Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 13, No. 2, 157 – 162 (1985)

Bacillus sphaericus Asporogenic Mutant Spo⁻-D1216의 毒性에 관한 연구

복거중 · 김영한 · 이형환

건국대학교 생물학과

(1985년 6월 10일 수리)

Studies on the Toxic Activity of *Bacillus sphaericus* Spo⁻-D1216 Asporogenic Mutant

Geo Jung Pok, Young Han Kim and Hyung Hoan Lee

Molecular Microbiology Laboratory, The Research Institute for Genetic Engineering
Department of Biology, Konkuk University, Seoul 133, Korea

(Received June 10, 1985)

The cell cultures and crude extracts of *Bacillus sphaericus* 1593 K-5 and its mutant Spo⁻-D1216 were respectively bioassayed against *Culex pipiens* var. *pallens* mosquito larvae. The *B. sphaeriucs* 1593 K-5 showed toxic activity against the larvae. LC_{50} values (cells/ml) was 2.6×10^2. Also the LC_{50} (μg protein/ml) of the crude extract was 10.26. However, *B. sphaericus* Spo⁻-D1216 didn't show toxic activity against the larvae.

The soluble cytoplasmic toxin in broken *B. sphaeriucs* 1593K-5 cells was partially purified by gel permeation chromatography and ion exchange chromatography. Among the fractions of the gel permeation chromatography only a single fraction was found to be toxic. LC_{50} values (μg protein/ml) of the active fraction was 0.182. The active fraction of the gel permeation was subjected to ion exchange chromatography. Only a single fraction showed toxic activity and its LC_{50} values (μg protein/ml) was 0.02.

*Bacillus sphaericus*는 폭이 0.6 μm이고 길이가 1.0~7.0 μm인 끝이 둥근 간균으로 그램염색에서 양성반응을 보이며, 아포는 말단 또는 아말단에 위치하고, 운동성을 보이며 28~35℃를 최적 성장온도로 하는 호기성균이라고 보고되었다.[9,10]

Bacillus sphaericus 1593 균주는 여러 종의 모기 유충에 대해서는 살충효과를 갖지만[10,11,12] 집파리 유충에는 살충효과를 보이지 않는다고 보고되었으며[12], 모기유충에 대한 살충효과는 아포에 연관된 독소에 기인하며 아포 형성기간에 독성이 증가한다는 보고도 있다.[10]

Bacillus sphaericus 1593 K-5 균주의 유전적인 연구를 위하여 Kim과 Lee[7,8]는 *B. sphaericus*의 정상형은 30℃에서는 정상이나 42℃에서는 치사 감온성 돌연변이체와 아포를 형성치 않는 돌연변이체를 분리하여 특성의 일부를 보고 하였으며, *B. sphaericus* 1593 Spo⁻-D1216 균주는 특히 아포를 어느 온도에서나 형성치 않는 asporogenic mutant인것으로 보고되었다[7].

본 연구에서는 이 *B. sphaericus* Spo⁻-D1216 돌연변이체의 독성에 대하여 조사하였다.

실험재료 및 방법

실험재료

균주

본 실험에 사용한 균주는 *Bacillus sphaericus* 1593 K-5 균주와 *Bacillus sphaericus* Spō-D1216 균주로써본 연구실에 보관되어 있다[7].

배지

Nutrient agar (Difco)는 균주 보관과 균체수 측정에 사용하였으며, NYSM (Nutrient broth-yeast extract-sporulation medium)은 포자 형성용 배지로써 사용되었고, 그 조성은 Nutrient broth, Yeast extract 0.05%, $MnCl_2$ 5×10^{-5}M, $CaCl_2$ 7×10^{-4}M, $MgCl_2$ 1×10^{-4}M이었다 (Myer 등. 1979).

모기유충

Culex pipiens var. *pallens*는 국립보건원에서 분양 받았다.

시약

Sephadex G-100, DEAE-Sephadex A-50 (phamacia Co.)와 Protease K, Lysozyme, Polyethylene glycol (Sigma Co.)을 사용하였다.

실험 방법

성장곡선

평판배지위에서 2~3일간 배양한 균을 nutrient broth 50ml과 BHI 50ml에 1루프씩 각각 접균하여 28℃, 150rpm으로 16시간 배양한 후, 이 배양액을 NB 250 ml와 BHI 250 ml에 각각 50 : 1로 접종하고 28℃, 150 rpm으로 배양하면서 1시간마다 600 nm에서 O.D를 측정하였다.

세포준비

평판 배지위에서 2~3일간 배양한 균을 NB 50 ml에 접균하여 28℃, 150 rpm으로 16시간 배양한후, 이 배양액을 NYSM broth 100 ml가 들어있는 삼각플라스크 3개에 50 : 1로 각각 접종하고 배양기에서 28℃, 150 rpm으로 각각 2시간, 8시간, 18시간 배양하였다. 이 배양세포들을 15,000×g로 10분간 원심분리하여 회수하고 3회 세척 후 생체검증을 행하였다.

수산화나트륨으로 독소의 추출

평판 배지 위에서 2~3일간 배양한 균을 NB50 ml에 접균하여 28℃, 150 rpm으로 16시간 배양한 후, 이 배양액을 NYSM broth 200 ml에 50 : 1로 접종하여 28℃, 150 rpm으로 48시간 배양하였다. 이 배양액을 15,000×g로 10분 동안 원심분리를 행하여 세포들을 회수하였다. 이 회수세포들을 증류수로 3회 세척한 후 0.05M 수산화나트륨 100 ml에 재현탁하여 3시간 30분 동안 200 rpm으로 진탕하였다. 이 진탕액을 25,000×g로 10분간 원심분리를 행한 후 상층액을 취하였으며 증류수에 대해 48시간 투석하였다. 이 용액을 여과지 (0.22 μm)로 여과한 후 생체검정을 행하였다.

용해세포질 독소의 정제

1) 세포질 독소 준비

평판 배지 위에서 2~3일간 배양한 균을 NB 50ml에 접균하여 28℃, 150 rpm으로 16시간 배양한 후 다시 NYSM broth 500 ml에 50 : 1로 접종하여 배양기에서 28℃, 150 rpm으로 48시간 동안 배양하였다. 이 배양액을 15,000×g로 10분간 원심분리를 행하여 세포들을 모았다. 이 세포들을 0.1M phosphate 완충액 (pH 7.0)으로 3회 세척 후, phosphate 완충액 50ml에 다시 현탁시키고 이 현탁액을 얼음용기에 담근 유리튜브 내에서 30분간 초음파로 세포들을 파괴하였다. 이 용액을 113,000×g로 90분간 초원심분리를 행한 후 상등액을 취하였다. 이 상등액을 여과지 (0.45 μm)로 여과한 후 Sephadex G-100 gel permeation 크로마토그래피를 행하였다.

2) 세포질 독소의 gel permeation 크로마토그래피

세포질 용액을 0.1M phosphate완충액 (pH 7.0)으로 평형시킨 Sephadex G-100 칼럼 (2.5×25 cm)에 통과시켜 단백질 분획을 얻었다. 상대적 단백질 양은 280nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였으며, 칼럼 통과량은 시간당 30 ml이었고 각 분획을 따로 모아 PEG로 농축시킨 후 생체검정을 실시하였다. 이 조작은 4℃에서 실시하였다.

3) 활성분획의 ion-exchange크로마토그래피

Gel permeation 크로마토그래피의 분획들 중에서 활성분획을 0.1M phosphate 완충액 (pH 6.3)으로 평형시킨 DEAE-Sephadex A-50 칼럼 (2.5×25 cm)에 0.1M 및 1M phosphate 완충액 (pH 6.3)을 사용하여 선상밀도기울기로 하여 단백질 분획을 얻었다. 칼럼 통과량은 시간당 60ml이었다.

모기유충에 대한 생체 검정

1) 세포의 독성효과는 각 희석액의 최종량 18ml

당 10마리의 2령기 모기유충을 넣어 검정하였다. 희석구당 3개의 well을 사용하였다.

2) 용해 세포질독소와 수산화나트륨을 사용하여 추출한 독소는 축소생체 검정을 실시하였다. 각 희석액당 최종량은 1.8ml이었고, 희석액당 10마리의 1령기 유충을 넣었으며 희석구당 3개의 Well을 사용하였다.

3) 죽은 모기유충은 48시간 후에 확인하였고, LC_{50}은 Hoskins의 방법으로 산정하였다[4].

단백질의 정량

수정된 Lowry의 방법을 사용하여 산정하였다[5].

결과 및 고찰

성장 곡선

B. sphaericus 1593 K-5 균주의 성장은 접균 후 2시간부터 대수증식기에 들어가 6시간 후에는 정체기에 들어갔으며, BHI 배지에서의 성장율이 NB

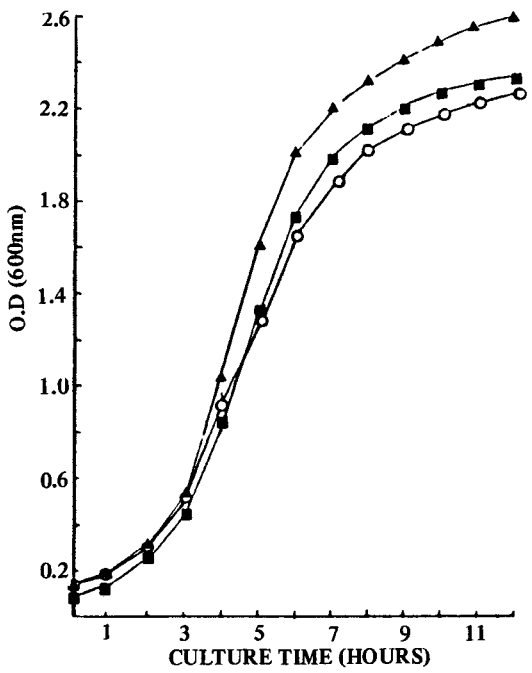

Fig. 1 Comparative growth patterns of *B. sphaericus* 1593 K-5 and Spo⁻-D1216.

—■—: *B. sphaericus* 1593 K-5 cultured in nutrient broth.

—▲—: *B. sphaericus* 1593 K-5 cultured in brain heart infusion.

—⊖—: *B. sphaericus* Spo⁻—D1216 cultured in nutrient broth.

Table 1. Insecticidal Activities of *B. sphaericus* 1593K-5 and Spo⁻-D1216 against mosquito larvae

B. sphaericus	Host Larvae	LC_{50} (cells/ml)
1593K-5	Culex pipiens var. pallens	2.6×10^2
Spo⁻—D1216	"	nontoxic

배지에서의 성장율보다 약간 높았다 (Fig. 1). *B. sphaericus* 1593 Spō-D1216 균주의 성장율은 대조균주인 *B. sphaericus* 1593 K-5 균주와 비슷한 성장율을 보였다. 즉, 접종 후 2시간부터 대수증식기에 들어가 6시간 후에 정체기에 들어감을 보였다 (Fig. 1).

모기유충에 대한 독성 비교

B. sphaericus 1593 K-5 균주를 모기유충(*Culex pallens*)에 생체검정을 실시한 결과 LC_{50}(cells/ml)이 2.6×10^2인 살충효과를 보였다. 하지만 *B. sphaericus* 1593 K-5 Spō-D1216 균주는 살충효과를 보이지 않았다 (Table 1).

Myers등[10]은 *B. sphaericus* 1593 K-5 균주가 *Culex quinquefasciatus* 모기유충에 대해 LC_{50}의 수치가 2.9×10^2인 독성을 보인다고 보고하였으며, Mulligan[9] 등은 *Culex quinquefasciatus* 모기유충에 대해 LC_{50}의 수치가 1.5×10^2이고 *Aebes nigrimaculis* 모기유충에 대해서는 LC_{50}의 수치가 4.7×10^2이며 *Aebes sierrenais* 모기유충에 대해서는 독성을 나타내지 않는다고 보고하였다. Singer[12]는 *Culex quinquefasciatus* 모기유충과 *Anopheles albimanus* 모기유충에 대해 LC_{50}이 각각 $10^1 \sim 10^2$과 10^1임을 보고하였다.

위에서 살펴본 바와같이 *B. sphaericus* 1593 K-5 균주는 *Culex pallens* 모기유충에 대해 다른 종의 모기유충에 유사한 독성을 나타냈다.

배양시간에 따른 독성 비교

세포들을 대수분열시기(2시간 배양), 포자 형성시기(8시간 배양), 열에 안정한 포자 생산시기(18시간 배양)로 나누어 *B. sphaericus* 1593 K-5 균주의 독성을 비교하였다.

모기유충에 대한 *B. sphaericus* 1593 K-5 균주 독성은 세포들이 포자 형성 초기에 들어서면서 상당히 증가함을 보였으며, 열에 안정한 포자를 형성하는 시기에 이르러 더욱 높은 독성을 보였다 (Table 2).

Myers와 Yousten[11]은 *Culex quinquefasciatus*모

Table 2. Toxic Activities of *B. sphaericus* 1593K-5 according to culturing time

Culture time (hours)	LC_{50} (cells/ml)
2	3.6×10^5
8	2.3×10^3
18	2.6×10^2

* LC_{50} values are the number of CFU per ml present at the 50% endpoint.

기유충에 대해 2시간 배양액, 8시간 배양액, 18시간 배양액의 LC_{50}(cells/ml)이 각각 1×10^6, 2×10^2, 5×10^2이라고 보고하였는데, 본 실험에서는 *Culex pallens* 모기유충에 대해 2시간 배양액, 8시간 배양액, 18시간 배양액의 LC_{50}이 각각 3.6×10^5, 2.3×10^3, 2.6×10^2으로 다른 양상을 보였다. 본 실험의 결과는 Myers와 Yousten[11]의 실험결과보다 LC_{50}이 2시간 배양액에서는 2배 정도 낮게 나타났고 8시간 배양액에서는 10배 정도 높게, 그리고 18시간 배양액에서는 2배 정도 낮게 나타났다. 또 Myers와 Yousten[11]은 포자 형성이 진행되는 동안 독성이 증가한다고 보고 하였는데 본 실험에서는 2시간 배양액 보다 8시간 배양액이 약 150배, 18시간 배양액이 약 1000배 정도 독성이 증가하므로 *B. sphaericus* 1593 K-5 균주의 독성도 포자가 형성되면서 증가하였다.

수산화나트륨으로 추출한 독소

0.05M 수산화나트륨에 용해된 독소는 LC_{50} (μg protein/ml)이 0.009로 용해 세포질 독소보다 높은 독성을 나타냈다.

Davidson[2]은 *Culex quinquefasciatus* 모기유충에 대해 LC_{50} (μg protein/ml)이 0.0045라고 보고하였는데, 본 실험에서는 *Culex pallens* 모기유충에 대해 LC_{50} (μg protein/ml)이 0.009로 2배 높았다. Davidson[2]에 의하면 수산화나트륨에 용해되어 추출되는 독소는 crystallike inclusion body라고 보고하였는데 본 실험에서는 확인하지 못했다.

용해 세포질 독소의 정제 및 독성효과

1) 용해 세포질 독소의 gel permeation 크로마토그래피

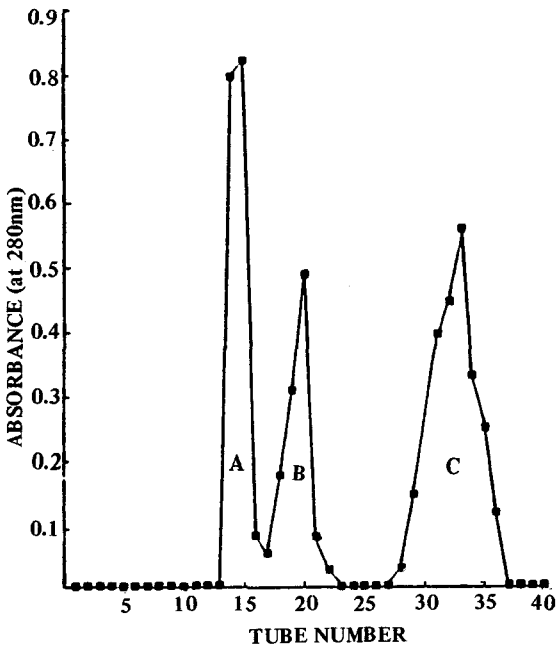

Fig. 2 Fractionations of crude cytoplasm of *B. sphaericus* 1593 K-5 by gel permeation chromatography.
The crude extract was characterized on a column (2.5x25cm) of Sephadex G-100 at 4°C with the use of 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) as the eluting buffer.

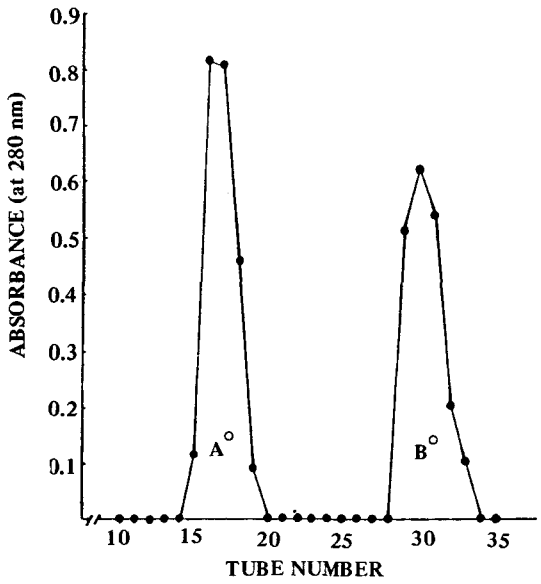

Fig. 3 Fractionations of the crude cytoplasm extract of *B. sphaericus* Spo⁻D1216 by gel permeation chromatography.
The crude extract was fractionated on a column (2.5x25cm) of Sephadex G-100 at 4°C with the use of 0.1M phosphate buffer (pH 7.0) as the eluting buffer.

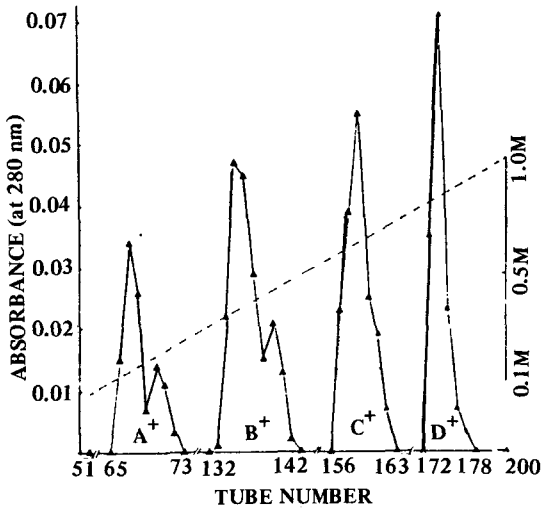

Fig. 4. Fractionations of the active fraction (A) by DEAE-Sephadex ion exchange column chromatography.
The active solution (A) in Fig. 2 was fractionated with 0.1M phosphate buffer (pH 7.0). Elution was carried out with a phosphate buffer (pH 7.0) gradient.

B. sphaericus 1593 K-5 균주의 용해 세포질을 Sephadex G-100 칼럼상에서 분획하였을 때 3개의 분획을 얻었으며 (Fig. 2) 이들 분획 중 A분획이 활성분획임이 생체검정결과 밝혀졌다.

활성도는 gel permeation 크로마토그래피에 의해 약 100배 정도 정제되었으며 (Table 4) 활성분획의 총단백질양은 원래의 세포질에 함유되어 있는 단백질양의 약 15~20%를 함유하였다.

B. sphaericus 1593 K-5 Spō-D 1216 균주의 세포질을 Sephadex G-100 컬럼상에서 분획 하였을때 2개의 분획을 얻었으며 (Fig. 3) 2개의 분획 모두가 모기유충에 대해 독성을 나타내지 않았다.

2) 활성분획 (A)의 ion-exchange 크로마토그래피

활성분획을 DEAE-Sephadex A-50 컬럼상에서 분획하였을 때 4개의 분획을 얻었으며 (Fig. 4) 이중 C분획이 활성분획임이 생체검정결과 밝혀졌다.

활성도는 Gel-크로마토그래피에 비해 약 10배정도 정제되었으며 (Table 3) 단백질의 양도 10~15%정도 함유하였다.

Davidson[2]의 보고에 의하면 *Culex quinquefasciatus* 모기유충에 대해 *B. sphaericus* 1593 균주의 crude cytoplasm, active Sephadex G-100분획, active ion-exchange분획의 LC_{50} (μg protein/ml) 이

Table 3. Insecticidal Activities of the Crude Cytoplasm Extract and Fractions from *B. sphaericus* 1593K-5 lysates

Fractions	LC_{50} (μg protein/ml)
Crude cytoplasm extract	10.26
Active Sephadex G-100	0.182
Active Ion exchange	0.02

각각 6.7, 0.28, 0.071이라고 하였는데, 본 실험에서는 *Culex pallens* 모기유충에 대해 LC_{50} (μg protein/ml)이 각각 10.26, 0.182, 0.02이었다 (Table 3).

Myers와 Yousten[2]의 보고에 의하면 *Culex quinquefasciatus* 모기유충에 대해 crude cytoplasm의 LC_{50} (μg dry weight/ml)이 58.0이었다. 이 결과는 dry weight로 계산하였으므로 본 실험에서의 LC_{50}의 산정방법이 단백질양이었으므로 비교하기는 어려웠다.

요 약

Bacillus sphaericus 1593 K-5 균주의 *Culex pallens* 모기유충에 대한 LC_{50} (cells/ml)은 2.6×10^2이었다. *B. sphericus* 1593 K-5 Spō-D 1216 균주는 *Culex pallens* 모기유충에 대해 독성을 나타내지 않았다. *B. sphaericus* 1593 K-5 균주는 포자가 형성되어 가면서 독성이 증가함을 보였다.

B. sphaericus 1593 K-5 균주의 세포질을 Sephadex G-100컬럼상에서 gel permeation크로마토그래피를 행하였을때 3개의 단백질 분획을 보였으며 이 중 한 분획이 활성분획이었다. 이 활성 분획을 DEAE-Sephadex A-50 컬럼상에서 ion-exchange 크로마토그래피를 행하였을때 4개의 단백질 분획을 보였으며 이중 한 분획이 활성분획이었다.

B. sphericus 1593 K-5 Spō-D1216균주의 세포질은 Sephadex G-100 컬럼상에서 gel permeation 크로마토그래피를 행하였을 때 2개의 단백질 분획을 보였으며 이 분획 모두가 활성이 없음이 생체실험 결과 밝혀졌다.

참고문헌

1. Buchanan, R.E. and N.E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology p 543, Baltimore, The Williams and Wilkins Co., (1974).

2. Davidson, E.W.: J. Invertebr. Pathol., **39**, 6-9 (1982).
3. Davidson, E.W.: Can. J. Microbiol., **29**, 271-275 (1983).
4. Hoskins, J.M.: Virological Procedures, Butterworth and Co., London, (1967).
5. Johnstone, A. and R. Thorpe: Immunochemistry in practice, Blackwell Scientific Publication, London, 3-4, (1982).
6. Larkin, J.M. and J.L. Stokes: The spore of *B. sphaericus* in Handbook of microbiology, III:75, CRC Press, (1967).
7. Kim, Y.H. and H.H. Lee: HG J. Gen. Eng., **1**, 15-21 (1984).
8. Kim, Y.H. and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 41-49 (1985).
9. Mulligan, F.S., C.H. Schaefer and T. Miura: J. Econ. Entomol., **71**, 774-777 (1978).
10. Myers, P.S., A.A. Yousten and E.W. Davidson: Can. J. Microbiol., **25**, 1227-1231 (1979).
11. Myers, P.S. and A.A. Yousten: Environ. Microbiol., **39**, 1205-1211 (1980).
12. Singer, S. : Biotechnol. Bioeng., **22**, 1335-1355 (1980).