

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Odbourávání rezistentních pesticidů ze skupiny s-triazinů
pomocí fotochemické oxidace na TiO₂**

Bakalářská práce

Lucie Keltnerová

Školitelka: Doc. RNDr. Šárka Klementová, CSc.

České Budějovice 2014

Keltnerová, L. (2014): Odbourávání rezistentních pesticidů ze skupiny s-triazinů pomocí fotochemické oxidace na TiO₂. [Degradation of resistant s-triazine pesticides by photochemical oxidation on a TiO₂ semiconductor. Bc. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The theoretical part of the Bachelor thesis summarizes fate of s-triazine pesticides in the environment, the effects of atrazine on animal and human health, published results about photocatalytic degradation of atrazine and toxicity assessments of atrazine.

In the experimental part, results of atrazine photochemical degradation on titanium dioxide immobilized on glass surface and results of the toxicity assessment of atrazine and its metabolites are presented.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

.....
V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala mé školitelce Doc. RNDr. Šárce Klementové, CSc. za vedení práce, cenné rady při provádění experimentů a zejména za její přátelský přístup a ochotu s čímkoliv pomoci.

Dále chci poděkovat Ing. Gabriele Strnadové, která mi pomohla zvládnout techniku HPLC.

Děkuji také Ing. Pavle Kužberské, která provedla LC-MS analýzu mých vzorků, a RNDr. Petru Šimkovi, CSc., který poskytl cenné rady při LC-MS měření.

Chci rovněž poděkovat pracovníkům Centra pro výzkum toxických látek v prostředí, Přf MU v Brně, Zuzaně Rábové a Lud'ku Bláhovi, kteří byli ochotni provést testy toxicity mých vzorků.

Na závěr bych ráda poděkovala mému příteli Ondřeji Hornychovi, který mi pomohl se závěrečnou korekturou mé práce.

Obsah

1 Cíle práce.....	1
2 Úvod.....	1
2.1 Osud s-triazinových herbicidů v přírodě.....	2
2.2 Vliv atrazinu na fyziologické procesy v tělech živočichů.....	5
2.3 Princip fotochemické degradace pomocí katalyzátoru.....	6
2.3.1. Kinetika odbourávání atrazinu při heterogenní fotokatalýze.....	9
2.3.2 Degradční mechanismus atrazinu.....	10
2.4 Další způsoby degradace polutantů.....	11
2.5 Testy toxicity atrazinu.....	12
3 Materiál a metody.....	13
4 Výsledky.....	15
4.1 Odbourávání atrazinu na vrstvě s imobilizovaným TiO ₂	15
4.2 Analýza degradačních produktů atrazinu pomocí LC-MS.....	19
4.3 Test toxicity ozářených vzorků atrazinu pomocí inhibice řasového růstu.....	20
5 Diskuze.....	24
6 Závěr.....	26
7 Literatura.....	27
8 Přílohy.....	35

1 Cíle práce

- seznámit se s mechanismem reakcí při heterogenní fotokatalýze na TiO_2
- provést literární rešerši ohledně heterogenní fotokatalýzy u atrazinu a toxicity produktů degradace
- seznámit se s technikou pokusů při testování degradace atrazinu na vrstvě TiO_2 v laboratorním měřítku
- zvládnout techniku HPLC pro detekci úbytku atrazinu při testech degradace

2 Úvod

Již několik posledních desetiletí je aplikováno velké množství herbicidů na zemědělskou půdu. Mnoho těchto chemických látek je dobře rozpustných ve vodě, tudíž dochází k jejich transportu povrchovými vodami a k průniku do podzemních vod. Měřitelná množství herbicidů a jejich degradačních produktů byla často zjištěna i ve zdrojích pitné vody, což vyvolalo obavy vědců i laické veřejnosti (Minero et al., 1992). Z tohoto důvodu vzniká mnoho studií, které se zabývají možnou degradací herbicidů, jejich perzistencí v půdě a vodních ekosystémech a v poslední řadě také jejich toxicitou.

Mezi nejčastěji detekované herbicidy ve vodních ekosystémech patří s-triazinové herbicidy, z nichž jsou nejvíce využívány atrazin, cyanazin a simazin (Kross et al., 1992; Scribner, et al., 2005). Atrazin (6-chloro-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5,-triazin-2,4-diamin) je bílá krystalická látka, která je využívána k hubení plevelu na zemědělské půdě, ale také k ošetřování golfových hřišť, soukromých trávníků a ploch kolem cest (Olsberg, 2007). Směrnice Evropské unie z roku 2004 nařizuje, že koncentrace atrazinu v pitné vodě nesmí přesáhnout hodnotu 0,1 $\mu\text{g/l}$ a koncentrace atrazinu ve směsi s ostatními vybranými pesticidy nesmí přesáhnout hodnotu 0,5 $\mu\text{g/l}$ (European Commission, 2004).

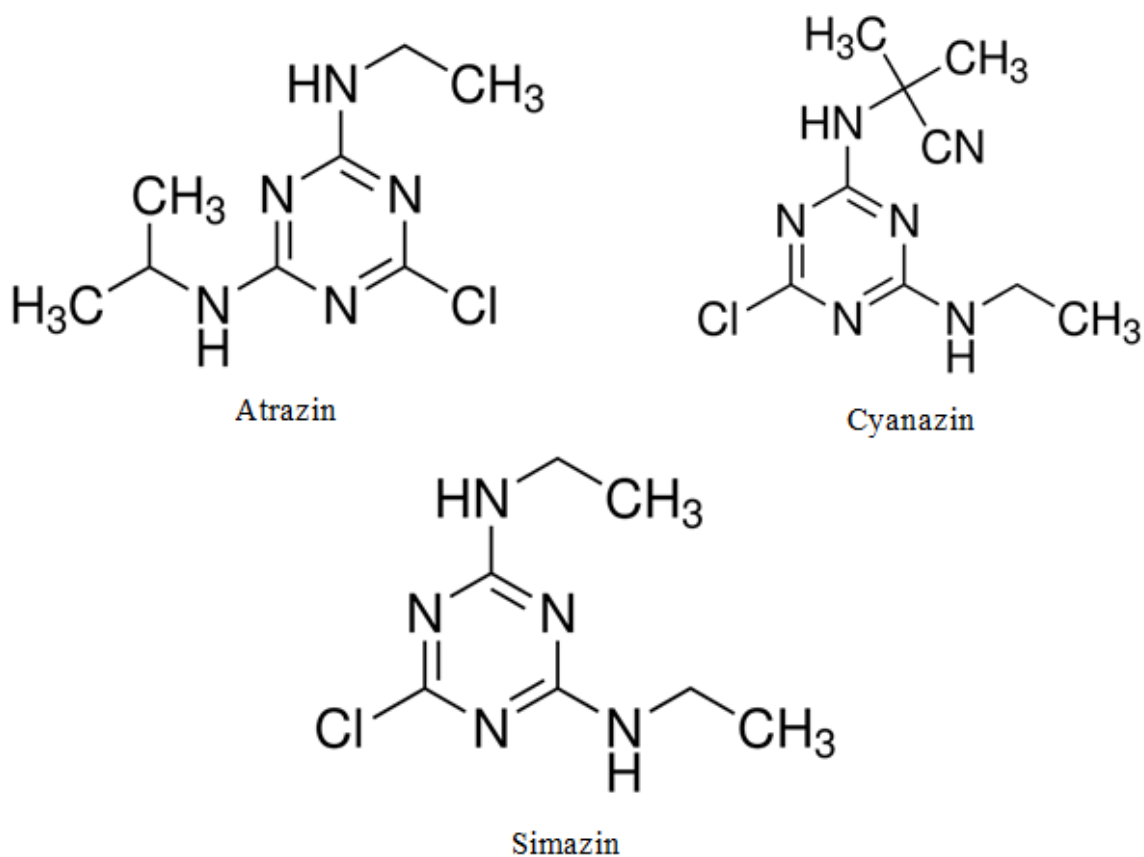
Atrazin patří mezi perzistentní organické sloučeniny, které jsou rezistentní vůči chemické a biologické degradaci (Malato & Agüera, 2004). Bylo navrženo mnoho metod na odstranění atrazinu a jiných polutantů z vodních zdrojů, např. ozonace, adsorpce na aktivovaném koksu, mikrobiální degradace, hydrolýza, homogenní fotodegradace (Campanella & Vitaliano, 2007), air stripping, spalování nebo tzv. AOP - z angličtiny Advanced Oxidation Processes (Malato & Agüera, 2004). Air stripping a adsorpce pouze

převádí toxické látky do jiné fáze, tudíž nejde o dlouhodobé řešení problému se znečištěním. Spalování je schopno přeměnit toxické látky na CO₂, vodu a anorganické sloučeniny, avšak tato metoda není veřejností pozitivně přijímána (Malato & Agüera, 2004). Mikrobiální a hydrolytické procesy jsou zase velmi pomalé a neefektivní (Campanella & Vitaliano, 2007).

Naopak AOP mohou být vhodnou metodou odstranění organických polutantů ze zdrojů vody. Jejich největším pozitivem je skutečnost, že dokáží zcela zničit toxické látky, ne je pouze převést do jiné fáze. Mezi AOP se řadí fotokatalytické oxidační procesy, přičemž nejvíce výhod skýtá fotokatalytická degradace pomocí UV záření a TiO₂ katalyzátoru. V ideálním případě se konečnými produkty této degradace stávají CO₂, voda a anorganické minerální soli (Konstantinou & Albanis, 2003).

2.1 Osud s-triazinových herbicidů v přírodě

S-triazinové herbicidy jsou široce využívanými herbicidy, zejména pak atrazin, simazin a cyanazin, jejichž chemickou strukturu znázorňuje obr. 1 (Scribner et al., 2005). Atrazin je obvykle aplikován ve formě vodního spreje o koncentraci 2,2 až 4,5 kg/ha na zemědělskou půdu (Mudhoo & Garg, 2011). Jakmile se atrazin dostane do prostředí, dochází k jeho transportu půdou, sorpci na půdní částice, splachu s dešťovou vodou a také k jeho degradaci.



Obr. 1: Nejčastěji používané s-triazinové herbicidy.

Pohyb atrazinu v půdě se uskutečňuje prostřednictvím dvou odlišných procesů: pomalého transportu skrz půdní hmotu, při kterém se uplatňuje sorpce a degradační reakce, a rychlého transportu skrz makropóry (Mudhoo & Garg, 2011).

Atrazin může být sorbován na organické i anorganické půdní částice, přičemž míra sorpce závisí na množství, distribuci a vlastnostech půdních částic (Mudhoo & Garg, 2011). Herbicidy jako atrazin mohou interagovat s povrchem částic prostřednictvím elektrostatických interakcí, výměnných reakcí s ionty či komplexací (Clausen et al., 2001). Atrazin se může sorbovat na pevnou organickou hmotu (SOM), rozpuštěnou organickou hmotu (DOM), jíly, oxidy a hydroxidy. Sorpce na SOM snižuje transport atrazinu v půdním profilu. Naopak sorpce atrazinu na DOM zvyšuje rozpustnost atrazinu v půdním roztoku a zvyšuje jeho mobilitu půdou (Mudhoo & Garg, 2011). Atrazin vykazuje vysokou afinitu vůči komplexům jílu a organické hmoty a jeho sorpce v půdě je pozitivně korelována s obsahem organického uhlíku v půdě (Binet et al., 2006).

Velké množství triazinů a jejich degradačních produktů je spláchnuto do vodních toků s dešťovou vodou. Nejvíce se tak děje při prvních deštích po aplikaci pesticidů. Detekované množství pesticidů ve vodních tocích bývá závislé na sezóně – větší procento detekcí se děje na jaře a na začátku léta, nižší procento na podzim a v zimě. Degradační produkty studovaných pesticidů se mnohdy nalézají častěji a ve vyšších koncentracích ve vodních tocích než samotné pesticidy (Scribner et al., 2005).

Atrazin nezůstává v půdě a ve vodě pouze v nezměněném stavu, ale podléhá degradaci. Degradace atrazinu v půdě je zprostředkována zejména mikroorganismy. Řada mikroorganismů rozkládá atrazin skrze metabolické procesy, které vedou ke vzniku a kumulaci metabolitů atrazinu. Těmito mikroorganismy jsou např. bakterie rodu *Pseudomonas*, *Agrobacterium radiobacter* nebo *Nocardioides* sp.. Některé mikroorganismy mohou získávat živiny a energii díky úplné mineralizaci atrazinu na CO₂ (Mudhoo & Garg, 2011).

Mikrobiální rozklad atrazinu je hydrolytický proces, který se skládá z dehalogenace, N-dealkylace, deaminace a rozštěpení aromatického kruhu kyseliny kyanurové (Ralebitso-Senior et al., 2002). Čtyři hlavní produkty jsou desethylatrazin, desisopropylatrazin, desethyldeisopropylatrazin a hydroxyatrazin (Mudhoo & Garg, 2011). Hydroxyatrazin je nejvýznamnějším metabolitem atrazinu, přičemž jeho retence v půdě je vyšší než u ostatních metabolitů (Prata et al., 2003). Hydroxyatrazin je nejméně mobilním produktem atrazinu, zatímco desethylatrazin a desisopropylatrazin jsou mobilnější než ostatní produkty (Panshin et al., 2000). Desethylatrazin a desisopropylatrazin jsou podobně toxické jako atrazin, avšak jsou rozpustnější ve vodě a slaběji interagují s půdními částicemi než atrazin (Abate & Masini, 2005a).

Některé tolerantní druhy rostlin umí rychle detoxifikovat atrazin prostřednictvím hydrolytických a konjugačních procesů. Po přijetí atrazinu rostlinou dochází k jeho detoxifikaci skrze neenzymatickou hydroxylaci a enzymatickou N-dealkylaci či konjugaci s cysteinem a glutationem (Lin et al., 2008). Rovněž některé druhy mykorrhizních hub jsou schopné metabolizovat atrazin (Mudhoo & Garg, 2011). Bylo také zjištěno, že zelené řasy a rozsivky jsou schopné ve svých buňkách kumulovat atrazin (Tang et al., 1998).

2.2 Vliv atrazinu na fyziologické procesy v tělech živočichů

Vzhledem k tomu, že atrazin a jeho degradační produkty byly často detekovány ve vodních ekosystémech a ve zdrojích pitné vody, vzniklo mnoho studií zabývajících se vlivem atrazinu na zdraví zvířat a lidí. Tyto studie se snaží potvrdit domněnku, že atrazin funguje jako endokrinní disruptor a může mít vliv na rozvoj některých typů rakoviny (Jowa & Howd, 2011).

Mnoho studií bylo prováděno na tzv. Sprague-Dawley krysách, což je linie krys vyšlechtěná z *Rattus norvegicus*, sloužící k laboratorním účelům. U samic těchto krys byl prokázán vyšší výskyt prsních nádorů (zejména karcinomů) v závislosti na podané dávce atrazinu (Mayhew, 1986; Morseth, 1998). Podávání dávky 400 ppm atrazinu způsobilo u Sprague-Dawley krys prodloužení estrálního cyklu, zvýšení počtu dní, při nichž byly krysy ve stádiu estru (doba říje) či byly pod vlivem estrogenu, dřívější vznik prsních cyst obsahujících mléko (v angličtině tzv. galactoceles) a dřívější vznik prsních a hypofyzárních tumorů (Wetzel et al., 1994; Morseth, 1998).

Wetzel et al. (1994) prováděli pokusy také na tzv. Fischerových krysách. Atrazin u této linie krys neměl vliv na hladiny estradiolu a progesteronu, ani na vznik a výskyt prsních nádorů.

O'Connor et al. (1987) studovali účinky atrazinu na zdraví psů plemene bígl. U jedinců krmených 1000 ppm atrazinu se objevil prokazatelně vyšší výskyt kardiopatie (skrytá degenerace myokardu), a to jak u samců, tak i u samic. Patologické změny myokardu byly provázené elektrokardiografickými změnami. Nebyl však prokázán výskyt nádorů v závislosti na podávání atrazinu.

Kromě studií prováděných na zvířatech existuje řada studií zabývajících se výskytem různých druhů rakoviny u lidí, kteří přicházeli do styku s atrazinem. Studie neprokázaly vliv atrazinu na výskyt rakoviny prsu u žen (Hopenhayn-Rich et al., 2002; Muir et al., 2004; Mills & Yang, 2006), mnohačetného myelomu (Brown et al., 1993; Rusiecki et al., 2004), rakoviny tlustého střeva (Van Leeuwen et al., 1999), rakoviny kostí (Thorpe & Shirmohammadi, 2005), rakoviny prostaty, plic, močového měchýře (Rusiecki et al., 2004), sarkomů měkkých tkání a Hodgkinova lymfomu (Hoar et al., 1986).

Van Leeuwen et al. (1999) ve své studii zjistili prokazatelnou spojitost mezi atrazinem v pitné vodě (koncentrace 50 – 649 ng/l) a výskytem rakoviny žaludku.

Řada studií se zabývala vlivem atrazinu na výskyt non-Hodgkinova lymfomu, přičemž některé studie (Hoar et al., 1986; Weisenburger, 1990; De Roos et al., 2003) prokázaly spojitost mezi atrazinem a tímto typem rakoviny, jiné studie (Cantor et al., 1992; Rusiecki et al., 2004) spojitost vyvrací. Nejasná souvislost je také mezi atrazinem a leukémií. Brown et al. (1990) zjistili slabé, ale průkazné zvýšení rizika vzniku leukémie u zemědělců manipulujících s atrazinem na rozdíl od mužů, kteří s atrazinem nepřicházeli do styku. Thorpe & Shirmohammadi (2005) však spojitost mezi atrazinem a leukémií nepotvrdili.

Sanderson et al. (2000) zjistili, že atrazin v závislosti na koncentraci je schopen zvýšit činnost CYP19 aromátázy, a to až 2,5 krát. Aromátáza se účastní konverze androgenů na estrogeny, což může mít za následek feminizaci samců, narušení činnosti endokrinního systému a vznik nádorů. Feminizace samců byla pozorována např. u žab (Hayes et al. 2002).

Atrazin ovlivňuje také činnost hypotalamu, především vylučování gonadotropin-uvolňujícího hormonu. Gonadotropin-uvolňující hormon řídí vylučování luteinizačního hormonu. Gonadotropin-uvolňující hormon je vylučován v pulzech, důsledkem toho je vylučování luteinizačního hormonu také v pulzech. Rozmnožovací orgány, zejména pak ty u Sprague-Dawley krys, jsou velmi citlivé na měnící se hladinu luteinizačního hormonu, tudíž každá odchylka ve vylučování LH ovlivní načasování a funkci estrálního cyklu a uvolňování estrogenu a testosteronu (Jowa & Howd, 2011). S věkem dochází u samic Sprague-Dawley k přirozeným změnám estrálního cyklu, které vedou k přetrvávajícímu estru. K této změně dochází po 1. roce života a je způsobena narušením správného uvolňování luteinizačního hormonu. Vaječníky takto postižených krys mají mnoho velkých folikulů a chybí vylučování žlutého tělíska, což vede k přetrvávajícímu uvolňování estradiolu a prolaktinu a k poklesu uvolňování progesteronu. Vystavení atrazinu dokáže vyvolat takovéto změny, jejichž výsledkem je zvýšený výskyt nádorů prsních žláz (Stevens et al., 1994).

2.3 Princip fotochemické degradace pomocí katalyzátoru

Fotochemická degradace pomocí katalyzátoru se dělí na homogenní a heterogenní. Při homogenní fotokatalýze dopadající záření produkuje katalyticky aktivní formu katalyzátoru, který je rozpuštěný v roztoku, kde dochází k reakci. Příkladem může být fotochemická redukce železitých iontů na železnaté ionty, které vykazují mnohem větší

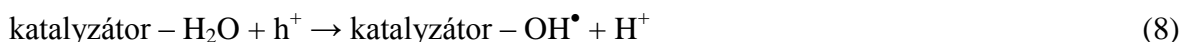
katalytickou aktivitu (Klementová, 2011). Katalyzátorem jsou při této metodě roztoky solí, nejčastěji železitých, jako je např. chloristan železitý, sulfid železitý (Canle et al., 2005) nebo směs peroxidu vodíku a železnaté soli, známá jako foto-Fenton (Malato & Agüera, 2004; Farré et al., 2005). Při homogenní fotokatalýze atrazinu za použití železitých, měďnatých a manganatých iontů jako katalyzátoru se nejvíce osvědčily železité ionty (Klementova & Hamsova, 2000). Se zvyšující se koncentrací železitých iontů se zvyšuje rychlost fotokatalýzy (Klementová, 2011; Canle et al., 2005), naopak nedostatečný přísun kyslíku fotokatalýzu zpomaluje (Canle et al., 2005).

Heterogenní fotokatalýza je metoda, při které dochází k fotochemickým reakcím na polovodiči, který je v pevném skupenství. Proces má několik fází: přenos kapalné či plynné fáze reaktantu difuzí na povrch katalyzátoru, adsorpce reaktantu na povrch katalyzátoru, reakce adsorbovaných molekul, desorpce produktů a odstranění produktů z oblasti povrchu katalyzátoru difuzí (Moore, 1979).

K aktivaci polovodiče dochází, jestliže ho ozáříme světlem o energii větší, než je energie tzv. zakázaného pásu polovodiče – v angličtině band gap energy – tedy energetické bariéry mezi pásem posledních obsazených molekulových orbitalů (HOMO – highest occupied molecular orbitals) a pásem vodivostním s prázdnými molekulovými orbitaly (LUMO – lowest unoccupied molecular orbitals).

Energie zakázaného pásu TiO₂ nebo ZnO je cca 3,2 eV (Fenoll et al., 2012), k aktivaci těchto polovodičů je tedy nutné záření o vlnové délce kratší než 387 nm. Při aktivaci polovodiče dochází k excitaci elektronů (e⁻) z valenčního pásu do vodivostního pásu polovodiče a ke vzniku kladně nabitých děr (h⁺) ve valenčním páse (Fenoll et al., 2012). Elektrony mohou redukovat přímo daný substrát nebo O₂ přítomný v reakční směsi na superoxidový anionradikál (O₂^{•-}). Díry mohou oxidovat organický substrát přímo, nebo nepřímo přes oxidaci vody či hydroxylových skupin na radiál OH[•] (Konstantinou & Albanis, 2003). Celý proces shrnují reakce č. 1 - 8 (Konstantinou & Albanis, 2003; Fenoll et al., 2012):





Vznikající částice OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO_2^\bullet jsou vysoce reaktivní a jsou zodpovědné za oxidaci organických substrátů při heterogenní fotokatalýze. Předpokládá se, že oxidace organických molekul probíhá pravděpodobněji přes tyto radikály, než přímo pomocí h^+ (Bianchi et al., 2006).

Nejběžněji používaným katalyzátorem je TiO_2 (forma anatas), jehož největšími výhodami jsou značná efektivita, stabilita vůči korozi, netoxičita a poměrně nízká pořizovací cena (Konstantinou & Albanis, 2003). Dalšími sloučeninami, které je možné využít jako katalyzátor, jsou např. ZnO , SrTiO_3 , ZnS , Fe_2O_3 , FeTiO_3 , $\text{Na}_4\text{W}_{10}\text{O}_{32}$ (Canle et al., 2005), SnO_2 , CdS nebo In_2O_3 (Granados-Oliveros et al., 2009). Při degradaci čistých pesticidů bývá nejúčinnějším TiO_2 , naopak při degradaci roztoků pesticidů obsahujících organické nečistoty se vyplatí použít spíše $\text{Na}_4\text{W}_{10}\text{O}_{32}$ jako katalyzátor (Canle et al., 2005). Fenoll et al. (2012) se zabývali heterogenní fotokatalytickou degradací atrazinu pomocí TiO_2 a ZnO . Z jeho výsledků vyplývá, že účinnější byl ZnO ve srovnání s TiO_2 . Po 4 hodinách ozařování bylo degradováno cca 85% a cca 30% počáteční koncentrace atrazinu za použití ZnO , resp. TiO_2 .

Průběh heterogenní fotokatalýzy pomocí TiO_2 může být ovlivněn přidáním huminových sloučenin do reakční směsi. Minero et al. (1992) tvrdí, že přítomnost huminových sloučenin ve vodném roztoku zvyšuje trojnásobně rychlost fotokatalytické degradace atrazinu pod simulovaným slunečním zářením. Děje se tak již při koncentraci 10 ppm organického uhlíku. Naopak Qin et al. (2010) ve své práci ukazuje, že huminové sloučeniny zpomalují průběh fotokatalytické degradace atrazinu, a to až o 92 % v závislosti na koncentraci huminových sloučenin.

Heterogenní fotokatalýza pomocí TiO_2 je účinná při ozařování dlouhovlnným UV zářením. Jestliže chceme, aby fotokatalýza probíhala i při ozařování katalyzátoru viditelným světlem, je nutné katalyzátor pozměnit tak, aby byl fotosenzitivní vůči viditelnému světlu, tj. snížit energetickou bariéru mezi HOMO a LUMO pásy. Jednou z metod, jak takového efektu dosáhnout, je navázání organických barviv na povrch TiO_2 (Granados-Oliveros et al., 2009) nebo modifikace TiO_2 kovy jako např. Au, Ag, Pt, W

(Zaleska, 2008; Chen & Mao, 2007). Při ozařování TiO₂ s navázaným barvivem dochází k fotoindukovanému přenosu elektronů z excitovaného barviva na vodivostní vrstvu TiO₂. Zatímco elektrony vodivostní vrstvy reagují s akceptorovými molekulami (např. s O₂ za vzniku O₂^{•-}), valenční vrstva zůstává neovlivněna. Těmito barvivy mohou být např. tetra(4-karboxyfenyl)porfyriny s různými navázanými kovy adsorbované na povrchu TiO₂ (Granados-Oliveros et al., 2009).

Jedním z problémů heterogenní fotokatalýzy je rychlá rekombinace mezi generovanými elektrony a děrami, která snižuje účinnost fotokatalýzy. Tento problém řešil Kexin et al. (2012) modifikací TiO₂ pomocí grafenu a středně porézního SiO₂. Grafen vykazuje značnou elektronovou mobilitu, což redukuje rekombinaci h⁺ - e⁻. Středně porézní SiO₂ je dobrým podpůrným materiálem s velkým povrchem. Fenoll et al. (2012) zabránil rekombinaci elektronů a děr přidáním Na₂S₂O₈ do roztoků pesticidů, Na₂S₂O₈ je totiž schopný pohlcovat fotogenerované elektrony a současně vytvářet hydroxylové radikály (OH[•]) a radikály SO₄^{•-}, které jsou silným oxidačním činidlem.

2.3.1. Kinetika odbourávání atrazinu při heterogenní fotokatalýze

Fotokatalytickou degradaci pesticidů lze popsat kinetikou prvního řádu (Malato & Agüera, 2004), jestliže se jejich koncentrace pohybuje v rozmezí ppb až několika ppm (Konstantinou & Albanis, 2003). Kinetiku prvního řádu popisuje rovnice č. 9:

$$[A]_t = [A]_0 \cdot e^{-kt} \quad (9)$$

kde [A]_t je koncentrace odbourávané látky v čase t, [A]₀ je počáteční koncentrace odbourávané látky a k je rychlostní konstanta.

Fenoll et al. (2012) určil kinetiku fotokatalytické degradace atrazinu pomocí TiO₂ jako kinetiku prvního řádu. Tento závěr podporuje i práce Canleho et al. (2005). Průběh fotokatalytické degradace atrazinu pomocí TiO₂ a H₂O₂ může být rovněž popsán kinetikou pseudoprvního řádu (Campanella & Vitaliano, 2007), neboť peroxid vodíku je v přebytku a neovlivňuje rychlostní rovnici. Aplikací ozonu k fotokatalytické degradaci atrazinu pomocí TiO₂ může však dojít ke změně průběhu degradace, přičemž tato degradace může být popsána kinetikou nultého řádu (Farré et al., 2005).

Při katalytické degradaci pesticidů vznikají meziprodukty, které spolu mohou soutěžit o místo na povrchu TiO₂. Koncentrace meziproduktů se v průběhu degradace mění v závislosti na jejich degradaci, tudíž celý proces degradace lépe popisuje Langmuir-Hinshelwoodův kinetický model (Malato & Agüera, 2004), který zohledňuje v kinetické rovnici i adsorpci pesticidu na heterogenní katalyzátor (Konstantinou & Albanis, 2003). Langmuir-Hinshelwoodův kinetický model popisuje rovnice č. 10:

$$r = \frac{dC}{dt} = \frac{kKC}{1+KC} \quad (10)$$

kde r je rychlost oxidace reaktantu (mg/l min), C je koncentrace reaktantu (mg/l), t je doba ozařování, k je rychlostní konstanta (mg/l min) a K je adsorpční koeficient reaktantu (l/mg) (Konstantinou & Albanis, 2003). Pro zředěné roztoky ($C < 10^{-3}$ mol/l) platí, že $KC \ll 1$ a reakce probíhá podle kinetiky prvního řádu. U roztoků o koncentraci větší než $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l vychází $KC \gg 1$ a reakce probíhá podle kinetiky nultého řádu (Herrmann, 1999).

2.3.2 Degradální mechanismus atrazinu

Degradace atrazinu pomocí heterogenní fotokatalýzy probíhá skrze oxidaci postranních alkylových řetězců, dealkylaci, hydrolytickou dehalogenaci a deaminaci (Minero et al., 1992). Prvním krokem degradace je uváděna oxidace postranních alkylových řetězců, při které vznikají acetamidoderiváty a dealkylované deriváty – desethylatrazin a desisopropylatrazin (Konstantinou & Albanis, 2003). V tomto kroku může v menší míře vznikat hydroxyatrazin, u něhož je chlor na pozici 2 nahrazen hydroxylovou skupinou (Scribner et al., 2005).

V dalších krocích degradace probíhá dealkylace, při které vzniká desethyldesisopropylatrazin, a dehalogenace, jejímiž produkty jsou desethylhydroxyatrazin a desisopropylhydroxyatrazin (Scribner et al., 2005). Z těchto produktů následně vzniká desethyldesisopropylhydroxyatrazin, který je nazýván jako ammelin. Nahrazením zbylých aminoskupin hydroxylovými skupinami vzniká z ammelinu kyselina kyanurová (Bianchi et al., 2006). Kyselina kyanurová je uváděna jako konečný produkt degradace, protože je stabilní sloučeninou, odolnou vůči další chemické a fotochemické degradaci (Minero et al., 1992).

Počáteční oxidace postranních alkylových řetězců a formace dealkylovaných produktů probíhá velmi rychle. Oproti tomu vznik konečných produktů vyžaduje delší dobu ozařování, zejména konečná substituce aminoskupin hydroxylovými skupinami je velmi pomalý proces (Konstantinou & Albanis, 2003).

2.4 Další způsoby degradace polutantů

Dalšími metodami degradace organických polutantů, které byly zkoušeny pro odstraňování organických polutantů z kontaminovaných vod, jsou např. přímá fotolýza, sonolýza, ozonace, fotosenzitizovaná degradace či různé modifikace fotokatalýzy.

Při přímé fotolýze je substrát ozařován světlem, jehož energie stačí na rozbití kovalentních vazeb. Pro fotolýzu se nejčastěji využívá záření o vlnové délce 254 nm (Canle et al., 2005; Bianchi et al., 2006; Campanella & Vitaliano, 2007). Energie tohoto záření, která činí cca 471,2 kJ/mol fotonů, odpovídá energii kovalentních vazeb. Problémem této metody je skutečnost, že sluneční záření dopadající na Zemi obsahuje vlnové délky větší než 290 nm, tudíž přímá fotolýza nemůže probíhat samovolně na zemském povrchu (Baker et al., 1980). Canle et al. (2005) se zabýval přímou fotolýzou atrazinu, přičemž poločas rozpadu atrazinu stanovil na 2,5 minuty. Poměrně rychlého úbytku atrazinu dosáhli ve svých pokusech i Bianchi et al. (2006) a Grcic et al. (2008). Celkový obsah organického uhlíku se snížil o pouhých 13 % (Grcic et al., 2008), atrazin se v reakční směsi přeměňoval na hydroxyderivát, hydroxyatrazin, který je poměrně stabilní a k jeho degradaci dochází velmi pomalu (Bianchi et al., 2006).

Bianchi et al. (2006) se zabývali využitím sonolýzy, ozonace a jejich kombinací k degradaci atrazinu. Při ozonaci ve tmě autoři dosáhli 80 % úbytku atrazinu již po 90 minutách pokusu, přičemž významným procesem zde byla dealkylace. Sonolýza a ozonace může být spřažena s přímou fotolýzou. Při kombinaci fotolýzy s ultrazvukem nedochází k synergickému efektu, tudíž rychlost degradace zůstává téměř nezměněna (Bianchi et al., 2006).

Aplikace ozonu k přímé fotolýze zvyšuje rychlost dealkylace, dechlorinace i míru mineralizace atrazinu, po dvou hodinách pokusu může být dosaženo téměř kompletní degradace atrazinu a až 52 % úbytku celkového obsahu organického uhlíku (Bianchi et al., 2006; Grcic et al., 2008).

Pro degradaci atrazinu a jiných organických polutantů je možné využít také fotosenzitizovanou reakci. K fotosenzitizované reakci jsou nutné molekuly senzitivátoru. Tyto molekuly jsou schopny absorbovat záření a přenášet absorbovanou excitační energii na jiné molekuly. Jestliže je energie přenesena na rozpuštěný molekulární kyslík, vzniká velmi reaktivní tzv. singletový kyslík, který oxiduje organický substrát. Příkladem senzitivátoru může být 1 % aceton, riboflavin, porfyrinové komplexy (Canle et al., 2005) nebo huminové sloučeniny, které jsou přítomny v přírodních vodách (Dojlido & Best, 1993).

2.5 Testy toxicity atrazinu

K degradaci atrazinu a jiných polutantů lze využít řadu metod. Někdy však mohou nekompletní degradací toxických polutantů vznikat ještě toxičtější meziprodukty, proto je důležité zařadit k degrační metodě testy toxicity.

Široce používanými testy toxicity jsou mikrobiální testy, a to kvůli vlastnostem, jako je např. krátká doba expozice, snadná manipulace a reprodukovatelnost výsledků mezi laboratořemi (Lapertot et al., 2008). Byly studovány různé kmeny luminiscenčních bakterií a různá média, až v roce 1979 byl navržen test pro rychlé určení toxicity vzorků vody, který využíval emise světla bakterií *Vibrio fischeri* (Bulich, 1979). Tento test se vyrábí pod názvem Microtox© a využívá speciální trubici, tzv. fotonásobič, který měří světlo vydávané bioluminiscenční bakterií *Vibrio fischeri*, což je mořský mikroorganismus, který produkuje záření pomocí oxidačního procesu. Tento proces je spojen s respirací a uvolňuje se při něm energie z ATP. Test toxicity je založen na měření míry inhibice produkce záření bakterií. Nepřináší však žádnou informaci o mechanismu působení toxinu. Během testu je zjištěna tzv. efektivní koncentrace (EC_x), což je koncentrace studované látky, při které je světlo produkované bakteriemi redukováno o určité procento. Nejčastěji se zjišťují efektivní koncentrace EC_{10} – redukce o 10 %, EC_{20} – redukce o 20 % a EC_{50} – redukce o 50 % (Kross et al., 1992).

Kross et al. (1992) zjišťovali EC_{50} v čase 5 minut působení na organismus pro atrazin, desethylatrazin a desisopropylatrazin. EC_{50} atrazinu činila cca 75 mg/l, EC_{50} desethylatrazinu činila cca 675 mg/l a EC_{50} desisopropylatrazinu činila cca 360 mg/l. Z hodnot vyplývá, že desethylatrazin a desisopropylatrazin jsou méně toxické než samotný atrazin. Tento závěr je v souladu s prací Strattona (1984). Podobnou hodnotu EC_{50} atrazinu v pěti minutách pokusu, a sice 89 mg/l, určili ve svých pokusech Lapertot et al. (2008).

Senzitivita testu toxicity závisí na mechanismu, jakým daný pesticid působí na testující bakterii. *Vibrio fischeri*, používaná v Microtox®, není fotosyntetizující organismus, proto nemůže být citlivá k herbicidům, které fungují jako blokátory fotosyntézy a elektronového transportu na tylakoidech. *Vibrio fischeri* rovněž nemá nervovou soustavu, tudíž není citlivá k neurotoickým insekticidům. Z toho vyplývá, že Microtox® není příliš vhodný pro testování toxicity herbicidů, včetně atrazinu (Lapertot et al., 2008).

K určování toxicity lze využít i jiné organismy. Pro zjištění efektivních koncentrací lze např. měřit míru inhibice respirace bakterie *Escherichia coli* nebo ovlivnění motility perloočky *Daphnia magna* (Konstantinou & Albanis, 2003). Zajímavým testem toxicity je zjišťování vlivu polutantů na aktivitu FDA-esterázy nálevníka *Tetrahymena pyriformis*. Tento test je výrazně citlivý k fungicidům, o něco méně k herbicidům, včetně atrazinu (Bogaerts et al., 2001).

Pro určení toxicity herbicidů může být vhodný test využívající zelenou řasu *Pseudokirchneriella subcapitata*. Test je založený na měření optické hustoty řasové suspenze, pomocí které je určena míra inhibice růstu řas danými herbicidy (Rábová & Bláha, 2013).

3 Materiál a metody

Atrazin v čistotě 97,0 % byl zakoupen od firmy Labor Dr. Ehrenstorfer. Zásobní roztok atrazinu byl připraven rozpuštěním 13,3 mg atrazinu v 200 ml a byl ponechán při pokojové teplotě rozpouštět 7 dní, aby se vytvořil nasycený roztok. Pro experimenty byl zásobní roztok atrazinu přefiltrován přes mikrofiltr 0,45 μ l (Chromafil), pro HPLC analýzy byly reakční směsi atrazinu filtrovány přes mikrofiltr 0,2 μ l (Millipore). Absorpční spektrum atrazinu bylo změřeno UV/VIS spektrofotometrem Shimadzu UV-1601 se softwarem UV Probe.

Pro ozařování byly 5 ml podíly zásobního roztoku atrazinu napipetovány do krystalizačních misek s plochým dnem o průměru 4 cm. Do každé misky bylo vloženo sklo s tenkou vrstvou TiO₂ (sklem dolů, vrstvou nahoru) a magnetické míchadlo tak, aby se při míchání magnetické míchadlo nedotýkalo skla s vrstvou TiO₂. Mikroskopická podložní skla s imobilizovaným TiO₂ byla získána od pracovníka VŠCHT Praha. Míchání vzorků v krystalizačních miskách bylo zajištěno pětimístnou magnetickou míchačkou JK IKA, typ RO 5. Vzorky byly ozařovány fluorescenční lampou Philips TL-D 15W/08,

kteřá emituje záření o vlnových délkách 350 – 400 nm, s maximem u 365 nm. Světelný výkon lampy byl změřen pomocí luxmetru UVA Light meter, model UVA-365.

Vzorky atrazinu byly ozařovány po dobu 0; 0,5; 1; 2; 3 a 5 hodin, poté byly kvantitativně převedeny do odměrných baněk o objemu 10 ml a doplněny deionizovanou ultračistou vodou (deionizace přístrojem ULTRAPUR 10, WATREX) na daný objem. Nakonec byly vzorky přefiltrovány přes mikrofiltr 0,2 μm (Millipore) do lahvíček s těsným šroubovacím víčkem.

HPLC analýza byla provedena pomocí vysokotlaké pumpy ConstaMetric 3200, UV detektoru Delta Chroma UVD 200 (Watrex) a kolony Phenomenex, Luna 5 μ C18, 250 x 4 mm. Vzorky byly dávkovány mikrostříkačkou Hamilton po 100 μl metodou přeplněné smyčky. UV detektor byl nastaven na vlnovou délku 230 nm a průtok byl nastaven na 1 ml/min. Mobilní fáze byla připravena z metanolu a deionizované ultračisté vody v poměru objemů 65 : 35 a byla odplyněna pomocí ultrazvukové lázně Netz K2. Chromatografická data byla zpracována v programu ClarityLite.

Standards pro LC-MS byly zakoupeny u firmy Labor Dr. Ehrenstorfer. Těmito standards byly: atrazin-desethyl (99,0 %), atrazin-desethyl-2-hydroxy (99,5 %), atrazin-desethyl-desisopropyl (98,5 %), atrazin-desethyl-desisopropyl-2-hydroxy (98,0 %), atrazin-desisopropyl (98,7 %), atrazin-desisopropyl-2-hydroxy (98,0 %), atrazine-2-hydroxy (98,0 %) a kyselina kyanurová (99,0 %).

LC-MS analýza byla provedena za podmínek odzkoušených pracovníky Laboratoře analytické biochemie ENTÚ AV ČR, tj. na koloně Gemini 3 μ C18, 110A, 150 x 2 mm, 30 °C, s mobilní fází pro měření v negativním módu (tvorba záporně nabitých iontů při elektrosprejové ionizaci) složenou z 0.1 % FA < MeCN a s mobilní fází pro měření v pozitivním módu (tvorba kladně nabitých iontů při elektrosprejové ionizaci) složenou z 0.1 % FA < W. Průtok byl nastaven na 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Objem nástřiku vzorků činil 10 μl . Na koloně byl nastaven gradient 5 % MeCN \rightarrow 90 % MeCN/13 min \rightarrow 90 % MeCN/15 min \rightarrow 5 % MeCN/16 min a ekvilibrace do 20 min. Výsledky byly vyhodnoceny dle MS² (schopnost dvojnásobné analýzy hmotnostního analyzátoru iontů). Koncentrace vzorků činila cca 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$, vzorky byly rozpuštěny v 10 % MeCN < 0,1 % FA.

Test toxicity pomocí inhibice řasového růstu provedli na pracovišti Centra pro výzkum toxických látek v prostředí, Přf MU v Brně. Pro test inhibice řasového růstu byla použita laboratorní kultura zelené řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*, která byla kultivována v Erlenmayerově baňce (100 ml) se sterilním 50 % ZBB médiem (složení

viz Příloha 1). Složení ZBB média bylo převzato z práce Michelové (2013). Kultivace probíhala v klimatizované místnosti s teplotou 24 °C a permanentním ozařováním světlem o intenzitě 1500 lux.

Na začátku pokusu bylo odebráno a rozředěno vhodné množství řasové suspenze (dle koncentrace řasových buněk) do kultivační jamkové destičky s 96 jamkami s ochranou proti vypařování, řasy byly poté vystaveny po dobu 120 hodin účinkům vzorků atrazinu (podmínky stejné jako při kultivaci). Koncentrace každého vzorku byla testována v 5 opakováních, negativní kontrola v 10 opakováních. Optická hustota řasové suspenze (jako míra biomasy) byla změřena nejprve ve dni 0, a poté v každém následujícím dni pomocí spektrofotometru pro měření přímo v 96 jamkových destičkách. Inhibice rychlosti růstu a nárůstu biomasy řas byla určena po 72 hodinách expozice testovaným vzorkům. Získaná data byla zpracována pomocí programů MS Excel 2007 a GraphPad Prism 5 Software.

Vzorky atrazinu (ozářené 0; 0,5; 1; 2; 3 nebo 5 hodin) byly nařaděny na koncentrace 0,001; 0,01; 0,1; 1 a 10 mg/l. Byly určeny efektivní koncentrace EC20 a EC50 každého vzorku, přičemž pro větší přesnost určení efektivních koncentrací byly do pokusu zařazeny další hodnoty koncentrace (0,008; 0,02; 0,069; 0,138; 0,27; 0,55; 1,11; 3,33 mg/l).

4 Výsledky

4.1 Odbourávání atrazinu na vrstvě s imobilizovaným TiO₂

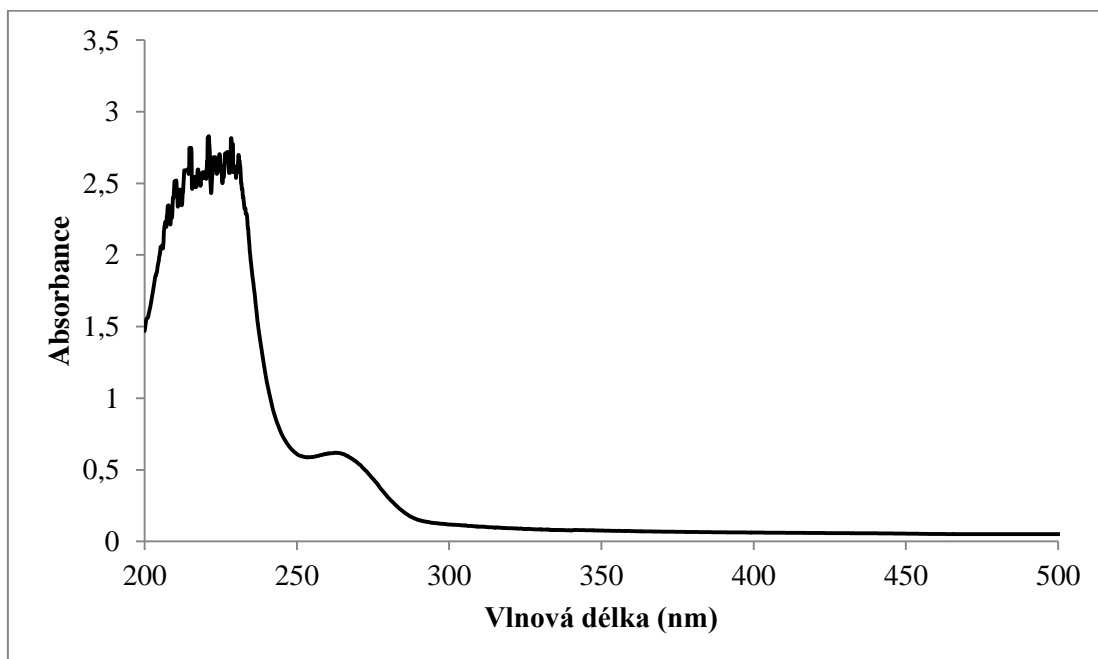
Před samotným ozařováním atrazinu byla testována účinnost lampy v jednotlivých pozicích na pětímístné magnetické míchačce. Výsledky jsou shrnuty v tab. 1.

Tab. 1: Světelný výkon lampy.

Pozice č.	Výkon lampy (mW/cm ²)
1	0,97
2	1,59
3	1,67
4	1,60
5	1,13

Z tabulky vyplývá, že lampa má největší světelný výkon na 3. pozici, tedy uprostřed magnetické míchačky. Světelný výkon lampy na vedlejších pozicích (2. a 4.) se od 3. pozice liší minimálně. Na krajních pozicích (1. a 5.) magnetické míchačky je světelný výkon lampy výrazně nižší, ale podle testů provedených v přípravných experimentech nebyla nižší intenzita záření na krajních pozicích určujícím faktorem pro kinetiku reakce.

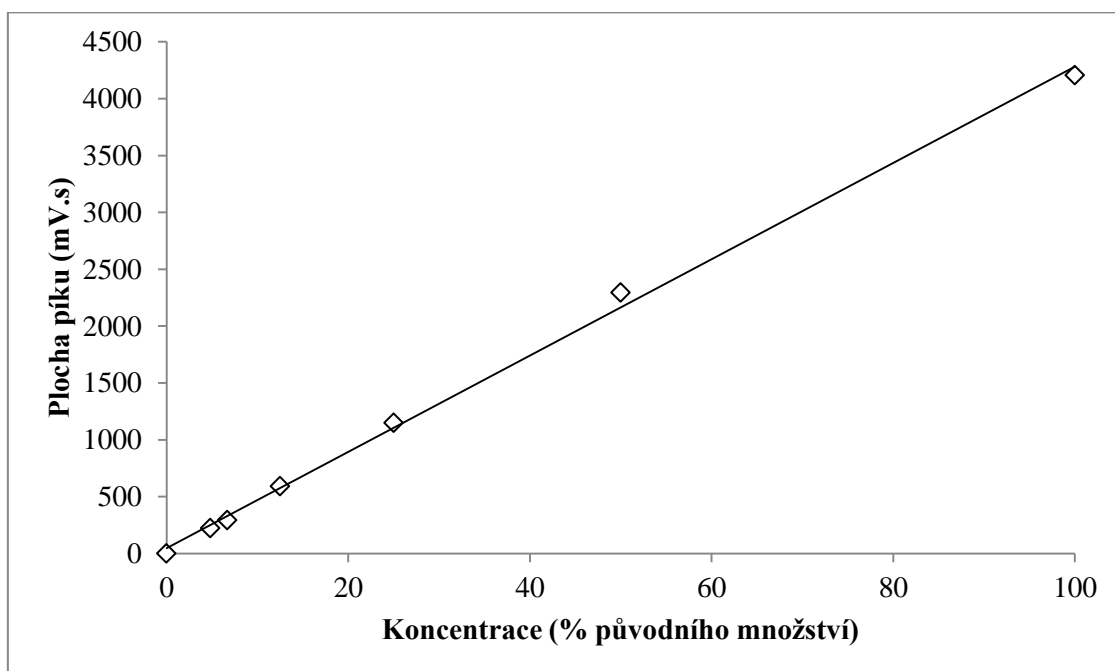
Atrazin absorbuje záření v oblasti vlnových délek kratších než 285 nm (viz obr. 2).



Obr. 2: Absorpční spektrum atrazinu (měření proti vzduchu).

Z obr. 2 vyplývá, že absorpční maximum atrazinu se pohybuje v rozmezí vlnových délek 210 – 230 nm. Záření o vlnové délce větší než 290 nm atrazin neabsorbuje.

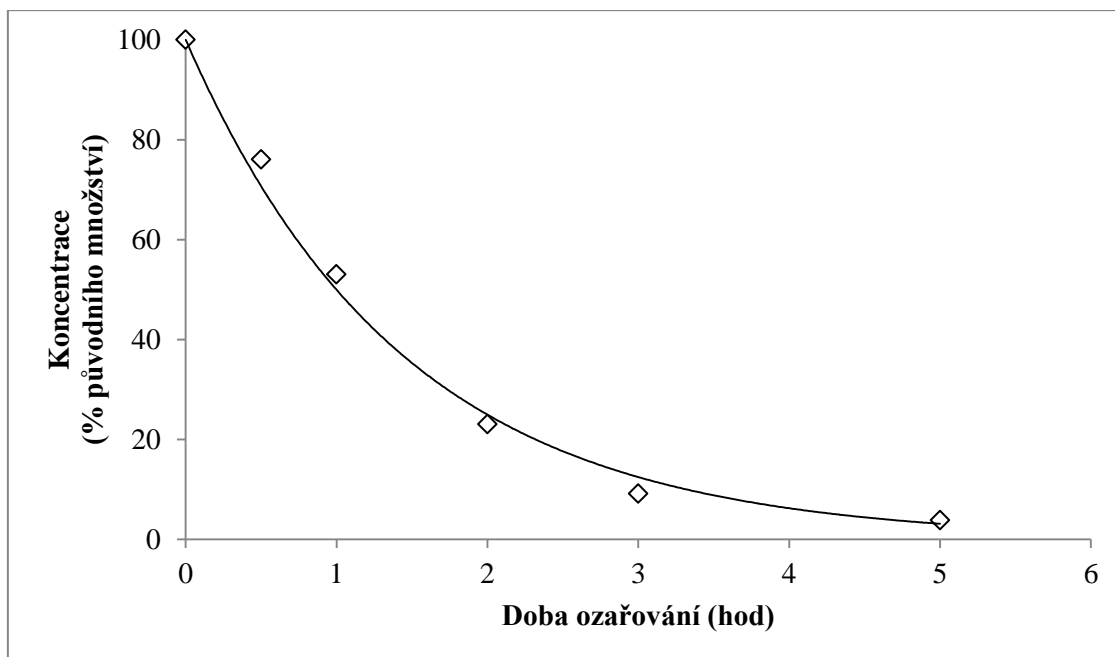
Pro chromatografické stanovení atrazinu pomocí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC) byla použita detekce při vlnové délce 230 nm. Kalibrační křivku HPLC stanovení atrazinu znázorňuje obr. 3.



Obr. 3: Kalibrační křivka roztoku atrazinu (počáteční koncentrace 66,5 mg/l).

Z obr. 3 je patrné, že závislost naměřených hodnot ploch píku na koncentraci atrazinu, vyjádřené jako % původního množství atrazinu, je lineární v měřeném rozsahu koncentrací. Kromě odezvy ve formě plochy píku byla také testována odezva ve formě výšky píku, která byla rovněž lineární v měřeném rozsahu koncentrací. Pro stanovení úbytku atrazinu při ozařování byly používány hodnoty ploch píku.

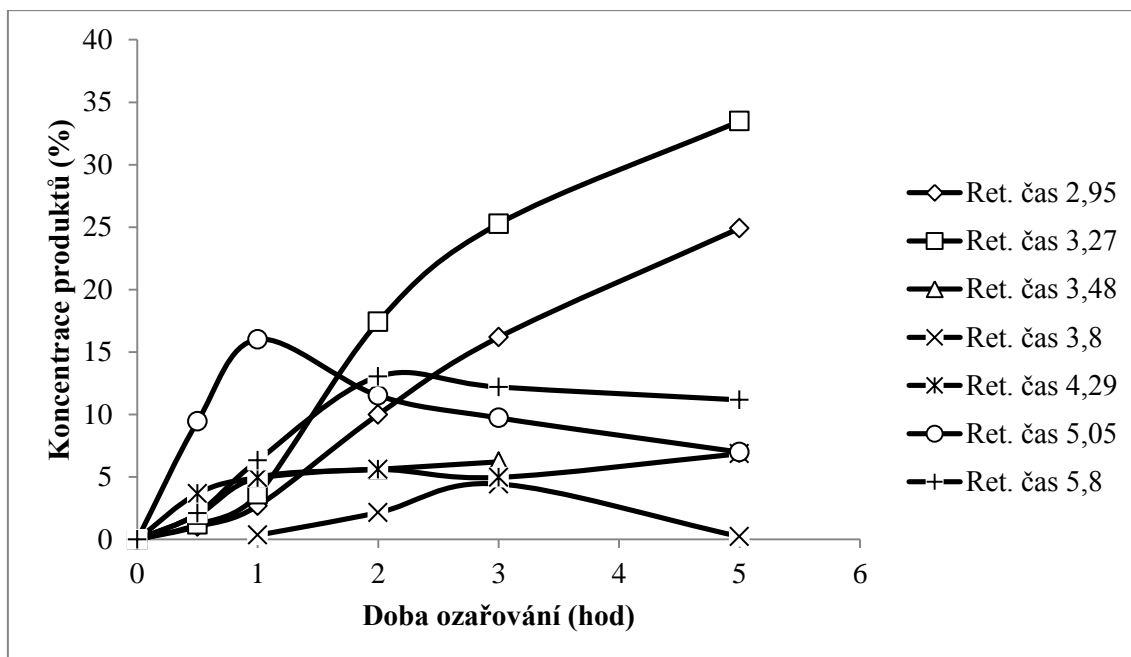
Úbytek atrazinu při ozařování na vrstvách TiO_2 ukazuje obr. 4.



Obr. 4: Úbytek atrazinu při ozařování na vrstvách TiO₂.

Experimentální body byly proloženy exponenciální křivkou o rovnici $y = 100e^{-0,694x}$. Po vyhodnocení křivky degradace atrazinu byla stanovena rychlostní konstanta této degradace, která činí 0,694 hod⁻¹.

Při HPLC stanovení degradačních produktů atrazinu bylo zjištěno, že při ozařování atrazinu vzniká 7 hlavních produktů. Tvorbu těchto produktů demonstruje obr. 5.



Obr. 5: Tvorba degradačních produktů při ozařování atrazinu na vrstvách TiO_2 .

Obr. 5 ukazuje, že v rané fázi ozařování atrazinu vzniká zejména produkt s retenčním časem 5,05 minut, jehož koncentrace dosahuje svého maxima v 1. hodině ozařování. Koncentrace produktů s retenčními časy 2,95; 3,27 a 4,29 minut se zvyšuje s dobou ozařování. Produkt s retenčním časem 3,8 minut začíná vznikat až v 1. hodině ozařování a maximální koncentrace dosahuje v čase 3 hodiny.

Pro vyjádření zastoupení produktů byl použit předpoklad stechiometrie odbourání atrazinu ku vzniku produktů 1 : 1 a předpoklad rovnosti absorbancí při detekční vlnové délce při HPLC analýze.

4.2 Analýza degradačních produktů atrazinu pomocí LC-MS

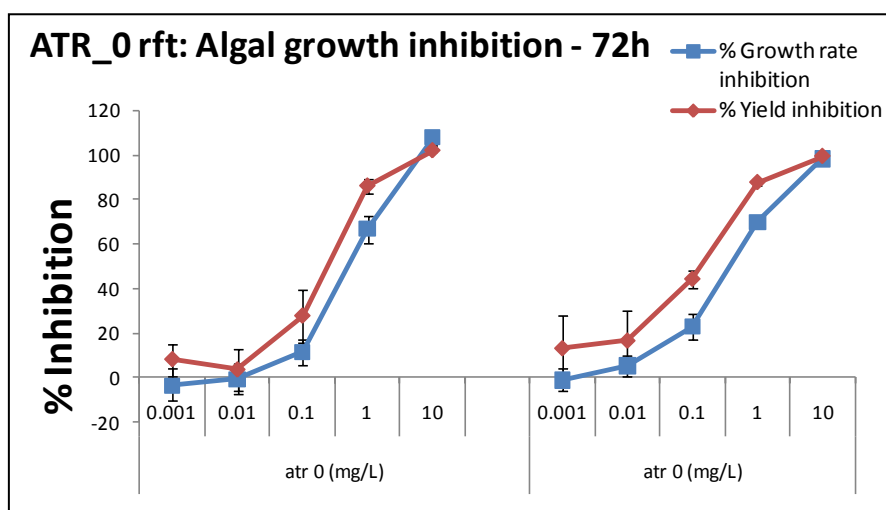
Pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem jako detektorem byly analyzovány 2 série ozářených vzorků atrazinu. V obou sériích vzorků byla naměřena detekovatelná množství následujících produktů fotokatalytické degradace atrazinu: desethylatrazinu, desisopropylatrazinu, desethyldesisopropylatrazinu a hydroxyderivátů těchto produktů. Ve vzorcích byl také přítomen samotný atrazin.

4.3 Test toxicity ozářených vzorků atrazinu pomocí inhibice řasového růstu

Před samotným testem toxicity atrazinu byl proveden test, při němž byl zjištěn rozsah efektivních koncentrací IC₅₀ a IC₂₀ neozářeného vzorku atrazinu. Naměřené hodnoty shrnuje tab. 2 a obr. 6.

Tab. 2: Test rozsahu efektivních koncentrací neozářeného vzorku atrazinu.

Atr 0 rft	SAMPLE	IC50	IC20
% Growth rate inhibition	atr 0	0.560	0.199447
	atr 0	0.378	0.08397
% Yield inhibition	atr 0	0.220	0.069789
	atr 0	0.108	0.016291



Obr. 6: Test rozsahu efektivních koncentrací neozářeného vzorku atrazinu – inhibice růstu řas.

Test rozsahu efektivních koncentrací neozářeného vzorku atrazinu byl prováděn ve dvou opakováních. Vzorky byly naředěny na koncentrace 0,001; 0,01; 0,1; 1 a 10 mg/l. Na základě zjištěných rozsahů efektivních koncentrací byly do samotného testu toxicity zařazeny navíc koncentrace 0,008; 0,02; 0,069; 0,138; 0,27; 0,55; 1,11 a 3,33 mg/l.

Samotný test toxicity byl prováděn na sérii vzorků neozářeného atrazinu a atrazinu ozářeného 0,5; 1; 2; 3 a 5 hodin, a to ve dvou opakováních. Spolu s ním byl proveden kontrolní test toxicity dichromanu draselného. Naměřené hodnoty IC₅₀ a IC₂₀ testovaných vzorků a dichromanu draselného v obou opakováních shrnuje tab. 3.

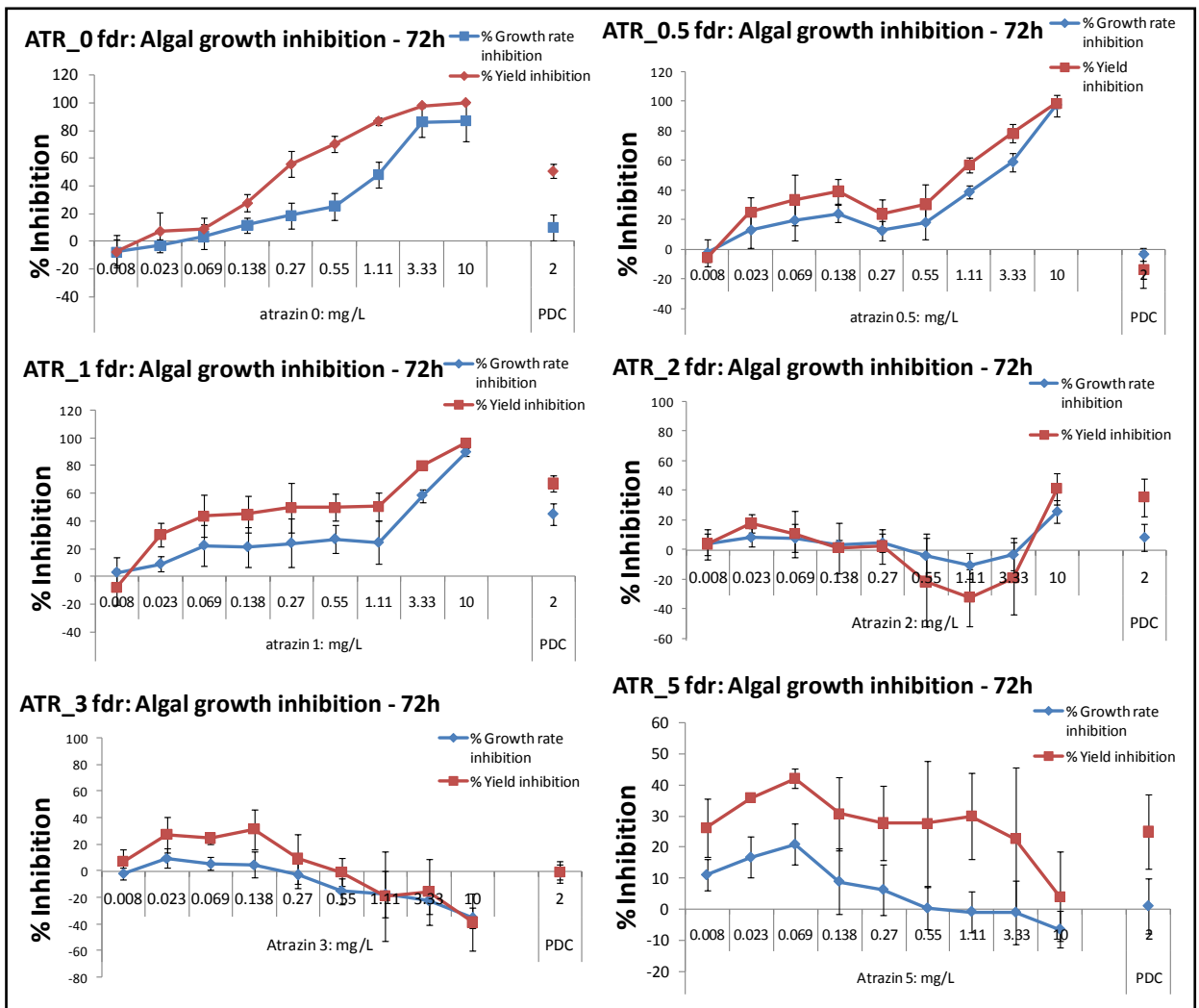
Tab. 3: Test toxicity atrazinu ve dvou opakováních – hodnoty efektivních koncentrací:
 atr 0 – atrazin neozářený; atr 0,5 – atrazin ozářený ½ hodiny; atr 1 – atrazin ozářený
 1 hodinu; atr 2 – atrazin ozářený 2 hodiny; atr 3 – atrazin ozářený 3 hodiny; atr 5 – atrazin
 ozářený 5 hodin.

SAMPLE	First test run		corresponding K ₂ Cr ₂ O ₇ toxicity values			Second test run		corresponding K ₂ Cr ₂ O ₇ toxicity values			
	IC50 (mg/L)	IC20 (mg/L)	Date	IC50 (mg/l)	IC20 (mg/l)	IC50 (mg/L)	IC20 (mg/L)	Date	IC50 (mg/L)	IC20 (mg/L)	
% Growth rate inhibition	atr 0	0.997	0.332	16.12.2013	8.693	3.992	0.379	0.168	3.2.2014	3.408	2.710
	atr 0.5	1.635	0.346	16.12.2013	8.693	3.992	0.278	0.116	7.2.2014	4.669	2.840
	atr 1	1.743	0.215	16.12.2013	8.693	3.992	0.605	0.294	3.2.2014	3.408	2.710
	atr 2	> 10	> 10	17.12.2013	10.02	2.389	1.270	0.613	7.2.2014	4.669	2.840
	atr 3	> 10	> 10	17.12.2013	10.02	2.389	3.266	2.120	3.2.2014	3.408	2.710
	atr5	> 10	0.005	17.12.2013	10.02	2.389	4.931	2.590	7.2.2014	4.669	2.840
% Yield inhibition	atr 0	0.265	0.099	16.12.2013	5.248	2.637	0.244	0.138	3.2.2014	2.983	2.379
	atr 0.5	0.622	0.067	16.12.2013	5.248	2.637	0.172	0.074	7.2.2014	3.372	1.962
	atr 1	0.315	0.022	16.12.2013	5.248	2.637	0.375	0.195	3.2.2014	2.983	2.379
	atr 2	> 10	> 10	17.12.2013	4.959	1.383	0.760	0.363	7.2.2014	3.372	1.962
	atr 3	> 10	0.011	17.12.2013	4.959	1.383	2.633	1.859	3.2.2014	2.983	2.379
	atr5	> 10	3.281	17.12.2013	4.959	1.383	3.042	1.665	7.2.2014	3.372	1.962
				these values are over the long term average (2,5 mg/L)					these values are close to the long term average (2,5 mg/L)		

Z tab. 3 vyplývá, že v prvním testu toxicity byly u vzorků atr 0, atr 0,5 a atr 1 naměřeny podobné hodnoty IC50 a IC20, a to jak v testu inhibice rychlosti růstu řas, tak i v testu inhibice růstu biomasy. U vzorků atr 2, atr 3 a atr 5 nebylo dosaženo 50 % inhibice růstu řas ani při koncentraci 10 mg/l, proto byla IC50 odhadnuta jako větší než 10 mg/l. V prvním testu ukázala kontrola pomocí dichromanu draselného sníženou senzitivitu řasové kultury, protože naměřené hodnoty IC50 jsou cca 2 – 4 krát vyšší, než jsou dlouhodobě průměrné hodnoty (1,25 – 3 mg/l).

V druhém testu naměřené hodnoty IC50 testovaných vzorků a dichromanu draselného indikují zvýšení senzitivity řasové kultury. Hodnoty IC50 pro dichroman draselný se pohybují mírně nad dlouhodobým průměrem, tudíž absolutní hodnoty IC50 jsou v tomto testu relevantnější.

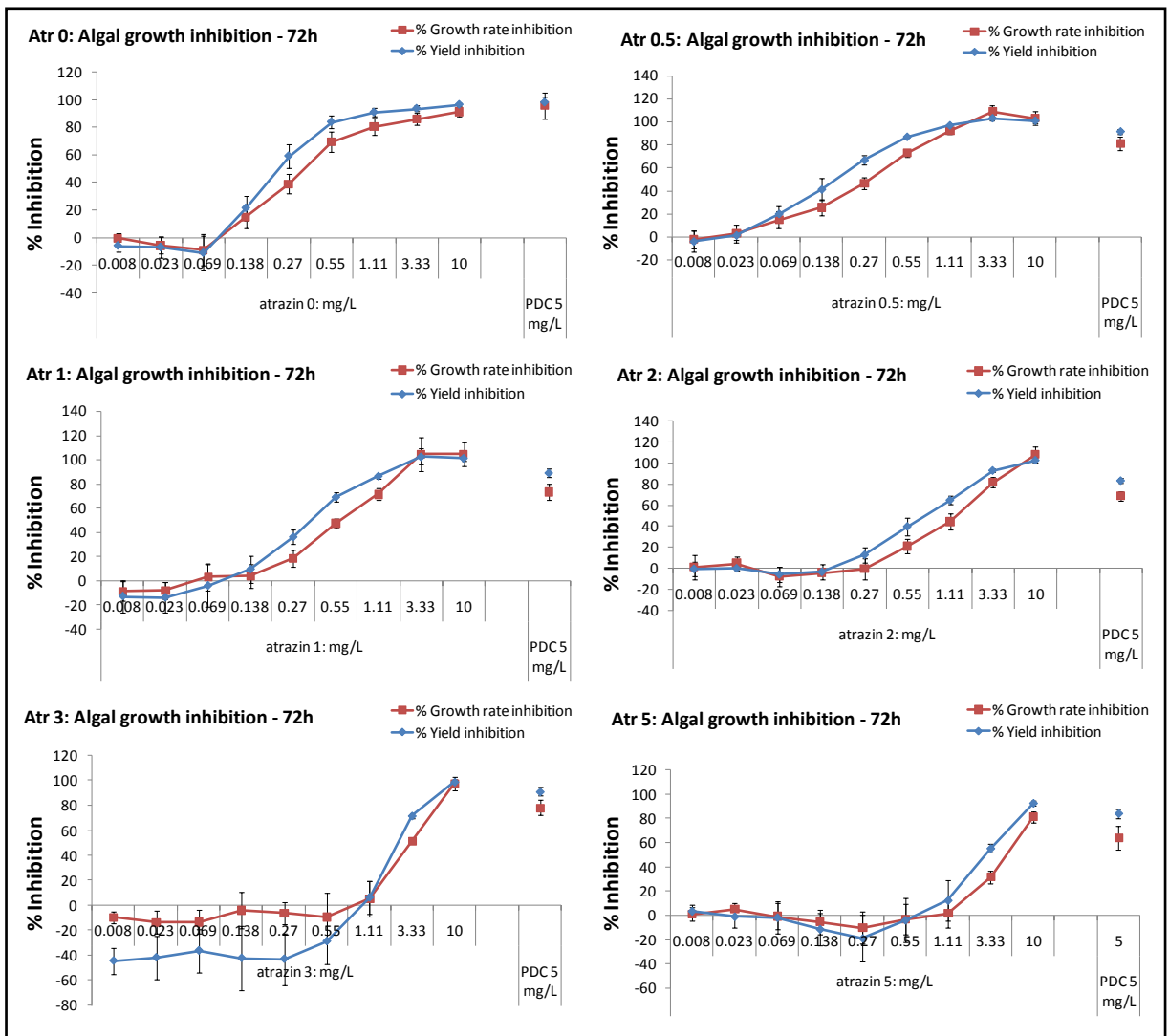
Inhibici růstu řas v prvním testu toxicity ozářených vzorků atrazinu ilustruje obr. 7.



Obr. 7: První test toxicity atrazinu – inhibice růstu řas.

Z obr. 7 je patrná inverzní závislost míry inhibice růstu řas na koncentraci vzorku u vzorků atr 2, atr 3 a atr 5. U nízkých koncentrací (0,08 – 0,27 mg/l) dochází až k 45 % inhibici růstu biomasy u vzorku atr 5, avšak u vyšších koncentrací (0,55 – 10 mg/l) je zřejmá daleko menší toxická odpověď až stimulace růstu řas.

Inhibici růstu řas v druhém testu toxicity ozářených vzorků atrazinu ilustruje obr. 8.



Obr. 8: Druhý test toxicity atrazinu – inhibice růstu řas.

Na obr. 8 je vidět celkový trend klesající toxicity s rostoucí dobou ozařování atrazinu (atr 0 → atr 5). U všech vzorků atr 0 – atr 5 je patrná pozitivní závislost míry inhibice růstu řas na koncentraci vzorku. U nejvyšší koncentrace (10 mg/l) bylo dosaženo 80 % inhibice růstu řas i u vzorku atr 5. V prvním testu nebylo dosaženo ani 50 % inhibice u nejvyšší koncentrace, a to u žádného ze vzorků atr 2, atr 3 a atr 5. Zajímavý trend pozorovaný v prvním testu, a sice střední míra toxicity při nižších koncentracích a stimulace růstu řas při vyšších koncentracích u vzorků atr 3 a atr 5, v druhém testu potvrzen nebyl.

5 Diskuze

Před ozařováním atrazinu byl testován světelný výkon lampy na jednotlivých pozicích magnetické míchačky. Měření ukázalo, že lampa má největší výkon na 3. pozici (uprostřed). Na sousedních pozicích (2. a 4.) se světelný výkon lampy liší minimálně, avšak na krajních pozicích (1. a 5.) je světelný výkon nižší, a to až 1,5 krát. Ideální by tedy bylo ozařovat atrazin pouze na třech prostředních pozicích magnetické míchačky, nicméně na základě předešlých experimentů (Šístková, 2011) bylo prokázáno, že nižší intenzita záření na krajních pozicích není rychlost určujícím faktorem pro kinetiku odbourávání atrazinu.

Kalibrační křivka roztoku atrazinu má lineární průběh v měřeném rozsahu koncentrací 0 – 66,5 mg/l, a to jak při dosazení hodnot ploch píků, tak i při dosazení hodnot výšek píků. Pišková (2003) ve své práci uvádí, že rozsah koncentrací roztoku atrazinu, při kterém má kalibrační křivka lineární průběh, je 0 – 50 mg/l, s mezí detekce za stejných podmínek při koncentraci 50 mg/l. Tyto hodnoty odpovídají námi zvolenému rozsahu koncentrací atrazinu.

Odbourávání atrazinu pomocí heterogenní fotokatalýzy na imobilizovaném TiO_2 je poměrně efektivní metoda, po 1. hodině ozařování došlo k úbytku téměř 50 % atrazinu. Odbourávání organického substrátu na vrstvě polovodiče je obecně působeno oxidací hydroxylovými radikály. Dalo by se tedy očekávat, že z kinetického hlediska bude křivka odbourávání vyhovovat kinetice 2. řádu nebo bude mít složitější charakter (necelistvý řád) vzhledem ke komplikovanějšímu odbourávání ve sledu několika následných reakcí. Jak ale ukazuje obr. 4, odbourávání atrazinu má exponenciální průběh. To ukazuje, že degradace atrazinu na TiO_2 probíhá podle kinetiky 1. řádu. Tento závěr je v souladu s pracemi Canleho et al. (2005) a Fenolla et al. (2012). Z této naměřené závislosti můžeme vyvodit, že se ve skutečnosti jedná o tzv. pseudoprvní řád, tedy systém, kde ostatní komponenty vstupující do reakce (jako např. vznikající hydroxylové radikály) jsou v reakčním systému v nadbytku a jejich koncentrace se v průběhu reakce díky neustálému obnovování ozařováním vodného roztoku s rozpuštěným kyslíkem nemění; rychlost reakce je pak dána pouze organickým substrátem, a proto pozorujeme kinetické chování odpovídající reakcím 1. řádu. Po vyhodnocení křivky degradace atrazinu byla stanovena rychlostní konstanta, která činí $0,694 \text{ hod}^{-1}$.

HPLC analýza ozářených vzorků atrazinu prokázala, že při odbourávání atrazinu vzniká řada meziproductů. V rané fázi ozařování vznikal zejména produkt s retenčním

časem 5,05 minut. Největší podíl z celkového množství produktů tvořily produkty s retenčními časy 2,95 a 3,27 minut. Při LC-MS analýze ozářených vzorků atrazinu byla naměřena detekovatelná množství následujících produktů fotokatalytické degradace atrazinu: desethylatrazinu, desisopropylatrazinu, desethyldeisopropylatrazinu a hydroxyderivátů těchto produktů. Vznik stejných degradačních produktů při odbourávání atrazinu potvrzují ve svých pracích Scribner et al. (2005) a Bianchi et al. (2006). Vzhledem k tomu, že při HPLC a LC-MS analýzách byly použity odlišné kolony, mobilní fáze i rozpouštědla, nelze porovnat výsledky obou analýz a přiřadit retenčním časům zjištěným při HPLC analýze konkrétní degradační produkty; dodatečné experimenty umožňující přiřazení meziproduktů detekovaných pomocí LC-MS analýzy jednotlivým produktům z HPLC dělení s UV detekcí budou součástí dalšího pokračování práce.

Test toxicity ozářených vzorků atrazinu pomocí zelené řasy *Pseudokirchneriella subcapitata* byl proveden ve dvou opakováních. Současně byl proveden i kontrolní test toxicity dichromanu draselného.

V prvním testu byla pozorována průkazně nižší toxicita u vzorků atrazinu ozářených 2; 3 a 5 hodin. Vzorky ozářené 0,5 a 1 hodinu vykazovaly podobnou míru toxicity jako neozářený vzorek atrazinu. Toxicita směsi atrazinu a jeho degradačních produktů se nesnižovala s rostoucí dobou ozařování v postupných krocích. K významnému snížení toxicity došlo po 2 hodinách ozařování. U vzorků ozářených 2; 3 a 5 hodin byla pozorována inverzní závislost míry inhibice růstu řas na koncentraci vzorku. U nízkých koncentrací (0,08 – 0,27 mg/l) docházelo až k 45 % inhibici růstu biomasy, avšak u vyšších koncentrací (0,55 – 10 mg/l) byla zřejmá daleko menší toxická odpověď až stimulace růstu řas.

V prvním testu ukázala kontrola pomocí dichromanu draselného sníženou senzitivitu řasové kultury, protože naměřené hodnoty IC₅₀ byly cca 2 – 4 krát vyšší, než jsou dlouhodobě průměrné hodnoty: 1,25 – 3 mg/l (Rábová & Bláha, 2013).

Stimulace růstu řas pozorovaná v prvním testu by mohla být důsledkem obohacení růstového média směsí degradačních produktů, která nese dusík dostupný pro asimilaci řas. Dalším možným vysvětlením může být snížená senzitivita řasové kultury, kvůli které došlo ke zkreslení naměřených hodnot IC₅₀ a IC₂₀.

Pro potvrzení pozorované stimulace byl proveden další pokus, k němuž byly znovu od začátku připraveny vzorky atrazinu a produktů vzniklých jeho fotodegradací na TiO₂. Řasová kultura byla stejně jako v prvním testu laboratorní kultura zelené řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*.

V tomto druhém testu toxicity byl pozorován celkový trend klesající toxicity s rostoucí dobou ozařování atrazinu (atr 0 → atr 5). U všech vzorků atr 0 – atr 5 byla patrná pozitivní závislost míry inhibice růstu řas na koncentraci vzorku. Zajímavý trend pozorovaný v prvním testu, a sice střední míra toxicity při nižších koncentracích a stimulace růstu řas při vyšších koncentracích u vzorků ozářených 2; 3 a 5 hodin, v druhém testu potvrzen nebyl.

Kontrola pomocí dichromanu draselného ukázala zvýšení senzitivity řasové kultury. Hodnoty IC₅₀ pro dichroman draselný se pohybovaly pouze mírně nad dlouhodobým průměrem, tudíž naměřené hodnoty IC₅₀ ozářených vzorků atrazinu v druhém testu jsou relevantnější, než hodnoty naměřené v prvním testu.

Dosažení rozdílných výsledků v obou testech toxicity může být vysvětleno zvýšením citlivosti řasové kultury v druhém testu toxicity. Oba experimenty potvrdily, že ozařování atrazinu UV zářením vede k postupnému poklesu toxicity se vzrůstající dobou ozařování. Výsledky druhého testu ukazují, že nedochází k tvorbě degradačních produktů, které by byly stejně či více toxické než samotný atrazin. K podobnému závěru došli ve své práci i Ralston-Hooper et al. (2009). Nižší toxicitu degradačních produktů atrazinu v porovnání s toxicitou samotného atrazinu potvrdil ve své práci také Stratton (1984), který použil odlišný test toxicity – Microtox®.

6 Závěr

Heterogenní fotokatalýza na imobilizovaném TiO₂ je vhodnou metodou odstraňování organických herbicidů z kontaminované vody. Degradace atrazinu na imobilizovaném TiO₂ je efektivní, po 1. hodině ozařování došlo k úbytku téměř 50 % přítomného atrazinu. Průběh odbourávání atrazinu odpovídá kinetice 1. řádu, rychlostní konstanta činí 0,694 hod⁻¹.

HPLC analýza ozářených vzorků atrazinu prokázala, že při odbourávání atrazinu vzniká řada meziproduktů. Největší podíl z celkového množství produktů tvořily produkty s retenčními časy 2,95 a 3,27 minut. Při LC-MS analýze ozářených vzorků atrazinu byla naměřena detekovatelná množství následujících produktů fotokatalytické degradace atrazinu: desethylatrazinu, desisopropylatrazinu, desethyldeisopropylatrazinu a hydroxyderivátů těchto produktů. Ve vzorcích byl také přítomen samotný atrazin. Vzhledem k odlišným podmínkám HPLC a LC-MS analýzy nebylo možné přiřadit jednotlivým retenčním časům zjištěným při HPLC analýze konkrétní degradační produkty.

Toxicita neozářeného atrazinu a atrazinu ozářeného 0,5; 1; 2; 3 a 5 hodin byla testována pomocí testu inhibice růstu řasy *Pseudokirchneriella subcapitata*, a to ve dvou opakováních. Oba experimenty potvrdily, že ozařování atrazinu UV zářením vede k postupnému poklesu toxicity se vzrůstající dobou ozařování. Výsledky druhého testu toxicity ukázaly, že nedochází k tvorbě degradačních produktů, které by byly stejně či více toxické než samotný atrazin.

7 Literatura

ABATE G., MASINI J. C. Sorption of atrazine, propazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine onto organovermiculite. *J. Braz. Chem. Soc.* 16(5), 936-943, 2005a.

BAKER K., SMITH R. C., GREEN A. E. Middle ultraviolet radiation reaching the ocean surface. *Photochem. Photobiol.* 32, 367-374, 1980.

BIANCHI C. L., PIROLA C., RAGAINI V., SELLI E. Mechanism and efficiency of atrazine degradation under combined oxidation processes. *Appl. Catal. B-Environ.* 64(1-2), 131-138, 2006.

BINET F., KERSANTÉ A., MUNIER-LAMY C., LE BAYON R.-C., BELGY M.-J., SHIPITALO M. J. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. *Soil Biol. Biochem.* 38(6), 1255-1263, 2006.

BOGAERTS P., BOHATIER J., BONNEMOY F. Use of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the assessment of toxicity and quantitative structure – activity relationships of xenobiotics: Comparison with the Microtox test. *Ecotox. Environ. Safe.* 49, 293-301, 2001.

BROWN L. M., BLAIR A., GIBSON R., EVERETT G. D., CANTOR K. P., SCHUMAN L. M., BURMEISTER L. F., VAN LIER S. F., DICK F. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* 50, 6585-6591, 1990.

BROWN L. M., BURMEISTER L. F., EVERETT G. D., BLAIR A. Pesticide exposures and multiple myeloma in Iowa men. *Cancer Cause. Control* 4(2), 153-156, 1993.

BULICH A. A. Use of luminiscent bacteria for determining toxicity in aquatic environment. *Aquat. Toxicol.* Second Conference. ASTM STP667. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 171-180, 1979.

CAMPANELLA L., VITALIANO R. Atrazine toxicity reduction following H₂O₂/TiO₂-photocatalyzed reaction and comparison with H₂O₂-photolytic reaction. *Ann. Chim.-Rome* 97, 123-134, 2007.

CANLE L. M., FERNÁNDEZ M. I., SANTABALLA J. A. Developments in the mechanism of photodegradation of triazine-based pesticides. *J. Phys. Org. Chem.* 18, 148-155, 2005.

CANTOR K. P., BLAIR A., EVERETT G., GIBSON R., BURMEISTER L. F., BROWN L. M., SCHUMAN L., DICK F. R. Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res.* 52, 2447-2455, 1992.

CLAUSEN L., FABRICIUS I., MADSEN L. Adsorption of pesticides onto quartz, calcite, kaolinite, and α -alumina. *J. Environ. Qual.* 30(3), 846-857, 2001.

DE ROOS A. J., ZAHM S. H., CANTOR K. P., WEISENBURGER D. D., HOLMES F. F., BURMEISTER L. F., BLAIR A. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup. Environ. Med.* 60, e11, 2003.

DOJLIDO J., BEST G. A. *Chemistry of Water and Water Pollution*. Chichester: Ellis Horwood Limited, 1993, 261-267.

European Commission. Decision 2004/248/EC: Commission Decision of 10 March 2004 concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance. Dostupné z: [\[http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32004D0248&model=guichett\]](http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&lg=EN&numdoc=32004D0248&model=guichett). Citováno: [2014-02-20].

FARRÉ M. J., FRANCH M. I., MALATO S., AYLLÓN J. A., PERAL J., DOMÉNECH X. Degradation of some biorecalcitrant pesticides by homogeneous and heterogeneous photocatalytic ozonation. *Chemosphere*. 58(8), 1127-1133, 2005.

FENOLL J., HELLÍN P., MARTÍNEZ C. M., FLORES P., NAVARRO S. Semiconductor-sensitized photodegradation of s-triazine and chloroacetanilide herbicides in leaching water using TiO₂ and ZnO as catalyst under natural sunlight. *J. Photoch. Photobio. A*. 238, 81-87, 2012.

GRANADOS-OLIVEROS G., PÁEZ-MOZO E. A., ORTEGA F. M., FERRONATO C., CHOVELON J. M. Degradation of atrazine using metalloporphyrins supported on TiO₂ under visible light irradiation. *Appl. Catal. B-Environ*. 89(3-4), 448-454, 2009.

GRCIC I., KOPRIVANAC N., VUJEVIC D., PAPIC S. Removal of atrazine from simulated groundwater by AOTs. *J. Adv. Oxid. Technol*. 11(1), 91-96, 2008.

HAYES T. B., COLLINS A., LEE M., MENDOZA M., NORIEGA N., STUART A. A., VONK A. Hermaphroditic, demasculinized frogs following exposure to the herbicide, atrazine, at ecologically relevant doses. *Proc. Nat. Acad. Sciences (USA)* 99(8), 5476-5480, 2002.

HERRMANN J.-M. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catal. Today* 53, 115-129, 1999.

HOAR S. K., BLAIR A., HOLMES F. F., BOYSEN C. D., ROBEL R. J., HOOVER R., FRAUMENI J. F. Agricultural herbicide use and risk of lymphoma and soft tissue sarcoma. *JAMA* 256(9), 1141-1147, 1986.

HOPENHAYN-RICH C., STUMP M. L., BROWNING S. R. Regional assessment of atrazine exposure and incidence of breast and ovarian cancers in Kentucky. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 42, 127-136, 2002.

CHEN X., MAO S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem. Rev*. 107, 2891-2959, 2007.

JOWA L., HOWD R. Should atrazine and related chlorotriazines be considered carcinogenic for human health risk assessment?. *J. Environ. Sci. Health, Part C* 29, 91-144, 2011.

KEXIN L., HUANG Y., YAN L., DAI Y., XUE K., GUO H., HUANG Z., XIONG J. Simulated sunlight photodegradation of aqueous atrazine and rhodamine B catalyzed by the ordered mesoporous graphene-titania/silica composite material. *Catal. Commun.* 18, 16-20, 2012.

KLEMENTOVA S., HAMSOVA K. Catalysis and sensitization in photochemical degradation of triazines. *Res. J. Chem. Environ.* 4, 7-12, 2000.

KLEMENTOVÁ Š. A critical view of the photoinitiated degradation of herbicides. *Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds*. Mohammed Nagnib Abd El-Ghany Hasaneen. Rijeka: Intech, 2011, 297-314.

KONSTANTINOOU I. K., ALBANIS T. A. Photocatalytic transformation of pesticides in aqueous titanium dioxide suspensions using artificial and solar light: intermediates and degradation pathways. *Appl. Catal. B-Environ.* 42, 319-335, 2003.

KROSS B. C., VERGARA A., RAUE L. E. Toxicity assessment of atrazine, alachlor, and carbofuran and their respective environmental metabolites using Microtox. *J. Toxicol. Env. Health* 37(1), 149-159, 1992.

LAPERTOT M., EBRAHIMI S., OLLER I., MALDONADO M. I., GERNJAK W., MALATO S., PULGARÍN C. Evaluating Microtox© as a tool for biodegradability assessment of partially treated solutions of pesticides using Fe³⁺ and TiO₂ solar photoassisted processes. *Ecotox. Environ. Safe.* 69(3), 546-555, 2008.

LIN C. H., LERCH R. N., GARRETT H. E., GEORGE M. F. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by forage grasses: transformation, uptake, and detoxification. *J. Environ. Qual.* 37(1), 196-206, 2008.

MALATO S., AGUERA A. Detoxification of pesticide in water using solar photocatalysis. *Acs. Sym. Ser.* 863, 113-126, 2004.

MAYHEW D. Twenty four month combined oral toxicity and oncogenicity study in rats utilizing Atrazine Technical. Ciba-Geigy Study No. 410-1102. Study conducted by American Biogenics Corporation for Ciba-Geigy. 1986. EPA MRID 40629302. DPR vol 220-064-078 # 044294-044308. Dostupné v: [http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-080803_6-Jun-88_110.pdf]. Citováno: [2014-02-20].

MICHELOVÁ M. Farmaka jako novodobé kontaminanty vodního prostředí a jejich účinky na necílové organismy. Diplomová práce. Přf MU, Brno, 62-63, 2013.

MILLS P. K., YANG R. Regression analysis of pesticide use and breast cancer incidence in California Latinas. *J. Environ. Health* 68(6), 15-22, 2006.

MINERO C., PRAMAURO E., PELIZZETTI E. Photosensitized transformations of atrazine under simulated sunlight in aqueous humid acid solution. *Chemosphere*. 24(11), 1597-1606, 1992.

MOORE W. J. *Fyzikální chemie*. Praha: SNTL, 1979, 508.

MORSETH S. Chronic (12 – 24 month) study in rats with atrazine technical. Covance Laboratories Inc. Study # 2386-108. 1998. EPA MRID 44544701. DPR vol 220-511 # 160554. Dostupné v: [http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-080803_4-Jan-99_254.pdf]. Citováno: [2014-02-20].

MUDHOO A., GARG V. K. Sorption, transport and transformation of atrazine in soils, minerals and composts: A review. *Pedosphere* 21(1), 11-25, 2011.

MUIR K., RATTANAMONGKOLGUL S., SMALLMAN-RAYNOR M., THOMAS M., DOWNER S., JENKINSON C. Breast cancer incidence and its possible spatial association with pesticide application in two counties of England. *Public Health* 118, 513-520, 2004.

O'CONNOR J., MCCORMICK G., GREEN J. Atrazine technical: Chronic toxicity study in dogs. Ciba-Geigy Study No. 2-001-31. EPA MRID 40431301. DPR vols 220-099-129#62676, 87668.1987. Dostupné v:

[http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-080803_11-Jun-96_243.pdf]. Citováno: [2014-02-20].

OLSBURG C. Atrazine: Chemical Summary. *U.S. EPA: Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health* [online]. 2007 [cit. 2013-12-01]. Dostupné z: [http://www.epa.gov/teach/chem_summ/Atrazine_summary.pdf]. Citováno: [2014-02-20].

PANSHIN S. Y., CARTER D. S., BAYLESS E. R. Analysis of atrazine and four degradation products in the pore water of the vadose zone, Central Indiana. *Environ. Sci. Technol.* 34(11), 2131-2137, 2000.

PÍŠKOVÁ V. Fotolýza triazinových pesticidů a jejich metabolitů. Magisterská práce. Přf JU, České Budějovice, 12, 2003.

PRATA F., LAVORENTI A., VANDERBORGHT J., BURAUDEL P., VEREECKEN H. Miscible displacement, sorption and desorption of atrazine in a Brazilian oxisol. *Vadose Zone J.* 2(4), 728-738, 2003.

QIN C., YANG S., SUN C., ZHAN M., WANG R., CAI H., ZHOU J. Investigation of the effects of humic acid and H₂O₂ on the photocatalytic degradation of atrazine assisted by microwave. *Front. Environ. Sci. Eng.* 4(3), 321-328, 2010.

RÁBOVÁ Z., BLÁHA L. Report on algal toxicity testing of atrazine samples from Doc. Šárka Klementová, JCU. RECETOX, Přf MU, Brno, 2013.

RALEBITSO T. K., SENIOR E., VAN VERSEVELD H. W. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation* 13(1), 11-19, 2002.

RALSTON-HOOPER K., HARDY J., HAHN L., OCHOA-ACUNA H., LEE L. S., MOLLENHAUER R., SEPÚLVEDA M. S. Acute and chronic toxicity of atrazine and its metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine on aquatic organisms. *Ecotoxicology* 18(7), 899-905, 2009.

RUSIECKI J. A., DE ROOS A., LEE W. J., DOSEMECI M., LUBIN J., HOPPIN J. A., BLAIR A., ALAVANJA M. C. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to atrazine in the Agricultural Health Study. *JNCI* 96(18), 1375-1382, 2004.

SANDERSON J. T., SEINEN W., GIESY J. P., VAN DEN BERG M. 2-Chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity? *Toxicol. Sci.* 54, 121-127, 2000.

SCRIBNER E. A., THURMAN E. M., GOOLSBY D. A., BATTAGLIN W. A. Summary of significant results from studies of triazine herbicides and their degradation products in surface water, ground water, and precipitation in the midwestern United States during the 1990s: Scientific investigations report 2005-5094. Reston, Virginia: U.S. Geological Survey, 2005, 1-27.

STEVENS J. T., BRECKENRIDGE C. B., WETZEL L. T., GILLIS J. H., LUEMPFT L. G. III, ELDRIDGE J. C. Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to certain triazine herbicides. *J. Toxicol. Environ. Health* 43(2), 139-153, 1994.

STRATTON G. W. Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 13, 35-42, 1984.

ŠÍSTKOVÁ L. Odbourávání rezistentních pesticidů pomocí fotochemické oxidace na polovodičích. Bakalářská práce. PřF JU, České Budějovice, 20, 2011.

TANG J., HOAGLAND K. D., SIEGFRIED B. D. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(6), 1085-1090, 1998.

THORPE N., SHIRMOHAMMADI A. Herbicides and nitrates in groundwater of Maryland and childhood cancers: A geographic information systems approach. *J. Environ. Sci. Health, Part C* 23(2), 261-278, 2005.

VAN LEEUWEN J. A., WALTNER-TOEWS D., ABERNATHY T., SMIT B., SHOUKRI M. Associations between stomach cancer incidence and drinking water contamination with atrazine and nitrate in Ontario (Canada) agroecosystems, 1987 – 1991. *Int. J. Epidemiol.* 28(5), 836-840, 1999.

WEISENBURGER D. D. Environmental epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma in Eastern Nebraska. *Am. J. Ind. Med.* 18(3), 303-305, 1990.

WETZEL L. T., LUEMPERT L. G., BRECKENRIDGE C. B., TISDEL M. O., STEVENS J. T., THAKUR A. K., EXTROM P. J., ELRIDGE J. C. Chronic effects of atrazine on estrus and mammary tumor formation in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health* 43(2), 169-182, 1994.

ZALESKA A. Doped-TiO₂: A Review. *Recent Pat. Eng.* 2, 157-164, 2008.

8 Přílohy

Příloha 1: Složení ZBB média.

Z medium:

	Zásobní roztok	Koncentrace zásobního roztoku	Objem zásobního roztoku pro přípravu 1 l média
No.1	NaNO ₃	46,7 g/l	10 ml
No.2	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	5,9 g/l	10 ml
No.3	K ₂ HPO ₄	3,1 g/l	10 ml
No.4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,5 g/l	10 ml
No.5	Na ₂ CO ₃	2,1 g/l	10 ml
No.6	Fe-EDTA	do 500 ml	10 ml
	FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,138 mg v 5ml 0,1N HCl	
	Chelaton III	0,186 mg v 5ml 0,1N HCl	
No.7	Gaffronovy mikročástice	do 100 ml	0,08 ml
	NiSO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ·6H ₂ O	19,8 mg	
	V ₂ O ₄ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	3,1 mg	
	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ ·4H ₂ O	8,8 mg	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	28,7 mg	
	Cd(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	15,4 mg	
	Al ₂ (SO ₄) ₃ K ₂ SO ₄ ·24H ₂ O	47,4 mg	
	Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	3,3 mg	
	KBr	11,9 mg	
	H ₃ BO ₃	31 mg	
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	223 mg	
	Cr(NO ₃) ₃ ·7H ₂ O	3,70 mg	
	Co(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	14,6 mg	
	KI	8,3 mg	
	Cu SO ₄ ·5H ₂ O	12,5 mg	

BB medium:

	Zásobní roztok	Koncentrace zásobního roztoku	Objem zásobního roztoku pro přípravu 1 l média
No.1	NaNO ₃	25 g/l	10 ml
No.2	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,5 g/l	10 ml
No.3	K ₂ HPO ₄	7,5 g/l	10 ml
No.4	KH ₂ PO ₄	17,5 g/l	10 ml
No.5	MgSO ₄ .7H ₂ O	7,5 g/l	10 ml
No.6	NaCl	2,5 g/l	10 ml
No.7	EDTA	5,0 g/100 ml	1 ml
No.8	H ₃ BO ₃	1,142 g/100 ml	1 ml
No.9	FeSO ₄ .7H ₂ O	do 100 ml	1 ml
	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,498 g	
	H ₂ SO ₄ konc.	0,1 ml	
No.10	Mikročástice	do 100 ml	1 ml
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,882 g	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,144 g	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,242 g	
	nebo MoO ₃	0,071 g	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,157 g	
	Co(NO ₃) ₂ .H ₂ O	0,049 g	