

UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA



Aleksandra Žurić

**Ispitivanje efikasnosti uklanjanja nitrata iz vodenih
rastvora primjenom hitozana**

MASTER RAD

Podgorica, 2025.

**UNIVERZITET CRNE GORE
METALURŠKO TEHNOLOŠKI FAKULTET
HEMIJSKA TEHNOLOGIJA**

**Ispitivanje efikasnosti uklanjanja nitrata iz vodenih
rastvora primjenom hitozana**

MASTER RAD

Podgorica, 2025.

PODACI I INFORMACIJE O MAGISTRANDU

Ime i prezime: Aleksandra Žurić

Datum i mjesto rođenja: 12.04.2000. godine, Podgorica

Institucija: Univerzitet Crne Gore - Podgorica

Osnovne studije: 2019. godine

Master studije: 2022. godine

INFORMACIJE O MAGISTARSKOM RADU

Naziv studija: Hemijska tehnologija

Naslov rada: Ispitivanje efikasnosti uklanjanja nitrata iz vodenih rastvora primjenom hitozana

Fakultet: Metalurško-tehnološki fakultet

UDK, OCJENA I ODBRANA MASTER RADA

UDK:

Datum prijave rada: 18.11.2024.god.

Datum prihvatanja teme: 09.12.2024. god.

Mentor: Prof. dr Milena Tadić

Komisija za ocjenu teme i podobnosti magistranda:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, predsjednik

Prof. dr Milena Tadić, vanredni profesor MTF-a, mentor

Prof. dr Irena Nikolić, redovni profesor MTF-a, član

Komisija za ocjenu rada:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, predsjednik

Prof. dr Milena Tadić, vanredni profesor MTF-a, mentor

Prof. dr Irena Nikolić, redovni profesor MTF-a, član

Komisija za odbranu radu:

Prof. dr Biljana Damjanović-Vratnica, redovni profesor MTF-a, predsjednik

Prof. dr Milena Tadić, vanredni profesor MTF-a, mentor

Prof. dr Irena Nikolić, redovni profesor MTF-a, član

Lektor: Autolektura

Datum odbrane: mart, 2025

IZJAVA O AUTORSTVU

Kandidat: Aleksandra Žurić

Na osnovu člana 22 Zakona o akademskom integritetu, ja, dolje potpisana

IZJAVLJUJEM

pod punom krivičnom i materijalnom odgovornošću da je master rad pod nazivom „***Ispitivanje efikasnosti uklanjanja nitrata iz vodenih rastvora primjenom hitozana***“ rezultat sopstvenog istraživačkog rada, da nisam kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica i da je navedeni rad moje originalno djelo.

Podgorica, 2025.godine

Potpis studenta

Zahvalnica

Zahvaljujem se svojoj mentorki, prof. dr Mileni Tadić, Vaša podrška, posvećenost i stručnost, su mi značile mnogo i doprinijele da ovaj rad izgleda upravo onako kako sam i zamislila.

Takođe, zahvaljujem se i članovima komisije prof. dr Ireni Nikolić i prof. dr Biljani Damjanović-Vratnica na konstruktivnim savjetima koji su doprinijeli da unaprijedim kvalitet svog rada.

Veliku zahvalnost dugujem mr Đini Perić iz Instituta za javno zdravlje Crne Gore, kao i spec. sci. hem. tehnol. Ani Vukčević iz Forenzičkog centra Crne Gore, koje su svojim angažmanom dale doprinos za izradu ove teze.

Ogromnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima i sestri Mariji. Bez vaše vjere u mene, motivacije i strpljenja, kojim ste me podsticali da izdržim sve izazove, nisam mogla da ostvarim svoj cilj. Vi ste moj nepresušni izvor snage i inspiracije.

Posebnu zahvalnost želim da iskažem svojoj sestri Anastasiji, koja je bila moj vjerni oslonac tokom cijelog akademskog usavršavanja. Tvoja podrška, pomoć, ohrabrenje, i ljubav imali su ključnu ulogu u mom napretku i uspjehu.

Takođe, želim da se zahvalim svim prijateljima i porodici koji su bili uz mene. Vaše prisustvo, razumijevanje i lijepa riječ značili su mnogo.

*Ovaj master rad posvećujem mom bratu Filipu! Svima koji misle da je nešto za tebe nemoguće
znaj- nebo je granica!*

Aleksandra Žurić

Izvod

Povećana poljoprivredna proizvodnja i ubrzana industrijalizacija doveli su do značajnog pogoršanja kvaliteta voda usled ispuštanja azotnih jedinjenja u vodene sisteme. Visoke koncentracije nitrata u vodi za piće mogu izazvati zdravstvene probleme. Tehnološki napredak u prečišćavanju otpadnih voda omogućio je razvoj efikasnih metoda za uklanjanje ovih zagađivača, uključujući adsorpciju.

Hitozan se ističe kao ekološki prihvatljiv adsorbens zahvaljujući svojim fizičko-hemijskim svojstvima, dostupnosti i biorazgradljivosti. Njegova sposobnost vezivanja nitrata potiče od prisustva amino i hidroksilnih grupa, koje omogućavaju jake interakcije sa negativno naelektrisanim nitratnim jonima.

Cilj istraživanja u ovom radu je bio da se ispita efikasnost primjene komercijalnog hitozana i laboratorijski sintetisanih varijanti hitozana, kao adsorbenata, za uklanjanje nitrata iz vodenih rastvora, pri različitom vremenu kontakta i dozi adsorbenta.

Rezultati su pokazali da se najveća efikasnost postiže u prvih 15–20 minuta, nakon čega dolazi do usporavanja procesa adsorpcije zbog zasićenja aktivnih mjesta. Komercijalni hitozan pokazao je stabilnije uklanjanje nitrata tokom cijelog eksperimenta u odnosu na laboratorijski dobijene hitozane. Sa povećanjem doze hitozana, raste i njegova sposobnost uklanjanja nitrata, pri čemu je najviša efikasnost zabilježena pri dozama od 5 mg i 7 mg, 44,3% i 45%, respektivno. Rezultati pokazuju da je komercijalni hitozan efikasniji adsorbent, dok laboratorijski hitozani imaju potencijal, ali uz moguću dodatnu modifikaciju.

Ključne riječi: otpadne vode, zagađenje, nitrati, hitozan, adsorpcija.

Abstract

Increased agricultural production and accelerated industrialization have led to a significant deterioration in water quality due to the discharge of nitrogen compounds into aquatic systems. High concentrations of nitrates in drinking water can cause health problems. Technological advancements in wastewater treatment have enabled the development of efficient methods for removing these pollutants, including adsorption.

Chitosan stands out as an environmentally friendly adsorbent due to its physicochemical properties, availability, and biodegradability. Its ability to bind nitrates originates from the presence of amino and hydroxyl groups, which allow strong interactions with negatively charged nitrate ions.

The aim of this study was to examine the efficiency of commercial chitosan and laboratory-synthesized chitosan variants, as adsorbents, for the removal of nitrates from aqueous solutions, considering different contact times and adsorbent doses.

The results showed that the highest efficiency is achieved in the first 15–20 minutes, after which the adsorption process slows down due to saturation of the active sites. Commercial chitosan showed more stable removal of nitrates during the entire experiment compared to laboratory-derived chitosans. With an increase in the dose of chitosan, its ability to remove nitrate also increases, with the highest efficiency recorded at doses of 5 mg and 7 mg, reaching 44.3% and 45%, respectively. The results indicate that commercial chitosan is a more efficient adsorbent, while laboratory-synthesized chitosan variants show potential but require further modification.

Key words: wastewater, pollution , nitrates, chitosan, adsorption.

Sadržaj

1. UVOD	10
2. TEORIJSKI DIO	11
2.2. Nitrati u otpadnim vodama	11
2.2.1. Nitrati kao pokazatelj kvaliteta voda	13
2.2.2. Izvori nitrata	14
2.3. Dejstvo nitrata na životnu sredinu i čovjeka	16
2.3.1. Eutrofikacija	16
2.3.2. Dejstvo nitrata na čovjeka	18
2.3.3. Dejstvo nitrata na životinje	19
2.4. Standardi i regulative za sadržaj nitrata u vodi	20
2.5. Postupci uklanjanja nitrata iz vode	22
2.5.1. Reverzna osmoza	22
2.5.2. Jonska izmjena	23
2.5.3. Elektrodijaliza	23
2.5.4. Biološka denitrifikacija	24
2.5.5. Adsorpcija	25
2.5.6. Primjena biopolimera za uklanjanje nitrata iz otpadnih voda	27
2.6. Hitozan	28
2.6.1. Istorija hitozana	28
2.6.2. Sastav, fizičko-hemijska i biološka svojstva hitozana	29
2.6.3. Dobijanje hitozana	35
2.6.4. Primjena hitozana	37
2.6.5. Primjena hitozana za prečišćavanje otpadnih voda	40
3. EKSPERIMENTALNI DIO	45
3.1. Priprema adsorbenta	45
3.2. Karakterizacija adsorbenta	49
3.3. Postupak adsorpcije u šaržnim uslovima	50
4. REZULTATI I DISKUSIJA	51
4.1. FTIR analiza	51
4.1.1. FTIR spektar komercijalnog hitozana	51
4.1.2. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana prvim postupkom	52

4.1.3. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana drugim postupkom	52
4.1.4. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana trećim postupkom	53
4.1.5. FTIR spektri hitozana nakon završenog procesa adsorpcije	54
4.2. Stepen deacetilacije hitozana	56
4.3. Uklanjanje nitrata iz vodenih rastvora hitozanom	57
4.3.1. Uticaj vremena kontakta na efikasnost uklanjanja nitrata	57
4.3.2. Uticaj doze adsorbenta na efikasnost uklanjanja nitrata	62
5. ZAKLJUČAK	65
6. LITERATURA	66

1. UVOD

Poljoprivredne aktivnosti, brza industrijalizacija i sve veće energetske potrebe u svijetu, uslovljavaju povećanje problema u pogledu pogoršanja kvaliteta voda i nestašice vode.¹ Kao posljedica navedenih aktivnosti dolazi do stvaranja i oslobađanja velikog broja zagađujućih materija u životnu sredinu. Prekomjernom upotrebom đubriva i intenzivnim razvojem industrije povećala se i količina azotnih jedinjenja, koja dopijevaju u vodene sisteme. Ova jedinjenja se u vodama nalaze uglavnom u tri oblika: amonijačnom, nitratom i nitritnom. Nitratni azot se javlja kao konačni proizvod lanca oksidativne transformacije azota: amonijačni azot - nitritni azot - nitratni azot.^{1,2}

Jedinjenja azota mogu izazvati velike ekološke probleme kao što su: eutrofikacija jezera i degradacija kvaliteta vode. Zbog svoje visoke rastvorljivosti, nitrati lako prodiru u zemljište, sve do podzemnih voda. Površinske vode, takođe, mogu biti zagađene nitratom iz istih razloga.³ Povećana koncentracija nitrata u vodi za piće može dovesti do methemoglobinemije, karcinoma želuca, poremećaja štitne žlijezde, citogenetskog defekta i gušavosti.⁴

Tehnološki napredak u oblasti prečišćavanja otpadnih voda je omogućio razvoj različitih metoda za uklanjanje azotnih jedinjenja, uključujući fizičko-hemijske i biološke postupke.⁵ U cilju smanjenja koncentracije nitrata koriste se razni tretmani kao što su: jonska izmjena, reverzna osomoza, adsorpcija. Tretman otpadnih voda zasnovan na adsorpciji je sve učestaliji u primjeni zbog veće efikasnosti, niskih troškova, jednostavnosti rada i raznovrsnosti dostupnih adsorbenata, kao što su organski adsorbenti, biosorbenti i neorganski adsorbenti.⁶

Hitozan se pokazao kao dobar adsorbent za prečišćavanje otpadnih voda zbog svojih fizičko-hemijskih osobina, dostupnosti, održivosti, ekonomske isplativosti, netoksične prirode, obnovljivosti, ekološke prihvatljivosti.^{6,7,8} Hitozan je linearni kopolimer koji se proizvodi deacetilacijom hitina. On sadrži veći broj primarnih amina ($-NH_2$), kao i hidroksilnih ($-OH$) grupa koje sadrže aktivna mjesta za efikasnu adsorpciju. Zbog svojih jedinstvenih svojstava, hitozan se koristi i kao: flokulant ili koagulant, agens za uklanjanje organohlorinih pesticida, teških metala, fluora, boja, mikroorganizama, nitrata, fenola i otpadnog ulja iz industrijskih i komunalnih otpadnih voda.^{6,7}

Cilj ovog rada je da se ispita efikasnost uklanjanja nitrata iz vodenih rastvora primjenom komercijalnog hitozana i laboratorijski dobijenog hitozana, kao ekološki prihvatljivih rešenja, kojima bi se postigla zaštita ljudskog zdravlja i životne sredine.

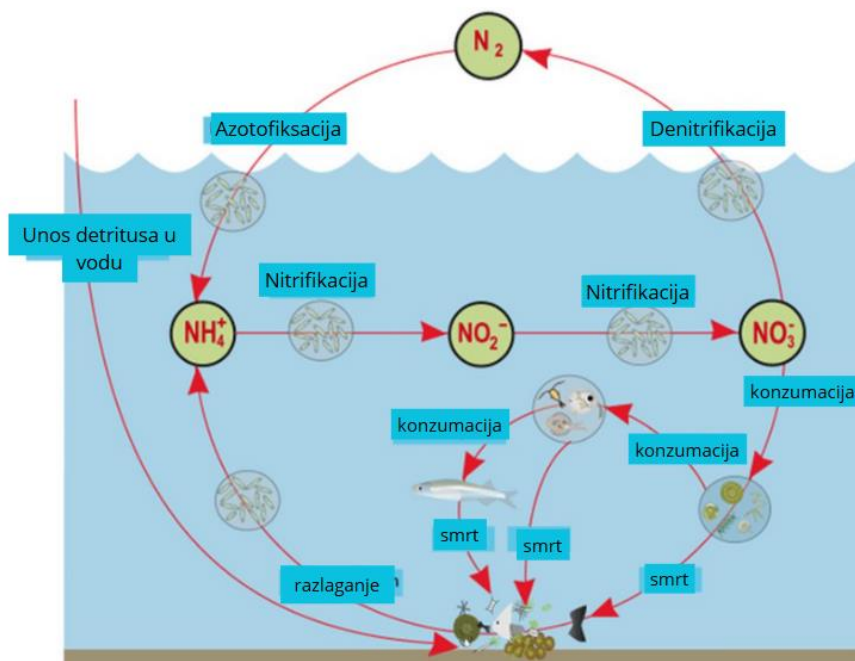
2. TEORIJSKI DIO

2.2. Nitrati u otpadnim vodama

Poljoprivredne aktivnosti, brza industrijalizacija i sve veće energetske potrebe u svijetu uslovljavaju pogoršanje kvaliteta voda i nestašice vode.⁹ U zemljama u razvoju 90% otpadnih voda se ispušta u lokalne rijeke i potoke bez prethodnog tretmana, ograničavajući snadbijevanje slatkom vodom.¹⁰ Intenzivna upotreba i nepravilno odlaganje proizvoda na bazi azota doprinose zagađenju podzemnih i površinskih voda. U vodi se azot može javiti u obliku amonijaka, nitrata i nitrita. Amonijak i nitrati se koriste u proizvodnji đubriva, fosilnih goriva i eksploziva.¹¹

Nitrati su joni veoma rastvorljivi u vodi. Oni čine sastavni dio azotnog ciklusa u prirodi (slika 1). Azotni ciklus je proces kruženja azota između atmosfere, vode i vodenih organizama. Azotni ciklus počinje azotofiksacijom gdje azot iz atmosfere, pod uticajem enzima nitrogenaze, prelazi u amonijumove jone. Ovaj proces obavljaju posebne bakterije, od kojih neke žive samostalno, dok druge žive u simbiozi s algama ili biljkama. Azotofiksacija se vrši bez kiseonika (anaerobno), jer kiseonik ometa enzim nitrogenazu, koji omogućava vezivanje azota. Jednom kada azot uđe u ekosistem, on se oslobađa razgradnjom mrtvih organizama i otpadnih materija kroz proces amonifikacije. Bakterije i gljive razlažu proteine i druge organske molekule, pri čemu se azot oslobađa u obliku amonijum jona, koji se može iskoristiti od strane biljaka i algi. Ako se amonijum ne iskoristi odmah, dolazi do nitrifikacije, procesa u kojem bakterije prvo pretvaraju amonijum u nitrite (NO_2^-), a zatim nitrite u nitrate (NO_3^-). Ovaj proces zahtijeva kiseonik i uglavnom se odvija u gornjim slojevima vode, gdje su aerobni uslovi povoljni.¹² U uslovima gdje nema dovoljno kiseonika, kao što su dublji slojevi vode ili mulj na dnu, dolazi do denitrifikacije. Ovaj proces omogućava bakterijama da koriste nitrate umjesto kiseonika, pri čemu se nitrati redukuju do gasovitog azota (N_2), koji se zatim vraća u atmosferu. Na taj način se sprečava prekomjerno nakupljanje azotnih jedinjenja u vodi, čime se smanjuje rizik od eutrofikacije. Pored denitrifikacije, u sredinama veoma siromašnim kiseonikom može se odvijati i disimilatorna redukcija nitrata, pri čemu se nitrati ne vraćaju u atmosferu već prelaze u amonijum jon. Ovaj proces omogućava određenim bakterijama, a prema novijim istraživanjima čak i nekim algama i gljivama, da prežive u ekstremnim uslovima, poput dna okeana ili močvarnog tla. Zahvaljujući azotnom ciklusu azot neprestano kruži u ekosistemu, čineći ga dostupnim za biljke i životinje, ali i sprečavajući njegov prekomjerni gubitak iz

vode.¹²



Slika 1. Prikaz azotnog ciklusa¹²

Nitrati u vodenj sredini predstavljaju rezultat različitih aktivnosti, uključujući prirodne i antropogene aktivnosti. Ostali izvori nitrata uključuju: hemijsku oksidaciju amonijaka, mikrobnu sintezu nitrata u zemljištu i sagorijevanje fosilnih goriva. Nitrati su zagađivači u vodi za piće, često prisutni u podzemnim vodama, u blizini postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda i industrija koje proizvode vatromet, oružje i eksplozive.¹³ Mnoge industrijske otpadne vode koje potiču iz: industrija prerade mesa, mliječnih proizvoda, rafinerija, proizvodnje đubriva i prerade sintetičkih vlakana, sadrže visok nivo nitrata. Sve veći problem na globalnom nivou, također, predstavlja i zagađenje voda nitratima intenzivnom upotrebom azotnih đubriva i neadekvatnim tretmanom otpadnih voda iz industrije.¹⁴

Poznati zdravstveni efekti prekomjernog unosa nitrata kod ljudi uključuju methemoglobinemiju, rak, probleme sa stomakom i gastrointestinalnim traktom, defekte pri rođenju, hipertrofiju štitne žlijezde.¹⁵ U zadnjih nekoliko godina ispitivane su koncentracije nitrata u podzemnim vodama na svjetskom nivou. Takvo jedno istraživanje naučnici Ortiz i drugi su prikazali u radu¹⁶ gdje je zapaženo da kada je riječ o zagađenim područjima, 30 regiona u Africi, 20 u Aziji i 9 u Evropi se nalaze u kritičnoj situaciji. Takođe, Evropa pokazuje najveći procenat regiona zagađenih sa više od 25% uzoraka iznad 50 ppm nitrata. Međutim,

podaci za Aziju ukazuju da na 45 regiona bez zagađenja nitratima, 19 područja ima zagađenje u najmanje 25% uzoraka. Zagađenje nitratima odgovorno je za gubitak 4% slatke vode u akviferima u mnogim razvijenim regionima, uključujući Sjedinjene Američke Države i Evropu. Istraživanja u Južnoj Africi, Kalahariju u Bocvani i Namibiji otkrila su koncentracije NO_3^- koje su bile od 14 do 500 mg/L u podzemnim vodama, što je uglavnom posledica upotrebe stajnjaka kao đubriva, kao i uginule stoke, prelivanja septičkih tankova i upotreba eksploziva na bazi amonijaka u rudarstvu.¹⁷

2.2.1. Nitrati kao pokazatelj kvaliteta voda

Osnovni parametri koji govore o kvalitetu vode su fizički, hemijski, mikrobiološki i biološki parametri.¹⁸ Tradicionalne metode procjene kvaliteta vode zasnivaju se na poređenju eksperimentalno određenih parametara sa lokalnim ili međunarodnim standardima. Međutim, nedostatak tradicionalnih metoda je to što ne omogućavaju lako praćenje globalnih promjena i razlika u kvalitetu vode, zbog čega je korišćenje indeksa kvaliteta vode postalo češće.¹⁹ Istraživanje koje je vršeno u Hodeidu¹¹, bavilo se indeksom kvaliteta vode (a indeks kvaliteta vode uključuju između ostalog nitrate). Istraživanjem su dobili vrijednosti indeksa kvaliteta vode koje ukazuju da je 75% podzemnih voda u istraživanom području bilo dobro za piće, dok su 25% bile vode lošeg kvaliteta. Kao zaključak predstavljeno je da kvalitet podzemnih voda u ispitivanom području u kategoriji dobrog-lošeg kvaliteta vode.¹⁹

Nitrati su značajan pokazatelj kvaliteta vode, jer mogu nastati pri razlaganju organskih materija koje sadrže azot ili dospjeti u vodu kroz ispiranje đubriva sa zemljišta. Sadržaj nitrata, kao neorganskih jedinjenja azota (NO_3^-), utiče na ekološke uslove, jer njihovo prisustvo može izazvati eutrofikaciju. Povećana koncentracija nitrata može ukazivati na zagađenje, što utiče na smanjenje rastvorenog kiseonika u vodi, čime se narušava ravnoteža vodenog ekosistema. Praćenje nivoa nitrata u vodi od esencijalne je važnosti za procjenu kvaliteta i ekološkog stanja vodenog sistema.²⁰

U jednom istraživanju sprovedenom u Kanadi, zbog prevelikog korišćenja azota na farmama, napravljen je i korišćen agroindikator. Ovaj indikator je korišćen kao indikator rizika od kontaminacije vode nitratnim azotom (Indicator of Water Contamination by Nitrogen - IROWC-N). Cilj indikatora bio je da poveže količinu rezidualnog azota u tlu sa klimatskim i zemljišnim uslovima, kako bi se procijenila vjerovatnoća kretanja azota kroz zemljište i njegov izlazak iz poljoprivrednog sistema u vodene resurse. Rezultati su pokazali da je količina azota

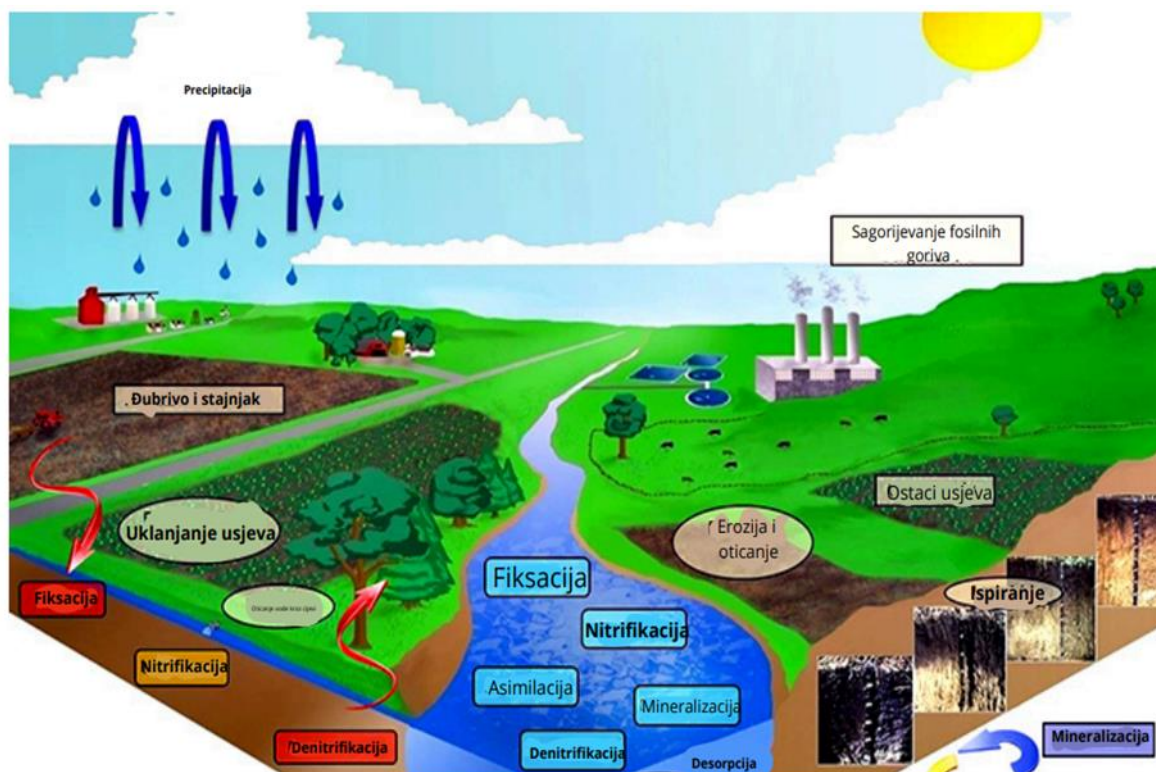
koja je ispirana iz zemljišta porasla sa 5,1 kg N/ha u 1991. godini na 6,4 kg N/ha u 2001. godini. Takođe, koncentracija nitrata u vodi povećala se sa 3,7 mg N/L u 1996. na 5,7 mg N/L u 2001. godini. Tokom 20 godina, oko 80% kanadskih poljoprivrednih površina bilo je u niskim rizicima, dok je 18% prešlo u viši rizik. Najveći rizici za kontaminaciju bili su u oblastima Manitobe, Ontarija i Kvebeka.²¹

2.2.2. Izvori nitrata

U biološkom ciklusu azota, azot postoji u različitim medijima (vazduhu, zemljištu i vodi) u različitim oblicima (npr. N_2 , NH_4^+ , NO_3^-), i oni mogu da se transformišu i međusobno djeluju.²² Azot nije samo esencijalni nutritijent, već i faktor koji utiče na ekosistem. Azot u obliku nitrata ulazi u vodu na različite načine, izazivajući štetne uticaje na vodu za piće i povećavajući rizik od bolesti. Takođe, nitrati mogu izazvati štetne efekte na vodene ekosisteme, kao što su: eutrofikacija vode, smrt vodenih životinja i biljaka i pogoršanje kvaliteta vode.²³

Zagađenje nitratima potiče od poljoprivredne djelatnosti, ali značajnu ulogu imaju i industrijski i komunalni otpaci (slika 2). Najčešća zagađenja nitratima su u oblastima intenzivne poljoprivrede, gdje se koriste mineralna đubriva, u blizini velikih stočnih farmi, koje postaju sve značajniji izvori azotnih jedinjenja. Nitratni azot se javlja kao konačni proizvod lanca oksidativne transformacije azota: amonijačni azot - nitritni azot - nitratni azot. Proces nitrifikacije, prelaz nitritnog azota u nitratni, traje kratko, može se usporavati ili ubrzavati u zavisnosti od temperature i hidrohemijskih faktora.²⁴

Nitrati se odlikuju dobrom rastvorljivošću u vodi i slabom adsorpcijom, pa mogu migrirati na velikim rastojanjima. Nitrati mogu poticati iz tačkastih (koncentrisanih) i netačkastih (difuznih) izvora zagađenja.¹⁵ Tačkasti izvori zagađenja nastaju usled slučajnog izlivanja supstanci bogatih azotom, nedostatka skladišta za stajnjak ili rezervoara za stajnjak u seoskim područjima. Primjeri tačkastih izvora uključuju mjesta sa velikim brojem stoke, septičke ili kanalizacione sisteme koji propuštaju vodu i mjesta gde se skladište hemikalije ili stajnjak.²⁵ Izvori vode kao što su nepokriveni bunari, bušotine, loše izgrađeni bunari i vrtače mogu biti izloženi tačkastom izvoru kontaminacije nitratom. Takođe, neadekvatni sistemi upravljanja otpadnim vodama u domaćinstvu mogu omogućiti stvaranje nitrata kroz oksidaciju u aerobnim uslovima i dospijevanje u podzemne vode.²⁶



Slika 2. Izvori zagađivanja voda nitratima²⁷

Netačkasti izvori zagađenja su difuzni tj. rasuti izvori i teško se mogu identifikovati. Široka primjena sintetičkih i organskih đubriva u poljoprivrednim aktivnostima jedan je od najčešćih netačkastih izvora nitrata (slika 2). Biljke ne mogu da iskoriste sav nitrat iz đubriva, zbog čega se nitrati akumuliraju u zemljištu. Kretanje nitrata u zemljištu je prirodan proces i nije uvijek štetan za okolinu. Međutim, prekomjerena upotreba đubriva i nepravilno upravljanje izvorima azota (nepravilno skladištenje stajnjaka ili nepravilno korišćenje đubriva) povećavaju brzinu ispiranja i veličinu kontaminacije podzemnih voda.²⁵

Koncentracija azotnih jedinjenja u industrijskim otpadnim vodama je veća od koncentracije u podzemnim i površinskim vodama. U ovoj vrsti otpadnih voda najproblematičnija jedinjenja azota su amonijak i nitrati. Amonijak u industrijskim otpadnim vodama se uklanja nitrifikacijom koja se postiže potpunom oksidacijom amonijaka do nitrata. Uklanjanje nitrata iz određenih vrsta industrijskih otpadnih voda je neizbježan korak u njihovom tretmanu.²⁴ Efluenti iz industrija koje proizvode: eksplozive, đubriva, pektin, celofan, sadrže više od 1000 mg NO_3^-/L . Prerada radioaktivnih metalnih proizvoda u postrojenjima za proizvodnju nuklearnog oružja i istraživačkim laboratorijama, produkuje otpadne vode koje sadrže više od 50.000 mg NO_3^-/L , koji prvenstveno potiče iz azotne kiseline koja se koristi za čišćenje

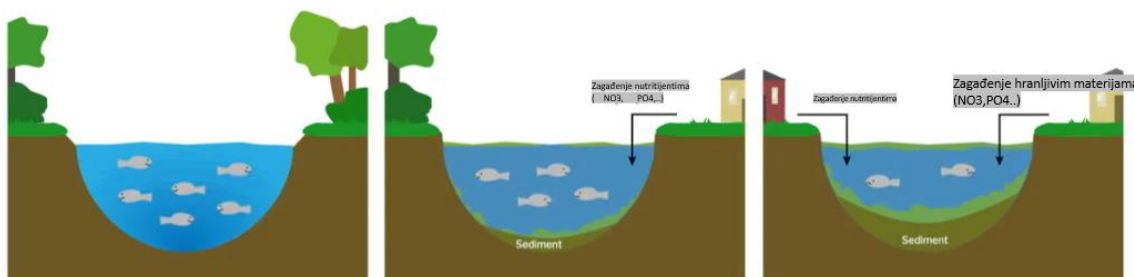
metala.²⁸

2.3. Dejstvo nitrata na životnu sredinu i čovjeka

Nitrati (NO_3^-) i amonijum joni (NH_4^+) su glavne forme azota dostupne biljkama u zemljištu. Zbog svog pozitivnog naelektrisanja, amonijum jon ima vrlo slabu pokretljivost u negativno naelektrisanim zemljištima. Međutim, kretanje nitrata u zemljištu je šest puta intenzivnije nego kretanje amonijuma.²⁹ Postoji niz faktora koji mogu uticati na akumulaciju i kretanje preostalih NO_3^- u zemljištu. Među faktorima, količina i vrijeme primjene đubriva, raspored navodnjavanja i procesi obrade zemljišta su najvažniji u redosledu njihove akumulacije. Prekomjerna primjena azota u zemljištu može dovesti do velikih koncentracija NO_3^- , koja ispiranjem uslovljava kontaminaciju vode. Ispiranje nitrata povećava se u toku perioda visokih padavina ili obimnog navodnjavanja. Prekomjerna količina nitrata u vodi može dovesti do ozbiljnih posledica kako na životnu sredinu, tako i na živi svijet. Jedinjenja azota mogu izazvati velike ekološke probleme kao što su: eutrofikacija jezera i degradacija kvaliteta vode.³⁰ Povećana koncentracija nitrata u vodi za piće može dovesti do: methemoglobinemije, karcinoma želuca, poremećaja štitne žlijezde, citogenetskog defekta i gušavosti.³¹

2.3.1. Eutrofikacija

Tokom poslednje dvije decenije antropogeni uticaj na sadržaj nutrijenata se povećao na Zemljinoj površini i u atmosferi. Porast hranljivih materija može dovesti do neželjenih promjena u strukturi i funkciji ekosistema tj. do eutrofikacije. Višak nitrata je ozbiljan ekološki problem koji pogoršava kvalitet vode u jezerima, močvarama i rijekama. Eutrofikacija predstavlja problem uzrokovan prekomjernim rastom vodenih biljaka usled velike dostupnosti nutrijenata. Na slici 3 je prikazan uticaj eutrofikacije nakupljanjem sedimenta u jezeru i smanjivanju njegove dubine tokom vremena.³²



Slika 3. Uticaj eutrofikacije na jezero ³³

Nitrati dospijevaju u površinske vodene ekosisteme kroz prirodne procese kao što su: erozija, površinsko oticanje i interakcija podzemnih i površinskih voda. Od tih procesa, oticanje i erozija doprinose najvećem dijelu nitrata u vodenim ekosistemima. Zbog prekomjerne dostupnosti nutrijenata, fitoplanktona i alge u vodama rastu prekomjerno, što dovodi do nedostatka rastvorljivog kiseonika koji je potreban za rast vodenih vrsta.³⁴ Kao negativna posledica eutrofikacije javlja se "cvetanje algi", pojava koja se javlja prekomjerenim razmnožavanjem jedne ili više vrsta algi (slika 4). Nedostatak kiseonika utiče na rast riba i drugih vrsta u vodenom ekosistemu, uključujući biljke. Zbog prenatrpanosti algi, stopa uginuća biljaka i riba se povećava, čini vodu neprikladnom za bilo koju namjenu zbog lošeg mirisa i ukusa. Problem se povećava ako alge proizvode biotoksine koji mogu uticati i na morske organizme i ljude ako se voda koristi za urbano vodosnadbijevanje.³⁵



Slika 4. Eutrofikacija i pojava cvjetanja algi u vodi ³⁶

2.3.2. *Dejstvo nitrata na čovjeka*

Određene koncentracije nitrata i nitrita se mogu naći i u hrani kao što je: povrće, rakovi, meso. Povrće poput zelene salate, spanaća, cvekla i celera sadrži relativno velike koncentracije nitrata, dok su koncentracije nitrita obično veoma niske. Nitrati i nitriti se dodaju kao konzervansi u hranu, kao što je suhomesnato meso, zbog čega se potrošači izlažu većim zdravstvenim rizicima. Nitrati i nitriti predstavljaju opštu zabrinutost za javno zdravlje, posebno sa aspekta methemoglobinemije i kancerogenih bolesti.³¹

Svjetska zdravstvena organizacija procijenila je dnevni unos nitrata i nitrita ishranom u različitim zemljama. U većini evropskih zemalja, srednji unos nitrata je oko 10–30 mg/dan. Vegetarijanci obično imaju dva do četiri puta veći unos nitrata nego nevegetarijanci. U Indiji se procjenjuje da 20 do 50% bunara u oblastima velike gustine naseljenosti proizvodi vodu čiji je nivo nitrata iznad 50 mg/L, što je veliki rizik po zdravlje. A voda za piće može ukazivati na ozbiljne potencijale za zagađenje i takođe može dovesti do ozbiljnih zdravstvenih problema.³⁷

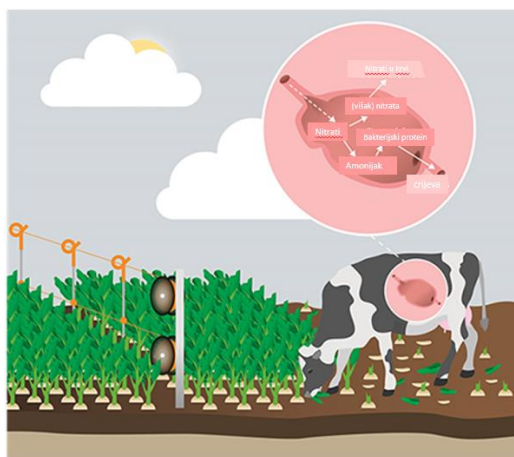
*Terblanche (1991)*³⁸ je sumirao zdravstvene opasnosti od nitrata u vodi za piće u mnogim razvijenim zemljama, uključujući Južnu Afriku. Od oko 219 miliona ljudi koji koriste vodu za piće putem sistema javnog vodosnadbijevanja u Sjedinjenim Državama, približno 1,7 miliona je izloženo nivoima nitrata iznad 10 mg/L. Otprilike dvije trećine izloženih (1,1 milion) opslužuju javni vodovodni sistemi koji koriste izvore snadbijevanja podzemnom vodom. Skoro 27 000 beba godišnje je izloženo vodi iz česme sa nivoom nitrata koji prelazi 10 mg/L.³⁸

Glavna zabrinutost zbog izloženosti nitratima je akutna toksičnost koju izaziva methemoglobinemija. Krv ima smanjen transport kiseonika putem hemoglobina do tkiva u tijelu, proizvodeći simptome nedostatka kiseonika kako se nivo methemoglobina povećava. Niske koncentracije methemoglobina se javljaju kod zdravih osoba. Smatra se da koncentracije do 5% nisu štetne i mogu dostići i do 10% bez kliničkih znakova. Znaci i simptomi povezani sa povećanjem nivoa methemoglobina su: centralna cijanoza udova ili trupa, depresija centralnog nervnog sistema, koma, aritmija, šok i konvulzije. Methemoglobinemija nosi visok rizik od smrtnosti u koncentracijama većim od 60%. Individualna osjetljivost na formiranje methemoglobina može varirati u zavisnosti od brzine konverzije nitrata u nitrit, nedostatka glukoza-6-fosfat dehidrogenaze ili nivoa methemoglobin reduktaze. Kod zdravih ljudi, pH želuca je generalno nizak, što smanjuje rast bakterija koje redukuju nitrate, pa je nivo nitrita u želucu nizak.³⁹

Istraživanja u Koloradu (Sjedinjene Američke Države) pokazala su značajne povezanosti između dijabetesa melitusa tipa 1 (koji zavisi od insulina) i koncentracije nitrata u vodi za piće, posebno kod djece uzrasta od 1 godine do 18 godina.⁴⁰ Takođe, utvrđena je povezanost između nitrita, nitrata i nitrozamina u hrani, a uočena je u grupi ljudi koji su imali ishranu sa visokim koncentracijama nitrata u Švedskoj.⁴¹ Takođe, ista povezanost je prijavljena u Finskoj. Međutim, u ovoj studiji, izloženost nitratu je prijavljena kao slaba.^{10,21} Takođe, nije primijećen značajan rizik kod djece sa dijabetesom, koja su bila izložena nitratima u 594 zaliha vode za piće u Škotskoj i djelovima centralne Engleske. Ova studija je obuhvatila 886 i 1376 engleske i škotske djece mlađe od 15 godina koja su identifikovana kao ljudi zaraženi ovom bolešću između 1986. i 1990. godine. Mjesečne prosječne koncentracije nitrata su prijavljene u vodi za piće od 22,94 i 2,07 mg/L u Škotskoj, Engleskoj, respektivno, u istom periodu.⁴² Slične studije u Holandiji i Italiji takođe su pokazale da ne postoji veza između različitih koncentracija nitrata i nitrita u vodi za piće i dijabetes melitusa tipa 1 zavisnog od insulina. Rezultati pomenutih istraživanja su pokazali da su podaci ograničeni i da postoje kontradiktornosti u ovoj oblasti, pa je u cilju postizanja sveobuhvatne i definitivne dijagnoze odnosa nitrata, nitrita i nitrozamina u organizmu i dijabetes melitusa, potrebna odgovarajuća procjena.^{43,44}

2.3.3. *Dejstvo nitrata na životinje*

Štetan uticaj na zdravlje životinja javlja se zbog visokog unosa nitrata kroz vodu ili kroz biljke koje konzumiraju (slika 5).



Slika 5. *Prikaz unosa nitrata u životinjski organizam*⁴⁵

Methemoglobinemija, je takođe, zabilježena kod životinja, naročito kod preživara, zbog njihove sposobnosti da pretvaraju nitrate u nitrite, a zatim u amonijak i bakterijske proteine pomoću mikroorganizama. Nitrit može izazvati methemoglobinemiju kod: krava, ovaca, svinja, pasa, štakora, pilića i ćuraka. Nivo toksičnosti zavisi od vrste i od stope konzumacije nitratom zagađene vode i hrane. Klinički simptomi akutnog trovanja nitratima kod goveda su: depresija, respiratorna teškoća i ubrzan rad srca. Ostali simptomi uključuju bolove u stomaku, dijareju, mišićnu slabost ili lošu koordinaciju, promjenu boje krvi sa crvene na braon ili čokoladnu boju, smanjen unos hrane i ometanje metabolizma vitamina A i E.⁴⁶ Trovanje nitratima kod životinja nastaje kada pojedu hranu bogatu nitratima (u višku od 0,35 do 0,45% nitrata u ishrani). Takođe, trovanje nitratima uneseno vodom se dešava kada je nivo nitrata do 1500 mg/ml.⁴⁷ Dugotrajno izlaganje koncentraciji nitrata od 10 mg/L može negativno uticati na slatkovodne beskičmenjake, ribe i vodozemce. Toksičnost nitrata izaziva promjene u plivanju, usporavanje rasta i na kraju smrt kod vodenih organizama. Kod riba izaziva histopatološke promjene na škragama, jednjaku i mozgu.⁴⁸

2.4. Standardi i regulative za sadržaj nitrata u vodi

U posljednje vrijeme, emisije hranljivih materija i pesticida postali su glavni uzroci zagađenja vode za piće i vodenih ekosistema širom Evrope i svijeta.⁴⁹ Poljoprivreda predstavlja glavni izvor emisije hranljivih materija i pesticida, ali postoje i drugi izvori zagađenja, poput komunalnih i industrijskih otpadnih voda.²⁴

Nitrati su u vodi prisutni u obliku jona, a povećanje njihove koncentracije može imati štetne efekte na ljudsko zdravlje i prirodu. U površinskim vodama, koncentracije nitrata ispod 1 mg/L smatraju se normalnim, dok koncentracije do 5 mg/L obično ukazuju na minimalno ljudsko dejstvo. Stoga, koncentracije nitrata iznad 5 mg/L u površinskim vodama mogu ukazivati na zagađenje spoljnim izvorima. Spoljni izvori mogu biti odlivi iz poljoprivrede (đubriva i stajnjak) ili industrijski otpad.⁴⁹

Za svaku zemlju postoje maksimalno dozvoljene koncentracije (MDK) za nitrate u vodi, koje su utvrđene zakonskom regulativom. Zbog toga je Evropska komisija razvila zakone za članice Evropske unije i druge zemlje, za zaštitu vode u cilju očuvanja resursa za buduće generacije, uključujući Okvirnu direktivu o vodama. Prirodni procesi poput nitrifikacije mogu dovesti do povećanja koncentracije nitrata u vodi do 20 mg/L. Dok su koncentracije nitrata i amonijaka u površinskim vodama obično niske, nivo nitrata u otpadnim vodama iz postrojenja za prečišćavanje može doseći do 30 mg/L, dok je dozvoljena vrijednost nitrata u vodi za piće 50 mg/L.⁴⁹

Za postizanje dobrog ekološkog i hemijskog statusa vodenih tijela, Okvirna direktiva o vodama (2000/60/EC) postavlja ciljeve za smanjenje koncentracije hranljivih materija kako bi se spriječila eutrofikacija. Cilj ove Direktive je da se spriječi i smanji zagađenje, promoviše održivo korišćenje vode, zaštiti i poboljša vodeni ekosistem, i ublaže posljedice poplava i suša. Glavni cilj je da se postigne dobar kvalitet voda.⁴⁹

Direktiva o nitratima (91/676/EC) ima za cilj sprječavanje i smanjenje zagađenja voda hranljivim materijama iz poljoprivrede. Direktiva o nitratima nalaže državama članicama da izrade i sprovedu odgovarajuće programe monitoringa kako bi ocijenile uspješnost svojih akcija. Države su obavezane da prate koncentraciju nitrata u površinskim vodama bar jednom mjesečno, a češće tokom poplava, kao i da prate koncentraciju nitrata u podzemnim vodama u redovnim intervalima, uzimajući u obzir odredbe Direktive 80/778/EE (Direktiva o kvalitetu vode za ljudsku potrošnju).⁴⁹ Monitoring treba da se ponovi barem svake četiri godine, osim u slučajevima kada su nivoi nitrata u svim prethodnim uzorcima bili ispod 25 mg/L i kada nisu nastali novi faktori koji bi povećali nivo nitrata, u tom slučaju monitoring se ponavlja svake osme godine. Takođe, države članice su obavezane da provjeravaju stanje eutrofikacije svojih slatkovodnih i priobalnih voda svakih četiri godine. Iako Direktiva o nitratima ne daje precizne smjernice u vezi sa eutrofikacijom, Direktiva o otpadnim vodama (91/271/EEC) zahtijeva smanjenje ispuštanja fosfora i azota iz postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda u područjima osjetljivim na eutrofikaciju.⁴⁹

U Italiji, ispuštanje otpadnih voda u površinske vode propisano je zakonskom regulativom koja zahtijeva da koncentracije nitrita i nitrata budu ispod 0,6 mg/L, odnosno 20 mg/L, dok je nivo nitrata u otpadnoj vodi koja se ispušta u kanalizaciju 30 mg/L.⁵⁰

U Sjedinjenim Američkim Državama, prema Zakonu o sigurnosti vode za piće (Safe Drinking Water Act), Agencija za zaštitu životne sredine (USEPA) reguliše maksimalne dozvoljene koncentracije nitrata i nitrita u vodi za piće, koje su postavljene na 10 mg/L za nitrate (u obliku azota) i 1 mg/L za nitrite.⁵¹ U Sjedinjenim Američkim Državama, prirodne koncentracije nitrata u podzemnim vodama obično se kreću od 4 do 9 mg/L, dok su koncentracije nitrita do 0,3 mg/L.⁵² U Sjedinjenim Američkim Državama, između 1991. i 2003. godine, testiran je ukupno 5101 bunar, pri čemu je više od 4% imalo nivoe nitrata veće od limita koji je postavila Agencija za zaštitu životne sredine (Environmental Protection Agency), koji iznosi 10 mg/L. Više od 75% uzoraka uzetih iz površinskih i podzemnih voda u Kaliforniji imalo je nivoe nitrata iznad dozvoljenog nivoa prema Svetskoj zdravstvenoj organizaciji (World Health Organization), što je uticalo na više od 275.000 ljudi. U istom periodu, u Južnoj Koreji, prosječna koncentracija nitrata u podzemnim vodama oblasti Gimpo bila je 79,4 mg/L, što je mnogo veće od dozvoljenog limita.¹³

2.5. Postupci uklanjanja nitrata iz vode

Povećana koncentracija nitrata dovodi do smanjenja rastvorljivog kiseonika, vrlo niske transmisije svjetlosti, smanjenja biodiverziteta i povećane proizvodnje fitoplanktonskih cvjetova. Ove promjene nastaju kada nivo koncentracije nitrata pređe dozvoljeni nivo. Srednji proizvod nastao iz nitrata je diazot-monoksid, koji ima veći potencijal za izazivanje globalnog zagrijavanja. Pored industrije, nitrata obično formira i atmosfera i životna sredina kroz proces azotnog ciklusa. Postoji nekoliko konvencionalnih tehnologija za smanjenje ili uklanjanje nitrata iz vode, kao što su: reverzna osmoza, jonska izmjena, elektrodijaliza, adsorpcija i biološka denitrifikacija.⁵³

2.5.1. Reverzna osmoza

Reverzna osmoza je fizički proces koji koristi polupropusne membrane. Voda prolazi kroz polupropusnu membranu pod pritiskom, omogućavajući molekulima vode da prođu, zadržavajući većinu rastvorenih materijala. Može se koristiti za uklanjanje više zagađivača istovremeno (jona, čestica i organskih jedinjenja). Korišćenjem sistema visokog pritiska može se postići efikasnost prečišćavanja vode do 85 procenata, ali ovaj sistem zahtijeva veliku potrošnju energije.⁵⁴

Reverzna osmoza je jedan od najskupljih tretmana vode i isplativa je samo ako je potražnja za vodom veoma niska. Reverzna osmoza zahtijeva pažljiv pregled karakteristika sirove vode i prethodnu obradu kako bi se spriječilo degradiranje membrane. Predtretman se sastoji u uklanjanju suspendovanih čvrstih materija iz vode. Svako postrojenje za prečišćavanje koje koristi ovaj sistem treba da obezbijedi pH posle tretmana i prilagođavanje alkalnosti za stabilizaciju vode.⁵³ Sistemi reverzne osmoze su obično visoko automatizovani i mogu se koristiti skoro svuda, bez obzira na obuku operatera. Učestalost zamjene i čišćenja membrane uslovljena je karakteristikama sirove vode. Potrebno je periodično čišćenje membrana koje se koriste u procesu reverzne osmoze. Za čišćenje membrana koriste se kisele supstance koje imaju ulogu uklanjanja zagađivača uskladištenih na membranama.⁵⁵ Nakon čišćenja, tretirana voda se koristi za njihovo čišćenje i vraćaju se u rad. Vremenom, degradacija membrane će dovesti do postepenog smanjenja njihove efikasnosti i membrana će morati da se zamijeni novom. Životni vijek membrane varira od 5 do 20 godina. Kao rezultat procesa, potrebno je odložiti prilično veliku zapreminu koncentrisanog toka (15-50 % početne zapremine vode). Pošto ima veoma visoku koncentraciju rastvorenih supstanci, posebno

solu, potrebno je tretiranje ovog toka prije nego se ispusti u kanalizacioni sistem. Upravljanje ostatkom koji je rezultat procesa reverzne osmoze uslovljeno je supstancama rastvorenim u koncentratu. Karakteristike sirove vode utiču na kvalitet koncentrata i time snažno utiču na troškove neophodne za bezbjedno uklanjanje koncentrata iz životne sredine i zdravlja ljudi koji nastaje reverznom osmozom.⁵³

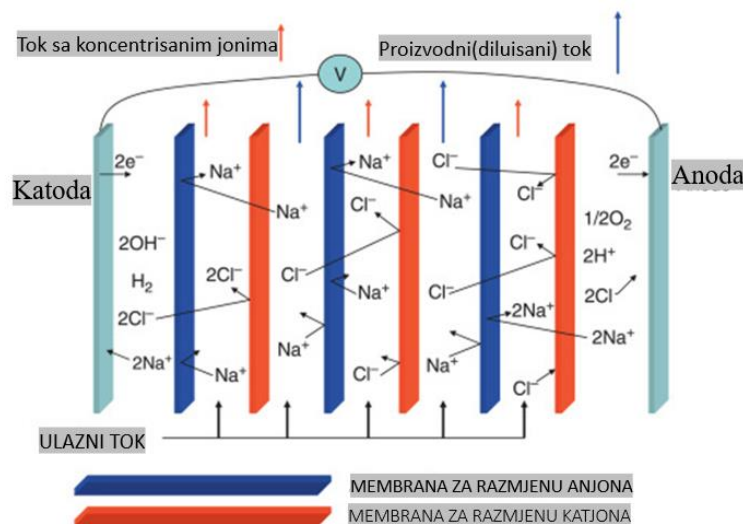
2.5.2. Jonska izmjena

Jonska izmjena se definiše kao zamjena jona vezanog za inertnu matricu drugim jonom. U zavisnosti od prirode izmijenjenih jona, procesi izmjene mogu biti: anjonska izmjena i katjonska izmjena. Jonski izmjenjivači su zrnaste, nerastvorljive supstance čija molekularna struktura sadrži bazične radikale ili kiseline koje mogu razmjenjivati negativne ili pozitivne jone sa tečnošću sa kojom su dovedeni u kontakt. U procesu jonske izmjene, ukupan broj jona u tečnosti ostaje nepromijenjen.⁵⁶ Upotreba jonskih izmjenjivača je efikasan i ekonomičan metod za smanjenje nitrata iz vode namijenjene za ljudsku upotrebu. Metoda obezbjeđuje kontrolu procesa, lako se automatizuje i na njega ne utiče temperatura u uobičajenom radnom opsegu. Metoda jonske izmjene se posebno koristi za postrojenja za prečišćavanje vode malih i srednjih kapaciteta.⁵⁴ Proces smanjenja nitrata uz pomoć jonske izmjene sličan je omekšavanju vode, ali se razlikuje po upotrebi polimernih smola.⁵⁴ Različiti faktori, kao što su: početna koncentracija nitrata, ukupni rastvoreni čvrsti materijali, regeneratori, tip smole i drugi joni, određuju efikasnost uklanjanja nitrata. Sprovedena istraživanja su pokazala da pri početnoj koncentraciji nitrata od 25 mg/L i ukupno rastvorenih čvrstih materija (total dissolved solids - TDS) od 400 mg/L, efikasnost uklanjanja nitrata bila je 99,8%, dok je za početnu koncentraciju nitrata između 18-25 mg/L, TDS od 530 mg/L i koncentraciju sulfata od 43 mg/L, efikasnost uklanjanja nitrata bila između 45-60%.⁵³

2.5.3. Elektrodijaliza

Elektrodijaliza je efikasan i fleksibilan proces redukcije nitrata. Ovaj proces se može uporediti sa reverznom osmozom zbog brzine redukcije nitrata. Zbog visokih troškova, elektrodijaliza je proces koji se ne koristi široko u tretmanu vode. Pogodan je za tretman malih količina vode. U procesu tretmana vode, elektrode se ubacuju u zapreminu vode i između elektroda se primjenjuje jednosmjerna ili pulsirajuća struja, što dovodi do elektrodijalize vode.⁵³ U procesu elektrodijalize, joni migiraju kroz selektivne polupropusne membrane kao rezultat električno naelektrisanih

površina membrane (slika 6). Za punjenje membrane koriste se pozitivna elektroda (katoda) i negativna elektroda (anoda). Nitratni joni se kreću kroz membranu do anode. Nastavljajući do anode, nitratni jon se odbija od strane nepropusne membrane za jonsku razmjenu i zadržava se u recirkulisanoj struji koncentrata.⁵⁷



Slika 6. Prikaz funkcionisanja elektrodijalize⁵⁸

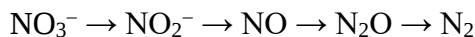
2.5.4. Biološka denitrifikacija

Biološki procesi su relativno noviji procesi koji se primjenjuju u tretmanu voda sa visokom koncentracijom nitrata. U poređenju sa drugim postojećim procesima, biološka denitrifikacija je efikasnija i jeftinija metoda, kojom se vrši redukcija nitrata u gasoviti azot uz pomoć denitrifikujućih bakterija.⁵³ Na osnovu iskorišćene hrane i izvora energije, bakterije su klasifikovane u dvije glavne kategorije, nazvane heterotrofne i autotrofne. Heterotrofnim denitrifikujućim bakterijama je potreban izvor organskog ugljenika za disanje. Ako se u vodi ne rastvori dovoljne količine organskog ugljenika, mogu se koristiti dodatne supstance kao što su metanol i etanol.⁵⁹

U cilju proučavanja efikasnosti denitrifikacije podzemnih voda korišćenjem etanola kao izvora ugljenika, sproveden je eksperiment na Tehnološkom institutu u Haifi.⁵⁴ Rezultati su potvrdili teorijske vrijednosti količina etanola koje se koriste za denitrifikaciju azota, odnosno utvrđeno je da je odnos između količine etanola koji koriste bakterije i količine redukovano azota jednak 0,5.⁵⁴

Redukcija nitrata u bezopasni azot u posebnim anaerobnim uslovima osnovni je princip

biološke denitrifikacije.⁶⁰ Nitrati se koriste kao terminalni akceptor elektrona u respiratornom procesu bakterija. Redukcija nitrata do azota odvija se u četiri koraka, kako je prikazano u jednačini⁶¹:



Fakultativni anaerobi obavljaju biološku denitrifikaciju, koja može biti organskog ili neorganskog porijekla. Heterotrofi i autotrofi su dvije glavne grupe denitrifikatora. Razlika između njih leži u načinu dobijanja supstanci koje koriste kao izvor energije: heterotrofi za to koriste organske supstance, dok autotrofi koriste neorganske supstance. Stopa denitrifikacije zavisi od vrste i koncentracije ugljen-dioksida, kao i odnosa ugljenik-nitrat.⁵³

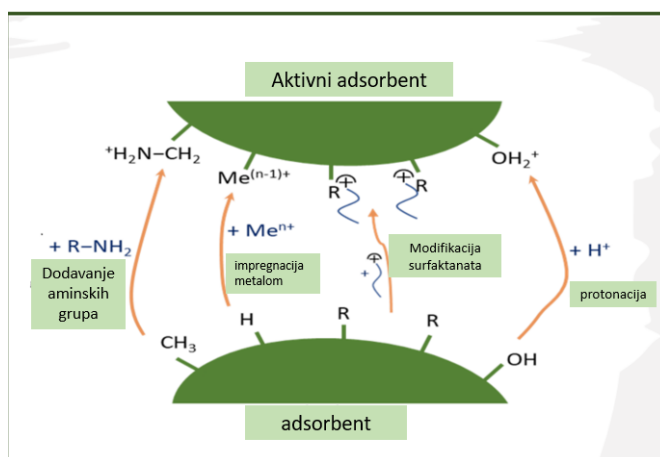
2.5.5. Adsorpcija

Proces adsorpcije je široko primjenjivan za uklanjanje zagađivača u vodenim sistemima kao posledica njegove tehničke izvodljivosti, jednostavni rada, pristupačnih troškova i mogućnosti upotrebe više adsorbenata različite prirode. Veličina čestica adsorbenta utiče na kapacitet adsorpcije, kao i specifična površina i struktura pora. Prisustvo grupa koje se lako jonizuju na površini adsorbenta će takođe povećati njegov adsorpcioni kapacitet.⁵³ Hemijske i fizičke karakteristike adsorbata (veličina molekula, polaritet, sastav i rastvorljivost), takođe određuju da li se on snažno ili slabo zadržava na površini adsorbenta. Specifične karakteristike nitratnih jona kao što su njihovo negativno naelektrisanje, veličina jona, gustina naelektrisanja i prisustvo nesparenih elektrona na atomima kiseonika su ključni faktori koji utiču na primjenljivost datog adsorbenta.⁶² Jonska snaga, temperatura i pH medijuma su, takođe, ključni parametri procesa adsorpcije. Proces adsorpcije je testiran za uklanjanje nitrata iz zagađenih voda sa širokim spektrom adsorbenata, uključujući granulirani aktivni ugalj, zeolite, sepiolit, slojevite dvostruke hidrokside, hitozan, leteći pepeo i druge biosorbente i biougljeve.⁶³

U cilju smanjenja otpada i očuvanja resursa, primjenjuje se ponovna upotreba i prerada biomase (organskog otpada) koji potiče iz poljoprivrede i industrija, koristeći tehnologije koje su ekološki prihvatljive i koje promovišu održivo upravljanje resursima. Postoje mnoge studije koje predlažu da se ovaj otpad transformiše u vrijedan sorbent koji će se koristiti za uklanjanje nitratnih jona iz vodenih sistema.⁵⁴

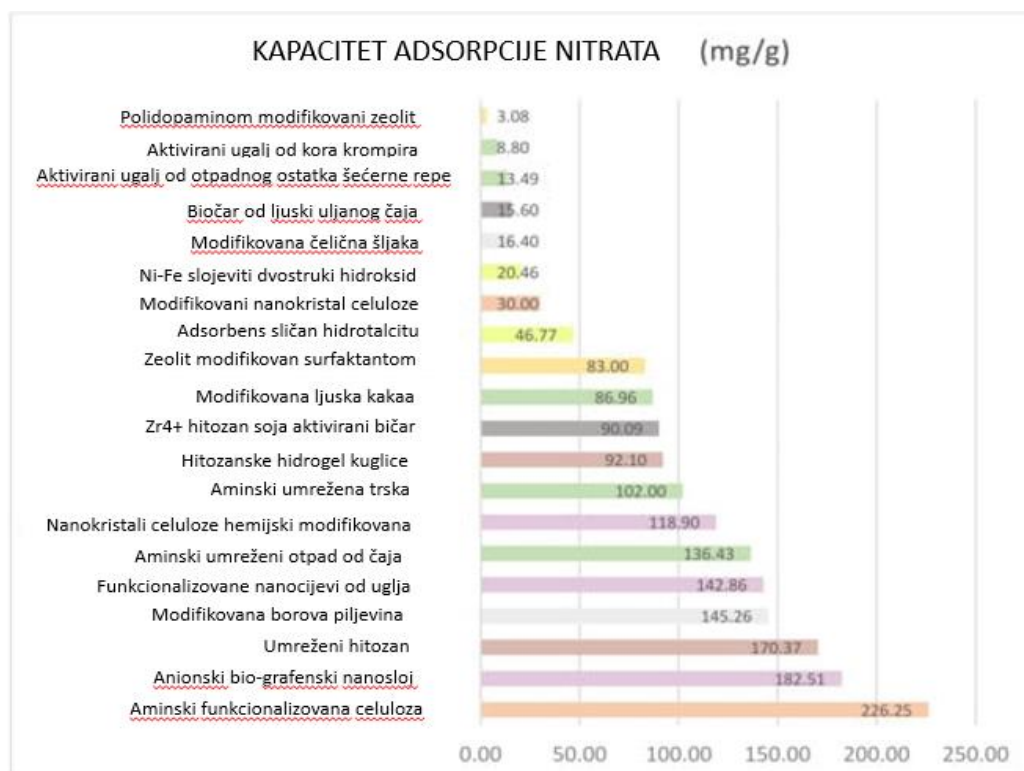
Nanomaterijali su nedavno otkriveni kao odlična alternativa konvencionalnim sorbentima za uklanjanje nitrata jer zbog svoje izuzetno male veličine čestica imaju veliku specifičnu površinu, a samim tim i veći kapacitet sorpcije.⁶⁴ Konvencionalni adsorbenti, generalno,

nemaju velik kapacitet adsorpcije, ali mogu biti podvrgnuti površinskim modifikacijama ili aktivacijama, kako fizičkim tako i hemijskim, kako bi se značajno povećala efikasnost njihove primjene. Ovi procesi aktivacije (slika 7) zavise od prirode adsorbata, a u slučaju nitratnih jona, kao najefikasniji procesi su se pokazali: protonacija, kalemljenje aaminskih grupa, impregnacija metalima ili metalnim oksidima ili ugradnja katjonskih surfaktanata.⁶⁴ Takođe je utvrđeno da se jednostavnom toplotnom obradom adsorbenta u nekim situacijama postiže značajna aktivacija njegovog kapaciteta zadržavanja nitrata, posebno u slučaju slojevitih dvostrukih hidroksida.⁶⁵



Slika 7. Šematski prikaz površinske funkcionalizacije adsorbenata⁶⁵

Mehanizam adsorpcije nitrata zavisi od strukture, hemijskog sastava i površinskih svojstava adsorbenata i uslova adsorpcije. U zavisnosti od situacije, nitrat može biti fiksiran za adsorbent elektrostatičkim interakcijama, kompleksiranjem, jonskom izmjenom i/ili vodoničnim vezom. Drugi anjoni prisutni u vodi, koji imaju tendenciju da se vezuju za reaktivnu površinu adsorbenta, će smanjiti njegovu efikasnost uklanjanja nitrata. Različiti adsorbenti različitog porijekla uklanjaju nitratne jone iz vode.⁶⁵ Na slici 8 prikazan je kapacitet adsorpcije nitrata primjenom određenih adsorbenata.



Slika 8. Kapaciteti adsorpcije nitrata od strane odabranih adsorbenata⁶⁵

Prikazani podaci za kapacitet adsorpcije (slika 8) odnose se na adsorbente koji su aktivirani jednom od pomenutih metoda modifikacije i aktivacije, jer sirovi adsorbenti ne pokazuju značajan kapacitet adsorpcije, zbog specifične prirode nitratnih jona. Uočen je disparitet u vrijednostima, u rasponu od 3 mg/g (zeolit modifikovan polidopaminom) do čak 225 mg/g (celuloza funkcionalizovana aminom).⁶⁵

2.5.6. Primjena biopolimera za uklanjanje nitrata iz otpadnih voda

Mnogi sintetički polimeri uglavnom potiču iz nafte i uglja kao sirovina, što ih čini ekološki neprihvatljivim jer je proces njihove razgradnje složen, dugotrajan i često dolazi do nastanka vrlo toksičnih materija. S obzirom na ekološke posledice povezane sa polimerima na bazi nafte (poli butilen-naftalat-PBN), prirodni biopolimeri, koji potiču iz biomase, mogu se smatrati rešenjem za postepeno zamjenjivanje PBN-ova, rešavanje potencijalnih izazova i prevazilaženje postojećih problema u vezi sa PBN-ovima. Biopolimeri imaju značajne prednosti u odnosu na PBN-ove u pogledu manjih troškova sirovina, ekološke prihvatljivosti i jednostavnosti za korisnike.⁶⁶

Biopolimeri su prirodni polimeri koji nastaju iz obnovljivih prirodnih izvora ili se biosintetizuju od strane živih organizama. Kao najpoznatiji biopolimeri koji se koriste u tretmanu otpadnih voda su: celuloza, lignin, hitin, hitozan i drugi. Biopolimeri i njihovi kompoziti su široko primjenjivani kao koagulanti, flokulanti, adsorbenti, za izradu membrane i fotokatalitički agensi za uklanjanje teških metala, boja, prirodnih organskih materija i drugih zagađivača iz vode.⁶⁷

Danas derivati hitozana i hitina privlače veliku pažnju kao efikasni bioadsorbenti zbog niske cijene i visokog sadržaja amino i hidroksilnih funkcionalnih grupa koje pokazuju značajan adsorpcioni potencijal za uklanjanje različitih zagađivača iz vode.⁶⁶

2.6. Hitozan

2.6.1. Istorija hitozana

Istorija hitina i hitozana započinje prvim izveštajima o izolovanju hitina iz 1811. godine, kada je francuski profesor Henri Brakono izvršio ispitivanje na jestivim gljivama (*Agaricus volvaceus*, *A. acris*, *A. Cantarellus*, *A. piperatus*, *Hydnum repandum*, *H. hybridum* i *Boletus viscidus*). Ispitivanjem je pronašao polisaharid koji se sastojao od hitina i glukana, nazvan fungin.⁶⁸ Augustin Odijer je 1823. godine nerastvorljivu supstancu koju je izolovao iz egzoskeleta insekata nazvao hitin. Hitozan je prvi put pomenut davne 1859. godine, kada je francuski fiziolog Čarls Ruže prvi put opisao deacetilaciju hitina. On je za deacetilaciju koristio koncentrovani kalijum-hidroksid. Istraživanjem je došao do otkrića da je dobijena supstanca rastvorljiva u kiselim rastvorima, što je suprotno od prirode hitina. Međutim, tek nakon 35 godina, deacetilovani hitin dobija naziv hitozan, koji je dao njemački fiziolog i hemičar Feliks Hoper-Sajler.⁶⁸ On je tretiranjem ljuski rakova, insekata i škorpija, kalijum-hidroksidom na 180 °C, otkrio hitozan. Početkom 1930. godine, Ramelbergova istraživanja dokazala su specifična svojstva hitozana dobijena iz hitina, posebno iz školjki, rakova i gljiva. Tokom 1950-ih godina, naučnici su unaprijedili proučavanje hitina i hitozana u gljivama rendgenskom analizom, infracrvenom spektroskopijom i enzimskom analizom. Prva monografija o hitinu i hitozanu pojavila se 1951. godine.⁶⁹

Početkom 1960-ih godina, istraživanja o hitozanu su bazirana na njegovu sposobnost da se veže za crvena krvna zrnca. Smatra se sredstvom za zaustavljanje krvarenja. Takođe, zbog osobina hitozana je, krajem 1970-ih godina, izazvao naučnu i industrijsku pažnju u: Sjedinjenim Američkim Državama, Koreji, Kini, Kanadi, Norveškoj, Australiji, Francuskoj, Ujedinjenom

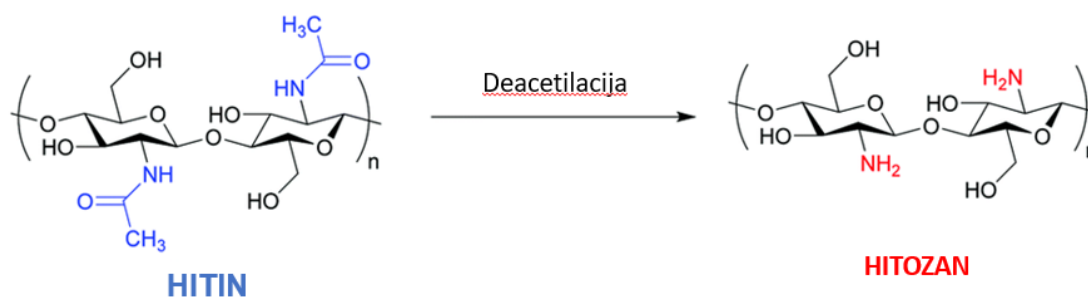
Kraljevstvu, Poljskoj i Njemačkoj. Od 1980-ih godina Japan je postigao značajan napredak u primjeni biopolimera, u komercijalizaciji i tehnologiji dobijanja. Primjenu hitozana, naučnici su počeli da istražuju u 20. vijeku i otkrili njegove specifične osobine. Povećano interesovanje za hitozan doprinosi njegovo porijeklo iz obnovljivih izvora (hitina), što ga čini relativno jeftinim i lako dostupnim. Netoksičan je i biorazgradiv, što ga čini ekološki prihvatljivijim u odnosu na većinu sintetičkih polimera. Već tri decenije, hitozan se koristi u postrojenjima za prečišćavanje vode.⁶⁸

2.6.2. Sastav, fizičko-hemijska i biološka svojstva hitozana

Hitozan je prirodni polimer ugljenih hidrata koji se dobija deacetilacijom hitina. Hitin je biopolimer sastavljen od 2-acetamido-2-deoksi-D-glukopiranoze. Izlaganjem hitina dejstvu deacetilacije jakim alkalnim rastvorima transformiše se u hitozan. Hitozan posjeduje amino grupe (nalaze se na C2-poziciji) i hidroksilne grupe (nalaze se na C3 i C6-poziciji), koje daju hidrofilnost i katjonska svojstva u kiselim uslovima. Hidroksilne i amino grupe omogućavaju mu formiranje kovalentne veze, različitim reakcijama, koja utiče na njegovu rastvorljivost.⁷⁰ Hitozan je N-deacetilovani derivat hitina koji se proizvodi promjenom acetamidnih grupa u primarne amino grupe. Reaktivne grupe u hitozanu se lako hemijski modifikuju, mijenjajući mehaničke i fizičke osobine. Kristalnost, viskoznost u vodi, količina nerastvorenih nečistoća, sadržaj suve materije i sadržaj pepela su sekundarni analizirani parametri, a zavise od: porijekla, metode deacetilacije i ekstrakcije hitina. Fizičko-hemijske karakteristike hitozana su: rastvorljivost, stepen deacetilacije, viskoznost i molekularna masa.⁷¹

Hitin, hitozan, oligosaharidi i njihovi derivati imaju mnoge biološke aktivnosti: antitumorske, antimikrobne, antioksidativne. Biološka svojstva hitozana su: biokompatibilnost, netoksičnost i biorazgradivost.⁷¹

Hemijska formula hitozana je $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$. Hitozan je po hemijskom sastavu poli- $[\beta-(1 \rightarrow 4)$ -N-acetil-D-glukozamin], a on je kopolimer D-glukozamina i N-acetil-D-glukozamina dobijen iz N-deacetilovanog hitina. Hemijska reakcija formiranja hitozana prikazana je na slici 9. Nakon deacetilacije hitina, u strukturi hitozana ostaje slobodna aminska grupa.⁷²



Slika 9. Hemijska reakcija formiranja hitozana⁷³

Rastvorljivost

Rastvorljivost hitozana je jedna od njegovih najbitnijih osobina. Grupa -NH_2 u hitozanu određuje njegovu rastvorljivost u kiselim rastvorima, jer je njegova pK -a vrijednost 6.5. Kada je oko 50% svih amino grupa protonisano, hitozan postaje rastvorljiv. Rastvorljivost hitozana zavisi od nekoliko faktora: molekulske težine polimera, stepena deacetilacije, pH, temperature i kristalne strukture polimera. Homogena deacetilacija hitozana omogućava proizvodnju polimera koji su rastvorljivi u vodenim rastvorima sirćetne kiseline sa stepenom deacetilacije nižim od 28%, dok ova vrijednost nikada nije dostignuta kod heterogene deacetilacije. Razlog tome je što homogena deacetilacija dovodi do povećanja broja glukozaminskih jedinica i modifikacije kristalne strukture polimera. U zavisnosti od stepena deacetilacije polimera, ove modifikacije variraju od smanjenja veličine kristala i savršenstva kristala do prisustva nove kristalne strukture koja je slična β -hitozanu.⁷⁴

Viskoznost

Viskoznost hitozana u kiselim rastvorima određuju: stepen deacetilacije, jonska jačina, molekulska masa, koncentracija hitozana, pH i temperatura rastvarača. Sa povećanjem temperature rastvarača, viskoznost opada. Takođe, proces može biti poremećen promjenom pH rastvora, zavisno od kiseline koja se koristi kao rastvarač. Viskoznost se može koristiti za određivanje stabilnosti polimera u rastvoru, jer se smanjenje viskoznosti opaža tokom čuvanja polimera usled degradacije.⁷⁵ Na primer, viskoznost hitozana rastvorenog u rastvoru sirćetne kiseline raste sa smanjenjem pH. Visoka koncentracija i stepen deacetilacije povećavaju viskoznost, dok visoka temperatura smanjuje viskoznost.⁷⁶

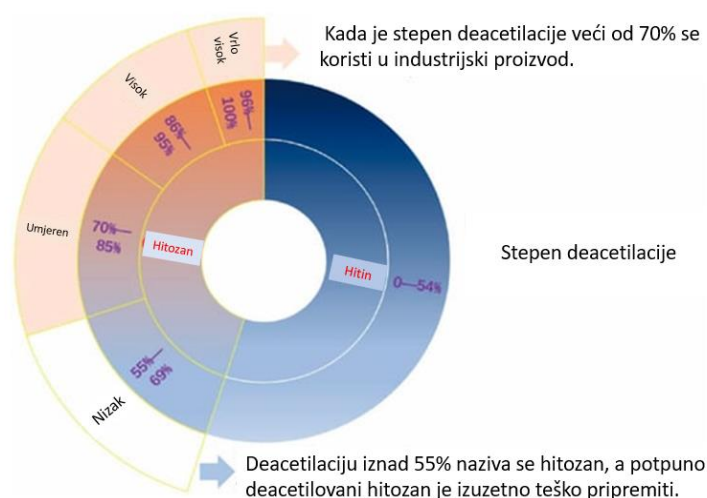
Molekulska težina

Molekulska težina utiče na fizičko-hemijska i biološka svojstva hitozana. U zavisnosti od izvora materijala, od načina njegove pripreme i ekstrakcije, molekulska težina hitozana varira. Hitozan se može klasifikovati kao hitozan visoke, srednje ili niske molekulske težine. Rastom molekulske težine, hitozan postaje viskozniji i manje rastvorljiv. Molekulska težina hitozana utiče na njegovu efikasnost kao polimernog flokulanta. Što je veća relativna molekulska težina, to je manja rastvorljivost. Hitozan se može rastvarati u razblaženoj kiselini, a u vodi nije rastvorljiv.⁷⁷

Proces deacetilacije hitozana izaziva promjene u molekularnoj masi. U procesu proizvodnje, relativna molekulska masa hitozana obično se izražava vrijednošću viskoznosti, a proizvodi sa različitim viskoznostima imaju različite namjene. Hitozan se koristi kao ljepljiva supstanca zbog svoje visoke molekulske mase i linearne strukture.⁷⁴

Stepen deacetilacije

Stepen deacetilacije predstavlja broj deacetilovanih glukozaminskih jedinica u odnosu na ukupan broj glukozaminskih jedinica. Step en deacetilacije ima veliki uticaj na: rastvorljivost, viskoznost, kristalnost, kapacitet jonske razmjene i flokulaciju hitozana. Hitozan sa više od 55% N-acetil grupa može se rastvoriti u 1% rastvoru sirćetne kiseline, a stepen deacetilacije se kreće od 60% do 100% zbog različitih uslova pripreme. Hitozan sa više od 70% stepena deacetilacije može se koristiti kao industrijski proizvod. Na slici 10 su prikazani standardi klasifikacije stepena deacetilacije hitozana.⁷⁴



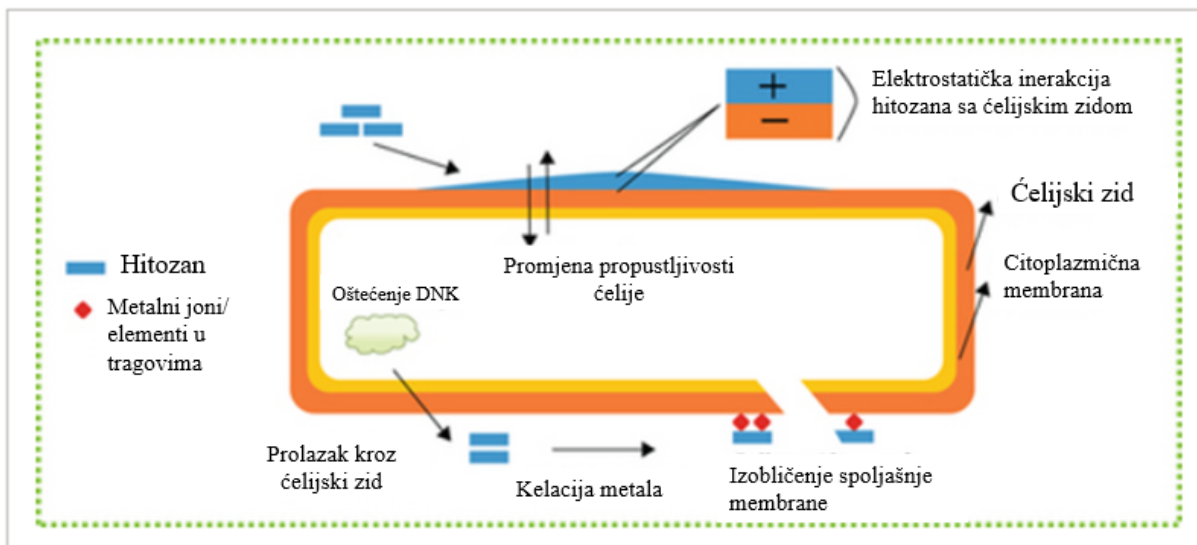
Slika 10. Standard klasifikacije stepena deacetilacije hitozana⁷⁴

Priprema hitozana sa visokim stepenom deacetilacije je važna u procesu razvoja hitozanskih proizvoda, jer stepen deacetilacije može odrediti rastvorljivost hitozana, a takođe je i preduslov za njegovu hemijsku i funkcionalnu modifikaciju. Povećanjem stepena deacetilacije povećavaju se slobodne amino grupe na molekularnom lancu i bolja je rastvorljivost u kiselini. Elastičnost lanca hitozana se mijenja promjenom stepena deacetilacije.⁷⁸ Hitozan sa visokim stepenom deacetilacije i niskom molekularnom masom i viskoznošću obično mora biti dalje hidrolizovan i degradiran. Testom rendgenske difrakcije, sa povećanjem stepena deacetilacije, rendgenski difrakcioni pik postaje oštiri i kristaliničnost je izraženija.⁷⁹

Antimikrobna svojstva

Antimikrobna svojstva hitozana u velikoj mjeri zavisi od stepena deacetilacije, molekulske težine, viskoznosti polimera i koncentracije polimera. Hitozan i njegovi derivati pokazuju antibakterijsku aktivnost protiv različitih mikroorganizama, kao i bakterije, gljive i kvasce. Mehanizam antibakterijske aktivnosti još uvijek nije potpuno razjašnjen. Međutim, predložene su različite hipoteze, pri čemu se većina mehanizama naslanja na polikationske osobine hitozana (slika 11).⁸⁰ Prvi predloženi mehanizam je da hitozan izaziva permeabilnost ćelijske membrane i inducira curenje unutarćelijskih komponenti usled interakcije sa anjonskim komponentama ćelijske membrane, što na kraju dovodi do smrti ćelije. Drugi mogući

mehanizam je penetracija hitozana kroz ćelijsku membranu, nakon čega se veže za DNK, što inhibira replikaciju DNK i na kraju dovodi do smrti ćelije.⁸⁰



Slika 11. Antimikrobni mehanizam hitozana⁸⁰

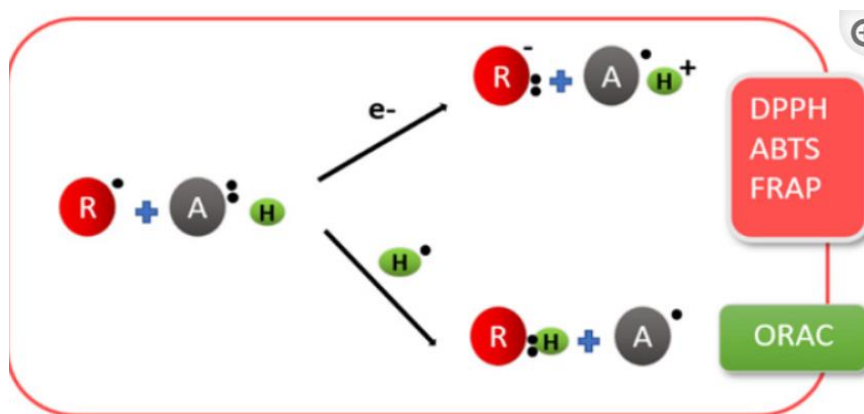
Hitozan takođe ima efekat inhibicije rasta jer ima veliku sposobnost da kreira komplekse sa različitim metalnim jonima, kao što su: Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} i Cu^{2+} , kada je pH vrijednost veća od pKa. Hitozan može da inhibira rast mikroba i formiranjem gustog polimernog filma na površini ćelije, sprečavajući unos nutrijenata i kiseonika. Takođe, hitozan pokazuje visoku efikasnost protiv patogenih mikroorganizama pri niskim dozama.⁸⁰

Antioksidativna svojstva

Antioksidansi privlače veliko interesovanje zbog povezanosti između oksidativnog stresa i različitih bolesti kao što su: Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Huntingtonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza i rak. Takođe, oksidativni stres je povezan sa komplikacijama kod drugih bolesti poput dijabetesa.⁸¹

Hitozan sadrži amino i hidroksilne grupe koje mogu reagovati sa slobodnim radikalima, pokazujući sposobnost njihovog uklanjanja. Neki derivati hitozana, poput hitozan sulfata ili N-2-karboksietil-hitozan, pokazali su poboljšanu antioksidativnu aktivnost. Različite metode su korišćene za određivanje antioksidativne aktivnosti hitozana i njegovih derivata: DPPH (2,2-

difenil-1-pikrilhidrazil-hidrat), ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzo-tiazolinske-6-sulfonske kiseline) i FRAP (ferična antioksidativna moć) testove, testove za uklanjanje peroksida i hidroksilnih radikala. DPPH i ABTS testovi bazirani su na prenosu elektrona i H atoma, dok se FRAP test bazira na reakciji prenosa elektrona, kao što je prikazano na slici 12. ORAC (kapacitet apsorpcije radikala kiseonika) test je takođe široko korišćen za ispitivanje antioksidativne aktivnosti.⁸²



Slika 12. Metode za ispitivanje antioksidativnih osobina hitozana⁸²

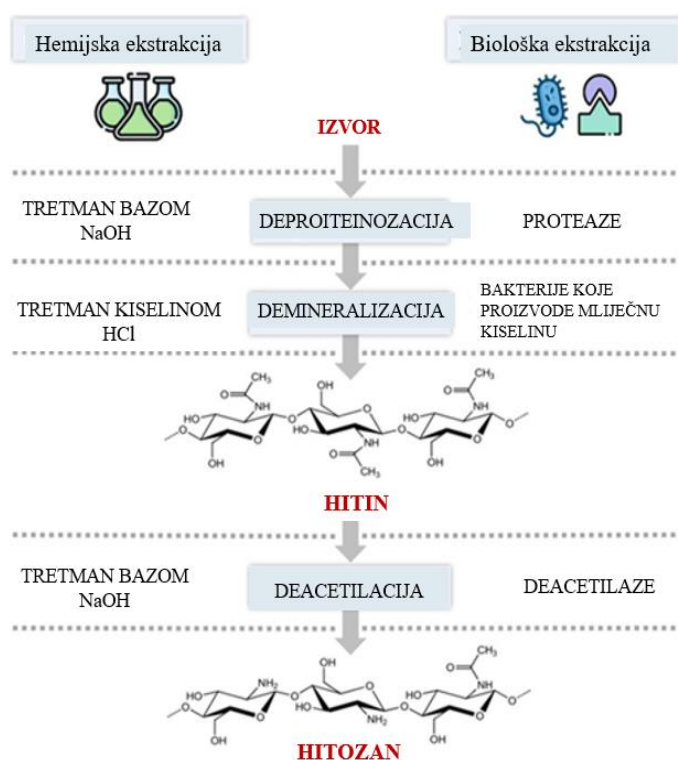
Razlike između testiranih polimera i metoda korišćenja za testiranje aktivnosti proizvode značajne razlike u koncentracijama polimera koje se kreću od 50 µg/mL do 400 mg/mL. Antioksidativna aktivnost je izraženija za uzorke niske molekulske težine u poređenju sa uzorcima visoke molekulske težine, jer kraći lanci formiraju manje intramolekularne vodonične veze, a reaktivne grupe su pristupačnije, doprinosi aktivnosti uklanjanja radikala. Povećanjem stepena acetilacije antioksidativna aktivnost opada.⁸²

Anti-inflamatorna svojstva

Inflamatorni proces je automatski fiziološki odgovor tijela na oštećenje tkiva. Glavni cilj inflamatornog odgovora je da dovede cirkulišuće leukocite i plazmatske proteine do mjesta infekcije ili oštećenja tkiva, kako bi eliminisao uzročnika, ako je moguće, i započeo proces liječenja. Iako je inflamacija neophodna za preživljavanje, kada je previše ozbiljna, nije u stanju da eliminiše uzročnika ili je usmjerena protiv domaćina, inflamatorni proces može izazvati oštećenje. Inflamatorni proces je usko povezan sa generacijom slobodnih radikala. Ova aktivnost je izraženija kada je molekulska težina hitozana smanjena.⁸³

2.6.3. Dobijanje hitozana

Otpad od rakova, škampa, školjki i gambora su primarni izvori biomase za industrijsku proizvodnju hitina i hitozana. Hitozan se takođe može proizvoditi iz insekata, ploča kostiju lignji i mikroorganizama. Ekstrakcija hitozana iz hitina sastoji se od četiri osnovna koraka: demineralizacija, deproteinizacija, dekolorizacija i deacetilacija (slika 13). Hitozan se može dobiti hemijskom i biološkom metodom.⁸⁴



Slika 13. Dobijanje hitozana⁸⁴

➤ Proizvodnja hitozana hemijskom metodom

Glavni koraci u proizvodnji hitozana uključuju ekstrakciju i prečišćavanje hitozana iz egzoskeleta rakova, škampa, gambora, gljiva i drugih morskih životinja. Glavne faze dobijanja hitozana su: demineralizacija, deproteinizacija i deacetilacija, dok proces dekolorizacije je optimalan i zavisi od pigmenata koji se nalaze u jedinjenju.⁸⁵

Deproteinizacija je prvi korak za dobijanje hitozana pri čemu dolazi do razaranja hemijskih

veza između hitina i proteina. Ovaj proces se obavlja korišćenjem hemikalija koje takođe depolimerišu biopolimer. Pri deproteinizaciji se koriste supstance: NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaHSO₃, Na₃PO₄ i Na₂S. U ovom koraku najčešće se koristi NaOH i primjenjuje se u koncentracijama od 0,125 do 5,0 M pri različitim temperaturama (do 160 °C) i različitim vremenom trajanja tretmana (od nekoliko minuta do nekoliko dana). Pored deproteinizacije, upotreba NaOH neizbježno dovodi do djelimične deacetilacije hitina i hidrolize biopolimera, što smanjuje njegovu molekulsku masu.⁸⁴

Demineralizacija se sastoji u uklanjanju minerala, prvenstveno kalcijum-karbonata. Demineralizacija se vrši kiselinama (HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH i HCOOH). Međutim, u istraživanjima se najčešće koristi razblažena hlorovodonična kiselina. Demineralizacija se lako postiže jer uključuje dekompoziciju kalcijum-karbonata u rastvorljive kalcijumove soli uz oslobađanje ugljen-dioksida.⁸⁶

Deacetilacija je proces uklanjanja acetilne grupe iz hitina, čime se hitin pretvara u hitozan. Upotreba baza je najčešći način deacetilacije hitina, jer su poznate glikozidne veze osjetljive na kiselinu. Proces se obično vrši tretiranjem hitina koncentrisanim NaOH ili KOH rastvorima (40-60%), obično 30 minuta na temperaturama od 80-140 °C ili višim.⁸⁴ Deacetilacija se može vršiti heterogeno ili homogeno. U heterogenoj deacetilaciji, hitin se tretira vrućim koncentrovanim rastvorom NaOH, a hitozan se proizvodi kao nerastvorljiv ostatak. U homogenoj deacetilaciji, hitin se tretira vrućim koncentrovanim rastvorom NaOH, a hitozan se proizvodi kao rastvorljiv ostatak, a zatim se rastvara u drobljenom ledu na oko 0 °C. Homogena deacetilacija dovodi do hitozana sa acetilnim grupama ravnomjerno raspoređenim duž lanaca. Iako potpuna eliminacija acetil grupe još nije dokazana, ponovljena upotreba NaOH na hitinu može dovesti do deacetilacije do 98%. Efikasnost procesa zavisi od više faktora, uključujući koncentraciju NaOH, temperaturu reakcije i vrijeme. U zavisnosti od metode i vrste koja se koristi, stepen deacetilacije obično se kreće između 56% i 99%.⁸⁵

➤ *Proizvodnja hitozana biološkom metodom*

Biološka metoda dobijanja hitozana može se vršiti na dva načina: enzimska metoda i metoda fermentacije. Enzimska metoda dobijanja hitozana je slična hemijskoj metodi. Međutim, značajna razlika je da se u ovoj metodi koriste enzimi: papain, tripsin, alkalaze i pepsin u koracima deproteinizacije i demineralizacije. Posle deproteinizacije i demineralizacije vrše se dodatne faze poput inaktivacije enzima i centrifugiranje. Korak centrifugiranja je važan jer se prilikom njega odvaja protein u supernatantu od hitozana u talogu. Nakon centrifugiranja

dobijeni talog se ispira vodom, etanolom ili acetonom, kako bi se dobio čist hitozan.⁸⁷

Supernatant podliježe dekolorizaciji aktivnim ugljem, zatim se filtrira, vrši proces neutralizacije (NaOH) i liofilizuje, čime se dobijaju proteinski hidrolizati. Dobijeni hidrolizati mogu proizvoditi peptide. Fermentacijska metoda koristi različite mikroorganizme poput *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* i druge. U ovoj metodi, otpad od rakova se prvo sakuplja i melje. Nakon toga, samljevena supstanca se miješa sa destilovanom vodom i odgovarajućim izvorom ugljenika, a zatim podliježe inkubaciji na 37 °C sa odgovarajućim mikroorganizmima radi fermentacije.⁸⁵ Nakon inkubacije od 2-3 dana, filtracija se koristi za odvajanje filtrata koji sadrži proteine. Preostali materijal se prikuplja i većinom sadrži hitin. Nakon pranja, hitin se deacetiluje da bi se dobio hitozan. U procesu fermentacije, jedinjenja koja proizvode fermentirajući mikroorganizmi odgovorna su za demineralizaciju otpada od rakova. U fermentaciji mliječne kiseline, mliječna kiselina koju proizvode bakterije reaguje sa kalcijum-karbonatom iz otpada rakova, stvarajući kalcijum laktat. Kalcijum laktat se zatim lako uklanja pranjem. Međutim, deproteinizacija otpada hitozana u fermentacijskoj metodi se uglavnom dešava putem autolize.⁸⁸

2.6.4. Primjena hitozana

Hitozan i derivati hitozana, zbog svojih hemijskih i bioloških karakteristika, su našli primjenu u mnogim oblastima: medicini, biomedicini, farmaciji, kozmetologiji, industriji hrane, poljoprivredi, tekstilnoj i papirnoj industriji, biotehnologiji, hemiji. Takođe, hitozan kao biopolimer se primjenjuje u procesu prečišćavanja vode, tretmanu otpadnih voda, sanaciji i dehidrataciji mulja. Danas, veoma su aktivna istraživanja u oblasti elektrohemijskih senzora, bio-slikanja, biokatalize, jonskih tečnosti, zelenih rastvarača, lijepkova i deterdženata. Vodeće zemlje za proizvodnju hitina i hitozana su: Japan, Sjedinjene Američke Države, Koreja, Kina, Kanada, Norveška, Australija, Francuska, Ujedinjeno Kraljevstvo, Poljska i Njemačka.⁸⁹

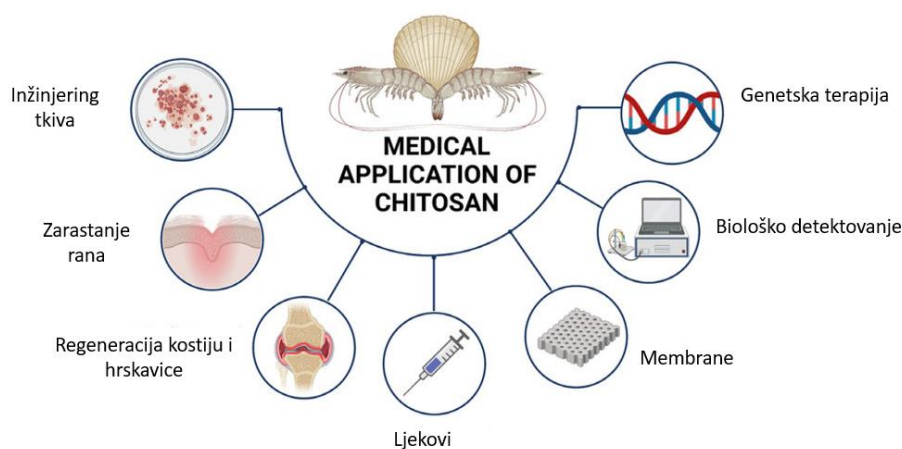
➤ Primjena hitozana u industriji hrane

U industriji za preradu hrane za procese kao što su: zgušnjavanje, geliranje, emulgiranje i mućenje, koriste se polisaharidi zbog svojih svojstava. Istraživanjem je potvrđeno da se hitozan može koristiti u industriji prerade hrane.⁹⁰ Takođe, hitozan je efikasan za dehidrataciju suspendovanih muljeva koji nastaju biološkom obradom otpada iz industrije piva i konzerviranja povrća. U 2016. godini, istraživači su najavili razvoj hitozanske folije koja

udvostručava rok trajanja nekih namirnica. Materijal je pored hitozana sadržao ekstrakt sjemena grejpfruta. Sjeme grejpfruta ima antibakterijska, antifungalna, antioksidativna, antiseptička i antitransmisijska svojstva. Ova plastika može koristiti sirove sastojke koji bi inače bili odbačeni. Folija se nakon odlaganja biorazgrađuje.⁹¹

➤ *Primjena hitozana u medicini*

Hitozan ima dobra biofarmaceutska svojstva: osjetljivost na pH, biokompatibilnost i niska toksičnost. Hitozan može da se metabolizuje od strane određenih ljudskih enzima, posebno lizozoma, a zatim se biorazgrađuje. U poslednjim godinama, zbog povoljnih svojstava, interesovanje za hitozan i njegove derivate u primjenama za industriju lijekova je poraslo. Koristi se u različitim oblastima (slika 14): liječenje rana i kostiju, kontrola nivoa holesterola u krvi, opekotine kože, kontaktna sočiva, hirurške šavove, inhibicija zubnog plaka, koagulacioni agensi i drugi.⁸⁹



Slika 14. *Primjena hitozana u medicini*⁹²

➤ *Primjena hitozana u poljoprivredi*

Antimikrobna, antiinsekticidna, netoksična i biorazgradiva svojstva omogućavaju hitozanu da se efikasno koristiti u poljoprivredi. Hitozan je materijal s antibakterijskim svojstvima koji djeluje protiv gljivica, bakterija i virusa. Zbog svojih širokih antibakterijskih svojstava, koristi se za usporavanje ili sprečavanje širenja bolesti na biljkama. Hitozan takođe pomaže u jačanju

biljnih odbrambenih mehanizama i podstiče proizvodnju sekundarnih metabolita koji poboljšavaju imunitet biljaka.⁹³

Hitozan može poboljšati kapacitet klijanja, dužinu i aktivnost korijenja i visini sadnica. Istraživanja su potvrdila da hitozan može formirati polupropustan film na površini sjemena, pa pomaže u održavanju vlažnosti sjemena biljaka. Takođe, premazivanje biljaka hitozanom pomaže biljkama da budu tolerantne na stres usled suše razvojem korjenovog sistema i povećanjem sposobnosti korijena da apsorbuju više vode. U stočarstvu, ostatak proteina koji se proizvodi kao nusproizvod hitozana može se koristiti kao dodatak ishrani, što može povećati imunitet životinja i zadovoljiti potrebu za proteinima. Takođe, hitozan i derivati hitozana mogu se prerađivati u stočnu hranu.⁹⁴

➤ *Primjena hitozana u industriji celuloze i papira*

Primjene hitozana u industriji celuloze i papira prikazane su u tabeli 1. Prva upotreba hitozana u industriji papira prijavljena je 1936. godine. Glavna primjena bila je poboljšanje čvrstoće papira. Hitozan kao funkcionalni materijal, takođe, može da interaguje sa celuloznom pulpom tokom formiranja papira i da formira film koji pruža kohezivnu otpornost na pucanje. Nastali biopolimer je takođe netoksičan, biorazgradiv i ekološki prihvatljiv, što omogućava usklađenost sa ekološkim propisima.⁹⁴ Hitozan se, kao helatni i kompleksni agent, takođe, koristi u prečišćavanju otpadnih voda iz industrije celuloze i papira za uklanjanje lignina, boje i neželjenih zagađivača, kao i za smanjenje ukupnog organskog ugljen-dioksida i hemijske potrošnje kiseonika.⁹⁵

Tabela 1. *Primjene hitozana u papirnoj i celuloznoj industriji*⁹⁴

Tema	Oblik	Primjena
Industrija papira	Sloj	Sredstvo za vlažnu čvrstoću; aditiv za jačanje
Celuloza papira	Puder	Sredstva za zadržavanje i drenažu
Tretman vode	Nanočestice	Dimenzionisanje i obrada papira
Industrija za proizvodnju papira		Priprema površinskog premaza: premazani papiri sa antibakterijskim i antimikrobnim svojstvima
		Biorazgradivo pakovanje za pakovanje hrane
		Ambalaža i toalet papir
		Hromatografski papir
		Karton
		Papir bez ugljena
		Modifikacija celuloznih vlakana
		Fotohromatski papir
		Prečišćavanje otpadnih voda za proizvodnju papira

2.6.5. Primjena hitozana za prečišćavanje otpadnih voda

Svakodnevno ispuštanje industrijskih otpadnih voda u prirodu izaziva velika zagađenja vode i životne sredine. Hitozan je jedinjenje koje se koristi za prečišćavanje otpadnih voda, kao koagulant i flokulant. Kao ekološki prihvatljivi materijali, mogu biti potencijalna zamjena za metalne soli i sintetičke polielektrolite u tretmanu vode za uklanjanje čestica i rastvorenih supstanci.⁹⁶

Fizičko-hemijski tretmani mogu se koristiti za uklanjanje teških metala i toksičnih jedinjenja iz otpadnih voda. Međutim, ove metode su štetne za životnu sredinu zbog upotrebe hemikalija. Prisutnost aktivnih funkcionalnih grupa ($-NH_2$ i $-OH$) omogućava hitozanu i njegovim derivatima veću efikasnost kao adsorbenta za prečišćavanje vode u odnosu na druge polisaharide. Teški metali su prisutni u podzemnim vodama u malim količinama, koje su potrebne živim organizmima, ali veće koncentracije teških metala su toksične za živi svijet.⁸⁹ Danas organski zagađivači predstavljaju značajan ekološki problem. Boje iz tekstilne industrije, pesticidi i herbicidi sa poljoprivrednih površina, lijekovi najčešći su organski polutanti pronađeni u vodama, a njihova adsorpcija zavisi od veličine, hemijske strukture i polariteta molekula. Hitozan ima potencijal da ukloni zagađivače iz vode, uključujući i mikrobe. Neka laboratorijska istraživanja pokazuju efikasnost uklanjanje bakterija i virusa iz vode primjenom hitozana, čak i do 99%.⁹⁷

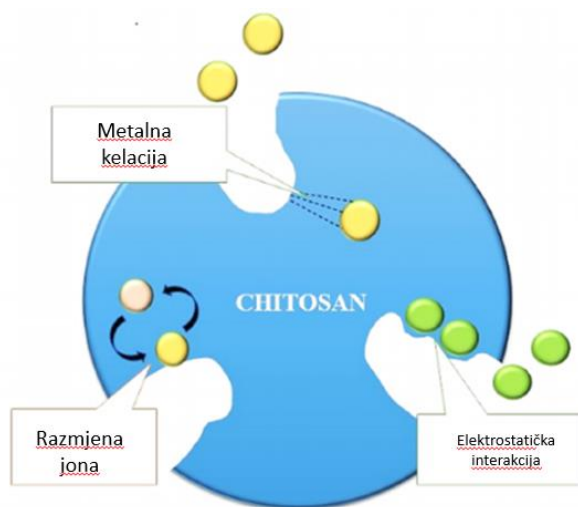
➤ *Hitozan kao koagulant u procesu prečišćavanja otpadnih voda*

Flokulacija je ključni proces u tretmanu industrijskih otpadnih voda. Organski polimerni flokulanti se danas široko koriste zbog svoje izuzetne sposobnosti da flokulišu efikasno uz malu količinu, u poređenju sa neorganskim koagulantima koji se često koriste, ali imaju nisku efikasnost flokulacije i ostavljaju male koncentracije metala u tretiranoj vodi. Koagulaciona i flokulaciona svojstva hitozana mogu se iskoristiti za uklanjanje negativno naelektrisanih koloidnih organskih ili neorganskih nečistoća iz otpadnih voda.⁹⁸ Hitozan je jedan od najperspektivnijih biopolimera za široku primjenu u tretmanu otpadnih voda, a njegova koagulativna sposobnost je veoma efikasna u poređenju sa mineralnim koagulantima kao što su: aluminijum-sulfat, polietilenimin i poliakrilamid u uklanjanju različitih zagađivača iz vodenih rastvora.⁹⁹ Protonisane aminske grupe duž lanca koje se dobijaju rastvaranjem hitozana u kiselinama, olakšavaju elektrostatičke interakcije između lanaca polimera i negativno naelektrisanih zagađivača (metalnih anjona, boja, organskih jedinjenja).⁹⁸ Zbog prisustva primarnih amino grupa, biopolimer ima visoku katjonsku gustinu naelektrisanja i duge lance sa visokom molekulskom težinom, što ga čini efikasnim koagulantom ili flokulantom za uklanjanje kontaminanata u suspendovanom i rastvorenom stanju. Aktivne amino grupe ($-NH_2$) u molekulu hitozana mogu se protonisati sa H^+ u vodi u katjonski polielektrolit, tako da molekul ima osobine statičke privlačnosti i adsorpcije. Efikasnost hitozana u koagulaciji mineralnih suspenzija može se poboljšati prisustvom neorganskih rastvora ili dodavanjem materijala ekstrahovanih iz zemljišta sa visokim pH vrijednostima.¹⁰⁰

Naučnici su ispitali efikasnosti hitozana kao koagulanta za tretman otpadnih voda iz tekstilne industrije.¹⁰¹ Istražili su kako različiti parametri, kao što su količina hitozana, pH vrijednost i vrijeme miješanja, utiču na proces flokulacije i sposobnosti hitozana da smanji koncentracije hemijske potrošnje kiseonika (chemical oxygen demand - COD) i mutnoće u otpadnim vodama. Eksperimentom su pokazali da je hitozan uspješno flokulisao anjonske suspendovane čestice, što je rezultiralo smanjenjem COD-a i mutnoće u otpadnoj vodi. Najbolji rezultati postignuti su pri upotrebi 30 mg/L hitozana, pH vrijednosti 4 i miješanju tokom 20 minuta, uz brzinu miješanja od 250 rpm u prvih 1 minut i 30 rpm za preostalih 20 minuta, dok je vrijeme taloženja iznosilo 30 minuta. Pod ovim uslovima, došlo je do smanjenja COD-a za 72,5% i smanjenja mutnoće za 94,9%. Zaključeno je da je hitozan efikasan koagulant za smanjenje nivoa COD-a i mutnoće u otpadnim vodama tekstilne industrije.¹⁰¹

➤ *Hitozan kao adsorbent u procesu prečišćavanja otpadnih voda*

Adsorpcija je metoda tretmana vode koja je posljednjih godina privukla pažnju ekologa i naučnika zbog svoje sposobnosti da vrši visokokvalitetan tretman efluenta uz niske troškove. To je široko prihvaćen proces ravnotežnog odvajanja, koji je efikasan i ekonomičan metod za tretman vode, kao i za analitičke tehnike odvajanja.¹⁰² Proces adsorpcije može se realizovati uz različite materijale koji se sastoje od biorazgradivih supstanci, organskih supstanci, minerala, aktivinih ugljenika i drugih. Najekonomičniji način korišćenja procesa adsorpcije je upotreba prirodnih organskih materijala kao što su biopolimeri, poput hitozana, hitina ili celuloze.¹⁰³ Cijeli proces upotrebe bioloških materijala za adsorpciju u cilju uklanjanja zagađivača, kao što su: metali, boje, metaloidi, naziva se biosorpcija, koja može uključivati žive ili mrtve organizme, a i biopolimere. Hitozan ima određena fizička i hemijska svojstva koja mu pomažu u procesu adsorpcije. Funkcionalne grupe ovog jedinjenja djeluju kao potencijalni "čistači" za jonske metale i zagađivače u procesu tretmana vode. Struktura hitozana sadrži jonske parove elektrona na $-NH_2$ i $-OH$ grupama, što dovodi do procesa koji se naziva hemisorpcija, a koji dalje zavisi i mijenja se u zavisnosti od pH vrijednosti rastvora.¹⁰⁴ U slučaju uklanjanja različitih boja iz otpadnih voda, mehanizmi koji djeluju uključuju fizičku adsorpciju, interakciju sa bojama i formiranje hemijskih veza. Najčešći mehanizam usvajanja kiselih boja pomoću nanočestica hitozana je interakcija koja se dešava između negativno naelektrisanih jonskih boja i amino grupa hitozana.¹⁰⁵ Mehanizam adsorpcije mijenja se sa pH vrijednošću rastvora. Ako se boja mora adsorbovati iz alkalnog rastvora, javlja se mehanizam helacijskih interakcija, a ne elektrostatističkih. Različiti mehanizmi adsorpcije hitozana prikazani su na slici 15.¹⁰⁴



Slika 15. *Mehanizmi adsorpcije hitozana*¹⁰⁵

Masheane i saradnici, 2017¹⁰⁵ su u svom istraživanju razvili kuglice od hitozana (CTs) sa aluminijumom i višeslojnim ugljeničnim nanocijevima (f-MWCNTs) za denitrifikaciju vode i ispitivanje interakcije između kompozitnih kuglica i nitrata tokom procesa adsorpcije. Adsorpcija nitrata iz vode pomoću CTs-Al/f-MWCNT kuglica sprovedena je u procesu adsorpcije u serijama. CTs-Al/f-MWCNT nanokompozitne kuglice su se pokazale kao efikasni adsorbenti za uklanjanje nitrata. U poređenju sa CTs koji je pokazao samo 23% uklanjanja pri pH 4, aluminijum i f-MWCNTs su poboljšali efikasnost uklanjanja CTs i smanjili rastvorljivost i kapacitet bubrenja CTs.¹⁰⁵

➤ *Hitozan kao hidrogel u procesu prečišćavanja voda*

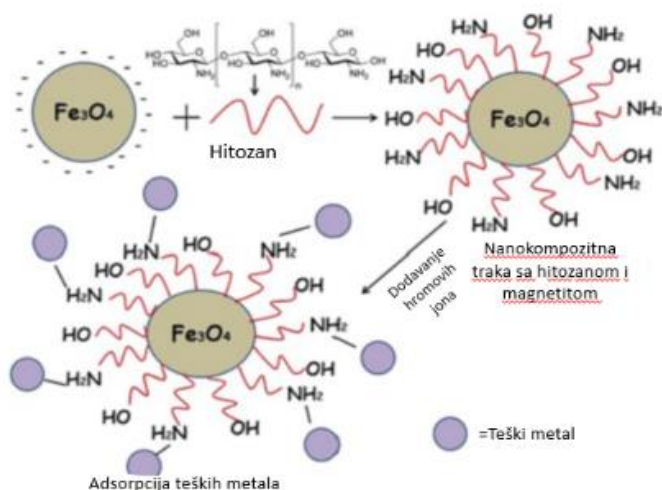
Upotreba i primjena hidrogelova na bazi hitozana predstavljaju novu tehniku za mnoge primjene koje se odnose na industriju lijekova, inženjering tkiva i tretman otpadnih voda. Hidrogelovi na bazi hitozana pripremaju se oblikovanjem fizičkih i hemijskih struktura hitozana pomoću umrežavanja, graftinga, impregniranja, uvođenja tvrdih punila, miješanja, interpenetracije i drugih tehnika.¹⁰⁶ Upotreba ovih hidrogelova za tretman vode ima veliki potencijal za kontrolu zagađenja. S obzirom na sve veći broj zagađivača u vodenim ekosistemima (teški metali, joni, boje i drugi organski otpad) proces biološkog tretmana zagađene vode postao je veoma važan. Iako postoje različite metode tretmana, uključujući osmozu, koagulaciju, flokulaciju, upotreba metoda adsorpcije ima veći potencijal u odnosu na ostale metode. Hidrogelovi na bazi hitozana imaju prednost zbog svojih svojstava biorazgradivosti, biokompatibilnosti i netoksičnosti, ali takođe imaju i određene nedostatke, kao što su niska stabilnost u kiselim sredinama, slabija mehanička čvrstoća i niža termička stabilnost. Istraživači su proučavali upotrebu hidrogelova na bazi hitozana za uklanjanje toksičnih boja i teških metala iz vodenih ekosistema i otkrili pozitivne rezultate. Upotreba ovih hidrogelova na bazi hitozana koristi se za uklanjanje raznih zagađivača (farmaceutski proizvodi, industrijski aditivi i slično).⁹⁷

➤ *Nanočestice na bazi hitozana za prečišćavanja voda*

Potencijalna upotreba hitozana u različitim industrijama, uključujući i prečišćavanje vode, poslednjih godina je detaljno proučavana. Hitozan, kao biopolimer, pokazao je različita svojstva koja omogućavaju njegovu uspješnu primjenu u medicini, tehnologiji hrane i

pomorskoj industriji zbog karakterističnih svojstava: biorazgradivost, adsorpcija, antimikrobne aktivnosti, netoksičnosti. Nanočestice na bazi hitozana imaju relativno novu primjenu za adsorpciju različitih teških metala i boja iz vode.⁹⁷

*Sureškumar i saradnici, 2015*¹⁰⁷ sintetisali su magnetit nanočestice (Fe_3O_4) korišćenjem metode ko-precipitacije (slika 16). Ove nanočestice su pomješane sa rastvorom hitozana kako bi se formirali hibridni nanokompoziti. Afinitet hibridnog nanokompozita za hrom proučen je korišćenjem $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ kao rastvora teškog metala koji sadrži Cr(VI) jone. Testovi adsorpcije sprovedeni su korišćenjem traka od hibridnog nanokompozita u različitim vremenskim intervalima, upoređeni sa trakama koje sadrže samo hitozan. Efikasnost uklanjanja hroma sa trakom od hitozana iznosi 29,39%, dok efikasnost trake od hitozan-magnetit nanokompozita iznosi 92,33%. Na osnovu ovih rezultata, trake od hitozan-magnetit nanokompozita su veoma efikasne u uklanjanju hroma iz otpadnih voda iz tekstilne industrije.¹⁰⁷



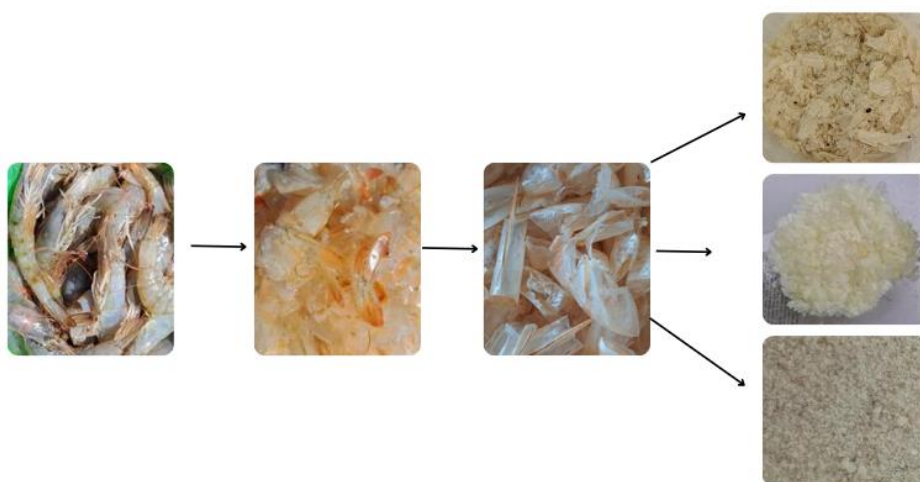
Slika 16. Šematski prikaz mehanizma uklanjanja hroma nanokompozitnom trakom hitozan-magnetita¹⁰⁷

3. EKSPERIMENTALNI DIO

Eksperimentalni dio master rada urađen je u Laboratoriji za Tehnologiju vode na Metalurško-tehnološkom fakultetu i Laboratoriji Instituta za javno zdravlje Crne Gore u Podgorici.

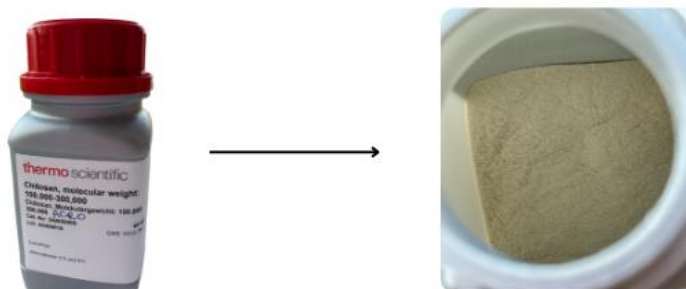
3.2. Priprema adsorbenta

Hitozan, koji je korišćena kao adsorbent u ovom master radu, dobijen je iz svježih gambora primjenom tri različita postupka. Gambori su porijeklom iz Jadranskog mora, ulovljeni u mjestu Bigova u Boki Kotorskoj. Na slici 18 prikazana je šema dobijanja laboratorijskog hitozana.



Slika 18. Šema dobijanja laboratorijskog hitozana

Za potrebe eksperimenta korišćen je i komercijalni hitozan, proizvođača Thermo Scientific (slika 19).



Slika 19. Komercijalni hitozan

- **Dobijanje hitozana prvim postupkom (1)**

Dobijanje hitozana prvim postupkom, počinje čišćenjem tijela gambora, nakon čega su ljuske gambora odvojene i ostavljene da se suše 3 dana na sobnoj temperaturi. Zatim je 16,45 g osušenih ljuski gambora stavljeno u čaši od 1000 ml i preliveno sa 400 ml 0,68 M hlorovodonične kiseline.¹⁰⁸ Ljuske su u ovom rastvoru miješane pomoću magnetne mješalice 6 sati na temperaturi od 30°C. Po završetku, ljuske su isprane destilovanom vodom, te ostavljene da se osuše. Sledeći korak podrazumijevao je dodavanje 400 ml 1 M rastvora NaOH i ponovno miješanje ljuski na magnetnoj mješalici 4 sata. Nakon ispiranja ljuski destilovanom vodom i njihovog sušenja dodat je rastvor kalijum-permanganata (1%) i oksalne kiseline (1%) zbog obezbojavanja ljuski. Nakon 2 sata, proces ispiranja i sušenja ljuski gambora je ponovljen. U sledećem koraku, korišćen je 50% rastvor NaOH, koji je dodat u čašu sa osušenim ljuskama gambora. Neprestano miješanje na temperaturi od 100 °C trajalo je 5 sati kako bi se postigla deacetilacija. Nakon toga, ljuske su odvojene od rastvora filtriranjem, isprane vodom i osušene u pećnici 8 sati na temperaturi od 80°C, a zatim usitnjenje pomoću avana i tučka. Na slici 20 prikazana je šema dobijanja hitozana prvim postupkom.

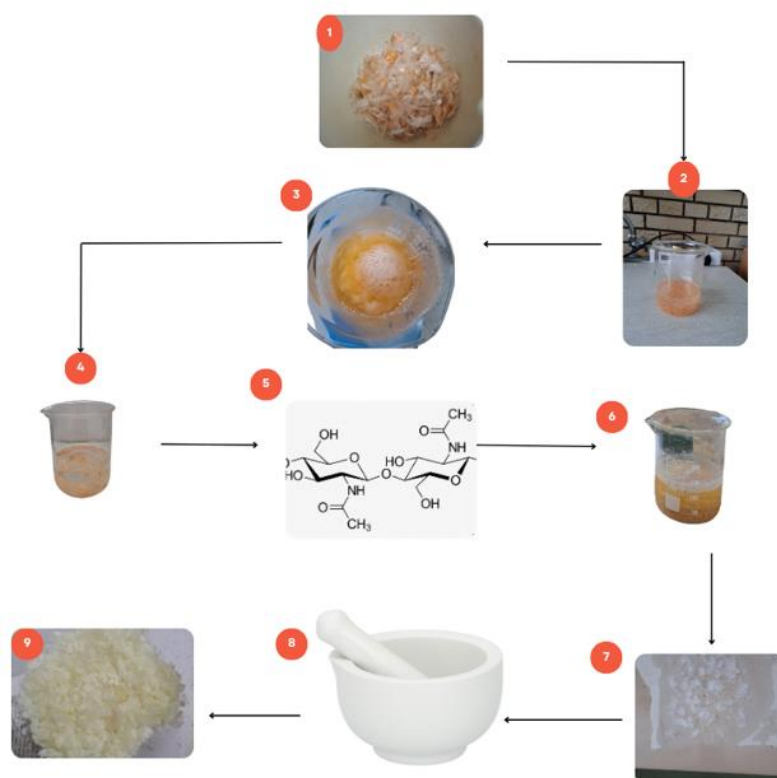


Slika 20. Šema dobijanja hitozana prvim postupkom

- **Dobijanje hitozana drugim postupkom (2)**

Drugim postupkom dobijanja hitozana, odmjereno je 5,95 g sušenih ljuski gambora, koje su zatim stavljene u čašu i ostavljene da odstoje 24 sata u 0,05 M rastvoru sirćetne kiseline.¹⁰⁹

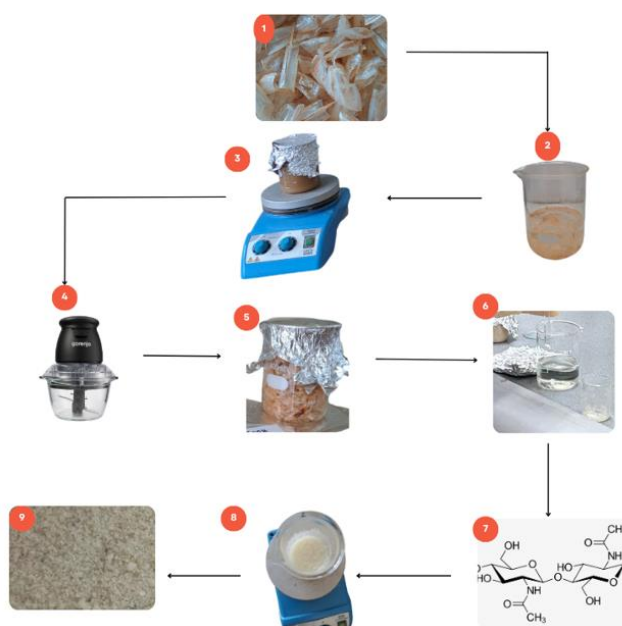
Nakon toga, ljuske gambora su isprane destilovanom vodom i ostavljene da se osuše. U čašu zapremine 250 ml stavljene su osušene ljuske gambora, koje su potom prelivene sa 1M rastvorom hlorovodonične kiseline. Miješane su pomoću magnetne mješalice 6 sati na temperaturi od 30 °C. Nakon završenog procesa, ljuske su opet isprane destilovanom vodom i ostavljene da se osuše. Sledeći korak uključivao je dodavanje 200 ml 1,5 M rastvora NaOH uz povremeno miješanje, a smješa je odstajala 16 sati, a zatim su ljuske isprane destilovanom vodom i ostavljene da se osuše. Zatim je korišćen 25 M rastvor NaOH, koji je dodat u čašu sa osušenim ljuskama gambora. Povremeno miješanje na temperaturi od 65°C trajalo je 20 sati kako bi se postigla deacetilacija. Nakon završetka ovog procesa, ljuske su odvojene od rastvora filtriranjem, isprane destilovanom vodom i konačno sušene na sobnoj temeperaturi 2 dana, a potom usitnjene avanom i tučkom. Na slici 21 prikazana je šema dobijanja hitozana drugim postupkom.



Slika 21. Šema dobijanja hitozana drugim postupkom

- ***Dobijanje hitozana trećim postupkom (3)***

Trećim postupkom dobijanja hitozana, prvo je odmjereno je 25,76 g sušenih ljuski gambora, koje su zatim stavljene u čašu i ostavljene da odstoje 24 sata u 1M rastvoru sirćetne kiseline.¹¹³ Nakon tog perioda, ljuske gambora su isprane destilovanom vodom i ostavljene da se osuše. U čašu zapremine 800 ml stavljene su osušene ljuske gambora, koje su potom prelivene sa 1 M rastvorom hlorovodonične kiseline (u odnosu 1:15). Miješanje je vršeno pomoću magnetne mješalice 2 sata na sobnoj temperaturi. Nakon završenog procesa, ljuske su isprane destilovanom vodom i ostavljene da se osuše. Nakon sušenja ljuske gambora su stavljene u blender kako bi se na taj način usitnile. Sledeći korak vršen je dodavanjem 150 g/l NaOH (u odnosu 1:10) uz povremeno miješanje, a smješa je odstajala 3 sata. Nakon ispiranja ljuski destilovanom vodom, usitnjene ljuske ostavljene su da se suše. Proces dekolorizacije je vršen 2% natrijum hipohloritom, nakon čega su ljuske odvojene od rastvora filtriranjem, isprane i osušene. Zatim je korišćen 25 M rastvor NaOH, koji je dodat u čašu sa osušanim ljuskama gambora. Povremeno miješanje na temperaturi od 100 °C trajalo je 3 sata kako bi se postigla deacetilacija. Nakon završetka ovog procesa, ljuske su odvojene od rastvora filtriranjem, zatim isprane destilovanom vodom i konačno sušene na sobnoj temepraturi 24 sata, čime je proces završen. Ovim procesom je dobijen prah hitozana. Na slici 22 prikazana je šema dobijanja hitozana trećim postupkom.



Slika 22. Šema dobijanja hitozana trećim postupkom

3.2. Karakterizacija adsorbenta

3.2.1. Infracrvena spektroskopija sa Fourier-ovom transformacijom – FTIR

Za karakterizaciju hitozana korišćen je Spectrum Two FTIR spektrometar, proizvođač PerkinElmer (slika 23). Snimanje uzoraka je vršeno pri intervalu od 4000 do 400 cm⁻¹.



Slika 23. FTIR spektrometar

3.2.2. Određivanje stepena deacetilacije

Stepen deacetilacije određivan je potenciometrijskom metodom. Izvršena je kiselinско-bazna titracija, uz određene modifikacije.¹¹⁰ Određivanje stepena deacetilacije vršeno je pomoću jednačine:

$$DD\% = \frac{[(V_2 - V_1) \cdot c_{NaOH} \cdot \text{Jedinična masa hitozana}]}{m_{\text{hitozana}}} \cdot 100 \quad (\text{jed. 1})$$

gdje je:

V₂ - zapremina natrijum hidroksida,

V₁ - zapremina hlorovodonične kiseline,

c_{NaOH} - koncentracija natrijum hidroksida,

jedinična masa hitozana - predstavlja molekulsku masu jedne monomerne jedinice hitozana. Ona iznosi 161,16g/mol,

m - masa uzorkovanog hitozana.

Odmjereno je 0.125 g hitozana, koji je zatim potpuno rastvoren u 25 mL 0.1 M rastvora HCl, a potom izvršena titracija sa 0.1 M rastvorom NaOH. Nakon toga je izračunat stepen decetilacije.

3.3. Postupak adsorpcije u šaržnim uslovima

Testovi adsorpcije u šaržnim (eng. *batch*) uslovima izvedeni su na sobnoj temperaturi. Za potrebe eksperimenta korišćeni su vodeni rastvori koji sadrže NO_3^- jone konstantne koncentracije od 50 ppm. Kao adsorbenti za uklanjanje nitrata iz rastvora, korišćeni su laboratorijski i komercijalni hitozan. Eksperimenti su izvođeni sa različitom masom adsorbenta: 1 mg, 3 mg, 5 mg, 7 mg i 10 mg, koja se dodavala rastvoru nitrata zapremine 60 ml. U cilju sagledavanja uticaja vremena na stepen adsorpcije, odnosno efikasnost uklanjanja nitrata, uzorci su miješani magnetnom mješalicom variranjem vremena kontakta: 15, 20, 25, 30 i 45 minuta. Nakon toga svaki uzorak je profiltriran, kako bi se odvojio hitozan od rastvora. Sadržaj nitrata u filtratu je određivan UV spektrofotometrijski.¹¹¹ Na spektrofotometru Cary Vis-UV Varian, na talasnoj dužini 220 nm, kvarcne kivete 1 cm.

Tokom eksperimenta mjerena je pH vrijednost vodenih rastvora nitrata pomoću pH-metra (HI8424 pH meter, Hanna Instruments).

Efikasnost prečišćavanja (EP), tj. uklanjanja nitrata iz vodenih rastvora je određivana korišćenjem sledeće formule:

$$EP = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \cdot 100\% \quad (\text{jed. 2})$$

gdje je C_0 početna koncentracija NO_3^- u rastvoru, a C_t koncentracija NO_3^- u rastvoru nakon vremena t .

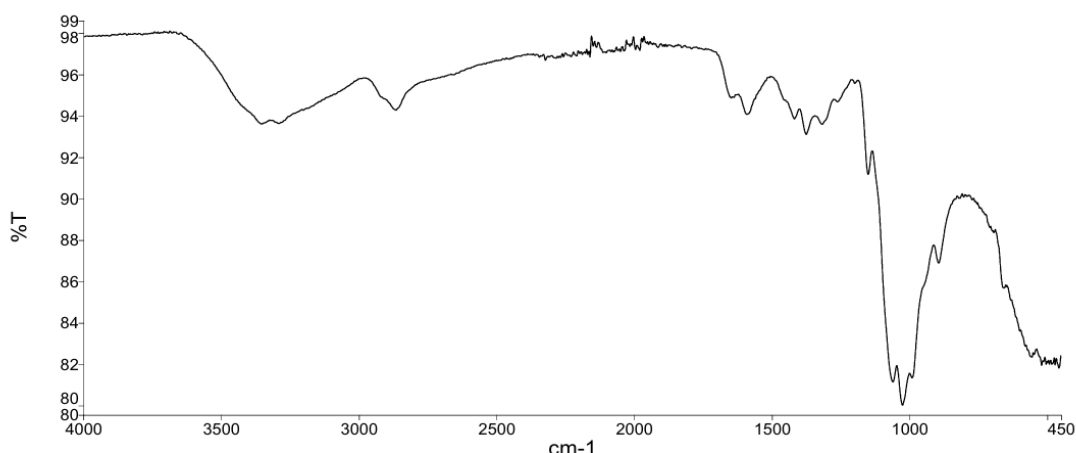
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. FTIR analiza

FTIR analiza je korišćena za određivanje hemijske strukture hitozana. Infracrveni spektri komercijalnog i laboratorijski dobijenih hitozana, prikazani su na slikama 24, 25, 26 i 27.

4.1.1. FTIR spektar komercijalnog hitozana

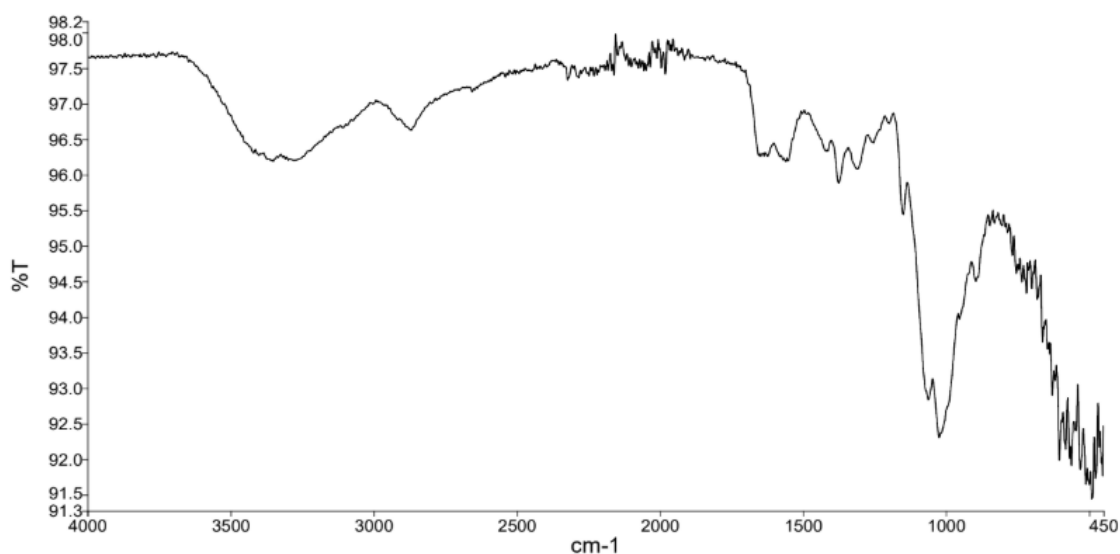
Apsorpcioni vrh pri 1651 cm^{-1} (C=O u amidskoj grupi, vibracija amida I), 1590.8 cm^{-1} (savijanje -NH_2 amida II) i 1375 cm^{-1} (istezanje N–H ili istezanje C–N veza, vibracija amida III), su karakteristični pikovi za komercijalni hitozan. Takođe, N–H i O–H istežanja (3354 cm^{-1}), C–H istežanje (2867 cm^{-1}) i C–O–C istežanje pik (1025 cm^{-1}) su karakteristični pikovi za hitozan. Spektar hitozana (slika 24) pokazuje široki vrh oko 3354.3 cm^{-1} koji odgovara simetričnoj vibraciji aaminskih N–H grupa i O–H grupa, kao i prisustvo vodoničnih veza. Odsustvo oštarih vrhova oko 3500 cm^{-1} potvrđuje da su hidroksilne grupe u pozicijama C2 i C6 hitozana uključene u intramolekulske i intermolekulske vodonične veze. Vrhovi pikova pri 2985 , 2867 i 2156.5 cm^{-1} dodijeljeni su simetričnim i asimetričnim vibracijama -CH_2 ugljovodoničnih prstenova. Apsorpcioni vrhovi u opsegu od 900 do 1200 cm^{-1} (u ovom radu 1150 cm^{-1}) su rezultat antisimetričnog istežanja C–O u saharidnoj strukturi hitozana, što je u skladu sa literaturnim podacima standarda hitozana.^{112,113}



Slika 24. FTIR spektar komercijalnog hitozana

4.1.2. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana prvim postupkom

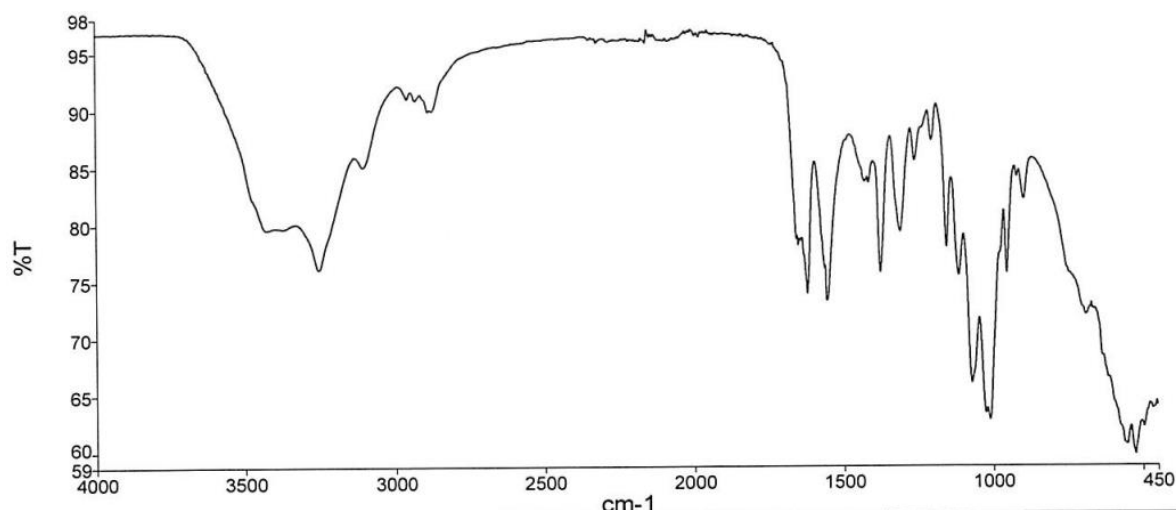
Glavna apsorpciona traka se primjećuje između 1220 i 1020 cm^{-1} što predstavlja slobodnu amino grupu ($-\text{NH}_2$) na C2 poziciji glukozamina, glavne grupe prisutne u hitozanu (slika 25). Takođe, pik na 1376 cm^{-1} predstavlja $-\text{C}-\text{O}$ istezanje primarne alkoholne grupe ($-\text{CH}_2 - \text{OH}$). Opsezi apsorpcije od 3353, 2985, 1559 i 1375 cm^{-1} ukazuju na istezanje N-H, simetrično rastezanje CH_3 , rastezanje CH, rastezanje $\text{C}=\text{O}$ u sekundarnom amidu (amid I) i rastezanje C–N u sekundarnom amidu (amid II), respektivno, što je u skladu sa literaturnim podacima.¹¹⁴



Slika 25. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana prvim postupkom

4.1.3. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana drugim postupkom

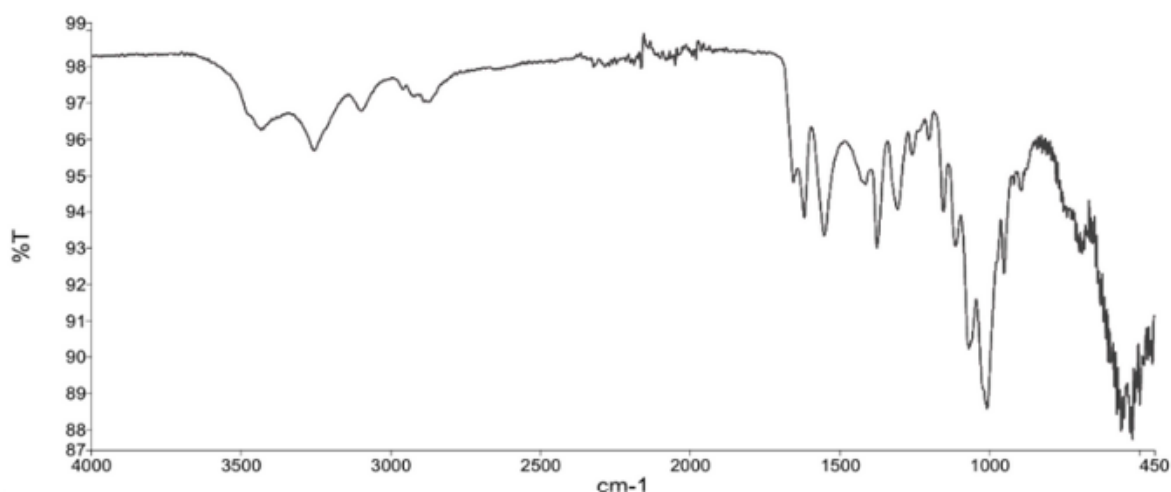
Snimanjem spektra hitozana na FTIR-u uočeni su sledeći pikovi: 3258, 2992, 1621, 1377, 1070, 1401. Na spektru (slika 26) se uočava da pik na 3258 cm^{-1} pojavljuje se zbog $-\text{OH}$ istezanja i preklapanja sa $-\text{NH}$ istezanjem vibracija. Slaba traka na 2992 cm^{-1} dodjeljuje se $-\text{CH}$ i $-\text{CH}_2$ istezanju vibracija hitozana. Karakteristična traka na 1621 cm^{-1} je posledica savijanja vibracija primarnog amina u hitozanu. C–H simetrično savijanje vibracija u $-\text{CHOH}-$ pojavljuje se na 1377 cm^{-1} . Deformacija $-\text{NH}$ vibracija u primarnom aminu može se naći na 1401 cm^{-1} , dok pik na 1070 cm^{-1} predstavlja istezanje vibracija C–O grupe.¹¹⁵



Slika 26. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana drugim postupkom

4.1.4. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana trećim postupkom

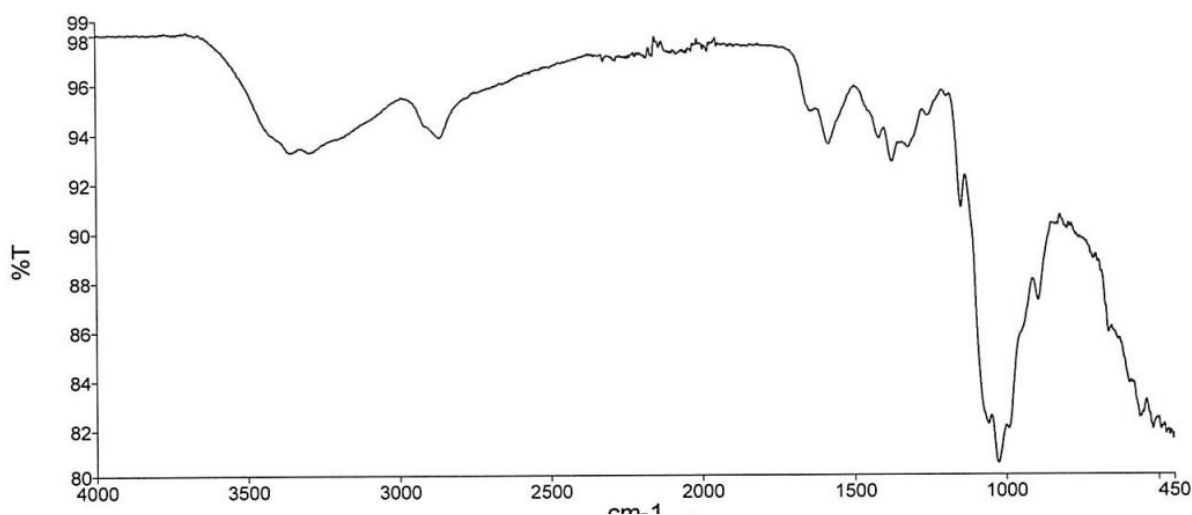
Hitozan dobijen trećim postupkom je takođe okarakterisan FTIR metodom. Pikovi koji se javljaju na 3483 i 3259 cm^{-1} (slika 27) se odnose na istezanje O-H i N-H (I amid). Istezanje alifatskih C-H veza je prisutno pri 2931 cm^{-1} i 2879 cm^{-1} . Glikozidne veze C-H istezanja pri 1156 cm^{-1} pokazuju njegovu saharidnu strukturu. Dva apsorpciona vrha pri 1619 cm^{-1} i 1559 cm^{-1} odnose se na C=O (acetilna grupa) sekundarnog amida i NH_2 primarnog amina. Dva apsorpciona vrha pri 1486 cm^{-1} i 1376 cm^{-1} mogu se pripisati savijanju C-H veza. Karakteristični pikovi hitozana u infracrvenom spektru potvrđuju njegovu saharidnu strukturu. Vrh pri 1418 cm^{-1} u C3 je nastao zbog vibracija savijanja OH i CH veza. Vrh na 1073 cm^{-1} odgovara simetričnom istezanju C–O grupe koje odgovaraju alkoholnim grupama u strukturi hitozana. ^{112,116}



Slika 27. FTIR spektar laboratorijski dobijenog hitozana trećim postupkom

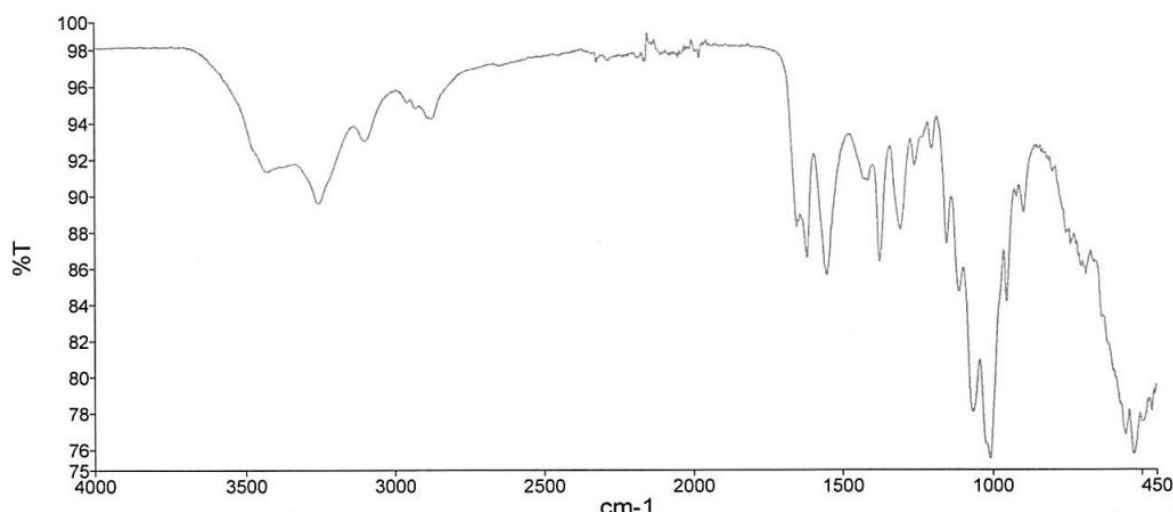
4.1.5. FTIR spektri hitozana nakon završenog procesa adsorpcije

FTIR spektri posle adsorpcije snimani su za komercijalni hitozan i hitozan dobijen drugim i trećim postupkom. Zbog jako male količine hitozana koja se koristila u ovom master radu, vršeno je snimanje po jednog uzorka od svakog hitozana nakon adsorpcije, koji su pokazali najbolju efikasnost uklanjanja.



Slika 28. FTIR sprektar nakon adsorpcije komercijalnog hitozana

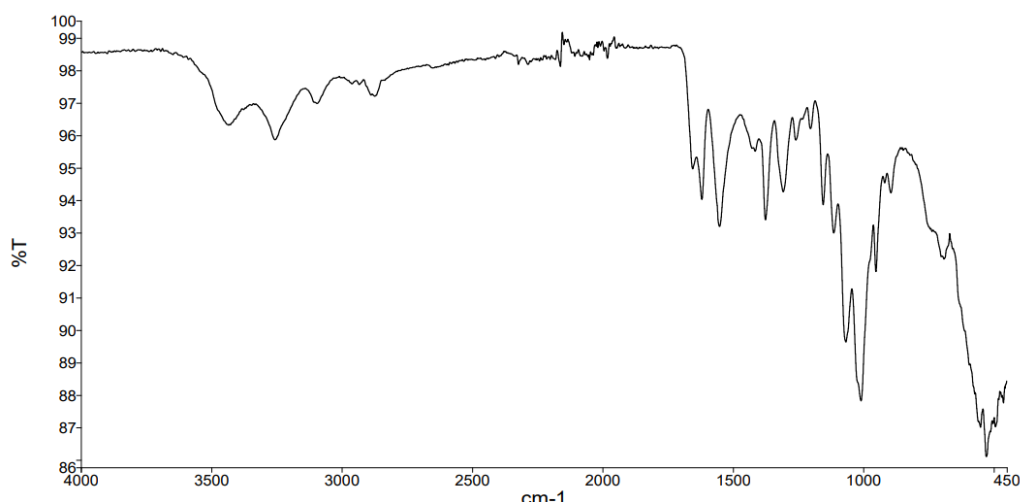
Uporedna analiza FTIR spektara komercijalnog hitozana prije i nakon adsorpcije nitratnih jona (slika 24 i 28) pokazuje određene promjene u spektru, što može ukazivati na interakcije između funkcionalnih grupa hitozana i adsorbovanih jona. Širok apsorpcioni pojas u regiji 3200–3500 cm^{-1} , koji pripada O-H i N-H vibracijama, pokazuje jako blagu promjenu intenziteta i pomjeranje, što se objašnjava mogućim stvaranjem novih vodoničnih veza sa nitratnim jonima. Pojasevi u regiji oko 1650 cm^{-1} i 1550 cm^{-1} , karakteristični za amidne grupe hitozana, pokazuju manje promjene, što može upućivati na interakcije sa nitratima putem elektrostatičkih sila ili vodoničnih veza. Područje ispod 1200 cm^{-1} , gdje se nalaze vibracije C-O-C i C-OH grupa, takođe pokazuje blage varijacije, što može ukazivati na moguće promjene u strukturi polisaharidnog lanca nakon adsorpcije. Prisutne varijacije sugerišu da je došlo do određenih strukturnih ili hemijskih modifikacija tokom procesa adsorpcije.



Slika 29. *Prikaz spektra nakon adsorpcije hitozana dobijenog drugim načinom*

Poređenjem slika 26 i 29, spektar hitozana prije i nakon adsorpcije nitratnih jona pokazuje izražene promjene u spektru, što upućuje na uspješnu interakciju između hitozana i adsorbovanih jona. Uočene su promjene u intenzitetu i poziciji karakterističnih apsorpcionih vrhova, posebno u oblastima koje se odnose na hidroksilne (-OH) i amino (-NH) funkcionalne grupe, koje su ključne za proces adsorpcije. Smanjenje ili pomjeranje određenih pikova u spektru nakon adsorpcije može ukazivati na formiranje vodoničnih veza ili elektrostatičke interakcije između nitratnih jona i funkcionalnih grupa hitozana. Takođe, promjene u regionu između 1000 i 1700 cm^{-1} dodatno sugerišu da je došlo do modifikacije strukture hitozana usled

adsorpcije. Ovi rezultati potvrđuju da je došlo do hemijske ili fizičke interakcije između hitozana i nitrata, što ukazuje na njegov adsorpcioni kapacitet.



Slika 30. *Prikaz spektra nakon adsorpcije hitozana dobijenog trećim postupkom*

Na FTIR spektru nakon adsorpcije (slika 30) u odnosu na FTIR spektar hitozana prije adsorpcije (slika 27) vidljive su promjene u određenim područjima, što ukazuje na interakciju hitozana s adsorbovanim jonima. Širok pojas u području $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, koji se pripisuje O-H i N-H vibracijama, pokazuje blagu promjenu intenziteta i pomjeranje, što može ukazivati na formiranje novih vodoničnih veza nakon adsorpcije. Pojasevi oko 1650 cm^{-1} i 1550 cm^{-1} , koji odgovaraju C=O (amid I) i N-H (amid II) grupama, pokazuju promjene u intenzitetu i pomjeranje, što može sugerisati interakciju ovih funkcionalnih grupa s adsorbovanim jonima. Regija ispod 1200 cm^{-1} , gdje se nalaze vibracije C-O-C i C-OH grupa, takođe pokazuje promjene u spektru nakon adsorpcije, što može ukazivati na uključivanje hidroksilnih grupa u proces vezivanja. Ove promjene ukazuju na to da je došlo do interakcije između funkcionalnih grupa hitozana i adsorbovanih jona, potvrđujući efikasnost adsorpcije.

4.2. Stepen deacetilacije hitozana

Primjenom jednačine 1 određeni su stepeni deacetilacije za laboratorijski dobijene hitozane, kao i za komercijalni. Dobijeni rezultati su prikazani u tabeli 2.

Tabela 2. Rezultati određivanog stepena deacetilacije za laboratorijski dobijene hitozane i komercijalni hitozan

<u>Hitozan</u>	(1)	(2)	(3)	<u>komercijalni</u>
Stepen deacetilacije (%)	51,57	64,46	77,35	90,24

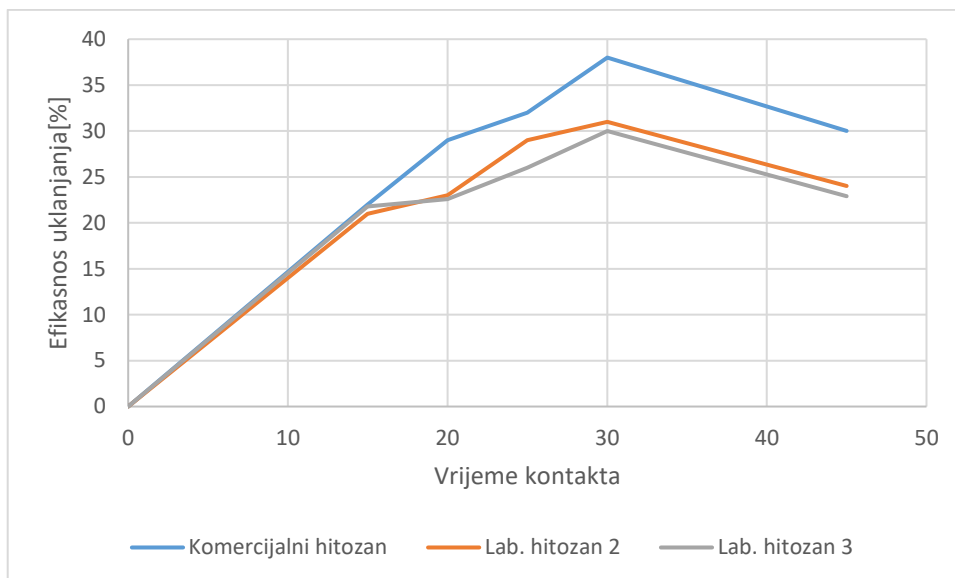
Hitozan dobijen prvim postupkom (51,57%) i drugim postupkom (64,46%) spadaju u grupu hitozana sa niskim stepenom deacetilacije, hitozan dobijen trećim postupkom spada u grupu hitozana sa umjerenim stepenom deacetilacije (77,35%), dok komercijalni spada u grupu sa visokim stepenom deacetilacije (90,24%).⁷⁴ Prema dostupnim literaturnim izvorima, hitozan sa stepenom deacetilacije višim od 60% se može koristiti u industrijske svrhe. Ovim rezultatima se potvrđuje da su ispitivani uzorci hitozana, osim hitozana čiji stepen deacetilacije iznosi 51,57%, jer hitozan sa stepenom deacetilacije manjim od 55% može biti i hitozan i hitin. Iz pomenutog razloga ovaj hitozan se nije koristio dalje u master radu.

4.3. Uklanjanje nitrata iz vodenih rastvora hitozanom

4.3.1. Uticaj vremena kontakta na efikasnost uklanjanja nitrata

U ovom master radu, ispitivani su komercijalni hitozan i dva laboratorijski dobijena hitozana (hitozan 2 i hitozan 3) za uklanjanje nitrata pri masama od 1mg, 3mg, 5mg, 7mg i 10mg i vremenom kontakta do 45 minuta. Reddy i Singh, 2020¹¹⁷ ističu da optimalno uklanjanje nitrata zavisi od vremena kontakta i pH.

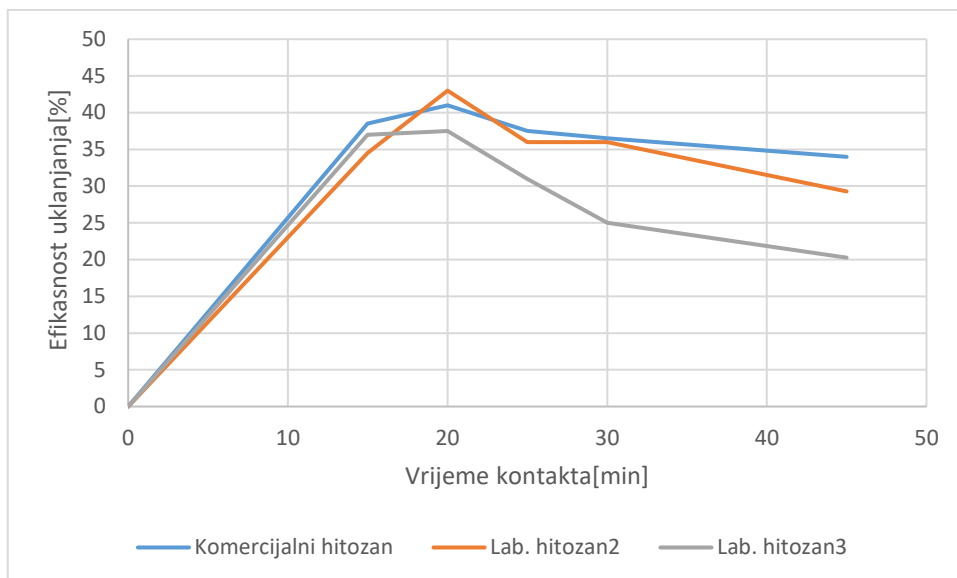
Na slici 31 je prikazana zavisnost efikasnosti uklanjanja nitrata iz vode tokom vremena kontakta (15, 20, 25, 30, 45 minuta) pomoću tri različita tipa hitozana: komercijalnog, laboratorijskog hitozana 2 i laboratorijskog hitozana 3, pri količini od 1 mg.



Slika 31. Zavisnost efikasnosti uklanjanja od vremena kontakta za hitozan od 1 mg

U prvih 15–20 minuta vidi se ubrzano povećanje efikasnosti kod sva tri uzorka, jer se najpristupačnija mjesta za adsorpciju popunjavaju relativno brzo. Nakon toga, porast efikasnosti je manji, a pri 45. minutu dolazi do postizanja skoro maksimalnih vrijednosti za svaki hitozan. Komercijalni hitozan bilježi najviši konačni procenat uklanjanja, što se pripisuje njegovoj industrijski optimizovanoj strukturi i većem broju reaktivnih mjesta dostupnih za vezivanje nitrata. Laboratorijski dobijeni hitozan 2 i hitozan 3, takođe, pokazuju stabilan rast efikasnosti, ali manju od komercijalnog hitozana, zbog izvjesnih razlika u stepenu deacetilacije. Vrijednosti pH u opsegu od 5 do 6 pogodovale su pozitivnom naelektrisanju amino grupa u hitozanu, čime je omogućena jača interakcija sa negativnim nitratnim jonima. Komercijalni hitozan je ostvario najbolji učinak u uklanjanju nitrata, dok laboratorijski hitozani, iako obećavajući, zahtijevaju dodatnu optimizaciju kako bi se približili efikasnosti industrijske formulacije (slika 31).

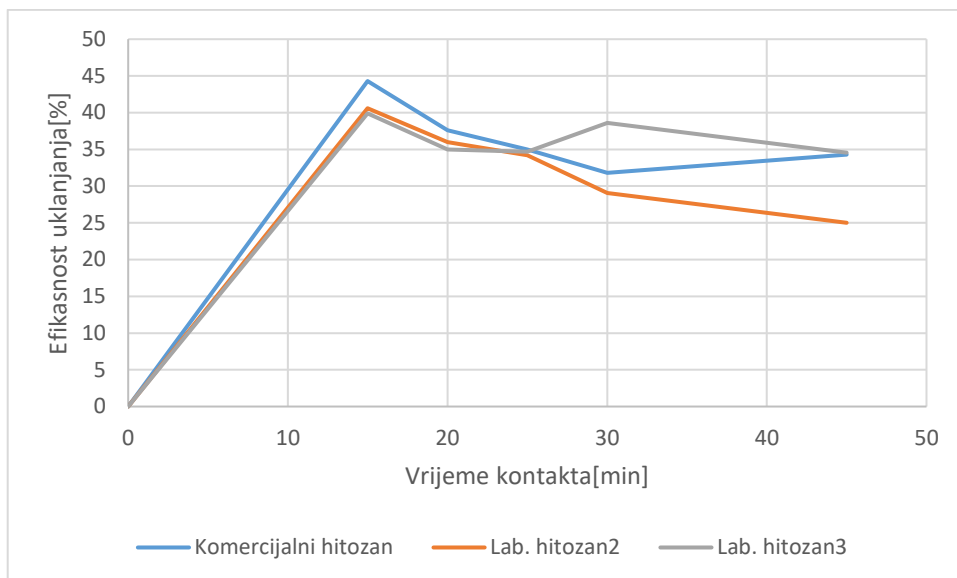
Na slici 32 prikazana je efikasnost uklanjanja nitrata u zavisnosti od vremena kontakta (od 15 do 45 minuta) za tri različite vrste hitozana: komercijalni, laboratorijski hitozan 2 i laboratorijski hitozan 3, pri količini od 3 mg.



Slika 32. *Zavisnost efikasnosti uklanjanja od vremena kontakta za hitozan od 3 mg*

Nakon 15. minuta primjećuje se da sva tri hitozana postižu zapaženu efikasnost, s tim što laboratorijski hitozani tada za nijansu nadmašuju komercijalni. Kako se kontakt produžava do 20 minuta, laboratorijski hitozan 2 i hitozan 3 dostižu maksimum uklanjanja (43% i 37,5%), ukazujući na veoma brzu kinetiku adsorpcije u ranim fazama, osim njih i komercijalni dostiže efikasnost u iznosu od 41%. Nakon 25. minuta, opada efikasnost kod oba laboratorijska uzorka, usled zasićenja površine. Komercijalni hitozan nastavlja da održava relativno stabilnu efikasnost sve do oko 30 minuta, da bi potom zabilježio umjeren pad. Na kraju eksperimenta, pri 45. minutu, komercijalni hitozan zadržava efikasnost uklanjanja nitrata na oko 34 %, dok laboratorijske varijante pokazuju niže vrijednosti (29,3% i 20,25%). Vrijeme kontakta je presudno za maksimalnu iskorišćenost aktivnih mjesta, pa je kod laboratorijskih hitozana brzi rast efikasnosti praćen ranijim dostizanjem ravnoteže i kasnijim padom, dok komercijalni hitozan ima postepeniji, stabilniji učinak u dužem vremenskom rasponu.

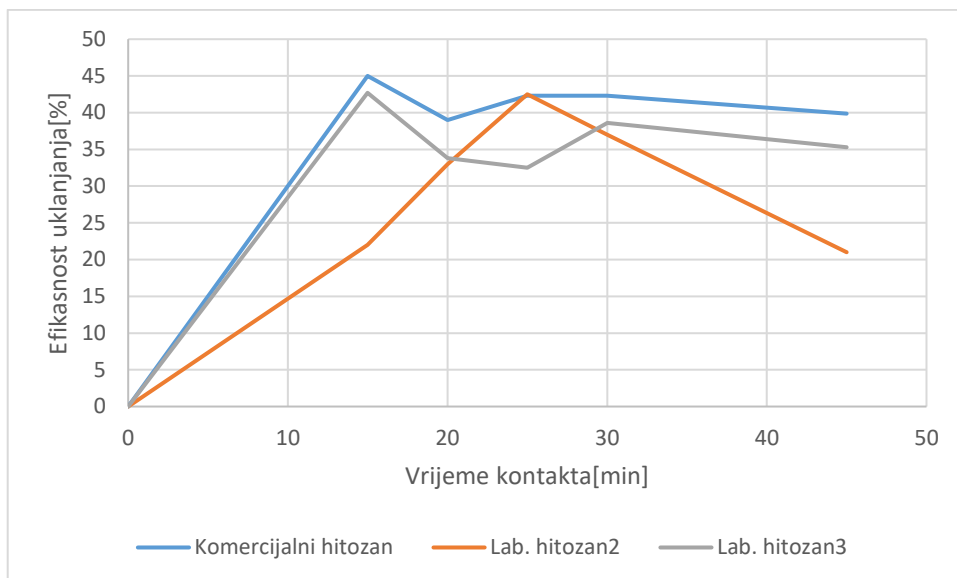
Efikasnost uklanjanja nitrata u zavisnosti od vremena kontakta za tri različite vrste hitozana, pri količini od 5 mg, prikazana je na slici 33.



Slika 33. Zavisnost efikasnosti uklanjanja od vremena kontakta za hitozan od 5mg

U početku (oko 10. minuta), sve tri krive bilježe relativno visoke vrijednosti adsorpcije, između 44,3 %, 40,6 % i 39,9 %, što ukazuje da su najpristupačnija aktivna mjesta brzo popunjena. Međutim, već nakon 20. minuta uočava se postepeni pad efikasnosti, naročito izražen kod laboratorijskog hitozana 2, koja do 45. minuta opada do 25 %. Kod laboratorijskog hitozana 3 vidljiv je mali porast između 25. i 30. minuta, ali se kasnije efikasnost ponovo opada od oko 45 minuta u vrijednosti od 34,55 %. Komercijalni hitozan ima relativno stabilnije vrijednosti tokom cijelog ispitivanja, završavajući eksperiment sa približno 34,33 % uklanjanja. Tendencija opadanja kod svih uzoraka može da ukazuje na djelimičnu desorpciju nitrata ili zasićenje površine adsorbenta, pri čemu duže trajanje kontakta ne donosi kontinuirano poboljšanje. Generalno, vremenski faktor ovdje naglašava da, iako se na početku postiže optimalna efikasnost kod svih tipova hitozana, održavanje visokog stepena uklanjanja kroz duži period najbolje uspijeva komercijalnom hitozanu.

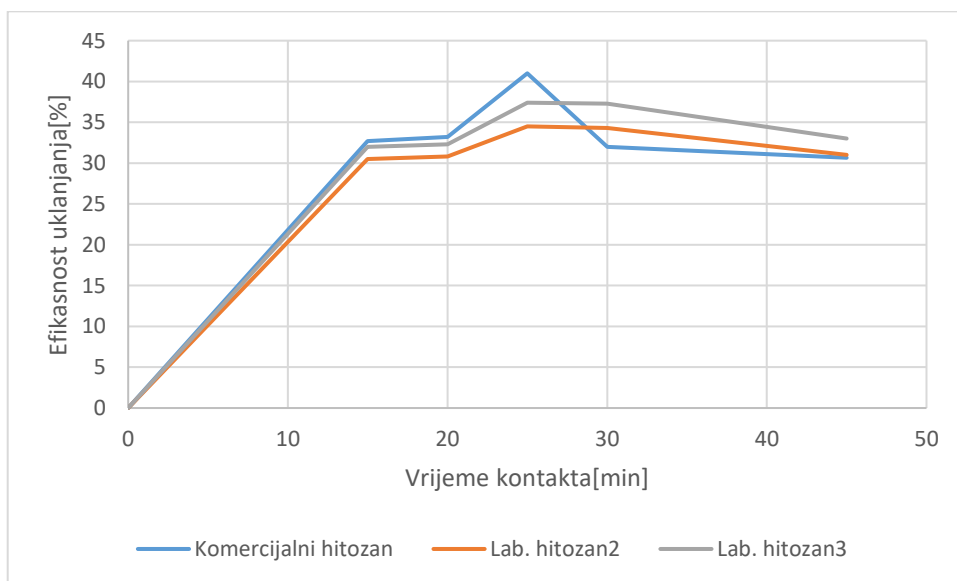
Na dijagramu (slika 34) je prikazana promjena efikasnosti uklanjanja nitrata tokom 45 minuta, pri dozi adsorbenta od 7 mg.



Slika 34. Zavisnosti efikasnosti uklanjanja od vremena kontakta za hitozan od 7mg

U prvih 15–20 minuta sva tri adsorbenta pokazuju porast u efikasnost uklanjanja nitrata, zbog toga što se najdostupnija aktivna mjesta prvo popunjavaju. Laboratorijski hitozan 2 postiže svoj vrhunac na 25. minutu (42,5%), dok komercijalni hitozan ima efikasnost od 45%. Laboratorijski hitozan 3 ipak svoj maksimum dostiže u vremenskom intervalu od oko 30 minuta, a njegova efikasnost iznosi 38,6%. Ispitivanje hitozana (komercijalnog, laboratorijskog hitozana 2 i laboratorijskog hitozana 3) trajalo je do 45. minuta. Nakon toga, efikasnost uklanjanja opada, dostižući vrijednosti od 39,85%, 21% i 35,3%, respektivno.

Na slici 35 je prikazana efikasnost uklanjanja nitrata u zavisnosti od vremena kontakta za hitozane, pri dozi od 10 mg.

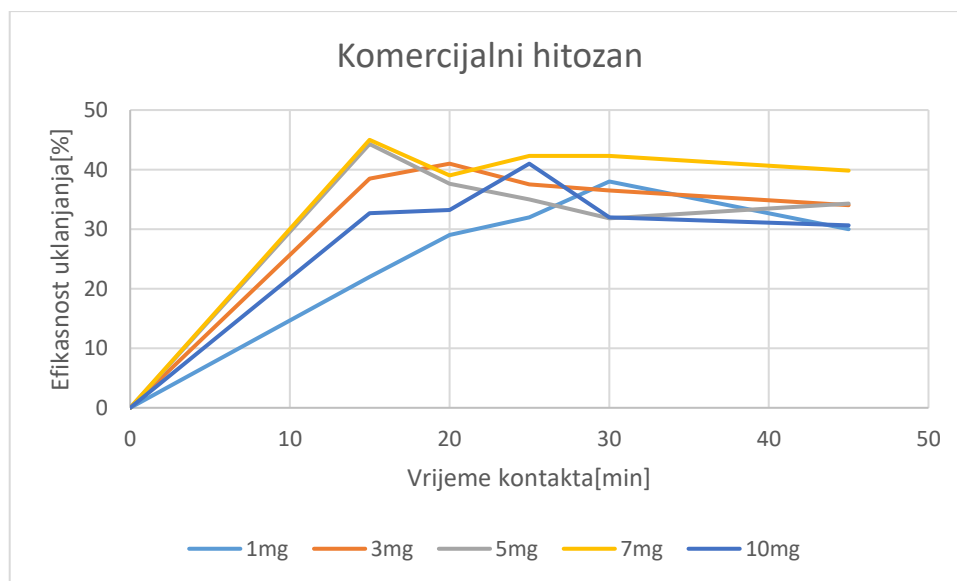


Slika 35. Zavisnosti efikasnosti uklanjanja od vremena kontakta za hitozan od 10mg

U prvih 15 minuta, sva tri uzorka postižu 32,7% (komercijalni), 30,5% (lab. hitozan 2) i 32% (lab. hitozan 3) efikasnost uklanjanja. Između 20. i 25. minuta vidljiv je nagli porast, pri čemu se komercijalni ističe kao najbolji, dok hitozan 2 i hitozan 3 dostižu nešto niže vrijednosti. U 25. minutu, dostiže se maksimum u navedenim uslovima uklanjanja nitrata: 41%, 34,5%, 37,4%, respektivno. Dok, u 45. minutu, efikasnost uklanjanja iznosi 30,65%; 31% i 33%, respektivno. Rezultati upućuju na to da se najintenzivnija adsorpcija ostvaruje između 15. i 25. minuta, dok duže vrijeme kontakta hitozana s ispitivanim rastvorom ne donosi značajno poboljšanje u efikasnosti uklanjanja nitrata.

4.3.2. Uticaj doze adsorbenta na efikasnost uklanjanja nitrata

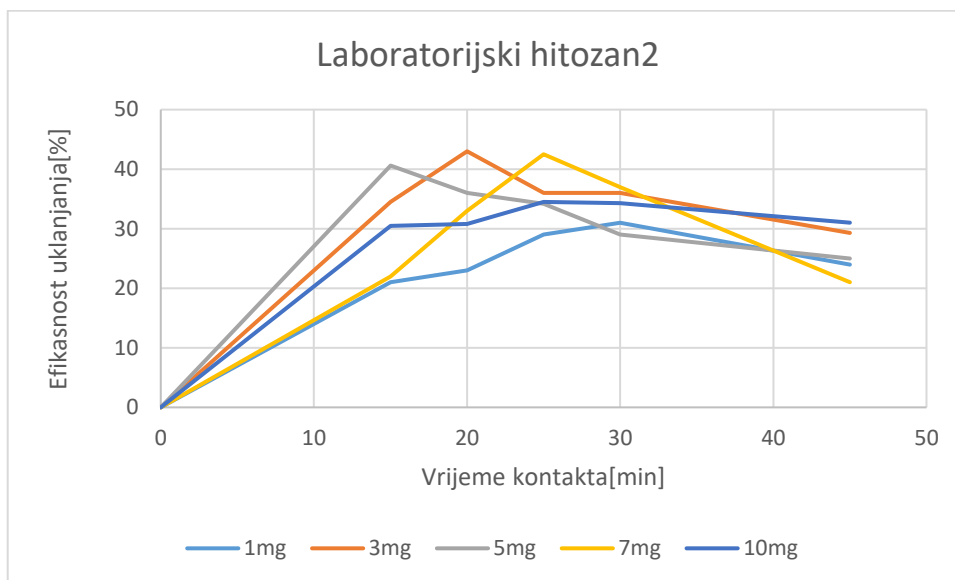
Efikasnost uklanjanja nitrata komercijalnim hitozanom zavisno od primijenjene doze adsorbenta: 1, 3, 5, 7 i 10 mg, prikazana je na slici 36.



Slika 36 . Uticaja doze komercijalnog hitozana na efikasnost uklanjanja nitrata

Pri dozama adsorbenta od 5 mg i 7 mg efikasnost uklanjanja dostiže maksimum već u 15. minutu u vrijednosti od 44,3% i 45%, respektivno, dok za 3 mg korišćenog hitozana u 20. minutu dostignut je maksimum od 41%, a nakon toga dolazi do postepenog opadanja. Za 10 mg korišćenog hitozana efikasnost uklanjanja postepeno raste i na 25. minutu dostiže maksimalnu efikasnost od 41%. Primjenom 1 mg komercijalnog hitozana bilo je potrebno duže

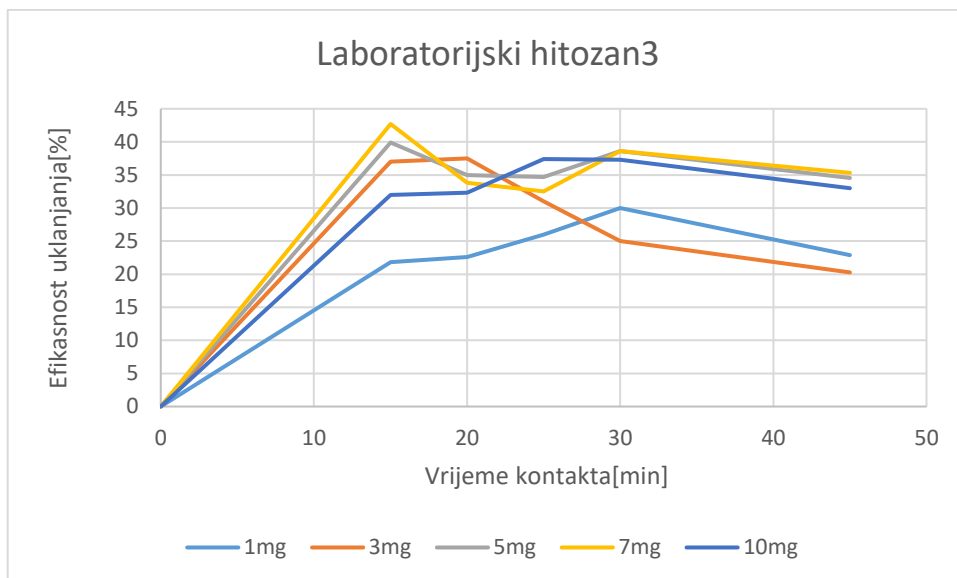
vrijeme kontakta od 30 min, kako bi se dostigala visoka efikasnost (38%) njegovom primjenom. Uticaj doze laboratorijskog hitozana 2 na efikasnost uklanjanja nitrata iz vodenih rastvora prikazana je na slici 37.



Slika 37. Uticaj mase laboratorijskog hitozana 2 na efikasnost uklanjanja nitrata

Efikasnost uklanjanja nitrata postepeno raste sa porastom doze adsorbenta, do određenog nivoa. Međutim, taj rast efikasnosti je umjereniji tj. sporiji nego kod komercijalnog hitozana. Pri dozi od 3 mg, postignuta je maksimalna efikasnost uklanjanja od 43%, u odnosu na druge primijenjene doze, i to u 20. minutu kontakta. U slučaju kada je korišćeno 7 mg navedenog hitozana, maksimalna efikasnost se dostiže u 25. minutu i iznosi 42,5%. Sa dozom adsorbenta od 5 mg, najveća efikasnost je postignuta u 15. minutu (40%), nakon čega dolazi do konstantnog pada. Pri masi od 1 mg, kako i kod komercijalnog hitozana bilo je potrebno duže vrijeme kontakta (30 min) da bi se postigla značajna efikasnost od 31%. Korišćena doza hitozana od 10 mg pokazuje umjeren porast efikasnosti tokom ispitivanog perioda.

Laboratorijski hitozan 3 pokazuje (slika 38) nešto bolje rezultate od hitozana 2.



Slika 38. *Prikaz uticaja mase laboratorijskog hitozana 3 na efikasnost uklanjanja*

Najviši nivo efikasnosti, dostignut je upotrebom 7 mg, a efikasnost iznosi približno 42,7% posle 15 minuta (slika 38). Brži početni porast efikasnosti uklanjanja u poređenju sa hitozanom 2 ukazuje na to da su modifikacije u pripremi hitozana 3 dovele do bolje raspodjele reaktivnih grupa i više pristupačnih pora, ali i dalje se ne dostižu optimalne vrijednosti kao kod industrijski obrađenog materijala tj. komercijalnog hitozana.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu prikazani su rezultati primjene komercijalnog i laboratorijski dobijenih varijanti hitozana, kao adsorbenata, za uklanjanje nitrata iz vodenih rastvora, pri različitom vremenu kontakta i dozi adsorbenta.

Rezultati istraživanja su pokazali da su sve navedene varijante hitozana postigle određenu efikasnost u uklanjanju nitrata, pri čemu su ključni faktori koji na to utiču bili vrijeme kontakta i masa adsorbenta. Najveći porast efikasnosti zabilježen je u prvih 15–20 minuta, nakon čega dolazi do usporavanja procesa adsorpcije zbog progresivnog zasićenja aktivnih mjesta. Komercijalni hitozan je pokazao bolju efikasnost uklanjanja nitrata u odnosu na laboratorijske varijante hitozana, a razlog tome može se pripisati njegovoj optimizovanoj strukturi i većem stepenu deacetilacije, što omogućava bolju dostupnost aktivnih mjesta za adsorpciju nitrata.

Povećanjem mase hitozana povećava se i procenat uklanjanja nitrata, pri čemu je najviša efikasnost zabilježena pri dozi od 5 mg i 7 mg. Maksimalne vrijednosti uklanjanja dostignute su u 15. minutu, a efikasnost je iznosila 44,3% i 45%, respektivno. Nakon toga dolazi do stabilizacije i/ili blagog opadanja efikasnosti usled moguće desorpcije ili kompeticije među jonima na površini adsorbenta.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je komercijalni hitozan efikasniji u uklanjanju nitrata u odnosu na laboratorijski sintetisane varijante, što ga čini pogodnijim za praktičnu primjenu u tretmanu otpadnih voda. Međutim, laboratorijski hitozani pokazuju obećavajući potencijal, te bi dalja optimizacija njihovih strukturnih i hemijskih svojstava mogla poboljšati njihovu adsorpcionu sposobnost. Ova istraživanja potvrđuju važnost hitozana kao ekološki prihvatljivog adsorbenta i pružaju smjernice za njegovu dalju primjenu u prečišćavanju voda.

6. LITERATURA

-
- ¹ S. H. Lin & C. L. Wu. (1996). Removal of nitrogenous compounds from aqueous solution by ozonation and ion exchange. *Water Research*. 30(8), 1851-1857.
- ² A. Hoekstra. (2015). The Water Footprint: The Relation Between Human Consumption and Water Use. *The Water We Eat*. 35–48.
- ³ R. D. Sooknah & A. C. Wilkie. (2004). Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. *Ecological Engineering*. 22(1), 27–42.
- ⁴ L. Bingqing, L. Xiaoting, D. Peiyao, G.R. Tick, Z. Chujmiao, Z. Young, M.M. UI-Hanass H. Bai & E. Lamy. (2020). Quantifying fate and transport of nitrate in saturated soil systems using fractional derivative model. *Applied Mathematical Modelling*. 81, 279-295.
- ⁵ S. Jodeh, I. Ibsharat, B. Khalaf, O. Hamed, D. Jodeh & D. Omar. (2019). The Use of Magnetic Multiwalled Carbon Nanotubes Functionalized with Chitosan for Nitrate Removal from Wastewater. *Chemistry Africa*. 2(15), 321-333.
- ⁶ D. C. de S. Alves, B. Healy, L. A. de A. Pinto, T. R. S. Cadaval & C. B. Breslin. (2021). Recent Developments in Chitosan-Based Adsorbents for the Removal of Pollutants from Aqueous Environments. *Molecules*. 26(3), 594.
- ⁷ R. S. M. A. Hamdon, A. Salem, H. Ahmed & M. M. H. El Zahar. (2022). Use of chitosan for enhancing the process of surface water purification in Egypt. *International Journal Environmental Science and Development*. 13(2), 26–34.
- ⁸ S. Suresh, M. Umesh & A. S. Santhosh. (2022). Wastewater treatment using chitosan and its derivatives: A mini review on latest developments. *Notulae Scientia Biologicae*. 14(4), 11369.
- ⁹ A. Y. Hoekstra. (2015). The Water Footprint: The Relation Between Human Consumption and Water Use. *The Water We Eat*. 35–48.
- ¹⁰ G. Z. Breish & J. Winter. (2010). Bio-removal of nitrogen from wastewaters-A review. *Journal of American Science*. 6(12), 505-528.
- ¹¹ K. M. Moloantoan, Z. P. Khetska, D. van Heerden, J.C. Castillo & E.D. Caston. (2022). Nitrate Water Contamination from Industrial Activities and Complete Denitrification as a Remediation Option. *Water*. 14(5), 799.

-
- ¹² J. Krpo-Ćetković. (2021). Hidroekologija, akvatični sistemi. *Univerzitet u Beogradu*. Beograd. 33-34.
- ¹³ S. Singh, A. G. Anil, V. Kumar, D. Kapoor, S. Subramanian, J. Singh & P. C. Ramamurthy. (2022). Nitrates in the environment: A critical review of their distribution, sensing techniques, ecological effects and remediation. *Chemosphere*. 287, 131996.
- ¹⁴ M. Li, C. Feng, Z. Zhang, S. Yang & N. Sugiura. (2010). Treatment of nitrate contaminated water using an electrochemical method. *Bioresource Technology*. 6553-6557.
- ¹⁵ B. Karthikeyan, P. Renganayaki & E. Lakeshmanan. (2017). Sources, toxicological effects and removal techniques of nitrates in groundwater: An overview. *Indian Journal of Environmental Protection*. 37(8), 667-700.
- ¹⁶ E. Abascal, L. Gómez-Coma, I. Ortiz & A. Ortiz. (2022). Global diagnosis of nitrate pollution in groundwater and review of removal technologies. *Science of the Total Environment*. 810, 152233.
- ¹⁷ A. Maherry, G. Tredoux, S. Clarke & P. Pengelbrecht. (2000). State of Nitrate Pollution in Groundwater in South Africa. *Environmental Science*. 15-36.
- ¹⁸ D. Kuzmanović. (2022). *Ekološki menadžment vodnih ekosistema*. Primena novih tehnologija u menadžmentu i ekonomiji. Beograd. 242-250.
- ¹⁹ S. M. K. Saleh, S. H. Gh. Al-Alaiy & B. A. Razzak. (2017). Application of water quality index to assessment of groundwater quality. *University of Aden Journal of Natural and Applied Sciences*. 21(1), 125-133.
- ²⁰ B. Dalmacija, J. Agbaba & S. Rončević. (2015). Tehnologije zaštite voda. Departman za hemiju, biohemiju i zaštitu životne sredine. *Prirodno-matematički fakultet*. Univerzitet u Novom Sadu. 373.
- ²¹ R. De Jong, J. Y. Yang, C. F. Drury, E. C. Huffman, V. Kirkwood & X. M. Yang. (2007). The indicator of risk of water contamination by nitrate-nitrogen. *Canadian Journal of Soil Science*. 87, 179–188.
- ²² J. Hu, X. Chen, Y. Chen, C. Li, M. Ren, C. Jiang, Y. Chen, S. An, Y. Xu & L. Zheng. (2021). Nitrate sources and transformations in surface water of a mining area due to intensive mining activities: Emphasis on effects on distinct subsidence waters. *Journal of Environmental Management*. 15, 298:113451.
- ²³ R. S. Dongre. (2018). Phosphate & Nitrate Removal from Agricultural Runoff by Chitosan-Graphite Composite. *Research and Development in Material Science*. 586-596.
- ²⁴ Y. Fernández-Nava, E. Marañón, J. Soons & L. Castrillón. (2008). Denitrification of wastewater containing high nitrate and calcium concentrations. *MDPI*. 7976–7981.

-
- ²⁵ Z. Zhou. (2015). A Global Assessment of Nitrate Contamination in Groundwater. *International Groundwater Resources Assessment Centre*. 27.
- ²⁶ S. Ghafari, M. Hasan & M. K. Aroua. (2008). Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater—A review. *Bioresource Technology*. 3965–3974
- ²⁷ https://www.google.com/search?q=nitrats%20u%20waste%20water&udm=2&tbs=rimg:Cdtv6V_1Le_19sYdn6fDfbEgjbsgIAwAIA2AIA4AIA&rlz=1C1GCEA_enME1109ME1109&hl=en&sa=X&ved=0CBoQuIBahcKEwig6PjazqeKAxUAAAAAHQAAAAAQBw&biw=1536&bih=695&dpr=1.25#vhid=puHQUmnEnr2AyM&vssid=mosaic
- ²⁸ C. Glass, J. Silverstein. (1999). Denitrification of high-nitrate, high-salinity wastewater. *Water Research*. 223–229.
- ²⁹ D. Dinnes, D. Karlen, D.B. Jaynes & T. Kaspar. (2002) Nitrogen management strategies to reduce nitrate leaching in tile drained Mid-Western soils. *Agronomy Journal*. 94:153–171
- ³⁰ R. D. Sooknah & A. C. Wilkie. (2004). Nutrient removal by floating aquatic macrophytes cultured in anaerobically digested flushed dairy manure wastewater. *Ecological Engineering*. 27-42.
- ³¹ M. Adelana.(2005). Nitrate Health Effects. *Water Encyclopedia*.1-12.
- ³² S.O. Akkinawo. (2023). Eutrophication: Causes, consequences, physical, chemical and biological techniques for mitigation strategies. *Environmental Challenges*. 1-18.
- ³³ <https://safesepticsystems.org/guide>
- ³⁴ S. Singh a , A. G. Anil, V. Kumar , D. Kapoor , S. Subramanian, J.Singh & P. C. Ramamurthy. (2022). Nitrates in the environment: A critical review of their distribution, sensing techniques, ecological effects and remediation. *Chemosphere*. 0045-6535.
- ³⁵ M. Devlin & J. Brodie. (2023). Nutrients and Eutrophication. *Marine Pollution – Monitoring, Management and Mitigation*. 75-100.
- ³⁶ <https://ekoblog.info/eutrofikacija/>
- ³⁷ H.H. Comly. (1945). Cyanosis in infants caused by nitrates in well water. *Journal of the American Medical Association*. 129: 112–116.
- ³⁸ A.P.S. Terblanche. (1991). Health hazards of nitrate in drinking water. *Water SA*. 17(1), 77–82.
- ³⁹ A. M. Fan. (2011). Nitrate and Nitrite in Drinking Water: A Toxicological Review. *Encyclopedia of Environmental Health*. 137–145.

-
- ⁴⁰ J.N. Kostraba, E. C. Gay, M. Rewers & R.F. Hamman. (1992). Nitrate levels in community drinking waters and risk of IDDM. An ecological analysis. *Diabetes Care. Pub Med.* 15(11):1505–8.
- ⁴¹ G. Dahlquist, L. Blom & G. Lonnberg. (1991). The Swedish Childhood Diabetes Study-a multivariate analysis of risk determinants for diabetes in different age groups. *Diabetologia.* 34, 757-762.
- ⁴² A. Mahvi, A. Dalvand, F. Goodarzi & M. Parvizishad. (2017). A Review of Adverse Effects and Benefits of Nitrate and Nitrite in Drinking Water and Food on Human Health. *Journal of Health Scope.* 6(3), 14164.
- ⁴³ J.M. Maanen , H.J. Albering, T.M. de Kok, S.G. van Breda, D.M. Curfs, I.T. Vermeer. (2000). Does the risk of childhood diabetes mellitus require revision of the guideline values for nitrate in drinking water? *Environ Health Perspect.* 108(5), 457–61.
- ⁴⁴ A. Casu, M. Carlini, A. Contu, G.F. Bottazzo & M. Songini. (2000). Type 1 diabetes in sardinia is not linked to nitrate levels in drinking water. *Diabetes Care.* 23(7):1043–4.
- ⁴⁵ <https://www.ruralnewsgroup.co.nz/dairy-news/dairy-farm-health/high-risk-of-nitrate-poisoning>
- ⁴⁶ J. B. Kaneene & C. S. Bruning-Fann. (1993). The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Veterinary and Human Toxicology.* 35(3):237-53.
- ⁴⁷ S. Awaghat.(2011). Nitrate and nitrite toxicity in farm animals. *Veterinary Practitioner.* 12(1), 110-112.
- ⁴⁸ P. Banerjee, P. Garai, N. C. Saha, S. Saha ,P.Sharma & A. K. Mait. (2023). A critical review on the effect of nitrate pollution in aquatic invertebrates and fish. *Water Air Soil Pollut.*
- ⁴⁹ S.Wujitsu, B. Fraters. R.V.Duijnen & S. Boekhold. (2022). Monitoring of nitrogen in water in the EU Legal framework, effects of nitrate, design principles, effectiveness and future developments Policy Department for Citizens' Rights and Constitutional Affairs Directorate-General for Internal Policies PE. *European Parliament Committee on Petitions.* 1-56.
- ⁵⁰ S. Ferro. (2012). Removal Of Nitrates From Industrial Wastewater-A critical review. *Lachimica laindustria.* 100-110.
- ⁵¹ L. A.Schaider,L. Swetschinski, C.Champell, R.A.Rudell. (2023). Environmental justice and drinking water quality: are there socioeconomic disparities in nitrate levels in U.S. drinking water? *Pub Med.* 18:3,1-20.
- ⁵² Nitrate and Nitrite in Drinking-water.(2003). Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality.WHO. 1-41.

-
- ⁵³ M. Mohsenipour, S. Shahid & K. Ebrahimi. (2014). Removal Techniques of Nitrate from Water. *Asian Journal of Chemistry*. 26 (23), 7881-7886.
- ⁵⁴ Matei, Racoviteanu G. (2021). Review of the technologies for nitrates removal from water intended for human consumption. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 664(1), 012024.
- ⁵⁵ R. M. Garud, S. V. Kore & G. S. Kulkarni. (2011). A Short Review on Process and Applications of Reverse Osmosis. *Environmental Journal*. 1(3), 233-238.
- ⁵⁶ A. Matei, E. Vulpaşu, & G. Racoviţeanu. (2022). Nitrates removal from water using ion exchange technologies. *Revista Română de Inginerie Civilă*. 13(4).
- ⁵⁷ B. V. der Bruggen. (2015). Advances in electrodialysis for water treatment. *Advances in Membrane Technologies for Water Treatment*. 185–203.
- ⁵⁸ <https://journaloption.com/what-is-bipolar-membrane-electrodialysis-forkid/>
- ⁵⁹ D. Grgas , T. Štefanac, M. Galant, A. Brozinčević, A. Štrkalj, & T. L. Dragičević. (2021). Biološka denitrifikacija. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*. 16 (1-2), 28-34.
- ⁶⁰ C. Seidel, C. Gorman, J.L. Darby, & V.B. Jensen. (2011). An Assessment of the State of Nitrate Treatment Alternative. Final Report. *American Water Works Association Inorganic Contaminant Research and Inorganic Water Quality Joint Project Committees*.
- ⁶¹ S. Ghafari, M. Hasan, & M. K. Aroua. (2008). Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater—A review. *Bioresource Technology*. 99(10), 3965–3974.
- ⁶² A. Bhatnagar, & M. Sillanpää. (2011). A review of emerging adsorbents for nitrate removal from water. *Chemical Engineering Journal*. 168(2), pp.493–504.
- ⁶³ Neşre Öztürk*, & T. Enn' il Bektas. (2004). Nitrate removal from aqueous solution by adsorption onto various materials. *Journal of Hazardous Materials*. 155–162.
- ⁶⁴ R. M. Dhoble, & L. A. Peechattukudy. (2017). Removal of Nitrate from Water by Adsorption – A Review. *IJSTE*. 3-9.
- ⁶⁵ J. A. F. López, M. Alacid, J.M. Obón, R. M. Vives & J.M. Angosto. (2023). Nitrate-Polluted Waterbodies Remediation: Global Insights into Treatments for Compliance. *Appl. Sci*. 13, 4154.
- ⁶⁶ A. M. Elgarahy, M.G. Eloffy, E. Guibal, H. M. Alghamdi, & K. Z. Elwakeel. (2023). Use of biopolymers in wastewater treatment: A brief review of current trends and prospects. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 292-320.

-
- ⁶⁷ T. Russo, P. Fucile, R. Giacometti, & F. Sannino. (2021). Sustainable Removal of Contaminants by Biopolymers: A Novel Approach for Wastewater Treatment. *Current State and Future Perspectives*. 9(4), 719.
- ⁶⁸ Grégorio Crini.(2019). Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Environmental Chemistry Letters*. 17,1623–1643.
- ⁶⁹ I. Dziedzic, & A. Kertmen. (2023). Methods of Chitosan Identification: History and Trends. *Letters in Applied NanoBioScience*.
- ⁷⁰ M. Rinaudo. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 31(7), 603–632.
- ⁷¹ A. K. Mondal, D. Alemu, & E. Getachew. (2023). Study on the Physicochemical Properties of Chitosan and their Applications in the Biomedical Sector. *International Journal of Polymer Science*. 1-13.
- ⁷² P. S. Bakshi, D. Selvakumar, K. Kadirvelu, & N. S. Kumar. (2020). Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1072–1083.
- ⁷³ T. Jin, T. Liu, E. Lam, & A. Moores.(2021). Chitin and chitosan on the nanoscale. *Royal Society of Chemistry*. 505-542.
- ⁷⁴ B. Li, J. Elango, & W. Wu. (2020). Recent Advancement of Molecular Structure and Biomaterial Function of Chitosan from Marine Organisms for Pharmaceutical and Nutraceutical Application. *Applied Science*. 10(14), 4719
- ⁷⁵ D.P. Chattopadhyay, & M.S. Inamdar. (2010). A queous behaviour of chitosan. *Int. J. Polym. Sci*. 1-7.
- ⁷⁶ M.R. Kasaai, J. Arul, & G. Charlet. (2000). Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *J. Polym. Sci. Part B*. 38:2591–2598.
- ⁷⁷ N. C. Minh, N. Van Hoa, T. S. Trung, S. Gopi, S. Thomas, & A. Pius. (2020). Preparation, properties, and application of low-molecular-weight chitosan. *Handbook of Chitin and Chitosan*. 453-471.
- ⁷⁸ M.R. Kasaai. (2010). Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques, a review. *Carbohydr. Polymers*. 801–810.
- ⁷⁹ Z. Zakaria, Z. Izzah, M. Jawaid, & A. Hassan. (2012). Effect of degree of deacetylation of chitosan on thermal stability and compatibility of chitosan-polyamide blend. *Bioresources*. 558-568.
- ⁸⁰ R. C. Goy, D. de Britto, & O. B. G. Assis. (2009). A Review of the Antimicrobial Activity of Chitosan. *Polimeros*. 241-247.

-
- ⁸¹ A. Singh, R. Kukreti, L. Saso, & S. Kukreti. (2019). Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules*. 24(8), 1583.
- ⁸² I. Aranaz, A.R. Alcántara, M.C. Civera, C. Arias, B.Elorza, A. H. Caballero, & N. Acosta. (2021). Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*. 13(19), 3256.
- ⁸³ K. Azuma, T. Osaki, S. Minami, & Y. Okamoto. (2015). Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. *J. Funct. Biomater*. 6(1), 33-49.
- ⁸⁴ A. EL-Araby, W. Janati, R. Ullah, S. Ercisli, & F. Errachidi. (2024). Chitosan, chitosan derivatives, and chitosan-based nanocomposites: eco-friendly materials for advanced applications (a review). *Sec. Green and Sustainable Chemistry*. 1-21.
- ⁸⁵ R. Al I. Reshad, T. A. Jishan, & N. N. Chowdhury. (2021). Chitosan and its Broad Applications: A Brief Review. *Journal Of Clinical And Experimental Investigations*. 1-13.
- ⁸⁶ H. Hemmami, A. B. Amor, S. Zeghoud, S. Ahmed, & A. A. Alhamad. (2024). Chitosan, Its Derivatives, Sources, Preparation Methods, and Applications: A Review. *JOTCSA*.341-364.
- ⁸⁷ A.R.Egorov, A. A. Kirichuk, V. V. Rubanik, V. V. Jr. Rubanik, A. G. Tskhoverbov, & A. S. Kritchenkov. (2023). Chitosan and Its Derivatives: Preparation and Antibacterial Properties. *Materials*. 16(18), 6076.
- ⁸⁸ S. Kou, L. M. Peters, & M. R. Mucalo. (2021). Chitosan: A review of sources and preparation methods. *International Journal of Biological Macromolecules*. 169, 85–94
- ⁸⁹ N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, & G. Crini. (2019). Fundamentals and Applications of Chitosan. *Sustainable Agriculture Reviews*. 49-123.
- ⁹⁰ A. Mendis, C. Thambiliyagodage, M. Jayanetti, G. Ekanayake, H. Liyanaarachchi, & S. Vigneswaran. (2023). Recent Advances in Chitosan-Based Applications—A Review. *Materials*. 16(5),1-58.
- ⁹¹ V. Manigandan, R. Karthik, S. Ramachandran, & S. Rajagopal. (2018). Chitosan Applications in Food Industry. *Biopolymers for Food Design*.
- ⁹² M. Derwich, L. Lassmann, K. Machut, A. Zoltowska, & E. Pawlowska. (2022). General Characteristics, Biomedical and Dental Application, and Usage of Chitosan in the Treatment of Temporomandibular Joint Disorders:A Narrative Review. *Pharmaceutics*.14(305),1-18.
- ⁹³ R. R. Doval, S. P. T. Arellanes, A. Y. T. Barajas, A. G. Shancez, & A. A. V. Lazcano. (2023). Chitosan: Properties and Its Application in Agriculture in Context of Molecular Weight. *Polymers*.
- ⁹⁴ N. M. Crini, E. Lichtfouse, G. Torri, & G. Crini. (2019). Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. *Environmental Chemistry Letters*. 1667-1692.

-
- ⁹⁵ P. Samyn, A. Barhoum, T. Öhlund, & A. Dufresne. (2017). Review: nanoparticles and nanostructured materials in papermaking. *Journal of Materials Science*. 53(1), 146–184.
- ⁹⁶ A. Muxika, A. Etxabide, J. Uranga, P. Guerrero, & K. de la Caba. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 105, pp.1358–1368.
- ⁹⁷ A. Bhatnagar, & M. Sillanpää. (2009). Applications of chitin- and chitosan-derivatives for the detoxification of water and wastewater — A short review. *Advances in Colloid and Interface Science*. 152, 26-38.
- ⁹⁸ A. Szygula, E. Guibal, M. A. Palacín, M. Ruiz, & A. M. Sastre. (2009). Removal of an anionic dye (Acid Blue 92) by coagulation–flocculation using chitosan. *Journal of Environmental Management*. 90(10), 2979–2986.
- ⁹⁹ C. S. Lee, J. Robinson, & M. F. Chong. (2014). A review on application of flocculants in wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*. 92(6), 489–508.
- ¹⁰⁰ P. Nechita. (2017). Applications of Chitosan in Wastewater Treatment. *Biological Activities and Application of Marine Polysaccharides*. 15(6), 1453.
- ¹⁰¹ M. Ariffin, A. Hassan, T. P. Li, & Z. Z. Noor. (2009). Coagulation and flocculation treatment of wastewater in textile industry using chitosan, *Journal of Chemical and Natural Resources Engineering*. 4(1), 43-53.
- ¹⁰² M. Nikzad, & F. Poureini. (2015). Application of Chitosan for wastewater treatment. *International Conference on Sustainable Development, Strategies & Challenges*. 1-9.
- ¹⁰³ P. Kalyani, & K.P.J. Hemalatha. (2016). Biosorption of heavy metals in the environment-a review paper. *International Journal of Current Research and Academic Review*. 74-102.
- ¹⁰⁴ S. Suresh, M. Umesh, & A. S. Santhosh. (2022). Wastewater treatment using chitosan and its derivatives: A mini review on latest developments. *Notuale Scientia Biologicae*. 14(4):11369.
- ¹⁰⁵ M. L. Masheane, L. N. Nthunya, S. P. Malinga, E. N. Nxumalo, & S. D. Mhlanga. (2017). Chitosan-based nanocomposites for de-nitrification of water. *Physics and Chemistry of the Earth. Parts A/B/C*. 100(1), 212–224.
- ¹⁰⁶ T. Kekes, & C. Tzia. (2020). Adsorption of indigo carmine on functional chitosan and β -cyclodextrin/chitosan beads: Equilibrium, kinetics and mechanism studies. *Journal of Environmental Management*. 262, 110372.
- ¹⁰⁷ V. Sureshkumar, S. C. G. Kiruba Daniel, K. Ruckmani, & M. Sivakumar. (2015). Fabrication of chitosan–magnetite nanocomposite strip for chromium removal. *Appl Nanosci*. 6(2), 1-9.

-
- ¹⁰⁸ A. J. AL-Manhel, A. R. S. AL-Hilphy, & A.K. Niamah. (2016). Extraction of chitosan, characterisation and its use for water purification. *Jurnal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 11:100122.
- ¹⁰⁹ L.N. Rao. (2015). Coagulation and flocculation of industrial wastewater by chitosan. *IJEAS*. 2(7), 50-52.
- ¹¹⁰ N. Varan. (2017). The Use of Titration Technique and FTIR Bands to Determine the Deacetylation Degree of Chitosan Samples. *Textile Sci Eng*. 17(1), 186-190.
- ¹¹¹ APHA (2005) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.
- ¹¹² A. Drabczyk, S. Kudłacik-Kramarczyk, M. Głąb, M. Kędzierska, A. Jaromin, D. Mierzwiński, & B. Tylińczak. (2020). Physicochemical Investigations of Chitosan-Based Hydrogels Containing Aloe Vera Designed for Biomedical Use. *Materials*.
- ¹¹³ S. Pokhrel, R. Lach, W. Grellmann, A. Wutzler, W. Lebek, R. Godehardt, P. N. Yadav, & R. Adhikari. (2016). Synthesis of Chitosan from Prawn Shells and Characterization of its Structural and Antimicrobial Properties. *Nepal Journal of Science and Technology*. 13(14), 3073.
- ¹¹⁴ Y. S. Puvvada, S. Vankayalapati, & S. Sukhavas. (2012). Extraction of chitin and chitosan from exoskeleton of shrimp for application in the pharmaceutical industry. *International Current Pharmaceutical Journal*. 17(1), 5-9.
- ¹¹⁵ A. Fatoni, P. L. Hariani, Hermansyah, & A. Lesbani. (2018). Synthesis and Characterization of Chitosan Linked by Methylene Bridge and Schiff Base of 4,4-Diaminodiphenyl Ether-Vanillin. *Indones. J. Chem*. 1(9): 258-263.
- ¹¹⁶ N. G. Kandile, H. T. Zaky, M. I. Mohamed, A.S. Nasr, & Y.G. Ali. (2018). Extraction and Characterization of Chitosan from Shrimp Shells. *Jurnal of Organic Polymer Materials*. 18(1), 92 – 101.
- ¹¹⁷ K. M. Reddy, & S. P. Singh, (2020). Easy removal of nitrate and phosphate anions from water by low cost chitosan and activated charcoal. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. 18(10–11): 20200113.