

## 세균(*Bacillus subtilis*)에 대한 등검은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii* Bolivar)의 세포성 면역반응

장병수 · 문명진 · \*한성식 · 여성문

단국대학교 자연과학대학 생물학과, \*고려대학교 자연자원대학 농생물학과

비병원성 세균인 *Bacillus subtilis* (ATCC6633)를 등검은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii* Bolivar)의 성충 복강에 주입한 후, 혈구의 반응양상을 투과전자현미경으로 관찰하였다. 세균에 대한 혈구의 면역반응은 plasmacyte와 granulocyte에 의한 식세포작용(phagocytosis)의 형태로 이루어졌으며, 결절형성(nodule formation)은 일어나지 않았다. 식세포작용의 초기 반응은 혈구의 세포질 돌기가 돌출되면서 이물질을 둘러싼 후, 원형질막과의 융합에 의해 식포가 형성되었고, 식포의 주변부에서는 일차 리소조오의 집적이 관찰되었으며, 이런 과정은 세균 주입 후, 10분 이내에 완료되었다. 일차 리소조오의 집적은 세균 주입 후 1시간 이내에 식포의 한계막과 융합하여 이차 리소조오를 형성하였으며, 소화된 이물질은 9시간 이내에 exocytosis에 의해 배출되었다.

**KEY WORDS:** Grasshopper, Phagocytosis, Cellular immune response

곤충의 체내에 이물질이 침입해 들어오면 혈구들은 신속하게 방어하며, 이러한 방어작용은 외래 침입자 뿐만 아니라 체내 비정상적인 조직과 잉여의 불필요한 조직에까지 작용하여 제거하기도 한다(Nappi *et al.*, 1984; Han, 1989). 혈구들에 의한 면역반응인 식세포작용(phagocytosis), 피낭형성(encapsulation), 결절형성(nodule formation) 등의 세포성 면역반응(cellular immune response)은 여러 곤충에서 다양하게 연구되어 왔다(Ratcliffe and Rowley, 1975; Lackie, 1979; Ennesser and Nappi, 1984; Guzo and Stoltz, 1987; Han and Gupta, 1989).

피낭형성은 단일 혈구가 포식하기에 너무 큰 이물질 즉, 선충 등이 침입해 들어왔을 때, 이물질 표면에 혈구들이 조밀하게 부착하여 다층의 혈구 capsule을 형성해서 침입자에 대한 산소공급의 차단, 혹은 melanin 대사의 중간산물인 toxic quinone으로 말미암아 결국은 죽게 되거나, 잔유물로 곤충 체내에 남는다(Chen and Laurence, 1985; Blackmore, 1989; Chang *et al.*, 1991). 결절형성은 혈구들이 식세포작용을 하기에는 너무

나 많은 다량의 이물질이 침입하였을 때, 특정 혈구가 일단 끈끈한 물질을 이물질 덩어리에 분비하여 놓은 후, 이들을 둘러싸서 서서히 분해시키면서 melanization시키는 것을 말한다(Chain and Anderson, 1982; Geng and Dunn, 1989).

식세포작용은 세균 또는 작은 이물질을 혈구들이 포식해서 식포(phagocytic vesicle)를 형성하는 일종의 endocytosis로서, 이런 과정은 chemotaxis에 의해서 혈구표면에 이물질이 부착되고, 소화되어 최종적으로 세포내에 잔유물(residual body)로 남게되거나, exocytosis에 의해서 세포외로 배출되는 것으로 보고되어 왔다(Ratcliffe *et al.*, 1985; Götz and Boman, 1985; Gupta, 1986). 또한, 이에 관여하는 혈구는 plasmacyte, granulocyte 그리고 coagulocyte 등에 의해서 이루어지는 것으로 보고된 바 있으나, 이중 plasmacyte에서 가장 활발하게 진행되는 것으로 알려져 왔다(Chain and Anderson, 1982; Gupta, 1985; Han, 1989). 한편, 이와 같은 면역반응은 세균과 같은 이물질을 주입하였을 때, 주입된 이물질의 양에 따라서 반응 양상이 식세포작용과 결절형성

등으로 각각 다르게 나타나는 것으로 보고된 바 있다(Dunn, 1986).

따라서, 본 실험은 비병원성 세균인 *Bacillus subtilis*(ATCC6633)를 등검은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii* Bolivar) 성충 복부에 주입하였을 때, 혈구들에 의해서 야기되는 면역반응 양상과 과정을 규명하고, 이런 반응에 관여하는 혈구의 종류 및 세포 활성화에 의한 세포질의 형태적 변화를 투과 전자현미경으로 관찰하였다.

## 재료 및 방법

야외에서 채집한 등검은메뚜기(*Euprepocnemis shirakii* Bolivar)를 실험실(25-27°C)에서 사육하여 마지막 탈피가 끝난 건강한 성충을 실험재료로 사용하였다.

메뚜기 체내에 이물질로 주입한 세균은 Trypticase soy broth(Difco, USA)에 접종시킨 후, 37°C 항온기에서 4시간 동안 배양한 *Bacillus subtilis*(ATCC6633)를 사용하였고, 배양된 세균은 saline(0.5% NaCl)에 희석한 후, spectrophotometer(Schimidzu UV-240)를 이용하여 파장 600 nm에서 OD(optical density) 0.5로 측정해서 세균수를  $5 \times 10^6$  cell/ml로 조정하였다.

등검은메뚜기 성충은 체내에 세균을 주입하기 전에 냉장고(4°C)에서 10분간 처리하여 마취시킨 다음, 70% ethanol로 복부를 소독시켰다. 조정된 균주는 Hamilton syringe를 사용해서 복부 세번째와 네번째 마디 사이로 10  $\mu$ l씩 주입한 후, 10분, 30분, 1시간, 3시간, 6시간, 9시간, 12시간 간격으로 혈림프를 채취하였다.

채취된 혈림프는 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde(4°C, phosphate buffer, pH 7.4)가 들어있는 Eppendorf tube에서 2000 r.p.m으로 10분간 원심분리시켜 혈구만을 응축시킨 후, 1시간 동안 전고정(pre-fixation)하였다. 고정된 혈구덩어리는 완충용액(4°C, phosphate buffer, pH 7.4)으로 10분간 3회 세척하였으며, 이어서 1% OsO<sub>4</sub>(4°C, phosphate buffer, pH 7.4)로 1시간 동안 후고정(post-fixation)하였다.

고정된 재료는 동일 완충용액으로 수회 세척한

후, ethanol 농도 상승순으로 탈수하였으며, propylene oxide로 치환하여 Epon-Araldite 혼합액에 포매한 다음, 60°C vacuum drying oven에서 36시간 중합반응 시켰다. 포매된 혈구덩어리를 ultramicrotome(LKB-2088)으로 초박질편을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중염색하여 JEOL 100CX-II형 투과전자현미경으로 80 kV에서 관찰하였다.

## 결 과

*Bacillus subtilis*를 등검은메뚜기 체내에 주입하였을 때, 혈구의 면역반응은 식세포작용의 형태로만 관찰되었고, 결절형성은 관찰되지 않았다. 세균에 대한 식세포작용은 plasmatocyte와 granulocyte에 의해서 이루어 졌으며, 다른 종류의 혈구에서는 관찰되지 않았다.

이물질로 사용한 *Bacillus subtilis*는 직경이 약 0.5  $\mu$ m, 길이가 약 2  $\mu$ m인 원주상간균으로서, 세포벽과 원형질막을 뚜렷하게 관찰할 수 있었고, 세포질에는 원형질막의 함입에 의해서 형성된 mesosome이 존재하고 있었으며, 분산핵(nucleotid)이 세포질 중앙 부위에 위치하고 있었다(Fig. 1).

주입 후 10분이 경과된 조직의 표본에서 세균은 순환혈구에 접근되어 있었다. Granulocyte에서 초기반응은 세균이 접근되어 있는 부위의 원형질막이 돌출되면서 세포질돌기(cytoplasmic process)를 형성하기 시작하였으며, 돌기가 형성되기 시작한 부위의 세포질에는 미토콘드리아가 많이 관찰되었다(Fig. 2). Plasmatocyte에서는 표면에 세포질돌기가 길게 형성되어 접근된 세균의 주변을 둘러싸기 시작하였고, 세균의 세포벽에는 정상 세균에서 관찰되지 않은 비교적 전자밀도가 강한 미세한 물질들이 흡착되어 있었다(Fig. 3). 또한, 이 시기에 세균을 둘러싼 세포질 돌기의 원형질막이 융합되면서 식포(phagocytic vesicle)가 형성되기 시작하였다(Fig. 4).

주입 후 30분이 경과되면서 세균은 모두 plasmatocyte와 granulocyte에 포식되었고, 다른 혈

구에서는 포식된 세균이 전혀 관찰되지 않았다. Plasmatocyte에서 원형질막의 융합에 의해서 형성된 식포는 세포질내로 이동하여 있었고, 세포질에는 free ribosome이 산재되어 있었다(Fig. 5). Granulocyte의 경우도 포식된 세균을 함유하고 있는 식포는 세포질내로 깊숙히 이동하여 핵과 인접한 부위에 존재하고 있었는데, 식포는 포식된 세균의 직경에 약 2배 정도의 크기로 형성되어 있었으며,  $0.5\ \mu\text{m}$ - $0.8\ \mu\text{m}$ 의 크기를 갖고 있는 과립(granule)들이 세포질의 대부분을 차지하고 있었고, 이들 주변에는 세균을 포식하지 않은 작은 식포들도 산재되어 있었다(Fig. 6). 이 시기에 plasmatocyte의 세포질에는 다수의 미토콘드리아가 식포의 주변에 집중되어 있었고, 리소조움의 형태로 보이는 작은 과립들과 식포들도 관찰할 수 있었다. 또한, 포식된 세균의 직경에 3-4배 정도의 크기를 갖고 있는 대형의 식포도 관찰되었는데, 한개의 세포에 여러개의 식포를 형성하였거나(Fig. 7), 하나의 식포내에 수개의 세균이 포식되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 8).

주입 후 1시간이 경과된 표본에서 혈구 내부에 형성된 식포는 응축되어 한계막(limiting membrane)과 포식된 세균 사이의 경계가 전 시기에 비해 좀더 조밀한 형태로 밀착되어 있었다. Plasmatocyte의 경우 식포의 주변 세포질에는 골지체의 형성면에서 생성된 과립과 이들의 융합에 의해서 형성된 것으로 보이는 일차 리소조움들이 존재하고 있었으며, free ribosome과 미토콘드리아도 밀집되어 있었고, 미세소관(microtubule)도 관찰되었다(Fig. 9). 또한, 이 시기부터 일차 리소조움은 식포막과 융합되어 용해효소가 식포내로 함입되기 시작하였는데, 주변의 세포질에서 이동되어 왔거나, 식포와 근접해 있는 골지체에서 부터 형성된 것으로 보이는 일차 리소조움들이 식포의 주변에 밀집되어 있었고, 이들의 크기는 약  $0.1\ \mu\text{m}$ - $0.5\ \mu\text{m}$ 의 크기의 원형이나 타원형의 형태를 띠고 있었다(Fig. 10).

주입 후 3시간이 경과된 표본에서 plasmatocyte와 granulocyte의 세포내에 존재하고 있는 식포는 일차 리소조움과 융합되어 이차 리소조움을 형성하기 시작하였다. 식포 내부는 일차 리소조움에서 분비된 용해효소가 세균을 둘러싸기 시작하였

으며, 세균 주위에 검은 물질이 침착되어 이차 리소조움이 형성되는 것을 관찰할 수 있었고, 이들 주변에는 식포와 아직 융합되지 않은 일차 리소조움들이 흩어져 있는 것이 관찰되었다(Fig. 11). 그러나, 세균을 포식한 혈구에서 모두 이차 리소조움을 형성하지는 않았는데, 이는 세포의 활성화도에 따라 일차 리소조움이 형성된 후, 식포의 주변부로 이동하여 융합되는 시기의 차에 따라 다른 것으로 나타났다. 이 시기부터 포식된 세균은 소화되어 파괴되기 시작하였고, 식포는 전 시기에 비해서 더욱 응축되어 한계막과 세균의 세포벽 사이가 아주 밀착되어 있었다. Granulocyte에서 초기 소화과정은 식포와 일차 리소조움이 융합된 부위의 세균 세포벽이 용해되면서 소화가 진행되었다(Fig. 12). Plasmatocyte의 경우 포식된 세균의 일부 세포벽이 용해되면서 일차 리소조움의 용해효소가 세균의 세포질 내부로 함입되면서 소화가 진행되었고, 이들 식포는 핵과 인접한 부위에 위치하고 있었으며, 세포질에는 식포와 아직 융합되지 않은 일차 리소조움과 미토콘드리아 등이 잘 관찰되었다(Fig. 13).

주입 후 6시간 경과된 표본의 경우 소화가 진행된 식포에서 세균은 완전히 파괴되어 형태를 알아볼 수 없었으며, 아직 소화되지 않은 세균의 세포벽만이 일부 관찰되었다(Fig. 14). 소화가 계속 진행되면서 plasmatocyte의 식포 내부에 존재하고 있는 소화된 물질은 전자밀도가 강한 물질로 변형되어 있었고, 한계막 주변에는 동심원상의 층상 구조도 관찰되었으며, 식포의 주변은 미토콘드리아와 골지체가 산재되어 있는 것이 관찰되었다(Fig. 15). Granulocyte에서 핵에 인접한 부위에 존재하고 있는 식포는 원형질막과 동일한 이중막으로 둘러싸여 있었고, 주변의 식포와 융합하여 multivesicular body를 형성하고 있었으며, 내부의 소화된 물질은 전자밀도가 낮은 부분과 전자밀도가 높은 부분으로 구분되어져 있었다(Fig. 16).

주입 후 9시간과 12시간 경과된 표본에서 plasmatocyte에 존재하고 있는 식포는 농축작용에 의해서 소화된 물질이 전 시기에 비해 전자밀도가 낮은 물질로 변형되어 있었는데, 식포 내부에는 부분적으로 동심원상의 층상 구조도 관찰되었고

(Fig. 17), 이들 물질은 점차 과립상 물질로 변형되기 시작하였다. 이 시기에 식포는 혈구의 원형질막 주변부로 이동하여 있었다(Fig. 18). 소화된 물질을 함유한 식포는 최종적으로 혈구의 원형질막 근처로 이동해서 식포의 한계막 일부가 원형질막과 융합되면서 소화된 물질을 세포밖으로 내보내는 것을 관찰하였다(Fig. 19).

## 고 찰

곤충체내에 침입한 이물질에 대한 저항은 혈림프에서 일어나는 세포성 면역반응과 체액성 면역반응에 의해서 이루어지며, 혈구들에 의한 반응인 세포성 면역반응은 주입된 이물질의 크기와 종류 및 양에 따라서 식세포작용, 피낭형성, 결절형성 등의 형태로 나타나는 것으로 알려져 왔다(Dunn, 1986; Gupta, 1986).

이물질로 사용한 세균에 대한 혈구의 면역반응양상에 관한 연구에서 Horohov와 Dunn(1982)은 병원성 세균인 *Pseudomonas aeruginosa*와 *Escherichia coli*를 각각  $10^6$  cell/ml의 농도로 담배나방(*Manduca sexta*)의 5령 유충에  $5 \mu\text{l}$ 씩 주입했을 때, 전체 혈구 수가 30분 이내에 증가하기 시작하여, 1시간이 경과되면서 최고에 도달한다고 하였는데, 증가된 혈구중에서 80% 이상이 plasmacyte와 granulocyte가 차지하고 있었으며, 이들 세포가 세균과 반응하여 결절을 형성한다고 보고하였다. 또한 같은 재료에  $10^6$  CFU/ml의 세균을 주입한 실험에서 초기 30분 이내에 plasmacyte의 결절형성에 의해서 세균이 90% 이상 감소되고 나머지는 granulocyte의 식세포작용에 의해서 포식된다고 보고한 바 있으며(Horohov and Dunn, 1983), Chain과 Anderson(1982)은 명나방(*Galleria mellonella*)에 병원성 세균인 *Bacillus cereus*를  $10^8$  cell/ml의 농도로  $10 \mu\text{l}$ 씩 주입한 실험에서 plasmacyte의 신속한 감소현상이 일어났다고 보고하였다.

Geng과 Dunn(1989)은 담배나방 5령 유충에  $10^8$  cell/ml의 세균과  $2 \times 10^{11}$ /ml의 latex bead(직경  $0.8 \mu\text{m}$ )를 주입한 실험에서, 세균을 주입한 경우, 결절형성에 의해서 plasmacyte의 신속

한 감소가 일어난다고 하였으며, latex bead를 주입한 경우는 plasmacyte와 granulocyte에 의해서 포식되었다고 보고하였다.

본 실험에서 비병원성 세균인 *Bacillus subtilis*를 Horohov와 Dunn(1982)이 주입한 균수보다는 많고, Geng과 Dunn(1989)이 주입한 균수 보다는 적은 수량을 등검은메뚜기 성충 체내에 주입한 결과 혈구에 의한 반응은 초기 30분 이내에 plasmacyte와 granulocyte에 의한 식세포작용의 형태로 관찰되었으며, 결절형성에 의한 면역반응은 전혀 관찰되지 않았다. Dunn(1986)은 주입된 이물질의 수에 따라, 즉 일정 수준의 역치 이하의 세균에 대해서는 식세포작용의 형태로 나타나며, 역치 이상의 세균을 주입하였을 경우는 결절형성의 형태로 나타난다고 보고한 바 있으며, Geng과 Dunn(1989)은 세균의 수를 다양하게 조정하여 주입한 후 광학현미경으로 관찰한 결과,  $10^3$  cell/ml이상의 세균을 주입했을 때 부터 plasmacyte의 감소에 의한 결절이 형성된다고 보고하였다. 본 실험에서 결절형성의 초기반응인 혈구들의 용해(lysis) 현상을 전혀 관찰할 수 없었고, 주입된 이물질의 양에 대한 실험상의 오차를 고려하더라도, 이와 같은 결과는 앞의 연구자들에 의해서 보고된 주입된 이물질의 양의 차이 뿐만 아니라, 병원성 유무 및 숙주 곤충의 크기나 변태시기에 따라서 결절형성과 식세포작용의 형태로 면역반응을 나타내는 것으로 사료된다.

식세포작용에서 이물질을 인식하는 초기반응은 혈구 표면의 막 수용체(Scott, 1971), 화학주성(chemotaxis) 및 혈구와 이물질 사이의 전하차(Lackie, 1981)에 의해서 유도되거나, lectin과 같은 응집소(agglutinin)가 혈장이나 혈구의 표면에 존재하고 있어서 혈구의 endocytosis를 용이하게 하는 중요한 역할을 할 것이라고 보고된 바 있다(Anderson, 1975; Rowley and Ratcliffe, 1980). 또한 혈구와 이물질이 접촉해서 응집이 일어나고 세포들이 파괴되면 mucopolysaccharide를 방출하여 다른 혈구들의 인식을 유도하는 것으로 보고된 바 있으며(Ratcliffe and Gagen, 1976), Brehelin 등(1989)은 혈구가 이물질을 효과적으로 인식하는 것을 혈림프에 존재하고 있는 prophenoloxidase의 활성화에 의해서 이루어진다고

하였다.

본 실험에서 비병원성 세균인 *Bacillus subtilis*의 인식은 초기 10분 이내에 주입된 세균의 세포벽에 전자밀도가 강한 작은 과립상 물질들이 흡착되어 있는 것으로 보아 혈구의 exocytosis에 의해서 방출된 성분(recognition factor)이거나(Brehelin *et al.*, 1989), 혈구와 혈장에 존재하고 있는 opsonin과 같은 물질이 흡착된 후, 혈구들이 세균을 인식하여 식세포작용을 하는 것으로 생각되나 이런 작용의 인식기작에 대해서는 아직까지 분명하게 알려져 있지 않은 상태이다.

식세포작용 과정은 혈구 표면에 이물질의 부착(attachment), 섭식(ingestion), 섭식된 이물질의 소화(digestion) 및 제거(disposal)에 의해서 이루어지며(Rizki and Rizki, 1984; Götz and Boman, 1985), 혈구가 이물질을 인식하게 되면 혈구 표면에 많은 세포질 돌기를 형성해서 이물질을 둘러싸게 되는데(Kislev *et al.*, 1969, Ratcliffe and Rowley, 1979), 본 실험에서도 혈구의 초기 반응은 세균과 접촉되어 있는 세포질 부위가 돌출되면서 돌기를 형성하였으며, 세포질돌기는 세균을 둘러싼 후, 원형질막의 융합에 의해서 식포를 형성하였고, 식포는 세포질내로 이동하였다.

소화과정은 일반적으로 포식된 이물질을 갖고 있는 식포가 일차 리소조음과 융합하여 이차 리소조음을 형성해서 섭식된 이물질을 분해하는 것으로 알려져 왔다(Gupta, 1985; Götz and Boman, 1985). 본 실험에서 Gupta(1985)가 보고한 바와 같은 기작으로 소화가 진행되었지만, 식포가 일차 리소조음과 융합되기 전에 세포질에 퍼져 있는 리소조음들이 식포의 주변부로 이동하여 분포하고 있었고, 골지체에서 부터 새로운 분비과립들이 계속 형성되는 것이 관찰되었으며, 소화된 이물질은 exocytosis에 의해서 세포밖으로 배출되는 것을 확인하였다. 이런 과정은 세균을 주입한 후, 1시간이 경과되면서 부터 식포가 일차 리소조음과 융합되기 시작하였고, 소화된 물질은 9시간이 경과되면서 세포밖으로 배출되었다.

식세포작용에 관여하는 혈구는 곤충과 이물질의 종류에 따라 다양하게 보고되어 왔다(Ratcliffe *et al.*, 1984; Gupta, 1986). 이물질로 세균을 사용한 실험에서, 나비목의 *Pseudaletia unipuncta*와 바

퀴(*Blaberus craniifer*) 및 노랑조파리(*Drosophila melanogaster*) 유충등의 혈구중에서 plasmatocyte가 식세포작용에 관여한다고 보고된 바 있으며(Wittig, 1965; Anderson *et al.*, 1973; Rizki and Rizki, 1984), 담배나방(*Manduca sexta*)과 누에나방(*bombyx mori*)에서는 granulocyte가 식세포작용을 한다고 보고되었다(Horohov and Dunn, 1983; Wago, 1984). 한편, Brehelin과 Hoffmann(1980)은 명나방(*Galleria Mellonella*)과 풀무치(*Locusta migratoria*)에 latex bead와 iron saccharide를 주입한 경우, 이물질은 plasmatocyte와 granulocyte에 의해서 포식되었다고 보고하였으며, Chang 등(1992)은 메뚜기(*Euprepcnemis shirakii*)에 불활성 물질인 금 입자를 주입한 실험에서 식세포작용은 단지 plasmatocyte에 의해서만 이루어졌고, 다른 혈구는 전혀 관여하지 않았다고 보고하였다.

본 실험에서 이물질로 사용된 세균에 대한 식세포작용은 plasmatocyte와 granulocyte에 의해서 이루어졌는데, 이와 같은 결과는 Chang 등(1992)이 동일 재료에 금 입자를 주입한 실험 결과와 비교해 볼 때, plasmatocyte는 이물질의 특성에 관계없이 식세포작용에 일차적으로 작용하는 중요한 면역혈구(immunocyte)이고, 주입된 이물질의 종류나 크기, 또는 양에 따라 granulocyte가 이차적으로 작용하는 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- Anderson, R. S., 1975. Phagocytosis by Invertebrate Cells *in vitro*: Biochemical Events and Other Characteristics Compared with Vertebrate Phagocytic Systems. In: Invertebrate Immunity (Maramorosch, K. and R. E. Shore, eds.). Academic Press, New York, pp. 153-180.
- Anderson, R. S., B. Holmes, and R. A. Good, 1973. *In vitro* bactericidal capacity of *Blaberus craniifer* hemocytes. *J. Invert. Pathol.* **22**: 127-135.
- Blackmore, M. S., 1989. The efficacy of melanotic encapsulation as a defense against parasite-induced mortality in snowpool mosquitoes (Diptera: Culicidae) infected by mermithid nematodes. *Canadian J. Zool.* **67**: 1725-1729.
- Brehelin, M., L. Drif, L. Baud, and N. Boemare, 1989.

- Insect haemolymph: cooperation between humoral and cellular factors in *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* **19**: 301-307.
- Brehelin, M. and J. A. Hoffmann, 1980. Phagocytosis of inert particles in *Locusta migratoria* and *Galleria mellonella*: study of ultrastructure and clearance. *J. Insect Physiol.* **26**: 103-111.
- Chain, B. M. and R. S. Anderson, 1982. Selective depletion of the plasmatocytes in *Galleria mellonella* following injection of bacteria. *J. Insect Physiol.* **28**: 377-384.
- Chang, B. S., S. M. Yoe, W. K. Kim, and M. J. Moon, 1991. Electron microscopic study on the hemocytic immune responses to the foreign substances in insects. II. Encapsulation. *Korean J. Entomol.* **21**: 119-131.
- Chang, B. S., S. M. Yoe, W. K. Kim, and M. J. Moon, 1992. Electron microscopic study on the hemocytic immune responses to the foreign substances in insects. I. Response to gold particles. *Korean J. Zool.* **35**: 58-69.
- Chen, C. C. and B. R. Laurence, 1985. An ultrastructural study on the encapsulation of microfilariae of *Brugia pahangi* in the haemocoel of *Anopheles quadrimaculatus*. *Inter. J. Parasitol.* **15**: 421-428.
- Dunn, P. E., 1986. Biochemical aspects of insect immunology. *Ann. Rev. Entomol.* **31**: 321-339.
- Ennesser, C. A. and A. J. Nappi, 1984. Ultrastructural study of the encapsulation response of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *J. Ultrastruct.* **87**: 31-45.
- Geng, C. and P. E. Dunn, 1989. Plasmatocyte depletion in larvae of *Manduca sexta* following injection of bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* **13**: 17-23.
- Götz, P. and H. G. Boman, 1985. Insect Immunity, In: Comprehensive Insect Phylogeny, Biochemistry and Pharmacology (Kerkut, G. A., and L. I. Gilbert, eds.). Pergamon Press, New York, pp. 453-485.
- Gupta, A. P., 1985. Cellular Elements in the Hemolymph, In: Comprehensive Insect Phylogeny Biochemistry and Pharmacology (Kerkut, G. A. and L. I. Gilbert, eds.). Pergamon Press, New York, pp. 401-451.
- Gupta, A. P., 1986. Arthropod Immunocytes, In: Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods (Gupta A. P., ed.). John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 3-61.
- Guzo, D. and D. B. Stoltz, 1987. Observations on cellular immunity and parasitism in the tussock moth. *J. Insect Physiol.* **33**: 19-31.
- Han, S. S., 1989. Insect immunity. *Korean J. Appl. Entomol.* **28**: 175-191.
- Han, S. S. and A. P. Gupta, 1989. Arthropod immune system. II. Encapsulation of implanted nerve cord and "plain gut" surgical suture by granulocytes of *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera: Blattellidae). *Zool. Sci.* **6**: 303-320.
- Horohov, D. W. and P. E. Dunn, 1982. Changes in the hemocyte population of *Manduca sexta* larvae following injection of bacteria. *J. Invert. Pathol.* **40**: 327-339.
- Horohov, D. W. and P. E. Dunn, 1983. Phagocytosis and nodule formation by hemocytes of *Manduca sexta* larvae following injection of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Invert. Pathol.* **41**: 203-213.
- Kislev, N., F. Harpaz, and A. Zelcer, 1969. Electron-microscopic studies on hemocytes of the Egyptian cottonworm, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) infected with a nuclear-polyhedrosis virus, as compared to non-infected hemocytes. II. Non-infected hemocytes. *J. Invert. Pathol.* **14**: 245-257.
- Lackie, A. M., 1979. Cellular recognition of foreignness in two insect species, the American cockroach and the desert locust. *Immunology.* **36**: 909-914.
- Lackie, A. M., 1981. Immune recognition in insects. *Dev. Comp. Immunol.* **5**: 191-204.
- Nappi, A. J., J. Kmiecik, and M. Silvers, 1984. Cellular immune competence of a *Drosophila* mutant with neoplastic hematopoietic organs. *J. Invert. Pathol.* **44**: 220-227.
- Ratcliffe, N. A. and S. J. Gagen, 1976. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vivo*: nodule formation and development in *Galleria mellonella* and *Pieris brassicae* larvae. *J. Invert. Pathol.* **28**: 373-382.
- Ratcliffe, N. A. and A. F. Rowley, 1975. Cellular defense reactions of insect hemocytes *in vitro*: phagocytosis in a new suspension culture system. *J. Invert. Pathol.* **26**: 225-233.
- Ratcliffe, N. A. and A. F. Rowley, 1979. Role of Hemocytes in Defense against Biological Agents, In: Insect Hemocytes (Gupta, A. P. ed.). Cambridge Univ. Press, London, pp. 85-127.
- Ratcliffe, N. A., A. F. Rowley, S. W. Fitzgerald, and C. P. Rhodes, 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. *Inter. Rev. Cytol.* **97**: 183-350.
- Rizki, T. M. and R. M. Rizki, 1984. The Cellular Defense System of *Drosophila melanogaster*, In: Insect Ultrastructure (King, R. C. and H. Akai, eds.). Plenum Press, New York, pp. 579-604.
- Rowley, A. F. and N. A. Ratcliffe, 1980. Insect erythrocyte agglutinins. *In vitro* opsonization experiments with *Clitumnus extradentatus* and *Periplaneta americana* hemocytes. *Immunology* **40**: 483-492.
- Scott, M. T., 1971. A naturally occurring hemagglutinin in the hemolymph of the American cockroach. *Arch. Zool. Exp. Gen.* **112**: 73-80.
- Wago, H., 1984. *In vitro* evidence for the requirement of filopodial elongation for the progress of phagocytosis

- by phagocytic granular cells of the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* **8**: 7-14.
- Wittig, G., 1965. Phagocytosis by blood cells in healthy and diseased caterpillars. I. Phagocytosis of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in *Pseudaletia unipuncta* (Haworth). *J. Invert. Pathol.* **7**: 474-488.
- (Accepted April 30, 1992)

---

**Cellular Immune Response of the Grasshopper, *Euprepocnemis shirakii* Bolivar Following Injection of *Bacillus subtilis***

Byung Soo Chang, Myung Jin Moon, \*Sung Sik Han, and Sung Moon Yoe (Department of Biology, Dankook University, Cheonan 330-714, \*Department of Agricultural Biology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Cellular immune responses to the introduction of non pathogenic bacteria, *Bacillus subtilis* (ATCC6633) into the hemocoel of grasshopper, *Euprepocnemis shirakii* Bolivar were examined using electron microscope. The injection of bacterial suspension ( $5 \times 10^6$  cell/ml) led to the rapid formation of phagocytosis in both plasmatocytes and granulocytes within 10 minutes, but nodule formation was not occurred. Phagocytosis was accompanied by an initial reaction of forming numerous cytoplasmic process on the cell surface. After recognition of the hemocytes to the bacteria, cytoplasmic processes surrounded the bacteria and fused with the plasma membrane within 10 minutes after inoculation. As they formed phagocytic vesicle which moved to the interior of the cell. Active primary lysosome was accumulated around the phagocytic vesicle and fused with limiting membrane of phagocytic vesicle, then developed to secondary lysosome within 1 hour. Digested bacterial residues were finally released from the cell by exocytosis within 9 hours after injection.

### Explanation of Figures

**Fig. 1.** Electron micrograph of thin section of *Bacillus subtilis*. Inset: cross section of bacterium showing mesosome (ME), CW: cell wall, PM: plasma membrane, N: nucleoid. ( $\times 48,000$ )

**Fig. 2.** Electron micrograph of the plasmatocyte at 10 minutes after injection of *Bacillus subtilis*. The bacterium (B) is entrapped within cytoplasmic processes (CP) of a plasmatocyte. ( $\times 18,000$ )

**Fig. 3.** The bacterium (B) is attached to the plasma membrane of the granulocyte at 10 minutes after injection. Note that the cell surface produces cytoplasmic processes (arrowheads) enclosing the bacterium. G granule, M: mitochondria. ( $\times 40,000$ )

**Fig. 4.** Cytoplasmic processes (CP) of the plasmatocyte are surrounded the bacterium (B) and fused with the plasma membrane which later formed phagocytic vesicle. ( $\times 16,000$ )

**Fig. 5.** Electron micrograph of the plasmatocyte at 30 minutes after injection of bacteria. At this stage the phagocytic vesicle (PV) containing phagocytosed bacterium (B) moved to the interior of the cell. N: nucleus. ( $\times 25,000$ )

**Fig. 6.** Phagocytosis of bacterium by a granulocyte at 30 minutes after the injection into the hemocoel. Note the phagocytic vesicle (PV) near the nuclear membrane. ( $\times 84,000$ )

**Fig. 7.** Plasmatocyte with phagocytosed bacteria (B). Note the presence of bacterium in two phagocytic vesicles (PV) of this cell. M: mitochondria, N: nucleus, L: primary lysosome. ( $\times 21,000$ )

**Fig. 8.** Part of the cytoplasm of a granulocyte containing several phagocytosed bacteria (B) in the phagocytic vesicle (PV). ( $\times 32,000$ )

**Fig. 9.** Electron micrograph of the plasmatocyte at 1 hours after injection of bacterium (B). The cytoplasm surrounding the phagocytic vesicle contains well developed primary lysosome (L) and mitochondria (M). G: Golgi complex. ( $\times 28,000$ )

**Fig. 10.** Electron micrograph of plasmatocyte with phagocytosed bacterium (B). The primary lysosomes (L) accumulated around the phagocytic vesicle and fused with it, their digestive enzymes discharged into phagocytic vesicle. G: Golgi complex, L: primary lysosome, N: nucleus. ( $\times 44,000$ )

**Fig. 11.** The phagocytic vesicles (PV) of plasmatocyte containing phagocytosed bacterium (B) are changed to secondary lysosome by the fusion of primary lysosome (L). ( $\times 44,000$ )

**Fig. 12.** Electron micrograph of the granulocyte at 3 hours after injection of bacterium (B). The phagocytosed bacterial cell wall (arrow) is began to lysis. G: granule. ( $\times 32,000$ )

**Fig. 13.** Electron micrograph of the plasmatocyte at 3 hours after injection of bacterium. Note the bacterial cell wall (arrow) lysis. N: nucleus. ( $\times 34,000$ )

**Fig. 14.** Electron micrograph of phagocytic vesicle (PV) in the plasmatocyte showing disintegration of the phagocytosed bacterium. The phagocytic vesicle contains fragments of destroyed bacterial cell wall (arrows). N: nucleus. ( $\times 28,000$ )

**Fig. 15.** High magnification electron micrograph of the plasmatocyte at 6 hours after injection. The digested bacteria is condensed and changed to electron dense debris. Part of phagocytic vesicle (PV) of this stage showing lamellar structure. ( $\times 44,000$ )

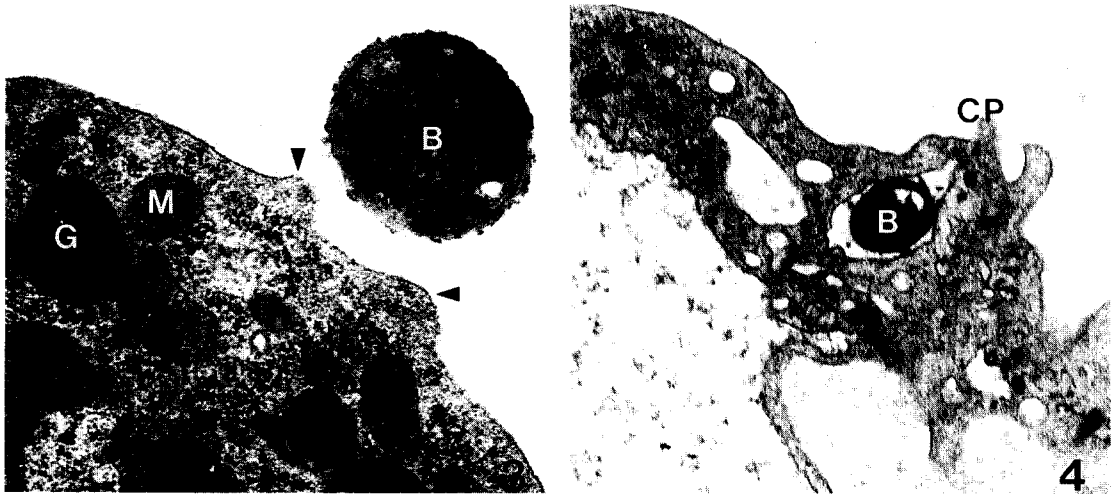
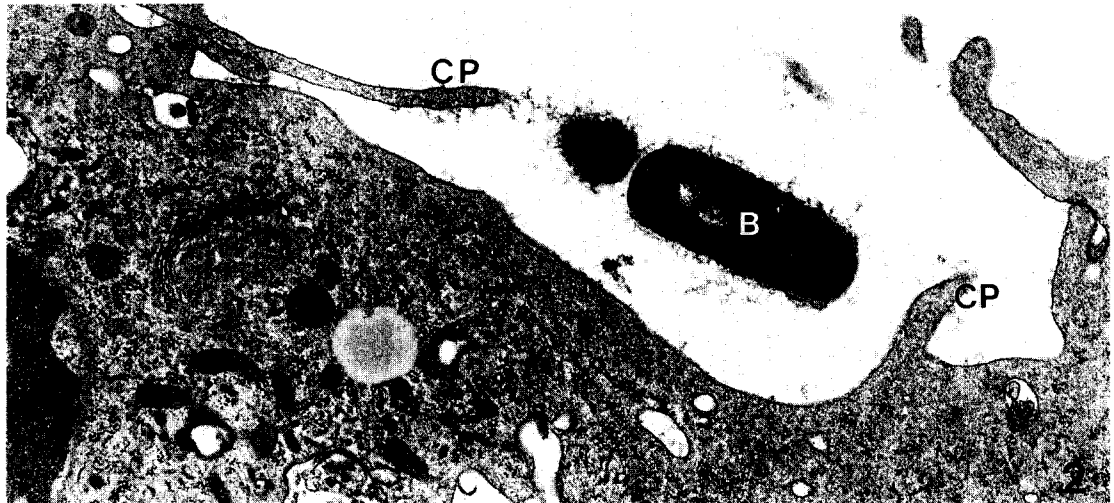
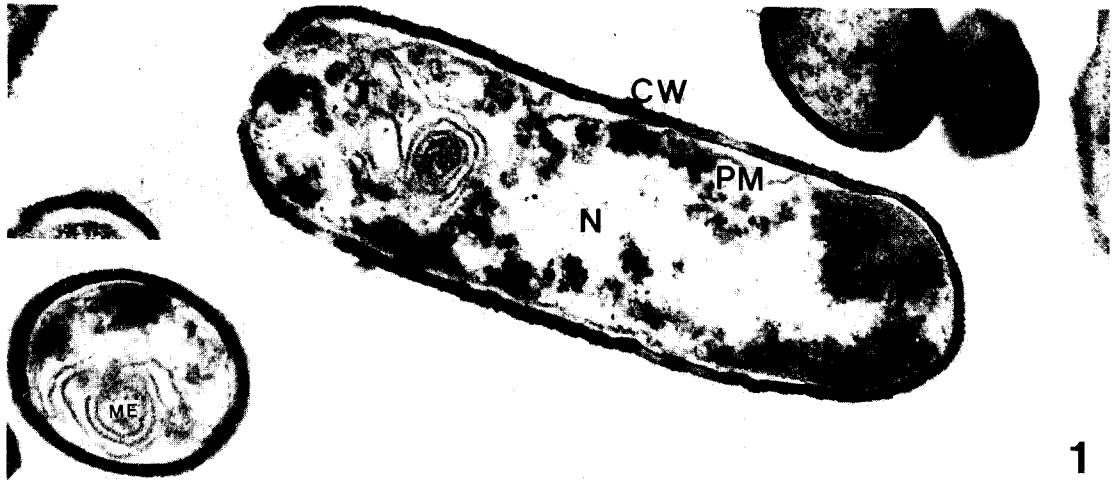
**Fig. 16.** Electron micrograph of the granulocyte containing digested bacteria 6 hours after injection. The phagocytic vesicles are fused each other and made to multivesicular body (MB). Note the double membranes of the phagocytic vesicle. G: granule. ( $\times 28,000$ )

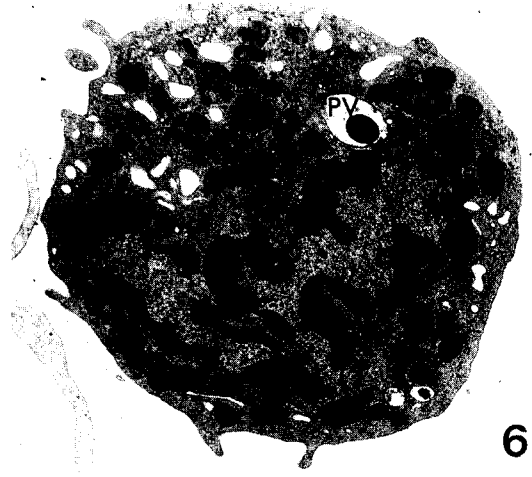
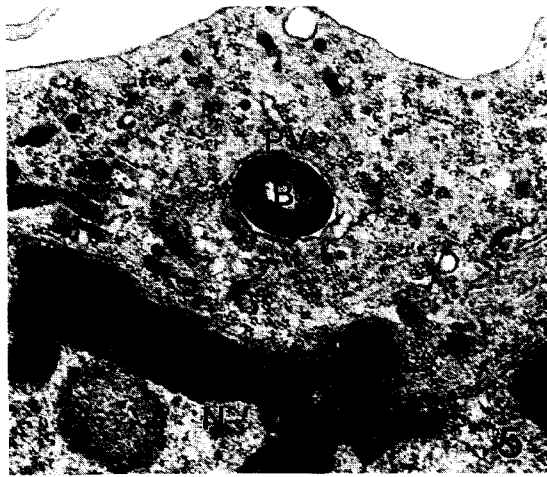
**Fig. 17.** Electron micrograph of the phagocytic vesicle (PV) of plasmatocyte showing digested bacteria at 9 hours after injection. ( $\times 44,000$ )

**Fig. 18.** Phagocytic vesicle (PV) containing digested bacteria is moved near the plasma membrane of plasmatocyte by intracellular movement. ( $\times 44,000$ )

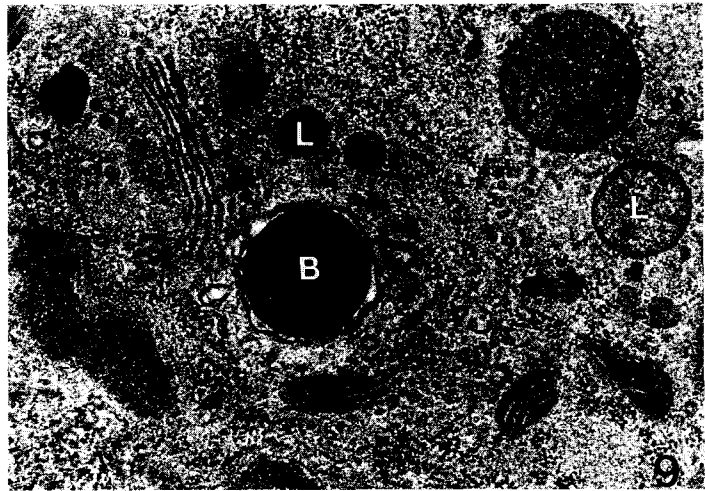
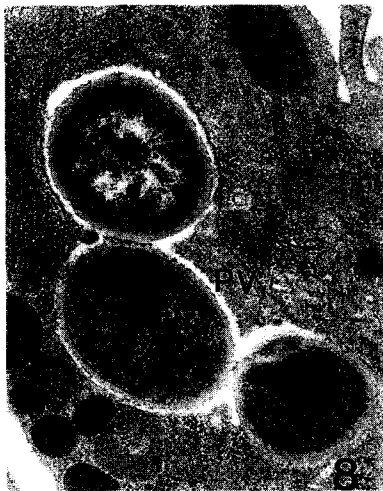
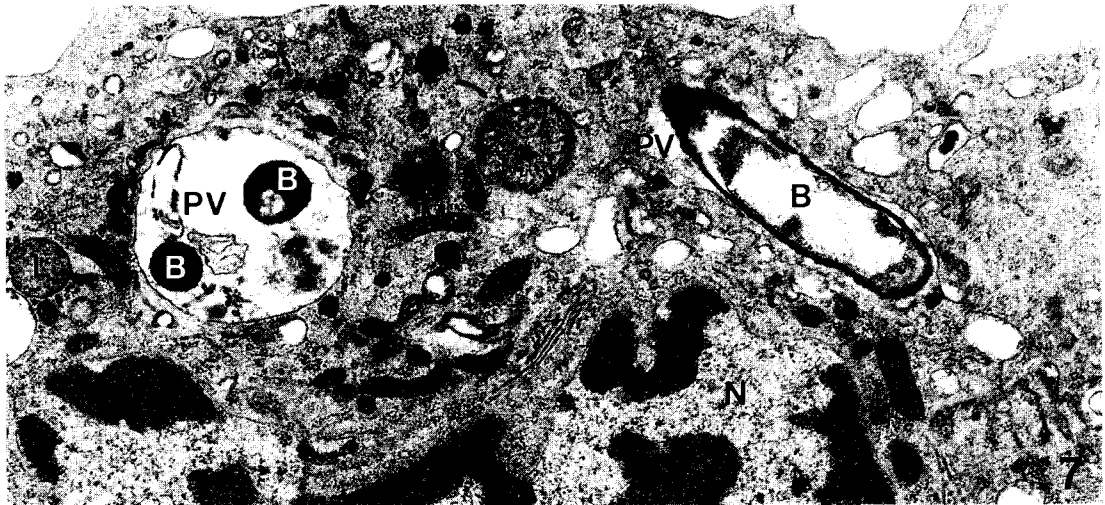
**Fig. 19.** At 9 hours after injection, digested bacteria (DB) are released from the granulocyte by exocytosis. G: granule, M: mitochondria, N: nucleus. ( $\times 23,000$ )







6



9

