

Možnosti pojavljanja kokcidiostatikov v okolju

The possibility of occurrence of coccidiostats in the environment

Anja KOROŠA¹, Suzana ŽIŽEK² & Nina MALI¹

¹Geološki zavod Slovenije, Dimičeva ul. 14, SI-1000 Ljubljana

²Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Gerbičeva 60, SI-1000 Ljubljana; e-mail: anja.korosa@geo-zs.si; nina.mali@geo-zs.si; suzana.zizek@vf.uni-lj.si

Prejeto / Received 12. 11. 2013; Sprejeto / Accepted 18. 5. 2014

Ključne besede: kokcidiostatiki, okolje, Dravsko polje, Slovenija

Key words: coccidiostats, environment, Drava field, Slovenia

Izvleček

Kokcidiostatiki so zdravila, ki preprečujejo oz. zdravijo kokcidiozo. V okolju predstavljajo možno tveganje zaradi njihove razširjene uporabe v veterini. V velikih količinah se uporabljajo kot krmni dodatek za piščance. V okolje v največji meri pridejo zaradi gnojenja z iztrebki zdravljenih živali, ki so velik vir nepredelanih kokcidiostatikov in njihovih razgradnih produktov, saj se vse do 95 % zaužitega kokcidiostatika izloči v nespremenjeni obliki. V Evropi je dovoljenih 11 različnih kokcidiostatikov, ki se razlikujejo po svojih mehanizmih delovanja. Z gnojenjem kmetijskih površin pridejo v tla ter v površinsko in podzemno vodo. Lahko jih obravnavamo tudi kot sledila in indikatorje za določanje izvora kmetijskega onesnaženja. Prisotnost, transport in koncentracije kokcidiostatikov v okolju so večinoma še neznani. V članku je pripravljen pregled kokcidiostatikov, njihova uporaba, učinkovitost in pojav v okolju. Opisani so faktorji, ki vplivajo na vsebnost kokcidiostatikov v okolju. Predstavljena je analiza člankov na temo kokcidiostatikov v okolju. Na primeru Dravskega polja smo določili potencialne okoljske koncentracije kokcidiostatika monenzina v okolju. Pri oceni smo upoštevali število piščancev na izbranih farmah, pripadajoče obdelovalne površine teh farm, ter značilnosti monenzina. Ugotovili smo, da so zaradi gnojenja s piščančjim gnojem predvidene okoljske koncentracije (PEC) monenzina v tleh do 0,30 mg/kg in v podzemni vodi do 80,4 µg/l.

Abstract

Coccidiostats are veterinary pharmaceuticals used for prevention and treatment of coccidiosis. They pose a potential environmental risk because of their widespread use in veterinary medicine. In large quantities they are used as feed additives for poultry. They enter the environment mostly through the use of manure from treated animals, which is a substantial source of coccidiostats since up to 95 % of consumed coccidiostats are excreted unchanged. In Europe, 11 coccidiostats are permitted, which differ in their mechanism of action. Through soil fertilization on agricultural areas coccidiostats are transferred via manure into surface water and groundwater. They could be used as indicators of agricultural pollution. The presence, transport and concentration of coccidiostats in the environment are still largely unknown. This article provides an overview of coccidiostats, their use, efficiency and occurrence in the environment. It describes the factors influencing their occurrence in the environment. An overview of literature on the topic of coccidiostats in the environment is presented. In the case of the Drava field the potential environmental concentration of the coccidiostat monensin in the environment was established. The assessment took into account the number of chickens on a chosen farm, the related arable land and the properties of monensin. It was found that due to fertilization with chicken manure we can expect predicted environmental concentrations (PEC) of monensin in soil up to 0,30 mg/kg and in groundwater up to 80,4 µg/l.

Uvod

Tako kot ostale organske spojine tudi ostanki veterinarskih zdravil in njihovi razgradni produkti predstavljajo resno grožnjo za okolje. Vanj pridejo predvsem z izločki zdravljenih živali, ki se uporabljajo za gnojenje obdelovalnih kmetijskih površin. Pri tem zdravilne učinkovine in njihovi metaboliti pridejo v stik z organizmi v okolju, v površinske in ne nazadnje tudi v podzemno vodo.

V zadnjih letih v svetu potekajo intenzivne raziskave vpliva kmetijske dejavnosti na okolje. Raziskave so usmerjene od monitoringa stanja

kakovosti do razumevanja procesov transporta in razgradnje onesnaževal v okolju. Kmetijstvo je glavni vir razpršenega onesnaženja, ki vpliva na podzemno vodo. Že sedaj v podzemni vodi najdemo ostanke herbicidov, pesticidov in različnih gnojil. Ostanke zdravil lahko prištevamo v skupino organskih spojin (emerging organic compounds EOC) in eden od izvorov EOC v površinski in podzemni vodi ter sedimentih je uporaba živalskega gnoja v kmetijstvu (STUART et al., 2012). Uporaba veterinarskih antibiotikov v živalski krmi je pomemben vir onesnaženja v ZDA in v

delih Evrope in Azije (BARTELT-HUNT et al., 2011). SARMAH in sodelavci (2006) so poročali o nizkih koncentracijah veterinarskih protimikrobnih izdelkov v podzemni vodi kot posledica uporabe gnoja in gnojevke v kmetijski praksi.

Iz krme preide preko živali 75 do 90 % hranilnih snovi neposredno v gnoj in gnojevko, ki jih vrnemo na kmetijske površine kot gnojilo (INTERNET 1). Zaradi visokega odstotka izločanja hranilnih snovi pri perutnini, je perutninski gnoj zelo cenjen. Piščanci izločijo vse do 95 % zaužitega kokcidiostatika v nespremenjeni obliki (EMA, 2005), zato lahko pričakujemo, da v okolje z gnojenjem prispejo velike količine kokcidiostatikov. Pot onesnaževala v okolju je odvisna od fizikalno-kemijskih parametrov snovi in okolja, v katerem se nahaja. Zaradi svojih hidrofobnih lastnosti so v prsti kokcidiostatiki večinoma vezani na delce, vendar jih lahko pričakujemo tudi v vodi (SASSMAN & LEE, 2007; YOSHIDA et al., 2010). EOC, ki so bili kakorkoli odloženi na površje, lahko potencialno migrirajo skozi zemljino (OPPEL et al., 2004; SCHEYTT et al., 2004) in nezasičeno cono v nasičeno cono vodonosnika (SNYDER, 2004; ZUEHLKE et al., 2004).

Uporaba kokcidiostatikov v krmi je določena z Uredbo parlamenta in sveta št. 1831/2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali. Cilj Uredbe je bil vzpostavitev postopka za pridobitev dovoljenja dajanja na trg in uporabe krmnih dodatkov in vzpostavitev določb za nadzor in označevanje krmnih dodatkov z namenom, da se zagotovi podlaga za zagotavljanje visoke ravni varovanja zdravja ljudi, živali, okolja ter interesov uporabnikov (EVROPSKI PARLAMENT IN SVET, 2003). Podrobna pravila za izvajanje omenjene Uredbe so opisana v Uredbi Komisije (ES) št. 378/2005 (EVROPSKA KOMISIJA, 2005), ki je bila nazadnje dopolnjena z Uredbo Komisije (ES) št. 885/2009, nadzor nad uporabo krmnih dodatkov v krmi pa je zajet v Uredbi (ES) št. 882/2004 Evropskega Parlamenta in Sveta o izvajanju uradnega nadzora (EVROPSKI PARLAMENT IN SVET, 2004). Veliko organskih spojin, med njimi tudi kokcidiostatikov, pa v okolju in podzemni vodi ni nadzorovanih. Nobena zakonodaja ne obravnava vseh poznanih spojin kot parametre, ki bi vplivali na kakovostno stanje ali zdravstveno ustreznost virov pitne vode. Na evropski ravni je kakovost podzemne vode urejena na podlagi Vodne direktive evropskega sveta (2000/60/ES) in Direktive o varstvu podzemne vode pred onesnaževanjem in poslabšanjem (2006/118/ES).

Kokcidiostatiki so ene od spojin, za katere vplivi na okolje še niso povsem poznani. Odgovorna uporaba veterinarskih zdravil mora zato upoštevati tudi njihovo potencialno nevarnost za okolje. Vse pogostejše se zavedamo problemov kokcidiostatikov v okolju, ki zaradi rezistence kokcidijev, s povečano uporabo vplivajo na onesnaževanje okolja in uspešnost preprečevanja kokcidioze.

Kokcidiostatikov ne obravnavamo zgolj kot neželena onesnaževala, temveč tudi kot sledila in indikatorje za določanje izvorov vrst onesnaženja oz. antropogene dejavnosti, ki vpliva na okolje in podzemno vodo. Vprašanja, ki se nam postavljajo v zvezi s pojavom kokcidiostatikov v okolju in podzemni vodi, so povezana z detekcijo snovi, razvojem analitskih metod za različne medije, ugotavljanjem izvora, študijo transportnih procesov, ugotavljanjem učinkov ter oceno tveganja za okolje.

V članku je pripravljen pregled kokcidiostatikov, njihove uporabe, učinkovitosti in pojavljanja v okolju. Predstavljena je analiza člankov na temo kokcidiostatikov v okolju. Na primeru analize rabe prostora na Dravskem polju in uporabe piščančjega gnoja na tem območju smo ocenili možen vnos kokcidiostatikov v podzemno vodo.

Kaj so kokcidiostatiki?

V Evropi in drugod po svetu se je za zadovoljitev povpraševanja po prehrani razvila močna živinorejska proizvodnja. Intenzivnost proizvodnje je mogoče zagotavljati le z ustrezno selekcijo živali, izboljševanjem tehnoloških pogojev reje, nadzorom zdravstvenega stanja živali in ne nazadnje tudi njihove prehrane (krme).

Kokcidioza, ki prizadene predvsem piščance, purane in kunce, je črevesna parazitna bolezen, katere posledice so lahko tudi smrtne. Povzročajo jo enocelični paraziti, ki invadirajo črevesno steno živali. Razvoj in razmnoževanje parazita v črevesni steni povzroči poškodbe. Če tega ne preprečimo, prihaja do različnih kliničnih znakov, od slabega prirasta, do pogina velike večine živali. V največji meri prizadene perutnino in kunce, lahko pa je usodna tudi za ostale živali (DORNE et al., 2011). Kokcidiostatiki so kemoterapevtiki, ki preprečujejo pojav kokcidioze. Moderna reja piščancev in puranov bi bila brez njih nemogoča.

Ukrepi za preprečevanje in terapijo bolezní segajo že več kot šestdeset let v preteklost, vendar do sedaj kokcidioze ni bilo mogoče v celoti zatreti. Dosedanji programi preprečevanja te bolezni temeljijo na dodajanju kokcidiostatikov v krmo. Piščanci dobivajo v krmi kokcidiostatik do nekaj dni pred zakolom, odvisno od vrste kokcidiostatika (MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO IN PROSTOR, 2012). Za preprečevanje razvoja kokcidij in njihove oslabitve ali inaktivacije je potrebna stalna prisotnost kokcidiostatika v krmi, kar po BEDNIKU (2004) pri mnogih preparatih povzroči neučinkovitost oz. rezistenco. Določanje kokcidiostatikov v krmi za potrebe uradnega nadzora v Sloveniji poteka na Inštitutu za higieno in patologijo prehrane živali Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani. Uporabljene metode sta opisala TAVČAR-KELCHER in VENGUŠT (2006).

Uvedba prvega ionofornega kokcidiostatika (monenzin) v sedemdesetih letih je bila pomemben dosežek pri nadzoru kokcidioze (KOMISIJA

EVROPSKIH SKUPNOSTI, 2008). Pred tem so bili izbruhi kokcidioze pogosti in težavni, saj so bili na voljo le neionoforni kokcidiostatiki, ki pa so bili bistveno manj učinkoviti, ker se je odpornost zajedavca nanje hitro razvila. Vsi kokcidiostatiki zavirajo razmnoževanje in ne odstranijo zajedavca iz črevesa živali v celoti. Tako imenovanimi »shuttle« programi zagotavljajo ustrezen nadzor nad boleznijo ter zmanjšujejo razvoj odpornosti zajedavca na najmanjšo možno raven. Pri komercialni reji se kot glavna metoda nadzora nad kokcidiozo uporablja dodajanje kokcidiostatikov v krmo (KOMISIJA EVROPSKIH SKUPNOSTI, 2008).

Na podlagi kemijske strukture in glavne biološke aktivnosti, je v Evropski uniji dovoljenih 11 kokcidiostatikov (MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO IN PROSTOR, 2012), navedenih v tabeli 1. Po mehanizmu delovanja jih razdelimo v dva razreda: prvi so naravno proizvedeni polietrni

ionoforji, med katere uvrščamo monenzin, lasalocid, salinomycin, narazin, maduramicin in semduramicin. Drugi so sintetični kokcidiostatiki (robenidin, dekokvinat, nikarbazin, diklazuril in halofuginon) (BROEKAERT et al., 2012). Ionoforni kokcidiostatiki so polietrni karboksilni antibiotiki, ki nastanejo pri fermentaciji sevov bakterij rodu *Streptomyces spp.* in *Actinomadura spp.* Imajo odlično antiprotazojsko aktivnost, so lipofilna sredstva, za katera je znano, da vplivajo in motijo transmembransko ionsko izmenjavo. So selektivni za specifične katione (ZIDAR & ŽIŽEK, 2012), bodisi monovalentne (monenzin, salinomycin) ali dvovalentne (lasalocid). Neionoforni kokcidiostatiki so sintetizirane spojine in imajo drugačne mehanizme delovanja, ki do sedaj v celoti še niso poznani. Robenidin je derivat gvanidina, ki inhibira oksidativno fosforilacijo in aktivnost ATP-aze. Diklazuril je derivat benzenacetonnitrila (DORNE et al., 2011).

Tabela 1. Kokcidiostatiki, njihove dovoljene koncentracije v krmi in potencialne koncentracije v tleh, površinskih in podzemnih vodah (EFSA, 2003a; EFSA, 2003b; EFSA, 2004a; EFSA, 2004b; EFSA, 2004c; EFSA, 2004d; EFSA, 2005; EFSA, 2006; EFSA, 2007b; EFSA, 2008a; EFSA, 2008b; EFSA, 2008c; EFSA, 2010a; EFSA, 2010b; EFSA, 2010c; EFSA, 2011a; EFSA, 2011c; EFSA, 2011d; EFSA, 2013; MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO IN PROSTOR, 2012).

Table 1. Coccidiostats, their permitted concentrations in feed and potential concentrations in soil and in surface and groundwaters (EFSA, 2003a; EFSA, 2003b; EFSA, 2004a; EFSA, 2004b; EFSA, 2004c; EFSA, 2004d; EFSA, 2005; EFSA, 2006; EFSA, 2007b; EFSA, 2008a; EFSA, 2008b; EFSA, 2008c; EFSA, 2010a; EFSA, 2010b; EFSA, 2010c; EFSA, 2011a; EFSA, 2011c; EFSA, 2011d; EFSA, 2013; MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO IN PROSTOR, 2012).

Učinkovina	Pripravek (trgovsko ime)	Datum izteka veljavnosti dovoljenja uporabe v EU	Koncentracija v krmi (mg/kg)	Potencialna koncentracija		
				Potential concentration		
				Tla (mg/kg)	Površinska voda (µg/l)	Podzemna voda (µg/l)
Active ingredient	Preparation (trade name)	Date of expiry of use in EU	Concentration in feed (mg/kg)	Soil (mg/kg)	Surface water (µg/l)	Groundwater (µg/l)
Dekokvinat Decoquinat	Deccox	30.7.2014	20 - 40	0,23	0,03 - 0,06	0,03 - 0,07
Diklazuril Diclazuril	Clinacox	16.3.2021	1	0,005	/	/
Halofuginon Halofuginone	Stenorol	Dne 8.11.2010 je bila predložena vloga za podaljšanje veljavnosti uporabe	2 - 3	/	/	/
Lasalocid Lasalocid	Avatec	28.9.2021	75 - 125	0,58	9,6	29
Maduramicin Maduramicin	Cygro	10.5.2021	5	0,0324	6,1	18
Monenzin Monensin	Elancoban Coxidin	30.7.2014 9.3.2022	60 - 125	0,632	38	112
Narazin Narasin	Monteban Maxiban	21.8.2014	60 - 70 40 - 50	0,26	3,6	10,8
Nikarbazin Nicarbazin	Maxiban	26.10.2020	40 - 50	*DNC: 0,276 HDP: 0,076	DNC: 0,32 HDP: 37	DNC: 0,96 HDP: 110
Robenidin Robenidine	Cycostat Robenz	21.6.2023 29.10.2014	30 - 66	0,235 - 0,94	0,01 - 0,04	0,03 - 0,12
Salinomycin Salinomycin	Sacox Salinomax Kokcisan	21.8.2014 22.4.2015 26.2.2018	20 - 70 50 - 70 60-70	0,33 - 0,68	od 10 - 21	100 - 210
Semduramicin Semduramicin	Aviax	20.10.2016	20 - 25	/	/	/

*Nikarbazin je molarna mešanica 1:1 4,4-dinitrokarbanilid (DNC) in 2-hidroksi-4,6-diemtilpirimidin (HDP) /
Nicarbazin is molar mixture of 1:1 4,4-dinitrokarbanilid (DNC) and 2-hidroksi-4,6-diemtilpirimidin (HDP)

Celotna poraba kokcidiostatikov v Sloveniji je približno 13 ton letno, največji prodajni delež v svetovnem merilu pa predstavljata salinomycin (20,7 %) in monenzin (16,6 %) (INTERNET 2). Piščanci izločijo vse do 95 % zaužitega kokcidiostatika v nespremenjeni obliki (EFSA, 2005), zato lahko pričakujemo, da v okolje pridejo preko gnojenja. Na relativno visoko tveganje kokcidiostatikov za okolje so opozorili tudi avtorji BOXALL in sodelavci (2003), KOOLS in sodelavci (2008) ter HANSEN in sodelavci (2009).

Kokcidiostatiki v okolju (izvor, transport in razgradnja)

Glavni vir kokcidiostatikov v okolju so živalski iztrebki. Ostanke kokcidiostatikov pridejo v okolje z urinom in blatom ter z odstranjevanjem neuporabljenih pripravkov. Pomemben vir kokcidiostatikov v okolju je gnoj, ki se uporablja v kmetijstvu za gnojenje kmetijskih površin. Upoštevat je treba številne okoliščine, ki vplivajo na koncentracijo kokcidiostatikov v gnoju. Npr. gnoj se običajno hrani na kmetiji najmanj 3 mesece, kar lahko vpliva na degradacijo kokcidiostatikov v njem, kar privede tudi do 50 % manjšega vnosa

(ŽIŽEK et al., 2011). Koncentracija je odvisna tudi od uporabe gnoja na različnih tipih tal, saj nekateri kokcidiostatiki hitreje razpadejo v tleh kot v gnoju, kar je odvisno tudi od fizikalno kemijskih pogojev okolja. Vplivi kokcidiostatikov na neciljne organizme v okolju so različni, odvisni od fizikalno kemijskih lastnosti kokcidiostatika, tal, vremenskih razmer, vlažnosti, pH, itd (ŽIŽEK et al., 2011).

Narejenih je bilo tudi nekaj študij in scenarijev za posamezno onesnaženje. V okviru projekta ARRS V4-0322 »Problematika izločanja kokcidiostatikov v okolje in možnosti navzkrižne kontaminacije v verigi priprave krmnih mešanic« (VENGUŠT, 2008) so bile narejene raziskave monenzina in lasalocida v iztrebkih kokoši. Z optimizacijo analitskih metod so določali koncentracije do meje zaznavnosti (LOD) 2,5 µg/kg in meje določljivosti (LOQ) 5,0 µg/kg za obe učinkovini. Rezultati raziskav so pokazali ostanke monenzina in lasalocida tudi v jajčnem rumenjaku (do 150 µg/kg), nižje koncentracije so pa ugotovili tudi v jajčnem beljaku, maščobi, mesu in ledvicah (VENGUŠT, 2008). Tudi študije narazina v gnoju kažejo, da se narazin ne razgradi povsem v procesu staranja gnoja (EFSA, 2004c).

Tabela 2. Kokcidiostatiki in njihove fizikalno-kemične značilnosti (EFSA, 2003A; EFSA, 2003B; EFSA, 2004A; EFSA, 2004B; EFSA, 2004C; EFSA, 2004D; EFSA, 2005; EFSA, 2006; EFSA, 2007B; EFSA, 2008A; EFSA, 2008B; EFSA, 2008C; EFSA, 2010A; EFSA, 2010B; EFSA, 2010C; EFSA, 2011A; EFSA, 2011C; EFSA, 2011D; EFSA, 2013).

Table 2. Coccidiostats and their physical and chemical properties (EFSA, 2003A; EFSA, 2003B; EFSA, 2004A; EFSA, 2004B; EFSA, 2004C; EFSA, 2004D; EFSA, 2005; EFSA, 2006; EFSA, 2007B; EFSA, 2008A; EFSA, 2008B; EFSA, 2008C; EFSA, 2010A; EFSA, 2010B; EFSA, 2010C; EFSA, 2011A; EFSA, 2011C; EFSA, 2011D; EFSA, 2013).

Učinkovina Active ingredient	log Kow	log Koc	Degradacija [DT50 (dni)] / Degradation [DT50 (days)]						Bioakumulacija Bioaccumulation
			Peščeno ilovnata tla Sandy loam	Mejljasta ilovica Silty clay	Glinena ilovica Clay loam	Glineni peski Clayey sand	Peščena glina Sandy clay	Mejljasta glina Silty clay	
Dekokvinat / Decoquinat	5,2 - 5,5	> 5,6	96	/	116	140	/	/	Potencialna bioakumulacija Potential bioaccumulation
Diklazuril / Diclazuril	4,54 - 4,00	/	/	/	/	/	/	/	/
Halofuginon / Halofuginone	3,6	/	/	/	/	/	/	/	/
Lasalocid / Lasalocid	1,4 - 2,3	1,5 - 3,0	1,8	/	0,6	/	14,2	/	Nizka bioakumulacija Low bioaccumulation
Maduramicin / Maduramicin	4 - 5	1,9 - 2,4	41	48	/	/	298	/	Potencialna bioakumulacija Potential bioaccumulation
Monenzin / Monensin	2,8 - 4,2	1,7 - 2,5	2,3	/	4	/	2,5	/	Potencialna bioakumulacija Potential bioaccumulation
Narazin / Narasin	4,87	2,9 - 3,4	21	49	29	/	/	/	/
Nikarbazin / Nicarbazin	DNC: 3,6 HDP: 0,94	DNC: 4,2 - 4,3 HDP: 1,5 - 2,0	DNC (DT50) HDP (DT90)	239 20	257 11	/	/	193 23	Potencialna bioakumulacija Potential bioaccumulation
Robenidin / Robenidine	2,5 - 3,3	> 5,63 (pH 6) - 2,91 (pH 2,5)	12	/	12	162	/	/	Nizka bioakumulacija Low bioaccumulation
Salinomycin / Salinomycin	5,15 ± 0,07	2,25 - 3,11	10	/	16	/	/	16	Potencialna bioakumulacija Potential bioaccumulation
Semduramicin / Semduramicin	2,21 - 2,58	/	/	/	/	/	/	/	Nizka bioakumulacija Low bioaccumulation

Na koncentracijo spojin v okolju vplivajo tudi izvirne koncentracije, ki so dovoljene za posamezni kokcidiostatik. Iz tega lahko sklepamo, da bi se v najnižjih koncentracijah v okolju pojavil diklazuril, ki ga v krmo mešajo v koncentraciji 1 mg/kg krme, v najvišjih pa lasalocid (75-125 mg/kg krme), monenzin (60-125 mg/kg krme), nikarbazin (40-50 mg/kg krme) in salinomicin (20-70 mg/kg krme).

Razgradnja kokcidiostatikov je odvisna od njihovih kemijskih lastnosti in od lastnosti okolja, v katerem se nahajajo (temperatura, vlaga, pH, vsebnost organskih spojin itd). Študije EFSA podajajo predvidene koncentracije posameznih kokcidiostatikov v tleh, površinskih in podzemni vodi. V vodi se najslabše topita dekokvinat (0,01-0,06 mg/l) in halofuginon (0,02 mg/l), medtem ko so ostali kokcidiostatiki bolj topni v vodi (EFSA, 2003B).

V tleh so predvidene koncentracije kokcidiostatikov precej višje od previdenih koncentracij v podzemni vodi (tab. 1). Predvidene koncentracije diklazurila so v tleh najmanjše (0,005 mg/kg), medtem ko so predvidene koncentracije robenidina v tleh lahko tudi do 940 µg/kg (tab. 1). Na koncentracijo v podzemni vodi vplivajo tudi faktorji adsorpcije ($\log K_{oc}$) in degradacije (DT_{50} – razpolovna doba razgradnje). $\log K_{oc}$ (soil organic carbon normalised distribution coefficient) je koeficient, s katerim opišemo afiniteto spojine do vezave na organski ogljik v tleh. Višje vrednosti K_{oc} pomenijo, da so spojine manj mobilne in se bolj adsorbirajo. Nižje vrednosti K_{oc} imajo bolj mobilne spojine, ki se manj adsorbirajo (INTERNET 3). Glede na $\log K_{oc}$ lahko sklepamo, da imata največjo afiniteto adsorpcije na trdne delce v tleh salinomicin in lasalocid, medtem ko se monenzin, robenidin, dekokvinat in narazin manj adsorbirajo in so bolj mobilni (tab. 2). Na sorpcijo vplivajo tudi pH, T, itd. Robenidin ima npr. pri pH 6 $\log K_{oc} > 5,63$, medtem ko je pri pH 2,5 koeficient adsorpcije mnogo manjši in znaša 2,91 ($\log K_{oc}$) (EFSA, 2011D).

Hitrost razgradnje spojin v tleh opišemo z disipacijskim faktorjem DT_{50} oz. DT_{90} . V študijah različnih kokcidiostatikov so dokazali različno hitrost razgradnje oz. disipacije v različnih tipih tal. V tabeli 2 so prikazane lastnosti posameznih kokcidiostatikov in njihova stopnja degradacije v različnih tleh. Raziskovalci poudarjajo, da je lahko velika razlika v degradaciji v glinenih tleh in v peščenih tleh. Glede na narejene študije se najpočasneje razgrajuje komponenta nikarbazina, 4,4-dinitrokarbanilid (DNC), od 193 do 257 dni. Počasna degradacija se pokaže tudi pri maduramicinu v peščeni glini (298 dni), nasprotno se pa najhitreje razgradi lasalocid (od 0,6 do 14,2 dni) (tab. 2). Raziskovalci so ugotovili, da je degradacija monenzina v tleh hitrejša ob večji prisotnosti organskih snovi in vode (YOSHIDA et al., 2010). Na degradacijo

monenzina, salinomicina in narazina vpliva tudi okolje in temperatura. V bolj kislem okolju in pri višji temperaturi je njihova degradacija hitrejša (BOHN et al., 2013).

Študije abiotske razgradnje lasalocida, monenzina, narazina in salinomicina so potrdile, da se samo lasalocid razgradi s fotolizo, medtem ko so monenzin, narazin in salinomicin odporni na neposredno fotolizo, saj svetlobo absorbirajo (BOHN et al., 2013). Fotoliza je bila potrjena tudi pri robenidinu (EFSA, 2011D), medtem ko je dekokvinat na svetlobo odporen (EFSA, 2003B). Iz rezultatov študij je razvidno, da bo robenidin v tleh prisoten v neionizirani obliki. DT_{50} v tleh je med 6 in 12 dnevi. V vodi je robenidin stabilen pri pH od 7 do 9, pri bolj kislih pogojih (pH 4) pa poteka degradacija (EFSA, 2011D).

HANSEN in sodelavci (2009) so izračunali, da PEC monenzina, salinomicina, narazina in lasalocida v tleh ne bi smele preseči koncentracij, ki bi lahko vplivale na neciljne organizme v tleh. Določene predvidene koncentracije monenzina in lasalocida v tleh so 0,65 mg/kg, salinomicina in narazina pa 0,364 mg/kg. Predvidene koncentracije monenzina v sedimentu so določili na 0,067 mg/kg, salinomicina 0,038 mg/kg, narazina 0,038 mg/kg in lasalocida 0,07 mg/kg. Po najslabšem možnem scenariju bi bile predvidene koncentracije monenzina 280 µg/l v podzemni in 28 µg/l v površinski vodi, salinomicina 157 µg/l v podzemni in 16 µg/l v površinski, narazina 157 µg/l in 16 µg/l ter lasalocida 50 µg/l in 5 µg/l (tab. 3).

V površinskih vodah na Danskem so koncentracije lasalocida, monenzina, salinomicina in narazina določali BAK in sodelavci (2013). Analize so pokazale, da so koncentracije pod mejo detekcije, kar pomeni

Tabela 3. Predvidene okoljske koncentracije kokcidiostatikov v tleh, podzemni vodi, površinski vodi in sedimentu (HANSEN et al., 2012).

Table 3. Predicted environmental concentrations of coccidiostats in soil, surface water, groundwater and sediment (HANSEN et al., 2012).

	PEC*			
	Tla (mg/kg)	Površinska voda (µg/l)	Podzemna voda (µg/l)	Sediment (mg/kg)
	Soil (mg/kg)	Surface water (µg/l)	Groundwater (µg/l)	Sediment (mg/kg)
Monenzin Monensin	0,65	28	280	0,067
Salinomicin Salinomycin	0,364	16	157	0,038
Narazin Narasin	0,364	16	157	0,038
Lasalocid Lasalocid	0,65	5	50	0,07

* PEC - predvidena okoljska koncentracija / predicted environmental concentrations

da so koncentracije kokcidiostatikov v vodi nizke. Iz rezultatov EFSA študij lahko razberemo, da so v površinskih vodah pričakovane nižje koncentracije spojin kot v podzemnih vodah, kar je lahko posledica fotodegradacije, termične razgradnje ter redoks pogojev v vodonosniku. Razmerje koncentracij je odvisno od vsakega posameznega kokcidiostatika in njegovih fizikalno-kemičnih lastnosti. Glede na podane predpostavke v podzemni vodi lahko pričakujemo najvišje koncentracije monenzina in salinomicina. Po razpoložljivih podatkih se v najmanjših koncentracijah predvidoma pojavljata dekokvinat in robenidin (tab. 1).

Problematika kokcidiostatikov in strupenost

Navzkrižna odpornost pri kokcidiostatikih se kaže v tem, da odpornost proti enemu kokcidiostatiku povzroči odpornost proti vsem drugim kokcidiostatikom iz iste skupine. Pri perutnini je možnosti za razvoj odpornosti proti kokcidiostatikom veliko, saj ti delujejo v poznem ciklu razvoja bolezni. Kokcidiostatiki prav tako ne »iztrebijo« bolezni do konca, kar še dodatno povečuje možnost odpornosti pri živali, ki je že »prebolela« bolezen (ABBAS et al., 2011).

Razvoj in stopnja rezistence je odvisna tudi od fizikalno-kemijskih lastnosti kokcidiostatika. Za nekatere je značilen počasen razvoj rezistence, medtem ko se na diklazuril rezistenca zelo hitro pojavi. Navzkrižna odpornost je značilna za ionoforne antibiotike (INTERNET 4). Visoko stopnjo navzkrižne odpornosti so raziskave potrdile med maduramicinom, monenzinom, salinomicinom, narazinom in lasalocidom. Za preprečitev navzkrižne odpornosti je zato dobro uporabljati tudi druga antikokcidiostatska sredstva, ki imajo različne mehanizme delovanja (ABBAS et al., 2011).

Raziskave o strupenosti in kopičenju kokcidiostatikov v organizmih so maloštevilne. Večina jih je narejenih za talne in vodne organizme. Za talne organizme je določena koncentracija monenzina, salinomicina, narazina in lasalocida, pri kateri umre 50 % organizmov (LC_{50} – median lethal concentration) med 1,3 mg/kg in 71,8 mg/kg, odvisno od vrste kokcidiostatika in vrste organizma (tab. 4). Za vodne organizme kot so alge, raki in ribe pa je LC_{50} med 1,14 mg/l – 2,5 mg/l. V splošnem so alge najbolj občutljive in raki najmanj (HANSEN et al., 2009). Koncentracija, pri kateri se pokaže učinek na 50 % organizmov (EC_{50} – median effect concentration), je nižja od LC_{50} (tab. 4). LC_{50} za vpliv monenzina na preživetje deževnikov so ŽIŽEK in sodelavci (2011) določili na 49,3 mg/kg prsti, kar je nekoliko manj, kot poročajo HANSEN in sodelavci (2009). EC_{50} za razmnoževanje deževnikov je bil 12,7 mg/kg prsti.

Porazdelitveni koeficient oktanol/voda (K_{ow}) je povezan z hidrofbnostjo in posredno z mobilnostjo spojin v vodnem okolju (tab. 2).

Če je log K_{ow} večji od 4, se spojina lahko kopiči v organizmu, če pa ima K_{ow} nižje vrednosti, je spojina mobilna v vodnem okolju (STUART et al., 2012). Glede na značilnosti log K_{ow} in razpolovnega časa posameznih kokcidiostatikov lahko sklepamo na njihovo kopičenje v telesu oz. bioakumulacijo posameznega kokcidiostatika. Potencialna bioakumulacija obstaja za dekokvinat, ki je zelo lipofilan (se topi v maščobi), diklazuril, maduramicin, monenzin, narazin in salinomicin. Lasalocid, robenidin in semduramicin pa imajo zelo nizko potencialno stopnjo bioakumulacije (log K_{ow} manjši od 3). Rezultati študij koncentracij kokcidiostatikov v surovi zelenjavi kažejo, da se del kokcidiostatika lahko prenese tudi v rastline in njihove plodove (EFSA, 2012).

Ocena potencialnega vnosa kokcidiostatikov v okolje - primer Dravskega polja

Za primer ocene potencialnega vnosa kokcidiostatikov v okolje smo izbrali prodni vodonosnik Dravskega polja, na katerem so izrazito kmetijska območja. Prepustnost vodonosnika se giblje med 10^{-2} in 10^{-4} m/s, v povprečju $4 \cdot 10^{-3}$ m/s. Temu primerna je hitrost toka, ki v poprečju znaša 6,2 m/dan (FEGUŠ, 2006). Na območju Dravskega polja je visoko razvita perutninska živilsko predelovalna industrija. Perutninski gnoj aplicirajo na kmetijskih površinah. Iz zbranih podatkov lokacij piščančjih farm in njihovih pripadajočih kmetijskih površin, števila glav piščancev in količin gnoja smo določili potencialen vnos kokcidiostatika monenzina na njivske površine. Monenzin smo izbrali kot enega izmed najbolj razširjenih kokcidiostatikov v Sloveniji, za katerega obstaja verjetnost, da se pojavi tudi v podzemni vodi.

Predvidene koncentracije monenzina iz piščančjega gnoja v okolju smo določili na podlagi podatkov števila piščancev na Dravskem polju in dostopnih podatkov površin GERK enot posameznega kmetijskega gospodarstva (grafična enota rabe kmetijskega gospodarstva v okviru posameznega kmetijskega gospodarstva – kmetije) (MKO, 2013). Podatki o številu piščancev na posameznem kmetijskem gospodarstvu se sistematično ne vodijo, zato je njihovo število zelo težko določiti. Za določitev števila smo si pomagali s podatki s spleta, kjer smo pridobili podatke za nekatere farme (MIN. ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO, 2011; MIN. ZA OBRAMBO, 2013). Ker podatki niso usklajeni na isto leto, smo predpostavili, da se število živali skozi leta ne spreminja.

Površina našega celotnega raziskovalnega območja na Dravskem polju meri 270,2 km² (sl. 1). Njivskih površin je 125,59 km² (46,48 % celotnega območja), od tega jih GERK enotam pripada 113,33 km² (41,95 % celotnega območja). V lasti izbranih kmetijskih gospodarstev oz. piščančjih

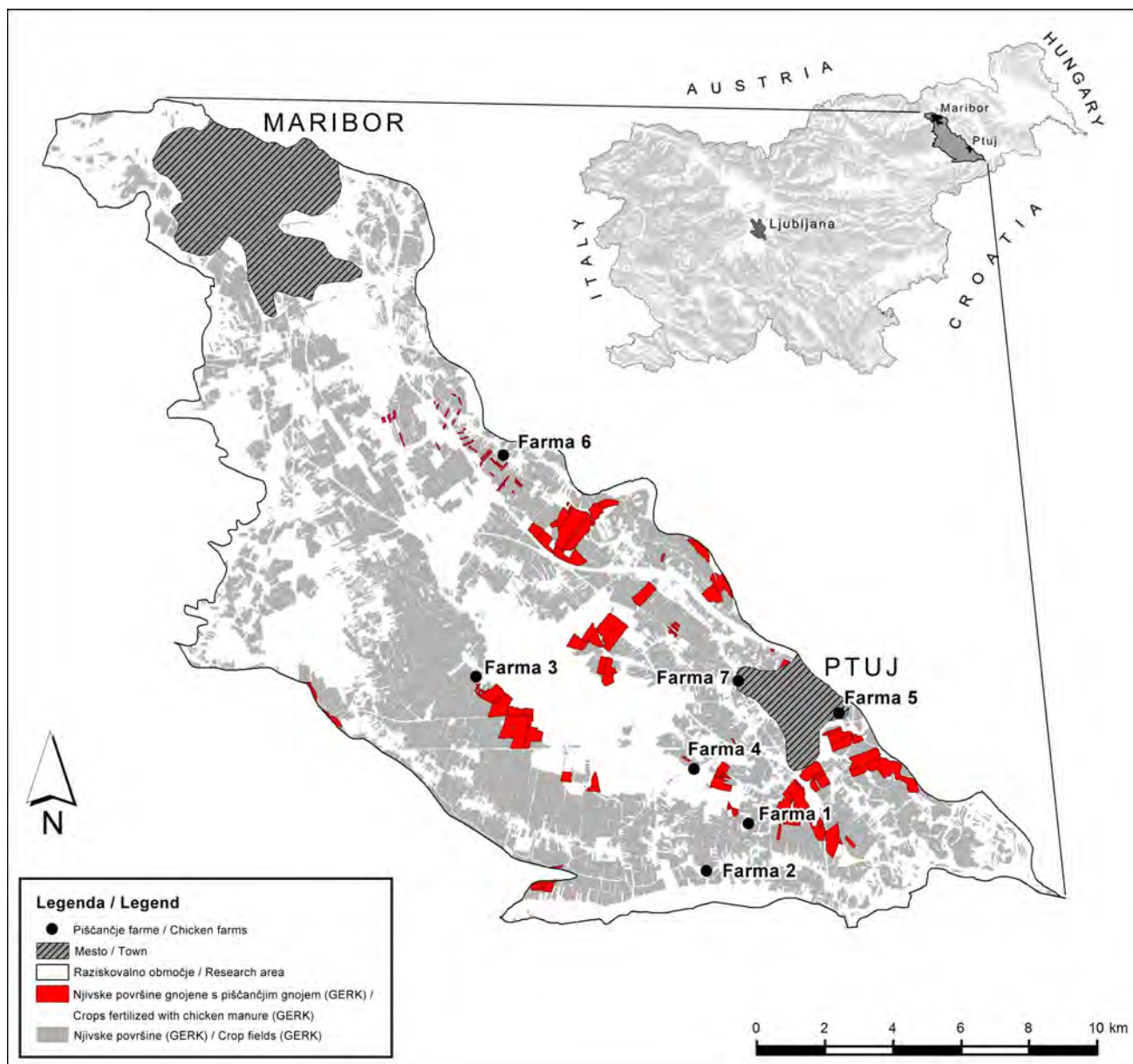
Tabela 4. Predvidene mejne koncentracije kokcidiostatikov za testne organizme v okolju (HANSEN et al., 2012; ŽIŽEK et al., 2011).
Table 4. Median lethal and effect concentrations of coccidiostats for test organisms in environment (HANSEN et al., 2012; ŽIŽEK et al., 2011).

	Testni organizmi v tleh Test organism in the soil	Koncentracija vpliva na organizme* (mg/kg) Effect concentration	Testni organizmi v vodi Test organism in the aquatic environment	Koncentracija vpliva na organizme* (mg/l) Effect concentration
Monenzin Monensin	<i>Folsomia fimetaria</i> (springtail)	EC ₅₀ 591 [254 - 927] (reprodukcija/reproduction)	<i>Lemna gibba</i> (makrofiti, plavajoči/macrophyte,	EC ₅₀ 0,998 [0,955 - 1,042] (rast/growth rate)
	<i>Enchytraeus crypticus</i> (črv/enchytraeid)	EC ₅₀ 356 [95 - 617] (reprodukcija/reproduction)	<i>Myriophyllum spicatum</i> (makrofiti, neplavajoči /	EC ₅₀ 0,197 [0,042 - 0,353] (rast/growth rate)
	<i>Eisenia foetida andrei</i> (deževnik/earthworm)	LC ₅₀ 49,3 - 56 (smrtnost/mortality)	<i>Daphnia magna</i> (raki/crustacean)	EC ₅₀ 7,29 (negibnost/immobility)
	<i>Raphanus sativus</i> (redkev/radish)	LC ₅₀ 9,8 (pojavljanje/emergence)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ribe/fish)	LC ₅₀ 1,88 (smrtnost/mortality)
	Talni mikroorganizmi / Soil micro-organisms	NOEC > 5 (dihanje, nitrifikacija/respiration, nitrification)	<i>Selenastrum subspicatus</i> (alge/algae)	EC ₅₀ 0,98 (rast/growth rate)- 4,3 (biomasa/biomass)
Salinomycin Salinomycin	<i>Raphanus sativus</i> (redkev/radish)	LC ₅₀ 1,3 (rast/growth rate)	<i>Pseudokirchnerella subcapitata</i> (alge/algae)	EC ₅₀ 3,41 (rast/growth rate) - 1,73 (biomasa/biomass)
	<i>Eisenia foetida andrei</i> (deževnik/earthworm)	LC ₅₀ 71 (smrtnost/mortality)	<i>Selenastrum subspicatus</i> (alge/algae)	EC ₅₀ 3,01 (rast/growth rate)- 2,09 (biomasa/biomass)
	Talni mikroorganizmi / Soil micro-organisms	NOEC > 2,3 (dihanje, nitrifikacija/respiration, nitrification)	<i>Daphnia magna</i> (raki/crustacean)	EC ₅₀ 13,3 (negibnost/immobility)
Narazin Narasin	<i>Raphanus sativus</i> (redkev/radish)	LC ₅₀ 5,07 (pojavljanje/emergence)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ribe/fish)	LC ₅₀ 1,14 (smrtnost/mortality)
	<i>Eisenia foetida andrei</i> (deževnik/earthworm)	LC ₅₀ 46,4 (smrtnost/mortality)	<i>Selenastrum subspicatus</i> (alge/algae)	EC ₅₀ 2,91 (rast/growth rate)- 0,77 (biomasa/biomass)
	Talni mikroorganizmi / Soil micro-organisms	NOEC > 17,4 (dihanje, nitrifikacija/respiration, nitrification)	<i>Daphnia magna</i> (raki/crustacean)	EC ₅₀ 20,6 (negibnost/immobility)
Lasalocid Lasalocid	<i>Lolium perenne</i> (trava/perennial ryegrass)	EC ₅₀ 87,8 (pojavljanje/emergence)	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ribe/fish)	LC ₅₀ 2,23 (smrtnost/mortality)
	<i>Eisenia foetida andrei</i> (deževnik/earthworm)	LC ₅₀ 71,8 (smrtnost/mortality)	<i>Selenastrum subspicatus</i> (alge/algae)	EC ₅₀ 3,1 (rast/growth rate)- 2,0 (biomasa/biomass)
	Talni mikroorganizmi / Soil micro-organisms	NOEC > 5 (dihanje, nitrifikacija/respiration, nitrification)	<i>Daphnia magna</i> (raki/crustacean)	EC ₅₀ 5,4 (negibnost/immobility)

* EC₅₀ - koncentracija, ki ima učinek na 50% organizmov / the concentration which has an effect on 50% of the organisms

LC₅₀ - koncentracija, pri kateri umre 50% organizmov / the concentration at which 50% of the organisms dies

NOEC - koncentracija brez opaznega učinka na organizme / no observed effect concentrations



Sl. 1. Raziskovalno območje; GIS analiza rabe prostora in uporabe piščančjega gnoja ter lokacije piščančjih farm.

Fig. 1. Research area; GIS analysis of land use and use of chicken manure, and chicken farm locations.

farm je 8,88 km² njivskih površin, kar je 3,3 % celotnega območja.

Podatke o GERK enotah na našem območju smo pridobili na Ministrstvu za kmetijstvo in okolje, Službi za register kmetijskih gospodarstev. Za tista gospodarstva, ki imajo vsaj eno GERK enoto na našem območju, smo pridobili KMG MID številko (identifikacijska številka kmetijskega gospodarstva), vse njihove pripadajoče G MID številke (v primeru, ko je gospodarstev (lokacij) ene kmetije več, imajo drugo in naslednja gospodarstva različne G MID št.) in vse GERK enote, ki pripadajo kmetijskemu gospodarstvu, tudi če ne ležijo na našem območju. Z oceno obremenitve teh površin smo izračunali predvideno okoljsko koncentracijo monenzina glede na količino porabljene krme na kmetiji in površine, ki jim pripadajo (sl. 1). Pri oceni nismo upoštevali razdalje od kmetije do obdelovalnih površin, ampak je monenzin porazdeljen na

vse GERK enote enako, ne glede na oddaljenost od kmetije. Za izračun ocene koncentracij smo izbrali tudi območja, ki so izven našega območja, kar skupaj nanese 28,11 km².

Za oceno najvišjih predvidenih okoljskih koncentracij monenzina na Dravskem polju smo kot najslabši scenarij upoštevali, da so vsi piščanci na Dravskem polju pitovni piščanci, ki dosežejo starost 45 dni in da tekom svojega življenja dobijo krmo s koncentracijo monenzina 125 mg v kg krme. Glede na pravilnik piščanci dobivajo v krmi monenzin do 1 dneva pred zakolom (MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO IN PROSTOR, 2012). Pri naših izračunih smo predpostavili, da se vnos kokcidostatikov ne spreminja in da vseh 45 dni h krmi dodajajo monenzin.

Na območju Dravskega polja, v sedmih večjih farmah (sl. 1), je skupaj 815.336 piščancev (MIN.

ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO, 2011; MIN. ZA OBRAMBO, 2013), ki so po predpostavki rejeni v petih serijah, kar pomeni 163067,2 piščancev v eni seriji. Po podatkih Univerze Ohio en piščanec pridela od 136,01 do 158,75 g gnoja na dan (NABER & BERMUDEZ, 1990), kar je odvisno od pasme piščanca in njegove starosti. V povprečju pa na dan zaužije od 117,934 g do 136,07 g krme (NABER & BERMUDEZ, 1990). Skupaj tako ena serija brojlerjev v svojem življenju porabi povprečno 931,9 ton krme, v kateri je 116,5 kg monenzina (en piščanec v svojem življenju povprečno zaužije 714,4 mg monenzina) in izloči 110,66 kg monenzina, če predpostavimo, da se izloči 95 % zaužitega monenzina (EFSA, 2005).

Ob predpostavki, da se ves pridelan gnoj s farm na območju Dravskega polja aplicira na njihove GERK enote dobimo povprečno koncentracijo monenzina v tleh po enačbi:

$$C = m/V = m_{\text{mon}}/m_{\text{soil}} \quad (1)$$

$$V = A \cdot \text{DEPTH}_{\text{field}} \quad (2)$$

$$m_{\text{soil}} = V \cdot \text{RHO}_{\text{soil}} \quad (3)$$

kjer je m_{mon} masa izločenega monenzina v gnoju (553,34 kg); m_{soil} predstavlja maso tal; V je volumen prsti na katero se aplicira gnoj; A predstavlja površino 28,11 km²; $\text{DEPTH}_{\text{field}}$ je standardna globina mešanja prsti in gnoja (0,2 m); RHO_{soil} je specifična gostota tal oz. prsti, ki je značilna za območje Dravskega polja (1500 kg/m³ – poljska tla) (URBANC et al., 2013; OGOREVC, 2008).

Glede na razpoložljive podatke smo upoštevali tudi različne dobe staranja gnoja. V primeru, da se piščančji gnoj ne skladišči in se takoj aplicira, je bil upoštevan izločen monenzin brez degradacije – Scenarij 1. V primeru 3 mesečnega staranja pa smo upoštevali 50 % degradacijo monenzina (ŽIŽEK et al., 2011) – Scenarij 2. Pri izračunu obeh scenarijev smo predpostavili, da se celotna enoletna količina gnoja aplicira na njivske površine enkrat in ne večkrat letno, kot je navada.

Izračunana povprečna koncentracija monenzina v tleh Dravskega polja znaša 0,53 mg/kg – Scenarij 1. V primeru, da upoštevamo 50 % degradacijo monenzina pa 0,27 mg/kg – Scenarij 2.

V zgornjem izračunu smo predvideli, da lahko kmetje ves pridobljeni gnoj iz piščančjih farm porabijo na svojih površinah. Vendar pa je količina uporabljenega gnoja zakonodajno omejena glede na vnos dušika v tla. Upoštevati moramo namreč Evropsko nitratno direktivo (91/676/EEC), ki za ranljiva območja (zaradi varstva voda pred onesnaževanjem z nitrati iz kmetijskih virov je celotno območje Republike Slovenije opredeljeno kot ranljivo območje) omejuje letni vnos dušika iz živinskih gnojil na največ 170 kg N/ha kmetijskih zemljišč v uporabi na ravni kmetijskega gospodarstva. Celotna masa dušika, ki ga v piščančjih farmah na Dravskem polju pridobijo v enem letu, znaša 824 t (svež piščančji gnoj v povprečju vsebuje 18,8 g/kg dušika), kar je preračunano na površino obdelovalnih zemljišč letno 293 kg N/ha. Mejna vrednosti dušika v tleh je na ta način presežena, zato moramo pri našem izračunu predvidenih okoljskih koncentracij monenzina v tleh upoštevati tudi določila nitratne direktive. PEC monenzina v tleh smo tako izračunali po formuli (EFSA, 2005):

$$\text{PEC}_{\text{soil}} = (\text{PEC}_{\text{manure}} \cdot Q) / (\text{RHO}_{\text{soil}} \cdot \text{CONV}_{\text{area field}} \cdot \text{DEPTH}_{\text{field}}) \quad (4)$$

kjer je PEC_{soil} predvidena koncentracija monenzina v tleh (mg/kg); $\text{PEC}_{\text{manure}}$ je koncentracija monenzina, izražena glede na vsebnost dušika v gnoju (mg/kg); Q je mejna vrednost dušika (170 kg/ha na leto); RHO_{soil} je specifična gostota tal oz. prsti, ki je značilna za območje Dravskega polja (1500 kg/m³ – obdelana peščena ilovica in peski); $\text{CONV}_{\text{area field}}$ predstavlja pretvorbeni faktor (10000 m²/ha); $\text{DEPTH}_{\text{field}}$ je standardna globina mešanja prsti in gnoja (0,2 m).

Z uporabo piščančjega gnoja brez predhodnega staranja gnoja in z upoštevanjem najvišjih koncentracij monenzina v gnoju (101,7 mg/kg), povprečne koncentracije dušika v svežem gnoju (18,8 g/kg) (ŽIŽEK et al., 2011) in mejne vrednosti

Tabela 5. Primerjava predvidenih okoljskih koncentracij monenzina v tleh in podzemni vodi.

Table 5. A comparison of predicted environmental concentrations of monensin in soil and groundwater.

	DRAVSKO POLJE		HANSEN ET AL. (2009)	EFSA (2004A)
	(Izračun po enačbi 1 / Calculated by equation 1)	(Izračun po enačbi 4 / Calculated by equation 4)		
PEC _{soil} * (monenzin/monensin)	0,53 mg/kg	0,30 mg/kg	0,65 mg/kg	0,59 mg/kg
PEC _{groundwater} ** (monenzin/monensin)	/	80,4 µg/l	280 µg/l	112 µg/l

* PEC_{soil} - predvidena okoljska koncentracija v tleh/ predicted environmental concentration in soil

** PEC_{groundwater} - predvidena okoljska koncentracija v podzemni vodi/ predicted environmental concentration in groundwater

dušika (170 kg/ha na leto) lahko pričakujemo, da na območju Dravskega polja koncentracije monenzina v tleh dosežejo do 0,30 mg/kg (PEC_{soil}). V primeru 3 mesečnega staranja gnoja, kjer smo upoštevali 50 % degradacijo monenzina (ŽIŽEK et al., 2011) – Scenarij 2, so najvišje izračunane koncentracije monenzina v gnoju 50,9 mg/kg. Glede na manjši PEC_{manure} je v tem primeru PEC_{soil} za monenzin v tleh 0,15 mg/kg.

Če izračunane predvidene okoljske koncentracije primerjamo z drugimi raziskavami (tab. 5), vidimo, da je PEC_{soil} v najslabšem primeru in ob upoštevanju določil Nitratne direktive na območju Dravskega polja za polovico manjši kot so poročali drugi raziskovalci (EFSA, 2004a; HANSEN et al., 2009). Brez upoštevanja Nitratne direktive so vrednosti primerljive s tistimi, ki jih navajajo drugi avtorji.

Za določitev potencialnih okoljskih koncentracij monenzina v podzemni vodi moramo upoštevati gostoto prsti, delež zraka, delcev in vode v prsti, delež organske snovi, temperaturo ter parni tlak in molsko maso snovi in njeno topnost v vodi. Za določitev potencialnih okoljskih koncentracij monenzina v podzemni smo upoštevali parametre po formuli (EFSA, 2005):

$$PEC_{groundwater} = (PEC_{soil} \cdot RHO_{soil}) / (K_{soil-water} \cdot 1000) \quad (5)$$

$$K_{soil-water} = F_{air-soil} \cdot K_{air-water} + F_{water-soil} + F_{solid-soil} \cdot RHO_{solid} \cdot (Kp_{soil}) / (1000) \quad (6)$$

$$Kp_{soil} = Foc_{soil} \cdot Koc \quad (7)$$

$$K_{air-water} = (VP \cdot MOLW) / (SOL \cdot R \cdot TEMP) \quad (8)$$

Pri izračunu smo upoštevali tipične vrednosti parametrov za karakterizacijo okolja (EFSA, 2005). $F_{air-soil}$ (0,2 m³/m³) predstavlja frakcijo zraka v tleh, $F_{water-soil}$ (0,2 m³/m³) frakcijo vode v tleh in $F_{solid-soil}$ (0,6 m³/m³) predstavlja frakcijo trdnih delcev v tleh, Foc_{soil} (0,02 kg/kg) frakcijo organskega ogljika v tleh, Koc za monenzin je 180; RHO_{solid} predstavlja gostoto trdnih delcev v tleh (2500 kg/m³). Parametri so povzeti po poročilu EFSA in predstavljajo splošen vzorec tal (EFSA, 2005). $K_{air-water}$ je koeficient porazdelitve zraka in vode v tleh in Kp_{soil} je koeficient porazdelitve trdnih snovi in vode v tleh. Kp_{soil} je produkt med masnim deležem organskega ogljika v tleh in Koc monenzina (tab. 2). $K_{air-water}$ je določen glede na parametre: VP parni tlak ($4,27 \cdot 10^{-18}$ mPa) (INTERNET 5); MOLW predstavlja molsko maso (693,8 g/mol) (EFSA, 2005); SOL je parameter za topnost v vodi (8,78 mg/l) (EFSA, 2005); R predstavlja plinsko konstanto (8,314 Pa m³/mol K); TEMP je temperatura (285 K) (EFSA, 2005). Glede na podatke smo določili potencialne okoljske koncentracije v podzemni vodi ($PEC_{groundwater}$), ki lahko dosežejo do 80,4 µg/l. V primeru, da upoštevamo 50 % degradacijo monenzina, so potencialne okoljske koncentracije v podzemni vodi do 40,2 µg/l. Če primerjamo dobljene rezultate z rezultati drugih študij,

so naše predvidene koncentracije tako kot v tleh tudi v podzemni vodi primerljive z drugimi raziskavami (tab. 5). Za pojavljanje kokcidiostatikov v podzemni vodi so pomembni tudi razpolovni časi posameznega kokcidiostatika, vpliv fotolize, degradacija v tleh in podzemni vodi, in njihove kemijske lastnosti. Za natančno določitev koncentracij monenzina v podzemnih vodah so zato potrebne nadaljnje raziskave in meritve.

Zaključki

Trenutno je uporaba kokcidiostatikov za nadzor kokcidioze pri reji piščancev nujno potrebna. Njihova uporaba prispeva k zaščiti zdravstvenega varstva in dobrega počutja živali. V primeru neuporabe kokcidiostatikov bi bila reja zelo gospodarsko prizadeta, potrošnikom pa bi lahko bil celo onemogočen dostop do perutninskega mesa, proizvedenega v skladu z varnostnimi standardi.

Prisotnost in koncentracije kokcidiostatikov v okolju so še velika neznanka. Z analizo uporabe kokcidiostatikov od krme pa do gnojenja na kmetijskih površinah smo poskušali oceniti količine vnosa kokcidiostatika monenzina v kmetijstvu in s tem možnost pojavljanja v okolju. Monenzin je eden najbolj razširjenih kokcidiostatikov, katerega prisotnost lahko pričakujemo tudi v podzemni vodi. Za območje Dravskega polja smo ocenili potencialne okoljske koncentracije monenzina v tleh na podlagi podatkov prisotnih piščančjih farm in pripadajočih njivskih površin. Zaključimo lahko, da je potencialna okoljska koncentracija na območju 3,3 % Dravskega polja v najslabšem primeru do 0,30 mg/kg prsti. Če upoštevamo 50 % degradacije pri staranem gnoju pa je PEC_{soil} do 0,15 mg/kg.

V Sloveniji raziskave onesnaženosti podzemne vode s kokcidiostatiki še niso bile opravljene. Razvoj analiznih metod, s katerimi bo mogoče določati kokcidiostatike v podzemnih vodah v zelo nizkih koncentracijah, bo omogočil ugotavljanje njihove prisotnosti, razgradnje in transportnih poti.

Zahvala

Raziskava je bila narejena v okviru podiplomskega študija in raziskovalnega usposabljanja mladih raziskovalcev po pogodbi št. 630-12/2012 ter raziskovalnega programa Podzemne vode in geokemija (P1-0020), ki ju financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

Literatura in viri

ABBAS, R.Z., IQBAL, Z., BLAKE, D., KHAN, M.N. & SALEEMI, M.K. 2011: Anticoccidial drug resistance in flow coccidia: the state of play revisited. *Worlds Poultry Science Journal*, 67: 337-3500, doi: 10.1017/S004393391100033x

- BAK, S.A., HANSEN, M., KROGH, K.A., BRANDT, A., HALLING-SØRENSEN, B. & BJØRKLUND, E. 2013: Development and validation of an SPE methodology combined with LC-MS/MS for the determination of four ionophores in aqueous environmental matrices. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93/14, doi:10.1080/03067319.2013.763250.
- BARTELT-HUNT, S., SNOW, D. D., DAMON-POWELL, T. & MIESBACH, D. 2011: Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *Journal of Contaminant Hydrology*, 123/3: 94–103, doi:10.1016/j.jconhyd.2010.12.010.
- BEDRNIK, P. 2004: Control of Poultry Coccidiosis in the 21st Century. *Praxis veterinaria*, 52: 49–54.
- BOHN, P., BAK, S.A., BJØRKLUND, E., KROGH, K.A. & HANSEN, M. 2013: Abiotic degradation of antibiotic ionophores. *Environmental Pollution* 182: 177–183, doi:10.1016/j.envpol.2013.06.040.
- BOXALL, A. B., FOGG, L. A., KAY, P., BLACKWEL, P. A., PEMBERTON, E. J. & CROXFORD, A. 2003: Prioritisation of veterinary medicines in the UK environment. *Toxicol. Lett.*, 142: 207–218, doi:10.1016/S0378-4274(03)00067-5.
- BROEKAERT, N., DAESELEIRE, E., DELEZIE, E., VANDECASTEELE, B., DE BEER, T. & VAN POUCKE, C. 2012: Can the use of coccidiostats in poultry breeding lead to residues in vegetables?: an experimental study. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 60: 12411–12418, doi:10.1021/jf304149d
- SVET EVROPSKIH SKUPNOSTI 1991: Direktiva sveta z dne 12.12.1991 o varstvu voda pred onesnaženjem z nitrati iz kmetijskih virov (91/676/EGS). UL L 375, 31.12.1991, 68–77.
- DORNE, J. L. C. M., FERNÁNDEZ-CRUZ M. L. & BERTELSEN, U. 2011: Risk assessment of coccidiostats during feed cross-contamination: Animal and human health aspects, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 270/3: 196–208, doi:10.1016/j.taap.2010.12.014.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2003A: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a Request from the Commission on the re-evaluation of coccidiostat Stenorol in accordance with article 9G. *The EFSA Journal*, 8: 1–45.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2003B: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the coccidiostat DECCOX in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. *The EFSA Journal*, 17: 1–40.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2004A: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the request of the Commission on the reevaluation of coccidiostat Elancoban in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. *The EFSA Journal*, 42: 1–61.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2004B: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the re-evaluation of efficacy and safety of the coccidiostat Monteban® G100 in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. *The EFSA Journal*, 90: 1–44.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2004C: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the Commission on the re-evaluation of coccidiostat Avatec in accordance with article 9G of Council Directive 70/524/EEC. *The EFSA Journal*, 53: 1–44.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2005: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on a request from the European Commission on the evaluation of the coccidiostat COXIDIN® (Monensin Sodium). *The EFSA Journal*, 283: 1–53.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2006: Opinion of the Scientific Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed on the safety and efficacy of the coccidiostat Elancoban® (monensin sodium) as a feed additive for calves for rearing and cattle for fattening in accordance with Regulation (EC) No 1831/2003. *The EFSA Journal*, 387: 1–33.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2007A: Safety of Kokcisan 120G as a feed additive for chickens for fattening 1 Updated Scientific Opinion of the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. *The EFSA Journal*, 547: 1–10.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2007B: Cross-contamination of non-target feeding-stuffs by lasalocid authorised for use as a feed additive 1 Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N° EFSA-Q-2005-220B). *The EFSA Journal*, 553: 1–46.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2008A: Cross-contamination of non-target feeding-stuffs by salinomycin authorised for use as a feed additive, Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain Question N° EFSA-Q-2005-220C. *The EFSA Journal*, 591: 1–38.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2008B: Cross-contamination of non-target feeding-stuffs by maduramicin authorised for use as a feed additive, Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain Question N° EFSA-Q-2005-220F. *The EFSA Journal*, 594: 1–30.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2008C: Cross-contamination of non-target feeding-stuffs by semduramicin authorised for use as a feed additive, Scientific opinion of the Panel

- on Contaminants in the Food Chain Question N° EFSA-Q-2005-220E. The EFSA Journal, 593: 1–27.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2010A: Scientific Opinion on the modification of authorisation of the feed additive Monteban® G100 (narasin) for chickens for fattening. The EFSA Journal, 9/3: 1549–1559.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2010B: Scientific Opinion on safety and efficacy of Cycostat® 66G (robenidine hydrochloride) for rabbits for breeding and fattening. The EFSA Journal, 9/3: 2102–2134.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2010C: Scientific Opinion on the safety and efficacy of Avatec® 150G (lasalocid A sodium) for turkeys, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). The EFSA Journal, 8/4: 1575–1600.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2011A: Scientific Opinion on the safety and efficacy of Maxibar® G160 (narasin and nicarbazin) for chickens for fattening. The EFSA Journal, 8/4: 1574–1619.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2011B: Scientific Opinion on the safety and efficacy of Coxidin® (monensin sodium) as a feed additive for chickens reared for laying, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). The EFSA Journal, 9/12: 2442–2457.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2011C: Scientific Opinion on safety and efficacy of Cygro® 10G (maduramicin ammonium) for chickens for fattening, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). The EFSA Journal, 9/1: 1952–1997.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2011D: Scientific Opinion on safety and efficacy of Cycostat® 66G (robenidine hydrochloride) for rabbits for breeding and fattening, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). The EFSA Journal, 9/3: 2102–2134.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2012: Experimental study: uptake of coccidiostats in vegetables. Supporting Publications:93 p.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA) 2013: Scientific Opinion on the safety and efficacy of diclazuril (Clinacox® 0.5 %) as feed additive for chickens reared for laying, EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). The EFSA Journal, 11/3: 3106–3121.
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA) 2004: Lasalocid sodium: Summary report - Committee for Veterinary Medicinal Products. Internet: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014596.pdf
- EVROPSKA KOMISIJA 2005: Uredba komisije (ES) 378/2005 z dne 4. Marca 2005 o podrobnih pravilih za izvajanje Uredbe Evropskega parlamenta in Sveta (ES) št. 1831/2003 o dolžnostih in nalogah referenčnega laboratorija Skupnosti, ki zadevajo vloge za izdajo dovoljenj za krmne dodatke. Uradni list Evropske unije L 59/8, 5.3.2005.
- EVROPSKI PARLAMENT IN SVET 2000: Direktiva Evropskega parlamenta in Sveta 2000/60/ES z dne 23. oktobra 2000 o določitvi okvira za ukrepe Skupnosti na področju vodne politike. UL L 327, 22.12.2000, 1–73.
- EVROPSKI PARLAMENT IN SVET 2003: Uredba Evropskega parlamenta in Sveta 1831/2003 z dne 22. septembra 2003 o dodatkih za uporabo v prehrani živali. Uradni list Evropske unije L 268/29, 18.10.2003, 238–252.
- EVROPSKI PARLAMENT IN SVET. 2004: Uredba (ES) št. 882/2004 Evropskega parlamenta in sveta z dne 29. aprila 2004 o izvajanju uradnega nadzora, da se zagotovi preverjanje skladnosti z zakonodajo o krmi in živilih ter s pravili o zdravstvenem varstvu živali in zaščito živali. Uradni list Evropske unije L 191/1, 30.4.2004, 200–251.
- EVROPSKI PARLAMENT IN SVET 2006: Direktiva 2006/118/ES Evropskega parlamenta in Sveta z dne 12. decembra 2006 o varstvu podzemne vode pred onesnaževanjem in poslabšanjem. UL L 372, 27.12.2006, 19–31.
- FEGUŠ, B. 2006: Vpliv točkovnih virov onesnaženja na podzemno vodo s primerom na Dravskem polju. Diplomsko delo, Naravoslovnotehniška fakulteta. Ljubljana:184 p.
- HANSEN, M., KROGH, K.A., BJORKLUND, E., BRANDT, A., HALLING-SØRENSEN, B. 2009: Environmental risk assessment of ionophores. Trends in Analytical Chemistry, 28/5: 534–542, doi:10.1016/j.trac.2009.02.015.
- KOMISIJA EVROPSKI SKUPNOSTI 2008: Poročilo komisije svetu in evropskemu parlamentu o uporabi kokcidiostatikov in sredstev proti histomonijazi kot krmnih dodatkov. Internet:<http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/docs/Report-Coccs-233-2008-SL.pdf>.
- KOOLS, S. A., BOXALL, A.B., MOLTSMANN, J. F., BRYNING, G., KOSCHORRECK, J. & KNACKER, T. 2008: A ranking of European veterinary medicines based on environmental risks. Integr. Environ. Assess. Manage., 4/4: 399–408, doi:10.1897/IEAM_2008-002.1.
- MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO, GOZDARSTVO IN PREHRANO 2011: Register obratov rej kokoši nesnic. 2011. Internet: http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/registri/seznami/REG-nesnice-2011_12_32.pdf
- MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO IN OKOLJE (MKO) 2013: Grafični podatki raba tal za celo Slovenijo. Internet: <http://rkg.gov.si/GERK/>.
- MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO IN PROSTOR 2012: Seznam I, Kokcidiostatiki in druge zdravilne snovi. Internet: http://www.mko.gov.si/fileadmin/mko.gov.si/pageuploads/podrocja/Varna_in_kakovostna_hrana_in_krma/SEZNAM_I_in_II_11102012.pdf
- MINISTRSTVO ZA OBRAMBO, UPRAVA RS ZA ZAŠČITO IN REŠEVANJE, IZPOSTAVA PTUJ 2013: Ocena ogroženosti ob pojavu posebno nevarnih

- bolezni živali za regijo Podravje. Internet: <http://www.sos112.si/db/priloga/izpostava/p16712.pdf>
- NABER, E. C. & BERMUDEZ, A. J. 1990. Poultry Manure Management and utilization problems and opportunities. Bulletin 804, Department of Animal Sciences, The Ohio State University. Internet: <http://ohioline.osu.edu/b804/index.html>.
- OGOREVC, B. 2008: Vpliv vode v tleh na tok geogenega CO₂ iz tal v atmosfero. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo, Ljubljana: 5 p.
- OPPEL, J., BROLL, G., LÖFFLER, D., MELLER, M., RÖMBKE, J. & TERNES, T. 2004: Leaching behaviour of pharmaceuticals in soil-testing-systems: a part of an environmental risk assessment for groundwater protection. *Science of the Total Environment*, 328/1–3: 265–273, doi:10.1016/j.scitotenv.2004.02.004.
- SARMAH, A. K., MEYER, M. T. & BOXALL, A. B. A. 2006: A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65/5: 725–759, doi:10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
- SASSMAN, S. A. & LEE, L. S. 2007: Sorption and degradation in soils of veterinary ionophore antibiotics: monensin and lasalocid. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26/8: 1614–1621, doi:10.1897/07-073R.1.
- SCHEYTT, T., MERSMANN, P., LEIDIG, M., PEKDEGER, A. & HEBERER, T. 2004: Transport of Pharmaceutically Active Compounds in Saturated Laboratory Columns. *Ground Water*, 42/5: 767–773, doi:10.1111/j.1745-6584.2004.tb02730.x.
- SNYDER, S. A. 2004: Biological and physical attenuation of endocrine disruptors and pharmaceuticals: implications for water reuse. *Ground Water Monitoring & Remediation*, 24/2: 108–118, doi:10.1111/j.1745-6592.2004.tb00719.x.
- STUART, M., LAPWORTH, D., CRANE, E. & HART, A. 2012: Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416: 1–21, doi:10.1016/j.scitotenv.2011.11.072.
- TAVČAR-KALCHER, G. & VENGUŠT, A. 2006: Kokcidiostatiki v perutninarski proizvodnji = Coccidiostats in poultry production. V: KAPUN, S., ČEH, T. & AMBROŽIČ, I. (ur.): Zbornik predavanj 15. posvetovanja o prehrani domačih živali: ŠtudiČ Zadravčevi-Erjavčevi dnevi = Zadravec-Erjavec Days, Radenci, 09. in 10. november 2006. Murska Sobota: Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije, Kmetijsko gozdarski zavod, 245–251.
- URBANC, J., KRIVIC, J., MALI, N., FERJAN STANIČ, T., KOROŠA, A., ŠRAM, D., MEZGA, K., BIZJAK, M., BOLE, Z., PINTAR, M., UDOVČ, A., GLAVAN, M., KACJAN-MARŠIČ, N., LOJEN, S., JAMŠEK, A., VALENTAR, V., ZADRAVEC, D., PUŠENJAK, M. & KLEMENČIČ-KOSI, S. 2013: Možnosti kmetovanja na vodovarstvenih območjih, Geološki zavod Slovenije, Ljubljana: 28–32.
- VENGUŠT, A. 2008: Problematika izločanja kokcidiostatikov v okolje in možnosti navzkrižne kontaminacije v verigi priprave krmnih mešanic – kratko poročilo. Internet: <http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:doc-IFW8LF20/>
- YOSHIDA, N., CASTRO, M. J. L. & FERNANDEZ CIRELLI, A. 2010: Degradation of monensin on soils: influence of organic matter and water content. *Chemistry and Ecology* 26/1: 27–33, doi:10.1080/02757540903468086.
- ZIDAR, P. & ŽIŽEK, S. 2012: The impact of coccidiostats monensin and lasalocid on Cd and Pb uptake in the isopod *Porcellio scaber*. *Applied Soil Ecology*, 55: 36–43, doi:10.1016/j.apsoil.2012.01.003.
- ZUEHLKE, S., DUENNBIE, U., HEBERER, T. & FRITZ, B. 2004: Analysis of Endocrine Disrupting Steroids: Investigation of Their Release into the Environment and Their Behavior During Bank Filtration. *Ground Water Monitoring & Remediation*, 24/2: 78–85, doi:10.1111/j.1745-6592.2004.tb00715.x.
- ŽIŽEK, S., HRZENJAK, R., TAVČAR KALCHER, G., ŠRIMPF, K., ŠEMROV, N. & ZIDAR, P. 2011: Does monensin in chicken manure from poultry farms pose a threat to soil invertebrates? *Chemosphere*, 83/4: 517–523, doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.058.
- Internetni viri (dostopni 4. 7. 2013):
 Internet 1: <http://www.tiba.si/clanki/Gnojevga-v-kmetijstvu.html>
 Internet 2: http://www.uni-lj.si/files/ULJ/userfiles/ulj/studij_na_univerzi/podiplomski_studij/varstvo_okolja/primoz_Zidar_predlogteme.pdf
 Internet 3: <https://fortress.wa.gov/ecy/clarc/FocusSheets/Physical&ChemicalParameters.htm>
 Internet 4: http://www.google.si/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCoQFjAA&url=http%3A%2F%2Ffk.uni-mb.si%2Ffkweb-datoteke%2FMikrobiologija%2Fantibiotiki.doc&ei=7irVUav9FMjLtQag-4CgDA&usg=AFQjCNFiV3T59sPKyyWa6Pjdr-N2byBaVQ&sig2=1xeQeYQrNI_Jjf7ZeGPU5w&bvm=bv.48705608,d.Yms
 Internet 5: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/1914.htm>

