

# Koncentracije arsena, kadmija i žive u pčelinjem vosku (*Apis mellifera*) tijekom njegove prerade iz saća u satne osnove



M. Kosanović, N. Bilandžić, M. Sedak, S. Kos i I. Tlak Gajger\*

## Sažetak

Teški se metali mogu desetljećima kumulirati u vosku. Uobičajena je pčelarska praksa vosak kontinuirano prerađivati u nove satne osnove i ponovno ga upotrebljavati u intenzivnom pčelarstvu. Uzorci pčelinjeg voska analizirani su primjenom grafitne tehnike atomske apsorpcijske spektrometrije (GFAAS) s ciljem utvrđivanja koncentracije As i Cd te koncentracija Hg primjenom analizatora žive. Pretraženi su uzorci voska poznatog podrijetla i starosti tijekom njegove prerade u satne osnove primjenom metode lijevanja na rashladene valjke s otisnutom Maraldijevom piramidom, a nakon dvostruke faze produžene sedimentacije i hlađenja. Ustvrdene su statistički značajne

razlike između koncentracija Hg ( $P < 0,05$ ) u pretraživanim uzorcima voska uzorkovanim iz više slojeva rastaljenog voska u čeličnim spremnicima te posebice značajno između slojeva "pročišćenog" voska korištenog za izradu satnih osnova i tamnog sloja taloženog sedam dana koji je kao otpadni materijal uklonjen iz daljnje prerade. Rezultati istraživanja potvrđuju da se primjenom opisane metode može učinkovito "isprati" akumulirane teške metale iz rastaljenog saća koji predstavlja sirovinu ovog vrijednog repromaterijala.

**Ključne riječi:** teški metali; saće; vosak; satna osnova; prerada

## Uvod

Vosak je pravi pčelinji proizvod. Medonosne pčele (*Apis mellifera*) ga koriste kao građevni materijal za saće.

Proizvode ga u voskovnim žlijezdama koje se nalaze na trbušnim ljuščicama zatka (7. do 10. ljuščica), a najbolje su

Marina KOSANOVIĆ, dr. med. vet., doktorantica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska; dr. sc. Nina BILANDŽIĆ, dipl. ing. biotehnol., znanstvena savjetnica, dr. sc. Marija SEDAK, dipl. ing. prehr. tehnol., Hrvatski veterinarski institut, Zagreb, Hrvatska; Snježana KOS, univ. dr. dent. med., Spadent d.o.o., Zagreb, Hrvatska; dr. sc. Ivana TLAK GAJGER\* (dopisni autor, e-mail: itlak@vef.hr), dr. med. vet., izvanredna profesorica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

razvijene u pčela radilica u dobi 12. do 18. dana života (Caron i Connor, 2013.). Vosak se u intenzivnom pčelarstvu kontinuirano reciklira preradom u satne osnove (Bogdanov, 2009.). Pri tome se najviše pčelinjeg voska u satne osnove preradi u specijaliziranim radionicama opremljenim odgovarajućom opremom koja mora osiguravati pravilnu provedbu pojedine faze prerade, primjerice vrlo važne sterilizacije. Budući da satne osnove predstavljaju nužan materijal pri uspostavljanju proizvodnih pčelinjih zajednica kao i tehnološkim postupcima pripreme zajednica za glavne medonosne paše, vrlo je važno da nisu onečišćene ksenobioticima (Coggshall i Morse, 1984., Bogdanov, 2006.).

Vosak je sastavljen od složene smjese estera visoko zasićenih masnih kiselina, lipida, alkohola, ugljikohidrata, bjelančevina i drugih tvari (Tulloch, 1980.) i zato saće u košnicama predstavlja "spužvu" za pohranu niza različitih onečišćivača iz okoliša (Buchwald i sur., 2009.). Stoga se vosak uz druge pčelinje proizvode može koristiti kao vrijedan materijal prilikom prikupljanja podataka o stupnju onečišćenja okoliša teškim metalima (Conti i Botre, 2001.). Prema literaturnim podacima vosak je općenito vrlo rijetko pretraživan, najmanje od svih pčelinjih proizvoda usprkos iznimnoj važnosti za fiziologiju pčelinje zajednice kao i zdravstvenu ispravnost meda i peluda koji zriju te su pohranjeni u stanicama saća (Bogdanov, 2016.).

Arsen (As), kadmij (Cd) i živu (Hg) se svrstava u teške metale koje se može ustvrditi pri procjenjivanju stupnja onečišćenja okoliša. Obzirom na raspored i redoslijed obavljanja zadataka kućnih pčela i pčela skupljačica navedenim metalima može se onečistiti i saće (Devillers i Pham-Delegue, 2002.), a prisutnost teških metala u vosku ovisi primarno o stupnju onečišćenja zraka, vode, tla, peluda i nektara (Buchwald i sur., 2009.). Iako vosak nije hrana, koristi

se kao dodatak hrani i u kozmetičkoj industriji, a sukladno važećoj legislativi na razini Europske unije propisane su maksimalne dopuštene vrijednosti spomenutih toksičnih metala: 3 mg/kg za As i 1 mg/kg za Hg (Anonymous, 1996.).

Kao posljedica dugogodišnje akumulacije spomenutih toksičnih metala i nemogućnosti njihove razgradnje u saću mogu nastati poremećaji u reproduktivnim, kao i drugim fiziološkim funkcijama pčelinje zajednice (Mahmoudi i sur., 2015.). Uobičajeni postupci prilikom prerade voska također nisu dovoljni za potpuno, a vjerojatno ni zadovoljavajuće "čišćenje", dok je primjenom tehnologije lijevanja voska s produženom fazom hlađenja i sedimentacije ustvrđena mogućnost uklanjanja znatne količine teških metala iz sirovine voska (Tlak Gajger i sur., 2014., Tlak Gajger i sur., 2016.a, Tlak Gajger i sur., 2016.b).

Obzirom na dosad navedeno cilj ovog istraživanja bio je ustvrditi koncentracije As, Cd i Hg u uzorcima voska poznatog podrijetla i starosti tijekom njegove prerade u satne osnove primjenom metode lijevanja na rashlađene valjke s otisnutom Maraldijevom piramidom, a nakon dvostruke faze produžene sedimentacije i hlađenja. Naime, nakon uobičajenog produženog taloženja u trajanju od 48 sati. Takav postupak je produžen na sedam dana i tada završava odbacivanjem istaloženog tamnog sloja te ponovno sedimentira tijekom sljedećih 48 sati prije ispuštanja i izrade konačnog proizvoda u obliku satne osnove.

## Materijali i metode

### Uzorkovanje

Kolutove sirovog voska u radionicu za preradu voska u satne osnove dostavio je profesionalni pčelar. Komercijalni pčelinjak gdje je tamno saće izvađeno iz košnica tijekom redovitog godišnjeg remonta saća i rastaljeno u vosak smješten je u kontinentalnom dijelu

Republike Hrvatske (45°56'54.71"N, 16°37'46.06"E; NUTS 2-HR04 i NUTS 3-HR045). Tijekom procesa prerade, a nakon taljenja dostavljenih kolutova voska, u čeličnom spremniku volumena 200 L i dvostrukih stjenki gdje cirkulira zagrijana voda vosak je homogeniziran i zagrijan na temperaturu 125 °C. Navedena temperatura nužno je potrebna zbog sterilizacije u svrhu uništavanja uzročnika opasnih zaraznih bolesti (primjerice spora bakterije *Paenibacillus larvae*) kao i uzročnika niza uvjetovanih bolesti pčelinjih zajednica. Sterilizacija uz istodobnu homogenizaciju trajala je 40 minuta, nakon čega je zaustavljena homogenizacija i temperatura automatski prebačena na 75 °C. Prvi set uzoraka uzet je nakon 48 sati sedimentacije (taloženja) s tri razine izravno iz spremnika: s površine (L1a), iz srednjeg sloja rastaljenog voska (L2a) te s dna spremnika (L3a). Sljedeće uzorkovanje provedeno je nakon sedam dana taloženja pri temperaturi 75 °C tako što je u potpunosti iz spremnika ispušten tamni talog (L1b) koji je neškodljivo uklonjen iz prerade. Svijetli vosak je uporabom pumpe pretočen u drugi čisti čelični spremnik i ostavljen na ponovnom taloženju i hlađenju tijekom sljedećih 48 sati nakon čega je ponovljeno uzorkovanje s površine (L1c), iz srednjeg sloja voska (L2c) te s dna spremnika (L3 c). Nakon svakog pojedinačnog uzorkovanja 100 mL rastaljenog voska stavljeno je u čistu plastičnu posudicu, označeno i dostavljeno u laboratorij gdje je do analiziranja prikupljeni materijal pohranjen pri 4 do 8 °C.

### Kemikalije i standardi

Svi upotrijebljeni reagensi ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HCl}$ ) su analitičke kvalitete (Kemika, Hrvatska). U analizama je korištena ultračista voda ( $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ ) dobivena primjenom sustava Milli-Q Millipore (Merck, Millipore Corporation, Njemačka). Plastično i stakleno posuđe je prije uporabe očišćeno potapanjem u razrijeđenoj  $\text{HNO}_3$  (1/9, v/v) te zadnjim

ispiranjem u destiliranoj vodi. Za kalibraciju instrumenata korištene su pojedinačne certificirane standardne otopine za svaki od analiziranih elemenata u koncentraciji  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  (Perkin Elmer, SAD). Radni standardi za izračunavanje kalibracijske krivulje su pripremljeni razrjeđivanjem matičnih cetrificiranih standardnih otopina s  $\text{HNO}_3$  (0,2 %). Kao modifikatori matriksa kod svake atomizacije za Cd uporabljeni su  $0,005 \text{ mg Pd}(\text{NO}_3)_2$  i  $0,003 \text{ mg Mg}(\text{NO}_3)_2$  (Perkin Elmer, SAD).

### Priprema uzoraka i analize

Uzorci voska (2 g) su izvagani u teflonskim posudicama u koje je dodano 5 mL  $\text{HNO}_3$  (65% v/v) i 1 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v), zatim su tako pripremljeni uzorci razoreni primjenom zatvorenog sustava mikrovalne pećnice Multiwave 3000 (Anton Paar, Njemačka). Mokro spaljivanje primjenom mikrovalne pećnice provedeno je u dva koraka: početni korak pri snazi 1200 W tijekom deset minuta, a onda nastavljen zadržavanjem pri istim uvjetima narednih deset minuta. Drugi korak na 0 W tijekom 15 minuta. Dobivene otopine su prebačene u odmjerne tikvice te su do konačnog volumena od 50 mL nadopunjene dvostruko deioniziranom vodom. Na jednaki način, ali bez uzorka, pripremljena je slijepa proba.

Koncentracije analiziranih elemenata (As, Cd) određene su pri valnim duljinama 193,7 i 228,8 nm pomoću grafitnog atomskog apsorpcijskog spektrometra AAnalyst 600 (Perkin Elmer, SAD). Koncentracije Hg u uzorcima voska određene su bez prethodne obrade kiselinom, a primjenom analizatora žive AMA 251 (Advanced Mercury Analyzer, Leco, Poljska) na principu izravnog izgaranja uzorka u atmosferi bogatoj kisikom. Uvjeti rada instrumenata i programi optimiziranih temperatura grafitnog spektrometra i analizatora žive prikazani su u Tabeli 1 a, b. Uzorci su analizirani u skupinama koje uključuju slijepa probe, standarde kali-

**Tabela 1.a,b** Uvjeti rada određivanja As i Cd primjenom grafitne tehnike atomske apsorpcijske spektrometrije (GFAAS) i koncentracije Hg primjenom analizatora žive

1. a

Grafitna tehnika atomske apsorpcijske spektrometrije (GFAAS)			
Metal	As	Cd	Pb
Valna duljina (nm)	193,7	228,8	283,3
Protok argona (mL/min)	250	250	250
Volumen uzorka (μL)	20	20	20
Volumen modifikatora (μL)	5	5	5
Program grijanja °C (vrijeme postizanja temp., vrijeme zadržavanja (s))			
Sušenje 1	110 (1, 30)	110 (1, 30)	110 (1, 30)
Sušenje 2	130 (15, 30)	130 (15, 30)	130 (15, 30)
Suho spaljivanje	1600 (10, 20)	700 (10, 20)	900 (10, 20)
Atomizacija	2000 (0, 5)	1550 (0, 5)	1850 (0, 5)
Čišćenje	2450 (1, 3)	2450 (1, 3)	2450 (1, 3)

1.b

Analizator žive	
Metal	Hg
Valna duljina (nm)	253,65
Vrijeme sušenja (s)	60
Vrijeme raspadanja (s)	150
Vrijeme čekanja (s)	45
Težina / Volumen uzorka	100 mg/100 mL
Raspon rada	0,05 - 600 ng

bracijskih krivulji i po dva predstavnika probnih signala. Granice detekcije (LOD) su izračunate kao koncentracija koje odgovaraju vrijednosti tri puta standardne devijacije od deset slijepih proba izražene u  $\text{ng kg}^{-1}$  (As 20, Cd 1 i Hg 1).

### Statistička analiza

Rezultati koncentracija As, Cd i Hg obrađeni su uporabom softverskog programa STATA® 13.1 (StataCorp®, USA). Koncentracije elemenata ustvrđene u uzorcima voska izražene su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija (SD) u

slučajevima kad su po skupini obrađena dva ili više uzorka. Shapiro-Wilk test je korišten za utvrđivanje raspodjele dobivenih podataka, a Kruskal-Wallis test za utvrđivanje statističkih razlika u koncentracijama elemenata između različitih skupina. Statistički značajne razlike su izražene na razini vjerojatnosti od 0,05.

### Rezultati

Rezultati provedenih analiza kojima su ustvrđene koncentracije As, Cd i

**Tabela 2.** Ustvrdene koncentracije teških metala (As, Cd i Hg) u uzorcima pčelinjeg voska uzetima tijekom njegove prerade primjenom metode lijevanja.

ELEMENT		As ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Cd ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) *	Hg ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Prikaz dizajna uzorkovanja rastaljenog voska tijekom različitih faza njegove prerade Srednja vrijednost $\pm$ SD		Srednja vrijednost $\pm$ SD	Srednja vrijednost $\pm$ SD	Srednja vrijednost $\pm$ SD
U Z O R C I  R A S T A L J E N O G  V O S K A	L1a (n = 1) (uzorkovano s površine)	20,00 $\pm$ 0	1,0 $\pm$ 0	1,00 $\pm$ 0
	L2a (n = 3) (uzorkovano u srednjem sloju)	20,00 $\pm$ 0	4,0 $\pm$ 0	3,00 $\pm$ 0
	L3a (n = 1) (uzorkovano s dna)	20,00 $\pm$ 0	9,67 $\pm$ 0,58	1,00 $\pm$ 0
	L1b (n = 2) (uzorkovano iz izdvojenog taloga na dnu spremnika nakon 7 dana)	30,7 $\pm$ 20,00	49 $\pm$ 17,7	95,3 $\pm$ 148
	L1c (n = 3) (uzorkovano s površine)	20,00 $\pm$ 0	1,33 $\pm$ 0,58	2,67 $\pm$ 1,15
	L2c (n = 3) (uzorkovano u srednjem sloju)	20,00 $\pm$ 0	6 $\pm$ 6,93	5,67 $\pm$ 2,52
	L3c (n = 4) (uzorkovano s dna)	20,00 $\pm$ 0	11 $\pm$ 9,63	14,5 $\pm$ 5,80

\*Statistički značajna razlika u utvrđenim koncentracijama između pojedinih uzorkovanih skupina voskova ( $P < 0,05$ )

Hg u uzorcima voska uzetima tijekom različitih faza njegove prerade u satne osnove prikazani su u Tabeli 2.

## Rasprava

Rezultati provedenih istraživanja vezanih uz utvrđivanje koncentracija teških metala u uzorcima odraslih pčela, među i peludu su značajno zastupljeni u člancima dostupnih bibliografskih baza (Conti i Botre, 2001., Bilandžić i sur., 2014.a,b, Bilandžić i sur., 2017.). Međutim, vosak, iako iznimno značajan

za suvremeno intenzivno pčelarstvo, je vrlo rijetko pretraživan na prisutnost okolišnih ksenobiotika (Wu i sur., 2011., 2012., Ravoet i sur., 2015., Tlak Gajger i sur., 2016.a, Calatayud-Vernich i sur., 2017.) ili prisutnost patvorina (Svečnjak i sur., 2015.). Obzirom da je kontinuirano prerađivanje voska uobičajena pčelarska praksa, važno je tijekom prerade toga vrlo skupog repromaterijala nadzirati, kako bi konačan proizvod - satna osnova bila zadovoljavajuće kvalitete i omogućila pčelinjoj zajednici brzu izgradnju saća

koje imaju mnogostruke mehaničke i biološke funkcije u košnici.

Ovim istraživanjem ustvrđene su statistički značajne razlike koncentracija Hg u pretraživanim uzorcima voska uzorkovanim tijekom više koraka prerade voska u satne osnove primjenom metode lijevanja s produženim trajanjem faza hlađenja i sedimentacije. Utvrdene koncentracije svih pretraživanih toksičnih elementa (As, Cd, Hg) su manje od maksimalno dopuštenih sukladno važećim europskim zakonskim propisima (Anonymous, 1996.). Koncentracije toksičnih metala ustvrđene u različitim slojevima rastaljenog voska prouzročene izravno iz specijaliziranog spremnika smanjivale su se sljedećim redoslijedom: L1b>(L1a, L2a, L3a)=(L1c, L2c, L3c) za As; L1b>L3c>L3a>L2c>L2a>L1c>L1a za Cd; te L1b>L3c> L2c>L2a> L1c>L3a=L1a za Hg.

U usporedbi s prethodno provedenim istraživanjem (Tlak Gajger i sur., 2016.a) na uzorcima voska kojima nije bilo poznato vrijeme držanja u košnici prije remonta saća, kao ni uvjeti ni dužina pohrane "kolutova" voska prije dostavljanja na preradu, sada dobiveni rezultati upućuju na visoku kvalitetu voska koji se koristio za izradu satnih osnova. Najveće koncentracije toksičnih metala u oba provedena istraživanja utvrđene su u L3, odnosno L1b sloju rastaljenog voska, a koji je tretiran kao otpadni materijal te uklonjen iz prerađivačkog procesa prije lijevanja tekućeg voska na rashlađene valjke o otiskom šestokutnih stanica ili u ovom istraživanju nakon sedam dana taloženja voska. Koncentracije Cd ustvrđene u slojevima voska koji je korišten za izradu satnih osnova su značajno niže, ili uzorcima sakupljenim na nekim lokacijama, slične prethodno objavljenim rezultatima (Formicki i sur., 2013.).

Uglavnom, onečišćenje pčelinjih proizvoda pa tako i voska, toksičnim metalima ponajviše ovisi o intenzitetu industrijske ili poljoprivredne djelatnosti

na pojedinim zemljopisnim područjima (Formicki i sur., 2013.). Također, sukladno rezultatima Tlak Gajger i sur. (2016.b), kao i ovog istraživanja, stupanj onečišćenja voska toksičnim metalima ovisi i o načinima provedbe biološko-tehnoloških postupaka na pčelinjaku, stupnju implementacije dobre pčelarske - veterinarske - okolišne prakse, uvjetima pohrane kolutova voska kao i metodi uporabljenj pri preradi voska u satne osnove.

## Literatura

1. Anon. (1996): Directive 96/77/EC of the European Commission of 2 December 1996 laying down specific purity criteria on food additives other than colours and sweeteners. [http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit\\_flavor/14\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/addit_flavor/14_en.pdf). Pristupljeno 10. listopada 2018.
2. BILANDŽIĆ, N., M. GAČIĆ, M. ĐOKIĆ, M. SEDAK, Đ. IVANEC ŠIPUŠIĆ, A. KONČURAT and I. TLAK GAJGER (2014a): Major and trace elements levels in multifloral and unifloral honeys in Croatia. *J. Food Comp. Analys.* 33, 132-138.
3. BILANDŽIĆ, N., M. SEDAK, M. ĐOKIĆ and I. TLAK GAJGER (2014b): Concentrations of lead in multifloral honeys from continental Croatia. Book of abstracts International Symposium on Bee Products and 3<sup>rd</sup> edition-Annual meeting of the International Honey Commission (IHC). 28-30. rujna 2014., Opatija, Croatia, 114-114.
4. BILANDŽIĆ, N., I. TLAK GAJGER, M. KOSANOVIĆ, B. ČALOPEK, M. SEDAK, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, I. VARENINA, ĐURĐICA BOŽIĆ ĐUBURIĆ, I. VARGA and M. ĐOKIĆ (2017): Essential and toxic element concentrations in monofloral honeys from southern Croatia. *Food Chem.* 234, 245-253.
5. BOGDANOV, S. (2006): Contaminants of bee products. *Apidologie* 37, 1-18. doi: 10.1051/apido:2005043
6. BOGDANOV, S. (2009): Beeswax book - Beeswax: Production, Properties Composition and Control, *Bee Product Science*, p. 1-17.
7. BOGDANOV, S. (2016): Beeswax. *Beeswax book. Bee product science* 2-10.
8. BUCHWALD, R., M. D. BREED, L. BJOSTAD, B. E. HIBBARD and A. R. GREENBERG (2009): The role of fatty acids in the mechanical properties of beeswax. *Apidologie* 40, 585-594. doi: 10.1051/apido/2009035
9. CALATAYUD-VERNICH, P., F. CALATAYUD, E. SIMO and Y. PICO (2017): Occurrence of pesticide residues in Spanish beeswax. *Sci. Total. Environ.* 605/606, 745-754.
10. CARON, D. M. and L. J. CONNOR (2013): *Honey Bee Biology and Beekeeping*. Wicwas Press LLC, Michigan.

11. COGGSHALL, W. L. and R. A. MORSE (1984): Beeswax. Production, harvesting and products. Wicwas Press, New York, USA.
12. CONTI, M. E. and F. BOTRE (2001): Honeybees and their products as potential bioindicators of heavy metal contamination. *Environ. Monit. Assess.* 69, 267-282. doi: 10.1023/A:1010719107006
13. DEVILLERS, J. and M. H. PHAM-DELEGUE (2002): Honey bees: Estimating the environmental impact of chemicals. Taylor and Francis, London, New York.
14. FORMICKI, G., A. GREN, R. STAWARZ, B. ZYSK and A. GAL (2013): Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Pol. J. Environ. Stud.* 22, 99-106.
15. MAHMOUDI, R., K. MARDANI and B. RAHIMI (2015): Analysis of heavy metals in honey from north-western regions of Iran. *J. Chem. Health Risk.* 5, 251-256.
16. RAVOET, J., W. REYBROECK and D. C. DE GRAAF (2015): Pesticides for apicultural and/or agricultural application found in Belgian bee wax combs. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 94, 543-548. doi: 10.1007/s00128-015-1511-y
17. SVEČNJAK, L., G. BARANOVIĆ, M. VINCEKOVIĆ, S. PRDUN, D. BUBALO and I. TLAK GAJGER (2015): An approach for routine analytical detection of beeswax adulteration using FTIR-ATR spectroscopy. *J. Apic. Sci.* 59, 37-49. doi: 10.1515/jas-2015-0018.
18. TLAK GAJGER, I., N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ and M. SEDAK (2014): Impact of honeybee casting comb foundations production on lead concentrations. Book of abstracts Natural resources green technology and sustainable development. 26-28. November 2014., Zagreb, Croatia, p. 69.
19. TLAK GAJGER, I., M. KOSANOVIĆ, N. BILANDŽIĆ, M. SEDAK and B. ČALOPEK (2016a): Variations in lead, cadmium, arsenic, and mercury concentrations during honeybee wax processing using casting technology. *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 67, 223-228. doi: 10.1515/aiht-2016-67-2780.
20. TLAK GAJGER, I., N. BILANDŽIĆ, M. KOSANOVIĆ, M. SEDAK and B. ČALOPEK (2016b): Concentrations of mercury during honeybee wax procession. Book of abstracts Natural resources green technology and sustainable development 2., 5.-7. listopada 2016., Zagreb, Croatia, p. 68.
21. TULLOCH, A. P. (1980): Beeswax - composition and analysis. *Bee World* 61, 47-62. doi:10.1080/0005772X.1980.11097776
22. WU, J. Y., C. M. ANELLI and W. S. SHEPPARD (2011): Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One* 6:e14720. doi:10.1371/journal.pone.0014720.
23. WU, J. Y., M. D. SMART, C. M. ANELLI and W. S. SHEPPARD (2012): Honey bees (*Apis mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues exhibit increased susceptibility to Nosema (Microsporidia) infection. *J. Invertebr. Pathol.* 109, 326-329. doi: 10.1016/j.jip-2012.01.005

## Concentrations of arsenic, cadmium and mercury in beeswax (*Apis mellifera*) during its processing from honeycombs to honeycomb foundations

Marina KOSANOVIĆ, DVM, PhD student, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia; Nina BILANDŽIĆ, PhD, Grad. Biotechnology Eng., Scientific Advisor, Marija SEDAK, PhD, Grad. Food Technology Eng., Croatian Veterinary Institute, Zagreb, Croatia; Snježana KOS, DMD, Spadent d.o.o., Zagreb, Croatia; Ivana TLAK GAJGER, PhD, DVM, Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Zagreb, Croatia

Heavy metals can accumulate in beeswax for decades. In modern beekeeping is common practice to continuously recycle wax from old honeycombs to new honeycomb foundations. Beeswax samples were analysed by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) for As and Cd, and using a mercury analyser for Hg. Samples of beeswax of known origin and stand age were taken during the production of beeswax foundations, using casting technology with a doubled prolonged cooling and sedimentation phase. Significant differences were determined in

concentrations of Hg ( $P < 0.05$ ) between the different levels of wax in the double-walled steel casting container, especially between the "pured" wax levels used for production of comb foundations and dark wax sediment removed from processing. The obtained results confirm that applying the described method could effectively "wash" a significant amount of heavy metals from the initial material used for the production of new beeswax foundations.

**Key words:** heavy metals; honeycomb; beeswax; honeycomb foundation