

## Saccharomyces cerevisiae에 대한除草劑 Paraquat의 増殖저해作用 및 酵母菌體의 微細構造의 變化

朴榮實·金美林·崔慶浩

曉星女子大學校 家政大學 食品營養學科

(1986년 6월 20일 수리)

### Growth Inhibition and Ultra-Structural Changes of *Saccharomyces cerevisiae* by Paraquat

Young-Sill Park, Mi-Lim Kim and Kyoung-Ho Choi

Department of Food Science and Nutrition, Hyoseung Women's University, Taegue, Korea

#### Abstract

Exponentially growing cells of *S. cerevisiae* were cultivated in the concomitant presence of  $2 \times 10^{-3}$  M paraquat for 12 hours. Cellular growth became slower as the time passed and then, it was completely inhibited after 6 hours of cultivation. More than 70 percent of the yeast cells were killed with in 12 hours of paraquat treatment. It was observed that size of the yeast cell varied from  $4.5 \times 5.5 \mu\text{m}$  to  $2.5 \times 3.5 \mu\text{m}$  in diameter, while that of control was uniform. The number of budding cells became rare, Cell wall of the paraquat treated cell was thinner ( $0.15 \mu\text{m}$ ) than that of control cell ( $0.20 \mu\text{m}$ ). Outer part of the cell wall had higher density than inner part. Membrane structures such as plasma membrane and mitochondria was decomposed during the paraquat treatment for 12 hours.

#### 머 리 말

Gramoxon, weedol 등의 이름으로 널리施用되고 있는 有機鹽素系 除草劑인 paraquat(1, 1'-dimethyl-4, 4'-bipyridinium dichloride)는 砂質土壤中 또는 土壤과 유리된 狀態에서는 尙상期間 동안 毒性이 殘留되어<sup>1,2)</sup> 環境을 오염시키고 있을 뿐만 아니라 이의 誤用으로 因한 中毒事故가 빈번히 發生되고 있다<sup>3)</sup>.

Paraquat의 毒性은 生體內에서 酸素를 活性化<sup>4,5)</sup>시키는 反面에 過酸化物的 代謝를 담당하는 super-

oxide dismutase 活性을 저해함<sup>6)</sup>에 기인하는 것으로 動, 植物 組織細胞 뿐만 아니라 *E. coli*를 위시한 腸內 細菌類<sup>7)</sup> 및 *Baillus*屬 菌株를 위시한 土壤微生物<sup>8)</sup>에 까지 광범위하게 毒性을 미치고 있다.

이러한 paraquat의 毒作用에 對하여 國內에서도 動物細胞를 中心하여 약간의 研究가 수행되어 왔으나<sup>6,9)</sup> 微生物에 關한 研究例는 찾아보기 어려우며 眞菌類에 對한 研究는 例를 찾아 못하였다. 더우기 paraquat의 毒作用은 酸素의 存在에 의존하는 것으로 一般의으로 인식되어 있으나 微生物에 서는 아직도 相反된 結果가 報告되고 있다<sup>10,11)</sup>.

著者는 이 論文으로 常春 洪鍾旭 博士님의 回甲을 紀念하고 學德을 尊敬하는 뜻을 表합니다.

이런 見地에서 本 論文에서는 嫌氣의인 상태도 增殖가능한 眞菌類인 *S. cerevisiae*에 對한 paraquat의 毒作用 및 이에 수반되는 菌體의 微細構造의 變化를 檢討하였다.

實驗材料 및 方法

1. 菌株 및 培地

Alcohol 발효용 *Sacchromyces cerevisiae* (IFO strain)를 供試菌으로 하였으며 이의 培養에는 培地 liter당 glucose 10g, yeast extract 3g, peptone 5g 및 malt extract 3g을 含有한 YM(yeast ext. and malt ext.) 培地<sup>12)</sup>를 使用하였다. 培地의 pH는 5.5로 調整하였으며 0.75kg/cm<sup>2</sup>에서 10分間 加壓살균 하였다. 固體培地의 경우에는 여기에 2.0%의 汗靑을 첨가하여 응고시킨 것을 使用하였다.

2. 培養

斜面培地로 부터 1~2白金耳의 菌體를 取하여 20ml의 액체배지에 接種하고 30°C에서 13時間 진탕배양(85rpm, 3cm stroke)한 後, 배양액 10ml를 取하여 신선한 培地 80ml에 再接種하여 約 8時間 진탕배양한 것을 種母로 하였다. 이것을 初期濁도가 0.1이 되도록 신선한 培地 100ml에 다시 接種하고 同一한 조건으로 培養하였다.

3. Paraquat 處理

代數增殖 中期인 15時間제에  $2 \times 10^{-3}$ 의 paraquat를 加하고 계속 培養하여 處理하였으며 paraquat는 東京化成(株) 試藥特級을 使用하였다.

4. 增殖度 測定

1) 濁度

初期濁도를 0.1로 調整한 後 계속적으로 진탕배양하면서 經時的으로 培養液의 濁도를 測定하여 增殖도를 구하였다. 濁도는 光電 比色計(Tokyo-koden, 7A)를 使用하여 660nm에서 測定하였다.

2) 總菌數 및 死菌數

10倍 희석한 培養液 中の 菌數를 hematometer를 使用하여 광학현미경하에서 計測하였으며 生菌과 死菌은 methylene blue 染色法<sup>13)</sup>으로 區分하였다.

3) 生菌數

菌培養液을 희석하여 plate한 後 30°C에서 48시

간 배양하고 이 때 生成된 colony數를 측정하였다

4) 乾物 重量

培養液 20ml를 遠心分離(6,000ram×10min)하여 集菌한 後 sodium phosphate buffer(1/15M, pH 5.5)로 세척하였다. 여기에 90% ethanol 10ml를 加하여 제현탁하고 60°C에서 24時間 豫備 乾燥시킨 後 105°C에서 恒量이 될 때까지 乾燥하여 秤量하였다.

5. 電子顯微鏡 試料製作

Ryter 等<sup>14)</sup>과 大隅<sup>15)</sup>의 方法에 따라 다음과 같이 製作하였다. 菌體를 4°C로 예비냉각한 증류수로 3回 반복 세척하여 不純物을 除去한 後 1.5% KMnO<sub>4</sub> 溶液으로 간부 振盪하면서 4°C에서 16~20時間 前固定하였다.

以後 증류수로 5回 반복 세척하여 餘分의 KMnO<sub>4</sub>를 除去하고 1.5% uranyl acetate로 4°C에서 60分間 처리하여 後固定하였다. 여기에 ethanol(40, 60, 80, 90, 95, 100%) 및 propylene oxide를 加하여 各 20分間 순차적으로 처리하여 脫水하였다. 특히 100% ethanol과 propylene oxide는 各各 2回 반복 처리하였다. 脫水한 菌體에 等量의 propylene oxide에 溶解한 edoxy resin(Epoke-812)을 加하여 실온에서 15時間 前處理한 後 잔존 propylene oxide를 除去하기 위하여 10時間동안 진공건조하였다. 乾燥된 試料를 2~4mm의 크기로 切斷한 後 epoxy resin에 담구어 37°C에서 38時間, 50°C 및 60°C에서 各各 10時間 incubation하여 重台시켜 包埋하였으며, 使用한 resin의 組成은 Table 1과 같다. 重台된 試料는 ultramicrotome(LKB, Ultratome V)으로 超薄切片한 後 2% uranyl acetate로 10分, lead citrate로 3分間 各各 染色하고 乾燥 後 電子顯微鏡(JEM 100-CX)으로 觀察하였다.

Table 1. Composition of epoxy resin

	Component	Content (ml)
Mixture A	Epoke 812	62
	DDSA	100
Mixture B	Epoke 812	100
	MNA	89

The final resin was consisted by same volume of above mixture A and B. Cells were embedded in gelatin capsule. DDSA : dodecylsuccinic anhydride, MNA : methyladic anhydride

6. 성적처리

실험성적은 "T" test로 그 유의성을 검정하였다.

結果 및 考察

1. Paraquat 術理에 의한 增殖阻害

供試菌 培養液의 濁度는 2~3時間의 誘導期를 거친後 培養 20時間까지 直線的으로 增加하였으며 以後 증가속도가 徐徐히 감소되었으나, paraquat 處理菌의 경우는 Fig. 1과 같이 處理한 時間부터 增加속도가 떨어지기 시작하여 處理 6時間째에 最高值(濁度=3.6)에 達하였으며 以後부터 濁도가 低下하기 시작하였다. 한편, paraquat 處理菌의 乾物中量도 Fig. 2와 같이 處理 6時間째에 335mg/ml로 最大值를 이룬 後 점차로 감소되었다.

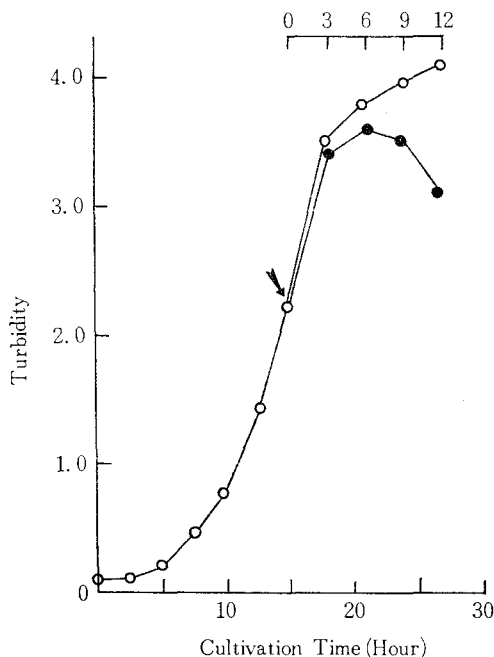


Fig. 1. Inhibition of turbidometric growth of the cell of *S. cerevisiae* by paraquat.

The herbicide was added on the arrowed time to be  $2 \times 10^{-3}M$ . Turbidity of the culture was measured at 660nm. Control: ○—○, Paraquat-treated cells: ●—●

Paraquat 處理에 따른 菌數의 變化는 Table 2와 같이 초기의 ml당  $1.14 \times 10^8$  cell로부터 處理 6時間째에는  $2.15 \times 10^8$  cell로 86%의 增加率을 나타내었으나, 以後 감소하기 시작하여 12時間째에는

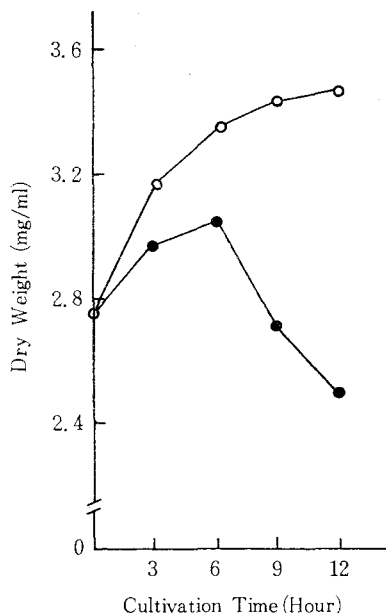


Fig. 2. Changes in dry weight of the yeast cell induced by treatment of paraquat.

Control: ○—○  
Paraquat-treated cells: ●—●

$1.66 \times 10^8$  cell로 감소되었다. 死菌率은 초기에는 0.28%로 매우 낮았으나 處理 後 3時間째에 39.26%로 急激히 증가하였으며, 그 후에도 經時的으로 증가되어 12時間째에는 72%에 達하였다.

한편, 현미경下에서 計測한 生菌數(總菌數)를 plate法으로 측정한 生菌數와 비교한 결과 Table 3과 같이 거의 近似하였으며 25% 以下의 生存率을 나타내었다.

菌數, 乾物重量 및 濁度는 微生物 增殖의 지표로 널리 利用되고있는 方法으로서 paraquat 處理菌에 있어서는 위의 모든 실험결과가 paraquat의 毒作用이 處理 後 6時間 以後부터 현저함을 나타내고 있다.

微生物에 대한 paraquat의 毒作用은 微生物의 種類, 培地 및 培養조건, paraquat 處理시 菌體의 增殖狀態 등의 要因에 依하여도 영향을 받으나,<sup>16)</sup> 處理한 paraquat의 濃도에 크게 의존하는 것으로서 Peterson 等<sup>17)</sup>은 *Escherichia coli*에서, Ellena 等<sup>7)</sup>은 *Bacillus megaterium*에서 各各  $1 \times 10^{-5}M$ 의 paraquat로 생육저해를 위한 最小濃度로 報告하고 있다.

本 실험에서는  $1 \times 10^{-2}M$  paraquat가 *S. cerevisiae*의 增殖阻害를 위한 最小濃度로 檢討되었으나 安全을 위하여 2倍量의 paraquat를 첨가하였다.

**Table 2.** Changes in dead cell counts and growth rate of the paraquat-treated cells

	Time after paraquat treatment (hour)	Total cell		Dead cell	
		Cell No (cells/ml)	Growth rate (doublings)	Cell No (cells/ml)	Death rate (%)
Control	0	$1.14 \times 10^8$	1.00	$3.18 \times 10^5$	0.28
	3	$2.12 \times 10^8$	1.86	$7.54 \times 10^6$	3.56
	6	$2.27 \times 10^8$	1.99	$1.93 \times 10^7$	8.50
	9	$2.31 \times 10^8$	2.03	$2.56 \times 10^7$	11.08
	12	$2.51 \times 10^8$	2.20	$4.00 \times 10^7$	15.93
Paraquat	0	—	—	—	—
	3	$2.11 \times 10^8$	1.85	$8.26 \times 10^{7b}$	39.26
	6	$2.15 \times 10^{8a}$	1.86	$1.11 \times 10^{8b}$	51.54
	9	$1.83 \times 10^{8b}$	1.61	$1.27 \times 10^{8b}$	69.62
	12	$1.66 \times 10^{8b}$	1.46	$1.20 \times 10^{8b}$	72.29

Dead cells were selectively stained by using the methylene blue.  
 a :  $p < 0.1$  and b :  $< 0.005$  against control.

**Table 3.** Changes in number of viable cells compared between different techniques (unit:  $\times 10^8$  cells/ml)

Cell count by the technique of	Control	Paraquat
Microscope	2.41	0.46
Plate	2.36	0.59

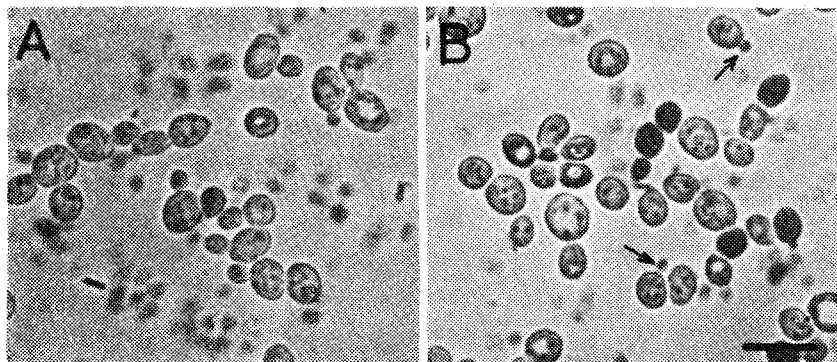
Cell count was carried out by using the broth cultivated for 12 hours. The cells negative against 0.1% methylene blue staining were counted as the living cells in microscopic counts.

供試菌의 생육저해를 위한 paraquat의 最小濃度가 높은 것은 供試菌이 眞菌類로서 細菌보다 월등히 두꺼운 glucomanan의 細胞壁을 가짐으로써<sup>18)</sup> 약제의 침투가 細菌에 比하여 어려움에 기인한 것으로 判斷된다.

2. 菌體의 構造 變化

1) 菌體의 형태 變化

Paraquat 處理後 9時間에 檢鏡한 結果 Fig. 3-A, B와 같이 對照區(A)에서는 大部分의 酵母가 出芽하고 있으며 出芽되고 있는 部位를 除外한 菌



**Fig. 3.** Morphology of paraquat-treated cells of *S. cerevisiae*. The cells were previously cultivated for 9 hours in the presence of  $2.0 \times 10^{-3}M$  paraquat and stained with 0.1% methylene blue. Photo A and B represent the morphology of normal cells and treated cells, respectively. Scale line indicates  $10\mu m$ . A few cells are budding at the arrowed parts in photo B, while almost of the cells are budding in photo A. Blank cells in photo B are stained by methylene blue to exhibit dead cells.

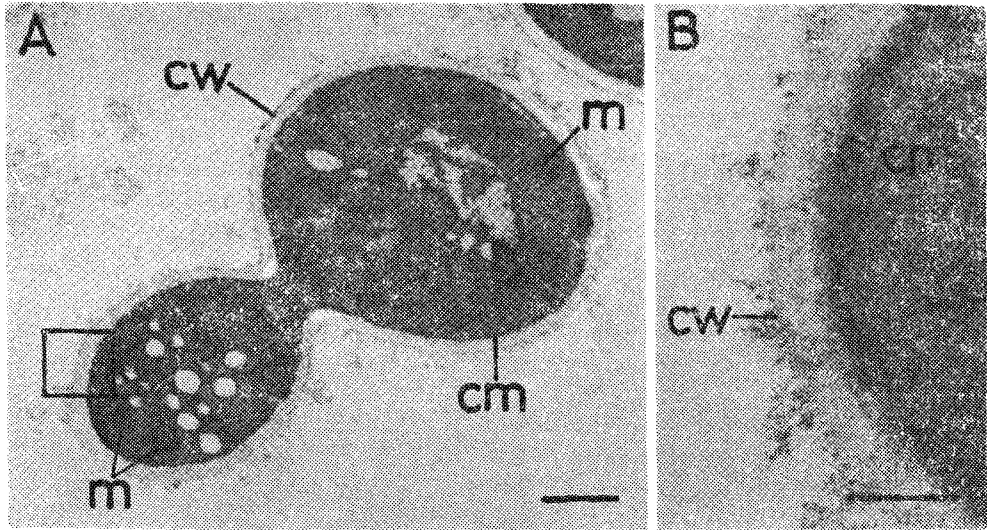


Fig. 4. Morphology of normal cells of *S. cerevisiae*.

Photo B was enlarged from rectangled part in photo A.

Symbols are cm: cytoplasmic membrane, cw: cell wall, m: mitochondria, n: nuclus and v: vacuole. Scale line indicates 1.0 $\mu$ m(A) and 0.5 $\mu$ m(B).

體의 크기가 3.5×5.5 $\mu$ m로 거의 均一하였으나, paraquat 處理菌(B)에서는 出芽하고 있는 菌體가 드물게 관찰되었을 뿐만 아니라 酵母의 크기가 2.5×3.5 $\mu$ m~4.5×5.5 $\mu$ m로 均一치 않고 原形質 內에 많은 空間을 가지고 있었다.

2) 微細構造의 變化

酵母를 超薄切片하여 電子顯微鏡으로 觀察한 結果, 정상적인 菌體는 Fig. 4-A, B와 같이 細胞壁의 두께가 0.2 $\mu$ m로 均一하고 여기에 原形質膜이 잘 밀착되었다. 原形質膜에서는 核膜에 둘러싸인 核과 mitochondria 等の 膜構造와 아울러 정상상태의 액포가 觀察되었다.

한편 paraquat 處理菌은 Fig. 5-A, B, C 및 D와 같이 paraquat 處理後 6時間째 (A 및 B)에는 細胞壁의 두께가 0.15 $\mu$ m로 정상적인 菌體에 比하여 얇아지고 細胞壁 外側に 전자밀도가 높은 層이 形成되었다. 內膜構造는 正常的인 菌과 거의 비슷하게 細胞壁에 밀착되어 있고 2重膜構造도 유지하고 있었으나, 原形質膜과의 경계선이 다소 不分明한 상태임이 觀察되었다.

Paraquat 處理 12時間째 (C)에는 細胞壁外側の 電子밀도가 보다 높아졌으며 內部的 膜構造가 完全히 瓦解됨과 아울러 많은 空間이 生成되었다.

Paraquat에 의한 菌體의 구조적인 變化로 他的 研究例를 찾지 못하여 直接 比較하지는 못하였으

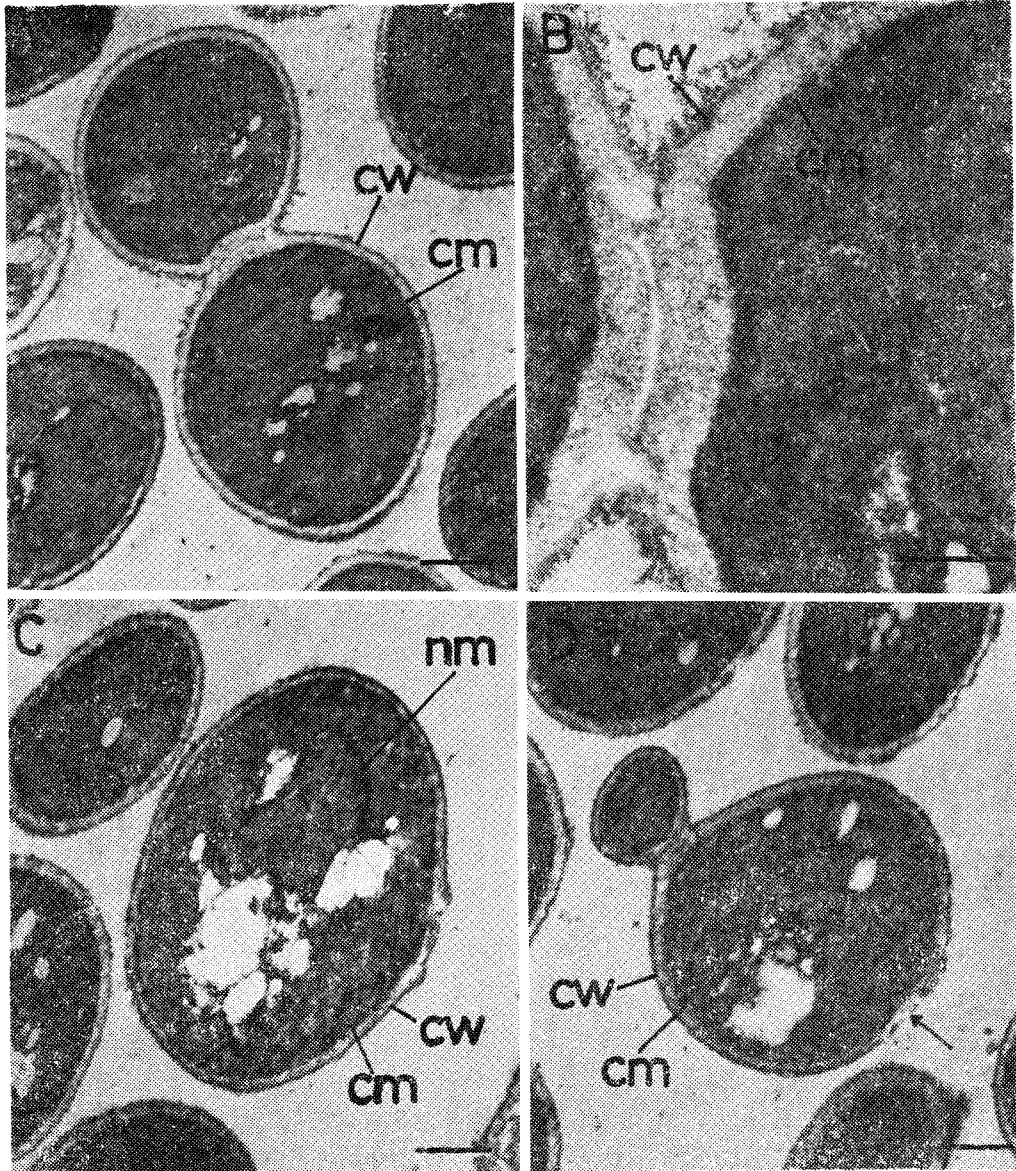
나 動物細胞에서 mitochondria의 退行 및 內膜構造의 變化가 報告<sup>19)</sup>되어 있고 paraquat에 의하여 脂算過酸化물이 생성됨을<sup>20)</sup> 감안하면 菌體內膜系의 瓦解는 필연적인 것으로 思料된다. 그러나 細胞壁 部位의 變化는 paraquat의 毒作用과는 直接的인 상관인 없는 것으로 상세한 檢討를 要하고 있다.

要 約

代數增殖 中期의 *S. cerevisiae*에 2×10<sup>-3</sup>M의 paraquat를 處理하여 菌體 增殖, 菌體의 一般의 형태 및 微細構造에 미치는 영향을 檢討하였다.

菌體의 增殖은 paraquat 處理後 阻害되기 시작하여 處理 6時間 以後 完全히 阻害되었다. 이 기간 동안 濁度는 0.1에서 3.6으로, 乾物 中量 1ml당 2.75mg으로부터 3.35mg으로, 總菌數는 ml당 2.14×10<sup>8</sup>cell로부터 2.15×10<sup>8</sup>cell로 增加되었으나 6時間 以上 處理時間이 길어짐에 따라 逆으로 감소되었고 死菌率은 초기의 0.28%로부터 6時間째에는 5%, 12時間째에는 72%로 계속 增加되었다.

Paraquat 處理에 의하여 菌體의 크기가 均一치 못하게 되었으며 細胞壁의 두께가 0.15 $\mu$ m(對照區 0.20 $\mu$ m)로 얇아지는 반면에 外側の 電子밀도가 높아졌으며 12時間 以上の 處理에 의하여 原形質膜 및 mitochondria와 같은 內膜構造가 瓦解되었다.



**Fig. 5.** Morphology of paraquat-treated cells of *S. cerevisiae*.

Photo A was taken after six hours of paraquat treatment. Photo B was enlarged from central budding site in photo A. Cell wall lysis was clearly visible at both sides of budding cell. Photo C and D were taken after twelve hours of paraquat treatment. Nuclear membrane is visible in photo C. Cell walls are lysed at the arrowed part in photo D. Scale line indicates 1.0 $\mu$ m (A, C and D) and 0.5 $\mu$ m (B).

參 考 文 獻

1. Fryer, J. D., Hance, R. J. and Luduing, J. W. : Weed Res., 15 : 189(1975).
2. Weed Science Society of America : In 'Herbicide Handbook' 4th Ed., 328 Weed Science Society of America, N. Y. (1979).
3. Ronald, F., Nostratoladabir, V., William, R., Fredrick, L. G., and Archiet, F. W. :

- Toxicology, 12 : 259(1979).
4. Hassan, H. M., and Fridovich, I. : J. Biol. Chem., 253(22) : 8143(1978).
  5. Khan, A. V. : J. Biol. Chem., 28 : 615(1978).
  6. 이순재, 이인자 : 효성여자대학교 논문집, 28 : 115(1984).
  7. Ellena, P., Ronald, F. John, M. and Tomos, C. : Appl. Environ. Microbiol., 41(1) : 327 (1981).
  8. Tu, C. M. and Bollen, W. B. : Weed Res 8 : 38(1968).
  9. 정진오, 손태중 : 경대의대논문집, 24 : 1(1983).
  10. Fisher, H. K. : Life Sciences, 19 : 421(1976).
  11. Charire, L. D. and Bruno P. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 136 : 359(1971).
  12. Walt, J. P. : In 'The Yeast' J, Lodder(ed), Chap. 2, North-Holland Pub. Co., Amsterdam(1970).
  13. 劉太鍾 : 食品微生物學 實驗書, p. 74, 普成文化社, 서울(1982).
  14. Ryter, A., Kellenberger, E. and Sechand, J. : J. Biophys. Biochem. Cytol., 40 : 671(1958).
  15. 大隅正子, 日本電子顯微鏡學會關東支部編, 電子顯微鏡試料製作技術集, 誠文堂新光社, 東京(1970).
  16. 차기선, 김형주 : 가정대 논문집 창간호 : 43(1982).
  17. Peterson, E., Fairshter, R., Morrison, and Cesario, T. : Appl. Environ. Microbiol., 41 : 327(1981).
  18. 金燦祚, 張智鉉 : 食品微生物學, p. 106, 修學社, p. 106, (1983).
  19. 金容鎮 : 慶北大學校 大學院 學位論文(1983).