

KONCENTRACIJE TEŠKIH METALA TIJEKOM PRERADE VOSKA

Klobučar, Lidija

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:565719>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

Lidija Klobučar

Koncentracije teških metala tijekom prerade voska

Diplomski rad

Zagreb, 2023.

Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet
Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela

Predstojnik: doc. dr. sc. Krešimir Matanović

Mentorice: prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger
dr. sc. Nina Bilandžić

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. prof. dr. sc. Andreja Prevendar-Crnić
2. dr. sc. Nina Bilandžić
3. prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger
4. doc. dr. sc. Krešimir Matanović (zamjena)

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Tlak Gajger te dr. sc. Nine Bilandžić u Hrvatskom veterinarskom institutu.

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja	3
2.1. Život pčelinje zajednice	3
2.2. Proizvodnja voska	7
2.3. Prerada voska	8
2.4. Primjena pčelinjeg voska	11
2.5. Onečišćenje okoliša teškim metalima	11
2.6. Vosak kao bioindikator okolišnog onečišćenja	13
2.7. Teški metali	13
3. Materijal i metode	17
3.1. Prikupljanje uzoraka voska	17
3.2. Priprema uzoraka za analizu	18
3.3. Metode određivanja metala	19
3.3.1. Određivanje žive izravnim spaljivanjem na živinom analizatoru	19
3.3.2. Određivanje metala primjenom induktivno spregnute plazme – masene spektrometrije (ICP-MS)	20
3.4. Statistička obrada podataka	22
4. Rezultati	24
5. Rasprava	26
6. Zaključci	28
7. Literatura	29
8. Sažetak	33
9. Summary	34
10. Životopis	35

ZAHVALE

Zahvaljujem mentoricama, prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger i dr. sc. Nini Bilandžić na pruženoj pomoći i savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala prijateljima i kolegama s kojima je studiranje bilo ljepše i ugodnije.

Veliko hvala obitelji na podršci, razumijevanju i olakšavanju studentskih dana.

1. Uvod

Vosak je pravi pčelinji proizvod kojeg pčele radilice izlučuju iz četiri para voskovnih žlijezda smještenih na zatku. One su najrazvijenije kod radilica starih 12 do 18 dana čiji je glavni zadatak gradnja saća. Radilice u saće pohranjuju nektar, med i pelud, a matica jaja iz kojih se razvija leglo, pa stoga saće ima značajnu ulogu u funkcioniranju cijele pčelinje zajednice. Boja pčelinjeg saća ovisi o duljini njegove uporabe u košnici. Starenjem saća boja mu se iz žute mijenja do smeđecrvene (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.) pa sve do crne boje.

Vosak je složena smjesa estera viših masnih kiselina, ugljikohidrata, proteina, alkohola i drugih spojeva. Takva specifična kemijska struktura omogućuje taloženje raznih štetnih spojeva iz okoliša, uključujući i teške metale, koje pčele unose tijekom uobičajene letačke aktivnosti. Upravo zbog činjenice da se vosak kontinuirano prerađuje, predstavlja idealan materijal za praćenje i kontrolu onečišćenja okoliša.

Najvažniji izvor teških metala u prirodi predstavljaju onečišćeni zrak, voda i tlo. Onečišćenje okoliša teškim metalima najčešće je posljedica antropogenih aktivnosti, industrije i prometovanja. Elementi poput bakra, cinka, mangana, željeza, kobalta i selena predstavljaju mikroelemente i toksični su u velikim količinama dok su kadmij, olovo, živa, nikal i arsen elementi u tragovima i toksični su već i pri niskim koncentracijama. Pčele, prilikom prikupljanja nektara i peludi s cvjetova biljaka, u zajednicu unose i te toksične spojeve koji mogu imati značajan negativan utjecaj na ponašanje zajednice i razvoj pčelinjeg legla. Onečišćeni pčelinji proizvodi potom ulaze u lanac ljudske prehrane i osim zdravlja pčela, posljedično mogu ugroziti i zdravlje ljudi (TLAK GAJGER i sur., 2016.).

U svakodnevnoj pčelarskoj praksi, pčelari skupljaju staro saće te ga odnose na preradu koja uključuje procese pretapanja, homogenizacije, sterilizacije i taloženja. Taloženjem voska nečistoće se talože na dno posude pa se taj sloj ne koristi za izradu novih satnih osnova niti kolotova voska nego se uklanja iz prerade. Na taj se način nastoji dobiti što čišći vosak koji će ponovno biti upotrijebljen za proizvodnju satnih osnova (TLAK GAJGER i sur., 2016.).

Od svih pčelinjih proizvoda, vosak je do sada najmanje kvalitativno i kvantitativno pretraživan na prisustvo teških metala. Zbog toga, izuzetno je važno provesti detaljne

analize voska s različitih pčelinjaka kako bi se utvrdio stupanj onečišćenja određenim spojevima te njihov mogući štetni utjecaj na zdravlje pčelinje zajednice.

U ovom radu analizirane su koncentracije arsena, kadmija, olova i žive tijekom prerade voska u satne osnove. Korištena je metoda induktivno spregnute plazme s masenom detekcijom (ICP-MS). Cilj je bio utvrditi prisutnost navedenih metala u različitim fazama prerade voska te koliko je faza produljene sedimentacije i hlađenja učinkovita u smanjenju koncentracije teških metala u konačnom proizvodu.

2. Pregled rezultata dosadašnjih istraživanja

2.1. Život pčelinje zajednice

Medonosna pčela (*Apis mellifera*) društveni je kukac koji živi u višegodišnjoj zajednici koja se sastoji od nekoliko desetaka tisuća članova. Svaka pčela u zajednici, ovisno o dobi, obavlja određeni zadatak u košnici (TOMAŠEC, 1949.).

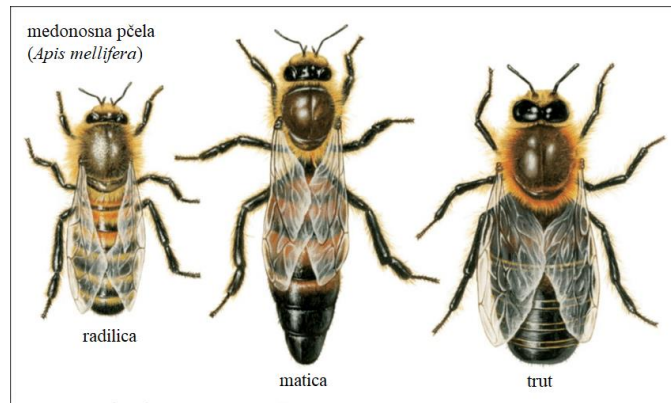
Davno, dok još nije postojalo pčelarstvo kakvo danas poznajemo, pčele su svoje nastambe gradile u prirodi. One su snalažljive i prilagodljive pa su divlja gnijezda gradile na raznim mjestima, a najviše su preferirale zaklonjena, neprimjetna i tamna mjesta. Najčešće su to bile duplje raznih stabala, ponajviše javora, hrasta i jasena (Slika 1.). U tim je gnijezdima leglo bilo odvojeno od hrane. Danas, u standardnim košnicama tijekom aktivnog unosa nektara, matičnom rešetkom, razdvajamo plodište i medište. Tama je u pčelinjem gnijezdu potrebna zbog učinkovitije proizvodnje voska jer ga pčele izložene svijetlu luče manje što rezultira sporijom gradnjom saća i slabijim razvojem pčelinje zajednice (CARON i CONNOR, 2013.).



Slika 1. Gnijezdo slobodno živućih pčela u duplji drveta, (<https://peacebeefarm.blogspot.com/2011/03/natural-honey-bee-nest.html?m=1>).

Svaka pčelinja zajednica sastoji se od jedne matice, nekoliko stotina trutova i nekoliko desetaka tisuća radilica. Osim što svatko od njih ima drugačiju ulogu u zajednici, razlikuju se morfoloijom tijela (Slika 2). Matica je jedina spolno zrela ženka u zajednici čija je glavna i jedina uloga polaganje jaja u stanice saća. Za razliku od radilica, matica zbog razvijenosti spolnog sustava ima zadak koji je duži od krila. Osim toga, nema voskovne ni mliječne žlijezde, a rilce i čeljusti slabije su joj razvijeni. Od svih članova zajednice ona

živi najduže, čak tri do četiri godine. Radilice su spolno nezrele ženke. Zadak je približno iste duljine kao krila. S obzirom na mnoštvo različitih zadataka koje imaju u košnici i izvan nje, dobro su im razvijeni organi za gradnju saća, hranjenje legla, sakupljanje hrane te žalac kao obrambeni aparat. Radilice ljeti žive oko 40 dana, a zimi nekoliko hladnih mjeseci. Trutovi su spolno zreli mužjaci i zadatak im je parenje s maticom. Imaju zdepasto tijelo i veći su od radilica. S obzirom da nemaju nikakvu ulogu u zajednici tijekom zime, radilice ih prije zimskog mirovanja izbacuju iz košnice i oni ugibaju (ENGELS, 1990.).



Slika 2. Morfološke razlike radilice, matice i truta,

(https://www.researchgate.net/figure/Worker-Queen-and-Drone-of-the-European-honey-bee-5_fig2_309195367).

Razvoj legla započinje polaganjem jaja matice u stanice saća (Slika 3.). Stanice saća mogu biti radilačke i trutovske. Radilačkih je stanica više, a trutovske su veće. Ovisno u koje od njih matica položi jaja, kao i o tome da li su oplodena ili neoplođena, razvit će se radilice ili trutovi. Matice se razvijaju iz posebnih stanica koje nazivamo matičnjaci, a radilice ih grade samo onda kad u zajednici postoji potreba za novom maticom. Prva tri dana razvoja svakog člana zajednice je podjednako, a kasnije postoje određene razlike, prvenstveno u režimu hranjenja ličinki pojedinog člana zajednice. Tri dana nakon polaganja jajeta razvija se savijena ličinka koju pčele hraniteljice prva tri dana hrane isključivo s mliječi koja se stvara u njihovim mliječnim žlijezdama, a kasnije dodaju pelud i med. S obzirom da i matica i radilice nastaju iz oplodjenog jajeta (trutovi se razvijaju iz neoplođenih jaja), koja će se od njih razviti ovisi o prehrani ličinke u ovom stadiju. Nastave li hraniteljice ličinku hraniti samo i isključivo matičnom mliječi (koja je bogata bjelančevinama i omogućava potpuni razvoj spolnog sustava), pregrade stanicu u matičnjak, razvit će se matica. Sljedeći stadij razvoja nazivamo ispružena ličinka. Tada se ličinka prestane hraniti i radilice stanicu saća pokrivaju voštanim poklopcem. Ovisno o razvoju pojedinog člana

zajednice, ispruženoj ličinki potrebno je dva do četiri dana da postane kukuljica. Potpuna preobrazba završava ovim stadijem koji kod matice traje šest, a kod radilica i trutova deset dana. Mlada pčela radilica pregriza poklopac svoje stanice, izlazi iz nje te započinje s aktivnostima u košnici. Razvoj matice ukupno traje 16 dana, radilice 21, a truta 24 dana (VIDAL-NAQUET, 2015.).



Slika 3. Razvoj pčele radilice,

(<https://onlinesciencenotes.com/life-cycle-honey-bee-uses-honey/>).

Mlada radilica prvih pet dana života obavlja poslove čišćenja stanica saća kako bi bile spremne za polaganje novih jaja. U dobi pet do dvanaest dana postaje pčela hraniteljica koja brine o prehrani legla. Mlade hraniteljice, starosti pet do osam dana, hrane ličinke starije od tri dana medom i peludi. Mlade ličinke mliječ dobivaju od starijih hraniteljica kojima su tada razvijene mliječne žlijezde. S dvanaest dana starosti razvijene su voskovne žlijezde radilice pa sve do dobi 18 dana izlučuju vosak i grade saće. Osim tih uloga, radilice u košnici obavljaju i druge zadatke poput spremanja hrane koju donose skupljačice, čišćenja košnice i prerade nektara u med. Od 18. dana starosti započinje njihova stražarska služba koja traje tri dana. Tada im je glavni zadatak obraniti košnicu od drugih kukaca, čovjeka, ali i pčela iz drugih košnica. U tom razdoblju obavljaju i orijentacijske letove kako bi s tri tjedna starosti bile potpuno spremne i upoznate s okolinom za posao skupljačica koji će obavljati do kraja života (HAMMER, 1995.).

Glavni je zadatak skupljačica sakupljanje nektara, peluda i vode. Pelud do košnice prenose u košaricama koje se nalaze na zadnjem paru nogu, a nektar i vodu rilcem usisavaju u medni mjehur (Slika 4.). Ako je paša dobra radilice će letjeti oko tri kilometra oko pčelinjaka, a po potrebi i mnogo dalje. Osim nektara i peluda, skupljačice prikupljaju i propolis koji od njih preuzimaju kućne pčele i koriste ga za lijepljenje svih pukotina u

košnici. Ono što je posebno zanimljivo u ponašanju skupljačica specifična je signalizacija koja drugim skupljačicama daje informacije o tome gdje se u odnosu na košnicu nalazi paša, a nazivamo ju pčelinjim plesom. Postoje plesovi različitih intenziteta, a svaki od njih drugim radilicama daje detaljne informacije o udaljenosti i smjeru prema bogatom izvoru prirodne hrane (VON FRISCH, 2016.).



Slika 4. Pčela skupljačica tijekom prikupljanja hrane.

Značaj pčela skupljačica nije samo usko vezan uz prehranu pčelinje zajednice nego je puno širi zbog izuzetno važnog procesa oprašivanja koji istodobno obavljaju. Od svih kukaca najveću ulogu u oprašivanju imaju upravo medonosne pčele. Oprašivanje je proces prenošenja peluda s prašnika na njušku tučka što je preduvjet za oplodnju te kasniji razvoj ploda (LAKTIĆ i ŠEKULJA, 2008.). Oprašivanje je posebno važno kod voćki i sjemenskog bilja. Ono što medonosne pčele čini dobrim oprašivačima činjenica je da pčela posjećuje uvijek istu vrstu cvjetova, sve dok ta biljka cvate. Također, u košnicama može se prevoziti na poljoprivredne površine prema potrebama. Osim toga, dlakavost pčela pospješuje prijenos peludi. Dobra i uspješna oplodnja povećava količinu i kakvoću plodova što nas dovodi do zaključka da je život bez pčela praktički nezamisliv (TLAK GAJGER i sur., 2016.).

Pčele skupljačice prilikom prikupljanja hrane i vode dolaze i u kontakt s česticama koje se nalaze na biljkama ili u zraku, a nazivamo ih ksenobiotici. Ksenobiotici su sve tvari koje se prirodno ne mogu pronaći u okolišu nego su tamo dospjele antropogenim utjecajem, a akumulirajući se u organizmu, na njega mogu imati štetan utjecaj (POSAVEC, 2015.). U najvećoj mjeri to su teški metali i pesticidi te praćenjem njihovih koncentracija u pčelinjim

proizvodima možemo dobiti informacije o onečišćenju okoliša, ali i o utjecaju na zdravlje i ponašanje pčelinje zajednice (TLAK GAJGER i PALIJAN BOSEK, 2014.).

2.2. Proizvodnja voska

Vosak je građevni element saća. Pčele radilice ga izlučuju iz svojih voskovnih žlijezda u dobi od 12. do 18. dana života (Slika 5.). Tekući vosak koji se izlučuje iz žlijezda u obliku voštanih listića na zraku se odmah skruti. Jedan voštani listić teži oko 1 mg, a potrebno ih je oko milijun za izgradnju jedne stanice saća. Radilice sa stražnjim nogama voštane listiće prebacuju prema čeljustima kojima ih obrađuju i onda lijepe na stanicu saća koju grade. Starijim radilicama žlijezde zakržljaju i one više ne grade saće nego preuzimaju druge poslove u zajednici. Najviše voska pčele izlučuju tijekom proljetnog razvoja zajednice. Jedan okvir Langstroth-Root košnice drži 100 g saća, a u kojem može biti skladišteno dva do četiri kilograma meda. Razlog tome leži u činjenici „interlocking“ građe saća gdje pčele graditeljice uz minimalnu količinu uporabljenog voska sagrađe saće velike čvrstoće (BOGDANOV, 2016.).



Slika 5. Izlučivanje voštanih listića iz voštanih žlijezda,

(<https://www.bbka.org.uk/the-other-things-honeybees-make>).

Saće u kojem se razvija leglo sa svakom novom generacijom pčela mijenja svoja svojstva (Tablica 1.). Njegova se boja iz žute mijenja u smeđu, a najstarije saće je potpuno crno. Tamnjenje stanica saća posljedica je izlučevina ličinkama, odbacivanje ovojnice kukuljica i ostataka propolisa. Osim toga, stanice postaju manje i deblje što rezultira razvojem sitnijih pčela. Stare stanice saća predstavljaju i mogući izvor infekcije uzročnicima zaraznih bolesti.

Med pohranjen u tim stanicama također postaje tamniji i moguće onečišćen ostacima štetnih tvari. Hrana se u starom saću brže kristalizira što otežava preživljavanje pčelinje zajednice preko zime. Staro saće sadrži više proteina što ga čini primamljivijim štetnicima, poput voskovih moljaca (*Galleria melonella*). Zbog navedenih promjena, pčelari bi saće trebali mijenjati redovito, u okviru dobre prakse zamjene saća, za nove satne osnove. Svake bi godine u svaku pčelinju zajednicu trebali postaviti 2 do 3 satne osnove kako bi pčele gradile novo saće (BOGDANOV, 2016.).

Tablica 1. Mijenjanje svojstava voska sa svakom novom generacijom pčela (BOGDANOV, 2016.).

Generacije pčela	Boja stanice saća	Volumen stanice saća (cm ³)	Debljina stanice saća	Promjer stanice saća	Masa pčele	% voska
0-1	žuta	0,282	0,22	5,42	123	86 - 100
2-5	smeđa	0,269	0,40	5,26	120	60
6-10	tamno-smeđa	0,255	0,73	5,24	118	49
13-15	crna	0,249	1,08	5,21	106	46

Osim gradivne uloge, vosak ima značajnu ulogu i u komunikaciji i termoregulaciji pčelinje zajednice. Određene tvari iz pčelinjeg voska djeluju poput feromona, kemijskih tvari koje djeluju kao signali koji prenose određenu informaciju drugim jedinkama zajednice. Dokazano je da su masne kiseline iz voska, posebice četiri nezasićene (palmitooleinska, oleinska, linolna i linolenska) i dvije zasićene (palmitinska i lignocerična) ključne za prepoznavanje jedinki unutar pčelinjih zajednica. Masne kiseline ujedno saću osiguravaju specifičnu konzistenciju i čvrstoću (SVEČNJAK, 2015.).

2.3. Prerada voska

Staro saće pčelari prerađuju pretapanjem u vosak. Time nastaju kolutovi voska koji se koriste za izradu novih satnih osnova. U tom procesu važno je ne miješati novije od starijeg saća jer novije sadržava veći postotak voska te je stoga kvalitetnije i ima višu cijenu. Poklopci

saća sadržavaju praktički čisti vosak i najkvalitetniji su i najskuplji dio saća. Staro saće poželjno je što prije odnijeti na preradu kako bi se spriječilo naseljavanje voskovog moljca kao i nastanak plijesni (COGGSHALL i MORSE, 1984.).

Kvaliteta dobivenog pčelinjeg voska ovisi o metodama obrade starog saća. Dvije su osnovne metode ekstrakcije voska iz starog saća: toplinska obrada i kemijska ekstrakcija od kojih se puno češće koristi prva spomenuta metoda. Razlog zašto se kemijska ekstrakcija izbjegava je zato jer benzin i ksilen, koji se koriste kao otapala, otapaju i organske materijale kojima je vosak onečišćen što onda narušava kvalitetu obrađenog voska. U prosjeku, obradom starog saća ponovno će biti upotrebljiva polovica njegove mase. Prvi korak u dobivanju voska, koji pčelari sami mogu napraviti, jest ostaviti saće da se topi u topioniku (sunčanom, parnom ili električnom). Na taj se način sprječava razvoj plijesni i naseljavanje voskovog moljca prije nego vosak odnesu na daljnju preradu (BOGDANOV, 2009.).

Toplinsku je obradu moguće izvesti na nekoliko različitih načina. Ekstrakcija uranjanjem u vruću vodu izvodi se na način da se saće stavi u jutene vreće koje se zaliju vodom i zakuhaju. S obzirom da je vosak lakši od vode, filtrirat će se kroz pore na vreći i izdignuti na površinu. Hlađenjem vosak će se na površini skrutnuti, a otpad će ostati u vreći. Ekstrakcija prešanjem izvodi se tako da se vosak stavi u 20 do 30 litara kipuće vode, a nakon što se otopi slijedi prešanje. Ekstrakcija se može izvršiti i kombinacijom prešanja i primjene vodene pare. Staro saće se u metalnoj vodonepropusnoj posudi uroni u kipuću vodu, a pritisak pomoću klipa preša saće te se vosak ekstrahira na površinu metalne posude. Kod ekstrakcije pomoću vodene pare saće se postavlja u spremnik u koji se pusti vodena para, a topljenjem vosak dolazi na dno spremnika. Centrifugalna ekstrakcija skupa je metoda i koristi se samo u većim pogonima za preradu voska. Izvodi se na način da se saće postavlja u kipuću vodu, a potom se ta otopljena smjesa lijeva u košarice centrifugalnog ekstraktora. On se vrti na više od 1500 okretaja po minuti i održava na temperaturi višoj od 65 °C kako bi se spriječilo skrućivanje voska. Čisti vosak tada izlazi kroz otvore na ekstraktoru. Ekstrakcija se može izvesti i na način da se okviri saća pritisnu između dvije grijane metalne ploče, a vosak se cijedi u posudu.

Tijekom prerade voska može doći do pogrešaka u obradi koje će narušiti kvalitetu voska. Predugo zagrijavanje i zagrijavanje na previsokim temperaturama uzrokovat će nastanak tamnog voska. Također, tamni vosak nastat će i ako se topljenje radi u posudama od željeza, bakra ili mjedi. Stoga ti materijali nisu preporučeni za ovu namjenu. Nije poželjno ni zagrijavanje u posudama od olova zbog mogućeg onečišćenja. Najprikladnije je koristiti posude od nehrđajućeg čelika ili aluminija (BOGDANOV, 2016.).

Spore bakterije *Paenibacillus larvae* rezistentne su na visoke temperature i uništiti će ih samo zagrijavanje na 120 °C i pod pritiskom od najmanje 1400 hPa, tijekom 30 minuta, pa uvijek treba paziti da se sterilizacija izvede na odgovarajući način (SVEČNJAK i sur., 2019.).

Ako je vosak i nakon prvotne obrade nečist, potrebno ga je dodatno obraditi na način da se drži duže u vodenoj kupelji na temperaturi 75 do 80°C. Nakon hlađenja donji dio voska, u kojem se nalaze nečistoće, potrebno je ostrugati (BOGDANOV, 2016.).

Satna osnova čini središnji dio satine i pčelama omogućava bržu i kontroliranu izgradnju saća. Dva su osnovna načina proizvodnje satnih osnova: valjanjem (Slika 6.) i lijevanjem. Prva primjenjivana metoda u proizvodnji satnih osnova bila je valjanjem. Prvi korak u tom procesu proizvodnja je voštanih listova prolaskom kroz ravne valjke, a drugi nanošenje otiska stanica saća prolaskom kroz gravirane valjke. Pritisak koji nastaje kada vosak prolazi kroz valjak mijenja raspored molekula pa proizvedena satna osnova postaje savitljiva (SVEČNJAK, 2019.). Satne osnove nastale lijevanjem lomljivije su od onih nastalih valjanjem, ali metoda proizvodnje vrlo je jednostavna, može se izraditi više satnih osnova iz iste količine voska i zato se često koristi u malim pčelarskim obrtima (BOGDANOV, 2016.). Također, moguće je primijeniti inovativnu tehnologiju dugotrajnog hlađenja i taloženja što doprinosi čistoći konačnog proizvoda (TLAK GAJGER i sur., 2016.).



Slika 6. Valjci za proizvodnju satnih osnova (<https://satne-osnove.hr/>).

Satne je osnove potrebno užičiti na drveni okvir. Žice na okviru mogu biti postavljene horizontalno, okomito, koso ili kombinirano. Satne osnove utiskuju se u okvire zagrijavanjem napeto postavljenih žica (SVEČNJAK i sur, 2019.).

2.4. Primjena pčelinjeg voska

Glavna je primjena pčelinjeg voska u proizvodnji satnih osnova, no vosak je upotrebljavan i u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, za proizvodnju svijeća, ali i u prehrambenoj industriji. U farmaceutskoj industriji vosak je podijeljen na *cera flava* – žuti pčelinji vosak i na *cera alba* – bijeli pčelinji vosak. U kozmetičkoj industriji koristi se u kremama, depilatorima, dezodoransima, balzovima i kremama za kosu, maskarama, ruževima i sjenilima. U kremama, losionima i mastima vosak i ulja osnovni su sastojci koji se koriste u različitim omjerima. Osim što pomaže cijeljenju kože, ima antiseptičko i antibakterijsko djelovanje, a koži pruža svježinu, glatkoću i elastičnost. Ruževima daje sjaj, konzistenciju i stabilizaciju intenziteta boje (BOGDANOV, 2016.).

U prehrambenoj industriji, u Europskoj uniji, pčelinji se vosak koristi kao glazirano sredstvo za slastičarstvo i pekarske proizvode. Kao prehrambeni aditiv koristi se pod oznakom E 901 i nosač je boja, ali nije odobren kao nosač okusa. Služi i kao sredstvo za površinsku obradu voća (EFSA, 2007.).

Rjeđa mu je primjena u proizvodima za poliranje namještaja i lakovima za drvo, kod restauracije slika, cijepljenja voćaka u rasadnicima te prilikom proizvodnje glazbenih instrumenata (BOGDANOV, 2004.).

2.5. Onečišćenje okoliša teškim metalima

Okolišna onečišćenja koja mogu imati utjecaj na zdravlje pčela i kvalitetu pčelinjih proizvoda potječu iz različitih izvora, a u najvećoj mjeri to su teški metali i pesticidi. Teški se metali akumuliraju u biološkim sustavima, visoko su toksični, a detoksikacija prirodnim procesima nije moguća. Zbog sve veće proizvodnje, prerade i primjene metala, raste i njihova koncentracija u zraku, tlu i vodi pa tako raste i opasnost po zdravlje ljudi i životinja koji u takvom okolišu borave. Toksikološka kinetika metala nedovoljno je istražena jer u organizam mogu ući u elementarnom stanju, u obliku soli ili organo-metalnog spoja pa o tome i ovise procesi njihove apsorpcije, raspodjele, deponiranja i izlučivanja (WERBER, 1835.). Izvor teških metala su, uz industriju proizvodnje i prerade, prometnice, vozila, ali i ostaci boja, premaza i slično.

Istraživanje 80-ih godina prošlog stoljeća pokazalo je da su najveći udio u emisiji olova (42,7 %) imali proizvodni procesi, a u emisiji arsena (59,4 %) i kroma (48,4 %) procesi izgaranja u termoenergetskim postrojenjima. U emisiji nikla, žive i kadmija najveći su utjecaj imali procesi izgaranja u industriji te cestovni promet (LONČARIĆ i sur., 2012.).

Osim atmosferske depozicije (koja je posljedica transporta čestica štetnih tvari i aerosola od izgaranja fosilnih goriva), u povećanju koncentracije teških metala značajnu ulogu ima i poljoprivreda. Krom, vanadij, kadmij i olovo uglavnom su porijeklom iz gnojiva. Neki pesticidi sadrže bakar, cink, željezo, mangan i arsen.

Metali iz okoliša u sve žive organizme najčešće dopijevaju putem hranidbenog lanca. Njihovo djelovanje raznovrsno je, a ponekad pojedini metali mogu međusobno djelovati u organizmu i polučiti specifičan učinak na zdravlje (SOFILIĆ, 2014.).

Pčele skupljačice, osim što dolaze u dodir sa zrakom u kojem se mogu nalaziti teški metali, prikupljaju nektar i pelud koji također mogu sadržavati teške metale te ih tim putem mogu unijeti u košnicu i kasnije, u svoje proizvode. Iako med prirodno sadrži metale koji potječu iz tla i nektara medonosnih biljaka, u njega mogu dospjeti i određeni metali čija je prisutnost posljedica antropogenog utjecaja i u njemu nisu poželjni (POHL, 2009.). Rezultati istraživanja potvrdili su da pčele, prilikom proizvodnje meda, detoksikacijski iz nektara uklanjaju teške metale kako se oni ne bi našli u medu. Dokazano je da su koncentracije teških metala u medu značajno niže od onih u nektaru (BORSUK i sur., 2021.). Smatra se da značajnu ulogu u kelaciji (procesu uklanjanja teških metala) iz meda imaju enzimi koje pčele izlučuju tijekom prerade nektara u med. Većina metala iz probavnog se sustava pčela prenosi u hemocel, masno tijelo, prsnu šupljinu, zadak te glavu. Kadmij i olovo djelomično se pohranjuju u masno-bjelančevinastom tijelu pa se određena koncentracija tih metala izlučuje fecesom (BORSUK i sur., 2021.). S obzirom na navedeno med, za razliku od pčelinjeg voska, nije tako dobar pokazatelj onečišćenja okoliša.

Istraživanje u Saudijskoj Arabiji pokazalo je da je koncentracija teških metala najviša u industrijskim regijama, a najniža u ekološki čistim područjima gdje je antropogeno djelovanje najmanje prisutno. Istraživanjem je dokazano i da su koncentracije teških metala više u tijelu odraslih pčela skupljačica nego u uzorcima voska. Stoga se smatra da pčelinji organizam akumulira teške metale te predstavlja djelomičnu prepreku za njihov daljnji prijenos na pčelinje proizvode (ALJEDANI, 2020.). Onečišćenje okoliša teškim metalima najznačajnije je u blizini rudnika, urbanih područja i autocesta. Također je poznato da se teški metali više talože u

aromatskom nego u zeljastom bilju (POHL, 2009.). Kadmij i cink teški su metali koji su prisutniji na površini tijela pčela što nam govori da je njima onečišćen zrak. S druge strane, olovo je prisutnije u organizmu pčela pa zaključujemo da je njime više od zraka onečišćeno tlo, odnosno bilje (ZAVRTNIK i sur., 2020.). Sastav i omjer elemenata u medu ovisi o njihovoj koncentraciji u tlu te o geološkim i geokemijskim svojstvima tla u kojem određena biljka raste. U medu podrijetlom iz nektara ima oko 0,1 do 0,2 % minerala, dok u medu podrijetlom iz medne rose taj postotak prelazi i 1 %. Med s obalnih područja i otoka sadrži i do deset puta više natrija i kalija, pa gledajući koncentracije metala, možemo određivati botaničko i geografsko podrijetlo meda (ZAVRTNIK i sur., 2020.).

2.6. Vosak kao bioindikator okolišnog onečišćenja

Vosak je, uz ostale pčelinje proizvode i odrasle pčele, jako dobar pokazatelj ili indikator onečišćenja okoliša. Posebice valja naglasiti izrazitu liposolubilnost i da činjenicu da se u košnici drži duže razdoblje pa je omogućena akumulacija veće količine ksenobiotika.

Usporedbom voskova različitih starosti i s različitih lokacija možemo dobiti informacije koliko je neko područje onečišćeno te kada bi staro saće, u kojem su koncentracije teških metala najviše, trebalo nositi na preradu zbog mogućeg utjecaja na zdravlje pčela, legla te ljudi koji konzumiraju pčelinje proizvode.

Već spomenuto istraživanje u Saudijskoj Arabiji, s druge strane, pokazalo je da su koncentracije teških metala bile više u uzorcima odraslih pčela nego u uzorcima voska. Koncentracija teških metala svakako je bila viša u onim uzorcima, i voska i pčela, koji su potjecali s pčelinjaka u blizini industrijskih područja (ALJEDANI, 2020.).

2.7. Teški metali

Teški metali anorganski su elementi koji se u prirodi nalaze u stijenama u obliku sulfida ili oksidnih ruda, a imaju gustoću veću od 5 g/cm³ (ABARCA i sur., 2020.). Taloženje u prirodi posljedica je erozija, vjetrovitog i kišnog vremena i vulkanske aktivnosti. Puno je veći problem taloženje teških metala koje je posljedica antropogenog djelovanja. Rudarska industrija, prerada metala te nepropisno odlaganje otpada mogu dovesti do povećanja koncentracije teških metala u okolišu. Oni u živi organizam ulaze apsorpcijom, inhalacijom ili ingestijom. Biljke ih

apsorbiraju iz tla, vode i zraka te se u njima akumuliraju, a one postaju izvor teških metala za životinje i ljude koje te biljke konzumiraju.

Teški metali dijele se u dvije skupine, esencijalni i neesencijalni. Esencijalni teški metali (bakar, cink, mangan, molibden, selen, željezo) su oni koji su biljkama, životinjama i ljudima potrebni u niskim koncentracijama, ali u visokim koncentracijama postaju toksični. Neesencijalni teški metali (olovo, živa, kadmij, arsen, aluminij, kositar, kobalt, paladij, platina) nemaju biološku ulogu i toksični su već i pri minimalnim koncentracijama (HAZRAT i sur., 2019.).

Metali ispitivani u ovom radu su olovo, arsen, kadmij i živa, a svi pripadaju u skupinu neesencijalnih elemenata.

Kadmij

Kadmij (Cd) bjelkasti je, mekani metal. Najveći izvor kadmija je tlo, a u tragovima ga se može naći i u zelenom povrću, krumpiru i žitaricama. Riža je namirnica u kojoj se može naći najviše kadmija (GENCHI i sur., 2020.). Cigarete su jedan od glavnih izvora kadmija, a on je i jedan od sastavnih dijelova u proizvodnji baterija. Jedan je od najtoksičnijih metala zbog dobre hlapljivosti i to na temperaturama nižim od vrelišta. Jako su otrovne pare kadmijeva oksida (DRČIĆ, 2014.).

Simptomi trovanja kadmijem kod ljudi očituju se bolovima u kostima i zglobovima, osteoporozom i češćim frakturama (GENCHI i sur., 2020.). Od ostalih simptoma prisutni su anemija, kašalj i oštećenja jetre (AOSHIMA, 2012.).

Prema europskoj legislativi, ne postoji propisana dozvoljena koncentracija za kadmij u medu ni u bilo kojem drugom pčelinjem proizvodu (EU KOMISIJA, 2014.).

Olovo

Olovo (Pb) je metal koji je široko rasprostranjen u zemljinoj kori. Iako se u vodi, tlu i zraku može naći nakon određenih prirodnih procesa, puno su češća zagađenja uzrokovana antropogenom aktivnošću (CALLENDER, 2003.). Mekan je i savitljiv, pa ima mnogostruku primjenu. Koristi se za izradu baterija, boja, cijevi, insekticida, krovišta, streljiva i slično (BRIFFA i sur., 2020.).

Fitotoksičnost olova očituje se pocrnjelim korijenjem, smanjenom fotosintezom, inhibicijom klijanja sjemena, sporijim rastom biljaka te mogućom nekrozom biljaka (HADI i AZIZ, 2015.) Neke su biljke razvile mehanizam kojim sprječavaju ulaz teških metala na način da sintetiziraju kalozu, polisaharid koji predstavlja mehaničku prepreku za ulaz teških metala u stanice (FAHR i sur., 2013.). Trovanje olovom kod ljudi očituje se neurološkim simptomima: vrtoglavicom, gubitkom pamćenja, depresijom, glavoboljom i slično (NEEDLEMAN, 2004., WANI i sur., 2015.).

Prema europskoj legislativi, dozvoljena koncentracija olova u pčelinjem vosku iznosi 5 mg/kg (DIREKTIVA EU, 1996.). S druge strane, EU organizacija za hranu i poljoprivredu (FAO) propisala je maksimalnu dozvoljenu koncentraciju olova u vosku na 2 mg/kg te maksimalni rezidualni limit od 1 mg/kg (EU KOMISIJA, 2002., EU KOMISIJA, 1999.). Europska agencija za sigurnost hrane preporučuje što nižu koncentraciju olova u hrani zbog njegove velike toksičnosti (EFSA, 2007.).

Živa

Živa (Hg) je jedini tekući metal i jedna od najtežih teških metala. Jako je otrovna jer se skladišti u mozgu, srcu, jetri i bubrezima, a i teško ju je ukloniti iz organizma. Elementarna živa puno se bolje apsorbira preko pluća u obliku aerosola nego što se adsorbira preko probavnog sustava (FODOR, 2002.).

Najveći izvor žive (ali i arsena) u prehrani ljudi čine ribe, rakovi i školjke. S obzirom da se živa izlučuje mlijekom za vrijeme laktacije, a metil-Hg (najtoksičniji organski spoj žive) prolazi transplacentarno, trudnicama i dojiljama preporučuje se minimalna konzumacija hrane morskog podrijetla. Trovanje živom očituje se oštećenjima središnjeg živčanog sustava, usporenim mentalnim razvojem, sljepoćom te cerebralnom paralizom (PLEADIN i sur., 2017.).

Prema europskoj legislativi, najveća dopuštena koncentracija žive u vosku iznosi 1 mg/kg (DIREKTIVA EU, 1996.).

Arsen

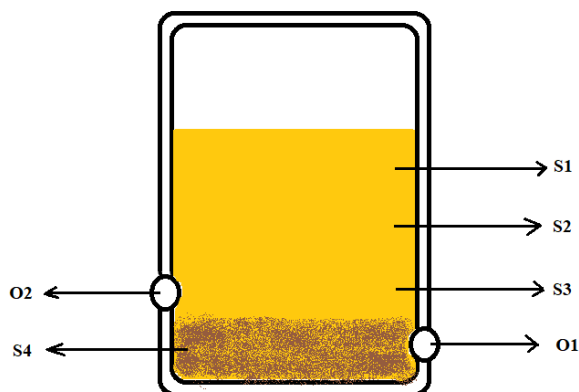
Arsen (As) je teški metal kojeg u prirodi nalazimo u obliku rudnih minerala: arsenopirit, realgar i orpiment. Arsin je najotrovniji spoj arsena i dobro se apsorbira preko pluća (PLAVŠIĆ, 2009.). Morski organizmi sadrže znatne količine arsena koji je prisutan u različitim anorganskim i organskim oblicima. Anorganski su oblici toksičniji. Arsen je i humani karcinogen, a akutna toksičnost dovodi do poremećaja rada živčanog i krvožilnog sustava te do promjena na koži (PLEADIN i sur., 2017.).

Prema europskoj legislativi, dopuštena koncentracija arsena u vosku iznosi 3 mg/kg (DIREKTIVA EU, 1996.).

3. Materijal i metode

3.1. Prikupljanje uzoraka voska

Uzorci voska prikupljeni su tijekom procesa prerade otopljenog voska u satnu osnovu metodom produljenog hlađenja i sedimentacije. Nakon taljenja kolutova voska, u čeličnom spremniku volumena 200 L s dvostrukim stijenkama između kojih cirkulira zagrijana voda, vosak je homogeniziran i zagrijan na temperaturu 125 °C u svrhu sterilizacije. Sterilizacijom se uništavaju uzročnici opasnih zaraznih bolesti, ali i uzročnici niza uvjetovanih bolesti pčelinjih zajednica. Nakon procesa sterilizacije (uz istodobnu homogenizaciju, pritisak od minimalno 1400 hPa) u trajanju od sat vremena, temperatura je automatski prebačena na 75 °C. Nakon 24 sata sedimentacije na spomenutoj temperaturi, uzorci su prikupljeni s četiri razine iz spremnika: s površine (S1), iz srednjeg gornjeg sloja (S2), srednjeg donjeg sloja (S3) te s dna spremnika (S4). Na spremniku se nalaze dva otvora (O1 i O2) iz kojih su prikupljeni uzorci iz slojeva 3 i 4, dok su uzorci iz slojeva 1 i 2 prikupljeni prije izlivanja na valjak kroz koji izlaze gotove satne osnove (Slika 8.). Svaki pojedinačni uzorak rastaljenog voska (100 mL) stavljen je u čistu plastičnu posudu, označen i pohranjen u laboratoriju do početka analiziranja na temperaturi 4 do 8 °C.



Slika 8. Slojevi rastaljenog i sedimentiranog voska u čeličnom spremniku.

3.2. Priprema uzoraka za analizu

Za određivanje koncentracije žive izravnim spaljivanjem na živinom analizatoru nije potrebna prethodna priprema uzoraka. Uzorci se važu (0,1 g) u lađice i postavljaju u autostopere (AS) instrumenta na odgovarajuća mjesta nakon čega odmah slijedi njihova obrada u uređaju.

Određivanje ostalih metala nešto je složenije jer zahtjeva pripremu uzoraka prije obrade ICP-MS uređajem. Prvo je potrebno izvagati 0,5 grama voska. Zatim se u epruvetu s uzorkom dodaje 1 mL deionizirane vode i 2,5 mL nitratne kiseline. Tako pripremljeni uzorak stavlja se u UltraWAVE ECR MW pećnicu (Slika 9.) koja ima 15 teflonskih posudica u kojima se vrši mikrovalna razgradnja uzoraka prema zadanom programu (Tablica 2.). Za slijepu probu reagensa u jednu posudu dodaje se 1 mL deionizirane vode i 2,5 mL nitratne kiseline.



Slika 9. UltraWAVE ECR MW pećnica.

Nakon mikrovalne razgradnje i hlađenja, uzorci se vade iz MW pećnice, a sadržaj se kvantitativno prenosi u odmjerne tikvice od 50 mL uz ispiranje sadržaja ultračistom vodom kako bi gubici analita bili što manji.

Tablica 2. Program mikrovalne razgradnje uzoraka.

Korak	T (min)	MW (W)	T1 (°C)	T2 (°C)	P1 (bar)
1.	20	1500	220	1	110
2.	10	1500	220	1	110

3.3. Metode određivanja metala

Za određivanje koncentracija četiri teška metala (arsen, olovo, kadmij i živa) u ovom su istraživanju korištene dvije metode: određivanje koncentracija žive izvedeno je izravnim spaljivanjem na živinom analizatoru, a određivanje ostalih metala primjenom ICP-MS.

3.3.1. Određivanje žive izravnim spaljivanjem na živinom analizatoru

Princip određivanja žive na živinom analizatoru (Slika 7.) temelji se na kvantificiranju iz homogeniziranih uzoraka koji su odvagani u lađicama. Uzorci u lađicama prenose se u peć za sagorijevanje gdje se suše i razgrađuju u struji kisika pri temperaturi 850 °C. Razgrađeni produkti prolaze kroz katalitičku peć zagrijanu na temperaturu od 700 °C na kojoj se zadržavaju dušikovi oksidi i sumpor. Živa se hvata na amalgamator koji se kratko razdoblje zagrijava te se živa otpušta, a njene se pare transportiraju u stanice za mjerenje. Atomi žive apsorbiraju radijaciju koju emitira živina lampa. Proporcionalno rastu broja atoma raste i količina apsorbiranog svjetla, a mjereći količinu apsorbiranog svjetla na odgovarajućoj valnoj duljini određuje se koncentracija žive u uzorcima voska. Parametri rada za određivanje žive navedeni su u tablici (Tablica 3.).

Tablica 3. Uvjeti kod određivanja koncentracija žive.

Parametri rada	
parametar mjerenja	apsorbancija
valna duljina	253,65 nm
vrijeme sušenja	60 sek
vrijeme dekompozicije	150 sek
vrijeme čekanja	45 sek
masa odvage	100 mg
način mjerenja	a.u.
područje linearnosti	0,05-600 ng

Prije mjerenja koncentracija elemenata u uzorcima potrebno je napraviti „čišćenje“ instrumenta (program „L“ u sučelju software-a AMA-254) kako bismo izbjegli mogućnost unutarnjeg onečišćenja. Valjanost postupka potvrđujemo mjerenjem slijepih proba („B“). Blank instrumenta mora biti niži od 0,05 ng žive. U uzorku se detektira količina apsorbiranog svjetla, a onda se preko kalibracijskog pravca dobiva količina žive (ng) koja se koristi za izračun koncentracije žive u uzorku.

Formula za izračun je: $C(\text{ng/mg}) = c(\text{ng})/m(\text{mg})$. „C“ označava koncentraciju žive u uzorku izraženu u ng/mg, „c“ koncentraciju žive izraženu u ng, a „m“ masu uzorka izraženu u mg.



Slika 7. Analizator žive.

3.3.2. Određivanje metala primjenom induktivno spregnute plazme – masene spektrometrije (ICP-MS)

Induktivno spregnuta plazma struja je visoko ioniziranog argona koji prolazi kroz magnetno polje zavojnice. Visoko frekventno magnetno polje ionizira argon koji je inertni plin i formira se plazma. Plazma dostiže temperature 8 000 do 10 000 K (kelvina) što joj omogućuje utvrđivanje oko 75 elemenata periodnog sustava. Nastala toplinska energija atomizira i ionizira uzorak. Ioni, zajedno s argonom, ulaze u maseni spektrometar preko sučelja koje razdvaja ICP. Maseni spektrometar omogućuje utvrđivanje iona na svakom omjeru mase i naboja u brzom slijedu pa se na taj način određuju pojedinačni izotopi elementa. Nakon ulaska u maseni spektrometar, ioni prolaze kroz ionsku optiku, a zatim prolaze kvadrupol prije nego što ih

prepozna detektor. Ionska optika, pomoću električnog polja, fokusira snop iona. Plinovi potrebni u ovoj metodi su argon, helij i vodik. Argon služi za formiranje plazme i čišćenje sistema prilikom pokretanja aparata, a helij uklanja interferencije (Slika 8.).

Za kalibriranje instrumenta potrebno je pripremiti mješavinu otopine standarda metala kako je navedeno u Tablici 4.

Tablica 4. Mješavina otopine standarda metala.

Element	Koncentracije standarda ($\mu\text{g/L}$)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
As	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Cd	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Hg									
Pb	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500

Radni standardi pripremaju se kako je opisano u Tablici 5. u volumenu od 50 mL.

Tablica 5. Priprema radnih standarda.

	Oznaka standarda	Ishodni standard IS (mL)	Međustandard MS (mL)	Std 5	5 % HNO_3 (mL)
„Blank“	/	0	/	/	50
MS (100 $\mu\text{g/L}$) Std 8 (100 ppb)	MS-100 ppb- ICPMS	0,5	/	/	49,5
Std1 (0,1 ppb)	Radni standard (RS) RS-std1-ICPMS	/	/	0,5	49,5
Std 2 (0,25 ppb)	RS-std2-ICPMS	/	0,125	/	49,875
Std 3 (1 ppb)	RS-std3-ICPMS	/	0,5	/	49,5
Std 4 (5 ppb)	RS-std4-ICPMS	/	2,5	/	47,5
Std 5 (10 ppb)	RS-std5-ICPMS	/	5	/	45,5
Std 6 (20 ppb)	RS-std6-ICPMS	/	10	/	40
Std 7 (50 ppb)	RS-std7-ICPMS	0,25	/	/	49,75
Std 8 (100 ppb)	RS-std8-ICPMS	0,5	/	/	49,5

Std 9 (500 ppb)	RS-std9-ICPMS	2,5	/	/	47,5
-----------------	---------------	-----	---	---	------

Koncentracija pripravljenog IS iznosi 200 µg/L. IS nalazi se odvojeno od standarda i kalibracijske slijepe probe i miješa se s njima pomoću Y spojnice. Od 20 mg/kg izvorne (stock) otopine mješavine internih standarda pipetira se 500 µL u plastičnu epruvetu od 50 mL i nadopuni do oznake. Pripremljeni uzorci slažu se u AS instrumenta u odgovarajuće polipropilenske epruvete te se analiziraju.

Specifičnost kod određivanja koncentracije olova temelji se na varijabilnosti izotopa olova u prirodi. Vrijednosti olova obilježavaju se s izotopom 208, a u prirodi su prisutna sva tri izotopa olova. Stoga je na izotop 208 potrebno primijeniti korekcijsku jednadžbu: $(1.000) (^{206}\text{Pb}) + (1.000) (^{207}\text{Pb}) + (1.000) (^{208}\text{Pb})$.



Slika 8. ICP-MS, Agilent ICP-MS system Model 7900 (Agilent, Palo Alto, CA, SAD).

Izračun rezultata radi se prema formuli $C(\mu\text{g}/\text{kg}) = c(\mu\text{g}/\text{L}) \times V(\text{ml})/m(\text{g})$. „C“ označava koncentraciju metala u uzorku izraženu u µg/kg, „c“ koncentraciju metala izraženu u µg/L, „V“ volumen uzorka izražen u mL i „m“ masu uzorka izraženu u gramima.

3.4. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati koncentracija arsena, kadmija, žive i olova statistički su obrađeni programom Small Stata 13.1 (StataCorp LP, 4905 Lakeway Drive, SAD). Koncentracije pretražena četiri teška metala u uzorcima voska prikazane su kao minimum (min) i maksimum (max), srednja vrijednost (SV) i standardna devijacija (SD).

Provjera distribucije rezultata provedena je pomoću Shapiro-Wilkovog testa kojim je utvrđeno da četiri elementa nemaju normalnu distribuciju ($p < 0.05$).

U daljnoj obradi primijenjen je Kruskal-Wallis test kojim su ispitane razlike u koncentracijama svih metala, a i razlike između pojedinih slojeva voska S1, S2, S3 i S4.

4. Rezultati

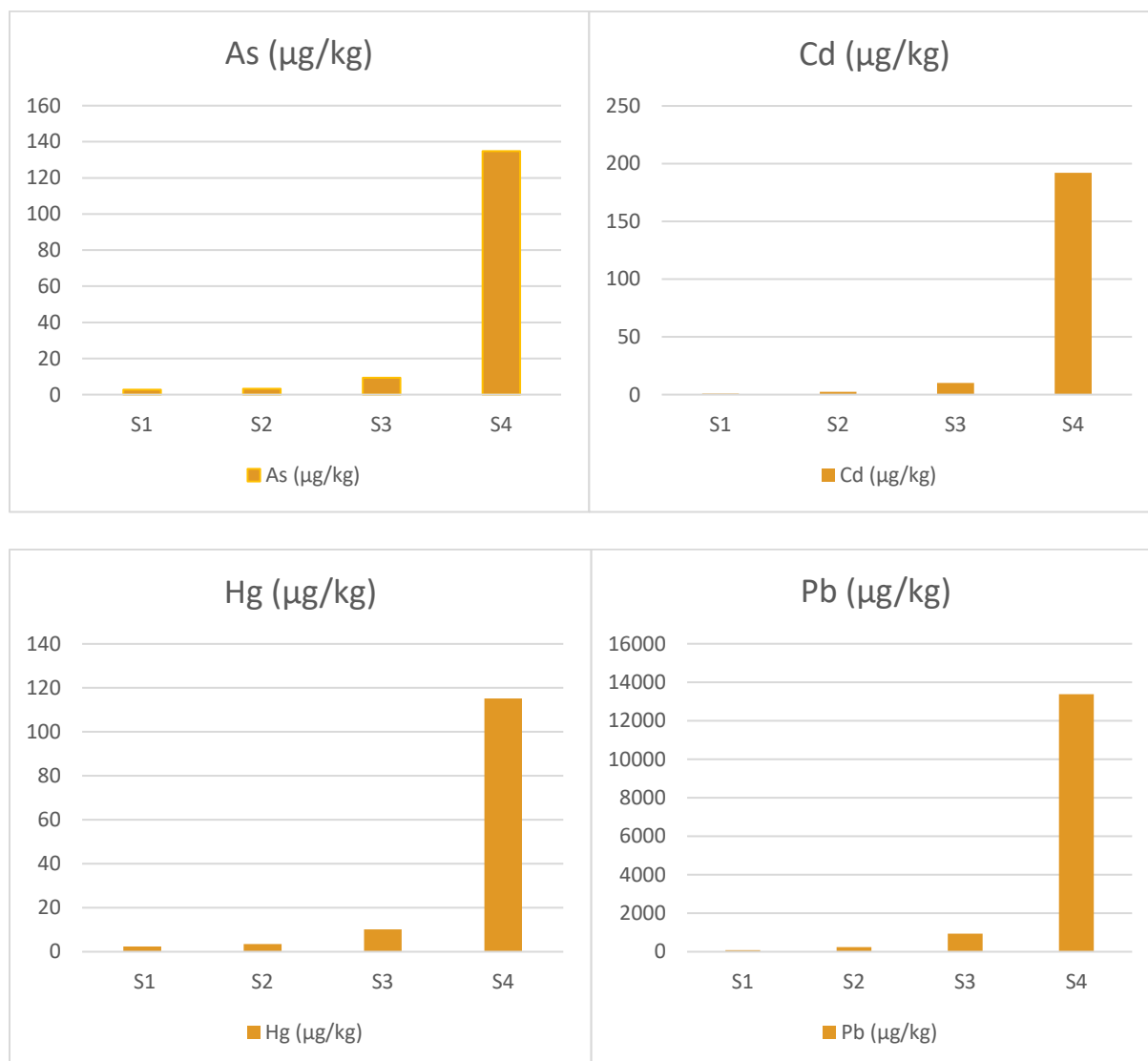
Analizom uzoraka izravnim spaljivanjem na živinom analizatoru te primjenom induktivno spregnute plazme – masene spektrometrije, koncentracije teških metala utvrdili smo za svaki pojedini sloj voska. Rezultati su prikazani u Tablici 6. Koncentracije As, Cd, Hg i Pb izmjerene su u rasponima ($\mu\text{g/kg}$): As 2,24 do 202,9, Cd 0,43 do 310,4, Hg 2,02 do 148,0 te Pb 49,6 do 8845,1. Srednje vrijednosti za svaki element pokazuju da svaki sljedeći sloj sadrži veću koncentraciju metala. Dobiveni rezultati pokazuju da se srednje vrijednosti za As, Cd, Hg i Pb od prvog S1 do sloja S4 povećavaju za 49,4, 218,4, 47,6 te 153 puta odnosno izraženo u $\mu\text{g/kg}$: As sa 2,73 na 134,9, Cd sa 0,88 na 192,2, Hg sa 2,42 na 115,5, Pb sa 87,5 na 12286,3. To pokazuje značajne razlike između slojeva voska što je potvrdila i statistička analiza koncentracija četiri metala između četiri razine voska, odnosno, utvrđene su statistički značajne razlike za sva četiri elementa ($p < 0.05$).

Tablica 6. Koncentracije teških metala u pretraživanim uzorcima.

Sloj	Statistika	As ($\mu\text{g/kg}$) *	Cd ($\mu\text{g/kg}$) *	Hg ($\mu\text{g/kg}$) *	Pb ($\mu\text{g/kg}$) *
S1	min	2,24	0,43	2,02	49,6
	max	3,02	1,60	2,67	154,6
	SV	2,73	0,88	2,42	87,5
	SD	0,42	0,63	0,35	58,3
S2	min	2,62	1,47	2,34	192,2
	max	4,09	3,52	5,67	313,1
	SV	3,21	2,35	3,49	232,7
	SD	0,78	1,05	1,89	69,7
S3	min	8,77	9,84	3,54	856,2
	max	10,3	10,5	14,5	987,4
	SV	9,42	10,1	10,1	942,7
	SD	0,81	0,37	5,82	75,0
S4	min	92,8	90,6	95,3	15297,6
	max	202,9	310,4	148,0	8845,1
	SV	134,9	192,2	115,2	13386,3
	SD	59,5	110,9	28,6	3949,2

*Statistički značajne razlike ($p < 0,05$) koncentracija elementa među slojevima voska S1 – S4.

Na Grafikonu 1. prikazane su srednje vrijednosti koncentracija svakog od pretraživanih metala po slojevima.



Grafikon 1. Koncentracije As, Cd, Hg i Pb u svakom od pretraživanih slojeva voska.

5. Rasprava

Od svih dosadašnjih istraživanja o utjecaju teških metala na pčelinju zajednicu i njene proizvode, vosak je najmanje analiziran, najvjerojatnije zato jer je to pčelinji proizvod koji se izravno ne koristi u prehrani ljudi (TLAK GAJGER i sur., 2016.).

U istraživanju provedenom u Slovačkoj utvrđivane su koncentracije 27 elemenata u uzorcima ličinaka, odraslih pčela, meda, voska i peluda. Od svih uzoraka, koncentracija arsena (61 µg/kg) bila je najviša upravo u uzorku voska s jednog pčelinjaka. Također je i koncentracija žive bila najviša u dva uzorka voska (90 i 36 µg/kg). Koncentracija žive bila duplo veća u uzorcima odraslih pčela i voska, a u usporedbi s koncentracijama u medu i pčelinjim ličinkama. Koncentracija olova dosta je varirala u uzorcima, a najviša je bila u jednom uzorku voska (3193 µg/kg). Koncentracije kadmija najviše su bile u uzorcima voska i odraslih pčela (ZAFERIAKI i sur., 2022.). Autori su tada zaključili da su koncentracije teških metala najviše upravo u uzorcima voska te je stoga vosak dobar materijal iz košnice za kontrolu onečišćenja okoliša metalima.

S druge strane, vosak je odličan pokazatelj koliko je neki okoliš onečišćen teškim metalima upravo zbog činjenice da se duža razdoblja drži u košnici, ali stalno prerađuje te višestruko koristi, pa se teški metali u njemu godinama mogu akumulirati. Taloženje tijekom dužeg razdoblja moguće je s obzirom da su teški metali rezistentni na visoke temperature kojima je vosak podvrgnut tijekom prerade (TLAK GAJGER i sur., 2016.).

Iako smo suočeni s manjkom istraživanja na ovu temu, upravo je ono iz 2016. godine pratilo koncentracije teških metala pretraženih i u ovom istraživanju. Tada su pretražena 24 uzorka voska koji su bili obrađeni na isti način kao naši, a rezultati pokazuju sličnosti s rezultatima našeg istraživanja. Koncentracija svih teških metala bila je najviša u najnižem sedimentiranom sloju. Koncentracija kadmija bila je u gornjim slojevima oko 50 puta niža nego u donjem, a koncentracija žive oko 15 puta viša u donjem sloju u usporedbi s gornjima. Od svih metala, jedino zabrinjava koncentracija olova čija je vrijednost bila visoka čak i u novim satnim osnovama (115 mg/kg). S obzirom da koncentracije olova nikad nisu bile tako visoke u drugim pčelinjim proizvodima, autori smatraju da visoke vrijednosti dijelom mogu biti povezane i s načinom skladištenja sirovog voska i prašinom koja se na njemu skuplja, a sadrži olovo i kadmij u visokim koncentracijama (TLAK GAJGER i sur., 2016.).

Slično istraživanje provedeno 2019. godine pratilo je razlike koncentracija raznih metala u uzorcima voska različite starosti i s različitim geografskih područja. S obzirom da je olovo metal koji je prvenstveno antropogenog podrijetla, njegove su koncentracije bile najviše u uzorcima voska s pčelinjaka u blizini autoceste te industrijskog područja. Kao i kod većine drugih metala, koncentracija olova viša je u starijim i tamnijim nego u mlađim i svjetlijim uzorcima voska. S obzirom da koncentracija većine metala raste što je vosak stariji, zanimljivo je da je kod željeza primijećena obrnuta pojava. Smatra se da je željezo važan esencijalni element potreban za razvoj legla čije se zalihe crpe sa svakim novim leglom, stoga njegova koncentracija pada kako vosak stari te je najniža u najstarijim uzorcima voska (TLAK GAJGER i sur., 2019.).

Još jedno slično istraživanje potvrdilo je da postoje statistički značajne razlike koncentracija žive u uzorcima voska koji je u satne osnove prerađen također metodom lijevanja s produženim trajanjem faze hlađenja i sedimentacije. Osim toga, koncentracije svih pretraživanih metala (arsena, kadmija i žive) bile su manje od maksimalno dopuštenih prema zakonskim propisima (KOSANOVIĆ i sur., 2019.).

Uzimajući u obzir koncentracije dopuštene prema europskoj legislativi (5 mg/kg za olovo, 3 mg/kg za arsen, te 1 mg/kg za živu), u analiziranim uzorcima voska u ovom istraživanju, jedino koncentracija olova u S4 prelazi dopuštene koncentracije (13,39 mg/kg). S obzirom da je S4 sloj u kojem je prisutno najviše nečistoća i koji se prije faze produljenog hlađenja i sedimentacije odbacuje, sporni sloj voska ne ide u daljnju obradu i u prerađenom vosku/novim satnim osnovama koncentracija olova neće prelaziti maksimalno dopuštene koncentracije. Zbog navedenog za ovu metodu smatramo da značajno smanjuje koncentraciju teških metala u prerađenom vosku i poželjna je kao odabir u preradi voska.

6. Zaključci

Iako je od svih pčelinjih proizvoda vosak najmanje analiziran na prisustvo teških metala, pokazao se kao jedan od boljih indikatora okolišnog onečišćenja zbog kemijske strukture koja je pogodna za taloženje teških metala te njegove dugotrajne uporabe na pčelinjacima.

Metoda lijevanjem s produženom fazom hlađenja i sedimentacije se pokazala učinkovitom i dobrodošlom metodom u preradi voska u nove satne osnove. Ovom metodom značajno se smanjuju koncentracije svih teških metala u onim slojevima nataloženog voska koji se koriste u izradi novih satnih osnova pa je tako, u najvećoj mogućoj mjeri, smanjena opasnost od štetnih utjecaja teških metala na pčelinju zajednicu.

7. Literatura

1. ABARCA, R.R.M., M. T. GAUDIO, S. CHAKRABORTY, P. BHATTACHERJEE (2020): Metals toxic pollutants in the environment: anthropogenic and geological causes and remediation. In: Current Trends and Future Developments on (Bio-) Membranes, Basile, A., A. Figoli, Y. Li (eds.). Elsevier, pp.109-124.
2. ALJEDANI, M. D. (2020): Revealing some Elements and Heavy Metals in Honeybee and Beeswax Samples Collected from Different Environments. *Entomol. Appl. Sci. Lett.* 7, 89-101.
3. ANONIMUS (1996): Directive 96/77/EC of the European Commission laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners.
4. ANONIMUS (1999): Council Regulation (EC) No 1804/1999 supplementing Regulation (EEC) No 2092/91 on organic production of agricultural products and foodstuffs to include livestock production. Chapter: Beekeeping and Beekeeping products.
5. ANONIMUS (2002): European Commission (EC). Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on honey and microbiological hazards.
6. ANONIMUS (2007): European Food Safety Authority. Beeswax (E 901) as a glazing agent and as carrier for flavours. *The EFSA Journal* 615, 128.
7. ANONIMUS (2007): European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food. *The EFSA Journal* 615, 1-28.
8. ANONIMUS (2014): Commission Regulation (EU) No 488/2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs.
9. AOSHIMA, K. (2012): Itai-itai disease: cadmium-induced renal tubular osteomalacia. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 67,4, 455-463.
10. BOGDANOV, S. (2004): Beeswax: Quality issues today. *Bee World* 85, 46-50.
11. BOGDANOV, S. (2009): Beeswax: Production, Properties, Composition and Control. *Beeswax book. Bee Product Science*, pp. 1-17.
12. BOGDANOV, S. (2016): Beeswax: Production, Properties, Composition and Control. *Bee Product Science*, pp. 2-10.
13. BORSUK, G., A. SULBORSKA, E. STAWIARZ, K. OLSZEWSKI, D. WIACEK, N. RAMZI, A. NAWROCKA, M. JEDRYCZKA (2021): Capacity of honeybees to remove

heavy metals from nectar and excrete the contaminants from their bodies. *Apidologie* 52, 1098–1111.

doi: 10.1007/s13592-021-00890-6

14. BRIFFA, J., E. SINAGRA, R. BLUNDELL (2020): Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans. *Heliyon*, 6, 9, e04691. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04691
15. CALLENDER, E. (2003): Heavy Metals in the Environment – Historical Trends. *Treatise on Geochemistry*, Turekian, K. i H. Holland (eds.), pp.67-105.
16. CARON, D. M., L. JOHN CONNOR (2013): Honey bee biology and beekeeping. Wicwas Press, Kalamazoo, pp. 75-77.
17. COGGSHALL, W. L., R. A. MORSE (1984): Beeswax: Production, Harvesting and Products. Wicwas Press, Ithaca, New York.
18. DRČIĆ, D. (2014): Ekotoksikologija kadmija. *TEDI* 4, 66-77.
19. ENGELS, W., V. L. IMPERAATRIZ-FONSECA (1990): Caste Development, Reproductive Strategies, and Control of Fertility in Honey Bees and Stingless Bees. U: *Social Insects*. Engels, W., Springer, Berlin, Heidelberg, pp.167-230.
20. FAHR, M., L. LAPLAZE, N. BENDAOU, V. HOCHER, M. EL MZIBRI, D. BOGUSZ, A. SMOUNI (2013): Effect of lead on root growth, *Front. Plant Sci.* 4, 1-7.
21. FODOR, F. (2002): Physiological responses of vascular plants to heavy metals. U: *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, pp.149-177.
22. GENCHI, G., M. SINICROPI, G. LAURIA, A. CAROCCI, A. CATALANO (2020): The Effects of Cadmium Toxicity. *Int. J. Environ. Res.* 17, 11, 3782.
23. HADI, F., T. AZIZ (2015): A Mini Review on Lead (Pb) Toxicity in Plants. *J. Biol. Life Sci.* 6, 2, 91-101.
24. HAMMER, M., R. MENZEL (1995): Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 15, 3, 1617-1630.
25. HAZRAT, A., K. EZZAT, I. IKRAM (2019): Environmental Chemistry and Ecotoxicology of Hazardous Heavy Metals: Environmental Persistence, Toxicity and Bioaccumulation. *J. Chem.* 4,1-14. doi: 10.1155/2019/6730305
26. KOSANOVIĆ, M., N. BILANDŽIĆ, M. SEDAK, S. KOS, I. TLAK GAJGER (2019): Concentrations of arsenic, cadmium and mercury in beeswax (*Apis mellifera*) during its processing from honeycombs to honeycomb foundations. *Veterinarska stanica* 50, 1, 19-25.

27. LAKTIĆ, Z., D. ŠEKULJA (2008): Suvremeno pčelarstvo. Globus, pp. 324-329.
28. LONČARIĆ, Z., I. KADAR, Z. JURKOVIĆ, V. KOVAČEVIĆ, B. POPOVIĆ, K. KARALIĆ (2012): Heavy metals from farm to fork. 47th Croatian International Symposium on Agriculture, 13-17 February, Opatija, Croatia, pp. 14-23.
29. NEEDLEMAN, H. (2004): Lead poisoning. *Ann. Rev. Med.* 55, 209-222.
doi: 10.1146/annurev.med.55.091902.103653
30. PLAVŠIĆ, F. (2009): Are You Afraid of Poison? Croatian Institute for Toxicology, Zagreb, pp. 212-213.
31. PLEADIN, J., T. BOGDANOVIĆ, T. MURATI, I. KMETIČ (2017): Kemijska onečišćivala iz okoliša i njihovi ostaci u hrani životinjskog podrijetla. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 12, 1-2, 19-29.
32. POHL, P. (2009): Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries. *Trends Anal. Chem.* 28, 117-128.
doi:10.1016/j.trac.2008.09.015
33. POSAVEC, D. (2015): Ksenobiotici. Diplomski rad. Međimursko veleučilište u Čakovcu, Čakovec.
34. SOFILIĆ, T. (2014): Ekotoksikologija. Metalurški fakultet, Sisak.
35. SVEČNJAK, L. (2015): Patvorenje pčelinjeg voska – problematika i otkrivanje metodom infracrvene spektroskopije. *Hrvatska pčela* 134, 9, 270-274.
36. SVEČNJAK, L. (2019): Utjecaj patvorenja pčelinjeg voska parafinom na sastav i kakvoću meda. *Hrvatska pčela*, 138, 6, 196-200.
37. SVEČNJAK, L., L. A. CHESSON, A. GALLINA, M. MAIA, M. MARTENELLO, F. MUTINELLI, M. NECASTI MUZ, F. M. NUNES, F. SAUCY, B.J. TIPPLE, K. WALLNER, E. WAŚ, T. A. WATERS (2019): Standard methods for *Apis mellifera* beeswax reasearch. *J. Apicul. Res.* 58, 2, 1-108.
38. TLAK GAJGER, I., I. BOSEK, N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ (2016): Utjecaj neonikotinoida na kukce oprašivače. *Veterinarska stanica* 47, 4, 353-363.
39. TLAK GAJGER, I., I. PALIJAN BOSEK (2014): Otrovanja kao značajan čimbenik slabljenja pčelinjih zajednica. U: Puškadija, Z. (ur.) Zbornik međunarodnog pčelarskog sajma i stručno znanstvenog skupa 11. pčelarski dani. 14.-15. ožujka 2014., Vinkovci, Hrvatska, 5-15.
40. TLAK GAJGER, I., M. KOSANOVIĆ, N. BILANDŽIĆ, M. SEDAK, B. ČALOPEK (2016): Variations in lead, cadmium, arsenic and mercury concentrations during

- honeybee wax processing using casting technology. Arh. Hig. Rada Toksikol. 67,223-228. doi: 10.1515/aiht-2016-67-2780
41. TLAK GAJGER, I., M. KOSANOVIĆ, V. OREŠČANIN, S. KOS, N. BILANDŽIĆ (2019): Mineral Content in Honeybee Wax Combs as a Measurement of the Impact of Environmental Factors. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 103, 697-703.
 42. TOMAŠEC, I. (1949): Biologija pčela. Nakladni zavod Hrvatske, Zagreb, str. 5-82.
 43. VIDAL-NAQUET, N. (2015): Honeybee Veterinary Medicine: *Apis mellifera* L. 5m Publishing, United Kingdom.
 44. VON FRISCH, K. (2016): The Dancing Bees. The University of Chicago Press, London, pp. 206-221.
 45. ZAFEIRAKI, E., R. SABO, K. M. KONSTANTINOS, K. MACHERA, L. SABOVA, T. MAJCHRAK (2022): Adult Honeybees and Beeswax as Indicators of Trace Elements Pollution in a Vulnerable Environment: Distribution among Different Apicultural Compartments. Molecules 6, 19, 6629.
doi: 10.3390/molecules27196629
 46. ZAVRTNIK, S., J. LOBOREC, I. GRČIĆ, D. ŽUBČIĆ (2020): Honey bee (*Apis mellifera*) in biomonitoring of environmental pollution. Veterinarska stanica 51, 4, 441-453. doi:10.46419/vs.51.4.5
 47. WANI, A., A. ARA, J.A. USMANI (2015): Lead toxicity: a review. Interdiscipl. Toxicol. 8, 2, 55-64.
 48. WERBER, W. J. A. (1835): Entwicklungsgeschichte der Physiologie und Medizin. Stuttgart und Leipzig, Deutschland, De Gruyter, p. 275.

8. Sažetak

KONCENTRACIJE TEŠKIH METALA TIJEKOM PRERADE VOSKA

Lidija Klobučar

Vosak, proizvod voštanih žlijezda pčela radilica u dobi 12 do 18 dana, je građevni materijal saća. U saće pčele radilice pohranjuju hranu (nektar, med, pelud), a matica polaže jaja iz kojih se razvija leglo. Specifična kemijska struktura voska omogućuje taloženje štetnih spojeva iz okoliša, uključujući i teške metale. S obzirom da svaki član pčelinje zajednice, leglo te svi pčelinji proizvodi dolaze u dodir sa saćem, štetni spojevi koji se u njemu nalaze mogu ugroziti funkcioniranje i zdravlje cijele zajednice, a posredno, putem pčelinjih proizvoda, i zdravlje ljudi. Starenjem saća smanjuje se njegova kvaliteta pa ga je potrebno prerađivati. Tijekom prerade rastaljeni vosak nakon homogenizacije je potrebno podvrgnuti sterilizaciji kako bi se spriječilo širenje uzročnika opasnih bolesti.

Tijekom procesa prerade voska metodom produljenog hlađenja i sedimentacije uzeti su uzorci voska s različitih razina (slojeva) iz spremnika. U uzrocima su određene koncentracije arsena, kadmija, olova i žive te su uspoređene s preporučenim koncentracijama prema europskoj legislativi. Od svih metala i slojeva voska samo je koncentracija olova veća od dopuštene koncentracije 5 mg/kg, i to u S4, a iznosi 13,39 mg/kg. S obzirom da se taj sloj voska prije faze sljedeće sedimentacije i hlađenja odbacuje, ne postoji opasnost od pojave nedopuštene koncentracije olova u prerađenom vosku/novim satnim osnovama. Stoga ovu metodu možemo smatrati učinkovitom i poželjnom za smanjivanje koncentracije teških metala u prerađenom vosku.

Ključne riječi: vosak, prerada voska, teški metali.

9. Summary

THE CONCENTRATIONS OF HEAVY METALS DURING WAX PROCESSING

Lidija Klobučar

Wax, a product of the wax glands of 12 to 18-days-old honey bee workers, is a building block of the comb. The workers store food (nectar, honey, pollen) in the combs, and the queen bee stores the eggs from which the bees' nest is developed. The specific chemical structure of wax enables the deposition of harmful compounds from the environment, including heavy metals. Given that every member of the honeybee colony, the nest and all the honeybee products come into contact with the wax, the harmful compounds contained in it can threaten the functioning and health of the entire colony, and indirectly, through the honeybee products, the health of human consumers. As the wax (honeycomb) ages, its quality decreases, so it necessity to be processed in order to be purified. Moreover, it must be sterilized to prevent the spread of dangerous diseases.

During the wax processing, using the method of extended cooling and sedimentation, the wax samples were taken from different levels (layers) of the tank. We determined the concentrations of arsenic, cadmium, lead and mercury in the samples using inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS). The mercury levels were tested on a mercury analyzer and compared the results with the concentrations allowed according to European legislation. Of all the metals and wax layers, only the concentration of lead exceeded the permissible concentration of 5 mg/kg in S4, and peaked at 13.39 mg/kg. Given that this wax layer is discarded before the new sedimentation and cooling phases, there is no danger of an impermissible concentration of lead in the processed wax or in the new comb foundations. Therefore, we can consider this method effective and desirable for reducing the concentration of heavy metals in processed wax.

Key words: wax, wax processing, heavy metals.

10. Životopis

Rođena sam 24. veljače 1998. godine u Virovitici. Osnovnu školu Slavka Kolara u Hercegovcu završila sam 2012. godine kada upisujem Gimnaziju u Bjelovaru, opći smjer. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2016. godine te na petoj godini studija odabrala usmjerenje Kućni ljubimci.