

Potencijal mikroorganizama i enzima u uklanjanju pendimetalina iz voda

Golub, Valentino

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:431330>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valentino Golub

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valentino Golub

POTENCIJAL MIKROORGANIZAMA I ENZIMA U UKLANJANJU PENDIMETALINA
IZ VODA

ZAVRŠNI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
doc. dr. sc. Martina Sudar
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2020.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Zvezdani Fındrik Blažević na uloženom trudu, korisnim savjetima i uputama pri pisanju ovog završnog rada.

Hvala na potpori mojoj obitelji i prijateljima, bez njihove podrške, moj život i školovanje bi bilo znatno kompliciranije.

Sažetak

U radu su opisane metode razgradnje pendimetalina u okolišu. Najvažniji način razgradnje pendimetalina u okolišu je mikrobiološka razgradnja. Opisane su razgradnje pendimetalina s bakterijama: *Bacillus subtilis* Y3, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus lehensis* XJU i *Bacillus circulans*. *Bacillus subtilis* Y3 sadrži enzim pendimetalin nitroreduktazu. Pendimetalin nitroreduktaza je enzim koji sudjeluje u nitroredukciji pendimetalina, uz pomoć elektron donora NAD(P)H. Produkt nitroredukcije pendimetalina je 6-aminopendimetalin. *Bacillus circulans* sadrži pendimetalin nitroreduktazu i pendimetalin-N-dealkilazu. Djelovanjem pendimetalin-N-dealkilaze na pendimetalin, dolazi do N-dealkilacije, te nastaju 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin i pentan.

Ključne riječi: pendimetalin, pesticid, bakterija, enzim

Abstract

This work describes methods for the degradation of pendimethalin in the environment. The most important way of degrading pendimethalin in the environment is microbiological degradation. Degradations of pendimethalin by bacteria: *Bacillus subtilis* Y3, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus lehensis* XJU and *Bacillus circulans* have been described. *Bacillus subtilis* Y3 contains the enzyme pendimethalin nitroreductase. Pendimethalin nitroreductase is an enzyme that participates in the nitroreduction of pendimethalin, with the help of electron donor NAD(P)H. The nitroreduction product of pendimethalin is 6-aminopendimethalin. *Bacillus circulans* contains pendimethalin nitroreductase and pendimethalin-N-dealkylase. By the action of pendimethalin-N-dealkylase on pendimethalin, it occurs N-dealkylation, and 3,4-dimethyl-2,6-dinitroaniline and pentane are formed.

Keywords: pendimethalin, pesticide, bacterium, enzyme

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Biokataliza i enzimi	2
3. Herbicidi	9
3.1. Klodinafop propargil	9
3.2. 2,4-diklorfenoksiacetilna kiselina.....	12
3.3. Atrazin	15
3.4. Metolaklor	17
3.5. Diuron.....	19
3.6. Glifosat	21
3.7. Imazapir	23
3.8. Parakvat	25
4. Pendimetalin	28
5. Metode razgradnje pendimetalina u okolišu	29
5.1. Utjecaj pesticidnih smjesa	29
5.2. Utjecaj vlažnosti tla	30
5.3. Fotorazgradnja pendimetalina	31
6. Mikrobiološka razgradnja pendimetalina	32
6.1. <i>Bacillus subtilis</i> Y3.....	33
6.2. <i>Bacillus megaterium</i>	34
6.3. <i>Pseudomonas putida</i>	36
6.4. <i>Azotobacter chroococcum</i>	38
6.5. <i>Bacillus lehensis</i> XJU	40
7. Enzimi u razgradnji pendimetalina	43
7.1. Pendimetalin nitroreduktaza iz <i>Bacillus subtilis</i> Y3	43
7.2. Pendimetalin nitroreduktaza i pendimetalin-N-dealkilaza iz <i>Bacillus circulans</i> ..	45
8. Zaključak	49
9. Popis simbola	50
10. Literatura	52
Životopis	62

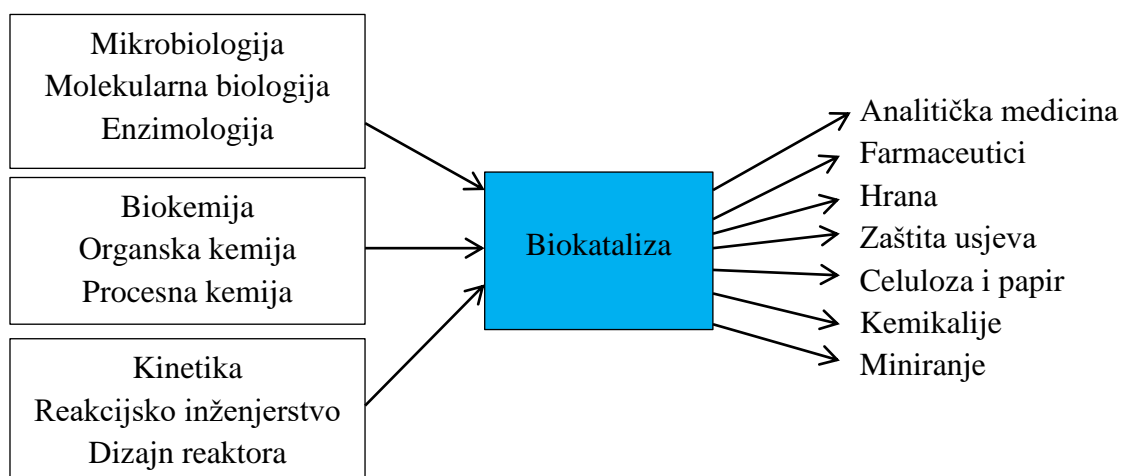
1. Uvod

Herbicidi su kemijski spojevi koji su otrovni prema nepoželjnim biljkama. Moderna se poljoprivreda oslanja na herbicide pri kontroli korova te postizanju maksimalnog iskorištenja usjeva. Razvoj biljaka otpornih na herbicide, doveo je do neočekivanog porasta otpornosti korova (Cherry, 2010). Osim toga, povećana upotreba herbicida predstavlja potencijalni problem za okoliš. Onečišćenje herbicidima može dovesti do zagađenja tla i vode te smanjene bioraznolikosti (Juhler et al., 2001). Moguće je da samo mala količina herbicida dolazi do ciljanih biljaka. Pritom, ostatak herbicida u tlu i vodi znatno utječe na zdravlje ljudi, životinja i usjeva (Pimentel, 1995). Kemijska svojstva i količina herbicida određuje njihovu otrovnost i postojanost u okolišu. Njihova interakcija s ciljanim i neciljanim organizmima je znatno oštetila ekosustav (Singh et al., 2013). Pendimetalin ili N-(1-etilpropil)-3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin je jedan od najčešće korištenih herbicida. Koristi se za kontrolu većine jednogodišnjih trava i širokolisnih korova kod usjeva (Singh & Singh, 2016). Mnoge bakterije imaju mogućnost razgradnje pendimetalina. Međutim, postoje samo dva enzima koja sudjeluju u razgradnji pendimetalina.

2. Biokataliza i enzimi

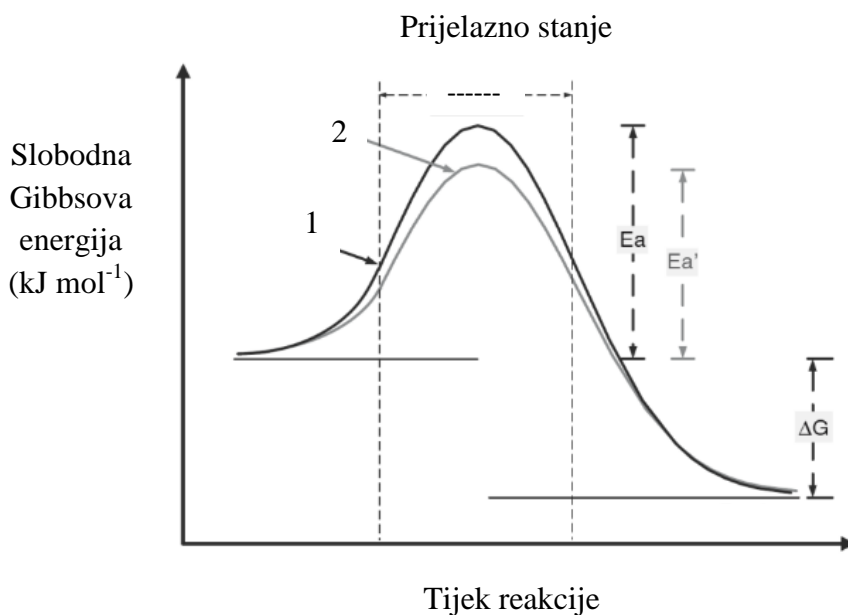
Postojanje oligopeptidnih i polipeptidnih katalizatora je dokaz da se sva enzimska djelovanja mogu objasniti pomoću racionalnih kemijskih i fizikalnih principa. Međutim, enzimi mogu stvoriti neobične reakcijske uvjete, poput niskog pKa ili visokog pozitivnog potencijala za redoks metalni ion. Enzimi mogu katalizirati većinu reakcija organske kemije. Osim što se biokataliza razlikuje po tipu katalizatora od ostalih procesa, razlikuje se i po bazi sirovina. Baza sirovih proizvoda se temelji na šećeru, ligninu, životinjskom ili biljnom otpadu. Ciljevi biokatalize su smanjenje troškova materijala i energije, manja količina otpada, manji broj koraka u proizvodnji te veće iskorištenje procesa (Bommarius & Riebel, 2004). U farmaceutskoj industriji, biokataliza se koristi za proizvodnju niza produkata zbog veće selektivnosti, u odnosu na ostale tehnologije. Nedostaci koji se spominju u kontekstu biokatalize su ograničena specifičnost svih enzima prema supstratu, ograničena dostupnost enzima, ograničeni broj enzima, ograničena stabilnost proteinskog katalizatora, ograničeno prostorno i vremensko iskorištenje enzimskih reakcija, potreba enzima za kompliciranim kosupstratima, to jest kofaktorima. Enzimi stvoreni za pretvorbu malih molekula, poput uree, imaju nisku specifičnost prema supstratu. Enzim katalaza pretvara vodikov peroksid u vodu i kisik (Bommarius & Riebel, 2004). Međutim, veliki enzim, poput neribosomske peptidne sintetaze, je izrazito specifičan (Kleinkauf & Doehren, 1996). Rasor i Voss su uočili da enzimi srednje veličine, koji djeluju na supstrate srednje veličine, u većini slučajeva imaju široku specifičnost prema supstratima (Rasor & Voss, 2001). Prema tome, opovrgnuta je kritika o ograničenoj specifičnosti za enzime. 1978. je otkrivena rekombinantna DNK tehnologija, koja je omogućila bržu proizvodnju enzima, veće čistoće i niže cijene. Pomoću rekombinantne DNK tehnologije, omogućeno je korištenje šireg spektra enzima (Baneyx, 1999). Postoje enzimi za svaku organsku kemijsku reakciju, međutim ima i reakcija za koje je potrebno više enzima, nego što ih je dostupno. Jedan od glavnih nedostataka enzima je ograničena stabilnost katalizatora, odnosno radne temperature između 15 i 50 °C, pH vrijednosti između 5 i 9 te vodeni medij. Soli, inhibitori i mehanički stres mogu usporiti ili u potpunosti deaktivirati enzime. Biokatalizatori nisu spori katalizatori, imaju dobru selektivnost te izvrsno prostorno i vremensko iskorištenje. Određeni enzimi zahtijevaju kofaktore (Bommarius & Riebel, 2004). Primjerice, dehidrogenaze zahtijevaju NAD(P)H, oksidaze zahtijevaju flavin mononukleotid ili flavin adenin dinukleotid. Potreba za kofaktorima predstavlja tehnološki izazov, ali oni koji su uspješno upotrijebljeni, ne smatra se da umanjuju ulogu biokatalizatora (Bommarius & Riebel, 2004). Glavna prednost

biokatalizatora je izvrsna selektivnost enzima, odnosno mogućnost različitog djelovanja na enantiomerne supstrate, s razlikom slobodnih Gibbsovih energija, 1-3 kJ/mol. Pomoću enzima se ostvaruje enantioselektivnost, veća od 99 % (Crossley, 1995). Glavni nedostatak biokatalizatora je nedovoljna stabilnost u željenom mediju. Čak i pri konformacijskoj promjeni, manjoj od 1 Å, može doći do znatnog smanjenja aktivnosti enzima. Izrazito je važno da enzim zadrži svoju početnu aktivnost (Carter & Wells, 1988). Postoje biokatalizatori za gotovo sve reakcije, međutim većina biokatalizatora nije dobro karakterizirana ili nije komercijalno dostupna. Danas, komercijalno postoji deset puta više biokatalizatora, nego prije deset godina te se očekuje daljnji rast. Razvoj najvažnijih biokatalitičkih procesa je trajao 10 do 20 godina. Primjerice, razvoj akrilamidnog procesa je trajao 20 godina. Jedan od razloga za dugo vrijeme razvoja je nepotpuno znanje o biotehnologiji i biokatalizi. Povećanjem znanja putem brojnih istraživanja, sigurno će doći do smanjenja vremena razvoja biokatalitičkih procesa (Bommarius & Riebel, 2004). Kako bi se uspješno primjenila biokataliza, potrebno je iskoristiti različite dijelove od triju disciplina. Discipline biokatalize su kemija, biologija i kemijsko inženjerstvo. Biokemija i organska kemija koriste osnove iz kemije; molekularna biologija, enzimologija i proteinska biokemija iz biologije; kataliza, transportni fenomeni i reakcijsko inženjerstvo iz kemijskog inženjerstva. Postoje mnoga područja primjene biokatalize, a neka od njih su: proizvodnja i transformacija spojeva u kemijskoj i farmaceutskoj industriji, analiza i dijagnostika u medicini, zaštita okoliša i bioobnova. Područja primjene se razlikuju od djelatnosti, koje ih primjenjuju. Najvažnije djelatnosti su: proizvodnja farmaceutika, hrane, kemikalija, celuloze, papira, zaštita usjeva, proizvodnja energije (Bommarius & Riebel, 2004).



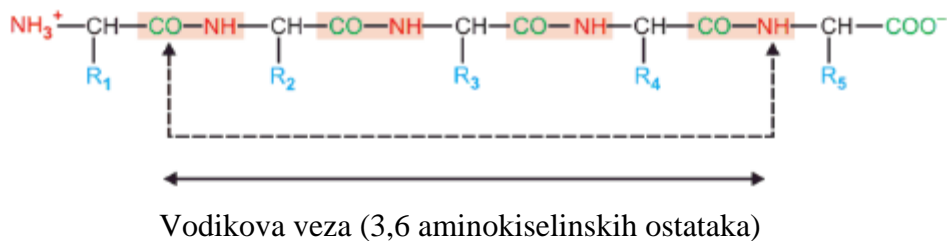
Slika 2.1. Prikaz glavne uloge biokatalize između interdisciplinarnih znanosti (biologija, kemija, kemijsko inženjerstvo) i multidisciplinarnih industrija (Bommarius & Riebel, 2004)

Mnoge kemijske reakcije se odvijaju spontano, međutim postoje one kojima je potreban katalizator. Katalizatori su molekule koje smanjuju energijsku barijeru, kako bi se jedna molekula mogla prevesti u drugi oblik. Termodinamički se veličina energijske barijere izražava promjenom slobodne energije. Katalizatori snižavaju slobodnu energiju, dolazi do interakcije između supstrata i katalizatora te se stvara aktivirani prijelazni kompleks sa supstratom (slika 2.2.) (Illanes, 2008).



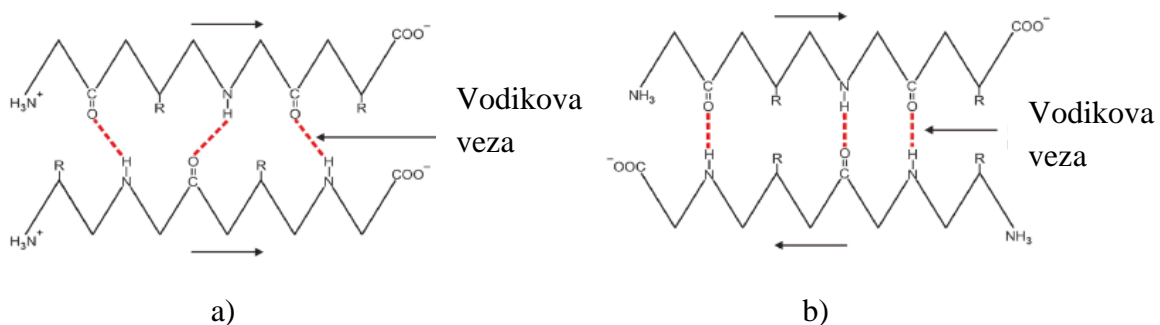
Slika 2.2. Ovisnost slobodne Gibbsove energije o tijeku reakcije za nekataliziranu (1) i kataliziranu (2) reakciju (Illanes, 2008)

Iz aktiviranog prijelaznog kompleksa se stvara produkt i oslobađa se katalizator. U teoriji, katalizator može beskonačno mnogo puta pretvoriti supstrat u produkt, međutim to se razlikuje u praksi. U praksi je ograničena stabilnost aktivne strukture enzima, odnosno ovisi o reakcijskim uvjetima. Svaka biokemijska reakcija staničnog metabolizma je katalizirana jednim specifičnim enzimom (Illanes, 2008). Enzimi su izrazito poželjni katalizatori, kada je nužna specifičnost reakcije, aktivnost katalizatora pri blagim uvjetima, pri strogim ekološkim ograničenjima (Benkovic & Ballesteros, 1997). Veliki nedostaci enzima su visoka molekularna kompleksnost i visoka cijena proizvodnje (Bommarius & Broering, 2005). Enzimi su proteini koji se sastoje od 100 ili više stotina aminokiselinskih ostataka, aminokiseline se spajaju putem reakcije dehidratacije, odnosno izlaskom molekule vode. Aminokiseline su povezane kovalentnim vezama, stvara se peptidna veza između ugljikovog atoma karbonilne skupine prve aminokiseline i dušikovog atoma amino skupine, druge



Slika 2.4. Stvaranje vodikove veze u α -heliksi (Naik, 2011)

Polipeptidni lanac β -naborane ploče je skoro u potpunosti izdužen, za razliku od lanca α -heliksa. β -naborana ploča se sastoji od dva ili više polipeptidnih lanaca. Stabilizira se vodikovim vezama između amino skupine i karboksilne skupine različitih polipeptidnih lanaca. Vodikove veze su okomite na polipeptidnu osnovu, dok kod α -heliksa su paralelne na polipeptidnu osnovu (Naik, 2011). Postoje dva oblika β -naborane ploče, paralelna i antiparalelna β -naborana ploča. Kod paralelne β -naborane ploče, N-krajevi lanaca su na istom kraju, vodikove veze se stvaraju između amino skupine jednog lanca i karbonylne skupine susjednog lanca (slika 2.5. a). Polipeptidni lanci su u suprotnim smjerovima kod antiparalelne β -naborane ploče te su stabilizirane s međumolekulskim vodikovim vezama (slika 2.5. b) (Naik, 2011).



Slika 2.5. Prikaz strukture a) paralelne i b) antiparalelne β -naborane ploče (Naik, 2011)

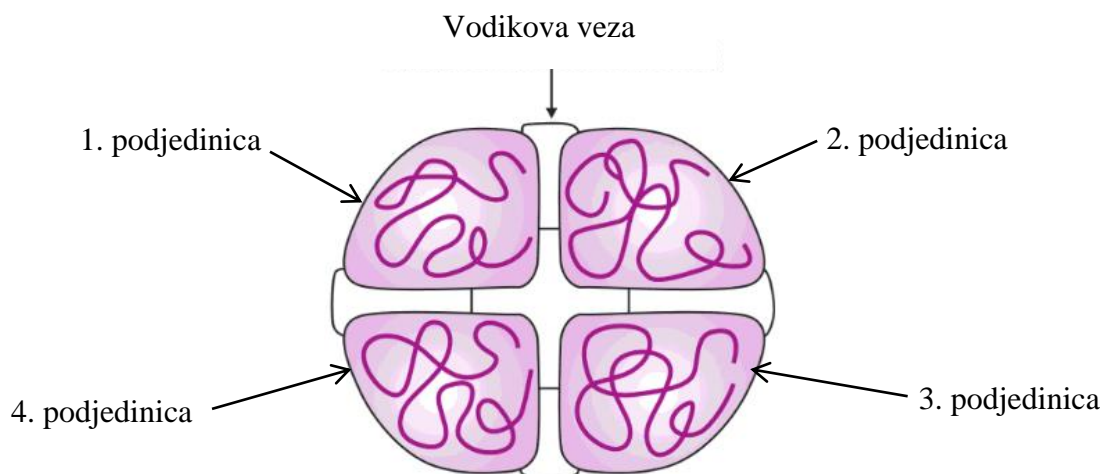
Daljnijim savijanjem i uvijanjem sekundarne strukture lanca, stvara se trodimenzionalni raspored polipeptidnog lanca. Aminokiselinski ostaci, koji su jako udaljeni u primarnoj strukturi proteina se mogu približiti, savijanjem. Pritom, stvaraju se ključna područja za funkcioniranje proteina, aktivna mjesta enzima. Trodimenzionalno preklopljena, kompaktna i biološki aktivna konformacija proteina se naziva tercijarna struktura (slika 2.6.). Tercijarna

struktura se stabilizira vodikovim vezama, hidrofobnim interakcijama, van der Waalsovima silama, disulfidnim vezama i elektrostatskim interakcijama (Naik, 2011).



Slika 2.6. Tercijarna struktura proteina (Naik, 2011)

Kvaterna struktura proteina predstavlja raspored polimernih polipeptidnih podjedinica u trodimenzionalnim kompleksima (slika 2.7.). Kvaternu strukturu imaju samo proteini, koji imaju više od jednog polipeptidnog lanca. Hemoglobin, laktat dehidrogenaza, piruvat dehidrogenaza su proteini s kvaternom strukturom. Podjedinice polimernog proteina se drže zajedno s nekovalentnim interakcijama, to jest vodikovim vezama, ionskim vezama i hidrofobnim interakcijama (Naik, 2011).



Slika 2.7. Kvaterna struktura proteina (Naik, 2011)

Pendimetalin nitroreduktaza je enzim, koji sudjeluje u razgradnji pendimetalina. On pripada skupini oksidoreduktaza, točnije reduktazama. Oksidoreduktaze su enzimi koji su prisutni u različitim mikroorganizmima, biljkama i životinjama. Sadrže jednu trećinu enzimskih aktivnosti prema BRENDA-i (BRAunschweig ENzyme DAtabase) (Sellés Vidal et al., 2018). Oksidoreduktaze kataliziraju izmjenu elektrona između donorske i akceptorske molekule, u

reakcijama koje uključuju prijenos elektrona, ekstrakciju protona ili umetanje kisika (Toone, 2010). Oksidoredukcijska reakcija se sastoji od dvije polureakcije, jedna je oksidacija, a druga je redukcija, s najmanje dva supstrata (Laskar et al., 2017). Primjer oksidoredukcijske reakcije je oksidoreduktazni enzim, aldehid dehidrogenaza, koja oksidira aldehid u karboksilnu kiselinu, dok drugi supstrat NAD^+ ili NAD(P)^+ se reducira u NADH ili NAD(P)H . Postoji šest vrsta oksidoreduktaza: oksidaze, dehidrogenaze, hidroksilaze, oksigenaze, peroksidaze i reduktaze (Nicholas & Lewis, 1999). Oksidaze se koriste kada je molekularni kisik, akceptor vodika ili elektrona. Enzimi dehidrogenaze oksidiraju supstrat pomoću prijenosa vodika na molekulu akceptora, to jest nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) ili nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADP^+) ili flavin adenin dinukleotid koenzim (Alam et al., 2016). Peroksidaze kataliziraju redukciju vodikovog peroksida i hidroperoksida. Hidroksilaze adiraju hidroksilne skupine na supstrate. Oksigenaze uključuju kisik u organske supstrate iz molekularnog kisika. Enzimi reduktaze kataliziraju reakcije redukcije (Husain & Ullah, 2019). Oksidoreduktaze imaju širok spektar supstrata i organskih (alkoholi, amini, ketoni) i anorganskih (sulfitni anion, atom žive). Navedeni enzimi imaju različite redoks aktivne centre za svoje fiziološke funkcije (Webb, 1992). Katalitička aktivnost mnogih enzima ovisi o prisutnosti neproteinskih kofaktora. Kofaktori se dijele na metalne ione i male organske molekule. Primjer metalnog iona kao kofaktora je cinkov (II) ion, koji je potreban ugljičnoj anhidrazi kako bi postigla svoju aktivnost. Glikogen fosforilaza koristi malu organsku molekulu kao kofaktor, odnosno piridoksal fosfat. Koenzimi su neproteinske, organske, niskomolekularne tvari povezane s aktivnošću enzima (Fursule et al., 2006). Često potječu od enzima, mogu biti slabo vezani (NAD^+) ili čvrsto vezani (hem) na enzim. Prostetičke skupine su čvrsto vezani koenzimi. Slabo vezani koenzimi se ponašaju kao kosupstrati, odnosno vežu se i otpuštaju s enzima kao supstrati i produkti. Holoenzim je katalitički aktivni kompleks enzima i kofaktora. Apoenzim je enzim bez svojeg kofaktora. Koenzimi se mijenjaju tijekom enzimske reakcije, međutim koenzimi se obnavljaju, za razliku od supstrata (Fursule et al., 2006).

3. Herbicidi

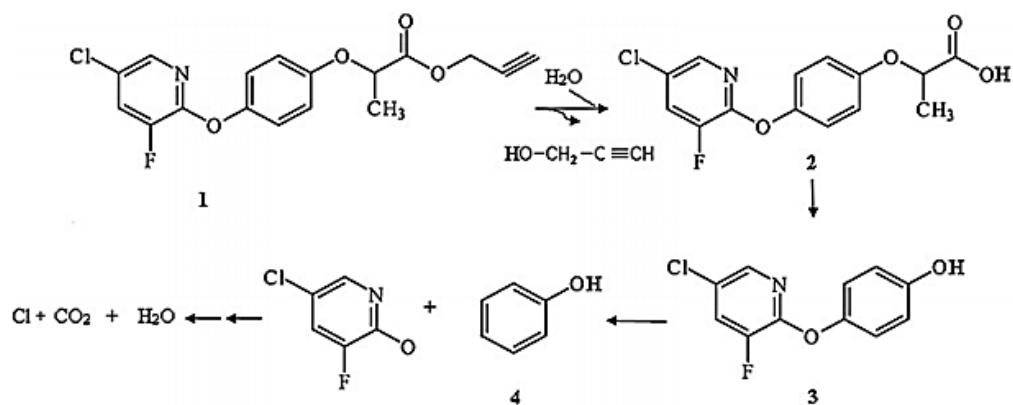
Herbicidi su kemijski spojevi koji su otrovni prema korovima. Moderna agrokultura se temelji na primjeni herbicida, kako bi se postiglo maksimalno iskorištenje usjeva te kontrola rasta korova. Korovi su biljke koje rastu tamo gdje nisu poželjne. Također, korovi se definiraju kao biljke koje stvaraju populacije, ulaze u stanište kultivirane biljke i umanjuju populaciju kultiviranih biljaka. Herbicidi smanjuju rad i vrijeme potrebno za učinkovitu kontrolu korova te time dolazi do povećanja zarade. Također, omogućeno je korištenje većeg područja za uzgoj poljoprivrednih kultura. Međutim, mogu se javiti i brojni problemi pri korištenju herbicida. Neki od mogućih problema su ozljede usjeva, smanjenje selektivnosti, djelovanje na biljke u susjednim poljima, onečišćenje okoliša (Monaco et al., 2002). Korištenjem herbicida na određeno tlo, dolazi do porasta otpornosti kako biljaka, tako i korova na djelovanje herbicida. Raste udio genetički modificiranih kultura koje su sve otpornije na herbicide, te se s njima javljaju i korovi koji su u potpunosti otporni na herbicide. Raste količina i broj herbicida koji se koriste, kako bi se kontrolirao rast i djelovanje biljaka i korova (Cherry, 2010). Zbog prevelikog korištenja herbicida dolazi do štetnog utjecaja herbicida na tlo, ljude, vodu, usjeve, životinje. Samo mali udio herbicida dolazi do biljaka, a ostatak dovodi do ekološkog onečišćenja (Pimentel, 1995). Kemijska svojstva i količina herbicida određuju njihovu postojanost i otrovnost u okolišu. Interakcija herbicida s ciljanim i ne ciljanim organizmima radi veliku štetu ekosustavu preko hranidbenih lanaca (Singh et al., 2013). Herbicidi se primjenjuju na listovima, tlu, cijelom području i na točno određenim mjestima. Najčešće korišteni herbicidi su: klodinafop propargil (CF), 2,4-diklorfenoksiacetilna kiselina (2,4-D), atrazin, metolaklor, diuron, glifosat (GP), imazapir, parakvat (PQ) i pendimetalin. Navedeni herbicidi rade štetu organizmima čak i kada su prisutni u mikrogramima. Opisana su karakteristična svojstva, otrovnost i mikrobiološka razgradnja navedenih herbicida (Singh et al., 2013).

3.1. Klodinafop propargil

Klodinafop propargil (CF) je ariloksifenoksi-propionat herbicid, koji se koristi za kontrolu korova žitarica. Njegova primjena je dovela do ispuštanja velikih količina spojeva u okoliš, koji dolaze do biosfere. Lišće ga apsorbira te se premješta na mjesta rasta listova i stabljika. Klodinafop propargil ometa proizvodnju masnih kiselina koje su potrebne za rast biljaka. On inhibira enzim acetil koenzim A karboksilazu, koji je nužan za sintezu lipida. CF ima nisku otpornost i kratko vrijeme poluživota u tlu, koje iznosi pet dana (Singh, 2013). U niskim

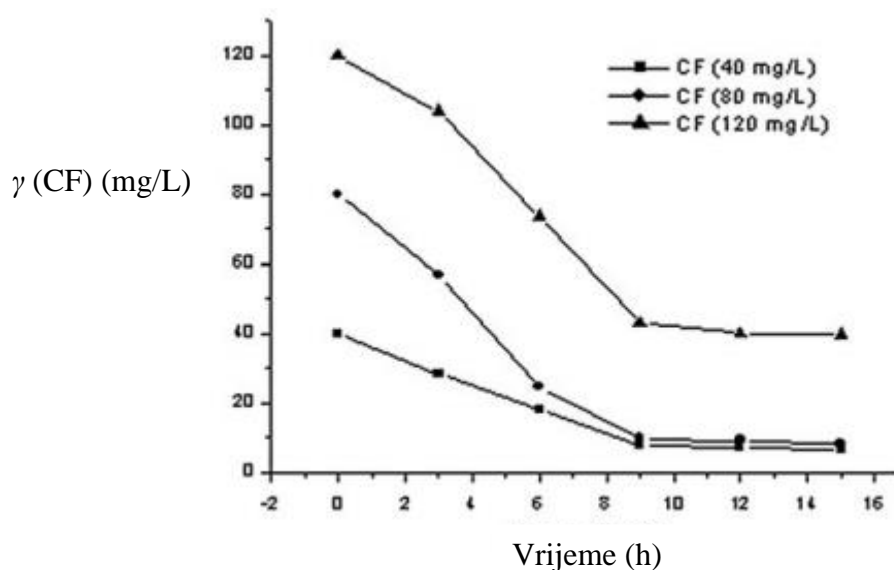
koncentracijama, CF je u interakciji s timusom DNK teleta pomoću interkalativnog načina vezanja. Interkalativni način vezanja predstavlja umetanje planarnog aromatskog ili heteroaromatskog dijela molekule, između susjednih parova baza u dvolančanu nukleinsku kiselinu (DNK), čime se uspostavljaju π - π interakcije malih molekula s nukleobazama (Capranico et al., 1997). Interkaliranje organskih molekula u polinukleotide dovodi do promjene raspodjele elektrona na susjednim bazama, čime se mijenjaju apsorpcijski UV-Vis i fluorescentni spektri. Interkaliranje u polinukleotidnom lancu dovodi do produljenja lanca, a ponekad i do djelomičnog odmotavanja i deformacije. Vezanjem interkalatora dolazi do stabilizacije i ukrućivanja polinukleotidnog lanca (Baguley, 1991). Klodinafop propargil predstavlja interkalator, koji se veže između susjednih baza u molekuli DNK. Klodinafop propargil ometa posteriorni i ventralni razvoj embrija kod zebrastih riba (Kashanian et al., 2008). Embriji su izloženi rasponu koncentracija od 0,2 μ M do 5 μ M počevši od faze kasnog cijepanja (dva sata nakon oplodnje) ili faze kasne gastrulacije (deset sati nakon oplodnje). Gastrulacija je proces kojim nastaju tri embrionalna sloja klica: endoderm, mezoderm i ektoderm. Odvija se tri tjedna nakon oplodnje, zatim se endoderm dijeli na neuroektodermu i epidermu (Chu & Loomis, 2017). Faza kasnog cijepanja i kasne gastrulacije daju isti minimum teratogene koncentracije od 0,6 μ M, ali uzrokuju različite urođene malformacije. Teratologija je znanost koja proučava urođene mane i njihove uzročnike. Pri rođenju, vjerojatnost da će doći do urođenih malformacija iznosi 2-3 %, a nakon prve godine vjerojatnost raste do 5 % (Sadler, 2012). Urođene malformacije predstavljaju defekte u građi životinja, nastale zbog genetskih mutacija koje su nasljeđene od roditelja ili uzrokovane novim mutacijama ili promjenama DNK. One usporavaju genetički proces životinja, povećavaju ekonomski gubitak uzgajivača zbog smrti životinja te smanjuju sposobnost reprodukcije (Gholap et al., 2014). Pošto je klorodinafop jako otrovan, njegova razgradnja može dovesti do velikog onečišćenja okoliša.

Bakterije vrste *Pseudomonas* soj B2 koriste herbicid klodinafop propargil kao izvor ugljika, to jest razgrađuju klodinafop propargil. Na slici 3.1. je prikazan raspad herbicida klodinafop propargila. U prvom stupnju se odvija hidroliza, kojom se izdvaja prop-2-in-1-ol iz klodinafop propargila (1) te nastaje klodinafopska kiselina (2). U drugom stupnju se klodinafopska kiselina raspada na 4-(2-fluor-4-klor-fenoksi) fenol koji je označen brojem 3. U trećem stupnju se iz 4-(2-fluor-4-klor-fenoksi) fenola izdvaja fenol (4). U četvrtome stupnju se izdvaja kloridni ion, ugljikov (IV) oksid i voda (Ma et al., 2013).



Slika 3.1. Razgradnja klodinafop propargila uz *Pseudomonas* soj B2 (Ma et al., 2013)

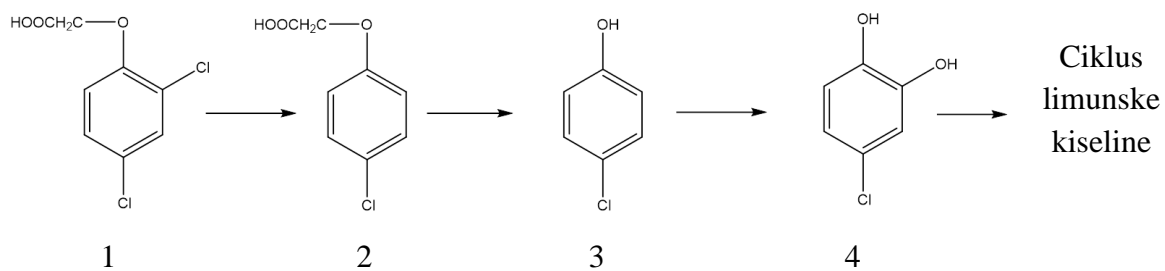
Na slici 3.2. je prikazana ovisnost masenih koncentracija klodinafop propargila (CF) o vremenu inkubacije uz *Pseudomonas*. Porastom koncentracije klodinafop propargila, dolazi do usporavanja razgradnje klodinafop propargila u odnosu na niže koncentracije. Nakon devet sati, bakterije *Pseudomonas* su razgradile 87,5 % herbicida pri početnim koncentracijama herbicida 40 mg/L i 80 mg/L, a za početnu koncentraciju od 120 mg/L se razgradilo 62,5 % herbicida (Ma et al., 2013).



Slika 3.2. Ovisnost razgradnje klodinafop propargila (CF) pomoću bakterija *Pseudomonas* soj B2, za početne masene koncentracije herbicida: 40 mg/L, 80 mg/L i 120 mg/L (Ma et al., 2013)

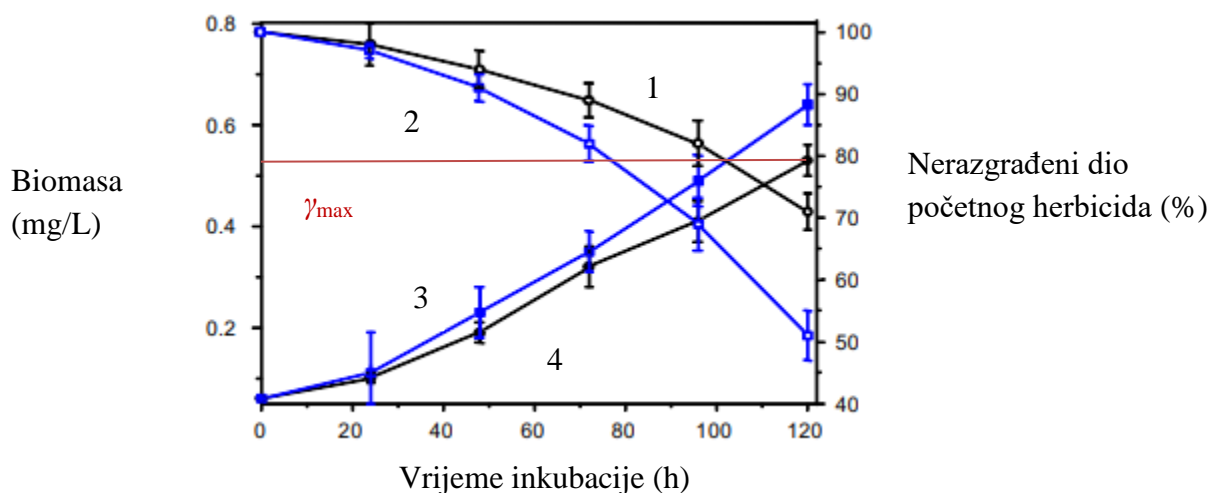
3.2. 2,4-diklorfenoksiacetilna kiselina

2,4-diklorfenoksiacetilna kiselina (2,4-D) je jedan od najčešće korištenih kloriranih kiselih fenoksi herbicida u svijetu, analogan je hormonu rasta (auksin). Njegova primjena je donijela ekonomsku, selektivnu i efektivnu kontrolu širokolisnih korova u poljoprivrednim usjevima, pašnjacima i šumama. 2,4-diklorfenoksiacetilna kiselina nastaje reakcijom između aaminskih soli, poput dimetil aminske soli i derivata estera u većini okolišnih uvjeta (Edwards, 2005). U biljkama održava visoku razinu hormona auksina, što dovodi do prekomjernog utjecaja na rast biljaka te na kraju i do smrti biljke. Nakon njegove primjene, apsorbira se u listovima i korijenu te se premješta u preostale dijelove biljke (González et al., 2005). Svjetska zdravstvena organizacija ga definira kao hormonalni herbicid otrovnosti druge razine. Preko kože, disanjem ili gutanjem dolazi u kontakt s ljudima. U većini slučajeva, glavni način izlaganja ovome herbicidu je apsorpcija nakon izlivanja ili apsorpcija kapljica aerosola preko kože (Chaudhry & Huang, 1988). 2,4-diklorfenoksiacetilna kiselina je jedan od najčešće korištenih herbicida u obradivim tlima. Pošto je otrovan za životinje i biljke, pomno se istražuje njegova razgradnja te geni koji sudjeluju u razgradnji. Bakterije roda *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Ralstonia*, *Delftia*, *Arthrobacter* i *Burkholderia* imaju mogućnost razgradnje 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline. 1 kb je jedinica duljine DNK ili RNK koja je jednaka tisuću nukleotida. Bakterija *Pseudomonas cepacia* sadrži konjugirani plazmid pJP4 koji je odgovoran za razgradnju 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline. Plazmid pJP4 sadrži gene *tdfA*, *tdfB*, *tdfC*, *tdfD*, *tdfE* i *tdfF* koji razgrađuju navedeni herbicid uz pomoć enzima (Don & Pemberton, 1985). U prvom stupnju nastaje 2,4-diklorfenol pomoću enzima 2,4-D monooksigenaze i gena *tfdA* iz 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline. Uz 2,4-diklorfenol hidrosilazu i gen *tfdB* nastaje 3,5-diklorkatehol. Drugi naziv za molekulu katehola jest 1,2-dihidroksibenzen. Iz 3,5-diklorkatehola uz enzim 3,5-diklorkatehol 1,2-dioksigenazu i gen *tfdC* nastaje 2,4-diklormukonat, molekula koja sadrži karboksilne skupine u položaju 1 i 6. Zatim, uz enzim klormukonat cikloizomerazu i gen *tfdD* nastaje trans-2-kloradien lakton. Laktoni su ciklički esteri, koji su nastali izdvajanjem vode te ciklizacijom karboksilnih kiselina. Enzim kloradienlakton izomeraza i gen *tfdE* mijenjaju konfiguraciju molekule iz trans u cis položaj. Iz cis-2-kloradien laktone uz enzim kloradienlakton hidrolazu i gen *tfdF* nastaje 2-klormaleilacetat. Zatim, 2-klormaleilacetat ulazi u ciklus limunske kiseline te se pregrađuje u sukcinu kiselinu (Bhat et al., 1994).



Slika 3.4. Razgradnja 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline uz *Azotobacter* soj SSB81 (Singh & Singh, 2016)

Iz slike 3.5. se uočava da porastom vremena inkubacije, raste i razgradnja 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline. Do razgradnje herbicida dolazi zbog prisutnosti bakterije *Azotobacter*, koja koristi herbicid kao izvor energije. Nakon 120 sati inkubacije herbicida uz bakteriju, dolazi do 29 %-tne razgradnje 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline (krivulja 1). U prvih 48 sati inkubacije dolazi do inhibicije rasta bakterije, u prisutnosti 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline (krivulja 4). Međutim, nakon 48 sati dolazi do rasta bakterije te se maksimalna masena koncentracija bakterije (γ_{\max}) postiže nakon 120 sati inkubacije i iznosi 0,53 mg/L (Gauri et al., 2012).



Legenda

- 1- razgradnja 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline
- 2- razgradnja p-kumarinske kiseline
- 3- rast bakterije *Azotobacter* uz p-kumarinsku kiselinu kao izvor energije
- 4- rast bakterije *Azotobacter* uz 2,4-diklorfenoksiacetilnu kiselinu kao izvor energije
- γ_{max} - maksimalna masena koncentracija bakterije *Azotobacter*

Slika 3.5. Ovisnost razgradnje 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline i nastajanja bakterija *Azotobacter* o vremenu inkubacije (Gauri et al., 2012)

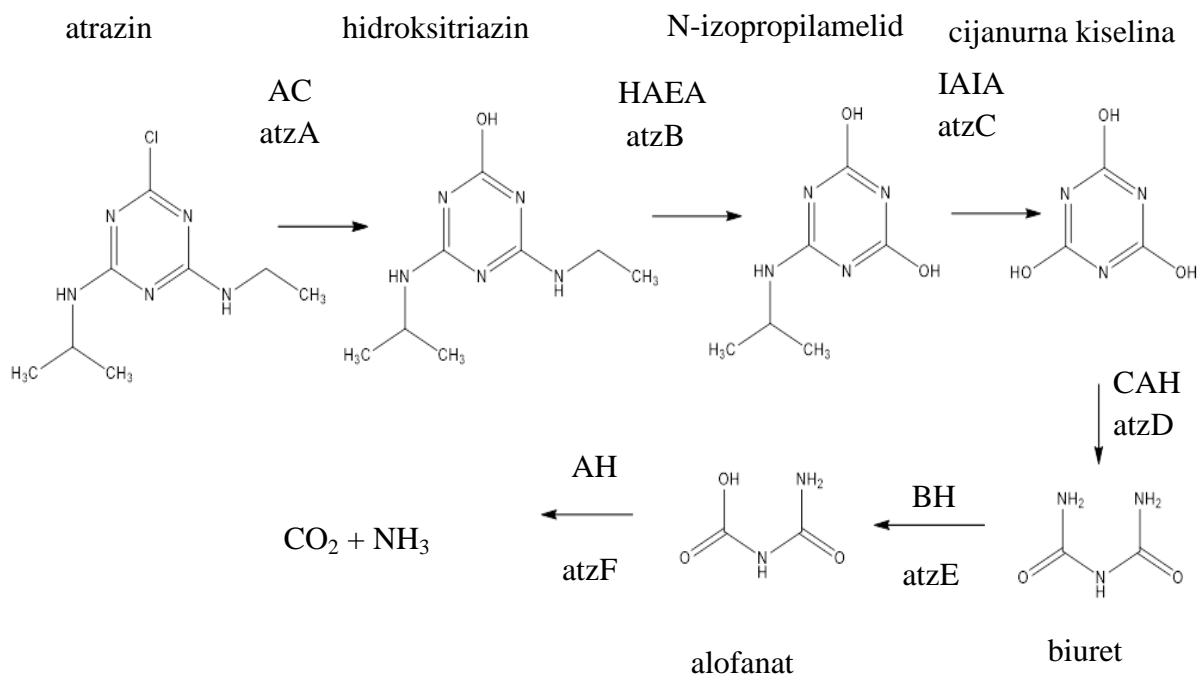
Maseni spektar 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline sadrži četiri pika pri vrijednostima omjera molekulske mase i naboja: 127, 141, 185 i 219. Signal na 219 odgovara molekulskom ionu 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline, pik na 185 pripada kationu 4-klorfenoksiacetata, signal na 141 odgovara kationu 4-klorfenola, te pik na 127 pripada kationu 4-klorokatehola. Dobiveni signali u masenom spektru su potvrda raspada 2,4-diklorfenoksiacetilne kiseline na navedene međuprodukte (Gauri et al., 2012).

3.3. Atrazin

Atrazin ili 2-klor-4-etilamin-6-izopropilamino-1,3,5-triazin je glavni predstavnik s-triazin herbicida. Često se detektira u površinskim i podzemnim vodama u koncentracijama iznad dopuštenih razina, zbog svoje visoke pokretljivosti u tlu i široke primjene (Biradar & Rayburn, 1995). Dva glavna faktora koja utječu na onečišćenje podzemnih i kišnih voda su umjerena kemijska otpornost atrazina (33 mg/L pri 20 °C) i niski koeficijent apsorpcije tla ($K_d = 3,7$ L/kg) (Siripattanakul et al., 2009). Atrazin posjeduje veliku kroničnu otrovnost, kod životinja i ljudi djeluje na sustav žlijezda s unutarnjim izlučivanjem (endokrini sustav). Također, utječe i na središnji živčani sustav, reproduktivni sustav, imunološki sustav i

kardiovaskularnu funkciju. Kod ljudi može uzrokovati nastajanje raka u navedenim sustavima (Jablonowski, 2008). Europska unija je u listopadu 2003. zabranila korištenje atrazina zbog zagađenja vode, međutim USEPA (United States Environmental Protection Agency) je isti mjesec odobrila korištenje atrazina. Atrazin je otrovan čak i kada je prisutan u nanogramima, zato je potrebno provesti proces bioobnove. Bioobnova predstavlja sigurnu ekonomsku, održivu i učinkovitu tehnologiju za obnovu onečišćenih mjesta. Ovisno o prirodi onečišćenja i uvjetima bioobnova se može primijeniti in situ ili ex situ. In situ postupak je ekonomski jeftiniji i učinkovitiji od ex situ postupka, zato što nije potrebno iskopati ili premjestiti onečišćeno tlo. Ex situ postupci uključuju iskopavanje i uklanjanje onečišćenog tla, provodi se na mjestu iskopa ili na drugom mjestu prije liječenja (Megharaj & Naidu, 2017). Glavni mehanizam razgradnje atrazina u tlu jest putem mikroorganizama. Postoji veliki broj mikroorganizama koji mogu razgraditi atrazin, među njima su bakterije *Pseudomonas* soj ADP i *Arthrobacter aurescens*. *Pseudomonas* soj ADP razgrađuje atrazin na amonijak i ugljikov (IV) oksid djelovanjem različitih enzima sa šest gena, atzABCDEF (Siripattanakul et al., 2009). Geni koji omogućuju enzimima hidrolizu atrazina su atzA, atzB, atzC, atzD, atzE, atzF, trzD i trzN. Svaki od navedenih gena posjeduje specifičnost prema određenom supstratu te se nalaze u različitim bakterijama koje razgrađuju atrazin. Razgradnja atrazina uključuje procese N-dealkilacije, deklorinacije i cijepanja aromatskog prstena (Mandelbaum et al., 1993). *Pseudomonas* soj ADP sadrži gene atzABCDE na kataboličkom plazmidu pADP-1, koji posjeduje 100 000 parova baza. AtzA, atzB i atzC geni su odgovorni za pretvorbu atrazina u cijanurnu kiselinu te se nalaze na tri udaljena položaja na nestabilnom području od 40 000 parova baza u pADP-1. Kod razgradnje atrazina uz *Pseudomonas* soj ADP (slika 3.6.), u prvom stupnju dolazi do deklorinacije atrazina s enzimom atrazin klorohidrolazom (AC), koji kodira gen atzA te nastaje hidroksiatrazin. Dolazi do supstitucije klora u položaju 2 s hidroksilnom skupinom. U drugom stupnju dolazi do N-dealkilacije etilamina, hidroksiatrazina, u položaju 4 te se veže hidroksilna skupina. N-dealkilacija se provodi pomoću enzima hidroksiatrazin etilaminohidrolaze (HAEA), kojeg kodira gen atzB te nastaje N-izopropilamelid. Zatim, ponovno dolazi do N-dealkilacije, ali u položaju 6. Izopropilamino se supstituira s hidroksilnom skupinom putem enzima N-izopropilamelid izopropilamidohidrolaze (IAIA), kojeg kodira gen atzC (De Souza et al., 1998). AtzDEF operon stvaraju geni atzD, atzE i atzF, koji se nalaze na drugom mjestu plazmida pADP-1, u odnosu na gene atzABC. Geni atzD, atzE i atzF su uključeni u cijepanje s-triazin prstena i oslobađanje amonijaka (Martinez et al., 2001). Prsten cijanurne kiseline se cijepa s hidrolazom cijanurne kiseline (CAH), koju kodira gen atzD. Zatim, dolazi do hidrolize jedne

amino skupine biureta u hidroksilnu skupinu pomoću biuret hidrolaze (BH), koju kodira gen atzE. Zadnji stupanj je izlučivanje amonijaka iz alofanata pomoću alofanat hidrolaze (AH), koju kodira atzF (De Souza et al., 1998).

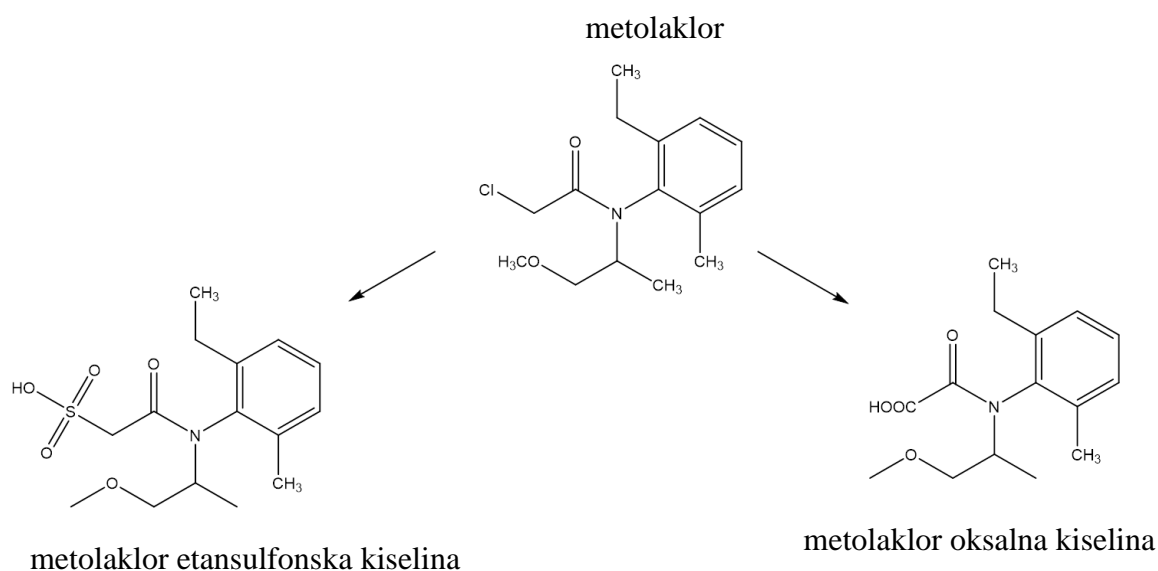


Slika 3.6. Razgradnja atrazina uz *Pseudomonas* soj ADP (Singh & Singh, 2016)

3.4. Metolaklor

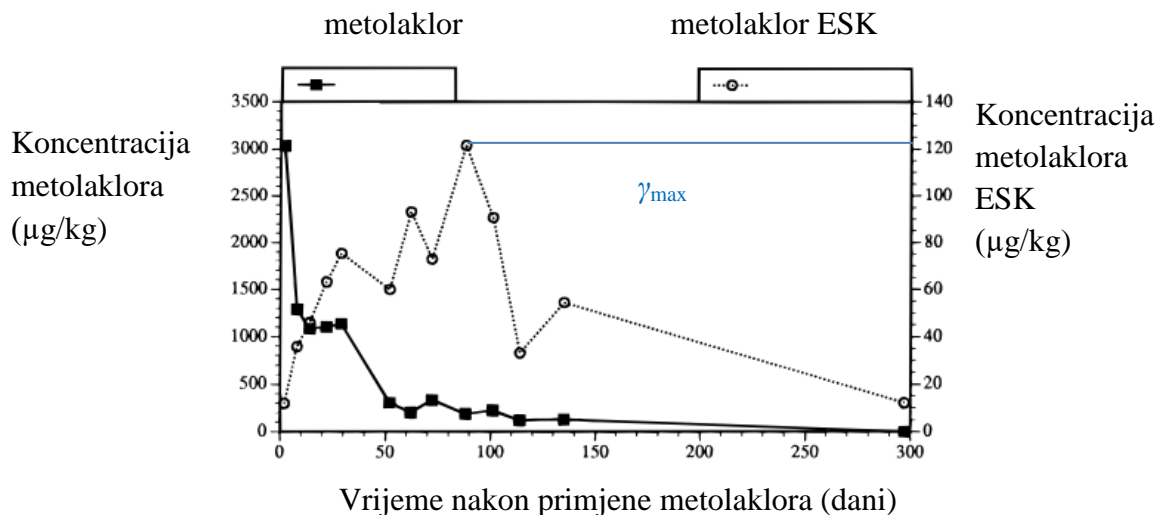
Metolaklor ili 2-klor-N-(2-etil-6-metilfenil)-N-(metoksiprop-2-il) acetamid je selektivan kloroacetamidni herbicid koji kontrolira širokolisne korove kod kukuruza, soje, kikirikija i krumpira (Gaynor et al., 1993). U Sjedinjenim Američkim Državama se koriste velike količine metolaklora, čak 22 milijuna kilograma po godini zbog velike proizvodnje soje i kukuruza. Nakon što se metolaklor apsorbira kroz korijenje i izbojke, djeluje kao inhibitor rasta, to jest inhibira sintezu klorofila, proteina, masnih kiselina, lipida, izoprenoida i flavonida (Pereira et al., 2009). Metolaklor ima klastogeno djelovanje, to jest uzrokuje cijepanje dijelova kromosoma, pri čemu dolazi do dobitka, gubitka ili premještanja dijelova kromosoma. Kod bakterija *Bacillus stearothermophilus*, koje su uzgajane u kompleksnom L-Broth mediju pri temperaturi od 65 °C, koncentracija metolaklora utječe na specifični rast, vrijeme zadržavanja i gustoću stanica bakterija. Porastom koncentracije metolaklora u mediju za rast bakterija, dolazi do smanjenja specifičnog rasta stanica *Bacillus stearothermophilus*. Pri koncentraciji metolaklora od 500 μM , smanjio se specifični rast bakterija za 50 %, u

odnosu na medij bez metolaklora. Porastom koncentracije metolaklora dolazi i do povećanja vremena zadržavanja bakterija (Pereira et al., 2009). Pri koncentraciji metolaklora od 600 μM , vrijeme zadržavanja bakterija se povećalo deset puta, u odnosu na medij bez herbicida. Gustoća stanica bakterija opada s porastom koncentracije metolaklora, u odnosu na hranjivi medij bez bakterija. Kod koncentracije metolaklora od 600 μM , dolazi do smanjenja gustoće stanice za 72 %. Prema navedenim podacima, uočava se da porastom koncentracije herbicida, dolazi do smanjenja rasta *Bacillus stearothermophilus*. Osim navedenog, koncentracija herbicida utječe i na potrošnju kisika u protoplastima bakterija. Protoplasti su stanice živih organizama kojima su odstranjene stanične membrane. Porastom koncentracije metolaklora u protoplastima, dolazi do smanjenja potrošnje kisika u stanicama (Pereira et al., 2009). Razgradnja metolaklora u tlu se odvija i s aerobnim i s anaerobnim organizmima. Primarni metaboliti na koje se metaklor razgrađuje su metaklor etansulfonska kiselina i metaklor oksalna kiselina (slika 3.7.). Metaklor se razgrađuje zbog pomaka atoma klora pomoću tripeptida glutaciona, koji se sastoji od tri aminokiseline: glicina, cisteina i glutaminske kiseline (Barbash & Gail, 1999). U tlu dolazi do konjugacije glutaciona, to je metabolički put kojim dolazi do supstitucije klora, u položaju 2 metolaklora, sa skupinom sulfonske kiseline. Međutim, nije poznato kojim postupkom nastaje drugi produkt razgradnje, metaklor oksalna kiselina. Konjugacija glutaciona je mehanizam koji koriste mikroorganizmi, kako bi se uklonio štetni utjecaj ksenobiotika, poput pesticida i lijekova (De Kok, 1993).



Slika 3.7. Mehanizam razgradnje metolaklora u tlu pri djelovanju aerobnih i anaerobnih mikroorganizama (Singh & Singh, 2016)

Na slici 3.8. je prikazana prosječna koncentracija metolaklora i metolaklor etansulfonske kiseline, kod dubine tla (0-15 cm), do 300 dana nakon primjene metolaklora. S vremenom se smanjuje koncentracija metolaklora, što je dokaz razgradnje metolaklora u tlu. Kako se smanjuje koncentracija metolaklora, dolazi do povećanja koncentracije metolaklor etansulfonske kiseline. Povećanje koncentracije metolaklor etansulfonske kiseline je dokaz razgradnje metolaklora (Taylor et al., 1971). Koncentracija metolaklora se eksponencijalno smanjuje, vrijeme poluraspada je 25 dana. Do 30.-tog dana se javlja izrazit rast koncentracije metolaklor etansulfonske kiseline te pri 30.-tom danu iznosi 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Maksimalna koncentracija metolaklor etansulfonske kiseline (metolaklor ESK, γ_{max}) iznosi 122 $\mu\text{g}/\text{kg}$ te se postiže nakon žetve kukuruza, to jest 90 dana nakon primjene metolaklora. Nagli porast koncentracije metolaklor ESK je dokaz, da je sulfonacija važan proces razgradnje metolaklora u tlu (Krause et al., 1985).

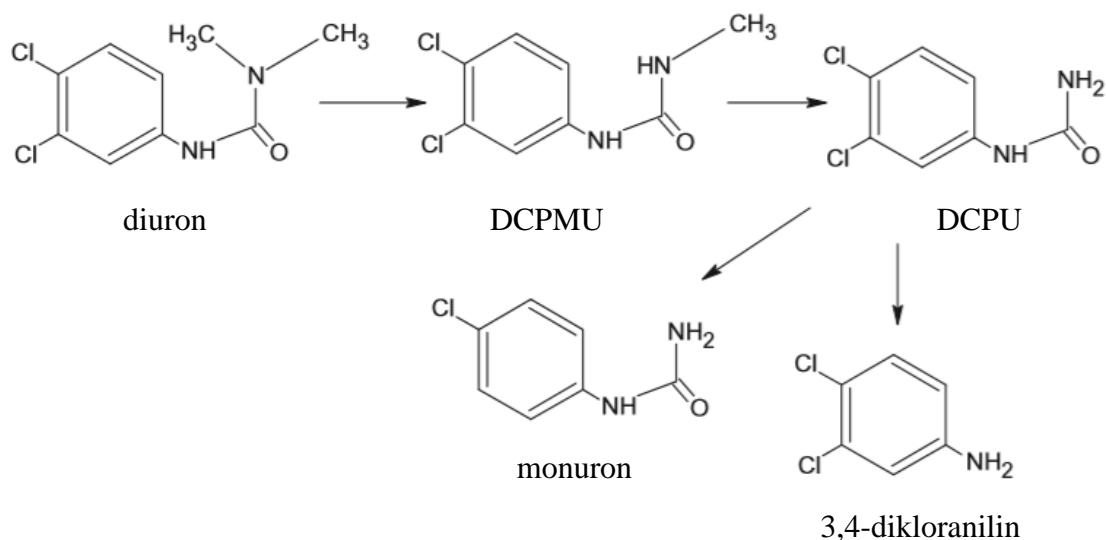


Slika 3.8. Ovisnosti koncentracije metolaklora i metolaklora etansulfonske kiseline u tlu, kod usjeva kukuruza o vremenu (Aga, 1996)

3.5. Diuron

Diuron ili 3-(3,4-diklorfenil)-1,1-dimetilurea je supstituirani herbicid feniluree, koji se koristi za kontrolu korova kod poljoprivrednih usjeva i ne poljoprivrednih područja (Castillo et al., 2006). Ne poljoprivredna područja predstavljaju mjesta uz cjevovode, dalekovode, željezničke pruge, ceste, industrijske i poljoprivredne zgrade, spremnike za naftu. Također, diuron se koristi kao algicid u ribnjacima, fontanama i akvarijima. Može se koristiti samostalno ili u kombinaciji s drugim herbicidima, poput bromacila, heksazinona, parakvata,

imazapira, natrijeva klorata, natrijeva metaborata, bakrova sulfata (USEPA, 2004). Na tržištu je dostupan u obliku vlažnog praha, granula, tableta, tekuće suspenzije i topljivih koncentriranih formulacija. U poljoprivredi se diuron koristi kao bijela, kristalna krutina, bez mirisa. Biljke ga preuzimaju preko svojih korijena, brzo se širi u stabljiku i listove preko transpiracijskog sustava, pomoću ksilema. Ksilem se sastoji od neživih stanica (apoplasti) koje su međusobno povezane te čine seriju uskih cijevi, te se protežu od korijena do izdanaka. Ksilemske cijevi se nastavljaju kroz peteljke listova na preostale dijelove listova. Glavna uloga ksilema je dovodjenje vode svim živim stanicama u biljci i otopljenih hranjivih tvari koje su apsorbirane pomoću korijena. Diuron se otapa u vodi te se prenosi od korijena, prema gore, kroz ksilem putem toka vode (Monaco et al., 2002). Diuron inhibira proces fotosinteze, to jest fotosistem 2, koji se nalazi u kloroplastu unutar stanica biljaka. Inhibicijom fotosistema 2, ne dolazi do stvaranja molekula ATP-a, koje predstavljaju izvor energije za proizvodnju ugljikohidrata. Ugljikohidrati su izrazito važne molekule jer omogućuju rast biljaka. Kod procesa fotosinteze dolazi do apsorpcije energije fotona pomoću skupine pigmenata, koje se zovu P₆₈₀. Dva pobuđena elektrona se premještaju na feofitin (PHEO) te s njega na plastokinon (Q_A), koji je vezan na protein D2. Diuron se natječe s plastokinonom (Q_B) za vezno mjesto na proteinu D1. Zbog toga ne dolazi do vezanja Q_B na protein D1 te time staje protok elektrona kroz fotosistem 2. Prema tome, ne nastaju reducirani oblici Q_BH₂ i PQH₂ (plastohidrokinon) niti molekula ATP-a (Monaco et al., 2002). Osim što inhibira proces fotosinteze, diuron je izrazito otrovan za vodene organizme. Kod riba za raspon koncentracija diurona između 4,3 i 42 mg/L, dolazi do smrti polovice populacije za 48 sati. Dolazi do smrti polovice populacije vodenih beskralježnjaka, nakon 48 sati pri koncentracijama diurona od 1 do 2,5 mg/L. Ostaci diurona se mogu pronaći u mlijeku, jetrima i bubrezima krava, koje su u svojoj prehrani sadržavale male količine diurona (EXTOXNET, 1996). Također, kod štakora koji su izloženi većim koncentracijama diurona je uočena njegova prisutnost u bubrezima i jetrima (Domingues et al., 2011). Diuron se razgrađuje s morskim mikroorganizmima i mikroorganizmima iz tla na 3,4-dikloranilin kao većinski produkt. *Beauveria bassiana*, *Caenorhabditis elegans*, *Phanerochaete chrysosporium* i *Mordellistena isabellina* su sojevi gljivica koji imaju mogućnost razgradnje diurona na dva produkta u različitim udjelima. Mehanizam razgradnje diurona je prikazan na slici 3.9.. U prvom koraku razgradnje dolazi do N-demetiliranja, to jest gubitka jedne metilne skupine s atoma dušika diurona te nastaje 3-(3,4-diklorfenil)-1-metilurea (DCPMU). Ponovno dolazi do N-demetiliranja te nastaje 1-(3,4-diklorfenil) urea (DCPU). U zadnjem koraku DCPU disocira na monuron [1-(4-klorofenil) urea] i 3,4-dikloranilin (Dalton et al., 1966).

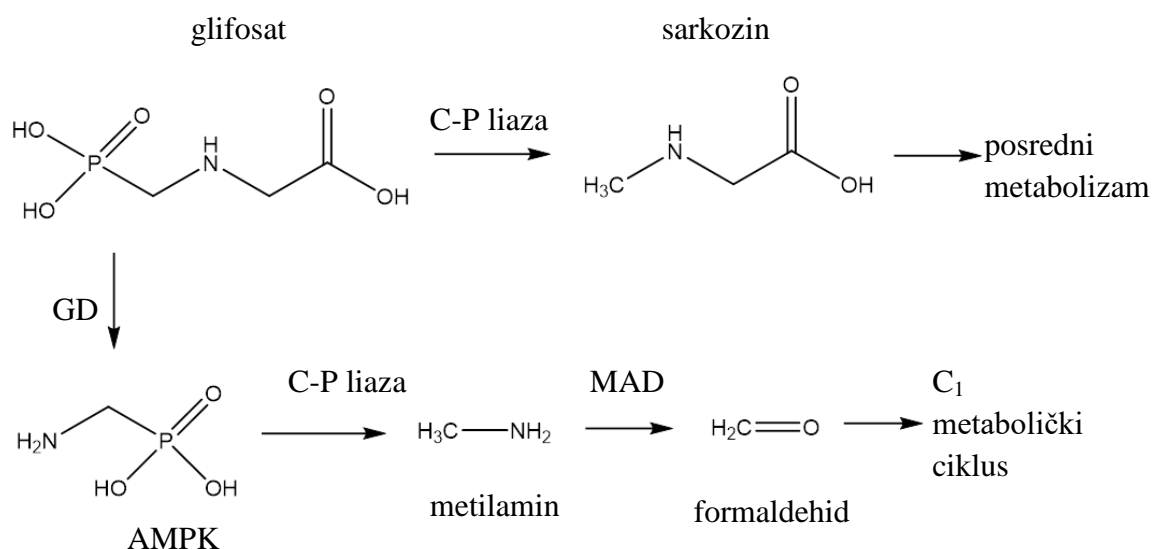


Slika 3.9. Mehanizam razgradnje diurona pri djelovanju mikroorganizama (Singh & Singh, 2016)

3.6. Glifosat

Glifosat ili N-fosfometil glicin je aktivni sastojak herbicida, koji se primjenjuje na godišnje i višegodišnje korove. Inhibira sintezu aromatskih aminokiselina, to jest enzim 5-enolpiruvilšikamat-3-fosfat sintazu. Glifosat je neselektivni herbicid, koji služi za kontrolu velikog broja korova u poljoprivredi, šumarstvu, voćnjacima, vinogradima (Celis et al., 2008). Iako se u prošlosti smatrao izrazito sigurnim herbicidom za korištenje, dokazano je da glifosat ima negativan utjecaj na ljudsko zdravlje. U podzemnim vodama su često detektirani glifosat i njegov primarni metabolit (aminometilfosfonska kiselina) (Laitinen et al., 2007). Pet do deset dana nakon primjene glifosata dolazi do žućenja i raspada listova zbog inhibicije sinteze aromatskih aminokiselina. Ovisno o adsorpciji na glinenim česticama i o vrsti organskih tvari prisutnih u tlu, mijenja se postojanost glifosata u vremenu (Peñaloza-Vazquez et al., 1995). Primjena glifosata kroz duži vremenski period dovodi do porasta osjetljivosti usjeva na bolesti. U tlu se molekule glifosata apsorbiraju na humus i mogu stvoriti komplekse s metalnim ionima željeza, bakra, magnezija i nikla (Veiga et al., 2001). Glifosat se apsorbira kroz lišće i kroz mekano tkivo biljke. Zatim, on se premješta na područja rasta biljke i inhibira stvaranje aromatskih aminokiselina, poput tirozina, triptofana i fenilalanina. Navedene aminokiseline su nužne za stvaranje proteina i sekundarnih produkata u osjetljivim biljkama. Ovaj mehanizam je prisutan i kod viših biljaka i mikroorganizama, ali ne i kod životinja. Međutim, proizvodi koji sadrže glifosat su izrazito otrovni za životinje (Cox, 1995). Biljke

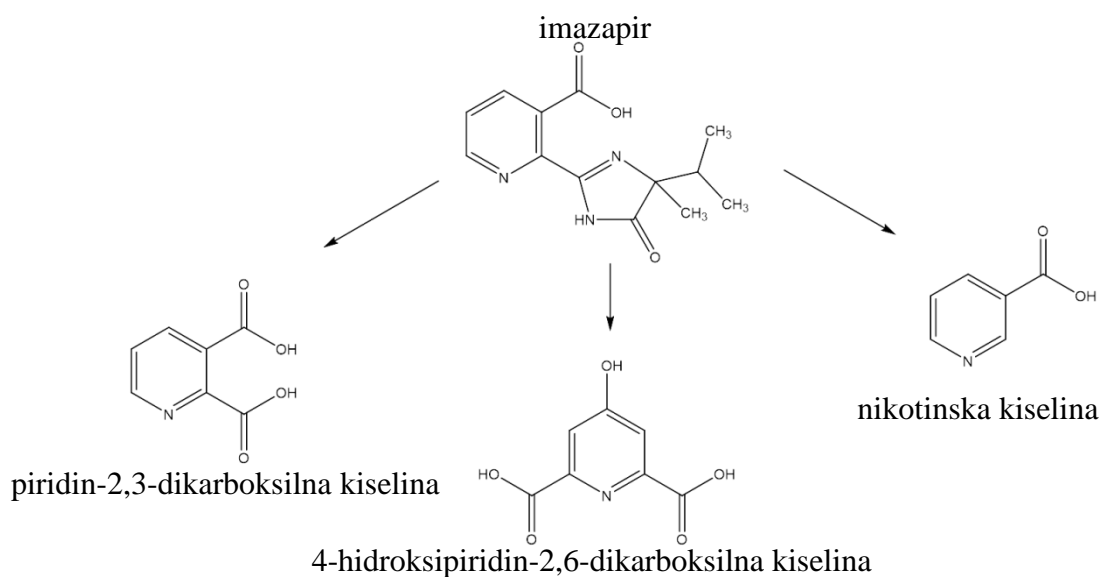
trahirane s glifosatom sporo umiru kroz nekoliko dana ili tjedana. Pošto se glifosat prenosi kroz biljku, niti jedan dio biljke ne preživljava (Duke & Powles, 2008). Glifosat je amfoteran spoj, stabilan na zraku i pod utjecajem svjetlosti. Netopljiv je u organskim otapalima, a potpuno se otapa u vodi zbog visoke polarnosti (Laitinen et al., 2007). Glifosat se može razgraditi u prisutnosti određenih mikroorganizama (slika 3.10.). U prisutnosti bakterija *Arthrobacter atrocyaneus* ili *Enterobacter aerogenes*, dolazi do pucanja veze između atoma ugljika i atoma fosfora, pri djelovanju enzima ugljik-fosfor lipaze (C-P liaza) (Zeleznick et al., 1963). Metilna skupina nastalog N-metilglicina (sarkozin) se može premjestiti do derivata tetrahidrofolne kiseline, kako bi se uključio u metabolizam s jednim ugljikovim atomom, pritom će se spontano stvoriti glicin (Hassan-Abdallah et al., 2005). Međutim, u prisutnosti dioksigena se može N-metilglicin pretvoriti u vodikov peroksid, formaldehid i glicin (Meskys, 2001). U prisutnosti *Geobacillus caldoxylosilyticus* i *Flavobacterium* sp., u prvom koraku pri djelovanju enzima glifosat dehidrogenaze (GD), dolazi do cijepanja karboksimetilen-dušikove veze. Nastali produkti su aminometilfosfonska kiselina (AMPK) i glioksilat. Zatim, dolazi do cijepanja veze između atoma ugljika i fosfora u AMPK-u. Nastali metilamin se uz pomoć enzima MDA pretvara u formaldehid, koji zatim ulazi u C₁ metabolički ciklus (Gard et al., 1997).



Slika 3.10. Dva mehanizma razgradnje glifosata (Singh & Singh, 2016)

3.7. Imazapir

Imazapir je neselektivan herbicid, koji se koristi za kontrolu godišnjih i višegodišnjih trava, širokolisnih grana, listopadnih drveća. Prvi put se pojavio 1984. godine u Sjedinjenim Američkim Državama. Apsorbira ga lišće i korijenje te se prenosi kroz ksilem i floem prema tvornim (meristemskim) tkivima. U meristemskim tkivima se imazapir nakuplja, prekida sintezu proteina i utječe na rast stanica i sintezu DNK. Postojan je u obliku slabe kiseline i 49 %-tne vodene otopine izopropilaminske soli. Svi komercijalni proizvodi imazapira su u obliku vodene otopine izopropilaminske soli. Imazapir je izrazito stabilan u tlu, njegovo vrijeme poluraspada iznosi sedamnaest mjeseci (USEPA, 1984). Nije otrovan za životinje, međutim uzrokuje iritaciju očiju, osip, crvenilo i otekline na mjestu primjene. Zaustavlja biosintezu esencijalnih alifatskih razgranatih aminokiselina u biljkama. Životinjama su nužne esencijalne alifatske razgranate aminokiseline te ih dobivaju prehranom, preko biljaka. Bakterije vrste *Pseudomonas* i *Bacillus* razgrađuju imazapir na tri produkta: 4-hidroksipiridin-2,6-dikarboksilnu kiselinu, piridin-2,3-dikarboksilnu kiselinu i nikotinsku kiselinu (piridin-3-karboksilna kiselina), što je prikazano na slici 3.11. (Singh & Singh, 2016).



Slika 3.11. Mehanizam razgradnje imazapira uz *Pseudomonas* i *Bacillus* (Singh & Singh, 2016)

Provedeno je ispitivanje razgradnje imazapira uz *Pseudomonas* biotipa II, *Bacillus cereus* i bez bakterija. Uzorci su inkubirani 48 sati s imazapirom koncentracije 50 µg/mL na 30 °C.

Bakterije koriste imazapir kao jedini izvor ugljika. Nakon inkubacije je ispitana razgradnja imazapira kod svakog uzorka te je izražena u postocima (Yingdi, 2002).

Tablica 3.1. Razgradnja 50 µg/mL imazapira uz *Pseudomonas* biotipa II i *Bacillus cereus*, nakon 48 sati inkubacije (Xuedong et al., 2005)

Uzorak	Razgradnja imazapira, %
Imazapir	4,9 ± 0,1
Imazapir uz <i>Pseudomonas</i> biotipa II	81,4 ± 5,9
Imazapir uz <i>Bacillus cereus</i>	86,6 ± 6,4

Iz dobivenih vrijednosti razgradnje imazapira (tablica 3.1.) se može zaključiti da uzorci imazapira uz *Pseudomonas* biotipa II i *Bacillus cereus*, imaju mogućnost ubrzane razgradnje imazapira, koncentracije 50 µg/mL. *Bacillus cereus* razgrađuje 86,6 % imazapira, a *Pseudomonas* biotipa II 81,4 % imazapira. Samostalni imazapir se izrazito slabo razgrađuje, tek 4,9 % (Yingdi, 2002). Prema dobivenim vrijednostima razgradnje, dolazi se do zaključka da *Bacillus cereus* ima najveću učinkovitost razgradnje imazapira, nakon 48 sati inkubacije. Bakterije *Pseudomonas* biotipa II i *Bacillus cereus* su izolirane te su provedena daljnja ispitivanja. Navedene bakterije i njihova smjesa su izloženi različitim koncentracijama imazapira, a te koncentracije su 48,7; 97,6; 202,5 i 287,4 µg/mL. U tablici 3.2. su navedene koncentracije preostalog imazapira u µg/mL i postocima nakon razgradnje uz *Pseudomonas* biotipa II, *Bacillus cereus* i njihovom smjesom (Xuedong et al., 2005).

Tablica 3.2. Koncentracija nedisociranog i disociranog imazapira, uz *Pseudomonas* biotipa II, *Bacillus cereus* i njihovu smjesu (Xuedong et al., 2005)

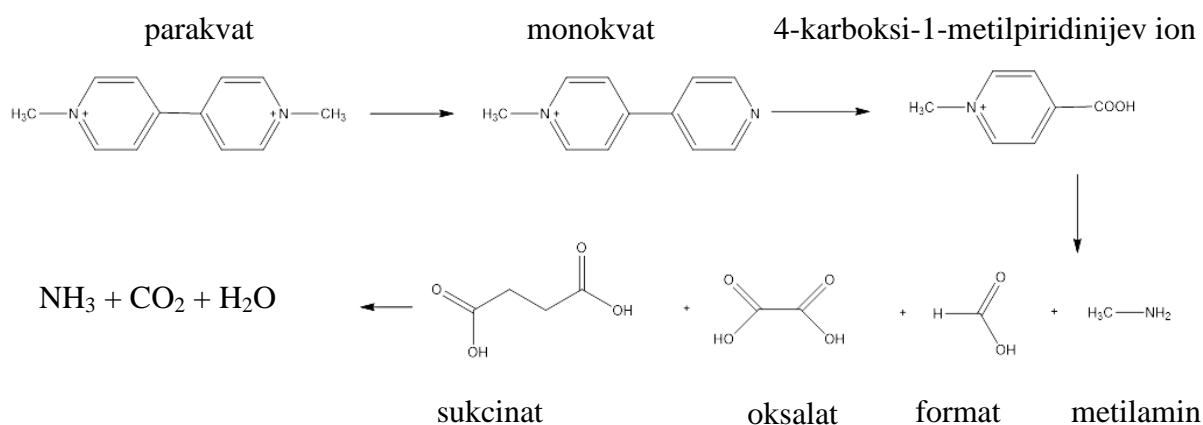
Početna koncentracija imazapira, µg/mL	<i>Pseudomonas</i> biotipa II		<i>Bacillus cereus</i>		Smjesa bakterija	
	Preostali imazapir, µg/mL	Razgradnja, %	Preostali imazapir, µg/mL	Razgradnja, %	Preostali imazapir, µg/mL	Razgradnja, %
48,7	9,1 ± 0,6	81,4	6,5 ± 0,5	86,6	1,6 ± 0,9	96,6
97,6	27,8 ± 1,4	71,5	23,6 ± 1,7	75,8	17,1 ± 1,3	83,4
202,5	136,3 ± 18,8	32,7	160,2 ± 10,0	20,9	61,7 ± 5,8	68,8
287,4	274,5 ± 16,9	4,5	261,2 ± 17,1	9,1	203,6 ± 6,1	31,3

Iz tablice 3.2. se uočava da je najveća razgradnja imazapira kod smjese bakterija i iznosi 96,6 %, pri početnoj koncentraciji 48,7 µg/mL. Pri početnoj koncentraciji 287,4 µg/mL, dolazi samo do 4,5 %-tne razgradnje imazapira, uz *Pseudomonas* biotipa II. To je najslabija razgradnja imazapira, nakon 48 sati inkubacije. Prema tome, porastom početne koncentracije

imazapira, dolazi do smanjenja njegove razgradnje uz bakterije i smjesu bakterija (Xuedong et al., 2005).

3.8. Parakvat

Parakvat ili N,N'-dimetil-4,4'-bipiridin je kvaterni dušikov herbicid, koji služi za kontrolu širokolisnih korova. Neselektivan je spoj koji pri kontaktu uništava zeleno biljno tkivo, ometa fotosintezu i uništava stanične membrane. Time je omogućen izlazak vode te dolazi do ubrzanog sušenja listova. Parakvat ima visoki afinitet za vezanje na glinene minerale i organske tvari u tlu. Pošto ga koža, pluća i sluznica lako apsorbiraju, otrovan je za žive organizme, uključujući ljude (Huang et al., 2012). Kod ispitivanja na životinjama, parakvat je pokazao veliku otrovnost pri njegovom udisanju te je stavljen u najvišu kategoriju otrovnosti, to jest kategoriju jedan (Baldwin et al., 1966). *Pseudomonas* i *Fusarium* su mikroorganizmi koji mogu razgraditi parakvat (slika 3.12.). U prvom stupnju dolazi do izlaska jedne metilne skupine s atoma dušika parakvata (demetilacija) i nastaje monokvat. Zatim, dolazi do oksidativnog cijepanja prstena monokvata i stvara se 4-karboksi-1-metilpiridinijev ion. Ponovno dolazi do oksidativnog cijepanja prstena, nastaju metilamin i tri karboksilne kiseline (oksalat, format, sukcinat). Konačni produkti mikrobiološke razgradnje parakvata su amonijak, voda i ugljikov (IV) oksid (Dinis-Oliveira et al., 2008).



Slika 3.12. Mehanizam razgradnje parakvata uz *Pseudomonas* i *Fusarium* (Huang et al., 2019)

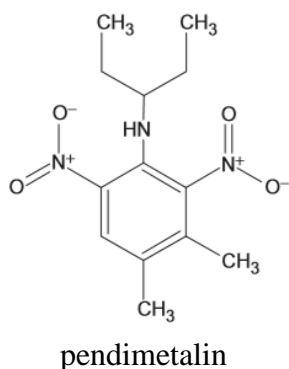
Jedna od karakterističnih osobina parakvata je njegova mogućnost inhibicije protoka elektrona u fotosintezi, točnije u 1. fotosustavu, tako što prima elektrone (Trebst, 1972). Parakvat, u obliku dvovalentnog kationa (PQ^{2+}) prima elektron od reducensa, nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) te se reducira u monovalentni radikal kation parakvata

(PQ⁺). Redukcija dvovalentnog kationa se može odviti u citosolu i mitohondriju, pomoću enzima: NADPH oksidaze, citokroma P₄₅₀ oksidoreduktaze, NADH ubikinon oksidoreduktaze, ksantin oksidaze. U prisutnosti molekule kisika, reducirani radikal kation parakvata (PQ⁺) se brzo reoksidira u dvovalentni kation (PQ²⁺). Pritom, dolazi do redukcije molekule kisika u superoksidni radikal (O₂^{•-}), koji je primjer reaktivnih kisikovih vrsta (Dinis-Oliveira et al., 2008). Reaktivne kisikove vrste su reaktivne molekule i slobodni radikali, koji potječu od molekularnog kisika. Aerobni organizmi najčešće proizvode kisikove radikale. Nastaju kao nusprodukti tijekom mitohondrijskog prijenosa elektrona tijekom aerobnog disanja ili preko oksidoreduktaznih enzima i metal kataliziranih oksidacija (Hancock et al., 2001). Kisik izrazito jednostavno stvara radikale jer atomarni kisik ima dva nesparena elektrona u vanjskoj elektronskoj ljusci. Primanjem elektrona dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, poput superoksida, vodikovog peroksida, hidroksilnog radikala, hidroksidnog iona i dušikovih oksida (McCord & Fridovich, 1968). Nastali superoksidni radikal se može pretvoriti u vodikov peroksid i kisik, pomoću enzima superoksid dismutaze (SOD). Željezov (II) ion ili bakrov (I) ion može reducirati vodikov peroksid na hidroksilni radikal. Ako se kontinuiranom redoks ciklusu parakvata dodaje odgovarajuća količina NADPH i kisika, dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta, koje ovise o koncentraciji NADPH i kisika. Prema tome, omogućena je kontrola proizvodnje unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta. Pri niskim količinama unutarstaničnih reaktivnih kisikovih vrsta dolazi do redoks mehanizma signalizacije (Yee et al., 2004), dok pri visokim količinama potiče se otrovnost parakvata te neurorazgradnja i plućna fibroza (Shukla et al., 2014). Nema poznatih kelatnih sredstava koja mogu vezati parakvat u krvi ili iz drugih tkiva. Neki od načina kontrole parakvata su smanjenje njegove apsorpcije ili poticanje eliminacije, to jest dolazi do modifikacije kinetike otrovnosti parakvata. Ove metode se koriste kako bi se spriječilo nakupljanje parakvata u tkivima, međutim nisu se pokazale izrazito djelotvornima te je visoka stopa smrtnosti (Bismuth et al., 1982). Kako bi se spriječilo oštećenje stanice zbog oksidansa, koriste se brojni antioksidansi. Jedan od primjera antioksidansa je superoksid dismutaza, koja se nalazi u obliku: bakar-cink superoksid dismutaze, mangan superoksid dismutaze i izvanstanične superoksid dismutaze (Fridovich, 1975). Superoksid dismutaza uklanja superoksidni anion, koji je nastao u redoks ciklusu parakvata te na taj način poništava štetno djelovanje parakvata (Block, 1979). Međutim, ponekad dolazi i do neučinkovitog djelovanja superoksid dismutaze. Zbog fizikalno kemijskih svojstava, poput velike molarne mase ili naboja, enzim ne može proći kroz staničnu membranu te ne može zaštititi stanicu (Freeman et al., 1985). Kako bi se spriječilo štetno djelovanje parakvata, koriste se superoksidi niske

molarne mase. Oni mogu proći kroz staničnu membranu i zaštititi endotelne stanice od unutarstaničnih ozljeda uzrokovanih parakvatom (Day et al., 1995). Osim superoksid dismutaze, askorbinska kiselina je također predstavnik antioksidansa. Askorbinska kiselina (vitamin C) je vitamin topljiv u vodi, koji uspješno uklanja slobodne radikale, poput hidroksilnog radikala, peroksidnog radikala i superoksidnog aniona. Ona je dvoelektronski reducens te pruža zaštitu donirajući elektron za redukciju slobodnih radikala (Carr & Frei, 1999). Visoke koncentracije vitamina C se nalaze u plućnoj tekućini, kako bi se zaštitili od stvaranja slobodnih radikala, pri djelovanju toksičnih spojeva iz zraka. Neki od otrovnih spojeva u zraku su ozon i sumporov dioksid (Menzel, 1994). Također, vitamin E je antioksidans topljiv u lipidima, koji uklanja slobodne radikale i stabilizira membrane s polinezasićenim masnim kiselinama (Witting, 2002). Kada se vitamin E primjenjuje u velikim dozama u dužem vremenskom razdoblju, pruža zaštitu od mogućeg oksidativnog oštećenja tkiva (Roehm et al., 1971). Međutim, vitamin E ne pruža zaštitu od parakvata kod životinja koje sadrže dovoljno vitamina E. Kod ljudi, vitamin E se pokazao neuspješnim u borbi protiv trovanja te nije utjecao na razinu lipidne peroksidacije (Yasaka et al., 1986). Jedan od mogućih razloga neuspješnosti vitamina E u obrani od parakvata je njegova topljivost. Antioksidansima topljivima u lipidima treba puno vremena kako bi difundirali kroz staničnu membranu (Newmark et al., 1975).

4. Pendimetalin

Pendimetalin ili N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-kzilidin je dinitroanilinski herbicid, molarne mase 281,312 g/mol s empirijskom formulom $C_{13}H_{19}N_3O_4$ (slika 4.1.) (Strandberg & Scott-Fordsmand, 2004). Primjenjuje se na tla prije ili nakon nicanja kod raznih usjeva, poput pamuka, soje, kukuruza, pšenice, riže, graška. Koristi se za kontrolu godišnjih trava, širokolisnih korova i za poticanje rasta biljaka u tropskim, subtropskim i umjerenim uvjetima. Nakon glifosata i parakvata, pendimetalin je treći najčešće korišteni, selektivni herbicid u svijetu. Nalazi se već 35 godina na tržištu (Ni et al., 2016). Pendimetalin ima nisku isparljivost zbog niskog tlaka pare od 0,4 Pa, pri 25 °C. Isparavanjem pendimetalina s površine tla, gubi se 10 % pendimetalina. Zbog niskog potencijala ispiranja, duže se zadržava u tlu. Njegova hidrofobnost potiče stvaranje fizikalne veze s organskom tvari tla i mineralima gline. Kod poljoprivrednih tla i sedimentnih voda u aerobnim i anaerobnim uvjetima, vrijeme poluraspada pendimetalina iznosi 20 dana (Singh & Singh, 2014). Glavni problem korištenja herbicida je da samo mala količina dolazi do ciljane biljke, a ostatak se akumulira u okoliš, gdje utječe na usjeve, životinje i ljude (Pimentel, 1995). Prekomjerno korištenje pendimetalina dovodi do mogućeg onečišćenja okoliša. Samo 10 % pendimetalina dolazi do ciljanog korova, 10-20 % isparava u prvom tjednu nakon primjene, a ostatak se može raspršiti biološkim ili kemijskim procesom, s vremenom poluraspada između 30 i 200 dana. Prema ovim podacima, uočava se da ima dovoljno vremena za fizikalnu adheziju za tlo, organsku frakciju, sediment i čestice gline (Strandberg & Scott-Fordsmand, 2004). Također, veća je vjerojatnost za ulazak pendimetalina u hranjivi lanac, raspad na otrovne dušikove okside i manja vjerojatnost razgradnje. Osim toga, pendimetalin toksikološki utječe na floru i faunu preko indirektnog i direktnog izlaganja. Povećano izlaganje pendimetalinu, povećava vjerojatnost za rak pluća i gušterače (Ahmad et al., 2016).



Slika 4.1. Struktura pendimetalina (Singh & Singh, 2016)

5. Metode razgradnje pendimetalina u okolišu

Jedan od najvažnijih procesa koji utječe na ponašanje herbicida u okolišu je njegova razgradnja u tlu. Na razgradnju pendimetalina u tlu utječu smjese različitih pesticida, udio vlage i fotokemijske reakcije.

5.1. Utjecaj pesticidnih smjesa

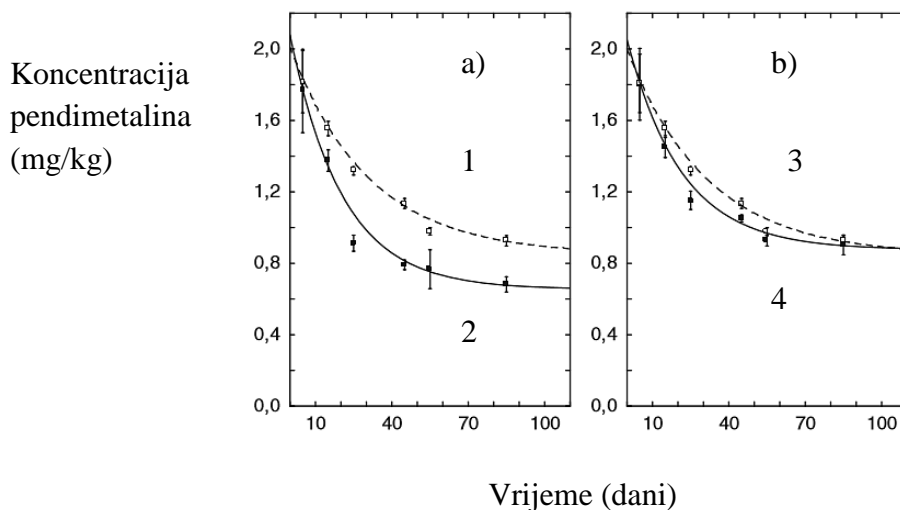
Ispitani su utjecaji smjese pendimetalina s tiametoksamom, metribuzinom, mankozebom ili s tiametoksamom i mankozebom na razgradnju pendimetalina u tlu. Iz tablice 5.1. se uočava da dodatkom pesticida, pendimetalinu, dolazi do povećanja vremena poluraspada pendimetalina u tlu. Samostalni pendimetalin ima najmanje vrijeme poluraspada u pješčanoj ilovači te iznosi 26,9 dana. Od svih ispitivanih smjesa, smjesa pendimetalina i metribuzina ima najmanje vrijeme poluraspada u pješčanoj i glinenoj ilovači, koje iznosi 28,7 dana, odnosno 37,7 dana. Najveće vrijeme poluraspada u pješčanoj ilovači, pendimetalin ima u smjesi s tiametoksamom i mankozebom. Dok, u glinenoj ilovači, pendimetalin ima najveće vrijeme poluraspada u smjesi s mankozebom. Samostalni pendimetalin ima najmanje vrijeme poluraspada u glinenoj ilovači, nakon smjese pendimetalina i metribuzina. Prema tome, najveći utjecaj na razgradnju pendimetalina imaju smjese pendimetalina s mankozebom i s tiametoksamom i mankozebom (Swarcewicz & Gregorczyk, 2012).

Tablica 5.1. Utjecaj smjese pesticida na razgradnju pendimetalina u tlu pri 60 %-tnom kapacitetu polja, pri temperaturi 22 ± 2 °C (Swarcewicz & Gregorczyk, 2012)

Vrste pesticida	Vrijeme poluraspada pendimetalina u tlu (dani)	
	pješčana ilovača	glinena ilovača
pendimetalin	26,9	44,4
pendimetalin + tiametoksam	35,6	54,4
pendimetalin + metribuzin	28,7	37,7
pendimetalin + mankozeb	46,1	63,9
pendimetalin + tiametoksam + mankozeb	62,2	63,3

Na slici 5.1. je prikazana ovisnost koncentracije pendimetalina o vremenu, u pješčanoj (a) i glinenoj (b) ilovači, za samostalni pendimetalin i smjesu pendimetalina s tiametoksamom i mankozebom. U prvih trideset dana, dolazi do ubrzane razgradnje pendimetalina u oba tla. Nakon trideset dana, dolazi do usporavanja razgradnje pendimetalina. Nakon 100 dana, razgrađuje se 55 % pendimetalina u smjesi s tiametoksamom i mankozebom, u pješčanoj i glinenoj ilovači. Međutim, veći postotak pendimetalina se razgrađuje u pješčanoj ilovači, u

odnosu na glinenu ilovaču. U pješčanoj ilovači se razgrađuje 67,5 % pendimetalina, a u glinenoj ilovači 55 % pendimetalina. Iz dobivenih vrijednosti se zaključuje da se pendimetalin samostalno znatno bolje razgrađuje u pješčanoj ilovači, u odnosu na glinenu ilovaču. Osim toga, isti je postotak razgradnje pendimetalina u smjesi s tiametoksamom i mankozebom i kod samostalnog pendimetalina, u glinenoj ilovači (Swarcewicz & Gregorczyk, 2012).



Slika 5.1. Ovisnost koncentracije pendimetalina o vremenu u pješčanoj (a) i glinenoj (b) ilovači, gdje su: 1 i 3 smjese pendimetalina s tiametoksamom i mankozebom, a 2 i 4 samostalni pendimetalin (Swarcewicz & Gregorczyk, 2012)

5.2. Utjecaj vlažnosti tla

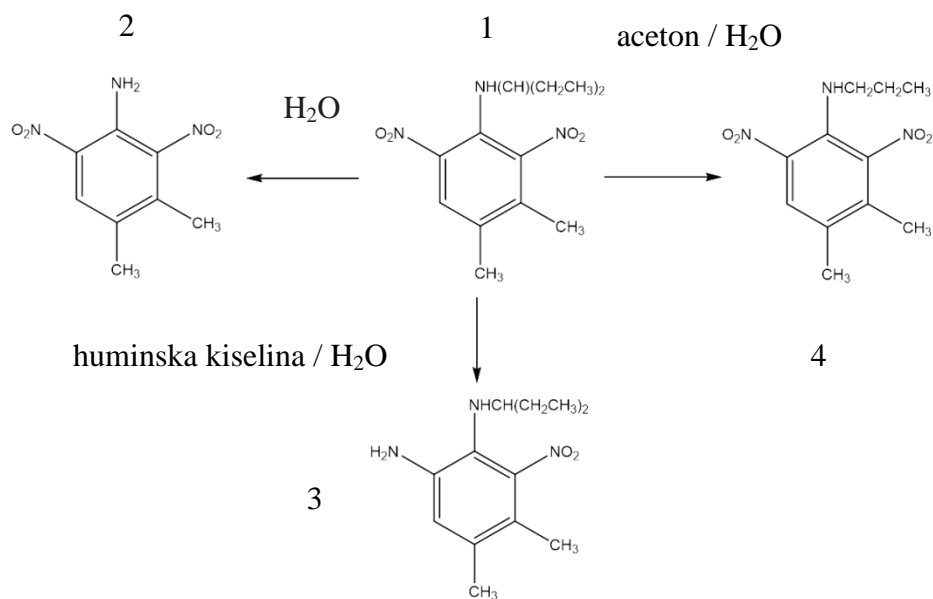
Osim vrsta pesticidnih smjesa, na raspad pendimetalina utječe i vlažnost tla. U tablici 5.2. su prikazani podaci za vrijeme poluraspada pendimetalina u različitim smjesama, u pješčanoj i glinenoj ilovači, pri 30 %-tnom i 90 %-tnom udjelu vlage (Swarcewicz & Gregorczyk, 2012). Pri 30 %-tnom udjelu vlage, najmanje vrijeme poluraspada pendimetalina, u pješčanoj ilovači, je u smjesi s mankozebom. Dok, u glinenoj ilovači, najmanje vrijeme poluraspada ima samostalni pendimetalin. Pri 90 %-tnom udjelu vlage, najmanje vrijeme poluraspada je kod samostalnog pendimetalina u pješčanoj i glinenoj ilovači te iznosi 21,9 dana, odnosno 27,9 dana. Najveće vrijeme poluraspada pendimetalina je u smjesi s mankozebom i u smjesi s tiametoksamom i mankozebom u pješčanoj, odnosno glinenoj ilovači. Porastom udjela vlage s 30 % na 90 %, dolazi do četverostrukog smanjenja vremena poluraspada pendimetalina za sve uzorke. Iznimka su smjesa pendimetalina s mankozebom i smjesa pendimetalina s tiametoksamom i mankozebom. Prema tome, porastom udjela vlage, smanjuje se vrijeme poluraspada pendimetalina (Swarcewicz & Gregorczyk, 2012).

Tablica 5.2. Prikaz vremena poluraspada samostalnog pendimetalina (P), u smjesi s tiametoksamom (P + T), mankozebom (P + M), tiametoksamom i mankozebom (P + T + M), za 30 %-tni i 90 %-tni udio vlage, u pješčanoj i glinenoj ilovači (Swarcewicz & Gregorczyk, 2012)

Udio vlage (%)	Vrijeme poluraspada pendimetalina u tlu (dani)							
	pješčana ilovača				glinena ilovača			
	P	P + T	P + M	P + T + M	P	P + T	P + M	P + T + M
30	94,6	80,0	77,4	121,8	112,7	118,4	134,5	150,9
90	21,9	24,4	34,2	33,5	27,9	29,7	55,2	65,7

5.3. Fotorazgradnja pendimetalina

Fotokemijske reakcije su najvažniji abiotički kemijski faktori, koji utječu na ponašanje herbicida. Primjeri abiotičkih kemijskih faktora su svjetlost, temperatura, pH, vjetar, vlažnost. U vodenim sustavima, fotokemijske reakcije imaju glavnu ulogu pri razgradnji herbicida. Dok, u tlu su fotokemijske reakcije značajne samo na površini. Međutim, kada je površina vlažna, fotokemijske reakcije se mogu odvititi na adsorbiranom dijelu i dijelu otopljenom u vodi. Modelne reakcije u vodenim otopinama simuliraju fotoreakcije, kemikalija otopljenih u vodenoj fazi tla te u suspenziji vode i tla. Kod pendimetalina dolazi do direktne i indirektna fotolize, u prisutnosti čestica tla (slika 5.2.) (Scheunert et al., 1993). Pri valnim duljinama manjim ili jednakim 290 nm, dolazi do direktne fotolize pendimetalina u vodi. Direktnom fotolizom, dolazi do N-dealkilacije pendimetalina (1) i nastaje 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin (2). Do indirektna fotolize pendimetalina, dolazi pri valnim duljinama većim ili jednakim 290 nm, u vodenoj otopini huminske kiseline. Huminska kiselina potiče redukciju nitro skupine pendimetalina u položaju 6, u amino skupinu te nastaje 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin (3). Pri valnoj duljini većoj ili jednakoj 290 nm, uz dodatak acetona, dolazi do izlaska etilne skupine pendimetalina. Dodatkom acetona, nastaje 2,6-dinitro-N-(1-propil)-3,4-ksilidin (4) (Scheunert et al., 1993).



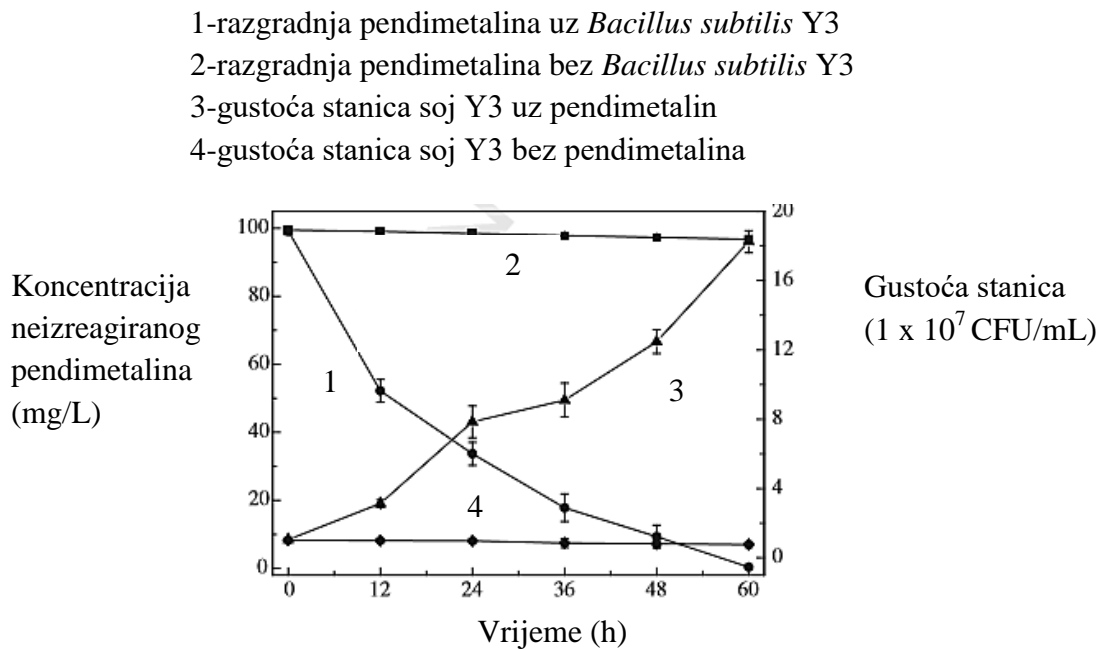
Slika 5.2. Mehanizam direktne i indirektne fotolize pendimetalina, gdje su: 1- pendimetalin, 2- 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin, 3- 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin, 4- 2,6-dinitro-N-(1-propil)-3,4-ksilidin (Scheunert et al., 1993)

6. Mikrobiološka razgradnja pendimetalina

Najvažniji način razgradnje pendimetalina je mikrobiološka razgradnja, pomoću različitih bakterija i gljivica. Razgradnja pendimetalina može započeti oksidativnom N-dealkilacijom, ciklizacijom ili nitroredukcijom (Kole et al., 1994). N-dealkilacijom dolazi do izlaska etilpropilne skupine, vezane na dušik amino skupine, uz pomoć enzima pendimetalin-N-dealkilaze. Produkti N-dealkilacije su 2,6-dinitro-3,4-dimetilanilin i pentan, gdje se pentan koristi kao izvor ugljika (Megadi et al., 2010). Nitroredukcijom dolazi do redukcije nitro skupine pendimetalina u amino skupinu, u položaju 6 aromatskog prstena. Nitroredukcija se odvija uz pendimetalin nitroreduktazu, kojoj je nužan elektron donor, NAD(P)H. Produkt nitroredukcije je 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin (Ni et al., 2016). Bakterije koje razgrađuju pendimetalin su *Bacillus subtilis* Y3, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida*, *Azotobacter chroococcum*, *Bacillus lehensis* XJU, *Bacillus circulans*.

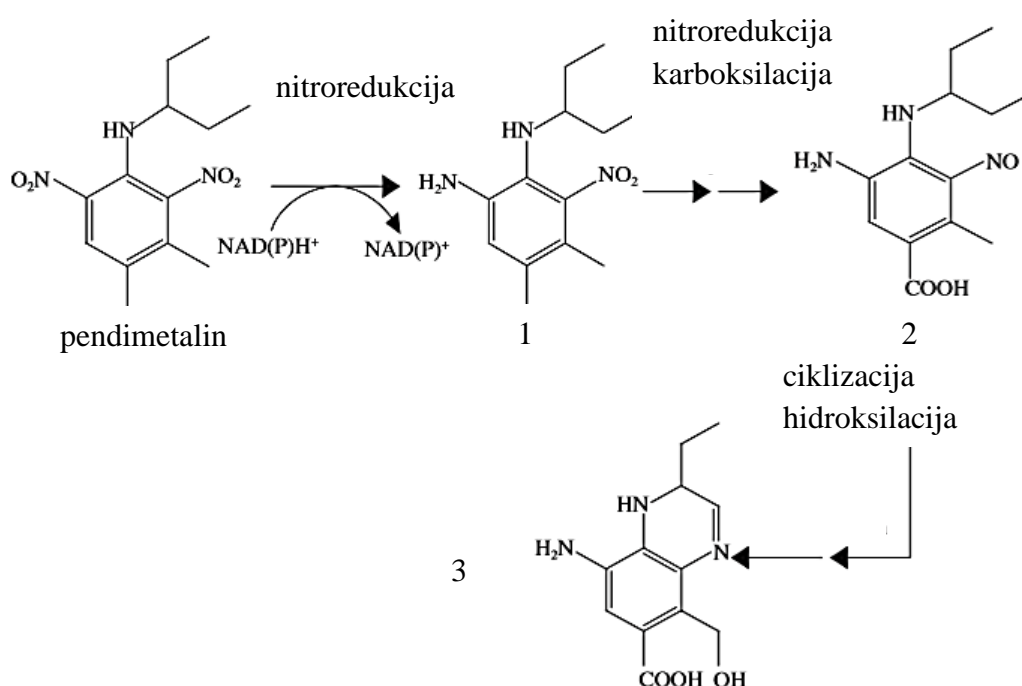
6.1. *Bacillus subtilis* Y3

Bacillus subtilis Y3 je jedan od mikroorganizama, koji razgrađuje pendimetalin. Ovisnost koncentracije pendimetalina, odnosno gustoće stanica *Bacillus subtilis* Y3 o vremenu inkubacije je prikazana na slici 6.1. (Ni et al., 2015). Nakon 36 sati inkubiranja pendimetalina uz *Bacillus subtilis* Y3, dolazi do 80 %-tne razgradnje pendimetalina masene koncentracije 100 mg/L (krivulja 1). Do 99,9 %-tne razgradnje pendimetalina, dolazi nakon 60 sati inkubacije, uz *Bacillus subtilis* Y3 (krivulja 1). Nakon 60 sati, samo se 3,2 % pendimetalina razgrađuje, kada nije prisutan *Bacillus subtilis* Y3 (krivulja 2). Gustoća stanica soj Y3, nakon 36 sati inkubacije s pendimetalinom iznosi 9×10^7 CFU/mL. CFU/mL predstavlja broj jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture, a računa se kao deseterostruki umnožak broja kolonija i broja kojim se koncentracija uzorka pomnoži, kako bi se dobila početna koncentracija. Maksimalna gustoća stanica soj Y3 ($1,83 \times 10^8$ CFU/mL) se postiže nakon 60 sati inkubacije uz pendimetalin (krivulja 3). Najmanja gustoća stanica soj Y3, bez pendimetalina iznosi 1×10^7 CFU/mL te se ne mijenja tijekom 60 sati (krivulja 4). Iz dobivenih podataka se može zaključiti da *Bacillus subtilis* Y3 izvrsno razgrađuje pendimetalin. Pendimetalin se samostalno izrazito slabo razgrađuje nakon 60 sati, tek 3,2 % pendimetalina se razgradi. Također, ne dolazi do rasta gustoće stanica soj Y3, bez prisutnosti pendimetalina (Ni et al., 2015).



Slika 6.1. Ovisnost koncentracije neizreagiranog pendimetalina i gustoće stanica *Bacillus subtilis* Y3 o vremenu (Ni et al., 2015)

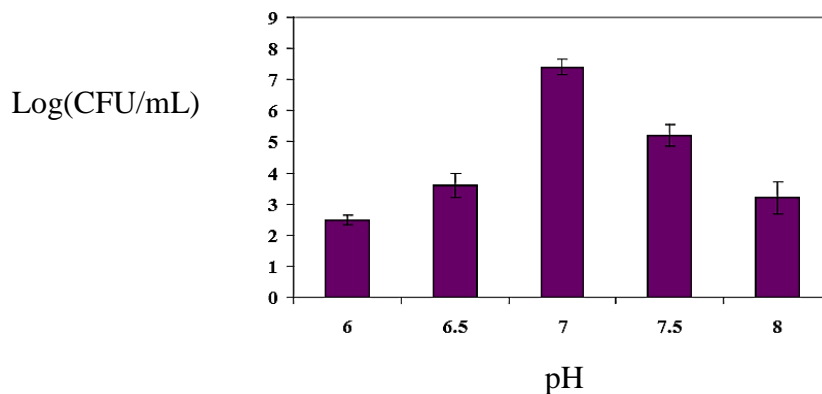
Mehanizam razgradnje pendimetalina uz *Bacillus subtilis* Y3 započinje nitroredukcijom nitro skupine u amino skupinu, koja je vezana na C6 atom aromatskog prstena. Nitroredukciju katalizira enzim pendimetalin nitroreduktaza, uz NAD(P)H kao elektron donor te nastaje 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin (1). Zatim, dolazi do nitroredukcije nitro skupine vezane na C2 atom aromatskog prstena u nitrozo skupinu (-NO) i karboksilacije metilne skupine vezane na C4 atom aromatskog prstena te nastaje 5-amino-2-metil-3-nitrozo-4-(pentan-3-ilamino) benzojeva kiselina (2). U zadnjem koraku, dolazi do ciklizacije i hidroksilacije te nastaje 8-amino-2-etil-5-(hidroksimetil)-1,2-dihidrokinoksalin-6-karboksilna kiselina (3) (Ni et al., 2015).



Slika 6.2. Razgradnja pendimetalina uz *Bacillus subtilis* Y3 na metabolite: 1: 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin, 2: 5-amino-2-metil-3-nitrozo-4-(pentan-3-ilamino) benzojeva kiselina, 3: 8-amino-2-etil-5-(hidroksimetil)-1,2-dihidrokinoksalin-6-karboksilna kiselina (Ni et al., 2015)

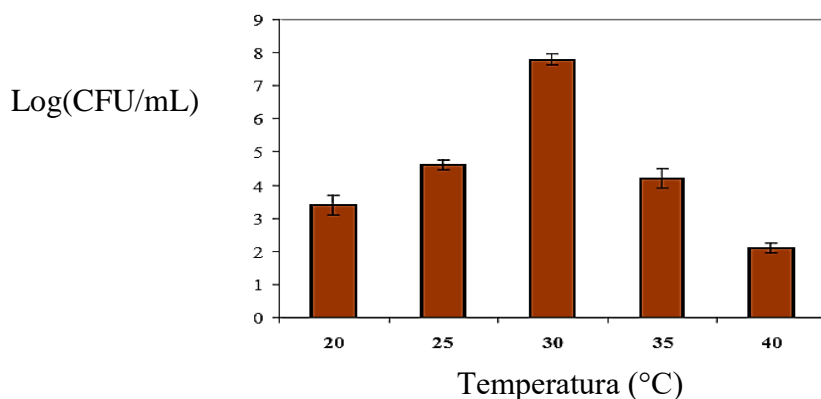
6.2. *Bacillus megaterium*

Osim *Bacillus subtilis* Y3, *Bacillus megaterium* ima mogućnost razgradnje pendimetalina. Međutim, nisu poznati produkti razgradnje pendimetalina uz *Bacillus megaterium*. Ovisnost rasta *Bacillus megaterium* o pH vrijednosti, uz pendimetalin kao izvor ugljika je prikazana na slici 6.3. (Belal & Hasan, 2013).



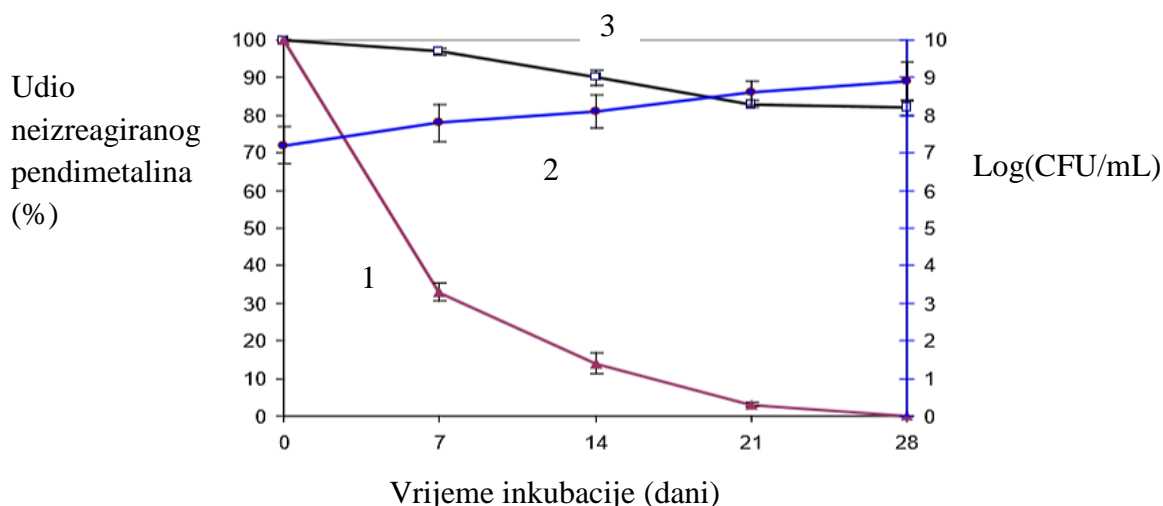
Slika 6.3. Ovisnost logaritma jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture (log(CFU/mL)) o pH, za *Bacillus megaterium*, uz pendimetalin kao izvor ugljika (Belal & Hasan, 2013)

Iz slike 6.3. se uočava da je najveći rast *Bacillus megaterium* pri pH 7, a najmanji rast pri pH 6. Većini bakterija odgovara neutralni pH (pH=7), što je slučaj i kod *Bacillus megaterium*. Međutim, *Bacillus megaterium* postiže zadovoljavajući rast, pri svim ispitivanim pH vrijednostima, odnosno između pH 6 i 8. Osim pH vrijednosti, temperatura utječe na rast *Bacillus megaterium*, uz pendimetalin kao izvor ugljika. Na slici 6.4. je prikazana ovisnost rasta *Bacillus megaterium* o temperaturi, uz pendimetalin kao izvor ugljika. Najveći rast *Bacillus megaterium* se postiže pri 30 °C, a najmanji rast pri 40 °C. Pri svim ispitivanim temperaturama, odnosno od 20 do 40 °C se postiže zadovoljavajući rast *Bacillus megaterium* (Belal & Hasan, 2013).



Slika 6.4. Ovisnost logaritma jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture (log(CFU/mL)) o temperaturi za *Bacillus megaterium*, uz pendimetalin kao izvor ugljika (Belal & Hasan, 2013)

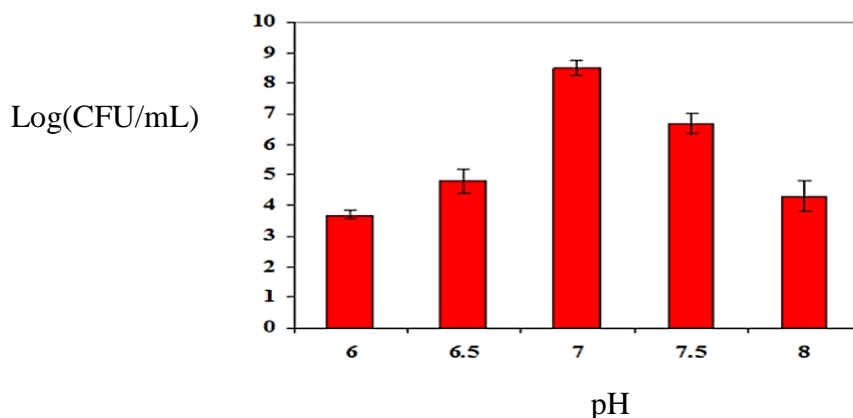
Bacillus megaterium je izrazito učinkovit mikroorganizam pri razgradnji pendimetalina, to jest u potpunosti razgrađuje pendimetalin. Na slici 6.5. je prikazana ovisnost koncentracije pendimetalina i rasta *Bacillus megaterium* o vremenu inkubacije, u vodenom sustavu. Vrijeme poluraspada pendimetalina uz *Bacillus megaterium* iznosi 5,6 dana. Dok, u netretiranom tekućem mediju, vrijeme poluraspada pendimetalina iznosi 53,4 dana. Nakon 28 dana inkubacije pendimetalina uz *Bacillus megaterium*, dolazi do potpune razgradnje pendimetalina (krivulja 1). Porastom udjela razgrađenog pendimetalina, dolazi do postupnog rasta *Bacillus megaterium*. Nakon 28 dana, dolazi do povećanja broja kolonija *Bacillus megaterium* po mililitru početne kulture za 100 puta, to jest s početnih deset milijuna (10^7) na jednu milijardu kolonija (10^9) (krivulja 2). U kontrolnom uzorku, odnosno u uzorku bez *Bacillus megaterium*, nakon 28 dana, dolazi samo do 17 %-tne razgradnje pendimetalina (krivulja 3) (Belal & Hasan, 2013).



Slika 6.5. Ovisnost neizreagiranog pendimetalina i logaritma jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture ($\log(\text{CFU/mL})$) o vremenu inkubacije, za *Bacillus megaterium*, gdje je: 1- raspad pendimetalina uz *Bacillus megaterium*, 2- rast *Bacillus megaterium*, 3- raspad pendimetalina bez *Bacillus megaterium* (Belal & Hasan, 2013)

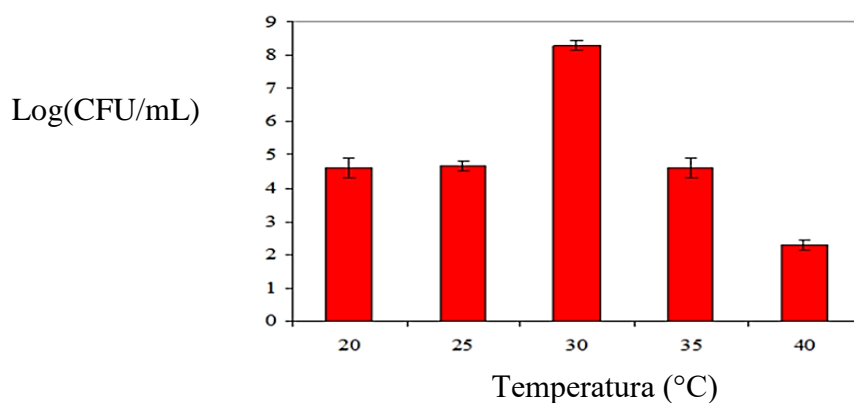
6.3. *Pseudomonas putida*

Također, *Pseudomonas putida* ima mogućnost razgradnje pendimetalina. pH i temperatura imaju velik utjecaj na rast *Pseudomonas putida*. Na slici 6.6. je prikazana ovisnost rasta *Pseudomonas putida* o pH vrijednosti, uz pendimetalin kao izvor ugljika (Elsayed & El-Nady, 2013).



Slika 6.6. Ovisnost logaritma jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture (log(CFU/mL)) o pH, za *Pseudomonas putida*, uz pendimetalin kao izvor ugljika (Elsayed & El-Nady, 2013)

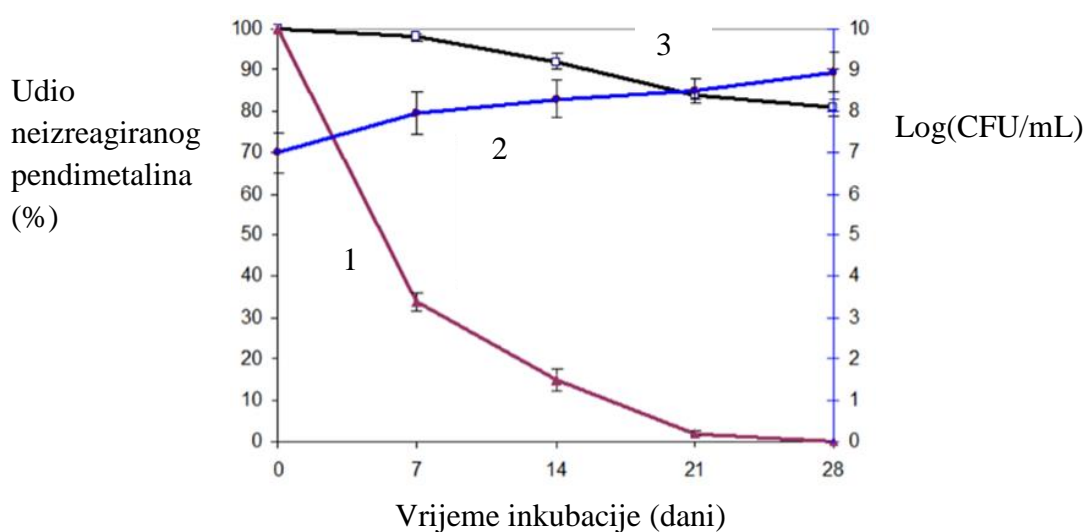
Najveći rast *Pseudomonas putida* se postiže pri pH 7, a najmanji rast pri pH 6. Kao i *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas putida* može rasti pri pH vrijednostima između 6 i 8. Pri svim ispitivanim pH vrijednostima, veći je rast *Pseudomonas putida* u odnosu na *Bacillus megaterium*. Na slici 6.7. je prikazana ovisnost rasta *Pseudomonas putida* o temperaturi, uz pendimetalin kao izvor ugljika. Pri 30 °C se postiže najveći rast *Pseudomonas putida*, a pri 40 °C najmanji rast. Pri svim ispitivanim temperaturama, odnosno između 20 i 40 °C se postiže zadovoljavajući rast *Pseudomonas putida*. Pri svim ispitivanim temperaturama, rast *Pseudomonas putida* je veći ili jednak rastu *Bacillus megaterium* (Elsayed & El-Nady, 2013).



Slika 6.7. Ovisnost logaritma jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture (log(CFU/mL)) o temperaturi, za *Pseudomonas putida*, uz pendimetalin kao izvor ugljika (Elsayed & El-Nady, 2013)

Na slici 6.8. je prikazana ovisnost koncentracije pendimetalina i rasta *Pseudomonas putida* o vremenu inkubacije, u vodenom sustavu. Vrijeme poluraspada pendimetalina uz

Pseudomonas putida iznosi 5,46 dana, što je manje u odnosu na *Bacillus megaterium*. Nakon 28 dana inkubacije pendimetalina uz *Pseudomonas putida*, dolazi do potpune razgradnje pendimetalina (krivulja 1). Međutim, u netretiranom tekućem mediju, vrijeme poluraspada pendimetalina iznosi 62,43 dana. Porastom razgradnje pendimetalina, dolazi do povećanja broja kolonija *Pseudomonas putida*. Nakon 28 dana, sto puta se povećao broj kolonija *Pseudomonas putida* po mililitru početne kulture, to jest s početnih deset milijuna (10^7) na jednu milijardu kolonija (10^9), kao i kod *Bacillus megaterium* (krivulja 2). U kontrolnom uzorku, odnosno bez *Pseudomonas putida*, samo se 17 % pendimetalina razgrađuje (krivulja 3) (Elsayed & El-Nady, 2013).

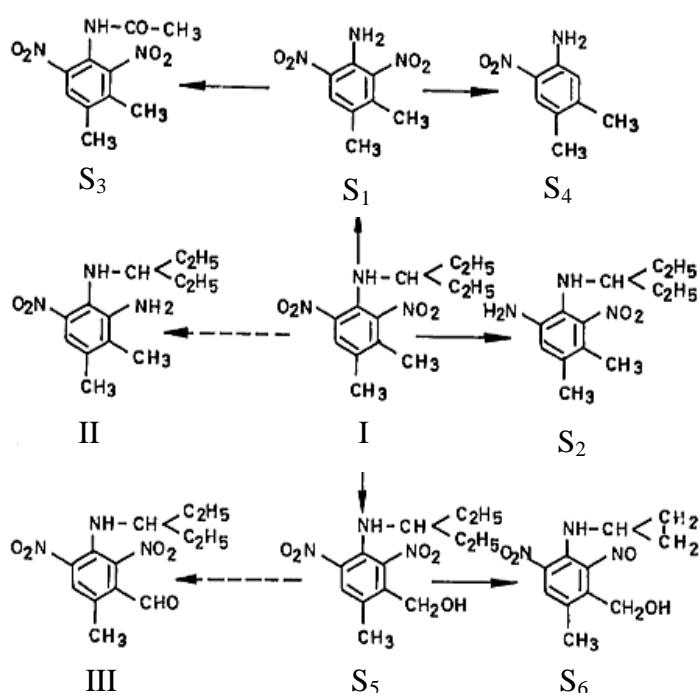


Slika 6.8. Ovisnost neizreagiranog pendimetalina i logaritma jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture ($\log(\text{CFU}/\text{mL})$) o vremenu inkubacije, za *Pseudomonas putida*, gdje je: 1- raspad pendimetalina uz *Pseudomonas putida*, 2- rast *Pseudomonas putida*, 3- raspad pendimetalina bez *Pseudomonas putida* (Elsayed & El-Nady, 2013)

6.4. *Azotobacter chroococcum*

Osim *Pseudomonas putida*, *Azotobacter chroococcum* ima mogućnost razgradnje pendimetalina (slika 6.9.). N-dealkilacijom pendimetalina (I) dolazi do izlaska etilpropilne skupine i stvaranja 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilina (S_1). Zatim, dolazi do acetilacije, to jest vezanja acetilne skupine na dušik amino skupine. Nastali produkt je N-(3,4-dimetil-2,6-dinitrofenil) acetamid (S_3). Također, direktnom eliminacijom nitro skupine u položaju 2 bez supstitucije, iz S_1 nastaje 4,5-dimetil-2-nitroanilin (S_4). Moguća je i razgradnja pendimetalina na 6-aminopendimetalin i 2-aminopendimetalin. Redukcijom nitro skupine pendimetalina u

amino skupinu, u položaju 6, nastaje 6-aminopendimetalin (S_2). Osim redukcije nitro skupine u položaju 6, dolazi do redukcije nitro skupine u položaju 2 te nastaje sporedni produkt, 2-aminopendimetalin (II) (Barua et al., 1990). Oksidacijom metilne skupine pendimetalina u položaju 3 benzenskog prstena, nastaje manjinski produkt, 2-metil-4,6-dinitro-N-(5-etilpropil) benzil alkohol (S_5). Zatim, dolazi do djelomične redukcije nitro skupine u položaju 6 u nitrozo skupinu (-NO), N-dealkilacije i oksidativne ciklizacije. Nastali produkt je 2-metil-4-nitro-5-N-(1-ciklopropil)-6-nitrozobenzil alkohol (S_6). Također, oksidacijom hidroksilne skupine u aldehidnu skupinu iz S_5 nastaje 2-metil-4,6-dinitro-5-(1-etilpropil amino) benzaldehid (III) (Pal et al., 1991).

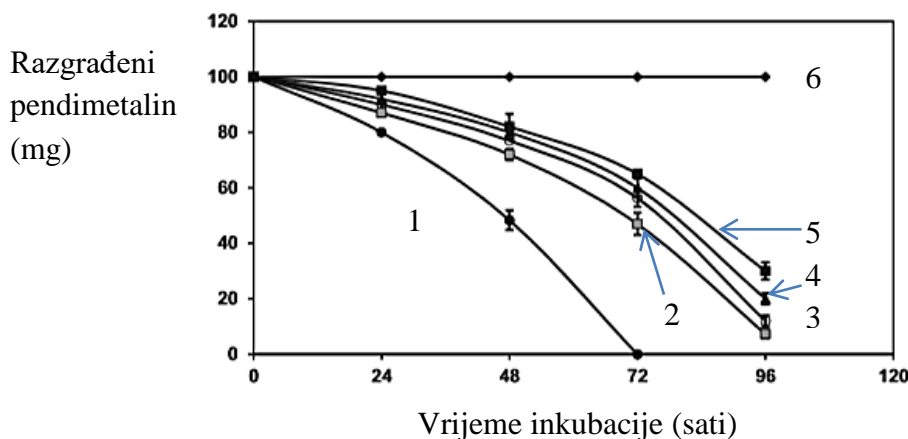


Slika 6.9. Razgradnja pendimetalina uz *Azotobacter chroococcum* (Kole et al., 1994)

Azotobacter chroococcum koristi C-dealkilaciju, kako bi se došlo do hidroksilacije na položaju C3 aromatskog prstena, S_5 i S_6 su međuprodukti procesa. Hidroksilacija prstena se može odviti na C1 (nakon N-dealkilacije), na C2 i C6 nakon redukcije nitro skupine i oksidativne deaminacije. *Azotobacter chroococcum* preferira C6 položaj pri hidroksilaciji prstena, u odnosu na C2 položaj. Prema tome, S_1 , S_2 , S_4 , S_5 i S_6 su najvjerojatniji međuprodukti za cijepanje aromatskog prstena pendimetalina (Kole et al., 1994).

6.5. *Bacillus lehensis* XJU

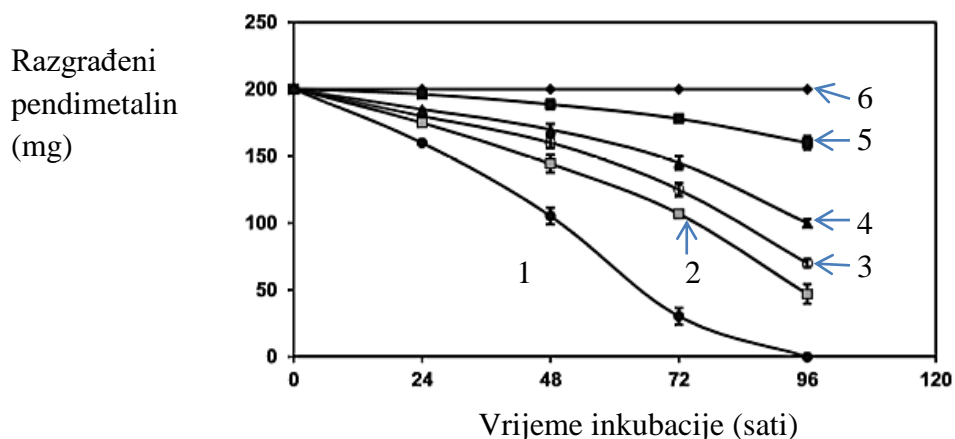
Bacillus lehensis XJU može razgraditi pendimetalin na dva glavna metabolita, 6-aminopendimetalin i 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin. 6-aminopendimetalin nastaje redukcijom nitro skupine pendimetalina u amino skupinu, u položaju šest aromatskog prstena. Također, dolazi do N-dealkilacije, kojom se pendimetalin razgrađuje na 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin i pentan. Glavni produkti razgradnje pendimetalina uz *Bacillus lehensis* XJU, isti su kao i kod *Bacillus circulans*. Pri niskoj koncentraciji pendimetalina 1 g/L, provedeno je ispitivanje razgradnje pendimetalina na različitim podlogama. Ovisnost razgradnje pendimetalina uz *Bacillus lehensis* XJU, imobiliziranim na različitim podlogama, o vremenu je prikazana na slici 6.10.. Nakon 72 sata inkubacije, pendimetalina s imobiliziranim stanicama na poliuretanskoj pjeni (1), dolazi do potpune razgradnje pendimetalina. Stanice imobilizirane na poliakrilamidu (2), natrijevom alginatu (3), agaru (4) i slobodne suspendirane stanice (5), približno jednako razgrađuju pendimetalin, nakon 96 sati inkubacije. Međutim, kod kontrolnog uzorka bez stanica *Bacillus lehensis* XJU (6), ne dolazi do razgradnje pendimetalina (Tallur et al., 2015).



Slika 6.10. Ovisnost razgradnje pendimetalina uz *Bacillus lehensis* XJU, o vremenu inkubacije, za početnu koncentraciju pendimetalina 1 g/L (Tallur et al., 2015)

Porastom koncentracije pendimetalina na 2 g/L (slika 6.11.), dolazi do smanjenja brzine razgradnje pendimetalina, u svim medijima. Međutim, nakon 96 sati dolazi do potpune razgradnje pendimetalina sa stanicama na poliuretanskoj pjeni (1). Nakon stanica u poliuretanskoj pjeni, dolazi do najveće razgradnje pendimetalina na poliakrilamidu (2) te iznosi 75 %. Na preostalim medijima i kod slobodnih suspendiranih stanica, dolazi do

50-70 %-tne razgradnje pendimetalina. Međutim, ne dolazi do razgradnje pendimetalina u uzorku bez stanica *Bacillus lehensis* XJU (6) (Tallur et al., 2015).

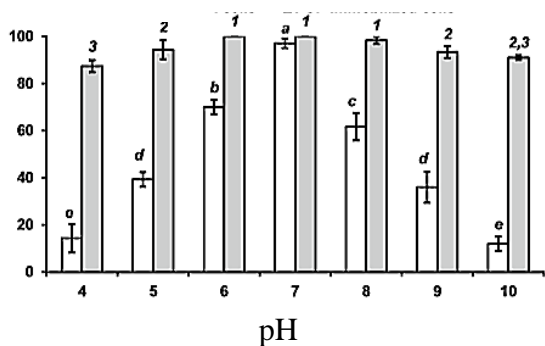


Slika 6.11. Ovisnost razgradnje pendimetalina uz *Bacillus lehensis* XJU, o vremenu inkubacije, za početnu koncentraciju pendimetalina 2 g/L (Tallur et al., 2015)

Porastom koncentracije pendimetalina, dolazi do smanjenja brzine razgradnje pendimetalina uz stanice *Bacillus lehensis* XJU. Pri obje koncentracije pendimetalina, u potpunosti se razgrađuje pendimetalin, uz stanice na poliuretanskoj pjenu. Međutim, nakon 96 sati, ne dolazi do razgradnje uzorka pendimetalina, bez stanica *Bacillus lehensis* XJU. Ispitana je ovisnost razgradnje pendimetalina koncentracije 1 g/L, uz slobodne suspendirane stanice i stanice imobilizirane na poliuretanskoj pjenu, o pH i temperaturi (slika 6.12.) (Tallur et al., 2015). Pri pH 6, 7 i 8, uz stanice imobilizirane na poliuretanskoj pjenu, dolazi do potpune razgradnje pendimetalina (slika 6.12. a). Do najmanje učinkovitosti razgradnje pendimetalina, uz stanice imobilizirane na poliuretanskoj pjenu, dolazi pri pH 4 te iznosi 88 %. Slobodne suspendirane stanice ne razgrađuju sav pendimetalin pri svim pH vrijednostima. Pri pH 7 je najveća razgradnja pendimetalina i iznosi 98 %. Međutim, pri pH 10, dolazi do najmanje razgradnje pendimetalina, to jest 12 %-tne razgradnje pendimetalina. Pri svim pH vrijednostima, stanice imobilizirane na poliuretanskoj pjenu razgrađuju veći postotak pendimetalina, u odnosu na slobodne suspendirane stanice (Tallur et al., 2015). Stanice imobilizirane na poliuretanskoj pjenu u potpunosti razgrađuju pendimetalin pri 25, 30 i 35 °C (slika 6.12. b). Pri 45 °C je najslabija razgradnja pendimetalina i iznosi 85 %. Slobodne suspendirane stanice samo pri 30 °C u potpunosti razgrađuju pendimetalin. Najmanja razgradnja pendimetalina je pri 45 °C te iznosi 35 %. Pri svim temperatura se pendimetalin bolje razgrađuje na poliuretanskoj pjenu, u odnosu na slobodne imobilizirane stanice (Tallur et al., 2015).

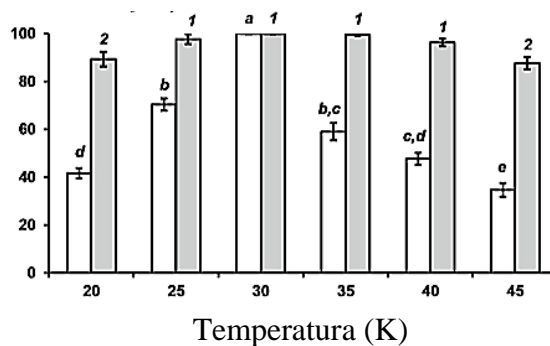
Razgrađeni
pendimetalin
(%)

a)



Razgrađeni
pendimetalin
(%)

b)



□ slobodne suspendirane stanice ■ stanice imobilizirane na poliuretanskoj pjenu

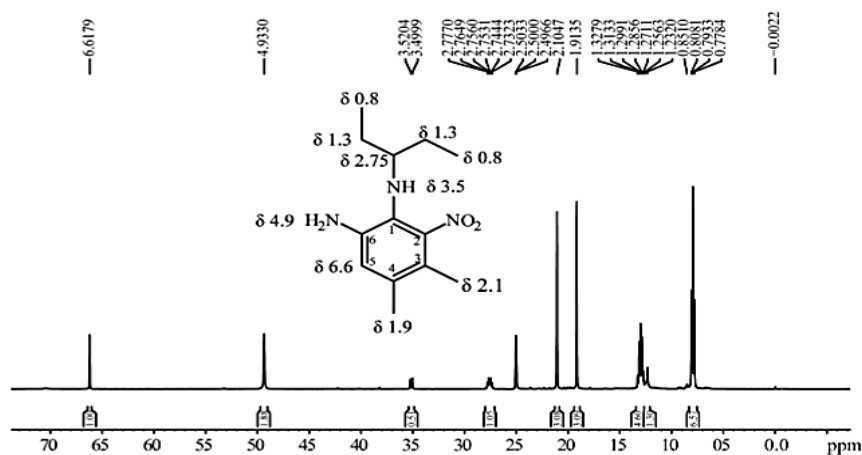
Slika 6.12. Ovisnosti postotka razgrađenog pendimetalina o a) pH i b) temperaturi, za slobodne suspendirane stanice i imobilizirane na poliuretanskoj pjenu (Tallur et al., 2015)

7. Enzimi u razgradnji pendimetalina

Pendimetalin nitroreduktaza je enzim koji razgrađuje pendimetalin. Pendimetalin nitroreduktaza se sastoji od 209 aminokiselina. Nitroreduktaze se dijele na jednoelektronski i dvoelektronski mehanizam nitroredukcije polinitroaromatskih spojeva. Nitroreduktaze tipa I nisu osjetljive na prisutnost kisika te zahtijevaju elektron donore, NAD(P)H, kod prijenosa dva elektrona. Nitroreduktaze tipa II su osjetljive na kisik, kataliziraju nitro skupinu putem jednoelektronske redukcije, pritom noseći nitro anionski radikal, koji se može reoksidirati u početni spoj u aerobnim uvjetima. Pendimetalin nitroreduktaza pripada nitroreduktazama tipa I. Pendimetalin nitroreduktazu sadrži *Bacillus subtilis* Y3 i *Bacillus circulans*. Osim pendimetalin nitroreduktaze, *Bacillus circulans* sadrži pendimetalin-N-dealkilazu (Ni et al., 2016).

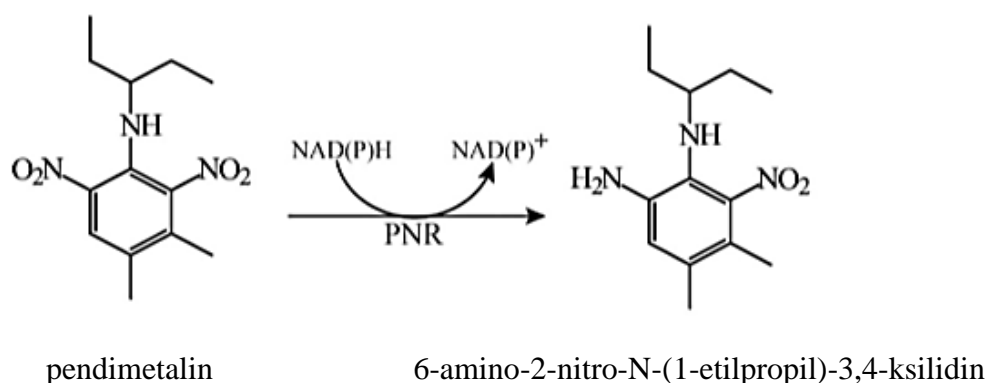
7.1. Pendimetalin nitroreduktaza iz *Bacillus subtilis* Y3

Bakterija *Bacillus subtilis* Y3 sadrži pendimetalin nitroreduktazu, koja reducira samo jednu nitro skupinu pendimetalina u amino skupinu. Pošto pendimetalin sadrži dvije nitro skupine, potrebno je putem ^1H NMR-a utvrditi produkt nitroredukcije. ^1H NMR spektar produkta nitroredukcije pendimetalina je prikazan na slici 7.1. (Ni et al., 2016). Singlet protona amino skupine na C6 ugljikovom atomu aromatskog prstena se nalazi na 4,9 ppm. Singlet na 6,6 ppm pripada protonu C5 ugljika aromatskog prstena. Singleti metilnih skupina vezanih na C4 i C5 ugljikove atome aromatskog prstena se javljaju na 1,9 i 2,1 ppm. Signali za N-(1-etilpropil) skupinu se nalaze na 3,5; 2,75; 1,3 i 0,8 ppm. U ^1H NMR-u 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin i 2-amino-6-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin se razlikuju po kemijskom pomaku C5 protona aromatskog prstena. Kod 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin signal za C5 proton se javlja na 6,6 ppm, dok za 2-amino-6-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin se javlja na 8,0 ppm. Prema tome, produkt nitroredukcije pendimetalina pomoću pendimetalin nitroreduktaze je 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin (Ni et al., 2016).



Slika 7.1. ^1H NMR spektar 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidina (Ni et al., 2016)

Kako bi se omogućila redukcija nitro skupine u amino skupinu, u položaju 6 aromatskog prstena, nužan je elektron donor, NAD(P)H. NAD(P)H se oksidira u NAD(P)^+ i otpušta dva elektrona, koja su nužna za redukciju pendimetalina u 6-amino-N-2-nitro-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin (slika 7.2.) (Ni et al., 2016).



Slika 7.2. Nitroredukcija pendimetalina u 6-amino-2-nitro-N-(1-etilpropil)-3,4-ksilidin pomoću enzima pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus subtilis* Y3 (Ni et al., 2016)

Dodatkom nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH) ili nikotinamid adenin dinukleotida (NADH), stanični ekstrakt *Bacillus subtilis* Y3, pokazuje veliku aktivnost pendimetalin nitroreduktaze. Osim toga, pendimetalin nitroreduktaza pokazuje slabu aktivnost u odsutnosti NADPH ili NADH. Najvjerojatniji razlog za to je mala količina pendimetalin nitroreduktaze u staničnom ekstraktu. Aktivnost pendimetalin nitroreduktaze je veća pri dodatku NADH, u odnosu na NADPH. Prema tome, NADH je preferirani kofaktor za

pendimetalin nitroreduktazu. Vrijednosti aktivnosti pendimetalin nitroreduktaze nakon dodatka NADPH, NADH i bez njihovog dodatka su prikazane u tablici 7.1. (Ni et al., 2015).

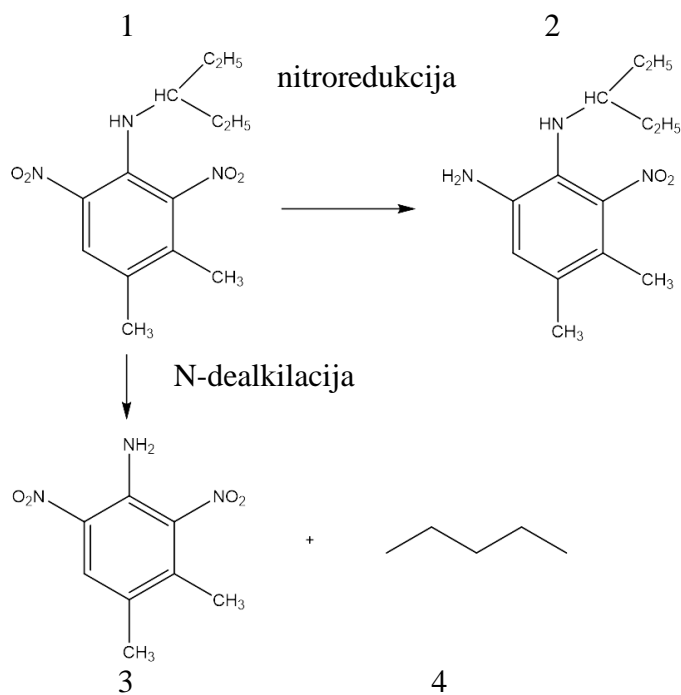
Tablica 7.1. Aktivnost pendimetalin nitroreduktaze u *Bacillus subtilis* Y3, uz dodatak NADPH, NADH i bez njihovog dodatka (Ni et al., 2015)

Aktivnost pendimetalin nitroreduktaze ($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$)			
	dodatak NADH	dodatak NADPH	bez dodatka
Stanični ekstrakt	$0,38 \pm 0,06$	$0,30 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,01$

Najveća aktivnost pendimetalin nitroreduktaze se postiže pri 30 °C i pH vrijednosti od 7,5. Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} i Ag^+ ioni inhibiraju pendimetalin nitroreduktazu. Dok, Fe^{2+} , Mg^{2+} i Ca^{2+} ioni povećavaju aktivnost pendimetalin nitroreduktaze (Ni et al., 2015).

7.2. Pendimetalin nitroreduktaza i pendimetalin-N-dealkilaza iz *Bacillus circulans*

Osim *Bacillus subtilis*, i *Bacillus circulans* sadrži enzim pendimetalin nitroreduktazu. *Bacillus circulans* sadrži i enzim pendimetalin-N-dealkilazu. Mehanizam razgradnje pendimetalinga uz *Bacillus circulans* je prikazan na slici 7.3. (Megadi et al., 2010). Djelovanjem enzima pendimetalin nitroreduktaze, dolazi do redukcije nitro skupine pendimetalinga (1) na položaju šest, na aromatskom prstenu, u amino skupinu te nastaje 6-aminopendimetalin (2). Kako bi se provela nitroredukcija, nužan je elektron donor NAD(P)H, koji se oksidira u NAD(P)⁺ i pritom otpušta dva elektrona. Djelovanjem pendimetalin-N-dealkilaze na pendimetalin, dolazi do N-dealkilacije te nastaju dva produkta. Produkti N-dealkilacije su 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin (3) i pentan (4). *Bacillus circulans* može oksidirati pendimetalin i pentan te ih iskoristiti kao izvor ugljika, to jest energije. Međutim, nema sposobnost oksidacije 6-aminopendimetalinga i 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilina jer ne potiču rast *Bacillus circulans* i unos kisika (Megadi et al., 2010).

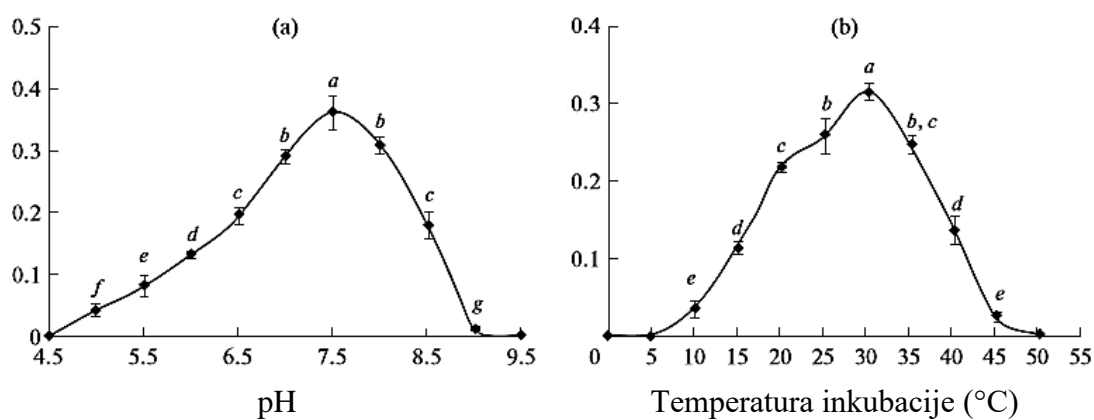


Slika 7.3. Mehanizam razgradnje pendimetalina pomoću enzima pendimetalin nitroreduktaze i N-dealkilaze iz *Bacillus circulans* (Megadi et al., 2010)

Pendimetalin nitroreduktaza iz *Bacillus circulans* je monomerni protein, čija masa iznosi $4,483 \times 10^{-23}$ kg. Ovisnost aktivnosti pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus circulans* o pH vrijednosti (a) i temperaturi (b) je prikazana na slici 7.4. (More et al., 2015).

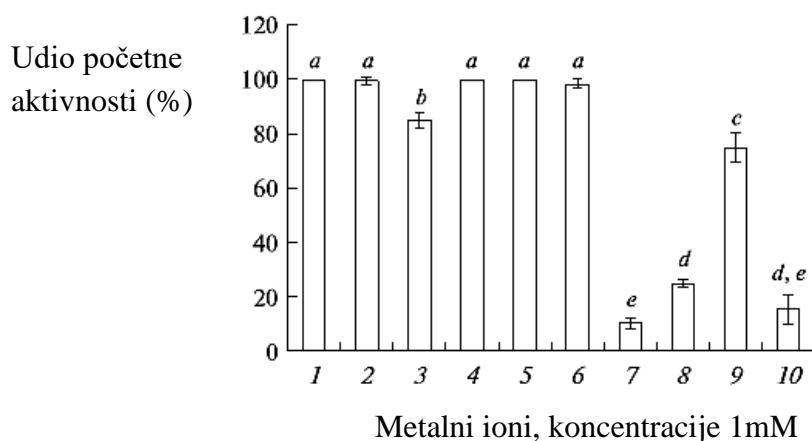
Aktivnost enzima
($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$)

Aktivnost enzima
($\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$)



Slika 7.4. Ovisnost aktivnosti pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus circulans* o pH (a) i temperaturi inkubacije (b) (More et al., 2015)

Iz slike 7.4. (a) se uočava da enzim ima najveću aktivnost pri pH vrijednosti 7,5. Zadovoljavajuća aktivnost enzima se postiže pri pH vrijednostima između 6,5 i 8,5. Pendimetalin nitroreduktaza nema aktivnost pri pH vrijednostima 4,5 i 9,5. Slika 7.4. (b) pokazuje da enzim ima najveću aktivnost pri 30 °C. Između 20 i 35 °C se postiže visoka aktivnost enzima. Pri 0, 5 i 50 °C, nema aktivnosti pendimetalin nitroreduktaze. Osim pH i temperature, na aktivnost pendimetalin nitroreduktaze u *Bacillus circulans* utječu različiti kationi (slika 7.5.) (More et al., 2015).



Slika 7.5. Smanjenje aktivnosti pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus circulans*, kod uzoraka: 1- nema iona, 2- Fe²⁺, 3- Fe³⁺, 4- Ca²⁺, 5- Mg²⁺, 6- Mn²⁺, 7- Hg²⁺, 8- Pb²⁺, 9- Cu²⁺ i 10- Ag⁺ (More et al., 2015)

Fe²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺ i Mn²⁺ ioni ne utječu na aktivnost pendimetalin nitroreduktaze. Fe³⁺ ion smanjuje aktivnost enzima za 15 %, a Cu²⁺ ion smanjuje aktivnost za 25 %. Hg²⁺ ion najviše inhibira enzim, smanjuje aktivnost enzima na 10 % početne aktivnosti. Također, Pb²⁺ i Ag⁺ ioni znatno smanjuju aktivnost pendimetalin nitroreduktaze. Osim iona, i vrsta kofaktora utječe na aktivnost enzima (More et al., 2015).

Tablica 7.2. Aktivnost pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus circulans*, uz kofaktore: NADPH, NADH, FAD i FMN (More et al., 2015)

Kofaktor, 1 μM	Relativna aktivnost, %	Kofaktor, 1 μM	Relativna aktivnost, %
NADPH	100,0 ± 0,0	FAD	0,0 ± 0,0
NADH	20,5 ± 1,3	FMN	0,0 ± 0,0

Iz tablice 7.2. se može iščitati da je NADPH najbolji kofaktor za pendimetalin nitroreduktazu iz *Bacillus circulans*. Uz NADPH kao kofaktor, ostvaruje se maksimalna aktivnost enzima.

Kada se koristi NADH kao kofaktor, aktivnost enzima iznosi 20,5 % od maksimalne vrijednosti. Flavin adenin dinukleotid (FAD) i flavin mononukleotid (FMN) ne utječu na aktivnost pendimetalin nitroreduktaze, to jest u potpunosti je inhibirano djelovanje enzima (More et al., 2015).

8. Zaključak

Konačan produkt razgradnje pendimetalina uz *Bacillus subtilis* Y3 je 8-amino-2-etil-5-(hidroksimetil)-1,2-dihidrokinoksalin-6-karboksilna kiselina. Nisu poznati produkti razgradnje pendimetalina uz *Bacillus megaterium* i *Pseudomonas putida*. Najvjerojatniji produkti razgradnje pendimetalina uz *Azotobacter chroococcum* su S₁, S₂, S₄, S₅ i S₆. Glavni produkti razgradnje pendimetalina uz *Bacillus lehensis* XJU su 6-aminopendimetalin i 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin. Djelovanjem pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus subtilis* Y3 na pendimetalin, uz elektron donor NAD(P)H, dolazi do nitroredukcije. Pomoću ¹H NMR-a je utvrđen produkt nitroredukcije pendimetalina. Signal C5 protona 2-aminopendimetalina se javlja pri 8,0 ppm, a signal za 6-aminopendimetalin se javlja na 6,6 ppm. Signal C5 protona produkta nitroredukcije se javlja pri 6,6 ppm. Prema tome, produkt nitroredukcije pendimetalina s pendimetalin nitroreduktazom iz *Bacillus subtilis* Y3 je 6-aminopendimetalin. Pendimetalin nitroreduktaza ima najveću aktivnost uz dodatak NADH, odnosno NADH je preferirani kofaktor za pendimetalin nitroreduktazu iz *Bacillus subtilis* Y3. *Bacillus circulans* sadrži pendimetalin nitroreduktazu i pendimetalin-N-dealkilazu. Djelovanjem pendimetalin-N-dealkilaze na pendimetalin, dolazi do N-dealkilacije te nastaju 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin i pentan. Uz NADPH kao kofaktor, ostvaruje se najveća aktivnost pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus circulans*. Flavin adenin dinukleotid (FAD) i flavin mononukleotid (FMN) u potpunosti inhibiraju djelovanje enzima, pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus circulans*. Pendimetalin nitroreduktaze iz *Bacillus subtilis* Y3 i *Bacillus circulans* imaju najveću aktivnost pri 30 °C i pH vrijednosti 7,5.

9. Popis simbola

K_a - ravnotežna konstanta kiseline

DNK - deoksiribonukleinska kiselina

RNK - ribonukleinska kiselina

BRENDA - BRaunschweig ENzyme DAtabase

CF - klodinafop propargil

2,4-D - 2,4-diklorfenoksiacetilna kiselina

GP - glifosat

PQ - parakvat

γ_{\max} - maksimalna masena koncentracija (mg/L)

K_d - koeficijent apsorpcije tla (L/kg)

P - postotak razgradnje herbicida

USEPA - United States Environmental Protection Agency

AC - atrazin klorohidrolaza

HAEA - hidroksiatrazin etilaminohidrolaza

IAIA - N-izopropilamelid izopropilaminohidrolaza

CAH - hidrolaza cijanurne kiseline

BH - biuret hidrolaza

AH - alofanat hidrolaza

ESK - etansulfonska kiselina

ATP - adenzin trifosfat

PHEO - feofitin

Q_A , Q_B – plastokinoni

DCPMU - 3-(3,4-diklorfenil)-1-metilurea

DCPU - 1-(3,4-diklorfenil) urea

GD - glifosat dehidrogenaza

AMPK - aminometilfosfonska kiselina

SOD - superoksid dismutaza

CFU/mL - broj jedinica za formiranje kolonija po mililitru početne kulture

S₁ - 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin

S₂ - 6-aminopendimetalin

S₃ - N-(3,4-dimetil-2,6-dinitrofenil) acetamid

S₄ - 4,5-dimetil-2-nitroanilin

S₅ - 2-metil-4,6-dinitro-N-(5-etilpropil) benzil alkohol

S₆ - 2-metil-4-nitro-5-N-(1-ciklopropil)-6-nitrozobenzil alkohol

NADH - nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

FAD - flavin adenin dinukleotid

FMN - flavin mononukleotid

10. Literatura

Aga D. S., Thurman E. M., Yockel M. E., Zimmerman L. R., Williams T. D., Identification of a new sulfonic acid metabolite of metolachlor in soil, *Environ. Sci. Technol.*, **30(2)** (1996) 596.

Ahmad I., Ahmad A., Ahmad M., Binding properties of pendimethalin herbicide to DNA: multispectroscopic and molecular docking approaches, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18(9)** (2016) 6476-6485.

Alam M. F., Laskar A. A., Choudhary H. H., Younus H., Human salivary aldehyde dehydrogenase: purification, kinetic characterization and effect of ethanol, hydrogen peroxide and sodium dodecyl sulphate on the activity of the enzyme, *Cell Biochem. Biophys.*, **74** (2016) 307–315.

Baguley B. C., DNA intercalating anti-tumour agents, *Anti-Cancer Drug Des.*, **6(1)** (1991) 1-35.

Baldwin B., Bray M., Geoghegan M., The microbial decomposition of paraquat, *Biochem. J.*, **101** (1966) 15.

Baneyx F., Recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **10** (1999) 411–421.

Barbash J. E., Thelin G. P., Koplín D. W., Gilliom R. J., Distribution of major herbicides in ground water of the United States, U.S. Geological Survey, Water Resources Investigations, Sacramento, 1999, str. 4198–4245.

Barua A. S., Saha J., Chaudhuri S., Chowdhury A., Adityachaudhury N., Degradation of pendimethalin by soil fungi, *Pestic. Sci.*, **29(4)** (1990) 419-425.

Belal E. B., Hasan N. E., Dissipation of pendimethalin by *Bacillus megaterium*, *Journal of Plant Protection and Pathology*, **4(5)** (2013) 467-470.

Benkovic S., Ballesteros A., Biocatalysts-the next generation, *Trends Biotechnol.*, **15(10)** (1997) 385-386.

Bhat M. A., Tsuda M., Horiike K., Nozaki M., Vaidyanathan C. S., Nakazawa T., Identification and characterization of a new plasmid carrying genes for degradation of 2,4-

dichlorophenoxyacetate from *Pseudomonas cepacia* CSV90, Appl. Environ. Microbiol., **60(1)** (1994) 307-312.

Biradar D. P., Rayburn A. L., Flow cytogenetic analysis of whole cell clastogenicity of herbicides found in groundwater, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **28(1)** (1995) 13-17.

Bismuth C., Garnier R., Dally S., Fournier P. E., Scherrmann J. M., Prognosis and treatment of paraquat poisoning, A review of 28 cases, J. Toxicol. Clin. Toxicol., **19** (1982) 461-474.

Block E. R., Potentiation of acute paraquat toxicity by vitamin E deficiency, Lung, **156** (1979) 195-203.

Bommarius A. S., Broering J. M., Established and novel tools to investigate biocatalyst stability, Biocatalysis and Biotransformation, **23(3-4)** (2005) 125-139.

Bommarius A. S., Riebel B. R., Biocatalysis: fundamentals and applications, John Wiley & Sons, Weinheim, 2004, str. 1-7.

Capranico G., Binaschi M., Borgnetto M. E., Zunino F., Palumbo M., A protein-mediated mechanism for the DNA sequence-specific action of topoisomerase II poisons, Trends Pharmacol. Sci., **18(9)** (1997) 323-329.

Carr A., Frei B., Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?, FASEB J., **13** (1999) 1007-1024.

Carter P., Wells J. A., Dissecting the catalytic triad of a serine protease, Nature, **332** (1988) 564-568.

Castillo M. A., Felis N., Aragon P., Cuesta G., Sabater C., Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil, Int. Biodeterior. Biodegrad., **58(3-4)** (2006) 196-202.

Celis E., Elefsiniotis P., Singhal N., Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions, Water research, **42(12)** (2008) 3218-3224.

Chaudhry G. R., Huang G. H., Isolation and characterization of a new plasmid from a *Flavobacterium* sp. which carries the genes for degradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetate, J. Bacteriol., **170(9)** (1988) 3897-3902.

- Cherry B., GM crops increase herbicide use in the United States, *Sci. Soc.*, **45** (2010) 44-46.
- Chu D. H., Loomis C. A., *Structure and development of the skin and cutaneous appendages, Fetal and Neonatal Physiology*, Elsevier, 2017, str. 491.
- Cox C., Glyphosate, part 2: human exposure and ecological effects, *Herbicide factsheet, J. Pestic. Reform*, **15** (1995) 14–20.
- Crossley R., *Chirality and the Biological Activity of Drugs*, CRC Press, Boca Raton, 1995, str. 1-189.
- Dalton R. L., Evans A. W., Rhodes R. C., Disappearance of diuron from cotton field soils, *Weeds*, **14(1)** (1966) 31-33.
- Day B. J., Shawen S., Liochev S. I., Crapo J. D., A metalloporphyrin superoxide dismutase mimetic protects against paraquat-induced endothelial cell injury in vitro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275** (1995) 1227-1232.
- De Kok L. J., Sulfur nutrition and assimilation in higher plants, *Workshop on Sulfur Metabolism in Higher Plants 1992: Garmisch-Partenkirchen, Germany*, SPB Academic, 1993, str. 221-237.
- De Souza M. L., Newcombe D., Alvey S., Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (1998) 178–184.
- Dinis-Oliveira R. J., Duarte J. A., Sánchez-Navarro A., Remião F., Carvalho F., Paraquat poisonings: mechanisms of lung toxicity, clinical features, and treatment, *Crit. Rev. Toxicol.*, **38(1)** (2008) 13–71.
- Domingues I., Pérez J., Soares A. M., Loureiro S., Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures, *Ecotoxicology*, **20(6)** (2011) 1167-1175.
- Don R. H., Pemberton J. M., Genetic and physical map of the 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid-degradative plasmid pJP4, *J. Bacteriol.*, **161(1)** (1985) 466-468.
- Duke S. O., Powles S. B., Glyphosate: a once-in-a-century herbicide, *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, **64(4)** (2008) 319-325.

Edwards D., Reregistration Eligibility Decision for 2,4-D, U. S. Environ. Prot. Agency, 2005, str. 1-304.

Elsayed B., El-Nady M. F., Bioremediation of pendimethalin-contaminated soil, Afr. J. Microbiol. Res., **7(21)** (2013) 2577-2580.

<http://extoxnet.orst.edu/pips/diuron.htm> (pristup 17. lipnja 2020.)

Freeman B. A., Turrens J. F., Mirza Z., Crapo J. D., Young S. L., Modulation of oxidant lung injury by using liposome-entrapped superoxide dismutase and catalase, Fed. Proc., **44** (1985) 2591-2595.

Fridovich I., Superoxide dismutases, Annu. Rev. Biochem. **44(1)** (1975) 147-159.

Fursule R. A., Kulkarni J. S., Agarkar P. H., Biochemistry Basics And Applied, Pragati Books Pvt. Ltd., Mumbai, 2006, str. 30.

Gard J. K., Feng P. C., Hutton W. C., Nuclear magnetic resonance timecourse studies of glyphosate metabolism by microbial soil isolates, Xenobiotica, **27** (1997) 633–644.

Gauri S. S., Mandal S. M., Dey S., Pati B. R., Biotransformation of p-coumaric acid and 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid by *Azotobacter* sp. strain SSB81, Bioresour. Technol., **126** (2012) 351-352.

Gaynor J. D., Hamill A. S., MacTavish D. C., Efficacy, fruit residues, and soil dissipation of the herbicide metolachlor in processing tomato, J. Am. Soc. Hortic. Sci., **118(1)** (1993) 68-72.

Gholap P. N., Kale D. S., Sirothia A. R., Genetic diseases in cattle: A review, Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences, **2(2)** (2014) 24-33.

González M., Soloneski S., Reigosa M. A., Larramendy M. L., Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt, I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells, Toxicol. in Vitro, **19(2)** (2005) 289-297.

Hancock J. T., Desikan R., Neill S. J., Role of Reactive Oxygen Species in Cell Signaling Pathways, Biochemical and Biomedical Aspects of Oxidative Modification, **29(2)** (2001) 345-350.

Hassan-Abdallah A., Zhao G., Eschenbrenner M., Chen Z. W., Mathews F. S., Jorns M. S., Cloning, expression and crystallization of heterotetrameric sarcosine oxidase from *Pseudomonas maltophilia*, *Protein Expr. Purif.*, **43** (2005) 33–43.

Huang C. L., Lee Y. C., Yang Y. C., Kuo T. Y., Huang N. K., Minocycline prevents paraquat-induced cell death through attenuating endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction, *Toxicol. Lett.*, **209(3)** (2012) 203-210.

Huang Y., Zhan H., Bhatt P., Chen S., Paraquat degradation from contaminated environments: current achievements and perspectives, *Front. Microbiol.*, **10** (2019) 6.

Husain Q., Ullah M. F., *Biocatalysis: Enzymatic Basics and Applications*, Springer Nature, Cham, 2019, str. 39-40.

Illanes A., *Enzyme biocatalysis, Principles and Applications*, Editorial Springer-Verlag New York Inc., United States, 2008, str. 1-2.

Jablonowski N. D., Koepchen S., Hofmann D., Schaeffer A., Burauel P., Spatial distribution and characterization of long-term aged ¹⁴C-labeled atrazine residues in soil, *J. Agric. Food Chem.*, **56(20)** (2008) 9548-9554.

Juhler R., Sorensen S., Larsen L., Analysing transformation products of herbicide residues in environmental samples, *Water Res.*, **35** (2001) 1371–1378.

Kashanian S., Askari S., Ahmadi F., Omidfar K., Ghobadi S., Tarighat F. A., In vitro study of DNA interaction with clodinafop-propargyl herbicide, *DNA Cell Biol.*, **27(10)** (2008) 581-586.

Kleinkauf H., Doehren H., A nonribosomal system of peptide biosynthesis, *Eur. J. Biochem.*, **236** (1996) 335–351.

Kole R. K., Saha J., Pal S., Chaudhuri S., Chowdhury A., Bacterial degradation of the herbicide pendimethalin and activity evaluation of its metabolites, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **52(5)** (1994) 779-786.

Krause A., Hancock W. G., Minard R. D., Freyer A. J., Honeycutt R. C., LeBaron H. M., Bollag J. M., Microbial transformation of the herbicide metolachlor by a soil actinomycete, *J. Agric. Food Chem.*, **33(4)** (1985) 584-589.

Laitinen P., Rämö S., Siimes K., Glyphosate translocation from plants to soil—does this constitute a significant proportion of residues in soil?, *Plant and Soil*, **300(1-2)** (2007) 51-60.

Laskar A. A., Alam M. F., Younus H., In vitro activity and stability of pure human salivary aldehyde dehydrogenase, *Int. J. Biol. Macromol.*, **96** (2017) 798–806.

Lehninger A. L., Mitochondria and calcium ion transport, *Biochem. J.*, **119(2)** (1970) 129-138.

Ma J., Xu L., Jia L., Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge, *Bioresour. Technol.*, **140** (2013) 15-21.

Mandelbaum R. T., Wackett L. P., Allan D. L., Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59(6)** (1993) 1695-1701.

Martinez B., Tomkins J., Wackett L. P., Wing R., Sadowsky M. J., Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid padp-1 from *Pseudomonas* sp. strain adp, *J. Bacteriol.*, **183(19)** (2001) 5684-5697.

McCord J. M., Fridovich I., The Reduction of Cytochrome C by Milk Xanthinase Oxidase, *J. Biol. Chem.*, **243** (1968) 5733-5760.

Megadi V. B., Tallur P. N., Hoskeri R. S., Mulla S. I., Ninnekar H. Z., Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus circulans*, *Indian J. Biotechnol.*, **9** (2010) 173, 175-176.

Megharaj M., Naidu R., Soil and brownfield bioremediation, *Microb. Biotechnol.*, **10(5)** (2017) 1244-1245.

Menzel D. B., The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress, *Toxicol. Lett.*, **72** (1994) 269-277.

Meskys R., Harris R. J., Casaitė V., Basran J., Scrutton N. S., Organization of the genes involved in dimethylglycine and sarcosine degradation in *Arthrobacter* spp.: implications for glycine betaine catabolism, *Eur. J. Biochem.*, **268** (2001) 3390–3398.

Monaco T. J., Weller S. C., Ashton F. M., *Weed science: principles and practices*, 4th ed., John Wiley & Sons, New York, 2002, str. 14, 109, 215-216.

More V. S., Tallur P. N., Ninnekar H. Z., Niyonzima F. N., More S. S., Purification and properties of pendimethalin nitroreductase from *Bacillus circulans*, *Appl. Biochem. Microbiol.*, **51(3)** (2015) 331-334.

Naik P., *Essentials of Biochemistry (for Medical Students)*, JP Medical Ltd, New Delhi, 2011, str. 54-58.

Newmark H. L., Pool W., Bauernfeind J. C., De Ritter E., Biopharmaceutic factors in parenteral administration of vitamin E, *J. Pharm. Sci.*, **64** (1975) 655-657.

Ni H., Yao L., Li N., Cao Q., Dai C., Zhang J., He Q., He J., Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus subtilis* Y3, *J. Environ. Sci.*, **41** (2016) 121–127.

Ni H. Y., Wang F., Li N., Yao L., Dai C., He Q., He J., Hong Q., Pendimethalin nitroreductase is responsible for the initial pendimethalin degradation step in *Bacillus subtilis* Y3, *Appl. Environ. Microbiol.*, **82(24)** (2016) 7052-7062.

Nicholas C., Lewis S., *Fundamentals of enzymology: the cell and molecular biology of catalytic proteins*, Oxford University Press, Oxford, 1999, str. 1-478.

Pal S., Moza P. N., A. Kettrup A., Photochemistry of pendimethalin, *J. Agric. Food Chem.*, **39(4)** (1991) 797-800.

Peñaloza-Vazquez A., Mena G. L., Herrera-Estrella L., Bailey A. M., Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by *Pseudomonas pseudomallei*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61(2)** (1995) 538-543.

Pereira S. P., Fernandes M. A., Martins J. D., Santos M. S., Moreno A. J., Vicente J. A., Jurado A. S., Toxicity assessment of the herbicide metolachlor comparative effects on bacterial and mitochondrial model systems, *Toxicol. in Vitro*, **23(8)** (2009) 1587-1588.

Pimentel D., Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics, *J. Agric. Environ. Ethics*, **8(1)** (1995) 17-29.

Rasor J. P., Voss E., Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry, *Appl. Catal. A: General*, **221** (2001) 145–158.

<http://www.regulations.gov/fdmspublic/component/main> (pristup 17. lipnja 2020.)

Roehm J. N., Hadley J. G., Menzel D. B., Antioxidants vs lung disease, Arch. Intern. Med., **128** (1971) 88-93.

Sadler T. W., Langman's medical embryology (Vol. 12), Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2012, str. 1-371.

Scheunert I., Mansour M., Doerfler U., Schroll R., Fate of pendimethalin, carbofuran and diazinon under abiotic and biotic conditions, Sci. Total Environ., **132(2-3)** (1993) 361, 366, 367.

Sellés Vidal L., Kelly C. L., Mordaka P. M., Heap J. T., Review of NAD(P)H-dependent oxidoreductases: properties, engineering and application, Biochim. Biophys. Acta, **1866(2)** (2018) 327–347.

Shukla A. K., Pragya P., Chaouhan H. S., Tiwari A. K., Patel D. K., Abdin M. Z., Chowdhuri D. K., Heat shock protein-70 (Hsp-70) suppresses paraquat-induced neurodegeneration by inhibiting JNK and caspase-3 activation in *Drosophila* model of Parkinson's disease, PLoS One, **9(6)** (2014) 1-11.

Singh B., Degradation of clodinafop propargyl by *Pseudomonas* sp. strain B2, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **91(6)** (2013) 730-733.

Singh B., Kaur J., Singh K., Microbial degradation of an organophosphate pesticide, malathion, Crit. Rev. Microbiol., **40(2)** (2013) 146–154.

Singh B., Singh K., Microbial degradation of herbicides, Critic. Rev. Microbiol., **42(2)** (2016) 245-261.

Siripattanakul S., Wirojanagud W., McEvoy J., Limpiyakorn T., Khan E., Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization, J. Appl. Microbiol., **106(3)** (2009) 986-992.

Strandberg M., Scott-Fordsmand J. J., Effects of pendimethalin at lower trophic levels—a review, Ecotoxicol. Environ. Saf., **57(2)** (2004) 190-201.

Swarcewicz M. K., Gregorczyk A., The effects of pesticide mixtures on degradation of pendimethalin in soils, Environ. Monit. and Assess., **184(5)** (2012) 3077, 3080-3082.

Tallur P. N., More V. S., Niyonzima F. N., More S. S., Enhanced degradation of pendimethalin by immobilized cells of *Bacillus lehensis* XJU, 3 Biotech., **5(6)** (2015) 970-972.

Taylor A. W., Freeman H. P., Edwards W. M., Sample variability and the measurement of dieldrin content of a soil in the field, J. Agric. Food Chem., **19(5)** (1971) 832-836.

Toone E. J., Advances in enzymology and related areas of molecular biology, Protein evolution, Hoboken, John Wiley & Sons, 2010, str. 1-340.

Trebst A., Measurement of hill reactions and photoreduction, Methods Enzymol., **24** (1972) 146-165.

USEPA-OPP, 5 (Jan. 30, 1984), Creeger S., Hazard Evaluation Division (to R. Taylor)

Veiga F., Zapata J. M., Marcos M. F., F. Alvarez F., Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain, Sci. Total Environ., **271(1-3)** (2001) 135-144.

Webb E. C., Enzyme nomenclature, Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes, Academic, San Diego, 1992, str. 1-1513.

Witting L. A., Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical initiated reactions, Free Radicals Biol., **4** (2012) 295-319.

Xuedong W., Huili W., Defang F., Biodegradation of imazapyr by free cells of *Pseudomonas fluorescense* biotype II and *Bacillus cereus* isolated from soil, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **74(2)** (2005) 352.

Yasaka T., Okudaira K., Fujito H., Further studies of lipid peroxidation in human paraquat poisoning, Arch. Intern. Med., **146** (1986) 681-685.

Yee C., Yang W., Hekimi S., The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans.*, Cell, **157** (2014) 897-909.

Yingdi H., Identification of bacteria carried by pine wood nematode, J. of Nanjing Forestry University, **26(5)** (2002) 37-40.

Zeleznick L. D., Myers T. C., Titchener E. B., Growth of *Escherichia coli* on methyl- and ethylphosphonic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **78** (1963) 546-547.

Životopis

Moje ime je Valentino Golub. [REDACTED] Od 2005. do 2013. pohađao sam Osnovnu školu Ljubo Babić u Jastrebarskom. 2013. godine upisao sam smjer Opća gimnazija u Srednjoj školi Jastrebarsko. Nakon završene srednje škole, 2017. upisao sam preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Stručnu praksu sam odradio u Jani, u Svetoj Jani. Na trećoj godini studija, ostvario sam pravo na STEM stipendiju, iz područja prirodnih znanosti.