

A KÖRNYEZETI MUTAGÉNEK GENETIKAI HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A TALAJBIOLÓGIA NÉZŐPONTJÁBÓL*

SZENDE KÁLMÁN

a biológiai tudományok kandidátusa

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

Az elmúlt 100 év folyamán oly mértékben fokozódott az ember beavatkozása környezetébe, ami túlhaladta az azt megelőző ezer évszázadot. Mivel egy globális ökoszisztémában élünk, a beavatkozás ily mértékű megnövekedése rövidesen megváltoztathatja annak teljes egyensúlyát. Ennek költsége van, és ezt az árat elsősorban nem a ma élő ember fizeti meg, hanem a majdan soron következő generációk. Meggondolandó tehát minden egyes beavatkozás szükségessége és mértéke, mivel a felelősség elsősorban a ma élő emberiségen van.

Gyakran a környezetbe jutnak olyan anyagok, amelyeknek tulajdonképeni hatását csak később ismerjük fel. Számos példa volt erre az elmúlt évtizedben, pl.: a hírhedt Contergan-ügy, a ciclamatok kérdése, nem beszélve a DDT-ről. Ezek az anyagok toxikusak, karcinogének, teratogének és mutagének lehetnek. Az első háromra már megfelelő szűrővizsgálatokat alkalmaznak. Hatásuk még az egyed életében jelentkezik; a mutagének hatása azonban csak az utódok között. Gyakran több generációnak kell eltelnie ahhoz, hogy egy nagyszülőt, dédszülőt ért mutagén hatás az utódban realizálódjon és szerencsétlenné tegye.

Ennek felismeréseként környezeti mutagén társaságok jöttek létre: 1969-ben az USA-ban, 1970-ben Európában, majd nemzeti társaságok is alakultak. Ezeknek a feladata megfelelő tesztrendszerek kidolgozása a környezeti mutagének kiszűrésére. Feladatuk továbbá egy nemzetközi adatbanknak a létrehozása, és az illetékes szerveknek, valamint a nagyközönségnek a tájékoztatása a felhasznált anyagok mutagén hatásáról.

A mutagének, fizikaiak és kémiaiak — feltehetően — évszázazredekken keresztül állandó szinten voltak és így a globális *gén poolban* — ezen a Földön élő összes élőlény teljes genetikai állományát értem — egy egyensúlyi helyzet alakulhatott ki. Fokozva a mutagének mennyiségét környezetünkben mind sugárzással, mind kémiai anyagok felhalmozásával, ennek a gén poolnak egyensúlyi helyzete megváltozik. A fokozódó mutációs nyomás következtében a variabilitás fokozódik, káros és szubletális gének halmozódnak fel a hetero-

* Előadás a Talajbiológiai Tudományos Ülésen. Debrecen 1973. szeptember 4.

zigota populációkban. Ezek azután szétterjednek és csökkentik a populációk életképességét. Példa erre a *Drosophila* nevű ecet-muslica fertilitása. Ez ma mintegy 70%-a a maximálisan elérhető, a fajra jellemző fertilitásnak. Ha a mai mutációs nyomást csak kétszeresére emeljük, úgy a *Drosophila* fertilitása 30%-ra csökken [DRAKE és FLAMM (1972)].

Tehát a mutagének mennyiségének fokozása a környezetben csökkenti a fertilitást, ezen felül befolyásol más tulajdonságokat is: így a szervezet ellenálló képességét betegségekkel szemben, szellemi képességek kialakulását stb. Nem beszélve azokról a megváltozásokról, melyek a zigoták pusztulását okozzák, a domináns vagy recesszív letális megváltozásokról. A fokozódó mutációs nyomás hatására az evolúció sebessége fokozódik. Egyes fajok eltűnnek (extinkció), más fajok dominánsak lesznek. Természetesen nyílt kérdés az, hogy az ember szempontjából és az egész ökoszisztéma szempontjából az ilyen domináns fajok kialakulásának milyen hatása lesz. Nemcsak az ember, de az egész élővilág egymással kölcsönhatásban van. Példa erre a táplálékláncok kialakulása, de a talaj termékenysége is számos faj együttes munkájának függvénye. Ha egy ilyen rendszerben eltolódások jönnek létre, ki képes azt előre megmondani ma, hogy mi lesz ennek a hatása a jövőben?

Az USA-ban mintegy 900 peszticidet használnak 2000 „célfaj” ellen [GRANT (1972)]. Ezeknek a peszticideknek a célfajokra kifejtett hatása sem ismert teljesen. Van ezzel szemben 200 000 egyéb, ún. nem célfaj, és ezek is ki vannak téve az alkalmazott peszticidek hatásának. Legtöbbjük esetében hatásuk egyáltalán nem ismert. Az USA-ban 200 000, Földünkön mintegy kétmillió faj él. Szerény becsléssel ezeknek mintegy 20%-a a bioszféra egyik jelentős komponensében, a talajban található. A talaj ökoszisztémás szerepének hatását nem kell különösen hangsúlyozni az emberiség és az egész élővilág életében. A peszticidekkel esetleg bevitt mutagéneknek a talajban élő szervezetek evolúciójára kifejtett hatása (pl. extinkció, vagy éppen domináns — esetleg káros vagy előnytelen — fajok elterjedése) nemcsak a talaj, de az egész globális ökoszisztémát befolyásolhatja. Lényeges tehát ezzel a kérdéssel foglalkozni.

Mik a megközelítés útjai?

Mindenekelőtt szükséges a talajjal érintkezésbe kerülő anyagok, vagy azok átalakulási termékeinek mutagén hatását ellenőrizni. Ez a *mutagén tesztelés*. Módszertani feladat ez, meg kell keresni azt a rendszert, amely alkalmas arra, hogy határozottan megállapítható legyen egy potenciális mutagén tényleges hatása.

Lényeges továbbá az *ellenőrzés* kérdése. Adatbank, összehasonlítások, szerkezeti következtetés, tanácsadás, felvilágosítás kérdései. Ez nem közvetlen kísérleti munka, arra csupán támaszkodik.

A harmadik — és talán a legfőbb — feladat a bevitt mutagének hatására bekövetkező *populáció-genetikai* és *evolúciós hatások* elemzése. Ezt az előbb mondottak alapján nem kell részletezni.

Hazánkban legjobb tudomásom szerint három helyen folynak ilyen jellegű genetikai vizsgálatok: Gödöllőn, az Agrártudományi Egyetem Növény-nemesítési Tanszékén magasabbrendű növényekkel végeznek ilyen munkát. A Joliot Curie Országos Sugárbiológiai Intézetben a humán gyógyászatban alkalmazott drogok mutagén hatásával foglalkoznak. Intézetünkben, az MTA Talajtani Kutató Intézetében, alakult egy környezeti mutagenézis csoport.

Arra a kérdésre válaszolva, hogy a peszticidek között vannak-e bizonyítottan mutagén hatású anyagok, két táblázatban ismertetem (I. és II. táblázat) az eddig feltárt peszticid eredetű mutagéneket, FISHBEIN (1972) alapján. Ezek egyrészt a DNS szintjén bekövetkező megváltozások, másrészt pedig a kromoszóma ún. nagyobb megváltozásait, aberrációit előidéző hatások lehetnek.

I. táblázat

Peszticidek mutagén hatásai a DNS szintjén

A peszticid	Fág	Baktérium	Gomba Sejt	Állat	Növény
Maleinsav hidrazid				+	
DDT			+		
Captan		+			+
Aramit		+		+	
DDVP (Vapona)				+	
Aziridinek					
TEPA	+	+	+	+	
METEPA	+		+	+	
APHOLATE			+	+	
Thiotepa			+	+	
TEM		+	+	+	
Hemel (triazin)				+	
Hempa				+	
Szerves higanyvegyületek				+	
Etilén dibromid			+		

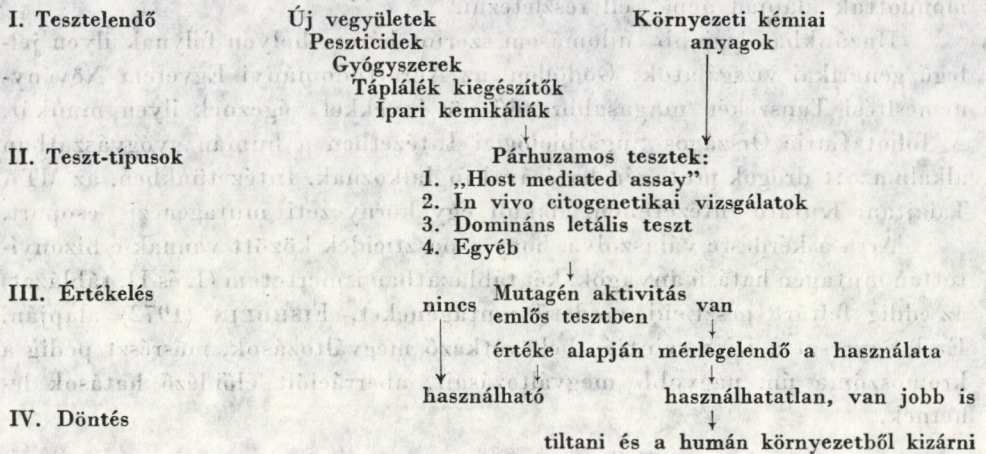
II. táblázat

Peszticidek kromoszóma-aberrációt okozó hatása

A peszticidek	Sejt	Növény	Állat	Sejt (humán)
Maleinsav hidrazid	+	+		
DDVP		+		
Aziridinek	+	+	+	+
TEM	+	+	+	+
Szerves higanyvegyületek				+

III. táblázat

Legator rendszere a környezeti mutagének kimutatására

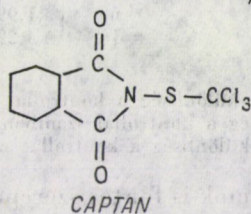
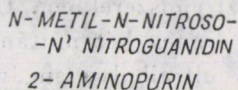
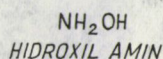
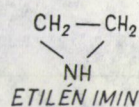
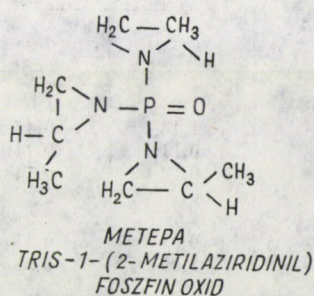
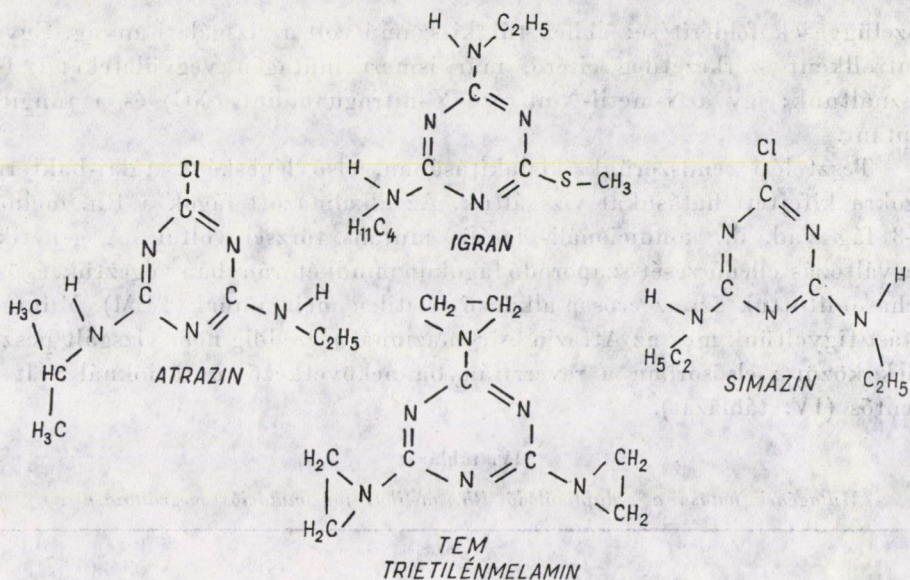


Az általánosan ismert mutagén tesztek és tesztelési rendszerek humán-centrikusak, és erre ismét egy példa a Legator (1972) által javasolt rendszer (III. táblázat).

Mivel vizsgálatainkban a talajszervezetekre kifejtett hatásokat elemezzük, szükséges a magunk területén egy, a talajélet szempontjából alkalmas rendszert létrehozni. Ebben a vizsgálatokat előtesztben (modell vizsgálatok) végezzük, ahol az esetleges mutagén hatást még a talajba juttatás előtt vizsgáljuk meg. Ezt követi az utóteszt, ebben a mutagén anyagnak a talajban kialakuló átalakulási termékeit elemezzük. Kísérleti célunk volt továbbá az is, hogy lehetőleg több rendszerben különféle organizmusokkal, de elsősorban talajban élőkkal vizsgáljuk az esetleges mutagén hatásokat. A mutáció kutatásának ma két fő problémája van. Ezek egyike a kromoszómák kisebb-nagyobb delécióinak kimutatása, másrészt az ún. gyenge mutagének (feltehetőleg ilyen a környezetünkbe kerülő mutagének nagy része) hatásának bizonyítása. Az elsőre rendszerünk nem alkalmas. A másodikat azonban, amint az eredményeink alapján megállapítható, megoldottuk.

Az alkalmazott tesztelési rendszerünk egyrészt a Rhizobium meliloti általunk izolált törzseit és fágjait, (SZENDE—ÖRDÖGH L, 1960; ÖRDÖGH L. — SZENDE, 1961) másrészt az Escherichia coli-lambda rendszert és AMES (1971) által kialakított és már széles körben használt Salmonella-rendszert tartalmazza. Mivel nem mindegy az, hogy egy mutáció „előre” történik (forward) vagy vissza (back), igyekeztünk a rendszerünkben mindkettőt alkalmazni. Ez helyes volt, sőt azt is kimutattuk, hogy a vizsgálati közeg is lényeges a mutációs hatás manifesztálódásában.

Vizsgálatainkban ismert mutagéneket hasonlítottunk össze egy peszticid (herbicide) csoport néhány tagjával. Ezek a herbicidek szimmetrikus triazinok



1. ábra. Triazinok, analóg- és rokonszerkezetű vegyületek

voltak (1. ábra). A triazinokra azért esett a választásunk, mivel FISHBEIN (1972) egy összefoglalásában az Atrazint és a Simazint mint potenciális mutagént említi.

Kontrollként szerkezetileg analóg, ill. hasonló potens mutagéneket használtunk. Nem volt célunk azonban a szerkezet és a mutagén hatás közti

összefüggések felderítése; ehhez túl kisszámú volt a vizsgálati anyag. Egyéb kontrollként szerkezetileg eltérő, már ismert mutagén vegyületeket is felhasználtunk: így a N-metil-N-nitroso-N'-nitroguanidint (NG) és a fungicid Captant.

Tesztelési rendszerünk kialakításában, első lépésként, talaj-bakteriógórokra kifejtett hatásukat vizsgáltuk. Az alkalmazott fágok a Rh. meliloti 16-3 fág vad, ill. kondicionális letális mutáns törzsei voltak. A genetikai megváltozás ellenőrzését szaporodó fágokon mindkét irányban végeztük, és összehasonlítottuk azt az erősen alkilező trietilen melaminnal (TEM). Mutagén hatást figyeltünk meg az Atrazin és Simazinnál az eddig nem vizsgált peszticidek között; elsősorban a reverzirányba bekövetkező mutációknál volt ez jelentős (IV. táblázat).

IV. táblázat

Mutagének hatása a reduplikálódó Rh. meliloti fág mutációs megváltozásaira

Peszticid mutagén	Dózis gamma per ml	A mutáció iránya		TEM-re vonatkoztatott relatív értékek	
		előre t → el × 10 ⁴	vissza ts → v × 10 ³	előre	vissza
		per 10 ⁶ élő fág			
TEM	10	3,27 ++	4,94 ++	1,0	1,0
Captan	10	4,75 ++	2,34 +	1,48	0,47
Atrazin	10	0,35 ±	1,67 ±	0,11	0,34
Simazin	10	0,58 ±	3,67 +	0,18	0,74
Igran	10	0,02	-0,56		
Metepa	60	0,16	-1,09		
NG	60	1,99 +	2,24 +	0,61	0,45
Etilén imin	10	4,22 ++	1,90 +	1,29	0,38

- ++ Jelentős különbség a kontrollal szemben.
+ Különbség a kontrollal szemben.
± Gyenge különbség a kontrollal szemben.

A baktériumok is fontos szerepet játszanak a tesztrendszerekben. Összehasonlítóként felhasználtuk a Salmonella-rendszert. Ennek két mutánsával a hisztidin igényes *his⁻* és a hisztidin, biotin igényes, ultraibolya sugárzásra érzékeny *his⁻ bio⁻ uvrB⁻* mutánsával dolgoztunk. Az *uvrB⁻* jelleggel jelzett törzsből, a sugárzás okozta sérülést reparáló enzimrendszer hiánya miatt a sérülések helyreállítása gátolt, legalábbis az ultraibolya sugárzás mutagén hatása fokozódik. Ma már ismert, hogy a kémiai mutagének okozta hatások realizálódásában is szerepe van ennek a mutációnak, és ezt kísérleteinkben is kimutattuk, mivel a *his⁻* törzsszel szemben a mutációk gyakoriságának értékei általában egy nagyságrenddel nagyobbak voltak. A szimmetrikus triazinok hatása ez esetben is jelentkezett, ha nem is olyan mértékben, mint a fágoknál (V. táblázat).

V. táblázat

Mutagén hatások *Salmonella thyphimurium* auxotrófokra cseppesztenben

Peszticidek	Mutáció iránya his ⁻ → vad			
	his ⁻	his ⁻ bio ⁻ uvrB ⁻	Rel. értékek NG-hez viszonyítva	
Simazin	8	100	0,01	0,1
Atrazin	9	100	0,01	0,1
Igran	94	200	0,09	0,2
Metepa	9	200	0,01	0,2
Captan	11	100	0,01	0,1
NG	1000	1000	1,0	1,0
TEM	4	600	0,005	0,6
Etilén imin	7	200	0,01	0,2

A további vizsgálatokban Rh. melilotit alkalmaztunk baktérium-teszterként. A mutáció irányát tekintve az „előre” (forward) mutációknál a streptomycin-érzékeny → streptomycin-rezisztens átalakulásokat vizsgáltuk. Mivel az indukált streptomycin-rezisztenciára történő mutáció kimutatása módszertanilag elég nehéz feladat — többek között az igen alacsony mutáció-gyakoriságok miatt — határozott hatást csak NG és Captan esetében tudtunk kimutatni, Atrazin és Simazinnál ez kisebb volt. Érdekes az, hogy az erősen alkilező TEM és az etilén imin sem volt mutagén hatású.

Más a helyzet az ellenkező irányú (back) mutációknál (VI. táblázat). Az itt ismertetett kísérletben négy aminosavigényes (auxotrof) Rh. meliloti törzset hasonlítottunk össze két szelektív táptalajon. A mutációk iránya auxotrof → vad típus (prototrof) volt. Az adatokból világosan látható, nem mindegy az, hogy milyen törzset és milyen közeget használunk. Míg a his₁⁻ törzs reverziós értékei alapján az A táptalajon a Simazin és az ismert mutagének hatása cseppesztenben azonos nagyságrendű volt, addig a met₂⁻

VI. táblázat

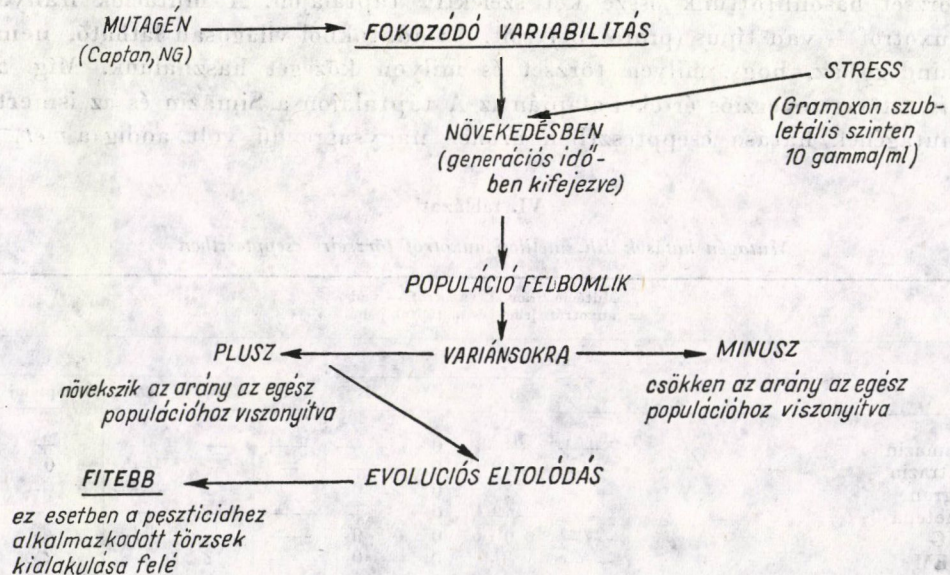
Mutagén hatások Rh. meliloti auxotróf törzseire cseppesztenben

Peszticidek	Mutáció iránya: auxotróf → vad Az auxotróf jelleg és a táptalaj hatása							
	met ₁ ⁻		met ₂ ⁻		his ₁ ⁻		his ₂ ⁻	
	A	B	A	B	A	B	A	B táptalaj
Simazin	++	+	0	+/-	++	+	+	+
Atrazin	+/-	+?	0	+	+	+	++	0
Igran	+/-	?	0	0	+	?	+/-	+
Metepa	-	+/-	0	+	++	+	+	-
NG	+/-	0	0	0	++	+	+/-	+
TEM	+/-	?	0	0	++	?	+	?
Etilén imin	+/-	?	0	0	++	+/-	+/-	+/-

törzs ugyanazon a táptalajon a mutációs hatás kimutatására nem bizonyult alkalmasnak, B táptalajon azonban már igen. Ez módszertani szempontból jelentős tényező lehet. A 4 törzs adatai alapján bizonyítottnak látszik a triazinok mutagén hatása.

Mivel a használt peszticidek kereskedelmi készítmények voltak (50%-os hatóanyag-tartalommal a Simazin és az Atrazin esetében), felmerülhet az a probléma, hogy a kiváltott hatás szisztematikus szennyeződésnek, esetleg a hordozó anyagnak tulajdonítható. Ellentmond azonban ennek egyrészt az, hogy a használt készítmények nem azonos eredetűek voltak, és így a nem peszticidszerű komponensek eltérők, mutagén hatásuk ezzel szemben azonos. Majdnem kizárt, hogy eltérő gyártási folyamatokban azonos szennyező és hordozó anyagok kerüljenek a készítményekbe. Másrészt a szerkezeti analógiák is inkább az aktív anyag mutagén hatására utalnak. Természetesen a nagymértékben tisztított készítményekkel végzett ellenőrző kísérletek után fogadjuk el majd a vizsgálataink eredményeit meggyőzőknek.

Előadásom kezdetén felhívtam a figyelmet arra, hogy a környezeti mutagén anyagok felszaporodása — a mutációs nyomás fokozódása — milyen, egyelőre beláthatatlan következményekkel járó populáció-genetikai és evolúciós megváltozásokat okozhat. Modellkísérleteket állítottunk be \pm mutagénnel kezelt és ugyanakkor egy *nem* mutagén peszticid stressz-hatásának kitett klónokkal annak bizonyítására, hogy a mutagén hatására létrejövő nagymértékű variabilitás kedvez bizonyos — jelen esetben gyorsabb növekedésű („fitebb”) — típusok kialakulásának. Ezek azután a stressz-közegben



2. ábra. A mutagén hatás populációs szinten

alkalmazott peszticid szubletális koncentrációjánál is jól növekednek, és így a populáció az „alkalmazkodott típusok” irányába eltolódik. Ezt világítja meg a VII. táblázat.

Az elvégzett előkísérletek azt mutatják, hogy ez a variabilitás nagymértékű megnövekedése következtében valóban kialakulhat, annak ellenére, hogy a mutagénnel kezelt klónok növekedése, generációs időben kifejezve, kisebb a kontrollnál.

Összegezve tehát vizsgálataink eredményeit: kimutattuk egyes szimmetrikus triazin herbicidek mutagén hatását talajbaktériumokra és fágjaikra. Kimutattuk azt, hogy a szűrővizsgálatokban lényeges a vizsgált teszt-organizmus és a közeg megfelelő megválasztása. Szükséges az, hogy a mutációs megváltozásokat mindkét irányban vizsgáljuk. Tehát a vizsgálatokat lehetőleg többféle feltétel között végezzük.

Bizonyítást nyert az is, hogy a talaj-mikroszervezetek, Rhizobiumok és fágjaik, alkalmasak egy mutagén teszt-rendszer kialakítására. Ez jelentős azért, mert a hatások ellenőrzése, populációs — populáció-genetikai eltolódások megfigyelése a talajban is lehetővé válik. Lényeges ez azért, mert így a fokozódó kemizálásnak a hatására kialakuló evolúciós trendekről, azoknak várható kihatásairól a talaj ökoszisztémákban, képet kaphatunk. Gyakorlati jelentősége ennek az, hogy a kapott eredmények alapján a szakemberek figyelme a káros hatásokra és elkerülésük módjaira irányítható.

IRODALOM

- AMES, B. N. (1971): In A. HOLLAENDAR (ed.) Chemical mutagens. Vol. 1. Plenum. Publ. Corp., NY.
- DRAKE, J. W., and FLAMM, W. G. (1972): The molecular basis of mutation. In H. E. Sutton and M. I. Harris (ed.) Mutagenic Effect of Environmental Contaminants 16—26. Acad. Press, N. Y.
- FISHBEIN, L. (1972): Pesticidal, industrial, food additive and drug mutagens. In H. E. Sutton and M. I. Harris (ed.) Mutagenic Effect of Environmental Contaminants 129—170. Acad. Press, N. Y.
- GRANT, W. F.: Pesticides — subtle promoters of evolution. In G. Vida (ed.) Evolution in Plants. Symp. Biol. Hung. 12, 43—50.
- LEGATOR, M. S. (1972): The need to detect chemically induced mutations in experimental animals. H. E. Sutton and M. I. Harris (ed.) Mutagenic Effect of Environmental Contaminants 69—79. Acad. Press, N. Y.
- ÖRDÖGH, F. and SZENDE, K. (1961): Temperate bacteriophages isolated from Rhizobium meliloti. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 3, 65—71.
- SZENDE, K. — ÖRDÖGH, F. (1960): Die Lysogenie von Rhizobium meliloti. Die Naturwiss. 47, 404—405.