

西洋種꿀벌의 殺虫劑分解酵素에 關한 研究

徐 鎔 澤·沈 在 漢
全南大學校 農科大學 農化學科

Enzyme Activities of a Honeybee(*Apis mellifera* L.) Associated with the Degradation of Some Insecticides

Yong-Tack Suh and Jae-Han Shim

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture,
Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

Abstract

In order to determine the appropriate usage of insecticides to honeybee(*Apis mellifera* L.), median effective dose to seven insecticides were studied. LC_{50} value of DDT was the highest as being 58 ppm, and that of EPN was the lowest as being 1.61ppm. Various detoxifying enzymes from the midgut of adult worker bee, including microsomal oxidases, glutathione S-transferases, esterases, and DDT-dehydrochlorinase were assayed. Effects of various insecticides on microsomal enzyme activities were as follows: Aldrin epoxidase activity was inhibited by malathione and permethrin treatment. N-demethylase activity was induced by diazinon and EPN treatment and O-demethylase activity was induced by diazinon treatment. Of the glutathione S-transferases, aryltransferase(DCNB conjugation) activity was significantly induced by diazinon, and moderately induced by permethrin. Of the esterases, α -NA esterase activity was moderately inhibited by malathion and permethrin. Acetylcholinesterase activity was not affected by the sublethal exposure of honeybee to the insecticides. Sublethal exposure of honeybee to the insecticides had no effect on DDT-dehydrochlorinase activity, except carbaryl and permethrin were significantly induced.

서 론

꿀벌은 各種 養蜂產物을 生産하는데 利用될 뿐 아니라 農作物의 花粉媒介에 活用되고 있는 重要한 有用昆蟲이다. *Apis*屬의 꿀벌에는 印度 最小種(*Apis florea* F.), 印度 最大種(*A. dorsata* F.), 東洋種(*A. cerana* F.) 및 西洋種(*A. mellifera* L.) 등의 四種이 있다.¹⁾ 西洋種은 그 原產地가 유럽,

아프리카로서 現在 全世界에 걸쳐 飼養되고 있으며 많은 變種과 系統으로 分化되어 있다. 西洋種이 韓國에 들어온 것은 1900年頃으로 여겨지며 現在 西洋種의 蜂群數는 東洋種의 蜂群數를 압도하고 있다.²⁾

最近 開發된 期機合成農藥들은 害虫에 對하여 毒性이 강할 뿐만 아니라 꿀벌에까지도 害를 끼치는 例가 있다. 이들중 殺虫劑는 거의 다 消化中毒 및 接觸毒을 겸하고 어떤 것은 燻蒸毒으로도 作用하여 꿀벌에 對하여 特히 해로운 것으로 報告³⁾되어 있다. 近來 各種 農作物 또는 山林病害虫의 防

1988년 4월 25일 수리
Corresponding author: Y.T. Suh

除를 爲해 많은 農藥이 使用됨에 따라 農藥에 依한 꿀벌의 被害가 심하게 發生되고 있다. Atkins⁵⁾에 따르면 使用되고 있는 農藥의 약 50%가 벌에 對해서 高毒性 리 低毒성을 지녔다고 하였다.

殺虫劑에 對한 꿀벌의 높은 感受性은 그들의 解毒性·酵素活性의 缺乏에 基因된 것으로 示唆되어 왔다.⁶⁾ 昆虫에서 지금까지 알려진 農藥의 解毒에 關與하는 重要한 酵素系로는 microsomal oxidase, glutathione S-transferase(GST), esterase, DDT-dehydrochlorinase(DDT-ase) 등이 있는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

農藥의 開發 및 使用과 昆虫의 抵抗性 發達 및 害虫綜合防除의 指標를 定하기 위해서는 毒性作用에 關한 研究가 先行되어야 하며 特히 解毒酵素에 關한 定量的인 研究가 必要하다. 그러나 우리나라에서 꿀벌의 農藥被害에 關한 研究는 거의 없는 상태이다. 最近 Choi 등⁷⁾의 設問調査에 의하면 우리나라 養蜂家의 94.7%가 農藥에 의한 꿀벌의 被害를 經驗하였다고 報告한 바 있다. 農藥으로부터 꿀벌을 保護하기 위한 對策이 이루어지기 爲해서는 꿀벌의 生理的인 側面에서 여러가지 研究가 活發히 이루어져야 되리라고 생각된다.

따라서 本 研究에서 西洋種 꿀벌을 供試하여 代表的인 몇가지 殺虫劑에 의한 中位致死濃度(LC₅₀)의 毒性差異를 檢討하고 準致死濃度を 決定하여 이 濃度에서 殺虫劑가 꿀벌의 解毒酵素인 microsomal oxidases(N-demethylase, O-demethylase 및 epoxidase), GST(DCNB, CDNB conjugation), esterases(α -NA esterase, carboxylesterase . AchE) 그리고 DDT-ase 活性에 미치는 影響을 調査하였다.

재료 및 방법

供試藥劑 및 試藥

Carbaryl, Diazuon, EPN, Malathion, Demeton S-methyl 및 Permethrin은 農藥研究所에서 分讓 받았으며 aldrin과 DDT는 Wakopure Chem. Co. (大板, 日本) 製品이었고 α -naphthol, bovine serum albumin, Florisil(60~100mesh), glutathione, p-hydroxymercuribenzoate(PHMB), D-glucose-6-phosphate(G-6-P), glucose-6-phosphate dehydrogenase(G-6-P-D), acetylthiocholine iodide(AThc), nicotin-amide adenine dinucleotide phosphate (disodium salt)(NADP), lauryl sulfate(sodium

salt), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNE), Diazo-blue B(tetrazotized) 및 3-carboxyl-4-nitrophenyl disulfide는 Sigma Chem. Co.(St. Louis, MO, U.S.A), 4-(dimethylaniline)benzaldehyde, p-nitroanisole, p-chloro-N-methylaniline, 3,4-dichloronitrobenzene(DCNB) 및 eserine은 Aldrich Chem. Co.(Milwaukee, Wisc. U.S.A), α -NA와 methyl cellosolve는 Fluka AG Chem.(Febrik, Buchs. Swiss)製 등을 使用하였다.

供試꿀벌

供試꿀벌은 西洋種(*A. mellifera* L.)成虫일벌을 광주시 매곡동 및 청옥동에서 1986.5~7월, 1987.5~9월에 採取하여 實驗室條件(26~28°C)에서 가루설탕 10 : 粒子설탕 8 : 물 2의 比率로 섞어 調製한 人工 먹이로 飼育하면서 供試하였다.

꿀벌試料調製

벌의 飼育箱子는 두께 0.5mm의 비닐을 7×8cm와 5.5×7cm의 구멍을 두어 防虫網을 씌워 防虫網箱子(높이 13.5cm, 直徑 8.5cm)를 製作하였다. 箱子의 兩面을 plastic petridish로 막아 使用하였다. 箱子의 뚜껑에 直徑 2.5cm의 구멍을 두개 만들고 먹이를 25ml 용 plastic vial에 넣어 氣體로 막아 箱子의 뚜껑에 거꾸로 세웠다.

所定濃度の 農藥을 acetone 20ml에 녹여 이것을 가루설탕 10g과 粒子설탕 8g의 混合粉末에 加하고 하루 동안 hood에서 acetone을 날려보내고 여기에 다시 2ml의 물을 加하여 混合하고 이것을 벌에 供給하였으며 對照區로는 acetone 20ml만 處理한 것을 먹였다. 모든 實驗은 26~28°C의 室內에서 行하였고 農藥供給 3日 後에 供試하여 먹이를 먹인 꿀벌 중 살아 있는 벌만 골라 容器에 모은 다음 -72°C의 冷凍庫에 保管하였다.

中位致死濃度(LC₅₀)와 準致死濃度

LC₅₀值와 準致死值를 구하기 위하여 藥劑當 6水準의 濃度로 하고 區당 30마리의 일벌을 3反復으로 處理하였다. Finney法⁸⁾에 의한 probit分析으로 LC₅₀值를 구했고 準致死值는 LC₁值의 1/2로 計算하였다.

酵素活性測定

1) Microsomal oxidase 活性

Microsomal oxidase 活性測定은 中腸 5~10個

를 벌에서 떼어낸 후 1.15% KCl 溶液에 保管하고 창자 內容物을 포함한 原狀中腸을 酵素源으로 하였다.

가. Microsomal epoxidase

Microsomal epoxidase 活性은 aldrin을 基質로 하여 測定하였다. 試驗管에 原狀中腸 5個, 그리고 NADP 1.8 μ mol, G-6-P 18 μ mol 및 G-6-P-D 1 unit를 含有한 0.1M 磷酸나트륨 緩衝溶液(pH 7.5) 4.9ml 와 250nmol aldrin을 含有한 methyl cello-solve 0.1ml를 넣고 진탕수조(40°C)에서 5분간 反應시켰다. 反應產物인 dieldrin을 hexane으로 추출하여 GLC(Pye Unicam, Series 304) 試料로 하였다.

나. N-Demethylase

N-Demethylase 活性은 Kupfer의 方法⁹⁾에 따라 P-chloro N-methylaniline을 基質로 하여 測定하였다. 原狀中腸 10個에 4°C로 냉각된 0.1M 磷酸나트륨 緩衝溶液(pH 7.5) 10ml를 加해 磨碎機에서 30초 동안 均質화시킨 液을 酵素液으로 하였다. 酵素液 4ml, 그리고 NADP 1.8 μ mol, G-6-P 18 μ mol 및 G-6-P-D 1 unit를 含有한 緩衝溶液 0.9ml 와 3 μ mol P-chloro N-methylaniline을 含有한 methylcellosolve 0.1ml를 시험관에 넣고 20분간 진탕배양(34°C)시킨 후 6% p-demethyl-aminobenzaldehyde를 含有한 3N H₂SO₄ 용액 2ml를 加하여 反應停止시켰다. N-demethylated 產物인 p-chloroaniline은 10,000g에서 15분 원심분리한 후 파장 445nm(Sp 8-400, Pye Unicam)에서 吸光度를 測定하였다.

다. O-Demethylase

O-Demethylase 活性은 Hansen 등의 方法²⁸⁾에 따라 P-nitroanisole을 基質로 하여 測定하였다.

2) Glutathion S-transferase(GST) 活性

腸內容物이 GST의 活性에 影響을 미치는 것을 줄이기 위해 解剖用 핀셋으로 中腸을 꺼내어 길게 잘라 內容物을 除去한 洗滌中腸을 供試하였다. Aryltransferase(DCNB conjugation) 活性을 測定하기 위해서는 0.1M tris-HCl 緩衝溶液(pH 9.0)을, 그리고 Aryltransferase(CDNB conjugation) 活性을 測定하기 위해서는 0.1M tris-HCl 緩衝溶液(pH 6.5)을 각각 使用하였다. 洗滌中腸 25個를 4°C로 냉각된 上記 緩衝溶液 12.5ml에 넣어 磨碎機에서 30초간 均質화시켰다. Homogenate를 二重가제로 濾過하여 10,000g에서 15분간 遠心分離한 후 上澄液을 超高速遠心分離機(Beckman L8-

70)에서 105,000g로 60분간 遠心分離한 上澄液을 酵素液으로 하였다.

가. Aryltransferase(DCNB)

Booth 등의 方法¹⁰⁾에 準하여 DCNB를 基質로 하여 測定하였다.

나. Aryltransferase(CDNB)

Habig 등의 方法¹¹⁾에 準하여 CDNB를 基質로 하여 測定하였다.

3) Esterases 活性

가. α -NA-esterase 와 Carboxylesterase.

洗滌中腸 5個를 4°C의 0.1M 磷酸나트륨 緩衝溶液(pH 7.0) 20ml에 넣어 磨碎機에서 30초간 均質화시켜 二重가제로 濾過하여 酵素液으로 使用하였다. Van Asperen의 方法¹²⁾에 의해 3×10^{-4} M α -NA(0.4M 磷酸緩衝溶液, pH 7.0)을 基質溶液으로 使用하였다. Carboxylesterase은 eserine(10^{-4} M)과 PHMB(10^{-4} M)을 배양액에 加하여 Cholinesterase(ChE)와 arylesterase를 除去하여 測定하였다.

나. Acetylcholinesterase(AChE)

AChE 活性은 Elman 法¹³⁾에 準하여 AThch을 基質로 하여 測定하였다. 頭部 10個에 4°C의 0.1M 磷酸나트륨緩衝溶液(pH 8.0) 10ml를 加하여 磨碎機에서 1분간 均質화시킨 後 homogenate를 二重가제로 濾過하여 酵素液으로 使用하였다.

4) DDT-Dehydrochlorinase(DDT-ase) 活性

Yu 등의 方法¹⁴⁾에 의하여 DDT를 基質로 하여 測定하였다. 洗滌中腸 25個에 0.1M 磷酸나트륨緩衝溶液(pH 7.5) 12.5ml를 加해 磨碎機에서 30초 동안 均質화하였다. Homogenate를 10,000g에서 15분간 遠心分離한 後 上澄液을 105,000g에서 다시 超高速遠心分離하여 上澄液을 酵素液으로 하였다.

이상의 모든 酵素實驗은 0~4°C에서 行하였고 蛋白質정량은 Lowry 등의 方法¹⁵⁾에 의하였으며 標準品은 borine serum albumin(fraction V)을 使用하였다.

결과 및 고찰

中位致死濃度(LC₅₀) 및 準致死濃度

꿀벌에 對한 各種 殺虫劑의 LC₅₀ 經口毒性值 및 準致死濃度は Table 1과 같다. LC₅₀ 值에 의한 毒性크기 順序는 EPN, demeton S-methyl, carbaryl, malathion, permethrin, diazinon, DDT 였고 EPN

Table 1. Susceptibility of adult worker of a honeybee(*A. mellifera*) to various insecticides

Insecticide	Oral toxicity(ppm)		
	LC ₅₀	95% confidence limits of LC ₅₀	Sublethal concentration
Carbaryl	1.99	1.66~ 2.29	0.22
DDT	58.69	45.55~71.83	2.75
Diazinon	10.04	6.21~13.87	0.65
EPN	1.61	1.39~ 1.83	0.11
Malathion	4.32	4.30~ 4.34	0.85
Demeton S-methyl	1.62	1.23~ 2.01	0.25
Permethrin	4.81	4.74~ 4.88	0.085

과 DDT의 LC₅₀ 값은 1.61과 58.69ppm으로 DDT에 대한 EPN의 독성은 36.5배의 차이를 보였다. 美農務省¹⁶⁾의 벌에 대한 독성분류에서는 DDT와 demeton S-methyl은 중간, 그 외 Carbaryl, diazinon, EPN, malathion 및 permethrin은 고독성으로 분류되었다. 西洋種에서 carbaryl, malathion 및 permethrin의 LC₅₀ 값이 1.44, 4.61 및 2.28ppm으로 報告¹⁷⁾되어 있는데 이는 permethrin을 除外하고는 本實驗의 결과와 비슷한 것이다. 準致死濃度は permethrin이 0.085ppm으로 가장 낮았고 DDT가 2.75ppm으로 가장 높았다. 이러한 결과는 西洋種에서 carbaryl, malathion 및 permethrin의 準致死値가 0.17, 0.16 및 0.017ppm으로 報告¹⁸⁾된 것과 比較해 볼 때 carbaryl을 除外하고는 相當한 差異를 보여주었다. 이러한 差異는 供試벌의 試料採取過程과 자라는 環境差에 의한 活力耐性の 差에 基因된 것으로 생각된다.

酵素의 活性

가. 꿀벌 解毒酵素의 比活性

解毒酵素로 알려진 9가지 調査된 酵素活性을 Table 2에 나타내었다. AChE는 비록 解毒酵素에는 屬하지 않지만 神經系의 刺戟傳達作用에 必須的인 acetylcholine(ACh)을 加水分解하고 有機磷劑의 target enzyme 이므로 이 酵素도 危습시켜서 測定하였다.

Microsomal epoxidase 活性의 測定에서 組織均質化가 酵素活性에 미치는 影響을 없애기 위해 原狀中腸을 그대로 使用하였고 N-demethylase와 O-demethylase 活性은 原狀中腸을 均質化시켜 使用하였다. Microsomal oxidases는 酵素活性이 낮아 pmol/min/midgut으로 表示하였고 蛋白質은 mid-

Table 2. Detoxifying enzyme activities in adult worker of a honeybee(*A. mellifera*)

Detoxifying enzyme ^a	Specific activity (nmol min ⁻¹ mg protein ⁻¹) ^d
Microsomal oxidases ^b	
Epoxidase	12.88 ± 3.52
N-Demethylase	222.50 ± 19.69
O-Demethylase	32.33 ± 4.50
Glutathione S-transferases	
Aryltransferase(DCNB)	2.06 ± 0.06
Aryltransferase(CDNB)	267.67 ± 28.17
Esterases	
α-NA esterase	317.40 ± 38.41
Carboxylesterase	168.49 ± 15.85
Acetylcholinesterase ^c	239.67 ± 19.78
DDT-Dehydrochlorinase	0.133 ± 0.029

a : Midguts were used as the enzyme source
 b : pmol min⁻¹ midgut⁻¹; 0.843mg protein/midgut
 c : Heads were used as the enzyme source
 d : Mean ± SE of triplications

gut當 0.843mg 이었다. Microsomal Oxidases中 N-demethylase의 活性이 가장 높았고 epoxidase의 活性이 가장 낮았다. GST는 aryltransferase(CDNB)活性이 aryltransferase(DCNB) 活性보다 훨씬 더 높았다. Esterases는 酵素活性이 다른 酵素보다 높았고 그 活性順序는 α-NA esterase > AChE > Carboxylesterase 順이었다.

나. Microsomal oxidases 活性에 미치는 殺虫劑의 影響

1) Microsomal epoxidase

準致死濃度の 殺虫劑가 成虫일벌의 microsomal oxidase 活性에 미치는 影響은 Table 3에 表示하

Table 3. Effects of sublethal concentrations of insecticides on microsomal oxidase activities in the honeybees (*A. mellifera*)

Insecticide ^a	Specific activity(%control ^b)		
	Aldrin epoxidase	N-Demethylase	O-Demethylase
Carbaryl	87.24±11.39	152.30±11.38	109.29±11.38
DDT	97.95±21.07	101.44±10.78	115.48± 7.29
Diazinon	88.69±30.46	143.77±20.70	147.44±10.21
EPN	117.02± 8.68	142.17±12.58	133.00±24.87
Malathion	95.74± 8.69	108.63± 8.15	98.98±19.06
Demeton S-methyl	145.39±18.08	123.01±17.65	86.61± 4.37
Permethrin	145.40±21.86	127.27±20.80	123.72±11.01

a : Groups of 30 workers were fed on a sugar cake containing corresponding insecticides at the sublethal levels for 3 days prior to enzyme assays

b : Mean±SE of triplications

Table 4. Effects of sublethal concentrations of insecticides on glutathione S-transferases activities in the honeybee (*A. mellifera*)

Insecticide ^a	Specific activity(% control ^b)	
	Aryltransferase (DCNB conjugation)	Aryltransferase (CDNB conjugation)
Carbaryl	89.65± 5.55	86.83±12.34
DDT	140.45± 8.26	101.90±15.70
Diazinbn	239.64±20.24	95.13± 5.33
EPN	127.83±22.21	102.24± 5.68
Malathion	119.58± 6.75	91.33± 6.13
Demeton S-methyl	103.88±12.21	72.77±15.66
Permethrin	145.47± 2.25	88.01± 6.36

a : Groups of 30 workers were fed on a sugarcake containing corresponding insecticides at the sublethal levels for 3 days prior to enzyme assays

b : Mean±SE of triplications

였다. Microsomal epoxidase 活性은 carbaryl, diazinon, DDT, EPN, malathion 處理區에서는 별 影響이 없었고 demeton S-methyl 및 permethrin 의 準致死濃度の 殺虫劑處理가 aldrin epoxidase 의 活性을 增大시키므로써 aldrin epoxidase 의 生成을 誘導하는 結果를 보였다.

Plapp¹⁷⁾는 DDT 와 dieldrin 이 *M. domestica* 의 抵抗性種에서 NADPH. 의존 酵素活性을 增大시킨다고 하였으며 *Spodoptera frugiperda* 에서 all-elochemical 과 permethrin 處理가 microsomal oxidase 活性을 增大시킨다는 報文¹⁸⁾이 있다.

2) N-Demethylase

準致死濃度の 藥劑處理에 따른 N-demethylase 活性은 Table 3에서 보는 바와 같이 carbaryl,

diazinon 및 EPN 處理區에서 活性이 增大되었다. 昆虫의 殺虫劑에 對한 感受性은 昆虫의 行動習性, 形態, 作用點의 感受性 및 機作 등 여러가지 要因에 의해 달라질 수 있다.

Brattsten 등¹⁹⁾은 *Prodenia eridania* 에서 藥劑의 投與에 의한 酵素活性의 誘導는 주로 腸組織에 있는 microsomal oxidase 活性에 影響을 미친다고 하였고 Dauterman 등⁶⁾은 DDT, cyclodienes, phosoric acid esters 와 幼若 hormone 類似體 등이 昆虫에서 cytochrome P450 의 inducer라고 하였으며 이들 inducer 들의 量 및 成分에 따라 誘導된 cytochrome P450 의 量的인 變化는 種의 연령, 性 및 種間差異에 따라 多樣할 것으로 推定하였다.

3) O-Demethylase

準致死濃度の 藥劑處理에 따른 O-demethylase 活性은 Table 3에 表示한 바와 같이 거의 일정하였고 diazinon 處理區에서만 活性이 增大되었다. *S. frugiperda*의 中腸에서 microsomal oxidase의 inducer로서 옥수수잎이 가장 影響이 큰 것을 밝혔고 콩잎에서는 活性의 增大가 없는 것을 確認하였으며 diazinon 및 permethrin 등의 殺虫劑에 對한 *S. frugiperda* 幼虫의 耐性이 콩잎을 먹인 幼虫보다 옥수수잎을 먹인 幼虫에서 더 強한 것은 먹이에 따라 藥劑에 對한 耐性이 다르기 때문이다.²⁰⁾

다. GST 活性에 미치는 殺虫劑의 影響

1) Aryltransferase(DCNB)

準致死濃度の 農藥이 꿀벌體內的 GST 活性에 미치는 影響은 Table 4에 表示한 바와 같이 aryltransferase(DCNB conjugation) 活性을 diazinon, permethrin 및 DDT 處理區에서 모두 增大시켰다. *M. domestica*에서 parathion, DDT, dieldrin 및 carbaryl의 處理가 aryltransferase에 의한 DCNB conjugation을 1.3, 1.5, 1.4 및 1.2倍 增大시키고 특히 有機鹽素系 殺虫劑가 더 많은 誘導現象을 나타냈다고 한 報告²¹⁾와 本 實驗의 結果와는 一致되는 傾向이었다. *A. mellifera*에 대한 aryltransferase에 의한 DCNB conjugation은 permethrin과 carbaryl 處理區에서 增大되었다는 報告⁵⁾가 있으나 本實驗에서는 permethrin 處理區에서는 增大되었지만 carbaryl 處理區에서는 거의 差異가 없었다. 또한 diazinon 處理區에서는 aryltransferase에 의한 DCNB conjugation이 현저히 增大되었는데

이는 이 化合物이 GST의 合成에 關與하는 遺傳子를 活性化시키는 作用을 한다는 報告²²⁾에서와 같이 diazinon의 構造가 역제분자에 結合이 용이하기 때문에 일어난 것이 아닌가 推定된다.

2) Aryltransferase(CDNB)

準致死濃度の 殺虫劑가 꿀벌의 aryltransferase에 의한 CDNB conjugation에 미치는 影響은 Table 4에 나타낸 바와 같이 全體적으로 거의 影響이 없었으나 침투성 殺虫劑인 demeton S-methyl 處理區에서 沮害를 보였다. Glutathione(GSH)이 異物質의 分解에 重要한 役割을 하기 때문에²³⁾ GSH와 conjugation을 이루는 다른 glutathione S-epoxide transferase, glutathione S-alkenyltransferase, glutathione S-alkenyltransferase 및 glutathione S-alkyltransferase 등에 대한 影響도 同時에 檢討되어야 하리라 생각된다.

라. Esterases 活性에 미치는 殺虫劑의 影響

1) α-NA esterase

準致死濃度の 農藥이 esterases 活性에 미치는 影響은 Table 5에 나타내었다. α-NA esterase 活性은 malathion, permethrin, DDT 및 EPN 處理區에서 沮害樣相을 보였다. Kapin 등²⁴⁾은 *L. dispar*의 esterase 活性은 中腸이 全體 esterase 活性의 91.5%를 나타낸다고 했고 Maa 등²⁴⁾ *Musca domestica*의 抵抗性과 感受性 系統의 esterase 活性을 4倍差異가 있는 것을 밝혔고 esterase 活性水準이 有機磷系 및 Pyrethroid系 殺虫劑의 選擇毒性和 抵抗性發達에 重要한 因子가 된다고 하였다.

Table 5. Effects of sublethal concentrations of insecticides on esterase activities in the honeybees (*A. mellifera*)

Insecticide ^a	Specific activity(%control ^b)		
	α-NA esterase	Carboxylesterase	Acetylcholinesterase
Carbaryl	97.62 ± 6.02	129.44 ± 17.15	102.32 ± 8.07
DDT	72.32 ± 4.62	90.76 ± 21.41	99.09 ± 8.07
Diazinon	103.22 ± 12.44	132.79 ± 21.95	108.21 ± 14.47
ENP	76.26 ± 5.41	78.60 ± 13.59	108.37 ± 19.66
Malathion	74.14 ± 4.07	87.34 ± 16.75	100.77 ± 7.23
Demeton S-methyl	97.52 ± 11.64	96.01 ± 11.34	101.52 ± 10.37
Permethrin	70.47 ± 11.33	92.80 ± 17.42	131.15 ± 11.53

a : Groups of 30 workers were fed on a sugar cake containing corresponding insecticides at the sublethal levels for 3 days prior to enzyme assays

b : Mean ± SE of triplications

本實驗의 malathion 處理區에서의 沮害는 *A. mellifera* 에서 malathion 處理에 의한 沮害를 했다는 報告와 一致하는 傾向이었다.

2) Carboxylesterase

PHMB와 eserine를 사용하여 ChE와 arylesterase를 除去한 다음 準致死濃度의 農藥이 carboxylesterase 活性에 미치는 影響을 調査한 結果는 Table 5와 같다. Diazinon 處理區에서는 活性의 增大를 보였지만 다른 處理區에서는 뚜렷한 影響이 없었다. Metcalf 등²⁵⁾은 *M. domestica*, *A. mellifera* 및 *Gromphadorhina Protentosa*의 homogenate에서 esterase 分解樣相을 調査하여 aromatic esterase(ArE)가 몇몇 有機磷系 殺虫劑의 加水分解에 關與한다는 것을 밝혔고 또한 이들 種은 적어도 ChE, aliphatic esterase(AliE) 및 ArE의 세 가지를 포함하고 있다고 報告했다. *A. mellifera*의 Esterase 組成比는 arylesterase가 32%, ChE가 8%, 그리고 carboxylesterase가 60%였다.

3) AChE

準致死濃度의 農藥이 AChE 活性에 미치는 影響은 Table 5에서 보는 바와 같이 뚜렷한 影響이 없었는데 이러한 結果는 *A. mellifera*에서 AChE 活性에 미치는 殺虫劑의 影響에 對한 報告²⁾에서와 비슷한 傾向이다. 本實驗에 使用한 殺虫劑의 準致死濃度는 꿀벌의 神經系에까지 影響을 미칠 수 있는 濃度以下인 것으로 생각할 수 있겠다. ChE는 AChE와 butyrylcholine sterase(BuChE)의 2가지가 있고 大部分의 昆虫은 AChE로 構成되어

있는데²⁶⁾ 벌꿀 頭部の ChE 組成은 AChE가 90%, BuChE가 10%로 나타났다.

다. DDT-ase 活性에 미치는 殺虫劑의 影響

準致死濃度의 農藥이 꿀벌의 DDT-ase 活性에 미치는 影響을 Table 6에서 보면 carbaryl 및 permethrin 處理區에서 活性의 增大를 보였다. DDT-ase 活性의 增大는 microsomal oxidase 活性의 增大와 關係된다는 報文²⁷⁾이 있고 또한 本實驗에서도 microsomal oxidase 活性이 더 높기 때문에 藥劑에 對한 DDT-ase 活性의 差異는 藥劑處理에 의한 MFO 活性의 差異와 어느정도 相關되지 않을가 생각된다. GSH의 酵素인 DDT-ase가 GST와 同一한 物質인지의 여부에 對해서 論難이 있었지만 現在는 그들이 서로 다르다는 것이 判明되었다. Lipke 등²⁷⁾은 DDT의 DDE로의 轉換比率는 昆虫種이나 個體에 따라 多樣하며 DDT-ase는 p.p'-DDT를 p.p'-DDE와 p.p'-TDE로 分解하는데 觸媒役割을 하지만 o.p'-DDT는 分解시키지 못한다고 하였다.

殺虫劑의 準致死濃度가 成虫일벌의 解毒酵素 活性에 미치는 影響은 일정한 傾向은 없었으나 permethrin 處理區에서 GST의 aryltransferase(DCNB conjugation), microsomal oxidase의 aldrin epoxidase 및 DDT-ase에서 活性의 增大를 보였는데 이는 解毒酵素相互間의 構造的인 類似點이 없더라도 酵素活性의 增大가 함께 일어난다는 報告²⁸⁾와 같은 傾向을 보여주었으며 一般의으로 microsomal oxidase와 DDT-ase 活性은 殺虫劑의 準致死濃度에 의해서 增大되는 傾向을 보여주었다.

Table 6. Effects of sublethal concentrations of insecticides on DDT-dehydrochlorinase activity in the honeybees (*A. mellifera*)

Insecticide ^a	Specific activity(%control ^b)
Carbaryl	169.68±30.00
DDT	130.79±21.79
Diazinon	81.30±5.00
EPN	76.35±12.00
Malathion	95.44±22.91
Demeton S-methyl	120.19±10.00
Permethrin	168.68±17.32

a : Groups of 30 workers fed on a sugar cake containing corresponding insecticides at the levels for 3 days prior to enzyme assays

b : Mean±SE of triplications

초 록

西洋種 꿀벌(*Apis mellifera* L)에 對한 殺虫劑의 毒性 및 解毒能力을 調査하고 農藥限界使用量 決定에 寄與하기 위하여 7가지 代表的인 殺虫劑의 꿀벌에 對한 毒性 및 解毒酵素의 活性을 調査하였다. 酵素活性은 解毒酵素로 알려진 microsomal oxidases, glutathione S-transferases, esterases와 DDT-dehydrochlorinase를 調査했고 成虫일벌의 中腸을 使用하여 測定하였다. LC₅₀ 值의 測定結果 供試 殺虫劑中 DDT가 58ppm으로 毒性이 가장 낮았고 EPN이 1.61ppm으로 毒性이 가장 強했다. 準致死濃度의 農藥이 成虫일벌의 microsomal oxidase에 미치는 影響은 malathion 및 permethrin 處理가 aldrin epoxidase 活性을 沮害시켰고 N-

demethylase 活性은 diazinon 處理區에서 增大되었다. Ghtathione S-transferase(DCNB conjugation) 活性은 diazinon 과 permethrin 處理區에서 增大되었다. Esterase 는 malathion 및 permethrin 處理區에서 α -NA esterase 活性의 沮害를 보였고 diazinon 處理區에서 carboxylesterase 活性이 增大되었으며 AChE 活性은 거의 影響이 없었다. DDT-dehy drochlorinase 活性은 carbaryl 및 permethrin 處理區에서 增大되었다.

사 사

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원으로 수행되었으며 재단 당국에 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. 이명렬, 최승윤, 한국양봉학회지, 1(1) : 5 (1986)
2. 최승윤, 新制養蜂學, 13~16, 47~55, 集賢社, (1982)
3. Metcalf, R.L., Fukuto, T.R., Wilkinson, C.F., Fahmy, M.H., El-Aziz, S.A. and Metcalf, E.R.,: J. Agr. Food Chem. 14 : 555 (1966)
4. Atkins, E.L.,: The Hive and the Honey Bee, 633, Datant & Sons, Hamilton, Illinois (1975)
5. Yu, S.J., Robinson, F.A. and Nation, J.L.,: Pestic. Biochem. Physiol. 22 : 360(1984)
6. Dauterman, W.C. and Hodgson, E.,: Biochemistry in insects, 541, Academic Press, New York(1978)
7. Choi, S.Y. and Lee, M.L.,: Korean J. Apiculture, 1(1) : 76(1986)
8. Finney, D.J.,: Probit analysis, 19~47, Cambridge Univ. Press, England(1971)
9. Kupfer, D. and Bruggeman, L.L.,: Anal. Biochem., 17 : 502(1966)
10. Booth, J., Boyland, E. and Sims, P.,: Biochemical J., 79 : 516(1961)
11. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.

- B.,: The J. of Biol. Chem., 249(22) : 7130 (1974)
12. Van Asperen, K.,: J. Insect Physiol, 8 : 401 (1962)
13. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. Jr. and Featherstone, R.M.,: Biochem. Pharmacol., 7 : 88(1961)
14. Yu, S.J. and Terriere, L.C.,: Pestic. Biochem. Physiol., 2 : 184(1972)
15. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.,: J. of Biol. Chem., 193 : 265(1951)
16. Pesticides and Honey Bees, 1~7, United States, Department of Agriculture, Washington D.C. (1977)
17. Plapp, F.W. Jr. and Casida, J.,: J. of Econ. Entomol., 63(4) : 1091(1970)
18. Yu, S.J.,: Pestic. Biochem. Physiol., 22 : 60 (1984)
19. Brattsten, L.B. and Wilkinson, C.F.,: Pestic. Biochem. Physiol., 3 : 393(1973)
20. Yu, S.J.,: Pestic. Biochem. Physiol., 17 : 59 (1982)
21. Hayaoka, T. and Dauterman, W.C.,: Pestic. Biochem. Physiol., 17 : 113(1982)
22. Oppernoorth, F.J.,: Pestic. Biochem. Physiol., 22 : 187(1984)
23. Kapin, M.A. and Ahmad, S.,: Insect Biochem., 10 : 331(1980)
24. Maa, W.D. and Terriere, L.C.,: Comp. Biochem. Physiol., 74C(2) : 461(1983)
25. Metcalf, R.L., Maxon, M., Fukuto, T.R. and March, R.B.,: Ann. Entomol. Soc. of Amer., 49 : 274(1956)
26. Eldefrawi, A.T.,: Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, 115 ~130, Pergamon Press, New York(1985)
27. Lipke, H. and Kearns, C.W.,: The J. of Biol. Chem. 234(8) : 2129(1959)
28. Hansen, L.G. and Hodgson, E.,: Biochem. Pharmacol., 20 : 1569(1971)