

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KATJA PERC

**FOTOKATALITSKO ODSTRANJEVANJE BISFENOLOV A, F IN AF V
PRETOČNEM REAKTORJU Z IMOBILIZIRANIM KATALIZATORJEM NA
OSNOVI TiO_2**

**PHOTOCATALYTIC REMOVAL OF BISFENOLS A, F AND AF IN A MIXED
FLOW REACTOR WITH IMMOBILIZED CATALYST BASED ON TiO_2**

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2014

Raziskovalno delo za magistrsko nalogo sem opravila na Kemijskem inštitutu, v Laboratoriju za okoljske vede in inženirstvo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Boštjana Erjavca. V zgoraj navedeni ustanovi so bili izvedeni vsi fotokatalitski poskusi, kromatografske, spektroskopske, elementne analize ter metode karakterizacije katalizatorja.

Na začetku študija nam je profesor dejal, da bo naš bodoči poklic delo, s katerim bomo osmislili svoje življenje, da bomo ne glede na področje dela vedno na nek način pomagali soljudem, delali za njihovo dobro počutje (blaginjo). Rada bi se torej zahvalila prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., da mi je omogočila izvedbo izbrane magistrske naloge ter tako potrdila profesorjeve besede in utrdila moje prepričanje, da sem si izbrala pravi poklic zase. Prav tako bi se rada mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolec in somentorju dr. Boštjanu Erjavcu zahvalila za pomoč, nasvete in usmerjanje pri praktičnem delu in pri pisanju magistrske naloge. Iskrena zahvala za pomoč pri laboratorijskih poskusih tudi vsem ostalim sodelavcem Laboratorija za okoljske vede in inženirstvo na Kemijskem inštitutu, še posebej dr. Tatjani Tišler. Posebej se zahvaljujem tudi svoji družini za vso podporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. in somentorstvom dr. Boštjana Erjavca.

Ljubljana, 2014

Katja Perc

Kazalo vsebine

Kazalo vsebine	iii
Kazalo slik	v
Kazalo preglednic	vii
Kazalo prilog	vii
Povzetek	viii
Abstract	x
Seznam okrajšav	xii
1 Uvod	1
1.1 Hormonski motilci	1
1.1.1 Bisfenoli A, F in AF kot hormonski motilci	2
1.1.1.1 Bisfenol A (BPA)	3
1.1.1.2 Bisfenol F (BPF)	6
1.1.1.3 Bisfenol AF (BPAF)	6
1.2 Prisotnost bisfenolov v okolju	8
1.2.1 Obdelava odpadnih voda	8
1.2.1.1. Napredni oksidacijski procesi (NOP)	8
1.2.1.1.1 Fotokataliza	9
1.2.1.1.2 Tipi idealnih reaktorjev za vodenje reakcije v tekočini	10
1.2.1.1.3 Uporaba TiO ₂ kot katalizatorja v fotolizi	11
1.2.2 Testi strupenosti	13
1.2.2.1 Daphnia magna	14
1.2.2.2 Vibrio fischeri	15
2 Namen dela	17
3 Materiali in metode	19
3.1 Priprava raztopin BPA in njegovih analogov	19
3.2 Priprava katalizatorja	19
3.3 Fotokataliza	21
3.3.1 Fotokatalitska oksidacija bisfenolov v šaržnem reaktorju	21
3.3.2 Fotokatalitska oksidacija bisfenolov v pretočnem mešalnem reaktorju	22
3.3.2.1 24-urna fotokatalitska oksidacija bisfenolov	22
3.3.2.2 25-urni test stabilnosti katalizatorja	24
3.4 Karakterizacija katalizatorja	25

3.4.1 XRD	25
3.4.2 UV-VIS-DR.....	25
3.4.3 CHNS.....	26
3.4.5 SEM.....	26
3.5 Vrednotenje učinkovitosti fotokatalitskih poskusov.....	26
3.5.1 Vrednotenje učinkovitosti fotokatalitskih poskusov s kemijskimi analiznimi metodami	26
3.5.1.1 HPLC	26
3.5.1.2 UV/VIS spektrofotometrija.....	27
3.5.1.3 TOC	28
3.5.1.4 Ionska kromatografija	29
3.5.2 Vrednotenje učinkovitosti fotokatalitskih poskusov z biološkimi testi strupenosti	30
3.5.2.1 Akutni testi strupenosti z vodno bolho <i>Daphnia magna</i>	30
3.5.2.2 Akutni testi strupenosti z bakterijo <i>Vibrio fischeri</i>	32
4 Rezultati in razprava.....	35
4.1 Karakterizacija imobiliziranega katalizatorja na osnovi TiO_2 z rentgensko praškovno difrakcijo (XRD), UV-VIS difuzno refleksijo (UV-VIS-DR), CHNS analizo in vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM).....	35
4.2 Fotokatalitski poskusi, izvedeni v šaržnem in pretočnem mešalnem reaktorju	39
5 Sklep	58
6 Literatura.....	61
Priloge	67

Kazalo slik

Slika 1: Bisfenol A (10)	3
Slika 2: Bisfenol F (17)	6
Slika 3: Bisfenol AF (20)	7
Slika 4: Kadička za impregniranje steklenih vlaken s pripravljeno bistro raztopino TiO_2	20
Slika 5: Sestavljen sistem za izvedbo fotokatalitske oksidacije v pretočnem mešalnem reaktorju.	24
Slika 6: Shema termobloka.....	33
Slika 7: Praškovni difraktogram štirih vzorcev: steklena vlakna; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 pred uporabo; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 po 4-ih in po 24-ih urah uporabe v območju $2\theta = 5-90^\circ$	35
Slika 8: UV-VIS-DR spekter slepe ter štirih vzorcev: steklena vlakna; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 pred uporabo; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 po 4-ih in po 24-ih urah uporabe.	36
Slika 9: Posnetki vrstične elektronske mikroskopije s prikazom a) sveže pripravljenega katalizatorja (steklena vlakna + TiO_2 _pred uporabo), b) katalizatorja, ki se je uporabljal za 4-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, in c) katalizatorja, ki se je uporabljal za 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, pri 25000-kratni povečavi.....	38
Slika 10: a) Fotokatalitska razgradnja BPA v šaržnem reaktorju v prisotnosti le UV svetlobe (slepa) in razgradnja v prisotnosti na steklena vlakna imobiliziranega TiO_2 , obsevanega z UV svetlobo za 4 in 6 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 3 vzorcev: izhodiščne raztopine BPA (10 mg/L), raztopine po 4-urni in raztopine po 6-urni fotokatalitski reakciji.	39
Slika 11: a) Fotokatalitska razgradnja BPF v šaržnem reaktorju v prisotnosti le UV svetlobe (slepa) in razgradnja v prisotnosti na steklena vlakna imobiliziranega TiO_2 , obsevanega z UV svetlobo za 4 in 6 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 3 vzorcev: izhodiščne raztopine BPF (8,77 mg/L), raztopine po 4-urni in raztopine po 6-urni fotokatalitski reakciji.	40
Slika 12: a) Fotokatalitska razgradnja BPAF v šaržnem reaktorju v prisotnosti le UV svetlobe (slepa) in razgradnja v prisotnosti na steklena vlakna imobiliziranega TiO_2 , obsevanega z UV svetlobo za 4, 6 in 8 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 4 vzorcev: izhodiščne raztopine BPAF (14,73 mg/L) ter raztopin po 4-, 6- in 8-urni fotokatalitski reakciji.	41
Slika 13: a) Fotokatalitska razgradnja vseh treh analogov ob 4 h obsevanju z UV svetlobo. b) Primerjava odstranitve celotnega organskega ogljika (TOC) pri različno dolgih fotokatalitskih poskusih, izvedenih v šaržnem reaktorju, za vse tri obravnavane bisfenole.	42
Slika 14: Odstotek negibnih vodnih bolh <i>Daphnia magna</i> po a) 24-ih in b) 48-ih urah v kontroli, vzorcih izhodiščnih raztopin bisfenolov (BPA = 10 mg/L; BPF = 8,77 mg/L; BPAF = 14,73 mg/L) in raztopinah po 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih reakcijah.....	43
Slika 15: Odstotek negibnih vodnih bolh in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini bisfenola AF in končnih raztopinah 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih oksidacij.	45
Slika 16: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah <i>Vibrio fischeri</i> ob izpostavitvi izhodiščnim raztopinam bisfenolov A, F in AF ter njihovim končnim raztopinam fotokatalitskih reakcij.....	46
Slika 17: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah <i>Vibrio fischeri</i> in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini BPAF ter raztopinah po 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih oksidacijah.....	47

Slika 18: a) Fotokatalitska razgradnja BPA v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 24 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPA (10 mg/L), raztopine pretokov 10 mL/min (1,5 h), 5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (9 h), 1,66 mL/min (13,5 h), 1,66 mL/min (18 h) in 1,66 mL/min (24 h).	47
Slika 19: a) Fotokatalitska razgradnja BPF v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 24 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPF (8,77 mg/L), raztopine pretokov 10 mL/min (1,5 h), 5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (9 h), 1,66 mL/min (13,5 h), 1,66 mL/min (18 h) in 1,66 mL/min (24 h).	48
Slika 20: a) Fotokatalitska razgradnja BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 24 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPAF (14,73 mg/L), raztopine pretokov 10 mL/min (1,5 h), 5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (9 h), 1,66 mL/min (13,5 h), 1,66 mL/min (18 h) in 1,66 mL/min (24 h).	49
Slika 21: a) Fotokatalitska razgradnja vseh treh analogov ob 24 h obsevanju z UV svetlobo. b) Primerjava odstranitve celotnega organskega ogljika (TOC) pri različno dolgih fotokatalitskih reakcijah, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju, za vse tri obravnavane bisfenole.....	50
Slika 22: Odstotek negibnih vodnih bolh po a) 24-ih in b) 48-ih urah v kontroli, vzorcih izhodiščnih raztopin analogov (BPA = 10 mg/L; BPF = 8,77 mg/L; BPAF = 14,73 mg/L) in raztopinah posameznih pretokov 24-urnih fotokatalitskih oksidacij.	51
Slika 23: Odstotek negibnih vodnih bolh in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini bisfenola AF in raztopinah posameznih pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije.	52
Slika 24: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah <i>Vibrio fischeri</i> ob izpostavitvi izhodiščnim raztopinam bisfenolov A, F in AF ter njihovim raztopinam posameznih pretokov 24-urnih fotokatalitskih reakcij.....	53
Slika 25: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah <i>Vibrio fischeri</i> in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini BPAF ter njenih raztopinah posameznih pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije.....	54
Slika 26: a) Fotokatalitska razgradnja BPA v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 25 ur, pri dveh različnih pretokih, najprej pri pretoku 2,5 mL/min, nato pri 1,66 mL/min ter na koncu zopet pri 2,5 mL/min za preverjanje stabilnosti delovanja katalizatorja. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPA (10 mg/L), raztopine pretokov 2,5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (5 h), 1,66 mL/min (9,5 h), 1,66 mL/min (20 h), 2,5 mL/min (24 h) in 2,5 mL/min (25 h).	54
Slika 27: Odstranitev celotnega organskega ogljika (TOC) pri posameznih pretokih 25-urnega testa stabilnosti katalizatorja, izvedenega v pretočnem mešalnem reaktorju, za BPA.	55
Slika 28: a) Kinetika fotokatalitske pretvorbe BPA v pretočnem mešalnem reaktorju-prikaz odvisnosti med logaritmom povprečne koncentracije posameznega pretoka ($\log(c_A)$) in logaritmom hitrosti reakcije ($\log(-r_A)$). b) Kinetika fotokatalitske pretvorbe BPF v pretočnem mešalnem reaktorju-prikaz odvisnosti med logaritmom povprečne koncentracije posameznega pretoka ($\log(c_A)$) in logaritmom hitrosti reakcije ($\log(-r_A)$). c) Kinetika fotokatalitske pretvorbe BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju-prikaz odvisnosti med logaritmom povprečne koncentracije posameznega pretoka ($\log(c_A)$) in logaritmom hitrosti reakcije ($\log(-r_A)$).....	56

Kazalo preglednic

Preglednica I: Koncentracija sproščenega BPA v vodo iz nove plastenke in plastenke, ki se je uporabljala 6 mesecev, pri 40 in 95-ih °C. (11)	4
Preglednica II: Najbolj pogosto uporabljeni NOP za obdelavo vod in odpadnih vod. (5)	9
Preglednica III: Vrednosti 24 h in 48 h EC50, pridobljene s testiranjem akutne strupenosti BPA različnih raziskovalcev. (24,43).....	15
Preglednica IV: Shema jemanja vzorcev za HPLC analizo pri treh različno dolgih fotokatalitskih poskusih.	22
Preglednica V: Shema načrta fotokatalitskih poskusov, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju.....	23
Preglednica VI: Valovna dolžina in energija prepovedanega pasu za tri vzorce: sveže pripravljen katalizator; katalizator, ki se je uporabljal za 4-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA; katalizator, ki se je uporabljal za 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA.....	36
Preglednica VII: S CHNS elementnim analizatorjem izmerjen odstotek ogljika na uporabljenih katalizatorjih v šaržnem reaktorju (4- in 6-urna fotokatalitska oksidacija BPA in BPF ter 4-, 6- in 8-urna fotokatalitska oksidacija BPAF) in pretočnem mešalnem reaktorju (24-urna fotokatalitska oksidacija BPA, BPF in BPAF ter 25-urni test stabilnosti katalizatorja).	37
Preglednica VIII: Odstotek prostega in vezanega F ⁻ v izhodiščni raztopini BPAF in raztopinah po različno dolgih fotokatalitskih oksidacijah, izvedenih v šaržnem reaktorju.....	43
Preglednica IX: Odstotek prostega in vezanega F ⁻ v izhodiščni raztopini BPAF in raztopinah po različno dolgih fotokatalitskih oksidacijah, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju.....	50
Preglednica X: Izračunane konverzije.....	57

Kazalo prilog

Priloga I: Shematski prikaz mehanizma fotokatalitske razgradnje BPA z uporabo TiO ₂ (32)	67
Priloga II: Shematski prikaz fotokatalitskega mehanizma TiO ₂ (36).....	67

Povzetek

Voda je glavni vir življenja. Ravno zato si mora človeštvo, ki je glavni stroj razvoja tehnologije oziroma industrije na splošno, in tako tudi vodilni onesnaževalec, prizadevati za zmanjševanje onesnaževanja in izboljšanje procesov čiščenja odpadnih voda iz industrijskih obratov in odlagališč komunalnih odpadkov. Ena izmed skupin onesnažil so bisfenoli, kamor sodijo tudi bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF) in bisfenol AF (BPAF). Gre za hormone motilce, ki so bili v povprečju po svetu sicer zaznani v nizkih koncentracijah, vendar so dokazali, da lahko že pri teh izkazujejo škodljive učinke na endokrini sistem. Velik potencial pri odstranjevanju škodljivih snovi kažejo napredni oksidacijski sistemi, znotraj katerih vse več pozornosti pridobiva heterogena fotokatalitska oksidacija z najpogosteje uporabljenim katalizatorjem TiO_2 , ki ga med drugim odlikuje visok oksidacijski potencial.

Glavni cilj magistrske naloge je bil pripraviti TiO_2 , imobiliziran na steklena vlakna, le-tega uporabiti za fotokatalitsko odstranjevanje BPA, BPF in BPAF najprej v šaržnem (4-, 6- in 8-urni poskusi) in nato še v pretočnem mešalnem reaktorju (24-urni poskusi) ter preveriti strupenost pripravljenih izhodiščnih raztopin in raztopin po fotokatalitski oksidaciji. Zanimalo nas je, kakšen vpliv na vse to imajo razlike v zgradbi analogov. Učinkovitost fotokatalitske razgradnje smo vrednotili s kemijskimi analiznimi metodami in biološkimi testi strupenosti. Med samim potekom fotokatalitske reakcije smo s HPLC spremljali padec koncentracije posameznega bisfenola, v samih končnih raztopinah ter v raztopinah posameznih pretokov pa smo s TOC analizatorjem spremljali odstranjevanje TOC (celotnega organskega ogljika) v primerjavi z izhodiščno raztopino ter z UV-VIS spektrofotometrijo določali absorpcijske lastnosti produktov. Z ionsko kromatografijo smo v raztopinah 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih oksidacij BPAF ter v raztopinah posameznih pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije BPAF določali koncentracijo prostega fluoridnega iona. Nihče si ne želi, da bi se izhodiščne raztopine tekom fotokatalitskih reakcij pretvorile v še bolj strupne spojine, zato smo testirali strupenost nastalih produktov ter začetnih raztopin bisfenolov, in sicer na dveh testnih organizmih, vodnih bolhah *Daphnia magna* in bioluminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri*. Na koncu smo s 25-urno fotokatalitsko razgradnjo BPA v pretočnem mešalnem reaktorju preverili stabilnost uporabljenega katalizatorja.

Tako v šaržnem kot v pretočnem mešalnem reaktorju se je razgradnja BPAF razlikovala od razgradnje BPA in BPF. Medtem ko smo v šaržnem reaktorju po 6-ih urah uspeli popolnoma mineralizirati BPA in BPF do CO_2 in H_2O , nam to pri BPAF ni uspelo niti po 8-ih urah, saj se je v tem času odstranilo le 85,2 % TOC. Nekoliko drugačno je bilo odstranjevanje TOC pri 24-urnih fotokatalitskih oksidacijah, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju. Največ TOC se je odstranilo pri BPA, malo manj pri BPF, najslabše pa je bilo odstranjevanje pri BPAF. 25-urni test stabilnosti TiO_2 , imobiliziranega na steklena vlakna, je razkril, da ima tako pripravljen katalizator zelo stabilno delovanje. Rezultati testov strupenosti so bili v skladu z rezultati TOC analize. Raztopine po fotokatalitski reakciji BPA in BPF so izkazovale zelo nizko strupenost na vodne bolhe in bioluminiscenčne bakterije, bolj je bila strupena izhodna raztopina BPAF ter njene raztopine po fotokatalitski oksidaciji, še posebej raztopine po 24-urni fotokatalitski reakciji. Razlika v strupenosti med na eni strani BPA in BPF ter na drugi BPAF je bila pri vodnih bolhah veliko večja kot pri bakterijah. Torej razlike v zgradbi obravnavanih bisfenolov vplivajo na učinkovitost fotokatalitskega odstranjevanja le-teh in tudi na strupenost.

Ključne besede:

- fotokataliza (photocatalysis),
- imobiliziran TiO_2 (immobilized TiO_2),
- hormonski motilci (endocrine disrupting chemicals),
- bisfenoli (bisphenols),
- testi strupenosti (toxicity tests).

Abstract

Water is the main source of life. That is why the mankind as the most important driving force of technology or in general industry development and thus the leading pollutant must strive to reduce pollution and to improve processes of purification of wastewater from industrial plants and municipal landfills. One group of pollutants is bisphenols, which also include bisphenol A (BPA), bisphenol F (BPF) and bisphenol AF (BPAF). They are endocrine disrupting chemicals that were around the world detected in low levels but on the other hand high enough for exhibiting adverse effects on endocrine system. Great potential for wastewater treatment show advanced oxidation processes within which heterogeneous photocatalysis is gaining more and more attention. The most widely used catalyst is TiO_2 which is distinguished by high oxidation potential.

The main objective of the master thesis was to prepare TiO_2 immobilized on glass fibers and to use as prepared catalyst for photocatalytic removal of BPA, BPF and BPAF first in batch reactor (4, 6 and 8 h trials) and then in mixed flow reactor (24 h trials) and in the end to verify toxicity of prepared starting solutions and solutions after photocatalytic oxidation. We wanted to know if the differences in structure affect the efficiency of above mentioned processes and the toxicity. We evaluated the efficiency of photocatalytic degradation with chemical methods of analysis and with biological toxicity tests. During the photocatalysis was with HPLC monitored drop in the concentration of bisphenols. In final solutions and in solutions of each flow was with TOC analyzer monitored removal of TOC (total organic carbon) in comparison with prepared starting solutions and with UV-VIS spectrophotometry determined absorption properties of products. Another chemical method used was ion chromatography with which did we determinate concentration of free fluoride ion in solutions of 4, 6 and 8 h photocatalytic oxidations of BPAF and in solutions of each flow of 24 h photocatalytic oxidation of BPAF. Conversion of starting solutions during photocatalytic reactions into even more toxic compounds is not desirable. That is why we decided to test the toxicity of resulting products and prepared starting solutions on two test organisms, water fleas *Daphnia magna* and bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri*. Finally we check the stability of used catalyst with 25 h photocatalytic degradation of BPA.

Both in batch and in mixed flow reactor the degradation of BPAF differed from the degradation of BPA and BPF. In batch reactor we managed to fully mineralize BPA and

BPF to CO_2 and H_2O in 6 hours but did not achieve the same results with BPAF not even after 8 hours since at that time the removal of TOC was only 85,2 %. Slightly different was the TOC removal in 24 h photocatalytic oxidations performed in mixed flow reactor. The highest TOC removal was at BPA, somewhat less at BPF and the lowest at BPAF. 25 h test of stability of TiO_2 immobilized on glass fibers revealed that the so prepared catalyst has very stable functioning. The results of toxicity tests were consistent with the results of TOC analysis. Solutions obtained after photocatalytic oxidation of BPA and BPF were very little toxic for water fleas and bioluminescent bacteria, more toxic was starting solution of BPAF and its solutions obtained after photocatalytic reactions especially solutions of 24 h photocatalytic oxidation. The difference in toxicity between on one hand BPA and BPF and on the other hand BPAF was much greater in water fleas than in bacteria. Therefore, the differences in the structure of present bisphenols impact on efficiency of photocatalytic degradation of these and also on toxicity.

Seznam okrajšav

B-CD	β -ciklodekstrin
BPA	bisfenol A
BPAF	bisfenol AF
BPF	bisfenol F
BPS	bisfenol S
CF ₃	trifluorometilna skupina
CH ₃	metilna skupina
CHNS	elementna analiza ogljika, vodika, dušika in žvepla
DR	difuzna refleksija
EC50	efektivna koncentracija (tista, ki povzroči učinek pri 50 % testnih organizmih)
ER α	estrogenski receptor α
ER β	estrogenski receptor β
F ⁻	fluoridni ion
HM	hormonski motilec
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC	ionska kromatografija
IC50	inhibitorna koncentracija (tista, ki povzroči zaviranje določene aktivnosti pri 50 % izpostavljenih testnih organizmih)
K ₂ Cr ₂ O ₇	kalijev dikromat
LD50	letalna koncentracija (tista, ki povzroči smrt pri 50 % izpostavljenih testnih organizmih)
MQ	ultra čista voda (18,2 M Ω -cm)

Na_2SO_4	natrijev sulfat
NOP	napredni oksidacijski procesi
θ	Braggov uklonski kot
$\cdot\text{O}_2^-$	superoksidni radikal
$\cdot\text{OH}$	hidroksilni radikal
$\cdot\text{OOH}$	hidroperoksilni radikal
Q	pretok
SEM	vrstični elektronski mikroskop
T	temperatura
τ	zadrževalni čas
TiO_2	titanov dioksid
TOC	celotni organski ogljik
US EPA	Ameriška agencija za varovanje okolja
UV	ultravijolično sevanje
V	volumen tekočine v reaktorski posodi
VIS	vidna svetloba
XRD	rentgenska praškovna difrakcija

1 Uvod

Molekula vode je sestavljena iz dveh vodikovih in enega kisikovega atoma in je ključnega pomena za življenje na Zemlji. Voda pokriva okoli 70 % površine Zemlje, od katere je 97,5 % najdemo v oceanih in le 1 % od preostale sladke vode uporablja človeštvo. Na začetku 21. stoletja se je svet soočil z vodno krizo, tako kar se tiče kvalitete vode kot njene kvantitete, povzročeno s stalno rastjo populacije, industrializacijo, proizvodnjo hrane, povečanjem življenjskega standarda in slabimi strategijami vodne uporabe. Po svetu skoraj 900 milijonov ljudi še vedno nima dostopa do varne vode. Upravljanje z odpadnimi vodami ali pomanjkanje le-tega ima neposreden vpliv na biološko raznolikost vodnih ekosistemov in s tem spreminja celovitost našega podpornega sistema življenja, od katerega je odvisen širok spekter sektorjev od urbanističnega razvoja do proizvodnje hrane in industrije. Onesnaževanje odpadnih voda je lahko povzročeno s patogeni, sintetičnimi kemikalijami, hranili, organskimi snovmi in težkimi kovinami, ki se v vodi raztope ali se v njej nahajajo kot trdni delci in vstopijo v vodo iz različnih virov ter vplivajo na kakovost vode. Te spojine preko bioakumulativnih, obstojnih in sinergističnih lastnosti vplivajo na delovanje in zdravje ekosistemov, proizvodnjo hrane, zdravje in dobro počutje (blaginjo) ljudi ter tako ogrožajo človeško varnost. (1)

1.1 Hormonski motilci

Med okoljska onesnažila sodijo tudi hormonski motilci (HM), katerih prisotnost v površinskih vodah je bila zaznana že v zgodnjih 1980-ih letih. (2) Gre za širok razred učinkovin, ki vključuje naravne in sintetične estrogene (17 β -estradiol, 17 α -etinilestradiol), fitoestrogene (izoflavoni), nekatere pesticide (atrazin, dieldrin), perfluorirane kemikalije (perfluorooktanojska kislina, perfluorooktan sulfonat) in derivate fenolov (alkilfenoli, parabeni, triklosan in **bisfenoli**). (2,3) HM motijo normalne hormonske aktivnosti, saj delujejo kot agonisti, antagonisti naravnih hormonov, spreminjajo sintezo in njihov metabolizem ter vplivajo na raven hormonskih receptorjev. (4) Za večino zgoraj navedenih snovi je bila do sedaj dokazana sposobnost motenja estrogenskega sistema, vpliva na druge sisteme pa še preučujejo.

HM je po definiciji eksogena snov, ki interferira s sintezo, sekrecijo, transportom, vezavo, delovanjem in izločanjem naravnih hormonov v telesu, ki so odgovorni za homeostazo, razmnoževanje, razvoj in vedenje, kot ga je definirala Ameriška agencija za varovanje okolja ali US EPA v letu 2001. (5)

Primarna funkcija endokrinega sistema je pretvorba različnih eksogenih dražljajev v kemijska sporočila in hormone, kar vodi do ekspresije pravih genov in sinteze proteinov in/ali aktivacije že obstoječih tkivno-specifičnih encimskih sistemov. Tri glavne končne točke endokrinega motenja so: estrogenska (spojine, ki posnemajo ali blokirajo naravne estrogene), androgena (spojine, ki posnemajo ali blokirajo naravni testosteron) in ščitnična (spojine z neposrednimi in/ali posrednimi vplivi na ščitnico). (5) Estrogenska receptorja ER α in ER β sta porazdeljena po celem telesu. ER α se primarno izraža v maternici, jetrih, ledvicah in srcu, ER β pa v ovarijih, prostati, pljučih, gastrointestinalnem traktu in mehurju. Soizražanje obeh receptorjev je prisotno v mlečnih žlezah, obmodku, ščitnici, nadledvični žlezi, kosteh in določenih regijah v možganih. 17 β -estradiol igra pomembno vlogo pri številnih fizioloških procesih, kamor spadajo normalna rast, razvoj, celično specifična genska regulacija v tkivih reproduktivnega trakta, centralnega živčnega sistema in okostja. (6)

Večina HM je vseprisotnih, saj se lahko nahajajo v vseh okoljskih segmentih (vodi, zraku, zemlji in sedimentih) zaradi nepopolnih proizvodnih procesov in/ali izluževanja iz končnih produktov. Viri onesnaževanja površinskih voda s HM so kanalizacijske odplake iz gospodinskih in industrijskih obratov ter industrijski izpusti. Glavni vir HM v gospodinskih odplakah so dnevno proizvedeni moški in ženski hormoni in/ali zaužiti sintetični steroidi, ki se izločajo preko urina v komunalni sistem, kjer se lahko delno odstranijo z biokemično oksidacijo, preden so sproščeni v površinske vode kot aktivni hormoni. (5) V več primerih je prisotnost HM v okolju vodila do škodljivih učinkov na razmnoževanje ter razvoj živalstva in rastlinstva, mnogi izmed njih prav tako predstavljajo pomembno grožnjo za zdravje ljudi in okolja. (4) Primer škodljivih učinkov je npr. feminizacija rib in drugih vodnih organizmov v velikih rekah, kar zmanjšuje njihov reprodukcijski potencial. Drugi učinki vključujejo mutacije, povezane z večjo pojavnostjo raka (kronična izpostavitve več različnim HM se povezuje s povečanim tveganjem za razvoj raka dojk) in nižjo reproduktivno stabilnostjo pri moških. (2,7)

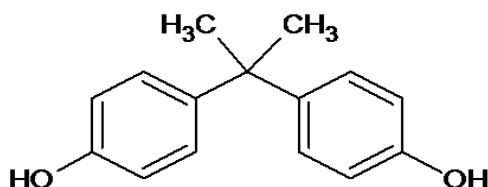
1.1.1 Bisfenoli A, F in AF kot hormonski motilci

Analogi BPA so razred kemikalij, poznan kot difenil metani, ki so zgrajeni iz dveh benzenskih obročev, ločenih s centralnim ogljikovim atomom (oziroma v primeru bisfenola S centralno sulfonsko skupino) in s para hidroksi skupino na obeh benzenskih obročih, ki je ključna za vezavo na estrogenske receptorje. (8) Uporabljajo se predvsem kot

surovina za izdelavo plastike in pripravo njihovih derivatov, ki jih uporabljamo v različnih izdelkih. Ravno zaradi njihove široke uporabe in tako prisotnosti v okolju naraščajo skrbi o njihovih potencialnih učinkih na ljudi in ostala živa bitja. Za določene bisfenole (BPA, BPB, BPF in BPAF) so namreč že dokazali, da delujejo kot HM. BPA, BPB in BPAF so tudi agonisti človeškega jedrnega receptorja PXR (pregnanski X receptor), ki regulira metabolizem ksenobiotikov. (9)

1.1.1.1 Bisfenol A (BPA)

BPA = 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan je zelo poznan HM, zgrajen iz dveh fenolnih obročev, ločenih s centralnim ogljikovim atomom z vezanima dvema metilnima skupinama (CH_3) (Slika 1).



Slika 1: Bisfenol A (10)

BPA je bela kristalinična trdna snov z molekulsko formulo $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_2$, molsko maso 228,29 g/mol, temperaturo tališča $156\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperaturo vrelišča $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ (11) in topnostjo v vodi 200 mg/L. (12). BPA ima zelo razširjeno uporabo pri proizvodnji polikarbonatov, epoksi smol, številnih plastičnih izdelkov in zobozdravstvenih tesnilnih mas. Najdemo ga v zgoščenkah, oblogah konzerv s hrano, plastenkah za pijače, plastičnih posodah, igračah, medicinski opreми, vodovodnih ceveh, kompozitnih zobnih zalivkah in kopirnem papirju. (4,11,13,14) Letna produkcija presega 3,8 milijonov ton. (11) Polimerizirane molekule BPA so med seboj povezane z estrskimi vezmi, ki ob izpostavitvi visokim temperaturam ali kislemu in bazičnemu okolju hidrolizirajo. Študije so pokazale, da se lahko BPA izlučuje iz polikarbonatne plastike in epoksi smol ter drugih produktov, ki ga vsebujejo, kar pripelje do zaužitja BPA. (14) Dokazali so, da je koncentracija BPA signifikantno višja v konzervirani hrani kot v sveži. V drugi raziskavi so ugotovili, da povišana temperatura in večkratna uporaba iste plastenke poveča hidrolizo polimera, kar vodi do večje migracije BPA v vodo (Preglednica I). (11)

Preglednica I: Koncentracija sproščenega BPA v vodo iz nove plastenke in plastenke, ki se je uporabljala 6 mesecev, pri 40 in 95-ih °C. (11)

	NOVA PLASTENKA	PO 6-IH MESECIH UPORABE
T (°C)	C sproščenega BPA (µg/L)	C sproščenega BPA (µg/L)
40	0,03	0,18
95	0,13	18,47

Zaradi migracije BPA se je več držav odločilo prepovedati proizvodnjo plastenk in embalaže, narejenih iz polimerov BPA. Kanada je bila prva, ki je prepovedala vsebnost BPA v stekleničkah za dojenčke in ga nadomestila z BPS. Leta 2011 je Evropska komisija omejila uporabo BPA v stekleničkah za otroke, leta 2012 pa je Agencija za hrano in zdravila (FDA, ZDA) prepovedala uporabo BPA v otroških plastenkah in formulah. Težko je vnaprej predvideti posledice nadomeščanja BPA z BPS in drugimi analogi, saj je poznavanje njihovih učinkov na ljudi in živali zelo skromno. (11)

Zaradi dejstva, da se BPA nahaja v predmetih, s katerimi pridemo vsakodnevno v stik, in da se lahko iz njih izlužuje, ni nobeno presenečenje, da je bil zaznan v 92,6 % vzorcev urina od več kot 2500 sodelujočih v raziskavi NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey), ki jo je izvedel Center za kontrolo bolezni (CDC). Povprečne vrednosti so bile 4,5 ng/mL pri otrocih (6-11 let), 3,0 ng/mL pri mladostnikih (12-19 let) in 2,5 ng/mL pri odraslih (nad 20 let). Zelo je pomembno, da so imeli otroci zaznane najvišje vrednosti, saj podatki iz študij na živalih kažejo na povečano ranljivost ob izpostavitvi med razvojem. (14)

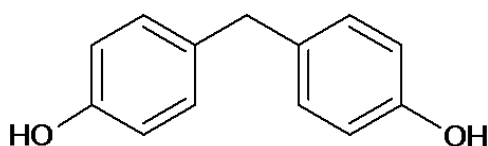
Ljudje torej pridejo v stik z BPA z zaužitjem onesnažene hrane (izpostavitve človeškega organizma preko prebavnega trakta je bila ocenjena na 0,48-1,6 µg/kg telesne teže/dan) in vode (višje vrednosti so običajno v vodi, ki je shranjena v plastičnih steklenicah), preko vdihavanja prahu in ob stiku s kožo. US EPA je določila referenčni odmerek, ki je bil 50 µg BPA/kg telesne teže/dan in je veljal za varnostni standard izpostavitve človeškega organizma BPA-ju (11) vse do januarja 2014, ko je EFSA (European Food Safety Authority) varnostni standard izpostavitve znižala na 5 µg BPA/kg telesne teže/dan. (15) Zanimivo je, da so v nedavno izvedeni študiji vsebnosti BPA v urinu nosečnic zaznali najvišje vrednosti pri blagajničarkah. Gre namreč za populacijo, ki ima po pričakovanjih visoke vrednosti, saj so vsakodnevno izpostavljene računom, ki so iz kopirnega papirja, leta pa je znan vir BPA, ki se lahko potencialno absorbira skozi kožo. (14)

BPA je ksenoestrogen, ki v prvi vrsti moti delovanje endokrinega sistema. Dokazali so, da deluje podobno kot naravni estrogen 17 β -estradiol. BPA namreč inducira estrogenske receptorje, vendar pri koncentracijah, ki so v primerjavi z estradiolom tisočkrat višje (10^{-6} do 10^{-4} M) in jih ne najdemo v človeški krvi. Najprej so obravnavali BPA kot šibek okoljski estrogen, katerega aktivnost proti klasičnim jedrnim receptorjem ER α in ER β je bila 1000-10000 nižja v primerjavi z 17 β -estradiolom. Nadaljnje raziskave so pokazale, da BPA celo pri zelo nizkih koncentracijah (piko in nano molarnih) izkazuje večsmerne učinke na fiziološke funkcije celic in tkiv preko vezave z zunaj jedrnimi receptorji. BPA se lahko poleg estrogenskih receptorjev veže tudi na androgenske kot tudi receptorje, aktivirane s proliferatorji peroksisomov, ki so povezani s hormoni endokrinega sistema in drugimi sistemi v telesu. Zato moti ne le funkcijo endokrinega sistema, kamor sodijo spremembe v funkciji spolnih hormonov, inzulina, leptina, adiponektina, tiroksina, ampak vpliva tudi na imunski in živčni sistem. (11) Rezultati raziskav kažejo tudi na to, da lahko BPA generira ROS (reaktivne kisikove zvrsti), ki tvorijo kovalentne adukte z nukleofilnimi makromolekulami in/ali sprožijo oksidativni stres. (8) BPA se močno veže na estrogenskim podobni receptor gama (ERRgama), ki je vključen v razvoj zarodka in novorojenčka. ERRgama se prav tako izraža v placenti, zato predvidevajo, da spodbuja nalaganje BPA v placenti in tako plodu olajšuje dostop do te strupene snovi. BPA se lahko veže tudi na receptor za ščitnične hormone in deluje kot njegov antagonist, saj zavira transkripcijsko aktivnost, stimulirano s ščitničnim hormonom trijodtironinom (T3). Vezavna afiniteta BPA do receptorja za ščitnične hormone je nižja kot afiniteta do estrogenskega receptorja, kar pomeni, da pride do zaviranja delovanja ščitničnega hormona le v prisotnosti visokih vrednosti BPA. Poleg vseh do sedaj navedenih receptorjev pa se lahko BPA veže tudi na človeški glukokortikoidni receptor in deluje kot njegov agonist, kar so z *in silico* študijo dokazali Prasanth in sod. Z drugo raziskavo so pri mladostnicah mater, ki so bile med nosečnostjo in dojenjem izpostavljene 40 μ g BPA/kg telesne teže/dan, zaznali povišane osnovne vrednosti kortikosterona. Prav tako so bile spremenjene vrednosti glukokortikoidnega receptorja v hipokampusu. (14) BPA naj bi bil tudi nevrotoksičen in teratogen, vendar so do sedaj pridobljeni rezultati protislovni. Zadnji rezultati namigujejo, da izpostavitve človeka BPA-ju poveča tveganje za debelost, diabetes in bolezni srca. Poročali so, da BPA zmanjšuje dnevno produkcijo sperme pri pubertetnih podganah in zatira serumski luteinizirajoči hormon (LH). (16) Raziskave so pokazale, da je BPA veliko manj toksičen za rastline in mikroorganizme, torej bakterije, glive in alge, ki

so sposobne pretvoriti BPA v presnovke, ki so običajno manj toksični in imajo nižjo estrogensko aktivnost kot BPA. Določene bakterije in glive so sposobne mineralizirati BPA in ga izkoristiti kot edini vir ogljika in energije. Organizmi, ki učinkovito razgrajujejo BPA, se uporabljajo za odstranjevanje le-tega iz onesnaženega okolja. (11)

1.1.1.2 Bisfenol F (BPF)

BPF = 4,4'-dihidroksidifenil-metan je HM, zgrajen iz dveh fenolnih obročev, ločenih s centralnim ogljikovim atomom z vezanima dvema vodikoma (Slika 2).

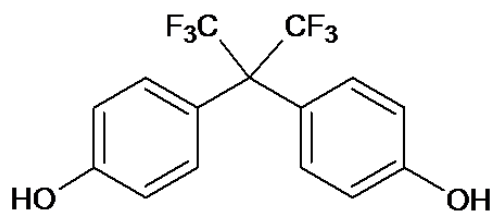


Slika 2: Bisfenol F (17)

BPF je trdna snov z molekulsko formulo $C_{13}H_{12}O_2$ in molsko maso 200,23 g/mol. V primerjavi z BPA je BPF manj viskozen in bolj odporen na topila. (3) BPF ima zelo široko uporabo pri proizvodnji lakov, loščil, oblog, lepil in vodnih cevi. Uporablja se tudi v zobozdravstvenih tesnilnih masah, napravah ustne protetike, tkivnih nadomestkih in prevlekah embalaže za hrano. BPF, ki se od BPA razlikuje le po odsotnosti dveh metilnih skupin na centralnem ogljiku, prav tako moti delovanje endokrinega sistema. Hashimoto in sod. (2000) so z uporabo testa z reporterskim genom (kvasni dvohibridni sistem) določili BPF kot najbolj estrogensko aktivno spojino izmed molekul, prisotnih v embalažah hrane ali uporabljenih v zobozdravstvu. (18)

1.1.1.3 Bisfenol AF (BPAF)

BPAF = 1,1,1,3,3,3-heksafluoro-2,2-bis(4-hidroksifenol)propan je HM, zgrajen iz dveh fenolnih obročev, ločenih s centralnim ogljikovim atomom z vezanima dvema trifluorometilnima skupinama (CF_3) (Slika 3) namesto dveh metilnih skupin (CH_3), ki sta prisotni v BPA. S tem se izboljša toplotna in kemijska stabilnost (9), saj so vezi C-F (~ 116 kcal/mol) močnejše kot vezi C-H (~ 99 kcal/mol). Zaradi elektronegativne razlike med C in F (2,5 proti 4,0) so vezi C-F bolj polarne, kar prispeva k razliki v moči vezave C-F proti C-H. (19)



Slika 3: Bisfenol AF (20)

BPAF je bel, svetlo siv ali rumenorjav prah z molekulsko formulo $C_{15}H_{10}F_6O_2$, molsko maso 336,23 g/mol in temperaturo vrelišča 400 °C. (21) BPAF je široko uporaben kot premreževalno sredstvo pri proizvodnji fluoropolimerov in fluoroelastomerov in kot monomer v proizvodnji mnogih polimerov, kot so polimidi, poliamidi, poliestri in polikarbonati. Ti polimeri se uporabljajo v visoko-temperaturnih kompozitih, elektronskih materialih, itd. (6,16) Ocenjeno je bilo, da letno v Združenih državah proizvedejo okoli 4500-225000 kg BPAF. (16)

Analize povezave med strukturo molekule in njeno aktivnostjo (SAR) BPA in sorodnih spojin namigujejo, da je BPAF bolj nevarna sintetična estrogenska kemikalija kot BPA, in sicer zaradi zamenjave propanskega mostu s hidrofobno skupino. Ta tip substitucije dokazano poveča estrogensko aktivnost. (16) CF_3 skupina BPAF je veliko bolj elektronegativna (in potencialno reaktivna) kot CH_3 skupina BPA. (6) Dnevne (3 dni) subkutane injekcije 100 mg/kg BPAF nezrelim samicam podgan vodijo do 337 % povečanja velikosti maternice v primerjavi z le 197 % povečanjem ob 3-dnevni izpostavljenosti 200 mg/kg BPA. Estrogenska aktivnost BPAF je torej za približno red velikosti močnejša kot pri BPA. Ravno zato je bil BPAF s strani Nacionalnega inštituta za vede o okoljskem zdravju (U.S. National Institute of Environmental Health Sciences-NIEHS) izbran za izčrpno toksikološko karakterizacijo zaradi njegovega potencialnega interferiranja z endokrino aktivnostjo oziroma zaradi pomanjkanja informacij o strupenosti tega analoga bisfenola. *In vitro* študije kažejo, da se je BPAF sposoben vezati z obema estrogenskima receptorjema, $ER\alpha$ in $ER\beta$. Vezavna afiniteta BPAF je približno 20x močnejša za $ER\alpha$ in približno 48x močnejša za $ER\beta$ kot afiniteta BPA. Izpostavitve BPAF lahko torej vodi do endokrinega motenja preko njegove agonistične aktivnosti z $ER\alpha$ ali antagonistične aktivnosti z $ER\beta$. (16) BPAF lahko povzroča redukcijo ekspresije steroidogenih genov, ki igrajo pomembno vlogo pri transportu holesterola in sintezi steroidov, kar vodi do zmanjšane proizvodnje testosterona. (9)

Vključenost fluorovega atoma v strukturo spojin vodi do povečane lipofilnosti in odpornosti na razgradnjo. Funkcionalna skupina CF_3 je ena izmed najbolj lipofilnih skupin. Njena prisotnost vodi do spremenjenih farmakokinetičnih lastnosti, torej do izboljšane pasivne difuzije spojin preko membran in tako do povečane biološke razpoložljivosti. (19)

1.2 Prisotnost bisfenolov v okolju

Glavni vir onesnaževanja vodnega okolja z umetnimi HM so odpadne vode iz kemijskih tovarn in drugih industrijskih obratov zaradi pomanjkanja čistilnih sistemov. (22) Stachel in sod. (2003) so določali BPA, BPF in nekatere druge ksenoestrogene v nemški reki Elbi in njenih pritokih. Koncentracije BPA v reki Elbi so se gibale med 4 in 30 ng/L, v njenih pritokih med 4,4 in 92 ng/L ter v sedimentih med 10 in 380 µg/kg. Koncentracije BPF so bile pod limito kvantifikacije v vseh vzorcih, razen v ustju reke Schwinge (0,4 ng/L). V sedimentih so prav tako zaznali nizke koncentracije BPF z maksimalno koncentracijo 7 µg/kg. (23) Višje koncentracije je moč zaznati v izcednih vodah. V Zahodni Nemčiji so v surovi izcedni vodi iz odlagališča komunalnih odpadkov našli 3,61 mg/L BPA, v izcednih vodah iz odlagališč na Japonskem do 17,2 mg/L, v izcednih vodah iz odlagališča industrijskih in drugih odpadkov v severni Italiji pa kar 33,5 mg/L. (24) V nemški raziskavi je bil BPAF zaznan v treh četrtinah vzorcev, zbranih iz površinskih voda in odplak, kot tudi v več kot polovici vzorcev sedimentov. (22) Ti rezultati se skladajo z objavljenimi razpolovnimi časi v vodi, ki so najdaljši pri BPAF (180 dni), sledi BPA (38 dni), najkrajši pa pri BPF (15 dni). (21) Prisotnost obravnavanih bisfenolov v okolju kaže potrebo po razvoju procesov obdelovanja odpadnih voda za odstranitev bisfenolov in po vpeljavi različnih testov, ki bi potrdili uspešnost odstranjevanja tovrstnih snovi iz odpadnih vod (npr. testov strupenosti na vodne organizme).

1.2.1 Obdelava odpadnih voda

Metode za razgrajevanje in odstranitev organskih onesnažil iz odpadnih voda lahko razdelimo v 3 glavne skupine: fizikalne, biološke in kemijske (NOP). (25) Konvencionalne biološke metode obdelave organskih onesnažil v odpadnih vodah so časovno zelo potratne in običajno nezmožne popolne odstranitve hormonskih motilcev. (26,27)

1.2.1.1. Napredni oksidacijski procesi (NOP)

NOP so tisti procesi, ki vključujejo *in situ* tvorbo visoko reaktivnih zvrsti, kot je hidroksilni radikal, ki je za fluorom najmočnejša oksidacijska zvrst z oksidacijskim potencialom 2,80 V. Za razliko od mnogih drugih radikalov je hidroksilni neselektiven in

reagira z veliko skupino organskih kemikalij, ki jih pretvori v manj kompleksne in manj škodljive vmesne produkte. Ob zadostnem času trajanja stika in ustreznih pogojih izvajanja je dejansko mogoče mineralizirati tarčno onesnažilo do CO₂, ki je najbolj stabilen končni produkt kemijske oksidacije. Izjemna prednost NOP nad vsemi kemijskimi in biološkimi procesi je, da so »okolju prijazni«, saj ne pretvarjajo onesnažil iz ene faze v drugo (kot pri fizikalni adsorpciji in koagulaciji) niti ne proizvajajo ogromnih količin nevarnega blata (kot pri aktivnem blatu). (5,28)

Preglednica II: Najbolj pogosto uporabljeni NOP za obdelavo vod in odpadnih vod. (5)

Fotokemični procesi	Nefotokemični procesi
UV oksidacijski procesi	Ozonacija
- UV/H ₂ O ₂	Fenton
- UV/O ₃	Ultrazvok (US)
- UV/H ₂ O ₂ /O ₃	- US/H ₂ O ₂ , US/O ₃ , US/Fenton
- UV/ultrazvok	Elektrokemijska oksidacija
Foto-Fentonova oksidacija	Superkritična vodna oksidacija
Fotokataliza	Ionsko obsevanje
Sonofotokataliza	Obsevanje z elektronskimi žarki
Vakum UV (VUV)	Mokra oksidacija (WAO)
Mikrovalovi	Pulzirajoča plazma

Tipi NOP, vpeljeni za raziskovanje razgradljivosti hormonskih motilcev v vodi, so: a) fotoliza (z UV, UV/O₃, UV/H₂O₂, UV/Fenton, UV/Fenton/oksalat), b) fotokataliza s TiO₂ ali drugimi polprevodniki in c) napredne oksidacijske reakcije z ozonom v temi, elektrokemijski procesi in ultrazvočna kavitacija. (5) Ena izmed najbolj obetavnih metod je fotokatalitska razgradnja zaradi visoke učinkovitosti mineralizacije, nizke toksičnosti, idealne proizvodnje CO₂, H₂O in anorganskih mineralnih ionov kot končnih produktov. (29)

1.2.1.1.1 Fotokataliza

V zadnjih letih je heterogena fotokataliza pridobila veliko pozornosti za obdelavo različnih skupin organskih onesnažil, najdenih v vodah in odplakah. (30) Gre za metodo, katere uporaba strmo narašča, saj ne zahteva dragih oksidantov. (28) Herrmann opisuje 5 fizikalnih parametrov, ki vplivajo na fotokatalizo: masa katalizatorja, valovna dolžina, začetna koncentracija reaktanta, temperatura in sevalni tok ali moč sevanja vira svetlobe. Drugi so mnenja, da vpliva tudi pH. Hitrost reakcije je sorazmerna z maso katalizatorja, vse dokler ne doseže platoja zaradi popolne absorpcije fotonov. Ker je adsorpcija spontan

in eksotermen fenomen, so nizke T le-ti bolj naklonjene. Ravno nasprotno visoke T škodijo adsorpciji reaktantov in prispevajo k padcu hitrosti reakcije, do česar pride posredno tudi pri visokem sevalnem toku, saj le-ta pripelje do povišanja T katalizatorja. (31) Wang in sod. so dokazali, da previsoka začetna koncentracija BPA ogrozi hitrost razgradnje zaradi omejenega števila aktivnih mest na površini katalizatorja. (29) Chen in sod. so dokazali, da pH raztopine igra pomembno vlogo pri nadzorovanju mehanizma fotokatalitske razgradnje BPA ter da določa stabilnost in strupenost vmesnih produktov. Vmesni produkti, tvorjeni pri pH 10, so bili težje razgradljivi, vendar manj toksični kot izhodiščna molekula BPA, medtem ko so bili vmesni produkti, tvorjeni pri pH 3, bolj dovzetni za razgradnjo in mineralizacijo, vendar v zgodnjih fazah oksidacije BPA bolj toksični kot izhodna molekula. (13) Ohko in sod. so leta 2001 prvič potrdili popolno mineralizacijo BPA v vodi in znatno znižanje estrogenske aktivnosti v obdelani vodi kot rezultat fotokatalitskih reakcij. (26)

Zelo pomembno je poznati mehanizem fotokatalitske razgradnje onesnažil. Za BPA je že bilo objavljenih nekaj mehanizmov različnih raziskovalcev. Fukahori in sod. (2003) so predlagali alternativni mehanizem razgradnje BPA v sistemu TiO_2 -UV, ki vključuje dve začetni reakciji s hidroksilnimi radikali: a) enomolekularno eliminacijo vode po hidroksilaciji BPA in b) odvzem vodikovega atoma iz fenolne hidroksilne skupine BPA. Posledica obeh teh začetnih reakcij je lahko tvorba fenoksi radikala, ki se nato pretvori v kinonu podobno spojino, ki se razgradi v para-benzokinon (p-BQ) in nastane kation radikalska spojina, ki se nato oksidira do para hidroksi- α -metilstirena (p-HMS), le-ta pa pretvori v para-hidroksiacetofenon (p-HAP). P-BQ se ireverzibilno pretvori v hidrokinon (HQ). Visoko nakopičenje HQ pomeni, da prevladuje pot, ki vključuje razgradnjo kinona, ne pa pot z odpiranjem obroča kinonu podobne spojine, kot je bilo predhodno predvidevano. Pri odpiranju obroča se tvori najprej para-hidroksibenzaldehid (p-HBA), ki se nato razgradi do para hidroksibenzojske kisline (p-HBAcid). Para hidroksiacetofenon, hidrokinon in para hidroksibenzojska kislina nato vstopijo v reakcije odpiranja obroča in mineralizacije, katerih končna produkta sta H_2O in CO_2 . V prilogi I je narisana shema mehanizma razgradnje. (32)

1.2.1.1.2 Tipi idealnih reaktorjev za vodenje reakcije v tekočini

- Šaržni reaktor (angl. batch reactor = BR): reaktanti so v reaktorski posodi idealno premešani in običajno izpostavljeni reakcijskim pogojem do popolne pretvorbe v

produkt(e). Gre za nestabilno stanje, saj se sestava spreminja s časom, čeprav je v vsakem trenutku sestava v celotnem reaktorju enotna.

- Pretočni oz. cevni reaktor (angl. plug flow reactor = PFR): gre za pretočni reaktor s čepastim tokom, pri katerem je tekočina idealno premešana v radialni smeri, medtem ko ni mešanja v aksialni smeri (naprej in nazaj). Dejansko je v cevnem reaktorju prisotno bočno mešanje, ne sme pa biti mešanja ali difuzije vzdolž pretočne poti. Potreben in zadosten pogoj za cevni reaktor je enak zadrževalni čas v reaktorju za vse dele tekočine.
- Pretočni mešalni reaktor (angl. mixed flow reactor = MFR): gre za še en tip pretočnega reaktorja (obratuje pri stacionarnih pogojih), znotraj katerega je vsebina idealno pomešana in tako enotna v celotni prostornini. Torej je sestava na iztoku reaktorja enaka sestavi v samem reaktorju. (33)

1.2.1.1.3 Uporaba TiO_2 kot katalizatorja v fotolizi

Eden izmed najpogostejše uporabljenih katalizatorjev je titanov dioksid (TiO_2), zaradi visokega oksidativnega potenciala, kemijske stabilnosti, odpornosti na korozijo, dostopnosti in relativno nizke cene. (25,34) Da ga lahko uporabimo kot fotokatalizator, je potrebno TiO_2 obsevat z ultravijoličnim sevanjem. Ko je zagotovljena energija, ki je višja kot energija prepovedanega pasu, lahko elektron iz valenčnega pasu vzbudimo, da gre v prevodni pas, v valenčnem pasu pa za seboj pusti vrzel (ang. hole). Vrzel v valenčnem pasu reagira z okoliškimi molekulami vode, pri čemer nastanejo hidroksilni radikali ($\cdot\text{OH}$), elektroni v prevodnem pasu pa reagirajo z molekularnim kisikom, pri čemer nastanejo superoksidni radikali ($\cdot\text{O}_2^-$). (35) $\cdot\text{OH}$ in $\cdot\text{O}_2^-$ lahko reducirajo ali oksidirajo onesnažilo. (34) Shematski prikaz zgoraj opisanega procesa je v prilogi II.

V naravi TiO_2 najdemo v treh modifikacijah: anataz, rutil in brukit. Rutil naj bi bila najstabilnejša oblika pri vseh temperaturah in tlakih. Za fotokatalizo se največkrat uporablja anataz, saj ima najvišjo fotokatalitsko aktivnost. (36) Glavna slabost čistega anataza je, da je energija prepovedanega pasu okoli 3,2 eV in za tvorbo parov elektron-vrzel v TiO_2 kristalnih zahteva uporabo UV svetlobe ($\lambda \leq 387 \text{ nm}$), torej ima le 5-8 % sončnih fotonov zadostno energijo za aktivacijo katalizatorja. (34) TiO_2 ima običajno izoelektrično točko pri pH med 6 in 7, zato ima njegova površina pozitiven naboj, ko je suspendiran v raztopini s pH 3, in negativen naboj, ko je suspendiran v raztopini s pH 10. (13)

Številni raziskovalci so veliko svojega časa posvetili povečanju fotokatalitske aktivnosti TiO_2 z dodajanjem prehodnih kovin (Au, Ag, Pt), promotorjev (β -ciklodekstrin), uporabo zunanje energije (mikro- in visoko frekvenčni ultrazvočni valovi), uporabo kompozita TiO_2 z mineralnimi materiali (ogljik, keramika, zeolit), imobilizacijo TiO_2 na filme ali podlage (steklena vlakna). (25) Ohko in sod. (2001) so poročali o razgradnji BPA v vodni suspenziji TiO_2 ob obsevanju s ksenonsko (Xe) žarnico, pri čemer so ugotovili, da sta popolno izginotje in mineralizacija zagotovljeni po 15 in 20 urah, znotraj tega časa pa izginejo tudi vsi vmesni produkti. Prav tako so ugotovili, da se v 4 urah transkripcijska estrogenska aktivnost kot odziv na človeški estrogenski receptor zmanjša na manj kot 1 % začetne aktivnosti. Wang in sod. (2006) so v želji po izboljšanju učinkovitosti procesa dodali β -ciklodekstrin (β -CD) in spremljali stopnjo razgradnje in mineralizacije BPA. Pod optimalnimi pogoji (β -CD = $4,4 \cdot 10^{-5}$ M, pH = 6) je bila 100 % mineralizacija zagotovljena znotraj 120 min, v odsotnosti β -CD pa se je v istem času odstranilo le 37 % BPA. Izboljšanje je moč pripisati povečani adsorpciji BPA na površino TiO_2 in slabitvi vezavne energije med atomi BPA molekule preko »vključitvenih interakcij (angl. inclusion interactions)« s β -CD. Chiang in sod. (2004) so primerjali učinkovitost navadnega in platiniziranega TiO_2 za fotolitsko razgradnjo in mineralizacijo BPA pri pH 3 in 10. Ugotovili so, da je lahko pri optimalnem nalaganju Pt fotokatalitska aktivnost izboljšana za 3-6 krat pri obeh pH-jih. Relativno nizka stopnja mineralizacije pri pH 10 je bila pripisana negativnemu naboju na površini TiO_2 (ki inhibira adsorpcijo) in prisotnosti karbonatnih ionov (ki izženejo OH radikale), tvorjenih med oksidacijo organskega ogljika. Na drugi strani so Coleman in sod. (2005) poročali, da je ojačitev fotokatalitske aktivnosti z imobilizacijo TiO_2 na Pt ali Ag odvisna od koncentracije BPA ter da je platinizacija neučinkovita v slabo koncentriranih raztopinah, kar je tipično za naravne vode. Poročali so, da platina pospeši stopnjo mineralizacije le, če je koncentracija BPA večja kot 50 mg/L. Lee in sod. (2004) so preiskovali učinkovitost razgradnje BPA z uporabo TiO_2 filmov, imobiliziranih na zunanjo površino steklene epruvete. Rezultati so razkrili, da je bila najvišja odstranitev BPA dosežena, ko je bila raztopina titan-sol uporabljena kot vezivo. Optimalno število oblog in debelina filma za maksimalni izkoristek sta bila 3 in 5,29 μm . Z eno oblogo so dosegli 68 % odstranitev BPA, pri 3-kratni pa kar 98 %, pri višjih pa je bila učinkovitost zmanjšana zaradi povečanega tekmovanja za UV sevanje. Zahtevnega ločevanja suspendiranih delcev katalizatorja iz raztopine ob koncu reakcije so se zavedali tudi Fukahori in sod. (2003), ki so ravno zato poskušali spremeniti kristalite TiO_2 z

združevanjem z močnim adsorbentom-zeolitom v tvorbo papirju podobnih kompozitov. Ugotovili so, da so sestavljene plasti (angl. sheet) TiO_2 -zeolit ob odsotnosti UV sevanja veliko bolj učinkovite za odstranjevanje BPA kot delci TiO_2 , medtem ko so v prisotnosti črne svetlobe (UV-A) bolj učinkoviti delci. Nasprotno je bila mineralizacija največja v prisotnosti osvetljenih TiO_2 -zeolit kompozitov, kar so avtorji pripisali odstranitvi oksidiranih vmesnih produktov z adsorpcijo na površino zeolita. Torej so kompozitni materiali močno priporočeni za odstranjevanje BPA iz vode zaradi a) njihove večje učinkovitosti mineralizacije kot pri delcih TiO_2 , b) njihovega potenciala zajetja vmesnih stranskih produktov in tako preprečitve sproščanja v vodo ter c) njihove nezahtevne ločitve iz raztopine. (5)

TiO_2 imobiliziran na steklena vlakna

Običajno se heterogene fotokatalize izvajajo s suspendiranim katalizatorjem TiO_2 , katerega velika omejitev je zahtevna filtracija neskončno majhnih delcev TiO_2 . (32) Tu se izkažejo imobilizirani katalizatorji, saj se z uporabo le-teh izognemo koraku filtracije, vendar pa se moramo zavedati, da je njihova kvantna učinkovitost na splošno nižja kot učinkovitost katalizatorja v raztopini, in sicer zaradi povečanih omejitev prenosa snovi do katalizatorja in zaradi zmanjšanja površine le-tega. (30) Katalizator lahko preko kemijskih vezi ali fizikalnih sil imobiliziramo na različne podlage: aktivno oglje, optična vlakna, steklena vlakna, steklo, steklene kroglice, stekleno volno, membrane, kremenov pesek, zeolite, nerjaveče jeklo, papir, itd. (37) Steklena vlakna so anorganski material, ki se uporabljajo kot podpora katalitskih zvrsti, saj je ekonomičen, odporen proti koroziji in enostaven za uporabo. (38)

1.2.2 Testi strupenosti

Večina kemijskih testov, dostopnih za določanje koncentracije toksičnih kemikalij, ne poda bioloških vplivov onesnažil, to je vplivov strupenih kemikalij na živa bitja, zato so se razvili različni biotesti. Pri testiranju strupenosti okoljskih onesnažil je potrebno uporabiti različne vrste testov zaradi različne občutljivosti testnih sistemov na toksične kemikalije. (2)

Tradicionalno so za testiranje vodne toksičnosti v uporabi raki, ribe in alge. Na popularnosti pa pridobivajo tudi bakterije, saj so le-te sestavni del ekosistema. (39) Zelo je pomembno preverjati strupenost ne le izhodiščnih raztopin, ampak tudi produktov

fotokatalitskih reakcij, saj ni zaželeno pretvoriti onesnažilo v še bolj reaktivno in škodljivo spojino. (13) Čeprav *in vitro* analize predstavljajo hitre in relativno poceni metode kvantifikacije vodne estrogenske aktivnosti, ti celični sistemi ne odražajo zapletenosti *in vivo* interakcij zaradi razlik v toksikokinetičnih in toksikodinamičnih parametrih, kamor spadajo absorpcija, distribucija, metabolizem in izločanje. Poleg tega lahko *in vitro* testi precenijo ali podcenijo relativno aktivnost mešanic HM zaradi aditivnih, sinergističnih ali antagonističnih interakcij. (4) Slabosti testiranj na živalih vključujejo tudi težave pri standardizaciji organizmov, zahteve po posebni opremi in izkušenih izvajalcih, dolgotrajnost testov in pomanjkanje ponovljivosti. (39)

1.2.2.1 *Daphnia magna*

Daphnia magna so sladkovodni nevretenčarji iz redu *Cladocera*, bolj poznani kot vodne bolhe. (40) To ime izhaja iz skakanju podobnega obnašanja, ki ga izkazujejo med plavanjem. (41) Imajo relativno kratko življenjsko dobo (7-8 tednov pri 20 °C) in dosežejo spolno zrelost znotraj 6-8 dni po zapustitvi zarodne komore. V kulturi je reprodukcija omejena na produkcijo samic z diploidno partenogenezo. Samci se izvalijo le kot odziv na okoljski stres, kot so visoka gostota populacije, akumulacija izločevalnih produktov in/ali zmanjšana dostopnost hrane. Zaradi njihove velikosti, enostavnega gojenja in kratke življenjske dobe so vodne bolhe razširjeno uporabljene kot reprezentativna sladkovodna nevretenčarska vrsta v toksikoloških študijah. (40)

Obstaja hipoteza, da nekateri ksenobiotiki, ki motijo endokrine procese pri vretenčarjih, lahko motijo tudi s hormoni povezan proces levitve pri členonožcih preko antagonističnega delovanja na endogene ekdisteroide, saj blokirajo ekdisteroidni receptor. (40) Ekdisteroidi predstavljajo razred steroidnih hormonov pri členonožcih, ki regulirajo njihov razvoj kot tudi rast in reprodukcijo. Mu in sod. (2004) so dokazali, da ima BPA anti-ekdisteroidno aktivnost v *Daphnia magna*. (42)

Številni raziskovalci so se tekom zadnjih desetletji ukvarjali z akutno toksičnostjo BPA in dobili različne vrednosti 24 h in 48 h EC50, ki so prikazane v preglednici III.

Preglednica III: Vrednosti 24 h in 48 h EC50, pridobljene s testiranjem akutne strupenosti BPA različnih raziskovalcev. (24,43)

Raziskava	Vrednost 24 h EC50 (mg/L)	Vrednost 48 h EC50 (mg/L)
Stephenson (1983)	/	3,9
Alexander in sod. (1985)	/	10,2
Chen in sod. (2002)	24,0	10,0
Hirano in sod. (2004)	/	12,8
Mu in sod. (2005)	/	16,0
Brennan in sod. (2006)	8,6	7,75
Jemec in sod. (2012)	13,8	/

1.2.2.2 *Vibrio fischeri*

Biotesti so običajno dragi, zahtevajo velike volumne vzorcev in so časovno potratni. Ravno zaradi teh omejitev so se začeli raziskovalci ukvarjati s hitrimi, reproducibilnimi in cenovno učinkovitimi bakterijskimi testi, med katerimi je *Vibrio fischeri* luminiscenčni inhibicijski test najpogostejši. Za oceno akutne toksičnosti je pogosto uporabljen sev NRRL B-11177, na katerem temelji več testnih kompletov: Microtox, LUMIS tox, ToxAlert. (39)

Vibrio fischeri so Gram negativne bioluminiscentne paličaste bakterije, ki jih najdemo v svetovnih oceanih, vendar v višjih koncentracijah v subtropskih vodah. Gre za nepatogeni član *Vibrionaceae*, velike družine proteobakterij z več patogenimi vrstami, kot so *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* in *Vibrio vulnificus*. (44) Celična stena *Vibrio fischeri* je zgrajena iz polisaharida in proteinov. Zunanja membrana celične stene vsebuje porine, ki so poram podobne strukture in omogočajo prehajanje le specifičnim molekulam. Čeprav najdemo *Vibrio fischeri* v prostem planktonskem plavajočem stanju, proizvaja svetlobo le v simbiozi z lignji *Euprymna scolopes*. (45) Bioluminiscentne značilnosti *Vibrio fischeri* so primarno uravnane z avtoinduktorjem homoserin laktonom. Nakopičenje le-tega preko pozitivne povratne zanke poveča transkripcijo lux operona (gena, ki kodira za bioluminiscenco) in tako bioluminiscenco na celico. (46) *Vibrio fischeri* proizvaja svetlobo kot stranski produkt dihanja. Ker je torej bakterijska bioluminiscenca neposredno povezana s celičnim dihanjem, vsaka inhibicija le-tega (zaradi toksičnega okolja) povzroči zmanjšanje ravni dihanja in tako skladno zmanjšanje ravni luminiscence. Bolj toksičen kot je vzorec, večji je odstotek izgube svetlobe iz testne suspenzije luminiscenčnih bakterij *Vibrio fischeri*. (13)

Testni protokol pri *Vibrio fischeri* luminiscenčnem inhibicijskem testu je preprost. Prvotno je bil namenjen za testiranje vodnih vzorcev in ekstraktov. V literaturi je zapisano, da je ta test najbolj občutljiv znotraj širokega spektra kemikalij v primerjavi z drugimi bakterijskimi testi, kot so inhibicija nitrifikacije, respirometrija, ATP luminiscenca in encimska inhibicija. Ta test izkazuje dobre povezave z drugimi standardnimi testi akutne strupenosti (testi strupenosti s sladkovodnimi ribami in raki). (39,46)

2 Namen dela

Glavni namen magistrske naloge je pripraviti na steklena vlakna imobiliziran katalizator na osnovi TiO_2 , ugotoviti njegovo učinkovitost pri fotokatalitskem odstranjevanju BPA, BPF in BPAF ter preveriti strupenost izhodiščnih raztopin obravnavanih onesnažil in raztopin po fotokatalitski oksidaciji. Fotokatalitske reakcije bomo najprej izvedli v šaržnem reaktorju. Pričeli bomo s 4-urnimi poskusi in le-te podaljševali za dve uri (do 8 h), saj želimo ugotoviti, če v 8 urah ali manj pri izbranih pogojih uspemo večino onesnažila mineralizirati do CO_2 in H_2O . Prav tako nas zanima, ali razlike v zgradbi BPA, BPF in BPAF vplivajo na hitrost mineralizacije. Na podlagi rezultatov poskusov, izvedenih v šaržnem reaktorju, bomo načrtovali fotokatalitsko oksidacijo obravnavanih analogov v pretočnem mešalnem sistemu. Izvedli bomo 24-urne fotokatalitske oksidacije, ki jih bomo razdelili na štiri različna časovna obdobja glede na zadrževalni čas (τ) spojin v pretočnem mešalnem sistemu. Začeli bomo z najvišjim pretokom (tj., najkrajšim τ) in ga postopno zniževali do pretoka, pri katerem pričakujemo zelo dobro odstranitev bisfenolov. Pri tako dolgih fotokatalitskih oksidacijah se je potrebno zavedati, da se lahko spremeni stabilnost katalizatorja, zato bomo le-to preverili s 25-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA v pretočnem mešalnem reaktorju. Poskus bomo začeli z določenim začetnim pretokom, nato bomo le-tega znižali, in po določenem času zopet nastavili začetni pretok, in opazovali ali so koncentracije BPA pri ponovno uporabljenem začetnem pretoku približno podobne koncentracijam na začetku poskusa.

Učinkovitost vseh fotokatalitskih poskusov, tako tistih, izvedenih v šaržnem reaktorju, kot tudi tistih, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju, bomo ovrednotili s kemijskimi analiznimi metodami in biološkimi testi strupenosti. Uporabljene kemijske analize metode bodo tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), s katero bomo spremljali učinkovitost odstranjevanja bisfenolov, UV-VIS spektrofotometrija, s katero bomo primerjali absorpcijske lastnosti izhodiščnih raztopin in raztopin po fotokatalitski oksidaciji, TOC analizo, ki nam bo pokazala, koliko celotnega organskega ogljika (TOC) je še prisotnega v končnih raztopinah glede na TOC v izhodiščnih raztopinah, in ionsko kromatografijo (IC), s katero bomo določili, koliko fluoridnega iona se je sprostilo iz BPAF. Biološki testi strupenosti bodo izvedeni na vodnih bolhah *Daphnia magna* in bioluminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri*. Zanima nas namreč, kakšna je strupenost pripravljenih izhodiščnih raztopin (ali se le-ta razlikuje med analogi) ter če raztopine po

fotokatalitski oksidaciji izkazujejo manjšo strupenost kot izhodiščne raztopine, kar je glavni cilj fotokatalitskega odstranjevanja onesnažil.

Na koncu bomo primerjali lastnosti sveže pripravljenega katalizatorja in katalizatorjev, ki jih bomo uporabili za 4- in 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA. To bomo storili z naslednjimi analizami: a) rentgensko praškovo difrakcijo (XRD), s katero bomo analizirali strukturne značilnosti, b) UV-VIS difuzno refleksijo (UV-VIS-DR), ki nam bo omogočila določitev območja, znotraj katerega TiO_2 absorbira svetlobo, in ugotovitev prisotnosti TiO_2 na uporabljenih katalizatorjih in c) vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), s katerim bomo videli strukturo in velikost delcev TiO_2 , nanesenih na steklena vlakna. Svež katalizator in vse uporabljene katalizatorje pa bomo analizirali s CHNS analizo, ki nam bo pokazala, ali se tekom fotokatalitskih poskusov na površini katalizatorjev nakopičijo ogljikovi depoziti (tj., adsorbirajo bisfenoli in njihovi razgradnji produkti).

Delovni hipotezi:

- TiO_2 , imobiliziran na steklena vlakna, je učinkovit katalizator za odstranjevanje BPA, BPF in BPAF tako v šaržnem reaktorju kot tudi v pretočnem mešalnem sistemu;
- razlike v zgradbi obravnavanih BPA in njegovih analogov BPF in BPAF vplivajo na učinkovitost fotokatalitskega odstranjevanja le-teh in tudi na strupenost na vodne bolhe in bakterije.

3 Materiali in metode

3.1 Priprava raztopin BPA in njegovih analogov

Proizvajalec v nalogi obravnavanih bisfenolov A, F in AF je Sigma-Aldrich, Nemčija. Njihova čistoča je bila najmanj 97 %. CAS številke: BPA 80-05-7, BPF 620-92-8, BPAF 1478-61-1. Eden izmed zastavljenih ciljev je bil primerjava fotokatalitskega odstranjevanja ter strupenosti izhodiščnih raztopin in raztopin po fotokatalitski oksidaciji vseh treh obravnavanih bisfenolov. Za ta namen smo pripravili ekvimolarne raztopine bisfenolov, saj imajo preučevane spojine različne molekulske mase. Določili smo maso, ki je ustrezala želenemu številu molov. Izhodišče je bila masna koncentracija BPA, ki je bila 10 mg/L.

$$C_{m \text{ BPA}} = C^0_{\text{BPA}} = 10 \text{ mg/L}$$

$$C_n = n / V = m / (M \times V) = C_0 / M$$

$$M_{\text{BPA}} = 228,29 \text{ g/mol}; C_{n \text{ BPA}} = 0,0438 \text{ mmol/L}$$

$$M_{\text{BPF}} = 200,23 \text{ g/mol}$$

$$C_{m \text{ BPF}} = C_{n \text{ BPA}} \times M_{\text{BPF}} = 8,77 \text{ mg/L}$$

$$M_{\text{BPAF}} = 336,23 \text{ g/mol}$$

$$C_{m \text{ BPAF}} = C_{n \text{ BPA}} \times M_{\text{BPAF}} = 14,73 \text{ mg/L}$$

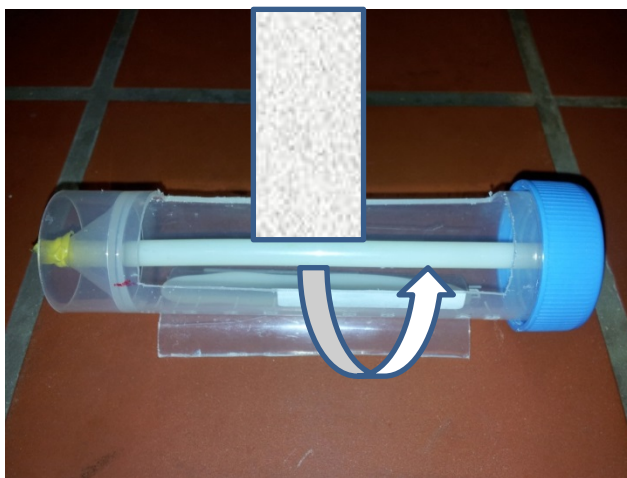
Raztopine smo pripravili v dvolitrskih bučkah. Posamezne zatehte so bile sledeče: 20,00 mg BPA, 17,54 mg BPF in 29,46 mg BPAF. Nato smo dopolnili bučko z ultra čisto vodo (Purelab Option – Q – ELGA_18,2 MΩ-cm) do približno $\frac{3}{4}$ prostornine in pustili mešati na magnetnem mešalu (IKA[®] C-MAG HS 7) za 24 h. Po končanem raztapljanju kristalov spojin smo nalili ultra čisto vodo -do oznake na bučki (2 litra), pustili mešati še eno uro, nato pa pripravljeno raztopino pospravili v hladilnik.

3.2 Priprava katalizatorja

Pri pripravi imobiliziranega katalizatorja je potrebno najprej pripraviti podlago, v našem primeru steklena vlakna proizvajalca Sartorius AG. Dobavljene A4 liste steklenih vlaken (Grade: MGA 52 g/m²) smo narezali na pravokotnike, dimenzije 6x17 cm. Sledila je priprava raztopine TiO₂, in sicer tako, da smo raztopili ustrezno maso prekursorja katalizatorja TiOSO₄xH₂SO₄xH₂O (proizvajalec Sigma-Aldrich; CAS: 123334-00-9) v ultra čisti vodi.

Z eksperimentalnim delom je bilo določeno, da je najboljše razmerje med ultra čisto H_2O in prekursorjem, če v 20 mL ultra čiste vode natehemo 1,65 g prekursorja (0,30 mol/L).

Raztapljanje prekursorja smo izvedli na magnetnem mešalu (IKA® C-MAG HS 7) v času 30 min oz. do razbarvanja raztopine iz začetne mlečno bele do prozorne. Transparentno raztopino smo nalili v impregnator oz. kadičko (Slika 4), s pomočjo katere smo narezane pravokotnike steklenih vlaken impregnirali z raztopljenim prekursorjem TiO_2 . Postopek impregnacije je potekal počasi z enakomerno hitrostjo omakanja, da se je zagotovil enakomeren nanos katalizatorja.

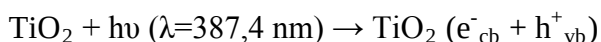


Slika 4: Kadička za impregniranje steklenih vlaken s pripravljeno bistro raztopino TiO_2 .

Po impregnaciji smo omočene nosilce iz steklenih vlaken delno posušili v sušilniku (Kambič SP-45C), ki je bil segret na temperaturo $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sušili smo jih ravno toliko časa, da jih je še bilo mogoče zviti v kolobar, in sicer tako, da je bila bolj hrapava površina na notranji strani. Posušena in zvita steklena vlakna smo iz sušilnika prestavili v kalcinacijsko peč (Nobertherm, kalcinacijsko območje od 30 do $3000\text{ }^{\circ}\text{C}$), kjer je potekla pretvorba prekursorja v TiO_2 v zračni atmosferi. Program kalcinacije je vključeval tri stopnje. Prva je bila segrevanje iz začetne temperature do 500 , in sicer $300\text{ }^{\circ}\text{C/h}$. V drugi stopnji smo omenjeno temperaturo vzdrževali 1 h . V zadnjem koraku smo katalizatorje ohladili do sobne temperature, prav tako z nastavljenjo hitrostjo ohlajanja $300\text{ }^{\circ}\text{C/h}$. S kalcinacijskim postopkom se steklena vlakna enakomerno prevlečejo s TiO_2 , kar vidimo pod elektronskim mikroskopom kot grudice na površini posameznih vlaken. Na ta način (zaradi dodatne hrapavosti) se poveča specifična površina steklenih vlaken. Kalcinacija običajno poteka pri $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, saj pri tej temperaturi preferenčno nastaja TiO_2 v kristalni strukturi anataza in ohranijo se mehanske lastnosti steklenih vlaken, ki se spremenijo pri $T > 550\text{ }^{\circ}\text{C}$. (47)

3.3 Fotokataliza

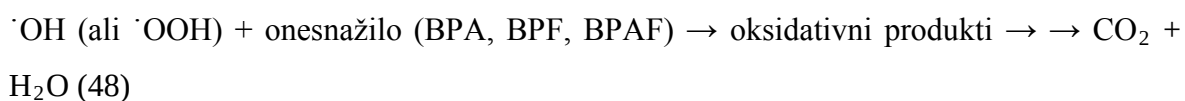
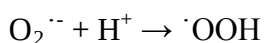
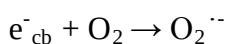
Predlagani splošni mehanizem fotokatalitske razgradnje onesnažil v prisotnosti TiO_2 : delci TiO_2 absorbirajo UV svetlobo z energijo, večjo kot je energija prevodnega pasu ($\approx 3,2 \text{ eV} \approx 387,4 \text{ nm}$), posledica česar je tvorba parov elektron-vrzel (angl. hole).



V luknje (h^+) se ujamejo HO^- ioni ali $\text{H}_2\text{O}_{\text{abs}}$ na površini delcev TiO_2 , pri čemer nastanejo H^+ in $\cdot\text{OH}$ radikali.



Hkrati molekule kisika reagirajo z elektroni prevodnega pasu (e^-_{cb}) in tako nastanejo superoksidni radikali $\text{O}_2^{\cdot -}$, iz katerih se s protonacijo tvorijo hidroperoksilni radikali $\cdot\text{OOH}$.



3.3.1 Fotokatalitska oksidacija bisfenolov v šaržnem reaktorju

Šaržni reaktorski sistem za fotokatalitsko oksidacijo sestavljajo reaktorska posoda s hladilnim plaščem za kontrolo temperature preučevane raztopine ($V = 300 \text{ mL}$), nizkotlačna živosrebrna žarnica (150 W , z maksimumom pri $\lambda = 254 \text{ nm}$), obdana s steklenim vodnim plaščem za neposredno odvajanje odvečne toplote, cev za kontroliran (Mass flow controller GFC AALBORG) dovod zraka (vir kisika), termočlen (kontrola temperature), magnetno mešalo (IKA RET control/t) in stojalo za katalizator. Katalizator smo skupaj s stojalom vstavili v posodo reaktorja, in sicer tako, da je kolobar katalizatorja obdajal vir svetlobe. Ko smo imeli nameščen reaktor, smo odprli dovod zraka in hladilne vode (hladilni plašč reaktorja in hladilni plašč žarnice). Dovod zraka smo nastavili na 750 mL/min , medtem ko smo reakcijo fotokatalitske oksidacije izvajali pri $20 \text{ }^\circ\text{C}$. V reaktor smo nalili 300 mL pripravljene raztopine analoga, potopili žarnico (na sredino višine obroča katalizatorja), termočlen in PTFE cev za zrak (izpust zraka je na dnu reaktorske posode, kjer je najbolj intenzivno mešanje raztopine in s tem zagotovljena dobra distribucija zraka). Magnetno mešalo smo nastavili na 360 obratov/min . Prvih 30 min je

potekala temna faza (z njo smo želeli ugotoviti, koliko bisfenola se adsorbira na katalizator), nato smo vzorčili in prižgali žarnico. Prvih 20 min po vklopu žarnice je bilo potrebno T raztopine konstantno spremljati in uravnavati s termostatom Julabo EO F25, da je bila T raztopine ves čas 20 °C.

Vzorčenje je potekalo po spodaj navedeni shemi (Preglednica IV). Do posamezne analize so bili vzorci shranjeni v hladilniku.

Preglednica IV: Shema jemanja vzorcev za HPLC analizo pri treh različno dolgih fotokatalitskih poskusih.

Trajanje fotokatalitske oksidacije (h)	Časovni intervali vzorčenja (min)														
	-30	0	20	40	60	80	100	120	150	180	210	240	300	360	480
4	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
6	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
8	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x

Ob koncu poizkusa smo raztopino iz reaktorja shranili v posode za shranjevanje in le-te shranili v hladilniku za izvedbo TOC, UV-VIS analize ter testov strupenosti. Uporabljen katalizator smo sprali z ultra čisto vodo in ga na zraku posušili ter ga uporabili v nadaljnjih karakterizacijskih testih.

3.3.2 Fotokatalitska oksidacija bisfenolov v pretočnem mešalnem reaktorju

3.3.2.1 24-urna fotokatalitska oksidacija bisfenolov

Pri pretočnem mešalnem sistemu velja pravilo, da je pri hitrejšem pretoku slabša konverzija, saj je raztopina manj časa v stiku s katalizatorjem. Prav tako je pomembno, da trajanje posameznega pretoka ni krajše od 3 zadrževalnih časov (τ), torej časov, ki so potrebni za obdelavo enega reaktorskega volumna pri določenih pogojih. Šele pri vsaj 3 τ pride do stabilizacije pogojev znotraj reaktorja.

Zasnovo za izvedbo 24-urne fotokatalitske oksidacije smo iskali v rezultatih šaržnih poskusov, pri katerih smo pri vseh treh analogih že po 150 min dobili zelo nizke koncentracije bisfenolov. Ravno zato je bil τ pri najpočasnejšem pretoku enak 150 min. Sorazmerno smo izbrali še τ enak 100, 50 in 25 min. Za razliko od šaržnih poskusov smo pri pretočnem sistemu volumen tekočine v reaktorju (V) zmanjšali na 250 mL (z namenom časovne optimizacije izvajanja testov v pretočnem načinu). S pomočjo formule $\tau = V/Q$ (Q = pretok) smo izračunali pretoke, pripadajoče izbranim zadrževalnim časom. Ob

upoštevanju zgoraj navedenega dejstva o potrebnih 3 τ smo izračunali še obdobja trajanja posameznega pretoka (Preglednica V). Obdobja so vključevala čas, enak tistemu, ki je potreben za obdelavo 3 reaktorskih volumnov, ali daljši od tega. Pri našem delu bi morali pri drugem in tretjem pretoku čas še nekoliko podaljšati (vsaj 30 min), da bi zadovoljili zgornji kriterij, vendar je bilo to časovno zelo težko izvedljivo.

Preglednica V: Shema načrta fotokatalitskih poskusov, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju.

Pretok (mL/min)	/	$Q_1 = 10$	$Q_2 = 5$	$Q_3 = 2,5$	$Q_4 = 1,66$
Trajanje posamezne stopnje (min)	30*	90	150	300	900
τ (min)	/	25	50	100	150
Prostornina prečrpane raztopine (mL)	/	900	750	750	1500

*30 min temne faze

$$Q_1 = 250 \text{ mL} / 25 \text{ min} = 10 \text{ mL/min} = 600 \text{ mL/h}$$

$$Q_2 = 250 \text{ mL} / 50 \text{ min} = 5 \text{ mL/min} = 300 \text{ mL/h}$$

$$Q_3 = 250 \text{ mL} / 100 \text{ min} = 2,5 \text{ mL/min} = 150 \text{ mL/h}$$

$$Q_4 = 250 \text{ mL} / 150 \text{ min} = 1,66 \text{ mL/min} = 100 \text{ mL/h}$$

Pred izvedbo poskusov smo morali eksperimentalno določiti, katera stopnja na uporabljeni črpalki (Ismatec) pomeni naš želeni pretok. Omenjena črpalka je večstopenjska (od 0 do 100) in vsaka stopnja pomeni svoj pretok. Za želeni pretok 10 mL/min je bilo potrebno črpalko nastaviti na 99, za 5 mL/min na 47, za 2,5 mL/min na 23 in za 1,66 mL/min na 15.

Pretočni mešalni sistem smo pripravili tako, da smo imeli bučo z raztopino bisfenola, iz katere je cevka vodila preko črpalke v reaktor, v katerega smo na začetku poskusa nalili 250 mL raztopine. Iz reaktorja je vodila debelejša cevka preko črpalke v čašo, v kateri smo zbirali raztopino po fotokatalitski reakciji (Slika 5). Tekom noči smo vzorčili z avtomatskim vzorčevalnikom (CHF122SC ADVANTEC) na vsako uro in pol (čas med vzorčenji je bil nastavljen na 90 min; vzorčil je 10 min, saj je bil pretok 1,66 mL/min, tako da je bilo v vsaki epruveti okoli 16 mL produkta). Ko vzorčevalnik ni vzorčil, je šel produkt direktno v 5-litrsko zbiralno čašo. V času poskusa je bilo potrebno kontrolirati zalogo izhodne raztopine.



Slika 5: Sestavljen sistem za izvedbo fotokatalitske oksidacije v pretočnem mešalnem reaktorju.

Izvedba:

Celoten postopek priprave na izvedbo fotokatalitske oksidacije (odpiranje vode za hlajenje žarnice, vode za hlajenje reaktorja, dovoda zraka (750 mL/min), nastavitve katalizatorja v stojalo, itd.) je bil enak kot pri šaržnih poskusih. Drugačen je bil le začetni volumen pripravljene raztopine preučevanih HM, in sicer 250 mL, prav tako smo pri teh poskusih povečali hitrost mešanja na magnetnem mešalu iz 360 na 400 obratov na minuto. Iz pripravljene izhodne raztopine z bisfenolom smo vzeli vzorec za HPLC analizo ($V = 1600 \mu\text{L}$), sledila je 30-minutna temna faza (za analizo akumulacije HM na katalizator), ob času 0 smo zopet vzeli vzorec ($V = 1600 \mu\text{L}$) in prižgali UV luč ter črpalko nastavili na 99 oz. 10 mL/min. Takšen pretok je bil 90 min. Med tem smo vsakih 15 min vzeli vzorec ($V = 1600 \mu\text{L}$). Po 90 min smo pretok nastavili na 47 oz. 5 mL/min ter vzorčili vsake pol ure. Po dveh urah in pol smo pretok nastavili na 23 oz. 2,5 mL/min ter zopet vzeli 5 vzorcev ($V_{\text{pos. vz.}} = 1600 \mu\text{L}$), in sicer na vsako uro enega. Po 5 h na tem pretoku, smo vklopili avtomatski vzorčevalnik in nastavili pretok na 15 oz. 1,66 mL/min. Kot je omenjeno že zgoraj, je avtomatski vzorčevalnik vzel vzorec ($V = 16 \text{ mL}$) vsako uro in pol. Vse vzorčke, ki smo jih zbrali čez dan, in tiste, ki jih je zbral vzorčevalnik čez noč, smo analizirali na HPLC analizatorju. Raztopine različnih pretokov smo zbirali v različne posode, saj so le-te služile za teste strupenosti ter analize na UV-VIS in TOC analizatorju. Vzorce, ki jih je zbral vzorčevalnik, smo za analizo z UV-VIS in TOC analizatorjem združili v 3 vzorce, in sicer tako, da smo dali prve 3 skupaj, druge tri skupaj ter zadnje štiri skupaj.

3.3.2.2 25-urni test stabilnosti katalizatorja

Za izvedbo preskusa stabilnosti katalizatorja smo uporabili enako pripravljen sistem kot za 24-urno fotokatalitsko oksidacijo bisfenolov. Uporabili smo pripravljeno raztopino BPA.

Preskus je potekal v treh fazah. Takoj po temni fazi smo vklopili črpalko, ki je imela nastavljen pretok na 2,5 mL/min, in sicer pet ur (vzorčenje za analizo na HPLC analizatorju je bilo vsako uro; zadnjih 15 min zadnjih dveh ur smo v plastične posodice zbirali vzorec za analizo na TOC in UV-VIS analizatorju). Nato smo čez noč nastavili črpalko na pretok 1,66 mL/min, ki je bil konstanten 15 ur (avtomatski vzorčevalnik je vzel vzorec vsako uro in pol). Naslednji dan zjutraj smo nastavili pretok nazaj na 2,5 mL/min, zopet vzorčili na vsako uro, zadnjih 15 min zadnjih dveh ur pa zbirali vzorec v posebne posode za shranjevanje za UV-VIS in TOC analizo.

3.4 Karakterizacija katalizatorja

3.4.1 XRD

Rentgenska praškovna difrakcija je najuporabnejša metoda za rutinske in tudi zahtevnejše strukturne preiskave trdnih kristaliničnih vzorcev. Z analizo rentgenskega praškovega difraktograma lahko ugotovimo: a) vrsto materiala, b) kristaliničnost in fazno čistost materiala, c) spremembe v elementni sestavi izomorfni spojin in d) velikost delcev, deformacije v kristalih. (49) Iz zbranih rentgenskih difrakcijskih vzorcev steklenih vlaken, sveže pripravljenega katalizatorja in katalizatorjev, ki sta služila za 4- in 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, smo določili kristalno sestavo. Za merjenje Bragg-ovih difrakcij smo uporabili PANalytical X'pert PRO MPD difraktometer s $\text{CuK}\alpha 1$ sevanjem ($1,54056 \text{ \AA}$) v refleksijski geometriji. Podatki so bili zbrani v območju med 10 in 90° v korakih po $0,034^\circ$.

3.4.2 UV-VIS-DR

UV-VIS-DR spektri steklenih vlaken, sveže pripravljenega imobiliziranega katalizatorja in katalizatorjev, ki sta služila za 4- in 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, so bili posneti pri sobni temperaturi s Perkin-Elmer Lambda 35 UV-VIS spektrofotometrom, ki je opremljen z RSA-PE-19M Praying Mantis nastavkom, namenjenim za merjenje difuzne refleksije vodoravno nameščenih prahov ali trdnih vzorcev s hrapavo površino. Za izvedbo popravka ozadja v območju med 200 in 900 nm smo uporabili bel standard Spectralon[®]. Želeli smo namreč ugotoviti, ali imajo katalizatorji po uporabi še vedno nanosen TiO_2 , ter njihove spektre primerjati s spektrom steklenih vlaken in sveže pripravljenega katalizatorja.

3.4.3 CHNS

V želji, da bi določili količino ogljikovih depozitov, ki so se tekom fotokatalitskih reakcij nakopičili na površini katalizatorja, smo s CHNS elementnim analizatorjem podjetja Perkin-Elmer (model 2400 Series II) analizirali sveže pripravljen katalizator in vse uporabljene katalizatorje.

3.4.5 SEM

Morfologijo in velikost delcev sveže pripravljenega katalizatorja in katalizatorjev, ki sta bila v uporabi za 4- in 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, smo preučili z vrstičnim elektronskim mikroskopom na poljsko emisijo (FE-SEM SUPRA 35VP, Carl Zeiss), opremljenim z energijsko disperzivnim detektorjem (Inca 400, Oxford Instruments). Predpriprava vzorcev za SEM analizo, ki niso elektronsko prevodni, je vključevala naslednje: del katalizatorja smo nalepili na ogljikov trak in še dodatno naprašili z ogljikom ter kovino (ogljik v obliki grafita namreč prevaja električni tok).

3.5 Vrednotenje učinkovitosti fotokatalitskih poskusov

3.5.1 Vrednotenje učinkovitosti fotokatalitskih poskusov s kemijskimi analiznimi metodami

3.5.1.1 HPLC

Kromatografija je separacijska tehnika, pri kateri se spojine ločujejo med seboj s porazdeljevanjem med dve fazi, stacionarno in mobilno. Spojine, ki se rajši porazdelijo v mobilno fazo, hitreje preidejo sistem kot spojine, ki se raje zadržijo na stacionarni fazi. Posamezne spojine iz reakcijske mešanice se torej eluirajo iz sistema glede na njihov naraščajoči porazdelitveni koeficient glede na stacionarno fazo in tako vplivajo na ločevanje. HPLC ali tekočinska kromatografija visoke ločljivosti je vrsta tekočinske kromatografije, ki je bila optimizirana z namenom zagotavljanja hitrih visoko ločljivih separacij. (50) HPLC omogoča identifikacijo, ločitev in kvantifikacijo spojin, ki so prisotne (raztopljene) v tekočih vzorcih. Metoda omogoča identifikacijo spojin, ki se nahajajo v sledovih (ppt-število delcev na trilion). HPLC lahko uporabimo za analizo hrane, farmacevtskih izdelkov, kozmetike, okoljskih matrik, forenzičnih vzorcev in industrijskih kemikalij. Glavni sestavni deli osnovnega HPLC sistema so:

- a) Posoda z mobilno fazo;
- b) Visokotlačna črpalka (zagotavlja ustrezen pretok mobilne faze, običajno v mL/min);

- c) Avtomatski vzorčevalnik (injicira vzorec v stalen tok mobilne faze, ki odnaša vzorec na HPLC kolono);
- d) Kolona (vsebuje stacionarno fazo);
- e) Detektor (zazna spojine, ko se eluirajo iz kolone; poznamo različne tipe detektorjev: UV detektor, fluorescentni detektor, itd; izbira detektorja je odvisna od lastnosti analiziranih spojin);
- f) Računalniški sistem, povezan z detektorjem (omogoča zapisovanje električnih signalov, ki so potrebni za izris kromatograma ter identifikacijo in kvantifikacijo koncentracij sestavin preučevanega vzorca).

V sistemih HPLC sta uporabljena dva osnovna načina elucije, in sicer izokratska in gradientna. Pri izokratski ima mobilna faza enako sestavo tekom celotne analize. Pri gradientni eluciji pa se sestava mobilne faze med ločevanjem spreminja. Ta način je zelo uporaben pri analizi vzorcev, ki vsebujejo spojine s širokim razponom polarnosti. Ko se ločevanje nadaljuje, se elucijska moč mobilne faze povečuje in je tako omogočena elucija tudi bolj zadržanih sestavin vzorca. (51)

Vzorci, ki smo jih v določenih časovnih obdobjih zbirali v vialah, smo analizirali s HPLC analizatorjem Spectra systemTM (Thermo Scientific). Določitve analogov so bile izvedene v izokratskem analitičnem načinu z uporabo kolone BDS Hypersil C18 (100 mm x 4,6 mm; 2,4 µm), termostatisane na 30 °C. Volumen injiciranja je bil 10 µL. Mobilna faza je imela pretok 0,50 mL/min. Pri vseh treh bisfenolih je bila sestavljena iz metanola in ultra čiste vode, različno pa je bilo razmerje med njima. Pri BPA in BPAF je bilo razmerje metanol/ultra čista H₂O 70:30, pri BPF pa 60:40. UV detekcija je bila fiksna pri valovni dolžini 210 nm. V vsako HPLC analizo smo vključili tudi vialo z ultra čisto vodo. Koncentracija bisfenolov v vzorcih je bila določena glede na umeritveno krivuljo, ki je že bila vpeljana v sistem.

3.5.1.2 UV/VIS spektrofotometrija

UV/VIS spektrofotometrija ali UV/VIS spektroskopija se nanaša na absorpcijsko spektroskopijo ultravijolično-vidnega spektralnega območja (185-1100 nm), pri kateri snov (atom, ion, molekula) absorbira energijo fotonov in pri tem prehaja v vzbujeno stanje, pri prehodu nazaj v osnovno pa pride do sproščanja predhodno absorbirane energije, ki je odraz vseh energijskih sprememb snovi. Slikovni prikaz odvisnosti absorbirane energije od valovne dolžine imenujemo absorpcijski spekter, katerega oblika je specifična za snov in

se uporablja za kvalitativno identifikacijo spojine. Položaj absorpcijskega maksimuma je odvisen od energije, ki jo moramo dovesti za vzbujanje elektronov iz osnovnega v vzbujeno stanje. Količino absorbirane svetlobe izmerimo tako, da svetlobo izbrane valovne dolžine pošljemo pravokotno na kiveto, v kateri je raztopina snovi. Pri prehodu svetlobe skozi raztopino snov del svetlobe absorbira, preostali del svetlobe pa izstopi na drugi strani kivete, torej v smeri vhodne svetlobe. Odnos med absorbanco in koncentracijo snovi v raztopini v kiveti opisuje Beer-Lambertov zakon, ki pravi, da je količina svetlobe, ki jo raztopina absorbira, odvisna od dolžine optične poti (l), molarnega absorpcijskega koeficienta snovi (ϵ) in koncentracije snovi v raztopini v kiveti (C): $A = \epsilon C l$. (52)

Za določanje absorpcije smo uporabili Perkin-Elmer Lambda 45 UV/VIS spektrofotometer. Analizirali smo vzorce izhodiščnih raztopin BPA, BPF in BPAF ter njihove raztopine po fotokatalitski oksidaciji. Želeli smo ugotoviti ali so v raztopinah po oksidaciji še prisotni absorpcijski vrhovi, značilni za izhodiščne raztopine, in v primeru da so, ali se s podaljševanjem fotokatalitske reakcije zmanjšujejo ali pa nastajajo vmesni produkti, ki v preučevanem območju (med 200 in 800 nm; absorbanca je bila merjena na vsake 0,2 nm) bolj absorbirajo svetlobo kot izhodiščne raztopine bisfenolov.

3.5.1.3 TOC

S TOC analizo določamo prisotnost organskega ogljika v analiziranih vzorcih, ne pa tudi vrsto spojin, ki vsebujejo ogljik. TOC je zelo razširjena analitska tehnika pri analizah kvalitete vode, saj lahko s temi analizatorji merimo:

- a) Celotni ogljik (TC): merjenje vsega ogljika (organskega in anorganskega), prisotnega v preučevanem vzorcu kot en parameter.
- b) Celotni organski ogljik (TOC): seštevek vsega organskega ogljika, prisotnega v vzorcu. Merjenje TOC je lahko direktno. Pri tem pristopu je anorganski ogljik (IC) najprej odstranjen z nakisanjem in prepihanjem, analizator pa nato izmeri preostali ogljik kot TOC. Obstaja pa tudi diferencialna metoda merjenja TOC, pri kateri sta najprej ločeno izmerjena TC in IC. Nato se vrednost TOC izračuna z odštetjem IC od TC.
- c) Anorganski ogljik (IC): vključuje karbonat, bikarbonat in raztopljeni CO_2 . IC je analiziran v tekočih vzorcih z zakisanjem z anorgansko kislino do pH 3 ali nižje in nato prepihanjem s tokom inertnega plina. Zakisanje pretvori karbonate in

bikarbonate v CO₂, ki je nato skupaj z raztopljenim CO₂ odstranjen s tokom plina ali izmerjen, da dobimo vrednost IC.

- d) Hlapni organski ogljik (POC): hlapne ali pol hlapne organske komponente, razpršene iz vzorca, ki običajno ne predstavljajo več kot 1 % celotnega ogljika v vzorcih.
- e) Nehlapni organski ogljik (NPOC=nonpurgeable organic carbon).

Merjenje TOC je sestavljeno iz treh korakov: a) oksidacije organskega ogljika v vzorcu, b) detekcije (pogosta je uporaba NDIR detektorja) in kvantifikacije oksidirane ogljika (CO₂) in c) prikaza rezultatov v enotah mase ogljika na volumen vzorca. (53,54)

Raven mineralizacije, to je celotne odstranitve organske snovi v odvzetih raztopinah po fotokatalitski oksidaciji, smo določili v smislu celotnega organskega ogljika (TOC). Uporabili smo TOC analizator, opremljen z visoko napetostnim NDIR detektorjem (Teledyne Tekmar, model Torch). Uporabili smo visoko temperaturno katalitično oksidacijo (HTCO) pri 750 °C, ki odšteje izmerjen anorganski ogljik (le-ta je odstranjen iz vzorca s prepihanjem nakisanega vzorca z očiščenim plinom) od merjenega organskega ogljika, ki v tem primeru ustreza vsebini TOC. V vsako analizo smo vključili standardne raztopine, s pomočjo katerih smo izračunali umeritveno krivuljo (na x os smo nanašali vrednost NDIR (Abs), ki jih je določil analizator, na y pa koncentracijo standardov), ki nam je omogočila izračun koncentracije. Prav tako smo v vsako analizo vključili tudi izhodiščne raztopine bisfenolov, saj smo le tako lahko izračunali odstotek odstranitve TOC v končnih raztopinah. Za merjenje TOC smo odvzeli vzorce le ob koncu fotokatalitskih poskusov oziroma v pretočnem sistemu iz zbranih raztopin posameznih pretokov, saj smo za to analizo potrebovali večje količine vzorcev (25 mL) in bi lahko imel odvzem le-teh med potekom poskusa znaten vpliv na napredek fotokatalitske odstranitve obravnavanih analogov.

3.5.1.4 Ionska kromatografija

Z ionsko kromatografijo smo določili koncentracijo prostega fluoridnega iona v izhodiščni raztopini BPAF, končnih raztopinah fotokatalitskih poskusov, izvedenih v šaržnem reaktorju, in raztopinah posameznih pretokov 24-urne fotokatalitske reakcije, izvedene v pretočnem mešalnem sistemu. Analize smo izvedli z analizatorjem IC-DIONEX AS (Thermo Scientific™ Dionex™). Vzorce in standarda za ionsko kromatografijo smo prefiltrirali čez filter in jih nato odpipetirali v viala. Potrebno je bilo pripraviti ustrezna

standarda (koncentracija je odvisna od pričakovanih koncentracij ionov, v tem primeru fluora), in sicer tako, da je bila končna koncentracija le-teh 0,5 in 1 mg/L. Rezultati so bili v obliki površin (angl. Area). Za izračun koncentracije prostega iona smo uporabili preprosti sklepní izračun. Upoštevali pa smo tisti standard, katerega površina je bila bližje površini za posamezen vzorec.

$\text{konc.}_{\text{std}} \dots \text{Area}_{\text{std}}$

$x_{\text{vz}} \dots \text{Area}_{\text{vz}}$

$$x_{\text{vz}} = (\text{konc.}_{\text{std}} * \text{Area}_{\text{vz}}) / \text{Area}_{\text{std}}$$

3.5.2 Vrednotenje učinkovitosti fotokatalitskih poskusov z biološkimi testi strupenosti

3.5.2.1 Akutni testi strupenosti z vodno bolho *Daphnia magna*

Akutni test strupenosti z vodno bolho *Daphnia magna* smo izvajali v skladu z ISO standardom 6341:2013. Vsak dan smo odstranili vse novorojene vodne bolhe iz akvarijev, tako da smo dobili naslednji dan nove vodne bolhe, mlajše od 24 ur, saj smo le-te potrebovali za izvedbo testa.

Kulturo vodnih bolh smo dobili iz inštituta ECT Oekotoxikologie, Nemčija. Vodne bolhe gojimo v 3-litrskih akvarijih (pokritih s steklenimi pokrovi), v katere nalijemo po 2,5 litra modificiranega M4 medija; začetna gostota vodnih bolh je 20 vodnih bolh v 2,5 litra. Akvarije postavimo pod belo fluorescenčno žarnico (dolžina 120 cm, 36 W) tako, da je intenziteta svetlobe približno 1800 luxov in dnevno nočni cikel 16 h svetlobe/8 h teme. Vodne bolhe hranimo 4x tedensko (torek, četrtek, sobota, nedelja) z enoceličnimi zelenimi algami *Desmodesmus subspicatus* Chodat 1926 iz zbirke kultur alg v Nemčiji (SAG 86/81, SAG Culture Collection of Algae, University of Göttingen, Nemčija) in sicer tako, da dobi vsaka vodna bolha med 0,1 in 0,2 mg ogljika na dan (s pipeto odmerimo 30 ml suspenzije alg v akvarij). 2x tedensko (ponedeljek, petek) hranimo vodne bolhe s Tetramin[®], Tetra (26,7 mg/akvarij), 1x tedensko (sreda) pa s suhim kvasom (5 µg/akvarij).

Medij za gojenje vodnih bolh in kronične teste (M4) smo pripravili tako, da smo v 10 L bučo odpipetirali raztopine po sledečem zaporedju:

- 40 mL raztopine 1.1. (CaCl₂ raztopina),
- 10 mL raztopine 1.2. (MgSO₄·7H₂O raztopina),
- 10 mL raztopine 1.3. (raztopina kalijevega klorida),

- 10 mL raztopine 1.4. (NaHCO_3 raztopina),
- 1 mL raztopine 2.1. (kationska raztopina, pripravljena iz $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, LiCl , RbCl , $\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, ZnCl_2 in $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)
- 5 mL raztopine 2.2. (anionska raztopina, pripravljena iz NaNO_3 , H_3BO_3 , NaBr , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, KJ , Na_2SeO_3 in NH_4VO_3)
- 2 mL raztopine 2.3. (silikatna raztopina; Na_2SiO_3),
- 50 mL raztopine 2.4. (ferram/EDTA raztopina, pripravljena iz $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ in $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$),
- 5 mL raztopine 2.5. (fosfatna raztopina, pripravljena iz KH_2PO_4 in K_2HPO_4),
- 1 mL raztopine 2.6. (vitaminska raztopina, pripravljena iz tiamin hidroklorida (B1), cianokobalamina (B12) in biotina (B7); globoko zamrznjena)

ter dolili 9866 mL ultra čiste vode.

Priprava vzorcev

a) Razredčevalna voda

V 10 L bučo smo odpipetirali pripravljene raztopine po sledečem zaporedju: 40 mL raztopine 1.1., 10 mL raztopine 1.2., 10 mL raztopine 1.3. in 10 mL raztopine 1.4. Temu smo dodali ultra čisto H_2O do oznake za 10 L.

b) Vzorci

Vzorci izhodiščnih raztopin in raztopin po fotokatalitski oksidaciji smo pripravljali v 100 mL bučkah, v katere smo odpipetirali vse 4 raztopine, ki so potrebne za pripravo razredčevalne vode. V ultra čisti vodi, v kateri so pripravljene raztopine bisfenolov, vodne bolhe namreč ne preživijo. Torej smo v vsako bučko odpipetirali 0,4 mL raztopine 1.1. ter 0,1 mL raztopine 1.2., 1.3. in 1.4. ter dodali vzorec do oznake. Kontrolni vzorec je bila pripravljena razredčevalna voda. Velja pravilo, da pH vrednost, če je potrebno, uravnamo na pH vrednost razredčevalne vode ($\text{pH} = 7,8 + 0,5$) z uporabo HCl ali NaOH tako, da dodan volumen ne presega 5 %. V primeru uravnavanja pH vrednosti je to potrebno navesti v poročilu o testu.

Pred izvedbo akutnih testov strupenosti z vodnimi bolhami je potrebno preveriti občutljivost vodnih bolh in usklajenost s postopkom, in sicer v obdobju enega meseca z določitvijo 24 h EC_{50} za kalijev dikromat. Če dobljena vrednost za 24 h EC_{50} pade izven

območja med 0,6 in 2,1 mg/L, preverimo pravilnost izvedbe postopka, način gojenja vodnih bolh in uporabimo novo kulturo vodnih bolh, če je potrebno.

Izvedba testa:

Manj kot 24 ur stare vodne bolhe smo pobrali iz akvarijev v čaše, jih nato s Pasteurjevo pipeto prenesli v izhodno petrijevko, iz nje pa po 10 vodnih bolh v vsako testno petrijevko, v katero smo pred tem nalili 30 mL razredčevalne vode (kontrolni vzorec) ali preučevanih vzorcev. V standardu ISO 6341:2013 je namreč navedeno, da mora biti za vsako vodno bolho na razpolago 2 mL testne raztopine. Vedno smo delali v paralelkah. Pri prenašanju bolh smo morali paziti, da smo odpipetirali čim manj gojitvene tekočine, po drugi strani pa smo morali biti pozorni, da so bile bolhe vedno v kapljici vode, saj nikoli ne sme priti zračni mehurček pod njihov karapaks (to je za njih namreč usodno in negativno vpliva na izvedbo testa, saj v tem primeru ne vemo, ali bolhe poginejo zaradi dikromata oz. bisfenola ali zaradi napak pri prenosu iz akvarija). Petrijevke z vodnimi bolhami smo postavili v termostatisiran prostor s temperaturo (20 ± 2) °C ter zagotovili dnevno nočni cikel 16 h svetlobe/8 h teme. Med testom vodne bolhe nismo hranili.

Po 24-ih in 48-ih urah smo prešteli gibajoče živali v vseh posodah. Za negibno vodno bolho smatramo bolho, ki 15 sekund po rahlem tresenju testne posode ne plava (vendar še lahko premika antene).

Rezultati so veljavni, če so izpolnjeni naslednji pogoji:

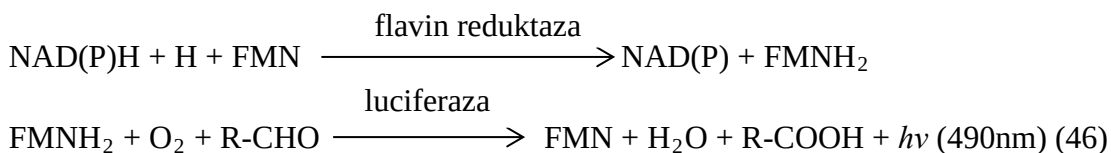
- odstotek negibnih vodnih bolh v kontroli je nižji ali enak 10 %;
- 24 h EC₅₀ za kalijev dikromat je v območju med 0,6 in 2,1 mg/L. (55)

3.5.2.2 Akutni testi strupenosti z bakterijo *Vibrio fischeri*

Za izvedbo tega preskusa strupenosti potrebujemo komercialno dostopni testni komplet proizvajalca Dr. Lange-DRLANGE LUMIS[®]therm, ki vsebuje epruvete z liofiliziranimi luminiscenčnimi bakterijami vrste *Vibrio fischeri* sev NRRL-B-11177, reaktivacijsko raztopino (glukoza, natrijev klorid, pH 7,0), standardno raztopino (7,5 % NaCl) in reakcijske epruvete (15 mL). Test smo izvedli v skladu z ISO standardom 11348-2. (56)

Osnovni princip testa: v bioluminiscenčnih bakterijah se FMN (flavin mononukleotid) reducira do FMNH₂ z NAD(P)H (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat) ob pomoči flavin reduktaze. Prosti FMNH₂ nato sodeluje v reakciji proizvodnje svetlobe, katero katalizira

encim bakterijska luciferaza, ki ima vezavno mesto za FMNH₂. Pri tej reakciji sodelujejo tudi molekularni kisik in alifatski aldehid (R-CHO). Končni produkt te reakcije je produkcija modro-zelene svetlobe (490 nm).

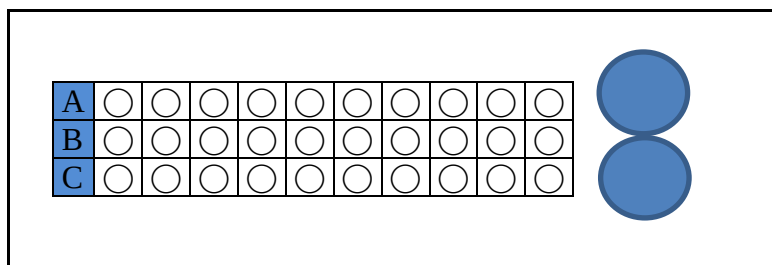


Priprava vzorcev

Vsem vzorcem (izhodiščnim raztopinam bisfenolov in raztopinam po fotokatalitski oksidaciji) smo dodali NaCl, in sicer toliko, da so na koncu vsebovali 2 % NaCl. Začetni volumen vzorcev je bil 10 mL, kar pomeni, da smo vsakemu dodali 0,2 g NaCl. Pripravili smo tudi 2 % raztopino NaCl (kontrola), in sicer tako, da smo 0,2 g NaCl raztopili v 10 mL ultra čiste vode. Tako pripravljenim vzorcem smo izmerili pH in le-tega po potrebi uravnali na $7,0 \pm 0,2$ (z 0,1 M NaOH ali 1,0 M HCl). (56)

Izvedba testa

15 minut pred začetkom testa smo vklopili luminometer in termoblok. Iz hladilnika smo vzeli reaktivacijsko raztopino, katere 12 mL smo odpipetirali v stekleno epruveto in jo dali termostatirati v termoblok za 15 min. Vmes jo je bilo potrebno mešati, da ni imel samo en del raztopine 15 °C. Termoblok je sestavljen iz 3 vrstic, od katerih ima vsaka 10 lukenj za kivete. Poleg tega je na termobloku tudi mesto za reaktivacijsko raztopino in liofilizirane bakterije (Slika 6). Ko smo imeli kivete naložene v termoblok, smo iz zamrzovalnika vzeli bakterije, jih odtalili v vodni kopeli (čša s toplo vodo-sobna temperatura), in sicer 2 min (tu je čas zelo pomemben). Odtaljenim bakterijam smo dodali 0,5 mL reaktivacijske raztopine, premešali na mešalu in jih dali v termoblok. Čez nekaj časa smo vanje odpipetirali še 4 mL reaktivacijske raztopine. V kivete iz vrstice A smo odpipetirali 2 mL kontrole, vzorcev in standarda. Kontrola je vedno v A1, standard v A10, vmes pa so vzorci.



Slika 6: Shema termobloka.

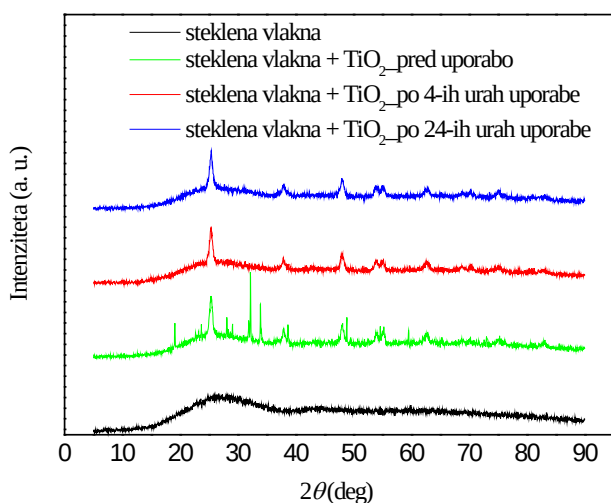
V kivete B1-C10 smo odpipetirali 0,2 mL resuspendiranih bakterij in termostatirali 15 min. Vrstici B in C predstavljata paralelki. V programu LUMISoft 4 smo vpisali izvajalca testa, ime testa, številko serije bakterij in datum izvedbe testa. Nato smo navedli še število vzorcev, časovni interval med merjenjem (običajno je 30 s), število kontrol (1) ter čas inkubacije (30 min). Na koncu smo vpisali še imena vzorcev, označili vrsto testa (G1 measurment) in navedli število blokov (1) ter zagnali analizo podatkov. Iz termobloka smo vzeli kiveto B1, jo dali v luminometer in začeli z merjenjem. Ko je bila luminiscenca izmerjena, smo dodali 0,8 mL kontrole iz A1, premešali in kiveto vrnili nazaj v termoblok. Nato smo počakali, da je pretekel čas med merjenji (30 s), vzeli kiveto C1, izmerili luminiscenco, ji dodali 0,8 mL kontrole iz A1, jo vrnili nazaj v termoblok in zopet počakali, da je minil interval med merjenji. Nato smo vzeli kiveto B2 in ponovili postopek. To smo ponavljali, dokler nismo izmerili začetne luminiscence vseh kivet z vzorci, kontrolo in standardom. Ko je pretekel čas inkubacije (30 min) za kiveto B1, smo le-to zopet vstavili v luminometer in izmerili luminiscenco. Čez naslednjih 30 sekund smo vzeli kiveto C1 ter zopet izmerili luminiscenco. To smo ponavljali toliko časa, da smo imeli izmerjeno končno luminiscenco vseh vzorcev, kontrole in standarda. Na koncu je računalniški program rezultate obdelal glede na kontrolni vzorec, ki ni vseboval testirane kemikalije, in nam podal % inhibicije luminiscence oz. vrednost IC50 in nam preko tega povedal, kakšna je strupenost vzorcev na preučevani testni organizem.

Test je veljaven, če je zaviranje v vzorcu s pozitivno kontrolo (7,5 % NaCl) med 40 in 60 % ter če je odstopanje paralelnih meritev od povprečja manjše kot 3 %. (56)

4 Rezultati in razprava

4.1 Karakterizacija imobiliziranega katalizatorja na osnovi TiO_2 z rentgensko praškovo difrakcijo (XRD), UV-VIS difuzno refleksijo (UV-VIS-DR), CHNS analizo in vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM)

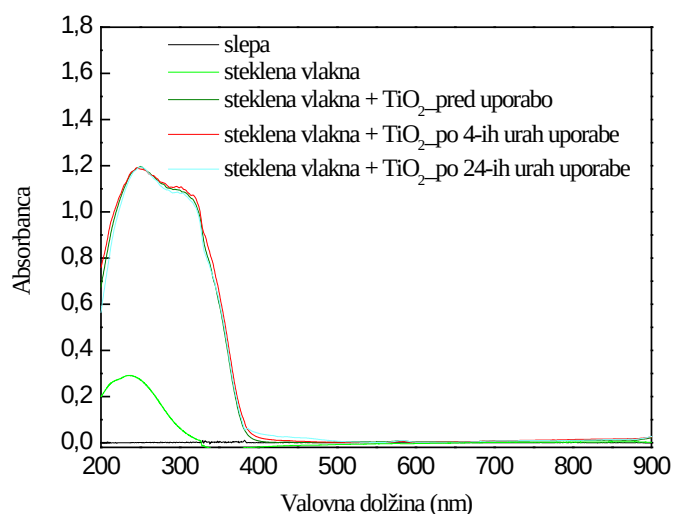
Za karakterizacijo uporabljenega imobiliziranega katalizatorja na osnovi TiO_2 smo uporabili 4 analizne tehnike, in sicer XRD, UV-VIS-DR, CHNS in SEM. XRD analizo smo izvedli z namenom določitve kristalne sestave.



Slika 7: Praškovi difraktogram štirih vzorcev: steklena vlakna; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 pred uporabo; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 po 4-ih in po 24-ih urah uporabe v območju $2\theta = 5-90^\circ$.

Iz praškovnega difraktograma (Slika 7) je razvidno, da je v vzorcih sveže pripravljenega katalizatorja ter katalizatorjev po uporabi (po 4- in 24-urni fotokatalitski oksidaciji BPA) prisoten anataz. Vidimo lahko tipične vrhove za to obliko TiO_2 pri $2\theta = 25,4^\circ$ (1 0 1), $37,8^\circ$ (0 0 4) in $48,1^\circ$ (2 0 0). Takšen rezultat je zelo pomemben, saj je anatazna oblika TiO_2 najbolj učinkovita kristalna oblika za izvedbo fotokatalize. Ima namreč najvišjo fotokatalitsko aktivnost. (36) Pri sveže pripravljenem katalizatorju so prisotni še dodatni vrhovi, ki kažejo na prisotnost natrijevega sulfata (Na_2SO_4). Ta namreč nastane iz prekursorja katalizatorja. Gre za nečistoto, ki se v vodi spere iz katalizatorja. Pri samih steklenih vlaknih ni vrhov značilnih za anatazno obliko TiO_2 , niti vrhov, ki bi kazali na prisotnost Na_2SO_4 . Če primerjamo samo vrhove anataza pri sveže pripravljenem katalizatorju ter pri obeh katalizatorjih po uporabi, opazimo, da z uporabo ni prišlo do bistvene inaktivacije katalizatorja ter da je po reakciji TiO_2 še vedno nanesen na vlakna.

UV-VIS-DR analiza nam je omogočila določitev prisotnosti oziroma odsotnosti TiO_2 ter njegovih absorpcijskih lastnosti na uporabljenih katalizatorjih v primerjavi s svežim.



Slika 8: UV-VIS-DR spekter slepe ter štirih vzorcev: steklena vlakna; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 pred uporabo; steklena vlakna z nanesenim katalizatorjem TiO_2 po 4-ih in po 24-ih urah uporabe.

Sveže pripravljen katalizator in oba katalizatorja po uporabi imajo zelo podoben UV-VIS-DR spekter (Slika 8), s čimer smo dokazali, da je po reakciji TiO_2 še vedno nanesen na steklena vlakna in da absorbira svetlobo v UV območju (med 200 in 400 nm). Katalizator, ki se je uporabljal za 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, ima nekoliko nižjo absorbanco kot sveže pripravljen in tisti, ki je bil v uporabi za 4-urno fotokatalitsko oksidacijo prav tako BPA, vendar je razlika tako majhna, da je zanemarljiva in lahko izvira iz eksperimentalne napake (različen nanos trdnega vzorca v testni nastavek). Iz spektrov smo določili tudi energijsko vrzel ali prepovedani pas posameznega vzorca, torej valovno dolžino, pri kateri začne vzorec absorbirati svetlobo. Prav tako smo izračunali energijo prepovedanega pasu. Rezultati so prikazani v preglednici VI.

Preglednica VI: Valovna dolžina in energija prepovedanega pasu za tri vzorce: sveže pripravljen katalizator; katalizator, ki se je uporabljal za 4-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA; katalizator, ki se je uporabljal za 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA.

Vzorec	Valovna dolžina (nm)	Energija prepovedanega pasu (eV)
steklena vlakna + TiO_2 pred uporabo	383,8	3,23
steklena vlakna + TiO_2 po 4-ih urah uporabe	380,0	3,26
steklena vlakna + TiO_2 po 24-ih urah uporabe	386,6	3,21

Energija vrzeli je bila pri naših vzorcih 3,2 eV, kar je v skladu z literaturnimi podatki za čisto obliko anataza (34), ki smo jo potrdili z rentgensko praškovo difrakcijo.

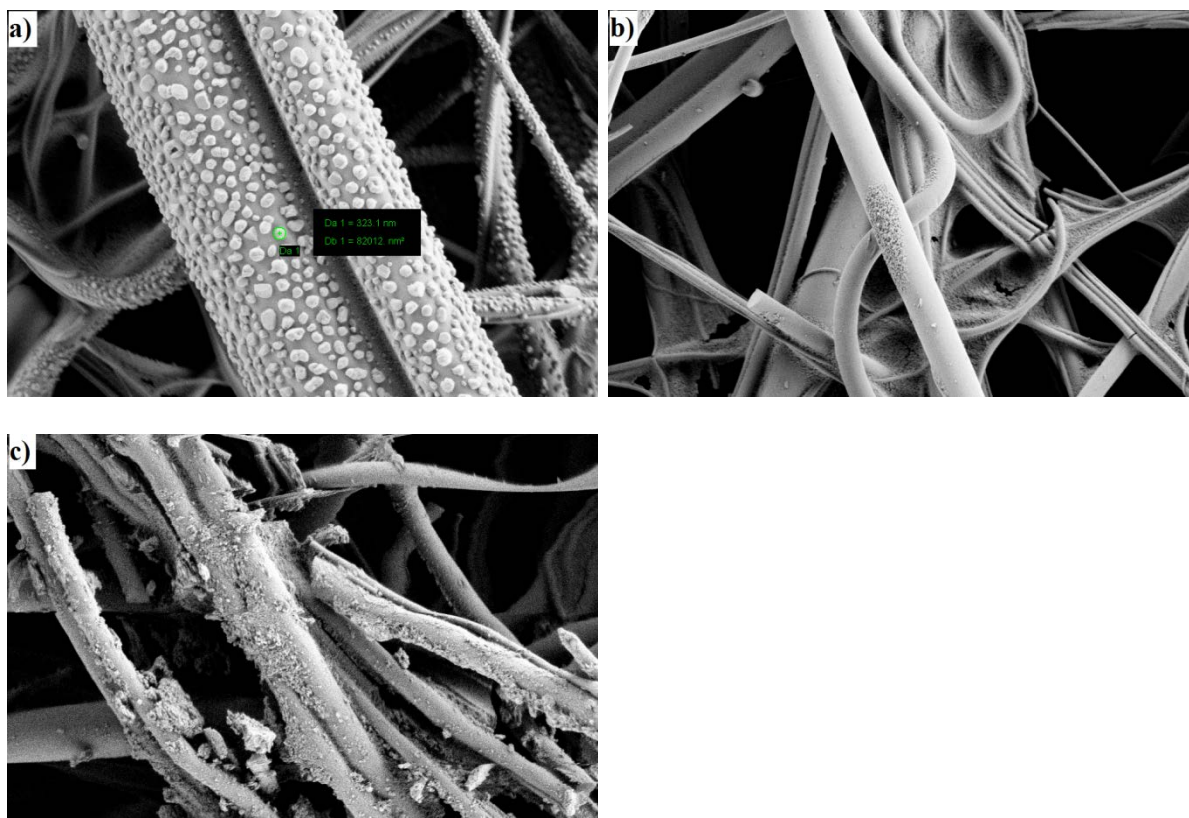
S CHNS analizo smo določali količino ogljika, ki se je tekom fotokatalitskih oksidacij vezal na katalizatorje. Rezultati so prikazani v preglednici VII.

Preglednica VII: S CHNS elementnim analizatorjem izmerjen odstotek ogljika na uporabljenih katalizatorjih v šaržnem reaktorju (4- in 6-urna fotokatalitska oksidacija BPA in BPF ter 4-, 6- in 8-urna fotokatalitska oksidacija BPAF) in pretočnem mešalnem reaktorju (24-urna fotokatalitska oksidacija BPA, BPF in BPAF ter 25-urni test stabilnosti katalizatorja).

VZOREC	% C, vezanega na katalizator
Steklena vlakna + TiO ₂ _pred uporabo	0,21
BPA_4h_TiO ₂	0,14
BPA_6h_TiO ₂	0,05
BPF_4h_TiO ₂	0,09
BPF_6h_TiO ₂	0,07
BPAF_4h_TiO ₂	0,19
BPAF_6h_TiO ₂	0,13
BPAF_8h_TiO ₂	0,13
BPA_24h_TiO ₂	0,15
BPF_24h_TiO ₂	0,17
BPAF_24h_TiO ₂	0,15
BPA_25h_TiO ₂ -test stabilnosti	0,19

Sveže pripravljen katalizator je imel vezanega 0,21 % ogljika (Preglednica VII), kar je več kot katalizator, ki se je uporabljal za katerokoli izvedeno fotokatalitsko reakcijo. To pomeni, da se bisfenoli in njihovi razgradni produkti med potekom fotokatalitske oksidacije niso vezali na površino katalizatorja in da je odstotek celotnega organskega ogljika, izmerjen s TOC analizatorjem, enak realni odstranitvi TOC. Rezultat, ki smo ga dobili s TOC analizatorjem, odstotek odstranitve TOC, je namreč seštevku TOC, ki se je vezal na katalizator, in realnega TOC (tistega, ki se je pretvoril v CO₂ in H₂O). Torej se padec TOC ni zgodil zaradi vezave ogljika na uporabljen katalizator, ampak je posledica učinkovite mineralizacije obravnavanih onesnažil ob uporabi TiO₂, imobiliziranega na steklena vlakna.

Zanimala sta nas tudi velikost in morfologija delcev sveže pripravljenega katalizatorja in katalizatorjev, ki sta bila v uporabi za 4- in 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA. Te podatke smo pridobili z analizo katalizatorjev z vrstičnim elektronskim mikroskopom.



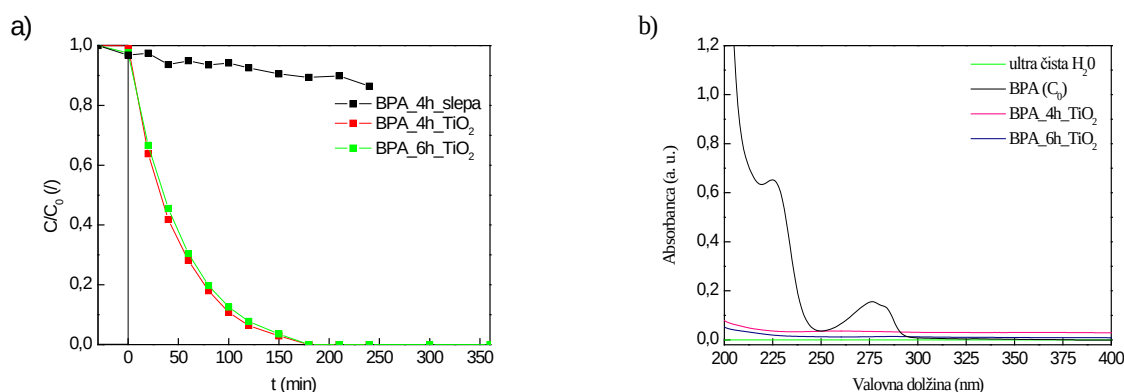
Slika 9: Posnetki vrstične elektronske mikroskopije s prikazom a) sveže pripravljenega katalizatorja (steklena vlakna + TiO_2 _pred uporabo), b) katalizatorja, ki se je uporabljal za 4-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, in c) katalizatorja, ki se je uporabljal za 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA, pri 25000-kratni povečavi.

Pri sveže pripravljenem katalizatorju (Slika 9a) so na vlaknih prisotni skupki, veliki okoli 300 nm, kar nakazuje na to, da se površini ne omakata, saj bi se v nasprotnem primeru TiO_2 bolj razvlekel po vlaknu (skupki bi bili manjši in bolj dispergirani). Svež katalizator vsebuje Na_2SO_4 , ki se hitro odstrani po začetku reakcije. Pri katalizatorju, ki se je uporabljal za 4-urno fotokatalitsko reakcijo (Slika 9b), so se delci nakopičili oz. zagozdili v vmesne prostore. Potrebno pa je poudariti, da so ti delci bistveno manjši. Veliki so namreč okoli 30 nm, kar pomeni, da so desetkrat manjši kot pri svežem katalizatorju. To nakazuje na dejstvo, da se Na_2SO_4 takoj, ko damo katalizator v vodo, raztopi, istočasno pa delci razpadejo na manjše delčke (to se zgodi še v temni fazi). Vrstični elektronski posnetek katalizatorja, ki se je uporabljal za 24-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA (Slika 9c), je podoben posnetku katalizatorja, ki je služil za 4-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA. Na določenih vlaknih je še moč opaziti ostanke katalizatorja, medtem ko je v prostorih med vlakni še nekoliko manj nakopičenih delcev kot pri katalizatorju po 4-urni fotokatalitski reakciji. TiO_2 na površini verjetno držijo površinske hidroksilne skupine.

4.2 Fotokatalitski poskusi, izvedeni v šaržnem in pretočnem mešalnem reaktorju

a.) Fotokatalitsko odstranjevanje BPA, BPF in BPAF v šaržnem reaktorju

V šaržnem reaktorju smo izvedli 4- in 6-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA in BPF ter 4-, 6- in 8-urno fotokatalitsko oksidacijo BPAF. Tekom fotokatalitskih poskusov smo s HPLC spremljali padec koncentracije posameznega bisfenola. V raztopinah, ki smo jih pridobili po reakcijah, pa smo z UV-VIS spektrofotometrijo določali absorpcijske lastnosti produktov v primerjavi z izhodiščnimi raztopinami bisfenolov.

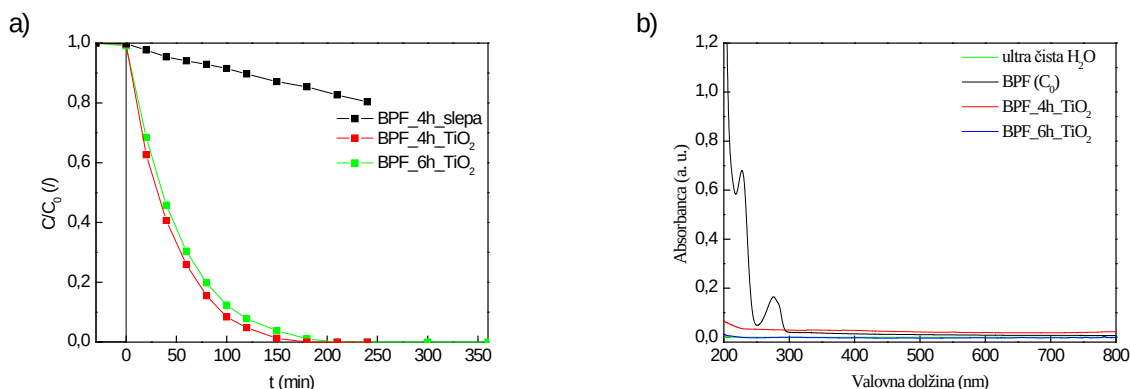


Slika 10: a) Fotokatalitska razgradnja BPA v šaržnem reaktorju v prisotnosti le UV svetlobe (slepa) in razgradnja v prisotnosti na steklena vlakna imobiliziranega TiO₂, obsevanega z UV svetlobo za 4 in 6 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H₂O ter 3 vzorcev: izhodiščne raztopine BPA (10 mg/L), raztopine po 4-urni in raztopine po 6-urni fotokatalitski reakciji.

Fotokatalitsko aktivnost na steklena vlakna imobiliziranega TiO₂ smo ovrednotili s pomočjo razgradnje v vodi raztopljenega onesnažila BPA ob obsevanju z UV svetlobo (Slika 10a). Najprej so eksperimenti potekali v temi (30 min), da bi lahko določili količino BPA, ki se adsorbira na površino katalizatorja. Dobljeni rezultati prikazujejo zanemarljivo zmanjšanje koncentracije BPA zaradi adsorpcije. Krivulji razgradnje BPA pri 4- in 6-urnem obsevanju z UV svetlobo sta zelo skladni, kar kaže na stabilnost delovanja katalizatorja in ponovljivost. Pri obeh fotokatalitskih poskusih je koncentracija BPA padla na 0 mg/L že po 180 min po začetku obsevanja z UV svetlobo. Izvedli smo tudi 4-urno fotolitsko razgradnjo BPA, pri čemer smo ugotovili, da se pri reakciji, pri kateri raztopino obsevamo z UV svetlobo v odsotnosti katalizatorja, koncentracija BPA zniža zelo malo v primerjavi s koncentracijo ob času 0 (samo 0,980 mg/L), kar pomeni, da je BPA stabilna molekula in za razgradnjo potrebujemo katalizator.

Učinkovito razgradnjo BPA potrjujejo tudi UV-VIS spektri (Slika 10b), saj absorpcijskih vrhov BPA, ki sta prisotna v izhodiščni raztopini tega onesnažila (pri 225 nm in 276 nm), v

raztopinah po 4- in 6-urni fotokatalitski oksidaciji ni več moč zaznati oziroma sta zanemarljivo majhna. Prav tako lahko na podlagi dobljenega spektra zaključimo, da 6-urna fotokatalitska oksidacija še bolj učinkovito odstrani BPA in njegove razgradne produkte kot 4-urna.

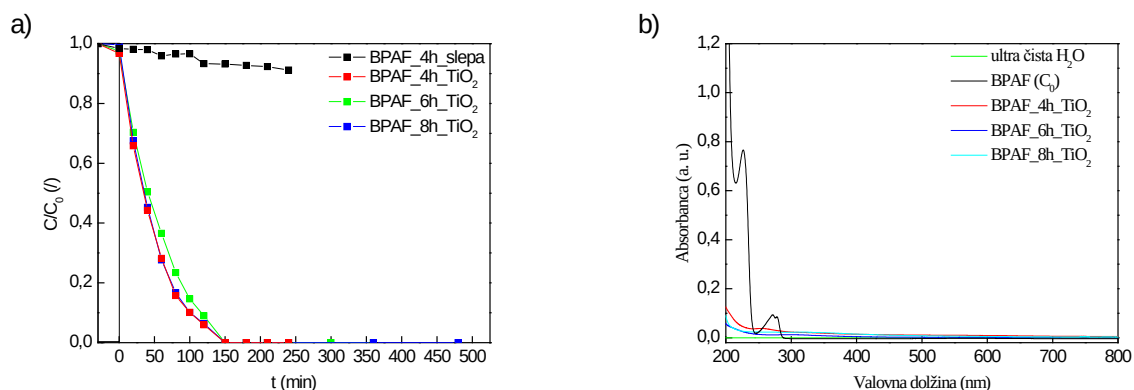


Slika 11: a) Fotokatalitska razgradnja BPF v šaržnem reaktorju v prisotnosti le UV svetlobe (slepa) in razgradnja v prisotnosti na steklena vlakna imobiliziranega TiO_2 , obsevanega z UV svetlobo za 4 in 6 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 3 vzorcev: izhodiščne raztopine BPF (8,77 mg/L), raztopine po 4-urni in raztopine po 6-urni fotokatalitski reakciji.

Fotokatalitsko aktivnost na steklena vlakna imobiliziranega TiO_2 smo ovrednotili tudi s pomočjo razgradnje BPF ob obsevanju z UV svetlobo (Slika 11a) in ga primerjali z razgradnjo BPA. Kot običajno smo poskuse začeli s temno fazo (30 min) ter tako spremljali adsorpcijo BPF, ki je zanemarljivo majhna. Med krivuljama razgradnje BPF pri 4- in 6-urnem obsevanju z UV svetlobo so malce večja odstopanja kot pri fotokatalitski razgradnji drugega obravnavanega analoga BPA. Vzroke za to lahko iščemo v pripravi katalizatorja (razlike v masi TiO_2 na steklenih vlaknih), lahko pa gre za eksperimentalno napako (žarnica med fotokatalitsko reakcijo ni na sredini obroča katalizatorja). Pri fotokatalitski oksidaciji, ki je potekala 4 h, je koncentracija BPF padla na 0 mg/L že po 180 min po začetku obsevanja z UV svetlobo, pri 6-urni pa po 210 min, čeprav je bila že po 180 min zelo nizka. Tako kot pri BPA smo tudi za analog BPF izvedli 4-urno fotolizno razgradnjo in ugotovili, da koncentracija BPF pade malo v primerjavi s koncentracijo ob času 0 (1,670 mg/L), kar kaže na stabilnost molekule BPF.

Učinkovito razgradnjo BPF potrjujejo tudi UV-VIS spektri (Slika 11b), saj v raztopinah po 4- in 6-urni fotokatalitski oksidaciji absorpcijskih vrhov BPF, ki sta prisotna v izhodiščni raztopini tega onesnažila (pri 227,8 nm in 276,2 nm), ni več moč zaznati oziroma sta zanemarljivo majhna. Spekter raztopine po 6-urni fotokatalitski oksidaciji je skoraj

vzporeden z UV-VIS spektrom ultra čiste H₂O, torej nam je v analiziranem času uspelo zelo dobro odstraniti BPF in njegove razgradne produkte.



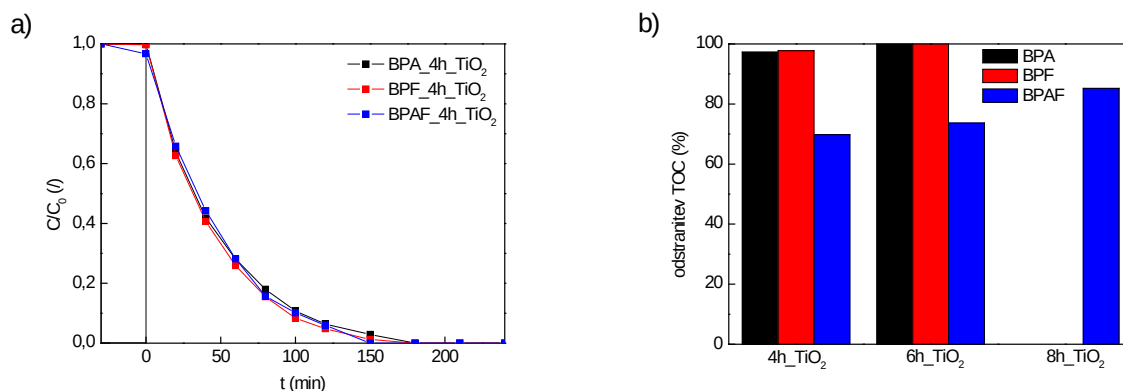
Slika 12: a) Fotokatalitska razgradnja BPAF v šaržnem reaktorju v prisotnosti le UV svetlobe (slepa) in razgradnja v prisotnosti na steklena vlakna imobiliziranega TiO₂, obsevanega z UV svetlobo za 4, 6 in 8 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H₂O ter 4 vzorcev: izhodiščne raztopine BPAF (14,73 mg/L) ter raztopin po 4-, 6- in 8-urni fotokatalitski reakciji.

V šaržnem reaktorju smo izvedli tudi fotokatalitsko oksidacijo BPAF (Slika 12a). Rezultati prvih 30 min reakcije v temi prikazujejo zanemarljivo zmanjšanje koncentracije BPAF kot posledica adsorpcije. V primerjavi z BPA so med krivuljami razgradnje BPAF pri 4-, 6- in 8-urni reakciji večja odstopanja, kar je bilo zaznano že pri BPF. Zopet gre lahko za napake analitika, narejene med samo pripravo katalizatorja ali pa med potekom fotokatalitske oksidacije. 4-urna fotolitska oksidacija je razkrila majhen padec koncentracije BPAF v primerjavi s koncentracijo ob prižigu UV luči (1,060 mg/L), kar pomeni, da je BPAF tako kot BPA in BPF stabilna molekula.

UV-VIS spektri raztopin po 4-, 6- in 8-urni fotokatalitski oksidaciji kažejo na odsotnost absorpcijskih vrhov izhodiščne raztopine BPAF (pri 226,6 in 221,6 nm) (Slika 12b). Za razliko od drugih dveh analogov pa pri BPAF ni bistvene razlike v spektrih produktov različno dolgih fotokatalitskih reakcij. Spekter produkta 8-urne reakcije izkazuje celo višjo absorpcijo kot spekter produkta 6-urne reakcije. Vzrok za to je lahko prisotnost vmesnih produktov, ki bolj absorbirajo v območju med 200 in 300 nm kot pa vmesni produkti 6-urne fotokatalitske pretvorbe. To bi lahko zagotovo vedeli le, če bi določili spojine, ki so prisotne v posameznih končnih raztopinah.

b.) Primerjava učinkovitosti 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih oksidacij vseh 3 bisfenolov, izvedenih v šaržnem reaktorju, s kemijskimi analiznimi metodami in biološkimi testi strupenosti

S TOC analizo smo primerjali odstotke odstranitve celotnega organskega ogljika pri obravnavanih bisfenolih, s testi strupenosti, izvedenimi na vodnih bolhah *Daphnia magna* in bakterijah *Vibrio fischeri*, pa primerjali strupenost raztopin po fotokatalitski oksidaciji.



Slika 13: a) Fotokatalitska razgradnja vseh treh analogov ob 4 h obsevanju z UV svetlobo. b) Primerjava odstranitve celotnega organskega ogljika (TOC) pri različno dolgih fotokatalitskih poskusih, izvedenih v šaržnem reaktorju, za vse tri obravnavane bisfenole.

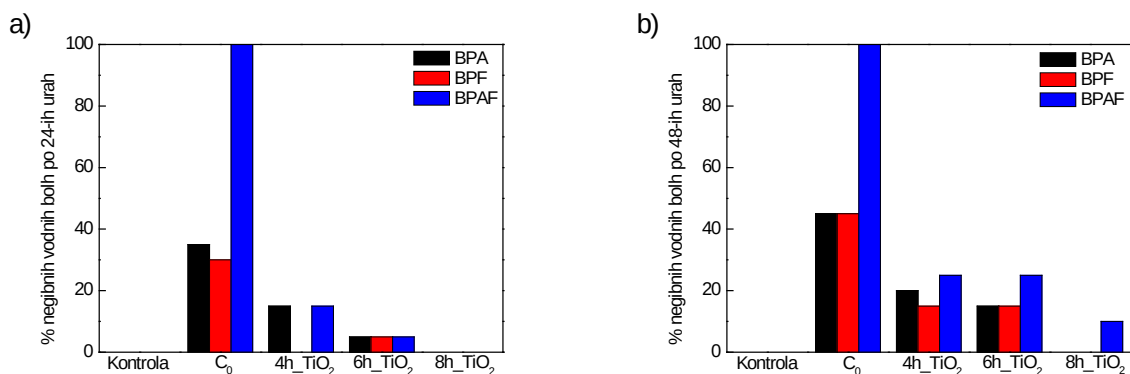
Pri večini fotokatalitskih reakcij je veliko lažje oksidirati izhodiščno onesnažilo, kot pa odstraniti tudi njegove razgradne produkte in s tem celoten organski ogljik, kar je želeni cilj fotokatalitskega odstranjevanja onesnažil. Tudi pri naših poskusih, izvedenih v šaržnem reaktorju, je bilo tako. Čeprav je večina krivulj konverzije BPA, BPF in BPAF dosegla $C/C_0 = 0$ že znotraj 150 min reakcijskega časa (Slika 13a), pa je po koncu 4-, 6- in 8-urnih reakcij še vedno ostalo nekaj celotnega organskega ogljika, kar je najbolj izrazito pri BPAF (Slika 13b). S 4-urno fotokatalitsko oksidacijo BPA in BPF smo se namreč zelo približali 100 % odstranitvi TOC, kar nam je dokončno uspelo ob podaljšanju reakcije za 2 uri. Veliko slabša je bila odstranitev TOC pri analogu BPAF, saj smo tudi pri 8-urni fotokatalitski oksidaciji uspeli doseči le 85,2 % odstranitve TOC. Bisfenol AF se namreč bistveno razlikuje od ostalih dveh analogov, saj ima v svoji strukturi halogeni element. Vsebuje namreč 6 atomov fluora. Z uporabo ionske kromatografije smo določili količino prostega fluorida, saj smo želeli vedeti, ali se med fotokatalitsko reakcijo le-ta odcepi iz spojine ali ne. Rezultati tega merjenja so prikazani v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Odstotek prostega in vezanega F⁻ v izhodiščni raztopini BPAF in raztopinah po različno dolgih fotokatalitskih oksidacijah, izvedenih v šaržnem reaktorju.

VZOREC	% PROSTEGA F ⁻	% VEZANEGA F ⁻
BPAF (C ₀)	0,017	99,983
BPAF_4h_TiO ₂	25,897	74,103
BPAF_6h_TiO ₂	29,271	70,729
BPAF_8h_TiO ₂	31,527	68,473

Največ fluridnega iona se ga je sprostilo pri 4-urni fotokatalitski oksidaciji. Ob podaljšanju le-te pa se procent prostega F⁻ zelo malo poveča. Torej se večina fluorida odcepi v prvih 4-ih urah reakcije.

Po 8-urni fotokatalitski oksidaciji BPAF je ostalo še 14,8 % TOC. Z ionsko kromatografijo smo izmerili, da je bilo 68,5 % F⁻ še vedno vezanega na ogljik, kar pomeni, da je 4/6 F⁻ še vezanega in to predstavlja 66,6 %. 4 F⁻ so verjetno vezani na 2 C atoma, kar pomeni, da sta 2 C še v raztopini v obliki TOC. BPAF ima 15 C, torej 2 C od 15 C predstavljata 13,3 %, kar je zelo blizu izmerjenim 14,8 %. Pri 4- in 6-urni fotokatalitski oksidaciji BPAF je skladnost manjša, saj so poleg fluora, vezanega na C, prisotni še preostali produkti razgradnje, ki se še niso odstranili (med drugim tudi alifatske kisline). S tem smo pokazali dobro ujemanje rezultatov, pridobljenih s TOC analizatorjem in ionsko kromatografijo. Prav tako pa lahko preko vsebnosti fluora v onesnažilu BPAF razložimo slabšo odstranitev TOC kot pri ostalih dveh bisfenolih. Vez ogljik-fluor (C-F, ~116 kcal/mol) je namreč močnejša kot vez ogljik-vodik (C-H, ~99 kcal/mol), kar zagotavlja BPAF večjo oksidativno stabilnost. (19)



Slika 14: Odstotek negibnih vodnih bolh *Daphnia magna* po a) 24-ih in b) 48-ih urah v kontroli, vzorcih izhodiščnih raztopin bisfenolov (BPA = 10 mg/L; BPF = 8,77 mg/L; BPAF = 14,73 mg/L) in raztopinah po 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih reakcijah.

Pred izvedbo akutnih testov strupenosti z vodno bolho *Daphnia magna* smo preverili občutljivost vodnih bolh in usklajenost s postopkom z določitvijo 24 h EC50 za kalijev dikromat ($K_2Cr_2O_7$). Dobljena vrednost za 24 h EC50 je bila 1,17 mg/L, kar je znotraj dovoljenih meja, torej med 0,6 in 2,1 mg/L (55), kar pomeni, da lahko rezultate realnih vzorcev obravnavamo kot zanesljive.

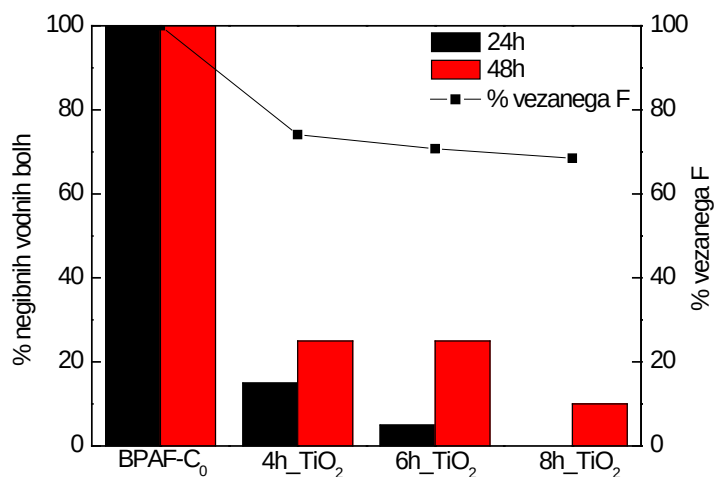
Bistven podatek, ki ga lahko razberemo iz zgornjih dveh grafov (Slika 14), je, da je pri izhodiščni raztopini BPAF bistveno večji odstotek negibnih vodnih bolh (100 % že po 24-ih urah) kot pri BPA in BPF, ki imata podoben učinek na to vrsto vodnih rakov. Podobno je tudi pri raztopinah po fotokatalitski oksidaciji, saj končne raztopine BPAF povzročajo največji odstotek negibnih bolh po 48-ih urah, vendar ta ne preseže 25 %, kar je še en dokaz, da je bil katalizator TiO_2 , imobiliziran na steklena vlakna, uspešen pri razgradnji preučevanih bisfenolov, saj poleg zagotovljene visoke mineralizacije onesnažil do CO_2 in H_2O , končne raztopine ne izkazujejo visoke strupenosti na vodne bolhe *Daphnia magna*. Poleg tega je 10 % negibnost znotraj območja dovoljene negibnosti vodnih bolh v kontroli in se tako ne obravnava kot strupena. (2) Dobro bi bilo, če bi lahko spremljali toksičnost vmesnih raztopin različno dolgih fotokatalitskih reakcij, vendar pri poskusih, izvedenih v šaržnem reaktorju, to ni mogoče, saj bi z odvzemom vzorca za teste strupenosti preveč spremenili reakcijski volumen znotraj reaktorja in s tem pogoje fotokatalitske oksidacije.

Rezultati testov strupenosti so v skladu z rezultati TOC analize, kjer smo pri dveh bisfenolih, BPA in BPF, po 6-ih urah dosegli popolno mineralizacijo do CO_2 , pri BPAF pa nam to ni uspelo niti po 8-ih urah. Kljub temu vzorci BPAF po 8-ih urah fotokatalitske oksidacije niso izkazovali strupenosti na vodne bolhe.

Vzrok za veliko večjo strupenost BPAF na vodne bolhe je moč iskati v strukturi tega bisfenola. Vsebuje namreč skupino $-CF_3$, ki je ena izmed najbolj lipofilnih skupin. Veliko večja lipofilnost BPAF kot BPA in BPF lahko vodi do povečane pasivne difuzije spojin preko membran, kar privede do izboljšane biološke razpoložljivosti in tako večjega negativnega učinka bisfenola na preučevani testni organizem. (19) Prav tako se lipofilne spojine bolj akumulirajo v organizmih.

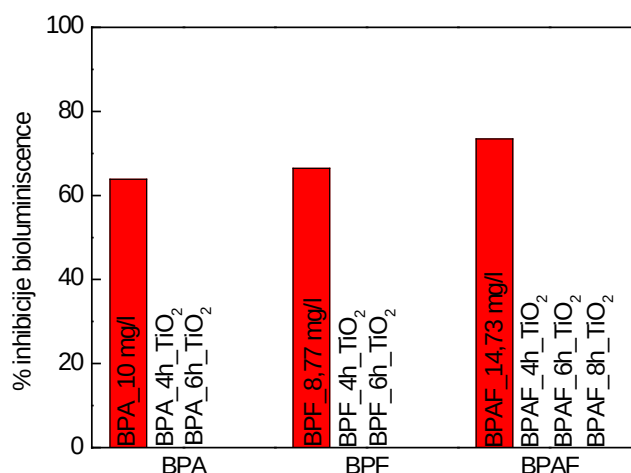
Objavljeni rezultati akutnega testa strupenosti z *Daphnia magno* na BPA so pokazali različne vrednosti 24 h EC50, in sicer 12,5 mg/L (2), 13,8 mg/L (24) in 8,57 mg/L (40). Prav tako so objavljene tudi različne vrednosti 48 h EC50: 7,5 mg/L (2), 10 mg/L (57) in

16 mg/L (58). Pri naših eksperimentih je imela izhodiščna raztopina BPA koncentracijo 10 mg/L in je povzročila 35 % negibnost vodnih bolh po 24-ih urah ter 45 % negibnost po 48-ih urah, kar je v skladu z zgoraj navedenimi literaturnimi podatki.



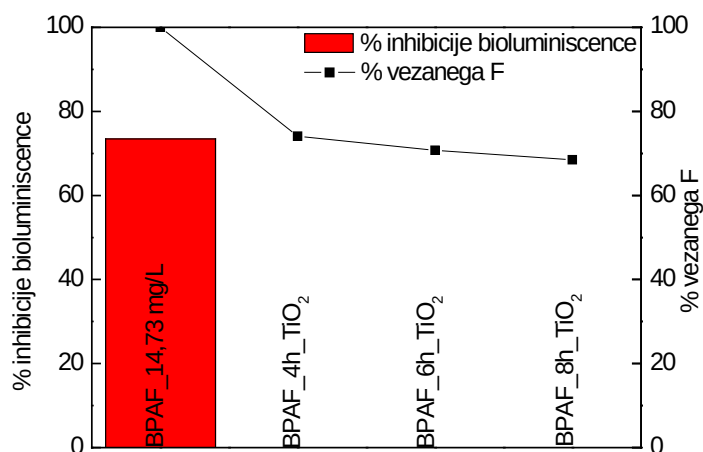
Slika 15: Odstotek negibnih vodnih bolh in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini bisfenola AF in končnih raztopinah 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih oksidacij.

Fluoridni ion, ki se je sprostil tekom fotokatalitskih reakcij, po rezultatih sodeč ne vpliva na celokupno strupenost raztopin po fotokatalitski oksidaciji (Slika 15). Izmerjene koncentracije sproščenega fluoridnega iona v raztopini so namreč 1,292 mg/L po 4-urni oksidaciji, 1,461 mg/L po 6-urni in 1,573 mg/L po 8-urni fotokatalitski oksidaciji BPAF. To so zelo nizke koncentracije, ki običajno niso strupene za vodne bolhe, saj so v literaturi navedene vrednosti 24 h LC50 med 205 in 352 mg F⁻/L in vrednosti 48 h LC50 med 98 in 304 mg F⁻/L. (60)



Slika 16: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri* ob izpostavitvi izhodiščnim raztopinam bisfenolov A, F in AF ter njihovim končnim raztopinam fotokatalitskih reakcij.

Medtem ko so imele končne raztopine fotokatalitskih oksidacij določen vpliv na negibnost vodnih bolh, pa ne povzročajo nobene inhibicije bioluminiscence pri bakterijah *Vibrio fischeri* (Slika 16). To velja tudi za raztopino po fotokatalitski oksidaciji BPAF, čeprav pri tem bisfenolu s fotokatalitsko reakcijo nismo uspeli odstraniti celotnega TOC. Če se osredotočimo le na izhodiščne raztopine, lahko zopet zaključimo, da imata BPA in BPF podoben učinek, medtem ko BPAF izkazuje večjo strupenost, vendar le-ta ne odstopa tako močno od strupenosti ostalih dveh analogov kot pri vodnih bolhah. Izhodiščna raztopina BPA s koncentracijo 10 mg/L je povzročila 63,84 % inhibicijo luminiscence pri bakterijah, kar je skladno z literaturo. V že objavljeni raziskavi je bila namreč 30 min IC₅₀ vrednost za BPA 2,4 mg/L. (2)

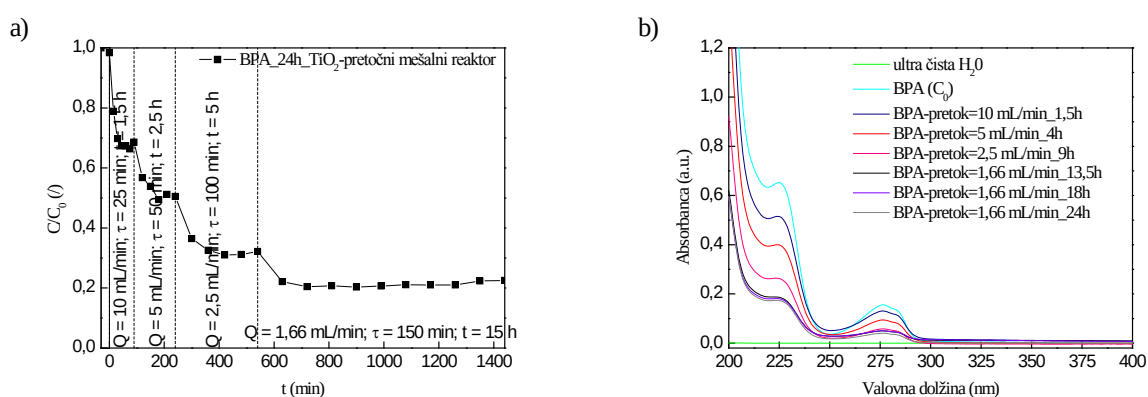


Slika 17: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri* in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini BPAF ter raztopinah po 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih oksidacijah.

Po rezultatih sodeč, koncentracija prostega fluoridnega iona (približno 1,5 mg/L), nima strupenega učinka na bakterije *Vibrio fischeri*, saj je bila inhibicija luminiscence pri vseh 3 raztopinah po fotokatalitskih oksidacijah enaka 0 (Slika 17).

c.) Fotokatalitsko odstranjevanje BPA, BPF in BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju

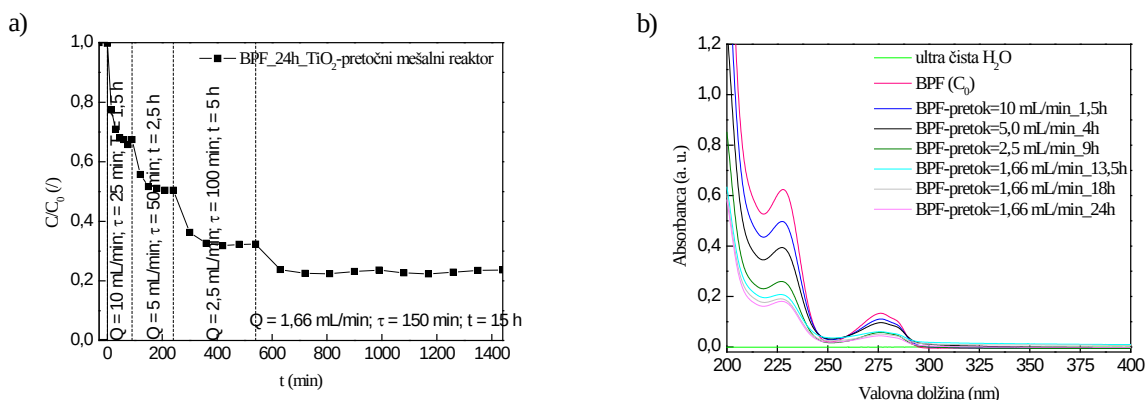
Tako kot pri poskusih, izvedenih v šaržnem reaktorju, smo tudi pri odstranjevanju bisfenolov v pretočnem mešalnem reaktorju med potekom le-tega s HPLC spremljali padec koncentracije bisfenolov, v raztopinah posameznih pretokov pa z UV-VIS analizo določili absorpcijske lastnosti produktov.



Slika 18: a) Fotokatalitska razgradnja BPA v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 24 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPA (10 mg/L), raztopine pretokov 10 mL/min (1,5 h), 5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (9 h), 1,66 mL/min (13,5 h), 1,66 mL/min (18 h) in 1,66 mL/min (24 h).

Rezultati fotokatalitske razgradnje BPA (Slika 18a) so v skladu s pravilom, ki pravi, da manjši kot je pretok, boljša je konverzija, saj je onesnažilo dlje časa v stiku s katalizatorjem. Poleg tega je iz slike 18a lepo razvidno, da so potrebni vsaj trije zadrževalni časi za zagotovitev stabilizacije pogojev v reaktorju znotraj vsakega posameznega pretoka. Tudi pri najnižjem pretoku nismo popolnoma odstranili BPA (ostalo ga je 1,83 mg/L), kar je pravilno, saj je v vsakem trenutku v reaktorju prisoten določen delež izhodiščne raztopine. Le-ta namreč konstantno doteka v reaktor pri tako zasnovani fotokatalitski reakciji.

Analiza UV-VIS spektrov (Slika 18b) potrdi rezultate fotokatalitske razgradnje. Nižji kot je pretok, manj je izhodiščne raztopine BPA v reakcijski mešanici in nižja sta absorpcijska vrhova, značilna za BPA. Med zadnjimi tremi spektri so čisto majhne razlike, kar smo pričakovali, saj gre za raztopine istega pretoka (1,66 mL/min), odvzete ob različnih časih. Vseeno pa ima raztopina, ki je bila zbrana v zadnjih 6 urah 24-urne fotokatalitske oksidacije, najnižja absorpcijska vrha.

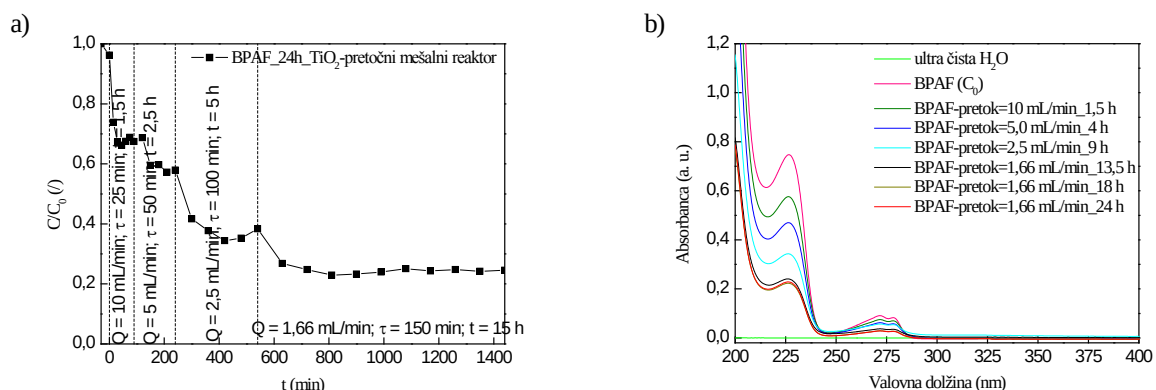


Slika 19: a) Fotokatalitska razgradnja BPF v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 24 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPF (8,77 mg/L), raztopine pretokov 10 mL/min (1,5 h), 5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (9 h), 1,66 mL/min (13,5 h), 1,66 mL/min (18 h) in 1,66 mL/min (24 h).

HPLC razgradnja BPF (Slika 19a) tako kot razgradnja BPA potrjuje pravilo, da pride do stabilizacije pogojev v reaktorju po vsaj 3 τ . Z nižanjem pretoka se odstrani več BPF. Pri pretoku 1,66 ml/min je ostalo še 1,99 mg/L BPF.

Analiza UV-VIS spektrov (Slika 19b) potrdi rezultate fotokatalitske razgradnje. Z nižanjem pretoka imajo raztopine vedno nižja absorpcijska vrhova, značilna za BPF. Podobno kot pri BPA so tudi pri BPF med zadnjimi tremi spektri zelo majhne razlike,

vseeno pa sta najnižja absorpcijska vrhova pri raztopini, pridobljeni v zadnjih 6-urah 24-urne fotokatalitske oksidacije.



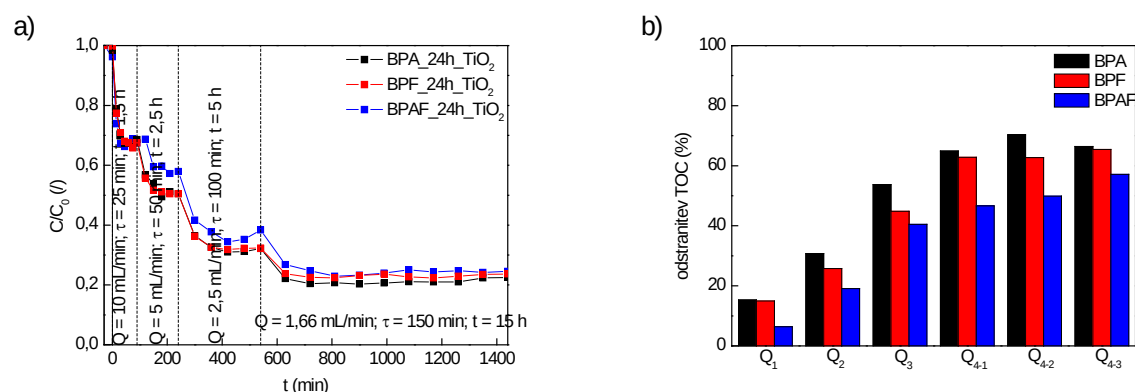
Slika 20: a) Fotokatalitska razgradnja BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 24 ur. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPAF (14,73 mg/L), raztopine pretokov 10 mL/min (1,5 h), 5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (9 h), 1,66 mL/min (13,5 h), 1,66 mL/min (18 h) in 1,66 mL/min (24 h).

Tudi rezultati fotokatalitskega odstranjevanja BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju (Slika 20a) so v skladu z že zgoraj omenjenima praviloma o povezavi med hitrostjo pretoka in konverzijo ter potrebi po 3τ za stabilizacijo pogojev znotraj reaktorja. Pri najnižjem pretoku 1,66 mL/min je še vedno ostalo 3,45 mg/L BPAF v reakcijski mešanici, kar je več kot pri ostalih dveh obravnavanih analogih. Prisotnost fluora namreč spremeni oksidacijski potencial aromatskega sistema. (19)

Rezultate fotokatalitske razgradnje potrdi analiza UV-VIS spektrov (Slika 20b). Tipična absorpcijska vrhova BPAF pri 226,6 in 221,6 nm se z zmanjševanjem pretoka nižata in sta najnižja pri zadnjih 3 spektrih, ki prikazujejo raztopine pretoka 1,66 mL/min.

d.) *Primerjava učinkovitosti 24-urnih fotokatalitskih oksidacij vseh 3 analogov, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju, s kemijskimi analiznimi metodami in biološkimi testi strupenosti*

Učinkovitost izvedenih oksidacij smo vrednotili s TOC analizo in biološkimi testi strupenosti.



Slika 21: a) Fotokatalitska razgradnja vseh treh analogov ob 24 h obsevanju z UV svetlobo. b) Primerjava odstranitve celotnega organskega ogljika (TOC) pri različno dolgih fotokatalitskih reakcijah, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju, za vse tri obravnavane bisfenole.

Pri vseh treh bisfenolih se z zniževanjem pretoka povečuje odstotek odstranitve celotnega organskega ogljika, kar je skladno z rezultati HPLC meritev (Slika 21a). Tako kot pri poskusih, izvedenih v šaržnem reaktorju, je tudi pri poskusih, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju, največ TOC ostalo neodstranjenega pri BPAF (Slika 21b). Vzrok zopet lahko iščemo v razlikah v strukturi. Znatna razlika med omenjenimi poskusi pa je v tem, da se je v pretočnem sistemu pri BPF odstranilo manj TOC kot pri BPA, ki sta imela zelo podobno odstranitev TOC v šaržnem reaktorju (po 4-ih urah fotokatalitske oksidacije).

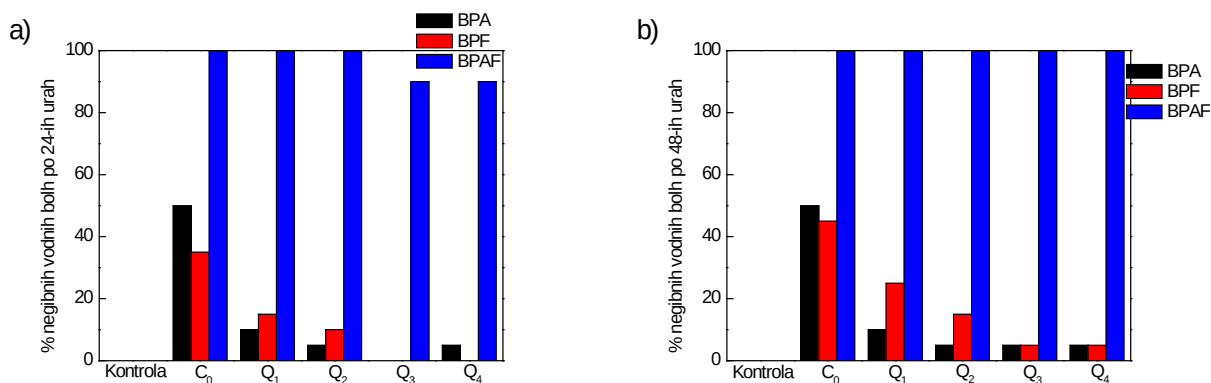
Pri raztopinah posameznih pretokov fotokatalitske pretvorbe BPAF smo tako kot pri raztopinah 4-, 6- in 8-urnih šaržnih poskusov z uporabo ionske kromatografije določili količino prostega fluorida, saj smo želeli vedeti, ali se med fotokatalitsko reakcijo le-ta odcepi iz spojine ali ne. Rezultati tega merjenja so prikazani v preglednici IX.

Preglednica IX: Odstotek prostega in vezanega F⁻ v izhodiščni raztopini BPAF in raztopinah po različno dolgih fotokatalitskih oksidacijah, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju.

VZOREC	% PROSTEGA F ⁻	% VEZANEGA F ⁻
BPAF (C ₀)	0,017	99,983
BPAF_Q ₁ =10 mL/min	4,901	95,099
BPAF_Q ₂ =5,0 mL/min	9,980	90,021
BPAF_Q ₃ =2,5 mL/min	18,258	81,742
BPAF_Q ₄ =1,66 mL/min	26,363	73,637

Nižji kot je pretok, več je prostega F⁻ oziroma daljši kot je zadrževalni čas, več je možnosti za cepitev vezi C-F in tako sprostitev fluoridnega iona. Pri fotokatalitski oksidaciji BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju je ujemanje rezultatov, pridobljenih s TOC analizatorjem in ionsko kromatografijo, slabše kot pri fotokatalitski oksidaciji, izvedeni v šaržnem

reaktorju, za kar obstaja logična razlaga. Pri pretočnih sistemih je namreč v reaktorju ves čas poleg vmesnih produktov razgradnje BPAF prisotna tudi sveža raztopina tega bisfenola, ki odločilno pripomore k relativno visokim vrednostim neodstranjenega TOC.

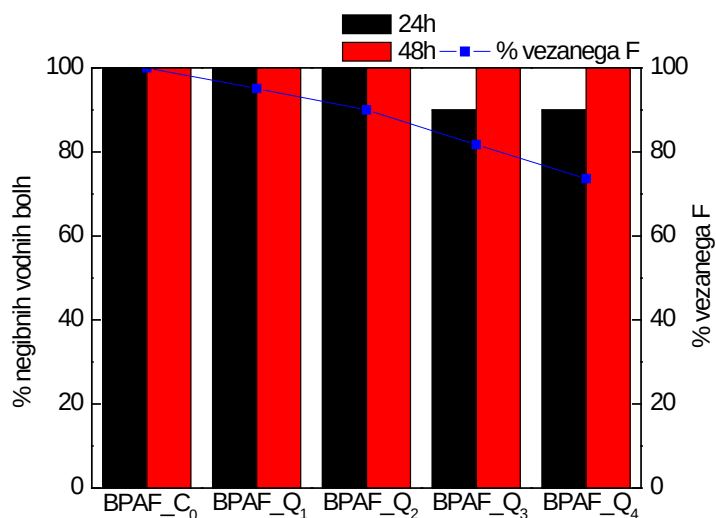


Slika 22: Odstotek negibnih vodnih bolh po a) 24-ih in b) 48-ih urah v kontroli, vzorcih izhodiščnih raztopin analogov (BPA = 10 mg/L; BPF = 8,77 mg/L; BPAF = 14,73 mg/L) in raztopinah posameznih pretokov 24-urnih fotokatalitskih oksidacij.

Pri raztopinah različnih pretokov 24-urnih fotokatalitskih oksidacij (Slika 22) je moč opaziti veliko razliko v strupenosti le-teh glede na preučevane analoge bisfenola. Medtem ko raztopine posameznih pretokov fotokatalitske oksidacije BPA in BPF izkazujejo zelo nizko strupenost na vodne bolhe *Daphnia magna* (raztopini pretoka 2,5 in 1,66 mL/min obeh analogov sploh ne moremo smatrati kot strupeni, saj je v kontroli dovoljena negibnost znotraj območja 10-ih %), pa so raztopine 24-urne fotokatalitske oksidacije BPAF zelo strupene za izbrani testni organizem. Po 48-ih urah so bile namreč negibne vse vodne bolhe v vseh raztopinah. Pri raztopini zadnjega pretoka (1,66 mL/min) je bila izmerjena povprečna koncentracija BPAF 3,45 mg/L, torej mora biti parameter 48 h EC₅₀ mnogo nižji od te vrednosti. Verjetno je tudi, da tekom fotokatalitske razgradnje BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju nastajajo vmesni produkti, ki so enako strupeni kot izhodiščna raztopina. Zagotovo tako kot BPAF vsebujejo fluor, kar vodi do večje lipofilnosti in s tem do izboljšane pasivne difuzije in končno do večjega učinka strupenosti. (19)

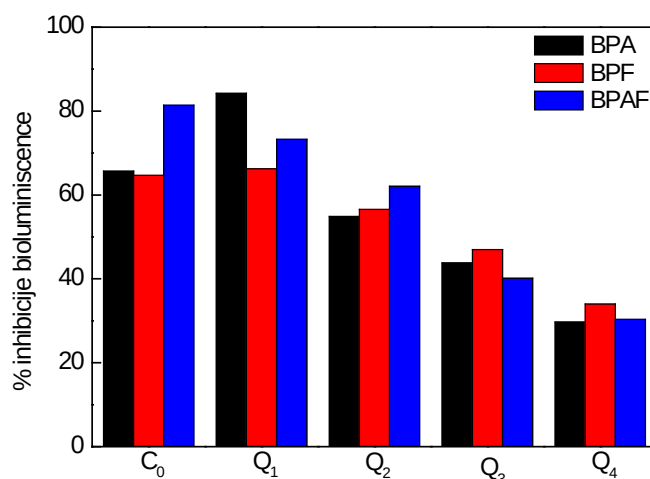
Pri analogu BPA je bila koncentracija onesnažila pri raztopini prvega pretoka (10 mL/min) 6,03 mg/L, za katero se je izkazalo, da ni več strupena za *Daphnia magna*, čeprav so v literaturi objavljeni podatki za 48 h EC₅₀ zelo blizu tej koncentraciji. Ena izmed objavljenih koncentracij, izražena kot 48 h EC₅₀, je namreč 7,5 mg/L. (2)

Raztopine pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije BPF izkazujejo nekoliko višji negativni vpliv na *Daphnia magno* kot raztopine pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije BPA, kar je v skladu z dobljenimi rezultati TOC analize, pri kateri se je več TOC odstranilo pri BPA in manj pri BPF.



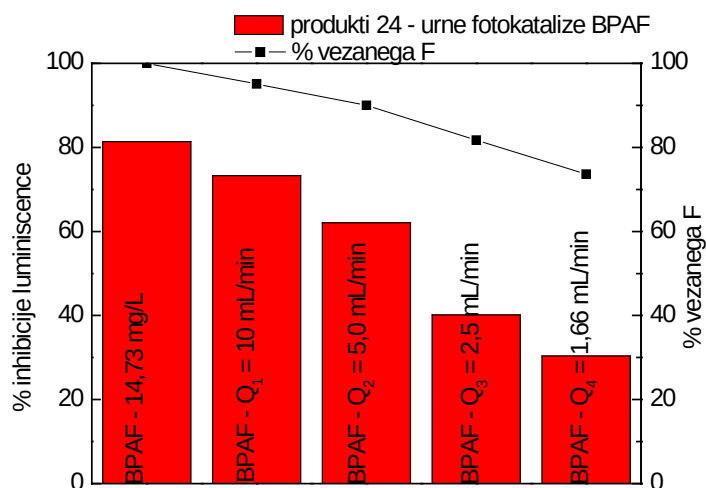
Slika 23: Odstotek negibnih vodnih bolh in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini bisfenola AF in raztopinah posameznih pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije.

Tako kot pri poskusih, izvedenih v šaržnem reaktorju, se je tudi v pretočnem sistemu sprostila prenizka količina fluora, da bi bila lahko strupena za vodne bolhe (Slika 23). Koncentracija prostega fluora je bila namreč pri pretoku 10 mL/min 0,245 mg/L, pri 5,0 mL/min 0,498 mg/L, pri 2,5 mL/min 0,911 in pri 1,66 mL/min 1,316 mg/L. To so mnogo nižje koncentracije, kot v literaturi objavljene koncentracije, pri katerih fluor povzroča škodljive učinke na to vrsto rakov. Torej večina fluora ostane vezanega v vmesnih produktih razgradnje, kar povečuje njihovo lipofilnost ter tako prehajanje znotraj organizma in vpliv na le-tega.



Slika 24: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri* ob izpostavitvi izhodiščnim raztopinam bisfenolov A, F in AF ter njihovim raztopinam posameznih pretokov 24-urnih fotokatalitskih reakcij.

Dokaz, da je vsak organizem svojevrsten in da je vedno potrebno izvesti teste strupenosti na različnih vrstah živih bitij, so rezultati akutnega testa strupenosti, izvedenega na luminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri* (Slika 24). Izkazalo se je namreč, da izpostavitve teh bakterij raztopinam posameznih pretokov 24-urnih fotokatalitskih oksidacij BPA, BPF in BPAF vodi do zelo podobne inhibicije bioluminiscence pri vseh treh bisfenolih. Izjema je raztopina prvega pretoka fotokatalitske pretvorbe BPA, ki odstopa od vrednosti pri ostalih dveh. Razlaga za to je verjetno nastanek vmesnih produktov, ki bolj zavirajo celične aktivnosti, zmanjšajo tudi celično dihanje in posledično pride do ustreznega zmanjšanja ravni luminiscence. Lahko gre za nastanek kinona (32), ki dokazano vpliva na bioluminiscentni sistem encimov -luciferazo in flavin reduktazo, rezultat česar je oslabitev vezi med endogenim flavinom (kofaktorjem) in encimi in posledično zmanjšanje encimske aktivnosti. (60)

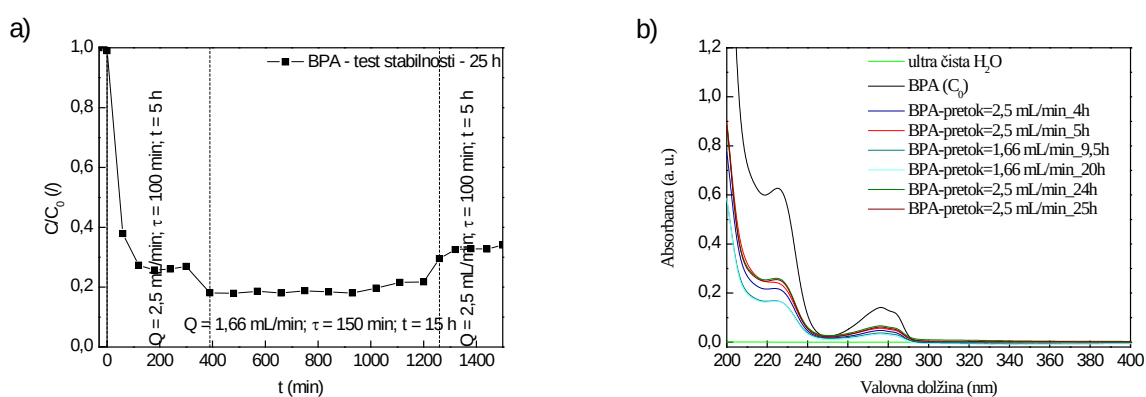


Slika 25: Odstotek inhibicije bioluminiscence v luminiscenčnih bakterijah *Vibrio fischeri* in odstotek vezanega fluora v izhodiščni raztopini BPAF ter njenih raztopinah posameznih pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije.

Opaziti ni nobene povezave med koncentracijo prostega fluora in strupenostjo raztopin posameznih pretokov 24-urne fotokatalitske oksidacije BPAF (Slika 25). Vpliv prostega F^- s koncentracijo okoli 1,3 mg/L na *Vibrio fischeri* ni bil zaznan.

e.) 25 – urni test stabilnosti katalizatorja v pretočnem mešalnem reaktorju

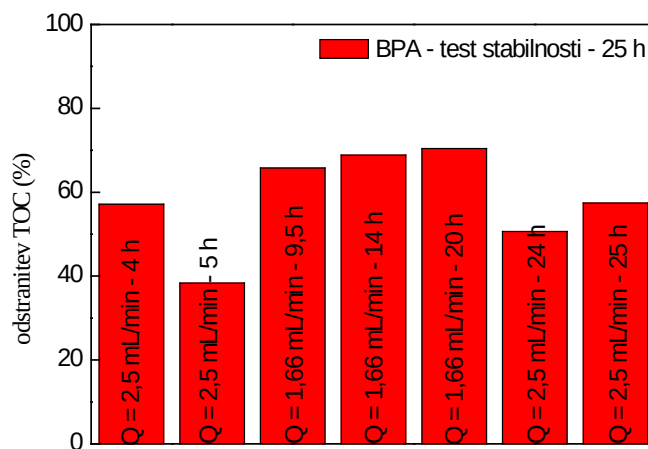
Stabilnost uporabljenega katalizatorja smo preverjali tako, da smo v pretočnem mešalnem reaktorju na začetku in na koncu testa uporabili pretok 2,5 mL/min, vmes pa manjši pretok, in sicer 1,66 mL/min. S HPLC smo spremljali odstranjevanje BPA in z UV-VIS absorpcijske lastnosti nastale raztopine posameznega pretoka.



Slika 26: a) Fotokatalitska razgradnja BPA v pretočnem mešalnem reaktorju v prisotnosti imobiliziranega TiO_2 in UV svetlobe v času 25 ur, pri dveh različnih pretokih, najprej pri pretoku 2,5 mL/min, nato pri 1,66 mL/min ter na koncu zopet pri 2,5 mL/min za preverjanje stabilnosti delovanja katalizatorja. b) UV-VIS spekter ultra čiste H_2O ter 7 vzorcev: izhodiščna raztopina BPA (10 mg/L), raztopine pretokov 2,5 mL/min (4 h), 2,5 mL/min (5 h), 1,66 mL/min (9,5 h), 1,66 mL/min (20 h), 2,5 mL/min (24 h) in 2,5 mL/min (25 h).

Pri preverjanju stabilnosti na steklena vlakna imobiliziranega TiO_2 so bile konverzije pri ponovni vkloplitvi pretoka 2,5 mL/min malce nižje (v povprečju za 0,326 mg/L BPA) kot na začetku poskusa pri istem pretoku (Slika 26a). To je še dodaten dokaz, da se katalizator pri daljši uporabi (24-urni in več) rahlo inaktivira, vendar še vedno zadovoljivo katalizira reakcije razgradnje obravnavanih HM. Lahko zaključimo, da ima stabilno delovanje. Skladno s temi rezultati je bila podobna inaktivacija nakazana že s posnetki vrstične elektronske mikroskopije.

Z analizo UV-VIS spektrov raztopin različnih pretokov (Slika 26b) lahko potrdimo rezultate, dobljene pri fotokatalitski razgradnji (Slika 26a). Jasno je razvidno, da je absorpcijski vrh pri 225 nm malce višji pri končnih raztopinah s ponovnim pretokom 2,5 mL/min (zbranih po 24-ih in 25-ih urah po vklopu UV luči) kot pri raztopinah na začetku reakcije z enakim pretokom (zbranih po 4-ih in 5-ih urah po vklopu UV luči). To je še ena potrditev, da pri dolgotrajni uporabi katalizator nekoliko zgubi na aktivnosti v primerjavi s sveže pripravljenim.



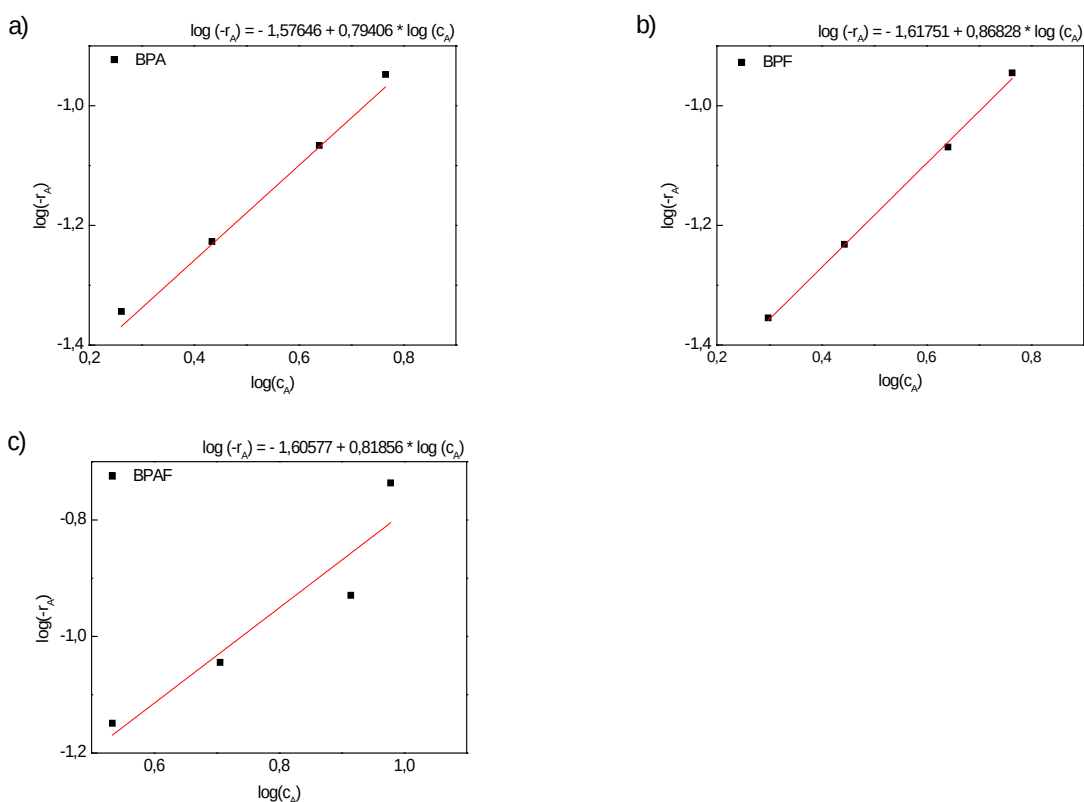
Slika 27: Odstranitev celotnega organskega ogljika (TOC) pri posameznih pretokih 25-urnega testa stabilnosti katalizatorja, izvedenega v pretočnem mešalnem reaktorju, za BPA.

Pri pretoku 1,66 mL/min se je odstranilo več TOC kot pri 2,5 mL/min (Slika 27), kar je pričakovano, saj je bila reakcijska mešanica pri višjem pretoku manj časa v stiku s katalizatorjem. Povprečna odstranitev TOC pri začetnem pretoku 2,5 mL/min je bila 47,7 % (povprečna vrednost pri produktu, zbranem po 4-ih in 5-ih urah), pri ponovljenem pretoku pa 54 % (povprečna vrednost pri produktu, zbranem po 24-ih in 25-ih urah). Ti rezultati ne kažejo, da je pri uporabljenem katalizatorju prišlo do rahle inaktivacije, zato je

pomembno, da se uporabi več komplementarnih analiznih tehnik, ki po pravilu dajo skupno in bolj verodostojno sliko nekega procesa.

f.) Kinetika 24-urnih fotokatalitskih reakcij

Pri izračunu povprečne koncentracije posameznega pretoka (c_A) smo upoštevali koncentracije, pri katerih je bila opazna stabilizacija pogojev (Slika 21a). Hitrost reakcije $-r_A$ smo pridobili s pomočjo naslednje enačbe: $(-r_A) = ((c_{A0} - c_A) * Q)/V$, pri čemer je c_{A0} vstopna koncentracija, Q pretok in V volumen raztopine v reaktorju. Izračunane vrednosti $-r_A$ in c_A smo vnesli v enačbo premice $\log(-r_A) = \log k + u * \log c_A$, pri čemer je k konstanta reakcijske hitrosti, u pa red reakcije.



Slika 28: a) Kinetika fotokatalitske pretvorbe BPA v pretočnem mešalnem reaktorju-prikaz odvisnosti med logaritmom povprečne koncentracije posameznega pretoka ($\log(c_A)$) in logaritmom hitrosti reakcije ($\log(-r_A)$). b) Kinetika fotokatalitske pretvorbe BPF v pretočnem mešalnem reaktorju-prikaz odvisnosti med logaritmom povprečne koncentracije posameznega pretoka ($\log(c_A)$) in logaritmom hitrosti reakcije ($\log(-r_A)$). c) Kinetika fotokatalitske pretvorbe BPAF v pretočnem mešalnem reaktorju-prikaz odvisnosti med logaritmom povprečne koncentracije posameznega pretoka ($\log(c_A)$) in logaritmom hitrosti reakcije ($\log(-r_A)$).

Razgradnja BPA, BPF in BPAF sledi kinetiki prvega reda, saj je u pri vseh treh analogih blizu 1 (pri BPA je 0,79, pri BPF 0,87 in pri BPAF 0,82) (Slika 28).

g.) Primerjava fotokataliz, izvedenih v šaržnem in pretočnem mešalnem reaktorju

Z uporabo formule - $\ln(1 - X_A) = kt$ (k izhaja iz zgoraj navedenih enačb premic, s katerimi smo preverjali kinetiko) smo izračunali konverzije (X) pri poskusih, izvedenih v šaržnem in pretočnem mešalnem reaktorju, saj je to enostaven način primerjave le-teh. Izračunane konverzije za posamezen analog so navedene v preglednici X.

Preglednica X: Izračunane konverzije.

ANALOG	X_A -pretočni mešalni reaktor	X_A -šaržni reaktor
BPA	0,67	0,59
BPF	0,67	0,63
BPAF	0,63	0,56

Zaradi različne prostornine analogov v reaktorju (pri šaržnih poskusih smo delali s 300 mL, medtem ko v pretočnem mešalnem reaktorju z 250 mL) konverzije niso povsem primerljive, vendar tudi odstopanja niso prevelika, da ne bi mogli zaključiti, da so bili testi fotokatalitskih oksidacij ustrezno izvedeni.

5 Sklep

Po opravljenih vseh zastavljenih poskusih smo prišli do naslednjih ugotovitev:

1. Stabilnost katalizatorja v fotolitskih reakcijah:
 - Z uporabljenimi analizami za karakterizacijo katalizatorja (XRD, UV-VIS-DR, CHNS, SEM) smo dokazali, da izbrani katalizator po uporabi svojih prvotnih lastnosti bistveno ne spremeni.
 - 25-urni test stabilnosti delovanja, izveden v pretočnem mešalnem sistemu, je razkril, da je TiO_2 , imobiliziran na steklena vlakna, zelo stabilen katalizator. Prišlo je le do rahle inaktivacije, ki je bila zaznana tudi z nekaterimi metodami karakterizacije.
2. Fotokatalitsko odstranjevanje proučevanih bisfenolov:
 - Tako v šaržnem kot v pretočnem mešalnem reaktorju se je razgradnja BPAF razlikovala od razgradnje BPA in BPF. Medtem ko smo v šaržnem reaktorju po 6-ih urah uspeli popolnoma mineralizirati BPA in BPF do CO_2 in H_2O , nam to pri BPAF ni uspelo niti po 8-ih urah, saj se je v tem času odstranilo le 85,2 % TOC. Nekoliko drugačno je bilo odstranjevanje TOC pri 24-urnih fotokatalitskih oksidacijah, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju. Največ TOC se je odstranilo pri BPA (67,2 % pri pretoku 1,66 mL/min), malo manj pri BPF (63,6 % pri pretoku 1,66 mL/min), najslabše pa je bilo odstranjevanje pri BPAF (51,2 % pri pretoku 1,66 mL/min). Rezultati CHNS analize pa so pokazali, da se je TOC zmanjšal le zaradi učinkovite mineralizacije onesnažil in ne zaradi vezave na katalizator.
3. Strupenost izhodiščnih raztopin in raztopin po fotokatalitskih oksidacijah na vodne bolhe *Daphnia magna*:
 - Pri enaki molarni koncentraciji izkazujeta pripravljene izhodiščni raztopini BPA in BPF podobno strupenost na vodne bolhe *Daphnia magna*, BPAF pa bistveno večjo, saj je že po 24-ih urah izpostavitve vodnih bolh BPAF negibnost 100 %.
 - Znotraj raztopin po 4-, 6- in 8-urnih šaržnih reakcijah so bile zopet najbolj strupene raztopine po fotokatalitski oksidaciji BPAF, vendar odstotek negibnih vodnih bolh po 48-ih urah ni presegal 25 %. Ti rezultati so v skladu z rezultati TOC analize.
 - Raztopine posameznih pretokov 24-urnih fotokatalitskih oksidacij BPA in BPF, izvedenih v pretočnem mešalnem reaktorju, so izkazovale zelo nizko strupenost na vodne bolhe (pri najvišjem pretoku je bil odstotek negibnosti po 48-ih urah pri BPA

10%, pri BPF pa 25 %, pri dveh najnižjih pretokih pa ne moremo govoriti o strupenosti, saj je bil % negibnosti pri obeh bisfenolih pod 10). Zopet je izstopal BPAF, pri katerem so bile po 48-ih urah negibne vse vodne bolhe pri raztopinah vseh pretokov.

4. Strupenost izhodiščnih raztopin in raztopin po fotokatalitskih oksidacijah na bakterije *Vibrio fischeri*:
 - Izhodiščni raztopini BPA in BPF sta bili podobno strupeni za bioluminiscenčne bakterije *Vibrio fischeri* (okoli 65 %), nekoliko bolj je bila strupena pripravljena raztopina BPAF (73 %), vendar razlika ni tako velika kot pri vodnih bolhah.
 - Raztopine po 4-, 6- in 8-urnih fotokatalitskih oksidacijah BPA, BPF in BPAF niso izkazovale strupenosti na *Vibrio fischeri*, čeprav je TOC analiza razkrila, da pri BPAF niti po 8-ih urah nismo uspeli popolnoma odstraniti TOC.
 - Izpostavitve luminiscenčnih bakterij raztopinam posameznih pretokov 24-urnih fotokatalitskih oksidacij BPA, BPF in BPAF je vodila do podobne inhibicije bioluminiscence (pri najnižjem pretoku je bila inhibicija okoli 30 %).

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko potrdimo obe delovni hipotezi. Zagotovo velja, da je TiO_2 , imobiliziran na steklena vlakna, učinkovit katalizator za fotokatalitsko odstranjevanje bisfenolov A, F in AF. Prav tako velja tudi, da razlike v zgradbi obravnavanih analogov vplivajo na učinkovitost fotokatalitskega odstranjevanja le-teh in tudi na strupenost na vodne bolhe in bakterije. Glavna strukturna enota BPAF, ki je odgovorna za slabše odstranjevanje tega analoga bisfenolov, je CF_3 . Gre namreč za skupino z večjo elektronegativnostjo (in potencialno reaktivnostjo) kot CH_3 skupina na BPA. Prav tako je funkcionalna skupina CF_3 ena izmed najbolj lipofilnih skupin, kar vodi do izboljšanih farmakokinetičnih lastnosti (povečana pasivna difuzija vodi do povišane biološke razpoložljivosti). Pri testih strupenosti se je izkazalo, da je potrebno preverjati strupenost okoljskih onesnažil na različnih vrstah živih bitji, saj imajo onesnažila različen vpliv nanje.

V prihodnje bi bilo potrebno natančno določiti predvsem mehanizem fotokatalitske razgradnje analogov BPAF in BPF, v prisotnosti katalizatorja na osnovi TiO_2 in s sklopljenimi tehnikami (npr. plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS) in/ali tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS-MS)) ločiti in identificirati vmesne produkte razgradnje. Na ta način bi lažje

pojasnili veliko večjo strupenost BPAF v primerjavi z BPA in BPF na vodne bolhe *Daphnia magna* ter podobno strupenost med vsemi obravnavanimi bisfenoli na bakterije *Vibrio fischeri*.

Voda je resnično pomemben naravni izvir življenja, zato si moramo ljudje, ki ves čas stremimo k širjenju industrijskih obratov in posledično vplivamo na okolje, v prvi vrsti prizadevati razvijati postopke čistih tehnologij, prav tako pa še postopke za odstranjevanje onesnažil iz okolja. Številne raziskave kažejo na učinkovitost naprednih oksidacijskih sistemov, predvsem heterogene fotokatalitske oksidacije, pri odstranjevanju strupenih in biološko nerazgradljivih organskih snovi iz vodnih virov. Kljub temu obstaja še precej prostora za izboljšave obstoječih katalizatorjev in čistilnih postopkov, zlasti ko je govora o prenosu tehnologij iz laboratorija na aplikativni nivo. Ti ukrepi so nujni za izboljšavo kvalitete vodnih virov in s tem tudi zdravja živih organizmov.

6 Literatura

1. UN-HABITAT. 'Sick water? The central role of wastewater management in sustainable development?' UNEP, Norway, 2010.
2. Plahuta M., Tišler T., Toman M.J., Pintar A. Efficiency of advanced oxidation processes in lowering bisphenol A toxicity and oestrogenic activity in aqueous samples. *Arh Hig Rada Toksikol* 2014; 65: 77-87.
3. Liao C., Kannan K. A survey of alkylphenols, bisphenols, and triclosan in personal care products from China and the United States. *Arch Environ Contam Toxicol* 2014; 67: 50-59.
4. Chen P.J., Linden K.G., Hinton D.E., Kashiwada S., Rosenfeldt E.J., Kullman S.W. Biological assessment of bisphenol A degradation in water following direct photolysis and UV advanced oxidation. *Chemosphere* 2006; 65: 1094-1102.
5. Gültekin I., Ince N.H. Synthetic endocrine disruptors in the environment and water remediation by advanced oxidation processes. *Journal of Environmental Management* 2007; 85: 816-832.
6. Matsushima A., Liu X., Okada H., Shimohigashi M., Shimohigashi Y. Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ER α but a highly specific antagonist for ER β . *Environmental Health Perspectives* 2010; 118: 1267-1272.
7. Li M., Yang Y., Yin J., Zhang J., Feng Y., Shao B. Biotransformation of bisphenol AF to its major glucuronide metabolite reduces estrogenic activity. *Plus One* 2013; 8: 12.
8. Schmidt J., Kotnik P., Trontelj J., Knez Ž., Peterlin Mašič L. Bioactivation of bisphenol A and its analogs (BPF, BPAF, BPZ and DMBPA) in human liver microsomes. *Toxicology in Vitro* 2013; 27: 1267-1276.
9. Song S., Ruan T., Wang T., Liu R., Jiang G. Distribution and preliminary exposure assessment of bisphenol AF (BPAF) in various environmental matrices around a manufacturing plant in China. *Environmental Science & Technology* 2012; 46: 13136-13143.
10. <http://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-9433.html>, dostop: 26.8.2014.
11. Michalowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2014; 37: 738-758.

12. Poerschmann J., Trommler U., Gorecki T. Aromatic intermediate formation during oxidative degradation of Bisphenol A by homogeneous sub-stoichiometric Fenton reaction. *Chemosphere* 2010; 79: 975-986.
13. Chiang K., Lim T.M., Tsen L., Lee C.C. Photocatalytic degradation and mineralization of bisphenol A by TiO₂ and platinized TiO₂. *Applied Catalysis A: General* 2004; 261: 225-237.
14. Rubin B.S. Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2011; 127: 27-34.
15. <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol.htm>, dostop: 13.10.2014.
16. Feng Y., Yin J., Jiao Z., Shi J., Li M., Shao B. Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats. *Toxicology Letters* 2012; 211: 201-209.
17. <http://store.accustandard.com/bisphenol-f.html>, dostop: 26.8.2014.
18. Cabaton N., Dumont C., Severin I., Perdu E., Zalko D., Cherkaoui-Malki M., Chagnon M.-C. Genotoxic and endocrine activities of bis(hydroxyphenyl)methane (bisphenol F) and its derivatives in the HepG2 cell line. *Toxicology* 2009; 255: 15-24.
19. Khetan S.K., Collins T.J. Human pharmaceuticals in the aquatic environment: a challenge to green chemistry. *Chemical Reviews* 2007; 107: 2319-2364.
20. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/257591?lang=en®ion=SI>, dostop: 26.8.2014.
21. Chemical Information Profile for Bisphenol AF [CAS No. 1478-61-1]. Supporting Nomination for Toxicological Evaluation by the National Toxicology Program. National Toxicology Program 2008. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/bisphenolaf_093008_508.pdf, dostop: 16.10.2014
22. Wang X., Yang J., Wang Y., Li Y., Wang F., Zhang L. Studies on electrochemical oxidation of estrogenic disrupting compound bisphenol AF and its interaction with human serum albumin. *Journal of Hazardous Materials* 2014; 276: 105-111.
23. Stachel B., Ehrhorn U., Heemken O.-P., Lepom P., Reincke H., Sawal G., Theobald N. Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution* 2003; 124: 497-507.

24. Jemec A., Tišler T., Erjavec B., Pintar A. Antioxidant responses and whole-organism changes in *Daphnia magna* acutely and chronically exposed to endocrine disruptor bisphenol A. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2012; 86: 213-218.
25. Tsai W.-T., Lee M.-K., Su T.-Y., Chang Y.-M. Photodegradation of bisphenol-A in a batch TiO₂ suspension reactor. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 168: 269-275.
26. Ohko Y., Ando I., Niwa C., Tatsuma T., Yamamura T., Nakashima T., Kubota Y., Fujishima A. Degradation of bisphenol A in water by TiO₂ photocatalyst. *Environ. Sci. Technol.* 2001; 35: 2365-2368.
27. Zhang L., Lv J., Xu T., Yang L., Jiang X., Li Q. High efficiency removal and recovery of an endocrine disrupting compound-bisphenol AF from wastewaters. *Separation and Purification Technology* 2013; 116: 145-153.
28. Barka N., Assabbane A., Nounah A., Ichou Y.A. Photocatalytic degradation of indigo carmine in aqueous solution by TiO₂-coated non-woven fibres. *Journal of Hazardous Materials* 2008; 152: 1054-1059.
29. Wang R., Ren D., Xia S., Zhang Y., Zhao J. Photocatalytic degradation of Bisphenol A (BPA) using immobilized TiO₂ and UV illumination in a horizontal circulating bed photocatalytic reactor (HCBPR). *Journal of Hazardous Materials* 2009; 169: 926-932.
30. Frontistis Z., Daskalaki V.M., Katsaounis A., Poullos I., Mantzavinos D. Electrochemical enhancement of solar photocatalysis: Degradation of endocrine disruptor bisphenol-A on Ti/TiO₂ films. *Water research* 2011; 45: 2996-3004.
31. Herrmann J-M. Titania-based true heterogeneous photocatalysis. *Environ Sci Pollut Res* 2012; 19: 3655-3665.
32. Fukahori S., Ichiura H., Kitaoka T., Tanaka H. Capturing of bisphenol A photodecomposition intermediates by composite TiO₂-zeolite sheets. *Applied Catalysis B: Environmental* 2003; 46: 453-462.
33. Levenspiel O: *Chemical reaction engineering*, 3rd ed. John Wiley & Sons, United States, 1999: 90-91.
34. Malengreaux C.M., Leonard G.M.-L., Pirard S.L., Cimieri I., Lambert S.D., Bartlett J.R., Heinrichs B. How to modify the photocatalytic activity of TiO₂ thin

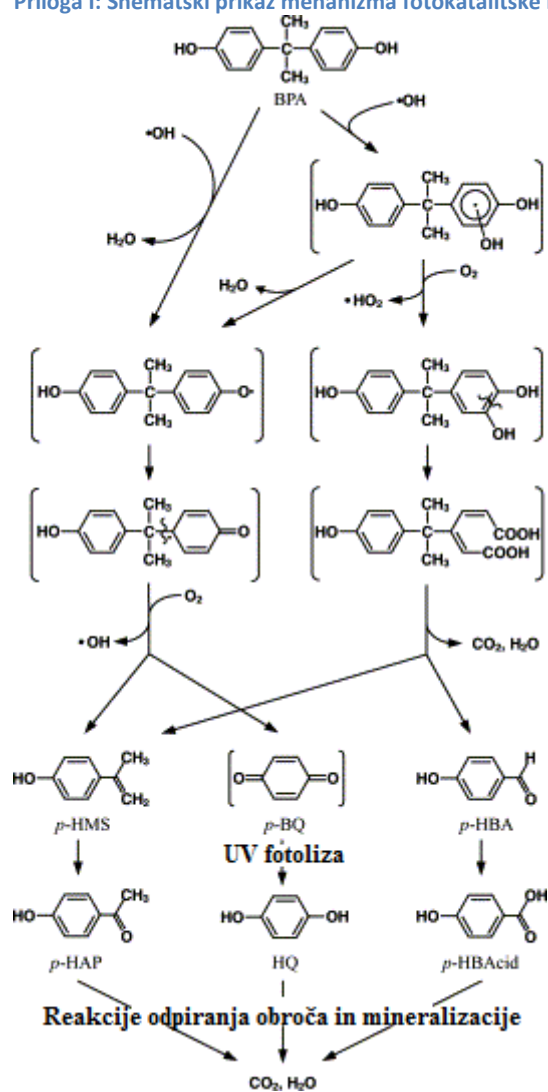
- films through their roughness by using additives. A relation between kinetics, morphology and synthesis. *Chemical Engineering Journal* 2014; 243: 537-548.
35. Pham T.-D., Lee B.-K. Feasibility of silver doped TiO₂/glass fiber photocatalyst under visible irradiation as an indoor air germicide. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2014; 11: 3271-3288.
 36. <http://projekti.gimvic.org/2009/2a/kataliza/fotokataliza.html>, dostop: 07.07.2014.
 37. Serrano B., de Lasa H., Salaices M: Photocatalytic reaction engineering. Springer Science + Business Media, New York, 2005: 19-21.
 38. Medina-Valtierra J., Sanchez-Cardenas M., Frausto-Reyes C., Calixto S. Formation of smooth and rough TiO₂ thin films on fiberglass by sol-gel method. *J. Mex. Chem. Soc.* 2006; 50: 8-13.
 39. Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International* 2006; 32: 265-268.
 40. Brennan S.J., Brougham C.A., Roche J.J., Fogarty A.M. Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna*. *Chemosphere* 2006; 64: 49-55.
 41. Ebert D, Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*, National Library of Medicine (US), 2005.
 42. Mu X., Rider C., Hwang G.S., Hoy H., LeBlanc G. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005; 24: 146-152.
 43. European Union Risk Assessment Report for Bisphenol A (BPA). Part 1. Environment Addendum of April 2008.
 44. Ruby E.G., Urbanowski M., Campbell J., Dunn A., Faini M., Gunsalus R., Lastroh P., Lupp C., McCann J., Millikan D., Schaefer A., Stabb E., Stevens A., Visick K., Whistler C., Greenberg E.P. Complete genome sequence of *Vibrio fischeri*: A symbiotic bacterium with pathogenic congeners. *The National Academy of Sciences* 2005; 102 (8): 3004-3009.
 45. <http://bioluminescence-vibrio.blogspot.com/p/background-phase-2.html>, dostop: 07.07.2014

46. Chen T. Y.: Toxicity assessment of environmental water by bioluminescent bacteria, *Vibrio fischeri*. Advanced Diploma in Science, Kuala Lumpur, Tunku Abdul Rahman College, 2010/11.
47. Robert D., Piscopo A., Heintz O., Weber J.V. Photocatalytic detoxification with TiO₂ supported on glass-fibre by using artificial and natural light. *Catalysis Today* 1999; 54: 291-296.
48. Watanabe N., Horikoshi S., Kawabe H., Sugie Y., Zhao J., Hidaka H. Photodegradation mechanism for bisphenol A at the TiO₂/H₂O interfaces. *Chemosphere* 2003; 52: 851-859.
49. http://www.ki.si/fileadmin/user_upload/datoteke-L09/nzl/Kristalografija-NZL-POGL4.pdf, dostop: 2.9.2014.
50. www.chromatography-online.org, dostop: 2.9.2014.
51. http://www.waters.com/waters/en_US/HPLC---High-Performance-LiquidChromatography/nav.htm?locale=en_US&cid=10048919, dostop: 2.9.2014.
52. Černe D, Ostanek B: Biomedicinska analitika I. Učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Ljubljana: Fakulteta za farmacijo, 2012: 8-22.
53. http://nett21.gec.jp/CTT_DATA/WMON/CHAP_4/html/Wmon-089.html, dostop: 3.9.2014.
54. <http://www.teledynetekmar.com/products/TOC/index.asp>, dostop: 4.9.2014.
55. International Organization for Standardization 2012. Water quality - Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Standard ISO 6341, Geneve.
56. International Organization for Standardization 1998. 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. International Standard ISO 11348-2, Geneve.
57. Alexander H.C., Dill D.C., Smith C.W., Guiney P.D., Dorn P.B. Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environ Toxicol Chem* 1988; 7: 19-26.
58. Mu X., Rider C.V., Soo Hwang G., Hoy H., LeBlanc G.A. Covert signal disruption: anti – ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signalling pathways. *Environ Toxicol Chem* 2005; 24 (1): 146-152.
59. Camargo J.A. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere* 2003; 50: 251-264.

60. Vetrova E.V., Kudryasheva N.S., Visser A.J.W.G., van Hoek A. Characteristics of endogenous flavin fluorescence of *Photobacterium leiognathi* and *Vibrio fischeri* NAD(P)H:FMN-oxidoreductase. *Luminescence* 2005; 20: 205-209.

Priloge

Priloga I: Shematski prikaz mehanizma fotokatalitske razgradnje BPA z uporabo TiO_2 (32)



Priloga II: Shematski prikaz fotokatalitskega mehanizma TiO_2 (36)

