

Identifikacija razgradnih produkata procesa biorazgradnje herbicida

Polonji, Iva

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:149:324290>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Iva Polonji

**IDENTIFIKACIJA RAZGRADNIH PRODUKATA PROCESA
BIORAZGRADNJE HERBICIDA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Doc. dr. sc. Dragana Vuk

Članovi ispitnog povjerenstva: Doc. dr. sc. Dragana Vuk

Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Prof. dr.sc. Zvezdana Findrik Blažević

Zagreb, rujan 2020.

Sažetak

Cilj ovog rada je proučavanje svojstava, strukture i toksičnosti dinitroanilinskog herbicida pendimetalina **1**, te uvjeta i produkata njegove biorazgradnje. Struktura pendimetalina je potvrđena i okarakterizirana dostupnim spektroskopskim tehnikama, a biodegradacijski putevi nekolicinom otkrivenih mikroorganizama predstavljeni su i detaljnije objašnjeni, uz identifikaciju i daljnje istraživanje potencijalne aktivnosti dobivenih produkata.

Ključne riječi: pendimetalin, biorazgradnja, fotodegradacija, toksičnost, potencijalna aktivnost

Summary

The aim of this work is to study the properties, structure and toxicity of the dinitroaniline herbicide pendimethalin **1**. Conditions and products of pendimethalins biodegradation were also studied. The structure of pendimethalin was confirmed and characterized by available spectroscopic techniques. Biodegradation pathways of several detected microorganisms were presented and explained in more detail, with the identification and further investigation of the resulting products potential activity.

Key words: pendimethalin, biodegradation, photodegradation, toxicity, potential activity

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za organsku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Dragani Vuk na razumijevanju, strpljivosti i pomoći tijekom izrade ovog rada. Također zahvaljujem za sve konstruktivne kritike, zajednički rad i prijateljski odnos.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na podršci i pomoći tijekom cijelog mog školovanja.

SADRŽAJ

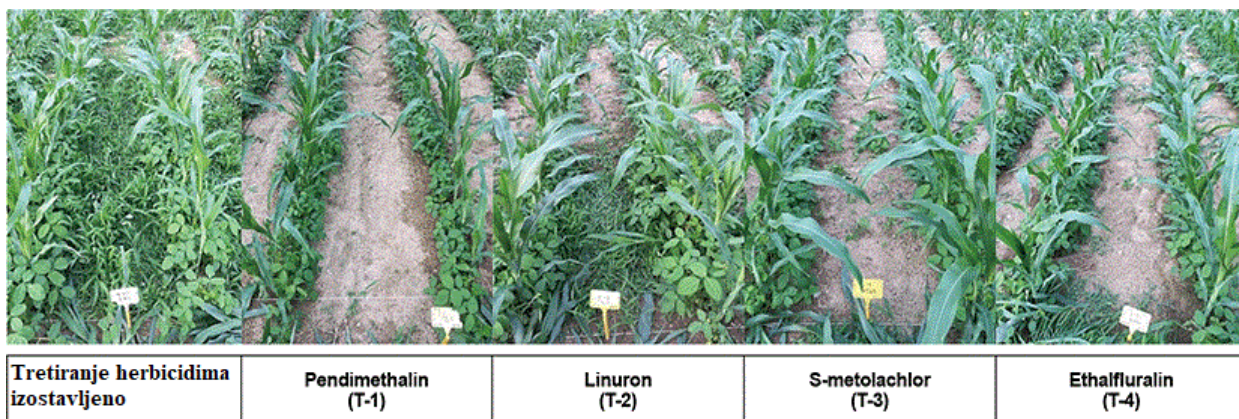
1	UVOD.....	1
2	OPĆI DIO.....	2
2.1	Kemijska i fizikalna svojstva pendimetalina.....	3
2.2	Postojanost herbicida u tlu.....	4
2.2.1	Faktori tla.....	5
2.2.2	Klimatski uvjeti.....	6
2.2.3	Svojstva herbicida.....	9
2.2.4	Postojanost pendimetalina u tlu.....	9
2.3	Toksičnost pendimetalina.....	10
2.3.1	Genotoksičnost pendimetalina.....	12
2.3.2	Pendimetalin i karcinom gušterače.....	14
2.3.3	Pendimetalin i Parkinsonova bolest.....	17
3	REZULTATI I RASPRAVA.....	18
3.1	Spektroskopska karakterizacija strukture pendimetalina.....	19
3.2	Biorazgradnja pendimetalina.....	25
3.2.1	Biorazgradnja pendimetalina mikroorganizmom <i>Bacillus subtilis</i> Y3.....	27
3.2.2	Biorazgradnja pendimetalina mikroorganizmom <i>Azotobacter chroococcum</i>	31
3.2.3	Biorazgradnja pendimetalina mikroorganizmom <i>Pyricularia oryzae</i>	33
3.2.4	Biorazgradnja pendimetalina sojem kvasca YC2.....	34
3.3	Razgradnja pendimetalina u bioslurry reaktoru.....	36
3.4	Potencijalna aktivnost pendimetalina i njegovih produkata biorazgradnje.....	39
3.4.1	Pendimetalin (1).....	40
3.4.2	3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin (2).....	42
3.4.3	2-nitro-6-amino-N-(1-etil-propil)-3,4-kilidin (3).....	43
3.4.4	8-amino-2-etil-5-(hidroksimetil)-1,2-dihidrokinoksalin-6-karboksilna kiselina (7).....	44
3.4.5	N-(1-etilpropil)-5,6-dimetil-7-nitrobenzimidazol (10).....	45
4	ZAKLJUČAK.....	46
5	LITERATURA.....	47
6	ŽIVOTOPIS.....	49

1 UVOD

Dinitroanilini su aromatski amini, najčešće žute boje. Iako se strukturni analozi dinitroanilina najčešće upotrebljavaju kao herbicidi s djelovanjem prije pojave sjemenskih klica, takozvani „preemergence“ herbicidi, njihova upotreba također je pronašla primjenu i u proizvodima poput azo boja, korozijskih inhibitora, te intermedijara u sintezama farmaceutika. Neki dinitroanilini koji se koriste u svrhu suzbijanja neželjenih biljnih vrsta, odnosno kao herbicidi su: trifluralin, orizalin, prodiamin i pendimetalin. Ti herbicidi sadrže propilamino, fluorida ili sulfonamido prostetičke skupine kao dodatak na osnovnu strukturu dinitroanilina čija se molekulska formula može prikazati: $C_6H_5N_3O_4/C_6H_3(NH_2)(NO_2)_2$, te može postojati u četiri osnovna izomerna oblika: 2,3-dinitroanilin, 2,4-dinitroanilin, 2,6-dinitroanilin i 3,5-dinitroanilin. Vrlo kompleksan degradacijski put ovih herbicida razlog je nedovoljne istraženosti njihove sudbine i rasprostranjenosti u okolišu, te posljedično izloženosti i utjecaju na zdravlje ljudi i živog svijeta. Oni snažno adsorbiraju u koloidne čestice tla, te u njima mogu biti postojani mjesecima. Ljudi su ovim herbicidima najčešće izloženi i dolaze u doticaj inhalacijskim i dermalnim, odnosno kožnim putem. Toksični učinci dinitroanilina uglavnom se povezuju s methemoglobinemijom, odnosno formiranjem methemoglobina (metHb). On nastaje kao produkt transformacije hemoglobina, kada se željezov (2^+) ion unutar strukture hemoglobina oksidira u željezov (3^+) ion. Takvim transformacijskim reakcijama onemogućava se transport kisika u krvi, što na poslijetku može dovesti do cijanoze, odnosno „blue skin“ sindroma i drugih simptoma trovanja dinitroanilinima, poput glavobolje, vrtoglavice, slabosti, gubitka koordinacije, kome i smrti. Nadalje, herbicidi s osnovnom kemijskom dinitroanilinskom skupinom mogu prekinuti mitozu u biljaka, što ima negativan utjecaj na daljnji rast određene biljke. Iako dinitroanilini nisu klasificirani kao kancerogena skupina kemijskih spojeva, mnogim herbicidima poput orizalina, trifluralina, etalfluralina, benfluralina i pendimetalina, kojima se struktura temelji, kako je već prethodno spomenuto, na dinitroanilinskoj osnovi, biološkim istraživanjima potvrđen je potencijal za razvitak tumorskih stanica. Stoga nije teško uočiti nužnost i važnost proučavanja utjecaja ovakvih herbicida i njihovih degradacijskih puteva na zdravlje ljudi i okoliš općenito.

2 OPĆI DIO

Pendimetalin [*N*-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-ksilidin] je sintetička kemikalija klase dinitroanilin koja se koristi kao herbicid sa svrhom suzbijanja jednogodišnjih trava i određenih širokolisnih korova koji ometaju rast, razvoj, prinos i kvalitetu poljoprivrednih kultura, na način da za svoj rast i razvoj troše hranjive tvari, vodu i svjetlost, također potrebnu uzgajanim kulturama. Prvi put je registriran kao herbicid u Sjedinjenim Američkim Državama 1972. godine. Ovaj herbicid selektivno inhibira diobu i produljenje stanica korijena i izdanka neželjenim travama i korovima, što je vidljivo na **slici 1.1**. Na taj način omogućuje poljoprivrednicima kontrolu populacije korova i sprječavanje njihove pojave, posebice tijekom ključne faze razvoja usjeva. Pendimetalin može biti formuliran kao tekućina, krutina u obliku zrnaca ili praha ili kao emulzirani koncentrat. Primjenjuje se prije pojave sjemenskih klica, odnosno sadnica korova ili tijekom ranog post-nicanja. Njegovo korištenje odobreno je u Europi, Sjevernoj i Južnoj Americi, Africi i Aziji za brojne kulture uključujući žitarice pšenicu, ječam i raž, te kukuruz, soju, rižu, pamuk, krumpir, duhan, mahunarke, voće, povrće, orašaste plodove, te travnjake u blizini stambenih objekata i ukrasne biljke. Pendimetalin je trenutno treći najčešće korišteni herbicid općenito, te najprimjenjivaniji selektivni herbicid na svijetu. Primjer izgleda jedne njegove prodajne ambalaže prikazan je na **slici 2.2**.



Slika 1.1. Djelovanje različitih herbicida na poljoprivredno tlo



Slika 1.2. Prodajna ambalaža herbicida pendimetalina

2.1 Kemijska i fizikalna svojstva pendimetalina

Pendimetalin je narančasto-žuta, ne-korozivna kristalna krutina blagog, orašastog mirisa, prikazana na **slici 1.3**. Temperatura tališta mu iznosi $56,0^{\circ}\text{C}$, a temperatura vrelišta $330,0^{\circ}\text{C}$. Topljivost u vodi za pendimetalin je $0,33 \text{ mg/L}$ pri 20°C . Uglavnom je topiv u organskim otapalima poput acetona (800 g/L), ksilena ($>800 \text{ g/L}$), heksana ($48,98 \text{ g/L}$) i diklorometana ($> 800 \text{ g/L}$), lako topiv u benzenu, toluenu i kloroformu, te blago topiv u petroleteru i benzinu. Vrlo je stabilan tijekom skladištenja i postojan na kiseline i lužine, započinje razgradnju izlaganjem sunčevom svjetlu i zagrijavanjem do dekompozicije emitira otrovne pare nitrooksida.



Slika 1.3. Kristali pendimetalina

2.2 Postojanost herbicida u tlu

Vrijeme koje određeni herbicid u svojoj aktivnoj formi provede u tlu označava postojanost istoga. Herbicidi se međusobno razlikuju po postojanosti u tlu, na što mogu utjecati mnogobrojni faktori koji se kategoriziraju u slijedeće tri skupine: faktori tla, klimatski uvjeti i svojstva dotičnog herbicida. Općenito govoreći, za herbicide koji se dodaju tlu u svrhu kontrole rasta trava i ostalog bilja, poželjno je da postojanost u tlu bude ograničena na sezonsko vrijeme zaštite usjeva, te da u tlu ne zaostaju u velikim koncentracijama i na taj način utječu na daljnji rast uzgajanih kultura. ¹ Primjena herbicida pendimetalina obradom gnojiva prikazana je na slikama 1.4. i 1.5.



Slika 1.4. Obrada gnojiva impregniranim pendimetalinom na površini tla (lijevo) i njegova primjena (desno)

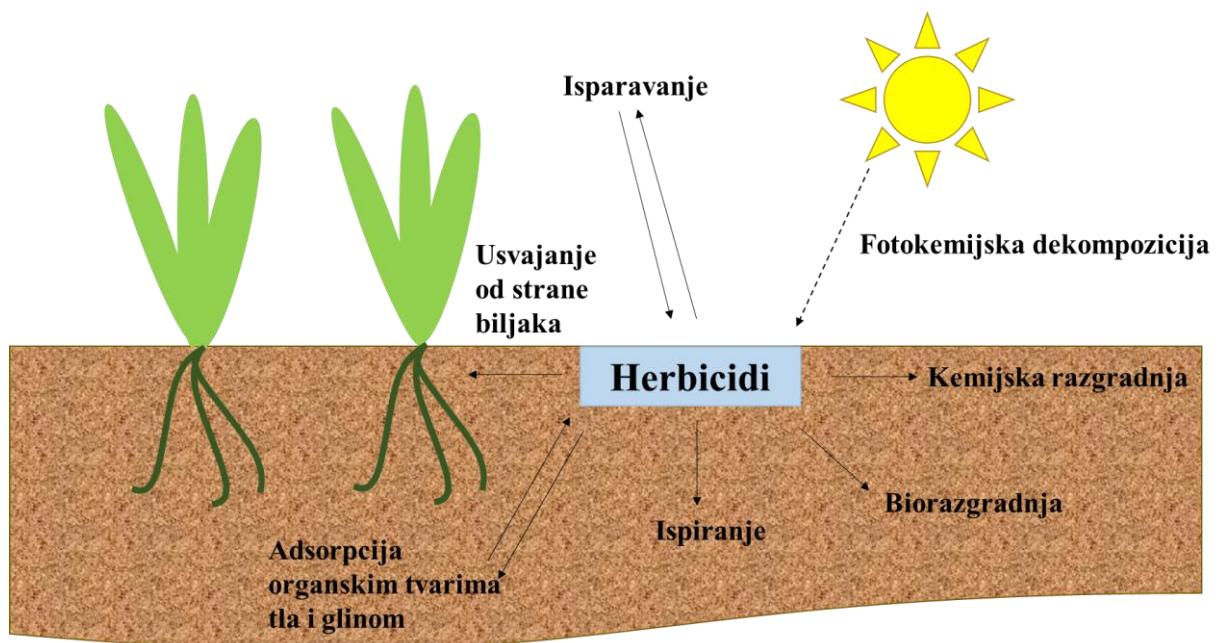


Slika 1.5. Gnojivo prije (lijevo) i nakon (desno) obrade formulacijom pendimetalina Prowl™

¹ Penn State College of Agricultural Sciences research; Persistence of Herbicides in Soil; Agronomy Facts 36

2.2.1 Faktori tla

Faktori tla koji mogu utjecati na postojanost herbicida u tlu su: sastav, kemizam tla, te mikrobnu aktivnost u tlu. Sastav tla je fizički faktor koji ovisi o udjelima pijeska, mulja i gline, kao i organske tvari u tlu. Općenito tla s visokim udjelom gline ili organske tvari lakše adsorbiraju herbicide na sebe, te se herbicidi teže gube iz tla ispiranjem ili isparavanjem, što za posljedicu može imati smanjeno početno djelovanje herbicida zbog njegovog snažnog vezanja za tlo, a kasnije predugog zadržavanja u tlu i na taj način štetnog utjecaja na poljoprivredne kulture koje se na određenom području uzgajaju. Različite sudbine primjenjenih herbicida u tlu prikazane su **slikom 1.6**. Također, vrlo važno svojstvo tla koje može utjecati na postojanost određenih herbicida je pH vrijednost. Mikrobnu aktivnost u tlu podrazumijeva poznavanje vrste i brojnosti mikroorganizama koji su u njemu prisutni, te predstavlja jedan od vjerojatno najvažnijih degradacijskih puteva herbicida općenito, čime automatski utječe i na njihovu postojanost u tlu. Ono što također može utjecati na mikrobnu aktivnost u tlu su vlaga, temperatura, pH vrijednost, koncentracija kisika u tlu i raspoloživost potrebnih minerala. Najpogodniji uvjeti za rast i razvoj mikroorganizama, te samim time i njihovo djelovanje u smislu razgradnje herbicida bili bi toplo, dobro prozračeno tlo s visokom koncentracijom zahtijevanih nutrijenata i približno neutralne pH vrijednosti.



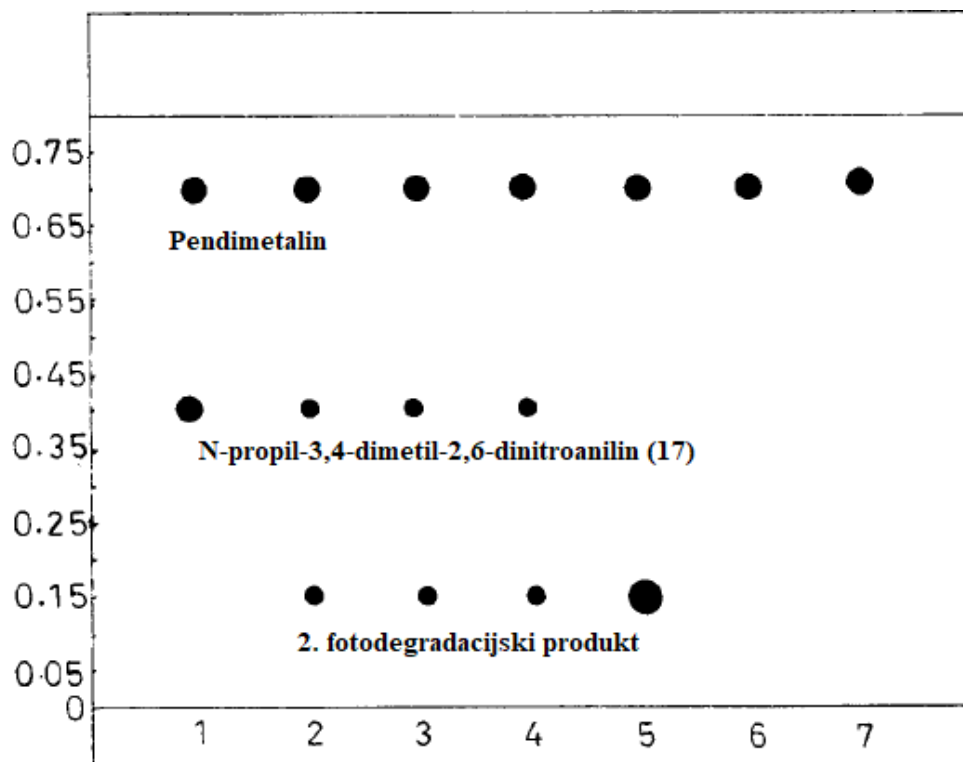
Slika 1.6. Sudbina herbicida u tlu

2.2.2 Klimatski uvjeti

Klimatski uvjeti koji utječu na postojanost, odnosno brzinu razgradnje herbicida u tlu podrazumijevaju vlagu u zraku, temperaturu zraka i količinu sunčeve svjetlosti. Općenito, brzina kemijske degradacije kao i biorazgradnje herbicida raste s porastom temperature i vlage. Hladni, suhi uvjeti usporavaju razgradnju herbicida, te omogućavaju vremenski dulju postojanost u tlu. Količina sunčeve svjetlosti važna je zbog fotodekompozicije ili razgradnje katalizirane sunčevom sjetlošću koja je uočena i proučavana kod mnogih herbicida pogotovo u tekućoj otopini ili na površini listova biljke. Pendimetalin također podliježe fotodekompoziciji, te se takav tip reakcija iskorištava za uklanjanje dotičnog herbicida iz tla i posljedično je, uz gubitak isparavanjem, jedan od glavnih razloga primjene pendimetalina.

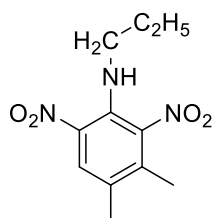
Dinitroanilinski herbicidi općenito se brzo degradiraju u vodenim medijima pri sunčevoj svjetlosti ultraljubičastih valnih duljina, te takva fotodegradacija uključuje reakcije oksidativne *N*-dealkilacije, nitro redukcije i ciklizacije.

Također, proučavana je fotodegradacija pendimetalina u različitim vrstama otapala i tlu, te su identificirani neki od produkata koji nastaju tim procesom. Istraživanje je provedeno na način da je jednaka količina uzorka pendimetalina otopljena u sljedećim organskim otapalima: *n*-heksan, benzen, aceton, kloroform, metanol, etanol i voda. Potom je svaka otopina bila izložena sunčevoj svjetlosti 80 sati, te je uzorak bio ekstrahiran i uparen do suha. Poslije toga provedla se analiza tankoslojnom kromatografijom, te je utvrđeno da se pendimetalin fotodegradira u svim korištenim otapalima, osim u metanolu i etanolu, gdje je detektiran isključivo kao čisti početni spoj. Na **slici 1.7.** vidljiv je rezultat opisane tankoslojne kromatografije.



Slika 1.7. Tankoslojna kromatografija pendimetalina pod utjecajem sunčevog zračenja u različitim vrstama otapala: 1. heksan, 2. benzen, 3. aceton, 4. kloroform, 5. voda, 6. etanol i 7. metanol

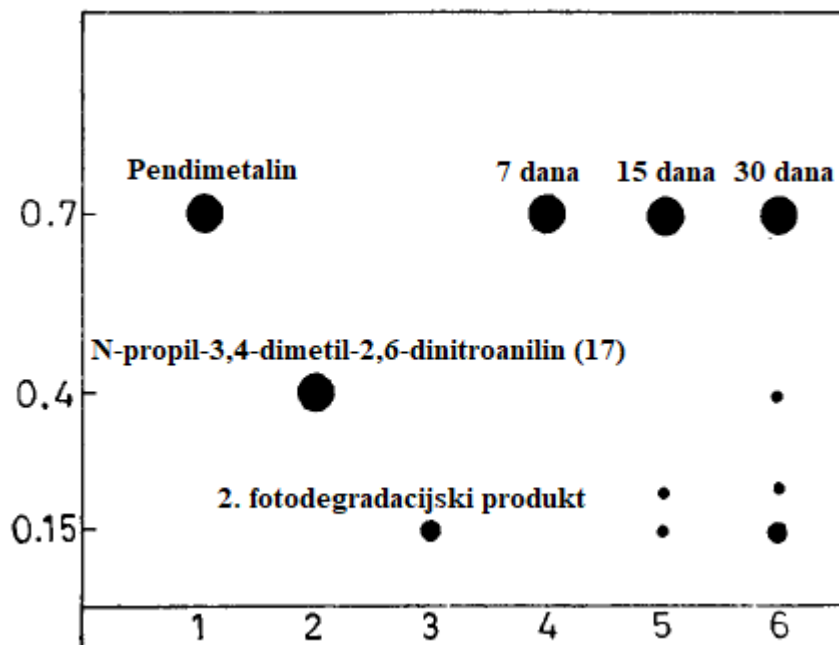
Dobiveni produkti analizirani su spektroskopskim tehnikama u svrhu njihove identifikacije. Pronađena su dva osnovna produkta fotodegradacije, te se jedan od njih identificiralo kao *N*-propil-3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin **17**, dok drugi nije bilo moguće identificirati zbog nedovoljne količine uzorka. Identificirani produkt fotodegradacije vidljiv je na **slici 1.8.** ispod.



17

Slika 1.8. Struktura *N*-propil-3,4-dimetil-2,6-dinitroanilina **17**

S druge strane, proučena je fotodegradacija pendimetalina u tlu, koja se provela na način da su pripremljeni tanki slojevi zemlje na koje su nanoseni jednaki volumeni uzorka pendimetalina. Tako pripremljene podloge bile su potom izložene sunčevom svjetlu 7, 15 i 30 dana, nakon čega su također analizirane tankoslojnom kromatografijom, a dobiveni produkti spektroskopskim tehnikama. Na **slici 1.9.** vidljivo je da nakon 7 dana nije razvijen niti jedan novi fotodegradacijski produkt pendimetalina u tlu, dok se nakon 15 javio prvi, neidentificirani produkt, a nakon 30 su vidljiva oba produkta uključujući i *N*-propil-3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin **17**. Pojava oba produkta s povećanjem vremenskog perioda od početka izlaganja pendimetalina ultraljubičastim zrakama, upućuje na to da se fotodegradacija ubrzava s vremenom.²



Slika 1.9. Tankoslojna kromatografija pendimetalina pod utjecajem sunčevog zračenja u tlu kroz vremenski period od 7, 15 i 30 dana

² Halder, P., Barua, A. S., Raha, P., Biswas, B., Pal, S., Bhattacharya, A., ... Chowdhury, A. (1989). *Studies on the photodegradation of pendimethalin in solvents and in Kalyani soil. Chemosphere, 18(7-8), 1611–1619. doi:10.1016/0045-6535(89)90051-9*

2.2.3 Svojstva herbicida

Svojstva herbicida koja mogu utjecati na njegovu postojanost u tlu su sljedeća kemijska svojstva: topivost u vodi, tlak para i osjetljivost molekula na kemijske ili mikrobne promjene ili razgradnje. Topivost herbicida u vodi određuje koliki će biti potencijal ispiranja određenog herbicida, odnosno kakvo će biti njegovo kretanje kroz profile tla nakon što je otopljen u vodi. Međutim ispiranje herbicida određuju i drugi čimbenici poput svojstava vezanja herbicida i tla, učestalosti i intenziteta oborina, fizičkih karakteristika tla, te koncentracije herbicida i vremena njegove primjene.

Tlak para herbicida određuje hlapljivost i općenito govoreći isparavanje se povećava s temperaturom i vlagom, te je većina herbicida u normalnim terenskim uvjetima relativno ne-hlapljiva.

Razgradnja pojedinog herbicida u tlu uvelike ovisi o kemijskoj strukturi istog. Neki herbicidi vrlo se brzo mogu degradirati odgovarajućom vrstom i brojem mikroorganizama uz povoljne uvjete za mikrobnu razgradnju koji su već prethodno navedeni, dok će drugi biti podložniji kemijskoj razgradnji. Iako se neke skupine herbicida mogu razgraditi na oba načina, one vrste koje se teže razlažu kemijskim putem uglavnom i primarno prolaze mikrobni degradacijski put, odnosno biorazgradnju.

2.2.4 Postojanost pendimetalina u tlu

Postojanost pendimetalina u tlu je umjerena s obzirom na podatak da mu vrijeme poluživota u tlu iznosi 90 dana, a u usporedbi s drugim dinitroanilinima pendimetalin ima relativno nisku hlapivost, zbog čega se manje gubi s površine tla isparavanjem. Također je važno napomenuti kako njegova široka upotreba, te postojanost i snažna adsorpcija na tlo i čestice sedimenta dovode do čestog otkrivanja ove kemikalije u tlu i vodi, iako je koncentracija pendimetalina u površinskim vodama znatno manja od one u tlu, radi prethodno spomenute snažne adsorpcije na tlo i čestice sedimenta. Njegova prisutnost također je otkrivena i u različitim životinjskim ekosustavima uključujući ribe, vodene beskrležnjake i ptice.

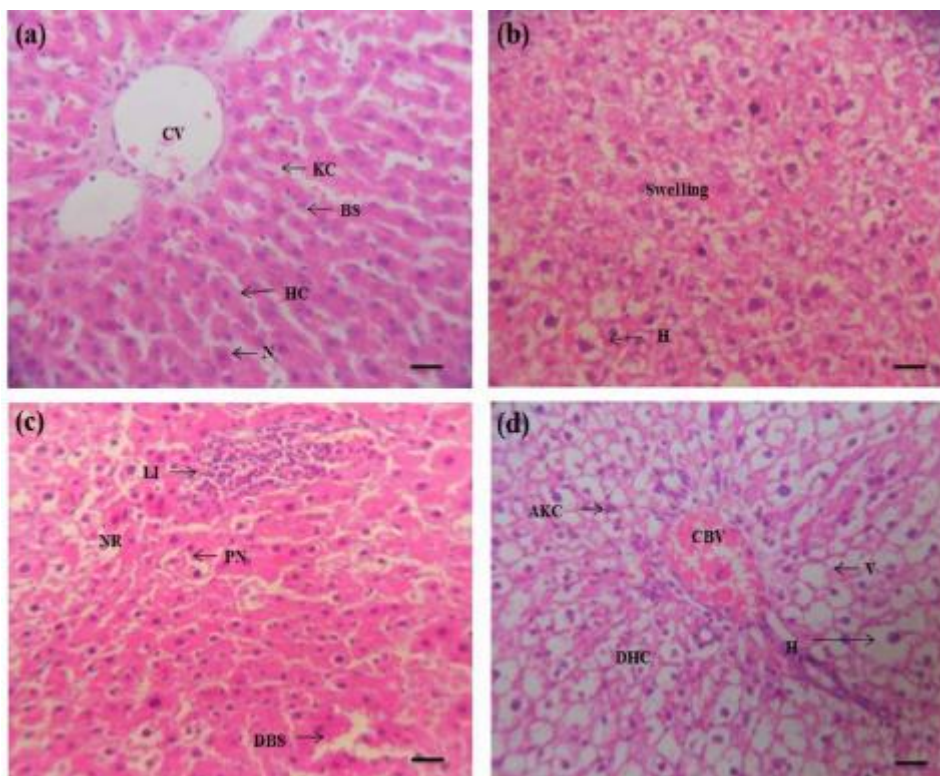
Pendimetalin se iz okoliša može uklanjati biotičkim ili abiotičkim putevima, što podrazumijeva postupke isparavanja, degradacije i biorazgradnje. Biorazgradnja, odnosno degradacija pendimetalina mikrobima, različitim sojevima bakterija i gljivicama koje se nalaze u tlu, obuhvaća važne metaboličke puteve ovog herbicida, o kojima će se više govoriti u nastavku ovog rada.

2.3 Toksičnost pendimetalina

Američka agencija za zaštitu okoliša (EPA) klasificira pendimetalin kao „blago toksičan“ spoj (klasa toksičnosti III) i mogući kancerogen za ljude (skupina C). Ljudi u doticaj s pendimetalinom dolaze na radnom mjestu, te se izlažu kožom, udisanjem i gutanjem aerosola za vrijeme miješanja i primjene herbicida, te doticaja s tretiranim biljkama. Međutim, unatoč niskoj akutnoj toksičnosti pendimetalina, u gotovim pripravcima herbicida često se osim pendimetalina dodaju i druge tvari razmjerno veće toksičnosti poput monoklorbenzena (MCB). Jedan takav gotov pripravak herbicida naziva se Prowl™, te je klasificiran kao moćan depresiv središnjeg živčanog sustava, životinjski onkogen, mutagen i teratogen, odnosno uzrok pojavljivanja urođenih mana, toksičan za jetru, bubrege i krvožilni sustav, a može suzbiti i imunološki sustav. No i za sam pendimetalin istraživanjima je otkriveno da uzrokuje nastajanje tumorskih stanica u štakora (**slike 1.10. i 1.11.**), što je potaknulo daljnja istraživanja o utjecaju na zdravlje čovjeka i kancerogenost. Tako oralna vrijednost mediana letalne doze za štakore iznosi $LD_{50} = 1250$ mg/kg, dok je dermalna vrijednost za kuniće $LD_{50} = 5000$ mg/kg, iz čega se može zaključiti da je pendimetalin blago toksičan oralnim izlaganjem, dok je netoksičan za izlaganje kožom. Dopušteni dnevni unos ovog herbicida iznosi 0,02 mg/L. Jedan od učinaka pendimetalina na zdravlje čovjeka temelji se na povišenom krvnom testu alkalne fosfataze, enzima koji u previsokoj koncentraciji ukazuje na povećanje težine jetre i lezije na jetri, što može za posljedicu može imati i razvoj karcinoma. Također postoje studije u kojima se pendimetalin povezuje s povećanjem frekvencije mikronukleusa i uzrokovanjem kromosomskog oštećenja. Osim toga pendimetalin je izrazito toksičan za ribe i vodene beskralježnjake, te mu vrijednost mediana letalne doze za te vrste iznosi $LD_{50} = 0,138-280$ ppm.³

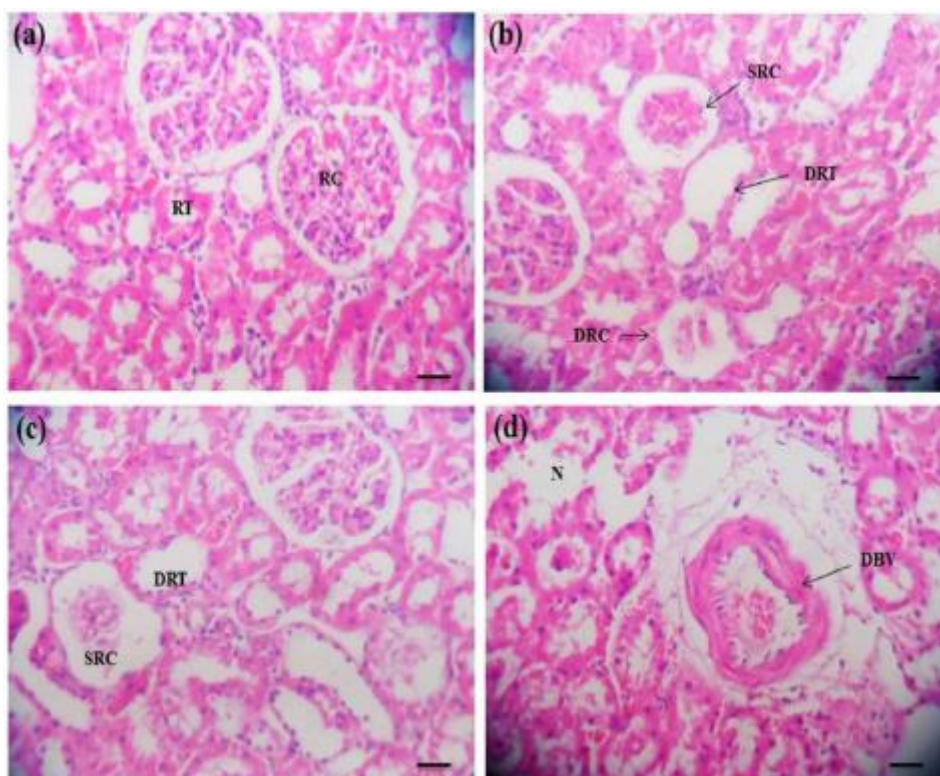
U svrhu povezivanja širokog spektra poljoprivrednih i životnih čimbenika s rizikom od pojave karcinoma i drugih kroničnih bolesti, poput Parkinsonove, te utjecaja na zdravlje ljudi i okoliš općenito, provedena su mnoga i različita istraživanja.

³ ChemicalWatch Factsheet A Beyond Pesticides/ NCAMP Factsheet; Pendimethalin; www.beyondpesticides.org



Slika 1.10. Histopatologija inducirana pendimetalinom u jetri štakora (slika a prikazuje normalan histološki izgled stanice, dok su na ostalim slikama vidljive različite histološke promjene stanice poput: oticanja, infiltracije leukocita (LI), dilatacije sinusoida krvi (DBS), velike vakuolacije (V) itd.)⁴

⁴ Ahmad, M.I., Zafeer, M.F., Javed, M. *et al.* Pendimethalin-induced oxidative stress, DNA damage and activation of anti-inflammatory and apoptotic markers in male rats. *Sci Rep* **8**, 17139 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35484-3>

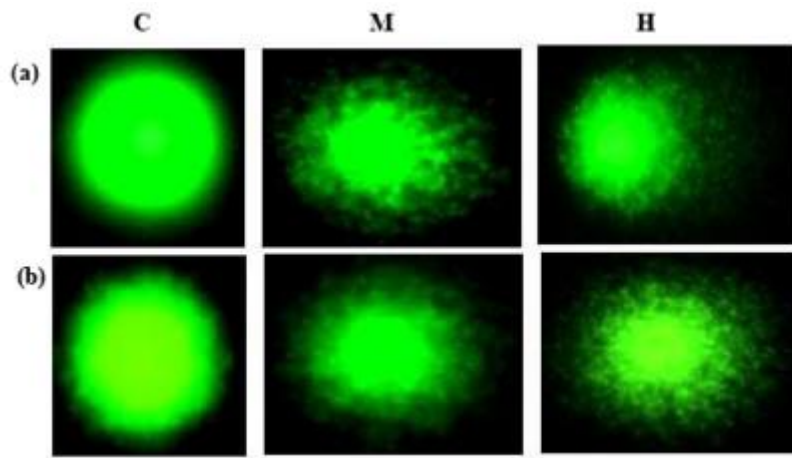


Slika 1.11. Histopatološka lezija izazvana pendimetalinom u bubrezima štakora (slika a prikazuje normalan izgled stanice bubrega štakora, dok su na drugim slikama vidljive histološke promjene) ⁴

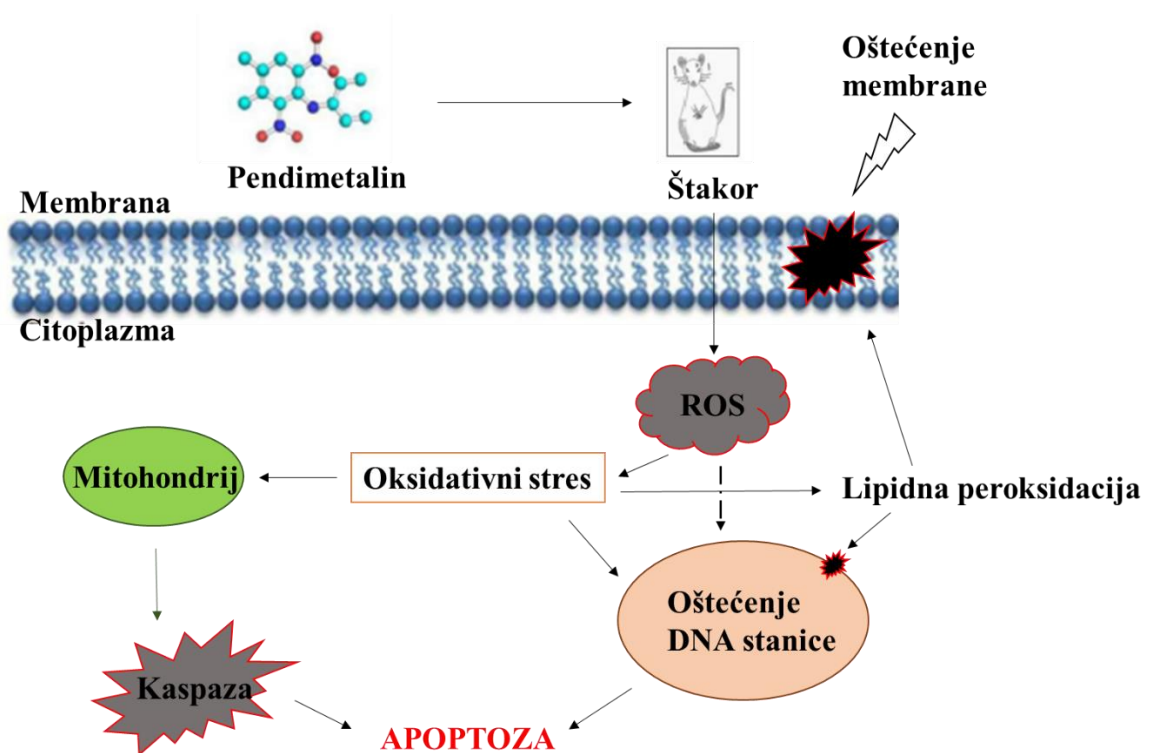
2.3.1 Genotoksičnost pendimetalina

Otkriveno je da pendimetalin može izravno oštetiti DNA stanice (**slika 1.12.**). U istraživanju je ispitivan genotoksični i citotoksični učinak pendimetalina na V79, stanicu izoliranu iz pluća hrčka i humanu stanicu limfocita. Kada je koncentracija pendimetalina dodana ispitivanoj stanici bila manja od 100 μ M postotak oboljelih stanica bio je nizak. Međutim, iznad te koncentracije vitalnost stanica se značajno smanjila. Za otkrivanje oksidativnog oštećenja DNA stanice koristio se enzim FPG (formamidopirimidin DNA glikozilaza), enzim koji u tijelu inače prepoznaje i uklanja širok spektar oksidiranih purina iz odgovarajuće oštećene DNA zahvaljujući visokom afinitetu za oksidirane purine. Ovim ispitivanjem također je uočeno da pendimetalin povećava frekvenciju mikronukleusa, te posljedično ima sposobnost kromosomskog oštećenja, a takva vrsta oštećenja klasificirana je kao marker karcinoma. Skupine pendimetalina koje predstavljaju potencijalni problem oksidativnog oštećenja DNA

lanaca što vodi putem stanične smrti, te genotoksičnosti i citotoksičnosti, ako na vrijeme ne djeluju mehanizmi popravka DNA, su dvije nitro i jedna anilinska skupina.⁵



Slika 1.12. Parametri oštećenja DNA kometnim testom u stanicama jetre i bubrega štakora izloženih različitim koncentracijama pendimetalina tijekom 14 dana⁴



Slika 1.13. Mehanizam staničnog oksidativnog stresa izazvanog pendimetalinom, oštećenje stanične membrane i DNA koje potiče apoptotski put stanice u štakora⁴

⁵ Sarıgöl Kılıç, Z., Aydın, S., Ündeğer Bucurgat, Ü., & Başaran, N. (2018). In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. Food and Chemical Toxicology, 113, 90–98.

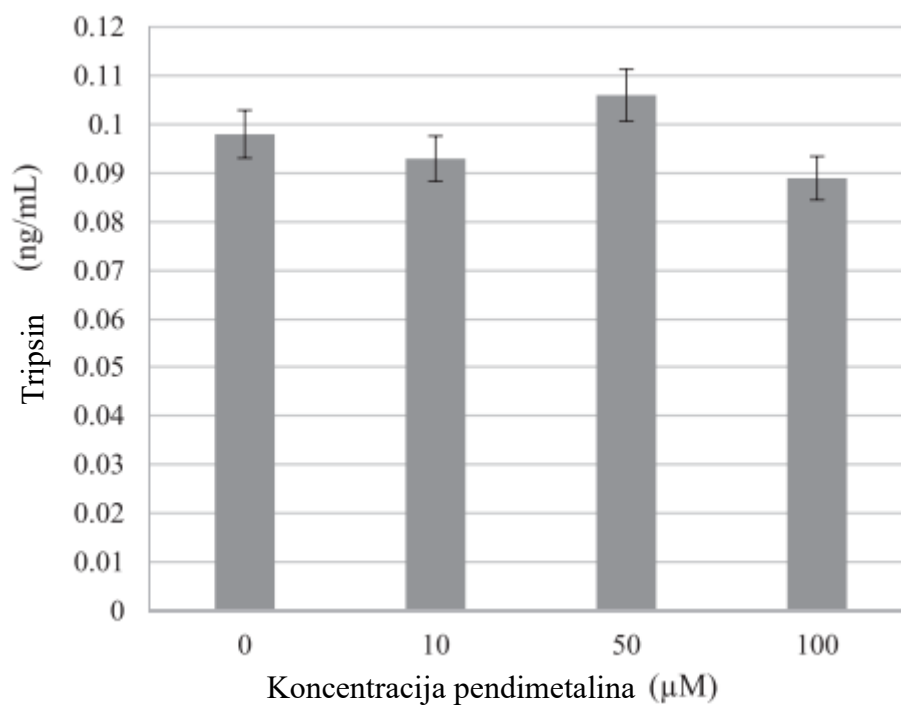
Slika 1.13. prikazuje mehanizam pojave oksidativnog oštećenja DNA stanice i stanične membrane što posljedično dovodi do apoptoze, odnosno stanične smrti. ROS predstavlja reaktivnu kisikovu vrstu, odnosno slobodno stvoreni radikal koji se često veže na višestruko nezasićene masne kiseline, što za posljedicu ima lipidnu peroksidaciju, te stvaranje oksidativnog stresa. Kaspaza je enzim, također odgovoran za staničnu smrt.

2.3.2 Pendimetalin i karcinom gušterače

Karcinom gušterače je rijetka, no brzo-napredujuća i fatalna bolest. Pušenje cigareta dosad je najbolje utvrđeni faktor rizika, koji objašnjava tek 25% slučajeva obolijevanja. Osim pušenja mogući su još neki faktori rizika od kojih valja izdvojiti slijedeće: dijabetes, pretilost, pankreatitis, obiteljska anamneza karcinoma gušterače, te doticaj s određenim herbicidima, među koje spada i pendimetalin. Zbog malog broja slučajeva oboljelih dugo se nije ispitivao utjecaj korištenja ovoga herbicida, no kasnijim istraživanjima utvrdila se statistički značajna povezanost izloženosti i odgovora s karcinomom gušterače. Pendimetalin sadrži nitrozo spojeve ili tzv. nitrozaminske nečistoće, spojeve slične onima koji se nalaze u duhanskim proizvodima i koji se smatraju važnim uzrocima raka kod čovjeka, uključujući i rak gušterače.⁶

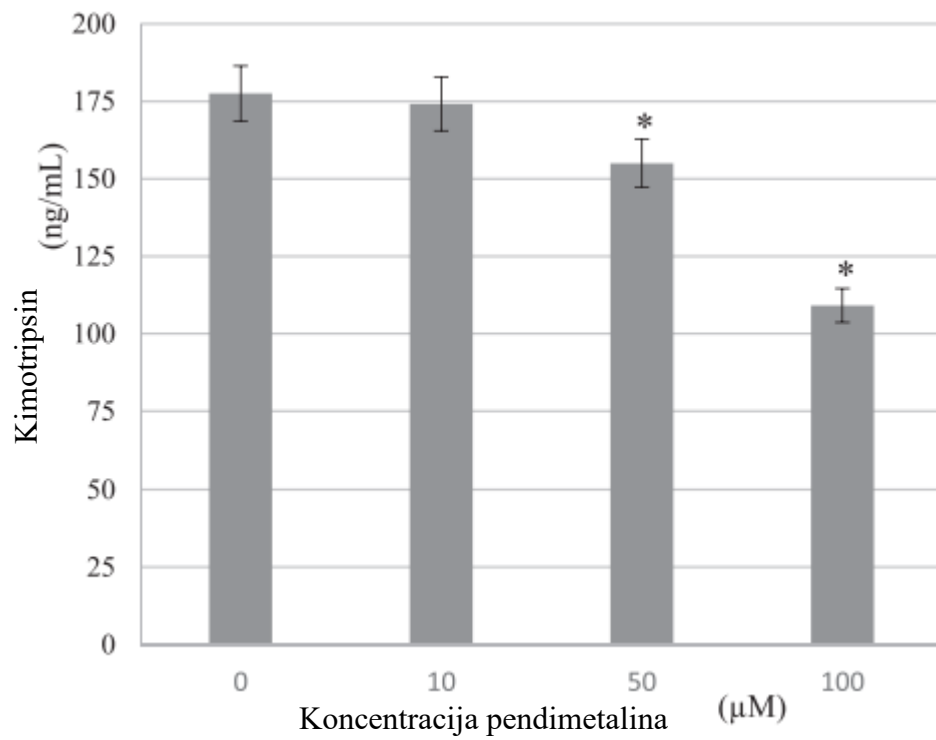
Na **slikama 1.14.** i **1.15.** vidljiv je trend opadanja nivoa enzima tripsina i kimotripsina uslijed izlaganja rastućim koncentracijama pendimetalina. Tripsin i kimotripsin su probavni enzimi, odnosno proteaze koje sudjeluju u razgradnji velikih proteinskih molekula, a proizvode se i oslobađaju u gušterači. Smanjena koncentracija ovih enzima uslijed izlaganja pendimetalinu, dovodi do oksidativnog stresa stanica i bolesti gušterače, pa i karcinoma.

⁶ Andreotti, G., Freeman, L. E. B., Hou, L., Coble, J., Rusiecki, J., Hoppin, J. A., ... Alavanja, M. C. R. (2009). Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. *International Journal of Cancer*, 124(10), 2495–2500. [doi:10.1002/ijc.24185](https://doi.org/10.1002/ijc.24185)



Slika 1.14. Procjena promjene nivoa tripsina nakon izlaganja rastućim koncentracijama pendimetalina⁷

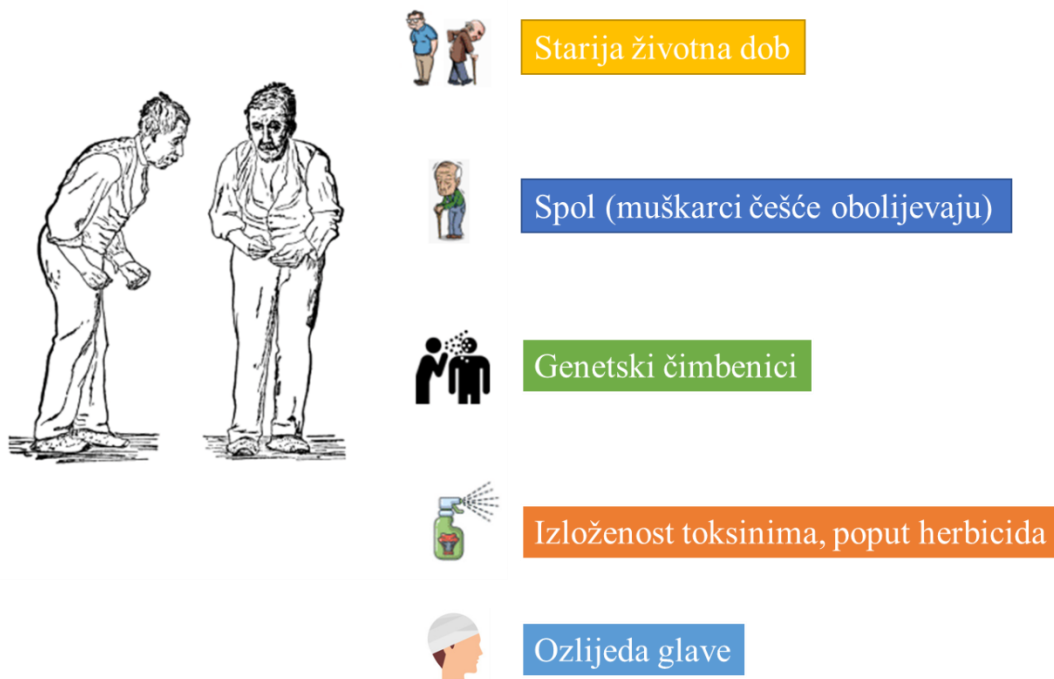
⁷ Arici, M., Abudayyak, M., Boran, T., & Özhan, G. (2020). Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation? *Chemosphere*, 252, 126644. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126644



Slika 1.15. Procjena promjene nivoa kimotripsina nakon izlaganja rastućim koncentracijama pendimetalina⁷

2.3.3 Pendimetalin i Parkinsonova bolest

Parkinsonova bolest progresivan je poremećaj centralnog živčanog sustava. Uzroci bolesti do sada nisu sasvim razjašnjeni, no pretpostavlja se kako etiologija bolesti uključuje genetske i okolišne čimbenike. Tako su mnoga istraživanja provedena u svrhu povezivanja pojave Parkinsonove bolesti s izloženosti herbicidima, što je posebice izraženo kod poljoprivrednih radnika. Otkrivena je pozitivna povezanost s korištenjem pendimetalina i pojavom bolesti, prevladavajući u onim slučajevima kada nije bila korištena osobna zaštita, kada se herbicid samostalno pripremao i nanosio, odnosno sama izloženost pendimetalinu je bila veća.⁸ Na **slici 1.16.** prikazani su dosad otkriveni čimbenici rizika za pojavu Parkinsonove bolesti.

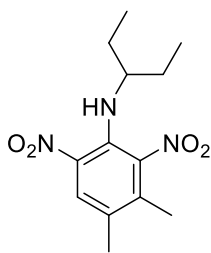


Slika 1.16. Čimbenici rizika za pojavu Parkinsonove bolesti

⁸ Kamel, F., Tanner, C., Umbach, D., Hoppin, J., Alavanja, M., Blair, A., ... Sandler, D. (2006). Pesticide Exposure and Self-reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 165(4), 364–374. [doi:10.1093/aje/kwk024](https://doi.org/10.1093/aje/kwk024)

3 REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu biti će detaljno opisana i definirana struktura herbicida pendimetalina, potkrijepljena nekim spektroskopskim karakterizacijama, dok će u nastavku rada biti priložena identifikacija i spektroskopska karakterizacija produkata nastalih procesima biorazgradnje spomenutog herbicida.

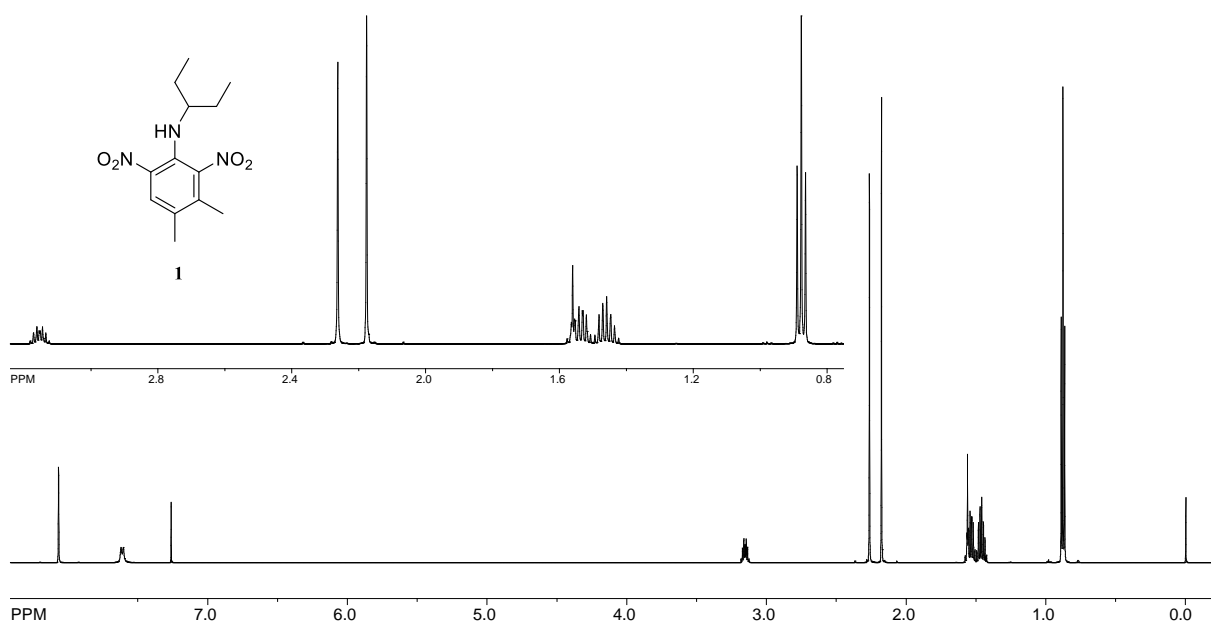


1

Slika 2.1. Struktura pendimetalina

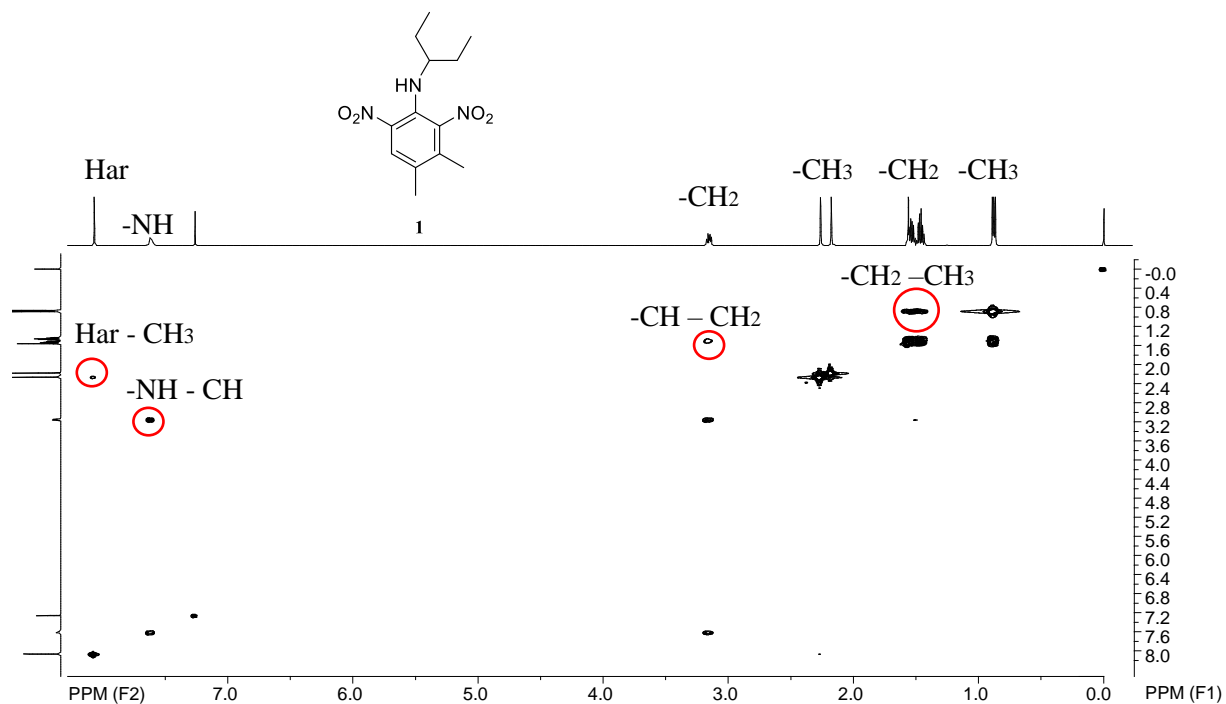
3.1 Spektroskopska karakterizacija strukture pendimetalina

^1H NMR spektar pendimetalina prikazan je na **slici 2.2.** U aromatskom području vidljiva su dva signala. Singletni signal na 8,06 ppm-a pripada jedinom protonu aromatskog prsten, dok dublet na 7,6 ppm-a pripada protonu $-\text{NH}$ skupine, dajući dubletni signal zbog prisutnosti susjedne $-\text{CH}$ skupine. U alifatskom dijelu spektra vide se dva singletna signala na 2,26 ppm-a i 2,17 ppm-a, koji odgovaraju protonima dviju metilnih skupina vezanih na aromatski prsten, odnosno benzilnim protonima. Također, od 3,1 do 3,2 ppm-a nalazi se multipletni signal koji odgovara protonu $-\text{CH}$ skupine, pomaknut u nezasjenjeno područje, odnosno nisko polje zbog induktivnog efekta elektronegativnog dušika. S druge strane, protoni $-\text{CH}_2$ skupina obilježeni su dvama multipletima od 1,4 ppm-a do 1,6 ppm-a. Tripletni signal na 0,86 ppm-a predstavlja preklapanje dvaju identičnih signala za $-\text{CH}_3$ skupine, za razliku od kojih su signali već prethodno spomenutih susjednih protona $-\text{CH}_2$ skupina međusobno razvedeni.



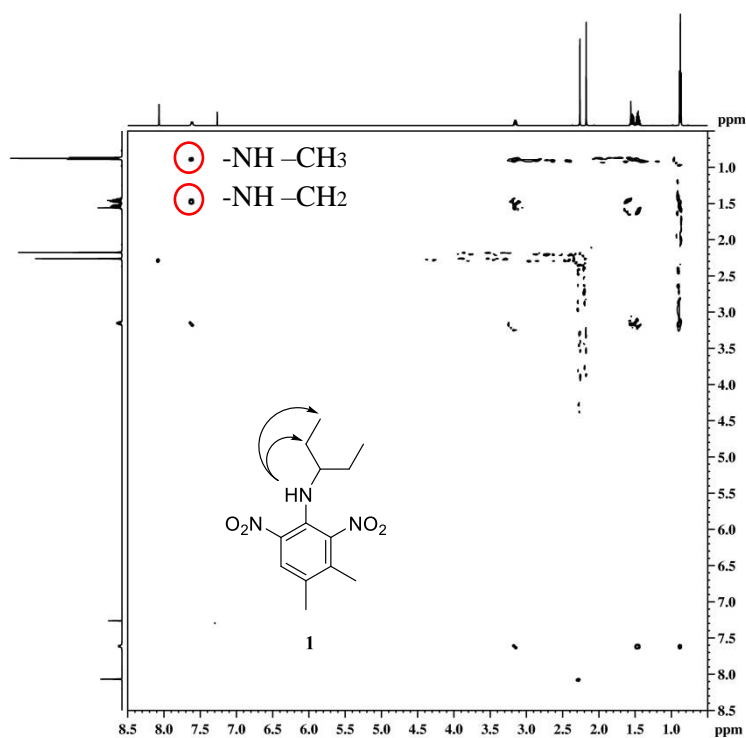
Slika 2.2. ^1H NMR spektar pendimetalina

Slika 2.3. prikazuje COSY spektar pendimetalina, odnosno sprege protona unutar kemijske strukture s određenim konstantama. Vidljivo je sprezanje između aromatskog i metilnih protona, protona unutar amino skupine i –CH skupine s konstantom sprege oko 10 Hz, zatim sprezanje protona –CH i –CH₂ skupina, te protona –CH₂ i –CH₃ skupina s konstantom od 7,48 Hz.



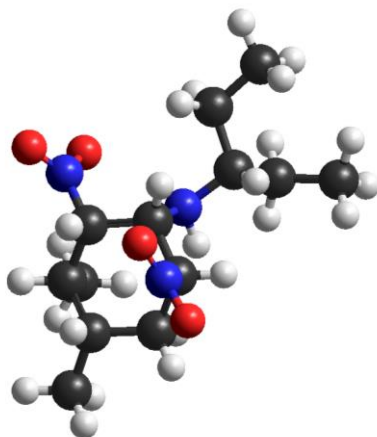
Slika 2.3. ¹H - ¹H COSY spektar pendimetalina

Na **slici 2.4.** vidljiv je NOESY spektar pendimetalina, odnosno spektar koji omogućava određivanje stereokemije željene molekule, budući da se vidi interakcija protona kroz prostor. Prema tome, na prikazanom spektru vidljivo je da se posebice ističe interakcija protona amino skupine s protonima $-CH_2$ i $-CH_3$ skupine.



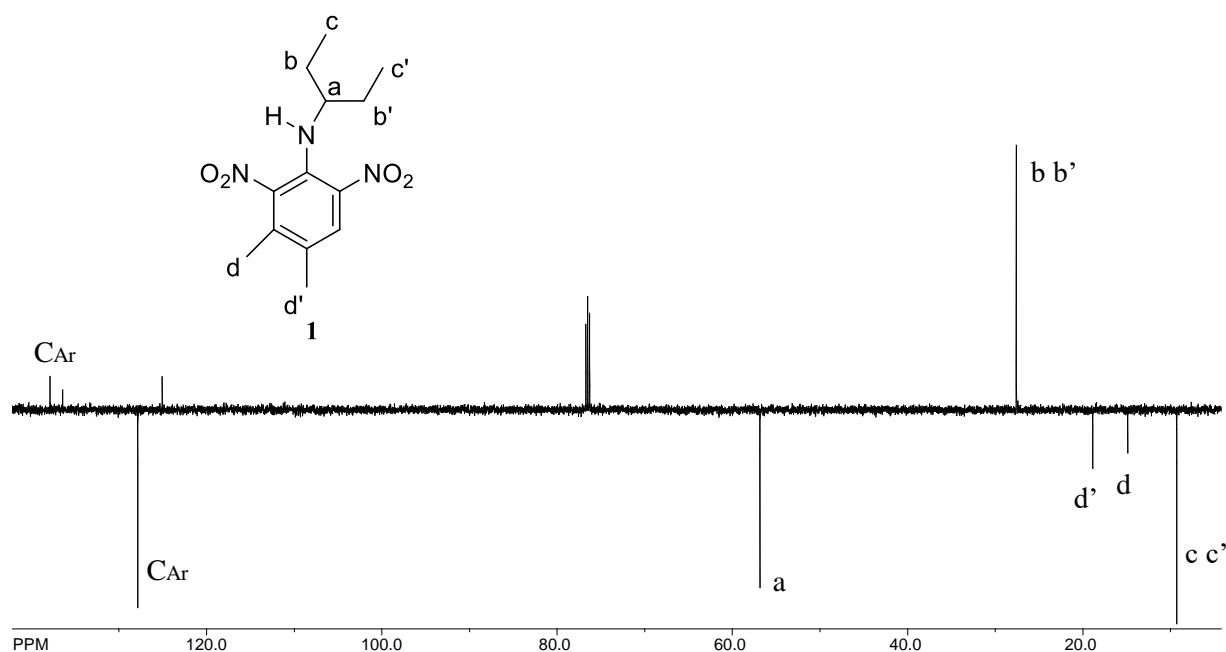
Slika 2.4. NOESY spektar pendimetalina

U svrhu određivanja najpovoljnije moguće stereokemije, odnosno 3D prostorne strukture molekule pendimetalina, korišten je program HyperChem, te je dobivena struktura prikazana na **slici 2.5.**



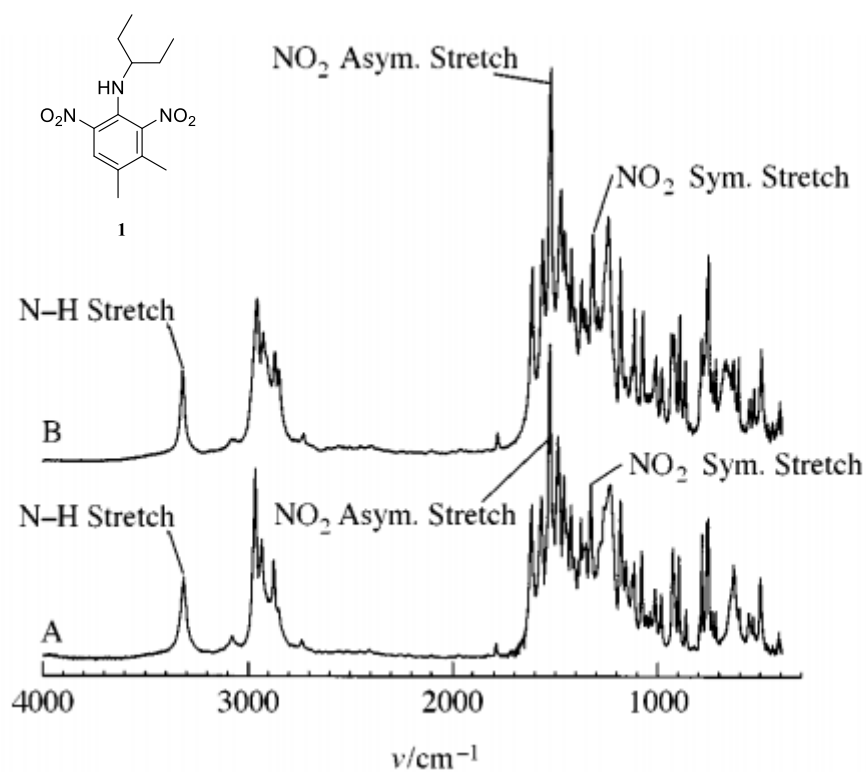
Slika 2.5. 3D prostorna strukture molekule pendimetalina

Slika 2.6. predstavlja ^{13}C spektar pendimetalina. Signali koji se nalaze na lijevoj strani spektra, u intervalu od 120 do 140 ppm-a, predstavljaju ugljikove atome aromatskog prstena. U području od 10 do 60 ppm-a nalaze se signali za alkilne ugljike u uobičajenom redosljedu sa smanjenjem ppm-a ($-\text{CH} > -\text{CH}_2 > -\text{CH}_3$). Pritom uzimajući u obzir da ugljici dviju $-\text{CH}_2$ skupina međusobno dijele jedan signal, kao i ugljici $-\text{CH}_3$ skupina, budući da su kemijski ekvivalentni. Dva manja signala ugljika metilnih skupina vezanih na aromatski prsten nalaze se unutar intervala od 15 do 20 ppm-a.



Slika 2.6. ^{13}C spektar pendimetalina

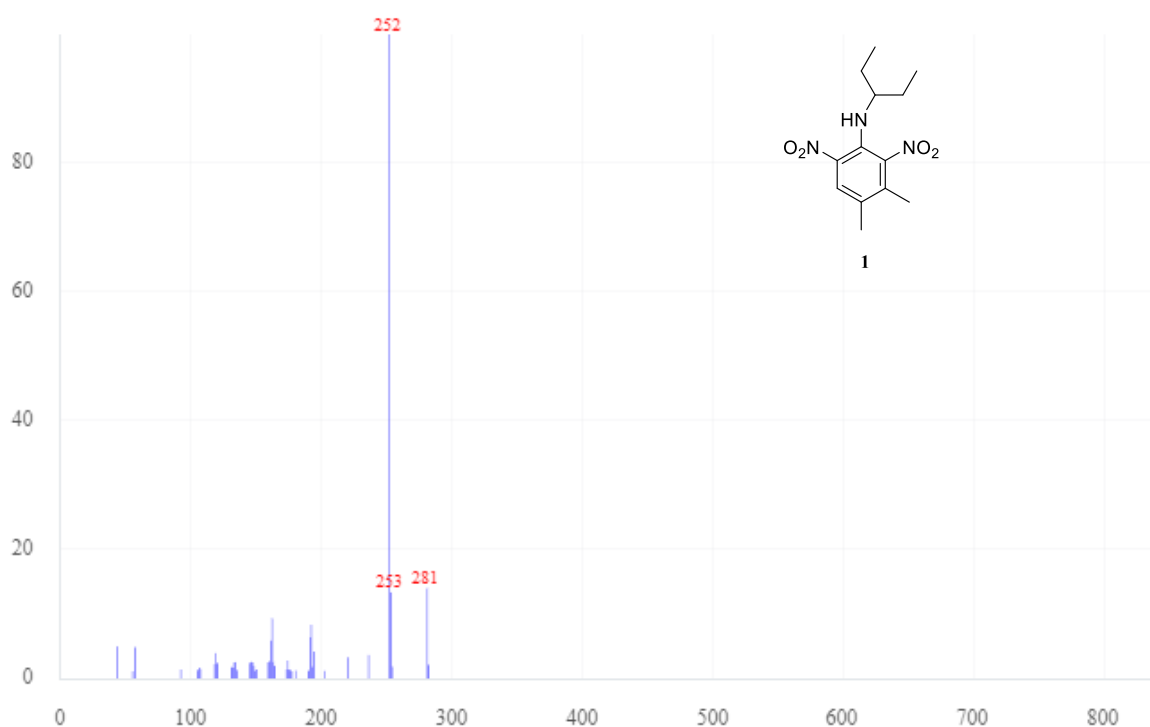
Na **slici 2.7.** prikazan je infracrveni spektar pendimetalina, te je vidljivo nekoliko karakterističnih rastezanja. Jedan signal na $3318,6\text{ cm}^{-1}$ označava N-H rastezanje sekundarnog amina, dok oštar pik na $1531,8\text{ cm}^{-1}$ predstavlja asimetrično rastezanje NO_2 skupine, a na $1330,1\text{ cm}^{-1}$ simetrično rastezanje NO_2 skupine.



Slika 2.7. IR spektar pendimetalina⁹

⁹ Stockton, G. W., Godfrey, R., Hitchcock, P., Mendelsohn, R., Mowery, P. C., Rajan, S., & Walker, A. F. (1998). Crystal polymorphism in pendimethalin herbicide is driven by electronic delocalization and changes in intramolecular hydrogen bonding. A crystallographic, spectroscopic and computational study. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (9), 2061–2072. [doi:10.1039/a705178f](https://doi.org/10.1039/a705178f)

Slika 2.8. prikazuje GC/MS (Plinska kromatografija/ spektrometrija masa) spektar pendimetalina. Na masenom spektru istaknut je jedan pik $m/z = 252$. Takav fragment može se objasniti nastajanjem stabilnog kationa izlaskom etilne skupine iz početnog spoja, budući da molekulska masa spoja iznosi 281,31 g/mol te se izlaskom etilne skupine, čiji fragment ima molekulska masu 29 g/mol, dobiva ono što je vidljivo na prikazanom spektru odnosno ion molekulske mase 252 g/mol.



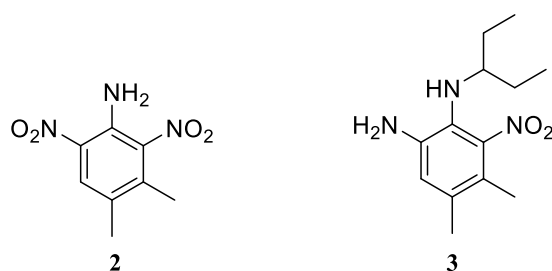
Slika 2.8. GC/MS spektar pendimetalina ¹⁰

¹⁰ National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Pendimethalin, CID=38479, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pendimethalin#section=Synonyms>

3.2 Biorazgradnja pendimetalina

Do danas je izolirano i okarakterizirano nekoliko mikroorganizama koji mogu razgraditi pendimetalin, uključujući *Azotobacter chroococcum*, *Fusarium oxysporum*, *Pyricularia oryzae* Cav., *Lecanicillium saksenae*, *Bacillus circulans* i *Bacillus subtilis* Y3. Degradacijski put pendimetalina navedenim mikroorganizmima sažet je i predložen na temelju strukturne identifikacije degradacijskih metabolita, odnosno produkata koji se javljaju tijekom reakcija degradacije pendimetalina HPLC-MS/MS spektroskopskim tehnikama, te je shematski prikazan na **slici 2.10**.¹¹

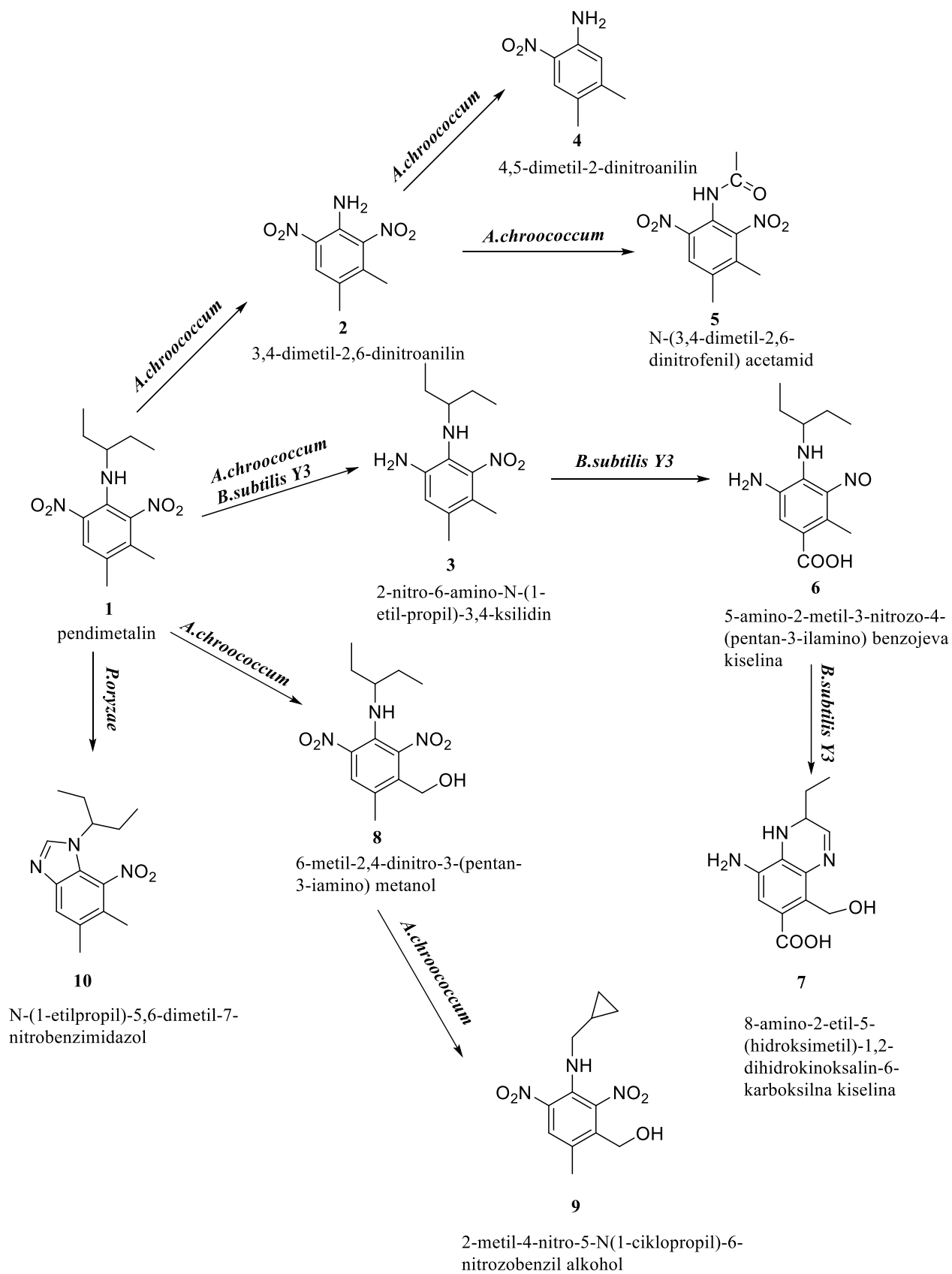
Različitim istraživanjima otkriveni su i drugi mikroorganizmi koji mogu razgraditi pendimetalin. Tako primjerice gljivice *Paecilomyces varioti* i *Rhizoctonia bataticola*, koje se mogu pronaći u tlu, uspješno degradiraju pendimetalin tvoreći produkte prikazane na **slici 2.9**. ispod, a koji se također mogu pronaći i na širem degradacijskom prikazu na **slici 2.10**, budući da te iste produkte tvore i neke druge vrste mikroorganizama.



*Slika 2.9. Degradacijski produkti pendimetalina mikroorganizmima Paecilomyces varioti i Rhizoctonia bataticola*¹²

¹¹ Ni, H., Wang, F., Li, N., Yao, L., Dai, C., He, Q., ... Hong, Q. (2016). Pendimethalin Nitroreductase Is Responsible for the Initial Pendimethalin Degradation Step in *Bacillus subtilis* Y3. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7052–7062. [doi:10.1128/aem.01771-16](https://doi.org/10.1128/aem.01771-16)

¹² S.B. Singh & G. Kulshrestha (1991) Microbial degradation of pendimethalin, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 26:3, 309-321

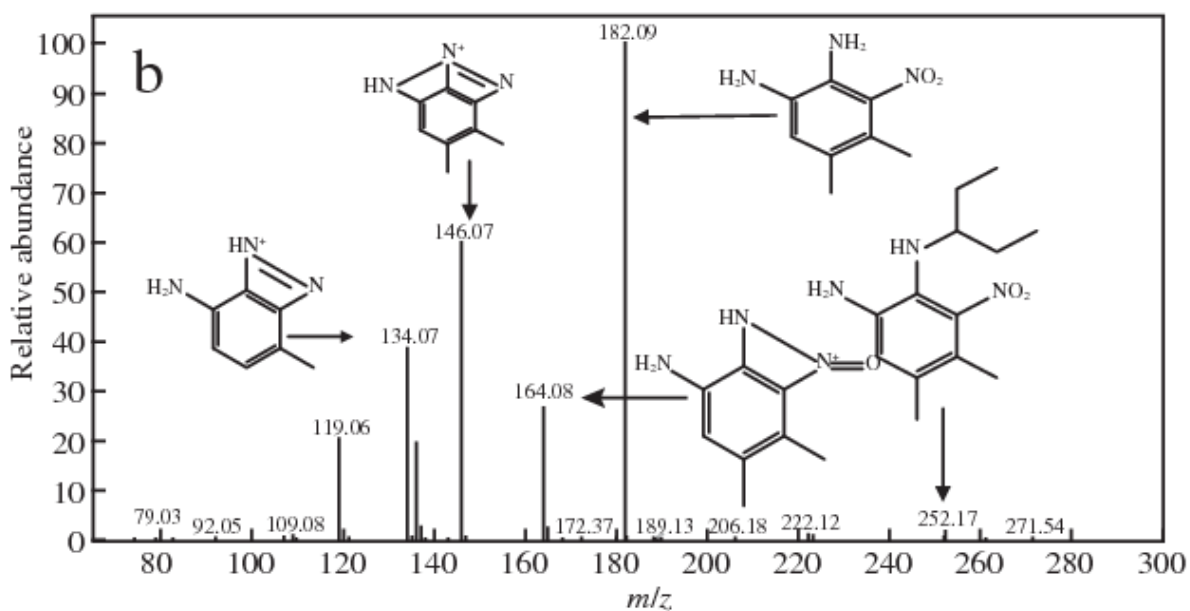


Slika 2.10. Shematski prikaz degradacijskog puta pendimetalina i produkata koji njime nastaju

3.2.1 Biorazgradnja pendametalina mikroorganizmom *Bacillus subtilis* Y3

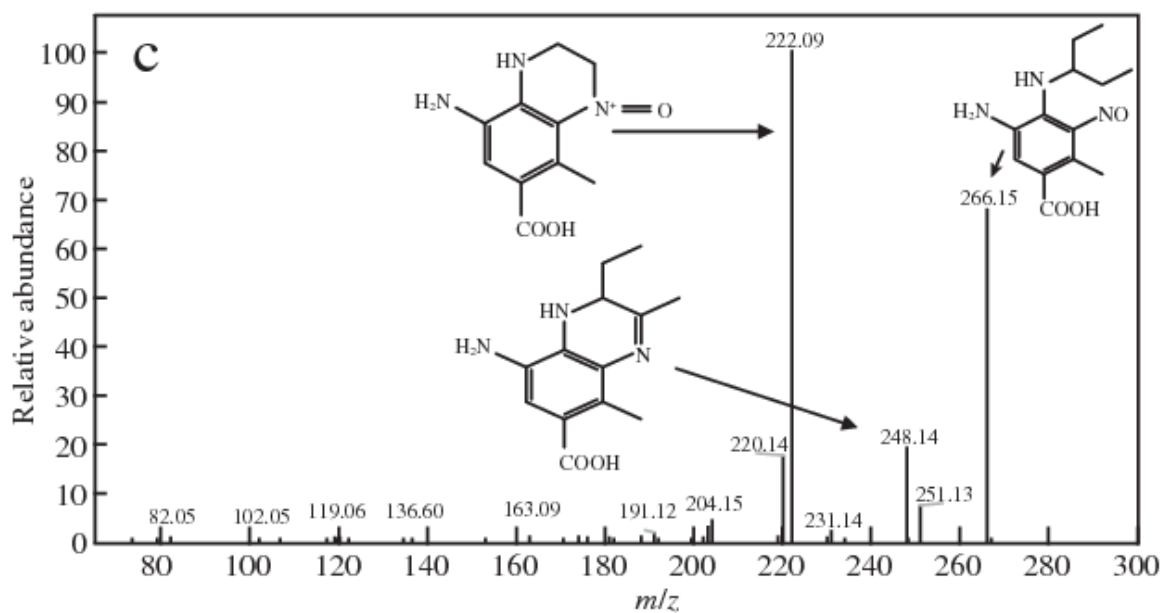
Bacillus subtilis Y3 je gram-pozitivna, sporogena bakterija za koju je dokazano da učinkovito degradira pendimetalin, a može se izolirati iz aktivnog mulja i identificirati prema svojim fenotipskim značajkama i filogenetskoj analizi ribosomalne ribonukleinske kiseline (rRNA). Ovaj soj bakterija može razgraditi 99,5% od 100 mg/L pendimetalina u roku od 2,5 dana u tekućoj kulturi, što pokazuje veću učinkovitost biodegradacije od bilo koje druge vrste mikroorganizama.¹³

Postupnom degradacijom daje tri metabolička produkta 2-nitro-6-amino-*N*-(1-etil-propil)-3,4-kstilidin **3**, 5-amino-2-metil-3-nitrozo-4-(pentan-3-ilamino) benzojevu kiselinu **6** i 8-amino-2-etil-5-(hidroksimetil)-1,2-dihidrokinoksalin-6-karboksilnu kiselinu **7**. Produkti su identificirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti u sustavu s masenom spektroskopijom (HPLC-MS/MS), te su sa svojim karakterističnim signalima na masenim spektrima prikazani na slikama 2.11., 2.12. i 2.13. ispod.

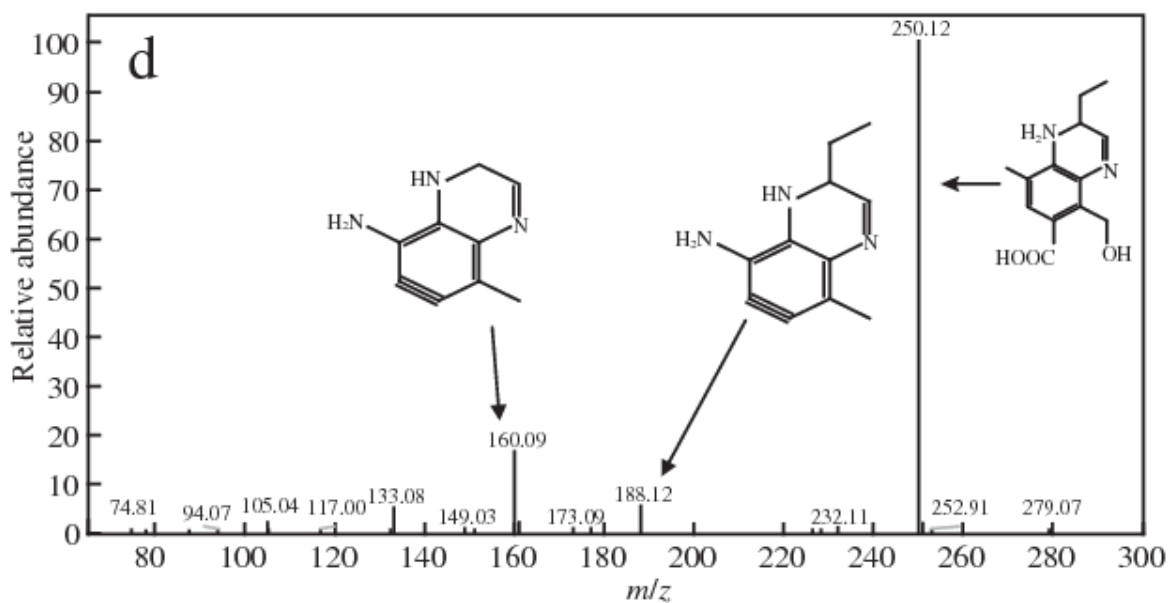


Slika 2.11. Maseni spektar degradacijskog produkta pendimetalina **3**¹³

¹³ Ni, H., Yao, L., Li, N., Cao, Q., Dai, C., Zhang, J., ... He, J. (2016). Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus subtilis* Y3. *Journal of Environmental Sciences*, 41, 121–127. (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.04.035>

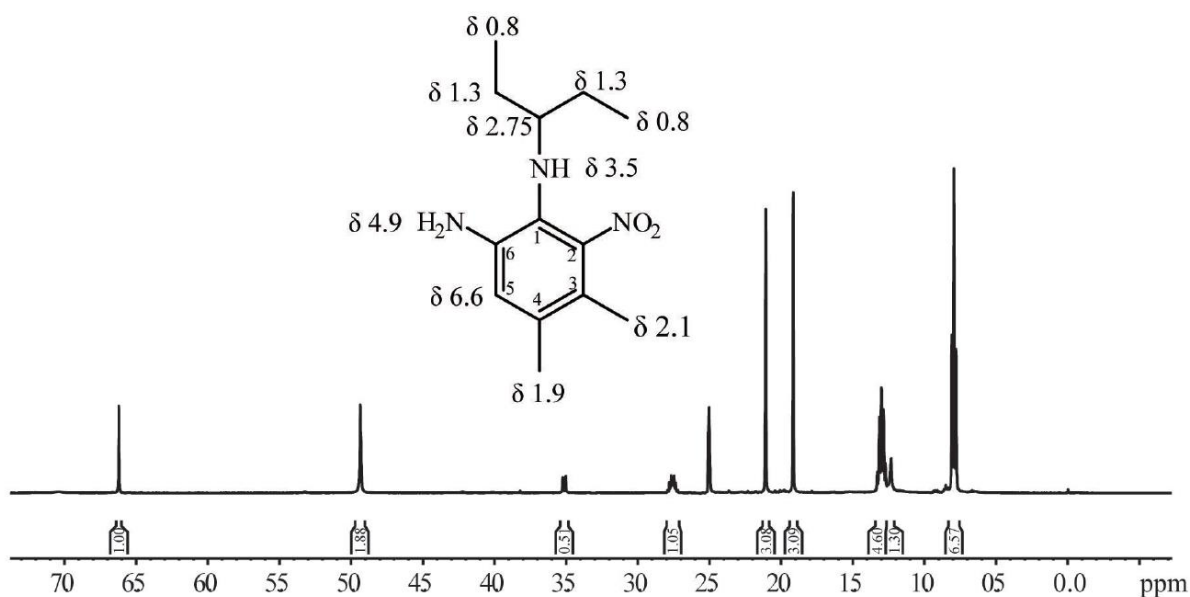


Slika 2.12. Maseni spektar degradacijskog produkta pendimetalina 6¹³



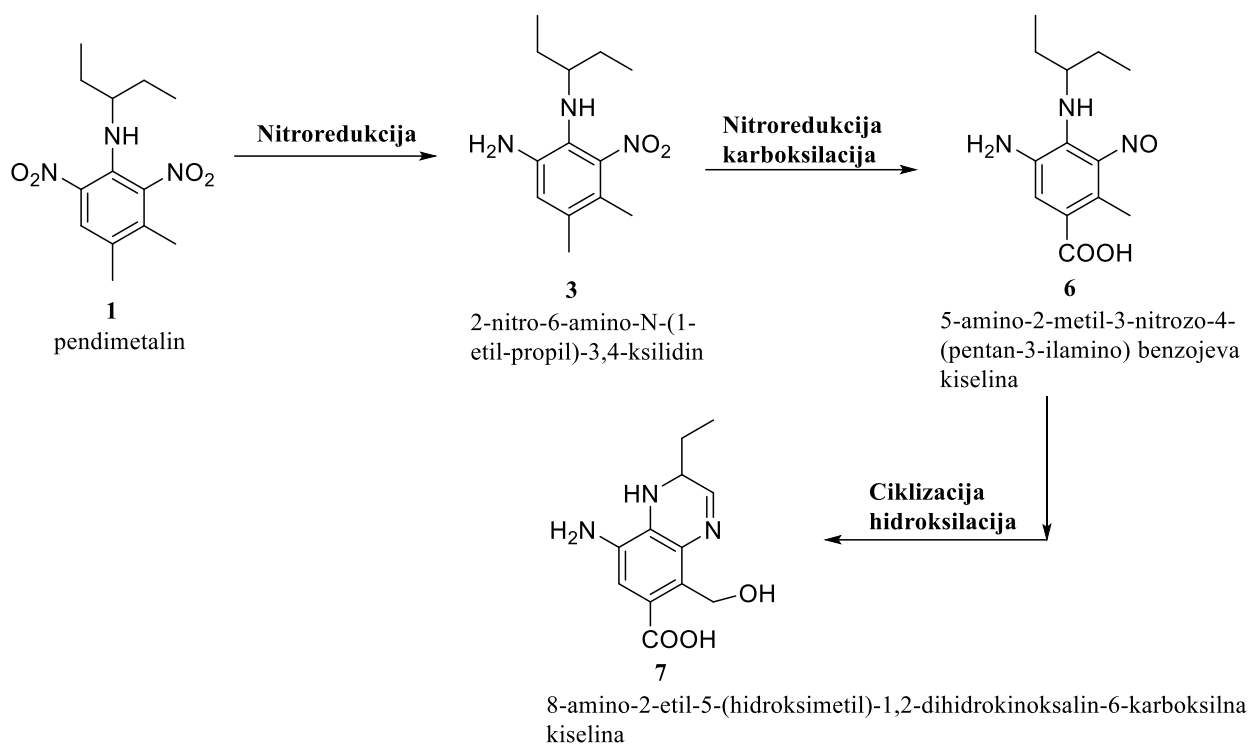
Slika 2.13. Maseni spektar degradacijskog produkta pendimetalina 7¹³

Osim toga prvi produkt nitroredukcije pendimetalina 3 identificiran je i ¹H NMR spektroskopskom tehnikom, te je dobiveni spektar prikazan na slici 2.14. ispod. Na spektru je vidljiv signal na 6,6 ppm-a za proton aromatskog prstena, 1,9 ppm-a i 2,1 ppm-a za protone dvije metilne skupine, te 4,9 ppm-a za proton amino skupine. Signali za protone *N*-(1-etilpropil) skupine javili su se na 3,5 ppm-a, 2,75 ppm-a, 1,3 ppm-a i 0,8 ppm-a.



Slika 2.14. ^1H NMR spektar degradacijskog produkta pendimetalina **3**¹³

U procesu degradacije ključan je korak u kojem se odvija nitroredukcija, budući da do sada nisu otkriveni geni ili enzimi koji bi svojim djelovanjem utjecali na proces degradacije pendimetalina, te je nitroredukcija generalna strategija u detoksikaciji nitroaromatskih produkata. Nitroredukcija je početni korak razgradnje i detoksikacije pendimetalina, a odvija se pomoću nitroreduktaze (PNR), koju je moguće izolirati i pročistiti iz soja mikroorganizama *Bacillus subtilis* Y3, odgovornih za degradaciju pendimetalina. PNR nitroreduktaza djeluje na način da reducira C-6 nitro skupinu aromatskog prstena pendimetalina u amino skupinu, dajući pritom produkt razgradnje **3**. Metabolit se nadalje transformira u produkt **6**, nitroredukcijom na nitro skupini povezanoj sa C-2 atomom i karboksilacijom arilmetilne grupe na C-4 atomu. Takav se produkt zatim transformira u **7**. Opisani degradacijski put pendimetalina vidljiv je na **slici 2.15.** ispod.



Slika 2.15. Put biorazgradnje pendimetalina mikroorganizmom *Bacillus subtilis* Y3

Dodatkom egzogene NADH uočeno je da je nitroreduktaza u ovom biodegradacijskom procesu imala povećanu aktivnost, što upućuje na to da bi NADH mogla biti kofaktor ove reakcije. Optimalna temperatura za djelovanje nitroreduktaze je 30°C, a pH vrijednost 7,5. Prisutnost iona žive (Hg^{2+}), nikla (Ni^{2+}), olova (Pb^{2+}), kobalta (Co^{2+}), mangana (Mn^{2+}), bakra (Cu^{2+}) i srebra (Ag^+), te EDTA snažno inhibiraju djelovanje nitroreduktaze, dok ju s druge strane ioni željeza (Fe^{2+}), magnezija (Mg^{2+}) i kalcija (Ca^{2+}) potiču. PNR također ima mogućnost katalize nitroredukcije triju drugih glavnih sorta herbicida pod kojima se podrazumijevaju butralin, orizalin i trifluralin. Međutim, prilikom nitroredukcije PNR-om navedenih herbicida može doći do redukcije dviju, umjesto jedne nitro skupine, što za posljedicu ima pojavu simetrije u nastalom produktu.

Provedeni testovi detoksikacije produkta **3**, otkrili su da nitroredukcijom dobiven produkt pendimetalina ne pokazuje inhibitorско djelovanje na rast određenih kultura kvasca poput *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, dok je pendimetalin **1**, s druge strane, na istom, pokazivao inhibitorски učinak. Taj podatak potvrđuje da PNR ima pretpostavljeni potencijal za detoksikaciju pendimetalina.

3.2.2 Biorazgradnja pendimetalina mikroorganizmom *Azotobacter chroococcum*

Azotobacter chroococcum je mikroaerofilna, gram-negativna rizobakterija, koja je po obliku bacil. Ova bakterija osim što potpomaže fiksaciju dušika u tlu i također je sredstvo za bioremedijaciju tla, budući da ima sposobnost vezivanja teških metala na sebe, te na taj način pospješuje proizvodnju usjeva, odgovorna je i za neke bolesti među kojima je i bolest duhanskog mozaika. No njeno svojstvo koje će se proučavati u ovom radu je sposobnost biodegradacije pendimetalina. Ona na pendimetalin, kao i na ostale herbicide dinitroaniline djeluje na način da ih degradira do ne-toksičnih produkata reakcijama *N*-dealkiliranja, nitroredukcije i ciklizacije.

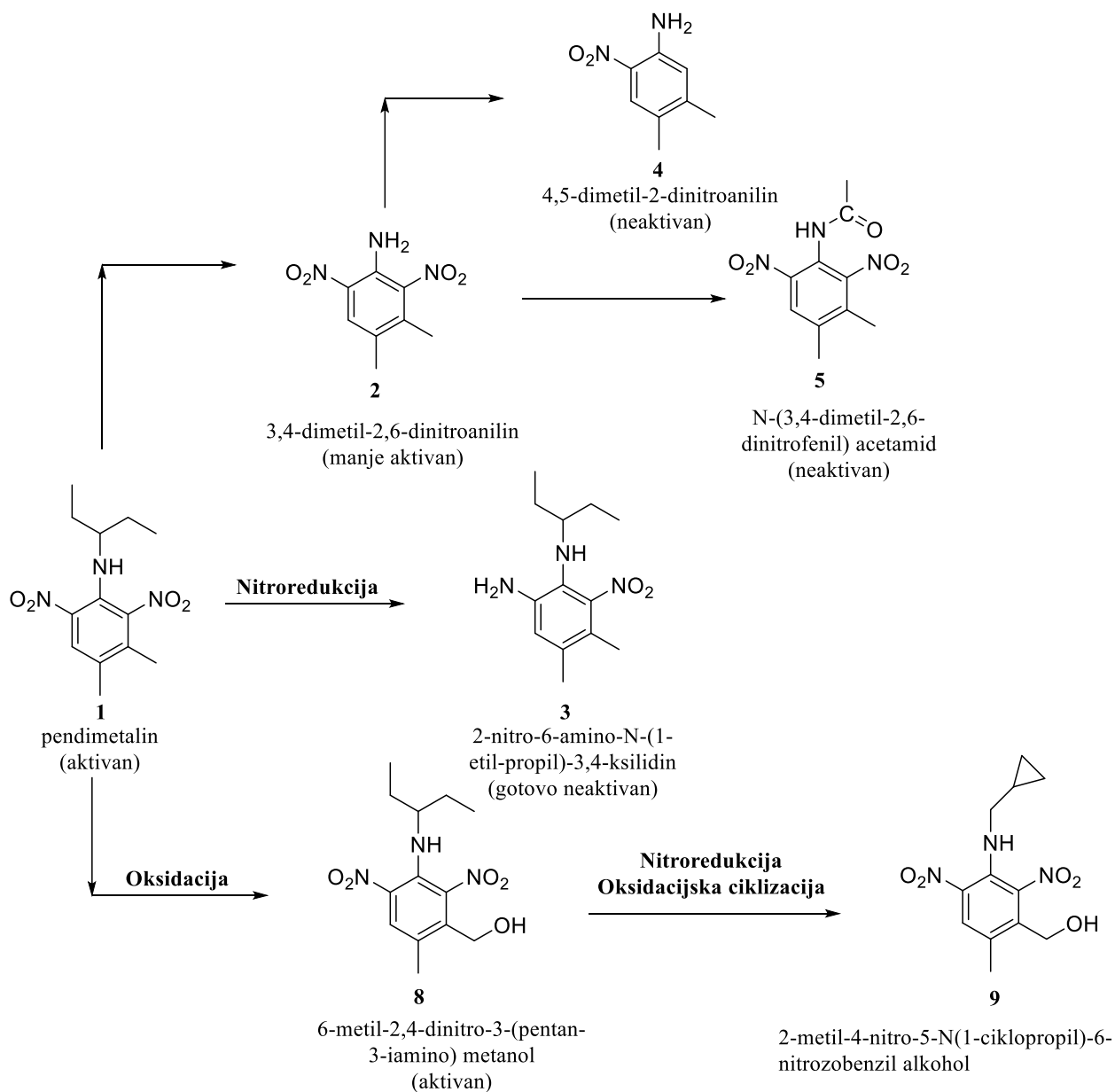
3.2.2.1 Produkti biorazgradnje

A. chroococcum efektivno degradira pendimetalin (45% u 10 dana, te 55% u 20 dana) u čistoj kulturi uz stvaranje metabolita 2-nitro-6-amino-*N*-(1-etil-propil)-3,4-ksilidina **3**, 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilina **2**, koji zatim prelazi u 4,5-dimetil-2-dinitroanilin **4** ili u *N*-(3,4-dimetil-2,6-dinitrofenil) acetamid **5**. Također, biorazgradnjom s ovim mikroorganizmom može nastati produkt 6-metil-2,4-dinitro-3-(pentan-3-iamino) metanol **8**, koji se dalje degradira do 2-metil-4-nitro-5-*N*-(ciklopropil)-6-nitrozobenzil alkohola **9**. Shematski prikaz navedenih produkata koji nastaju ovom biodegradacijom vidljiv je na **slici 2.16**.

Iz donjeg shematskog prikaza također je vidljivo da produkt pod oznakom **3** nastaje redukcijom nitro skupine na C-6 atomu pendimentalina, te da je minorni produk pod oznakom **8** nastao oksidacijom arilmetilne grupe na C-3 atomu pendimentalina, koji zatim djelomičnom redukcijom 2-nitro skupine i oksidacijskom ciklizacijom prelazi u novi metabolit koji se na ovom shematskom prikazu nalazi pod oznakom **9**. Osim toga na shematskom prikazu također su vidljivi i opisi aktivnosti pojedinih nastalih metabolita. Produkti **2** i **3** smatraju se glavnim metabolitima degradacije pendimentalina bakterijom *Azotobacter chroococcum* (**slika 2.16**).

14

¹⁴ Kole, R. K., Saha, J., Pal, S., Chaudhuri, S., & Chowdhury, A. (1994). Bacterial degradation of the herbicide pendimethalin and activity evaluation of its metabolites. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(5). [doi:10.1007/bf00195503](https://doi.org/10.1007/bf00195503)



Slika 2.16. Shematski prikaz produkata koji nastaju biodegradacijom pendimetalina mikroorganizmom *Azotobacter chroococcum*

3.2.2.2 Toksičnost produkata biorazgradnje

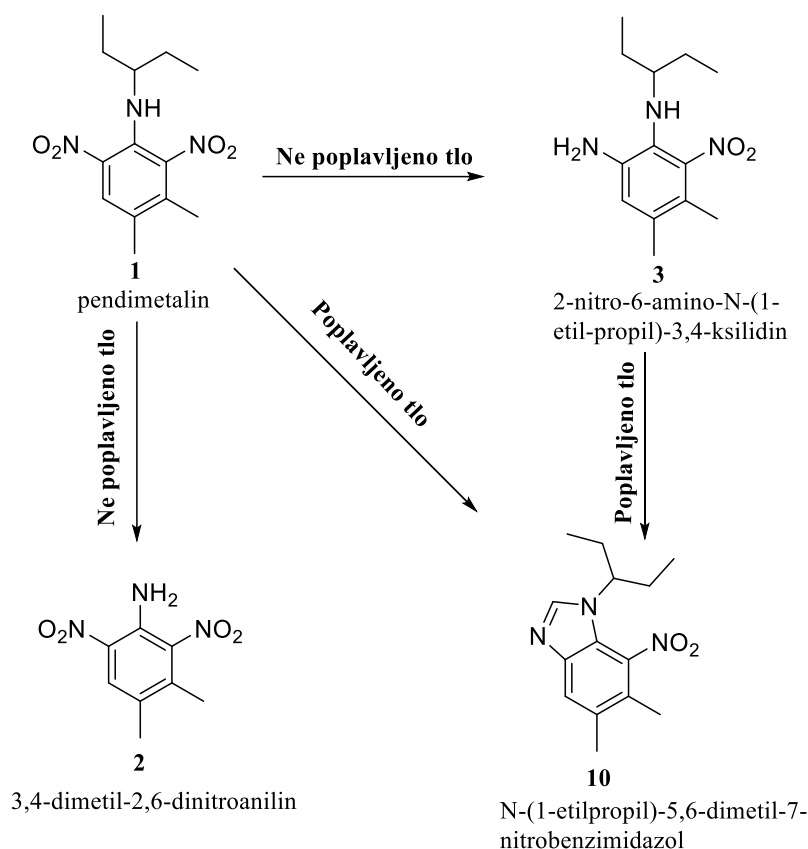
Pendimetalin, kao i drugi dinitroanilinski herbicidi pokazuje uobičajene simptome inhibicije rasta, odnosno fitotoksičnosti kod, primjerice, sadnica pšenice. Tako bi za prethodno opisane produkte biorazgradnje pendimetalina mikroorganizmom *Azotobacter chroococcum* (slika 2.16.) redosljed aktivnosti inhibicije rasta biljaka bio: pendimetalin (1) > 8 > 2 > 3, dok su spojevi 4 i 5 potpuno neaktivni, odnosno nisu fitotoksični. Različiti stupnjevi fitotoksičnosti mogu se objasniti odnosima između strukture i aktivnosti. Redukcijom bilo koje nitro skupine matične molekule pendimetalina, produkt se gotovo u potpunosti inaktivira. Oksidativna N-

dealkilacija također je rezultirala smanjenjem aktivnosti produkata biorazgradnje. Produkt **2** tako je potpuno izgubio svoju aktivnost kada je jedan od vodika amino skupine zamijenjen s acetilnom skupinom kod spoja **5**, dok s druge strane gubitkom jedne nitro skupine nastaje produkt **4**. Iz svega navedenog može se zaključiti da su procesi biorazgradnje koji uključuju redukciju nitro skupine i oksidativnu *N*-alkilaciju usmjereni ka detoksikaciji matične herbicidne molekule pendimetalina.¹³

3.2.3 Biorazgradnja pendimetalina mikroorganizmom *Pyricularia oryzae*

Pyricularia oryzae je biljna patogena gljiva koja uzrokuje ozbiljnu bolest riže kao poljoprivredne kulture. Ona se razvija u pogodnim uvjetima, što podrazumijeva duge periode s visokom vlagom zraka i tla u kojima je vlaga koja se sakuplja na listovima potrebna za infekciju. Međutim otkriveno je kako se i biorazgradnja pendimetalina brzo odvija u uvjetima poplavljenog tla, što se povezuje s djelovanjem mikroorganizma *Pyricularia oryzae*, te na poslijetku stvaranjem degradacijskog produkta *N*-(1-etilpropil)-5,6-dimetil-7-nitrobenzimidazola **10**. Spoj je identificiran spektroskopskim tehnikama i tankoslojnom kromatografijom, te usporedbom sa sintetički pripremljenim spojem. Na masenom spektru daje signal $m/z = 261$.¹⁵

¹⁵ G. Kulshrestha and S. B. Singh; Influence of Soil Moisture and Microbial Activity on Pendimethalin Degradation; Division of Agricultural Chemicals, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110012, India



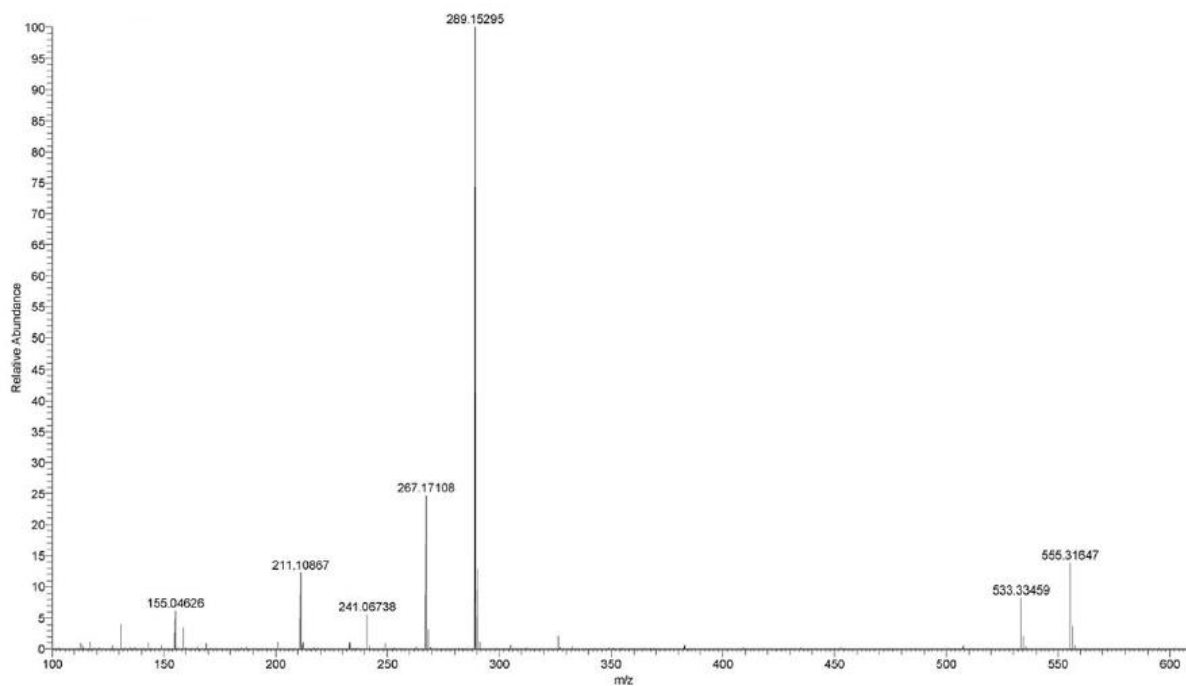
Slika 2.17. Degradacijski put pendimetalina mikroorganizmom *Pyricularia oryzae* uz nastajanje produkta **10**

3.2.4 Biorazgradnja pendimetalina sojem kvasca YC2

U istraživanju Hana i suradnika¹⁶ provedena je izolacija soja kvasca YC2 koji ima mogućnost biorazgradnje pendimetalina. Ova biorazgradnja temelji se na inicijaciji katabolizma pendimetalina putem oksidacije amino skupine, stvarajući pritom dva nova metabolita. Ovaj kvasac ima sposobnost degradacije preko 60% 200 mg/L pendimetalina unutar pet dana, te tijekom tog perioda smanjuje pH vrijednost od početne 7,51 do 5,50, što posljedično potencira rast kvasca i samu aktivnost biorazgradnje. Dobiveni produkti identificirani su HPLC-MS/MS-om, te su dobiveni maseni spektri prikazani na slikama **2.18.** i **2.19.**

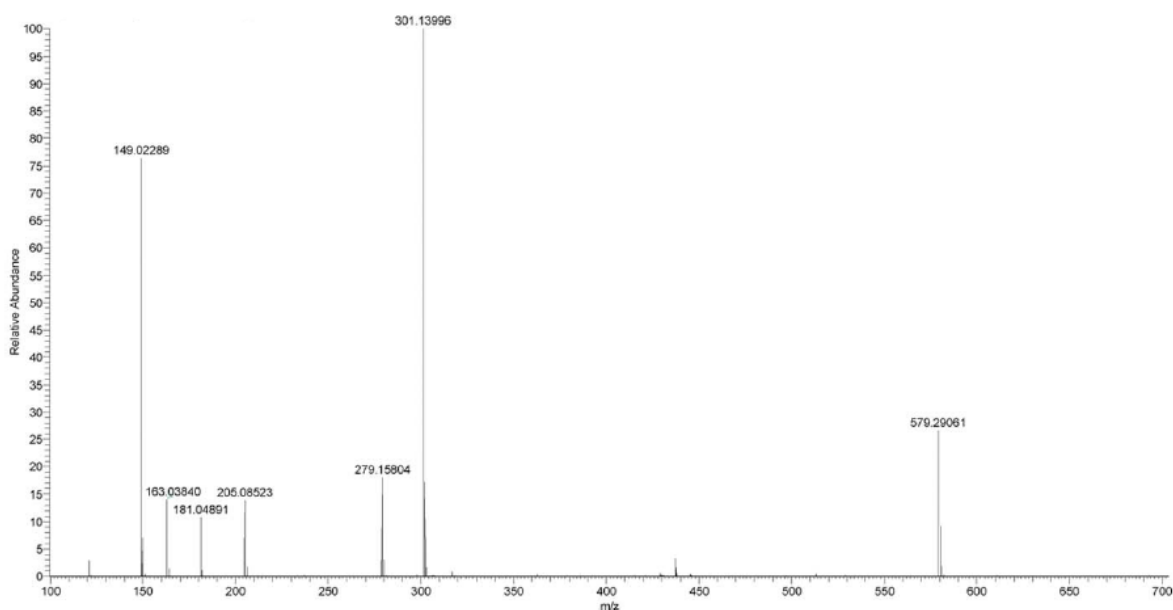
Produkt **11** (1,2-dimetil-3,5-dinitro-4-*N*(buta-1,3-dien-2-il)-dinitrobenzamin-*N*-oksid) na masenom spektru daje sljedeće signale za molekulske ione: m/z 265 ($M + H$)⁺, m/z 289 ($M + Na$)⁺, m/z 533 ($2M + H$)⁺ i m/z 555 ($2M + Na$)⁺, odgovarajući molekulskej formuli C₁₃H₁₂N₃O₅.

¹⁶ Han, Y., Tang, Z., Bao, H., Wu, D., Deng, X., Guo, G., ... Dai, B. (2019). Degradation of pendimethalin by the yeast YC2 and determination of its two main metabolites. RSC Advances, 9(1), 491–497. [doi:10.1039/c8ra07872f](https://doi.org/10.1039/c8ra07872f)



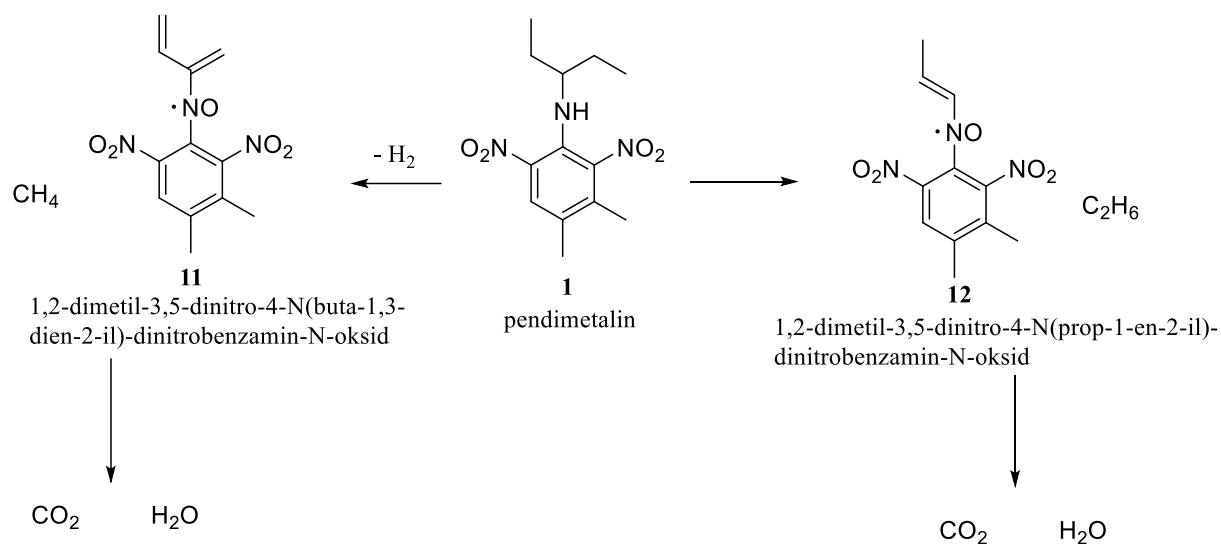
Slika 2.18. Maseni spektar degradacijskog produkta pendimetalina **11** ¹⁶

Produkt **12** (1,2-dimetil-3,5-dinitro-4-*N*(prop-1-en-2-il)-dinitrobenzamin-*N*-oksid) na masenom spektru daje sljedeće signale za molekulske ione: m/z 279 ($M + H$)⁺, m/z 301 ($M + Na$)⁺ i m/z 579 ($2M + H$)⁺ odgovarajući molekulskej formuli $C_{11}H_{12}N_3O_5$.



Slika 2.19. Maseni spektar degradacijskog produkta pendimetalina **12** ¹⁶

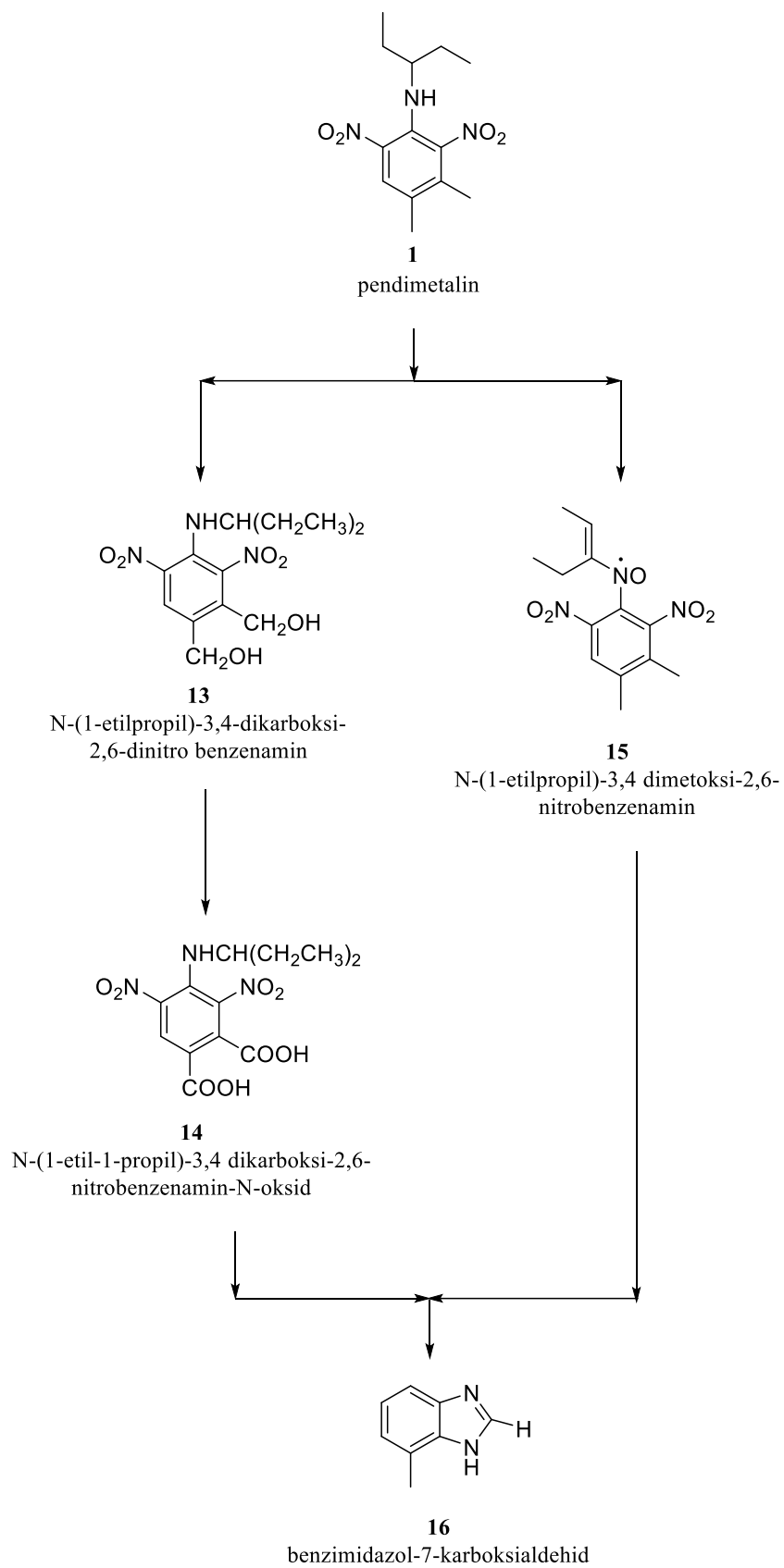
Degradacijski put pendimentalina sojem kvasca YC2 prikazan je na **slici 2.20**. Oksidacijom amino skupina dolazi do izdvajanja metana i etana, a produkti **11** i **12** degradiraju se nizom enzimatskih reakcija do ugljikovog dioksida i vode.



Slika 2.20. Degradacijski put pendimetalina sojem kvasca YC2 i nastali produkti

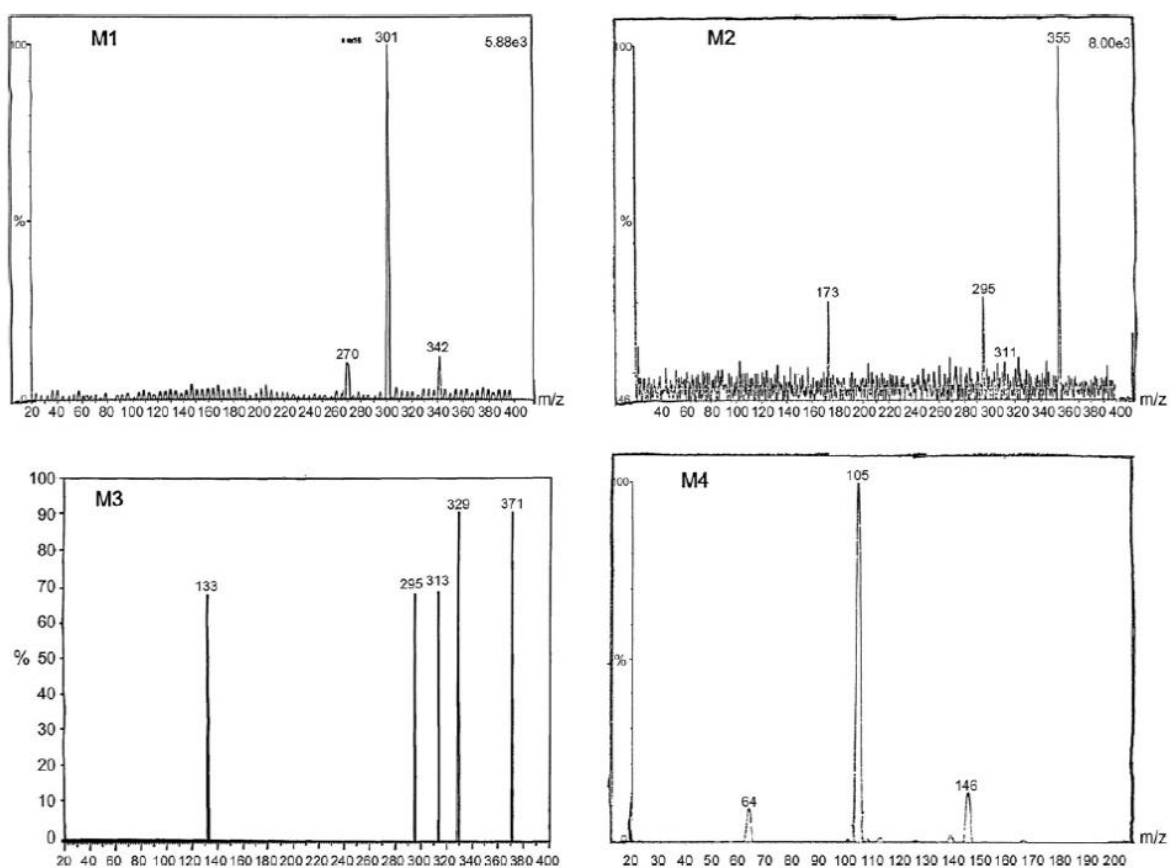
3.3 Razgradnja pendimetalina u bioslurry reaktoru

Bioslurry reaktor može se koristiti za degradaciju pendimetalina u onečišćenoj zemlji, na način da se u njemu koriste prirodno prisutne bakterije ili određeni sojevi koji imaju posebna metabolička svojstva za pretvaranje štetnih organskih spojeva u ugljikov dioksid i vodu. Tijekom ovog procesa u reaktoru nastaju četiri nova degradacijska produkta pendimetalina, identificirana HPLC i LC-MS/MS-om (**slika 2.21**).



Slika 2.22. Degradacijski put pendimetalina u bioslurry reaktoru i dobiveni produkti

Maseni spektar produkta **13** (*N*-(1-etilpropil)-3,4-dikarboksi-2,6-dinitro benzenamin) pokazuje osnovni signal na $m/z = 301$, te još dva signala $m/z 342$ i $m/z 270$ dok produkt **14** (*N*-(1-etil-1-propil)-3,4 dikarboksi-2,6-nitrobenzenamin-*N*-oksid) ima osnovni signal molekularnog iona na $m/z 355$ i još dva signala $m/z 311$ i $m/z 173$. Maseni spektar *N*-(1-etilpropil)-3,4 dimetoksi-2,6-nitrobenzenamina (**15**) pokazuje molekularni ion na $m/z 371$, te ostala tri signala $m/z 329$, $m/z 313$ i $m/z 295$. Benzimidazol-7-karboksialdehid (**16**) osnovni signal ima na $m/z 146$, te ostale signale na $m/z 105$ i $m/z 64$.



Slika 2.21. Maseni spektri produkata degradacije pendimetalina u bioslurry reaktoru ¹⁷

¹⁷ Ramakrishna, M., Venkata Mohan, S., Shailaja, S., Narashima, R., & Sarma, P. N. (2008). Identification of metabolites during biodegradation of pendimethalin in bioslurry reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 151(2-3), 658–661. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.06.039

3.4 Potencijalna aktivnost pendimetalina i njegovih produkata biorazgradnje

Spektar biološke aktivnosti nekog kemijskog spoja skup je različitih vrsta bioloških aktivnosti, kao rezultata interakcija određenog spoja s drugim biološkim entitetima. Biološka aktivnost općenito može biti pretpostavljena na temelju kemijske strukture i fizikalno-kemijskih svojstava određenog spoja.

PASS (eng. Prediction of Activity Spectra for Substances) je softverski proizvod dizajniran kao alat za procjenu općeg biološkog potencijala organske molekule. On omogućuje predviđanje biološke aktivnosti temeljene na strukturi određene organske molekule, te se zbog toga može primjenjivati za procjenu profila biološke aktivnosti bilo koje virtualne molekule prije njene stvarne kemijske sinteze i biološkog ispitivanja. Popis bioloških aktivnosti koji se može predvidjeti ovim softverom uključuje oko 4000 izraza, od kojih su neki primjerice: farmakoterapeutski učinci, biokemijski inhibitori, kancerogenost, toksičnost, regulacija genetske ekspresije itd. Procijenjena prosječna točnost ovakve vrste predviđanja iznosi oko 95%.

Softver nudi crtanje virtualne kemijske strukture pomoću jednostavnih alata, te za predloženu molekulu izbacuje tablicu sa trima sljedećim vrijednostima: **Pa**, **Pi** i **Aktivnost**.

Pa („vjerojatnost za aktivnost“) vrijednost procjenjuje vjerojatnost da ispitivani spoj pripada podskupini aktivnih spojeva, odnosno nalikuje strukturama molekula koje su najtipičnije u toj podskupini.

Pi („vjerojatnost za neaktivnost“) vrijednost procjenjuje vjerojatnost da ispitivani spoj pripada podskupini neaktivnih spojeva, odnosno nalikuje strukturama molekula koje su najtipičnije u toj podskupini.¹⁸

¹⁸ www.way2drug.com

3.4.1 Pendimetalin (1)

Tablica 1. Pa i Pi vrijednosti, te potencijalne aktivnosti pendimetalina

Pa	Pi	Aktivnost
0,845	0,018	Inhibitor ubikinon-citokrom-C-reduktaze
0,693	0,003	Antivirotik (gripa A)
0,836	0,014	Inhibitor kimoza
0,548	0,015	Inhibitor t-RNA ligaze
0,559	0,061	Stimulator bubrežne funkcije
0,414	0,034	Liječenje mišićne distrofije
0,434	0,085	Antivirotik (Picornavirus)
0,402	0,062	Inhibitor elastaze gušterače
0,371	0,037	Antiparazit
0,492	0,178	Liječenje fobičnih poremećaja
0,337	0,054	Liječenje prionskih bolesti
0,295	0,031	Antiprotozoa (Trihomonas)
0,293	0,029	Inhibitor 3C-proteaze (humani koronavirus)
0,302	0,114	Imunosupresiv

0,262	0,098	Antituberkulots
0,662	0,011	Methemoglobinemija
0,515	0,017	Kancerogen

Iz **tablice 1.** vidljive su neke od potencijalnih aktivnosti pendimetalina temeljene na prethodno definiranim Pa i Pi vrijednostima. Iz prikaza se može zaključiti da je pendimetalin biološki aktivan kemijski spoj, budući da se za njega procjenjuje velik broj raznovrsnih aktivnosti. Velik broj tih aktivnosti nije štetan, te objašnjava i potvrđuje zašto je pendimetalin u širokoj upotrebi, no s druge strane postoji i velik broj pretpostavljenih, nedovoljno istraženih aktivnosti pendimetalina koje mogu biti potencijalno opasne i ugroziti zdravlje i sigurnost ljudi i okoliša. Jedan od najčešće pretpostavljenih i ujedno najopasnijih bioloških aktivnosti je biokemijska inhibicija. Prema dobivenim podacima vidljivo je da pendimetalin potencijalno može imati inhibitorški učinak na ubikinon-citokrom-C-reduktazu, nezamjenjivi enzim u oksidacijskoj fosforilaciji, metaboličkom procesu proizvodnje energije iz oksidiranih hranjivih tvari. Nadalje, pretpostavlja se da može inhibirati kimozin, proteolitički enzim za koagulaciju mlijeka, te t-RNA ligazu, enzim zadužen za spajanje odgovarajuće amino kiseline na pripadajuću t-RNA molekulu. Ima i mogućnost inhibicije pankreatične elastaze, enzima gušterače odgovornog za razgradnju složenijih hranjivih molekula. Prema tabličnim podacima, pendimetalin se može smatrati i imunosupresivom, odnosno kemijskim spojem koji sprječava odgovor imunskog sistema čovjeka na infekciju ili bolest. No, postoji i određen broj pozitivnih pretpostavljenih aktivnosti pendimetalina od kojih se mogu istaknuti sljedeće: antivirotičko djelovanje za gripu A i Picornavirus, pomaže u liječenju mišićne distrofije, fobičnih poremećaja i prionskih bolesti (progresivne, fatalne i neizlječive degenerativne neurološke bolesti), te se također smatra i antiprotozoo-om (poput Trihomonasa) i antituberkulots-om.

3.4.2 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilin (2)

Tablica 2. Pa i Pi vrijednosti, te potencijalne aktivnosti 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilina

Pa	Pi	Aktivnost
0,954	0,003	Iritator kože
0,862	0,013	Inhibitor ubikinon-citokrom-C-reduktaze
0,791	0,022	Inhibitor kimoзина
0,791	0,022	Inhibitor saharopepsina
0,936	0,003	Mutagen
0,899	0,004	Kancerogen
0,734	0,007	Methemoglobinemija

Prema podacima prikazanim u **tablici 2.** vidljivo je da jedan od početnih produkata biorazgradnje pendimetalina **2** nema uvelike smanjenu potencijalnu aktivnost u odnosu na početni spoj. On poput pendimetalina najčešće pokazuje biološke aktivnosti biokemijske inhibicije raznovrsnih enzimatskih procesa nužnih i neizbježnih za normalnu funkciju i očuvanje zdravlja živog svijeta. Neki od enzima za koje se pretpostavlja da ovaj produkt pendimetalina može inhibirati su: ubikinon-citokrom-C-reduktaza, kimozin, saharopepsin itd. Također, zanimljivo je da ovaj produkt prema omjerima Pa i Pi vrijednosti pretpostavlja veću vjerojatnost za razvoj bolesti methemoglobinemije, prethodno opisane bolesti koju se često povezuje sa spojevima dinitroanilinske kemijske osnove, te kancerogeno i mutageno djelovanje u odnosu na početni pendimetalin.

3.4.3 2-nitro-6-amino-*N*-(1-etil-propil)-3,4-ksilidin (3)

Tablica 3. *Pa* i *Pi* vrijednosti, te potencijalne aktivnosti 2-nitro-6-amino-*N*-(1-etil-propil)-3,4-ksilidina

<i>Pa</i>	<i>Pi</i>	Aktivnost
0,980	0,002	Iritator kože
0,789	0,036	Inhibitor ubikinon-citokrom-C-reduktaze
0,768	0,027	Inhibitor saharopepsina
0,716	0,036	Inhibitor poliporoepsina
0,653	0,003	Antivirotik (gripa A)
0,759	0,005	Methemoglobinemija
0,553	0,015	Kancerogen

U **tablici 3.** priloženi su podaci o potencijalnoj aktivnosti za produkt biorazgradnje pendimetralina 2-nitro-6-amino-*N*-(1-etil-propil)-3,4-ksilidin. Ponovno se može primjetiti najzastupljenija biološka aktivnost biokemijske inhibicije već prethodno spomenutih i objašnjenih procesa. No, vidljivo je i da je pretpostavljena vjerojatnost tih procesa smanjena u odnosu na produkt **2**, kao i kancerogenost ovog produkta, te potencijal za razvoj mehemoglobinemije. Osim toga, za ovaj produkt se procjenjuje i antivirusno djelovanje za gripu tipa A.

Za produkte biorazgradnje pendimetralina **4**, **5**, **6**, **8** i **9**, procjenjene aktivnosti su vrlo slične prethodno opisanom produktu **3**.

3.4.4 8-amino-2-etil-5-(hidroksimetil)-1,2-dihidrokinoksalin-6-karboksilna kiselina (7)

Tablica 4. Pa i Pi vrijednosti, te potencijalne aktivnosti 8-amino-2-etil-5-(hidroksimetil)-1,2-dihidrokinoksalin-6-karboksilne kiseline

Pa	Pi	Aktivnost
0,674	0,030	Antineoplastik
0,627	0,044	Antiishemik
0,540	0,032	Stimulator leukopoeze
0,477	0,047	Stimulator eritropoeze
0,592	0,021	Hiperuricemija
0,559	0,043	Alergijski dermatitis

Za produkt biorazgradnje pendimetalina **7** podaci o potencijalnoj aktivnosti prikazani su u **tablici 4**. Prema iznosima Pa i Pi vrijednosti može se zaključiti da je biološka aktivnost u odnosu na početni kemijski spoj uvelike smanjena. Također, vidljivo je i kako se vrsta aktivnosti promijenila, odnosno biokemijska inhibicija više nije primarna aktivnost ovog produkta, a kancerogenost i mutagenost, kao i razvoj bolesti methemoglobinemije za ovaj spoj uopće nisu pretpostavljene. S druge strane, za ovaj produkt degradacije pendimetalina potencijalno je moguća nekolicina novih, pozitivnih bioloških aktivnosti. Jedna od najčešće pretpostavljenih je antineoplastik (kemijski spoj koji se koristi u svrhu liječenja zloćudnih bolesti uz primjenu kirurške intervencije i liječenja zračenjem, budući da zaustavlja rast tumorskih stanica i uništava ih), antiishemik (kemijski spoj koji se koristi u liječenju ishemije, bolesti smanjenog dotoka krvi kroz suženu krvnu žilu u neki od organa tijela), te simulator leukopoeze i eritropoeze, odnosno procesa stvaranja bijelih i crvenih krvnih stanica. Negativne biološke aktivnosti ovog spoja su, kako je već prethodno spomenuto, uvelike smanjene u odnosu na pendimetalin i neke od prethodnih produkata, te se na tom području, mogu istaknuti jedino hiperuricemija (previsoka razina mokraćne kiseline u krvi) i alergijski dermatitis.

3.4.5 N-(1-etilpropil)-5,6-dimetil-7-nitrobenzimidazol (10)

Tablica 5. Pa i Pi vrijednosti, te potencijalne aktivnosti N-(1-etilpropil)-5,6-dimetil-7-nitrobenzimidazola

Pa	Pi	Aktivnost
0,908	0,005	Antiishemik
0,636	0,063	Inhibitor saharopepsina
0,679	0,077	Inhibitor ubikinon-citokrom-C-reduktaze
0,720	0,038	Aplastična anemija
0,692	0,054	Neutrofilna dermatitoza (Sweetov sindrom)

Iz **tablice 5.** vidljive su najvjerojatnije potencijalne aktivnosti produkta degradacije pendimetalina **10**. Poput prethodno opisanog produkta i ovaj ima smanjenu aktivnost u odnosu na početni pendimetalin. Zadržao je neke biološke aktivnosti biokemijske inhibicije poput inhibicije saharopepsina i ubikinon-citokrom-C-reduktaze. Kancerogenost, mutagenost ili pojava methemoglobinemije ne pretpostavljaju se za ovaj spoj, te su aplastična anemija i neutrofilna dermatitoza, poznatija kao Sweetov sindrom (bolest kože koja se često pojavljuje uz osnovnu zloćudnu bolest, osobito hematološkog sustava) neke od negativnih aktivnosti zabilježenih za ovaj produkt.

4 ZAKLJUČAK

Proučavanje ponašanja svakodnevno korištenih herbicida u poljoprivredi u smislu njihove degradacije i nastajanja određenih produkata drugačijeg kemijskog sastava i svojstava, te toksičnosti vrlo je važno područje znanstvenog istraživanja, budući da ima utjecaj na okoliš i sav živi svijet. Kontaminacija podzemnih i površinskih voda, te tla agrokulturalnim kemikalijama, pod koje spadaju herbicidi i pendimetalin, jedan je od problema i opasnosti današnjice u cijelom svijetu. Stoga je vrlo važno poznavati kemikalije koje se primjenjuju u okolišu i poljoprivrednoj proizvodnji, te njihovo ponašanje u određenim, prirodnim uvjetima. Razvoj biorazgradivih herbicida koji uspješno obavljaju svoju primarnu funkciju, te čiji produkti nisu toksični niti se pretjerano akumuliraju u okoliš, cilj je kojega se nastoji ostvariti. U ovom radu provedeno je istraživanje svojstava i strukture dinitroanilinskog herbicida pendimetalina, te mikroorganizama sa sposobnošću njegove biorazgradnje, kao i produkata nastalih tim procesima. Na poslijetku je istražena potencijalna aktivnost pendimetalina i njegovom biorazgradnjom dobivenih produkata.

Azotobacter chroococcum razgrađuje pendimetalin na sljedećih šest, brojevima označenih, metabolita: **2**, **3**, **4**, **5**, **8** i **9**. Nitroredukcijom i postupnom degradacijom pomoću mikroorganizma **Bacillus subtilis Y3** pendimetalin daje tri metabolička produkta **3**, **6** i **7**. Biorazgradnjom pendimetalina mikroorganizmom **Pyricularia oryzae** nastao je produkt **10**. Opisana je i biorazgradnja pendimetalina sojem **kvasca YC2** kojim su dobiveni međuprodukti **11** i **12**, no nizom enzimatskih reakcija oni se konačno raspadaju do ugljikovog dioksida i vode. Na poslijetku je objašnjena degradacija pendimetalina u **bioslurry reaktoru**, pri čemu su dobivena 4 nova produkta: **13**, **14**, **15** i **16**. Osim toga u teorijskom dijelu rada opisana je i moguća fotodegradacija pendimetalina kojom nastaju dva nova produkta. Također, potencijalna aktivnost pendimetalina i njegovih produkata biodegradacije istražena je u ovom radu, pri čemu se može zaključiti da je pendimetalin relativno toksičan kemijski spoj, što podrazumijeva niz izraženih, štetnih aktivnosti poput kancerogenosti i biokemijske inhibicije enzima. Međutim, postoje i određene aktivnosti koje se mogu smatrati pozitivnima, poput potencijalnog antivirotičkog djelovanja ili ljekovitih svojstava u liječenju različitih bolesti. Svi produkti biorazgradnje uglavnom su pokazali smanjenu aktivnost u odnosu na pendimetalin, te neke nove pozitivne aktivnosti kao lijekovi za različita oboljenja, osim produkta **2**, za koji se u pogledu kancerogenosti i methemoglobinemije pretpostavlja veća aktivnost od početnog pendimetalina.

5 LITERATURA

- 1) Stockton, G. W., Godfrey, R., Hitchcock, P., Mendelsohn, R., Mowery, P. C., Rajan, S., & Walker, A. F. (1998). *Crystal polymorphism in pendimethalin herbicide is driven by electronic delocalization and changes in intramolecular hydrogen bonding. A crystallographic, spectroscopic and computational study. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (9), 2061–2072. [doi:10.1039/a705178f](https://doi.org/10.1039/a705178f)
- 2) Halder, P., Barua, A. S., Raha, P., Biswas, B., Pal, S., Bhattacharya, A., ... Chowdhury, A. (1989). *Studies on the photodegradation of pendimethalin in solvents and in Kalyani soil. Chemosphere*, 18(7-8), 1611–1619. [doi:10.1016/0045-6535\(89\)90051-9](https://doi.org/10.1016/0045-6535(89)90051-9)
- 3) National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Pendimethalin, CID=38479, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pendimethalin#section=Synonyms> (pristup stranici 25. lipnja 2020.)
- 4) Ahmad, M.I., Zafeer, M.F., Javed, M. *et al.* Pendimethalin-induced oxidative stress, DNA damage and activation of anti-inflammatory and apoptotic markers in male rats. *Sci Rep* 8, 17139 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35484-3>
- 5) Penn State College of Agricultural Sciences research; Persistence of Herbicides in Soil; Agronomy Facts 36
- 6) ChemicalWatch Factsheet A Beyond Pesticides/ NCAMP Factsheet; Pendimethalin; www.beyondpesticides.org ; (pristup stranici 20. lipnja 2020.)
- 7) Arici, M., Abudayyak, M., Boran, T., & Özhan, G. (2020). *Does pendimethalin develop in pancreatic cancer induced inflammation? Chemosphere*, 252, 126644. [doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126644](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126644)
- 8) Sarıgöl Kılıç, Z., Aydın, S., Ündeğer Bucurgat, Ü., & Başaran, N. (2018). *In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin. Food and Chemical Toxicology*, 113, 90–98. [doi:10.1016/j.fct.2018.01.034](https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.034)
- 9) Andreotti, G., Freeman, L. E. B., Hou, L., Coble, J., Rusiecki, J., Hoppin, J. A., ... Alavanja, M. C. R. (2009). *Agricultural pesticide use and pancreatic cancer risk in the Agricultural Health Study Cohort. International Journal of Cancer*, 124(10), 2495–2500. [doi:10.1002/ijc.24185](https://doi.org/10.1002/ijc.24185)
- 10) Kamel, F., Tanner, C., Umbach, D., Hoppin, J., Alavanja, M., Blair, A., ... Sandler, D. (2006). *Pesticide Exposure and Self-reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study. American Journal of Epidemiology*, 165(4), 364–374. [doi:10.1093/aje/kwk024](https://doi.org/10.1093/aje/kwk024)
- 11) Ni, H., Wang, F., Li, N., Yao, L., Dai, C., He, Q., ... Hong, Q. (2016). *Pendimethalin Nitroreductase Is Responsible for the Initial Pendimethalin Degradation Step in Bacillus*

- subtilis* Y3. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(24), 7052–7062. [doi:10.1128/aem.01771-16](https://doi.org/10.1128/aem.01771-16)
- 12) S.B. Singh & G. Kulshrestha (1991) Microbial degradation of pendimethalin, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 26:3, 309-321; <http://dx.doi.org/10.1080/03601239109372737>
 - 13) Ni, H., Yao, L., Li, N., Cao, Q., Dai, C., Zhang, J., ... He, J. (2016). *Biodegradation of pendimethalin by Bacillus subtilis Y3*. *Journal of Environmental Sciences*, 41, 121–127. (2015), [http:// dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.04.035](http://dx.doi.org/10.1016/j.jes.2015.04.035)
 - 14) Kole, R. K., Saha, J., Pal, S., Chaudhuri, S., & Chowdhury, A. (1994). *Bacterial degradation of the herbicide pendimethalin and activity evaluation of its metabolites*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(5). [doi:10.1007/bf00195503](https://doi.org/10.1007/bf00195503)
 - 15) G. Kulshrestha and S. B. Singh; Influence of Soil Moisture and Microbial Activity on Pendimethalin Degradation; Division of Agricultural Chemicals, Indian Agricultural Research Institute, New Delhi-110012, India
 - 16) Han, Y., Tang, Z., Bao, H., Wu, D., Deng, X., Guo, G., ... Dai, B. (2019). *Degradation of pendimethalin by the yeast YC2 and determination of its two main metabolites*. *RSC Advances*, 9(1), 491–497. [doi:10.1039/c8ra07872f](https://doi.org/10.1039/c8ra07872f)
 - 17) Ramakrishna, M., Venkata Mohan, S., Shailaja, S., Narashima, R., & Sarma, P. N. (2008). *Identification of metabolites during biodegradation of pendimethalin in bioslurry reactor*. *Journal of Hazardous Materials*, 151(2-3), 658–661. [doi:10.1016/j.jhazmat.2007.06.039](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.06.039)
 - 18) Young, R. A. (2014). *Dinitroanilines*. *Encyclopedia of Toxicology*, 172–174. [doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00670-9](https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386454-3.00670-9)
 - 19) Baljinder Singh & Kashmir Singh (2016) Microbial degradation of herbicides, *Critical Reviews in Microbiology*, 42:2, 245-261, [DOI:10.3109/1040841X.2014.929564](https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.929564)
 - 20) Ramasahayam, S. (2014). *Pendimethalin*. *Encyclopedia of Toxicology*, 765–767.
 - 21) www.way2drug.com (pristup stranici 21. kolovoza 2020.)

