

# Aflatoxin이 *Bacillus megaterium*의 生育에 미치는 영향

崔 彦 浩 · 李 寬 寧 · 李 瑞 來

韓國原子力研究所 農業生化學研究室

(1975년 12월 15일 수리)

## Effect of Aflatoxin on the Growth of *Bacillus megaterium*

by

Eon-Ho Choi, Kwan-Young Lee and Su-Rae Lee

Agricultural Biochemistry Laboratory, Korea Atomic

Energy Research Institute, Seoul

(Received December 15, 1975)

### Abstract

Growth inhibition and morphological alteration of *Bacillus megaterium* NRRL B-1368 in aflatoxin-containing TGY liquid media and its growth restoration in normal media were investigated.

Crude aflatoxins (B<sub>1</sub> 22.7%, B<sub>2</sub> 1.6%, G<sub>1</sub> 3.6 % and G<sub>2</sub> 0.2%) at concentrations of more than 20 $\mu$ g/ml inhibited the growth of the microorganism and prevented the formation of septum, resulting in abnormal elongation and disturbance of cell division. The aberrant cells, however, grew normally by septum formation and cell division upon returning to aflatoxin-free culture media. It was, therefore, assumed that aflatoxin affects the function of mesosome related to septum formation in bacteria.

### 서 론

Aflatoxin은 *Aspergillus*屬과 *Penicillium*屬에 속하는 곰팡이의 어떤 특정균주에 의하여 생성되는 mycotoxin의 일종으로서 고등동물에 대하여 發癌, 致死 등 강력한 毒性작용을 나타낸다. (1)

Aflatoxin의 독성작용을 연구하는 생물재료로서는 주로 쥐의 肝과 어떤 종류의 세균이 이용되어 왔다. (2-12) Burmeister & Hesseltine (2)은 329종에 달하는 미생물의 aflatoxin에 대한 感受性を 檢索한 결과 *Bacillus brevis*와 *B. megaterium* 중의 몇 균주가 극히 민감하다고 보고하였으며 Lillehoj 등 (3)은 *Flavobacterium aurantiacum*의 生細胞와 死細胞간의 aflatoxin 吸收能을 비교하고

aflatoxin이 세포내에 흡수, 결합됨을 증명하였다. Lillehoj 등 (3), Beuchat & Lechowich (4)는 aflatoxin에 의한 세균의 형태적인 변화를 관찰하였고 Clifford 등 (5,6), King & Nicholson (7)은 핵산과 aflatoxin과의 관계를 보고한 바 있다. 그러나 aflatoxin이 미생물 세포내에서 어떠한 방법으로 결합하고 또 독성작용을 어떻게 일으키는가에 대한 機作은 아직도 불분명한 점이 많이 남아 있다.

저자들은 국내 變質米에서 분리된 *Aspergillus flavus* var. *columnaris* 균주가 aflatoxin 생성능을 가지고 있음을 보고한 바 있다. (12,13) 이와 관련하여 aflatoxin이 미생물에 미치는 생물학적 효과를 연구중에 있는 바 그 중 aflatoxin에 민감한 세균으로 알려진 *Bacillus mega-*

terium의 生育阻害, 형태적 변화와 生育回復 과정에 미치는 aflatoxin의 영향을 조사하였기에 그 결과를 이에 보고한다.

### 실 험 방 법

#### 1. Bacillus megaterium 균주의 배양

시험균주로 사용된 Bacillus megaterium NRRL B-1368 균주는 미국 농무성 Northern Regional Research Laboratory에서 분양받은 것이다.

B. megaterium 균주를 37°C TGY(수용액 1,000 ml 중 tryptone 10 g, glucose 2 g, yeast extract 5 g) 사면배지에서 약 18시간 배양한 후 50 ml의 TGY 액체배지가 들어있는 300 ml 진탕배양용 후라스크에 접종하였다. 회전식 진탕배양기(Yanagimoto Model 24, 100 rev/min)로 37°C에서 2.5~3시간 배양한 對數期의 세균 현탁액은 Spectronic 20 spectrophotometer를 사용하여 파장 660 mμ에서의 흡광도를 측정, 배양액 1 ml당 10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup> 개가 되도록 농도를 조절하여 현탁原液으로 사용하였다.

#### 2. Aflatoxin의 조제 및 처리

Aflatoxin 생산균주로 미국 농무성 Northern Regional Research Laboratory에서 분양받은 Aspergillus parasiticus NRRL 2999 균주를 이용하였다. 즉 본 균주를 蒸 煮한 백미에 접종, 6일간 진탕배양하여 생성된 aflatoxin을 chloroform으로 추출하고 silica gel column을 통과시키는 일련의 정제 과정을 거쳐 crude aflatoxin (B<sub>1</sub> 22.7%, B<sub>2</sub> 1.1%, G<sub>1</sub> 3.6%, G<sub>2</sub> 0.2%)을 얻었다. 정제 및 정량방법은 前報<sup>(12, 13)</sup>에서 기술된 바와 같다.

供試균주의 aflatoxin처리를 위해에서는 chloroform에 녹인 crude aflatoxin용액 일정량을 25 ml의 TGY액체배지가 들어 있는 300 ml의 삼각 후라스크에 넣고 15 psig에서 15분간 가열하여 살균과 동시에 chloroform을 제거하였다. 이때 crude aflatoxin의 농도는 액체배지 1 ml 당 0, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 μg이 되도록 하였다 이와 같이 만든 배지에 B. megaterium 현탁원액을 1 ml씩 접종하고 회전식 진탕배양기로 37°C에서 진탕배양하였다.

#### 3. 생육곡선 및 생존균수의 조사

Aflatoxin 함유배지에서의 B. megaterium의 생육상태를 조사하기 위하여 6시간 배양기간중 매시간마다 배양액을 6 ml와 0.5 ml씩 따로 따로 취하였다. 前者는 660 mμ에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 그리는데 사용하였고, 後者는 M/15 phosphate buffer (pH 7.0)로서 10배 단위로 적당히 희석하여 TGY 평판배지(내경 10 cm의 petri dish)에 0.2 ml씩 접종하고 37°C에서

18시간 배양후에 현상된 colony를 계수하여 生存균수를 조사하는데 이용하였다.

#### 4. 생육 회복현상의 조사

Aflatoxin 함유배지에서 3시간 진탕배양한 B. megaterium 배양액을 원심분리(8,000×G에서 10분간)하고 M/15 phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척하여 배양액과 용액중의 aflatoxin을 제거하였다. 殘渣(균체)에 phosphate buffer를 다시 가하여 각 구간에 균체현탁액의 흡광도가 동일하도록 조절한 후 aflatoxin이 함유되지 않은 TGY 액체배지 75 ml에 1 ml씩 접종하였다. 이를 37°C에서 9시간 진탕배양하면서 매시간마다 6 ml씩을 취하여 흡광도를 측정하였다.

#### 5. 현미경 관찰

위 3항과 4항의 B. megaterium 배양액을 한시간마다 數滴씩 slide glass에 떨어뜨려서 그대로 방치, 건조시킨 다음 crystal violet 액으로 染色한 후 현미경을 사용하여 형태변화를 관찰하고 사진촬영(1,500배) 하였다.

### 결 과

#### 1. 세균생육에 미치는 aflatoxin의 영향

Crude aflatoxin이 함유된 TGY 액체배지에서 B. megaterium을 배양하면서 흡광도로 균체증식량을 조사한 결과, Fig. 1에서와 같이 aflatoxin의 농도가 높을수록 균의 증식이 억제되었다. 생육곡선을 볼때 crude aflatoxin의 농도가 2.5, 5.0 μg/ml에서는 균의 증식속도가 약간 늦기는 하였으나 배양 5~6 시간후에는 무처리구에서

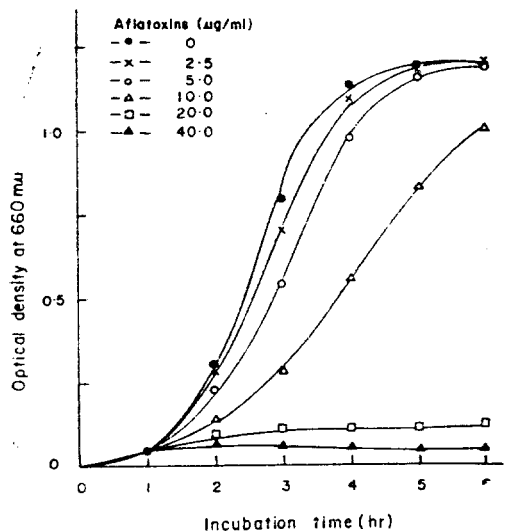


Fig. 1. Growth of Bacillus megaterium NRRL B-1368 in TGY liquid media containing crude aflatoxins, as determined by turbidity method.

와 마찬가지로 定常期(stationary phase)에 도달하였다. 10  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서는 증식속도가 매우 낮아졌고 20  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 3시간 이후부터 흡광도의 증가가 전혀 없었으며 40  $\mu\text{g/ml}$ 에서는 오히려 감소현상을 보였다. 供試菌을 crude aflatoxin이 함유된 TGY 액체배지에서 배양하는 기간중 生存菌數를 조사하고자 TGY 평판배지에서 計數한 결과는 Fig. 2와 같다. 이에 의하면 aflatoxin이 함유된 배지에서 증식이 정지된 것으로 보

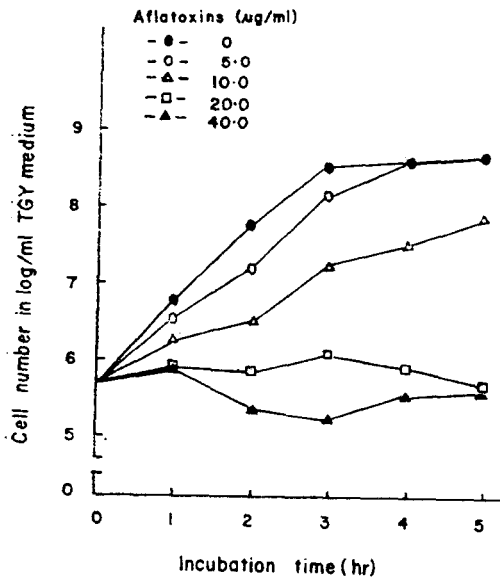


Fig. 2. Growth of *Bacillus megaterium* NRRL B-1368 in TGY liquid media containing crude aflatoxins, as determined by viable cell count on plate.

이던 20, 40  $\mu\text{g/ml}$  농도에서도 colony가 상당수 형성되고 있었으며 供試菌이 적어도 배양 5시간까지는 aflatoxin에 의하여 致死되지 않았음을 알 수 있었다. 20  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 배양초기와 말기 사이에 큰 차를 보여주지 않고 있었으나 40  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 배양 2시간 후에 감소를 보이다가 다시 증가하는 경향을 보여주었다.

## 2. Aflatoxin 처리세균의 生育回復현상

*B. megaterium*을 aflatoxin이 함유된 TGY 액체배지에서 3시간 배양한 후 균체를 세척하고 aflatoxin이 첨가되지 않은 TGY 액체배지에서 배양하면서 흡광도 측정에 의하여 세균의 生育을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 이에 의하면 aflatoxin 처리구는 상당히 느리게 증식되기 시작하였지만 배양 4~5시간 이후부터는 20, 40  $\mu\text{g/ml}$  처리구에서도 흡광도의 측정이 가능하였고 시간이 경과함에 따라 급격히 증가하였다.

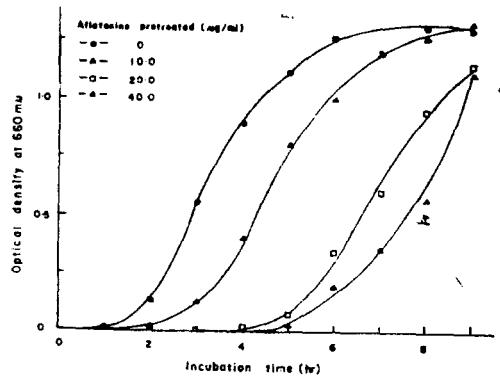


Fig. 3. Growth restoration of *Bacillus megaterium* NRRL B-1368 pretreated with crude aflatoxins as incubated in aflatoxin-free TGY liquid media.

결국 供試菌은 aflatoxin의 존재하에서 그의 生育이 억제되었으나 시험한 aflatoxin의 농도 및 처리시간의 범위에서는 致死효과를 나타내지 않은 것 같으며 aflatoxin이 제거되면서 그의 生育이 다시 정상적으로 회복되었다.

## 3. Aflatoxin에 의한 세균의 形態의 변화

*B. megaterium*을 aflatoxin이 함유된 배지에 배양하면 供試菌의 형태에 변화가 생겼고 그로 인하여 현미경에 의한 計數도 곤란하였다. 즉 aflatoxin의 10  $\mu\text{g/ml}$  농도 처리구에서부터 畸形의로 길게 伸長한 균체가 小數이나 觀察되었고 20, 40, 80  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 거의 전부가 기형적인 긴 균체로서 긴것은 正常균체의 10~20배에 달하였다 (Fig. 4 A, B). Aflatoxin 처리구에서는 균체가 기형적으로 길 뿐만 아니라 고농도에서는 Gram 染色이 정상세포보다 연한 색을 보였으며 세포의 바깥쪽이 마치 褪色된 것 같이 보이는 균체가 상당수 있었다. 이와 같은 기형적인 균체의 출현은 배양 첫째 시간부터 볼 수 있었으며 따라서 처음부터 균수를 계수하기가 곤란하였다. 160  $\mu\text{g/ml}$  농도에서는 기형세포가 전혀 보이지 않았고 정상세포와 형태가 동일하였으며 이는 모두 죽은 死細胞임이 배양으로서 증명되었다 (Fig. 4 C).

Aflatoxin 함유 배지에서 3시간 배양한 供試菌을 정상적인 배지에 옮겨 배양하면 시간이 경과함에 따라 증식이 가능하였다고 前述한 바 있는데 현미경 관찰에서 이러한 회복현상은 더욱 잘 확인될 수 있었다 (Fig. 5) 즉 畸形균체를 정상적인 배지에 아주 고농도로 배양하여 현미경으로 관찰하면 기형적으로 길었던 많은 균체가 시간이 경과함에 따라 거의 보이지 않았고 正常형태의 균체가 많아졌음을 알 수 있었다. 다시말해서 기

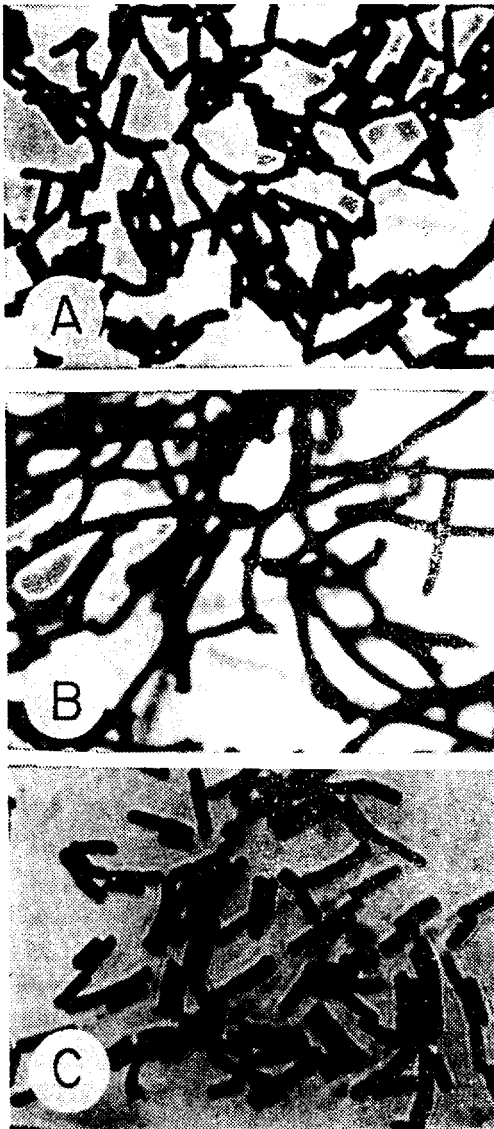


Fig. 4. Morphological alterations of *Bacillus megaterium* NRRL B-1368 cultured in aflatoxin-containing TGY media for 3 hours. The cultures were centrifuged and washed three times before taking photographs (magnified 1500X).  
 A, normal cells in aflatoxin-free medium;  
 B, abnormal cells in aflatoxin-containing medium (40 µg/ml);  
 C, dead cells in aflatoxin-containing medium (160 µg/ml).

형적으로 길었던 균체가 끊어져서 정상세포로 바뀐 것이다. 이들 기형세포를 저농도로 배양하면 3시간 이후부터 긴 균체가 염색이 잘 되어서 여러마디로 구분된 것이 더욱 뚜렷하게 보이며 시간이 경과함에 따라서 마

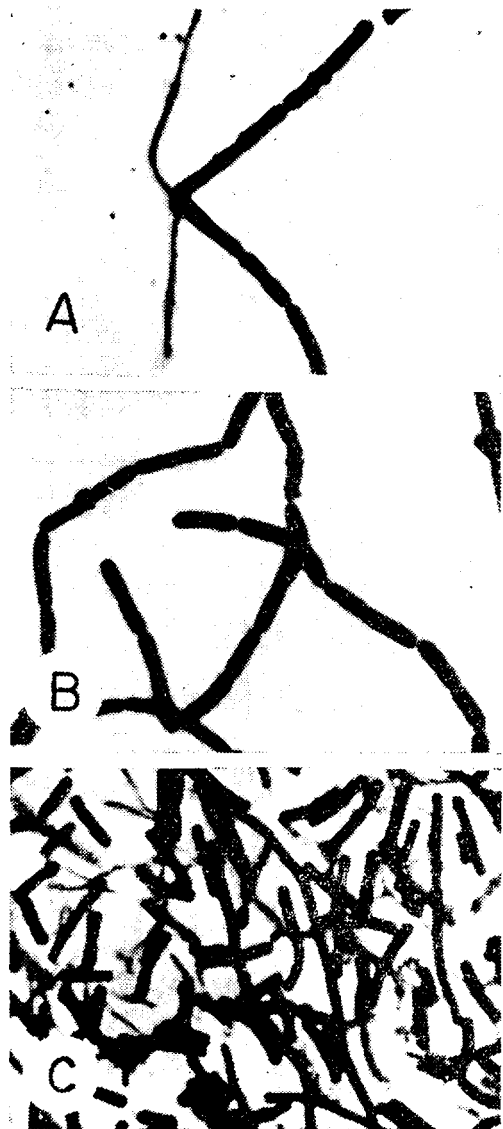


Fig. 5. Recovery of aberrant cells grown in aflatoxin-containing TGY media (40 µg/ml) as transferred to aflatoxin-free media (magnified 1500X).  
 A, 5-hour culture at a low cell concentration;  
 B, 6-hour culture at a low cell concentration;  
 C, 8-hour culture at a high cell concentration.

디마디가 끊어져 정상적인 세포형태를 보였다. 즉 aflatoxin의 어떤 작용으로 인하여 隔壁이 형성되지 못하고 길기만 하던 균체가 경해진 위치, 즉 원래부터 분렬하여 끊어졌어야 할 위치에 격막을 형성하고 끊어지면서

한개의 기형적인 균체에서 많은 수의 독립된 個體를 형성하는 회복현상을 보였다.

## 고 찰

Aflatoxin의 종류로서는 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub> 등이 있는 바 그 중 B<sub>1</sub>은 동물에 대한 독성이 가장 강하고 곰팡이에 의하여 가장 많이 생성되는 것으로 알려져 있다. (4) 본 실험에 사용된 crude aflatoxin의 純度는 27.6% (B<sub>1</sub> 22.7%, B<sub>2</sub> 1.1%, G<sub>1</sub> 3.6%, G<sub>2</sub> 0.2%)로서 그중 독성이 강한 B<sub>1</sub>과 G<sub>1</sub>은 각각 82%와 13%를 차지하였다. Aflatoxin은 물에 난용성이며 열에 매우 안정하기 때문에 (4) chloroform에 녹여 배지에 첨가하였으며 chloroform은 배지를 가압살균할 때 쉽게 제거할 수 있었다.

*B. megaterium* NRRL B-1368 균주는 aflatoxin에 매우 민감하므로 aflatoxin의 生物學的 同定에 이용되고 있다. (18,19) 본 실험에서 이균주는 crude aflatoxin 2.5 µg/ml의 농도에서도 다소 생육에 阻害를 받았으며 20 µg/ml 이상의 농도에서는 3시간 이후부터 균체량이 거의 증가되지 않았다. 고농도의 aflatoxin 처리구에서는 균체가 畸形的으로 길어지기만 하고 분열이 일어나지 않기 때문에 현미경에 의한 計數가 매우 곤란하여 탁도로서 균체량의 증가를 판단할 수 밖에 없었다. 20 µg/ml 이상의 농도에서는 배양초기에 균체가 길게 신장하여 긴 것은 평균길이의 10~20배에 달하며 그 때문에 탁도가 증가하나 이들이 분열하지 않고 停滯상태에 있어 3시간 이후부터는 탁도가 전혀 증가하지 않는 것 같다.

배양액중에 있는 aflatoxin은 세균에 의하여 吸收, 結合된다고 한다. Sporn등 (16)에 의하면 aflatoxin은 DNA와 결합하며 이것이 癌性작용의 원인이 된다고 하였다 Lillehoj등 (3)은 생세포와 死세포의 aflatoxin 吸收能을 비교하고 감압살균된 *Flavobacterium aurantiacum*의 死세포에 의하여 흡수된 aflatoxin은 水洗에 의하여 추출될 수 있었으나 생세포에 의하여 흡수된 것은 추출될 수 없었다고 보고하였다. 한편 *B. megaterium*을 사용한 실험에서는 균체에 흡수된 aflatoxin이 3회 수세로서 68%, 5회 수세로서 78%가 제거되었으며 나머지도 超音波, chloroform처리에 의하여 추출될 수 있었다고 하였다. (10) 또한 Clifford & Rees (6)은 DNA-aflatoxin 혼합물을 sephadex column으로 분리하였다고 한다. 위와 같은 사실로 보아 aflatoxin의 세포내 결합은 aflatoxin의 분해 또는 공유결합에 의하는 것이 아닌 극히 약한 결합임이 분명하다.

본 실험에서 aflatoxin에 처리되었던 供試菌은 3회만

水洗하여 生育回復과정을 조사하였기 때문에 正常배지에 옮겼을때 균체는 아직도 상당량의 aflatoxin을 함유하고 있었을 것으로 생각된다. 그러나 供試菌은 시간이 경과함에 따라 회복현상을 보였다. 다시 말해서 기형적으로 길었던 균체에 일정간격으로 隔膜(septum)이 생기고 나중에는 끊어져서, 즉 분열하여 독립된 여러개의 개체로 나누어지고 이들이 정상적으로 세포분열을 새로 시작함을 볼 수 있었다. 이것으로 보아 aflatoxin은 세포분열에 있어서의 필수조건인 격막형성에 어떤 저해를 일으킴이 틀림없다. 고농도의 aflatoxin 처리에서는 세포가 때로는 가늘어지고 염색이 연하게 되는 점으로 보아 세포벽의 형성에도 어떤 장애가 있었으나 세포가 상당히 길게 신장할 수 있었다는 점으로 보아 그 보다는 격막형성에 직접적인 장애가 있지 않았나 생각된다.

세균에 있어서 격막형성에는 mesosome이 필수적으로 관여하며 또한 격막이 형성되지 않으면 세포분열은 물론 포자형성도 불가능하다. (17,18) 그러므로 aflatoxin 함유배지에서 供試菌을 장시간 배양후에도 포자가 발견되지 않은 것은 너무나 당연한 일이다. 궁극적으로 aflatoxin은 mesosome의 機能에 어떤 영향을 주는 것으로 생각되며 이에 대하여는 앞으로 追試되어야 할 課題라 하겠다.

## 요 약

Aflatoxin이 함유된 TGY 액체培地에서 *Bacillus megaterium* NRRL B-1368 균주를 배양시 供試菌의 生育阻害, 形態的 변화 및 正常배지에서의 生育回復과정을 조사하였다.

Crude aflatoxin (B<sub>1</sub> 22.7%, B<sub>2</sub> 1.6%, G<sub>1</sub> 3.6%, G<sub>2</sub> 0.2%)의 농도 20 µg/ml 이상에서는 供試菌의 生育이 완전히 抑制되었고 隔膜이 형성되지 않아 畸形的으로 伸長하는 세포분열의 장애현상을 보였다. 이들 畸形세포를 正常배지에서 다시 배양하던 격막이 형성되면서 正常세포로 분열, 증식되었다. 따라서 aflatoxin은 세균의 격막형성에 관계하는 mesosome의 機能에 영향을 미치는 것으로 推論되었다.

## 참 고 문 헌

1. Goldblatt, L. A. (ed.): *Aflatoxin: Scientific background, control and implications*, Academic Press, New York (1969).
2. Burmeister, H. R. and Hesseltine, C. W.: *Appl. Microbiol.*, **14**, 403 (1966).
3. Lillehoj, E. B., Ciegler, A. and Hall, H. H.: *J.*

- Bacteriol.*, 93, 464 (1967).
4. Beuchat, L. R. and Lechowich, R. V.: *Appl. Microbiol.*, 21, 124 (1971).
  5. Clifford, I., Rees, K. R. and Stevens, M. E. M.: *Biochem. J.*, 103, 258 (1967).
  6. Clifford, J. I. and Rees, K. R.: *Biochem. J.*, 103, 467 (1967).
  7. King, A. M. Q. and Nicholson, B. H.: *Biochem. J.*, 114, 679 (1969).
  8. Gelboin, H. V., Wortham, J. S., Wilson, R. G., Friedman, M. and Wogan, G. N.: *Science*, 154, 1205 (1966).
  9. Lillehoj, E. B. and Ciegler, A.: *J. Bacteriol.*, 94, 787 (1967).
  10. Lillehoj, E. B. and Ciegler, A.: *J. Gen. Microbiol.*, 54, 185 (1968).
  11. Beuchat, L. R. and Lechowich, R. V.: *Appl. Microbiol.*, 21, 119 (1971).
  12. 이관영, 이서래 : 한국식품과학회지, 6, 169 (1974).
  13. 이관영, 최언호, 이서래 : 한국생화학회지, 8, 1 (1975).
  14. Dollear, F. G.: Detoxification of aflatoxins in foods and feeds, in *Aflatoxin* edited by Goldblatt, L.A., Chapter 13, Academic Press, New York (1969).
  15. Clements, N. C.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 51, 1192 (1968).
  16. Sporn, M. B., Dingman, C. W., Phelps, H. L. and Wogan, G. N.: *Science*, 151, 1539 (1966).
  17. Holt, S. C. and Burge, R. E.: *Bacteriol. Rev.*, 33, 346 (1969).
  18. Holt, S. C., Gauthier, J. J. and Tipper, D. J.: *J. Bacteriol.*, 122, 1322 (1975).