

Analiza koncentracije metala u drvnoj biomasi

Krajnik, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:262071>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Martina Krajnik

6645/BT

ANALIZA KONCENTRACIJE METALA U DRVNOJ BIOMASI

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 3

Mentor: prof. dr. sc. Tonči Rezić

Zagreb, 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

**Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju
slada i piva**

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Analiza koncentracije metala u drvnoj biomasi

Martina Krajnik, 0058202516

Sažetak: U ovom istraživanju analizirana je koncentracija teških metala (bakra, željeza i mangana) na drvnoj biomasi topole i smreke prije i nakon površinskog uzgoja micelija gljiva *Formitopsis pinicola* i *Phanerochaete chrysosporium*. Analiza metala provedena je korištenjem optičke emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Rezultati analize pokazali su utjecaj rasta micelija na promjenu koncentracije iona metala (željeza, bakra i mangana) na površini drva smreke i topole. Također, u radu su opisani razvoj i validacija ICP-OES metode mjerenja koncentracije metala željeza, bakra i mangana u supernatantima dobivenim ispiranjem površine drva prije i nakon uzgoja micelija gljiva *F. pinicola* i *P. chrysosporium*.

Ključne riječi: drvna biomasa, *Formitopsis pinicola*, ICP-OES spektrometar, *Phanerochaete chrysosporium*, teški metali

Rad sadrži: 26 stranica, 16 slika, 3 tablice, 28 literaturnih navoda, 5 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Tonči Rezić

Pomoć pri izradi: dr. sc. Marija Trkmić (Centralno kemijsko-tehnološki laboratorij HEP-Proizvodnja d.o.o.)

Datum obrane: 17. prosinca 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Biotechnology

Department of biochemical engineering

Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Malting and Brewing Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Analysis of metal concentration in wood biomass

Martina Krajnik, 0058202516

Abstract: In this study, the concentration of heavy metals (copper, iron, and manganese) on the wood biomass of poplar and spruce was analyzed before and after surface cultivation of mycelium of the fungi *Formitopsis pinicola* and *Phanerochaete chrysosporium*. Metal analysis was performed using inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES). The results of the analysis showed the influence of mycelium growth on the change concentration of metal ions (iron, copper and manganese) on the surface of spruce and poplar wood. Also, the thesis describe the development and validation of the ICP-OES method of measuring the concentration of iron, copper and manganese metals in supernatants obtained by washing the surface of the wood before and after growing the mycelium of the fungus *F. pinicola* and *P. chrysosporium*.

Keywords: wood biomass, *Formitopsis pinicola*, ICP-OES spectrometer, *Phanerochaete chrysosporium*, heavy metals

Thesis contains: 26 pages, 16 figures, 3 tables, 28 references, 5 supplements

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Tonči Rezić

Technical support and assistance: dr. sc. Marija Trkmić (Central Chemical and Technological Laboratory HEP-Proizvodnja d.o.o.)

Defence date: December 17th 2019

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. DRVNA BIOMASA	2
2.1.1. Topola (<i>Populus</i>)	3
2.1.2. Smreka (<i>Picea</i>).....	3
2.1.3. Metode predobrade lignoceluloznih sirovina	4
2.2. GLJIVE	4
2.2.1. Teški metali – toksičnost i tolerancija	5
2.2.2. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	6
2.2.3. <i>Formitopsis pinicola</i>	7
2.3. METODE ANALIZE TEŠKIH METALA	8
2.3.1. ICP-OES	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. ZADATAK	12
3.2. MATERIJALI	12
3.2.1. Drvna biomasa	12
3.2.2. Mikroorganizam	12
3.2.3. Kemikalije	13
3.3. UREĐAJ	13
3.4. ICP-OES METODA	16
3.4.1. Priprema standarda za kalibraciju	16
3.4.2. Priprema uzorka	16
3.4.3. Analiza uzoraka	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. ANALIZA REZULTATA	20
4.1.1. Analiza koncentracija iona bakra nakon rasta micelija <i>P. chrysosporium</i> i <i>F. pinicola</i> na drvu smreke i topole	20
4.1.2. Analiza koncentracija iona željeza nakon rasta micelija <i>P. chrysosporium</i> i <i>F. pinicola</i> na drvu smreke i topole	21
4.1.3. Analiza koncentracija iona mangana nakon rasta micelija <i>P. chrysosporium</i> i <i>F. pinicola</i> na drvu smreke i topole	22
5. ZAKLJUČAK	23
6. LITERATURA	24

1. UVOD

Biorazgradnja lignocelulozne biomase važan je proces za kruženje ugljika u prirodi. Lignoceluloza je makromolekularni kompleks koji se sastoji od lignina, celuloze i hemiceluloze. Fizikalno-kemijska svojstva vezana uz kompleksnu strukturu lignocelulozne biomase čine biomasu otpornom na razgradnju (Kumar i sur., 2006). Stoga je proveden veliki broj istraživanja s ciljem da se istraže mehanizmi biološke razgradnje lignoceluloznih sirovina. U ovim istraživanjima korišteni su mikroorganizmi i gljiva smeđeg i bijelog truljenja sa sposobnošću biorazgradnje lignina, hemiceluloze i celuloze (Pérez i sur., 2002). Gljive bijelog truljenja privukle su posebnu pozornost zbog njihove sposobnosti razgradnje lignina (Hatakka, 2001). *Phanerochaete chrysosporium* istraživane su zbog sposobnosti učinkovite razgradnje lignina korištenjem lignolitčkih enzima (Yu i sur., 2009). Aktivnost lignolitčkih enzima tijekom rasta micelija i razgradnje lignocelulozne biomase ovisi o koncentraciji metala. Stoga, teški metali utječu na mikrobnu reprodukciju i uzrokuju morfološke i fiziološke promjene (Pagès i sur., 2007), te posredno utječu na biorazgradnju biljnih ostataka. Međutim, nedostatak teških metala može stvarati problem enzimima gljiva zbog složenosti reakcija i metaboličkih procesa u kojima su potrebni (Tuomela i sur., 2005). Prethodna su istraživanja bila usredotočena na odgovor gljiva na esencijalne metale, poput bakra i cinka, te su interakcije metala s gljivama bijelog truljenja privukle pozornost (Iqbal i Edyvean, 2004). Pokazalo se da gljive mogu rasti uz nižu koncentraciju metala, razgrađujući lignoceluloznu biomasu (Zenet i sur., 2007). Međutim, nedostatak teških metala negativno utječe na rast micelija i usporava metaboličke procesa tijekom rasta gljiva i razgradnje biomase (Tuomela i sur., 2005). Tijekom prethodnih istraživanja istražen je utjecaj koncentracije iona metala bakra i cinka na rast micelija gljiva bijelog truljenja, te je istražena bioakumulacijska sposobnost imobiliziranih stanica micelija *Phanerochaete chrysosporium* (Iqbal i Edyvean, 2004). Pokazalo se da gljive mogu rasti uz nižu koncentraciju metala, razgrađujući lignoceluloznu biomasu i akumulirajući metale cinka i bakra u biomasu micelija (Zenet i sur., 2007). Međutim, učinci teških metala na rast micelija i aktivnost lignocelulolitičkih enzima još uvijek nisu istraženi. Stoga je potrebno provesti dodatna istraživanja vezana uz mehanizme vezanja metala i korištenje metala, osobito tijekom rasta micelija gljiva na lignoceluloznoj biomasu „in situ“. Također potrebno je odrediti utjecaj metala na aktivnost enzima i efikasnost razgradnje biomase. Da bi se mogle pratiti promjene koncentracije metala tijekom rasta micelija gljiva na lignoceluloznoj biomasu „in situ“ potrebno je razviti pouzdanu analitičku metodu za mjerenje koncentracije metala.

U ovom istraživanju odabrane su dvije vrste micelija gljiva *P. chrysosporium* i *F. pinicola*. *P. chrysosporium* pripada gljivama bijelog truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više lignolitičkih enzima i razgrađuje lignin. *F. pinicola* pripada gljivama smeđeg truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više celulozičkih enzima i razgrađuje celulozu i hemicelulozu. Uzgoj i rast micelija proveden je na dva različita drva smreke i topole. Smreka je odabrana kao mekše drvo, a topola kao tvrđe drvo. Cilj je utvrditi utjecaj rasta micelija na promjenu koncentracije iona metala (željeza, bakra i mangana) u supernatantima prije i nakon uzgoja gljiva na odabranim uzorcima drva smreke i topole. Također u radu su opisani razvoj i validacija metode mjerenja koncentracije metala u supernatantima korištenjem metode induktivno spregnute plazme s optičko emisijskom spektroskopijom (ICP OES).

2. TEORIJSKI DIO

2.1. DRVNA BIOMASA

Drvena biomasa je organska tvar nastala u šumskom ekosustavu ili nusproizvod poljoprivredne i drvne industrije. Može se koristiti kao jeftin izvor ugljika za rast mikroorganizama. Smatra se obnovljivim izvorom energije s najviše potencijala zbog široke rasprostranjenosti i mogućnosti proizvodnje energije (bioetanol, bioplin, električnu i toplinsku energiju) bez obzira na vremenske uvijete (za razliku od ostalih obnovljivih izvora energije: vjetra, vode i Sunca). Sastoji se od makromolekularnih tvari stanične stijenke (celuloza, hemiceluloza i lignin), te mineralnih tvari, organskih tvari topljivih u vodi i anorganskih tvari.

Elementarni sastav biomase sastavljen je iz elemenata ugljika (C), vodika (H) i kisika (O), s obzirom da se rast stabla odvija pod kontrolom reakcije fotosinteze (proizvodnja različitih ugljikohidrata iz ugljikovog dioksida i vode uz prisutnost klorofila i Sunčevog svjetla). U elementarni sastav drveta ulazi i dušik (N), no on se često ne računa zbog relativno malog udjela (ovisno o vrsti drveta varira između 0,10 i 0,17 %). Odnos ostalih anorganskih tvari ovisi o vrsti drveta, starosti, zdravstvenom stanju, geografskom području rasta drveta, okolišnom zagađenju, te se određuju iz pepela. Glavni sastojci su kalij, kalcij, magnezij, natrij, aluminij i željezo, dok se mangan, olovo, cink, bakar, kobalt, nikal nalaze u tragovima.

S obzirom da drvena biomasa pripada lignoceluloznim sirovinama, sastoji se od dva ugljikohidratna polimera, celuloze i hemiceluloze te fenolnog polimera koji ne sadrži ugljikohidrate, lignina. Lignin se veže za celulozna vlakna kako bi se očvrstio i ojačao

stanični zid. Celuloza je glavni strukturni polisaharid primarne stanične stijenke biljke, a izgrađena je od D-glikozidnih jedinica, povezanih β (1,4) vezom. Hemiceluloza je uklopljena u staničnu stijenku, tako što veže celulozna vlakna kako bi se ojačala stanična stijenka. Za razliku od celuloze, hemiceluloza ima nasumičnu i amorfnu strukturu, koja se sastoji od nekoliko heteropolimera uključujući ksilan, glukuronoksilan, arabinoksilan, glukomanan i ksiloglukan (Panda, 2015).

Prije upotrebe biomase potrebno je analizirati njen sastav, odnosno prekontrolirati kvalitetu sirovine. Kada se biomasa koristi kao supstrat za uzgoj mikroorganizama, potrebno je dodati hranjive tvari koje nedostaju (najčešće spojevi s dušikom i fosforom).

Za korištenje drvne biomase u proizvodnji biogoriva potrebno je izvršiti predobradu sirovine kako bi joj se promjenio sastav i struktura. Cilj je postići efikasniju enzimsku hidrolizu, bržu fermentaciju bez inhibicije, smanjenje energetske troškova za miješanje i izdvajanje proizvoda te smanjenje troškova zbrinjavanja otpada.

2.1.1. Topola (*Populus*)

Topola (*Populus*) je rod listopadnih stabala (bjelogorice) iz porodice vrba (*Salicaceae*). Rasprostranjena je u Europi, Aziji te dijelovima Sjeverne Amerike i Afrike. Raste na vlažnom tlu uz rijeke i jezera te je prirodno stanište za gljive bukovače (*Pleurotus ostreatus*) i shiitake (*Lentinula edodes*). Za rast joj je, također, potrebno puno Sunca (ne podnosi sjenovita područja) te dobro drenirano, bogato tlo.

Topola sadrži 47,4 % celuloze, 22,5 % lignina, 25,3 % hemiceluloze, 4,0 % mineralnih i organskih tvari, te 0,8 % anorganskih tvari. Elementarni sastav čini 49,7 % ugljika, 6,3 % vodika i 44,0 % kisika.¹ Prosječan sastav elemenata važnih za ovaj rad su: 10 – 100 ppm mangana i željeza, te 1 – 10 ppm bakra (Žeger, 2012).

2.1.2. Smreka (*Picea*)

Smreka (*Picea*) je zimzeleno stablo iz porodice borovki (*Pinaceae*). Rasprostranjena je u sjevernoj Europi te na brdskim i planinskim područjima srednje i južne Europe. Raste na

¹ Navedeni podaci o kemijskom sastavu drveta samo su orijentacijske vrijednosti jer je drvo po sastavu heterogeno. Sastav drveta ovisi o klimatskim uvjetima rasta, o dijelu stabla s kojeg smo uzeli uzorak te kojim se analitičkim postupkom dotični spoj određivao.

svježem, rahlom, humusnom i kiselom tlu te dobro podnosi zasjenu, hladne temperature i sušu.

Smreka sadrži 46,0 % suhe tvari celuloze, 30,0 % lignina, 20,0 % hemiceluloze, 3,3 % organskih tvari, te 0,7 % anorganskih (mineralnih) tvari. Elementarni sastav čini 49,6 % ugljika, 6,4 % vodika i 44,0 % kisika.¹ Prosječan sastav elemenata važnih za ovaj rad su: 10 – 100 ppm mangana i željeza, te 1 – 10 ppm bakra (Žeger, 2012).

2.1.3. Metode predobrade lignoceluloznih sirovina

Fizikalna predobrada lignoceluloznih sirovina (mljevenje i zračenje) osigurava povećanje površine i pora sirovine, smanjuje kristaličnost celuloze i djelomično ili potpuno hidrolizira hemicelulozu. Nedostaci ove metode su veliki utrošak energije i slabo uklanjanje lignina.

Kemijska predobrada lignoceluloznih sirovina osigurava povećanje površine i pora sirovine, djelomično uklanjanje lignina (delignifikaciju), smanjenje stupnja polimerizacije, djelomičnu ili potpunu hidrolizu hemiceluloze. Pri tome se koriste kiseline (kloridna, fosfatna i sulfatna), lužine (amonijak i natrijev hidroksid), organska otapala, ionske tekućine i ozonoliza. Nedostaci ove metode su: korištenje agresivnih kemikalija, te potreba za njihovim zbrinjavanjem, kao i procesna oprema otporna na djelovanje kemikalije, što povećava kapitalne i operativne troškove. Prednost metode je efikasnost.

Fizikalno – kemijska predobrada lignoceluloznih sirovina ima iste učinke kao i kemijska predobrada.

Biološka predobrada lignoceluloznih sirovina osigurava delignifikaciju, djelomičnu hidrolizu celuloze i smanjenje stupnja polimerizacije. Pri tome se koriste saprofitne gljive (*Phanerochaeta chrysosporium*, *Ceriporia lacerata*, *Cyathustercolerus*) i enzimske metode. Prednosti ovog načina predobrade su: mali utrošak energije, efikasna hidroliza celuloze te je nepotrebno korištenje agresivnih kemikalija (Vaishaly i sur., 2015).

2.2. GLJIVE (*Fungi*)

Gljive spadaju u najrasprostranjenije žive organizme na Zemlji. Uključuju kvasce i plijesni te skupinu makroskopskih organizama. Mikologija je znanost koja se bavi

proučavanjem gljiva, no kako su one izrazito biokemijski aktivne, značajne su i u biotehnologiji, odnosno u proizvodnji piva, vina, fermentiranih mliječnih proizvoda i antibiotika. Iskorištavaju ugljikohidrate i dušične spojeve za sintezu njihovih vlastitih aminokiselina i enzima, te mogu izlučivati hidrolitičke enzime, koji razgrađuju supstrate prisutne u okolišu, a zatim otopljene hranjive tvari apsorbiraju. Većinom rastu na blago kiselim supstratima te na vlažnim i tamnim mjestima. Mogu se razmnožavati spolno i nespolno, a karakterizira ih postojanje micelija, vegetativne tubularne strukture sastavljene od mnoštva hifa.

Manji broj gljiva ima sposobnost razgradnje drveta. Nazivaju se gljive truležnice, te se dijele u tri skupine: gljive mekog truljenja, gljive smeđeg truljenja i gljive bijelog truljenja. Imaju važnu ulogu u procesu kruženja tvari u prirodi te mogu razgraditi drvenu biomasu do CO₂, H₂O i minerala.

2.2.1. Teški metali – toksičnost i tolerancija

Teški metali su sastavni dijelovi toksičnih spojeva koji se u okoliš ispuštaju većinom iz razvojne industrije i prometa. Zatim prelaze na biljke i ulaze u hranu, što direktno utječe na zdravlje čovjeka.

Gljive su poznati metalni akumulatori: metali su vezani za vanjski sloj micelija. Vrste koje rastu na drvnoj biomasi sadrže manju koncentraciju teških metala od onih koje rastu na zemlji (Baldrian i sur., 1999).

Neki metali, kao što su magnezij, kalij, kalcij i natrij, potrebni su za normalan rad stanica. Dok su bakar, željezo, mangan, kobalt, molibden i cink potrebni u malim količinama kao katalizatori enzimske aktivnosti (Adepoju-Bello i sur., 2009). Za rast stanica potrebni su Zn, Cu, Mn, Ni i Co (Marschner, 1995). Povišenje koncentracija teških metala od svega nekoliko puta, postaje toksično za gljivu (Zaidi i sur., 2011). Gljive bijelog truljenja se moraju nositi s otrovnim koncentracijama metala na tlu na kojem rastu. Vrste koje rastu na drvnoj biomasi sadrže manju koncentraciju teških metala od onih koje rastu na zemlji. Koncentracija teških metala u gljivama pokazuje stvarno stanje okolišnog zagađenja, tako da ih se smatra bioindikatorima (Baldrian i sur., 1999).

2.2.2. *Phanerochaete chrysosporium*

Phanerochaete chrysosporium gljiva je bijelog truljenja (Slika 1). Može se pronaći u Sjevernoj Americi, dijelovima Europe i Iranu, zbog svoje optimalne temperature od 40 °C. Ova visoka temperatura omogućuje joj rast na kompostnim hrpama drveta.

Njena najvažnija uloga je razgradnja lignina iz različitih drveća i drugih biljaka čime pomaže kruženju tvari u prirodi kao jedan od razgrađivača (Slika 2). Lignin razgrađuje pomoću lignolitičkih enzima, koje izlučuje u sekundarnoj fazi metabolizma, a to su: lignin peroksidaza i mangan peroksidaza (pripadaju skupini peroksidaza koje sadrže željezo) te lakaza (pripada skupini oksidoreduktaza). Osim željeza, u degradaciji lignina direktno sudjeluju i bakar i mangan. Mn je potreban u ciklusu mangan ovisne peroksidaze, a Cu služi kao kofaktor katalitičkom centru lakaze (Panda, 2015). Lakaze kataliziraju oksidaciju širokog raspona fenolnih spojeva uz redukciju molekularnog kisika u vodu. Gljive upotrebljavaju lakazu za razgradnju lignina, obranu od stresa i detoksifikaciju (Wellington, 2012).



Slika 1. *Phanerochaete chrysosporium*



Slika 2. Degradacija drvne biomase pomoću gljive *Phanerochaete chrysosporium*

2.2.3. *Formitopsis pinicola*

Formitopsis pinicola gljiva je smeđeg truljenja. Najčešće raste na crnogoričnom drveću (rjeđe na bjelogorici). Ponaša se kao saprofit na već mrtvim stajaćim stablima, polegnutim deblima i panjevima. No, može i parazitirati na još živim stablima uzrokujući njihovo propadanje. Sudjeluje u razgradnji celuloze i hemiceluloze, pomoću egzocelularnog enzima celobiohidrolaze. Egzocelularna celobiohidrolaza cijepa celobiozni dimer s nereducirajućeg kraja kristalične molekule celuloze te nastaje celobioza (Badrian i sur., 1999).



Slika 3. *Formitopsis pinicola*



Slika 4. Rezultat djelovanja gljive *Formitopsis pinicola* (degradirano drvo)

2.3. METODE ANALIZE TEŠKIH METALA

Sve analitičke metode imaju određene prednosti i nedostatke, te se prije analize treba odrediti opravdanost odabrane metode s obzirom na cijenu i potrebnu preciznost.

Kromatografija je analitička metoda za razdvajanje smjese. Ona uključuje kretanje ispitivane smjese, otopljene u mobilnoj fazi, kroz stacionarnu fazu, čime se dijelovi smjese razdvajaju i izoliraju, te ih je moguće analizirati i kvantitativno odrediti. Vrste kromatografija su: ionska kromatografija, adsorpcijska kromatografija, gel-kromatografija, afinitetna kromatografija, tekućinska kromatografija.

Ionska kromatografija (ili kromatografija ionske izmjene; eng. Ion Chromatography - IC) je kromatografija koja razdvaja iona i polarne molekule na temelju njihovog afiniteta prema ionskom izmjenjivaču. Radi na gotovo bilo kojoj vrsti nabijenih molekula - uključujući velike proteine, male nukleotide i aminokiseline. Dvije vrste ionske kromatografije su anionska izmjena i kationska izmjena. Često se upotrebljava u pročišćavanju proteina, analizi vode i kontroli kvalitete. Molekule koje su topljive i nabijene u vodi, kao što su proteini, aminokiseline i peptidi, vežu se na dijelove koji su suprotno nabijeni stvaranjem ionskih veza na netopljivu stacionarnu fazu. Ravnotežna stacionarna faza sastoji se od ionizirane funkcionalne skupine na koju se ciljane molekule iz smjese koja se odvajaju i kvantificira mogu vezati dok prolaze kroz kolonu - kationska stacionarna faza se koristi za odvajanje aniona i anionska stacionarna faza se koristi za odvajanje kationa. Zatim se vezane molekule mogu eluirati i sakupljati koristeći eluens koji sadrži anione i katione, dodavajući višu koncentraciju iona kroz kolonu ili promjenom pH kolone (Small, 1989). Tijekom primjene ionske kromatografije kod analize metala, u smjesu za analizu dodaju se kompleksirajuća sredstva poput citrata kako bi pojačala kemijsku razliku među analiziranim metalnim ionima (Tompkins i Mayer, 1947).

Adsorpcijska kromatografija temelji se na mehanizmu vezanja otopljenih tvari na površinu adsorbensa Van der Waalsovih silama i steričkim interakcijama (vezanje nisko polarnih tvari). Razdvajanje ovisi o uspostavljenoj ravnoteži između čvrste stacionarne faze i mobilne tekuće faze te relativne topljivosti tvari u mobilnoj fazi. Konkurencija između otopljenih tvari i otapala za vezanje na adsorbens uspostavlja dinamičan proces u kojem otopljena tvar i otapalo kontinuirano dolaze u kontakt s površinom adsorbensa. Molekule s većim afinitetom za adsorbens selektivno zaostaju (Khopkar, 2004). Pri čemu se javljaju problemi zbog ireverzibilnog vezanja polarnijih molekula enzima te slabih mehaničkih svojstava adsorbensa. Adsorpcijska kromatografija primjenjuje se i za analizu metala. Prije

same analize treba pripremiti smjesu stvaranjem kelatnih kompleksa s metalima. Na taj način možemo odvojiti grupe metala iz smjese te naknadnom kromatografijom ih razdvojiti i odrediti. No moguće je i selektivno određivanje metala i metala u tragovima (Timerbaev i sur., 1987).

Gel-kromatografija - mehanizam se temelji na separaciji molekula iz otopine na osnovi veličine tj. molekulske mase, odnosno sposobnosti penetracije otopljenih molekula u pore polimerne čvrste faze u kromatografskoj koloni (difuzija). Punila u koloni (nosači) su točno definiranih veličina pora. Manje molekule se duže zadržavaju u koloni, stoga se prvo eluiraju veće molekule. Elucija se provodi promjenom pH i ionske jakosti otopine. Prije analize metala potrebno je u smjesu dodati acetalacetone kako bi se vezao s metalnim spojevima te tvorilo kelatne komplekse. Zatim se tako pripremljen uzorak propušta kroz kolonu punjenu umreženim polivinil acetatom (gel) (Saitoh i Suzuki, 1977).

Afinitetna kromatografija je visoko specifična kromatografija, razvijena iz gel kromatografije. Na nosač se kovalentnom vezom vežu ligandi specifični za određeni enzim (supstrat, inhibitor enzima, kofaktor, antitijelo, specifične reaktivne boje). Na ligand strogo specifično se veže enzim ili grupa enzima uz visoki stupanj pročišćavanja ili razdvajanja. Elucija se vrši promjenom pH, temperature ili ionske jakosti otopine (Khopkar, 2004). Ova analiza koristi se i za određivanje metala, s obzirom na mogućnost stvaranja kelatnih kompleksa metalnih iona s ligandom (Gaberč-Porekar i sur., 2001)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. High performance liquid chromatography - HPLC) ili tekućinska kromatografija pod visokim tlakom (eng. High pressure liquid chromatography - HPLC) je oblik kromatografije na stupcu, a koristi se za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu. Uzorci prolaze kroz stupac (cijev punjenu materijalom sačinjenim od sitnih čestica, a time i velike površine) pumpanjem tekućine (mobilne faze) pod visokim tlakom kroz sam stupac. Unosi se mali volumen uzorka u tok mobilne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenta smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Vrijeme u kojem se tvar eluira (retencijsko vrijeme) karakteristično je za određenu tvar (Khopkar, 2004). Za detekciju metala koriste se kinetički inertni i termodinamički metalni kompleksi s polisaharidima (Szpumar i sur, 1999).

UV/VIS (eng. UltraViolet-VISible) spektroskopija je spektroskopija koja upotrebljava vidljivu svjetlost i ultraljubičasto zračenje za pobuđivanje elektrona unutar atoma, molekula,

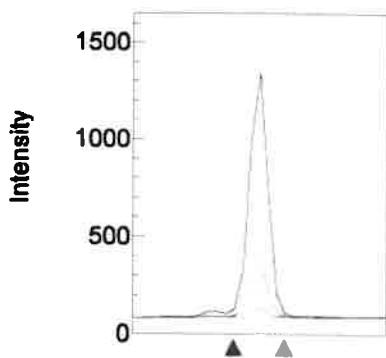
kristalnih tvari ili amorfni tvari. Spektroskopijom vidljivog zračenja se proučavaju efekti prouzrokovani promjenom elektronske strukture atoma ili molekula te njihova elektronska struktura, kao i elektronska struktura kristalinih i amorfni tvari. Vidljivo zračenje emitiraju objekti čija je toplinska energija atoma ili molekula jednaka ili veća energiji pobuđivanja njihovih elektrona. Ti objekti moraju biti na temperaturi većoj od 1000 °C.

Spektroskopija je znanstvena disciplina koja se bavi proučavanjem emisijskih i apsorpcijskih elektromagnetskih spektara atoma i molekula. Njome se mjeri veličina zračenja u ovisnosti o energiji, valnoj duljini, frekvenciji ili količini gibanja. Upotrebljava se u kemiji, medicini, astronomiji, metalurgiji i drugdje zbog mogućnosti određivanja fizikalnih i kemijskih osobina neke tvari. Dijeli se u sljedeće velike grupe s većim brojem podgrupa: atomska, molekularna, masena, laserska, ionska. Analizom se dobivaju podaci o prisutnosti raznih vrsta atoma i molekula u tvari te služi za identifikaciju nepoznatih vrsta spojeva pa se uspješno upotrebljava u znanosti, medicini, industriji (Khopkar, 2004).

Masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) je tehnika u kojoj se induktivno spregnuta plazma koristi kao ionizacijski izvor, a detekcija se vrši masenom spektrometrijom visoke rezolucije, koji kombinacijom fizičkog ograničavanja snopa iona prolaskom kroz usku pukotinu različitih dimenzija, te specifične konstrukcije MS (dvostruko fokusiranje u elektrostatskom i magnetskom polju) omogućuju znatno preciznije fokusiranje izotopa i korištenje tri različite rezolucije (niske, srednje i visoke). Izborom odgovarajuće rezolucije za pojedini element postiže se maksimalno razdvajanje izotopa koji želimo mjeriti od mogućih interferencija (Olesik, 1991). Instrument karakterizira visoka osjetljivost, velik linearni raspon i mogućnost paralelnog određivanja 50 elemenata (multielementa analiza).

2.3.1. ICP-OES

ICP-OES (eng. Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy) je induktivno spregnuta plazma - optičko emisijska spektrometrija - analitička metoda za detekciju i kvantifikaciju prisutnih elemenata u uzorku. Uzorci se uvode u plazmu koja ih razdvaja, ionizira i pobuđuje. Pronađeni elementi određuju se pomoću njihovih karakterističnih pikova, a koncentracija s obzirom na intenzitet pika (Slika 5). Karakteristike metode su: veliki protok uzorka koji omogućuje učinkovitu analizu velikih šarži, istovremeno određivanje više elemenata u istom uzorku, veliki linearni raspon te zanemariva interferencija kemijskih komponenti.



Slika 5. Primjer pika

Metoda ICP-OES se pokazala učinkovitijom, zbog većeg limita detekcije, od atomske apsorpcijske spektroskopije (AAS) i induktivno spregnute plazme – masene spektroskopije (ICP-MS) (Silva i sur., 2003). Ona omogućuje analizu niskih koncentracija teških metala iz drvene biomase. Potreba za metodom se javila zbog korištenja biomase za proizvodnju energije. Tijekom izgaranja, anorganske nezapaljive tvari biomase pretvaraju se u pepeo. Za korištenje biomase na održiv način pepeo, koji sadrži velike količine hranjivih sastojaka, treba vratiti u tlo kojim će se koristiti za ponovni uzgoj biljaka. Međutim, iako je količina teških metala u pepelu biomase općenito mala, neki organizmi imaju tendenciju unošenja i nakupljanja određenih teških metala iz tla (Lind i sur., 1999). U većini ICP-OES analiza potrebno je pretvaranje čvrstih uzoraka u otopine kiselinskom digestijom. Za ovu svrhu koristi se mikrovalna pećnica sa zatvorenim posudom, zbog kratkog vremena zagrijavanja (20-40 min), smanjenog rizika od kontaminacija, minimalnih količina reagensa i minimalnih gubitaka isparljivih tvari (Korn i sur., 2008). Također, kombinacija razrijeđene smjese oksidansa i zatvorene posude mikrovalne pećnice omogućuje poboljšanje granice detekcije i smanjenje troškova analize. Tako dobivene otopine pogodnije su za uvođenje raspršivačem i minimiziranjem kemijskog napada na dijelove opreme, poput komora za raspršivanje i plazme (Ferreira i sur., 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je odrediti koncentraciju teških metala (bakra, željeza i mangana) u drvnoj biomasi (topole i smreke) prije i nakon rasta micelija gljiva (*Phanerochaete chrysosporium* i *Formitopsis pinicola*).

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Drvna biomasa

Kao hranjiva podloga za radni mikroorganizam korištena je drvna biomasa smreke kao predstavnika crnogoričnog drveta te topole kao bjelogoričnog.

3.2.2. Mikroorganizam

Kao radni mikroorganizmi korišteni su gljiva bijelog truljenja *P. chrysosporium* (Slika 6) i gljiva smeđeg truljenja *F. pinicola* (Slika 7). Gljive su uzgajane na drvnoj biomasi smreke i topole kroz 10 tjedana. Nakon čega su isprane destiliranom vodom s drveta te su u daljnjem eksperimentu korišteni tekući uzorci drveta.



Slika 6. *P. chrysosporium* porasla na ostacima drveta smreke



Slika 7. *F. pinicola* porasla na ostacima drveta smreke

3.2.3. Kemikalije

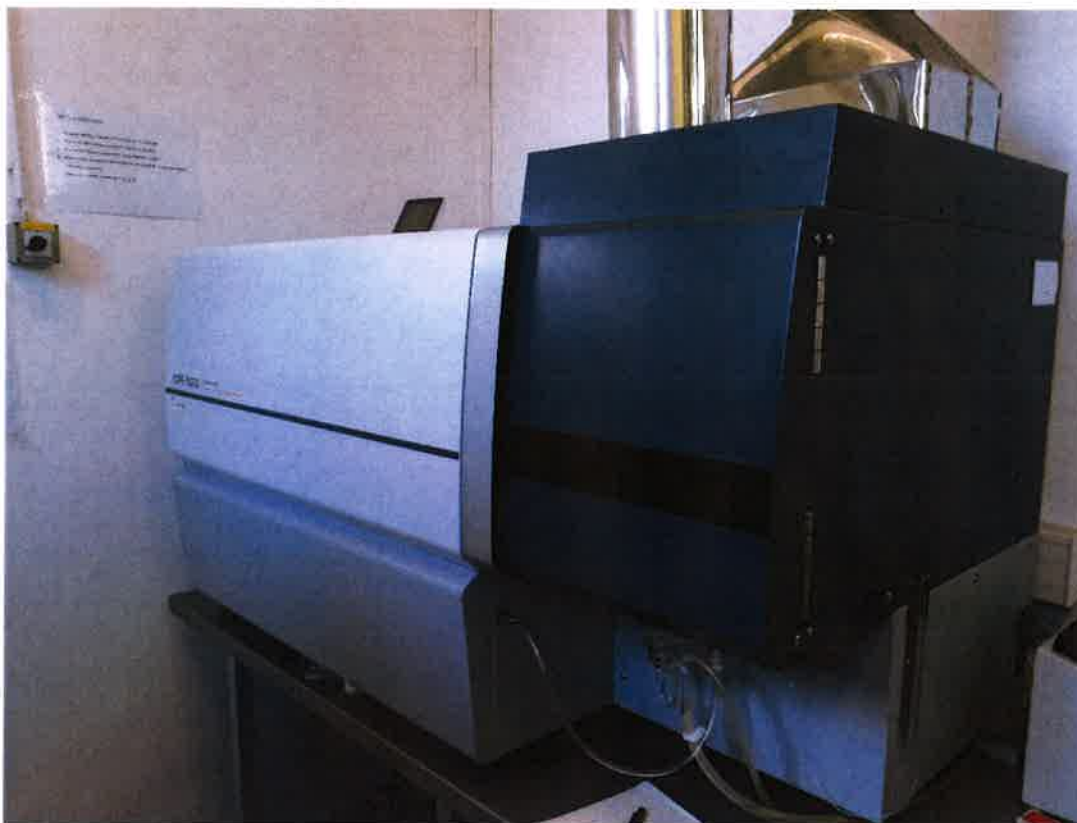
Popis kemikalija korištenih za analizu koncentracije metala u drvnjoj biomasi nalazi se u tablici 1.

Tablica 1. Kemikalije za analizu

Kemikalija	Proizvođač
Nitratna kiselina (HNO ₃)	BDH, Ujedinjeno Kraljevstvo
ICP Multi-element standard	Certipur, Njemačka

3.3. UREĐAJ

Za određivanje metala u tekućim uzorcima korišten je Shimadzu ICP Emisijski Spektrometar, tip ICPE-9000 (Slika 8, Prilog 1) u Centralnom kemijsko - tehnološkom laboratoriju. Razlog odabira baš tog instrumenta je očekivanje izrazito malih koncentracija metala u uzorku, a limiti detekcije ICP-OES spektrometra su 0,0073845 mg/L za željezo, 0,0024539 mg/L za bakar i $7.776878 \cdot 10^{-4}$ mg/L za mangan.



Slika 8. ICP-OES

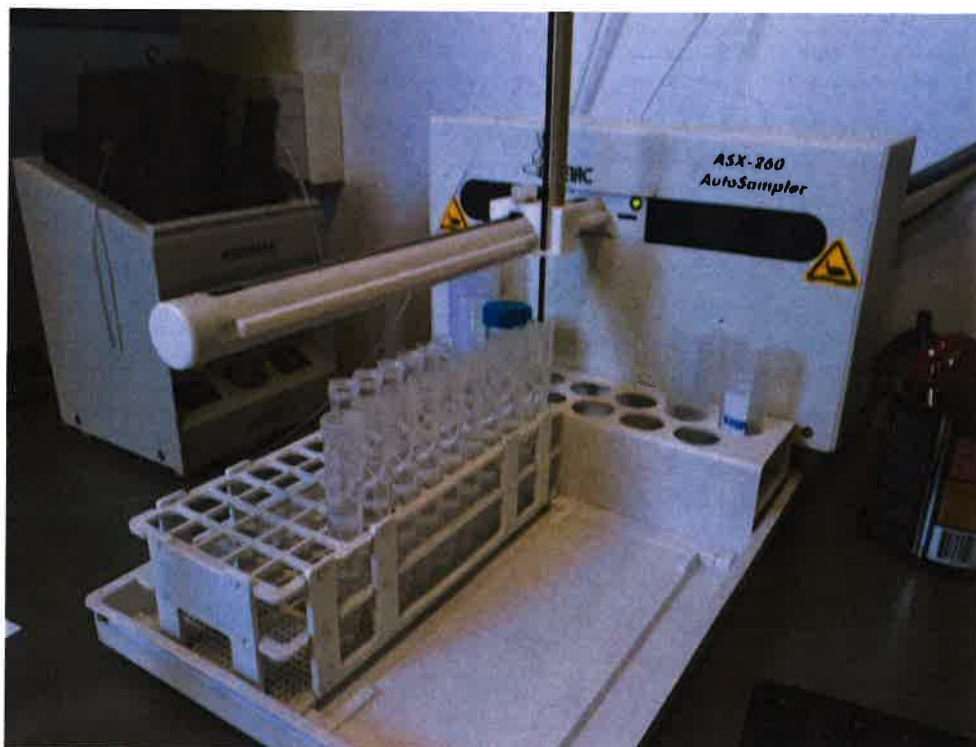
Ostali dijelovi uređaja su: pumpa (Slika 9), hladilo (Slika 10), sustav za uvođenje uzorka (Slika 11), odvod zraka (Slika 12) i dovod plina argona (Slika 13).



Slika 9. Pumpa



Slika 10. Hladilo



Slika 11. Sustav za unošenje uzorka



Slika 12. Odvod zraka



Slika 13. Dovod plina argona

3.4. ICP-OES METODA

Korištena metoda je QuanBase (Standard mode) za kvantitativnu analizu elemenata, čije su karakteristike korištenjem standardnog raspršivača s peristaltičkom pumpom, uz normalni aksijalni pogled plazme, koji se koristi za postizanje nižih granica detekcije s većom preciznošću.

3.4.1. Priprema standarda za kalibraciju

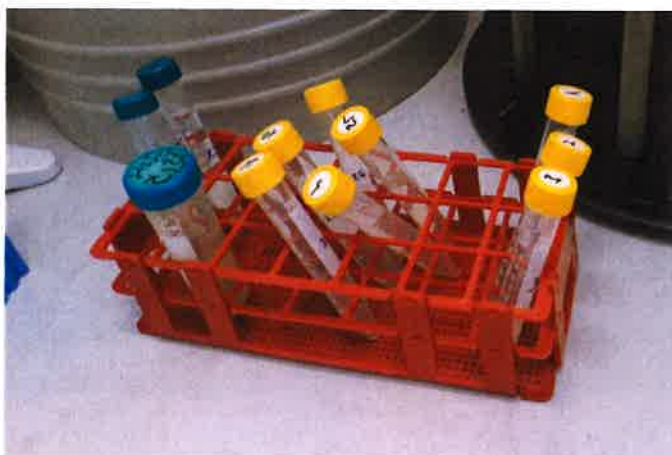
Za pripremu standarda korišteno je: zakiseljena voda (10 %-tni HNO₃, pripremljen pomoću vode i 69 % HNO₃) i multi element 1000 mg/L. Pripremljeno je šest različitih koncentracija standarda (0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 i 0.5 mg/L) te smo za svaki element (Cu, Mn, Fe) dobili baždarni dijagram (Prilog 2, 3, 4).

3.4.2. Priprema uzoraka

Prije analize potrebno je zakiseliti uzorke sa HNO₃ (u 10 mL uzorka 100 µL HNO₃) kako bi se vezali metali u otopini.

Tablica 2. Prikaz uzoraka

Uzorci	Vrsta gljive	Supstrat	Vrijeme uzgoja (tjedni)
30	neg. kontrola	topola	0
29	neg. kontrola	smreka	0
28	<i>P. chrysosporium</i>	topola	2
27	<i>P. chrysosporium</i>	smreka	2
26	<i>F. pinicola</i>	topola	2
25	<i>F. pinicola</i>	smreka	2
4	<i>P. chrysosporium</i>	topola	10
3	<i>P. chrysosporium</i>	smreka	10
2	<i>F. pinicola</i>	topola	10
1	<i>F. pinicola</i>	smreka	10



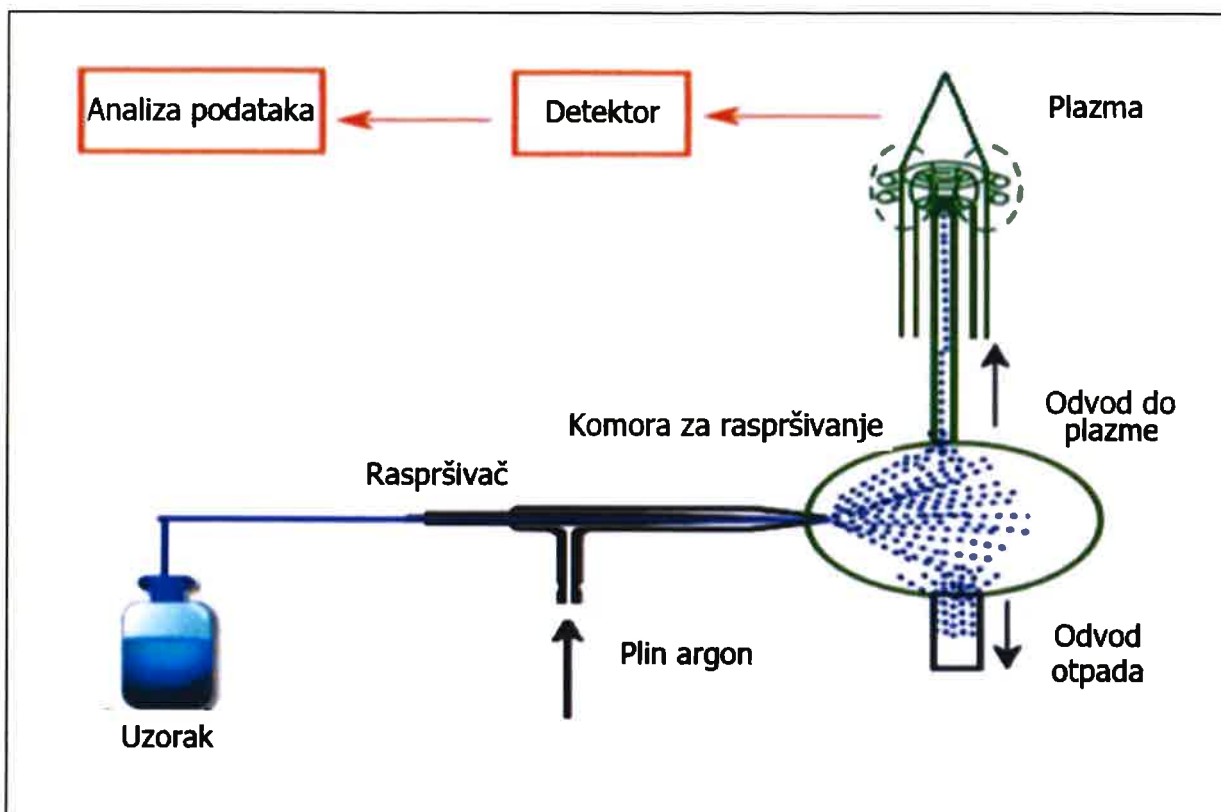
Slika 14. Uzorci

3.4.3. Analiza uzoraka

Peristaltička pumpa uvodi tekući uzorak u raspršivač, gdje nastaje aerosol koji se unosi u plazmenu ICP baklju u kojoj otapalo isparava i pobuđuju se elektroni. U sprej komori, velike kapljice odvajaju se u otpad, a fine male kapljice se odводе do plazme (Slika 15). Više od 99 % injektiranog uzorka odlazi u otpad, dok se svega 1 % ili manje odvodi do plazme. U plazmi se pobuđuju ioni, a pri povratku u osnovno stanje dolazi do emisije zračenja karakterističnih valnih duljina za pojedini element te je upravo intenzitet tog emitiranog zračenja mjera koncentracije analita u plazmi. Zračenje se detektira i pretvara u električne signale koji se potom konvertiraju u informacije o koncentracijama elemenata (Slika 16.).



Slika 15. Plazma



Slika 16 . Shematski prikaz rada ICP-OES spektrometra od unosa uzorka do detektora

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju odabrane su dvije vrste micelija gljiva *P. chrysosporium* i *F. pinicola*. *P. chrysosporium* pripada gljivama bijelog truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više lignolitičkih enzima i razgrađuje lignin. *F. pinicola* pripada gljivama smeđeg truljenja te tijekom rasta micelija proizvodi više celulolitičkih enzima i razgrađuje celulozu i hemicelulozu. Uzgoj i rast micelija proveden je na dva različita drva smreke i topole. Smreka je odabrana kao mekše drvo, a topola kao tvrđe drvo. Cilj je utvrditi utjecaj rasta micelija na promjenu koncentracije iona metala (željeza, bakra i mangana) u supernatantima prije i nakon uzgoja gljiva na odabranim uzorcima drva smreke i topole, odnosno bioakumulacijsku sposobnost istraživanih micelija gljiva. Također u radu su opisani razvoj i validacija metode mjerenja koncentracije metala u supernatantima korištenjem metode induktivno spregnute plazme s optičko emisijskom spektroskopijom (ICP-OES).

Rezultati analize metala Cu, Fe i Mn u supernatantima prije i nakon 10.-og tjedna rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i jele prikazani su u Tablici 3 kronološkim redom.

Tablica 3. Rezultati analize metala Cu, Fe i Mn u supernatantima tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole

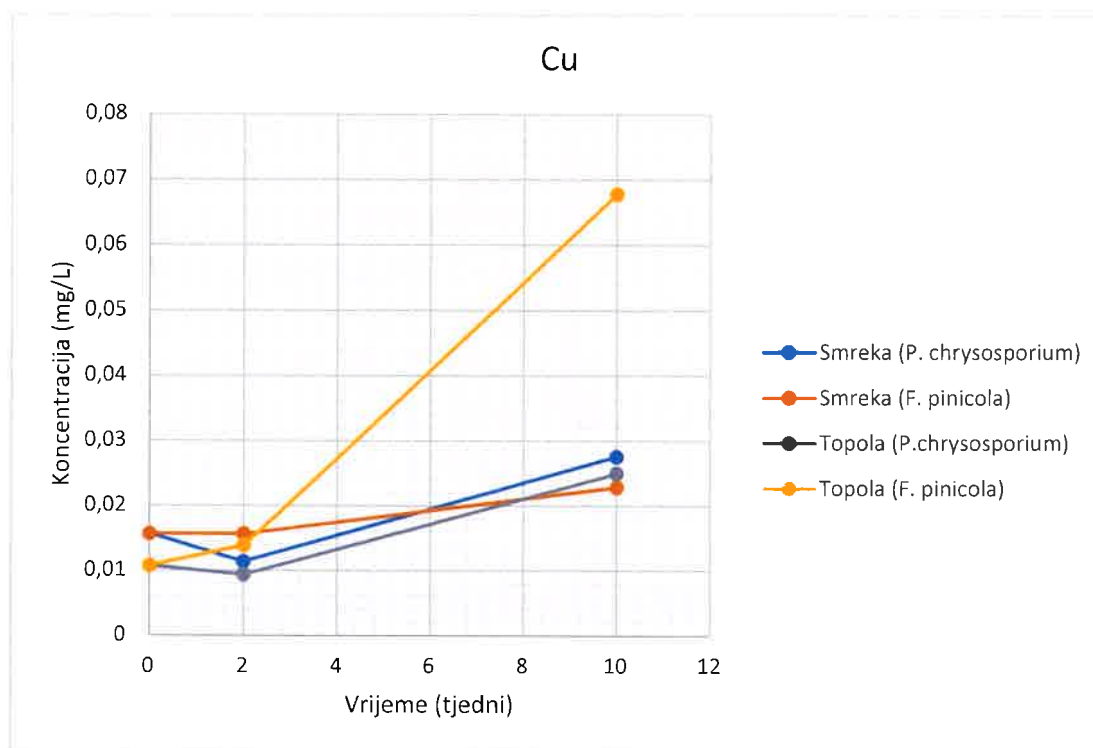
Uzorci	Cu 224.700 mg/L	Fe 259.940 mg/L	Mn 257.610 mg/L
29. neg. kontrola smreka	0.0157	0.0191	3.07
27. smreka (<i>P. chrysosporium</i>)	0.0114	0.0316	2.57
3. smreka (<i>P. chrysosporium</i>)	0.0276	0.0617	0.326
25. smreka (<i>F. pinicola</i>)	0.0157	0.0557	2.06
1. smreka (<i>F. pinicola</i>)	0.0229	0.141	0.190
30. neg. kontrola topola	0.0108	0.0183	0.253
28. topola (<i>P. chrysosporium</i>)	0.0094	0.0206	0.0881
4. topola (<i>P. chrysosporium</i>)	0.0250	0.0551	0.0408
26. topola (<i>F. pinicola</i>)	0.0139	0.0264	0.0748
2. topola (<i>F. pinicola</i>)	0.0678	0.197	0.0442

Valne duljine analize određene su pomoću internacionalnog standarda ISO 11885 Water quality – Determination of selected elements by inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). (Prilog 5)

S obzirom da smo koristili tekuće uzorke drveta, očekivali smo vrlo male koncentracije teških metala (oko 0,01 mg/L), te možemo zaključiti da su rezultati u skladu s očekivanjima.

4.1. ANALIZA REZULTATA

4.1.1. Analiza koncentracija iona bakra nakon rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole



Graf 1. Koncentracije iona bakra u supernatantu tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole

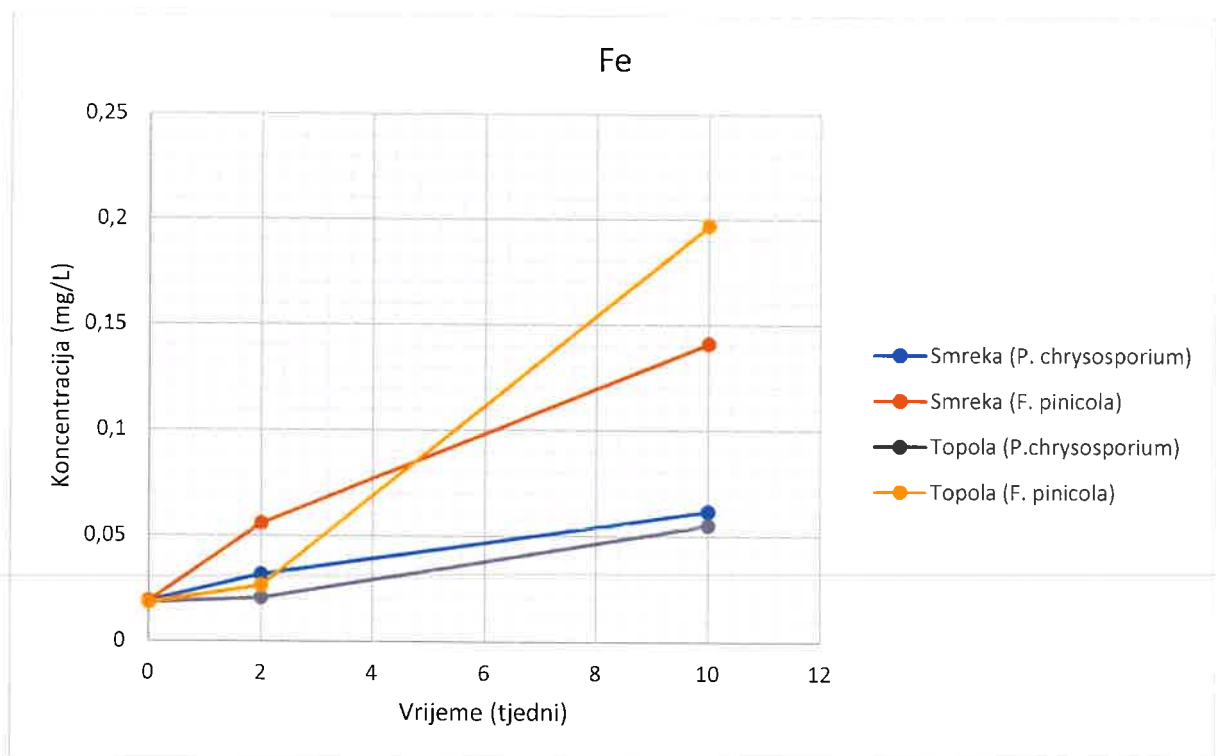
Iz grafa 1 je vidljiv porast koncentracije bakra. U uzorcima drvene biomase na kojima je rasla *P. chrysosporium* prvo je vidljiv pad koncentracije Cu, a zatim rast. Dok je značajniji porast zabilježen u uzorku topole na kojoj je rasla *F. pinicola* (s 0.0108 na 0.0678 mg/L). Rastom micelija gljiva na površini drva dolazi do razgradnje organskog dijela i oslobađanja mineralnih tvari i iona metala. Oslobođene ione metala, nakon rasta, gljive koriste za rast i sintezu lignolitičkih i hemicelulolitičkih enzima. Porast koncentracije iona bakra u supernatantu nakon rasta *F. pinicola* na topoli ukazuje na smanjenu aktivnost enzima koji u aktivnom mjestu imaju ione bakra. Ovo se prije svega odnosi na lakazu. Stoga se u ovim supernatantima može očekivati znatno niža aktivnost lakaza.

Razlika u koncentracije iona bakra nakon rasta *F. pinicola* na topoli odnosno na smreki može se objasniti utjecajem fizikalno-kemijskih svojstava biomase drva. Različita

mehanička svojstva (čvrstoća, tvrdoća), te struktura istraživanih uzoraka drva značajno utječe na rast gljiva i razgradnju osnovnih jedinica drvene biomase (celuloza, hemiceluloza i lignin). *F. pinicola* (gljiva smeđe truleži) sintetizira više hemicelulolitičkih enzima i razgrađuje celulozne jedinice pri čemu ostaje nerazgrađeni lignin. *P. chrysosporium* koristi drvenu biomasu za sintezu lignolitičkih enzima i razgrađuje lignin pri čemu nerazgrađena ostaje celuloza.

P. chrysosporium tijekom rasta koristi ione bakra za sintezu lignolitičkih oksidoreduktaza (lakaze) koje u aktivnom mjestu imaju ugrađen ion bakra (Podgornik i sur., 2001). Stoga je nakon rasta *P. chrysosporium* zabilježena znatno niža koncentracija iona bakra u supernatantima. Pretpostavka je da su tijekom rasta *P. chrysosporium* ioni bakra iskorišteni za sintezu lakaze. Ovu pretpostavku trebalo bi provjeriti mjerenjem aktivnosti lakaze u supernatantima.

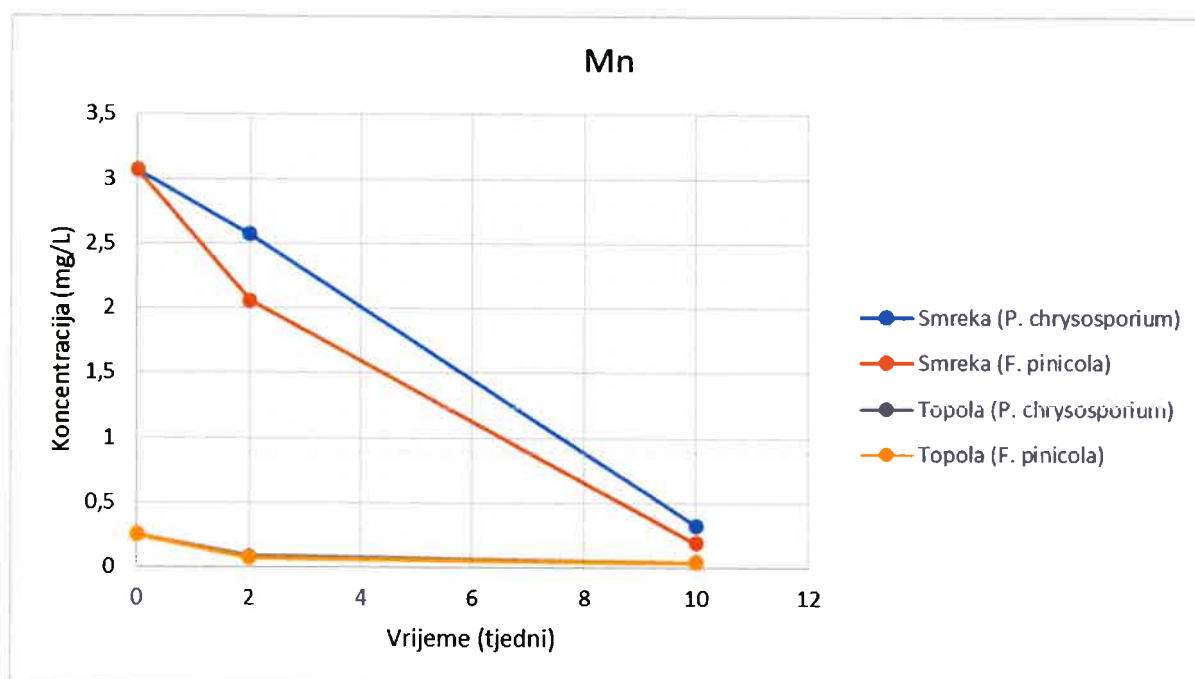
4.1.2. Analiza koncentracija iona željeza nakon rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole



Graf 2. Koncentracije iona željeza u supernatantu tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole

Iz grafa 2 je vidljiv porast koncentracije željeza. Značajniji rast koncentracije Fe utvrđen je u uzorcima drvene biomase na kojoj je porasla *F. pinicola*, kod smreke sa 0.0191 mg/L na 0.141 mg/L, te kod topole sa 0.0183 mg/L na 0.197 mg/L). Ioni željeza kao i ioni bakra inhibiraju djelovanje celulaza, a aktiviraju lignolitičke enzime. *F. pinicola* pripada grupi gljiva smeđeg truljenja te sintetizira celulolitičke enzime. Porast koncentracije iona željeza nakon rasta *F. pinicola* na drvu smreke i topole ukazuje na mogućnost inhibicije celulolitičkih enzima i smanjenja njihove aktivnosti u supernatantima (Pereira i sur., 2016). *P. chrysosporium* sintetizira tijekom rasta lignolitičke enzime te ih koristi u razgradnji lignina. Za sintezu lignolitičkih enzima *P. chrysosporium* koristi ione metala te ih ugrađuje u aktivna mjesta lignolitičkih enzima. Stoga je izmjerena koncentracija iona željeza nakon rasta *P. chrysosporium* na drvu topole i smreke niža u uporedbi s koncentracijama iona željeza izmjerenim nakon rasta *F. pinicola*. Navedena zapažanja trebalo bi potvrditi mjerenjem aktivnosti lignolitičkih i celulolitičkih enzima u dobivenim supernatantima nakon uzgoja *P. chrysosporium* i *F. pinicola*.

4.1.3. Analiza koncentracija iona mangana nakon rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole



Graf 3. Koncentracije iona mangana u supernatantu tijekom rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola* na drvu smreke i topole

Iz grafa 3. je vidljiv pad koncentracije mangana, najznačajniji u uzorcima smreke, gdje s 3.07 mg/L koncentracije padne na 0.326 mg/L (smreka na kojoj je porasla *P. chrysosporium*), odnosno na 0.190 mg/L (smreka na kojoj je porasla *F. pinicola*). Tijekom razmatranja promjene koncentracija iona mangana, potrebno je uzeti u obzir i utjecaj vezanja iona mangana na biomasu micelija gljiva. Ionska jakost i ionski radijus iona mangana različiti je od ionskog radijusa i ionske jakosti iona željeza i bakra. Stoga je afinitet za vezanje iona metala adsorpcijom na površini micelija različit. Efekti adsorpcije i bioakumulacije utječu na bioraspoloživost ovih metala u supernatantima nakon razgradnje drva i rasta micelija *P. chrysosporium* i *F. pinicola*. Ukoliko prevladava efekt adsorpcije koncentracija iona metala u supernatantu se smanjuje tijekom rasta micelija. Adsorpcijski afinitet ovisi o fizikalnim svojstvima biomase odnosno o navedenim svojstvima iona. Bioakumulacija je vezana uz biokemijske procese unutar stanica micelija i ugradnju iona metala u biomasu. Ukoliko prevladava efekt adsorpcije, koncentracija metala se smanjuje s vremenom, kao u slučaju adsorpcije iona mangana. Da bi potvrdili navedeno potrebno je napraviti analizu koncentracije iona metala vezanih na površini micelija nakon uzgoja. Također potrebno je razmotriti i mineralni sastav korištene biomase odnosno koncentraciju metala nakon spaljivanja korištene biomase te izmjeriti koncentraciju istraživanih metala u korištenom drvu smreke i topole. Iz dobivenih rezultata koncentracije iona mangana nakon uzgoja na drvu topole može se zaključiti da je koncentracija ovih metala u biomasi niža u usporedbi s ionima metala željeza i bakra. Ovakvo zapažanje trebalo bi potvrditi mjerenjem mineralnog sastava topole i smreke nakon spaljivanja.

5. ZAKLJUČAK

Značaj prikazanog istraživanja je u razvoju i validaciji metode mjerenja niskih koncentracija metala tijekom rasta gljiva *F. pinicola* i *P. chrysosporium* na drvu topole i smreke. Pri tome je, zbog mogućnosti analize vrlo niskih koncentracija metala u uzorcima drvne biomase korištena optičke emisijske spektrometrije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-OES). Limiti detekcije ICP-OES spektrometra su 0,0073845 mg/L za željezo, 0,0024539 mg/L za bakar i $7.776878 \cdot 10^{-4}$ mg/L za mangan.

Na osnovu promjene koncentracije metala tijekom rasta micelija gljiva *F. pinicola* i *P. chrysosporium* na drvu smreke i topole određena je bioakumulacijska sposobnost navedenih micelija gljiva. Koncentracija mangana se smanjila u svim analiziranim uzorcima, što ukazuje

na sposobnost *F. pinicola* i *P. chrysosporium* da bioakumuliraju teške metale. Navedeno bi trebalo potvrditi analizom koncentracije iona metala vezanih na površini micelija nakon uzgoja micelija.

Nakon rasta *F. pinicola* na drvu topole u uzorcima su izmjerene najviše koncentracije iona bakra i željeza, što ukazuje na smanjenu aktivnost enzima, poput lakaze. *P. chrysosporium* koristi ione bakra i željeza tako što ih ugrađuje u aktivna mjesta lignolitičkih enzima, stoga su izmjerene koncentracije navedenih metala niže. Ove pretpostavke bi trebalo potvrditi dodatnim mjerenjima aktivnosti enzima u uzorcima nakon rasta istraživanih gljiva.

6. LITERATURA

1. Anahid S., Yaghmaei S., Ghobadinejad Z. (2011). Heavy metal tolerance of fungi, *Scientia Iranica*, Vol 18, 502-508
2. Baldrian P., Gabriel J., Čurdova E., Suchanek M., Rychlovsky P. (1999). Heavy and trace metal in wood-inhabiting fungi *Fomitopsis pinicola*, *Ganoderma applanatum*, *Piptoporus betulinus* and *sterum hirsutum* from medium polluted sites in Czech republic, *Toxicological and environmental chemistry*, Vol 71, 475 – 483
3. de Cassia Pereira J., Giese E. C., de Souza Moretti M. M., dos Santos Gomes A. C., Micali Perrone O., Boscolo M., da Silva R., Gomes E., Alonso Bocchini Martins D. (2016). Metal ions, chemical agents and organic compounds on lignocellulolytic enzymes activities
4. Gaberc-Porekar V., Menart V. (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography, *Journal of biochemical biophysical*, Vol 49, 335–360
5. Hatakka A., (2001). Biodegradation of lignin. In: Hofrichter, M., Steinbuchel, A., *Biopolymers: Lignin, humic substances and coal*. Wiley-VCH, Weinheim, 129–180
6. ICPEsolution za ICPE-9000, Uputstva za uporabu
7. Iqbal M., Edyvean R. G. J., (2004). Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*, *Miner. Eng.* 17, 217–223
8. Khopkar S. M. (2004). Basic concepts of analytical chemistry, New age international
9. Korn M. D. A., Morte E. S. D., dos Santos D. C. M. B., Castro J. T., Barbosa J. T. P., Teixeira A. P. (2008). Sample preparation for the determination of metals in food

- samples using spectroanalytical methods, *Applied spectroscopy reviews*, Vol 43, 67–92
10. Kumar A. G., Sekaran G., Krishnamoorthy S., (2006). Solid state fermentation of *Achras zapota* lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*, *Bioresour. Technol.* 97, 1521–1528
 11. Lamar R. T., Larsen M. J., Kent Kirk T., Glaser A. J. (1987). Growth of the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soil, Land disposal, remedial action, incineration and treatment of hazardous waste: Proceedings of the 13th annual research symposium at Cincinnati, 419-424
 12. Lind T., Valmari T., Kauppinen E. I., Sfiris G., Nilsson K., Maenhaut W., Volatilization of the heavy metals during circulating fluidized bed combustion of forest residue, *Environ. sci. technol.* 1999, Vol 33, 496-502
 13. Pages D., Sanchez L., Conrod S., Gidrol X., Fekete A., Schmitt-Kopplin P. (2007). Exploration of intracolonial adaptation mechanisms of *Pseudomonas brassicacearum* facing cadmium toxicity. *Environ. Microbiol.* 9, 2820–2835
 14. Panda H. (2015.). Handbook on coal, coke, cotton, lignin, hemicellulose, wood, wood- polymer composites, lignocellulosic – plastic composites from recycled materials, wood fiber, rosin and rosin derivatives, 182-183
 15. Perez J., Munoz-Dorado J., De la Rubia T., Martinez J., (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Int. Microbiol.* 5, 53–63
 16. Podgornik H., Stegu M., Zibert E., Perdih A. (2001). Laccase production by *Phanerochaete chrysosporium* an artefact caused by Mn(III), *Letters in applied microbiology*, Vol 32, 407-411
 17. Silva J. C. J., Baccan N., Nóbrega J. A. (2003). Analytical performance of an inductively coupled plasma optical emission spectrometry with dual view configuration. *Journal of Brazilian chemical society*, Vol 14, 310–315
 18. Small H. (1989). *Ion chromatography*, Plenum Press, New York
 19. Szpunar J., Pellerin P., Makarov A., Doco T., Williams P., Łobin R. (1999). Speciation of metal–carbohydrate complexes in fruit and vegetable samples by size-exclusion HPLC-ICP-MS, *Journal of analytical atomic spectrometry*, Vol 4
 20. Timerbaev A. R., Petrukhin O. M., Zolotov Yu. A. (1987). Analytical application of liquid adsorption chromatography of metal chelates, *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, Vol 327, 87-101

21. Tompkins E. R. i Mayer S. W. (1947). Ion exchange as a separation method. III. equilibrium studies of the reactions of rare earth complexes with syntetic ion exchange resins, *Journal of the American chemical society*, Vol 69, 2859-2865
22. Tuomela M., Steffen K. T., Kerko E., Hartikainen H., Hofrichter M., Hatakka A. (2005). Influence of Pb contamination in boreal forest soil on the growth and ligninolytic activity of litter-decomposing fungi, *FEMS Microbiol. ecol.* 53, 179– 186
23. Wellington K. (2002). Applications of laccases in organic synthesis, *Green Chemistry*, Nova science publishers, 167-211
24. Yu M., Zeng G. M., Chen Y. N., Yu H. Y., Huang D. L. (2009). Influence of *Phanerochaete chrysosporium* on microbial communities and lignocellulose degradation during solid-state fermentation of rice straw. *Process Biochem.* 44, 17– 22
25. Vaishaly A. G., Blessy B. M., Krishnamurthy N. B., Krishnamurthy T. P. (2015). Bioaccumulation of heavy metals by fungi, *SBT Journals*, Vol 1, 15-21
26. Zaidi A., Oves M., Ahmad E., Khan M. S. (2011). Importance of free-living fungi in heavy metal remediation, *Department of agricultural microbiology*, Vol 21
27. Zeng G. M., Huang D. L., Huang G. H., Hu T. J., Jiang X. Y., Feng C. L., Chen Y. N., Tang L., Liu H. L., (2007). Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus, *Bioresour. Technol.* 98, 320–326
28. Žeger T. (2012). Određivanje pentozana različitih vrsta drva UV-spektrofotometrijskom analizom, diplomski rad, Šumarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

7. PRILOZI

Shimadzu ICP Emisijski Spektrometar

ICPEsolution za ICPE-9000

Uputstva za uporabu

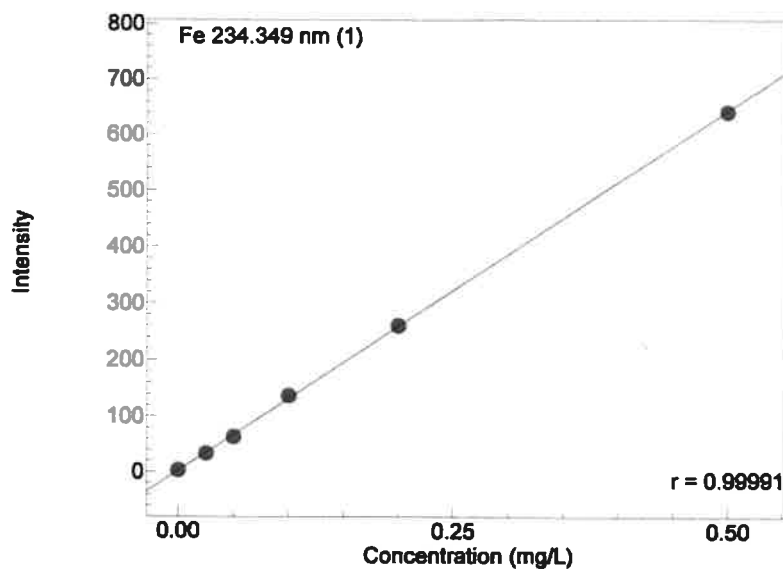
**Prije upotrebe pažljivo pročitajte uputstva za uporabu.
Zadržite uputstva za uporabu.**

SHIMADZU CORPORATION
KYOTO JAPAN

ANALYTICAL & MEASURING INSTRUMENTS DIVISION

Calibration Curve:G1

Quantitation Method:Calibration-Curve Method



Equation: $Conc = a * I^3 + b * I^2 + c * I + d$

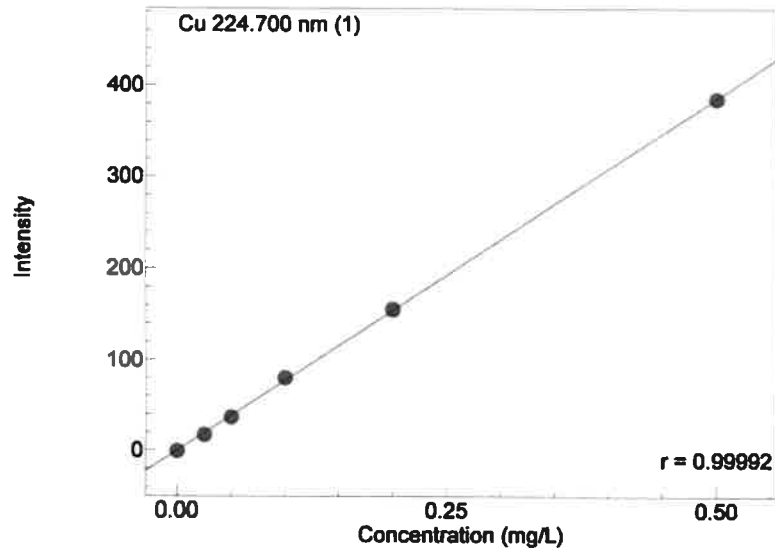
a = 0.000000 c = 7.782543e-004 Weight: None
 b = 0.000000 d = -0.0015738 Origin: None
 Detection Limit (3s) = 0.0022154 Limit of Quantity (10s) = 0.0073845

Class	Sample Name	Plot	Set Conc	Intensity	Conc	Diff of Conc	Excl
CAL1	blank		0.000000	2.278258	0.0002	0.0002	
CAL2	0,025		0.025000	32.24482	0.0235	-0.0015	
CAL3	0,05		0.050000	62.20517	0.0468	-0.0032	
CAL4	0,1		0.100000	135.9601	0.104	0.0042	
CAL5	0,2		0.200000	260.5646	0.201	0.0012	
CAL7	0,5		0.500000	643.1912	0.499	-0.0010	

Prilog 2: Baždarni dijagram za određivanje koncentracije željeza

Calibration Curve:G1

Quantitation Method:Calibration-Curve Method



Equation: $Conc = a * I^3 + b * I^2 + c * I + d$

$a = 0.000000$

$c = 0.0012931$

Weight: None

$b = 0.000000$

$d = 1.909214e-004$

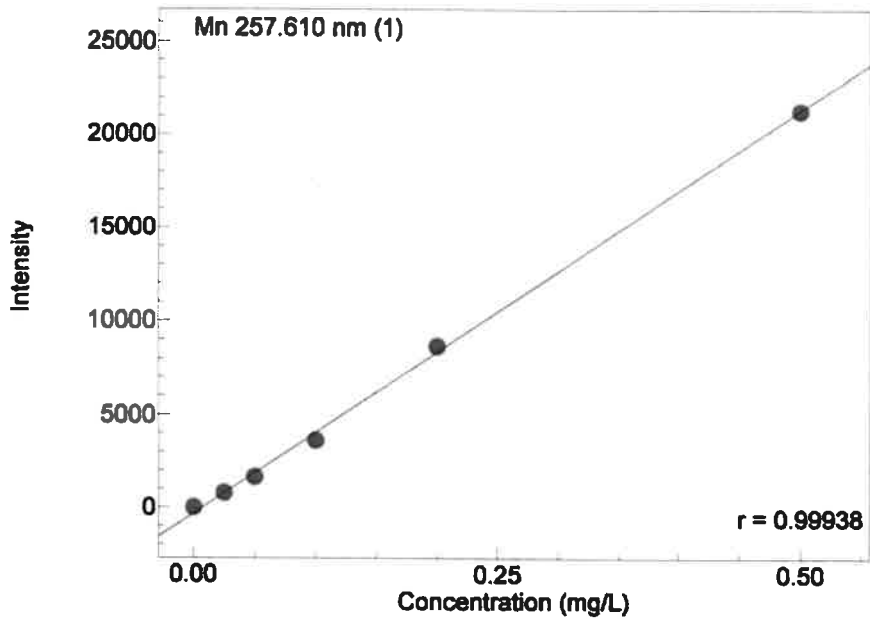
Origin: None

Detection Limit (3s) = 7.361706e-004

Limit of Quantity (10s) = 0.0024539

Class	Sample Name	Plot	Set Conc	Intensity	Conc	Diff of Conc	Excl
CAL1	blank		0.000000	-0.2563808	-0.0001	-0.0001	
CAL2	0,025		0.025000	17.39848	0.0227	-0.0023	
CAL3	0,05		0.050000	36.97367	0.0480	-0.0020	
CAL4	0,1		0.100000	80.26770	0.104	0.0040	
CAL5	0,2		0.200000	155.8279	0.202	0.0017	
CAL7	0,5		0.500000	385.5951	0.499	-0.0012	

Prilog 3: Baždarni dijagram za određivanje koncentracije bakra



Equation: $\text{Conc} = a * I^3 + b * I^2 + c * I + d$

$a = 0.000000$ $c = 2.309725e-005$
 $b = 0.000000$ $d = 0.0073574$
 Detection Limit (3s) = $2.333063e-004$

Weight: None
 Origin: None
 Limit of Quantity (10s) = $7.776878e-004$

Class	Sample Name	Plot	Set Conc	Intensity	Conc	Diff of Conc	Excl
CAL1	blank		0.000000	6.014834	0.0075	0.0075	
CAL2	0,025		0.025000	783.2938	0.0254	0.0004	
CAL3	0,05		0.050000	1646.041	0.0454	-0.0046	
CAL4	0,1		0.100000	3602.560	0.0906	-0.0094	
CAL5	0,2		0.200000	8644.928	0.207	0.0070	
CAL7	0,5		0.500000	21289.22	0.499	-0.0009	

Prilog 4: Baždarni dijagram za određivanje koncentracije mangana

INTERNATIONAL
STANDARD

ISO
11885

Second edition
2007-08-01

**Water quality — Determination of
selected elements by inductively coupled
plasma optical emission spectrometry
(ICP-OES)**

*Qualité de l'eau — Dosage d'éléments choisis par spectroscopie
d'émission optique avec plasma induit par haute fréquence (ICP-OES)*



Copyright International Organization for Standardization
Provided by BSI under license with ISO
No reproduction or retransmission permitted without license from BSI

Not for Resale

Reference number
ISO 11885:2007(E)

© ISO 2007

Prilog 5: Internacionalni standard prema kojem su očitavani rezultati

Zadnja stranica završnog rada

(uključiti u konačnu verziju završnog rada u pdf formatu, kao skeniranu potpisanu stranicu)

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Martina Krajić

ime i prezime studenta