

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andraž PREMUR

**STRUPENOST HERBICIDA JODOSULFURONA ZA
VODNE ORGANIZME PRED IN PO
FOTOKATALITSKI OKSIDACIJI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Andraž PREMUR

**STRUPENOST HERBICIDA JODOSULFURONA ZA VODNE
ORGANIZME PRED IN PO FOTOKATALITSKI OKSIDACIJI**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**TOXICITY OF HERBICIDE IODOSULFURON TO WATER
ORGANISMS BEFORE AND AFTER PHOTOCATALYTIC
OXIDATION**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Vse analize so bile opravljene na Kemijskem inštitutu v Ljubljani v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo.

Študijska komisija univerzitetnega medoddelčnega študija biotehnologije je dne 16. 06. 2010 odobrila naslov diplomskega dela in za mentorico diplomskega dela predlagala prof. dr. Romano Marinšek-Logar in somentorico doc. dr. Tatjano Tišler.

Recenzent: prof. dr. Tom Turk.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Branka JAVORNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Članica:	prof. dr. Romana MARINŠEK-LOGAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Članica:	doc. dr. Tatjana TIŠLER Kemijski inštitut Ljubljana
Član:	Prof. dr. Tom TURK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 11.10.2011

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Spodaj podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Andraž PREMUR

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 502:60(043.2)=163.6
KG	ekotoksikologija/varstvo okolja/herbicidi/jodosulfuron/vodni organizmi/zeleno alge/ <i>V. fischeri</i> / <i>D. magna</i> /fotokatalitska oksidacija/titanov dioksid/Slovenija
KK	AGRIS T01
AV	PREMRU, Andraž
SA	MARINŠEK-LOGAR, Romana (mentorica) / TIŠLER, Tatjana (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2011
IN	STRUPENOST HERBICIDA JODOSULFURONA ZA VODNE ORGANIZME PRED IN PO FOTOKATALITSKI OKSIDACIJI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 68 str., 8 pregl., 19 sl., 58 vir.
IJ	sl
JJ	sl/en
AI	Zaradi naraščajoče uporabe pesticidov po svetu je zaskrbljenost glede njihove usode v okolju vedno večja. Spiranje in pronicanje pesticidov skozi tla lahko pripelje do onesnaženja voda in škodljivih vplivov na vodne organizme, kot tudi za ljudi. V mnogih primerih so pesticidi težko biorazgradljive spojine, zato se za njihovo razgradnjo namesto bioloških postopkov čiščenja uporabljajo napredni oksidacijski postopki (NOM), s katerimi lahko dosežemo njihovo popolno mineralizacijo. V primerih, ko razgradnja ni popolna, pa so lahko razgradni produkti bolj strupeni od izhodne spojine. Namen našega dela je bil ugotoviti strupenost herbicida jodosulfurona za vodne organizme pred in po fotokatalitski oksidaciji, ki spada med NOM. Fotokatalitska oksidacija je potekala pri kombinacijah različnih dejavnikov (prisotnost/odsotnost fotokatalizatorja, prepihovanje, osvetlitev, prisotnost vode). Raziskovali smo strupenost neobdelane raztopine in obdelanih raztopin jodosulfurona za morske bakterije <i>V. fischeri</i>, vodne bolhe <i>D. magna</i> in zelene alge <i>D. subspicatus</i>. Ugotovili smo, da je jodosulfuron zelo strupen za zelene alge ($IC_{50(72h)} = 0,1375$ mg/L), manj strupen za vodne bolhe ($EC_{50(48h)} = 61,9$ mg/L) in najmanj strupen za morske bakterije ($IC_{50(30min)} = 169,1$ mg/L). Po fotokatalitski razgradnji se je zmanjšala strupenost obdelanih raztopin jodosulfurona za zelene alge, povečala pa se je strupenost za bakterije in vodne bolhe. Strupenost obdelanih vzorcev za izpostavljene organizme se je spreminjala kot posledica različnih kombinacij razmer v procesu fotokatalitske oksidacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ŠD Dn

DC UDC 502:60(043.2)=163.6

CX ecotoxicology/environmental protection/herbicides/iodosulfuron/water
organisms/green algae/*V. Fischeri*/*D. magna*/photocatalytic oxidation/titanium
dioxide/Slovenia

CC AGRIS T01

AU PREMUR, Andraž

AA MARINŠEK-LOGAR, Romana (supervisor)/TIŠLER, Tatjana (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic Study Programme in
Biotechnology

PY 2011

TI TOXICITY OF HERBICIDE IODOSULFURON TO WATER ORGANISMS
BEFORE AND AFTER PHOTOCATALYTIC OXIDATION

DT Graduation Thesis (University studies)

NO XIII, 68 p., 8 tab., 19 fig., 58 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Increasing use of pesticides has become a major concern worldwide. Pesticide contamination of ground and surface water through leaching and runoffs is of special concern, as it can cause negative effects on aquatic organisms and also humans. In many cases pesticides are non-biodegradable and can't be removed from water with the use of otherwise very effective biological processes. In such cases advanced oxidation processes (AOP's) are usually employed. With the use of AOP's total mineralisation of pesticides can be achieved. In some cases the degradation is not complete and the process can result in end-products that are more toxic than parent compounds. The purpose of our work was to investigate the toxicity of herbicide iodosulfuron to water organisms before and after photocatalytic oxidation. Photocatalysis was performed using different combinations of treatment conditions (presence/absence of photocatalyst, bubbling, irradiation, water). Toxicity of initial and treated solutions was observed using *V. fischeri*, water fleas *D. magna* and algae *D. subspicatus*. Our results show, that undegraded iodosulfuron is very toxic for green algae ($IC_{50(72h)} = 0.1375 \text{ mg/L}$), less toxic for water fleas ($EC_{50(48h)} = 61.9 \text{ mg/L}$) and least toxic for marine bacteria ($IC_{50(30min)} = 169.1 \text{ mg/L}$). In general, the toxicity of treated iodosulfuron solutions was decreased in the case of algae, and increased for bacteria and water fleas. Toxicity of treated solutions to exposed organisms varied as a result of different condition combinations used in photocatalytic treatment.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VIII
Kazalo slik	IX
Okrajšave in simboli.....	XII
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 NAMEN IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 TESTI STRUPENOSTI Z VODNIMI ORGANIZMI	4
2.1.1 Testni organizmi	6
2.1.1.1 <i>Vibrio fischeri</i> (NRRL-B-1117)	7
2.1.1.2 <i>Daphnia magna</i> (Straus 1820)	7
2.1.1.3 <i>Desmodesmus subspicatus</i> (Chodat 1926).....	8
2.2 PESTICIDI	9
2.2.1 Herbicidi.....	10
2.2.1.1 Zaviranje acetolaktat sintaze	11
2.2.1.2 Sulfonilsečninski herbicidi.....	12
2.2.1.2.1 Jodosulfuron.....	14
2.2.2 Usoda pesticidov v okolju	16
2.2.2.1 Adsorpcija pesticidov	16
2.2.2.2 Migracija pesticidov	17
2.2.2.3 Razgradnja ali razpad pesticidov.....	17
2.3 NAPREDNE OKSIDACIJSKE METODE	17
2.3.1 Fotokatalitska oksidacija	20
2.3.1.1 Fotokatalizatorji na osnovi TiO ₂	22

3	MATERIALI IN METODE	24
3.1	TESTI STRUPENOSTI	24
3.1.1	Test strupenosti z bakterijami <i>V. fischeri</i>	24
3.1.2	Test strupenosti z vodnimi bolhami <i>D. magna</i>	24
3.1.3	Test strupenosti z zelenimi algami <i>D. subspicatus</i>	25
3.1.3.1	Analiza in prikaz rezultatov	27
3.2	PRIPRAVA VZORCEV	28
3.2.1	Neobdelana vodna raztopina jodosulfurona	28
3.2.1.1	Test strupenosti z bakterijami <i>V. fischeri</i>	28
3.2.1.2	Test strupenosti z vodnimi bolhami <i>D. magna</i>	28
3.2.1.3	Test strupenosti z zelenimi algami <i>D. subspicatus</i>	29
3.2.2	Obdelana vodna raztopina jodosulfurona	29
3.2.2.1	Fotokatalitska oksidacija jodosulfurona	29
3.2.2.1.1	Priprava vzorcev.....	29
3.2.2.1.2	Potek eksperimentov	30
3.2.2.1.3	Spremenljivi parametri	30
3.2.2.2	Test strupenosti z bakterijami <i>V. fischeri</i>	33
3.2.2.3	Test strupenosti z vodnimi bolhami <i>D. magna</i>	33
3.2.2.4	Test strupenosti z zelenimi algami <i>D. subspicatus</i>	33
4	REZULTATI	35
4.1	REZULTATI TESTOV STRUPENOSTI ZAČETNE, NEOBDELANE VODNE RAZTOPINE JODOSULFURONA	35
4.2	REZULTATI TESTOV STRUPENOSTI OBDELANE VODNE RAZTOPINE JODOSULFURONA	36
4.2.1	Rezultati testov strupenosti z bakterijami <i>V. Fisheri</i>	36
4.2.2	Rezultati testov strupenosti z vodnimi bolhami <i>D. magna</i>	41
4.2.3	Rezultati testov strupenosti z zelenimi algami <i>D. subscipatus</i>	47
4.2.4	Primerjava rezultatov testov strupenosti obdelane raztopine jodosulfurona za <i>Vibrio fischeri</i> in <i>Daphnia magna</i>	49
4.2.5	Potek fotokatalitske oksidacije jodosulfurona	51

5	RAZPRAVA IN SKLEPI.....	52
5.1	RAZPRAVA.....	52
5.1.1	Razlaga rezultatov testov strupenosti neobdelane raztopine jodosulfurona	52
5.1.2	Razlaga rezultatov testov strupenosti obdelane raztopine jodosulfurona	53
5.1.2.1	Obrazložitev rezultatov testov strupenosti z bakterijami <i>V. fischeri</i>	53
5.1.2.2	Obrazložitev rezultatov testov strupenosti z vodnimi bolhami <i>D. magna</i>	55
5.1.2.3	Obrazložitev rezultatov testov strupenosti z zelenimi algami <i>S. subspicatus</i>	56
5.1.2.4	Primerjava in obrazložitev rezultatov testov strupenosti med <i>Vibrio fischeri</i> in <i>Daphnia magna</i>	57
5.2	SKLEPI.....	58
6	POVZETEK	61
7	VIRI	63
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Klasifikacija, fizikalno-kemijske in ekotoksikološke lastnosti jodosulfurona.	14
Preglednica 2: Pregled obdelave vodne raztopine jodosulfurona (čas, uporabljen katalizator, osvetlitev, voda, prepihovanje), dosežena konverzija, preostala koncentracija jodosulfurona v vzorcih in pH vodnih raztopin jodosulfurona po fotokatalitski obdelavi.	31
Preglednica 3: Inhibitorni koncentraciji jodosulfurona IC_{50} in IC_{20} (mg/L) za bakterije <i>V. fischeri</i> . Prikazani so rezultati 30 minutnih definitivnih testov ter njihovo povprečje.	35
Preglednica 4: Efektivna koncentracija jodosulfurona EC_{50} (mg/L) za vodne bolhe <i>D. magna</i> . Prikazani so rezultati 48 urnih definitivnih testov ter njihovo povprečje.	35
Preglednica 5: Inhibitorna koncentracija jodosulfurona IC_{50} (mg/L) za zelene alge <i>D. subspicatus</i> . Prikazani so rezultati 72 urnih preliminarinih in definitivnih testov, ter povprečje definitivnih testov.	35
Preglednica 6: Konverzija, preostala koncentracija in najvišja testirana koncentracija jodosulfurona posameznih obdelanih vzorcev, ter zaviranje (I_b) in povprečno zaviranje ($\bar{I}_b$) bioluminiscence bakterij <i>V. fischeri</i> po izpostavitvi vzorcem.	36
Preglednica 7: Konverzija, preostala koncentracija in najvišja testirana koncentracija jodosulfurona posameznih obdelanih vzorcev, ter delež negibnih vodnih bolh <i>D. magna</i> po 24 in 48 urni izpostavitvi vzorcem.	41
Preglednica 8: Konverzija, IC_{50} , inhibitorni indeks, maksimalna zaviranje rasti alg (I_{max}), koncentracija jodosulfurona, ki v obdelanih vzorcih in začetni raztopini povzroča I_{max} (C_{i-X} in C_{i-0}) in inhibitorni indeks pri koncentraciji jodosulfurona C_{i-X} za obdelane vzorce.	47

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prikaz mehanizma delovanja ALS inhibitornih herbicidov.	11
Slika 2: Splošna struktura sulfonilsečninskih herbicidov.	13
Slika 3: Dogajanje v polprevodniku ob osvetlitvi s svetlobo primerne valovne dolžine.	21
Slika 4: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane brez katalizatorja. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.	37
Slika 5: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjem TiO ₂ -P25 (Degussa). % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.	37
Slika 6: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjem TiO ₂ -Nd10. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.	38
Slika 7: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjema TiO ₂ -N(1.1) (vzorci 16-18) in TiO ₂ -N(1.2) (vzorci 19 in 20). % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.	39
Slika 8: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjema TiO ₂ -PcN2 (vzorci 21-23) in TiO ₂ -PcN3 (vzorec 24). % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.	39
Slika 9: Zbirna preglednica, ki prikazuje vse vzorce in njihovo povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije. Slednje so prikazane tudi v tabeli na grafom. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.	40
Slika 10: % konverzije vzorcev obdelanih brez katalizatorja in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.	42

- Slika 11: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-P25}$ (Degussa) in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom. 43
- Slika 12: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-Nd10}$ in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom. 43
- Slika 13: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjema $\text{TiO}_2\text{-N(1.1)}$ (vzorci 16-18) in $\text{TiO}_2\text{-N(1.2)}$ (vzorci 19 in 20) in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom. 44
- Slika 14: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjema $\text{TiO}_2\text{-PcN}_2$ (vzorci 21-23) in $\text{TiO}_2\text{-PcN}_3$ (vzorec 24) in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom. 45
- Slika 15: Zbirna preglednica, ki prikazuje vse vzorce in njihov % negibnih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve vzorcem in % konverzije. Slednje so prikazane tudi v tabeli na grafom. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom. 45
- Slika 16: Prikaz % konverzije jodosulfurona in % zaviranja bioluminiscence bakterij, % zaviranja rasti alg in % negibnih vodnih bolh po izpostavitvi obdelanim raztopinam jodosulfurona. Vodne bolhe smo izpostavili 100 vol% in bakterije 80 vol% vzorcev. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom. 49
- Slika 17: Prikaz % konverzije jodosulfurona in % zaviranja bioluminiscence bakterij, % zaviranja rasti alg in % negibnih vodnih bolh po izpostavitvi vzorcem obdelanim z UV svetlobo. Vodne bolhe smo izpostavili 100 vol% in bakterije 80 vol% vzorcev. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom. 50
- Slika 18: Prikaz % konverzije jodosulfurona in % zaviranja bioluminiscence bakterij, % zaviranja rasti alg in % negibnih vodnih bolh po izpostavitvi vzorcem obdelanim z vidno svetlobo. Vodne bolhe smo izpostavili 100

vol% in bakterije 80 vol% vzorcev. % konverzije za posamezen vzorec je
zapisan nad grafikonom. 50

Slika 19: 3D diagram poteka fotokatalitske oksidacije vodne raztopine
jodosulfurona ($c_0=5 \times 10^{-5}$ M) v šaržnem reaktorju z goščo v prisotnosti
TiO₂N-(1.1) katalizatorja (T=20° C, $c_{kat.}=0.5$ g/L, UV žarnica). 51

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

NOM	napredne oksidacijske metode
jodosulfuron	jodosulfuron-metil-natrij
konverzija	pretvorba jodosulfurona
MQ	ultra čista voda
kontrola	postopek v testih strupenosti, kjer je del testnih organizmov izpostavljen identičnim pogojem kot ostali, vendar brez prisotnosti preiskovane snovi (služi za primerjavo odzivov organizmov, izpostavljenih preiskovani snovi)
IC	(<i>inhibitory concentration</i>) koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči zaviranje opazovane biološke funkcije izpostavljenih organizmov (npr. zaviranje emitirane svetlobe, zaviranje rasti), glede na kontrolo
IC ₅₀	koncentracija, ki povzroči 50 % zaviranje opazovane biološke funkcije pri izpostavljenih organizmih, glede na kontrolo
EC	(<i>effective concentration</i>) koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči specifičen odziv pri določenem odstotku populacije izpostavljenih organizmov (npr. težave z gibanjem)
EC ₅₀	koncentracija, ki povzroči specifičen odziv pri 50 % populacije izpostavljenih organizmov
LC	(<i>lethal concentration</i>) koncentracija snovi, ki v določenem času povzroči smrt pri določenem odstotku populacije izpostavljenih organizmov
LC ₅₀	koncentracija, ki povzroči smrt pri 50 % populacije izpostavljenih organizmov

LOEC	(<i>lowest observed effect concentration</i>) najnižja koncentracija snovi, pri kateri se vrednosti merjenega odziva izpostavljenih organizmov statistično razlikujejo od vrednosti merjenega odziva v kontroli
NOEC	(<i>no observed effect concentration</i>) najvišja koncentracija snovi, pri kateri se vrednosti merjenega odziva izpostavljenih organizmov statistično ne razlikujejo od vrednosti merjenega odziva v kontroli
FFS	fitofarmacevtska sredstva
ALS	encim acetolaktat sintaza
Sus	sulfonilsečninski (herbicidi)
PP	prevodni pas
VP	valenčni pas
Eš	elektronska špranja
I _b	zaviranje bioluminiscence bakterij
I _a	zaviranje rasti alg
vol%	volumski delež oz. volumska koncentracija (predstavlja volumen topljenca (mL) v 100 mL nastale raztopine)
preliminarni test	test za ugotavljanje približne strupenosti preiskovane snovi (ugotavljamo razpon območja koncentracij z 0 % in 100 % odzivom izpostavljenih organizmov)
definitivni test	test za natančno merjenje strupenosti preiskovane snovi (določanje vrednosti IC, EC ali LC)
TiO ₂	titanov dioksid

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Zaradi naraščajočih potreb svetovnega prebivalstva po hrani in surovinah je kemijska kontrola škodljivcev, bolezni in plevela v kmetijstvu in industriji postala nujna. Moderno kmetijstvo si brez uporabe pesticidov težko predstavljamo, kljub nespornim prednostim, ki jih njihova uporaba predstavlja, pa njihov vpliv na okolje predstavlja vedno večji problem.

V začetku 21. stoletja je poraba vode v kmetijskih panogah predstavljala kar 60 % skupno porabljene vode na svetu (Silva, 2008). Zaskrbljujoče je, če ta podatek združimo z raziskavami, v katerih so dokazali sorazmerno hiter prenos večine uporabljenih pesticidov in njihovih presnovkov v podtalne vode, kjer se dolgo zadržujejo, procesi razgradnje pa zaradi stabilnega puferskega okolja potekajo počasi (Grmek-Košnik in sod., 2006).

S kopičenjem pesticidov v vodah se potencialno tveganje za okolje in zdravje ljudi povečuje. Mnoge izmed teh snovi so strupene za vodne organizme, kar lahko pripelje do negativnih učinkov na celoten ekosistem. Obstaja več evropskih direktiv (Council directive 98/83/EEC, 1998; Council directive 2000/60/EC, 2000), ki določajo mejne vrednosti za pesticide in druge škodljive snovi v vodnih virih. Identifikacija znanih spojin v vodah in ohranjanje njihovih koncentracij pod dovoljenimi vrednostmi pa nam samo po sebi ne zagotavlja zadostne kvalitete vodnih virov. Med kemikalijami in njihovimi presnovki lahko prihaja do medsebojnih vplivov, ki potencialno vodijo k povečanju strupenosti voda (Cobb in Reade, 2010a). Trenutno je na svetu preko 48 milijonov komercialno dostopnih kemikalij (CAS Report, 2011). Za identifikacijo mnogih izmed njih v vodnih raztopinah analitske metode še ne obstajajo ali pa so drage in dolgotrajne. Zato so pomembni strupenostni testi, ki nam ne glede na vsebnost posameznih kemikalij v vodnem vzorcu povedo ali je vzorec strupen ali ne. Z uporabo organizmov iz več trofičnih nivojev v t.i. biotestih ocenimo škodljiv vpliv, ki ga ima lahko onesnažena voda na žive organizme v okolju.

Ugotavljanje strupenosti voda je zgolj del okoljskih raziskav in tehnologij, katerih glavni cilj je odstranitev organskih in anorganskih spojin iz onesnaženih voda. Uspešni in cenovno ugodni so postopki biološkega čiščenja voda, vendar so neučinkoviti ob

prisotnosti biološko nerazgradljivih ali strupenih spojin v vodi. Takrat je potrebna uporaba alternativnih metod, kot so napredne oksidacijske metode (NOM), ki so neselektivne in lahko vodijo v popolno razgradnjo (mineralizacijo) organskih snovi ter zmanjšanje količine anorganskih in kovinskih ionov v vodi, kar lahko vodi v zmanjšanje strupenosti voda (Herrmann in sod., 2007; Herrmann in Lacroix, 2010).

NOM že uporabljajo pri obdelavi s pesticidi onesnaženih voda, vendar ne pride vedno do popolne mineralizacije spojin, končni produkti so včasih celo bolj obstojni in strupeni od izhodnih spojin. Zato je potrebno obdelavo onesnaženih voda s fizikalno-kemijskimi metodami združiti z uporabo testov strupenosti in preveriti potencialne škodljive vplive, ki bi jih lahko okoljska aplikacija teh postopkov čiščenja pustila na okolje (Konstantinou in Albanis, 2003).

1.2 NAMEN IN HIPOTEZE

V diplomski nalogi smo raziskovali strupenost vodnih raztopin herbicida jodosulfuron-metil-natrija za vodne organizme pred in po fotokatalitski oksidaciji. Zanimalo nas je, ali so obdelane raztopine jodosulfurona v primerjavi z začetnimi neobdelanimi raztopinami bolj ali manj strupene za vodne organizme. Fotokatalitska oksidacija je potekala pri različnih kombinacijah naštetih dejavnikov:

- UV ali vidna svetloba
- ultra čista (MQ) ali vodovodna voda
- prepihovanje raztopin z O₂ ali N₂
- različni fotokatalizatorji na osnovi TiO₂
- čas obdelave.

Vzorci vodnih raztopin jodosulfurona smo po fotokatalitski oksidaciji uporabili v testih strupenosti z različnimi vrstami organizmov. Izvedli smo test zaviranja bioluminiscence bakterij *V. fischeri*, test akutne strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna* in strupenostni test zaviranja rasti zelenih alg *D. subspicatus*. Iz dobljenih eksperimentalnih podatkov smo izračunali vrednosti IC₅₀ ali EC₅₀ posameznih vzorcev in primerjali rezultate med vzorci znotraj iste vrste organizmov in med različnimi vrstami organizmov. Kadar vrednosti IC₅₀ ali EC₅₀ nismo mogli izračunati, smo rezultate predstavili kot % zaviranja ali % organizmov, pri katerih je bil opazen merljiv odgovor na posamezne vzorce.

V diplomski nalogi smo preverjali naslednje hipoteze:

- jodosulfuron je strupen za zelene alge že pri nizkih koncentracijah ($C_{\text{jodosulfuron}} < 1$ mg/L)
- jodosulfuron je strupen za bakterije in vodne bolhe pri višjih koncentracijah kakor za zelene alge (20 - 200 mg/L)
- jodosulfuron je bolj strupen za bakterije kakor za vodne bolhe
- po fotokatalitski oksidaciji so raztopine jodosulfurona manj strupene ali nestrupene za zelene alge, vodne bolhe in bakterije
- v različnih razmerah fotokatalitske oksidacije pride do razlik v pretvorbi jodosulfurona in posledično v strupenosti posameznih obdelanih raztopin jodosulfurona za zelene alge, vodne bolhe in bakterije.

2 PREGLED OBJAV

2.1 TESTI STRUPENOSTI Z VODNIMI ORGANIZMI

V svetu in pri nas temelji monitoring kakovosti pitne vode na ugotavljanju prisotnosti, identifikaciji in kvantifikaciji kemikalij ter mikroorganizmov s spremljanjem fizikalnih, kemijskih in mikrobioloških parametrov. Ustrezno kakovost voda ugotavljamo s primerjavo izmerjenih vrednosti z maksimalno dovoljenimi vrednostmi (mejnimi vrednostmi) za posamezne parametre (Marinšek-Logar in sod., 2006; Tišler in sod., 2008).

S fizikalno-kemijskimi postopki lahko izmerimo koncentracijo posameznih znanih kemikalij v vodi, s čimer pa dobimo le podatke o prisotnosti oz. odsotnosti teh snovi, ne pa tudi podatkov o njihovih potencialnih učinkih na žive organizme, o njihovih razgradnih produktih ali o neznanih snoveh v vodnem vzorcu (Marinšek-Logar in sod, 2006). Zato je potrebno izmerjene vrednosti primerjati z mejnimi vrednostmi za posamezne snovi, ki predstavljajo količino (masa, koncentracija, volumski delež) snovi, ki nima negativnih oz. ima še sprejemljive vplive na okolje in zdravje ljudi. Problem je v tem, da so mejne vrednosti določene za posamezne kemikalije, med različnimi kemikalijami in/ali njihovimi razgradnimi produkti pa lahko v vodnih raztopinah pride do medsebojnih vplivov, kot so sinergizem, aditivnost ali antagonizem, ki povzročijo povečanje ali zmanjšanje učinkov kemikalij na žive organizme (Fernández-Alba in Guil, 2002). Ocena tveganja, ki temelji na meritvah koncentracij posameznih kemikalij lahko torej pripelje do podcenjevanja tveganja mešanice kemikalij.

Fizikalno kemijske metode so omejene tudi z mejo detekcije (najnižja koncentracija posamezne snovi, ki jo lahko z določeno metodo zaznamo) in specifičnostjo (z metodami ne moremo zaznati novih, neznanih kemikalij). Če snovi s fizikalno-kemijskimi testi nismo zaznali, še ne pomeni, da te snovi v vodnem vzorcu ni, ter da nima potencialnega vpliva na druge, v vodi prisotne snovi ali organizme. Znano je tudi, da nekatere snovi niso strupene, dokler ne pridejo v stik z živimi organizmi, v katerih pride do njihove bioaktivacije (Marinšek-Logar in sod, 2006).

Za oceno kvalitete in varnosti voda se, zaradi pomanjkljivosti fizikalno-kemijskih metod, vedno bolj uveljavlja integrirana uporaba le-teh s testi strupenosti z živimi organizmi

(biotesti). Uporabo biotestov kot dodatek fizikalno-kemijskim testom podpira tudi evropska direktiva iz leta 1993 (Council Directive 93/21/EEC, 1993).

Strupenost neke snovi predstavlja potencial oz. zmožnost te snovi, da ob stiku z živimi organizmi povzroči zanje neželjene in neugodne učinke. Strupenost je rezultat doze (koncentracije, kateri je bil organizem izpostavljen) in časa izpostavljenosti, odvisna pa je od spremenljivk, kot so temperatura, kemijska zgradba in biološka dostopnost (Eaton in sod., 1998).

Biotesti za oceno kvalitete in varnosti voda temeljijo na uporabi živih organizmov, ki jih izpostavimo vodnim vzorcem in vrednotimo letalni učinek (smrtnost) ali določamo subletalne učinke na vseh nivojih biološke organizacije (biokemijski in fiziološki učinki, vpliv na razmnoževanje, rast, razvoj...). V testih torej spremljamo merljiv odziv (npr. število mrtvih osebkov, upad bioluminiscence, zaviranje rasti) organizmov na vodne vzorce. Rezultate večinoma predstavimo v obliki vrednosti IC, EC, LC, NOEC in LOEC (Marinšek-Logar in sod, 2006).

Bioteste ločimo glede na :

- trajanje testov (kratkotrajni oz. akutni, srednje dolgi in dolgotrajni oz. kronični testi)
- dodajanje raztopin (statični, obnavljajoči in pretočni sistemi)
- namen testov (testiranje posameznih kemikalij, kompleksnih mešanic, preiskovanje specifičnih odzivov...).

Z akutnimi testi ocenjujemo strupenost kemikalij oziroma onesnaževal na izbrani vodni organizem v kratkem časovnem obdobju izpostavljenosti (nekaj minut do nekaj dni). Pri akutni strupenosti je navadno prisoten intenziven odgovor na preiskovano snov, pogosto je končni merjeni odziv akutnih biotestov smrtnost izpostavljenih organizmov (enostavno merljiv odziv), zato so izpostavitvene koncentracije preiskovanih snovi relativno visoke (Eaton in sod., 1998).

S kroničnimi testi strupenosti ocenjujemo škodljiv vpliv kemikalij na izbrani vodni organizem ob dolgotrajni oz. ponavljajoči se izpostavitvi preiskovanim vzorcem (nekaj tednov do let). Ponavadi gre za nižje koncentracije kot pri akutnih testih, zato je odziv izpostavljenih organizmov manj intenziven. V kroničnih testih strupenosti smrt organizmov ni zaželjena, v tovrstnih testih največkrat preučujemo subletalne vplive na

življenjski cikel organizma ali na del življenjskega cikla (npr. rast in razmnoževanje) (Eaton in sod., 1998).

Prednost testov strupenosti z uporabo živih organizmov je, da odražajo strupenost vseh prisotnih kemikalij v danem okoljskem vzorcu, tudi tistih, ki so v vzorcu prisotne le v sledovih in bi jih s tradicionalnimi fizikalno-kemijskimi analizami spregledali, a lahko vseeno vplivajo na strupenost vzorca. V takem pristopu torej ni spregledan učinek nobene kemikalije na škodljivost vzorca, saj gre za oceno biološkega odziva organizmov na celoten vzorec (Escher in sod., 2005).

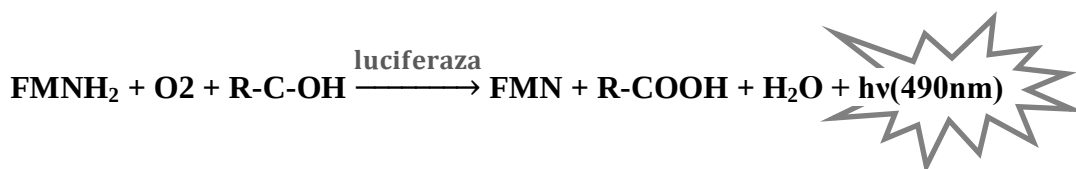
2.1.1 Testni organizmi

Za celovito napoved potencialnih toksičnih učinkov na vodotoke je potrebna izvedba testov na različnih taksonomskih skupinah organizmov, saj se, zaradi specifičnega učinka kemikalij, različni organizmi na iste snovi odzivajo drugače in so na njih različno občutljivi. Večina raziskav temelji na uporabi bakterij, alg, rakov in rib (Hrenovic in sod., 2005). Ugotavljanje strupenosti vodnih vzorcev temelji na merjenju zaviranja bioluminiscence po 30 minutah pri morskih bakterijah *Vibrio fischeri* ("screening" metoda), merjenju zaviranja rasti alg po 72 urah pri zelenih algah, merjenju zaviranja oz. motenj gibanja po 24 ali 48 urah pri vodnih bolhah in na preživetju odraslih rib (Tišler in sod., 2008).

Zaradi svetovnih smernic za razvoj novih in vitro postopkov, manj etično spornih in invazivnih postopkov v ekotoksikoloških raziskavah, ter pojavljanja novih kemikalij in potencialnih onesnažil (npr. hormonski motilci), razvijajo nove metode, kot so uporaba celičnih linij (E-screen test), spremljanje embrionalnega razvoja rib ali testi z gensko spremenjenimi enoceličnimi organizmi (YES test) (Tišler in sod., 2008). Pomembno je, da so testi strupenosti enostavni, hitri, poceni, in da ne potrebujejo veliko prostora ter opreme. V ta namen se stalno razvijajo komercialno dostopni kompleti, t.i. strupenostni kiti (Microtox[™], LUMISTox[™], Biotox[™], Daphnotox[™], idr.), ki vsebujejo vse potrebno za izvedbo biotestov (navodila, raztopine, organizme in opremo) (Escher in sod., 2005).

2.1.1.1 *Vibrio fischeri* (NRRL-B-1117)

Vibrio fischeri so gram negativne morske bakterije paličaste oblike. Ponavadi so prisotne v svetilnih organih morskih živali (npr. lignjev ali globokomorskih rib), s katerimi živijo v simbiozi, najdemo pa jih tudi prosto v okolju. *V. fischeri* imajo sposobnost emitiranja šibke luminiscenčne svetlobe, gre za t.i. bioluminiscenco. Ta sposobnost je posledica ekspresije *lux* operona, ki vsebuje gene za encim luciferazo. Luciferaza v prisotnosti koencima flavin mononukleotida (FMNH₂) katalizira oksidacijo organskih spojin (npr. aldehida R-CO-H). Koencim se v reakciji oksidira, sproščena energija pa se sprosti v obliki modro-zelene svetlobe z valovno dolžino 490 nm (Dunlap, 1999).



Bakterije *V. fischeri* se največkrat uporabljajo v hitrih, presejalnih akutnih testih strupenosti, ki so na voljo v obliki komercialnih strupenostnih kitov (LUMISTox™, Microtox™). Bakterije izpostavimo vzorcem in merimo upad intenzitete emitirane svetlobe, ki je sorazmerna z metabolno aktivnostjo bakterij. Če je v vzorcu prisotna snov, ki na bakterije deluje škodljivo, se njihova metabolna aktivnost zniža, zaradi česar pride do upada bioluminiscence. Bolj kot se intenziteta emitirane svetlobe zniža, bolj je vzorec za bakterije strupen. Rezultat testa predstavimo z vrednostjo IC_{50(30min)} (Parvez in sod., 2006).

2.1.1.2 *Daphnia magna* (Straus 1820)

Rake *D. magna* imenujemo tudi vodne bolhe. To ime so dobili po značilnem gibanju v vodi, ki spominja na gibanje navadnih bolh (*Siphonaptera*). *D. magna* so majhni sladkovodni raki, ki zrastejo 5-6 mm. Razen glave jim celoten trup obdaja dvodelni karapaks (zunanjí skelet oz. ščit). Vrh glave imajo eno sestavljeno, pigmentirano oko, telo pa je brezbarvno in prozorno. Na glavi imajo 2 para anten. Prve so majhne s škrgami, druge pa so velike in razvejane ter služijo za gibanje. Na hrbtni strani med hrbtom in košem je valilnik, kamor vodne bolhe odlagajo jajčeca. (Ruppert in Barnes, 1994).

Vodne bolhe se večino leta razmnožujejo nespolno. V populaciji so večinoma samice, do pojava samcev pride le ob neugodnih razmerah. Ko se v populaciji pojavijo samci, se

vodne bolhe razmnožujejo spolno. Takemu načinu razmnoževanja pravimo ciklična partenogeneza (USEPA, 2002).

Partenogeneza je vrsta nespolnega razmnoževanja, pri kateri pride do razvoja zarodka iz jajčne celice brez oploditve. Pri partenogenezi vodnih bolh so vir genskega materiala mladičev izključno samice, za razliko od spolnega razmnoževanja, kjer polovico genskega materiala prispevajo samci. Takšna oblika nespolnega razmnoževanja omogoča laboratorijsko pridobitev velikega števila klonov samic z majhno genetsko variabilnostjo in ponovljivimi testnimi rezultati (Eaton in sod., 1998).

Vodne bolhe so zelo priljubljene v akutnih in kroničnih testih strupenosti, predvsem zaradi kratkega življenjskega cikla (40 do 56 dni), nezahtevnosti za gojenje in občutljivosti na kemikalije. Pri akutnih testih strupenosti vodne bolhe izpostavimo vodnim vzorcem in po 24 ali 48 urah opazujemo težave pri gibanju, negibnost oz. neodzivnost na dražljaje in/ali smrtnost. Rezultate testov akutne strupenosti predstavimo z vrednostima $EC_{50(24h/48h)}$ in $LC_{50(24h/48h)}$ (Grayman in sod., 2001).

2.1.1.3 *Desmodesmus subspicatus* (Chodat 1926)

Alge so eno ali večcelični avtotrofni organizmi (imajo sposobnost proizvodnje organskih molekul iz anorganskih molekul z uporabo svetlobne ali kemijske energije), ki živijo v sladkih ali morskih vodah ter vlažnih kopenskih okoljih. So primarni producenti in predstavljajo ključno komponento vodnih ekosistemov. Proizvajajo kisik in organske snovi, ki mnogim vodnim organizmom služijo kot vir hrane in jim omogočajo preživetje. Zastrupitev primarnih producentov ima torej lahko posledice tudi za organizme višjih trofičnih nivojev in za celoten vodni ekosistem (Ma in sod., 2007).

Vse skupine alg vsebujejo klorofil – zelen fotosintetski pigment potreben za fotosintezo. Vsebujejo lahko tudi druge fotosintetske pigmente, zaradi katerih je zelena barva zakrita (fukoksantin, fikoeritrin) (Eaton, 1998). Barva oz. vsebnost različnih fotosintetskih pigmentov je eden od taksonomskih ključev za klasifikacijo alg. Zelene alge so najbolj raznolika skupina alg. Fotosintezo vršijo preko pigmentov klorofil-a in klorofil- b, ki se nahajata v kloroplastih. Imajo značilno zeleno barvo, od koder izvira tudi njihovo ime.

Alge redno uporabljajo v raziskavah kot orodje za ugotavljanje strupenosti vodnih vzorcev ali ugotavljanja strupenosti znanih kemikalij. Prednosti uporabe alg v biotestih so kratek

odzivni čas (hitro zaznavanje negativnih sprememb v okolju), splošna občutljivost na strupene snovi, hitrost rasti alg, hitrost izvedbe testov in cena. Na voljo so komercialni strupenostni kiti (npr. Algaltoxit FTM), ki omogočajo enostavno in hitro analizo vzorcev (Pavlič in sod., 2005). Ugotavljanje strupenosti vodnih vzorcev z algami najpogosteje temelji na merjenju količine fotosintetskih pigmentov, meritvah zakasnjene luminiscence ali spremljanju zaviranja rasti alg.

Alge *Desmodesmus subspicatus* (prej poznane kot *Scenedesmus subspicatus*) uvrščamo med zelene alge. So sladkovodne enocelične planktonske alge, okroglih do elipsoidnih oblik, ki lahko tvorijo kolonije. Celice so negibne z razvito celično steno in posameznimi izrastki (bodicami). Spadajo med steljčnice (organizmi, ki še nimajo jasno razvitih tkiv in organov) (Shubert, 2011).

Strupenostni test zaviranja rasti alg temelji na določanju vrednosti IC₅₀ preiskovane snovi, torej koncentraciji preiskovane snovi, pri kateri je rast alg zmanjšana za 50 % glede na kontrolo. Alge štejemo v času 0 in 72 ur s pomočjo svetlobnega mikroskopa v Bürkerjevi števnici kamrici. Iz dobljenih koncentracij izračunamo hitrost rasti alg za posamezne vzorce in iz primerjave hitrosti rasti vzorcev s hitrostjo rasti kontrole izračunamo odstotek pospeševanja oz. zaviranja rasti alg (Marinšek- Logar in sod., 2006; ISO 8692, 2004).

2.2 PESTICIDI

Beseda pesticid je sestavljena iz latinskih besed *pestis* (= kuga) in *cid* oz. *cidium* (= umor). Po definiciji Organizacije za hrano in kmetijstvo (FAO, Food and Agriculture Organization) so pesticidi ali fitofarmacevtska sredstva (FFS) - substance ali mešanice substanc namenjene za preprečevanje, uničevanje, privabljanje in kontrolo škodljivcev (Ware in Whitacre, 2004). Pesticid je aktivna substanca, ki je ponavadi v določeni koncentraciji primešana inertnemu mediju, ta mešanica pa se prodaja kot zatiralno sredstvo proti škodljivcem in boleznim.

Pesticide delimo glede na (Grmek-Košnik in sod., 2006):

- kemijsko strukturo (organoklorni, organofosforni, triazinski, karbamatni, itd.)
- biološko aktivnost na ciljne organizme (baktericidi (bakterije), insekticidi (žuželke), fungicidi (glive), akaricidi (pršice), herbicidi (pleveli), nematicidi ali antihelmintiki (gliste), rodenticidi (glodalci), itd.)

- izvor (sintetični pesticidi in naravni/biološki pesticidi)
- obseg delovanja (pesticidi s širokim/ozkim spektrom delovanja) in način delovanja (kontaktni pesticidi, ki delujejo na površini in sistemski pesticidi, ki prodirajo v notranjost organizmov).

FFS so po kemijski sestavi anorganske (žveplova, bakrova sredstva) ali organske spojine, med katerimi v zadnjem času prevladujejo kompleksne organske spojine, ki so večinoma sintetične (Whare in Whitacre, 2004). Predvsem zadnje so lahko ob neustrezni uporabi škodljive za človeka in biosfero. Negativni vplivi pesticidov na človeški organizem so odvisni od koncentracije pesticidov, ki vstopajo v okolje, načina uporabe, stopnje razgradljivosti, obstojnosti v okolju, sposobnosti bioakumulacije in biokoncentracije, sposobnosti vključevanja v prehranjevalne verige, mutagenosti, genotoksičnosti in še mnogih drugih dejavnikov (Grmek-Košnik, 2006). Kljub željeni specifičnosti pesticidov lahko pride tudi do negativnih učinkov na ne-tarčne organizme.

2.2.1 Herbicidi

Herbicid je katerakoli kemikalija, ki jo uporabljamo z namenom uničevanja ali zaviranja rasti rastlin, predvsem plevelov in druge neželjene vegetacije. Najbolj razširjena je uporaba v kmetijstvu, v manjšem obsegu pa se uporabljajo tudi v drugih dejavnostih, ki posegajo v okolje (gozdarstvo, urejanje pašnikov, čiščenje železnic, letališč) (Cobb in Reade, 2010a).

Herbicide najpogosteje delimo glede na:

- kemijsko strukturo
- vrsto rastlin ali rastlinskih organov, ki jih poškodujejo
- obseg delovanja
- mehanizme delovanja.

Herbicide ločimo na več kemijskih skupin, ki imajo lahko isti mehanizem delovanja. Poznamo triazine, ureate, triazinone, uracile, sulfonilsečnine, imidazolinone, karbamate, kloroacetanilide, acetamide, nitroaniline, benzoate, cikloheksandione, kaboksilate, itd.

Po obsegu delovanja ločimo kontaktne in sistemske herbicide. Kontaktni herbicidi delujejo le na mestu nanosa. Rastline jih sprejemajo skozi zelene dele rastlin, po rastlini se ne premeščajo in povzročajo le lokalno odmiranje poškropljenih rastlinskih delov. Sistemski herbicidi v rastlino vstopajo preko listov ali korenin in se po prevajalnem sistemu

premeščajo v ostale dele rastline, kjer negativno vplivajo na življenjsko pomembne encimske procese ter povzročajo odmiranje rastlinskih organov oz. celih rastlin (Cobb in Reade, 2010a, Cobb in Reade, 2010b, Beyer in sod., 1988).

Glede na mehanizme delovanja ločimo herbicide na:

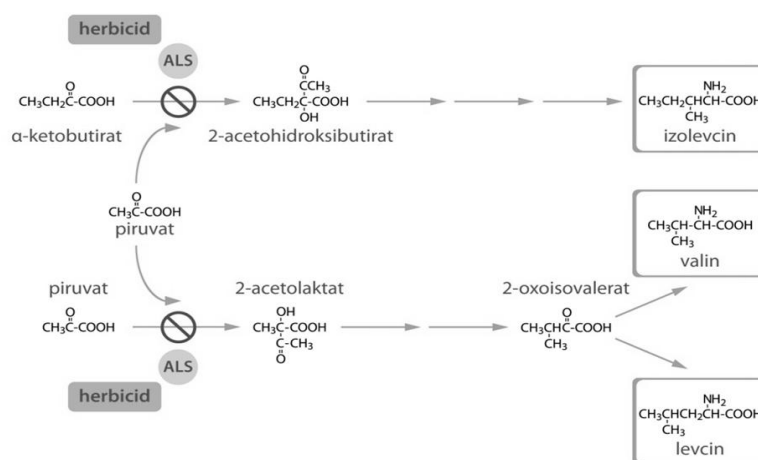
- inhibitorje acetil-CoA-karboksilaze (ACC)
- inhibitorje acetolaktat-sintaze (ALS)
- inhibitorje enol-piruvil-šikimat-3-fosfat-sintaze (EPSPS)
- sintetične avksine
- inhibitorje fotosinteze v fotosistemu I in/ali fotosistemu II
- inhibitorje sinteze fotosintetskih pigmentov.

2.2.1.1 Zaviranje acetolaktat sintaze

Acetolaktat sintaza (ALS) je encim, značilen zgolj za rastline in mikroorganizme (bakterije, glive). V rastlinah je v kloroplastih in katalizira prvi korak v sintezi razvejanih aminokislin valina, levcina in izolevcina (Zhou in sod., 2007).

ALS katalizira 2 reakciji (slika 1) (Submaranian in sod. 1991; Zhou in sod., 2007; Cobb in Reade, 2010b):

- pretvorba ene molekule piruvata in α -ketobutirata v CO_2 in 2-acetohidroksibutirat, ki je prekursor za aminokislino izolevcin
- pretvorba dveh molekul piruvata v CO_2 in 2-acetolaktat, ki je prekursor za aminokislini valin in levcin.



Slika 1: Prikaz mehanizma delovanja ALS inhibitornih herbicidov (povzeto po Griffin, 2010).

Herbicidi, ki zavirajo delovanje ALS, so med najbolj razširjenimi na svetu. Preko zaviranja delovanja ALS preprečijo sintezo esencialnih aminokislin valina, levcina in izolevcina, kar pripelje do pomanjkanja le-teh v rastlinskih celicah. Posledično se v rastlinah zniža raven sinteze proteinov, kar vodi v upad celičnih delitev in celične rasti. Simptomi zaviranja delovanja ALS so močno zavrta rast rastlin (hitro opazen simptom), izguba olistanosti, razbarvanje žil, odmiranje popkov in poganjkov, kloroze, nekroze in v končni fazi smrt rastlin (Brown, 1990; Duke, 1990). Ni znano, ali so fitotoksični učinki, ki nastanejo zaradi zaviranja ALS, zgolj posledica pomanjkanja esencialnih aminokislin, razlog bi lahko bil tudi prekomerno nabiranje prekurzorjev sinteze aminokislin, kot je npr. α -ketobutirat (Russell in sod., 2002).

Poznamo 5 skupin herbicidov, ki zavirajo delovanje ALS (Zhou in sod., 2007):

- sulfonilsečnine
- imidazolinoni
- triazolpirimidini
- sulfonilamino-karboniltriazolinoni
- pirimidinil-tio(alo oks)-benzoati.

2.2.1.2 Sulfonilsečninski herbicidi

Odkritje sulfonilsečninskih herbicidov (Sus herbicidov) v 80-ih letih prejšnjega stoletja predstavlja pomembno odkritje v raziskovalnem polju herbicidov in zaznamuje novo obdobje v zatiranju plevelov. Značilnosti Sus herbicidov so (Beyer in sod., 1988):

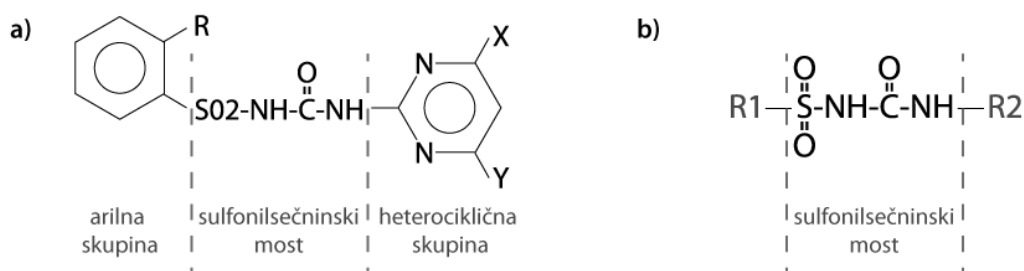
- edinstven mehanizem delovanja - zaviranje ALS
- visoka fitotoksičnost
- nizka koncentracija uporabe
- selektivnost
- majhna nevarnost za ljudi in živali.

Visoka fitotoksičnost Sus herbicidov je omogočila njihovo učinkovito uporabo v 10-100x nižjih koncentracijah (3-40 g/ha), kot pri takrat znanih herbicidih (v kg/ha) (Devine in Vanden, 1985; Cessna in sod., 2006). Razloga za visoko fitotoksičnost Sus herbicidov sta specifičen mehanizem delovanja in hiter prenos herbicida po rastlini. Ti herbicidi imajo

namreč rahlo kisel značaj, zaradi česar hitro potujejo tako po ksilemu kakor po floemu rastlin (Russell in sod., 2002).

Pomembna lastnost Sus herbicidov je tudi njihova naravna selektivnost oz. specifičnost. Selektivnost je posledica razlik v metabolizmu tolerantnih in občutljivih rastlin. Tolerantne rastline lahko hitro transformirajo herbicid v nepolarno, biološko neaktivno obliko. Selektivnost je lahko tudi posledica neobčutljivosti aktivnega mesta herbicida v rastlinskih celicah, vendar je ta mehanizem rezistence manj razširjen kot prvi (Russell in sod., 2002). Sus herbicidi so selektivni tudi v smislu, da je zaviranje ALS omejeno na rastline in mikroorganizme, ki imajo omenjeni encim, za druge organizme (npr. živali ali ljudi), ki tega encima nimajo, pa so Sus herbicidi malo ali nestrupeni.

V starejši virih (Beyer in sod., 1988; Duke, 1990) je splošna struktura molekule Sus herbicidov iz 3 delov: arilne (aromske) skupine, sulfonilsečninskega mostu in heterociklične skupine z vezanim dušikom. (slika 2a) R, X in Y skupine se lahko razlikujejo med posameznimi Sus herbicidi.



Slika 2: Splošna struktura sulfonilsečninskih herbicidov. (povzeto po Beyer in sod., 1988; Duke, 1990; Cessna in sod., 2006; Duggleby in sod., 2008)

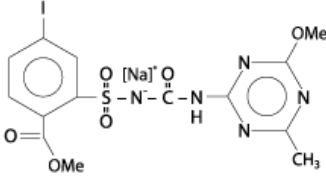
V novejših virih (Cessna in sod., 2006; Duggleby in sod., 2008) je molekula Sus herbicidov prav tako iz 3 delov. Sulfonilsečninskega mostu in dveh R skupin, ki se na vsaki strani pripenjata nanj (slika 2b). R₁ skupina, ki se pripenja na žveplov atom je lahko alifatska, aromatska ali heterociklična, R₂ skupina, ki se pripenja na terminalni dušikov atom sulfonilsečninskega mostu, pa je lahko substituiran triazinski ali pirimidinski obroč. Obema zapisoma je skupen sulfonilsečninski most, po katerem je ta skupina herbicidov tudi dobila ime (Russell in sod., 2002).

Novejši sulfonilsečninski herbicid so amidosulfuron (Eagle®, Pursuit®), foramsulfuron (Equip®, Option®), rimsulfuron (Matrix®, Shadeout®), sulfosulfuron (Maverick®,

Sundance®), tritosulfuron (Corto®), jodosulfuron-metil (Husar®), itd. V zadnjih dveh desetletjih so bili Sus herbicidi ena izmed intenzivno raziskovanih skupin in so danes med najbolj razširjenimi skupinami herbicidov na svetu.

2.2.1.2.1 Jodosulfuron

Preglednica 1: Klasifikacija, fizikalno-kemijske in ekotoksikološke lastnosti jodosulfurona.

KLASIFIKACIJA	
Splošno ime	jodosulfuron-metil-natrij
Kemijsko ime (IUPAC)	4-jodo-2-[3-(4-metoksi-6-metil-1,3,5-triazin-2-il)-ureidosulfonil]benzoat, natrijeva sol
CIPAC številka	634,501
CAS številka	144550-36-7
Funkcija	herbicid
Družina	sulfonilsečnine
Mehanizem delovanja	zaviranje acetolaktat-sintaze
FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI	
Molekulska formula	$C_{14}H_{13}IN_5NaO_6S$
Molekulska masa	529,28 g/mol
Strukturna formula	
Oblika	kristalni prah
Topnost v vodi	pH 4: 20 mg/L (20°C) pH 5: 160 mg/L (20°C) pH 7: 25000 mg/L (20°C) pH 9: 65000 mg/L (20°C)
Topnost v organskih topilih	n-heptan: 0.0011 g/L n-heksan: 0.0012 g/L toluen: 2.1 g/L 2-propanol: 4.4 g/L metanol: 12 g/L etil-acetat: 23 g/L acetonitril: 52 g/L
Hidrolitska stabilnost (DT ₅₀)	pH 4: 4 dni (20°C) pH 5: 31 dni (20°C) pH 6: >365 dni (20°C) pH 7: >365 dni (20°C) pH 9: 362 dni (20°C)

(se nadaljuje)

(nadaljevanje)

FIZIKALNO-KEMIJSKE LASTNOSTI	
Disociacijska konstanta	$pK_a = 3,22 \pm 0,06$
Maksimalna absorpcija UV/vidne svetlobe	1471 L/mol x cm (metanol) 2073 L/mol x cm (metanol/NaOH, 9:1)
Fotostabilnost v vodi (DT_{50})	$DT_{50} \approx 50$ dni (pH 7, 25°C, 12 urna fotoperioda)
STRUPENOST ZA VODNE ORGANIZME (ekotoksikološke lastnosti)	
Akutna strupenost za nevretenčarje	<i>Daphnia magna</i> : smrtnost po 48 urah, $EC_{50} > 100$ mg/L
Kronična strupenost za nevretenčarje	<i>Daphnia magna</i> : reprodukcija po 21 dneh, NOEC = 10 mg/L
Akutna strupenost za alge	<i>Pseudokircherinella subpccapitata</i> : prirast biomase po 72 urah, $EC_{50} = 0,070$ mg/L
Akutna strupenost za vodne rastline	<i>Lemna gibba</i> : biomasa in zaviranje rasti po 14 dneh, $EC_{50} = 0,00083$ mg/L

Uporabo jodosulfurona kot FFS v Evropi ureja Council Directive 91/414/EEC o dajanju fitofarmaceutskih sredstev v promet. Raziskave o vključitvi jodosulfurona med dovoljena FFS so se začele leta 1998 in zaključile s potrditvijo poročila o aktivni substanci jodosulfurona 4. julija 2003 (SANCO/10166/2003-Final, 2003).

Ugotovili so, da, ob upoštevanju splošnih pogojev uporabe FFS navedenih v direktivi 91/414/EEC:

- ostanki jodosulfurona nimajo škodljivih učinkov za ljudi ali živali
- uporaba jodosulfurona nima nesprejemljivih vplivov na okolje
- nobena izmed oblik, nečistoč jodosulfurona, glede na dosedanje podatke, ne predstavlja toksikoloških ali okoljskih problemov in skrbi
- je potrebna posebna pazljivost in pozornost ob uporabi jodosulfurona na področjih, kjer lahko pride do onesnaženja podtalnih vodnih virov
- je potrebna posebna pozornost pri zaščiti vodnih rastlin.

Jodosulfuron je topen v vodi pri pH = 4, zelo topen pri pH = 7 in najbolj topen pri pH = 9 (preglednica 1). Ker ne prihaja do močne adsorpcije na delce prsti obstaja potencialna nevarnost spiranja ali pronicanja herbicida v podtalne vode. Jodosulfuron ni hlapen in izkazuje majhno verjetnost bioakumulacije v organizmih. Je malo strupen za *D. magna*, močno strupen za sladkovodne alge *P. subpccapitata* in srednje strupen za vodne in kopenske rastline (SANCO/10166/2003-Final, 2003).

Pričakovana okoljska koncentracija (Expected Environmental Concentration - EEC) jodosulfurona v vodi je 0,0003 mg/L. Vrednost so dobili z upoštevanjem biotransformacije, fototransformacije, adsorpcije, disociacije in podobnih procesov, ki lahko doletijo spojino jodosulfurona v vodnem okolju. Vrednost je predvidena za gostoto vode 1 g/mL, globino 80 cm in scenarij, v katerem je pesticid poškropljen na površino vode. Nanos jodosulfurona je bil 2 g/ha (maksimalna predlagana koncentracija nanosa v Kanadski regulativi) (REG2004-04, 2004; PRD2008-06, 2008).

2.2.2 Usoda pesticidov v okolju

Na pesticide v okolju vpliva veliko procesov, ki odločajo o njihovi obstojnosti, migracijah in končni usodi. Ti procesi so lahko koristni, lahko npr. premaknejo pesticid v pravo območje delovanja ali vplivajo na odstranitev potencialno škodljivih razgradnih produktov, lahko pa so škodljivi in povzročijo zmanjšano učinkovitost kontrole škodljivcev, negativno vplivajo na ne-tarčne vrste organizmov in/ali povzročijo okoljsko škodo (Crosby, 1973; Gavrilesu, 2005).

Procese, ki sodelujejo pri usodi pesticidov, lahko razdelimo na 3 glavne skupine (Gavrilesu, 2005):

- adsorpcijo
- snovni prenos oz. migracijo
- razgradnjo ali razpad.

2.2.2.1 Adsorpcija pesticidov

Pri adsorpciji pride do vezave pesticidov na delce prsti. Do vezave pride zaradi privlačnih sil med spojinami in delci, pozitivno nabiti pesticidi se lahko vežejo na negativno nabite delce gline in obratno. Na adsorpcijo pesticidov vpliva veliko dejavnikov oz. lastnosti tal (npr. vsebnost organskih snovi, vlažnost) (Gavrilesu, 2005).

Problemi, ki nastanejo z adsorpcijo pesticidov v tla vključujejo zmanjšano kontrolo škodljivcev in bolezni (slabši prevzem na prst vezanih pesticidov v rastlino) ali poškodbo netačnih rastlin (adsorbirani pesticidi se lahko s časom sprostijo z delcev prsti in vplivajo na ne-tarčne rastline) (Gavrilesu, 2005).

2.2.2.2 Migracija pesticidov

Premik pesticidov je včasih ključen za učinkovito kontrolo škodljivcev in bolezni. Pesticidi, ki se uporabljajo pred kalitvijo rastlin, morajo priti skozi zemljo do semen. Tudi premik pesticidov v območje korenin lahko zviša učinkovitost njihovega delovanja. Preveliki premiki pa lahko pesticid odstranijo iz optimalnih območij delovanja, kar vodi v zmanjšano kontrolo škodljivcev in bolezni, kontaminacijo površinskih in podtalnih voda ter do potencialnih škodljivih učinkov na ne-tarčne vrste organizmov (Gavrilescu, 2005).

Zaskrbljujoč je predvsem premik FFS v površinske in podtalne vodne vire, saj lahko preko vodnih virov direktno vplivajo na zdravje ljudi. Z uveljavitvijo Pravilnika o pitni vodi je leta 2003 v Sloveniji začela veljati v EU predpisana mejna vrednost 0,10 µg/L za posamezne pesticide in mejna vrednost 0,5 µg/L za seštevek vseh pesticidov v vodi. Zahteve veljajo za vrednosti izmerjene na neposrednem viru za uporabnika, poleg pesticidov pa vključujejo tudi njihove metabolne, razgradne in reakcijske produkte v vodi (Council directive 98/83/EC, 1998; Council directive 2000/60/EC, 2000; Silva, 2008).

2.2.2.3 Razgradnja ali razpad pesticidov

Procesi razgradnje ali razpada pesticidov so ponavadi koristni, saj spremenijo večino pesticidov in njihovih ostankov v nestrupene in neškodljive spojine. Včasih pa so pesticidi in njihovi ostanki preveč stabilni za naravno razgradnjo, lahko so strupeni za organizme, ki razgradnjo vršijo, ali pa je rezultat biotransformacije spojina, ki je bolj strupena od izhodne (Gavrilescu, 2005).

Poznamo 3 tipe razgradnje pesticidov (Gavrilescu, 2005):

- mikrobiološka razgradnja (razgradnja pesticidov s strani mikroorganizmov)
- kemijska razgradnja (razgradnja pesticidov preko kemijskih reakcij v tleh, najpogosteje preko procesa hidrolize)
- fotodegradacija (razpad pesticidov zaradi vpliva svetlobe).

2.3 NAPREDNE OKSIDACIJSKE METODE

Posledica vsakdanjega življenja so organsko močno onesnažene odpadne vode (industrijske odplake, komunalne vode), površinski in podtalni viri pitne vode. Uspešen in cenovno ugoden proces odstranjevanja organskih onesnažil iz voda je biološko čiščenje

(npr. biološke čistilne naprave). Pri tovrstnem čiščenju gre za izpopolnjene procese v naravi prisotnega samočiščenja voda. Ti procesi vključujejo biološko razgradnjo spojin s strani mikroorganizmov in rastlin, transformacijo biorazgradljivih spojin v sprejemljive končne produkte, odstranjevanje večjih in manjših trdnih delcev, odstranjevanje hranil ter predelavo le-teh v novo celično maso (biomaso), itd. V splošnem gre torej za odstranitev in zmanjšanje koncentracije organskih in anorganskih spojin v odpadnih vodah (Tabrizi in Merhvar, 2004).

Težave nastopijo, ko se v onesnaženih vodah pojavijo stabilne, biološko nerazgradljive snovi, ki so strupene ali pa delujejo zaviralno na organizme, ki so vključeni v biološke procese čistilnih naprav. Pri čiščenju takih voda je biološka razgradnja neuspešna in neučinkovita. Zato je včasih pred biološkimi postopki čiščenja potrebna uporaba alternativnih tehnologij, s katerimi pride do predobdelave in/ali odstranitve motečih spojin (Stasinakis, 2008). Med alternativne tehnologije obdelave voda spadajo napredne oksidacijske metode (NOM), z uporabo katerih lahko v onesnaženih vodah dosežemo zmanjšanje koncentracije onesnažil, transformacijo biološko nerazgradljivih spojin v biološko razgradljive in/ali transformacijo strupenih snovi v nestrupene (Tabrizi in Merhvar, 2004).

NOM v osnovi posnemajo naravne oksidacijske procese na zemlji. V postopkih čiščenja onesnaženih voda je cilj teh metod popolna razgradnja (mineralizacija) organskih onesnažil do CO₂, vode in anorganskih soli (Badawy in sod., 2006), lahko pa se uporabijo tudi za zmanjševanje strupenosti anorganskih ionov in odstranjevanje težkih kovin iz vodnih medijev (Herrmann in sod., 2007). Glavni mehanizem delovanja NOM je ustvarjanje visoko reaktivnih prostih radikalov, ki reagirajo s tarčno molekulo ter povzročijo njen razpad. Poznamo 3 tipe razgradnje organskih spojin (Tabrizi in Merhvar, 2004):

- zadovoljiva razgradnja organskih spojin (v procesu pride do strukturne spremembe izhodnih spojin, ki zmanjša strupenost ali omogoča lažjo biorazgradljivost teh spojin)
- popolna mineralizacija (razgradnja organskih spojin do CO₂ in vode)
- nezadovoljiva razgradnja organskih snovi (v procesu pride do strukturne spremembe izhodnih spojin, ki poveča strupenost vodne raztopine).

Pri obdelavi vodnih medijev se najpogosteje uporablja hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$). $\cdot\text{OH}$ je zelo učinkovit, neselektiven in močan oksidant, ki učinkuje na večino organskih molekul. Obstajajo trije mehanizmi reakcije hidroksilnega radikala z organskimi molekulami (Stasinakis, 2008):

- adicija hidroksilnega radikala na organski radikal (R) (enačba (1.1))
- odcep vodikovega atoma, pri čemer nastaneta voda in reaktivni organski radikal (enačba (1.2))
- prenos elektrona z organskega radikala na hidroksilni radikal (enačba (1.3)).



Za ustvarjanje hidroksilnih radikalov NOM ponavadi vključujejo uporabo oksidantov, ultravijoličnega (UV) sevanja in katalizatorjev (Badawy in sod., 2006). Avtor Munter (2001) NOM deli na na:

- ne-fotokemijske metode:
 - ozonacija (O_3) pri povišanem pH (pH višji od 8,5), sistem $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, sistem O_3 /katalizator in Fentonov sistem ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$)
- fotokemijske metode:
 - sistem O_3/UV , sistem $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, sistem $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, foto-Fentonov sistem ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}/(\text{UV})$) in fotokatalitska oksidacija (TiO_2/UV).

Glavni dejavniki, ki vplivajo na potek teh procesov, so začetne koncentracije tarčnih spojin, količina oksidirajočih agentov in katalizatorjev, intenziteta svetlobe, čas obsevanja in lastnosti obdelovane vodne raztopine (predvsem pH ter prisotnost trdnih delcev in ionov) (Stasinakis, 2008).

Slabosti NOM so visoka cena procesov, visoka poraba energije, nastajanje neznanih intermediatov (so lahko bolj strupeni in obstojni od izhodne substance) in neučinkovitost procesa pri razgradnji določenih substanc, ki so odporne na napade hidroksilnih radikalov. Raziskave so zato usmerjene v razvoj novih, učinkovitejših NOM, ki bodo temeljile na uporabi nizko cenovnih materialov, obnovljivih naravnih virov energije, učinkoviti razgradnji novih tipov onesnažil in integraciji različnih procesov. Integracija separacijskih procesov (koagulacija, sedimentacija, filtracija), NOM procesov (odstranitev strupenih in

biološko nerazgradljivih snovi) in biološkega čiščenja (biorazgradnja organskih snovi v CO₂ in vodo) lahko zniža stroške in zviša učinkovitost čiščenja odpadnih vod. NOM že uporabljajo za čiščenje voda onesnaženih s pesticidi, površinsko aktivnimi snovmi, barvili, farmacevtiki in motilci endokrinega sistema (Stasinakis, 2008).

2.3.1 Fotokatalitska oksidacija

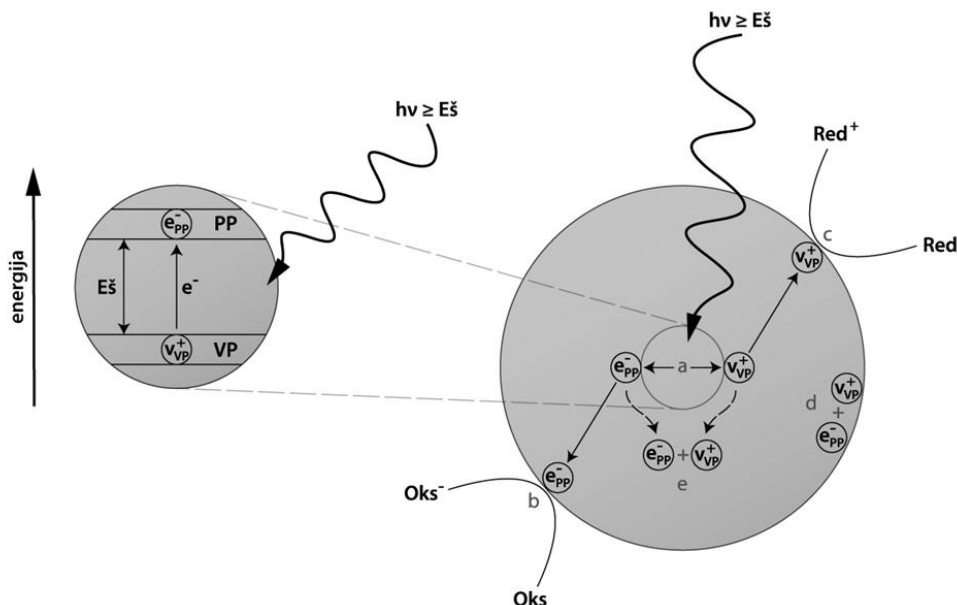
Fotokataliza spada med fotokemijske NOM. Metoda temelji na uporabi vidne UV svetlobe ($h\nu = 300 - 400 \text{ nm}$) za aktivacijo fotokatalizatorja, ki nato na površini ali v bližnji okolici svoje površine reagira s kemijskimi snovmi (Zeltner in Tompkins, 2005). Proces fotokatalize so intenzivno preučevali 20 let in predstavlja izredno obetajoč proces v sklopu NOM. Konec 20. stoletja je bilo objavljenih več kot 2000 objav s tega področja, trenutno je na temo fotokatalize objavljenih več kot 1000 člankov in publikacij letno (Herrmann, 2010). Večina aplikacij fotokatalize je usmerjenih v oksidacijo organskih onesnažil, zato se ta proces pogosto imenuje tudi fotokatalitska oksidacija. Fotokatalitska oksidacija temelji na osvetljevanju in aktivaciji polprevodnika (fotokatalizatorja) s svetlobo določene valovne dolžine (Zeltner in Tompkins, 2005).

Svetlobo si lahko predstavljamo kot množico kvantiziranih energijskih paketov, t.i. fotonov. Vsaki valovni dolžini svetlobe ustrezajo fotoni z določeno energijo. Energija fotonov in valovna dolžina svetlobe sta v obratnem sorazmerju (nižja kot je valovna dolžina svetlobe, višja je energija fotonov).

Različni polprevodniki potrebujejo različno količino energije, da preidejo v aktivirano oz. vzbujeno stanje, v katerem pride do vzbuditve elektronov in njihovega prehoda iz valenčnega pasu v prevodni pas polprevodnika. Valenčni pas in prevodni pas sta energijska pasova molekul med katerima je t.i. energijska špranja. Valenčni pas predstavlja zadnji energijski pas nevzbujenih elektronov v molekuli, prevodni pas pa energijski pas v katerega vzbujeni elektroni prehajajo. Energijska špranja ustreza energiji, ki jo je treba dovesti za prehod enega elektrona iz valenčnega v prevodni pas (Zeltner in Tompkins, 2005; Silva, 2008).

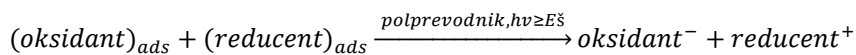
Pri fotokatalizi energijo za prehod polprevodnika v vzbujeno stanje dovajamo s fotoni. Energija enega fotona lahko vzbudi največ en elektron. Premik vzbujenega elektrona (e^-) v prevodni pas (PP) povzroči primanjkljaj elektrona v valenčnem pasu (VP), zato tam

nastane pozitivno nabita vrzel (V_{VP}^+). Prehod elektrona poteče le, če je dovedena svetlobna energija ($h\nu$) enaka ali večja od energijske špranje (E_s) (Slika 3, reakcija a).



Slika 3: Dogajanje v polprevodniku ob osvetlitvi s svetlobo primerne valovne dolžine (povzeto po Silva (2008)).

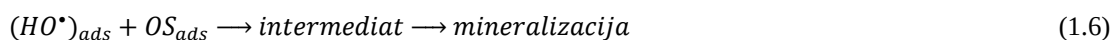
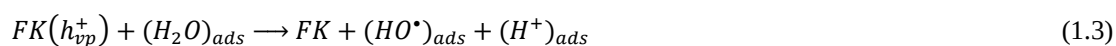
Nastali elektroni (e_{pp}^-) in vrzeli (V_{VP}^+) se lahko v notranjosti ali na površini polprevodnika ponovno združijo oz. rekombinirajo, s čimer se zmanjša aktivnost fotokatalizatorja. (Slika 3, reakcija e; Slika 3, reakcija d). Če elektron in vrzel dosežeta površino materiala pred rekombinacijo, lahko reagirata s spojinami v obdajajočem mediju. Elektroni reagirajo z adsorbiranimi oksidanti, ki se na površini polprevodnika reducirajo (Slika 3, reakcija b), vrzeli pa reagirajo z adsorbiranimi reducenti (Red), ki se na površini polprevodnika oksidirajo (Slika 3, reakcija c) (Zeltner in Tompkins, 2005; Silva, 2008).



V vodnih sistemih kot akceptor elektronov (oksidant) največkrat nastopa O_2 , kot donor elektronov (reducent) pa H_2O in OH^- . Pozitivno nabite vrzeli polprevodnika (FK) sprejmejo elektrone vode (enačba (1.3)) in hidroksidnih ionov (enačba (1.4)), kar pripelje do nastanka visoko reaktivnih hidroksil radikalov ($\cdot OH$). Ti radikali reagirajo z večino organskih spojin (OS), pri čemer pride do njihove razgradnje (enačba (1.5)). Vrzeli lahko tudi direktno reagirajo z organskimi spojinami (enačba (1.6)), vendar ta reakcijski mehanizem ni popolnoma dokazan. Enačba (1.1) predstavlja vzpostavitev para elektron

(e_{pp}^-) – vrzel (h_{vp}^+) v polprevodniku po osvetlitvi s svetlobo primerne valovne dolžine (Zeltner in Tompkins, 2005; Silva, 2008). Redukcija O_2 (enačba (1.2)) je pomembna, saj zagotavlja oddajanje in vezavo elektronov fotokatalizatorja, s čimer se podaljša obstojnost para elektron-vrzel in zmanjša verjetnost njune rekombinacije. Z zagotavljanjem stalne količine O_2 zvišujemo in ohranjamo aktivnost in učinkovitost fotokatalizatorja, vendar lahko preveč raztopljenega kisika povzroči slabšo adsorbcijo organskih spojin (Kuo, 2002; Silva, 2008).

Primeri reakcij na površini fotokatalizatorja (Silva, 2008):



2.3.1.1 Fotokatalizatorji na osnovi TiO_2

Fotokatalitska oksidacija temelji na uporabi različnih polprevodnikov (TiO_2 , ZnO , ZnS , WO_3 , $SrTiO_2$) kot katalizatorjev v procesu fotokatalitske razgradnje organskih spojin. Med njimi je najbolj razširjen titanov dioksid (TiO_2) (Matilainen in Sillanpää, 2010).

Za katalitsko aktivnost potrebuje TiO_2 obsevanje s svetlobo valovne dolžine krajše od 388 nm (v bližini UV spektra), ki inducira vzbujeno stanje tega polprevodnika (Sanches in sod., 2010). V vzbujenem stanju na površini TiO_2 delcev nastajajo radikali, ki zaradi svojega oksidacijskega potenciala razgrajujejo veliko večino organskih spojin, hkrati pa so lahko zelo strupeni tudi za mikroorganizme. TiO_2 se poleg uporabe v oksidaciji organskih spojin uporablja tudi v procesih odstranjevanja anorganskih spojin. Lahko namreč katalizira oksidacijo velikega števila strupenih anorganskih ionov do neškodljivih ali manj škodljivih oksidacijskih stanj (npr. SO_3^- , HSO_3^- , $S_2O_3^{2-}$, S^{2-} in HS^- so oksidirani do SO_4^- ionov). Polega tega lahko reducira tudi mnoge katione težkih kovin (Ag^+ , Hg^{2+} , Pb^{2+}), ki so potencialno toksični zaradi bioakumulacije. Reducirani kovinski kationi se na fotokatalizator nalagajo kot kristalni depoziti in se lahko na ta način odstranijo iz vodnih raztopin (Herrmann in sod., 2007; Herrman in Lacroix, 2010).

TiO₂ se ponavadi uporablja v obliki suspenzije (kot fin prah ali majhni delci) ali kot imobiliziran katalizator na nosilcu (npr. vlaknast nosilec - papir). Uporaba v suspenziji je bolj učinkovita, saj zagotavlja večjo reakcijsko površino katalizatorja. Ob koncu procesa je potrebno suspendirane delce fotokatalizatorja odstraniti s procesom separacije (npr. filtracija), kar procesu zviša ceno. Pri uporabi imobiliziranega katalizatorja je reakcijska površina manjša, prednost pa je v tem, da ni potrebe po dragi separaciji (Silva, 2008).

Delci TiO₂ so eni tistih, ki jih najpogosteje uporabljamo v procesih fotokatalitske oksidacije, za kar obstaja več razlogov (Nasr-Esfahani in sod., 2009):

- močne oksidacijske moči valenčne vrzeli
- oksidacije velikega števila organskih spojin
- kemijske inertnosti
- fotostabilnosti
- nizke cene in široke dostopnosti
- okoljske neškodljivosti
- možnosti koriščenja sončne energije kot vira svetlobe.

Prednosti koriščenja sončne energije so znižanje stroškov procesov, obnovljivost vira energije in preprosta izpostavitve obdelovanih voda viru svetlobe. Slabost je ta, da je le 3-5 % sončne svetlobe, ki doseže površino zemlje, uporabne za aktivacijo TiO₂, ki je trenutno najbolj primeren fotokatalizator za tovrstno izpostavitve svetlobnemu viru (Matilainen in Sillanpää, 2010). Drugi fotokatalizatorji so nestabilni v vodnih medijih ali ob stiku z zrakom, so toksični, imajo nižjo fotokatalitsko aktivnost kot TiO₂ ali pa so foto-nestabilni (Nasr-Esfahani in sod., 2009).

TiO₂ ima energijsko špranjo $E_g \approx 3,23$ eV, kar ustreza energiji fotonov svetlobe UV spektra. Energija fotonov pri svetlobi višjih valovnih dolžin (npr. vidna svetloba) ne zadošča za prehod TiO₂ v vzbujeno stanje. Zato je v velikem interesu razvoj fotokatalizatorjev na osnovi TiO₂, ki bodo tudi z obsevanjem z višjimi valovnimi dolžinami svetlobe ($h\nu \geq 388$ nm) lahko prešli v vzbujeno stanje, kljub temu, da bo $h\nu < E_g$ (Nasr-Esfahani in sod., 2009). To lahko dosežemo z dodajanjem elementov (N, S, B, O, Se) ali žlahtnih kovin (Ag, Pt, Ni, CuPd) v strukturo TiO₂. Tem postopkom pravimo dopiranje TiO₂ (Matilainen in Sillanpää, 2010).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 TESTI STRUPENOSTI

V testih strupenosti smo uporabljali morske bakterije *Vibrio fischeri*, vodne bolhe *Daphnia magna* in zelene alge *Desmodesmus subspicatus*. Ugotavljali smo strupenost neobdelane raztopine jodosulfurona in fotokatalitsko obdelane raztopine jodosulfurona za izpostavljene organizme.

3.1.1 Test strupenosti z bakterijami *V. fischeri*

Testiranje je potekalo po postopku, ki ga določa mednarodni standard ISO 13348-2: 2007. Uporabljali smo komplet testa za bakterijsko luminiscenco LCK 482 (*bacterial luminiscent test LCK 482*), ki smo ga kupili od proizvajalca DR LANGE (Dr. Bruno Lange, Düsseldorf, Germany). S testom smo ugotavljali akutno strupenost vzorca za sev luminiscenčnih bakterij *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177, ki se odraža kot zmanjšanje intenzitete emitirane luminiscenčne svetlobe bakterij.

Neobdelane vzorce jodosulfurona smo redčili po geometrični (G1) redčitveni vrsti in z luminometrom LUMIStox (DR LANGE) izmerili luminiscenco pred in po 30 minutni izpostavitvi bakterij vzorcem. Po 30 minutah smo na podlagi izmerjene luminiscence pred in po dodatku vzorca preračunali % zaviranja in izračunali vrednosti $IC_{20(30min)}$ in $IC_{50(30min)}$ za posamezen neobdelan vzorec oz. redčitev vzorca (program LUMISOFT4). Obdelanih vzorcev nismo redčili v redčitvene vrste, teste strupenosti smo izvedli z obdelanimi vzorci s koncentracijo 80 vol%. Pri obdelanih vzorcih smo opazovali le % zaviranja bakterijske luminiscence po 30 minutni izpostavitvi vzorcem in vrednosti IC nismo računali. Rezultate smo primerjali z doseženim % zaviranja luminiscence ob izpostavitvi bakterij začetni, neobdelani raztopini jodosulfurona.

3.1.2 Test strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna*

Testiranje je potekalo po postopku, ki ga določa mednarodni standard ISO 6341:1996. Uporabljali smo vodne bolhe *Daphnia magna* Straus 1820; kultura izvira iz Institut für wasser, Boden und Lufthygiene, des Umweltbundesantes, Berlin. Vodne bolhe smo gojili v steklenih 3 L akvarijih v 2,5 L modificiranega medija M4 (razredčevalna voda) pri 16 : 8

urni dnevno/nočni fotoperiodi (1800 lux) pri 21 ± 1 °C. V testih smo uporabljali vodne bolhe iz 2 - 5 generacije, mlajše od 24 ur, ki smo jih izpostavili vzorcem oz. redčitvam vzorcev.

Vodne bolhe smo hranili z algami *Desmodesmus subscipatus* CHODAT 1926. Alge smo filtrirali (velikost por – 1,2 µm) in filtrat razredčili z razredčevalno vodo do ustrezne koncentracije. Koncentracijo alg v suspenziji smo določali spektrofotometrično z merjenjem absorbanca A_{680} . Koncentracija alg v suspenziji korelira s količino ogljika, ki ga vodne bolhe pridobijo pri hranjenju z algami. Ustrezno koncentracijo alg za potrebno količino ogljika smo izračunali na podlagi predhodno pripravljene umeritvene krivulje in vodne bolhe hranili tako, da je vsaka dobila 0,1 – 0,2 mg ogljika/dan.

Pri testu akutne strupenosti za vodne bolhe smo določali koncentracijo vzorca, ki je v 24 oz. 48 urah povzročila negibnost pri 50 % izpostavljenih organizmov (vrednost $EC_{50(24h/48h)}$). Kot negibne vodne bolhe smo šteli tiste, ki se, po rahlem stresanju vodne raztopine, niso premaknile. Izračunali smo vrednosti EC z uporabo statističnega programa PROBIT. Pri obdelanih vzorcih nismo delali z redčitvenimi vrstami, zato smo opazovali le % negibnih vodnih bolh v nerazredčenem vzorcu in vrednosti EC nismo računali. Rezultate smo primerjali z doseženim % negibnih vodnih bolh izpostavljenih začetni, neobdelani raztopini jodosulfurona.

3.1.3 Test strupenosti z zelenimi algami *D. subspicatus*

Testiranje je potekalo po postopku, ki ga določa mednarodni standard ISO 8692:2004. Uporabljali smo zelene, enocelične alge *Desmodesmus subspicatus* Chodat 1926 (CCAP 276/22; Culture Collection of Algae and Protozoa, Cumbria, United Kingdom). Alge smo pred testi strupenosti gojili v mediju po Jaworskem na krožnem stresalniku pri 150 rpm (z izmeničnim 15 minutnim stresanjem in počivanjem) pri 21 ± 1 °C in fluorescentni osvetlitvi 4000 lux. 72 ur pred testi strupenosti smo alge sterilno precepili iz medija po Jaworskem v sveže pripravljen, sterilni ISO rastni medij in jih gojili na krožnem stresalniku pri 150 rpm s stalnim stresanjem in osvetlitvijo 7000 lux. Pred izpostavitvijo alg vzorcem smo s svetlobnim mikroskopom, z uporabo Bürkerjeve števne kamrice, alge v rastnem mediju ISO prešteli in izračunali njihovo koncentracijo. Nato smo preračunali, kolikšen volumen izhodne suspenzije moramo dodati vzorcem, da bo začetna koncentracija

suspenzije alg v raztopinah testiranih vzorcev enaka 1×10^{-4} celic alg/mL ($C_{alg(0h)}$). Pri ugotavljanju strupenosti neobdelane in obdelanih raztopin jodosulfurona smo pripravili redčitvene vrste, v nekaterih primerih pa smo, zaradi nezadostne količine vzorcev, testirali nerazredčene vzorce. Za vsako redčitev neobdelane raztopine jodosulfurona smo test strupenosti izvedli v dveh vzporednih meritvah (paralelkah) in celoten test dvakrat ponovili. Z obdelanimi vzorci smo zaradi pomanjkanja vzorcev izvedli le en test strupenosti z dvema paralelkama za vsak vzorec.

Suspenzije alg in vzorcev smo 72 ur stresali na krožnem stresalniku pri 150 rpm in osvetlitvi 7000 lux. Po 72 urah ($t_{(72h)}$) smo z mikroskopom v Bürkerjevi števeni kamrici alge prešteli in izračunali njihove koncentracije v posameznih vzorcih ($C_{alg(72h)}$). Po enačbi (1.1) smo izračunali povprečno specifično hitrost rasti (μ_i) in zaviranje rasti alg ($I_{\mu i}$) po enačbi (1.2). Pri redčenih vzorcih smo rezultate vnesli v grafikon (abscisa = log(koncentracija vzorca), ordinata = % zaviranja rasti alg) in z linearno regresijsko premico izračunali koncentracijo jodosulfurona, pri kateri pride do 50 % zaviranja rasti alg ($IC_{50(72h)}$). Pri večini obdelanih vzorcev 50 % zaviranja nismo mogli izračunati, ker smo z najvišjo testirano koncentracijo jodosulfurona dosegli premajhno zaviranje rasti alg ($I_a < 50 \%$).

$$\mu_i = \frac{\ln C_{alg(72h)} - \ln C_{alg(0h)}}{t_{72h} - t_{0h}} \quad \left[\frac{1}{\text{dan}} \right] \quad (1.1)$$

$$I_{\mu i} = \frac{\mu_{i(\text{kontrola})} - \mu_{i(\text{vzorec ali redčitev})}}{\mu_{i(\text{kontrola})}} \times 100 \quad [\%] \quad (1.2)$$

Obdelane raztopine jodosulfurona smo redčili tako, da je bila koncentracija nerazgrajenega jodosulfurona (preostala koncentracija) v posameznih redčitvah vzorcev dovolj nizka, da smo lahko opazovali spremembo zaviranja rasti alg. Obdelane vzorce smo redčili na podlagi vrednosti IC_{50} neobdelane raztopine jodosulfurona tako, da so bile vrednosti preostale koncentracije jodosulfurona v obdelanih vzorcih razporejene okrog vrednosti $IC_{50(72h)}$ začetne, neobdelane raztopine jodosulfurona.

3.1.3.1 Analiza in prikaz rezultatov

V primeru, ko smo lahko izračunali vrednosti IC_{50} obdelanih vzorcev, smo oceno oz. indeks strupenosti posameznih vzorcev podali kot razmerje med IC_{50} začetne, neobdelane raztopine (IC_{50-0}) in IC_{50} posameznih vzorcev (IC_{50-X}) (enačba (1.1)). X v enačbi (1.1) predstavlja številko vzorca.

$$IC_{50-0}/IC_{50-X} = \text{inhibitorni indeks} \quad (1.1)$$

Če je bil inhibitorni indeks < 1 , je bila koncentracija jodosulfurona v obdelanih vzorcih, potrebna za 50 % zaviranje rasti alg, višja od koncentracije neobdelane raztopine jodosulfurona, ki je povzročila isto zaviranje. To pomeni, da je bila raztopina jodosulfurona po fotokatalitski obdelavi manj strupena za zelene alge kot pred obdelavo.

Kadar vrednosti IC_{50} nismo mogli izračunati, ker je bilo zaviranje rasti alg premajhno ($I_a < 50 \%$), smo primerjali koncentracijo jodosulfurona, ki je v posameznem obdelanem vzorcu povzročila največje opaženo zaviranje (npr. $I_{a-X} = 30 \%$) in koncentracijo jodosulfurona v kontroli oz. neobdelani raztopini, ki je povzročila enak odstotek zaviranja (enačba (1.2)). Koncentracije začetne, neobdelane raztopine, ki so povzročile določen % zaviranja rasti alg (npr. $I_{a-0} = 30 \%$) smo izračunali iz enačb linearnih regresijskih premic (dve paralelki) z istim postopkom kot smo izračunali $IC_{50(72h)}$. Uporabili smo enačbi, s katerimi smo izračunali $IC_{50(72h)}$ vrednosti začetne, neobdelane raztopine jodosulfurona v definitivnih testih strupenosti za alge. Za vsak % zaviranja smo upoštevali dve koncentraciji (dve paralelki) in izračunali njuno povprečje, ki smo ga podali kot C_{i-0} .

$$C_{i-0}/C_{i-X} = \text{inhibitorni indeks pri koncentraciji } C_{i-X} \quad (1.2)$$

C_{i-X} predstavlja koncentracijo jodosulfurona v obdelanih vzorcih, ki je povzročila najvišje zaviranje rasti alg za vzorec X (npr. $I_{\max-X} = 30 \%$; $C_{i-X} = 2 \text{ mg/L}$). X predstavlja številko vzorca. C_{i-0} predstavlja koncentracijo jodosulfurona v neobdelani raztopini, ki povzroči enako zaviranje, kot ga je povzročila testirana koncentracija jodosulfurona v obdelanem vzorcu (npr. $I_{\max-X} = I_{a-0} = 30 \%$; $C_{i-0} = 0,1 \text{ mg/L}$).

Če je vrednosti, izračunana po enačbi (1.2) < 1 , lahko trdimo, da je koncentracija jodosulfurona v obdelanem vzorcu, ki je povzročila določen % zaviranja, višja, kakor koncentracija jodosulfurona v neobdelani raztopini, ki povzroči enako zaviranje rasti alg. To pomeni, da je bil fotokatalitsko obdelan vzorec manj strupen kakor neobdelana raztopina jodosulfurona, vendar pa lahko to trdimo le za koncentracijo jodosulfurona, ki smo jo uporabili za izračun ($C_{\text{jodosulfurona}} = C_{i-x}$). Ugotovitve ne moremo posplošiti za strupenost celotnega vzorca.

3.2 PRIPRAVA VZORCEV

3.2.1 Neobdelana vodna raztopina jodosulfurona

3.2.1.1 Test strupenosti z bakterijami *V. fischeri*

0,01 g jodosulfurona smo v 50 mL bučki razredčili z destilirano vodo, tako, da smo dobili koncentracijo 200 mg/L. Dodali smo 1 g NaCl, da smo dobili 2 % NaCl raztopino. Raztopino smo dali na mešalo in mešali, dokler se sol in jodosulfuron nista raztopila. Nato smo vzorcu s pH metrom umerili pH na $7 \pm 0,2$ (z dodajanjem 0,1 M NaOH ali 0,1 M HCl).

Založno raztopino jodosulfurona ($c_{\text{jodosulfuron}} = 200 \text{ mg/L}$) smo v nadaljevanju testa redčili z dodatkom 2 % NaCl raztopine in suspenzije bakterij po G1 geometrični redčitveni vrsti, tako, da smo dobili raztopine s koncentracijami 160; 100; 50; 25; 12,5; 6,25 in 3,125 mg/L. Za kontrolo je služila 2 % NaCl raztopina. Za vsako redčitev vzorca smo naredili dve paralelki in celoten test dvakrat ponovili.

3.2.1.2 Test strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna*

0,01 g jodosulfurona smo v 100 mL bučki razredčili z razredčevalno vodo, tako, da smo dobili koncentracijo 100 mg/L. Raztopino smo mešali na mešalu dokler se jodosulfuron ni raztopil in vzorcu uravnali pH na $7,8 \pm 0,2$.

Založno raztopino jodosulfurona ($c_{\text{jodosulfuron}} = 100 \text{ mg/L}$) smo redčili z razredčevalno vodo (destilirana voda + založne raztopine), tako, da smo dobili koncentracije 100 ; 70 ; 50 ; 35 in 25 mg/L. Za kontrolo je služila razredčevalna voda ($c_{\text{jodosulfuron}} = 0 \text{ mg/L}$). Test smo izvajali v petrijevkah s 30 mL raztopine vzorca. Za vsako koncentracijo vzorca smo

naredili dve paralelki in celoten test trikrat ponovili. Redčitveno vrsto, ki smo jo uporabili v definitivnem testu, smo izračunali na podlagi rezultatov preliminarne testa, ki je služil za okvirno oceno strupenosti jodosulfurona za vodne bolhe.

3.2.1.3 Test strupenosti z zelenimi algami *D. subspicatus*

V bučke z volumnom 100 mL smo odpipetirali 10 mL ISO rastnega medija ter ustrezne volumne suspenzije alg in založne vodne raztopine jodosulfurona ($C_{\text{jodosulfuron}} = 1 \text{ mg/L}$), da smo dobili začetno koncentracijo alg $C_{\text{alg(0h)}} = 1 \times 10^4$ celic/mL in koncentracije jodosulfurona 0,428; 0,298; 0,209; 0,146; 0,102; 0,0715 in 0,05 mg/L. Za kontrolo je služil ISO rastni medij, razredčen v destilirani vodi v razmerju 1:10 z enako začetno koncentracijo alg. Pri vsaki rečitvi smo prelili po 40 mL pripravljene suspenzije v dve 100 mL erlenmajerici (dve paralelki). Redčitveno vrsto, ki smo jo uporabili v definitivnem testu, smo izračunali na podlagi rezultatov preliminarne testa, ki je služil za okvirno oceno strupenosti jodosulfurona za zelene alge *D. subspicatus*. Definitivni test smo dvakrat ponovili.

3.2.2 Obdelana vodna raztopina jodosulfurona

3.2.2.1 Fotokatalitska oksidacija jodosulfurona

Fotokatalitsko obdelavo vodne raztopine jodosulfurona je v okviru mednarodnega projekta izvedla Radina Kralchevska, podiplomska študentka na Faculty of Chemistry, University of Sofia, pod mentorstvom prof. dr. Marije Milanove in prof. dr. Albina Pintarja. Eksperiment je potekal v prostorih Kemijskega Inštituta v Ljubljani, v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo, pod vodstvom prof. dr. Albina Pintarja.

3.2.2.1.1 Priprava vzorcev

V 250 mL vodovodne ali ultra čiste vode smo raztopili ustrezno količino jodosulfuron-metil-natrija, da smo dobili 5×10^{-5} molarno koncentracijo vodne raztopine jodosulfurona, kar ustreza 26,46 mg/L jodosulfurona.

Fotokatalitska oksidacija vodne raztopine jodosulfurona je potekala v steklenem laboratorijskem šaržnem bioreaktorju. 250 mL vodne raztopine jodosulfurona smo v bioreaktorju dodali 125 mg posameznega fotokatalizatorja ($C_{\text{kat}} = 0,5 \text{ g/L}$) in suspenzijo v

temi mešali na magnetnem mešalu, dokler se ni fotokatalizator razporedil po celotnem volumnu raztopine.

3.2.2.1.2 Potek eksperimentov

Raztopino jodosulfurona in fotokatalizatorja smo 3 ure obsevali z UV ali vidno svetlobo pri 20 °C in pri atmosferskem tlaku. Raztopino smo v času eksperimentov prepihovali z zrakom ali dušikom (N₂) s pretokom 20 L/h. Pred in po začetku osvetljevanja smo v rednih časovnih intervalih odvzemali 2 mL vzorca in v njih z izokratsko visokotlačno tekočinsko kromatografsko metodo (HPLC) analizirali vsebnost jodosulfurona in drugih, novo nastalih spojin v raztopini. Pred HPLC analizo in po koncu poskusa smo s filtriranjem skozi filter SARTORIUS z velikostjo por 0,45 µm iz raztopin odstranili delce fotokatalizatorjev. Končne vzorce smo dali v hladilnik na -4 °C. Tako obdelane vzorce smo uporabili v testih ugotavljanja strupenosti za vodne organizme.

3.2.2.1.3 Spremenljivi parametri

Voda:

- ultra čista (MQ) voda (vodovodna voda prečiščena s sistemom za pripravo ultračiste vode Milipore do upornosti 18,2 MΩcm)
- vodovodna voda (pitna voda iz ljubljanskega vodovoda)

Svetloba:

- UV svetloba (svetloba UV-A spektra ($v_{\max} = 365$ nm) proizvedena s 150 W visokotlačno Hg UV žarnico (Ushio))
- vidna svetloba (svetloba celotnega spektra proizvedena s 150 W halogensko žarnico)

Prepihanje:

- zrak
- N₂

Fotokatalizatorji:

- TiO₂-P25 (Degussa)
- TiO₂-Nd10
- TiO₂-N(1.1)

- $\text{TiO}_2\text{-N}(1.2)$
- $\text{TiO}_2\text{-PcN2}$
- $\text{TiO}_2\text{-PcN3}$

Različne kombinacije spremenljivih parametrov so prikazane v preglednici 2. Kot izhodišče primerjave strupenosti različno obdelanih vzorcev je v strupenostnih testih služila neobdelana raztopina jodosulfurona (vzorec 0), ugotavljali pa smo tudi strupenost obdelane raztopine fotokatalizatorja $\text{TiO}_2\text{-N}(1.1)$ brez prisotnosti jodosulfurona (vzorec 15), s čimer smo preverili morebiten toksičen vpliv katalizatorja na testne organizme. Vzorec 15 smo pred izvedbo strupenostnih testov prav tako filtrirali in fotokatalizator odstranili. Del vzorcev smo obdelali le fotolitsko, brez fotokatalizatorjev (vzorci 1-4).

Preglednica 2: Pregled obdelave vodne raztopine jodosulfurona (čas, uporabljen katalizator, osvetlitev, voda, prepihanje), dosežena konverzija, preostala koncentracija jodosulfurona v vzorcih in pH vodnih raztopin jodosulfurona po fotokatalitski obdelavi.

št. vzorca	čas tretmaja (ura)	katalizator	osvetlitev	voda	prepihovanje	pH	konverzija (%)	preostala koncentracija (mg/L)
0	–	začetna raztopina ¹	–	–	–	5,9	–	26,46
1	3	brez katalizatorja	UV	v. voda ²	zrak	8,0	47,4	13,91
2	3	brez katalizatorja	UV	MQ	N_2	4	62,2	9,99
3	3	brez katalizatorja	vidna svetloba	MQ	N_2	5,5	0,2	26,41
4	3	brez katalizatorja	vidna svetloba	MQ	zrak	5,5	0	26,51
5	3	TiO_2 P-25 (Degussa)	UV	MQ	N_2	5,1	99,1	0,25
6	3	TiO_2 P-25 (Degussa)	vidna svetloba	MQ	N_2	5,2	87,4	3,32
7	3	TiO_2 P-25 (Degussa)	UV	MQ	zrak	5,2	98,8	0,32

¹neobdelana raztopina jodosulfurona

²vodovodna voda

(se nadaljuje)

(nadaljevanje)

8	3	TiO ₂ P-25 (Degussa)	UV	v. voda	zrak	7,8	99,3	0,20
9	3	TiO ₂ P-25 (Degussa)	vidna svetloba	v. voda	zrak	8	36	16,93
10	3	TiO ₂ P-25 (Degussa)	vidna svetloba	MQ	zrak	4,3	90,1	2,62
11	3	TiO ₂ -Nd10	UV	MQ	zrak	4,1	99	0,28
12	3	TiO ₂ -Nd10	UV	v. voda	zrak	7,9	56,3	11,57
13	3	TiO ₂ -Nd10	vidna svetloba	MQ	zrak	5,9	18,7	21,52
14	3	TiO ₂ -Nd10	vidna svetloba	v. voda	zrak	8	5,8	24,93
15	3	TiO ₂ -N (1.1) – samo katalizator	UV	MQ	zrak	5,9	–	–
16	3	TiO ₂ -N (1.1)	UV	MQ	zrak	4,1	91	2,39
17	7	TiO ₂ -N (1.1)	UV	MQ	zrak	5,1	98	0,52
18	3	TiO ₂ -N (1.1)	vidna svetloba	MQ	zrak	6,1	10,5	23,68
19	3	TiO ₂ -N (1.2)	UV	MQ	zrak	4,3	97,2	0,75
20	3	TiO ₂ -N (1.2)	vidna svetloba	MQ	zrak	5,7	19,9	21,21
21	3	TiO ₂ -PcN2	UV	MQ	zrak	6	97,1	0,76
22	3	TiO ₂ -PcN2	vidna svetloba	MQ	zrak	5,7	24,2	20,05
23	3	TiO ₂ -PcN2	vidna svetloba	v. voda	zrak	8	7,1	24,58
24	3	TiO ₂ -PcN3	vidna svetloba	MQ	zrak	4,7	10,8	23,61

3.2.2.2 Test strupenosti z bakterijami *V. fischeri*

Odpipetirali smo 20 mL posameznih obdelanih vzorcev jodosulfurona in dodali 0,4 g NaCl, da smo dobili 2 % NaCl raztopino. Vzorcem smo umerili pH na vrednost $7 \pm 0,2$ (z dodajanjem 0,1 M NaOH ali 0,1 M HCl).

Vzorci smo v nadaljevanju testa razredčili na 80 vol% z dodatkom 2 % NaCl raztopine in suspenzije bakterij. Vsak vzorec smo v testu preizkušali v dveh paralelkah, celoten test pa smo ponovili dvakrat. Redčitev vzorcev nismo pripravili zaradi omejenega volumna vzorcev.

3.2.2.3 Test strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna*

Zaradi majhne količine vzorcev smo postopek naveden v ISO standardnem postopku priredili. Teste z obdelanimi vzorci smo izvajali v 50 mL čašah. V vsako čašo smo odpipetirali 20 mL vzorca in dodali ustrezne količine založnih raztopin (sestavine razredčevalne vode), ki so predpisane v ISO standardu. S tem smo v obdelanih vzorcih ustvarili takšne razmere, kot smo jih imeli pri testiranju neobdelanih raztopin, kjer smo jodosulfuron redčili v razredčevalni vodi. Vzorcem smo izmerili pH vrednost in jo, kjer je bilo potrebno, umerili na $7,8 \pm 0,2$. Pripravili smo tudi kontrolo, v kateri je bila le razredčevalna voda. Redčitev in paralelk nismo delali, test pa smo za večino vzorcev ponovili $2 \times$ (pri nekaterih je vzorca zmanjkalo).

3.2.2.4 Test strupenosti z zelenimi algami *D. subspicatus*

Zelene alge smo izpostavili redčitvenim vrstam posameznih vzorcev, ki so bile narejene glede na preostalo koncentracijo jodosulfurona v obdelanih raztopinah. V nekaterih primerih je bilo vzorca premalo, zato smo organizme izpostavili vzorcem s koncentracijo 90 vol%. V steklene bučke z volumnom 100 mL smo odpipetirali 8 mL rastnega medija ISO ter ustrezen volumen suspenzije alg, da smo dobili začetno koncentracijo alg $c_{alg(0h)} = 1 \times 10^{-4}$ celic/mL. Nato smo, v bučke odpipetirali različne volumne obdelanih vzorcev, da smo za posamezen vzorec dobili več redčitev preostale koncentracije jodosulfurona v vzorcu. Na koncu smo suspenzijo s pipeto dopolnili do 80 mL z destilirano vodo. Za kontrolo je služila suspenzija rastnega medija ISO, razredčenega v destilirani vodi v razmerju 1:10, z enako začetno koncentracijo alg, kakor pri vzorcih. Pri vsaki redčitvi

vzorca smo prelili po 40 mL pripravljene suspenzije v dve 100 mL erlenmajerice (dve paralelki). Pri testiranju nerazredčenih vzorcev smo 72 mL vzorca dodali 8 mL ISO medija, da smo dobili 90 vol% raztopino vzorca, kateri smo dodali ustrezen volumen suspenzije alg. Zaradi pomanjkanja vzorcev nekaterih obdelanih raztopin jodosulfurona nismo testirali.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI TESTOV STRUPENOSTI ZAČETNE, NEOBDELANE VODNE RAZTOPINE JODOSULFURONA

V tem poglavju so prikazani rezultati testov strupenosti neobdelane vodne raztopine jodosulfurona. Povprečna koncentracija neobdelane raztopine jodosulfurona, ki je povzročila 20 % zaviranje bioluminiscence bakterij *V. Fischeri* po 30 minutah je bila 77,7 mg/L, koncentracija jodosulfurona, ki je povzročila 50 % zaviranje bioluminiscence istih bakterij pa je bila 169,1 mg/L (preglednica 3). Povprečna koncentracija neobdelane raztopine jodosulfurona, ki je povzročila negibnost pri 50 % izpostavljenih vodnih bolh *D. magna* po 48 urah je bila 61,9 mg/L (preglednica 4). Povprečna koncentracija neobdelane raztopine jodosulfurona, ki je povzročila 50 % zaviranje rasti zelenih alg *D. subspicatus* po 72 urah je bila 0,1375 mg/L (preglednica 5).

Preglednica 3: Inhibitorni koncentraciji jodosulfurona IC_{50} in IC_{20} (mg/L) za bakterije *V. fischeri*. Prikazani so rezultati 30 minutnih definitivnih testov ter njihovo povprečje.

$IC_{x(30\ min)}$ (mg/L)	definitivni test		povprečje
	ponovitev 1	ponovitev 2	
IC_{20}	78,5	76,8	77,7
IC_{50}	173,4	164,8	169,1

Preglednica 4: Efektivna koncentracija jodosulfurona EC_{50} (mg/L) za vodne bolhe *D. magna*. Prikazani so rezultati 48 urnih definitivnih testov ter njihovo povprečje.

$EC_{x(48h)}$ (mg/L)	definitivni test			povprečje
	ponovitev 1	ponovitev 2	ponovitev 3	
EC_{50}	52,2	67,3	66,1	61,9

Preglednica 5: Inhibitorna koncentracija jodosulfurona IC_{50} (mg/L) za zelene alge *D. subspicatus*. Prikazani so rezultati 72 urnih preliminarinih in definitivnih testov, ter povprečje definitivnih testov.

$IC_{x(72h)}$ (mg/L)	preliminarni test	definitivni test		
		ponovitev 1	ponovitev 2	povprečje
IC_{50}	0,126	0,138	0,137	0,1375

4.2 REZULTATI TESTOV STRUPENOSTI OBDELANE VODNE RAZTOPINE JODOSULFURONA

4.2.1 Rezultati testov strupenosti z bakterijami *V. Fischeri*

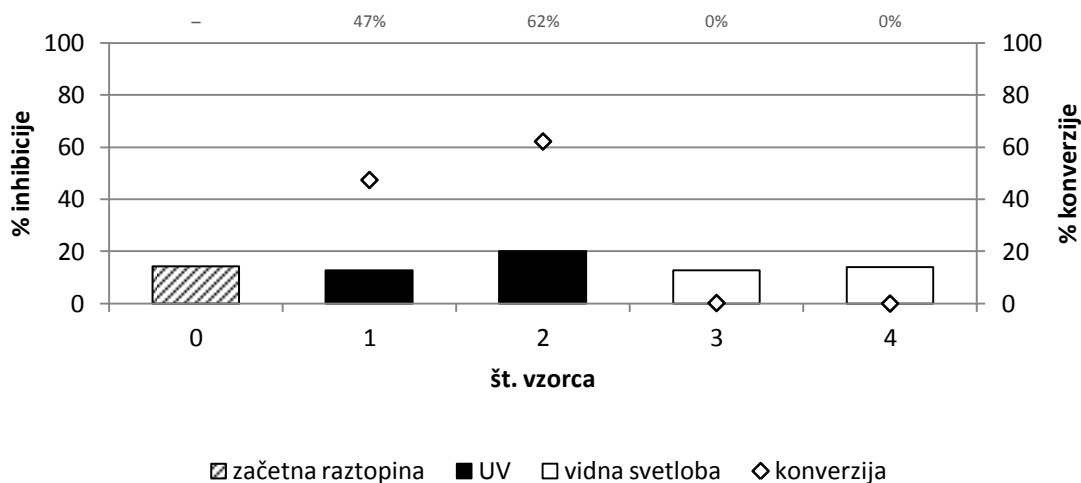
V tem poglavju so v preglednici 6 in grafikoni (slika 4-9) prikazani rezultati testov strupenosti z bakterijami *V. Fischeri*. Rezultati za posamezne vzorce so razloženi nad grafikoni.

Preglednica 6: Konverzija, preostala koncentracija in najvišja testirana koncentracija jodosulfurona posameznih obdelanih vzorcev, ter zaviranje (I_b) in povprečno zaviranje ($\bar{I}_b$) bioluminiscence bakterij *V. fischeri* po izpostavitvi vzorcem.

številka vzorca ³	konverzija (%)	preostala koncentracija (mg/L)	najvišja testirana koncentracija (mg/L)	I_b = zaviranje bioluminiscence bakterij <i>Vibrio fischeri</i> (%)		$\bar{I}_b$ = povprečno zaviranje (%)
				ponovitev 1	ponovitev 2	
0	–	26,46	21,2	16,1	12,6	14,3
1	47,4	13,91	11,1	12,9	12,6	12,7
2	62,2	9,99	8	20,8	19,4	20,1
3	0,2	26,41	21,1	14,3	11,0	12,6
4	0	26,51	21,2	13,7	14,1	13,9
5	99,1	0,25	0,2	18,7	17,0	17,8
6	87,4	3,32	2,7	49,2	41,9	45,5
7	98,8	0,32	0,3	19,9	21,5	20,7
8	99,3	0,20	0,2	24,5	26,6	25,6
9	36	16,93	13,5	14,7	19,7	17,2
10	90,1	2,62	2,1	45,5	40,4	43,0
11	99	0,28	0,2	32,8	18,6	25,7
12	56,3	11,57	9,3	24,1	20,4	22,3
13	18,7	21,52	17,2	35,1	36,5	35,8
14	5,8	24,93	20	12,2	14,5	13,4
15	–	–	–	12,9	10,9	11,9
16	91	2,39	1,9	57,2	60,1	58,6
17	98	0,52	0,4	25,2	28,5	26,8
18	10,5	23,68	18,9	35,2	29,3	32,3
19	97,2	0,75	0,6	52,3	48,8	50,5
20	19,9	21,21	17	42,6	43,6	43,1
21	97,1	0,76	0,6	9,7	9,0	9,3
22	24,2	20,05	16	59,6	33,5	46,5
23	7,1	24,58	19,7	20,6	21,3	21,0
24	10,8	23,61	18,9	48,9	44,3	46,6

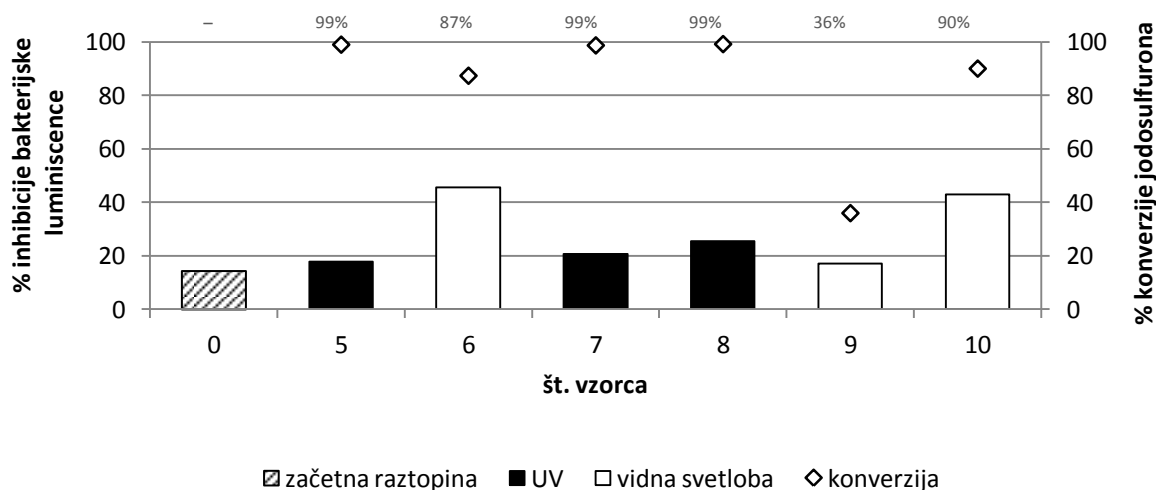
³Pomen številke posameznih vzorcev je razložen v podpoglavju 3.2.2.1.3 v preglednici 2.

Začetna, neobdelana raztopina jodosulfurona (vzorec 0) je povzročila 14,3 % zaviranje bakterijske luminiscence. Izmed vzorcev, obdelanih brez katalizatorja, je le vzorec 2 povzročil rahlo povečano zaviranje bakterijske luminiscence, glede na vzorec 0 (slika 4).



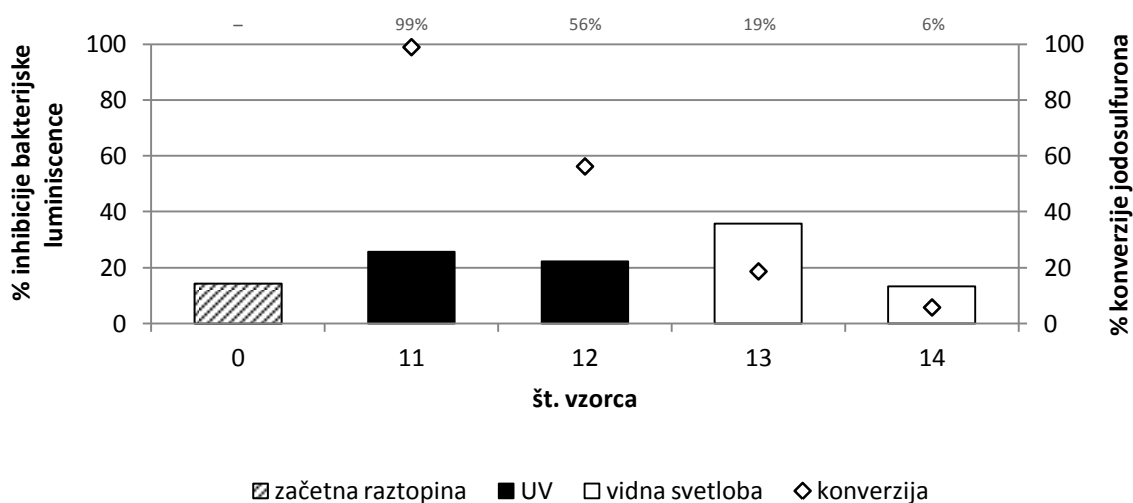
Slika 4: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane brez katalizatorja. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

V skupini vzorcev obdelanih s komercialnim katalizatorjem Degussa smo, glede na začetno raztopino, povečano zaviranje ($\bar{I} > 40$ %) opazili pri vzorcih 6 in 10. Vzorca sta bila obdelana z vidno svetlobo, dosežena konverzija jodosulfurona je bila ≈ 90 %. Vzorci obdelani z UV svetlobo in konverzijo jodosulfurona > 95 %, glede na začetno raztopino, bistveno povečanega zaviranja bakterijske luminiscence niso povzročili ($\bar{I} \approx 20$ %) (slika 5).



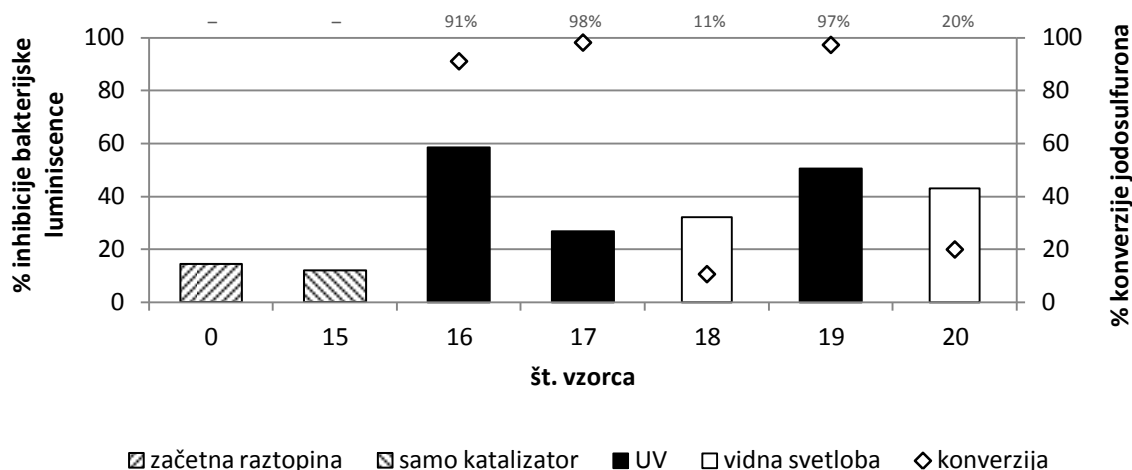
Slika 5: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-P25}$ (Degussa). % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Izmed vzorcev, ki so bili obdelani s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-Nd10}$ sta vzorca 11 in 12 povzročila povečano zaviranje bakterijske luminiscence ($\bar{I} \approx 20\%$). Vzorca sta bila obdelana z UV svetlobo, konverzija jodosulfurona pri vzorcu 11 je bila $\approx 99\%$ konverzija, pri vzorcu 12 pa $\approx 56\%$. Vzorec 13, ki je v tej skupini povzročil največje zaviranje bakterijske luminiscence je bil obdelan z vidno svetlobo in je dosegel majhno, 19 % konverzijo jodosulfurona. Vzorec 14, obdelan z vidno svetlobo s 6 % konverzijo jodosulfurona, je povzročil enako zaviranje kot začetna raztopina jodosulfurona (slika 6).



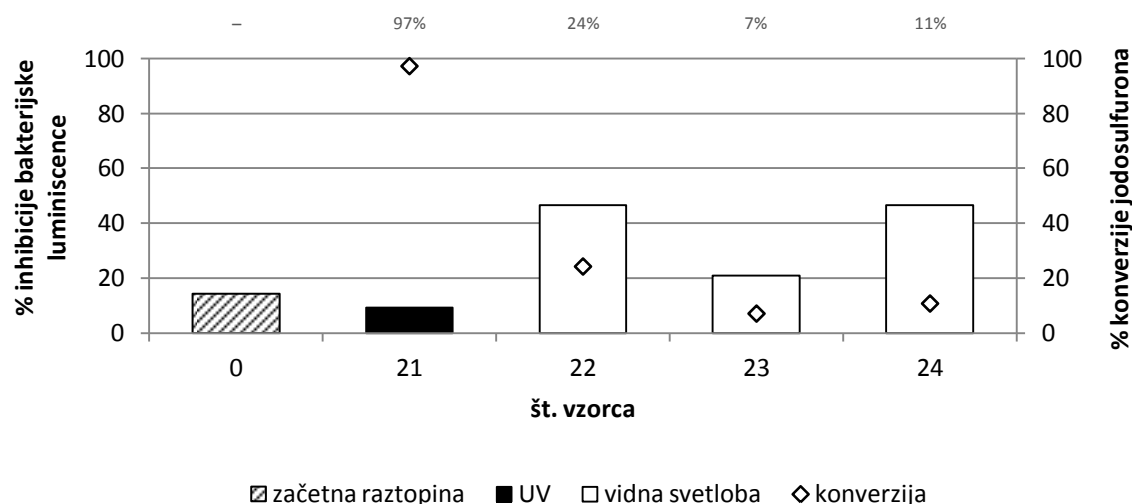
Slika 6: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-Nd10}$. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Vzorec brez jodosulfurona, pri katerem smo obdelali le raztopino katalizatorja $\text{TiO}_2\text{-N(1.1)}$ (vzorec 15), je povzročil 12 % zaviranje bakterijske luminiscence, torej manjše kot začetna raztopina jodosulfurona. Vsi vzorci obdelani s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-N(1.1)}$ so povzročili večje zaviranje bioluminiscence kot začetna raztopina. Vzorca 16 in 17 sta bila obdelana v enakih razmerah, razlikoval se je le čas obdelave. Posledica daljše obdelave je bila večja konverzija jodosulfurona pri vzorcu 17 (98 %) kakor pri vzorcu 16 (91 %), opazili smo tudi zmanjšanje zaviranja luminiscence ob izpostavitvi bakterij vzorcu 17, glede na vzorec 16. Vzorca obdelana s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-N(1.2)}$ (vzorca 19 in 20) sta povzročila povečano zaviranje bakterijske luminiscence ($\bar{I} > 40\%$). Vzorec 19 s 97 % konverzijo jodosulfurona je bil obdelan z UV svetlobo, vzorec 20 z 20 % konverzijo pa je bil obdelan z vidno svetlobo (slika 7).

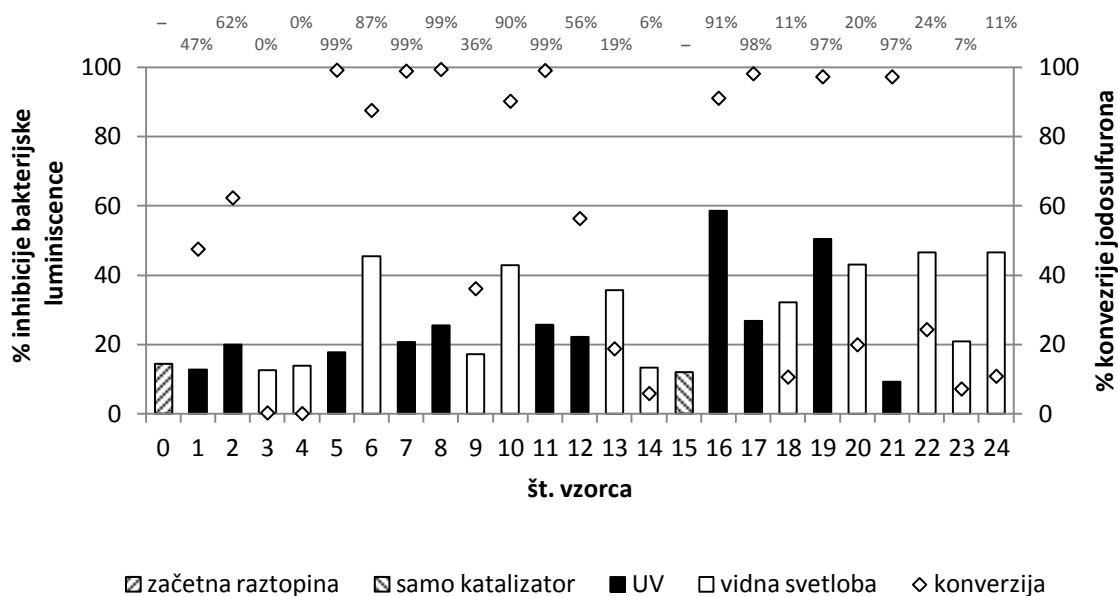


Slika 7: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjema $\text{TiO}_2\text{-N}(1.1)$ (vzorci 16-18) in $\text{TiO}_2\text{-N}(1.2)$ (vzorci 19 in 20). % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Izmed vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-PcN2}$ je povečano zaviranje ($\bar{I} > 40 \%$) bakterijske luminiscence povzročil vzorec 22 s 24 % konverzijo jodosulfurona. Razmere obdelave vzorcev 22 in 23 so se razlikovale le v uporabljeni vodi, oba sta bila obdelana z vidno svetlobo, pri vzorcu 22 smo uporabili MQ vodo, pri vzorcu 23 pa vodovodno vodo. Posledica tega je bila slabša konverzija jodosulfurona pri vzorcu 23, opazili smo tudi zmanjšanje zaviranja luminiscence pri vzorcu 23 glede na vzorec 22. Vzorec 24, obdelan z vidno svetlobo s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-PcN3}$, je tako kot vzorec 22, pri majhni konverziji (11 %) povzročil povečano zaviranje bakterijske luminiscence $\bar{I} > 40 \%$ (slika 8).



Slika 8: Povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije za vzorce obdelane s katalizatorjema $\text{TiO}_2\text{-PcN2}$ (vzorci 21-23) in $\text{TiO}_2\text{-PcN3}$ (vzorec 24). % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.



Slika 9: Zbirna preglednica, ki prikazuje vse vzorce in njihovo povprečno zaviranje bakterijske luminiscence (%) in % konverzije. Slednje so prikazane tudi v tabeli na grafom. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Največje zaviranje bakterijske luminiscence je povzročil vzorec 16 ($\bar{I} = 58.6 \%$), najmanjše pa vzorec 21 ($\bar{I} = 9.3 \%$). Skupno je bilo 78 % vzorcev obdelane raztopine jodosulfurona za bakterije *V. fischeri* bolj strupenih od začetne raztopine, 96 % vzorcev je bilo za bakterije *V. fischeri* bolj strupenih od obdelane raztopine katalizatorja $\text{TiO}_2\text{-N}(1.1)$ brez dodanega jodosulfurona (vzorec 15) (slika 9).

Med 78 % vzorcev, ki so za bakterije bolj strupeni od začetne raztopine, je bilo 50 % vzorcev obdelanih z vidno svetlobo in 50 % z UV svetlobo. V skupini vzorcev obdelanih z vidno svetlobo je pet vzorcev preseglo 40 % zaviranje, dva sta presegla 30 % zaviranje bioluminiscence bakterij. Pri skupini vzorcev obdelanih z UV svetlobo sta dva vzorca presegla 50 % zaviranje, ostali so povzročili zaviranje manjše od 30 % ali 20 % (slika 9).

Izmed sedmih vzorcev s konverzijo $> 95 \%$ je samo vzorec 19 povzročil močno povečano zaviranje bakterijske luminiscence ($\bar{I} > 40 \%$). Vsi vzorci s konverzijo $80 \% < K < 95 \%$ so povzročili močno povečano zaviranje bakterijske luminiscence. Izmed devetih vzorcev z majhno konverzijo (konverzija $< 40 \%$) so močno povečano zaviranje ($\bar{I} > 40 \%$) povzročili vzorci 24, 22 in 20, srednje povečano zaviranje ($30 \% < \bar{I} < 40 \%$) pa vzorca 18 in 13. Ostali vzorci ne glede na konverzijo povečanega zaviranja niso povzročili ($\bar{I} < 30 \%$) (slika 9).

4.2.2 Rezultati testov strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna*

V preglednici 7 in grafikonih (slika 10-15) so prikazani rezultati testov strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna*. Rezultati za posamezne vzorce so razloženi nad grafikoni.

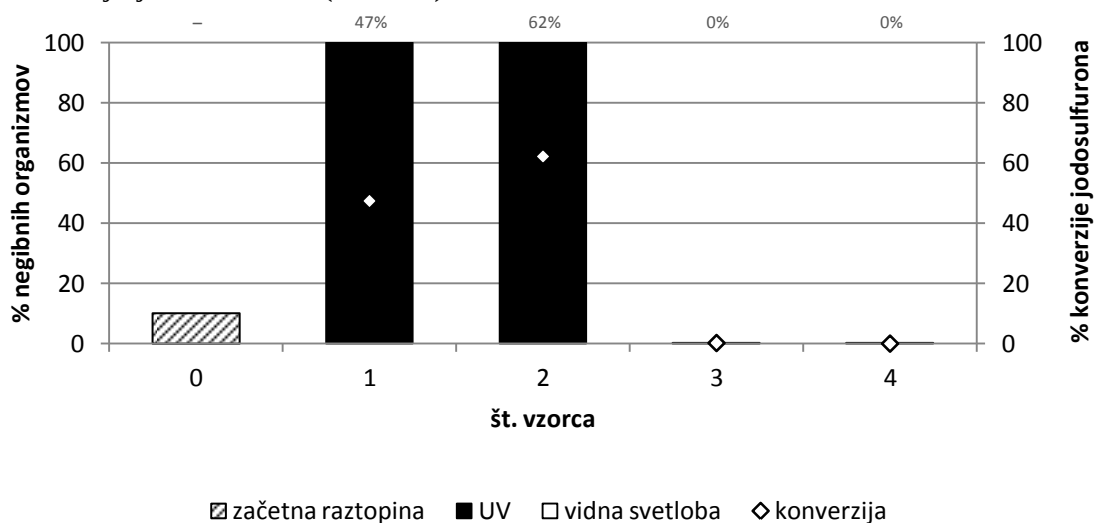
Preglednica 7: Konverzija, preostala koncentracija in najvišja testirana koncentracija jodosulfurona posameznih obdelanih vzorcev, ter delež negibnih vodnih bolh *D. magna* po 24 in 48 urni izpostavitvi vzorcem.

številka vzorca ⁴	konverzija (%)	preostala koncentracija (mg/L)	najvišja testirana koncentracija (mg/L)	N = delež negibnih vodnih bolh <i>Daphnia magna</i> (%) ⁵	
				N _{24ur}	N _{48ur}
0	–	26,46	26,46	10	10
1	47,4	13,91	13,91	90	100
2	62,2	9,99	9,99	70	100
3	0,2	26,41	26,41	0	0
4	0	26,51	26,51	0	0
5	99,1	0,25	0,25	100	100
6	87,4	3,32	3,32	100	100
7	98,8	0,32	0,32	100	100
8	99,3	0,20	0,20	40	75
9	36	16,93	16,93	0	0
10	90,1	2,62	2,62	15	100
11	99	0,28	0,28	100	100
12	56,3	11,57	11,57	5	10
13	18,7	21,52	21,52	5	5
14	5,8	24,93	24,93	0	0
15	–	–	–	0	5
16	91	2,39	2,39	90	100
17	98	0,52	0,52	100	100
18	10,5	23,68	23,68	5	30
19	97,2	0,75	0,75	100	100
20	19,9	21,21	21,21	-	10
21	97,1	0,76	0,76	95	100
22	24,2	20,05	20,05	100	100
23	7,1	24,58	24,58	0	5
24	10,8	23,61	23,61	0	0

⁴Pomen številke posameznih vzorcev je razložen v podpoglavju 3.2.2.1.3 v preglednici 2.

⁵Kjer vidnega odziva ob izpostavitvi organizmov obdelanim vzorcem raztopine jodosulfurona ni bilo (delež negibnih vodnih bolh = 0%) je zaradi lažje vizualizacije na slikah 10-15 prikazana črta nad številko vzorca (vzorci 3, 4, 9, 14, 15, 23, 24). Ti vzorci niso imeli vpliva na gibanje vodnih bolh.

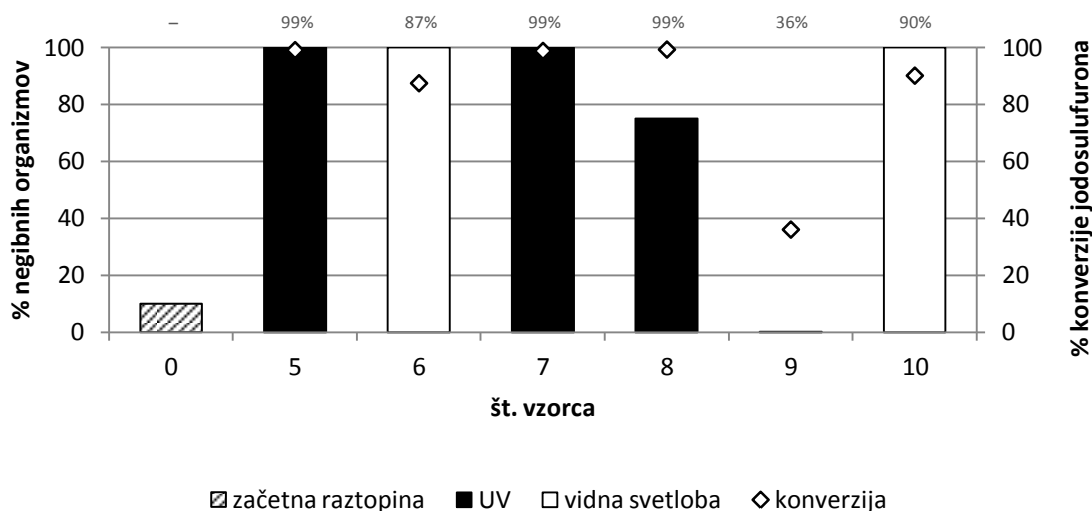
Začetna, neobdelana raztopina jodosulfurona je povzročila negibnost pri 10 % izpostavljenih organizmov po 48 urah. Vzorca 1 in 2, obdelana z UV svetlobo brez fotokatalizatorja, sta v 48 urah oba povzročila negibnost pri 100 % izpostavljenih organizmov. Vzorca 3 in 4, obdelana z vidno svetlobo brez fotokatalizatorja, na gibanje vodnih bolh nista vplivala. Pri vzorcih 3 in 4 do konverzije jodosulfurona ni prišlo oz. je bila zanemarljiva, pri obdelavi vzorca 1 smo dosegli 47 % konverzijo, pri vzorcu 2 pa 62 % konverzijo jodosulfurona (slika 10).



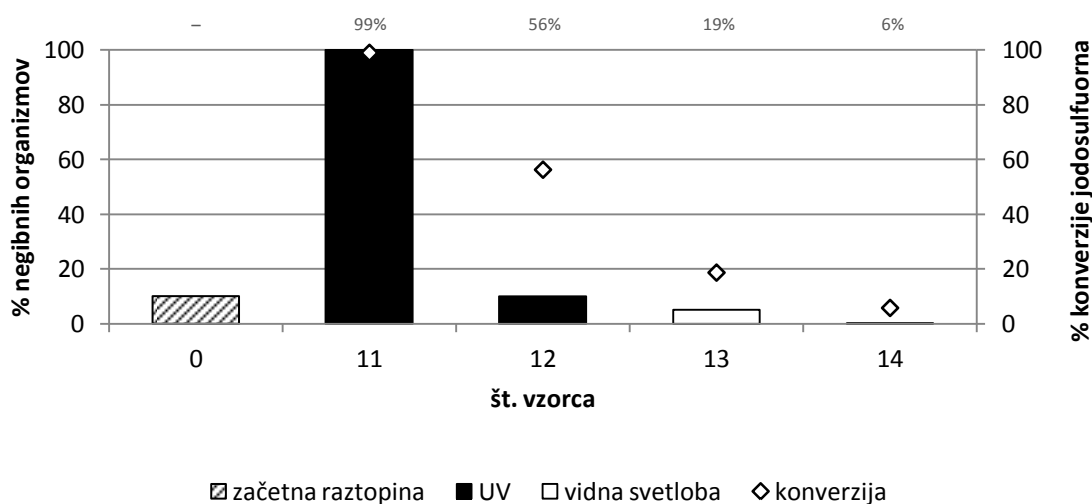
Slika 10: % konverzije vzorcev obdelanih brez katalizatorja in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

V skupini vzorcev obdelanih s katalizatorjem Degussa so po 48 urah vsi vzorci z visoko konverzijo izpostavljenim vodnim bolham povzročili težave z gibanjem. Vzorci 5, 6, 7 in 10 so povzročili negibnost pri 100 %, vzorec 8 pa negibnost pri 75 % izpostavljenih organizmov. Vzorec 9 po 48 urah na gibanje vodnih bolh ni imel vpliva. Obdelava vzorcev 5 in 6 je, z izjemo osvetlitve, potekala v identičnih razmerah. Posledica je bila manjša konverzija vzorca 6, razlik v strupenosti pa med vzorcema nismo opazili. Obdelava vzorcev 7 in 8 je, z izjemo uporabljene vode, potekala v identičnih razmerah. Pri obeh je bila konverzija jodosulfurona podobna (99 %), opazili pa smo razliko v strupenosti med vzorcema. Vzorec 7, pri katerem smo uporabili MQ vodo, je bil za vodne bolhe bolj strupen, kot vzorec 8, pri katerem smo uporabili vodovodno vodo. Vzorec 8 smo primerjali tudi z vzorcem 9. Obdelava vzorcev je, z izjemo osvetlitve, potekala pri identičnih pogojih. Pri vzorcu 8 smo uporabili UV svetlobo, pri vzorcu 9 pa vidno svetlobo. Med obdelavo vzorca 9 je prišlo do precej manjše konverzije jodosulfurona kot pri vzorcu 8. Vzorec 9 za

razliko od vzorca 8 na gibanje vodnih bolh ni imel vpliva (slika 11). Tudi obdelava vzorcev 9 in 10 je potekala v identičnih razmerah, različna je bila le uporabljena voda. Pri vzorcu 9 smo uporabili vodovodno vodo, pri vzorcu 10 pa MQ vodo. Posledica uporabljene vode je bila izrazito povečana konverzija vzorca 10 in močno povečana strupenost vzorca 10, glede na vzorec 9 (slika 11).



Slika 11: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-P25}$ (Degussa) in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

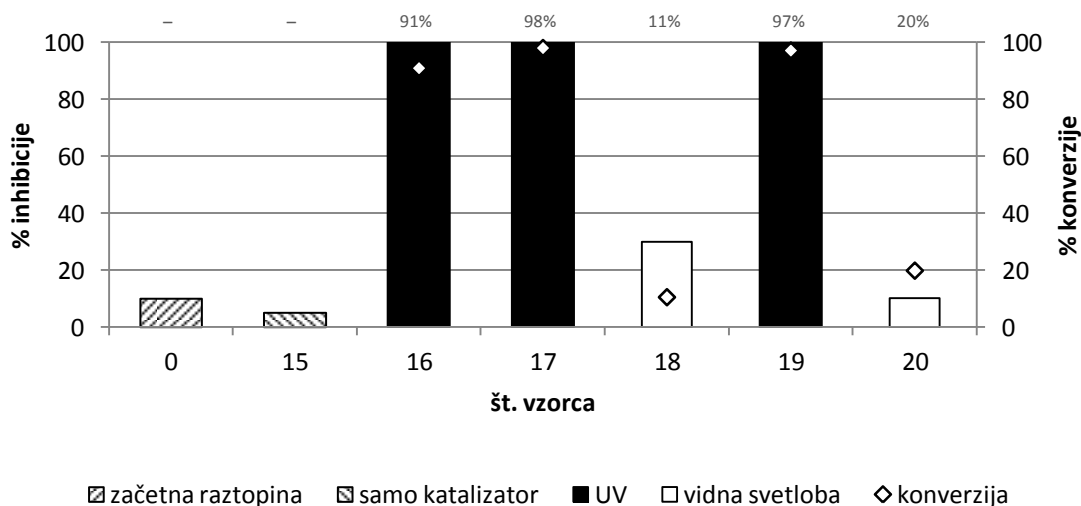


Slika 12: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-Nd10}$ in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Izmed vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-Nd10}$ je samo vzorec 11 po 48 urah pozročil izrazito povečan % negibnih vodnih bolh. Vzorci 12, 13 in 14 so bili za vodne bolhe enako ali manj strupeni od začetne raztopine. Obdelava vzorcev 11 in 12 je potekala v enakih razmerah, z izjemo uporabljene vode. Pri vzorcu 11 so uporabili MQ vodo, pri

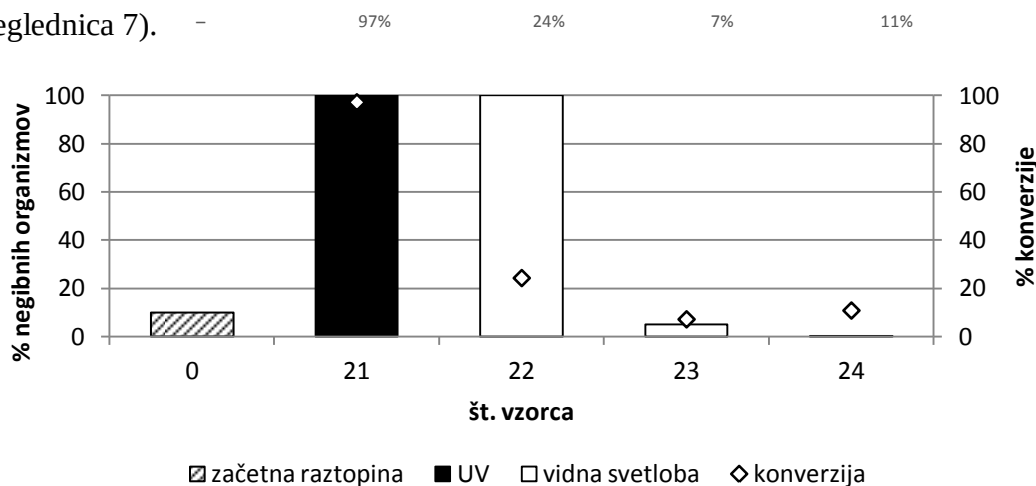
vzorcu 12 pa vodovodno vodo. Pri vzorcu 11 je prišlo do močno povečane konverzije in imobiliziranosti pri 100 % izpostavljenih organizmov, pri vzorcu 12 pa smo opazili precej manjšo konverzijo in le negibnost pri 10 % izpostavljenih vodnih bolh. Pri vzorcih 13 in 14 je prišlo do majhne konverzije jodosulfurona, če primerjamo oba vzorca je prišlo do večje konverzije pri vzorcu 13, pri katerem so uporabili MQ vodo (slika 12).

Vzorec brez jodosulfurona, pri katerem smo fotolitsko obdelali le raztopino katalizatorja $\text{TiO}_2\text{-N(1.1)}$ je po 48 urah povzročil negibnost pri 5 % izpostavljenih vodnih bolh. Izmed vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-N(1.1)}$ sta negibnost pri 100 % testiranih vodnih bolh povzročila vzorca 16 in 17, negibnost pri 30 % testiranih organizmov pa vzorec 18. Vzorec 18 in 16 smo obdelali v identičnih razmerah, z izjemo osvetlitve. Vzorec 18 smo obdelali z vidno svetlobo, vzorec 16 pa z UV svetlobo. Med vzorcema so razlike tako v doseženi konverziji jodosulfurona kot v strupenosti za vodne bolhe. Pri vzorcu 18 sta konverzija in strupenost manjši kakor pri vzorcu 16. Podobno smo opazili pri vzorcih 19 in 20, obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-N(1.2)}$. Vzorec 19 smo obdelali z UV svetlobo, vzorec 20 pa z vidno svetlobo. Pri vzorcu 19 smo dosegli zelo visoko konverzijo jodosulfurona (97 %), pri vzorcu 20 pa je bila konverzija majhna. Vzorec 19 je povzročil negibnost pri 100 %, vzorec 20 pa negibnost pri 10 % izpostavljenih organizmov (slika 13).

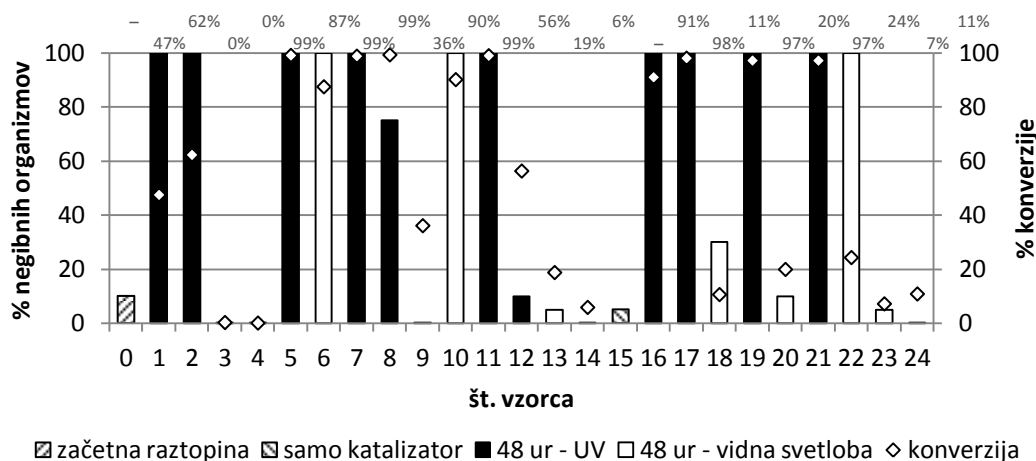


Slika 13: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjema $\text{TiO}_2\text{-N(1.1)}$ (vzorci 16-18) in $\text{TiO}_2\text{-N(1.2)}$ (vzorci 19 in 20) in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Izmed vzorcev obdelanih s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-PcN}_2$ je bil po 48 urah samo vzorec 23 za vodne bolhe manj strupen kot začetna raztopina. Vzorca 21 in 22 sta povzročila negibnost pri 100 % izpostavljenih vodnih bolh, obdelana sta bila v enakih razmerah, z izjemo osvetlitve. Pri vzorcu 22, obdelanem z vidno svetlobo, je prišlo do izrazito manjše konverzije kot pri vzorcu 21. Tudi obdelava vzorcev 22 in 23 je potekala pri identičnih pogojih, različna je bila le uporabljena voda. Vzorec 23, pri katerem smo uporabili vodovodno vodo, je bil izrazito manj strupen za vodne bolhe od vzorca 22, pri katerem smo uporabili MQ vodo, manjša je bila tudi konverzija vzorca 23. Vzorec 24, obdelan s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-PcN}_3$ na gibanje vodnih bolh v 48 urah ni vplival (slika 14, preglednica 7).



Slika 14: % konverzije vzorcev obdelanih s katalizatorjema $\text{TiO}_2\text{-PcN}_2$ (vzorci 21-23) in $\text{TiO}_2\text{-PcN}_3$ (vzorec 24) in % negibnih vodnih bolh po 48 urni izpostavitvi le-tem. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.



Slika 15: Zbirna preglednica, ki prikazuje vse vzorce in njihov % negibnih vodnih bolh po 48 urah izpostavitve vzorcem in % konverzije. Slednje so prikazane tudi v tabeli na grafom. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Skupno je bilo 61 % obdelanih vzorcev raztopine jodosulfurona za vodne bolhe bolj strupenih od začetne raztopine, 52 % obdelanih vzorcev je povzročilo negibnost pri 100 % testiranih vodnih bolh. Sedem vzorcev je povzročilo negibnost pri 100 % izpostavljenih vodnih bolh v 24 urah in pet vzorcev v 48 urah eksperimenta, skupno je dvanajst vzorcev povzročilo negibnost pri 100 % izpostavljenih vodnih bolh (slika 15).

Med 61 % obdelanimi vzorci, ki so za vodne bolhe bolj strupeni od začetne raztopine, je bilo 71 % vzorcev obdelanih z UV svetlobo. Izmed 52 % obdelanih vzorcev, ki so dosegli negibnost pri 100 % testiranih vodnih bolh, je bilo 75 % obdelanih z UV svetlobo. 22 % obdelanih vzorcev na gibanje vodnih bolh ni vplivalo, vsi so bili obdelani z vidno svetlobo (slika 15).

Med desetimi vzorci z visoko stopnjo konverzije jodosulfurona (konverzija > 80 %) jih je 90 % povzročilo negibnost pri 100 % izpostavljenih vodnih bolh, 10 % pa negibnost pri 75 % testiranih vodnih bolh. 67 % vzorcev s srednje visoko stopnjo konverzije (40 % < konverzija < 80 %) je povzročilo negibnost pri 100 % testiranih vodnih bolh. Večina vzorcev z majhno konverzijo je bila za vodne bolhe enako ali manj strupena od začetne raztopine jodosulfurona, izjema sta bila vzorca 18 in 22. Slednji je edini, ki je pri majhni konverziji povzročil imobiliziranost pri 100 % testiranih vodnih bolh. 92 % vzorcev, ki so povzročili negibnost pri 100 % izpostavljenih vodnih bolh je imelo konverzijo > 80 % (slika 15).

4.2.3 Rezultati testov strupenosti z zelenimi algami *D. subscipatus*⁶

V tem poglavju so v preglednici 8 prikazani rezultati testov strupenosti z zelenimi algami *D. subscipatus*. Rezultati za posamezne vzorce so razloženi pod preglednico.

Preglednica 8: Konverzija, IC₅₀, inhibitorni indeks, maksimalna zaviranje rasti alg (I_{max}), koncentracija jodosulfurona, ki v obdelanih vzorcih in začetni raztopini povzroča I_{max} (C_{i-X} in C_{i-0}) in inhibitorni indeks pri koncentraciji jodosulfurona C_{i-X} za obdelane vzorce.

X = št. vzorca ⁷	konverzija (%)	IC _{50(72h)} (mg/L)	inhibitorni indeks (IC ₅₀₋₀ /IC _{50-X})	C _{i-X} (mg/L)	I _{max-X} (%)	C _{i-0} (mg/L)	inhibitorni indeks pri C _{i-X} ($\bar{C}_{i-0} / C_{i-X}$)
0	–	0,1375	1	–	–	–	–
1	47,44	–	–	–	–	–	–
2	62,24	–	–	1,99	32,60	0,096	0,048
3	0,19	–	–	–	–	–	–
4	0	–	–	–	–	–	–
5	99,06	–	–	0,224	28,08	0,088	0,393
6	87,44	–	–	0,332	25,77	0,084	0,253
7	98,78	0,198	0,694	–	–	–	–
8	99,26	–	–	0,176	10,29	0,062	0,353
9	36,03	0,156	0,881	–	–	–	–
10	90,10	0,237	0,580	–	–	–	–
11	98,95	–	–	0,25	39,81	0,112	0,447
12	56,26	–	–	0,231	47,49	0,131	0,566
13	18,69	0,289	0,476	–	–	–	–
14	5,79	0,156	0,881	–	–	–	–
15	–	–	–	0	0	–	0
16	90,97	–	–	0,239	31,72	0,095	0,397
17	98,04	–	–	–	–	–	–
18	10,53	–	–	–	–	–	–
19	97,16	0,313	0,439	–	–	–	–
20	19,85	–	–	–	–	–	–
21	97,14	–	–	0,129	49,19	0,135	1,050
22	24,23	0,278	0,495	–	–	–	–
23	7,10	0,208	0,661	–	–	–	–
24	10,76	0,218	0,631	–	–	–	–

⁶Zaradi pomanjkanja vzorcev strupenostnih testov z algami nismo izvedli za vzorce 1, 17, 18 in 19. Pri vzorcih 3 in 4 smo se zaradi nizke konverzije jodosulfurona odločili, da strupenostnih testov ne bomo izvedli, ker smo pričakovali iste rezultate kot za neobdelano in nerazgrajeno raztopino jodosulfurona.

⁷Pomen številke posameznih vzorcev je razložen v podpoglavju 3.2.2.1.3 v preglednici 2.

V preglednici 8 C_{i-X} predstavlja koncentracijo jodosulfurona v obdelanih vzorcih, ki je povzročila največje opaženo zaviranje rasti alg (I_{max-X}) za vzorec X (npr. $I_{max-X} = 30 \%$; $C_{i-X} = 2 \text{ mg/L}$). X predstavlja številko vzorca. C_{i-0} predstavlja koncentracijo jodosulfurona v neobdelani raztopini, ki povzroči isto zaviranje, kot ga je povzročila testirana koncentracija jodosulfurona v obdelanem vzorcu (npr. $I_{max-X} = I_a = 30 \%$; $C_{i-0} = 0,1 \text{ mg/L}$).

Iz preglednice 8 je razvidno, da so bili vzorci 7, 9, 10, 13, 14, 19, 22, 23 in 24 manj strupeni za zelene alge kakor neobdelana raztopina jodosulfurona (inhibitorni indeks < 1). Vzorcem se je glede na začetno raztopino zmanjšala strupenost ne glede na konverzijo, opazne pa so razlike med posameznimi vzorci. Pri primerjavi vzorcev 9 in 10, 13 in 14 ter 22 in 23 vidimo, da so bili vzorci z majhno konverzijo in uporabljeno vodovodno vodo (vzorci 9, 14 in 23) za alge bolj strupeni, kot vzorci z večjo konverzijo in uporabljeno MQ vodo (vzorci 10, 13 in 22), kljub temu, da so bili obdelani z istimi fotokatalizatorji (vzorca 9 in 10; 13 in 14; 22 in 23). Če primerjamo vzorca 7 in 10 vidimo, da se je pri zelo veliki konverziji strupenost vzorca 7 za alge povečala, glede na vzorec 10. Edina razlika pri obdelavi teh dveh vzorcev je bila uporaba UV svetlobe pri vzorcu 7 in vidne svetlobe pri vzorcu 10 (preglednica 8).

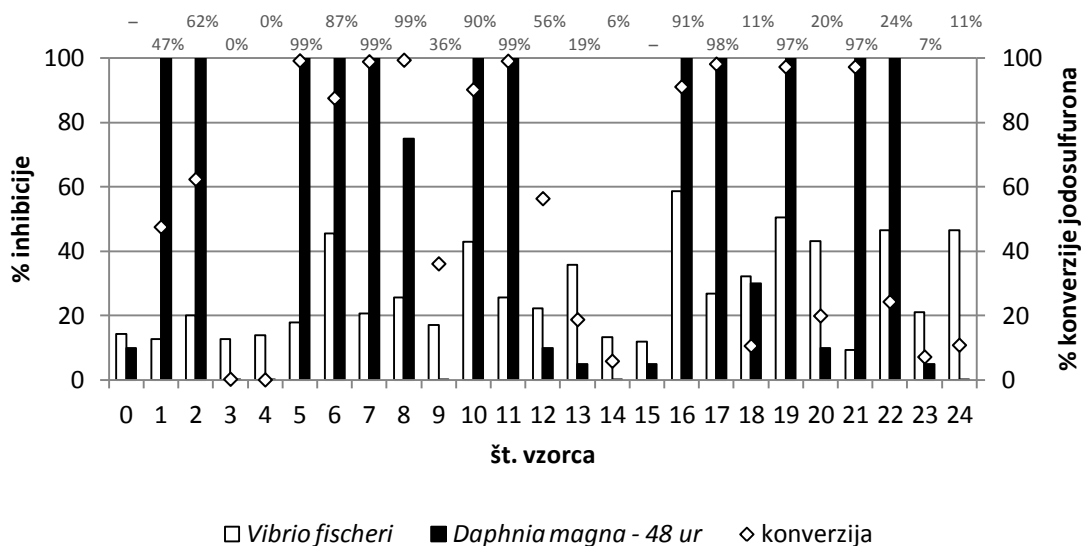
Vzorci 2, 5, 6, 8 11, 12 in 16 so bili pri koncentracijah C_{i-X} jodosulfurona v raztopini manj strupeni za alge od začetne raztopine jodosulfurona. Samo vzorec 21 je bil pri koncentraciji jodosulfurona (C_{i-21}) za alge bolj strupen od začetne raztopine (inhibitorni indeks > 1).

Obdelana raztopina fotokatalizatorja brez prisotnosti jodosulfurona za zelene alge ni bila strupena. Vrednost $IC_{50(72h)}$ začetne, neobdelane raztopine jodosulfurona je bila 0.1375 mg/L .

4.2.4 Primerjava rezultatov testov strupenosti obdelane raztopine jodosulfurona za *Vibrio fischeri* in *Daphnia magna*

V tem poglavju smo primerjali rezultate testov strupenosti med organizmoma *Vibrio fischeri* in *Daphnia magna*. Rezultati so podani v obliki grafikonov (slika 16-18).

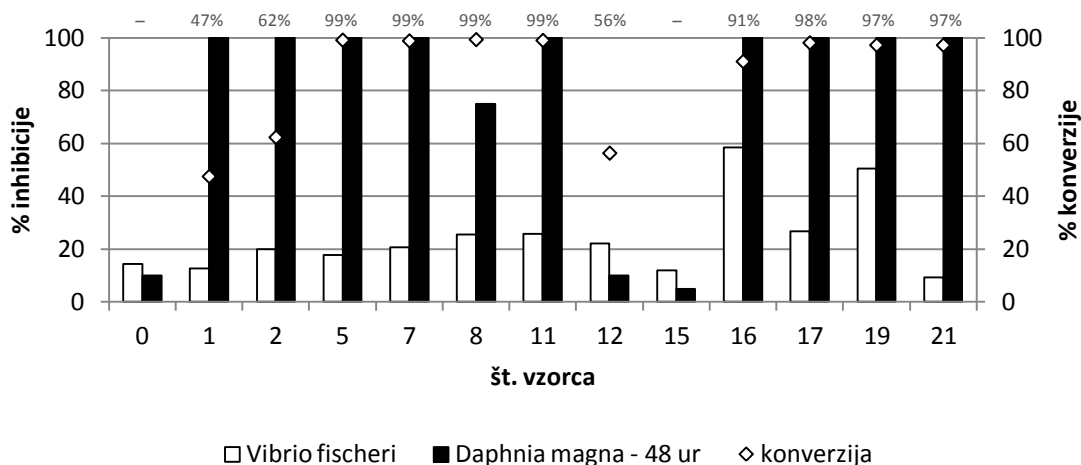
93 % vzorcev s konverzijo jodosulfurona > 40 % je bilo bolj strupenih za vodne bolhe kot za bakterije. 90 % vzorcev s konverzijo jodosulfurona < 40 % je bilo bolj strupenih za bakterije kot za vodne bolhe. Začetna raztopina jodosulfurona (vzorec 0) in obdelana raztopina fotokatalizatorja brez dodatka jodosulfurona (vzorec 15) sta bili bolj strupeni za bakterije kot za vodne bolhe (slika 16).



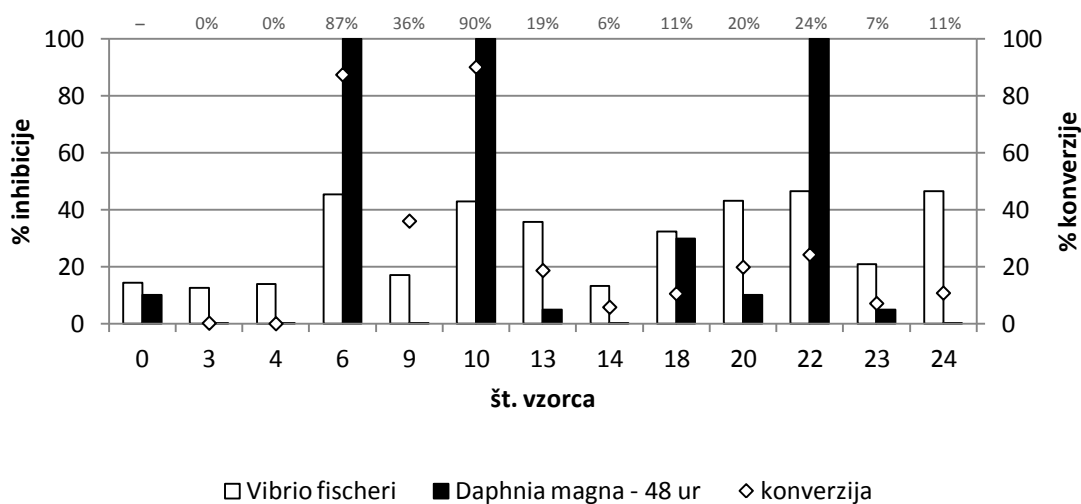
Slika 16: Prikaz % konverzije jodosulfurona in % zaviranja bioluminiscence bakterij, % zaviranja rasti alg in % negibnih vodnih bolh po izpostavitvi obdelanim raztopinam jodosulfurona. Vodne bolhe smo izpostavili 100 vol% in bakterije 80 vol% vzorcev. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

Iz slike 17 je razvidno, da je 91 % vzorcev obdelanih z UV svetlobo bolj strupenih za vodne bolhe kot za bakterije (slika 17).

67 % vzorcev obdelanih z vidno svetlobo je bilo za bakterije bolj strupenih kot za vodne bolhe (slika 18). Vzorca 6 in 10 sta dosegla največjo konverzijo izmed vzorcev obdelanih z vidno svetlobo in sta dva izmed skupno treh vzorcev, ki pri vidni svetlobi povzročajo 100 % negibnost vodnih bolh.



Slika 17: Prikaz % konverzije jodosulfurona in % zaviranja bioluminiscence bakterij, % zaviranja rasti alg in % negibnih vodnih bolh po izpostavitvi vzorcem obdelanim z UV svetlobo. Vodne bolhe smo izpostavili 100 vol% in bakterije 80 vol% vzorcev. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

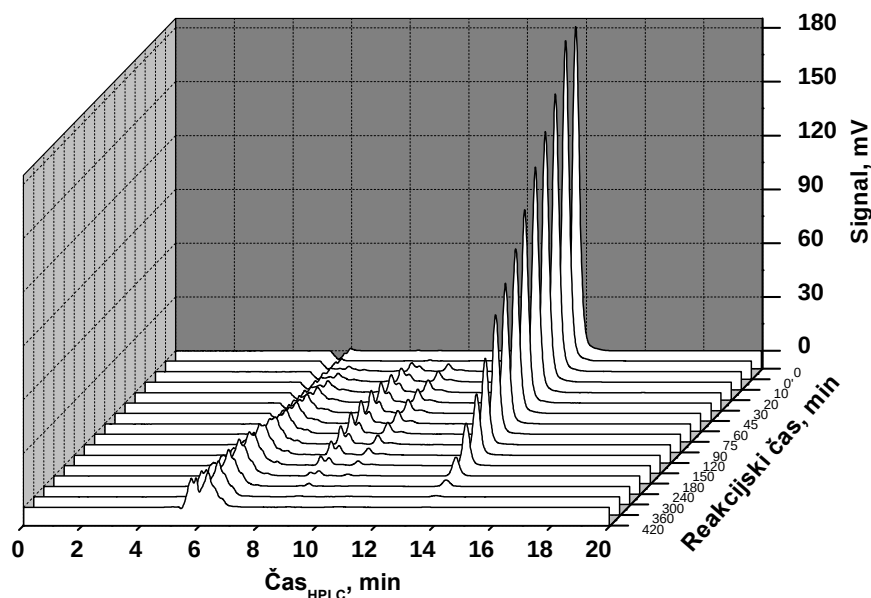


Slika 18: Prikaz % konverzije jodosulfurona in % zaviranja bioluminiscence bakterij, % zaviranja rasti alg in % negibnih vodnih bolh po izpostavitvi vzorcem obdelanim z vidno svetlobo. Vodne bolhe smo izpostavili 100 vol% in bakterije 80 vol% vzorcev. % konverzije za posamezen vzorec je zapisan nad grafikonom.

4.2.5 Potek fotokatalitske oksidacije jodosulfurona

V tem poglavju je na sliki 19 prikazana od časa odvisna razgradnja jodosulfurona ($\text{čas}_{\text{HPLC}} = 14 \text{ min}$) in nastajanje različnih skupin produktov ($\text{čas}_{\text{HPLC}} = 6 \text{ min}$, $\text{čas}_{\text{HPLC}} \approx 9 \text{ min}$, $\text{čas}_{\text{HPLC}} = 10 \text{ min}$). Gre za 7 urno obdelavo jodosulfurona, raztopljenega v MQ vodi, s fotokatalizatorjem $\text{TiO}_2\text{N}-(1.1)$ in UV svetlobo (vzorec 17).

Na sliki so opazne 3 glavne skupine razgradnih produktov. 2 skupini razgradnih produktov sta s časom izginjali ($\text{čas}_{\text{HPLC}} \approx 9 \text{ min}$, $\text{čas}_{\text{HPLC}} = 10$), in jih po 6 urah razgradnje s HPLC analizo nismo več zaznali. 1 skupina razgradnih produktov ($\text{čas}_{\text{HPLC}} = 6 \text{ min}$) se je kopičila v raztopini do konca 7 urne obdelave. Po 4 urah razgradnje (240 min) s HPLC analizo ostankov originalne molekule jodosulfurona nismo več zaznali.



Slika 19: 3D diagram poteka fotokatalitske oksidacije vodne raztopine jodosulfurona ($c_0=5 \times 10^{-5} \text{ M}$) v šaržnem reaktorju z goščo v prisotnosti $\text{TiO}_2\text{N}-(1.1)$ katalizatorja ($T=20^\circ \text{ C}$, $c_{\text{kat}}=0.5 \text{ g/L}$, UV žarnica). (Tišler in sod., 2010)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Razlaga rezultatov testov strupenosti neobdelane raztopine jodosulfurona

Jodosulfuron je selektiven sulfonilsečninski herbicid, ki zavira delovanje rastlinskega encima acetolaktat sintaze. Zaradi obstojnosti v naravi in vodnih raztopinah je v literaturi označen kot potencialno strupen za vodne organizme in močno strupen za vodne rastline in alge (SANCO/10166/2003-Final, 2003). Naši rezultati strupenosti jodosulfurona za alge, bakterije in vodne bolhe se večinoma skladajo s podatki v literaturi (preglednica 1, 2, 3, 4, poglavje 4.1), razen pri vrednostih akutne strupenosti za vodne bolhe, ki je v naših poskusih nižja ($EC_{50(48h)} - \text{SANCO/10166/2003-Final} > 100 \text{ mg/L}$, $EC_{50(48h)} - \text{REG2004-04} = 86,9 \text{ mg/L}$, $EC_{50(48h)} - \text{naši rezultati} = 61,9 \text{ mg/L}$) (SANCO/10166/2003-Final, 2003; REG2004-04, 2004). Jodosulfuron je bil po naših pričakovanjih najbolj strupen za zelene alge, nepričakovani pa so bili rezultati strupenosti za morske bakterije. Rezultati so bili za alge pričakovani, saj imajo encim ALS, na čigar delovanje inhibitorno vplivajo Sus herbicidi, zato smo pričakovali visoko občutljivost alg na jodosulfuron. Večina bakterij ima prav tako encim ALS, pričakovali bi torej, da sulfonilsečninski herbicidi zavirajo delovanje encima in povzročijo zmanjšanje metabolizma bakterij ter v končni fazi njihovo smrt, tako kot pri rastlinah. Naši rezultati kažejo, da je jodosulfuron za bakterije nestrupen oz. zgolj rahlo strupen. Razlog je najbrž v tem, da so bakterije sposobne prevzema aminokislin in njihovih prekurzorjev iz okolja in ne potrebujejo biosinteze le-teh za preživetje. Asimilacija aminokislin lahko odstrani vpliv zaviranja ALS na sintezo valina, levcina in izolevcina, s čimer se zviša odpornost bakterij na sulfonilsečninske herbicide (Allievi in Gigliotti, 2001). Zelo verjetno je tudi, da se bakterijska acetolaktat sintaza razlikuje od rastlinske. Raziskave so namreč pokazale, da je že zamenjava 1 aminokisline v strukturi proteina ALS dovolj za rezistenco na določene Sus herbicide (Duggleby in sod., 2008). Prav tako lahko pri rezistenci na jodosulfuron igra vlogo metabolizem bakterij, lahko bi namreč prišlo do transformacije jodosulfurona v neaktivno, za bakterije neškodljivo obliko.

Vuliet in sod. (2004) ter Martins in sod. (2001) so pri raziskovanju strupenosti Sus herbicidov triasulfurona in rimsulfurona za vodne organizme prišli do podobnih ugotovitev

kot mi. Raziskovana herbicida sta najbolj strupena za vodne rastline in alge, precej manj strupena za vodne bolhe in najmanj strupena za bakterije.

5.1.2 Razlaga rezultatov testov strupenosti obdelane raztopine jodosulfurona

5.1.2.1 Obrazložitev rezultatov testov strupenosti z bakterijami *V. fischeri*

78 % vzorcev obdelane raztopine jodosulfurona je bilo bolj strupenih od neobdelane raztopine jodosulfurona. Opazili smo, da vzorci obdelani z vidno svetlobo v povprečju povzročajo večje zaviranje bakterijske luminiscence ($\sum \bar{I}_{b\text{-vidna svetloba}} / \text{št. vzorcev}_{\text{vidna svetloba}} = 30,9 \%$), kot vzorci obdelani z UV svetlobo ($\sum \bar{I}_{b\text{-UV}} / \text{št. vzorcev}_{\text{UV}} = 13,2 \%$). Razlog bi lahko bil v manjši konverziji jodosulfurona (nastane manj razgradnih produktov) ali v nastanku drugačnih razgradnih produktov z vidno svetlobo kakor pri obdelavi z UV svetlobo. V večini primerov je namreč delna razgradnja jodosulfurona ($20 \% < \text{konverzija} < 85 \%$) povzročila večjo strupenost vzorcev za bakterije kot skoraj popolna razgradnja (konverzija $> 95 \%$). Iz tega lahko sklepamo, da med razgradnjo jodosulfurona nastajajo za bakterije strupeni razgradni produkti oz. skupine razgradnih produktov, ki se lahko v procesu fotokatalitske oksidacije tudi razgradijo in iz katerih lahko nastanejo novi razgradni produkti. To se sklada z ugotovitvami Sleiman in sod. (2007), ki navajajo, da se lahko med fotokatalitsko oksidacijo jodosulfurona s fotokatalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-P25}$ (Degussa) prehodno pojavi 21 različnih produktov. Le-ti nastajajo ter izginjajo v različnih časovnih obdobjih obdelave jodosulfurona. Na sliki 5 (poglavje 4.2.1) lahko vidimo, da je pri 40 % razgradnji jodosulfurona s katalizatorjem Degussa zaviranje bakterijske luminiscence vzorca majhno, pri 90 % razgradnji je zaviranje bakterijske luminiscence veliko, pri 95-99 % razgradnji pa je zaviranje spet majhno. Očitno razgradni produkti, strupeni za bakterije, nastajajo med 40 % in 95 % razgradnjo jodosulfurona, vendar tega z gotovostjo ne moremo trditi, ker so bile razmere, v katerih je potekala obdelava posameznih vzorcev, različne. Na strupenost vzorcev za bakterije bi lahko vplivala tudi osvetlitev z vidno svetlobo in/ali uporaba vodovodne vode.

Razlike v strupenosti obdelanih vzorcev za bakterije kažejo na to, da se razgradni produkti pri razgradnji z različnimi fotokatalizatorji razlikujejo, ali pa, da so razgradni produkti enaki, vendar vsak katalizator favorizira svojo pot razgradnje, zaradi česar pride do kopičenja posameznih razgradnih produktov, katerih skupni učinek je za bakterije bolj ali

manj škodljiv. V povprečju vzorci obdelani s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-N}(1.2)$ najbolj zavirajo bakterijsko luminiscenco ($\sum \bar{I}_{\text{b-TiO}_2\text{N}(1.1)} / \text{št. vzorcev}_{\text{TiO}_2\text{N}(1.1)} = 46,8 \%$), najmanj pa vzorci obdelani brez katalizatorja ($\sum \bar{I}_{\text{b-brez kat.}} / \text{št. vzorcev}_{\text{brez kat.}} = 14,8 \%$). Vzorci obdelani brez katalizatorja ne glede na pogoje obdelave in doseženo konverzijo niso bistveno bolj strupeni za bakterije od začetne raztopine. Iz tega lahko sklepamo, da so razgradni produkti, ki nastanejo pri fotolizi, za bakterije manj strupeni od razgradnih produktov, ki nastanejo pri fotokatalizi jodosulfurona.

Vzrok strupenosti vzorcev za bakterije je lahko tudi količina razgradnih produktov. Sleiman s sod. (2007) navaja, da se koncentracije posameznih razgradnih produktov jodosulfurona znotraj raztopine stalno spreminjajo. Lahko, da so za bakterije strupene snovi prisotne v začetnih stopnjah razgradnje jodosulfurona (pri majhni konverziji) in nato popolnoma izginejo, ali pa se njihova količina zmanjša do mere, ki jo bakterije tolerirajo. Na sliki 19 (poglavje 4.2.5) lahko vidimo, da s podaljševanjem časa fotokatalitske oksidacije nekateri produkti oz. skupine produktov izginjajo in da nastajajo novi produkti. Vidimo lahko, da sta pri 7-urni obdelavi raztopine jodosulfurona s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-N}(1.1)$ izginili skupini razgradnih produktov, ki sta bili prisotni pri 3 urah. Strupenost vzorca 17 (7-urna obdelava) se je glede na vzorec 16 (3-urna obdelava) zmanjšala. Glede na sliko 19 lahko trdimo, da je večja strupenost vzorca 16 zelo verjetno povezana s skupinama razgradnih produktov, ki sta se s podaljšanim časom obdelave razgradili. S podaljševanjem časa fotokatalitske oksidacije lahko torej strupenost raztopine jodosulfurona in razgradnih produktov za bakterije zmanjšamo.

Na strupenost obdelanih vzorcev vodne raztopine jodosulfurona je vplivala tudi uporabljena voda. Močno povečano strupenost za bakterije so v večini primerov povzročili obdelani vzorci jodosulfurona raztopljenega v MQ vodi. Pri vzorcih, ki so jih obdelali v enakih razmerah, vendar z uporabo vodovodne vode, je bila strupenost za bakterije manjša. Možnih razlogov za to je več. Razgradnja jodosulfurona je bila v vodovodni vodi slabša, nastalo je torej manj potencialno strupenih razgradnih produktov. V vodovodni vodi so prisotne snovi (ioni, kationi, organske substance...), ki bi lahko reagirale z jodosulfuronom, njegovimi razgradnimi produkti ali fotokatalizatorjem, ter s tem vplivale na potek fotokatalitske oksidacije in končno strupenost vzorcev za bakterije. Vsi vzorci z vodovodno vodo so imeli višji pH kot vzorci z ultra čisto vodo ($\text{pH}_{\text{vodovodna voda}} \approx 8$). TiO_2

delci so v alkalnih okoljih deprotonirani, torej negativno nabiti, tudi jodosulfuron je v alkalnih raztopinah negativno nabit. Badawy in sod. (2006) navajajo, da je glavni mehanizem fotokatalize oksidacija substrata na površini fotokatalizatorja, pri čemer je izredno pomembna adsorbcija substrata na površino katalizatorja. V primeru, ko sta tako substrat kot fotokatalizator negativno nabita, lahko pride do odbojnih sil med obema, s čimer se zmanjša število interakcij med njima, kar vodi v manjšo učinkovitost procesa fotokatalitske razgradnje (Silva, 2008).

5.1.2.2 Obrazložitev rezultatov testov strupenosti z vodnimi bolhami *D. magna*

Vzorca začetne raztopine jodosulfurona in samo katalizatorja $\text{TiO}_2\text{-N}(1.1)$ sta povzročila negibnost pri 10 % in 5 % izpostavljenih vodnih bolh. Glede na zahteve standarda ISO 6341 je smrt 10 % izpostavljenih organizmov v kontroli še sprejemljiva napaka, v tem primeru torej nismo govorili o povečani strupenosti vzorcev za vodne bolhe (ISO 6341, 1996). Strupenost obdelanih vzorcev za vodne bolhe je bila odvisna predvsem od učinkovitosti fotokatalizatorja oz. od dosežene razgradnje jodosulfurona. Pri večini vzorcev s konverzijo jodosulfurona < 80 % povečane strupenosti nismo opazili. Izjema sta bila vzorca 18 in 22 (30 % in 100 % zaviranje), ter vzorca obdelana brez katalizatorja 1 in 2, ki sta kljub srednje visoki stopnji konverzije povzročila negibnost pri 100 % testiranih vodnih bolh. Iz tega lahko sklepamo, da pri fotolizi z UV svetlobo pri nekaterih vzorcih nastajajo drugačni, za vodne bolhe bolj strupeni produkti, kot pri fotokatalitski oksidaciji, pri kateri je prišlo do podobne razgradnje jodosulfurona. Vsi vzorci s konverzijo > 80 % so bili za vodne bolhe zelo strupeni.

Konverzija jodosulfurona korelira z uporabo UV svetlobe pri obdelavi raztopin jodosulfurona, večina vzorcev z visoko stopnjo razgradnje je bila obsevana z UV svetlobo. Glede na rezultate strupenosti vzorcev za vodne bolhe lahko rečemo, da so v splošnem vzorci obsevani z UV svetlobo za vodne bolhe bolj strupeni, ne moremo pa reči, če je to zaradi drugačnih produktov, ki pri UV fotokatalizi nastanejo ali zaradi kopičenja razgradnih produktov zaradi intenzivne razgradnje jodosulfurona. Tudi vzorci obsevani z vidno svetlobo, ki dosegajo visoko stopnjo konverzije, so namreč za vodne bolhe zelo strupeni, torej strupeni produkti niso izključno posledica obdelave vzorcev z UV svetlobo.

Največji % negibnih vodnih bolh so v povprečju povzročile raztopine jodosulfurona obdelane s katalizatorjema Degussa ($N_{48ur} = 79,2 \%$) in $TiO_2-N(1.1)$ ($N_{48ur} = 76,6 \%$), najmanjši % negibnih vodnih bolh pa raztopine obdelane s katalizatorjem TiO_2-Nd10 ($N_{48ur} = 28,75 \%$). Edini vzorec, ki je povzročil negibnost pri 100 % izpostavljenih vodnih bolh tako pri majhni kot pri veliki konverziji je bil vzorec obdelan s fotokatalizatorjem TiO_2-PcN_2 . Lahko rečemo, da je obdelava raztopine jodosulfurona s tem katalizatorjem za vodne bolhe najbolj škodljiva, saj očitno že pri majhni razgradnji jodosulfurona nastajajo za vodne bolhe izredno strupeni razgradni produkti. Podaljševanje časa razgradnje jodosulfurona s katalizatorjem $TiO_2-N(1.1)$ ni zmanjšalo strupenosti vzorca 17 za vodne bolhe, kot se je zgodilo pri bakterijah.

Na strupenost vzorcev za vodne bolhe je vplivala tudi uporaba MQ ali vodovodne vode. Vzorci, pri katerih smo uporabili vodovodno vodo so bili za vodne bolhe manj strupeni, kot vzorci, pri katerih smo uporabili MQ vodo. To je opazno zlasti pri vzorcih obdelanih s katalizatorjem TiO_2-PcN_2 , kjer je bil vzorec z MQ vodo, kljub majhni konverziji jodosulfurona, izredno strupen za vodne bolhe, vzorec z vodovodno vodo pa ne (slika 14 , poglavje 4.2.2).

5.1.2.3 Obrazložitev rezultatov testov strupenosti z zelenimi algami *S. subspicatus*

Vsi vzorci, katerim smo lahko izračunali inhibitorni indeks, so bili za alge manj strupeni kakor začetna raztopina jodosulfurona. Strupenost teh vzorcev se je razlikovala glede na uporabljeno svetlobo, vodo in doseženo konverzijo. Vzorci, pri katerih je prišlo do manjše konverzije jodosulfurona, so bili za alge bolj strupeni, kakor vzorci z večjo konverzijo jodosulfurona.

Jodosulfuron spada med sulfonilsečninske herbicide, ki zavirajo delovanje encima ALS. Sulfonilsečninski herbicidi se vežejo na specifična mesta znotraj proteinske strukture ALS s poudarkom na vezavi med specifičnimi deli proteina in aromatskim obročem, heterocikličnim obročem in sulfonilsečninskim mostom molekule jodosulfurona. Vezava sulfonilsečninskega mostu naj bi bila zelo pomembna za zaviranje encima, saj se veže na mesto v encimu, ki je bistveno za normalno delovanje ALS kompleksa (Duggleby in sod., 2008). Eden izmed mehanizmov razgradnje jodosulfurona je cepitev sulfonilsečninskega mostu, s čimer nastaneta dva tipa molekul, molekule z aromatskim obročem in molekule s

heterociklično skupino (Sleiman in sod., 2007). V teoriji bi se te molekule lahko vezale na vezavno mesto ALS za Sus herbicide, ne da bi povzročile zaviranje delovanja encima. S tem bi onemogočile vezavo jodosulfurona na zasedena vezavna mesta. Te molekule bi lahko, zaradi svoje velikosti, uspešno tekmovala z molekulo jodosulfurona za vezavna mesta proteina. Vezavno mesto za sulfonilsečninske herbicide je namreč znotraj 3D strukture ALS proteina, velikost molekul pa dokazano vpliva na vezavo molekul na ta mesta (Duggleby in sod., 2008). To je zgolj hipoteza, ki je nepotrjena in nedokazana, vendar se dobro ujema z našimi rezultati strupenosti obdelanih vzorcev za zelene alge.

Pri vzorcih, pri katerih nismo uspeli izračunati IC_{50} in smo izračunali le inhibitorni indeks pri določeni koncentraciji jodosulfurona, smo opazili podoben trend kot pri ostalih vzorcih. Inhibitorni indeks je bil pri vseh vzorcih < 1 , razen pri vzorcu 21, kjer je bil > 1 . To pomeni, da je bila večina vzorcev pri določenih koncentracijah manj strupenih od začetne raztopine. Iz teh rezultatov, ter rezultatov vzorcev pri katerih smo uspeli izračunati IC_{50} lahko predvidevamo, da so bile v splošnem obdelane raztopine jodosulfurona za alge manj strupene, vendar tega z gotovostjo ne moremo trditi. Podobno so ugotovili tudi Vulliet in sod. (2004), ki so raziskovali strupenost triasulfurona za zelene alge *P. subcapitata* po fotokatalitski obdelavi. Ugotovili so, da se je strupenost obdelanih vzorcev za zelene alge, glede na začetno, neobdelano raztopino herbicida.

5.1.2.4 Primerjava in obrazložitev rezultatov testov strupenosti med *Vibrio fischeri* in *Daphnia magna*

Ko primerjamo rezultate strupenosti za bakterije in vodne bolhe na slikah 23, 24 in 25 opazimo, da so bili obdelani vzorci s konverzijo $> 40\%$ bolj strupeni za vodne bolhe kakor za bakterije. Razlog bi lahko bil v tem, da smo bakterije izpostavili 80 vol% vzorcev, vodne bolhe pa 100 vol%. Po drugi strani so vzorci s konverzijo $< 40\%$ v večini primerov bolj strupeni za bakterije kakor za vodne bolhe. Bolj verjeten razlog, kot razlika v strupenosti zaradi izpostavitve bakterij nižjim koncentracijam jodosulfurona v vzorcih, je torej, da pri nekaterih vzorcih, med fotokatalitsko oksidacijo, nastajajo strupeni produkti, ki so bolj škodljivi za vodne bolhe, pri drugih pa razgradni produkti, ki so bolj strupeni za bakterije. Opazna je korelacija med konverzijo jodosulfurona v vzorcih in strupenostjo vzorcev za vodne bolhe in bakterije, konverzija pa je povezana z uporabo UV ali vidne

svetlobe pri obdelavi vzorcev. Možno je torej, da se strupenostni produkti razlikujejo glede na uporabljeno svetlobo. Neodvisno od uporabljene svetlobe je značilno, da so produkti, ki nastajajo v začetnih stopnjah razgradnje jodosulfurona v večini primerov bolj škodljivi za bakterije, z nadaljevanjem razgradnje pa nastajajo produkti, ki so bolj škodljivi za vodne bolhe. Možno je tudi, da se z bolj intenzivno razgradnjo jodosulfurona določeni razgradni produkti kopičijo v raztopini, tako da povečane strupenosti za vodne bolhe ne povzročijo novi produkti, temveč previsoka koncentracija že prej prisotnih produktov, ki pa so nestrupeni za bakterije. Glede na rezultate lahko z gotovostjo trdimo, da so bile v splošnem obdelane raztopine jodosulfurona za bakterije in vodne bolhe bolj strupene od neobdelane raztopine jodosulfurona. Podobno so ugotovili tudi Vulliet in sod. (2004), ki so raziskovali strupenost triasulfurona za vodne bolhe *D. magna* in bakterije *V. fischeri* po fotokatalitski obdelavi. Ugotovili so, da se strupenost obdelanih vzorcev za omenjena organizma poveča, glede na začetno, neobdelano raztopino herbicida.

5.2 SKLEPI

Fotokatalitsko obdelane raztopine jodosulfurona so bolj strupene za bakterije kot neobdelana raztopina jodosulfurona. Strupenost za bakterije se razlikuje glede na način obdelave (uporabljen katalizator, osvetlitev, prepihovanje, uporabljena voda, čas obdelave), s poudarkom na uporabljenem katalizatorju, osvetlitvi in vodi. Točnega vzroka za povečano strupenost iz izvedenih preiskusov ne moremo določiti. Različne kombinacije dejavnikov obdelave povzročajo razlike v strupenosti vzorcev obdelane raztopine jodosulfurona za bakterije, med njimi je najbolj strupena kombinacija 3 urne obdelave raztopine jodosulfurona v MQ vodi obdelane s katalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-N}(1.1)$ in z UV svetlobo. Strupenost fotokatalitsko obdelanih raztopin jodosulfurona za bakterije se lahko zmanjša z uporabo bolj učinkovitega fotokatalizatorja oz. bolj učinkovito razgradnjo jodosulfurona ali podaljševanjem časa obdelave. Tudi uporaba vodovodne vode zmanjša strupenost obdelanih vzorcev, vendar negativno vpliva na razgradnjo jodosulfurona. Najbolj sprejemljiv kompromis med učinkovito razgradnjo herbicida in strupenostjo za bakterije smo opazili pri vzorcu 21 ($\text{TiO}_2\text{-PcN}_2$). Obdelava le-tega je potekala pri osvetljevanju z UV svetlobo in je omogočila visoko stopnjo razgradnje jodosulfurona raztopljenega v MQ vodi, z manjšo strupenostjo končnega vzorca za bakterije, kakor jo je povzročila začetna raztopina jodosulfurona.

Fotokatalitsko obdelane raztopine jodosulfurona so bolj strupene za vodne bolhe kakor neobdelana raztopina jodosulfurona. Povečana strupenost se pojavi predvsem pri raztopinah z visoko razgradnjo jodosulfurona, odvisna je torej predvsem od fotokatalizatorja in osvetlitve. UV svetloba pozitivno vpliva na aktivnost fotokatalizatorja in učinkovitost fotokatalitske oksidacije, posledično so vzorci obdelani z UV svetlobo za vodne bolhe bolj strupeni kakor vzorci obdelani z vidno svetlobo. Pri nekaterih katalizatorjih že pri majhni razgradnji jodosulfurona nastajajo za vodne bolhe zelo strupeni produkti ($\text{TiO}_2\text{-N}(1.1)$, $\text{TiO}_2\text{-PcN}_2$). Na strupenost vzorcev lahko vpliva tudi uporabljena voda, raztopine jodosulfurona v vodovodni vodi so po obdelavi manj strupene kot raztopine jodosulfurona v MQ vodi. Najboljši kompromis med razgradnjo jodosulfurona in sprejemljivo škodljivostjo za vodne bolhe predstavlja obdelava raztopine jodosulfurona v vodovodni vodi pod UV svetlobo s fotokatalizatorjem $\text{TiO}_2\text{-Nd}$ (vzorec 12).

Vsaj tretjina obdelanih vzorcev je za zelene alge po obdelavi manj strupenih kakor začetna raztopina jodosulfurona, večina vzorcev pa nakazuje trend manjše strupenosti za zelene alge po fotokatalitski obdelavi raztopine jodosulfurona. Dejavniki obdelave ne vplivajo bistveno na strupenost obdelanih vzorcev za zelene alge.

Glede na rezultate lahko potrdimo naslednje hipoteze:

- jodosulfuron je strupen za zelene alge že pri nizkih koncentracijah
- jodosulfuron je strupen za bakterije in vodne bolhe pri višjih koncentracijah kot za zelene alge
- v različnih razmerah fotokatalitske oksidacije pride do razlik v strupenosti obdelanih raztopin jodosulfurona za zelene alge, vodne bolhe in bakterije

Glede na rezultate lahko ovržemo naslednje hipoteze:

- po fotokatalitski oksidaciji so raztopine jodosulfurona manj strupene ali nestrupene za zelene alge, vodne bolhe in bakterije
- jodosulfuron je bolj strupen za bakterije kot za vodne bolhe

Fotokatalitska oksidacija je glede na naše rezultate učinkovit proces razgradnje jodosulfurona, vendar lahko pripelje do povečane strupenosti končnih, obdelanih raztopin za testirane vodne organizme. Z vidika okoljskega tveganja ima lahko torej fotokatalitska razgradnja jodosulfurona bolj škodljive posledice za vodne organizme, kakor, če pesticida

ne razgrajujemo. Temu v prid govori tudi dejstvo, da so pričakovane okoljske koncentracije nižje od naših in v literaturi omenjenih vrednosti IC_{50} in EC_{50} izpostavljenih organizmov, kar pomeni, da ob upoštevanju trenutne zakonodaje, neobdelan jodosulfuron v vodnih okoljih ne predstavlja večjega tveganja za vodne organizme, s fotokatalitsko obdelavo pa bi lahko prišlo do strupenosti vodnih raztopin jodosulfurona za vodne organizme. Za relevantno oceno okoljskega tveganja jodosulfurona in razgradnih produktov bi bile potrebne dodatne analize in predvsem ocena akutne in kronične strupenosti jodosulfurona in vseh razgradnih produktov za vodne organizme iz različnih taksonomskih skupin v takih koncentracijah, ki odražajo realne koncentracije jodosulfurona v okolju.

6 POVZETEK

Kemijska kontrola škodljivcev v kmetijskih panogah je nujna. Vedno večja uporaba pesticidov zaradi njihove naravne obstojnosti predstavlja veliko tveganje za okolje. S spiranjem in pronicanjem skozi tla lahko pesticidi in njihovi presnovki onesnažijo vodne vire in škodljivo vplivajo na vodni ekosistem ter potencialno, preko pitnih vodnih virov, tudi na ljudi.

Zaradi slabe biološke razgradljivosti in, v mnogih primerih, tudi strupenosti za ne-tarčne organizme, pesticidov z biološkimi metodami razgradnje (npr. v biološki čistilni napravi) ponavadi ne moremo odstraniti iz onesnaženih voda. V teh primerih se vedno bolj uveljavlja uporaba naprednih oksidacijskih metod (NOM), s katerimi lahko dosežemo popolno mineralizacijo organskih onesnažil v vodah.

Ena izmed NOM je fotokatalitska oksidacija, pri kateri z osvetlitvijo povzročimo aktivacijo polprevodnika (fotokatalizatorja), kar v vodnih medijih večinoma pripelje do nastanka visoko reaktivnih hidroksil radikalov ($\cdot\text{OH}$), ki oksidirajo in razgradijo organske spojine.

V nalogi smo raziskovali strupenost herbicida jodosulfuron-metil-natrija za vodne organizme pred in po fotokatalitski oksidaciji. Jodosulfuron spada v skupino sulfonilsečninskih herbicidov, ki zavira delovanje acetolaktat sintaze prisotne v rastlinah in mikroorganizmih. Opazovali smo strupenost vzorcev za vodne bolhe *D. magna*, morske bakterije *V. fischeri* in zelene alge *D. subspicatus*. Fotokatalitska oksidacija je potekala v različnih razmerah, preučevali smo vpliv fotokatalizatorjev, uporabljenega vodnega medija, prisotnost kisika in vira svetlobe (vidna, UV) na potek reakcije (pretvorba onesnažila) in strupenost raztopine po fotokatalitski obdelavi.

Rezultati strupenostnih testov kažejo, da so fotokatalitsko obdelani vzorci raztopine jodosulfurona za bakterije in vodne bolhe bolj strupeni, kot začetna, neobdelana raztopina jodosulfurona, za zelene alge pa manj strupeni od začetne raztopine jodosulfurona. Strupenost vzorcev za vodne organizme se razlikuje glede na uporabljene dejavnike obdelave, s poudarkom na osvetlitvi, fotokatalizatorju in uporabljeni vodi. Za vodne bolhe so bolj strupeni vzorci obdelani z UV svetlobo, za bakterije pa vzorci obdelani z vidno svetlobo. V večini primerov so obdelani vzorci jodosulfurona raztopljenega v vodovodni vodi povzročili manjšo strupenost za bakterije in vodne bolhe, kakor obdelani vzorci

jodosulfurona raztopljenega v MQ vodi. Najbolj pomemben dejavnik pri strupenosti vzorcev za posamezne organizme je dosežena razgradnja jodosulfurona in nastajanje razgradnih produktov. Pri bakterijah je delna razgradnja jodosulfurona ($20 \% < \text{konverzija} < 85 \%$) pozročila večjo strupenost kot zelo velika razgradnja ($\text{konverzija} > 95 \%$). Pri vodnih bolhah konverzija jodosulfurona $< 80 \%$ v večini primerov ni povzročila povečane strupenosti vzorcev za vodne bolhe. Obstajajo torej razlike v strupenosti posameznih vzorcev za različne organizme, ki so v veliki meri odvisne od razmer, v katerih poteka fotokatalitska obdelava raztopine jodosulfurona. Prav tako obstajajo razlike v strupenosti obdelanih vzorcev za posamezne izpostavljene organizme.

Glede na rezultate naše raziskave lahko torej trdimo, da je neobdelana raztopina jodosulfurona močno strupena za zelene alge *D. subspicatus* ter rahlo strupena za vodne bolhe *D. magna* in bakterije *V. fischeri*. Fotokatalitska oksidacija poveča akutno strupenost raztopine jodosulfurona za vodne bolhe in morske bakterije ter zmanjša strupenost raztopine jodosulfurona za zelene alge.

Fotokatalitska oksidacija je glede na naše rezultate učinkovit proces razgradnje jodosulfurona, vendar lahko pripelje do večje strupenosti obdelanih raztopin jodosulfurona za testirane organizme. Z vidika okoljskega tveganja je lahko torej fotokatalitsko obdelan jodosulfuron za vodne organizme bolj strupen, kot neobdelan jodosulfuron.

7 VIRI

- Allievi L., Gigliotti C. 2001. Response of bacteria and fungi of two soils to the sulfonylurea herbicide cinosulfuron. *Journal of Environmental Science and Health B*, 36, 2: 161-175
- Badawy M.I., Ghaly M.Y., Gad-Allah, T.A. 2006. Advanced oxidation processes for removal of organo-phosphorus pesticides from wastewater. *Desalination*, 194, 1-3: 166-175
- Beyer E. M., Duffy M.J., Hay J.V., Schlueter D.D. 1988. Sulfonylureas. V: *Herbicides: Chemistry, Degradation, and Mode of Action*. Vol.3. Kearney P.C., Kaufman D.D. (eds.). New York, Marcel Dekker Inc: 117-189
- Brown H.M. 1990. Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pesticide Science*, 29, 3: 263-281
- CAS Report. 2011. <http://www.cas.org/cgi-bin/cas/regreport.pl> (11. maj 2011)
- Cessna A.J., Donald D.B., Bailey J., Waiser M., Headley J.V. 2006. Persistence of the Sulfonylurea Herbicides Thifensulfuron-Methyl, Ethametsulfuron-Methyl, and Metsulfuron-Methyl in Farm Dugouts (Ponds). *Journal of Environmental Quality*, 35: 2395-2401
- Cobb A.H., Reade J.P. 2010a. *Herbicide Discovery and Development*. V: *Herbicides and Plant Physiology*. 2nd edition. Cobb A.H., Reade J.P. (eds.). Oxford, Wiley-Blackwell: 27-49
- Cobb A.H., Reade J.P. 2010b. *The Inhibition of Amino Acid Biosynthesis*. V: *Herbicides and Plant Physiology*. 2nd edition. Cobb A.H., Reade J.P. (eds.). Oxford, Wiley-Blackwell: 176-199
- Council directive 98/83/EC. 1998. Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.
- Council directive 2000/60/EC. 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.

- Crosby D.G. 1973. The Fate of Pesticides in the Environment. Annual Review of Plant Physiology, 24: 467-492
- Devine M. D., Vanden Born W.H. 1985. Absorption, translocation, and foliar activity of clopyralid and chlorsulfuron in Canada thistle (*Cirsium arvense*) and perennial sowthistle. Weed Science, 33: 524-530
- Duggleby R.G., McCourt J.A., Guddat L.W. 2008. Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. Plant Physiology and Biochemistry, 46, 3: 309-324
- Duke S.O. 1990. Overview of Herbicide Mechanisms of Action. Environmental Health Perspectives, 87: 263-271
- Dunlap P.V. 1999. Quorum Regulation of Luminescence in *Vibrio fischeri*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 1, 1: 5-12
- Eaton A.D., Clesceri L.S., Greenberg E.A. 1998. Standard methods for the examination of water & wastewater. 20th edition. Washington, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation
- Escher B.I., Bramaz N., Maurer M., Richter M., Sutter D., von Känel C., Zschokke M. 2005. Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater. Environmental Toxicology and Chemistry, 24, 3: 750-758
- Fernández-Alba A.R, Guil F. 2002. Comparative evaluation of the effect of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. Analytica Chimica Acta, 451, 2: 195-202
- Gavrilescu M. 2005. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. Engineering in Life Sciences, 5, 6: 497-526
- Grayman W.M., Deininger R.A., Males R.M., AWWA Research Foundation. 2001. Biomonitoring of raw water sources. V: Design of early and predictive source-water monitoring systems. Denver, Awwa Research Foundation and American Water Works Association: 51-69
- Griffin L.J. 2010. Chapter 18: Inhibition of Amino Acid Synthesis. V: AGRO 4070: Weed Science and the Environment. LSU AgCenter (4. avg. 2010).
<https://www.lsuagcenter.com/MCMS/RelatedFiles/%7BC5E3E644-A39F-4A5F-9B39-066D5C915E12%7D/Griffin.WeedCourse.Chapter18.2005.pdf> (20. jan. 2011)

- Grmek-Košnik I., Ambrož B., Blaznik U., Otorepec P. 2006. Pesticidi v pitni vodi. *Zdravniški vestnik*, 75: 537-48
- Herrmann J.-M. 2010. Fundamentals and misconceptions in photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 216, 2-3: 85-93
- Herrmann J.-M., Duchamp C., Karkmaz M., Thu Hoai B., Lachheb H., Puzenat E., Guillard C. 2007. Environmental green chemistry as defined by photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials*, 146, 3: 624-629
- Herrmann J.-M., Lacroix M. 2010. Environmental Photocatalysis in Action for Green Chemistry. *Kinetics and Catalysis*, 51, 6: 793-800
- Hrenovic J., Stilinovic B., Dvoracek L. 2005. Use of Prokaryotic and Eukaryotic Biotest to Assess Toxicity of Wastewater from Pharmaceutical Sources. *Acta Chimica Slovenica*, 52: 119-125
- ISO 6341. Water Quality – Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) Acute Toxicity Test. 1996: 9 str.
- ISO 8692. Water Quality – Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Unicellular Green Algae. 2004: 15 str.
- ISO 11348-2. Water Quality – Determination of the Inhibitory Effect of Water Samples on the Light Emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent Bacteria Test) – Part 2: Method Using Liquid-dried Bacteria. 2007: 21 str.
- Konstantinou I.K., Albanis T.A. 2003. Photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: intermediates and degradation pathways. *Applied Catalysis B: Environmental*, 42, 4: 319-335
- Kuo W.S. 2002. Photocatalytic oxidation of pesticide rinsate. *Journal of Environmental Science and Health*, 37, 1: 65-74
- Ma J., Wang P., Chen J., Sun Y., Che J. 2007. Differential Response of Green Algal Species *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa* to Six Pesticides. *Polish Journal of Environmental Studies*, 16, 6: 847-851

- Marinšek-Logar R., Zrimec A., Berden Zrimec M., Čepeljnik T., Tišler T. Ugotavljanje strupenosti in genotoksičnosti pitnih vod. V: Zbornik referatov. Vodni dnevi 2006, Portorož, 18-19 okt. 2006. Roš. M (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 58-69
- Martins J.M.F., Chevre N., Spack L., Tarradellas J., Mermoud A. 2001. Degradation in soil and water and ecotoxicity of rimsulfuron and its metabolites. *Chemosphere*, 45, 4-5: 515-522
- Matilainen A., Sillanpää M. 2010. Removal of natural organic matter from drinking water by advanced oxidation processes. *Chemosphere*, 80, 4: 351-365
- Munter R. 2001. Advanced oxidation processes – current status and prospects. *Proceedings of the Estonian Academy Sciences: Chemistry*, 50, 2: 59-80
- Nasr-Esfahani M., Montazerozohori M., Abdi K. 2009. Photocatalytic oxidation of dihydropyrimidinones using titanium dioxide suspension. *Archive for Organic Chemistry (ARKIVOC)*, 10: 255-264
- Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S. 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, 31, 2: 265-268
- Pavlič Ž., Vidaković-Cifrek Ž., Puntarić D. 2005. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. *Chemosphere*, 61, 8: 1061-1068
- PRD2008-06. 2008. Proposed Registration Decision: Iodosulfuron-Methyl-Sodium Technical Herbicide. Ottawa, Canada, Pest Management Regulatory Agency.
- REG2004-04. 2004. Iodosulfuron-methyl-sodium. Ottawa, Canada, Pest Management Regulatory Agency.
- Ruppert E.E., Barnes R.D. 1994. Crustaceans. V: *Invertebrate Zoology*. 6th edition. South Melbourne, Brooks/Cole Pub Co: 678-787

- Russell M.H., Saladini J.L., Lichtner F. 2002. Sulfonylurea herbicides. Pesticide Outlook, 13: 166-173
- SANCO/10166/2003-Final. 2003. Review report for the active substance iodosulfuron. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General, E1 – Plant Health. Brussels, Belgium.
- Sanches S., Barreto Crespo M.T., Pereira V.J. 2010. Drinking water treatment of priority pesticides using low pressure UV photolysis and advance oxidation processes. Water Research, 44, 6: 1809-1818
- Shubert E. 2011. *Desmodesmus subspicatus* (pond scum, green weed). Natural History Museum.
<http://www.nhm.ac.uk/nature-online/species-of-the-day/scientific-advances/industry/desmodesmus-subspicatus/> (15. jan. 2011)
- Silva C.G. 2008. Synthesis, Spectroscopy and Characterization of Titanium Dioxide Based Photocatalysts for the Degradative Oxidation of Organic Pollutants. Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy in Chemical and Biological Engineering, at the Faculty of Engineering, University of Porto.
<http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/11536/2/Texto%20integral.pdf> (24. jan. 2011)
- Sleiman M., Conchon P., Ferronato C., Chovelon J.-M. 2007. Iodosulfuron degradation TiO₂ photocatalysis: Kinetic and reactional pathways investigations. Applied Catalysis B: Environmental, 71, 3-4: 279-290
- Subramanian M.V., Loney-Gallant V., Dias J.M., Mireles L.C. 1991. Acetolactate Synthase Inhibiting Herbicides Bind to the Regulatory Site. Plant Physiology, 96: 310-313
- Stasinakis A.S. 2008. Use of advanced oxidation processes (AOPs) for wastewater treatment – a mini review. Global NEST Journal, 10, 3: 376-385

- Tabrizi G.B., Mehrvar M. 2004. Intergation of Advanced Oxidation Technologies and Biological Processes: Recent Developments, Trends, and Advances. *Journal of Environmental Science and Health*, 39, 11-12: 3029-3081
- Tišler T., Bistan M., Jemec A. 2008. Biološki preskusi za ugotavljanje prisotnosti nevarnih kemikalij v odpadnih vodah. V: Zbornik referatov. Vodni dnevi 2008, Portorož, 15.-16. okt. 2008. Roš. M. (ur.). Ljubljana, Slovensko društvo za zaščito voda: 104-111
- Tišler T., Premru A., Milanova M., Kralchevska R., Todorovsky D., Pintar A. 2010. Evaluation of iodosulfuron toxicity to aquatic organisms after photocatalytic oxidation. V: Book of Abstracts. The 11th European Meeting on Environmental Chemistry - EMEC 11, Portorož, 8.-11. dec. 2010. Trebše P., Petrič M., Lavtižar V. (eds.). Nova Gorica, University of Nova Gorica: 159-160
- USEPA. 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth edition. Washington, US Environmental Protection Agency, Office of Water. EPA-821-R-02-012
- Vulliet E., Emmelin C., Chovelon J.-M. Chouteau C., Clement B. 2004. Assesment of toxicity of triasulfuron and its photoproducts using aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 12: 2837-2843
- Zeltner W.A., Tompkins D.T. 2005. Shedding light on photo catalysis. *ASHRAE Transactions*, 3: 523-534
- Zhou Q., Liu W., Zhang Y., Liu K.K. 2007. Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89, 2: 89-96
- Ware G.W., Whitacre D. 2004. Pesticides:Chemical and Biological Tools. V: The Pesticide Book. 6th edition. Ware G.W., Whitacre D. (eds.). Willoughby, Meister Media Worldwide: 3-23

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Albinu Pintarju za pomoč pri praktičnem in teoretičnem delu diplome ter za pomoč s strokovnimi nasveti.

Posebna zahvala gre somentorici doc. dr. Tatjani Tišler in mentorici prof. dr. Romani Marinšek-Logar za njun čas, znanje, izkušnje ter spodbudo in potrpežljivost pri pisanju diplomskega dela.

Hvala tudi sodelavcem na Kemijskem Inštitutu za tehnično pomoč pri izvedbi praktičnega dela.

Za recenzijo diplomske naloge se zahvaljujem prof. dr. Tomu Turku.

Na koncu bi se zahvalil še svoji družini in prijateljem za potrpežljivost in podporo pri doseganju zastavljenih ciljev.

Najlepša hvala vsem.