

## 살균제 carbendazim이 DNA, 유전자 및 염색체에 미치는 영향

이제봉\* · 성필남<sup>1</sup> · 정미혜 · 신진섭 · 강규영<sup>2</sup>

농업과학기술원 농약안전성과, <sup>1</sup>난지농업연구소 축산과, <sup>2</sup>경상대학교 농생대 환경생명화학과

**요약** : 광범위 보호 살균제인 carbendazim이 DNA, 유전자 및 염색체에 미치는 영향을 평가하기 위하여 Ames가 개발한 미생물복귀돌연변원성시험, CHL (chinese hamster lung fibroblast cell) 세포를 이용한 염색체 이상시험, DNA 손상시험 및 마우스 골수세포를 이용한 소핵시험을 수행하였다. Carbendazim 156~2,500  $\mu\text{g}$  /plate 농도로 직접법 및 대사활성화법으로 TA 1535, TA 1537, TA 98 및 TA 100에서 수행한 Ames test결과 음성 대조군(DMSO)과 유사한 colony수를 보여 유전자의 염기절단에 의한 결손이나 염기 치환을 일으키지 않았다. 염색체에 미치는 영향을 검색하기 위하여 CHL세포에 2.0~32.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 carbendazim을 처리하여 염색체이상시험을 수행한 결과 염색분체 절단과 같은 구조이상은 없었으나 염색체의 수에 변화가 관찰되어 수적 이상은 인정되었다. Carbendazim 25, 50 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 마우스에 처리하여 30분, 60분 및 120분에 DNA에 직접 노출시켜 DNA손상 시험을 수행한 결과 60분까지는 영향이 없었으나, 120분 노출 군에서 대조군에 비해 22~27%정도의 DNA이동거리가 증가하여 약간의 손상이 관찰되었으며, 세포에 노출시켰을 때도 중 농도와 저 농도에서 16%의 이동거리 증가와 120분 노출시켰을 때 10%~26%의 이동거리 증가가 있어 DNA에 직접 노출한 경우와 비슷하였다. Carbendazim 375, 750 및 1,500 mg/kg 농도로 투여한 소핵시험결과 음성으로 판단되었으며, 골수세포에 대한 세포독성도 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 benzimidazole계 살균제 carbendazim이 DNA손상 및 염색체의 수적이상을 일으킨다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 계속적으로 논란이 되고 있는 benzimidazole계 농약인 benomyl이나 carbendazim에 장기적으로 인체에 노출되었을 경우 유전물질에 영향을 미칠 수 있을 것으로 생각되나 만성독성성적과 노출량 등 구체적인 자료를 이용한 위해성평가를 수행하여야 보다 정확한 판단을 할 수 있을 것으로 사료되었다. (2004년 11월 10일 접수, 2004년 12월 20일 수리)

### 서 론

최근 환경보호에 대한 인식이 고조되면서 농약 등 화학물질에 대한 안전성 평가가 절대적으로 필요하게 되었으며, 또한 사회적인 관심이 급속도로 증가되고 있다(James, 1999; 한국과학기술원, 2000). 합성화학물질은 암, 유전병, 내분비계장애 등의 원인으로 추정되면서, 이와 같은 위해성을 판단하기 위한 수단으로 안전성평가가 수행되어 왔다(Kamrin, 1997; US/EPA, 1996, 1999, 2000, 2001). 농약의 안전성평가에서 가장 중요한 부분이 발암성평가이지만 기존의 실험동물을 이용한 발암성시험에는 수십억원에 달하는 시험경비와 막대한 시간이 문제점으로 지적되고 있다. 이와 같은 배경에서 학자들은 동물을 이용한 독성시험보다 시간 및 경비 면에서 경제적이고, 또한 동물을 보호

할 수 있는 대체시험법으로 *in vitro* 시험 또는 단기독성시험을 수행하여 장기간 노출에 의한 대규모시험을 대체할 수 있는 방법을 모색하여왔다(Ames 등, 1975; Ashby, 1986; Eisenbrand 등 2002). 현재 새로운 독성평가 방법으로 대두되고 있는 주요 토픽으로 세포수준에서의 DNA, 유전자 및 염색체에 대한 영향을 검색하므로 특정 화학물질의 발암성, 기형독성과 같은 중요한 독성을 예측하거나 평가하는 기초 자료로 이용하고 있다(한국과학기술원, 2000). Carbendazim을 포함하고 있는 benzimidazole계 살균제는 미국 DuPont사에 의해 1969년에 등록되었으며(Tomlin, 1997), 국내에서는 1975년 benomyl 50% 수화제가 처음 등록되면서 현재 총 31품목이 등록되어 있고, benzimidazole계 살균제 성분 함유 농약(benomyl, carbendazim, thiophanate-methyl 및 thiabendazole 등 4종)의 사용량은 연간 1,000 M/T(1999)정도로 국내 살균제 사용량의 12.4%

\* 연락저자

에 해당한다. 등록된 품목의 제품독성은 30품목이 LD<sub>50</sub> 500~5,000 mg/kg 범위로 저독성이며, thiophanate-methyl 40% SC만이 LD<sub>50</sub> 416 mg/kg으로 보통독성이었다(농약공업협회, 2000). 지금까지 알려진 benzimidazole계 살균제의 원제독성은 급성독성이 약하며, 만성, 발암성, 기형독성 등의 NOEL이 각각 8.0~12.5 mg/kg/day, 8.8 mg/kg/day, 10~30 mg/kg/day이었고, DNA합성을 저해하며, 발암성도 일부 실험동물에서 유발하는 것으로 알려져 있다(Hayes, 1982). 그러나 benzimidazole계 살균제의 위해성에 대해서는 나라별로 다르게 평가되고 있고, 곰팡이에 대한 benzimidazole계 살균제의 독성은 tubulin에 대한 결합력과 관련이 있으며, 곰팡이 병원균에 대한 살균력도 tubulin과의 결합력에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다(David & Flach, 1977). *In vitro* rat brain tubulin assembly는 carbendazim이나 benomyl의 25μM/L의 농도에서 20%저해되었지만(De Brabander 등, 1976), carbendazim의 소나 양의 brain microtubulin assembly는 100 μM/L이상의 높은 농도에서도 나타나지 않았다(Ireland 등, 1979). Benzimidazole계 살균제가 인체세포 mitosis에 어떤 영향을 미치는지는 정확하게 알 수 없으며(Holden 등, 1980), tubulin에 대한 영향이나 기형독성에 대한 영향도 위의 독성기전에 의해 일어나는 것으로 추정하고 있을 뿐(Ellis 등, 1988; Albertini 등, 1988), 이와 같은 농약의 유전물질에 대한 영향은 명확히 밝혀져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 benzimidazole계 살균제인 carbendazim의 DNA, 유전자 및 염색체에 미치는 영향을 연구하여 안전성평가를 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시험농약 및 시약

시험농약으로 carbendazim(90% up) 원제를 농약회사로부터 분양받아 사용하였으며, 대조 농약인 captafol(99%)은 농업과학기술원에 보관중인 분석용 원제를 사용하였다. 양성대조물질인 sodium azide, ICR 191, 2-nitrofluorene, 2-aminofluorene, benzo(a)pyrene, 2-acetic aminofluorene 및 histidine, biotin, streptomycin 등은 Sigma(USA)사로부터 구입하였고, 그 밖의 배지 및 시약은 Difco 및 Gibco에서 구입하였으며, 일반 시

약은 시중에서 구입하여 사용하였다.

### 시험미생물

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* TA1535, TA 1537, TA 100, TA 98은 Maron과 Ames(1983) 원저에 제시한 방법에 따라, 본시험에 앞서 histidine 요구성, crystal violet 감수성, UV 감수성, 항생제 내성과 자발 복귀돌연변이 빈도 등의 유전적 특성을 확인하였다. 각 균주는 -70℃의 DMSO 동결보존으로부터 직접 10 mL의 nutrient broth에 접종하여 37℃ 회전식 진탕배양기(Vision)에서 12시간 배양하여 시험에 사용하였다.

### 시험세포

세포독성시험 및 염색체이상 시험에 사용된 세포는 Chinese hamster lung(CHL) fibroblast cell로서, 염색체 수는 25개이며 세포주기는 15시간이다. 배양액은 5% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 1%의 antibiotic-antimycotic용액(100X 용액, Gibco)을 포함한 Eagle's minimal essential medium(EMEM, Gibco)을 사용하며, 포화 습도하에서 5% CO<sub>2</sub>를 공급하는 37℃의 배양기(Vision, Korea)에서 배양하였다. 배양된 세포는 3~5 일마다 0.05% trypsin-EDTA(Gibco)용액을 이용하여 계대 배양하며 유지하였다.

### 시험동물

농업과학기술원 농약안전성과 실험동물실에서 사육한 Sprague Dawley(SD계) 랫드 및 ICR계 마우스를 사용하였으며, 사육은 온도 23±3℃, 상대습도 50±10%, 환기횟수 13~18/hr., 조명시간 12시간(오전6시-오후6시) 및 조도 200~300 Lux로 설정된 실험동물실에서 사육하였다. 시험기간 중 사료는 실험동물용 고품사료(삼양사료(주))를, 음용수는 수도물을 여과 멸균하여 자유 급식시켰다.

### S9 mix의 조제

Sprague-Dawley계 수컷(체중 약 200-250g, 8주령)에 약물대사효소계 유도체인 alchlor1254를 500 mg/kg되게 1회 복강내 투여하였다. 투여 5일째에 경추 탈골에 의해 도살하여 간장을 적출하고 혈액을 제거한 후 3배의 0.15M KCl 용액으로 균질화하였다. 이것을 9,000 g에서 원심분리하여 얻어진 상층액 0.1 mL을 nutrient agar 배지에 도말한 후 12시간 배양하여 무균

성을 확인하였다. 이와 같이 얻어진 효소액(S9 fraction)을 사용할 때까지 -70°C에서 동결보존 하였다. S9 mix의 조제는 실험실시 직전에 혼합하여 직경 0.45  $\mu\text{m}$  여과지로 여과하여 사용하였다.

#### 미생물복귀돌연변이 시험(*Salmonella typhimurium*, reverse mutation assay)

TA 100에 대한 예비독성시험에서 항균력이 약하게 나타나는 농도를 최고 농도로 결정하였으며, 시험물질의 최고투여 농도는 carbendazim 2,500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , captafol 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 로 5 단계 공비 2로 시험하였다. 모든 검체를 pre-incubation method를 이용하여 시험관 (13 mm  $\times$  100 mm)에 각 배양균 0.1 mL, 시험물질 0.1 mL 및 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 0.5 mL(대사활성화법에서는 S-9 mix 0.5 mL)을 넣어 혼합한 후 30분간 37°C에서 진탕배양 하였다. 배양 후 top agar 2 mL을 첨가하여 혼합하고 glucose 한천 평판배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 복귀변이된 균 총수를 수동식 집락계수기로 계수하였다. 복귀변이 집락의 수는 3개의 plate의 평균치로 나타내었고, 돌연변이 유발성의 판정은 용매대조에 비해 2배이상의 집락을 나타내며 용량의존적일 때 양성으로 평가하였다.

#### 염색체이상시험(Chromosome aberration test)

예비독성시험에서 50% 세포생장을 억제하는 농도를 산출하여 carbendazim 직접법 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 대사활성화법 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 captafol 직접법 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 대사활성화 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 최고농도로 4단계 공비 2로 하여 용매대조군과 양성대조군을 설정하여 시험하였다. 염색체이상시험은 CHL세포를 60mm 일회용 플라스틱 petri dish에  $1 \times 10^5/\text{mL}$  되도록 파종하여 3일간 배양후, 각 시험물질과 양성대조 물질등을 함유하는 배양액으로 교환하여 22시간동안 배양하였다. 각 petri dish에 colcemid(Gibco)를 1 $\mu\text{M}$ 되도록 처리한후 2시간동안 더 배양하여 총 검체 처리시간이 24시간이 되도록 하였다. 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 15 mL원심관에 세포를 모은 다음 37°C의 저장액(0.075 M KCl) 10 mL에 잘 현탁시켜 37°C 수조에 15분간 방치하고, 고정액(methanol : acetic acid = 3:1)으로 3회 고정시킨후 slide를 제작하였다. 제작된 슬라이드는 공기 건조법으로 건조하여 5% Giemsa용액에 15분간 염색하여 현미

경(Zeiss Axiolab<sup>®</sup>, Germany)으로 관찰하였다.

양성대조 물질로는 mitomycin-C 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 benzo(a)pyrene 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 사용하였으며 결과의 관찰은 구조이상으로 염색분체 gap, 염색분체 절단, 염색분체 교환, 염색체절단, 염색체 교환으로 구별하여 판독하였으며, 숫적 이상으로는 이수성 및 배수체가 있다. 결과의 평가는 5%미만이면 음성, 5%이상 10미만이면 의양성으로 판단하며 그이상의 이상염색체 출현시는 양성으로 판정하나 농도 의존적인지 여부를 참조하여 판정하였다.

#### 소핵시험(Micronucleus test)

본연구소에서 사육한 ICR마우스(7주령)를 온도 23  $\pm$ 1°C, 습도 55 $\pm$ 5%, 배기 10~18회/hr, 명암교대 12hr cycle, 조도 300~500 Lux의 사육환경에서 폴리카보네이트 케이지에 10마리씩 넣어 사육하였다. 사료는 삼양사로부터 구입한 마우스용 고형사료를 급식시켰으며, 음수는 수도수를 공급하였다.

시험물질의 조제는 carbendazim 및 captafol을 옥수수 기름에 용해시켜 투여하였다. 투여량은 급성경구독성성적을 참고하여 결정하였으며, 최고 투여농도는 carbendazim 1,500 mg/kg, captafol 200 mg/kg으로 3단계 공비 2로 경구투여 하여 시험하였다. 용매대조물질로는 옥수수기름 20 ml/kg, 양성대조물질은 Mitomycin-C를 주사용 증류수에 용해시켜 2 mg/kg으로 처리하였다.

시험물질 투여후 24시간에 경추탈골에 의해 도살한 동물의 양 대퇴골을 적출하고, 미리 준비된 0.5 mL fetal bovine serum(FBS, Gibco)을 주입한 1 mL주사기(23gauge 주사침)을 삽입하여 골수를 채취하고 부유액을 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상정액을 제거한 후 침전된 골수를 pasteur pipet으로 소량의 혈청에 고르게 현탁시켜 청결한 슬라이드에 도말하고 상온에서 충분히 건조시킨 다음 메탄올에 5분간 고정하였다. 고정된 슬라이드를 건조시켜 5% Giemsa액에 30분간 염색하였다. 염색후 동일 완충액에 1회 세척하고 0.004%의 구연산수용액에 수초간 점적한 다음 증류수에 수회 세척하고 상온에서 건조시켜 1,000배의 광학현미경(Zeiss Axiolab<sup>®</sup>, Germany)으로 조사하였다. 결과의 판정은 마우스 1개체당 1,000개의 적혈구에서 다염성적혈구(polychromatic erythrocyte, PCE)와 정염성적혈구(normochromatic erythrocyte, NCE)의 비를 구하고 다시 1,000개의 다염성 적혈구중에서 소핵을 가진

다염성 적혈구의 출현빈도를 구하였다. 계수시 소핵의 크기는 세포직경의 1/2로부터 관찰 가능한 범위까지로 하였으며, 주변 유헤세포의 핵과 염색상이 동일한 것을 선택하였다.

#### DNA손상시험(Comet assay, single cell microgel electrophoresis)

0.5% agarose(Ameresco, Biometra Tech.)를 생리식염수(0.89% NaCl)에 녹여 50°C heating block에 1.0 ml씩 1.5 ml microcentrifuge tube에 분주하였다. 전면이 frost된 슬라이드글라스에 100  $\mu$ l의 agarose를 plating하고 cover glass(24×40)로 즉시 덮어 1분 동안 4°C에서 굳힌 다음 cover glass를 제거하고  $10^4 \sim 10^5$ 의 랫드 혈구 세포가 포함된 agarose 50  $\mu$ l를 중층으로 plating하고 다시 cover glass를 덮은 다음 4°C에서 즉시 굳혀 cover glass를 제거하였다. 다시 200  $\mu$ l의 agarose로 세 번째 층을 놓고 cover glass를 덮어 4°C에서 굳힌 다음 즉시 cover glass를 제거하고 detergent가 포함된 cold lysis buffer(2.5M NaCl, 100mM Na<sub>4</sub>EDTA(pH 10), 10mM Tris HCl(pH 10), 1% sodium lauryl sarcosinate, 1% Triton X-100)에서 1시간 동안 암상태로 4°C에서

향온하였다. 향온이 끝난 후 다시 37°C lysis buffer에 1시간 동안 암상태에 보관하였다. Lysis가 끝나면 전기영동 용액(300 mM NaOH, 0.1% 8-hydroxyquinoline, 2% DMSO, 10 mM Na<sub>4</sub>EDTA)에서 20분간 DNA unwinding을 시켰다. 전기영동은 12V, 225~250 mA(0.4 V/cm)에서 1시간 동안 4°C에서 분당 50 mL의 속도로 전기영동 용액을 순환시키며 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 슬라이드를 5 mL 10 M ammonium acetate와 45 mL 100% ethanol용액에 넣어 30분간 중화, 탈수 및 침적시켰다. 100% ethanol용액에서 2시간 이상 탈수시킨 후 70% ethanol로 5분간 rehydration하여 상온에서 건조시킨다. YOYO (molecular probes, USA) 1.0 uL을 1 mL 5% DMSO가 들어있는 증류수에 녹여 슬라이드 당 50 uL로 염색하고 cover glass로 덮은 다음 100배의 형광현미경으로 관찰하여 DNA의 이동거리를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 복귀돌연변이 시험

Carbendazim 및 대조농약인 captafol의 유전자에 미

Table 1. Potency of microbial reverse mutation in *Salmonell typhimurium* treated with carbendazim

Concentration ( $\mu$ g/plate)	S-9 mix	Number of revertant/plate			
		TA1535	TA1537	TA98	TA100
0	-	13.3±4.04	9.3±0.58	37.7±10.77	103.7±7.50
156	-	16.3±2.53	6.0±3.00	29.0±5.00	134.0±10.28
312	-	13.3±4.00	8.3±3.06	28.3±3.53	131.7±9.50
625	-	12.7±2.65	7.7±3.58	36.3±4.03	124.0±12.00
1,250	-	16.0±3.65	7.0±2.00	34.3±9.51	141.5±6.75
2,500	-	14.0±3.06	8.3±3.08	32.0±5.00	154.5±14.33
SAZ <sup>a</sup> 1.5	-	2813.3±292.24	-	-	3188.0±243.24
ICR191 1.0	-	-	4961.3±399.01	-	-
2-NF <sup>b</sup> 1.0	-	-	-	725.3±49.01	-
0	+	11.0±3.00	5.0±2.00	27.3±6.08	113.3±16.74
40	+	6.3±3.51	4.7±1.53	25.3±1.08	99.3±13.56
80	+	7.3±3.08	3.0±2.65	25.0±2.58	121.3±18.72
160	+	8.0±1.00	6.3±2.04	28.3±5.01	125.0±1.00
320	+	8.3±2.21	4.7±1.53	29.3±6.33	112.3±17.56
640	+	7.3±4.21	5.0±2.65	32.0±4.00	98.7±15.79
2-AF <sup>c</sup> 10	+	50.0±7.46	48.7±6.43	3274.3±93.63	498.7±9.02

Bacterial cells( $1 \times 10^8$ /plate) were added to variable concentration of carbendazim with or without S9 mixture. The mixture was poured onto minimal glucose agar plate with soft agar after 30 minutes pre-incubation at 37°C. The plates were incubated at 37 °C for 48 hour and then revertants were counted. Each value represents mean±SE for three replicates.

<sup>a</sup>)Sodium azide, <sup>b</sup>)2-Nitrofluorene, <sup>c</sup>)2-Aminofluorene.

Table 2. Potency of microbial reverse mutation in *Salmonella typhimurium* treated with captafol

Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )	S-9 mix	Number of revertant/plate(mean $\pm$ SD)			
		TA1535	TA1537	TA98	TA100
0	-	11.3 $\pm$ 0.58	7.3 $\pm$ 0.58	23.0 $\pm$ 1.00	166.7 $\pm$ 16.50
5	-	197.7 $\pm$ 12.90	44.0 $\pm$ 7.00	46.7 $\pm$ 3.79	481.7 $\pm$ 19.86
10	-	246.3 $\pm$ 54.26	120.0 $\pm$ 12.17	69.0 $\pm$ 12.17	732.0 $\pm$ 28.35
20	-	299.7 $\pm$ 60.58	272.7 $\pm$ 22.31	98.3 $\pm$ 33.50	767.0 $\pm$ 143.79
40	-	206.7 $\pm$ 34.49	82.7 $\pm$ 50.64	57.0 $\pm$ 16.37	619.0 $\pm$ 41.87
80	-	124.7 $\pm$ 88.27	0.0 $\pm$ 0.00	18.0 $\pm$ 4.00	474.3 $\pm$ 118.36
SAZ <sup>a</sup> 1.5	-	2813.3 $\pm$ 292.24	-	-	3188.0 $\pm$ 243.24
ICR191 1.0	-	-	4961.3 $\pm$ 399.01	-	-
2-NF <sup>b</sup> 1.0	-	-	-	725.3 $\pm$ 49.01	-
0	+	12.0 $\pm$ 1.00	6.0 $\pm$ 3.00	47.0 $\pm$ 4.58	162.3 $\pm$ 18.50
5	+	12.0 $\pm$ 9.00	7.0 $\pm$ 1.00	37.7 $\pm$ 10.60	162.0 $\pm$ 12.29
10	+	14.3 $\pm$ 13.80	7.3 $\pm$ 2.89	33.7 $\pm$ 10.69	152.3 $\pm$ 10.12
20	+	30.3 $\pm$ 9.29	7.0 $\pm$ 2.00	38.0 $\pm$ 2.65	178.0 $\pm$ 7.94
40	+	50.3 $\pm$ 11.02	9.3 $\pm$ 7.57	44.7 $\pm$ 3.21	179.3 $\pm$ 16.56
80	+	470.7 $\pm$ 98.01	397.7 $\pm$ 59.18	220.0 $\pm$ 6.08	1116.0 $\pm$ 83.16
2-AF <sup>c</sup> 10	+	13.3 $\pm$ 2.08	48.7 $\pm$ 6.43	3274.3 $\pm$ 93.63	498.7 $\pm$ 9.02

Bacterial cells( $1 \times 10^8/\text{plate}$ ) were added to variable concentration of captafol with or without S9 mixture. The mixture was poured onto minimal glucose agar plate with soft agar after 30 minutes pre-incubation at 37°C. The plates were incubated at 37°C for 48 hour and then revertants were counted. Each value represents mean $\pm$ SE for three replicates.

<sup>a</sup>Sodium azide, <sup>b</sup>2-Nitrofluorene, <sup>c</sup>2-Aminofluorene.

치는 영향을 검색하기 위하여 *S. typhimurium*을 이용한 미생물복귀돌연변이시험을 수행하였다. 시험결과 표 1, 2 및 그림 1에서와 같이 carbendazim을 156, 312, 625, 1,250 및 2,500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ , 그리고 captafol을 5, 10, 20, 40 및 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$  농도로 직접법 및 대사활성화법으로 TA 1535, TA 1537, TA 98 및 TA 100에서 수행한 결과 carbendazim은 음성대조군(DMSO)과 유사한 colony수를 보여 유전자의 염기절단에 의한 결손이나 염기 치환을 일으키지 않았으나, 대조농약인 captafol은 직접법에서 TA 1535는 모든 처리농도에서 대조군의 (DMSO)의 11~27배로 염기의 결손이나 절단에 의한 손상을 일으키는 물질이었으며, TA 1537, TA 98 및 TA 100에서도 3~39배의 colony를 형성하여 염기 치환을 유발하는 물질이었다. 대사활성화법에서도 40 및 80  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 에서 2배 이상의 colony를 형성하여 양성으로 판단되었다. 이상의 시험결과 carbendazim은 직접법 및 대사활성화법의 모든 용량단계에서 시험균주인 TA98, TA100, TA1535 및 TA1537에 대한 복귀돌연변이 집락수는 Ames 등(1975)이 제시한 자연복귀돌연변이 수준으로 나타나 음성으로 판정되었으나,

양성대조 농약인 captafol은 직접법 및 대사활성화법에서 양성을 나타내었고, sodium azide 등 양성대조물질에서는 수배에서 수백배에 이르는 양성 colony를 형성하였다. 이와 같은 결과는 benzimidazole계 살균제는 유전자 상에서 염기서열의 치환이나 염기서열에서의 절단에 의한 변이가 유발되지 않는다는 것을 의미하며, 유전자에 이상을 초래하지 않는 물질인 것으로 판단되었다. Sarrif 등(1994)이 benomyl과 carbendazim에 대하여 *S. typhimurium* TA 102 및 104을 이용한 시험에서 1,200  $\mu\text{g}/\text{plate}$ 까지 처리하여도 영향이 없는 것과 동일한 결과였으며, 이들의 대사물질에서도 음성으로 나타났다는 결과와 유사하였다.

#### 염색체 이상시험

Carbendazim 및 captafol의 염색체에 미치는 영향을 검색하기 위해 CHL cell을 이용한 염색체 이상시험을 수행하였다. 시험물질 처리는 시험물질만 처리한 것과(직접법) 랫드 간으로부터 분리한 S-9 mix(liver microsome)와 시험물질을 동시에 처리한 것(대사활성화법)을 세포독성을 고려하여 처리하였으며, 염색체가

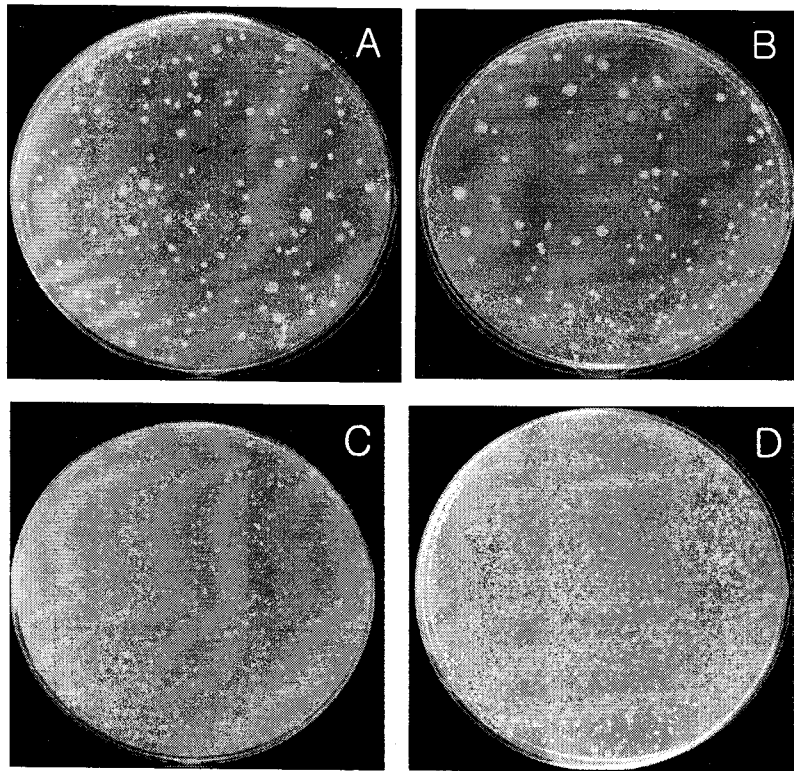


Fig.1. Typical features of microbial reverse mutation results in *S. typhimurium* TA 100 treated with benzimidazole fungicides. A ; Negative control, B ; Carbendazim, C ; Captafol, D ; Positive control.

상은 구조이상과 수적이상을 조사하였다. 시험결과 표 3에서 보는 바와 같이 carbendazim을 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 16.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 직접 처리한 시험에서 구조이상은 용매대조와 비슷한 수치로, 영향이 없는 것으로 판단되었으나, 수적이상에서는 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군을 제외한 4.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상 처리군에서 36%~73%로 농도 의존적으로 증가하여 수적이상이 인정되었다. 대사활성화 법에서도 구조이상은 음성으로 판정되었으나, 수적이상에서는 최저농도부터 28.3%~53.0%수준으로 양성으로 판정되었다. 양성대조 물질로 사용된 mitomycin-C 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군에서는 chromatid gap 5.3%, chromatid breakage 8.0%, chromatid exchange 32.3%로 45%이상의 구조이상이 관찰되었으며, 수적이상은 대조군과 유사한 경향이였다. 양성대조 물질인 benzo(a)pyrene 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 chromatid gap 9.7%, chromatid breakage 6.0%, chromatid exchange 6.0%로 22%의 구조이상을 보였으며, 수적이상은 용매대조와 유사하였다.

Captafol을 0.25, 0.5, 1.0 및 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 직접 처리한 시험에서 표 4에서 보는 바와 같이 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$

처리군의 구조이상이 chromatid gap 7.0%, chromatid breakage 0.3%, chromatid exchange 2.0%로 의양성을 보였으나 나머지 처리군에서는 용매대조와 비슷한 수치로, 영향이 없는 것으로 판단되었으며, 수적이상에서는 용매대조군과 유사하게 나타나 수적이상이 인정되지 않았다. 대사활성화 법에서는 구조이상은 음성으로 판정되었으나, 수적이상에서는 28.3%~53.0%수준으로 이상이 관찰되었다. 이상의 시험결과 benzimidazole계 살균제는 CHL세포에서 염색체에 수적이상을 유발하는 물질로 판단되었다.

Benomyl과 carbendazim은 *Aspergillus nidulans*에서 수적이상을 보였으나, 구조적인 염색체 이상은 일으키지 않았다(Aardema 등, 1998)는 보고와 유사하였고, 완두콩을 이용한 환경오염물질의 염색체이상 시험에서 carbendazim이 양성을 보였다(Grant와 Owens, 2001)는 결과와도 유사하였다. 또한 benzimidazole계 살균제의 주요 독성기전은 microtubule assembly를 저해하므로(Alp Can과 Albertini, 1997) 세포분열은 억제하며, 이와 같은 영향으로 정자 및 고환에 대한 이상을 유발하는 것으로 알려져 있다(Nakai 등, 1998; Lim과

Table 3. Frequencies of chromosome aberration in CHL cell treated with carbendazim for 24 hour

Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S9 Mix	Frequencies of aberrant cell					Normal cell
		ctg <sup>a)</sup>	ctb <sup>b)</sup>	cte <sup>c)</sup>	ane <sup>d)</sup>	pol <sup>e)</sup>	
0.0	-	0.5±0.71	-	-	18.0±2.83	2.0±0.00	79.5±3.54
2.0	-	1.3±0.58	1.3±0.58	-	26.7±3.51	0.3±0.58	70.3±5.03
4.0	-	1.0±1.00	0.7±0.58	-	36.0±6.56	0.7±0.58	61.7±6.66
8.0	-	1.3±0.58	0.3±0.58	0.3±0.58	56.3±1.15	4.0±1.73	37.7±3.79
16.0	-	2.0±1.00	1.0±1.73	-	73.0±4.58	7.7±0.58	16.3±3.51
MMC <sup>f)</sup> 0.1	-	5.3±1.15	8.0±1.00	32.3±0.58	-	-	54.3±2.52
0.0	+	1.0±1.00	0.7±0.58	-	10.0±1.00	0.3±0.58	88.0±1.00
4.0	+	1.0±0.00	-	-	28.0±2.00	0.3±0.58	70.7±2.08
8.0	+	-	-	-	36.7±3.06	1.3±0.58	62.0±3.61
16.0	+	0.7±1.15	0.7±0.58	0.7±1.15	36.3±1.53	0.7±0.58	61.0±1.00
32.0	+	0.7±0.58	0.7±1.15	0.7±0.58	50.3±2.89	2.7±1.53	45.0±3.00
BP <sup>g)</sup> 2.0	+	9.7±3.21	6.0±1.00	6.0±1.73	-	-	78.3±3.06

CHL cells were cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 3 days and carbendazim was treated to the cultured CHL cells for 24 hours. Structural and numerical aberration were investigated by chromosome aberration test using light microscope(Zeiss Axiolab, Germany) by magnified 1,000. All date are expressed a number per 100 cell and the Mean±SD for three replicate.

<sup>a)</sup>chromatid gap, <sup>b)</sup>chromatid breakage, <sup>c)</sup>chromatid exchange, <sup>d)</sup>aneuploidy, <sup>e)</sup>ployploidy, <sup>f)</sup>Mitomycine-C, <sup>g)</sup> Benzopyrene.

Table 4. Frequencies of chromosome aberration in CHL cell treated with captafol for 24 hour

Dose ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	S9 Mix	Frequencies of aberrant cell					Normal cell
		ctg <sup>a)</sup>	ctb <sup>b)</sup>	cte <sup>c)</sup>	ane <sup>d)</sup>	pol <sup>e)</sup>	
0.0	-	0.5±0.71	-	-	18.0±2.83	2.0±0.00	79.5±3.54
0.25	-	5.7±4.04	0.7±0.58	0.3±0.58	26.3±2.08	0.3±0.58	66.3±1.53
0.5	-	3.7±1.53	1.0±0.00	0.7±0.58	31.7±1.53	1.0±1.00	62.0±3.61
1.0	-	13.0±6.93	2.0±1.73	1.3±0.58	30.0±5.57	0.7±1.15	53.0±1.00
2.0	-	3.0±2.65	0.3±0.58	2.0±2.65	25.3±2.31	3.0±0.00	66.3±3.51
MMC <sup>f)</sup> 0.1	-	5.3±1.15	8.0±1.00	32.3±0.58	-	-	54.3±2.52
0.0	+	1.0±1.00	0.7±0.58	-	10.0±1.00	0.3±0.58	88.0±1.00
0.5	+	0.7±1.15	-	-	42.0±4.36	1.7±1.15	56.0±5.29
1.0	+	2.3±1.53	-	0.7±0.58	47.0±6.93	0.7±0.58	49.3±5.69
2.0	+	1.0±1.00	0.7±0.58	0.3±0.58	35.3±3.51	-	66.0±1.73
4.0	+	1.3±0.58	-	0.7±0.58	50.7±2.52	1.3±0.58	46.0±2.65
BP <sup>g)</sup> 2.0	+	9.7±3.21	6.0±1.00	6.0±1.73	-	-	78.3±3.06

CHL cells were cultured in CO<sub>2</sub> incubator for 3 days and captafol was treated to the cultured CHL cells for 24 hours. Structural and numerical aberration were investigated by chromosome aberration test using light microscope(Zeiss Axiolab, Germany) by magnified 1,000. All date are expressed a number per 100 cell and the Mean±SE for three replicate.

<sup>a)</sup>chromatid gap, <sup>b)</sup>chromatid breakage, <sup>c)</sup>chromatid exchange, <sup>d)</sup>aneuploidy, <sup>e)</sup>ployploidy, <sup>f)</sup> Mitomycine-C, <sup>g)</sup> Benzopyrene.

Miller, 1997). 이상의 결과에서 benzimidazole계 살균제는 CHL세포에서도 염색체에 수적이상을 유발하는 물질로 기존의 연구와 유사한 결과를 얻었다.

소핵시험

마우스 골수세포를 이용한 carbendazim의 생체내 유전물질에 미치는 영향을 검색하기 위하여 소핵시험을 수행하였다. Carbendazim 375 mg/kg, 750 mg/kg 및 1,500 mg/kg, 그리고 captafol 50 mg/kg, 100mg/kg 및 200mg/kg로 투여하여 시험한 결과 표 5에서 보여준

Table 5. Effect of different doses of carbendazim and captafol on the rate of micronucleated polychromatic erythrocytes(Mn PCE) in ICR male mice

Test chemical	Administration dose (mg/kg)	Mn PCE <sup>a)</sup> (%)	PCE/PCE+NCE <sup>b)</sup>
Corn oil	20ml/kg	0.15±0.05	0.49±0.02
Carbendazim	375	0.30±0.01	0.50±0.02
	750	0.21±0.03	0.52±0.01
	1,500	0.27±0.02	0.51±0.01
Captafol	50	0.40±0.14	0.50±0.03
	100	0.38±0.05	0.49±0.02
	200	0.45±0.17	0.50±0.05
Mitomycin-C	2	8.48±1.42	0.47±0.02

Carbendazim and captafol were administered orally to ICR mice, 7~8 weeks old. Bone marrow smear preparations were made according to Schmid's standard method on the 24 hours after administration and for other preparation(Mitomycin-C) was made on the 30 hours after intraperitoneal injection(Schmid, 1975). The number of micronucleated cells in 1,000 polychromatic erythrocytes(PCE) and the number of PCE in 1,000 total erythrocytes(PCE+NCE) were counted. Each value represents mean±SE

<sup>a)</sup>The number of micronucleated cells in 1,000 polychromatic erythrocytes. <sup>b)</sup>The ratio of PCE in 1,000 total erythrocytes.

바와 같이 음성대조 물질인 corn oil 투여군의 MnPCE는 0.15±0.05이며 전체 적혈구중 PCE출현율은 0.49±0.02로 나타났고, 양성대조물질인 mitomycin C 처리군의 MnPCE 출현율은 8.48±0.42를 나타내었으며 PCE 출현율은 0.47±0.02으로 나타났다. 시험물질인 carbendazim의 MnPCE는 0.21±0.03, PCE 0.50±0.02~0.52±0.01범위내에 있어 음성으로 판단되었으며, 골수세포의 PCE출현율도 30%이상으로 영향이 없었다. Captafol의 MnPCE는 0.38±0.05~0.48±0.17, PCE는 0.49±0.02~0.50±0.03범위내에 있어 의양성으로 판단되었으나 골수세포에 대한 세포독성은 없었다. 이와

같은 결과는 Benning 등(1992)이 mitomycin-C에 대한 연구에서 나타난 음성 및 양성 대조물질로서의 성격과 유사하여 전체적인 시험조건을 만족시켰다.

Piatti 등(1994)은 상온에서 carbendazim으로 쉽게 대사되는 benomyl과 pirimiphos-methyl 혼합제(6:1)의 배양 간세포를 이용한 소핵시험에서 농도 의존적인 소핵의 증가를 관찰하였으며, 이와 같은 영향이 benomyl에 의한 것임을 밝혔다. 이와 같은 결과가 본 연구의 결과와 차이가 있는 것은 *in vivo* 시험은 노출 경로의 복합성, 약리반응, 종 특이적 대사 등이 다양하게 관여하기 때문에 *in vitro* 시험이 *in vivo* 시험보다 더 민감함을 의미하는 것으로 추정되었다(Brusick 1994).

#### DNA 손상시험

Comet assay에 의한 DNA 손상시험은 DNA에 대한 손상을 검출하는데 정확성과 신속성 그리고 재현성 등에서 좋은 방법이며, 최근에 개발된 방법으로 널리 이용되고 있다(Hartmann 등, 2001). Comet assay, V79 cell을 이용한 소핵시험 그리고 Ames test를 36종의 의약품으로 비교 시험한 결과 세가지의 시험법이 서로 깊은 상관관계가 있었으며, 특히 Ames test에서 음성인 16종의 물질이 comet assay에서 양성을 보여 Ames test 보다 민감한 방법으로 판단했다(Rojas 등, 1999; Vigreux, 1998). Carbendazim이 DNA에 미치는 영향을

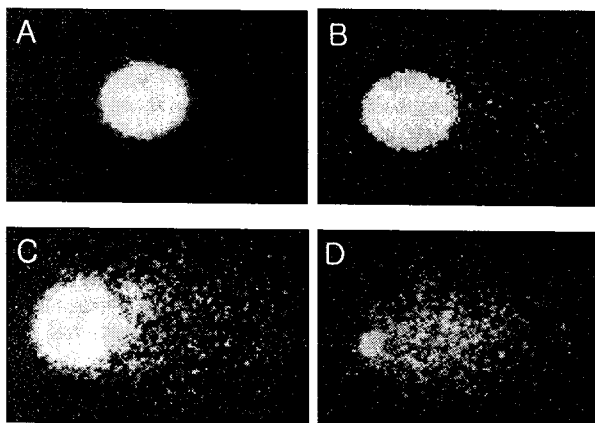


Fig. 2. Image of various degrees of DNA damaged cells. A ; Undamaged cell, B ; slightly damaged cell, C, D ; Highly damaged cell.



Table 6. DNA damage by carbendazim in whole blood cell of SD rat by the single cell microgel electrophoresis assay

Treatment	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Migration of DNA( $\mu\text{m}$ )after given times		
		30	60	120min
DNA	0	36.31 $\pm$ 4.80	43.80 $\pm$ 4.47	39.75 $\pm$ 4.83
	25	35.78 $\pm$ 3.02	43.25 $\pm$ 5.12	49.25 $\pm$ 7.38**
	50	37.64 $\pm$ 4.45	46.55 $\pm$ 5.92	50.35 $\pm$ 7.66**
	100	35.05 $\pm$ 4.15	50.60 $\pm$ 6.55**	51.60 $\pm$ 6.27**
Cell	0	38.85 $\pm$ 3.62	37.44 $\pm$ 3.39	49.56 $\pm$ 3.83
	25	37.99 $\pm$ 3.34	42.90 $\pm$ 5.63*	55.02 $\pm$ 2.70**
	50	39.57 $\pm$ 3.89	43.47 $\pm$ 4.45*	58.27 $\pm$ 7.72**
	100	40.60 $\pm$ 5.81	40.42 $\pm$ 6.90	63.38 $\pm$ 5.16**

Carbendazim was treated to whole blood cells and DNA of blood cell in SD rat and at dose levels of 25, 50, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . DNA damage was measured by SCMG method. Each value represents mean $\pm$ SE.

\*,\*\*Statistically significant difference with respect to the control value. Student's *t*-test,  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

검색하기 위하여 랫드 혈구세포를 이용한 comet assay로 DNA손상시험을 수행하였다. 표 6에서와 같이 carbendazim 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  및 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  처리하여 30분, 60분 및 120분에 DNA에 직접 노출시켜 시험한 결과 60분까지는 영향이 없었으나, 120분 노출에서 대조군에 비해 22~27% 정도의 DNA이동거리가 증가하여 약간의 손상이 관찰되었으며, 세포에 노출시켰을 때도 중 농도와 저 농도에서 16%의 이동거리 증가와 120분 노출시켰을 때 10%~26%의 이동거리 증가가 있어 DNA에 직접 노출한 경우와 비슷하였다. 인체 임파구를 이용한 carbendazim 및 chlorothalonil에 대한 시험에서 chlorothalonil은 DNA에 손상을 일으켰으나, carbendazim은 인체 임파구에서는 영향을 미치지 않았다(Lebailly 등, 1997)는 보고와 차이가 있었으나, CD-1 마우스에 thiabendazole 등 농약을 200 mg/kg 투여한 후 시간별로 주요조직을 적출하여 comet assay를 수행한 결과 thiabendazole과 biphenyl은 위, 간, 신장, 방광, 폐, 뇌 및 골수 등 시험한 모든 장기에서 DNA손상을 일으켰으며, 3~8시간에 가장 손상이 심하였으나, 24시간부터는 감소하였다(Sasaki 등, 1997)는 보고와는 유사하였다. 이와 같은 차이는 benzimidazole계 살균제의 DNA에 대한 손상이 시험 종이나 세포에 따라 다른 반응을 보일 수 있을 가능성에 기인한 것으로 판단되었다(WHO, 1993). 시험결과 carbendazim은 랫드 혈구세포에서 미약한 DNA손상을 일으키는 것으로 생각되었다.

이상의 결과로부터 benzimidazole계 농약인 carben-

dazim은 DNA에 미약한 손상을 유발하며, 감수분열시 염색체의 tubulin이동을 저해하므로 세포분열과 관련된 독성을 부분적으로 유발할 가능성이 있음을 확인하였다.

## 인용문헌

- Aardema, M. J., S. Albertini, P. Arni, L. Henderson, M. M. Kirsch-Volders, J. M., Sarraf, A. M. Mackay, D. A. Stringer and R. D. F. Taalman. 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutation Research* 410:3~79.
- Albertini, S., U. Friederich, C. Holderegger and F. E. Wurgler. 1988. The *in vitro* porcine brain tubulin assembly assay : effects of genotoxic carcinogen (aflatoxic B1), eight tumor promoters and nine miscellaneous substances. *Mutation Research* 201:283~292.
- Alp Can and D. F. Albertini. 1997. M-phase specific centrosome-microtubule alterations induced by the fungicide MBC in human granulosa cells. *Mutation Research* 373:139~151.
- Ames, B. N., J. McCann. and E. Yamasaki. 1975. Method for detecting carcinogens and mutagens with *salmonella/mammalian-microsomal* mutagenicity test. *Mutation Research* 31:347~364.
- Ashby, J. 1986. The prospects for a simplified and

- internationally harmonized approach to the detection of possible human carcinogens and mutagens. *Mutagenesis* 1:3~16
- Benning, V., F. Depasse, C. Melcion and A. Cordier. 1992. Detection of micronuclei after exposure to mitomycin C, cyclophosphamide and diethylnitrosamine by the *in vivo* micronucleus test in mouse splenocytes. *Mutation Research* 280:137~142
- Brusick, D. 1994. Genetic Toxicology. In Principles and Methods of Toxicology, Third Edition, edited by A. W. Hayes, printed from Raven Press, Ltd. New York. pp.545~577
- David. L. C. and W. Flach. 1977. Differential binding of methyl benzimidazol-2-yl carbamate to fungal tubulin as a mechanism of resistance to this antimitotic agent in mutant strains of *Aspergillus nidulans*. *J Cell Biol*, 72:174~193.
- De Brabander, M., R. van de Veire, F. Aerts, S. Geuens and J. Hoebeke. 1976. A new culture model facilitating rapid quantitative testing of mitotic spindle inhibition in mammalian cells. *J Natl Cancer Inst*, 56:357~363.
- Eisenbrand, G., B. Pool-Zobel, V. Baker, M. Balls, B. J. Blaauboer, A. Boobis, A. Carere, S. Kevekordes, J. C. Lhuguenot, R. Pieters and J. Kleiner. 2002. Methods of *in vitro* toxicology. *Food and Chemical Toxicology* 40:193~236
- Ellis, W.G., F. De Roos, R. J. Kavlock and F.J. Zeman. 1988. Relationship of periventricular overgrowth to hydrocephalus in brains of fetal rats exposed to benomyl. *Teratog Carcinog Mutagen* 8:377~391.
- Grant W. F. and E. T. Owens. 2001. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. *Mutation Research* 488:93~118.
- Hartmann, A., E. Elhajouji, A. Kiskinis, F. Poetter, H. J. Martus, A. Fjallman, W. Friauff, and W. Suter. 2001. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening; comparative investigation with the micronucleus test. *Food & Chemical Toxicology* 39:843~858
- Hayes, W. J. 1982. Pesticides studied in man. Williams & Wilkins, Baltimore/London, 610~615.
- Holden, H.E, P.A, Crider and M.G. Wahrenburg. 1980. Mitotic arrest by benzimidazole analogs in human lymphocyte cultures. *Environ Mutat.* 2:67~73.
- Ireland, C.M., K. Gull, W.E. Gutteridge and C. I. Pogson. 1979. The interaction of benzimidazole carbamates with mammalian microtubule protein. *Biochem Pharmacol.* 28:2680~2682.
- James V. Bruckner. 1999. Differences in Sensitivity of Children and Adults to Chemical Toxicity : The NAS Panel Report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31:280~285.
- Kamrin, M. A. 1997. Environmental risk harmonization: Federal/State Approachs to Risk Assessment and Management. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 25:158~165.
- Lebailly, P., C. Vigreux, T. Godard, F. Sichel, E. Bar, J. Y. LeTalaer, M. Henry-Amar and P. Gauduchon. 1997. Assessment of DNA damage induced *in vitro* by etoposide and two fungicides (carbendazim and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 375:205~217.
- Lim, J., and M. G. Miller. 1997. The role of the benomyl metabolite carbendazim in benomyl-induced testicular toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 142(2):401~410.
- Maron, D.M., and B. N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research* 113:173~215
- Nakai, M., K. Toshimori, K. Yoshinaga, T. Nasu and R. A. Hess. 1998. Carbendazim-induced abnormal development of the acrosome during early phases of spermiogenesis in the rat testis. *Cell and Tissue Research* 294(1):145~152.
- Piatti, E., L. Marabini and E. Chiesara. 1994. Increase of micronucleus frequency in cultured rat hepatocytes treated *in vitro* with benomyl and pirimiphos-methyl separately and in mixture. *Mutation Research* 324:59~64
- Rojas, E., M. C. Lopez and M. Valverde. 1999. Single cell electrophoresis assay: methodology and

- applications. *Journal of Chromatography B* 722:225~254.
- Sarrif, A. M., G. T. Arce, D. F. Krahn, R. M. O'Neil and V. L. Reynolds. 1994. Evaluation of carbendazim for gene mutations in the Salmonella/Ames plate-incorporation assay: the role of aminophenazine impurities. *Mutation Research* 321(1~2):43~56.
- Sasaki, Y. F., A. Saga, M. Akasaka, K. Yoshida, E. Nishidate, Y. Q. Su, N. Matsusaka and S. Tsuda. 1997. *In vivo* genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl, and thiabendazole detected in multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Res.*:189~198
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. *Mutation Research* 31:12~15.
- Tomlin, C. D. S. 1997. The pesticide manual, eleventh edition. British crop protection council.
- US/EPA. 1996. Office of pesticide programs list of chemical evaluated for carcinogenic potential.
- US/EPA. 1999. Benomyl-report of the FQPA safety factor committee.
- US/EPA. 2000. RED of Thiabendazole.
- US/EPA. 2000. RED of Thiophanate-methyl.
- US/EPA. 2001. Benomyl and carbendazim - endpoint selection for incidental oral ingestion for carbendazim.
- Vigreux, C., J. M. Poul, E. Deslandes, P. Lebailly, T. Godard, F. Sichel, M. Henry-Amar and P. Gauduchon. 1998. DNA damaging effects of pesticides measured by the single cell gel electrophoresis assay (comet assay) and the chromosomal aberration test, in CHOK1 cells, *Mutation Research* 419:79~90
- WHO. 1993. Environmental Health Criteria 149(carbendazim). pp.50~85
- 농약공업협회, 2000. 농약연보
- 한국과학기술원, 한국산업기술진흥협회. 2000. 진보된 안전성평가와 환경호르몬 검출기법.

#### Effects of carbendazim on DNA, gene and chromosome

Je Bong Lee\* · Pil Nam Sung<sup>1</sup> · Mi-Hye Jeong · Jin Sup Shin · Kyu Young Kang<sup>2</sup>

(Pesticide Safety Division, NIAST, Suwon, Korea, <sup>1</sup>Livestock division, Institute of Subtropical Agriculture, Jeju, Korea, <sup>2</sup>Dept. of Environ. Biotechnology, Gyeong Sang National University, Jinju, Korea)

**Abstract :** Benzimidazole pesticide carbendazim that is effective against a wide range of fungal plant pathogens is a protective, eradicant, and systemic fungicide. For genetic toxicity evaluation of carbendazim on DNA, genes and chromosome were investigated with chromosome aberration, bacterial reverse mutation, micronucleus test in mouse born marrow and DNA damage assay by single cell microgel electrophoresis. Substitution and frameshift mutation were not induce at variable concentration of carbendazim on Ames test with or without rat liver microsomal activation. For the result of chromosome aberration test, numerical changes of chromosome were detected at the concentrations higher than 4.0  $\mu\text{g/ml}$ , but structural aberration was not induced. Positive control, Mitomycin-C and captafol made a structural aberration, but numerical change of chromosome did not appear. In the micronucleus test for mouse born marrow, carbendazim was negative, but was weak positive in DNA damage assay by single cell microgel electrophoresis because of increased DNA moving length of 20% to control.

**Key word :** Carbendazim, DNA damage, Gene mutation, Chromosome aberration, Micronucleus test.

\*Corresponding author(Fax : +82-31-290-0508, E-mail : jblee@rda.go.kr)