



© Н. С. Карамова¹,
А. П. Денисова¹, З. Сташевски²

¹ Казанский государственный университет, Казань

² Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Казань

☼ Мутагенная активность пяти пестицидов; актара, зенкор, моспилан, пенкоцеб, фастак, наиболее часто используемых для обработки посадок картофеля в Республике Татарстан, была исследована в тесте Эймса. Предварительная оценка токсического действия исследованных пестицидов на тестерный штам *Salmonella typhimurium* TA 100 позволила нам выбрать оптимальные концентрации препаратов для исследования их мутагенной активности в тесте Эймса. Пестициды пенкоцеб, актара, моспилан и фастак ни в одной из исследованных концентраций не обладали мутагенным эффектом в тесте Эймса без метаболической активации *in vitro*. Гербицид зенкор в концентрации 1 мкг/чашка индуцировал более чем двукратное превышение числа колоний ревертантов His⁺ над спонтанным фоном мутирования тестерного штамма, что свидетельствует о его слабой мутагенной активности. Метаболическая активация *in vitro* фракцией S9 печени крыс снижала мутагенный потенциал гербицида зенкор и практически не влияла на мутагенную активность пестицидов пенкоцеб, актара, моспилан, фастак.

☼ **Key words:** пестициды, генотоксичность, мутагенная активность, тест Эймса, метаболическая активация *in vitro*

Поступила в редакцию 04.07.2008
Принята к публикации 01.11.2008

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ПЕСТИЦИДОВ: АКТАРА, ЗЕНКОР, МОСПИЛАН, ПЕНКОЦЕБ, ФАСТАК В ТЕСТЕ ЭЙМСА

ВВЕДЕНИЕ

Масштабное использование химических средств защиты растений является одним из важнейших факторов интенсификации современного сельскохозяйственного производства. В настоящее время активное применение находят свыше 600 видов пестицидов, для синтеза которых используются более 1500 видов химических соединений (Wilkinson, 1990). Способность к длительному сохранению в окружающей среде, обусловленная относительно высокой стабильностью, и выраженная биологическая активность пестицидов позволяют отнести их к числу наиболее опасных загрязнителей окружающей среды. Вышесказанное определяет необходимость строгого регламентирования применения химических средств защиты растений, основанного на результатах всестороннего исследования биологических эффектов данных соединений. Особого приоритета заслуживает оценка генотоксического потенциала препаратов как первичного фактора риска для долгосрочных патологических эффектов, таких, как канцерогенез и наследственные заболевания. На сегодняшний день большинство известных пестицидов тестированы на мутагенную активность (Dearfield, 1999; Bolognesi, 2003), тем не менее реальная оценка генотоксического потенциала многих пестицидов весьма затруднена из-за недостатка или противоречивости данных.

В настоящей работе представлены результаты оценки мутагенного потенциала пяти пестицидов: актара, зенкор, моспилан, пенкоцеб, фастак, наиболее часто используемых для обработки посадок картофеля в Республике Татарстан.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованные соединения. В работе исследовано 5 пестицидов.

Зенкор (метрибузин). Действующее вещество — 4-амино-6-трет-бутил-3-(метилтио)-1,2,4-триазинон-5. Гербицид, действующий через листья и почву, уничтожая двудольные сорняки и сорные злаки. Производитель — фирма «Байер АГ», Германия.

Актара (тиаметоксам). Действующее вещество — 5-метил-3-(2-хлортиазол-5-илметил)-1,3,5-оксадиазинан-4-илиден-N-нитроамин. Внутривидовый инсектицид, воздействующий на ацетилхолиновый рецептор нервной системы насекомых. Производитель — фирма «Новартис Протекшн АГ», Швейцария.

Моспилан (ацетамиприд). Действующее вещество — N¹-метил-N¹-[(6-хлор-3-пиридил)метил]-N²-цианацетамидин. Системный инсектицид контактно-кишечного действия, который взаимодействует с ацетилхолиновым рецептором постсинаптической мембраны как конкурент ацетилхолина. Производитель фирма «Ниппон Сода Ко», ЛТД, Япония.

Фастак (альфа-циперметрин). Действующее вещество — смесь (1:1) изомеров циперметрина: (S)- α -циано-3-феноксibenзилового эфира (1 R)-

цис-3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты и (R)- α -циано-3-феноксibenзилового эфира (1S)-цис-3-(2,2-дихлорвинил)-2,2-диметилциклопропанкарбоновой кислоты. Контактно-кишечный пиретроидный инсектицид широкого спектра действия. Производитель — фирма «Цианамид», США.

Пенкоцеб (манкоцеб). Действующее вещество — комплекс этилен — бис-дитиокарбаматов цинка и марганца (с содержанием цинка и марганца соответственно 2,55 и 18 %). Фунгицид широкого спектра действия. Производитель — фирма «Серексагри С. А.», Франция. (Ассортимент средств защиты растений, 2000; Список пестицидов и агрохимикатов, 2000).

Пестициды растворяли в стерильной дистиллированной воде.

Мутагенную активность пестицидов исследовали в тесте Эймса. Эксперименты проводили согласно методике Maron and Ames (1983). В качестве тестерного штамма использовали ауксотрофный по гистидину штамм *Salmonella typhimurium* TA 100 (*his G46*, *rfa*, Δ *uvrB*, *bio*, *pKm 101*), любезно предоставленный Dr. V. Ames (США). Штамм *S. typhimurium* TA 100 имеет мутацию в гистидиновом опероне (миссенс-мутация *his G46*) и регистрирует точковые мутации типа замены пар оснований. При действии мутагенных факторов тестерный штамм может ревертировать к прототрофности по гистидину.

Для экспериментов с метаболической активацией *in vitro* использовали микросомную активирующую смесь (МАС) на основе препаратов лиофилизированной фракции S9 печени крыс, предоставленных НИИ Экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН (г. Пермь).

В качестве негативного контроля использовали дистиллированную воду, для позитивного контроля в экспериментах без метаболической активации использовали N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ, 50 мкг/мл) и бенз[а]пирен (50 мкг/мл) в вариантах с метаболической активацией *in vitro*.

Каждую концентрацию исследуемых соединений тестировали в трех, негативный контроль — в пяти повторностях.

Мутагенную активность исследуемых препаратов оценивали путем сравнения числа колоний ревертантов His⁺, выросших на чашках Петри с минимальным агаром в опытном варианте, с таковым в негативном контроле (спонтанный фон мутирования тестерных бактерий). При анализе результатов теста Эймса соединение расценивается как мутагенное, если среднее число колоний индуцированных ревертантов His⁺ превышает спонтанный фон мутирования более чем в 2 раза (Mortelmans and Zeiger, 2000). Превышение числа колоний ревертантов His⁺ в опытном варианте над таковым в негативном контроле от 2 до 10 раз свидетельствует о слабой и от 10 до 100 раз — о средней мутагенной активности исследуемого соединения (Дуган и др., 1990).

Таблица 1

Токсическое действие пестицидов актара, зенкор, моспилан, пенкоцеб, фастак на клетки *Salmonella typhimurium* TA 100

Исследуемые соединения	Выживаемость, %	
Контроль (H ₂ O)	100	
Актара 1 мкг/чашка	83 ± 7,2	
	10 мкг/чашка	86 ± 9,1
	100 мкг/чашка	55 ± 7,0
Зенкор 1 мкг/чашка	83 ± 12,3	
	10 мкг/чашка	69 ± 4,4
	100 мкг/чашка	64 ± 10,2
Моспилан 1 мкг/чашка	96 ± 9,8	
	10 мкг/чашка	97 ± 5,0
	100 мкг/чашка	94 ± 4,7
Пенкоцеб 1 мкг/чашка	85 ± 8,2	
	10 мкг/чашка	53 ± 5,6
	100 мкг/чашка	0
Фастак 0,05 мкл/чашка	89 ± 11,8	
	0,5 мкл/чашка	23 ± 8,5
	5 мкл/чашка	0

Токсичность пестицидов оценивали по проценту выживаемости, определяемой как отношение числа колоний тестерных бактерий *S. typhimurium* TA 100, выросших на чашках с L-агаром при действии исследуемых соединений, к числу колоний в контрольном варианте.

Статистическую обработку результатов проводили, используя критерия Стьюдента (Лакин, 1990). Приведенные в работе данные представляют собой среднее значение в каждой группе ± σ (среднеквадратичное отклонение). Различия между группами данных считали достоверными при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Химические средства защиты растений, как правило, оказывают токсический эффект не только в отношении определенного вида-вредителя, но также способны блокировать многие жизненно важные функции организмов разного уровня организации.

Нами было исследовано токсическое действие пестицидов актара, зенкор, моспилан, пенкоцеб, фастак на штамм *S. typhimurium* TA 100 для исключения возможности получения ложноотрицательных результатов при тестировании их на мутагенность в микробной тест-системе.

Из результатов, представленных в таблице 1 видно, что наиболее значимый токсический эффект проявляют фунгицид пенкоцеб и инсектицид фастак. Соединения

Таблица 2
Мутагенная активность пестицидов актара, зенкор, моспилан, пенкоцеб, фастак в тесте Эймса

Исследуемые соединения	Число колоний His ⁺ ревертантов/чашка	
	– S9	+ S9
Контроль (H ₂ O)	65 ± 10,0	150 ± 11,1
Актара 1 мкг/чашка	105 ± 6,1*	169 ± 11,0
	10 мкг/чашка	95 ± 7,0
	100 мкг/чашка	82 ± 5,3
Зенкор 1 мкг/чашка	151 ± 11,5*	174 ± 7,0*
	10 мкг/чашка	88 ± 4,4
	100 мкг/чашка	87 ± 3,6
Моспилан 1 мкг/чашка	74 ± 10,6	158 ± 13,2
	10 мкг/чашка	87 ± 5,0
	100 мкг/чашка	91 ± 9,5*
Пенкоцеб 1 мкг/чашка	98 ± 6,2	151 ± 10,0
	10 мкг/чашка	73 ± 5,0
	100 мкг/чашка	83 ± 7,9
Фастак 0,05 мкл/чашка	85 ± 6,2	78 ± 12,5
	0,5 мкл/чашка	70 ± 4,0
	5 мкл/чашка	63 ± 8,9

* — статистически достоверно отличается от контроля, P ≤ 0,05.

демонстрировали дозозависимое токсическое действие на клетки тестерного штамма, причем в наивысшей из исследованных концентраций (100 мкг/чашка и 5 мкл/чашка, соответственно), препараты полностью подавляли рост бактерий. Некоторое ингибирующее действие на рост тестерного штамма также оказывали гербицид зенкор и инсектицид актара (при действии препаратов в концентрации 100 мкг/чашка процент выживаемости тестерных бактерии составил 64 % и 55 %, соответственно). Инсектицид моспилан в диапазоне исследованных концентраций (1–100 мкг/чашка) не оказывал токсического действия на штамм *S. typhimurium* TA 100 (табл. 1). Данные, полученные при оценке токсичности пестицидов на штамме *S. typhimurium* TA 100, позволили нам выбрать оптимальные концентрации препаратов для исследования их мутагенной активности в тесте Эймса.

Результаты оценки мутагенной активности исследованных нами пестицидов в тесте Эймса представлены в таблице 2. Препараты пенкоцеб, актара, моспилан, фастак ни в одной из исследованных концентраций не обладали мутагенным эффектом. Как видно из таблицы 2, число колоний ревертантов His⁺, индуцированных гербицидом зенкор в концентрации 1 мкг/чашка, более чем в 2 раза превышало спонтанный фон мутирования

тестерного штамма, что свидетельствует о слабой мутагенной активности препарата. При повышении концентрации препарата (10 мкг/чашка и 100 мкг/чашка) происходило снижение его мутагенного потенциала. Данный эффект вряд ли может быть обусловлен токсическим действием зенкора на клетки *S. typhimurium*. Согласно данным, полученным Саратовских с соавт. (2007), зенкор в концентрации 2 мкмоль (430 мкг) на пробу также не проявлял значимого мутагенного эффекта на штамме *S. typhimurium* TA 100. В то же время среднее число колоний индуцированных пестицидом ревертантов His⁺ штамма *S. typhimurium* TA 98 до 25,2 раз превышало спонтанный фон мутирования. Основываясь на вышеприведенных фактах, мы можем предположить, что мутагенный эффект зенкора, обнаруженный нами на штамме *S. typhimurium* TA 100, возможен только в диапазоне низких концентраций, что, вероятно обусловлено особенностями механизма индукции точковых мутаций типа замены пар при действии данного соединения.

Для моделирования метаболизма пестицидов в организме млекопитающих в условиях *in vitro* нами была использована МАС на основе препаратов лиофилизированной фракции S9 печени крыс. Установлено, что в присутствии МАС гербицид зенкор ни в одной из исследованных концентраций не вызывает значимого (более чем в 2 раза) превышения числа колоний ревертантов His⁺ над таковым в контроле (табл. 2). Это свидетельствует о том, что биотрансформация *in vitro* ферментами печени крыс приводит к снижению мутагенной активности пестицида. Интересно отметить, что метаболическая активация фракцией S9 печени крыс также значительно уменьшала мутагенный потенциал зенкора, обнаруженный Саратовских с соавт. (2007) на штамме *S. typhimurium* TA 98.

Присутствие МАС на основе фракции S9 печени крыс практически не влияло на мутагенный потенциал пестицидов пенкоцеб, актара, моспилан, фастак (табл. 2).

Ранее также было показано, что зенкор проявляет умеренный генотоксический эффект в SOS-хромотесте (метод микрочашек) (Venkat et al., 1995). Препарат вызывал повреждения ДНК в эритроцитах головастика *Rana catesbeiana*, хотя авторы работы указывают на отсутствие зависимости «доза-эффект» (Clements et al., 1997). Согласно данным Кайя с соавт. (Kaaya et al., 2000), зенкор не способен индуцировать ни соматические мутации, ни митотические рекомбинации в клетках *Drosophila melanogaster*. В то же время обработка семян данным гербицидом повышала уровень хромосомных aberrаций в клетках проростков ячменя (*Hordeum vulgare*) и гороха (*Pisum sativum*) (Кожуро, Максимова, 2003). Зенкор в концентрациях 0,01 и 0,05 % вызывал хромосомные нарушения также у *Crepis capillaris* (Азатян и др., 1984).

Согласно литературным данным, генотоксическое действие триазиновых гербицидов наблюдается после биотрансформации данных пестицидов в раститель-

ных тканях (Means et al., 1988). Флорес-Маиа с соавт. (Flores-Maya, 2005) показали, что экстракты корней растений *Vicia faba*, обработанных в течение 4 часов метрибузином и аметрином вызывали образование СХО в лимфоцитах крови человека, в то время как при непосредственном действии исходных пестицидов на культуру клеток лимфоцитов такого эффекта не наблюдалось.

Сведения о генотоксических эффектах пестицидов пенкоцеб, актара, моспилан, фастак, имеющиеся в литературе, немногочисленны и в основном отражают результаты исследований с использованием клеток млекопитающих.

Инсектициды актара и моспилан не индуцировали генные мутации в клетках китайского хомячка с метаболической активацией и без нее, а также не увеличивали частоту появления микроядер *in vivo* (Regulatory Note, 2001; 2002). Инсектицид фастак проявил генотоксический эффект как в микроядерном тесте и в тесте на хромосомные аберрации в клетках костного мозга мышей, так и мутагенную активность, индуцируя доминантные летальные мутации в половых клетках мышей (Regulatory Note, 2002). Пенкоцеб является слабым мутагеном в тесте на *D. melanogaster*, в то время как продукт его разложения — этилентиомочевина (ЭТМ) — индуцирует сестринские хроматидные обмены и хромосомные транслокации в лимфоцитах рабочего персонала, контактирующего с данным препаратом (Steenland et al., 1997).

Таким образом, анализ полученных результатов показывает, что из пяти исследованных нами пестицидов только гербицид зенкор в концентрации 1 мкг/чашка проявляет слабый мутагенный эффект, индуцируя генные мутации в клетках тестерных бактерий *S. typhimurium*. Примечательно, что в присутствии микросомной фракции печени, ответственной за метаболизм ксенобиотиков в организме млекопитающих, происходит снижение мутагенного потенциала зенкора.

При изучении биологических эффектов пестицидов особое внимание должно быть уделено исследованию процессов их накопления и биотрансформации в растительных тканях. Показано, что растения, например картофель, способны поглощать хлорорганические пестициды из почвы в количествах, превышающих ПДК. Обнаружено, что фосфорорганические пестициды (хлорофос, карбофос) также способны попадать через корневую систему и накапливаться в растениях картофеля, даже если их применяли в рекомендуемых дозах (Найнштейн, 1973). Метаболизм многих ксенобиотиков, в том числе и пестицидов, в растениях может сопровождаться образованием более генотоксичных метаболитов, причем некоторые соединения активируются именно S9-фракцией растений, но не микросомными монооксигеназами млекопитающих (Plewa and Wagner, 1993; Gentile et al., 1982; Flores-Maya, 2005). Таким образом, для реальной оценки генетической безопасности исследованных нами пестицидов необходимо также изучение роли фермент-

ных систем биотрансформации растений в модуляции генотоксического потенциала данных соединений.

Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда НИОКР Республики Татарстан (проект № 04-4.5-162 (Ф)).

Литература

1. Азатян Р. А., Авакян В. А., Мирзоян Г. И., 1984. Цитогенетический эффект гербицидов зенкора, базаграна и дифенамида // Цитология и генетика. № 6. С. 460–462.
2. Ассортимент средств защиты растений, включающий новые поколения биопестицидов, БАВ, экологически безопасные пестициды и аналоги природных соединений. Инсектициды, акарициды, фунгициды, гербициды. Ч. 1–3. 2000. — СПб: Изд-во РАСХН ВИЗР, 80 с.
3. Дуган А. М., 1990. Критерии учета мутагенных эффектов в тесте Эймса // Цитология и генетика. Т. 24. № 6. С. 41–45.
4. Кожуро Ю., Максимова Н., 2003. Цитогенетический анализ действия гербицидов гезагарда, гранстара, зенкора и симазина на проростки ячменя (*Hordeum vulgare*) и гороха (*Pisum sativum*) // Вестн НАН Беларуси. Сер. биол. наук. № 1. С. 45–58.
5. Лакин Г. Ф., 1990. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990. 352 с.
6. Найнштейн С., 1973. Гигиеническое значение наличия пестицидов в почве // Поведение, превращение пестицидов и их метаболитов в почве. Материалы I Всесоюзного совещания, Пущино-на-Оке. С. 27–28.
7. Саратовских Е. А., Глазер В. М., Костромина Н. Ю., Котелевцев С. В., 2007. Генотоксичность пестицидов в тесте Эймса и их способность к комплексообразованию с ДНК // Экологическая генетика. Т. V. № 3. С. 46–54.
8. Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации, 2000. // Защита и карантин растений. № 3. С. 350.
9. Bolognesi C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies // Mutation Research. Vol. 543. N 2. P. 251–272.
10. Clements C., Ralph S., Petras M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single cell gel DNA electrophoresis (comet) assay // Environmental and Molecular Mutagenesis. Vol. 29. N 3. P. 277–288.
11. Dearfield K. L., McCaroll N. T., Protzel A. et al., 1999. A survey of EPA/OPP and open literature on selected pesticide chemicals. II Mutagenicity and carcinogenicity of selected chloracetanilides and related compounds // Mutation Research. Vol. 443. P. 197–233.

12. Flores-Maya S., Comez-Arroyo S., Calderon-Segura M. E. et al., 2005. Promutagen activation of triazine herbicides metribuzin and ametryn through *Vicia faba* metabolism inducing sister chromatid exchanges in human lymphocytes *in vitro* and in *V. faba* root tip meristems // *Toxicology in vitro*. Vol. 19. P. 243–251.
13. Gentile J. M., Gentile G. J., Bultman J. et al., 1982. An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation // *Mutation Research*. Vol. 101. P. 19–29.
14. Kaya B., Yanikoglu A., Creus R., Marcos R., 2000. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test // *Mutation Research*. Vol. 465. N 1. P. 77–84.
15. Maron D., Ames B., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test // *Mutation Research*. Vol. 113. N 3/4. P. 174–210.
16. Means J. S., Plewa M. J., Gentile J. M., 1988. Assessment of the mutagenicity of fractions from s-triazine-treated *Zea mays* // *Mutation Research*. Vol. 197. P. 325–336.
17. Mortelmans K., Zeiger E., 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay // *Mutation Research*. Vol. 455. P. 29–60.
18. Plewa V. J., Wagner E. D., 1993. Activation of promutagens by green plants // *Annual Reviews of genetics*. Vol. 27. P. 93–113
19. Regulatory Note — REG 2001 — 03. 2001 // Pesticide Management Regulatory Agency, Canada. 51 p.
20. Regulatory Note — REG 2002 — 05 // Pesticide Management Regulatory Agency, Canada. 114 p.
21. Shukla Y., Taneja P., 2002. Mutagenic potential of cypermethrin in mouse dominant lethal assay // *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. Vol. 21, N 3. P. 259–265.
22. Steenland K., Cedillo L., Tueker J. et al., 1997. Thyroid hormones and cytogenetic outcomes in backpack sprayers using etilenbis (ditiocarbamate) (EBDC) fungicides in Mexico // *Environmental Health Perspectives*. Vol. 105. N 10. P. 1126–1130.
23. Venkat J., Shami S., Davis K. et al., 1995. Relative genotoxic activities of pesticides evaluated by modified SOS microplate assay // *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Vol. 25. N 1. P. 67–76.
24. Wilkinson C. F., 1990. Introduction and overview // *The effect of pesticides on human health* / Eds. S. R. Baker, C. F. Wilkinson Princeton.: Princeton Scientific Publishing. P. 5–33.

Evaluation of mutagenic activity of the pesticides: actara, sencor, mospilan, pencozeb, fastac in the Ames test

N. S. Karamova, A. P. Denisova, Z. Stasevski

☛ **SUMMARY:** The mutagenic activity of five pesticides actara, sencor, mospilan, pencozeb, fastac widely used for treatment of potato plant lands in Tatarstan was tested in the Ames test. The non toxic concentrations of the pesticides determined in preliminary cytotoxicity test were used in the Ames assay. Pesticides actara, mospilan, pencozeb, fastac did not show mutagenic effect in *Salmonella typhimurium* TA 100 without rat liver S9 fraction. The weak mutagenic effect of herbicide sencor was established at concentration 1 µg/plate. Metabolic activation *in vitro* using rat liver S9 fraction decreased the mutagenic activity of sencor and did not alter the mutagenicity rate of the pesticides actara, mospilan, pencozeb and fastac.

☛ **KEY WORDS:** pesticides, genotoxicity, mutagenic activity, Ames test, metabolic activation *in vitro*.

Информация об авторах:

Карамова Назира Сунагатовна, к. б. н., вед. инженер НИЛ ББФ, кафедра микробиологии, Казанский государственный университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18. E-mail: Nazira.Karamova@ksu.ru. Kazan State University, Kazan, Russia.

Денисова Александра Петровна, аспирант, Химический институт им. А. М. Бутлерова, лаборатория химии окружающей среды, Казанский государственный университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18. E-mail: alex-andrina@rambler.ru. Kazan State University, Kazan, Russia.

Сташевски Зенон, зав. лабораторией, лаборатория селекции картофеля, Татарский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, 420059, г. Казань, Оренбургский тракт, 48. E-mail: zenons@bk.ru. Tatar Institute of Agriculture, Kazan, Russia.