

植物成長 Hormone이 結核菌의 增殖에 미치는 影響

高神大學 醫學部 微生物學教室

張明雄 · 金光燦 · 朴仁達

Effects of the Plant Growth Hormones on the Growth of *Mycobacterium tuberculosis*

Myung Woong Chang, Kwang Hyuk Kim and In Dal Park

*Department of Microbiology, Kosin Medical College,
Pusan, Korea*

＝ Abstract ＝

Gibberellin, auxin, and cytokinin tested acted as either stimulants or inhibitants to the growth of *Mycobacterium tuberculosis* in Dubos complete broth.

1) The bacterial growth in Dubos broth was stimulated significantly by 10^{-6} moles per ml and slightly by 10^{-3} moles and 10^{-9} moles per ml of gibberellin.

2) The bacterial growth in Dubos broth was severely inhibited by 10^{-3} moles per ml, but it was not influenced by 10^{-6} moles and 10^{-9} moles per ml of auxin.

3) The bacterial growth in Dubos broth was stimulated slightly by 10^{-3} moles and 10^{-6} moles per ml, and drastically by 10^{-9} moles per ml of cytokinin.

I. 緒 論

結核菌은 增殖 速度가 늦어 固型培地에서 結核菌이 增殖된 集落을 觀察하는데 約3週間이 所要되며, 可檢物로 부터 結核菌의 增殖有無의 確診은 3~8週間이 徑過되어야 陰性으로 判定할 수 있어 結核

의 早期 確診에 많은 어려움이 있다.¹⁾ 그러므로 結核菌의 增殖을 促進시켜 短時日內에 結核을 確診할 수 있는 方法의 改發이 切實하게 要求된다. 이에 植物生長促進hormone의 利用 可能性 與否를 再檢討 코자 하였다.

植物成長促進 hormone은 1920年 Kursawa 등이 gibberellin을, 1926年 Went가 auxin을, 1955年 Miller 등이 cytokinin을 各各 發見하게 되면서 植物의 成

長調節機構가 밝혀져 gibberellin은 細胞의 伸長에, auxin과 cytokinin은 核酸合成과 蛋白質合成을 促進한다고 한다.^{2,3)}

한편 이들 hormone이 各種 細菌의 增殖에 미치는 影響에 關係서도 많이 研究되었다.^{4~11)} 그러나 大部分이 一般 土壤細菌,^{7,9)} chlorella,^{5,10)} 및 酵母^{8,11)} 등에 對한 것이었고 病原菌⁴⁾이나 增殖速度가 낮은 抗酸菌¹²⁾에 對한 研究는 많지않다.

Luridiana等¹²⁾이 結核菌의 增殖에 對한 植物成長 hormone의 影響을 觀察한 바 gibberellin과 β -indole acetic acid를 1~100 mcg/ml 濃度로 添加한 Dubos 培地에서 低濃度에서는 增殖에 影響이 없으나 高濃度에서는 增殖이 抑制되었다고 報告하였다.

一般 細菌의 增殖에 미치는 이들 hormone의 濃도가 菌種에 따라 多少 差異는 있으나 一般的으로 10^{-6} ~ 10^{-9} moles/ml 濃度가 使用되고 있어 Luridiana等이 結核菌에 添加한 濃도가 높은 것으로 생각된다. 따라서 著者等은 本 實驗에서 Luridiana等이 使用한 最低濃度를 基準으로 하여 이보다 높은 濃도와 낮은 濃度에서 結核菌의 增殖像을 觀察하여 얻은 成績을 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1) 菌株：本 實驗에서 使用된 菌株는 Mycobacterium tuberculosis H₃₇ Rv. (Trudeau Institute, USA, via NIH, Tokyo, Dr. Kanai, 1975)였다.

2) 培地：結核菌의 培養에는 Dubos液體培地(榮研, 日本, 大阪市)를 使用하였다.

3) 植物成長 hormone：本 實驗에 使用된 植物成長 hormone은 gibberellin, auxin, cytokinin (和光, 日本, 大阪市)을 使用하였다.

gibberellin과 auxin은 各各 50% ethanol에 10^{-2} moles/ml 濃度로 溶解시키고, cytokinin은 0.1N HCl에 10^{-2} mole/ml 濃度로 溶解시킨 後 membrane filter (孔徑 0.45 μ m)에 濾過滅菌시켜 原液으로 하고 이를 各各 稀釋하여 各 培地에 最終濃度가 10^{-3} moles/ml, 10^{-6} moles/ml, 10^{-9} moles/ml되게 添加 하였다.

4) 增殖曲線의 測定：結核菌을 5 ml의 Dubos液體培地에 接種하여 1日 2回 振盪하면서 2週間 37℃에 培養시킨 後 1000rpm으로 10分間 遠沈시켜 그 上澄液을 0.5ml 새培地에 接種하여 2週間 같은 方法으로 培養하여 다시 遠沈시켜 그 上澄液 1ml를 1.5 ℓ 의 Dubos培地에 接種하고 잘 混合한 다음 100ml씩 15개로 나누고 各各에 gibberellin, auxin, cytokinin를 各 濃度別로 添加하였다. 이를 各各 screw cap試驗管에 5ml씩 分注하여 37℃에서 1日 1回 振盪하면서 28日間 培養하였다.

增殖曲線의 測定은 各群別로 1회에 2個의 試驗管을 可檢物로 하였다. 各 試驗管은 잘 振盪後 Coleman Jr. Spectrophotometer로 525nm 波長에서 吸光度(OD)를 測定하여 平均値를 산출 하였다.

Table 1. Percent Transmittance(525 nm) of M. tuberculosis Cultured in Dubos Broth Containing Various Concentration of Gibberellin.

Gibberellin (moles/ml)	Incubation period (days)						
	0	3	7	10	14	21	28
Control	100	98	85	78	64	47	36
Solvent control	100	98	82	73	63	48	39
Gibberellin 10 ⁻³	100	98	77	71	59	43	34
Gibberellin 10 ⁻⁶	100	98	74	64	50	39	32
Gibberellin 10 ⁻⁹	100	97	73	66	57	43	35

Table 2. Percent Transmittance(525nm) of *M. tuberculosis* Cultured in Dubos Broth Containing Various concentration of Auxin.

Auxin(moles/ml)	Incubation period(days)						
	0	3	7	10	14	21	28
Control	100	94	85	76	56	36	35
Solvent control	100	98	82	77	57	39	35
Auxin 10^{-3}	100	96	94	96	96	95	95
Auxin 10^{-6}	100	96	88	80	70	43	40
Auxin 10^{-9}	100	98	86	78	69	39	34

Table 3. Percent Transmittance(525 nm) of *M. tuberculosis* Cultured in Dubos Broth Containing Various concentration of Cytokinin.

Cytokinin(moles/ml)	Incubation period(days)						
	0	3	7	10	14	21	28
Control	100	97	84	80	71	58	37
Solvent control	100	93	88	83	72	44	36
Cytokinin 10^{-3}	100	94	86	77	60	45	40
Cytokinin 10^{-6}	100	91	85	69	59	38	35
Cytokinin 10^{-9}	100	93	86	66	56	38	35

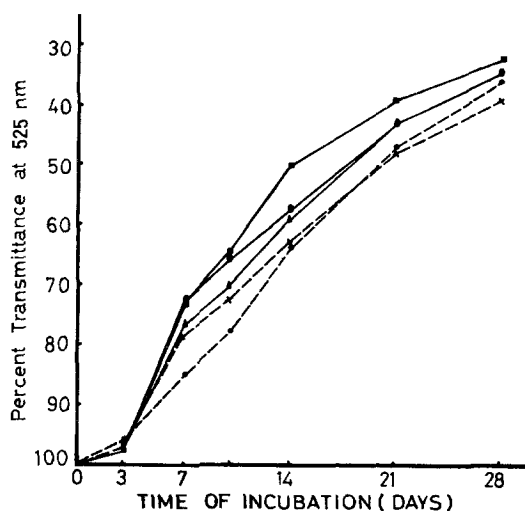


Fig. 1. Effects of Various Concentrations of Gibberellin on Growth of *M. tuberculosis* in Dubos Broth. ●---●, Control; ×---×, Solvent Control; ▲---▲, Gibberellin 10^{-3} moles/ml; ■---■, Gibberellin 10^{-6} moles/ml; ○---○, Gibberellin 10^{-9} moles/ml.

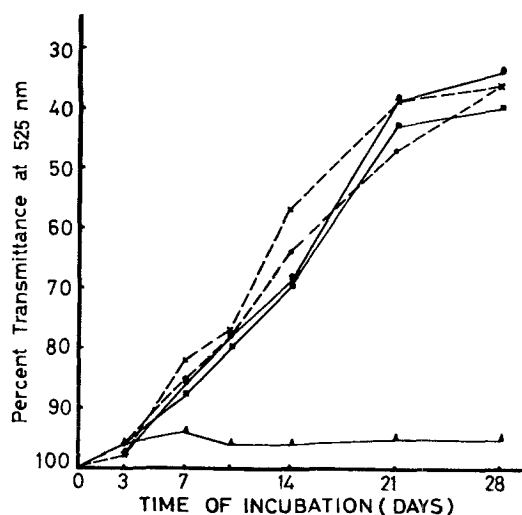


Fig. 2. Effects of Various Concentrations of Auxin on Growth of *M. tuberculosis* in Dubos Broth. ●---●, Control; ×---×, Solvent Control; ▲---▲, Auxin 10^{-3} moles/ml; ■---■, Auxin 10^{-6} moles/ml; ○---○, Auxin 10^{-9} moles/ml.

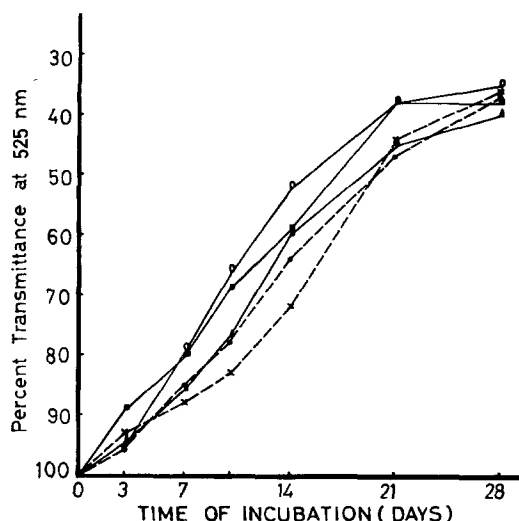


Fig. 3. Effects of Various Concentrations of Cytokinin on Growth of *M. tuberculosis* in Dubos Broth. ● — — — ●, Control; × — — — ×, Solvent Control; ▲ — — — ▲, Cytokinin 10^{-3} moles/ml; ■ — — — ■, Cytokinin 10^{-6} moles/ml; ○ — — — ○, Cytokinin 10^{-9} moles/ml.

Ⅲ. 實驗成績

1. gibberellin이 結核菌의 增殖에 미치는 影響 : 表 1 과 그림 1 에서와 같이 gibberellin이 10^{-3} moles/ml, 10^{-6} moles/ml 및 10^{-9} moles/ml 含有된 培地에서 結核菌의 增殖은 對照群과 實驗群에서 모두 菌接種 3 日~21 日까지가 代數 增殖期였으며, gibberellin이 10^{-3} moles/ml과 10^{-9} moles/ml 培地에서 結核菌의 增殖이 對照群보다 促進되었으나 10^{-6} moles/ml 濃度에서는 對照群과 다른 實驗群보다 顯著히 促進되었다. 이를 吸光度가 50 (OD_{50})에 到達하는 時間으로 比較하여 보면 對照群은 約 20 日, 10^{-3} moles/ml, 과 10^{-9} moles/ml 濃度에서는 18 日이었으나, 10^{-6} moles/ml 濃度에서는 14 日로 短縮되었다. 한편 溶媒對照群에서는 對照群과 別 差異가 없으므로 gibberellin의 溶媒로 使用한 alcohol은 結核菌의 增殖에 別 影響이 없었다.

2. Auxin이 結核菌의 增殖에 미치는 影響 : 表 2 및 그림 2 에서와 같이 auxin이 10^{-3} moles/ml, 10^{-6} moles/ml 및 10^{-9} moles/ml 含有된 培地에서 結核菌의 增殖은 對照群과 10^{-6} moles/ml과 10^{-9} moles/ml 濃度에서는 菌接種 3 日~21 日 사이가 代數增殖期였으나 10^{-3} moles/ml 濃度에서는 菌의 增殖이 抑制되었다. 이를 OD_{50} 이 되는 時間으로 比較해 보면 對照群에서 20 日, 10^{-6} moles/ml과 10^{-9} moles/ml 濃度에서 各 19.5 日과 18.5 日이고 溶媒對照群에서 16.5 日로 對照群과 實驗群間에 差異가 없었다. 따라서 auxin은 10^{-3} moles/ml 濃度에서는 結核菌의 增殖을 抑制하고 10^{-6} moles/ml과 10^{-9} moles/ml 濃度에서는 結核菌의 增殖에 別 影響이 없었다.

3. Cytokinin이 結核菌의 增殖에 미치는 影響 : 表 3 과 그림 3 에서 보는 바와 같이 cytokinin이 10^{-3} , 10^{-6} , 및 10^{-9} moles/ml 濃度로 含有된 培地에서 結核菌의 增殖은 菌接種 後 7 日~21 日까지가 代數增殖期였으며 이 期間에 OD_{50} 이 되는 時期를 比較해 보면 對照群에서 約 19.5 日, 10^{-3} moles/ml 濃度에서 18.5 日, 10^{-6} moles/ml 濃度에서 17 日, 10^{-9} moles/ml 濃度에서 15 日로, 高濃度에서 보다 低濃度에서 結核菌의 增殖이 促進되었다. 溶媒對照群에서는 對照群과 差異가 없어 溶媒로 使用한 0.1N HCl은 結核菌의 增殖에 影響을 미치지 못하였다.

Ⅳ. 考 察

各種 細菌의 增殖에 미치는 이들 hormone의 影響에 關한 Maruzzella等⁴⁾의 報告에 依하면 kinetin이 10^{-7} , 10^{-8} 과 10^{-9} moles/ml 濃度로 含有된 培地에서 大腸菌과 葡萄球菌의 增殖이 가장 旺盛하였으며, *Agrobacterium tumefaciens*는 10^{-6} , 10^{-7} moles/ml 濃度에서, *Erwinia carotovora*는 10^{-6} , 10^{-7} 과 10^{-8} moles/ml 濃度에서 增殖이 가장 旺盛하였고, *Corynebacterium michiganense*는 10^{-5} ~ 10^{-10} moles/ml 濃度에서 모두 別 影響이 없었다고 報告하였다. 또한 Greenberg等⁷⁾은 gibberellin이 0.1~1.0, 10.0 mcg/ml 濃度로 含有된 境遇 *Azotobacter indicus*의 增殖에는 別 影響이 없으나 100 mcg/ml에서는 增殖이 促

進 되었다고 報告하는 等 菌種에 따라 差異가 있을 수 示唆하여 준다.

本 成績에서 結核菌의 増殖에 對한 gibberellin의 影響은 gibberellin이 10^{-3} moles/ml과 10^{-9} moles/ml 濃度로 含有된 培地에서 OD_{50} 에 所要되는 時間이 對照群의 20日에 비해 18日로 2日이 短縮되었으며, 10^{-6} moles/ml 濃度에서는 OD_{50} 의 所要時間이 14日로 對照群에 비해 6日이나 短縮되었다. 이는 Luridiana 등의 報告와는 달리 低濃度에서 結核菌의 増殖이 促進됨을 示唆하여 준다.

本 成績에서 auxin의 影響은 auxin이 10^{-3} moles/ml 濃度 含有된 培地에서 結核菌의 増殖은 完全히 阻止되었으며, 10^{-6} moles/ml와 10^{-9} moles/ml 濃度에서는 모두 對照群과 差異가 없어 OD_{50} 에 到達하는 時間도 對照群이 20日, 10^{-6} moles/ml과 10^{-9} moles/ml 濃度에서 各各 19.5日과 18.5日로 差異가 없었다. 이는 Luridiana 등의 報告와 같이 高濃度에서는 抑制되었고 低濃度에서는 別 影響이 없었다.

本 成績에서 cytokinin의 影響은 cytokinin이 10^{-3} moles/ml, 10^{-6} moles/ml과 10^{-9} moles/ml 濃度로 含有된 培地에서 濃度가 낮아질 수록 結核菌의 増殖이 漸次的으로 促進되었다. OD_{50} 에 達하는 時間이 對照群에서 19.5日인데 비해 10^{-3} moles/ml 에서는 18.5日로 別 差異가 없었고, 10^{-6} moles/ml 에서는 17日로 2日 程度 短縮되었고 10^{-9} moles/ml 에서는 15日로 對照群에 비해 4日 程度 短縮시킬 수 있었다.

本 實驗의 結果로 미루어 보면 植物 成長 促進 hormone을 適當한 濃度로 添加한 培地에서 結核菌의 増殖을 促進시킬 수 있으며 이를 固型培地에 應用하여 集落의 形成을 比較하여 봄과 同時에 臨床 可檢物로 부터 直接 結核菌의 檢出에 利用 可能性을 再確認하여 볼 必要가 있다고 思慮된다.

V. 結 論

植物成長促進 hormone인 gibberellin, auxin과 cytokinin이 結核菌의 増殖에 미치는 影響을 觀察한바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Gibberellin이 10^{-3} , 10^{-6} 및 10^{-9} moles/ml 濃度로 含有된 Dubos培地에서 結核菌의 増殖은 各濃度에서 促進되었으나 10^{-6} moles/ml 濃度에서 가장 顯

著하였다.

2. Auxin이 10^{-3} , 10^{-6} , 및 10^{-9} moles/ml 濃度로 含有된 Dubos培地에서 結核菌의 増殖은 10^{-3} moles/ml 에서는 増殖이 阻止되었으며, 10^{-6} moles/ml 와 10^{-9} moles/ml 濃度에서는 増殖에 別 影響이 없었다.

3. Cytokinin이 10^{-3} moles/ml, 10^{-6} moles/ml, 10^{-9} moles/ml 濃度로 含有된 Dubos培地에서 結核菌의 増殖은 10^{-9} moles/ml에서 가장 顯著히 促進 되었으며 10^{-6} moles/ml, 10^{-3} moles/ml 順으로 促進 效果가 적었다.

以上の 結果로 미루어 보아 gibberellin 은 10^{-6} moles/ml 濃度에서 cytokinin 은 10^{-9} moles/ml 濃度에서 結核菌의 増殖을 促進 시킬 수 있을 것으로 思慮된다.

참고문헌

1. Youmans GP: Tuberculosis. Philadelphia, WB Saunders Co., 1979, pp. 46~63
2. Wareing PF, Phillips IDJ: Growth and differentiation in plants. 3rd ed. Oxford, Pergamon press, 1981, pp. 75~104
3. Robert JW: Plant growth substances in agriculture. San Francisco, WH Freeman Co., 1972, pp. 90~117
4. Maruzzella J C, Garner JG: Effect of kine - ttin on bacteria. Nature 203:385, 1963
5. Saono susono : Effect of gibberellic acid on the growth and multiplication of some soil microorganisms and unicellular green algae. Nature 204:1328, 1964.
6. Litvinenko SN: Effects of growth stimulants on some microorganisms. Microbiologia 35:51, 1966
7. Greenberg L, Tirpak J: A note of the effect of gibberellic acid on Azotobacter indicus. J Am Pharm 8:233, 1960
8. Barea JM, Navarro, E, Polmares A, Montoya E : A rapid microbiological assay method for auxins, gibberellic acid and kinetin using yeast. J Appl Bact 37:1717, 1974

9. Lu KC, Gilmour CM, Zagallo AC, Bollen WB:
Effects of gibberellic acid on soil microor -
ganisms. Nature 181:189, 1958
 10. Kennell D: The effects of indoleacetic acid
and kinetin on the growth of some microor -
ganisms. Exp cell Research 21:19, 1960
 11. Churikova VV, Orlova AI: The effect of gi -
bberellin on the multiplication and activities
of yeast. Prikl Biokhim Mikrobiol 10:161, 1974
 12. Luridiana N, Robustell F: The auxins accessory
factors of cellular growth effects of gibbere -
llic acid and β -indoleacetic acid on the gro -
wth of Mycobacterium tuberculosis. Biol Lat
(Mialano) 13:263, 1960
-