

Ispitivanja mutagenih svojstava herbicida GAL-57 (bentazon + dikamba) primenom mikronukleus testa

Dragica Brkić¹, Slavica Gašić², Erzsébet Béres³, Enikő Pápai³, Vesela Karan⁴ i Neško Nešković¹

¹*Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd, Srbija (dragica.brkic@infosky.net)*

²*Galenika-Fitofarmacija a.d., Beograd, Srbija*

³*LAB International Ltd., Veszprem, Hungary*

⁴*Poljoprivredni fakultet, Beograd, Srbija*

REZIME

Mutageni potencijal herbicida GAL-57, koji je formulisan kao mešavina bentazona i dikambe, ispitan je primenom mikronukleus testa.

Ispitivanja su rađena na meševima oba pola (soj: CRL: NMRI BR), a ispitivani herbicid (preparat) je doziran oralno (sondom u želudac) u dozi od 2000 mg/kg, dva puta u razmaku od 24 sata. Kao pozitivna kontrola korišćen je ciklofosamid (60 mg/kg), a kao negativna rastvarač (destilovana voda). Životinje su žrtvovane 24 sata nakon drugog tretiranja, izolovane su ćelije koštane srži (iz femura) i ocenjivan je efekat supstancije.

Dobijeni rezultati su pokazali da ponovljen tretman miševa herbicidom GAL-57 ne izaziva ni biološki ni statistički značajno povećanje broja mikronukleusa kod tretiranih životinja. Istovremeno, kod životinja tretiranih ciklofosamidom (pozitivna kontrola) broj mikronukleusa u polihromatskim eritrocitima koštane srži miševa bio je statistički značajno povećan. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da ispitivani herbicid (preparat), u uslovima mikronukleus testa, ne ispoljava mutagena svojstva.

Ključne reči: GAL-57; bentazon; dikamba; mutagenost; mikronukleus test

UVOD

Svake godine u svetu se, za suzbijanje štetnih bioloških agenasa, upotrebi oko 2.5 miliona tona različitih pesticida. Međutim, delujući na štetne organizme pesticidi mogu da naruše balans koji postoji u prirodi na način koji nije poželjan. Između ostalog, uočena je veza između uvođenja na hiljade novih hemikalija i pove-

ćanog broja mutacija kod živih organizama na zemlji. Zbog svega toga je pažnja koja se posvećuje upotrebi pesticida velika, a njihovo korišćenje strogo regulisano.

Pesticidi se često formulišu kao mešavine dve ili više aktivnih materija. Herbicid GAL-57, čija su mutagena svojstva ispitivana u ovom radu, mešavina je dve aktivne materije, bentazona i dikambe. Bentazon [3-(izopropil)-1H-2,1,3-benzotiadiazin-4(3H)-on 2,2-dioksid] je selektivni,

kontaktni herbicid koji pripada grupi benzotiadiazinona. Primenuje se u različitim usevima (kukuruz, pšenica, pirinač, pasulj, soja, grašak, krompir, kikiriki) za suzbijanje širokolisnih vrsta korova (Huber i Otto, 1994).

Dikamba (3,6-dihlor-o-anizinska ili anizolna kiselina; 3,6-dihloro-2-metoksi benzoeva kiselina) je derivat benzoeve kiseline. Kao selektivni hormonski herbicid koristi se za suzbijanje jednogodišnjih i nekih višegodišnjih širokolisnih vrsta korova u usevima merkantilnog i silažnog kukuruza, sirka, šećerne trske i asparagusa, na strništima, pašnjacima i travnjacima (Ahrens, 1994; FAO, 2001).

I bentazon i dikamba su, po kriterijumima FAO/WHO i DPR, svrstani u grupu pesticida koji ne poseduju mutagena svojstva, ne izazivaju hromozomske aberacije niti oštećenja DNA, ni u *in vitro* ni u *in vivo* eksperimentima (FAO/WHO, 1992). Iako su podaci vezani za genotoksična svojstva ova dva herbicida oprečni (Wuu i Grant, 1968; Yodler i sar., 1973; Perocco i sar., 1990; Biradar i Rayburn, 1995; Mohammed i Ma, 1999; Filkowski i sar., 2003; Kaya i sar., 2004) ipak sva dostupna ispitivanja njihovih mutagenih svojstava primenom mikronukleus testa pokazuju da ni jedan od ovih herbicida ne izaziva pojavu mikronukleusa u polihromatskim eritrocitima koštane srži miša (Hrelia i sar., 1994; Garagna i sar., 2005).

Mikronukleus test je citogenetski test koji se koristi za *in vivo* detekciju oštećenja hromozoma ili mitotičkog aparata eritroblasta eritrocita iz koštane srži eksperimentalnih životinja, najčešće glodara. Ovim testom se identifikuju supstance koje prouzrokuju citogenetska oštećenja koja dovode do formiranja mikronukleusa koji sadrži fragmente hromozoma ili cele hromozome. S obzirom na činjenicu da polihromatski eritrociti nemaju jedro, pojava mikronukleusa u njima se lako uočava. Povećanje učestalosti pojave mikronukleusa kod eksperimentalnih životinja ukazuje na oštećenje hromozoma, odnosno na mutagena svojstva ispitivane supstance (OECD, 1997; Sugihara i sar., 2000).

Različiti problemi proizilaze iz proučavanja posledica koje nastaju u toku izloženosti više nego jednoj toksičnoj supstanci istovremeno. Poznato je da istovremena izloženost većem broju hemijskih agenasa može da dovede do promjenjenih farmakoloških i toksikoloških odgovora. Pre svega postavlja se pitanje da li te supstance reaguju međusobno, i ako reaguju na koji način i kakve su posledice na zdravlje ljudi i životnu sredinu. Imajući u vidu podatak da ni bentazon ni dikamba, prema literaturnim podacima, ne izazivaju pojavu mikronukleusa u polihromatskim eritrocitima koštane srži miša,

cilj ovog rada bio je da se, primenom mikronukleus testa, ispituju mutagena svojstva preparata GAL-57, koji je mešavina ova dva herbicida, odnosno da se utvrdi da li ima razlike u njihovom pojedinačnom delovanju u odnosu na njihovo delovanje u preparatu.

MATERIJAL I METODE

Ispitivano jedinjenje

U radu je korišćen herbicid GAL-57, proizvod preduzeća „Galenika-Fitofarmacija” a.d., Beograd, herbicid koji u svom sastavu ima dve aktivne materije, bentazon i dikambu. Preparat je formulisan kao koncentrovani rastvor (SL) a bentazon i dikamba se u preparatu nalaze u obliku natrijumovih soli rastvorljivih u vodi. Od pomoćnih materija u sastav preparata ulaze i EDTA kao stabilizator (takođe u obliku Na-soli) i voda, kao rastvarač. Preparat je, neposredno pre doziranja, rastvaran u destilovanoj vodi i korišćen u roku od dva sata.

Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni miševi (soj: CRL: NMRI BR) oba pola, starosti 6-12 nedelja, ujednačene telesne mase koja ne prelazi 35 g za ženke, odnosno 40 g za mužjake. Životinje potiču iz Charles River (Europe) laboratorije, Toxi Coop Ltd. Budimpešta, Mađarska. Tokom trajanja eksperimenta držane su u polipropilensko-polikarbonatnim kavezima (40 x 25 x 18 cm) na temperaturi od $22 \pm 3^\circ\text{C}$, sa dvanaestčasovnim svetlosnim ciklusom, hranjene su gotovom hranom za laboratorijske životinje (Sniff SM R/M-Z+H, Nemačka), i imale su na raspolaganju hranu i vodu *ad libitum*.

Po prijemu životinja, kao i dan pre tretmana, vršen je detaljni zdravstveni pregled svih životinja a životinje su aklimatizovane na laboratorijske uslove u toku sedam dana.

Mikronukleus test

U skladu sa OECD i EPA metodama (OECD, Metoda 1997; EPA, OPPTS 870.5395, 1998), kao i literaturnim podacima za bentazon i dikambu, rađen je Limit test, a ispitivano jedinjenje, u dozi od 2000 mg/kg, je primenjeno oralnim putem (sondom u želudac). Kao pozitivna kontrola korišćen je ciklofosamid (60 mg/kg) rastvor u 0.9% NaCl, koji je doziran intraperitonealno (0.1 ml/10 g telesne mase), a kao negativna

kontrola korišćen je rastvarač (destilovana voda), koji je kao i ispitivani preparat, primenjen oralno (sondom u želudac). Životinje su opservirane na prisustvo simptoma trovanja odmah posle doziranja, i zatim nakon 1, 2, 3, 4, 5, 24 i 48 sati (pred žrtvovanje životinja).

Životinje su žrtvovane 24 i 48 sati nakon tretiranja, izolovane su ćelije koštane srži iz femura, pravljeni su razmazi ćelija (na predmetnom staklu) koji su zatim fiksirani, bojeni akridin-oranžom i posmatrani, na fluorescentnom mikroskopu, na prisustvo ili odsustvo mikronukleusa (ocenjivan je efekat supstancije) (Hayashi i sar., 1983; Sugihara i sar., 2000).

Dozno-zavisno povećanje broja mikronukleusa određivano je neparametrijskim ANOVA testom Kruskal-Wallis-a, a kao kriterijum značajnosti razlike korišćene su verovatnoće od 0.05 i 0.01. U interpretaciji rezultata korišćen je, pored statističkog, i biološki značaj dobije-

nih rezultata a u obzir su uzeti i rezultati istorijske kontrole laboratorije u kojoj su ispitivanja rađena.

REZULTATI I DISKUSIJA

Životinje koje su preparat (herbicid) GAL-57 dobijale oralnim putem u dozi od 2000 mg/kg nisu uginjavale tokom eksperimenta, niti su registrovane pojave toksičnih efekata preparata. Od simptoma trovanja registrovano je samo neznatno smanjenje aktivnosti u prva četiri sata nakon tretiranja.

Učestalost pojave mikronukleusa u polihromatskim eritrocitima koštane srži miša data je u Tabelama 1 i 2. Iz rezultata se vidi da je kod mužjaka u kontrolnoj grupi nađen samo jedan mikronukleus, kod životinja tretiranih dozom od 2000 mg/kg dva, a kod životinja tretira-

Tabela 1. Broj mikronukleusa kod kontrolnih i mužjaka tretiranih preparatom GAL-57 i ciklofosfamidom (pozitivna kontrola)

Table 1. Number of Micronuclei in control and males administered GAL-57 herbicide and cyclophosphamide (positive control)

Tretman Treatment	Koncentracija Concentration (mg/kg)	Broj životinje Animal No.	Broj mikronukleusa Number of micronuclei	Broj pregledanih eritrocita Number of examined erythrocytes
Kontrola Control	0	7704	0	200
		7703	1	200
		7702	0	200
		7701	0	200
		7700	0	200
		Sred. vrednost: Mean value:		0.20
± SD:		0.45		
GAL-57	2000	7709	0	200
		7708	0	200
		7707	0	200
		7706	1	200
		7705	1	200
		Sred. vrednost: Mean value:		0.40
± SD:		0.55		
Pozitivna kontrola (Ciklofosfamid) Positive Control (Cyclophosphamide)	60	7714	31	200
		7713	21	200
		7712	19	200
		7711	3	200
		7710	27	200
Sred. vrednost: Mean value:		20.20		
± SD:		10.73		

SD = Standardna devijacija/Standard deviation

Tabela 2. Broj mikronukleusa kod kontrolnih i ženki tretiranih preparatom GAL-57 i ciklofosfamidom (pozitivna kontrola)**Table 2.** Number of Micronuclei in control and females administered GAL-57 herbicide and cyclophosphamide (positive control)

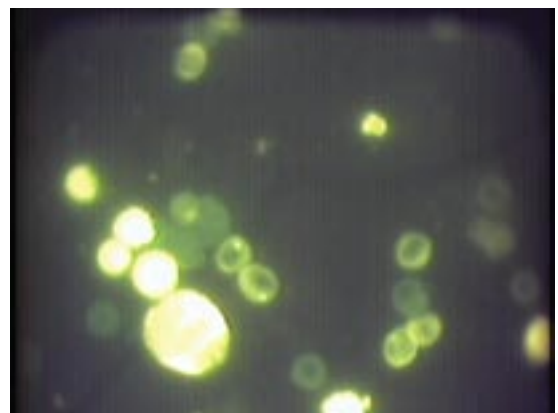
Tretman Treatment	Koncentracija Concentration (mg/kg)	Broj životinje Animal No.	Broj mikronukleusa Number of micronuclei	Broj pregledanih eritrocita Number of examined erythrocytes
Kontrola Control	0	7644	0	200
		7643	0	200
		7642	1	200
		7641	2	200
		7640	0	200
		Sred. vrednost: Mean value: ± SD: 0.89		0.60
GAL-57	2000	7649	0	200
		7648	0	200
		7647	0	200
		7646	1	200
		7645	1	200
		Sred. vrednost: Mean value: ± SD: 0.55		0.40
Pozitivna kontrola (Ciklofosfamid) Positive Control (Cyclophosphamide)	60	7654	31	200
		7653	21	200
		7652	19	200
		7651	3	200
		7650	27	200
Sred. vrednost: Mean value: ± SD: 9.83		29.20		

SD = Standardna devijacija/Standard deviation

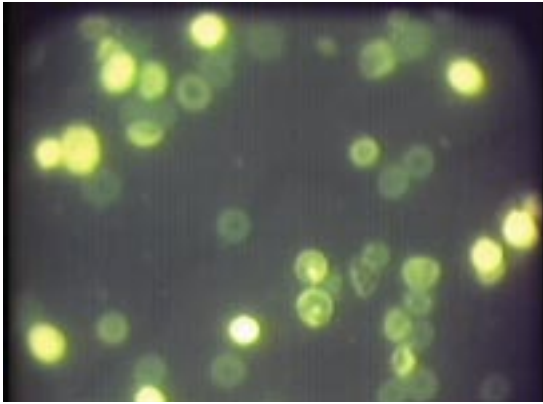
nih ciklofosfamidom (pozitivna kontrola) 101 mikronukleus (Slika 1). Kod ženki, u kontroli, nađena su tri mikronukleusa, kod doze od 2000 mg/kg dva, a kod životinja tretiranih ciklofosfamidom (pozitivna kontrola) nađeno je 146 mikronukleusa (Slika 2).

Rezultati statističkih proračuna za ovaj eksperiment (Tabela 3) pokazuju da je statistički značajno povećan broj mikronukleusa samo kod pozitivne kontrole (mužjaci i ženke).

Rezultati dobijeni u ovom testu pokazuju da nema ni statistički ni biološki značajnih razlika u pojavi mikronukleusa kod tretiranih i kontrolnih životinja. Prema tome, herbicid (preparat) GAL-57, u datim eksperimentalnim uslovima, ne izaziva pojavu mikronukleusa u polihromatskim eritrocitima koštane srži miša, pa se na osnovu toga može zaključiti da ne poseduje genotoksična svojstva.



Slika 1. Mikronukleusi kod mužjaka tretiranih ciklofosfamidom (pozitivna kontrola)
Figure 1. Micronuclei in males treated cyclophosphamide (positive control)



Slika 2. Mikronukleusi kod ženki tretiranih ciklofosfamidom (pozitivna kontrola)

Figure 2. Micronuclei in females treated cyclophosphamide (positive control)

Literaturni podaci, kao što je već navedeno, ukazuju na to da, u uslovima mikronukleus testa, pojedinačni herbicidi koji ulaze u sastav ispitivanog preparata ne poseduju mutagena svojstva (Hrelia i sar., 1994; Garagna i sar., 2005). Prema tome, može se reći da ni preparat GAL-57, koji je kombinacija bentazona i dikambe, ne poseduje mutagena svojstva, odnosno da u kombinaciji ova dva herbicida ne dolazi do stvaranja mutagenih supstanci, i da prema tome nema razlike u pojedinačnom delovanju ova dva herbicida i u delovanju obe supstance i isto vreme.

LITERATURA

- Abrens, W.H. (Ed.):** Herbicide Handbook (7th Edition). Weed Science Society of America, Champaign, IL, USA, 1994.
- Biradar, D.P. and Rayburn, A.L.:** Flow Cytogenetic Analysis of Whole Cell Clastogenicity of the Herbicides Found in Groundwater. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 28(1): 13-17, 1995.
- EPA:** OPPTS 870.5395 Health Effects Test Guidelines: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. US Environmental Protection Agency (US EPA), Washington, DC, USA, 1998.
- FAO/WHO:** Pesticide Residues in Food, Evaluations 1991 – Part II: Toxicology. International Programme on Chemical Safety (IPCS), World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, 1992, pp. 25-54.
- FAO/WHO:** FAO Specifications and Evaluations for Plant Protection Product - Dicamba. Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, Italy, 2001.
- Filkowski, J., Besplug, J., Burke, P., Kovalchuk, I. and Kovalchuk, O.:** Genotoxicity of 2,4-D and Dicamba Revealed by Transgenic *Arabidopsis thaliana* Plants Harboring Recombination and Point Mutation Markers. Mutat. Res., 542: 23-32, 2003.
- Garagna, S., Vasco, C., Merico, V., Esposito, A., Zuccoti, M. and Redi, C.A.:** Effects of Low Dose Bentazon on Spermatogenesis of Mice Exposed During Foetal, Postnatal and Adult Life. Toxicology, 212(2-3): 165-174, 2005.
- Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M.Jr.:** An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus test. Mutat. Res., 120: 241-247, 1983.
- Hrelia, P., Vigagni, F., Maffei, F., Morotti, M., Colacci, A., Perocco, P., Grilli, S. and Cantelli-Forti, G.:** Genetic Safety Evaluation of Pesticides in Different Short-Term Tests. Mutat. Res., 321(4): 219-228, 1994.
- Huber, R. and Otto, S.:** Environmental Behavior of Bentazon Herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol., 137: 111-134, 1994.
- Kaya, B., Marcos, R., Yanikoğlu, A. and Creus, A.:** Evaluation of the Genotoxicity of Four Herbicides in the Wing Spot Test of *Drosophila melanogaster* Using Two Different Strains. Mutat. Res., 557: 53-62, 2004.
- Mohammed, K.B. and Ma, T.H.:** *Tradescantia*-Micronucleus and -Stamen Hair Mutation Assays on Genotoxicity of the Gaseous and Liquid Forms of Pesticides. Mutat. Res., 426(2): 193-199, 1999.
- OECD:** OECD Guideline for Testing of Chemicals, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (No. 474, 1997). Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD), Paris, France, 1997.
- Perocco, P., Ancora, G., Rani, P., Valenti, A.M., Mazzullo, M., Colacci, A. and Grilli, S.:** Evaluation of Genotoxic Effects of the Herbicide Dicamba Using *in vivo* and *in vitro* Test Systems. Environ. Mol. Mutagen., 15(3): 131-135, 1990.
- Sugihara, T., Sawada, S., Hakura, A., Hori, Y., Ushida, K. and Sagami, F.:** A Staining Procedure for Micronucleus Test Using New Methylene Blue and Acridine Orange: Specimens that are Supravivally Stained with Possible Long-Term Storage. Mutat. Res., 470: 103-108, 2000.
- Wuu, K.D. and Grant, W.F.:** Chromosomal Aberrations Induced by Pesticides in Meiotic Cells of Barley. Cytologia, 33: 545-554, 1968.
- Yodler, J., Watson, M. and Benson, W.W.:** Lymphocyte Chromosome Analysis of Agricultural Workers During Extensive Occupational Exposure to Pesticides. Mut. Res., 21(6): 335-340, 1973.

Examination of Mutagenic Effects of GAL-57 Herbicide (Bentazone+Dicamba) Using Mouse Micronucleus Test

SUMMARY

A micronucleus test was run to investigate mutagenic potential of the herbicide GAL-57, a formulated mixture of bentazone and dicamba.

The test was applied to mice of both sexes (strain: CRL: NMRI BR) and the herbicide (product) was administered by gavage at 2000 mg/kg rate, twice within 24 hs. Cyclophosphamide (positive control) was administered at 60 mg/kg, while distilled water as a solvent was negative control. The animals were sacrificed 24 hs after second treatment, their bone marrow cells isolated from femur, and effects evaluated.

The data acquired showed that repeated treatment of mice with GAL-57 caused neither biological nor significant statistical increase in the number of micronuclei in treated animals. At the same time, the number of micronucleated polychromatic erythrocytes in the bone marrow of animals treated with cyclophosphamide (positive control) showed a significant statistical increase. The results suggest that the herbicide product tested did not show any mutagenic activity under the conditions of mouse micronucleus test.

Keywords: GAL-57; Bentazone; Dikamba; Mutagenicity; Micronucleus test