoki, Kvasci i plijesni, *Listeria monocytogenes* i senzorske parametre.

Kemijska analiza

Kiselost sira određena je pH metrom Metler Toledo, prema postupku koji su opisali Božanić i sur. (2010) (titracijska kiselost prema AOAC standardnoj metodi (2007)), prema kojoj se miješa sir s vodom temp. 40 °C i homogenizira, te alikvot titrira s 0,1M

NaOH uz fenolftalein kao indikator (AOAC Metoda 92.124; 2007). Ukupan udio vode određen je sušenjem uzorka na 105 ± 2 °C do postizanja konstantne mase (ISO 5534:2004). Mliječna mast određena je butirometrijskom metodom prema Gerberu (ISO 3432:2008).

Mikrobiološka analiza

Uzorci svježeg sira su analizirani na pojedine mikroorganizme prema preporučenim i obveznim mikrobiološkim parametrima prema Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) i Zakonu o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 83/22) (Tablica 1). Također, prema navedenoj zakonskoj regulativi izrađen je plan uzorkovanja (Tablica 2).

Tablica 1. Analizirani mikroorganizmi i metode mikrobiološke analize

Table 1. Methods for microbiological analysis

Mikroorganizam	Metoda
<i>Salmonella</i> spp.	HRN EN ISO 6579-1:2017
<i>Escherichia coli</i>	HRN ISO 21528-2:2017
Koagulaza pozitivni stafilocoki/ <i>Staphylococcus aureus</i>	HRN EN ISO 6888-1:2004
Kvasci i plijesni	HRN ISO 21527-1:2012 HRN ISO 21527-2:2012
<i>Listeria monocytogenes</i>	HRN EN ISO 11290-2:2017

Tablica 2. Plan uzorkovanja i kriteriji za meke (svježi) sirevi od pasteriziranog mlijeka (Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, 2011)

Table 2. Sampling plan and criteria for soft (fresh) cheeses made from pasteurized milk (Guidance for microbiological criteria for food, 2011)

Preporučeni parametar	Plan uzorkovanja		Kriteriji
	n	c	
<i>Salmonella</i> spp.	5	0	n.n. u 25 g
<i>Escherichia coli</i>	5	2	m=10 cfu/g; M=10 ² cfu/g
Koagulaza pozitivni stafilocoki <i>Staphylococcus aureus</i>	5	2	m=10 cfu/g; M=10 ² cfu/g
Kvasci	5	1	m=10 ² cfu/g; M=10 ³ cfu/g
Plijesni	5	1	m=10 cfu/g; M=10 ² cfu/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	M=0 cfu/25g

n - broj elementarnih jedinica uzorka koji čine uzorak, c - broj jedinica uzorka, gdje se broj bakterija može nalaziti između "m" i "M", m - granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim, M - granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim; n.n.- nije nađeno

Senzorska analiza

Senzorsko ocjenjivanje sira provela je skupina od pet panelista koristeći metodu ISO 22935-2:2009 (Hershlet i sur., 2005), prema kojoj se koristi sustav bodovanja. Za svako svojstvo računa se srednja ocjena koja se zatim množi s faktorom značajnosti prethodno utvrđenim za to svojstvo i tako se dobiju ponderirani bodovi. Zbroj svih bodova pomnoženih s odgovarajućim faktorom uzima se kao konačna ocjena senzorske analize, a maksimalan broj bodova koje neki uzorak može dobiti iznosi 20. Izračunavanjem ukupnih bodova dobiva se kategorija kakvoće sira (Tablica 3) (Božanić i sur., 2010).

Tablica 3. Kategorije kakvoće prema rasponu ponderiranih bodova (Božanić i sur., 2010)

Table 3. Quality categories according to the range of weighted points (Božanić et al., 2010)

Kategorija kakvoće	Raspon ponderiranih bodova
Izvrсна	17,6 do 20
Dobra	15,2 do 17,5
Osrednja	13,2 do 15,1
Prihvatljiva	11,2 do 13,1
Neprihvatljiva	manje od 11,2

Rezultati i rasprava

Prema Pravilniku o sirevima i proizvodima od sireva (NN 141/13), a s obzirom na udio vode u bezmasnoj tvari sira, vrijednost udjela vode za svježi sir iznosi u rasponu od 69 - 85 %. Iz dobivenih rezultata (Tablica 4), vidljivo je da prikazane vrijednosti za udio vode odgovaraju vrijednostima za svježi sir koje propisuje Pravilnik, a iznose u rasponu od 79 - 83 %. S obzirom na visok udio vode u svježem siru, za očekivati je da će biti podložniji mikrobiološkom kvarenju (Cermiki i sur., 2008).

Tablica 4. Rezultati kemijske analize svježih sireva

Table 4. Results of chemical analysis of soft (fresh) cheeses

Broj uzorka	Udio vode (%)	Kiselost (°SH)	pH	Udio masti (%)
1	79	7,5	4,5	1,5
2	82	8,0	4,8	1,4
3	83	8,2	4,9	0,5
4	81,3	7,9	4,8	1,9
5	81,5	7,8	4,9	2,0

pH vrijednost proučavanih uzoraka kretala se u rasponu od 4,5 do 4,9 dok su razlike u titracijskoj kiselosti bile nešto veće i to u rasponu između 7,5 do 8,2 °SH. U istraživanju koje su proveli Lante i sur. (2006) pH talijanskih svježih sireva Crescenza i Squacquerone iznosio je 5,05-5,21, a sirevi proizvedeni u ovom istraživanju bili su

nešto kiselij. Kiselost sira utječe na nastajanje karakteristične arome, a niske pH vrijednosti djeluju inhibitorno na rast mikroorganizama ili usporavaju njihov rast (Babić, 2009). U skladu s navedenom tvrdnjom iz rezultata istraživanja (Tablice 4 i 5) vidljivo je da su uzorci koji su imali nižu pH vrijednost imali i bolje rezultate mikrobiološke analize. Specifičan okus kiselosti svježeg sira je poželjno senzorsko svojstvo. Sama kiselost se tijekom vremena skladištenja sira povećava. Kontrolom ovog parametra ujedno se i kontrolira starost sira i uvjeti skladištenja. Rezultat veće titracijske kiselosti je najčešće i rezultat većeg udjela proteina, fosfata i kalcija u mlijeku što ne utječe na smanjenje pH vrijednosti mlijeka (Babić, 2009). Rezultati istraživanja (Tablica 4) pokazuju da je uzorak 3 imao veću vrijednost za kiselost izreženu u °SH, a nižu pH vrijednost u odnosu na ostale uzorke. Također, imao je i najniži udio mliječne masti i vode. Proučavani kemijski parametri upućuju na pretpostavku da je u navedenom uzorku u odnosu na ostale uzorke veći udio proteina što je rezultiralo smanjenjem pH vrijednosti. Uzorak br. 1 koji je imao najniži udio vode, najnižu kiselost i najbolje rezultate mikrobiološke analize dobio je i najbolje ocjene prilikom senzorskog ocjenjivanja. Starter kulture koje se koriste u proizvodnji sira uvjetuju niz biokemijskih procesa koje pogoduju razvoju poželjnog okusa sira (Smit i sur., 2005).

Tablica 5. Rezultati mikrobiološke analize svježih sireva

Table 5. Results of microbiological analysis of soft (fresh) cheeses

Broj uzorka	SS	EC		KPS		K		P		LM
	(cfu/25 g)	(cfu/25 g)		(cfu/25 g)		(cfu/25 g)		(cfu/25 g)		(cfu/25 g)
	n.n.	m	M	m	M	m	M	m	M	M
1	n.n.	5	0	5	0	5	0	5	0	0
2	n.n.	4	1	5	0	5	0	5	0	0
3	n.n.	3	0	4	1	4	1	5	0	0
4	n.n.	5	0	4	1	5	0	5	0	0
5	n.n.	4	1	3	2	4	1	5	0	0

n.n. – nije nađeno; SS – *Salmonella spp.*; EC – *Escherichia coli*; KPS - koagulaza pozitivni stafilokoki; K - kvasci; P – plijesni; LM - *Listeria monocytogene*

Tablica 6. Rezultati senzorske analize svježih sireva

Table 6. Results of sensory analysis of soft (fresh) cheeses

Broj uzorka	Senzorsko svojstvo (ponderirani bodovi)					
	Opći izgled (1)	Boja (2)	Miris (3)	Konzistencija (4)	Okus (10)	Ukupno (20)
1	1	2	3	4	10	20
2	1	2	2,88	4	9	18,88
3	0,95	1	2,88	3,80	9	17,63
4	0,95	1	3	4	10	18,95
5	1	2	2,88	3,80	8	17,68

Prema israživanjima Havranek i sur. (2014) udio masti utječe na aromu i konzistenciju sira. Također, navode da mast u siru otapa spojeve nastale hidrolitičkom razgradnjom masti i proteina te sprječava nastajanje i stezanje čvrstoga proteinskoga 57 gumenog matriksa, koji čini kontinuiranu fazu sira, a koji bi bez mliječne masti u svojoj strukturi bio izrazito gumaste konzistencije. Rezultati istraživanja su u skladu s navedenim tvrdnjama s izuzetkom uzorka 5 koji je imao najviši udio mast (2,0 %), ali je dobio najniže ocjene za miris, konzistenciju i okus (Tablica 6). Na promjene u navedenim senzorskim svojstvima najvjerojatnije je utjecao razvoj nepoželjnih mikroorganizama Koagulaza pozitivnih stafilokoka i kvasaca koji su analizom detektirani, ali su bili u granicama dopuštenog (Tablica 5). Kvasci također mogu biti uzročnici kvarenja, intenzivne proizvodnje plina, pojave stranog okusa i sluzi (Fleet, 1990). Prisutnost mikroorganizma *Escherichia coli* u hrani posljedica je kontaminacije sirovina, te nedovoljne higijene tijekom proizvodnje (Bardasi i sur., 2015). U uzorcima 2, 3 i 5 detektirana je *Escherichia coli*, ali u granicama dozvoljenih vrijednosti (M).

Zaključci

Uzorci svih analiziranih svježih posnih sireva bili su zadovoljavajuće kvalitete, mikrobiološki ispravni, te senzorski prihvatljivi. Iz toga proizlazi zaključak da su u proizvodnji poštivani standardi kvalitete i higijenski standardi proizvodnje. Do mikrobiološkog kvarenja i promjena u senzorskim svojstvima može doći i za vrijeme čuvanja sireva uslijed neadekvatnog skladištenja na prodajnim mjestima. Uzorci sira koji u kojima je detektirana *Escherichia coli* u dozvoljenim granicama, dobili su i nešto niže ocjene prilikom senzorskog ocjenjivanja. Navedeno upućuje na zaključak da je prisutnost *Escherichia coli* utjecalo na smanjenje senzorske kvalitete sira, premda su i ti sirevi još uvijek zadovoljavajućih svih parametara senzorske kvalitete. U ovom slučaju, istraživanje je pokazalo da su svježiji sirevi visokokvalitetna namirnica sigurna za konzumaciju u predviđenom roku trajanja.

Literatura

- AOAC (2007): Official Methods of Analysis. 18th Edition, Association of Official Analytical chemists, Gaithersburg.
- Babić M. (2009): Utjecaj dodatka meda na fermentaciju kravljeg, kozjeg i sojinog mlijeka baterijom *Lactobacillus casei*-01. Diplomski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno - tehnološki fakultet Osijek, Osijek.
- Bardasi, L., Taddei, R., Nocera, L., Ricchi, M., Merialdi, G. (2015): Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat and vegetable products in Emilia Romagna Region, years 2012-2013, *Italian journal of food safety* 4(1).
- Božanić, R., Jelčić, I., Bilušić, T. (2010): Analiza mlijeka i mliječnih proizvoda : priručnik. Zagreb: Plejada.
- Barukčić, I., Keškić, M., Lisak Jakopović, K., Karlović, S. i Božanić, R. (2020): Effect of selected starter cultures on production, properties and shelf life of fresh type cheese, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 15 (3-4), 124-132

- Cindrić, M. (1997): Proizvodnja svježeg sira Schulenburgovim postupkom, *Mljekarstvo*, 47(3), str. 195-199. Preuzeto s: <https://hrcak.srce.hr/94916> (Datum pristupa: 31.10.2022.)
- Dermiki, M., Ntzimani, A., Badeka, A., Savvaidis, I., N., Kontominas, M., G. (2008): Shelflife extension and quality attributes of the whey cheese „Myzithra Kalathaki“ using modified atmosphere packaging. Elsevier LWT 41, str. 284-294
- Fernández-García E, Carbonell M, Nuñez M. (2002): Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese, *J Dairy Res.* 69, 579-93.
- Fleet G. H. (1990): Yeast in dairy products, *J. Appl. Microbiol.* 68, 199-211.
- Havranek, J., Kalit, S., Antunac, N., Samaržija, D. (2014): Sirarstvo, Hrvatska mljekarska udruga, Zagreb.
- Hersleth, M., Ilseng, M. A., Martens, M., & Næs, T. (2005): Perception of cheese: a comparison of quality scoring, descriptive analysis and consumer responses, *Journal of food quality* 28(4), 333-349.
- ISO 5534:2004 (2004): Cheese and processed cheese - Determination of the total solids content (Reference method).
- ISO 3432:2008 (2008): Determination of fat content — Butyrometer for Van Gulik method.
- Kalit, S. (2015): Sirarstvo u teoriji i praksi (Opće sirarstvo). Karlovac: Veleučilište u Karlovcu.
- Hrvatski zavod za norme (2004): Mikrobiologija hrane i stočne hrane -- Horizontalni postupak brojenja koagulaza-pozitivnih stafilokoka (*Staphylococcus aureus* i druge vrste) -- 1. dio: Postupak primjene Baird-Parkerove hranjive podloge na agaru, HRN EN ISO 6888-1:2004.
- Hrvatski zavod za norme (2012): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni -- 2. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode većim od 0,95, HRN ISO 21527-2:2012.
- Hrvatski zavod za norme (2017): Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti, određivanje broja i serotipizaciju *Salmonella* -- 1. dio: Dokazivanje prisutnosti *Salmonella* spp. HRN EN ISO 6579-1:2017.
- Hrvatski zavod za norme (2017): Mikrobiologija u lancu hrane -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i određivanje broja *Listeria monocytogenes* i drugih *Listeria* spp. -- 2. dio: Metoda određivanja broja, HRN EN ISO 11290-2:2017.
- Hrvatski zavod za norme: (2017): Mikrobiologija hrane i hrane za životinje -- Horizontalna metoda za dokazivanje prisutnosti i brojenje Enterobacteriaceae -- 2. dio: Metoda određivanja broja kolonija, HRN ISO 21528-2:2017.
- Lau KY, Barbano DM, Rasmussen RR. (1991): Influence of pasteurization of milk on protein breakdown in Cheddar cheese during aging, *J Dairy Sci.* 74, 727-40.
- Ledenbach, L.H., Marshall, R.T. (2009): Microbiological Spoilage of Dairy Products. In: Sperber, W., Doyle, M. (eds) Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. Food Microbiology and Food Safety. Springer, New York, NY.
- Lante, A., Lomolino, G., Cagnin, M., Spettoli, P. (2006): Content and characterisation of minerals in milk and in Crescenza and Squacquerone Italian fresh cheeses by ICP – OES, *Food Control* 17, 229 – 233.
- McSweeney PLH, Fox PF, Lucey JA, Jordan KN, Cogan TM. (1993): Contribution of the indigenous microflora to the maturation of Cheddar cheese, *Int Dairy J.* 3, 613-34.
- Miletić, S. (1994): Mlijeko i mliječni proizvodi. Zagreb: Školska knjiga.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2011): Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu. 3. izmijenjeno izdanje, Zagreb, Hrvatska: Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja, pp.51-52.

- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2013): Pravilnik o sirevima i proizvodima od sireva, Zagreb, Hrvatska: Narodne novine d.d., 141/13.
- Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja (2022): Zakon o higijeni hrane i mikrobiološkim kriterijima za hranu, Zagreb, Hrvatska: Narodne novine d.d., 83/22.
- Ortigosa M, Torre P, Izco JM. (2001): Effect of pasteurization of ewe's milk and use of native starter culture on the volatile components and sensory characteristics of Roncal cheese, *J Dairy Sci.* 84, 1320-30.
- Samaržija, D., Zamberlin, Š., i Pogačić, T. (2012): Psychrotrophic bacteria and their negative effects on milk and dairy products quality, *Mljekarstvo* 62(2), 77-95.
- Smit G., Smit B.A., Wim J.M., Engels J.M. (2005): Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavor profiling of cheese products, *FEMS Microbiol. Lett.* 29, 591–610.
- Tratnik, Lj. (1988): Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Zagreb: Hrvatska mljekarska udruga.

Organoleptic, physical - chemical and microbiological quality of fresh cheese on the market

Svjetlana Škrabal*, Maja Ergović Ravančić, Valentina Obradović, Helena Marčetić, Tanja Abramović

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Tourism and Rural Development, Vukovarska 17, 34000 Požega, Croatia

**Corresponding author: sskrabal@ftrr.hr*

professional paper

Summary

Fresh cheese is a highly valuable food. Consumers in the Republic of Croatia relatively often consume it fresh. In this paper, five samples of fresh cheeses from different producers were analyzed. The samples were purchased in a shopping center. The aim of the research was to determine the quality of fresh cheeses on the market, and to compare it with the legal regulations. Cheese samples were analyzed for acidity, water content, fat content, sensory properties, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, Coagulase-positive staphylococcus, *Listeria monocytogenes*, and yeasts and molds. The results of the research showed that all the analyzed cheese samples were in accordance with the microbiological criteria and requirements for physical-chemical quality parameters. During the sensory assessment, they received different grades. Precisely their sensorial properties will be crucial when choosing a particular cheese for consumption. Given that fresh cheeses are easily perishable foods with specific sensory properties, their production is a very demanding technological process in which the rules of good production and hygiene practice must be strictly observed.

Keywords: fresh cheese, physicochemical parameters, microbiological quality, sensory properties

Voćni žele i snack proizvodi od naranče

**Ajla Avdić, Amela Kusur, Martina Tanović*, Amel Selimović,
Dijana Miličević, Gordan Avdić**

*Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet/Prehrambena tehnologija, Urfeta Vejzagića 8,
75000 Tuzla, Bosna i Hercegovina*

**Dopisni autor: martina.andrejas@hotmail.com*

stručni rad

Sažetak

Prilikom prerade voća i tokom proizvodnje različitih proizvoda od voća nastaje voćna kaša. U ovisnosti od toga kako je nastala voćna kaša može biti nusproizvod, odnosno poluproizvod. Ako nastaje prilikom proizvodnje bistrih sokova, kao što su, na primjer, bistri sokovi od naranče, jabuke i kruške, onda nastala voćna kaša predstavlja nusproizvod. U slučaju da nastaje pasiranjem sezonskog voća, kao što su: kajsije, breskve, jagode i maline, onda je riječ o poluproizvodu. U tom slučaju voće se prevodi u kašu i kao takvo konzervira. U ovom radu je pasiranjem proizvedena voćna kaša od naranči, te je izdvojen sok. Kaša je osušena, te su od nje napravljeni snack proizvodi. Od izdvojenog soka je napravljen žele proizvod. U kaši i soku je određena količina pektina, ukupna kiselost, količina vitamina C i količina suhe tvari. Sprovedena je i sezorska analiza gotovih snack proizvoda. Na osnovu dobijenih rezultata određen je sastav proizvoda, te poželjnost proizvoda putem senzorske analize.

Ključne riječi: voćna kaša, voćni sok, snack proizvod, žele proizvod, naranče

Uvod

Snack proizvodi predstavljaju hranu koja se konzumira između glavnih obroka (doručka, ručka i večere). Webster (1985) definiše u svom rječniku imenicu snack kao laganu hranu koja se jede između redovnih obroka, odnosno hranu pogodnu za užinu i grickanje. Prema upotrijebljenim sirovinama, tehničko-tehnološkim i senzorskim svojstvima u proizvodnju, prometu i potrošnji, snack-proizvodi stavljaju se u promet kao: čips proizvodi, flips proizvodi, ekspanzirana žita, prženi plodovi i sjemenke, mješavine snack-proizvoda i ostali snack-proizvodi (Narodne novine, 1995). Većina snack proizvoda spada u skupinu gotove hrane koja je sve popularnija među potrošačima zbog lakoće pripreme i konzumacije (Brennan i sur., 2013). Za proizvodnju snack proizvoda najčešće se koriste krumpir, žito, škrob, jezgrasto voće i sjemenke. Također, snack proizvodi mogu biti obogaćeni ili napravljeni i od raznih nusprodukata prehrambene industrije kao što su kruti ostaci nakon ekstrakcije soka koji se sastoje od kore, sjemenki i pulpe, a sadrže značajne količine prehrambenih vlakana, prirodnih antioksidanasa i drugih nutritivno vrijednih sastojaka, a najčešće korišteni su trop jabuke, grožđa, citrusa, mrkve i rajčice (Jozinović i sur., 2016). U skupinu citrusa spadaju naranče, koje su korištene tijekom izrade ovog rada. Naranča se može prerađivati na više načina, a jedan od njih jeste sušenje naranče, kao i sušenje njene kore pri čemu se dobiva kandirana kora naranče. Kandirana kora naranče se

može koristiti kao dodatak u prehrambenoj industriji. Naranča se koristi i za proizvodnju voćne pulpe, kao i različitih vrsta sokova (sirovi sok, koncentrirani sok, sok sa dodatkom šećera i vode, te sok konzerviran kemijskim sredstvima). Koristi se i za proizvodnju voćnih sirupa i voćnih likera. Velika primjena naranče je i u proizvodnji marmelada, džemova, želea i kompota (Vitolović, 1949). Suvremenu prehrambenu industriju, u okviru ukupnog razvoja globalne ekonomije odlikuju ubrzan razvoj novih tehnologija proizvodnje i prerade hrane, ali i suvremeni postupci distribucije, skladištenja i izlaganja robe. Prehrana suvremenih potrošača sve više uključuje obroke koji se konzumiraju izvan kuće, a kod kuće se često koriste gotovi proizvodi pripremljeni za upotrebu ili proizvodi koji se mogu konzumirati uz minimalnu doradu ili pripremu. To je utjecalo na razvoj novih vrsta proizvoda, čime je proširena ponuda prehrambenih proizvoda na tržištu. Također, potrošači imaju i sve veća očekivanja što se tiče sigurnosti i kvalitete hrane (Radovanović i Đekić, 2011). Prehrambena industrija vrši kontrolu kvalitete proizvoda instrumentalno-analičkim metodama i senzorskim metodama. Senzorska ocjena kvalitete u prehrambenoj industriji koristi se za: razvoj proizvoda; unapređenje proizvoda/smanjenje troškova; monitoring; kontrolu kvalitete; osiguranje kvalitete; utvrđivanje senzorskih karakteristika proizvoda; utvrđivanje karakteristika kvalitete sirovina; utvrđivanje stabilnosti proizvoda tijekom skladištenja; praćenje odnosa proces-sastojak-analičko mjerenje-senzorska ocjena. Cilj rada je bio proizvesti pasiranjem naranči sok i izdvojiti voćnu kašu. Kaša je osušena, te su od nje napravljeni snack proizvodi. Od izdvojenog soka je napravljen žele proizvod. U kaši i soku je određena količina pektina, ukupna kiselost, količina vitamina C i količina suhe tvari. Sprovedena je i sezorska analiza gotovih snack proizvoda. Na osnovu dobijenih rezultata određen je sastav proizvoda, te poželjnost proizvoda putem senzorske analize. (Grujić, 2015).

Materijali i metode

Materijali

Materijali korišteni u ovom istraživanju su: naranča, želatina, škrob, agava sirup, guar guma, smeđi i bijeli šećer.

Metode

Postupak izrade želea od soka naranči

30 g želatine u listićima namočeno je u hladnoj vodi (prema uputstvu s proizvoda) deset minuta dok nisu omekšala. Iscijeden je sok od 6 naranči (648 ml), te je pomiješan sa 405 g šećera. U sok je dodana omekšana želatina, koji je zatim kuhan na niskoj temperaturi 6 – 7 minuta, uz miješanje, to jeste dok se želatina nije istopila. Žele je izliven u silikonski kalup, te je ostavljen da se ohladi na sobnoj temperaturi, a zatim stavljen u hladnjak u trajanju od 5 h kako bi se u potpunosti ohladio i želirao.

Postupak izrade snack proizvoda od voćne kaše

Pravljene su tri vrste snack proizvoda. Razlika je bila u korištenim zgušnjivačima i sladilima. Jedan snack proizvod je napravljen sa škrobom i agava sirupom, drugi sa guar gumom i smeđim šećerom, a treći sa želatinom i bijelim šećerom. Cjelokupna masa ocijedene voćne kaše je bila 785,80 g, te je podijeljena na tri dijela od po 261,90 g. U prvi dio voćne kaše je stavljeno 10 g škroba i 26,19 g. U drugi dio 2,61 g guar gume i 26,19 g smeđeg šećera. U treći dio je dodano 10 g želatine i 26,19 g bijelog šećera. Svaki zgušnjivač je bio dobro izmiješan sa dodatnih 30 ml iscijedenog soka naranče, sve dok se nije rastopio. Izmiješane smjese su stavljene da se kuhaju deset minuta na maloj temperaturi kako ne bi došlo do zagorijevanja smjese. Nakon kuhanja, smjese su izliveno u silikonske kalupe i ostavljene na sobnoj temperaturi da se ohlade. Nakon hlađenja, snack proizvodi su izvađeni iz kalupa i stavljeni u dehidrator na sušenje. Raspored oblikovanih snack proizvoda je napravljen tako da se omogući kruženje vrućeg zraka. Sušenje je trajalo 6 h. Nakon sušenja snack proizvodi su izvađeni i ohlađeni u hladnjaku prije ocjenjivanja. Sušenje je vršeno prva 2 h na temperaturi od 65 °C, a preostala 4 h na temperaturi od 70 °C.

Određivanje topive suhe tvari refraktometrom u voćnoj kaši i iscijedenom soku

Za određivanje topive suhe tvari korišten je digitalni refraktometar. Rezultati se očitavaju u °Brix - a kojima se određuje ostatak šećera (Poljski, 2016).

Određivanje ukupne kiselosti u voćnoj kaši i iscijedenom soku

Ukupna kiselost je određena u voćnoj kaši i iscijedenom soku naranče koristeći metode iz Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka i vršenja kemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća (Službeni list SFRJ, 29/83).

Određivanje pektinskih tvari

Udjeli kalcijevog pektata u voćnoj kaši i iscijedenom soku naranče su određeni koristeći metode iz Pravilnika o metodama uzimanja uzoraka i vršenja kemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća (Službeni list SFRJ, 29/83).

Određivanje L – askorbinske kiseline titracijom sa 2,6 diklorfenol – indolfenolom (Tilmanov reagens) u voćnoj kaši i iscijedenom soku naranče

Prije upotrebe otopina 2,6 diklorfenol - indolfenol standardizovana je askorbinskom kiselinom. U Erlenmeyer tikvicu od 100 mL otpipetirano je 10 mL standardne otopine i titrisano s 2,6 diklorfenol - indolfenolom do pojave ružičaste boje koja je bila

postojana 15 - 20 sekundi, te je izračunat E, odnosno titar otopine 2,6 diklorfenola - indolfenola.

$$E = A/Z \quad (1)$$

gdje je:

A – količina askorbinske kiseline u 10 mL standardne otopine (mg) i

Z – količina 2,6 diklorfenola - indolfenola utrošenog za titraciju 10 mL standardne otopine askorbinske kiseline.

Priprema uzorka:

Odvagano je 5 g ispitivanog uzorka, te homogenizirano u blenderu s 10 - 15 mL 2 % oksalne kiseline. Suspenzija je prebačena u odmjernu tikvicu od 100 mL i dopunjena 2 % oksalnom kiselinom do oznake. Zatim je uzeto 10 mL ove otopine, te je izvršena titracija s otopinom 2,6 diklorfenola - indolfenola do pojave ružičaste boje koja se morala zadržati 15 - 20 sekundi.

$$c = (V \cdot E \cdot 10)/G \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je:

c – masa askorbinske kiseline (mg/100 g uzorka),

V – volumen 2,6 diklorfenola - indolfenola (mg/mL),

E – titar 2,6 diklorfenola - indolfenola (mg/mL) i

G – odvagana količina uzorka (g) (Nielsen, 2017).

Senzorska analiza proizvoda

Senzorska analiza uzoraka je sprovedena DLG metodom. Senzorsko ocjenjivanje je vršio panel od 7 obučanih ocjenjivača, kojima su dostavljani pojedinačni šifrirani uzorci na ocjenjivanje. Ocjene su upisivali u senzorski listić, te su ocjenjivana različita senzorska svojstva kvaliteta, i to:

1. Oblik, boja, površina (koeficijent važnosti – 1);
2. Čvrstoća, struktura (koeficijent važnosti – 3);
3. Žvakanje (koeficijent važnosti – 3);
4. Miris (koeficijent važnosti – 1.5);
5. Okus (koeficijent važnosti – 1.5).

Svaki od parametara kvaliteta je imao različit koeficijent važnosti. Umnoškom ocjene i koeficijenta važnosti dobijen je broj bodova za svaki pojedinačni faktor kvalitete, te ukupan broj bodova za svaki uzorak.

Rezultati i rasprava

Zadatak ovog rada bio je napraviti tri vrste snack proizvoda, te usporediti njihovu senzorsku kvalitetu. Naranče su propasirane, proizveden je sok, a dobijena je voćna kaša kao nusproizvod. Kako bi se iskoristila voćna kaša koja je nastala kao nusproizvod, izvršeno je njeno sušenje i korištenje u proizvodnji snack proizvoda. Od dobijenog soka, napravljen je žele proizvod. Na sirovini od koje su pravljani svi proizvodi, izvršene su kemijske analize, čiji su rezultati prikazani u tablici 1.

Prema prikazanim rezultatima u tablici 2 najbolje senzorske ocjene ima snack proizvod sa dodatkom guar gume i smeđeg šećera, a nakon njega slijedi snack proizvod sa dodatkom želatine i bijelog šećera. Najlošije senzorski ocjenjen je snack proizvod proizveden sa dodatkom škroba i agava sirupa. Kada se gledaju pojedinačni faktori kvalitete snack proizvoda, najveće ocjene za sve faktore kvaliteta je imao snack proizvod sa dodatkom guar gume i smeđeg šećera. Najniže ocjene za oblik, boju, veličinu, žvakanje i okus je dobio snack proizvod sa dodatkom škroba i agava sirupa, a najnižu ocjenu za miris, snack proizvod sa dodatkom želatine i bijelog šećera. U pogledu teksture i strukture, podjednako su ocijenjeni snack proizvodi sa dodatkom škroba i agava sirupa, te snack proizvod sa dodatkom želatine i bijelog šećera.

Tijekom izrade snack proizvoda nije dolazilo ni do kakvih problema, svi su se ponašali isto prilikom dodavanja određenih sladila i tvari za zgušnjavanje. No, već nakon termičke obrade, počeli su pokazivati određene promjene u pogledu teksture i strukture. Naime, tijekom hlađenja sadržaja koji su se trebali oblikovati u snack proizvode, primjećeno je da najtvrdju strukturu ima snack proizvod proizveden sa dodatkom guar gume i smeđeg šećera, te je njega bilo najlakše oblikovati. Najmekšu strukturu imao je snack proizvod proizveden sa dodatkom škroba i agava sirupa, te je bio najzahtjevniji prilikom oblikovanja.

Senzorska analiza provedena na žele proizvodu dala je jako dobre rezultate, koji su prikazani u tablici 3. Svi faktori kvalitete su ocijenjeni najvećom ocjenom, osim mirisa koji je dobio nešto nižu ocjenu. Cjelokupna ocjena ukazuje da bi ovaj proizvod bio poželjan na tržištu. Tokom termičke obrade i procesa hlađenja nisu uočene nikakve neželjene promjene na proizvodu.

Veći udio topljive suhe tvari, izmjerene digitalnim stolnim refraktometrom, za 0,86 °Brix imala je kaša naranče, što je i očekivano zbog većeg udjela vode u iscijeđenom soku.

U kaši naranče, prema izvršenim analizama, ukupna kiselost je upola manja od ukupne kiselosti u voćnom soku naranče. Kiselost naranče potječe od limunske kiseline prisutne u njoj.

Pektinske tvari najčešće se nalaze u kori (pokožici) ploda i srži ploda. Prosječni udio pektinskih tvari u voću kreće se oko 0,1 – 0,3 %. Prema tome, rezultati udjela Ca–pektata dobiveni u istraživanju poklapaju se s navedenim vrijednostima. Količina Ca – pektata u kaši i soku naranče je gotovo identična, te možemo zaključiti da su svi dijelovi naranče izrazito bogati pektinskim tvarima.

Prema Pravilniku o dodacima prehrani („Narodne novine“, broj 148/2008) koji se primjenjuje u Republici Hrvatskoj, preporučena dnevna doza (RDA) C vitamina iznosi 60 mg. Američke preporuke navode dozu od 75 mg za žene nepušačice i 110 mg na dan za

žene koje puše, te 90 mg za muškarce nepušače i 125 mg na dan za muškarce koji puše. Tablica 1 pokazuje rezultate količine vitamina C u vrijednosti od 23,5350 mg/100 g za voćnu kašu i 21,2863 mg/100 g za voćni sok. Prosječna količina vitamina C u 100 g naranče iznosi od 51 do 53 mg. Stoga, možemo zaključiti da sirovina korištena u ovom istraživanju može zadovoljiti jednu trećinu dnevne potrebe za vitaminom C. Udio vitamina C u ispitivanoj sirovini nije odgovarao literaturnim podacima zbog same starosti sirovine. Naime, istraživanje je provedeno sa sirovinom od prethodne godine, koja je tijekom distribucije, i skladištenja izgubila na svojoj početnoj vrijednosti.

Tablica 1. Rezultati kemijskih analiza sprovedenih na voćnoj kaši i iscijeđenom soku naranče
Table 1. Results of chemical analyzes carried out on fruit pulp and squeezed orange juice

Uzorak	Suha tvar (°Brix – a)	Ukupna kiselost (mmol/100 g; mmol/100 mL)	Ca – pektat (%)	Masa L – askorbinske kiseline (mg/100 g)
Voćna kaša	9,83	4,5943	0,2802	23,5350
Iscijeđeni sok	8,97	10,12	0,2816	21,2863

Tablica 2. Senzorska analiza snack proizvoda
Table 2. Sensory analysis of snack products

Faktori		UZORAK 1 (škrob + Agava sirup)	UZORAK 2 (guar guma + smeđi šećer)	UZORAK 3 (želatin + bijeli šećer)
Faktori kvaliteta	Faktor značaja	Ocjena	Ocjena	Ocjena
Oblik, boja, veličina	0,8	3,54	4	3,71
Tekstura, struktura	0,8	3,54	3,94	3,54
Žvakanje	0,8	3,31	3,71	3,49
Miris	0,6	2,57	2,92	2,53
Ukus	1,0	4,29	4,86	4,36
Ukupni bodovi		17,25	19,43	17,63

Tablica 3. Senzorska analiza žele proizvoda
Table 3. Sensory analysis of jelly products

Faktori		UZORAK-žele proizvod
Faktori kvaliteta	Faktor značaja	Ocjena
Oblik, boja, veličina	0,8	4
Tekstura, struktura	0,8	4
Žvakanje	0,8	4
Miris	0,6	2,83
Ukus	1,0	5
Ukupni bodovi		19,83

Zaključci

Na osnovu rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Prema senzorskom ocjenjivanju koje je vršio panel od 7 osoba, najbolju senzorsku kvalitetu imao je snack proizvod proizveden s dodatkom guar gume i smeđeg šećera, dok je najlošiju senzorsku kvalitetu imao snack proizvod s dodatkom škroba i agava sirupa.
- Ni jedan od ispitivanih snack proizvoda nije imao loše ocjene, što zapravo ukazuje na prihvatljivu senzorsku kvalitetu napravljenih proizvoda i mogućnost prihvaćanja tih proizvoda od strane potrošača kada bi se našli na tržištu.
- Drugi napravljeni proizvod, žele, imao je visoke ocjene svih parametara senzorske kvalitete, i skoro maksimalnu ukupnu ocjenu, što predstavlja izrazito dobar i prihvatljiv proizvod od strane ispitanika.
- Sirovina koja je korištena u izradi proizvoda bila je stara godinu dana, no na provedene kemijske analiza, ukazuju na zadovoljavajuću kvalitetu, osim za vitamin C. Naime, upotrijebljena sirovina ima 56,6 % manje vitamina C od uobičajene količine vitamina C na 100 g naranče.
- U daljim istraživanjima bi se kvaliteta ovih i sličnih snack proizvoda mogla poboljšati većim stupnjem usitnjavanja sirovine i / ili dodatkom nekih drugih sredstava za zaslađivanje i ugušćivanje.

Literatura

- Brennan, M.A., Derbyshire, E., Tiwari, B.K., Brennan, C.S. (2013): Ready to eat snack products: The role of extrusion technology in developing consumer acceptable and nutritious snacks, *Int. J. Food Sci. Tech.* 48, 893-902.
- Grujić, S. (2015): Senzorna ocjena kvaliteta i prihvatljivosti prehrambenih proizvoda, Univerzitet u Banjoj Luci, Tehnološki fakultet Banja Luka.
- Miličević D. (2021): Senzorska analiza, Interna skripta, Univerzitet u Tuzli, Tehnološki fakultet, Tuzla.
- Narodne novine (1995): Pravilnik o temeljnim zahtjevima za snack-proizvode Zagreb, Narodne novine d.d., NN 52/1997.
- Nielsen, S.S. (2017): Vitamin C Determination by Indophenol Method, Department of Food Science, Purdue University, West Lafayette, IN, USA.
- Jozinović, A., Ačkar, Đ., Babić, J., Miličević, B., Šubarić D. (2016): Nutritivno vrijedniji ekstrudirani snack proizvodi obogaćeni nusproizvodima prehrambene industrije, Prehrambeno - tehnološki fakultet, Osijek.
- Poljski V. (2016): Kemijska i organoleptička svojstva različitih sokova od naranče, završni rad, Veleučilište u Požegi, Požega.
- Pravilnik o metodama uzimanja uzoraka i vršenja hemijskih i fizičkih analiza radi kontrole kvaliteta proizvoda od voća i povrća, „Službeni list SFRJ“, broj 29/83.
- Radovanović, R., Đekić, I. (2011): Upravljanje kvalitetom u procesima proizvodnje hrane. Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija.
- Vitolić V. (1949): Prerada voća, Poljoprivredno izdavačko preduzeće, Beograd.
- Webster, M. (1985): Webster's Ninth New Collegiate Dictionary, Springfield, Massachusetts.

Orange fruit jelly and snack products

**Ajla Avdić, Amela Kusur, Martina Tanović^{1*}, Amel Selimović,
 Dijana Miličević, Gordan Avdić**

*University of Tuzla, Faculty of Technology, Urfeta Vejzagića 8, 75000 Tuzla,
 Bosnia and Herzegovina*

**Corresponding author: martina.andrejas@hotmail.com*

professional paper

Summary

Fruit pulps can be produced during the fruit processing and production of various fruit products. Depending on how it is made, fruit pulp can be a semi-product or a by-product. If the fruit pulp is produced during a production of clear fruit juices (such as clear orange juices, or clear apple and pear juices), than the produced fruit pulp represents a nus-product. Fruit pulp represents a semi-product if it is produced by mashing seasonal fruits, such as: apricots, peaches, strawberries and raspberries. In that case mashed fruit must be conserved. In this paper, fruit pulp was produced by mashing oranges, and the juice was extracted. The mash was dried, and snack products were made from it. A jelly product were made from the separated juice. In the mash and juice were determined the amount of pectin, total acidity, amount of vitamin C and the amount of a dry matter. Sensor analyses of produced snack products were also conducted. Based on the obtained results, the composition of the product was determined, as well as the desirability of the product through sensory analysis.

Keywords: fruit pulp, fruit juice, snack product, jelly product, oranges

5

**Sekcija: KEMIJA U POLJOPRIVREDI
I ŠUMARSTVU**

**Topic: CHEMISTRY IN AGRICULTURE
AND FOREST**



The effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries

**Slaven Jurić, Ana Jakoplić, Kristina Vlahoviček Kahlina,
Marija Sigurnjak Bureš, Mirna Fuka, Luna Maslov Bandić***

University of Zagreb, Faculty of Agriculture, Svetosimunska 25, 10000 Zagreb, Croatia

**Corresponding author: lmaslov@agr.hr*

original scientific paper

Summary

Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) are well known for their great taste, high concentration of bioactive compounds, and numerous health benefits they offer to consumers. Fresh blueberries are very sensitive during the postharvest period mainly caused by water loss, mold decomposition, and metabolic changes. Blueberries have a shelf life of 7 to 40 days at 4 °C, depending on characteristics such as fruit cultivar, storage conditions, and maturity harvest technique. Edible coatings are used to extend the shelf life of perishable fruits like blueberries. This research reports use of two types of hydrogel coatings in postharvest treatment of fresh blueberries: (i) sodium alginate (2% (w/v)) (ii) and tannic acid (1% (w/v)) enriched sodium alginate (2% (w/v)). Fruit quality was evaluated for weight loss, titratable acidity, total soluble solids content, total polyphenolic content, total anthocyanin content, and antioxidant capacity. Sodium alginate coated samples showed lower values of total soluble solids content and titratable acidity compared to the control samples while tannic acid-enriched sodium alginate coated samples had significantly higher values of total polyphenols, total anthocyanins, and antioxidant capacity.

Keywords: blueberries, edible coatings, sodium alginate, tannic acid, bioactive compounds

Introduction

Fresh fruits and vegetables are highly valued in the market today due to their nutritional value (Raghav et al., 2016). In recent years, consumers are increasingly aware of the importance of fruit and vegetable consumption for maintaining health (Olivas et al., 2008). However, fruits and vegetables are highly perishable because after harvesting there are significant losses due to respiration and transpiration, damage by microorganisms and insects, and handling conditions during transport and storage. This is why the preservation of fruits and vegetables is a big challenge (Raghav et al., 2016). In order to reduce decay losses during storage, extend shelf life, and improve their quality, the method of applying edible coatings to fruits is applied (Olivas et al., 2008; Raghav et al., 2016). Edible coatings are promising environmentally friendly materials for preserving the quality and extending the shelf life of fresh fruit (Tavassoli-Kafrani et al., 2022). Although the use of edible coatings has become popular only recently, as early as the beginning of the 12th century, lemons and oranges were coated with wax to preserve their quality for longer. Since

then, many studies have been published on the application of edible coatings (Olivas et al., 2008; Yousuf et al., 2021). Edible coatings form a protective layer around the fruits and can thus regulate their respiration rate and protect them from water loss, firmness and microbial contamination, as well as preserve their texture and taste. Besides being able to reduce fruit decay, they can add commercial value to fruits by improving their appearance and act as carriers of functional ingredients (Tavassoli-Kafrani et al., 2022). The materials used to make edible coatings affect the efficiency and stability of the coatings themselves. Edible coatings are generally based on biological materials that include polysaccharides, proteins, and lipids that can be alone or in combination (Mannozi et al., 2017). In addition to being edible, these materials have a number of advantages, some of which are biodegradability, low cost of availability, ease of production and environmental friendliness (Tavassoli-Kafrani et al., 2022). Blueberries (*Vaccinium* spp.) are a valued fruit and are an important part of functional food attributed to the fact that the fruits are a rich source of bioactive compounds that can have a beneficial effect on human health (Zikmanis et al., 2021). However, blueberry is a perishable fruit that quickly deteriorates after harvest (Medina-Jaramillo et al., 2020). Physical deterioration that occurs during storage of blueberries is mainly the result of loss of mass, and thus of firmness, and microbial deterioration (Mannozi et al., 2017). Likewise, bioactive compounds can be rapidly degraded during storage due to oxidation of polyphenols, which can negatively affect the level of phenols and antioxidant capacity in fruits (Duan et al., 2011; Mannozi et al., 2018). Therefore, the application of edible coatings can show great potential in preserving the quality of fresh blueberry fruits (Pérez-Laalle et al., 2020) because it affects the physiological, physicochemical, sensory and microbiological properties (Maringgal et al., 2020). The aim of this work was to examine the effect of an edible coating based on alginate and the effect of an edible composite coating based on alginate and tannic acid, on preserving the physical and chemical properties of blueberry fruit at refrigerator temperature for seven days. The influence of edible coatings on the quality of blueberry fruit was examined with special emphasis on weight loss, content of bioactive components (polyphenols, antioxidant activity and anthocyanins), solubility of dry matter and abundance of microorganisms.

Materials and methods

Samples

In this research, the blueberry variety 'Bluecrop' (*Vaccinium corymbosum* L.) grown organically in the Cetingrad (Croatia) was used. The fruits were hand-picked at full maturity and then transported to the laboratory of the Department of Chemistry at the University of Zagreb, Faculty of Agriculture. Fruits of uniform maturity, size and color, without mechanical damage and disease, were selected for analysis.

Culture media

Plate count agar (PCA)

PCA plate count medium was prepared by dissolving 23.5 g of PCA medium (Biolife, Italy) in 1000 mL of distilled water. The mixture was heated to boiling with constant stirring to completely dissolve the substrate. The substrate was sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes. The cooled medium was mixed well and distributed into sterile petri dishes.

Plate count Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol (DRBC)

DRBC plate count medium was prepared by dissolving 15.5 g of DRBC medium (Biolife, Italy) in 500 mL of distilled water. The mixture is heated to completely dissolve the substrate. The substrate was sterilized in an autoclave at 121 °C for 15 minutes. One vial of chloramphenicol was then added to the solution. The cooled medium was mixed well and distributed into sterile petri dishes.

Experimental procedure

Blueberry fruits were randomly divided into three groups (control, sodium alginate and sodium alginate + tannic acid) with three subsamples for each group, a total of nine samples. Each of the samples contained 50 g of blueberry fruits. The first treatment was based on sodium alginate. Blueberry fruits were immersed in sodium alginate solution (2% w/v) for 3 minutes, followed by draining off the excess solution and drying at room temperature. For the second treatment, the process of coating the blueberry fruits in a sodium alginate solution (2% w/v) was repeated for 3 minutes, and then the fruits were left to dry in the air for 5 minutes, after which they were immersed in a tannic acid solution (1% w/v) for 3 minutes. The treated fruits were left to dry at room temperature. Untreated blueberry fruits served as a control. All blueberry fruit samples were stored in a refrigerator at 0 °C for seven days.

Quality evaluation

The content of total soluble dry matter was measured in the fruit juice of blueberries. The measurement was made using a Pal-1 digital refractometer (Atago, Japan), and the results are expressed in %. The weight loss of blueberry samples was determined by weighing the fruits per sample at the beginning of the experiment (day 0) and at intervals of two days during the seven days of storage. A precision balance (Shimadzu AX 200, Japan) was used to measure the mass, which had an accuracy of 0.1 mg. Mass loss (% W) was calculated as a percentage of mass loss in relation to the initial mass of the samples according to the following formula:

$$\% W = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \times 100 \quad (1)$$

m_0 - initial mass of each sample

m_f - mass at the time of measurement or final mass of the sample

Determination of bioactive compounds

Sample extracts were prepared for the determination of total polyphenols, total anthocyanins and total antioxidant activity. Blueberry fruit extracts for each analysis were prepared by crushing 100 g of previously weighed blueberry fruits. 10 g of the crushed sample was weighed on an analytical balance in two 50 mL centrifuge tubes, 25 mL of methanol was added and homogenized in a centrifuge at 5,000 revolutions per minute for 6 minutes. Extractions were performed under conditions of reduced light. After homogenization, the extracts were filtered through filter paper for further analysis.

Determination of total phenols

A modified Folin-Ciocalteu method was used to determine the total content of polyphenols (Singleton et al., 1999). Blueberry extract (0.1 mL) was mixed with 7.9 mL of distilled water and 0.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted with distilled water in a ratio of 1:2). A volume of 1.5 mL of 20% (w/v) sodium carbonate was added to the suspension which was vortexed and left to react for 2 hours at room temperature. Gallic acid was chosen as the standard compound. Absorbance was measured using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-1700, Japan) at 765 nm, and the results were expressed as mg of gallic acid equivalents per 100 g of fresh blueberries.

Determination of total anthocyanins

Total anthocyanins were determined from blueberry fruit extract. Blueberry extract was diluted to a volume of 3 mL by mixing with a mixture of methanol and 0.1 M HCl in a ratio of 85:15 (MeOH: HCl). The anthocyanin solution was diluted to the appropriate concentration for absorbance measurement on a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, UV-1700, Japan) using a 1 cm wide cuvette at 538 nm. Total anthocyanins are expressed as cyanidin 3-rutinoside equivalents. The molar absorption of cyanidin 3-rutinoside with a value of 31085 at 530 nm in MeOH: HCl was used for the calculation.

Determination of antioxidant activity

Antioxidant potential of blueberry fruit juice was determined using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) reagent, according to the method of Brand-Williams et al. (1995). A volume of 3.9 mL of a methanol solution of DPPH ($0.094 \text{ mmol dm}^{-3}$) was added to a test tube with 100 μL of blueberry extract. The free radical scavenging capacity of the sample was determined by measuring the decrease in absorbance using a UV-visible spectrophotometer (Shimadzu, UV-1700, Japan) at 517 nm after 30 min of incubation relative to the blank. The water-soluble vitamin E analog Trolox ((\pm) - 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was chosen as the standard compound. The results are expressed as μmol of Trolox equivalents per 100 g of fresh blueberries.

Microbiological analysis

Microbiological analysis was based on the determination of the number of total aerobic mesophilic bacteria (AMB) and the determination of the number of yeasts and molds. Both analyzes were performed at the end of the storage period.

Briefly, 10 g of each sample was transferred to sterile plastic bags, 90 mL of saline solution (0.85%) was added and homogenized using a Stomacher for 1 minute at 250 ppm. Then followed a series of dilutions. Test tubes for serial dilutions are marked from 10^{-1} to 10^{-4} and topped up with 9 mL of physiological solution. 1 mL of sample suspension was added to test tube 10^{-1} , after which the content of the test tube was well homogenized by vortexing. Then 1 mL of the suspension from test tube 10^{-1} was sterile transferred to test tube 10^{-2} and homogenized by vortexing. The procedure was repeated up to a dilution of 10^{-4} . Appropriate dilutions were inoculated in duplicates, in a volume of 0.1 mL, onto plate counts PCA (AMB) and DRBC (moulds and yeasts) media. Plates were incubated according to culture requirements, AMB (aerobic, $30 \text{ }^\circ\text{C}/72 \text{ h}$) and molds and yeasts ($25 \text{ }^\circ\text{C}/5 \text{ days}$).

After incubation, the colonies were counted and the number of formed colonies per gram of fresh blueberries (CFU/g) was calculated.

Statistical analysis

Research data were statistically processed in the Excel program (Microsoft Office, 2019). Data were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA), and mean values were compared with the Tukey HSD test. Results are considered significantly different at $p < 0.05$.

Results and discussion

Fruit weight loss is associated with loss of fruit freshness. In blueberries, a mass loss of 5-8 % is often the reason for their unusability (Chiabrando et al., 2017). Loss of fruit mass during storage is a consequence of water migration from the fruit to the environment. Storage temperature, water vapor pressure gradient between the fruit tissue and the environment affect the rate of water loss (Mannozi et al., 2017). In this work, weight losses of blueberry fruits were about 4-7 % during seven days of storage at low temperature. Figure 1 shows the weight loss of blueberries of the variety 'Bluecrop' with and without edible casings during seven days of storage. All blueberry fruit samples showed a loss of mass compared to the initial mass of the samples, that is, the mass loss gradually increased during the storage period.

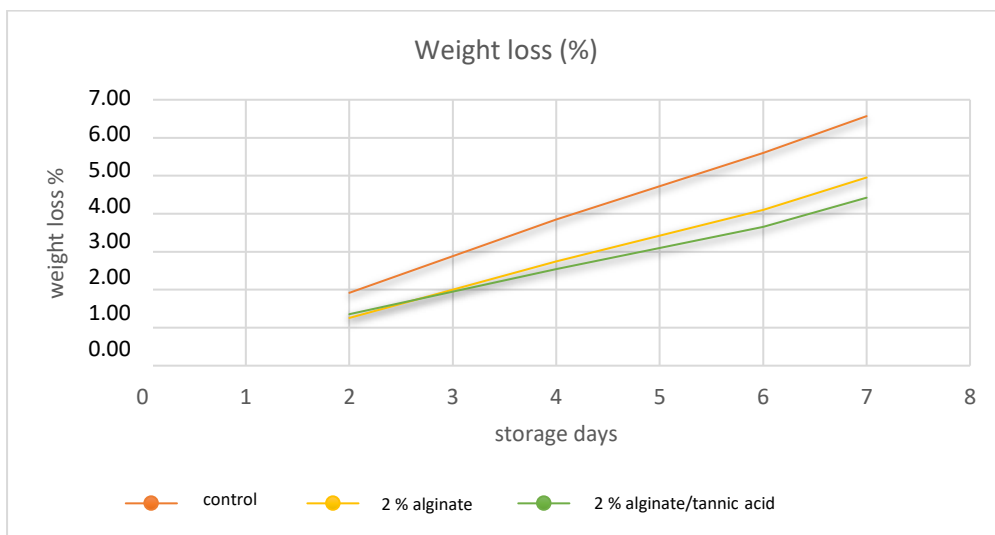


Figure 1. The effect of edible coatings on the weight loss of blueberry fruits

After seven days of storage at refrigerator temperature, the samples treated with sodium alginate (2% w/v) and tannic acid (1% w/v) showed a minimum weight loss of 4.42% in relation to the untreated samples where weight loss was recorded of 6.57%. In samples treated with sodium alginate (2% w/v), a mass loss of 4.95% was recorded. The material covering the fruit is crucial to limit the loss of fruit mass during storage. Differences in the ability to reduce the weight loss of blueberry fruits are attributed to the different water vapor permeability of the materials used in the production of edible coatings (Chiabrando and Giacalone, 2017). The content of total soluble solids (TSS) is one of the indicators of the metabolic status of blueberry fruits (Tahir et al., 2019). The effect of edible coatings on the content of TSS during storage

of blueberry fruits is shown in Table 1. According to the obtained results, a slight increase in TSS was observed at the end of the storage period (day 7) compared to the beginning (day 0). After seven days of storage, blueberry fruit samples treated with sodium alginate (2% w/v) and tannic acid (1% w/v) showed the highest increase (15.6%) compared to day 0 (12.1%).

Table 1. TSS (%) in blueberry fruits with treatment and without treatment during storage

Storage days	TSS (%)
(0 day) control	12.1
(7 days) 2 % sodium alginate	13.8
(7 days) 2 % sodium alginate / 1 % tannic acid	15.6
(7 days) control	15.2

Also, an increase was recorded in the control samples (15.2%). The smallest increase was recorded in samples treated with sodium alginate (2% w/v) (13.8%). The reason for the lower increase in the content of TSS in the samples treated with sodium alginate (2% w/v) could be due to the effect of the edible coating on the respiration rate of the fruit. Similar results of their research were published by Mannozi et al. (2017) and Tahir et al. (2019). According to Mannozi et al. (2017), the increase in TSS is probably a consequence of metabolic reactions and processes during storage, which continue to convert starch and acids into sugar, resulting in a decrease in total acidity, i.e. an increase in pH value and TSS. In the Table 2 are presented results of bioactive compound content in blueberry fruits. Changes in the content of total polyphenols of the treated blueberry fruits were not significantly different compared to the recorded initial values.

Table 2. The content of total polyphenols, antioxidant activity and anthocyanins in coated blueberry fruits and uncoated (control)

	Total phenols (mg GAE /100 g)	Antioxidant activity DPPH (μ mol TE/100 g)	Total anthocyanins (mg cyanidine-3-rutinoside/100 g)
(0 day) control	150.58 \pm 6.25 ^a	275.00 \pm 14.26 ^a	32.42 \pm 0.12 ^a
(7 days) 2% sodium alginate	155.17 \pm 4.43 ^a	267.38 \pm 8.42 ^a	32.00 \pm 0,61 ^a
(7 days) 2% sodium alginate/ 1% tannic acid	149.98 \pm 2.77 ^a	276.01 \pm 6.02 ^a	32.66 \pm 0.58 ^a
(7 days) control	107.20 \pm 2.43 ^b	217.78 \pm 12.34 ^b	31.12 \pm 1.32 ^a

Values marked with the same letter within a column are not statistically significantly different according to Tukey's HSD test ($p < 0.05$)

Treatment with sodium alginate (2% w/v) showed a higher content of total polyphenols (155.17 mg GAE/100 g). Similar values from the beginning of storage (150.58 mg GAE/100 g) were also shown by the treatment with sodium alginate (2% w/v) and tannic acid (1% w/v) (149.98 mg GAE/100 g) recorded on the seventh days, according to which we can conclude that this treatment did not significantly affect the total content of polyphenols. A significant decrease in total polyphenols compared to day 0 was observed in control samples of blueberry fruits (107.20 mg GAE/100 g). The higher content of total polyphenols in fruits coated with sodium alginate (2% w/v) can be associated with antioxidant activity. Also, the reduction of total polyphenols in control samples at the end of the storage period is the result of fruit ripening and the breakdown of the lateral structure (Tahir et al., 2019). Given that control samples without coatings showed a significant decrease in polyphenol content after seven days of storage, while samples treated with coatings showed similar or higher polyphenol values compared to those at the initial time, it indicates that the coatings successfully prevented the loss of polyphenols in blueberry fruits. Medina-Jaramillo et al. (2020) reported similar results in their study of blueberries treated with alginate and a combination of alginate and carvacrol during 21 days of storage at 0 °C. Antioxidant activity is used to assess the status of the antioxidant potential of fruit tissues, i.e. the amount of bioactive compounds present (Chiabrando and Giacalone, 2017). Antioxidant activity, similar to the content of total polyphenols, did not significantly change in the treated samples compared to the recorded initial values. In samples treated with sodium alginate (2% w/v) and tannic acid (1% w/v), a slight increase in antioxidant activity (276.01 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$) was observed compared to the recorded initial value (275.00 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$), while a lower value (267.38 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$) was recorded for samples treated with sodium alginate (2% w/v). A significant decrease in antioxidant activity was shown by the control samples (217.78 $\mu\text{mol TE}/100\text{ g}$). The reason for the decrease in antioxidant activity in untreated samples could be attributed to the aging and deterioration of fruits during the storage period (Tahir et al., 2019). In this work, the total anthocyanins were not significantly affected by the application of edible coatings. The minimal difference in total anthocyanin reduction was recorded in control samples (31.12 mg cyanidin-3-rutinoside equivalents/100 g) compared to the recorded initial value (32.42 mg cyanidin-3-rutinoside equivalents/100 g). These results confirmed that the application of edible coatings can maintain the content of total polyphenols, antioxidant activity and anthocyanins in blueberry fruits during cold storage.

Microbial populations occur naturally on fresh blueberries, and their number in this experiment was determined at the end of the storage period and shown in Table 5. The causes of microbiological spoilage of fruit can be bacteria, molds and yeasts, but the main causes of spoilage are considered to be molds and yeasts due to the low pH values of fruits (Alvarez et al., 2017).

Table 3. The influence of different coatings on the presence of microorganisms

	AMB (CFU/g)	Molds and yeasts (CFU/g)
2% sodium alginate	$2.75 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$	$5.7 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^2$
2% sodium alginate / 1 % tannic acid	$4.55 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$	$1.15 \times 10^4 \pm 5.0 \times 10^2$
control	$6.25 \times 10^3 \pm 3.5 \times 10^2$	$1.07 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^2$

From the obtained results (Table 3), it is evident that the application of edible coatings on blueberry fruits had the effect of reducing the total number of aerobic mesophilic bacteria (AMB) and yeasts and molds compared to the control. Blueberry samples treated with edible casings reduced the abundance of AMB. The least formed AMB colonies were shown by the coating based on sodium alginate (2% w/v) ($2.75 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$ CFU/g), followed by the coating based on sodium alginate (2% w/v) and tannic acid (1% w/v) ($4.55 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$ CFU/g) compared to the control samples in which the highest number of formed colonies was recorded ($6.25 \times 10^3 \pm 3.5 \times 10^2$ CFU/g). Similarly, samples coated with sodium alginate (2% w/v) also showed the lowest abundance of molds and yeasts ($5.7 \times 10^3 \pm 3.0 \times 10^2$ CFU/g) compared to control samples ($1.07 \times 10^4 \pm 3.0 \times 10^2$ CFU/g) and samples treated with a composite coating of sodium alginate (2% w/v) and tannic acid (1% w/v) ($1.15 \times 10^4 \pm 5.0 \times 10^2$ CFU/g). Mannozi et al. (2017) in their research also examined the influence of different coatings (sodium alginate, pectin and sodium alginate + pectin) on the quality of blueberry fruit and on the growth of microorganisms during 14 days of storage at 4 °C. Microbiological results showed a positive effect of treating blueberry samples with regard to the growth of microorganisms. The application of alginate-based and pectin-based coatings significantly reduced the growth kinetics of AMB and yeasts compared to control samples.

Similar results were published by Alvarez et al. (2017) in their research. Using edible coatings based on sodium alginate and chitosan enriched with dietary fiber (apple fiber, orange fiber, inulin and oligofructose), they examined the influence on the microbiological characteristics of fresh blueberries during 18 days of storage at 5 °C. Their results show that the best effect in inhibiting the growth of AMB and molds and yeasts was caused by a coating based on chitosan (with and without fibers). Furthermore, the addition of dietary fiber improved the antimicrobial effect of chitosan, especially significant inhibitory effects were observed in samples coated with chitosan with the addition of oligofructose and with the addition of orange fiber compared to the use of the chitosan coating alone.

Conclusions

The current study showed that edible coatings are a safe, affordable, and environmentally friendly way to extend the shelf life of fresh blueberries. The obtained results indicate that the application of an edible coating based on alginate 2% (w/v) and a composite coating consisting of 2% (w/v) alginate and 1% (w/v) tannic acid can be used to preserve the freshness of fruits and bioactive components in blueberry fruits.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge the financial support of the Croatian Science Foundation through a project entitled Mandarins from Neretva valley - Chemical characterization and Innovative postharvest TREATments (CITREA) (UIP-2020-02-7496).

References

- Al-Tayyar N. A., Youssef A. M., & Al-Hindi R. R. (2020): Edible coatings and antimicrobial nanoemulsions for enhancing shelf life and reducing foodborne pathogens of fruits and vegetables: A review, *Sustain. Mater. Technol.* (26), 215-225.
- Alvarez M. V., Ponce A. G., & Moreira M. R. (2017): Influence of polysaccharide-based edible coatings as carriers of prebiotic fibers on quality attributes of ready-to-eat fresh blueberries, *J. Sci. Food Agric.* 98(7), 2587-2597.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., & Berset C. (1995): Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT-Food Sci. Technol.* 28(1), 25-30.
- Chiabrando V. & Giacalone G. (2017): Quality evaluation of blueberries coated with chitosan and sodium alginate during postharvest storage, *Int. Food Res. J.* 24(4), 1553-1561.
- Chiabrando V., & Giacalone G. (2015): Anthocyanins, phenolics and antioxidant capacity after fresh storage of blueberry treated with edible coatings, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 66(3), 248-253.
- Chiabrando V., Giacalone G., & Rolle L. (2009): Mechanical behaviour and quality traits of highbush blueberry during postharvest storage, *J. Sci. Food Agric.* 89(6), 989-992.
- Dhall R. K. (2013): Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53(5), 435-450.
- Duan J., Wu R., Strik B. C., & Zhao Y. (2011): Effect of edible coatings on the quality of fresh blueberries (Duke and Elliott) under commercial storage conditions, *Post. Bio. Technol.* 59(1), 71-79.
- Halim A.L.A., Kamari A., & Phillip E. (2018): Chitosan, gelatin and methylcellulose films incorporated with tannic acid for food packaging, *Int. J. Bio. Macro.* (120), 1119-1126.
- Mannozi C., Cecchini J. P., Tylewicz U., Siroli L., Patrignani F., Lanciotti R., Rocculi P., Dalla Rosa M., & Romani S. (2017). Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life, *LWT - Food Sci. Technol.* 85, 440-444.
- Mannozi C., Tylewicz U., Chinnici F., Siroli L., Rocculi P., Dalla Rosa M., & Romani S. (2018): Effects of chitosan based coatings enriched with procyanidin by-product on quality of fresh blueberries during storage, *Food Chem.* 251, 18-24.

- Medina-Jaramillo C., Quintero-Pimiento C., Díaz-Díaz D., Goyanes S., & López-Córdoba A. (2020): Improvement of andean blueberries postharvest preservation using carvacrol/alginate-edible coatings, *Polymers* 12(10), 2352.
- Olivas G. I., Dávila-Aviña J. E., Salas-Salazar N. A., & Molina F. J. (2008): Use of edible coatings to preserve the quality of fruits and vegetables during storage, *Stewart Post. Rev.* 3(6), 1-10.
- Raghav P. K., Agarwal N., & Saini M. (2016): Edible coating of fruits and vegetables: A review, *Education*, 1, 2455-5630.
- 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 reagent, *Methods in Enzymology* 299, 152-178.
- Tahir H. E., Zhihua L., Mahunu G. K., Xiaobo Z., Arslan M., Xiaowei H., Yang Z., & Mariod A. A. (2019): Effect of gum arabic edible coating incorporated with African baobab pulp extract on postharvest quality of cold stored blueberries, *Food Sci. Biotechnol.* 29(2), 217-226.
- Tavassoli-Kafrani E., Gamage M. V., Dumée L. F., Kong L., & Zhao S. (2022): Edible films and coatings for shelf life extension of mango: A review, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62(9), 2432-2459.
- Tournas V. H., & Katsoudas E. (2005): Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits, *Int. J. Food Microbiol.* 105(1), 11-17.
- Yousuf B., Qadri O. S., & Srivastava A. K. (2018): Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review, *LWT - Food Sci. Technol.* 89, 198-209.
- Yousuf B., Sun Y., & Wu S. (2021): Lipid and Lipid-containing Composite Edible Coatings and Films, *Food Rev. Int.* 1-24.
- Zikmanis P., Juhņeviča-Radenkova K., Radenkova V., Segliņa D., Krasnova I., Kolesovs S., Orlovskis Z., Šilaks A., & Semjonovs P. (2021): Microbial Polymers in Edible Films and Coatings of Garden Berry and Grape: Current and Prospective Use, *Food Bioproc Tech.* 14(8), 1432-1445.

6

Sekcija: ZAŠTITA OKOLIŠA

Topic: ENVIRONMENTAL PROTECTION



Usability of straw for secondary packaging printed by offset and gravure printing techniques

Irena Bates*, Ivana Plazonić, Valentina Radić Seleš,
Maja Rudolf, Katja Petric Maretić

University of Zagreb, Faculty of Graphic Arts, Getaldićeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: irena.bates@grf.unizg.hr

original scientific paper

Summary

Packaging is the material with which the product is wrapped or inside which the product is placed. The main function of packaging is to protect the packaged product, identify it and place it on the market, and to ensure the original shape of the packaged goods. The trend today is to reduce the global amount of packaging waste by recycling the same waste or reusing other available waste materials, while maintaining the required quality of the packaging thus produced. Cereal grains which include wheat, rye, barley, oats, rice, corn, millet, sorghum, wheat, spelt and others, are staple foods for human and animal consumption. Each year, large quantities of stalks are left in the fields after harvesting, and after drying in the sun is mostly treated as waste. Given the high availability of cereals worldwide, cereal straw could be more usefully utilized as an alternative source of fiber for secondary packaging. Therefore, the printing paper substrates were formed from the straw pulp of three different cereal species (wheat, barley and triticale) and mixed with recycled wood pulp in a 3:7 ratio. Since offset and gravure printing are used globally to print absorbent packaging, in this study we analyzed the black prints made by these two printing techniques. The usability of the printed papers with straw pulp for secondary packaging was observed based on the penetration of the ink into the printing substrate. It was found that the composition of the paper substrate has no effect on the depth of ink penetration into the printing substrate, so that cereal straw can be used as waste material for the production of secondary packaging. In general, prints with gravure inks have lower ink penetration compared to offset inks.

Keywords: gravure printing, offset printing, packaging, ink penetration, straw pulps

Introduction

The main function of the label and packaging is to identify, declare and market the product. Packaging also protects the packaged product and ensures the original shape of the packaged product (Vujković et al., 2007). A product without a label or packaging causes uncertainty among consumers. Packaging and labels are used for a wide range of products and have become an indispensable part of everyday life (Nelson, 1993). Nowadays, consumers are demanding environmental and health friendly packaging with the aim of reducing, reusing and recycling the amount of waste worldwide (Three Rs) (Fahzy, 2014). Considering that 1.3 billion tons of waste are produced each year and that this amount is expected to increase to 2.2 billion by

2025 and 27 billion tons annually by 2050. Of this, only one-third will come from Asia, namely China and India. It is surprising that Asian countries generate up to 1 million tons of waste every day. Waste is the biggest problem of the present and a challenge for the future generations. Today, most of the industrial and household waste is deposited in landfills or surface impoundments. Waste treated in this way can pollute groundwater, rivers, and streams, while the decomposition of paper in landfills releases methane gas, which is 25 times more toxic than CO₂ (David et al., 2019).

Reducing the amount of global waste is possible by recycling the same waste or reusing other available waste materials. Recycled paper accounts for only 50% of the world's total paper fiber production. Recycled paper usage rates vary widely, depending on desired quality and end use. In Europe, the production of recycled paper packaging was expected to increase by 63.7%, publications by 26.0% (18.6% for newsprint and 7.4% for other graphic products), household and sanitary products by 6.9%, and other paper grades by only 3.4% in 2010 (Blanco et al., 2013). Europe is currently struggling with paper shortages due to the war in Ukraine, as a result of restrictions that have led to the removal of paper and cardboard imports from Russia (Fast Markets, 2022). Since crop straw is treated as waste and large amounts remain in the fields after harvesting each year, crop straw could be more usefully used as an alternative fiber source for secondary packaging due to its global availability. Offset and gravure printing are the leading printing technologies for packaging printing on absorbent substrates. Each printing technique is suitable for a particular graphic product. They differ in the way the ink is transferred from the inking unit to the printing substrate and in the way the printing plate itself holds the ink. In offset printing, where high viscosity inks are used, a very thin ink layer of 0.5 μm to 1.5 μm is achieved on the substrate, while in gravure printing, where low viscosity inks are used, ink coverage is in the range of 8 μm to 12 μm (Kipphan, 2001).

In this study, the usability of printed papers made from straw pulp of three different crops (wheat, barley and triticale) mixed with recycled wood pulp was analyzed based on ink penetration into the paper substrate. The laboratory-produced papers were printed with black ink in full tone using equipment that simulates offset and gravure printing techniques. The total penetration depth of black ink containing fluorescent pigments into the laboratory-produced paper substrate was observed using a confocal laser scanning microscope (CLSM) with fluorescent light. There are several methods for determining ink penetration into the interior of paper, differing in non-destructive or destructive patterns, sample preparation, image capture, sample size, and resolution. The most common destructive methods rely on microtomy and microscope analysis, scanning electron microscopy (SEM) analysis, secondary ion mass spectroscopy (SIMS) analysis, focused ion beam instrument (FIB) analysis, or confocal laser scanning microscope (CLSM) analysis, which records the fluorescence emitted by fluorescent pigments. The most common non-destructive method for determining ink penetration depth is based on Kubelka-Munk theory using spectral reflectance. (Ren'ai et al., 2015). In the research of Kappell et al. (2008), it was confirmed that papers that have not been additionally treated with a coating have a

more open surface and a capillary system with large pores, which affect the flowability of the ink during printing and increases the penetration of the ink into the interior of the substrate, reducing print density and increasing mottling (Kappel et al., 2008). Papers without fillers have a more hydrophilic surface and a more porous structure, resulting in faster and deeper ink penetration. However, the calendering process could make the paper structure more compact and reduce its porosity, and thus the ink penetration depth after printing. Therefore, with a suitable combination of sizing agent, filler content and calendering process, a more stable print with higher optical density, saturation and color could be produced.

Papers with alternative fiber sources are usually not subjected to the bleaching process, because of their specific fibers and in order to maintain the sustainable and circular nature of these papers (Karlovits et al., 2020). Based on our previous research, the addition of alternative fiber sources to recycled fiber pulp has been found to produce papers suitable for inkjet and flexographic printing (Plazonic et al., 2016; Bates et al., 2020; Bates et al. sur., 2022; Radić Seleš et al., 2022).

Materials and methods

The experimental part of this research was performed in the following steps: 1. production of laboratory paper substrates with straw pulp; 2. printing of laboratory-produced papers; 3. print quality assessment 3a. ink penetration depth analysis; 3b. analysis of integral optical ink density; 3c. analysis of spectrophotometric values and optical spectrum.

Laboratory-produced papers

Straw of wheat (*Triticum spp.*), barley (*Hordeum vulgare L.*), and triticale (*Triticale sp.*), the most abundant crops in Croatia, was collected after harvest and manually cut into 3 cm long pieces with scissors. The cleaned straw was processed into semi-chemical pulp using the soda-pulp method. Laboratory-produced papers with a weight of about 42.5 g/m² consisted entirely of recycled wood pulp or a mixture of 70% recycled wood pulp and 30% unbleached wheat, barley or triticale pulp (Table 1) (Plazonić, 2016a, Plazonić, 2016b) were formed using a Rapid-Köthen sheet former (FRANK-PTI) according to the standard EN ISO 5269-2:2004 (ISO 5269-2:2004).

Table 1. Marking laboratory-produced papers used as printing substrates

Paper type/Mark	Composition	
	Straw pulp	Recycled wood pulp
N	0%	100%
3NW	30% wheat	70%
3NB	30% barley	70%
3NTR	30% triticale	70%

According to composition, three different laboratory-produced papers with straw pulp were compared with laboratory-produced paper consisted only of recycled wood pulp (N).

Printing laboratory-produced papers

In this research, the main techniques for printing secondary packaging on absorbent substrates were used. Offset printing is the predominant technique used for printing publications and packaging, while gravure printing is used for printing luxury products, publications and packaging in very long runs.

Offset printing was performed in full tone using conventional black ink Express (manufactured by Sun Chemicals) with 5% red fluorescent pigment (Radion, Radglo PS-15) using a Prüfbau multipurpose testing machine at a temperature of 23 °C and a relative humidity of 50%. All samples were printed at a speed of 0.5 m/s and a pressure of 600 N.

Gravure printing was performed with a laboratory KPP Gravure System using a printing cylinder with a mechanical hardness (HS) of 65 Shore and an engraved printing plate at an angle of 37° with a diamond needle at an angle of 130° with a screen of 100 lines/inch, or 40 lines/cm. Prints were made in full tone using Sunprop black ink (manufactured by Sun Chemicals) containing a 5% red fluorescent pigment (Radion, Radglo PS-15) at a speed of 20 m/min at a temperature of 23 °C and a relative humidity of 52%.

Print quality assessment

The print quality or printability analysis was aimed to compare the reproduction of the innovative laboratory-produced papers with straw pulp versus laboratory-produced papers made exclusively from recycled wood pulp, based on ink penetration depth, integral optical ink density, spectrophotometric values and optical spectrum.

Ink penetration depth of black ink into the laboratory-produced papers was determined by mixing a red fluorescent pigment into a conventional black ink with which prints were then made. Samples measuring 10 mm x 30 mm were cut on a Microtom machine and then filled with EpoFik Kit epoxy compound (manufactured by Struers). The obtained samples were dried cold at room temperature for a period of 12 hours without pressure. Grinding with sandpapers: P320, P600, P1000, P2000 and P4000 and polishing with Struers diamond pastes 3µm and 1µm was done after hardening of the resin with the samples.

A cross-section of the samples was taken using a Leica TCS SP8 X confocal laser scanning microscope with a fluorescence excitation channel of 560 nm (reflection) and processed with the Leica Microsystem program at a magnification of 63x, numerical aperture of 1.4 (immersion objective: HC PL APO CS2 63×/1.40) and additionally analyzed with the ImageJ program.

The ImageJ program was used to determine the highest values of ink penetration into the laboratory-produced paper substrate.

The mean values and standard deviation of the ink penetration depth (H_p) were calculated from 50 sections obtained from the microscopic images using the Eq. 1:

$$[H_p] = l/d \times 100 \quad (1)$$

where l is the maximum ink penetration value and d is the local thickness of the paper in the measured part.

The *optical ink density* parameter was used to determine the thickness of the ink film (black ink with red fluorescent pigment) on laboratory-produced paper substrates. Optical ink density (D_i) was measured on all prints using a Techkon SpectroDens densitometer (manufacturer Techkon GmbH) through a 3 mm aperture (measurement conditions status E, illumination D50, standard observer 2°, no polarizing filter, calibrated to paper samples). The ink layer on the print is opaque, therefore the optical density of the ink can be calculated from the value of light intensity reflected from the ink layer (I) versus the light intensity transmitted and reflected from unprinted paper substrates (I_0) according to Eq. 2. A higher value of the optical ink density means a larger ink layer or a higher ink concentration and a higher optical contrast compared to the substrate. (Kipphan, 2001)

$$D_i = \log \frac{I_0}{I} \quad (2)$$

Spectrophotometric values and optical spectrum of prints

Spectrophotometry is the basis for color measurement. As far as color perception is concerned, the connection between physics and physiology was recognized very early, when the physicist Isaac Newton contributed to spectrophotometry and colorimetry in 1704 with his attempts to divide white light into spectral colors.

However, the color perception of the human eye was defined 1802 by the physician Thomas Young. Young is considered to be the first to describe how color is perceived in the eye with the three receptors red, green and blue. Today we know that every color experience can be completely described with three numerical values (L^* , a^* , b^*) (Young, 1802; Heesen, 2015).

In the graphic industry, color reproduction is controlled by measuring spectrophotometric values $L^*a^*b^*$ and the optical spectrum of samples with spectrophotometers.

Results and discussions

In order to compare the usability of printed paper with straw pulp for secondary packaging, first the penetration depth of the printing ink into the substrate was

determined and then the quality of the print was observed using three qualitative parameters.

Significantly high ink penetration into all laboratory-produced paper substrates was observed with offset printing, while these values were lower with gravure printing (Figures 1 and 2).

Observing the images of the cross-sections of the samples, it is evident that in the offset prints, the least amount of ink penetrated the substrate when the samples were made from recycled wood pulp only (N), while the highest ink penetration was achieved in samples with wheat straw (Figures 1 & 2). The images of the cross-sections of gravure prints show minor differences between the printing substrates. From the measured numerical values of the ink penetration depth (Hp), it can be seen that all analyzed offset prints have very similar ink penetration depth values, while in gravure printing, the lowest ink penetration depth into the printing substrate was achieved with laboratory-produced paper with barley pulp (3NW) (Figure 3).

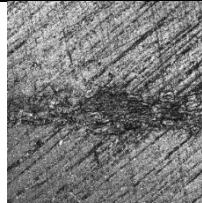
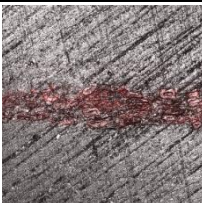
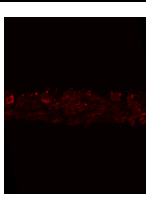


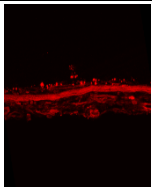
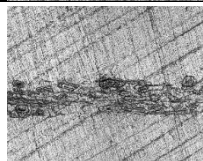
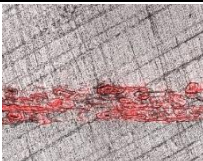
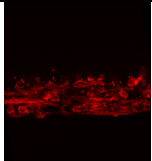


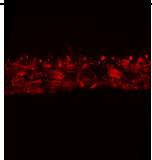
Laboratory-produced papers	Cross-section microscopic image		
	Taken with CLSM Leica TCS SP8 X (63x magnification)	Taken with fluorescence channel of 560 nm extraction	The ink penetration depth
N			
3NW			
3NB			
3NTR			

Figure 1. Microscopic images of cross-section of printed laboratory-produced papers by offset technique

Laboratory-produced papers	Cross-section microscopic image		
	Taken by CLSM Leica TCS SP8 X (63x magnification)	Taken with fluorescence channel of 560 nm extraction	The ink penetration depth
N			
3NW			
3NB			
3NTR			

Figure 2. Microscopic images of cross-section of printed laboratory-produced papers by gravure technique

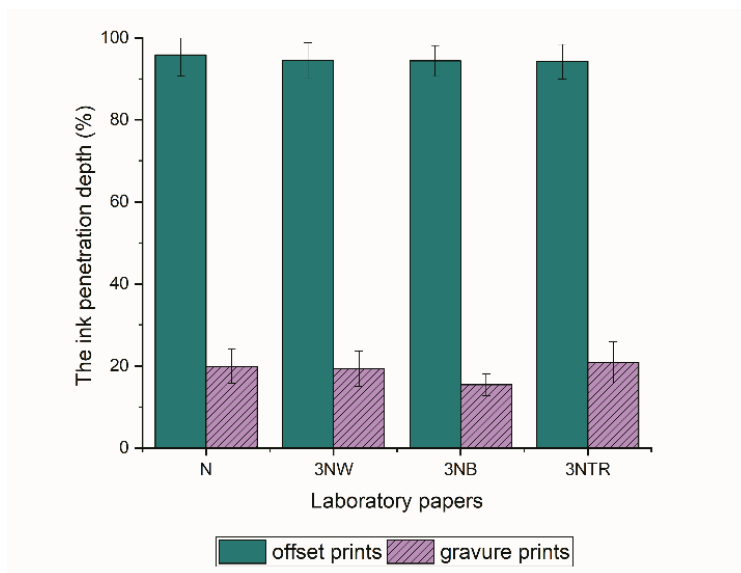


Figure 3. The ink penetration depth of offset and gravure prints

The analysis of the print quality of all laboratory-produced paper samples proves that similar ink layers were applied to the substrates (Table 2), showing very small differences in colorimetric values a^* and b^* , while more pronounced in lightness. Offset prints have a higher lightness value (Figure 4), i.e. a casual observer perceives these colors as brighter compared to gravure prints.

The resulting reflectance spectrum of the prints shows that the reflectance values across the spectrum are increased in offset prints compared to gravure prints. We can conclude that offset prints have increased reflectance in the green and red parts of the spectrum (Figure 5).

Table 2. Optical ink density values on offset prints and gravure prints

	D_i	
	<i>Offset prints</i>	<i>Gravure prints</i>
N	1.22 ± 0.03	1.29 ± 0.01
3NW	1.27 ± 0.02	1.31 ± 0.41
3NB	1.26 ± 0.02	1.29 ± 0.28
3NTR	1.28 ± 0.40	1.30 ± 0.32

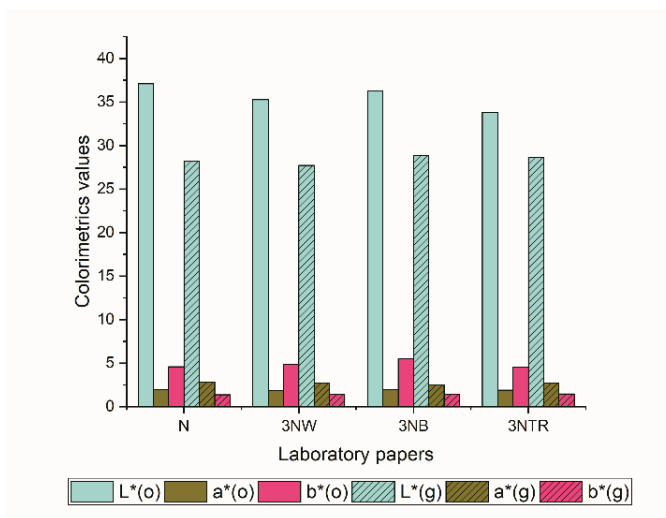


Figure 4. Colorimetric values of offset prints (o) and gravure prints (g)

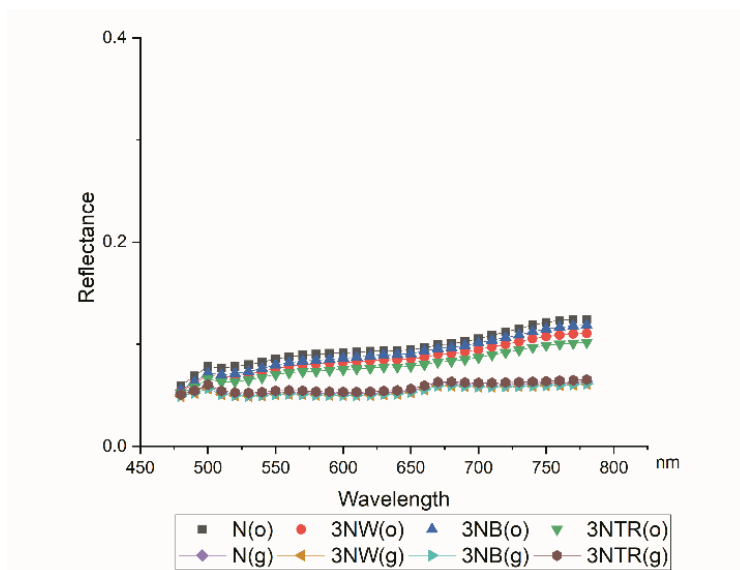


Figure 5. Optical spectrum of black prints with fluorescent pigments obtained with offset printing (o) and gravure printing (g)

Conclusions

Based on the results of assessing the usability of wheat, barley and triticale straw for secondary packaging using the parameters of ink penetration depth, optical density, spectrophotometric values and reflectance spectrum, the following conclusions can be drawn:

- Based on the value of integral optical density, spectrophotometric values and reflectance spectrum, it is not possible to determine the penetration depth of black ink into laboratory-produced papers.
- Substrates printed with gravure black ink have lower ink penetration compared to offset black ink, with lower reflectance values being achieved, which is characteristic of achromatic (black) color.
- The composition of the laboratory-produced paper substrate has no influence on the depth of ink penetration into the printing substrate, so cereal straw can be used as a waste material for the production of a substrate for printing secondary packaging.

Acknowledgments

This work has been supported in part by Croatian Science Foundation under the project „Printability, quality and utilization of substrates with non-wood fibres“ (UIP-2017-05-2573)

References

- Anyadike, N. (2003): Introduction to Flexible Packaging, Pira International Ltd, Surrey.
- Blanco, A., Miranda, R., Monte, M. C. (2013): Extending the limits of paper recycling: improvements along the paper value chain, *For. Syst.* 22(3), 471–483.
- David, A., Thangavel, Y., Sankriti, R. (2019): Recover, Recycle and Reuse: An Efficient Way to Reduce the Waste, *International Journal of Mechanical and Production Engineering Research and Development (IJMPERD)* 9 (3), 31-42.
- Fahzy, A.-R. (2014): Reduce, Reuse, Recycle: Alternatives for Waste Management: Guide G-314, College of Agricultural, Consumer and Environmental Sciences, New Mexico State University.
- Fairley, M. (2004): Encyclopedia of Label and Label Technology, London.
- Fast Markets, “How Russia’s invasion of Ukraine impacts the European pulp and paper industry.” <https://www.fastmarkets.com/insights/how-russias-invasion-of-ukraineimpacts-the-european-pulp-and-paper-industry> (accessed Jun. 09, 2022).
- Hanlon, J.F., Kelsey, R.J., Forcinio H.E. (1998): Handbook of package engineering, 3th edition, CRC Press LLC, Boca Raton.
- Heesen, R. (2015): The Young-(Helmholtz)-Maxwell Theory of Color Vision.
- ISO 5269-2:2004, Pulps — Preparation Of Laboratory Sheets For Physical Testing — Part 2: Rapid-Köthen Method, 2004.

- Kappel, C., Hirn, U., Donoser, M., Bauer, W. (2008): Measurement of printing ink penetration in uncoated papers and its influence on print quality. In: 94th Annual Meeting / Pulp and Paper Technical Association of Canada, Montreal, Canada, pp B539-B542.
- Karlovits, I., Lavrič, G. (2020): Paper surface efficiency and inkjet colour reproduction on invasive and agro residue papers. In: GRID Symposium 2020, Novi Sad, Serbia, pp. 177-183.
- Kipphan, H., (2001): Handbook of Print Media, Springer, Berlin.
- Li, R., Zhang, Y., Cao, Y., Liu, Z. (2015): Ink Penetration of Uncoated Inkjet Paper and Impact on Printing Quality, *BioResources* 10 (4), 8135-8147.
- Nelson, R.E. (1993): The Place of Packaging on Our Society; Process Color Printing and Flexographic Inks, Nelson, R.E. (ed.) Package Printing, New York, USA.
- Plazonić, I., Barbarić-Mikočević, Ž., Antonović, A. (2016a): Chemical Composition of straw as an alternative material to wood raw material in fibre isolation, *Drvna Ind.* 67(2), 119-125.
- Plazonic, I., Bates, I., Barbaric-Mikocevic, Z. (2016b): The effect of straw fibers in printing papers on dot reproduction attributes, as realized by UV Inkjet technology, *BioResources* 11(2).
- Plazonić, I., Rudolf, M., Radić Seleš, V., Bates, I., Petric Maretić, K. (2021): Potentials of lignocellulosic agricultural residues in paper production, *The Holistic Approach To Environment* 11(3), 72–77.
- Tefft, J. (2007): The Study of Coating and Ink Penetration into Coating Structures Using a Confocal Laser Scanning Microscope, Master of Science (MS).
- Tehnička enciklopedija (1997): Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb.
- Vujković, I., Galić, K., Vereš, M. (2007): Ambalaža za prehrambene namirnice, Tectus, Zagreb.
- Young, T. (1802): On the Theory of Light and Colours, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 92, 12-48.

Obrada otpadne vode aerobnim granulama mulja pri različitim omjerima C/N

Dijana Grgas^{1*}, Marija Biškup¹, Mirjana Galant², Tea Štefanac¹,
Korana Ambrozić³, Tibela Landeka Dragičević¹

¹Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Pierottijeva 6,
10000 Zagreb, Hrvatska

²Odvodnja Poreč d.o.o., Mlinska 1, 52440 Poreč, Hrvatska

³TD Vodovod d.o.o. Slavonski Brod, Nikole Zrinskog 25, 35000 Slavonski Brod, Hrvatska

*Dopisni autor: dgrgas@pbf.hr

originalni znanstveni rad

Sažetak

Zrele aerobne granule korištene su za obradu sintetske otpadne vode u laboratorijskom SBR reaktoru. Tijekom 150 dana istražena je razgradnja 70 ± 10 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, pri omjeru C/N 4, 8 i 12 iz acetata kao izvora ugljika. S povećanjem omjera C/N učinkovitost uklanjanja organskih sastojaka, $\text{NH}_4\text{-N}$, ukupnog dušika i $\text{PO}_4\text{-P}$ raste. Obradena otpadna voda je pri svim istraživanim omjerima C/N zadovoljavajuće kvalitete za ispušt u površinske vode s obzirom na KPK vrijednost i koncentraciju amonijakalnog dušika, odnosno za ispušt u sustav javne odvodnje prema vrijednostima ukupnog dušika i ortofosfata. Duža faza punjenja pri anaerobnim uvjetima bi vjerojatno pridonijela nižim koncentracijama ukupnog dušika i ortofosfata u obrađenoj vodi.

Ključne riječi: aerobni granulirani mulj, SBR, uklanjanje nutrijenata, sintetska otpadna voda

Uvod

Granularni mulj je spontano samoimobilizirna mikrobna biomasa u matriksu izvanstaničnih polimernih tvari (*EPS*, engl. Extracellular Polymeric Substances), bez nosača, kompaktne strukture.

Proces nastajanja aerobnih granula – aerobna granulacija rezultat je kombinacije bioloških i kemijskih procesa, a sastoji se od četiri koraka: (i) fizički kontakt između bakterija, (ii) stabilizacija privlačnih sila između čvrstih površina i bakterija, (iii) agregacija stanica zbog lučenja *EPS*, i (iv) oblikovanje stacionarne trodimenzionalne strukture pomoću hidrodinamičkih sila smicanja (Liu i Tay, 2002).

Karakteristike aerobnih granula su vrlo dobro zadržavanje biomase, odlična taloživost, mogućnost istovremenog uklanjanja dušika i fosfora, otpornost na toksične tvari i velike brzine opterećenja (Gonzalez-Gil i Holliger, 2014). U odnosu na tehnologiju koja primjenjuje flokulirani mulj, tehnologija aerobnih granula ima 23-40 % manju potrošnju električne energije, 20-25 % manje operativnih troškova, i 50-75 % manje zahtjeva za prostorom, a u odnosu na membranske reaktore ima 35-70 % manju potrošnju električne energije (Bengtsson i sur., 2018).

Aerobne granule znatno su veće (0,2-5 mm) od flokula (< 0,2 mm), pravilnog i sferičnog oblika a flokule su nepravilnog i nitastog oblika. Odlikuju se dobrom proizvodnjom *EPS*, velikom kompaktnosti i gustoćom za razliku od flokuliranog mulja. Aerobne granule talože se brzinom 10-90 m/h, a flokulirani mulj 2-10 m/h (Bengtsson i sur., 2018; Nancharaiah i Reddy 2018).

Granule su slojevite strukture u kojoj dolazi do opadanja/smanjenja gradijenta kisika prema središtu granule i formiranja aerobnih, anoksičnih i anaerobnih zona, što omogućava raznolikost mikroorganizama u granulama i zato se granule mogu smatrati „mini ekosustavom“ (Liu i Tay, 2004).

Formiranju granula iz flokuliranog aktivnog mulja pogoduje niz okolišnih i procesnih čimbenika, poput: kratko vrijeme taloženja, veliki omjer visine i promjera reaktora, velike hidrodinamičke sile smicanja, šaržni rad sustava s periodima obilnog hranjenja i gladovanja (Wilén i sur., 2018), veća proizvodnja *EPS*, prisutnost kalcijevih iona i niža koncentracija inhibitornih tvari, duže vrijeme zadržavanja krutih tvari, viša koncentracija otopljenog kisika (*DO*, engl. Dissolved Oxygen), brzina organskog opterećenja, sastav podloge (Nancharaiah i Reddy 2018).

Jedan od najvećih izazova primjene aerobnih granula je njihov dugotrajan stabilnost, budući da pri dugotrajnom vođenju procesa većinom dolazi do raspadanja granula a čemu pridonosi prekomjerni rast filamentoznih vrsta, organičenije prijenosa mase, smanjena sklonost stanica za agregaciju, te nastajanje anaerobnih zona unutar granula (Adav i sur., 2010), duljina trajanja aeracije, intenzitet aeracije, brzina organskog opterećenja i omjer C/N (ugljik/dušik) (He i sur., 2019).

Aerobni granularni mulj koristi se za obradu komunalne i industrijske otpadne vode, u laboratorijskom i industrijskom mjerilu (He i sur., 2019). Komunalna otpadna voda je izazov za učinkovitu biološku obradu zbog niskog omjera C/N (< 4). Nedovoljna količina organskih sastojaka utječe na učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora, te na stabilnost i raspadanje granula (Kim i sur., 2021; He i sur., 2019; Kim i Ahn, 2019; Kocaturk i Erguder, 2016; Luo i sur., 2014).

Za uklanjanje dušika iz otpadne vode primjenjuje se kombinacija procesa nitrifikacije i denitrifikacije. Nitrifikacija je oksidacija amonijaka preko nitrita do nitrata, a denitrifikacija redukcija nitrata preko nitrita do plinovitog dušika. Nitrifikaciju provode nitrificirajuće bakterije, aerobne autotrofne bakterije: (i) amonijak oksidirajuće bakterije, *AOB*, koje provode oksidaciju amonijaka do nitrita, i (ii) nitrit oksidirajuće bakterije, *NOB*, koje provode oksidaciju nitrita do nitrata. Nitrificirajuće bakterije karakterizira vlo niska brzina rasta (Metcalf i Eddy, 2003; Gerardi, 2002). Luo i sur. (2014) su istaknuli da smanjenje omjera KPK/N s 4 na 1 ima nepovoljan učinak na brzinu i učinkovitost nitrifikacije zbog pomaka u sastavu zajednice mikroorganizama u aerobnim granulama i smanjenju sadržaja *EPS*, zbog čega se smanjuje fizička snaga i veličina granula, i narušava se taloživost. Denitrifikaciju provode denitrificirajuće bakterije, pri čemu se nitrati reduciraju do plinovitog dušika. Denitrificirajuće bakterije su anoksični heterotrofni organizmi koji posjeduju niz reduktaza: nitrat reduktaza (Nar, engl. Nitrate reductase) – reducira nitrat do nitrita, nitrit reduktaza (Nir, engl. Nitrite reductase) – reducira nitrit do dušikovog

monoksida, dušikov monoksid reduktaza (Nor, engl. Nitrit oxide reductase) – reducira dušikov monoksid do didušikovog oksida i didušikov oksid reduktaza (Nos, engl. Nitrous oxide reductase) – reducira didušikov oksid do plinovitog dušika. Za denitrifikaciju nitrata potrebni su organski sastojci kao donori elektrona, koji mogu biti: (i) biološki razgradivi organski sastojci u otpadnoj vodi, (ii) dodani vanjski izvor ugljika, primjerice metanol, glukoza, acetat, propionat, i (iii) unutarstanične rezerve ugljika. Potrebna količina organskih sastojaka (omjer C/N) za potpunu denitrifikaciju nitrata ovisi o sastavu izvora ugljika. Također, izvor ugljika je jedan od čimbenika koji utječe na brzinu denitrifikacije, pri čemu se s lakorazgradivim izvorom ugljika postiže veća brzina denitrifikacije (Metcalf i Eddy, 2003; Gerardi, 2002).

Za uklanjanje fosfora iz otpadnih voda odgovorni su fosfor akumulirajući organizmi (*PAOs*, engl. *Phosphate Accumulating Organisms*), u procesu naprednog biološkog uklanjanja fosfora, u naizmjeničnim anaerobno aerobnim (anoksičnim) uvjetima. U anaerobnim uvjetima *PAOs* u stanice unose hlapljive masne kiseline iz vodenog medija i pohranjuju kao polihidroksialkanoate (*PHAs*, engl. *Polyhydroxyalkanoates*). Energiju potrebnu za taj proces *PAOs* dobivaju hidrolizom glikogena i otpuštanjem ortofosfata iz unutarstaničnih rezervi polifosfata u miješanu tekućinu. U aerobnim uvjetima *PAOs* koriste rezerve *PHA* za unos fosfata iz vodenog medija u svoje stanice i pohranjuju ih kao polifosfate, za obnavljanje rezervi glikogena i za stanični rast, pri čemu je bilanca procesa na strani aerobnog unosa fosfata. U aerobnim uvjetima akceptor elektrona je kisik (Bunce i sur., 2018; He i sur., 2018; Barr i sur., 2010), a kad se umjesto aerobne faze primijeni anoksična faza akceptori elektrona su nitrati odnosno nitriti. Za uklanjanje fosfata iz otpadnih voda u anaerobno/anoksičnim uvjetima odgovorni su denitrificirajući fosfor akumulirajući organizmi (*DPAOs*, engl. *Denitrifying Phosphorus Accumulating Organisms*). *DPAOs* su skupina *PAOs* koji imaju anaerobno/anoksičan metabolizam. Izuzev akceptora elektrona, metabolizam *PAOs* i *DPAOs* je isti. Ipak, u sustavima u kojima se primjenjuje anaerobno/anoksična faza za uklanjanje fosfora iz otpadnih voda, zabilježena je ušteda na izvoru ugljika, ušteda na kisiku, i manji višak aktivnog mulja. Također, pri ovakvoj konfiguraciji reaktora, moguće je postići istovremeno uklanjanje organskih sastojaka, dušika i fosfora (Bunce i sur., 2018; He i sur., 2018; Barr i sur., 2010).

Neovisno o primijenjenoj konfiguraciji reaktora, anaerobno/aerobnoj ili anaerobno/anoksičnoj, konačno uklanjanje fosfora se odvija prilikom ispuštanja viška aktivnog mulja iz *SBR* reaktora, koji je bogat fosfatima. Takav mulj se može koristiti kao izvor fosfata (Bunce i sur., 2018; He i sur., 2018; Barr i sur., 2010).

U procesu naprednog biološkog uklanjanja fosfora prisutni su i glikogen akumulirajući organizmi (*GAOs*, engl. *Glycogene Accumulating Organisms*) koji se tijekom anaerobne faze nadmeću sa *PAOs* za hlapljive masne kiseline, ali *GAOs* nemaju mogućnost unosa fosfata u svoje stanice. Ukoliko dođe do proliferacije *GAOs*, tijekom anaerobne faze unesu više hlapljivih masnih kiselina u svoje stanice pa *PAOs* nemaju dovoljno rezervi *PHA* u narednoj aerobnoj/anoksičnoj fazi i posljedično dolazi do narušavanja učinkovitosti uklanjanja fosfata (Bunce i sur., 2018; de Sousa Rollemberg i sur., 2018; He i sur., 2018; Xia i sur., 2018; Sarma i Tay, 2018).

Cilj ovog rada bio je istražiti učinak omjera C/N na aktivnost aerobnih granula u obradi sintetske otpadne vode koja simulira komunalnu otpadnu vodu.

Materijali i metode

Aktivni mulj s uređaja za obradu komunalnih otpadnih voda granuliran je na način da je vrijeme taloženja postupno skraćeno s 30 min na 10 min. U pokusima su korištene zrele aerobne granule koncentracije 3 g *MLSS/L* (engl. Mixed Liquor Suspended Solids, hrv. suspendirane čestice miješane tekućine).

Sintetska otpadna voda je priređena otapanjem soli u vodovodnoj vodi: 2 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 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 . Otopina elemenata u tragovima je dodana u količini 0,3 mL/L sastava: 1,5 g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L H_3BO_3 , 0,03 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,18 g/L KI , 0,12 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,06 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,12 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,15 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 g/L EDTA (Smolders i sur., 1994). Nakon 24 h stajanja na sobnoj temperaturi filtrirana je kroz grubi filter papir veličine pora 0,45 μm . Natrijev acetat – izvor ugljika, odvagana je u odgovarajućoj količini za postizanje odabranog omjera C/N 4, 8 i 12. Odabrani omjer C/N održavan je tijekom 50 dana pokusa. Pokusi su vođeni pri vrijednosti pH u rasponu 7-8, koncentraciji otopljenog kisika 2 mg *DO/L* tijekom faze reakcije i pri temperaturi 22 ± 2 °C.

Pokusi su vođeni u laboratorijskom *SBR* reaktoru (engl. Sequencing Batch reactor, hrv. šaržni reaktor koji radi u slijedu), rađenom po narudžbi, radnog volumena 2 L. Ciklus je trajao 12 sati, i sastojao se od faza: punjenje (20 min), reakcija (11 h i 10 min), taloženje (10 min) i dekantiranje (20 min). Reaktor je bio opremljen elektrodama i mjernim aparatima za motrenje temperature, koncentracije otopljenog kisika (WTW Oxi3210 i DurOx, Njemačka) i vrijednosti pH (WTW 330i i SenTix41, Njemačka). Aeracija je imala ulogu osiguravanja kontakta mikroorganizama i supstrata – miješanje, i osiguravanja željene koncentracije otopljenog kisika, koja je ostvarena upuhivanjem zraka u *SBR* pomoću kompresora (HIBLOW HP 40, SAD). Omjer izmjene volumena (engl. volume exchange ratio) je iznosio 50 %.

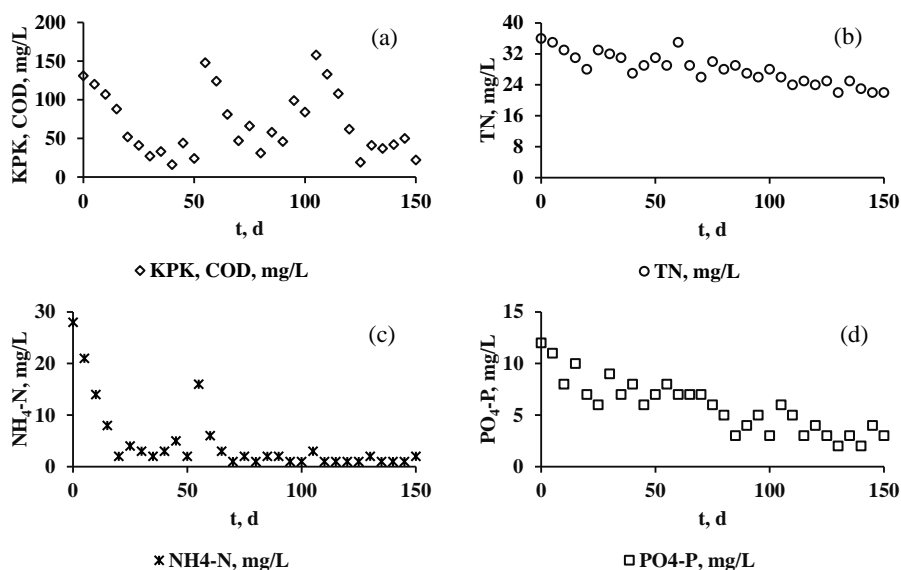
Koncentracije KPK (Kemijska Potrošnja Kisika), *TN* (engl. Total Nitrogen, hrv. ukupni dušik), $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, $\text{PO}_4\text{-P}$ i *MLSS* su određivane prema standardnim metodama (APHA, 2005).

Rezultati i rasprava

Nizak omjer C/N, odnosno KPK/N, karakterističan za komunalnu otpadnu vodu, je često ograničavajući čimbenik za postizanje zakonom propisanih vrijednosti organskih sastojaka i nutrijenata za ispušt u površinske vode (Wagner i sur., 2015). Nedovoljan omjer KPK/N se često kompenzira dodatkom vanjskog izvora ugljika, poput primjerice acetata. Razlozi korištenja acetata su vrlo kratko vrijeme prilagodbe mikroorganizama na acetat, s acetatom se postižu veće brzine uklanjanja nutrijenata

u odnosu na primjerice etanol i metanol i mikroorganizmi vrlo lako mogu koristiti acetat kao izvor ugljika. S druge strane, acetat je skuplji od metanola i etanola (Osaka i sur., 2008; Peng i sur., 2007).

Učinkovitost uklanjanja KPK rasla je s porastom omjera C/N, i pri omjerima C/N 4, 8 i 12 ostvarena je prosječna učinkovitost uklanjanja KPK 89 %, 93 % i 96 % (Slika 1a).



Slika 1. Promjena koncentracije: (a) KPK, (b) ukupnog dušika, (c) $\text{NH}_4\text{-N}$, i (d) $\text{PO}_4\text{-P}$, pri omjerima C/N 4, 8 i 12

Figure 1. The variations of: (a) COD, (b) total nitrogen, (c) $\text{NH}_4\text{-N}$, and (d) $\text{PO}_4\text{-P}$ concentration, at ratios C/N 4, 8 and 12

Pri sva tri istraživana omjera C/N prosječna vrijednost KPK u izlazu je bila niža od maksimalne dopuštene koncentracije za ispušt u površinske vode (Slika 1a) (Pravilnik, 2020). Isti trend promjene KPK vrijednosti u izlazu je vidljiv pri svim istraživanim omjerima C/N: KPK vrijednost izlaza bila je bila viša u početnim danima izloženosti mikroorganizama višem omjeru C/N a zatim se smanjivala i ustalila (Slika 1a). Promjene vrijednosti KPK odražavaju metabolizam heterotrofnih organizama, koji koriste organske sastojke kao izvor energije i ugljika (Kocaturk i Erguder, 2016). Povećanje omjera KPK/N rezultira dominacijom heterotrofnih bakterija i postupnim smanjenjem brojnosti i raznolikosti mikroorganizama prisutnih u granulama (Zhao i sur., 2013).

Granule karakterizira slojevita i kompaktna struktura zbog čega dolazi do otpora difuzije i gradijenta supstrata i kisika od površine granule prema unutrašnjosti, pa su u granulama prisutne anaerobna, anoksična i aerobna zona (Gonzalez-Gil i Holliger, 2014; Chen i sur., 2007), što upućuje da su heterotrofni organizmi koji su trošili organske sastojke vjerojatno i aerobni i anoksični heterotrofni organizmi (Desireddy i Sabumon, 2021; He i sur., 2019; He i sur., 2018; Sarma i Tay, 2018; Xia i sur., 2018), iako je koncentracija otopljenog kisika tijekom faze reakcije u bioreaktoru iznosila 2 mg *DO/L*.

Omjer *KPK/N* važan je zbog sastava mikrobne populacije u granulama, stabilnog i dugotrajnog rada uređaja za biološku obradu otpadnih voda, održavanja integriteta granula i učinkovitosti biološke obrade otpadnih voda (He i sur., 2017). U literaturi se navodi da su niži omjer *KPK/N* poput $KPK/N \leq 3,3$ odgovarajući za nitrificirajuće bakterije, omjer *KPK/N* 7,5 pogoduje održavanju stabilnosti aerobnih granula, dok viši omjeri poput $KPK/N \geq 20$ odgovara heterotrofima (Kim i sur., 2021; Kocaturk i Erguder, 2016).

Nedostatak niskog omjera *KPK/N*, poput omjera *KPK/N* 1-5, je raspadanje granula zbog nedovoljne količine organskih sastojaka, pri čemu dolazi do ispiranja mulja iz sustava (Kim i sur., 2021; Kim i Ahn, 2019; Kocaturk i Erguder, 2016; Luo i sur., 2014).

Slični rezultati uklanjanja organskih sastojaka s rezultatima ovog rada (slika 1a), su prikazani u literaturi: pri omjeru *KPK/N* 7,5 i nižem, zabilježena je učinkovitost uklanjanja *KPK* 63-79 %, pri omjeru *KPK/N* 10 zabilježeno je 76-90 % i pri omjeru *KPK/N* 20 je zabilježena učinkovitost uklanjanja *KPK* 94 % (Kocaturk i Erguder, 2016), kao i učinkovitost uklanjanja *KPK* 93,7 %, 90,8 %, 82,4 % i 70,7 % pri omjerima *KPK/N* 10, 7,5, 5 i 2,5 (Kim i Ahn, 2019). Visok omjer *KPK/N* 30 je doveo do smanjenja učinkovitosti uklanjanja *KPK* s 95 % na 87 % zbog proliferacije filamentoznih bakterija koje su narušile strukturu granula (Kocaturk i Erguder, 2016). Učinkovitost uklanjanja ukupnog dušika od 55 %, 59 % i 66 % i prosječne vrijednosti ukupnog dušika u izlazu 31,5 mg *TN/L*, 29 mg *TN/L* i 24 mg *TN/L* postignuto pri omjeru *C/N* 4, 8 i 12 (Slika 1b) ne zadovoljavaju zakonske propise za ispust u površinske vode nego za ispust u sustav javne odvodnje (Pravilnik, 2020). Slične rezultate uklanjanja *N* pri omjeru *KPK/N* 5, 10, 15 i 20 od 57,5 %, 61,6 %, 69,6 % i 79,1 % su zabilježili Kim i sur. (2021), kao i učinkovitost uklanjanja *N* od 72,3 %, 65,3 %, 61,7 % i 52,3 % pri *KPK/N* omjerima 10, 7,5, 5 i 2,5 (Kim i Ahn, 2019). Kocaturk i Erguder (2016) su pri omjeru *KPK/N* 1 zabilježili uklanjanje *N* od 26 %, pri omjerima *KPK/N* 2-7,5 učinkovitost uklanjanja *N* od 35-54 %, a pri *KPK/N* omjerima 7,5-30 učinkovitost uklanjanja *N* od 17-18 %.

Prosječne koncentracije NH_4-N u izlazu (Slika 1c) su bile 8,4 mg NH_4-N/L , 3,5 mg NH_4-N/L i 1,4 mg NH_4-N/L pri omjerima *C/N* 4, 8 i 12, pri čemu je ostvarena učinkovitost uklanjanja NH_4-N 88 %, 95 % i 98 %, a postignute koncentracije su bile unutar raspona vrijednosti dopuštenih za ispust u površinske vode (Pravilnik, 2020). U literaturi su objavljene učinkovitosti uklanjanja amonijaka od 75 % (*KPK/N* 1), više od 90 % (*KPK/N* 2-7,5), 37 % (*KPK/N* 7,5-30) (Kocaturk i Erguder, 2016).

Unatoč kompeticiji za otopljeni kisik između heterotrofa i nitrificirajućih bakterija, a tijekom faze reakcije u *SBR* ciklusu održavana je aeracija na 2 mg *DO*/L, uz uklanjanje organskih sastojaka (slika 1a) postignuta je i oksidacija $\text{NH}_4\text{-N}$ (slika 1c), što sugerira da je bila osigurana dovoljna koncentracija otopljenog kisika u miješanoj tekućini i da je u aerobnim granulama prisutna odgovarajuća brojnost nitrificirajućih bakterija dobre aktivnosti.

Pokusi u ovom radu (slika 1c) vođeni su pri rasponu vrijednosti pH 7-9, koja je povoljna za nitrificirajuće bakterije, te nije došlo do pomaka u ravnoteži između ionskog $\text{NH}_4\text{-N}$ u molekularni NH_3 , kao ni do pomaka između ionskog $\text{NO}_2\text{-N}$ u molekularni HNO_2 , slobodnu nitritnu kiselinu. Nitrificirajuće bakterije ne mogu koristiti NH_3 kao izvor dušika, i NH_3 se otplinjava (pri visokoj vrijednosti pH). Slobodna nitritna kiselina je poznati inhibitor metabolizma brojnih skupina mikroorganizama prisutnih u aktivnom mulju (pri niskoj vrijednosti pH) (Gerardi, 2002; Anthonisen i sur., 1976).

Slojevita struktura granula omogućava odvijanje istovremene nitrifikacije i denitrifikacije, zbog prisutne aerobne, anoksične i anaerobne zone u granulama (Szabó i sur., 2017; Chen i sur., 2007).

U izlazu je zabiježena određena koncentracija ukupnog dušika (slika 1b) zbog nepotpune denitrifikacije nitrata akumuliranih tijekom procesa nitrifikacije, što se može objasniti: (i) većom koncentracijom otopljenog kisika unutar granule od one koja je potrebna za denitrificirajuće bakterije, što je dovelo do djelomične inhibicije denitrificirajućih reduktaza (Wang i Chu, 2016), (ii) utroškom organskih sastojaka od strane aerobnih heterotrofa, pa nije više bilo dovoljno donora elektrona za redukciju nitrata (Gutierrez-Wing i sur., 2012), i (iii) prekratkim fazom punjenja (20 min) koja se odvijala bez aeracije, pa su *PAOs* i *GAOs* koristili dio organskih sastojaka i pospremili ih kao unutarstanične zalihe ugljika, *PHAs*, pri čemu je brzina denitrifikacije s unutarstaničnim zalihama ugljika znatno niža u odnosu na vanjski, lako razgradivi supstrat, poput acetata (Karahana i sur., 2008).

Duljina anaerobne faze tijekom faze punjenja bioreaktora povoljno utječe na učinkovitost uklanjanja dušika (Yuan i sur., 2019; Kocaturk i Erguder, 2016).

Prosječne koncentracije $\text{PO}_4\text{-P}$ u izlazu iznosile su 8,3 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$, 5,5 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ i 3,5 mg $\text{PO}_4\text{-P/L}$ uz učinkovitost uklanjanja $\text{PO}_4\text{-P}$ od 31 %, 54 % i 71 %, pri C/N 4, 8 i 12 (Slika 1d) Izlazne vrijednosti $\text{PO}_4\text{-P}$ nisu bile zadovoljavajuće za ispuštavanje u površinske vode, ali su bile zadovoljavajuće kvalitete za ispuštavanje u sustav javne odvodnje (Pravilnik, 2020).

U ovom radu povećanje omjera C/N (slika 1d) je omogućilo veću raspoloživu količinu acetata za pohranu u obliku *PHA*, što je rezultiralo manjim koncentracijama fosfata u izlazu. Kako se faza punjenja provodila bez aeracije, koncentracija otopljenog kisika je bila vrlo mala, *PAOs* su tijekom faze punjenja koristili dio acetata i pospremili ga kao *PHA*, koji su zatim u fazi reakcije (aerobna faza) koristili za unos fosfata u stanice. Moguće je da je 20 minuta faze punjenja bilo nedovoljno za stvaranje značajnije zalihe *PHA*, pa je to vjerojatan razlog zabilježene koncentracije fosfata u izlazu pri svim istraživanim C/N omjerima.

Tijekom aerobne faze, za kisik kao akceptor elektrona, natjecali su se *PAOs*, nitrifikanti i aerobni heterotrofi. *DPAOs*, prisutni u dubljim slojevima granule su koristili nitrate i nitrite kao akceptore elektrona za unos fosfata u stanice. Tijekom faze punjenja odvijala se vjerojatno i kompeticija za acetat između *PAOs* i *GAOs*.

Zaključci

Istovremeno uklanjanje organskih sastojaka, ukupnog dušika, amonijaka i ortofosfata je postignuto pomoću zrelih aerobnih granula u *SBR* reaktoru laboratorijskog mjerila. S povećanjem omjera C/N od 4 do 12 raste učinkovitost uklanjanja *KPK*, *TN*, amonijakalnog dušika i $PO_4\text{-P}$. Slojevita struktura granula omogućila je odgovarajuće uvjete za aktivnost nitrificirajućih i denitrificirajućih bakterija i fosfor akumulirajućih organizama. Dulja faza punjenja pri anaerobnim uvjetima bi vjerojatno pridonijela boljoj učinkovitost uklanjanja dušika i fosfora. Aerobne granule pokazuju visoki potencijal za obradu komunalne otpadne vode s ciljem uklanjanja organskih sastojaka i nutrijenata.

Literatura

- Adav, S. S., Lee, D. J., Lai, J. Y. (2010): Potential cause of aerobic granular sludge breakdown at high organic loading rates, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1601-1610.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B., Srinath, E. G. (1976): Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid, *J. Water Pollut. Control. Fed.* 48, 835-852.
- APHA (2005): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21. izd., American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), Water Environment Federation, Washington DC.
- Barr, J. J., Cook, A. E., Bond, P. L. (2010): Granule formation mechanisms within an aerobic wastewater system for phosphorus removal, *Appl. Environ. Microb.* 76, 7588-7597.
- Bengtsson, S., Blois, M., Wilén, B., Gustavsson, D. (2018): A comparison of aerobic granular sludge with conventional and compact biological treatment technologies, *Environ. Technol.* 13, 1479-1487.
- Bunce, J. T., Ndam, E., Ofiteru, I. D., Moore, A., Graham, D. W. (2018): A review of phosphorus removal technologies and their applicability to small-scale domestic wastewater treatment systems, *Front. Environ. Sci.* 6, 8.
- Chen, Y., Jiang, W., Liang, D. T., Tay, J. H. (2007): Structure and stability of aerobic granules cultivated under different shear force in sequencing batch reactors, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 76, 1199-1208.
- de Sousa Rollemberg, S. L., Barros, A. R. M., Firmino, P. I. M., Dos Santos, A. B. (2018): Aerobic granular sludge: Cultivation parameters and removal mechanisms, *Bioresour. Technol.* 270, 678-688.
- Desiredy, S., Sabumon, P. C. (2021): Development of aerobic granulation system for simultaneous removal of C, N, and P in sequencing batch airlift reactor, *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 106100.
- Gerardi, M. H. (2002): Nitrification and Denitrification in the Activated Sludge Process, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Gonzalez-Gil, G., Holliger, C. (2014): Aerobic granules: microbial landscape and architecture, stages, and practical implications, *Appl. Environ. Microb.* 80, 3433-3441.

- Gutierrez-Wing, M. T., Malone, R. F., Rusch, K. A. (2012): Evaluation of polyhydroxybutyrate as a carbon source for recirculating aquaculture water denitrification, *Aquac. Eng.* 51, 36-43.
- He, Q., Chen, L., Zhang, S., Chen, R., Wang, H. (2019): Hydrodynamic shear force shaped the microbial community and function in the aerobic granular sequencing batch reactors for low carbon to nitrogen (C/N) municipal wastewater treatment, *Bioresour. Technol.* 271, 48-58.
- He, Q., Chen, L., Zhang, S., Wang, L., Liang, J., Xia, W., Wang, H., Zhou, J. (2018): Simultaneous nitrification, denitrification and phosphorus removal in aerobic granular sequencing batch reactors with high aeration intensity: Impact of aeration time, *Bioresour. Technol.* 263, 214-222.
- He, Q., Zhang, W., Zhang, S., Wang, H. (2017): Enhanced nitrogen removal in an aerobic granular sequencing batch reactor performing simultaneous nitrification, endogenous denitrification and phosphorus removal with low superficial gas velocity, *Chem. Eng. J.* 326, 1223-1231.
- Karahan, O., Orhon, D., van Loosdrecht, M. C. M. (2008): Simultaneous storage and utilization of polyhydroxyalkanoates and glycogen under aerobic conditions, *Water Sci. Technol.* 58, 945-951.
- Kim, H. G., Ahn, D. H. (2019): Effects on the stability of aerobic granular sludge (AGS) at different carbon/nitrogen ratio, *J. Environ. Sci. Int.* 28, 719-727.
- Kim, H. G., Kim, J. T., Ahn, D. H. (2021): Effects of carbon to nitrogen ratio on the performance and stability of aerobic granular sludge, *Environ. Eng. Res.* 26, 190284.
- Kocaturk, I., Erguder, T. H. (2016): Influent COD/TAN ratio affects the carbon and nitrogen removal efficiency and stability of aerobic granules, *Ecol. Eng.* 90, 12-24.
- Liu, Y. Q., Tay, J. H. (2004): State of art of biogranulation technology for wastewater treatment, *Biotechnol. Adv.* 22, 533-563.
- Liu, Y., Tay, J. H. (2002): The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge, *Water Res.* 36, 1653 - 1665.
- Luo, J., Hao, T., Wei, L., Mackey, H. R., Lin, Z., Chen, G. H. (2014): Impact of influent COD/N ratio on disintegration of aerobic granular sludge, *Water Res.* 62, 127-135.
- Metcalf & Eddy (2003): *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse*. 4. izd., Tchobanoglous G, Burton FL, Stensel HD (ured.), McGraw-Hill Education, New York.
- Nancharaiyah, Y. V., Reddy, G. K. K. (2018): Aerobic granular sludge technology: mechanisms of granulation and biotechnological applications, *Bioresour. Technol.* 247, 1128-1143.
- Osaka, T., Shirotani, K., Yoshie, S., Tsuneda, S. (2008): Effects of carbon source on denitrification efficiency and microbial community structure in a saline wastewater treatment process, *Water Res.* 42, 3709-3718.
- Peng, Y., Ma, Y., Wang, S. (2007): Denitrification potential enhancement by addition of external carbon sources in a pre-denitrification process, *J. Environ. Sci.* 19, 284-289.
- Pravilnik (2020): Pravilnik o graničnim vrijednostima emisija otpadnih voda. Narodne Novine 26, Zagreb. Pristupljeno 23. kolovoza 2020
- Sarma, S. J., Tay, J. H. (2018): Carbon, nitrogen and phosphorus removal mechanisms of aerobic granules, *Crit. Rev. Biotechnol.* 38, 1077-1088.
- Smolders, G. J., van der Meij, J., van Loosdrecht, M. C. M., Heijnen, J. J. (1994): Model of the anaerobic metabolism of the biological phosphorus removal process: Stoichiometry and pH influence, *Biotechnol. Bioeng.* 43, 461-470.
- Szabó, E., Liébana, R., Hermansson, M., Modin, O., Persson, F., Wilén, B. M. (2017): Microbial population dynamics and ecosystem functions of anoxic/aerobic granular sludge in sequencing batch reactors operated at different organic loading rates, *Front. Microbiol.* 8, 1-14.

- Wagner, J., Guimaraes, L. B., Akaboci, T. R. V., Costa, R. H. R. (2015): Aerobic granular sludge technology and nitrogen removal for domestic wastewater treatment, *Water Sci. Technol.* 71, 1040-1046.
- Wang, J., Chu, L. (2016): Biological nitrate removal from water and wastewater by solid-phase denitrification process, *Biotechnol. Adv.* 34, 1103-1112.
- Wilén, B. M., Liébana, R., Persson, F., Modin, O., Hermansson, M. (2018): The mechanisms of granulation of activated sludge in wastewater treatment, its optimization, and impact on effluent quality, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 5005 – 502.
- Xia, J., Ye, L., Ren, H., Zhang, X. X. (2018): Microbial community structure and function in aerobic granular sludge, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3967-3979.
- Yuan, Q., Gong, H., Xi, H., Xu, H., Jin, Z., Ali, N., Wang, K. (2019): Strategies to improve aerobic granular sludge stability and nitrogen removal based on feeding mode and substrate, *J. Environ. Sci.* 84, 144-154.
- Zhao, Y., Huang, J., Zhao, H., Yang, H. (2013): Microbial community and N removal of aerobic granular sludge at high COD and N loading rates, *Bioresour. Technol.* 143, 439-446.

Wastewater treatment by aerobic granules at different C/N ratios

**Dijana Grgas^{1*}, Marija Biškup¹, Mirjana Galant², Tea Štefanac¹,
Korana Ambrozić³, Tibela Landeka Dragičević¹**

¹University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Pierotti Str. 6,
10000 Zagreb, Croatia

²Odvodnja Poreč d.o.o., Mlinska 1, 52440 Poreč, Croatia

³TD Vodovod d.o.o. Slavonski Brod, Nikole Zrinskog 25, 35000 Slavonski Brod, Croatia

*Corresponding author: dgrgas@pbf.hr

original scientific paper

Summary

Mature aerobic granules for the treatment of synthetic wastewater in a laboratory *SBR*, were used. The decomposition of 70 ± 10 mg $\text{NH}_4\text{-N/L}$, at C/N ratios of 4, 8 and 12, with acetate as a carbon source, during 150 days was investigated. With an increase in the C/N ratio, the removal efficiency of organic compounds, $\text{NH}_4\text{-N}$, total nitrogen and $\text{PO}_4\text{-P}$ increased. The quality of treated wastewater with regard to COD value and ammoniacal nitrogen is below the maximum allowed concentrations for discharge into surface waters, while the values of total nitrogen and orthophosphate are of satisfactory quality for discharge into the public drainage system, at all investigated C/N ratios. A longer fill phase under anaerobic conditions would likely contribute to lower concentrations of total nitrogen and orthophosphate in the treated water.

Keywords: aerobic granular sludge, *SBR*, nutrient removal, synthetic wastewater

Ispitivanje ekotoksičnosti diklofenaka i pantoprazola

**Karlo Grgurević, Martina Miloloža, Vesna Očelić Bulatović,
Dajana Kučić Grgić***

*Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska*

**Dopisni autor: dkucic@fkit.hr*

originalni znanstveni rad

Sažetak

Usljed antropogenog djelovanja, ksenobiotici dospijevaju u okoliš. Ksenobiotici, među koje se ubrajaju farmaceutici, antibiotici, otrovi te pesticidi, su tvari koje su biološki aktivne, a zaostaju u okolišu u visokim koncentracijama s obzirom na njihovu jaku postojanost i bioakumulaciju. Prema tome, potrebno je istraživati njihov utjecaj na organizme u okolišu. U ovome je radu istraživana ekotoksičnost dvaju ksenobiotika, diklofenaka i pantoprazola, na četiri testna organizma: morskoj bakteriji *Vibrio fischeri*, bakteriji *Pseudomonas putida*, mikroalgi roda *Chlorella*, te kvascu *Saccharomyces cerevisiae*. Ispitivan je ekotoksični utjecaj svakog pojedinog navedenog ksenobiotika, ali i njihove smjese u volumnim omjerima 1:1, 2:1 i 1:2. Za navedeno je proveden test ekotoksičnosti s *V. fischeri* tijekom 30 min izloženosti uz praćenje smanjenja bioluminiscencije bakterije. Ukupan broj živih stanica bakterija (CFU) *P. putida* te mikroalgi *Chlorella* sp., pratio se tijekom 3 dana provedbe pokusa u svrhu uočavanja ekotoksičnog utjecaja na rast navedenih mikroorganizama. Tijekom istog vremena izloženosti, provodio se i pokus sa *S. cerevisiae* u kojem se pratio volumen nastalog CO₂, odnosno volumen istisnute tekućine. Rezultati promjene inhibicije u odnosu na ispitivane koncentracije diklofenaka i pantoprazola su prikazani karakterističnom krivuljom doza-odgovor, a kao najosjetljiviji testni organizmi pokazali su se *S. cerevisiae* te *V. fischeri*.

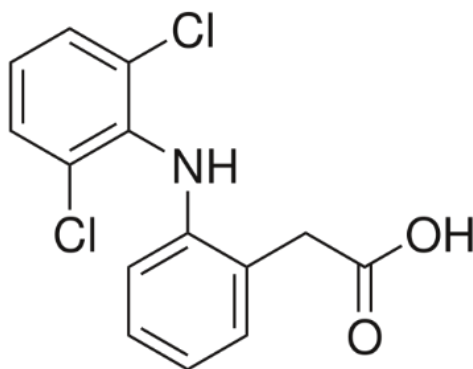
Ključne riječi: ekotoksičnost, Vibrio fischeri, Pseudomonas putida, Chlorella sp., Saccharomyces cerevisiae

Uvod

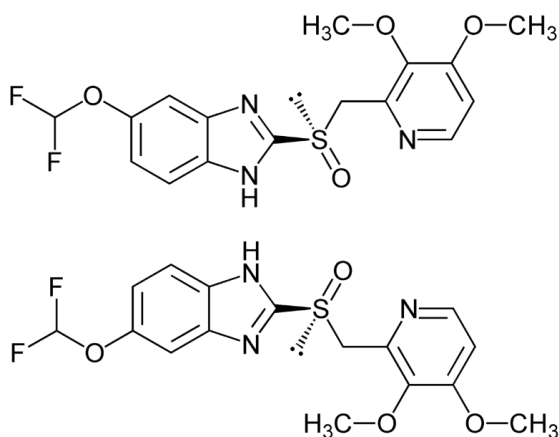
U današnje vrijeme, procesi poput urbanizacije, industrijalizacije, globalizacije, kao i porasta ljudske populacije imaju snažan utjecaj na cjelokupno društvo i okoliš. Iako su navedeni procesi doveli do nevjerojatnog ekonomskog i tehnološkog napretka, utjecaj na cjelokupni ekosustav u velikoj je mjeri negativan. Potreba za prolongiranjem i poboljšanjem ljudskog života, primarno proizvodnjom i korištenjem raznih lijekova, pesticida, aditiva u hrani i slično, povećala je mogućnost onečišćenja okoliša, odnosno namjernog i nenamjernog otpuštanja raznih supstanci u okoliš (Štefanac et al., 2021). Upravo se takve, biološki aktivne tvari koje antropogenim putem dospijevaju u određeni ekološki sustav nazivaju ksenobiotici (grč. *xenos*-stran, *bios*-život) (Posavec, 2015; Gudelj, 2016). Ksenobiotici se mogu kategorizirati na temelju više različitih kriterija, a najčešći su njihova struktura, uporaba, agregatno stanje i patofiziološki učinak. Tako ksenobiotike dijelimo na šest glavnih skupina:

pesticidi, farmaceutici, proizvodi za osobnu higijenu, zabranjene droge, nuklearni otpad i drugi industrijski produkti (Štefanac et al., 2021).

Analgetici su farmaceutici koji se mogu definirati kao tvari koje umanjuju osjećaj boli u nekom organizmu bez trajnih psihoaktivnih učinaka (Vandam, 1972). Postoje tri glavne skupine analgetika, a to su neopioidni, opioidni i pomoćni analgetici (Mimica Matanović, 2014). Svi neopioidni analgetici osim paracetamola spadaju u nesteroidne protuupalne lijekove. To znači da djeluju na način da se upliću u sustav prostaglandina, sustav tvari odgovoran za osjet boli i tako smanjuju upalu, oteknuće, nadražljivost i sam osjećaj boli (Mimica Matanović, 2014). Jedan od najčešće korištenih analgetika (slika 1) je diklofenak (Baranašić, 2019). Diklofenak (2-[2-(2,6-diklorfenilamino)fenil]octena kiselina) spada u nesteroidne protuupalne analgetike koji se koristi za ublažavanje boli u zglobovima, mišićima i kostima (National Library of Medicine). Struktura diklofenaka omogućava mu sposobnost inhibicije enzima ciklooksigenaze-1 i ciklooksigenaze-2 koji su odgovorni za sintezu prostaglandina, tvari koja uzrokuje osjet boli (Puljak, et al., 2015). Pantoprazol ((*RS*)-5-(difluormetoksi)-2-[(3,4-dimetoksipiridin-2-il)metilsulfinil]-3*H*-benzoimidazol) (Milić, 2021) (Slika 2) spada u lijekove koji se nazivaju inhibitorima protonske pumpe, a djeluju na način da smanjuju količinu proizvedene želučane kiseline (Kosma, 2016). Nakon konzumacije, ljudski organizam izlučuje oko 70-95 % pantoprazola u obliku farmaceutski aktivnih i neaktivnih metabolita. Zbog konstantnog unosa diklofenaka i pantoprazola u okoliš, navedeni farmaceutici postaju pseudotrajni onečišivači okoliša (Sathishkumar et al., 2020). Pseudotrajni onečišivači su tvari koje su biološki razgradive, međutim uslijed kontinuiranih emisija u okoliš mogu se u njemu trajno akumulirati (Sathishkumar et al., 2020).



Slika 1. Strukturna formula diklofenaka
Figure 1. Structural formula of diclofenac



Slika 2. Strukturna formula pantoprazola
Figure 2. Structural formula of pantoprazole

Otpadne vode su jedan od najvećih izvora onečišćujućih tvari koje narušavaju kvalitetu i čistoću prirodnih voda, tla i okoliša u cjelini (Janton, 2017). Prema Zakonu o vodama (NN 84/2021) otpadne se vode prema svojem porijeklu mogu podijeliti na oborinske, tehnološke i komunalne otpadne vode (NN 66/2019). Farmaceutska industrija široko je rasprostranjen i kompleksan sustav koji za proizvodnju koristi brojne reaktante, katalizatore, otapala, a između ostalog i vodu kao ulaznu i izlaznu sirovinu. Voda se koristi prilikom obrade, formuliranja i proizvodnje lijekova što uzrokuje nastanak otpadnih voda čiji sastav i količina ovisi o vrsti proizvodnog procesa u kojem se koriste. Najčešće sadržavaju neizreagirane reaktante, međuprodukte, ostatke djelatnih tvari, katalizatore i slično te se zbog toga i farmaceutske otpadne vode mogu svrstati u zasebnu kategoriju (Janton, 2017). Budući da njihovo nekontrolirano ispuštanje u okoliš može izazvati negativne učinke, farmaceutske i ostale organske tvari sadržane u otpadnim vodama nužno je pravilno zbrinuti. U tu svrhu primjenjuju se brojni fizikalno-kemijski i biološki postupci obrade kao što su membranski procesi, adsorpcija, kemijska oksidacija i slično. Zbog visoke učinkovitosti obradnih procesa visoke koncentracije farmaceutika ne predstavljaju toliki problem za okoliš (Janton, 2017). Ono što je potencijalno opasno za sve članove ekosustava jesu farmaceutici u tragovima, koji se ponekad ne mogu detektirati, a imaju sposobnost akumulacije u okolišu i organizmima koji u njemu obitavaju (Travis et al., 1991). Spoznaje o ekotoksikološkim utjecajima farmaceutika u niskim koncentracijama na organizme i mikroorganizme u tlu i vodi nisu potpuna, zbog čega je nužno njihovo dodatno istraživanje. Mikroorganizmi su prijeko potrebni za održavanje funkcionalnosti ekosustava jer razgradnjom organskih tvari osiguravaju hranjive tvari za druge organizme u hranidbenom lancu. Iako imaju sposobnost vrlo brze prilagodbe na novonastale okolišne uvjete, često navedene tvari mogu toksično

djelovati na njih što se u konačnici odražava na cijeli ekosustav, uključujući i na čovjeka (Miloloža, 2018).

U ovom znanstvenom radu ispitaio se ekotoksični utjecaj ksenobiotika, odnosno farmaceutika diklofenaka i pantoprazola, na četiri testna organizma: morsku bakteriju *Vibrio fischeri*, bakteriju *Pseudomonas putida*, mikroalgu *Chlorella* sp. te na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*.

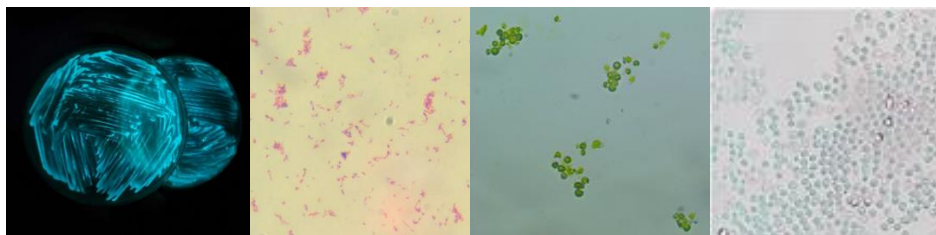
Materijali i metode

Ksenobiotici

Ksenobiotici korišteni u ovom istraživanju su diklofenak i pantoprazol proizvođača Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka. Koncentracija temeljne otopine diklofenaka i pantoprazola iznosila je $\gamma = 32 \text{ mg L}^{-1}$. Radne koncentracije ispitivanih ksenobiotika bile su $\gamma_1 = 16 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_2 = 8 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_3 = 2 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma_4 = 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ i $\gamma_5 = 0,125 \text{ mg L}^{-1}$. Za pripremu smjesa diklofenaka i pantoprazola koristile su se njihove temeljne otopine. Smjese diklofenaka i pantoprazola pripremljene su u njihovim volumnim omjerima 1:1, 2:1 i 1:2.

Testni organizmi

Ekotoksičnost diklofenaka i pantoprazola te njihovih smjesa određivala se pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*, bakterije *Pseudomonas putida*, mikroalge *Chlorella* sp i kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, slika 3. Navedeni testovi ekotoksičnosti određivali su se prema normama: HRN/EN ISO 11348-1:2000⁹⁶ (test s morskom bakterijom *V. fischeri*), ISO 10 712:199597 (*P. putida*) i OECD 201:198498 (mikroalga *Chlorella* sp.). U svrhu određivanja ekotoksičnosti navedenih farmaceutika s kvascem *S. cerevisiae* provodio se *Yeast Toxicity Test*, YTT.



Slika 3. Testni organizmi: *V. fischeri*, *P. putida*, *Chlorella* sp. i *S. cerevisiae* (s lijeva na desno)

Figure 3. Test organisms: *V. fischeri*, *P. putida*, *Chlorella* sp. and *S. cerevisiae* (from left to right)

Metode rada

Ekotoksičnost diklofenaka ispitana je na sva četiri testna organizama, a pantoprazola te smjesa diklofenaka i pantoprazola na *V. fischeri* i *S. cerevisiae*. Prilikom provođenja testa ekotoksičnosti primjenom bakterije *Vibrio fischeri*, promatrala se inhibicija njezinog fiziološkog svojstva bioluminiscencije. Test se provodio na luminometru, a temeljio se na mjerenju intenziteta bioluminiscentne svjetlosti prije i 30 minuta nakon dodavanja spomenutih ksenobiotika. Inhibicija (INH) se izračunala prema formuli:

$$INH = \frac{Lu_{30,kontrola} - Lu_{30,uzorak}}{Lu_{30,kontrola}} \times 100 \quad (1)$$

gdje je $Lu_{30, kontrola}$ intenzitet bioluminiscencije kontrolnog uzorka nakon 30 minuta, a $Lu_{30, uzorak}$ intenzitet bioluminiscencije uzorka s ispitivanim ksenobiotikom nakon 30 minuta.

Test ekotoksičnosti primjenom gram-negativne bakterije *Pseudomonas putida* temeljio se na određivanju inhibicijskog utjecaja ispitivanih tvari mjerenjem rasta bakterije (optička gustoća, OG i ukupan broj živih stanica bakterija, CFU). Mjerenja su se provodila svakih 24 sata tijekom 72 sata, a OG se odredila spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 436 nm. CFU se odredio metodom *plate count*. Pomoću logaritamske vrijednosti CFU ($\log CFU$) izračunala se i inhibicija rasta bakterije (INH):

$$INH = \frac{\log CFU_{kontrola} - \log CFU_{uzorak}}{\log CFU_{kontrola}} \times 100 \quad (2)$$

gdje je $\log CFU_{kontrola}$ logaritamska vrijednost ukupnog broja živih bakterijskih stanica u kontrolnoj tikvici, a $\log CFU_{uzorak}$ logaritamska vrijednost ukupnog broja živih bakterijskih stanica u uzorku.

Ispitivanje ekotoksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp. temeljio se na mjerenju inhibicije njezinog rasta. Prije provođenja testova mjerila se pH-vrijednost medija te koncentracija otopljenog kisika pomoću kisikove elektrode. Test se provodio u periodu od 72 sata prilikom čega su se povoljni fiziološki uvjeti za mikroalge konstantno održavali miješanjem na rotacijskoj tresilici. Temperatura se održavala između 21 °C i 25 °C. Optička gustoća određivala se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 600 nm svakih 24 sata. Broj ukupnih stanica mikroalgi određivao se pomoću Thominove komorice i svjetlosnog mikroskopa. Na Thominovu komoricu stavila se kap suspenzije mikroalgi koja se pokrila pokrovnim stakalcem. CFU vrijednost određivala se brojanjem stanica mikroalgi na tri nasumično odabrana kvadratića vidljivih na Thominovoj komorici, a računala se prema formuli:

$$N = \frac{m \times n \times 16 \times 10^4}{K} \quad (3)$$

gdje je N (ili CFU) ukupan broj stanica u 1 mL, m ukupan broj pobrojanih stanica, $I6$ ukupan broj velikih kvadrata u Thominoj komorici, 10^4 korekcija volumena i K broj velikih kvadrata u kojima je izvršeno brojanje. Inhibicija se izračunala prema Formuli 2.

Test ekotoksičnosti primjenom pivskog kvasca (engl. *Yeast Toxicity Test*, YTT) temelji se na fiziološkom svojstvu kvasca da fermentira saharozu do etanola, C_2H_5OH , te ugljikovog(IV) oksida, CO_2 . U sterilizirane staklene bočice ukupnog volumena 30 mL, ulilo se 5 mL sterilizirane tekuće hranjive podloge, 0,6 mL suspenzije kvasca te odgovarajući volumeni otopina čistog diklofenaka i pantoprazola te njihovih smjesa (slika 4). Bočice su se hermetički zatvorile gumenim i metalnim čepom. Kroz gumeni čep uronila se sterilizirana igla na koju se stavila graduirana šprica. Uzorci su se čuvali u termostatu pri 28 °C. Svakih 24 sata tijekom 72 sata očitavao se volumen istisnute tekućine u šprici, koju je iz bočice istisnuo plin nastao fermentacijom. Uzorci s ispitivanim ksenobiotcima uspoređivali su se s kontrolnim uzorcima bez ispitivanih ksenobiotika. Inhibicija stvaranja ugljikovog(IV) oksida (INH) se izračunala prema formuli:

$$INH = \frac{V_{kontrola} - V_{uzorak}}{V_{kontrola}} \times 100 \quad (4)$$

gdje je $V_{kontrola}$ volumen istisnute tekućine u kontrolnim bočicama, V_{uzorak} volumen istisnute tekućine u bočicama s ispitivanim ksenobiotcima.



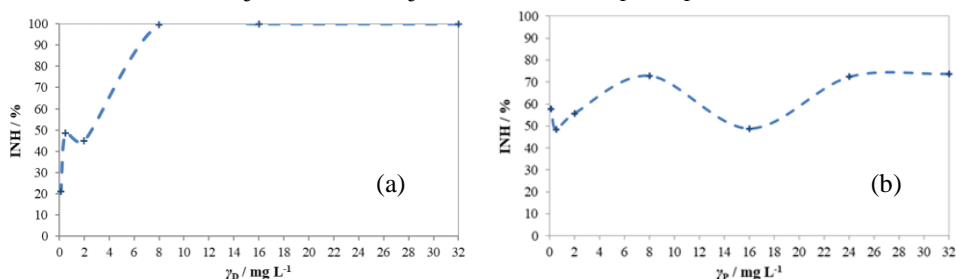
Slika 4. Provođenje testa ekotoksičnosti diklofenaka primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 4. Conducting the ecotoxicity test of diclofenac using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Rezultati i rasprava

U ovom istraživanju ispitao se ekotoksičan učinak dvaju ksenobiotika, diklofenaka i pantoprazola, na četiri testna organizama, *V. fischeri*, *P. putida*, *Chlorella* sp. i *S. cerevisiae*.

Nakon provedbe testa ekotoksičnosti pomoću morske bakterije *Vibrio fischeri*, dobivene su vrijednosti intenziteta bioluminiscencije prije i nakon dodavanja otopine ksenobiotika. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunata je inhibicija te su napravljeni grafovi ovisnosti inhibicije o razrjeđenju pojedinih otopina ksenobiotika te graf s krivuljom doza-odgovor, odnosno krivuljom koncentracija-inhibicija (slika 5). Pomoću luminometra dobivene su masene koncentracije koje uzrokuju 20 %, odnosno 50 % inhibicije (EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti), međutim ukoliko ih instrument nije mogao izračunati, po mogućnosti su iste vrijednosti određene grafički (Tablica 1). U tablici 2 dane su EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti za smjese diklofenaka i pantoprazola.



Slika 5. Krivulja doza-odgovor za diklofenak (a) i pantoprazol (b) dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom morske bakterije *Vibrio fischeri*

Figure 5. Dose-response curve for diclofenac (a) and pantoprazole (b) obtained by performing acute toxicity tests using the marine bacterium *Vibrio fischeri*

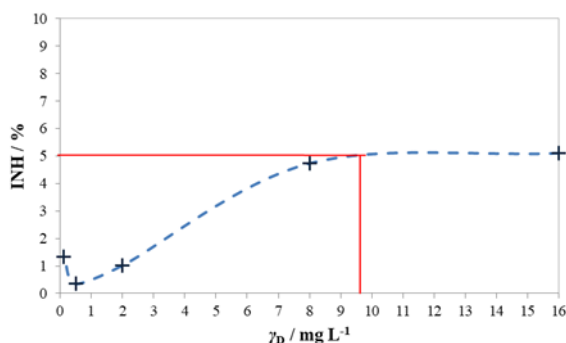
Tablica 1. Dobivene EC vrijednosti za pojedine ispitivane koncentracije diklofenaka i pantoprazola
Table 1. Obtained EC values for individual tested concentrations of diclofenac and pantoprazole

$\gamma / \text{mg L}^{-1}$	EC _x / mg L ⁻¹			
	Diklofenak		Pantoprazol	
	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₂₀	EC ₅₀
32	0,32	0,97	3,48	9,23
16	0,31	0,72	2,55	7,77
8	0,36	0,77	1,40	2,68
2	0,89	/	0,06	1,27
0,5	/	/	0,41	0,83
0,125	0,12	/	0,35	0,86

Tablica 2. Dobivene EC vrijednosti za smjese diklofenaka i pantoprazola
Table 2. Obtained EC values for mixtures of diclofenac and pantoprazole

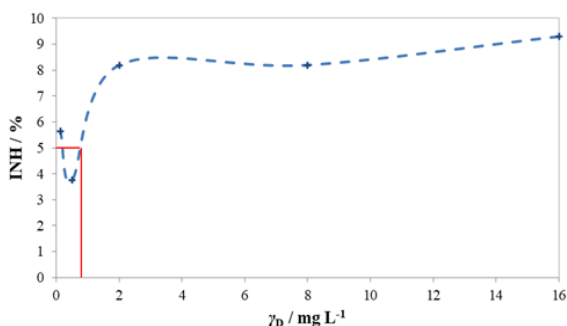
φ (D : P)	EC _x / %	
	EC ₂₀	EC ₅₀
1:1	0,66	3,56
2:1	0,78	2,86
1:2	3,44	12,14

Vrijednosti EC_{20} i EC_{50} dobivene za promatrane koncentracije diklofenaka su manjih vrijednosti od vrijednosti dobivenih za iste koncentracije pantoprazola što ukazuje na to da je diklofenak toksičniji u odnosu na pantoprazol. Koncentracije pantoprazola od $0,125 \text{ mg L}^{-1}$ do 2 mg L^{-1} pokazuju relativno niske vrijednosti EC_{20} i EC_{50} , dok su za iste koncentracije diklofenaka dobivene samo vrijednosti EC_{20} . Također, na temelju vrijednosti EC_{50} za temeljne otopine diklofenaka i pantoprazola koncentracije $\gamma = 32 \text{ mg L}^{-1}$, diklofenak se može klasificirati kao visoko toksična tvar, a pantoprazol kao srednje toksična tvar (Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals). Rezultati EC_{50} vrijednosti za pripremljene smjese diklofenaka i pantoprazola (D:P) prilično su niskih vrijednosti. Smjesa 1:1 pokazuje vrijednosti $EC_{20} = 0,66 \%$ i $EC_{50} = 3,56 \%$, smjesa 2:1 vrijednosti $EC_{20} = 0,78 \%$ i $EC_{50} = 2,86 \%$, a smjesa 1:2 vrijednosti $EC_{20} = 3,44 \%$ i $EC_{50} = 12,14 \%$. Uspoređujući dobivene EC_{50} vrijednosti za čiste tvari i smjesu tvari pri koncentraciji od 32 mg L^{-1} i omjeru 1:1 i 2:1 može se primijetiti da pantoprazol djeluje pozitivno na diklofenak, odnosno da je došlo do antagonističkog učinka te smanjenja toksičnosti u odnosu na toksičnost čiste otopine diklofenaka. Međutim, diklofenak povećava toksičnost otopine u smjesi s pantoprazolom što znači da diklofenak negativno djeluje na pantoprazol, tj. dolazi do sinergističnog učinka. Ukoliko u otopinu dodamo veći udio pantoprazola od diklofenaka (omjer 2:1) možemo primijetiti da se toksičnost otopine smanjila odnosno da je došlo do antagonističnog učinka. Na slikama 6 i 7 prikazane su dobivene krivulje inhibicije u odnosu na koncentraciju ispitivane tvari – diklofenaka na testne organizme *P. putida* i *Chlorella* sp. S obzirom da navedeni testni organizmi nisu pretjerano osjetljivi na navedeni spoj, nije se mogla odrediti EC_{50} vrijednost, nego EC_5 vrijednost koja je iznosila $9,3 \text{ mg L}^{-1}$ odnosno $0,8 \text{ mg L}^{-1}$. Shodno dobivenim rezultatima vidljivo je da je mikroalga osjetljivija na diklofenak od bakterije *P. putida*. Dobiveni rezultati u skladu su s objavljenom literaturom (Guzman Rodriguez et al. 2019; Wang et al., 2017).



Slika 6. Krivulja doza-odgovor za diklofenak dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom bakterije *Pseudomonas putida*

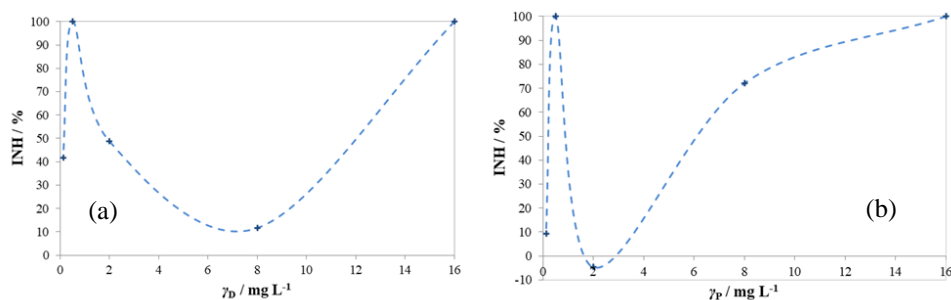
Figure 6. Dose-response curve for diclofenac obtained by performing acute toxicity tests using the bacterium *Pseudomonas putida*



Slika 7. Krivulja doza-odgovor za diklofenak dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom mikroalge *Chlorella* sp.

Figure 7. Dose-response curve for diclofenac obtained by performing acute toxicity tests using the microalgae *Chlorella* sp.

Prilikom provođenja testova ekotoksičnosti pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, na graduiranim špicama očitavani su volumeni istisnute tekućine pod utjecajem plina nastalog fermentacijom. Test se provodio na otopinama diklofenaka, otopinama pantoprazola te smjesama tih dvaju ksenobiotika. Pomoću vrijednosti volumena za pojedine uzorke s ksenobioticima i vrijednosti kontrolnog uzorka izračunate su vrijednosti inhibicije (INH), Slika 8. Rezultati testova sa smjesama tijekom tri dana prikazani su u tablici 3.



Slika 8. Krivulja doza-odgovor za diklofenak (a) i pantoprazol (b) dobivena provedbom akutnih testova toksičnosti primjenom kvasca *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 8. Dose-response curve for diclofenac (a) and pantoprazole (b) obtained by performing acute toxicity tests using the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Grafovi ovisnosti inhibicija o koncentracijama diklofenaka i pantoprazola poprilično su slični, što se može vidjeti prema 100 %-tnoj inhibiciji pri 0,5 mg L⁻¹ i 16 mg L⁻¹ diklofenaka i pantoprazola. Pri niskim koncentracijama diklofenaka od 0,125 mg L⁻¹ i

2 mg L⁻¹ vidljive su visoke vrijednosti inhibicije od čak 41,86 %, odnosno 48,84 %. Na slici 8b uočava se najniža inhibicija pri koncentraciji od 2 mg L⁻¹, koja je u blago negativnom području grafa. Navedeno ukazuje na pojavu efekta hormeze pri toj ispitivanoj koncentraciji. Nadalje, kod oba ksenobiotika krivulje imaju specifičan oblik doza-odgovor krivulje, a to je „U“ krivulja (Davis et al., 1990). Taj tip krivulje spada u tzv. „nemonotone odgovore na doze“ (Xiong et al., 2018) i nije toliko čest, međutim pojavljuje se u ekotoksikologiji te ga je također potrebno znati interpretirati. Naime, niže vrijednost inhibicije između koncentracije 0,5 mg L⁻¹ te koncentracije 16 mg L⁻¹ mogu upućivati na efekt hormeze (Gomaa et al., 2021). Međutim, to ne mora uvijek biti slučaj jer se takav trend krivulje može objasniti nepredvidljivim ponašanjem ekotoksičnosti ksenobiotika pri različitim koncentracijama. Drugim riječima, budući da se pri višim koncentracijama ksenobiotika javljaju i više vrijednosti inhibicija, može se pretpostaviti da niske koncentracije neće štetno djelovati na organizme zbog pojave niskih vrijednosti inhibicija, međutim takve pretpostavke ne moraju se nužno obistinuti u realnom sustavu (Gomaa et al., 2021). Upravo u slučaju testa s kvascem *Saccharomyces cerevisiae*, rezultati su pokazali trend visoke inhibicije pri nižim ispitivanim koncentracijama, snižavanje inhibicije do određene koncentracije, nakon koje je opet zabilježen rast do visokih inhibicija. Također, takav trend može se objasniti i nepredvidivom mogućnošću prilagodbe mikroorganizama na prisutnost jako toksičnih tvari (Mehinto et al., 2009).

Tablica 3. Vrijednosti inhibicija za pojedine i ukupne volumene istisnute tekućine tijekom tri dana za određene smjese i kontrolni uzorak (SP)

Table 3. Inhibition values for individual and total volumes of displaced liquid during three days for certain mixtures and the control sample (SP)

$\varphi(D : P)$	INH / %			V_{uk} / mL
	1. dan	2. dan	3. dan	
1:1	100,00	100,00	100,00	100,00
2:1	100,00	100,00	100,00	100,00
1:2	100,00	100,00	100,00	100,00
SP	0,00	0,00	0,00	0,00

Smjese diklofenaka i pantoprazola u svim mjerenim omjerima pokazuju maksimalnu toksičnost od 100 %. Ta činjenica ukazuje na veliki sinergistički efekt diklofenaka i pantoprazola u smjesi, odnosno ukazuje na to da diklofenak i pantoprazol međusobno pojačavaju ekotoksičnost jedan drugoga u testu primjenom *Saccharomyces cerevisiae*.

Zaključci

Na temelju provedenih ispitivanja ekotoksičnosti diklofenaka, pantoprazola i njihovih smjesa primjenom različitih mikroorganizama, može se zaključiti sljedeće:

- inhibicija intenziteta svjetlosti bakterije *Vibrio fischeri* uzrokovana diklofenakom iznosi više od 99 %, a pantoprazolom 73,73 % što ukazuje na visoku ekotoksičnost oba ksenobiotika
- različite ispitane koncentracije diklofenaka pokazuju niže EC₂₀ i EC₅₀ vrijednosti od pantoprazola, što također ukazuje na ekotoksičniji utjecaj diklofenaka na bakteriju *Vibrio fischeri* od pantoprazola
- temeljem EC₅₀ vrijednosti testa s *Vibrio fischeri* diklofenak se klasificira kao visoko toksična, a pantoprazol kao srednje toksična tvar
- najveća vrijednost inhibicije rasta bakterije *Pseudomonas putida* uzrokovane diklofenakom iznosi 5,11 % što ukazuje na slab ekotoksični učinak diklofenaka na bakterijsku kulturu
- maksimalna inhibicija rasta mikroalge *Chlorella* sp. iznosi 9,30 % ($\gamma_D = 16 \text{ mg L}^{-1}$) što ukazuje na slab ekotoksični učinak diklofenaka na mikroalgu
- negativna ili niža inhibicija pri nižim koncentracijama ukazuje na pojavu efekta hormeze koja je nepredvidiva te se može pojaviti pri različitim uvjetima
- kvasac *Saccharomyces cerevisiae* i bakterija *Vibrio fischeri* osjetljiviji su na diklofenak od alge *Chlorella* sp. te bakterije *Pseudomonas putida*
- bakterija *Vibrio fischeri* osjetljivija je na pantoprazol nego kvasac *Saccharomyces cerevisiae*
- izlaganje smjese diklofenaka i pantoprazola najčešće izaziva sinergistički efekt
- smjese diklofenaka i pantoprazola imaju ekotoksičniji utjecaj na kvasac *Saccharomyces cerevisiae*, nego na morsku bakteriju *Vibrio fischeri*

Literatura

- Baranašić, T. (2019): Farmaceutski ksenobiotici u okolišu – izvor, analiza, primjena, utjecaj i tretiranje, Završni rad, Geotehnički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Davis, J. M., Svendsgaard, D. J. (1990): U-Shaped dose-response curves: Their occurrence and implications for risk assessment, *Journ. of Tox. Environ. Health* 30, 71-83.
- Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS), United Nations, 9/2021.
- Gomaa, M., Zien-Elabdeen, A., Hifney, A. F., Adam, M. S. (2021): Phycotoxicity of antibiotics and non-steroidal anti-inflammatory drugs to green algae *Chlorella* sp. and *Desmodesmus spinosus*: Assessment of combined toxicity by Box-Behnken experimental design, *Environ. Tech. & Innov.* 23, 1-11.
- Gudelj, I. (2016): Nove onečišćujuće tvari – ksenobiotici, *Hrv. vode* 95, 58-61.

- Guzman Rodriguez, M., Hyde, R., Vanner, S., Allen – Vercoe, E., Sheth, P., Petrof, E. O. (2019): Direct bactericidal effect of pantoprazole on bacterial isolates from the gut microbiome, *Journ. Can. Assoc. of Gastroent.* 2, 305-306.
- Janton, N. (2017): Bioremedijacijski potencijal aktivnog mulja u obradi farmaceutske otpadne vode, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu.
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., Albanis, T. A. (2016): Analysis, occurrence, fate and risks of proton pump inhibitors, their metabolites and transformation products in aquatic environment: A review, *Sci. Tot. Environ.* 570, 732-750.
- Mehinto, A. C. (2009): Impacts of the human pharmaceutical diclofenac in the aquatic environment, University of Exeter, str. 81-184.
- Milić, C. (2021): Potencijalne klinički značajne interakcije inhibitora protonске pumpe, Završni specijalistički rad, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Miloloža, M. (2018): Procjena utjecaja eritromicina na bakterijsku kulturu *Pseudomonas putida* izoliranu iz farmaceutske otpadne vode, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu.
- Mimica Matanović, S. (2014): Farmakokinetika i farmakodinamika analgetika, *Medicus* 23, 31-46.
- National Library of Medicine, Diclofenac, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac> (pristup 13. studenog 2022.)
- Posavec, D. (2015): Ksenobiotici, Završni rad, Međimursko veleučilište u Čakovcu.
- Puljak, L., Krnić, D., Anić-Matić, A., Dosenović, S., Draganić, P., Zezelić, S. (2015): National consumption of opioid and nonopioid analgesics in Croatia, *Therap. and Clin. Risk. Manag.* 11, 1304-1314.
- Sathishkumar, P., Meena, R. A. A., Palanisami, T., Ashokkumar, V., Palvannan, T., Gu, F. L. (2020): Occurrence, interactive effects and ecological risk of diclofenac in environmental compartments and biota – a review, *Sci. Tot. Environ.* 698, 1-32.
- Štefanac, T., Grgas, D., Landeka Dragičević, T. (2021): Xenobiotics – Division and Methods of Detection: A Review, *Journ. Xenobio.* 11, 130-141.
- Travis, C. C., Hester, S. T. (1991): Global Chemical Pollution, *Environ. Sci. Technol.* 25, 815-819.
- Vandam, L. D. (1972): Analgetic Drugs, *New Eng. Journ. Med.* 286, 20-23.
- Zakon o vodama, NN 84/2021.
- Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Ding, X., Liu, Y. (2017): An analogous wood barrel theory to explain the occurrence of hormesis: A case study of sulfonamides and erythromycin on *Escherichia coli* growth, *PLoS ONE* 12, 1-12.
- Xiong, J.-Q., Kurade, M. B., Jeon, B.-H. (2018): Can Microalgae Remove Pharmaceutical Contaminants from Water?, *Trends. in Biotech.* 36, 30-44.

Ecotoxicity testing of diclofenac and pantoprazole

**Karlo Grgurević, Martina Miloloža, Vesna Ocelić Bulatović,
Dajana Kučić Grgić***

*University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia*

**Corresponding author: dkucic@fkit.hr*

original scientific paper

Summary

Xenobiotics enter the environment through anthropogenic actions. Xenobiotics, which include pharmaceuticals, antibiotics, toxins, and pesticides, are substances that are biologically active and persist in the environment at high concentrations due to their strong persistence and bioaccumulation. Therefore, it is necessary to study their effects on organisms in the environment. In this work, the ecotoxicity of two xenobiotics, diclofenac and pantoprazole, was studied on four test organisms: the marine bacterium *Vibrio fischeri*, the bacterium *Pseudomonas putida*, the microalga of the genus *Chlorella*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The ecotoxic effect of each of the mentioned xenobiotics as well as their mixture in the volume ratios 1:1, 2:1 and 1:2 was tested. For the above substances, an ecotoxicity test was performed with *V. fischeri* during a 30-minute exposure and the decrease in bioluminescence of the bacteria was observed. The total number of living bacterial cells (CFU) of *P. putida* and microalgae *Chlorella* sp. was monitored during the 3 days of the experiment to observe the ecotoxic effect on the growth of the mentioned microorganisms. During the same exposure period, an experiment with *S. cerevisiae* was also performed, monitoring the volume of CO₂ produced, i.e., the volume of liquid displaced. The results of the change in inhibition as a function of the tested concentrations of diclofenac and pantoprazole are represented by a characteristic dose-response curve, and the most sensitive test organisms were *S. cerevisiae* and *V. fischeri*.

Keywords: ecotoxicity, Vibrio fischeri, Pseudomonas putida, Chlorella sp., Saccharomyces cerevisiae

Influence of wheat pulp in printing substrate on the chemical stability of gravure prints

Ivana Plazonić*, Valentina Radić Seleš, Maja Rudolf, Katja Petric Maretić, Irena Bates

University of Zagreb, Faculty of Graphic Arts, Getaldićeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

**Corresponding author: ivana.plazonic@grf.unizg.hr*

original scientific paper

Summary

Today, the global emphasis is on the importance and necessity of recycling all types of waste. In the paper industry, the waste paper has been a very important raw material for decades resulting in recycled cellulose fibres. As cellulose fibres become shorter with each recycling cycle, it is necessary to add virgin fibres to the paper pulp to achieve the required quality and stability of the formed paper. Enriching the pulp of recycled fibres with alternative non-wood fibres could be one of the environmentally friendly approaches to paper production. Wheat straw, as a by-product of globally available field crops, has imposed itself as a logical choice of alternative raw material. From the pulp of recycled fibres and from pulp admixture of 70% recycled fibres and 30% wheat fibres, laboratory papers were formed and served as the printing substrates for this study. The possibility of using such papers as printing substrates was assessed based on the chemical stability of the prints produced by the gravure printing technique with two types of inks (conventional and UV). Namely, gravure is the most common technique in printing packaging and the chemical stability of prints is one of the very important requirements in packaging printing.

Keywords: chemical stability, gravure prints, printing substrate, wheat pulp

Introduction

Recycling is one of the most important actions currently available to reduce the accumulation of waste sent to landfills and natural habitats worldwide (Hopewell et al., 2009). Almost everything we see around us can be recycled, although different materials require different techniques of recycling. Most of the commonly recyclable materials are paper, plastics, metals, glass, batteries, biodegradable waste, clothing and others. Recycling is much more than just reducing the amount of waste in landfills. It also brings economic and social benefits (Ahmad K. Jassim, 2017). Although 75% of all waste can be recycled or repurposed, we only recycle around 30% of it. Paper and cardboard make up a large share of total waste, roughly 10% of total municipal solid waste (Ozola et al., 2019). On average, 58% of paper waste is recycled worldwide. In some of the more developed countries, the recycling of waste paper has even increased to 75% of the total amount of waste paper (Ozola et al., 2019). This trend of the collection of waste paper and utilization of recovered paper will continue to grow because paper is a material with a high recycling rate (Cabalova

et al. 2011). Paper recycling is an essential part of the pulp and paper industry and offers significant environmental benefits (Vu et al., 2018). However, paper recycling is limited by the availability of resources, as well as by their recovery and quality (Miranda and Blanco, 2010). As paper can be recycled up to 7 times since cellulose fibres are shortened with each recycling cycle (Obradovic and Mishra, 2020), it is necessary to add virgin fibres to the paper pulp in order to produce quality paper (Czene and Koltai, 2020). Enriching the pulp of recycled fibres with alternative non-wood fibres could also be one of the environmentally friendly approaches for paper production. Straw is one of the most common lignocellulosic wastes that are produced by crops during their agricultural cultivation (Tufail et al., 2021). Wheat straw, as a by-product of globally available field crops, has imposed itself as a logical choice of alternative raw material. Namely, wheat straw is the main crop residue in European countries with an annual production of about 170×10^6 tonnes (Knežević et al., 2016). Since its cellulose content is nearly the same as for most wood species, and the content of lignin is lower (Plazonić et al., 2016a; Fang and Shen, 2018; Börcsök and Pásztor, 2021), the possibility of using wheat straw as a raw material for the paper industry has been intensively researched in recent years. Although it is used as a raw material for the production of cardboard (Vargas et al., 2012), little is known about the use of this type of raw material for paper intended for printing. Based on the research conducted so far, it has been observed that the addition of straw pulp to the pulp of recycled fibres produces papers suitable for printing using various printing technologies (Plazonić et al., 2016b; Bates et al., 2020; Bates et al., 2022; Radić Seleš et al., 2022). In this study, the possibility of using paper with wheat pulp as a printing substrate was assessed based on the chemical stability of the gravure prints made with conventional and UV inks on such substrates. Namely, gravure is the most common technique in printing packaging (Kipphan, 2001), and the chemical stability of prints is one of the most important requirements in packaging printing.

Materials and methods

Printing substrates

Commercial paper made only from pulp of recycled fibres (marked as K) was used as a control sample, as in this research the pulp from wheat straw was introduced into the pulp from recycled fibres with the aim of enriching the pulp to achieve production of quality paper as a printing substrate. In the laboratory phase, papers weighing approximately 42.5 g/m^2 were formed with a Rapid-Köthen sheet former (FRANK-PTI) according to the standard EN ISO 5269-2:2004 (ISO Std. 5269-2, 2004). The crop residues that remained in the Croatian fields after the harvest of wheat were collected and manually cut into pieces up to 3 cm long using as a source of virgin fibres. The straw, cleaned of grains and impurities, was converted into a semi-chemical pulp using the soda pulping method (Plazonić et al., 2016b). The resulting

unbleached wheat pulp was blended with a recycled wood fibre pulp at a ratio of 30:70, resulting in the laboratory papers used as printing substrates in this research (marked as 3NW). The same laboratory conditions were used to produce a paper made only from recycled pulp (marked as N) which was used as a reference sample. Further research steps are shown in Figure 1.

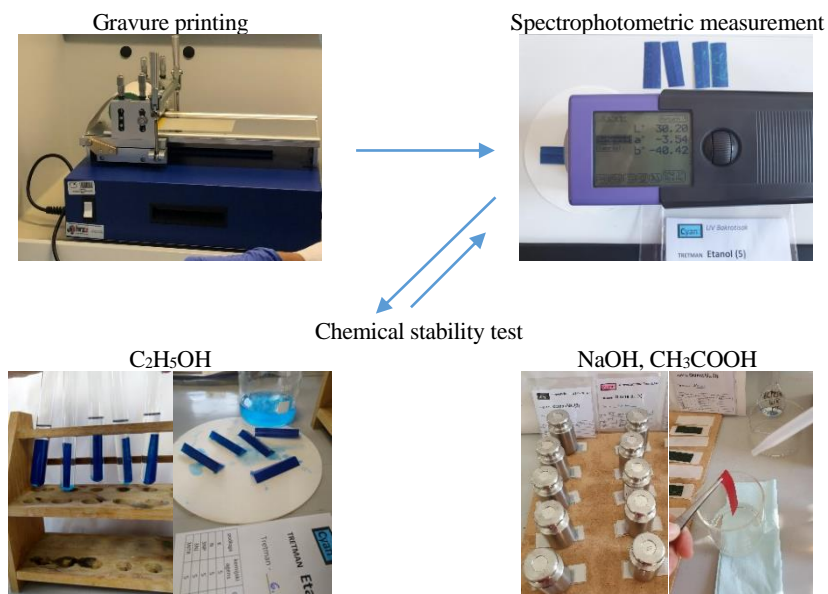


Figure 1. Research steps

Gravure printing

Gravure printing is a printing process that achieves the highest, most consistent print quality with continuous reproduction compared to other printing techniques (Kipphan, 2001). In this study, all substrates were cut in dimensions of 160 mm x 95 mm prior printing. Gravure printing in full tone was performed using a laboratory device KPP Gravure system with a 65 shore impression roller and a 100 lines/inch engraving plate (RK Rint Coat Instrument Ltd) with two types of inks, conventional and UV. Printing was done at a temperature of 23 °C and a relative humidity of 50% using Sunprop inks and Solarflex UV-curable inks from Sun Chemical corporation intended for flexographic printing and gravure printing. After printing at a speed of 20 m/min, the UV gravure prints were dried using a Technigraf Aktiprint L 10-1 continuous dryer with a light source output of 120 W/cm and an intensity of 60%.

Chemical stability treatment

All prints were tested for resistance to chemical agents in accordance with the ISO 2836:2004 standard (ISO Std. 2836, 2004). Since three different chemical agents were chosen for the chemical stability assessment, it is important to emphasize that the treatment procedure and test conditions depend on the liquid chemical agent used (Table 1).

Table 1. Test conditions for selected liquid chemical agents

Test liquid agent	Receptor surface	Contact pressure	Contact duration	Drying conditions
Sodium hydroxide (NaOH, 1% (w/v))	4 Filter paper	1 kg on 54 cm ²	10 min	30 min at 40 °C
Acetic acid (CH ₃ COOH, 5% (v/v))	2 Filter paper	1 kg on 54 cm ²	30 min	30 min at 50 °C
Ethanol (C ₂ H ₅ OH, 96% (v/v))	Glass tube	-	5 min	10 min at 40 °C

Frist, all prints were cut into samples of the same dimensions (20 mm x 50 mm) and placed on the lower glass plate between strips of filter paper that have been previously soaked in a liquid chemical agent (where the number of filter papers was defined by the ISO 2836:2004 standard). Finally, the upper glass plate was placed on top and weighed by 1kg weight for a period of time defined in a Table 1 after which the samples were rinsed with distilled water and dried in an oven under the drying conditions prescribed by the standard (Table 1). With ethanol as a chemical agent, the procedure was completely different. Namely, each print was immersed for five minutes in a glass test tube containing ethanol. The samples treated with alcohol were also dried in an oven at 40 °C, but for a shorter period of time (10 minutes).

Chemical stability assessment

The assessment of the chemical stability for all prints was made based on the changes in optical properties after chemical treatment with various chemical agents. Optical properties were measured with an X-Rite SpectroEye spectrophotometer based on colour values in the CIE L*a*b* colour system, which is a quantitative relationship of colours on three axes: L* as lightness (from white to black), a* (from green to red), and b* (from blue to yellow). To calculate the difference between chemically treated and untreated samples, the Euclidean colour difference (ΔE_{00}^*) was calculated according to Equation 1, using the untreated sample as a reference.

$$\Delta E_{00}^* = \sqrt{\left(\frac{\Delta L'}{k_L S_L}\right)^2 + \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right)^2 + \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)^2 + R_T \left(\frac{\Delta C'}{k_C S_C}\right) \left(\frac{\Delta H'}{k_H S_H}\right)} \quad (1)$$

where: $\Delta L'$ represents the difference in lightness between printed samples before and after chemical treatment, $\Delta C'$ represents the chroma difference between the printed samples before and after chemical treatment and $\Delta H'$ represents the hue difference between the printed samples before and after chemical treatment. R_T represents the rotation function while k_L , k_C , k_H represent the parametric factors for variation in experimental conditions and S_L , S_C , S_H represent the weighing functions (Sharma et al., 2005).

According to the tolerance definition, $\Delta E_{00}^* \leq 2$ is classified as a very small noticeable difference for a standard observer, while $\Delta E_{00}^* \geq 5$ is defined as a large noticeable difference in colour that a standard observer can detect (Plazonić et al., 2020).

Results and discussions

The chemical stability of all observed prints made with conventional and UV inks in cyan, magenta, yellow and black is discussed based on the Euclidean colour difference (ΔE_{00}^*) results.

Observing the calculated ΔE_{00}^* values presented in Figure 2, it can be generally concluded that UV inks show lower chemical stability towards sodium hydroxide (NaOH) than conventional inks, regardless of the composition of the paper used as a printing substrate. All prints (cyan, magenta, yellow and black) with conventional inks showed good chemical stability towards sodium hydroxide because their colour change is unnoticeable to a standard observer ($\Delta E_{00}^* \leq 2$), except for cyan prints on paper with 30% wheat pulp where $\Delta E_{00}^*_{3NW}$ was 2.75.

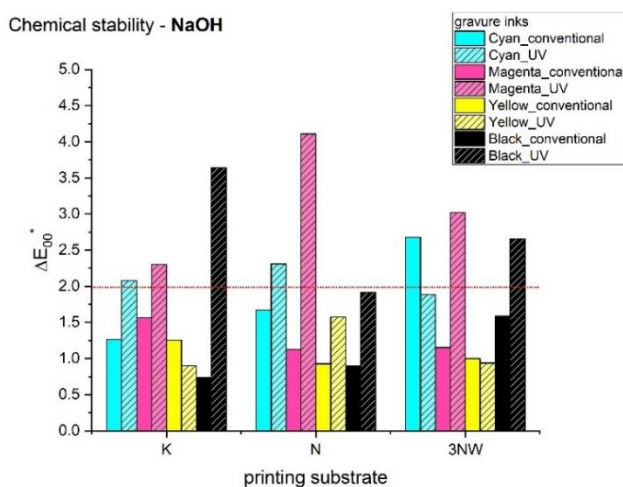


Figure 2. Colour difference (ΔE_{00}^*) of prints caused by the treatment with sodium hydroxide

As can be seen in Figure 3, of all the chemical agents selected for this chemical stability test, the prints were the most stable to acetic acid (generally, $\Delta E_{00}^* < 2$) regardless of the composition of the printing substrate. In our previous research (Plazonić et al., 2020), the same minimal influence of acetic acid was observed on UV inkjet prints.

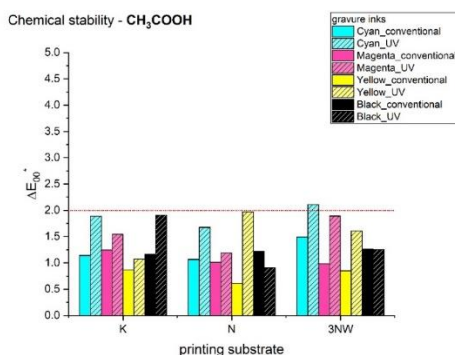


Figure 3. Colour difference (ΔE_{00}^*) of prints caused by the treatment with acetic acid

From Figure 4, it is evident that the influence of ethanol on prints strongly depends on the type of paper production (commercial or laboratory). Commercial papers printed with both types of observed inks, conventional and UV, are more stable than laboratory-made papers (with or without the addition of wheat pulp) printed with the same ink colours. When comparing prints made on laboratory papers, it is visible that the addition of wheat pulp into the printing substrate had a positive influence on the chemical stability of cyan and yellow UV prints. However, it is important to emphasize that cyan prints, especially UV ones, are the most unstable to ethanol (ΔE_{00}^* reaches up to 4.75). This was expected because during the chemical stability test, the cyan ink was dissolved in ethanol which can be seen in Figure 1.

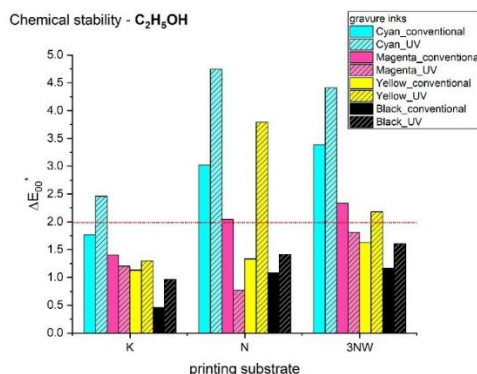


Figure 4. Colour difference (ΔE_{00}^*) of prints caused by the treatment with ethanol

To get a better insight into the results of the chemical stability of the gravure prints, the maximum values of colour difference ($\Delta E_{00 \max}^*$) after all chemical treatments were selected and shown in Figure 5. It is clearly visible that UV inks are generally more sensitive to liquid chemical agents than conventional ones. Prints are the most sensitive to ethanol, while they are the most stable to acetic acid as a chemical agent, regardless of the type of printing ink (conventional or UV). Also, of all process inks, cyan ink is the most sensitive one, while yellow ink is the most stable to all analysed chemical agents. Interestingly, the addition of wheat pulp to the pulp of recycled fibres provides printing substrates with relatively equal or even better stability to chemical agents after printing with gravure inks.

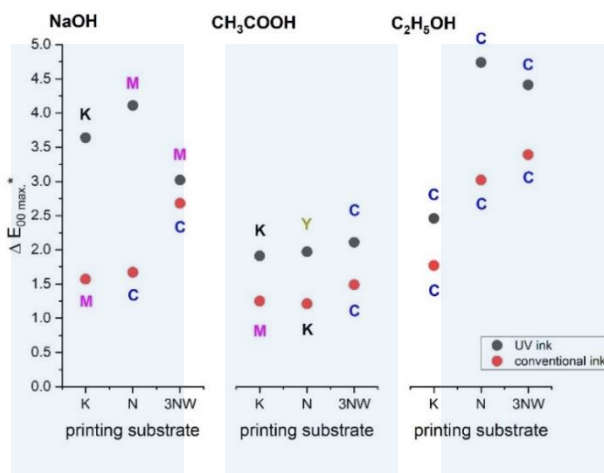


Figure 5. Maximum values of colour difference ($\Delta E_{00 \max}^*$) of gravure prints after chemical treatment

Conclusions

All results indicate that conventional inks are more stable in contact with sodium hydroxide, acetic acid or ethanol than UV inks, regardless to the composition of the printing substrate used. The greatest change in print colour was observed after contact with ethanol, especially for the cyan gravure ink. Laboratory papers made from pulp of recycled fibres and those with the addition of wheat pulp provide almost equal chemical stability of the prints, while wheat pulp in the printing substrate shows a positive influence on the reduction of the ΔE_{00}^* value for all yellow prints.

Acknowledgments

This work has been supported in part by Croatian Science Foundation under the project „Printability, quality and utilization of substrates with non-wood fibres“ (UIP-2017-05-2573)

References

- Ahmad K. Jassim (2017): Sustainable Solid Waste Recycling, In: Skills Development for Sustainable Manufacturing, IntechOpen, pp.1–17.
- Bates, I., Plazonić, I., Radić Seleš, V., Barbarić-Mikočević, Ž. (2020): Determining the quality of paper substrates containing triticale pulp for printing industry, *Nordic pulp & paper research journal* 35 (2), pp. 272–278.
- Bates, I., Plazonić, I., Petric Maretić, K., Rudolf, M., Radić Seleš, V. (2022): Assessment of the UV inkjet ink penetration into laboratory papers within triticale pulp and its influence on print quality, *Coloration Technology* 138, pp. 16–27.
- Börcsök, Z., Pásztor, Z. (2021): The role of lignin in wood working processes using elevated temperatures: an abbreviated literature survey, *European Journal of Wood and Wood Products* 79, pp. 511–526.
- Cabalova, I., Kacik, F., Geffert, A., Kacikova, D. (2011): The Effects of Paper Recycling and its Environmental Impact, In: Environmental Management in Practice, IntechOpen, pp. 329 – 350.
- Czene, T., Koltai, L. (2020): The effect of the virgin fibers to the properties of different paper products, *Proceedings - The Tenth International Symposium on Graphic Engineering and Design GRID 2020*, Novi Sad, ed. Sandra Dedijer - Novi Sad: Faculty of Technical Sciences, Serbia, pp.147–152.
- Fang, G., Shen, K. (2018): Wheat Straw Pulping for Paper and Paperboard Production. In: Global Wheat Production, IntechOpen, pp. 223–240.
- Hopewell, J., Dvorak, R., Kosior, E. (2009): Plastics recycling: challenges and opportunities, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364 (1526), pp. 2115–2126.
- Miranda, R., Blanco, A. (2010): Environmental awareness and paper recycling, *Cellulose Chem. Technol.* 44 (10), pp. 431–449.
- ISO Std. 5269-2 (2004): Pulps -- Preparation of laboratory sheets for physical testing -- Part 2: Rapid-Köthen method.
- ISO Std. 2836 (2004): Graphic technology, Prints and printing inks, Assessment of resistance of prints to various agents.
- Kipphan, H. (2001): Handbook of Print Media, Berlin, Heidelberg: Springer.
- Knežević, A., Stajić, M., Jovanović, V.M., Kovačević, V., Čilerdžić, J., Milovanović, I., Vukojević, J. (2016): Induction of wheat straw delignification by *Trametes* species, *Sci Rep* 6 (26529), pp. 1–12
- Obradovic, D., Mishra, L.N. (2020): Mechanical properties of recycled paper and cardboard, *The Journal of Engineering and Exact Sciences – jCEC* 6 (3), pp. 0429–0434.
- Ozola, Z.U., Vesere, R., Kalnins, S.N., Blumberga, D. (2019): Paper Waste Recycling. Circular Economy Aspects, *Environmental and Climate Technologies* 23 (3), pp. 260–273.
- Plazonić, I., Barbarić-Mikočević, Ž., Antonović, A. (2016a): Chemical Composition of Straw as an Alternative Material to Wood Raw Material in Fibre Isolation, *Drvna industrija* 67 (2), pp. 119–125.
- Plazonic, I., Bates, I., Barbaric-Mikocevic, Z. (2016b): The Effect of Straw Fibers in Printing Papers on Dot Reproduction Attributes, as Realized by UV Inkjet Technology, *BioResources* 11 (2), pp. 5033–5049.
- Plazonić, I., Petric Maretić, K., Bates, I., Rudolf, M., Radić Seleš, V., Radovčić, J. (2020): The Effect of Acids on the Chemical Stability of UV Inkjet Prints on Papers with Straw Pulp, *European Journal of Sustainable Development Research (EJSDR)* 4 (1), pp. 15–21.

- Radić Seleš, V., Bates, I., Plazonić, I., Rudolf, M., Zjakić, I. (2022): Chemical and mechanical print stability of substrates containing alternative non-wood fibres, *Cellulose chemistry and technology* 56 (3-4), pp. 379–389.
- Sharma, G., Wu, W., Dalal, E.N. (2005): The CIEDE2000 color-difference formula: Implementation notes, supplementary test data, and mathematical observations, *Color Research & Application* 30 (21), pp. 21–30.
- Tufail, T., Saeed, F., Afzaal, M., Ul Ain, H.B., Gilani, S.A., Hussain, M., Anjum, F.M. (2021): Wheat straw: A natural remedy against different maladies, *Food Science & Nutrition* 9 (4), pp. 2335–2344.
- Vargas, F., González, Z., Sánchez, R., Jiménez, L., Rodríguez, A. (2012): Cellulosic pulps of cereal straws as raw material for the manufacture of ecological packaging, *BioResources* 7 (3), pp. 4161–4170.
- Vu, H.H.T., Lai, T.Q., Ahn, J.W. (2018): Appropriate Technology for the Paper Recycling: A New Paradigm, *Journal of Energy Engineering (에너지공학)* 27 (2), pp.81–88.

Prikaz ocjene kemijskog stanja površinskih voda Kopačkog rita na temelju analize odabranih teških metala kroz jednogodišnje vremensko razdoblje

**Ivan Damjanović¹, Hrvoje Sučić¹, Danijela Bezik¹,
Mirna Habuda-Stanić², Dario Kolarić¹, Zdenka Šušić¹,
Leontina Toth¹, Barbara Petrovicky Šveiger¹, Marika Kralj¹,
Ines Ruškan¹, Mirna Tokić¹, Mirta Eberhard¹, Tanja Marković¹,
Hrvoje Babić¹, Nataša Turić¹, Snježana Benkotić¹**

¹*Nastavni zavod za javno zdravstvo Osječko-baranjske županije,
Služba za zdravstvenu ekologiju, F. Krežme 1, 31000 Osijek, Hrvatska*

²*Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
F. Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska*

**Dopisni autor: zz-ekologija-pelud@zjz.osijek.hr*

stručni rad

Sažetak

Močvarni ekosustavi predstavljaju najproduktivnije ekosustave na Zemlji. Zbog izmjene suhe i vlažne faze osiguravaju raznolikost ekoloških uvjeta na istom staništu te podržavaju veliku bioraznolikost flore i faune. Dinamika plavljenja Kopačkog rita posljedica je njegovog geografskog smještaja na području ušća Drave u Dunav. Kemijsko stanje površinske vode utvrđuje se na temelju prosječne (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK). Teški metali ubrajaju se u grupu najopasnijih anorganskih onečišćujućih tvari zbog bionerazgradivosti, bioakumulacije i zbog ugradnje u hranidbene mreže. Otopljeni u vodi nalaze se u ionskom obliku i ne mogu se biološki razgraditi, ali se mogu bioakumulirati. U sklopu projekta Naturavita na području Kopačkog rita provedeno je uzorkovanje i analiza žive, nikla, kadmija i olova te njihovih spojeva na 19 postaja kroz jednogodišnji period od 12 ciklusa. Prema rezultatima, za sve mjerne postaje izmjerene prosječne (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) ne prelaze SKVO iz Uredbe o standardu kakvoće vode (NN 96/2019) te je na svim postajama postignuto dobro kemijsko stanje.

Ključne riječi: teški metali, Kopački rit, močvarni ekosustavi, bioakumulacija

Uvod

Teški metali ubrajaju se u grupu najopasnijih anorganskih onečišćujućih tvari zbog bionerazgradivosti, bioakumulacije i ugradnje u hranidbene mreže (Gautam i sur., 2015). Teški metali ne djeluju na isti način i nemaju isti mehanizam te njihova toksičnost ovisi o nekoliko parametara poput temperature, koncentracije, ionskog oblika teških metala, koncentracije ostalih tvari s kojima su u kontaktu i sl. Teški metali koji su otopljeni u vodi nalaze se u ionskom obliku te se ne mogu biološki razgraditi, ali se mogu bioakumulirati (Cross i sur., 1970; Bryan & Hummerstone,

1977; Inglezakis & Pouloupoulos, 2006). Na taj način se unose u žive organizme i zbog toga ispuštanje velikih količina teških metala u vodna tijela ima za posljedicu ozbiljne ekološke, ali i zdravstvene probleme za žive organizme u okruženju (Inglezakis & Pouloupoulos, 2006; Ahmad i sur. 2010), te se mogu ugraditi u hranidbene mreže šireći toksični učinak izvan izvora zagađenja (Tilzer & Khondker, 1993).

Izvori teških metala u površinskim vodama i razlozi njihova ispuštanja mogu biti prirodnog (Wilson & Pyatt 2007; Khan i sur., 2008; Bai i sur., 2011; Martin i sur., 2015) i antropogenog (Nduka & Orisakwe, 2011) porijekla pri čemu se razvijaju novi antropogeni činioci u obliku farmaceutske industrije i proizvoda koji postaju važan faktor procjene stanja okoliša (Gasparotti i sur., 2014). Prirodna pojava teških metala u površinskim vodama je normalna (Popescu i sur., 2022), a prirodni izvori teških metala mogu biti vulkanske aktivnosti, erozija tla i otjecanje vode te čestice aerosola. Erozija tla posebno utječe na kakvoću vode, budući da se teški metali u sedimentu s oborinama ispiru u vodu. U nekim slučajevima, za vrijeme oborina, otpadni teški metali mogu se isprati u sustave odvodnje, a zatim i u obližnje rijeke. Antropogeni izvori teških metala najčešće su vezani za aktivnosti vezane uz obradu metala, tekstilnu industriju, rudarske djelatnosti i druge grane sličnih industrija.

Područje Kopačkog rita je dugi niz godina predmet mnogobrojnih znanstvenih i stručnih istraživanja (Mihaljević & Martinčić 1999). Dosadašnja istraživanja uglavnom su bila usmjerena na određivanje pojavnosti pojedinih teških metala analiziranih iz tkiva bioloških elemenata. Štambuk i sur. (2009) su radili procjenu primjenjivosti metode analize genotoksičnosti slatkovodnih ekosustava putem slatkovodnog školjkaša slikarske lisanke (*Unio pictorum*) u kaveznom uzgoju. Klobučar i sur. (2010) donose istraživanje procjene genotoksičnosti slatkovodnih ekosustava analizom tkiva kaveznog šarana (*Cyprinus carpio*). Međutim, sustavna istraživanja pojavnosti teških metala u površinskim vodama na području Kopačkog rita nisu rađena.

Jedno od najznačajnijih potencijalno opasnih kemijskih spojeva za ekosustav su teški metali. Unosom teških metala u ekosustav oni postaju dio hranidbene mreže jer se akumuliraju u sustavu kroz biološku komponentu (biocenozu) i biotop (neživi dio ekosustava), uključujući tlo, mulj, vodu i druge medije.

Teški metali ubrajaju se u grupu najopasnijih anorganskih onečišćujućih tvari zbog bionerazgradivosti, bioakumulacije i zbog ugradnje u hranidbene mreže (Gautam i sur., 2015). Teški metali ne djeluju na isti način i prema jednakom mehanizmu te njihova toksičnost ovisi o nekoliko parametara poput temperature, koncentracije, ionskog oblika teških metala, koncentracije ostalih tvari s kojima su u kontaktu i sl. Teški metali koji su otopljeni u vodi nalaze se u ionskom obliku te se ne mogu biološki razgraditi, ali se mogu bioakumulirati. Na taj način se unose u žive organizme i zbog toga ispuštanje velikih količina teških metala u vodna tijela ima za posljedicu ozbiljne ekološke, ali i zdravstvene probleme za žive organizme u okruženju (Inglezakis & Pouloupoulos, 2006).

Izvori teških metala u vodama su prirodnog i antropogenog porijekla. Prirodni izvori teških metala mogu biti vulkanske aktivnosti, erozija tla i otjecanje vode te čestice

aerosola. Erozija tla posebno utječe na kakvoću vode, budući da se teški metali u sedimentu s oborinama ispiru u vodu. U nekim slučajevima, za vrijeme oborina, otpadni teški metali mogu se isprati u sustave odvodnje, a zatim i u obližnje rijeke. Antropogeni izvori teških metala najčešće su vezani za aktivnosti vezane uz obradu metala, tekstilnu industriju, rudarske djelatnosti i druge grane sličnih industrija (Gautam i sur., 2015).

Najtoksičniji teški metali su olovo, živa, nikal, kadmij i arsen. Prema projektnom zadatku iz popisa prioriternih tvari i drugih onečišćujućih tvari za površinske vode (NN 96/2019) analizirani su sljedeći pokazatelji:

1. Olovo i spojevi olova
2. Živa i spojevi žive
3. Nikal i spojevi nikla
4. Kadmij i spojevi kadmija

Cilj rada je utvrditi pojavnost odabranih teških metala u vodenom mediju na području Parka prirode Kopački rit.

Materijali i metode

Lokacije uzorkovanja

Istraživanje se provodilo na unaprijed definiranih 19 lokacija kroz vremenski period od godine dana sa jednomjesečnom dinamikom uzorkovanja i analiza (Slika 1, Tablica 1). Uzorkovanje podrazumijeva sakupljanje uzoraka na terenu i rukovanje uzorkom do njegova prispjeća u laboratorij. Prije uzorkovanja izvršena je procjena sigurnosti na mjestu uzorkovanja što uključuje brzi pregled potencijalnih opasnosti od dolaska do mjesta uzorkovanja (npr. skliska ili ledena obala), opasnosti od vode (npr. uzvodne brane od trupaca), brzinu te dubinu vode i slično.

Lokacije uzorkovanja predstavljaju vodna tijela na području Parka prirode Kopački rit. Obuhvaćaju antropogena vodna tijela i prirodna jezera i kanale kojima voda iz Dunava i Drave ulazi u staništa Kopačkog rita. Gledajući zonu plavljenja Kopačkog rita lokacije uzorkovanja mogu se podijeliti u dvije grupe. Prvu grupu predstavljaju lokacije u zoni prirodnog plavljenja Dunava i Drave, a drugu grupu čine lokacije koje se nalaze u branjenoj zoni. Prvu grupu čine postaje pod rednim brojevima 8. – 19., a drugu grupu lokacije pod rednim brojevima 1. – 7.

U tablici 1 dan je prikaz lokacija uzorkovanja sa geografskim koordinatama i tipom tekućice prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019).

Uzorkovanje vode provedeno je sukladno normama:

HRN ISO 5667-3:2018 Kvaliteta vode - Uzorkovanje - 3. dio: Čuvanje i rukovanje uzorcima vode (ISO 5667-3:2018; EN ISO 5667-3:2018),

HRN ISO 5667-4:2016 Kakvoća vode - Uzorkovanje - 4. dio: Upute za uzorkovanje vode prirodnih i umjetnih jezera (ISO 5667-4:2016),

HRN ISO 5667-6:2016 Kvaliteta vode - Uzorkovanje - 6. dio: Upute za uzorkovanje vode rijeka i potoka (ISO 5667-6:2014; EN ISO 5667-6:2016),

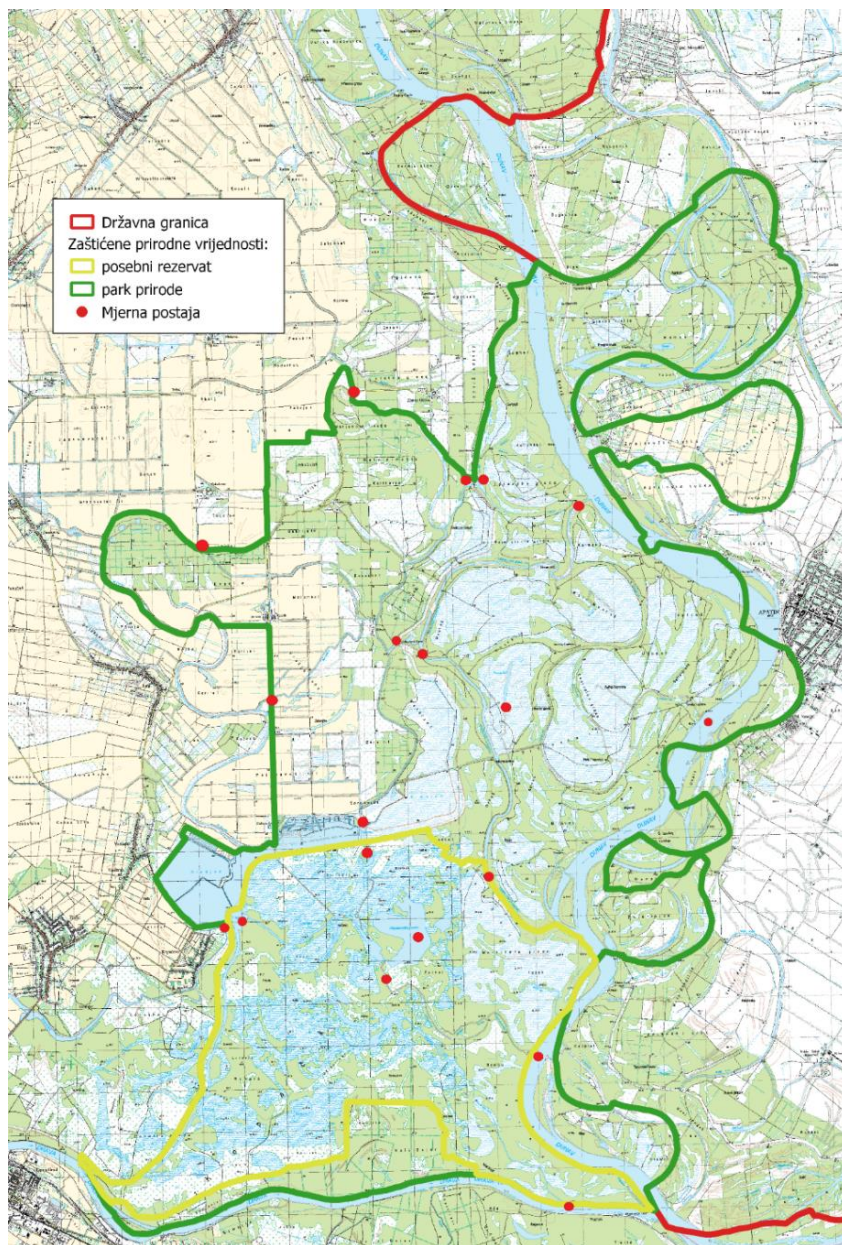
HRN ISO 5667-14:2016 Kvaliteta vode - Uzorkovanje - 14. dio: Upute za osiguravanje kvalitete i kontrolu kvalitete pri uzorkovanju i rukovanju uzorcima vode iz okoliša (ISO 5667-14:2014; EN ISO 5667-14:2016).

Tablica 1. Mjerne postaje za procjenu kemijskog stanja površinskih voda na području Parka prirode Kopački rit

Table 1. Sampling stations for assessing the chemical state of surface waters in the area of the Kopački rit Nature Park

R. broj	Mjerna postaja	HR TIP Tekuće (Uredba)*	GPS koordinate	
			x	y
1.	Kanal Čarna most	Nizinske male tekućice s glinovito-pjeskovitom podlogom (HR-R_2A)	45° 43' 21,8''	018° 50' 28,1''
2.	Crpna stanica Zlatna Greda	-	45° 42' 05,1''	018° 52' 33,9''
3.	Crpna stanica Tikveš	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 40' 04,4''	018° 51' 07,5''
4.	Kanal Mali Dunav (Šuma Siget)	Nizinske male tekućice s glinovito-pjeskovitom podlogom (HR-R_2A)	45° 43' 21,8''	018° 50' 28,1''
5.	Kanal Podunavlje most	-	45° 39' 27,3''	018° 48' 47,8''
6.	Crpna stanica Podunavlje	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 43' 21,8''	018° 50' 28,1''
7.	Ustava Kopačevo – Stara Drava	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 36' 30,1''	018° 47' 53,5''
8.	Dunav – ušće kanala Petreš u Dunav	Nizinske vrlo velike tekućice u silikatnoj podlozi – Dunav (HR-R_5D)	45° 39' 03,3''	018° 56' 46,2''
9.	PZR - Četverokut	SPSCNP	45° 37' 32,0''	018° 50' 25,6''
10.	Kopačko jezero	SPMSNP	45° 36' 18,9''	018° 51' 12,6''
11.	Kanal Hulovo	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 35' 57,2''	018° 50' 41,2''
12.	Kanal Zlatna Greda	-	45° 42' 06,1''	018° 50' 43,9''
13.	Vemeljski Dunavac Tikveš kompa	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 39' 56,6''	018° 51' 37,1''
14.	Bara Semenča	-	45° 39' 0,34''	018° 53' 0,3''
15.	Jezero Veliki Sakadaš	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 36' 38,0''	018° 48' 03,8''
16.	Vemeljski Dunavac – ulaz	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 41' 40,7''	018° 54' 23,5''
17.	Vemeljski Dunavac – Nadhat fok	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 37' 15,9''	018° 52' 35,1''
18.	Hulovski kanal – ušće u Dunav	Nizinske srednje i velike tekućice (HR-R_4)	45° 34' 18,4''	018° 53' 19,9''
19.	Renovski kanal – ušće u Dravu	-	45° 32' 53,7''	018° 53' 47,6''

*Uredba o standardu kakvoće voda (NN 96/2019)



Slika 1. Prikaz područja Kopačkog rita sa ucrtanim mjernim postajama
Figure 1. Research area of Kopački rit with marked sampling stations

Laboratorijska obrada

Uzorkovanje površinskih voda za analize teških metala se vršilo ručno, a uzorak se uzima pomoću boce za uzorkovanje te se zatim ulijeva u staklenu bocu od 1000 ml u kojoj se držao do laboratorijske analize. Uzet je po jedan uzorak na svakoj lokaciji. Kako bi uzorci bili homogeni i bez organskih nečistoća u obliku lišća, grančica i sl. pri ulijevanju u bocu su pročišćeni kroz sterilnu gazu. Potom su začepljeni i transportirani u hladnjacima na temperaturi od 4 °C u ispitni laboratorij.

Za svaki uzorak u laboratorijsku bilježnicu se upisivao i zapisnik o uzorkovanju koji obuhvaća podatke kao što su oznaka uzorka, datum i vrijeme uzorkovanja, temperatura zraka, dubina vodnog tijela, prozirnost vode, temperatura vode, koncentracija otopljenog kisika, zasićenost, miris, boja, vodni režim lokacije te podaci o uzorkivačima.

Ukupno je prikupljeno 228 uzoraka površinske vode na 19 lokacija kroz 12 ciklusa uzorkovanja.

S uzorcima se pažljivo postupalo i u adekvatnom laboratorijskom prostoru i odjeći; rukavice od lateksa i laboratorijske kute korištene su tijekom rukovanja uzorcima za izbjegavanje kontaminacije. Staklene boce i ostalo posuđe su uredno očišćeni propisanim kemikalijama. Slijepe probe su se koristile za dobivanje točnih očitavanja instrumenta.

Za analize je korišten AAnalyst 800 atomski apsorpcijski spektrometar s grafitnom pećnicom.

Za olovo, kadmij i nikal potrebno je profiltrirati 50 ml uzorka u staklenoj čaši uređajem za membransku vakuum filtraciju, zakiseliti s 250 ul HNO₃ do pH ≤ 2. Uzorak upariti na grijačkoj ploči do cca 10 ml i kvantitativno prenijeti u odmjernu tikvicu od 10 ml, isprati čašu s ultračistom vodom i nadopuniti tikvicu do oznake. U ovako pripremljenim uzorcima mjeri se koncentracija otopljenog Pb, Cd i Ni grafitnom tehnikom. U grafitnoj tehnici Aparat pomoću autosampler-a aplicira alikvot uzorka u grafitnu kivetu pećnice atomskog apsorpcijskog spektrometra. Izvor svjetlosti (HCL lampe) emitira svjetlost specifične valne duljine za pojedini element. Kada zraka svjetlosti prolazi kroz atomski oblak oslobođen atomizacijom u grafitnoj pećnici, atomi apsorbiraju svjetlost ispitivanog elementa u atomskom oblaku. Mjeri se smanjenje intenziteta svjetla određene valne duljine. Aparat na temelju kalibracijske krivulje očitava koncentraciju elementa u µg/l uzorka.

Živu profiltrirati 250 ml uzorka u borsilikatno staklo uređajem za membransku vakuum filtraciju, zakiseliti s 7,5 ml HCl i dodati 2,5 ml 0,5 % K₂Cr₂O₇ za stabilizaciju. U ovako pripremljenim uzorcima mjeri se koncentracija otopljene žive hidridnom tehnikom. U hidridnoj tehnici Mono ili di - valentna živa reducira se do elementarne žive pomoću natrijevog borhidrida u kiselom mediju. Potom se elementarna živa prenosi iz otopine uz pomoć struje inertnog plina u obliku plina atoma i zajedno sa oslobođenim vodikom, transportira se u kvarcnu kivetu. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini od 253,7 nm u radijacijskom snopu atomskog apsorpcijskog spektrometra. Koncentracija se računa iz kalibracijskog pravca.

U tablici 2 nalazi se popis pokazatelja i pripadajućih metoda, oznake normi analitičkih metoda, mjernih nesigurnosti i vrijednosti granica detekcije i kvantifikacije za svaki pokazatelj koji se određuje u sklopu istraživanja kemijskog stanja površinskih voda.

Tablica 2. Popis pokazatelja, pripadajućih metoda, oznaka normi, mjernih nesigurnosti i vrijednosti granica kvantifikacije za istraživanje kemijskog stanja površinskih

Table 2. A list of indicators, methods, standards, measurement uncertainties and quantification limit values for the assessment of the chemical state of surface waters

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Naziv norme	Oznaka norme	Granica detekcije (µg/l)	Granica kvantifikacije (µg/l)	Mjerna nesigurnost (%)
Olovo i spojevi olova	µg/l	GFAAS	*HRN EN ISO 15586: 2008	0,04	0,12	± 40,0
Živa i spojevi žive	µg/l	FIAS	AAS 019 REV 0 (od 1.1.2015.)	0,006	0,02	± 11,4
Nikal i spojevi nikla	µg/l	GFAAS	*HRN EN ISO 15586: 2008	0,15	0,48	± 11,0
Kadmij i spojevi kadmija	µg/l	GFAAS	*HRN EN ISO 15586: 2008	0,006	0,02	± 18,0

Napomena:

*akreditirana metoda

Rezultati i rasprava

Stanje površinskih voda određuje se na temelju ekološkog i kemijskog stanja tijela ili skupine tijela površinskih voda. Kemijsko stanje ocjenjuje se u odnosu na pokazatelje kemijskog stanja, odnosno prioriternih i prioriterno opasnih tvari, sukladno Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019).

Kemijsko stanje površinskih voda ocjenjuje se u odnosu na pokazatelje kemijskog stanja navedene u Prilogu 5.A. važeće Uredbe o standardu kakvoće voda (NN 96/2019).

Stanje tijela površinske vode određuje se na temelju ekološkog ili kemijskog stanja toga tijela, ovisno o tome koje je lošije.

U ovom radu dana je ocjena kemijskog stanja tijela površinskih voda na temelju rezultata mjerenja pokazatelja prioriternih i prioriterno opasnih tvari.

Tijelo površinske vode razvrstava se na temelju rezultata ocjene elemenata kakvoće u kategorije kemijskog stanja i to:

1. dobro kemijsko stanje ili
2. nije postignuto dobro kemijsko stanje.

Kemijsko stanje tijela površinske vode utvrđuje se na temelju prosječne godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) pokazatelja

prioritetnih i prioritetno opasnih tvari iz Priloga 5.B. navedene Uredbe o standardu kakvoće voda.

Prosječna godišnja koncentracija i maksimalna godišnja koncentracija izračunavaju se na temelju svih rezultata mjerenja pokazatelja prioritetnih i prioritetno opasnih tvari, izmjerenih u različitim razdobljima tijekom godine.

Analiza po pojedinim pokazateljima za ocjenu kemijskog stanja određuje se na temelju prosječne godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) pokazatelja. Stoga su u grafičkim prikazima za usporedbu rezultata na svim postajama korištene vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK).

Kako su koncentracije pojedinih kemijskih pokazatelja u određenom uzorku niže od granice kvantifikacije, za izračun srednjih vrijednosti koncentracija se koristi pola vrijednosti granice kvantifikacije, sukladno Članku 15., stavak 1 Pravilnika o posebnim uvjetima za obavljanje djelatnosti uzimanja uzoraka i ispitivanja voda (NN 3/2020). Također, za izradu grafičkih prikaza, korištene su navedene vrijednosti pola granice kvantifikacije jer program u kojemu se rade grafički prikazi ne prepoznaje znak < (manje).

Tijelo površinske vode razvrstava se u kategoriju kemijskog stanja »nije postignuto dobro kemijsko stanje« kada je izračunata prosječna godišnja koncentracija najmanje jedne tvari iz Priloga 5.A. Uredbe veća od standarda kakvoće vodnog okoliša za prosječnu godišnju koncentraciju ($PGK_i > SKVO$ za PGK), a maksimalna izmjerena koncentracija najmanje jedne tvari iz Priloga 5.A. Uredbe veća od standarda kakvoće vodnog okoliša za maksimalnu godišnju koncentraciju ($MGK_i > SKVO$ za MGK) (NN 96/2019.).

Ocjena kemijskog stanja tijela površinske vode određuje se najlošijom od vrijednosti rezultata, uzimajući u obzir rezultate ocjene pokazatelja kemijskog stanja.

Kemijsko stanje tijela površinske vode razvrstava se na temelju rezultata ocjene elemenata kakvoće u navedene kategorije i prikazuje se na kartama odgovarajućom bojom i to:

1. dobro kemijsko stanje, plavom
2. nije postignuto dobro kemijsko stanje, crvenom

Granične vrijednosti kategorija kemijskog stanja za pokazatelje metala prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019) prikazane su u tablici 3.

Za kadmij i spojeve kadmija SKVO ovise o tvrdoći vode koja je razvrstana u pet klasnih kategorija (klasa 1: < 40 mg CaCO₃/l, klasa 2: 40 do < 50 mg CaCO₃/l, klasa 3: 50 do < 100 mg CaCO₃/l, klasa 4: 100 do < 200 mg CaCO₃/l i klasa 5: ≥ 200 mg CaCO₃/l).

Prema rezultatima za parametar tvrdoće, na svim postajama, vode se svrstavaju klasu 5. (≥ 200 mg CaCO₃/l).

Tablica 3. Granične vrijednosti za ocjenu kemijskog stanja površinskih voda prema Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019)

Table 3. Threshold values for the assessment of the chemical state of surface waters according to the Regulation on water quality standards (Official Gazette 96/2019)

Br.	Naziv tvari	CAS Broj ⁽¹⁾	PGK-SKVO ⁽²⁾ Kopnene površinske vode ⁽³⁾	PGK-SKVO ⁽²⁾ Druge površinske vode	MGK-SKVO ⁽⁴⁾ Kopnene površinske vode ⁽³⁾	MGK-SKVO ⁽⁴⁾ Druge površinske vode
1.	Kadmij i spojevi kadmija (ovisno o klasama tvrdoće vode) ⁽⁶⁾	7440-43-9	≤ 0,08 (klasa 1) 0,08 (klasa 2) 0,09 (klasa 3) 0,15 (klasa 4) 0,25 (klasa 5)	0,2	≤ 0,45 (klasa 1) 0,45 (klasa 2) 0,6 (klasa 3) 0,9 (klasa 4) 1,5 (klasa 5)	≤ 0,45 (klasa 1) 0,45 (klasa 2) 0,6 (klasa 3) 0,9 (klasa 4) 1,5 (klasa 5)
2.	Olovo i spojevi olova	7439-92-1	1,2 (13)	1,3	14	14
3.	Živa i spojevi žive	7439-97-6			0,07	0,07
4.	Nikal i spojevi nikla	7440-02-0	4 (13)	8,6	34	34

Legenda:

PGK prosječna godišnja koncentracija

MGK maksimalna godišnja koncentracija

SKVO standard kakvoće vodnog okoliša

Olovo i spojevi olova

Raspon vrijednosti rezultata prema kriteriju prosječne godišnje koncentracije kreće se od 0,18 µg/l do 0,43 µg/l. Najniža vrijednost zabilježena je na lokaciji br. 9.PZR Četverokut, a najviša na lokaciji uzorkovanja br. 5.Kanal Podunavlje most (Slika 2). Najviše izmjerene vrijednosti u promatranom rasponu, osim lokacije uzorkovanja br. 5 zabilježene su i na 2.Crpna stanica Zlatna Greda (0,33 µg/l), 7.Ustava Kopačevo - Stara Drava (0,38 µg/l), 8.Dunav – ušće kanala Petreš u Dunav (0,32 µg/l), 12.Kanal Zlatna Greda (0,31 µg/l), 13.Vemeljski Dunavac Tikveš – kompa, 18.Hulovski kanal – ušće u Dunav i 19.Renovski kanal – ušće u Dravu.

Dobiveni rezultati za olovo u korelaciji su sa rezultatima Popescu i sur. (2022) na Dunavu, čije su vrijednosti olova u rasponu od 0,21 µg/l do 0,31 µg/l, te nema značajnih odstupanja u prosječnim godišnjim koncentracijama. U odnosu na istraživanja Bhuyana i sur. (2017) na rijeci Meghna, čije prosječne vrijednosti olova iznose 10 µg/l, i Ahmad i sur. (2010) sa 65.45 µg/l na rijeci Buriganga, rezultati koncentracija olova dobiveni provedbom ovog istraživanja u Kopačkom ritu su znatno niži.

Rezultati istraživanja pokazuju da nema značajne razlike u prosječnim godišnjim koncentracijama na lokacijama uzorkovanja gledajući lokacije kroz prizmu prirodnog plavljenja i branjenog područja. Zabilježene povišene maksimalne koncentracije i dalje su u granicama propisanih vrijednosti, a nalaze se na kanalima Kopačkog rita koji su vezani uz Dunav i Dravu, stoga se može zaključiti da su posljedica vodnog režima dvaju rijeka i dotoka onečišćujućih tvari putem njih. Sukladno Uredbi o

standardu kakvoće vode (NN 96/2019) iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su prosječne i maksimalne godišnje koncentracije unutar propisanih vrijednosti.



Slika 2. Prikaz vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) olova i spojeva olova na svim lokacijama uzorkovanja
Figure 2. The mean and maximum annual values of lead and lead compounds at all sampling locations

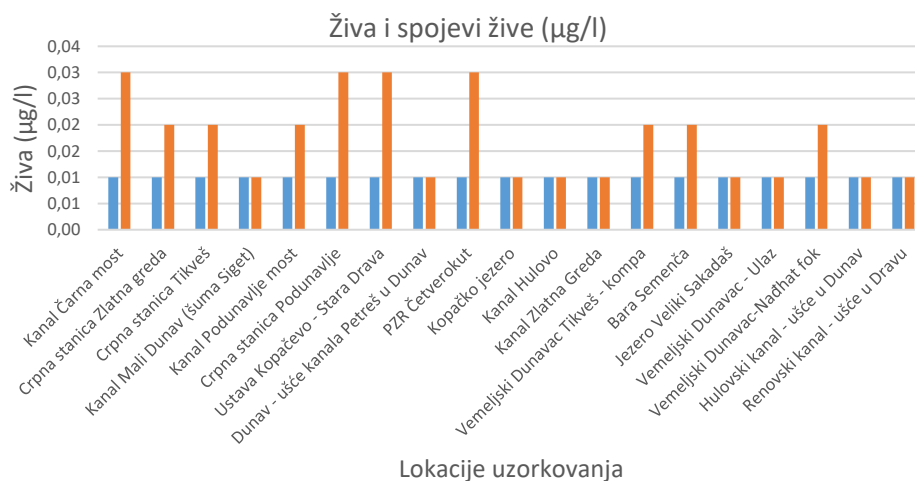
Živa i spojevi žive

Na slici 3 prikazane su vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) žive i spojeva žive utvrđene na svim lokacijama uzorkovanja. Kod uzoraka gdje je koncentracija žive i spojeva žive bila niža od granice kvantifikacije, prikazane su vrijednosti od 0,01 µg/l, odnosno pola od vrijednosti granice kvantifikacije.

Najviše vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) žive i spojeva žive (0,03 µg/l) utvrđene su na lokaciji uzorkovanja br. 1 – Kanal Čarna most, lokaciji uzorkovanja br. 6 - Crpna stаница Podunavlje, br. 7 - Ustava Kopačevo – Stara Drava, br. 9 - PZR Četverokut).

Prema Popescu i sur. (2022) vrijednosti žive su u rasponu od 0,009 µg/l do 0,017 µg/l, što je u korelaciji sa rezultatima ovog istraživanja.

Prema rezultatima za živu i spojeve žive nema značajne razlike na obje grupe lokacija uzorkovanja; zona prirodnog plavljenja i branjena zona. Sukladno Uredbi o standardu kakvoće vode (NN 96/2019) iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su prosječne i maksimalne godišnje koncentracije unutar propisanih vrijednosti.



Slika 3. Prikaz vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) žive i spojevi žive na svim lokacijama uzorkovanja

Figure 3. The mean and maximum annual values of mercury and mercury compounds at all sampling locations

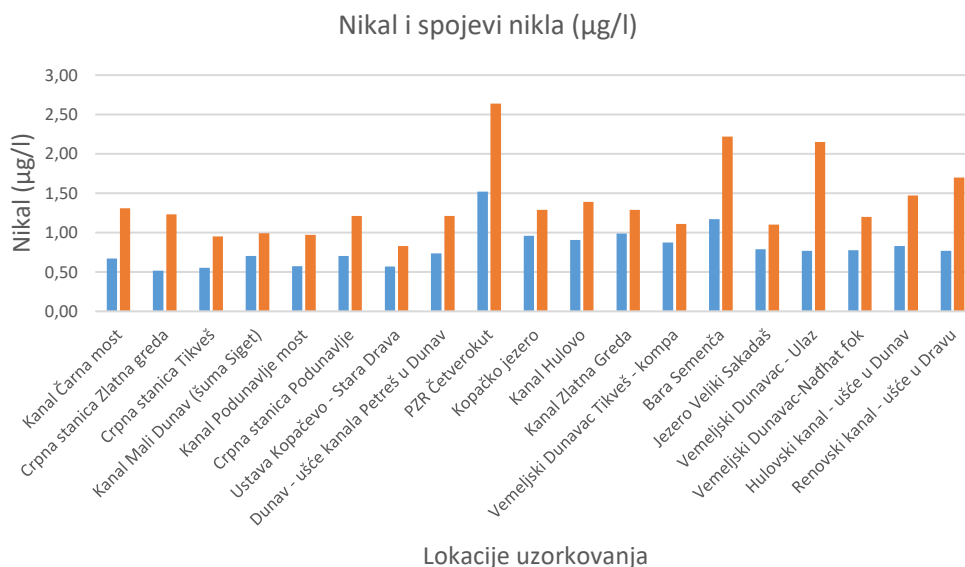
Nikal i spojevi nikla

Slika 4 prikazuje vrijednosti godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) nikla i spojeva nikla na svim postajama uzorkovanja. Izmjerene vrijednosti prosječne godišnje koncentracije nikla i spojeva nikla kreću se u rasponu od 0,52 µg/l (lokacija uzorkovanja br. 2 - Crpna stanica Zlatna Greda) do 1,52 µg/l (lokacija uzorkovanja br. 9 - PZR Četverokut).

Vrijednosti PGK na svim lokacijama uzorkovanja bile su u rasponu do 1,00 µg/l osim na već spomenutoj lokaciji br. 9 - PZR Četverokut i lokaciji br. 14 - Bara Semenča s vrijednošću od 1,17 µg/l. Primijećeno je da su na lokaciji br. 9 - PZR Četverokut za vrijeme uzorkovanja obavljani mehanički radovi u sklopu izgradnje Ustave.

Dobiveni rezultati za nikal znatno su niži od Bhuyana i sur. (2017), čije su vrijednosti nikla 20 µg/l sa maksimalno izmjerenom koncentracijom od 300 µg/l, te od Ahmad i sur. (2010) koji bilježe 8.80 µg/l.

Iz dobivenih rezultata za nikal i spojeve nikla vidljivo je da nema značajne razlike u rezultatima na obje grupe lokacija uzorkovanja; zona prirodnog plavljenja i branjena zona. Sukladno Uredbi o standardu kakvoće vode (NN 96/2019) iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su prosječne i maksimalne godišnje koncentracije unutar propisanih vrijednosti. Za povišene izmjerene maksimalne koncentracije može se pretpostaviti da su rezultat nepovoljnog vodnog režima i male dubine vodnog tijela uzrokovane sušom te uzorkovanja vode neposredno od samog dna vodnog tijela.



Slika 4. Prikaz vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) nikla i spojeva nikla na svim postajama uzorkovanja
Figure 4. The mean and maximum annual values of nickel and nickel compounds at all sampling locations

Kadmij i spojevi kadmija

Slika 5 prikazuje prosječne vrijednosti godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) kadmija i spojeva kadmija na svim postajama uzorkovanja. Izmjerene vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) kadmija i spojeva kadmija kreću se u rasponu od <0,02 µg/l (lokacija uzorkovanja br. 6 - Crpna stаница Podunavlje i lokacija uzorkovanja br. 18 - Hulovski kanal – ušće u Dunav) do 0,04 µg/l (lokacija uzorkovanja br. 19. Renovski kanal - ušće u Dravu).

Povišene vrijednosti kadmija i spojeva kadmija zabilježene su i na lokacijama 14. Bara Semenča (0,028 µg/l), 16. Vemeljski Dunavac – ulaz (0,028 µg/l), 2. Crpna stаница Zlatna Greda (0,52 µg/l) te 9. PZR Četverokut (0,52 µg/l). Uzorci vode uzorkovani na ukupno 11 lokacija imali su vrijednosti PGK niže od granice kvantifikacije.

Dobiveni rezultati za kadmij znatno su niži od Bhuyana i sur. (2017), čije su vrijednosti kadmija 18 µg/l. Popescu i sur. (2022) bilježe prosječne godišnje koncentracije kadmija u rasponu 0,004 – 0,088 µg/l, vrijednosti koje su niže od rezultata ovog istraživanja. Ahmad i sur. (2010) donose prosječnu koncentraciju kadmija od 9.34 µg/l.

Iz dobivenih rezultata za kadmij i spojeve kadmija vidljivo je da nema razlike u prosječnoj godišnjoj koncentraciji između dvaju grupa lokacija, ali su zabilježene povišene maksimalne godišnje koncentracije na tri postaje koje se nalaze u zoni prirodnog plavljenja. Sukladno navedenom, može se zaključiti da su zabilježene maksimalne povišene vrijednosti posljedica vodnog režima Dunava. Sukladno Uredbi o standardu kakvoće vode (NN 96/2019) iz dobivenih rezultata može se zaključiti da su prosječne i maksimalne godišnje koncentracije unutar propisanih vrijednosti.



Slika 5. Prikaz vrijednosti prosječne godišnje koncentracije (PGK) i maksimalne godišnje koncentracije (MGK) kadmija i spojeva kadmija na svim lokacijama uzorkovanja

Figure 5. The mean and maximum annual values of cadmium and cadmium compounds at all sampling locations

Ocjena stanja

Za sve mjerne postaje izmjerena prosječna godišnja koncentracija (PGK) i maksimalna godišnja koncentracija (MGK) ne prelaze SKVO iz Uredbe o standardu kakvoće vode (NN 96/2019) te sve postaje se ocjenjuju kao dobro kemijsko stanje što je vidljivo iz tablice 4.

Tablica 4. PGK pokazatelja kemijskog stanja na svim lokacijama s ocjenom kemijskog stanja prema važećoj Uredbi o standardu kakvoće voda (NN 96/2019)

Table 4. The mean annual values of indicators of the chemical state at all locations with an assessment of the chemical state according to the Regulation on water quality standards (Official Gazette 96/2019)

R. broj	Postaja	olovo i spojevi olova		živa i spojevi žive		nikal i spojevi nikla		kadmij i spojevi kadmija		Ocjena Kemijskog stanja
		PGK	MGK	PGK	MGK	PGK	MGK	PGK	MGK	
1	Kanal Črna most	0,28	0,82	<0,02	0,03	0,67	1,31	<0,02	0,03	Dobro
2	Crpna stanica Zlatna greda	0,33	1,04	<0,02	0,02	0,52	1,23	<0,02	0,02	Dobro
3	Crpna stanica Tikveš	0,27	0,84	<0,02	0,02	0,55	0,95	<0,02	0,03	Dobro
4	Kanal Mali Dunav (šuma Siget)	0,23	0,69	<0,02	<0,02	0,70	0,99	<0,02	0,03	Dobro
5	Kanal Podunavlje most	0,43	2,64	<0,02	0,02	0,58	0,97	<0,02	0,04	Dobro
6	Crpna stanica Podunavlje	0,24	0,62	<0,02	0,03	0,70	1,21	0,02	0,04	Dobro
7	Ustava Kopačevo - Stara Drava	0,38	1,52	<0,02	0,03	0,57	0,83	<0,02	0,04	Dobro
8	Dunav - ušće kanala Petreš u Dunav	0,32	0,64	<0,02	<0,02	0,74	1,21	0,02	0,06	Dobro
9	PZR Četverokut	0,18	0,46	<0,02	0,03	1,52	2,64	0,02	0,03	Dobro
10	Kopačko jezero	0,28	0,44	<0,02	<0,02	0,96	1,29	<0,02	0,03	Dobro
11	Kanal Hulovo	0,27	0,57	<0,02	<0,02	0,91	1,39	<0,02	0,03	Dobro
12	Kanal Zlatna Greda	0,31	0,82	<0,02	<0,02	0,99	1,29	<0,02	0,04	Dobro
13	Vemeljski Dunavac Tikveš - kompa	0,33	1,14	<0,02	0,02	0,88	1,11	0,02	0,03	Dobro
14	Bara Semenča	0,24	0,45	<0,02	0,02	1,17	2,22	0,03	0,13	Dobro
15	Jezero Veliki Sakadaš	0,29	0,88	<0,02	<0,02	0,79	1,10	<0,02	0,04	Dobro
16	Vemeljski Dunavac - Ulaz	0,28	0,71	<0,02	<0,02	0,77	2,15	0,03	0,11	Dobro
17	Vemeljski Dunavac - Nadhat fok	0,25	0,46	<0,02	0,02	0,78	1,20	<0,02	0,03	Dobro
18	Hulovski kanal - ušće u Dunav	0,41	1,81	<0,02	<0,02	0,83	1,47	0,02	0,07	Dobro
19	Renovski kanal - ušće u Dravu	0,32	1,14	<0,02	<0,02	0,77	1,70	0,04	0,13	Dobro

Legenda: Dobro kemijsko stanje; Nije postignuto dobro kemijsko stanje

Zaključci

Sukladno rezultatima statističke obrade analiza svih uzorka vode uzorkovanih na devetnaest lokacija prema planu istraživanja kemijskog stanja površinskih voda tijekom jedne godine uzorkovanja, značajna odstupanja u rezultatima nisu uočena. Tijelo površinske vode razvrstava se u kategoriju kemijskog stanja »dobro kemijsko stanje« kada je izračunata prosječna godišnja koncentracija svake od tvari iz Priloga 5.A. ove Uredbe manja ili jednaka standardu kakvoće vodnog okoliša za prosječnu godišnju koncentraciju ($PGK_i \leq SKVO$ za

PGK), a maksimalna izmjerena koncentracija svake tvari iz Priloga 5.A. ove Uredbe manja ili jednaka standardu kakvoće vodnog okoliša za maksimalnu godišnju koncentraciju ($MGK_i \leq SKVO$ za MGK). Na svim lokacijama vrijednosti prosječne i maksimalne godišnje koncentracije su manje od standarda kakvoće vodnog okoliša navedenih u Prilogu 5.B. Uredbe o standardu kakvoće voda (NN 96/2019) te se sukladno navedenoj Uredbi, tijela površinskih voda na području Parka prirode Kopački rit razvrstavaju se u kategoriju kemijskog stanja: dobro kemijsko stanje.

Literatura

- Ahmad, M.K., Islam, S., Rahman, S., Haque, M.R., Islam, M.M., (2010): Heavy metals in water, sediment and some fishes of Buriganga River, Bangladesh, *Int. J. Environ. Res.* 4, pp. 321–332.
- Bai, J., Xiao, R., Cui, B., Zhang, K., Wang, Q., Liu, X., Gao, H., Huang, L., (2011): Assessment of heavy metal pollution in wetland soils from the young and old reclaimed regions in the Pearl River Estuary, South China, *Environ. Pollut.* 159, pp. 817–824.
- Bhuyana, S., Abu Bakar, M., Akhtara, A., Hossain, M. B., Alid, M.M., Islama, S. (2017): Heavy metal contamination in surface water and sediment of the Meghna River, Bangladesh, *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 8, pp. 273–279
- Bryan, G. W and Hummerstone, L. G. (1977): Indicators of heavy metal contamination in the Looe Estuary (Cornwall) with particular regard to Silver and Lead, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 57 (1), pp. 75–92
- Cross, F. A., Duke, T. W. and Willes, J. N. (1970). Biogeochemistry of trace elements in coastal plane estuary: Distribution of manganese, iron and zinc in sediments, water and polychaetous worms, *Chesapeake Sci.* 11, pp. 221–234.
- Gasparotti, C. (2014): The main factors of water pollution in Danube River basin, *Euro Econ.* 33, pp. 93–106.
- Gautam, R., Sharma, S., Mahiya, S., Chattopadhyaya, M. (2015): Contamination of Heavy Metal in Aquatic Media: Transport, Toxicity and Technologies for Remediation. In: *Heavy Metals in Water*, Presence, Removal and Safety. Sanjay K. Sharma (ed.): The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 380.
- Inglezakis, V.J., Pouloupoulos, S.G. (2006): *Adsorption, Ion Exchange and Catalysis*. Design of Operations and Environmental Applications Elsevier, 1st Edition - August 23, 2006, pp. 602.
- Khan, S., Cao, Q., Zheng, Y.M., Huang, Y.Z., Zhu, Y.G., (2008): Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China, *Environ. Pollut.* 152, pp. 686–692
- Klobučar G.I.V., Štambuk A., Pavlica M., Sertić Perić M., Kutuzović Hackenberger B., Hylland K. (2010): Genotoxicity monitoring of freshwater environments using caged carp (*Cyprinus carpio*), *Ecotoxicology* 19(1), pp. 77–84.
- Martin, J.A.R., Arana, C.D., Ramos-Miras, J.J., Gil, C., Boluda, R., (2015): Impact of 70 years urban growth associated with heavy metal pollution, *Environ. Pollut.* 196, pp. 156–163.
- Mihaljević, M., Martinčić, J. (ur.). (1999): Kopački rit – pregled istraživanja i bibliografija. Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Osijek 1999. (monografija), 188 str.
- Nduka, J.K., Orisakwe, O.E., (2011): Water-quality issues in the Niger Delta of Nigeria: a look at heavy metal levels and some physicochemical properties, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18, pp. 237–246.
- Plan upravljanja Parkom prirode Kopački rit (2011): Javna Ustanova Park prirode Kopački rit, Tikveš, svibanj 2010. 135 str.

- Popescu, F., Trumić, M., Cioabla, A. E., Vujić, B., Stoica, V., Trumić, M., Opris, K., Bogdanović, G., Trif-Tordai, G. (2022): Analysis of Surface Water Quality and Sediments Content on Danube Basin in Djerdap-Iron Gate Protected Areas, *Water* 14, 2991.
- Pravilnik o posebnim uvjetima za obavljanje djelatnosti uzimanja uzoraka i ispitivanja voda, Narodne novine, br. 3/2020.
- Prostorni plan parka prirode Kopački rit (2006): Zavod za prostorno planiranje. Ministarstvo zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva, Republika Hrvatska. 176 str.
- Štambuk, A., Pavlica, M., Vignjević, G., Bolarić, B., Klobučar, G.I.V., (2009): Assessment of genotoxicity in polluted freshwaters using caged painter's mussel, *Unio pictorum*, *Ecotoxicology* 18(4), 430-9.
- Tilzer, M. M., Khondker, M. (1993): Hypertrophic and polluted freshwater ecosystems: Ecological basis for water resource management. Dept. of Botany, Dhaka University, Bangladesh.
- Uredba o standardu kakvoće voda, Narodne novine, br. 96/2019.
- Wilson, B., Pyatt, F.B., (2007): Heavy metal dispersion persistence, and bioaccumulation around an ancient copper mine situated in Anglesey, UK, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, pp. 224–231.

Evaluation of chemical status of Kopački rit surface water bodies through analysis of selected heavy metals through one-year period

Ivan Damjanović¹, Hrvoje Sučić¹, Danijela Bezik¹, Mirna Habuda-Stanić², Dario Kolarić¹, Zdenka Šušić¹, Leontina Toth¹, Barbara Petrovický Šveiger¹, Marika Kralj¹, Ines Ružkan¹, Mirna Tokić¹, Mirta Eberhard¹, Tanja Marković¹, Hrvoje Babić¹, Nataša Turić¹, Snježana Benković¹

¹Teaching Institute of Public Health for the Osijek-Baranja County, Drinska 8, 31000 Osijek, Croatia

²Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Food Technology Osijek, F. Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

*Corresponding author: zz-ekologija-pelud@zjzjosijek.hr

professional paper

Summary

Wetlands are the most productive ecosystems on Earth. Due to the undergoing wet – dry cycles, they ensure the diversity of ecological conditions and support high biodiversity. The dynamics of the Kopački rit floodplain water regime is a consequence of its geographical location in the area of the Drava – Danube confluence. The chemical status of surface water is based on the annual average concentrations (AAC) of the substances and on the maximum annual concentration (MAC). Heavy metals are among the most dangerous inorganic pollutants due to biodegradability, bioaccumulation, toxicity and due to incorporation into food chains. Dissolved in water, they are in ionic form and non-biodegradable and tend to accumulate in living things in the process of bioaccumulation. As part of the Naturavita project in the Nature Park Kopački rit, sampling and analysis of mercury, nickel, cadmium, lead and their compounds were carried out at 19 locations through one-year period of 12 field survey cycles. According to the obtained results, at all sampling locations, the measured average (AAC) and maximum annual concentrations (MAC) do not exceed allowable concentration according to Regulation on water quality standard (OG 96/2019). Good chemical status has been achieved at all sampling locations.

Ključne riječi: heavy metals, Kopački rit Nature Park, wetland ecosystems, bioaccumulation

Morfologija biorazgradnje polimernih mješavina

Lucija Kefurt¹, Vesna Očelić Bulatović^{2*}, Dajana Kučić Grgić²,
Anita Štrkalj¹

¹Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Avenija narodnih heroja 3,
44000 Sisak, Hrvatska

²Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Dopisni autor: vocelicbulatovic@fkit.hr

stručni rad

Sažetak

Izvrсна svojstva polimernih materijala i danas ih čine gotovo nezamjenjivim materijalima u svakodnevnoj uporabi. No svijest o ograničenim izvorima nafte kao i rastuća svijest o očuvanju okoliša, stavlja sve veći naglasak na uporabu polimernih materijala dobivenih iz obnovljivih izvora. Upravo škrob, kao prirodni materijal ima velik potencijal u primjeni zbog svoje prirodne biorazgradivosti u širokom rasponu okruženja, niske cijene te lake dostupnosti. U ovom istraživanju naglasak je stavljen na biorazgradnju polimernih mješavina polietilena i termoplastičnog škroba. Biorazgradnja provedena je procesom kompostiranja u adijabatskom reaktoru tijekom 16 dana. Biorazgradnja polimernih mješavina pratila se promjenom mase kao i praćenjem promjene strukture svjetlosnim (LM) i pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM). Procesom kompostiranja došlo je do potpune biorazgradnje TPS-a. TPS zbog hidrofilnog karaktera, upija i zadržava vlagu iz kompostne mase, što pridonosi bržoj biorazgradnji polimernih mješavina. LM-om kao i SEM-om potvrđena je brža i prodornija biorazgradnja polimernih PE /TPS mješavina i to naglašeno s većim udjelom dodanog TPS-a.

Ključne riječi: polimerne mješavine, termoplastični škrob, biorazgradnja, kompostiranje, morfologija

Uvod

Zanimanje i potreba za pronalaskom alternativnih polimernih materijala kao biomaterijala staro je nekoliko desetljeća, no još uvijek nije uspjelo u potpunosti zaživjeti. Prva generacija biopolimera bazirana je na smolama i nije se istakla s nikakvim boljim svojstvima osim biorazgradnje na manje dijelove te time nije bila ni ekološki najprihvatljivija, dok je druga generacija biopolimera bazirana na sintetiziranju alifatskih poliesteru iz nafte, pronašla svoje mjesto na tržištu kao uistinu biorazgradivi polimerni materijal (Alavi i sur., 2015). Značajni pozitivan utjecaj, s ekološkog stajališta, ima proizvodnja biorazgradivih prirodnih polimera, poput škroba, celuloze i drugih. Prednost biorazgradivih polimernih materijala je preusmjeravanje iskorištenja ugljikova dioksida koji nastaje njihovom biorazgradnjom, jer se apsorbira za uzgoj istih kultura, što znači da dolazi i do smanjenja emisije ugljikova dioksida u atmosferu, odnosno smanjenja proizvodnje

stakleničkih plinova (Pervaiz i sur., 2005). Treba istaknuti da uz proizvodnju biorazgradivih prirodnih polimernih materijala iz obnovljivih izvora prednost leži i u njihovoj biokompatibilnosti, jednostavnoj biorazgradnji te velikoj rasprostranjenosti sirovina u svijetu (Ghanbarzadeh i Almasi, 2013). Današnja ekološka osviještenost sve više ističe važnost prirodnih biorazgradivih polimera koji se dobivaju iz obnovljivih izvora ili nastaju polimerizacijom monomera prirodnog porijekla. Glavni nedostatak biorazgradivih polimernih materijala dobivenih petrokemijskim putem ujedno je i glavna prednost prirodnih polimera zbog neobnovljivosti izvora, odnosno ograničenih resursa izvora nafte. Najveću važnost imaju u zamjeni za trenutno najrasprostranjenijim sintetskim polimerima, te svoju primjenu nalaze primarno kao ambalažni materijali i proizvodi, u poljoprivredi, u medicini, u elektronici, u autoindustriji kao i drugim industrijama (Tokiwa i sur., 2009).

Biorazgradivi polimeri imaju lošija fizikalna svojstva u odnosu na sintetske polimere, smanjenu čvrstoću i stabilnost, a većina ih nije ekonomski isplativa te je proces dobivanja i prerade veoma zahtijevan i kompleksan (Aburto i sur., 1997; Pedroso i Rosa, 2005). Upravo navedeno dovelo je do proizvodnje polimernih mješavina koje se baziraju na umješavanju biorazgradivog polimera u matricu sintetskog nerazgradivog polimera pri čemu nastaje polimerna mješavina sa značajno poboljšanim svojstvima (Ghanbarzadeh i Almasi 2013; Tajedolin i Arabkhedri 2020; Tokiwa i sur., 2009). S obzirom na to da je škrob prirodni polimer ima veliku mogućnost primjene kao biorazgradivi materijal, a njegova niska cijena proizvodnje i velika rasprostranjenost daju mu izuzetnu prednost. U industrijskoj primjeni prirodni škrob ima ograničenu uporabu, zbog želatinacije i stabilnosti u kiselim medijima i pri visokim temperaturama. Radi bolje primjene podvrgava se fizikalnim, kemijskim i/ili enzimskim postupcima te se miješa s drugim polimerima kako bi se modificirao u namjeni poboljšanja svojstava. Fizikalnim modificiranjem, toplinskom obradom uz dodatak vode, bubrenjem i ekstruzijom dobiva se termoplastični škrob (TPS) kojeg odlikuju poboljšana željena svojstva u usporedbi sa čistim škrobom (Leja i Lewandowicz 2010, Khan i sur., 2017, Pervaiz i sur., 2014; Hoque i sur., 2013).

Biorazgradivi polimerni materijali se mogu reciklirati mehaničkim (koji se ističe svojom jednostavnošću) i organskim recikliranjem koje je pogodnije jer se uz mogućnost kompostiranja pomoću organskog otpada uz obogaćivanje tla ujedno i smanjuje količina odloženog polimernog otpada kao i cijena njezina uklanjanja. Kompostiranje je kontrolirani proces biorazgradnje čvrste organske tvari koju provodi zajednica mikroorganizama u aerobnim uvjetima prilikom kojeg nastaje kompost (stabilan produkt koji ima uporabu kao dodatak organskih i mineralnih tvari tlu), ugljikov dioksid, amonijak, voda, biomasa te se stvara toplina.

Cilj ovog rada je provesti proces kompostiranja polimernih mješavina sintetskog polietilena (PE) i TPS-a kao prirodnog biorazgradivog polimera. Analiza biorazgradnje promatrana je utjecajem na morfologiju PE/TPS mješavina pomoću svjetlosnog mikroskopa (light microscope, LM) kao i pretražnog elektronskog mikroskopa (scanning electron microscope, SEM).

Eksperimentalni dio

Materijali i metode

Za pripremu polimernih mješavina upotrijebljen je PE niske gustoće, (DOW™ LDPE 780E) proizvođača *The Dow Chemical Company*, MFR= 0,25 g/10 min (190 °C/2,16 kg), gustoće 0,921 g cm⁻³, te prirodni pšenični škrob, Srpanjka, doniranog od poljoprivrednog instituta Osijek. Kao plastifikator korišten je redestilirani glicerol, proizvođača Gram Mol.

Priprava mješavina

Prvotno je pripremljen TPS, plastificiranjem prirodnog pšeničnog škroba s 40 % glicerola kao plastifikatorom. Plastifikacija je provedena u jednopužnom ekstruderu, Brabender 19/20 DN, Njemačka, pri brzini vrtnje od 40 o/min s temperaturnim profilom 100/100/130 °C. Polimerne mješavine pripravljene su u Brabender gnjetilici, Njemačka ($T=160\text{ °C}$, 60 o/min, $t=9\text{ min}$).

Ispitni filmovi za daljnju karakterizaciju dobiveni su prešanjem ($T=150\text{ °C}$, $p=25\text{ kPa}$, $t=5\text{ min}/1\text{ min}$ predgrijavanja) na hidrauličkoj preši Fontuna, Nizozemska. Uzorci su hlađeni pod tlakom do sobne temperature te su izvađeni iz kalupa i dobiveni u obliku filma. Uzorci su rezani na dimenzije 10 x 10 mm (debljina uzoraka cca 400 μm). Pripremljene su PE/TPS polimerne mješavine s masenim udjelom TPS od 10, 20, 30, 40 i 50 %.

Biorazgradnja mješavina procesom kompostiranja

Ispitivanje biorazgradnje pripremljenih polimernih mješavina provedeno je u adijabatskom reaktoru ($V=10\text{ dm}^3$) procesom kompostiranja tijekom 16 dana, gdje je kao kompostni materijal korištena mješavina biootpada i kanalizacijskog aktivnog mulja (uređaj za obradu otpadnih voda grada Vrgorca) (Kučić Grgić i sur., 2020.). Detalji provedenog procesa kompostiranja uz određene fizikalno-kemijske i mikrobiološke parametre opisani su u prethodnom istraživanju (Kučić Grgić i sur., 2020.). Prije samog procesa kompostiranja pripremljene PE /TPS polimerne mješavine su sušene u pećnici na 40 °C tijekom 24 sata kako bi se dobila njihova početna masa (m_0). Nakon 16 dana procesa kompostiranja pažljivo je izvađen supstrat iz reaktora te vrlo oprezno pretražen kako bi se pronašle polimerne PE/TPS mješavine. Pronađene polimerne mješavine su temeljito očišćene i oprane s 70 % etanolom i destiliranom vodom te stavljeni u ventilirani prostor na sušenje, nakon čega im je izvagana konačna masa (m_f). Postotak gubitka mase ispitivanih uzoraka određen je prema jednadžbi 1:

$$\text{Gubitak mase} = \frac{m_0 - m_f}{m_0} \cdot 100 \quad (\%) \quad (1)$$

Proces biorazgradnje je potvrđen je procjenom gubitka mase te analiziran promjenom morfologije uzoraka pomoću LM-a kao i SEM-a.

Morfološka analiza polimernih mješavina

Analiza svjetlosnim mikroskopom

Ispitivani uzorci polimernih mješavina kao i čistih polimera promatrani su prije i poslije procesa kompostiranja reflektirajućom svjetlošću na svjetlosnom mikroskopu Stereomicroscope SMZ-2T marke Nikon, Japan.

Analiza pretražnim elektronskim mikroskopom

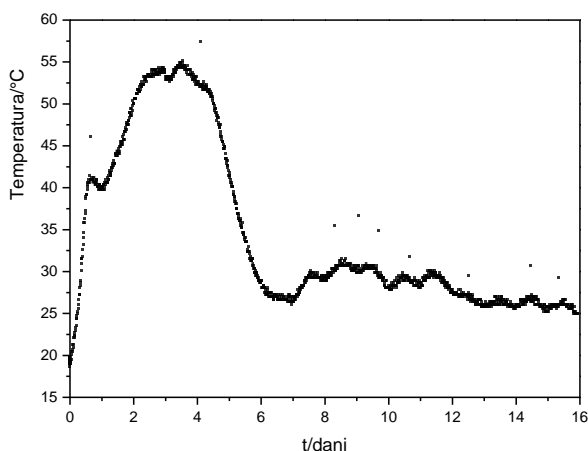
Morfološka struktura polimernih mješavina istražena je SEM-om Tescan, VEGA 3, Brno, Češka, skeniranjem vanjskih površina prije i nakon procesa kompostiranja. Svi uzorci prekriveni su tankim slojem platine (vakuumski raspršivač SCD 050; Leica; Austrija) i promatrani pod mikroskopom pri naponu ubrzanja 3 kV pomoću sekundarnog detektora elektrona.

Rezultati i rasprava

Biorazgradnja polimernih mješavina

Proces kompostiranja proveden je u reaktorskom sustavu, adijabatskom reaktoru radnog volumena od 10 dm^3 pri protoku zraka od $0,6 \text{ dm}^3 \text{ min}^{-1}$ tijekom 16 dana. Kao što je navedeno u eksperimentalnom dijelu, detalji procesa kompostiranja prikazani su u našem prethodnom radu (Kučić Grgić i sur., 2020.). Najvažniji fizikalno-kemijski parametar kojim se prikazuje učinkovitost provedbe procesa kompostiranja je praćenje temperature. Na slici 1 prikazana je promjena temperature kompostne mase tijekom 16 dana procesa kompostiranja. Iz grafičkog prikaza vidljivo je da je došlo do uspješnog procesa kompostiranja jer je postignuta termofilna faza (vidljiv maksimum platoa na temperaturnoj krivulji). Na početku procesa kompostiranja temperatura je iznosila $19 \text{ }^\circ\text{C}$ te je nakon samo 24 sata porasla na $41 \text{ }^\circ\text{C}$. Naredna 24 sata bilježi se eksponencijalni rast kada započinje termofilna faza te temperatura raste preko $50 \text{ }^\circ\text{C}$, postičući najvišu vrijednost od $58 \text{ }^\circ\text{C}$. Termofilna faza trajala je punih četiri dana i u njoj dolazi do najintenzivnije biorazgradnje kompostne mase te je za očekivati da u ovoj fazi dolazi do biorazgradnje polimernih PE/TPS mješavina. U prvoj mezofilnoj fazi dolazi do biorazgradnje jednostavnijih spojeva, dok se biorazgradnja složenijih spojeva, kao što su polimerne mješavine, očekuje upravo u termofilnoj fazi. Nakon četvrtog do sedmog dana bilježi se pad temperature te izmjerena temperatura u 7. danu iznosi $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nakon čega do desetog dana blago raste i doseže vrijednost od $31 \text{ }^\circ\text{C}$. Nadalje, temperatura se blago smanjuje sve do kraja procesa kompostiranja. Upravo aktivnost pojedinih vrsta mikroorganizma uzrokuje biorazgradnju organskih frakcija

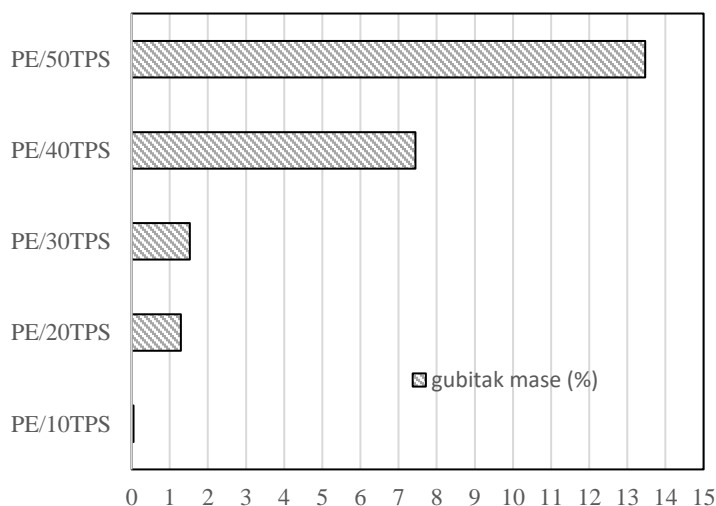
i promjene temperature tijekom procesa. Mikrobiološkom biorazgradnjom supstrata oslobađa se toplina što dovodi do povećanja temperature i promjene broja i vrste mikroorganizama te dolazi do porasta temperature i oslobađanja CO₂. Porast temperature izravno je povezan s izraženijom biokemijskom aktivnosti termofilnih zajednica mikroorganizama, nakon čega u fazi hlađenja ponovno dolazi do aktivacije mezofilnih mikroorganizama.



Slika 1. Temperatura promjena procesa kompostiranja tijekom 16 dana
Figure 1. Temperature profile of the composting process during 16 days

Svi polimeri neovisno o porijeklu i strukturi su podložni razgradnji u odgovarajućim uvjetima, a kako velika količina PE (najzastupljenijeg ambalažnog materijala) nažalost završava odbačena s biološkim otpadom, nameće se potreba njegove biorazgradnje kako bi se spriječilo nagomilavanje nerazgradivog polimernog otpada. Smanjenje molekulske mase navodi se kao ključni parametar pri razgradnji polimernih materijala, zbog formiranja manjih produkata tijekom procesa razgradnje. S druge strane, poznato je da se škrob razgrađuje gljivama i/ili bakterijama pod utjecajem enzimske aktivnosti mikroorganizama, što na kraju dovodi do stvaranja ugljikova dioksida, vode i šećera (Hogue i sur., 2013; Khan i sur., 2017). Biorazgradnju polimernih PE/TPS mješavina pratili smo promjenom mase, odnosno gubitkom mase, prije i nakon procesa kompostiranja. Na slici 2 prikazan je gubitak mase polimernih PE/TPS mješavina tijekom procesa kompostiranja. Čisti PE nije pokazao gubitak mase nakon 16 dana provedenog procesa kompostiranja što ukazuje na nemogućnost njegove biorazgradnje, što je i očekivano obzirom da se radi o nerazgradivom polimernom materijalu. Poznato je da je PE nerazgradivi polimerni materijal, visoko otporan na biorazgradnju zbog svoje strukture dugih lanca s ugljik-ugljik vezama koje omogućuju visoku otpornost na hidrolizu i

mikrobiološko djelovanje, tj. visoka molekulska masa te velika gustoća pakiranja lanaca PE polimera otežavaju njegovu biorazgradnju (Borghei i sur., 2010). Općenito, biorazgradnju polimernih materijala, ometaju i aditivi, antioksidansi i drugi stabilizatori koji se dodaju prilikom proizvodnje, odnosno nezaobilazan su dio materijala u uporabi, a mogu imati i toksično djelovanje na živi svijet. Uzorak čistog TPS-a nije pronađen nakon 16 dana procesa kompostiranja, što ukazuje na njegovu potpunu biorazgradnju. TPS zbog svoje amorfne strukture te hidrofilnog karaktera olakšava prodor mikroorganizama u svoju strukturu, i glavni je izvor hrane za mikroorganizme, koji svojom enzimskom aktivnošću u potpunosti razgrađuju TPS. Polimerna PE/10TPS mješavina pokazuje neznatni gubitak mase (0,05 %) nakon 16 dana procesa kompostiranja. Zbog kratkog perioda procesa kompostiranja od samo 16 dana, te malog udjela dodanog TPS-a nije došlo do značajnog gubitka mase. S obzirom na veći udio nerazgrađivog polimera, biorazgradnja je bila onemogućena. Pri većem udjelu dodanog termoplastičnog polimera vidljiv je i veći gubitak mase. Kod polimernih mješavina s udjelom TPS-a većim od 30 mas. % dolazi do većeg gubitka mase što ukazuje da je biorazgradnja započela i unutar polimerne mješavine, a ne samo na njenoj površini. Polimerne mješavine koje sadrže 20, 30, 40 i 50 mas. % TPS-a pokazale su redom gubitak mase od 1,29, 1,53, 7,44 i 13,47 %. Vidljivo je da tek udio TPS-a od 40 i 50 mas. % pokazuje značajniju promjenu mase procesom kompostiranja. Veći sadržaj TPS-a ubrzava biorazgradnju polimernih mješavina. TPS zbog hidrofilnog karaktera, upija i zadržava vlagu iz kompostne mase, što pridonosi biorazgradnji polimernih mješavina. Veći udio TPS-a u polimernoj mješavini, pridonosi većem udjelu upijanja vlage što pogoduje mikroorganizmima te dolazi do ubrzavanja biorazgradnje.

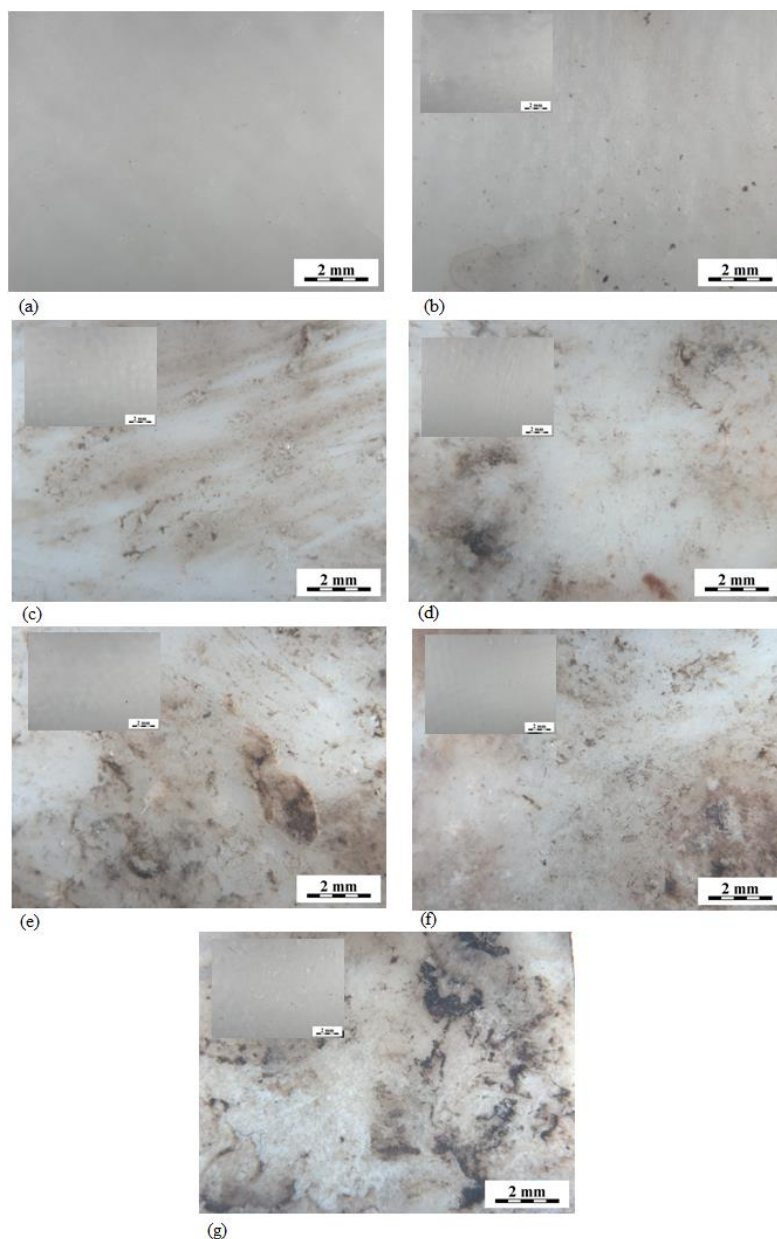


Slika 2. Gubitak mase polimernih PE/TPS mješavina
Figure 2. Mass loss of polymeric PE/TPS blends

Hidrofilni karakter TPS-a omogućuje lako upijanje vlage, a vlažnost je nužna za sve žive organizme pa tako i za mikroorganizme koji su odgovorni za biorazgradnju u procesu kompostiranja. Gubitak mase, kao mjera biorazgradnje materijala se povećava s većim udjela TPS-a iz razloga što veći udio TPS-a omogućava više hranjive podloge za rast i prodiranje mikroorganizama u strukturu polimernih mješavina koju onda određeni enzimi mikroorganizama razgrađuju (Khan i sur., 2017). Za očekivati je da će se prvotno, i brže biorazgraditi TPS unutar polimerne PE/TPS mješavine što će omogućiti lakši prodor mikroorganizmima drugim komponentama unutar polimerne mješavine, kao i njihov brži rast. TPS postaje supstrat, odnosno izvor ugljika za mikroorganizme, te time dolazi do ubrzanja biorazgradnje drugih komponenata unutar mješavine, odnosno PE u ovom ispitivanju. TPS se prvotno i brže razgrađuje unutar polimerne mješavine ostavljajući za sobom prazna mjesta unutar strukture, povećava poroznost strukture i time je olakšan pristup mikroorganizmima drugim komponentama potičući njihovu biorazgradnju. Uklanjanjem TPS-a, odnosno biorazgradnjom TPS-a PE matrica u polimernoj PE/TPS mješavini gubi svoju kompaktnu strukturu i integritet te se mikroorganizmima omogućava daljnje prodiranje i time se potiče i ubrza proces biorazgradnje PE unutar polimerne mješavine (Borghei i sur., 2010). Dodavanjem hidrofilnog TPS-a hidrofobnom PE znatno se povećava hidrofilnost mješavine, koja je bitan faktor u procesu biorazgradnje. Za biorazgradnju TPS-a odgovorna su dva enzima kojeg izlučuju mikroorganizmi, esteraza koja cijepa estersku vezu oslobađajući ftalnu kiselinu i škrob, dok amilaza djeluje na škrob proizvodeći reducirajuće šećere (Khan i sur., 2017).

Analiza svjetlosnim mikroskopom

Morfologija ispitivanih uzoraka polimernih PE/TPS mješavina kao i čistih uzoraka PE i TPS-a prije i poslije procesa kompostiranja praćena je LM-om kao i SEM-om. Na slici 3 prikazana je površinska struktura polimernih PE/TPS mješavina, kao i struktura čistog TPS-a i PE, prije i nakon procesa kompostiranja snimljena svjetlosnim mikroskopom (napomena: površinska struktura TPS-a nakon procesa kompostiranja nije prikazana zbog potpune biorazgradnje TPS-a). Na prikazanim fotografijama polimernih PE/TPS mješavina kao i kod čistog PE-a i TPS-a prije procesa kompostiranja vidljiva je glatka, potpuno svijetla struktura koja može ukazivati na potpunu mješljivost i dobru homogenost polimernih PE/TPS mješavina. Pri većem udjelu dodanog TPS-a, od 30 mas. % moguće je razaznati bijela područja koja mogu ukazivati na nakupljanje čestica škroba unutar matrice PE-a. Škrob ima tendenciju aglomeracije zbog hidrofilnog karaktera u usporedbi s PE-om koji ima izraziti hidrofobni karakter. Također, zbog snažnih intermolekularnih veza unutar molekula škroba dolazi do aglomeracije škroba unutar matrice.



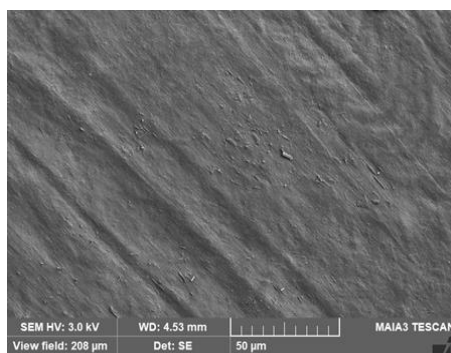
Slika 3. Površinska mikrostruktura polimernih mješavina prije (slika u slici) i nakon procesa kompostiranja: (a) TPS (prije procesa kompostiranja), (b) PE, (c) PE/10TPS, (d) PE/20TPS, (e) PE/30TPS, (f) PE/40TPS, (g) PE/50TPS

Figure 3. Surface microstructure of polymer blends before (picture in picture) and after the composting process: (a) TPS (before the composting process), (b) PE, (c) PE/10TPS, (d) PE/20TPS, (e) PE/30TPS, (f) PE/40TPS, (g) PE/50TPS

Bolji uvid u mješljivost i stvaranje homogene strukture dati će analiza SEM mikrofotografija prikazana u nastavku (Slike 4-10). Fotografije dobivene LM-om jasno ukazuju na promjene polimernih PE/TPS mješavina nakon procesa kompostiranja. Jasno je vidljiva promjena boje na površini uzoraka s jače izraženim tamnim područjima koji ukazuju na biorazgradnju površine polimernih mješavina. Pri većem udjelu dodanog TPS-a na površini su izraženija mjesta početka biorazgradnje. Čisti PE ne pokazuje nikakve značajne promjene nakon procesa kompostiranja (Slika 3(b)), što je u skladu i s rezultatima gubitka mase. Površina PE ostaje glatka, homogena bez naznaka moguće biorazgradnje, što ukazuje da nije napadnut mikroorganizmima tijekom procesa kompostiranja. Već dodatak 10 mas. % TPS-a dovodi do vidljivije promjene površine uzoraka (Slika 3(c)). Primijećene su oštro izražene smeđe linije na površini uzorka koje povećavaju intenzitet s većim udjelom dodanog TPS-a. Dodatkom 30 mas. % TPS-a (Slika 3(e)) na površini uzorka nakon procesa kompostiranja uočava se formiranje „crnih otoka“ koji ukazuju na moguću biorazgradnju i kolonizacija mikroorganizama. Očekuje se kolonizacija mikroorganizama u dijelovima uzoraka gdje se nalazi TPS, jer je on predstavlja supstrat za mikroorganizme, odnosno izvor ugljika potreban za rast mikroorganizama. Najveća promjena površine vidljiva je za uzorak PE/50TPS (Slika 3(g)) gdje su izraženiji, širi i dominantniji „crni otoci“ na površini uzorka, što je i očekivano zbog većeg udjela biorazgradivog TPS-a. Navedeno je u korelaciji s gubitkom mase gdje je najveća promjena mase dobivena, upravo, za polimernu PE/50TPS mješavinu, s obzirom na veći udio TPS-a (Slika 2).

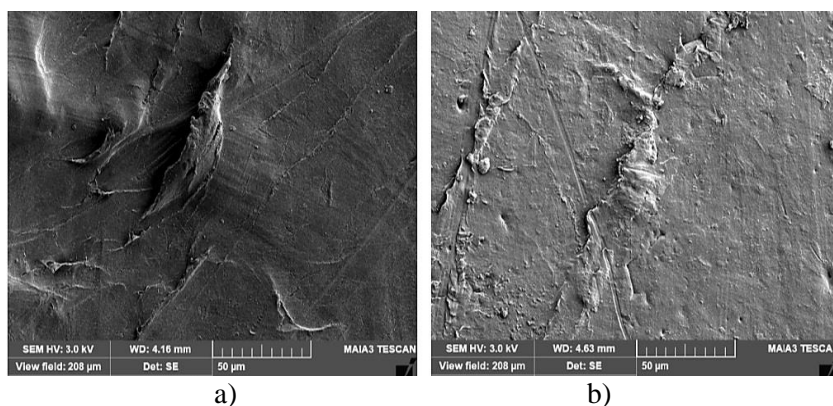
Analiza pretražnim elektronskim mikroskopom

Na SEM mikrofotografijama (Slike 4-10) prikazana je površinska mikrostruktura promatrana SEM-om čistog TPS-a, PE kao i polimernih PE/TPS mješavina prije i nakon procesa kompostiranja.

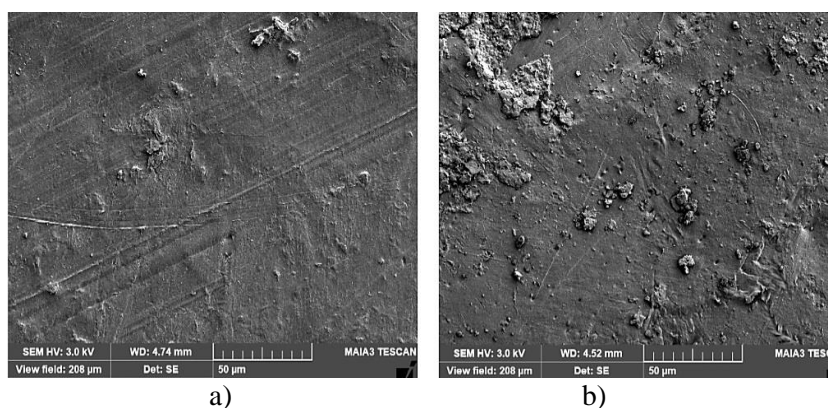


Slika 4. Mikrofotografija čistog TPS-a prije procesa kompostiranja
Figure 4. Micrograph of pure TPS before composting

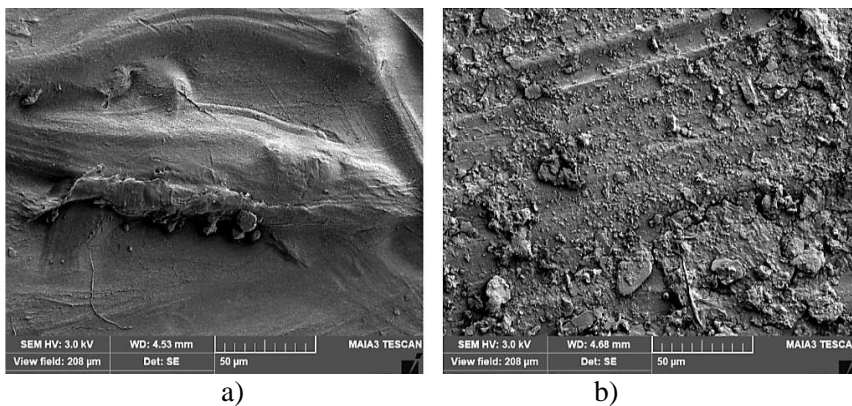
Iz mikrofotografije TPS-a vidi da su se plastifikacijom škroba sve čestice otopile i stvorile homogenu strukturu (Slika 4). Vidljiva je formirana, glatka jednolična struktura TPS-a. Nakon procesa kompostiranja, uzorak TPS nije pronađen, stoga nije niti snimljen SEM mikroskopom, te zaključujemo da se TPS u potpunosti biorazgradio. Mikrofotografija čistog PE, također, pokazuje glatku, vlaknastu strukturu što ukazuje na prisutnost plastične deformacije koja karakterizira PE (Slika 5). Nakon procesa kompostiranja gotovo da i nema vidljivih promjena, poneka raspucala brazda na samoj površini uzorka, koja se može pripisati vrlo tankom uzorku PE koji je 16 dana bio u kompostnoj masi, što je u korelaciji sa svim prethodno prikazanim rezultatima (Slika 3 (b)).



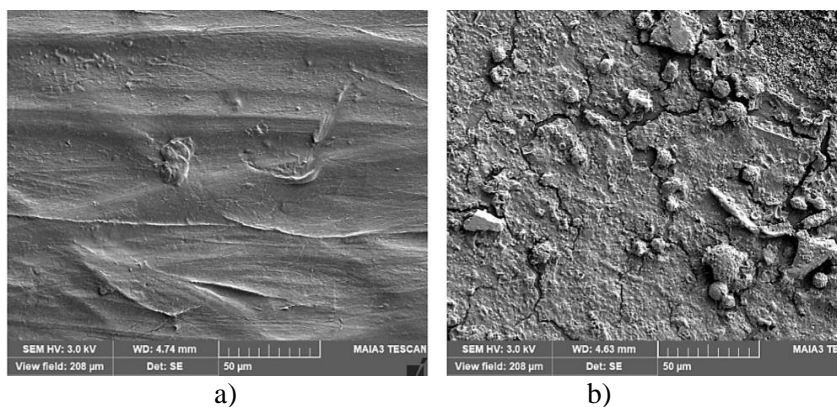
Slika 5. Mikrofotografije čistog PE; a) prije i b) poslije procesa kompostiranja
Figure 5. Micrographs of pure PE; a) before and b) after composting process



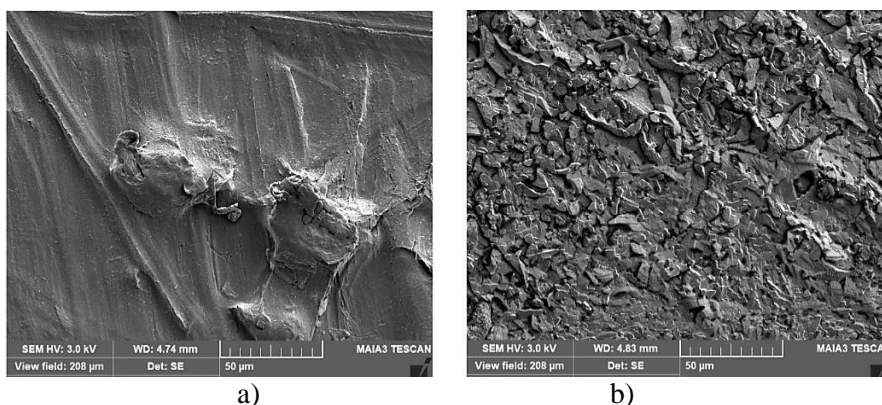
Slika 6. Mikrofotografije polimerne PE/10TPS mješavine;
 a) prije i b) poslije procesa kompostiranja
Figure 6. Micrographs of PE/10TPS polymer blend;
 a) before and b) after composting process



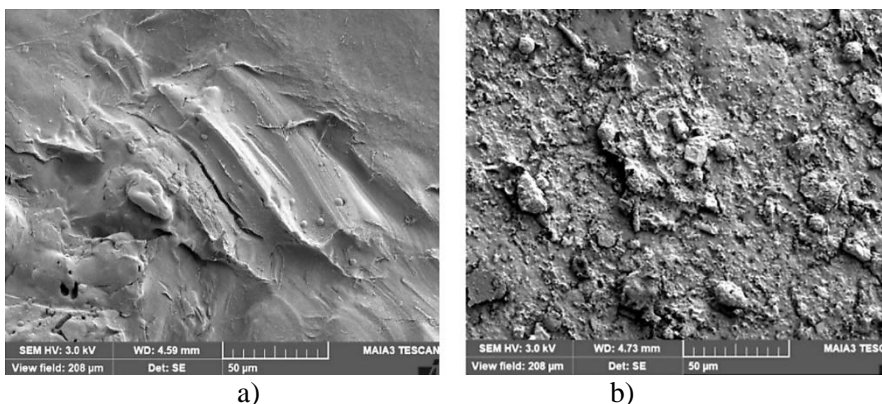
Slika 7. Mikrofotografije polimerne PE/20TPS mješavine;
a) prije i b) poslije procesa kompostiranja
Figure 7. Micrographs of PE/20TPS polymer blend;
a) before and b) after composting process



Slika 8. Mikrofotografije polimerne PE/30TPS mješavine;
a) prije i b) poslije procesa kompostiranja
Figure 8. Micrographs of PE/30TPS polymer blend;
a) before and b) after composting process



Slika 9. Mikrofotografije polimerne PE/40TPS mješavine;
 a) prije i b) poslije procesa kompostiranja
Figure 9. Micrographs of PE/40TPS polymer blend;
 a) before and b) after composting process



Slika 10. Mikrofotografije polimerne PE/50TPS mješavine;
 a) prije i b) poslije procesa kompostiranja
Figure 10. Micrographs of PE/50TPS polymer blend;
 a) before and b) after composting process

Mikrofotografije polimernih PE/TPS mješavina nakon procesa kompostiranja su u korelaciji s fotografijama dobivenih svjetlosnim mikroskopom (Slika 3). Mikrofotografije jasnije ukazuju na mješljivost/nemješljivost polimernih PE/TPS mješavina. Pri manjem udjelu dodanog TPS-a moguće je zaključiti da su polimerne mješavine homogene, s jasno izraženom glatkom strukturom, što ukazuje na dobru mješljivost polimernih PE/TPS mješavina, odnosno dobru penetriranost TPS-a unutar

PE matrice. Pri većem udjelu TPS-a mogu se primijetiti nakupine škroba unutar strukture, što ukazuje na oslabljenju mješljivost pri većem udjelu TPS-a. Promatrajući mikrofotografije polimernih PE/TPS mješavina nakon kompostiranja uočavaju se jasne promjene. Polimerne mješavine s manjim udjelom TPS-a pokazuju više površinske promjene, te istiskivanje i nakupljanje škroba na samu površinu materijala. S veći udjelom TPS-a površina uzorka postaje grublja, raspucana, s izraženom naglašenom hrapavosti površine. Može se reći da je kod polimernih mješavina s manjim udjelom TPS-a došlo tek do površinskog napada mikroorganizama, odnosno početka površinske biorazgradnje uzorka, dok se kod polimernih mješavina s većim udjelom TPS-a uočava i unutrašnji prodor mikroorganizama i veća, i dublja biorazgradnja materijala. Kod polimernih mješavina s manjim udjelom TPS-a vidljivo je da su čestice TPS sadržane unutar strukture PE, dobro raspoređene, čime je otežana njegova biorazgradnja koja je ključna i za biorazgradnju PE-a. Manji udio TPS-a u polimernim PE/TPS mješavinama omogućuje slabije prodiranje vlage i mikroorganizama u unutrašnjost strukture materijala. Iz mikrofotografija jasno se može zaključiti da je biorazgradnja PE/TPS materijala moguća te da je naglašena kod polimernih mješavina s većim udjelom TPS-a. Na mikrofotografijama s većim udjelom TPS-a jasno je vidljivo da je cijela struktura narušena. Površina materijala vidno je razorena, izražena je hrapavost i puknuće površine. Količina nastalih brazda i pukotina te njihove dubine jasno sugeriraju da se biorazgradnja dogodila i u unutrašnjosti samog materijala. Umješavanjem hidrofilnog TPS-a u hidrofobni PE postignuto je lakše prodiranje mikroorganizama i vlage koja im je potrebna za neometano djelovanje, odnosno rast, a time i biorazgradnju materijala. TPS svojim hidrofilnim karakterom omogućava lakše prodiranje vlage, odnosno veže molekule vode čime slabe intermolekularne veze unutar TPS-a, lakše pucaju te je mikroorganizmima omogućen lakši pristup hranjivim tvarima, potrebnima za njihov neometan i brži rast. Mikroorganizmi prvotno troše TPS kao supstrat, lako ga razgrađuju i time i unutrašnjost postaje biodostupna. U samom početku biorazgradnje polimerne mješavine, TPS djeluje kao „katalizator“ koji ubrzava proces biorazgradnje (Abioye i sur., 2019; Danjaji i sur., 2002) te se tako ukupan broj živih stanica mikroorganizama povećava. Što je veći udio TPS-a, veći je udio supstrata za mikroorganizme kao i njihov brži rast unutar polimerne mješavine. Time dolazi do stvaranja energije koja je potrebna za daljnje metaboličke aktivnosti mikroorganizama, odnosno napad na teži, nerazgradivi dio strukture. Iz mikrofotografije polimerne PE/50TPS mješavine (Slika 10) vidljiva je izuzetna rascjepkanost površine, potpuno razorena struktura, s jasno izraženim širim pukotinama, koje ukazuju na unutrašnji prodor mikroorganizama i veću biorazgradnju materijala. Sam proces biorazgradnje može se pojednostavljeno podijeliti u nekoliko faza. Bitno je naglasiti da je kolonizacija mikroorganizama na površinu polimerne mješavine jedino moguća ukoliko je hidrofilna te predstavlja supstrat za mikroorganizme (Numata i sur., 2009). Obzirom da PE ima samo CH₂ grupe njegova je površina izuzetno hidrofobna, time TPS dobiva na značaju, kao bitan dio polimerne PE/TPS mješavine. Kako je TPS po prirodi izuzetno hidrofilan omogućava umetanje

hidrofilnih skupina na površinu polimernih mješavina, čime se smanjuje površinska energija i potiče biorazgradnja drugih komponenata unutar polimerne mješavine (Numata i sur., 2009). Nakon kolonizacije mikroorganizama na površinu polimerne mješavine (prva faza), mikroorganizmi iskorištavaju materijal kao supstrat, odnosno izvor ugljika i energije. Dolazi do potrošnje škroba iz polimerne mješavine čime se povećava poroznost strukture. Porozna struktura primamljiva je mikroorganizmima jer je obavijena škrobom, kao lako razgradivim supstratom za mnoge mikroorganizme. Mikroorganizmi tako rastu i razmnožavaju se te se njihov broj povećava. Prema tome, biorazgradnjom škroba, povećava se broj mikroorganizama, te se ubrzava biorazgradnja polimerne mješavine. Povećani broj mikroorganizama dovodi do slabljenja i lomljenja PE lanaca. Upravo, primarnom biorazgradnjom PE-a glavni se lanac cijepa i nastaju manji fragmenti, odnosno fragmenti manje molekulske mase (oligomeri, dimeri i monomeri), koji zatim postaju pogodniji mikroorganizmima za biorazgradnju (Borghesi i sur., 2010). Dakle, veći udio TPS-a potiče mikroorganizme na bržu biorazgradnju polimera, što je i vidljivo iz mikrofotografija polimernih PE/TPS mješavina s većim udjelom TPS-a, s obzirom na njihovo vidno narušenu površinu.

Zaključci

Biorazgradnja polimernih PE/TPS mješavina provedena procesom kompostiranja pratila se gubitkom mase prije i nakon procesa kompostiranja, kao i promatranjem promjena površine mješavina LM-om kao i SEM-om. Čisti PE nije pokazao gubitak mase nakon 16 dana provedenog procesa kompostiranja što ukazuje na nemogućnost njegove biorazgradnje, dok se TPS u potpunosti biorazgradio. Veći udio TPS-a (40 i 50 mas. %) u polimernoj PE /TPS mješavini pokazuje značajniju promjenu mase, odnosno gubitak mase nakon procesa kompostiranja. Veći udio TPS-a u PE/TPS mješavinama ubrzava biorazgradnju, te dolazi do izraženije biorazgradnje polimernih mješavina. TPS zbog hidrofilnog karaktera upija i zadržava vlagu iz kompostne mase što pridonosi rastu mikroorganizama, a time i bržoj biorazgradnji polimernih mješavina. Prvotnom biorazgradnjom TPS-a matrica PE u polimernoj PE/TPS mješavini gubi svoju kompaktnu strukturu i integritet te se mikroorganizmima omogućava daljnje prodiranje u unutrašnjost strukture i time se potiče i ubrzava proces biorazgradnje i PE unutar polimerne mješavine. LM-om kao i SEM-om potvrđena je brža i prodornija biorazgradnja polimernih PE /TPS mješavina i to naglašeno s većim udjelom dodanog TPS-a.

Zahvala

„Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) Hrvatske zaklade za znanost.

Literatura

- Abioye, A. A., Obuekwe, C., Fasanmi, O., Oluwadare, O., Abioye, O. P., Afolalu, S. A., Akinlabi, S. A., Bolu, A. C. (2019): Investigation of biodegradation speed and biodegradability of polyethylene and manihot esculenta starch blends, *J. Ecol. Eng.* 20 (2), 65-72.
- Aburto, J., Thiebaud, S., Alric, I., Borredon, E., Bikiaris, D., Prinós, J., Panayiotou, C. (1997): Properties of octanoated starch and its blends with polyethylene, *Carbohydr. Polym.* 34 (1-2), 101-112.
- Alavi, S., Sabu, T., Sandeep K.P., Nandakumar K., Jini V., Srinivasarao Y., Conventional plastic in packaging applications (2015): *Polymers for packaging applications*, New Jersey, Apple Academic Press, str. 3-83.
- Borghai, M., Karbassi, A., Khoramnejadian, S., Oromiehie, A., Hossein Javid, A. H. (2010): Microbial biodegradable potato starch based low density polyethylene, *Afr. J. Biotechnol.* 9 (26), 4075-4080.
- Kučić Grgić, D., Bera, L., Miloloža, M., Cvetnić, M., Ignjatić Zokić, T., Miletić, B., Leko, T., Očelić Bulatović, V. (2020): Obrada aktivnog mulja s uređaja za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda procesom kompostiranja, *Hrvatske vode* 26, 1-8.
- Danjaji, I. D., Nawang, R., Ishiaku, U. S., Ismail, H., Mohd Ishak, Z. A. M. (2002): Degradation studies and moisture uptake of sago-starch-filled linear low-density polyethylene composites, *Polym. Test.* 21 (1), 75–81.
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H. (2013): *Biodegradable Polymers „Biodegradation- Life of Science“* University of Valparaiso, Chile.
- Hoque, M. E., Ye, T. J., Yong, L. C., Dahlan, K. Z. M. (2013): Sago Starch-Mixed Low-Density Polyethylene Biodegradable Polymer: Synthesis and Characterization, *J. Mater.*, Article ID 365380.
- Khan, B., Niazi, M. B. K., Jahan, Z., Samin, G. (2017): Thermoplastic Starch: A possible biodegradable food packaging material - A review, *J. Food Proc. Eng.* 40 (3), e12447.
- Leja, K., Lewandowicz, G. (2010): Polymer biodegradation and biodegradable polymers- a Review, *Pol. J. Environ. Stud.* 19 (2), 255-266.
- Numata, K., Hideki, A., Tadahisa, I. (2009): Biodegradability of Poly(hydroxyalkanoate) materials, *Materials* 2 (3) 1104 – 1126.
- Pedroso, A. G., Rosa, D. S. (2005): Mechanical, thermal and morphological characterization of recycled LDPE/corn starch blends, *Carbohydr. Polym.* 59 (1), 1-9.
- Pervaiz, M., Oakley, P., Sain, M. (2014): Development of Novel Wax-enabled Thermoplastic Starch Blends and Their Morphological, Thermal and Environmental Properties, *Int. J. Compos. Mater.* 4 (5), 204-212.
- Tajeddin, B., Arabkhedri, M. (2020): *Polymers and food packaging*. In: *Polymer Science and Innovative Applications*, M. A. A. (ur.), Elsevier, pp. 525-543, 2020.
- Tokiwa, Y., Calabria, B. P., Ugwu, C. U., Aiba, S. (2009): Biodegradability of plastics, *Int. J. Mol. Sci.* 10 (9), 3722-3742.

Morphology of biodegradation of polymer blends

Lucija Kefurt¹, Vesna Ocelić Bulatović^{2*}, Dajana Kučić Grgić²,
Anita Štrkalj¹

¹University of Zagreb, Faculty of Metallurgy, Avenija narodnih heroja 3,
44000 Sisak, Croatia

²University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: vocelicbulatovic@fkit.hr

professional paper

Summary

The outstanding properties of polymeric materials make them almost irreplaceable in everyday use even today. However, knowledge of limited petroleum resources and growing awareness of environmental protection are increasingly pushing the use of polymer materials made from renewable raw materials to the forefront. Starch in particular, as a natural material, has great application potential due to its natural biodegradability in a variety of environments, low price, and easy availability. In this study, the focus is on the biodegradability of polymer blends of polyethylene and thermoplastic starch. Biodegradation was carried out by composting in an adiabatic reactor for 16 days. The biodegradation of the polymer blends was monitored by changing the mass and observing the structural changes using a light (LM) and scanning electron microscope (SEM). The composting process resulted in complete biodegradation of TPS. Due to its hydrophilic nature, TPS absorbs and retains moisture from the compost mass, contributing to faster biodegradation of the polymer blends. Faster and more extensive biodegradation of the polymer blends PE / TPS was confirmed by both, LM and SEM, and this was further emphatically with higher amounts of added TPS.

Keywords: polymer blends, thermoplastic starch, biodegradation, composting process, morphology

Automatsko brojanje bakterijskih kolonija

Karlo Josić¹, Martina Miloloža^{2*}, Vesna Očelić Bulatović³,
Dajana Kučić Grgić²

¹Visoko učilište Algebra, Gradišćanska 24, 10000 Zagreb, Hrvatska

²Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska

³Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
Savska cesta 16, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Dopisni autor: miloloza@fkit.hr

stručni rad

Sažetak

Mikrobiološka istraživanja podrazumijevaju uzgoj mikroorganizama na hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama uz primjenu u poljoprivredne, prehrambene te medicinske svrhe. Izrasle kolonije se prebrojavaju u svrhu određivanja ukupnog broja živih stanica bakterija (*Colony Forming Unit*, CFU). Određivanje CFU može biti dugotrajno, pogotovo u slučaju gustog uzorka, prilikom kojeg se može lako pogriješiti. U svrhu ubrzavanja provedbe ove analize te značajne uštede vremena mikrobiolozima, postojeća se analiza pokušava unaprijediti uz računalnu tehnologiju. Prvi uređaj koji se koristio za automatsko brojanje kolonija korišten je 1957. godine. Slika Petrijeve zdjelice se skenirala na CRT zaslonu pomoću fotomultiplikatora, a obrada digitalizirane slike se vršila pomoću računala. Stoga, glavni dijelovi automatskog brojača su kamera i računalo s odgovarajućim softverom za obradu slike. Novija inačica koja je ispitivana čini Sony cyber shot kamera uz *Biowizard* softver za analizu slike. U usporedbi s ručnim brojanjem kolonija i drugim komercijalnim softverima, dobiveni su bolji rezultati o parametrima kolonija uz kraće vrijeme analize primjenom *Biowizard*-a. Nekoliko automatiziranih sustava za brojanje kolonija je komercijalno dostupno (poput *ProtoCOL*, *Whitley aCOLyte*, *AID BacSpot*), ali nemaju široku upotrebu zbog njihove visoke cijene. Stoga je potrebno usmjeriti daljnja istraživanja u razvoj i povećanje preciznosti automatiziranog sustava uz dostupnost za laboratorijske upotrebe.

Ključne riječi: mikrobiologija, CFU, fraktalna dimenzija, programiranje, softveri

Uvod

Zlatni standard za kvantificiranje bakterija, kako u rutinskoj dijagnostici, tako i u znanstvenim istraživanjima, je uzgoj bakterijskih kultura na hranjivim podlogama, te inkubacija pri odgovarajućoj temperaturi (najčešće pri 37 °C), te brojanje kolonija u svrhu određivanja CFU (*Colony Forming Units*) (Nai i sur., 2021). Osim što je ručno brojanje izraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama naporna metoda, oduzima i puno vremena te je subjektivno. Kvantifikacija bakterija, primjerice u slučaju infekcija, vrlo je važna za karakterizaciju interakcija između patogena i domaćina (Hoffmann i sur., 2018). Automatizacija standardnog postupka

za određivanje CFU omogućuje pojednostavljenje procesa, čineći ga lakšim i bržim, uz smanjenje varijabilnosti u rezultatima, jer je potrebno dobiti točne i precizne rezultate. Predložene su neke visokoučinkovite metode za određivanje CFU, kao što je fluorescentno označavanje, mikronizovi za ispitivanje genoma, kvantitativna PCR metoda, ali te metode zahtijevaju specifičnu opremu i vrlo detaljan protokol s mnogo unosa (Albaradei i sur., 2020). Alati umjetne inteligencije, poput strojnog učenja, predloženi su za poboljšanje prilikom određivanja CFU, kao što je *Convolutional Neural Network* koju su predložili Ferrari i sur. (2017). Međutim, ova metoda nije prikladna za uzorke s velikim brojem izraslih kolonija. Stoga su također istraživane i druge metode strojnog učenja koje su učinkovite i za određivanje CFU pri većem broju izraslih kolonija, kao što je *Transfer Learning*, koji je prvi put dizajniran za brojanje kolonija pri vrlo gustim uzorcima (Albaradei i sur., 2020).

U ovome će se radu dati literaturni pregled koji obuhvaća automatsko brojanje kolonija bakterija izraslih na čvrstoj hranjivoj podlozi.

Mikrobiološka istraživanja

Mikrobiologija je znanost koja se bavi proučavanjem svih živih organizama koji su premali da bi bili vidljivi golim okom, uključujući bakterije, viruse, gljive, protozoe te alge. Mikroorganizmi imaju ključnu ulogu u kruženju hranjivih tvari, biorazgradnji, klimatskim promjenama, kvarenju hrane, uzroku bolesti te biotehnologiji (McPherson i sur., 2018). Zahvaljujući njihovoj sveprisutnosti, mikroorganizmi se mogu koristiti za brojne primjene, primjerice za proizvodnju lijekova, biogoriva, remedijaciju onečišćenoga okoliša, uklanjanje onečišćujućih tvari, ali i u prehrambene svrhe. Proučavanje mikroorganizama dovelo je do velikih otkrića, poput otkrića cjepiva protiv velikih boginja, otkrića penicilina, boljeg razumijevanje poveznice između infekcije s bakterijom *Helicobacter pylori* i čira na želucu, kao i između papiloma virusa i raka vrata maternice. Nadalje, bakterijski rast bitan je pokazatelj u mnogim studijama o mikroorganizmima. Primjerice, prilikom odabira antibiotika, toksikoloških testova te procjene sigurnosti hrane i lijekova potrebno je određivanje broja mikroorganizama kako bi se potvrdilo istraživačko postignuće (Chiang i sur., 2015). Generalno, mikrobiološka istraživanja su ključna za ispunjavanje mnogih trenutačnih globalnih težnji i izazova, kao što je održavanje sigurnosti hrane, vode i energije za zdravu populaciju.

Razvoj automatskog brojanja kolonija

Brojanje bakterijskih kolonija izraslih na hranjivoj podlozi najčešće je korištena metoda za određivanje ukupnog broja živih stanica bakterija u uzorku. Naširoko se primjenjuje u ispitivanju sigurnosti hrane i lijekova, biomedicinskim ispitivanjima, nadzoru okoliša i javnom zdravstvu (Zhu i sur., 2018). Obično se brojanje kolonija bakterija izraslih na hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama izvodi ručno. No taj je

postupak ručnog prebrojavanja subjektivan, sklon pogreškama, niske točnosti, vremenski intenzivan, zamoran i naporan jer je potrebno izbrojati do 300 kolonija za jednu Petrijevu zdjelicu s hranjivom podlogom. Prema tome, poželjne su automatske metode brojanja visoke učinkovitosti, koje bi mogle zamijeniti ručnu metodu brojanja izraslih kolonija.

Trenutačno se u većini laboratorija naširoko koristi neka vrsta automatskog digitalnog brojača bakterijskih kolonija. Međutim, nije doista automatski budući da ovisi o osobama koje koriste sondu za identifikaciju svake kolonije tako da senzorski sustav može osjetiti i registrirati svako brojanje. Iako je to općenito jednostavan zadatak, može postati vrlo naporan i dugotrajan kada treba izbrojati veći broj izraslih kolonija za puno uzoraka. S razvojem tehnologije računalnog vida, razvijene su različite vrste sustava za automatsku analizu koji se koriste za brojanje kolonija na temelju obrade slike i prepoznavanja uzoraka. Naime, napravljen je automatski brojač bakterijskih kolonija, koji može ne samo brojati, već i klasificirati kolonije (Chen i Zhang, 2009). Nadalje, razvijeni sustav brojanja kolonija predstavljen u radu Brugger i sur. (2012) pruža mogućnost razlikovanja bakterijskih kolonija izraslih na krvnom agaru, ali i drugim hranjivim podlogama, dok je implementiran i sustav brojanja kolonija koji uključuje snimanje Petrijeve zdjelice te analizu tih slika (Ogawa i sur., 2012). Nešto složeniju metodu je predložio Hu (2013) pri čemu se automatsko brojanje i identifikacija bakterijskih kolonija provodi metodom transformacije udaljenosti i progresivne erozije. Lawless i sur. (2010) razvili su uređaj “*Colonyzer*”, primjenom kojeg je moguće prikupljati slike te analizirati veličinu, oblik, boju, pa čak i lokaciju kolonija izraslih na čvrstoj hranjivoj podlozi. Predložena su i druga rješenja za određivanje broja kolonija izraslih na čvrstoj hranjivoj podlozi korištenjem različitih metoda (Chiang i sur., 2015; Ferrari i sur., 2017; Matic i sur., 2016). Štoviše, razvijeni su softveri za brojanje kolonija, koji rade na računalima poput *NICE* (NIST–ov integrirani popisivač kolonija) (Clarke i sur., 2010), *CHiTA* (eng. *Circular Hough Image Transform Algorithm*) (Bewes i sur., 2008), *OpenCFU* (Geissmann, 2013), *ImageJ* (Cai i sur., 2011), *ImageJ makro Cell Colony Edge* i *CellProfiler Pipeline Cell Colony Counting* (Choudhry, 2016), *MicroCount* (Siqueira i Carvalho, 2017), *AutoCellSeg* (Khan i sur., 2018) te *Biowizard* (Raju i sur., 2019) (Tablica 1). Također je razvijen i Android mobilni višeplatformski softver otvorenog koda za automatsko brojanje kolonija bakterija (Minoi i sur., 2016). Poznato je i nekoliko komercijalnih sustava kao što su *ColonyDoc-It™* proizvođača UVP (Analytik Jena AG), te *STEMvision™* proizvođača STEMCELL Technologies, no ovi programi zbog visoke cijene i sučelja koje nije prilagođeno korisnicima nisu u širokoj uporabi (Khan i sur., 2018).

Tablica 1. Postojeći softveri za automatsko brojanje izraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevim zdjelicama

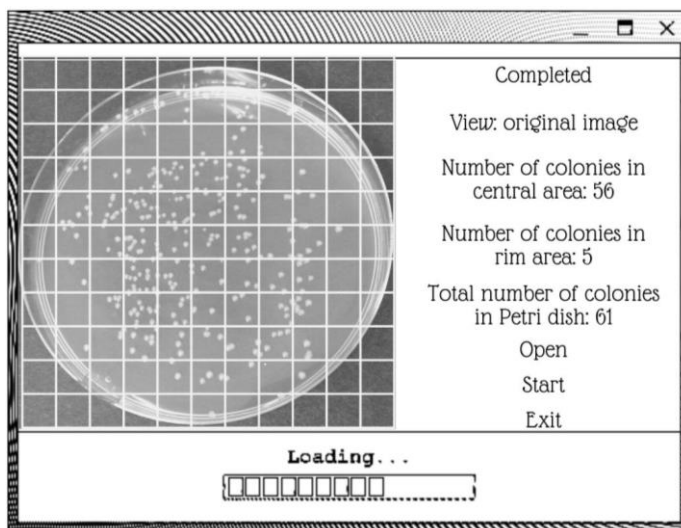
Table 1. Software used for automatic counting of colonies cultured on a solid culture medium in Petri dishes

Softver	Literatura
<i>NICE (NIST–ov integrirani popisivač kolonija)</i>	Clarke i sur., 2010
<i>ChiTA (Circular Hough Image Transform Algorithm)</i>	Bewes i sur., 2008
<i>OpenCFU</i>	Geissmann, 2013
<i>ImageJ</i>	Cai i sur., 2011; Nai i sur., 2021
<i>ImageJ makro Cell Colony Edge CellProfiler Pipeline Cell Colony Counting</i>	Choudhry, 2016
<i>MicroCount</i>	Siqueira i Carvalho, 2017
<i>AutoCellSeg</i>	Khan i sur., 2018
<i>Biowizard</i>	Raju i sur., 2019

Clarke i sur. (2010) predložili su jeftin sustav za brojanje kolonija visoke osjetljivosti koji se sastoji od softvera za brojanje kolonija i digitalne kamere. Softver pod nazivom “NICE” čita standardne formate slika te se stoga može koristiti u kombinaciji s mnogim sustavima za snimanje. Softver za analizu slike *Biowizard* jednostavan je za korištenje i ne zahtijeva nikakvu posebnu obuku. Raju i sur. (2019) izvijestili su da su primjenom *Biowizard*-a dobivene bolje informacije o parametrima kolonija (osjetljivost i potrebno vrijeme) u usporedbi s ručnim brojanjem kolonija i drugim komercijalnim softverima. Program *OpenCFU* omogućuje kontrolu nad parametrima obrade slika, te se također može koristiti za brojanje kolonija (Geissmann, 2013). Prilikom upotrebe *Clono-Counter*-a, korisnik treba imati iskustvo za pronalazak odgovarajućih parametara prema kojima se vrši brojanje kolonija (Niyazi i sur., 2007). Točniji od *Clono-Counter*-a se pokazao automatski brojač kolonija za brojanje bakterijskih kolonija bez ikakve ljudske intervencije (Zhang i Chen, 2007). Iako ovaj automatski brojač ima visoku točnost ukoliko se radi sa slikama s pozadinom u boji, nedostaci istoga su uočeni za slike s prozirnou pozadinom.

U navedenim su istraživanjima korištene tradicionalne kamere za snimanje slika Petrijevih zdjelica s izraslim kolonijama na čvrstoj hranjivoj podlozi pri vidljivoj svjetli. Prikaz dizajna korisničkog sučelja prikazan je na slici 1. Većina ovakvih metoda detekcije kolonija funkcionira adekvatno samo kada postoji relativno visok kontrast kolonije između kolonija bakterija i pozadine, kada su kolonije velike i dobro razmaknute te kada su slike ravnomjerno osvijetljene. Ako ti optimalni uvjeti nisu zadovoljeni, gubi se točnost rezultata (Choudhry, 2016; Frost i sur., 2016). Kako bi istražili utječe li valna duljina svjetlosti na točnost brojanja bakterija, Yoon i sur. (2015) primijenili su tehnologiju hiperspektralnog snimanja u vidljivoj i bliskom infracrvenom (Near-infrared spectroscopy, NIR) spektralnom rasponu od 400 nm do 1000 nm kako bi izbrojali kolonije. Otkrili su da morfologija kolonije, uključujući veličinu i teksturu, ovisi o valnoj duljini vidljive svjetlosti, ali na infracrvenom svjetlu od 850 nm, morfologija kolonije je bila jasna i imala je očit kontrast s pozadinom.

Također, Masschelein i sur. (2012) razvili su sustav brojanja kolonija pomoću hiperspektralnog snimanja i pokazali su da bi brojanje kolonija moglo biti automatsko, ali uz automatski oporavak spektra. Iako bi tehnologija hiperspektralnog snimanja mogla dati visoku učinkovitost, korišteni instrument je skup (obično veći od 100 000 američkih dolara). Međutim, do sada ne postoje znanstveni radovi koji se bave razvojem jeftinog sustava za brojanje kolonija na bliskom infracrvenom svjetlu (Zhu i sur., 2018). Nadalje, Nai i sur. (2021) ispitivali su tzv. fraktalnu dimenziju (eng. *fractal dimension*) kao novu metodologiju za određivanje CFU. Navedena metodologija se pokazala kao učinkovit alat u svrhu određivanja CFU u uzorcima. Naime, Petrijeve zdjelice s izraslim kolonijama na čvrstoj hranjivoj podlozi su fotografirane digitalnom kamerom pod prirodnim svjetlom. Fotografije su potom binarizirane (prevedene u binarni kod, što obuhvaća prijenos u crno–bijelo) i analizirane primjenom *ImageJ* softvera prema već spomenutoj metodologiji. Korištene bakterijske kulture u ovome istraživanju bile su *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* i *Enterococcus faecalis* (Nai i sur., 2021).



Slika 1. Prikaz dizajna grafičkog korisničkog sučelja koji obrađuje sliku Petrijeve zdjelice u svrhu određivanja CFU (*Colony forming units*) u uzorku (Chiang i sur., 2015)

Figure 1. Design of the graphical user interface that processes the image of the Petri dish to determine the CFU (*Colony forming units*) in the sample (Chiang et al., 2015)

Bakterije su inkubirane u krvnom agaru i u cistin laktoza agaru uz manjak elektrolita. Nakon inkubacije, Petrijeve su zdjelice uslikane digitalnom kamerom te su fotografije analizirane primjenom *ImageJ* softvera. Prvo su fotografije prevedene u 8 bitni sustav, a zatim u 2 bitni sustav kako bi se dobila podjela slike na crno i bijelo jer se prema

metodologiji fraktalne dimenzije mjere samo crna područja na slici (Nai i sur., 2021). Prema navedenoj metodologiji, brojanje kolonija se izvodi prema “*box-counting*” metodi (Nai i sur., 2021). Tijekom analize, prema programu se proučavaju dvije dimenzije uz kvantifikaciju raspodjele piksela, a bez uzimanja u obzir teksture slike. S obzirom na visoku korelaciju rezultata dobivenih ovom metodologijom i metodom ručnog brojanja, kao i upotrebu dviju hranjivih podloga, ova je metodologija primjenjiva za određivanje CFU, i to u različitim uvjetima. No ipak se morfološke karakteristike izraslih kolonija ne uzimaju u obzir. Naime, pojam “fraktalna dimenzija” uveo je matematičar Mandelbrot 1975. godine, koji je izjavio da svaki skup može imati fraktalnu dimenziju, a ona predstavlja stupanj zauzeća nekog geometrijskog lika u prostoru, odnosno ukazuje na nepravilnost analiziranog lika (Ostwald, 2013). Dakle, metodologija fraktalne dimenzije je koristan alat za određivanje CFU u uzorcima, no potrebno je prilikom izvođenja obratiti pozornost na sljedeće: Petrijeve zdjelice moraju biti fotografirane s iste udaljenosti; veličina analiziranog područja mora biti ista za sve Petrijeve zdjelice; kamera treba biti pričvršćena na stalak kako bi udaljenost od Petrijevih zdjelica bila ista i kako ne bi bilo podrhtavanja prilikom fotografiranja; Petrijeve zdjelice trebaju biti uslikane na ravnoj podlozi pod kutem od 90° u odnosu na pod uz izloženost bijeloj svjetlosti; te je potrebno izbjeći sjenu na slikama jer sjena onemogućuje binarizaciju slika što posljedično onemogućuje provedbu metodologije fraktalne dimenzije (Nai i sur., 2021). Bez obzira na navedeno, ova metodologija ima svoju primjenu u primjeni u istraživanjima kardiovaskularnih bolesti, neuroznanosti, analizama karcinoma pluća te analizama prisutnosti patogenih mikroorganizma u uzorcima (Nai i sur., 2021).

Zaključci

U biološkim istraživanjima automatizirano odvajanje i brojanje izraslih kolonija imperativ je zbog golemih količina istraživanja. Automatiziranje ovoga sustava predstavlja komplikaciju zbog odgovarajućih uvjeta snimanja slike (udaljenost, kut, osvjetljenje), pozadinske buke te velikih varijacija u morfološkim karakteristikama kolonija u eksperimentima, što ukazuje na zahtjev za prilagođenu, prilagodljivu i robusnu sliku za obradu. Automatsko brojanje izraslih kolonija, odnosno određivanje CFU, može biti otežano u slučaju gusto izraslih kolonija na Petrijevim zdjelicama, prisutnosti nečistoća u hranjivoj podlozi, inherentne pozadinske buke, nedosljednih artefakata osvjetljenja, refleksije svjetlosti te niske rezolucije slike.

Dakle, kako bi se automatiziralo određivanje CFU u uzorcima, potrebno je razviti algoritam koji automatski odvaja kolonije iz pozadine na način da se znaju granice svake kolonije. Na temelju odvajanja kolonija, izvršava se i brojanje kolonija, ali i dodatna svojstva kolonija (morfološke karakteristike). Međutim, to dovodi do pojedinačnih koraka tipične analize slike: uklanjanje šuma, segmentacija slike, izdvajanje značajki, odabir značajki, brojanje/klasifikacija objekata. Za svaki pojedinačni korak, potrebni su algoritamski parametri za dobivanje ciljanih kolonija na svakoj pojedinačnoj slici. Za

analizu cijelog skupa podataka, moraju se odabrati fleksibilniji parametri, jer pojedinačne slike mogu varirati međusobno uvelike u veličini i morfologiji kolonija, kao i intenzitetu slike. U pozadini analize cijelog skupa podataka, automatizirana analiza slike može se implementirati s intuitivnim i fleksibilnim parametrima koje bi trebali postavljati korisnici.

U budućim istraživanjima potrebno je nastojati osigurati sveobuhvatniji sustav brojanja s mogućnošću brojanja i analiziranja različitih vrsta kolonija na različitim hranjivim podlogama, koje variraju u boji i neprozirnosti. Ovime bi se proširio raspon primjene ovakvih sustava i pružila mikrobiolozima prikladna metoda za karakterizaciju bakterijskih kolonija.

Literatura

- Albaradei, S.A., Napolitano, F., Uludag, M., Thafar, M., Napolitano, S., Essack, M., Bajic, V.B., Gao, X. (2020): Automated counting of colony forming units using deep transfer learning from a model for congested scenes analysis, *IEEE Access* 8, 164340.
- Bewes, J.M., Suchowerska, N., McKenzie, D.R. (2008): Automated cell colony counting and analysis using the circular Hough image transform algorithm (CHiTA), *Phys. Med. Biol.* 53 (21), 5991.
- Brugger, S.D., Baumberger, C., Jost, M., Jenni, W., Brugger, U., Mühlemann, K. (2012): Automated counting of bacterial colony forming units on agar plates, *PLoS One* 7 (3), e33695.
- Cai, Z.L., Chattopadhyay, N., Liu, W.J., Chan, C., Pignol, J.P., Reilly, R.M. (2011): Optimized digital counting colonies of clonogenic assays using ImageJ software and customized macros: Comparison with manual counting, *Int. J. Radiat. Biol.* 87 (11), 1135–1146.
- Chen, W.B., Zhang, C. (2009): An automated bacterial colony counting and classification system, *Inf. Syst. Front.* 11 (4), 349–368.
- Chiang, P.J., Tseng, M.J., He, Z.S., Li, C.H. (2015): Automated counting of bacterial colonies by image analysis, *J. Microbiol. Methods* 108, 74–82.
- Choudhry, P. (2016): High-throughput method for automated colony and cell counting by digital image analysis based on edge detection, *PLoS One* 11 (2), e0148469.
- Clarke, M.L., Burton, R.L., Hill, A.N., Litorja, M., Nahm, M.H., Hwang, J. (2010): Low-cost, high-throughput, automated counting of bacterial colonies, *Cytometry Part A* 77A (8), 790–797.
- Ferrari, A., Lombardi, S., Signoroni, A. (2017): Bacterial colony counting with convolutional neural networks in digital microbiology imaging, *Pattern Recogn.* 61 (SI), 629–640.
- Frost, H.R., Tsoi, S.K., Baker, C.A., Laho, D., Sanderson-Smith, M.L., Steer, A.C., Smeesters, P.R. (2016): Validation of an automated colony counting system for group a *Streptococcus*, *BMC Res. Notes* 9, 72.
- Geissmann, Q. (2013): OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects, *PLoS One* 8 (2), e54072.
- Hoffmann, S., Walter, S., Blume, A.K., Fuchs, S., Schmidt, C., Scholz, A., Gerlach, R.G. (2018): High-throughput quantification of bacterial-cell interactions using virtual colony counts, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8 (43), 1–10.

- Hu, Z.F. (2013): Automated counting and identification of cell colonies based on distance transform and progressive erosion. In: Proceedings of the 2013 International Conference on Advanced Computer Science and Electronics Information. Zheng, F. (ed.), Beijing, China, pp.139–142.
- Khan, A.M., Torelli, A., Wolf, I., Gretz, N. (2018): AutoCellSeg: robust automatic colony forming unit (CFU)/cell analysis using adaptive image segmentation and easy-to-use post-editing techniques, *Sci. Rep.* 8 (1), 7302.
- Lawless, C., Wilkinson, D.J., Young, A., Addinall, S.G., Lydall, D.A. (2010): Colonyzer: automated quantification of micro-organism growth characteristics on solid agar, *BMC Bioinformatics* 11 (1), 287.
- Masschelein, B., Robles-Kelly, A., Blanch, C., Tack, N., Simpson-Young, B., Lambrechts, A. (2012): Towards a colony counting system using hyperspectral imaging. In: Farkas, D.L., Nicolau, D.V., Leif, R.C. (eds.), *Imaging, Manipulation, and Analysis of Biomolecules, Cells, and Tissues X*. Vol. 8225 Spie-Int Soc Optical Engineering, Bellingham.
- Matic, T., Vidovic, I., Siladi, E., Tkalec, F. (2016): Semi-automatic prototype system for bacterial colony counting. 2016 International Conference on Smart Systems and Technologies. pp. 205–210.
- McPherson, M.R., Wang, P., Marsh, E.L., Mitchell, R.B., Schachtman, D.P. (2018): Isolation and analysis of microbial communities in soil, rhizosphere, and roots in perennial grass experiments, *J. Vis. Exp.* 137, e57932.
- Minoi, J.L., Chiang, T.T., Lim, T., Yusoff, Z., Karim, A.H.A., Zulharnain, A. (2016): Mobile vision-based automatic counting of bacteria colonies. 2016 Proceedings of the International Conference on Information and Communication. Technology 41–46.
- Nai, G.A., TALAvera Martelli, C.A., Lopes Medina, D.A., Cayres de Oliveira, M.S., Delfino Caldeira, I., Henriques, B.C., Schadeck Portelinha, M.J., Winkelstroter Eller, L.K., Alencar Marques, M.E. (2021): Fractal dimension analysis: a new tool for analyzing colony-forming units, *MethodsX* 8, 101228.
- Niyazi, M., Niyazi, I., Belka, C. (2007): Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software, *Radiat. Oncol.* 2 (1), 1–3.
- Ogawa, H., Nasu, S., Takeshige, M., Funabashi, H., Saito, M., Matsuoka, H. (2012): Noise free accurate count of microbial colonies by time-lapse shadow image analysis, *J. Microbiol. Methods* 91 (3), 420–428.
- Ostwald, M.J. (2013): The fractal analysis of architecture: calibrating the box-counting method using scaling coefficient and grid disposition variables, *Environ. Plan. B Plan. Des.* 40 (4), 644–663.
- Raju, S., HG, A., Krishnan, A.V., Naryanan, D., Gangadhnan, V., Paul, S.C. (2019): Automated counting of bacterial colonies by image analysis, *J. Multi Dent Res.* 5(1), 17–19.
- Siqueira, A.A., Carvalho, P.G.S. (2017): MicroCount: Free software for automated microorganism colony counting by computer, *IEEE Lat. Am. Trans.* 15 (10), 2006–2011.
- Zhang, C., Chen, W.-B. (2007): An effective and robust method for automatic bacterial colony enumeration. Proceedings of International Conference on Semantic, Computing, pp. 581–588.
- Zhu, G., Yan, B., Xing, M., Tian, C. (2018): Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light, *J. Microbiol. Met.* 153, 66–73.
- Yoon, S.-C., Lawrence, K.C., Park, B. (2015): Automatic counting and classification of bacterial colonies using hyperspectral imaging, *Food Bioprocess. Technol.* 8 (10), 2047–2065.

Automated counting of bacterial colonies

**Karlo Josić¹, Martina Miloloža^{2*}, Vesna Očelić Bulatović³,
Dajana Kučić Grgić²**

¹University College Algebra, Gradišćanska 24, 10000 Zagreb, Croatia

²University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia

³University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Savska cesta 16, 10000 Zagreb, Croatia

*Corresponding author: miloloza@fkit.hr

professional paper

Summary

Microbiological research involves the cultivation of microorganisms on a nutrient medium in Petri dishes used for agricultural, food, and medical purposes. The colonies are counted to determine the total number of live bacterial cells (*Colony Forming Unit*, CFU). CFU determination can be time consuming, especially in a dense sample where errors can easily occur. To speed up the implementation of this analysis and save microbiologists a lot of time, computer technology is used to improve the existing procedure. The first device for automatic colony counting was used in 1957. The image of the Petri dish was transferred to a CRT screen using a photomultiplier, and the digitized image was processed by a computer. Thus, the main components of an automatic counter are a camera and a computer with appropriate image processing software. The new version tested has a Sony Cyber Shot camera with *Biowizard* image analysis software. Compared to manual colony counting and other commercial software, better colony parameter results and shorter analysis time were obtained with *Biowizard*. Several automated colony counting systems are commercially available (e.g., *ProtoCOL*, *Whitley aCOlyte*, *AID BacSpot*), but they are not widely used due to their high cost. Therefore, further research is needed to develop and improve the precision of automated systems available for use in the laboratory.

Keywords: microbiology, CFU, fractal dimension, programming, software

Mehanička i toplinska svojstva biokompozita na bazi pluta i PLA

Sara Šušak, Vesna Očelić Bulatović*, Dajana Kučić Grgić, Mirela Leskovac

*Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije,
 Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Hrvatska
 Dopisni autor: vocelicbulatovic@fkit.hr

stručni rad

Sažetak

U ovom radu istraženi su biokompoziti na bazi pluta i polilaktidne (PLA) matrice. Toplinska svojstva ispitana su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC), termogravimetrijskom analizom (TGA) dok su rastezna svojstva određena testom jednoosnog naprezanja. Analiza površinskih svojstava određena je mjerenjem kontaktnog kuta, određivanjem slobodne površinske energije komponenata. Iz DSC rezultata vidljiv je znatan porast entalpije kristalizacije, s porastom udjela pluta u PLA/pluto biokompozitima što upućuje da prisutnost pluta znatno potiče kristalizaciju PLA u ciklusu hlađenja. Proračunate vrijednosti parametara adhezije ukazuju na prisutnost slabijih interakcija na međupovršini PLA/pluto što je potvrđeno i sniženjem mehaničkih svojstava biokompozita dodatkom pluta.

Ključne riječi: biokompoziti, pluto, polilaktid

Uvod

U današnjem svijetu nezaobilazna je upotreba plastike, a njezinom rastućom upotrebom dolazi do velikom opterećenja za okoliš. Posljednjih godina porastom ekološke svijesti potrošača, ali i industrije intenzivno se radi na smanjenju plastičnog otpada, a samim time i do minimiziranja njegovog utjecaja na okoliš. Zbog povećanja svijesti društva sve je veći interes za materijalima koji proizlaze iz obnovljivih izvora. Smanjenje plastičnog otpada može se postići ponovnim korištenjem proizvoda i recikliranjem, a dodatno je u porastu i razvoj biopolimera, odnosno polimera iz obnovljivih izvora koji su razgrađivi u prirodi, a nisu toksični za okoliš. Jedan od vodećih ekološki prihvatljivih biopolimera dobiven iz netoksičnih obnovljivih sirovina je polilaktid (PLA). Zanimanje za biopolimere je u stalnom porastu, budući da imaju prihvatljiva mehanička i toplinska svojstva u usporedbi sa sintetskim polimerima kao što su npr. polietilen (PE) i polipropilen (PP) (Averous, 2004). PLA je vodeći biorazgradljiv kandidat za zamjenu polimera iz petrokemijskih izvora zbog svoje sposobnosti prilagođavanja mehaničkih, fizičkih, mikrostrukturnih i kemijskih svojstava za specifične primjene u rasponu od robe široke potrošnje do biomedicinskih proizvoda (Farah i sur., 2005). Također, od velike važnosti za očuvanje okoliša, je da se pri njegovoj proizvodnji ispušta 60 % manje stakleničkih

plinova, te je potrebno 50 % manje neobnovljive energije u odnosu na proizvodnju ostalih polimera (Pereira, 2007). Pojavom laganih kompozitnih materijala njihova primjena u raznim industrijama poput zrakoplovstva, automobilske industrije, sportske opreme i strukturnih komponenti višestruko se povećala. Kompozitni materijali omogućavaju dobivanje novih materijala poboljšanih svojstava poput čvrstoće, tvrdoće, krutosti, težine, kemijske i toplinske postojanosti, itd. Takav materijal se sastoji od kontinuirane faze, matrice i diskontinuirane faze, punila (Rakesh i Singh, 2019). Dodatak punila, osim za poboljšanje svojstava može se koristiti u svrhu povećanja ekonomičnosti samog materijala, uz zadržavanje dobrih svojstava matrice (Rakesh i Singh, 2019). Zbog sve veće ekološke svijesti, današnja istraživanja se usmjeravaju na biokompozitne materijale u kojima se kao punilo koriste prirodni materijali, a kao matrica biopolimer. Kao prirodno punilo, zbog svojih jedinstvenih kombinacija svojstava kao što su niska gustoća, izvrsna akustična i toplinska svojstva, nepropusnost za tekućine i plinove, elastičnost, nameće se pluto. Navedena svojstva su izravna posljedica njegove karakteristične alveolarne, sačaste stanične strukture, složene u stupove i ispunjene zrakom. Otprilike 60 % pluta sastoji se od zraka, što je razlog njegove male mase (Pereira, 2007). Sve navedeno čini ga izvrsnim kandidatom za razne primjene, a važno je za istaknuti da je prirodni, višekратно upotrebljiv i obnovljiv proizvod koji nudi jedinstven izgled i dodir zbog čega ga je teško zamijeniti sintetskim materijalima. Dobiva se iz vanjske kore hrasta plutnjaka, *Quercus suber L* bez oštećenja stabla, čemu je i dokaz 200 godina star hrast plutnjak na kojem je izvršeno 20 berbi (Gibson i sur., 1981, Pereira, 2007).

U ovom radu predmet istraživanja su zeleni kompoziti odnosno biokompoziti na bazi PLA i pluta. Istražen je utjecaj različitog udjela pluta, na svojstva PLA. Toplinska svojstva biokompozita ispitana su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom (DSC), i termogravimetrijskom analizom (TGA). Mehanička svojstva ispitana su jednoosnim rasteznim ispitivanjem na mehaničkoj kidalici. Analiza površinskih svojstava provedena je mjerenjem kontaktnog kuta i određivanjem slobodne površinske energije kako bi se dobio uvid u interakcije na međupovršini biokompozita PLA/pluto.

Materijali i metode

Materijali

Za pripremu biokompozita PLA/pluto upotrijebljen je polilaktid (Polylactide resin 4043D) proizvođača Nature Works, MFR = 6 g/10 min, gustoće 1,24 g cm⁻³. Kao punilo korišteno je pluto, odnosno sakupljeni pluteni čepovi (zatvarači vinskih boca).

Priprema pluta

Prije samog umješavanja s čistim PLA pluteni čepovi su usitnjeni u kugličnom kriogenom mlinu Retsch CryoMill, Njemačka, s integriranim sustavom za hlađenje s tekućim dušikom koji kontinuirano hladi posudu za mljevenje.

Priprava biokompozita

Biokompoziti PLA/pluto pripravljeni su zamješavanjem u Brabender gnjetelici pri $T=180$ °C, uz brzinu miješanja od 60 min^{-1} u trajanju od 10 min. Rastaljena masa izvađena je iz Brabender komore te su prešane pločice dimenzija $10 \times 10 \text{ cm}$ na hidrauličkoj preši Fortuna Holland pri temperaturi od 190 °C i tlaku od 25 kPa u trajanju od 5 min, uz predgrijavanje od 1 min. Uzorci se hladeni vodom pod tlakom te izvađeni iz kalupa. Pripremljeni su uzorci biokompozita s udjelom pluta od 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10,0 mas. %.

Karakterizacija

Laserska difrakcija

Za određivanje raspodjele veličina čestica (raspon veličina od $0,02$ do $3000 \mu\text{m}$) korišten je uređaj SALD-3101, Shimadzu, Kyoto, Japan, koji kao izvor zračenja koristi He-Ne laser. Rezultati određivanja raspodjele veličina čestica prikazani su kao kumulativna funkcija raspodjele $dQ_3(x)$, koja prikazuje udio čestica pojedine veličine x .

Diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC)

Fazni prijelazi PLA i biokompozita PLA/pluto određeni su na DSC instrumentu Mettler Toledo DSC 823^o, Mettler-Toledo. Uzorci mase od oko 10 mg analizirani su u struji dušika protoka 50 ml min^{-1} , uz brzinu zagrijavanja i hlađenja od 10 °C min^{-1} u temperaturnom području od 0 °C do 200 °C, kroz dva ciklusa zagrijavanja i jedan ciklus hlađenja. Uzorci su držani 3 min na temperaturi 200 °C da bi se osiguralo potpuno uklanjanje toplinske i mehaničke povijesti uzorka u postupku pripreme. Hlađenje je provedeno hladnjakom (engl. *Intracooler*).

Stupanj kristalnosti ($\chi_c/\%$) za čisti uzorak PLA i biokompozite PLA/pluto izračunat je prema izrazu (1) (Běhálek i sur., 2020):

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m - (\Delta H_{cc} + \Delta H_{pmc})}{\Delta H_m(1-w)} * 100 \quad (1)$$

gdje w maseni udio pluta, $\Delta H_m / \text{J g}^{-1}$ eksperimentalna vrijednost entalpije taljenja PLA, $\Delta H_{cc} / \text{J g}^{-1}$ vrijednost entalpije hladne kristalizacije PLA, $\Delta H_{pmc} / \text{J g}^{-1}$ entalpija kristalizacije prije taljenja u ciklusu zagrijavanja, $\Delta H_m^o / \text{J g}^{-1}$ vrijednost entalpija taljenja koja odgovara 100 % kristalnom PLA koja prema literaturi iznosi $93,1 \text{ J g}^{-1}$ (Lim i sur., 2007).

Termogravimetrijska analiza (TGA)

Toplinska stabilnost PLA i biokompozita PLA/pluto određena je na instrumentu Q500, TA Instruments. Mjerenje je provedeno pri brzini zagrijavanja od 10 °C min^{-1} ,

u temperaturnom području od 25 °C do 600 °C. Uzorci mase od oko 10 mg zagrijavani su u inertnoj atmosferi uz protok dušika 60 ml min⁻¹.

Mjerenje kontaktnog kuta

Mjerenja kontaktnog kuta provedena su na goniometru Data Physics OCA 20 Instruments GmbH, metodom položene kapi. Mjerenja su provedena s testnim kapljevina poznatih vrijednosti slobodne površinske energije: voda (redestilirana voda, $\kappa = 1,33 \mu\text{S cm}^{-1}$) i formamid (p.a. 99,5 %, Fluka) kao polarne te dijodometan (p.a. 99 %, Aldrich) kao nepolarna kapljevina. Vrijednosti slobodnih površinskih energija korištenih testnih kapljevina prikazane su u tablici 1. Mjerenja su provedena pri temperaturi od 23 ± 1 °C i relativnoj vlažnosti 60 % s kapljicom volumena 2 μL , uz vrijeme stabilizacije kapi od 30 s, pomoću sustava za injektiranje. Provedeno je ukupno 10 mjerenja na svakom uzorku te su izračunate srednje vrijednosti kontaktnog kuta. Vrijednosti kontaktnog kuta korištene su za proračun slobodne površinske energije pomoću računalnog programa DataPhysics SCA 20 incl. SCA 21 i SCA 22 primjenom dvoparametarskih modela Owens Wendt i Wu (Chaudhury, 1993, Owens i Wendt, 1969, Wu, 1973). Vrijednosti slobodne površinske energije PLA i pluta korištene su za proračun parametara adhezije biokompozitnih sustava: termodinamičkog rada adhezije, W_{pm} , slobodne međupovršinske energije, γ_{pm} , i koeficijenta razlijevanja, S_{pm} (Mittal, 1976).

Tablica 1. Vrijednosti komponenata slobodne površinske energije testnih kapljevina (Van Oss i sur., 1993)

Table 1. Values of the free surface energy components of the test liquids (Van Oss et al., 1993)

Testne kapljevine	Slobodna površinska energija		
	γ_s /mJ m ⁻²	γ_s^d /mJ m ⁻²	γ_s^p /mJ m ⁻²
Voda	21,8	51,0	72,8
Formamid	39,0	19,0	58,0
Dijodometan	50,8	0,0	50,8

Uvjete optimalne adhezije predstavlja: maksimalan termodinamički rad adhezije, $W_{pm} = \max.$, pozitivna vrijednost koeficijenta razlijevanja, $S_{pm} > 0$, i minimalna vrijednost slobodne međupovršinske energije, $\gamma_{pm} = \min.$

Mehanička svojstva

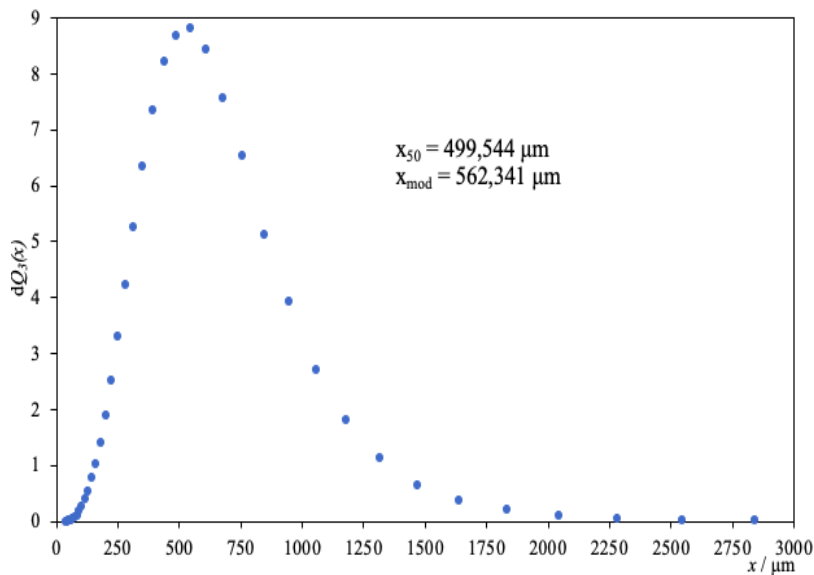
Mehanička svojstva ishodnog PLA i biokompozita PLA/pluto određena su na univerzalnoj mehaničkoj kidalici, ZWICK 1445, pri sobnoj temperaturi uz brzinu ispitivanja od 50 mm min⁻¹ i razmaku čeljusti od 50 mm. Za svaki uzorak provedeno je pet mjerenja, a kao rezultat ispitivanja dobivene su srednje vrijednosti značajki:

prekidna čvrstoća, σ_R / Nmm⁻², prekidno istezanje, ε_R / %, rastezni modul, E / Nmm⁻² i rad loma, W / Nm.

Rezultati i rasprava

Laserska difrakcija

Veličina i raspodjela veličina čestica određena je metodom laserske difrakcije. Rezultati raspodjele veličine čestica prikazani su kumulativnom funkcijom raspodjele $dQ_3(x)$ koja pokazuje udio čestica određene veličine x , Slika 1.



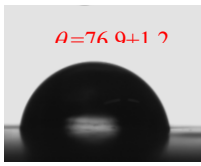
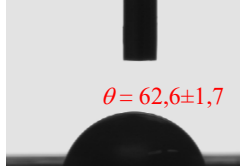
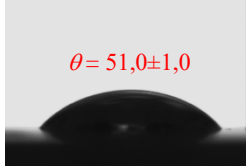

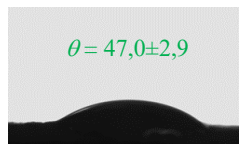
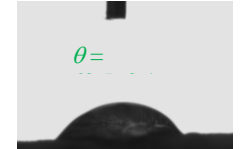
Slika 1. Raspodjela veličine čestica pluta
Figure 1. Particle size distribution of cork

Medijan, x_{50} , je veličina koja razdvaja populaciju na dva jednaka dijela, odnosno 50 % čestica je manje, a 50 % čestica veće od 499,544 μm . Najučestalija veličina čestica pluta iznosi 562,341 μm i odgovara vrhu krivulje, te se naziva modusom raspodjele, x_{mod} .

Slobodna površinska energija

Poznavanjem vrijednosti kontaktnog kuta mogu se procijeniti interakcije s pojedinom kapljevnom koje nam daju informacije o vlaženju krutine određenom kapljevnom. Površinske karakteristike PLA i pluta kao punila određene su mjerenjem kontaktnog kuta s različitim testnim kapljevnama (Tablica 2).

Tablica 2. Vrijednosti kontaktnog kuta uzoraka s testnim kapljevinama
Table 2. Contact angle values with of samples test liquids

Uzorak	Vrijednosti kontaktnih kutova, $\theta / ^\circ$		
	Voda	Formamid	Dijodometan
PLA			
PLUTO			

Vrijednosti kontaktnih kutova testnih kapljevin na površini PLA ukazuju na jače interakcije (bolje vlaženje) s nepolarnom kapljevinom dijodometanom i slabije interakcije (slabije vlaženje) s polarnim kapljevinama vodom i formamidom. Rezultati upućuju na nepolarnu prirodu površine PLA, hidrofobnog karaktera.

Visoka vrijednost kontaktnog kuta s vodom ($\theta = 84,3^\circ$) na površini pluta ukazuje na slabo vlaženje površine, odnosno na slabe interakcije s polarnom kapljevinom, što je posljedica hidrofobnosti površine. Dobiveni rezultat je u skladu sa strukturom pluta koji se sastoji od stanica pluta ispunjenih zrakom međusobno povezanih prirodnim smolastim vezivom niže površinske energije koje ih drži zajedno te ih čini nepropusnima za vodu. Slaba kapilarnost proizlazi iz stanične strukture, i značajno otežava prodor tekućina kroz pluto (Mangal i sur., 2003, Pereira, 2007.). Jače interakcije površina pluta uspostavlja s formamidom ($\theta = 47,0^\circ$) koji je manje polaran od vode i s nepolarnim dijodometanom ($\theta = 63,5^\circ$). Proračunate vrijednosti disperzijske i polarne komponente kao i ukupne slobodne površinske energije PLA i pluta primjenom dvoparametarskih modela Owens-Wendt-a, i Wu-a, dane su u tablici 3.

Tablica 3. Vrijednosti disperzijske i polarne komponente i ukupne slobodne površinske energije PLA i pluta

Table 3. Values of dispersion and polar component and total free surface energy of PLA and cork

Uzorak	Slobodna površinska energija, γ / mJm^{-2}					
	Owens-Wendt model			Wu model		
	γ^d	γ^p	γ	γ^d	γ^p	γ
PLA	30,68	6,16	36,85	31,36	9,35	40,71
PLUTO	34,01	2,88	36,88	34,30	5,97	40,27

Vidljivo je da su vrijednosti dobivene Owens-Wendt-ovim modelom niže od vrijednosti dobivenih primjenom Wu-ova modela što je rezultat korištenja različitih matematičkih pristupa. Gotovo iste vrijednosti slobodne površinske energije ova dva uzorka (Tablica 3) ukazuju na vrlo sličnu aktivnost površine. Niska vrijednost polarne komponente i slobodne površinske energije PLA karakteristična je za polimere koji u svojoj strukturi imaju CH₂ skupine. Izvjesna polarnost površine PLA $\gamma^p = 6,16 \text{ mJm}^{-2}$ (Owens-Wendtov model) i $\gamma^p = 9,35 \text{ mJm}^{-2}$ (Wu-ov model) potječe od karbonilnih skupina, C=O prisutnih u strukturi (Otsuka i sur. 2000). Pluto, kao hidrofoban materijal, ima niske vrijednosti polarne komponente, $\gamma^p = 2,88 \text{ mJm}^{-2}$ (Owens-Wendtov model) i $\gamma^p = 5,97 \text{ mJm}^{-2}$ (Wu-ov model). Kompoziti predstavljaju materijale s međupovršinama, u kojima svojstva međupovršine polimer/punilo imaju ključnu ulogu na svojstva materijala u cjelini. Jedan od načina procjene interakcija na međupovršini polimer/punilo jest proračun parametara adhezije kao što su slobodna međupovršinska energija, γ_{pm} , termodinamički rad adhezije, W_{pm} i koeficijent razlijevanja, S_{pm} . Prema ranijim spoznajama utvrđeno je da su za optimalnu odnosno zadovoljavajuću adheziju odgovorni visoka vrijednost termodinamičkog rada adhezije, minimalna vrijednost slobodne međupovršinske energije i pozitivna vrijednost koeficijenta razlijevanja (Mittal, 1976). Termodinamički parametri adhezije izračunati su iz podataka slobodne površinske energije PLA i pluta dobivenih Wu-ovim modelom, a dobivene vrijednosti prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Parametri adhezije biokompozita PLA/pluto
Table 4. Adhesion parameters of PLA/cork biocomposite

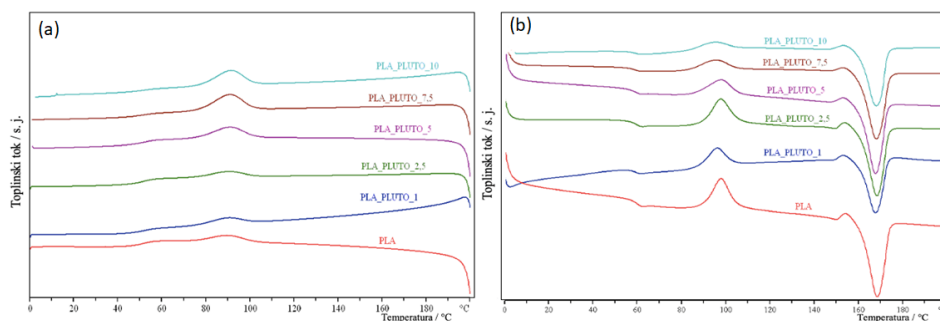
Par komponenti	Parametri adhezije / mJm^{-2}		
	γ_{pm}	W_{pm}	S_{pm}
PLA/pluto	0,88	80,10	-0,44

Vrijednost termodinamičkog rada adhezije, W_{pm} , para komponenti PLA/pluto iznosi 80,10 mJm^{-2} . Niska vrijednost međupovršinske energije, γ_{pm} , ukazuje na dobru adheziju između PLA matrice i punila pluta. Međutim, negativna vrijednost koeficijenta razlijevanja ukazuje na prisutnost slabijih interakcija na međupovršini PLA/pluto i mogućnost odvajanja polimerne matrice od površine punila. Na osnovi dobivenih rezultata može se pretpostaviti da će se na međupovršini PLA/pluto uspostavljati izvjesne, ali slabije interakcije.

Rezultati diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC)

S ciljem određivanja utjecaja pluta na fazne prijelaze u biokompozitima PLA/pluto provedena su DSC mjerenja. DSC krivulje dobivene nakon ciklusa hlađenja i drugog ciklusa zagrijavanja za ishodni PLA te biokompozite PLA/pluto prikazane su na slici 2, a karakteristične vrijednosti očitane iz krivulja prikazane su u tablici 5. PLA je kristalast polimer, što znači da sadrži amorfnu i kristalnu fazu te su njegova toplinska

svojstva određena udjelom tih faza kao i molekulnom masom PLA. Na DSC krivulji drugog zagrijavanja (slika 2 (a)) PLA jasno se uočavaju tri prijelaza koja odgovaraju temperaturi staklastog prijelaza (T_g), hladnoj kristalizaciji (T_{cc}) i temperaturi taljenja (T_m). T_g za ishodni PLA jasno je vidljiv pri 59 °C, nakon kojeg se javlja egzotermni prijelaz vezan za hladnu kristalizaciju PLA pri 98 °C. Daljnjim zagrijavanjem, dolazi do taljenja kristalnih domena PLA i pojave endoternog prijelaza s jasno izraženim maksimumom pri 168,9 °C.



Slika 2. DSC termogrami biokompozita: a) ciklus hlađenja b) ciklus drugog zagrijavanja
Figure 2. DSC thermograms of biocomposites: a) cooling cycle b) second heating cycle

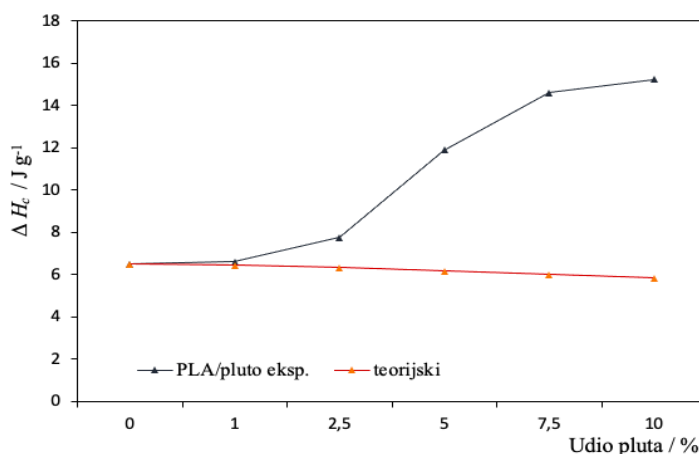
Tablica 5. Rezultati toplinskih svojstava biokompozita

Table 5. Results of thermal properties of the biocomposites

Biokompoziti	T_{mc} /°C	ΔH_{mc} /Jg ⁻¹	T_g /°C	T_{cc} /°C	ΔH_{cc} /Jg ⁻¹	T_{pmc} /°C	ΔH_{pmc} /Jg ⁻¹	T_m /°C	ΔH_m /Jg ⁻¹	χ_c /%
PLA	90,1	6,5	59,0	98,1	21,1	154,4	1,8	168,9	43,9	22,6
PLA_PLUTO_1	90,8	6,6	58,7	97,8	18,9	153,9	2,0	168,6	38,1	18,7
PLA_PLUTO_2,5	90,0	7,8	58,3	96,0	14,4	153,0	1,4	167,7	32,1	17,4
PLA_PLUTO_5	91,1	11,9	60,5	98,1	13,2	153,1	1,3	168,2	40,6	29,5
PLA_PLUTO_7,5	91,8	14,6	59,1	95,8	8,6	153,5	1,9	168,5	40,5	34,8
PLA_PLUTO_10	91,4	15,2	59,9	94,8	7,6	153,4	1,6	168,4	34,1	29,7

Na DSC termogramu ciklusa hlađenja (Slika 2 (a)) vidljiv je manje izražen egzotermni prijelaz pri temperaturi kristalizacije iz taline $T_{mc} = 90,1$ °C s entalpijom kristalizacije iz taline $\Delta H_{mc} = 6,5$ Jg⁻¹. Iz malog iznosa entalpije kristalizacije vidljivo je da u danim uvjetima ispitivanja pri brzini hlađenja od 10 °C min⁻¹, tijekom hlađenja kristalizira manji dio PLA nego tijekom zagrijavanja, što ukazuje na sporu kristalizaciju PLA tijekom hlađenja. Ispod temperature T_g u ciklusu hlađenja makromolekule se nalaze u staklastom stanju i kristalizacija je otežana, te tek manji dio, koji nije iskristalizirao tijekom prvog ciklusa zagrijavanja kristalizira tijekom hlađenja (Fukushima, 2012). Tijekom hlađenja biokompozita T_{mc} se ne mijenja značajno, dok je vidljiv znatan

porast vrijednosti ΔH_{mc} , s porastom udjela pluta u biokompozitu PLA/pluto. Kako bi se dobio bolji uvid u promjene uvjetovane dodatkom pluta u PLA, izračunate su korigirane vrijednosti ΔH_{cc} koje isključuju udio punila, koje ne kristalizira. Na slici 3 prikazana je ovisnost ΔH_{cc} PLA dobivene eksperimentalno i korigirane u ovisnosti u udjelu pluta. Vidljivo je da manji udio punila pluta, 1,0 i 2,5 mas. % doprinosi manjem povećanju entalpije kristalizacije iz taline dok se s većim udjelom pluta, 5,0, 7,5 i 10,0 mas. % entalpija kristalizacije znatno povećava što upućuje da prisutnost pluta znatno potiče kristalizaciju PLA u ciklusu hlađenja.



Slika 3. Promjena entalpije kristalizacije iz taline s udjelom pluta u biokompozitu PLA/pluto

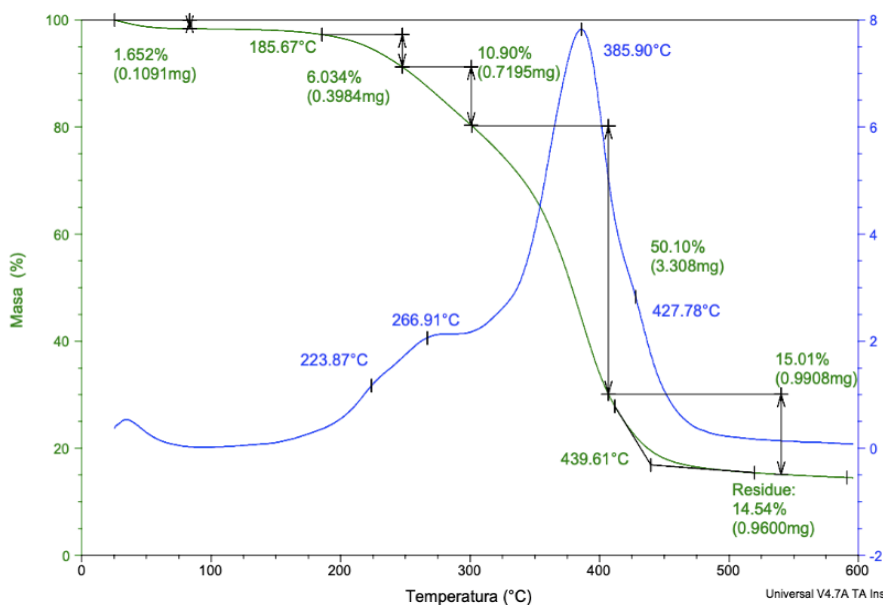
Figure 3. Change of crystallization enthalpy from melt with cork content in PLA/cork biocomposite

Dodatkom pluta kao i povećanjem udjela (Tablica 5) ne dolazi do promjene temperature staklastog prijelaza, T_g , što ukazuje da dodatak punila ne utječe na promjenu fleksibilnosti makromolekula, odnosno da ne ometa pokretljivost polimernih lanaca PLA. Temperatura hladne kristalizacije, T_{cc} , ne mijenja se znatno pri manjem udjelu dodanog pluta, dok kod PLA/pluto biokompozita sa 7,5 i 10,0 mas. % pluta hladna kristalizacije započinje pri nižoj temperaturi u odnosu na čisti PLA što kod ovih biokompozita upućuje na nešto raniju kristalizaciju PLA, potaknutu prisutnim plutom. Iz vrijednosti stupnja kristalnosti vidljivo je da pri većem udjelu dodanog pluta dolazi do povećanja stupnja kristalnosti što ukazuje na nukleacijski efekt pluta u biokompozitima PLA/pluto i to pri udjelu 5,0 7,5 i 10,0 mas. %. (Tablica 5).

Rezultati termogravimetrijske analize (TGA)

Termogravimetrijska analiza provedena je kako bi se utvrdila promjena toplinske stabilnosti PLAdodatkom različitog udjela pluta. Dobiveni rezultati prikazani su na

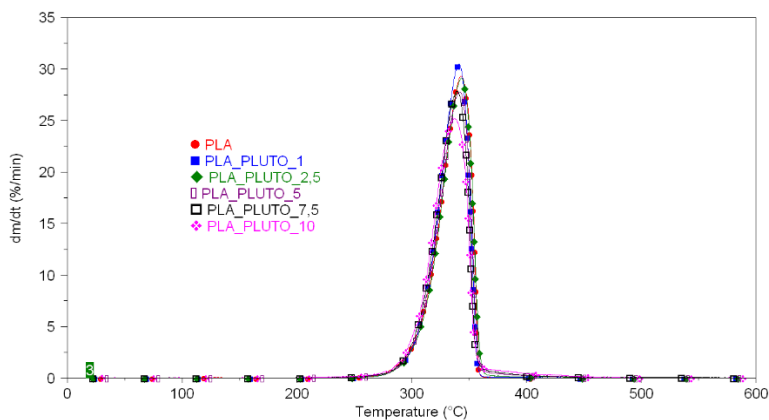
slikama 4 i 5, te sumarno u tablici 6. Temperatura pri kojoj uzorak gubi 5 % početne mase uzeta je kao temperatura početka razgradnje koja nam ukazuje na toplinsku stabilnost ispitivanih biokompozita PLA/pluto.



Slika 4. TG/DTG krivulja pluta
Figure 4. TG/DTG curve of cork

Zagrijavanjem pluta do 200 °C (TG krivulja) (Slika 4) dolazi do smanjenja mase uzorka (1,6 %) i vezana je uz isparavanje vode prisutne u plutu (Liu i Zhang, 2012). Daljnjim zagrijavanjem pluta vidljiva su četiri stupnja toplinske razgradnje. Prvi i drugi stupanj razgradnje (200 do 350 °C) vezan je za toplinsku razgradnju polisaharida, odnosno celuloze i hemiceluloze. Hemiceluloza se u potpunosti razgrađuje, dok se razgradnja celuloze proteže kroz cijelo temperaturno područje razgradnje pluta zbog njezine kompleksne strukture. Nadalje, suberin kao dominantna struktura pluta razgrađuje se pri temperaturi maksimalne brzine razgradnje 385,9 °C što je vidljivo kao jasno izraženi treći maksimum na DTG krivulji (plava krivulja). Slijedno, suberin kao dominantna komponenta s najvećim udjelom u strukturi pluta ima i najveći gubitak mase tijekom razgradnje u iznosu od 50,1 %. Veliki ostatak nakon razgradnje pluta, odnosno pepeo, iznosi 14,5 % i može se pripisati velikom udjelu lignina koji se nije u potpunosti razgradio pri 600 °C. Za pretpostaviti je se da se toplinska razgradnja lignina uočava kao rame na DTG krivulji (Slika 4), nakon toplinske razgradnje suberina no ne s potpunom toplinskom razgradnjom. Pojava jednog stupnja razgradnje (Slika 5) za čisti PLA ukazuje da se toplinska razgradnja

PLA odvija u jednom stupnju razgradnje u relativno uskom temperaturnom području (302-354 °C). Gubitak mase PLA iznosi 98,9 %, odnosno ostatak od 1,1 % pri 600 °C ukazuje na potpunu razgradnju PLA (Mohanty i sur. 2000). Dodatkom pluta u PLA, iz tablice 6. vidljivo je da pluto ne utječe na toplinsku stabilnost PLA te se i dalje javlja samo jedan stupanj razgradnje. Utjecaj pluta i to pri većem udjelu (5,0, 7,5 i 10,0 mas. %) uočava se kod znatno viših temperatura, T_{95} . Za biokompozit PLA/pluto s 10 mas.% pluta, temperatura T_{95} se pomiče prema višim vrijednostima u odnosu na čisti PLA za $\Delta T = 33,2$ °C. Ovaj doprinos porastu toplinske stabilnosti može se prepisati strukturi pluta, odnosno ligninu koji je stabilan pri visokim temperaturama. Dobiveni rezultati upućuju da pluto utječe na porast toplinske stabilnosti PLA pri višim temperaturama osobito pri većim udjelima pluta. Vrijednosti temperatura maksimalne brzine razgradnje, T_{max} , (Tablica 6) ne mijenjaju se znatno, što upućuje da nema promjene brzine razgradnje dodatkom pluta kao punila, te da ne dolazi do promjene toplinske stabilnosti PLA. Vrijednosti ostatka pri 600 °C u skladu je s porastom udjela pluta, što je posljedica je nepotpune razgradnje lignina.



Slika 5. DTG krivulje PLA i biokompozita PLA/pluto
Figure 5. DTG curve of PLA and PLA/cork biocomposites

Tablica 6. Rezultati termogravimetrijske analize biokompozita
Table 6. Results of thermogravimetric analysis of the biocomposites

Biokompozit	TG						DTG
	$T_5/^\circ\text{C}$	$T_{50}/^\circ\text{C}$	$T_{95}/^\circ\text{C}$	$T_{kraj}/^\circ\text{C}$	$\Delta m/\%$	$m_{k,600^\circ\text{C}}/\%$	$T_{max}/^\circ\text{C}$
PLA	302,0	336,9	353,8	353,9	98,9	0,689	342,7
PLA_PLUTO_1	303,7	335,5	352,7	351,7	97,9	1,195	341,1
PLA_PLUTO_2,5	304,2	337,6	355,7	354,3	97,2	1,915	343,3
PLA_PLUTO_5	302,5	336,3	364,9	352,8	96,0	1,990	341,5
PLA_PLUTO_7,5	301,3	334,6	365,9	352,3	95,7	2,481	339,5
PLA_PLUTO_10	298,7	333,2	386,95	351,1	95,5	2,980	337,3

Rezultati mehaničkih svojstava biokompozita

Mehanička svojstva PLA i biokompozita PLA/pluto određena su testom jednoosnog istezanja. Dobivene vrijednosti prekidnog istezanja, ε , %, prekidnog naprezanja, σ , N mm⁻², rasteznog modula, E , N mm⁻² i rad loma, W , Nm, sumarno su prikazane u tablici 7. PLA, kao čvrst materijal, male žilavosti i slabe rastezljivosti pokazuje visoku vrijednost prekidne čvrstoće, niski rad loma te nisku vrijednost prekidnog istezanja. Dodatkom manjeg udjela pluta od 1,0 i 2,5 mas. % povećava se vrijednost prekidne čvrstoće, prekidnog istezanja i rada loma u odnosu na čisti PLA, dok se vrijednost rasteznog modula smanjuje. Dobiveni rezultat ukazuje na prisutnost interakcija na međupovršini PLA/ pluto što doprinosi ojačanju PLA. Daljnjim porastom udjela pluta vrijednost prekidne čvrstoće se znatno smanjuje uz postupno sniženje istezljivosti materijala. Veći udio pluta ne utječe na krutost PLA dok je vidljivo smanjenje žilavosti. Dobiveni rezultat mogu ukazivati na prisutnost agregiranih čestica pluta koje predstavljaju slaba mjesta u strukturi, što ima za posljedicu slabije interakcije s PLA i u konačnici rezultira materijalom slabijih mehaničkih svojstava. Općenito se sniženje vrijednosti rasteznog modula kod kompozita s plutom kao punilom može pripisati manjoj krutosti pluta (nižeg rasteznog modula) u odnosu na PLA i/ili agregaciji čestica pluta, kao što je istaknuto u istraživanju Vilela i sur. (2014). Rezultati mehaničkih ispitivanja mogu se povezati s interakcijama na međupovršini PLA i pluta. Općenito, agregacija čestica punila utječe na popuštanje materijala, što se očituje i na mehanička svojstva i to prekidnu čvrstoću i prekidno istezanje. Dodatak punila polimernoj matrici, ukoliko su prisutne jake interakcije na međupovršini polimer/punilo, obično utječe na povećanje čvrstoće, smanjenje prekidnog istezanja, odnosno smanjenje žilavosti materijala. U ovom istraživanju utvrđeno je povećanje prekidne čvrstoće kod manjeg udjela dodanog pluta uz povećanje prekidnog istezanja i žilavosti. To se može objasniti prisutnim interakcijama na međupovršini polimer/punilo što je i predviđeno na osnovi proračuna parametara adhezije, i to pri manjem udjelu dodanog punila.

Tablica 7. Mehanička svojstva biokompozita
Table 7. Mechanical properties of the biocomposite

Kompozit	σ_R /Nmm ⁻²	ε_R /%	E /Nmm ⁻²	W /Nm
PLA	41,53±2,95	2,65±0,64	1725,1±140,9	0,27±0,13
PLA_PLUTO_1	46,08±5,78	3,37±0,63	1595,1±198,2	0,45±0,19
PLA_PLUTO_2,5	41,33±3,19	3,43±0,23	1489,1±118,5	0,41±0,05
PLA_PLUTO_5	33,57±3,19	3,10±0,34	1516,3±154,4	0,30±0,05
PLA_PLUTO_7,5	30,26±3,19	2,86±0,17	1661,7±52,0	0,25±0,02
PLA_PLUTO_10	29,81±3,19	3,14±0,30	1489,2±76,0	0,29±0,05

Zaključci

Prema proračunu parametra adhezije, unatoč visokoj vrijednosti termodinamičkog rada adhezije i niskoj vrijednosti slobodne međupovršinske energije, negativna vrijednost koeficijenta razlijevanja, para komponenti PLA/pluto ukazuje na prisutnost slabih interakcija na međupovršini PLA/pluto. Iz DSC rezultata vidljivo je da dodatkom i povećanjem udjela pluta ne dolazi do promjene temperature staklastog prijelaza, T_g , što ukazuje da pluto ne utječe na promjenu fleksibilnosti makromolekula. S druge strane, dodatkom kao i povećanjem udjela pluta u biokompozitu PLA/pluto rezultira znatnim porastom entalpije kristalizacije što upućuje da prisutnost pluta potiče kristalizaciju PLA u ciklusu hlađenja. Iz rezultata mehaničkih svojstava vidljivo je da PLA odražava ponašanje čvrstog, slabo rastezljivog materijala, visoke krutosti i male žilavosti. Pri manjem udjelu pluta dolazi do povećanja vrijednosti prekidne čvrstoće, prekidnog istezanja i rada loma u odnosu na PLA, dok se vrijednost rasteznog modula smanjuje. Porastom udjela pluta vrijednost prekidne čvrstoće se znatno smanjuje uz postupno sniženje rasteznog modula i rada loma što je posljedica slabih interakcija PLA i pluta. PLA/pluto su novi biokompoziti na potpuno biorazgradljivoj osnovi koji imaju potencijal postići vrlo inovativna svojstva, za što su potrebna daljnja opsežna istraživanja.

Zahvala

„Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) Hrvatske zaklade za znanost.

Literatura

- Avérous, L. (2004): Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. *Polym. Rev.*, 44 (3) 231–274.
- Běhálek, L., Borůvka, M., Brdlik, P., Habr, J., Lenfeld, P., Kroisová, D., Veselka, F., Novák, J. (2020): Thermal properties and non-isothermal crystallization kinetics of biocomposites based on poly(lactic acid), rice husks and cellulose fibres, *J. Therm. Anal. Calorim.*, 142, 629–649.
- Chaudhury, M. K. (1993): Surface free energies of alkylsiloxane monolayers supported on elastomeric polydimethylsiloxanes, in K. L. Mittal (Ed.): Contact angle, Wettability and Adhesion, VSP, Utrecht, pp. 691 – 697.
- Farah, S., Anderson, D. G., Langer, R. (2016): Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 107 (15) 367-392.
- Fukushima, K., Find, A., Geobaldo, F., Venturello, A., Camino, G. (2012): Properties of poly(lactic acid) nanocomposites based on montmorillonite, sepiolite and zirconium phosphonate. *eXPRESS Polym. Lett.*, 6 (11), 914-926.
- Gibson, L. J., Easterling, K. E., Ashby, M. F. (1981): The structure and mechanics of cork. *Proc. Roy. Soc.*, 377 99-117.
- Giles B. Cooke, Cork and the cork tree, Pergamon Press, 1961., str 1-32.

- Lim, T., Auras, R., Rubino, M. (2008): Processing technologies poly(lactic acid), *Progr. Polym. Sci.*, 33 (8), 820-852.
- Liu, H., Zhang, J. (2012): Toughening modification of poly(lactid) acid via melt blending. *ACS Sym. Ser.*, 1105,27-46.
- Mangal, R., Saxena, N. S., Joshi, G. P., Sreekala, M. S., Thomas, S. (2003): Measurement of effective thermal conductivity and thermal diffusivity for assessing the integrity of fiber to matrix bond in natural fiber composite. *Indian J. Pure Appl. Phys.*, 41 (9), 712–718.
- Mittal, K. L. (1976): Adhesion mensurement of thin film, *Electrocomp. Sci. Technol.*, 3 21-42.
- Mohanty, A. K., Mistra, M., Hinrichsen, G. (2000): Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromol. Mater. Eng.*, 276/277 (1), 1-24.
- Otsuka, H., Nagasaki, Y., Kataoka K. (2000): Dynamic wettability study on the functionalized PEGylated layer on a polylactide surface constructed by the coating of aldehyde-ended poly(ethylene glycol) (PEG)/polylactide (PLA) block copolymer. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 1 (1) 21–29.
- Owens, D. K., Wendt, R. C. (1969): Estimation of the surface free energy of polymers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 13 (8), 1741-1747.
- Pereira, H. (2007): Cork: Biology, Production and Uses, Elsevier, London, pp. 241-305.
- Rakesh, P. K., Singh, I. (2019): Processing of Green Composites, Springer Nature Singapore Pte Ltd., Singapore, str. 1-13.
- Van Oss, C. J., Giese, R. F., Li, Z., Murphy, K., Norris, J., Chaudhury, M. K., Good, R. J. (1993): Determination of contact angles and pore sizes of porous media by column and thin layer wicking. In: K. L. Mittal (Ed.): Contact Angle, Wettability and Adhesion, VSP, Utrecht, The Netherlands, 1993, str. 269–284.
- Vilela, C., Sousa, A.F., Fonseca, A. C., Serra, A. C., Coelho, J. F. J., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. (2014): The quest for sustainable polyesters – insights into the future. *Polym. Chem.* 5 (9), 3119-3141.
- Wu, S. (1973): Polar and Nonpolar Interactions in Adhesion. *J. Adhesion.*, 5 (1), 39-55.

Mechanical and thermal properties of biocomposites based on cork and PLA

Sara Šušak, Vesna Očelić Bulatović*, Dajana Kučić Grgić,
Mirela Leskovac

University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology,
Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb, Croatia
*Corresponding author: vocelicbulatovic@fkit.hr

professional paper

Summary

This work investigated biocomposites based on a cork and polylactide (PLA) matrix. Thermal properties were tested by differential scanning calorimetry (DSC), and thermogravimetric analysis (TGA), while tensile properties were determined by a uniaxial stress test. The analysis of surface properties is determined by measuring the contact angle, and determining the surface free energy of the components. From the DSC results, a significant increase in the enthalpy of crystallization is visible, with an increase in the proportion of cork in PLA/cork biocomposites, which indicates that the presence of cork significantly promotes the crystallization of PLA in the cooling cycle. The calculated values of the adhesion parameters indicate the presence of weaker interactions at the PLA/cork interface, which was also confirmed by the decrease in the mechanical properties of the biocomposite with the addition of cork.

Keywords: biocomposite, cork, polylactide

Floristic characteristics of Kopački rit and Danube Delta

Siniša Ozimec^{1*}, Denis Deže², Dragan Prlić³

¹*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Vladimira Preloga 1, 31000 Osijek, Croatia*

²*Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Postgraduate interdisciplinary university study programme Environment Protection and Nature Conservation (student),*

Trg Svetog Trojstva 3, 31000 Osijek, Croatia

³*Donji Meljani 92c, 33520 Slatina, Croatia*

**Corresponding author: sozimec@fazos.hr*

professional paper

Summary

Two most recognisable wetland areas in the Danube River catchment are Kopački rit, located in the middle part of the Danube River course, and Danube Delta in the area of the mouth into the Black Sea. Due to exceptional biological and ecological values, these areas are protected at national level as the Kopački rit Nature Park in Croatia and the Danube Delta Biosphere Reserve in Romania. Both areas are also designated as the Ramsar Sites, the Biosphere Reserves under the UNESCO's Man and the Biosphere Programme, and sites of Natura 2000 ecological network. Vascular flora diversity of Kopački rit and Danube Delta has been analysed from the taxonomic and ecological viewpoint. Flora diversity of Kopački rit comprises 572 species (11% of Croatian flora), and of Danube Delta comprises 1,031 species (27% of Romanian flora). There are 56 alien species, and 26 invasive alien species in the flora of Kopački rit, and 163 alien species, and 36 invasive alien species in the flora of Danube Delta. Differences in the floristic characteristics between Kopački rit and Danube Delta are mainly determined by their biogeographic position in Europe.

Keywords: flora, wetlands, Kopački rit, Danube Delta

Introduction

Wetlands represents some of the most biologically diverse and valuable ecosystems on the planet. Wetlands perform many essential ecosystem services that have benefit to human society, such as: flood control through the storage of large amounts of water, shoreline stabilization, natural filters for improving water quality, sediment storage, reducing erosion, carbon storage, maintenance of biodiversity by providing habitats for many animal and plant species, food production, medicinal resources, and raw materials (Keddy et al., 2009). The global economic value of wetlands ecosystem services is estimated to 26.9 trillion USD per year, more than forests and grasslands (Costanza et al., 2014). Degradation and loss of wetlands have a significant economic and social impact, such as increased flood risk and water quality degradation, with implications for the health and well-being of the population.

Two most recognisable wetland areas in the Danube River catchment are Kopački rit, located in Croatia, in the middle part of the Danube River course, and Danube Delta, located in Romania and Ukraine, in the area of the Danube River mouth into the Black Sea. The aim of this paper is to describe general characteristics and nature protection status for both protected wetland areas at national level (in Croatia and Romania), international protection level and EU level under the Natura 2000 ecological network. Vascular plant diversity, floristic composition and ecological characteristics were analysed and compared between Kopački rit and Danube Delta.

Materials and methods

Study area

The Kopački rit Nature Park is located in north-eastern Croatia, in the angular area formed by the confluence of the Danube and the Drava River (Figure 1). The Park covers an area of 231 km² with an altitudinal range from 78 to 86 m a.s.l. The appearance of the whole area and an overall biodiversity depends on the flooding intensity of the Danube River, while the Drava River has much less importance (Tadić et al., 2013). The area is interwoven by side arms, dead arms, oxbow lakes, channels and numerous ponds. The largest water body is the Kopačko Lake, with surface of 200–250 ha in the period without flooding, while the deepest one is the Sakadaš Lake with a mean depth of 7 m. The lakes and floodplain are interconnected with rivers through a network of natural channels. The inflow of the Danube floodwaters is distributed by the 6 km long Hulovo Channel, and 16,4 km long side arm Vemeljski Dunavac in the northern part (Ozimec and Topić, 2018). The Čonakut channel (Figure 3) is 3 km long waterway between the Sakadaš Lake and the Kopačko Lake. Regarding the phytogeographical position, the Kopački rit belongs to the Eurosiberian-North American region and the Pannonian sector of the Central European province. This is a transitory region between the vegetation of the *Carpinion betuli* alliance and forest-steppe zone of the *Aceri tatarici-Quercion* alliance (Topić and Šegulja, 2005). The climate belongs to Cfb type of temperate warm and moist climate with warm summers (Šegota and Filipčić, 2003). The mean annual air temperature is 11.0 °C, and the mean annual rainfall amounts to 696 mm (Cvitan, 2014). Annual Lang's rain factor is 63, so the climate is defined as semi-humid and moderately warm.

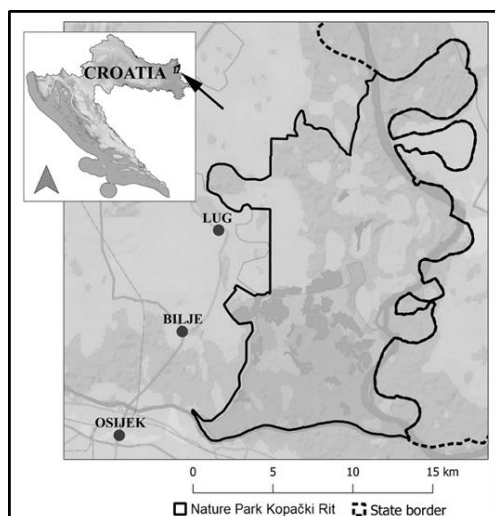


Figure 1. The geographical location of Kopački rit Nature Park
 (Source: Ozimec et al., 2021)

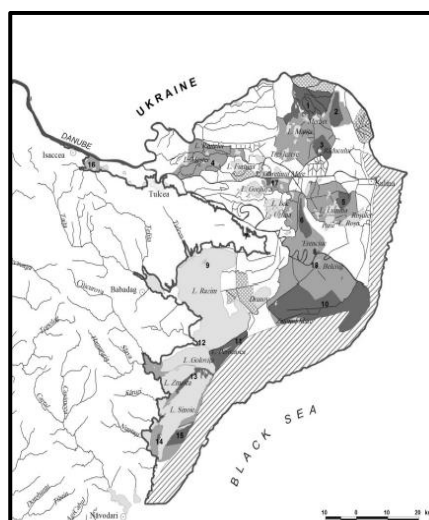


Figure 2. The geographical location of Danube Delta Biosphere Reserve
 (Source: Gastescu, 2009)

Danube Delta is the second largest delta in Europe (after the Volga) and 23rd in the world. The total area of the Delta is 4,178 km², of which 3,446 km² (82%) in Romania, and 732 km² (18%) in Ukraine (Figure 2). The Danube River annually discharges 77% of the total river runoff to the Black Sea (Giosan et al., 2005). The Danube River develops its delta in the north-western part of the Black Sea where the river flows into the sea through three main branches: the Chilia has a length of 120 km and takes about 58% of the water and alluvium, the Sulina (63.7 km) takes 19%, and Sfintu Gheorghe (70 km) takes 21-25 % (Gastescu, 2009).

Two large delta sectors can be distinguished: the fluvial delta and the fluvial-marine delta. The Delta is lying 0.52 m above mean Black Sea level. Only 20.5% of the area is below 0 m, and 54.6% is in the range 0–1 m. The highest points are situated in the forest areas in Letea (12.4 m), and Caraorman (7 m), developed on sandy marine levees (Panin, 2003). Lakes are one of the most important morphohydrographic elements in the Delta (Figure 4). Due to anthropogenic interventions in the past, the number and surface of lakes has been reduced from 668 (31,262 ha) in 1964 to 480 (25,000 ha) today (Gastescu, 1993). The larger lakes include Dranov (2,170 ha), Gorgova (1,377 ha), Roșu (1,445 ha) and Merhei (1,368 ha). Reed marshes cover more than 200.0000 ha (Covaliov et al., 2010). Regarding the phytogeographical position, the Danube Delta is situated at the merging limit of the two floristic provinces, eastern of the Danubial province of the Lower Danube and western of the Pontic (Black Sea) province, forming a particular unit, the Danube Delta's District (Ciocarlan, 2011).

Two climate types are distinguished, Cfa type of humid subtropical climate, and cold semi-arid climate (Bsk) with a hot and dry summer and a cold winter. The mean annual air temperature is 11.0 °C, and the mean annual rainfall amounts to 438 mm (Gastescu, 2009). Annual Lang’s rain factor is 40, so the climate is defined as arid and moderately warm.



Figure 3. The Čonakut channel in Kopački rit (Photo: Siniša Ozimec)



Figure 4. One of the lakes in Danube Delta (Photo: Siniša Ozimec)

Nature protection status

The comparison of the nature protection status between Kopački rit and Danube Delta according to protection categories is presented in Table 1.

The area of Kopački rit was firstly protected in 1967 under the category of Managed Natural Reserve (Rožac et al., 2018). Actual protection status in category of Nature Park was established by the Act adopted in 1999, including the middle Danube reach between river km 1,412 and 1,382. Kopački rit was designated on the List of Wetlands of International Importance under the Ramsar Convention (inscription number: 583), on 2 November 1992. The Kopački rit Nature Park is an integral part of the UNESCO Transboundary Biosphere Reserve Mura-Drava-Danube (Croatia/Hungary), proclaimed in 2012, and most recently of the UNESCO Five-country biosphere Reserve Mura-Drava-Danube (Austria, Croatia, Hungary, Serbia, Slovenia), proclaimed in 2021. Kopački rit is also included in two areas of the ecological network Natura 2000 in Croatia, established under the EU Birds and Habitats Directives: Special Protection Area (SPA) HR1000016 Podunavlje i donje Podravlje, and Site of Community Importance (SCI) HR2000394 Kopački rit. One of the Natura 2000 target habitat type is presented in Figure 5.

The Danube Delta Biosphere Reserve was firstly proclaimed by the Romanian Government Decree in 1990, followed by the Act adopted in 1993 (Gastescu, 2009). Danube Delta was designated on the List of Wetlands of International Importance under the Ramsar Convention (inscription number: 521) on 21 May 1991. Danube

Delta Biosphere Reserve was designated on the UNESCO World Heritage List as the natural heritage site (inscription number: 588) in 1991. Danube Delta is an integral part of the UNESCO Danube Delta Transboundary Biosphere Reserve (Romania/Ukraine), proclaimed in 1998. Danube Delta is also included in three areas of the ecological network Natura 2000 in Romania: Special Protection Area (SPA) ROSPA0031 Delta Dunarii si Complexul Razim-Sinoie, and Sites of Community Importance (SCI) ROSCI0065 Delta Dunarii and ROSCI0066 Delta Dunarii-zona marina. One of the Natura 2000 target habitat type is presented in Figure 6.

Table 1. Comparison of the nature protection status between Kopački rit and Danube Delta

Kopački rit (Croatia)	Danube Delta (Romania)
National protection status	
Managed Nature Reserve (Act in 1967) Nature Park (Act in 1999)	Biosphere Reserve „Danube Delta“ (Government Decree in 1990, Act in 1993)
International protection status	
Ramsar List (1992), No. 593	Ramsar List (1991), No. 521
UNESCO „Man and Biosphere Programme“: Mura-Drava-Danube Transboundary Biosphere Reserve, Croatia/Hungary (2012) Five-country Biosphere Reserve Mura-Drava-Danube (Austria, Croatia, Hungary, Serbia Slovenia) (2021)	UNESCO „Man and Biosphere Programme“: Danube Delta Transboundary Biosphere Reserve (Romania/Ukraine) (1998)
-	UNESCO World Heritage List (1991)
Natura 2000 status	
Special Protection Area / SPA (Birds Directive)	
POP HR1000016 Podunavlje i donje Podravlje	ROSPA0031 Delta Dunarii si Complexul Razim-Sinoie
Site of Community Importance / SCI (Habitats Directive)	
POVS HR2000394 Kopački rit	ROSCI0065 Delta Dunarii ROSCI0066 Delta Dunarii – zona marina



Figure 5. Habitat type 3130 developed on dried shore of the Kopačko Lake in August 2022 (Photo: Siniša Ozimec)



Figure 6. Habitat type 2110 on the Black Sea sandy coast with endemic species *Convolvulus persicus* (Photo: Siniša Ozimec)

Data collection

Data for the analyses of the vascular flora were collected from the previously published sources, for Kopački rit: Ozimec and Topić (2018), Rožac et. al. (2018), Ozimec et al. (2021), and for Danube Delta: Ciocarlan (2011), Anastasiu (2010, 2011), Oprea et al. (2011), Anastasiu et al. (2014), Strat et al. (2017), and Sarbu et al. (2018). Taxonomic rank and nomenclature had been adjusted according to Nikolić (2020).

Ecological and phytogeographical analyses

The plant life-forms and floristic elements for the chorological analyses were interpreted according to Pignatti (2002), and Ciocarlan (2011). Allochthonous flora was analysed according to Mitić et al. (2008) and Nikolić et al. (2014). Invasive alien plant species and their areas of origin were attributed according to Boršić et al. (2008).

Results and discussion

Comparison of the taxonomic composition of the vascular flora of Kopački rit and Danube Delta is presented in Table 2.

Table 2. Taxonomic analyses of the vascular flora of Kopački rit and Danube Delta

Taxonomic category	Family		Genus		Species	
	Kopački rit	Danube Delta	Kopački rit	Danube Delta	Kopački rit	Danube Delta
Pteridophyta (Pteridophytes)	6	8	6	8	9	16
Coniferophytina (Gymnosperms)	0	1	0	1	0	1
Magnoliophyta (Angiosperms)	91	104	305	426	561	1014
Magnoliopsida (Dicotyledons)	73	82	238	321	425	761
Liliopsida (Monocotyledons)	18	22	67	105	138	253
Total	97	113	311	435	572	1031

The vascular plant diversity of Kopački rit comprises 97 families, 311 genera and 572 taxa (species and subspecies), which makes 11% of the total of 5,027 taxa recorded for the vascular flora of Croatia (Nikolić, 2020).

The vascular plant diversity of Danube Delta comprises 113 families, 435 genera and 1,031 taxa (species and subspecies), which makes 27% of the total of 3.829 taxa recorded for the vascular flora of Romania (Hurdu et al., 2022).

Comparison of the diversity of plant families in the flora of Kopački rit and Danube Delta is presented in Table 3. The most numerous plant families in the flora of Kopački rit were: Asteraceae (47), Poaceae (45), Lamiaceae (38), and Cyperaceae (30), and in the flora of Danube Delta: Asteraceae (124), Poaceae (112), Brassicaceae (59) and Fabaceae (56 taxa).

Table 3. The most numerous families in the vascular flora of Kopački rit and Danube Delta

Kopački rit			Danube Delta		
Family	Number of taxa	Percentage (%)	Family	Number of taxa	Percentage (%)
Asteraceae	47	8.3	Asteraceae	124	12.0
Poaceae	45	7.9	Poaceae	112	10.9
Lamiaceae	38	6.7	Brassicaceae	59	5.7
Cyperaceae	30	5.3	Fabaceae	56	5.4
Fabaceae	25	4.4	Cyperaceae	48	4.7
Scrophulariaceae	24	4.2	Chenopodiaceae	40	3.9
Brassicaceae	24	4.2	Apiaceae	35	3.4
Rosaceae	20	3.5	Caryophyllaceae	33	3.2
Polygonaceae	18	3.2	Scrophulariaceae	33	3.2
Boraginaceae	15	2.6	Lamiaceae	32	3.1
Ranunculaceae	15	2.6			

The most diverse genera in the flora of Kopački rit were: *Carex* (17 taxa), *Ranunculus* and *Veronica* (10 each), and *Potamogeton* (9), and in the flora of Danube Delta: *Carex* (21), *Polygonum* (18), *Chenopodium* (15) and *Plantago* (14 taxa).

Life-form spectrum of the flora of Kopački rit (Figure 7) showed that hemicryptophytes (39%) were dominant, followed by geophytes (25%) and therophytes (24%). This indicated the phytogeographical position of Kopački rit in the Pannonian sector of the Central European floristic province (Topić and Šegulja, 2005), and plant resistance to the cold winter conditions. The percentage of therophytes indicated warm and temporary dry climate, as well as on intensity of anthropogenic impact.

Life-form spectrum of the flora of Danube Delta (Figure 8) showed that therophytes (38%) were dominant, followed by hemicryptophytes (33%) and geophytes (22%). This indicated the transitional phytogeographical position of Danube Delta, eastern of the Danubial province and western of the Pontic province (Ciocarlan, 2011), with developed specific vegetation of the psamphilic and halophilic habitats in the coastal area of the Black Sea, and dry steppic grasslands, as well as the intensity of anthropogenic impact. The percentage of hemicryptophytes reflected plant resistance to the cold winter conditions.

The presence of 11% of phanerophytes (trees and shrubs) in the flora of Kopački rit was much higher than 6% in the flora of Danube Delta. Forest and forest land covers 5,984.31 ha or 26% of the Kopački rit Nature Park (Pfeiffer, 2013), while in the Danube Delta Biosphere Reserve covers 15,377 ha or 2.7% (Ciocarlan, 2011).

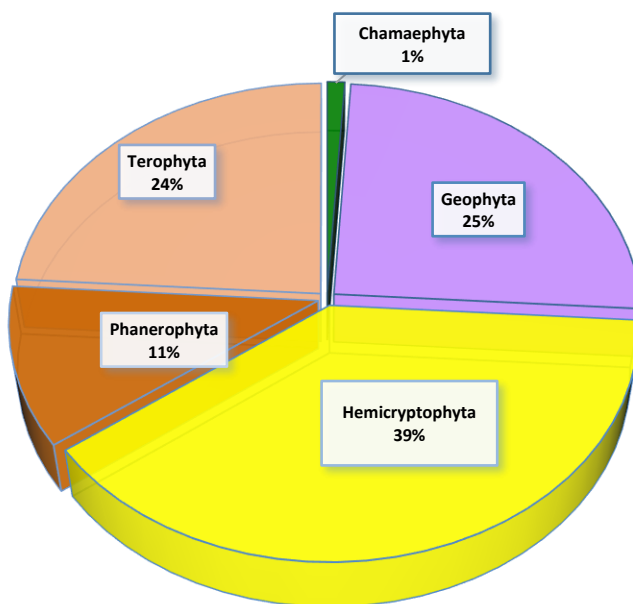


Figure 7. Life-form spectrum of the flora of Kopački rit

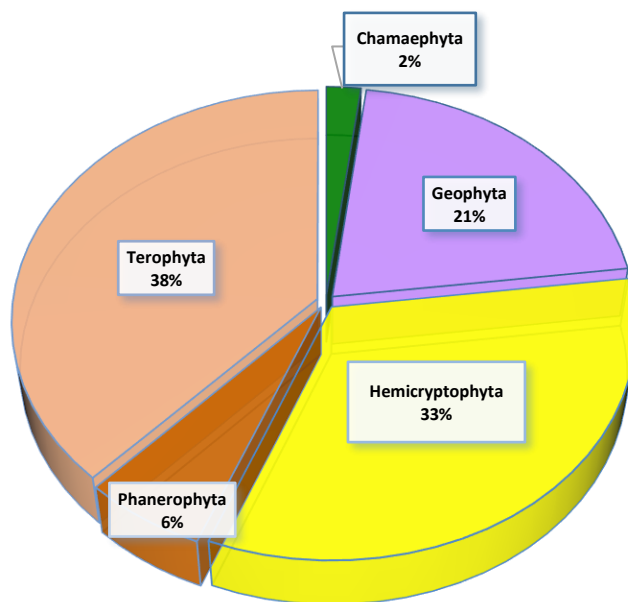


Figure 8. Life-form spectrum of the flora of Danube Delta

Phytogeographical analyses of the flora of Kopački rit (Figure 9) showed the prevalence of Eurasian floral element (33%), followed by Cosmopolites or widespread plants (27%), European (11%), and Mediterranean floral element (10%).

Phytogeographical analyses of the flora of Danube Delta (Figure 10) showed the dominance of Eurasian floral element (28%), followed by the East European-Pontic floral element (24%), and European (14%) floral element, while Cosmopolites and adventive plants makes 13%.

Percentage of the East European-Pontic (24%) and European (14%) floral element in the flora of Danube Delta is much higher than in the flora of Kopački rit (2% and 11%, respectively). Different chorological spectra reflect specific biogeographic position of Kopački rit and Danube Delta in Europe. Kopački rit is positioned in the influence zones of two biogeographic regions: Continental and Pannonian, and Danube Delta is positioned in the influence zones of four biogeographic regions: Continental, Steppic, Black Sea and Mediterranean regions (Cervellini et al., 2020).

Allochthonous flora in Kopački rit was represented by 56 species or 10% of the total flora (Ozimec et al., 2021). According to geographic origin, most of the allochthonous plants (29 species) have the North American and South American origin, followed by 13 species of Asian origin, 9 species of Eurasian origin, and 3 species of Mediterranean origin. The richer allochthonous flora shows disturbance intensity caused by anthropogenic activities. Invasive alien plants were represented by 26 species (5% of the total flora). Allochthonous flora in Danube Delta was represented by 163 species or 16% of the total flora. (Anastasiu et al., 2014). According to geographic region, most of the allochthonous plants (84 species) have the North American and South American origin, followed by 38 species of Asian origin and 24 species of Mediterranean origin. Invasive alien plants were represented by 36 species (32% of the total flora). Comparison showed that number of allochthonous and invasive alien plant species is higher in the flora of Danube Delta (16%) than in the flora of Kopački rit (10%). While the number of species of the American and Asian origin is equal in both areas, the number of allochthonous and invasive plants of the Mediterranean origin is much higher in Danube Delta, due to its biogeographic position in Europe.

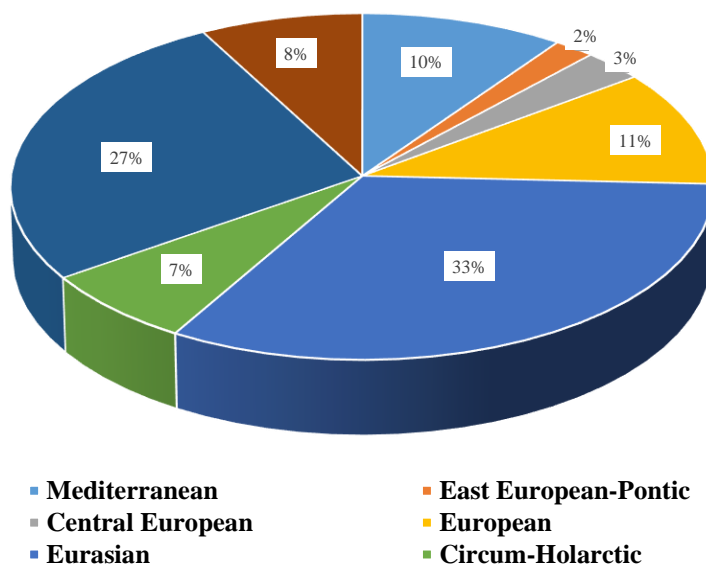


Figure 9. Chorological spectrum of the flora of Kopački rit

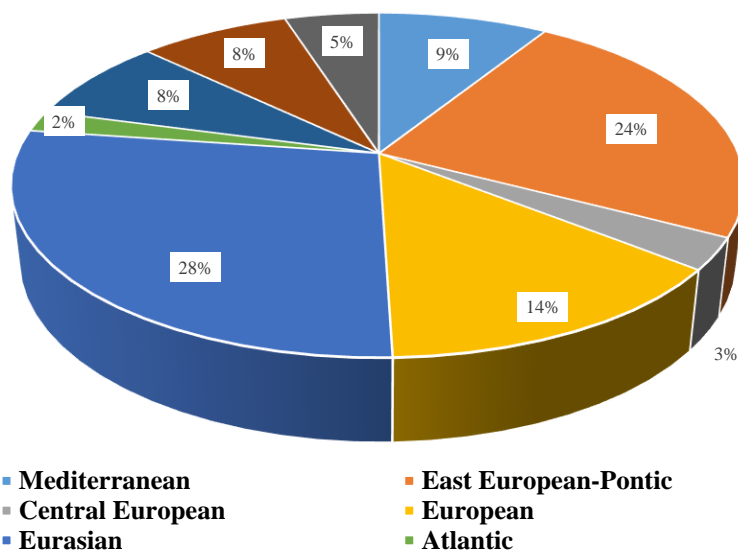


Figure 10. Chorological spectrum of the flora of Danube Delta

Conclusions

Two most recognisable wetland areas in the Danube River catchment are the Kopački rit Nature Park in Croatia, and the Danube Delta Biosphere Reserve in Romania. Both areas are designated as Ramsar sites, Natura 2000 ecological network sites, and the UNESCO's Biosphere Reserves. Vascular plant diversity of Kopački rit comprises 572 species, and of Danube Delta 1,031 species. Differences in the floristic characteristics, life-forms and chorological spectra between the vascular flora of Kopački rit and Danube Delta are mainly determined by the biogeographic position in Europe, climate types and other climate characteristics, level of aridity and oceanographic processes in the Danube Delta.

References

- Anastasiu, P. (2010): Contributions to chorological data on Romanian flora, *Acta Horti Bot. Bucurest.* 37, 45-50.
- Anastasiu, P. (2011): New taxa and chorological data for Danube Delta flora, *Acta Horti Bot. Bucurest.* 38, 33-38.
- Anastasiu, P., Negrean, G., Smarandache, D., Litescu, S., Basnou, C. (2014): Neophytes in protected areas. Case study: The Danube Delta Biosphere Reserve, *Acta Horti Bot. Bucurest.* 41, 41-36.
- Boršić, I., Milović, M., Dujmović, I., Bogdanović, S., Cigić, P., Rešetnik, I., Nikolić, T., Mitić, B. (200.): Preliminary check-list of invasive alien plant species (IAS) in Croatia, *Nat. Croat.* 17(2), 55-71.
- Cervellini, M., Zannini, P., Di Musciano, M., Fattorini, S., Jiménez-Alfaro, B., Rocchini, D., Field, R., Vetaas, O.R., Irl, S.D.H, Beierkuhnlein, C., Hoffmann, S., Fischer J.-C., Casella, L., Angelini, P., Genovesi, P., Nascimbene, J., Chiarucci, A. (2020): A grid-based map for the Biogeographical Regions of Europe, *Biodiv. Data J.* 8, e53720.
- Ciocarlan, V. (2011): Vascular flora of the Danube Delta, *Anal. St. Univ. „Al. I. Cuza“ Iasi* 57 (1), 41-64.
- Costanza, R., de Groot, R., Sutton, P., van der Ploeg, S, Anderson, S.J., Kubiszewski, I., Farber, S., Turner, R.K. (2014): Changes in the global values of ecosystem services, *Glob. Environ. Change* 26, 152-158
- Covaliov, S., Doroftei, M., Hanganu, J. (2010): Danube Delta Biosphere Reserve (D.D.B.R.): reed dynamics within actual context, *Int. J. Bioflux Soc.* 2(1), 69-80.
- Cvitan, L., 2014: Initial indices of spatial climate diversities of the broader area of Kopački rit Nature Park, *Croat. Meteorol. J.* 48/49, 63-91.
- Gastescu, P. (1993): The Danube Delta: Geographical Characteristics and Ecological Recovery, *GeoJournal* 29 (1), 57-67.
- Gastescu, P. (2009): The Danube Delta Biosphere Reserve. Geography, biodiversity, protection, management, *Rom. J. Geogr.* 53 (2), 139-152.
- Giosan, L., Donnelly, J.P., Vespremeanu, E., Bhattacharya, J.P., Olariu, C., Buonaiuto, F.S. (2005): River delta morphodynamics: examples from the Danube Delta. In: *River Deltas - Concepts, Models, and Example*, SEPM Special Publicatio 83, Giosan, L., Bhattacharya, J.P. (eds.), Tulsa, USA: SEPM Society for Sedimentary Geology, Tulsa, pp. 1-19.

- Hurdu, B.-I., Costea, A., Halmagyi, A., Szatmari, P.-M., Farkas, A., Pușcaș, M., Turtureanu, P.D., Roșca Casian, O., Tănasehi, C., Oprea, A., Mardari, C., Răduțoiu, D., Camen-Comănesc, P., Sîrbu, I.M., Stoie, A., Lupoae, P., Cristea, V., Jarda, L., Holobiuc, I., Goia, I., Cătană, C., Butiuc-Keul, A. (2022): *Ex situ* conservation of plant diversity in Romania: A synthesis of threatened and endemic taxa, *J. Nat. Cons.* 68, 126211
- Keddy, P.A., Lauchlan, H.F., Solomeshch, A.I., Junk, W.J., Campbell, D.R., Arroyo, M.T.K., Alho, C.J.R. (2009): Wet and wonderful: the world's largest wetlands are conservation priorities, *BioScience* 59 (1), 39-51.
- Mitić, B., Boršić, I., Dujmović, I., Bogdanović, S., Milović, M., Cigić, P., Rešetnik, I., Nikolić, T. (2008): Alien flora of Croatia: proposals for standards in terminology, criteria and related database, *Nat. Croat.* 17 (2), 73-90.
- Nikolić, T., Mitić, B., Boršić, I. (2014): Flora Hrvatske - invazivne biljke, Zagreb, Croatia: Alfa, pp 296.
- Nikolić, T. (2020): Flora Croatica, Vols 1-3, Zagreb, Croatia: Alfa d.d.
- Oprea, A., Sîrbu, C., Doroftei, M. (2011): New contributions to the flora of Romania, *Anal. St. Univ. „Al. I. Cuza“ Iasi* 57 (2), 79-90.
- Ozimec, S., Topić, J. (2018): Macrophytes of the Croatian Danube reach. In: Macrophytes of the River Danube Basin, Janauer, G.A., Gaberščik, A., Kvet, J., Germ, M., Exler, N. (eds.), Prague, Czech Republic: Academia, pp. 252-267.
- Ozimec, S., Prlić, D., Rožac, V. (2021): A retrospective of ten years of botanical exploration in Nature Park Kopački rit (Croatia). In: 43rd IAD Conference, Cyffka, B., Betz, F., Borgs, T., Gelhaus, M., Stammel, B., Vontz, M. (eds.), Neuburg/Donau, Germany, pp. 43-47.
- Panin, N. (2003): The Danube Delta. Geomorphology and Holocene Evolution: a Synthesis, *Geomorphol., Relief Process, Environ.* 9 (4), 247-262.
- Pfeiffer, D. (2013): Šumske površine na području Parka prirode „Kopački rit“. In: 2nd Symposium Kopački rit Past, Present Future 2013, Ozimec, S., Bolšec, B., Kučera, S., Rožac, V. (eds.), Tikveš, pp. 18-19.
- Pignatti, S. (2002): Flora d'Italia, Vols. 1-3, Bologna, Italy: Edagricole.
- Rožac, V., Prlić, D., Ozimec, S. (2018): The vascular flora of Kopački rit Nature Park (Croatia), *Acta Biolog. Sloven.* 61 (2), 47-70.
- Sarbu, A., Janauer, G.A., Schmidt-Mumm, U., Exler, N. (201.): Macrophytes of the Romanian Danube reach and the Danube Delta. In: Macrophytes of the River Danube Basin, Janauer, G.A., Gaberščik, A., Kvet, J., Germ, M., Exler, N. (eds.), Prague, Czech Republic: Academia, pp. 303-333.
- Strat, D., Stoyanov, S., Holobiuc, I. (2017): The occurrence of the alien plant species *Cenchrus longispinus* on the Danube Delta shore (Northwest Black Sea coast) – threats and possible impacts on the local biodiversity, *Acta Horti Bot. Bucurest.* 44, 17-31.
- Šegota, T., Filipčić, A. (2003): Köppenova podjela klime i hrvatsko nazivlje, *Geoadria* 8 (1), 17-37.
- Tadić, L., Dadić, T., Barač, B. (2013): Flood frequency modelling of the Kopački rit Nature Park. *Tehnički vjesnik* 20 (1), 51-57.
- Topić, J., Šegulja, N. (2005): Phytogeographical position and regions of Croatia. In: Red Book of Vascular Flora of the Republic of Croatia, Nikolić, T., Topić, J. (eds.), Zagreb, Croatia: Ministry of Culture, State Institute for Nature Protection, pp. 564-567.

7

Sekcija: 8. SUSRET MLADIH KEMIČARA

Topic: 8th MEETING OF YOUNG CHEMISTS



Utjecaj različitih temperatura čuvanja na svojstva piva kontaminiranog s *Lactobacillus brevis*

Antonio Mamić¹, Kale Marković¹, Dorotea Štefanac¹, Nika Vitas¹,
Jasminka Žiža^{1*}, Ivana Ćosić², Bojan Matijević²

¹Gimnazija Karlovac, Rakovac 4, 47000 Karlovac, Hrvatska

²Veleučilište u Karlovcu, Trg J.J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Hrvatska

*Dopisni autor: zizajasminka@gmail.com

Sažetak

Pojava nepoželjnih mikroorganizama (kontaminanta) može uzrokovati promjenu senzorskih svojstava (okusa, mirisa i izgleda) piva i činiti ga neupotrebljivim za piće. Posebnu pažnju treba posvetiti mikrobiološkoj kontroli piva, pravovremenom otkrivanju izvora i vrste kontaminacije. *Lactobacillus brevis* je gram – pozitivna bakterija koja se koristi u industriji za proizvodnju fermentirane hrane. Međutim, ovu bakteriju povezuje se i s kvarenjem hrane i pića, posebice piva. Cilj rada je istražiti intenzitet promjena svojstava piva kontaminiranog s *Lb. brevis* i čuvanog pri različitim temperaturama. Uzorci piva kontaminirani su s *Lb. brevis* i čuvani pri različitim temperaturama, T = 4, 20 i 37 °C, tijekom 7 dana. U pivu su, prije i nakon čuvanja, praćena sljedeća svojstva: pH – vrijednost, ekstrakt u osnovnoj sladovini, udio alkohola, gorčina, polifenoli, boja i mutnoća. Također, određen je i ukupan broj stanica *Lb. brevis*.

Ključne riječi: inkubacija, kontaminacija, *Lactobacillus brevis*, svojstva piva

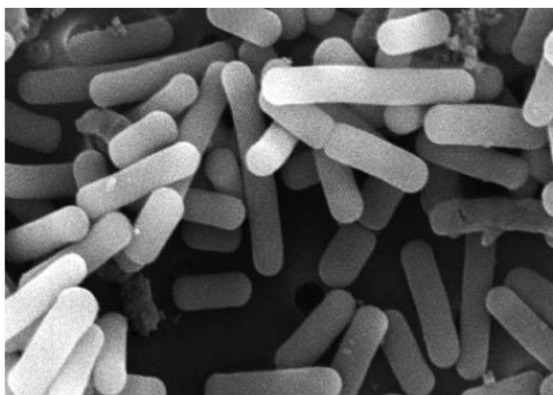
Uvod

Pivo je pjenušavo slabo alkoholno piće gorkog okusa i hmeljne arome dobiveno alkoholnim vrenjem pивske sladovine (Kunze, 2014). Prisutnost navedenih sastojaka te niska koncentracija kisika čine pivo mikrobiološki stabilnim proizvodom. Svega je nekoliko rodova bakterija i kvasaca koji ipak uspješno rastu u pivu i sladovini kao hranjivim podlogama. Prilikom ukomljavanja i kuhanja sladovine mogu se pojaviti bakterije mliječne kiseline, a najčešći kontaminanti piva su iz rodova *Pediococcus* i *Lactobacillus*. Ovi mikroorganizmi kvare pivo i uzrokuju povećanje mutnoće te neugodne senzorne promjene piva. Prepoznate su kao najopasnije bakterije za pivovare budući da su ti organizmi odgovorni za približno 70 % incidenata mikrobnog kvarenja piva (Zhenbo i sur., 2020).

Bakterije iz roda *Lactobacillus* imaju striktno fermentativan metabolizam, ne sporuliraju i štapičastog su oblika. Vrste se razlikuju prema načinu na koji metaboliziraju ugljikohidrate (šećere), a glavni proizvod metabolizma je mliječna kiselina. Najčešći kontaminant piva je *Lactobacillus brevis*, bakterija otporna na mikrobicidno djelovanje kolupulona i trans-humulona koji su sastavni dio hmelja. Otpornost *Lb. brevis* na hmelj je osobina, na koju utječe više čimbenika, a neki od tih

čimbenika su otpornost na niski pH i visoki udio etanola, stoga se *Lb. brevis* može naći kao kontaminant piva (Feyereisen i sur., 2019; Zhenbo i sur., 2020.)

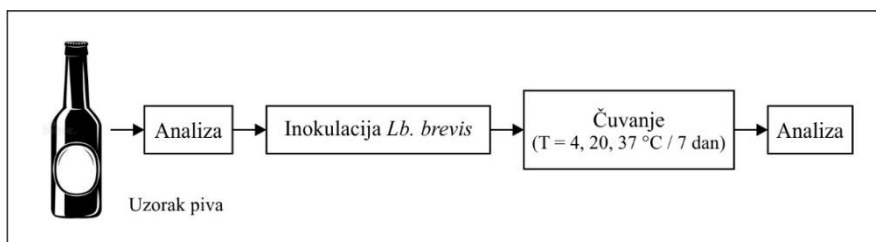
Kako bi se ispitao utjecaj fermentativne bakterije *Lb. brevis*, na kvalitativna svojstva piva, ista je inokulirana u uzorke gotovog proizvoda. To je gram-pozitivna, štapićasta, anaerobna bakterija, koja sudjeluje u fermentaciji hrane, a ujedno je i jedan od značajnijih kontaminanata piva. Optimalni uvjeti za njen razvoj su temperatura od 37 °C te pH u rasponu od 4 do 5.



Slika 1. Bakterija *Lb. brevis* snimljena elektronskim mikroskopom
Figure 1. The bacterium *Lb. brevis* recorded with an electron microscope
 (Calumba at al., 2021)

Materijali i metode

Četiri faze istraživačkog rada su: analiza kontrolnih uzoraka, inokulacija piva, inkubacija inokuliranog piva na tri različite temperature i analiza testnih uzoraka. Za potrebe istraživanja, koje se sastojalo od mikrobiološkog i fizikalno-kemijskog dijela, korišteno je 35 boca lager piva od kojih je 5 kontrolnih, a 30 testnih.



Slika 2. Plan istraživanja
Figure 2. Research plan

Priprema inokuluma i mikrobiološke analize

Bakterija *Latobacillus brevis* umnožena je u 250 mL MRS bujona anaerobno pri 37 °C/24 h. Nakon toga je dodano 1 % (v/v) inokuluma u pivo (Calumba i sur., 2021). Mikrobiološka analiza provedena je na kontrolnom uzorku piva (nakon inokulacije) i na uzorcima nakon 7 dana inkubacije. Iz osnovnog uzorka piva napravljena su decimalna razrijeđenja i inokulirana na Petrijevu zdjelicu te zalivena sa RAKA-RAY agarom, inkubacija je provedena u anaerobnim uvjetima pri 37 °C / 3 dana (Hug i sur., 1978; Priest, 2003). Nakon provedene inkubacije određena je CFU vrijednost poraslih kolonija.

Fizikalno-kemijske analize piva

Fizikalno-kemijskom analizom određeni su osnovni parametri piva: alkohol (EBC 9.2.6), ekstrakt u osnovnoj sladovini (EBC 9.4) te mutnoća, boja, pH i energija. Parametri su određeni koristeći Anton Paar DMA 4500 M analizator uz nadograđene module za određivanje mutnoće, boje i pH vrijednosti. Vrijednosti gorčine te koncentracije polifenola u ispitivanim uzorcima određene su prema EBC 9.8 i 9.11 metodama koristeći spektrofotometar, Shimadzu UV-1280. Koncentracija CO₂ određena je prema EBC 9.28.5 koristeći Anton Paar CboxQC uz PFD uređaj za uzorkovanje.



Slika 3. Anton Paar analizator
Figure 3. Anton Paar analyzer



Slika 4. Anton Paar CboxQC + PFD
Figure 4. Anton Paar CboxQC + PFD



Slika 5. i 6. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije gorčine
Figures 5. and 6. Spectrophotometric determination of bitterness concentration

Obrada rezultata

Pokusi su ponovljeni dva puta. Rezultati su obrađeni u programu Microsoft Office Excel 2016 i prikazani su kao srednja vrijednost u tablicama i grafovima (Tablica 1; Slike 7-15).

Rezultati i rasprava

S obzirom na to da je cijelo istraživanje provedeno u dva dijela, mikrobiološki i fizikalno-kemijski, rezultati istraživanja su tako i podijeljeni.

Mikrobiološki dio

Početni broj *Lb. brevis* u svim uzorcima piva bio je u prosjeku oko $2,66 \times 10^6$ CFU/mL (Tablica 1). Nakon 7 dana inkubacije došlo je do značajnog pada broja živih stanica *Lb. brevis* u uzorcima inkubiranim pri 20 °C i 37 °C i to ispod 10^3 CFU/mL. Razlog ovako značajnog pada broja živih stanica može se povezati sa nedostatkom fermentabilnih šećera. Naime, prilikom fermentacije sladovine, kvasac je pretvorio sav šećer u etanol. Kod uzoraka piva inkubiranih na 4 °C nije došlo do značajnijeg pada živih stanica *Lb. brevis* niti nakon 7 dana inkubacije, što je posljedica inhibicije pri tako niskoj temperaturi.

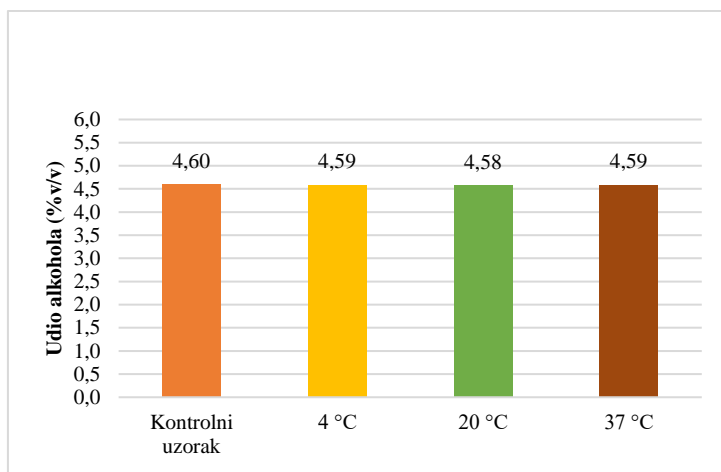
Tablica 1. Rezultati mikrobiološkog ispitivanja uzoraka

Table 1. Results of microbiological testing of samples

Uzorak piva	Temperatura inkubacije	CFU/mL
Kontrolni uzorak	-	$2,66 \times 10^6$
Uzorak 1	4 °C	$2,68 \times 10^6$
Uzorak 2	20 °C	$< 10^3$
Uzorak 3	37 °C	$< 10^3$

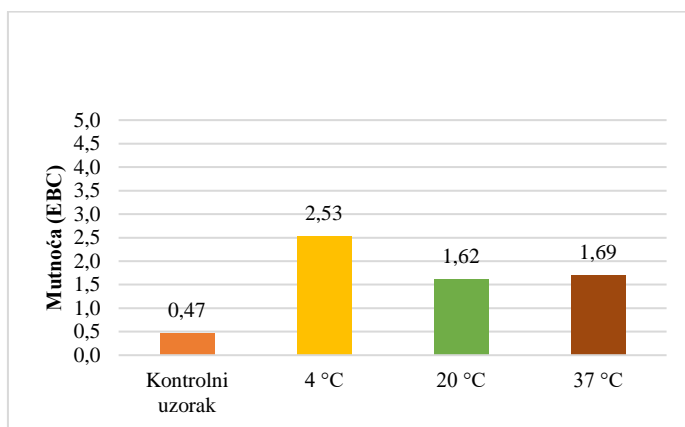
Fizikalno-kemijski dio

U fizikalno-kemijskom dijelu istraživanja ispitivane su vrijednosti parametara koji kvalitativno i kvantitativno određuju kvalitetu piva. Standardni volumni udjel alkohola za lager piva je 4 – 6 %. Korišten je kontrolni uzorak koji je imao 4,6 % alkohola te se taj postotak nije značajnije promijenio uslijed inokulacije kolonija bakterija i čuvanja pri 4 °C, 20 °C i 37 °C što je i očekivano s obzirom na to da su inokulirane bakterije mliječnog, a ne alkoholnog vrenja.



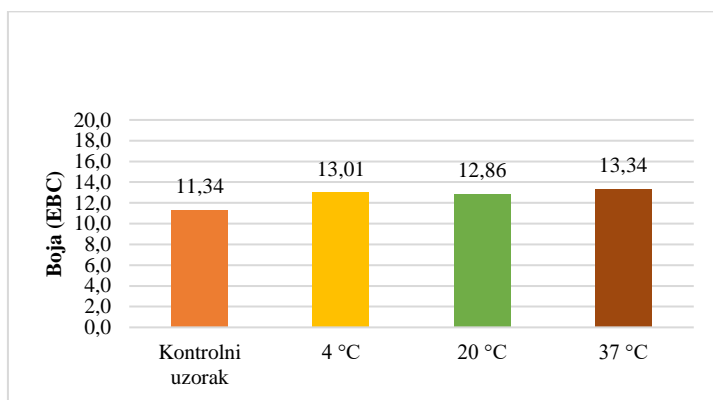
Slika 7. Izmjereni udio alkohola
Figure 7. Measured alcohol content

Jedan od najvažnijih parametara koji utječu na percepciju piva kod potrošača je mutnoća. Ona predstavlja prisutnost suspendiranih čestica u pivu te se njena vrijednost, usporede li se kontrolni uzorci s inokuliranim, povisila. Porast vrijednosti mutnoće rezultat je inokulacije s bakterijom *Lb. brevis*. Obzirom na činjenicu da je broj kolonija inokulirane bakterije pri $T = 4\text{ °C}$ neznatno promijenjen u odnosu na kontrolni uzorak, vrijednost mutnoće znatno je veća u odnosu na uzorke inkubirane pri $T = 20\text{ °C}$ i 37 °C . Porast vrijednosti mutnoće za uzorke termostatarane pri $T = 4\text{ °C}$ doseže do 81,42 % u odnosu na kontrolni uzorak.



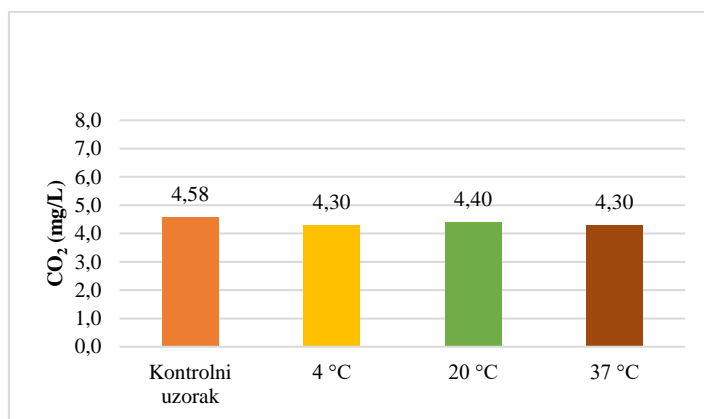
Slika 8. Izmjerena mutnoća
Figure 8. Measured clarity

Boja je također jedan od parametara koji ima direktan utjecaj na percepciju potrošača o proizvodu. Porast vrijednosti jedinica boje direktno je povezan s inokulumom koji je tamnije boje od samog piva. U odnosu na kontrolni uzorak boja je porasla za ± 2 EBC jedinice u svim ispitivanim uzorcima, što iznosi do cca 15 % u odnosu na kontrolni uzorak.



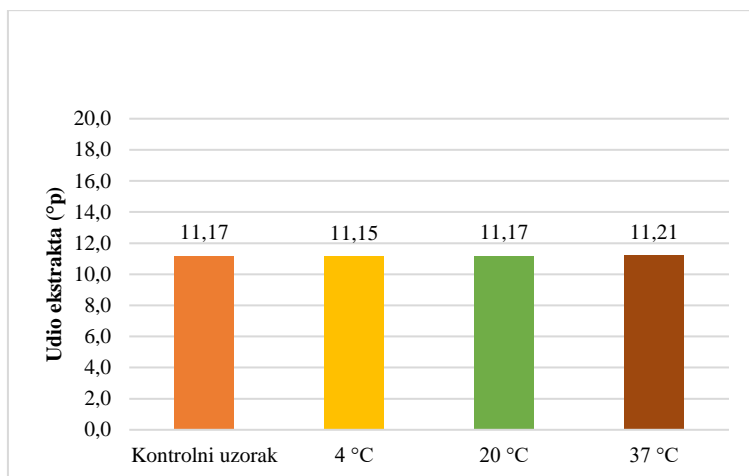
Slika 9. Izmjerena boja
Figure 9. Measured color

CO₂ zaslužan je za okusnu percepciju piva, točnije za osvježavajuć okus, gorčinu i punoću okusa. Iz rezultata provedenog istraživanja vidljivo je smanjenje udjela CO₂ u pivu, no to smanjenje je zanemarivo s obzirom na referentne vrijednosti. Najniže vrijednosti zabilježene su pri temperaturi od 4 °C i 37 °C.



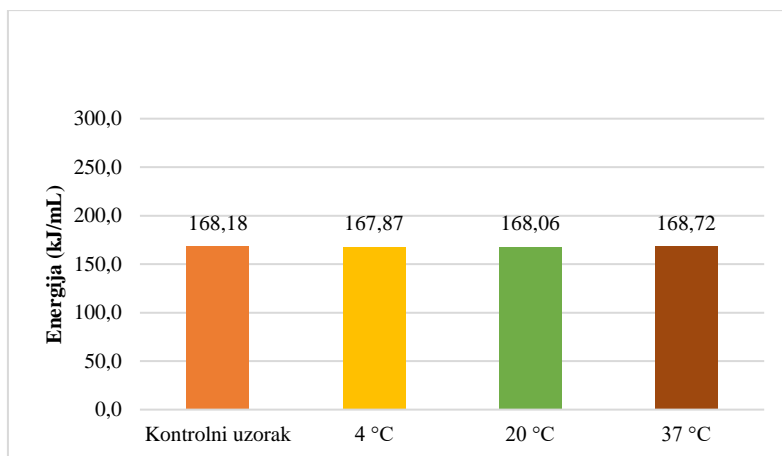
Slika 10. Izmjereni udio CO₂
Figure 10. Measured proportion of CO₂

Ekstrakt označava sve otopljene sastojke u slakovini i njegova je vrijednost tijekom analiza ostala nepromijenjena.



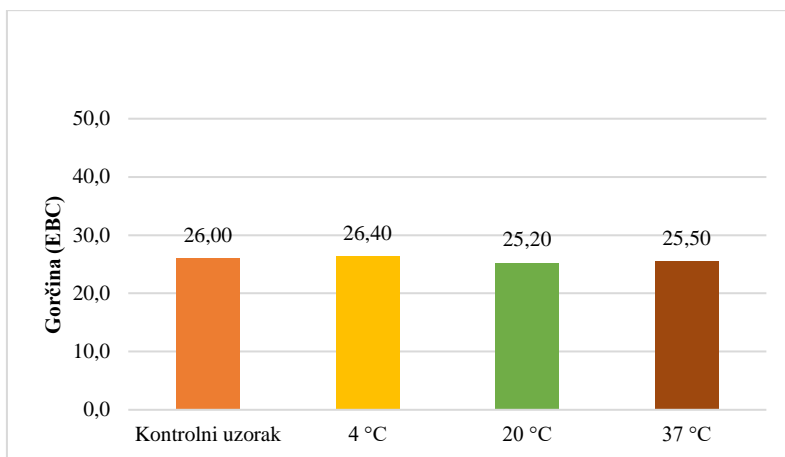
Slika 11. Izmjereni udio ekstrakta
Figure 11. Measured proportion of extract

Energija piva, tj. njezina kalorična vrijednost nije se promijenila nakon inkubacije.



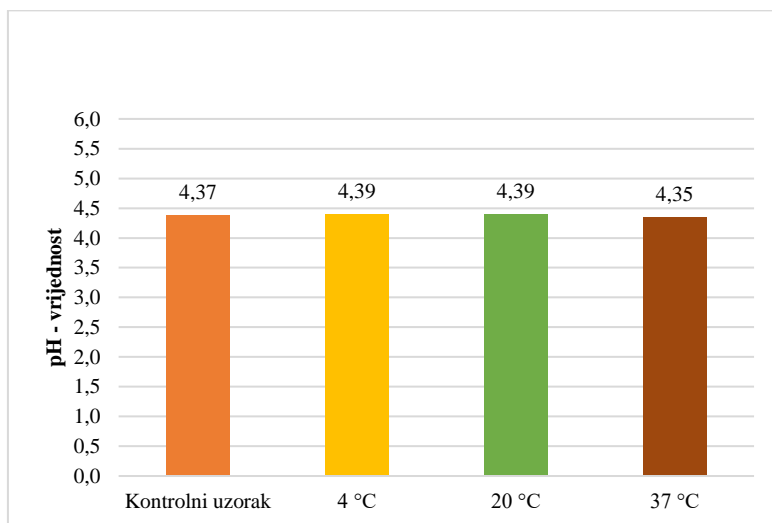
Slika 12. Izmjerena energija
Figure 12. Measured energy

Također, nije se promijenila ni vrijednost gorčine pive koja označuje koncentraciju izo-alfa kiseline.



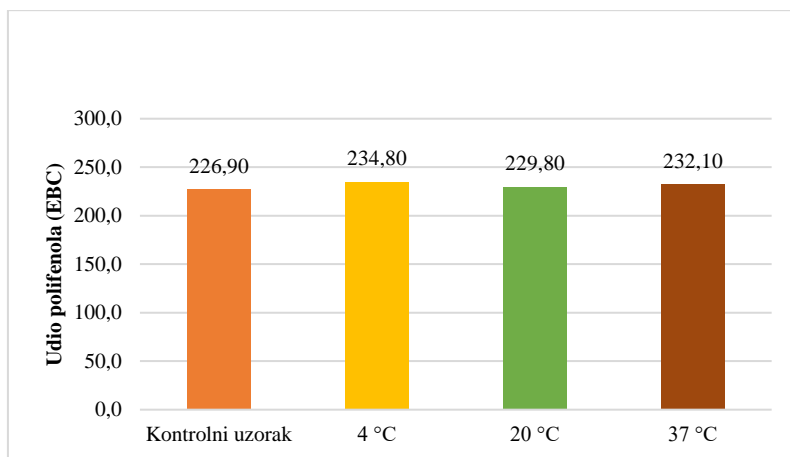
Slika 13. Izmjerena gorčina
Figure 13. Measured bitterness

pH kontrolnog uzorka iznosio je 4,37 te se nakon inkubacije nije značajno promijenio.



Slika 14. Izmjereni pH
Figure 14. Measured pH

Polifenoli u pivu utječu na njegovu aromu te okus, a u našem istraživanju njihova se vrijednost nije promijenila.



Slika 15. Izmjereni udio polifenola
Figure 15. Measured content of polyphenols

Zaključci

Konstantnost većine fizikalno-kemijskih parametara (alkohol, pH, ekstrakt, CO₂, energija, gorčina, polifenoli), osim boje i mutnoće piva, uzrokovana je nemogućnošću bakterijske aktivnosti u pivu. Bakterija *Lb. brevis* uzrokovala je porast mutnoće piva, dok je promjenu boje uzrokovala tamnija boja inokuluma. Iako je optimalna temperatura za razvoj *Lb. brevis* 37 °C, zbog nedostatka fermentabilnih šećera njezin broj pri 20 °C i 37 °C se smanjio, dok je pri 4 °C ostao jednak što je posljedica inhibicije pri tako niskoj temperaturi. Rezultati fizikalno-kemijskih analiza ispitivanih uzoraka potvrđuju rezultate mikrobioloških ispitivanja. Ovim preliminarnim istraživanjem otvara se prostor za daljnja istraživanja.

Literatura

- Calumba, K.F., Reyes, V., Bonilla, F., Villasmil, E., Sathivel, S. (2021): Ale beer containing free and immobilized *Lactobacillus brevis*, a potential delivery system for probiotics, *Food Production, Processing and Nutrition* 3 (8), 1-14.
- EBC Method 9.11 - Total Polyphenols in Beer by Spectrophotometry.
- EBC Method 9.2.6 - Alcohol in Beer by Near Infrared Spectroscopy.
- EBC Method 9.28.5 - Determination of dissolved Carbon Dioxide in Beer by Volume Expansion.
- EBC Method 9.4 - Original, Real and Apparent Extract and Original Gravity of Beer.

EBC Method 9.8 - Bitterness of Beer.

Feyereisen, M., Mahony, J., Lugli, G.A., Ventura, M., Horst, N., Franz, C.M.A.P., Noben, J., O'Sullivan, T., van Sinderen, D. (2019): Isolation and Characterization of *Lactobacillus brevis*, *Viruses* 11, 1–16.

Hug, H., Schlienger, E., Pfenninger, H. (1978): *Schweizer Brauerei-Rundschau* 89, 145.

Kunze, W. (2014): *Technology Brewing & Malting*, 5th ed., VLB, Berlin.

Priest, G.F. (2003): Gram-positive brewery bacteria, *Brewing Microbiology*, 3rd edition, Priest, F.G., Campbell, I Ed., Springle, New York, 181 – 2017.

Zhenbo, X., Yuting, L., Yuzhu, M., Ruixin, P., Jinxuan, C., Thanapop, S., Caiying, B., Ling, C. Yi, L., Jianyu, S., Kan, W., Junyan, L., Birthe, V.K. (2020): Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry, *J. Microbiol. Biotechnol.* 30 (7), 955–961.

Influence of different storage temperatures on the properties of beer contaminated with *Lactobacillus brevis*

Antonio Mamić¹, Kale Marković¹, Dorotea Štefanac¹, Nika Vitas¹,
Jasminka Žiža^{1*}, Ivana Ćosić², Bojan Matijević²

¹Gymnasium Karlovac, Rakovac 4, 47000 Karlovac, Croatia

²Karlovac University of Applied Sciences, Trg J.J. Strossmayera 9, 47000 Karlovac, Croatia

*Corresponding author: zizajasminka@gmail.com

Summary

The occurrence of unwanted microorganisms (contaminants) can cause a change in the sensory properties (taste, smell and appearance) of beer and make it unusable for drinking. Special attention should be dedicated to the microbiological control of beer, timely detection of the source and type of contamination. *Lactobacillus brevis* is a member of gram-positive bacteria used in industry to manufacture fermented food. However, these bacteria are also connected to the spoilage of food and beverages, especially beer. This paper aims to investigate the intensity of changes in the properties of beer contaminated by *Lb. brevis* and stored at different temperatures. Beer samples are contaminated by *Lb. brevis* and kept at different temperatures, T = 4, 20 and 37 °C, for 7 days. The following properties were monitored in the beer before and after storing: pH value, extract in the basic wort, alcohol content, bitterness, polyphenols, colour and clarity. The total number of *Lb. brevis* cells was also determined.

Keywords: storing, contamination, *Lactobacillus brevis*, beer, properties

Praćenje kvalitete vode prirodnog izvora Belski dol

Petra Novak Mlinarić*, Tamara Tkalec-Car

Graditeljska prirodoslovna i rudarska škola, Hallerova aleja 3, 42000 Varaždin, Hrvatska

**Dopisni autor: petra_novak_mlinaric@hotmail.com*

Sažetak

U današnje vrijeme sve je veći interes i potreba za vodom odgovarajuće kakvoće, no istovremeno zbog sve intenzivnijeg industrijskog i poljoprivrednog razvoja te utjecaja urbanih sredina na okoliš, degradacija kakvoće podzemne vode gotovo je neizbježna. Nažalost izuzetak nisu ni podzemne vode Varaždinske županije čiju posebnu vrijednost čine mnogobrojni prirodni izvori vode. Maleno mjesto Bela u Varaždinskoj županiji ima svoj vlastiti vodovod izgrađen 60' tih godina prošlog stoljeća, a voda kojom se opskrbljuje dolazi iz prirodnog izvora Belski dol. Mještani imaju svoju vlastitu vodovodnu mrežu koja se nalazi ispod županijskog vodovodnog sustava. Cilj ovog rada je praćenje kvalitete izvorske vode Belski dol tijekom godine dana te utvrđivanje onečišćenja, ako postoji i u kojem obujmu. Provedena su mjerenja pH, mutnoće, električne provodnosti, koncentracije nitrata i klorida. Uočeno je da tijekom godine voda ima ujednačenu pH vrijednost i električne provodnosti dok je udio nitrata nešto veći tijekom pojačane poljoprivredne aktivnosti, a koncentracija klorida je povećana u zimskom periodu kada se sole okolne ceste. Svi parametri tijekom čitave godine su na donjim granicama prema Pravilniku o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće što nam govori da je voda iz izvora Belski dol izvrsne kvalitete.

Cljučne riječi: prirodni izvor vode, pitka voda, nitrati, kloridi

Uvod

Voda je jedan od najrasprostranjenijih resursa koji naša zemlja ima, tekućina je bez boje, okusa i mirisa. Jedno od najvažnijih svojstava vode je otapanje mnogih tvari svih agregacijskih stanja što je čini jedinstvenim i nezamjenjivim prirodnim resursom ograničenih količina i neravnomjerne prostorne i vremenske raspodjele. Hrvatska je zemlja koja je bogata vodom što potvrđuju i podaci UNESCO–a iz 2003. godine prema kojima je na 42. mjestu u svijetu, odnosno 5. u Europi po dostupnosti i bogatstvu vodnih resursa. Iz činjenice da su svi oblici života i sve ljudske aktivnosti vezane uz nju jasno proizlazi važnost odnosa prema vodi. Hrvatska raspolaže velikim, prostorno i vremenski nejednoliko raspoređenim količinama površinskih i podzemnih voda. Pitka voda je namirnica i civilizacijska potreba nužna za život pojedinaca i funkcioniranje društvenih zajednica. Na zemlji postoje veoma male količine pitke vode, stoga pojedine države imaju trajni nedostatak pitke vode. Ako se one nalaze uz more, moguće ih je preraditi u pitku. Svake godine zbog nedostatka pitke vode umire 3 milijuna djece mlađe od 5 godina (https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_08_91_2900.html). Oko 72 % površine Zemlje je pokriveno vodom. Od toga je 97 % slane vode, a samo 3 % slatke vode. Kao

posljedica porasta životnog standarda, promjena životnih navika i poljoprivredne proizvodnje, potrošnja vode u svijetu neprestano raste te predstavlja stratešku prijetnju kvaliteti ljudskog života i održivosti okoliša. Problemi s kojima smo suočeni najviše su izazvani od strane čovjeka, zbog njegovog neodgovornog korištenja ovog resursa. Stanovništvo bogatijih zemalja je rastrošno, ne obraća pažnju na potrošnju vode i nema ispravan odnos prema njoj. S druge strane, suprotnost su siromašne zemlje u kojima postoje ljudi koji nemaju pristup pitkoj vodi. Da bismo izbjegli neželjene prognoze u bliskoj budućnosti, upravljanje vodom mora uključivati koncept održivog razvoja. Hrvatska pripada skupini zemalja svijeta (https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_08_91_2900.html) koje imaju iznadprosječne zalihe pitke vode i gdje problemi s vodom nisu ograničavajući faktor razvitka. Ipak, bitno je brinuti za budućnost i mudro postupiti u upravljanju vodom. Prosječna opskrbljenost stanovništva vodom iz javnih vodoopskrbnih sustava u Hrvatskoj iznosi 76 % (https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2008_08_91_2900.html) (Slika 1).



Slika 1. Opskrbljenost i potrošnja vode RH
Figure 1. Water distribution in Croatia

Materijali i metode

Dobra opremljenost školskih laboratorija omogućila je izradu ovog projekta bez većih tehničkih problema. Analiza vode obuhvaćala je nekoliko koraka:

- a) Uzimanje uzoraka vode s izvorišta Belski dol
- b) Ispitivanje fizikalnih svojstava
- c) Ispitivanje kemijskih svojstava

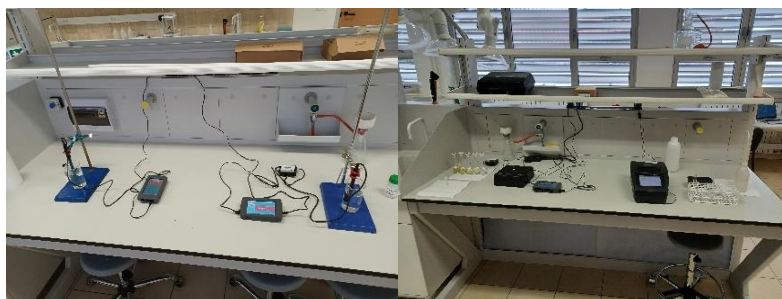
Određeni su sljedeći fizikalno - kemijski parametri: pH-vrijednost, masena koncentracija klorida i nitrata, provodnost i mutnoća. U analizi su korištene metode titracija, turbidimetrija i spektrofotometrija.

Uzorkovanje je provedeno na mjesečnoj bazi u vremenskom periodu od godine dana direktno na samom izvorištu Belski dol (Slika 2). Boca je napunjena, i označena prema propisima i dopremljena u školski laboratorij na ispitivanja (Weihnacht, 2009).



Slika 2. Izvor vode Belski dol
Figure 2. Water source Belski dol

Prije samog mjerenja instrumenti su kalibrirani i pripremljeni za rad (Pitnac, 2016). Električna provodnost i pH - vrijednosti određivana su na Vernier uređaju pomoću odgovarajućih sondi (Slike 3 i 4).



Slika 3. Određivanje pH –
 vrijednosti i provodnosti
Figure 3. Determination
 of pH and conductivity

Slika 4. Spektrofotometrijsko
 određivanje
Figure 4. Spectrophotometric
 determination

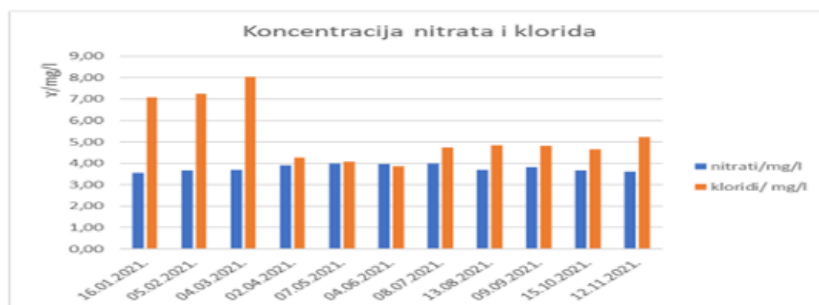
Rezultati i rasprava

Rezultati ispitivanja uzorka vode iz prirodnog izvora Belski dol prikazani su u tablici (Tablica 1) i grafičkim prikazom (Slika 5). Kontrola zdravstvene ispravnosti vode za ljudsku potrošnju definirana je Zakonom o vodi za ljudsku potrošnju iz Narodnih novina (NN 56/13, 64/15, 104/17, 115/18, 16/20) (MZSS, 2018) i Pravilnikom o parametrima sukladnosti, metodama analize, monitoringu i planovima sigurnosti vode za ljudsku potrošnju te načinu

vođenja registra pravnih osoba koje obavljaju djelatnosti javne vodoopskrbe objavljenom u Narodnim novinama (NN 125/17). Vode zagađene industrijskim otpadom mogu imati nisku pH - vrijednost dok prirodne vode imaju pH – vrijednost od 5,5 do 8,6 (Šoljić, 2002) što je bio i slučaj s našim uzorkom ispitivane izvorske vode čija pH- vrijednost, kao što se može vidjeti u tablici, kretala se od 7,27 do 7,73. Najviša vrijednost električne provodnosti bila u listopadu. U proljetnom periodu također su zabilježene najviše koncentracije nitrata, što ukazuje da na kvalitetu vode utječe poljoprivredna aktivnost na tom području. Najviša izmjerena koncentracija nitrata bila je 4,00 mg/l dok je maksimalna dopuštena koncentracija nitrata u pitkoj vodi 50 mg/l. Masene koncentracije klorida tijekom čitave godine također su bile značajno niže od maksimalne dopuštene vrijednosti i kretale su se od 3,85 – 8,05 mg/l. Najviše koncentracije klorida zabilježene su u zimskim mjesecima kada se provodi soljenje lokalnih prometnica. Vrijednost mutnoće bila je najveća u ljetnom periodu i iznosila je 1,82°NTU što je i očekivano s obzirom da je tada protok vode iz izvora najmanji.

Tablica 1. Prikaz vrijednosti dobivenih ispitivanjem uzoraka izvorske vode Belski dol
Table 1. Presentation of values obtained by testing water samples of Belski dol

Datum uzorkovanja	pH	Vodljivost $\mu\text{S}/\text{cm}$	Mutnoća	Nitrati mg/L	Kloridi mg/L
16.01.2021.	7,51	449	0,00	3,55	7,09
05.02.2021.	7,72	457	0,00	3,65	7,25
04.03.2021.	7,35	450	0,00	3,68	8,05
02.04.2021.	7,52	457	0,02	3,91	4,26
07.05.2021.	7,34	456	0,46	3,98	4,07
04.06.2021.	7,27	458	0,67	3,97	3,85
08.07.2021.	7,34	458	1,82	4,00	4,72
13.08.2021.	7,47	452	0,75	3,69	4,83
09.09.2021.	7,60	459	0,67	3,82	4,80
15.10.2021.	7,37	461	0,48	3,66	4,66
12.11.2021.	7,73	459	0,00	3,60	5,23



Slika 5. Grafički prikaz masenih koncentracija nitrata i klorida
Figure 5. Graphic representation of mass concentration of nitrates and chlorides

Zaključci

Izvor Belski dol zbog kakvoće izvorske vode velika je gospodarska i ekološka vrijednost za Varaždinsku županiju, što su i pokazali sami rezultati ovog rada. Uspješnost gospodarenja vodom izvorišta ovisi o njegovom poznavanju, kao i o njegovoj zaštiti. Izvorište Belski dol sa svojih 63 L/s izvorske vode važno je u vodoopskrbi velikog dijela Varaždinske županije pa tako i malog mjesta s početka priče. Upravo iz tog razloga bitne su ovakve mjere razvijanja ekološke svijesti samih građana kroz razne aktivnosti, kako bi se poduzele zaštitne mjere od negativnih utjecaja postojećih cesta. Uspoređujući rezultate mjerenja možemo zaključiti da su prirodne izvorske vode blago lužnate, specifična električna provodnost nije se bitno mijenjala tokom mjeseci. Veća vrijednost masene koncentracije nitrata u proljeće je posljedica poljoprivrednih aktivnosti, odnosno gnojenja, a masena koncentracija klorida veća je zimi zbog soljenja cesta. Mutnoća je ispod maksimalne dozvoljene granice 4 °NTU što ukazuje na malu količinu suspendiranih tvari. Primjenom fizikalno – kemijskih metoda prikupljeni podaci u ovom radu potvrđuju kakvoću izvorske vode Belski dol, ali i svima predstavljaju važan zadatak – smanjiti negativan utjecaj čovjeka na okoliš te zahvaliti izvoru na najbolji mogući način – očuvanjem, njegovanjem i zaštitom.

Literatura

- Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi, Pravilnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za piće, NN 47/2008, **16** (2018).
- Pitinac, N., Pecikozić, Đ. (2016): Priručnik za instrumentalne metode ispitivanja sastavnica okoliša u strukovnim školama, Tehnička i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijek.
- Šoljić, Z., Kaštelan-Macan, M. (2002): Analitička kemija-Volumetrija, HINUS, Zagreb.
- Weihnacht, Z., Rupčić Petelinc, S., Žužek, S. (2009): Praktikum analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb.

Monitoring the water quality of natural source Belski dol

Petra Novak Mlinarić*, Tamara Tkalec-Car

*School of building technology, natural science and mining, Hallerova aleja 3,
42000 Varaždin, Croatia*

**Corresponding author: petra_novak_mlinaric@hotmail.com*

Summary

Nowadays, there is an increasing interest and need for quality water, but at the same time, due to increasingly intensive industrial and agricultural development and the impact of urban environments on the environment, the degradation of quality groundwater is almost inevitable. Unfortunately, the underground waters of Varaždin County are no exception, the special value of which is made up of numerous natural water sources. For this reason, the protection of groundwater should be one of the main prerequisites for the further development of the region and the improvement of the quality of life. The small town of Bela in Varaždin County has its own water supply system built in the 60s of the last century, and the water supplied comes from the natural spring Belski dol. Locals have their own water network, which is located under the county water system. The aim of this work is to monitor the quality of the Belski dol spring water throughout the year and to determine pollution, if any, and to what extent. Investigations of pH, turbidity, electrical conductivity, nitrate and chloride concentration were carried out. It was observed that throughout the year the water has a uniform pH and electrical conductivity value, while the nitrate content is slightly higher during increased agricultural activity, and the chloride concentration is increased in the winter period when the surrounding roads are salted. All parameters throughout the year are at the lower limits according to the Ordinance on the Healthiness of Drinking Water, which tells us that the water from the source of Belski dol is of excellent quality.

Keywords: natural water source, drinking water, nitrates, chlorides

Ispitivanje fizikalno-kemijskih parametara maske za lice od zelene gline

Vanja Perković, Ana Penava, Marko Tomas*

*Katolički školski centar „Don Bosco“, Opća gimnazija, Stjepana Radića b.b.,
 72230 Žepče, Bosna i Hercegovina*

**Dopisni autor: marko.tomas2020@gmail.com*

Sažetak

Cilj rada bio je dobiti proizvod koji ne sadrži štetne kemikalije, a daje blistavost, djeluje hidratacijski, te smiruje crvenilo i upalne procese kože lica. Maska za lice pripremljena za ovu analizu sadrži ventiliranu zelenu glinu, glicerol i prirodne sastojke poput hidrolata lavande, ulja badema i eteričnog ulja čajevca. Zelena glina sadrži prirodne i netretirane nutrijente koji djeluju remineralizirajuće i detoksirajuće te podižu imunitet organizma. Mješanjem lavande i čajevca dobiva se proizvod dobrog antibakterijskog i protuupalnog djelovanja. Kvaliteta ispitivane maske utvrđena je ispitivanjem fizikalno-kemijskih parametara; pH-vrijednost, mjerenje vodljivosti, analiza teksture, određivanje peroksidnog broja po Wheeleru, određivanje vlažnosti standardnom metodom (ISO 665;1991), te recenzijom koju su dali učenici naše škole.

Ključne riječi: maska za lice, zelena glina, peroksidni broj po Wheeleru

Uvod

Maska za lice je jedan od najvažnijih proizvoda kozmetičke industrije. Osnovna namjena maske za lice je pročišćavanje, remineralizacija i hidratacija kože, te eliminirati štetne mikroorganizme s lica. Osim navedenih namjena maske, cilj ovog rada bio je i napraviti prirodnu masku za lice bez štetnih kemikalija.

Prirodna maska za lice koja je bila predmet istraživanja u ovom radu izrađena je od zelene ventilirane gline, hidrolata kadulje, ulja badema i eteričnog ulja čajevca.

Zelena glina je prirodni sastojak mineralnog porijekla nastao dugogodišnjim i sporim razlaganjem vulkanskih stijena. Ono što joj daje specifičnu boju je razloženi biljni materijal, izuzetno je bogata mineralima (magnezij, kalcij, aluminij, fosfor, cink, bakar, a posebno silicijem). Posebnu vrijednost zelena glina ima za lice, zato što ima veliku moć upijanja. To je čini moćnim saveznikom protiv bubuljica i protiv masne kože. Ona izvlači iz pora dubinski sve nečistoće na površinu kože. Zelena glina je poznata i po svom detoksirajućem djelovanju. Molekule zelene gline nose negativni električni naboj, dok toksini i nečistoće (virusi, paraziti, gljive, bakterije itd.) nose pozitivan naboj (Elmore, 2018). Negativno nabijene čestice gline vežu s pozitivno nabijenim česticama toksina i nečistoća. Slijedom toga, glina neutralizira bakterije i druge nečistoće s površine lica. Glicerolova najvažnija uloga jest ovlaživanje maske. Kadulja je biljka nevjerojatno širokog spektra djelovanja. Ima snažno protuupalno,

antivirusno, antibakterijsko i protugljivično djelovanje (Narayanan i sur., 2015). Ljekovita kadulja svojim djelovanjem smiruje i liječi upalu. Sadrži supstance koje ubrzavaju zacjeljivanje rana. Liječi akne, ranice na licu i sprječava naticanje upalnih područja lica. Eterično ulje čajevca ima antiseptičko i antibakterijsko djelovanje te zbog toga pridodaje svježem izgledu kože lica nakon tretiranja s maskom.

Materijali i metode

Zadatak ovog rada bio je napraviti masku za lice od prirodnih sastojaka (Tablica 1), ispitati fizikalno-kemijska svojstva proizvoda i mišljenje korisnika.

Tablica 1. Sastojci za izradu maske za lice
Table 1. Ingredients for making a face mask

Sastojci	<i>m</i> (uzorka) / g
Zelena ventilirana glina, Argital, Italija	120
Hidrolat kadulje, vlastita proizvodnja	60
Glicerol, Mayam, Rumunjska	10
Eterično ulje čajevca, Dietpharm, Hrvatska	4 kapi
Ulje badema, Pharmamed, BIH	10

Prilikom pripreve proizvoda korištene su rukavice, a alkoholom – etanolom 96 %-tnim (Sigma – Aldrich) je dezinficirana radna površinu, posuđe i pribor.

Na analitičkoj vagi (KERN & Sohn GmbH) s odstupanjem od $\pm 0,0001$ udvagani su svi potrebni sastojci koji su zatim pomješani u čaši volumena 500 mL. Nakon homogenizacije smjese, gotova maska prenesena je u odgovarajuću ambalažu (Slika 1).



Slika 1. Maska za lice od zelene gline (izvor autor)
Figure 1. Face mask made of green clay (source author)

Kvaliteta prirodne maske utvrđena je ispitivanjem fizikalno-kemijskih parametara; pH-vrijednost, mjerenje vodljivosti, analiza teksture, određivanje peroksidnog broja po Wheeleru, određivanje vlažnosti standardnom metodom (ISO 665;1991), te recenzijom koju su dali učenici naše škole.

Analiza kemijskih i fizikalnih parametara utvrđena je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek (Republika Hrvatska).

Određivanje udjela vlage (suha tvar)

Ukupan udio vlažnosti je važan pokazatelj kvalitete maske za lice. Za određivanje udjela vlažnosti korištena je standardna ISO 662 metoda iz 2016. godine. Metoda se temelji na isparavanju vode i hlapljivih sastojaka iz smjese zagrijavanjem u sušioniku na 105 °C. Za određivanje ukupne vlažnosti izvršena su tri paralelna mjerenja iz kojih je izračunata srednja vrijednost (Slika 7).

Na analitičkoj vagi s odstupanjem od $\pm 0,0004$ (Slika 2) izvagane su prazne metalne posude sa oznakama 33, 42 i 44. Navedene posude su prethodno osušene i ohlađene u eksikatoru te je u njih približno odvagano 5 g prirodne maske (Tablica 2).



Slika 2. Prikaz vaganja uzorka za određivanje ukupne vlažnosti (izvor autor)
Figure 2. Display of sample weighing to determine total humidity (source author)

Nakon vaganja posude su zagrijavanje u sušioniku 90 minuta na 105 °C nakon čega su ohlađene u eksikatoru do sobne temperature, izvagane (Tablica 3) te ponovno stavljene u sušionik 30 min. Ponovnim hlađenjem i vaganjem ustanovljeno je da nije bilo promjene mase u odnosu na masu iz tablice 3.

Tablica 2. Mase praznih posuda i uzoraka prije sušenja

Table 2. Masses of empty containers and samples before drying

Broj posude	m (posude)/g	m (uzorak)/g
33	41,8129	4,9550
42	41,4218	5,4565
44	38,9663	5,3582

Tablica 3. Mase posuda + uzorak nakon zagrijavanja na 105 °C i 90 min.

Table 3. Masses of containers + sample after heating at 105 °C and 90 min.

Broj posude	m (posuda + uzorak)/g
33	44,7213
42	44,6169
44	42,1186

Nakon provedenog postupka, udio vlage u uzorku izračunat je prema izrazu (1):

$$\% \text{ vode} = (m_1 - m_2) / (m_1 - m_0) \times 100 \quad (1)$$

gdje je:

m_0 – masa prazne posude (g)

m_1 – masa posude sa uzorkom prije sušenja (g)

m_2 – masa posude sa uzorkom nakon sušenja (g)

Određivanje peroksidnog broja

Peroksidni broj je pokazatelj stupnja oksidacijskog kvarenja biljnih ulja. U radu, Pbr je određen standardnom metodom ISO 3960 iz 2007 ili metodom po Wheeleru (Slika 3). Postupak se provodi na način da se uzorak ulja otopi u smjesi ledene octene kiseline i kloroforma, promiješa i doda mu se kalijev jodid. Točno jednu minutu uzorak se miješa rukom, a zatim se razrijedi prethodno prokuhanom i ohlađenom destiliranom vodom, nakon čega se dodaje otopina škroba koja služi kao indikator. Djelovanjem peroksida oslobađa se jod iz otopine kalijevog jodida koji se zatim određuje titracijom s natrij-tiosulatom uz škrob kao indikator. Rezultat je izražen kao broj milimola aktivnog kisika koji potječe od nastalog peroksida prisutnih u 1 kg ulja (mmol O₂/kg). Pbr je izračunat prema izrazu (2):

$$\text{Pbr} = (V_1 - V_0) \times 5/m \quad (2)$$

gdje je:

V_1 – volumen otopine Na₂S₂O₃ (0,01 mol/L) utrošen za titraciju uzorka (mL)

V_0 – volumen otopine Na₂S₂O₃ (0,01 mol/L) utrošen za titraciju slijepo probe (mL)

m – masa uzorka ulja (g)



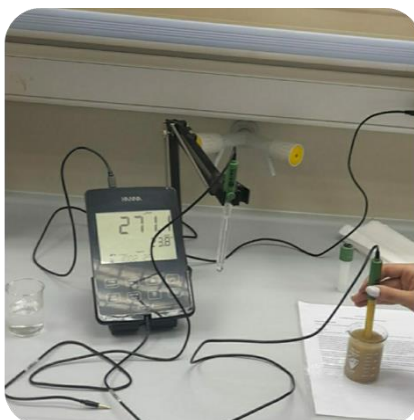
Slika 3. Određivanje Pbr po Wheeleru (izvor autor)
Figure 3. Determination of Pbr according to Wheeler (source author)

Određivanje pH vrijednosti i provodljivosti

Uzorak za određivanje pH vrijednosti i provodljivosti je pripremljen na način da je izvagana masa ispitivane tvari (prirodna maska za lice – 1,98 g) i otopljena u 200 mL destilirane vode na sobnoj temperaturi ($t = 24\text{ }^{\circ}\text{C}$). pH je određena pomoću pH-metra (Slika 4), a provodljivost pomoću konduktometra (Slika 5).



Slika 4. Određivanje pH-vrijednosti (izvor autor)
Figure 4. Determination of pH value (source author)



Slika 5. Određivanje provodljivosti (izvor autor)
Figure 5. Determination of conductivity (source author)

Metoda određivanja teksture

Tekstura je određena korištenjem TTC nastavka za određivanje mazivosti uz upotrebu analizatora teksture (TA.XT Plus, Stable Micro System). Uređaj je kalibriran s 5 kg teškim utegom za mjerenje sile. Brzina mjerenja iznosila je 3 mm/s a visina 25 mm. U nastavak za teksturu konusnog oblika doziran je uzorak i postavljen na analiziranje. Uzorak je analiziran prodiranjem drugog nastavka konusnog oblika u postavljenu uzorak (Slika 6). Spomenutim uređajem određena je čvrstoća (maksimalna sila na grafu ovisnosti sile o vremenu) odnosno mazivost (otpor smicanju, određen površinom ispod krivulje).



Slika 6. Prikaz prodiranja nastavka za teksturu konusnog oblika (izvor autor)
Figure 6. View of the penetration of the conical texture attachment (source author)

Izvršena su tri paralelna mjerenja (Tablica 4) iz kojih je izračunata srednja vrijednost.

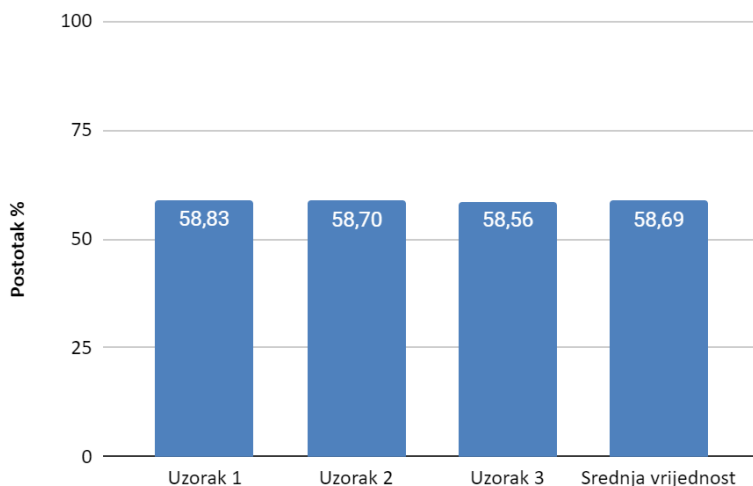
Tablica 4. Prikaz mjerenja čvrstoće uzorka i otpora smicanju.

Table 4. Presentation of measurements of sample strength and shear resistance.

Uzorak	Čvrstoća (kg)	Otpor smicanju –mazivost (g*s)
Uzorak 1	0,686	0,713
Uzorak 2	0,775	0,809
Uzorak 3	0,803	0,820

Rezultati i rasprava

Ukupni udio vlažnosti izračunat je na osnovu izmjerenih podataka iz tablice 2 i tablice 3 i prema izrazu (1). Rezultati su izraženi u postocima i srednjom vrijednosti (Slika 7).

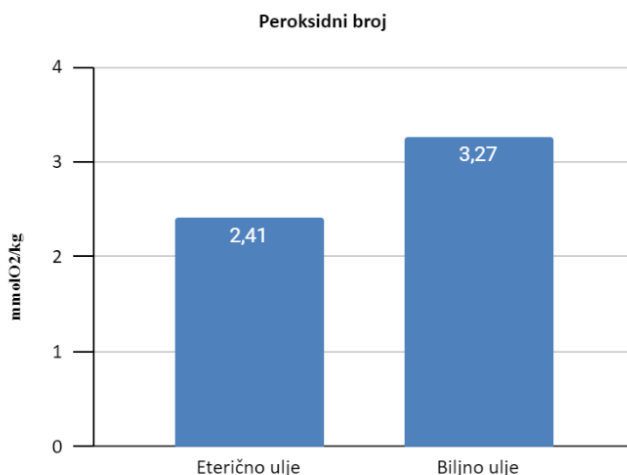


Slika 7. Postotak ukupnog udjela vlažnosti u prirodnoj maski

Figure 7. Percentage of the total share of humidity in the natural mask

Iz dobivenih vrijednosti može se zaključiti da je ukupni udio vlage u ispitivanoj maski dobar i da maska pokazuje dobra hidratacijska svojstva.

Peroksidni broj je određivan prirodnom ulju (ulje badema) i eteričnom ulju (eterično ulje čajevca) prema već spomenutoj metodi. Izvršena su tri uzastopna mjerenja iz kojih je izračunata srednja vrijednost (Slika 8), a rezultati su izraženi u mmol O₂/kg.



Slika 8. Usporedni prikaz srednje vrijednosti peroksidnog broja eteričnog ulja čajevca i ulja badema

Figure 8. Comparative display of the mean value of the peroxide number of tea tree essential oil and almond oil

Na osnovu dobivenih vrijednosti (Slika 8) može se zaključiti da su ispitivana ulja dobre kakvoće s tim da biljno ulje (ulje badema) pokazuje veći stupanj oksidacije u odnosu na ispitivano eterično ulje.

Uz pomoć pH metra prikazano na slici 4 je izmjerena pH – vrijednost maski za lice koja iznosi 8,6 što znači da je prirodna maska za lice blago alkalna. Ispitivana maska za lice pokazuje i blagu sposobnost provođenja električne struje koja je određena konduktometrom (Slika 5) i iznosi $\sigma = 271,4$ mS/cm.

Prirodnoj maski za lice određena je i tekstura. Na osnovu podataka (Tablica 4) izračunata je srednja vrijednost i standardna odstupanja (Tablica 5). S obzirom na dobivene vrijednosti tekstura ispitivane maske je plastična, nalik na gel.

Tablica 5. Srednje vrijednosti teksture prirodne maske za lice od zelene gline

Table 5. Mean texture values of natural green clay face mask

Uzorak	Čvrstoća (kg)	Otpor smicanju –mazivost (g*s)
Maska za lice	$0,755 \pm 0,061$	$0,781 \pm 0,059$

Recenzija korisnika

Zadnji dio istraživačkog rada bio je recenzija korisnika, odnosno potrošača (Slika 9). Za svaki proizvod, pa tako i za prirodnu masku za lice, najvažniji kriterij je upravo ocjena korisnika i njihovo mišljenje o korištenom proizvodu. U anketi od pet pitanja sudjelovalo je 40 ispitanika te je dobiveno općenito mišljenje o ovoj maski za lice. Ispitanici su bili uglavnom učenici naše škole.

Dobiveni su sljedeći rezultati:

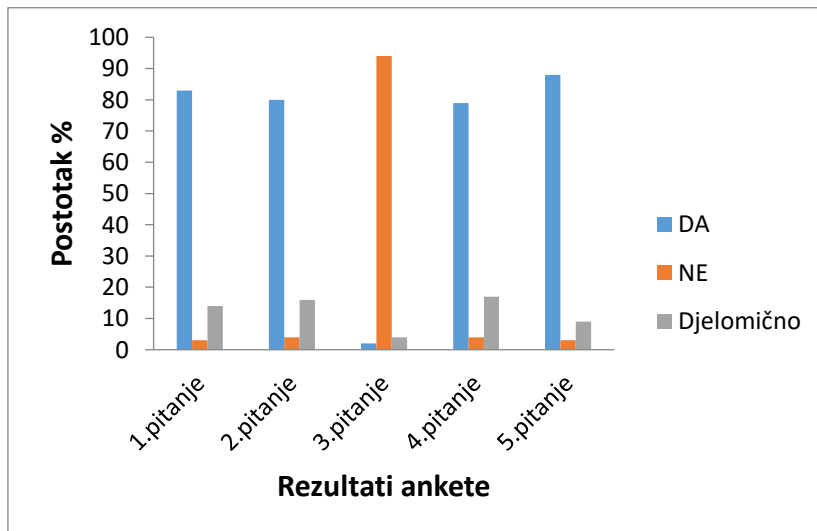
1. pitanje: *Jeste li zadovoljni proizvodom i rezultatima nakon korištenja proizvoda?*
 83 % ispitanika odgovorilo je sa *Da*, 3 % sa *NE* i 14 % sa *djelomično*.

2. pitanje: *Je li koža nakon korištenja proizvoda bila hidratizirana?*
 80 % ispitanika je odgovorilo sa *Da*, 4 % sa *NE* i 16 % sa *djelomično*.

3. pitanje: *Je li se nakon korištenja proizvoda pojavilo crvenilo na licu?*
 94 % ispitanika je odgovorilo sa *NE*, 2 % sa *Da* i 4 % sa *djelomično*.

4. pitanje: *Jeste li zadovoljni teksturom proizvoda?*
 79 % ispitanika je odgovorilo sa *Da*, 4 % sa *NE* i 17 % sa *djelomično*.

5. pitanje: *Biste li preporučili ovaj proizvod?*
 88 % ispitanika je odgovorilo sa *Da*, 3 % sa *NE* i 9 % sa *djelomično*.



Slika 9. Rezultati ankete
Figure 9. Survey results

Zaključci

Na temelju rezultata dobivenih ispitivanjem kvalitete maske za lice od zelene gline može se zaključiti:

- Maska pokazuje zadovoljavajuće hidratacijsko djelovanje, blagu alkalnost i slabu provodljivost električne struje.
- Analizom peroksidnog broja eteričnog ulja čajevca i prirodnog ulja badema zaključuje se da su ispitivana ulja korištena u pripremi maske dobrih svojstava i ispravni za upotrebu.
- Metodom određivanja teksture određeno je da je maska plastična, teksture nalik gelu.
- Rezultati ispitivanja korisnika proizvoda govore kako je većina ispitanika zadovoljna i planira i dalje koristiti ispitivanu masku za lice.
- Ispitivanjem korisnika može se zaključiti kako su ispitanici zainteresirani i žele koristiti i druge prirodne proizvode, koji su svakako zdravija i kvalitetnija alternativa proizvodima koji se inače kupuju i koriste na svakodnevnoj bazi.

Literatura

- Abramović H, Abram V (2005): Physico-Chemical Properties, Composition and Oxidative Stability of Camelina sativa Oil, *Food Technology and Biotechnology* 43 (1), 63–70.
- Burt, S. (2004): Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, *Int. J. Food Microbiol.* 94 (3), 223–253.
- Čorbo S (2008): Tehnologija ulja i masti. Univerziteti udžbenik. Sarajevo, str. 36.
- Deuel HJ (1951): The Lipids. Interscience publishers, New York, str. 10.
- Dimić E, Turkulov J (2000): Kontrola kvaliteta u tehnologiji jestivih ulja. Tehnološki fakultet, Novi Sad, 32–33.
- Elmore, L. (2018): Bentonite clay the secret to healthy gums and teeth, URL: <https://lindseyelmore.com/bentonite-clay-the-secret-to-healthy-gums-and-teeth/> (Pristupljeno 06.09. 2022.).
- Hammer, K. A., Carson, C. F., Riley, T. V., Nielsen, J. B. (2006): A review of the toxicity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil, *Food Chem. Toxicol.* 44, 616 – 625.
- Harris, R. (2002): Progress with superficial mycoses using essential oils, *Int. J. Aromather.* 12, 83–91.
- Herenda, F. (2019): Prirodna kozmetika, Panacea, Zadar. Kuzman, I., Schönwald, S. (2000): Infektologija, Medicinska naklada, Zagreb.
- Moslavac T (2015): Tehnologija ulja i masti. Interna skripta. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
- Vučetin N (2004): Neobavezne informacije na komercijalnoj ambalaži. Info pak.

Testing of physico-chemical parameters of green clay face mask

Vanja Perković, Ana Penava, Marko Tomas*

*Catholic School Center "Don Bosco", General Gymnasium, Stjepana Radića b.b.,
72230 Žepče, Bosnia and Herzegovina*

**Corresponding author: marko.tomas2020@gmail.com*

Summary

The goal of the work was to obtain a product that does not contain harmful chemicals, but gives radiance, has a moisturizing effect, and calms redness and inflammatory processes of the facial skin. The face mask prepared for this analysis contains ventilated green clay, glycerol and natural ingredients such as lavender hydrolate, almond oil and tea tree essential oil. Green clay contains natural and untreated nutrients that have a remineralizing and detoxifying effect and increase the body's immunity. By mixing lavender and tea tree, a product with good antibacterial and anti-inflammatory effects is obtained. The quality of the tested mask was determined by testing the physical and chemical parameters; pH-value, conductivity measurement, texture analysis, determination of the peroxide number according to Wheeler, determination of humidity using the standard method (ISO 665; 1991), and a review given by the students of our school.

Keywords: face mask, green clay, Wheeler peroxide number

8

KAZALO AUTORA *AUTHOR INDEX*



A		F	
Abramović, Tanja	172	Fuka, Mirna	188
Ambrozić, Korana	210	G	
Apalović, Uršula	1	Galant, Mirjana	210
Avdić, Ajla	180	Glavaš, Zoran	1, 27
Avdić, Gordan	180	Grgas, Dijana	210
B		Grgurević, Karlo	220
Babić, Hrvoje	242	Grmuša, Luana	9
Balić, Tomislav	112	H	
Bašić, Anita	122	Habuda-Stanić, Mirna	242
Bates, Irena	199, 233	Herceg, Ana	122
Benkotić, Snježana	242	Herceg, Srečko	98
Bezic, Danijela	242	J	
Biškup, Marija	210	Jajčinović, Magdalena	20
Blažević, Ivica	9	Jakoplić, Ana	188
Bolf, Nenad	98	Josić, Karlo	274
Borović, Teona Teodora	76	Jukić, Ante	134
C		Jurić, Slaven	188
Carek, Andreja	20	K	
Ć		Kefurt, Lucija	258
Ćosić, Ivana	310	Kinart, Zdzisław	76
D		Kolarić, Dario	242
Damjanović, Ivan	242	Korica, Milenko	112
Delić, Žana	164	Košutić, Ivor	55
Deže, Denis	298	Kralj, Marika	242
Domanovac, Tomislav	146	Krznarić Došen, Ines	155
Đ		Kučić Grgić, Dajana	220, 258, 274, 283
Đulović, Azra	9	Kukovec, Boris-Marko	65
E		Kusur, Amela	180
Eberhard, Mirta	242	Kuzmanić, Nenad	122
Ergović Ravančić, Maja	155, 172	L	
		Landeka Dragičević, Tibela	210
		Leskovac, Mirela	283

M		Roje, Vibor	55
Mamić, Antonio	310	Rudolf, Maja	199, 233
Marčetić, Helena	155, 172	Ružkan, Ines	242
Marić, Martina	27	S	
Marijanović, Zvonimir	164	Selimović, Amel	180
Marković, Kale	310	Sigurnjak Bureš, Marija	188
Marković, Tanja	242	Slokar Benić, Ljerka	20
Martić, Ines	36	Sokol, Vesna	65
Maslov Bandić, Luna	188	Stojmilović, Ivana	146
Matijević, Bojan	310	Sučić, Hrvoje	242
Miličević, Dijana	180	Svilović, Sandra	122
Miloloža, Martina	220, 274	Š	
N		Šabić Runjavec, Monika	146
Novak Mlinarić, Petra	321	Šarolić, Mladenka	164
O		Škrabal, Svjetlana	155, 172
Obradović, Valentina	155, 172	Špoljarić, Andrea	134
Očelić Bulatović, Vesna	220, 258, 274, 283	Štefanac, Dorotea	310
Ozimec, Siniša	298	Štefanac, Tea	210
P		Štrkalj, Anita	1, 20, 27, 285
Papović, Snežana	76	Šušak, Sara	283
Pavlović, Željana	164	Šušić, Zdenka	242
Pehar, Ivan	76	T	
Penava, Ana	327	Tanović, Martina	180
Perković, Irena	155	Tkalec-Car, Tamara	321
Perković, Vanja	327	Tokić, Mirna	242
Petric Maretić, Katja	199, 233	Tomas, Marko	327
Petrovicky Šveiger, Barbara	242	Tomaš, Renato	76
Plazonić, Ivana	199, 233	Toth, Leontina	242
Prlić, Dragan	298	Trtinjak, Martina	146
R		Turić, Nataša	242
Radić Seleš, Valentina	199, 233	U	
Radonić, Ani	164	Ujević Andrijić, Željka	36, 98
Radoš, Ante	65		
Rimac, Nikola	36		

V	
Vidović, Elvira	134
Vitas, Nika	310
Vlahoviček Kahlina, Kristina	188
Vraneš, Milan	76
Vuković Domanovac, Marija	146

Z	
Zajkić, Hana	112
Ž	
Žiža, Jasminka	310



SPONZORI, DONATOR I IZLAGAČI
SPONSORS, DONORS, AND EXHIBITORS



Srebrni sponzori | Silver Sponsors



Brončani sponzori | Bronze Sponsors



Sponzori, donatori, izlagači | Sponsors, Donors, Exhibitors



Srebrni sponzori | *Silver sponsors*





OSJETI ČISTU SNAGU

INA Class Plus goriva



**MAKSIMALNA
SNAGA**



**SMANJENA
POTROŠNJA**



**SNAŽNIJI
MOTOR**



**BOLJE
PERFORMANSE**



**ČISTI
MOTOR**



Čitavo stoljeće
posvećeni brizi
za zdravlje.



Naša kompanija od 1996. godine proizvodi HLOOROGEN®, tehnološku opremu za proizvodnju 1% rastvora natrijum hipohlorita na mestu potrošnje, a od 2012. godine proizvodi OksiHLOOROGEN® tehnološku opremu za proizvodnju mešovitog dezinfektanta na mestu potrošnje koncentracije 0,4% (0,35% natrijum hipohlorita i 0,04% hlor dioksida).

Primarni korisnici ove opreme su javni vodovodi (za dezinfekciju pijaće vode), prehrambena industrija (dezinfekcija vode u procesu proizvodnje hrane), privatni bazeni, banje i javna kupališta (dezinfekcija vode za kupanje u bazenima).



Sigma d.o.o proizvodi dezinfekciona sredstva na bazi natrijum hipohlorita/aktivnog hlora sa dokazanim delovanjem na različite vrste bakterija, gljivica i virusa. Biocidni proizvodi iz porodica Aqualor H imaju primenu za dezinfekciju ruku, različitih radnih i podnih površina u zdravstvenim ustanovama, domaćinstvu, prehrambenoj industriji, veterinarskim ustanovama, ugostiteljstvu, hotelijarstvu, teretanama, spa i wellness centrima, u obrazovnim ustanovama i drugim javnim prostorima u kojima je neophodno održavati higijenu radi zaštite zdravlja ljudi i životinja.

Sigma d.o.o.

Ivana Milutinovića 77, 25220 Crvenka, Srbija

+381 25 731 805

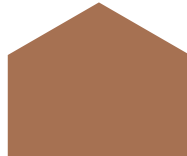
www.hlorogen.com

www.minutzazdravlje.com

office@hlorogen.com



Bronačni sponzori | *Bronze sponsors*



25 godina Shimadzu inovacija u Hrvatskoj



Svojom tehnologijom, Shimadzu u Hrvatskoj već 25 godina omogućuje korisnicima sofisticirana rješenja za unaprijeđenje i zaštitu zdravlja i života ljudi, ujedno podupirući zaštitu okoliša na globalnoj razini.

Sustavi za plinsku kromatografiju (GC)

osiguravaju pouzdanu i osjetljivu analizu hlapljivih spojeva sadržanih u uzorku.



Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrometrijom.



Spektrofotometri mjere intenzitet svjetlosti koju apsorbiraju ili emitiraju kemijske tvari.



Analizatori ukupnog organskog ugljika (TOC) mjere ukupnu količinu organskog ugljika u vodi, plinovima i čvrstim tvarima. Zadovoljavaju raznolik raspon potreba u područjima kao što su istraživanje okoliša, kontrola kvalitete i upravljanje procesima.

Sustavi za plinsku kromatografiju - masenu spektrometriju (GC/MS) omogućuju brzu identifikaciju nepoznatih komponenti i preciznu kvantitativnu analizu, čak i za komponente u tragovima.



Sustavi za visoko učinkovitu tekućinsku kromatografiju (HPLC) podržavaju širok raspon aplikacija, uključujući analizu hrane, lijekova te uzoraka iz okoliša.



Sustavi za tekućinsku kromatografiju (LC) uspješno razdvajaju tvari na osnovi razmjesta između čvrste stacionarne faze i tekuće mobilne faze.



Shimadzu d.o.o.
Zavrtnica 17,
Zagreb, Hrvatska
tel. +385 1 6185 777
shimadzu@shimadzu.hr



Xellia Pharmaceuticals is a specialty pharmaceutical company focused on providing important anti-infective treatments against serious and often life-threatening infections. Our anti-infective treatments are generics that combat serious bacterial and antibiotic resistant infections as well as certain fungal diseases. We are a world leader in the development, manufacturing and supply of fermented anti-infectives sold as active pharmaceutical ingredients and finished dosage forms to key pharmaceutical industry companies. Headquartered in Copenhagen, Denmark and owned by Novo Holdings A/S, Xellia Pharmaceuticals has more than 1500 employees globally. From state-of-the-art manufacturing sites in the U.S., China, Denmark and Hungary to R&D sites in Norway and Croatia; Xellia Pharmaceuticals excels within innovative product development to deliver high quality products to its customers.

Our product portfolio of anti-bacterial and anti-fungal products used for the treatment of severe infections, including infections caused by multi-resistant bacteria and fungi, is the foundation for our growth strategy within the antibiotics sector. Xellia is the leading supplier of important anti-infectives Vancomycin and Colistimethate Sodium (CMS). Our success and strong market position is built on more than 100 years experience in the pharmaceutical industry. Xellia Pharmaceuticals' focus its R&D investments within inhalable and injectable product technologies as we are committed to researching solutions, which not only improve patients' quality of life, but will also save lives. Based on our long-term expertise, we bring value for our stakeholders and signify a patient-centric mindset through an embedded corporate motivation of integrating science and innovation to save lives.



xellia.com



xellia
PHARMACEUTICALS

www.xellia.com



Sponzori, donatori, izlagači | Sponsors, donors, exhibitors



ZANESLJIV
LABORATORIJSKI
PARTNER

TRUSTED LAB
PARTNER

BIA d.o.o. (Biotechnology, Instrumentation, Analysis)

Već više od 30 godina distribuiramo vodeće svjetske proizvođače kao što su:

- Advion Interchim Scientific (flash i preparativna kromatografija)
- Distek (dissolution oprema, BIONe Single-Use Bioreactor (SUB))
- Knauer (analitička, preparativnai SMB kromatografija, FPLC, LNP)
- Infors HT (inkubatorski shakeri, bioreaktori)
- Radleys (oprema za kemijsku sintezu)
- SP Genevac

i mnogo više..... potraži na www.bia.si;
sales@bia.si; 00385916011720



IZDAVAČI | PUBLISHERS

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Faculty of Food Tehnology Osijek

Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa
Croatian Society of Chemical Engineers

Osijek i Zagreb, 2023.