

微生物에 의한 殺魚性物質의 生成 및 그 作用

都 在 浩 · 徐 正 埴

慶北大學校 農科大學 農化學科
(1978년 3월 15일 접수)

Production and Action of Microbial Piscicidal Substance

Do Jae Ho · Jung Hwn Seu

Department of Agricultural Chemistry, Kyung Pook National University, Taegu, Korea
(Received March 15, 1978)

Abstract

Piscicidal substance produced by *Streptomyces* sp. isolated from soil was toxic against various kinds of fish. After extraction with CHCl_3 from the culture medium, the substance was purified by avicel column chromatography.

In order to test toxicity, various kinds of fish were subjected to the aqueous solution of 100 mg of the substance per liter of water. Generally, the substance was toxic to most fish, but *Macropodus chinenses* and *Misgurnus mizolepis* are resistant to the substance than *Gobius similis* and *Pseudorasbora parva*.

The substance was stable at pH range, 3.0 to 7.0, but labile at alkaline pH, and to heat as well. Succinic dehydrogenase on most of tissue cell of *Cyprinus carpio* was inhibited by this substance strongly, but spinal cord was not inhibited.

By addition of Cu and Pb salts to the culture medium, piscicidal substance producibility was activated.

緒 論

지금까지 非病原性이라고 취급되어 온 여러가지 微生物의 毒性物質生成에 對한 研究가 많이 이루어졌으며 특히 絲狀菌類에 의해서 生成되는 毒性物質은 約 200種에 이르는데 가장 代表的인 것은 1960年 英國에서 發見된 *Aspergillus flavus*의 代謝生成物인 aflatoxin이며 이 aflatoxin에 관해서는 詳細히 研究⁽¹⁾되어 오고 있으며 잘 알려져 있는 toxin이다.

한편 殺魚類性物質에 對한 研究는 化學藥品⁽²⁻³⁾과 生物由來 특히 植物由來⁽⁴⁻¹⁴⁾의 殺魚性物質에 관한 研究는 많지만 微生物 由來의 殺魚性物質은 1948年에 發見된 antifungal antibiotics인 antimycin

(15-18)外에는 거의 알려진바가 없으며 1974年 本實驗室에서 宋等⁽¹⁹⁻²²⁾이 發表한 것에 불과하다.

요즈음 급속도로 發達하고 있는 微生物工業으로 말미암아 有效物質은 使用하고 廢棄物을 버리는데 이러한 廢棄物이 魚類에 對해 毒作用을 나타낼 수 있는 가능성이 있다.

이러한 관점에서 本實驗에서는 放線菌이 生成하는 物質이 魚類에 毒作用을 나타내므로 이 物質이 魚類에 미치는 여러가지 基本的 性質에 對해서 實驗한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 供試菌株의 分離 및 選別

本實驗에 使用한 菌株는 大邱近郊 및 八公山 一

帶의 土壤을 菌源으로 하여 約 200 餘種의 放線菌을 分離하였으며 그 分離用 培地는 다음과 같다.

Potato ext. sol. 100 ml, K_2HPO_4 0.05%,
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, NaCl 0.1%,
 Peptone 0.25% glucose 1.0%
 final pH 7.4

上記 組成의 培地를 常法에 따라 殺菌한 後(15 Lbs, 15 分間) 接種하여 $30^\circ C$ 에서 5~6 日間 培養하여 그 培養濾液을 一定濃度로 稀釋하여 참붕어(*Pseudorasbora parva* L.)⁽²³⁾를 飼育시켜 그 生存時間을 測定하여 生存時間이 가장 짧은 菌株(At-518) 一株를 選別하였으며 一般적으로 한 試驗區에 4~5 마리의 참붕어(3~4 cm)를 40 ml의 水를 넣은 100 ml 비이커內에서 飼育시켰다.

2. 供試魚類

供試魚類로서는 다음과 같으며 주로 참붕어를 對象으로 하였다.

참붕어(*Pseudorasbora parva* Temmincket Schlegel)

잉어(*Cyprinus carpio* L.)

피라미(*Zacco platypus*, T. et. S.)

붕어(*Carassius carassius* L.)

금붕어(*Carassius carassius* L. gold fish)

메기(*Parasilus asotus* L.)

미꾸라지(*Misgurnus mizolepis* G.)

밀어(*Gobius similis* Jordan et Synder)

버들붕어(*Macropodus chinensis* Bloch)

以上の 魚類를 本大學 校庭內의 연못과 慶北 達城郡 洛東江 流域에서 採取하였다.

3. 毒性物質의 分離

本 實驗에 使用한 毒性物質을 얻기 위하여 glucose 2.0%, soybean meal 1.0%, peptone 0.5%, NaCl 0.2%의 液體培地(pH 7.4)를 常法에 따라 殺菌한 後 $30^\circ C$ 에서 5~6 日間 靜置培養한 後 그 培養原液을 Fig. 1에서 보는 바와 같이 分離하였다.

1. Succinic dehydrogenase inhibition test(S. D.

I. test)

잉어(全長 20 cm)의 臟器 및 筋肉組織을 摘出直後 約 0.5 g에 對하여 1 ml의 生理食鹽水를 加하여 磨碎한 後 三重으로 된 꺼즈친으로 여과하여 얻은 均一한 細胞懸濁液과 0.33 mg/ml의 本 試料溶液을 各 各 1 ml씩 Thunberg tube의 主室에 加하여 $37^\circ C$ 에서 1.5 時間 前處理시킨 後 T. T. C. 0.335 mg/ml 溶液과 Na-succinate 27 mg/ml 溶液을 各 各 1 ml씩 加한 副室을 附着하여 3 分間 減壓한 後

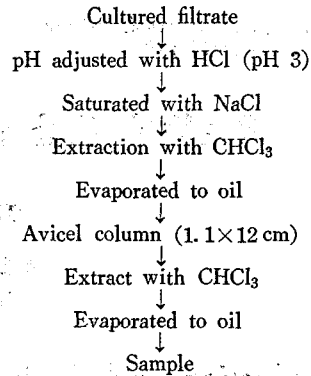


Fig. 1. Preparation of Sample.

tube의 兩液을 混合하여 1.5 時間동안 作用시킨 後 還元된 2,4,6-triphenyltetrazolium(TTCH₂)를 10 ml의 acetone을 加하여 溶解시키고 魚類의 細胞 및 기타 침전물은 遠心分離하여 除去한 後 그 上層液을 最하여 還元된 2,4,6-triphenyltetrazolium chloride(TTCH₂)의 色度를 比色하여 (470 nm) 本 試料를 加하지 않은 對照區와 吸光度의 差로서 그 阻害能을 나타내었다.

結 果

1. 毒性

本 物質의 活性度를 測定하기 위하여 9.4 mg/l에서 300 mg/l까지의 各 濃度에서 體長 3.0~4.0 cm의 참붕어의 生存時間을 보면 75 mg/l 濃度에서 約 140 分 以內에 참붕어를 致死시킬 수 있는 비교적 강한 毒性을 나타내는 物質이었으며, 對照區에서는 48 時間 以上 正常的으로 生存하였으므로 以下 實驗에서는 對照區의 生存時間의 記述을 省略하였으며 그 結果는 Fig. 2와 같다.

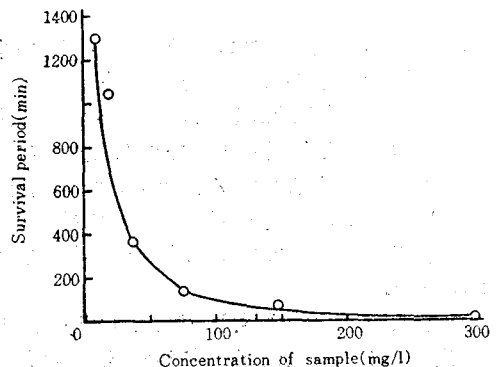


Fig. 2. Piscicidal Activity of Sample on *Pseudorasbora parva*.

2. 毒性試料의 pH에 對한 安定性

本 毒性試料을 600 mg/l 濃度에서 0.1M phosphate buffer 용액 pH 3.0~11.0 까지 各 段階의 溶液에 30°C에서 10 時間까지 處理하면서 經時的으로 그 殘存活性을 檢討한 結果 pH 3~7 사이는 매우 安定하였으나 alkali 性에서는 급격히 失活했으며 緩衝溶液으로 處理한 後 本 試料의 最終濃도가 90 mg/l 로 되게 하였으며 對照區에도 同一한 濃度の 緩衝溶液을 添加한 結果 緩衝溶液 自體는 全然 魚類에 對하여 影響이 없음을 Fig. 3 과 같이 確認하였다.

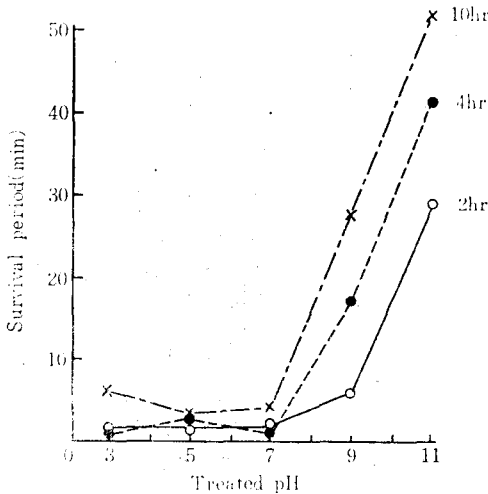


Fig. 3. Stability of the Sample in Various pH. Sample solution was treated at 30°C from 2 to 10 hrs. The treated sample was diluted with 40 ml pond water (90 mg/l). The applied fish was *Pseudorasbora parva*.

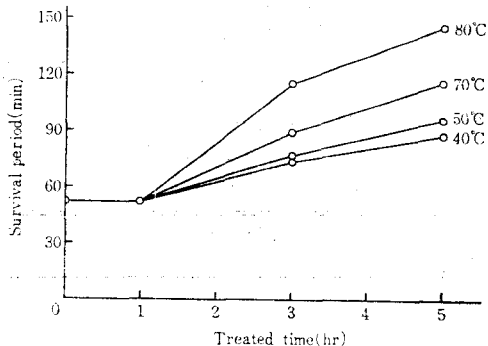


Fig. 4. Heat Stability of the Sample. Sample solution (225 mg/l) was treated at a given temperature. After heat treatment *Pseudorasbora parva* was subjected to the sample solution to determine the survival time.

3. 毒性試料의 溫度에 對한 安定性

本 毒性試料의 溫度에 對한 安定性을 檢討하고 자 225 mg/l 의 溶液을 40°C에서 80°C 까지 段階別로 5 時間까지 處理하면서 經時的으로 殘存活性을 常法에 따라 培養어에 對한 生存時間을 測定한 바 그 結果는 Fig. 4 와 같다.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 處理後 1 時間까지는 別 影響이 없었으나 그 以後부터는 서서히 失活하는 傾向을 나타내었다.

5. 水溶液 狀態에서의 安定性

本 試料을 100 mg/l 의 濃度로 되게 하여 水溶液 狀態에서의 安定性을 檢討하기 위해서 7°C에서 5 日間까지 處理하면서 그 殘存活性을 測定한 結果는 Fig. 5 와 같다.

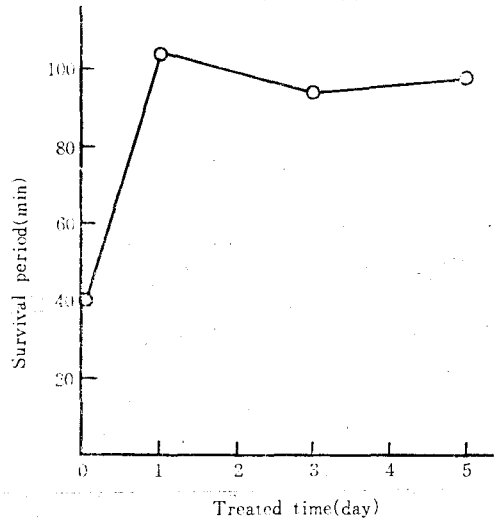


Fig. 5. Stability of the Sample (100 mg/l) in Aqueous Solution. The applied fish was *Pseudorasbora parva*.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 處理後 하루까지의 급격한 失活을 나타냈으나 그 以後에서는 別 影響을 나타내지 않았다.

6. Complex media에서의 toxin 生成能

Peptone, beef extract, asparagine 및 soybean meal 등을 질소원으로 한 여러가지 培地에서의 毒性物質 生成能을 檢討한 結果는 Table 1 과 같이 glucose, soybean meal medium에서 比較的 높은 toxin 生成能을 나타내었다.

7. 魚種 및 魚體重에 따른 毒性的의 比較

韓國産 淡水魚로서 代表的인 붕어外 10 餘種에 對하여 100 mg/l 濃度の 毒性試料溶液에서 各種 魚類를 飼育시켜서 生存時間을 比較해본 結果는 Ta-

Table 1. Producibility of Toxin in Complex Media.

Medium	Final pH	Toxicity*
Glucose	1.0%	
Peptone	0.5	
Beef ext.	0.5	
NaCl	0.5	6.8

Glucose	1.0	
KH ₂ PO ₄	0.05	
Asparagine	0.05	6.2

Glycerin	1.0	
Beef ext.	0.5	
Peptone	1.0	
NaCl	0.3	8.0

Glucose	2.0	
Soybean meal	1.0	
NaCl	0.2	
Peptone	0.5	7.0

		185 min
		240
		120

*The applied fish was *Pseudorasbora parva*.

ble 2와 같이 體重이 증가함에 따라 生存時間도 길었지만 汚水에 忍耐力이 강한 버들붕어와 미꾸라지는 他魚類에 비해 體重에는 別關係 없이 本毒性物質에 對한 저항성이 매우 컸다.

Table 2. Piscicidal Activity of Sample for Various Fish The Concentration of Sample was 100 mg/l.

Kinds of fish	Body length (cm)	Body weight (g)	Toxicity (min.)
<i>Carassius carassius</i>	9.0	9.4	275
	10.4	18.2	310
	11.9	25.6	561
<i>Pseudorasbora parva</i>	4.3	0.8	123
<i>Zacco platypus</i>	3.2	0.2	238
	3.9	0.4	250
<i>Gobius similis</i>	3.9	0.4	54
	4.3	0.8	85
<i>Macropodus chinensis</i>	3.3	0.4	2,220
	6.7	2.8	2,540
<i>Carassius carassius</i> (gold fish)	5.8	1.9	1.15
	8.8	7.4	778
<i>Tadpole</i>	3.5	0.4	380
<i>Parasilus asotus</i>	20.0	53.1	543
<i>Misgurnus mizolepis</i>	9.0	3.4	2,310
	17.5	32.5	2,730

8. 毒性的 殘留性

本 毒性試料의 魚類에 對한 殘留性을 檢討-. 故 자 참붕어를 300 mg/l의 本 毒性試料 溶液 5分에서 30分까지 處理하여 다시 신선한 水물에 옮겨서 飼育시켰을 때 그 生存時間을 測定하여 殘留性을 檢討한 結果는 Fig. 6과 같다.

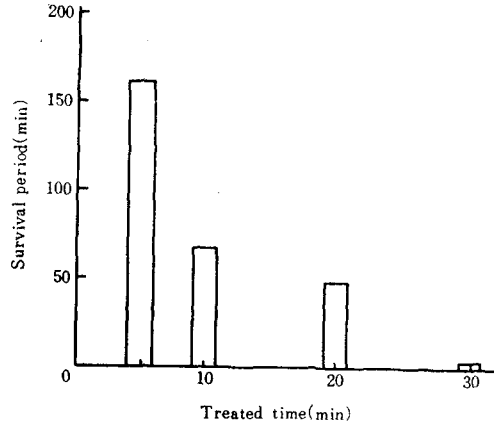


Fig. 6. Revival Ability of Sample Treated Fish. The applied fish was *Pseudorasbora parva*.

Fig. 6에서 보는 바와 같이 本 毒性試料溶液에 5分 處理하였을 때는 162分까지 生存하지만 30分 동안 處理을 때는 4分만에 致死하였다.

9. Succinic dehydrogenase 活性에 미치는 毒性試料의 影響

本 試料가 魚類에 對해서 毒作用을 나타낼 경우 그 作用機作을 究明하기 위한 基礎段階로서 잉어 (全長 20 cm) 組織細胞內的 TCA cycle에서의 succinic dehydrogenase 活性에 對한 阻害作用을 檢討하였다. 잉어의 各組織의 S. D. I. 實驗結果는 Table 3에서 보는 바와 같이 척수를 제외한 他組織에 있어서는 succinic dehydrogenase 活性이 阻害되었

Table 3. Inhibitory Activity of the Sample (0.33 mg/ml) on Succinic Dehydrogenase of the Organs of *Cyprinus carpio* (length 20 cm).

Organ	Optical density (470 nm)	Inhibition (%)
Gill	0.0024	4.7
Liver	0.0299	12.9
Muscle	0.1106	78.8
Pancreas	0.0007	8.6
Brain	0.0327	40.4
Heart	0.0807	62.8
Spinal cord	0.0000	0.0

으며 특히 근육, 심장의 組織이 強하게 阻害되었다.

10. Toxin 生成에 미치는 金屬 ion의 影響

本 毒性物質生成에 金屬 ion이 미치는 影響을 조사하기 위하여 여러가지 金屬 ion을 添加한 結果는 Table 4와 같다.

Table 4. Effect of Metal Ions on Production of Toxin. The concentration of metal ion was $\frac{1}{2} \times 10^{-4}M$. The applied fish was *Pseudorasbora parva*.

Ions	Metal salts	Growth	Final pH	Toxicity
Mn ⁺	MnCl ₂ · 4H ₂ O	卅	7.4	49 (min)
Zn ⁺	MnSO ₄ · 4~6H ₂ O	卅	7.4	105
	ZnCl ₂	卅	7.4	55
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	卅	7.4	53
Mg ⁺	MgCl ₂ · 6H ₂ O	卅	7.4	47
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	卅	7.6	78
Fe ⁺	Fe ₂ (SO ₄) ₃ · 5H ₂ O	卅	7.2	73
	FeCl ₃ · 6H ₂ O	卅	7.4	43
	FeSO ₄ · 7H ₂ O	卅	7.4	96
Li ⁺	Li ₂ SO ₄ · H ₂ O	卅	7.4	39
Pb ⁺	Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂ · 3H ₂ O	卅	7.4	39
Ba ⁺	BaCl ₂ · 2H ₂ O	卅	7.2	49
Cu ⁺	CuSO ₄ · 5H ₂ O	卅	7.4	36
Ni ⁺	NiSO ₄	卅	7.6	61
Al ⁺	Al ₂ (SO ₄) ₃ · 18H ₂ O	卅	7.4	53
None		卅	7.4	74

Table 4에서 보는 바와 같이 Cu²⁺, Pb²⁺의 添加가 毒性物質生成을 強하게 촉진시켰으며 Fe³⁺, Mn²⁺, Li⁺, Ba²⁺의 添加도 毒性物質生成을 촉진시켰다.

11. 培養時間과 toxin 生成과의 關係

培養時間과 toxin 生成과의 關係를 調査하기 위하여 15日동안 培養하면서 經時的으로 毒性을 測定해 본 結果는 Fig. 7과 같다.

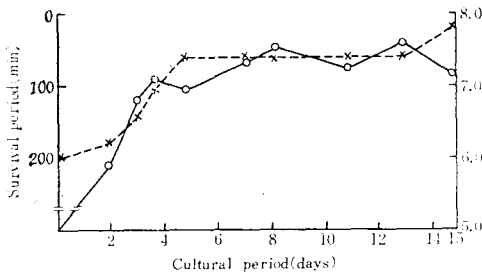


Fig. 7. Time Course of Toxin Production. The applied fish was *Pseudorasbora parva*.
—○—: Toxin production —×—: pH

Fig. 7에서 보는 바와 같이 培養後 2日째 부터 급격한 毒性物質生成을 보였으며 4日동안 培養하였을 때는 거의 最高에 도달하였으며 pH變化도 4日以後부터는 constant level을 유지하였다.

要 約

眞菌類인 *Aspergillus flavus*의 代謝生成物인 aflatoxin이 發癌性物質이라는 것이 알려진 이래 非病原性 微生物이라고 믿어왔던 여러가지 微生物의 毒性物質 生成與否에 관한 研究가 많이 이루어져 우리 食生活에 微生物毒 즉 mycotoxin에 對한 問題는 더욱 重要하게 되었다.

本 實驗에서는 土壤에서 分離한 放線菌屬 菌株가 生成하는 殺魚性物質의 基本的인 性質은 pH 3~7사이는 安定하였으나 pH 8以上에서는 매우 不安定하였으며 熱에 對해서도 比較的 不安定한 物質이었으며 魚種과 魚體重에 따른 毒性의 比較는 體重이 增加함에 따라 生存時間이 길었지만 버들붕어와 미꾸라지가 他魚種에 비해서 本 毒性物質에 對한 저항성이 매우 컸다.

一般的으로 微生物毒의 生物에 對한 作用(24~26)은 hemolytic necrotizing, proteolytic, neurotoxic, cardiotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic 등을 들 수 있으나 大部分의 毒性物質은 上記 毒作用 가운데 한 두 가지로서 그 主因이 된다. 本 物質의 잉어에 對한 各 組織의 succinic dehydrogenase 活性에 對한 阻害作用을 調査한 結果 근육, 심장, 뇌組織에 強한 阻害現象을 나타내었다.

本 毒性物質生成에 對한 金屬 ion의 影響을 調査한 結果 Cu²⁺, Pb²⁺의 添加가 크게 관계한다는 것을 알았으며 기타 本物質生成에 carbohydrate, amino acid, vitamin이 미치는 影響을 調査해 보 고자 하며 魚類以外的 他 溫血動物의 組織에 本 毒性物質을 作用시켜 그 結果를 알고자 한다.

한편 本物質이 잉어의 各 組織에 對한 succinic dehydrogenase 活性에 미치는 程度 및 本物質生成에 미치는 金屬鹽의 影響을 볼 때 宋(19~22) 등이 分離한 物質과는 差異가 있음을 알았다.

參 考

土壤에서 分離한 放線菌屬 菌株가 生成하는 殺魚性物質을 分離, 粗精製한 後 그 毒性物質이 魚類에 미치는 여러가지 性質을 檢討한 結果를 要約

하면 本 毒性物質의 毒性은 75 mg/l의 濃度에서 140 分以內에 침봉어(體重 0.3~0.6g, 體長 3.0~4.0 cm)를 致死시켰으며 pH에 對한 安定性은 pH 사이는 安定하였으며 熱에 對해서는 비교적 不安定한 物質이었다.

本 毒性物質의 水溶液 狀態에서의 安定性은 7°C에서 하루만에 급격한 失活을 나타냈으나 그 以後에서는 더 이상 失活되지 않았으며 *Cyprinus carpio* (잉어, 全長 20 cm)의 各 組織에 對한 succinic de hydrogenase 活性에 對한 阻害作用을 檢討한 結果, 근육, 심장, 뇌組織에서 甚한 阻害를 받았으나 척수에는 거의 阻害를 받지 않았으며 金屬 ion에 對한 影響은 Cu^{2+} , Pb^{2+} 의 添加가 本 毒性物質生成을 촉진시켰다.

參 考 文 獻

- 1) 栗飯原景昭, 矢野信禮: 食品衛生의 微生物(朝倉書店, 日本), p. 1, (1970).
- 2) Marking, Leif L., Salicylanilide I: *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **101**(3), 526 (1972).
- 3) Marking, Leif L.: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **104**(3), 579 (1975).
- 4) Yoshida, Takashi: *Tetrahedron Lett.*, **41**, 37 17 (1976).
- 5) Sakada, Kanzo: *Tetrahedron Lett.*, **16**, 1141 (1971).
- 6) Sakada, Kanzo: *Agr. Biol. Chem.*, **35**(13), 2113 (1971).
- 7) Haq. Molla F.: *Sci. Res.*, **7**, 111 (1970).
- 8) Kawazu, Kazuyoshi: *Bull. Inst. Chem. Res.*, **50**(3), 160 (1972).
- 9) Ohigashi, Hajime: *Bull. Inst. Chem. Res.*, **50**(3), 239 (1972).
- 10) Kanasaki, Toshinori: *Agr. Biol. Chem.*, **40**(6), 1239 (1976).
- 11) Ohta, Keiichi: *Agr. Biol. Chem.*, **44**(4), 61 0 (1969).
- 12) Ohta, Keiichi: *Agr. Biol. Chem.*, **35**(3), 431 (1971).
- 13) Ohigashi, Hajime: *Agr. Biol. Chem.*, **38**(5), 1093 (1974).
- 14) Ohigashi, Hajime: *Agr. Biol. Chem.*, **36**(13), 2529 (1972).
- 15) Kluepfel, Dieter: *J. Antibiot.*, **23**(2), 75 (1970).
- 16) Antonioni, Mary E.: *Trans. Wis. Acad. Sci., Arts Lett.*, **62**, 285 (1974).
- 17) Lennon, Robert E.: *Advan. Appl. Microbiol.*, **16**, 55 (1973).
- 18) Marking, Leif L.: *Tech. Environ. Chem.*, **16** 357 (1973).
- 19) 宋邦鎬, 徐正墳: 韓產微誌, **3**, 63 (1975).
- 20) 宋邦鎬, 徐正墳: 韓產微誌, **3**, 69 (1975).
- 21) 宋邦鎬, 徐正墳: 韓產微誌, **5**, 36 (1977).
- 22) 宋邦鎬, 徐正墳: 韓產微誌, **5**, 61 (1977).
- 23) 楊洪準: 韓國陸水學會誌, **6**, 19 (1973).
- 24) Davis, B.D.: *Principles of Microbiology and Immunology*, Harper and Raw, p. 579 (1969).
- 25) Thomas D. Brock: *Biology of Microorganisms*, Prentice-Hall Inc., p. 420 (1970).
- 26) Joseph A.: *Bellanti, Immunology*, W.B. Saunders Co., p. 246 (1971).