

## 환경변이원 및 항변이원에 관한 연구 : 살균제 Captan 및 유기인계 살충제 (Diazinon, MEP, Malathion 및 EPN)의 혼합처리가 *E. coli* WP<sub>2</sub>S (*uvrA*<sup>-</sup>, *trp*<sup>-</sup>) 균주의 돌연변이와 생존율에 미치는 영향\*

### 조봉금

건국대학교 자연과학대학 생화학과

(1989. 7. 16 접수)

살균제 Captan, 살충제 Diazinon, MEP, Malathion 및 EPN의 단독 처리 그리고 Captan의 반복처리와 이들 살충제와 서로 다른 조합으로의 동시적, 시差的 복합처리가 *E. coli* WP<sub>2</sub>S (*uvrA*<sup>-</sup>, *trp*<sup>-</sup>) 균주의 突然變異유발 빈도 및 生殘率에 미치는 영향을 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Captan, Diazinon, MEP, Malathion, EPN 및 UV의 동시적 복합처리는 이들 농약의 단독 처리에서 보다 *E. coli* WP<sub>2</sub>S (*uvrA*<sup>-</sup>, *trp*<sup>-</sup>) 균주의 돌연변이유발빈도가 높았고 이들 농약의 단독처리효과를 합한 가산적 영향으로 나타났으며, 同一 조건하에서 이들 농약의 처리농도를 배로 늘렸을 때는 倍加 효과를 보였으나 이 균주의 增加된 돌연변이 유발빈도는 cinnamaldehyde 30  $\mu$ g 및 60  $\mu$ g/ml 그리고 tannic acid 50  $\mu$ g/ml 培地로 각각 첨가했을 때 감소되었고 生殘율은 증가되었다.
2. Captan의 시差的(매 2시간) 反復처리효과는 반복 回數가 증가함에 따라 *E. coli* WP<sub>2</sub>S (*uvrA*<sup>-</sup>, *trp*<sup>-</sup>)의 revertants 유발頻度を 指數的으로 증가시켰으며, 生殘率은 2~5회 處理까지는 증가되었으나 6회 처리때 부터는 감소되었다. 이는 Captan의 잔류량이 증가함에 따라 DNA의 손상이 repair 되므로써 生殘率이 증가되기 보다는 error-prone으로 인해 돌연변이 유발빈도가 증가되었고 生殘율은 농약의 최종 잔류농도가 커질수록 감소되었음을 시사한다.
3. Captan 처리후 시차적(每 2시간 간격)으로 순차 첨가된 다른 농약의 처리에 의한 *E. coli* WP<sub>2</sub>S (*uvrA*<sup>-</sup>, *trp*<sup>-</sup>) 균주의 돌연변이 유발빈도 및 生殘율은 최초 Captan만의 처리때 보다 각각 증가되었다. 이는 균주를 Captan으로 처리후 2시간 배양기간은 DNA 손상의 repair 기구에 충분한 시간이며 또한 repair 기구에 관여하는 효소의 양이 충분히 증가된 상태에 있기 때문에 同 · 농도의 다른 농약을 시차적으로 순차처리한 결과 生殘율이 증가되었을 것으로 생각된다. 한편 同 · 조건에서 처리농약의 농도를 2배로 늘렸을 때 돌연변이의 유발빈도는 상승적으로 증가되었으나 生殘율은 감소되었다.
4. 이들 결과로부터 개개의 농약에 대한 잔류 허용기준량으로 안전하더라도 이들 농약의 복합처리로 유발된 돌연변이의 빈도는 개개의 농약에 대하여 얻어진 효과가 가산적, 배가적 그리고 상승적으로 증가되므로, 이들 농약의 잔류허용 기준량은 多元的 요인을 고려하여 전체적으로 복합 처리되었을 때 生物體에의 안전성이 卽하여질 수 있도록 개개의 농약잔류허용 기준량은 최대한으로 낮춤과 동시에 농약의 총잔류 허용량이 설정되어야만이 生物體에 대한 안전성이 卽하여질 것으로 생각된다.

\*본 연구는 문교부 1988년도 학술연구 조성비에 의함.

## 서 론

인체가 환경 돌연변이 물질에 노출되면 급성, 만성 및 유전자가 영향을 받는데 유전적 영향의 실체는 유전자의 돌연변이 혹은 염색체 이상(Dean & Danford, 1984)의 발생으로 개체의 생존 및 자손에 유해한 것으로 알려져 있다(Kondo *et al.*, 1970; Ishii & Kondo, 1972; Takebe *et al.*, 1972). 환경 돌연변이원의 독성이 자손 유전자에 영향을 주었을 것으로 의심되는 영광의 원자력 발전소의 방사선에 노출된 직원의 연속적인 뇌없는 기형아출산 및 골프장에 5년이상 캐디로 근무했던 여성들이 최근 주목을 끌고 있다. 사람의 색소성 건피증환자는 대장균의 DNA repair 기구 결손주인 *Exc<sup>-</sup>*株와 같은 유전적 결함이 있어 UV에 대해 대장균처럼 dimer 제거능이 결손되어 있음이 밝혀졌는데, (Dean & Danford, 1984; Cleaver, 1968; Takebe *et al.*, 1972), 이러한 고등생물에 영향을 주는 돌연변이원검출은 미생물을 이용한 돌연변이 유발실험을 통해 할 수 있다(Ames *et al.*, 1975; Kada *et al.*, 1980; Ohta *et al.*, 1983). 미생물을 이용한 환경변이원검출 및 독성평가에서 약 80%가 발암성을 나타내므로 발암성물질의 1차 screening법으로서 세계에서 널리 이용되고 있다. 1960년대 후반부터 식량증산을 위해 쓰인 농약 및 화학비료의 대량살포는 토양(양창술, 1982), 수질 및 식품을 오염(고영수, 1960; 김정현 & 김명희, 1989), 잔류되어 생태계를 파괴시키고 있다. 이런 농약의 대부분은 난분해성이고 먹이 연쇄에 의해 최종적으로는 사람에게 잔류, 농축되 돌연변이성을 발휘하여 현대병을 조성할 가능성이 있다. 현재 우리 농가의 농약사용실태는 매년 더 독한 농약을 더 많이 뿌렸고 여러 농약을 단독 혹은 혼용해서 수확씩 살포해 왔으며, 금년에도 21,200여톤이 뿌려졌다. 우리는 매일 여러 식품을 동시에 섭취한다는 관점에서 생각해 볼 때 하나하나에 대한 잔류 허용기준은 안전하더라도 여러 식품에 잔류된 여러 농약이 생체 내에서 동시적 또는 시차적 혼합으로 인한 복합 반응 및 똑같은 농약이 잔류된 식품을 오랜동안 반복 섭취함에 따른 생체내 잔류량의 증가가 일어나면 각각의 농약효과는 배가적 또는 상승적으로 작용할 것이다.

본 연구는 최근 사용량이 급증한 농약인 유기 살균제 Captan 및 유기인계 살충제의 단독, 혼용 및 시차적 혼합 그리고 일정농도의 Captan을 반복처리한 후의 *E. coli* WP<sub>2</sub>S(*trp<sup>-</sup>*, *uvr<sup>-</sup>*) 균의 돌연변이율과 생존수의 변동을 통해서 식품에 잔류된 여러 농약이 생체내에서 혼합돼 복합반응을 일으켰을 때 그리고 같은 또는 다른 농약이 잔류된 식품을 오랜동안 반복섭취에 따른 생체 내에서의 영향 및 그 작용을 억제시키는 물질에 대해 연구 검토 하고자 했다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 *E. coli* B/r WP<sub>2</sub>S (*uvrA<sup>-</sup>*, *trpE<sup>-</sup>*)이며 일본 잔류농약연구소의 T. Ohta 씨로부터 분양받았고, Nutrient broth 배양액에 glycerin을 10%되게 첨가 -80°C에서 보존한 것을 실험에 사용했다. 배지로는 Nutrient broth No. 2 (oxid) 또는 Vogel-Bonner의 최소 배지E( $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  3.5g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g, citric acid·H<sub>2</sub>O 2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2g, glucose 4g, 증류수 1,000ml) (Venitt *et al.*, 1984)에 발육배지로는 tryptophan 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 복귀균검출은 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하여 사용했으며 그 한천배지 및 top agar (0.6% agar-0.6% NaCl)에도 각각 첨가 사용했다.

### 돌연변이원 및 시약

담배연기 농축물인 tar 는 glass fiber filter 부착 suction flask 를 이용 담배 10개피(1개피당 4분씩) 를 태워 얻은 농축물(0.4g)을 acetone 과 DMSO 로 용해시킨 후 증류수로 희석 돌연변이원 실험에 사용했다(Mi-zusaki, *et al.*, 1977). 유기살균제 Captan 및 유기인계 살충제인 Diazinon, MEP, Malathion 및 EPN (일본 和光) 등은 잔류농약 시험용으로 acetone 또는 DMSO 에 용해시킨 후 증류수로 희석 사용했으며 4NQO (4-Nitroquinoline-N-oxide :nacalai tesque), DMSO(Dimethyl sulfoxide :和光) 그리고 항돌연변이 시약으로는 tannic acid(国産化学) 및 cinnamaldehyde(和光) 를 사용했다.

### UV 조사

$10^7/ml$  의 균현탁액 7ml 를 직경 9cm Petridish 에 넣고 회전시키면서 15W 의 Toshiba UV 살균 등으로 6.5 erg/sec 선량을 거리에서 10초 조사한 후 및 농약 또는 담배 tar 와 혼합처리에 따른 복합처리로 어떤 결과가 대장균의 돌연변이율 및 생존율을 통해 나타나는지를 비처리결과와 비교하면서 복합적인 환경물질에 노출되었을 때의 영향을 검토하고자 했다.

자외선의 선량을 측정은 UV radiometer (Topcon UVR-1 :Tokyo) 를 이용했다.

### 돌연변이율 및 생존율측정

*E. coli* WP<sub>2</sub>S (uvrA<sup>-</sup>, trpE<sup>-</sup>) 균은 nutrient broth 에서 20h 전후 37°C 에서 진탕배양후 같은 배지로 50 배 희석 대수기까지 배양후 10,000r.p.m 에서 10분 원심분리, 분리된 균체는 1/30M 인산완충액 (pH=7.2) 로 2회 세척 및 재현탁하여 돌연변이 처리용 균현탁액으로 썼다. 균현탁액 0.5ml 에 단독 혹은 여러 종의 농약을 혼합한 복합농약 0.5ml 를 첨가 37°C 에서 30분간 진탕배양하는 preincubation (Venitt *et al.*, 1984 ;Kada *et al.*, 1978) 법으로 처리된 균현탁액 0.1ml 는 tryptophan 1μg/ml 포함 top agar 2ml 로 혼합, Vogel-Bonner 최소배지 E 에 tryptophan 1μg/ml 포함 한천배지 위에 분산시켜 37°C 3일 배양후 출현하는 trp<sup>+</sup> 복귀균을 계측했고, 생산균수는 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> 으로 희석 0.1ml 를 tryptophan 5μg/ml 포함 top agar 2ml 에 혼합, Vogel-Bonner 최소 배지 E 에 tryptophan 5μg/ml 를 포함시킨 한천평판배지 위에 분산시켜, 37°C 3일 배양후 출현 colony 를 계측하므로써 구했다. 돌연변이 유발빈도는 농약 및 여러변이원 물질들의 혼합처리로 인한 복합반응 효과의 결과로 유발되는 돌연변이율과 생산균수를 비처리시료의 결과와 서로 비교하고 자연발생 복귀균수를 공제한 후 구했다.

한편 Captan 의 계속적인 반복처리 및 Captan 과 유기인계 살충제의 시차적 혼용 처리를 위한 前배양액은 Vogel-Bonner 최소배지에 tryptophan 10μg/ml 를 첨가한 액체배지로 배양후 같은 배지로 50배 희석 대수기까지 배양, 같은 새배지 4ml 에 균현탁액 4ml 및 농약 0.6ml 를 넣고 37°C 2시간 진탕배양후 일부시료를 채취하여 복귀균검출 및 생산균수를 계측 했으며, 그것에 다시 반복해서 2시간마다 같은 농약 혹은 다른 농약을 재첨가 처리하여 반복오염 및 장기간에 걸쳐 여러종의 농약의 시차적 복합오염에 따라 유발되는 돌연변이율 및 생산균수를 구했다. 각종 농약 처리후 antimutagen 처리가 돌연변이율과 생존율에 미치는 영향을 측정하고자 Vogel Bonner 최소배지 E 의 평판배지에 cinnamic aldehyde 는 30μg/ml 또는 60μg/ml 그리고 tannic acid는 50 μg/ml 포함시켜 각 조건의 농약으로 처리한 균 0.1ml 를 위의 top ager 2ml 에 혼합 그 위에 분산시켜 37°C 3일후 출현하는 trp<sup>+</sup> 복귀균수와 생산균수를 구했다. 각 평판배지에 농약처리로 유발된 trp<sup>+</sup> revertant 수 (Mi) 는 자연발생 복귀균수를 공제한 후 평균치로 나타내었다.

## 결 과

Captan 과 유기인계 살충제(Diazinon, MEP, Malathion, EPN) 의 동시적 혼용

생체에 대한 환경오염물질의 작용은 늘 重複的, 時差的 및 同時的이고 우리는 이런 오염물질을 가진 각종 식품을 매일 중복적, 시차적 및 동시적으로 섭취한다. 이런 多重, 多元的 요인의 여러종 농약이 혼합된 조건에 생물이 노출됐을 때 이것이 유발시키는 돌연변이빈도는 加算的, 倍加的 혹은 상승적인지를 검토했다. 유기살균제 Captan 및 유기인계 살충제의 단독처리 및 Captan 과 이들의 서로 다른 조합의 동시적 혼합처리가 *E. coli* WP<sub>2</sub>S의 trp<sup>-</sup>를 trp<sup>+</sup> revertant 로 유발시키는 빈도 및 생산율에 주는 영향을 검토한 것이 그림 1 및 표 1이다. 그림 1에서 단독 또는 Captan 과 Diazinon, Diazinon 과 MEP, 3종, 4종 및 5종의 농약을 각 농도별로 동시적 혼합처리 했을 때의 결과는 단독처리보다 2~3종의 동시적 혼용처리쪽이 돌연변이빈도가 높았다. 표 1은 Captan, 담배 tar, Diazinon 및 MEP의 단독 또는 4종의 동시적 혼합처리 및 선량 65 erg로 UV 처리한 균현탁액을 가지고 동시적으로 복합처리한 결과이다. Captan, 담배 tar, Diazinon 및 MEP의 동시적 혼합처리하는 각 효과를 합한 가산적 결과를 보였고 처리농도를 올렸을 때는 배가적이었다.

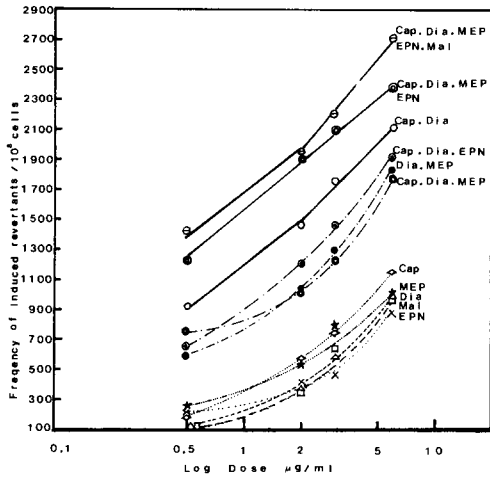


Fig. 1. Effects of simultaneous mixed treatment with each combinational composite pesticides and treatment with each pesticide at indicated dose for 30min on mutagenesis.

- ◆ Captan            × Malathion
- △ Diazinon        □ EPN
- ★ MEP             ○ Cap. Dia
- Cap. Dia. MEP
- ⊙ Cap. Dia. EPN
- ⊗ Cap. Dia. MEP. EPN
- ⊕ Cap. Dia. MEP. EPN. Mal

동시적 복합농약 처리에 대한 Antimutagen의 효과

식품과 식수 등은 연속성을 가지고 함께 공존하는 多元的 물질과 상호반응, 가산적, 배가적 결과를 보이기도 하나, 항돌연변이 물질도 공존해 있다면 서로가 상쇄되고 남은 물질이 항돌연변이제와 돌연변이제중 어느 쪽이냐에 따라 주는 영향은 다를 것이다. 표 2는 이미 항돌연변이제로 알려진 cinnamadehyde 및 tannic acid를 함유하는 plate 에 Captan 단독 및 Captan 과 2~5종 혼합처리를 동시에 했을 때 유발되는 revertants의 빈도는 감소됐고 생존율은 증가됐다.

Captan의 시차적 반복처리효과

장기적인 안목에서 같은 농약의 중복적 섭취에 의한 잔류량 증가가 유발되는 revertant의 빈도와 생산율에 미치는 영향을 검토하고자 2시간 간격으로 Captan 2.1µg/ml을 9번 반복처리 했을 때의 결과이다. 그림 2, 표 3에서 반복처리 횟수가 증가함에 따라 유발 revertants의 빈도는 3배, 5.5, ..... 115배로 지수적 상승을 보였다. 한편 생존율은 2번째 반복처리 횟수부터 5번째까지 115, 120,

188 및 143%였으며 6번째 처리부터는 처리농도 증가에 따라 감소되어 갔다.

Captan 과 유기인계 살충제의 시차적 혼용처리효과

서로 다른 종류의 농약이 2시간(대장균의 세대시간에 4배 배양기간) 간격의 시차로 들어왔을 때

**Table.1. Effects of simultaneous mixed treatment of UV and tobacco tar and each pesticide on cellular viability and mutagenesis.**

Treated mutagen (erg/mm <sup>2</sup> ) or (μg/ml)		Viable cells/ 10 <sup>5</sup> dilution plate	Net induced trp <sup>+</sup> rever- tants/plate	Frequency of induced rever- tants/10 <sup>8</sup> cells	Survival %
Captan	5	174	178	1023	54
	10	132	203	1537	41
Tobacco tar	13	315	90	286	98
	66	302	130	430	94
Dieldrin	5	261	186	713	81
	10	237	195	823	74
MEP	5	290	164	566	90
	10	258	178	690	80
Cap.Tob.Dia.MEP each	13-5	148	390	2635	46
Cap.Tob.Dia.MEP each	66-10	148	650	5285	38
UV	32.5	187	538	2877	58
	65	90	670	7444	28
UV-Cap	65-5	54	450	8333	17
UV-Dia	65-5	76	870	11447	24
UV-MEP	65-5	101	815	8069	31
UV-Tob	65-66	90	878	9756	28
UV-Cap.Tob.Dia MEP. each	65-5	80	795	9938	25
UV-Cap.Tob.Dia MEP. each	65-5	73	982	13452	23

The ranges of spontaneous trp<sup>+</sup> revertants per plate were from 9 to 16. All the determination are averages for plates.

**Table 2. Effects of cinnamaldehyde and tannic acid on the mutagenesis and cellular viability of *E. coli* B/r WP<sub>2</sub>S strain after simultaneous mixed treatment with composite pesticides.**

Mutagen concn ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	Anti mutagen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) *	Viable Cells/ 10 <sup>-5</sup> dilution plate	Net Induced trp <sup>+</sup> revertants /plate	Net frequency of Induced revertants /10 <sup>8</sup> cells (Mi)	Decreased Mi (%)	Survival (%)	Increased Survival (%)	
Captan	2	—	328	196	597	94	70	
		C30	438	16	37	94	34	
	7.7	—	314				67	
		C60	277				58	
4NQO	2.5	—	85	1027	12082		13	
		C30	91	914	10044	17	15	
		—	83				13	
		C60	75				13	
Cap. Dia	2	—	260	456	1754		55	
		C30	390	46	118	93	83	51
	5	—	393	611	1555		84	
		C30	481	120	249	84	120	22
Cap. EPN	3	—	281				60	
		C60	346				74	23
		T50	320				68	13
Cap. Dia. EPN	3	—	293	486	1659		62	
		C30	406	214	527	68	87	40
Cap. Dia. MEP	2	—	280	336	1200		60	
		C30	360	18	50	96	77	28
	3	—	209	209			45	
		C60	202				43	
Cap. Dia. MEP. EPH	3	T50	256				55	22
		T	117	259	2214		25	
		C30	190	184	968	56.3	41	64
Cap. Dia. MEP.	3	—	237				51	
		C60	166				35	
		T50	384				65	27
Cap. Dia. MEP.	3	—	245				52	
EPN. MAL.	3	C60	327				70	35
		T50	334				71	37

\*C30 cinnamaldehyde 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in plate  
C60 cinnamaldehyde 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in plate  
T50 Tannic acid 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in plate

% decrease in the Frequency of Induced revertants (Mi) per plate.

Mi can be obtained from the following expression

$$\text{Mi} = \frac{\text{mutants/test plate} - \text{mutants/control plate}}{\text{viable cells/test plate}}$$

Table 3. Effects of a serial repeated addition treatment with Captan 2.1 µg/ml per 2 hours on survival and mutagenesis.

Mutagen Final Concn (µg/ml)	Treated hours (h)	Viable cells/10 <sup>-6</sup> dilutoin plate	Induced trp <sup>+</sup> revertants/plate	Frequency of induced revertants/10 <sup>8</sup> cells (Mi)	Increased times of Mi	Survival (%)	Increased survival (%)
0	2	199	9			100	
2.1	2	186	124	62		93.5	
4.2	4	228	436	187	3	115	15
6.3	6	239	819	339	5.5	120	20
8.4	8	375	1914	508	8.2	188	80
10.5	10	185	2049	719	11.6	143	43
12.6	12	42	770	1573	25.4	21	
14.7	14	32	1246	3866	62.4	16	
16.8	16	14	734	5179	83.5	7	
18.9	18	8	580	7138	115	4.5	

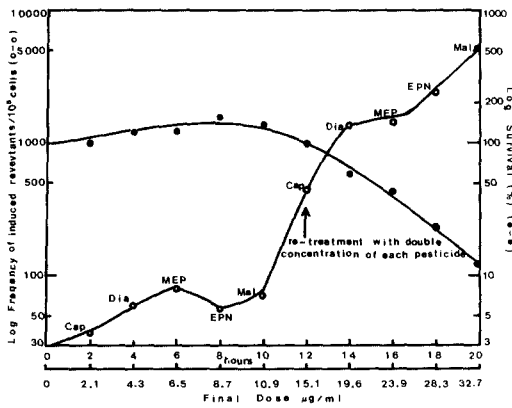


Fig. 2. Effects of a Serial repeated addition treatment with captan 2.1 µg/ml per 2 hours on Survival and Mutagenesis.

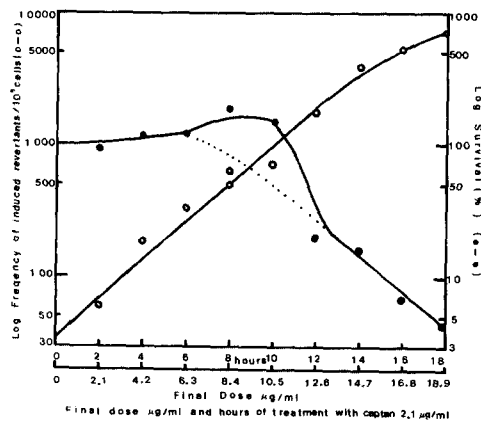


Fig. 3. Effect of a serial additional composite retreatment with double concentration of each pesticide and additional composite treatment with each pesticide per 2 hours on cellular Viability and Mutagenesis.

Table 4. Effects of a serial additional composite retreatment with double concentration of each pesticide and additional composite treatment with each pesticide per 2 hours on cellular viability and Mutagenesis

Mutagen final concn ( $\mu\text{g/ml}$ )	Treated hours (h)	Viable cells/ $10^{-6}$ dilution plate	Induced trp <sup>+</sup> revertants plate	Frequency of Induced revertants/ $10^8$ cells(Mi)	Increased times of Mi	Survival (%)	Increased survival (%)
	0	190	9				
Captan	2.1	210	84	36		105	5.5
Diazinon final	2.2 4.3	242	175	69	1.9	121.6	21.6
MEP final	2.2 6.5	247	205	78	2.2	124.1	42
EPN final	2.2 8.7	260	176	56	1.6	150.8	50.8
Malathion Final	2.2 10.9	280	203	69	1.9	140.7	40.7
retreatment							
Captan final	4.2 15.1	200	913	452	12.5(6.6)	100.5	
retreatment							
Daizinin final	4.4 19.5	117	1566	1331	36(19.3)	58.8	
retreatment							
MEP final	4.4 23.9	88	1240	1399	39(20.3)	44.2	
retreatment							
EPN final	4.4 28.3	1075	2369	66(34.3)	66(34.3)	22.6	
retreatment							
Malathion final	4.4 32.7	24	1227	5075	141(73.6)	12	



그리고 2배가 높은 농도의 이들 농약이 들어왔을 때에 대해서도 검토하고자 했다. Captan 및 각 농약 4종의 단독처리 및 그들의 농도를 배로 올려서 시차적으로 첨가한 후의 돌연변이 빈도 및 생산율을 검토한 것이 표 4 및 그림 3이다. Captan 을 첨가후 2시간 동안(대장균의 세대시간의 4 배의 시간)의 배양기간은 Captan 으로 생긴 DNA 손상을 error-prone repair 기구의 repair 결과로서 생산율의 변화를 통해 보였는데, 2시간 배양후 생산율은 DNA 손상은 회복되어 더욱 증가했다. Error-prone SOS repair 기구에 관여하는 효소량이 증가돼 있는 상태에 Diazinon 을 첨가적 처리하고 2시간후 일부시료를 채취한 결과는 생산율을 21.6%나 더 증가시켰고 돌연변이빈도는 Captan 결과보다 배가 증가됐다.

농약을 2시간 간격으로 첨가적 단독처리한 결과는 거의 비슷한 결과를 보였다. 그러나 Malathion 을 첨가적 처리하고 2시간후 농도를 배로 올려서 Captan 부터 2시간에 한번씩 순차적으로 재 첨가했을 때 생산율은 최종농도가 증가하는데 따라 감소됐고 돌연변이빈도는 최초의 Captan 에 비해 12.5 배(앞의 Malathion 처리보다 6.6배) 상승적 증가를 보였다. 각 농약을 두배 농도로 올려 재첨가한 결과는 최후의 Malathion 첨가로 돌연변이 유발빈도가 141배(앞의 Malathion 처리에 비해 73.6배) 증가된 상승효과를 보였다. 생산율의 감소와 돌연변이빈도의 상승적 증가는 배로 농도를 올린 농약을 가지고 단독, 첨가적 재처리했을 때 나타났다.

## 토 론

최근 콩나물 재배시 발아콩의 살균제(김정현 & 김명희, 1989) 골프장 잔디유지 및 각종 과일과 야채 등에 多量 사용되어온 결과 토양 및 식품에 잔류돼 있고 검출(고영수, 1986) 되고 있다. 사용량이 급증한 유기살균제 Captan 혹은 유기인계 살충제의 단독처리 및 Captan 과 서로 다른 조합의 동시적 복합처리는 각 효과를 합한 가산적 결과 혹은 배가 효과를 나타냈다(그림 1, 표 1). 우리의 상식식품에는 돌연변이원성을 현저히 감소시키는 물질도 포함하고 있음이 밝혀졌는데(Morita *et al.*, 1986, 1978; Kada *et al.*, 1978; Ohta *et al.* 1983; Shimoi *et al.*, 1985) 변이원성을 상쇄시키는 물질의 공존 및 증진시키는 물질에 관한 연구는 발암성과 관련지어 볼 때 이론 및 실용적인 면에서 중요하다. Captan 단독 및 Captan 과 다른 농약 수종과 동시적 복합처리했을 때 cinnamaldehyde 및 tannic acid 가 유발되는 revertants 의 빈도를 감소시키고 생존율을 증가시킨다는 결과(표 2)는 이러한 항돌연변이제를 함유한 식품을 함께 섭취하는 것도 각종 농약으로 부터의 발암 및 유발돌연변이 빈도 감소(Ohta *et al.*, 1986) 그리고 현대병을 줄이는 한가지 방법이라 하겠다.

같은 농약의 중복적 섭취로 잔류량이 증가되, 유발되는 revertant 의 빈도는 반복처리횟수증가(즉 최종 잔류량 증가)에 따라 상승적으로 증가되었다. 한편 생산율은 2~5회까지 증가되었으며 이러한 증가는 처음 Captan 을 첨가후 2시간 배양하는 사이에 DNA 는 손상을 repair 하기 위해(대장균의 세대시간의 4배의 배양기간에 해당되는 시간) 그 조건에 적응하기 위해, repair(Witkin, 1976) 기구에 관여하는 효소량을 증가(Morita *et al.*, 1986; Ohta *et al.*, 1984; Obana *et al.*, 1986) 시킨 상태에 제 2~5회까지의 반복처리 결과는(즉 low dose 처리) error-prone repair 기구에 관여하는 효소로 생산율을 계속 증가시키면서 돌연변이 빈도를 11.6배까지 증가시켰을 것이다. 6회째의 반복처리로 Captan 의 잔류량은 12.6 $\mu$ g까지 증가된다. Low dose 로 반복처리하면 DNA repair mechanism 에 작용하는 효소계생산이 증가돼 dose-증가에 따른 생산곡선은 shoulder 가 커져 내성으로 됐다(Davies & Sinskey, 1973). Mitomycin C

로 유발된 DNA의 cross links도 post incubation 동안 제거되나 chloramphenicol 존재하에서는 저해되므로, 처리후 유발되는 protein이 repair에 중요하다는 것을 알 수 있다(Kitayama, 1982). 생존율의 증가는 그 환경에서 repair 계를 증가시킨 세포가 적응 선택돼 증식된 결과로 볼 수 있다. Captan 첨가후 2시간 배양은 Captan으로 생긴 DNA 손상을 repair하고 증식하기에 충분한 시간이다. 대장균 *uvrA<sup>-</sup>* 균에서 UV 처리후 세포분열이 15분 늦어졌으나 60~120분 배양하는 사이 DNA는 비처리균과 똑같이 회복됐다(Rupp *et al.*, 1971). 그러나 잔류량이 많아지면 error-prone repair 기구가 유도돼 점차 생존율은 감소되고 반면에 돌연변이빈도는 상승적으로 증가됐다(그림 2, 표 3). 이러한 결과는 Captan과 유기인계 살충제의 시차적 혼용처리에서도 나타났다. 2시간별로 각 농약을 순차적 첨가처리는 생존율을 증가시켰고 돌연변이빈도를 처음 Captan 처리결과와 배로 증가시키나, 처리농도를 두배로 올려 Captan부터 2시간마다 순차적 재첨가 처리하면 생존율은 점차 감소되어가고 돌연변이빈도는 상승적으로 증가됐다(그림 3, 표 4).

한편 염기치환형 돌연변이제인 Catan은 cysteine 또는 blood를 첨가하여 10분 배양하면 돌연변이 activity가 없어지고, sulfhydryl group를 가진 사료로 사육된 쥐의 발암성은 negative 결과를 보이므로, 이런 농약이 생체내 위벽을 통해 흡수되더라도 혈액에 의해(불안정해서) 쉽게 파괴되 이들 농약의 발암성은 없을 것이라고 보고하고 있다(Moriya *et al.*, 1978). 그러나 하나하나의 단독 농약에 대한 잔류허용기준이 안전하더라도 이들 농약이 혼합되면 유발돌연변이빈도는 각각으로 구한 효과가 가산적, 배가적 및 상승적으로 증가되므로 잔류허용기준은 다원적인 원인을 고려해 여러 농약이 전체적으로 혼합되었을 때도 안전성을 줄 수 있도록 각 농약의 잔류허용 기준은 최대한 낮춤과 동시에 총 농약 잔류량 허용기준을 정할 필요가 있다. 극소량의 각종 변이원은 항돌연변이 물질도 공존되어 있는 상태에서 다원적으로 혼합된 상태에 장기간 계속 노출되었을 때와 같이 전체 요인의 종합 효과로서의 장애를 검출할 수 있는 방법개발이 필요하며, 복합적으로 항돌연변이 물질과의 반응으로 상쇄되고 남은 잔류성 환경변이 물질들을 간단 신속히 분석하는 기술개발 또한 시급하다 하겠다.

## REFERENCES

1. 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.
2. Bridges, B.A., and S.G. Sedgwich (1974): Effect of photoreactivation on the filling of Caps in deoxyribonucleic acid synthesized after exposure of *E. coli* to ultraviolet light. *J. Bacteriol.* 117(3): 1077-1081.
3. Cleaver, J.E. (1968): Defective repair replication of DNA in xeroderma pigmentosum. *Nature.* 218: 652-656.
4. Davies, R., and A.J. Sinskey, (1973): Radiation-resistants of *Sal. typhimurium* LT2: Development and characterization. *J. Bacteriol.* 113(1): 133-144.
5. Dean, B.J., and N. Danford (1984): Assays for the detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells. *In: Mutagenicity Testing* (by Stemitt & J.M. Parry) IRL Press. 187-232.
6. Ishii, Y., and S. Kondo, (1972): Spontaneous and radiation-induced deletion mutations in *E. coli* strains with different DNA repair capacities. *Mutation Res.* 16: 13-25.

7. Kada, T., K. Morita, and T. Inoue, (1978): Antimutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrrolisate. *Mutation Res.* 53: 351-353.
8. Kada, T., K. Hirano, and Y. Shirasu, (1980): Screening of environmental chemical mutagens by the rec-assay system with *Bacillus subtilis*. In: Chemical Mutagens, vol 6 (eds. F.J. de Serres and A. Hollaender), Plenum Publishing Corporation, pp. 149-173.
9. Kitayama, S., (1982): Adaptive repair of cross-links in DNA of *Micrococcus radiodurans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 697: 381-384.
10. Kondo, S., H. Ichikawa, K. Iwo, and T. Kato, (1970): Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of *E. coli* with different DNA repair capacities. *Genetics* 66: 187-217.
11. Maron, D.M., and B.N. Ames, (1983): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113: 173-215.
12. Mizusaki, S., T. Takashima, and K. Tomaru, (1977): Factors affecting mutagenic activity of cigarette smoke condensate in *Salmonella typhimurium* TA 1538. *Mutation Res.* 48: 29-36.
13. Morita, M., Hara, and T. Kada, (1978): Studies on natural desmutagens: Screening for vegetable and fruit factors active in inactivation of mutagenic pyrolysis products from amino acids. *Agric. Biol. Chem.*, 42(6): 1235-1238.
14. Morita, K., M. Hara, and T. Kada, (1986): Antimutagenic effects of 5-fluorouracil and 5-fluorodeoxyuridine on UV-induced mutagenesis in *E. coli*. *Mutation Res.* 173: 19-24.
15. Moriya, M., K. Kato, and Y. Shirasu (1978): Effects of cysteine and a liver metabolic activation system on the activities mutagenic pesticides. *Mutation Res.* 57: 259-263.
16. Obana, H., S. Nakamura, and R. Tanaka. (1986): Suppressive effects of coffee on the SOS response induced by UV and chemical mutagens. *Mutation Res.* 175: 47-50.
17. Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, and Y. Shirasu T. Kada, (1983): Antimutagenic effects of cinnamaldehyde on chemical mutagenesis in *E. coli*. *Mutation Res.* 107: 219-227.
18. Ohta, T., K. Watanabe, M. Moriya, Y. Shirasu, and T. Kada, (1983): Analysis of the antimutagenic effect of cinnamaldehyde on chemically induced mutagenesis in *E. coli*. *Mol. Gen. Genet.* 192: 309-315.
19. Ohta, T., N. Nakamura, M. Moriya, Y. Shirasu, and T. Kada, (1984): The SOS function inducing activity of chemical mutagens in *E. coli*. *Mutation Res.* 131: 101-109.
20. Ohta, T., M. Watanabe, K. Watanabe, Y. Shirasu, and T. Kada, (1986): Inhibitory effects of flavouring on mutagenesis induced by chemicals in bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 24(1): 51-54.
21. Rupp, W.D., C.E. Wilde III, D.L. Reno, and P. Howard Flanders, (1971): Exchanges between DNA strands in ultraviolet irradiated *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 61: 25-44.
22. Shimoi, K., Y. Nakamura, I. Tomita, and T. Kada, (1985): Bio-antimutagenic effect of tannic acid on UV and chemically induced mutagenesis in *E. coli*. B/r. *Mutation Res.* 149: 17-23.
23. Takebe, H., J. Furuyama, Y. Miki, and S. Kondo, (1972): High sensitivity of

- xeroderma pigmentosum cells to the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Mutation Res.* 15: 98-100.
24. Venitt, S., C. Crofton-Sleigh, and R. Forster, (1984): Bacterial mutation assays using reverse mutation. *In: Mutagenicity Testing* (by S. Venitt & J.M. Parry) IRL Press 45-98.
25. Weigle, J.J. (1953): Induction of mutation in bacterial viruses. *Proc, Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 39: 623-636.
26. Witkin, E.M. (1976): Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*. *Bacteriol. Rev.* 40(4): 869-907.
27. 고영수, (1986) : 위해 농약사용실태조사보고서, 소비자 문제풀 연구하는 시민의 모임주최 프레젠타 11월 26일.
28. 김정현, 김명희, (1989) : 콩나물의 잔류 농약분석. *한국식품과학회지* 21 (2) : 224 - 228.
29. 양창술, (1982) : 토양중의 합성농약의 거동과 토양 생물상에 미치는 영향. *건국대학교 부설 농업자원개발연구소 논문집* 제 7 집 159 - 167.

**Research on Environment Mutagens and Antimutagen: Effects of Mixed Treatment of Fungicide Captan and Organic Phosphorus Insecticides Diazinon, MEP, Malathion and EPN on Cellular Viability and Mutagenesis in *E. coli* WP<sub>2</sub>S (uvrA<sup>-</sup>, trp<sup>-</sup>) Strain.**

**Bong-Gum, Cho**

*Department of Biochemistry, College of Natural Science,  
Kon-kuk University, Seoul, Korea*

This study was carried out to investigate the effects of individual treatment of fungicide Captan or insecticides Diazinon, MEP, Malathion and EPN, and repeated treatment of Captan and to simultaneous mixed treatment with these pesticides on the frequency of induced mutation and survival rate in *E. coli* WP<sub>2</sub>S (uvrA<sup>-</sup>, trp<sup>-</sup>) strain.

The results were as follows.

1. The simultaneous mixed treatment of Captan with Diazinon, MEP, Malathion, EPN, and UV radiation raised the frequency of induced mutation in *E. coli* WP<sub>2</sub>S (uvrA<sup>-</sup>, trp<sup>-</sup>) strain. When the concentration of the pesticides was increased twice as much, the frequency of induced mutation became double. However, the increased frequency of induced mutation was depressed with addition of cinnamaldehyde 30mg and 60mg/ml and tannic acid 50mg/ml concentration of medium respectively, but survival rate of this strain was increased in the same condition.
2. The time differential repeat-treatment (every two hours) increased the frequency of induced revertants in *E. coli* WP<sub>2</sub>S(uvrA<sup>-</sup>) exponentially, and further the survival rate of this strain was increased by repeat-from 2 to 5 times, but decreased by the treatment from 6 times. These results suggest that the increase of the frequency of induced mutation in the strain is due to error-prone rather than increase of survival rate by repairing of DNA damage, and that the higher the final residual concentration of the chemicals is, the lower the survival rate of the strain is.
3. The frequency of induced mutation and the survival rate in *E. coli* WP<sub>2</sub>S (uvrA<sup>-</sup>, trp<sup>-</sup>) strain were increased by the time differential treatment (every 2 hours) of different additional pesticides following captan-treated. And when the concentration of pesticides was increased twice as much under the same condition, the frequency of induced mutation was increased synergistically while, the survival rate was decreased.
4. Because the frequency of induced mutation from the treatment of simultaneous mixed pesticide was increased additionally doubly and synergistically, the residual tolerance level of each pesticide should be set up to be lowered as much as possible in respect to the total tolerance level of pesticide-residual.