

# KONCENTRACIJE ESENCIJALNIH I TOKSIČNIH ELEMENTA U VOSKU MEDONOSNE PČELE (APIS MELLIFERA) TIJEKOM PRERADE SAĆA U SATNU OSNOVU

---

**Kosanović, Marina**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2024**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:152353>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-14**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

Marina Kosanović

**KONCENTRACIJE ESENCIJALNIH I  
TOKSIČNIH ELEMENATA U VOSKU  
MEDONOSNE PČELE  
(*APIS MELLIFERA*) TIJEKOM PRERADE  
SAĆA U SATNU OSNOVU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marina Kosanović

**ESSENTIAL AND TOXIC ELEMENTS  
CONCENTRATIONS IN HONEYBEE  
(*APIS MELLIFERA*) WAX DURING  
PROCESSING FROM HONEYCOMBS TO  
COMB FOUNDATIONS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

MARINA KOSANOVIĆ

**KONCENTRACIJE ESENCIJALNIH  
I TOKSIČNIH ELEMENATA U VOSKU  
MEDONOSNE PČELE  
(*APIS MELLIFERA*) TIJEKOM PRERADE  
SAĆA U SATNU OSNOVU**

DOKTORSKI RAD

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

Zagreb, 2024.



University of Zagreb  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Marina Kosanović

**ESSENTIAL AND TOXIC ELEMENTS  
CONCENTRATIONS IN HONEYBEE  
(*APIS MELLIFERA*) WAX DURING  
PROCESSING FROM HONEYCOMBS TO  
COMB FOUNDATIONS**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:  
Prof Ivana Tlak Gajger, PhD  
Nina Bilandžić, PhD

Zagreb, 2024



Sveučilište u Zagrebu  
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Marina Kosanović, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do onih navedenih u radu.

---

(potpis studenta)

Zagreb, 2024. godina

***Doktorski rad izrađen je u:***

*Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela  
Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu*

*Laboratoriju za određivanje rezidua  
Hrvatski veterinarski institut*

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Veterinarski fakultet**

**Zavod za biologiju i patologiju riba i pčela**

**Predstojnik Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela:**  
izv. prof. dr. sc. Krešimir Matanović

**Mentorice:**

prof. dr. sc. Ivana Tlak Gajger

dr. sc. Nina Bilandžić



*Doktorski rad predan je na ocjenu Fakultetskom vijeću Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupanja doktora znanosti iz znanstvenog područja Biomedicina i zdravstvo, polja Veterinarska medicina, grane Animalna proizvodnja i biotehnologija.*

## **ZAHVALE**

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ivani Tlak Gajger na znanstvenom i stručnom usmjeravanju, korisnim savjetima te nesebičnoj pomoći i razumijevanju tijekom izrade ovog doktorskog rada. Hvala na pruženoj mi prilici da upišem doktorski studij Veterinarskog fakulteta.*

*Zahvaljujem mentorici dr. sc. Nini Bilandžić i stručnom timu osoblja Laboratorija za rezidue Hrvatskog veterinarskog instituta koji su mi pomogli u provođenju eksperimentalnog dijela rada.*

*Zahvaljujem djelatnicima radnje Apivita na tehničkoj pomoći pri uzorkovanju.*

*Mojim roditeljima zahvaljujem na iskrenoj podršci, na razumijevanju, pomoći i ljubavi koja mi je bila snažan oslonac i podrška tijekom svih godina moga stručnog i znanstvenog rada. Puno hvala što ste mi pružili priliku pohađati doktorski studij Veterinarske znanosti.*

*Zahvaljujem prof. dr. sc. Alenu Slavici na svim savjetima i pomoći.*

*Hvala i mojim prijateljicama, Andreji i Tari, na svakom druženju, na svakoj šali i pošalicama i što znam da ste uz mene i kad se dugo ne vidimo.*

*Po vašoj toplini i razumijevanju, ovo razdoblje će mi zauvijek ostati u lijepom sjećanju.*

Marina

## SAŽETAK

### KONCENTRACIJE ESENCIJALNIH I TOKSIČNIH ELEMENATA U VOSKU MEDONOSNE PČELE (*APIS MELLIFERA*) TIJEKOM PRERADE SAĆA U SATNU OSNOVU

Pčelinji vosak proizvod je medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) koji pčele sintetiziraju u vlastitom organizmu. Saće u košnici građeno je od voska, a čini gnijezdo u kojemu se razvija pčelinje leglo i mjesto u kojemu pčele pohranjuju prikupljenu hranu. Vosak se u intenzivnom pčelarstvu kontinuirano reciklira preradom starog saća u satnu osnovu koja je nužan materijal pri uspostavljanju proizvodnih pčelinjih zajednica kao i pri api-biotehnološkim postupcima pripreme pčelinjih zajednica za glavne medonosne paše ili primjene biološko-tehnoloških načina kontroliranja ektoparazitskih bolesti poput varooze. Pčelinji je vosak složena smjesa estera viših masnih kiselina, slobodnih masnih kiselina, ugljikovodika, alkohola i drugih tvari, a saće u košnicama liposolubilno je materijal koji poput spužve zaprima rezidue niza različitih onečišćivača iz okoliša. U preporukama pčelarskih radova navodi se redoviti godišnji remont za najmanje 30 do 40 % ukupnog saća pojedinog pčelinjaka, što podrazumijeva zamjenu starog saća za novu satnu osnovu. Primjenom tehnologije lijevanja voska s produljenom fazom hlađenja i taloženja utvrđena je mogućnost uklanjanja znatne količine teških metala iz sirovog voska, kao i koncentriranja esencijalnih elemenata koji se troše tijekom razvoja pčelinjeg legla u saću. Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi prisutnost i kretanje koncentracija 16 esencijalnih i toksičnih elemenata: Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn u uzorcima voska tijekom prerade saća u satnu osnovu, primjenom analitičke metode induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS) kao višeelementne analize.

Rezultati su pokazali da je kod većine elemenata primijenjena tehnika dugotrajnog hlađenja i taloženja voska tijekom njegove prerade dala pozitivan učinak s obzirom na znatno smanjenje visokih koncentracija, posebice teških metala i toksičnih elemenata, prilikom odbacivanja četvrtog sedimentiranog sloja voska prije druge faze njegove prerade. Ukratko, statistička obrada razlika u koncentracijama elemenata primjenom Kruskal-Wallisova testa između četiri razine otopljenog voska, R1, R2, R3 i R4, uzorkovanih nakon prve faze prerade (nakon 1. dana) pokazala je statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) za sve pretraživane elemente (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn), uz iznimku Fe, za koji je utvrđeno da nema statistički značajne razlike ( $p > 0,05$ ).

Međusobnom usporedbom koncentracija elemenata utvrđene su četiri razine voska (R1, R2, R3, R4) uzorkovane nakon 7. dana, u drugoj fazi prerade. Utvrđene su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) za elemente Ag, As, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, V i Zn. Iznimka su Cr i Se za koje nisu nađene statistički značajne razlike između koncentracija četiri razine uzorkovanja voska. Također, utvrđene su statistički značajne razlike između koncentracija pretraživanih elemenata za iste slojeve voska uzorkovane 1. i 7. dana prerade za: Hg i Mo za R1; Hg, Cu i Mo za R2; Ag, Cr, Hg, Zn i V za R3; Ag, As, Ba, Cd, Co, Cu, Hg, Mo, Mn, Pb, Se, Zn i V za R4. Jedino u slučaju Fe i Ni nisu utvrđene značajne razlike između istih slojeva uzorkovanih u ta dva navrata uzorkovanja.

Tijekom prve faze prerade voska koncentracija pretraživanih elemenata u slojevima voska koji služe za izradu satne osnove u usporedbi sa slojem koji je odbačen iz daljnje prerade smanjena je za: Cr 64,02 %; As 88,61 %; Hg 83,94 %; Cd 81,6 %; Pb 86,11 %; Mn 97,14 %; Se 91,70 %; Ni 64,02 %; Co 97,1 %, Ag 93,72 %; Ba 92,89 %; Mo 89,77 %, te V 94,54 %. Pretraživanje saća i/ili sirovog voska primjenom tehnike ICP-MS na prisutnost i kvantifikaciju teških metala i metaloida može biti jedan od pokazatelja onečišćenja okoliša te pomoći pčelarima pri izboru primjerene lokacije za smještaj ili preseljenje pčelinjaka.

Ključne riječi: medonosna pčela (*Apis mellifera* L.), pčelinji vosak, prerada voska, esencijalni elementi, toksični elementi, ICP-MS

## EXTENDED ABSTRACT

### ESSENTIAL AND TOXIC ELEMENTS CONCENTRATIONS IN HONEYBEE (*APIS MELLIFERA*) WAX DURING PROCESSING FROM HONEYCOMBS TO COMB FOUNDATIONS

Beeswax is a product of honeybees (*Apis mellifera* L.) which they synthesize in their organism. It is of utmost importance for the honeybee colony's physiology and the health, and safety of honey and bee pollen stored in honeycomb cells in which they also ripen. Honeycombs in the hive are built of wax, forming a nest in which honeybee brood develops and where bees store collected food, nectar, honey and bee pollen. Wax is continuously recycled in intensive beekeeping by processing old (dark) honeycomb to comb foundations, which are a necessary material in the establishment of productive honeybee colonies as well as technological procedures for the preparation of honeybee colonies for the main honey pastures. It is crucial that honeycombs, as well as food supplies in the hive, are not contaminated with xenobiotics from the environment.

Beeswax represents a complex mixture of esters of higher fatty acids, free fatty acids, hydrocarbons, alcohols and other substances. Honeycomb in hives represents a liposoluble material that, like a "sponge", receives residues of many different environmental pollutants. Therefore, beeswax is considered to be an important bioindicator when collecting data on the degree of environmental pollution with heavy metals and/or metalloids. The recommendations of beekeeping practice specify a regular annual overhaul for at least 30 to 40% of the total honeycomb of each apiary, which implies the replacement of the old honeycomb for a new comb foundation, obtained by processing wax, i.e. by melting the old honeycomb. Successful replacement of old honeycombs with new comb foundations is crucial for achieving and maintaining quality production and is in line with good beekeeping, veterinary and environmental practices.

The effects of toxic elements on the reduced pollinating activity of insects, especially honeybees, as well as their reduced longevity and survival can also be significant after their exposure to concentrations of toxic metals, which are lower than the prescribed minimum risk concentrations for humans. In the hive, as a result of the possible long-term accumulation of toxic metals such as cadmium (Cd), zinc (Zn), chromium (Cr), nickel (Ni), mercury (Hg) and arsenic (As), and the inability to decompose them in honeycombs, reproduction disorders can

occur as well as other physiological functions of the honeybee colony. Some trace elements, such as copper (Cu), zinc (Zn), manganese (Mn), iron (Fe), cobalt (Co) and selenium (Se) represent micronutrients that are essential for the development of honeybee brood and the functioning of the whole honeybee colony. However, in high concentrations they also become toxic.

The usual wax processing procedures are also not sufficient for complete, or probably not even satisfactory *cleaning*. In contrast, the application of beeswax casting technology with prolonged cooling and deposition has established the possibility of removing a significant amount of heavy metals from raw wax.

Biochemical analyzers use the spectrophotometric method to measure analytes in combination with appropriate reagents, calibrators, and materials for quality control of sample analysis. Spectrophotometric analyzers are analytically precise and require a high level of repeatability. The analytical method of inductively coupled plasma with mass spectroscopy (ICP-MS) represents a modern method used to measure metals, metalloids, and other elements in biological samples. As an ionization source, inductively coupled plasma is used, and detection takes place by mass spectrometry. They start from the fact that in the literature are only a few and insufficiently confirmed results on the effectiveness of the implementation of wax processing technologies and the quality of the final product, research on this issue is necessary and scientifically justified. Therefore, this study aimed to determine the presence and movement of concentrations of selected essential and toxic elements in wax samples during honeycomb processing in comb foundations, using the ICP-MS technique as a multielement analysis.

Wax samples were collected in a craft for processing beeswax in comb foundations. Samples of dissolved crude beeswax were taken during the process of its processing in comb foundations by the method of prolonged cooling and sedimentation ( $n = 48$ ). The first set of liquid wax samples was taken after 24 hours (I) from the beginning of the three-level deposition phase directly from the tank. Samples were taken using a rake with a long handle or dropped from the lower parts of the tank. Namely, on the tank there are two openings (taps) between which there is a 7% altitude difference, and from which samples from layers 3 and 4 were collected, while samples from layers 1 and 2 were collected with a rake before pouring on the roller through which the finished comb foundations come out. The wax was taken from the surface layer (R1a), from the middle layer of melted wax (R2a), and from the bottom (R3a) of the tank (Figure 14). After the first sampling was carried out, a dark precipitate of contaminated

beeswax (R4) was completely released from the tank, which was removed from the processing. Then, using a pump, the remaining bright beeswax was poured into a clean steel tank and left for re-deposition and slow cooling. The following sampling was carried out after seven days (II) from the beginning of the repeated deposition phase of beeswax that was maintained at 75 °C. When taking the second set of samples, sampling was repeated from the surface level (R1b), from the middle beeswax layer (R2b), and sediment on the bottom of the tank (R3b).

In laboratory conditions, 48 beeswax samples were prepared and analyzed on two occasions (after 24 hours and after seven days) during the processing of honeycombs in comb foundations. The samples were qualitatively and quantitatively analyzed on 16 essential and toxic elements (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V and Zn), using the ICP-MS technique.

The obtained results of concentrations of analyzed elements were statistically processed by Small Stata 13.1 (StataCorp LP, 4905 Lakeway Drive, USA). The concentrations of elements in beeswax samples are shown as the minimum (Min) and maximum (Max), mean (SV) and standard deviation (SD). In statistical processing, the Shapiro-Wilk test was used to test the distribution of data, while the Kruskal-Wallis test examined differences in element concentrations between layers R1 to R4 in the same sampling term, i.e. days 1 and 7 (I, II), and Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) test of differences in element concentrations between the same layers sampled in the first and second phases of beeswax processing.

The results show that in most elements applied the method of long-term cooling and deposition of wax during its processing gave a positive effect due to a significant decrease in high concentrations, especially heavy metals and toxic elements, when removing the fourth sedimented layer of wax before the second stage of processing.

In summary, the statistical processing of differences in element concentrations using the Kruskal-Wallis test between the four levels of dissolved wax R1, R2, R3 and R4 sampled after day 1 (I) of processing showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) for all elements (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V and Zn) except for Fe which was found to have no statistically significant differences ( $p > 0.05$ ).

By mutually comparing the concentrations of elements determined in four beeswax levels (R1, R2, R3, R4) sampled after day 7 (II) in the second phase of processing, the Kruskal-Wallis test determined statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) for the elements Ag, As, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, V and Zn. The exception is Cr and Se for which no statistically

significant differences were found between the concentrations of four levels of beeswax sampling.

Also, statistically significant differences were found between concentrations of analyzed elements for the same beeswax layers sampled on day 1 (I) and day 7 (II) for Hg and Mo for R1; Hg, Cu and Mo for R2; Ag, Cr, Hg, Zn, and V for R3; Ag, Ba, Cd, Co, Cu, Hg, Mo, Mn, Pb, Se Zn and V for R4. Only in the case of Fe and Ni have significant differences been found between the same layers sampled on these two occasions of sampling.

Beeswax is a honeybee product that is not food and is rarely searched from an ecotoxicological point of view. It is mostly used in the framework of good beekeeping practices and biosecurity measures because the success of beekeeping and the productivity of honeybee colonies largely depend on the effective replacement of the old honeycomb and its processing into new comb foundations. Since the honeycomb is kept in the hive for several consecutive years, and is built of extremely liposoluble material, it can serve as a bioindicator for collecting data on the degree of environmental pollution by hazardous pollutants. For example, heavy metals and other toxic elements can accumulate in honeycombs over long periods, causing unintended consequences for consumers of honeybee products or more often honeybee colonies. With the accumulation of certain heavy metals in plants, through pollen and nectar, pollinating insects become exposed to the harmfulness of environmental pollution. Namely, the negative effects of heavy metals on the development and care of honeybee brood, learning and memory, the longevity of adult bees, the overall productivity of the colony, and behavioral patterns when taking food are known. It has been found that honeybees do not distinguish essential micronutrients such as Zn from highly toxic elements such as Pb or As, or do not react with altered behavior to the concentrations introduced into their body corresponding to the relevant field doses.

Although it is known that beeswax is purified during processing, metals are particularly resistant to high temperatures during processing and can accumulate for years since it is a constant beekeeping practice to recycle honeycombs into comb foundations that are reused in beekeeping production. The concentrations of most of the searched elements decreased in the following order:  $R4 > R3 > R2 > R1$ . The established concentrations of Hg were about seven times lower in wax samples taken from layers R1 to R3 compared to concentrations in sedimented beeswax from layer R4. The concentration values of Pb in the beeswax layer R4, which is excluded after the first phase of wax processing, were up to one hundred and fifty times higher than in the light layers of beeswax layer R1, and its concentrations increased



following:  $R1 < R2 < R3 < R4$ . Cd concentrations increased in the same order, and the established values in lighter layers of beeswax were lower or similar to previously published results. The content of As, Hg, Cd and Pb in beeswax layers transferred to the second stage for further processing moved within the maximum permissible levels following the regulations for food additives. The highest concentration of Ni was measured in beeswax samples from the R4 level, and its value was about fifty times higher compared to the measured value in beeswax samples from layer R1. For the metals Co, Cu, Mn, Fe, Se and Zn, concentrations decreased in the following order  $R4 > R3 > R2 > R1$ . In doing so, the mean concentrations of metals in the beeswax layer R4 were higher compared to the concentrations determined in layers R1: Co about 250 times, Cu about 230 times, Mn about 230 times, Fe 130 times, Se 14 times, and Zn about 300 times.

Manganese, Se and Co are essential trace elements and micronutrients necessary for a range of metabolic functions, but potentially toxic in larger quantities. In this study, the concentrations of these tested elements also decreased in order:  $R4 > R3 > R2 > R1$ . In doing so, the mean values of lighter layers of beeswax (R1-R3) did not differ statistically significantly from the values in the same layers of the second phase of beeswax processing. However, compared to lighter layers after day 1 of beeswax sedimentation in the tank, they were found to be 97.14% (Mn); 91.70% (Se); and 97.1% (Co) of a higher concentration of an element in the R4 layer that was excluded from further processing. After day 7 of sedimentation, an additional 12.84% (Mn) was excreted from processing compared to the first phase of processing in R4; 15.621% (Se); and 8.25% (Co).

For the group of elements Ag, Ba, Mo and V, according to our knowledge, there is no published data available so far. For all of these elements, a statistically significant difference in the concentrations of analyzed elements was found between the four beeswax levels during the first and second phases of honeycomb processing into comb foundations ( $p < 0.05$ ). In doing so, in layer R4 compared to lighter layers of beeswax (R1 – R3) after 24 hours of sedimentation, 93.72% (Ag) was determined; by 92.89% (Ba); for 89.77% (Mo) and 94.54% (V) higher concentration of individual elements.

Keywords: honeybee (*Apis mellifera* L.), beeswax, beeswax procession, essential elements, toxic elements, ICP-MS

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>4</b>
2.1. ŽIVOT ZAJEDNICE MEDONOSNE PČELE .....	4
2.2. GRAĐA I FUNKCIJA SAĆA .....	8
2.3. UPOTREBA PČELINJEG VOSKA.....	14
2.4. PRERADA VOSKA U SATNE OSNOVE.....	17
2.5. BIOINDIKATORI .....	22
2.6. ESENCIJALNI I TOKSIČNI ELEMENTI.....	26
2.6.1. ARSEN (As).....	26
2.6.2. BAKAR (Cu) .....	27
2.6.3. BARIJ (Ba) .....	28
2.6.4. CINK (Zn) .....	29
2.6.5. KADMIJ (Cd) .....	30
2.6.6. KOBALT (Co).....	31
2.6.7. KROM (Cr) .....	31
2.6.8. MANGAN (Mn) .....	32
2.6.9. MOLIBDEN (Mo).....	33
2.6.10. NIKAL (Ni).....	33
2.6.11. OLOVO (Pb) .....	34
2.6.12. SELENIJ (Se) .....	35
2.6.13. SREBRO (Ag) .....	35
2.6.14. VANADIJ (V) .....	36
2.6.15. ŽELJEZO (Fe).....	36
2.6.16. ŽIVA (Hg).....	37
<b>3. OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>38</b>
<b>4. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>39</b>
4.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA VOSKA .....	39
4.2. PRIPREMA UZORAKA VOSKA ZA LABORATORIJSKO ANALIZIRANJE .....	41
4.3. PRIMJENA INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME S MASENOM SPEKTROMETRIJOM ZA ODREĐIVANJE ELEMENATA U VOSKU .....	43
4.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA ŽIVE IZRAVNIM SPALJIVANJEM U UREĐAJU ZA ANALIZIRANJE ŽIVE .....	50
4.5. KONTROLA KVALITETE REZULTATA PROVEDENIH ANALIZA .....	52
4.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	54
<b>5. REZULTATI</b> .....	<b>55</b>

<b>6. RASPRAVA .....</b>	<b>66</b>
<b>7. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>72</b>
<b>8. LITERATURA.....</b>	<b>73</b>
<b>9. PRILOZI .....</b>	<b>101</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>104</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

% – postotak

mg/kg – miligram po kilogramu

FAO - Food and Agriculture Organization

WHO – World Health Organization

EFSA – European Food Safety Authority

Cu – bakar

Cd – kadmij

Pb – olovo

Zn – cink

Ni – nikal

ICP-MS – induktivno spregnuta plazma s masenom spektrometrijom

V – vanadij

Cr – krom

Mn – mangan

Fe – željezo

Co – kobalt

As – arsen

Se – selenij

Mo – molibden

Hg – živa

Ag – srebro

Ba – barij

< – manje

> – više

r i – polumjer upisane kružnice (apotem)

d i – promjer upisane kružnice

r c – polumjer opisane kružnice

d c – promjer opisane kružnice

hPa – hektopaskal

K – kalij

P – fosfor

Fe – željezo  
Mg – magnezij  
Zn – cink  
Ca – kalcij  
Mn – mangan  
g/cm<sup>3</sup> – gram po kubnom centimetru  
pH – snaga vodika (lat. *potentia hydrogenii*)  
ppm – *parts per million*  
InAs – indij-arsenid  
mg/t – miligram na tonu  
Ca<sup>2+</sup> – kation kalcija  
mL – mililitar  
ICV – inicijalna kalibracijska verifikacija  
CCV – kontinuirana kalibracijska verifikacija  
HNO<sub>3</sub> – dušična kiselina  
MW – megavat  
μg/kg – mikrogram po kilogramu  
mg/kg – miligram po kilogramu  
≥ – više ili jednako  
μg/L – mikrogram po litri  
mg/L – miligram po litri  
μL – mikrolitar  
ng – nanogram  
ng/mg – nanogram po mil  
IS – interni standard  
SP – slijepa proba  
KM – kontrolni materijal  
CRM – certificirani referentni materijal  
NDK – najveća dopuštena koncentracija

## 1. UVOD

Pčelinji vosak proizvod je medonosne pčele (*Apis mellifera* L.) koji pčele sintetiziraju u vlastitom organizmu. To je izlučevina pčelinjeg organizma, a proizvode ga pčele radilice u dobi od 12 do 18 dana (graditeljice) te se koriste njime kao građevnim materijalom za saće. Pčelinji je vosak iznimno važan za fiziologiju pčelinje zajednice kao i zdravstvenu ispravnost meda i pčelinje peludi koji su pohranjeni u stanicama saća u kojima ujedno i dozrijevaju (BOGDANOV, 2016.). Saće u košnici građeno je od voska. Ono čini gnijezdo u kojemu se razvija pčelinje leglo i mjesto u kojemu pčele pohranjuju prikupljenu hranu, nektar (od kojega nastaje med) i pčelinju pelud (od koje nastaje fermentirana pčelinja pelud, odnosno pčelinji kruh). Vosak se u intenzivnom pčelarstvu kontinuirano reciklira preradom starog (tamnog) saća u satnu osnovu (BOGDANOV, 2009.), koja je nužan materijal pri uspostavljanju proizvodnih pčelinjih zajednica kao i tehnološkim postupcima pripreme pčelinjih zajednica za glavne medonosne paše. Vrlo je važno da saće, kao i zalihe hrane u košnici, nisu onečišćene ksenobioticima iz okoliša (BOGDANOV, 2006.; BILANDŽIĆ i sur., 2014.a; 2014.b; 2017.).

Pčelinji vosak (dalje u tekstu: vosak) složena je smjesa estera viših masnih kiselina, slobodnih masnih kiselina, ugljikovodika, alkohola i drugih tvari (SVEČNJAK i sur., 2019.), a saće u košnicama liposolubilno je materijal koji poput spužve zaprima rezidue niza različitih onečišćivača iz okoliša (BUCHWALD i sur., 2009.; RAVOET i sur., 2015.). Stoga se smatra da je vosak važan bioindikator prilikom prikupljanja podataka o stupnju onečišćenja okoliša teškim metalima i/ili metaloidima (CONTI i BOTRE, 2001.; FORMICKI i sur., 2013.).

U preporukama pčelarskih radova navodi se redoviti godišnji remont za najmanje 30 do 40 % ukupnog saća pojedinog pčelinjaka, što podrazumijeva zamjenu starog saća za novu satnu osnovu, dobivenu preradom voska, odnosno pretapanjem starog saća (TOMLJANOVIĆ i sur., 2020.). Uspješna zamjena starog saća novim satnim osnovama ključna je za postizanje i održavanje kvalitetne proizvodnje, te je u skladu s dobrom pčelarskom, veterinarskom i okolišnom praksom (TLAK GAJGER i sur., 2019.; TLAK GAJGER, 2020.). Također, znatno pridonosi očuvanju zdravlja pčelinje zajednice, njezine vitalnosti, kao i stupnju preživljavanja pčelinjeg legla tijekom razvoja i odraslih pčela nakon izlaska iz stanica saća. Kvaliteta voska iznimno je bitna i u intenzivnoj proizvodnji matica.

S obzirom na raspored i redoslijed obavljanja zadataka kućnih pčela i odraslih pčela skupljačica, metalima se može onečistiti i saće (DEVILLERS i PHAM-DELEGUE, 2002.), a prisutnost toksičnih metala u vosku ovisi primarno o stupnju onečišćenja zraka, vode, tla, peludi i nektara (BUCHWALD i sur., 2009.; CALATAYUD-VERNICH i sur., 2017.; TLAK GAJGER i sur., 2019.). Smatra se da je onečišćenje toksičnim elementima ekološki problem na industrijski razvijenim područjima kao i područjima intenzivne poljoprivredne proizvodnje (ZARIC i sur., 2016.; 20018.a; 2018.b).

Iako vosak nije hrana, u EU-i je dopušten i služi kao prehrambeni aditiv pod nazivom E901, a ima široku primjenu i u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji. Prema važećoj legislativi o utvrđivanju specifikacija za prehrambene aditive na razini Europske unije (Uredba EU 231/2012; Direktiva Komisije 2009/10/EZ) propisane su maksimalne dopuštene vrijednosti za nekoliko toksičnih elemenata: 3 mg/kg za arsen (As), 1 mg/kg za živu (Hg) te 5 mg/kg za olovo (Pb) (COMMISSION DIRECTIVE, 2009.; COMMISSION REGULATION, 2012.). FAO/WHO stručno povjerenstvo za vosak kao dodatak hrani preporučuje maksimalno 1 do 2 mg/kg za Pb (EUROPEAN COMMISSION, 2002.), dok EFSA smatra da za Pb maksimalne dopuštene vrijednosti treba postaviti na što je moguće niže vrijednosti zbog niza mogućih toksičnih učinaka (EFSA, 2007.).

Učinci toksičnih elemenata na smanjenu oprašivačku aktivnost kukaca, posebice pčela, kao i njihovu smanjenu dugoživost i preživljavanje mogu biti važni i pri izloženosti koncentracijama toksičnih metala koje su niže od propisanih minimalnih rizičnih koncentracija za ljude (ATSDR, 2022.). Utvrđeno je da pojedine medonosne biljke (primjerice zlatošipka i maslačak) akumuliraju toksične metale poput Cu, Cd, Pb, Zn i Ni u listovima i cvjetovima. Istodobno je zaključeno da prisutnost magnezija (Mg), aluminijsa (Al) ili nikla (Ni) u peludi i nektaru cvjetova može poremetiti orijentacijsku sposobnost pčela i drugih kukaca oprašivača, ali i znatno smanjiti broj slijetanja na cvijet (BURDEN i sur., 2019.). Dosad nije u potpunosti razjašnjeno u kojoj su mjeri pčele skupljačice sposobne okusom *prepoznati* prisutnost štetnih tvari u prirodnoj hrani, a niti kolika je vjerojatnost njihova prelaska iz onečišćenih stanica saća u leglo tijekom različitih razvojnih stadija pčele (WU i sur., 2011.). U košnici, kao posljedica mogućeg dugogodišnjeg akumuliranja toksičnih metala poput kadmija (Cd), cinka (Zn), kroma (Cr), Ni, Hg i As, te nemogućnosti njihove razgradnje u saću, mogu nastati poremećaji u razmnožavanju i u drugim fiziološkim funkcijama pčelinje zajednice (DI i sur., 2016.; 2020.; MAHMOUDI i sur., 2015.; HLADUN i sur., 2016.). Pojedini su elementi u tragovima, poput bakra (Cu), Zn, mangana (Mn), željeza (Fe), kobalta (Co) i selena (Se), mikronutrijenti koji su

esencijalni za rast i razvoj pčelinjeg legla, kao i fiziologiju pčelinje zajednice. No u visokim koncentracijama također postaju toksični.

Najviše pčelinjeg voska preradi se u satne osnove u specijaliziranim radionicama opremljenim odgovarajućom opremom koja treba osigurati pravilnu provedbu pojedine faze prerade, primjerice vrlo važne sterilizacije. Budući da su satne osnove neizostavan materijal pri uspostavljanju proizvodnih pčelinjih zajednica, vrlo je važno da nisu onečišćene ksenobioticima (COGGSHALL i MORSE, 1984., BOGDANOV, 2006.; PAVLIČEK i sur. 2021., 2023.) ili patvorinama (SVEČNJAK i sur., 2015.).

Uobičajeni postupci prilikom prerade voska također nisu dovoljni za potpuno, pa vjerojatno ni zadovoljavajuće *čišćenje*, dok je primjenom tehnologije lijevanja voska s produljenom fazom hlađenja i taloženja utvrđena mogućnost uklanjanja znatne količine teških metala iz sirovog voska (TLAK GAJGER i sur., 2014.; TLAK GAJGER i sur., 2016.a; 2016.b).

Biokemijski analizatori spektrofotometrijskom metodom mjere analite u kombinaciji s odgovarajućim reagensima, kalibratorima i materijalima za kvalitetu kontrole pretraživanja uzoraka. Spektrofotometrijski su analizatori analitički precizni i zahtijevaju visoku razinu ponovljivosti. Analitička metoda induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (ICP-MS) suvremena je metoda koja se primjenjuje za mjerenje metala, metaloida i drugih elemenata u biološkim uzorcima. Kao ionizacijski izvor koristi se induktivno spregnuta plazma, a detekcija se radi masenom spektrometrijom (Au680 Chemistry Analyzer In-Lab Training) (NELMS, 2005.).

Polazeći od činjenice da u literaturnim podacima postoje tek malobrojni i nedovoljno potvrđeni rezultati o učinkovitosti primjene tehnologija prerade voska i kvalitete konačnog proizvoda u obliku satne osnove, istraživanje ove problematike potrebno je i znanstveno opravdano. Stoga je cilj ovog istraživanja bio utvrditi prisutnost i kretanje koncentracija 16 esencijalnih i toksičnih elemenata: srebro (Ag), As, barij (Ba), Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, molibden (Mo), Ni, Pb, Se, vanadij (V) i Zn, u uzorcima voska tijekom prerade saća u satnu osnovu, primjenom tehnike ICP-MS kao višeelementne analize.



## 2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

### 2.1. ŽIVOT ZAJEDNICE MEDONOSNE PČELE

Prema načinu života medonosna pčela svrstava se u najprepoznatljivije društvene kukce koji žive u višegodišnjim zajednicama. Živi u organiziranoj zajednici od nekoliko desetaka tisuća odraslih pčela, u gnijezdu izgrađenom od voska, zajedno sa svojim leglom i skladištenom hranom (slika 1). Pčelinju zajednicu čine muški (trutovi) i ženski (matice, radilice) članovi, koji se međusobno razlikuju prema morfološkim značajkama, veličini tijela i zadacima koje obavljaju u zajednici (TOMAŠEC, 1949.; TAUTZ, 2008.; CONNOR, 2012.). Ponašajni obrasci zajednice podrazumijevaju feromonski određen raspored i podjelu poslova pojedinih članova, ovisno o njihovoj dobi i spolu, ali i sezoni, vanjskim ekološkim čimbenicima koji utječu na dugoživost članova, te veličinu populacije pčela tijekom godine (WINSTON, 1987.; KANE i FAUX, 2021.). Pojedinačna pčela ne može živjeti sama te brzo ugiba izvan pčelinje zajednice. Prilagodba medonosnih pčela na mnogostruke utjecaje okolišnih prilika izražena je godišnjim razvojem zajednice, dostupnošću hrane te odnosom nositelj – nametnik ili uzročnik bolesti. S obzirom na to da bolesti znatno utječu na vitalnost i jačinu zajednice, može se reći da je proizvodnost pčelinje zajednice povezana s godišnjim ciklusom zajednice, zdravstvenim statusom i primjenom dobrih proizvođačkih praksi (TOMLJANOVIĆ i sur., 2012.; RITTER, 2014.; VIDAL-NAQUET, 2015.; TLAK GAJGER, 2020.; RADAKOVIĆ i sur., 2022.).



Slika 1. Članovi pčelinje zajednice, leglo i hrana u stanicama saća.

Matica je spolno razvijena ženka čija je najvažnija uloga polaganje jaja u stanice saća i dugotrajna (primarna) feromonski regulirana organizacija života i rada pčelinje zajednice (NIÑO i sur., 2013.; CARR, 2016.; KANE i FAUX, 2021.). Majka je svih članova zajednice. U usporedbi s radilicom, matica je veća i snažnija (slika 2). Dužina njezina tijela iznosi oko 20 mm, a masa za njezine najjače aktivnosti iznosi oko 0,23 g. Najuočljivija je razlika između radilice i matice to što matica ima nešto širi i duži zadak, koji dužinom prelazi stražnji kraj krila. U pčelinjoj zajednici matica ima glavnu ulogu održavanja legla i prenošenja transgeneracijske imunosti svojim potomcima (SALMELA i sur., 2015.). Nema razvijene anatomske strukture za skupljanje hrane (primjerice peludne košarice) na nogama, izostaju i voskovne i mliječne žlijezde, a čeljusti i rilce slabije su joj razvijeni nego u pčele radilice. Za nju se brinu i hrane je radilice matičnom mliječi, što joj osigurava dugoživost, ali i uvjetuje drugačiji sastav crijevnog mikrobioma (ANDERSON i sur., 2018.). Matica u prosjeku živi četiri do pet godina, no u proizvodnom pčelarenju matice se mijenjaju svake druge godine da bi se izbjeglo smanjenje stupnja proizvodnosti (TOMAŠEC, 1949.; CONNOR, 2008.; DAVIS, 2011.).



Slika 2. Matica medonosne pčele (*A. mellifera*).

Najbrojniji članovi pčelinje zajednice jesu pčele radilice kojih ljeti, ovisno o jačini zajednice, prosječno ima 50 000 do 80 000. U pčelinjoj zajednici postoji podjela poslova prema dobi pčela radilica i potrebama zajednice. S obzirom na podjelu zadataka radilice dijelimo na dvije skupine. Jednu skupinu čine mlade pčele u dobi do tri tjedna, koje obavljaju samo poslove unutar košnice (takozvane kućne pčele) i čine oko 2/3 ukupnog broja radilica. U drugu skupinu

ubrajamo starije pčele, koje obavljaju poslove izvan košnice (skupljačice) (TOMAŠEC, 1949.). Radilice su ženke kojima su jajnici nerazvijeni te nemaju funkciju razmnožavanja (DAVIS, 2011.). Njih je u pčelinjoj zajednici nekoliko desetaka tisuća, što ovisi o jačini pčelinje zajednice i sezoni (VIDAL-NAQUET, 2015.). Zadaci koje obavljaju u pčelinjoj zajednici kao kućne pčele jesu čišćenje košnice, briga o leglu (prehrana, održavanje higijene, zagrijavanje, hlađenje), gradnja saća i obrana zajednice. Nakon tri tjedna provedena u kućanskim poslovima postaju skupljačice, usavršavaju svoje letačke sposobnosti te skupljaju hranu u prirodi. Tijelo radilica dugo je oko 12 do 14 milimetara. Njihova tjelesna masa iznosi oko 0,1 g, ali dosta varira ovisno o količini hrane koju uzimaju (u prosjeku 10 000 radilica čini jedan kilogram „žive pčele“) (TOMAŠEC, 1949.; STELL, 2012.).

Spolni organi radilica nepotpuno su razvijeni. To se očituje i u veličini zatka, koji doseže do ruba krila ili ih tek neznatno prelazi. S obzirom na zadatke koje radilice obavljaju u pčelinjoj zajednici, imaju dobro razvijene organe za skupljanje hrane (pelud, nektar), gradnju saća, hranjenje legla, a i žalčani aparat kao obrambeni alat. Ljetne pčele koje obavljaju intenzivne radne aktivnosti žive tek nekoliko tjedana (četiri do šest tjedana), a za vrijeme zimskog mirovanja i do nekoliko mjeseci (od jeseni do proljeća) što im individualno omogućuje u prvom redu razvijeno masno-bjelančevinasto tijelo (TAUTZ, 2008.), visoka koncentracija vitelogenina (AMDAM i sur., 2012.), niska razina juvenilnog hormona (DOKE i sur., 2015.), kao i socijalni ponašajni obrazac održavanja topline unutar zimskog klupka (JOHNSON, 2010.; DÖKE i sur., 2015.).

Trutovi su spolno razvijeni muški članovi pčelinje zajednice (slika 3). Ima ih od nekoliko stotina do nekoliko tisuća, ovisno o sezoni, jačini i potrebama zajednice, te primijenjenim biološko-uzgojnim mjerama i pčelarskim praksama. Njima je glavni zadatak parenje s maticom, pri čemu ispuštaju feromonske signale (HRASSNIGG i CRAILSHEIM, 2005.; BORTOLOTTI i COSTA, 2014.). Morfološki oni imaju tijela duža od radilica te zaobljeniji, zdepasti zadak. Dužina njihova tijela iznosi oko 15 do 17 mm, a ukupna masa tijela oko 0,196 g. Trutovi nemaju organe za skupljanje hrane niti žalčani aparat. Njihov život traje tri do šest mjeseci, a potkraj ljeta pčele radilice ih izbacuju iz košnice, te oni ugibaju (ENGELS i EMPERATRIZ-FONCESCA, 1990.).





Slika 3. Radilice i trut na saću.

Nakon što se mlada radilica u potpunosti razvije u stanici saća, progrize poklopac i izlazi iz stanice saća. Mlada je pčela sive boje, slaba, polako se kreće i ne može letjeti. Prvi poslovi koje obavlja jesu čišćenje stanica saća od prvog do petog dana života. Taj posao pčele po potrebi mogu obavljati i kasnije, do dobi od 21. dana, do kada obavljaju kućne poslove u košnici. Jedan dio mladih pčela obitava mirno na saću i grije leglo. Pčele radilice u dobi od šestog do 12. dana života hrane leglo i njih nazivamo pčelama hraniteljicama. U prvom dijelu tog razdoblja hrane mješavinom peludi, meda i vode ličinke koje su starije od tri dana. Zbog obilne prehrane u tim danima radilicama se ubrzo razvijaju mliječne žlijezde te je sljedeći zadatak hranjenje posve mladih ličinki u dobi do tri dana, i to matičnom mliječi. Taj posao obavljaju radilice hraniteljice, obično do 12. dana života, a u iznimnim potrebama i dan do dva dulje (BORTOLOTTI i COSTA, 2014.). Poslije toga funkcija se mliječne žlijezde mijenja.

U prilikama kad se naglo prekine ta funkcija mladih pčela (npr. za vrijeme rojenja) ostaju mliječne žlijezde u funkciji i u starijoj dobi pčele, no to ovisi o potrebama zajednice. Mliječne žlijezde ostaju razvijene i u pčela hraniteljica koje su ušle u zimovanje u fazi izlučivanja matične mliječi, pa te pčele nastave hraniti novo položeno leglo nakon izlaska iz zime, iako već imaju nekoliko mjeseci. Sve dok pčele radilice hrane mlađe leglo matičnom mliječi, trebaju uzimati velike količine peludi koja sadržava visokovrijedne prehrambene sastojke poput bjelančevina, masti, ugljikohidrata, vitamina i drugih esencijalnih nutrijenata. Među pčele te dobi ubrajaju se i tzv. pčele pratiteljice (njih oko 12) koje neprestano okružuju maticu i dodaju joj matičnu mliječ s rilca na rilce (ANDERSON i sur., 2018.). Pri kraju tog

životnog razdoblja pojedine mlade pčele izlaze na svoje prve orijentacijske letove izvan košnice.

Nakon 12. dana života počinju se u pčela radilica razvijati voskovne žlijezde (četiri para) koje su najrazvijenije oko 15. dana, a ostaju razvijene do 18. dana života (TAUTZ, 2008.; DAVIS, 2011.). Tada radilice obilno sintetiziraju i izlučuju vosak i grade saće. U razdoblju kad radilice proizvode i izlučuju matičnu mliječ i vosak, obavljaju i funkciju spremanja rezerve hrane i čišćenja košnice. Mlade pčele čekaju pčele skupljačice koje donose nektar, primaju ga od njih s rilca i prenose u svojem mednom mjehuru u stanice saća. Kućne pčele sudjeluju i u pohranjivanju peludi tako što radom svojih čeljusti utiskuju pčelinju pelud (peludne granule) u stanicu saća, ispune do tri četvrtine visine stanice saća te prekriju slojem meda čime dolazi do fermentacije kojom nastaje pčelinji kruh (SNODGRASS i sur., 2015.).

Od otprilike 18. pa do 21. dana života radilice su stražarice i čuvaju ulaz u košnicu od pčela tuđica te drugih štetnika i neprijatelja. Pri kraju tog razdoblja pčele radilice izlaze sve češće iz košnice na orijentacijske letove, dok se potpuno ne upoznaju s okolinom i konačno u dobi od oko tri tjedna postaju skupljačice (HAMMER, 1995.).

## 2.2. GRADA I FUNKCIJA SAĆA

Vosak medonosne pčele sadržava preko 300 različitih sastavnica. Prevladavaju esteri masnih kiselina (~ 67 %), ugljikovodici (~ 14 %) te zasićene i nezasićene slobodne masne kiseline (~ 12 %) (TULLOCH, 1980.; SVEČNJAK i sur, 2019.). Vosak dobiven od različitih podvrsta medonosne pčele *A. mellifera* neznatno se razlikuje, uglavnom prema pojedinim udjelima nabrojanih najzastupljenijih spojeva (BEVERLY, 1995.; FROHLICH i sur., 2000.). Glavne skupine spojeva u pčelinjem vosku definirane su kao one koje prelaze 5 % ukupnog sastava pčelinjeg voska (alkani, alkeni, slobodne masne kiseline, monoesteri, diesteri i hidroksimonoesteri), dok sporedni spojevi čine manje od 5 % ukupnog sastava pčelinjeg voska (primjerice masni alkoholi) (AICHHOLZ i LORBEER, 1999.; 2000.; HEPBURN i sur., 2014.). Najzastupljeniju frakciju estera čine monoesteri (primarno palmitati i oleati) koji su u pčelinjem vosku zastupljeni s prosječno 40,8 % (AICHHOLZ i LORBEER, 1999.; 2000.). Sadržaj hidroksimonoestera i diestera znatno je manji u usporedbi s monoesterima.

Ukupni sadržaj ugljikovodika u pčelinjem vosku kreće se između 12,3 i 17,8 % (WAS i sur., 2014.b), a sastoji se od ravnolančanih (nerazgranatih) zasićenih ugljikovodika (12,8 %) s prevladavajućom dužinom lanca C27 – C31. Najbrojniji su linearni zasićeni ugljikovodici (n-

alkani), koji čine oko 67 % svih ugljikovodika, dok se razgranati alkani (izoalkani) pojavljuju u mnogo manjim količinama (0,2 %) (STREIBL i sur., 1966.).

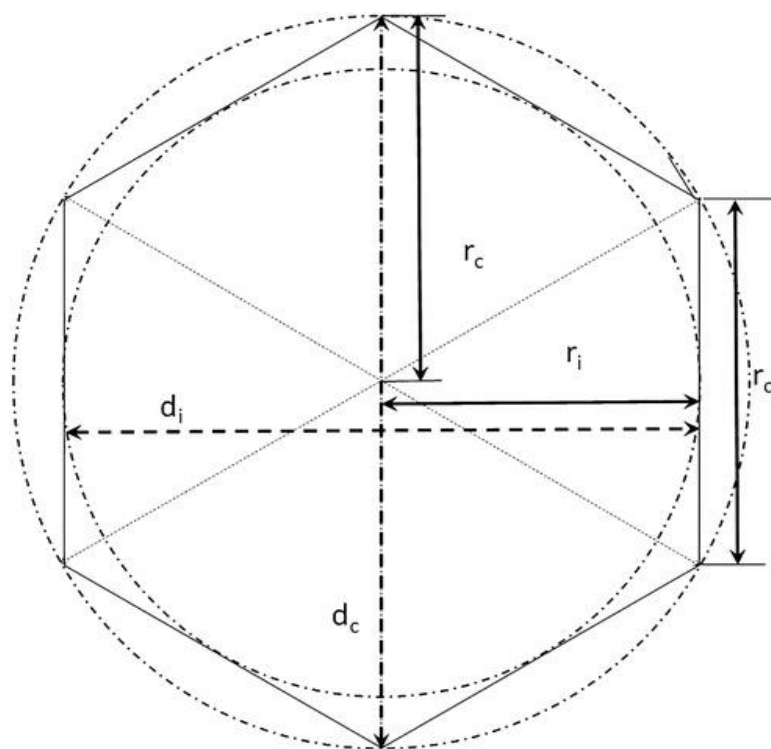
Štoviše, postotni udio n-alkana s neparnim brojem ugljikovih atoma znatno je veći u odnosu na alkane s parnim brojem ugljikovih atoma i iznosi oko 95 % (WAS i sur., 2014.a, 2014.b). Alkan C27 (heptakozan) najzastupljeniji je ugljikovodik i prosječno u djevičanskom pčelinjem vosku iznosi oko 13 %, a udio se kreće u rasponu od 9,19 do 16,8 % (AICHHOLZ i LORBEER, 1999.; MAIA i NUNES, 2013.).

Pčelinji vosak medonosne pčele sadržava visoke udjele slobodnih masnih kiselina (do 18 %) u usporedbi s pčelinjim voskom drugih vrsta pčela. Primjerice, kod *A. cerana* udio slobodnih masnih kiselina iznosi 3,6 %, kod *A. florea* 0,8 %, kod *A. andreniformis* 2,6 %, kod *A. dorsata* 4,9 %, a kod *A. laboriosa* 4,3 % (AICHHOLZ i LORBEER, 1999.; SVEČNJAK i sur., 2019.). Najvećim dijelom sadržava zasićene dugolančane masne kiseline (oko 85 %) s parnim brojem ugljikovih atoma (C14 – C36). Najzastupljenija je slobodna masna kiselina pčelinjeg voska tetrakozanova (lignocerična) kiselina (AICHHOLZ i LORBEER, 1999., 2000.; JIMENEZ i sur., 2003.) koja čini više od 5 % njegova ukupnog sastava, a od zasićenih masnih kiselina u znatnom se udjelu u pčelinjem vosku pojavljuje i palmitinska kiselina (TULLOCH, 1980.; AICHHOLZ i LORBEER, 1999.). Od nezasićenih masnih kiselina u pčelinjem je vosku najzastupljenija oleinska kiselina (3,90 %).

Masne kiseline imaju važnu ulogu u zajednicama medonosnih pčela pri kemijskoj komunikaciji, odnosno pri međusobnom prepoznavanju članova iste zajednice (BROCKMANN i sur., 2003.; D'ETTORRE i sur., 2006.; FRÖHLICH i sur., 2000.; HEPBURN i sur., 2014.). Naime, masne kiseline iz pčelinjeg voska djeluju kao kemijski znakovi prepoznavanja jedinki koje pripadaju istoj zajednici, a uključuju četiri nezasićene kiseline (palmitoleinsku, oleinsku, linolnu i linolensku) i dvije zasićene masne kiseline (palmitinsku i lignoceričnu). Te su kiseline prisutne u pčelinjem vosku u znatnim količinama i daju „kemijski potpis“ zajednici. Ulogu masnih kiselina u mehaničkim svojstvima pčelinjeg voska, poput čvrstoće i elastičnosti, potvrdili su BUCHWALD i sur. (2005.; 2006.; 2009.).

Od manje zastupljenih sastojaka pčelinjeg voska nalazimo slobodne masne alkohole (~ 1 %) s dužinom lanca C28 – C35.

Geometrijski promatrano, stanica saća prikazuje se s obzirom na upisanu (i) i (c) opisanu kružnicu, pri čemu je:  $r_i$ , polumjer upisane kružnice;  $d_i$ , promjer upisane kružnice;  $r_c$ , polumjer opisane kružnice; i  $d_c$ , promjer opisane kružnice (slika 4).



Slika 4. Dvodimenzionalni model stanice saća oblika pravilnog šesterokuta (SVEČNJAK i sur., 2019.).

Pčele se koriste voskom kao građevnim materijalom za svoje gnijezdo, odnosno saće. Proizvode ga u svojim voskovnim žlijezdama, koje su potpuno razvijene u pčela radilica u dobi 12 do 18 dana (TAUTZ, 2008.; DAVIS, 2011.). Najveće količine voska pčelinje zajednice proizvode tijekom proljetnog razvoja, što je u područjima s umjerenim klimatskim prilikama uobičajeno od travnja do lipnja. Glavni nutrijenti nužni za proizvodnju i izlučivanje voska jesu ugljikohidrati (fruktoza, glukoza i saharoza). Smatra se da za proizvodnju jednog kilograma voska pčele utroše oko šest do osam kilograma meda (DAVIS, 2011.). U jedan okvir za Langstroth-Root košnicu, koji sadržava samo 100 g voska (oko 8000 stanica, za što pčele trebaju proizvesti oko 125 000 voštanih ljuskica), pčele mogu pohraniti do četiri kilograma meda (TAUTZ, 2008.). Pčele graditeljice iznimno su ekonomične i pri istodobnoj gradnji dvorednih stanica saća sa zajedničkim dnom koriste se jedinstvenom gradnjom kojom postižu maksimalnu čvrstoću saća i iskorištavanje prostora unutar košnice, a uz upotrebu minimalne količine voska (TAUTZ, 2008.; DAVIS, 2011.; KANE i FAUX, 2021.).

Izgrađene stanice saća međusobno se razlikuju prema veličini i obliku. Najveće su stanice matičnjaka, koje u košnici nalazimo u doba uzgoja matica. Najviše ima radiličkih šesterokutnih stanica, koje su najmanje, položene vodoravno na osnovu saća i služe za uzgoj

radilica, kao i za pohranjivanje peludi i meda. Trutovske su stanice slične radilačkim, no šireg su promjera i služe za uzgoj trutova i pohranjivanje peludi, rjeđe za pohranjivanje meda (jedino u slučaju nedostatka praznih stanica) (TOMAŠEC, 1949.; CARON i CONNOR, 2013.).



Slika 5. Radilačke stanice saća ispunjene savijenim ličinkama (fotografija: Tlak Gajger, 2020.).

Proizvodnja voska i aktivnost izgradnje saća u pčelinjoj zajednici određene su i sljedećim čimbenicima: unosom nektara, količinom legla i njegovom feromonskom aktivnošću (BORTOLOTTI i COSTA, 2014.), prisutnošću i kvalitetom matice, temperaturom zraka (stalne vanjske temperature zraka 20 do 30 °C pogoduju izgradnji saća) te dovoljnom količinom peludi kao izvora proteina pčelama graditeljicama. Pri gradnji cilindričnih, šesterostranih stanica saća, zbog nužne podatnosti pčele zagriju vosak na 37 do 40 °C (TAUTZ, 2008.). Drugim riječima, pčele izlučuju vosak i grade saće samo za vrijeme dobrih medonosnih paša ili kad se obilno prihranjuju.

Vosak izlučuju samo pčele radilice (graditeljice), i to iz spomenutih četiri para voskovnih žlijezda. To su kožne žlijezde, koje se nalaze na trbušnoj strani zatka, od četvrtog do sedmog kolutića. Te žlijezde nemaju ni matica ni trut. Na prednjem dijelu navedenih kolutića egzoskeleta nalaze se po dvije prozirne hitinske pločice koje su izbušene sitnim rupicama (tzv. voštano zrcalo) (DAVIS, 2011.; STELL, 2012.). Te se pločice ne vide jer su pokrivene stražnjim krajem ljuskice prethodnog kolutića egzoskeleta. S unutarnje strane tih pločica nalaze



se voskovne žlijezde koje se sastoje od jednog reda epitelnih stanica, a ispod kojih je sloj masnih stanica i enocita u kojima se stvara vosak. Navedene stanice izlučuju vosak koji u tekućem stanju prolazi kroz rupice i skuplja se na vanjskoj strani trbušne ljuskice u obliku sitne voštane pločice. Oblik te pločice odgovara obliku voštanog zrcala (DAVIS, 2011.).

Pčele koje izlučuju vosak i grade saće objese se jedna o drugu i vise u obliku zavjese. Najgornje pčele uhvate se prednjim nogama za gornji dio okvira. Druge se pčele prihvate čaporcima za čaporke njihovih nogu. Pčela koja je izlučila vosak popne se do mjesta gradnje saća, skine voštanu ljuskicu stražnjim nogama i prinese je pomoću posebnih pokreta nogu ustima, gdje sitne pločice izlučenog voska uz dodatak sline pretvara u izotropni materijal za gradnju saća (SVEČNJAK i sur., 2019.). Pčele grade saće odozgo prema dolje (TAUTZ, 2008.). Svježe izgrađeno saće prvotno je gotovo bezbojno, a s uporabom postaje žute do smeđe, pa čak i crne boje. Voštane pločice i novoizlučeni vosak (djevičanski vosak) bijele su boje, ali u košnici vosak brzo poprima karakterističnu žutu boju koja potječe od peludi i propolisa (BOGDANOV, 2004.).



Slika 6. Voštani poklopci karakterističnog izgleda iznad radilačkog i trutovskog legla (fotografija: Tlak Gajger, 2023.).



Slika 7. Vijenac zrelog, voštanim poklopcima pokrivenog meda oko pčelinjeg legla  
(fotografija: Tlak Gajger, 2023.).

Nad starijim pčelinjim leglom, a prije prelaska u razvojnu fazu kukuljice, kućne pčele radilice pokrivaju stanice saća voštanim poklopcima karakteristična izgleda. Zdrave poklopce možemo opisati kao blago izbočene kod radilačkog i kupolasto izbočene kod trutovskog legla, suhe, porozne i boje okolnog saća (TLAK GAJGER, 2019.) (slika 5) Voštani poklopci nad zrelim medom u ravnini su stijenki stanica saća, glatki ili blago naborani, te poprimaju patinu svjetlije boje koja stajanjem postaje tamnija (slika 6).

Vosak ima ulogu i u mehaničkoj komunikaciji (pčelinji simbolični plesovi) i termoregulaciji unutar pčelinje zajednice. Saće posreduje u prijenosu feromona koji služe za poklapanje stanica, popravak i izgradnju matičnjaka, obranu zajednice i specifičan miris zajednice (HEPBURN, 1998.). Također, kao što je prethodno spomenuto, masne kiseline iz pčelinjeg voska, nezasićene (palmitooleinska, oleinska, linolna i linoleinska) i zasićene (palmitinska i lingocerična), imaju važnu ulogu u prepoznavanju jedinki iste zajednice. Masne kiseline osiguravaju saću specifičnu konzistenciju i čvrstoću (SVEČNJAK i sur., 2015.; SVEČNJAK i sur., 2019.). Saće sudjeluje u prijenosu vibracijskih signala tijekom izvođenja pčelinjeg plesa (SANDEMAN i sur., 1996.), kojim pčele komuniciraju o smjeru, udaljenosti i kvaliteti izvora hrane s ostalim pčelama u košnici.

Utvrđeno je da su pčele koje nisu imale priliku naučiti izvođenje plesa zatkom prije negoli su ga prvi put izvele, proizvele znatno više pogrešaka vezanih uz kut njihanja zatkom, kao i prenošenja netočne udaljenosti (DONG i sur., 2023.). Stoga se smatra da je socijalno učenje vrlo važan čimbenik u oblikovanju signalizacije u medonosnih pčela. Specifičan kemijski sastav pčelinjeg voska ima veliku važnost za zajednicu medonosnih pčela s obzirom na to da saće posreduje u prepoznavanju članova zajednice u gnijezdu (BREED i sur., 1988.), ali i zbog toga što se u saće ugrađuju razni toksini iz okoliša i drugi onečišćivači (TLAK GAJGER i sur., 2019.).

Općenito, saće pčelinjoj zajednici osigurava zaklon, mjesto za pohranu nektara i dozrijevanje meda, skladište poklopljenog meda, skladište fermentirane peludi (pčelinjeg kruha), gnijezdo za polaganje jajašca i razvoj legla, kemijsku komunikaciju među članovima zajednice te njihovo međusobno sporazumijevanje i pohranu informacija, kao i obranu od patogenih mikroorganizama (TAUTZ, 2008.; SAMMATARO i YODER, 2012.).

### **2.3. UPOTREBA PČELINJEG VOSKA**

Još su se stari Egipćani koristili pčelinjim voskom za balzamiranje, mumificiranje mrtvih osoba, za očuvanje svitaka papirusa, za izradu svijeća i žigova te za zaštitu slika. Stari Perzijanci koristili su se voskom za balzamiranje mrtvih, dok su stari Rimljani modelirali posmrtno maske i likove od pčelinjeg voska u prirodnoj veličini (BENSON i sur., 1978.; CRANE, 1999.). U najpoznatijoj kineskoj knjizi iz medicine *The Shen Nong Book of Herbs* pčelinji je vosak prepoznat kao vrhunski ljekoviti sastojak zbog blagotvorna utjecaja na krv i energetske sustave te cjelokupnu ravnotežu tijela. Također, vosku se pripisuje poboljšanje ljepote i usporavanje starenja, posebice pri primjeni u mješavinama s medom i biljkama (RIT i BEHRER, 1999.).

Danas pčelinji vosak ima široku primjenu u farmaceutskoj, kozmetičkoj i prehrambenoj industriji (BOGDANOV, 2016.). Koristi se u raznim proizvodima i procesima, od pakiranja do obrade i očuvanja, ili kao sastavnica izolacijskih materijala. No zbog stalne primjene u svakodnevnom pčelarenju najveću upotrebu, razumljivo, ima u proizvodnji satnih osnova.

Procesi prerade starog i onečišćenog voska, zaperaka i voštanih poklopaca uglavnom se provode tehnikama pretapanja ili kemijskom ekstrakcijom. Pretapanje voska kipućom vodom, parom ili električnom energijom najčešći su postupci ili pčelarske prakse u pripremi prerađenog voska, odnosno proizvodnje satne osnove. Kemijsku ekstrakciju moguće je provesti

samo u laboratorijski kontroliranim uvjetima. S obzirom na složenu i važnu ulogu voska u pčelinjoj zajednici, iznimno je važno da satna osnova na kojoj pčele grade saće bude izrađena od što čišćeg prerađenog voska iz kojega su uklonjeni onečišćivači iz okoliša, kao i primjerice ostaci štetnih tvari veterinarskih lijekova primjenjivanih u pčelarstvu (TLAK GAJGER i sur., 2016.; 2019.; 2021.; RADAKOVIĆ i sur., 2022.).

Vosak se uz druge pčelinje proizvode može koristiti kao vrijedan materijal prilikom prikupljanja podataka o stupnju onečišćenja okoliša teškim metalima (CONTI i BOTRE, 2001.). Primjerice, As, Cd i Hg svrstavaju se u teške metale koji se mogu pratiti pri procjenjivanju stupnja onečišćenja okoliša. S obzirom na raspored i redoslijed obavljanja zadataka kućnih pčela i pčela skupljačica, navedenim se metalima može onečistiti i saće (DEVILLERS i PHAM-DELEGUE, 2002.), a prisutnost teških metala u vosku ovisi primarno o stupnju onečišćenja zraka, vode, tla, peludi i nektara (BUCHWALD i sur., 2009.).

Kao posljedica dugogodišnje akumulacije spomenutih toksičnih metala i nemogućnosti njihove razgradnje u saću, mogu nastati poremećaji u reproduktivnim i drugim fiziološkim funkcijama pčelinje zajednice (MAHMOUDI i sur., 2015.).

S obzirom na to da je pčelinji vosak najmanje alergen pčelinji proizvod s utvrđenim antibakterijskim svojstvima, primjenjuje se u apiterapiji (KACANIOVA i sur., 2012.). Služi i za oblaganje tableta, pilula ili kapsula, čime se olakšava njihovo gutanje, a usporava otapanje i otpuštanje lijeka, za žvakanje pri jačanju gingive, povećanje količine sline i želučanih sokova (POTSCHINKOVA, 1992.). Mješavina pčelinjeg voska, meda i maslinova ulja uspješno se primjenjuje u tretiranju dermatitisa ili psorijaze (AL WAILI, 2003.) te protiv analnih fisura i hemoroida (AL WAILI i sur., 2006.) i pri ublažavanju opekline (MOUSTAFA i ATIBA 2015.) i artritisa (PUENTE i sur. 2014.). Topli pčelinji vosak ima izvrsna svojstva zagrijavanja kada se primjenjuje protiv upala mišića, živaca i zglobova kao termoterapija (POTSCHINKOVA, 1992.).

Tablica 1. Primjena pčelinjeg voska za različite kategorije proizvoda (CBI, 2002.a, EU Market Survey, Honey and Beeswax, www.cbi.eu)

Kategorija proizvoda	Proizvod	Karakteristike proizvoda
svijeće	svijeće (izlivene u kalupima)	čvrstoća, sporo gorenje, terapijski učinak
satna osnova	valjana ili lijevana satna osnova	povećanje proizvodnje meda
umjetnost	umjetničke voštane figure i statue	svojstva taljenja i oblikovanja, čvrstoća i otpor protiv topljenja
skulpture	metalni odljevi, modeliranje, nakit	plastična kalupljivost, taljenje
graviranje	graviranje stakla i metala	zaštita od nagrizzajućih kiselina, tehnika otpora
proizvodnja hrane	pekarstvo, pakiranje premazivanje slatkiša	sredstvo za odvajanje, konzerviranje, sredstvo protiv lijepljenja
farmaceutika	lijekovi, pilule, kapsule, melemi i masti	nosač lijeka
fizioterapija	oblozi	sposobnost zadržavanja topline
prirodna terapija	čepići za uši	mekoća, nepropusnost
kozmetika	kreme, losioni, ruževi za usne, maskare, sjenila, dezodoransi, kreme za kosu, depilatori, regeneratori za kosu	omekšivač i emulgator, poboljšanje izgleda, konzistencija, osjetljivost na topljenje
tekstil	batik	vodootporno, otporna na boje
rukotvorine	ekodizajn	sredstvo za žbukanje
glazbeni instrumenti	flaute, <i>didgeridoo</i> , violine, bubnjevi	mekoća dijelova usta i smanjenje poroznosti
lakovi i poliranje	slike, restauracija umjetnina, metal, drvo i obrada kože	zaštita, nepropusnost za zrak, vlagu i štetnike
industrijski proizvodi	antikorozivni inhibitor hrđe, lubrikanti	smanjenje viskoznosti, sredstvo za sprečavanje korozije

Komercijalni vosak uglavnom proizvodi europska medonosna pčela (*A. mellifera*), dok znatan dio voska u Kini i ostalim azijskim zemljama proizvodi azijska medonosna pčela (*A. cerana*). Budući da je velik udio komercijalnog pčelinjeg voska onečišćen reziduama akaricida

i pesticida (SCHROEDER i WALLNER, 2003.), na tržištu postoji povećana potreba za proizvodnjom čistog (nekontaminiranog) pčelinjeg voska.

Teško je doći do pouzdanih podataka o ukupnoj proizvodnji voska jer se veći dio pčelinjeg voska upotrebljava u pčelarstvu za proizvodnju satnih osnova. Prema FAOSTATU (2023.) Indija je zemlja koja proizvodi najviše pčelinjeg voska u svijetu. U 2022. godini proizveli su 25 292 tona sirovog voska. Etiopija je na drugom mjestu, s proizvodnjom od 5699 tona. Argentina je u istom razdoblju proizvela 4973 tona, Republika Koreja 3843 tona, dok Turska zauzima peto mjesto s proizvedenih 3766 tona. Honduras ima prijavljenu najmanju godišnju proizvodnju voska na svijetu (16 tona). Prema dostupnim podacima (INDEXBOX, 2023.) prosječna uvozna cijena voska u Hrvatskoj za 2022. godinu iznosila je 9954 \$ po toni. Postojale su razlike u prosječnim cijenama među glavnim zemljama dobavljačima, pri čemu je zemlja s najvišom cijenom bila Belgija (21367 \$ po toni), a Bugarska zemlja najnižim cijenama (7525 \$ po toni). Iste je godine prosječna izvozna cijena pčelinjeg voska u Hrvatskoj iznosila 15 679 \$ po toni. Najviša cijena zabilježena je u Sloveniji (16 787 \$ po toni) i UK-u (16 500 \$ po toni), dok je prosječna cijena za izvoz u Irsku (11 322 \$ po toni) i Sjevernu Makedoniju (13 733 \$ po toni) bila među najnižima. U 2022. godini u Hrvatsku je uvezena 21 tona pčelinjeg voska (209 000 \$). Najveći je porast uvoza bio 2020. godine, kad je iznosio 48 tona (349 000 \$). U istom je razdoblju najviše pčelinjeg voska uvezeno iz Bugarske (6,0 tona), Njemačke (3,9 tona), Slovenije (2,9 tona), Nizozemske (2,7 tona) i Bosne i Hercegovine (2,3 tona). Glavna su izvozna tržišta za pčelinji vosak iz Hrvatske bila Slovenija (614,0 kg), Bosna i Hercegovina (337,0 kg), Irska (230,0 kg), Sjeverna Makedonija (120,0 kg) i Velika Britanija (2,0 kg) (INDEXBOX, 2023.)

#### **2.4. PRERADA VOSKA U SATNE OSNOVE**

Svake godine pčelari bi trebali izvaditi staro tamno saće iz košnice te ga pretopiti i preraditi u novu satnu osnovu. Takvom se pčelarskom praksom pčele stimuliraju na izgradnju novog saća. Saće za razvoj legla treba izmjenjivati u intervalima od oko dvije do tri godine, jer vosak upotrebom postupno tamni zbog nakupljanja propolisa, peludi i kokona od kukuljica. Glavne su sirovine za preradu voska i proizvodnju satnih osnova staro saće i voštani poklopci sa stanica saća skinuti prije vrcanja meda (slika 8). Staro saće i komadići voska trebaju se pretopiti u tzv. blokove voska (sirovi vosak) koji se zatim dopremaju na daljnju preradu u specijalizirane radnje. Tako pčelar može izbjeći probleme s voskovim moljcem (*Galleria melonella*) i plijesni, koje se često pojavljuju prilikom skladištenja izgrađenog saća.





Slika 8. Voštani poklopci sa stanica saća skinuti neposredno prije vrcanja meda.

Industrijska proizvodnja pčelinjeg voska započela je u 19. stoljeću. Godine 1857. Mehring iz Njemačke pokrenuo je proizvodnju satnih osnova (COGGSHALL i MORSE, 1984.). Pčelari uobičajeno pretopljeno staro saće (sirovi pčelinji vosak) daju na preradu specijaliziranim proizvođačima satnih osnova. Kvaliteta pčelinjeg voska ovisi o proizvođačkoj praksi prerade voska, a to su pretapanje i ekstrakcija. Kemijska ekstrakcija izvediva je samo u laboratoriju i provodi se s otapalima poput benzina i ksilena. Nedostatak je ove metode što su svi organski dijelovi voska i ostaci kokona kukuljica, propolis i pelud otopljeni. Dakle, kvaliteta voska može biti slabija. Izdvajanje voska ovisi o starosti saća i korištenoj praksi ekstrakcije. Općenito, iskoristivost voska je oko 50 %, ali i više ako se u preradi upotrebljava više voštanih poklopaca. Prerađena sirovina nakon odvajanja čistog voska sadržava još oko 30 % ostataka voska.

Danas se za ekstrakciju voska upotrebljavaju parni i električni te sunčani topionici. U skladu s tim vosak se može otopiti kipućom vodom i vodenom parom, električnom ili Sunčevom energijom. Primjerice, metoda ekstrakcije vodenom parom podrazumijeva primjenu preše kod koje se metalna košara sa starim saćem stavi u spremnik s nepropusnim poklopcem. U duplom dnu spremnika vodena para podiže temperaturu i uzrokuje otapanje saća u vosak. Klip preše dodatno čini pritisak na saće, a otopljeni se vosak prikuplja u donjem dijelu posude gdje istječe kroz otvor s vanjske strane spremnika u limenu posudu. Električni topionik voska

jest uređaj koji izdvaja zaostali vosak nakon topljenja u parnom topioniku, a voda grijana električnim grijačem osigurava stalnu prisutnost pare u sustavu. Sunčani topionik voska sastoji se od posude koja ima prozirni poklopac od akrilnog stakla, limeno kućište, dno i konusnu kadnicu od nehrđajućeg čelika koja se nalazi na dnu posude u koju se cijedi otopljeni vosak. Okviri sa saćem namijenjeni otapanju mijenjaju se pri visokim vanjskim temperaturama, a konusna se posuda prazni u jutarnjim ili večernjim satima.

U pčelarskoj praksi otapanja saća u topionicima i prikupljanja dijela otopljenog sirovog voska najčešće metode prerade pčelinjeg voska obuhvaćaju i dodatnu ekstrakciju centrifugiranjem kako bi se otopio zaostali vosak. Centrifugalna ekstrakcija obuhvaća postupak pri kojemu se saće stavlja u kipuću vodu, a nastala se smjesa ulijeva u košarice centrifugalnog ekstraktora voska pri više od 1500 okretaja u minuti i pri temperaturi iznad 45 °C kako bi se spriječilo taloženje voska. Čisti ekstrahirani vosak istječe kroz otvor s vanjske strane ekstraktora. To je metoda koja se primjenjuje za veće proizvodne jedinice.

Da bi se spriječilo tamnjenje voska prilikom pretapanja i prerade, saće se ne smije zagrijavati na previsokim temperaturama (> 140 °C) i u posudama od željeza, mjedi ili bakra. Također, ne smije se skladištiti u posudama od olova zbog mogućeg onečišćenja, dok su aluminij i nehrđajući čelik prihvatljivi. Zanimljivo je da se zbog sprečavanja neugodna mirisa voska ne smije pretapati saće koje sadržava fermentirani (pokvareni) med.

Pri preradi voska osim faze zagrijavanja i homogenizacije nužno je provesti i sterilizaciju kako bi se spriječilo moguće širenje sporogene bakterije uzročnika američke gnjiloće *Paenibacillus larvae*. Naime, potrebno je otopljeni vosak zagrijavati na prosječno 125 °C (121 – 140 °C) tijekom najmanje 30 minuta i pod pritiskom od 1400 hPa (MÁCHOVÁ, 1993.; TLAK GAJGER, 2015.; SVEČNJAK i sur., 2019.) za sigurno uništavanje spora kao najotpornijeg oblika moguće prisutnih mikroorganizama.

Nakon pretapanja saća vosak nije dovoljno čist. Za dodatno pročišćivanje prikladni su spremnici vode od visokokvalitetnog čelika s ugrađenim grijačima u kojima vosak ostavljamo pri temperaturi od 75 do 80 °C (najbolje preko noći). Prljavština se taloži na dno spremnika. U industrijskim se uvjetima tekući vosak može pročistiti filtracijom u grijanim filtrima pod pritiskom i centrifugiranjem (COGGSHALL i MORSE, 1984.).





Slika 9. Čelični spremnik za preradu voska (TLAK GAJGER, 2015.).

Blokovi voska suše se i čuvaju na tamnom i hladnom mjestu. Time će se zadržati stvaranje *prašine*, za koju se pretpostavlja da je sol masnih kiselina (TEMNOV, 1967.). Tvrdoća i krutost pčelinjeg voska povećavaju se skladištenjem. Tijekom skladištenja koeficijent tvrdoće povećava se za 61 do 74 %. Duljim skladištenjem pčelinji vosak dobiva bjelkasti sloj topljiv u organskim otapalima, a vjerojatno predstavlja sol nezasićenih organskih kiselina s talištem 35 do 36 °C (CHUDAKOV, 1965.; TEMNOV, 1967.).

Blokovi voska koji su dobiveni nakon pretapanja saća (sirovi vosak) u pčelarstvu se najčešće upotrebljavaju za izradu satnih osnova (slika 10). Satne osnove izrađuju se pomoću preše ili valjka na kojima su utisnuti šesterokutni oblici koji odgovaraju radilačkim stanicama. Satne su osnove koje su proizvedene u prešama krute, teško savitljive i lako se lome. Temperatura pčelinjeg voska pri izradi satnih osnova iznosi 85 do 90 °C.



Slika 10. Blokovi voska pripremljeni za transport u radnju za preradu voska u satne osnove (TLAK GAJGER, 2015.).

Satne osnove proizvedene lijevanjem na valjke savitljive su i mogu se namatati na rolu kao platno. Pčelinji vosak prolazi kroz gravirane valjke i tako nastane traka jednake debljine, te istodobno poprima oblik šesterostranih stanica (slika 11) (TLAK GAJGER, 2015.).



Slika 11. Završna faza izrade satnih osnova tehnikom lijevanja (TLAK GAJGER, 2015.).



Slika 12. Izrađene satne osnove izrezane na veličinu okvira u koji će se užičavati.

## 2.5. BIOINDIKATORI

Bioindikatorima smatramo žive organizme ili njihove proizvode kojima možemo prikupljati informacije koje nam omogućuju tumačiti status *zdravlja okoliša* i biogeografskih promjena koji se događaju u njihovu okolišu (PARMAR i sur., 2016.; ZAGHLOUL i sur., 2020.). Važni su kao sustav ranog praćenja onečišćenja i predviđanja razine otrovnosti onečišćivača koja može utjecati na zdravlje životinja, biljaka i ljudi (ZAGHLOUL i sur.; 2020.).

Biomonitor održava abiotsko ili biotsko stanje okoliša, koji sadržava informacije o kvaliteti životne sredine (MC'GEOGH, 1998.). Biomonitor je uvijek bioindikator, ali bioindikator ne mora uvijek biti i biomonitor. BURGER (2006.) opisuje četiri glavne kategorije upotrebe bioindikatora koji međudjeluju: procjena zdravlja prirodnih ekosustava, antropološki učinci, intervencije čovjeka te zdravlje i dobrobit čovjeka. Razlagači, proizvođači i potrošači mogu biti bioindikator i utjecati jedni na druge u svom okolišu, te su među najboljim pokazateljima kako će ekosustav reagirati na stresore (ZAGHLOUL i sur., 2020.).

Bioakumulatore dijelimo na akumulacijske i utjecajne. Akumulacijski akumuliraju jednu i/ili više tvari iz okoliša na površini ili unutrašnjosti organizma. Kod utjecajnih bioindikatora određeni se učinak pojavljuje kao odgovor na prisutnost tvari ili elementa. Prisutnost nekih elemenata uzrokuje morfološke, histološke ili stanične promjene u organizmu, mijenjaju se metaboličko-biokemijski procesi, dolazi do promjena u ponašanju jedinki ili strukturi populacije. To su reakcijski indikatori (MARKERT i sur., 2003.). Također,

razlikujemo aktivni i pasivni biomonitoring. Pasivni biomonitoring podrazumijeva upotrebu pasivnih organizama, njihovih dijelova ili zajednica organizama koji su prisutni na određenom području koje istražujemo. Aktivni se biomonitoring koristi organizmima koji nisu dio prirodnog ekosustava, već su uneseni kao bioindikatori (WITTING, 1993.). Kad su u pitanju akumulacijski bioindikatori, koncentracija nekih tvari koje se mogu naći u njihovu organizmu ne odražavaju koncentraciju tih tvari u okolišu. Mnoge biljke i životinje imaju visoku razinu akumulacije za određene tvari kad su njihove koncentracije u okolišu niske, ali se čimbenik akumulacije smanjuje pri višim koncentracijama u okolišu (MARKERT i sur., 1997.).

Kukce njihova osjetljivost na čimbenike iz životnog okruženja i velika brojnost čini izvrsnim bioindikatorima (SKALDINA i sur., 2020.). Mogu se hvatati u velikom broju što ih čini idealnim modelom za praćenje raznolikosti vrsta i za usporedbu među geografskim regijama. Iznimno male promjene u okolišu mogu uzrokovati fluktuacije u raznolikosti vrsta i brojnosti populacije kukaca (GERLACH i sur., 2013.). Među zemljanim kukcima, tvrdokrilci (Coleoptera) važna su skupina koja služi kao indikator stanja šuma i poljoprivrednih kultura (DAVIS, 2000.). Moljci i leptiri (Lepidoptera) jako su osjetljivi na promjene u okolišu, te se upotrebljavaju kao bioindikatori zagađenja teškim metalima i ugljikovim oksidom (CO<sub>2</sub>) u blizini industrijskih i gradskih područja. Mravi služe kao bioindikatori stanja životnog okoliša i onečišćenja insekticidima (PEREIRA i sur., 2010.).

Medonosne pčele izložene su utjecajima iz okoliša koji ovise o smještaju pčelinjaka (GORETTI i sur., 2020.). Uobičajeni je put ulaska onečišćivača iz okoliša u organizam pčele putem hrane, vode i zrakom. Prirodna prehrana odraslih pčela ovisi o cvijeću s kojega uzimaju pelud i nektar, dok vodu uzimaju iz prirodnih izvora ili ponuđenu u pojilicama. Pčele pretvaraju nektar u med i pohranjuju ga u saću (TOPITZHOFER i sur., 2019.). Svaka od spomenutih sastavnica može biti onečišćena prije negoli je pčela konzumira (SMITH i sur., 2019.; GORETTI i sur., 2020.). Ovu hranu pčele skupe i transportiraju u košnicu gdje je predaju drugim pčelama. Uzimajući hranu s biljaka pčele skupljaju i tvari onečišćivače koji se nalaze u tim biljkama, a samim time i one koje se nalaze u tlu i zraku. Isti je slučaj i s vodom koju nose u košnicu. Također, tijekom letenja u potrazi za hranom na dlačicama svojeg tijela hvataju različite sitne čestice onečišćivača.

Medonosne se pčele mogu koristiti kao biomonitori i bioindikatori. U svojstvu bioindikatora njihova prisutnost, odnosno odsutnost s određenog područja upućuje na stupanj onečišćenja okoliša. Veći broj uginulih pčela pokazuje da je prisutan onečišćivač s letalnim djelovanjem. Jedan je od razloga zašto su dobri bioindikatori taj što pokrivaju veliko područje (do 7 km<sup>2</sup>) tijekom skupljačkih letova na velikom broju biljaka (PERUGINI i sur., 2011.).

Biljke i drveće skupljaju hranjive tvari *in situ* i podložni su stresovima i zagađivačima iz okoliša. Uzimaju hranjive tvari iz tla pomoću korijenja. Tlo sadržava neesencijalne minerale od kojih neki mogu postati bioraspoloživi biljkama i drveću (TURKYILMAZ i sur., 2019.). Voda djeluje kao otapalo za hranjive tvari u tlu i omogućuje korijenu biljaka da ih apsorbiraju, rastu i proizvode plodove i cvatove koji privlače kukce oprašivače. Površina lišća može se analizirati sezonski za procjenu taloženja elemenata u tragovima iz zraka, dok se kora može uklanjati više puta godišnje. Kvaliteta tla, zraka i vode može se pratiti pomoću drveća sezonski, na višegodišnjoj osnovi i tijekom dugih razdoblja (MAZARI i FILIPPELLI, 2020.). Ove informacije mogu poslužiti za mjerenje razine onečišćenja prije, tijekom i nakon aktivnosti čovjeka i utjecaja koji su one potencijalno imale na okoliš neke lokacije (ARTEAU i sur., 2020.; WANG i sur., 2020.).

Biljke koje su pogođene utjecajem onečišćivača mogu se identificirati kroz fizička oštećenja, zastoj u rastu, nekroze te klorozu lišća (NOUCHI, 2002.). Taloženje onečišćivača na listovima biljaka fizički ometa svjetlost i time što smanjuje fotosintezu i proizvodnju hrane (SETT, 2017.). Biljke služe kao bioindikator, pri čemu se neki zagađivači mogu identificirati specifičnim morfološkim promjenama na biljci, dok se drugi mogu identificirati samo kemijskom analizom (ZAGHLOUL i sur., 2020.). Hipotolerantne biljke koje ih akumuliraju mogu iskoristiti veliki postotak jednog ili više teških metala te ih pohraniti bez toksičnog učinka (RASCIO i NAVARI IZZO, 2011.). Hiperakumulaciju teških metala biljka može iskoristiti kao obranu protiv štetnih kukaca i puževa ili mogu pokazivati fizičke simptome zagađenja (BOYD, 2010.).

Biljke proizvode pelud nužnu u procesu njihova spolnog razmnožavanja. Pelud se prenosi vjetrom, vodom, životinjama te osobito kukcima (ACKERMAN, 2000.; CHEN i ZHAO, 2019.). Primarni je izvor proteina u prehrani medonosne pčele, a sadržava aminokiseline, vitamine, masti i minerale. Pčele lete od cvijeta do cvijeta skupljajući pelud i ujedno je prenose s jednog cvijeta na drugi. Pčela dok leti, postaje pozitivno nabijena te privlači elektrostatički negativno nabijenu pelud i sitne zagađivače zraka na svoje dlakavo tijelo (AMADOR i sur., 2017.; VAKNIN i sur., 2000.). Pčele prebacuju pelud pomoću krutih dlačica na nogama specijaliziranim pokretima do lateralne strane treće noge u peludnu košaricu gdje je zbijena ostrugom (AMADOR i sur., 2017.). Stoga se pelud, ali i svi onečišćivači iz okoliša, unose u košnicu gdje se pohranjuju u stanice saća.

Nektar je slatka tekućina proizvedena u biljnim žlijezdama, tzv. nektarijama, kojima privlači kukce oprašivače (PARACHNOWITSCH i sur., 2019.; SOLHAUG i sur., 2019.). Nektarije su smještene u osnovi cvjetnog omotača, tako da su kukci oprašivači prilagođeni za

doticanje reproduktivnih struktura cvijeta (prašnici i tučak). Nakon što se pelud prenese s pčele na tučak cvijeta, dolazi do oplodnje. Neke biljke proizvode nektar izvan cvjetnih nektarija, poznate kao ekstranupcijske nektarije (HEIL, 2011.). One izlučuju nektar u biljnim žlijezdama koje se razvijaju izvan cvijeta i nisu uključene u oprašivanje, te privlače i štetočine i korisne kukce. Opisane su u svim nadzemnim biljnim organima, uključujući lišće (lisne nektarije), sporedne listiće, kotiledone, plodove i biljne izdanke (HEIL, 2011.).

Za razliku od cvjetnih nektarija, nektar proizveden izvan cvijeta ima obrambenu funkciju. Nektar privlači predatorske kukce koji jedu i nektar i štetočine. Nektar izvan cvjetnih nektarija pruža lisnim ušima da se hrane bez prodiranja u biljku i bez potencijalnog prijenosa bolesti, ali istodobno privlači i mrave koji se hrane lisnim ušima i nektarijama (HEIL, 2011.). Mravi mogu kontrolirati populaciju lisnih uši, ali to može smanjiti oprašivanje i oplodnju jer mogu otjerati kukce oprašivače (BALLANTYNE i WILMER, 2012.). Glavni je sastojak nektara prirodni šećer, i to saharoza, glukoza i fruktoza (SOLHAUG i sur., 2019.). Koncentracija ovih šećera varira među vrstama biljaka (PARACHNOWITSCH i sur., 2019.; SOLHAUG i sur., 2019.). Kukci oprašivači koriste se nektarom kao primarnim izvorom ugljikohidrata (NICOLSON, 2011.; PAMMINGER i sur., 2019.), šećeri su najzastupljeniji sastojci, a ima i aminokiselina, lipida, minerala, vitamina te alkaloida (GUTIÉRREZ i sur., 2020.).

Kemijski sastav nektara varira o biljci i morfologiji cvijeta (PELLISSIER i sur., 2010.), ovisno o tome kojeg kukca oprašivača biljka pokušava privući (NICOLSON i THORNBURG, 2007.). Biljke koje proizvode nektar s visokim udjelom saharoze posjećuju bumbari, leptiri, noćni leptiri i općenito životinje s dugim rilcem (PELLISSIER i sur., 2010.). Minerali iz tla prenose se iz korijena biljke kroz tkiva biljke, uključujući organe za razmnožavanje (XUN i sur., 2017.). Medonosne pčele skupljaju i transportiraju nektar u mednim mjehurima u košnicu gdje ga pohranjuju u stanicama saća i pretvaraju u med. Pojedini elementi (minerali) mogu postati otrovni i za biljke (SHAH i sur., 2010.) i za pčele (SETHY i sur., 2020.) u različitim koncentracijama (SHRIVASTAVA i sur., 2019.).

Med je prirodna hrana koju proizvode medonosne pčele, a ljudi koriste tisućama godina (FESSENDEN, 2015.). Nektar koji se sastoji od vode, minerala i disaharida pčele privremeno pohranjuju u mednom mjehuru (OLAITAN i sur., 2007.) tijekom transporta. Enzimi invertaza i diastaza (amilaze) počinju razgrađivati složene šećere na jednostavne i lakoprobavljive šećere. Monosaharid glukoza može se pretvoriti u glukonlaktan pomoću drugog enzima glukonlaktana, koji zauzvrat stvara glukonsku kiselinu i vodikov peroksid (BRUDZYNSKI, 2020.). Pčele nektar pohranjen unutar stanica saća dehidriraju mahanjem krilima dok ne prijeđe



u med s manje od 18 % vode. Med pčele zatim zatvore voštanim poklopcem, a visok sadržaj šećera i prisutnost vodikova peroksida te fitokemikalija čine med nepokvarljivom namirnicom (EYER i sur., 2016.). Teški metali u tlu mogu se prenijeti u nektarije unutar biljke, te se onečišćivači mogu prenijeti vjetrom na izlučevine biljaka gdje su dostupni za pčele oprašivače kad ih sakupljaju.

## 2.6. ESENCIJALNI I TOKSIČNI ELEMENTI

### 2.6.1. ARSEN (As)

Arsen je polumetal koji ekolozi svrstavaju u skupinu teških metala zajedno s kadmijem, živom i olovom. Talište mu je na 817 °C, a vrelište na 616 °C. Postoji u tri alotropna oblika. Elementarni As proizvodi se termičkim razlaganjem ili oksidacijom sulfidnih ruda. Pritom nastaje elementarni As u obliku četveroatomske molekule As<sub>4</sub> ( $\alpha$ -modifikacija). Ohlade li se njegove pare naglo na zraku, dobiva se nepostojana modifikacija – žuti As. On se lako otapa u ugljikovu disulfidu (CS<sub>2</sub>), a iz te se otopine hlađenjem iskristalizira u prozirne, mekane kristale koji jako lome svjetlost. Slabim zagrijavanjem ili pod utjecajem svjetla prelazi u sivu (metalnu) modifikaciju. Taj je sivi ili metalni As najpostojaniji. Treći oblik, crni arsen, ima strukturu crvenog fosfora.

As se u spojevima pojavljuje u oksidacijskim stanjima III i V, pri čemu su i anorganski i organoarsenovi spojevi u oksidacijskom stanju III otrovniji od onih u oksidacijskom stanju V. Arsenovi su spojevi kumulativni otrovi. Zagrijavanjem na zraku arsen izgara modrikastim plamenom, uz karakterističan miris po češnjaku, a nastaje i bijeli dim arsenova (III) oksida (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Upotrebljava se u medicini, industriji boja i za konzerviranje drva i kože. Najvažniji su anorganski spojevi arsena oni s vodikom (arsenovodik, arsin), kisikom (arsenik), vodikom i kisikom (arsenitna i arsenatna kiselina), sumporom (žuto i crveno arsenko staklo) i halogenim elementima (arsenovi kloridi).

U Hrvatskoj As nalazimo u podzemnim vodama (bunari) istočnog dijela Slavonije. U hrani ga najviše nalazimo u ribama, školjkašima (oko 4 ppm) i rakovima (oko 175 ppm). No relativno se lako izlučuje urinom jer se u obliku arsenobetaina (analog trimetilglicina) apsorbira u crijevima (EMSLEY, 2005.). Većina žitarica, voća i povrća sadržava 0,1 do 1,0 mg As po kilogramu suhe tvari jer je često sastavni dio pesticida. To je posebice problem u zemljama u kojima je riža osnova prehrane stanovništva, poput Kine, jer se pokazalo da se As osobito

nakuplja u riži. Poput drugih teških metala, pokazuje učinak bioakumulacije i nakupljanja u tkivima riba u obliku metiliranih spojeva. Upotreba kao otrova u prošlosti bila je česta jer se mogao lako pribaviti kao sredstvo za uništavanje korova ili ubijanje štetnih kukaca, a simptomi otrovanja bili su opći i lako su se mogli zamijeniti sa simptomima bolesti (EMSLEY, 2005.).

U današnje je vrijeme najveći izvor onečišćenja arsenom upotreba pesticida u poljoprivrednoj proizvodnji. Elementarni arsen najviše se rabi u legurama s Pb, manje s Cu, za izradu baterija, dok se međumetalni spojevi, poput galij-arsenida (GaAs) i indij-arsenida (InAs) upotrebljavaju u izradi LED dioda, laserskih prozora, tunelnih dioda i infracrvenih emitera (GREENWOOD i EARNSHAW, 1984.). Budući da toksičnost spojeva nekog elementa ovisi o vrsti spoja (organski/anorganski), oksidacijskom stanju kemijskog elementa, organoarsenovi spojevi pokazuju široku raznolikost u oblicima toksičnosti, a samim time u poteškoćama otkrivanja individualnih učinaka na žive organizme. Arsenati i arsenov trioksid mogu uzrokovati karcinom pluća u sisavaca, dok organski trimetilarsin-oksid može uzrokovati karcinom jetre u štakora (PALACIOS i CAPDEVILA, 2013.). Toksičnost arsena u organizmima vezana je uz oštećenja DNA različitim mehanizmima, što može dovesti do apoptoze. Mehanizmi apoptoze, međutim, mogu biti osnova za uništavanje stanica, primjerice leukemije, u čemu se očituje uporaba arsenovih spojeva kao potencijalnih lijekova protiv karcinoma. Dugotrajno izlaganje arsenu može uzrokovati nedostatak vitamina A u organizmu. Različiti znakovi otrovanja arsenom, poput dijareje, konvulzija, pigmentacije kože, bolesti srca, moždanih udara, dijabetesa, respiratornih bolesti i karcinoma, utvrđeni su u sisavaca, no smatra se da takvi učinci mogu biti i posljedica dugotrajnog izlaganja u ekstremnim uvjetima prisutnosti velikog onečišćenja arsenom i njegovim spojevima (PALACIOS i CAPDEVILA, 2013.).

Prema europskoj legislativi dopuštena koncentracija As u vosku iznosi 3 mg/kg (FAOLEX, 2006.).

## **2.6.2. BAKAR (Cu)**

Bakar je prijelazni teški metal koji se prirodno nalazi u okolišu, gustoće 8,96 g/cm<sup>3</sup>, tališta na 1,356 °C, vrelišta na 2,868 °C, a nalazi se na 29. mjestu u periodnom sustavu (CALLENDER, 2003.; BRIFFA i sur., 2020.). Esencijalni mineral u tragovima, koji je potreban biljkama, životinjama i ljudima, ali u rijetkim slučajevima može postati otrovan u većim koncentracijama (YRUELA, 2009.; GAETKE i sur., 2014.). Prirodni element, koji se nalazi u Zemljinoj kori, ulazi u atmosferu erozijom te biva izbačen iz Zemljine jezgre vulkanskim



erupcijama ili prilikom šumskih požara (CALLENDER, 2003.; GAETKE i sur., 2014.). Koristi se u industriji i poljoprivredi. Drobljenjem i taljenjem rude metalna prašina dolazi u atmosferu, dok se primjenom gnojiva, herbicida, fungicida i insekticida u poljoprivredi povećava onečišćenje tla (BRIFFA i sur., 2020.; YRUELA, 2009.). Potreban je za fotosintetske procese, proizvodnju klorofila i sjemena, disanje, metabolizam stanične stijenke, te sudjeluje u apsorpciji drugih hranjivih tvari (PIETRINI i sur., 2019.; YRUELA, 2009.). Odgovoran je za mnoge biološke funkcije u tijelu, uključujući enzime i sintezu proteina, pa i omogućuje spajanje kolagena i elastina, što je potrebno za stvaranje vezivnog tkiva (GAETKE i sur., 2014.; YAMAGUCHI i sur., 2018.). Bitan je za stvaranje eritrocita, pigmenta melanina u koži i formiranje mijelinske ovojnice koja prekriva neurone (COLLINS i sur., 2010.; GAETKE i sur., 2014.). Uključen je u stvaranje enzima, povezan s redukcijom kisika u vodi u staničnom disanju i apsorpciji željeza u crijevima (GAETKE i sur., 2014.). Loša apsorpcija Cu ima različite uzroke. Prekomjerna upotreba dodataka Zn i Fe dovodi do većeg izlučivanja Cu. Tijekom faza brzog rasta tijelo brzo iskoristi zalihe Cu i bez kontinuiranog unosa može doći do njegova nedostatka (UAUY i sur., 1998.). Toksičnost zbog nakupljanja Cu neuobičajena je u ljudi i većine sisavaca. Tijelo može regulirati njegovu apsorpciju i izlučivanje, ali se toksičnost ipak može dogoditi (GAETKE i sur., 2014.). Koristi se u fungicidima, algicidima kao zaštitnim sredstvima i za čišćenje vode pri cvjetanju algi (TAYLOR i sur., 2019.). Aktivnosti čovjeka utječu na bioakumulaciju Cu u vodi, on se sedimentira i taloži u vodotocima (RAJESHKUMAR i LI, 2018.). Toksičnost u ljudi i sisavaca je niska, dok su vodene bakterije, biljne i životinjske vrste iznimno osjetljive (MAHAMOUD AHMED i sur., 2018.). Toksičnost se u riba može očitovati u morfološkim i fiziološkim promjenama, kraćem životu te bioakumulaciji u tkivu (AUSTIN, 1999.). Otropane ribe namijenjene za prehranu ljudi mogu uzrokovati subletalnu izloženost u ljudi (RAJESHKUMAR i LI, 2018.).

### **2.6.3. BARIJ (Ba)**

Barij je srebrni mekani zemnoalkalijski metal. U prirodi se pojavljuje u obliku minerala barita i viterita. Benitoit je rijetki dragi kamen čiji je sastojak Ba. Lako oksidira na zraku, pa se čuva u mineralnom ulju (HRVATSKA ENCIKLOPEDIJA, 1999.). Metal se koristi kao geter u elektronskim cijevima za usavršavanje vakuuma, kao deoksidans u rafiniranju bakra i kao sastojak u određenim legurama. Svi su spojevi Ba topljivi u vodi ili kiselinama i jaki su otrovi. U malim je količinama mišićni stimulans, a u većima djeluje na živčani sustav uzrokujući tremor, slabost, nepravilnosti u radu srca, anksioznost, dispneju ili paralize. Upotrebljava se u

vojnoj industriji za proizvodnju pirotehničkih sredstava, poput svjetlećeg streljiva za pješaštvo i protuzračnu obranu (WALLACE, 2008.). Barijev sulfid upotrebljava se kao bijeli pigment za umjetničke boje, pri izradi fotopapira, kao punilo u industriji guma i papira te u kozmetici kao depilator. Barijev sulfat (barit) najvažnija je barijeva sol koja dolazi u obliku bijelog pigmenta, a upotrebljava se u grafičkim i slikarskim bojama, punilima u industriji gume, papira, kozmetike te u rudarstvu. Barijev karbonat otapa se u želučanoj kiselini zbog čega je otrovan. Barijev oksid služi kao obloga za elektrode fluorescentnih cijevi, barijev hidroksid kao baritna voda i jaka lužina u analitičkoj kemiji. Barijev peroksid koristi se pri spajanju tračnica. Barijev nitrat daje zelenu boju vatrometima. Barijev klorid dobro je topljiva sol i vrlo otrovan. Služi za impregnaciju drva i u proizvodnji stakla.

#### **2.6.4. CINK (Zn)**

Cink je prijelazni metal i prirodno se pojavljuje u okolišu. To je metal gustoće 7,134 g/cm<sup>3</sup>. Talište mu je na 419,6 °C, a vrelište pri 907 °C (CALLENDER, 2003.; BRIFFA i sur., 2020.). Klasificiran je kao esencijalni mineral jer ima biološke funkcije za biljke, životinje i ljude (CABOT i sur., 2019.; BRIFFA i sur., 2020.). Kod svih teških metala nedostaci i višak mogu dovesti do neravnoteže u biološkim funkcijama (BROWN i sur., 1993.; BRIFFA i sur., 2020.). Prirodni je element koji se nalazi u Zemljinoj kori, a u atmosferu dolazi erozijom, vulkanskim aktivnostima, isparavanjem i šumskim požarima (CALLENDER, 2003.; SINGH i sur., 2011.; BRIFFA i sur., 2020.).

Antropogeno onečišćenje Zn nastaje zbog njegova iskapanja (CALLENDER, 2003.), primjenom guma, proizvodnjom cementa, spaljivanjem otpadaka, primjenom pesticida te taljenjem željeza i čelika (SINGH i sur., 2011.; BRIFFA i sur., 2020.). Cink je esencijalni mikronutrijent u biljkama, životinjama i ljudima. Potreban je za razne biološke funkcije, no njegov višak može uzrokovati i negativne učinke (BROWN i sur., 1993.; BROADLEY i sur., 2007.; CABOT i sur., 2019.; BRIFFA i sur., 2020.; KAUR i GARG, 2021.). U biljkama je nužan za proizvodnju enzima, stabilizaciju DNA, ekspresiju gena, rast i metaboličke puteve koji su uključeni u obranu biljke (BROADLEY i sur., 2007.; CABOT i sur., 2019.). Nedostaci mogu dovesti do slabljenja stanične stijenke, poremećaja enzimske aktivnosti, kloroze i nekroze (BROWN i sur., 1993.). Toksičnost cinka u biljkama može se očitovati nedostatkom drugih hranjivih tvari (KAUR i GARG, 2021.).

Kod nekih hiperakumulacijskih biljaka obilje cinka u njima djeluje kao zaštita od štetnih kukaca (CABOT i sur., 2019.). U ljudi je potreban za stabilizaciju enzima, za stanični rast i razvoj, staničnu diobu i aktivaciju stanice. Pomaže u regulaciji pH, funkciji štitnjače, mineralizaciji kostiju i zgrušavanje krvi. Potreban je kod zacjeljivanja rana i stvaranja kolagena za kožu, kosu i nokte (CHASAPIS i sur., 2012.; BRIFFA i sur., 2020.). Upotrebljava se u svakodnevnom životu u raznim industrijskim granama gdje ulazi u atmosferu, vodu i hranu. To je esencijalni mineral i mikronutrijent koji je potreban biljkama, životinjama i ljudima za homeostazu.

### **2.6.5. KADMIJ (Cd)**

Kadmij je neesencijalni teški metal bijele boje koji se nalazi uz Zn i Pb kao ruda u Zemljinoj kori. Oslobađa se iz Zemljine kore pomoću vulkanskih erupcija, šumskih požara i klizišta (CALLENDER, 2003.; GUO i sur., 2019.). Izvor Cd je tlo, rudnici, izgaranje fosilnih goriva te gnojiva. Budući da je topljiv u vodi, ona mu služi kao medij za širenje. Može doći i do onečišćenja atmosfere prašinom obogaćenom česticama metala koji se širi pomoću vjetra. Upotrebljava se u proizvodnji televizijskih ekrana, galvanizaciji, proizvodnji čelika i željeza, lasera te baterija (CALLENDER, 2003.; BERNHOFT, 2013.). Biljkama i životinjama nije esencijalni element i smatra se toksičnim (GUO i sur., 2019.; GENCHI i sur., 2020.). Iz industrije Cd može dospjeti u rijeke, jezera, oceane i tlo te tako počinje proces akumuliranja u sva tkiva biljke (BRIFFA i sur., 2020.). Unos je određen količinom Cd soli u tlu, pH, svojstvima tla, atmosferskom taloženju i nedostatkom biljnih minerala (SMOLDERS, 2001.).

Kod nekih biljaka toksičnost može dovesti do uvijanja lišća, kloroze, nekroze, zaostajanja u rastu, dok druge mogu podnijeti mnogo veće doze bez pokazivanja znakova otrovanja (BERNAVIDES i sur., 2005.). Otrovanje u ljudi i životinja dolazi zbog konzumiranja i udisanja zagađenih biljaka te putem vode (HUSEEN i MOHAMMED, 2019.; HAZRAT i sur., 2019.; BRIFFA i sur., 2020.). Jedan od glavnih izvora Cd jesu cigarete, a u tragovima se može naći u zelenom povrću, žitaricama i krumpiru. Visoke koncentracije sadržavaju školjkaši, iznutrice životinja, ulje sjemenskih usjeva i biljna hrana iz zagađenih područja (GENCHI i sur., 2020.). Riža je namirnica u kojoj ima najviše kadmija. Prisutnost kadmija u organizmu uzrokuje simptome kao što su jaka bol u kostima i zglobovima, dekalifikacija kostura, češći prijelomi kostiju, iskrivljenje dugih kostiju i osteoporoza (GENCHI i sur., 2020.).

Nema propisane zakonske legislative za Cd u medu, ali su za neke vrste hrane propisane maksimalno dopuštene koncentracije (COMMISSION REGULATION, 2014.). Najniža razina tolerancije propisana je za zamjensku hranu u dojenčadi proizvedene od kravljeg mlijeka (0,005 mg/kg), a najveća za dodatke prehrani načinjene od morskih algi (3 mg/kg).

#### **2.6.6. KOBALT (Co)**

Kobalt biljke apsorbiraju korijenom, ali i preko listova i stabljike (KABATA-PENDIAS, 2000.). Neke biljke mogu akumulirati veće koncentracije u lišću (CONNOR i sur., 1975.) dok kod nekih čak i male doze izazivaju toksične učinke. Prvi znakovi toksičnog djelovanja jesu bijeli i neživi vrhovi lišća, zatim slabiji rast, nekroza, kloroza ili čak propadanje biljke (VANSELOW, 1966.). Iako je poznato da je Co esencijalan za pojedine funkcije mikroorganizama, on također inhibira iskorištavanje magnezija. Esencijalni je element za životinje i ljude jer je dio vitamina B<sub>12</sub>. Prilikom udisanja dolazi do poremećenih dišnih funkcija (KYONO i sur., 1992.). Konzumiranje većih količina može dovesti do poremećaja u kardiovaskularnom sustavu, kao i do oštećenja jetre, alergijskih reakcija, a akutno trovanje može uzrokovati paralizu živčanog sustava. Pri kroničnom otrovanju dolazi do zaostajanja u rastu i nedostataka vezanih za tireoidnu žlijezdu (DRASZAWKA-BOLZAN, 2014.).

#### **2.6.7. KROM (Cr)**

U prirodi se pojavljuje u dva stabilna oblika, trovalentni krom (III) i šesterovalentni krom (VI) (OLIVEIRA, 2012.). Elementarni se krom ne pojavljuje prirodno. Gustoća od 7,14 g/cm<sup>3</sup> svrstava ga na 24. mjesto periodnog sustava (ERTANI i sur., 2017.). Cr (VI) najpokretljiviji i najotrovniji je za mikroorganizme, biljke i životinje. Cr (III) nije tako pokretan ili toksičan. Mikronutrijent je za sisavce u mikrodozama, ali u većim koncentracijama može postati toksičan (ERTANI i sur., 2017.; SHANKER i sur., 2005.). Cr (III) može katkad oksidirati u Cr (VI) i Cr (VI) se može reducirati u Cr (III) s redoks-reakcijom (BANDARA i sur., 2020.; STAMBULSKA i sur., 2018.). U prirodi se Cr pojavljuje kao Cr (III) u obliku kromita FeCr<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, dok Cr (VI) nastaje kao posljedica antropogenih aktivnosti (TUMOLO i sur., 2020.). Najveća se toksičnost pripisuje njegovom obliku Cr (VI) (TCHOUNWOU i sur., 2012.).

Kod biljaka se Cr najviše akumulira u korijenu, zatim u lišću i izdancima, a najmanje u plodu (KABATA-PENDIAS, 2000.). Utječe na smanjenje koncentracija gotovo svih glavnih nutrijenata, K, P, Fe i Mg u biljaka. Cr (VI) se upotrebljava u industriji, stoga dolazi do njegova

znatnog povećanja u okolišu (ERTANI i sur., 2017.; SHANKER i sur., 2005.; TUMOLO i sur., 2020.). Onečišćenje vode i tla može nastati nepravilnim skladištenjem krutog i tekućeg otpada ili je pušten u zemlju kroz otpadnu vodu iz industrijskih postrojenja (OLIVEIRA, 2012.; TUMOLO i sur., 2020.). Prirodni atmosferski Cr (III) može se pojaviti taloženjem iz vulkanskih erupcija (SHARMA i sur., 2020.). Toksičnost ovisi o vrsti, dozi, trajanju izloženosti i mjestu ulaska u tijelo. Maksimalni dnevni unos po dobi ne bi smio prelaziti u dojenčadi do prve godine 33 do 45 mg/dan, u djece do 11 godina 123 do 171 mg/dan, a u odraslih 246 do 343 mg/dan (SHEKHAWAT i sur., 2015.). Inhalacije Cr (VI) u manjim dozama uzrokuju iritacije sluznice, perforacije septuma, smanjenje aktivnosti pluća i infekcije.

Visoke doze uzrokuju DNA oštećenja, karcinom ili smrt (SHEKHAWAT i sur., 2015.; TUMOLO i sur., 2020.). Cr (VI) i Cr (III) uzrokuju iritaciju kože, svrbež i dermatitis (HAZRAT i sur., 2019.). Unos kroma, nakupljanje, utjecaj i tolerancija variraju ovisno o biljci, mediju i pH u kojemu rastu, te interakcijama mikroorganizma i biljke. Neke biljke imaju aktivni mehanizam kako bi se zaštitile (CERVANTES i sur., 2001.; OLIVEIRA, 2012.). *Rhizobium* spp. bakterije u mahunarkama akumuliraju teške metale, uključujući Cr iz tla i vode, te pomažu u detoksikaciji biljke (STAMBULSKA i sur., 2018.). Cr je teški metal koji je nužan mikronutrijent za metaboličke procese sisavaca, ali može uzrokovati toksičnost za okoliš, biljke, životinje i ljude. Industrijalizacija utječe na povećanje količine u atmosferi, vodi, tlu i dovodi do bioakumulacije u biljkama, životinjama i ljudima uzrokujući potencijalnu prijetnju za sigurnost hrane, toksičnost, bolesti i smrt.

#### **2.6.8. MANGAN (Mn)**

Mangan je esencijalni element koji je nužan za rast biljaka i pripada u mikronutrijente. Kod biljaka se može pojaviti deficit Mn, koji se vidi na niže raspoređenim listovima na biljci. U većim je koncentracijama toksičan. Toksičnost Mn jedan je od glavnih razloga smanjenog prinosa kod biljaka koje rastu na kiselim zemljištima. Oštećenja se pojavljuju u starijim listovima (HORST, 1988.). Višak Mn može utjecati na noduse azotofiksirajućih bakterija u korijenu biljaka i samim tim i na fiksaciju azota (KABATA PENDIAS, 2000.). Deficit se pojavljuje u mnogih životinjskih vrsta, ali ne i u čovjeka. Znakovi deficita su smanjen rast, abnormalnosti kostura, poremećena funkcija razmnožavanja i poremećaji u metabolizmu lipida i ugljikohidrata. Smatra se jednim od najmanje toksičnih mikroelemenata nakon oralnog unosa (WHO, 1996.). Najčešći je izvor otrovanja udisanje para bogatih manganom koje u životinja i ljudi dovodi do pneumonije (BOOJAR i GOODARZI, 2002.). U ljudi i životinja najčešći su

problemi koji se pojavljuju prilikom otrovanja manganom promjene u ponašanju, metabolizmu i moždanim funkcijama (MORENO i sur., 2009.; BRNA i sur., 2011.; WASSERMAN i sur., 2011.).

### **2.6.9. MOLIBDEN (Mo)**

Molibden je srebrnobijeli vrlo tvrdi metal. Pokazuje veliku čvrstoću i elastičnost na visokim temperaturama te dobru toplinsku i električnu vodljivost. Kao mikroelement u živim organizmima ima važne biološke funkcije. Neravnoteža u odnosu s bakrom uzrokuje reproduktivne probleme. Osim u metalurgiji za legiranje čelika, upotrebljava se u proizvodnji žarulja, za izradu nosača žarnih niti te kao nosač poluvodičkih elemenata (HRVATSKA ENCIKLOPEDIJA, 2021.a). Odgovoran je za vezivanje dušika iz zraka putem simbioze s bakterijama *Rhizobium* spp. kod leguminoza (soja, grašak, lucerna). Smatra se važnim u ishrani biljaka (oam Fe, Mn, Zn, Cu). Ulazi u sastav kloroplasta pa je važan u fotosintezi. Regulira transport Fe kroz biljku, a pri nedostatku listovi biljaka poprimaju smotani oblik s izbočenim rubovima.

### **2.6.10. NIKAL (Ni)**

Nikal je funkcionalni element za djelovanje enzima ureaze koji se može naći u biljkama, životinjama i ljudima, pa se smatra esencijalnim elementom (HÄNSCH i MENDEL, 2009.). Nedostatak može dovesti do usporenog rasta i hematopoeze. Pri većim koncentracijama može biti toksičan za biljke uzrokujući kloroze i nekroze, poremećaje u funkcioniranju stanične membrane i poremećaje u balansu vode (GONNELLI i sur., 2001.; RAHMAN i sur., 2005.). Može dovesti i do ometanja normalne apsorpcije nutrijenata, do smetnji u razvoju korijena i metabolizmu biljke (KABATA-PENDIAS, 2000.). Većina se toksičnosti u ljudi i životinja očituje poremećajima fiziološke uloge Mg, Zn, Ca i Mn. Može zamjeniti Zn na mjestu vezivanja određenih enzima i na taj način imati inhibicijski ili aktivacijski učinak. Višak uvjetuje nedostatak željeza jer sprečava njegovu translokaciju (ALCÓN i sur., 1991.).

### 2.6.11. OLOVO (Pb)

Ovo je teški metal za biljke, životinje i ljude, koji može dovesti do toksičnosti u vrlo malim dozama (VORVOLAKOS i sur., 2016.; BRIFFA i sur., 2020.). Nalazi se u Zemljinoj kori i može ući u atmosferu putem erozije, vulkanske erupcije, klizišta i šumskih požara. Glavni su uzrok onečišćenja okoliša antropološki izvori Pb (rudarstvo, izgaranje ugljena i nafte, ispušni plinovi vozila, spaljivanje otpada) (CALLENDER, 2003.; GAD i PHAM, 2014.; BRIFFA i sur., 2020.). Pb je sive boje, rastezljiv i mekan metal. Upotrebljava se u baterijama, bojama, cijevima, streljivu, insekticidima, u glazurama za keramiku krovništa te za opremu u teretanama (BRIFFA i sur., 2020.).

Neesencijalni je toksični element za biljke bez biološke funkcije. Unos u biljke kontroliran je vrijednošću pH, veličinom čestica, kapacitetom izmjene kationa tla, izlučivanjem iz korijena te drugim fizikalnim i kemijskim parametrima. Tolerancija se razlikuje od vrste do vrste (FAHR i sur., 2013.; HADI i AZIZ, 2015.; POURRUT i sur., 2011.). Olovo ulazi u biljku kroz polupropusne  $\text{Ca}^{2+}$  kanale u korijenu (POURRUT i sur., 2011.). Neke su biljke razvile mehanizam sprečavanja unosa Pb sintezom i taloženjem kaloze, biljnog saharida koji služi kao zapreka za sprečavanje prodora teških metala (FAHR i sur., 2013.).

Olovo kod biljaka uzrokuje pojavu crnog korijenja, što smanjuje upijanje hranjivih tvari, fotosintezu i klorozu. Pritom inhibira rast biljke i dovodi do nekroze stabljike i listova (HADI i AZIZ, 2015.).

Razina apsorpcije toksičnih koncentracija razlikuje se u ljudi i životinja. Djeca, trudnice i ljudi s nedostatkom Ca, Zn, Fe skloni su resorbirati više Pb. Uobičajeni su simptomi otrovanja olovom encefalopatija, vrtoglavica, teturanje, poremećaj koncentracije, gubitak pamćenja, depresija, nejasan govor i anemija (WANI i sur., 2016.).

Pb se ne može izlučiti iz organizma, već se kumulira. Otrovanje se liječi tvarima koje stvaraju stabilne kompleksne spojeve i za sebe čvrsto vežu Pb, pa se lako izlučuju mokraćom (kalcijev etilendiamintetracetat,  $\text{CaNa}_2\text{EDTA}$  / etilendiamintetraoctena kiselina). Najveću primjenu ima u proizvodnji akumulatora, u izradi puščanih zrna i drugog streljiva. Rijeke, jezera i potoci mogu biti onečišćeni erozijama ruda, vjetrom nošenom prašinom te industrijskim procesima i izlivanjem (BRIFFA i sur., 2020.). Voda onečišćena olovom ulazi u ribe, životinje i biljka te putem hranidbenog lanca u ljude (ISHAQUE i sur., 2020.).

### 2.6.12. SELENIJ (Se)

Selenij je esencijalni metal koji u prirodi rijetko dolazi u elementarnom obliku. U visokim je koncentracijama otrovan. Bitan je sastojak glutation-peroksidaze i tireodoksina reduktaze, koji održavaju redoks homeostazu i reguliraju staničnu signalizaciju, te jodotironim-deiodinaze koja regulira aktivnost hormona štitne žlijezde. Danas mu je glavni izvor anodni mulj koji nastaje pri elektrolitičkom dobivanju bakra. Upotrebljava se u izradi fotoosjetljivih slojeva za fotokopiranje, u industriji guma, proizvodnji katalizatora te pri bojenju stakla. Otrovanje nastaje unosom bilja koje kumulira selenij iz tla te zbog pogrešaka uzrokovanih nepažnjom veterinaru ili stočara prilikom njegova dodavanja u hranu za životinje. Najveći udio distribuiranog Se nalazi se u jetri, no najveća je ukupna količina pohranjena u mišićju (PUŠIĆ i sur., 2018.). U prirodi se nalazi u organskom i anorganskom obliku. Anorganski oblik pronalazimo u raznim mineralima, poput selenida, selenita i selenata. Najčešći su izvor otrovanja škrljevci (npr. kredni), izgaranje fosilnih goriva i ugljen (KABATA-PENDIAS, 2000.).

### 2.6.13. SREBRO (Ag)

Elementarno je srebro bijeli, sjajni, lako obradiv metal (FILIPOVIĆ i LIPANOVIĆ, 1995.). Ima ga 20 puta više nego zlata i platine. Nalazi se u Zemljinoj kori u koncentraciji od 70 mg/t. Danas se oko 80 % Ag dobiva pri eksploataciji i metalurškoj preradi olova, cinkovih i bakrenih ruda, a ostatak iz samorodnog Ag i njegovih ruda te iz sekundarnih sirovina. Sirovo se srebro uvijek rafinira elektrolitskim postupkom do čistoće od 99,99 %. U prirodi se pojavljuje kao kompaktna masa u obliku grumenja i granula u hidrotermalnim žilama te kao kristal i u obliku spojeva (selenati, sulfidi, halogenidi, telurati). U prirodi, osim u elementarnom obliku, dolazi sa zlatom, olovom i bakrom (FILIPOVIĆ i LIPANOVIĆ, 1995.). Najviše se upotrebljava u obliku slitina, od kojih su najvažnije one s Cu, Zn, Ni. Najveća se količina proizvedenog Ag (1/3 svjetske proizvodnje) upotrebljava za kovanice (slitina s 5 do 50 % bakra), u proizvodnji nakita (slitina do 20 % bakra) te pribora za jelo (OPĆA ENCIKLOPEDIJA, 1977.). Metal Ag, odnosno ioni  $Ag^+$  imaju antibakterijsko djelovanje pa se upotrebljavaju u izradi posuda, spremnika i cijevi u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (POLITANO i sur., 2013.).



Unošenje znatnih koncentracija  $Ag^+$  uzrokuje pad imunosti u životinja, promjene u krvožilnom sustavu i živčanom tkivu te oštećenje jetre, bubrega i štitnjače. Dugogodišnjim radom s Ag i njegovim solima pojavljuje se bolest argirija. Ag se taloži u tkivima, stijenkama kapilara, bubrezima, koštanoj srži i slezeni. Koži daje sivozelenu ili plavičastu boju. Pokazuje baktericidnu aktivnost prema gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama (IP i sur., 2006.; FRANCI i sur., 2015.). Osim antimikrobne pokazuje i antitumorsku aktivnost (KALINOWSKA-LIS i sur., 2016.).

#### **2.6.14. VANADIJ (V)**

Vanadij je biološki važan kao mikroelement nužan za život. Sive ili srebrnobijele je boje i na zraku stabilan, dok je na višim temperaturama podložan oksidaciji. U prirodi se pojavljuje u rijetkim mineralima (vanadinit), ali prati druge metale (željezo, olovo, krom, cink) u njihovim rudama (HRVATSKA ENCIKOLOPEDIJA, 2021.). Unosi se u organizam hranom poput peršina, špinata, gljiva ili školjkaša. Glavni je izvor toksičnog učinka izloženost velikim količinama vanadijevih oksida u zraku oko industrijskih pogona koji proizvode, obrađuju i prerađuju vanadij. Nakon što uđe u organizam inhalacijom ili hranom, dolazi do oštećenja dišnog, želučano-crijevnog i krvožilnog sustava (CSEH i sur., 2012.; VENKATARMAN i SUDHA, 2015.).

#### **2.6.15. ŽELJEZO (Fe)**

Željezo je esencijalni element koji je nužan za proizvodnju klorofila kod biljaka (HÄNSCH i MENDEL, 2009.), dok se kod životinja može naći u hemoglobinu, mioglobinu, citokromima, enzimima koji sadržavaju željezo, kao i u proteinima za skladištenje željeza feritinu i hemosiderinu. Kod biljaka deficit izaziva klorozu mladih listova, dok u ljudi dovodi do anemije (LUCENA, 2000.). Iako je esencijalni element, za žive organizme može biti toksičan u većim koncentracijama. Kod biljaka je toksičnost željeza uglavnom posljedica slobodnih radikala koji nepovratno narušavaju staničnu strukturu i oštećuju membrane, DNK i proteine (DE DORLODOT i sur., 2005.). Toksičnost Fe smanjuje fotosintezu i prinos te povećava oksidacijski stres (SINHA i sur., 1997.). Akutno trovanje željezom može dovesti do konstipacije, mučnine, povraćanja i padanja u nesvijest (AGGETT, 2012.). Dođe li ipak do

otrovanja, može prouzročiti neurodegenerativne, hormonske i imunosne poremećaje (CHANG i RANGAN, 2011.).

#### **2.6.16. ŽIVA (Hg)**

Ovo je sjajni, srebrnobijeli metal. Loše provodi toplinu i električnu struju. Stabilan je na zraku, a na sobnoj je temperaturi tekućina. Živine su pare otrovne. U prirodi se može naći u obliku sitnih kapljica u kamenju i stijenama. Mala se količina nalazi u sastavu granita, bazalta, pijeska i sastavu mora. Najveće se količine nalaze u spojevima poput minerala cinabarita i levingstonita. Trenutačno je ispuštene žive u atmosferi do 500 % iznad prirodne količine, a u oceanima oko 200 % (EEA, 2018.).

Sagorijevanje krutih goriva, poput ugljena, treseta, drva u industriji i kućanstvima, jedan je od najvećih izvora onečišćenja u svijetu. Najvažniji je put izloženosti u ljudi konzumacija morskih plodova. Glavni je problem utjecaj na nerođenu i malu djecu. Procjenjuje se da se samo u Europi svake godine rađa 1,8 milijuna djece s većom količinom Hg od preporučene sigurnosne granice (EEA, 2018.). Trovanje živom uzrokuje oštećenje središnjeg živčanog sustava, sljepoću, cerebralnu paralizu te usporen mentalni razvoj (PLEADIN i sur., 2017.). Prema Europskoj legislativi najveća je dopuštena koncentracija Hg u vosku 1 mg/kg (FAOLEX, 2006.).

### 3. OBRAZLOŽENJE TEME

Vosak se u intenzivnom pčelarstvu kontinuirano reciklira preradom starijeg tamnog saća iz košnica u satne osnove. Satne osnove čine zajedničku osnovu izgrađenom saću i nužan su materijal pri uspostavljanju proizvodnih pčelinjih zajednica i njihovu proširivanju. Također, potrebne su pri api-biotehnološkim postupcima pripreme pčelinjih zajednica za glavne medonosne paše ili u primjeni biološko-tehnoloških načina kontroliranja ektoparazitskih bolesti poput varooze.

S obzirom na specifičan način života, raspored i redosljed obavljanja zadataka radilica (kućnih pčela i skupljačica), saće je važan bioindikator koji može poslužiti za prikupljanje podataka o stupnju onečišćenja okoliša toksičnim elementima. Uobičajeni postupci prilikom prerade voska u satnu osnovu nisu dovoljni za potpuno, pa vjerojatno ni zadovoljavajuće pročišćivanje od raznih ksenobiotika podrijetlom iz okoliša ili unesenih prilikom obavljanja rutinskih pčelarskih poslova i kontroliranja bolesti.

Pretpostavka je da primjenom tehnologije lijevanja voska s produljenom fazom hlađenja i taloženja postoji mogućnost uklanjanja znatne količine toksičnih teških metala iz sirovog voska, kao i koncentriranja esencijalnih elemenata koji se troše tijekom razvoja pčelinjeg legla u saću. Stoga je primarni cilj ovoga rada bio utvrditi kretanje koncentracija 16 esencijalnih i toksičnih elemenata (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn) u uzorcima voska tijekom prerade u satnu osnovu, primjenom tehnike ICP-MS kao višeelementne analize koja u jednom ciklusu pretraživanja omogućuje istodobnu analizu više elemenata.

Očekivani znanstveni doprinos dobiven ovim istraživanjem jest bolji uvid u učinkovitost prerade voska primjenom tehnologije lijevanja voska s produljenom fazom hlađenja i taloženja. Poseban je naglasak stavljen na znatnije uklanjanje toksičnih metala iz sirovog voska, kao i moguće koncentriranje esencijalnih elemenata. S obzirom na nedostatak dostupne literature o opisanoj problematici, dobiveni rezultati mogli bi imati važno značenje u praktičnom pčelarstvu, posebice intenzivnoj proizvodnji voska. Također, primjenom tih rezultata moglo bi se utjecati na smanjenje pojavnosti bolesti pčelinjeg legla, lakše održavanje vitalnosti pčelinjih zajednica, ali i sigurniju proizvodnju kvalitetnih pčelinjih proizvoda koji su i hrana za čovjeka.

## 4. MATERIJAL I METODE

### 4.1. PRIKUPLJANJE UZORAKA VOSKA

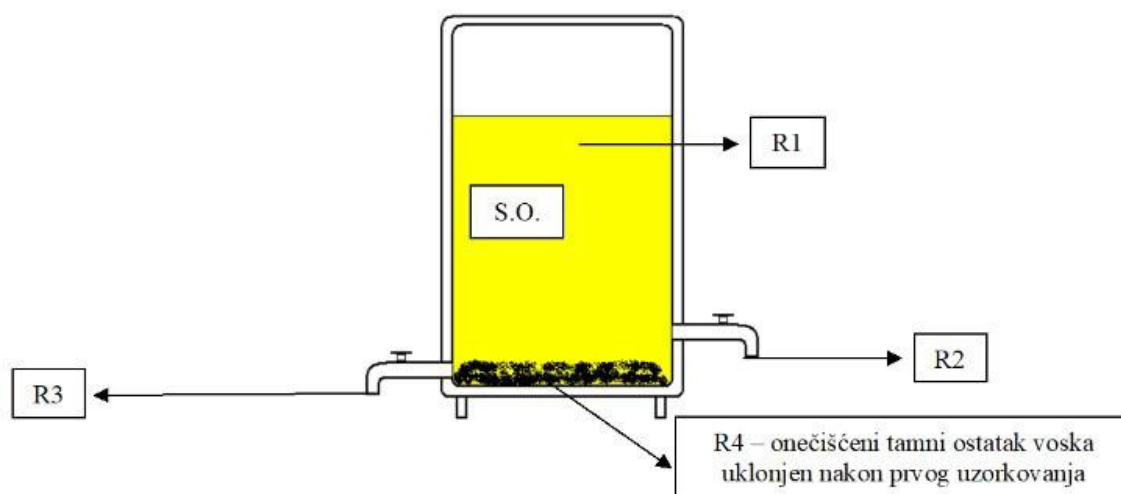
Uzorci voska prikupljeni su u radionici za preradu voska u satne osnove. Uzimani su uzorci otopljenog voska tijekom postupka njegove prerade u satnu osnovu metodom produljenog hlađenja i taloženja. Neprerađeni vosak prikupljen je u obliku blokova voska poznatog podrijetla s pčelinjaka koji su smješteni u kontinentalnom djelu Republike Hrvatske, a na kojima je tamno saće izvađeno iz košnica tijekom redovitog godišnjeg remonta saća i pretopljeno u sirovi vosak. Za istraživanje su korišteni uzorci otopljenog, homogeniziranog i sedimentiranog voska tijekom njegove prerade u satne osnove (n = 48) (slika 13).



Slika 13. Prikupljeni uzorci voska.

Postupak prerade voska odvijao se u čeličnom spremniku dvostrukih stijenki u kojemu cirkulira zagrijana voda, a volumena je 200 litara. Nakon pretapanja blokova voska cjelokupna je masa tekućeg voska homogenizirana i sterilizirana. Sterilizacija voska iznimno je važan dio dobrih pčelarskih, veterinarskih i okolišnih praksi, pa je otopljeni vosak zagrijavan do temperature 125 °C. Navedena je temperatura potrebna zbog sigurnog uništavanja moguće prisutnih uzročnika opasnih zaraznih bolesti, kao i uzročnika uvjetovanih bolesti pčelinje zajednice. Posebice je važno stvoriti uvjete sterilizacije koji će uništiti spore bakterije *P. larvae* koja uzrokuje američku gnjiloću medonosne pčele. Faza sterilizacije je s istodobno nastavljenom fazom homogenizacije trajala 40 minuta, a nakon toga je rad homogenizatora zaustavljen te je temperatura spremnika automatski prebačena na 75 °C. Pod učinkovitom se sterilizacijom podrazumijeva osiguravanje pritiska od minimalno 1400 hPa te postupak prerade bez dodavanja vode.

Prvi set uzoraka tekućeg voska uzet je 24 sata (I) nakon početka faze taloženja s tri razine izravno iz spremnika. Uzorci su uzimani grabilicom s dugim drškom ili ispuštani iz donjih dijelova spremnika. Naime, na spremniku se nalaze po dva otvora (slavine) između kojih postoji 7 % visinske razlike, a iz kojih su prikupljeni uzorci iz slojeva 3 i 4, dok su uzorci iz slojeva 1 i 2 prikupljeni grabilicom prije izlivanja na valjak kroz koji izlaze gotove satne osnove. Vosak je uzet s površinskog sloja (R1a), iz srednjeg sloja otopljenog voska (R2a) te s dna (R3a) spremnika (slika 14). Postupak uzorkovanja proveden je prema protokolu koji su detaljno opisali TLAK GAJGER i sur. (2016.a). Nakon obavljenog prvog uzorkovanja u potpunosti je iz spremnika ispušten tamni talog onečišćenog voska (R4) koji je neškodljivo uklonjen iz prerade. Zatim je pomoću pumpe preostali svijetli vosak pretočen u čisti čelični spremnik i ostavljen na ponovnom taloženju i sporom hlađenju. Sljedeće je uzorkovanje provedeno sedam dana (II) nakon početka ponovljene faze taloženja voska koji je održavan na temperaturi 75 °C. Prilikom uzimanja drugog seta uzoraka ponovljeno je uzorkovanje s površinske razine (R1b), dva iz srednjeg sloja otopljenog voska (R2b; R3b), te s dna spremnika talog (R4b).



Slika 14. Prikaz uzorkovanja otopljenog voska iz površinskog i srednjeg sloja (R1, R2) te dna spremnika (R3, R4) tijekom prerade voska u satne osnove metodom produljenog hlađenja i taloženja.

Svaki je pojedinačni uzorak otopljenog voska stavljen u čistu plastičnu posudicu zapremine 100 mL, zatvoren, označen i dostavljen u laboratorij gdje je do početka analiziranja bio pohranjen na temperaturi 4 do 8 °C.

## 4.2. PRIPREMA UZORAKA VOSKA ZA LABORATORIJSKO ANALIZIRANJE

U laboratorijskim je uvjetima pripremljeno i analizirano 48 uzoraka voska uzetih u dva navrata (nakon 24 sata i nakon sedam dana) tijekom prerade saća u satnu osnovu. Uzorci su kvalitativno i kvantitativno pretraženi na 16 esencijalnih i toksičnih elemenata (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn).

Određivanje većine pretraživanih elemenata zahtijeva pripremu uzoraka prije obrade u ICP-MS uređaju. Priprema je započeta vaganjem na analitičkoj vagi s mogućnošću očitavanja vrijednosti od 0,01 g (Vaga Ohaus, Pioneer, Ohaus Corp. Pine Brook, NY, USA) i odvajanjem potrebnih 0,5 grama pojedinog uzorka voska. Zatim je u pojedinačnu epruvetu s uzorkom dodano po 1 mL deionizirane vode (Buchs, Switzerland) i 2,5 mL ultračiste nitratne kiseline (65 % p. a.) (Darmstadt, Germany). Tako pripremljeni uzorak postavljen je u nosače mikrovalne pećnice (UltraWAVE ECR MW, Milestone Srl, Italija) u kojoj je 15 teflonskih posudica u kojima se zbilja mikrovalna razgradnja uzoraka voska prema zadanom programu (slika 15, tablica 2). Pritom svaka serija (set od 15 uzoraka) spaljivanja sadržava slijepu probu reagensa, negativnu kontrolu (vosak), negativnu kontrolu voska obogaćenu na koncentracije analita od interesa – 1, negativnu kontrolu voska obogaćenu na koncentracije analita od interesa – 2 te ispitivane uzorke voska. Za slijepu probu umjesto uzorka u jednu posudu dodano je 1 mL deionizirane vode i 2,5 mL nitratne kiseline (65 % p. a.)

Tablica 2. Program razgradnje uzoraka voska u mikrovalnoj pećnici.

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

Legenda: T – vrijeme, MW – snaga mikrovalova, T1 – temperatura 1, T2 – temperatura 2, P1 – tlak

Nakon razgradnje i hlađenja uzoraka voska u mikrovalnoj pećnici njihov sadržaj iz posude kvantitativno je prenesen u odmjerne tikvice zapremine 50 mL uz ispiranje sadržaja ultračistom vodom kako bi gubici analita bili što manji. Potrebno je naglasiti da se nakon mikrovalne razgradnje uzoraka teflonske posudice čiste kako bi se izbjeglo onečišćenje. Čišćenje se provodi tako da se u upotrebljavane teflonske posudice stavi 5 mL nitratne kiseline i 2 mL ultračiste

vode te se pokrene mikrovalni program za čišćenje (engl. *cleaning*). Program je prikazan u tablici 3.



Slika 15. Ultra WAVE ECR mikrovalna pećnica.

Tablica 3. Program čišćenja teflonskih posudica nakon pripreme uzoraka voska u mikrovalnoj pećnici.

Faza	T (min)	MW (W)	T1 (°C)	T2 (°C)	P1 (bar)
1	00:15:00	1500	200	60	60
2	00:05:00	1500	200	60	60

Legenda: T – vrijeme, MW – snaga mikrovalova, T1 – temperatura 1, T2 – temperatura 2, P1 – tlak

Za određivanje koncentracije Hg izravnim spaljivanjem na živinu analizatoru nije potrebna prethodna priprema uzorka. Homogenizirani uzorci važu se (0,1 g) u lađice i stavljaju na odgovarajuća mjesta u *autosampler* (automatski uređaj za uzorkovanje) instrumenta (AS) nakon čega slijedi njihova obrada u uređaju.

#### 4.3. PRIMJENA INDUKTIVNO SPREGNUTE PLAZME S MASENOM SPEKTROMETRIJOM ZA ODREĐIVANJE ELEMENATA U VOSKU

Određivanje koncentracija elemenata u uzorcima voska provedeno je primjenom tehnike induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom (AU680 Chemistry Analyzer In-Lab Training Manual) (NELMS, 2005.) koja omogućuje istodobnu analizu više elemenata. Definicije pojmova (izraza) korištenih u laboratorijskom protokolu pretraživanja prikazane su u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz definicija pojmova i /ili izraza korištenih u laboratorijskom protokolu za tehniku induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom.

Redni broj	Pojam/izraz	Definicija
1.	Kalibracijska slijepa proba ili kalibracijski <i>blank</i>	Otopina bez standarda koja sadržava sve reagense u istoj koncentraciji koji se koriste u analitičkom postupku pripreme. Slijepa proba ne podliježe postupku pripreme.
2.	Baždarni ili kalibracijski standard	Niz standardnih otopina poznate koncentracije koje se koriste za kalibraciju instrumenta. Otopine ne podliježu postupku pripreme, ali sadržavaju istu količinu reagensa koja se koristi pri pripremi uzoraka za analizu.
3.	Početna kalibracijska potvrda ili inicijalna kalibracijska verifikacija (ICV)	Otopina pripravljena iz matične ( <i>stock</i> ) standardne otopine različitog dobavljača od onog koji se koristi za pripremu standarda kalibracije. Koristi se za provjeru vjerodostojnosti kalibracijskih koncentracija.
4.	Kontinuirana kalibracijska potvrda ili kontinuirana kalibracijska verifikacija (CCV)	Standardna kalibracijska otopina koja se koristi za provjeru stabilnosti kalibracije s vremenom analize. To je izvorni kalibracijski standard čija se koncentracija nalazi na sredini kalibracijske krivulje i analizira se svakih 20 mjerenja ili više.



Princip tehnike induktivno spregnute plazme predstavlja struja visoko ioniziranog argona (99,999 %, White Martins, Rio de Janeiro, Brazil) koji prolazi kroz magnetno polje zavojnice. Pritom visokofrekventno magnetno polje ionizira argon, koji je inertni plin i formira se plazma. Plazma razvija temperature od 8000 do 10000 kelvina (K), što joj omogućuje utvrđivanje oko 75 elemenata iz periodnog sustava. Ova toplinska energija atomizira i ionizira pojedini uzorak voska. Nastali ioni zajedno se s argonom prenose iz područja s atmosferskim tlakom (oko 760 Torr) u sučelje masenog spektrometra koji radi pri mnogo nižem tlaku (oko  $10^{-5}$  Torr). Pomoću niza ionskih leća ioni se fokusiraju u analizator masa, gdje se primjenom električnog polja razdvajaju na temelju njihova omjera mase i naboja. Ioni koji izlaze iz analizatora masa detektiraju se multiplikatorom elektrona koji pretvara mjerljivi signal u maseni spektar. Ova tehnika omogućuje određivanje pojedinačnih izotopa elemenata. Plinove koje ICP koristi su argon, helij i vodik. Argon služi za formiranje plazme i čišćenje sustava od nečistoća prilikom pokretanja uređaja dok helij služi za uklanjanje interferencija.

Za pravilan rad i analiziranje provedenih pretraživanja potrebno je pridržavati se određenih mjera predostrožnosti:

- otopine standarda potrebno je pohranjivati u hladnjaku pri temperaturama 2 °C do 8 °C i do isteka roka trajanja, odnosno u skladu s preporukom certifikata proizvođača
- prilikom pripreme uzoraka voska treba koristiti koncentrirane kiseline (npr. HNO<sub>3</sub>) i spriječiti doticaj reagensa s kožom
- nikada ne treba koristiti kemikalije kojima je prošao rok trajanja jer to može rezultirati slabom osjetljivošću primijenjene metode
- s obzirom na to da se koriste kemijski opasne tvari, uvijek je potrebno raditi u digestoru i sa zaštitnim rukavicama
- pridržavati se propisa prikupljanja i neškodljivog uklanjanja otrovnih i štetnih tvari
- sve laboratorijsko posuđe treba biti zadovoljavajuće čistoće za analiziranje elemenata u tragovima
- preporučeni postupak čišćenja laboratorijskog posuđa uključuje ispiranje vodom, natapanje u 10 % HNO<sub>3</sub> i ispiranje ultračistom vodom
- staklo se ne smije koristiti zbog mogućeg onečišćenja uzoraka.

Za kalibriranje instrumenta potrebno je pripremiti mješavinu otopine standarda elemenata kako je navedeno u tablici 5. Za kalibraciju instrumenta korišten je certificirani standard čistoće 99,99 % koji se sastoji od Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn (10 mg/L; Standard za kalibraciju okoliša, Agilent Technologies, Santa Clara, CA,

SAD). Ultračista voda (otpornost 18.2 MW/cm) proizvedena primjenom Direct-Q® 5 UV sustava (Millipore Corporation Merck, Darmstadt, Njemačka) korištena je za pripremu razrjeđenja standarda i pripremu uzoraka. U analizama je korišten i interni standard za korekciju odstupanja osjetljivosti i efekt matrice koji se sastoji od smjese Bi, In i Sc (Inorganic Ventures, Blacksburg, VA, USA) (BILANDŽIĆ i sur., 2019.). Prema testu stabilnosti proizvođača elementi do 100 µg/L stabilni su 375 dana (<https://www.inorganicventures.com/stability-elements-ppb-concentration-levels>). Kalibracijski pravac za svaki određivani element izrađuje se snimanjem pripremljene mješavine otopine standarda na minimalno četiri koncentracijske razine, pri čemu se svaka točka očitava u tri ponavljanja. Propisani kriterij za koeficijent korelacije iznosi  $\geq 0,995$ .

Tablica 5. Mješavine otopina standarda pojedinih elemenata.

Element	Koncentracije standarda (µg/L)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Fe	10	25	100	500	1000	2000	5000	10000	50000
As	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Cd	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Co	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Cr	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Cu	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Mn	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Mo	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Pb	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Se	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Zn	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Ni	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
V	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Ba	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500
Ag	0,1	0,25	1	5	10	20	50	100	500

Otopine radnih standarda uobičajeno se pripremaju u volumenu od 50 mL. Ishodna (*stock*) otopina sadržava standarde podijeljene na dvije koncentracijske razine: 10 mg/kg i 1000 mg/kg. Uvjeti za pripremu radnih standarda prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Priprema radnih standarda.

Radni standard	Oznaka Standarda	Ishodni ( <i>stock</i> ) standard (mL)	MS (mL)	Standard 5	5 % HNO <sub>3</sub> (mL)
Blank	/	0	/	/	50
MS (100 µg/L)	MS-100 ppb-	0,5	/	/	49,1
Std 8 (100 µg/L)	ICPMS				
Std 1 (0,1 µg/L)	RS-std1-ICPMS	/	/	0,5	49,5
Std 2 (0,25 µg/L)	RS-std2-ICPMS	/	0,125	/	49,875
Std 3 (1 µg/L)	RS-std3-ICPMS	/	0,5	/	49,5
Std 4 (5 µg/L)	RS-std4-ICPMS	/	2,5	/	47,5
Std 5 (10 µg/L)	RS-std5-ICPMS	/	5	/	45,5
Std 6 (20 µg/L)	RS-std6-ICPMS	/	10	/	40
Std 7 (50 µg/L)	RS-std7-ICPMS	0,25	/	/	49,75
Std 8 (100 µg/L)	RS-std8-ICPMS	0,5	/	/	49,5
Std 9 (500 µg/L)	RS-std9-ICPMS	2,5	/	/	47,5

Koncentracija pripravljenog internog standarda (IS) iznosi 200 µg/L. IS se nalazi odvojeno od standarda i kalibracijskog *blanka* i miješa se s njima pomoću Y-spojnice. Od 20 mg/L ishodne otopine mješavine internih standarda pipetira se 500 µL u plastičnu epruvetu od 50 mL i nadopuni do oznake.

Instrumentalna analiza provedena je na uređaju ICP-MS Agilent system Model 7900 (Agilent, Palo Alto, CA, SAD). Pripremljeni uzorci stavljeni su u *autosampler* instrumenta u odgovarajuće polipropilenske epruvete i analizirani. Redoslijed injektiranja uzoraka nakon provedene kalibracije iz odabranog Batcha: ICV → sp reagensa → QC kontrola → uzorci → CCV (svakih 20 mjerenja i/ili kraj Batcha) → QC kontrola (opcija). Ako je broj uzoraka veći od 30, QC kontrola na kraju je poželjna. Uvjeti rada uređaja navedeni su u tablici 7.

Tablica 7. Uvjeti rada uređaja ICP-MS (Agilent ICP-MS system Model 7900) pri analiziranju uzoraka voska.

Raspršivač ( <i>Nebulizer</i> )	MicroMist	
Komora za raspršivanje ( <i>Spray chamber</i> )	Cyclonic	
Sučelje ( <i>Interface</i> )	Pt cones	
Analizator masa ( <i>Mass analyzer</i> )	Quadropole	
RF snaga	1,55 kW	
Način rada (Acq mode)	Spektar	
Obrazac pikova ( <i>Peak pattern</i> )	1 točka	
Ponavljjanja ( <i>Replications</i> )	3	
Sweep/replicate	100	
Sample uptake rate	0,4 rps	
Vrijeme stabilizacije (Stabilization time)	No gas	He
	10 s	5 s
Ion lenses mode	x-Lens	
Tune parameters	Standard tune	
Protok plina nosioca (Carrier gas)	1,07 L/min	
Protok plazme (Plasma gas)	14,99 L/min	
Aux gas	0,9 L/min	
Omega Bias	-80 V	
Omega Lens	8,4 V	



Slika 16. Uređaj ICP-MS Agilent system Model 7900.

Način podešavanja instrumenta provodi se prema uputama proizvođača, i to bez plina u normalnom načinu rada i uz primjenu helija, odnosno visokoionizirajućem He načinu ako se upotrebljava u metodi primjerice za određivanje Se. Potrebno je obvezno provjeriti u izvješću podešenih parametara jesu li zadovoljene specifikacije za osjetljivost, omjer oksida i dvostruko nabijenih omjera. Niski oksidi i niske dvostruko nabijene vrste važne su za smanjenje interferencija. Ovisno o učestalosti rada potrebno je uskladiti pulsno-analogni faktor (P/A faktor) zbog točnijeg prelaska kalibracijske krivulje iz pulsno u analogni način tako da krivulja tvori linearan odgovor u širokom rasponu intenziteta signala. No ako je u metodi uključena mogućnost podešavanja P/A faktorom, nije potrebno raditi usklađivanje pulsno i analognog načina, jer to uređaj čini automatski tijekom rada. Prikaz podešenih parametara na sučelju uređaja pri analiziranju uzoraka voska nalazi se na slici 17. Takvi se izvještaji ne ispisuju, već se samo provjeravaju prije početka mjerenja, a dostupni su na *C:\data\agilent\ICPMH\1\performance report.xml*.

Parameter	Measured Value	Agilent-Recommended Limit	Customer Limit (if applicable)	Pass/Fail	Verified By/Date
Peak Width (No Gas Mode)					
<sup>7</sup> Li		0.65-0.80 @ 10%			
<sup>89</sup> Y					
<sup>205</sup> Tl					
Mass Axis (No Gas Mode)					
<sup>7</sup> Li		Selected mass +/- 0.1			
<sup>89</sup> Y					
<sup>205</sup> Tl					
Sensitivity (No Gas Mode) <i>For the Measured Value, multiply the mean counts by 10,000.</i>					
<sup>7</sup> Li		> 25.5 Mcps/ppm			
<sup>89</sup> Y		> 85 Mcps/ppm			
<sup>205</sup> Tl		> 51 Mcps/ppm			
Doubly-Charged Species (No Gas Mode)					
<sup>70</sup> Ce <sup>2+</sup> / <sup>140</sup> Ce <sup>+</sup>		≤ 2.3			
Oxide Species (No Gas Mode)					
<sup>156</sup> CeO <sup>+</sup> / <sup>140</sup> Ce <sup>+</sup>		≤ 1.38%			
Sensitivity (He Mode) <i>For the Measured Value, multiply the mean counts by 10,000.</i>					
<sup>59</sup> Co		> 20.4 Mcps/ppm			
Sensitivity (H <sub>2</sub> Mode) <i>For the Measured Value, multiply the mean counts by 10,000.</i>					
<sup>89</sup> Y		> 51 Mcps/ppm			

Slika 17. Prikaz parametara podešenih na sučelju uređaja pri analiziranju uzoraka voska.

Postupak pripreme otopina za podešavanje parametara na instrumentu i P/A faktora navedeni su u tablici 8. Postavke instrumenta obuhvaćaju parametre mjerenja, način mjerenja, integracijska vremena, masu, cps i intenzitet, a prikazani su u tablici 9. Potrebno je primijeniti korekcijske jednadžbe za Pb:  $Mc(208) = M(206) \cdot 1 + M(207) \cdot 1 + M(208) \cdot 1$ .

Tablica 8. Priprema otopina Tunea i P/A faktora.

0,5 mL P/A Tuning solution 1+0,5 mL P/A Tuning solution 2+ 39 mL ultračiste vode	P/A Faktor
0,1 mL 10 mg/L Tune solution+99,9 mL ultračiste vode →10µg/L ↓ 5 mL 10 µg/L+ 45 ml ultračiste vode →1µg/L	1 µg/L Tune

Tablica 9. Prikaz postavki instrumenta za parametre mjerenja koncentracija analita.

Element	Masa	Funkcija	Is	Integracijsko vrijeme/masi (sek)		
				No gas	He	HEHe
As	75	Analit	In 115		0,5	
Ag	107	Analit	In 115		0,5	
Ba	135	Analit	In 115		0,5	
Cd	111	Analit	In 115		0,5	
Co	59	Analit	In 115		0,5	
Cr	52	Analit	In 115		0,5	
Cu	63	Analit	In 115		0,5	
Fe	56	Analit	In 115		0,5	
Mo	95	Analit	In 115		0,5	
Mn	55	Analit	In 115		0,5	
Ni	60	Analit	In 115		0,5	
Pb	208	Analit	Bi 209	0,1		
Se	78	Analit	In 115			1
V	51	Analit	Sc 45	0,1		
Zn	66	Analit	In 115		0,5	
Sc	45	Is	Sc 45	0,1		
In	115	Is	In 115	0,1	0,5	1
Bi	209	Is	Bi 209	0,1		

Konačan izračun rezultata radi se prema formuli:

$$C(\mu\text{g/kg}) = c(\mu\text{g/L}) \times V(\text{ mL})/m(\text{g}).$$

Pritom C označuje koncentraciju elementa u uzorku izraženu u  $\mu\text{g/kg}$ , c koncentraciju elementa izraženu u  $\mu\text{g/L}$ , V volumen uzorka voska izražen u mL, a m masu uzorka voska izraženu u gramima.

Za smanjenje pojava kemijskih interferencija koncentracija  $\text{HNO}_3$  treba biti manja od 5 % (V/V) za ICP-MS analize. Tako se smanji šteta na sučelju uređaja i minimiziraju izobarne molekularne smetnje. Upotreba Pt konova može koristiti pri upotrebi agresivnijih kiselina, a konačno razrjeđenje uzoraka voska treba odgovarati sadržaju reagensa korištenih u pripremi kalibracijskih standarda kako bi se podudarale moguće interferencije.

Kod instrumentalne interferencije pojavljuju se interferencije izobarnih molekula i dvostruko nabijeni ioni čija je pojava uzrokovana utjecajem poliatomskih iona. Spektralne su interferencije pak rezultat prisutnosti drugih izotopa ili iona koji imaju istu atomsku masu ili maseni broj kao analit.

Specifičnost u određivanju koncentracije Pb temelji se na promjenjivosti izotopa Pb u prirodi. Vrijednosti koncentracija Pb obilježavaju se s izotopom 208, a u prirodi su prisutna sva tri izotopa Pb. Stoga je na izotop 208 potrebno primijeniti korekcijsku jednadžbu:  $(1,000) (^{206}\text{Pb}) + (1,000) (^{207}\text{Pb}) + (1,000) (^{208}\text{Pb})$ .

#### **4.4. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJA ŽIVE IZRAVNIM SPALJIVANJEM U UREĐAJU ZA ANALIZIRANJE ŽIVE**

Postupak određivanja koncentracija Hg na uređaju za analiziranje (slika 18) zasniva se na kvantificiranju homogeniziranih uzoraka voska koji su odvagani na preciznoj analitičkoj vagi i preneseni u specijalne lađice. Uzorci u lađicama prenose se u katalitičku cijev, gdje se suše u struji kisika i razgrađuju pri temperaturi od  $850\text{ }^\circ\text{C}$ . Zatim razgrađeni produkti prolaze kroz katalitičku peć zagrijanu na temperaturu od  $700\text{ }^\circ\text{C}$  na kojoj se zadržavaju dušikovi oksidi i sumpor. Pritom se Hg prihvaća na amalgamator koji se kratko zagrije, te se živa otpušta, a njezine se pare prenose u stanice za mjerenje. Atomi Hg apsorbiraju zračenje koje emitira živina lampa. Proporcionalno rastu broja atoma raste i količina apsorbiranog svjetla, a mjereći

količinu apsorbiranog svjetla na odgovarajućoj valnoj dužini određuje se koncentracija Hg u uzorcima voska. Uvjeti rada uređaja za određivanje Hg navedeni su u tablici (tablica 10).



Slika 18. Uređaj za analiziranje uzoraka na prisutnost i kvantifikaciju žive AMA – 254.

Prije određivanja koncentracija Hg u uzorcima voska potrebno je napraviti tzv. čišćenje uređaja (program L u sučelju softvera AMA-254) kako bismo izbjegli mogućnost unutarnjeg onečišćenja. Valjanost postupka čišćenja potvrđuje se mjerenjem slijepih proba. Slijepa proba uređaja treba biti niža od 0,05 ng Hg. U uzorku se utvrđuje količina apsorbiranog svjetla, a onda se preko kalibracijskog pravca dobiva količina Hg (ng) koja služi za izračun koncentracije u pojedinom uzorku voska.

$\text{Formula za izračun je: } C \text{ (ng/mg)} = c \text{ (ng)} / m \text{ (mg)}$
--

Pritom C označuje koncentraciju žive u uzorku izraženu u ng/mg, c koncentraciju Hg izraženu u ng, a m masu uzorka voska izraženu u mg.

Tablica 10. Uvjeti rada uređaja za određivanja koncentracija žive.

Uvjeti rada	
parametar mjerenja	apsorbancija
valna dužina	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 do 600 ng



#### 4.5. KONTROLA KVALITETE REZULTATA PROVEDENIH ANALIZA

Kontrola kvalitete dobivenih rezultata provedenih analiza provjerava se preko ICV-a, CCV-a, kontrolom slijepih proba i kontrolnim kartama. Ukratko, otopina koja sadržava analite od interesa koncentracije unutar kalibracijskog pravca ( $10 \mu\text{g/L}$ ), a pripravljena je iz matične standardne otopine koja se razlikuje od početnih standardnih otopina za pripremu kalibracijskih standarda. ICV se primjenjuje za provjeru kalibracijskog pravca i analizira se neposredno nakon kalibracije. Također služi za povećanje točnosti kalibracije tijekom analiza kao kontinuirana provjera kalibracije (CCV) pri čemu se analizira svakih 20 uzoraka i/ili na kraju Batcha. Vrijednosti koncentracije ne smiju se razlikovati više od  $\pm 10\%$  (raspon  $9 - 11 \mu\text{g/L}$ ).

---

0,5 mL 10 mg/L Multi elem. Calib std 2A+45,5 mL ultračiste vode $\rightarrow$ 100 $\mu\text{g/L}$	10 $\mu\text{g/L}$ ICV
---	------------------------

---

5 mL 100 $\mu\text{g/L}$ + 45 ml ultračiste vode $\rightarrow$ 10 $\mu\text{g/L}$
---

---

Slijepa proba kontrolira se kako bi se provjerila eventualno prisutna onečišćenja koja se mogu dogoditi zbog nečistog posuđa, onečišćenih kemikalija i slično. Najprije se provjere slijepa probe reagensa svih serija razgrađenih uzoraka. Ako slijepa proba reagensa određene serije uzoraka ne odgovara zadanom kriteriju (treba biti ispod limita kvantifikacije), svi se uzorci isključuju iz postupka. U svakoj seriji uzoraka razgrađivanoj u mikrovalnoj pećnici treba biti prisutan kontrolni materijal koji može biti negativni uzorak ili odgovarajući certificirani referentni materijal. Negativni se uzorak obogaćuje na vrijednost od  $1 \text{ mg/kg}$ . Kontrolni se materijal radi u duplikatu. Rrazdoblje kontrole procesa ovisi o učestalosti mjerenja. U tablici 11 prikazan je sažetak kontrole kvalitete.

Tablica 11. Sažetak kontrole kvalitete pretraživanja uzoraka.

QC uzorak	Mjerenje	Minimalna učestalost	Kriterij prihvatljivosti	Popravne radnje
Kal. std.	Linearnost kalibracijske krivulje	Jedanput/metodi/danu	Koeficijent korelacije $\geq 0,995$	Ponovna analiza
Interni standard (IS)	Korekcija driftova	Svi standardi, sp, uzorci	80 do 120 % u odnosu na kalibracijski blank	Ako je odziv IS izvan granica, ponovno analizirati uzorak koji je potrebno razrijediti po potrebi. Ako ne, uzorak je potrebno analizirati s drugom kalibracijom.
ICV	Kontrola rada sustava	Jedanput, nakon kalibracije	Iskorištenje 90 – 110 %	Ispraviti problem prije nastavka analize. Rekalibrirati ako je potrebno.
CCV	Preciznost	Na kraju i/ili svakih 20 uzoraka	Iskorištenje 85 – 115 %	Zaustaviti analizu, ispraviti problem, rekalibrirati i ponovno analizirati obuhvaćene uzorke.*
Slijepa proba (SP)	Onečišćenja zbog reagensa, laboratorijskog posuđa i sl.	Minimalno jedna po <i>batchu</i>	Vrijednost $\leq$ LOQ metode	Utvrđiti i ukloniti uzrok onečišćenja. Zahvaćeni uzorci se moraju ponovno pripremiti i analizirati.*
Matrica obogaćena nakon pripreme uzoraka	Provjera matriks interferencija	Po potrebi	Iskorištenje 75 do 125 %	Analizirati uzorke metodom standardne adicije.
Kontrolni materijal (KM) (duplikat)	Preciznost metode	Minimalno jedna po <i>batchu</i>	-	Prema pravilima kontrolne karte.

\*Ako je koncentracija elementa od interesa znatno niža od NDK vrijednosti ( $\leq 50$  % NDK), uzorak nije potrebno ponovno analizirati.

#### 4.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobiveni rezultati koncentracija 16 elemenata statistički su obrađeni programom Small Stata 13.1 (StataCorp LP, 4905 Lakeway Drive, USA). Koncentracije elemenata u uzorcima voska prikazane su kao minimum (Min) i maksimum (Max), srednja vrijednost (SV) i standardna devijacija (SD). U statističkoj obradi primijenjen je Shapiro-Wilkov test za testiranje distribucije podataka.

Kruskal-Wallisovim testom ispitane su razlike u koncentracijama elemenata između slojeva R1 do R4 u istom terminu uzorkovanja, odnosno 1. i 7. dana (I, II). Wilcoxonovim *rank-sum* (Mann-Whitney) testom ispitane su razlike u koncentracijama elemenata između istih slojeva uzorkovanih 1. (I), odnosno 7. (II) dana uzorkovanja. Shapiro-Wilkov test primijenjen je za određivanje distribucije podataka te je utvrđeno da rezultati niti jednog elementa (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn) nemaju normalnu distribuciju ( $p < 0,05$ ).

## 5. REZULTATI

Rezultati pokazuju da je kod većine elemenata primijenjena metoda dugotrajnog hlađenja i taloženja voska tijekom njegove prerade dala pozitivan učinak s obzirom na znatno smanjenje visokih koncentracija, posebice teških metala i toksičnih elemenata, prilikom odbacivanja četvrtog sedimentiranog sloja voska prije druge faze prerade. Rezultati provedenih analiza prikazani su u tablicama 12 – 14.

Tablica 12. Koncentracije As, Cd, Cr, Hg, Ni i Pb utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom prve faze njegove prerade.

Uzorkovanje	Razina uzorkovanja	Statistika	As * (µg/kg)	Cd * (µg/kg)	Cr * (µg/kg)	Hg * (µg/kg)	Ni * (µg/kg)	Pb * (µg/kg)
I	R1	Min	2,24	0,43	12,8	2,02	11,9	49,6
		Max	3,02	1,60	48,9	2,67	76,0	154,6
		SV	2,73	0,88	27,9	2,42	39,1	87,5
		SD	0,42	0,63	18,8	0,35	33,1	58,3
	R2	Min	2,62	1,47	43,5	2,34	44,1	192,2
		Max	4,09	3,52	71,5	5,67	66,7	313,1
		SV	3,21	2,35	55,1	3,49	54,2	232,7
		SD	0,78	1,05	14,7	1,89	11,6	69,7
	R3	Min	8,77	9,84	1136,4	3,54	135,9	856,2
		Max	10,3	10,5	2820,9	14,5	1348,6	987,4
		SV	9,42	10,1	1733,5	10,1	661,1	942,7
		SD	0,81	0,37	943,3	5,82	622,4	75,0
	R4	Min	92,8	90,6	156,3	95,3	1057,9	8845,1
		Max	202,9	310,4	259,4	148,0	2849,2	15297,6
		SV	134,9	192,2	197,7	115,2	1923,4	13386,3
		SD	59,5	110,9	54,5	28,6	897,2	3949,2

\*Statistički značajne razlike koncentracija pretraživanih elemenata između četiri razine voska (R1, R2, R3 i R4) tijekom prve faze prerade, a uzorkovanih nakon 1. dana (I), ( $p < 0,05$ ).

Detaljnije, tijekom prve faze prerade voska (I), u uzorcima otopljenog voska uzetim s površine spremnika vidljivo je da su se vrijednosti koncentracija As kretale od 2,24 do 3,02  $\mu\text{g/kg}$ , Hg 2,02 do 2,67  $\mu\text{g/kg}$ , Pb od 49,6 do 154  $\mu\text{g/kg}$ , Cd od 0,43 do 1,60  $\mu\text{g/kg}$ , Cr od 12,8 do 48,9  $\mu\text{g/kg}$ , Ni od 11,9 do 76,0  $\mu\text{g/kg}$ . U uzorcima voska koji su uzeti iz srednjeg sloja spremnika uslijedio je blagi porast utvrđenih vrijednosti pojedinih koncentracija, te su oni iznosili za As 2,62 do 4,09  $\mu\text{g/kg}$ , za Hg 2,34 do 5,67  $\mu\text{g/kg}$ , za Pb 192,2 do 313,1  $\mu\text{g/kg}$ , za Cd 1,47 do 3,52  $\mu\text{g/kg}$ , za Cr 43,5 do 71,5  $\mu\text{g/kg}$ , te za Ni 44,1 do 66,7  $\mu\text{g/kg}$ . Kod uzoraka uzetih s donje trećine visine spremnika uočen je porast utvrđenih vrijednosti, te su one iznosile kod As 8,77 do 10,3  $\mu\text{g/kg}$ , Hg 3,54 do 14,5  $\mu\text{g/kg}$ , Pb 856,2 do 987,4  $\mu\text{g/kg}$ , Cd 9,84 do 10,5  $\mu\text{g/kg}$ , Cr 1136,4 do 2820,9  $\mu\text{g/kg}$ , te za Ni 135,9 do 1348,6  $\mu\text{g/kg}$ . U uzorcima koji su uzeti iz sedimentiranog tamnog sloja voska koji se odbacuje iz daljnje prerade uočene su statistički značajno veće koncentracije navedenih teških metala ( $p < 0,05$ ), te su iznosile za As 92,8 do 202,9  $\mu\text{g/kg}$ , za Hg 95,3 do 148,0  $\mu\text{g/kg}$ , za Pb 8845,1 do 15297,6  $\mu\text{g/kg}$ , za Cd 90,6 do 310,4  $\mu\text{g/kg}$ , za Cr 156,3 do 259,4  $\mu\text{g/kg}$  i za Ni 1057,9 do 2849,2  $\mu\text{g/kg}$ .

Kod druge skupine pretraživanih elemenata, a tijekom prve faze prerade voska u uzorcima uzetima s površine otopljenog, homogeniziranog i steriliziranog voska, srednja vrijednost utvrđenih koncentracija bila je 69,1  $\mu\text{g/kg}$  za Mn, 1922  $\mu\text{g/kg}$  za Zn, 3,64  $\mu\text{g/kg}$  za Se, 0,70  $\mu\text{g/kg}$  za Co, 118,4  $\mu\text{g/kg}$  Cu, te 3995,7  $\mu\text{g/kg}$  za Fe. U uzorcima otopljenog voska uzetih iz srednjeg sloja spremnika primijećena je povećana srednja vrijednost koncentracija za Mn koja je iznosila 238,6  $\mu\text{g/kg}$ , za Zn 6666,5  $\mu\text{g/kg}$ , za Co 2,01  $\mu\text{g/kg}$ , za Cu 701,4  $\mu\text{g/kg}$ , za Fe 11596,1  $\mu\text{g/kg}$ . No utvrđeno je smanjenje srednje vrijednosti koncentracija za Se, koja je iznosila 3,58  $\mu\text{g/kg}$ . Kod uzoraka voska uzetih s donje razine spremnika srednja vrijednost utvrđenih koncentracija za Mn iznosila je 1039  $\mu\text{g/kg}$ , za Zn 31022,7  $\mu\text{g/kg}$ , za Se 5,18  $\mu\text{g/kg}$ , za Co 12,5  $\mu\text{g/kg}$ , za Cu 2154,5  $\mu\text{g/kg}$  te za Fe 46786,4  $\mu\text{g/kg}$ . U uzorcima istaloženog voska na dnu spremnika, odnosno s četvrte razine uzorkovanja vidljiv je statistički značajan porast srednjih vrijednosti utvrđenih koncentracija ( $p < 0,05$ ) koji je za Mn iznosio 15702,3  $\mu\text{g/kg}$ , za Zn 576766,5  $\mu\text{g/kg}$ , za Se 49,8  $\mu\text{g/kg}$ , za Co 179,5  $\mu\text{g/kg}$ , te za Cu 27575,9  $\mu\text{g/kg}$ .

U navedenoj fazi prerade voska jedino za utvrđene koncentracije Fe razlike koncentracija pretraživanih elemenata između četiri razine voska tijekom prve faze prerade (I), nije utvrđena statistički značajna razlika.

Tablica 13. Koncentracije Co, Cu, Fe, Mn, Se i Zn utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom prve faze njegove prerade.

Uzorkovanje	Razina uzorkovanja	Statistika	Co* (µg/kg)	Cu* (µg/kg)	Fe (µg/kg)	Mn* (µg/kg)	Se* (µg/kg)	Zn* (µg/kg)
I	R1	Min	0,40	71,5	2341,357	42,5	3,27	925,4
		Max	0,89	194,7	5650,0	106,0	4,08	3633,9
		SV	0,70	118,4	3995,7	69,1	3,64	1922,9
		SD	0,26	66,6	1654,3	32,9	0,41	1488,5
	R2	Min	1,29	602,6	16527,1	183,5	2,53	4676,4
		Max	3,29	866,8	9238,5	348,3	4,86	10393,4
		SV	2,01	701,4	11596,1	238,6	3,58	6666,5
		SD	1,11	144,2	4271,8	95,0	1,18	3230,1
	R3	Min	8,61	2099,7	43615,6	1011,5	4,56	29017,0
		Max	19,8	2260,9	50124,7	1092,7	6,27	33271,6
		SV	12,5	2154,5	46786,4	1039,2	5,18	31022,7
		SD	6,33	92,1	3257,8	46,3	0,95	2137,7
	R4	Min	124,3	18214,6	274621,0	12074,6	30,9	324889,4
		Max	273,1	40517,7	765992,1	5311,4	83,5	750177,4
		SV	179,5	27575,9	520306,6	15702,3	49,8	576766,5
		SD	81,5	11574,6	245685,6	12602,6	29,3	223237,9

\*Statistički značajne razlike koncentracija pretraživanih elemenata između četiri razine voska (R1, R2, R3 i R4) tijekom prve faze prerade, a uzorkovanih 1. dana (I), ( $p < 0,05$ ).

Tijekom prve faze prerade voska u uzorcima uzetim s prve razine uzorkovanja utvrđene su vrijednosti koncentracija koje su za iznosile Ag 0,001 do 0,68 µg/kg, za Ba 16,8 do 37,9 µg/kg, za Mo 0,35 do 1,79 µg/kg i za V 1,02 do 1,69 µg/kg. Utvrđene vrijednosti koncentracija pretraživanih elemenata u uzorcima uzetim iz srednjeg sloja spremnika bile su veće i iznosile su za Ag 0,001 do 0,32 µg/kg, za Ba 64,6 do 111,6 µg/kg, za Mo 1,47 do 2,21 µg/kg, te za V 2,20 do 4,81 µg/kg. Kod uzoraka voska uzetih s treće razine iz spremnika utvrđene koncentracije su iznosile za Ag 1,53 do 2,29 µg/kg, za Ba 299,2 do 344,3 µg/kg, za Mo 5,86 do 8,13 µg/kg, te za V 14,6 do 15,3 µg/kg. U uzorcima voska uzetih iz istaloženog tamnog sloja utvrđene su vrijednosti iznosile za Ag 14,8 do 62,8 µg/kg, za Ba 3985,4 do 9274,2 µg/kg, za Mo 47,0 do 148,0 µg/kg i za V 200,5 do 487,8 µg/kg.

Ukratko, statistička obrada razlika u koncentracijama elemenata primjenom Kruskal-Wallisova testa između četiri razine otopljenog voska R1, R2, R3 i R4 uzorkovanih nakon 1. dana (I) prerade pokazala je statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) za sve elemente (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn) uz iznimku Fe za koji je utvrđeno da nema statistički značajnih razlika ( $p > 0,05$ ).

Tablica 14. Koncentracije Ag, Ba, Mo i V utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom prve faze njegove prerade.

Uzorkovanje	Razina uzorkovanja	Statistika	Ag* ( $\mu\text{g/kg}$ )	Ba* ( $\mu\text{g/kg}$ )	Mo* ( $\mu\text{g/kg}$ )	V* ( $\mu\text{g/kg}$ )
I	R1	Min	0,001	16,8	0,35	1,02
		Max	0,68	37,9	1,79	1,69
		SV	0,23	25,4	0,87	1,32
		SD	0,39	11,1	0,80	0,34
	R2	Min	0,001	64,6	1,47	2,20
		Max	0,32	111,6	2,21	4,81
		SV	0,11	81,3	1,85	3,08
		SD	0,19	26,3	0,37	1,51
	R3	Min	1,53	299,2	5,86	14,6
		Max	2,29	344,3	8,13	15,3
		SV	1,88	322,4	7,19	14,9
		SD	0,38	22,6	1,19	0,37
	R4	Min	14,8	3985,4	47,0	200,5
		Max	62,8	9274,2	148,0	487,8
		SV	35,4	6039,4	96,9	353,6
		SD	24,7	2835,2	50,5	144,6

\*Statistički značajne razlike koncentracija pretraživanih elemenata između četiri razine voska (R1, R2, R3 i R4) tijekom prve faze prerade, a uzorkovanih 1. dana (I), ( $p < 0,05$ ).

Međusobnom usporedbom koncentracija elemenata utvrđene su razlike između četiri razine voska (R1, R2, R3, R4) uzorkovane nakon 7. dana (II) u drugoj fazi prerade. Kruskal-Wallisovim testom utvrđene su statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ) za elemente Ag, As, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, V i Zn. Iznimka su Cr i Se za koje nisu nađene statistički značajne razlike između koncentracija četiriju razina uzorkovanja voska. Rezultati su prikazani u tablicama 15 – 17, te na slikama 19 – 22.

Tablica 15. Koncentracije As, Cd, Cr, Hg, Ni i Pb utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom druge faze njegove prerade.

Uzorkovanje	Razina uzorkovanja	Statistika	As * ( $\mu\text{g/kg}$ )	Cd * ( $\mu\text{g/kg}$ )	Cr ( $\mu\text{g/kg}$ )	Hg * ( $\mu\text{g/kg}$ )	Ni * ( $\mu\text{g/kg}$ )	Pb * ( $\mu\text{g/kg}$ )
II	R1	Min	2,58	0,432	12,8	0,60	24,2	42,6
		Max	2,93	1,01	53,7	1,04	72,0	70,9
		SV	2,71	0,75	32,5	0,82	49,1	57,7
		SD	0,20	0,30	20,5	0,22	23,9	14,3
	R2	Min	2,71	1,20	71,5	1,02	44,1	221,5
		Max	7,57	2,30	791,4	1,27	134,1	803,3
		SV	5,35	1,93	430,2	1,18	89,8	426,5
		SD	2,45	0,63	359,9	0,14	45,0	326,8
	R3	Min	7,16	8,18	135,0	3,00	140,0	766,1
		Max	9,72	10,0	297,1	3,46	669,3	1123,3
		SV	8,59	9,11	190,7	3,16	330,9	934,2
		SD	1,31	0,92	92,2	0,26	293,9	179,5
	R4	Min	12,6	11,2	205,0	16,2	926,3	1064,3
		Max	23,9	26,1	452,7	20,2	1244,8	2437,2
		SV	18,8	20,0	310,0	18,8	1173,3	1858,4
		SD	5,78	7,82	128,1	2,25	220,1	711,3

\*Statistički značajne razlike koncentracija pretraživanih elemenata između četiri razine voska (R1, R2, R3 i R4) tijekom druge faze njegove prerade, a uzorkovanih 7. dana (II), ( $p < 0,05$ ).

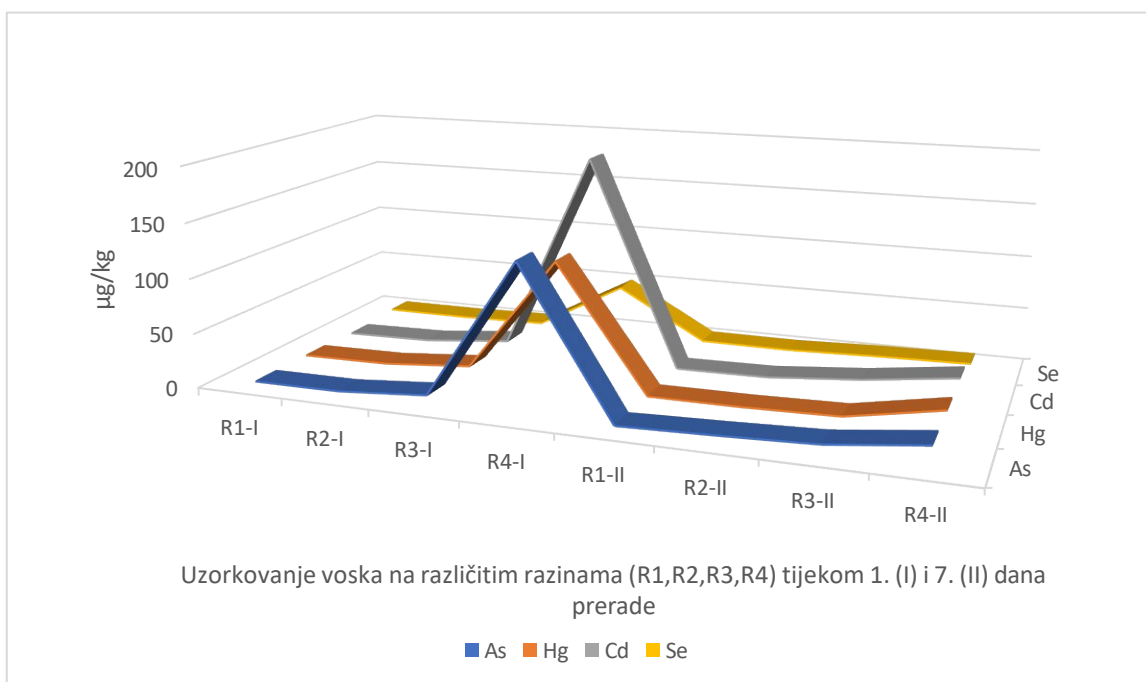
Tijekom druge faze prerade obrađenog voska, odnosno nakon 7. dana taloženja ponovno su uzeti uzorci voska s četiri razine spremnika. Prema utvrđenim koncentracijama elemenata



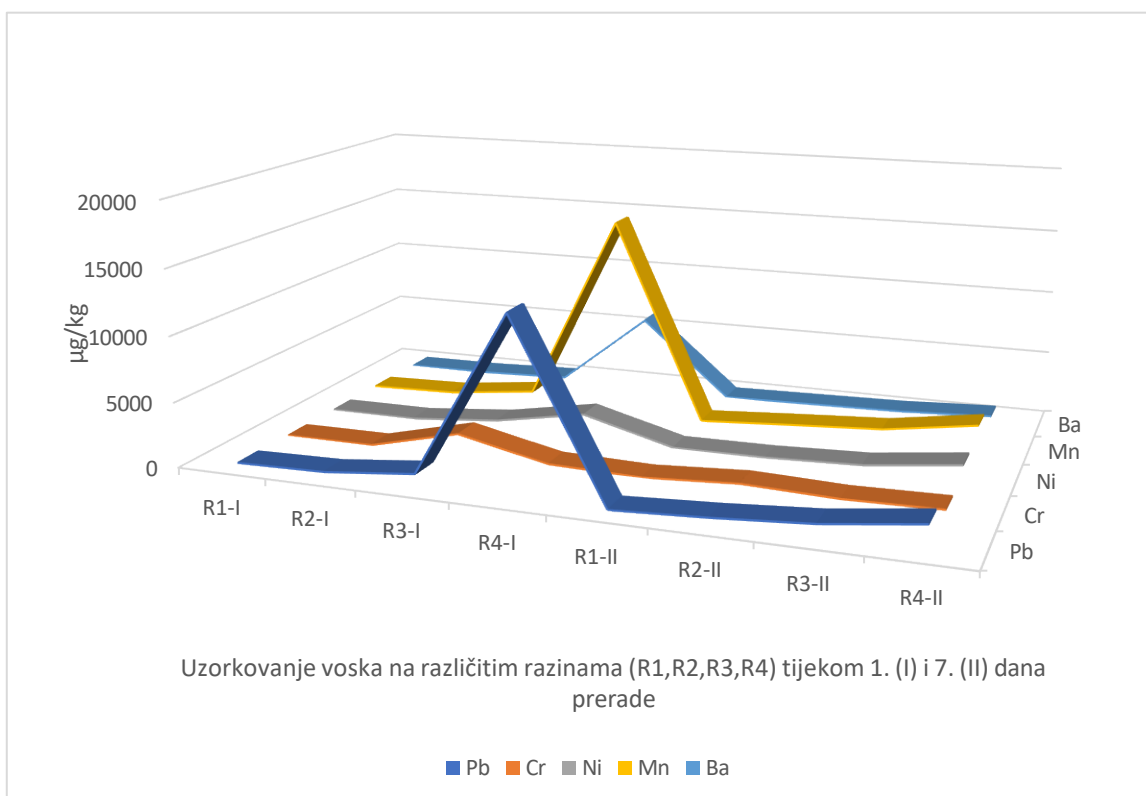
vidljiva je smanjena koncentracija svih elemenata u usporedbi s prvom fazom prerade. Za As vrijednosti koncentracija iznosile su 2,58 do 2,93 µg/kg, za Hg 0,60 do 1,04 µg/kg, za Pb 42,6 do 70,9 µg/kg, za Cd 0,432 do 1,01 µg/kg, za Cr 12,8 do 53,7 µg/kg, te za Ni 24,2 do 72,0 µg/kg. U uzorcima voska uzetih iz druge razine spremnika uslijedilo je blago povećanje koncentracije elemenata u odnosu na uzorke uzete s površine (R1) i one su iznosile za As 2,71 do 7,57 µg/kg, za Hg 1,02 do 1,27 µg/kg, za Pb 221,5 do 803,3 µg/kg, za Cd 1,20 do 2,30 µg/kg, za Cr 71,5 do 791,4 µg/kg i za Ni 44,1 do 134,1 µg/kg. U uzorcima uzetima iz treće razine spremnika uočeno je daljnje smanjivanje koncentracija pretraživanih elemenata, a u odnosu na prvu fazu prerade voska. Tako su za As utvrđene koncentracije varirale od 7,16 do 9,72 µg/kg, za Hg 3,00 do 3,46 µg/kg, za Cd 8,18 do 10,0 µg/kg, za Cr 135,0 do 297,1 µg/kg, te za Ni 140,0 do 669,3 µg/kg. No za Pb je uočeno povećanje utvrđenih vrijednosti, i to od 766,1 do 1123,3 µg/kg. U uzorcima voska uzetima iz četvrte razine spremnika vrijednosti koncentracije su se kretale za As 12,6 do 23,9 µg/kg, za Hg 16,2 do 20,2 µg/kg, za Cd 11,2 do 26,1 µg/kg, za Cr 205,0 do 452,7 µg/kg, te za Ni 926,3 do 1244,8 µg/kg. Za Pb zabilježeno je kretanje vrijednosti njegovih koncentracija od 1064,3 do 2437,2 µg/kg.

Tijekom druge faze u uzorcima uzetim s površine vidi se smanjenje srednje vrijednosti u odnosu na prvu fazu, i to kod Mn 55,2 µg/kg, Zn 1034,3 µg/kg, Co 0,60 µg/kg, Cu 87,1 µg/kg, dok je povećana srednja vrijednost kod Se 3,64 µg/kg, a kod Fe 4897,872 µg/kg. U uzorcima uzetima iz srednjeg sloja povećana je srednja vrijednost u odnosu na prvu fazu Mn 511,2 µg/kg, Zn 14340,8 µg/kg, Se 3,30 µg/kg, Co 2,89 µg/kg, Cu 1326,6 µg/kg, Fe 15639,755 µg/kg. U uzorcima koji su uzeti s dna smanjena je srednja vrijednost u odnosu na prvu fazu, i to kod Mn 924,5 µg/kg, Zn 26732,1 µg/kg, Co 7,73 µg/kg, Cu 2059,5 µg/kg, te povećana kod Se 5,95 µg/kg, i Fe 49218,129 µg/kg. Na zadnjoj razini smanjena je srednja vrijednost u odnosu na prvu fazu, i to kod Mn 2015,365 µg/kg, Zn 60299,3 µg/kg, Se 7,77 µg/kg, Co 14,8 µg/kg, Cu 4839,9 µg/kg, Fe 95582,166 µg/kg.

Također, u R1 koncentracije Ag kretale su se od 0,001 do 0,62 µg/kg, Ba 16,8 do 26,7 µg/kg, Mo 2,07 do 2,21 µg/kg i V 1,02 do 2,07 µg/kg. U uzorcima uzetima iz R2 raspon minimalnih i maksimalnih koncentracija iznosio je za Ag 0,04 do 1,19 µg/kg, za Ba 77,4 do 293,2 µg/kg, za Mo 4,70 do 6,19 µg/kg, te za V 2,21 do 7,41 µg/kg. Za R3 uzorke voska utvrđene su vrijednosti za Ag 0,49 do 1,27 µg/kg, za Ba 236,8 do 310,3 µg/kg, za Mo 6,74 do 12,8 µg/kg i za V 7,74 do 10,5 µg/kg. U istaloženom R4 sloju koncentracije Ag kretale su se od 1,37 do 4,51 µg/kg, za Ba 374,5 do 810,1 µg/kg, za Mo 7,01 do 15,4 µg/kg i V 12,3 do 28,6 µg/kg.



Slika 19. Usporedni prikaz kretanja utvrđenih koncentracija As, Hg, Cd i Se tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.



Slika 20. Usporedni prikaz utvrđenih koncentracija Pb, Cr, Ni, Mn i Ba tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.

Tablica 16. Koncentracije Co, Cu, Fe, Mn, Se i Zn utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom druge faze njegove prerade.

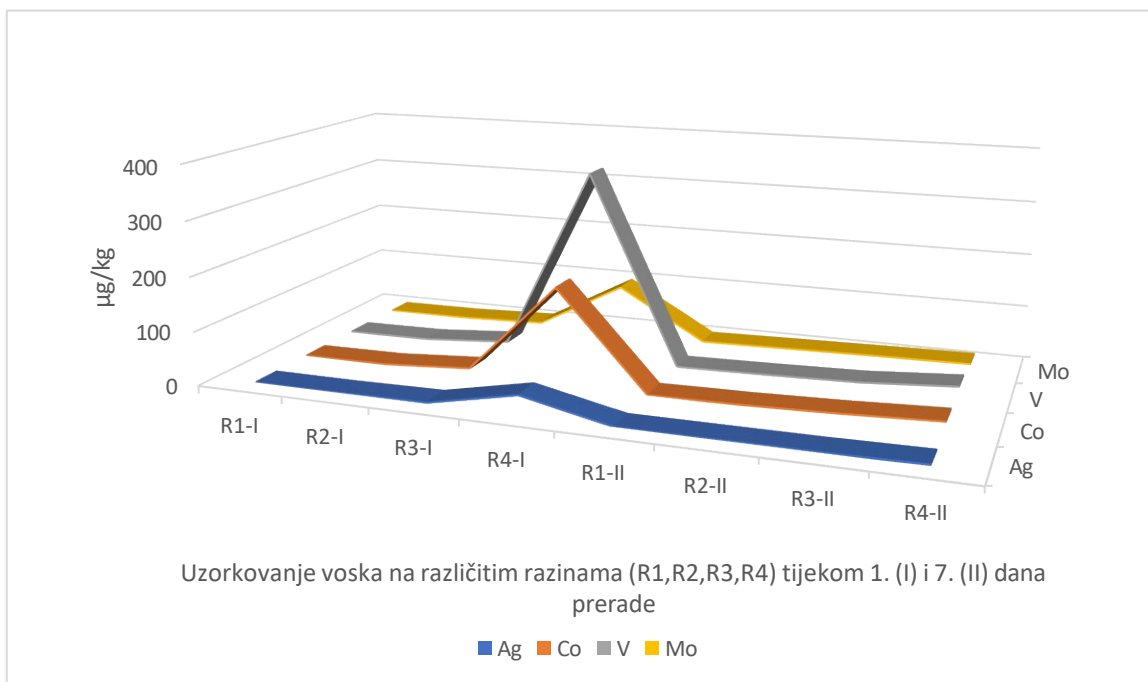
Uzorkovanje	Razina uzorkovanja	Statistika	Co* (µg/kg)	Cu* (µg/kg)	Fe* (µg/kg)	Mn* (µg/kg)	Se (µg/kg)	Zn* (µg/kg)
II	R1	Min	0,40	71,5	2485,4	42,5	2,41	854,3
		Max	0,74	112,8	9022,6	64,9	4,43	1323,2
		SV	0,60	87,1	4897,9	55,2	3,64	1034,3
		SD	0,18	22,4	3589,2	11,5	1,08	252,7
	R2	Min	1,45	991,2	9238,5	250,1	1,90	5823,2
		Max	3,81	1869,6	19584,5	1011,6	4,95	30561,8
		SV	2,89	1326,6	15639,8	511,2	3,30	14340,8
		SD	1,26	474,6	5593,3	433,4	1,54	14053,7
	R3	Min	5,85	1933,1	38745,8	802,3	4,11	23404,7
		Max	10,3	2188,2	62651,9	1011,9	7,10	28585,1
		SV	7,73	2059,5	49218,1	924,5	5,95	26732,1
		SD	2,33	127,5	12225,1	109,0	1,61	2887,8
	R4	Min	8,61	2470,6	56382,4	1166,6	6,32	33652,7
		Max	19,9	6957,6	124233,2	2603,4	9,78	79882,7
		SV	14,8	4839,9	95582,2	2015,4	7,77	60299,3
		SD	5,70	2254,0	35133,9	753,0	1,79	23910,7

\*Statistički značajne razlike koncentracija pretraživanih elemenata između četiri razine voska (R1, R2, R3 i R4) tijekom druge faze njegove prerade, a uzorkovanih 7. dana (II), ( $p < 0,05$ ).

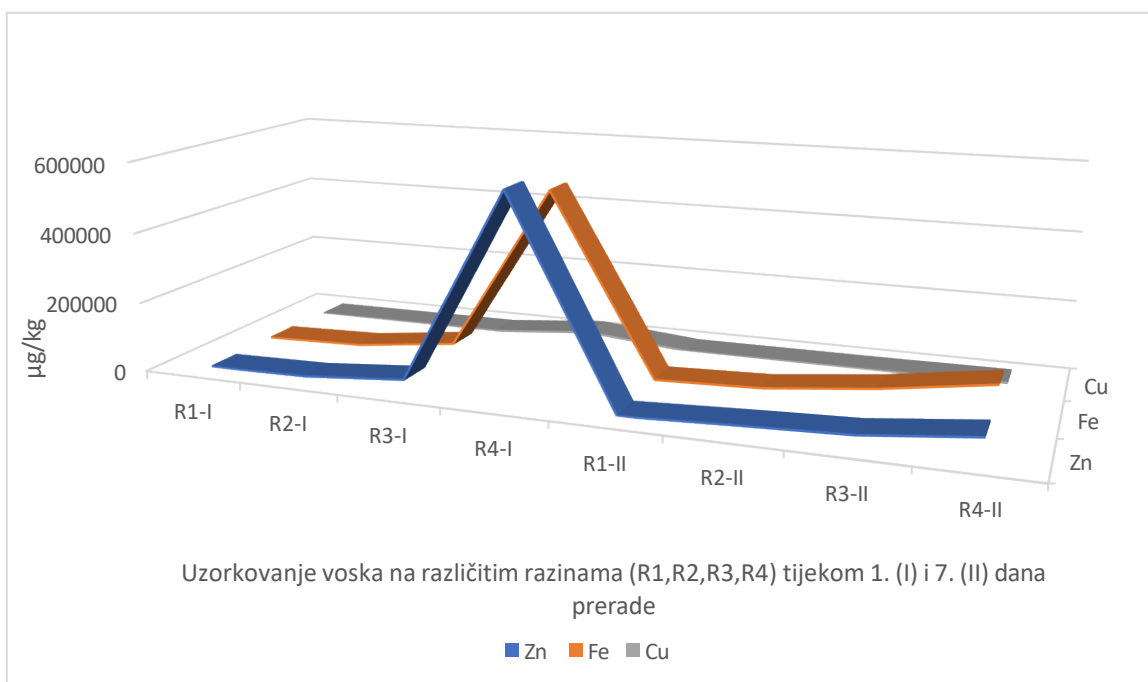
Tablica 17. Koncentracije Ag, Ba, Mo i V utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom druge faze njegove prerade.

Uzorkovanje	Razina uzorkovanja	Statistika	Ag* (µg/kg)	Ba* (µg/kg)	Mo* (µg/kg)	V* (µg/kg)
II	R1	Min	0,001	16,8	2,07	1,02
		Max	0,62	26,7	2,21	2,07
		SV	0,21	21,4	2,12	1,63
		SD	0,36	5,00	0,08	0,55
	R2	Min	0,04	77,4	4,70	2,21
		Max	1,19	293,2	6,19	7,41
		SV	0,60	150,7	5,31	4,76
		SD	0,58	123,4	0,78	2,60
	R3	Min	0,49	236,8	6,74	7,74
		Max	1,27	310,3	12,8	10,5
		SV	0,81	281,3	8,84	9,47
		SD	0,41	39,1	3,44	1,51
	R4	Min	1,37	374,5	7,01	12,3
		Max	4,51	810,1	15,4	28,6
		SV	3,20	627,3	11,5	21,3
		SD	1,64	226,1	4,22	8,30

\*Statistički značajne razlike koncentracija pretraživanih elemenata između četiri razine voska (R1, R2, R3 i R4) tijekom druge faze njegove prerade, a uzorkovanih 7. dana (II), ( $p < 0,05$ ).



Slika 21. Usporedni prikaz utvrđenih koncentracija Ag, Co, V i Mo tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.



Slika 22. Usporedni prikaz utvrđenih koncentracija Zn, Fe i Cu tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.

Također, utvrđene su statistički značajne razlike između koncentracija pretraživanih elemenata za iste slojeve voska uzorkovane 1. dana (I) i 7. dana (II) za: Hg i Mo za R1; Hg, Cu i Mo za R2; Ag, Cr, Hg, Zn i V za R3; Ag, As, Ba, Cd, Co, Cu, Hg, Mo, Mn, Pb, Se Zn i V za R4. Jedino u slučaju Fe i Ni nisu utvrđene značajne razlike između istih slojeva uzorkovanih u ta dva navrata uzorkovanja. Analiza rezultata prikazana je u tablici 18.

Tablica 18. Statistički značajne razlike između koncentracija elemenata za iste slojeve uzorkovane 1. dana (I) i 7. dana (II).

Slojevi voska	Ag	As	Ba	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Hg	Mo	Mn	Ni	Pb	Se	Zn	V
R1 I : R1 II									+	+						
R2 I : R2 II							+		+	+						
R3 I : R3 II	+					+			+						+	+
R4 I : R4 II	+	+	+	+	+		+		+	+	+		+	+	+	+

+ označuje da je utvrđena statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između pojedinih slojeva voska.

## 6. RASPRAVA

Vosak je pčelinji proizvod koji nije hrana te se s ekotoksikološkog gledišta rijetko pretražuje (HASSONA i ABD EL-WAHED, 2023.). No pčelinji se vosak učestalo upotrebljava u prehrambenoj, kozmetičkoj, kemijskoj i farmaceutskoj industriji (AL-WAILI, 2005; SVEČNJAK i sur., 2019.; CHAIREH i sur., 2020.). Najviše se upotrebljava u okviru dobrih pčelarskih praksi i biosigurnosnih mjera jer uspješnost pčelarenja, kao i proizvodnost pčelinjih zajednica, uvelike ovisi o učinkovitoj zamjeni starog saća i njegovoj preradi u nove satne osnove (SMITH i sur., 2017.). S obzirom na to da se saće u košnici drži i po nekoliko uzastopnih godina te da je građeno od izrazito liposolubilnog materijala (FRATINI i sur., 2016.), može služiti kao bioindikator za prikupljanje podataka o stupnju onečišćenja okoliša opasnim onečišćivačima (TLAK GAJGER i sur., 2019.; KAST i sur., 2022.). Primjerice, teški metali i drugi toksični elementi mogu se u saćama nakupljati tijekom duljih razdoblja te pritom izazivati neželjene posljedice za konzumente pčelinjih proizvoda ili, češće, pčelinju zajednicu (BOSANČIĆ i sur., 2020.; NGAT i sur., 2020.; ĆIRIĆ i sur., 2021.). Nakupljanjem pojedinih teških metala u biljkama, preko peluda i nektara, kukci oprašivači postaju izloženi štetnosti zagađenja iz okoliša (TOMCZYK i sur., 2023.).

Naime, opisani su negativni učinci teških metala na razvoj i njegu pčelinjeg legla, učenje i pamćenje, dugoživost odraslih pčela, ukupnu proizvodnost zajednice kao i na ponašajne obrasce pri uzimanju hrane (HESKETH i sur., 2016.; BURDEN i sur., 2019.; MONCHANIN i sur., 2021.). Metalni ioni mogu u pčela izmijeniti funkcije perifernih receptora uključenih u obrasce ponašanja vođene okusima, posebice smanjenjem osjetljivosti okusnih neurona za šećere (KOUL, 2008.). Uvijek su aktualna istraživanja o razumijevanju ekotoksikoloških rizika, odnosno sposobnosti životinja pri izbjegavanju uzimanja hrane koja sadržava štetne tvari. Za medonosne je pčele utvrđena mogućnost izbjegavanja uzimanja hrane onečišćene velikim koncentracijama Pb i Zn u pokusnim uvjetima, no pčele ipak ne prepoznaju njihovu otrovnost u realističnim dozama u polju (MONCHANIN i sur., 2022.), dok As, Se i Cd uopće ne izbjegavaju (HLADUN i sur., 2012.; XUN i sur., 2018.; BURDEN i sur., 2019.). Uzimanje hrane koja sadržava metale u tragovima, mikronutrijente, potrebno je jer su nužni za obavljanje niza fizioloških funkcija (HERBERT i SHIMANUKI, 1978.). Objavljeni rezultati pokazuju da pčele ne razlikuju esencijalne mikronutrijente poput Zn od jako toksičnih elemenata poput Pb ili As, odnosno ne reagiraju promijenjenim ponašanjem na koncentracije koje odgovaraju relevantnim poljskim dozama (CHICAS-MOSIER i sur., 2017.).

Onečišćenje metalima drugih pčelinjih proizvoda, poput meda i peludi, pa i odraslih pčela, detaljnije su istraživana i dobro dokumentirana (CONTI i BOTRE. 2001., FORMICKI i sur., 2013.; BILANDŽIĆ i sur., 2014.a; BILANDŽIĆ i sur., 2017.; ĆIRIĆ i sur., 2021.). No pčele u saće pohranjuju med i pelud, te metali iz saća, slično kao i pesticidi, mogu nepovoljno djelovati na razvoj pčelinjeg legla, vitalnost pčela nakon izlaska iz stanica saća, na proizvodnost zajednice i dugoživost odraslih pčela (WU i sur., 2011.; COLLINS i PETTIS, 2013.; BONMATIN i sur., 2015.). Zato posljednjih godina zabrinjava činjenica da tako vrijedan i važan repromaterijal, nužno korišten u pčelarstvu, nizu ljudskih djelatnosti te apiterapiji, nije redovito pretraživan na prisutnost ksenobiotika. Posebice važan tehnološki dio za pretraživanje sigurnosti, kvalitete i prisutnosti rezidua različitih onečišćivača iz okoliša čini prerada saća u satne osnove.

Iako je poznato da se tijekom prerade vosak pročisti, posebice su metali otporni na visoke temperature pri preradi i mogu se nakupljati godinama jer je stalna pčelarska praksa reciklirati saće u satne osnove koje se ponovno koriste u pčelarskoj proizvodnji. Također, REDDY i suradnici (2012.) utvrdili su da je izgrađeno pčelinje saće vrijedna biomasa za okoliš i predložili primjenu saća kao atraktivnu mogućnost za uklanjanje teških metala i drugih toksičnih elemenata iz pitke vode, kao i otpadnih voda. No zasad se vosak ne pretražuje rutinski na prisutnost i kvantifikaciju kemijskih elemenata.

Ciljevi ovoga istraživanja zasnovani su na ranije objavljenim preliminarnim rezultatima o mogućoj primjeni tehnologije lijevanja voska s produljenom fazom hlađenja i taloženja kao potvrđenoj mogućnosti uklanjanja znatne količine teških metala i drugih toksičnih elemenata iz sirovine voska tijekom prerade saća u satne osnove (TLAK GAJGER i sur., 2014.; TLAK GAJGER i sur., 2016.a; TLAK GAJGER i sur., 2016.b). Također, zbog nedostatka podataka o sadržaju različitih elemenata u pčelinjem vosku, kao i o utjecaju njihova sadržaja na kvalitetu saća (BOMMURAJ i sur., 2019.; TLAK GAJGER i sur., 2019.; ULLAH i sur., 2022.), provedeno je istraživanje o prisutnosti i kretanju koncentracija niza esencijalnih i toksičnih elemenata (Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, V i Zn) u uzorcima voska tijekom inovativne tehnike prerade saća u satnu osnovu u dvije uzastopne faze, primjenom tehnike ICP-MS.

U ovom su istraživanju utvrđene statistički značajne razlike u koncentracijama svih pretraživanih elemenata između četiri razine voska u spremniku (R1, R2, R3 i R4) tijekom prve faze prerade, a uzorkovanih 24 sata nakon otapanja od pčelara prikupljenih blokova voska ( $p < 0,05$ ). Iznimka je Fe kod kojega su razlike uočene, no nisu statistički značajne. Pritom su



najmanje koncentracije svih pretraživanih elementa utvrđene u slojevima otopljenog voska R1 i R2, što je bio očekivani rezultat, posebice važan s obzirom na to da taj vosak ide u daljnju preradu do završnog proizvoda, odnosno satne osnove. Najveće su koncentracije svih ispitivanih elemenata u prvoj fazi prerade voska u satne osnove bile utvrđene u uzorcima otopljenog voska uzetima iz razine sedimentiranog sloja R4 koji se nakon taloženja uobičajeno odbacuje iz daljnje prerade.

Iznimka su bile visoke koncentracije Cr utvrđene u trećoj razini voska taloženog u spremniku, no tijekom daljnjeg taloženja u drugoj fazi prerade takva razlika više nije bila vidljiva. Inače, Cr se svrstava u štetne metale i najčešće onečišćivače okoliša, ali i u esencijalne elemente u tragovima. Sadržaj Cr u uzorcima saća ili voska varira ovisno o geografskim i klimatskim prilikama na različitim mjestima i namjenama uzorkovanja, kao i o primjenjivanim pčelarskim praksama. Svakako su vidljive razlike u sadržaju Cr (a i drugih elemenata), ovisno o učestalosti zamjene saća za nove satne osnove, načinima prerade te uvjetima i trajanju skladištenja izgrađenih saća, blokova voska ili satnih osnova.

Tako su u rijetkim ranije objavljenim radovima podaci o utvrđenim koncentracijama pojedinih kemijskih elemenata u vosku varijabilni i izražavani u različitim mjernim jedinicama (HASSONA i ABD EL-WAHED, 2023.). Primjerice, koncentracije Cr utvrđene u uzorcima saća (voska) iznosile su 432  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (BOMMURAJ i sur., 2019.); 82 – 982  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ZAFEIRAKI i sur., 2022.); 247,600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ĆIRIĆ i sur., 2021.); 2,016, 2,300 i 3,920  $\text{mg}/\text{kg}$  (ALJEDANI, 2020.); te 41,030 – 56, 280 ppm (TLAK GAJGER i sur., 2019.). U ovom je istraživanju najveća utvrđena koncentracija Cr izmjerena u sloju voska R3 (1733,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) u prvoj fazi prerade, te je u odnosu na vrijednosti izmjerene u ostalim razinama svijetlog voska (R1 – R2) iznosila i do dvadesetak puta više. U drugom dijelu postupka prerade voska srednje vrijednosti koncentracija Cr za slojeve R1, R2 i R3, koji su bili osnova za lijevanje satne osnove, utvrđena je konačna koncentracija 217,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , što je za 64,02 % manje u usporedbi s koncentracijom utvrđenom nakon završetka prve faze prerade (605,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Statistički značajna razlika između prve i druge faze prerade utvrđena je za uzorke voska iz sloja R3 ( $p < 0,05$ ).

Koncentracije većine pretraživanih elemenata smanjivale su se sljedećim redoslijedom  $R4 > R3 > R2 > R1$ . Utvrđene koncentracije Hg bile su oko sedam puta manje u uzorcima voska uzetima iz slojeva R1 do R3 u usporedbi s koncentracijama u sedimentiranom vosku iz sloja R4. Vrijednosti koncentracija Pb u sloju voska R4, koji se nakon prve faze prerade voska odbacuje, bile su do sto pedeset puta veće nego u svijetlim slojevima voska sloja R1, a koncentracije su mu se povećavale slijedom  $R1 < R2 < R3 < R4$ . Koncentracije Cd povećavale

su se istim redoslijedom, a utvrđene su vrijednosti u svjetlijim slojevima voska bile niže ili slične prethodno objavljenim rezultatima (FORMICKI i sur., 2013., TLAK GAJGER i sur., 2016.a). Sadržaj As, Hg, Cd i Pb u slojevima voska koji se prenose u drugu fazu na daljnju preradu kretao se unutar maksimalno dopuštenih razina u skladu s propisima za prehrambene dodatke i aditive (EUROPEAN COMMISSION, 2002.; FAOLEX, 2006.; EFSA, 2007., COMMISSION REGULATION, 2014.). Sadržaj As u slojevima voska koji se koriste za izradu osnova nije se značajno razlikovao 1. i 7. dana nakon početka prerade, no utvrđena je statistički značajna razlika u odbačenom vosku ( $p < 0,05$ ) nakon prvog (134,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) i drugog uzorkovanja (18,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Nakon prve faze prerade koncentracija As u odbačenom je sloju R4 bila za 88,61 % veća u usporedbi s voskom koji je dalje prerađivan.

Srednje vrijednosti koncentracija Hg utvrđene u uzorcima svjetlijih slojeva voska (R1 – R3) bile su za 67,72 % manje nakon 7. dana taloženja, a u usporedbi s koncentracijama utvrđenima nakon prvog uzorkovanja. To je jedini pretraživani element za koji su utvrđena statistički značajna smanjenja koncentracija u svakom pojedinačnom sloju voska ( $p < 0,05$ ) ako uspoređujemo prvu i drugu fazu prerade. Zanimljiv je podatak da je 83,94 % ovog teškog metala izlučeno iz proizvodnje nakon prve faze prerade.

Koncentracije Cd u vosku za izradu satne osnove bile su slične nakon oba uzorkovanja, no duljim taloženjem u drugim dijelima prerade izbačeno je dodatnih 18,04 % u usporedbi s koncentracijama utvrđenima u R4 nakon prvog uzorkovanja (192,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). U okviru monitoringa onečišćenja okoliša objavljeni su rezultati uglavnom manjih koncentracija za vosak kako slijedi: 29 – 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ZAFEIRAKI i sur., 2022.); 470-9870  $\mu\text{g}/\text{g}$  (FORMICKI i sur., 2013.); 0,059-0,075  $\text{mg}/\text{g}$  (ALJEDANI, 2020.). Prema rezultatima HASSONA i ABD EL-WAHED (2023.) saće tijekom godina upotrebe u košnici kontinuirano kumulira Cd: nakon jedne godine 0,024 ppm; nakon dvije godine 0,040 ppm; nakon treće godine 0,043 ppm; nakon četvrte godine 0,048 ppm, te nakon pete godine 0,054 ppm.

U ovom se istraživanju koncentracije Pb u uzorcima voska iz slojeva namijenjenima izradi satne osnove nisu značajno razlikovale nakon 1. i 7. dana. No utvrđena je statistički značajna razlika između koncentracija Pb u sedimentiranim slojevima R4 prve i druge faze prerade voska ( $p < 0,05$ ). Pritom je 86,11 % Pb odbačeno iz daljnje proizvodnje nakon prvog dijela postupka prerade voska. Zanimljivo je da su rezultati istraživanja TLAK GAJGER i suradnika (2016.a) pokazali visoke koncentracije Pb i u satnim osnovama iako su mu u prethodnim koracima prerade izlučene znatne količine. No o ovakvim je rezultatima teško raspravljati zbog nedostatka detaljnih podataka o pčelarskim praksama koje obuhvaćaju

rukovanje i načine skladištenja blokova voska prije njegove dostave u radionicu za preradu. Rezultati provedenih istraživanja o koncentracijama Pb i Cd u nizu pčelinjih proizvoda dobiveni u okviru praćenja zdravlja okoliša uglavnom pokazuju manje vrijednosti koje pozitivno koreliraju sa stupnjem onečišćenja okoliša na mikrolokacijama iz kojih potječu pretraživani uzorci različitih materijala iz košnice (BOGDANOV, 2006.; FORMICKI i sur., 2013.; BOMURAJ i sur., 2019.; TLAK GAJGER i sur., 2019., ALJEDANI i sur., 2020.; ĆIRIĆ i sur., 2021.; HASSONA i ABD EL-WAHED, 2023.). Olovo se smatra jednim od najštetnijih toksina iz okoliša, a otrovanje njime u sisavaca uzrokuje niz organskih poremećaja (BOSKABADY i sur., 2018.).

Najveća je koncentracija Ni izmjerena u uzorcima voska iz razine R4, a vrijednost joj je bila oko pedeset puta veća u usporedbi s izmjerenom vrijednošću u uzorcima voska iz sloja R1. Slojevi voska korišteni za izradu satnih osnova sadržavali su za 64,02 % manje Ni od sloja R4 koji je odbačen iz daljnje prerade. Nije utvrđena statistički značajna razlika u izmjerenim koncentracijama Ni između pojedinih slojeva istaloženog voska (R4) u spremnicima nakon 1. kao ni nakon 7. dana. Takvi su rezultati u suglasju s rezultatima koncentracija teških metala u saću različite starosti, gdje koncentracije Ni utvrđene u sedimentiranom R4 sloju voska odgovaraju koncentracijama utvrđenima u saću korištenom četiri do pet godina (HASSONA i ABD EL-WAHED, 2023.). U dosad objavljenim publikacijama vezanima za praćenje onečišćenja okoliša koncentracije Ni u uzorcima pčelinjeg voska kretale su se od 194 do 1019  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ZAFEIRAKI i sur., 2022.); 15 – 313  $\mu\text{g}/\text{g}$  (FORMICKI i sur., 2013.); 0,474 – 0,678  $\mu\text{g}/\text{g}$  (ALJEDANI, 2020.); 0,251  $\mu\text{g}/\text{g}$  (ULLAH i sur., 2022.) te 12,170 – 17,830 ppm (TLAK GAJGER i sur., 2019.).

Za metale Co, Cu, Mn, Fe, Se i Zn koncentracije su se smanjivale redoslijedom  $R4 > R3 > R2 > R1$ . Pritom su srednje vrijednosti koncentracija metala u sloju voska R4 bile veće u odnosu na koncentracije određene u slojevima R1: za Co oko 250 puta, za Cu oko 230 puta, za Mn oko 230 puta, za Fe 130 puta, za Se 14 puta, te Zn oko 300 puta. Koncentracije Fe, Zn i Cu bile su u odnosu na druge pretraživane elemente vrlo visoke, no ako ih promatramo kao esencijalne elemente nužne za proizvodnju proteina i kolagena, vezivnog tkiva, kao i njihova međusobnog iskorištavanja, posebice su važni u saću plodišta pčelinje zajednice. Naime, u saću se razvija pčelinje leglo koje za razvoj, rast i niz presvlačenja ovojnica kože (egzoskeleta) tijekom metamorfoze u odraslu pčelu zasigurno zahtijeva povećane koncentracije navedenih elemenata. Poznate su posljedice njihova nedostatka na zaostali rast i razvoj, poremećaje enzimskih sustava, a posebice Zn na osjetljivost prema kožnim infekcijama (PRASAD 2020.,

HASSONA i ABD EL-WAHED, 2023.; LU i sur., 2023.). No utvrđene koncentracije Fe u prvoj fazi prerade saća u satne osnove nisu se statistički razlikovale između pojedinih slojeva voska uzorkovanih iz spremnika, kao što se nisu razlikovale niti uspoređujući koncentracije između pojedinih slojeva voska prve i druge faze prerade. Ipak, velike količine otopljenog homogeniziranog voska u spremniku pokazale su veće koncentracije većine pretraživanih elemenata, a posebice esencijalnih, u usporedbi s objavljenim rezultatima ispitanih uzoraka saća u okviru geografskih istraživanja i istraživanja okoliša (FORMICKI i sur., 2013.; TLAK GAJGER i sur., 2019.; ALJEDANI i sur., 2020.; ULLAH i sur., 2022.; HASSONA i ABD EL-WAHED, 2023.).

Mangan, Se i Co su esencijalni elementi u tragovima i mikronutrijenti nužni za odvijanje niza metaboličkih funkcija, no potencijalno toksični u većim količinama (LEYSENS i sur., 2017.). S obzirom na to da su potrebni za metabolizam energije, posebice glukoze i lipida, važni su za koordinirani rad pčelinje zajednice. U ovom su se istraživanju koncentracije navedenih ispitivanih elemenata također smanjivale redoslijedom:  $R4 > R3 > R2 > R1$ . Pritom se srednje vrijednosti svjetlijih slojeva voska ( $R1 - R3$ ) nisu statistički značajno razlikovale od vrijednosti u istim slojevima druge faze prerade voska. No u usporedbi sa svjetlijim slojevima nakon 1. dana sedimentacije voska u spremniku utvrđene su za 97,14 % (Mn), 91,70 % (Se) i 97,1 % (Co) veće koncentracije elementa u sloju R4 koji je izbačen iz daljnje prerade. Nakon 7. dana sedimentacije, u usporedbi s prvom fazom prerade u R4, iz prerade je izlučeno dodatnih 12,84 % (Mn), 15,621% (Se) i 8,25% (Co).

Za skupinu elementa Ag, Ba, Mo i V, prema našim saznanjima, zasad nema publiciranih dostupnih podataka. Za sve je navedene elemente utvrđena statistički značajna razlika u koncentracijama pretraživanih elemenata između četiri razine voska tijekom prve i druge faze prerade saća u satnu osnovu ( $p < 0,05$ ). Pritom je u sloju voska R4 u usporedbi sa svjetlijim slojevima voska ( $R1 - R3$ ) nakon 24 sata sedimentacije utvrđena za 93,72 % (Ag), za 92,89 % (Ba), za 89,77 % (Mo) i za 94,54% (V) veća koncentracija pojedinih elemenata. Statistički značajna razlika između koncentracija elemenata za iste slojeve voska uzorkovanog 1. i 7. dana utvrđena je kod Ag za slojeve R3 i R4, Ba za sloj R4, Mo za slojeve R1, R2 i R4 te V za slojeve R3 i R4.

Primjenom dobrih pčelarskih, veterinarskih i okolišnih praksi vezanih za zamjenu saća i preradu sirovog pčelinjeg voska pridonosi se učinkovitoj i uspješnoj pčelarskoj proizvodnji.

## 7. ZAKLJUČCI

1. Pčelinji vosak važan je bioindikator stupnja onečišćenja okoliša teškim metalima i/ili metaloidima.
2. Zamjena tamnog saća i prerada sirovog voska u satne osnove nužna je pčelarska praksa koja znatno pridonosi uspješnom pčelarenju.
3. Prva faza prerade voska, koja uključuje sve korake – od otapanja blokova voska, homogenizaciju, sterilizaciju i taloženje tijekom 24 sata, do izrade satnih osnova – zadovoljavajuće pročišćuje vosak.
4. Tijekom prve faze prerade voska koncentracija pretraživanih elemenata u slojevima voska koji služe za izradu satne osnove u usporedbi sa slojem koji je odbačen iz daljnje prerade smanjena za: Cr 64,02 %; As 88,61 %; Hg 83,94 %; Cd 81,6 %; Pb 86,11 %; Mn 97,14 %; Se 91,70 %; Ni 64,02 %; Co 97,1 %, Ag 93,72 %; Ba 92,89 %; Mo 89,77 % i V 94,54 %.
5. Pretraživanje saća i/ili sirovog voska primjenom tehnike ICP-MS na prisutnost i kvantifikaciju teških metala i metaloida može biti jedan od pokazatelja onečišćenja okoliša te pomoći pčelarima pri izboru primjerene lokacije za smještaj ili preseljenje pčelinjaka.

## 8. LITERATURA

1. ACKERMAN, J. D. (2000): Abiotic pollen and pollination: Ecological, functional and evolutionary perspectives. *Plant Syst. Evol.* 222, 167-185. doi: 10.1007/BF00984101
2. AGGETT, P. J. (2012): Iron. U: Present Knowledge in Nutrition (Erdman, J. W., I. A. Macdonald, S. H. Zeisel, ur.). 10<sup>th</sup> edition. Wiley-Blackwell. Washington, USA, 506-520. doi: 10.1002/978111994604
3. AICHHOLZ, R., E. LORBEER (2000): Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry: II: High-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 883, 1–2, 75–88. doi: 10.1016/S0021-9673(00)00386-19
4. AICHHOLZ, R., E. LORBEER (1999): Investigation of combwax of honeybees with high-temperature gas chromatography and high-temperature gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. I. High-temperature gas chromatography. *J. Chromatogr. A.* 855, 2, 601-615. doi: 10.1016/S0021-9673(99)00725-6
5. AL WAILI, N. S. (2003): Topical application of natural honey, beeswax and olive oil mixture for atopic dermatitis or psoriasis: partially controlled, single-blinded study. *Complement. Ther Med.* 11, 4, 226-234. doi:10.1016/s0965-2299(03)00120-1
6. ALCÓN, M. P., L. AROLA, A. MAS (1991): Response to acute nickel toxicity in rats as a function of sex. *Biol. Met.* 4, 3, 136–140. doi: 10.1007/BF01141303
7. AL-WAILI, N. S. (2005): Clinical and mycological benefits of topical application of honey , olive oil and beeswax in diaper dermatitis. *Clin Microbiol Infect.* 11, 2, 160-163. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01013.x
8. AL-WAILI, N. S., K. S. SALOOM, T. N. AL WAILI, A. N. AL WAILI (2006): The safety and efficacy of a mixture of honey, olive oil and beeswax for the management of haemorrhoids and anal fissure: a pilot study. *Sci. World J.* 2, 6, 1998-2005. doi: 10.1100/tsw.2006.333

9. ALJEDANI, D. M. (2020): Revealing some elements and heavy metal sin honeybee and beeswax samples collected from different environments. *Entomol Appl Sci Lett.* 7, 4, 89-101.
10. AMADOR, G. J., M. MATHERNE, D. WALLER, M. MATHEWS, S. N. GORB, D. L. HU (2017): Honey bee hairs and pollen kit are essential for pollen capture and removal. *Bioinspir. Biomim.* 12, 2, 026015. doi: 10.1088/1748-3190/aa5c6e
11. AMDAM, G. V., FENNERN, E., HAVUKAINEN, H. (2012): Vitellogenin in Honey Bee Behaviour and Lifespan. U: *Honeybee Neurobiology and Behaviour* (Galizia, C., D. Eisenhardt, M. Giurfa, ur.). Springer, Dordrecht. doi:10.1007/978-94-007-2099-2\_2
12. ANDERSON, K. E., V. A. RICIGLIANO, B. M. MOTT, D. C. COPELAND, A. S. FLOYD., P. MAES (2018): The queen's gut refines with age: longevity phenotypes in a social insect model. *Microbiome* 6, 1, 108. doi: 10.1186/s40168-018-0489-1
13. ARTEAU, J., E. BOUCHER, A. POIRIER, D. WIDORY (2020): Historical smelting activities in Eastern Canada revealed by Pb concentrations and isotope ratios in tree rings of long-lived white cedars (*Thuja occidentalis L.*). *Sci. Total Environ.* 740, 19, 139992. doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139992
14. ATSDR (2022): ATSDR <https://www.atsdr.cdc.gov/>
15. AUSTIN, B. (1999): The effects of pollution on fish health. *J. App. Microbiol.* 85, 234-242. doi: 10.1111/j.1365-2672.1998.tb05303.x
16. BALLANTYNE, G., P. WILMER (2012): Nectar theft and floral anti – repellence: A Link between Nectar Volume and Anti – Repellent Traits. *PLoS ONE.* 7, 8: e43869. doi: 10.1371/journal.pone.0043869
17. BANDARA, P. C, J. PEÑA- BAHAMONDE, D. F. RODRIGUES (2020): Redox mechanisms of conversion of Cr (VI) to Cr (III) by graphene oxide-polymer composite. *Sci. Rep.* 10, 9237. doi: 10.1038/s41598-020-65534-8
18. BENSON, G. G., S. R. HEMINGWAY, F. N. LEACH (1978): Composition of the wrappings of an ancient Egyptian mummy. *The world history of beekeeping. J. Pharm. Pharmacol.* 30, 1-78. doi: 10.1111/j.2042-7158.1978.tb10785.x

19. BERNAVIDES, M. P., S. M. GALLEGO, M. L. TOMARO (2005): Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 1, 21-34. doi: 10.1590/S1677-04202005000100003
20. BERNHOFT, R. A. (2013): Cadmium toxicity and treatment. *Sci. World J.* 394652, 1-5. doi: 10.1155/2013/394652
21. BEVERLY, M. B., P. T. KAY, K. J. VOORHEES (1995): Principal component analysis of the pyrolysis mass spectra from African, Africanized hybrid and European beeswax. *J Anal Appl Pyrolysis.* 34, 2, 251–263. doi: 10.1016/0165-2370(95)00891-H
22. BILANDŽIĆ, N., I. TLAK GAJGER, M. KOSANOVIĆ, B. ČALOPEK, M. SEDAK, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, I. VARENINA, Đ. BOŽIĆ LUBURIĆ, I. VARGA, M. ĐOKIĆ (2017): Essential and toxic element concentrations in monofloral honeys from southern Croatia. *Food Chem.* 234, 245-253. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.180
23. BILANDŽIĆ, N., M. GAČIĆ, M. ĐOKIĆ, M. SEDAK, Đ. IVANEC ŠIPUŠIĆ, A. KONČURAT, I. TLAK GAJGER (2014a): Major and trace elements levels in multifloral and unifloral honeys in Croatia. *J. Food Comp. and Analys.* 33, 132-138. doi: 10.1016/j.jfca.2013.12.002
24. BILANDŽIĆ, N., M. SEDAK, M. ĐOKIĆ, A. GROSS BOŠKOVIĆ, T. FLORIJAČIĆ, I. BOŠKOVIĆ, M. KOVAČIĆ, Z. PUŠKADIJA, M. HRUŠKAR (2019): Element content in ten Croatian honey types from different geographical regions during three seasons. *J. Food Compos. Anal.* 84, 103305.
25. BILANDŽIĆ, N., M. SEDAK, M. ĐOKIĆ, I. TLAK GAJGER (2014b): Concentrations of lead in multifloral honeys from continental Croatia. Book of abstracts International Symposium on Bee Products and 3<sup>rd</sup> edition-Annual meeting of the International Honey Commission (IHC). 28-30 September 2014, Opatija, Croatia, 114-114.
26. BOGDANOV, S. (2004): Quality and standards of pollen and beeswax. *Apiacta*, 38, 334-341.
27. BOGDANOV, S. (2006): Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1–18. doi: 10.1051/apido:2005043



28. BOGDANOV, S. (2009): Beeswax book - Beeswax: Production, Properties Composition and Control. Bee Product Science Publishing. Switzerland. 1-17.
29. BOGDANOV, S. (2016): Beeswax. Beeswax book. Bee Product Science Publishing. Switzerland. 2-10.
30. BOMMURAJ, V., Y. CHEN, H. KLEIN, R. SPERLING, S. BAREL, J. A. SHIMSHONI (2019): Pesticide and trace element residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration. *Food Chem.* 299, 125123. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125123
31. BONMATIN, J.-M., C. GLORIO, V. GIROLAMI, D. GOULSON, D.P. KREUTZWEISER, C. KRUPKE, M. LIESS, E. LONG, M. MARZARO, E. A. D. MITCHELL, D. A. NOOME, N. SIMON- DELSO, A. TAPPARO (2015): Environmental fate and exposure ; neonicotinoids and fipronil. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22, 1, 35-67. doi: 10.1007/s11356-014-3332-7
32. BOOJAR, M. M., F. GOODARZI (2002): A longitudinal follow-up of pulmonary function and respiratory symptoms in workers exposed to manganese. *J. Occup. Environ. Med.* 44, 3, 282–290. doi: 10.1097/00043764-200203000-00016
33. BORTOLOTTI, L., C. COSTA (2014): Chemical Communication in the Honey Bee Society. U: Neurobiology of Chemical Communication (Mucignat-Caretta, C. ur.). CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA.
34. BOSANČIĆ, B., M. ŽABIĆ, D MIHAJLOVIC, J. SAMARDŽIĆ, G. MIRJANIĆ (2020): Comparative study of toxic heavy metal residues and other properties of honey from different environmental production systems. *Environ Sci Pollut Res Int.* 27, 30, 38200-38211 doi: 10.1007/s11356-020-09882-y
35. BOSKABADY, M., N. MAREFATI, T. FARKHONDEH (2018): The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review. *Environ Int.* 120, 404-420. doi: 10.1016/j.envint.2018.08.013
36. BOYD, R. S. (2010): Heavy metal pollutants and chemical ecology: Exploring New Frontiers. *J. Chem. Ecol.* 36, 1, 46-58. doi: 10.1007/s10886-009-9730-5

37. BREED, M. D. (1998): Recognition pheromones of the honey bee. *Biosci.* 48, 6, 463–470. doi: 10.2307/1313244
38. BRIFFA, J., E. SINGARA, 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
39. BRNA, P., K. GORDON, J. M. DOOLEY, V. PRICE (2011): Manganese toxicity in a child with iron deficiency and polycythemia. *J. Child Neurol.* 26, 7, 891–4. doi: 10.1177/0883073810393962
40. BROADLEY, M. R., P. J. WHITE, J. P. HAMMOND, I. ZELKO, A. LUX (2007): Zinc in plants. *New Phytol.* 173, 4, 677-702. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.01996.x
41. BROCKMANN, A., C. GROH, B. FROHLICH (2003): Wax perception in honeybees: Contact is not necessary. *Sci. Nat.* 90, 424–427. doi: 10.1007/s00114-003-0442-3
42. BROWN, P. H., I. CAKMAK, Q. ZHANG (1993): Form and function of zinc plants. U: *Developments in Plant and Soil Sciences: Zinc in Soils and Plants* (Robson, A. D. ur.). Springer Dordrecht. Australia, 55, 93-106. doi: 10.1007/978-94-011-0878-2\_7
43. BRUDZYNSKI, K. (2020): A current perspective on hydrogen peroxide production in honey. A review. *Food Chem.* 1, 332, 127229. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127229
44. BUCHWALD, A. R., M. D. BREED, L. BJOSTAD, B. E. HIBBARD, A. R. GREENBERG (2009): The role of fatty acids in the mechanical properties of beeswax. *Apidologie* 40, 5, 585–594. doi: 10.1051/apido/2009035
45. BUCHWALD, R., A. R. GREENBERG, M. D. BREED (2005): Biomechanical perspective on beeswax. *Am. Entomol.* 51, 1, 39–41. doi: 10.1093/ae/51.1.39
46. BUCHWALD, R., M. D. BREED, A.R.G REENBERG, G. OTIS (2006): Interspecific variation in beeswax as a biological construction material. *J. Exp. Biol.* 209, 20, 3984–3989. doi: 10.1242/jeb.02472
47. BURDEN, C. M., M. O. MORGAN, K. R. HLADUN, G. V. AMDAM, J. J. TRUMBLE (2019): Acute sublethal exposure to toxic heavy metals alters honey bee (*Apis mellifera*) feeding behaviour. *Sci. Rep.* 9, 4253. doi: 10.1038/s41598.019-40396-x

48. BURGER, J. (2006): Bioindicators: Types, Development, and Use in Ecological Assessment and Research. *Environ. Bioindic.* 1, 1, 22-39. doi: 10.1080/15555270590966483
49. CABOT, C., S. MARTOS, S. LLUGANY, B. GALLEGO, R. TOLRÁ, C. POSCHENRIEDER (2019): A role for zinc in plant defence against pathogens and herbivores. *Front. Plant Sci.* 4, 10, 1171, 1-15. doi: 10.3389/fpls.2019.01171
50. CALATAYUD-VERNICH, P., F. CALATAYUD, E. SIMO, Y. PICO (2017): Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Sci. Total. Environ.* 15, 605-606, 745-754. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.174
51. CALLENDER, E. (2003): Heavy Metal in the Environment - Historical Trends. U: Treatise on Geochemistry (Holland, H. D., K. K. Turekian, ur.). Elsevier Science, USA, 9, 67-105. doi: 10.1016/B0-08-043751-6/09161-1
52. CARON, D. M., L. J. CONNOR (2013): Honeybee Biology and Beekeeping. Wicas Press LLC, Michigan.
53. CARR, J. (2016): Managing bee health: A practical guide for beekeepers. 5m Publishing LTD, Sheffield, UK.
54. CBI (2002a): EU Market Survey, Honey and Beeswax. CBI Ministry of Foreign Affairs, www.cbi.eu. Pristupljeno 10. prosinca 2023.
55. CERVANTES, C., J. CAMPOS\_GARCÍA, S. DEVARIS, F. GUTIÉRREZ-CORONA, H. LOZA-TAVERA, J. C. TORRES-GUZMÁN, R. MORENO-SÁNCHEZ (2001): Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 3, 335-47. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
56. CHAIREH, S., P. NGASATOOL, K. KAEWTATIP (2020): Novel composite foam made from starch and water hyacinth with beeswax coating for food packaging applications. *Int J Biol Macromol.* 165A, 1382-1391. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.007
57. CHANG, T. P., C. RANGAN (2011): Iron poisoning: a literature-based review of epidemiology, diagnosis, and management. *Pediatr. Emerg. Care.* 27, 10, 978-85. doi: 10.1097/PEC.0b013e3182302604

58. CHASAPIS, C. T., A. C. LOUTSIDOU, C. A. SPILIOPOULOU, M. E. STEFANIDOU (2012): Zinc and human health: An update. *Arch. Toxicol.* 86, 4, 521-34. doi: 10.1007/s00204-011-0775-1
59. CHEN, M., X. ZHAO (2019): Impact of floral characters, pollen limitation, and pollinator visitation on pollination success in different populations of *Caragana korshinskii* Kom. *Sci. Rep.* 9, 1, 9741. doi: 10.1038/s41598-019-46271-z
60. CHICAS-MOSIER, A. M. B. A. COOPER, A. M. MELENDEZ, M. PÉREZ, D. OSKAY, C. I. ABRAMSON (2017): The effects of ingested aqueous aluminium on floral fidelity and foraging strategy in honey bees (*Apis mellifera*). *Ecotoxicol Environ Saf.* 143, 80-86. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.05.008
61. COGGSHALL, W. L., R. A. MORSE (1984): *Beeswax. Production, harvesting and products.* Wicwas Press, New York, USA.
62. COLLINS, A. M., J. S. PETTIS (2013): Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie* 44, 3, 351-356. DOI:10.1007/s13592-012-0186-1
63. COLLINS, J. F., J. R. PROHASKA, M. D. KNUTSON (2010): Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr. Rev.* 68, 3, 133-147. doi: 10.1111/j.1753-4887.2010.00271.x
64. COMMISSION DIRECTIVE (2009): Commission Directive 2009/10/EC of 13 February 2009 amending Directive 2008/84/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners (Text with EEA relevance).
65. COMMISSION REGULATION (2012): Commission Regulation (EU) No 231/2012 of 9 March 2012 laying down specifications for food additives listed in Annexes II and III to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council Text with EEA relevance.
66. COMMISSION REGULATION (2014): Commission Regulation (EU) No 488/2014 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of cadmium in foodstuffs.

67. CONNOR, J. J., H. T. SHACKLETTE, R. J. EBENS, J. A. ERDMAN, A. T. MIESCH, R. R. TIDBALL, H. A. TOURTELOT (1975): Background geochemistry of some rocks, soils, plants, and vegetables in the conterminous United States, with sections on Field studies. US Geological Survey. Professional Paper 574-F, str. 1-F168. doi: 10.3133/pp574F
68. CONNOR, L. J. (2008): Bee sex essentials. Wicwas Press, Kalamazzo, Michigan.
69. CONNOR, L. J., R. MUIR (2012): Bee-sentials. A field guide. Wicwas Press Essentials Book, Michigan.
70. CONTI, M. E., F. BOTRE (2001): Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metal contamination. Environ. Monit. Assess. 69, 3, 267-282. doi: 10.1023/A:1010719107006
71. CRANE, E. (1999): The world history of beekeeping and honey hunting. Gerald Duckworth & Co Ltd. London, 524-538. doi: 10.4324/9780203819937
72. CSEH, L., L. INGERMAN, S. KEITH, Y. TAYLOR (2012): TOXICOLOGICAL PROFILE FOR VANADIUM (2012): U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Atlanta, Georgia, USA. 11-15. <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/12386>
73. ĆIRIĆ, J., D. ŠPIRIĆ, T. BALTIĆ, I. BRANKOVIĆ LAZIĆ, D. TRBOVIĆ, N. PARUNOVIĆ, R. B. PETRONIJEVIĆ (2021): Honey bees and their products as indicators of environmental element deposition. Biol. Trace Elem. Res. 199, 2312-2319. doi: 10.1007/s12011-020-02321-6
74. D'ETTORRE, P., T. WENSELEERS, J. DAWSON, S. HUTCHINSON, T. BOSWELL, F. L. W. RATNIEKS (2006): Wax combs mediate nestmate recognition by guard honeybees. Anim. Behav. 71, 4, 773–779. doi: 10.1016/j.anbehav.2005.05.014
75. DAVIS, A. J. (2000): Does reduced-impact logging help preserve biodiversity in tropical rainforests? A Case Study from Borneo using Dung Beetles (*Coleoptera: Scarabaeoidea*) as Indicators. Environ. Entomol. 29, 3, 467–475. doi: 10.1603/0046-225X-29.3.467
76. DAVIS, C. F. (2011): The honey bee inside out. Bee craft limited, Warwickshire, UK.

77. DE DORLODOT, S., S. LUTTS, P. BERTIN (2005): Effects of ferrous iron toxicity on the growth and mineral composition of an inter specific rice. *J. Plant Nutr.* 28, 1, 1–20. doi: 10.1081/PLN-200042144
78. DEVILLERS, J., M. H. PHAM-DELEGUE (2002): Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals. 1<sup>st</sup> Edition. CRC Press. London, UK. doi: 10.1201/9780203218655
79. DI, N., K. R. HLADUN, K. ZHANG, T.-X. LIU, J. T. TRUMBLE (2016): Laboratory bioassays on the impact of cadmium, cooper and lead on the development and survival of honeybee (*Apis mellifera* L.) larvae and foragers. *Chemosphere*, 152, 530-538. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.03.033
80. DI, N., K. ZHANG, K. R. HLADUN, M. RUST, Y.-F. CHEN, Z.-Y. ZHU, T.-X. LIU, J. T. TRUMBLE (2020): Joint effects of cadmium and copper on *Apis mellifera* foragers and larvae. *Comp. Biochem. Physiol. Part -C: Toxicol. Pharmacol.* 237, 108839. doi: 10.1016/j.cbpc.2020.108839
81. DÖKE, M. A., M. FRAZIER, C. M. GROZINGER (2015): Overwintering honey bees: biology and management. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 185-193. doi: 10.1016/j.cois.2015.05.014
82. DONG, S., T. LIN, K. TAN, J. C. NIEH (2023): Social signal learning of the waggle dance in honey bees. *Science* 379, 6636, 1015-1018. doi: 10.1126/science.ade1702
83. DRASZAWKA – BOŁZAN, B. (2014): Effect of heavy metals on living organisms. *World Sci. News.* 3, 26-34.
84. EEA (2018): Mercury in Europe's environment. A priority for European and global action. European Environmental Agency. doi: 10.2800/558803
85. EFSA (2007): European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to a 16<sup>th</sup> list of substances for food contact materials (Question No EFSA-Q-2006-021). *EFSA J.* 615, 1-28. doi: 10.2903/j.efsa.2007.555

86. EMSLEY, J. (2005): Vodič kroz elemente (Građa prirode). Izvori, Zagreb, Hrvatska. 47–51.
87. ENGELS, W., V. L. IMPERATRIZ-FONSECA (1990): Caste development, reproductive strategies, and control of fertility in honey bees and stingless bees. U: Social insects (Engels, W. ur.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York. 167–230.
88. ERTANI, A., A. MIETTO, M. BORIN, S. NARDI (2017): Chromium in agricultural soils and crops: A Review. *Water Air Soil Pollut.* 228, 190. doi: 10.1007/s11270-017-3356-y
89. EUROPEAN COMMISSION (2002): European Commission (EC). Opinion of the scientific committee. [https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-12/sci-com\\_scv\\_out53\\_en.pdf](https://food.ec.europa.eu/system/files/2020-12/sci-com_scv_out53_en.pdf).
90. EYER, M., P. NEUMANN, V. DIETEMANN (2016): A look into the cell: honey storage in honey bees, *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 11, 8:e0161059. doi: 10.1371/journal.pone.0161059
91. 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, 175, 1-7. doi: 10.3389/fpls.2013.00175
92. FAOLEX (2006): Commission directive 2006/129/EC of 8 December 2006 amending and correcting Directive 96/77/EC laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners. <https://faolex.fao.org/docs/pdf/eur68078.pdf>
93. FAOSTAT (2023): <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI>. Pristupljeno 15. studenoga 2023.
94. FESSENDEN, M. (2015): Our ancient ancestors probably loved honey too. Available: <https://www.smithsonianmag.com/smart-news/relationship-between-humans-and-honeybees-goes-back-9000-years-180957245/>. Pristupljeno 22. studenoga 2023.
95. FILIPOVIĆ, I., S. LIPANOVIĆ (1995): Opća i anorganska kemija II. Dio. Školska knjiga, Zagreb, Hrvatska. 9, 1067–1085.

96. FORMICKI, G., A. GREŃ, R. STAWARZ, B. ZYŚK, A. GAL (2013): Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Pol. J. Environ.* 22, 1, 99-106.
97. FRANCI, G., A. FALANGA, S. GALDIERO, L. PALOMBA, M. RAI, G. MORELLI, M. GALDIERO (2015): Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20, 5, 8856–8874. doi: 10.3390/molecules20058856
98. FRATINI, F., G. CILIA, B. TURCHI, A. FELICOLI (2016): Beeswax: a minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. *Asian Pac J Trop Med.* 9, 9, 839-843. doi: 10.1016/j.apjtm.2016.07.003
99. FROHLICH, B., J. TAUTZ, M. RIEDERER (2000): Chemometric classification of comb and cuticular waxes of the honeybee *Apis Mellifera Carnica*. *J. Chem. Ecol.* 26, 1, 123–137. doi: 10.1023/A:1005493512305
100. GAD, S. C., T. PHAM (2014): Lead. U: Philip Wexler Encyclopedia of Toxicology. 3<sup>rd</sup> ed. Elsevier, London, UK. 61-65.
101. GAETKE, L. M., H. S. CHOW-JOHNSON, C. K. CHOW (2014): Copper: Toxicological relevance and mechanisms. *Arch. Toxicol.* 88, 11, 1929-1938. doi: 10.1007/s00204-014-1355-y
102. GENCHI, G., M. S. SINICROPI, G. LAURIA, A. CAROCCI, A. CATALANO (2020): The effects of cadmium toxicity. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17, 11, 3782. doi: 10.3390/ijerph17113782
103. GERLACH, J., M. SAMWAYS, J. PRYKE (2013): Terrestrial invertebrates as bioindicators: an overview of available taxonomic groups. *J. Insect Conserv.* 17, 4, 831-850. doi: 10.1007/s10841-013-9565-9
104. GONNELLI, C., F. GALARDI, R. GABBRIELLI (2001): Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. *Physiol. Plant.* 113, 507–514. doi: 10.1034/j.1399-3054.2001.1130409.x
105. GORETTI, E., M. PALLOTTINI, R. ROSSI, G. LA PORTA, T. GARDI, B. T. CENCI GOGA, A. C. ELIA, M. GALLETTI, B. MORONI, C. PETROSELLI, R. SELVAGGI,



- D. CAPPELLETTI (2020): Heavy metal bioaccumulation in honey bee matrix, an indicator to assess the contamination level in terrestrial environments. *Environ Pollut.* 256, 113388. doi: 10.1016/j.envpol.2019.113388
106. GREENWOOD, N. N., A. EARNSHAW (1984): Boron. U: Chemistry of the elements. 2<sup>nd</sup> edition. Butterworth Heinemann. University of Leeds, UK. 155–242.
107. GUO, B., C. LIU, Y. LIANG, N. LI, Q. FU (2019): Salicylic acid signals plant defence against cadmium toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 12, 2960. doi: 10.3390/ijms20122960
108. GUTIERREZ, M., R. MOLERO, M. GAJU, J. VAN DER STEEN, C. PORRINI, J. A. RUIZ (2020): Assessing heavy metal pollution by biomonitoring honeybee nectar in Córdoba (Spain). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 10, 10436-10448. doi: 10.1007/s11356-019-07485-w
109. HADI, F., T. AZIZ (2015): A mini review on lead (Pb) toxicity in plants. *J. boil. life sci.* 6, 2, 91-101. doi: 10.5296/jbls.v6i2.7152
110. HAMMER, M., R. MENZEL (1995): Learning and memory in the honeybee. *J. Neurosci.* 15, 3, 1617-1630. doi: 10.1523/JNEUROSCI
111. HÄNSCH, R., R. R. MENDEL (2009): Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 3, 259–266. doi: 10.1016/j.pbi.2009.05.006
112. HASSONA, N. M., A. A. ABD EL- WAHED ( 2023): Heavy Metal Concentrations of Beeswax ( *Apis mellifera* L.) at Different Ages. *Bull Environ Contam Toxicol.* 111, 3, 26 doi: 10.1007/s00128-023-03779-5
113. HASSONA, N. M., A. A. ABD EL- WAHED ( 2023): Heavy Metal Concentrations of Beeswax ( *Apis mellifera* L.) at Different Ages. *Bull Environ Contam Toxicol.* 111, 3, 26 doi: 10.1007/s00128-023-03779-5
114. HAZRAT, A., K. EZZAT, I. IKRAM (2019): Environmental chemistry and ecotoxicology of hazardous heavy metals: Environmental Persistence, Toxicity, And Bioaccumulation. *J. Chem.* 2019, 6730305. doi: 10.1155/2019/6730305

115. HEIL, M. (2011): Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends Plant Sci.* 16, 4, 191-200. doi: 10.1016/j.tplants.2011.01.003
116. HEPBURN, H. R. (1998): Reciprocal interactions between honeybees and combs in the integration of some colony functions in *Apis mellifera L.* *Apidologie* 29, 1-2, 47–66 doi: 10.1051/apido:19980103
117. HEPBURN, H. R., C. W. PIRK, O. DUANGPHAKDEE (2014): Honeybees nests: Composition, structure, function. Springer. New York, NY. doi: 10.1007/978-3-642-54328-9
118. HERBERT, E. W., H. SHIMANUKI (1978): Mineral requirements for brood-rearing by honeybees fed a synthetic diet. *J. Apic. Res.* 17, 118-122. doi: 10.1080/00218839.1978.11099916
119. HESKETH, H., E. LAHIVE, A. A. HORTON, A. G. ROBINSON, C. SVENDSEN, A. RORTAIS, J.-L. DORNE, J. BAAS, D. J. SPURGEON, M. S. HEARD (2016): Extending standard testing period in honeybees to predict lifespan impacts of pesticides and heavy metals using dynamic energy budget modelling. *Sci Rep.* 6, 1, 37655-37666. doi: 10.1038/srep37655
120. HLADUN, K. R., B. H. SMITH, J. A. MUSTARD, R. R. MORTON, J. T. TRUMBLE (2012): Selenium toxicity to honey bee (*Apis mellifera L.*) pollinators: effects on behaviours and survival. *PLoS ONE*, 7, 4:e34137. doi: 10.1371/journal.pone.0034137
121. HLADUN, K. R., N. DI, T.-X. LIU, J. T. TRUMBLE (2016): Metal contaminant accumulation in the hive: Consequences for whole-colony health and brood production in the honeybee (*Apis mellifera L.*). *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 2, 322-329. doi: 10.1002/etc.3273
122. HORST, W. J. (1988): The physiology of manganese toxicity. U: Manganese in soils and plants (Graham, R. D., R. J. Hannam, N. C. Uren, ur.). *Developments in plant and soil sciences.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. 175-188. doi: 10.1007/978-94-009-2817-6\_13

123. HRASSNIGG, N., K. CRAILSHEIM (2005): Differences in drone and worker physiology in honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie* 36, 2, 255-277. doi: 10.1051/apido:2005015
124. HRVATSKA ENCIKLOPEDIJA (2021): Vanadij. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Hrvatska.
125. HRVATSKA ENCIKLOPEDIJA (2021a): Molibden. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Hrvatska.
126. HRVATSKA ENCIKLOPEDIJA (LZMK) (1999): Broj 1 (A-Bd). Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Zagreb, Hrvatska.
127. HUSEEN, H. M., A. J. MOHAMMED (2019): Heavy metals causing toxicity in fishes. *J. Phys. Conf. Ser.* 1294, 6, 062028. doi:10.1088/1742-6596/1294/6/062028
128. INDEXBOX (2023): INDEXBOX World - Beeswax - Market Analysis, Forecast, Size, Trends and Insights <https://www.indexbox.io/store/world-beeswax-market-report-analysis-and-forecast-to-2020/>
129. IP, M., L.S. LUI, V. K. M. POON, I. LUNG, A. BURD (2006): Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. *J. Med. Microbiol.* 55, 1, 59–63. doi: 10.1099/jmm.0.46124-0
130. ISHAQUE A., S. ISHAQUE, A. ARIF, H. G. ABBAS (2020): Toxic effects of lead on fish and human. *Biol. Clin. Sci. Res. J.* 1, 47, 1-7. doi: 10.54112/bcsrj.v2020i1.47
131. JIMENEZ, J. J., J. L. BERNAL, S. AUMENTE, L. TORIBIO, J. BERNAL (2003): Quality assurance of commercial beeswax II. Gas chromatography-electron impact ionization mass spectrometry of alcohols and acids. *J. Chromatogr. A.* 1007,1–2, 101–116. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00962-2
132. JOHNSON, B. R. (2010): Division of labor in honey bees: form, function and proximate mechanisms. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64, 3, 305-316. doi: 10.1007/s00265-009-0874-7
133. KABATA-PENDIAS, A. (2000): Trace elements in soils and plants. 3<sup>rd</sup> Edition. CRC Press, Boca Raton. 1-432. doi: 10.1201/9781420039900

134. KACANIOVA, M., N. VUKOVIC, R. CHLEBO, P. HASCIK, K. ROVNA, J. CUBON, M. DZUGAN, A. PASTERNAKIEWICZ (2012): The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. Arch. Biol. Sci. 64, 3, 927-934. doi: 10.2298/ABS1203927K
135. KALINOWSKA-LIS, U., A. FELCZAK, L. CHEĆIŃSKA, I. SZABŁOWSKA-GADOMSKA, E. PATYNA, M. MAŁECKI, K. LISOWSKA, J. OCHOCKI (2016): Antibacterial activity and cytotoxicity of silver(I) Complexes of Pyridine and (Benz)Imidazole Derivatives. X-ray Crystal Structure of [Ag(2,6-di(CH<sub>2</sub>OH)py)<sub>2</sub>]NO<sub>3</sub>. Molecules, 21, 2, 87, 1–14. doi: 10.3390/molecules21020087
136. KANE T. R., C. M. FAUX (2021): Honey Bee Medicine for the Veterinary Practitioner. John Wiley & Sons, Hoboken, USA.
137. KAST, C., V. KILCHENMANN (2022): An *in vitro* model for assessing the toxicity of pesticide sin bees wax on honey bee larvae. Chemosphere, 287, 2, 132214-132221. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.132214
138. KAUR, H., N. GARG (2021): Zinc toxicity in plants: a Review. Planta 253, 6, 129. doi: 10.1007/s00425-021-03642-z
139. KOUL, O. (2008): Phytochemicals and insect control: an antifeedant approach. Crit. Rev. Plant Sci. 27, 1, 1-24. doi:10.1080/07352680802053908
140. KYONO, H., Y. KUSAKA, H. KATSUNORI, H. KUBOTA, Y. ENDO-ICHIKAWA (1992): Reversible lung lesions in rats due to short-term exposure to ultrafine cobalt particles. Ind Health. 30, 3-4, 103–118. doi: 10.2486/indhealth.30.103
141. LEYSSSENS, L., B. VINCK, C. VAN DER STRATEN, F. WUYTS, L. MAES (2017): Cobalt toxicity in humans – A review of the potential sources and systemic health effects. Toxicology 387, 43-56. doi: 10.1016/j.tox.2017.05.015
142. LU, C. W., J. H. S. PANG, Y. S. KO, C. J. CHANG, C. W. WANG, W. T. CHEN, C. B. CHEN, R. C. Y. HUI, S. I. HUNG, L. Y. LU, K. L. LU, C. L. WANG, C. E. WU, P. C. HSU, Y. F. FANG, S. H. LI, K. W. KO, L. C. TSENG, F. Y. SHIH, M. J. CHEN, W. H. CHUNG (2023): Zinc deficiency associated with cutaneous toxicities induced by

- epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy in patients with lung adenocarcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venerol.* 37, 2, 328-339. doi: 10.1111/jdv.18703
143. LUCENA, J. J. (2000): Effects of bicarbonate, nitrate and other environmental factors on iron deficiency chlorosis. A review. *J. Plant Nutr.* 23, 11-12, 1591–1606. doi: 10.1080/01904160009382126
144. MÁCHOVÁ, M. (1993): Resistance of bacillus-larvae in beeswax. *Apidologie* 24, 1, 25-31. doi: 10.1051/APIDO:19930103
145. MAHAMOUD AHMED, A., E. LYAUTEY, C. BONNINEAU, A. DABRIN, S. PASCE (2018): Environmental concentrations of copper, alone or in mixture with arsenic, Can Impact River Sediment Microbial Community Structure and Functions. *Front. microbiol.* 9, 1852. doi: 10.3389/fmicb.2018.01852
146. MAHMOUDI, R., K. MARDANI, B. RAHIMI (2015): Analysis of heavy metals in honey from north-western regions of Iran. *J. Chem. Health Risk.* 5, 251-256. doi:10.22034/JCHR.2018.544114.
147. MAIA, M., F. M. NUNES (2013): Authentication of beeswax (*Apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food Chem.* 136, 2, 961-968. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.09.003
148. MARKERT, B., BREURE, H. ZECHMEISTER (2003): Bioindicators and biomonitors: Principles, Concepts, and Applications. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment.* Elsevier Sci. 6, 15-25.
149. MARKERT, B., J. OEHLMANN, M. ROTH (1997): General aspects of heavy metal monitoring by plants and animals. *Environmental Biomonitoring*, 654, 2, 19–29. doi: 10.1021/bk-1997-0654.ch002
150. MAZARI, K., G. M. FILIPPELLI (2020): Using deciduous trees as bioindicators of trace element deposition in a small urban watershed, Indianapolis, IN, USA. *J. Environ. Qual.* 49, 1, 163-171. doi: 10.1002/jeq2.20009

151. MC'GEOCH, M. A. (1998): The Selection, Testing and Application of Terrestrial Insects as Bioindicators. *Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.* 73, 181-201. doi: 10.1017/S000632319700515X
152. MONCHANIN, C., A. BLANC- BRUDE, E. DRUJONT, M. M. NEGAHI, C. PASQUARETTA, J. SILVESTRE, D. BAQUÉ, A. ELGER, A. B. BARRON, J-M. DEVAUD, M. LIHOREAU (2021): Chronic exposure to trace lead impairs honey bee learning. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 212, 112008. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112008
153. MONCHANIN, C., M. G. DE BRITO SANCHEZ, L. LECOUVREUR, O. BOIDARD, G. MÉRY, J. SILVESTRE, G. LE ROUX, D.BAQUÉ, A. ELGER, A. B. BARRON, M. LIHOREAU, J.-M. DEVAUD (2022): Honey bees cannot sense harmful concentrations of metal pollutants in food. *Chemosphere* 297, 134089. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.134089.
154. MORENO, J. A., E. C. YEOMANS, K. M. STREIFEL, B. L. BRATTIN, R. J. TAYLOR, R. B. TJALKENS (2009): Age-Dependent Susceptibility to Manganese-Induced Neurological Dysfunction. *Toxicol. Sci.* 112, 2. 394–404. doi: 10.1093/toxsci/kfp220
155. MOUSTAFA, A., A. ATIBA (2015): The effectiveness of a mixture of honey, beeswax and olive oil in treatment of canine deep second-degree burn. *Glob Vet.* 14, 2, 244-250. doi: 10.5829/idosi.gv.2015.14.02.9361
156. NELMS, S. M. (2005): *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing, Oxford, UK. 1-498.
157. NGAT, T. T., T. XUAN LAM, H. GIA MINH , N. THI PHUONG LIEN (2020): Honeybee products as potential bioindicators of heavy metals contamination from Northern Vietnam. *Vietnam J Biotechnol.* 18, 2, 373-384. doi: 10.15625/1811-4989/18/2/15086
158. NICOLSON, S. W. (2011): Bee food: the chemistry and nutritional value of nectar, pollen and mixtures of two. *Afr. Zool.* 46, 197-204. doi: 10.3377/004.046.0201
159. NICOLSON, S. W., R. W. THORNBURG (2007.): *Nectar chemistry U: Nectaries and nectar* (Nicolson, S. W., M. Nepi, E. Pacini, ur.). Springer, Dordrecht, Netherlands. 215-264.

160. NIÑO, E., O. MALKAL, A. HEFETZ, D. R. TARPY, C. M. GROZINGER (2013): Chemical Profiles of Two Pheromone Glands Are Differentially Regulated by Distinct Mating Factors in Honey Bee Queens (*Apis mellifera L.*). PLOS ONE 8, 11:e78637. doi: 10.1371/journal.pone.0078637
161. NOUCHI, I. (2002): Plants as Bioindicators of Air Pollutants U: Air Pollution and Plant Biotechnology (Omasa, K., H. Saji, S. Youssefian, N. Kondo, ur.). Springer, Tokyo.
162. OLAITAN, P. B., O. E. ADELEKE, I. O. OLA (2007): Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes. Afr. Health Sci. 7, 3, 159-165. doi: 10.5555/afhs.2007.7.3.159
163. OLIVEIRA, H. (2012): Chromium as an environmental pollutant: Insights on Induced Plant Toxicity. J. Bot. 2012, 2090-0120. doi: 10.1155/2012/375843
164. OPĆA ENCIKOPEDIJA (1977): Srebro (Ag). 3. izdanje (osam svezaka). Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb.
165. PALACIOS, O., M. CAPDEVILA (2013): Toxicology (Pb, Hg, Cd, As, Al, Cr, and Others). U: Comprehensive Inorganic Chemistry II (Second Edition) From Elements to Applications. Elsevier. 3, 51-63. doi:10.1016/B978-0-08-097774-4.00304-1
166. PAMMINGER, T., R. BECKER, S. HIMMELREICH, C. W. SHNEIDER, M. BERGTOLD (2019): The nectar report: quantitative review of nectar sugar concentrations offered by bee visited flowers in agricultural and non- agricultural landscapes. PeerJ 7:e6329. doi: 10.7717/peerj.6329
167. PARACHNOWITSCH, A. L., J. S. MANSON, N. SLETVOLD (2019): Evolutionary ecology of nectar. Ann. of Bot. 123, 2, 247-261. doi: 10.1093/aob/mcy132
168. PARMAR, T. K., D. RAWTANI, Y. K. AGRAWAL (2016): Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. Front. Life Sci. 9, 2, 110-118. doi: 10.1080/21553769.2016.1162753
169. PAVLIČEK, D., N. BILANDŽIĆ, I. TLAK GAJGER, M. DENŽIĆ LUGOMER (2021): Uporaba neonikotinoida i praćenje njihovih rezidua u medonosnim pčelama i pčelinjim proizvodima. Vet. stn. 52, 5, 565-577. doi:10.46419/vs.52.5.12

170. PAVLIČEK, D., I. TLAK GAJGER, N. BILANDŽIĆ, M. ĐOKIĆ, I. VARENINA, M. SEDAK (2023): Determination of neonicotinoid residues in comb honey and beeswax from Croatia using high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. 48<sup>th</sup> International Apicultural Congress. Santiago, Chile, 4 – 8 September 2023, p. 264.
171. PELLISSIER, L., J. POTTIER, P. VITTOZ, A. DUBUIS, A. GUISAN (2010): Spatial pattern of floral morphology: possible insight into the effects of pollinators on plant distributions. *Oikos* 119, 11, 1805-1813. doi: 10.1111/j.1600-0706.2010.18560.x
172. PEREIRA, J. L., M. PIKANÇO, A. A. SILVA, E. DE BARROS, R. S. DA SILVA, T. V. D. S. GALDINO, C. G. S. MARINHO (2010): Ants as environmental impact bioindicators from insecticide application on corn. *Sociobiology* 55, 1B, 153–164.
173. PERUGINI, M., M. MANERA, L. GROTTA, M. C. ABETE, R. TARASCO (2011): Heavy metal (Hg, Cr, Cd, and Pb) contamination in urban areas and wildlife reserves: honeybees as bioindicators. *Biol. Trace Elem Res.* 140, 2, 170–176. doi: 10.1007/s12011-010-8688-z
174. PIETRINI, F., M. CARNEVALE, C. BENI, M. ZACCHINI, F. GALLUCCI, E. SANTANGELO (2019): Effect of different copper levels on growth and morpho-physiological parameters in giant reed (*Arundo donax L.*) in Semi-Hydroponic Mesocosm Experiment. *Water* 11, 9, 1837. doi: 10.3390/w11091837
175. 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.
176. POLITANO, A. D., K. T. CAMPBELL, L. H. ROSENBERGER, R. G. SAWYER (2013): Use of silver in the prevention and treatment of infections: silver review. *Surg. Infect.* 14, 1, 8–20. doi: 10.1089/sur.2011.097
177. POTSHINKOVA, P. (1992): *Bienenprodukte in der Medizin. Apitherapie.* Ehrenwirth Verlag München.



178. POURRUT, B., M. SHAHID, C. DUMAT, P. WINTERTON, E. PINELLI (2011): Lead uptake, toxicity and detoxification in plants. *Rev Environ Contam Toxicol.* 213, 113-136. doi: 10.1007/978-1-4419-9860-6\_4
179. PRASAD, A. S. (2020): Lessons learned from experimental human model of zinc deficiency. *J Immunol Res.* 2020, 9207279. doi: 10.1155/2020/9207279
180. PUENTE, R., J. ILLNAIT, R. MAS, D. CARBAJAL, S. MENDOZA, J. C. FERNÁNDEZ, M. MESA, R. GÁMEZ, P. REYES (2014): Evaluation of the effect of D-002, a mixture of beeswax alcohols, on osteoarthritis symptoms. *Korean J. Intern. Med.* 29, 2, 191-202. doi: 10.3904/kjim.2014.29.2.191
181. PUŠIĆ, I., B. BEER LJUBIĆ, M. VIHNANEK LAZARUS, L. RADIN, Z. JANJEČIĆ, D. BEDEKOVIĆ, I. KRIŽEK, J. JURČEVIĆ, J. ALADROVIĆ (2018): Dietary organic selenium supplementations affect oxidative stability of chilled and frozen chicken meat. *J. Food Nutr. Res.* 57, 3, 274-283.
182. RADAKOVIC, M., B. JAKOVAC STRAJN, I. TLAK GAJGER, A. M. AMANN, J. ALDISS (2022): EVERI Position paper –“Veterinarians employed in industry”. [https://everi.fve.org/cms/wp-content/uploads/ap10.1.1-EVERI-Position-Paper\\_Vets-in-Industry\\_19-09-2022\\_logo.pdf](https://everi.fve.org/cms/wp-content/uploads/ap10.1.1-EVERI-Position-Paper_Vets-in-Industry_19-09-2022_logo.pdf)
183. RAHMAN, H., S. SABREEN, S. ALAM, S. KAWAI (2005): Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in barley plants grown in nutrient solution. *J. Plant Nutr.* 28, 3, 393–404. doi: 10.1081/PLN-200049149
184. RAJESHKUMAR, S., X.LI (2018): Bioaccumulation of heavy metal sin fish species from the Meiliang Bay, Taihu Lake, China. *Toxicol. Rep.* 5, 288-295. doi: 10.1016/j.toxrep.2018.01.007
185. RASCIO, N., F. NAVARI-IZZO (2011): Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180, 2, 169-181. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.08.016
186. RAVOET, J., W. REYBROECK, D. C. DE GRAAF (2015): Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian bee wax combs. *B Environ Contam Toxicol.* 94, 5, 543-548. doi: 10.1007/s00128-015-1511-y

187. REDDY, D. H. K. S-M. LEE, K. SESHAIHAH (2012): Biosorption of toxic heavy metal ions from water environment using honeycomb biomass- an industrial waste material. *Water Air Soil Pollut*, 223, 5967-5982. doi:10.1007/s11270-012-1332-0
188. RIT, T., R. BEHRER (1999): *Beeswax through the ages*. Bladel: Koster Keunen Holland BV.
189. RITTER, W. (2014): *Bee Health and Veterinarians*. World Organization for Animal Health. OIE. Paris.
190. SALMELA, H., G. V. AMDAM, D. FREITAK (2015): Transfer of immunity from mother to offspring is mediated via egg-yolk protein vitellogenin. *PLoS Pathog.* 11, 7:e1005015. doi: 10.1371/journal.ppat.1005015
191. SAMMATARO, D., J. A. YODER (2012): *Honey bee colony health. Challenges and Sustainable Solutions*. CRC Press, Taylor & Francis, Boca Raton, Florida, USA. 1-302.
192. SANDEMAN, D. C., J. TAUTZ, M. LINDAUER (1996): Transmission of vibration across honeycombs and its detection by bee leg receptors. *J. Exp Biol.* 199, 12, 2585–2594. doi: 10.1242/jeb.199.12.2585
193. SCHROEDER, A., K. WALLNER (2003): The actual situation of varroacides in beeswax: An international comparison. *Apidologie* 34, 5, 1-3.
194. SETHY, K., S. PATI, D. JENA, S. K. PANDA, S. K. PRADHAN, C. K. MISHRA (2020): Heavy metal toxicity in animals: A review. *Pharma Innov.* 9, 6, 134-137.
195. SETT, R. (2017): Responses in plants exposed to dust pollution. *Hortic. Int. J.* 1, 53-56. doi: 10.15406/hij.2017.01.00010
196. SHAH, F. U. R., N. AHMAD, K. R. MASOOD, J. PERALTA-VIDEO, F. D. AHMAD (2010): Heavy metal toxicity in plants. U: *Plant Adaptation and Phytoremediation* (Ashraf, M., M. Ozturk, M. S. A. Ahmad, ur.). Springer. Dordrecht. doi: 10.1007/978-90-481-9370-7\_4
197. SHANKER, A. K., C. CERVANTES, H. LOZA-TAVERA, S. AVUDAINAYAGAM (2005): Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31, 5, 739-753. doi: 10.1016/j.envint.2005.02.003

198. SHARMA, A., D. KAPOOR, J. WANG, B. SHAHZAD, V. KUMAR, A. S. BALI, S. JASROTIA, B. ZHENG, H. YUAN, D. YAN (2020): Chromium bioaccumulation and its impacts on plants: An Overview. *Plants (Basel)*, 9, 1, 100. doi: 10.3390/plants9010100
199. SHEKHAWAT, K., S. CHATTERJEE, B. JOSHI (2015): Chromium toxicity and its health hazards. *Int. J. Adv. Res.* 3, 7, 167-172. ps://www.journalijar.com/article/5151/chromium-toxicity-and-its-health-hazards/
200. SHRIVASTAVA, M., A. KHANDELWAL, S. SRIVASTAVA (2019): Heavy Metal Hyperaccumulator Plants: The Resource to Understand the Extreme Adaptations of Plants Towards Heavy Metals. U: *Plant-Metal Interaction* (Srivastava, S., A.K. Srivastava, P. Suprasanna, ur.). Springer International Publishing. 79-97. doi: 10.1007/978-3-030-20732-8\_5
201. SINGH, R., N. GAUTAM, A. MISHRA, R. GUPTA (2011): Heavy metals and living systema: An overview. *Indian J. Pharmacol.* 43, 3, 246-253. doi: 10.4103/0253-7613.81505
202. SINHA, S., M. GUPTA, P. CHANDRA (1997): Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillate* (l.f.) Royle: Response of Antioxidants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 3, 286–291. doi: 10.1006/eesa.1997.1598
203. SKALDINA, O., R. CISZEK, S. PERÄNIEMI, M. KOLEHMAINEN, J. SORVARI (2020): Facing the threat: common yellow jacket wasps as indicators of heavy metal pollution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 29031-29042. doi: 10.1007/s11356-020-09107-2
204. SMITH, K. E., D. WEIS, M. AMINI, A. E. SHIEL, V. W.-M. LAI, K. GORDON (2019): Honey as a biomonitor for a changing world. *Nat. Sustain.* 2, 3, 223-232. doi: 10.1038/s41893-019-0243-0
205. SMITH, M. L., P. A. KOENING, J. M. PETERS (2017): The cues of colony size: how honey bees sense that their colony is large enough to begin to invest in reproduction. *J Exp. Biol.* 220, 1597-1605. doi: 10.1242/jeb.150342
206. SMOLDERS, E. (2001): Cadmium uptake by plants. *Int. J. Occup. Med Environ Health.* 14, 2, 177-183.

207. SNODGRASS, R. E., E. H. ERICKSON, S. E. FAHRBACH (2015): The Hive and the Honey Bee. Dadant and Son, Hamilton, IL.
208. SOLHAUG, E. M., E. JOHNSON, C. J. CARTER (2019): Carbohydrate metabolism and signalling in squash nectaries and nectar throughout floral maturation. *Plant Physiol.* 180, 4, 1930-1946. doi: 10.1104/pp.19.00470
209. STAMBULSKA, U. Y., M. M. BAYLIAK, V. I. LUSHCHAK (2018): Chromium (VI) Toxicity in legume plants: Modulation effects of *Rhizobial* symbiosis. *BioMed Res. Int.* doi: 10.1155/2018/8031213
210. STELL, I. (2012): Understanding bee anatomy. The Catford Press, UK.
211. STREIBL, M., K. STRANSKY, F. SORM (1966): Über einige neue Kohlenwasserstoffe in Wachs der Honigbiene (*Apis mellifera* L.). *Fette Seifen Anstrichmittel*, 68, 799–805.
212. SVEČNJAK, L., G. BARANOVIĆ, M. VINCEKOVIĆ, S. PRĐUN, D. BUBALO, I. TLAK GAJGER (2015): An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using FTIR-ATR spectroscopy. *J. Apic. Sci.* 59, 37-49. doi: 10.1515/jas - 2015-0018
213. SVEČNJAK, L., L. A. CHESSON, A. GALLINA, M. MAIA, M. MARTINELLO, F. MUTINELLI, M. NECATI MUZ, F. M. NUNES, F. SAUCY, B. J. TIPPLE, K. WALLNER, E. WAŚ, T. A. WATERS (2019): Standard methods for *Apis mellifera* beeswax research. *J. Apic. Res.* 58, 2, 1-108. doi: 10.1080/00218839.2019.1571556
214. TAUTZ, J. (2008): The Buzz about Bees – Biology of a Superorganism. Springer Verlag, Berlin, Germany.
215. TAYLOR, A. A., J. S. TSUJI, M. R. GARRY, M. E. MCARDLE, W. L. GOODFELLOW JR., W. J. ADAMS, C. A. MENZIE (2019): Critical review of exposure and effects: implications for setting regulatory health criteria for ingested copper. *Environ Manage.* 65, 1, 131-159. doi: 10.1007/s00267-019-01234-y

216. TCHOUNWOU, P. B., C. G. YEDJOU, A. K. PATLOLLA, SUTTON D. J. (2012) Heavy Metals Toxicity and the Environment. *Exp. Suppl.* 101, 133–164. doi: 10.1007/978-3-7643-8340-4\_6
217. TEMNOV, V. A. (1967): *Tekhnologia Produktov Pchelovodstva*. Kolos. Moscow. 1-191.
218. TLAK GAJGER, I. (2015): *Primjena nutraceutika u pčelarstvu*. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
219. TLAK GAJGER, I. (2020): *Veterinarska medicina u području pčelarstva*. Hrvatski veterinarski vjesnik, 28, 4, 44-51.
220. TLAK GAJGER, I., A. M. MAÑES, G. FORMATO, M. MORTARINO, J. TOPORCAK (2021): Veterinarians and beekeeping: What roles, expectations and future perspectives? - a review paper. *Vet. Arhiv.* 91, 4, 437-443. doi: 10.24099/vet.arhiv.1444
221. TLAK GAJGER, I., M. KOSANOVIĆ, N. BILANDŽIĆ, M. SEDAK, B. ČALOPEK (2016a): Variations in lead, cadmium, arsenic, and mercury concentrations during honeybee wax processing using casting technology. *Arh Hig Rada Toksikol.* 67, 3, 223-228. doi: 10.1515/aiht-2016-67-2780
222. 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, 5, 697–703. doi: 10.1007/s00128-019-02713-y
223. TLAK GAJGER, I., N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ, M. SEDAK (2014): Impact of honeybee casting comb foundations production on lead concentrations. U: *Book of abstracts Natural resources green technology and sustainable development* (Bubalo, C., I. Radojević Redovniković, M. Vuković, D. Erdec Hendrih, ur.). Faculty of Food Tehnology and Biotehnology, Zagreb, 69- 69.
224. TLAK GAJGER, I., N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ, M. SEDAK, B. ČALOPEK (2016b): Concentrations of mercury during honeybee wax procession. U: *Book of abstracts Natural resources green technology and sustainable development* (Radojčić Redovniković, I., K. Radošević, T. Jakovljević, R. Stojaković, V. Gaurina Srček, D.

- Erdec Hendrih, ur.). Faculty of Food Tehnology and Biotehnology, Zagreb, Croatia, 68-68.
225. TOMAŠEC, I. (1949): Biologija pčela. Nakladni zavod Hrvatske, Zagreb. 5-82.
226. TOMCZYK, M., G. ZAGULA, M. KACZMARSKI, C. PUCHALSKI, M. DŽUGAN (2023): The Negligible Effect of Toxic Metal Accumulation in the Flowers of Melliferous Plants on the Mineral Composition of Monofloral Honeys. *Agriculture*, 13, 2, 273. doi: 10.3390/agriculture13020273
227. TOMLJANOVIĆ, Z., D. CVITKOVIĆ, S. PAŠIĆ, B. VOLAREVIĆ, I. TLAK GAJGER (2020): Production, practices and attitudes of beekeepers in Croatia. *Vet. Arhiv.* 90, 4, 413-427.
228. TOMLJANOVIĆ, Z., I. TLAK GAJGER, V. SANTRAČ (2012): Dobra veterinarska praksa u pčelinjaku. Bayer Animal Health, Zagreb. 1-80.
229. TOPITZHOFER, E., H. LUCAS, P. CHAKRABARTI, C. BREECE, V. BRYANT, R. R. SAGILI (2019): Assessment of pollen diversity available to honey bees (*Hymenoptera: Apidae*) in Major Cropping Systems During Pollination in the Western United States. *J. Econ. Entomol.* 112, 5, 2040-2048. doi: 10.1093/jee/toz168
230. TULLOCH, A. P. (1980): Beeswax – Composition and analysis. *Bee World*, 61, 2, 47–62. doi: 10.1080/0005772X.1980.11097776
231. TUMOLO, M., V. ANCONA, D. DE PAOLA, D. LOSACCO, C. MASSARELLI, V. F. URICCHIO (2020): Chromium pollution European water, sources, health risk and remediation strategies: Sn Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 17, 15, 5438. doi: 10.3390/ijerph17155438
232. TURKYILMAZ, A., S. HAKAN, I. KAAAN, C. MEHMET (2019): Use of tree rings as a bioindicator to observe atmospheric heavy metal deposition. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 5122-5130. doi: 10.1007/s11356-018-3962-2
233. UAUY, R., M. OLIVARES, M. GONZÁLEZ (1998): Essentiality of cooper in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 5, 9525-9595. doi: 10.1093/ajcn/67.5.952S

234. ULLAH, R., F. A. JAN, H. GULAB, S. SALEEM, S. N. ULLAH, -- WAJIDULLAH (2022): Metal contents in honey, beeswax and bees and human health risk assessment due to consumption of honey: a Case study from selected districts in Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Arch Environ Contam Toxicol.* 82, 1, 341-354. doi:10.1007/s00244-021-00910-7
235. VANSELOW, A. P. (1966): Cobalt. U: Diagnostic Criteria for Plants and Soils (Chapmann, H. D., ur.). 1<sup>st</sup> edition. University of California, Division of Agricultural Science. Berkeley. 142-156.
236. VENKATARMAN, B. V., S. SUDHA (2005): Vanadium toxicity. *Asian J. Sci.* 19, 2, 127-134. <http://ajesjournal.com/PDFs/05-2/15-Vanadium%20Toxicity.pdf>
237. VIDAL-NAQUET, N. (2015): Honeybee Veterinary Medicine: *Apis mellifera L.* 5m Publishing Benchmark House, Sheffield, UK.
238. VORVOLAKOS, T. H., S. ARSENIU, M. SAMAKOURI (2016): There is no safe threshold for lead exposure: A literature review. *Psychiatr.* 27, 3, 204-214. doi: 10.22365/jpsych.2016.273.204
239. WALLACE, J. S. (2008): Chemical analysis of fire arms, ammunition and gunshot residues. 2<sup>nd</sup> edition. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
240. WANG, X., J. LUO, C.-J. LIN, D. WANG, W. YUAN (2020): Elevated cadmium pollution since 1890s recorded by forest chronosequence in deglaciated region of Gongga, China. *Environ. Pollut.* 260, 114082. doi: 10.1016/j.envpol.2020.114082
241. WANI, A. L., A. ARA, J. A. USMANI (2016): Lead toxicity: a review. *Interdiscip. Toxicol.* 8, 2, 55-64. doi: 10.1515/intox-2015-0009
242. WAŚ, E., T. SZCZERSNA, H. RYBAK-CHMIELEWSKA (2014a): Determination of beeswax hydrocarbons by gas chromatography with a mass detector (GC-MS) technique. *J Apic Sci.* 58, 1, 145–157. doi: 10.2478/JAS-2014-0015
243. WAŚ, E., T. SZCZERSNA, H. RYBAK-CHMIELEWSKA (2014b): Hydrocarbon composition of beeswax (*Apis mellifera*) collected from light and dark coloured combs. *J Apic Sci.* 58, 2, 99–106. doi: 10.2478/jas-2014-0026

244. WASSERMAN, G. A., X. LIU, F. PARVEZ, P. FACTOR-LITVAK, H. AHSAN, D. LEVY, J. KLINE, A. VAN GEEN, J. MEY, V. SLAVKOVICH, A. B. SIDDIQUE, T. ISLAM, J. H. GRAZIANO (2011): Arsenic and manganese exposure and children's intellectual function. *Neurotoxicology*, 32, 4, 450–457. doi: 10.1016/j.neuro.2011.03.009
245. WINSTON, M. L. (1987): *The Biology of the Honey Bee*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
246. WITTIG, R. (1993): General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. U: *Plants as Biomonitors – Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment* (Markert, B., ur.). VCH Press. Weinheim. 3–27.
247. WU, J. Y., C. M. ANELLI, W. S. SHEPPARD (2011): Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLOS One* 6, 2:e14720. doi: 10.1371/journal.pone.0014720
248. XUN, E., Y. ZHANG, J. ZHAO, J. GUO (2017): Translocation of heavy metals from soils into floral organs and rewards of *Cucurbita pepo*: Implications for plant reproductive fitness. *Ecotoxicol Environ. Saf.* 145, 235-243. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.045
249. XUN, E., Y. ZHANG, J. ZHAO, J. GUO (2018): Heavy metals in nectar modify behaviours of pollinators and nectar robbers: consequences for plant fitness. *Environ. Pollut.* 242, 1166-1175. doi: 10.1016/j.envpol.2018.07.128
250. YAMAGUCHI, Y., A. UGAJIN, S. UTAGAWA (2018): Double-edged heat: honeybee participation in a hot defensive bee ball reduces life expectancy with an increased likelihood of engaging in future defense. *Behav Ecol Sociobiol.* 72, 123. doi: 10.1007/s00265-018-2545-z
251. YRUELA, I. (2009): Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct. Plant Biol.* 36, 5, 409-430. doi: 10.1071/FP08288
252. ZAFEIRAKI, E., R. SABO, K. M. KASIOTIS, K. MACHERA, L. SABOVÁ, T. MAJCHRÁK (2022): Adult honeybees and beeswax as indicators of trace elements pollution in a vulnerable environment: distribution among different apicultural compartments. *Molecules*, 27, 19, 6629-6654. doi: 10.3390/molecules27196629



253. ZAGHLOUL, A., M. SABER, S. GADOW, F. AWAD (2020): Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. Bull Nati Res Cent. 44, 127, 1-11. doi: 10.1186/s42269-020-00385-x
254. ZARIC, N. M., I. V. DELJANIN, K. ILIJEVIĆ, LJ. STANISAVLJEVIĆ, M. RISTIĆ, I. GRZETIĆ (2018a): Assessment of spatial and temporal variations in trace element concentrations using honeybees (*Apis mellifera*) as bioindicators. Peer J. 6:e5197. doi: 10.7717/peerj.5197
255. ZARIC, N. M., I. V. DELJANIN, K. ILIJEVIĆ, LJ. STANISAVLJEVIĆ, M. RISTIĆ, I. GRZETIĆ (2018b): Honeybees as sentinels of lead pollution: spatio-temporal variations and source appointment using stable isotopes and Kohonen self-organizing maps. Sci. Total. Environ. 642, 56–62. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.06.040
256. ZARIC, N. M., K. ILIJEVIĆ, LJ. STANISAVLJEVIĆ, I. GRZETIĆ (2016): Metal concentrations around thermal power plants, rural and urban areas using honeybees (*Apis mellifera* L.) as bioindicators. Int. J. Environ. Sci. Technol. 13, 2, 413-422. doi: 10.1007/s13762-015-0895-x

## 9. PRILOZI

### POPIS SLIKA I TABLICA

Slika 1. Članovi pčelinje zajednice, leglo i hrana u stanicama saća.

Slika 2. Matica medonosne pčele (*A. mellifera*).

Slika 3. Radilice i trut na saću.

Slika 4. Dvodimenzionalni model stanice saća oblika pravilnog šesterokuta.

Slika 5. Radilačke stanice saća ispunjene savijenim pčelinjim ličinkama.

Slika 6. Voštani poklopci karakterističnog izgleda iznad radiličkog i trutovskog legla.

Slika 7. Vijenac zrelog, voštanim poklopcima pokrivenog meda oko pčelinjeg legla.

Slika 8. Voštani poklopci sa stanica saća skinuti neposredno prije vrcanja meda.

Slika 9. Čelični spremnik za preradu voska.

Slika 10. Blokovi voska pripremljeni za transport u radnju za preradu voska u satne osnove.

Slika 11. Završna faza izrade satnih osnova tehnikom lijevanja.

Slika 12. Izrađene satne osnove izrezane na veličinu okvira u koji će se užičavati.

Slika 13. Prikupljeni uzorci voska.

Slika 14. Prikaz uzorkovanja otopljenog voska iz površinskog i srednjeg sloja (R1, R2), te dna spremnika (R3, R4) tijekom prerade voska u satne osnove metodom produljenog hlađenja i taloženja.

Slika 15. Ultra WAVE ECR mikrovalna pećnica.

Slika 16. Uređaj ICP-MS Agilent system Model 7900.

Slika 17. Prikaz parametara podešenih na sučelju uređaja pri analiziranju uzoraka voska.

Slika 18. Uređaj za analiziranje uzoraka na prisutnost i kvantifikaciju žive AMA – 254.

Slika 19. Usporedni prikaz kretanja utvrđenih koncentracija As, Hg, Cd i Se tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.

Slika 20. Usporedni prikaz utvrđenih koncentracija Pb, Cr, Ni, Mn i Ba tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.

Slika 21. Usporedni prikaz utvrđenih koncentracija Ag, Co, V i Mo tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.

Slika 22. Usporedni prikaz utvrđenih koncentracija Zn, Fe i Cu tijekom prve (I) i druge (II) faze prerade voska.

Tablica 1. Primjena pčelinjeg voska za različite kategorije proizvoda.

Tablica 2. Program razgradnje uzoraka voska u mikrovalnoj pećnici.

Tablica 3. Program čišćenja teflonskih posudica nakon pripreme uzoraka voska u mikrovalnoj pećnici.

Tablica 4. Prikaz definicija pojmova i /ili izraza korištenih u laboratorijskom protokolu za tehniku induktivno spregnute plazme s masenom spektrometrijom.

Tablica 5. Mješavine otopina standarda pojedinih elemenata.

Tablica 6. Priprema radnih standarda.

Tablica 7. Uvjeti rada uređaja ICP-MS (Agilent ICP-MS system Model 7900) pri analiziranju uzoraka voska.

Tablica 8. Priprema otopina Tune-a i P/A faktora.

Tablica 9. Prikaz postavki instrumenta za parametre mjerenja koncentracija analita.

Tablica 10. Uvjeti rada uređaja za određivanja koncentracija žive.

Tablica 11. Sažetak kontrole kvalitete pretraživanja uzoraka.

Tablica 12. Koncentracije As, Cd, Cr, Hg, Ni i Pb utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom prve faze njegove prerade.

Tablica 13. Koncentracije Co, Cu, Fe, Mn, Se i Zn utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom prve faze njegove prerade.

Tablica 14. Koncentracije Ag, Ba, Mo i V utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom prve faze njegove prerade.

Tablica 15. Koncentracije As, Cd, Cr, Hg, Ni i Pb utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom druge faze njegove prerade.

Tablica 16. Koncentracije Co, Cu, Fe, Mn, Se i Zn utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom druge faze njegove prerade.

Tablica 17. Koncentracije Ag, Ba, Mo, i V utvrđene u slojevima otopljenog voska tijekom druge faze njegove prerade.

Tablica 18. Statistički značajne razlike između koncentracija elemenata za iste slojeve uzorkovane 1. dana (I) i 7. dana (II).

## 10. ŽIVOTOPIS

Marina Kosanović, dr. med. vet. rođena je 10. studenog 1980. godine u Zagrebu. Osnovnu školu Krunoslava Kutena završila je 1995., a opću gimnaziju u Srednjoj školi Vrbovec 1999. godine u Vrbovcu. Iste je godine upisala Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Budući da se njezini roditelji bave pčelarstvom, tijekom studija zainteresirala se za tu granu veterinarske medicine. Pod mentorstvom prof. dr. sc. Željke Matašin 2008. godine napisala je studentski rad *Teški metali u medu različitog botaničkog podrijetla*. Godine 2010. obranila je diplomski rad pod naslovom *Zdravstveni nadzor zečeva (*Lepus europaeus* Pall.) u kaveznom tipu uzgoja*. Iste je godine odradila pripravnički staž u Veterinarskoj stanici Vrbovec, gdje i danas radi, kao ovlaštenu veterinar u kontrolnom tijelu. Godine 2014. upisala je poslijediplomski doktorski studij *Veterinarske znanosti*, a 2021. godine obranila je temu doktorskog rada.

### STRUČNO USAVRŠAVANJE I EDUKACIJE

1. Regionalna konferencija o pčelarstvu: *Utjecaj klimatskih promjena na sektor pčelarstva u regiji i mogući odgovori*, 25. – 26. veljače 2022., Banja Luka, Republika Srpska.
2. Tečaj *Biosigurnosne mjere na pčelinjaku*, 26. rujna 2022., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
3. Tečaj *Postavljanje sumnje na bolesti pčela i uzorkovanje na pčelinjaku*, 2. prosinca 2020., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
4. Radionica *Afrička svinjska kuga u divljih svinja – osnove i mjere sprječavanja*, 2020., Lovište Črnovšćak, Prečec, Hrvatska.
5. Radionica *Velutina Task Force*, 28. – 29. lipnja 2018., Bilbao, Španjolska.
6. Druga hrvatska radionica o trihinelozu, 26. siječnja 2017., Vinkovci, Hrvatska.

7. Second International Scientific and Expert Conference *Natural resources, green technology and sustainable development/2*, 5. – 7. listopada 2016., Zagreb, Hrvatska.
8. *American Beekeeping Federation Conference and Tradeshow*, 5. – 9. siječnja 2016., Ponte Vedra Beach (Jacksonville) Florida, SAD.
9. *Recognizing of honeybee diseases controlled according legislation terms*, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2. listopada 2015., Zagreb, Hrvatska.
10. Međunarodni kongres *Veterinarska znanost i struka*, 1. – 2. listopada 2015., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
11. *Ante i post mortem pregled goveda i svinja*, 2015., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
12. *44<sup>th</sup> Apimondia – International Apicultural Congress*, 15. – 19. rujna 2015., Daejeon, Južna Koreja.
13. *Međulaboratorijska usporedba u dijagnosticiranju trihineloze metodom umjetne probave*, Hrvatski veterinarski zavod Vinkovci, 2015., Vinkovci, Hrvatska.
14. *6<sup>th</sup> European Conference of Apidology*, 2014., Murcia, Španjolska.
15. *Program osposobljavanja veterinarâ za pretragu na prisutnost oblića iz roda Trichinella u mesu prema odredbama Pravilnika o načinu obavljanja pretrage na prisutnost Trichinella u mesu (NN 62/08, 74/08, 102/08, 78/12)*, 4. lipnja 2013., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
16. Sedma konferencija *Prevention of Honeybee Colony Losses*, 2011., Beograd, Srbija.
17. *Četvrta Europska konferencija o pčelarstvu METU*, 7. – 9. rujna 2010., Ankara, Turska.
18. 6. konferencija *Prevention of Honeybee Colony Losses*, 2010., Ankara, Turska.
19. 3. Europska konferencija o pčelarstvu *EurBee*, 2008., Belfast, Irska.
20. Prvi kongres studenata veterinarske medicine, 14. – 19. lipnja 2005., Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

## POPIS RADOVA

### Izvorni znanstveni i pregledni radovi

1. 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. doi.org/10.1007/s00128-019-02713-y
2. KOSANOVIĆ, M., N. BILANDŽIĆ, M. SEDAK, S. KOS, I. TLAK GAJGER (2019): Koncentracije arsena, kadmija i žive u pčelinjem vosku (*Apis mellifera*) tijekom njegove prerade iz saća u satne osnove. *Vet. stn.* 50, 1, 19-25.
3. BILANDŽIĆ, N., I. TLAK GAJGER, M. KOSANOVIĆ, B. ČALOPEK, M. SEDAK, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, I. VARENINA, Đ. BOŽIĆ LUBURIĆA, I. VARGA, M. ĐOKIĆ (2017): Essential and toxic element concentrations in monofloral honeys from southern Croatia. *Food chem.* 234, 245-253.
4. TLAK GAJGER, I., I. BOSEK, N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ (2016): Utjecaj neonikotinoida na kukce oprašivače. *Vet. stn.* 47, 4, 353-363.
5. 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

### Sažeci u zbornicima skupova

1. TLAK GAJGER, I., V. OREŠČANIN, M. KOSANOVIĆ, N. BILANDŽIĆ (2017): Trace metal concentrations in “bee bread” originated from continental Croatia. *Book of abstracts 24<sup>th</sup> International conference Krmiva 2017*, 31. svibnja – 2. lipnja 2017., Opatija, Croatia, 101-101.
2. TLAK GAJGER, I., N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ, M. SEDAK, B. ČALOPEK (2016): Concentrations of mercury during honeybee wax procession. *Natural resources green technology & sustainable development/2 – Book of Abstracts, RADOJČIĆ*

REDOVNIKOVIĆ, I., K. RADOŠEVIĆ, T. JAKOVLJEVIĆ, R. STOJAKOVIĆ, V. GAURINA SRČEK, D. ERDEC HENDRIH (ur.). Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Zagreb, 68-68.

3. TLAK GAJGER, I., N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ, M. SEDAK (2015): Effect of honeybee wax processing on toxic metal content. Book of abstracts 44<sup>th</sup> Apimondia International Apicultural Congress, 15.-19. September 2015., Daejeon, Korea, 257.
4. JURAS, M., S. ŠPIČIĆ, D. ŽUŽUL, I. BADOVINAC, A. VALUŠEK, M. KOSANOVIĆ (2015): Occurrence of tuberculosis in cattle slaughtered in Croatian abattoir. Book of Abstracts of The 6<sup>th</sup> International congress "Veterinary science and profession", HORVATEK TOMIĆ, D., K. SEVERIN, A. SLAVICA (ur.). Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb, Zagreb, 88-88.
5. TLAK GAJGER, I., N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ, M. SEDAK (2014): Impact of honeybee casting comb foundations production on lead concentrations. Book of abstracts Natural resources green technology and sustainable development, CVJETKO BUBALO, M., I. RADOJEVIĆ REDOVNIKOVIĆ, M. VUKOVIĆ, D. ERDEC HENDRIH. (ur.). Faculty of Food Tehnology and Biotehnology, Zagreb, 69-69.

#### Diplomski rad

1. KOSANOVIĆ, M. (2010): Zdravstveni nadzor zečeva (*Lepus europaeus* Pall.) u kaveznom tipu uzgoja / diplomski rad. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.