

Spektrofotometrijske metode analize okolišnih uzoraka

Hajdaš, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:184:352387>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Medicine - FMRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Hajdaš

SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ANALIZE
OKOLIŠNIH UZORAKA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

SVEUČILIŠTE U RIJECI
MEDICINSKI FAKULTET
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
SANITARNOG INŽENJERSTVA

Sara Hajdaš

SPEKTROFOTOMETRIJSKE METODE ANALIZE
OKOLIŠNIH UZORAKA

Diplomski rad

Rijeka, 2024.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Mirna Petković Didović, dipl. ing. kemije

Diplomski rad obranjen je dana 3. rujna 2024. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

1. prof. dr. sc. Ivana Gobin, dipl. sanit. ing., predsjednica povjerenstva
2. doc. dr. sc. Sunčica Buljević, dipl. sanit. ing.
3. izv. prof. dr. sc. Mirna Petković Didović, dipl. ing. kemije.

Rad sadrži 48 stranica, 27 slika, 1 tablicu i 36 literaturnih navoda.

Od srca se zahvaljujem mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Mirni Petković Didović za neizmjereno strpljenje, stručnost i podršku tijekom izrade ovog rada. Hvala za svaki savjet, profesionalni i privatni, koje dalje nosim sa sobom, te za motivaciju kada je sama nisam mogla pronaći.

Duboku zahvalnost želim izraziti i prof. dr. sc. Ivani Gobin za njenu stručnost i nesebičnu pomoć tijekom istraživanja, bez koje ono ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se mojoj ljubavi i mojoj obitelji, te prijateljima i kolegama, za sve dobre i loše trenutke u ovom poglavlju života.

Posebno se zahvaljujem baki i dedi za neopisivu podršku tijekom cijelog mog školovanja.

Iznad svega, hvala mojoj majci za beskrajnu ljubav, žrtvu i oslonac na svakom koraku.

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD.....	1
1.1. OSNOVNA NAČELA SPEKTROFOTOMETRIJE	1
1.2. VRSTE SPEKTROFOTOMETARA I NJIHOVA PRIMJENA	5
1.2.1. UV–VIS spektrofotometrija	5
1.2.2. VIS spektrofotometrija.....	9
1.2.3. IR spektroskopija.....	10
1.2.4. Fluorescencijska spektrofotometrija	13
1.2.5. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija	14
1.2.6. Atomska emisijska spektrofotometrija.....	15
1.3. AZO BOJILA	16
1.3.1. Mikrobiološka razgradnja.....	18
1.4. MASLINOVO ULJE	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	23
3. MATERIJALI I METODE.....	24
3.1. ANALIZA AZO BOJE PONCEAU S.....	24
3.2. ANALIZA MASLINOVOG ULJA	27
4. REZULTATI.....	30
4.1. DEKOLORIZACIJA BOJE PONCEAU S U MEDIJU INOKULIRANOM S <i>P. AERUGINOSA</i>	30
4.1.1. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 1. mjerenje.....	30
4.1.2. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 2. mjerenje.....	32
4.1.3. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 3. mjerenje.....	34
4.1.4. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 4. mjerenje.....	35
4.1.5. Uspješnost mikrobiološke razgradnje azo boje.....	37
4.2. SPEKTROFOTOMETRIJSKA ANALIZA MASLINOVOG ULJA.....	38
4.2.1. K vrijednosti uzoraka maslinovih ulja	38
4.2.2. Kakvoća i autentičnost uzoraka maslinovih ulja.....	39
5. RASPRAVA.....	41

5.1. USPJEŠNOST SPEKTROFOTOMETRIJSKOG ISPITIVANJA DEKOLORIZACIJE AZO BOJE PONCEAU S POMOĆU <i>P. AERUGINOSA</i>	41
5.2. USPJEŠNOST ISPITIVANJA SVOJSTAVA MASLINOVOG ULJA STANDARDIZIRANOM SPEKTROFOTOMETRIJSKOM METODOM.....	42
6. ZAKLJUČAK	44
7. LITERATURA.....	45
8. ŽIVOTOPIS	48

SAŽETAK

Spektrofotometrija, grana spektroskopije, bavi se mjerenjem optičkih svojstava tvari kao funkcije valne duljine i proučavanjem interakcije tvari s elektromagnetskim zračenjem. Različite vrste spektrofotometrije uključuju UV–VIS, IR, fluorescencijsku te atomsku apsorpcijsku i atomsku emisijsku spektrofotometriju, a svaka je vrsta prikladna za specifične primjene. Zbog svoje sposobnosti za preciznu identifikaciju i kvantificiranje spojeva, spektrofotometri se naširoko koriste u okolišnim analizama te u brojnim područjima znanosti i ljudskog djelovanja. Uz pregled spektrofotometrijskih načela i metoda, istraživanje je usmjereno na dva eksperimentalna cilja: procjenu mikrobiološke razgradnje azo bojila Ponceau S te procjenu kakvoće i autentičnosti maslinovog ulja. Za analizu dekolorizacije Ponceau S uzorci su pripremljeni u tri različita medija sa suspenzijom *P. aeruginosa* i otopinom boje koncentracije 100 mg/L te je u različitim vremenima pomoću VIS spektrofotometra izmjerena apsorbanacija u uzorcima. Došlo je do mikrobiološke razgradnje azo boje, a spektrofotometrijska mjerenja utvrdila su stupanj obezbojenja. Za analizu maslinovog ulja, koristeći se propisanom metodom i UV–VIS spektrofotometrom mjerena je apsorbanacija šest homogeniziranih uzoraka maslinovog ulja u izooktanu pri određenim valnim duljinama kako bi se otkrili oksidacijski produkti koji ukazuju na kakvoću ulja. Rezultati isključuju vjerojatnost patvorenja ulja te ukazuju na neodgovarajuće uvjete skladištenja. Opisane metode i rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazuju učinkovitost i svestranost spektrofotometrije u analizi složenih uzoraka.

Ključne riječi: spektrofotometrija, elektromagnetsko zračenje, azo bojila, mikrobiološka razgradnja, maslinovo ulje, patvorenje

SUMMARY

Spectrophotometry, a branch of spectroscopy, focuses on measuring optical properties of matter as a function of wavelength and on the interaction of matter with electromagnetic radiation. Different types of spectrophotometry include UV–VIS, IR, fluorescence, atomic absorption and atomic emission spectrophotometry, each suitable for specific applications. Because of their ability to precisely identify and quantify compounds, spectrophotometers are widely used in environmental analysis and in numerous fields of science and human activity. In addition to an overview of spectrophotometric principles and methods, this research focuses on two experimental goals: evaluation of microbiological degradation of azo dye Ponceau S and evaluation of quality and authenticity of olive oil. For the Ponceau S decolorization analysis, samples were prepared in three different media with *Pseudomonas aeruginosa* suspension and a 100 mg/L dye solution, and absorbance in samples was measured at different times using a VIS spectrophotometer. Microbiological degradation of azo dye occurred, and spectrophotometric measurements determined the degree of discoloration. For the analysis of olive oil, absorbance of six homogenized samples of olive oil in isooctane was measured at certain wavelengths using the prescribed method and a UV-VIS spectrophotometer, in order to detect oxidation products that indicate the quality of oil. Results exclude the possibility of adulteration of oil and indicate inadequate storage conditions. Methods described and results obtained from this research show the effectiveness and versatility of spectrophotometry in the analysis of complex samples.

Key words: spectrophotometry, electromagnetic radiation, azo dyes, microbiological degradation, olive oil, adulteration

1. UVOD

Svaka tvar apsorbira, prenosi ili reflektira svjetlost iz čega proizlaze njihova optička svojstva, a navedeni fenomeni posljedica su interakcije materije sa elektromagnetskim zračenjem. Spektrofotometrija je grana spektroskopije koja se bavi kvantitativnim mjerenjem optičkih svojstava materije kao funkcije valne duljine. Ljudsko oko reagira na valne duljine od oko 380 do 780 nm što čini vidljivi dio elektromagnetskog spektra. Spektrofotometrijska mjerenja najčešće se izvode u ultraljubičastom i vidljivom području, no moderni spektrofotometri mogu koristiti i infracrveno zračenje te mikrovalove, ali i druge procese poput fluorescencije i atomske apsorpcije. Spektrofotometrijske metode nezaobilazni su dio analitike te svoju primjenu nalaze u širokom području znanosti i tehnologije, a u ovome radu primijenjene su i opisane dvije takve metode.

1.1. Osnovna načela spektrofotometrije

Spektroskopija se temelji na elektromagnetskom zračenju, obliku energije prenošenom kroz prostor ogromnim brzinama, čija se svojstva opisuju dualnim modelom. Kada su u pitanju fenomeni refleksije, refrakcije, interferencije i difrakcije, elektromagnetsko zračenje modelira se kao valovi okomito oscilirajućih električnih i magnetskih polja sa svojstvima valne duljine, frekvencije, brzine i amplitude. Ipak, ovaj model ne uspijeva objasniti fenomene povezane s apsorpcijom i emisijom energije zračenja stoga se u tom slučaju ono tretira kao snop čestica nazvanih fotoni. Energija fotona izravno je proporcionalna frekvenciji te se dva modela međusobno nadopunjuju. (1)

Interakcija elektromagnetskog zračenja s materijom ili uzorkom prvenstveno uključuje apsorpciju, transmisiju, refleksiju, emisiju i raspršenje. Rezultat ovih interakcija jesu kvantni prijelazi između energetske razine atoma ili molekula. Ukoliko se energija fotona prenosi na materiju tj. zračenje se apsorbira, govorimo o prijelazu iz osnovnog u pobuđeno stanje. Kada se materija pak stimulira, elektroni se pobuđuju na višu energetske razine, a njihov povratak u osnovno stanje praćen je emisijom zračenja. Specifične vrste promatranih interakcija ovise o energiji zračenja te su prikazane na Slici 1.

Vrsta interakcije:	promjena spina		rotacije	vibracije	prijelazi elektrona		nuklearni prijelazi
	10 ⁻²		1	100	10 ⁴	10 ⁶	10 ⁸
	10 m		100 cm	1 cm	100 μm	1000 nm	10 nm
	3 × 10 ⁶		3 × 10 ⁸	3 × 10 ¹⁰	3 × 10 ¹²	3 × 10 ¹⁴	3 × 10 ¹⁶
	10 ⁻³		10 ⁻¹	10	10 ³	10 ⁵	10 ⁷
Područje EM spektra:	radiovalovi		mikrovalovi	infracrveno	vidljivo i ultraljubičasto	X-zrake	γ-zrake

Slika 1. Područje elektromagnetskog (EM) spektra i pripadajuće vrste interakcija. Preuzeto i prilagođeno iz (1).

Tijekom prijenosa energije, svaka tvar apsorbira karakteristične frekvencije elektromagnetskog zračenja pri čemu dolazi do povećanja energije materije i smanjenja energije zračenja. U smislu modela fotona, snop zračenja se prigušuje te se broj fotona smanjuje. Intenzitet zračenja smanjuje se s početnog I_0 na propušteno I , a omjer ovih dviju veličina daje udio zračenja koji prenosi uzorak koji se definira kao transmitancija, T :

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Apsorbancija, A odnosi se na količinu apsorbiranog zračenja i obrnuto je proporcionalna transmitanciji, a povezuje ih logaritamski izraz:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = -\log T$$

Količina elektromagnetskog zračenja koja će proći kroz analiziranu tvar do detektora ovisna je o koncentraciji uzorka i duljini puta zrake tj. debljini kivete u kojoj se nalazi uzorak. Navedeno opisuje Lambert–Beerov zakon pomoću kojeg je moguće odrediti nepoznatu koncentraciju u analiziranom uzorku, a dan je sljedećim izrazom:

$$A = \varepsilon * b * c$$

gdje je:

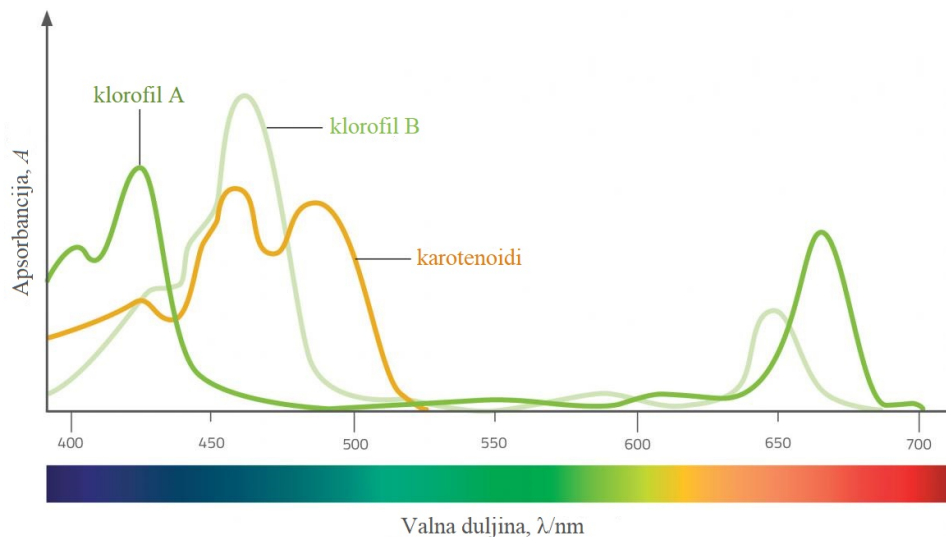
ε – molarni apsorpcijski koeficijent tvari [$\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$]

b – debljina kivete [cm]

c – koncentracija otopine [g L^{-1}]

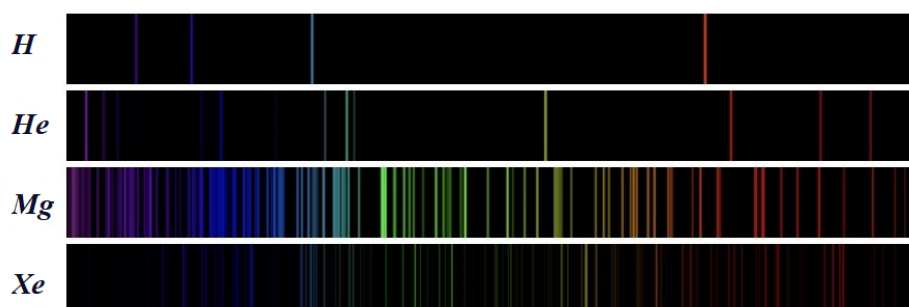
Zahvaljujući Lambert–Beerovom zakonu, pomoću spektrofotometrijskih metoda možemo kvantificirati koncentraciju spojeva u otopini, pronaći i definirati funkcionalne skupine u kemikalijama, odrediti strukturu i molekulsku masu spojeva te odrediti sastav različitih materija. Ipak, treba imati na umu da molarni apsorpcijski koeficijent ovisi o uvjetima okoline kao što su otapalo, sastav otopine i temperatura stoga su moguće varijacije i odstupanja od stvarnih vrijednosti ako se u analizi koriste literaturne vrijednosti koeficijenata. Iz tog razloga, točniji rezultati analize dobivaju se korištenjem standardne otopine analita u istom otapalu pri sličnoj temperaturi (1). Također, Lambert–Beerov zakon opisuje uvjete apsorpcije samo otopina koje su razrijeđene stoga je u tom smislu ograničavajući. Do odstupanja od linearnog odnosa apsorpcije i koncentracije može doći pri otopinama većih koncentracija i otopina sa visokim sadržajem drugih tvari zbog elektrostatskih interakcija i promjene raspodjela naboja (1).

Kada tvari apsorbiraju elektromagnetsko zračenje, apsorbiraju ono samo određenih valnih duljina, dok ostatak prolazi nesmanjenog intenziteta. Prikaže li se grafički ovisnost apsorpcije o valnoj duljini dobivamo spektralni apsorpcijski dijagram tzv. spektar, a isti se može nacrtati i u odnosu na valni broj ili frekvenciju. Svaki spoj ima jedinstveni apsorpcijski spektar te se na temelju ove spoznaje njihovim tumačenjem mogu identificirati određene nepoznate tvari ili potvrditi njihovo prisustvo. Apsorpcijski spektar nekog spoja uvjetuje njegovu obojanost što je objašnjeno na primjeru fotosintetskih pigmenata prikazanih na Slici 2. Klorofili apsorbiraju zračenje valnih duljina vidljivog dijela elektromagnetskog spektra u području plave i crvene boje, dok u području zelene i žute oni prenose zračenje koje ljudsko oko detektira kao zelenu boju klorofila. Karotenoidi apsorbiraju u području plave, što se očituje komplementarnom narančastom bojom. Ako materija apsorbira pri svim valnim duljinama u vidljivom području, dolazi do crne obojanosti, a ako pak propušta elektromagnetsko zračenje u potpunosti, očitovana boja biti će bijela (2).



Slika 2. ApSORPCIJSKI spektri fotosintetskih pigmenata. Preuzeto i prilagođeno iz (3).

Do emisije elektromagnetskog zračenja dolazi nakon pobuđivanja materije na jednu ili više energetskih razina, točnije, prilikom vraćanja na nižu energetsku razinu ili u osnovno stanje koje se očituje u obliku viška energije. Kada se energija otpuštenog zračenja, često izražena kao relativna snaga, grafički opiše kao funkcija valne duljine ili frekvencije, dobiva se emisijski spektar. Emisijski spektar može biti linijski, vrpčasti ili kontinuirani. Linijski ili diskontinuirani emisijski spektar dobiva se prilikom zračenja dobro odvojenih pojedinačnih atoma ili iona, a sastoji se od jasno definiranih spektralnih linija (Slika 3.). Kao i apSORPCIJSKI, linijski spektar karakterističan je za svaki element zbog čega se često koristi za kvalitativnu analizu. Vrpčasti emisijski spektar sastoji se od nekoliko skupina blisko razmaknutih linija koje se očituju kao vrpce, a nastaju prilikom zračenja malih molekula ili radikala. Kontinuirani emisijski spektar prikazuje isprekidanu liniju koja karakterizira toplinsko zračenje užarenih krutina nazvano zračenje crnih tijela. (1)



Slika 3. Emisijski linijski spektri vodika, helija, magnezija i ksenona. Preuzeto i prilagođeno iz (4).

1.2. Vrste spektrofotometara i njihova primjena

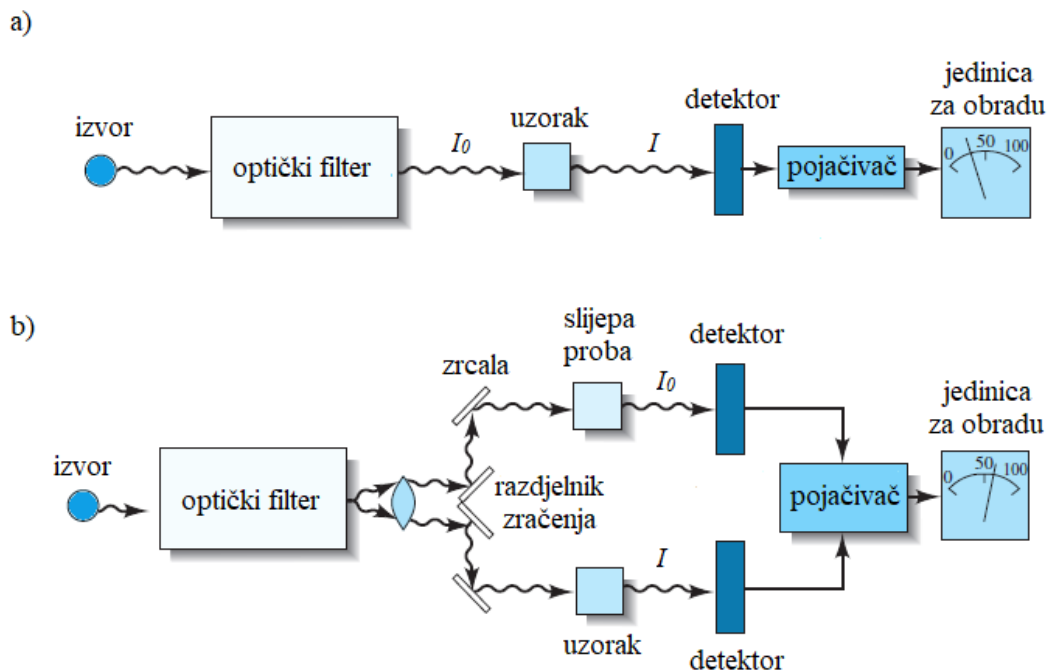
Instrumenti pomoću kojih se izvodi mjerenje i dobivaju spektri nazivaju se spektrofotometri, a oni omogućuju izlaganje ispitivanog uzorka elektromagnetskom zračenju i mjerenje intenziteta propuštenog ili otpuštenog zračenja u odnosu na njegovu valnu duljinu. Kod starijih spektrofotometara propušteno zračenje grafički se znalo prikazivati kao odnos transmitancije u odnosu na valnu duljinu, no danas se apsorbancija prikazuje izravno (1). Osnovne komponente ovih instrumenata za mjerenje apsorpcije, emisije i fluorescencije slične su po pitanju značajki te se većina spektrofotometara sastoji od: 1) stabilnog izvora energije zračenja, 2) monokromatora, komponente koja izolira valne duljine određenog područja zračenja, 3) spremnika za uzorak, 4) detektora zračenja i 5) elektroničke jedinice za očitavanje i obradu signala. Ovisno o korištenom području elektromagnetskog zračenja, analitički instrumenti imaju svojstvene karakteristike.

1.2.1. *UV–VIS spektrofotometrija*

Spektrofotometrijske metode najčešće se primjenjuju u ultraljubičastom (UV) i vidljivom (VIS) području elektromagnetskog spektra. UV–VIS spektrofotometri jedni su od najčešće korištenih analitičkih instrumenata čija je mogućnost rada od 180 nm pa sve do ~ 1000 nm što već spada u blisko infracrveno područje. Služe za mjerenje apsorbcije uzoraka te njihovu kvantitativnu i kvalitativnu analizu. Prema konstrukciji, dijele se na spektrofotometre s jednostrukom, dvostrukom i podijeljenom zrakom čije su glavne komponente prikazane na Slici 4.

Spektrofotometar s jednostrukom zrakom koristi izvor zračenja koje se lećama usmjerava na optički filter ili monokromator koji ga razdvaja. Kroz optičku rešetku zraka određene valne intenziteta duljine usmjerava se na ćeliju s uzorkom gdje dolazi do apsorpcije. Propušteni dio zračenja zatim dolazi do detektora koji energiju zračenja pretvara u signal koji se pojačava i mjeri na elektroničkom hardveru ili računalu. Ovakvi spektrofotometri najprikladniji su za kvantitativna mjerenja apsorpcije pri jednoj valnoj duljini, a prednost im je jednostavnost, niska cijena i lakoća održavanja. Kod spektrofotometra s dvostrukom zrakom, zračenje iz filtera ili monokromatora razdjelnikom se dijeli na dvije zrake koje se ogledalima usmjeravaju na referentnu otopinu i uzorak kroz koje istovremeno prolaze do detektora. Dva signala se pojačavaju, a njihov omjer koji odgovara apsorbanciji uzorka prikazuje se na izlaznoj

elektroničkoj jedinici. Opisani princip mjerenja s dvostrukom zrakom omogućava bolju preciznost i veću razinu automatizacije.



Slika 4. Shematski prikaz komponenti UV–VIS spektrofotometara s a) jednostrukom i b) dvostrukom zrakom. Preuzeto i prilagođeno iz (1).

Izvor mora osiguravati stabilno zračenje dovoljno jakog intenziteta radi jednostavne identifikacije i mjerenja. U tu svrhu koriste se žarulje koje sadrže plin nekog elementa ili pare metala pod određenim tlakom čiji pobuđeni elektroni emitiraju zračenje određenog dijela elektromagnetskog spektra. Za UV područje najčešće se koriste vodikova, deuterijeva i živina žarulja, dok je za VIS područje to volframova ili žarulja halogena. U UV–VIS spektrofotometriji najčešće se koristi kombinacija dvaju izvora kako bi se pokrila oba područja valnih duljina.

Funkciju razlaganja emitiranog zračenja imaju optički filtri uz koje se postavljaju razne leće, pukotine i zrcala za suzbijanje, propuštanje i usmjeravanje zračenja. Optički filtri su obojena stakla visoke čistoće, a u UV–VIS spektrofotometrima koriste se monokromatori poput prizme ili, češće, difrakcijska rešetka koja je sastavljena od niza sitnih paralelnih pukotina. Navedene komponente uvelike povećavaju selektivnost i osjetljivost instrumenta te smanjuju odstupanje od Lambert–Beerovog zakona (1).

U prostoru za mjerenje nalazi se spremnik tj. držač u koji se stavlja nosač uzorka što je u ovome slučaju kiveta. Kivete mogu biti napravljene od silikatnog stakla, pomiletil–akrilata ili plastike za ispitivanje u VIS području, dok su za UV područje primjenjive samo kivete napravljene od taljenog silicija ili kvarca (1). Klasični oblik kiveta korištenih u spektrofotometriji je prizma duljine i širine od 10 mm.

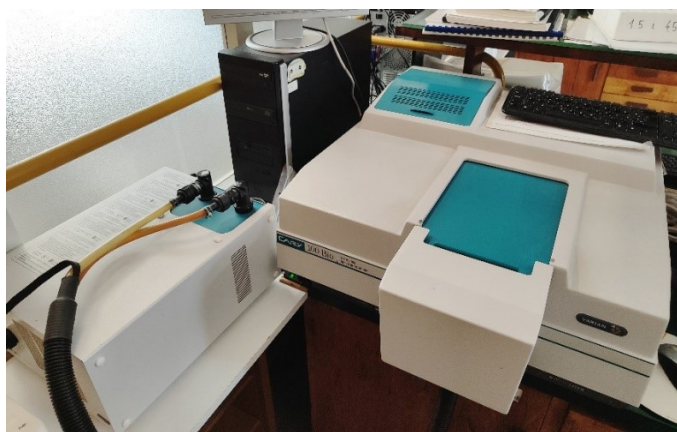
Funkcija detektora u spektrofotometru je prepoznati intenzitet propuštenog zračenja kroz fotoelektričnu pretvorbu energije u mjerljivi električni signal. Često korišteni detektori su fotocijevi, fotomultiplikatorske cijevi i niz gusto sastavljenih fotodioda. Princip rada navedenih komponenti temelji se na promjeni napona i prijenosa emitiranih fotoelektrona s katode na anodu pri čemu nastaje struja koja se može pojačavati i mjeriti. Broj fotoelektrona koji su preneseni s katode izravno je proporcionalan zračenju na površini katode.

Prikupljanje i obrada rezultata spektrofotometrijskih ispitivanja danas je nezamisliva bez primjene računala. Moderni spektrofotometri većinom sadrže ugradbenu memoriju i digitalni prikaz za prilagođavanje postavki i parametara metode te pregled rezultata. Zahvaljujući softverskim programima instrumenata, osim same obrade i pohrane rezultata, moguće je razno manipuliranje podacima (npr. korekcije bazne linije spektra, poboljšanje rezolucije), usporedba rezultata s bazama podataka, bolja kontrola svih čimbenika analize te validacija samog instrumenta.

UV–VIS spektrofotometrija korisna je za otkrivanje kromofornih skupina koje uzrokuju obojenost organskih spojeva te kao potpora drugim tehnikama, no samostalno nije dovoljno specifična za kvalitativnu analizu. Ipak, za provođenje kvantitativne analize jedan je od najkorisnijih dostupnih alata. Njezine prednosti su jednostavnost i mogućnost automatiziranja, dobra selektivnost i točnost, visoka osjetljivost i širok raspon mjerenja. Većina organskih, anorganskih i biokemijskih spojeva apsorbira UV ili VIS zračenje zbog čega se ove metode svakodnevno koriste u različitim područjima znanosti i industrije. Koristi se u prirodnim znanostima, za razna bakteriološka ispitivanja te u biokemiji prvenstveno za kvantitativnu procjenu DNA, RNA i proteina te za istraživanje aktivnosti enzima (5). Nezamjenjiva je u analizama vode, zraka i tla gdje se koristi za određivanje prisutnosti onečišćujućih tvari te za procjenu kvalitete i validacije čistoće npr. vode za laboratorijska ispitivanja ili terenska ispitivanja sigurnosti vode za piće pomoću prijenosnog spektrofotometra (6). Široku uporabu nalazi i u medicini i dijagnostici: kvantifikacija bioloških molekula, mjerenje glukoze, kolesterola, bilirubina i ostalih metabolita u krvi i urinu, otkrivanje infekcija analizom specifičnih apsorpcijskih uzoraka nusprodukata patogena i mnoge druge. U farmaceutskoj

industriji koristi se za testiranje sirovina, međuproizvoda i finalnih proizvoda npr. mjerenjem apsorpcijskog spektra koji je u korelaciji s određenim vrijednostima koncentracije lijeka (7). Također se koristi u kontroli kvalitete sustava boja i cementa te je prikladna za kolometrijsku primjenu u industrijama koje koriste pigmente poput tiska, tekstila ili proizvodnje tinte i boja. Koristi se i u forenzici za praćenje dokaza i otkrivanje porijekla ilegalnih supstanci ili npr. procjenu starosti hematoma postavljanjem optičke sonde direktno na površinu kože (8). Jedno od najvažnijih i brzorastućih područja primjene spektrofotometrijskih metoda je prehrambena industrija i lanac opskrbe hranom u svrhu osiguravanja kvalitete i sigurnosti hrane. Ovdje se koristi za mjerenje koncentracije specifičnih spojeva poput vitamina, bojila i konzervansa koji osiguravaju kvalitetu hrane, za kvantificiranje hranjivih tvari u svrhu nutritivne analize, za otkrivanje onečišćivača i toksina, za praćenje promjena u sastavu hrane tijekom njene obrade te za testiranje autentičnosti vrijednih prehrambenih proizvoda poput maslinovog ulja, meda i vina.

U ovome istraživanju korišten je Cary 100 Bio UV–VIS spektrofotometar visokih performansi prikazan na Slici 5. Ovo je spektrofotometar s dvostrukom zrakom i naprednim optičkim sustavom, a njegova mogućnost rada obuhvaća elektromagnetsko područje od 190 do 900 nm te očitavanje pojedinačnih nanometrijskih jedinica. Vidljivi dio spektra pokriva volframova halogena svjetiljka s kvarcnim prozorom, a ultraljubičasti izvor je deuterijeva lučna žarulja. Instrument dolazi s dodatkom za kontrolu temperature koji omogućuje precizno upravljanje temperaturom uzorka, sadrži snažan softver za prikupljanje i analizu podataka te posjeduje različite module za specifične analize poput kinetike, enzimskih testova i kvantifikaciju proteina i nukleinskih kiselina. Cary 100 Bio svestran je UV–VIS spektrofotometar prikladan za precizna i pouzdana mjerenja u biološkim i ekološkim istraživanjima te različitim kemijskim analizama.



Slika 5. Cary 100 Bio UV–VIS spektrofotometar.

1.2.2. VIS spektrofotometrija

Iako se UV–VIS spektrofotometrija na prvu može činiti kao superiornija tehnika, spektrofotometri koji koriste isključivo vidljivo područje elektromagnetskog spektra imaju svoje prednosti i svrhu. To su spektrofotometri s jednostrukom zrakom čije su značajke opisane u prethodnom poglavlju, a karakterizira ih jednostavnost uporabe, cjenovna prihvatljivost i vrlo često kompaktan dizajn instrumenta. VIS spektrofotometri korisni su prilikom ispitivanja pri točno određenim valnim duljinama, a najčešće se koriste u području medicine i zdravstva te ekološkim ispitivanjima. U mikrobiološkim ispitivanjima redovno se koriste pri određivanju koncentracije bakterijskih kolonija (engl. *colony-forming units*, CFU), a u tu svrhu je u ovome istraživanju korišten spektrofotometar BioPhotometer 6131 prikazan na Slici 6.

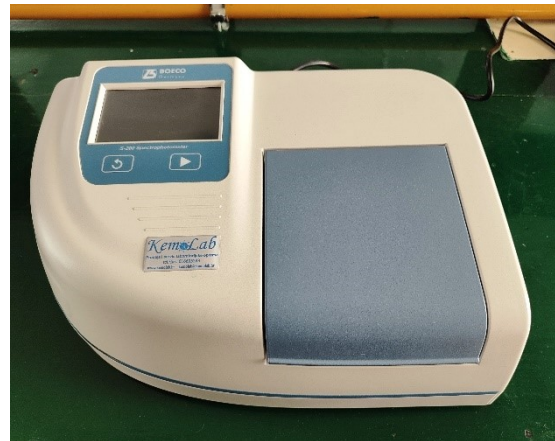


Slika 6. VIS spektrofotometar BioPhotometer 6131.

U istraživanju su korištena još dva VIS spektrofotometra – Spectroquant Pharo 100 (Slika 7.) i S–200 (Slika 8.). Oba spektrofotometra imaju mogućnost očitavanja pojedinačnih nanometrijskih jedinica i interne pohrane podataka. Pharo 100 se pokazao primjerenijim prilikom snimanja apsorpcijskih spektara zbog opcije izravnog prijenosa podataka na vanjsku sabirnicu. S–200 novije je generacije što se očituje u njegovoj brzini rada zbog čega je korišten u većem dijelu istraživanja prilikom mjerenja apsorbancije pri određenoj valnoj duljini.



Slika 7. VIS spektrofotometar Spectroquant Pharo 100.



Slika 8. VIS spektrofotometar S-200.

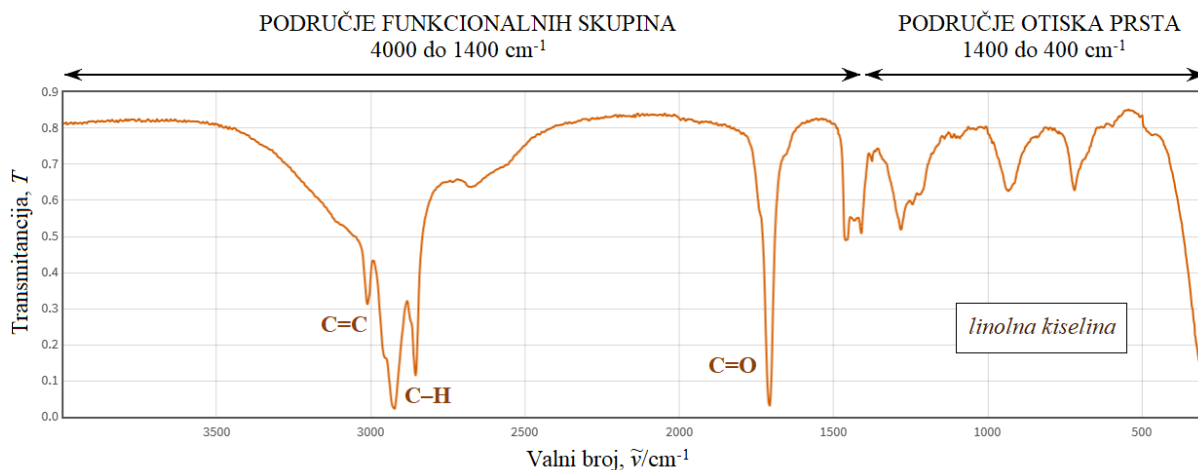
1.2.3. IR spektroskopija

Spektroskopija u infracrvenom (IR) području temelji se na apsorpciji elektromagnetskog zračenja valnih duljina karakterističnih za vibracije molekula. Gotovo sve molekule apsorbiraju infracrveno zračenje stoga se ova vrsta spektroskopije koristi za kvalitativnu analizu organskih i anorganskih spojeva, a ona se može provoditi na uzorcima svih agregatnih stanja. Prednosti ovih metoda jesu brzina izvođenja, mala količina potrebnog uzorka te velika točnost s obzirom da svaki molekularni spoj ima jedinstveni infracrveni apsorpcijski spektar. Ipak, za kvalitativne analize manje je zadovoljavajuća od UV–VIS spektrofotometrije zbog manje preciznosti i osjetljivosti, što ne znači da se ne može koristiti u tu svrhu.

Molekule će apsorbirati infracrveno zračenje samo onih frekvencija koje odgovaraju karakterističnim mehaničkim vibracijama kemijskih veza molekule. Uvjet za takvu apsorpciju je promjena električnog dipolnog momenta, zbog čega spojevi poput O₂, N₂ i Cl₂ koji su simetrični i ne posjeduju stalni dipolni moment, neće apsorbirati zračenje. Vibracije koje mijenjaju dipolni moment molekule jesu asimetrično istezanje, asimetrično savijanje i interna rotacija veze.

Infracrveno područje elektromagnetskog zračenja širokog je raspona te je podijeljeno na tri dijela: blisko IR (4 000 cm⁻¹ do 14 000 cm⁻¹), srednje IR (400 cm⁻¹ do 4 000 cm⁻¹) i daleko IR područje (10 cm⁻¹ do 400 cm⁻¹). U IR spektroskopskim ispitivanjima najviše se koristi blisko IR područje, a dobiveni spektar podijeljen je na dva dijela (Slika 9.). IR apsorpcijski spektri interpretiraju se prvenstveno pronalaženjem karakterističnih pikova ili vrpca koji odgovaraju

određenim funkcionalnim skupinama i kemijskim vezama u prvome području spektra. Područje otiska prsta karakteristično je za molekulu kao cjelinu te ono koristi za pouzdanu identifikaciju spojeva usporedbom uzorcima pikova ovog dijela spektra sa spektrima iz baza podataka, umjesto analizom pojedinih pikova.

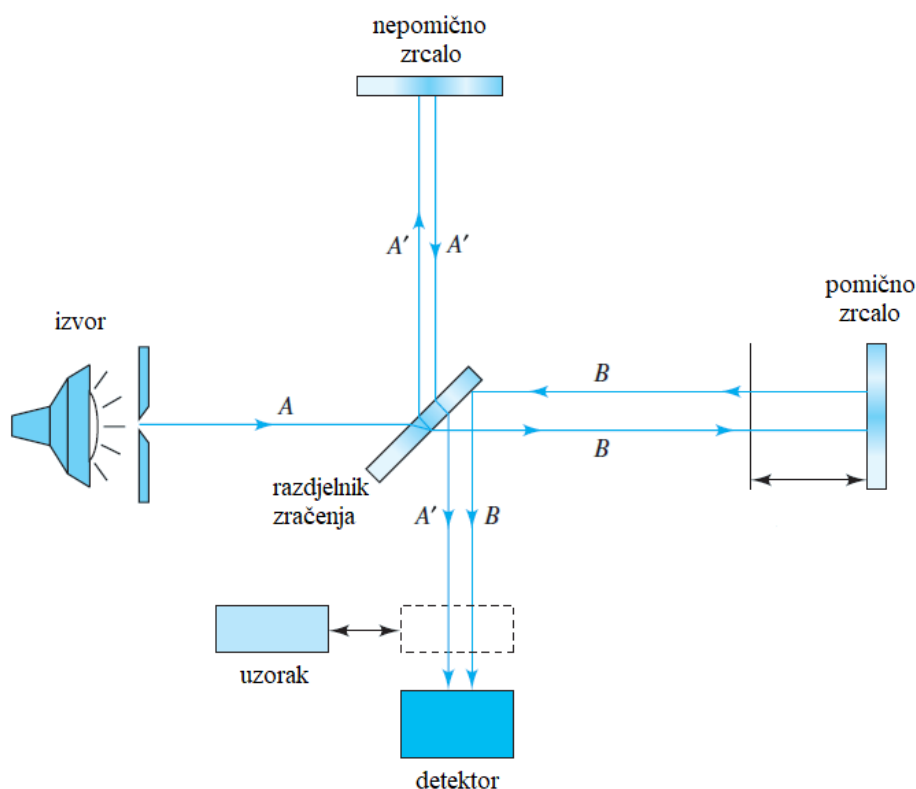


Slika 9. IR apsorpcijski spektar linolne kiseline. Preuzeto i prilagođeno iz (9).

U IR spektroskopiji koriste se disperzivni spektrometar i spektrometar s Fourierovom transformacijom (FTIR), a njihove glavne komponente ne razlikuju se mnogo od onih u UV–VIS spektrofotometriji. Ipak, kod IR spektrometara spremnik za uzorak obično se nalazi između izvora zračenja i monokromatora jer nema opasnosti od fotoraspada uzorka kao kod izvora UV i VIS zračenja. Također, IR izvori su zagrijane čvrste tvari te IR detektori reagiraju na toplinu, a ne fotone. Izvori zračenja za srednje IR područje najčešće su Nernstov žar, Globar i metalne spirale, za blisko IR područje volfram žarulje i metalni vodiči te za daleko IR područje živina žarulja (1). Kao nosači uzorka za krutine koriste se pločice od natrijevog klorida, a za tekućine i plinove posebno građene kivete. Od izvora, toplinsko zračenje prolazi istovremeno kroz uzorak i slijepu probu nakon čega dolazi do monokromatora gdje se razdvaja te se svaka valna duljina usmjerava na detektor koji proizvodi električni signal za daljnju obradu. U disperzivnom spektrometru koriste se toplinski i fotonski detektori poput termopara i bolometra.

Disperzivni IR spektrometri ograničeni su jer pojedinačno ispituju valne duljine analita što rezultira dužim vremenom mjerenja i niskom osjetljivošću zbog čega se danas češće koriste FTIR spektrometri. FTIR spektrometar na mjestu monokromatora koristi Michelsonov interferometar koji dijeli zračenje u dvije zrake (Slika 10.). Jednu zraku reflektira nepomično zrcalo, dok pomično zrcalo okomito na prvo reflektira drugu zraku pri čemu nastaje razlika u

putanjama dviju zraka. One se rekombiniraju na razdjelniku i usmjeravaju na uzorak, a zbog razlike u optičkom putu sve valne duljine se otkrivaju i mjere istovremeno. Kako bi se konačno dobili apsorpcijski spektri, dobiveni interferogrami dekodiraju se matematičkim tehnikama poznatima kao Fourierova transformacija koje za takvu obradu zahtijevaju dostatna računala velike brzine. Jednostavniji dizajn, veća brzina, visoka rezolucija i osjetljivost, točnija kalibracija, bolja preciznost i visoka ponovljivost sve su prednosti zbog kojih su FTIR spektrometri danas gotovo u potpunosti zamijenili disperzivne.



Slika 10. Shematski prikaz Michelsonovog interferometra. Preuzeto i prilagođeno iz (1).

Metode IR spektroskopije široko se primjenjuju u raznim područjima koji zahtijevaju identifikaciju organskih tvari npr. prirodne znanosti gdje je sastavni dio laboratorija za identifikaciju i definiranje strukture kemijskih spojeva. Koriste se u ekološkim ispitivanjima za analizu i prisustvo onečišćujućih tvari te u istu svrhu i u prehrambenoj industriji. U farmaceutskoj industriji koriste se za analizu i kontrolu kvalitete lijekova, a u proizvodnji općenito za procjenu kemijskih reakcija i mjerenje pojave ili nestanka određenih reaktanata i produkata. U forenzici se koriste za identifikaciju nepoznatih tvari s mjesta zločina, a u umjetnosti se testiranjem pigmenata boja provjerava autentičnost umjetnina. Iako je srednje IR

područje najkorištenije, blisko IR područje korisnije je za analizu vodenih uzoraka jer su pikovi –OH skupine manje izraženiji. Daleko IR područje primjenu nalazi u analizi materijala koji u svom sastavu sadrže metale stoga su ove metode koristan alat za pronalaženje greški u raznim strukturama što se primjenjuje u industrijama poput građevinske, zrakoplovne, naftne i plinske. IR spektroskopija također igra nezamjenjivu ulogu u otkrivanju svemira i proučavanju astronomskih objekata koji emitiraju IR zračenje zbog čega se ovim tehnikama mogu promatrati te su sastavni dio mnogih teleskopa i svemirskih letjelica. (1,10,11)

1.2.4. *Fluorescencijska spektrofotometrija*

Za razliku od prethodnih triju opisanih tehnika koje se najvećim dijelom baziraju na apsorpciji elektromagnetskog zračenja, fluorescencijska spektrofotometrija mjeri njegovu emisiju. Fluorescencija je vrsta fotoluminiscencije pri kojoj apsorpcijom pobuđeni atomi ili molekule prilikom relaksacije otpuštaju višak energije u obliku fotona. Emitirano zračenje veće je valne duljine od apsorbiranog stoga dolazi do kratkotrajne pojave svjetlosti nakon čega se atomi tj. molekule vraćaju u osnovno stanje. U odnosu na apsorpcijsku spektrofotometriju, fluorescencijska je mnogo osjetljivija i selektivnija te nudi veliki linearni koncentracijski raspon što je čini pogodnom za niske koncentracije analita. Ipak, podložnija je utjecaju vanjskih čimbenika poput pH, temperature ili prisutnosti drugih spojeva te su ove metode zbog manjeg broja kemijskih sustava koji su podložni fluorescenciji manje primjenjive od apsorpcijskih. Spektrofluorimetri obično su osjetljiviji od prethodno spomenutih spektrofotometara te koriste snažnije izvore zračenja poput ksenonove žarulje, a bitna razlika je da se detektor postavlja pod kutom od 90° u odnosu na izvor kako bi se izbjegla detekcija ukupnog emitiranog zračenja i detektiralo samo fluorescentno zračenje.

Iako naizgled inferiornija tehnika, fluorescencijska spektrofotometrija svoju primjenu nalazi u mnogim područjima prirodnih znanosti. Fluorescencijom se mogu odrediti različiti tipovi spojeva poput aminokiselina, proteina, koenzima, vitamina, nukleinskih kiselina i mnogih metabolita na način da se fluorescentne sonde ili oznake kovalentno vežu na određena mjesta u molekulama što omogućuje njihovu daljnju detekciju. Jedan od primjera ovakve detekcije je metoda fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) koja se koristi za identifikaciju gena i kromosoma. Npr. DNA koja kodira gen od interesa kovalentno je vezana za fluorescentnu molekulu te se ona ispire preko ispitivanog kromosoma organizma prilikom čega dolazi do vezanja za komplementarnu sekvencu. Kada se uzorak izloži UV zračenju, dolazi do

fluorescencije koja otkriva prisutnost i položaj traženog gena. Zbog svoje osjetljivosti, fluorescencijska spektrofotometrija koristi se i kao tehnika detekcije u mnogim drugim instrumentalnim metodama poput tekućinske kromatografije i elektroforeze. Vrijedan je alat u ekološkim ispitivanjima za identifikaciju onečišćujućih tvari poput organofosfornih pesticida, ali i prilikom izlivanja nafte. Nezaobilazna je i u identifikaciji lijekova koji u svojoj strukturi sadrže jedinstveni fluorescentni marker što je, osim u farmaceutskoj industriji, posebno korisno u kliničkoj dijagnostici za analizu krvi i urina. (1,10)

1.2.5. *Atomska apsorpcijska spektrofotometrija*

Dosad opisane tehnike koriste se za analizu tvari koje postoje kao molekule stoga se one svrstavaju u molekularnu spektrofotometriju. S druge strane, predmet istraživanja atomske spektrofotometrije jesu slobodni atomi tj. njihova apsorpcija, emisija i fluorescencija zračenja. Ove metode koriste se za kvalitativnu i kvantitativnu analizu elementarnih tvari, a odlikuje ih prikladnost, brzina i visoka selektivnost. Kako bi ovakva analiza bila moguća, pojedinačni atomi moraju međusobno biti dobro odvojeni stoga je prvi korak svake atomske spektrofotometrijske metode atomizacija. Atomizacija je proces prilikom kojeg uzorak isparava i razgrađuje se na način da nastaju slobodni atomi i elementarni ioni u plinovitoj fazi. Kritičan je korak u ovoj tehnici s obzirom da njena učinkovitost i ponovljivost može imati velik utjecaj na cjelokupnu analizu te osjetljivost, preciznost i točnost same metode. (1)

Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS) najraširenija je atomska tehnika. Prvi komercijalni atomski apsorpcijski spektrofotometar predstavljen je 1959. godine te je nakon toga uporaba ovih metoda drastično porasla (1). Kod ove tehnike, tvari se prevode u disocirano nepobuđeno osnovno stanje nakon čega element apsorbira elektromagnetsko zračenje određene valne duljine koje se naposljetku mjeri te je na osnovu toga izračunom moguće odrediti koncentraciju analizirane tvari. Atomizaciju je u ovoj tehnici moguće postići elektrotermalnim raspršivačem ili, češće, plamenom. Plamena atomizacija pogodna je za elemente s niskim energijama pobude, a za izgaranje se koristi kombinacija goriva i oksidacijskog sredstva, najčešće acilen sa zrakom ili dušikovim oksidom. Iako atomizacija plamenom ima visoku ponovljivost, značajan nedostatak je njena učinkovitost koja je vrlo mala. Iz tog razloga se za analizu elemenata u tragovima koristi elektrotermalna atomizacija zbog bolje osjetljivosti i veće granice detekcije, no u ovom slučaju smanjene su brzina, preciznost i ponovljivost. Ovakva vrsta atomizacije provodi se u električno grijanoj grafitnoj cijevi, smještenoj između izvora

zračenja i monokromatora, kao i u slučaju plamena. U AAS koristi se linijski izvor zračenja, a najčešće je to žarulja sa šupljom katodom.

AAS se zbog svoje osjetljivosti i specifičnosti široko koristi u raznim područjima za elementarnu analizu, najčešće metala. Relativno je jeftina i isplativa tehnika, no obično je ograničena na analizu jednog elementa po mjerenju te zahtijeva različite žarulje za različite elemente. U ekološkim istraživanjima koristi se za detekciju tragova metala u uzorcima vode, tla i zraka, dok se u kliničkoj i biokemijskoj dijagnostici koristi za praćenje i otkrivanje bolesti putem određivanja metalnih iona u biološkim uzorcima poput krvi, urina i tkiva. Također, plamena AAS pokazala se korisnom i u analizi ljudskog mlijeka za određivanje esencijalnih minerala i elemenata u tragovima (12). Kako bi se osigurala sigurnost hrane, ovom tehnikom kontroliraju se onečišćivači u prehrambenim proizvodima i poljoprivrednim uzorcima. Kontrola kvalitete analizom elemenata u tragovima također se provodi i u farmaceutskim proizvodima.

1.2.6. Atomska emisijska spektrofotometrija

U atomskoj emisijskoj spektrofotometriji (AES), atomi ili ioni analita u osnovnom stanju primanjem toplinske ili električne energije prelaze u trenutačno pobuđeno stanje. Nakon nekoliko nanosekundi, takvi pobuđeni atomi vraćaju se u svoje osnovno stanje otpuštajući energiju u obliku fotona karakterističnih valnih duljina tj. dolazi do emisije elektromagnetskog zračenja. Intenzitet emitiranog zračenja direktno je proporcionalan koncentraciji elementa od interesa u uzorku. Osim plamena i elektrotermalnog raspršivača, u AES se za atomizaciju koristi i plazma, vodljiva plinovita smjesa koja sadrži visoke koncentracije kationa i elektrona. Najčešće je to induktivno spregnuta plazma (ICP) koja koristi snažan generator radiofrekvencije kroz koji struji argon. Jednom kada se u plazmi formiraju ioni argona, oni mogu apsorbirati dovoljno energije iz izvora zračenja za održavanje temperature i do 10 000 K pri kojoj daljnja ionizacija održava plazmu neograničeno dugo. Ovakve tehnike visoko su osjetljive i pogodne za multielementarnu analizu, no zahtijevaju složeniju i skuplju opremu te kvalificirano osoblje za rad. AES je prikladna za otkrivanje širokog spektra elemenata zbog čega se koristi za analizu okoliša, geoloških i bioloških uzoraka te metalnih legura u različitim industrijama.

1.3. Azo bojila

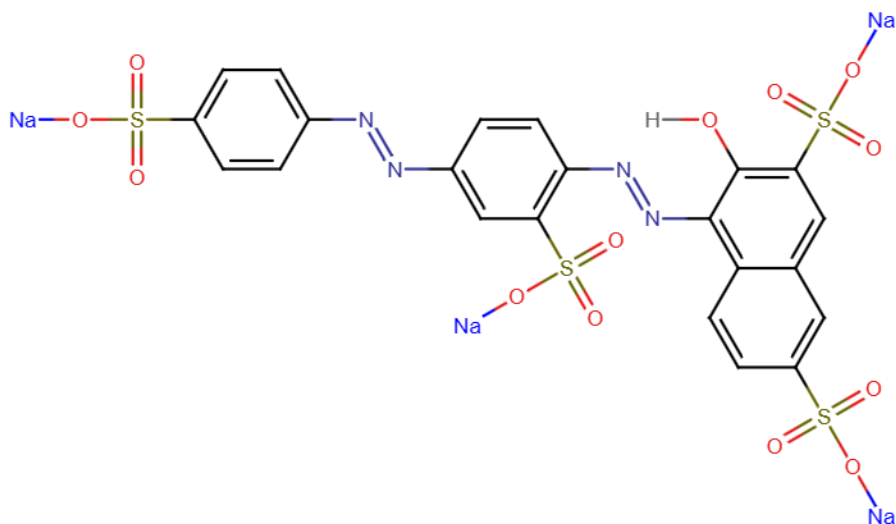
Spektrofotometrijske tehnike koriste se za identifikaciju obojanih tvari što ove metode čini vrlo korisnima prilikom detekcije određenih onečišćivača kao što su azo bojila. Azo bojila najbrojnija su skupina organskih sintetskih bojila, a ujedno i najraznovrsnija te najkorištenija. Karakterizira ih najmanje jedna azo skupina $-N=N-$ vezana na aromatsku jezgru, a u svom sastavu sadrže i auksokromnu skupinu. Navedena azo skupina je kromoforna i odgovorna je za apsorpciju elektromagnetskog zračenja za razliku od auksokromne skupina koja zračenje ne apsorbira već pojačava apsorpcijsko djelovanje kromofora. Auksokromna skupina uvodi se u strukturu ovih spojeva radi mogućnosti vezanja bojila na materijal te produbljivanja njegove obojenosti u svrhu tehničke uporabe, a neki od najvažnijih auksokroma jesu hidroksilna skupina $-OH$, karboksilna skupina $-COOH$, sulfo-skupina $-SO_3H$ te amino skupina $-NH_2$ (13). Složena aromatska struktura i sintetsko podrijetlo čini ova bojila izuzetno stabilnima i teško razgradivima.

Više od pola svjetske proizvodnje boja i pigmenata otpada upravo na azo bojila, a zbog velike moći bojenja materijala svoju primjenu nalaze u raznim industrijama od kojih je najveći potrošač tekstilna za koju se godišnje u svijetu proizvede oko 70 milijuna tona sintetičkih bojila (14). Tijekom tehnoloških procesa, ne vežu se sva bojila za tkaninu, a taj gubitak u otpadnim vodama može iznositi od 2 % do čak 50 % ovisno o korištenom bojilu. Azo bojila u otpadnim vodama dokazano pridonose mutagenom djelovanju površinskih i podzemnih voda te ometaju prodor svjetlosti i smanjuju topljivost kisika u vodenim tijelima što značajno utječe na floru i faunu (15). Kao što je već spomenuto, teško su razgradiva, a njihovi međuprodukti toksični su, mutageni i kancerogeni. Neki od štetnih učinaka azo bojila na zdravlje očituju se kao smanjena funkcija bubrega i jetre, bolesti mokraćnog i reproduktivnog sustava, utjecaj na mozak i središnji živčani sustav, iritacija respiratornog trakta, razne alergije i određeni karcinomi (16,17). Dokazano je da čak i neke bakterije ljudske kože mogu biotransformirati azo bojila u odjeći što može rezultirati apsorpcijom aromatskih amina koji su zaslužni za njihovo toksično djelovanje (16). Zbog svega navedenog te uzimajući u obzir veliku količinu vode koju troši, tekstilna industrija jedan je od glavnih onečišćivača voda, a odlaganje azo bojila u okoliš predstavlja bitan ekološki problem.

Konvencionalne fizikalno-kemijske metode obrade otpadnih voda često nisu zadovoljavajuće po pitanju uklanjanja bojila, nisu energetske učinkovite ni ekonomične te stvaraju sekundarni

otpad koji zahtijeva daljnju obradu. Neodgovarajuća obrada otpadnih voda iz industrija koje koriste azo bojila može biti jednako štetna za okoliš i ljudsko zdravlje kao i njihovo odlaganje u okoliš. Biološke metode učinkovitije su i prihvatljivije, no azo bojila smatraju se ksenobioticima te su otpornija na konvencionalnu biorazgradnju od ostalih onečišćivača. Ipak, mikrobiološke metode pokazale su se uspješnima te neke bakterije, gljivice, kvasci i alge u određenim okolišnim uvjetima mogu u potpunosti obezbojiti te u većoj ili manjoj mjeri mineralizirati azo bojila.

Potencijal uporabe mikrobioloških metoda obrade voda u kombinaciji sa konvencionalnim metodama posljednjih se godina sve više istražuje, a prednosti bakterijske razgradnje azo bojila očituju se u ekološkoj prihvatljivosti metoda, većem stupnju biorazgradnje, manjoj količini nastalog mulja te primjenjivosti na velik broj azo bojila. Glavna tehnika za mjerenje dekolorizacije boje putem mikroorganizama je upravo UV-VIS spektrofotometrija. Izolirani su mnogi bakterijski sojevi sposobni za dekolorizaciju azo bojila te je istu moguće postići pomoću čistih i kombiniranih kultura, a u više istraživanja *Pseudomonas* sp. pokazao se uspješan u razgradnji boje pri različitim uvjetima (14,15,18,19). U ovome radu, za ispitivanje dekolorizacije odabran je glavni humani patogen unutar ovog roda, *Pseudomonas aeruginosa*. Ova bakterija je gram–negativni aerobni bacil i široko rasprostranjeni oportunistički patogen čija je karakteristika preživljavanje u nepovoljnim životnim uvjetima poput niskih koncentracija hranjivih tvari (20). Kao bojilo, zbog dostupnosti odabrana je crvena azo boja Ponceau S ($C_{22}H_{16}N_4O_{13}S_4$) poznata i pod imenom Acid Red 112 čija je struktura prikazana na Slici 11. gdje su vidljive karakteristične azo– i auksokromne skupine te aromatsko porijeklo spoja. Ovo bojilo se osim u tintama i bojama koristi kao indikator i reagens, a najčešće za detekciju proteina i laboratorijsko bojanje.



Slika 11. Kemijska struktura azo boje Ponceau S.

1.3.1. Mikrobiološka razgradnja

Kada su u pitanju bakterije, obezbojenje ili dekolorizacija se može odvijati u anaerobnim, anoksičnim i aerobnim uvjetima ovisno o korištenim kulturama, a reduktivno cijepanje $-N=N-$ veze prvi je korak razgradnje azo bojila. U anaerobnim uvjetima, dekolorizacija je relativno jednostavna i nespecifična, a općenito započinje cijepanjem azo veze azoreduktazom. Ovaj proces uključuje dvije faze prijenosa dvaju elektrona na azo boju kao konačni akceptor elektrona, pri čemu dolazi do obezbojenja (18). Obezbojenje također može biti i rezultat nespecifičnih izvanstaničnih reakcija između reduciranih spojeva nastalih u anaerobnoj biomasi. U procesu sudjeluju mnoge različite skupine bakterija poput acidogenih, acetogenih i metanogenih kojima je nužno osigurati organski izvor ugljika tj. energije (15).

Za aerobnu razgradnju azo bojila ključni su oksidacijski enzimi bakterija koji zahtijevaju prisutnost kisika u cijelome procesu (21). Mono- i di-oksigenaze kataliziraju ugradnju kisika iz O_2 u aromatske prstene spojeva što uzrokuje njihovu fisiju, dok kisikom katalizirane azoreduktaze reduciraju azo bojila na već opisani način (18). Osim kisika, aerobne azoreduktaze pronađene u vrstama *Pseudomonas* K22 i KF46 za reduktivno cijepanje mogu koristiti i NADPH te NADH kao kofaktore (22). Kao i u slučaju anaerobne razgradnje, većina bakterija ne može koristiti azo bojila kao supstrat za rast. Ipak, sojevi poput *Xenophilus azovorans* KF

46 i *Pigmentiphaga kullae* K24 iznimka su te mogu koristiti aromatske amine nastale nakon cijepanja azo veze kao jedini izvor ugljika (18).

Daljnje aromatske međuprodukte koji su izuzetno termodinamički stabilni, bakterije razgrađuju zahvaljujući posebno razvijenim enzimskim sustavima u aerobnim i anoksičnim uvjetima. Prilikom aerobne razgradnje, reakcije započinju zamjenom funkcionalnih skupina aromatskog prstena sa hidroksilnim skupinama, nakon čega uz pomoć O₂ nastupa njegovo cijepanje. U anoksičnim uvjetima, prisutne su reakcije poput redukcije prstena, karboksilacija, reduktivna dehidroksilacija i adicija. U slučaju anaerobnih uvjeta, mnoga istraživanja pokazala su da mineralizacija složenih aromatskih amina nije moguća. S obzirom da je većina aromatskih amina toksična, njihovo uklanjanje je nužno i zahtijeva aerobne uvjete. Najčešći produkti bakterijske dekolorizacije azo bojila jesu sulfonirani naftilamini, a izolirane čiste kulture koje ih mogu razgraditi ili koristiti kao izvor sumpora pripadaju rodovima *Moraxella*, *Arthrobacter* i *Pseudomonas*. (15)

1.4. Maslinovo ulje

Osim u detekciji samih boja, spektrofotometrijske tehnike neizostavne su u analizi prehrambenih proizvoda koji su sastavni dio ljudske svakodnevice. Jedno od najstarijih pronađenih usjeva te sinonim mediteranske kulture je drvo masline, *Olea europaea*. Prešanjem plodova dobiva se maslinovo ulje koje svoju primjenu osim u prehrani, od davnina pronalazi i u religiji, medicini, farmaciji, kozmetici te industriji. Globalno gledajući, maslinovo ulje čini tek 3 % ljudske potrošnje u usporedbi sa sojinim (27 %), palminim (20 %), repičinim (15 %) i suncokretovim (12 %) uljem (23). Ipak, gospodarska i društvena važnost sektora proizvodnje maslinovog ulja neporeciva je kada su u pitanju zemlje Mediterana, uključujući i Hrvatsku. Svjetska proizvodnja maslinovog ulja gotovo je u potpunosti koncentrirana u ovoj regiji, najvećim dijelom zbog klimatskih uvjeta koje maslina zahtijeva, a potrošnja u nekim zemljama doseže i do 50 %.

Maslinovo ulje kao prehrambeni proizvod cijenjeno je zbog svojih vrijednih nutritivnih i organoleptičkih svojstava, a u njegovu sastavu nalaze se mononezasićene masne kiseline, tokoferoli, karotenoidi i fenolni spojevi koji imaju blagodatan utjecaj na zdravlje (24). Konzumacija maslinovog ulja dokazano regulira krvni tlak i smanjuje razine ukupnog kolesterola u krvi kao i LDL kolesterol te trigliceride, što se očituje u smanjenom riziku

oboljenja od ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti. Osim na krvožilni, maslinovo ulje povoljno djeluje i na probavni i imunološki sustav, a njegova antioksidativna svojstva usporavaju razvoj osteoporoze i imaju zaštitno djelovanje na kognitivne funkcije te starenje stanica i mitohondrija. Zaštitni učinak maslinovog ulja očituje se i u različitim stadijima određenih vrsta karcinoma poput onog dojke, prostate, endometrija, debelog crijeva i dr. (25). Pogodan utjecaj na zdravlje imati će isključivo kvalitetna ulja, a navedene blagodati najčešće se pripisuju djevičanskim maslinovim uljima.

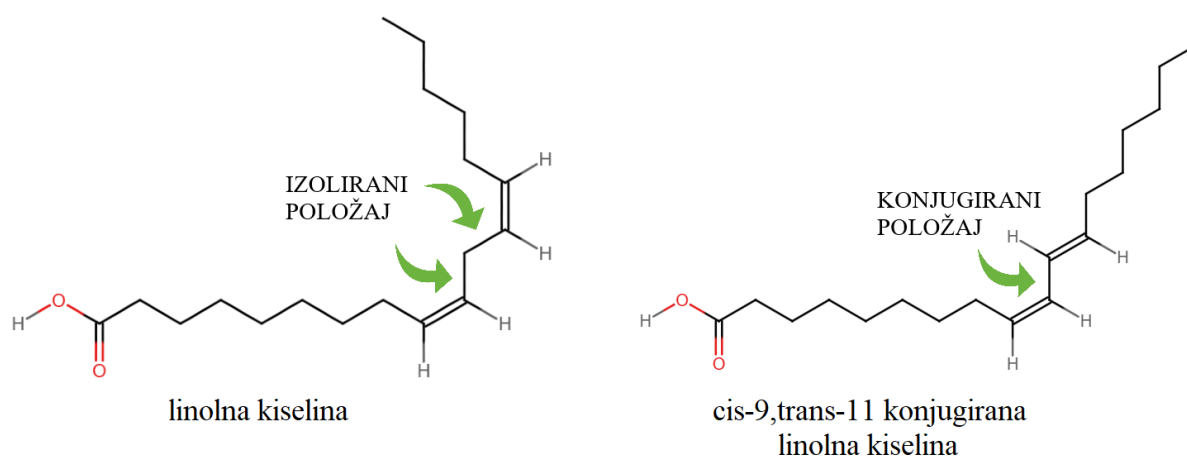
Zbog jedinstvenih senzorskih i nutritivnih karakteristika, maslinovo ulje posjeduje veliku ekonomsku vrijednost te je kao takvo izloženo visokom riziku od patvorenja. U 2019. godini, prema izvještaju EU mreže za prijekare povezane s hranom (engl. *The EU Agri-Food Fraud Network*, FFN), maslinovo ulje je zauzelo prvo mjesto kao najčešće prijavljeni prehrambeni proizvod u pogledu nesukladnosti (26). Postupci poput razrjeđivanja ulja manje kvalitetnima, zamjena ulja i neistinito zemljopisno podrijetlo ugrožavaju identitet ovog proizvoda te osim kvalitete, narušavaju prava potrošača i percipirane zdravstvene dobrobiti maslinovog ulja.

Prema Pravilniku o uljima od ploda i komine maslina, NN 7/2009 (27) maslinova ulja svrstavaju se u sljedeće kategorije kvalitete: 1. djevičansko maslinovo ulje, 2. rafinirano maslinovo ulje, 3. maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih maslinovih i djevičanskih maslinovih ulja, 4. sirovo ulje komine maslina, 5. rafinirano ulje komine maslina, te 6. ulje komine maslina. Djevičanska maslinova ulja definiraju se kao ulja dobivena iz ploda masline isključivo mehaničkim ili drugim fizičkim postupcima koji ne dovode do promjena sastava ulja te koja nisu bila podvrgnuta nikakvoj obradi osim pranja, dekantiranja, centrifugiranja i filtracije (28). Ova kategorija najviše je kvalitete te se dodatno kategorizira na: a) ekstra djevičansko maslinovo ulje, b) djevičansko maslinovo ulje, te c) maslinovo ulje lampante.

Opisana kategorizacija temelji se na tehnološkim postupcima primijenjenim u proizvodnji te fizikalno–kemijskim i senzorskim svojstvima ulja i samih sirovina propisanih već spomenutim Pravilnikom NN 7/2009. Nacionalni pravilnik napisan je po uzoru na međunarodnu legislativu, a njenu osnovu čine Delegirana uredba Komisije EU 2016/2095 (29), na globalnoj razini Codex Alimentarius i, prvenstveno, Međunarodno vijeće za masline (engl. *International Olive Council*, IOC) koje u skladu s tržišnim zahtjevima i najnovijim istraživanjima propisuje i procjenjuje metode analize maslinovog ulja te standarde i ograničenja istih (30). Propisani zahtjevi kvalitete i njihov nadzor nužni su u svrhu kontrole krivotvorenja, provjere autentičnosti i osiguravanja kvalitete maslinovog ulja te same garancije sigurnosti potrošača.

Osnovni pokazatelji kvalitete maslinovog ulja jesu udio ukupnih slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj, parametri K_{232} i K_{270} te organoleptička svojstva. Slobodne masne kiseline izražavaju se kao udio oleinske kiseline na 100 g ulja, a ovim pokazateljem dobiva se informacija o kvaliteti samih plodova masline prije njihove obrade. Određivanje peroksidnog broj jedna je od najstarijih metoda analize ulja i masti, a pokazatelj je primarne oksidacije ulja. Kao dodatni pokazatelj stupnja oksidacijskog kvarenja, provodi se i spektrofotometrijsko mjerenje K vrijednosti čime se bavilo ovo istraživanje. Za utvrđivanje organoleptičkih svojstava, grupa odabranih i osposobljenih ocjenjivača ovlaštenih od strane Ministarstva poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja provodi senzorsku analizu djevičanskih maslinovih ulja pomno definiranim tehnikama degustacije. Ovakvom analizom omogućeno je razlikovanje ulja istih fizikalno–kemijskih svojstava te klasifikacija u tri najviše kategorije kvalitete. (31)

Spektrofotometrijsko ispitivanje u UV području elektromagnetskog spektra daje informacije o kakvoći ulja, stanju njegove očuvanosti, promjenama nastalim tijekom proizvodnje, ali i mogućem patvorenju s rafiniranim maslinovim ili drugim biljnim uljima. Prilikom procesa oksidacije, vezanje kisika na lanac polinezasićene masne kiseline uzrokuje premještanje dvostruke veze iz izoliranog u konjugirani položaj (Slika 12.). Ovakve konjugirane dvostruke veze apsorbiraju energiju UV zračenja što omogućava procjenu oksidacijskog kvarenja mjerenjem apsorbancije. Najzastupljenije polinezasićene masne kiseline u maslinovom ulju su linolna i linolenska kiselina iz kojih nastaju primarni i sekundarni produkti oksidacije. Iz linolne kiseline koja je dvostruko nezasićena nastaju konjugirani dieni, primarni produkti oksidacije, čiji je maksimum apsorpcije pri 232 nm, dok iz trostruko nezasićene linolenske kiseline nastaju konjugirani trieni, sekundarni produkti oksidacije, koji apsorpcijski maksimum pokazuju pri 270 nm. Apsorpciju pri 270 nm povećavaju i drugi sekundarni produkti poput aldehida i ketona koji nastaju zbog pucanja lanaca masnih kiselina na mjestu gdje se kisik vezao. (31,32) Navedene kemijske promjene mogu biti rezultat neprikladnog skladištenja ulja, njegove starosti, nedozvoljene rafinacije ili patvorenja dodavanjem drugih ulja što ovu metodu čini neizostavnom u smislu analize maslinovih ulja, naročito onih najviše kategorije kvalitete.



Slika 12. Dvostruke veze linolne kiseline u izoliranom i konjugiranom položaju.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Zahvaljujući jednostavnosti korištenja i lakoj dostupnosti instrumenata s jedne strane, a odličnoj preciznosti i niskoj razini detekcije s druge strane, spektrofotometrijske tehnike već su desetljećima iznimno raširene metode analize. Primjenu su, osim u znanosti, našle u gotovo svim područjima ljudskog djelovanja (medicina, forenzika, farmacija, poljoprivreda, ekologija, prehrambena industrija, itd.), pa tako i u sanitarnom inženjerstvu. Samo sanitarno inženjerstvo vrlo je multidisciplinarno, obuhvaćajući i ekološki aspekt, higijensko–epidemiološke mjere, sanitarni nadzor, sigurnost i kvalitetu hrane, i dr. Ovaj je rad zato imao tri cilja:

- 1) Dati pregled najčešćih spektrofotometrijskih tehnika i njihove primjene.
- 2) Provesti eksperimentalno istraživanje koje uključuje uporabu spektrofotometrijske tehnike na ekološki problem iz domene sanitarnog inženjerstva. Konkretno, ispitati učinkovitost UV/VIS-spektrofotometrije za praćenje mikrobiološke razgradnje boje Ponceau S, ksenobiotika iz skupine azo bojila, koja predstavlja jednu od glavnih skupina onečišćivača otpadnih voda iz tekstilne industrije.
- 3) Provesti eksperimentalno istraživanje koje uključuje uporabu spektrofotometrijske tehnike iz domene kontrole kvalitete prehrambenih proizvoda. Konkretno, primijeniti UV/VIS-spektrofotometriju za ispitivanje kakvoće i provjeru vjerodostojnosti deklarirane kategorije kvalitete maslinovog ulja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Analiza azo boje Ponceau S

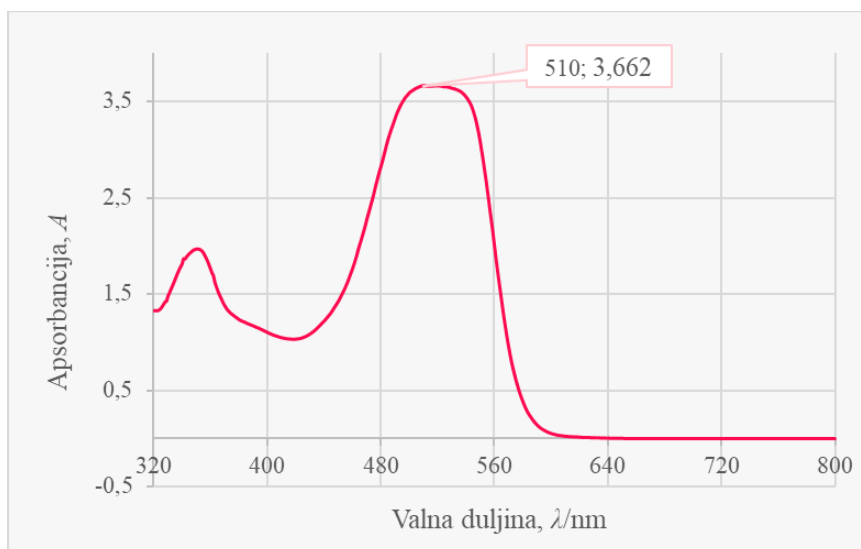
Kako bi se ispitala dekolorizacija boje u uzorku, u ovom istraživanju promatrana su dva čimbenika – vrijeme inkubacije i medij u kojem bakterija *P. aeruginosa* potencijalno razgrađuje boju. Baena–Baldiris i dr. (16), uz navedene, optimizirali su metodu ispitujući utjecaj i drugih čimbenika poput pH, temperature i koncentracije boje. Po uzoru na spomenuto istraživanje, u ovom radu korištene su optimalne vrijednosti temperature (36 °C) i koncentracije boje (100 mg/L) kod kojih je dekolorizacija bila najuspješnija.

Materijali, pribor i uređaji za pripremu otopine boje:

- analitička vaga; Explorer, Ohaus, Parsippany, SAD
- destilirana voda
- odmjerna tikvica od 100 mL s brušenim čepom
- pH–metar; MP 220, Mettler Toledo, EU
- plastične kivete debljine 10 mm
- Ponceau S, prah
- staklena čašica
- stakleni štapić
- spektrofotometar; Spectroquant Pharo 100 VIS , Merck, Darmstadt, Njemačka

Za pripremu otopine boje, u staklenu čašicu odvagano je 0,01 g Ponceau S crvene boje koja je zatim otopljena u destiliranoj vodi i prebačena u odmjernu tikvicu od 100 mL. Ispiranjem čašice i dokapavanjem destilirane vode tikvica je nadopunjena do oznake čime je dobivena otopina koncentracije 100 mg/L. Prije daljnje analize, dobivenoj otopini izmjereni su temperatura (25 °C) i pH (6,02), a koristeći se Spectroquant Pharo 100 VIS spektrofotometrom snimljen je njezin spektar (Slika 13.) u rasponu od 320 do 800 nm u intervalu od 1 nm kako bi se dobila

informacija o apsorpcijskom maksimumu pri kojem će biti izvedena daljnja mjerenja. Iako je korišteni spektrofotometar nešto starije generacije, u ovu svrhu odabran je zbog jednostavnosti prijenosa dobivenih podataka te su na njemu snimljeni svi spektri prikazani u ovome radu.



Slika 13. Spektar otopine boje Ponceau S koji pokazuje apsorpcijski maksimum pri 510 nm.

Materijali, pribor i uređaji za ispitivanje dekolorizacije:

- bakterijske kolonije *Pseudomonas aeruginosa* na cetrimidnom agaru
- centrifuga; 5418, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- inkubatorska tresilica; Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Njemačka
- Luria Bertani bujon
- membranski filter za špricu
- mikropipeta promjenjivog volumena 10–1000 μL
- Mueller Hinton bujon
- plastične epruvete s čepom na navoj volumena 50 mL
- plastične mikro–epruvete za centrifugu
- plastične eze
- plastične kivete debljine 10 mm
- plastične šprice volumena 10 mL

- spektrofotometar; BioPhotometer 6131, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- spektrofotometar; S–200 VIS, Boeco, Hamburg, Njemačka
- staklene epruvete s plutenim čepom volumena 15 mL
- voda iz slavine, sterilizirana
- vortex; TK3S, Kartell, Noviglio, Italija

Uzorci za ispitivanje dekolorizacije pripremljeni su na način da je u plastične epruvete sa čepom dodano 9 mL medija, 1 mL suspenzije *P. aeruginosa* i 2 mL otopine boje. Kao medij izabrane su tekuće hranjive podloge Mueller Hinton (MH) bujon i Luria Bertani (LB) bujon zbog svojih nutritivnih svojstava te sterilizirana voda iz slavine. Uz slijepu probu za svaki medij – inokulirani medij bez boje, rađeni su duplikati uzoraka sa bojom, što ukupno čini 3 uzorka po mediju. Otopina boje je prije dodavanja u uzorak pomoću šprice propuštena kroz jednokratni membranski filter radi sterilne filtracije za uklanjanje bakterija, kako bi se spriječila kontaminacija uzoraka.

Za pripremu bakterijske suspenzije u staklene epruvete dodani su 4 mL bujona ili vode, ovisno o uzorku, te bakterijske kolonije *P. aeruginosa* koje su pomoću sterilne eze pokupljene sa agara i dobro promiješane u mediju. Ovakva suspenzija zatim se mjeri na spektrofotometru pri 600 nm kako bi apsorbancija iznosila 1 što označava koncentraciju od 10^9 CFU/mL. Ukoliko je apsorbancija manja od 1, u suspenziju se dodaje još bakterijskih kolonija i mjerenje se ponavlja kako bi se dobila željena vrijednost. Prilikom ovog mjerenja korišten je BioPhotometer 6131, a nakon što je postignuta apsorbancija iznosila otprilike 1, po 1 mL ove suspenzije dodano je u 9 mL odgovarajućeg medija te je na taj način postignuta konačna koncentracija od 10^8 CFU/mL.

Nakon pripreme te prije svakog mjerenja uzorci su homogenizirani na vortexu, a čuvani u inkubatorskoj tresilici na 36 °C i 170 rpm. Za svako mjerenje uzet je po 1 mL uzorka koji je stavljen u centrifugu na 10 min i 4 000 rpm nakon čega je 600 µL supernatanta otpipetirano u plastične kivete za spektrofotometrijsko ispitivanje. Mjerenja su rađena pri izmjerenom apsorpcijskom maksimumu pri 510 nm na S–200 VIS spektrofotometru. Prvo mjerenje izvedeno je u nultom satu te su uzorci nadalje promatrani i ispitivani tijekom 3 do 4 dana, a ukupno je izvedeno 4 serija ispitivanja sa različitim uzorcima.

Mjerenja za svaki uzorak izvedena su po tri puta te je u daljnjem izračunu korištena prosječna vrijednost. Postotak dekolorizacije je računat prema sljedećem izrazu (16):

$$\%D = \frac{A_0 - A_t}{A_0} * 100$$

gdje je:

A_0 – apsorbancija uzorka u nultom satu prije obezbojenja

A_t – apsorbancija uzorka u vremenu t

3.2. Analiza maslinovog ulja

Za analizu kakvoće maslinovog ulja korištena je metoda Međunarodnog vijeća za masline koja opisuje postupak izvedbe spektrofotometrijskog ispitivanja u UV području (33). Metoda se temelji na mjerenju ekstinkcija pri određenim valnim duljinama koje se izražavaju kao specifične ekstinkcije 1 %-tne otopine ulja u otapalu s duljinom puta od 1 cm, a dogovorno označavaju s K . Ekstinkcija se odnosi na zbroj apsorpcije i raspršenja, a predstavlja ukupan učinak otopine na elektromagnetsko zračenje koje kroz istu prolazi. Kao što je već spomenuto u uvodu, do apsorpcije dolazi zbog prisutnosti konjugiranih dienskih i trienskih sustava pri određenim valnim duljinama koji su rezultat oksidacijskih procesa i/ili postupaka rafinacije.

Ispitivano je 6 uzoraka maslinovog ulja iz triju različitih kategorija kvalitete (*ekstra djevičansko maslinovo ulje* – EDM, *djevičansko maslinovo ulje* – DM, *maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja* – MRD):

- 1. Ekstra djevičansko maslinovo ulje iz Španjolske, Primadonna, 1 L, Španjolska – EDM
- 2. Ekstra djevičansko maslinovo ulje iz Španjolske, Sol&Mar, 750 mL, Španjolska – EDM
- 3. Ekstra djevičansko maslinovo ulje, Farchioni, 1 L, Italija – EDM
- 4. Ekstra djevičansko maslinovo ulje, Metro Chef, 5 L, Italija – EDM
- 5. Djevičansko maslinovo ulje, Blato, 1 L, Hrvatska – DM
- 6. Maslinovo ulje – sastavljeno od rafiniranih maslinovih ulja i djevičanskih maslinovih ulja, Primadonna, 1 L, Španjolska – MRD

Materijali, pribor i uređaji:

- analitička vaga; Explorer, Ohaus, Parsippany, SAD
- uzorci maslinovog ulja
- izooktan spektrofotometrijske čistoće
- kivete od kvarcnog stakla debljine 10 mm
- odmjerne tikvice s brušenim čepom volumena 25 mL
- plastične pipete
- spektrofotometar; Cary 100 Bio UV–VIS, Varian, Palo Alto, SAD
- špatulica

Pomoću analitičke vage s mogućnošću očitavanja do 0,0001 g izvagano je otprilike 0,25 g svakog uzorka ulja u odmjerne tikvice od 25 mL koje su zatim napunjene otapalom do oznake. Kao otapalo, korišten je izooktan (2,2,4–trimetilpentan). Uzorci su homogenizirani čime su dobivene bezbojne otopine spremne za analizu. U slučaju prisutnosti zamućenja ili opalescencije, otopine ulja bi bilo potrebno profiltrirati pomoću filter papira.

Ova metoda zahtijeva mjerenje apsorbancija u UV području stoga je prilikom analize korišten prethodno opisani Cary 100 Bio UV–VIS spektrofotometar s dvostrukom zrakom. Prije samog mjerenja, provedena je njegova validacija putem programa samog spektrofotometra koji sadrži unaprijed definirane testove za optimiziranje postavki i osiguravanje točnosti.

Primarni proizvodi oksidacije ulja imaju apsorpcijski maksimum pri 232 nm, dok sekundarni isti pokazuju pri 270 nm. Ipak, mjerenja su prema metodi provedena pri 232 i 268 nm iz razloga što izabrano otapalo, izooktan, maksimum pri višoj valnoj duljini pomiče za 2 jedinice. Mjerenja su provedena i na 264 te 272 nm kako bi se odredilo odstupanje specifičnih ekstinkcija, ΔK . Kao referentna otopina korišten je izooktan čija je bazna linija snimljena u području od 220 do 290 nm. Uzorci su ispitivani u kivetama od kvarcnog stakla. Testnim ispitivanjem uzoraka, primijećene su prevelike vrijednosti izmjerenih apsorbancija stoga su prvotno priređene otopine razrijeđene u omjeru 2:1 čime su dobivene konačne otopine koje su korištene u daljnjoj analizi.

Ekstinkcije pri različitim valnim duljinama računaju se prema izrazu:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c * b}$$

gdje je:

K_{λ} – specifična ekstinkcija pri valnoj duljini λ

E_{λ} – izmjerena ekstinkcija tj. apsorbancija pri valnoj duljini λ

c – koncentracija otopine [g/100 mL]

b – debljina kivete [cm]

Varijacija specifične ekstinkcije dana je izrazom:

$$\Delta K = K_m - \frac{K_{m-4} - K_{m+4}}{2}$$

gdje je:

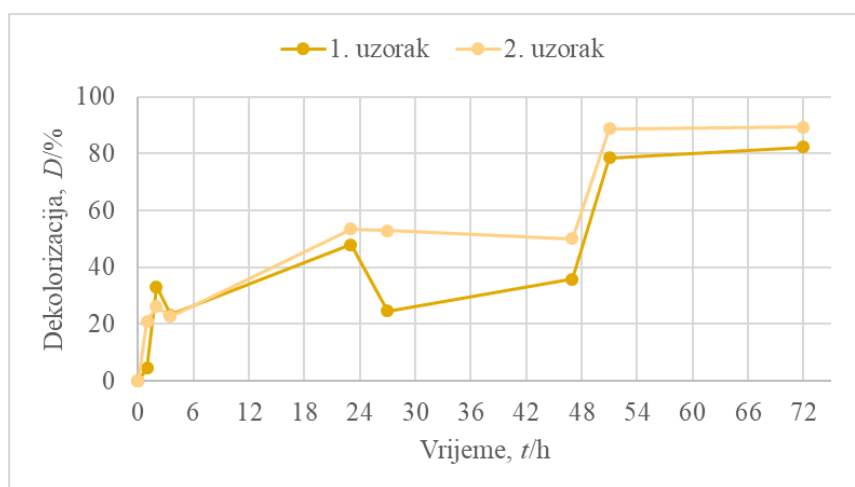
K_m – specifična ekstinkcija pri kojoj je zabilježena maksimalna apsorbancija otapala

4. REZULTATI

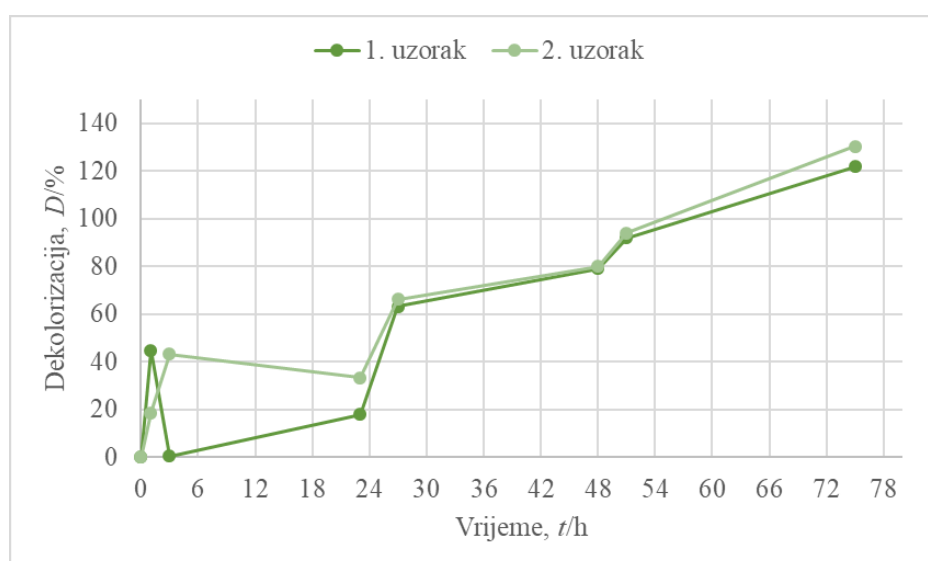
4.1. Dekolorizacija boje Ponceau S u mediju inokuliranom s *P. aeruginosa*

4.1.1. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 1. mjerenje

U prvoj seriji mjerenja obezbojenje je praćeno u dva različita medija, MH bujonu i LB bujonu. Postotak dekolorizacije uzoraka u utrošenom vremenu prikazan je na slikama koje slijede.



Slika 14. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranom MH bujonu, 1. mjerenje.

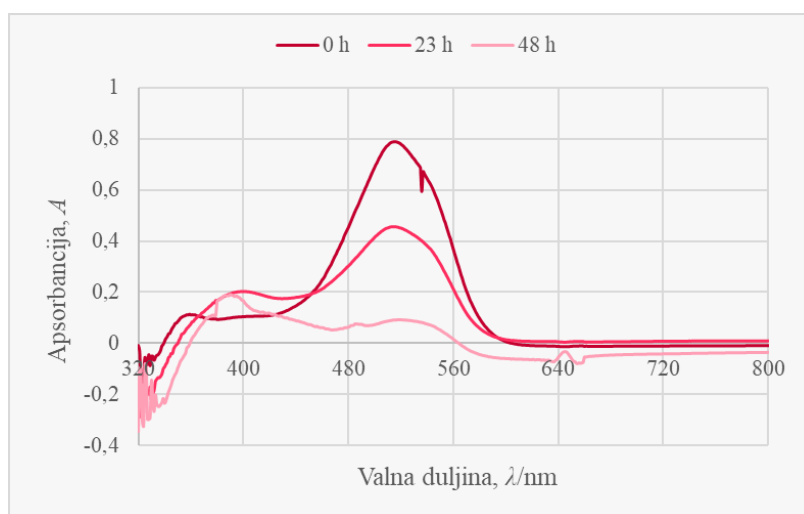


Slika 15. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranom LB bujonu, 1. mjerenje.

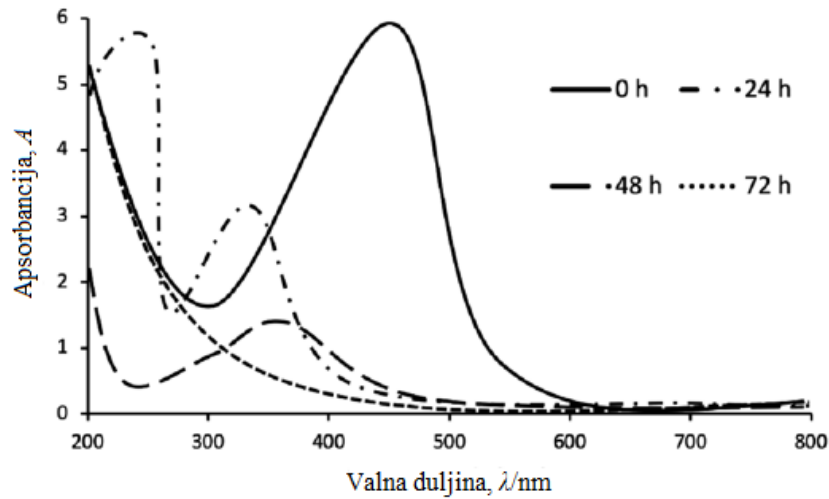
U oba ispitivana medija dolazi do pojave obezbojenja u odnosu na slijepu probu što znači da *P. aeruginosa* uspješno razgrađuje azo boju Ponceau S. Najveći intenzitet dekolorizacije i promjene u boji primijećeni su tijekom prvog dana. Do potpune dekolorizacije došlo je u uzorcima s LB bujonom nakon otprilike 54 h, dok je u onima s MH bujonom došlo do stagnacije te prosječna postignuta dekolorizacija iznosi 86,1 %. Veće obezbojenje kod LB bujona u odnosu na slijepu probu (126,6 %) moglo bi biti posljedica veće aktivnosti *P. aeruginosa* u uzorcima, razrjeđenja bujona otopinom boje zbog korištenja destilirane vode kao otapala, ili nastanka drugačijih produkata tijekom biotransformacije.

Uspoređujući izmjerene vrijednosti duplikata uzoraka u istom mediju, primijećene su razlike između uzoraka. Kao što je prije spomenuto, svaka vrijednost apsorbancije izmjerena je 3 puta te je za izračun uzeta prosječna vrijednost. U prvoj seriji mjerenja, kiveta s uzorkom spuštena je u instrument jednom nakon čega su očitane 3 vrijednosti apsorbancije. Kako bi se dobili vjerodostojniji rezultati i pravilnija krivulja kod njihovog iskazivanja, u daljnjoj analizi za svako pojedinačno mjerenje kiveta s uzorkom je na novo stavljena na odgovarajući držač u spektrofotometar.

Uz mjerenje dekolorizacije opisanom metodom, snimljeni su i cijeli spektri jednog uzorka u različitim vremenima inkubacije prikazani na Slici 16. Prvotni pik pri 510 nm nestaje što upućuje na razgradnju kromoforne grupe $-N=N-$, dok prema manjim valnim duljinama dolazi do spektralnih promjena radi stvaranja novih spojeva. Baena–Baldiris i dr. (16) prikazali su promjene i u UV području gdje dolazi do pojave novih pikova prvotno kod većih valnih duljina te s vremenom i kod nižih (Slika 17.). Ove promjene odražavaju tijek razgradnje izvornih molekula boje na metaboličke međuprodukte i produkte.



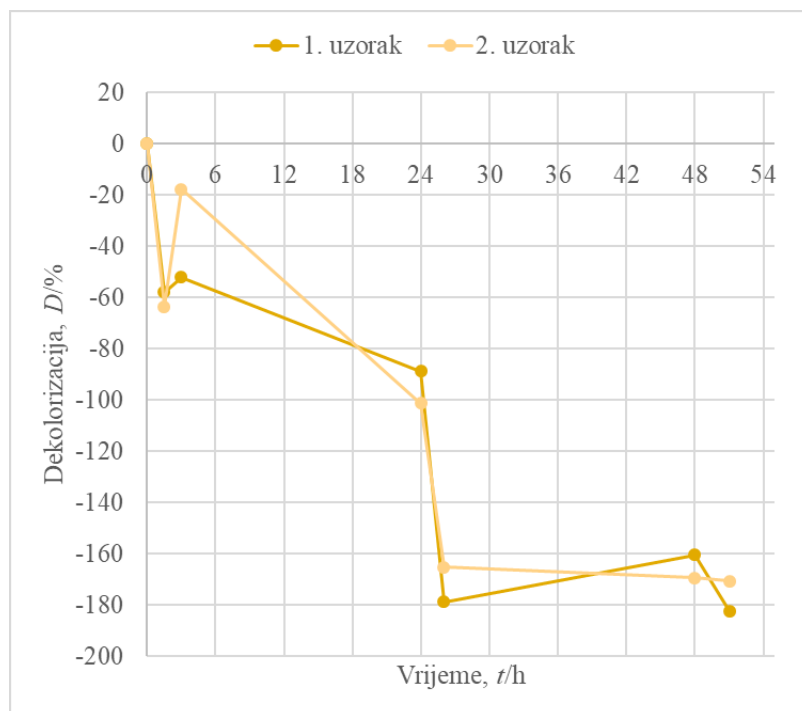
Slika 16. Spektri 1. uzorka boje Ponceau S u inokuliranoj LB bujoni u različitim vremenima.



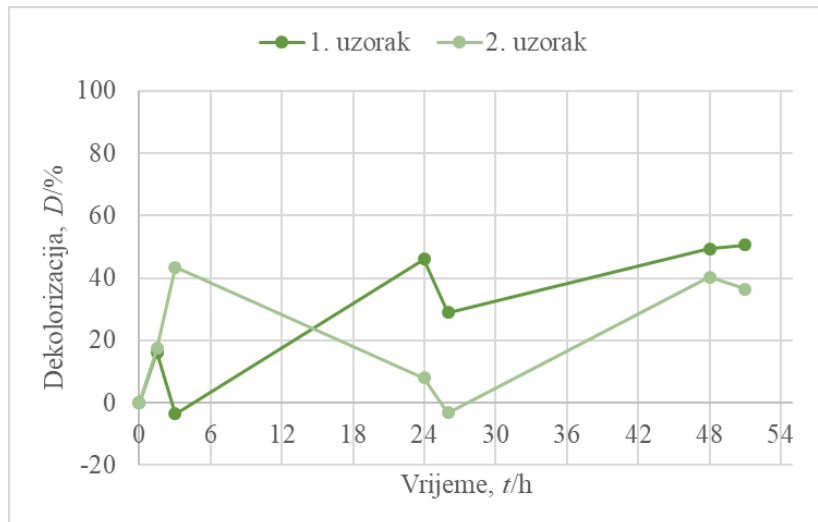
Slika 17. UV–VIS spektri dekolorizacije boje Ponceau S u različitim vremenima. Preuzeto i prilagođeno iz (16).

4.1.2. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 2. mjerenje

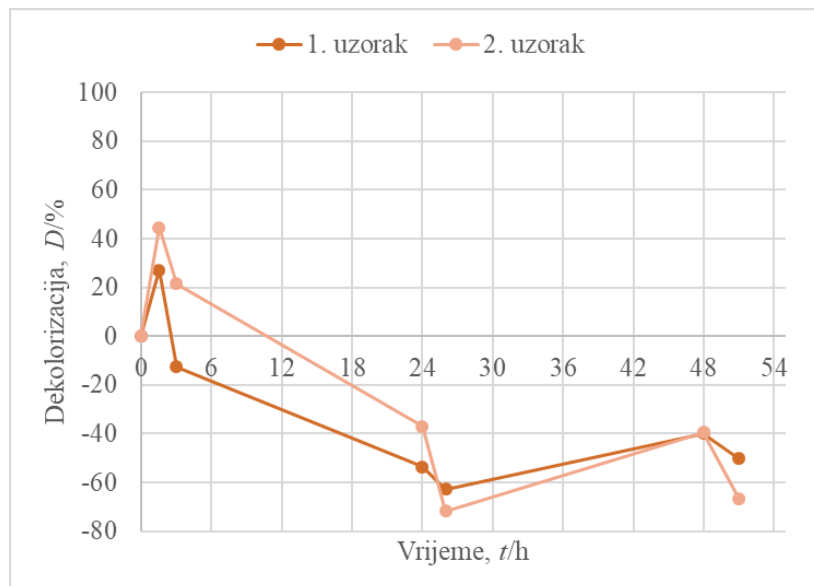
S obzirom na varijabilnost bioloških uzoraka, mjerenja su ponovljena te su ovog puta uzorci pripremljeni i u trećem mediju, a u tu svrhu korištena je voda iz slavine koja je prethodno sterilizirana.



Slika 18. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranom MH bujonu, 2. mjerenje.



Slika 19. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranom LB bujonu, 2. mjerenje.



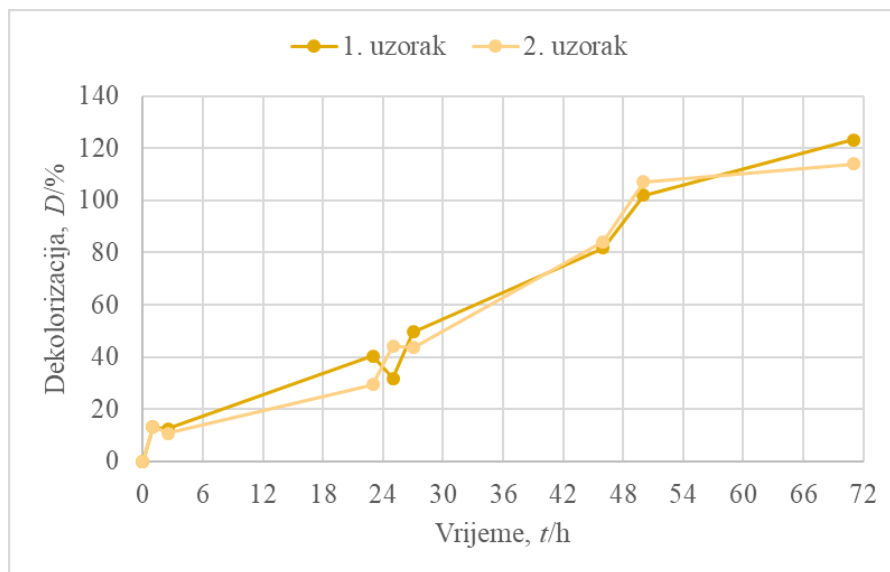
Slika 20. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranoj vodi iz slavine, 2. mjerenje.

Prilikom ovih mjerenja, dobivene su vrlo heterogene vrijednosti te u nijednom uzorku nije došlo do potpune dekolorizacije. Kod uzoraka s LB bujonom primijećen je djelomičan gubitak obojenja, no zabilježena dekolorizacija je znatno manja u odnosu od one zabilježene prilikom prvog mjerenja. Kod MH bujona i vode iz slavine postotak dekolorizacije je negativnih vrijednosti, iako je kod vode iz slavine u početku prisutna pozitivna vrijednost. S obzirom na dobivene rezultate i odstupanje navedenih dvaju medija, u po jednom uzorku od svakog provjerena je potencijalna kontaminaciju i odsutnost *P. aeruginosa*. Nakon dva dana rasta na

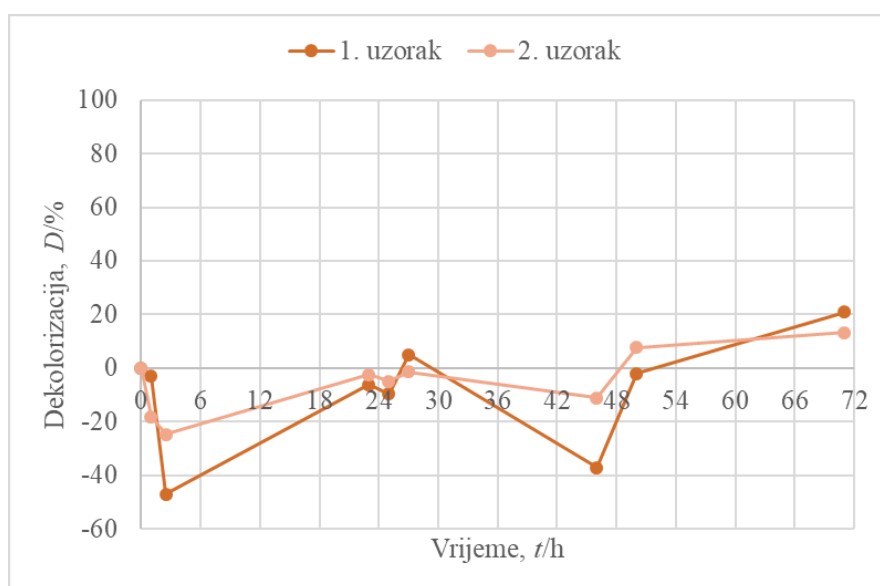
nutritivnom agaru, potvrđena je prisutnost navedene bakterije i odsutnost drugih koje bi potencijalno mogle narušiti željeni proces. Zbog nesukladnih rezultata, mjerenja su ponovljena u novoj seriji.

4.1.3. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 3. mjerenje

U trećoj seriji mjerenja ponovno su promatrani uzorci MH bujona i vode iz slavine.



Slika 21. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranom MH bujonu, 3. mjerenje.

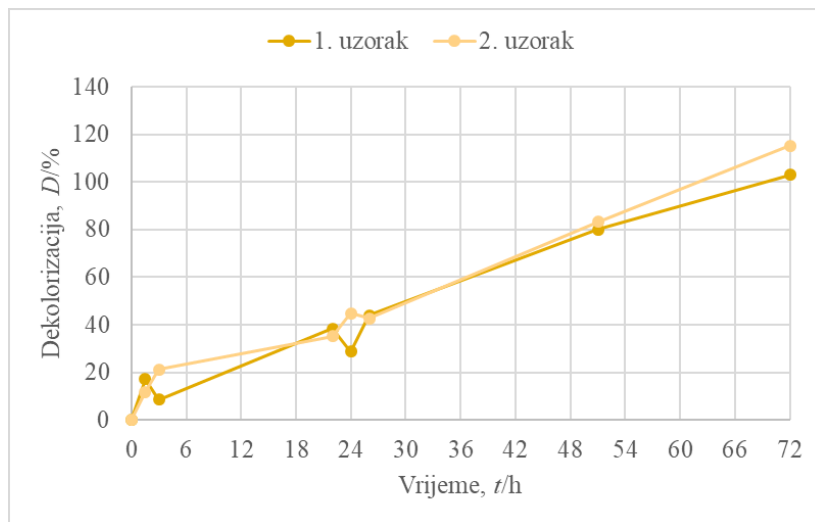


Slika 22. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranoj vodi iz slavine, 3. mjerenje.

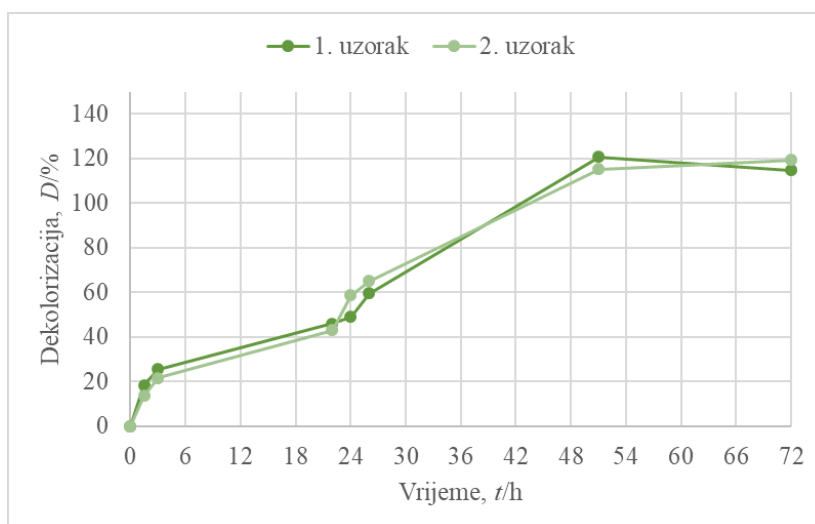
Ovog puta, došlo je do potpune dekolorizacije u MH bujonu oko 48. sata. Razgradnja je nešto brža nego pri prvotnim mjerenjima, no trend je očigledan. Ipak, u uzorcima pripremljenima s vodom iz slavine dekolorizacija je neznatna, 17 % u 72. satu, te je dobivena krivulja nepravilna i doseže u negativne vrijednosti. Kako bi se potvrdili trendovi dekolorizacije, provedena je još jedna serija ispitivanja.

4.1.4. Dekolorizacija boje u inokuliranom mediju, 4. mjerenje

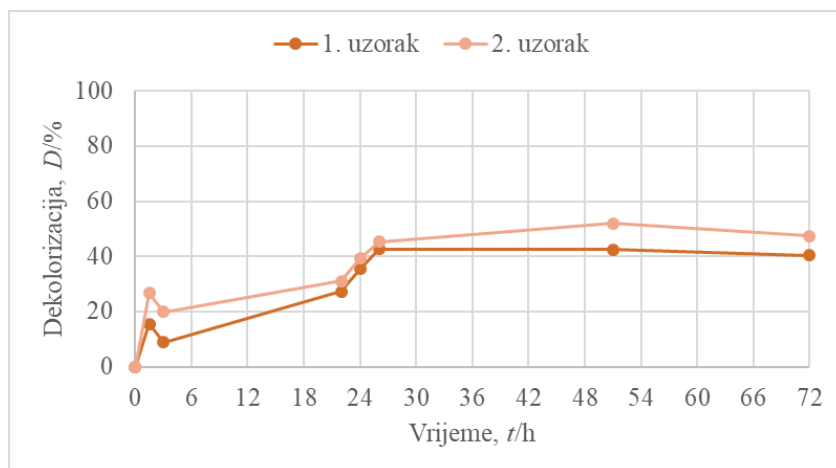
U posljednjoj seriji mjerenja ponovno je ispitana razgradnja boje u sva tri inokulirana medija.



Slika 23. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranom MH bujonu, 4. mjerenje.

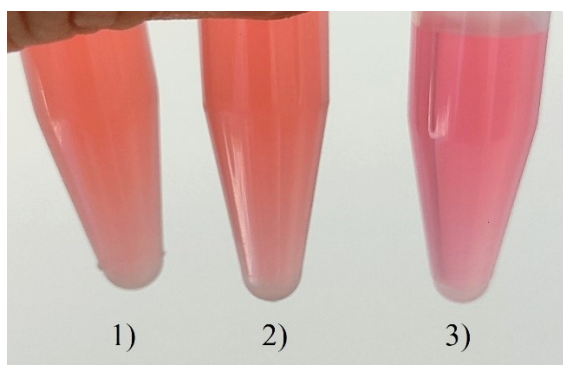


Slika 24. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranom LB bujonu, 4. mjerenje.

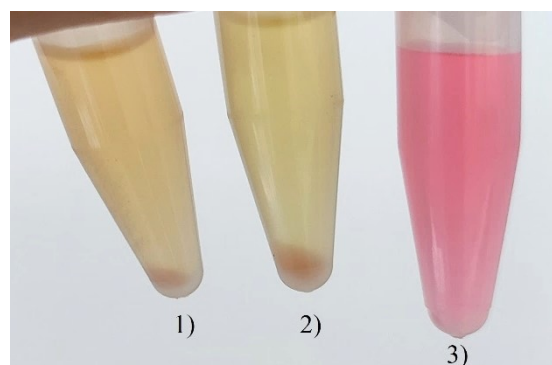


Slika 25. Dekolorizacija uzoraka boje u inokuliranoj vodi iz slavine, 4. mjerenje.

Do pojave obezbojenja došlo je u sva tri medija. U MH bujonu, do potpune dekolorizacije došlo je u otprilike 60. satu, dok je u LB bujonu razgradnja bila brža te je potpuna dekolorizacija zabilježena oko 42. sata. Razgradnja obojanih tvari nastavlja se i nakon potpune dekolorizacije, a iz Slike 24. vidljivo je da ona u slučaju LB bujona počinje vrlo brzo stagnirati sa nepunih 120 %. Kod uzoraka vode iz slavine, prvi put je primijećen jasan trend dekolorizacije, no ona nije potpuna te vrlo brzo, nakon 24 h, počinje stagnirati pri otprilike 45 % obezbojenja. Razlika u boji uzoraka nakon dekolorizacije u odnosu na početak mjerenja vidljiva je na Slikama 26. i 27. Na Slici 27. u prvome i drugome uzorku vidljiv je blago crveni talog namnoženih bakterija koje su nakon razgradnje zadržale obojenje.



Slika 26. Obojanost uzoraka u nultom satu, 4. mjerenje. 1) MH bujon, 2) LB bujon, 3) voda iz slavine.



Slika 27. Obojanost uzoraka u 72. satu, 4. mjerenje. 1) MH bujon, 2) LB bujon, 3) voda iz slavine.

4.1.5. Uspješnost mikrobiološke razgradnje azo boje

Dekolorizacija azo boje Ponceau S praćena je u tri medija – MH bujonu, LB bujonu i sterilnoj vodi iz slavine. *P. aeruginosa* pokazala se uspješnom u razgradnji boje, no nije u svim ispitivanim uzorcima došlo do potpune dekolozacije. Općenito, hranjive podloge pokazale su se kao prikladniji medij za ispitivanje mikrobiološke razgradnje boje što je bilo i očekivano s obzirom na povoljne uvjete i hranjive tvari koje osiguravaju bakterijama. Ipak, najveći postoci dekolozacije redovno su zabilježeni kod uzoraka pripremljenih u LB bujonu gdje je ona bila uspješnija u odnosu na MH bujon. Dva bujona različita su po svom sastavu stoga se iz navedenog može zaključiti da LB bujon osigurava bolje uvjete za rast *P. aeruginosa* što se posljedično odrazilo i na samu dekolozaciju. Varjani i dr. (21) opisali su kako okolišni (pH, temperatura, kisik, agitacija) te prehrambeni čimbenici (topljive soli, dodatak ugljika i dušika, koncentracija i struktura boje) utječu na samu razgradnju.

Kod uzoraka pripremljenih u sterilnoj vodi iz slavine dobiveni su različiti rezultati te su u tri mjerenja zabilježene i pozitivne i negativne vrijednosti postotka dekolozacije, kao i stagnacija iste, što ovaj medij čini nepouzdanim za provedeno ispitivanje. Iako *P. aeruginosa* ima sposobnost preživljavanja u nepovoljnim životnim uvjetima, čini se da mali udio dostupnih hranjivih tvari u vodi iz slavine nije bio dostatan za njegov rast. Već je rećeno da većina bakterija, kao i *Pseudomonas* sp., ne može koristiti samu boju kao supstrat za rast te je iz tog razloga razgradnja boje Ponceau S u ovim uzorcima u većoj mjeri izostala.

Osim medija, drugi čimbenik koji je promatran u ovome istraživanju je vrijeme u kojem se boja razgrađuje. U svim uzorcima najveće promjene u obojenju opažene su tijekom prvog dana kada je mikrobiološka razgradnja boje bila najbrža. Potpuna dekolozacija obićno je nastupala nakon otprilike 48 h, a najmanje vrijeme potrebno za istu zabilježeno je kod uzoraka pripremljenih u LB bujonu.

Prilikom drugog mjerenja, dobivene su negativne vrijednosti u slučaju MH bujona i vode iz slavine te znatno manja dekolozacija u slučaju LB bujona zbog čega je provjereno prisustvo *P. aeruginosa* u uzorcima. Iako su bakterije bile prisutne, dekolozacija nije bila uspješna što bi zahtijevalo daljnju mikrobiološku obradu. S obzirom da navedena problematika prelazi glavni fokus ovog rada što je spektrofotometrijska analiza te da rezultati odstupaju od prve, treće i četvrte serije mjerenja, rezultati ove serije zanemareni su.

4.2. Spektrofotometrijska analiza maslinovog ulja

4.2.1. K vrijednosti uzoraka maslinovih ulja

Spektrofotometrijskom analizom uzoraka maslinovih ulja u UV području izmjerene su vrijednosti ekstinkcija E_{λ} koje su prema prethodno navedenim izrazima preračunate u specifične ekstinkcije K_{λ} prikazane u Tablici 1. Navedene granične vrijednosti propisane su Delegiranom uredbom Komisije (EU) 2016/2095, a istima odgovara i nacionalni Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, NN 7/2009 (27,29).

Tablica 1. Izmjerene i propisane K vrijednosti uzoraka maslinovih ulja; EDM – ekstra djevičansko maslinovo ulje, DM – djevičansko maslinovo ulje, MRD – maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja

Izmjerene vrijednosti					
Uzorak	K_{232}	K_{264}	K_{268}	K_{272}	ΔK
1. EDM	2,24	0,29	0,27	0,25	-0,003
2. EDM	2,11	0,34	0,32	0,30	-0,005
3. EDM	2,38	0,37	0,35	0,34	-0,003
4. EDM	2,34	0,37	0,35	0,34	-0,003
5. DM	2,12	0,32	0,30	0,29	-0,003
6. MRD	2,27	0,31	0,31	0,25	0,033
Granične vrijednosti					
Ekstra djevičansko maslinovo ulje	$\leq 2,5$	-	$\leq 0,22$	-	$\leq 0,01$
Djevičansko maslinovo ulje	$\leq 2,6$	-	$\leq 0,25$	-	$\leq 0,01$
Maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja	-	-	$\leq 1,15$	-	$\leq 0,15$

Vrijednosti parametra K_{232} u nijednom uzorku ne premašuju propisane te svi uzorci zadovoljavaju kriterije prve kategorije, ekstra djevičansko maslinovo ulje, gdje ta vrijednost ne smije prelaziti 2,5. Ipak, primjetno je da se sve vrijednosti uzoraka maslinovih ulja nalaze blizu gornje granice propisanih vrijednosti.

Gledajući parametar K_{268} , jasno je da prvih pet ispitanih uzoraka ne zadovoljava kriterije kvalitete, iako vrijednosti parametra ΔK , odgovaraju propisanim. Od ukupno 6 analiziranih

uzoraka, samo uzorak 6. MRD zadovoljava sve propisane kriterije odgovarajuće kategorije kvalitete.

4.2.2. *Kakvoća i autentičnost uzoraka maslinovih ulja*

Spektrofotometrijskim ispitivanjem maslinovih ulja opisanom metodom dobivene su informacije o vrijednostima specifičnih ekstinkcija K_{232} i K_{268} te varijaciji specifične ekstinkcije ΔK . Izmjerene vrijednosti donekle su zadovoljavajuće, ali ne u potpunosti.

Parametar K_{232} pokazatelj je primarne oksidacije ulja. Zahvaljujući značajnom udjelu antioksidansa u svom sastavu, djevičansko maslinovo ulje u velikom dijelu je otporno oksidacijskom kvarenju. Ipak, prilikom izlaganja ulja svjetlosti, zraku, povećanoj temperaturi ili određenim metalima, dolazi do prijenosa energije što uzrokuje nastajanje primarnih produkata oksidacije koji apsorbiraju pri 232 nm. Ulja dobre kvalitete uglavnom imaju vrijednosti K_{232} manje od 1,80, dok se vrijednosti veće od 2,20, kakve su prisutne i u ispitivanim uzorcima, javljaju kod starijih i loše skladištenih ulja. (31)

Primarni produkti oksidacije nisu stabilni te se brzo raspadaju na sekundarne produkte zbog čega se mjeri i vrijednost parametra K_{268} . Konjugirani trieneni koji apsorbiraju u ovome području, osim sa sekundarnom oksidacijom, povezuju se i sa određenim vrstama zemlje koje se koriste u tehnološkom procesu za postupak dekolorizacije zbog čega povećane vrijednosti ovog parametra mogu ukazivati na nedozvoljeni dodatak rafiniranog ulja (23). Kod svih pet ispitivanih uzoraka djevičanskih maslinovih ulja vrijednosti K_{268} premašuju one propisane što može upućivati na njihovo patvorenje.

Ipak, parametar ΔK je taj koji omogućava razlikovanje oksidiranog i patvorenog ulja (32). U ispitivanim uzorcima, sve dobivene vrijednosti ΔK zadovoljavaju propisane iz čega se može zaključiti da je malo vjerojatno da su ispitivana maslinova ulja patvorena tj. da sadrže nedozvoljeni dodatak rafiniranog ulja te da su povećane vrijednosti parametra K_{268} posljedica neprikladnog skladištenja ulja. Povećane vrijednosti K_{232} i K_{268} te zadovoljavajuće vrijednosti ΔK , kao što su dobivene i u ovome istraživanju, dobili su i Derewiaka i dr. (34).

Od svih ispitivanih uzoraka maslinovih ulja, jedino uzorak 6. MRD iz kategorije *maslinovo ulje sastavljeno od rafiniranih i djevičanskih maslinovih ulja* zadovoljava sve propisane zahtjeve kvalitete. Nadalje, navedeni uzorak zadovoljava vrijednosti K_{232} najviše kategorije kvalitete

ekstra djevičansko maslinovo ulje. Međutim, s obzirom na deklarirani dodatak rafiniranog maslinovog ulja koje ispitivano ulje te ulja ove kategorije općenito sadržavaju, isto ne može biti klasificirano u višu kategoriju kvalitete jer se ne sastoji isključivo od neobrađenog djevičanskog maslinovog ulja što je determinirajući čimbenik ove kategorije.

5. RASPRAVA

5.1. Uspješnost spektrofotometrijskog ispitivanja dekolorizacije azo boje Ponceau S pomoću *P. aeruginosa*

Spektrofotometrija opisana u prvoj metodi ovog istraživanja korištena je u svrhu praćenja dekolorizacije azo boje Ponceau S pomoću *P. aeruginosa*, a metoda je osmišljena po uzoru na Baena–Baldiris i dr. (16) te prikladno optimizirana kako je prethodno opisano. Tijekom različitih vremena inkubacije, inokuliranim uzorcima boje mjerena je apsorbancija pomoću VIS spektrofotometra te je iz dobivenih podataka izračunat postotak obezbojenja u odgovarajućem vremenu. Uspoređujući apsorbancijske vrijednosti slijepe probe i uzoraka tijekom vremena, dokazana je i kvantificirana sposobnost *P. aeruginosa* da razgradi boju. Uporaba spektrofotometrijske tehnike u tu svrhu pokazala se ključnom, a sama metoda uspješnom i specifičnom.

Azo bojila postoje su onečišćujuće tvari otporne na oksidativnu biorazgradnju i konvencionalne metode obrade što je posljedica prisutnosti sulfo– i azo– skupina u njihovoj strukturi. Rajaguru i dr. (35) dokazali su da je potpuna mineralizacija ovih bojila moguća u slučaju anaerobne redukcije praćene aerobnom oksidacijom nastalih aromatskih amina. Nachiyar i Rajakumar (22) izolirali su i karakterizirali aerobnu azoreduktazu iz *P. aeruginosa* i istražili enzimatsku razgradnju različitih azo bojila od kojih je u slučaju Navitan Fast plave S5R zabilježena najuspješnija dekolorizacija. Ovakva azoreduktaza neosjetljiva na kisik i čiste kulture *P. aeruginosa* pokazuju velik potencijal za aerobnu obradu otpadnih voda onečišćenim azo bojilima naspram mješovitih mikrobioloških kultura koje su, iako uspješnije u biorazgradnji, ograničene na anaerobne uvjete.

Iako su se primjena opisane spektrofotometrijske metode i odabir mikrobiološke kulture pokazali uspješnim, tijekom istraživanja uočeni su i potencijalni nedostaci. Prilikom prvih mjerenja, uočeno je da se izmjerene vrijednosti apsorbancija između duplikata uzoraka razlikuju više od očekivanog te da rezultati odskaču od baždarne krivulje. Navedene razlike direktna su posljedica samog izvođenja mjerenja što je pravodobno prepoznato i ispravljeno. Naime, kod korištenja spektrofotometra uočeno je da kiveta u samome držaču ne stoji potpuno učvršćeno zbog čega je prilikom svakog novog mjerenja kiveta na novo postavljena u držač u svrhu dobivanja pravilnije krivulje i točnijih rezultata. Također, potencijalno poboljšanje leži u

pripremi same otopine boje Ponceau S koja je otopljena u destiliranoj vodi. Pretpostavka je da bi se korištenjem otopina boje sa MH bujonom, LB bujonom i steriliziranom vodom iz slavine za odgovarajuće uzorke izbjeglo razrjeđenje te bi bile dobivene točnije vrijednosti postotaka dekolorizacije u odnosu na slijepu probu. Ipak, priprema otopine boje i sa destiliranom vodom nužna je kako bi se dobio podatak o apsorpcijskom maksimumu, a ukoliko bi se metoda primjenjivala na stvarne sustave pročišćavanja, određeno razrjeđenje sustava bilo bi očekivano.

S obzirom da analiza zahtijeva biološki materijal, za pripremu višestrukih uzoraka i bakterijskih suspenzija potrebno je određeno vrijeme i pažljivo rukovanje kako bi se smanjio rizik od kontaminacije koja bi mogla utjecati na rezultate. Osim opreznim postupanjem prilikom pripreme, točniji rezultati osiguravaju se ponavljanjem analize te većim brojem uzoraka i mjerenja. Bez obzira, integracija spektrofotometrijskih tehnika sa mikrobiološkim otvara potencijal za detaljno proučavanje mehanizama dekolorizacije i sigurnog uklanjanja azo bojila iz okoliša.

Tijekom ove analize, korištena su tri različita VIS spektrofotometra, što potvrđuje njihovu implementaciju u svakodnevnu uporabu. Prvi je korišten prilikom određivanja koncentracije CFU u bakterijskoj suspenziji, dok su druga dva korištena za mjerenje apsorbancije uzoraka i snimanje spektara.

5.2. Uspješnost ispitivanja svojstava maslinovog ulja standardiziranom spektrofotometrijskom metodom

Spektrofotometrijskim ispitivanjem ulja u UV području ocjenjuju se njegova kakvoća, očuvanost i tehnološke promjene u sastavu masti te autentičnost samog proizvoda. U tu svrhu, korištena je standardizirana metoda Međunarodnog vijeća za masline COI/T.20/Doc.No19/Rev.5 koja se temelji na mjerenju ekstinkcija pri određenim valnim duljinama. Ova metoda pruža detaljan protokol za spektrofotometrijsku analizu maslinovog ulja te uključuje rezultate istraživanja priznatih laboratorija koji osiguravaju ponovljivost i reproducibilnost.

Specifične ekstinkcije po navedenoj metodi računaju se za 1 %-tnu otopinu ulja u kiveti od 1 cm, no pošto su pri prvim mjerenjima dobivene prevelike vrijednosti apsorbancija, otopine su razrijeđene te su u daljnjoj analizi korištene 0,5 %-tne otopine maslinovih ulja. Ove vrijednosti izračunavaju se iz očitavanja apsorbancija pri valnim duljinama od 232 nm i 268 nm koje se

odnose na primarne i sekundarne oksidacijske produkte. No, kako bi se mogla razlikovati patvorena ulja od oksidiranih, izračunava se parametar ΔK . Prema istraživanju Casadei i dr. (26), ekstra djevičansko maslinovo ulje ostaje jedan od najčešće patvorenih prehrambenih proizvoda na tržištu. Osim patvorenja, potrošača se može dovesti u zabludu pogrešnim deklariranjem zemljopisnog podrijetla maslinovog ulja. Skiada i dr. (36) istraživali su profil masnih kiselina i sterola u svrhu karakterizacije sorta i autentifikaciju s obzirom na njihovu botaničko i zemljopisno podrijetlo.

Koristeći se spektrofotometrijskim tehnikama, ova metoda pruža sveobuhvatnu procjenu kvalitete te omogućava kategorizaciju maslinovih ulja u najviše kategorije kvalitete pomoću preciznih rezultata. Koristeći se standardiziranim međunarodnim smjericama, osigurani su dosljednost i usporedivost rezultata. Priprema uzoraka i izvedba mjerenja jednostavna je, a za samu metodu potrebna je dostupna oprema što podrazumijeva uobičajeno laboratorijsko posuđe i UV–VIS spektrofotometar. Ipak, treba obratiti pažnju na kalibraciju i validaciju samog instrumenta te uvjete čuvanja uzoraka maslinovih ulja kao što su temperatura te izloženost svjetlosti i zraku, kako bi dobiveni rezultati bili pouzdani i točni.

6. ZAKLJUČAK

Spektrofotometrija ostaje ključna i naširoko primijenjena tehnika u raznim znanstvenim, medicinskim i industrijskim područjima zbog sposobnosti pružanja preciznih i pouzdanih rezultata. Pomoću ovih analitičkih metoda moguće je otkrivanje, praćenje i mjerenje različitih okolišnih čimbenika što pridonosi zaštiti okoliša, prevenciji i dijagnostici bolesti, sigurnosti hrane i vode te poboljšanju javnog zdravlja općenito. Zbog potrebe za preciznim i učinkovitim analitičkim tehnikama, uloga spektrofotometrije se proširuje, a metode se kontinuirano razvijaju. U istraživanju je uporabom spektrofotometrijskih načela praćena i dokazana dekolorizacija azo boje Ponceau S pomoću bakterije *P. aeruginosa*. Navedena bakterija pokazala se kao dobar izbor za razgradnju onečišćujućih azo bojila te potencijalan subjekt istraživanja za učinkovitu mikrobiološku obradu otpadnih voda u aerobnim uvjetima, uz omogućene uvjete za njen rast. Priprema bioloških uzoraka i samo korištenje spektrofotometra zahtijeva pažljivo postupanje, a ponavljanjem analize osiguravaju se pouzdanost i ponovljivost rezultata. Reproducibilnost je bitna karakteristika spektrofotometrijskih metoda, a upravo ona osigurava njenu implementaciju u standardizirane protokole poput onog za ispitivanje maslinovog ulja kao jednog od najreguliranih i najčešće patvorenih prehrambenih proizvoda. Ispitivanjem 6 uzoraka maslinovog ulja nije otkriven nedozvoljeni dodatak rafiniranih ulja prema vrijednostima parametra ΔK , no povećane vrijednosti parametara K_{232} i K_{268} ukazuju na neprikladno skladištenje ulja. Korištene metode pokazale su pristupačnima i pouzdanima, a spektrofotometrija neizostavna u složenim analizama i djelatnosti sanitarnog inženjerstva.

7. LITERATURA

1. Skoog DA. Fundamentals of analytical chemistry. 9th Ed. Belmont, CA: Cengage - Brooks/Cole; 2012.
2. LibreTexts Chemistry [Internet]. Spectrophotometry. Dostupno na: <https://chem.libretexts.org/@go/page/1431>
3. Tarragó-Celada J, Fernández Novell JM. Colour, chlorophyll and chromatography. Teach. Ijeto 2019.;(47):41–5.
4. Lund L. Introduction to Chemistry [Internet]. LibreTexts, Anoka-Ramsey Community College; Dostupno na: <https://chem.libretexts.org/@go/page/289513?pdf>
5. Sánchez Rojas F, Bosch Ojeda C, Cano Pavón JM. Spectrophotometry | Biochemical Applications. U: Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier; 2013.
6. Shi Z, Chow CWK, Fabris R, Liu J, Jin B. Applications of Online UV-Vis Spectrophotometer for Drinking Water Quality Monitoring and Process Control: A Review. Sensors. 13. travanj 2022.;22(8):2987.
7. Østergaard J. UV imaging in pharmaceutical analysis. J Pharm Biomed Anal. siječanj 2018.;147:140–8.
8. Hughes VK. The practical application of reflectance spectrophotometry for the demonstration of haemoglobin and its degradation in bruises. J Clin Pathol. 01. travanj 2004.;57(4):355–9.
9. National Institute of Standards and Technology, US Department of Commerce. NIST Chemistry WebBook [Internet]. Dostupno na: <https://webbook.nist.gov/>
10. Harvey D. Instrumental Analysis [Internet]. LibreTexts, DePauw University; Dostupno na: <https://chem.libretexts.org/@go/page/332634>
11. The Editors of Encyclopaedia Britannica. Infrared Astronomy [Internet]. Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/infrared-astronomy>
12. Luo Y, Zhang B, Chen M, Wang J, Zhang X, Gao W yin, i ostali. Rapid and Simultaneous Determination of Essential Minerals and Trace Elements in Human Milk by Improved Flame Atomic Absorption Spectroscopy (FAAS) with Microwave Digestion. J Agric Food Chem. 08. rujan 2010.;58(17):9396–400.
13. Lipovac T. Uklanjanje metilenskog modrila iz vodenih otopina primjenom otpadne biomase drvene industrije kao adsorbensa [Diplomski rad]. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet; 2019.
14. Ledakowicz S, Paździor K. Recent Achievements in Dyes Removal Focused on Advanced Oxidation Processes Integrated with Biological Methods. Molecules. 06. veljača 2021.;26(4):870.

15. Pandey A, Singh P, Iyengar L. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int Biodeterior Biodegrad.* ožujak 2007.;59(2):73–84.
16. Baena-Baldiris D, Montes-Robledo A, Baldiris-Avila R. *Franconibacter sp.*, 1MS: A New Strain in Decolorization and Degradation of Azo Dyes Ponceau S Red and Methyl Orange. *ACS Omega.* 03. studeni 2020.;5(43):28146–57.
17. Chung KT. Azo dyes and human health: A review. *J Environ Sci Health Part C.* listopad 2016.;34(4):233–61.
18. Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *J Taiwan Inst Chem Eng.* siječanj 2011.;42(1):138–57.
19. Zhuang M, Sanganyado E, Zhang X, Xu L, Zhu J, Liu W, i ostali. Azo dye degrading bacteria tolerant to extreme conditions inhabit nearshore ecosystems: Optimization and degradation pathways. *J Environ Manage.* svibanj 2020.;261:110222.
20. Tafra D. Izolacija i karakterizacija bakterije *Pseudomonas aeruginosa* iz uzoraka vode [Diplomski rad]. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2017.
21. Varjani S, Rakholiya P, Ng HY, You S, Teixeira JA. Microbial degradation of dyes: An overview. *Bioresour Technol.* listopad 2020.;314:123728.
22. Nachiyar CV, Rajakumar GS. Purification and characterization of an oxygen insensitive azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Enzyme Microb Technol.* ožujak 2005.;36(4):503–9.
23. Harwood J, Aparicio R, urednici. *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties.* Boston, MA: Springer US; 2000.
24. Malavi D, Nikkhah A, Raes K, Van Haute S. Hyperspectral Imaging and Chemometrics for Authentication of Extra Virgin Olive Oil: A Comparative Approach with FTIR, UV-VIS, Raman, and GC-MS. *Foods.* 17. siječanj 2023.;12(3):429.
25. International Olive Council [Internet]. Madrid, c2023. Dostupno na: <https://www.internationaloliveoil.org/olive-world/olive-oil-health/>
26. Casadei E, Valli E, Panni F, Donarski J, Farrús Gubern J, Lucci P, i ostali. Emerging trends in olive oil fraud and possible countermeasures. *Food Control.* lipanj 2021.;124:107902.
27. Narodne novine. Pravilnik o uljima od ploda i komine maslina, NN 7/2009. 2009.
28. International Olive Council. Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive-Pomace Oils, COI/T.15/NC.No3/Rev.14. 2019.
29. Commission Delegated Regulation (EU) 2016/2095. Official Journal of the European Union; 2016.
30. Conte L, Bendini A, Valli E, Lucci P, Moret S, Maquet A, i ostali. Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future. *Trends Food Sci Technol.* studeni 2020.;105:483–93.

31. Koprivnjak O. Djevičansko maslinovo ulje: od masline do stola. Poreč: MIH; 2006.
32. Dobra M. Laboratorijska analiza maslinova ulja [Diplomski rad]. Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet; 2017.
33. International Olive Council. Method of analysis: Spectrophotometric investigation in the ultraviolet, COI/T.20/Doc.No19/Rev.5. 2019.
34. Department of Biotechnology, Microbiology and Food Evaluation, Warsaw University of Life Sciences ? SGGW, Department of Chemistry, Warsaw University of Life Sciences ? SGGW, Derewiaka D, Łuczak A, Reder M. Detection of adulteration of extra virgin olive oils available on the Polish market. Nauka Przyr Technol [Internet]. 30. prosinac 2016. [citirano 22. kolovoz 2024.];10(4). Dostupno na: <http://www.npt.up-poznan.net/volume10/issue4/abstract-47.html>
35. Rajaguru P, Kalaiselvi K, Palanivel M, Subburam V. Biodegradation of azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. Appl Microbiol Biotechnol. 15. kolovoz 2000.;54(2):268–73.
36. Skiada V, Agriopoulou S, Tsarouhas P, Katsaris P, Stamatelopoulou E, Varzakas T. Evaluation and Origin Discrimination of Two Monocultivar Extra Virgin Olive Oils, Cultivated in the Coastline Part of North-Western Greece. Appl Sci. 25. rujan 2020.;10(19):6733.

8. ŽIVOTOPIS

Sara Hajdaš rođena je 16. siječnja 1997. u Zaboku gdje pohađa jezičnu gimnaziju, a 2016. upisuje stručni studij Sanitarnog inženjerstva na Zdravstvenom Veleučilištu u Zagrebu. Tijekom studiranja, aktivno se uključuje u rad i događanja EKO ZVU grupe te pohađa znanstvene kongrese vezane uz unapređenje zdravlja i struke (*Kongres o sigurnosti i kvaliteti hrane* u Opatiji, 2017. i 2018., *1. međunarodna studentska GREEN konferencija* u Osijeku, 2018.). Jedan je od autora četiriju studentskih istraživačkih projekata: *Odvajamo zajedno*, 2018.; *Upoznavanje s močvarnim staništima RH i važnošću njihove zaštite*, 2018.; *Istraživanje vrsta komaraca i krpelja na Sljmenu*, 2019.; te *Svijet kukaca u Hrvatskoj*, 2019. U sklopu neformalne grupe studenata uključuje se u projekt Ministarstva regionalnog razvoja i fondova EU *Akademija regionalnog razvoja i fondova EU* gdje stječe dodatna znanja i vještine u osmišljavanju i provedbi projekata, a na poziv Veleučilišta Velika Gorica sudjelovala je i u pokazno–terenskim vježbama u Šibeniku organiziranih u sklopu 12. međunarodne konferencije *Dani kriznog upravljanja*. Studiranje nastavlja 2020. upisivanjem diplomskog studija Sanitarnog inženjerstva na Medicinskom fakultetu u Rijeci u sklopu kojeg se priključuje i 2. *GREEN konferenciji* u Osijeku, 2022., a na 6. *studentskom kongresu zaštite zdravlja Sanitas* 2023. sudjeluje aktivno s predavanjem "Spektrofotometrija: od Newtona do piva" te se 2024. kongresu priključuje pasivno. Za studiranja redovno radi u ugostiteljstvu, a za vrijeme COVID–19 pandemije radi na uzorkovanju i dijagnostici u sklopu Nastavnog zavoda za javno zdravstvo PGŽ te volontira u Centru za proteomiku. Osim u struci, strast pronalazi u hrani, glazbi, sportu i plesu, što potvrđuje 12–ogodišnje članstvo u Udruzi Bedekovčanskih mažoretkinja prvenstveno kao plesač, a naposljetku i trener mažoret sporta.