

Bacillus thuringiensis phage의 분포와 형태에 관한 연구

李泰雨 · 安慶濬

(청주사범대학 생물교육과)

The distribution and Morphology of *Bacillus thuringiensis* Phages in Korea

Rhee, Tai Woo and Kyung Joon Ahn

Department of Biological Education, Cheongju College of Education

Abstract

Several phages of *Bacillus thuringiensis* distributed in Korea were isolated. The distribution and morphological characteristics of phages were studied.

The results are as follows;

1. The isolated phages were highly specific for *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. They were classified as YM series phages and designated as phage YM-1, YM-2 and YM-3 according to their morphological characteristics.
2. Most of these YM series phages were isolated from compost including domestic animal dung and soil under sewage.
3. The YM-1 phage was similar to *Bacillus subtilis* φ25 in morphology. It has 94nm x 86nm head, contractile tail sheath and base plate with four cornered structure.
4. The YM-2 phage was similar to *Bacillus subtilis* GA-1 phage in morphology. It had 70nm x 56nm head and tail without contractile tail sheath.
5. The YM-3 phage was similar to *Bacillus subtilis* φ29 phage. It had 56nm x 43nm head and tail with distal enlargement.

序論

누에의 致命的인 病菌으로 알려져 있는 *Bacillus thuringiensis*는 胞子이외에 結晶性의 단백질 毒素를 生産하므로 crystaliferous bacteria라고 부른다.

이 菌의 毒素는 주로 鱗翅目의 幼虫에 대해 강한 毒作用을 나타내어致死시키므로 (Hanny, 1953, Angus,

1954) 미국, 프랑스, 일본등에서는 樹木의 害虫에 대한 선택적인 殺虫剤로 개발되어 시판되고 있다.

이러한 *B. thuringiensis*는 생화학적인 조사와 血清学的인 방법으로 11亞種으로 분류되었으나 (Bonne foi and de Barjac, 1963), 근래에는 새로운 연구로 16亞種으로 분류되고 있다. (Padua et al., 1980)

*B. thuringiensis*의 phage는 배양 과정에서 汚染을 일으키기도 하는데, Chapman과 Norris(1966)

는 상품화된 細菌 製剤로 부터 phage를 분리하였고, Perlak 등(1979)은 토양으로 부터 분리하기도 하였다.

B. thuringiensis phage의 宿主域은 이 菌에만 한정되지 않고 *B. cereus*와 같은 近緣관계에 있는 균주에도 높은 感染率을 보이고 있다고 한다(Chapman and Norris, 1966).

韓國내에 자연적으로 分布하고 있는 *B. thuringiensis*에 대한 보고가 거의 없으나, Rhee(1980)의 조사로 *B. thuringiensis*의 서식이 확인 되었으므로 이를 宿主菌으로 하는 phage의 分布를 調査하였다.

B. thuringiensis 自体의 分布를 직접 밝히는 일은 매우 어려우나 宿主 特異性을 이용하여 phage의 분포를 밝히는 일은 비교적 용이한 것으로 사료되었다.

이와 같이 *B. thuringiensis*의 phage 分布를 밝힘으로서 宿主菌의 分布域을 추정할 수 있으며, 蠶業農家の *B. thuringiensis* 感染에 대한 예방에 유익한 자료를 얻을 수 있을 것이다.

본 연구에서는 全國 各地의 各種 分離原으로 부터 phage를 분리하였고, 분리된 phage에 대해 일차적으로 形態的 특성을 밝혔기에 이에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

宿主菌으로 *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*와 *B. thuringiensis* var. *israelensis*를 사용하였다.

2. 使用培地

phage 분리를 위한 培地로는 peptone broth(peptone 10g, glucose 1g, NaCl 3g, Ca Cl₂ 0.1M 1ml, Mg Cl₂ 0.1M 10ml, KH₂PO₄ 0.1M 3.2ml, D.W. 1ℓ, pH 7.2)를 사용하였고 宿主菌과 phage의 增殖에는 L-broth 培地(peptone 10g, glucose 1g, NaCl 5g, yeast extract 5g, D.W. 1ℓ, pH 7.2)를 사용하였으며, 보관시 phage의 안정을 위하여 MgSO₄ · 7H₂O를 5 × 10⁻⁴M 첨가하였다.

3. 標本 채취

경기도 화성군 정남면 문학리, 충북 청주시, 미평, 경북 가야산의 根圈토양, 下水, 퇴비등에서 표본을 채취하였다.

4. phage의 分離

채취한 시료 1g을 취하고 여기에 peptone broth

5 ml를 가해 잘 혼들어 섞은 후 5,000×g로 20분간 원심분리한 상동액 9ml에 15시간 정도 배양한 숙주균을 1ml加해서 하룻밤 진탕 배양시켰다.

이 배양액을 5 ml 취하여 Chloroform 3~5 ml를 가하고 30℃에서 30분간 두었다가 5,000×g로 10분간 원심분리하여 상동액으로 spot하여서 phage를 분리하였다(Rhee, 1979).

5. 電子顯微鏡 試料 製作

(1) phage 液

phage를 (m.o.i.; 0.1~10)宿主菌에 感染시켜 溶菌시킨 후 5,000×g에서 10분간 원심분리한 상동액을 시료로 사용하였다.

(2) 試料 製作

溶菌된 phage液을 carbon coating한 collodion 膜에 받아서 약 30초간 말린 후 KOH로 pH 6.8~7.0으로 맞춘 1% Phosphotungstic acid로 negative staining하였다(Brenner and Horne, 1959).

관찰은 JEM-50B와 JEM-100C로 하였다.

結 果

1. phage의 命名

B. thuringiensis var. *thuringiensis*에서 분리한 毒性 phage를 YM群으로 定하고 形態적 特징에 따라 YM-1, YM-2, YM-3로 命名하였다.

2. Phage의 宿主域

Phage를 분리할 때 *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*와 *B. thuringiensis* var. *israelensis*를 사용하였는데 YM群의 phage는 *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*에 대해서만 溶菌能을 나타내었다.

3. Phage의 分布域

Phage의 分布域은 Table 1과 같다.

Phage는 주로 퇴비와 하수 흙에서 많이 분리되었으며 측백나무와 소나무의 균권토양에서도 소량 분리되었다.

하수 흙의 경우는 물이 흐르는 장소 보다 고여있는 장소에서 더 많은 phage가 분리되었으며 누에똥에서는 분리되지 않았다.

4. 電子顯微鏡에 의한 Phage의 形態觀察

Phage의 形態를 전자顯微鏡으로 관찰한 결과는 plate 1~2와 같으며, 각 phage를 분석한 所見은 Fig. 1~3의 모식도와 같다.

Table 1. Samples isolated phages of *B. thuringiensis* (no. of isolated samples/no. of samples)

Source Station	Rhizosphere						Waste water	Sewage		S ₃	Compost		Silk- worm dung
	P	O ₁	O ₂	A	M ₁	M ₂		S ₁	S ₂		C ₁	C ₂	
Mun Hak-Ri											0 4	8 8	0 7
Cheong Ju I		1 1					0 4	0 2			1 1		
II	1 2		0 4	0 3	0 4					0 2		0 1	
III							0 3		1 7	0 3			
IV									1 4	2 3			
V								4 4	0 1	1 1	0 5	1 4	
Mipyeong								2 2	6 6	2 2	0 3	9 10	
Ka Ya Mt.	0 5		0 5		0 5	0 5							

* P : pine tree

O₁ : oriental arborvitaeO₂ : oak tree

A : acacia

M₁ : maple treeM₂ : moldS₁ : soil under stationary waterS₂ : soil under flow waterS₃ : soil under trashC₁ : straw mainlyC₂ : domestic animal dung mainly

(1) YM- 1

核酸을 보유하고 있는 normal form(plate 1 - 1, 1 - 2)과核酸을放出한 contracted form(plate 1 - 3 ~ 1 - 6)이 관찰되었다.

Head의 크기는 $94 \times 86 \text{m}\mu$ 이었으며, normal form에서는 tail sheath가 $168 \times 20 \text{m}\mu$ 이었으나, contracted form에서는 $82 \times 30 \text{m}\mu$ 으로 짧고 굽어졌으며 tube가 돌출되었고 head의 모습은 원형으로 변형되었다.

Neck의 길이는 $15 \text{m}\mu$ 이었고 $10 \times 3 \text{m}\mu$ 크기의 collar 구조가 보이며 (plate 1 - 5) pin의 수와 cross band는 판별이 잘 안되었다.

base plate 부분에는 $45 \text{m}\mu$ 을 한변으로 하는 사각형 구조로 되어 있었다. (plate 1 - 4, 1 - 6).

(2) YM- 2

Head의 모습은 폭에 비해 길이가 길어서 $70 \times 56 \text{m}\mu$ 이었으며, capsid 구조가 보였으며, head 내용물의 일부가 상실된 모습이 관찰되었다(plate 2 - 5).

Contractile tail sheath를 갖지 않는 대신 head의 기부에 두께 $4 \text{m}\mu$ 의 collar과 base plate의類似한 구조가 관찰되었으며, $35 \times 10 \text{m}\mu$ 의 tail이 붙어 있었다(Fig. 3-a).

그러나 head의 내용물 일부가喪失된 경우에는 이

러한 구조들이 없는 것으로 관찰되었다(plate 2 - 5).

(3) YM- 3

Head의 모습은 YM- 2 와 같이 폭에 비해 길이가 길었으며 $56 \times 43 \text{m}\mu$ 이었다.

Contractile tail sheath는 갖지 않았으며 head의 기부쪽에 확실히 판별되지 않는 부속기관과 길이 $46 \text{m}\mu$ 의 tail이 붙어있고 tail의 말단에는 $25 \times 10 \text{m}\mu$ 의 비후된 부분이 관찰되었다(Fig. 3 - 6)

tail과 부속기관이喪失된 모습이 관찰되었으며 (plate 2 - 6), tail 말단의 비후된 부분이 상실된 경우도 관찰되었다(plate 2 - 10).

考 察

B. thuringiensis phage의分布를 보면 주로 퇴비나 고인 하수구 흙에서 분리되었으며 누에똥이나 흐르는 하수에서는 발견되지 않음으로 보아宿主菌의分布를 간접적으로 알 수 있었다.

특히牛糞이 많이 섞인 퇴비의 경우에서 많은phage가 분리된 사실은 소가 넓은 지역에 산재한 풀을 먹으면서 풀잎 표면에 붙어 있던宿主菌의胞子가 소의消化기관을 거치면서 살아남아牛糞으로 배설되므로 일종의 농축작용이 일어나는 것이 아닌가 사료되며 이는 고인하수 흙의 경우에도 마찬가지 일것

이다.

이와 같이 숙주균이 농축되어 있는 장소에 숙주균의 phage가 많을 것은 충분히 예상할 수 있는 사실이다.

각試料에 포함된 phage의量은 퇴비의 경우 $1.2 \times 10^6 \sim 7.6 \times 10^6$ PFU/ml이었고, 하수 흙의 경우는 $5.2 \times 10^4 \sim 9.4 \times 10^5$ PFU/ml이었다.

한편 분리된 phage YM-1의形態는 *B. subtilis*의 phage φ25와 비슷하였으나(Liljemark and Anderson, 1970) φ25보다 전체적으로 크고, base plate의크기는 φ25는 지름이 $70m\mu$ 이었으나, YM-1에서는 한번이 $45m\mu$ 의 사각형 구조로 되어 있으므로 관찰되는角度에 따라서 길이가 다르게 보일 것으로 추측된다.

base plate의 구조는 *E. coli*의 T-even phage에서 육각형의 구조가 밝혀졌으나(Bradley, 1967), 사각형 구조는 보고된 바 없었으며 정사각형 구조인지, 직사각형 구조인지는 확인하지 못하였다.

phage YM-2는 *B. subtilis*의 phage GA-1과 형태가類似하나 head의 크기에서 GA-1은 $57 \times 40m\mu$ 이었으나, YM-2에서는 $70 \times 56m\mu$ 으로 나타났고, tail 크기도 GA-1은 $35 \times 6m\mu$ 이었으나 YM-2는 $35 \times 10m\mu$ 이었다(Bradley, 1965).

GA-1의 경우 육각형의 base plate 구조가 가정되었으나, 본 연구 결과에서는 정확한 구조를 판별할 수 없었고, pin도 확인하지 못하였다.

plate 2-5에서와 같이 head 내용물의 일부가 상실된 경우에는 tail과 부속기관이 없는 것으로 보아核酸을放出한 경우 tail과 부속기관을喪失하는 것으로 사료된다.

YM-3의 경우에는 *B. subtilis*의 phage φ29와 외관상 유사하나 head의 크기에서 φ29는 $41.5 \times 31.5 m\mu$ 이었으며 YM-3는 $56 \times 43m\mu$ 으로 크게 나타났고 tail은 길이가 φ29는 $32.5m\mu$ 이나 YM-3는 $46m\mu$ 이고, tail 말단부위의 비후부분에서 φ29는 $13 \times 6 m\mu$ 이었으나 YM-3에서는 $25 \times 10m\mu$ 으로 관찰되었으며, φ29에서와 같은 head projection은 관찰되지 않았고 collar는 확인하지 못하였다(Anderson et al. 1966).

結論

한국내에 분포하는 *B. thuringiensis*의 phage를 분리하였다.

phage의 분리원과 형태적 특징은 다음과 같다.

1. 분리한 phage는 *B. thuringiensis* var. *thuringiensis*를宿主로 하며 *B. thuringiensis* var. *israelensis*는溶菌시키지 못하였다.

이들을 YM系 phage로 분류하고 형태적 특징에 따라 YM-1, YM-2, YM-3로命名하였다.

2. YM系 phage는 주로牛糞이 섞인 퇴비나 고인 하수 흙에서 분리되었다.

3. YM-1 phage는 외관상 *B. subtilis*의 φ25 phage와 유사하여 head는 $94 \times 86m\mu$ 이었고 contractile tail sheath를 가지며 base plate부위에 사각형 구조를 가지고 있었다.

4. YM-2 phage는 *B. subtilis*의 phage GA-1과 유사하고 head는 $70 \times 56m\mu$ 이었으며 contractile tail sheath를 보유하지 않았다.

5. YM-3 phage는 *B. subtilis*의 phage φ29와 유사하여 head는 $56 \times 43m\mu$ 이었고 contractile tail sheath를 가지지 않았으며, tail 말단에는 비후된 부분이 있었다.

References

- Anderson, D.L., D.D. Hickman and B.E. Reilly 1966. Structure of *Bacillus subtilis* bacteriophage φ29 and the length of φ29 DNA. J. of Bacteriol. 91:2081-2089.
- Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralysing silk-worm larvae. Nature, London 173:545.
- Bonnefond, A. and H. de Barjae 1963. Entomophaga 8:823.
- Bradley, D.E. 1965. The isolation and morphology of some new bacteriophages specific for *Bacillus* and *Acetobacter* species. J. Gen. Microbiol. 41:233-241.
- Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophage and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31:230.
- Brenner, S. and R.W. Horne 1959. A negative staining method for high resolution electron microscopy of virus. Biochimica et Biophysica Acta. 34:103-110.
- Chapman, H.M. and J.R. Norris 1966. Four new bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol. 29:529-535.
- Hanny, C.L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore-forming bacteria. Nature, Lond. 172:1004.
- Liljemark, W.F. and D.L. Anderson 1970. Structure of

- Bacillus subtilis* bacteriophage ϕ 25 and ϕ 25 DNA. 140:699-706.
J. of Virol. 6:107-113.
- Pauda, L.E., M. Ohba and K. Aizawa 1980. J. Invert. Pathol. 36.
- Perlark, F.J., C.L. Mendelsohn and C.B. Thorne 1979. Converting bacteriophage for sporulation and crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. of Bacteriol. 17:97-130.
- Rhee, T.W. 1979. Studies on the bacteriophages of *Brevibacterium lactofermentum*. Kor. J. of Microbiol. 10:199-215.
- Rhee, T.W. 1980. Microbiological control of *Hyphantria cunea* Drury. Bulletin of Cheongju college of Education 10:199-215.

Explanation of Plates

Plate 1. Electron micrographs of phage YM-1.

- (1) and (2) Normal forms of phage YM-1. x82,000.
- (3) Contracted forms of phage YM-1. x100,000.
- (4) Contracted form of phage YM-1 with four-cornered structure. x270,000.
- (5) Contracted form of phage YM-1 with collar (arrow). x300,000.
- (6) Contracted forms of phage YM-1 with four-cornered structure (arrow). x300,000.

Plate 2. Electron micrographs of phage YM-2 and YM-3.

- (1) Phage YM-2. x8,000.
- (2), (3) and (4) Normal forms of phage YM-2. x300,000.
- (5) Phage YM-2 with partially deficient head. x300,000.
- (6) Phage YM-3 with distal enlargement (arrow). x82,000.
- (7), (8) and (9) Phage YM-3. x62,000, x82,000 and x82,000 respectively.
- (10) Phage YM-3 without distal enlargement. x82,000.

Figure Legends

Fig. 1. Schematic diagram of phage YM-1 : normal and contracted form.

Fig. 2. Schematic diagram of phage YM-1 : three dimensional view.

Fig. 3. Schematic diagram of phage : (a) YM-2 (b) YM-3.

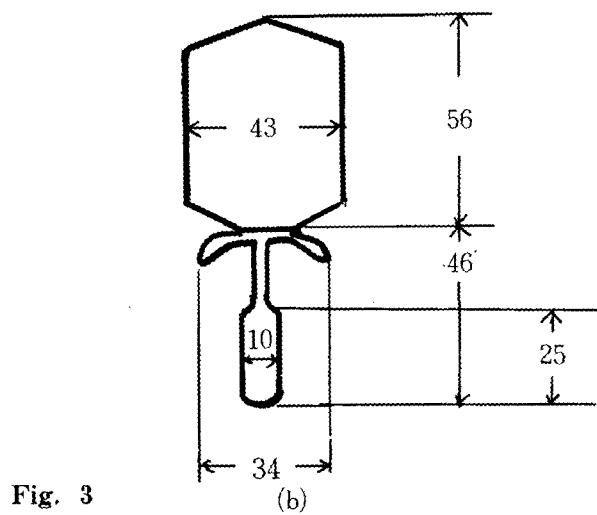
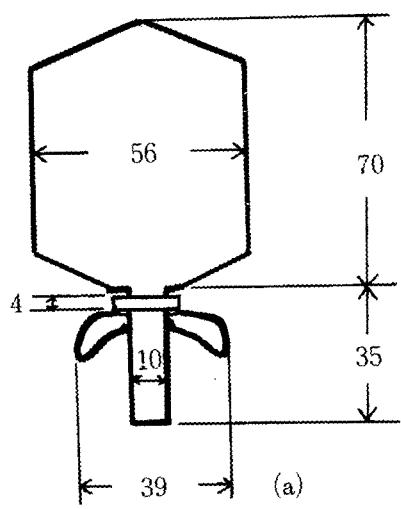
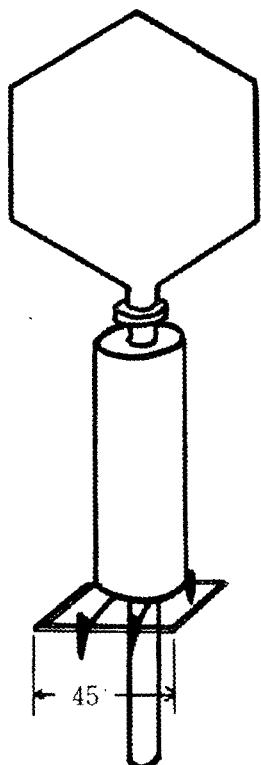
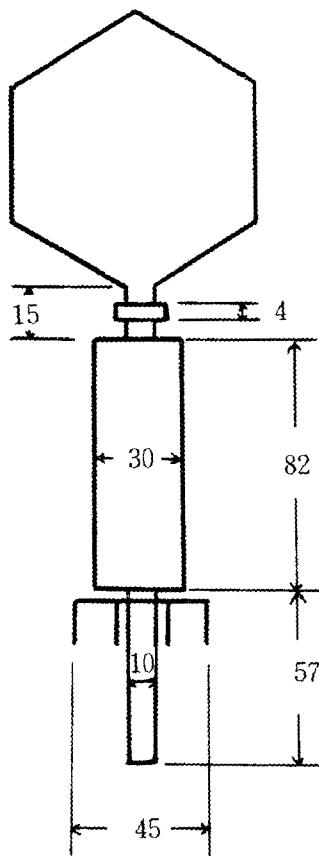
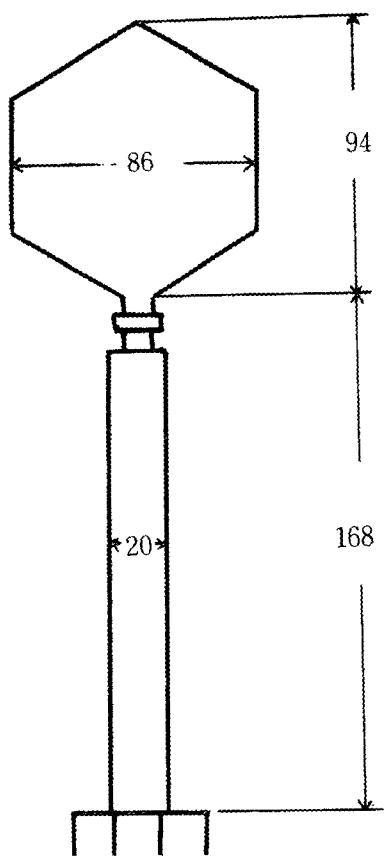


Plate 1

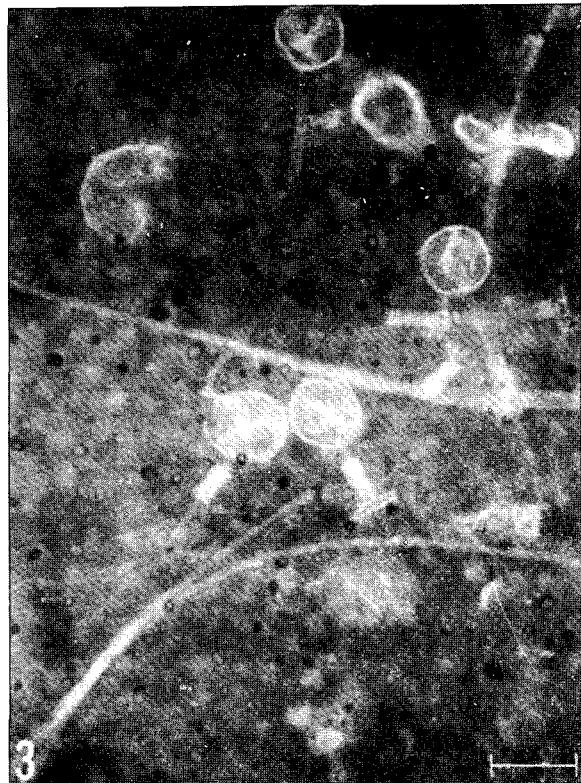
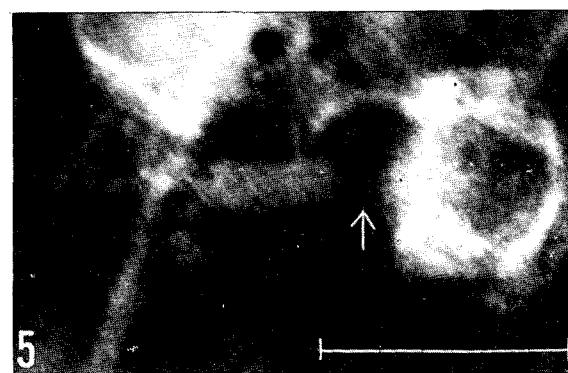
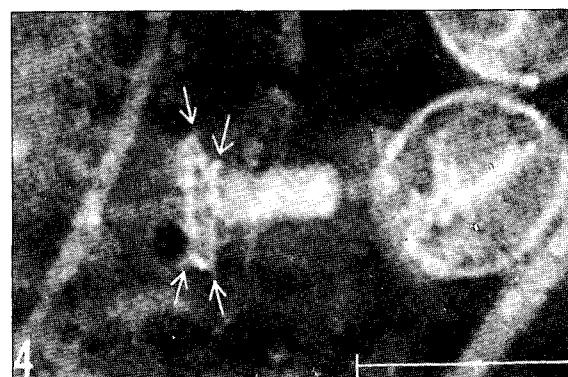


Plate 2.

