

# Ispitivanja genotoksičnosti herbicida GAL-57 na *Salmonella typhimurium* i *Escherichia coli*

Dragica Brkić<sup>1</sup>, Slavica Gašić<sup>2</sup>, Adél Vértesi<sup>3</sup>, Vesela Karan<sup>4</sup> i Neško Nešković<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

<sup>2</sup>Galenika-Fitofarmacija a.d., Beograd

<sup>3</sup>LAB International Ltd., Veszprém, Mađarska

<sup>4</sup>Poljoprivredni fakultet, Beograd

## REZIME

Genotoksična svojstva herbicida GAL-57, koji u svom sastavu ima dve aktivne materije, bentazon i dikambu, ispitivana su primenom Ames-ovog testa.

Korišćene su bakterije *Salmonella typhimurium* (sojevi TA98 i TA100) i *Escherichia coli* (WP2uvrA soj). Ispitivano je devet koncentracija preparata u opsegu 19.53-5000 µg/ploča pri čemu je svaka koncentracija, kao i kontrole, testirana po tri puta. Ispitivanje je obavljeno sa i bez metaboličke aktivacije (mikrozomska frakcija jetre, S-9 mix).

Rezultati ispitivanja su pokazali da nema ni biološki ni statistički značajnog povećanja faktora mutacije na osnovu čega se zaključuje da herbicid GAL-57, u eksperimentalnim uslovima Ames-ovog testa, ne poseduje genotoksična svojstva (sa i bez metaboličke aktivacije).

**Ključne reči:** GAL-57; mutagenost; bentazon; dikamba; Ames-ov test

## UVOD

GAL-57 je herbicid (preparat) koji u svom sastavu ima dve aktivne materije, bentazon i dikambu. Name njen je za suzbijanje širokolisnih korova u usevima strnih žita, kukuruza, i dr.

Bentazon [3-(izopropil)-1H-2,1,3-benzotiazidin-4(3H)-on 2,2-dioksid] je selektivni, kontaktni herbicid koji pripada grupi benzotiazidinona a deluje kao inhibitor transporta elektrona u procesu fotosinteze. Koristi se za suzbijanje širokolisnih vrsta korova u različitim usevima, pre svega uskolisnim (kukuruz, pšenica, pirinač), ali i širokolisnim (pasulj, soja, grašak,

krompir, kikiriki) (Huber i Otto, 1994). Dikamba (3,6-dihlor-o-anizinska ili anizolna kiselina; 3,6-dihloro-2-metoksi benzoeva kiselina) je selektivni, hormonski herbicid, derivat benzoeve kiseline koji deluje kao sintetički auksin. Primenjuje se u usevima merkantilnog i silažnog kukuruza, sirka, šećerne trske i asparagusa, na strništima, pašnjacima i travnjacima, u skoro svim zemljama Evrope i SAD, za suzbijanje jednogodišnjih i nekih višegodišnjih širokolisnih vrsta korova (Ahrens, 1994; FAO, 2001).

Proučavanja sudbine i prisustva pesticida u životnoj sredini, u poslednjih dvadesetak godina, pokazala su da se bentazon i dikamba, gotovo redovno, nalaze na li-

sti zagađivača površinskih i podzemnih voda kao i voda za piće širom sveta, nekad i u koncentracijama koje su veće od dozvoljenih po svetski priznatim standardima (Caux i sar., 1993; Spliid i Køppen, 1998; Gilliom i sar., 1999; Philips i Bode, 2004; Riise i sar., 2004; Guizzella i sar., 2005). Zbog toga se poslednjih godina intenzivno radi na ispitivanju toksičnih svojstava ova dva herbicida a posebna pažnja se posvećuje njihovim mutagenim svojstvima zbog eventualnih štetnih efekata na čoveka i životnu sredinu. Rezultati ispitivanja genotoksičnih svojstava bentazona i dikambe su oprečni (nisu konzistentni). Mada su oba herbicida, po kriterijumima WHO i IPCS (International Programme on Chemical Safety), 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 (WHO/IPCS, 1992), novija proučavanja pokazuju da to nije sasvim tačno.

Tako su, na primer, Gelbke i Jackh (1985; cit. WHO/IPCS, 1992) utvrdili slaba mutagena svojstva bentazona, odnosno utvrdili su da izaziva tačkaste mutacije u eksperimentima na HGPR1 lokusu jajnih ćelija kineskog hrčka (Chinese Hamster Ovary Cells). Biradar i Rayburn (1995) su pokazali da bentazon poseduje klastogena svojstva ali da povećanje koeficijenta varijacije, koje je praćeno kao pokazatelj klastogenog potencijala, nije bilo statistički značajno. Mutagena svojstva bentazona nedavno su potvrdili i Kaya i saradnici (2004) na testu sa *Drosophila melanogaster*, ali samo posle bioaktivacije, što su autori objasnili kao posledicu delovanja metabolita bentazona koji su genotoksičniji od samog bentazona. Proučavanja Yodera i saradnika (1973) pokazala su da dikamba, zajedno sa drugim primenjivanim pesticidima, izaziva veću učestalost pojave hromozomskih aberacija kod radnika koji su primenjivali pesticide u toku sezone, u poređenju sa istim ispitivanjima u toku zime. Proučavanja genotoksičnih svojstava dikambe u *in vitro* testovima pokazuju da dikamba izaziva oštećenja DNA u kulturi perifernih limfocita čoveka (sa metaboličkom aktivacijom), a takođe i da utiče na povećanje učestalosti promene sestrinskih hromatida (Perocco i sar., 1990). Najnovija proučavanja Sornesena i saradnika (2004. i 2005) pokazala su da dikamba ne poseduje genotoksična svojstva u CHO testu, ali da je, posle reakcije sa redukovanom glinom, nivo oštećenja DNA u direktnoj zavisnosti od primenjenih koncentracija.

Ispitivanja genotoksičnih svojstava dikambe u testovima koji se izvode na biljkama mahom daju pozitivne rezultate. Tako su Wu i Grant (1966. i 1967) utvrdili da dikamba izaziva pojavu hromozomskih aberacija na

ćelijama polena ječma, a Mohammed i Ma (1999) su sa *Tradescantia*-mikronukleus testom i *Tradescantia*-testom mutacija na polenu (Stamen Hair Mutation Test) pokazali da je dikamba, u svim ispitivanim dozama, bila pozitivna, tako da je zaključeno da, u ovim testovima, izaziva mutacije i oštećenja hromozoma.

Testovi sa transgenom biljkom *Arabidopsis thaliana* pokazali su da dikamba pokazuje mutagena svojstva, odnosno izaziva pojavu povećane (2.07 puta) učestalosti homologih rekombinacija i tačkastih (adenin-guanin) mutacija (65%) pri čemu je utvrđena zavisnost mutagenih promena i primenjene koncentracije dikambe što je prvi eksperimentalni nalaz te vrste u svetu (Filkowski i sar., 2003).

U ranijim radovima u kojima je genotoksičnost ispitivana na bakterijama roda *Salmonella* i *Escherichia* utvrđeno je da dikamba i bentazon ne poseduju mutagena svojstva (Andersen i sar., 1972; Poole i sar., 1977; Simmon, 1980; Eisenbeis i sar., 1981; Morya i sar., 1983). I neki noviji radovi potvrđuju konstataciju da dikamba i bentazon ne poseduju mutagena svojstva. Tako je u eksperimentima u kojima je praćena pojava hromozomskih aberacija u koštanoj srži pacova potvrđeno da dikamba ne poseduje klasterogena svojstva (Hrelia i sar., 1994) dok su, primenom Comet i mikronukleus testa, Garagna i saradnici (2005) utvrdili da bentazon nije genotoksičan.

Imajući u vidu podatke o genotoksičnim svojstvima bentazona i dikambe, cilj ovog rada bio je da se, primenom Ames-ovog testa, ispita genotoksična svojstva preparata koji je mešavina ova dva herbicida, i da se utvrdi da li ima razlika u pogledu delovanja aktivnih materija pojedinačno i u kombinaciji, odnosno (i) da li posle njihovog mešanja u preparatu dolazi do promene mutagenih svojstava pojedinačnih aktivnih materija.

## MATERIJAL I METODE

### Eksperimentalne bakterije

U ovim ispitivanjima korišćene su bakterije *Salmonella typhimurium* (sojevi TA98 i TA100), Prof. Ames's Laboratory, Berkeley, CA, USA, i *Escherichia coli* WP2uvrA soj, Gedeon Richter Co. Budapest, Mađarska. Bakterije su, pre početka eksperimenta, skladištene na  $-80 \pm 10^\circ\text{C}$  u mikrobiološkoj laboratoriji LAB International Ltd., Veszprém, Mađarska. Pre početka eksperimenta izvršena je provera rasta bakterija u medijumu sa tragovima histidina, odnosno triptofana.

### Test supstanca (Ispitivani preparat)

U radu je korišćen herbicid (preparat) GAL-57, proizvod firme „Galenika-Fitofarmacija”, Beograd, koji u svom sastavu ima dve aktivne materije, bentazon i dikambu. Preparat je u obliku tečnosti, svetlo braon boje, bez mirisa. Bentazon i dikamba se u preparatu nalaze u obliku natrijumovih soli rastvorljivih u vodi.

### Ames-ov test

Ames-ov test je rađen po metodologiji OECD i EPA (OECD, Metoda 471, 1997; US EPA, 1996. i 1998). Sojevi bakterija *Salmonella typhimurium* (TA98 i TA100) i *Escherichia coli* WP2uvrA koji su korišćeni u ovim eksperimentima imaju mutaciju na genomu koja im onemogućava rast na podlogama bez histidina, odnosno triptofana. U prisustvu mutagenih agenasa dolazi do mutacije na istom mestu u genomu i one ponovo stiču sposobnost rasta na podlogama bez pomenuatih amino kiselina, što ukazuje na mutageno delovanje supstance. *Salmonella typhimurium* TA98 se koristi za detekciju „frameshift” mutacija dok se *Salmonella typhimurium* TA100 i *E. coli* WP2uvrA koriste za detekciju takozvanih zamena parova baza (base-pair substitutions) (Ames i sar., 1975; Maron i Ames, 1983).

Ispitivano je devet koncentracija test supstance: 5000, 2500, 1250, 625, 312.50, 156.25, 78.13, 39.06 i 19.53 µg/ploča, pri čemu je svaka koncentracija, kao i kontrole, testirana po tri puta. Ispitivanje je obavljeno sa i bez metaboličke aktivacije (mikrozomska frakcija jetre, S-9 mix). Kao pozitivne kontrole korišćeni su: natrijum azid (SAZ), 9-aminoakridin (9AA), 4-nitro-0-fenilendiamin (NPD), metil-metansulfonat (MMS) i 2-aminoantracen (2AA), kao negativna kontrola korišćeni su rastvarači (destilovana voda i DMSO), a kao netretirana kontrola samo agar. Pre izvođenja glavnog testa urađen je test rastvorljivosti preparata (GAL-57) kao i „range finding” test.

Broj kolonija u pozitivnoj i negativnoj kontroli, kao i broj kolonija u petri-posudama sa ispitivanim preparatom očitavan je (jednostavnim brojanjem kao i brojanjem uz pomoć automatskog brojača) 48 sati nakon zasejavanja kolonija a srednja vrednost i standardna devijacija su izračunate korišćenjem softverskog programa Microsoft Excel.

U skladu sa primenjenim metodama kao kriterijum za interpretaciju rezultata korišćen je njihov biološki značaj. Po ovoj metodologiji, test supstanca se smatra

mutagenom ako se pojavi povećanje broja revertanata koje je zavisno od primenjenih doza i ako se ovakav biološki pozitivan rezultat može ponoviti za bar jednu ispitivanu dozu, kod najmanje jednog soja bakterija, sa ili bez metaboličke aktivacije. Ako test supstanca ne izaziva povećanje broja revertanata koje je dozno zavisno, i ako dobijeni pozitivni rezultati nisu ponovljivi za bilo koju ispitivanu dozu onda se smatra da test supstanca ne poseduje mutagena svojstva.

### REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja prikazani su u Tabelama 1, 2 i 3. Kao što se iz rezultata prikazanih za soj *Salmonella typhimurium* TA98 može videti (Tabela 1) nema biološki značajnog povećanja faktora mutacije a zabeležene su vrednosti od 0.90 do 1.45, sa i bez metaboličke aktivacije. Do neznatnog povećanja došlo je samo u dozi od 2500 µg/ploča, bez metaboličke aktivacije, ali i u tom slučaju faktor mutacije je iznosio 1.45. Kod soja TA 100, sa i bez metaboličke aktivacije, faktor mutacije kretao se 0.86-1.17 (Tabela 2), dok se kod *E. coli* WP2 uvra kretao 0.80-1.35 (Tabela 3).

U ispitivanju mutagenih svojstava herbicida GAL-57 uočena su sporadična povećanja broja revertant kolonija ispitivanih sojeva bakterija, u poređenju sa vrednostima registrovanim za kontrolu, koja nisu bila u korelaciji sa primenjenim koncentracijama. Najveće registrovano povećanje zabeleženo je za soj *S. typhimurium* TA98 pri koncentraciji od 2500 µg/ploča (bez metaboličke aktivacije). Faktor mutacije u tom slučaju iznosio je 1.45. U isto vreme faktor mutacije za pozitivnu kontrolu (NPD) iznosio je 20.55.

U slučaju *E. coli*, za koncentraciju od 156.25 µg/ploča (bez metaboličke aktivacije) faktor mutacije iznosio je 1.35, dok je za pozitivnu kontrolu (MMS) iznosio 10.71.

Oba registrovana povećanja su bez statističke, ali i bez biološke značajnosti u poređenju sa kontrolnim vrednostima. U oba slučaja registrovani faktori mutacije bili su daleko ispod „praga”, a zabeležene promene su, najverovatnije, odraz biološke varijabilnosti ispitivanih sojeva bakterija. Broj revertanata u slučaju rastvarača (DMSO) bio je neznatno smanjen u odnosu na netretiranu kontrolu, ali je i ovo smanjenje odraz biološke varijabilnosti i u granicama je istorijske kontrole laboratorije. Razvoj bakterijskih kolonija bio je normalan u svim ispitivanim sojevima, sa i bez metaboličke aktivacije.

**Tabela 1.** Broj revertant kolonija u inicijalnom testu mutacija sa sojem *Salmonella typhimurium* TA98**Table 1.** Revertant colony number in the initial mutation test with *Salmonella typhimurium* TA98

Koncentracija (µg/ploča) Concentration (µg/plate)		Bez metaboličke aktivacije (-S9) Without metabolic activation (-S9)	Sa metaboličkom aktivacijom (+S9) With metabolic activation (+S9)
5000	$\bar{X}$	25.3	23.7
	SD	2.52	2.08
	MF	1.10	0.90
2500	$\bar{X}$	33.3	25.0
	SD	4.62	2.65
	MF	1.45	0.95
1250	$\bar{X}$	29.7	27.0
	SD	7.57	1.00
	MF	1.29	1.03
625	$\bar{X}$	29.3	25.0
	SD	3.21	7.00
	MF	1.28	0.95
312.5	$\bar{X}$	25.7	27.0
	SD	3.21	5.20
	MF	1.12	1.03
156.25	$\bar{X}$	26.7	25.0
	SD	5.51	5.57
	MF	1.16	0.95
78.13	$\bar{X}$	28.3	30.3
	SD	8.02	10.02
	MF	1.23	1.15
39.06	$\bar{X}$	29.7	25.0
	SD	3.79	6.24
	MF	1.29	0.95
19.53	$\bar{X}$	24.0	26.7
	SD	6.08	3.51
	MF	1.04	1.01
Netretirana kontrola Untreated control	$\bar{X}$	23.0	20.3
	SD	1.00	4.04
	MF	1.00	0.77
DMSO kontrola DMSO control	$\bar{X}$	17.7	28.3
	SD	3.51	2.08
	MF	0.77	1.08
Kontrola sa destilovanom vodom Distilled water control	$\bar{X}$	23.0	26.3
	SD	0.00	6.51
	MF	1.00	1.00
Pozitivna kontrola Positive control (NPD - 4 µg)	$\bar{X}$	363.0	1894.7
	SD	33.18	19.50
	MF	20.55	66.87

$\bar{X}$  = Srednja vrednost (Mean value)  
SD = Standardna devijacija (Standard deviation)  
MF = Faktor mutacije (Mutation factor)

**Tabela 2.** Broj revertant kolonija u inicijalnom testu mutacija sa sojem *Salmonella typhimurium* TA100**Table 2.** Revertant colony number in the initial mutation test with *Salmonella typhimurium* TA100

Koncentracija (µg/ploča) Concentration (µg/plate)		Bez metaboličke aktivacije (-S9) Without metabolic activation (-S9)	Sa metaboličkom aktivacijom (+S9) With metabolic activation (+S9)
5000	$\bar{X}$	141.7	120.3
	SD	23.69	11.06
	MF	1.08	0.86
2500	$\bar{X}$	148.0	136.7
	SD	17.44	11.68
	MF	1.12	0.98
1250	$\bar{X}$	154.7	141.3
	SD	15.50	8.74
	MF	1.17	1.01
625	$\bar{X}$	133.7	151.0
	SD	22.59	16.00
	MF	1.02	1.08
312.5	$\bar{X}$	141.3	130.0
	SD	14.01	6.56
	MF	1.07	0.93
156.25	$\bar{X}$	135.7	130.3
	SD	15.63	11.15
	MF	1.03	0.93
78.13	$\bar{X}$	132.0	146.0
	SD	8.89	9.64
	MF	1.00	1.04
39.06	$\bar{X}$	136.0	148.0
	SD	7.94	7.21
	MF	1.03	1.06
19.53	$\bar{X}$	129.7	146.7
	SD	18.77	24.85
	MF	0.97	1.05
Netretirana kontrola Untreated control	$\bar{X}$	146.0	145.0
	SD	3.00	21.28
	MF	1.11	1.04
DMSO kontrola DMSO control	$\bar{X}$	134.3	132.0
	SD	11.55	16.82
	MF	1.02	0.94
Kontrola sa destilovanom vodom Distilled water control	$\bar{X}$	131.7	140.0
	SD	19.60	13.86
	MF	1.00	1.00
Pozitivna kontrola Positive control (SAZ - 2 µg)	$\bar{X}$	988.7	1672.0
	SD	41.43	145.66
	MF	7.51	12.67

$\bar{X}$  = Srednja vrednost (Mean value)  
SD = Standardna devijacija (Standard deviation)  
MF = Faktor mutacije (Mutation factor)

**Tabela 3.** Broj revertant kolonija u inicijalnom testu mutacija sa sojem *Escherichia coli* WP2 uvrA**Table 3.** Revertant colony number in the initial mutation test with *Escherichia coli* WP2 uvrA

Koncentracija ( $\mu\text{g}/\text{ploča}$ ) Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )		Bez metaboličke aktivacije (-S9) Without metabolic activation (-S9)	Sa metaboličkom aktivacijom (+S9) With metabolic activation (+S9)
5000	$\bar{X}$	45.0	51.7
	SD	1.00	4.16
	MF	0.95	1.14
2500	$\bar{X}$	42.3	50.0
	SD	8.08	5.29
	MF	0.89	1.10
1250	$\bar{X}$	38.0	51.3
	SD	3.61	8.50
	MF	0.80	1.13
625	$\bar{X}$	49.0	54.3
	SD	3.46	8.50
	MF	1.04	1.20
312.5	$\bar{X}$	53.0	54.7
	SD	6.93	7.77
	MF	1.12	1.21
156.25	$\bar{X}$	63.7	52.0
	SD	17.67	3.46
	MF	1.35	1.15
78.13	$\bar{X}$	43.7	55.7
	SD	4.04	7.64
	MF	0.92	1.23
39.06	$\bar{X}$	48.7	57.7
	SD	6.66	4.04
	MF	1.03	1.27
19.53	$\bar{X}$	39.3	50.7
	SD	11.02	4.51
	MF	0.83	1.12
Netretirana kontrola Untreated control	$\bar{X}$	48.0	42.7
	SD	9.17	6.03
	MF	1.01	0.94
DMSO kontrola DMSO control	$\bar{X}$	40.7	48.7
	SD	8.08	6.35
	MF	0.86	1.07
Kontrola sa destilovanom vodom Distilled water control	$\bar{X}$	47.3	45.3
	SD	1.53	12.58
	MF	1.00	1.00
Pozitivna kontrola Positive control (SAZ - 2 $\mu\text{g}$ )	$\bar{X}$	507.0	151.3
	SD	104.48	7.23
	MF	10.71	3.11

 $\bar{X}$  = Srednja vrednost (Mean value)

SD = Standardna devijacija (Standard deviation)

MF = Faktor mutacije (Mutation factor)

Sa druge strane, broj revertant kolonija kod ispitivanih poznatih mutagenih agenasa, koji su korišćeni kao pozitivna kontrola, bio je statistički i biološki značajno povećan. Po metodologiji po kojoj je rađen test ispitivana supstanca se smatra mutagenom ako se pojavi povećanje broja revertanata koje je u korelaciji sa primenjenim dozama ili ako se javi ponovljiv, biološki relevantan pozitivan odgovor za najmanje jednu dozu, kod najmanje jednog soja bakterija, sa ili bez metaboličke aktivacije. Prema tome, može se reći da ispitivani herbicid, u datim eksperimentalnim uslovima, ne ispoljava mutagena svojstva ni kod jednog soja bakterija, sa i bez metaboličke aktivacije.

Kao biološki relevantano povećanje smatra se ono koje se javi u sledećim slučajevima:

- ako je za soj TA100 broj reverzija najmanje dva puta veći u odnosu na kontrolu (rastvarač), i
- ako je za sojeve TA98, TA1535 i TA1537 i *E. coli* WP2uvrA broj reverzija najmanje tri puta veći u odnosu na kontrolu (rastvarač).

Prema tome može se reći da ispitivani herbicid nije ispoljio mutagena svojstva ni kod jednog soja bakterija, sa i bez metaboličke aktivacije.

I aktivne materije bentazon i dikamba su, po kriterijumima WHO/IPCS (1992), svrstani u grupu pesticida koji ne poseduju mutagena svojstva i ne izazivaju pojavu hromozomskih aberacija ni oštećenja DNA ni u *in vitro* ni u *in vivo* eksperimentima. Ames-ovim testom na bakterijama roda *Salmonella* i *Escherichia* brojni autori su pokazali da dikamba i bentazon ne deluju mutageno (Andersen i sar., 1972; Poole i sar., 1977; Simon, 1980; Eisenbeis i sar., 1981; Morya i sar., 1983).

U ovim ispitivanjima je pokazano da ova dva herbicida u kombinaciji (GAL-57), takođe, ne ispoljavaju mutagena svojstva, odnosno da nema razlike u njihovom pojedinačnom delovanju i u delovanju obe supstance u isto vreme.

## LITERATURA

- Abrens, W.H. (Ed.):* Herbicide Handbook (7<sup>th</sup> Edition). Weed Science Society of America, Champaign, IL, USA, 1994.
- Ames, B.N., McCann, J. and Yamasaki, E.:* Methods for Detecting C arcinogens and Mutagens with the *Salmonella* (Mammalian-Microsome Mutagenicity Test). *Mutat. Res.*, 31: 347-364, 1975.
- Andersen, K.J., Leighty, E.G. and Takahashi, M.T.:* Evaluation of Herbicides for Possible Mutagenic Properties. *J. Agric. Food Chem.*, 20(3): 649-656, 1972.

- 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.
- Caux, P.Y., Kent, R.A., Tache, M., Grande, C., Fan, G.T. and McDonald, D.D.:** Environmental Fate and Effects of Dicamba: A Canadian Perspective. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 133: 1-58, 1993.
- Eisenbeis, S.J., Lynch, D.L. and Hampel, A.E.:** The Ames Mutagen Assay Tested Against Herbicides and Herbicide Combinations. *Soil. Sci.*, 131(1): 44-47, 1981.
- EPA:** OPPTS 870.5100 Health Effects Test Guidelines: Bacterial Reverse Mutation Test 712-C-98-247. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 1998.
- EPA:** OPPTS 870.5100 Health Effects Test Guidelines: *Escherichia coli* WP2 and WP2 uvrA Reverse Mutation Assays 712-C-98-247. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 1996.
- FAO:** 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.
- Gilliom, R.J., Barbash, J.E., Kolpin, D.W. and Larson, S. J.:** Testing Water Quality for Pesticide Pollution: U.S. Geological Survey Investigations Reveal Widespread Contamination of the Nation's Water Resources. *Environ. Sci. Technol.*, 33(7): 164-169, 1999.
- Guzzella, L., Pozzoni, F. and Giuliano, G.:** Herbicide Contamination of Surficial Groundwater in Northern Italy. *Environ. Pollut.*, 142: 344-353, 2006.
- 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.
- Maron, D.M. and Ames, B.N.:** Revised Method for the *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutat. Res.*, 113: 173-215, 1983.
- 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.
- Morya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K. and Shirasu, Y.:** Further Mutagenicity Studies on Pesticides in Bacterial Reversion Assay Systems. *Mutat. Res.*, 116: 185-216, 1983.
- OECD:** OECD Guideline for Testing of Chemicals, Bacterial Reverse Mutation Test, No. 471 (Adopted 21<sup>st</sup> July 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.
- Phillips, P.J. and Bode, R.W.:** Pesticides in Surface Water Runoff in South-Eastern New York State, USA: Seasonal and Stormflow Effects on Concentrations. *Pest. Manag. Sci.*, 60(6): 531-543, 2004.
- Poole, D.C., Simmon, V.F. and Newell, G.W.:** In Vitro Mutagenic Activity of Fourteen Pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 41(1): 196, 1977.
- Riise, G., Lundekvam, H., Wu, Q.L., Haugen, L.E. and Mulder, J.:** Loss of Pesticides from Agricultural Fields in SE Norway-runoff Through Surface and Drainage Water. *Environ. Geochem. Health.*, 26(2-3): 269-276, 2004.
- Simmon, V.F.:** In Vitro Microbiological Mutagenicity and Unscheduled DNA Synthesis Studies of Eighteen Pesticides. US Ntis. Pb. Rep. PB-133, 226, 177, 1980.
- Sorensen, K.C., Stucki, J.W., Warner, R.E. and Plewa, M. J.:** Alteration of Mammalian-Cell Toxicity of Pesticides by Structural Iron(II) in Ferruginous Smectite. *Environ. Sci. Technol.*, 38(16): 4383-4389, 2004.
- Sorensen, K.C., Stucki, J.W., Warner, R.E., Wagner, E.D. and Plewa, M.J.:** Modulation of the Genotoxicity of Pesticides Reacted With Redox-Modified Smectite Clay. *Environ. Mol. Mutagen.*, 46(3): 174-181, 2005.
- Spliid, N.H. and Koppen, B.:** Occurrence of Pesticide in Danish Shallow Ground Water. *Chemosphere*, 37(7): 1307-1316, 1998.
- WHO/IPCS:** World Health Organization (WHO)/ International Programme on Chemical Safety (IPCS), Pesticide Residues in Food, Part I. Geneva, Switzerland, 1992.

*Wuu, K.D. and Grant, W.F.:* Chromosomal Aberrations Induced by Pesticides in Meiotic Cells of Barley. *Cytologia*, 33: 545-554, 1968.

*Yoder, 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.

---

## Genotoxicity of GAL-57 Herbicide in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*

### SUMMARY

Genotoxicity of the herbicide GAL-57, containing two active ingredients, bentazon and dicamba, was investigated using the Ames test.

*Salmonella typhimurium* (tester strains TA98 and TA100) and *Escherichia coli* (strain WP2uvrA) were used. Nine product concentrations were tested at a range of 19.53-5000 µg/plate and each concentration, as well as the controls, in triplicate. Testing was done with and without metabolic activation (liver microsomal fraction, S-9 mix).

The results of our investigation revealed no biological or statistically significant increase in mutagenic factors, and this offered a basis for our conclusion that the herbicide GAL-57 has no genotoxic properties (with or without metabolic activation) under experimental conditions in the Ames test.

**Keywords:** GAL-57; Mutagenicity; Bentazon; Dicamba; Ames test