

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 생육 및 배양 특성에 미치는 pH의 영향

심창환 · 신원철* · 유주현¹

강원대학교 발효공학과, ¹연세대학교 식품공학과

Effect of pH on Growth and Cultural Characteristics of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M

Shim, Chang-Whan, Won-Cheol Shin* and Ju-Hyun Yu¹

Department of Fermentation Engineering, Kangweon National University, Chuncheon 200-701, Korea

¹Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

Abstract — The growth and cultural characteristics of *Bacillus* sp. SH-8 and SH-8M were investigated at various pH conditions. *Bacillus* sp. SH-8 showed normal growth pattern above pH 9.0. However, with the pH adjusted below 7.7, O.D.₅₅₀ decreased rapidly with concomitant reduction in viable cell numbers. In contrast, *Bacillus* sp. SH-8M demonstrated growth capability at pH 7.7, but with slightly reduced growth rate at pH 6.9. Similar results were obtained when those two strains were cultivated on the solid medium. Both of them showed short rod shapes at pH 10.2. However, at pH 7.7 only *Bacillus* sp. SH-8 was observed to have elongated rod shape. Extracellular pH of both the strains, when cultured at initial pH of 10.2, reached to 9.0 after the incubation of 28 hours. At the initial pH of 9.0 and 9.6, the extracellular pH was reduced at the beginning of cultivation, but elevated after 12 hours. When cultured at initial pH of 6.9 and 7.7, extracellular pH of *Bacillus* sp. SH-8M increased to 8.0 and 8.7, respectively, while that of *Bacillus* sp. SH-8 remained constant pH 7.0. The highest sporulation rate of *Bacillus* sp. SH-8 and SH-8M was obtained at the initial pH of 10.2 and after the incubation of 3 days with the sporulation rate of 95% and 85%, respectively.

호알칼리성 미생물은 생육 배지의 pH에 따라 배양 특성이 변한다고 보고되어져 있다. 예를 들면 Souza와 Deal(1)은 호알칼리성 미생물을 pH를 달리하여 배양하였을 때 균의 형태가 filament 또는 단간균의 모양을 나타내어 pH에 의한 균의 형태차이를 보고 하였다. 한편 Ueyama와 Horikoshi(2), Guffanti 등(3)에 의하면 호알칼리성 미생물은 배양 pH에 따라 균체의 pH를 변화시킨다고 보고하였으며 Kelly와 Fogarty(4)도 호알칼리성 *Bacillus*에서 균체의 pH 변화는 초기 pH에 의존한다고 하였다. 또한 Horikoshi와 Akiba(5)는 호알칼리성 미생물이 알칼리 배지

에서는 균체의 pH를 배양시간에 따라 초기보다 낮추며 중성 배지에서는 초기보다 높혀 균체의 pH를 생육에 적합하도록 변화시키는 성질을 가지고 있다고 언급하였다. 이 외에도 배지의 초기 pH가 호알칼리성 미생물의 생육 및 배양 특성에 미치는 영향에 관한 연구가 많이 보고되어져 있다(6-9). 한편 Kudo와 Horikoshi(10)는 호알칼리성 *Bacillus*의 포자형성과 생육 pH에 관한 연구에서 포자형성의 최적 pH 조건이 균의 생육 최적 pH 조건과 동일하였다고 보고한 바가 있다.

따라서 본 연구에서는 전보(11)에서 토양으로부터 분리한 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8과 중성에서도 생육 가능한 변이주인 *Bacillus* sp. SH-8M의 생육, 형태 특성 및 포자형성능에 미치는 초기 pH의 영향을 비교 검토하였다.

Key words: Alkalophilic, *Bacillus* sp., pH change, cultural characteristics

*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주

전보(11)에서 토양으로부터 분리한 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8과 중성에서 생육 가능한 변이주 *Bacillus* sp. SH-8M을 사용하였다.

배지

Horikoshi와 Akiba(5)의 배지(glucose 10g, peptone 5g, yeast extract 5g, KH_2PO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, 1 liter)를 사용하였으며 실험 목적에 따라 Na_2CO_3 의 농도를 달리하여 배지의 초기 pH를 조절하였다.

균주의 배양 및 생육 측정

균주의 배양은 알칼리성 액체배지(pH 10.2)에 균을 1 백금이 접종하여 30°C에서 하룻밤 진탕배양시킨 종균 배양액을 실험 목적에 따라 초기 pH를 조절한 새로운 배지에 0.5%(v/v) 접종하여 30°C에서 진탕 배양하였다. 액체배지에서의 생육 측정은 분광광도계(Spectronic 20)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 고체배지에서의 생육 측정은 평판배지에 획선 접종하여 30°C에서 배양하면서 생육 유무를 관찰하였다.

균주의 형태 관찰 및 균체의 pH 측정

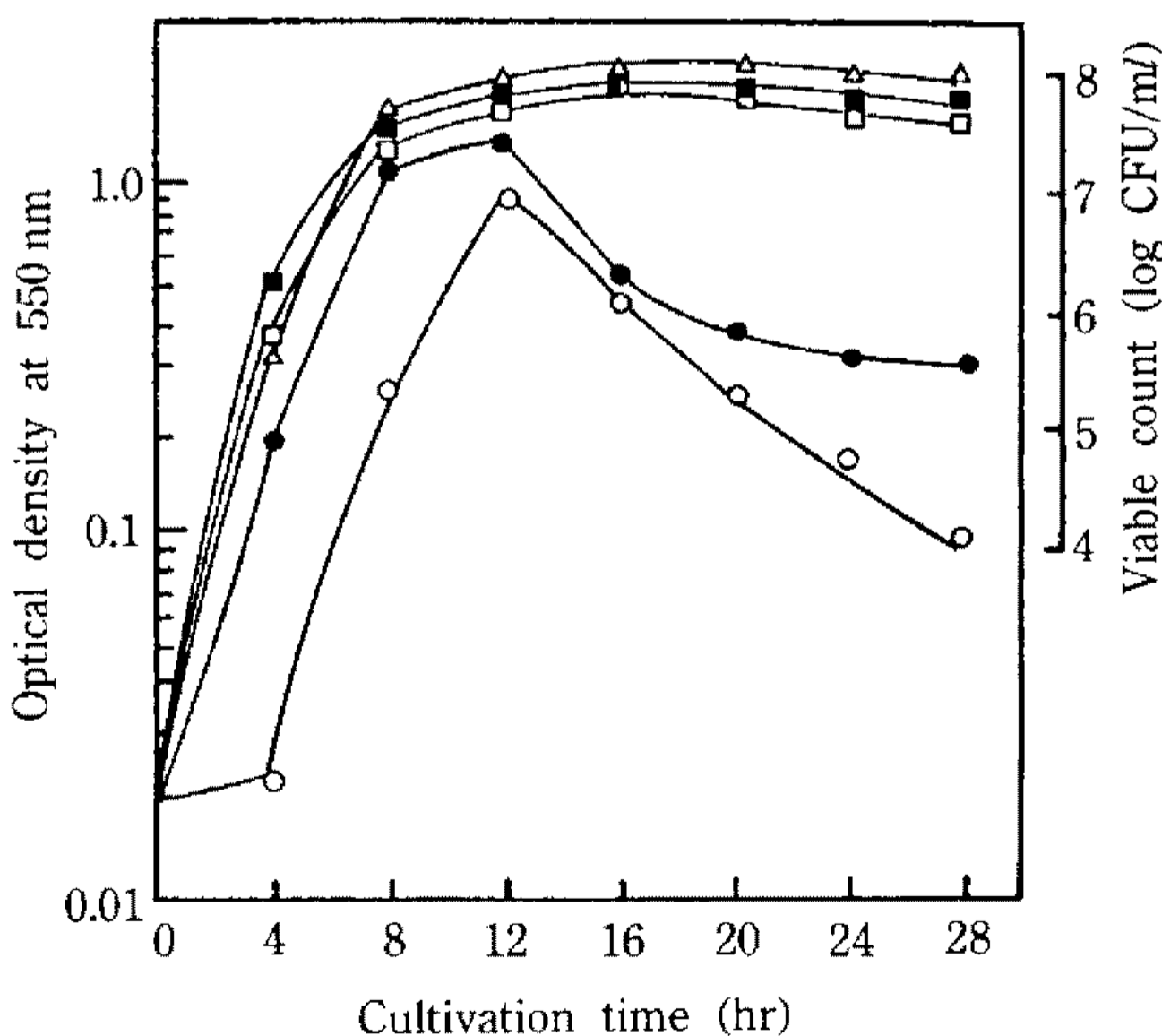


Fig. 1. Growth curves of *Bacillus* sp. SH-8 at various pHs.
○: pH 6.9, ●: pH 7.7, □: pH 9.0, ■: pH 9.6, △: pH 10.2

균주의 형태 관찰은 pH 7.7과 10.2로 조절한 액체 배지에서 12시간 진탕배양한 후 위상차 현미경을 사용하여 관찰하였으며, 균체의 pH 측정은 각각 pH를 조절한 액체배지에서 배양하면서 4시간 간격으로 배양액의 pH를 pH meter로 측정하였다.

포자형성능의 측정

초기 pH를 조절한 액체배지에 포자형성을 시키기 위하여 $7 \times 10^{-4} M$ $CaCl_2$, $1 \times 10^{-3} M$ $MgCl_2$ 및 $5 \times 10^{-5} M$ $MnCl_2$ 를 첨가하여(12) 배양시킨 후 slide glass 위에 도말하였다. Malachite green 수용액(5%)을 가하고 2~3분간 가열하여 수세하였다. Safranin 수용액(0.5%)으로 30초간 대비염색하고 다시 수세하여 광학현미경으로 검경하였다. 포자형성능은 전 세포수에 대한 포자형성 세포수를 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

액체배지에서의 생육 특성

초기 pH가 서로 다른 액체배지에서 *Bacillus* sp. SH-8의 생육을 조사한 결과(Fig. 1), pH 9.0 이상의 배지에서 생육이 좋았으며 12시간 이후에 정지기에 도달하였다. 그러나 pH 6.9와 7.7에서는 12시간 이후부터 O.D.₅₅₀가 급격히 감소하였으며 생균수도 감소하였다. 그러나 *Bacillus* sp. SH-8M의 경우에는 pH

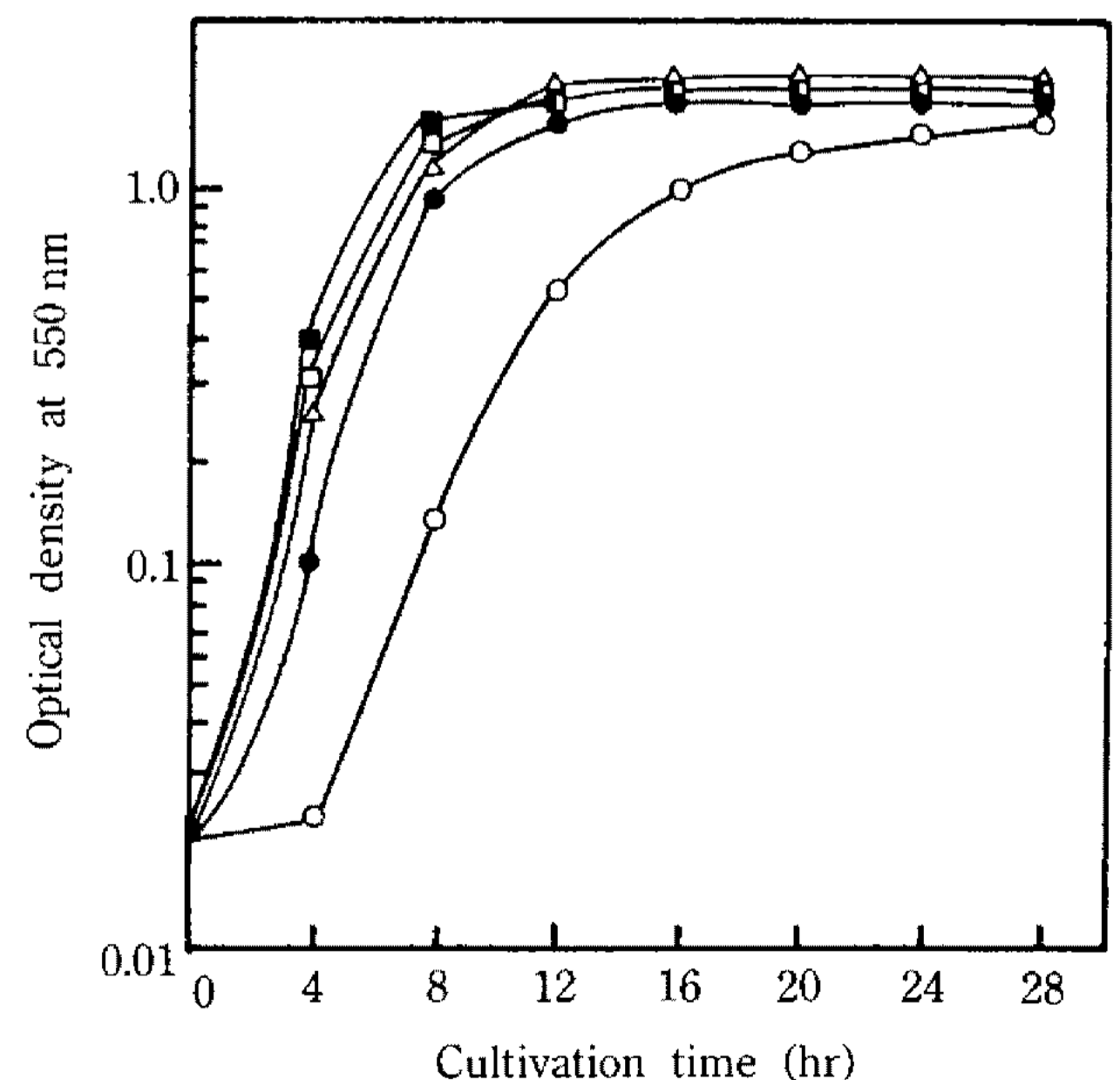


Fig. 2. Growth curves of *Bacillus* sp. SH-8M at various pHs.
○: pH 6.9, ●: pH 7.7, □: pH 9.0, ■: pH 9.6, △: pH 10.2

9.0 이상의 배지에서 뿐만 아니라 pH 6.9와 7.7에서도 12시간 이후 생육을 계속하여 중성배지에서 *Bacillus* sp. SH-8과는 생육의 차이를 보였다(Fig. 2).

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 생육 곡선으로부터 균주의 세대 시간을 구한 결과 두 균주 모두 배지의 초기 pH가 9.6일 때 각각 약 35분 및 45분으로 가장 빨랐으며 그 외의 pH에서도 중성보다 알칼리성 배지에서 생육이 더 빨랐다. 또한, 초기 pH가 같을 때 중성 및 알칼리성 배지에서 *Bacillus* sp. SH-8이 *Bacillus* sp. SH-8M보다 세대시간이 빠른 경향을 나타내었다.

고체배지에서의 생육 특성

초기 pH를 달리한 평판배지에서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M의 생육을 검토한 결과는 Fig. 3

과 같다. *Bacillus* sp. SH-8의 경우 알칼리성 배지(pH 10.2)에서는 시간경과에 따라 생육을 계속하는 반면 중성배지(pH 7.7)에서는 약 14시간까지는 생육을 하였으나 그 후 시간이 경과함에 따라 균의 형체가 점점 소실되는 현상을 보였다. *Bacillus* sp. SH-8M의 경우에는 알칼리성(pH 10.2) 및 중성(pH 7.7) 배지에서 모두 생육이 잘 되었다. 따라서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M 모두 액체배지에서와 같은 성질을 고체배지에서도 나타냄을 알 수 있었다. 이상의 생육 특성을 검토한 결과로부터 호알칼리성 *Bacillus* sp. SH-8은 중성에서 생육이 불가능하였는데 이와 같은 원인에 대해서는 앞으로 연구가 더욱 진행되어야 할 것으로 생각된다.

pH에 따른 세포의 형태 특성

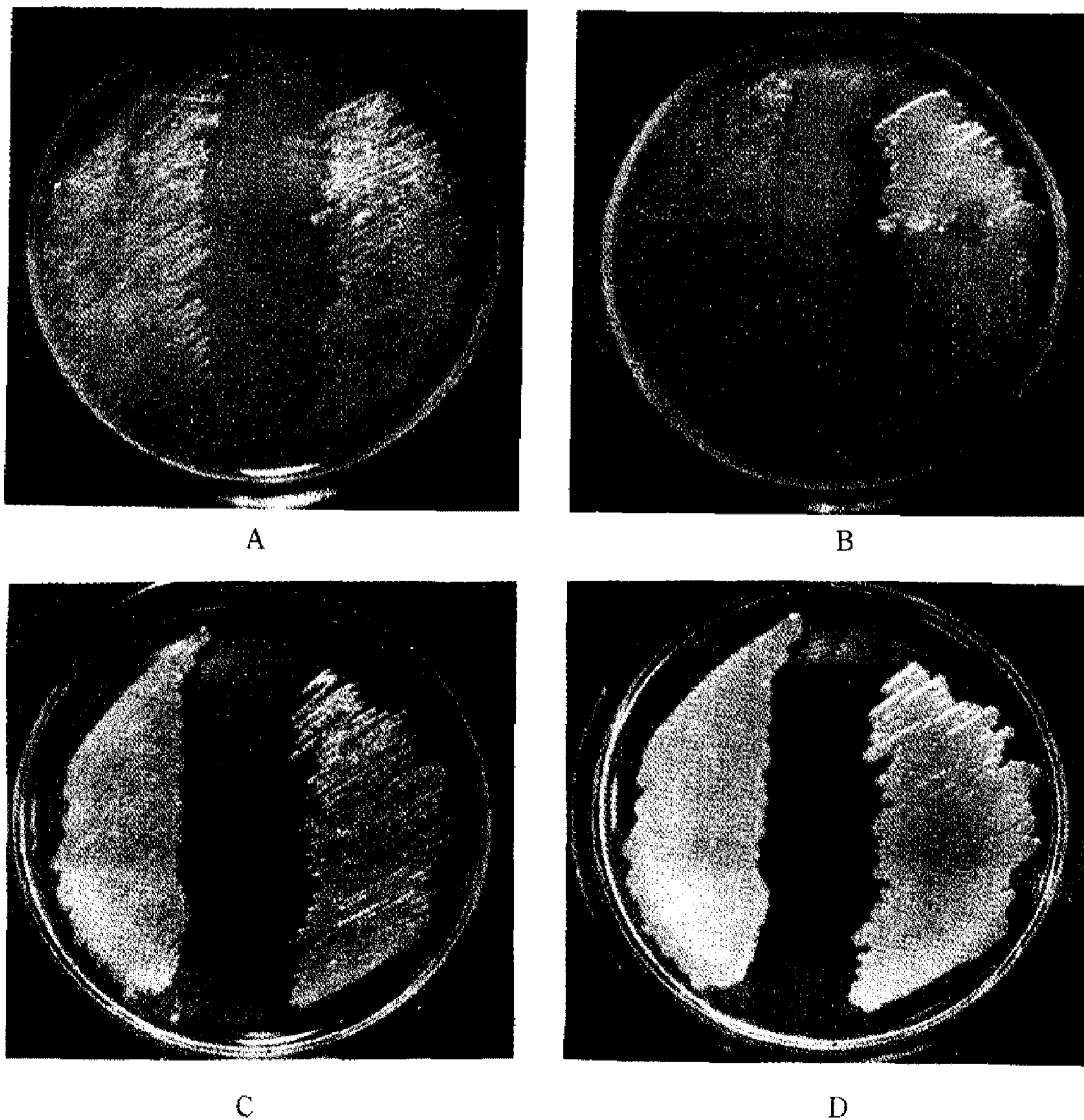


Fig. 3. Growth of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M on the solid medium at pH 7.7 and 10.2.
 Left side of each plate was *Bacillus* sp. SH-8.
 Right side of each plate was *Bacillus* sp. SH-8M.
 A & B: pH 7.7, A & C: 14 hours incubation, C & D: pH 10.2, B & D: 24 hours incubation

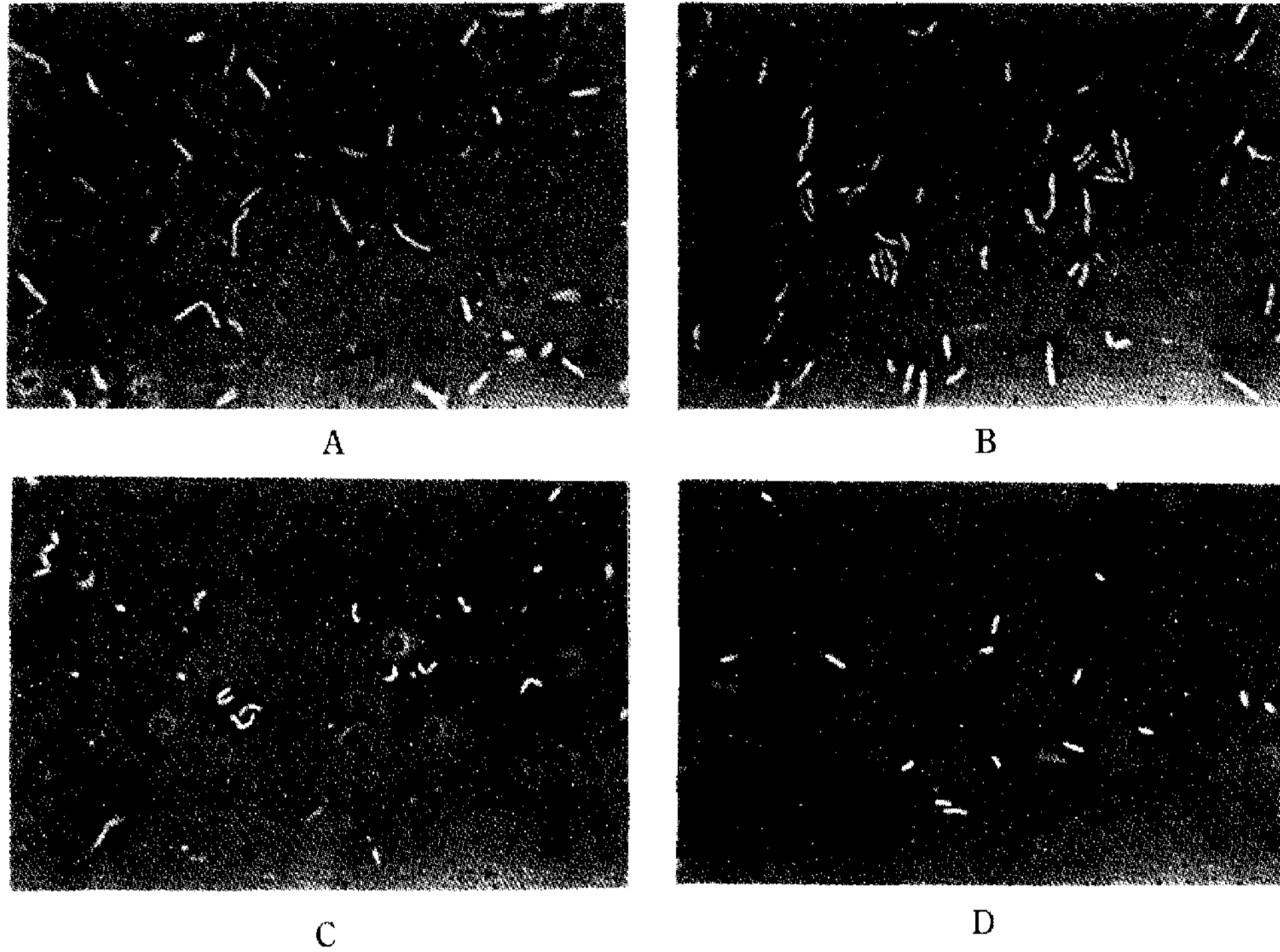


Fig. 4. Photograph of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M in the liquid medium at pH 7.7 and 10.2 (×600).
 A & B: pH 7.7, A & C: *Bacillus* sp. SH-8, C & D: pH 10.2, B & D: *Bacillus* sp. SH-8M
 Morphology was checked after 12 hours cultivation.

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M을 초기 pH를 조절한 액체배지에서 진탕배양한 후 위상차 현미경을 사용하여 관찰한 결과는 Fig. 4와 같았다. *Bacillus* sp. SH-8의 경우 중성 배지(pH 7.7)에서는 장간균의 형태가 관찰되었으며, 알칼리성 배지(pH 10.2)에서는 정상적인 단간균이었다. 그러나 *Bacillus* sp. SH-8M은 중성 배지(pH 7.7)에서도 장간균의 형태가 관찰되지 않았다.

배양중의 pH 변화

Bacillus sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M을 초기 pH를 조절한 액체배지에서 진탕배양하면서 배양액의 pH를 측정된 결과, *Bacillus* sp. SH-8의 경우(Fig. 5) 초기 pH가 10.2일 때에는 배양시간이 경과함에 따라 계속해서 pH가 낮아져 배양시킨 28시간 후에는 약 pH 9.0이 되었고 초기 pH가 9.6과 9.0일 때는 12시간까지 pH가 저하되었다가 그 후 다시 상승하였다. 초기 pH가 7.7과 6.9에서 배양시킨 *Bacillus* sp. SH-8은 12시간 이후부터 더 이상 생육을 못하고 배지의 pH는 모두 7.0 부근으로 일정하였다. 한편, *Bacillus* sp. SH-8M의 경우 Fig. 6에서와 같이 초기 pH가 10.2일 때 배양시간이 경과함에 따라 pH가 낮아져 28시간

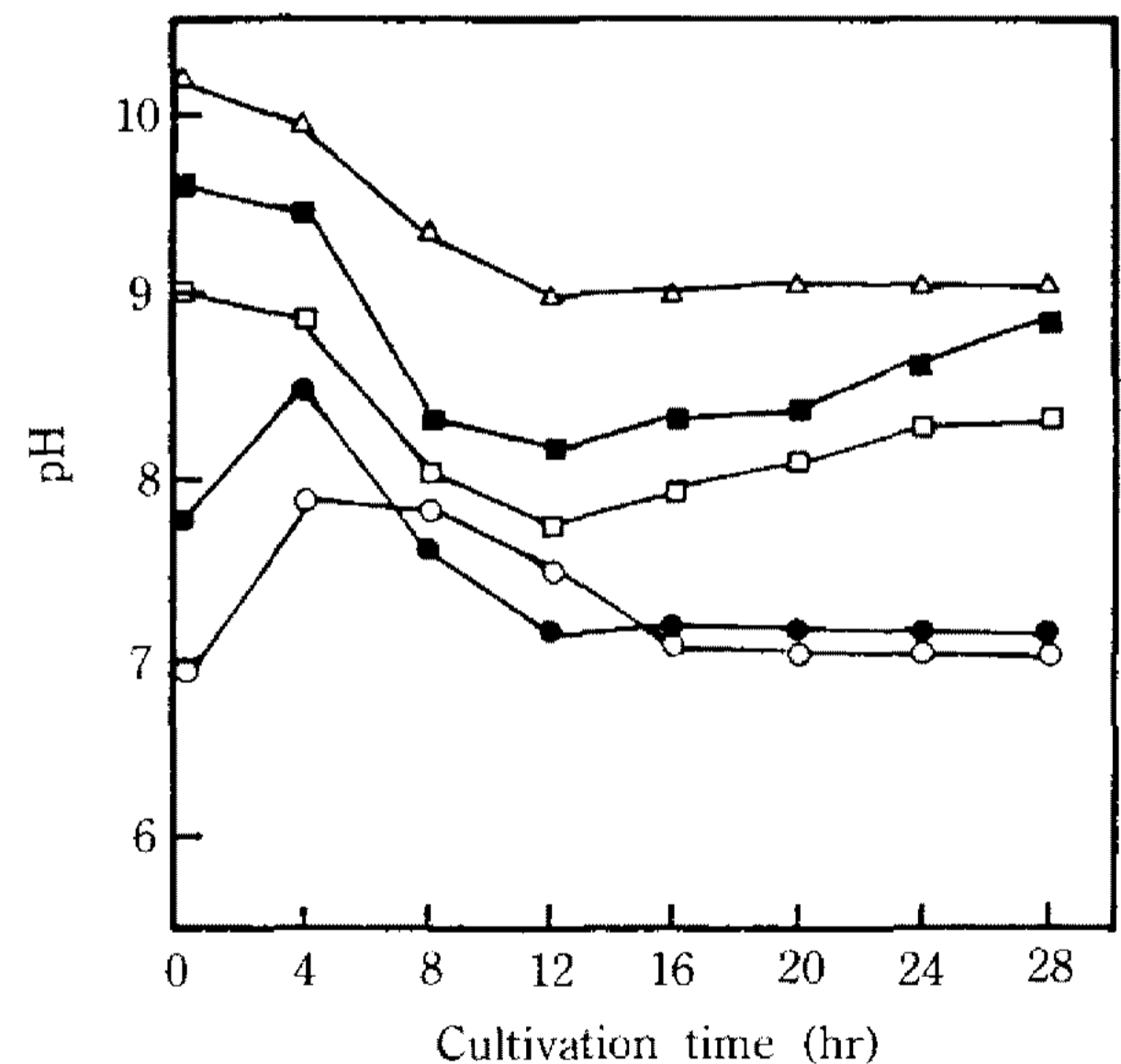


Fig. 5. Change of external pH during the cultivation of *Bacillus* sp. SH-8 at various pHs.
 ○: pH 6.9, ●: pH 7.7, □: pH 9.0, ■: pH 9.6, △: pH 10.2

후 pH가 9.0 부근에 도달하였다. 초기 pH가 9.6과 9.0일 때 초기에는 pH가 저하되었다가 배양시간에 따라 다시 상승하였고 초기 pH가 7.7과 6.9에서도 배양시간에 따라 배지의 pH가 알칼리쪽으로 상승하였다.

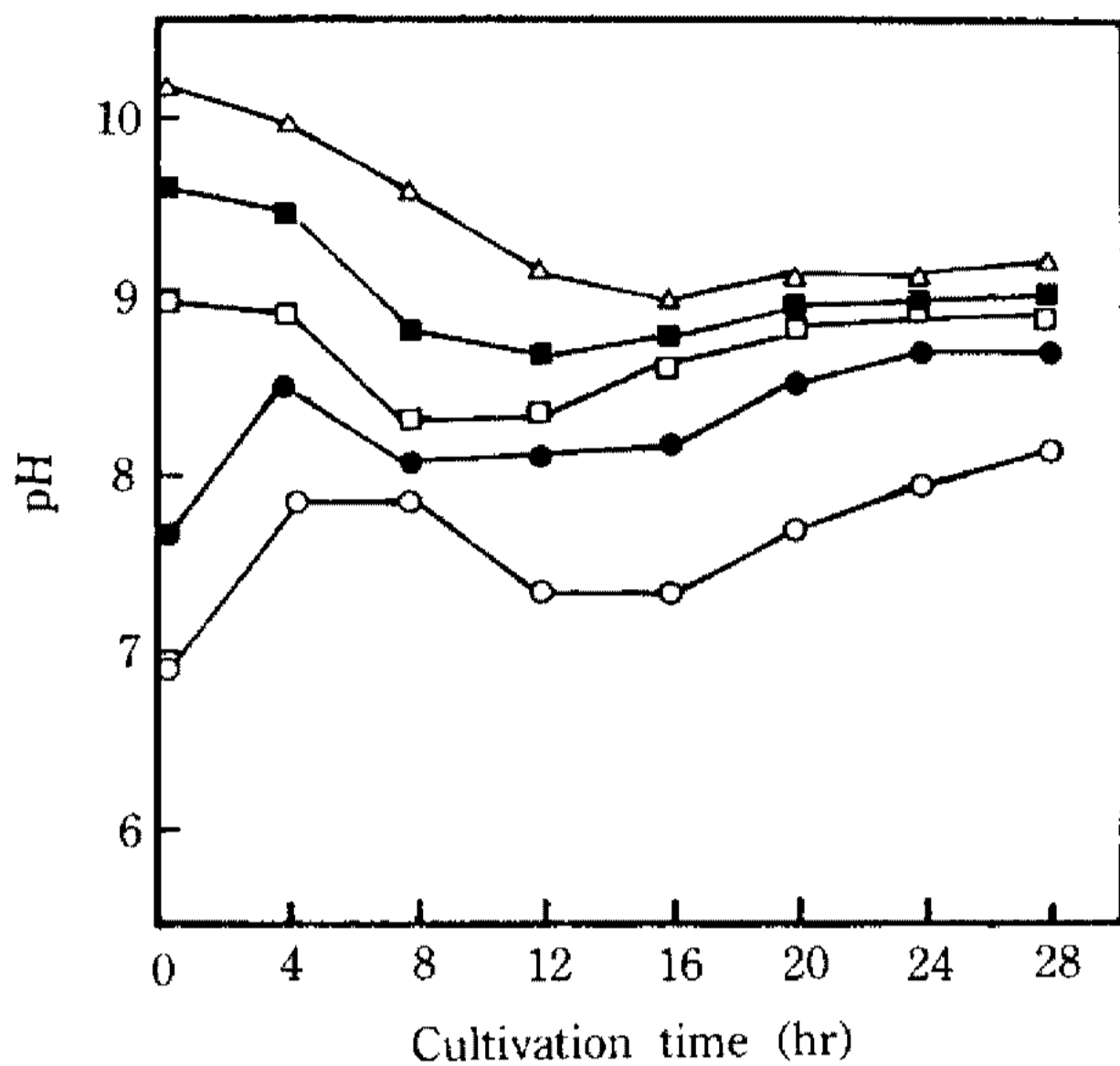


Fig. 6. Change of external pH during the cultivation of *Bacillus* sp. SH-8M at various pHs.

○: pH 6.9, ●: pH 7.7, □: pH 9.0, ■: pH 9.6, △: pH 10.2

호알칼리성 미생물의 배양 특성중의 하나는 pH를 자신의 생육에 적합하도록 변화시킬 수 있다는 점이다 (5). 즉 배지의 초기 pH가 알칼리성일 때는 호알칼리성 세균이 생육하면서 배지의 pH를 초기보다 낮추며, 배지의 초기 pH가 중성일 때는 배지의 pH를 초기보다 알칼리쪽으로 높이는 성질을 가지고 있다. 또한 Ueyama와 Horikoshi는(2) 호알칼리성 *Arthrobacter* sp.의 실험에서 초기 pH를 조절한 각각의 배지에서 균주의 배양 도중 pH를 자신의 생육에 적합한 조건으로 변화시킨다고 보고한 바가 있다. 본 실험 결과, *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M 균주도 이와 같은 호알칼리성 세균의 배양 특성을 잘 나타내었다.

포자형성능

초기 pH를 조절한 액체배지(pH 6.9~10.2)에 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M을 진탕배양하면서 포자형성능을 검토한 결과는 Table 1과 같다. *Bacillus* sp. SH-8은 초기 pH 9.0에서 96시간 배양까지 전혀 포자를 형성하지 않았으며, 초기 pH 9.6과 10.2에서는 배양시간에 따라 포자형성능이 증가하였고 같은 배양시간에서는 pH 10.2에서 포자형성능이 가장 높게 나타났다. 한편, *Bacillus* sp. SH-8M의 경우에는 초기 pH 6.9일 때 배양시간이 경과해도 5% 미만의 포자형성능을 나타내었으며, 초기 pH 7.7에서 10.2까지에서는 배양시간에 따라 포자형성능이 증가

Table 1. Effect of initial pH on the sporulation of *Bacillus* sp. SH-8 and *Bacillus* sp. SH-8M

Cultivation time (day)	Sporulation (%)									
	<i>Bacillus</i> sp. SH-8					<i>Bacillus</i> sp. SH-8M				
	pH					pH				
	6.9	7.7	9.0	9.6	10.2	6.9	7.7	9.0	9.6	10.2
1	-	-	0	0	5	0	15	15	25	40
2	-	-	0	75	90	5	45	55	65	75
3	-	-	0	90	95	5	50	65	75	85
4	-	-	0	90	95	5	50	65	75	85

-: not determined

하였으며, 같은 배양시간에서는 배지의 초기 pH가 알칼리쪽 일수록 포자형성능이 높았다. 따라서 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M 모두 초기 pH 10.2일 때 포자형성능이 높음을 알 수 있었으며, 이때 각각 최고 95, 85%를 나타내어 분리균주인 *Bacillus* sp. SH-8이 그 변이주인 *Bacillus* sp. SH-8M보다 포자형성능이 높음을 알 수 있었다.

본 실험결과는 Kudo와 Horokoshi(10)가 보고한 호알칼리성 *Bacillus* No. 2b-2의 실험에서 포자형성능이 알칼리 pH(pH 8.0~9.5)에서 높게 나타났다는 결과와 유사한 경향을 나타내었다.

요 약

Bacillus sp. SH-8은 pH 9.0 이상에서 생육이 가능하였고 pH 7.7 이하에서는 배양 12시간부터 O.D.₅₅₀가 급격히 감소하였으며 생균수도 감소하였다. 그러나 *Bacillus* sp. SH-8M은 pH 7.7에서 생육이 가능하였고 pH 6.9에서도 약간 생육속도가 늦었으나 정상적인 생육을 나타내었다. 고체배지의 생육 양상도 액체배지에서와 비슷한 결과를 나타내었다. 균주의 형태는 pH 10.2에서 두 균주 모두 단간균의 형태를 나타내었으나 pH 7.7에서는 *Bacillus* sp. SH-8 균주만이 장간균의 형태를 나타내었다. 균체의 pH는 초기 10.2일 때 두 균주 모두 배양 28시간 후에는 9.0이었고 초기 pH 9.0과 9.6에서는 배양초기에 pH가 저하되었다가 12시간 후부터 상승하였다. 한편, *Bacillus* sp. SH-8M은 초기 pH 6.9와 7.7일 때 배양시간에 따라 균체 외의 pH가 8.0과 8.7로 상승하였으나 *Bacillus* sp. SH-8은 배양 12시간 이후에도 7.0으로 일정하였다. 포자형성능은 *Bacillus* sp. SH-8과 *Bacillus* sp. SH-8M 모두 배양 3일 후, 초기 pH 10.2일 때 각각 95%와

85%로 가장 높았다.

참고문헌

1. Souza, K.A. and P.H. Deal. 1977. Characterization of a novel extremely alkalophilic bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **101**: 103-109.
2. Ueyama, H. and K. Horikoshi. 1981. *Japan Patent* 56-186153.
3. Guffanti, A.A., O. Finkelthal, D.B. Hicks, L. Falk, A. Sidhu, A. Garro and T.A. Krulwich. 1986. Isolation and characterization of new facultatively alkalophilic strains of *Bacillus* species. *J. Bacteriol.* **167**: 766-773.
4. Kelly, C.T. and W.M. Fogarty. 1978. Production and properties of polygalacturonate lyase by an alkalophilic microorganisms *Bacillus* sp. RK9. *Can. J. Microbiol.* **24**: 1164-1172.
5. Horikoshi, K. and T. Akiba. 1982. *Alkalophilic Microorganisms*, Pp. 35-37. Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
6. Souza, K.A., P.H. Deal, H.M. Mack and C.E. Turnbill. 1974. Growth and reproduction of microorganisms under extremely alkaline conditions. *Appl. Microbiol.* **28**: 1066-1068.
7. Akiba, T. and K. Horikoshi. 1976. Identification and growth characteristics of α -galactosidase-producing microorganisms. *Agric. Biol. Chem.* **40**: 1845-1849.
8. Chislett, M.E. and D.J. Kushner. 1961. A strain of *Bacillus circulans* capable of growing under highly alkaline conditions. *J. Gen. Microbiol.* **24**: 187-190.
9. Gee, J.M., B.M. Lund, G. Metcalf and J.L. Peel. 1980. Properties of a new group of alkalophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **117**: 9-17.
10. Kudo, T. and K. Horikoshi. 1979. The environmental factors affecting sporulation of an alkalophilic *Bacillus* species. *Agric. Biol. Chem.* **43**: 2613-2614.
11. 심창환, 신원철, 유주현. 1991. 호알칼리성 미생물의 분리, 동정 및 중성에서 생육 가능한 변이주의 분리. *산업미생물학회지* **19**: 543-547.
12. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G.B. Philips. 1981. *Manual of Methods for General Bacteriology*, Pp. 114-115. American Society for Microbiology, Washington.

(Received May 15, 1992)