

Akutna toksičnost herbicida GAL-57 (bentazon + dikamba) za pacova

Dragica Brkić, Slavica Gašić i Neško Nešković

*Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Laboratorija za toksikologiju
11080 Beograd, Banatska 31b, Srbija
(dragica.brkic@pestring.org.rs)*

*Primljen: 20. avgusta 2009.
Prihvaćen: 10. septembra 2009.*

REZIME

Akutna oralna toksičnost herbicida (preparata) GAL-57 (Avalon), koji je mešavina dve aktivne materije, bentazon i dikamba, ispitivana je na pacovima primenom nove metode koja se koristi tek nekoliko godina (od 2001. godine).

Praćeni su simptomi trovanja i smrtnost životinja u različitim intervalima nakon doziranja, a po završetku perioda opservacije obavljene su odgovarajuće patohistološke analize.

Kod životinja koje su dobijale preparat GAL-57 u dozi od 2000 mg/kg, registrovana je pojava veoma izraženih simptoma trovanja kao što su: smanjena aktivnost, nekoordinirano kretanje, opušten položaj zadnjih nogu (koje vuku pri kretanju), smanjen refleks, smanjen tonus udova i čitavog tela, dispneja. Simptomi se postepeno intenziviraju, a životinje uginjavaju u periodu 30-60 minuta posle tretiranja.

Kod životinja koje su dobijale preparat GAL-57 u dozi od 300 mg/kg nije bilo uginjavanja, niti su registrovane pojave kliničkih simptoma trovanja. Njihova fizička aktivnost i ponašanje (i kod mužjaka i kod ženki) nisu se značajnije razlikovali u odnosu na kontrolne životinje.

Po metodologiji korišćenoj u ovim ispitivanjima može se zaključiti da se LD-50 herbicida GAL-57 kreće između 300 i 2000 mg/kg, pa prema tome preparat može biti razvrstan po našim kriterijumima u III grupu otrova, u kategoriju 4 po kriterijumima Globalno usaglašenog sistema klasifikacije (Globally Harmonized Classification System), odnosno u kategoriju III po klasifikaciji EPA (Environmental Protection Agency).

Ključne reči: GAL-57; pacov; Acute toxic class method; akutna toksičnost

UVOD

Savremena poljoprivreda se, bez obzira na konstantna istraživanja u oblasti alternativnih metoda, ne može zamisliti bez intenzivne primene pesticida, hemijskih sredstava za zaštitu bilja. Procenjuje se da se svake godi-

ne širom sveta upotrebi oko 2,5 miliona tona pesticida što svakako veoma utiče na povećanje produktivnosti proizvodnje. Međutim, fiziološka i biohemijska sličnost organizama koji nisu predmet suzbijanja čini ih osetljivim na toksično delovanje pesticida. To praktično znači da pesticidi mogu imati štetan efekat i na druge (ko-

risne) vrste, kao i na životnu sredinu. Delujući na štetne vrste oni mogu da naruše opšti balans koji postoji u prirodi na način koji uopšte nije poželjan. Zbog toga je pažnja koja se posvećuje upotrebi pesticida velika, a njihovo korišćenje strogo regulisano (Pimentel, 1995; Stenersen, 2004).

Pre stavljanja u promet pesticidi prolaze veoma detaljna ispitivanja vezana za fizičko-hemijske osobine (aktivna materija i nečistoće), potencijalne toksične efekte za čoveka, opasnosti od unošenja hranom (aktivna materija i metaboliti), i ekotoksikološka ispitivanja (Williams, 2003). Iako se kriterijumi za stavljanje u promet konstantno pooštavaju a sve veća pažnja posvećuje mogućim štetnim efektima na korisne organizme i životnu sredinu, ipak je sve više podataka o štetnim posledicama njihove primene za čoveka i okruženje u kome on živi. Sa ovim posledicama stanovništvo se svakodnevno, neminovno suočava. Zbog toga se čine veliki napori da bi se izvršila pravilna procena odnosa između koristi koje nam pesticidi donose, sa jedne, i mogućih, neželjenih posledica njihove upotrebe na zdravlje ljudi i životnu sredinu, sa druge strane.

Pri ispitivanju toksičnih svojstava novih jedinjenja, najpre se radi test određivanja akutne toksičnosti koji obuhvata određivanje akutne oralne, dermalne i inhalacione toksičnosti, kao i ispitivanja iritacije kože i sluzokože oka. Testovi akutne toksičnosti omogućavaju, manje ili više precizno (u zavisnosti od primenjenih metoda), izračunavanje srednje smrtno doze (LD-50), određivanje organa koji su mesto delovanja supstance, kliničke manifestacije akutne toksičnosti, zatim utvrđivanje reverzibilnosti toksičnog efekta i određivanje doza za dalja ispitivanja (Gallo, 2001).

Sve strožiji kriterijumi korišćenja životinja u eksperimentalne svrhe usloveli su primenu manje preciznih metoda za određivanje akutne toksičnosti, koje omogućavaju samo razvrstavanje ispitivanih supstanci u grupe (klase) bez određivanja precizne LD-50 vrednosti, ali uz primenu minimalnog broja životinja (OECD, 2001). U tom smislu razvijene su nove metode koje se koriste u tim ispitivanjima, a Acute toxic class method je upravo primer jedne od novijih metoda za određivanje akutne oralne toksičnosti pesticida, uz primenu veoma malog broja eksperimentalnih životinja.

Cilj ovog rada je bio da se, primenom pomenute metode, odredi akutna oralna toksičnost herbicida (preparata) GAL-57 (bentazon i dikamba) za potrebe njegove klasifikacije i obeležavanja.

MATERIJAL I METODE

Ispitivani preparat

U radu je korišćen preparat GAL-57 (komercijalno ime: Avalon), proizvod firme „Galenika-Fitofarmacija” a.d., Beograd-Zemun, herbicid koji u svom sastavu ima dve aktivne materije; bentazon i dikambu. Preparat je u obliku tečnosti, mrke boje, bez mirisa. Formulisan je kao koncentrovani rastvor (SL), a bentazon i dikamba se u preparatu nalaze u obliku natrijumovih soli rastvorljivih u vodi. U sastav preparata ulazi 98 g/l dikambe (Na-so) i 349 g/l bentazona (Na-so).

Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni albino pacovi [soj: CRL: (WI) BR Wistar] oba pola, ne stariji od devet nedelja, ujednačene telesne mase koja ne prelazi 20% od srednje vrednosti mase životinja na početku eksperimenta (150-180 g za ženke, odnosno 220-240 g za mužjake). Životinje potiču iz Charles River (Europe) Laboratory, ToxiCoop Ltd., Budapest, Mađarska. Tokom trajanja eksperimenta životinje su držane u polipropilensko-polikarbonatnim kavezima (43x43x19 cm) na temperaturi $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, sa dvanaestočasovnim svetlosnim ciklusom, hranjene su gotovom hranom za laboratorijske životinje (Ssniff SM R/M-Z+H, Nemačka), i imale su na raspolaganju hranu i vodu *ad libitum*.

Pre početka eksperimenta životinje su aklimatizovane na laboratorijske uslove, tokom 13 dana. Nakon obeležavanja životinje su stavljane u kaveze koji su obeležavani identifikacionim karticama na kojima je bio naznačen broj ispitivanja, pol, doza, broj kaveza i brojevi životinja koje se u njima nalaze.

Akutna toksičnost

Akutna oralna toksičnost određivana je na pacovima oba pola, po metodologiji OECD (Acute toxic class method – OECD metoda 423, 2001). Po ovoj metodi, za određivanje akutne toksičnosti koriste se ženke kao osetljivije, ali s obzirom na to da neka prethodna saznanja ukazuju na veću osetljivost mužjaka, u ovim ispitivanjima korišćene su životinje oba pola. Obeležavanje životinja vršeno je vodootpornim markerom, pri čemu su brojevi pisani na repovima životinja. Na osnovu literaturnih podataka o akutnoj toksičnosti aktivnih materija koje ulaze u sastav preparata GAL-57 (bentazon i dikamba) primenjen je limit test (doza od 2000 mg/kg). Životinjama

je, noć pre tretmana, sklonjena hrana i merene su neposredno pre tretmana. Rastvor preparata u destilovanoj vodi doziran je oralno (sondom u želudac) u dozi od 2000 mg/kg (tri mužjaka i tri ženke), a zatim, u drugom koraku, u dozi od 300 mg/kg (tri mužjaka i tri ženke) sa još jednim ponavljanjem doze od 300 mg/kg (samo na mužjacima). Period opservacije iznosio je 14 dana.

Simptomi trovanja i smrtnost registrovani su 30 minuta, 1, 2, 3, 4 i 6 sati posle tretiranja, i zatim svakodnevno tokom perioda opservacije. Praćenje simptoma na životinjama uključivalo je detaljnu opservaciju kože, krzna, očiju, mukoznih membrana, promena pri disanju, promena u autonomnom i centralnom nervnom sistemu, kao i promena u ponašanju. Posebna pažnja bila je posvećena praćenju (eventualnih) pojava tremora, konvulzija, salivacije, dijareje, letargije i kome.

Nakon 14 dana životinje su žrtvovane i vršen je patološki pregled da bi se utvrdile eventualne promene na organima i tkivima. Broj uginulih, odnosno preživelih životinja omogućava međunarodno priznatu klasifikaciju ispitivanog preparata u jednu od grupa (klasa) otrova.

REZULTATI

Rezultati ispitivanja akutne toksičnosti herbicida (preparata) GAL-57 (Avalon) za pacova prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Akutna oralna toksičnost preparata GAL-57 (Avalon) za pacova

Pol	Mušjaci	Ženke	Mušjaci	Ženke	Mušjaci
Doza (mg/kg)	2000	2000	300	300	300
Broj životinja	3	3	3	3	3
Smrtnost	3/3*	3/3	0/3	0/3	0/3

* Broj uginulih/broj tretiranih

Tabela 2. Simptomi trovanja kod kontrolnih i pacova tretiranih preparatom GAL-57 (Avalon)

Simptomi	Mušjaci			Ženke		
	0 mg/kg	300 g/kg	2000 g/kg	0 mg/kg	300 g/kg	2000 g/kg
Bez simptoma	3/3*	6/6	0/3	3/3	3/3	0/3
Smanjena aktivnost	0/3	0/6	3/3	0/3	0/3	2/3
Dispneja	0/3	0/6	3/3	0/3	0/3	3/3
Nekoordinirano kretanje	0/3	0/6	3/3	0/3	0/3	3/3
Neuobičajen hod	0/3	0/6	3/3	0/3	0/3	3/3
Letargija	0/3	0/6	2/3	0/3	0/3	2/3
Prostracija	0/3	0/6	3/3	0/3	0/3	3/3
Salivacija	0/3	0/6	3/3	0/3	0/3	2/3
Lakrimacija	0/3	0/6	2/3	0/3	0/3	3/3

* Broj životinja sa simptomima/ukupan broj životinja

Petnaestak minuta nakon unošenja preparata (2000 mg/kg) dolazi do ispoljavanja izraženih simptoma trovanja. Životinje pokazuju smanjenu aktivnost (uglavnom leže), kad se kreću pokazuju nekoordinaciju pokreta, imaju opušten položaj zadnjih nogu koje vuku pri kretanju, smanjen refleks vraćanja u normalni položaj, smanjen tonus udova i čitavog tela, kao i blagu do izraženu dispneju. Vremenom, simptomi se intenziviraju; javlja se lakrimacija, salivacija, letargija, prostracija i dolazi do uginjavanja životinja (u periodu 30-60 minuta nakon tretiranja). Nema vidljivih razlika u simptomima kod mužjaka i kod ženki (Tabela 2).

Kod uginulih životinja registrovana je pojava nazalnog eksudata (kod dva mužjaka), a patološkim pregledom utvrđeno je da životinje imaju edemična pluća intenzivno crvene, neujednačene, boje (kod svih tretiranih životinja).

Kod životinja koje su dobijale preparat GAL-57 u dozi od 300 mg/kg nisu registrovane pojave kliničkih simptoma trovanja. Njihova fizička aktivnost i ponašanje (i kod mužjaka i kod ženki) nisu se razlikovali u odnosu na kontrolne životinje (Tabela 2).

Patološkim pregledom ovih životinja (nakon perioda opservacije), registrovane su pojave hemoragija (veličine glave čiode) kod pet mužjaka i dve ženke, kao i pojava hidrometre kod jedne ženke. Nije bilo drugih promena na organima i tkivima koje bi se mogle dovesti u vezu sa toksičnim delovanjem preparata GAL-57.

Po metodologiji korišćenoj u ovim ispitivanjima može se zaključiti da se LD-50 preparata GAL-57 kreće između 300 i 2000 mg/kg, i da na osnovu tih rezultata može biti razvrstan u III grupu otrova po kriterijumima priznatim u našoj zemlji, u kategoriju 4 Globalno usaglašenog sistema klasifikacije (Globally Harmonized Classification System) (OECD metoda 423, Direktiva 2004/73/EC), odnosno u kategoriju III po klasifikaciji EPA (Environmental Protection Agency) (Tabela 3).

DISKUSIJA

Prema raspoloživim podacima o ispitivanjima akutne toksičnosti i drugih toksikoloških osobina, aktivne materije koje ulaze u sastav preparata GAL-57 (bentazon i dikamba) razvrstane su u III grupu otrova. Akutna oralna toksičnost bentazona, u zavisnosti od literaturnog izvora, kreće se od 1056 do 2964 (FAO/WHO, 1992; WHO, 1996). Za dikambu LD-50 iznosi 1581-2740 (mužjaci), odnosno 1879 mg/kg (ženke) (Kamrin, 1997).

Rezultati naših ispitivanja saglasni su sa pomenutim rezultatima i pokazuju da herbicid GAL-57 (Avalon) ima LD-50 između 300 i 2000 mg/kg. U našim istraživanjima nije potvrđena veća osetljivost mužjaka nego ženki, zbog toga što korišćena OECD metoda nije dovoljno precizna za utvrđivanje (eventualnih) takvih razlika. Međutim, ovaj podatak o većoj osetljivosti mužjaka, kada su u pitanju aktivne materije, uslovio je dopunu korišćene OECD metode, tako što su za određivanje akutne toksičnosti, u našem eksperimentu, korišćeni i mužjaci i ženke, iako se po metodi koriste samo ženke kao osetljivije.

Od znakova trovanja koji se javljaju prilikom utvrđivanja akutne toksičnosti bentazona registrovana je apatija, dispneja, teturanje pri hodu, prostracije, a kod dikambe gubitak apetita, povraćanje, smanjen tonus mišića, „plitko” disanje, bradikardija, cijanoza kože i desni kao i efekti na CNS (uzbuđenje ili depresiv-

nost) (Hofmann i Zeller, 1970; cit. FAO/WHO, 1992; Kamrin, 1997).

Prilikom utvrđivanja LD-50 herbicida GAL-57 (Avalon), posle primene doze od 2000 mg/kg, životinje su pokazivale veoma intenzivne (nespecifične) simptome trovanja; smanjena aktivnost-letargija, nekoordinacija pokreta, „paraliza” zadnjih nogu, smanjen refleks vraćanja u normalni položaj, smanjen tonus udova i čitavog tela, kao i blaga do izražena dispneja. Životinje su uginjavale u periodu 30-60 minuta posle tretiranja. Životinje koje su dobile preparat u dozi od 300 mg/kg nisu pokazivale simptome trovanja i ponašale su se potpuno normalno. Simptomi trovanja registrovani u našim eksperimentima, saglasni su sa simptomima registrovanim u ispitivanjima akutne toksičnosti bentazona, dok su od simptoma koji su karakteristični za dikambu registrovani samo smanjen tonus mišića i „plitko” disanje. S obzirom na sastav preparata u kome dominira bentazon, dobijeni rezultati, vezani za simptome trovanja, su u skladu sa očekivanjima, odnosno preovlađuju simptomi karakteristični za trovanja bentazonom.

Kod uginulih životinja iz grupe od 2000 mg/kg registrovan je krvav nazalni eksudat (kod dve od tri tretirane životinje), a patološkim pregledom registrovani su edem pluća (kod svih životinja), neujednačeno obojena (intenzivno crvena) pluća što ukazuje, najverovatnije, na akutnu cirkulatornu insuficijenciju koja je bila uzrok smrti životinja.

Patološkim pregledom životinja iz grupe od 300 mg/kg registrovana je pojava hemoragija malih dimenzija (veličine glave čiode) (kod pet od šest tretiranih mužjaka i kod dve od tri tretirane ženke), kao i pojava hidrometre kod jedne ženke. Pojava hemoragija na plućima rezultat je, najverovatnije, pripreme životinja za patološki pregled i krvarenja u toku pripremnog postupka (iskrvavljenja), dok je hidrometra rezultat polnog ciklusa ženke i uobičajena je pojava kod eksperimentalnih životinja, tako da se može reći da uočene promene nisu rezultat delovanja test supstance.

Tabela 3. Simptomi trovanja kod kontrolnih i pacova tretiranih preparatom GAL-57 (Avalon)

Doza (mg/kg)	Smrtnost (mrtve/tretirane)	LD-50 (mg/kg telesne mase)	GHS kategorija
2000	0/6 do 2/6	preko 2000	5
300	0/6 do 2/6	između 300 i 2000	4
50	0/6 do 2/6	između 50 i 300	3
5	0/6 do 2/6	između 5 i 50	2
5	3/6 ili više	ispod 5	1

Preparat GAL-57, na osnovu rezultata dobijenih u ispitivanju akutne toksičnosti primenom ove metode (Acute toxic class method), može biti razvrstan u III grupu otrova prema klasifikaciji priznatoj u našoj zemlji. Po globalno usaglašenom sistemu klasifikacije (svetski priznatom sistemu klasifikacije) ispitivani preparat se može klasifikovati u kategoriju 4, odnosno u kategoriju III po klasifikaciji Agencije za zaštitu životne sredine, s obzirom da se LD-50 nalazi u granicama 300-2000 mg/kg telesne mase.

ZAHVALNICA

Ova ispitivanja su realizovana u okviru projekta TR20041 – Biološka, hemijska, toksikološka i ekotoksikološka proučavanja herbicida i njihova primena, koji finansira Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

LITERATURA

FAO/WHO: Pesticide Residues in Food 1991, Evaluations 1991 – Part II: Toxicology. International Programme on

Chemical Safety (IPCS). World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, 1992 (WHO/PCS/92.52).

Gallo, M.A.: History and scope of toxicology. In: Casarett and Doull's Toxicology – The Basic Science of Poisons (Klaassen C.D., ed.), Sixth Edition. McGraw-Hill Companies Inc., Medical Publishing Division, New York, USA, 2001.

Kamrin, A.M. (ed.): Pesticide Profiles. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 1997.

OECD: OECD Guideline for Testing of Chemicals, Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (No. 423). Organisation for Economic Co-Operation and Development (OECD), Paris, France, 2001.

Pimentel, D.: Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8(17): 29, 1995.

Stenersen, J.: Chemical Pesticides – Mode of Action and Toxicology. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2004.

Williams, D.P.E.: Developing the national strategy. Proceedings of British Crop Protection Conference – Pests and Diseases, 1, Brighton, UK, 2003, pp. 163-170.

WHO: Guidelines for Drinking Water Quality (Second Edition). World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland, 1996, pp. 23-27.

Acute Oral Toxicity Study of GAL-57 (Bentazon + Dicamba) Herbicide in Rats

SUMMARY

An acute oral toxicity study of the herbicide GAL-57 (Avalon), a mixture of bentazon and dicamba as active ingredients, was investigated on rats, using a new method that has been used in the past several years (2001).

Clinical observations symptoms and mortality were performed for all animals in different time intervals after treatment, and gross necropsy was performed at the end of observation period.

Clinical symptoms (decreased activity, prone position, abnormal limb position, decreased righting reflex, decreased grip and limb tone, decreased body and abdominal tone, dyspnoea) of marked degree were noted after administration of 2000 mg/kg, and animals were dead in the period of 30-60 minutes after the treatment.

GAL-57 did not cause any clinical sings at single 300 mg/kg bw dose. The physical condition and behaviour of animals (males and females) were normal, and it is not differ in reaction to the control.

According to the methodology used in the present study, it could be concluded that the acute oral LD-50 value of the GAL-57 proved to be between 300 and 2000 mg/kg body weight in rats, and the product was ranked into Poison group III according to Serbian criteria, category 4 of the Global Harmonized Classification System, and Category III of the EPA classification.

Keywords: GAL-57; Rat; Acute toxic class method; Acute toxicity