



SADRŽAJ OLOVA I ARSENA U UZORCIMA SIROVOG MLIJEKA NA PODRUČJU UNSKO SANSKOG KANTONA LEAD AND ARSENIC CONTENT IN SAMPLES OF RAW MILK IN UNA-SANA CANTON

Asmir Budimlić¹, Arijana Spahić Bajrić¹, Zlatko Jusufhodžić¹, Mithat Jašić², Drago Šubarić³, Milica Vilišić²

¹ Veterinarski zavod Bihać, Omera Novljanina br 6, 77000 Bihać, BiH

² Tehnološki fakultet, Univerzitet u Tuzli, Univerzitetska 8, 75000 Tuzla, BiH

³ Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Sažetak

Uvod i cilj: Proizvodnja mlijeka je jedna od važnih privrednih aktivnosti u Bosni i Hercegovini i tretira se kao strateško opredjeljenje, jer predstavlja uslov za radni angažman velikog broja poljoprivrednih gazdinstava, ali samo uz prihvatanje standarda i ispunjavanje EU kriterija kvalitete. Uzorci sirovo mlijeka mogu imati različite hemijske dodatke, te stoga mogu dovesti do potencijalno različite razine izloženosti toksičnim elementima. Olovo (Pb) se nalazi među elementima koji izazvaju najveću zabrinutost u pogledu štetnih učinaka na ljudsko zdravlje. Arsen (As) je sveprisutan element koji može zagaditi tlo, vodu, te postrojenja uključujući i ostale dijelove eko sistema i okoliša, te u konačnici utječe na ljudsko zdravlje i dobrobit. Istraživanjem se željelo utvrditi u kojoj će se mjeri zadovoljiti kvalitet mlijeka prema zahtjevima EU legislativne nakon analiza teških metala (Pb, As) u sirovom mlijeku.

Metode: U okviru ovog istraživanja analizirali smo sadržaj arsena i olova u 30 uzoraka sirovo mlijeka sa područja Unsko sanskog kantona metodom atomske apsorpcione spektrofotometrije.

Rezultati: Arsen je detektovan u svim ispitivanim uzorcima, ali nijedan rezultat nije prešao maksimalno dozvoljenu koncentraciju koja u EU iznosi 0,1 mg/kg. Olovo je također detektovano u svim ispitivanim uzorcima, a 33,3% uzoraka je premašilo maksimalno dozvoljenu koncentraciju koja u EU iznosi 0,020 mg/kg.

Zaključak: Teški metali u mlijeku su rizici za javno zdravlje prilikom konzumacije jer se kontrola prisutnosti ovih kontaminanata ne radi sistematično.

Ključne riječi: teški metali, olovo, arsen, ljudsko zdravlje

UVOD

Proizvodnja mlijeka je jedna od glavnih poljoprivrednih aktivnosti u Bosni i Hercegovini. Mlijeko predstavlja velik udio u prehrani stanovništva, posebno dojenčadi, djece, trudnica i dojilja, te starije populacije. Konzumiranjem mlijeka i mliječnih proizvoda u organizam se unosi malo kalorija, a puno korisnih tvari. Konzumiranje kravljeg mlijeka značajno doprinosi očuvanju zdravlja tokom cijelog životnog vijeka pa je od izuzetne važnosti imati nadzor nad kvalitetom mlijeka, te pratiti, analizirati i konstantno održavati kvalitet mlijeka. Sve zemlje EU imaju vlastitu proizvodnju sirovo mlijeka koja je organizirana na savremenim načelima proizvodnje, prerade i profitabilnosti u proizvodnji mlijeka. Proizvodi koji se dobivaju iz svježeg mlijeka, ključni su u zdravoj i funkcionalnoj ishrani europsjana. To mliječnu industriju svrstava u jednu od najvažnijih industrija za očuvanje zdravlja i zdrav razvoj Europe (CM, 2015). Stanovništvo želi da konzumira zdravstveno ispravno mlijeko od kojeg zasigurno neće biti posljedica po zdravlje. Zbog toga je praćenje kontaminanata u sirovom mlijeku postao najvažniji red prioriteta u proizvodnji i otkupu. Prisutnost hemijskih zagađivača u mlijeku se sporadično prati što dodatno uslođnjava ionako nedovoljne mjere kontrole i nadzora nad kvalitetom mlijeka. Radi nerazvrstnosti primarne proizvodnje mlijeka, nedovoljne primjene proizvodnih postulata i kontrole, proizvodni kapaciteti u BiH se ne mogu izložiti konkurenciji na međunarodnom mliječarskom tržištu.

Kontaminanti u mlijeku

Kontaminanti u mlijeku su štetne tvari za zdravlje ljudi, koje nisu namjerno dodane hrani, a čija je prisutnost u hrani posljedica postupaka tokom proizvodnje, prerade, pripreme, tretiranja, pakiranja, prevoza ili skladištenja te hrane ili posljedica onečišćenja okoline (VM BiH, 2014a). Hemijski kontaminanti u mlijeku sadrže hemijske opasnosti koje mogu dospjeti u proizvodnji mlijeka (Jahed, 2007). Ocjena zdravstvene ispravnosti mlijeka kompleksan je pojam koji obuhvata, između ostalog, i nalaz različitih štetnih tvari hemijskog porijekla čija primjena u intenzivnoj stočarskoj proizvodnji ponekad rezultira i neželjenim posljedicama (Zdolec i sar., 2006). Mnoge sirovine u prehrambenoj industriji sadrže hemijske tvari, koje zbog svoje toksičnosti, ako se konzumiraju u velikim količinama, mogu uzrokovati zdravstvene probleme. U svakom slučaju, na prvom je mjestu sigurnost potrošača, a maksimalna su ograničenja najčešće postavljena na približno 100 puta manju vrijednost od utvrđene vrijednosti toksičnoga djelovanja (Šarkanj i sar., 2010). Hemijske opasnosti u hrani sa aspekta uzroka njihovog nastanka tokom proizvodnje i prerade mogu biti prirodno prisutne opasnosti u hrani kao njen legalan sastojak. Uzrok kontaminacije hrane može biti zagađenost zraka, vode i tla. Ovi izvori kontaminacije zbog globalnih utjecaja vrlo teško se kontroliraju. Glavni zagađivači zraka su otrovni plinovi iz industrijskih postrojenja i sagorijevni gasovi iz motornih vozila (Jašić, 2015). Teški metali dolaze do izražaja ispred svih opasnih tvari koje uzrokuju zdravstvene opasnosti za čovjeka. Olovo i arsen su među elementima koji izazvaju najveću zabrinutost u pogledu štetnih učinaka na ljudsko zdravlje (Salah i sar., 2013). Prisutnost toksičnih metala u prehrambenom lancu je posljedica zagađenja okoline i njihove koncentracije moraju biti stalno pod kontrolom (Seyed i Ebrahim, 2012), a njihova prisutnost u okruženju može izazvati ozbiljne opasnosti po okolinu i zdravlje ljudi. Prisutni su u okolini od prirodnih i ljudskih aktivnosti (Abdulkhalil i sar., 2012), a mnogi izvještaji ukazuju na prisustvo teških metala u mlijeku. Prisutnost toksičnih elemenata u mlijeku može stvoriti značajne zdravstvene probleme za ljude. Mnogi opasni spojevi i elementi poput metala i metaloida, akumuliraju se zajedno u lancu hrane. Njihove koncentracije u okolini rastu u povećanjem urbane, poljoprivredne i industrijske emisije (Semaghiul i sar., 2008). Povećanje industrijskih i poljoprivrednih procesa je rezultiralo povećanjem koncentracije metala u zraku, vodi i tlu, iz čega su odvedeni u biljke i slijedom toga nakupljaju se u tkivima (Ogabiela i sar., 2011). Onečišćenja zraka obično su locirana u gusto naseljenim urbanim područjima, osobito u zemljama u razvoju, gdje su zakoni o zaštiti okoline općenito relativno slabi ili ih uopće i nema (Isildak, 2011). S toga je izuzetno važno neprestano kontrolirati visoke razine teških metala, te održavati dobru kvalitetu mlijeka i mliječnih proizvoda (Elham i sar., 2011). U posljednjih nekoliko godina, kontaminacija mlijeka smatra se jednim od glavnih opasnih aspekata (Pilarczyk i sar., 2013). U gotovo svim živežnim namirnicama, pa tako i mlijeku i mliječnim proizvodima nalaze se teški metali u sklopu mineralnih sastojaka i to u veoma malim količinama, u trgovinama. Prisustvo toksičnih elemenata izaziva povećanu zabrinutost zbog njihove razine posebno u mlijeku i mliječnim proizvodima, te zahtjeva pažljivo praćenje (Naem i sar., 2014). Olovo (Pb) se nalazi među elementima koji izazvaju najveću zabrinutost u pogledu štetnih učinaka na ljudsko zdravlje (Pilarczyk i sar., 2013). Olovo se može opisati kao čisto toksičan element. Ne postoji razina izloženosti ispod koje se može reći da je eventualna konzumacija sigurna za zdravlje. Visoka razina olova je posebno veliki problem pogotovo s obzirom na činjenicu da mlijeko i mliječne proizvode konzumiraju uglavnom dojenčad i djeca, te sama apsorpcija olova predstavlja ozbiljan rizik za zdravlje ljudi (Ogabiela i sar., 2011). Arsen (As) je sveprisutan element koji može zagaditi tlo, vodu, te postrojenja uključujući i ostale dijelove eko sistema i okoliša, te u konačnici utječe na ljudsko zdravlje i dobrobit (Jochen i sar., 2012). Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani (VM BiH, 2014) koji je uskladen sa Uredbom Europske komisije 1881/2006 o maksimalnoj razini određenih kontaminanata u hrani (EPV, 2006) propisuje da je maksimalno dozvoljena količina olova u mlijeku 0,020 mg/kg, dok za arsen maksimalno dozvoljena vrijednost iznosi 0,1 mg/kg. Ataro i sar., (2008) su pokazali da različiti uzorci mlijeka mogu imati različite hemijske dodatke, te stoga mogu dovesti do potencijalno različite razine izloženosti toksičnim elementima (Ataro i sar., 2008). Prisutnost toksičnih metala u prehrambenom lancu je posljedica zagađenja okoliša i njihove koncentracije moraju biti stalno pod kontrolom (Seyed i Ebrahim, 2012). Dawd i sar., (2012) su istraživanjem potvrdili tezu mnogih autora da je razina teških metala u uzorcima mlijeka povezana s kontaminiranim pašnjacima sa industrijskim utjecajem i rudarstvom. Ovo područje je od velikog naučnog interesa, jer koncentracija tih metala u mlijeku može biti visoka i postati potencijalni zdravstveni problem zbog geoloških i ljudskih aktivnosti. Preporučili su provođenje daljnjih istraživanja na razini toksičnih metala uzimanjem većeg broja uzoraka mlijeka iz svih dijelova regiona (Dawd i sar., 2012). Dobro organizirano praćenje i kontrola kvaliteta su neizostavne aktivnosti u vezi zdravstvene sigurnosti proizvoda (Khalil i Selim, 2013).

MATERIJAL I METODE

Metodologija istraživanja svodila se na prikupljanje, obradu i analizu prikupljenih i obrađenih podataka. Pratio se udio teških metala odnosno olova i arsena u sirovom mlijeku, čija se prisutnost u mlijeku i općenito hrani intenzivno istražuje u svijetu. Poligon istraživanja je područje Unsko sanskog kantona tokom jednogodišnjeg perioda (2013.godina). Uzimanje uzoraka sirovo mlijeka za analizu teških metala je vršeno putem referenta subjekta u poslovanu sa mlijekom. Atomska apsorpciona spektrofotometrija (AAS) mjeri smanjenje intenziteta monohromatskog zračenja pri prolasku uzorka kroz atomsku paru. Atomski ispitivanih elementa apsorbiraju samo onu energiju koja im omogućava prelaz sa nižeg na više energijsko stanje. Određivanje teških metala odnosno sadržaja arsena i olova je određeno na atomskom apsorpcionom spektrofotometru AA – 6800 Shimadzu koji nudi mogućnost rada sa plamenom, grafitnom i hidridnom tehnikom. Ova metoda opisuje razaranje uzoraka mikrovalnom digestijom pod visokim pritiskom i temperaturom te očitavanje rezultata na atomskom apsorpcionom spektrofotometru. Rezultati se izražavaju kao mg/kg. Osiguranje kvaliteta rezultata ispitivanja se vrši primjenom postupaka za unutrašnje upravljanje kvalitetom (provjera kritičnih tačaka analize, mjerenjem koncentracije spojivanih uzoraka).

REZULTATI I RASPRAVA

U okviru istraživanja analizirali smo sadržaj olova i arsena u 30 uzoraka sirovo mlijeka sa područja Unsko sanskog kantona.

Tabela 1. Razina olova u uzorcima sirovo mlijeka

Olovo - MDK 0,020 mg/kg		
Pb	n	%
Nije detektovano	0	0
Detektovano	30	100
Ukupno (n, %)	30	100
Raspon Pb		
	n	%
0,00 – 0,020 mg/kg	20	66,66
0,021 – 0,040 mg/kg	10	33,33
Ukupno (n, %)	30	99,99
Deskriptivna statistika		
Srednja vrijednost	0,018	
Standardna greška	1,38	
Standardna devijacija	7,60	
Min	0,00978	
Max	0,03976	
Mod	0,01588	

Grafikon 1. Sadržaj olova u uzorcima sirovo mlijeka

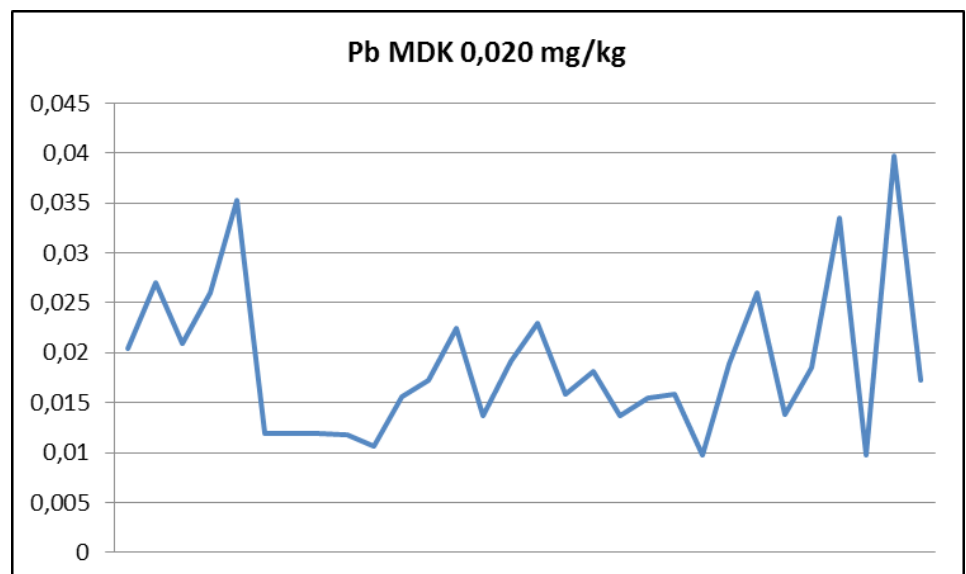


Tabela 2. Razina arsena u uzorcima sirovo mlijeka

As - MDK 0,10 mg/kg		
As	n	%
Nije detektovano	0	0
Detektovano	30	100
Ukupno (n, %)	30	100
Raspon As		
	n	%
0,00 – 0,10 mg/kg	30	100
>0,10mg/kg	0	0
Ukupno (n, %)	30	100
Deskriptivna statistika		
Srednja vrijednost	0,00085	
Standardna greška	0,47	
Standardna devijacija	2,61	
Min	0,00017	
Max	0,01163	
Mod	0,00017	

Grafikon 2. Sadržaj arsena u uzorcima sirovo mlijeka

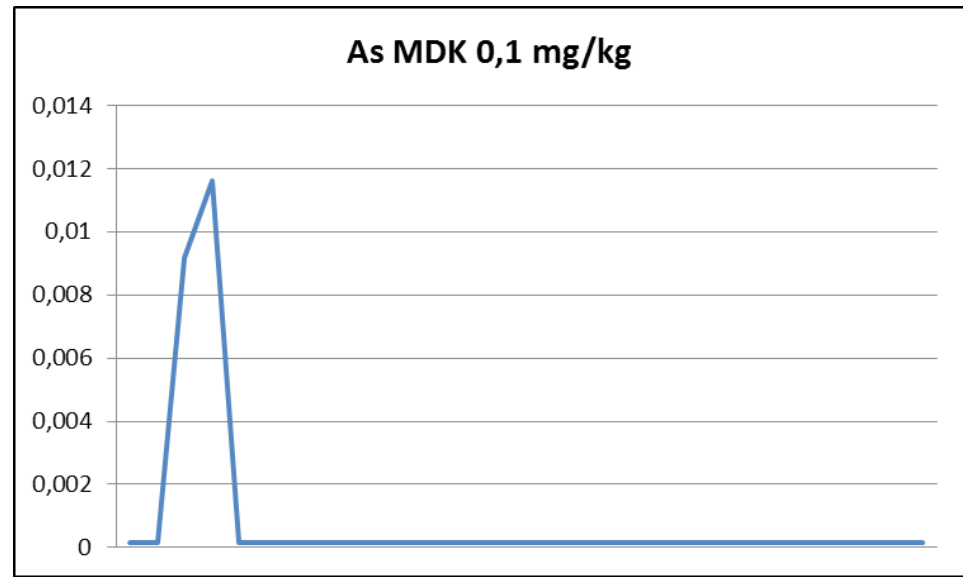


Tabela 2. prikazuje rezultate ispitivanja arsena u sirovom mlijeku. Rezultati istraživanja pokazuju da je arsen detektovan u svim ispitivanim uzorcima, ali nijedan rezultat nije prešao maksimalno dozvoljenu koncentraciju od 0,1 mg/kg. Osim toga, koncentracije su bile dosta niske jer se 28 uzoraka (93,33%) nalazilo u rasponu < 0,00017 mg/kg što predstavlja donju granicu detekcije. Srednja vrijednost je iznosila 0,00085 mg/kg, dok je maksimalno izmjerena vrijednost iznosila 0,0116 mg/kg što je daleko niža koncentracija od legislativnog limita koji iznosi 0,1 mg/kg. Isto tako, Jochen i sar., (2012) su u izmjerili niske koncentracije arsena u uzorcima mlijeka. Kretale su se u intervalu od 0,0005 mg/kg do 0,0078 mg/kg (Jochen i sar., 2012.). Sigrist i sar., (2010) su proveli istraživanja na 12 farmi, a rezultati su pokazali da u 11 farmi nije identificiran arsen nikako, a samo jedna farma je sadržavala koncentraciju koja se nalazila ispod maksimalno dozvoljene koncentracije (Sigrist i sar., 2010).

ZAKLJUČAK

Proizvodnja mlijeka u Bosni i Hercegovini se vrši na različitim lokalitetima, često u nejednakim uslovima, a farmeri na godišnjem nivou troše različite količine mineralnih gnojiva i zaštitnih sredstava čime se dobiveno mlijeko može razlikovati po svom sastavu i osobinama odnosno kvaliteta mlijeka nerijetko ovisi o vrlo velikom broju faktora koji uvjetuju manje ili veće razlike. Uzevši u obzir rezultate istraživanja možemo konstatirati da prisustvo teških metala u mlijeku nije zabrinjavajuća činjenica ako je njihova razina ispod one koja je propisana legislativom i koja ne ugrožava ljudsko zdravlje. Olovo je detektovano u svim ispitivanim uzorcima, a 33,3% uzoraka je premašilo maksimalno dozvoljenu koncentraciju od 0,020 mg/kg. Arsen je detektovan u svim ispitivanim uzorcima, ali nijedan rezultat nije prešao maksimalno dozvoljenu koncentraciju od 0,1 mg/kg. Praćenje koncentracija teških metala u sirovom mlijeku na području Bosne i Hercegovine nije sistemski riješeno, analize se rade sporadično i na pojedinim lokalitetima. Ako uzmemo u obzir navode gore citiranih autora, a znajući da povišena koncentracija teških metala može biti uzrok nastanka autoimunih oboljenja, pri čemu se stvaraju protutijela usmjerena protiv vlastitih organa, u budućnosti je neophodno povesti ozbiljnije aktivnosti koje će dovesti do dobro organiziranog praćenja, kontrole i nadzora nad koncentracijama olova i arsena na svim otkupnim područjima subjekata u poslovanju sa mlijekom. Ako želimo imati potpuni nadzor nad ovakvim otrovima koji trenutno ili dugotrajno štetno djeluju na žive organizme analize teških metala u mlijeku moraju postati rutinske analize prilikom proizvodnje i otkupa sirovo mlijeka.

LITERATURA

- Abdulkhalil, A., Swaileh, K.M., Hussein, R.M., Matani, M. (2012): Levels of metals (Cd, Pb, Cu and Fe) in cow's milk, dairy products and hen's eggs from the West Bank, Palestine, International Food Research Journal 19 (3): 1089-1094.
- Ataro, A., McCrindle, R.L., Botha, B.M., McCrindle, C.M.E., Ndibewu, P.P. (2008): Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS); Food Chemistry volume 111, 243-248.
- Bilandžić, N., Đokić, M., Sedak, M., Solomon, B., Varenina, I., Knežević, Z., Benić, M. (2011): Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia, Food Chemistry volume 127, 63-66.
- CM, (2015): Mliječne kvote, CroMilk, Udruga hrvatskih otkupljivača i prerađivača mlijeka.
- Dawd, A.G., Gezmu, T.B., Haki, G.D. (2012): Essential and toxic metals in cow's whole milk from selected sub-cities in Addis Ababa, Ethiopia, Online International Journal of Food Science, vol.1, 12-19.
- Deniz, Y.S., Ali, R.T. (2007): Method validation for the determination of lead in raw cow's milk by electrothermal atomic absorption spectrometry, Annali di Chimica, 97 by Societa Chimica Italiana, 983-993.
- Elham, M.E., Ahmed, M.H., Sanna, M.B., Amr, A.M. (2011): A Survey of Selected Essential and Toxic Metals in Milk in Different Regions of Egypt using ICP-AES, International Journal of Dairy Science 6 (2): 158-164.
- ElSayed, E.M., Badran, S.M., Mostafa, A.A., Hamed, A.M. (2011): Evaluation of the Factors Influencing the Content and Retention of Selected Heavy Metals in Milk and Some Dairy Products, International Journal of Dairy Science 6 (6), 305-313.
- EPV (2006): Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of the European Communities L 364/5.
- Isildak, Ö. (2011): Determination of Ion Concentrations and Heavy Metals in the Air Particulates of an Industrial Area, Karacelmas Science and Engineering Journal 1 (2), 49-54.
- Jahed, K.Gh.R. (2007): Chemical Contaminants in Milk and Public Health Concern, A Review, International Journal of Dairy Science 2 (2): 104-115.
- Jašić, M. (2015): Rezidui i kontaminanti u hrani, Tehnološki fakultet Tuzla.
- Jochen, B., Bibhash, N., Prusov, B., Chen-Wuung, L., Maria, A.A., Myriam, V.M.L., Dina, L.L., Jjin-Shuh, J., Lorena, C., Luciene, F.L.M., Alfredo, T.F. (2012): Arsenic in the human food chain, the Latin American perspective, Science of the Total Environment volume 429, 92-106.
- Khalil, H.M., Selim, A.F. (2013): Determination of Heavy Metals (Pb, Cd) and some Trace Elements in Milk and Milk Products Collected from Najran Region in K.S.A., Life Science Journal 10 (2), 648-652.
- Naem, K., In Seon, J., In Min, H., Jae Sung, K., Sung, H.C., Eun, Y.N., Ji Yeon, C., Kyung, S.P., Kyong, S.K. (2014): Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), Food Chemistry 147, 220-224.
- Naem, K., In Seon, J., In Min, H., Jae Sung, K., Sung, H.C., Eun, Y.N., Ji Yeon, C., Kyung, S.P., Kyong, S.K. (2014): Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS), Food Chemistry 147, 220-224.
- Ogabiela, E.E., Udibia, U.U., Adesina, O.B., Hammuel, C., Ade-Ajayi, F.A., Yebpella, G.G., Mmreore, U.J., Abdullahi, M. (2011): Assessment of Metal Levels in Fresh Milk from Cows Grazed around Challawa Industrial Estate of Kano, Nigeria, J. Basic. Appl. Sci. Res. 1 (7): 533-538.
- Ogabiela, E.E., Udibia, U.U., Adesina, O.B., Hammuel, C., Ade-Ajayi, F.A., Yebpella, G.G., Mmreore, U.J., Abdullahi, M. (2011): Assessment of Metal Levels in Fresh Milk from Cows Grazed around Challawa Industrial Estate of Kano, Nigeria, J. Basic. Appl. Sci. Res. 1 (7): 533-538.
- Pavlović, I., Sikirić, M., Havranek, J.L., Plavljanić, N., Brajenović, N. (2004): Lead and cadmium levels in raw cow's milk from an industrialised Croatian region determined by electrothermal atomic absorption spectrometry, Czech Journal of Animal Science 49 (4), 164-68.
- Pilarczyk, R., Wójcik, J., Czerniak, P., Sablik, P., Pilarczyk, B., Tomza Marciniak, A. (2013): Concentrations of toxic heavy metals and trace elements in raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from organic farm, Environ Monit Assess, 185: 8383-8392.
- Preeda, P., Shing, T.L., Preecha, L., Nasavan, T. (2003): Regional monitoring of lead and cadmium contamination in a tropical grazing land site, Thailand, Environmental Monitoring and Assessment 85: 157 - 173.
- Salah, F.A.A.E., Esmat, I.A., Mohamed, A.B. (2013): Heavy metals residues and trace elements in milk powder marketed in Dakahlia Governorate, International Food Research Journal 20 (4): 1807-1812.
- Semaghiul, B., Simona, D., Gabriela, S., Alina, S. (2008): Determination of major and minor elements in milk through ICP AES, Environmental Engineering and Management Journal vol.7, No.6, 805-808.
- Seyed, M.D., Ebrahim, R. (2012): Determination of Lead Residue in Raw Cow Milk from Different Regions of Iran by Flameless Atomic Absorption Spectrometry, American Eurasian Journal of Toxicological Sciences 4 (1): 16-19.
- Sigrist, M., Beldoménico, H., Repetti, M.R. (2010): Evaluation of the influence of arsenical livestock drinking waters on total arsenic levels in cow's raw milk from Argentinean dairy farms, Food Chemistry volume 121, 487-491.
- Šarkanj, B., Kipčić, D., Vasić, R.D., Delaš, F., Galić, K., Katalenić, M., Dimitrov, N., Klapec, T. (2010): Kemijske i fizikalne opasnosti u hrani, Hrvatska agencija za hranu (HAH), Osijek.
- Tasneem, G.K., Nusrat, J., Jameel, A., Ghulam, A.K., Hassan, I.A., Mohammad, B.A., Mohammad, K.J., Abdul, Q.S. (2009): Assessment of toxic metals in raw and processed milk samples using electrothermal atomic absorption spectrophotometer, Food and Chemical Toxicology volume 47, 2163-2169.
- VM BiH (2014a): Pravilnik o maksimalno dozvoljenim količinama za određene kontaminante u hrani, Vijeće ministara BiH, Službeni glasnik BiH broj 68/14.
- Zdolec, N., Hadzišimonović, M., Kozachiński, L., Cvrtila, Ž., Filipović, I. (2006): Ostaci biološki štetnih tvari u mlijeku, Mliječarstvo 56 (2) 191-202.