

Određivanje fenola u otpadnim vodama

Sudar, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:280498>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Sudar

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja **Matea Sudar**

Predala je izrađen završni rad dana: 11. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

dr. sc. Lidija Furač, viša predavačica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Matija Cvetnić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Petar Kassal, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 14. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Sudar

ODREĐIVANJE FENOLA U OTPADNIM VODAMA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: dr. sc. Lidija Furač, v. predavač, FKIT

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. dr. sc. Lidija Furač, v. predavač, FKIT
2. doc. dr. sc. Matija Cvetnić, FKIT
3. doc. dr. sc. Petar Kassal, FKIT

Zagreb, rujan 2023.

SAŽETAK

Opstanak svijeta i živih bića ovisi o vodi pa nedostatak vodenih resursa dovodi do ozbiljnih problema. Više od 50 % svjetske populacije se suočava s nestašicom vode. Neki od uzroka tome su konstantan rast stanovništva, onečišćenje površinskih i podzemnih voda, neodgovarajuća raspodjela vodenih resursa te povremene suše. Onečišćena voda jednako utječe i na životinjski i biljni svijet. Smrt mnogih vodenih životinja posljedica je ulaska onečišćene vode u more. Budući da naš svijet nije odvojen od svijeta vodenih bića, ptica i biljaka, opasnost od ovih uzastopnih onečišćenja sve je veća i veća. U današnje vrijeme porast emisija industrijskih otpadnih voda predstavlja sve veći problem. Među opasnijim onečišćivalima ističu se fenolni spojevi čije je određivanje ključno za procjenu kvalitete vode i za sigurnost okoliša. Oni predstavljaju značajan rizik za ekosustav i ljudsko zdravlje zbog svojih toksičnih i kancerogenih svojstava.

Ovaj rad ima za cilj istaknuti analitičke metode određivanja fenola u otpadnim vodama. Od analitičkih metoda, ističu se spektrofotometrijska metoda, tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) i masena spektrometrija (engl. *Mass Spectrometry*, MS). Odabir odgovarajuće metode ovisi o sastavu i količini vode koja se obrađuje, željenoj učinkovitosti postupka, ekološkoj prihvatljivosti te operativnim troškovima.

Ključne riječi: fenol, otpadna voda, određivanje, analitička metoda

SUMMARY

The survival of the world and of living beings depends on water. Therefore, the deficiency of water resources can cause serious problems. More than 50 % of the world's population faces some form of water deficiency. Some of the causes are the constant population growth, the pollution of both surface and ground waters, the inadequate distribution of water resources and the occasional droughts. Moreover, polluted water equally affects the animal and the plant kingdoms and the death of many water animals is a direct consequence of polluted water entering the sea. Given the fact that our world is not separated from the worlds of animals, birds and plants, the danger of these various types of pollution becomes greater every day. Today, the increasing emission of industrial wastewater represents a growing issue. Phenolic compounds can be traced among the most dangerous pollutants and their identification is crucial for the water's quality assessment and for the environment's safeguard. They represent a high risk for the ecosystem and for the human health due to their toxic and carcinogenic properties.

This thesis gives an overview of analytical methods for the detection of phenols in wastewater. Among the analytical methods, spectrophotometric method, High Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry need to be pointed out. The choice of an appropriate method depends on the composition and quantity of water, the desired efficiency of the process, environmental acceptability and operational costs.

Key words: phenol, wastewater, the detection, the analytical method

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. OTPADNE VODE.....	2
2.1.1. Komunalne otpadne vode	2
2.1.2. Industrijske otpadne vode	4
2.1.3. Oborinske otpadne vode	5
2.2. OSNOVNI POSTUPCI OBRADNE OTPADNIH VODA	6
2.2.1. Mehanička obrada otpadnih voda	7
2.2.2. Biološka obrada otpadnih voda.....	8
2.2.3. Fizikalno-kemijska obrada otpadnih voda	10
3. GLAVNI DIO	11
3.1. FENOLI.....	11
3.2. DOBIVANJE FENOLA	15
3.2.1. Petrokemijski proces.....	15
3.2.2. Ekstrakcija fenola iz ugljenog katrana	16
3.2.3. Pretvorba biomase.....	16
3.2.4. Oksidacija toluena.....	17
3.3. OBRADA INDUSTRIJSKIH OTPADNIH VODA ONEČIŠĆENIH FENOLIMA .	17
3.3.1. Fizikalno-kemijska obrada industrijskih otpadnih voda onečišćenih fenolima .	19
3.3.2. Biološka obrada industrijskih otpadnih voda onečišćenih fenolima.....	21
3.4. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA FENOLA U OTPADNIM VODAMA	26
3.4.1. Spektrofotometrija	27
3.4.2. Plinska kromatografija	30
3.4.3. Tekućinska kromatografija.....	33
3.4.4. Kapilarna elektroforeza.....	36
3.4.5. Kolorimetrija.....	38
3.4.6. Amperometrijski biosenzori.....	41
3.4.7. Enzimski biosenzori.....	42
3.4.8. Optički biosenzori.....	43
3.4.9. Biosenzori cijele stanice	45
3.5. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE ZA ANALIZU FENOLA I KLORFENOLA IZ VODENIH UZORAKA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM-MASENOM SPEKTROMETRIJOM.....	46

3.6. ANALIZA FENOLA IZ OTPADNIH VODA POMOĆU MIKROEKSTRAKCIJE IZ ČVRSTE FAZE I PLINSKE KROMATOGRFIJE.....	49
3.7. PRIMJENA SIROVE PEROKSIDAZE HRENA IMOBILIZIRANE BIOUGLJENOM ZA UKLANJANJE FENOLA IZ VODA	52
4. ZAKLJUČAK.....	54
5. LITERATURA.....	55
6. POPIS SLIKA.....	60
7. POPIS TABLICA.....	62

1. UVOD

Fenoli i njihovi derivati često predstavljaju onečišćivala u otpadnim vodama iz različitih industrija poput plinskih, rafinerija nafte i koksa, proizvodnje fenol-formaldehidnih smola te farmaceutskih proizvoda. Fenoli su naširoko uključeni u petrokemijsko inženjerstvo, tiskanje, bojanje, preradu hrane i kemijsku proizvodnju. Ispuštanjem u okoliš postaju jedan od najštetnijih onečišćivala zbog visoke toksičnosti i niske biorazgradivosti. Mogu otrovati ribu, onečistiti poljoprivredne proizvode i utjecati na funkcije živčanog, mokraćnog i probavnog sustava čovjeka [1]. Neki od fenola, kao što su alkilfenoli i klorfenoli široko se koriste kao supstrati za dobivanje poljoprivrednih pesticida, također i kao konzervansi u deterdžentima za kućanstvo, lijekovima te međuproducti u mnogim industrijama. Fenoli mogu uzrokovati oštećenje jetre, reproduktivne abnormalnosti, karcinom i endokrini poremećaj čak i u malim količinama [2]. Koncentracije ovih spojeva u otpadnim vodama mogu varirati od 1,1 do 7000 mg/L. Komunalne i industrijske otpadne vode moraju prije ispuštanja u vodotokove biti obrađene. Nedostatak adekvatnog načina obrade ovakvih otpadnih voda može predstavljati ozbiljnu prijetnju okolišu i ljudskom zdravlju kada se ispušta izravno u okoliš. Konvencionalne metode obrade otpadnih voda često ne postižu potreban visok stupanj pročišćavanja, dok istovremeno održavanje prihvatljivih troškova predstavlja izazov. Zbog toga su razvijeni alternativni procesi obrade kao što su biološki, uključujući enzimske katalitičke reakcije, koje omogućuju visoku učinkovitost uklanjanja onečišćivala uz manje troškove [3]. Zadnjih desetljeća su razvijene nove tehnologije za uklanjanje fenola iz tokova otpadnih voda. Dok su konvencionalne metode obrade vrlo učinkovite u uklanjanju fenola; neke od ovih metoda nisu ekološki prihvatljive, a druge su skupe. Stoga se održive i zelene tehnologije koriste i uzimaju u obzir u pročišćavanju fenolnih otpadnih voda zbog njihove učinkovitosti, pristupačnosti i ekološke kompatibilnosti [4].

2. OPĆI DIO

2.1.OTPADNE VODE

Najzastupljenija tvar u građi živih bića je voda, koja obuhvaća i najveći dio Zemljine površine od 70,8 % [5]. Budući da su klimatske promjene i suše rezultirale nedostatkom vode ponovna upotreba otpadnih voda postala je ključna točka upravljanja vodama. Osim toga, porast svjetske populacije i porast životnog standarda doveli su do sve veće potrošnje svježih vode i generiranje otpadnih voda [6].

Otpadne vode razlikuju se po vrsti i sastavu te ih dijelimo na komunalne, industrijske i oborinske otpadne vode. Na fizikalni, kemijski i biološki sastav otpadnih voda utječu mnogi faktori kao što je potrošnja vode u kućanstvu, topografski i geografski uvjeti kanalizacijskog sustava te tipovi industrijskih otpadnih voda. Fizikalne karakteristike otpadnih voda razlikuju se od običnih voda. Otpadne vode brže uzrokuju koroziju zbog rasta sulfato-reducirajuće biomase na stijenkama cjevovoda. Stvaranjem naslaga, dolazi do postizanja anaerobnih uvjeta koji pogoduju razvijanju drugih agresivnih tvari. Do ubrzanja korozivnih procesa dolazi i zbog jako lužnatih ili jako kiselih supstanci koje dopijaju u kanalizacijski sustav. Osim toga, povišena temperatura otpadnih voda uzrokuje ubrzanje kemijskih procesa korozije materijala [7].

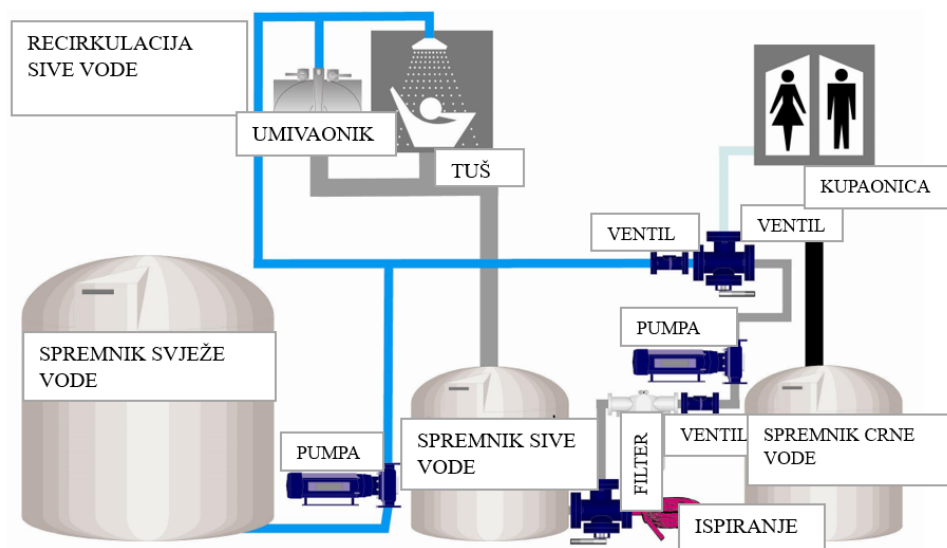
2.1.1. Komunalne otpadne vode

Komunalne otpadne vode posljedica su kućanskih aktivnosti, obavljanja životnih funkcija te sanitarnih potreba. Kućanske otpadne vode mogu se podijeliti na sive vode te na crne vode [7].

Sive vode čine 80-85 % kućanskih otpadnih voda. Ova voda potječe od - perilica, umivaonika, bazena, tuševa, kupaonica. Sadrži tenzide zato što su oni glavni sastojci sredstva za čišćenje. U budućnosti siva voda predstavlja značajni izvor vode zbog svoje velike količine, a očekuje se da će njezino pročišćavanje biti lakše izvedivo u usporedbi s kućanskom otpadnom vodom zbog manjeg potencijala onečišćenja. S obzirom na navedeno, razvijeno je nekoliko metoda za pročišćavanje i ponovnu upotrebu sive vode. U to se ubrajaju

prirodni sustavi za pročišćavanje, izgrađene močvare, filtracija, biološki i kemijski procesi, ultrafiltracija, nanofiltracija te oksidacija. Iako biološki procesi mogu lako ukloniti biorazgradive spojeve u otpadnoj vodi, neki deterdženti i aktivne tvari u sivoj vodi nisu lako biorazgradivi te je time biološki proces manje učinkovit. Prilikom kemijske obrade i oksidacijskih procesa postiže se visoka učinkovitost uklanjanja otopljenog organskog ugljika [6].

Crne vode koje potječu iz kanalizacijskog otpada se anaerobno razgrađuju. U anaerobnoj digestiranoj crnoj vodi uzgaja se *Tetrademus obliquus* kako bi se promatrali čimbenici ograničenja rasta i fiziološka svojstva stanica algi. Dodavanjem Fe^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+} u crnu vodu omogućuje se maksimalan rast algi. Ovaj postupak je alternativni proces obrade kućanskih otpadnih voda s brojnim prednostima kao što su smanjenje gustoće patogena, očuvanje hranjivih tvari te proizvodnja energije. Shodno tome, sustav anaerobne digestije zajedno s naknadnim uzgojem algi može pružiti mnoge prednosti jer će se hranjive tvari ukloniti iz otpadne vode i proizvesti bioplin i alge [8]. Na slici 2.1. prikazan je način korištenja sive i crne vode.



Slika 2.1. Korištenje sive i crne vode te njihovi izvori

2.1.2. Industrijske otpadne vode

Industrijska otpadna je voda nastala u procesima industrijske proizvodnje te ona zahtijeva preradu prije ispuštanja u okoliš ili prije ponovne upotrebe. Uzimajući u obzir rizik za okoliš, industrijska postrojenja trebaju težiti maksimiziranju učinkovitosti procesa obrade vode. Važno je odrediti vrste onečišćivala u otpadnim vodama te njihove koncentracije što je u industrijama izazovno. Na slici 2.2. prikazana je otpadna voda dobivena iz prehrambene industrije. Navedene vode dijele se na biološki razgradive te biološki nerazgradive otpadne vode. Biološki razgradive se mogu miješati s gradskim otpadnim vodama, dok se biološki nerazgradive moraju podvrgnuti procesu pročišćavanja prije miješanja s gradskom otpadnom vodom. Otpadne vode nastale u industriji sadrže ione teških metala, organske spojeve, otrovne kemikalije te druga onečišćivala koja u prevelikim količinama uzrokuju trovanje tijela [7].

U svrhu uklanjanja onečišćivala koriste se različite metode obrade industrijskih voda, a one uključuju fizikalne, kemijske i biološke procese. Fizikalna obrada uključuju filtraciju i taloženje. Kemijska obrada koristi koagulatne i flokulante za uklanjanje otopljenih tvari. Biološka obrada je ključni proces u upravljanju industrijskim otpadnim vodama. Ona koristi mikroorganizme za razgradnju organske tvari i uklanjanje hranjivih tvari, poput dušika i fosfora [9].

Od analitičkih metoda za određivanje onečišćivala u industrijskim vodama ističu se Ramanova spektroskopija, infracrvena spektroskopija i rendgenska spektroskopija. Infracrvena spektroskopija je analitička metoda koju karakteriziraju vrlo visoke mjerne mogućnosti te se stoga često koristi za kvalitetnu procjenu različitih tvari i proizvoda. Njena glavna prednost, u odnosu na ostale metode je visoka selektivnost postignuta mjerenjima visoke razlučivosti, mogućnosti istovremenog mjerenja više tvari te visoka osjetljivost. Iz ovih razloga, primjenom ove metode moguće je provođenje analize izravno u industrijskom procesu. Rendgenska spektroskopija se koristi za određivanje sadržaja elemenata, posebno elemenata u tragovima kvalitativnim i kvantitativnim analizama krutina, tekućina i praha. Ramanova spektroskopija nalazi primjenu u proučavanju industrijskih otpadnih voda, bioloških materijala, arheoloških otkrića ili uzoraka iz okoliša. Temelji se na promjenama polarnosti molekula. Uspoređujući infracrvenu i Ramanovu spektroskopiju, bolje rezultate za tekuće uzorke daje Ramanova spektroskopija zbog činjenica da prisutnost vode u uzorku ima jak utjecaj i uzrokuje interferenciju u infracrvenom spektru. No, u slučaju Ramanove

spektroskopije smetnje mogu biti uzrokovane fluorescencijom što predstavlja komplikaciju pri analizi obojenih tvari [10].



Slika 2.2. Otpadna voda dobivena iz prehrambene industrije

2.1.3. Oborinske otpadne vode

Oborinska otpadna voda je voda koja nastaje kao posljedica prevelike količine kiše ili topljenja snijega. Odvodi se direktno u vodotokove, no u urbanim sredinama odvodi se u komunalne tokove te ulazi u sustav pročišćavanja. Budući da teče kroz urbanu sredinu, sklona je kupljenju raznih onečišćivala kao što su nafta, maziva, teški metali, guma, plastika te štetne kemikalije [7]. Količina oborinske vode koja se odvede u vodotok pogoršava čistoću vodotoka, oštećuje vodene ekosustave i negativno utječe na gospodarstvo. Smanjivanje količine oborinskih voda može se postići implementacijom zelenih površina kao što su kišni vrtovi. Isto tako izgradnjom bazena koji zadržavaju oborinsku vodu može se smanjiti protok vode te se mogu ukloniti onečišćivala prije samog ispuštanja [11]. Posljednjih pet desetljeća provedena su istraživanja kojima se identificiraju izvori onečišćivala u urbanim sredinama te je istraživani način na koji se oni mogu smanjiti. Postoje empirijski modeli kojima se upravlja

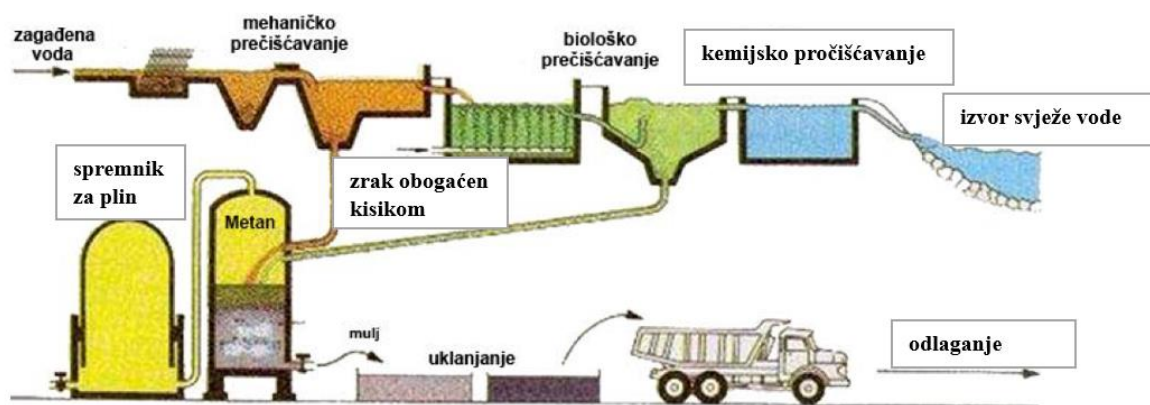
oborinskim otpadnim vodama. Kako bi se zadovoljili propisi o najvećem dnevnom opterećenju otpadne vode, modeli se koriste za određivanje utjecajnih koncentracija na mjere kontrole oborinskih voda. Predviđanje kvalitete oborinskih voda je višestruki problem, a korištenje empirijskih modela ne uzima u obzir sve čimbenike koji utječu na njihovu kvalitetu. Suprotno tome, fizički modeli za koje se pretpostavlja da točnije prikazuju dinamiku onečišćenja zahtijevaju brojne ulazne parametre koje je teško dobiti i procijeniti što otežava kalibraciju takvih modela. Iako su metode za kalibraciju modela napredovale u posljednjih par godina, učinkovitost takvih metoda je još uvijek ograničena dostupnošću podataka. Kako bi se prevladalo ovo ograničenje; mnogi modeli, metode kalibracije i prethodno stvoreni empirijski odnosi koji su temeljeni na regresiji i strojnom učenju koriste podatke o kvaliteti oborinske vode bez obzira na starost tih podataka. Postoji pretpostavka kada se razvijaju modeli koji koriste podatke stare desetljećima za predviđanje trenutnih i budućih uvjeta kvalitete oborinskih voda, a ona glasi da je kvaliteta oborinskih voda vremenski statična tijekom desetljeća. No, kasnijim istraživanjima, prema autorima I. M. Simpson i suradnicima 2023. godine stvoreni su odnosi temeljeni na regresiji i strojnom učenju kako bi procijenili kvalitetu oborinske vode koristeći podatke stare do 40 godina. Nedavno se pretpostavlja da podatci o kvaliteti oborinskih voda nisu vremenski statični te da poboljšanja u kvaliteti netretirane oborinske vode mogu biti povezana s napretkom u proizvodnji te ostalim izvorima koji doprinose smanjenju atmosferskog taloženja, izgaranja i stvaranja onečišćivala koja se na kraju prenose oborinskim vodama. Prema tom istraživanju, dobila bi se čišća voda u usporedbi s istraživanjima provedenim u prethodnim desetljećima [12].

2.2.OSNOVNI POSTUPCI OBRADJE OTPADNIH VODA

Pročišćavanje otpadnih voda neophodno je za ublažavanje degradacije okoliša i zdravstvenih rizika. Načini obrađivanja otpadne vode su odvajanje krutine od tekućine, kapljevine od vode te plinova od vode. Postoje tri stupnja pročišćavanja otpadnih voda, a potreban stupanj određuje se ovisno o količini suspendirane tvari u otpadnoj vodi. Za obradu je neophodno pronaći odgovarajući obujam spremnika te kapacitet crpki ovisno o količini otpadne vode. Upravo to se određuje prema utrošku jednog stanovnika neke populacije tijekom jednog

dana. Prvi stupanj uključuje fizikalni i/ili kemijski proces obrade, dok drugi i treći stupanj uključuju biološki proces obrade otpadne vode [13].

Prema tome, razlikujemo tri osnovna postupka u obradi voda, a to su mehanička obrada, biološka obrada i fizikalno-kemijska. Na slici 2.3. su prikazani osnovni postupci obrade otpadne vode.



Slika 2.3. Osnovni postupci obrade otpadne vode

2.2.1. Mehanička obrada otpadnih voda

Mehanička obrada ili primarna obrada uključuje fizičko odvajanje i uklanjanje suspendiranih krutih tvari te onečišćivala iz otpadne vode. Grube krute tvari, velike predmete i krhotine je moguće ukloniti pomoću sita ili rešetke. Rupa u rešetki smije biti maksimalno široka 16 mm. Otpadne vode mogu se obrađivati i filtracijom kroz pijesak. Komore za pijesak se koriste za taloženje i uklanjanje teških anorganskih čestica koje mogu uzrokovati abraziju i habanje unutar sustava za obradu. Na slici 2.4. prikazane su vertikalne komore za pijesak. U spremnicima, taloženje je pod utjecajem gravitacije ili upotrebom centrifugalne sile. Talozanjem pod utjecajem gravitacije dolazi do nastanka mulja na dnu spremnika [14].



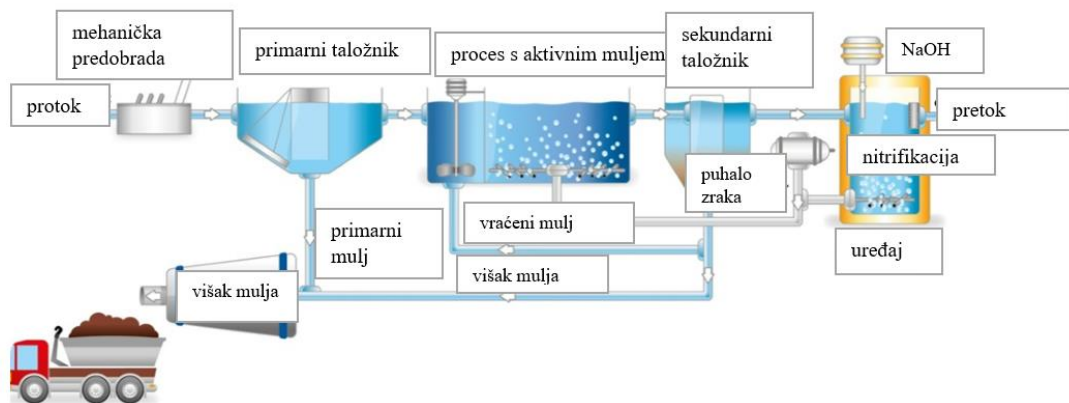
Slika 2.4. Komora za pijesak

2.2.2. Biološka obrada otpadnih voda

Biološka obrada otpadnih voda ili sekundarna obrada je proces uklanjanja onečišćivala iz otpadnih voda pomoću mikroorganizama. Proces je prikazan na slici 2.5. te se oslanja na iskorištavanje prirodnih sposobnosti različitih zajednica mikroorganizama da razgrade i metaboliziraju organske tvari, dušikove i fosforne spojeve koji su prisutni u otpadnoj vodi [9]. U biološkom uklanjanju dušikovih i fosfornih spojeva iz otpadnih voda koristi se proces denitrifikacije te proces biološkog uklanjanja fosfora. Nositelji oba procesa su heterotrofni organizmi te je jedan od faktora koji utječe na njihovu učinkovitost količina organskog ugljika koji ulazi u bioreaktor s otpadnom vodom. Ponekad može doći do manjka organskih spojeva čime se smanjuje učinkovitost uklanjanja nutrijenata. Kako bi se zadovoljili zahtjevi za konačnom kvalitetom otpadne vode u bioreaktor je potrebno unijeti dodatni izvor organskog ugljika kao što je metanol, etanol i octena kiselina. Drugo rješenje je korištenje otpadnih proizvoda iz prehrambene industrije ili glicerinom. Organski spojevi koji su supstrati za denitrifikacijske bakterije i organski spojevi koji akumuliraju fosfor mogu se dobiti iz primarnog mulja te iz viška mulja koji je otpadni proizvod pročišćavanja otpadnih voda [15].

Kako bi se uklonili otopljeni sastojci koriste se aerobni i anaerobni postupci čiji je temelj različit odnos mikroorganizama prema otopljenom kisiku. Aerobni proces je proces u prisutnosti kisika koji je učinkovit za niže koncentracije hranjivih tvari. Kemijska potrošnja

kisika (KPK) za aerobne procese je do 1.0 g/dm^3 . S druge strane, određivanjem otpadnih voda s visokim vrijednostima KPK nastaju velike količine aktivnog mulja. Da bi proces obrade mogao ići dalje, aktivni mulj se mora izdvojiti iz sustava obrade vode zbog suviška organskih i anorganskih tvari koje treba ukloniti. Anaerobni proces je proces bez prisutnosti kisika. U anaerobne sustave za obradu spadaju anaerobni digestori u kojima anaerobne bakterije i drugi mikroorganizmi zajedno razgrađuju organske spojeve. Tijekom ovog procesa, organski spojevi prolaze kroz složene mikrobiološke procese. Razgradnjom organskih spojeva nastaju metan i ugljikov dioksid kao nusprodukti. Prvi dio složenog procesa razgradnje je hidroliza polisaharida i polifenola do njihovih monomera. Polisaharidi i polifenoli se uz pomoć acetogenih bakterija razgrađuju do organskih kiselina. Do metana i ugljikovog dioksida se dolazi razgradnjom organskih kiselina pomoću metanogenih bakterija [16]. U odnosu na aerobni proces, anaerobni ima visoku energetska učinkovitost, odnosno troši manje energije. Razlog tome je što ne zahtijeva stalno prozračivanje čime se smanjuju operativni troškovi. Također, anaerobni proces stvara manje mulja što uzrokuje održiviji pristup gospodarenja otpadom. Unatoč ovim prednostima, proces je osjetljiv na promjenjive temperature i pH vrijednosti [17].



Slika 2.5. Biološka obrada otpadnih voda

2.2.3. Fizikalno-kemijska obrada otpadnih voda

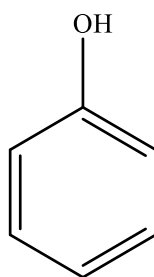
Fizikalno-kemijska obrada otpadnih voda ili tercijarna obrada nadopunjuje biološke procese pročišćavanja. Među procese fizikalne obrade ubraja se uklanjanje krutih čestica prosijavanjem, filtracijom, taloženjem. Prosijavanjem se uklanjaju veliki predmeti i krhotine, dok se taloženjem omogućuje da teže čestice od vode talože na dno zbog utjecaja gravitacije. Kako bi se ubrzalo taloženje mora se utjecati na elektrokinetička svojstva koloidno suspendiranih tvari. Nakon taloženja slijedi filtracija kojom se dodatno pročišćava otpadna voda propuštanjem kroz porozne medije poput kvarcnog pijeska ili aktivnog ugljena. U fizikalnu obradu ubraja se i adsorpcija na čvrsti adsorbens, reverzna osmoza, destilacija te ozračivanje [7].

Od kemijskih procesa obrade ističe se neutralizacija, koagulacija, flokulacija, dezinfekcija i oksidacija. U postupku koagulacije i flokulacije dodatkom koagulanata i flokulanata male čestice se grupiraju u veće flokule koje je onda lakše ukloniti pri obradi otpadne vode. Dezinfekcija uključuje upotrebu klora kojim se uklanjaju štetni mikroorganizmi prisutni u pročišćenoj otpadnoj vodi. Upravo ona je ključna kako bi voda zadovoljila standarde prije ispuštanja u okoliš [7].

3. GLAVNI DIO

3.1.FENOLI

Fenoli su skupina organskih spojeva koji sadrže hidroksilnu skupinu (OH) vezanu na aromatski benzenski prsten. Na slici 3.1. je prikazana kemijska struktura fenola. Ovi spojevi topljivi su u alkoholu, glicerolu, nafti i vodi te ih karakterizira prepoznatljiv katranasti miris. Poznati su po jedinstvenim kemijskim svojstvima zbog čega se klasificiraju prema strukturi, na temelju broja ugljikovih atoma u molekuli, biosintetskog puta te biološke aktivnosti. Fenol je prozirna, bezbojna masa kristala na sobnoj temperaturi, no nakon miješanja s vodom nastaje bijeli prah ili tekućina poput sirupa. Kristali na zraku mijenjaju boju od roze do crvene, a karakteriziraju ih higroskopska svojstva [1].

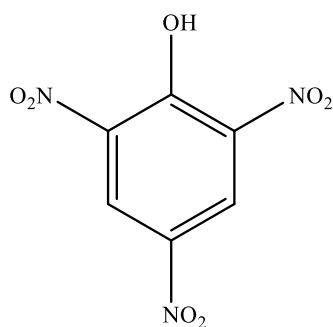


Slika 3.1. Kemijska struktura fenola

Prisutnost fenola u vodi potječe od dva izvora, a to je prirodna pojava te antropogene aktivnosti. Prirodni fenol se dobiva iz mrtvih biljaka ili životinja. Antropogene aktivnosti uključuju ispuštanje fenola iz industrije te iz poljoprivrednog sektora [4]. Osim toga, prirodno se mogu pronaći u različitim izvorima kao što su biljke, ugljen, sirova nafta, trulo povrće, eterična ulja i lignin. Fenoli su bitni kao obrambeni mehanizam nekih biljaka te djeluju kao signalne molekule u raznim fiziološkim procesima. Prema tome, oni su osnovna strukturna jedinica za sintezu organskih spojeva obuhvaćajući pesticide i poljoprivredne kemikalije. Osim toga, koriste se i u brojnim industrijskim primjenama poput proizvodnje plastike i farmaceutskih proizvoda. Pred kraj 19. stoljeća počinju se koristiti za sintezu boja, dobivanje aspirina te pikrinske kiseline [16].

Pikrinska kiselina ili 2,4,6- trinitrofenol je snažan i vrlo eksplozivan organski spoj čija je kemijska struktura prikazana na slici 3.2. Poznata je po svom povijesnom značaju u

proizvodnji eksploziva, boja te u medicini. Ona ima visok eksplozivni potencijal te je vrlo osjetljiva na udarce. Osim što se koristi u vojsci, ona svoju svrhu pronalazi i u proizvodnji vatrometa, šibica, raketnog goriva, lijekova i boja. Otrovnost je za ljude te može uzrokovati anemiju, oštećenje jetre i pluća. Dopušteni sadržaj pikrinske kiseline u vodi je 0.001 mg/L. Prema tome, otkrivanje pikrinske kiseline važan je uvjet za očuvanje okoliša i zaštitu ljudskog zdravlja kako bi se smanjilo širenje potencijalno opasnih materijala i njihov negativan utjecaj na prirodne resurse. Za kvantifikaciju i detekciju pikrinske kiseline koristi se plinska kromatografija u kombinaciji s masenom spektrometrijom, Ramanova spektroskopija, masena spektrometrija. Nedostaci ovih metoda su loša prenosivost te prevelika osjetljivost na lažno pozitivne rezultate koji su uzrokovani onečišćivačima iz okoline. Za otkrivanje pikrinske kiseline koristi se optička metoda zbog velike raznolikosti fluorescentnih entiteta, jednostavnosti instrumentacije koja se zahtijeva pri korištenju kolorimetrijskih sonda te često niske granice detekcije koja se postiže pri korištenju fluorescentnih sonda. Ovakav način detekcije u odnosu na pristupe temeljene na apsorpciji je osjetljiviji te ima šire linearne raspon. Budući da se detektor i izvor fluorescentnog pristupa mogu jednostavno integrirati u ručni uređaj za otkrivanje eksploziva na terenu. Ovaj pristup daje brz način za otkrivanje eksploziva. Svaka promjena koja uzrokuje promjenu intenziteta fluorescencije i promjenu valne duljine ima potencijal otkriti nefluorescentne eksplozive. Pikrinska kiselina je vrlo nestabilna te predstavlja značajne sigurnosne rizike zbog svoje mogućnosti stvaranja kristalnih soli osjetljivih na udarce, poznatijih kao pikrati. Upravo te soli su vrlo eksplozivne što dovodi do slučajnih detonacija i teških nesreća. Iz ovih razloga je upotreba pikrinske kiseline ograničena te je zamijenjena sigurnijim alternativama. U prošlosti se koristila u tekstilnoj industriji kao žuta boja za bojenje vune i svile. U medicini se zbog svojih antiseptičkih svojstava koristila za liječenje rana i opekline. Zbog svoje toksičnosti, zamijenjena je modernijim medicinskim načinima [18].



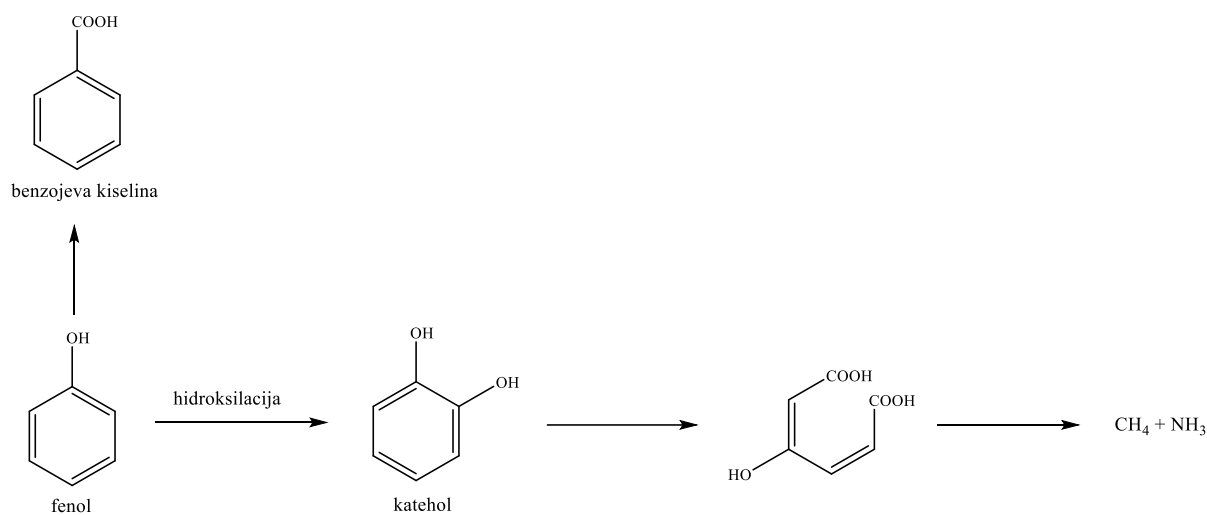
Slika 3.2. Kemijska struktura pikrinske kiseline ili 2,4,6-trinitrofenola

Osim toga, fenoli se mogu kondenzirati aldehidima. Time se dobivaju smolasti spojevi koji su temelj plastike te se mogu pronaći u izradi proizvoda od drva [16]. Sirovine tradicionalnih ljepila za drvo sastoje se od neobnovljivih izvora kao što su formaldehid i fenol. Nažalost, ove sirovine ne samo da štete okolišu i ljudskom zdravlju već su i sve rjeđe i skuplje. Lignocelulozni materijali jedan su od najobilnijih resursa biomase na Zemlji, kao i skladište kemijskih sirovina prirodnih polimera. Lignin je složena molekularna struktura koja ima veliku prostornu smetnju te nisku reakcijsku dostupnost. Budući da je njegova većina aktivnih mjesta zamijenjena to rezultira niskom reaktivnošću. Rješenje ovog problema leži u prethodnom metiliranju lignina s formaldehidom u reaktoru kako bi se dobio metilirani lignin. Upravo ovo predstavlja veliki napredak u industrijskoj primjeni smola na bazi lignina. Međutim, zbog poboljšanja reaktivnosti lignina nakon modifikacije, fenolna smola na bazi lignina zahtijeva strože uvjete otvrdnjivanja što povećava proizvodne troškove za proizvodnju drva [19].

Trovanje fenolom može biti posljedica udisanja, gutanja ili kontakta kože s fenolom. Izravan kontakt s fenolom može izazvati jaku iritaciju i oštećenje kože, očiju i sluznice. Može dovesti do kemijskih opekline i nekroze. Udisanjem para fenola može doći do iritacije nosa, grla i pluća. Gutanje fenola može uzrokovati mučninu, povraćanje te bolove u trbuhu. Simptomi sustavnog trovanja su vrtoglavica, glavobolja, zbunjenost, slabost i ubrzan rad srca. Dugotrajna izloženost uzrokuje oštećenje jetara i bubrega što dovodi do žutice, disfunkcije jetara i zatajenja bubrega. U nekim slučajevima simptomi trovanja fenolom se možda neće pojaviti odmah nakon izlaganja. Odgođeni učinci mogu uključivati promjenu boje kože, oštećenje tkiva koje se razvija nekoliko sati ili dana nakon kontakta. U pročišćavanju otpadnih voda, fenoli su izazovna skupina za uklanjanje zbog svoje stabilnosti i otpornosti na razgradnju. Osim voda, onečišćuju i zrak i tlo tako što mijenjaju njihova kemijska i biološka svojstva [16].

Fenole je moguće pretvoriti u polimere te u jednostavne spojeve pomoću abiotičkih i biotičkih katalizatora što je prikazano na slici 3.3. U te spojeve ubraja se benzojeva kiselina te katehol. Katehol se prevodi u 2- hidroksi-*cis*, *cis*-mukonsku kiselinu te se daljnjim reakcijama prevodi do metana i vode. U abiotičke katalizatore svrstava se glina, Fe_2O_3 , MnO_2 , a u biotičke enzim fenoloksidaza. Navedeni enzim je proizveden od biljaka, gljiva i bakterija. Ova dva katalizatora se uspoređuju prema njihovoj sposobnosti oksidacije fenolnih spojeva mjerenjem unosa kisika i analizom nestanka supstrata tekućinskom kromatografijom. Sposobnosti oksidacije oba katalizatora su slične. No, u enzimski kataliziranim reakcijama kisik djeluje

kao akceptor elektrona, dok u reakcijama kataliziranim glinom ne djeluje. Prema tome, enzimi kao homogeni katalizatori učinkovitiji su u usporedbi s abiotičkim kao heterogenim katalizatorima. Međutim, abiotički još uvijek imaju značajnu ulogu u transformaciji fenolnih spojeva zbog zastupljenosti u prirodi. Na oba procesa utječe pH vrijednost, temperatura, koncentracija katalizatora, vrijeme zadržavanja, prisutnost drugih katalizatora [20]. U nastavku je navedeno nekoliko glavnih načina dobivanja fenola, a to je ekstrakcija fenola iz ugljenog katrana, petrokemijska proizvodnja, pretvorba biomase, oksidacija toluena, fuzija natrijevog benzensulfonata s natrijevim hidroksidom te grijanje monoklorbenzena pod visokim tlakom s natrijevim hidroksidom.



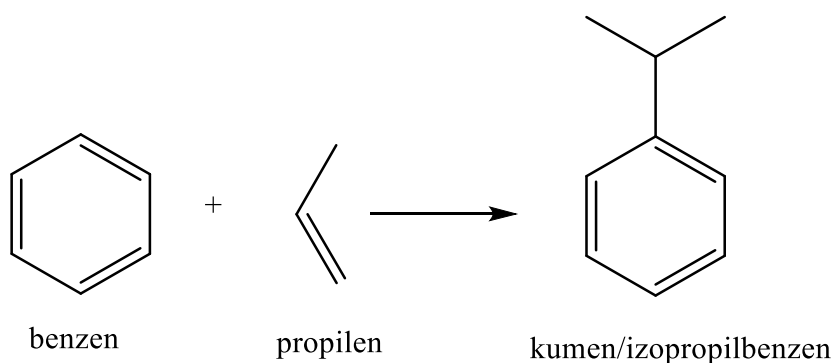
Slika 3.3. Pretvorba fenola u jednostavnije spojeve

3.2.DOBIVANJE FENOLA

3.2.1. Petrokemijski proces

Fenoli se u industrijama dobivaju petrokemijskim procesom. Benzen koji je dobiven iz sirove nafte služi kao početni materijal za sintezu fenola. Primarna metoda u proizvodnji fenola je kumenski proces, gdje se kumen oksidira u kumen-hidroperoksid koji se zatim cijepa da bi se proizveli fenol i aceton.

Na slici 3.4. je prikazan kumenski proces, odnosno željena reakcija benzena s propilenom čime nastaje kumen. Nepoželjnom reakcijom kumena s propilenom nastaje *p*-diizopropilbenzen. Obje reakcije su nepovratne. Budući da nepoželjna reakcija ima veću energiju aktivacije to ukazuje da niže temperature reaktora poboljšavaju selektivnost kumena. Međutim, niske temperature reaktora rezultiraju niskom konverzijom propilena zbog čega je potreban veći reaktor. Selektivnost se može poboljšati korištenjem viška benzena kako bi se koncentracija kumena i propilena zadržale na niskoj razini, ali se time povećavaju troškovi. Ovim procesom se mora postići kompromis između sljedećih veličina: veličina reaktora u odnosu na temperaturu, selektivnost u odnosu na brzinu protoka recikliranja te veličina reaktora u odnosu na brzinu protoka recikliranja. Varijable optimizacije dizajna utječu na troškove energije i na kapitalna ulaganja. Proces se sastoji od cijevnog reaktora i dvije destilacijske kolone. Svježa tekuća sirovina i benzen isparavaju, a prethodno se zagrijavaju te uvode u reaktor kao parna faza. Produkt reaktora se hladi i uvodi u prvu kolonu koja kao destilat proizvodi benzen koji se ponovno reciklira. Druga kolona odvaja željeni produkt kumen od neželjenog produkta *p*-diizopropilbenzen [21].



Slika 3.4. Nastajanje kumena reakcijom benzena i propilena

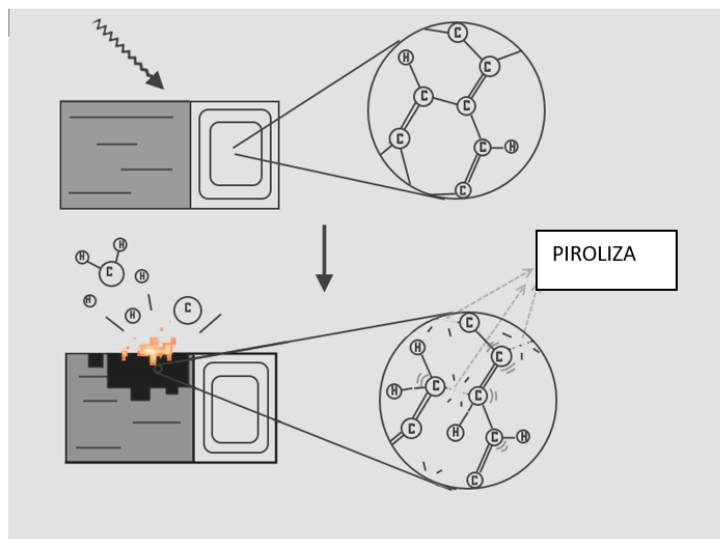
3.2.2. Ekstrakcija fenola iz ugljenog katrana

Fenoli se dobivaju iz ugljenog katrana, nusprodukta rasplinjavanja ugljena ili procesa koksiranja. Iz ugljenog katrana se kao produkt dobije mješavina organskih spojeva, uključujući fenole koji čine 20-50 % mase ugljenog katrana. Fenolni spojevi se iz ugljenog katrana odvajaju ekstrakcijom [22]. Trenutno je glavna metoda ekstrakcije fenola alkalna metoda. Nakon što ugljeni katran dođe u kontakt s otopinom anorganske lužine, otopina fenolata se može formirati iz fenola i lužine. To se zatim neutralizira mineralnom vodom kako bi se oslobodili fenoli. Ova metoda troši anorgansku kiselinu i lužine te generira puno otpadne vode koja sadrži sol i fenole. Kako bi se fenoli ekstrahirali iz katrana na ekološki način i uz niže troškove, potrebno je odabrati sredstvo koje ima veću selektivnost i nižu cijenu za regeneraciju sredstva za ekstrakciju i istovremeno prikupljanje fenola uz mali utjecaj na okoliš.

Fenoli se mogu ekstrahirati vodenom otopinom amina. Organski amin s više amino skupina, hidroksilnom skupinom i jakom elektronegativnosti je najbolji za ekstrakciju. Razlog tome je vodikova veza nastala između amino radikala i hidroksila fenola na temelju Lewisove kiselobazne teorije. Ovaj način zahtijeva veću potrošnju energije za prekid vodikove veze za regeneraciju ekstrakta [23].

3.2.3. Pretvorba biomase

Biomasa kao obnovljiva sirovina koristi se za dobivanje proizvoda visoke tehnološke vrijednosti, kao što su fenoli. Fenoli dobiveni iz biomase nude ekološki prihvatljivu alternativu tradicionalnim petrokemijskim metodama. Za dobivanje fenola iz biomase koriste se procesi poput katalitičke pretvorbe ili pirolize što je prikazano slikom 3.5. [24]. Tijekom procesa pirolize fenol se raspada na molekule niskog vrelišta s manje od 4 atoma ugljika i polimerizira u makromolekule s više od 1500 atoma ugljika [25].



Slika 3.5. Piroliza

3.2.4. Oksidacija toluena

Dobivanje fenola iz toluena provodi se u dva koraka. Prvo se toluen oksidira u benzojevu kiselinu, nakon čega se benzojeva kiselina pretvara u fenol koristeći bakrov benzoat kao glavni katalizator.

Reakcija je opisana kao dva odvojena jednostruka prijenosa elektrona pomoću para Cu^{2+} iona. Radi se o elektrofilnoj aromatskoj supstituciji na benzojevoj kiselini ili benzoatu kao supstratu. Stvaranje fenola je opisano kao regiospecifično spajanje dviju molekula benzojeve kiseline preko ravnog šesteročlanog prstena. Prijelazno stanje dovodi do nastajanja salicilnog benzoata. Zatim dolazi do dekarboksilacije i hidrolize dajući fenol [26].

3.3.OBRADA INDUSTRIJSKIH OTPADNIH VODA ONEČIŠĆENIH FENOLIMA

Industrijske otpadne vode onečišćene fenolima predstavljaju značajan izazov za okoliš zbog svoje toksične prirode. Obrada industrijskih otpadnih voda onečišćenih fenolima višestruk je izazov koji zahtijeva inovativna i održiva rješenja. Provedba procesa obrade smanjuje onečišćenje okoliša te promiče odgovornu industrijsku primjenu, štiteći okoliš i dobit

ljudi. Kako je već spomenuto, industrijske otpadne vode nastale u proizvodnji maslinovog ulja su najbolji primjer otpadne vode onečišćene fenolima [16].

Pri proizvodnji maslinovog ulja nastaje čvrsti ostatak masline. Čvrsti ostatak se sastoji od koštice masline te komadića kore. Od jedne tone maslina dobije se 400 kg čvrstog ostatka i 120 L mljevene vode. Maslinovo ulje i čvrsti ostatci su bogati fenolnim spojevima. Najreprezentativniji fenolni spojevi u maslinom ulju su oleuropein, tirozol i hidroksitirozol te oni mogu pridonijeti prevenciji i kontroli niza bolesti od kardiovaskularnih bolesti do karcinoma. S druge strane, masline i njihovi derivati su stalno izloženi onečišćivačima kao što su mikotoksini, pesticidi i policiklički aromatski ugljikovodici. Fenolni spojevi iz maslinovog ulja smanjuju toksičnost navedenih onečišćivala. Prisutnost fenolnih spojeva doprinosi antioksidativnim, antikancerogenim te antimikrobnim svojstvima masline. U koštici masline najzastupljeniji su sekoiridoidni spojevi, posebno oleuropein i njegov aglikonski oblik te već spomenuti tirozol i hidroksitirozol kao produkti njegove hidrolize. Produkti hidrolize čine 30 % ukupno prisutnih fenolnih spojeva u plodu masline te pokazuju bioaktivna svojstva. Fenolni spojevi sprječavaju citotoksičnost izazvanu okratoksinom A. To je mikotoksin koji onečišćuje hranu s teškim nefrotoksičnim učincima [27]. Okratoksin A je svrstan u skupinu mogućih ljudskih kancerogena te predstavlja rizik za ljudsko i životinjsko zdravlje jer se može izravno unijeti u čovjekov organizam putem onečišćene hrane [28].

Prema tome, proizvodnja maslinovog ulja sadrži najveću koncentraciju fenola kao što je i prikazano u tablici 3.1. No, fenole je moguće pronaći i u drugim industrijskim pogonima kao što su pogoni za obradu drva, petrokemijska industrija, proizvodnja plastičnih masa te industrija papira i celuloze [16].

Tablica 3.1. Koncentracija fenola u industrijama

INDUSTRIJSKI PROCES	γ (fenoli) / g dm ⁻³
INDUSTRIJA PAPIRA I CELULOZE	0,01
PETROKEMIJSKA INDUSTRIJA	0,05 - 0,06
POGONI ZA OBRADU DRVA	0,15
PROIZVODNJA PLASTIČNIH MASA	0,6 - 2
PROIZVODNJA MASLINOVOG ULJA	9,2 - 80

3.3.1. Fizikalno-kemijska obrada industrijskih otpadnih voda onečišćenih fenolima

Kao što je već navedeno, tercijarna obrada otpadnih voda odnosno fizikalno-kemijska obrada uključuje fizikalne procese kao što su adsorpcija na čvrsti adsorbens te kemijske procese flokulacije, koagulacije i oksidacije. Ova četiri fizikalno-kemijska procesa se najviše ističu pri obradi voda onečišćenih fenolima.

Adsorpcija je široko korišten proces koji uključuje pričvršćivanje molekula fenola na čvrstu površinu koja se naziva adsorbens. Aktivni ugljen je najčešće korišten adsorbens zbog svoje velike površine i adsorpcijskog kapaciteta [29]. On se može aktivirati toplinskom obradom ili kemijskom aktivacijom. Postoji u granuliranom i praškastom obliku. Granulirani aktivni ugljen je povoljan zbog sposobnosti regeneracije, dok se praškasti aktivni ugljen obično ne koristi zbog smanjene učinkovitosti. Regeneracija je posljedica poroznosti i kemijskih svojstava aktivnog ugljena. Fizikalna adsorpcija fenola na aktivni ugljen je kontrolirana stupnjem poroznosti. Ova vrsta adsorpcije se dijeli na nekoliko faza, počevši od masovne adsorpcije kako bi se popunile mikropore, a zatim i mezopore. Kemijska adsorpcija aktivnog ugljena se oslanja na prisutnost bazalnih linija na njegovoj površini [30]. Za uklanjanje fenola iz vodenih otopina koristi se aktivni ugljen koji je pripremljen od atlaskog hrasta. Korištenjem fosforne kiseline kao aktivatora procijenjena je sposobnost aktivnog ugljena da adsorbira fenol u različitim uvjetima. Proces adsorpcije slijedi kinetiku drugog reda. Na teorijskoj razini je dokazano da je model monosloja s dva energetska mjesta najbolji model za opisivanje fenomena adsorpcije fenola. Prostorni parametri pokazuju da se molekule fenola okomito adsorbiraju na površinu novog materijala. Prema termodinamici, adsorpcija fenola je fizičke, spontane i endotermne prirode te ovisi o elektrostatskim interakcijama te vodikovim vezama [31]. Osim aktivnog ugljena, adsorpcija je provedena s još nekoliko adsorbensa, uključujući montmorilonit, aktivirani aluminijev oksid te titanijev dioksid [30].

Koagulacija i flokulacija oslanjaju se na dodatak kemijskih koagulanata kao što je aluminijev sulfat i željezov klorid za destabilizaciju i agregaciju čestica fenola, tvoreći veće flokule koje se mogu lakše odvojiti. Dodavanjem aluminijevog sulfata u otpadnu vodu koja sadrži fenole, on disocira na aluminijeve katione (Al^{3+}) i sulfatne anione (SO_4^{2-}). Pozitivno nabijeni kationi aluminijska djeluju kao koagulant i imaju ključnu ulogu u procesu koagulacije. Nakon što se aluminijev sulfat doda u otpadnu vodu, pozitivno nabijeni ioni aluminijska neutraliziraju negativne naboje na suspendiranim česticama, uključujući molekule fenola. Ova neutralizacija naboja smanjuje elektrostatsko odbijanje između čestica, potičući njihovu

agregaciju i stvaranje većih čestica poznatijih kao flokule. Nakon koagulacije dolazi do flokulacije. Flokule tijekom procesa flokulacije nastavljaju rasti te se time dodatno uklanjaju fenoli iz otpadne vode. Nakon ova dva procesa dolazi do odvajanja flokula od pročišćene vode filtracijom. Međutim, bitno je optimizirati dozu aluminijevog sulfata, pH razinu te intenzitet miješanja kako bi se postigli najbolji rezultati uklanjanja fenola [32].

Procesi oksidacije uključuju upotrebu kemijskih oksidansa ili naprednih procesa oksidacije za razgradnju fenola u manje štetne tvari. Uobičajeni oksidansi su klor, ozon i vodikov peroksid. Napredni oksidacijski procesi kao što su reakcija uz Fentonov reagens i fotokataliza stvaraju visoko reaktivne radikale za učinkovito razlaganje fenola. Pomoću fotokatalize i Fentonovog reagensa moguće je uspješno ukloniti onečišćivača iz otpadnih voda. Ograničavajući čimbenici navedenih procesa su niske koncentracije aktivnih vrsta kao što su hidroksilni radikali. Za ovaj primjer uklanjanja fenola CuFe_2O_4 pokazuje izvrsnu aktivnost. Razlog tome je što navedeni spoj sadrži željezo i bakar koji mogu reagirati s vodikovim peroksidom (H_2O_2) te proizvesti hidroksilni radikal. Uski zabranjeni pojas CuFe_2O_4 može u potpunosti iskoristiti vidljivu svjetlost, a Fe^{3+} i Cu^{2+} iz navedenog spoja mogu uhvatiti fotogenerirane elektrone i potaknuti valentne prijelaze Fe^{3+} u Fe^{2+} i Cu^{2+} u Cu^+ kako bi došlo do fotokatalize i degradacije Fentonovog reagensa. Stvaranje dvoelektronskog centra važno je sredstvo za promicanje učinkovitosti degradacije. Centar s dva elektrona je podijeljen na područja siromašna i područja bogata elektronima na temelju razlike u distribuciji elektrona. Reakcija redukcije odvija se u području bogatom elektronima kako bi se reducirao vodikov peroksid i proizveo hidroksilni radikal. Reakcija oksidacije se odvija u području siromašnom elektronima. Kako se redoks reakcije odvijaju na različitim mjestima dolazi do poboljšanja učinkovitosti aktivacije vodikovog peroksida i sposobnosti degradacije reakcije s Fentonovim reagensom. Fenol djeluje kao donor elektrona u područje bogato elektronima tijekom procesa razgradnje Fentonovog reagensa, ubrzavajući razgradnju vodikovog peroksida i potičući aktivnost razgradnje Fentonovog reagensa [33]. Osim vodikovog peroksida koristi se i ozon (O_3). On može učinkovito razgraditi organske i anorganske komponente, ali mora biti u kombinaciji s ultraljubičastim zračenjem ili vodikovim peroksidom. Nedostatak O_3 je niska topljivost, visoka cijena proizvodnje te niska stopa oksidacije fenola. Za poboljšanje učinkovitosti O_3 mora biti u kombinaciji s ultraljubičastim zračenjem ili s vodikom peroksidom. Takav sustav se naziva homogena katalitička oksidacija [30].

Iako ove metode imaju mnoge prednosti, njihovi nedostaci očituju se u tome što imaju visoke operativne troškove i troškove održavanja, visoke zahtjeve za energiju, zahtjeve za prethodnu

obradu, nisku učinkovitost uklanjanja te stvaranje kamenca. Stoga, kao jedna od učinkovitijih metoda obrade je biološka obrada.

3.3.2. Biološka obrada industrijskih otpadnih voda onečišćenih fenolima

Biološki procesi obrade imaju brojna svojstva uključujući visoku specifičnost, pristupačnost i odsutnost proizvodnje štetnih nusproizvoda. Različite biljne vrste i mikroorganizmi su korišteni za biološko uklanjanje onečišćivala kao što su fenolni spojevi iz otpadnih voda. Biološka obrada fenolnih spojeva se može provesti na tri različita načina. Prvi način je fitoremedijacija gdje se biljke koriste za ekstrakciju, zadržavanje ili razgradnju organskih i anorganskih onečišćivala. Drugi način je enzimima gdje su enzimi ekstrahirani iz različitih živih organizama kao što su biljke, gljive i bakterije i kao takvi se koriste za obradu otpadne vode. Treći način je bioremedijacija gdje se voda tretira pomoću mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice i kvasci koji iskorištavaju onečišćivala kao izvor ugljika i razgrađuju ga u ugljikov dioksid i vodu [34].

Fitoremedijacija je proces razgradnje štetnih onečišćivala u manje štetne tvari pomoću biljaka. Smatra se ekološki prihvatljivom te isplativom metodom za uklanjanje različitih organskih i anorganskih onečišćivala. Ovaj proces se provodi na dva načina. Prvi način je fitoekstrakcija gdje se onečišćivala izravno razgrađuju u biljkama. Nekoliko biljnih enzima je uključeno u razgradnju i transformaciju organskih onečišćivala kao što su citokrom P450 i glutation-S-transferaza. Drugi način je rizomedijacija pomoću biljaka. Onečišćivala razgrađuju enzimi poput lakaze, dehalogenaze i nitro-reduktaze koje izlučuje biljka ili njezina zajednica mikroorganizama [34].

Enzim lakaza je multibakreni enzim koji oksidira razne aromatske i nearomatske spojeve praćene četveroelektronskom redukcijom molekularnog kisika u vodi. Biosenzori lakaze mogu izravno katalizirati oksidaciju katehola u o-kinon. Ovo praćenje temeljeno na lakazi omogućuje izvođenje elektrokemijskog određivanja pri niskim potencijalima. Učinkovita imobilizacija enzimskog proteina na elektrodi ključna je za pripremu učinkovitog i stabilnog katalitičkog sustava [35].

Mikroorganizmi u tlu koriste eksudate korijena biljaka (šećeri, organske kiseline) kao izvore energije i ugljika, a zauzvrat pomažu u razgradnji onečišćivala. Osim toga, biljne izlučevine mogu povećati bioraspodivnost onečišćivala povećanjem topljivosti tih onečišćivala. Kako bi

se povećala učinkovitost fitoremedijacije te kako bi se postigle veće stope razgradnje koristi se više biljnih vrsta. Na ovaj način se povećavaju funkcionalne raznolikosti mikroorganizama te enzimski aktivnost. Detoksikacija fenola počinje transformacijom gdje onečišćivala postaju topljiva. Enzimi kao što su peroksidaze i lakaze kataliziraju ove reakcije. Neka istraživanja autora A. Bibi i suradnika 2023. godine pokazala su da sirovi enzimi biljaka mogu oksidirati fenol cijepanjem strukturnog prstena i stvaranjem dikarboksilne kiseline i katehola kao intermedijera. Daljnja oksidacija dovodi do stvaranja fumarne kiseline. Nakon transformacije, onečišćivala će se konjugirati s endogenim spojevima biljke. Ovaj korak je vrlo važan jer povećava pokretljivost i hidrofilnost onečišćivala. Primjer enzima koji se koristi u navedenom koraku je *N*-glukoziltransferaza. Konjugacija može samo djelomično smanjiti toksičnost jer će se topljiva onečišćivala akumulirati u različitim biljnim tkivima, odnosno vakuolama. Nakon toga, onečišćivala se ili obrađuju ili izlaze iz stanice egzocitozom. Onečišćivalo, odnosno fenol se može izlučiti iz lišća biljke u okolni zrak. Poboljšana fitoremedijacija fenola se može postići uporabom nekoliko postupaka kao što je odabir najprikladnije biljne vrste te korištenje transgenih biljaka s poboljšanim sposobnostima za razgradnju fenola. Provedena su istraživanja sposobnosti pročišćavanja otpadne vode pomoću mahunarke *Vicia Sativa L.* Tolerancija ove biljke na fenol ispitana je u različitim fazama rasta. Ova mahunarka je učinkovita u području fitoremedijacije jer ima učinkovit zaštitni mehanizam protiv oksidativnog oštećenja izazvanog fenolom te ga ona može ukloniti u koncentracijama do 100 mg/L [34].

Osim toga, A. Bibi i suradnici istražili su 2023. godine korištenje transgenog sustava dlakastih korijena duhana čime su prikazani osnovni geni peroksidaze iz rajčice koji služe za uklanjanje fenola. Rezultati su pokazali da su peroksidaze uključene u uklanjanju fenola i kada je on prisutan u rajčicama te kada je on prisutan u drugim biljkama, poput duhana. Prema istraživanjima navedenih autora, zaključuje se da se fitoremedijacijom fenoli mogu s učinkovitošću u rasponu od 60-99 % ukloniti u velikim količinama vode. Važna je napomena da je fitoremedijacija sporiji proces koji zahtijeva daljnju obradu otpadnih voda [34].

Prednost enzimskih sustava u metodi enzimskog uklanjanja fenola je ta što mogu ukloniti fenole i u nepovoljnim uvjetima temperature i pH vrijednosti gdje bi bakterije bile inhibirane. Peroksidaze su enzimi koji se intenzivno koriste u uklanjanju fenola zbog prisutnosti redoks aktivnih ostataka cisteina na njihovim aktivnim mjestima. Postoji nekoliko istraživanja literatura enzima peroksidaze autora A. Bibi i suradnika 2023. godine. Jedan od njih je istraživanje upotrebe peroksidaze proizvedene iz nusprodukata otpada krumpirove pulpe

kako bi se uklonili fenoli iz industrijskih otpadnih voda. Učinkovitost uklanjanja fenola je 95 % s početnom koncentracijom od 94,11 mg/L, gdje su enzimi održavali svoju pH vrijednost u rasponu od 4-8 te su bili stabilni u širokom rasponu temperatura [34].

U drugom istraživanju autora A. Bibi i suradnika peroksidaze su ekstrahirane iz biljke *Prosopis juliflora* te su ti enzimi korišteni za uklanjanje fenola s početnom koncentracijom od 40 mg/L. Utvrđeno je da su sirove peroksidaze sposobne razgraditi fenol unutar 30 min s učinkovitošću višom od 90 % za tekstilne i industrijske otpadne vode. Prema navedenom, poljoprivredni otpadni materijali se koriste kao vrlo važan izvor enzima te su oni vrlo učinkoviti pri uklanjanju fenola. Osim toga, enzimi mogu biti imobilizirani na materijalu na bazi ugljika kao što je aktivni ugljen. Prema navedenom istraživanju, lakaza je imobilizirana na nanočesticama kitozana, a oko 82 % fenola s početnom koncentracijom od 20 mg/L je razgrađeno unutar prva 4 h u usporedbi sa slobodnom lakazom koja je razgradila tek 80 % fenola za 12 h. Imobilizacija lakaze je očuvala enzimsku aktivnost u širem pH rasponu te je pokazala pomak prema višim temperaturama od 30 do 40 °C u usporedbi sa slobodnim enzimom i dosegnutom temperaturom od 30 °C. Nakon toga, imobilizirana je i peroksidaza hrena koja je kovalentnom vezom vezana na grafen oksid. Upravo time je poboljšán raspon pH vrijednosti te raspon temperature u usporedbi kada je enzim slobodan. Za imobiliziranu peroksidazu hrena učinkovitost je 100 %, a za slobodni enzim je 55 % pri početnoj koncentraciji fenola od 2500 mg/L. Prema svemu navedenom, procesi temeljeni na enzimima su razvijeni kako bi se prevladali problem toksičnosti. Utvrđeno je da ovi procesi selektivno i učinkovito tretiraju niske koncentracije fenola do 2500 mg/L s učinkovitošću uklanjanja od 55 do 100 % [34].

Mnogi mikroorganizmi u bioremedijaciji mikroorganizama mogu razgraditi organske spojeve u bezopasne proizvode. Mikroorganizmi kao što su *Pseudomonas*, *Alcaligenes* i *Acinetobacter* koriste fenole kao svoj glavni izvor ugljika te ih zauzvrat pretvaraju u ugljikov dioksid i vodu. Bakterije iz roda *Acinetobacter* i *Pseudomonas* proizvode važne enzime kao što je fenol hidroksilaza, a upravo taj enzim pomaže u razgradnji fenolnih spojeva. Vrste koje pripadaju rodu *Pseudomonas* i *Bacillus* su sposobne za razgradnju fenola meta-cijepanjem budući da navedeni organizmi imaju širok raspon kataboličkih enzima uključenih u proces razgradnje fenola. I aerobni i anaerobni mikroorganizmi imaju sposobnost razgradnje fenola. U aerobnoj razgradnji, enzimi fenol hidroksilaze kataliziraju oksidaciju fenola do katehola. Nakon toga, dolazi do cijepanja prstena između dviju hidroksilnih skupina katehola. Fenol hidroksilaze mogu biti flavoprotein monooksigenaze ili višekomponentne hidroksilaze.

Katehol se oksidira preko puta orto-cijepanja pomoću 1-2-dioksigenaze. Kao konačni produkt dobije se molekula koja može ući u ciklus trikarboksilne kiseline. U nedostatku kisika, fenol se može razgraditi karboksilacijom u para položaju te time može nastati 4-hidroksibenzoat. Ovakva vrsta karboksilacije je uključena u anaerobnu razgradnju nekoliko aromatskih kompozita. Metode koje koriste zajednice mikroorganizama za razgradnju fenola mogu izdržati koncentraciju fenola do 2000 mg/L. Prema mnogim istraživanjima je sugerirano da je primjena mikroorganizama obećavajuća budući da se na taj način može povećati tolerancija na toksična onečišćivala te povećati učinkovitost procesa razgradnje poboljšanjem sinergetskih aktivnosti različitih mikroorganizama koji luče razne enzime [34].

Korištenjem bakterijskih vrsta kao što su *Pseudomonas sp.*, *Bacillus sp.*, *Acinetobacter sp.* primijećeno je da je zajednica koja proizvodi biofilm sposobna obraditi fenolom onečišćenu otpadnu vodu. Vrlo je važan reaktor s pokretnim slojem biofilma koji se temelji na ugljiku jer se na taj način osigurava zaštićena površina na kojoj se mogu akumulirati različite skupine mikroorganizama. Osim toga, treba spomenuti i anaerobne bakterije *Cloacibacterium* i *Hydrogenphaga* koje pridonose pojačanoj denitrifikaciji. Isto tako, grabežljiva bakterija *Bdellovibrio* ima ulogu u fiksaciji dušika i pretvorbi biomase pretvaranjem složenih biopolimera u izvanstanične tvari čime se stvaraju flokule [34].

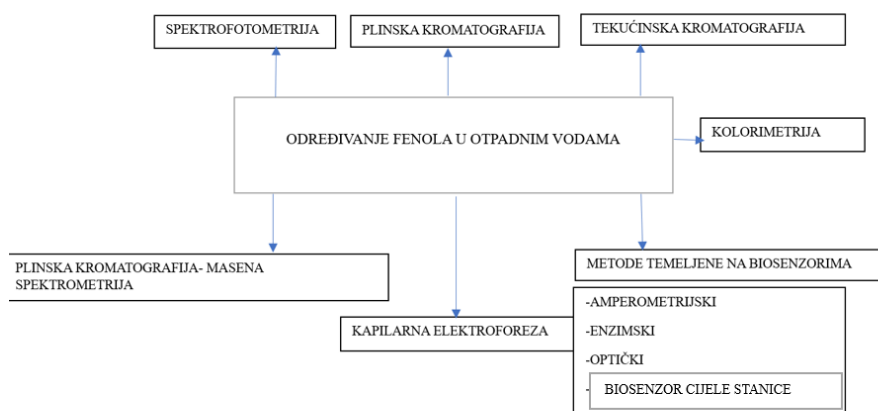
Još jedna obećavajuća metoda u području obrade fenolnih otpadnih voda je korištenje aerobnog granuliranog mulja. On može pospješiti razgradnju fenolnih spojeva i povećati toleranciju na toksičnost zbog činjenice da se te granule sastoje od vrlo gustih, fiziološki raznolikih i prostorno heterogenih zajednica mikroorganizama. Na površinu aerobnog granuliranog mulja se radi zaštite luče polisaharidi čime se smanjuju toksični učinci onečišćivala. Upravo ti polisaharidi smanjuju toksičnost fenola združivanjem čestica čvrstih tvari mulja. Osim toga, polisaharidi pomažu u biosorpciji onečišćivala pružajući učinkovite elektrostatske sile čime se osigurava proces razgradnje. A. Bibi i suradnici 2023. godine istražili su upotreba šaržnog reaktora za istovremeno uklanjanje fenola, dušika i fosfora iz otpadne vode pomoću već navedenog mulja. Reaktor je uspio razgraditi fenol s koncentracijom do 100 mg/L djelovanjem više bakterijskih vrsta. Također je provedeno istraživanje autora A. Bibi i suradnika 2023. godine gdje se aerobno granulirani mulj koristio za otpadne vode visoke čvrstoće fenola. Sposobnost mulja da razgradi fenol je bila inhibirana pri koncentracijama fenola iznad 3000 mg/L. Međutim, kada su se koristile aklimatizirane granule, postigla se učinkovita razgradnja fenola pri koncentracijama do 5000 mg/L. Biorazgradnja mikroorganizama je učinkovita za obradu otpadnih voda srednje i visoke

čvrstoće koje sadrže do 5000 mg/L fenola. U usporedbi s fitoremedijacijom i enzimskim uklanjanjem ova metoda je najučinkovitija te postiže od 88-100 % učinkovitosti uklanjanja [34].

Za uklanjanje fenola se koristi i *Candida tropicalis*. Ovaj mikroorganizam može iskoristiti fenol kao izvor ugljika za svoj rast, a mehanizam uklanjanja fenola je posljedica biorazgradnje. Osim što se njome uklanja fenol, može se značajno smanjiti dušik u amonijaku, ukupni fosfor te kemijska potrošnja kisika u otpadnoj vodi s vrlo visokom učinkovitošću uklanjanja. *Candida tropicalis* se može prilagoditi širokom temperaturnom rasponu te ima visoku toleranciju na sol [36].

3.4. ANALITIČKE METODE ODREĐIVANJA FENOLA U OTPADNIM VODAMA

Kako bi se točno odredile koncentracije fenola u otpadnoj vodi razvijene su različite analitičke metode koje nude poboljšanu osjetljivost i specifičnost te olakšavaju identifikaciju i kvantifikaciju višestrukih fenolnih spojeva istovremeno. Odabir analitičke metode ovisi o čimbenicima kao što je potrebna granica detekcije, dostupna oprema, razina stručnosti. Redovita kalibracija i mjera kontrole kvalitete su neophodne kako bi se osigurala pouzdanost podataka. Određivanje koncentracije fenola se može provesti različitim metodama kao što su kolorimetrija, plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC), plinska kromatografija-masena spektrometrija (engl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS), tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), spektrofotometrija, metode temeljene na biosenzorima poput amperometrijski, enzimski, optički i biosenzor cijele stanice te kapilarna elektroforeza (engl. *Capillary Electrophoresis*, CE). Usvojene su različite metode prekoncentriranja za određivanje fenola, odnosno ekstrakcija čvrste (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE), mikroekstrakcija tekuće faze (engl. *Liquid-Phase Microextraction*, LPME), disperzivna mikroekstrakcija tekućina-tekućina (engl. *Dispersive Liquid-Liquid microextraction*, DLLME) te emulgiranje-mikroekstrakcija uz pomoć ultrazvuka (engl. *Ultrasound-assisted Emulsification Microextraction Chemistry*, USAEME). Na slici 3.6. su prikazane navedene metode određivanja fenola u otpadnim vodama [37].



Slika 3.6. Analitičke metode određivanja fenola u otpadnim vodama

3.4.1. Spektrofotometrija

Spektrofotometrija uključuje mjerenje apsorpcije svjetlosti od strane molekula fenola u ultraljubičastom (engl. *Ultraviolet*, UV) ili vidljivom području (engl. *Visible*, VIS). Odabire se određena valna duljina pri kojoj fenol ima karakterističnu apsorbciju. Ova metoda omogućuje kvantitativno mjerenje svojstava refleksije i transmisije materijala, otopina ili prozirnih čvrstih izvora svjetlosti putem njihovog intenziteta. Spektrofotometar direktno detektira spektre apsorbirane svjetlosti. Osim toga, može detektirati fotone svjetlosti apsorbirane u uzorku otopine. Ovime se mogu prepoznati promjene u refleksiji i transmisiji putem različitih valnih duljina svjetlosti. Spektrofotometrija se počela primjenjivati u biološkom istraživanju od 1941. godine, a posebno je istaknuta u istraživanjima proteina od 1990-ih. Prilikom analize putem spektrofotometrije čija je analiza prikazana na slici 3.7., koristi se monokromatski izvor svjetla koji emitira usmjeren snop svjetlosti. Svjetlosni snop prolazi kroz otvor prije nego što dosegne kivetu ili uzorak. Nakon prolaska kroz uzorak, svjetlosni snop doseže fotodetektor koji mjeri intenzitet svjetla. Ta vrijednost se potom pretvara u digitalni oblik koji je lako čitljiv i interpretiran. Prednost ove metode je ta da omogućuje kvantitativno mjerenje apsorpcije svjetlosti te da različite vrste spektrofotometara omogućuju analizu različitih dijelova elektromagnetskog spektra. Nedostaci spektrofotometrije su ti da ovisno o konfiguraciji i tipu spektrofotometra, može biti ograničena na određeni dio elektromagnetskog spektra te da osjetljivost ovisi o valnim duljinama svjetla i konkretnim svojstvima uzorka. Osim toga, potrebna je pažljiva priprema uzorka kako bi se postigli precizni rezultati. Ovisno o vrsti analize, moguće su interakcije između svjetla i uzorka koje mogu utjecati na rezultate [37].

I. Lavilla i suradnici 2012. godine proveli su istraživanje fenola u otpadnoj vodi pomoću spektrofotometriju [38]. U radu je razvijena nova metoda koja se temelji na kombinaciji DLLME s mikrovolumenskom spektrofotometrijom kao standardnom metodom za određivanje fenola u vodi i otpadnoj vodi. Metoda se oslanja na oksidativno spajanje fenola s 4-aminoantipirinom (4-AAP). Kako bi se prekoncentrirala nastala boja, klasična ekstrakcija tekućina-tekućina koja se koristila u standardnoj metodi (koja uključuje 500 mL uzorka i 50 mL triklormetana) zamijenjena je s mikroekstrakcijom tekućina-tekućina (s 5 mL uzorka, 50 μ L triklormetana i 200 μ L acetonitrila). Nakon optimizacije, metoda je dala granice detekcije 0,8 μ g/L. i kvantifikacije, 2,5 μ g/L. Rezultati su bili uspoređeni s onima dobivenim

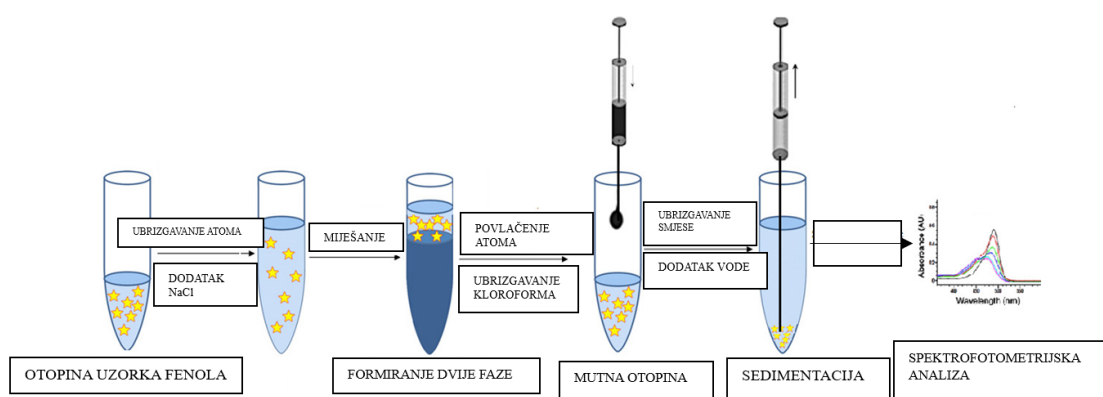
standardnom metodom. Ponovljivost, izražena kao relativna standardna devijacija, bila je 5,2 %, a faktor obogaćivanja (engl. *Enrichment Factor*, EF) bio je 700. Predložena metoda primijenjena je na određivanje fenola u različitim uzorcima vode i otpadne vode s povratom u rasponu od 90–99 %. Osim toga, može se istaknuti odsutnost postojeće bioakumulativne i otrovne kemikalije te korozivnih reagensa što uzrokuje drastično smanjenje proizvedenog otpada. Kombiniranjem DLLME s mikrovolumenskom UV-VIS spektrofotometrijom za određivanje fenola je postignuta više ekološka alternativa u odnosu na standardnu metodu. Osim toga, došlo je do minimalne potrošnje uzorka i reagensa za ekstrakciju. Prema rezultatima, dobiva se granica detekcije od 0,8 µg/L i faktor obogaćenja od 700 [38].

Kako bi se uštedjelo vrijeme i troškovi, fenoli se obično prate kao ukupni sadržaj umjesto pojedinačnih vrsta. Ova se metoda temelji na oksidativnom spajanju fenola s 4-aminoantipirinom (4-AAP) u prisutnosti oksidansa kako bi nastala antipirinska boja, čija se absorbancija mjeri. Za povećanje osjetljivosti, ova tvar se ekstrahira iz vodene otopine triklormetanom. Ova metoda je korisna za određivanje fenola, odnosno *orto*- i *meta*-supstituiranih fenola. Oni fenoli kod kojih je supstitucija nitro, nitrozobenzoilna, alkilna, arilna ili aldehidna skupina ne reagiraju s 4-AAP. Glavni nedostatak standardne metode sa stajališta zelene analitičke kemije je korištenje velikih količina reagensa osobito opasnog otapala kao što je triklormetan. Kako bi se smanjilo ili eliminiralo to otapalo, razvijeno je nekoliko strategija, prekoncentracija produkta reakcije ekstrakcijom adsorbensa koja uključuje C18-modificiranu mikrokolonu silicija, kombinirana primjena spektrofotometrije čvrste faze s anionskom izmjenjivačkom smolom ili uklanjanjem koraka ekstrakcije korištenjem sustava s mikropumpom. U usporedbi sa standardnom metodom, ovi su postupci ekološki prihvatljiviji i osjetljiviji, ali ih nije lako prilagoditi za rutinsku analizu. Priprema uzorka, posebno putem LPME predstavlja jednostavnu alternativu koja omogućuje uštedu otapala i uzoraka uz minimalno stvaranje otpada. Klasična ekstrakcija tekućina-tekućina (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) može se izravno izvesti pomoću takozvane metode disperzivne mikroekstrakcije tekućina-tekućina. U DLLME, odgovarajuća mješavina otapala za ekstrakciju (visoke gustoće) i otapala za raspršivanje ubrizgava se u vodeni uzorak stvarajući mutnu otopinu koja omogućuje bliski kontakt između vodene i organske faze. DLLME je nedavno primijenjen za određivanje pojedinačnih fenola u kombinaciji s različitim metodama odvajanja kao što je HPLC, GC i CE. U mikroekstrakciji tekućina-tekućina je nužna primjena detektora mikrouzoraka kako bi se izbjeglo razrjeđivanje uzorka. Varijable koje utječu na DLLME optimizirane su za maksimalnu učinkovitost ekstrakcije

fenola. Predložena metoda primijenjena je na određivanje fenola u različitim uzorcima vode i otpadnih voda [38].

Osim ovog istraživanja, R. Tabaraki i suradnici 2019. godine spektrofotometrijski su određivali fenole i klorfenole uklanjanjem soli [39]. U ovom istraživanju, ekstrakcija tekućina-tekućina sa uklanjanjem soli u kombinaciji s DLLME razvijena je kao nova ekstrakcijska metoda za ekstrakciju i prekoncentraciju fenola i klorfenola u uzorcima vode iz okoliša. Analiti su derivatizirani s 4-aminoantipirinom i određeni spektrofotometrijski. Optimizirani su eksperimentalni parametri kao što su vrsta i volumen organskog otapala, vrsta i količina soli, pH vrijednost i vrijeme vrtloženja. Pod optimalnim uvjetima, kalibracijske krivulje bile su linearne u rasponu od 1–300 µg/L, a granica detekcije bila je u rasponu od 0,15–0,22 µg/L. Iskorištenje ekstrakcije i faktori obogaćivanja bili su u rasponu od 94,80 % do 106,1 % odnosno 78,12 % do 82,53 %. Ponovljivost metode na temelju pet ponavljanja mjerenja fenola bila je u rasponu od 4,8-7,2 %. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem pokazali su da je predložena metoda jednostavna, brza i ekološki prihvatljiva s visokom ekstrakcijskom učinkovitošću za prekoncentraciju i određivanje fenola i klorfenola u stvarnim uzorcima. Predložena metoda je također uspoređena s referentnom metodom. Derivatizacija fenola s 4-aminoantipirinom (4-AAP) za spektrofotometrijsko određivanje još uvijek se često koristi zbog svoje brzine i isplativosti. Fenoli reagiraju s 4-AAP u prisutnosti oksidansa i formiraju antipirinsku boju. Kako bi se postigla veća selektivnost i osjetljivost, ovaj se kompleks ekstrahira iz vodene otopine u kloroform. Standardna metoda za određivanje fenola zahtijeva veliki volumen kloroforma što je glavni nedostatak ove metode u odnosu na zelenu analitičku kemiju. Nedavno su se istraživanja usredotočila na minijaturizaciju metode ekstrakcije tekućina-tekućina kako bi se smanjilo korištenje organskog otapala u pripremi uzorka. Stoga su predložene neke metode mikroekstrakcije kao što je mikroekstrakcija čvrste faze i mikroekstrakcija tekuće faze za obogaćivanje fenola i klorfenola. Kasnije je DLLME metoda predstavljena kao novu metodu mikroekstrakcije tekuće faze. Ova metoda koristi trostruki sustav otapala, u kojem se otopina ekstrakcijskog otapala u disperziranom otapalu brzo ubrizgava u vodeni uzorak koji sadrži analit. Otapalo za raspršivanje može se miješati i u vodenoj i u organskoj fazi. Otapalo za ekstrakciju ne smije se miješati s vodom i treba stvarati sitne fine kapljice u njoj. Kombinacija DLLME i SPE je način da se poveća faktor obogaćivanja DLLME. Upotrebom SPE, analiti se prethodno koncentriraju iz velikog volumena matrice uzorka u mali volumen organskog otapala, koje može djelovati kao otapalo za raspršivanje u DLLME. Međutim, SPE postupak zahtijeva

kondicioniranje kolone, eluiranje uzorka i isparavanje otapala, jer je radno intenzivan, zahtijeva vrijeme i otapalo. Cilj ovog istraživanja već navedenih autora bio je razviti novu ekstrakcijsku metodu koja se temelji na kombinaciji ekstrakcija tekućina-tekućina s uklanjanjem soli, kao jednostavne i ekološki prihvatljive metode, i DLLME za prekoncentraciju fenola i klorfenola. Koliko je poznato, po prvi put se ova kombinacija primjenjuje za spektrofotometrijsko određivanje fenola i klorfenola u uzorcima otpadne vode [39].



Slika 3.7. Spektrofotometrijska metoda

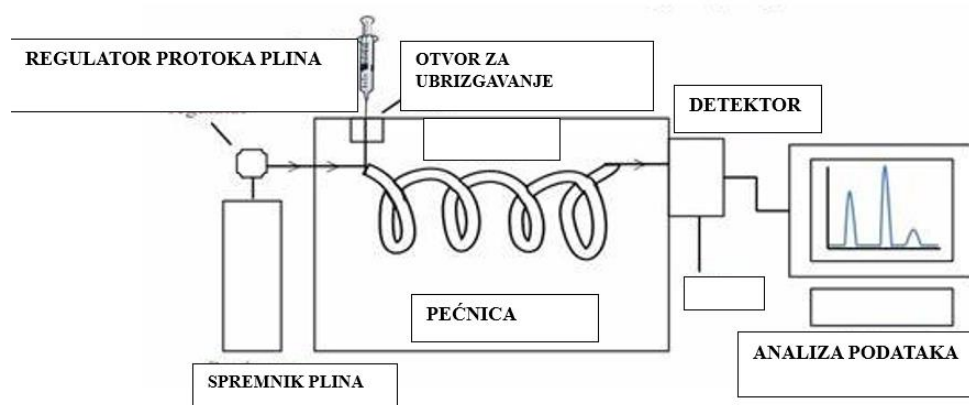
3.4.2. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je široko korištena metoda za analizu hlapljivih i poluhlapljivih spojeva kao što su fenol i njegovi derivati te je na slici 3.8. prikazan ovaj način analize. Nakon ekstrakcije i derivatizacije, fenoli se odvajaju na temelju njihove raspodjele između tekuće stacionarne faze i plinovite pokretne faze. Uzorak se ubrizgava u grijanu kromatografsku kolonu gdje dolazi do interakcije sa stacionarnom fazom. Postoje dvije glavne vrste koje se koriste za određivanje fenola, a to su plinsko-tekućinska kromatografija i plinsko-čvrsta kromatografija. Plinsko-tekućinska kromatografija koristi tekuću stacionarnu fazu obloženu čvrstom podlogom, dok plinsko-čvrsta koristi čvrstu stacionarnu fazu koja je u izravnom kontaktu s analitima. Postoje različiti reagensi za derivatizaciju, a to su

pentafluorobenzoil bromid, anhidrid octene kiseline, diazometan. Međutim, reagensi kao što je pentafluorobenzoil klorid su poželjni jer uvode elektronegativne supstituente u molekulu. Derivatizacija anhidridom octene kiseline je jednostavna, dok dinitrofenoli stvaraju probleme. Prema istraživanjima D. Puig i suradnika iz 1996. godine preporučena je derivatizacija u metilirane fenole umjesto u derivate pentafluorobenzoil etera [40]. Međutim, ova metoda zahtijeva korištenje diazometana koji ima potencijalne opasnosti jer je kancerogen i eksplozivan. Prilikom određivanja se mogu razni detektori spojiti s plinskom kromatografijom kako bi se točno kvantificirali fenoli. Detektor plamene ionizacije se često koristi zbog svoje visoke osjetljivosti i kompatibilnosti sa širokim rasponom spojeva. Međutim, daleko najprikladniji uređaj za određivanje fenola je masena spektrometrija jer daje i kvantitativne i kvalitativne informacije. Za točnu kvantifikaciju se priprema kalibracijska krivulja korištenjem standardnih otopina poznatih koncentracija fenola. Za izradu kalibracijske krivulje se koristi vrijeme zadržavanja i površina vrhova. Koncentracija fenola u uzorku se određuje usporedbom njegove površine vrha s kalibracijskom krivuljom. Ova metoda je široko korištena pri određivanju fenola u različitim uzorcima. Njezina sposobnost da pruža točne i pouzdane rezultate, fleksibilnost analize širokog raspona hlapljivih i poluhlapljivih spojeva ju čini dobrom metodom za analiziranje fenola [40].

U kontekstu svojstava fenola i endokrinih poremećaja te analize farmaceutskih proizvoda koji utječu na okoliš, istraživanje H. K. Lee i suradnika iz 2005. godine naglašava važnost analize ovih tvari.[41]. Iako postoje različite metode za identifikaciju i kvantifikaciju, mnoge od njih su vremenski zahtjevne. Plinska kromatografija omogućuje istovremeno analiziranje više parametara. U spomenutom istraživanju fenoli su bili eluirani iz uzorka zajedno s kiselinama, čime se postigla selektivna analiza. Ovaj pristup je posebno koristan za mješavine otpadnih voda. Nadalje, uzorci se mogu derivatizirati kako bi se postigla selektivna i osjetljiva analiza. Prednost ove metode je ta da omogućava odvajanje i analizu kako organskih tako i anorganskih materijala, čineći je veoma univerzalnom metodom. Osim toga, ona pruža visoko precizne i točne rezultate, što je ključno za pouzdane analize. Plinska kromatografija je ekonomična metoda analize, što je pogodno za laboratorijske postupke s ograničenim proračunom. U odnosu na druge analitičke metode, plinska kromatografija se ističe visokom razlučivošću, omogućavajući precizno razdvajanje komponenata u složenim smjesama. Nedostatak ove metode je taj da je toplinska stabilnost uzorka od suštinskog značaja jer se uzorci koji nisu stabilni na visokim temperaturama mogu razgraditi tijekom analize. Osim toga, pravilno ubrizgavanje plinovitog uzorka zahtijeva pažnju i vještine kako bi se osigurala

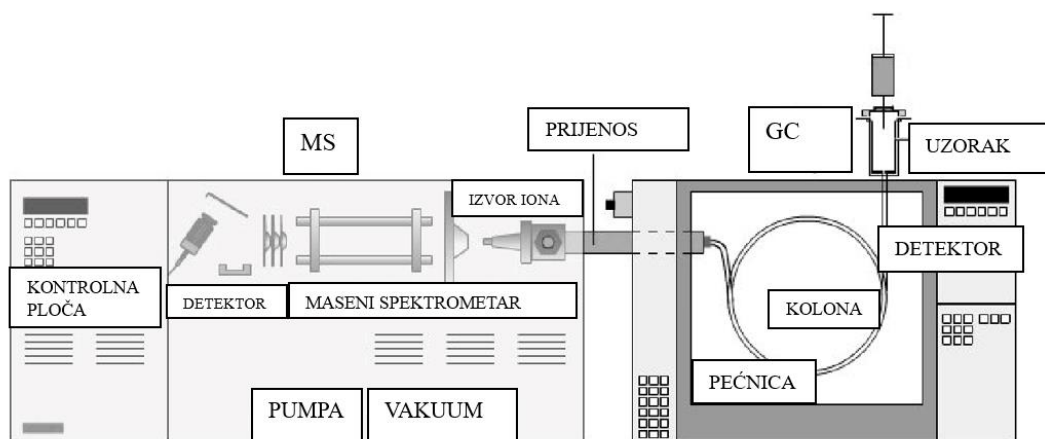
ispravna analitička procedura. Analiza značajne količine uzorka može biti komplicirana i zahtijeva posebne pristupe i prilagodbe postupka [41].



Slika 3.8. Princip rada plinske kromatografije

Plinska kromatografija može biti u kombinaciji s masenom spektrometrijom (GC-MS). Ova metoda je razvijena i korištena sredinom 1950-ih. Znanstvenici R. S. Gohlke i F. W. McLafferty razvili su GC-MS metodu koja je prikazana na slici 3.9. [42]. Kad je metoda bila razvijena, bilo je potrebno previše vremena za analizu, ali nakon 1996. godine za analizu je bilo potrebno samo 90 s. Metoda uključuje otkrivanje efluenta mnogih spojeva. Plinska kromatografija pomaže u odvajanju tvari, ali ne daje nikakvu informacije o izoliranim spojevima dok masena spektrometrija može pružiti pojedinosti o spojevima. Osnova za plinsku kromatografiju je rezolucija koja uključuje odvajanje komponenata. S druge strane, masena spektrometrija zahtijeva masovnu rezoluciju, tj. analizira i odvaja prema omjeru mase i naboja. Ova GC-MS metoda sastoji se od dva značajna koraka. U plinskoj kromatografiji, odvajanje spojeva u čistom obliku s obzirom na hlapljivost. U drugom koraku, odvojeni spojevi izlaze kroz kolonu i idu prema detektoru kako bi se dobio detalj mase i naboja. Predviđen je ulaz kolone za uvođenje uzorka. Za isparavanje, prisutna je grijana komora. GC-MS preferira analizu hlapljivih spojeva umjesto razmatranja nehlapljivih i visoko molekularnih spojeva. Pomoću toga su odvojeni fenolni sastojci. Ovo je uglavnom analizirano na fenole za ukapljivanje ugljena. Prednost ove metode je ta da jednostavno odvaja visoko koncentrirane uzorke. Osim toga, uključuje kemijsku ionizaciju i elektronsku

udarnu ionizaciju te je pogodna za direktnu analizu plinovitih uzoraka. Nedostatak metode je moguća potreba za derivatizacijom uzorka. Osim toga, metoda se temelji na praćenju odabranih iona te može naići na izazove u analizi atmosferskih plinova. Ova metoda procjenjuje ekstrakte, uključujući one koji nisu biorazgradivi (plastične tvari) [42].



Slika 3.9. Princip rada plinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom (GC-MS)

3.4.3. Tekućinska kromatografija

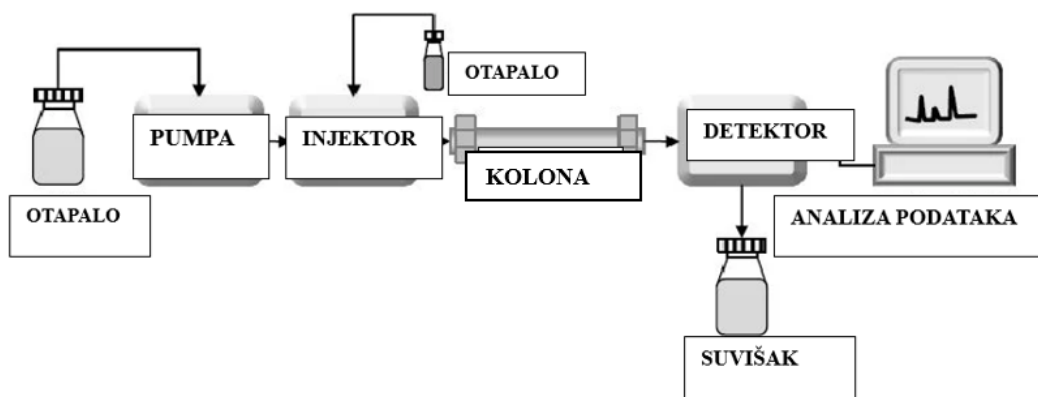
Tekućinska kromatografija je analitička metoda koja nudi izvrsnu mogućnost odvajanja, visoku osjetljivost i mogućnosti analize širokog raspona fenolnih spojeva. Uključuje odvajanje fenola na temelju njihovog različitog afiniteta za stacionarnu (čvrsta ili tekuća faza) ili mobilnu fazu (tekuća faza). Uzorak se stavlja u kromatografsku kolonu gdje dolazi u interakciju sa stacionarnom fazom. Spojevi s različitim afinitetima za stacionarnu fazu se zadržavaju i kreću različitim brzinama što dovodi do njihovog odvajanja [40].

Postoji nekoliko vrsta tekućinske kromatografije, a među njima se ističe tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) koja je prikazana na slici 3.10. Ova metoda je popularna zbog svoje visoke razlučivosti i mogućnosti obrade složenih uzoraka. Osim nje, ističe se tekućinska kromatografija ultra visoke učinkovitosti (engl. *Ultra-High-Performance Liquid Chromatography*, UHPLC) koja je naprednija zbog kraćeg vremena analize i veće

učinkovitosti. Nju karakterizira visoka razlučivost, brzina analize, pouzdanost te dostupnost širokog spektra UHPLC instrumenta. Spajanje UHPLC s masenom spektrometrijom donosi dodatne prednosti u pogledu selektivnosti i osjetljivosti [43].

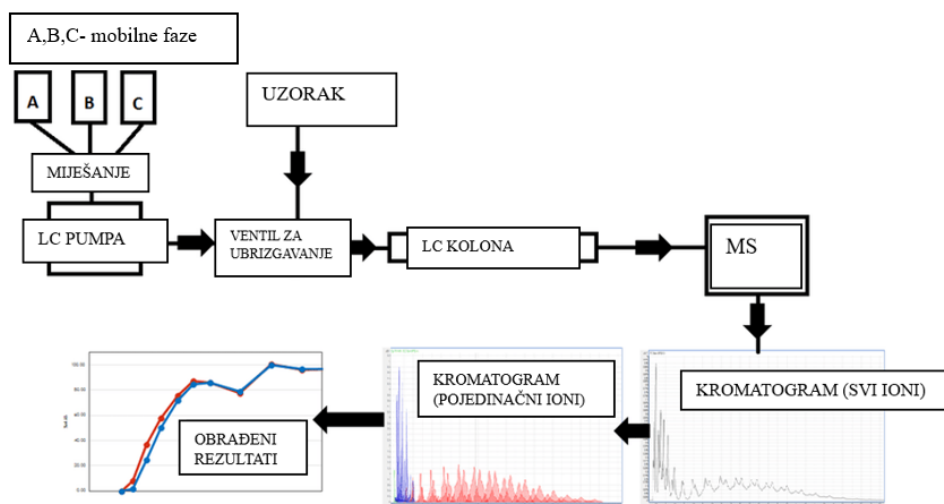
Među metodama detekcije ističe se UV-VIS koja se koristi zbog svoje široke dostupnosti i osjetljivosti na aromatske spojeve poput fenola. UV detektori su detektori gdje se detekcija provodi na 280 nm, osim za nitrofenole i pentaklorfenole koji pokazuje najbolji signal na 310 nm. Do smanjenja granica detekcije dolazi korištenjem elektrokromatografske detekcije. Visoka osjetljivost elektrokromatografske detekcije omogućuje smanjenje volumena uzorka. Prema tome, smanjenjem volumena s 50 na 10 mL je bilo moguće otkriti fenol. Unatoč svim prednostima ove metode, njen nedostatak proizlazi iz zahtijeva za čišćenjem elektrokemijske ćelije. Kasnije su se razvili pulsni amperometrijski detektori koji imaju poboljšanu stabilnost signala, no bez obzira na to i u ovom slučaju se radna elektroda mora čistiti. Prema tome, elektrokromatografsko određivanje je dobra alternativa za praćenje relativno čistih uzoraka. No, uvedeni su i kulometrijski detektori polja. Za razliku od uobičajenih elektrokemijskih detektora, ovi detektori pretvaraju 100 % analita zbog oksidacije fenola koja se događa u elektrodi visoke poroznosti. Zbog visoke cijene ovih uređaja, smanjena je njihova primjena [40].

U svom radu M. Mattonai i suradnici 2019. godine analizirali su fenole iz maslinovog ulja koristeći HPLC metodu. Otpadne vode pri proizvodnji masline važni su nusprodukti proizvodnje maslinova ulja. Široka dostupnost i nevjerojatni ekonomski troškovi odlaganja otpadnih voda pri proizvodnji maslina potaknuli su interes za njihovu moguću eksploataciju kao održivog izvora polifenola. Stoga je potreban razvoj i optimizacija poboljšanih analitičkih metoda za detaljnu karakterizaciju molekularnih profila polifenola nakon proizvodnje i tijekom uvjeta skladištenja. Maslina na stacionarnoj fazi s ugrađenom polarnom skupinom predložena je kao alternativa konvencionalnim C18 kolonama. Postupak je korišten za kvantitativno određivanje 11 polifenola, koristeći detekciju niza dioda i postizanje kvantitativnih granica jednakih ili nižih od 0,1 $\mu\text{g/g}$. Ista kromatografska postavka, u kombinaciji s masenom spektrometrijom visoke rezolucije omogućila je identificiranje hidroksitirozil estera enolne kiseline, čija se relativna zastupljenost predlaže za praćenje starenja otpadne vode pri proizvodnji maslina tijekom skladištenja [44].



Slika 3.10. Princip rada tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija kombinirana s masenom spektrometrijom (LC-MS) kombinira snagu razdvajanja tekućinske kromatografije s mogućnostima spektrometrije masa te je prikazana na slici 3.11. Zbog svoje specifičnosti i osjetljivosti ova metoda je prikladna za analizu u tragovima. Trenutno su dostupna različita sučelja za LC-MS pokuse. Sučelje termospreja daje dobar odgovor za većinu fenola. Izuzetci su 4-metilfenol i 2,4-dimetilfenol jer ih puferi ne mogu deprotonirati čak i kada je visoka koncentracija pufera. Sučelje snopa čestica služi za analizu pentaklorfenola, ali njegova upotreba u području okoliša je spriječena jer daje manju osjetljivost u usporedbi s drugim uređajima. Sučelje s atmosferskim tlakom rezultira boljom osjetljivošću te je jako jednostavan za korištenje. U ovom sučelju dolazi do podizanja napona konusa što dovodi do smanjenja osjetljivosti pa treba pažljivo optimizirati ovaj parametar. U budućnosti će se najviše koristiti sučelja s atmosferskim tlakom zbog visoke osjetljivosti te obilja strukturnih informacija koje pružaju. Glavni problem sučelja s atmosferskim tlakom je potreba za čišćenjem uzorka. Ova metoda nudi visoku učinkovitost odvajanja, no zahtijeva dulje vrijeme analize u usporedbi s drugim metodama poput plinske kromatografije [40].



Slika 3.11. Princip rada tekućinske kromatografije u kombinaciji s masenom spektrometrijom (LC-MS)

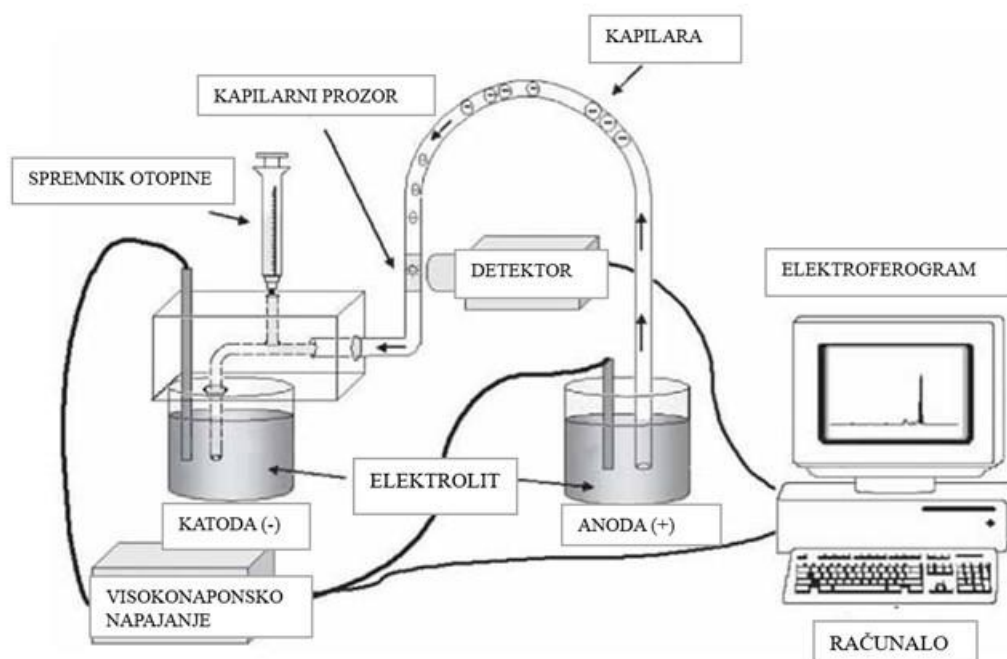
3.4.4. Kapilarna elektroforeza

Kapilarna elektroforeza se oslanja na diferencijalno kretanje nabijenih vrsta u električnom polju kroz usku kapilarnu cijev što omogućuje učinkovito odvajanje i kvantifikaciju fenolnih spojeva. Ova metoda prikazana na slici 3.12. iskorištava razlike u elektroforetskoj pokretljivosti nabijenih analita u kapilari ispunjenoj elektrolitom kada je podvrgnuta električnom polju. Kapilara je načinjena od silicijevog dioksida s unutarnjim promjerom od 25 do 100 μm . Mali promjer osigurava visoku učinkovitost i omogućuje učinkovito odvajanje fenolnih spojeva. Duljina kapilare može varirati ovisno o složenosti uzorka i potrebnoj rezoluciji. Fenolni spojevi, uključujući različite derivate nose specifične naboje zbog prisutnosti funkcionalnih skupina. Oni se odvajaju na temelju omjera naboja i mase tijekom njihove kretnje kroz kapilaru. Kapilarna elektroforeza se primjenjuje jer je brza, ima veliku rezoluciju te je prikladna za analizu polarnih, nepolarnih i ionskih spojeva. Osim toga, nudi mogućnost obogaćivanja kapilara koristeći izotahoforezu te pokazuje kompatibilnost s masenom spektrometrijom. Glavni nedostatak ove metode je malo opterećenje kapaciteta koji je u rasponu od nekoliko nanolitara. Pri odvajanju fenola koristi se kapilarna zonska elektroforeza. Ova metoda je primijenjena na bazičnom pH pomoću natrijevog borata kao elektrolita. Uspoređujući ovu metodu s tekućinskom kromatografijom zaključeno je da se

bolji kromatografski profili mogu dobiti pomoću kapilarne zonske elektroforeze. U slučaju kapilarne zonske elektroforeze pH vrijednost je ograničena jer može potaknuti hidrolizu nekih analita kao što je nitrofenol ili može doći do polimerizacije katehola. Osim ove metode, postoje i druge izvedbe kapilarne elektroforeze, a to su micelarna elektrokinetička kromatografija i kapilarno izoelektrično fokusiranje. Kapilarna zonska elektroforeza se koristi za odvajanje, dok micelarna elektrokinetička kromatografija uključuje micidele za poboljšanje odvajanja neutralnih spojeva, uključujući neionske fenole. Za određivanje fenola se koriste različite metode detekcije. UV-VIS se najčešće koristi zbog jednostavnosti. Druge metode detekcije su laserski inducirana fluorescencija i masena spektrometrija koje mogu pružiti veću osjetljivost i selektivnost za analizu razine tragova i identifikaciju specifičnih fenolnih spojeva. Ova metoda nudi nekoliko prednosti za određivanje fenola, uključujući visoku učinkovitost odvajanja, nisku potrošnju uzoraka i reagensa te kratko vrijeme analize. Zahtijeva minimalnu upotrebu organskog otapala, što je ekološki vrlo prihvatljiva metoda [40].

U svom radu H. Turkia i suradnici istražili su 2013. godine kapilarnu elektroforezu za praćenje fenolnih spojeva u bioprocesima [45]. Hidrolizati lignocelulozne biomase, koji se koriste kao supstrati za održivu proizvodnju goriva i kemikalija, često sadrže velike količine fenolnih spojeva koji inhibiraju proizvodnju skupina mikroorganizama. Kvantifikacija ovih inhibitora može pomoći u razumijevanju mogućih poteškoća u bioprodukciji i daljnjem razvoju učinkovitijih, robusnijih i tolerantnijih procesa. Razvijena je metoda odvajanja koja se temelji na kapilarnoj elektroforezi s UV detekcijom za istovremenu kvantifikaciju 10 fenolnih spojeva koji mogu imati svojstva inhibitora. Tijekom jednog dana relativne standardne devijacije bile su manje od 0,7 % za vrijeme migracije i između 2,6 % i 6,4 % za vršna područja. Tijekom različitih dana relativne standardne devijacije bile su manje od 3,0 % za vrijeme migracije i između 5,0 % i 7,2 % za vršna područja. *Saccharomyces cerevisiae* je tijekom uzgoja uspjela smanjiti koncentracije vanilina, koniferil aldehida, siringaldehida i cimetine kiseline, dok su se koncentracije fenola povećale. Korištenje lignoceluloznih materijala kao obnovljivog izvora za proizvodnju goriva i kemikalija povećalo se tijekom posljednjih godina. Lignoceluloza je prirodan, obilan i jeftin materijal koji se sastoji od tri glavne komponente: celuloze, hemiceluloze i lignina. Inhibitori koji potječu iz lignoceluloznog materijala mogu se općenito podijeliti u tri skupine: alifatske kiseline, derivati furana i fenolni spojevi. Analiza inhibitora može pružiti dodatne informacije

za optimizaciju bioprocasa. Mehanizmi inhibicije fenolnih spojeva su proučavani, ali još uvijek nisu u potpunosti shvaćeni. Utvrđeno je da su prinosi biomase, stope rasta i produktivnost etanola smanjeni. Fenolni spojevi također mogu djelovati na stanične membrane. Za proučavanje učinaka fenolnih spojeva u uzgoju mogu se koristiti hidrolizati dobiveni iz lignoceluloznih materijala ili sintetskih medija u kojima su svi potrebni spojevi umjetno dodani mediju za uzgoj. Primjenom sintetskih inhibitora lakše je regulirati pojedinačna stanja inhibitora i proučavati njihov učinak na organizam i na cjelokupni bioprocen [45].

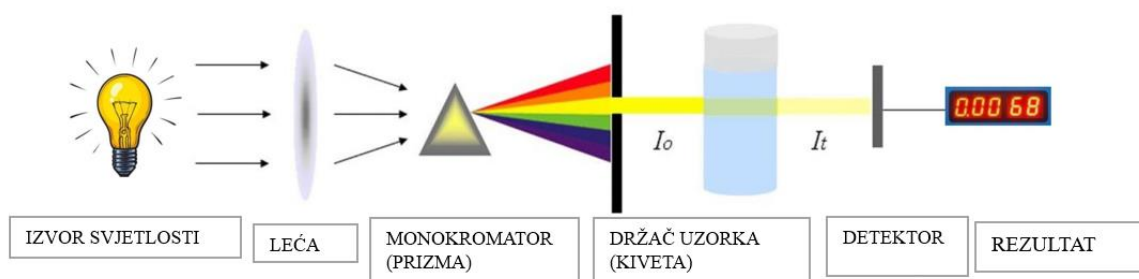


Slika 3.12. Princip rada kapilarne elektroforeze

3.4.5. Kolorimetrija

Osnovni princip kolorimetrije leži u mjerenju intenziteta boje putem usporedbe s poznatom standardnom bojom. Ova metoda prikazana na slici 3.13. dizajnirana je za kvantitativno mjerenje koncentracije tvari putem analize njenog bojnog intenziteta. Kada svjetlost prolazi kroz materijal, ona može biti apsorbirana, reflektirana, lomljena i prenošena kroz materijal, čiji se intenzitet može izmjeriti. Kolorimetar se sastoji od tri glavna dijela: izvor svjetlosti, uzorak koji se analizira i detektor. Svjetlosni snop prolazi kroz standardnu boju, zatim kroz uzorak, a koncentracija uzorka se procjenjuje na temelju apsorpcije i transmisije svjetla.

Apsorbirana svjetlost se detektira pomoću detektora, koji generira rezultat. Ovi rezultati se prikazuju na grafičkom prikazu, a usporedba s poznatim vrijednostima pomaže u određivanju koncentracije nepoznatog uzorka. Postoje dva osnovna zakona kolorimetrije, a to su Beerov zakon i Lambertov zakon. Beerov zakon govori o smanjenju intenziteta monokromatskog svjetla kako svjetlosni snop prolazi kroz otopinu s rastućom koncentracijom. Lambertov zakon se bavi vezom između debljine apsorbirajuće otopine i intenziteta monokromatskog svjetla koje prolazi kroz prozirni medij. Zakon također ističe da intenzitet monokromatskog svjetla opada s povećanjem debljine apsorbirajućeg medija. Primjer primjene ove metode uključuje istraživanje R. S. Alkasira i suradnika 2012. godine koji su koristili kolorimetrijski biološki test za detekciju fenola i njegovih derivata na papiru [46]. Kolorimetrija ima niz prednosti, uključujući brzo i precizno mjerenje, sposobnost pružanja rezultata u širokom rasponu intenziteta, analizu pojedinačnih kemijskih vrsta, mogućnost kontrole protiv nekemijskih faktora te relativno nisku cijenu. Međutim, također ima i određene nedostatke, kao što su ograničenje na razmjerno razrijeđene otopine za apsorpciju, potreba za održavanjem konstantne boje otopine radi preciznih rezultata, osjetljivost na nečistoće u otopini, potreba za stabilnom električnom energijom i mogućnost greške u rezultatima zbog međudjelovanja s drugim supstancama s istom bojom [46].



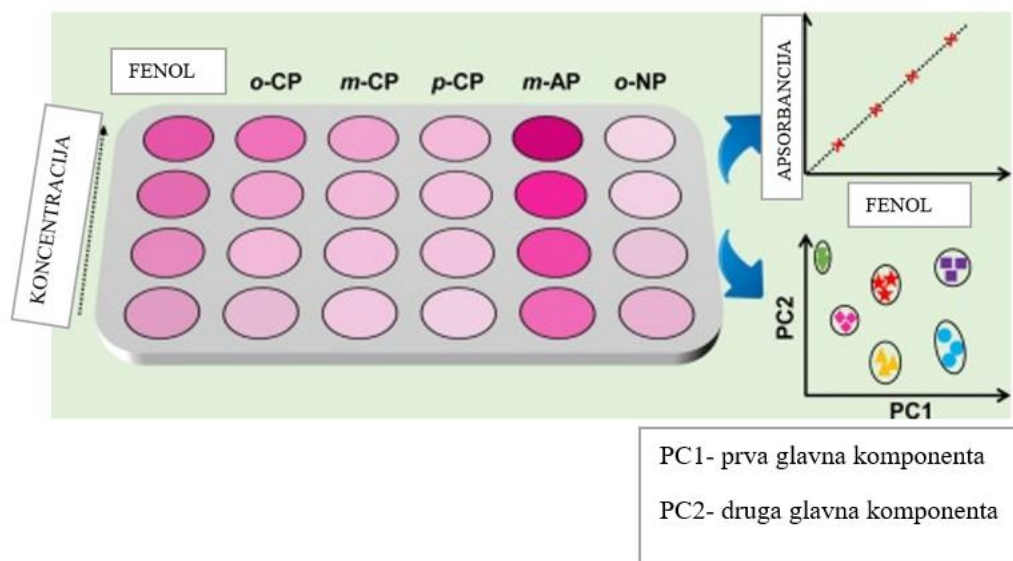
Slika 3.13. Princip rada kolorimetrije

U svom radu S. Boher i suradnici 2023. godine istražili su određivanje fenolnih spojeva kolorimetrijom [47]. Kolorimetrijske metode su klasične metode koje su široko primijenjene za detekciju različitih analita. Ova metoda je jeftina, jednostavna za izvođenje te praktično

primjenjiva za određivanje uzoraka, jer se promjene boje mogu vizualno primijetiti čak i pri niskim koncentracijama ciljane analize. Stoga se različite metode koriste za određivanje i kvantifikaciju pesticida i fenolnih spojeva, poput bisfenola A. Navedeni istraživači su primijetili prisutnost organskih kloridnih pesticida u majčinom mlijeku i masnom tkivu, a ti spojevi mogu imati estrogenske i antiestrogenske aktivnosti koje su povezane s rizikom od karcinoma dojke. Ista svojstva endokrinih poremećaja zajednička su za oba analita. Bisfenol A (fenolni spoj) se često koristi u proizvodnji monomera i plastike. Upotrebljava se za proizvodnju polikarbonatne plastike, premaze limenki hrane, boce za bebe, posude za mlijeko. Metode identifikacije pesticida i fenolnih spojeva ponekad su spore i zahtijevaju visoko kvalificiranu radnu snagu kako bi se koristili sofisticirani instrumenti koji su često skupi ili preveliki za upotrebu izvan specijaliziranih laboratorija. Ovo istraživanje fokusira se na diskriminirajuću i ekonomičnu kolorimetrijsku metodu detekcije pesticida i fenolnih spojeva kao što je bisfenol A pomoću različitih nanokompozita. Temeljem dosadašnjih istraživanja, primjena kolorimetrije s nanokompozitima omogućava nisku granicu detekcije i dobru ponovljivost za identifikaciju pesticida i fenolnih spojeva u raznim uzorcima, uključujući uzorke hrane [47].

Osim ovog istraživanja, u svom radu S. Wu i suradnici 2020. godine istražili su kolorimetrijsku kvantifikaciju i diskriminaciju fenolnih onečišćivala na bazi nanočestica Fe_3O_4 sličnih peroksidazi. Navedeni autori predlažu jednostavan senzorski niz visokih performansi za kolorimetrijsku kvantifikaciju i diskriminaciju fenolnih onečišćivala korištenjem nanočestica Fe_3O_4 . Ove nanočestice pokazuju povoljnu katalitičku aktivnost za poticanje reakcije 4-aminoantipirina i fenolnih vrsta. Kao rezultat toga, pristup je omogućio linearni odgovor za fenol u rasponu koncentracija od 0,00000167 mol/L do 0,0012 mol/L nudeći granicu detekcije do 0,0000079 mol/L. Integracijom kolorimetrijskog niza s analizom glavnih komponenti, uobičajeni fenolni spojevi, uključujući fenol, *o*-klorfenol (*o*-CP), *m*-klorfenol (*m*-CP), *p*-klorfenol (*p*-CP), *m*-aminofenol (*m*-AP) i *o*-nitrofenol (*o*-NP), dobro su razlikovani čak i pri vrlo niskim koncentracijama što je prikazano na slici 3.14. Ovi rezultati upućuju na to da je navedeni niz senzora učinkovit alat za brzo otkrivanje i razlikovanje fenolnih onečišćivala u matricama okoliša i hrane. Kolorimetrijsko određivanje je privuklo posebnu pozornost zbog svoje operativne jednostavnosti, lakog očitavanja, niske cijene i velike propusnosti. Kolorimetrijska analiza fenola može se provesti praćenjem oksidativnog meta-spajanja s 4-aminoantipirinom (4-AAP). Kako bi se olakšala kromogena reakcija,

bioenzimi se često koriste za brzu analizu fenola u blagim uvjetima [1]. Prema tome, Z. A. Lin i suradnici 2014. godine izvijestili su o anorganskoj hibridnoj kolorimetrijskoj platformi peroksidaze hrena (engl. *Horseradish Peroxidase*, HRP) za vizualnu detekciju fenola. Iako strategija pokazuje povoljnu izvedbu za praćenje fenola, još uvijek ima dovoljno prostora za poboljšanje kolorimetrijske metode, a to bi se postiglo zamjenom HRP-a. Korištenjem HRP-a u procesu ne samo da povećava troškove detekcije, već smanjuje robusnost pristupa [48].

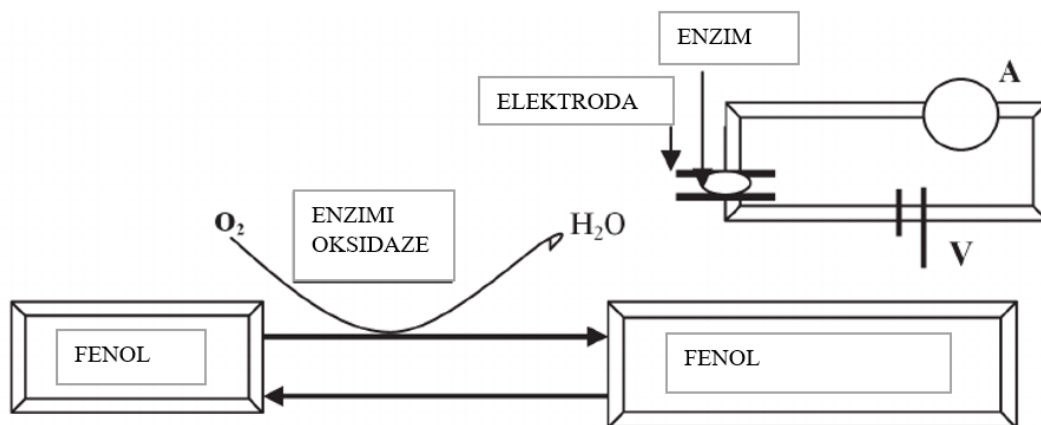


Slika 3.14. Kolorimetrijska kvantifikacija fenolnih onečišćivala

3.4.6. Amperometrijski biosenzori

Razvoj analitičke biotehnologije predstavlja novo nastalo polje koje igra ključnu ulogu u mnogim aspektima suvremenog istraživanja i primjene. Koncentracija proizvoda i struje su izravno povezani s amperometrijskim biosenzorima, koji su postali važan alat u otkrivanju i praćenju bioloških i kemijskih reakcija. Postoje tri glavne vrste amperometrijskih biosenzora: izravni prijenos, posredovan i neposredovan. Međutim, komercijalno dostupni amperometrijski biosenzori obično koriste posredovani pristup. Primjer primjene amperometrijskog biosenzora koji je prikazan na slici 3.15. je određivanje fenola koje su razvili J. Kulys i suradnici 2003. godine koristeći grafične elektrode i rekombinantnu gljivu

Polyporus pinsitus [49]. Ovaj biosenzor detektira fenol, 1-naftol i druge srodne fenolne spojeve. Enzim albumin iz goveđeg seruma korišten je za imobilizaciju na elektrodu. Amperometrijski biosenzori imaju niz prednosti, uključujući selektivnost prema tvarima, jednostavnost rada i rukovanja te sposobnost otkrivanja različitih tvari kao što su benzen, trimetilamin, alkoholi i herbicidi. Također, ova metoda je ekonomična i dugotrajna. Međutim, amperometrijski biosenzori imaju i svoje nedostatke, kao što su kratko vrijeme rada, niža brzina odgovora u usporedbi s nekim drugim biosenzorima, manja točnost, potreba za prisutnošću redoks elemenata za pojačavanje struje te mogući utjecaj okolnih smetnji. Usprkos nedostacima amperometrijski biosenzori su dragocjeni alati u analitičkoj biotehnologiji koji omogućavaju brzu i osjetljivu analizu bioloških i kemijskih procesa te imaju velik potencijal u različitim područjima istraživanja i primjene [49].

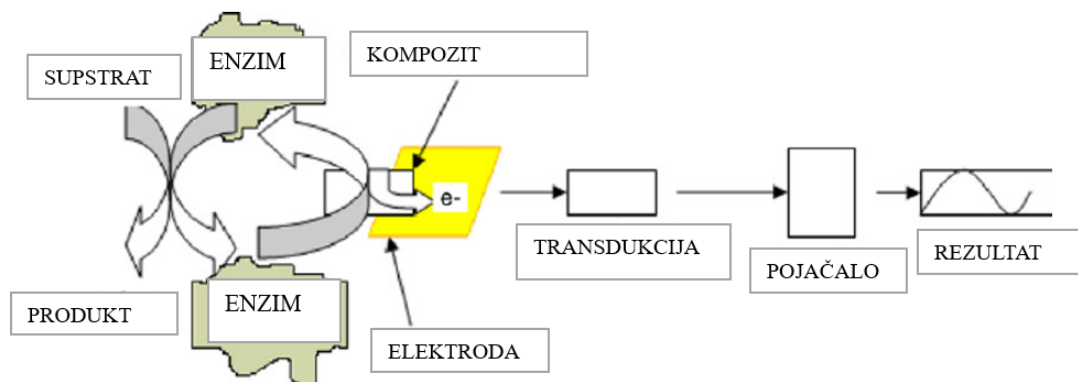


Slika 3.15. Princip rada amperometrijskog biosenzora

3.4.7. Enzimski biosenzori

Enzimski biosenzori prikazani na slici 3.16. su učinkoviti uređaji koji omogućuju otkrivanje različitih onečišćivala i analita. Oni se temelje na biološkim interakcijama s enzimima kao aktivnim komponentama i koriste se za detekciju i kvantifikaciju ciljnih molekula. Pri izradi enzimskih biosenzora, ključno je osigurati stabilnost i funkcionalnost enzima kako bi se osigurala pouzdana analiza. Mobilizacija enzima, odnosno njihovo smještanje u odgovarajući okoliš, ključan je korak za postizanje visokih performansi enzimskih biosenzora. Primjer korištenja lakaze kao enzimskog biosenzora istražio je M. M. Rodriguez-Delgado i suradnici

2015. godine [50]. Oni su koristili lakazu kao biosenzor za detekciju i kvantifikaciju spojeva izvedenih iz fenola. Ovi biosenzori su se pokazali brzim i osjetljivim za praćenje fenolnih spojeva te su se istaknuli svojom primjenjivošću u prehrambenoj, farmaceutskoj industriji i zaštiti okoliša. Enzimski biosenzori imaju niz prednosti, a među njima se ističe ta da su alternativa drugim metodama određivanja i pružaju brz odgovor na prisutnost ciljnog analita. Osim toga, pokazuju visoku osjetljivost i selektivnost prema ciljnom analitu. No, također imaju određene nedostatke. Osjetljivi su na prisutnost inhibitora koji mogu utjecati na interakciju enzima i ciljnog analita. Također, proizvodnja enzimskih biosenzora može biti skupa i zahtjevna te mogu pokazivati nepovratnu termalnu deaktivaciju enzima. Osjetljivi su na visoke temperature, što može utjecati na njihovu stabilnost, dok imobilizacija enzima može dovesti do gubitka aktivnosti enzima. Unatoč tim nedostacima, enzimski biosenzori su moćan alat za brzu i specifičnu analizu različitih analita, čime doprinose razvoju analitičke biotehnologije i primjeni u različitim industrijama [50].

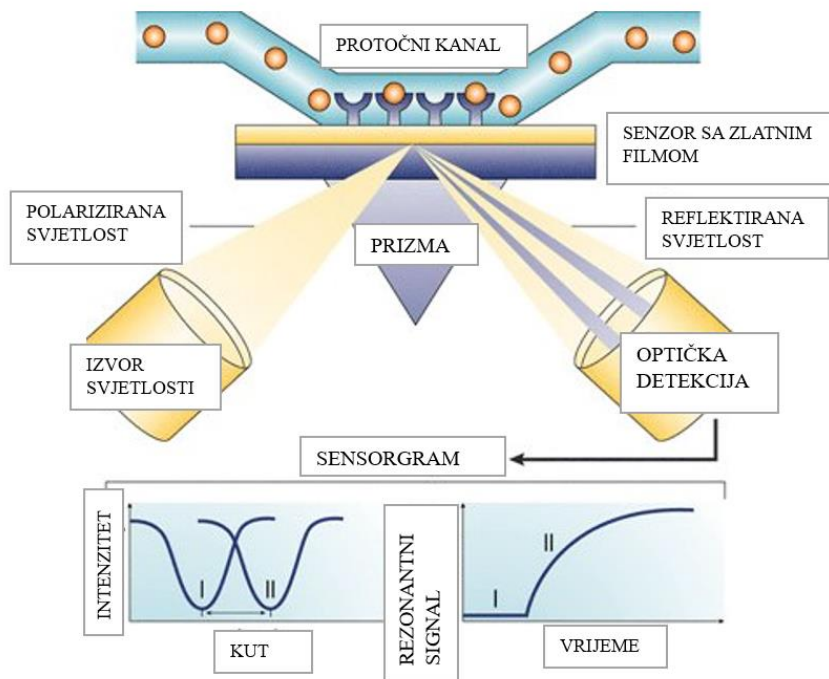


Slika 3.16. Princip rada enzimskog biosenzora

3.4.8. Optički biosenzori

Optički biosenzori su uređaji koji se temelje na interakciji između supstrata i biomolekula kako bi generirali optičke signale za detekciju. Ova metoda prikazana na slici 3.17. omogućuje analizu bioloških interakcija i prisutnosti ciljnih molekula kroz emisiju svjetlosnih fotona. Optički biosenzori igraju ključnu ulogu u biotehnologiji, kliničkim i medicinskim područjima. Optički biosenzori koriste se za detekciju različitih ciljnih molekula te su posebno korisni u praćenju opasnih onečišćivala. Ova metoda se često primjenjuje u

projektiranju optičkih biosenzora zbog svoje sposobnosti za direktnu i brzu detekciju. Upotreba optičkih vlakana pruža dodatnu prednost u detekciji različitih analita. Jedna od ključnih prednosti optičkih biosenzora je da omogućuju analizu uzorka bez potrebe za prethodnom obradom. To znači da uzorak može biti direktno testiran, što ubrzava analitički proces. Važno je napomenuti da optički biosenzori zahtijevaju precizno kalibriranje i optimizaciju kako bi osigurali pouzdane rezultate. Kroz daljnji razvoj i optimizaciju, optički biosenzori imaju potencijal postati još važniji alat u istraživanju i primjeni bioloških interakcija. Biosenzori su razvijeni kako bi prevladali komplikacije koje su se javljale s dostupnim metodama, pružajući povećanu preciznost i točnost u analizama. Upotreba optičkih biosenzora sve više raste zbog njihove sposobnosti za visoko precizno mjerenje. Primjerice, J. Abdullah i suradnici 2006. godine predstavili su inovativan biosenzor temeljen na imobilizaciji metilbenzotiazola u nafion/sol-gel silikatnom filmu [51]. Ovaj biosenzor pokazao je karakteristike kao što su visoka osjetljivost, stabilnost i ponovljivost u ponašanju. Prednost ove metode je ta da su optički biosenzori snažni alati za analizu bioloških interakcija i detekciju ciljnih molekula. Oni pružaju alternativu drugim metodama detekcije s boljom preciznošću i osjetljivošću. Osim toga, optički biosenzori zbog svoje visoke osjetljivosti omogućuju detekciju čak i niskih koncentracija fenola. Ova metoda omogućuje brzu i realno-vremensku detekciju ciljnih molekula. Nedostaci optičkih biosenzora uključuju visoki trošak opreme jer je nabava i održavanje opreme za optičke biosenzore skupa. Osim toga optički biosenzori mogu biti osjetljivi na promjene okoline, što može utjecati na rezultate. Izazovi u smislu površinske interakcije također predstavljaju problem jer imobilizacija biomolekula na površini može predstavljati izazove, utječući na pouzdanost i osjetljivost biosenzora. Još jedan nedostatak je precizno kalibriranje i upotreba visoko preciznih optičkih uređaja koji su ključni za točne rezultate [51].



Slika 3.17. Princip rada optičkog biosenzora

3.4.9. Biosenzori cijele stanice

Biosenzori cijele stanice su razvijeni kako bi otkrili onečišćenje okoliša. Ova vrsta biosenzora koristi se kao "bio-reporteri" i koristi žive stanice kao osjetne elemente, uključujući stanice protozoa, gljiva, biljaka, algi i bakterija. Ova metoda se primjenjuje za određivanje različitih onečišćivala poput pesticida, fenola, teških metala i drugih štetnih tvari u okolišu. Biosenzor cijele stanice omogućuje kvantitativnu analizu uz pomoć živih bioloških stanica. Prednosti ove metode su te da daje informacije o ukupnoj dostupnosti onečišćivala, uključujući i njegov slobodni oblik te prisutnost u kombinaciji s drugim spojevima. Osim toga moguće je kontinuirano pratiti prisutnost onečišćivala u okolišu, što omogućuje bolje razumijevanje promjena tijekom vremena. Metoda je jeftina u održavanju, odnosno održavanje ovih biosenzora često zahtijeva manje resursa i troškova u usporedbi s nekim drugim metodama za otkrivanje onečišćivala. Omogućuje brzu i jednostavnu procjenu prisutnosti onečišćivala što je važno u situacijama gdje je potrebna hitna reakcija. Među nedostacima se ističe zahtjev za upotrebom živih stanica koje moraju biti održavane i uzgajane tijekom vremena, što može biti zahtjevno. Osim toga, učinkovita primjena ove metode zahtijeva poznavanje mikrobiologije, biokemije i metodu uzgoja stanica te znanje o opasnim i otrovnim spojevima. Integracija

biosenzora cijele stanice s optičkim biosenzorima omogućuje glatko i precizno otkrivanje onečišćivala. Z. Zeng i suradnici 2015. godine otkrili su metodu za otkrivanje fenola koristeći endospore divljeg tipa bakterije *Bacillus amyloliquefaciens* [52]. Koncentracija fenola procijenjena je detekcijom apsorpcijskih signala na valnoj duljini od 510 nm. Ova kombinacija metoda omogućuje pouzdano otkrivanje fenola u okolišu [52].

3.5. RAZVOJ I OPTIMIZACIJA METODE ZA ANALIZU FENOLA I KLORFENOLA IZ VODENIH UZORAKA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM-MASEKOM SPEKTROMETRIJOM

U svom radu A. Kovacs i suradnici 2011. godine istražili su i razvili metodu za analizu fenola i klorfenola iz vodenih uzoraka [53]. Analitički postupak je razvijen u tri koraka te je prikazan na slici 3.18. i optimiziran je za istovremeno određivanje šest fenola i devetnaest klorfenola iz uzoraka vode iz okoliša. Klorfenoli nastaju kao produkti kloriranja pitke vode.

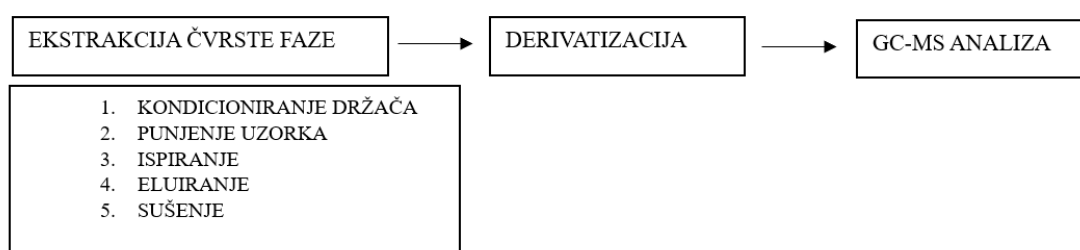
Analitička shema se sastoji od :

1. Ekstrakcija čvrste faze
2. Derivatizacija s trimetilsilil-*N,N*-dimetilkarbamatom
3. Analiza s plinskom kromatografijom-masenom spektrometrijom praćenjem iona (GC-MS)

Etil acetat, smjesa etil acetata i octene kiseline, diklormetan i acetonitril su uspoređeni u pogledu njihove sposobnosti eluiranja fenola i klorfenola u što manjem volumenu otapala. U ekstrakciji se koristi minimalna količina organskog otapala, samo 4 mL etil acetata. Derivatizacija fenola i klorfenola s već navedenim spojem proučavana je s obzirom na konverziju, višak reagensa, medij, temperaturu i stabilnost derivata trimetilsilila. Ako se reagens primijeni u dovoljnom višku, dolazi do trenutačne reakcije, a derivati ostaju stabilni 24 h. Ukupna metoda je dala granice detekcije od 0.05-100 ng/L za sve spojeve osim rezorcinola.

Najpoznatije analitičke metode su već spomenuta HPLC i kapilarna plinska kromatografija. Fenoli su obično podložni plinskoj kromatografiji bez derivatizacije. Polarniji fenoli su skloni razgradnji na aktivnim centrima što rezultira lošim kromatografskim vrhovima i gubitkom

tvori osobito pri nižim koncentracijama. Kako bi se prevladali ti problemi te kako bi se omogućila niža granica detekcije postoji nekoliko metoda derivatizacije. Reagensi se mogu klasificirati u alkiliranje, aciliranje te sililiranje. Alkiliranje i aciliranje se ne mogu primijeniti na sve fenole. Aciliranje zahtijeva da fenoli budu prisutni kao anioni fenolata što zahtijeva alkalni pH. Sililiranje se može primijeniti na širok raspon fenola, uključujući alkil-, nitro- i klorfenole. Međutim, t-butil-dimetilsilil predstavlja značajnu steričku smetnju koja zahtijeva povišenu temperaturu i produljeno vrijeme reakcije. U nastavku su opisane metode po koracima [53].



Slika 3.18. Analitički postupak analize fenola i klorfenola

1. Ekstrakcija čvrste faze

Ekstrakcija čvrste faze uključuje upotrebu krutog upijajućeg materijala, odnosno držača za uzorak koji selektivno zadržava fenolne spojeve. Metoda se oslanja na principe adsorpcije i desorpcije, gdje se otopina propušta kroz držače za uzorak, a fenoli se zadržavaju na površini adsorbensa. Postupak se sastoji od nekoliko koraka. Prvi korak je kondicioniranje držača adsorbensom kako bi se osiguralo da adsorbens bude čist i aktiviran za pravilno zadržavanje fenola. Zatim slijedi punjenje uzorka. Neki analiti stupaju u interakciju sa adsorbensom dok se neželjeni spojevi uklanjaju pranjem. Otapalo pri pranju mora proći kroz držač kako bi se eliminirale komponente koje bi mogle ometati analizu. Nakon koraka ispiranja, zadržani fenoli se eluiraju iz držača pomoću polarnijeg otapala. Dobiveni eluat se isparava kako bi se uklonilo eluirajuće otapalo te kako bi se fenoli dodatno koncentrirali. Ova metoda se koristi za pripremu uzorka za izolaciju i koncentriranje fenola. Koncentrirani ekstrakt se zatim analizira već spomenutim metodama poput HPLC, GC i MS. U ovom primjeru ekstrakcije,

uzroci su zakiseljeni pomoću 37 % HCl do pH vrijednosti 2. Svako standardnoj otopini je dodano 10 µL uzorka prije ekstrakcije. Držak uzorka je kondicioniran s 10 mL metanola i 10 mL destilirane vode zakiseljene do pH vrijednosti 2 pri protoku od 5 mL/min. Uzorak je propušten kroz držak pri protoku od 3.5 mL/min. Tijekom procesa uzorak ne smije biti suh. Sušenje na adsorbensu se provodi sa zrakom sve dok adsorbens ne promijeni boju. Unatoč sušenju mogu ostati tragovi vlage. Kako bi se uklonila vlaga, štrcaljka je napunjena bezvodnim natrijevim sulfatom te je stavljena ispod držača. 2 mL eluenta je dodano ručno i ostavljeno da se namače 5 min prije nego što je pušteno kroz držak brzinom od 0.5 mL/min. Postupak je ponovljen s još 2 mL etilacetata.

2. Derivatizacija

Prilikom derivatizacije je prebačeno 100 µL koncentriranog ekstrakta u bočicu s uvijenim vratom opremljenu mikroumetkom od 0.2 mL. Zatim je otopini dodano 100 mL trimetilsilil-*N*, *N*-dimetilkarbamata. Bočica je odmah zaklopljena s poklopcem te je otopina miješana. Za kraj je potrebno analizirati uzorke na GC-MS unutar 12 h.

3. Masena spektrometrija

Mjerenja masene spektrometrije se provode na 70 eV. Za dobivanje masenih spektralnih podataka i vremena zadržavanja, raspon detektiranih masa je bio 50-500 Da. Odabrani način praćenja iona je korišten u kvantitativne svrhe. Za svaki spoj su bila odabrana dva ili tri iona te su oni bili detektirani.

4. Kromatogram

Analiza i procjena kromatograma je ključan korak u određivanju koncentracije tvari u uzorku. Procjena kromatograma uključuje analizu vremena zadržavanja, identifikaciju vrhova, kvantificiranje površine ispod vrha, procjenu čistoće vrha te razlučivost.

GC-MS kromatogrami su procijenjeni pomoću područja pika analita. Za svaku tvar je kvantifikacija temeljena na piku ciljanog iona. Preostali ioni služe samo za identifikaciju. Tijekom razvoj ekstrakcije čvrste faze, oktafluornaftalen je korišten kao standardna otopina. Tijekom kalibracije, pri analizi više otopina kao standardna otopina se koristio 1,3,5,6-tetraklor-2,4-dimetilbenzen.

5. Kalibracija i granica detekcije

Za kvantitativnu analizu se konstruiraju kalibracijske krivulje. Odziv detektora na različite koncentracije standarda se koristi za određivanje koncentracije nepoznatog uzorka. Prema tome, kalibracijske krivulje za ovaj slučaj su dobivene sa standardnim otopinama pripremljenim u etil acetatu. Korišteno je 7 koncentracija u rasponu od 0.001 i 25 $\mu\text{g/mL}$, po dva ponavljanja. Dobivena kalibracijska krivulja je bila linearna u cijelom rasponu.

6. Oporavak fenola

Nekoliko istraživanja je pokazalo da razina koncentracije ne utječe na oporavak fenola na adsorbensu. Prema tome je odabrana relativno visoka razina koncentracije od 50 $\mu\text{g/L}$ za svaki fenol. Kao rezultat su se dobile površine vrhova koje su bile dovoljno velike da se dopusti jednostavno tumačenje kromatograma, čime se smanjila greška [53].

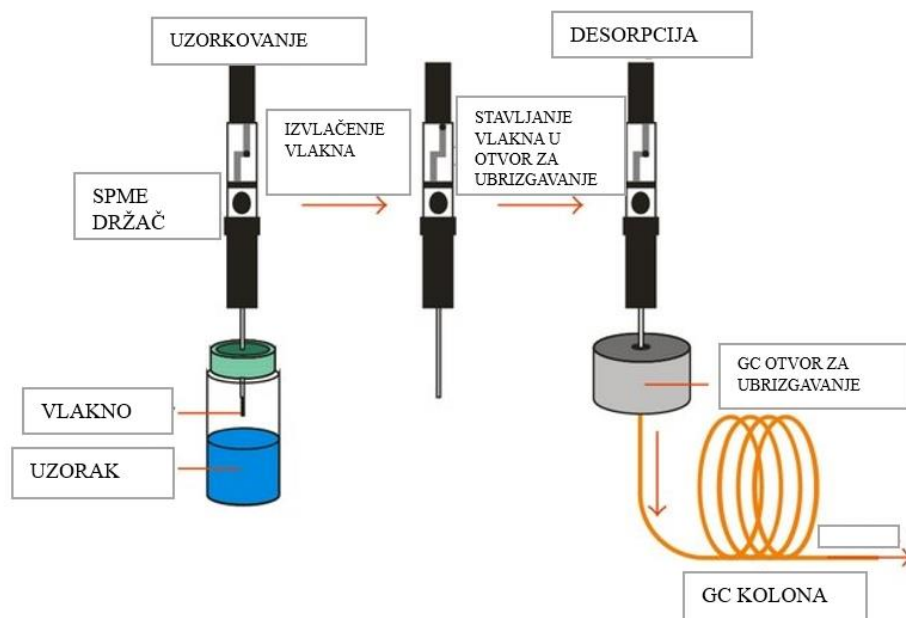
3.6. ANALIZA FENOLA IZ OTPADNIH VODA POMOĆU MIKROEKSTRAKCIJE IZ ČVRSTE FAZE I PLINSKE KROMATOGRAFIJE

Mikroekstrakcija čvrste faze (engl. *Solid-phase microextraction*, SPME) je metoda pripreme uzorka koja se koristi za ekstrakciju fenolnih spojeva. Ova metoda nudi brz postupak ekstrakcije bez otapala. Metoda uključuje upotrebu presvučenih vlakana kao medija za ekstrakciju koji služe i kao koncentrator za fenole. Sastoji se od nekoliko koraka. U prvom koraku je potrebno obložiti vlakno. Vlakno je obloženo stacionarnom fazom koja pokazuje visok afinitet i selektivnost za fenole. Materijali za premazivanje su polidimetil, polidimetilsiloksan, poliakrilat i karboksen. Nakon toga se obloženo vlakno izravno izlaže uzorku koji sadrži fenole. Fenolni spojevi se adsorbiraju na premazu vlakna. Vrijeme ekstrakcije ovisi o koncentraciji analita. Nakon ekstrakcije, vlakno se prenosi u otvor za ubrizgavanje ili izravno u detektor gdje dolazi do desorpcije analita i odvajanja za analizu. Koncentracija fenola u uzorku se određuje na temelju odziva signala dobivenog kromatografskom analizom. Prednosti ove metode su potreba za minimalnim volumenom uzorka, smanjena upotreba otapala, poboljšana osjetljivost te uzorkovanje na licu mjesta [54].

U svom radu F. Zhou i suradnici 2005. godine istražili su mikroekstrakciju spojenu s plinskom kromatografijom za određivanje fenola [55]. Do detekcije dolazi plamenom ionizacijom. Analiza je provedena za šest fenolnih spojeva u uzorcima vode. Parametri koji utječu na sorpciju analita na vlakno su temperature i vrijeme desorpcije. Mikroekstrakcija čvrste faze povezana s plinskom kromatografijom je primijenjena za analizu fenolnih spojeva u tlu, vodi, vinu i hrani te je princip rada prikazan na slici 3.19. Kao što je već navedeno, da bi se postiglo selektivnije određivanje spojeva koriste se različite vrste premaza vlakana, a to su poliakrilat, polidimetilsiloksan i polidimetilsiloksan, divinilbenzen. Sva navedena vlakna su pogodna za ekstrakciju fenola osim polidimetilsiloksana zbog svoje nepolarosti. Povoljna ekstrakcija fenola se dobiva pomoću poliakrilat premaza. Međutim, zbog odsutnosti kemijske veze između polimernih premaza i površine taljenog silicijevog vlakna dolazi do niske toplinske stabilnosti otapala. Prema tome, imobilizacija polimernog premaza je bitan preduvjet za maksimalno iskorištenje njegovog analitičkog potencijala. Često je teško postići prihvatljiv stupanj imobilizacije debelih premaza putem konvencionalnih pristupa. Rješenje tome je tehnologija sol-gel premaza koja može učinkovito kombinirati površinsku obradu, deaktivaciju, premazivanje i imobilizaciju stacionarne faze. Ovom metodom pripremljeno je vlakno 5,11,17,23-tetra-terc-butil-25,27-dietoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren/hidroksi-silikon s uljem premazanim vlaknima. Ovo vlakno se može primijeniti za nekoliko aromatskih amina, klorfenola te estera ftalnih kiselina. Ono ima visoku toplinsku stabilnost te izvrsnu selektivnost i osjetljivost osobito za manje polarne molekule. Zatim je sintetiziran 25,27-dihidroksi-26,28-oksi(2,7-diokso-3,6-diazaoktil)oksi-*p*-terc-butikaliks[4]aren te je time pripremljeno amidno vlakno za sol-gel tehnologiju premazivanja. Novo vlakno je pripremljeno za analizu i određivanje trimetilamina u ribljem tkivu. Zbog amidnog mosta u gore navedenom arenu, vlakno pokazuje dobru osjetljivost i selektivnost na polarne amine uz visoku toplinsku stabilnost. Ovom metodom se može odrediti isključivo ukupni sadržaj fenola pa se zbog toga ne može procijeniti toksičnost pojedinačnih fenola. Zaključeno je da je sposobnost ekstrakcije dva amidno premoštena vlakna puno bolja od hidroksi-silikona s uljem premazanim vlaknima čime se potvrdila važnost amidno premoštenog mosta tijekom ekstrakcije. Vlakno s amidnim mostom ima veću sposobnost zbog polarnog amidnog mosta u kaliks[4]arenu čime se povećao polaritet vlakna te afinitet za fenole.

Proučavani spojevi su bili fenol, *o*-krezol, *p*-krezol, 3,5-dimetilfenol, 1-naftol, 2-naftol. Ove standardne smjese šest fenola pripremljene su otapanjem 10 mg svakog spoja u metanolu u volumetrijskoj posudi od 10 mL. Otopine su pohranjene na 4 °C. Zatim je potrebno skupiti

uzorke. Uzorci vode se prije i nakon biokemijske obrade iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda skupe u čaše od 500 mL te se zakisele do pH vrijednosti 2 s klorovodičnom kiselinom. Prema testovima ekstrakcije je zaključeno da je koncentracija onečišćivala u vodi vrlo visoka. Analize su se provodile 3 dana od uzorkovanja. Analiza je provedena na SP-6800A spektralnom analizatoru koji je opremljen kapilarnim sustavom i sustavom detekcije plamenom ionizacijom. Kao plin nosilac koristi se dušik pri linearnoj brzini od 12 cm/s. Temperature injektora i detektora su na 260 °C. Temperatura pećnice je na 80 °C prve 3 min, zatim je povećana na 120 °C pa sve do 230 °C. Mikroekstrakcija iz čvrste faze je provedena na idući način. 10 µg standardne otopine koja sadrži fenole je stavljeno u staklene bočice od 10 mL s 5 mL destilirane vode i 2 g NaCl, a uzorak je potrebno zakiseliti do pH vrijednosti 2 klorovodičnom kiselinom. Dodana je i mala magnetna šipka za miješanje. Kako bi se izbjeglo isparavanje uzorka, bočice su zatvorene čepovima od butilne gume. Ekstrakcija je izvedena izlaganjem obloženog kraja vlakna u prostor iznad otopine uzorka. Uzorak je miješan konstantnom brzinom od 700 o/min. Vlakno je umetnuto u otvor injektora. Prije analize se vlakna kondicioniraju 30 min u injektoru na temperaturi od 260 °C. Prije početka eksperimenta je potrebno provesti slijepu probu kako bi se potvrdilo da nema stranih spojeva desorbiranih u vlakno [55].



Slika 3.19. Princip rada SPME u kombinaciji s GC

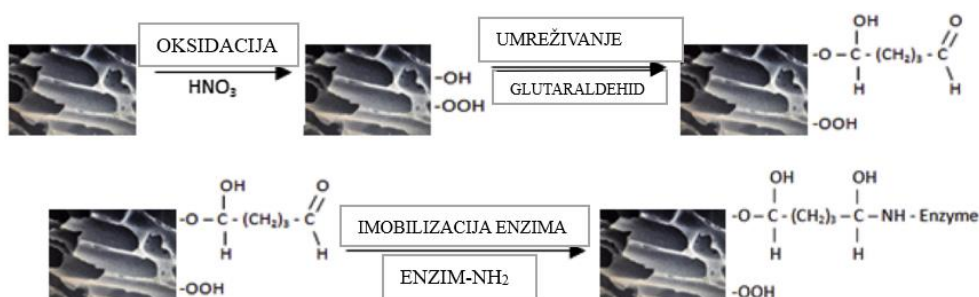
3.7. PRIMJENA SIROVE PEROKSIDAZE HRENA IMOBILIZIRANE BIOUGLJENOM ZA UKLANJANJE FENOLA IZ VODA

U svom radu M. Petronijević i suradnici 2021. godine istražili su primjenu sirove peroksidaze hrena imobilizirane biougljenom za uklanjanje fenola iz otpadnih voda. Biougljen je izazvao veliku pažnju kao ekološki prihvatljiv materijal za primjenu u procesima pročišćavanja otpadnih voda. U ovom istraživanju, istražena je upotreba biougljena dobivenog iz drva kao nosača za kovalentnu imobilizaciju peroksidaze hrena (HRP) putem glutaraldehida kao umreživača što je prikazano na slici 3.20. Glutaraldehyd je poznat po svojoj sposobnosti uklanjanja fenola iz vode. Ispitan je utjecaj različitih parametara na učinkovitost imobiliziranog HRP-a u uklanjanju fenola iz vode, uključujući različite doze polietilen glikola (PEG300) u rasponu od 0 do 750 mg/L, koncentracije vodikovog peroksida (H_2O_2) u rasponu od 0,0015 do 0,0035 mol/L te vrijeme reakcije od 5 do 120 min. Također je provedeno ispitivanje opće toksičnosti vode tretirane imobiliziranim enzimom pomoću testa na biljci *Allium cepa*. Sve navedene analize provedene su i za slobodni enzim [3].

Rezultati su pokazali da je imobilizirani enzim pokazao najbolju aktivnost pri temperaturi od 30 °C i pH vrijednosti 7. Najveća učinkovitost u uklanjanju fenola, 90 % postignuta je primjenom 0,0025 mol/L H_2O_2 i 1,5 mg/L PEG300 pri pH vrijednosti 7 tijekom 2 h reakcije. Nakon 4 pranja, imobilizirani HRP je zadržao više od 79 % svoje aktivnosti uz istovremeno uklanjanje fenola od 64 %. Korištenjem imobiliziranog enzima značajno se smanjuje toksičnost tretirane vode na 80 %, što ukazuje na to da se ovaj postupak može smatrati ekološki prihvatljivim za pročišćavanje otpadnih voda. Analiza uzoraka pročišćene vode je također provedena kako bi se identificirali mogući produkti razgradnje. Korištena su tekućinska i plinska kromatografija s masenom spektrometrijom, uključujući metodu mikroekstrakcije krute faze za analizu hlapljivih tvari. U uzorcima vode pronađeni su različiti spojevi temeljeni na fenolu [3].

Peroksidaza hrena (HRP) je često korištena kao učinkovit katalizator za uklanjanje fenola. Ona katalizira stvaranje organskih fenoksi radikala u prisutnosti vodikovog peroksida, što dovodi do daljnje polimerizacije fenolnih spojeva i smanjenja njihove toksičnosti. Imobilizacija HRP-a je proces pretvaranja topljivog enzima u netopljivi oblik. To se postiže vezivanjem enzima za čvrsti nosač, što rezultira stabilnim biokatalizatorom s većom aktivnošću od slobodnog enzima. Imobilizacija omogućuje ponovnu upotrebu enzima, čime se smanjuje potrošnja enzima i troškovi. U ovom istraživanju, biougljen je ispitivan kao

potpora za imobilizaciju HRP-a u procesu uklanjanja fenola iz vode. Biougļjen je ekološki prihvatljiv materijal s visokom specifičnom površinom i poroznošću, što ga čini učinkovitim za adsorpciju i katalitičke reakcije. Rezultati istraživanja obuhvaćaju stabilnost i učinkovitost imobiliziranog HRP-a pod različitim uvjetima reakcije te usporedbu s slobodnim HRP-om. Ovo istraživanje doprinosi razumijevanju primjene biougļjena kao ekološki prihvatljivog materijala za pročišćavanje otpadnih voda [3].



Slika 3.20. Imobilizaciju peroksidaze hrena (HRP) putem glutaraldehida

4. ZAKLJUČAK

Analiza i određivanje fenola u otpadnim vodama je ključna za praćenje okoliša i kontrolu njegovog onečišćenja. Koncentracije fenola variraju ovisno o izvorima i prirodi otpadne vode, pri čemu neke koncentracije prelaze dopuštene granice propisane u zakonodavstvu ili pravilnicima o zaštiti okoliša. Konvencionalne metode obrade kao što su destilacija, apsorpcija, ekstrakcija, kemijska oksidacija i elektrokemijska oksidacija pokazuju visoku učinkovitost s različitim fenolnim spojevima, dok napredni oksidacijski procesi kao što je Fentonov proces koriste manje kemikalija u usporedbi s konvencionalnim, ali imaju visok utrošak energije. Od bioloških metoda obrade otpadnih voda kao najučinkovitije ističu se enzimске metode zbog veće katalitičke učinkovitosti i niže cijene u odnosu na tradicionalne kemijske metode. Određivanje fenola u otpadnim vodama obavlja se primjenom različitih analitičkih metoda. Najučinkovitije analitičke metode su tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) te masena spektrometrija. Ove metode zbog svoje visoke osjetljivosti i preciznosti omogućuju i otkrivanje fenola u tragovima u otpadnoj vodi.

5. LITERATURA

- [1] Wu, S., Guo, D., Xu, X., Pan, J., Niu, X., Colorimetric quantification and discrimination of phenolic pollutants based on peroxidase-like Fe₃O₄ nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **303**(2020)127225.
- [2] Colon, L. P., Rascon, A., Ballesteros, E., Simultaneous determination of phenolic pollutants in dairy products held in various types of packaging by gas chromatography-mass spectrometry, *Food control*, **146**(2023)109564.
- [3] Petronijević, M., Panić, S., Savić, S., Agbaba, J., Molnar Jazić, J., Milanović, M., Đurišić-Mladenović N., Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water, *Colloids and surfaces B*, **208**(2021)112038.
- [4] Bolzonella, D., Fatone, F., Di Fabio, S., Cecchi, F., Application of membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse in the Mediterranean region: Focusing on removal efficiency of non-conventional pollutants, *Journal of Environmental Management*, **91**(2010)2424-2431.
- [5] Zrnčević, S., Obrada industrijske otpadne vode iz proizvodnje celuloze i papira, *Hrvatske Vode*, **27**(2019)317-342.
- [6] Nur Karahan, B., Akdag, Y., Fakioglu, M., Korkut, S., Guven, H., Ersahin, E. M., Ozgun, H., Coupling ozonation with hydrogen peroxide and chemically enhanced primary treatment for advanced treatment of grey water, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **11**(2023)110116.
- [7] Z. Jurac, Otpadne vode, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2009., str. 63-91.
- [8] Admirasari, R., Hindersin, S., von Schwartzberg, K., Hanelt, D., Nutritive capability of anaerobically digested black water increases productivity of *Tetradesmus obliquus*: Domestic wastewater as an alternative nutrient resource, *Bioresource Technology Reports*, **17**(2022)100905.
- [9] <https://hrcak.srce.hr/file/53001>, Biološka obrada otpadnih voda (pristup lipanj 2023.)
- [10] Lochyński, P., Szymańska, M., Charazińska, S., Poznańska, E., Kubicz, J., Raman spectroscopy and XRF identification: First step in industrial wastewater management, *Water Resources and Industry*, **30**(2023)100216.
- [11] <https://mpgi.gov.hr/vijesti-8/donesen-program-razvoja-zelene-infrastrukture-u-urbanim-podrucjima/14152> (pristup lipanj 2023.)
- [12] Simpson, M. I., Schwartz, S. J., Hathaway, M. J., Winston, J. R., Environmental regulations in the United States lead to improvements in untreated stormwater quality over four decades, *Water Research*, **243**(2023)120386.
- [13] Dutta, D., Arya, S., Kumar, S., Industrial wastewater treatment: Current trends, bottlenecks, and best practices, *Chemosphere*, **285**(2021)131245.
- [14] <https://hr.ellas-cookies.com/biznes/5167-mehanichesкая-ochistka-stochnyh-vod-sposoby-osobnosti-i-shema.html> (pristup srpanj 2023.)

- [15] Zubrowska-Sudol, M., Walczak, J., Piechota, G., Disintegration of waste sludge as an element bio-circular economy in waste water treatment plant towards carbon recovery for biological nutrient removal, *Bioresource Technology*, **360** (2022)127622.
- [16] Leslie, G. C. P., Daigger, G. T., Lim, H. C., Filipe, C. D. M., Biological Wastewater Treatment, 3. dio, Iwa Publishing, Boca Raton, 2011., str.5-30.
- [17] Tušar B., Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, CROATIA KNJIGA, Zagreb, 2004, str.153-200.
- [18] Kathiravan, A., Narayanan, M., Jhonsi, A. M., Anbazhagan, V., Receptor-free phenothiazine derivative as fluorescent probe for picric acid: Investigation of the inner filter effect channel, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **303**(2023)123166.
- [19] Liu, L., Xie, E., Tang, Y., Feng, R., Gan, W., Eco-friendly phenol formaldehyde resin wood adhesive from bagasse lignin liquefaction, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, **33**(2023)101129.
- [20] Pal, S., Bollag, M. J., Huang, M. P., Role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenolic compounds through oxidative coupling reactions, *Soil Biology and Biochemistry*, **26**(1994)813-820.
- [21] Luyben, L. W., Design and Control of the Cumene Process, *Industrial Engineering Chemistry Research*, **49**(2010)719–734.
- [22] Hidayat, M., Sediawan, B. W., Mulyono, P., Fardhyanti, S. D., Separation of Phenolic Compounds from Coal Tar, World Academy of Science, *Engineering and Technology*, **7**(2012)6-20.
- [23] Li, Y., Luo, H., Ai, Q., You, K., Zhao, F., Xiao, W., Efficient separation of phenols from coal tar with aqueous solution of amines by liquid-liquid extraction, *Chinese Journal of Chemical Engineering*, **35**(2021)180-188.
- [24] Popa, V., Volf, I., Biomass as Renewable Raw Material to Obtain Bioproducts of High-tech Value, Elsevier, 2018.
- [25] Yan, Y., Xu, J., Liu, S., Wang, M., Yang, C., Reactive force-field MD simulation on the pyrolysis process of phenolic with various cross-linked and branched structures, *Chemical Engineering Science*, **272**(2023)118606.
- [26] Bujis, W., The mechanism of phenol formation in the Dow Phenol Process, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, **146**(1999)237-246.
- [27] Schmidt, L., Prestes, D. O., Augusti, R. P., Moreira, F. C. J., Phenolic compounds and contaminants in olive oil and pomace - A narrative review of their biological and toxic effects, *Food Bioscience*, **53**(2023)102626.
- [28] Pleadin, J., Perši, N., Kovačević, D., Vulić, A., Frece, J., Markov, K., Ochratoxin A reduction in meat sausages using processing methods practices in households, *Food Additives and Contaminants: Part B*, **7**(2014)239-246.

- [29] Said, M. H., D'Orazio, A., Sajadi, M. S., Inc, M., Adsorptions of phenol molecules by graphene-based nanostructures, modified with nitrogen and bromine, from petroleum wastewater using molecular dynamics simulation, *Engineering Analysis with Boundary Elements*, **150**(2023)636-641.
- [30] Said, K. A. M., Ismail, A. F., Karim, Z. A., Abdullah, M. S., Hafeez, A., A review of technologies for the phenolis compounds recovery and phenol removal from wastewater, *Process Safety and Environmental Protection*, **151**(2021)257-289.
- [31] Dehmani, Y., Franco, P. S. D., Georgin, J., Lamhasni, T., Brahmi, Y., Oukhrib, R., Youcef, B. H., Sadik, A., Towards experimental and theoretical understanding of the adsorption behavior of phenol on a new activated carbon prepared from oak wood, *Journal of Water Process Engineering*, **54**(2023)103936.
- [32] <https://hr.thpanorama.com/articles/qumica/sulfato-de-aluminio-al2so43-estructura-usostipos-toxicidad.html> (pristup srpanj 2023.)
- [33] Wang, S., Tong, Z., An, W., Cui, W., Hu, J., Mechanism of phenol-assisted photocatalysis-Fenton degradation of MB: Coordination of the two-electron center and mixed contaminants, *Separation and Purification Technology*, **321**(2023)124239.
- [34] Bibi, A., Bibi, S., Abu-Dieyeh, M., Al-Ghouti, A. M., Towards sustainable physiochemical and biological techniques for the remediation of phenol from wastewater: A review on current applications and removal mechanisms, *Journal of Cleaner Production*, **417**(2023)137810.
- [35] Cabaj, J., Jędrychowska, A., Zając, D., Krawiec, S., Sołoducho, J., Phenolic Compounds Determination Using Laccase-based Electrode Modified with Conducting Polymer Support, *International Journal of Electrochemical Science*, **11**(2016)609-620.
- [36] Zhao, Q., Yu, Q., Wang, X., Li, X., Li, Y., Li, L., Wang, X., Yu, D., Ge, B., Efficient treatment of phenol wastewater by co-culture of *Chlorella vulgaris* and *Candida tropicalis*, *Algal Research*, **65**(2022)102738.
- [37] Arfin, T., Sonawane, K., Tarannum, A., Review on Detection of Phenol in Water, *Advanced Materials Letters*, **10**(2019)753-785.
- [38] Lavilla, I., Gil, S., Costas, M., Bendicho, C., Dispersive liquid-liquid microextraction combined with microvolume spectrophotometry to turn green the 5530 AP standard method for determining phenols in water and wastewater, *Talanta*, **98**(2012)197-202.
- [39] Tabaraki, R. Heidarizadi, E., Spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols by salting out assisted liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid liquid microextraction, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **215**(2019)405-409.

- [40] Puig, D., Barcel, D., Determination of phenolic compounds in water and waste water, *TrAC Trend sin Analytical Chemistry*, **15**(1996)362-375.
- [41] Lee, H. B., Peart, T. E., Svoboda, M. L., Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 2005.
- [42] Gohlke, R.S.; McLafferty, F.W.,_Early gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry.*, 4(1993)367-371
- [43] Nováková, L., Svoboda, P., Pavlík, J., Chapter 29-Ultra-high performance liquid chromatography, *Liquid Chromatography (Second Edition)*, 2017, 19-769.
- [44] Mattonai, M., Vinci, A., Degano, I., Ribechini, E., Franceschi, M., Modugno, F., Olive mill wastewaters: quantitation of the phenolic content and profiling of elenolic acid derivatitives using HPLC-DAD and HPLC/MS² with and embedded polar group stationary phase, *Natural Product Research*, **33**(2019)3171-3175.
- [45] Turkia, H., Siren, H., Penttila, M., Pitkanen, J., Capillary electrophoresis for the monitoring of phenolic coumounds in bioprocess, *Journal of Chromatography A*, **1278**(2013)175-180.
- [46] Alkasir, R.S., Ornatska, M., Andreescu, S., Colorimetric Paper Bioassay for the Detection of Phenolic Compounds, *Anal. Chem.*, **84**(2012)9729-9737.
- [47] Boher, S., Ullah, R., Tuzen, M., Saleh, T., Metal doped nanocomposites for detection of pesticides and phenolic compounds by colorimetry: Trends and challenges, *OpenNano*, **13**(2023)100168.
- [48] Lin, Z. A., Xiao, Y., Yin, Y. Q., Hu, W. L., Liu, W., Yang, H. H., Facile synthesis of enzymeinorganic hybrid nanoflowers and its application as a colorimetric platform for visual detection of hydrogen peroxide and phenol, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**(2014)10775–10782.
- [49] Kulys, J.; Vidziunaite, R., Amperometric biosensors based on recombinant laccases for phenols determination, *Biosens. Bioelectron.*, **18**(2003)319.
- [50] Rodríguez-Delgado, M.M., Alemán-Nava, G.S., RodríguezDelgado, J.M., Dieck-Assad, G., Martínez-Chapa, S.O., Barceló, D., Parra, R.,_Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds, *Trends Analyt. Chem.*, **74**(2015)21-45.

- [51] Abdullah, J., Ahmad, M., Heng, L.Y., Karuppiah, N., Sidek, H., Chitosan-based tyrosinase optical phenol biosensor employing hybrid nafion/sol-gel silicate for MBTH immobilization, *Talanta*, **70**(2006)527-532.
- [52] Zeng, Z., Tian, L., Li, Z., Jia, L., Zhang, X., Xia, M., Hu, Y., Biosensors and Bioelectrones., **69**(2015)162.
- [53] Kovacs, A., Mortl, M., Kende, A., Development and optimization of a method for the analysis of phenols and chlorophenols from aqueous samples by gas chromatography-mass spectrometry, after solid-phase extraction and trimethylsilylation, *Microchemical Journal*, **99**(2011)125-131.
- [54] Alizadeh, N., Zarabadipour, H., Mohammadi, A., Headspace solid-phase microextraction using an electrochemically deposited dodecylsulfate-doped polypyrrole film to determine of phenolic compounds in water, *Analytica Chimica Acta*, **605**(2007)159-165.
- [55] Zhou, F., Li, X., Zeng, Z., Determination of phenolic compounds in wastewater samples using a novel fiber by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography, *Analytica Chimica Acta*, **538**(2005)63-70.

6. POPIS SLIKA

Slika 2.1. Agredano, R., RV Grey Water Recycling Made Easy, *Maintenance, Modification and Repairs*, 2014.

Slika 2.2. Prehrambena industrija | Obrada otpadnih voda | COM-ING TRADE (pristup srpanj 2023.)

Slika 2.3. Tušar, B., Pročišćavanje otpadnih voda, Kigen, Zagreb, 2009.

Slika 2.4. <https://hr.ellas-cookies.com/biznes/5167-mehanicheskaya-ochistka-stochnyh-vod-sposoby-osobennosti-i-shema.html> (pristup srpanj 2023.)

Slika 2.5. Aerobic wastewater treatment, Processes activated sludge process (PPT - AEROBIC WASTEWATER TREATMENT PROCESSES ACTIVATED SLUDGE PROCESS PowerPoint Presentation - ID:8769132 (slideserve.com) (pristup lipanj 2023.)

Slika 3.1. ChemDraw

Slika 3.2. ChemDraw

Slika 3.3. ChemDraw

Slika 3.4. ChemDraw

Slika 3.5. SimpleDiagramPyrolysis - Piroliza – Wikipedija (wikipedia.org) (pristup srpanj 2023.)

Slika 3.6. Arfin, T., Sonawane, K., Tarannum, A., Review on Detection of Phenol in Water, *Advanced Materials Letters*, **10**(2019)753-785.

Slika 3.7. Tabaraki, R. Heidarizadi, E., Spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols by salting out assisted liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid liquid microextraction, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, **215**(2019)405-409.

Slika 3.8. Aryal, S., Gas Chromatography- Definition, Principle, Parts, Steps, Uses (microbenotes.com), 2022.

Slika 3.9. Hussain, S. Z., Maqbool, K., GC-MS: Principle, Technique and its application in Food Science, 2014.

Slika 3.10. Aryal, S., HPLC: Principle, Parts, Types, Uses, Diagram (microbenotes.com), 2023.

Slika 3.11. Van der Lee, M., Van den Pol, E., Chromatographic Separation of Surfactants in Chemical EOR, 2015.

Slika 3.12. Unarokov, Z., Studying the Dynamics of Changing the Concentration of Acetate Ions in the Blood of Patients in the Course Dialysis Method Using Capillary Electrophoresis, 2012.

Slika 3.13. colorimetry.jpg (638×359) (analisawarna.com) (pristup srpanj 2023.)

Slika 3.14. Wu, S., Guo, D., Xu, X., Pan, J., Niu, X., Colorimetric quantification and discrimination of phenolic pollutants based on peroxidase-like Fe₃O₄ nanoparticles, *Sensors and Actuators B: Chemical*, **303**(2020)127225.

Slika 3.15. Sadashiv Pitre, K., Microfaradaic Electrochemical Biosensors for the Study of Anticancer Action of DNA Intercalating Drug: Epirubicin, 2011.

Slika 3.16. Sarma, A., Recent invention of material Science -enzyme electrode, 2008.

Slika 3.17. Melinda, D., Florescu, M., BIOMOLECULAR INTERACTION EVALUATION USING SURFACE PLASMON RESONANCE. SPR BIOSENSORS, *Biophysics for Biomedical and environmental Sciences*, 2016.

Slika 3.18. Kovacs, A., Mortl, M., Kende, A., Development and optimization of a method for the analysis of phenols and chlorophenols from aqueous samples by gas chromatography-mass spectrometry, after solid-phase extraction and trimethylsilylation, *Microchemical Journal*, **99**(2011)125-131.

Slika 3.19. Schmidt, K., Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer, 2015.

Slika 3.20. Petronijević, M., Panić, S., Savić, S., Agbaba, J., Molnar Jazić, J., Milanović, M., Đurišić-Mladenović N., Characterization and application of biochar-immobilized crude horseradish peroxidase for removal of phenol from water, *Colloids and surfaces B*, **208**(2021)112038.

7. POPIS TABLICA

Tablica 3.1. Jurac Z., Otpadne vode, Veleučilište u Karlovcu, Karlovac, 2009. str. 63-91.