

Penicillin 이 Bacillus subtilis 의 生育에 미치는 影響

洪 淳 德
慶北大學校 農科大學
農化學科

The Effects of Penicillin on the growth of *Bacillus subtilis*

Soon-duck, Hong

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture
Kyung-Pook National University, Taegu, Korea.

(Received March 24, 1973)

Abstract

This experiment was done to investigate the growth and the fine structural changes of *Bacillus subtilis* which were influenced by the penicillin with electromicroscope. The results were as follows;

- 1) The higher the concentration of penicillin the more prominent inhibition of the growth was observed.
- 2) The septa was not formed, derangements of synthesis of cell wall and cell membrane.
- 3) Cytoplasm was increased with swelling of cell body because of weakness of cell membrane induced by deranged synthesis of cell membrane. Some of the cells showed desruption of their membrane with loss of cytoplasm, remaining empty space, which suggest loss of cell function.
- 4) It can be suggested that penicillin had affected on the cell wall of *Bacillus subtilis*, and inhibited growth of the cell by deranging the formation of the cell wall.

I. 緒 論

Bacillus subtilis 는 好氣性 또는 통성 혐기성에 屬하는 gram positive의 桿菌으로서 生體內的 일 단에 한개의 内生孢子를 形成하며 이 spore는 耐熱성이 아주 强하다.

이 *Bacillus subtilis* 는 自然界에 널리 分布하고 있으며 amylase와 protease를 強力히 分泌하는 菌株로서 그 利用이 광범하며 또한 肉類나 牛乳 등을 부패시키므로 腐敗菌으로도 잘 알려져 있다. 그리하여 最近에는 이 菌을 利用하여 전분의 糖化, 油脂의 分解, 牛乳의 응고, Gelatin의 液化, Biotin,

Vitamin K₂의 合成等 여러分野에 利用되고 있으며 植物성유의 醱酵精練 및 酵素劑의 製造에 應用되고 있다^{1,2)}.

*Bacillus subtilis*의 形態 및 細胞內微細構造에 對해서도 많은 研究가 되어 왔는데 M. R. J. Salton은 Cell wall structure에 관하여³⁾ Tokuyasu 및 Yamada는 cytoplasmic membrane structure에 對하여⁴⁾ S. Mudd, T. F. Anderson은 flagella의 diameter⁵⁾, G. Knaysi의 cell wall과 protoplast에 관해서 研究되었고⁶⁾ 또 最近에 와서는 J. M. Wiame, Rostorck 및 E. Vander Winkel 등은 *Bacillus megaterium*과 함께 Osmium tetroxide

와 formalin에 固定하여 methacrylate resin에 embedding 하여 成長細胞를 section해서 細胞內微細構造를 比較하였으며⁷⁾ 村上은 spore의 發芽 mechanism에 關한 研究⁸⁾ 등이 있다.

一般的으로 抗生物質은 微生物의 membrane에 作用하여 生育에 저해를 일으킨다고 하며 따라서 抗生物質中 penicillin은 gram positive菌에 特異한 反應이 있다는 것도 알려져 있다.

저자는 培地에 penicillin을 첨가하여 *Bacillus subtilis*을 배양하였을 때 이때의 生育狀態와 아울러 細胞內微細構造를 전자현미경으로 관찰하여 結果를 보고 하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

1) 供試菌株 및 培地

本實驗에 使用한 菌株은 本研究室에 保管되어 있는 *Bacillus subtilis*이다.

本菌의 培養에 使用한 培地는 비교적 菌의 成育이 良好한 것으로 알려져 있는 bouillon medium으로서 beef extract 10g과 polypeptone 10g 및 NaCl 3g을 물 1000ml에 溶解시켜 pH 7.0으로 조절하여 常法에 依하여 調製하였다.

2) 固定法

本菌의 固定에 使用한 液은 Palade⁹⁾의 固定液으로서 pH 7.4로 調節하였다.

3) 包埋材料

a) Epoxy resin ; Epon 812

b) 硬化劑 ; DDSA (dodeceny succinic anhydride) MMA (methyl malic anhydride)

c) 重合加速劑 ; DMP-30 (2, 4, 6-trimethyl aminomethyl pheno 1)

d) 置換劑 ; propylen oxide

e) Epon混合液

A液 ; Epon 812.....62ml

DDSA.....100ml

B液 ; Epon 812 ...100ml

MNA89ml

上記 A, B液의 混合比率는 A : B를 3 : 7로 混合하여 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 培養法

本菌의 培食은 penicillin을 濃度別로 첨가한 培地에 菌을 接種하여 30°C에서 진탕배양하였으며 各 phase (10—40시간)마다 菌體를 遠心, 集菌하

여 전자현미경으로 관찰하였으며 growth curve bouillon medium에 寒天을 加하여 平板培養하여 colony 數를 計測하였다.

2) 固定 및 脫水

本菌의 細胞內微細構造를 전자현미경으로 관찰하기 위하여 Palade의 固定液으로 4°C에서 20時間 固定하여 脫水하기전에 菌體를 agar에 包埋시켜 1mm³ 크기로 끊어서 脫水하였다. 脫水는 ethyl alcohol 50%, 70%, 80%, 90% 順으로 各 30分씩 脫水시키고 無水 alcohol로서 1時間씩 2回 처리하였다.

3) 包埋 및 置換

包埋는 無水 alcohol로서 處理한 후 propylen oxide로 30分간 2回 置換시켜 propylen oxide-Epon混合液(1:1)으로 1時間, 다음에 이 液에 等量의 Epon 混合液을 加하여 4時間 浸漬시킨후 이 液을 버리고 Epon 混合液만을 加하여 1時間 浸透시킨후에 이것을 Epon 混合液에 2%의 重合加速劑(DMP-30)을 넣어 40°C에서 10時間, 60°C에서 1주야 順次 重合하였다.

4) Cutting(薄切) 및 Staining

包埋重合된 Block를 trimming 하여 두께가 400—500Å으로 薄切하여 mesh 위에 절편을 얹어서 건조 시킨다. 이때 使用한 microtome은 porter Blum Ultramicrotome MT-2B type로 glass knife를 使用하였다.

염색은 Reynolds, ¹⁰⁾에 依하여 二重염색을 하였는데 먼저 포화 Uranyl acetate液에 40分간 염색한후 grid를 물로 잘 세척한 다음 lead acetate液에 20分간 염색하였다.

특히 lead acetate 염색에 있어 室內空氣와 接觸을 피하여야하며 空氣中의 炭酸가스과 結合해서 炭酸鉛의 結晶이 析出하여 전자현미경으로 관찰이 不可能하게 된다.

이때 使用한 전자현미경은 Hitachi HU-11C-type로 관찰하였다.

III. 結果 및 考察

1. Penicillin의 影響

本菌의 penicillin 영향하에 있어서의 生育狀態를 調查하기 위하여 培地에 penicillin을 첨가하지 않은 Control區와 penicillin을 各 濃度別(10, 20, 40, 100 μg/100ml)로 첨가하여 30°C에서 40時間 培養하여 各 phase에 따른 菌의 生育狀態를 비교 검토한결과 Fig. 1과 같다.

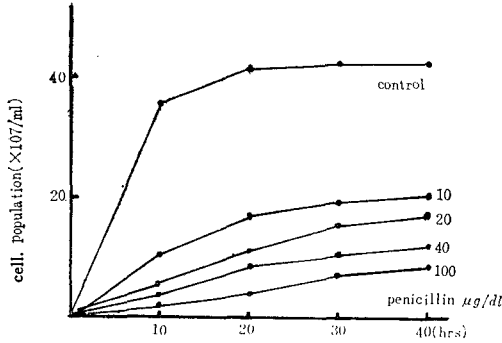


Fig. 1. Growth of *Bacillus subtilis* influenced by the penicillin

即 penicillin을 첨가하지 않은 培地에서는 菌의 生育이 왕성하나 여기에 penicillin을 10 μ g/100ml 만 첨가하여도 菌의 生育이 억제되어 control 구에 비하여 약 半數가되며 따라서 penicillin의 농도가 높아짐에 따라 比例的으로 菌의 生育이 현저하게 억제됨을 알수있다.

그런데 control 區에서는 菌을 접종하여 20時間以後부터는 菌의 生育이 平行線을 나타내나 penicillin을 첨가한 各 區에서는 초기에는 菌의 生育이 심하게 억제되나 시간이 경과함에 따라 그 生育이 점차 上昇됨을 알수있으며 이것은 菌이 penicillin에 對한 耐性이 있다고 사료되나 여기에 對해서는 今後 究明코자 한다.

2. 電子顯微鏡의 觀察

本菌에 penicillin을 첨가하지않은 培地와 penicillin을 各 濃度別 (10, 20, 40, 100 μ g/100ml)로 첨가하여 30°C에서 30時間 培養한 것을 遠心集菌하여 生理食鹽水로 세척한다음 菌體를 osmic acid로 固定, epoxy resin으로 embedding하고 ultramicrotome으로 薄切하여 電子顯微鏡으로 觀察하면 다음과 같다.

Fig. 2은 penicillin을 첨가하지않은 培地에서 培養한 菌으로서 菌體構造는 細胞주위가 두껍고 전자 밀도가 높은 cell wall로서 쌓여 있으며 이 cell wall 과 細胞質 사이에는 unit membrane으로된 二重의 細胞膜을 구성하고 있다. 그리고 細胞質은 均質한 形質로서 충만되어있고 이 細胞質의 中央에는 電子密度가 낮은 細胞核이 있다. 또한 細胞의 一端에 孢子를 形成하고 있다. 本菌이 다른 細菌과 特異한 것은 孢子를 이루고 있으며 一般的으로 細菌의 孢子는 one cell, one spore와 one cell, two

spore 의 두 type가 있으나 本菌은 前者에 屬한다.

孢子는 球形으로서 그 内部가 아무런 構造도 없이 비어있는 것과 不明確한 構造를 가지고 있는 것도 있다. 内部가 비어 있는 孢子는 菌體를 固定하여 전자 현미경으로 觀察하기까지 脫水, 包埋의 여러과정을 거치는 동안 孢子의 內容物이 溶出된 것으로 生覺된다. (사진 2 참조)

Fig. 3. 는 penicillin 10 μ g/100ml를 培地에 첨가하여 培養한 것으로, 細胞의 構造는 control 과 별 차이가 없으나 細胞核部分이 약간 파괴되어 있고 細胞가 서로 융합된 것을 보아 細胞分裂에 저해를 일으킨 것 같다. (사진 3 참조)

Fig. 4. 은 penicillin 20 μ g/100ml를 첨가한 배지에서 培養한 細胞로서 역시 分裂된 細胞가 分離되지 못하고 서로 융합되어 있다. 細胞核과 細胞質의 파괴를 볼수 있다. (사진 4 참조)

Fig. 5는 40 μ g/100ml에서 培養한 細胞로서 septa 形成에 저해를 일으키며 細胞質 및 核이 파괴되어 cell wall의 capsule 만 남아 있어 細胞自體의 機能이 상실된 것도 있다. (사진 5 참조)

Fig. 6 培地에 penicillin 100 μ g/100ml을 첨가하여 배양한 細胞인데 大部分의 細胞가 細胞質 및 核이 파괴되어 内部構造物이 상실된 空白이며 cell wall 만 남아 있는 死滅狀態에있다. 그리고 cell wall 및 membrane 形成에 심한 저해를 일으켜 septa가 전혀 形成되지 않아 細胞의 分裂를 일으키지 못하는 것 같다. (사진 6 참조)

一般的으로 penicillin의 作用은 細胞膜의 形成을 저해한다는 說에 잘 一致되는 것 같다. 따라서 細胞膜形成의 저해로 말미암아 細胞分裂은 되지 않고 細胞質만 增殖되어 細胞가 팽대될 뿐 아니라 이 現象이 심하게 되면 cell wall 및 membrane 이 파괴되어 細胞의 內容物이 外部로 流出되어 cell wall 만의 capsule 만 남게되며 菌自體는 그 機能이 상실되어 死滅하게 된다고 生覺된다.

IV. 要 約

Penicillin을 濃度別로 첨가한 Bouillon medium에서 培養한 *Bacillus subtilis*의 成長狀態와 細胞內微細構造를 電子顯微鏡으로 觀察하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. penicillin의 濃도가 높아짐에 따라 本菌의 成長이 현저하게 억제되고 分裂된 細胞일지라도 分離가 잘 되지않고 서로 융합되어 있다.

2. Cell wall 및 cell membrane 形成에 저해를

일으켜 septa形成이 不可能하다.

3) 細胞質은 增加하나 細胞膜의 形成저해로 因하여 細胞가 팽대되어 細胞膜이 파열되며, 細胞質이 細胞外로 流出되어 内部가 空白狀態로 된다. 따라서 그 機能을 상실하게 되는 것 같다.

참 고 문 헌

- 1) 朝井勇宣, 相田 浩; 應用微生物學, 38, (1967)
- 2) 宮路憲二; 應用菌學, 上 208 (1957)
- 3) Salton, M. R. J.; Bact. Revs. 21, 82, (1957)
- 4) Yamada; Tokuyasu, The Bacteria 1, 252 (1960)
- 5) Mudd, S. and T. F. Anderson; J. Immunol, 42, 251 (1941)
- 6) Knaysi G.; J. Bact. 19, 113 (1930)
- 7) Wiame, J. M. R, Storck and E. Vanderwinkel; Biochem. Biophys. Acta. 18, 353 (1955)
- 8) 村上八郎; 日農化 44, 539 (1970)
- 9) Palade. G. E.; A study fixation for electronmicroscopy J. Exp. Med. 95, 285, (1952)
- 10) Reynolds, E. S.; J. C. B. 208, 17 (1963)

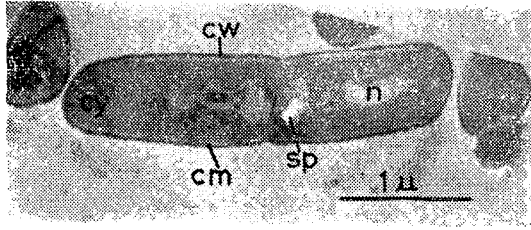


Fig. 2 *Bacillus subtilis*, cultured in Bouillon medium for 30 hrs. Electron light central nucleoid is well contrasted to homogeneously electron dense cytoplasm. Cell membrane and cell wall are well preserved. (X 37000)

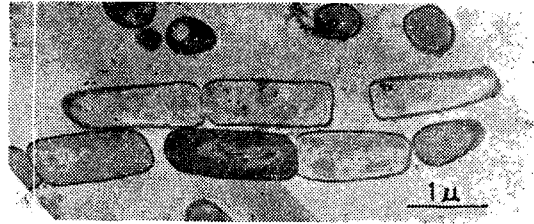


Fig. 5 *Bacillus subtilis*, cultured in Bouillon medium and 40 μg/100ml of penicillin for 30hrs. Inhibition of cell wall formation is noted with few connection of two fused cells. (X 24000)

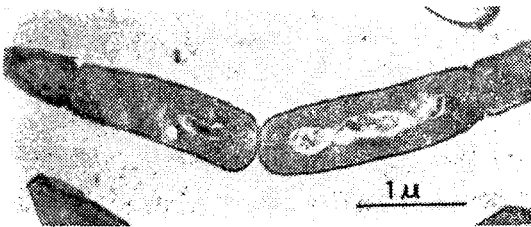


Fig. 3 *Bacillus subtilis*, cultured in Bouillon medium and 10 μg/100ml of penicillin for 30 hrs. Nucleoid is slightly destructed and two cells in the right are fused each other. (X32500)

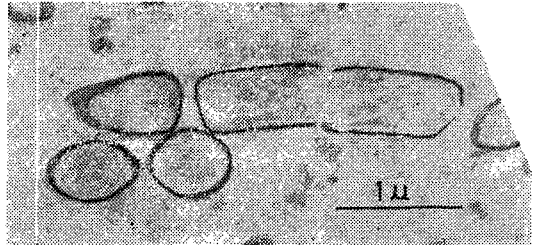


Fig. 6 *Bacillus subtilis*, cultured in Bouillon medium and 100 μg/100ml of penicillin for 30 hrs. Septa, between two fused cells is entirely absent. Partial disruption of their cell wall with loss of cytoplasm is noted. (X 36000)

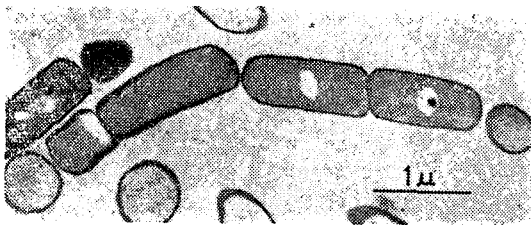


Fig. 4 *Bacillus subtilis*, cultured in Bouillon medium and 20 μg/100ml of penicillin for 30 hrs. Both nucleoid and cytoplasm are destructed. Two fused cells are separated by thin incomplected cell wall. (X 29000)