

果菜類 栽培에 使用되는 殘留性 農藥의
突然變異 誘發性에 關한 研究

高 容 九

濟州道 保健環境研究所

**Mutagenicity of residual pesticides using
to cultivate the fruits and vegetables
in the *Salmonella typhimurium***

Yong-Gu, Ko

*Cheju Provincial Institute of Health
and Environment*

Abstract

Twelve residual pesticides which is applied mainly on the fruits and vegetables cultivation were tested for mutagenic activity using *Salmonella typhimurium*. The results were as follows.

1) The pesticides tested - Thalonil, Monopho, Tedion, Danoton, Ometon, Prosing, EPN, Phentoate, Parathion, Sappiran and Captan-, except Dicofol, showed mutagenic activity. Especially, the pesticides which activated with S-9 mixture gave strong mutagenic activity.

2) With *Salmonella typhimurium* TA100, the pesticides Monopho, Parathion and Sappiran showed mutagenic activity at 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$; Ometon, 0.01 $\mu\text{l}/\text{plate}$; Thalonil, 0.20 $\mu\text{g}/\text{plate}$; Prosing, 0.20 $\mu\text{l}/\text{plate}$; Tedion, Danoton and Phentoate, 1.0 $\mu\text{l}/\text{plate}$; and Captan, 1.0 $\mu\text{g}/\text{plate}$.

3) With *Salmonella typhimurium* TA98, the pesticide Sappiran showed mutagenic activity at 0.02 $\mu\text{g}/\text{plate}$; Thaloniil, 0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$; EPN, 0.05 $\mu\text{l}/\text{plate}$; Phentoate, 0.10 $\mu\text{l}/\text{plate}$; Danoton, 0.50 $\mu\text{l}/\text{plate}$; Prosing, 0.50 $\mu\text{g}/\text{plate}$; and Tedion and Monopho, 1.0 $\mu\text{l}/\text{plate}$.

4) With *Salmonella typhimurium* TA1535, The pesticides Captan and Danoton showed mutagenic activity at 0.10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ and 0.20 $\mu\text{g}/\text{plate}$, respectively.

5) With *Salmonella typhimurium* TA1538, The pestides Phentoate showed mutagenic activity at 0.05 $\mu\text{l}/\text{plate}$; Monopho, 0.10 $\mu\text{l}/\text{plate}$; Thaloniil, 0.20 $\mu\text{g}/\text{plate}$; and Tedion and EPN, 1.0 $\mu\text{l}/\text{plate}$.

6) The pesticides which commonly showed high mutagenic activity were Thaloniil, Phentoate, Parathion and Sappiran. The pesticides Ometon and EPN showed mutagenic activity at only TA100 and TA98, respectively.

I. 緒 論

최근急速한 産業의 發達로 急性 및 慢性 毒性의 原因이 되는 有害有毒한 物質들이 우리 人間이 接觸 機會가 많아지고 있다. 이러한 環境性 化學物質에 의한 deoxyribonucleic acid(DNA)의 損傷은 癌과 遺傳의 出産缺陷(genetic birth defects)의 主原因이 되고 있으며, 心臟病, 老化, 白內障 및 進行性 出産缺陷(developmental birth defects)의 原因이 될 수 있다. (Ames, 1979).

現代 文明生活의 向上과 더불어 우리 周邊 環境은 점점 化學物質들로 채워져 가고 있다. 즉, 衣食住 生活의 便利를 圖謀하기 위한 많은 生活用品들이 化學的으로 合成開發되고 있으며, 이때 材料로 利用되거나 또는 製造過程에서 새로이 生成되는 化學物質들이 여러 經路를 통하여 人體로 流入되고 있다. 이러한 化學物質들 중에는 突然變異를 誘導하는 變異原이 많음이 알려지고 있다. 그러므로 人間은 強力한 變異效果를 지닌 化學物質에 露出될 可能性이 漸次 增加하고 있

다고 할 수 있다.(Committee 17 appointed by the Council of EMS, 1975; Ames, 1983). 變異原에 대한 露出은 우리들의 飲食物에 있는 天然化學物質(Clark, 1976)에서, 農業用 殺蟲劑, 除草劑, 染色劑, 化粧品 및 醫藥品 같은 合成化學物質(Shirasu et al., 1976; Seiler, 1973; Harris, 1971), 그리고 담배煙氣(Kier et al., 1974) 및 물과 大氣에 있는 汚染物質과 같은 複合化合物(Ames, 1979)에서 뿐만 아니라 심지어는 食品의 調理, 加工中에도 生成되고 있다고 하였다.(Commoner et al., 1978; Pariza, 1972; Sugimura, 1985).

이러한 環境性 化學物質 중에서도 農藥은 食糧生産의 見地에서 人類生活과 密接한 關係를 갖고 있을 뿐만 아니라 全世界의 으로 그 使用量이 엄청나기 때문에 人間露出機會가 상당히 높다 할 수 있다(Legator et al., 1969; Shirasu, 1976; 邊 등 1976).

農藥撒布는 環境汚染을 招來하여 直·間接的으로 食品을 汚染시킬 機會가 많아지고 있는데 病蟲害 防止를 위해 撒布된 農藥은

그 일부가 農作物에 吸收蓄積되었다가 飮食物을 통하여 人體로 流入되어 慢性毒性에 의한 健康障害를 直接일으키기도 한다. 그런데, 殘留農藥은 公害要因으로서, 食品의 殘留農藥에 의한 被害可能性을 科學적으로 把握하기 위해서는 食品攝取 總量調査를 實施하여 이를 人體에 許容되는 1日 攝取量과 比較되어 貯야 하는데, 우리나라에서는 아직 이러한 意圖下에서 研究가 이루어지고 있지 못한 實情이다.(鄭, 1982). 따라서 環境汚染을 惹起시켜 社會的 問題로 크게 擡頭되고 있다. 더우기 農作物 病害蟲의 耐性獲得과 並行하여 農藥撒布量이 增加하기 때문에 農作物의 殘留農藥量이 增加가 危險水準에 달하고 있는 實情이다.

農作物에 의한 主所得原을 柑橘에 依存하고 있는 濟州道에서는 '86年 現在 農藥使用量이 1,508 톤으로 그 前年度인 '85年度에 비해 11%의 增加率을 나타내고 있으며(濟州道, 1987), 每年 增加幅은 커질 것으로 보인다. 果菜類에 殘留農藥 含量은 Table 1,2와 같다. 최근 그 使用量이 增加一路에 있는 農藥은 下川이나 海洋으로도 많은 量이 흘러들어가 水, 海洋을 汚染시키고 그 중에서도 殘留性農藥은 水中生物의 먹이連鎖를 거치며, 生體濃縮되고, 이들 水産物을 食品으로 攝取하는 人間의 體內에 蓄積되어 여러 形態의 慢性毒性을 일으키고 있다.(Lee와 Lee, 1984). 그 중에서도 注目해야 할 事實은 이들 農藥中에는 癌이나 突然變異誘發能이 있음이 알려져 지고 있다.(Ames, 1979).

遺傳物質의 本體는 染色體에 存在하는 核酸인 DNA이며, DNA의 遺傳情報가 混亂을 일으켜 遺傳因子에 遺傳的 變化를 일으키는

境遇를 突然變異라 하며, 이것의 分類方法은 여러가지이지만, 일반적으로 다음과 같이 分類한다. 즉, 單一因자의 變化와 染色體의 構造나 數의 變化로 大別하는데, 因子突然變異(gene mutation) 또는 點突然變異(point mutation)라 하고, 後者를 染色體突然變異(chromosomal mutation), 染色體異常(chromosomal aberration), 또는 染色體變化(chromosomal change)라 하며 잘 알려진 染色體의 變化들이 여기에 속한다.(Stent et al., 1978).

여러 突然變異誘發性檢定 중에서도 微生物을 利用한 方法은 다른 어떤 方法보다도 짧은 期間동안에 많은 試料에 대해 동시에 施行할 수 있으며(Committee 17 appointed the council of EMS 1975), 따라서

Table 1. The contents of pesticide residues in fruits and Vegetables (ppm)

Pesticide	Corps	
	Cirtus	Apple
Thalonil	1.905(1.0)	0.189(1.0)
EPN	0.025(0.1)	0.034(0.1)
Phantoate	0.028(0.2)	0.008(0.2)
Parathion	0.063(0.3)	ND* (0.3)
Monopho	0.221(0.2)	NA**
Tedion	0.203(2.0)	NA
Danoton	0.133(1.0)	NA
Ometon	0.253(2.0)	NA
Prosting	0.212(2.0)	NA
Dicofol	0.078(1.0)	0.097(1.0)
Sappiran	0.049(0.8)	0.026(0.8)
Captan	0.060(5.0)	0.238(5.0)

* ND, Not detected; ** NA, Not analysed; (), Tolerance. Erom Kim et al.(1985); Baik et al(1985); Kwon et al.(1985); Lee & Lee(1984).

廣範圍한 環境汚染性物質 즉, 突然變異誘發物質에 대한 效果的인 突然變異檢定方法의 하나로 널리 利用되고 있다.(Ames 등, 1975 ; Bridges, 1976 ; Maron & Ames, 1983). Ames 등 (1973)에 의해 처음 試圖된 이 방법은 癌誘發物質의 “突然變異誘發潛在能內包”를 根據로 癌誘發物質의 一次的 檢證에 널리 利用되어지고 있다.(Ames et al., 1975).

初期에는 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph 菌株만으로 突然變異誘發源의 抗突然變異誘發能을 檢定하였으나 突然變異誘發源에 대한 感受性を 높이기 위해 보수결여성突然變異 (repair deficient mutation) 및 세포벽突然變異 (cell wall mutation) 등의 附隨的 突然變異를 菌株에 導入시켰으며 현재는 感受

性を 높이기 위해 plasmid인 ampicillin 저항인자를 導入시킨 菌株를 使用하기에 이르렀다 (McCann et al., 1975a,b). 또한 微生物에 哺乳動物의 肝 microsome 효소 (liver micromosomal enzyme)를 處理하면 微生物에 대해 直接的인 突然變異誘發物質이 되지 못하는 化合物들도 突然變異誘發物質로 傳換될 수 있으므로 쥐간에서 추출된 효소복합체인 S-9을 導入하기에 이르렀다 (Ames et al., 1973 ; Garner et al., 1972 ; Slater 등, 1971 ; Malling, 1971). 이로써 *in vitro*에서 間接的으로나마, *in vivo*實驗을 哺乳動物의 生體內에서의 代謝와 類似한 條件으로, 어떤 非活性 物質이 生體內에 吸收된 후 活性化되어 突然變異를 일으킬 수 있는지에 대한 可能性 與否를 追跡할 수 있게 되었다 (Ames et al., 1975)

Table 2. The contents of pesticide residues in fruits and vegetables

Corps	Pesticide		
	EPN	PAP	Parathion
Cucumber	0.012(0.1)*	0.024(0.1)	0.028(0.7)
Unripe red peper	0.033(0)	0.006(0)	ND**(0.7)
Carrot	0.005(0.1)	0.006(0)	0.042(0.7)
Onion	0.007(0.1)	0.004(0)	ND (0.7)
Radish Korean	0.005(0)	0.010(0.1)	ND (0.7)
Cabbage Korean	0.007(0.1)	0.010(0.2)	ND (0.7)
Spinach	0.029(0)	(0)	ND (0.7)
Tomato	ND (0.2)	0.007(0.2)	ND (0.3)
Peach	0.298(0.1)	0.012(0.2)	0.063(0.3)
Pear	0.006(0.1)	0.025(0.1)	0.036(0.5)
Crape	0.007(0.1)	0.063(0.1)	0.015(0.5)

* (), Tolerance; ** ND, Not detected.

From Rhn et al.(1985); Baik et al.(1985); Kwon et al.(1984); Kwon et al.(1983); Kim et al.(1985).

또한 Ames와 McCann(1981)은 癌誘發性과 突然變異誘發性간의 相關關係는 約 83%라는 評價를 내렸는데, 이러한 높은 比率은 단적으로 化學物質들의 突然變異誘發性이 癌誘發性과 直結됨을 알 수 있다(Maron & Ames, 1983).

Salmonella system을 利用한 環境性汚染物質의 突然變異誘發性檢定方法은 수 年동안에 걸쳐 여러 研究者들에 의하여 開發되어 왔는데, Ames 등(1975)이 이를 綜合하여 300여種의 化學物質에 대한 發癌性, 즉 突然變異誘發성에 대하여 報告한 바 있으며, 그 이후에 이 方法을 더욱 改良 發展시켜 여러 化合物質의 突然變異能을 檢定 報告하였다.(Ames et al., 1975; Livin et al.; 1982). 또한 많은 研究者들에 의하여 이 方法이 優秀性を 認定받고 있으며, 이 方法이 活用되고 있다(Morita et al., 1979; Inoue et al., 1981; Byean et al., 1976; 柳 등, 1986).

農藥에 대한 突然變異誘發성에 대해서 여러 研究者들에 의해 報告되어져 있으며 (Seiler, 1973; Verret et al., 1969; Legator et al., 1969; Legator et al., 1975; Ashword-Smooth et al., 1972), 또한 Shirasu 등(1976)은 166種의 農藥에 대해 *Bacillus subtilis*의 H17 rec⁺와 M45 rec⁻ 菌株를 使用한 rec-assay와 *E. coli* 및 *Sal. typhimurium*의 auxotroph를 使用한 reversion assay를 並行하여 廣範圍한 突然變異誘發性檢定結果를 報告하고 있다.

本 論文은 *Salmonella typhimurium*의 鹽基置換性 突然變異體(base substitute mutant)인 TA1535와 構造移動性 突然變

異體(frameshift mutant)인 TA1538의 두 菌株와 이에 各各 약품저항인자인 R-factor pKM 101을 導入시킨 TA100 및 TA98 등 모두 네 菌株를 使用하여 強力한 突然變異原인 N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, 2-acetylaminofluorene과 ornidazole 및 果菜類에 널리 利用되고 있는 農藥들에 대한 突然變異誘發性 檢定을 實施하였다.

國內의 突然變異誘發성에 대한 研究로는 邊 등(1958)의 phenylenediamine과 그 誘導體들의 突然變異 誘發性, 邊과 李(1970)의 pKM 101과 *uvr B* deletion 効果 등이 있으며, 農藥에 대한 報告는 邊 등(1976)의 *Salmonella* microsomal 효소계에서의 農藥의 突然變異誘發성에 대한 報告가 있을 뿐이며 國內에서의 突然變異誘發性檢定에 대한 研究가 微弱한 實情이고, 더구나 果菜類 栽培時 使用되는 農藥에 대한 報告나, 특히 濟州地域에서 生産되는 溫洲密柑, 金柑, 小유자, 레몬등에 撒布되는 農藥들의 癌이나 突然變異誘發성에 關한 檢討는 아직 찾아볼 수 없다.

本 實驗에서는 밀감, 사과, 배, 복숭아, 포도 등 果實類와 토마토, 무우, 오이, 배추 등에 利用되는 農藥中, 年中 撒布量이 많아서 殘留할 可能性이 높은 12種을 選定하고, *Salmonella* System을 利用하여 이들의 突然變異能을 究明하여 癌 및 突然變異原의 한 惡性 疾患의 豫防策을 모색하는데 基礎資料를 얻고자 試圖하였다.

II. 材料 및 方法

1. 試 料

實驗에 使用한 農藥과 그의 化學名은

Table 3 과 같으며 農村振興廳 濟州試驗場 으로부터 提供받아 검관에 殘留하는 殘留量 및 허용기준에 따라 두 군으로 나누고 Table 4 와 같이 plate 당 各各을 다섯가지 濃度로 희석 使用하였다.

2. 菌 株

美國 캘리포니아大學 Dr. Ames 로 부터 提供받은 *Salmonella typhimurium* LT-2 의 histidine auxotroph는 다음의 4 가지 種類이다.

(1) TA 1535 ; 이 菌株는 *Salmonella typhimurium* LT-2 의 histidine auxo-

Table 4. The group of classification and amounts of pesticides per plate

Group	Pesticide	Amount per plate
1	Thalonil (μg)	0.05, 0.20, 0.20, 0.50, 1.0
	Monophht (μl)	
	Tedion (μl)	
	Danoton (μl)	
	Ometon (μl)	
	Prosing (μg)	
2	EPN (μl)	0.01, 0.02, 0.05, 0.50, 1.0
	Phentoate (μg)	
	Parathion (μg)	
	Dicofol (μg)	
	Sappiran (μg)	
	Captan (μg)	

* Amount of pesticides per plate was followed in residues and tolerance level.

* Dilute with dimethyl sulfoxide (DMSO).

Table 3. Chemical name of pesticides

Common name	Chemical name
Thalonil	Tetrachloroisophthalonitrile
EPN	O-Ethyl-O-(4-nitrophenyl)Phenyl phosphonothioate
PAP	O,O-Dimethyl-S-(-ethoxycarbonylbenzy)-phosphorodithioate
Parathion	O,O-Diethyl-O-4-nitrophenyl phosphothioate
Monopho	O,O-Diethyl-O-(2-methylcarbamoyl-1-methylphospate
Tedion	4-Chlorophenyl-2,4,5, trichorophenyl sulfonate
Danoton	2-(1-Methyl-2-propyl)-4,6-dinitrophenyl isopropyl carbanate
Ometon	Dimethyl-S-(N-methylcarbamoylmethyl)phosphorothate
Prosing	Cyano(3-phenoxyphenyl) methyl-4-phosphore-(1-methyl-ethyl)benzeneacetate
Sappiran	4-Chlorophenyl-4-Chlorobenzene sulfonate
Dicofol	2,2,2-Tricloro-1,1-bis-(4-chlorophenyl)-ethanol
Captan	N-Trichloromethylthio-1,2,3,6-tetrahydrophalimide

troph 중 base substitute 突然變異 菌株인 his G46을 母菌으로하여 試藥에 대한 透過性을 높이기 위해 膜의 構成成分인 lipopolysaccharide가 缺如된 deep rough(*rfa*)와 repair system인 *uvrB* deletion을 導入시킨 菌株이다.

(2) TA1538 ; 이 菌株은 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph 중 구조이동성 突然變異 菌株인 his D3052를 母菌으로 해서 TA1535와 같은 附隨 突然變異를 導入시킨 菌株이다.

(3) TA100;TA1535에 plasmid인 pKM 101을 導入시킨 菌株이다.

(4) TA98 ; TA1538에 plasmid인 pKM 101을 導入한 菌株이다.

使用된 菌株들의 遺傳子型은 Table 5와 같다.

3. 菌株의 同定 및 分離

Ames 교수로부터 分讓받은 菌株은 단일 colony를 分離後 各 遺傳形質의 確認을 위

해서 다음과 같이 實驗하였다.

(1) Histidine 과 biotin 要求性 Histidine과 biotin 要求性은 Fig. 1과 같이 同定하였다.

(2) Deep rough(*rfa*)

Deep rough(*rfa*)型은 Fig.2와 같이 同定한다.

(3) *uvrB*

*uvrB*는 Fig.3과 같이 同定하였다.

(4) R-factor

R-factor는 Fig.4와 같이 同定하였다.

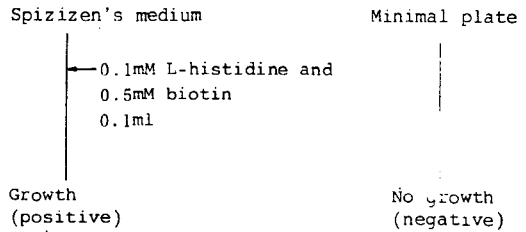


Fig 1. Histidine and biotin requirement test procedures of strains

Table 5. Genotype of the TA strains used for mutagenesis testing

Introduced R-factor	Additional mutation in		Histidine mutation in strain	
	LPS	Repair	HisG 46	HisD 3052
pKM 101	LPS	Repair	HisG 46	HisD 3052
-	+	+	hisG46	hisD3052
-	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	TA 1535	TA 1538
+	<i>rfa</i>	Δ <i>uvrB</i>	TA 100	TA 98

Abbreviation: LPS, Lipopolysaccharide.

All strains were originally derivated from *Salmonella typhimurium* LT-2. Wildtype genes are indicated by +. The deletion (Δ) through *uvrB* also includes the nitrite reductase and biotion(*bio*)gene. The *rfa* mutation eliminate the polysaccharide side chine of the LPS that coats the bacterial surface.

From Ames et al.(1973)

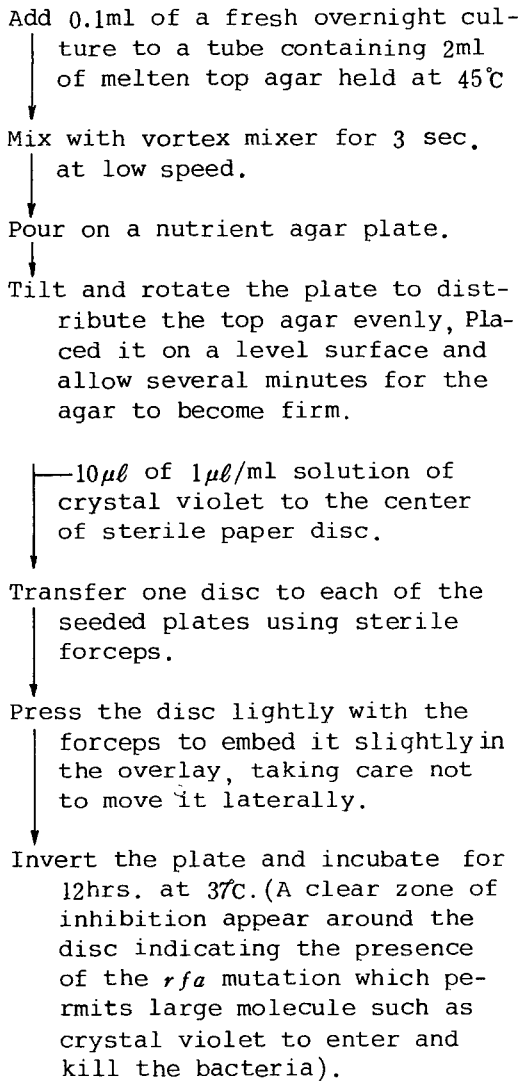


Fig 2. *rfa* Mutation test procedure of strains.

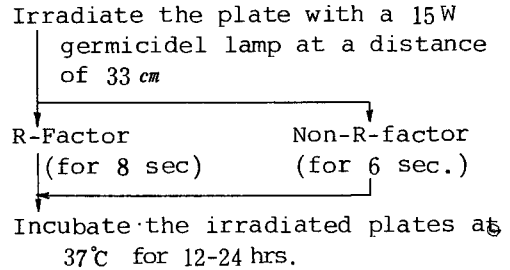
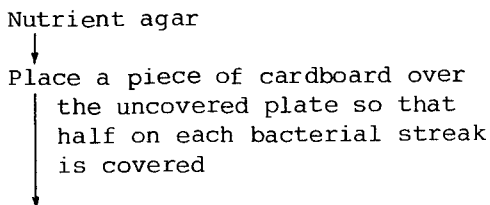
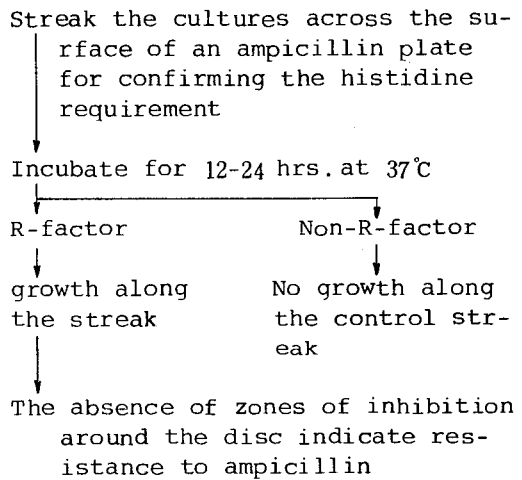


Fig 3. uvr mutation test procedures of strains



Ffg.4. R-factor test procedures of strains

4. 使用培地 및 S-9 Mixture의 調製

(1) 培地 調製

本 檢定에 使用된 培地는 Maron 과 Ames (1983)의 方法에 따라 다음과 같이 調製하였다.

(2) S-9 Mixture 調製

國立保健院에서 1987年2月 分讓받은 rat 를 사육하면서 평균 체중 200g 내외의 male rat를 選擇하여 도살 5日前 500 mg/kg의 Phenobarbital을 1回 복강내 주사하여 Fig.5,6과 같이 調製하였다.

 Recipes for stock solution and medium

1. Vogel-Bonner Medium E(50x)

Use: Minimal agar

Ingredient	Per plate
Warm distilled H ₂ O(45°C)	670ml
Magnesium sulfate(MgSO ₄ ·7H ₂)	10g
Citric acid monohydrate	100g
Potassium phosphate, dibasic(anhydrous)(K ₂ HPO ₄)	500g
Sodium ammonium phosphate(NaH ₂ PO ₄ ·7H ₂ O)	175g

2. 0.5mM histidine/biotin solution

Use: Mutagenicity assay(add 10ml to 100ml of top agar)

Ingredient	Per 250ml
D-Biotin(F.W.247.3)	30.9mg
L-Histidine.HCl(F.W.191.7)	24.0mg
Distilled H ₂ O	250ml

3. Top agar

Use: Mutagenicity assay

Ingredient	Per liter
Agar	6g
Sodium chloride(NaCl)	5g
Distilled H ₂ O	1000ml

4. Minimal glucose plates

Use: Mutagenicity assay

Ingredient	Per liter
Agar	15g
Distilled H ₂ O	930ml
50X VB salts	20ml
40 % Glucose	50ml

5. Nutrient agar plates

Use: 1. Tests for genotypes

(1) crystal violet sensitivity(*rfa*)(2) UV sensitivity(*uvrB*)

2. Tests for viability of bacteria

Ingredient	Per liter
Difco bacto nutrient broth	8g
NaCl	5g
Agar	15g
Distilled H ₂ O	1000ml

6. Crystal violet solution(0.1%)

Use: Tests for crystal violet sensitivity(to confirm *rfa* mutation)

Ingredient	Per liter
Crystal violet	0.1g
Distilled H ₂ O	100ml

7. Histidine/biotin plates

Use: Master plates for non-R-factor strains

Tests for histidine requirements

Ingredient	Per liter
Agar	15g
Distilled H ₂ O	914ml
50X VB salts	20ml
40% Glucose	50ml
Sterile histidine.HCl.H ₂ O (2g per 400ml H ₂ O)	10ml
Sterile 0.5 mM biotin	6ml

8. 1M Glucose-6-phosphate

Use: S-9 mix for mutagenicity assay

Ingredient	Per 10ml
Glucose-6-phosphate(G-6-P)	2.82g
Sterile distilled H ₂ O	10ml

9. S-9 Mix(Rat liver microsomal enzymes + cofactors)

Use: Mutagenicity assay

Ingredient	Per 50ml	
	Standard	High
Rat liver S-9(phenobarbital-induced)	2.0 ml (4%)	5.0ml (10%)
MgCl ₂ -KCl salts	1.0 ml	5.0 ml
1M Glucose-6-phosphate	0.25ml	0.25ml
0.1M NADP	2.0 ml	2.0 ml
0.2M phosphate buffer, pH 7.4	25.0 ml	25.0 ml
Sterile distilled H ₂ O	19.75ml	16.75ml

10. Ampicillin solution(8mg/ml)

Use:Tests of ampicillin resistance

Master plates for R-factor strains

Ingredient	Per liter
Ampicillin trihydrate	0.8g
Sodium hydroxide(0.02N)	100ml

11. Salt solution(1.65M KCl+0.4M MgCl₂)

Use:S-9 mix for mutagenicity assay)

Ingredient	Per 500ml
Potassium chloride(KCl)	61.5g
Magnesium chloride(MgCl ₂ ·6H ₂ O)	40.7g
to final volume of 500ml	

12. 0.2M Sodium phosphate bufer, pH7.4

Use:S-9 mix for mutagenicity assay.

Ingredient	Per 500ml
0.2M sodium dihydrogen phosphate(NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O) (13.8g/500ml)	60ml
0.2M disodium hydrogen phosphate(Na ₂ HPO ₄) (14.2g/500ml)	440ml

13. 1M NADP solution(Nicotine Adenine Dinucleotide Phosphate)

Use:S-9 mix for mutagenicity assay

Ingredient	Per 5ml
NADP(F.W.765.4)	383mg
Sterile distilled H ₂ O	5ml

Kill the animal by cervical dislocation
↓
Place it on its back on an autopsy board
↓
Secure the feet with pins
↓
Swab the skin using sterile pointed scissors or scalpel
↓
Fold back the skin flaps and pin them to the autopsy board to avoid getting fur into the

abdominal cavity
↓
Swab the muscle layer with ethanol
↓
Cut through this layer with a fresh pair of sterile scissors or scapel, taking care not to cut into the esophagus or intestines as the will result in contamination of the liver homogenate
↓
Excise the livers

Fig 5. Removal procedures of liver from rats.

Prepare stock solution of 0.1M NADP and 1M glucose-6-Phosphate with steile water in sterile tube(store at - 20°C)

↓

Autoclave the stock salt solution (0.4M MgCl₂, 1.65 M KCl) and phosphate buffer(0.2M, pH7.4)

↓

store in the refrigerator

↓

Freshly prepare S-9 mix each day

↓

Keep on ice several hours before use

Fig.6. Preparation procedures of S-9 mix

Table 6. Chemical name of standard mutagens, and solvents used

Common Name	Chemical Name	solvent
MNNG	N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine	H ₂ O
AAF	2-Acetylaminofluorence	DMSO*
ornidazole	α -Chloromethyl-2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol	DMSO

* DMSO, Dimethyl sulfoxide

5. 突然變異 誘發性 檢定方法

突然變異 誘發性 檢定은 Ames 등 (1975)의 方法에 따라 TA 1535, TA1538, TA98 및 TA100의 네 種類의 菌株를 使用하여 Fig. 7과 같은 方法으로 시행하였고 Table 6에 나타난 化合物을 positive control로 使用하였다.

Add histidine and biotin to the top agar

↓

Distribute 2ml of top agar into capped culture tubes held at 45°C in a heating block

← 0.1ml of the tester strains

← 0.1ml or less of the tester chemical

← 0.5ml of S-9

↓

Mix the test compound by vortexing the soft agar 3 sec. at the assay

↓

Pour onto a minimal glucose agar plate

↓

Quickly tilt and rotate the uncovered plate

↓

Within an hour the should be inverted and placed in a dark, vented, 37°C incubator

↓

After 48 hr., count the revertant colonies on the control plate and on the test plates

Fig 7. The mutagenicity test procedure

III. 結果 및 考察

1. 標準化合物의 突然變異 誘發性

MNNG, Ornidazole 및 AAF는 強力한 發癌物質 (즉, 突然變異原)로 알려져 있으며 이들 化合物은 突然變異 誘發性 檢定の 指標化合物로 널리 利用되고 있다.

(Ames et al., 1973 b; Byeon, et al; 1976 a, b; McCann et al.; 1975a, b; Byeon & Lee, 1979; Yu et al., 1986; McGregor, 1978). 이들 化合物들은 이들의 濃度 變化와 S-9 添加 여부에 따라 菌株에 내

한 感應性이 다르기 때문에 이들 化合物의 濃度와 S-9 添加여부에 따라 感應度를 檢討하기 위하여 實驗하였는데, 그 結果는 Fig.8,9 및 10 과 같다.

MNNG는 TA 100 과 TA1535에 대해 높은 活性度를 보였고, 더우기 S-9을 添加한 경우에 더 큰 感應度를 보였다. 이는 MNNG가 鹽基置換性 突然變異原이며 TA100 과 TA 1535에 높은 活性를 보인점은 McCann 등 (1976b)의 報告와 일치 하였다. MNNG 濃度에 따른 感應度는 S-9이 添加되지 않았을 경우 MNNG 濃度 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$

에서 TA100은 revertant colony 의 수가 116으로 가장 높은 感應度를 나타내었고 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서는 84였다 (Fig.8) 그 이하의 濃度에서는 64~80 정도였다. 이는 Yu 등 (1984)의 報告에서 MNNG 10 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 添加시 TA100에서 4,000개의 revertant colony, 2 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 18,701이라는 報告보다는 매우 낮은 값이었다. 또한 TA1535에서도 Ames 등 (1973), Byeon 과 Lee (1979)의 實驗結果보다 낮은 感應度를 보였다. 構造移動性菌株인 TA98과 TA1538에서는 突然變異 誘發活性을 나타내지 않았

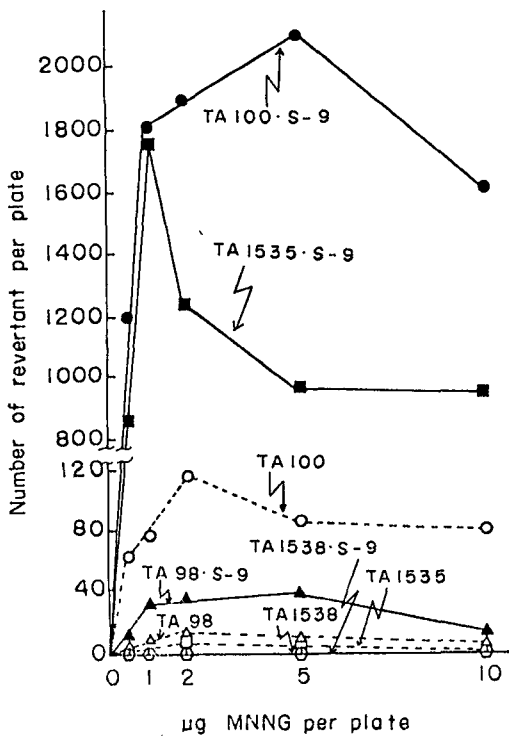


Fig 8. Dose-response of MNNG on TA strains with and without microsomal enzyme activation.

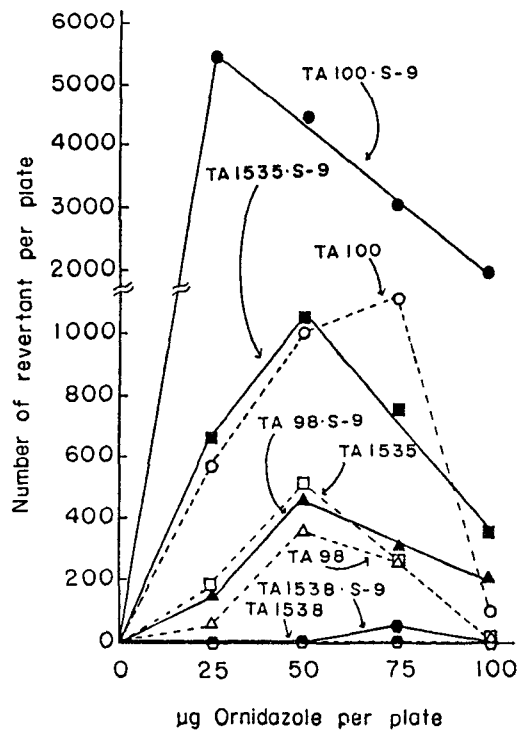


Fig 9. Dose-response of Ornidazole on TA strains with and without microsomal enzyme activation.

데, 이는 McCann 등 (1975) 과 Yu 등 (1984) 의 報告와 잘 일치 하였다.

Oridazole도 역시 TA100 과 TA1535 에 서 活性을 나타내는 鹽基置換性 突然變異原 이다 (Byeon et al., 1976 b). 本 實驗에 서는 S-9 을 添加했을 경우 TA100 과 TA 1535 에 서 높은 活性을 보였으며 構造移動 性變異原菌株인 TA98 과 TA1538 에서는 感 應도가 거의 없거나 매우 낮았다. 이는邊 등 (1976 b)의 結果와 대체로 일치하는 경향을 보였다.(Fig. 9) 그러나 S-9 을 添加한 경

우 이들의 結果에서는 無添加시와 비슷한 경향을 보였는데 반하여, 本 實驗에서는 매우 높은 感應도를 보이는 結果를 얻었다.

AAF는 構造移動性 突然變異原으로 TA98 과 TA1538 에서 예민한 感應을 보이는 菌株 이다.(Ames et al., 1973 a ; McGregor, 1978). 本 實驗에서는 S-9 을 添加하지 않았을 경우, TA 100 이나 TA 1535에서는 거 의 活性을 나타내지 않았으나, TA98 에서는 380 의 revertant를 보였으며 S-9 添加 시에는 TA1535 를 제외한 모든 菌株에 대해 높은 感應도를 보였다 (Fig. 10). 즉, S-9 을 添加할 경우 TA98 과 TA100 에서는 75 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 添加시 각각 6,500 과 2,700으로 나타났고 TA 1538 은 50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 添加 시 가장 높은 값으로 1,500 개의 revertant colony를 나타내었다 (Fig. 10).

이러한 結果는 Ames 등 (1973 b) 이나 McCann 등 (1975b)의 結果와 일치하는 경 우도 있으나 TA100 과 TA1538 에서 感應을 나타낸다는 면에서는 다른 結果를 보이고 있다.

2. 果菜類 食品中の 農藥의 突然變異 誘發性

① Thaloni1: S-9 을 添加하지 않았을 경 우 TA100 에서는 0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 添加시 가 장 높았고 (524), TA1535 에서는 같은 濃度에 서 48 이었다. 그러나 S-9 을 添加했을경 우에는 TA98, TA100 및 TA1538 에서는 각 각 1,237(0.05 μg), 710(0.2 μg) 및 1,233 (0.2 μg)으로 높았으나 TA 1538 에서는 S-9 을 添加하지 않을 경우보다 낮은 感應도를 보였다. (Table 7). 이와같은 結果로 보아

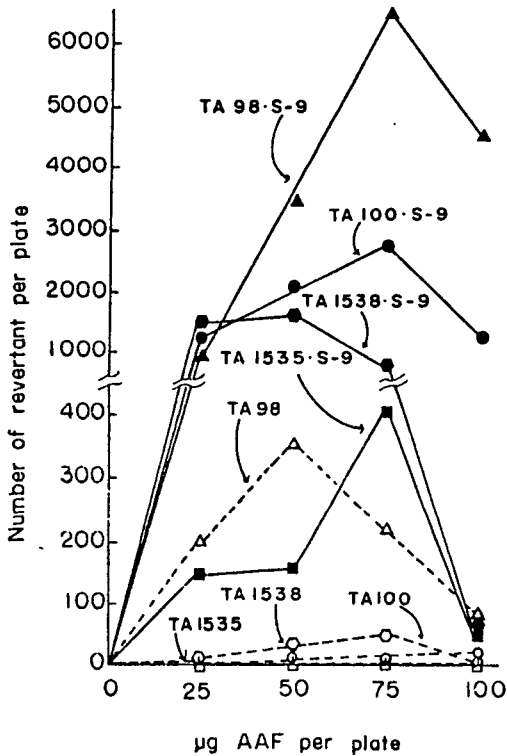


Fig 10. Dose-response of AAF on TA strains with and without microsomal enzyme activation.

Thalonil 은 비교적 높은 突然變異能을 지니고 있으며 鹽基置換能보다는 構造移動能이 강하다고 생각된다.

② Monopho: S-9을 添加하지 않았을 경우, TA1535에서 plate당 0.2 μl 添加시 90, 1.0 μl 添加시 34로 나타낸 반면, S-9을 添加했을 경우, TA98, TA100 및 TA1538에서 각각 1,737(1.0 μl), 1,260(0.05 μl) 및 1,783(0.1 μl)으로 높게 나타났으나 TA1538에서는 전혀 感應을 보이지 않았다.(Table 8)

이상의 結果에서 Manopho는 염기치환능을 지닌 변이원으로 판단되며, 생체肝 추출물로 活性化시켰을 때는 構造移動 變異能을 지닌다고 생각된다.

③ Tedion: S-9을 添加하지 않을 경우 TA98, TA100, TA1535, TA1538의 네 菌株에

서 각각 49(0.2 $\mu\text{l}/\text{plate}$), 31(0.2 μl), 295(1.0 μl) 및 66(0.1 μl)으로 비교적 낮은 感應을 보인 반면, S-9을 添加했을 경우, TA98과 TA100에서 각각 2,000(0.5 μl), 9,900(1.0 μl)으로 상당히 높았으나 TA1535와 TA1538에서는 비교적 낮았다 (Table 9). 이상의 結果에서 Tedion은 S-9으로 活性化시켰을 때 Plasmid pKM101을 導入한 菌株에서 높은 變異能을 갖는다고 판단된다.

④ Danoton: S-9 非添加시, TA100과 TA1535에서 각각 436(0.5 $\mu\text{l}/\text{plate}$)과 148(0.2 μl)로 나타났으나 이외의 濃度에서는 거의 感應度를 보이지 않았다. 반면 S-9 添加시 TA100에서 plate당 0.5 μl 의 化合物에 대해 2,000, 100 μl 에서 4,910으로 나타났으나 其他 菌株에서는 感應이 없거나

Table 7. Dose-response of Thalonil on TV strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate.)

Amount plate	S-9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.05 μg	+	1,237	53	261	0
	-	0	0	241	18
0.10 μg	+	1,017	883	560	23
	-	134	0	292	20
0.20 μg	+	897	1,233	710	15
	-	111	0	306	38
0.50 μg	+	653	0	610	0
	-	19	0	524	48
1.0 μg	+	117	0	361	0
	-	7	0	39	11

Spontaneous revertants were subtracted.

Table 8. Dose-response of Monopho on TA strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate)

Amount/ plate	S-9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.05 μ l	+	687	523	1,260	0
	-	0	0	36	21
0.10 μ l	+	737	1,783	560	0
	-	0	0	163	22
0.20 μ l	+	1,077	733	411	0
	-	0	9	536	34
0.50 μ l	+	1,187	586	311	0
	-	0	11	562	90
1.0 μ l	+	1,737	481	210	0
	-	0	32	5	9

Spontaneous revertants were subtracted

Table 9. Dose-response of Tedion on TA strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate).

Amount/ plate	S-9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.50 μ g	+	677	0	610	0
	-	0	32	0	7
0.10 μ g	+	1,493	7	710	0
	-	17	66	0	7
0.20 μ g	+	1,800	23	910	7
	-	49	0	31	20
0.50 μ g	+	2,000	41	4,900	18
	-	38	0	26	22
1.0 μ g	+	4,937	483	9,900	12
	-	0	0	0	259

Spontaneous revertants were subtracted.

낮았다.(Table 10) 따라서 Danoton은 S-9으로 활성화시켰을 때 plasmid pKM101을導入한 菌株에서 높은 變異能을 갖는 것으로 판단된다.

⑤ Ometon : S-9을 添加하지 않을 경우, TA100에서 거의 感應을 보이지 않은 반면, S-9을 添加했을 경우, TA 100에서 490 ($1.0 \mu\text{l}/\text{plate}$)으로 가장 높은 活性을 보였고, TA98에서는 $0.5 \mu\text{l}$ (128)에서 活性을 보였으나 기타의 菌株에서 아주 낮은 活性을 나타냈다(Table 11). 따라서 Ometon은 염기치환능을 지니는 변이원으로 판단되며 S-9으로 활성화되었을 경우 매우 강한 變異能을 지님을 알 수 있다.

⑥ Prosing : S-9을 添加하지 않을 경우 plate 당 $0.10 \mu\text{g}$ (109)에서 活性을 보였으나 기타의 菌株에서는 낮은 活性을 보였다.

반면, S-9을 添加할 경우, TA98과 TA 10에서 각각 $0.5 \mu\text{g}$ (670), $0.2 \mu\text{g}$ (283), 添加시 活性을 보였으나, TA1535와 TA1538에서는 活性이 거의 없었다(Table 12). 따라서 Prosing은 전반적으로 變異能 있음을 알 수 있었다.

⑦ EPN: S-9을 添加하지 않을 경우 모든 菌株에서 活性이 거의 없었다. 생체간효소혼합물인 S-9을 添加하여 活性化시켰을 때 TA98에서만 感應性을 나타내었다.

(Table 13) 따라서 EPN은 變異能이 미약하다고 판단되나 구조이동성변이원으로서 재검토가 要한다고 생각된다.

⑧ Phentoate : S-9을 添加하지 않았을 경우에는 TA100을 제외한 모든 菌株에서 活性을 나타내지 않았다. S-9으로 活性化시켰을 때는, TA98, TA1538 및 TA100

Table 10. Dose-response of Danoton on TA strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate).

Amount/ plate	S-9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.05 μg	+	1,437	0	261	0
	-	0	1	0	1
0.10 μg	+	1,500	14	410	0
	-	0	0	0	27
0.20 μg	+	1,700	0	500	0
	-	0	7	0	148
0.50 μg	+	2,000	0	900	0
	-	0	6	436	12
1.0 μg	+	1,230	0	4,910	42
	-	0	0	0	4

Spontaneous revertants were subtracted.

Table 11. Dose-response of Ometon on TA strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate).

Amount/ plate	S - 9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.05 $\mu\ell$	+	5	0	1,023	33
	-	0	0	36	34
0.10 $\mu\ell$	+	91	31	4,890	16
	-	0	1	59	36
0.20 $\mu\ell$	+	112	38	1,910	14
	-	0	3	78	16
0.50 $\mu\ell$	+	128	25	1,660	8
	-	0	13	103	10
1.0 $\mu\ell$	+	77	21	490	0
	-	0	0	47	7

Spontaneous revertants were subtracted.

Table 12. Dose-response of Prosing on TA strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate).

Amount/ plate	S - 9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.05 μg	+	7	0	63	0
	-	0	1	18	13
0.10 μg	+	10	31	118	0
	-	1	0	109	35
0.20 μg	+	424	38	283	11
	-	0	0	107	15
0.50 μg	+	670	25	180	17
	-	0	0	102	15
1.0 μg	+	20	21	131	32
	-	0	0	63	28

Spontaneous revertants were subtracted.

Table 13. Dose-response of EPN on TA strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate).

Amount/ plate	S - 9	Strain			
		TA 95	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.01 μ l	+	168	0	12	4
	-	0	0	0	3
0.02 μ l	+	423	49	30	22
	-	0	0	0	4
0.05 μ l	+	440	69	32	20
	-	0	0	0	18
0.10 μ l	+	90	99	0	19
	-	0	0	0	5
0.1 μ l	+	83	180	12	11
	-	0	0	0	1

Spontaneous revertants were subtracted.

Table 14. Dose-response of Phentoate on TA strains with ant without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate).

Amount/ plate	S - 9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.01 μ l	+	16	7	56	31
	-	0	0	0	0
0.02 μ l	+	175	122	82	27
	-	0	0	5	1
0.05 μ l	+	199	142	90	25
	-	0	0	26	0
0.10 μ l	+	540	137	150	15
	-	0	0	32	8
1.0 μ l	+	210	100	494	6
	-	0	0	152	97

Spontaneous revertants were subtracted.

에서 다소 活性을 보였으나 (Table 14), 突然變異誘發能은 다른 農藥에 비하여 대체로 낮은 것으로 판단된다.

⑨ Parathion : S-9을 添加하지 않았을 경우 모든 菌株에서 活性을 나타내지 않았으나 S-9을 添加했을 경우, TA98에서 만 높은 活性을 보였는데 (0.01 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 820, 0.50 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 910), 이로써 다소 구조이동성 變異能을 갖는다고 생각된다. (Table 15).

⑩ Dicofol : S-9으로 活性化시켰을 경우 경미한 感應性 (0.05 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 添加시 126)을 보였을 뿐 Table 16에서 보는바와 같이 全試驗區의 모든 菌株에서 53개 이하의 격세유전돌연변이체가 나타났다 (Table 16). 이로써 Dicofol은 1 $\mu\text{g}/\text{plate}$ 이하의 濃度에서는 突然變異能이 없는 것으로 판

단된다.

⑪ Sappiran : S-9을 添加하지 않았을 경우, 모든 菌株에서 活性을 보이지 않았으나, S-9을 添加했을 경우, TA98에서는 꽤 높은 活性을 보였고, TA100에는 보다 낮은 活性을 나타내었다 (Table 17). 이로써 Sappiran은 염기치환성 변이능보다 구조이동성 변이능이 강한 것으로 판단된다.

⑫ Captan : TA100과 TA1535에서 突然變異能 보였으며 이 農藥濃度의 增加에 따라 感應度가 상승하는 경향을 보였다. 반면 TA98과 TA1538에서는 거의 感應性이 보이지 않았다 (Table 18).

이로써 本 農藥은 염기치환능을 지닌다고 생각되며 McCann 등 (1975b)의 結果와 잘 일치하였다.

Table 15. Dose-response of Parathion on TA strains with and without microsomal enzyme activation (number of revertant per plate).

Amount/ plate	S-9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.01 μg	+	820	0	4	0
	-	0	0	2	9
0.02 μg	+	290	0	130	23
	-	0	0	5	10
0.05 μg	+	910	0	145	24
	-	0	0	16	10
0.10 μg	+	0	0	22	27
	-	0	0	52	12
0.1 μg	+	0	0	7	80
	-	0	0	13	22

Spontaneous revertants wear subtracted.

Table 16. Dose-response of Dicofol on TA strains with and without microsomal enzyme activation (number of revertant per plate).

Amount/ plate	S - 9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.01 μg	+	7	49	4	24
	-	0	0	2	0
0.02 μg	+	19	0	22	17
	-	0	0	5	0
0.05 μg	+	10	0	26	14
	-	0	0	16	0
0.10 μg	+	12	0	53	13
	-	0	0	52	0
1.0 μg	+	6	0	5	12
	-		0	13	0

Spontaneous revertants were subtracted.

Table 17. Dose-response of Sappiran on TA strain with and without microsomal enzyme activation (number of revertant per plate).

Amount/ plate	S - 9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.01 μg	+	890	10	52	20
	-	0	0	81	8
0.02 μg	+	1,210	15	195	21
	-	0	0	87	10
0.05 μg	+	840	48	295	18
	-	0	0	94	17
0.10 μg	+	790	0	118	15
	-	0	0	94	39
1.0 μg	+	9	0	24	19
	-	0	10	96	6

Spontaneous revertants were subtracted.

Table 18. Dose-response of Captan on TA strains with and without microsomal enzyme activation(number of revertant per plate).

Amount/ plate	S-9	Strain			
		TA 98	TA 1538	TA 100	TA 1535
0.01 μg	+	2	0	4	2
	-	0	0	52	0
0.02 μg	+	11	0	250	6
	-	0	0	61	0
0.05 μg	+	22	16	490	7
	-	0	2	202	148
0.10 μg	+	21	34	540	17
	-	8	8	0	180
1.0 μg	+	86	0	2,700	168
	-	0	9	0	0

Spontaneous revertants were subtracted.

要 約

Salmonella typhimurium 을 이용하는 Ames 방법(1973)에 따라 果菜類 재배에 많이 사용되는 12종의 농약에 대하여 突然變異 誘發성을 檢定한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1) 殘留性 農藥 12種에 대한 突然變異 誘發성은 Dicofol을 제외한 11種의 農藥에서 나타났다. 특히 쥐간 혼합추출물(S-9 mixture)로 活性化시켰을 때 강한 突然變異 誘發성을 보였다.

2) 突然變異 誘發성은 다음과 같이 分類할 수 있었다.

① 本 實驗의 試料인 12種의 農藥의 突然變異 誘發성은 *Salmonella typhimurium* TA

100에서 EPN과 Dicofol을 제외한 10種의 農藥에서 感應성을 나타내었으며 특히 S-9 mixture로 活性化시켰을 경우에는 강한 感應성을 보였다. 各 農藥의 가장 높은 感應성을 나타낸 農藥別 濃度を 보면, Thalonil은 0.2 μg /plate(710), Monopho는 0.05 μl /plate(1,260), Tedion은 1.0 μl /plate(9,900), Danoton은 1.0 μl /plate(4,910), Ometon은 0.10 μl /plate(4,980), prosing은 0.20 μg /plate(283), Phentoate는 1.0 μg /plate(494), Parathion은 0.05 μl /plate(145), Sappiran은 0.05 μg /plate(295) 및 Captan은 1.0 μg /plate(2,700)이었다.

② *Salmonella typhimurium* TA98에서 는 Dicofol과 Captan을 제외한 10種의

農藥에서 感應性を 보였다. 各 農藥의 가장 높은 感應性を 나타낸 農藥別 濃度を 보면, Thaloniil 은 $0.05\mu\text{g}/\text{plate}(1,237)$, Monopho는 $1.0\mu\text{g}/\text{plate}(1,737)$, Tedion 은 $1.0\mu\text{l}/\text{plate}(4,937)$ Danoton 은 $0.5\mu\text{l}/\text{plate}(2,000)$, Ometon 은 $0.10\mu\text{l}/\text{plate}(112)$, Prosing 은 $0.50\mu\text{g}/\text{plate}(670)$, EPN 은 $0.05\mu\text{l}/\text{plate}(440)$, Phentoate 는 $0.01\mu\text{g}/\text{plate}(540)$, Parathion 은 $0.05\mu\text{g}/\text{plate}(910)$ 및 Sappiran 은 $0.02\mu\text{g}/\text{plate}(1,210)$ 이었다.

③ *Salmonella typhimurium* TA 1535 TA1538 에서는 TA100 과 TA98 에 비하여 대체적으로 낮은 感應性を 나타내었는데, TA 1535 에서는 Canoton이 $0.2\mu\text{l}/\text{plate}(148)$, Tedion이 $1.0\mu\text{l}/\text{plate}(295)$ 및 Captan이 $0.1\mu\text{g}/\text{plate}(170)$ 이었고, TA 1538 에서는 Thaloniil $0.2\mu\text{g}/\text{plate}(1,233)$, Monopho가 $0.1\mu\text{l}/\text{plate}(1,783)$, Tedion이 $1.0\mu\text{l}/\text{plate}(483)$, EPN이 $1.0\mu\text{l}/\text{plate}(180)$ 및 Phentoate 가 $0.05\mu\text{g}/\text{plate}(142)$ 이었다.

3) *Salmonella typhimurium* TA100 과 TA98 에서 共通적으로 높은 感應性を 보이는 農藥은 Thaloniil, Monopho, Tedion, Danoton, Prosing, Phentoate, Parathion 및 Sappiran 이었다. Ometon 은 TA100, EPN 은 TA98 에서만 活性을 보였다.

4) Dicofol 을 제외한 11 種의 農藥이 果皮를 食用하는 果實類 및 채소류에 사용하는 것은 食品衛生上 問題가 있다고 판단되며 앞으로 이에 대하여는 더욱 研究檢討 되어야 한다고 생각된다.

參 考 文 獻

1. Ames, B.N., 1979. Identifying environmental chemical causing mutations and cancer. Science, 204 (11):587-593.
2. Ames, B.N., 1983. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Science, 221:1256-1264.
3. Ames, B.N., W.E. Durston, E. Yamasaki & F.D. Lee, 1973a. Carcinogens are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for detection Proc. Natl. Acad. Sci., 70(8):2281-2285.
4. Ames, B.N., W.E. Lee & W.E. Durston, 1973b. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci., 70(3):782-786.
5. Ames, B.N., & J. McCann, 1981. Validation of the *Salmonella* test: A reply to Rinkus and Legator. Cancer Res., 41:4192-4196.
6. Ames, B.N., J. McCann & E. Yamasaki, 1975. Methods for detecting and mutagens and carcinogens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutation Res., 31:347-364.
7. Ashwood-Smoth, M.J., J. Trevino & R. Ring, 1972. Mutagenicity of dichlorvos, Nature, 240:418-420.
8. Back, D.W., W.C. Kwon, K.H. Shin, O. H

- Kim, Y.J., Kim, Y.S., Sho, K.S., Park, D. H., Seong, S.C., Seo, K.Y., Cha, J.R., Lim, K.T., Sho, H.C., Jin & K.S. Jeong, 1985. Monitoring program of food contaminants. Report of NIH Korea, 22: 407-441.
9. Bjelke, E., 1985. Dietary vitamin A and human lung cancer. *Int. Cancer*, 15:561-565.
10. Bridges, B.A., 1976. Short-term Screening tests for carcinogens. *Nature*, 261:195-200.
11. Byeon, W.H., H.H. Hyun & S.Y. Lee, 1976a. Mutagenicity of pesticides in the *Salmonella*/microsome system. *Kor. J. Microbiol.*, 14:128-134.
12. Byeon, W.H., H.H. Hyun & S.Y. Lee, 1976b. Mutagenicity of nitrofurans, nitroimidazole and nitrothiazole derivatives on *Salmonella*/microsome system. *Kor. J. Microbiol.*, 14: 151-158.
13. Byeon, W.H. & S.Y. Lee, 1979. Effects of plasmid pKM101 and *uvr* B deletion on chemical mutagenesis and toxicity in *Salmonella typhimurium*. *Kor. J. Genetice*, 1:28-43.
14. Byeon, W.H., S.G. Paik & S.Y. Lee, 1975. Mutagenicity of phenylendiamines and their derivatives(I), *Kor. J. Microbiol.*, 13:51-58.
15. Cambien, P., Ducimetiere & J. Richard, 1980. Total serum cholesterol and cancer mortality in a middle-aged population. *Am. J. Epidemiol.*, 112:389-391.
16. Chi, Y.T. & S.Y. Lee, 1981. Mutagenicity of domestic animal medicines in the *Salmonella typhimurium* system. *Environmental Mutagens and Carcinogens*, 1:30-38.
17. Clark, A.M., 1976. Naturally occurring mutagens. *Mutation Res.*, 32:361-374.
18. Clark, A.M., 1976. Naturally occurring mutagens. *Mutation Res.*, 32: 361-374.
19. Committee appointed by the Environmental Mutagen Society, 1975. Environmental mutagenic hazards. *Science*, 187:503-514.
20. Commoner, B., A.J. Vithayathil, P. Dolara, P. Madyastha & G.C. Cuca, 1978. Formation of mutagens in beef extract during cooking. *Science*, 201:913-916.
21. Garner, R.C., E.C. Miller & J.A. Miller, 1972. Liver microsomal metabolism of Aflatoxin B to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA 1530. *Cancer Res* 32:2058-2066.
22. Graham, S. M. Tiffany, W. R. Jr. Beall & W. F. Gutknecht, 1979. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds towards C1300 neuroblastoma cells *in vitro*. *Mol. Phar-*

- macl., 14:644-650.
23. Harris, M., 1971. Mutagenicity of chemical and dsugs. *Science*, 171:51-52.
 24. Hirayama, T., 1979. The eidermiology of gastric cancer in Japan: C. J. Pfeiffer Witzstrock, New Yosk: 60-82.
 25. Inoue, T., K. Morita & T. Kada, 1981. Purification and properties of a plant desmutagenic factor for the mutagenic principle of tryptopham pyrolysate. *Agric. Biol. Chem.*, 45(2):345-353.
 26. 鄭東孝 編, 1982. 食品의 毒性. 6. 우리나라 食品中の 殘留農藥. 現代科學新書 121:158-163.
 27. 濟州道, 1987. 영농화학 물질과 오염 방지대책.
 28. Kier, L. D., E. Yamasaki & B. N. Ames, 1974. Detection of mutagenic activity in cigarette smoke condensates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71(1):1459-4139.
 29. 김영구, 이병무, 권혁모, 정인명, 1985. 농약의 안전사용에 관한 연구. *농약연*, 13:64-68.
 30. Kwon, W. G., K. H. Shin, J. H. Kim, O. H. Kim, Y. J. Kim, D. H. Seong, Y. S. Sho, K. J. Cho, K. S. Park & C. Song, 1983. Monitoring program of NIH Korea, 20:269-297.
 31. Kwon, W. C., K. H. Shin, J. H. Kim, O. H. Kim, D. H. Seong, Y. H. Sho, K. S. Park, S. C. Seo, K. Y. Cha, J. R. Lim, K. T. Sho, J. H. Park, H. C. Jin & I. M. Cheng, 1984. Monitoring program on food contaminants. Report of NIH Korea, 21:428.
 32. 이해근, 이영득, 1984. 농약의 잔류성에 관한 연구. *농약원*, 17:71-74.
 33. Legator, M. S., T. H. Connor & M. Stockel, 1975. Detection of mutagenic activity of metronidazole in body fluid of human and mice. *Science*, 192:1118-1119.
 34. Legator, M. S., F. J. Kelly, S. Green & E. J. Oswald, 1969. Mutagenic effects of Captan. *Ann. Sci.*, 160:344-351.
 35. Livin, D. E., M. Hollstein, M. F. Cristman, E. A. Schwierts & B. N. Ames, 1982. Anew *Salmonella* tester strain(TA102) with A-T base pair at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79:7445-7449.
 36. Malling, M. V., 1971. Dimethylnitrosamine: Formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsome. *Mutation Res.*, 13:425-429.
 37. Maron, D. M. & B. N. Ames, 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113:173-215.
 38. Maugh II, T. H., 1978. Chemicals: How many are there? *Science*, 199:162.
 39. McCann, J. B. Choi. E. Yamasaki &

- B.N. Ames, 1975a. Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: Assay of 300 chemicals. Proc. Natl. Acad. Sci., 72(12):5135-5139.
40. McCann, J., N.E. Spingarn, J. Kobori & B. N. Ames, 1975b. Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strains with factor plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci., 72(3):978-983
41. McGregor, D. B., 1978. Cotton rat anomaly. Nature, 274:21
42. Mettlin, C., S. Graham, R. Priore, J. Marshall & M. Swanson, 1981. Diet and cancer of the esophagus. Nutr. Cancer, 2:143.
43. Morita, K.M. Hara & T. Kada, 1979. Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. Agric. Biol. Chem., 42(6):235-238.
44. Pariza, M. W., 1982. Mutagens in heated foods. Food Technology, 3: 53-56.
45. Rhu, H.I., I. K. Kim, H. Y. Kim, S. H. Jun & Y. S. Suh, 1983. Study on the pesticide residues in crops. Report of NEPI Korea, 5:181-191.
46. Ryu, B.H., B. H. Chi, D. S. Kim & M. S. Ha, 1986. Desmutagenic effect of extracts obtained from seaweeds. Bull. Korean Fish., 19(5):502-508.
47. Ryu, B. H. Lee, M. S. Ha, D.S. Kim, D. B. Sin & K. D. Nam, 1986. Desmutagenic effect of legumes and plants curde sapoins in *Salmonella typhimurium* TA 98. Korean. J. Food Sci. Tec., 18(5):345-348.
48. Seiler, J. P., 1973. A survey on the mutagenicity of various pesticides. Experientia, 29:622-623.
49. Shirasu, Y., M. Moriya, K. Kato, A. Furuhashi & T. Kada, 1971. Mutagenicity screening of pesticides in the microsomal system. Mutation Res., 40:19-30.
50. Slater, E.E., M. D. Anderson & H. S. Rosenkranz, 1971. Repair detection of mutagens. Cancer Res., 31:970-973.
51. Stainer, R. Y., A. E. Adeldberg & J. L. Ingraham, 1976. The Microbial world. Third Englewood Cliff New Jersey, 402.
52. Stent, G. S. & R. Colender, 1978. Molecular Genetics, Ed. W. H. Preman and Company, Sanfrancisco
53. Sugimura, T. 1985. Carcinogenicity of mutagenic amines formed during the cooking process. Mutation Res., 150:33-41.
54. Suh, Y. S., H. I. Rhu, I. K. Kim, H. Y. Kim & S. H. Jun, 1984. Organophorus insecticide residues in fruits and vegetables. Kor. J. Environ., 3(2):30-36.

-
55. Verret, M. J, M. K. Mutchler, W. E. Reonaldo & J. Mclaughlix. 1965.
56. Tetratogenic effects of captan and compounds in the developing chicken embryo. Ann. NY. Acad. S Sc.. 160:334-340.
57. Yu, Y. N., X. R. Chen, C. Ding, Z.N. Cal & Q. G. Li, 1984, Genotoxic activity of caramel on *Salmonella* and cultured mammalian cells. Mutation Res., 139:161-165.