

.....

**Ana PINTAR, Zvonimir OSTOJIĆ, Klara BARIĆ**

*Sveučilište u Zagrebu Agronomski fakultet, Zavod za herbologiju*

*apintar@agr.hr*

## **BIOTEST METODE ZA UTVRĐIVANJE REZIDUA HERBICIDA U TLU**

### **SAŽETAK**

Primjena zemljišnih herbicida ima za cilj postizanje produljenog (rezidualnog) učinka u suzbijanju korova tijekom vegetacijske sezone. Budući da osigurava zaštitu usjeva od korova tijekom duljeg vremena, rezidualnost smatramo poželjnim svojstvom. No i pored pozitivnih učinaka, rezidualni herbicidi imaju niz nedostataka. Rezidualni herbicidi, naročito rezidue onih herbicida koji u tlu ostaju u aktivnom obliku dulje od godine dana, mogu štetno djelovati na iduće kulture u plodoredu i na taj način znatno ograničiti plodored. Koliko će se dugo neki herbicid zadržati u tlu izravno ovisi o činiteljima koji utječu na razgradnju i premještanje aktivne tvari s mjesta primjene. Među najvažnijim takvim činiteljima jesu fizikalno-kemijska svojstva herbicida, svojstva tla (sadržaj i tip koloida tla, pH i prisutne populacije mikroorganizama) i vremenske prilike (temperatura i vlažnost). Ti činitelji, izravno ili neizravno, a najčešće u interakciji, utječu na ponašanje herbicida u tlu. Kad postoji sumnja da bi rezidue nekog herbicida mogle oštetiti iduću kulturu u plodoredu, dva su načina s pomoću kojih se može predvidjeti ta opasnost: kemijskom analizom uzoraka tla ili metodom biotesta. Kvantitativna analiza uglavnom se provodi kemijskim metodama, a biološko testiranje provodi se mjerenjem biološkog odgovora biljke na prisutnost herbicida. Glavne prednosti biotesta nad skupim kemijskim analizama jesu jednostavnost izvođenja, reproduktivost i niska cijena. Osim toga, primjenom biotesta dobiva se pouzdan odgovor o ostatcima herbicida koji su određenoj biljci dostupni te odgovor da li ti ostatci izazivaju fitotoksičnost.

**Ključne riječi:** herbicidi, rezidui, fitotoksičnost, plodored, biotest

### **UVOD**

Perzistentnost (postojanost) je svojstvo prvenstveno zemljišnih herbicida, odnosno onih herbicida koji se primjenjuju na tlo (prije sjetve ili nakon sjetve, a prije nicanja). Od takvih herbicida upravo se i traži da imaju rezidualno (produženo) djelovanje, odnosno da osiguravaju zaštitu usjeva od korova kroz određeno razdoblje. Idealno bi bilo kad bi djelotvornost iskazivali samo tijekom kritičnog razdoblja zakorovljenosti kulture, no u praksi često nije tako. Vrlo često herbicidi s naglašenim perzistentnim djelovanjem ostavljaju aktivne

rezidue u tlu sve do žetve ili čak nakon žetve, što ima brojne štetne posljedice. Neke od posljedica jesu štetno djelovanje na osjetljive kulture u plodoredu, sužavanje plodoreda, ograničavanje izbora herbicida, negativno djelovanje na mikroorganizme u tlu i brojne druge. Perzistentnost herbicida ovisi o vrlo kompleksnoj interakciji svojstava tla, vremenskih prilika i fizikalno-kemijskih svojstava herbicida (Ostojić, 1989). Imajući to u vidu, sasvim je jasno da je perzistentnost svojstvo koje za isti herbicid nema iste vrijednosti u različitim pedo-klimatskim uvjetima, a ni za različite herbicide u istim pedo-klimatskim uvjetima. S obzirom na veliki broj i interakciju čimbenika koji određuju perzistentnost nekog herbicida, može se dogoditi da se fitotoksični učinak rezidua herbicida pojavi i kad se poštuju ograničenja plodoreda. Provjera mogućnosti sjetve neke kulture nakon primjene rezidualnog herbicida može se obaviti primjenom instrumentalnih (analitičkih) metoda i metodom biotesta. Analitičke metode (plinska kromatografija, tankoslojna kromatografija, imunološki testovi i dr.) omogućavaju dobivanje kvantitativnih, vrlo preciznih rezultata o stanju rezidua pojedinog herbicida u tlu, ali ne daju odgovor na to kolika je njihova dostupnost biljkama. Osim toga, te su metode, u odnosu na biotest, skuplje, priprema uzoraka tla za analizu traje dulje, a u nekim slučajevima nisu dovoljno osjetljive za detekciju niskih preostalih količina određenoga herbicida (Zhao i sur., 2006). Prema Beyer i sur. (1988), biotest je praktično jedina metoda koja daje uvid o utjecaju edafskih i klimatskih čimbenika na ponašanje herbicida u tlu i o njegovoj dostupnosti biljkama.

U radu će biti prikazane mogućnosti i uvjeti provedbe te prednosti i nedostaci biološkoga testa u odnosu na ostale metode kojima se utvrđuju rezidue herbicida u tlu.

## PONAŠANJE HERBICIDA U TLU

Perzistentnost nekoga herbicida razdoblje je tijekom kojega herbicid ostaje u aktivnom obliku u tlu. To je razdoblje u kojem određeni herbicid iskazuje rezidualno djelovanje (Ostojić, 2004). Sudbina herbicida nakon primjene u okolišu uvjetovana je brojnim čimbenicima i njihovom kompleksnom interakcijom. Čimbenici se uobičajeno razvrstavaju u četiri skupine: fizikalno-kemijska svojstva herbicida, svojstva tla, vremenske prilike i čovjek, odnosno agrotehničke mjere (Colquhoun i sur., 2003).

Fizikalno-kemijska svojstva herbicida koja određuju njegovu perzistentnost u tlu jesu poluvijek razgradnje ( $DT_{50}$ ), konstanta adsorpcije ( $K_{oc}$ ), topljivost u vodi ( $S_w$ ), konstanta raspodjele organska faza - voda ( $K_{ow}$ ) i konstanta ionizacije ( $pK_a$ ). To su konstante odnosno koeficijenti koji upućuju na sposobnost vezanja herbicida za čestice tla, a na koje utječu vremenske prilike i čovjekovo djelovanje, odnosno agrotehničke mjere koje čovjek provodi u tehnologiji uzgoja kulture (Devlin i sur., 2002).

Tlo kao činitelj perzistentnosti obuhvaća fizikalne čimbenike (sadržaj i odnos mineralnih čestica, sadržaj organske tvari), kemijske čimbenike (pH, kapacitet za zamjenu iona i sadržaj minerala) i mikrobiološke čimbenike (vrsta i količina mikroorganizama). Tla koja imaju visok sadržaj organske tvari i gline zahtijevaju primjenu viših dozacija herbicida za postizanje zadovoljavajućeg učinka jer navedene komponente takvih tala imaju velik kapacitet za adsorpciju herbicida. U takvim tlima rezidualni učinak herbicida više je izražen pa su i veće mogućnosti oštećenja kultura u plodoredu (Ostojić, 2004). To potvrđuju Long i sur. (2014), koji su proučavali razgradnju s-metolaklora u pet tipova tala, različitih po sadržaju organske tvari i gline, pri jednakoj temperaturi (25 °C) i vlažnosti tla (60 %). U tlu s najvećim sadržajem organske tvari i gline, vrijeme potrebno da se razgradi pola od primijenjene doze s-metolaklora bilo je dvostruko dulje u odnosu na tlo koje je sadržavalo najmanji udio organske tvari i glinenih čestica.

Reakcija tla (pH vrijednost) kao kemijsko svojstvo važan je čimbenik koji utječe na ponašanje organskih kemikalija koje ioniziraju. Utječe na biotičku i abiotičku razgradnju ionskih i neionskih spojeva (Weber i sur., 2000). Tako primjerice, imidazolinoni su podložniji razgradnji i kraće perzistiraju u uvjetima visokih pH vrijednosti (alkalna tla), a u kiselim tlima molekule herbicida čvršće se vežu za adsorpcijski kompleks tla te je i njihova perzistentnost izraženija (Loux i Reese, 1993).

Mikroorganizmi tla imaju najvažniju ulogu u procesu razgradnje herbicida. Budući da njihov sastav i raspodjela znatno variraju s temperaturom i dubinom tla, stupanj mikrobiološke razgradnje može se razlikovati u površinskom i potpovršinskom sloju tla (Caracciolo i sur., 2001). U dubljim slojevima tla broj mikroorganizama znatno se smanjuje pa osnovni put razgradnje preuzimaju kemijski procesi. Povećanjem vlage i temperature tla razgradnja teče brže te je najizraženija u prozračnim, umjereno vlažnim tlima, neutralne pH vrijednosti i s većim sadržajem minerala. Suprotno navedenom, u hladnim i suhim uvjetima, su usporeni procesi razgradnje pa je i rezidualno djelovanje herbicida izraženije (Ostojić, 2004). Iz navedenog se vidi da je stupanj kemijske i mikrobiološke razgradnje herbicida u uskoj vezi s vremenskim prilikama, i to u prvom redu s količinom i rasporedom oborina te s temperaturom tla i zraka. Osim vlage i temperature, znatan utjecaj na perzistentnost herbicida podložnih fotorazgradnji (npr. pendimetalin, napropamid) ima i sunčeva svjetlost.

Važan utjecaj na procese razgradnje herbicida ima i čovjek, odnosno agrotehničke mjere koje provodi. Neki autori navode da različiti sustavi obrade i gnojidbe tla znatno utječu na promjenu mikrobiološke aktivnosti (Anderson, 2003; Beck i sur., 2005; Joergensen i Emmerling, 2006). Pojedine agrotehničke mjere mogu smanjiti populaciju mikroorganizama, usporiti enzimatsku aktivnost, povećati ili smanjiti brojnost nekih grupa mikroorganizama i na taj način neposredno utjecati na procese mikrobiološke degradacije. Brojnost i

aktivnost mikroorganizama znatno se povećava u tlima koja su bogata organskom tvari, a budući da obrada tla utječe na promjene u sadržaju organskog ugljika, najizraženija enzimatska aktivnost utvrđena je u površinskom sloju koji nije u sustavu konvencionalne obrade (Levanon i sur., 1994; Böhme i sur., 2005).

## BIOTEST METODE

Biotest u širem smislu riječi *jest određivanje (predviđanje) veličine (snage) nekog fizičkog, kemijskog, biološkog, fiziološkog ili psihološkog stimulansa, s pomoću reakcije koju on izaziva na drugom živom testnom organizmu* (Finny, 1947). Iako u prirodnim znanostima biotest ima puno širu definiciju, za utvrđivanje ostataka herbicida u tlu, biotest obuhvaća niz metoda kojima se s pomoću reakcije osjetljive (testne) biljke utvrđuju eventualne preostale količine prethodno primijenjenoga herbicida. Taj se test može provesti na dva načina, izravno u polju ili u stakleniku (laboratoriju) na uzorcima koji su uzeti iz polja (Ostojić, 2004). Bez obzira na to provodi li se biotest u polju ili u kontroliranim uvjetima za pouzdanost rezultata, vrlo je važno odabrati odgovarajuću testnu biljku. Odabir testne biljke ponajprije ovisi o istraživanom herbicidu. Provodi se tako da se potencijalna testna biljka, a radi toga da se dobije krivulja osjetljivosti, tretira serijom rastućih koncentracija pojedinog herbicida (Santelmann, 1977). Krivulja osjetljivosti zapravo je odgovor biljke na različite dozacije herbicida, a odgovarajućom se smatra ona biljka koja na porast dozacije reagira porastom osjetljivosti (Santelmann i sur., 1971). Osim relativne osjetljivosti (ne prejako i ne slabo) na dotični herbicid, testna biljka mora se odlikovati relativno brzim i ujednačenim nicanjem te ujednačenim rastom i brзом tvorbom organske mase (Sekutowski, 2011). Jednako tako, vrlo je važno da reagira jasnim, lako uočljivim i mjerljivim simptomima. Kao i u drugim eksperimentima i u biotestu je važno da utvrđena reakcija biljke bude ponovljiva. Stoga se kao testne biljke uglavnom koriste kulturne biljke, koje u odnosu na korove imaju malu genetsku varijabilnost, što je jedan od preduvjeta za ponovljivost reakcije (Pestemer i Gunther, 1993). Za pojedine kemijske skupine herbicida utvrđene su odgovarajuće testne biljke, koje sukladno mehanizmu djelovanja pojedinog herbicida, iskazuju tipične simptome oštećenja. Tako Horowitz (1976) navodi zob kao odgovarajuću testnu biljku za herbicide iz kemijskih skupina triazini, triazinoni i triazolopirimidini. Za herbicide koji inhibiraju djelovanje enzima acetolaktat sintaze (sulfonilureja, triazolopirimidini, triazoloni) kao pogodne testne biljke utvrđene su uljana repica, lucerna, sirak i suncokret (Hager i Nordby, 2007). Kukuruz je utvrđen kao odgovarajuća testna biljka za sulfonilureja herbicide (Groves i Foster, 1985), a šećerna repa, osim za sulfonilureja (Nicholls i Evans, 1985) i za herbicide iz kemijske skupine imidazolinoni (Hart i sur., 1991). Osim

.....

odabira testne biljke, za pravilnu provedbu biotesta važno je odabrati i parametar za procjenu osjetljivosti. Odluka o odgovarajućem parametru donosi se ovisno o nastalim vizualnim oštećenjima. Često uključuje utvrđivanje duljine korijena, stabljike, lista, vaganje svježe i/ili suhe mase biljaka. Santelmann (1977) navodi da je svježija masa pouzdaniji mjerni parametar u odnosu na suhu masu biljaka. Naime, nekrotično tkivo ima smanjenu sposobnost zadržavanja vode koja se očituje kao razlika u masi svježe mase osjetljivih i otpornih biljaka. Kad bi se promatranje provodilo samo kroz parametar suhe mase, spomenute razlike ne bi došle do izražaja. Mjerenja u biološkim testovima uključuju i fiziološke reakcije biljaka. Koja će se reakcija ocjenjivati ovisi o mehanizmu djelovanja istraživanog herbicida, a može se odnositi na utvrđivanje potrošnje vode (Witt i sur., 1970), apsorbciju izlučivoga klorofila, klijavost sjemena (Schmidt, 1993), izmjenu CO<sub>2</sub> (Truelove i sur., 1974), utvrđivanje sadržaja karotenoida i na druge parametre.

## BIOTEST U POLJU

Biotest u polju provodi se da bismo bili sigurni da se na parceli, na kojoj planiramo sjetvu ili sadnju određene kulture, ne nalaze preostale količine prethodno primijenjenog herbicida na koji je ta kultura osjetljiva (Lavy i Santelmann, 1986). U jesen ili proljeće, neposredno prije sjetve ili sadnje kulture, sije se testna biljka. Sije se u jedan ili više redova duž parcele, i to na ona mjesta za koja se pretpostavlja da se na njima nalazi najveća koncentracija prethodno primijenjenog herbicida. Osim na tretiranom dijelu parcele, testna biljka sije se i na netretiranom dijelu zbog usporedbe eventualnih oštećenja. Biljke se uzgajaju do pojave simptoma nakon čega se utvrđuje reakcija, odnosno mjere im se parametri. U slučaju reakcije testne biljke svakako je uputno odustati od sjetve te kulture (Ostojić, 2004.) Prema Santelmannu (1977) glavni nedostaci biotesta u polju jesu to što se provodi na većim površinama te dulje trajanje u odnosu na biotestove u stakleniku (laboratoriju). Osim toga, budući da su biljke izložene vanjskim uvjetima, vrlo je važno da se provode uz nadzor stručnjaka da se eventualna oštećenja nastala pod utjecajem abiotskih čimbenika ne bi, pogrešno, pripisala fitotoksičnom učinku rezidua herbicida.

## BIOTEST U STAKLENIKU (LABORATORIJU)

Biotest koji se provodi u stakleniku (laboratoriju) može biti kvalitativan i kvantitativan (Ostojić, 2004). Provođenjem kvalitativnoga biotesta ne dobiva se odgovor o količini rezidua pojedinog herbicida, nego se samo na temelju reakcije testne biljke utvrđuje da li su u tlu prisutni ostatci prethodno primijenjenog herbicida. U provođenju kvalitativnog biotesta u stakleniku

(laboratoriju) točnost dobivenih rezultata znatno ovisi o načinu uzorkovanja tla te o tome da je u tlu, koje planiramo uzorkovati, prisutan samo jedan herbicid (Hurle, 1977). Uzorci se uzimaju u rano proljeće ili 20-40 dana prije roka sjetve, sondom na više pravilno raspoređenih mjesta po polju. Uzimaju se s dvije dubine, a dubine uzorkovanja ovise o cilju istraživanja. Najčešće se uzimaju uzorci sa 0-7,5 i 7,5-15 cm dubine. Broj potrebnih uzoraka ovisi o veličini parcele. Za parcelu veličine 1 ha uzima oko 5-7 uzoraka, a za hektarski veće parcele potreban je manji broj uzoraka. Uzeti uzorci uprosječe se za svaki od uzorkovanih slojeva tla. Posebno se uprosječe uzorci uzeti na rubovima parcele i na mjestima preklapanja prohoda prskalice. Uprosječeni uzorci trebali bi sadržavati 1-2 kg tla, da bi se tlom mogle napuniti uzgojne posude promjera oko 10 cm (Ostojić, 2004). Jako je važno da uzgojne posude ne sadrže otvor na dnu da se ne bi herbicidi isprali. Osim s tretiranog dijela parcele, uzorci se uzimaju i s netretiranoga dijela parcele koji će služiti kao kontrola. Uzeti uzorci ne smiju se držati u toplim prostorijama dulje od dva dana jer bi u takvim uvjetima degradirali herbicidi (Martin i sur., 1989). Stoga je važno pravilno pospremiti u zamrzivač uzorke s kojima se ne planira odmah raditi. Uzorke s kojima odmah planiramo provesti biotest, ako su vlažni, potrebno je prosušiti na sobnu temperaturu i usitniti tako da grude promjerom odgovaraju veličini zrna graška (Ostojić, 2004). Nakon pravilne pripreme uzoraka tla, sije se testna biljka. Važno je naglasiti da se samo jedna biljna vrsta rabi kao testna biljka po pojedinom pokusu. U svaku uzgojnu posudu sije se 10-15 sjemenki testne kulture. Uzorci tla s usijanim testnim biljkama navlaže se do poljskog kapaciteta za vodu i stavljaju u staklenik ili komoru u kojima se biljke razvijaju u kontroliranim uvjetima duljine dana i noći (16h / 8h), temperature (22 °C dnevna / 18 °C noćna) i intenziteta svjetlosti (300  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) (Jovanović-Radovanov, 2011). Tijekom tog razdoblja biljke se redovito zalijevaju da bi odgovarajuća vlažnost tla bila stalna. Nakon 10-20 dana, ovisno o tipu herbicida i količini rezidua, provodi se mjerenje odgovarajućih morfoloških i fizioloških parametara (Ostojić, 2004).

Za razliku od kvalitativnoga biotesta, u kvantitativnom biotestu poznate su količine rezidua herbicida. Uzimaju se uzorci tla s netretirane površine. Uzorci se, ako su vlažni, prosuše, usitne i ravnomjerno rasporede u plastične kadice određenih dimenzija. Raspoređeni uzorci tretiraju se standardnom serijom poznatih rastućih koncentracija herbicida. Odmah nakon aplikacije tlo se ručno izmiješa, zatim se nekoliko minuta stavlja u rotacijsku mješalicu (Jovanović-Radovanov, 2011). Nakon homogenizacije uzorci se stavljaju u uzgojne posude i usijavaju sjemenom odabrane testne biljke. Paralelno s tim tretmanima pripremaju se i kontrolni tretmani s netretiranim uzorcima tla. Za svaku koncentraciju provode se tri, četiri ponavljanja. Nakon sjetve testne biljke uzorci se zalijevaju (do poljskoga kapaciteta) i stavljaju u staklenik ili klima

komoru u kojima se biljke razvijaju sve do pojave simptoma, nakon čega im se mjere parametri.

## ZAKLJUČAK

Da bi se problem rezidualnoga djelovanja herbicida što više umanjio, važno je poznavati ponašanje pojedinog herbicida u tlu, u određenim pedo-klimatskim uvjetima. Djelovanje herbicida nakon primjene uvjetovano je velikim brojem čimbenika i njihovom kompleksom interakcijom, pa se vrlo često događa da se fitotoksični učinak rezidua herbicida pojavi i kad se poštuju ograničenja plodoreda. Stoga, da bi se navedeno neželjeno djelovanje izbjeglo preporučuje se provođenje metoda za analizu rezidua herbicida na svim površinama za koje se sumnja da sadrže ostatke prethodno primijenjenoga herbicida. Kemijske analize rezidua herbicida relativno su skupe pa ih se često ne isplati provoditi za male površine. Za tu svrhu puno je prihvatljivija metoda kvalitativnog biotesta. Test je relativno jeftin, jednostavno se provodi, a na osnovi dobivenih rezultata može se donijeti vjerodostojna odluka o sjetvi naredne kulture u plodoredu.

## SUMMARY

### BIOASSAY METHODS FOR DETECTING HERBICIDE RESIDUES IN SOIL

The use of soil-applied herbicides aims to provide prolonged (residual) weed control during the vegetation season. Despite positive sides, residual herbicides have also negative effect, especially those that stay active in soil longer than one year. That kind of residual herbicides can be quite damaging for the next crop in the crop rotation. Time of decay of these herbicides in soil depends on its numerous biotic and abiotic factors that influences degradation and movement of active substances from the applied zone. Among the most important factors are physical and chemical properties of herbicides, properties of soil (content and the type of soil colloids, pH and present population of microorganism) and weather conditions (temperature and humidity). Those factors have direct or indirect affect on the herbicides, but mostly they are in interaction. If there is a suspicion that residue of some herbicides could damage next crop in the crop rotation, there are two ways to predict that danger, chemical analysis and bioassay method. Quantitative analysis includes chemical methods while bioassay presents measuring of biological response of plants on used/applied herbicides. Main advantages of bioassay are simplicity of use, reproducibility and low price. Besides that, the use of bioassay gives us reliable answer about herbicide residues that are available to the certain plant and if they could to cause phototoxicity.

**Keywords:** herbicides, residues, phytotoxicity, crop rotation, bioassay

LITERATURA

- Anderson, T. H.** (2003). Microbial eco-physiological indicators to assess soil quality. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 98: 285-293.
- Beck, L., Römbke, J., Bruere, A. M. and Mulder, C.** (2005). Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62: 189-200.
- Beyer, E. M., Duffy, M. J., Hay, J. V., Schlueter D. D.** (1988). Sulfonylureas. U: Kearney P.C i Kaufman D.D., *Herbicides: chemistry, degradation and mode of action*, Vol. 3, Dekker, New York, 117–189.
- Böhme, L., Langer, U., Böhme, F.** (2005). Microbial biomass, enzyme activities and microbial community structure in two European long-term field experiments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 109: 141-152.
- Caracciolo, A. B., Giuliano, G., Di Corcia, A., Crescenzi, C., Silvestri, C.** (2001). Microbial Degradation of Terbutylazine in Surface Soil and Subsoil at Two Different Temperatures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67:815–820.
- Colquhoun, J., Mallory-Smith, C. Ball, D.** (2003). Weed management in Clearfield™ wheat with imazamox. Extension Service, Columbia Basin Agricultural Research Center, Oregon State University.
- Devlin, D. L., Peterson, D. A., Regehr, D. L.** (2002). Residual Herbicides, degradation and Recropping Intervals. Kansas State University Publication C-707.
- Finney, D. J.** (1947). Probit analysis. London: Cambridge Univ. Press.
- Groves, K. E. M., Foster, R. K.** (1985). A corn (*Zea mays* L.) bioassay technique for measuring chlorsulfuron levels in three Saskatchewan soils. *Weed Science*. 33: 825-828.
- Hager, A. G., Nordby, D.** (2007). Illinois Agricultural Pest Management Handbook, 3: 343-350.
- Hart, R., Lignowski, E., Taylor, F.** (1991). Imazethapyr herbicide. U: The Imidazolinone Herbicides. D. Shaner and S. O'Connor Ed., CRC Press. Boca Raton. FL, 247-256.
- Horowitz, M.** (1976). Application of bioassay techniques to herbicide investigations. *Weed Research*. 16, 209-215.
- Hurle, K.** (1977). Biotests for the detection of herbicides in the soil. U: Crop Protection Agents - their Biological Evaluation. C.R. McFarland Ed. Academic Press, London, 285-306.
- Joergensen, R. G., Emmerling, C.** (2006). Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass and diversity in agricultural soils. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 169: 295-309.
- Jovanović-Radovanov, K.** (2011). Osetljivost gajenih biljaka na rezidualno delovanje imazetapira i klomazona. Beograd, doktorska disertacija.
- Lavy, T. L., Santelmann, P. W.** (1986). Herbicide Bioassays as a Research Tool. U: Research Methods in Weed Science. 3rd Edition. Camper, N.D. Ed., Southern Weed Science Society, Weed Science Society of America, Champaign, IL, 201-217.
- Levanon, D., Meisinger, J. J., Codling, E. E., Starr, J. L.** (1994). Impact of tillage on microbial activity and the fate of pesticides in the upper soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 72: 1-4.



- .....
- Long, Y. H., Li, R. Y., Wu, X. M.** (2014). Degradation of S-metolachlor in soil as affected by environmental factors. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14:189-198.
- Loux, M. M., Reese, K. D.** (1993). Effect of Soil Type and pH on Persistence and Carryover of Imidazolinone Herbicides. *Weed Technology* 7:452-458.
- Martin, A. R., Stougaard, R. N., Shea, P. J.** (1989). A Quick Test for Atrazine Carryover. *NebGuide*, pp 4.
- Nicholls, P. H., Evans, A. A.** (1985). The behaviour of chlorsulfuron and metsulfuron in soils in relation to incidents of injury to sugar beet. *Proceedings of the British Crop Protection Conference – Weeds*, 341-348.
- Ostojić, Z.** (1989). Herbicidi i tlo. U: Studija o jedinstvenim kriterijima zagađivača voda, vazduha i tla na području SAP Vojvodine i potrebne hitne mere zaštite na mestima sa najvažnijim zagađivačima, str. 319-320.
- Ostojić, Z.** (2004). Biotest (bio assay) za dokazivanje rezidualnog učinka perzistentnih herbicida na kulture u plodoredu. *Glasilo biljne zaštite* 1: 13-19.
- Pestemer, W., Gunther, P.** (1993). No-Observable-Effect Level (NOEL). U: *Herbicide Bioassays*,. Streibig, J.C; Kudsk, P. Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 137-152.
- Santelmann, P. W., Weber, J. B., Wiese, A. F.** (1971). A study of soil bioassay techniques using prometryne. *Weed Science* 19, 170-174.
- Santelmann, P. W.** (1977). *Herbicide Bioassays*. U: *Research Methods in Weed Science*. Truelove, B. Ed., Southern Weed Science Society, Auburn University, Auburn, AL., 80-87.
- Schmidt, R. R.** (1993). Development of Herbicides - Role of Bioassays. U: *Herbicide Bioassays*, Streibig, J.C., Kudsk. P. Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 7-28.
- Sekutowski, T.** (2011). Application of Bioassays in Studies on Phytotoxic Herbicide Residues in the Soil Environment, *Herbicides and Environment*, Dr Andreas Kortekamp (Ed.), InTech, <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/application-of-bioassays-in-studies-on-phytotoxic-herbicide-residues-in-the-soil-environment/> pristupljeno: 20.02.2017.
- Truelove, B., Davis, D. E., Jones, L. R.** (1974). A new method for detecting photosynthetic inhibitors. *Weed Science*, 22: 15-20.
- Weber, J. B., Wilkerson, G. G., Linker, H. M., Wilcut, J. W., Leidy, R. B., Senseman, S., Witt, W. W., Barrett, M., Vencill, W. K., Shaw, D. R., Mueller, T. C., Miller, D. K., Brecke, B. J., Talbert, R. E., Peeper, T. F.** (2000). A proposal to standardize soil/solution herbicide distribution coefficients, *Weed Science*, 48:75–88.
- Witt, W., Evetts, L., Davidson, J. M., Santelmann, P. W.** (1970). Influence of herbicide application method on bioassay sensitivity. *Proceedings of the Southern Weed Science Society*, 23: 338-342.
- Zhao, J., Guo-xiang, Y., Su-ping, H., Bao-min, W., Cai-xia, Y., Gang, L., Zhi-xi, Z., Zhao-hu, L., Qing L.** (2006). Development of a Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Herbicide Chlorimuron-ethyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 4948-4953.

Pregledni rad