

## *Salmonella*/microsomal enzyme activation system에서의 농약의 돌연변이 유발성

변 우 현, 현 형 환, 이 세 영

(한국원자력연구소·분자생물실)

### Mutagenicity of pesticides in the *Salmonella*/Microsome System

BYEON, Woo-Hyeon, Hyung Hwan HYUN, and Se Yong LEE

(Division of Molecular Biology, Korea Atomic Energy Research Institute)

#### Abstract

19 pesticides including 12 insecticides, 2 herbicides and 5 fungicides have been tested for mutagenic activity in the *Salmonella*/microsomes system. It was found that insecticides, DDVP, Trichlorfon, Sumithion, Naled, fungicide, TMTD and herbicide NIP induced base substitute mutation and herbicide MO frameshift mutation. Mutagenicity of Sumithion and NIP was appeared only after rat microsomal enzyme activation and that of TMTD was increased after the microsomal enzyme activation.

#### 서 론

여러 돌연변이 유발성 검출방법 중에서도 미생물을 이용한 방법이 다른 어느 방법보다도 짧은 기간동안 많은 시료에 대해 동시에 시행할 수 있다고 평가되고 있으며 (Committee 17 appointed by the council of the EMS, 1975) 따라서 광범한 환경오염성 물질에 대한 좋은 돌연변이 유발성 검출방법의 하나로 널리 추천되고 있다 (Bridges, 1976, De Serre, 1976, Ames 등, 1975).

Ames 등에 의해 1973년 처음 시도된 이 방법은 최근 알려진 바 처럼 "암유발물질들의 돌연변이 유발 잠재능 내포"를 근거로 암유발물질들의 일차적 검증에 널리 이용되고 있다 (Ames 등, 1975). 초기에 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph 균주만으로 돌연변이 유발원의 역 돌연변이

유발능력을 보던 이 방법은 점차 돌연변이 유발원에 대한 감수성을 높이기 위해 repair deficient mutation 및 cell wall mutation 등의 부수적인 돌연변이를 균주에 도입시켰으며 (Ames 등, 1973) 역시 감수성을 높이기 위해 plasmid인 ampicillin resistant factor를 도입시킨 균주들을 사용하게 되었다 (McCann 등, 1975).

한편 미생물에 대해서 직접적인 돌연변이 유발원이 못되는 화합물들도 포유동물의 간 microsomal enzyme들을 처리하면 돌연변이 유발성 물질로 변화될 수 있다는 사실을 Malling 등 (1971)이 보고한 바 있는데 이로써 *in vitro*에서 간접적으로나마 포유동물 생체 내에서의 대사와 유사한 과정을 재현하여 *in vivo* 실험을 직접 하지 않고도 어떤 비활성 물질이 생체내에 흡수된 뒤 활성화되어 돌연변이를 일으킬 수 있는가에

대한 가능성을 추적할 수 있게 되었다. 최근 *Salmonella typhimurium*의 histidine auxotroph를 사용하는 실험에서는 대부분이 방법을 병용하여 사용하고 있다.

본 논문은 *S. typhimurium*의 base substitute mutant인 TA 1535와 frameshift mutant인 TA 1538의 두 균주와 또 이에 각각 R factor인 pKM 101을 도입시킨 TA 100 및 TA 98의 도합 네 균주를 사용하여 국내에서 널리 사용하고 있는 농약들에 대한 돌연변이 유발성을 검토한 결과를 종합한 것이다. *Salmonella* system을 이용한 환경오염성 물질의 돌연변이 유발성 검출은 최근 수년동안 벌써 여러 실험실에서 상당한 진척이 있어서 이들을 종합한 300여종 화합물에 대한 발암성—돌연변이 유발성 관계의 논문이 Ames등에 의해 1975년 발표되어 있다. 농약에 대한 돌연변이 유발성은 Seiler(1973), Verret등(1969), Legator 등(1969) 및 Ashwood-Smith등(1972)에 의해 이미 많은 보고가 있었고 최근 Shirazu등(1976)은 166종의 농약에 대해 *Bacillus subtilis*의 H 17 Rec<sup>+</sup>와 M 45 Rec<sup>-</sup> 균주를 사용한 rec-assay와 *E.coli* 및 *S. typhimurium*의 auxotroph 균주를 사용한 reversion assay를 병행하여 광범한 돌연변이 유발성 검출

결과를 보고하고 있다. 본 실험에 사용된 농약중에는 상기의 Shirazu등의 논문에 포함된 것도 여러개 있으나 이들이 사용한 균주보다 훨씬 돌연변이 유발원에 대한 감수성이 높은 R factor plasmid를 가진 TA 100과 TA 98을 사용하였고 이들을 다시 microsomal activation system으로 처리하여 실험하였기 때문에 Shirazu등이 사용한 system에서 돌연변이 유발성이 음성으로 나타난 여러 화합물이 약한 양성 또는 비교적 강한 양성으로 나타나고 있다.

농약은 식량생산의 견지에서 인류생활과 가장 긴밀한 관계에 놓여 있을 뿐만 아니라 전 세계적으로 그 사용량이 엄청나기 때문에 이들이 갖는 고등동물에 대한 일반적 독성조차도 크게 문제시되고 있는 환경오염성 물질중의 하나이다. 더구나 이들이 유전적 독성인 돌연변이 유발성을 혹은 발암성을 갖는다면 이들의 사용에 훨씬 큰 주의를 요하게 되는 것이다.

실험에 사용된 농약은 19종이었으며 그중 돌연변이 유발성이 나타난 종류는 7종이었다.

재료 및 방법

균주 배지 및 방법에 대해서는 Ames등의

Table I. Chemical name of pesticides

Common name	Chemical name
(Insecticides)	
DDVP (dichlorvos)	Phosphoric acid 2,2-dichlorovinyl dimethyl ester.
Naled (Dibrom)	1,2-Dibromo 2,2-dichloroethyl dimethylphosphate.
Sumithion (Fenitrothione)	Phosphothioic acid O,O-dimethyl O-4-nitro m-tolyl ester.
Malathion	S-(1,2-Dicarbethoxyethyl) O,O-dimethyl dithiophosphate.
Trichlorfon (Dipterex)	O,O-Dimethyl (2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate.
BHC (Lindane)	1,2,3,4,5,6-Hexachlorocyclohexane.
Diazinon	O,O-Diethyl-O-(2-isopropyl-4-methyl-6-pyrimidinyl) phosphorothioate.
EPN	O-Ethyl-O-nitrophenyl phenyl phosphorothioate.
DDT	1,1,1-Trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl) ethane.
Baygon (Propoxur)	2-Isopropoxyphenyl N-methyl carbamate.
Omite.	2-(p-Tert-butylphenoxy) cyclohexyl propynyl sulfite.

BC-100 (Herbicides)	O-2,4-Dichlorophenyl O,O-diethyl phosphorothioate.
MO	p-Nitrophenyl 2,4,6-trichloro phenyl ether.
NIP (TOK)	2,4-Dichlorophenyl-p-nitrophenyl ether.
(Fungicides)	
TMTD	Bis (dimethylthiocarbamoyl) disulfide.
Polyoxin-D	
Vitavax	2,3-Dihydro-5-carboxanilido-6-methyl-1,4-oxathiin.
Blasticidine-S	Blasticidin-S-benzylamino benzene sulfonate.
Kasugamycin	

standard method (1975)에 의거했으며 저자 등의 1975년도 발표논문에서 상세히 기술한 바 있다(Byeon등, 1975). 단 liver enzyme induction을 위해서 지난번에 사용한 phenobarbital대신 이번에는 polychlorinatedbiphenyl complex인 Aroclor 1254를 사용했으며 기타의 S-9 fraction 제조를 위한 과정은 먼저와 동일했다.

시료 : 수집된 국내사용 시약의 종류는 표 I 과 같이 살충제 12종, 제초제 2종 및 살균제 5종의 도합 19종이었으며 국립보건원, 국립농업자재검사소, KIST 및 동방농약주

식회사로부터 제공받은 것이다.

**결과 및 고찰**

여러농도의 시료를 균과 같이 한천 배지 상에 접종하고 균체 수가 시료의 독성에 의해 감소되지 않는 최고 농도를 정한 뒤 그 농도에서의 돌연변이 유발성이 시험되었다. 약품에 따라 균에 대한 독성은 각기 큰 차이가 있었으며 이 독성검사를 거친 후 실제로 실험된 농약의 농도는 다음의 표 2와 같다.

**Table 2.** Maximum concentration of tested compounds per plate

Compd.	Amount per plate	Solvent used	Compd.	Amount per plate	Solvent used
DDVP	3 ul	DMSO	Omite	10 ul	DMSO
Naled	0.1 ul	"	BC-100	10 ul	"
Sumithion	1 ul	"	MO	5 mg	"
Malathion	10 ul	"	NIP	1 mg	"
Trichlorfon	5 mg	aceton	TMTD	50 ug	"
BHC	100 ug	DMSO	Polyoxin-D	10 mg	"
Diazinon	1 ul	"	Vitavax	1 mg	"
EPN	250 ug	"	Blasticidin-S	200 ug	H <sub>2</sub> O
DDT	5 mg	"	Kasugamycin	200 ug	"
Baygon	1 mg	"			

이들을 사용한 실험에서 각 균주에 대한 농약의 돌연변이 유발성은 다음 표 3의 7종이 양성 및 의양성으로 나타났다.

이 중에서 Naled는 독성이 매우 강한 반면 대조구에 비해 revertant의 증가비가 현저하지 못했기 때문에 돌연변이 유발물질로 확실하게 단정 할 수는 없었지만 미약하게나

마 dose에 대한 response를 나타내고 있는 물질이며 NIP의 경우에는 TA 100에서 비교적 강한 response가 있었기 때문에 TA 98에서의 약한 돌연변이 유발가능성은 더 이상 추구되지 않았다.

그림 1은 돌연변이를 나타낸 화합물들의 화학구조식이다.

Table 3. Mutagenicity of pesticides on TA1535, TA1538, TA100 and TA98 with and without microsomal enzyme activation

Compd.	Strain		TA 1535		TA 100		TA 1538		TA 98	
	s-9	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TMTD			+ <sup>c</sup>	+	+++ <sup>a</sup>	+++ <sup>b</sup>	-	-	-	-
NIP			-	-	++	-	-	-	±	±
MO			-	-	-	-	-	-	+	+
Thichlorfon			-	-	+	+	-	-	-	-
DDVP			+	+	+++	+++	-	-	-	-
Sumithion			-	-	++	-	-	-	-	-
Naled			± <sup>d</sup>	±	±	±	-	-	-	-

<sup>a</sup>+++ , strongly mutagenic; <sup>b</sup>++ , moderately mutagenic; <sup>c</sup>+ , weakly mutagenic; <sup>d</sup>± , ambiguous. Strongly, moderately and weakly mutagenic means formation of 500 to 300, 300 to 100 and 100 to 0 colonies per plate, respectively, after spontaneous revertants were subtracted.

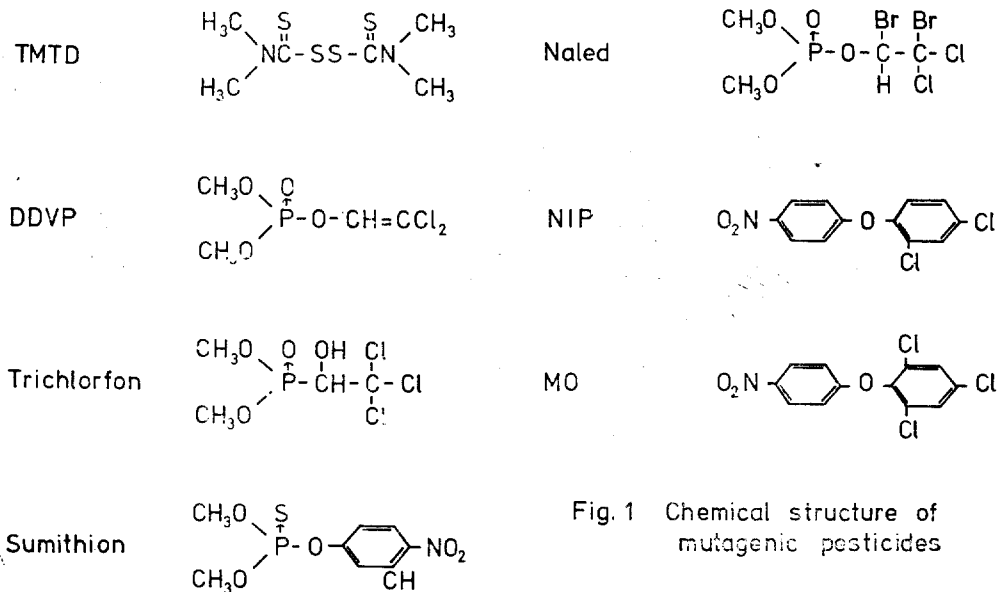


Fig. 1 Chemical structure of mutagenic pesticides

돌연변이 유발능이 일단 확인된 이들 농약에 대해서는 4가지 균주들 중에서 가장 감수성이 높은 균주를 골라 dose response 를 보았다. 표 3의 결과에서 처럼 TMTD, Naled, Trichlorfon 및 DDVP는 TA 100 으로 activation system없이, NIP와 Sumithion은 TA 100으로 activation system을 도입해서만 또 MO는 activation system없이 TA 98에서 각각 돌연변이 유발성이 가

장 높았기 때문에 이 조건으로 dose response 를 보았다. 각 농도에 따른 농약들의 revertant 유발정도는 다음 표 4, 5, 6, 7, 8, 9, 및 10에 나타난 수와 같다(숫자들은 각 실험구에서 spontaneous revertant수를 제외한 숫자들이다).

표4의 TMTD의 경우 microsomal enzyme activation system을 적용시키면 최고의 돌연변이 유발능이 30µg/plate에서 나타났었

**Table 4.** Does response of TMTD on TA100 with and without microsomal enzyme activation (number of revertant per plate)

Amount/ plate	10ug	20ug	30ug	40ug	50ug
Compd.					
TMTD(s-9 +)	178	238	413	203	179
(s-9 -)	72	86	97	113	72

**Table 5.** Dose response of DDVP on TA100 without microsomal enzyme activation (number of revertant per plate)

Amount/ plate	0.6ul	1.2ul	1.8ul	2.4ul	3.0ul
Compd					
DDVP	173	262	334	316	335

**Table 6.** Dose response of Trichlorfon on TA 100 without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate)

Amount/ plate	1mg	2mg	3mg	4mg	5mg
Compd.					
Trichlorfon	28	17	104	124	173

**Table 7.** Dose response of Sumithion on TA 100 with microsomal enzyme activation (number of revertant per plate)

Amount/ plate	0.2ul	0.4ul	0.6ul	0.8ul	1.0ul
Compd.					
Sumithion (s-9 +)	137	224	243	283	231

**Table 8.** Dose response of Naled on TA 100 without microsomal enzyme activation (number of revertant per plate)

Amount/ plate	0.02ul	0.04ul	0.06ul	0.08ul	0.1ul
Compd.					
Naled	17	40	38	44	75

**Table 9.** Dose response of NIP on TA 100 with microsomal enzyme activation (number of revertant per plate)

Amount/ plate	0.2mg	0.4mg	0.6mg	0.8mg	1mg
Compd.					
NIP(s-9 +)	119	172	159	207	210

**Table 10.** Dose response of MO on TA 98 without microsomal enzyme activation (number of revertant per plate)

Amount/ plate	1mg	2mg	3mg	4mg	5mg
Compd.					
MO	18	26	41	31	46

고 이를 적용시키지 않았을 경우에는 경향성은 비슷했으나 활성화 시켰을 때에 비해 약간 낮은 수치를 보여주고 있었다. Shirazu 등의 보고에서 TMTD는 *Bacillus*의 rec-assay로는 양성이나 같은 논문내에서 *Salmonella typhimuium* TA1535 series를 사용한 실험결과로는 음성으로 보고되어 있다.

DDVP에 대해서는 이미 여러 system에서 많은 보고가 있어왔으며 (Ashwood-Smith 등, 1972; Dyer 등, 1973; Voogd 등, 1972) 돌연변이 유발성이 있다는 점에 대해 대개 긍정하고 있는 편이다.

Trichlorfon의 경우는 표 6에서 처럼 비교적 높은 dose에 따라 완만한 증가를 보여주고 있다.

Sumithion은 activation된 경우에만 비교적 강한 돌연변이 유발성을 나타냈는데 0.8  $\mu$ l/plate 정도에서 최고치를 보여주고 있다. 이 살충제에 대해서는 1973년 Bens 등이 발표한 바로는 80ppm까지 rat에 투여하여도 dominant lethal mutation 빈도에 전혀 증가를 가져오지 않았을 뿐 아니라 역시 같은 농도에서 골수세포의 cytological analysis에서도 별다른 변화를 초래하지 않았다고 보고한 점은 본 실험의 결과와 꼭 흥미있는 대비라고 생각된다. 이는 이 화합물의 고등동물 대사산물이 미생물에는 돌연변이 유발성을 갖지만 고등동물 자체에는 영향을 주지 않는다고 해석할 수도 있다.

Naled는 국내에서 dibrom으로 알려진 살충제로서 *Salmonella* system에 대해 매우 특성이 강했으며 이에 비해 돌연변이 유발성은 비교적 낮은 것으로 나타난 화합물이다. 이런 경우는 특성의 증가가 돌연변이 유발성의 증가를 능가해서 나타난 결과로 보아지지만 어쨌든 TA100의 배지당 평균

spontaneous revertant수인 90—120에 비해 그 증가비가 너무 작아서 돌연변이 유발 물질로 확정할 수는 없었다.

돌연변이 유발성이 enzyme activation을 요구하는 NIP는 국내 제조제로서 사용량이 적은 TOK로서 0.8mg/plate정도에서 최고치를 나타내고 있다.

역시 같은 제조제인 MO는 frameshift mutant인 TA98에 mutation을 일으키는 화합물로서 그 투여량에 비해 돌연변이 유발성은 꽤 낮았으나 뚜렷한 dose response를 보여주고 있다. 구조상 NIP와 매우 유사함에도 불구하고 activation에 의해 base substitute mutation을 일으키는 NIP와는 달리 MO는 activation system없이 frame-

shift mutation을 일으키는 점은 꽤 흥미로운 사실이라 생각된다.

이상은 농약에 대한 1차적 검출결과 얻어진 자료이며 앞으로 TMTD의 enzyme activation에 따른 독성감소와 mutagenicity 증가문제, NIP의 frameshift mutation 유발문제 등의 과제에 대해서는 앞으로 추구되어질 문제이며 추후 발표될 것이다.

유전적 독성은 일반적인 특성처럼 그 유발원과의 접촉을 끊음으로써 쉽사리 회복되는 것이 아니고 미약한 돌연변이 원에 의해서 유발된 돌연변이가 조차도 축적되어 있다. 가 어느 시기에 여러 불치의 병으로 나타나기 때문에 이들이 갖는 돌연변이 유발성이 약하다고 간과해서는 안된다고 믿는다.

## 적 요

국내 사용 농약 19종에 대해 *Salmonella typhimurium* / microsomal enzyme system을 이용하여 돌연변이 유발성을 검토하였다. Fungicide로 쓰이는 TMTD와 살충제 Sumithin 및 살충제 NIP는 rat microsomal enzyme activation에 의해 base substitute type의 돌연변이 유발성을 나타냈고 살충제 DDVP, Naled 및 Trichlorfon은 직접적으로 TA100에 대해 돌연변이 유발성이 있었으며 제조제 MO는 직접적으로 frameshift type의 돌연변이를 각각 나타냈다.

## 사 의

본 연구수행에 사용된 경비중의 일부는 국제원자력기구(IAEA)의 보조 (contract number: RC/1637-KOR)에 의한 것이다.

## 인 용 문 헌

- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee, 1973. Carcinogens are Mutagens; A simple test system combining liver homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 8, 2281-2285.
- Ames, B. N., F. D. Lee, and W. E. Durston, 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 782-786.
- Ames, B. N., J. McCann, and E. Yamasaki, 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31, 347-364.
- Ashwood-Smith, M. J., J. Trevino, and R. Ring, 1972. Mutagenicity of dichlorvos. *Nature* 240, 418-420.
- Bens, V., R. J. Sram, and R. Tuscany, 1973. Testing of mutagenicity of Fenitrothione. *Mutation Res.* 21, 23-24.
- Bridges, B. A., 1976. Short term screening tests for carcinogens. *Nature* 261, 195-200.
- 변우현, 백상기, 이세영, 1975. Phenylendiamine과 그 유도체들의 돌연변이 유발성(제1보). *한국미생물학회지* 13, 51-58.
- Committee 17 appointed by the Council of the Environmental Mutagen Society, 1975. Environmental Mutagenic Harzards. *Science* 187, 503-514

9. De Serres, F. J., 1976. Prospects for a revolution in the methods of Toxicological evaluation. *Mutation Res.* **38**, 165-176.
10. Dyer, K. F., and P. J. Hanna, 1973. Comparative mutagenic activity and toxicity of triethylphosphate and dichlorvos in bacteria and *Drosophila*. *Mutation Res.* **21** 175-117.
11. Legator, M. S., F. J. Kelly, S. Green, and E. J. Oswald, 1969. Mutagenic effect of captan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **160**, 344-351.
12. Malling, M.V., 1971. Dimethylnitrosoamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. *Mutation Res.* **13**, 425-429.
13. McCann, J., E. Choi, E. Yamasaki, and B. N. Ames, 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 5135-5139.
14. McCann, J., N. E. Springarn, J. Kabori, and B. N. Ames, 1975. The detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with R factor plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 979-983.
15. Seiler, J. P., 1973. A survey on the mutagenicity of various pesticides. *Experientia* **29**, 622-623.
16. Shirazu, Y., M. Moriya, K. Kato, A. Furuhashi, and T. Kada, 1976. Mutagenicity screening of pesticides in the microbial system. *Mutation Res.* **40**, 19-30.
17. Verret, M. J., M. K. Mutchler, W. E. Scott, E. F. Reonardo, and J. McLaughlix, 1969. Teratogenic effects of captan and related compounds in the developing chicken embryo. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **160**, 334-340.
18. Voogd, C. E., J. J. J. A. A. Jacobs, and J. J. van der Stel, 1972. On the mutagenic action of dichlorvos. *Mutation Res.* **16**, 413-416.