مقاله تحقیقی

مطالعه *Insilico* و محیطی پایداری و تاثیرات سم بروموبوتید در آب و خاک شالیزار در منطقه انزلی

بابک خلیلی حداد

دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، رودهن، ایران

* **مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: babak.khalili.hadad@gmail.com ، تلفن ۰۹۱۲۳۱۷۷۳۸۷

محل انجام تحقیق: سازمان جهاد کشاورزی، استان گیلان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن

تاریخ دریافت: ۹۶/۴/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۲۰

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۲- تابستان ۱۳۹۵

چکیده

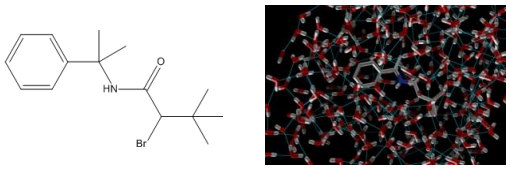
علف کش ها برای چندین دهه است که در مقیاس وسیع در کشاورزی استفاده می شوند. یکی از انواع پرکاربرد آن سم بروموبوتید است. مطالعه خصوصیات ساختاری بروموبوتید، ۲-برومو-۳، ۳-دی متیل-N-(۱- متیل-۱-۱-فتیل اتیل) بوتانامید ($C_{15}H_{22}BrNO$), راه مهمی برای بررسی پایداری آن در آب و خاک شالیزار و نیز در راستای تلاش جهت تغییر ساختار نسل بعدی این علف کش است تا بتوان با کاهش پایداری آن در طبیعت و شرایط بدن و افزایش جذب آن توسط گیاه به سلامت کارگران و محیط کمک نمود. نیم عمر بروموبوتید در خاک شالیزار حدود یک هفته است که بر اساس نتیجه آزمایشات حاضر می تواند تا دو روز کاهش پیدا کند که علت این پدیده می تواند جذب و تغییر ماده به متابولیت ثانویه باشد. مطالعه حاکی از آن است که ساختاراین ترکیب در دمای حدود ۲۵ درجه سانتی گراد پایدار بوده و برای ارائه در بازار و بهره برداری آماده است. معمولاً در محیط آبی نظیر فرم محلول و آمادهٔ مصرف، درون توده گیاه یا بدن جانور با افزایش دما پایداری بیشتر ساختارمشاهده می شود. این امر می تواند موجب افزایش نیم عمر فیزیکی بروموبوتید شود.

کلمات کلیدی: بروموبوتید، آب شالیزار، خاک شالیزار، بدن انسان ، دما، نیم عمر، توزیع شارژ سطحی، عملکرد بر پایه ذات مولکولی (SCRF)

مقدمه

تاکنون مطالعات زیادی بر مشخصات ساختاری علف کش ها انجام شده است (۱-۴). تمام علف کش ها به طور بالقوه برای حیوانات خطرناک هستند. پیش از هرگونه استفاده از علف کش ها، بهتر است تا کشاورز گزینه های غیر شیمیایی مانند مبارزات بیولوژیک را نیز مد نظر قرار دهد. اصولاً علف کش ها برای از بین بردن برخی گیاهان مورد استفاده قرار میگیرند. علف کش از طریق تجزیه و یا انجام واکنش های شیمیایی یا زیستی به اجزا کوچکتری تجزیه می شوند. زمانی که یک علف کش تجزیه می شود، چندین متابولیت با خصوصیات شیمیایی متنوع از نظر سمّیت، مقاومت به تجزیه پذیری و ظرفیت جذب شکل می گیرد. در برخی موارد خصوصیات و طبیعت متابولیتها به خوبی شناخته نشده است. مطالعه ساختار علف کش ها و راههای کاهش پایداری ساختار شیمیایی آن ها در بدن جانوران و در مقابل آن افزایش جذب در گیاهان بسیار حائز اهمیت است. گام اول بررسی و شناخت

خصوصیات فیزیکوشیمیایی ساختار پایه، قبل از هرگونه تغییری است. این مهم، دانشمندان را به سمت درک و بررسی مکانیزم تجزیه نوری (۵)، تجزیه میکروبی (۶-۹) و تجزیه شیمیایی (۵) هدایت می کند. علف کش ها می توانند باعث سوزش پوست یا چشم، حالت تهوع، سردرد و در موارد حادتر اختلالات ژنتیکی، نقص های مادرزادی، فلج، سرطان و حتی مرگ در حیوانات (در صورت استفاده از دوزهای کشنده) شود. کارگران زراعتی اغلب با علف کش ها از طریق پوست یا تنفس در تماس هستند. برخورد اتفاقی علف کش ها با چشم می تواند سبب بروز مشکلات جدی و یا حتی کوری شود (۱۰). عکس العمل بدن انسان به سمّیت این قبیل سموم، بستگی به میزان دوز، سمّیت ، راه جذب، مدّت زمان در معرض قرار گرفتن و ویژگی بدن فرد دارد (۱۱-۱۲). از این رو افراد مختلف عکس العملهای متفاوتی به دوز یکسان علف کش نشان می دهند. این مواد شیمیایی می توانند اثرات سمی حاد یا مزمن داشته باشند. معرفی خصوصیات ساختاری بروموبوتید، ۲-برومو-۳، ۳-دی متیل-N-(۱- متیل-۱-۱-فتیل اتیل) بوتانامید ,($C_{15}H_{22}BrNO$) (شکل ۱-الف)، راه مهمی برای بررسی پایداری آن در آب شالیزار و تلاش برای تغییر آن در نسل بعدی علف کش ها است. بروموبوتید سم مشترک رایج در کشورهای تولید کننده برنج است(۱۳). متابولیت جدید بروموبوتید دبرومو N-(a,a-dimethylbenzyl)-3,3-dimethylbutyramide در پی تجزیه شیمیایی به واسطه نوراز بروموبوتید ایجاد می شود (۱۴).



شکل ۱ - ساختار شیمیایی بروموبوتید (راست)، ملکول به همراه آب در محیط آبی و احاطه شده توسط پیوندهای هیدروژنی.

متابولیسم راه دیگر تجزیه این مواد شیمیایی است (۱۵). بررسی پایداری بروموبوتید در بدن انسان به علت جذب آن در بدن کارگران زراعتی از طریق پوست یا تنفس حائز اهمیت است. هدف از انجام این پژوهش مطالعه رفتار ملکولی بروموبوتید در زمین های شالی کاری شمال ایران و همچنین شبیه سازی وضعیت پایداری مواد شیمیایی در بدن کارگران زراعتی و محیط بیولوژیک است.

مواد و روش ها

روشهای محاسبه ای

در این پژوهش در فاز آغازین و پیش از ورود به محیط شالیزار از تکنیک های محاسباتی به روش ab initio بهره گیری شد. به کمک این روش ساختار بروموبوتید طراحی شده در محیط Biochem 3D به طور ژئومتریک بهینه سازی شد. پیش از شبیه سازی سیستم ملکولی و اقدام به تحلیل آن در نرم افزار Gaussian 03 لازم است میزان انرژی تام مولکول طراحی شده به حداقل برسد که این مساله در سطح MM^{+} به انجام رسید. ab initio مشتمل بر سری از روشهای محاسباتی است که از اصول تئوری مشتق شده اند. یکی از پرکاربردترین روشهای محاسبه ای آن Hartree-Fock (HF) است. در این روش تخمین اصلی براساس تخمین میدان مرکزی بنیان گذاری شده است. از دافعه کلمبی الکترون-الکترون به منظور محاسبه وضعیت دافعه استفاده شده است تا بواسطهٔ آن میانگین اثر دافعه نشان داده شود. در این بررسی میان کنش عمومی دافعه مورد نظر نبوده است. یکی از فوائد این روش شکستن معادله شرودینگر به بخش های متعدد و ساده تر است. روش (RHF) Restricted Hartree-Fockیکی از روشهایی است که غالباً در محاسبات کوانتومی ab initio مورد استفاده قرار می گیرد. می توان با عملکرد موجی آن انرژی ملکول را به حداقل رساند تا حداکثر پایداری حاصل شود. در تحقیق حاضر ساختار ۲-برومو-۳، ۳-دی متیل-N-(۱- متیل-۱-۱-فتیل اتیل) بوتانامید ,($C_{15}H_{22}BrNO$) و نیز انرژی و ممان دوقطبی توسط محاسبات مکانیکی کوانتوم در مدل Onsager Self - consistent reaction field (SCRF) با استفاده از روش RHF در سطح RHF/6-31G (d,p) بررسی شده است. ساختار ملکول توسط نرم افزار $Hyperchem^{TM}$ 8.0.6 طراحی شده و بهینه سازی ژئومتریک بروموبوتید در محیط آب و همچنین محیط فاقد هر گونه عوامل مداخله گر(شاهد) در دماهای ۲۷۳،

۳۱۰،۲۹۰و ۳۱۵ کلوین توسط Gaussian 03 کاملا بهینه شده است. محاسبات در سطوح Hartree-Fock (HF) توسط رایانه شخصی پنتیوم IV/ 2.8 GHz توسط نرم افزار Gaussian 03 و برنامه Gaussian 03 view انجام گرفته است. بهینه سازی ژئومتریک با بهره گیری از پارامترهای استاندارد بدون هیچ گونه محدودیتی در انرژی پتانسیل در سطوح Hartree-Fock در سطح پایه 6-31G (d, p) انجام شده است. مقدارA0 برای استفاده در محاسباتSCRF براساس مدل Onsager برای تمام پارامترها به طور جداگانه انجام شد. ممان دوقطبی و انرژی آزاد گیبس در شرایط شبیه سازی شده بدن و محیط دارای آب و فاقد آب محاسبه شد. اثر حلال می تواند در محاسبات شیمیایی کوانتومی بواسطه در نظر گرفتن آن به عنوان یک محیط دی-الکتریک به آسانی گنجانده شود. این مساله می تواند با در نظر گرفتن یک ثابت دی-الکتریک انجام شود. توزیع الکتریکی بار سطحی ملکول که از طریق القا قطبیت صورت می گیرد نقش الکترون ها در ملکول را مشخص می کند. در مدل Self-Consistent Reaction Field در این خصوص بحث می کند. بنابراین این مدل شامل توصیف مکانیک- کوانتومی و روش های واسطه کلاسیک است. در برنامهGaussian 03 از یک روش تخمینی ساده استفاده شده که در آن حجم حلال برای محاسبه شعاع حفره ای فرضی که سطح ملکول قرار دارد محاسبه می شود.

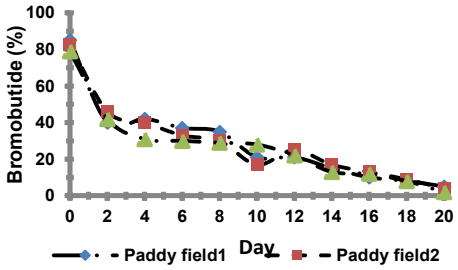
آزمایشات در محیط شالیزار

آزمایشها برای سه زمین شالی کاری در شهر انزلی واقع در استان گیلان طراحی شد. غلظت بروموبوتید به کار برده شده در این سه زمین عبارت بود از ۱۹۰۰ -۱۱۰۰ µg/L ، که در زمین شماره ۱به مساحت ۱۴۰۰m^2، در زمین شماره ۲ به مساحت ۲۳۰۰m^2 و در زمین شماره ۳ به مساحت ۲۹۸۰m^2 استفاده شد(۱۶). نمونه های خاک از عمق ۵ سانتی متری زمین های شالیزار جمع آوری و آزمایش شدند. مقدار مساوی از نمونه ها برای آنالیز هر آزمایش استفاده شد. میانگین محتوای آبی در زمینها ۵۸/۳±۲۵/۸، ۶۲/۴±۷/۸ و ۱۳/۳±۳/۲ درصد بود. مقدار گل و خاک رس قابل گزارش ۴۵/۶۵٪، ۳۸/۹٪ و ۱۵/۰٪ بود. متوسط ترکیبات آلی بدست آمده به ترتیب ۵/۳±۱/۰۷٪، ۴/۶±۰۹٪ و ۱۳/۳±۳/۲٪ بود. نمونه ها در ظرفهای کاملا تاریک و دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی گراد نگهداری شده و در طول ۲۴ ساعت آزمایش شدند. کروماتوگرافی گازی، GC-MS Agilent (MSD ۵۹۷۳ و سیستم GC ۶۸۹۰ ، امریکا) برای جداسازی ترکیبات مورد استفاده قرار گرفت. ۹-بروموآنتراسن و ۱و۴-دی یدو بنزن به عنوان استاندارد داخلی استفاده شدند. هر دو ترکیب و بروموبوتید استاندارد در استون حل شدند. اندازه گیری بروموبوتید در آب و خاک محیط اطراف مطابق روش مستند انجام شد(۱۷). برای تهیه نمونه خاک ۱۰ گرم از خاک نمونه در ۱۰ میلی لیتر استون حل شد. اولتراسونیکاسیون برای ۱۵ دقیقه روی این مخلوط اعمال شد و سپس با strokes/min ۲۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه هم زده شد. مخلوط برای ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با rpm ۳۰۰۰ قرار گرفت. سوپرناتان (محلول رویی) فیلتر شد و این مرحله مجدداً تکرار گردید. سپس نمونه ها ترکیب شدند ومحلول در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و تا تبخیر انجام شود و در نهایت به غلظت ۵ میلی لیتر برسد. محلول با ۱۰ میلی لیتر هگزان ترکیب شد و سپس محلول نهایی با ۲ میلی لیتر آب مقطر شسته شد. از سدیم سولفات بدون آب برای خشک کردن لایه های هگزان جهت تغلیظ محلول به ۱ میلی لیتر تحت جریان هیدروژن خالص استفاده شد. ۱۰ µLمحلول استاندارد داخلی به محلول تغلیظ شده اضافه شد. ۱ میکرو لیتر از محلول تهیه شده با استفاده از GC/MS مورد بررسی قرار گرفت. نسبت استفاده شده برای تعیین کمیت و تائید کردن بروموبوتید ۱۲۰m/z و ۲۳۲ m/z و ۳۳۰ m/z برای 1,4-Diiodobenzene و ۲۵۶ m/z برای ۹- bromoanthracene بود.

نتایج و بحث

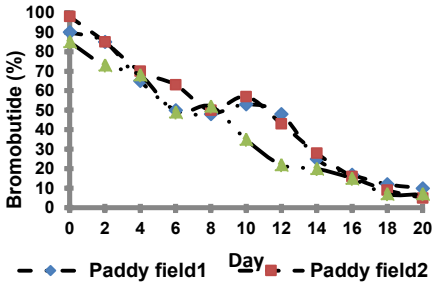
خاک و آب شالیزار

نمونه ها هر دو روز یک بار آزمایش می شدند. تحقیقات نشان داد که بین روزهای ۸-۶ کمیت بروموبوتید به نصف رسید. بین روزهای ۱۶-۱۴ این پدیده دوباره مشاهده شد (شکل ۲).



شکل ۲: این نمودار نشان دهنده تغییرات درصدی بروموبوتید در خاک شالیزار در طول ۲۰ روز است. نیمه عمر بروموبوتید در خاک شالیزار ۶ تا ۸ روز پس از استفاده گزارش شد.

دو روز پس از استفاده از آب، سطح بروموبوتید به نصف کاهش پیدا کرد و تا پس از ۵ روز قابل مشاهده بود (شکل ۳).



شکل ۳ - آب شالیزار نیمه عمر فیزیکی بروموبوتید را به ۲ روز کاهش می دهد.

جزئیات تئوریک

انرژی آزاد گیبس (G)، تابع دما (T) و فشار (P) است (معادله ۱). این فرآیند را میتوان به عنوان ترکیبی از دو فرآیند توصیف کرد که در اولی در فشار ثابت (ایزوبار)، دما تغییر می در دومی در دمای ثابت (ایزوترم)، فشار تغییر می کند. از این رو دانستن تغییرات G با دمای ثابت (ایزوترمال) و فشار ثابت (ایزو بار) ارزشمند است. اگر وضعیت انرژی آزاد گیبس را از نظر

وابستگی به دما در فشار ثابت بررسی گردد، در P ثابت، $dP = 0$ ، بنابراین (معادله ۱):

$$G = H + T\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P \Rightarrow H = G - T\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P$$

معادله ۱ $\partial G = -S\partial T + V\partial P$

$$\partial G = -S\partial T$$

$$\partial G = V\partial P$$

برای بحث در مورد وابستگی دمایی G به طور کمّی آنتروپی را از رابطه dG تعریف می کنیم (معادله ۲):

معادله ۲

$$S = -\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P$$

بنابراین میتوانیم بنویسیم $G = H - TS$ به طوری که (18) (معادله ۳):

معادله (۳)

$$G = H + T\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P \Rightarrow H = G - T\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P$$

تقسیم در هر دو طرف توسط $T2$ - معادله ۴ را بدست می آید:

معادله (۴)

$$\frac{-H}{T^2} = \frac{-G}{T^2} + \frac{1}{T}\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P = G\left(\frac{\partial\left(\frac{1}{T}\right)}{\partial T}\right)_P + \frac{1}{T}\left(\frac{\partial G}{\partial T}\right)_P = \left(\frac{\partial\left(\frac{G}{T}\right)}{\partial T}\right)_P$$

نتیجه نهایی در معادله زیر، به ما اجازه می دهد از طریق تخمین مقادیر مختلف G در دماهای تعیین شده آنتالپی را تخمین بزنیم (معادله ۵):

معادله (۵)

$$\left(\frac{\partial\left(\frac{G}{T}\right)}{\partial T}\right)_P = \frac{-H}{T^2} \Rightarrow \int_{\frac{G(T_1)}{T_1}}^{\frac{G(T_2)}{T_2}} d\left(\frac{G}{T}\right) = \int_{T_1}^{T_2} \frac{-H(T)}{T^2} dT \Rightarrow \quad \frac{G(T_2)}{T_2} - \frac{G(T_1)}{T_1} \cong H\left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right)$$

بررسی پایداری ترمودینامیکی علف کش ها در محیط فاقد آب

جهت مطالعه انرژی آزاد گیبس مولکول به صورت بنیادی (شاهد) و بدون در نظر گرفتن عوامل مداخله گر به منظور مقایسه های بعدی الزاماً باید آن را در شرایط استاندارد و در عدم حضور آب مطالعه کرد. در چنین شرایطی مشخص شد که بروموبوتید بالاترین پایداری را در ۲۹۸ کلوین (-۲۰۴۹۳۹۸/۸۰kcal/mol) و کمترین آن را در ۲۷۳K (-۲۰۳۶۷۳۵/۸۴kcal/mol) و K (-۲۰۳۶۷۴۰/۱۱ kcal/mol) ۳۰۸ و(- ۲۰۳۶۷۴۱/۳۷ kcal/mol) ۳۱۸K نشان می دهد. میزان تغییرات انرژی آزاد گیبس (ΔG) در حد ۱۸۲۷۳۳۷ kcal/mol- بین از ۲۷۳ تا ۲۹۸ کلوین قابل توجه بود. اگرچه ممان دوقطبی به صورت عام ۲/۲۳۵۶ دی بای است، اما در ۲۹۸ کلوین تا حد ۲/۹۳۵۵ دی بای افزایش می یابد . این نتیجه ما را به سمت درک خصوصیات ملکولی پایه و بدون حضور آب هدایت می کند.

بررسی علف کش های انتخاب شده در محیط آبی و دمای بدن

بهترین شرایط برای مطالعه ی برموبوتید، بررسی آن در محیط آبی است زیرا در فضای شالیزار این سم در آب محلول است و از همین طریق نیز جذب بدن کشاورزان می گردد. در بدن نیز بالغ بر ۷۰٪ محیط از نظر بیوشیمیایی از آب تشکیل شده است. انتظار می رود تغییرات دمایی در بدن افراد بتواند سیستم ترمودینامیکی سم را تحت تاثیر قرار دهد. انرژی آزادی گیبس بروموبوتید در ۲۹۸،۲۷۳ ، ۳۰۸ و ۳۱۸ کلوین به ترتیب برابر با-۲۰۳۶۷۳۵/۸۴ ، -۲۰۴۹۳۹۸/۸۵ ، -۲۰۳۶۷۴۰/۱۱ و -۲۰۳۶۷۴۱/۳۸ کیلوکالری به ازاء هر مول است. با افزایش دما تغییری در ممان دو قطبی مشاهده نشد و در این شرایط توزیع سطحی برای بروموبوتید ۲/۹۷۱۸ دی بای می باشد.

تعیین مکانیزم عمل رده های جدید علف کش ها توسط بسیاری از محققان این رشته بواسطه ی آزمایشات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در حال انجام است. علی رغم تحقیقات بسیار، هنوز محل اثر ملکولی برخی از کلاس های مهم علف کش ها ناشناخته است. عدم دسترسی به تستهایی با دقت و صحت مکفی سبب می شود تا پیش بینی فعالیت علف کش ها و محل دقیق عمل کرد برخی رده های شیمیایی جدید آن ها، سبب شود تا دهها میلیون دلار برای صنعت علف کش ها هزینه ایجاد شود. به طور کل علف کش ها شامل دامنه وسیعی از مواد شیمیایی هستند که در بخشهای انتقال انرژی و عملکردهای متابولیک در سلولهای گیاهی تداخل می کنند. تعداد کمی از علف کش ها هستند که کاملاً بصورت علمی ساخته شده باشند و ساختار، عملکرد و اساس شیمیایی آنها براساس اطلاعات بیوشیمیایی و جایگاه فعال ملکول تهیه شده باشد. بر اساس یافته ها زمان کاهش مقدار برموبوتید در فاز اول نیمه عمرآن در آب شالیزار بسیار کمتر از خاک شالیزار بوده است. به نظر می رسد جذب علف کش توسط گیاه، علت اصلی کاهش آن در خاک بوده است امّا در معرض آفتاب قرار گرفتن و تجزیه نوری علت اصلی کاهش سریع آن در آب است(۲۰-۲۱). در دمای صفر درجه سانتی گراد کمترین پایداری در ساختار این سم مشاهده شده و بنابراین یخ زدگی در زمستان می تواند سبب ناپایداری بیشتر علف کش ها شود. در حدود ۲۵ درجه سانتی گراد ساختار آزمایش شده پایدار بوده و برای هرگونه هدف تجاری و استفاده مناسب است. ممان دوقطبی در بروموبوتید در ^{o}C ۲۵ تغییر میکند. این در حالی است که این پارامتر در سایر دماها ثابت است. محیط آبی باعث می شود که ملکول ممان دوقطبی بزرگتری داشته باشد بنابراین در این حالت تغییرات ساختاری قابل انتظار

است. براساس این پدیده حلالیت برموبوتید تغییر کرده و نفوذ آن در مقایسه با حالت اولیه متفاوت خواهد بود. به طور کلی در محیطهای آبی مانند محلول آبی یا درون توده سلول گیاهی و یا درون بدن حیوانات مانند بدن انسان، افزایش دما سبب پایداری ساختار می شود و این اثبات می کند که زمانی که فردی در معرض چنین سمی قرار می گیرد، تجزیه فیزیکی آن دشوار می شود. نیمه عمر فیزیکی چنین علف کشی در خاک و آب نه تنها به تجزیه شدن توسط نور خورشید بلکه به جذب آن توسط گیاه هم بستگی دارد هرچند که ممکن است در معرض نور قرار گرفتن اثر مهم تری روی این پدیده داشته باشد.

تقدیر و تشکر

از همکاری پرسنل سازمان جهاد کشاورزی، استان گیلان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن که در انجام این پروژه یاری رساندند تشکر می گردد.

منابع مورد استفاده

1. Besien, T. J., Williams, R. J., Johnson, A. C., 2000. The transport and behaviour of isoproturon in unsaturated chalk cores. Journal of Contaminant Hydrology 43(2): 91-110.
2. Chilton, P. J., Stuart, M. E., Gooddy, D. C., Williams, R. J., Johnson, A., 2005. Pesticide fate and behaviour in the UK Chalk aquifer, and implications for groundwater quality. Quarterly Journal of Engineering Geology and Hydrogeology 38: 65-81.
3. Farmer, W. J., Aoch, Y., Biggar, J. W., Seiber, J. N., 1987. Chemical conversion of pesticides in the soil-water environment. Chapter 7 in Fate of pesticides in the environment. Publication 3320. University of California.
4. Hasukawa, H., Komai, S., Mizutani, S., Oobayashi, H., Fujii, Y., Sudo, M., 2009. Reductions in outflow loads during paddy rice cropping period by environment-conscious agricultural practice. Bull Shiga Pref Agric Technol Promo Cent 48: 1-21.
5. Helling, C. S., Kearney, P. C., Alexander, M., 1971. Behavior of pesticides in soil. Adv Agron 23: 147-240.
6. Houghton, M., Knipe, D. M., Howley, P. M., 1996. Fields Virology, 3rd, Hepatitis C viruses, Philadelphia: Lippincott - Raven.
7. Hutzinger, O., 1981. Environmental and toxicological chemistry at the University of Amsterdam: Five years of philosophy and practice of environmental health chemistry. Ann Arbor Science Publishers Inc.: Michigan.
8. Isobe, N., Matsuo, M., Miyamoto, J., 1984. Comparative metabolism studies on N-(1-methyl-1-phenylethyl)-2-bromo-3, 3-dimethylbutanamide (bromobutide) and its debromonated derivative in rats and mice. J Pestic Sci 9: 105-115.
9. Iwafune, T., Inao, K., Horio, T., Iwasaki, N., Yokoyama, A., Nagai, T., Ibaraki, A., 2010. Behavior of paddy pesticides and major metabolites in the Sakura RiverJapan. J Pestic Sci 35: 114-123.
10. Johnson, A. C., Hughes, C. D., Williams, R. J., Chilton, P. J., 1998. Potential for aerobic isoproturon biodegradation and sorption in the unsaturated and saturated zones of a chalk aquifer. Journal of Contaminant Hydrology 30 (3-4): 281-297.
11. Johnson, A. C., White, C., Bhardwaj, C. L., Dixon, A., 2003. The ability of indigenous micro-organisms to degrade isoproturon, atrazine and mecoprop within aerobic UK aquifer systems. Pest Management Science 59(12): 1291-1302.
12. Marer, P. J., Flint M. L., Stimmann, M. W., 1988. The safe and effective use of pesticides. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources.
13. McCall, P. J., Vrona, S. A., Kelley, S. S., 1981. Fate of uniformly carbon-14 ring labeled 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. J Agric Food Chem 29: 100-107.
14. Morinaka, H., Murakami, M., Takesada, H., Azuchi, Y., Tsuzuki, K., Takematsu, T., 1993. Changes in concentrations of active ingredients of a flowable and granules consisting of a combination of pyributicarb, bromobutide and benzofenap in water of paddy fields. Weed Res Jpn 38: 275-281.
15. Morohashi, M., Nagasawa, S., Enya, N., Suzuki, K., Kose, T., Kawata, K., 2012. Behavior of bromobutide in paddy water and soil after application. Bull Environ Contam Toxicol 88: 521-525.

16. Spear, R., 1991. Recognized and possible exposure to pesticides. Handbook of pesticide toxicology, San Diego, California: Academic Press, Inc.
17. Voos, G., Groffman, P. M., 1997. Relationships between microbial biomass and dissipation of 2, 4-D and dicamba in soil. Biol Fertil Soils 24: 106-110.
18. Ware, G. W., 1991. Fundamentals of pesticides: A self-instruction guide. Fresno. California: Thomson Publications.
19. World Health Organization, http://www.who.int/inf-fs/en/fact164.html, 1997. Hepatitis C.
20. Takashi, N., Mikami, N., Yamada, H., Miamoto, J., 1985. Photodegradation of the herbicide bromobutide in water. J Pesticide Sci 10: 247-256.
21. Yaron, B., Gerstl, Z., 1985. Spencer, W. F., Behavior of herbicides in irrigates soils. Springer-Verlag New york Inc. Advances in soil science 3: 122-211.