

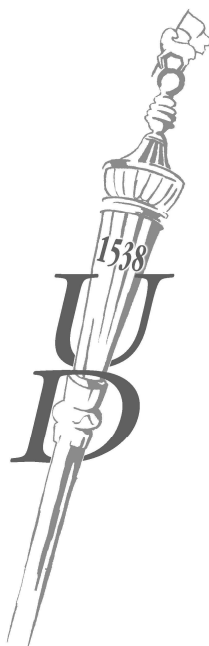
Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Környezeti tényezők szerepe növényvédő szerek fotokatalizált degradációjában

Virág Diána

Témavezető: Prof. Fábián István

Társtémavezető: Dr. Kiss Attila



DEBRECENI EGYETEM
Kémia Doktori Iskola

Debrecen, 2012.

Bevezetés, célkitűzések

Az egri Eszterházy Károly Főiskolán közel tíz éve folynak a peszticidekre irányuló kutatások Dr. Kiss Attila vezetésével a Biokémia és Molekuláris Biológia tanszéken. Dolgozatomban a peszticidek, mint a környezeti szennyezők egyik legjelentősebb csoportját alkotó vegyületek fotodegradációjával, bomlástermékeik analitikai vizsgálatával, a degradáció lehetséges útvonalainak feltárásával, egyes környezeti tényezők fotolitikus átalakulásra gyakorolt befolyásának tanulmányozásával kapcsolatos kutatásainkat és azok eredményét mutatom be.

A frekventáltan alkalmazott peszticidek maguk is nagy perzisztenciával bírnak, azonban ezen szennyezőkön kívül bomlástermékeik is hosszú ideig jelen lehetnek a környezetben. A bioszférába bejutva, a táplálékláncon végighaladva, számos helyen és módon képesek káros, élettanilag kedvezőtlen hatásukat kifejteni. Környezetben való átalakulásuk tanulmányozása, biológiai rendszerekbe való bejutásuk és az ezt befolyásoló tényezők szerepének feltárása indokolt. Korábbi hasonló kutatások döntően a biológiai hatás és átalakulás felmérésére irányultak, így a kémiai degradáció részleteinek tanulmányozása kiemelt fontosságú kutatási terület.

Munkánk során fő célunk hét, eltérő szerkezetű peszticid esetében a fotodegradáció során képződő, termékek analitikai vizsgálata és a bomlási útvonalak feltárása, illetve a bomlás során a toxicitásban bekövetkező változások mikrobiológiai vizsgálatokkal történő modellezése volt. Ezen túlmenően tanulmányoztuk a peszticidek fotodegradációját befolyásoló egyes környezeti paraméterek szerepét, különös tekintettel a talajtípusra, illetve a talajok fém-, és szerves anyag tartalmára. Egyes peszticidek biohosszúéletű és biofelvehető mennyisége nagy mértékű változatosságot mutat az egyes talaj paraméterek függvényében, melynek tanulmányozása szintén vizsgálataink tárgyát képezte.

I. Alkalmazott vizsgálati módszerek

- A peszticidek fotobomlását egy Millipore gyártmányú, 15 W teljesítményű, bemerülő, kisnyomású higanygőzlámpával váltottuk ki, amely 254 nm hullámhosszúságú fénysugarat bocsát ki állandó intenzitással. A kísérleteket 200 ppm, illetve 50 ppm koncentrációjú vizes, illetve butanolos peszticid-oldatokban végeztük.
- A peszticidek UV besugárzás hatására végbemenő átalakulásának és előrehaladásának igazolására vékonyréteg-kromatográfiás és UV-spektrofotometriás módszereket használtunk.
- A különböző időközönként vételezett mintákban található bomlástermékek vizsgálata GC-MS, illetve HPLC-MS technikával történt.
- Egyes környezeti paraméterek (talaj jelenléte, fém-, szervesanyag-tartalma) peszticidek fotodegradációját befolyásoló hatásának modellezéséhez az acetoklórt és az EPTC-t választottuk, illetve homok-, és barna erdőtalajt alkalmaztunk.
- A peszticidek degradációs mechanizmusaira gyakorolt hatásának tanulmányozása során a modellvizsgálatokhoz a talajok fémtartalmát EDTA-extrakcióval, a szervesanyag-tartalmát roncsolással csökkentettük, illetve talajmentes fémoldatok és szerves anyagok további hozzáadásával készített oldatokban váltottuk ki a vegyületek degradációját. A különböző reakcióelegyeket alkotó bomlástermékek összetételét GC-MS-sel vizsgáltuk.
- A peszticid bomlástermékek biológiai hatásának modellezéséhez 6 gyakori talajmikrobát választottunk teszt-mikroorganizmusként: három baktériumfajt (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*) és három gombafajt (*Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium oxysporum*). A vizsgálati módszer alapja az, hogy a peszticidszármazékok toxicitására valamint az egyes fajok érzékenysége a mikrobaszaporodás gátlását jelző, ún. kioltási zóna nagyságából következtethetünk.

- A peszticidek biohosszaférhető mennyiségének becsléséhez összehasonlító extrakciós eljárást alkalmaztunk 5 oldószerral (kloroform, metanol, nátriumacetát-ecetsav puffer, kalciumklorid-oldat, huminsav-oldat) 3 különböző talaj esetében (barna erdőtalaj, homoktalaj, réti öntéstalaj).
- A legfontosabb talajparaméterek (pH-érték, mikrobiális aktivitás, humusztartalom) biohosszaférhetőségre gyakorolt hatását extrakciós modellkísérletekkel az előbbi három talajtípus alkalmazásával végeztük.
- A kultúrnövényekben, így ezáltal az élelmiszerekben is bejutni képes, biológiailag hozzáférhető peszticid mennyiségének meghatározását két növény: búza (*Triticum aestivum*), kukorica (*Zea mays*), valamint csiperkegomba (*Agaricus bisporus*) alkalmazásával végeztük.

II. Eredmények

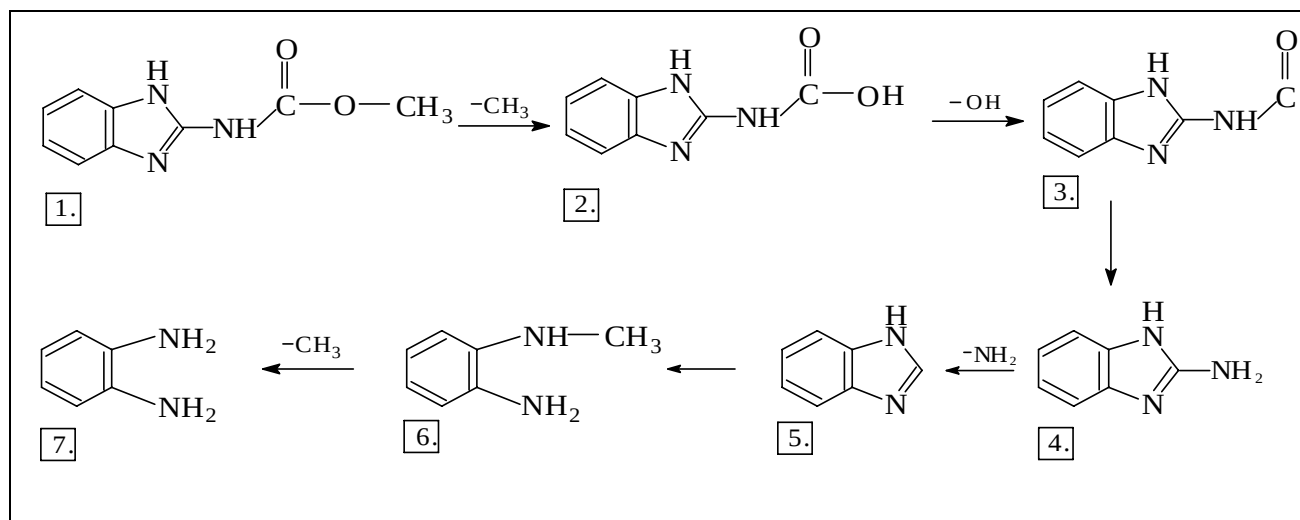
1. A vizsgált peszticidek fotodegradációjának feltételezett útvonalai

1.1. A **KARBENDAZIM** besugárzása során vett mintákból az alapvegyületen kívül 6 terméket detektáltunk HPLC-MS technikával. Valamennyi detektált bomlástermék nevét, retenciós idejét, molekulatömegét a 1. táblázat összegzi.

1. táblázat: A karbendazim fotobomlása során keletkező termékek molekulatömege és retenciós ideje.

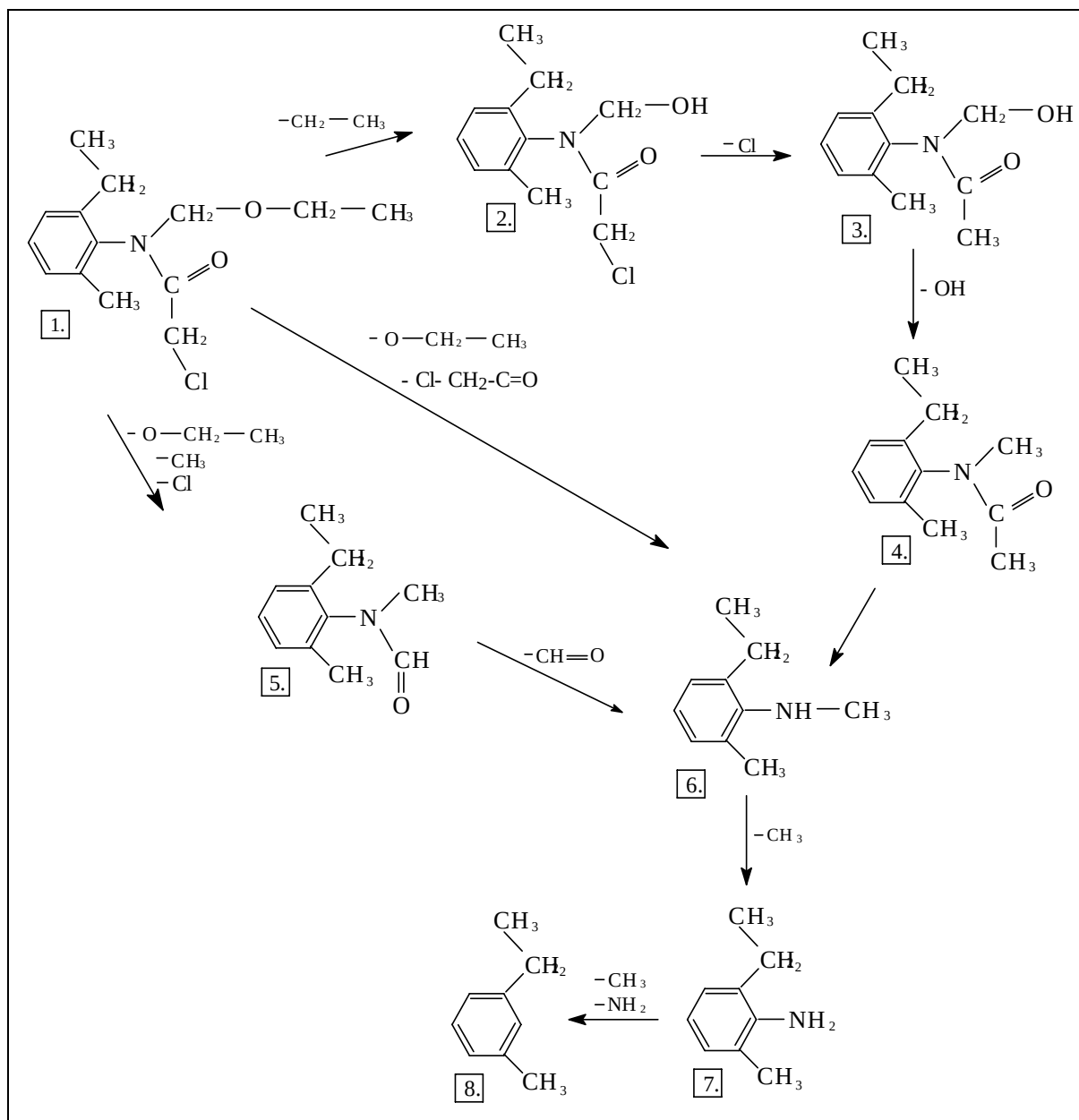
Vegyület neve	Molekulatömeg (g/mol)	Retenciós idő (min)
1. metil-benzimidazol-2-ilkarbamát	191	7,53
2. 2- benzimidazol-karbaminsav	177	6,56
3. 2-benzimidazol-ilkarbamát	161	8,33
4. 2-amino-benzimidazol	133	8,28
5. benzimidazol	118	7,66
6. 2-metil-amino-anilin	122	8,01
7. 1,2-diamino-benzol	108	7,25

A degradációt a 1. ábrán bemutatott reakciósémával értelmeztük, a folyamat végterméke az 1,2-diamino-benzol (7).



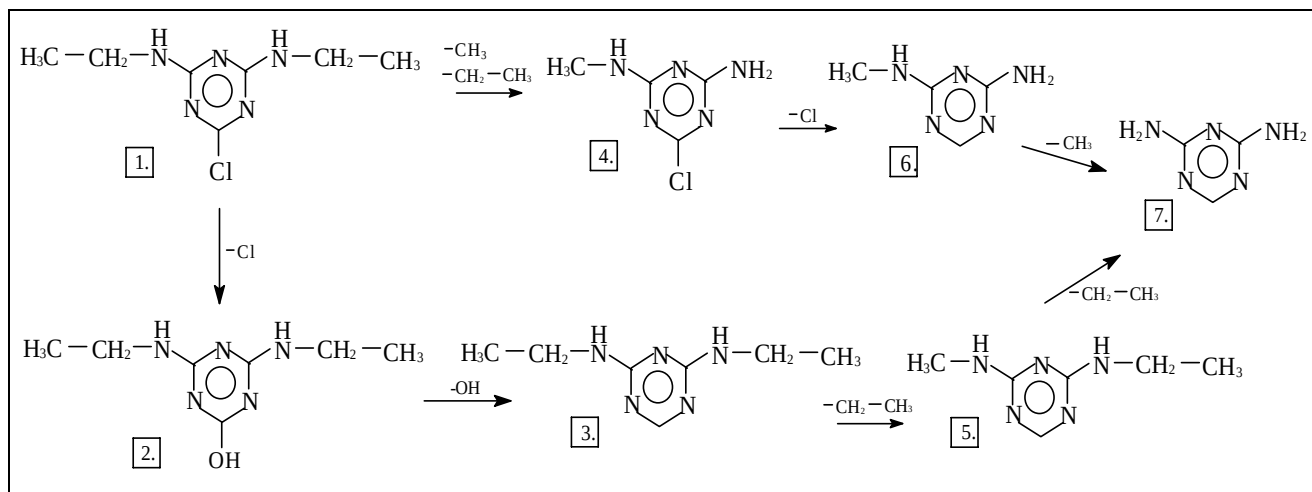
1. ábra: Karbendazim fotodegradációjának reakcióútja

1.2. Az **ACETOKLÓR** UV-besugárzása során hét olyan vegyületet azonosítottunk GC-MS technikával, melyek az acetoklór bomlásából származhatnak. Az acetoklór fotodegradációjának feltételezett folyamata a 2. ábrán bemutatásra kerülő útvonal szerint játszódhat le. A köztitermékek egyidejű jelenléte, illetve egymásból való átalakulásuk alapján a bomlás kezdeti szakaszában (0-3 óra) három bomlási útvonal vázolható fel. A besugárzás végtermékeként 1-etil-3-metil benzolt (8) azonosítottunk.



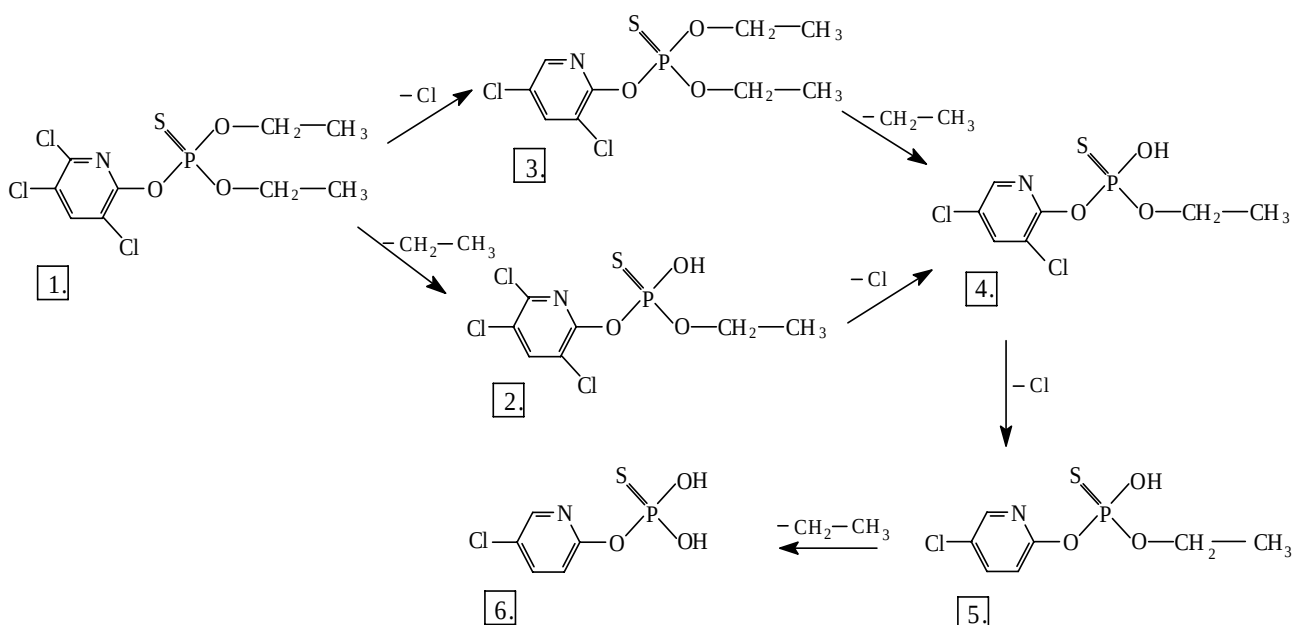
2. ábra: Az acetoklór fotodegradációjának javasolt reakciómechanizmusa

1.3. A **SIMAZIN** fotodegradációjakor az alapvegyületen kívül hat degradációs terméket detektáltunk. Mivel az azonosított termékek a degradáció adott szakaszában egymás mellett is megfigyelhetők és egymásból nem levezethetők, feltételezhető, hogy a simazin bomlása UV fotonok hatására két párhuzamos reakcióúton megy végbe (3. ábra). A vizsgálataink során detektált termékek összhangban állnak a korábbi kutatások során detektált deklórozott, dezaminált, dezalkilezett és hidroxilezett termékekkel, azonban dimerek képződését nem tapasztaltuk.



3. ábra: A simazin fotodegradációjának javasolt reakciómechanizmusa

1.4. A **KLÓRPIRIFOSZ** (1.) fotobomlása főbb lépéseinek a deklórozás és az alkil oldalláncok disszociációja tekinthető. Bizonyos termékek együttes jelenléte a mintában szintén arra enged következtetni, hogy a klórpirifosz fotodegradációja két reakcióúton valósulhat meg (9. ábra), mely összekapcsolódik egy közös terméken keresztül, és végül O-(5-klór-2-piridil)-tiofoszfát (6.) keletkezik végtermékként.



4. ábra: A klórpirifosz fotodegradációjának feltételezett reakciómechanizmusa

1.5. Az **EPTC** fotolitikus bomlása során az alapvegyületből egy tioetil-csoport leválását, majd az így keletkező vegyület formilcsoportjának lehasadását tapasztaltuk. A bomlás végterméke, az N,N-dietil-amid, mely többlépcsős dezalkilezések révén képződik. A degradáció kezdetén két bomlási út lehetséges, mivel az N,N-dipropil-formamid és az N,N-dietil-propionamid egymás mellett mutatható ki a mintákból, egymásból azonban nem keletkezhetnek. Az EPTC fotodegradációjára irányuló korábbi kutatásokkal való összevetésben vizsgálataink során 3 analógnak tekinthető terméket detektáltunk, valamint 3 új termék keletkezését tapasztaltuk.

1.6. Az **ATRAZIN** fotodegradációja 3 termék keletkezéséhez vezet az általunk felállított kísérleti modellrendszerben. A fotoátalakulás fő lépései (deklórozás, hidroxilezés, illetve a metil és etil csoportok leválása) összhangban vannak a szakirodalmi előzményekkel. A korábbi vizsgálati eredményekkel ellentétben gyűrűfelnyílást, dimerizációt és dekarboxileződést nem tapasztaltunk, továbbá az eddig közölt bomlási útvonalakkal teljes átfedést nem találtunk.

1.7. A **DIURON** fotodegradációjakor az alapvegyületen kívül 6 bomlástermék képződését tapasztaltuk. A dehalogénezés és az alkil csoportok disszociációja jelenti a bomlás főbb lépéseit. A diuron UV-transzformációjakor szintén két bomlási útvonal létezését lehet feltételezni. A korábbi kutatások eredményeivel a deklórozott vegyületek képződése van összhangban.

A vizsgált peszticidek fotodegradációja során tapasztalt főbb átalakulási lépéseket a 2. táblázat összesíti.

2. táblázat: A vizsgált peszticidek fotoátalakulásának főbb lépései.

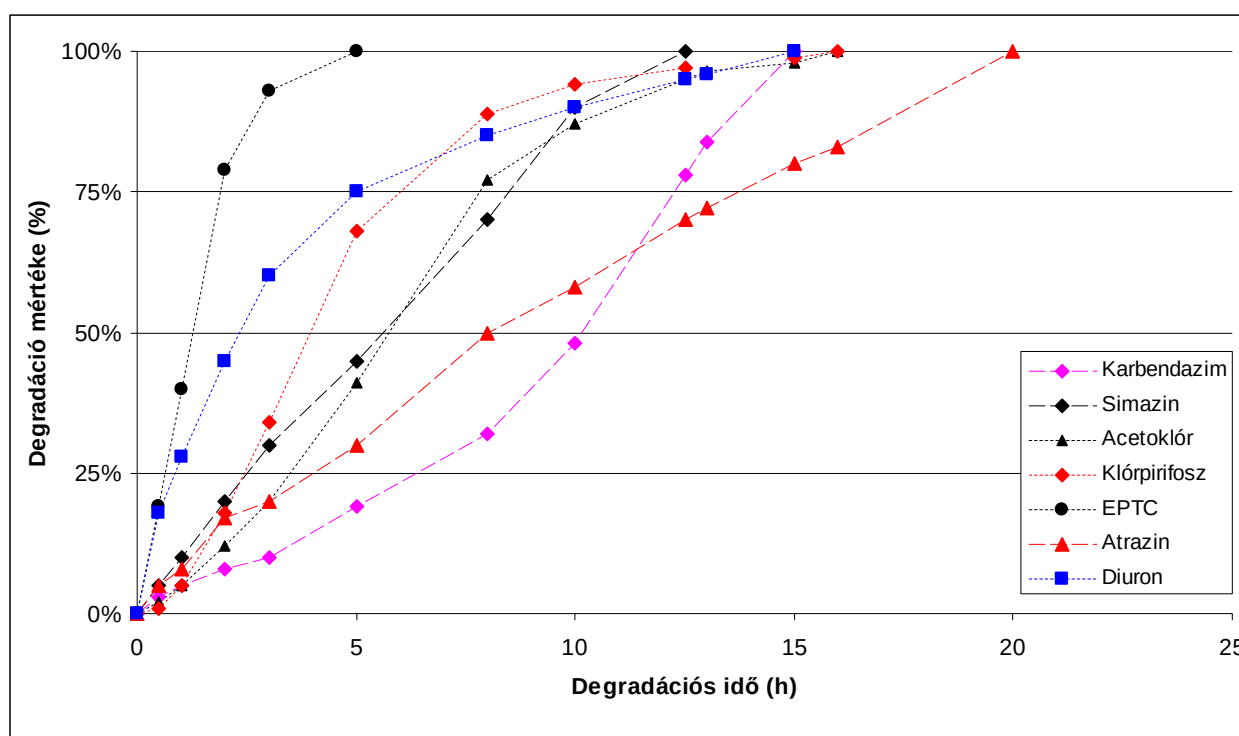
	Vegyület neve	Főbb átalakulási lépések	Termékek száma
1.	Karbendazim	demetileződés, dehidroxileződés, dekarboxileződés, dezaminálódás, gyűrűnyílás	6
2.	Acetoklór	éterkötés-hasadás, deklórozás, dihidroxileződés, dezacileződés, demetileződés	7
3.	Simazin	demetileződés, dezetileződés, dehidroxilezés, deklórozás	6
4.	Klórpirifosz	dezetileződés, deklórozás	5
5.	EPTC	demetileződés, tioetil-és propionil-csoport hasadása	6
6.	Atrazin	deklórozás, hidroxileződés, demetileződés, dezetileződés	3
7.	Diuron	deklórozás, hidroxileződés, - CO-vesztés, dimetilamin- vesztés	6

2. A fotodegradáció mértékének időbeli alakulása

2.1. A fotodegradáció időbeli lefolyásának tanulmányozása során megállapítottuk, hogy a vizsgált vegyületek fotolitikus stabilitásában az egyedi szerkezeti sajátosságoktól és az eltérő szubsztituensek jelenlététől függően nagymértékű különbség mutatkozik.

2.2. A vizsgált peszticidek köréből az EPTC fotodegradációja megy végbe a leggyorsabban, 3 órás besugárzást követően 90 %-ot is meghaladja az átalakulás mértéke, ellentétben az acetoklórral, mely esetében még 2 órás besugárzást követően is csak 10 %-os a konverzió.

2.3. A klórpirifosz és az acetoklór teljes degradációjához 16 órás, míg az EPTC bomlásához csak 5 órányi UV-besugárzásra volt szükség. A vizsgált peszticidek degradációjának időbeli lefolyását az 5. ábra mutatja be.



5. ábra: A vizsgált peszticidek degradációjának mértéke az idő függvényében

3. A degradációs termékek toxicitásának elemzése mikrobiológiai vizsgálatokkal

3.1. A potenciális biológiai hatást modellező mikrobiológiai tesztvizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a tesztmikroorganizmusok peszticidenként eltérő érzékenységet mutattak. A mikrobák eltérő érzékenységet mutattak továbbá az alapvegyületre és annak bomlástermékeire. Pl.: a klórpirifosz alapvegyülete a *Mycobacterium phlei*-re hatott toxikusan, míg bomlástermékei a *Pseudomonas fluorescens*, és a *Bacillus subtilis* számára.

- 3.2. Egyes peszticidek mikrobagátló hatása a besugárzási idő előrehaladásával változott: a karbendazim mikrobagátló hatása a *Trichoderma harzianum* és a *Fusarium. oxysporum* gombafajok esetén csökkenő intenzitással érvényesül a fotodegradáció előrehaladtával.
- 3.3. Valamennyi vizsgált talajmikroba egyaránt érzékenységet mutatott az acetoklór az alapvegyületére és a bomlástermékeire is.
- 3.4. Megállapítottuk, hogy a vizsgált talaj-mikroorganizmusok érzékenysége miatt a vizsgált peszticidek fotodegradációja következtében keletkező termékei módosíthatják a talaj mikrobiota összetételét a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok arányának megváltoztatásával, valamint egyes gombafajok háttérbe szorításával, így károsan befolyásolhatják a talaj mikrobiológiai egyensúlyát.

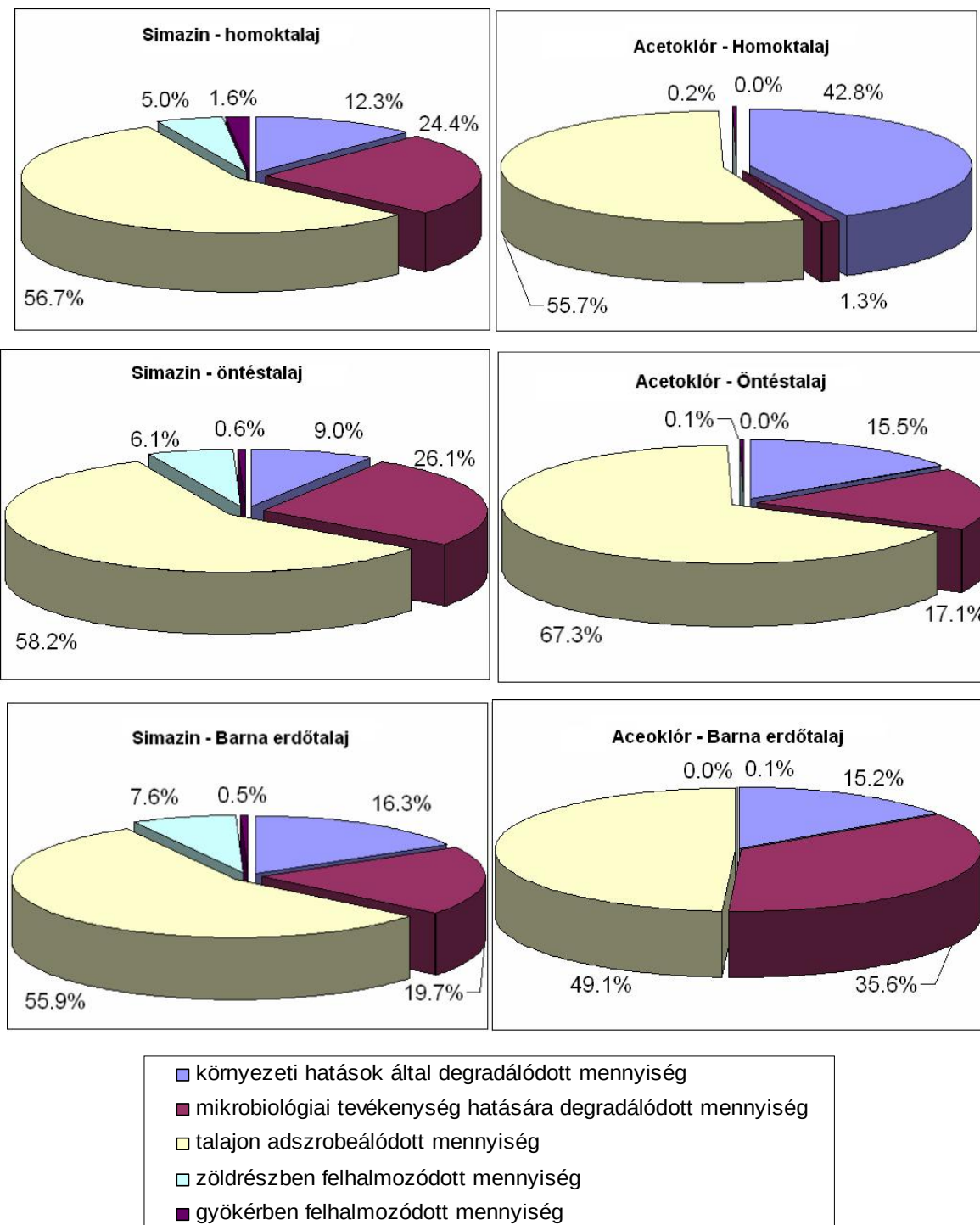
4. Peszticidek degradációját befolyásoló talajparaméterek vizsgálata

- 4.1. Egyes környezeti tényezőknek az acetoklór fotodegradációja mechanizmusára gyakorolt hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a korábban azonosított bomlástermékeken kívül a talaj jelenléte, illetve annak összetételének megváltoztatása 11 új termék képződését eredményezi. Ezen új termékek közül hat vegyület az adott minta domináns komponensének tekinthető. Ezen túlmenően az egyes egyedi degradációs termékek egymáshoz viszonyított aránya igen nagymértékű variabilitást mutatott a megváltoztatott talajparaméterek függvényében.
- 4.2. Az EPTC esetében a korábbi fotodegradációs vizsgálatok során talált termékekkel való összevetésben 6 olyan terméket azonosítottunk, melyek a különböző talajparaméterek megváltoztatásának hatására keletkeztek. Ezek a vegyületek az összes degradációs terméknek nem teszik ki döntő hányadát, azonban az átalakulás útvonalára és a köztitermékek arányára hatással vannak.

5. *Peszticidek biofelvehetősége és biohosszáférhetősége búza és kukorica valamint csiperkegomba esetében*

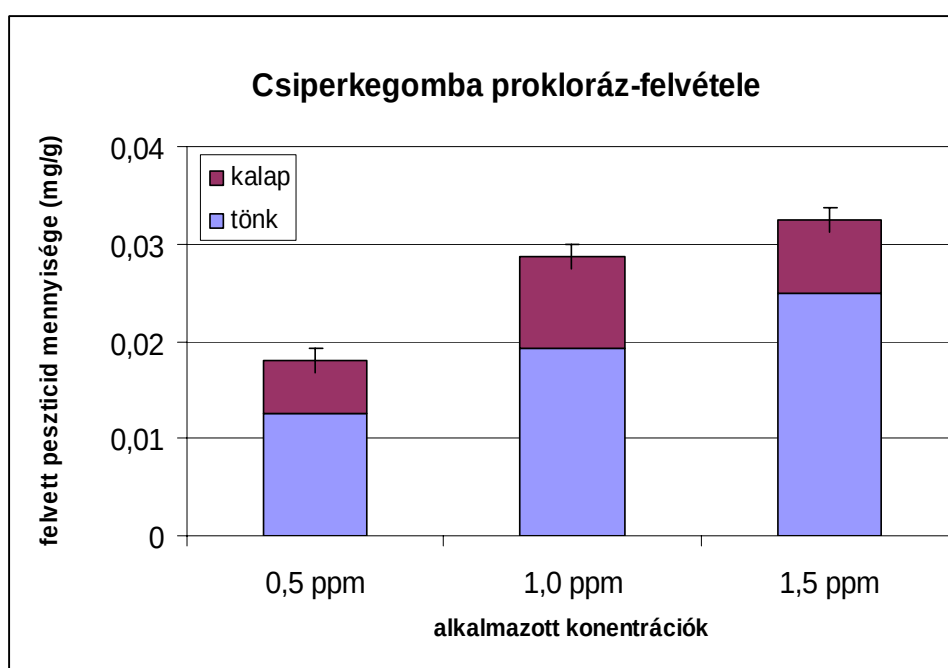
- 5.1. Kutatásunk során összehasonlítottuk a búza és kukorica által felvett növényvédő szer mennyiségeit, illetve vizsgáltuk a felhalmozódás mértékét és helyét.
- 5.2. Felállítottuk az egyes peszticidekre jellemző anyagmérlegeket, melyek tartalmazzák a peszticid mennyiségének környezeti hatások révén bekövetkező változását, a talajban a mikrobiológiai tevékenység hatására degradálódott peszticid mennyiségét, a talajadszorpció mértékét, a növény gyökerében illetve a növény zöld részében felhalmozódott peszticid mennyiségét.
- 5.3. Vizsgáltuk a peszticidek felhalmozódásának mértékét, valamint a felvett mennyiség csiperkegombán belüli eloszlását.
- 5.4. A vizsgálatok alapján megállapítottuk, hogy:
- a kijutatott peszticidek elérő biológiai felvehetőséget és bioakkumulációt mutatnak csiperkegomba, búza és kukorica tesztnövények esetében,
 - a kijutatott peszticidek a talajtípustól függően különböző mértékben halmozódtak fel az egyes növényi részekben (6. ábra),
 - a vizsgált növényvédő szerek biológiailag felvehető mennyisége a vizsgált növényi résztől, a peszticid és a talajtípus fizikai és kémiai sajátosságaitól függően változott (6. ábra),
 - a búza mindhárom vizsgált talajról a simazint vette fel legnagyobb mértékben, és a felvett mennyiséget elsősorban a zöld növényi részben akkumulálta (6. ábra),
 - a búza peszticidfelvételében a talajtípus meghatározó szerepet játszik: a homoktalajon nevelt búza a kisebb mennyiségű simazint vett fel, mint a másik két talajtípusról, de az acetoklór biofelvehetőségéhez képest ez az akkumuláció is nagyságrendekkel nagyobb mértékű (6. ábra),

- a kukorica növény gyökerében és zöld részeiben jelentősen nagyobb mennyiségű peszticidet mutattunk ki valamennyi kísérleti mintánál, mint a búza esetében. Ezzel összhangban a talajból extrahált peszticid mennyisége minden esetben kevesebb, mint a búza esetében (6. ábra).



6. ábra: Simazin és acetoklór biofelvehetőségének és biohosszútartósságának aránya búza (*Triticum aestivum*) esetében.

- A prokloráz a gombakalapban és a tönkben eltérő mértékben halmozódott fel, a kimutatott mennyiség jelentősebb része a gomba tönkjében található (7. ábra).
- A teflubenzuron bioakkumulációja átlagosan ötszöröse a proklorázénak. A teflubenzuron a prokloráznál megfigyelttel ellentétben, a kalapban jelentősen nagyobb mennyiségben halmozódik fel, mint a tönkben (7. ábra).
- A kultivációs periódust követően egyértelmű korrelációt állapítottunk meg a gombák által felvett és a komposztban maradt peszticidmennyiség között (7. ábra).



7. ábra: Csiperkegomba eltérő koncentrációjú prokloráz-felvétele

6. A peszticidek biohosszáférhetőségét befolyásoló paraméterek vizsgálata

Munkánk során három, jelentősen eltérő kémiai szerkezetű peszticid (diuron, simazin és acetoklór) esetében vizsgáltuk a legfontosabb talajparaméterek (pH, mikrobiális aktivitás, humusztartalom) biohosszáférhetőségre gyakorolt hatását extrakciós modellkísérletekkel, három különböző talajtípus alkalmazásával (homoktalaj, barna erdőtalaj, öntéstalaj).

6.1. A talaj mikrobiológiai összetételének hatása a biohosszáférhetőségre

- Megállapítottuk, hogy az öntés- és a homoktalaj mikrobiológiai enzimaktivitása az első napon, a barna erdőtalajé a harmadik napon bizonyult a legnagyobbnak.
- A peszticidek biohosszáférhető mennyisége a mikrobiológiailag aktív talajok esetében 20 – 60 %-kal alacsonyabb a légszáraz talajokról kinyert peszticidmennyiséghez viszonyítva mindhárom peszticid és mindhárom talaj esetében.
- A vizsgált peszticidek hozzáférhető mennyisége fordítottan arányos a talajok mikrobiológiai aktivitásával.

6.2. *A talaj humusztartalmának hatása*

- Mindhárom vizsgált talajtípus esetében a szervesanyag-tartalom növekedésével fordítottan arányosnak adódott a hozzáférhető peszticidek mennyisége, amennyiben vizes alapú extrahálószeret, vagy kloroformot alkalmaztunk a modellrendszerrel.
- A metanolos extrakció során az esetek többségében nem tapasztaltunk egyértelmű összefüggést a szervesanyag-tartalom változása és a hozzáférhető peszticid mennyisége között.

6.3. *A talaj pH értékének hatása*

- Megállapítottuk, hogy a talajminták hozzáférhető peszticid mennyisége függ a talaj pH-értékétől, azonban a különböző peszticidek hozzáférhetősége eltérő pH-függést mutat.
- Az eredmények értelmezéséhez az egyes peszticidek különböző pH-értéken való stabilitását és oldószerekkel való kölcsönhatásait kellene figyelembe venni.
- Ezen vizsgálatok hozzájárulnak a peszticidek hozzáférhető mennyiségét befolyásoló tényezők szerepének megértéséhez.

7. A peszticidek fotodegradációjával kapcsolatos eredményeink gyakorlati jelentősége

- Az eddig nem, vagy kevésbé leírt specifikus fotodegradációs termékek feltárása olyan szennyezők megjelenésének lehetőségére hívja fel a figyelmet, amelyek az elővigyázatosság elve alapján potenciális veszélytényezőként kezelendők, illetve információt szolgáltathatnak a másodlagos környezetterhelésre vonatkozóan.
- Egyes peszticideknél (karbandazim) jelentős változást idéz elő a végbemenő fotobomlás az antifungális hatás spektrumában, amit speciális esetekben (pl. baktériumos vagy mikorrhizagombás talaj- vagy magoltáskor) érdemes figyelembe venni az alkalmazás megtervezésekor.
- A fotolitikus átalakulásra érzékeny peszticidek átfogó jellemzéséhez szükséges képet árnyalják eredményeink a stabilitás, perzisztencia, és a kiváltott hatás időspektruma tekintetében, így azok alkalmazást nyerhetnek a gyakorlati növényvédelemben.
- A peszticid-talaj kölcsönhatásoknak, illetve a környezeti paraméterek fotodegradációra gyakorolt hatásának elemzése hozzájárulhat a valóságban végbemenő folyamatok pontos megértéséhez, és a növényvédő szerek környezeti viselkedésének feltárásához.
- A peszticidek biofelvehetőségére, illetve biohosszaférhetőségére vonatkozó hagyományos és újszerű módszerekkel nyert eredmények összevetése a komplex problémakör teljesebb megértéséhez vezet.

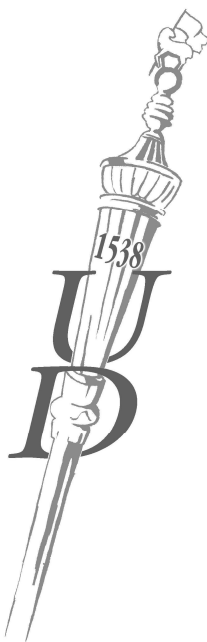
PhD theses

**Effects of environmental factors on the photocathalic degradation of
pesticides**

Virág Diána

Supervisor: Prof. István Fábián

Co-supervisor: Dr. Attila Kiss



DEBRECEN UNIVESITY

Chemistry Ph.D. School

Debrecen, 2012.

I. Introduction and the aim of the work

Pesticide related studies had been launched at the Eszterházy Károly College's Department of Biochemical and Molecular Biology nearly ten years ago headed by Attila Kiss, the director of Egerfood Regional Knowledge Centre. In the dissertation the results major emphasis is laid on the plausible pathways of pesticides' photodegradation, as pesticides might be regarded as one of the most relevant environmental pollutants. Analysis of the degradates, estimation of possible change in toxicity occurring due to decomposition, revelation of the connection between certain environmental factors and the process of photodegradation were involved in our studies.

Pesticides are referred to as physiologically harmful pollutants, hence model studies on their environmental transformation processes are of utmost importance. Previous related studies mainly were focused on the biological effects and transformation processes of pesticides, thus thorough investigations of the chemical degradation of pesticides provides us with novel research results.

As a consequence of the extensive use of pesticides with high persistency, their degradation products can be present in the environment even for decades. As pesticides' degradates might find their way to the food chain, accomplishment of model examinations of the biological effects of pesticides and their degradates can contribute to the feasibility of more detailed and comprehensive risk assessments.

Major objects of our research were to study the photodegradation feature of seven pesticides with diverse chemical structures, analytical examination of the generated degradation products, revealing the plausible transformation routes of pesticides and estimate the toxicity of the degradation products by microbiological model experiments. The role of factors affecting the photodegradation of pesticides was also studied, such as soil type and the soil's metal and organic matter content. Estimation of the bioavailable and biouptakable amount of pesticides by means of application of versatile methods was also involved in our work.

II. Experimental methods

- Photodegradation of pesticides was induced by the application of a low-pressure mercury vapour lamp (15W) which emits at 254 nm, manufactured by Millipore. The concentration of the irradiated pesticide solutions were 200 and 50 ppm, respectively. Distilled water and butanol were applied as solvents.
- Thin-layer-chromatography and spectrophotometric measurements were applied in order to justified the accomplishment of UV-degradation and to estimate the extent of the decomposition.
- The analytical examination of the degradation products present in the samples, which were taken at regular time intervals, was accomplished by GC-MS and HPLC-MS.
- Influence of certain environmental factors affecting the photodegradation of two pesticides (acetochlor, EPTC) was studied by model experiments in which sandy and brown forest soil were involved.
- The metal-content of soils was decreased by EDTA extraction while their organic matter content was diminished by acidic and alkaline destruction. Metal salts were also added to the pesticide solutions prepared without soil in order to assess the effects of metals on the degradation.
- In order to model the biological effects of the pesticide degradates, 6 frequent soil microbes were chosen: three bacterium species (*Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Mycobacterium phlei*) and three fungi species (*Trichoderma harzianum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium oxysporum*). The applied method is based on the connection between the rate of the toxicity of a compound and the size (mm) of the hindering zone around the filter paper disc containing the pesticide and its degradation products.
- To estimate the bioavailable amounts of pesticides comparative studies were performed including extraction procedures with 5 distinctive solvents (chloroform, methanol, sodium-acetate-acetic-acid-buffer, calcium-chloride

solution, humic acid solution) and three types of soils (brown forest soil, sandy soil, alluvial soil).

- The effects of major soil parameters (pH, microbial activity, organic matter content) on the bioavailability were also studied by the abovementioned model experiments.
- The estimation of the biologically uptakable amounts of pesticides, which can also be regarded as plausible food contaminants, were performed by the application of two plant species: wheat (*Triticum aestivum*), corn (*Zea mays*) and a fungus: champion (*Agaricus bisporus*).

III. Results / New Scientific Achievements

1. The presumed degradation pathways of the studied pesticides

1.1. Six degradation products were detected by HPLC-MS in the samples taken from the reaction mixture of **CARBENDAZIM** during the irradiation procedure. The name, the retention time and the molar mass of the detected degradates observed throughout the whole irradiation period are summarized in table 1.

Table 1: Degradation products of carbendazimw.

Name of compound	Molar mass (g/mol)	Retention time (min)
1 methyl-benzimidazole-2-ylcarbamate	191	7.53
2 2- benzimidazole-carbamic acid	177	6.56
3 2-benzimidazole-ylcarbamate	161	8.33
4 2-amino-benzimidazole	133	8.28
5 benzimidazole	118	7.66
6 2-methylamino-aniline	122	8.01
7 1,2-diamino-benzole	108	7.25

The way of degradation can be interpreted as it is shown in figure 1. The end-product of the degradation is 1,2-diamino-benzole.

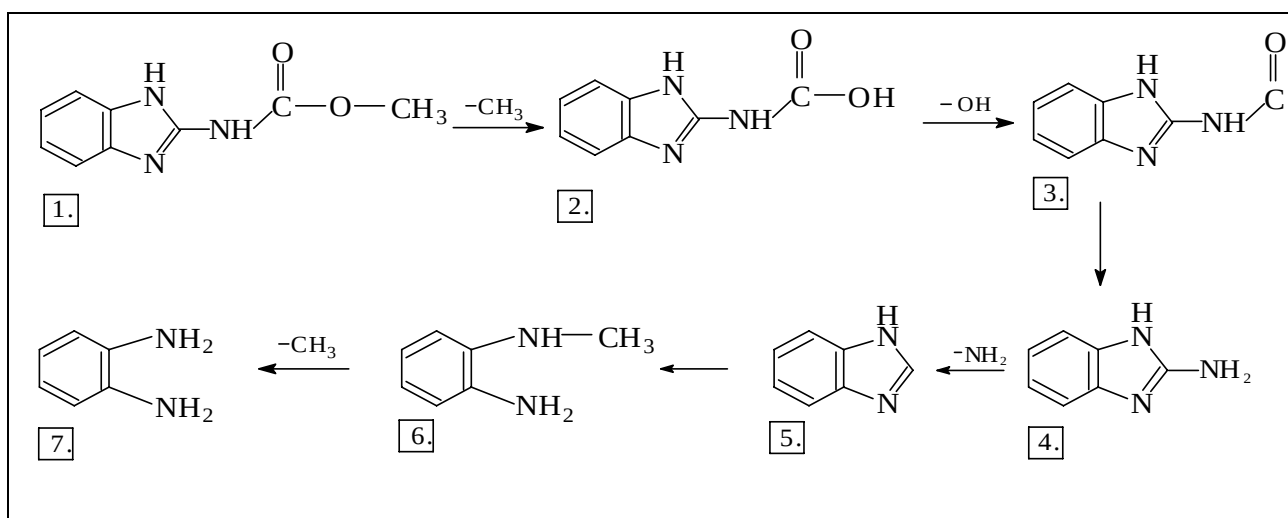


Figure 1: Proposed photodegradation pathway of Carbendazim.

1.2. In samples taken from the reaction mixture of **ACETOCHLOR** during its irradiation seven degradation products were detected by GC-MS technique which can be derived from the basic compound of acetochlor. The presumed degradation pathway is demonstrated in figure 2. Due to the parallel presence of the degradation products of acetochlor and the unfeasibility of origination from one another three degradation pathways can be assumed in the first part of the degradation process (0-3 hours). 1-ethyl-3-methyl benzene (8) was detected as the end-product of the degradation process.

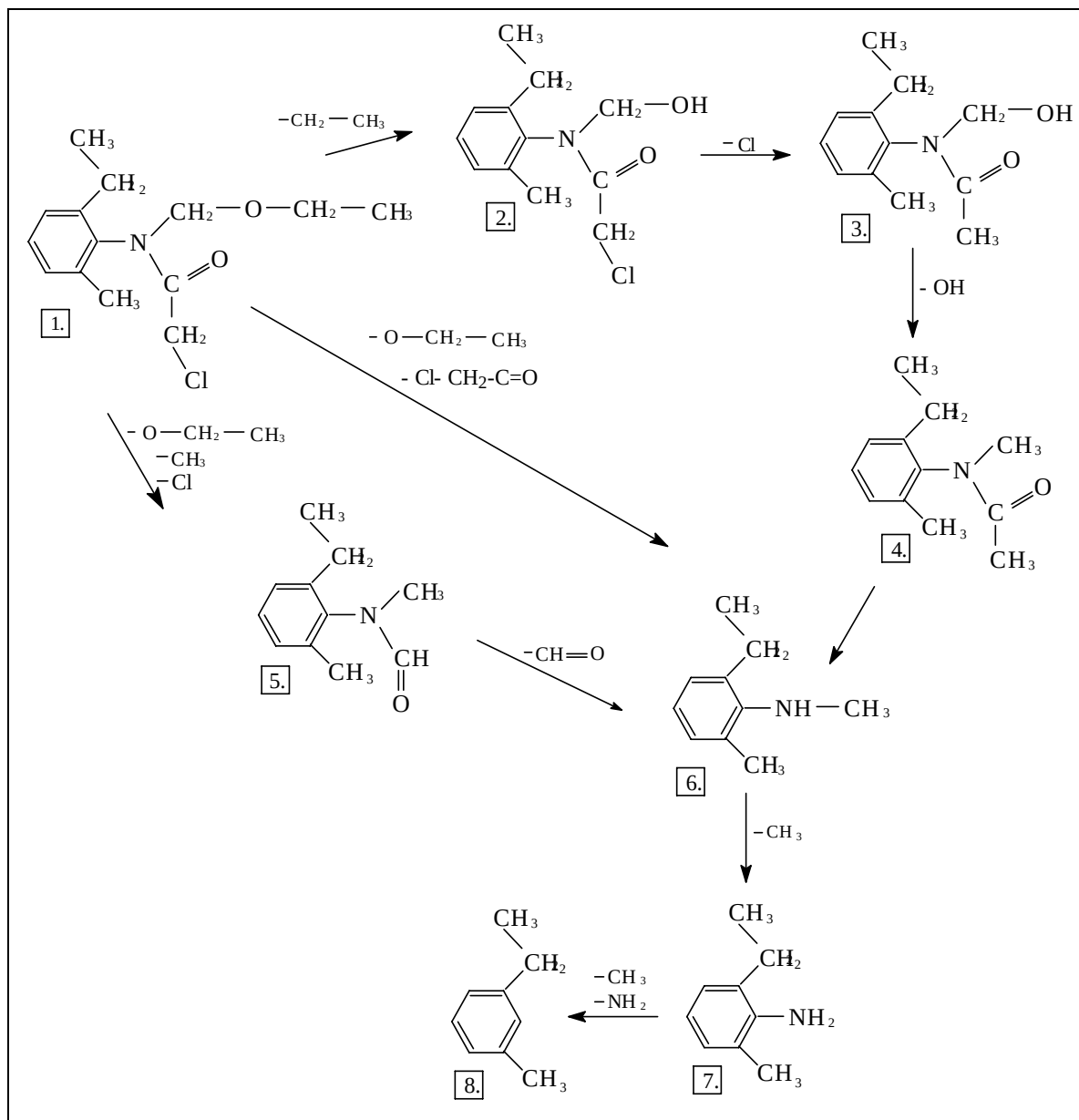


Figure 2: Proposed photodegradation pathway of acetochlor.

1.3. During the photodegradation of **SIMAZINE** six degradation products were detected. Since the degradates were present in the same time and they can not be derived from one another, it can be supposed that the photodegradation of simazine might be accomplished via two parallel decomposition routes (figure 7). The degradation products that we detected during our research are partly in accordance with the former research results. The previously detected dechlorinated, deaminated, dealkylated and hydroxylated products were also present in our sample, while we did not observe dimerization during the degradation.

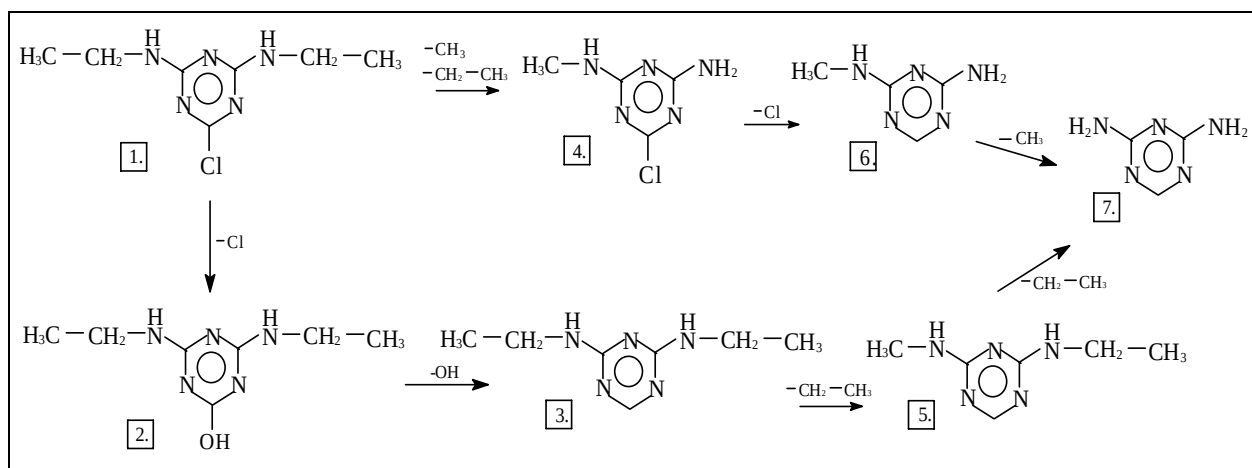


Figure 3: Proposed photodegradation pathway of simazine.

1.4. Major steps of the photocomposition of **CHLORPIRIPHOS** (1) are dechlorination and scission of the alkyl-side chains. Certain degradates present in the same time led us to suppose the existence of parallel degradation pathways (Figure 9). These two routes are linked through a common degradation product (4), and O-(5-chloro-2-pyridil)-thiophosphate (6) generated as end-product.

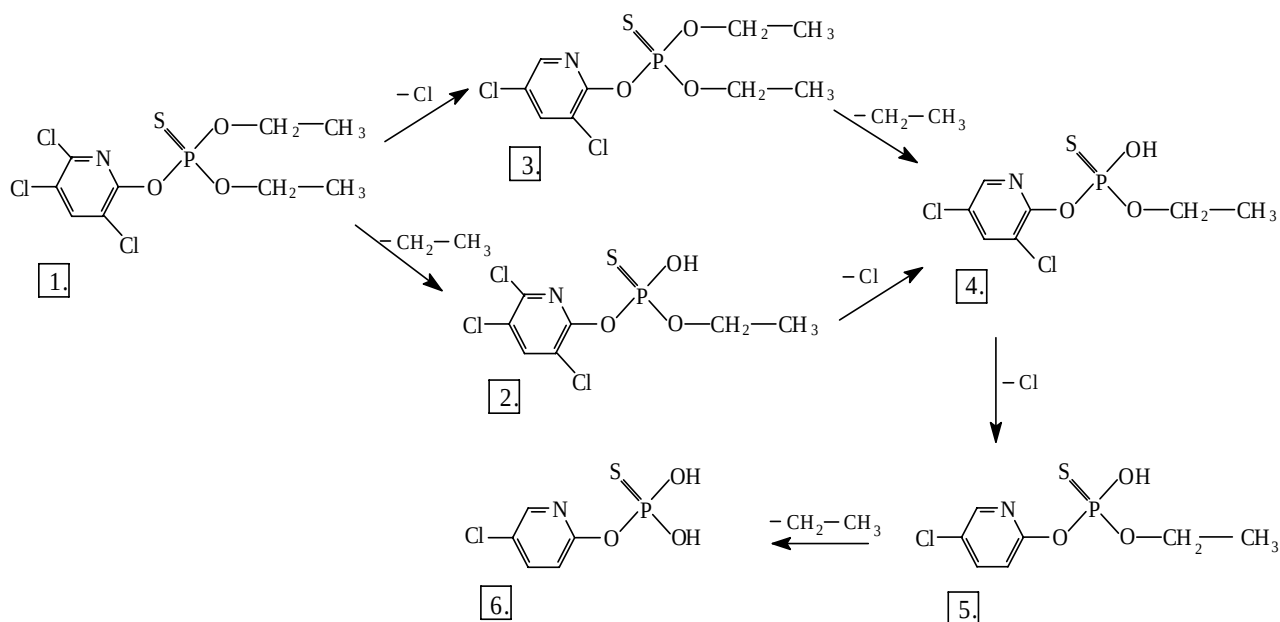


Figure 4: Proposed photodegradation pathway of chlorpiriphos.

1.5. During the photodegradation of **EPTC** cleavage of the thioethyl-group, then that of the formyl-group was observed. The end-product of the decomposition process is N,N-diethyl-amide which is generated through stepwise dealkylation. Hence N,N,-dipropyl-formamide and N,N-diethyl-propionamide were detected in the same sample and they can not be derived from one another, the presence of two degradation pathway might be proposed in the first period of the degradation. Three common and three previously not detected products were observed during the photodegradation of EPTC in comparison with former researches.

1.6. Three degradation products were generated during the photodegradation of **ATRAZIN**. The observed main steps of the phototransformation, namely dechlorination, hydroxylation and the cleavage of methyl and ethyl groups are in accordance with the results of the previously published researches. On the contrary ring-opening, dimerization and decarboxylation were not noticed during our experiments.

1.7. During the photodecomposition of **DIURON** six degradates were detected in the samples which were regularly taken from the reaction mixture of the irradiated pesticide solution. Dehalogenation and the cleavage of the ethyl-groups were the main steps of the decomposition. Also two degradation pathways might be suggested during the UV-transformation of diuron. The generation of the dechlorinated degradation products is in accordance with the previously published research results. Five degradates, that we detected and which were not published earlier, signify the occurrence of a new degradation pathway.

Table 2. Summary table of degradation steps and generated products.

	Pesticide	Main transformation steps	Number of degradation products
1	Carbendazim	- demethylation, dehydroxylation, decarboxylation, deamination, ringopening	6
2	Acetochlor	- ether-bound scission, dechlorination, dehydroxylation, deacylation, demethylation	7
3	Simazine	- demethylation, deethylation, dehydroxylation, dechlorination	6
4	Chlorpyrifos	- deethylation, dechlorination	5
5	EPTC	- demethylation, cleavage of thioethyl and propionyl group	6
6	Atrazine	- dechlorination, hydroxylation, demethylation, deethylation	3
7	Diuron	- dechlorination, dehydroxylation, -CO-loss, dimetilamine-loss	6

2.Extent of photodegradation of pesticides

2.1. Pesticides display great variability in terms of photo-stability and irradiation time dependency of the photodegradation even in the case of agents with similar chemical structure.

2.2. Among the studied pesticides EPTC underwent the fastest photodegradation: its transformation was more than 90% after 3 hours of irradiation. On the contrary, in case of acetochlor 10% of the initial amount degraded after 2 hours of irradiation.

2.3. The degradation of chlorpyrifos and acetochlor was completed after 16 hours of irradiation, while in case of EPTC just 5 hours was required for the entire decomposition. The progress of the degradation of the studied pesticides is demonstrated in figure 5.

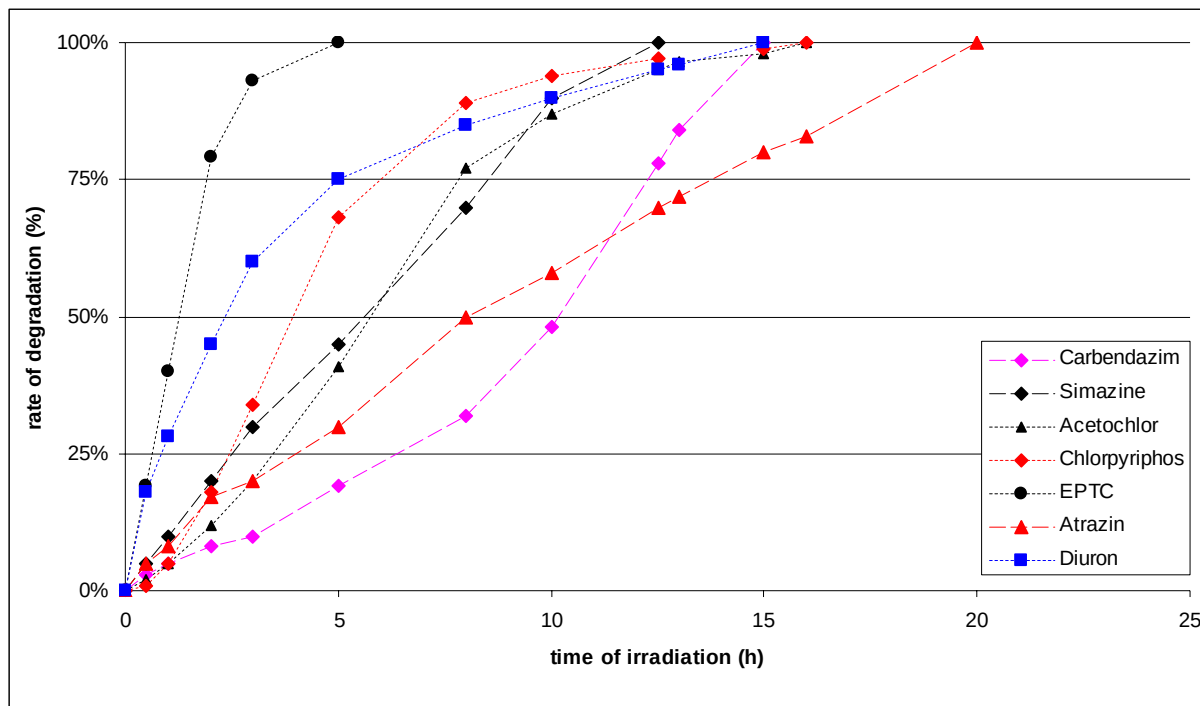


Figure 5: Progress of the photodegradation of the studied pesticides

3.The toxicity of degradation products estimated by microbiological experiments

- 3.1. By means of microbiological test experiments biological effects of the studied reaction mixture (pesticide and its degradation products) was modelled and it was observed that the *Mycobacterium phlei* exhibits the most pronounced sensitivity against chlorpyrifos, while *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* were sensitive against the degradation products of chlorpyrifos.
- 3.2. The microbe-hindering effect of carbendazim was observed in case of *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* with decreasing intensity with the progress of irradiation time.
- 3.3. All of the tested microbes were sensitive against the acetochlor and its degradation products as well.

3.4. Due to the variable toxicity of both the pesticides and their degradation products as well as the sensitivity of the tested soil microbes led us to the assumption that the degradation products of the pesticides generated with UV-irradiation can modify the composition of the soil community.

4.Effects of soil parameters on the degradation of pesticides

4.1. Studying the effects of certain environmental factors on acetochlor's photodegradation it was observed that the presence of soil and the alteration of its two major parameters may contribute to the generation of new degradation products. Out of the observed 11 new degradates 6 can be regarded as dominant components of the sample. Moreover the ratio of the degradation products was variable depending on the soil characteristics.

4.2. In case of EPTC 6 new degradation products were detected in the samples containing soil with diverse characteristics in comparison with the control samples. The analysis justified that these degradation products were generated due to the presence of soils. The ratio of these degradates is not predominant in the samples but they modify the degradation pathway of EPTC.

5.Bioutakability and bioavailability of pesticides in case of wheat, corn and champignon

5.1. The uptaken amounts of pesticides were established by the application of model plants (wheat, corn). The location (leaf, root) of the accumulation of the pesticides and their ratio in different plant parts were also determined.

5.2. Ratio of pesticide degraded by environmental factors was taken into account in setting up the material balance of the studied pesticides. Microbiological degradation, soil adsorbance and the plant uptake may also play crucial role in the pesticides' fate in environment.

5.3. The pesticide accumulation in the different parts of the champignon (stump, cap) was also measured. The results are shown in figure 6 and 7. Major observations are as follows:

- the bioavailability and the bioaccumulation of pesticides were different in case of the studied model plants (wheat, corn) and the champignon,
- the bioaccumulation of pesticides in the segments of plants were varied depending on the type of the soils,
- the biologically uptakable amounts of pesticides varied according to the part of the tested plant, the type of the pesticide and the physical and chemical characteristic of the applied soils.
- Wheat has uptaken the highest amount of simazin among the tested pesticides from all the tree types of soils. The uptaken amount was mainly accumulated in the aerial part of the wheat.
- The soil type was a determining factor in terms of the pesticide accumulation by wheat. Wheat grown in sandy soil accumulated less simazin than wheat grown in the other two types of soil. In case of wheat the amount of the uptaken simazin was still considerably more than the accumulated amount of acetochlor.
- In comparison of the uptaken amounts of pesticides in case of wheat with corn it can be stated that the corn accumulated more pesticide than wheat in all cases. In accordance with this, the amounts of the pesticides, extracted from the soils after the cultivation period, were fewer in case of corn than in case of wheat.

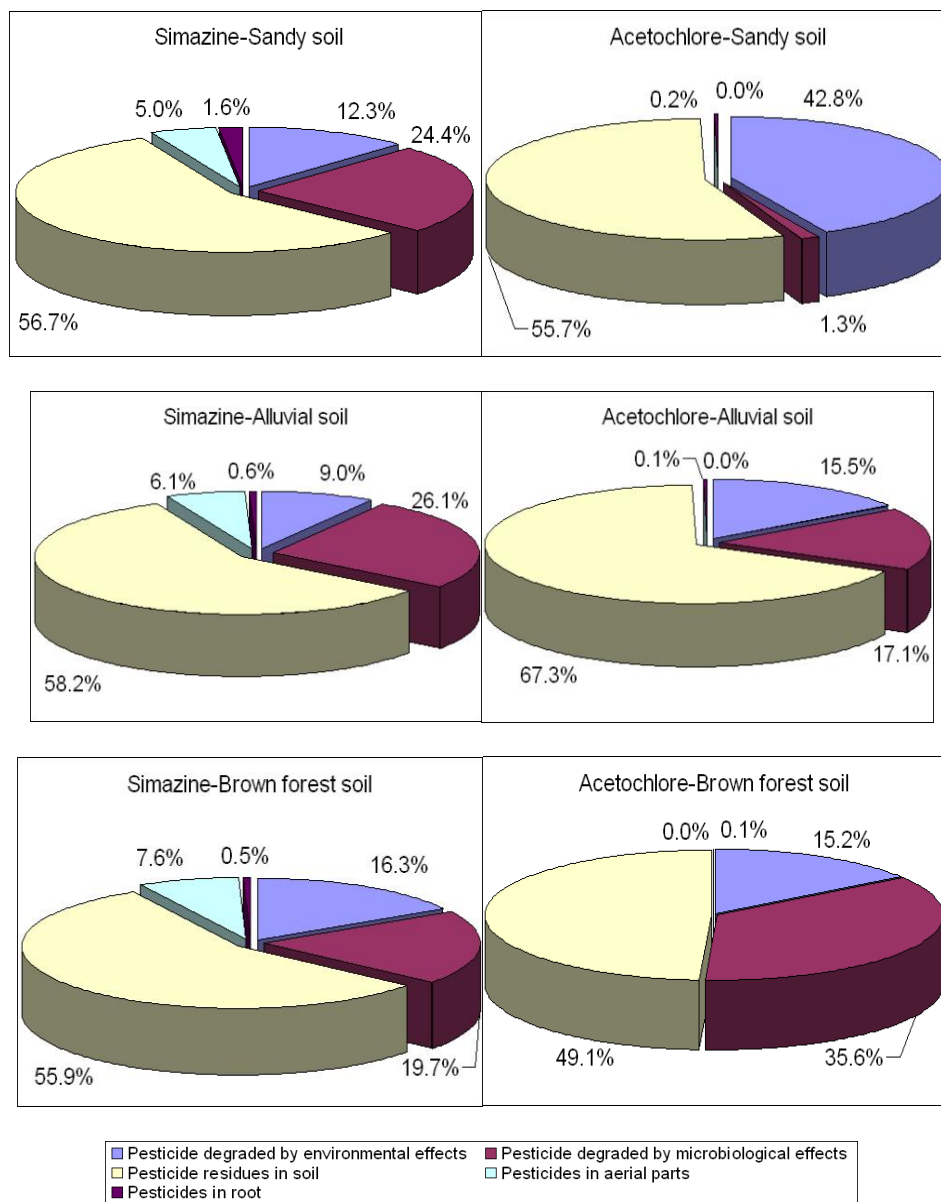


Figure 6: Biouptakable and bioavailable amounts of simazin and acetochlor in case of wheat (*Triticum aestivum*).

- Prochloraz was accumulated at different ratios in the cap and the stump of the mushroom: majority of the uptaken amount of the pesticide was accumulated in the stump of the champignon (figure 7.).
- The bioaccumulation of teflubenzuron by mushroom is five times more than in case of prochloraz. On the contrary, teflubenzuron was accumulated mainly in the cap of the mushroom.
- After the cultivation period the correlation was definitive between the uptaken amount of pesticides and the amount that remained in the compost.

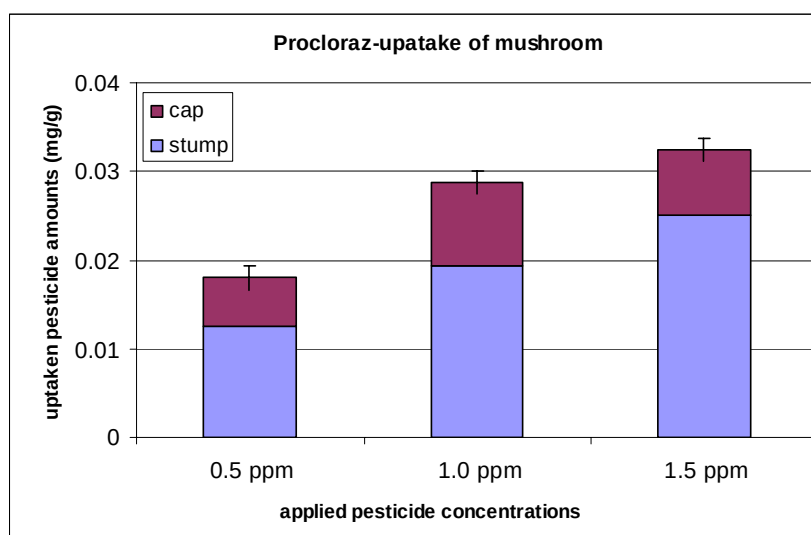


Figure 7: Bioavailable amounts of diverse concentration of prochloraz of mushroom (*Agaricus bisporus*).

6. Soil parameters affecting the bioavailability of pesticides

During our work three pesticides (diuron, simazin, acetochlor) with different chemical structure were involved to study the effects of major soil parameters (pH, microbial enzyme activity, organic matter content) on the bioavailability of pesticides by comparative extraction systems in case of three distinctive soil types (sandy soil, brown forest soil, alluvial soil).

6.1. The effects of the microbial character of the soils on the bioavailability

- The microbial enzyme activity was the largest on the first day of incubation in case of sandy- and alluvial soil, while in case of brown forest soil it was outstanding after three days of incubation.
- In case of both soil types and pesticides the bioavailable amounts of pesticides were less by 20-60% in case of microbiologically active soils than in case of air dried soils.
- The bioavailable amounts of the studied pesticides were inversely proportional to the microbiological activity of the soils.

6.2. The effects of the organic matter content of the soils on the bioavailability

- In case of all the three types of soils the bioavailable amounts of the studied pesticides were inversely proportional to the organic matter content of the soils when aqueous extracting solvents or chloroform were applied as extracting solvents.
- Clear correlation was not observed between the bioavailability of pesticides and the organic matter content of soils samples when methanol was applied as extracting solvent.

6.3. The effects of soil pH value on the bioavailability

- It can be stated that bioavailability of pesticides depends on the pH values of soils samples but different pH-dependency was observed in case of the studied pesticides.
- The stability of the pesticides at different pH values and their interaction with the solvents need to be taken into consideration in order to provide extensive interpretation of the results.
- The results of these experiments contribute to proper understanding of the role of parameters having effects on the bioavailability of pesticides.

7. Exploitation of major results on the photodegradation of pesticides

- Justification of presence of photodegradation products which formerly have not been detected draw the attention to the plausible formation of pollutants. These compounds might be regarded as potential risk factors in compliance with the precautionary principle. Moreover these degradates contribute to the overall burden of environment as secondary pollutants.
- In case of carbendazim the occurred photodecomposition resulted in the change in the pesticide's antifungal characteristic, furthermore antimicrobial effects were observed in the course of the photodecomposition. The presence the photolytic degradates of pesticides may largely influence the soil microbial community, hence the most sensible way of application.
- The estimation of the stability, the persistence, and the extent of the degradation of the photosensible pesticides might be applied in respect of establishment of optimal pesticide usage.
- The estimation of the effects on the environmental factors on the photodegradation and the analysis of soil-pesticide interaction contribute to the proper and comprehensive understanding of environmental behaviour of pesticides occurring under real circumstances.
- Bioavailability and biouptakability of pesticides were compared by applying different traditional and novel model systems leading to a more authentic interpretation of the complex issue.

8. Tudományos publikációk (publications)

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények (articles connected to the thesis)

Nemzetközi (referált, IF)

- 1) D. Virág, Z. Naár, A. Kiss: **Microbial toxicity of pesticide derivatives produced with UV-photodegradation.** *Bullentin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, (2007), pp. 356-359. ISSN: 0007-4861, I.F. 0,563 (2007), I.F.: 1,139 (2010)
- 2) D. Virág, A. Kiss: **Comparative study of accessibility of distinctive pesticides.** *Journal of Environmental Science and Health, Part B.* 44:01, (2009), pp. 69-75. ISSN: 0360-1234, I.F.: 1,097 (2009), I.F.: 1,119 (2010)
- 3) A. Kiss, D. Virág: **Photostability and photodegradation pathways of distinctive pesticides.** *Journal of Environmental Quality*, 38:1, (2009), pp. 157-163. ISSN: 0047-2425, I.F.: 2,291 (2009), I.F.: 2,236 (2010)
- 4) A. Kiss, D. Virág: **Interpretation and modeling of environmental behavior of diverse pesticides by revealing photodecomposition mechanisms.** *Microchemical Journal*, 92:2, (2009), pp. 119-122. ISSN: 0026-265 I.F.: 2,579 (2009), I.F.: 2,480 (2010)

Hazai (referált, IF nélküli)

- 1) A. Kiss, D. Virág: **GC-MS studies to map mechanistic aspects of photolytic decomposition of pesticides.** *Acta Agraria Debreciensis*, 28,(2008), pp. 11-17.
- 2) D. Virág, A. Kiss: **Comparative studies to model bioavailability of pesticides in distinctive soil types.** *Acta Agraria Debreciensis*, 28, (2008), pp. 17-25.
- 3) Attila Kiss, Diána Virág: **Mechanistic and kinetics studies to reveal photodegradation behaviour of distinctive pesticides.** *Acta Academiae Paedagogicae Agriensis. Nova Series Tom. XXXIII. Sectio Biologiae.* Redigit János Varga. Eger, 2006. p. 19-35. (ISSN: 1216-4216)
- 4) Diána Virág, Attila Kiss: **Comparison of novel Model Systems for Characterising Pesticides Bioavailability and the Role of Soil Microorganisms.** *Acta Academiae Paedagogicae Agriensis. Nova Series Tom. XXXIII. Sectio Biologiae.* Redigit János Varga. Eger, 2006. p. 37-50. (ISSN: 1216-4216)

Egyéb közlemények az értekezés témájából (Könyvfejezet)

Attila Kiss, Diána Virág: **Interpretation and Modelling of Environmental Behaviour of Diverse Pesticides by revealing Photodecomposition Mechanisms.** In: *Pesticides – Formulations, Effects, Fate.* (Ed.: Margarita Stoytcheva) InTech, 2011. pp. 661-668. (ISBN: 978-953-307-532-7)

Az értekezéshez nem kapcsolódó közlemények (articles connected to the thesis)

Nemzetközi (referált, IF)

- 1) Zsuzsanna Bori, Gábor Csiffáry, Diána Virág, Marianna Tóth-Markus, Attila Kiss, Nóra Adányi: **Determination of L-Lactic Acid Content in Foods by Enzyme-Based Amperometric Bioreactor.** *Electroanalysis*, Special Issue: Mátrafüred '11, 24, (1) 2012, pp. 158–164. ISSN: 1040-0397, I.F.: 2,721 (2010)
- 2) Beáta Bóka, Nóra Adányi, Diána Virág, Marek Sebel, Attila Kiss: **Spoilage Detection with Biogenic Amine Biosensors, Comparison of Different Enzyme Electrodes.** *Electroanalysis*, Special Issue: Mátrafüred '11, 24, (1) 2012, pp. 181-186. ISSN: 1040-0397, I.F.: 2,721 (2010)

Hazai (referált, IF)

- 1) E. Milinki, Sz. Molnár, A. Kiss, D. Virág and E. Péntes-Kónya: **Study of Microelement Accumulating Characteristics of Microlgae.** *Acta Botanica Hungarica* 53(1-2), pp. 159-167, 2011. (DOI: 10.1556/ABot.53.2011.1-2.15, ISSN: 15882578)
- 2) Sz. Molnár, É. Milinki, A. Kiss, D. Virág, Cs. Csutorás, Z. Murányi: **Comparative studies on accumulation of selected microelements by *Spirulina platensis* and *Chlorella vulgaris* with the prospects of functional food development.** *Acta Alimentaria* ISSN: 0139-3006, I.F.: 0,379 (2010) (under review)