

Salmonella System에 있어서의 農藥의 突然變異 誘發性

白 炯 錫·邊 宇 玄*·全 文 鎮·李 世 永*
高麗大學校 農化學科·韓國原子力研究所 分子生物學 研究室

Mutagenicity of Pesticides in the *Salmonella* System

Hyung-Suk Baik · Woo-Hyun Byeon* · Moon-Jin Chun and Se-Young Lee*

Dept. of Agricultural Chemistry, Korea University · Molecular Biology Lab.,
Korea Atomic Energy Research Institute, Seoul, Korea

(Received Sept. 26, 1977)

Abstract

20 pesticides including 11 insecticides, 5 herbicides and 4 fungicides have been tested for mutagenic activity in the *Salmonella* microsome system. It was found that Captan showed strong mutagenic activity directly in TA 1535, TA 100 and TA 98 strains, indicating that it induces both base substitution and frame shift mutation. With microsomal activation system, mutagenicity of Captan was slightly decreased.

Micut, Dimethoate and Triforine revealed slight mutagenicity in TA100 without microsomal enzyme activation.

緒 論

突然變異는 遺傳子인 DNA에 化學的 또는 物理的 要因에 의해 그 構造上 變化가 일어나는 것이고 이런 變化는 細胞 혹은 個體의 子孫에게 遺傳되는 것이다⁽¹⁾. 突然變異는 어떤 體細胞와 生殖細胞에서도 일어날수 있으며 이로 말미암아 大部分의 細胞는 죽게 되지만 때때로 遺傳的으로 그 機能이 變換 細胞가 살아 남아서 遺傳病, 畸形, 低能, 短命, 不妊, 早老등의 原因이 되고 특히 體細胞의 突然變異는 發癌과 密接한 關聯이 있다. 生殖細胞의 突然變異는 그것이 子孫에게 傳達되기 때문에 더욱 重大하다⁽²⁾.

突然變異 誘發性 物質은 自然界에도 存在하지만 지난 30年동안 急速한 科學技術의 發達로 化學物質의 用度가 갑자기 增加되었으며 우리가 日常生活에 使用하고 있는 化學物質들은 醫藥品, 化粧品, 農藥, 食品添加物, 其他, 家庭用品등 대단히 多様

하다.

이들은 直接的으로, 혹은 空氣, 물, 土壤을 통해 間接的으로 우리 體內에 吸收된다. 이중에서 農藥의 使用量에 對하여 살펴보면 1971年度에 8,429,762 kg이던것이 1975年度에는 41,437,224 kg으로서 4年間に 約 5배가 增加하였으며 每年 使用量이 엄청나게 增加하고 있다.

農藥은 食糧生産에 있어 人類 生活과 가장 密接한 關係에 있으면서도 高等動物에 대한 毒性이 環境汚染性 物質이기 때문에 이의 繼續的인 使用量의 增加는 環境과 人間健康에 뜻하지 않은 結果를 가져오고 있다. 특히 農藥은 이들의 一般毒性에 附加하여 遺傳的毒性인 突然變異 誘發性, 畸形誘發性, 또는 發癌性이 問題가 되고 있으며 여러 學者들에 의해 報告되고 있다^(4~7).

遺傳的 毒性을 檢出하기 위한 生體實驗은 막대한 時間과 經費를 必要로 하므로 感度가 銳敏하고 짧은 期間동안 많은 試料에 對해 同時에 施行할수 있으며 또한 가장 簡便한 微生物을 利用한 方法이

수많은 環境汚染性 物質에 대한 좋은 突然變異誘發 檢出方法의 하나로 널리 推薦되고 있다⁽⁸⁻⁹⁾.

Salmonella typhimurium LT-2의 histidine auxotroph를 利用하여 突然變異 誘發物質을 檢出하는 方法은 B. N. Ames와 H. J. Whitefield Jr.에 의해서 처음 紹介되었으며 그 후 여러學者들에 의해 補完되어 1973年 이후 實際로 實驗에 使用되고 있으며 “癌誘發物質들의 突然變異 誘發 潛在能 內包”를 근거로 癌誘發 物質들의 一次的 檢證에 널리 利用되고 있다.

初期에는 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph 菌株만으로 突然變異 誘發原의 逆突然變異 誘發能力을 보던 이 方法은⁽⁴⁾ 점차 突然變異 誘發原에 對한 感受性을 높이기 위해 repair deficient mutation 및 cell wall mutation등의 附隨的인 突然變異를 菌株에 導入시켰으며⁽¹²⁾ 역시 感受性을 높이기 위해 plasmid인 ampicillin resistant factor를 導入시킨 菌株들을 使用하게 되었다.⁽¹³⁾ 또한 微生物에 直接的인 突然變異 誘發源이 못되는 化合物들도 哺乳動物의 肝 microsomal enzyme들로 처리하면 突然變異 誘發物質로 變化될수 있다는 事實을 Ames등,⁽¹⁴⁾ Slater등⁽¹⁵⁾, Garner등⁽¹⁶⁾과 Mallig⁽¹⁷⁾이 報告한바 있는데 이로써 *in vitro*에서 間接的으로 나타 哺乳動物 生體內에서의 代謝와 유

사한 과정을 再現하여 *in vivo* 實驗을 直接하지 않고서도 어떤 非活性 物質이 生體內에 吸收된뒤 活性化되어 突然變異를 일으킬수 있는 가에 대한 可能性을 追跡할수 있게 되었다.

*Salmonella system*을 利用한 農藥의 突然變異 誘發性은 Mohn,⁽¹⁸⁾ Hanna,⁽¹⁹⁾ Buselmaier 등⁽²⁰⁾, Styles,⁽²¹⁾ McCann등⁽²²⁾, 邊등⁽²³⁾에 의해 報告가 있었고 Shirazu등⁽²⁴⁾은 166種의 農藥에 對하여, Seiler⁽²⁵⁾는 37개 農藥에 對한 實驗結果를 報告하고 있다. 本 論文은 農藥의 突然變異 誘發能力을 檢討하기 위하여 *Salmonella typhimurium*의 base substitute mutant인 TA 1535와 frame-shift mutant인 TA 1538의 두 菌株와 또 이에 각각 R factor인 pK M 101을 導入시킨 TA 100 및 TA 98의 모두 네 菌株를 使用하여 現在 우리 나라에서 使用하고 있는 農藥에 對하여 突然變異 誘發性을 檢討한 結果이다.

材料 및 方法

試料

수집된 試料의 種類는 20種이었으며 表 1과 같이 殺虫劑 11種, 殺菌劑 4種, 除草劑 5種이었으며 韓國三共農藥株式會社 및 서울農藥株式會社로부터 提供받은 것이다.

Table 1. Chemical Name of Pesticide.

Item	Chemical name
((Insecticides)	
Akar	4-Chloro- α -(4-chlorophenyl)- α -hydroxybenzene acetic acid ethyl ester
Acarol	Isopropyl-4, 4-dibromobenzylate
Birlane	Phospric acid 2-chloro-1-(2, 4-dichlorophenyl) ethenyl diethyl ester
Dieldrin	3, 4, 5, 6, 9, 9-Hexachloro-1a, 2, 2a, 4, 6, 6a, 7, 7a-octahydro-2, 7; 3, 6-dimethanonaphth [2, 3-b] oxirene
Dmethoate	Phosphorodithic acid O, O-dimethylS-[2-(methylamino)-2-oxoethyl] ester
Endrin	1, 2, 3, 4, 10, 10-Hexachloro-6, 7-epoxy-1, 4, 4a, 5, 6, 7, 8, 8a-octahydro-endo, endo-1, 4, 5, 8-diemethanonaphthalene
Kelthane	1, 1-bis (p-chlorophenyl) 2, 2, 2-trichloroethanol
Micut	1, 5-Di (2, 4-dimethylphenyl)-3-methy-1, 3, 5-triazapenta-1, 4-diene
PAP	Ethyl ester of O, O-dimethyl dithiophos phoryl phenyl acetic acid
Triforine	N, N'-[1, 4-Piperajinediyl-bis-(2, 2, 2-trichloroethylidene)]-bis-formamide
Thiolix	6, 7, 8, 9, 10, 10-Hexachloro-1, 5, 5a, 6, 9, 9a-hexahydro-6, 9-methano-2, 4, 3-benzodioxathiepin 3-oxide
(Herbicides)	
Ronstar	5, tert-Butyl-3-(2, 4-dichloro-5-isopoxyphenyl)-1, 3, 4-oxadiazoline-2-one
Saturn	N, N-Diethyl-S-(4-chlorobenzyl) thiocarbamate
Simazine	6-Choro-N, N'-diethyl-1, 3, 5-triazine-2, 4-diamine

Simetryn	<i>N, N'</i> -Diethyl-6-(methylthio-1, 3, 5-triazine-2, 4-diamine
Swep (Fungicides)	Methyl- <i>N</i> -(3, 4-dichlorophenyl) carbamate
Benlate	[1-(Butylamino) carbonyl]-1H-benzimidazole-2-ylcarbamic acid methyl ester
Captan	3a, 4, 7, 7a-Tetrahydro-2-[(trichloromethyl) thio]-1H-isindole-1, 3(2H)-dione
Pentaben	Pentachloronitrobenzene
PMA	Phenyl mercuric acetate

菌株, 培地 및 方法에 대해서는 Ames등⁽¹⁰⁾의 standard method에 의거 했으며 liver enzyme induction을 위해서 polychlorinated biphenyl complex 인 Aroclor 1254를 사용하였다.

結果 및 考察

毒性檢査를 거친후 突然變異 誘發性 實驗에 사용된 農藥의 濃度는 表 2와 같았다.

Table 2. Maximum Contration of Tested Compound per Plate.

Compd.	Amount per plate	Solvent used
Acarol	1 mg	DMSO
Akar	200 μg	"
Benlate	20 μg	"
Birlane	0.1 λ	"
Captan	10 μg	"
Dieldrin	100 μg	"
Dimethoate	0.2 λ	"
Endrin	100 μg	"
Kelthane	1 mg	"
Micut	10 mg	"
PAP	0.5 λ	"
Pentaben	1 mg	"
PMA	0.01 μg	"
Ronstar	100 μg	"
Saturn	1 λ	"
Simazine	1 mg	"
Simetryn	1 μg	"
Swep	10 μg	"
Thiolix	100 mg	"
Triforine	10 mg	"

Abbreviation : DMSO-Dimethyl sulfoxide.

이들을 사용한 實驗에서 각 菌株에 對한 農藥의 突然變異 誘發性은 表 3과 같이 4種이 陽性 및 擬陽性으로 나타났다. 이들 중에서 Micut, Dimethoate, Triforine등은 對照區에 비해 Revertant의 증가가 현저하지 못했기 때문에 突然變異誘發物質

Table 3. Mutagenicity of Pesticides on TA1535, TA100, TA1538 and TA98 without Microsomal Enzyme Activation.

Strain S-9 Comps.	TA1535		TA100		TA1538		TA98	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Acarol	-	-	-	-	-	-	-	-
Akar	-	-	-	-	-	-	-	-
Boenlate	-	-	-	-	-	-	-	-
Birlane	-	-	-	-	-	-	-	-
Captan	+	+	###	###	+	+	##	##
Dieldrin	-	-	-	-	-	-	-	-
Dimethoate	-	-	-	±	-	-	-	-
Endrin	-	-	-	-	-	-	-	-
Kelthane	-	-	-	-	-	-	-	-
Micut	-	-	±	-	-	-	-	-
PAP	-	-	-	-	-	-	-	-
Pentaben	-	-	-	-	-	-	-	-
PMA	-	-	-	-	-	-	-	-
Ronstar	-	-	-	-	-	-	-	-
Saturn	-	-	-	-	-	-	-	-
Simazine	-	-	-	-	-	-	-	-
Simetryn	-	-	-	-	-	-	-	-
Swep	-	-	-	-	-	-	-	-
Thiolix	-	-	-	-	-	-	-	-
Triforine	-	-	-	±	-	-	-	-

###, Strongly mutagenic; ##, moderately mutagenic; +, weakly mutagenic; ±, ambiguous. Strongly, moderately and weakly mutagenic means formation of over 300, 300 to 100, and 100 to 0 colonies per plate, respectively, after spontaneous revertants were subtracted. Ambiguous indicates weak mutagenic response for which the complete dose response relationship could not be established because of the toxicity of testing compound.

이라고 斷定할수가 없었지만 Micut의 경우에는서는 미약하게 dose에 대한 response를 나타냈으며 Dimethoate는 plate당 0.1 λ와 0.2 λ를 처리했을 때에만 TA100에 대하여 弱한 증가가 있었고 그 이상에서는 毒性으로 인하여 처리할 수가 없었으며

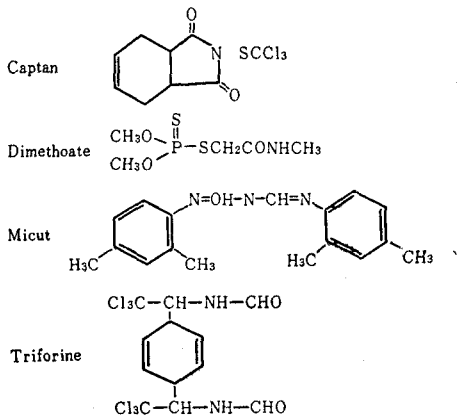


Fig. 1. Chemical Structure of Mutagenic Pesticides.

Triforine의 경우에도 6 mg과 10 mg에서만이 revertant의 증가가 있었으며 그 이상에서는 毒性으로 인하여 實驗할 수 없었다. 그림 1은 陽性 또는 擬陽性으로 突然變異를 나타낸 化合物의 構造式이다.

突然變異 誘發能力이 일단 확인된 이들 農藥에 對해서는 4가지 菌株中에서 Captan의 경우에서는 base substitute mutant인 TA 100과 frame-shift mutant인 TA 98로 dose response를 보았다.

Activation system을 사용한 Captan의 突然變異 誘發性은 TA 100 및 TA 98의 두경우에 S-9 mix에 의해 약간의 감소를 가져왔는데 이는 microsomal enzyme에 의해 部分的으로나마 그 構造가 變化를 받는 理由인것 같았다. 이 Captan에 對해서는 dose response를 확실히 하기위해 S-9 mix없이 직접적으로 실험하였다.

各 濃度에 따른 農藥들의 revertant 誘發程度는 다음의 표 4, 5, 6과 7에 나타난 바와 같다(숫자들은 各 實驗區에서 spontaneous revertant수를 除外한 숫자들이다).

表 4의 Captan의 경우 TA 100에 대한 count 가능한 최고의 突然變異 誘發程度가 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 나타났고 TA 98에서는 TA 100의 處理濃度에서보다 낮은 數値를 보여주고 있다. Captan은 McCann 등⁽²²⁾이 TA 1535, TA 100, TA 1538 및 TA 98에 대한 직접적인 突然變異 誘發性 結果를 報告하고 있으며 *E. coli*의 tryptophan-requiring mutant 및 *Salmonella typhimurium* AT 15 35, TA 1537 및 TA 1538을 사용한 Shirazu⁽²⁴⁾의 報告에서도 突然變異 誘發性을 確實히 하고 있다. 本 實驗結果에서도 上記의 引用著者들과 거의 같은 結果를 얻었

Table 4. Dose Response of Captan on TA 100 and TA 98 without Microsomal Enzyme Activation (number of revertant per plate).

Amount/plate Bacteria Compd.	1 μg	2 μg	4 μg	6 μg	10 μg	
	Captan	TA100 101	299	507	566	1,012
	TA 98	32	36	143	218	297

Table 5. Dose Response of Micut on TA 100 without Microsomal Nzyme Activation (number of revertant per plate).

Amount/plate Compd.	1 mg	2 mg	4 mg	6 mg	10 mg
Micut	7	23	26	39	55

Table 6. Dose Response of Dimethoate on TA 100 without Microsomal Enzyme Activation (number of revertant per plate).

Amount/plate Compd.	0, 1 λ	0.2 λ
Dimethoate	15	50

Table 7. Dose Response of Triforine on TA 100 without Microsomal Enzyme Activation (number of revertant per plate).

Amount/plate Compd.	6 mg	10 mg
Triforine	15	78

는데 이 Captan에 있어서 흥미있는 事實은 base substitute mutant인 TA 100과 frame-shift mutant인 TA 98에 同時에 突然變異 誘發性을 갖는 것으로써 이것은 base substitute mutation과 frame-shift mutation을 同時에 일으킬수 있는 아주 위험한 물질임을 나타내주는 것이라 볼 수 있다.

表 5의 Micut는 plate당 최고처리농도가 10 mg 程度였는데 이는 細菌에 대해 毒性이 매우 弱한 農藥中의 하나로 보아진다. 이 처리농도에서의 이런 弱한 revertant의 증가는 이 化合物質의 突然變異 誘發性으로 確定하기에는 問題點이 있다고 보이며 微量으로 存在하는 다른 突然變異 誘發性 附隨物에 의한 가능성도 있다고 思料된다.

表 6의 Dimethoate는 *B. subtilis*의 recassy, *Sal-*

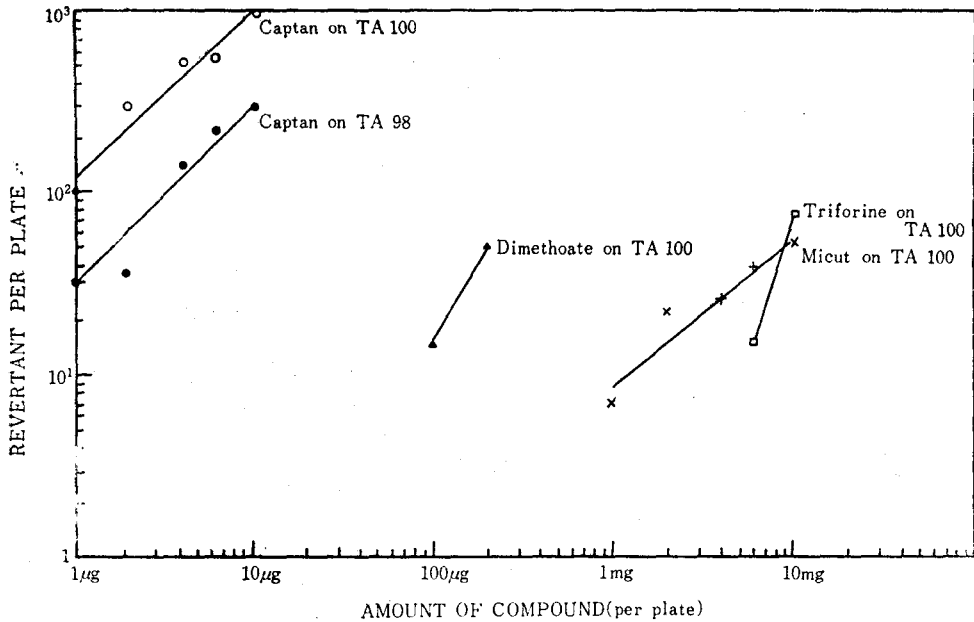


Fig. 2. Dose response of Mutagenic Activity of Captan, Dimethoate, Micut, and Triforine on TA 100 and TA 98 without Microsomal Enzyme Activation.

*monella typhimurim*과 *E. coli* system을 사용한 Shirazu 등⁽²⁴⁾의 報告에는 突然變異 誘發性이 없다고 報告된 物質이다. 한편 *Salmonella typhimurium* his G 46을 사용한 Seiler⁽²⁵⁾의 spotting test에서는 突然變異 誘發性이 있다고 報告되고 있다. 또한 *E. coli* K-12를 사용한 Mohn⁽¹⁸⁾의 報告에 의하면 Dimethoate는 상당히 낮은 突然變異 誘發성을 나타낸다는 報告로 보아 本 實驗의 結果와 一致한다 할 수 있다.

表 7의 Triforine은 處理最高濃度가 10 mg/plate로 Micut와 마찬가지로 毒성이 낮아서 突然變異 誘發性 物質로 確定키 어려운 農藥中의 하나였다.

Captan, Micut, Dimethoate와 Triforine의 突然變異 誘發성을 比較한 各各의 dose response의 結果는 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는 바와 같이 각 compound의 dose response는 Captan이 대단히 높는데 비하여 Dimethoate, Micut, 그리고 Triforine은 dose response가 대단히 낮아 本 實驗에 使用된 菌株만으로는 突然變異 誘發性이 있다고 確信할수는 없을 것으로 생각되며 다른 方法으로 좀더 明確한 結果를 期待하여야 할 것으로 판단된다.

그러나 遺傳의 毒性은 一般의인 毒性처럼 그 誘發原과의 接觸을 끊음으로써 쉽사리 回復되는 것

이 아니고 微弱한 突然變異原에 의해서 誘發된 突然變異 조차도 蓄積되었다가 어느 時期에 이르러 여러가지 不治病으로 나타날 수도 있기 때문에 Captan은 물론이며 擬陽性인 Micut, Dimethoate, 그리고 Triforine의 突然變異도 看過해서는 안될 것으로 믿어진다.

要 約

Salmonella typhimurium LT-2의 histidine auxotroph 중 base substitute mutant인 TA 1535와 TA 100, 그리고 frame-shift mutant인 TA 1538과 TA 98을 각각 使用하였고 microsomal enzyme activation system을 竝用하여 國內 使用農藥 20種에 對한 突然變異 誘發성을 檢하였다.

이중 다음 4種의 農藥이 陽性 및 擬陽性의 誘發성을 나타냈다.

(1) Captan은 強力한 突然變異 誘發性 物質로서 TA 1535, TA 100 및 TA 98에 대해 直接的으로 10 μg/plate의 濃度에서 plate당 各各 205, 1012, 그리고 297의 突然變異 菌體의 出現을 나타냈으며 microsomal enzyme activation에 의해 그 誘發能力이 약간 減少되는 경향을 보였다.

(2) Micut는 TA 100에 대해 直接的으로 10 mg/

plate의 濃度에서 55 revertant 程度의 微弱한 突然變異 誘發性을 나타냈다.

(3) Dimethoate는 TA 100에서 역시 直接的으로 處理可能 最高濃度인 0.2 μ /plate에서 55 revertant/plate 程度의 微弱한 突然變異 誘發性을 나타냈다.

(4) Triforing도 역시 TA 100에서 直接的으로 10 mg/plate로 處理된 濃度에서 78 revertant/plate 程度의 弱한 突然變異 誘發性을 나타냈다.

參考 文獻

- 1) Stainer R. Y., E. A. Adelberg, and J. L. Ingraham: *The microbial world*, 4th ed. Englewood Cliff, New Jersey, 402. (1976).
- 2) Siebert, F. K. Zimmermann, and E. Lemperle: *Mutation Research*, **10**, 533 (1970).
- 3) 農藥年報: 社團法人 農藥工業協會, 74 (196).
- 4) Ames B. N.: The detection of chemical mutagens with enteric bacteria, in A. Hollaender (Ed.) *Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection*. Plenum, New York, 267 (1971).
- 5) Seiler J. P.: A survey on the mutagenicity of various pesticides. *Experientia*, **29**, 622 (1973).
- 6) Verret M. J., M. K. Mutchler, W. E. Scott, E. F. Reonalds, and J. McLaughlin: Teratogenic effects captan and related compound in the developing chicken embryo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **160**, 334 (1969).
- 7) Voogd C. E., J. J. A. A. Jacobs, and J. J. van der Stel: On the mutagenic action of dichlorvos. *Mutation Research*, **16**, 413 (1972).
- 8) Bridges B. A.: Short term screening tests for carcinogens. *Nature*, **261**, 195 (1876).
- 9) De Serres F. J., Prospects for a revolution in the methods of toxicological evaluation. *Mutation Research*, **38**, 165 (1976).
- 10) Ames B. N., J. McCann, and E. Yamasaki: Methods for detecting carcinogens and Mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Research*, **31**, 347 (1975).
- 11) Ames B. N., and H. Jr. Whitefield: Frameshift mutagenesis in *Salmenella*. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **31**, 221 (1966).
- 12) Ames B. N., F. D. Lee, and W. E. Durston: An improved bacterial test system for detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **70**(3), 782 (1973).
- 13) McCann J., N. E. Springharm, J. Kobori, and B. N. Ames.: Detection of carcinogens as Mutagens Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **72**(3), 979 (1973).
- 14) Ames B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee: Carcinogens combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Nat. Acad. U. S. A.*, **70**(8), 2281 (1973).
- 15) Slater E. E., M. D. Anderson, and H. S. Rosenkranz: Rapid detection of Mutagens and Carcinogens. *Cancer Research*, **31**, 970 (1971).
- 19) Garner R. G., E. C. Miller, and J. A. Miller: Liver microsomal metabolism of Aflatoxin B to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530. *Cancer Research*, **32**, 2058 (1972).
- 17) Malling M. V.: Dimethylnitrosoamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsome. *Mutation Research*, **13**, 425 (1971).
- 18) Mohn G.: 5-Methyl tryptophan resistance mutations in *Esherichia coli* K \sim 12. *Mutation Research*, **20**, 7 (1973).
- 19) Hanna P. J., and K. E. Dyer: Mutagenicity of organophosphorous compounds in bacteria and *Drosophila*. *Mutation Research*, **28**, 405 (1975).
- 20) Buselmaier W., Röhrborn, and P. Propping: Comparative investigations on the mutagenicity of pesticides in mammalian test systems. *Mutation Research*, **21**, 25 (1973).
- 21) Styles: J. A. Cytotoxic effect of various pesticides *in vivo* and *in vitro*. *Mutation Research*, **21**, 50 (1973).
- 22) McCann J., E. Choi, E. Yamasaki, and B. N. Ames: Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300

- chemicals. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**(12), 5135 (1975).
- 23) 변우현, 현형환, 이세영 *Salmonella*/ microsomal enzyme activation system에서의 농약의 돌연변이 유발성, *한국미생물학회지* **14**, 128 (1976).
- 24) Shirazu Y., M. Moriya, K. Kato, A. Furuhashi, and T. Kada: Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutation Research*, **40**, 19 (1976).
- 25) Seiler J.P.: Nitrosation *in vitro* and *in vivo* by sodium nitrate, and mutagenicity of nitrogenous pesticide. *Mutation Research*, **48**, 225 (1977).