Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 23, No. 4, 390-396 (1995)

세균성 Urease Gene에 의한 모기유충 방제균 *Bacillus sphaericus* 1593의 형질전환

한길환 · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Introduction and Expression of the Urease Gene in Mosquitocidal *Bacillus sphaericus* 1593

Kil-Hwan Han and Sang-Dal Kim*
Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract — *Bacillus sphaericus* 1593 is a larvicidal toxin-producing mosquitocidal bacterium. The toxin contains a parasporal crystalline inclusion which is composed of a protein that is activated under alkaline condition. To enhance alkaline environment around toxin protein, cryptic plasmid cured, *B. sphaericus* 1593 was transformed by the *Bacillus pasteurii* urease gene which generate ammonia from urea. Transformant produced urease at about 80% more than wild type strain. *B. sphaericus* 1593, and the urease gene was stably maintained. It also produced crystalline toxin protein at the same level as the wild type strain *B. sphaericus* 1593.

질병매개곤충이나 농작물해충을 박멸하기 위해서 막대하게 사용되는 화학살충제의 피해가 날로 증가되고 있다(1). 화학살충제의 잔류로 심각해지는 환경오염과 해충의 저항성에 의해 증가되는 유독살충제 피해를 줄이기 위한 노력으로 *Bacillus thuringiensis* 등 미생물을 이용하는 생물학적 해충 방제방법이 오래전부터 연구되어 오고 있다(2). 한편, *Bacillus sphaericus*도 *Culex, Anopheles* 등의 모기유충을 살충할 수 있고 인체에 무독성인 결정성 독소 단백질을 생산한다는 사실이 밝혀진 이래(3), 살충성 독소단백질의 효과(4), 발현기작(5) 및 자연환경에서의 안정성(6) 등에 대해 많은 연구 보고가 있다. 그러나 살충범위의 제한과 육종균주의 불안정성 등으로 대규모의 실용화에는 아직 해결해야 할 문제가 많다고 생각되어진다(7).

B. sphaericus 1593는 *B. sphaericus* 중에서 치사율이 가장 높은 모기유충치사 단백질을 생산하는데 이 살충단백질은 알칼리성 환경에서 활성화된다(8). 따라서, 본 연구에서는 세균중 urease 생산량이 가장 크고 *B. sphaericus*와 같은 속인 *Bacillus pasteurii*의 urease 유전자를 모기치사균주 *B. sphaericus* 1593에 도입하여 알카리도를 증가하고자 하였으며, 이를 위해 *B. sphaericus* 1593의 cryptic plasmid를 먼저 제거시킨 후 *B. pasteurii* urease가 삽입된 재결합 plasmid pGU66(9)으로 형질전환시켜 urease 생산능력을 대폭 증가시켰다. 아울러 형질전환된 *B. sphaericus* 1593의 모기치사 결정성 단백질 생산능과 도입된 urease 유전자의 안정성도 조사하였다.

Key words: *Bacillus sphaericus* 1593, mosquitocidal toxin, urease gene
*Corresponding author

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmid

본 실험에 사용된 균주는 미국 Arizona 대학 미생물학과에서 분양받은 모기유충 방제균인 *Bacillus sphaericus* 1593이었다.

Ammonia 농도 증가 목적으로 이용한 urease gene 삽입 plasmid는 *Bacillus pasteurii*의 urease gene을 *E. coli-Bacillus* shuttle vector인 pGR71로 *E. coli* RR1 내에 cloning 시킨 재결합 plasmid pGU66(9)이었다(Fig. 1).

Cryptic plasmid의 확인 및 항생물질 내성조사

숙주로 사용할 모기유충 방제균 *B. sphaericus* 1593

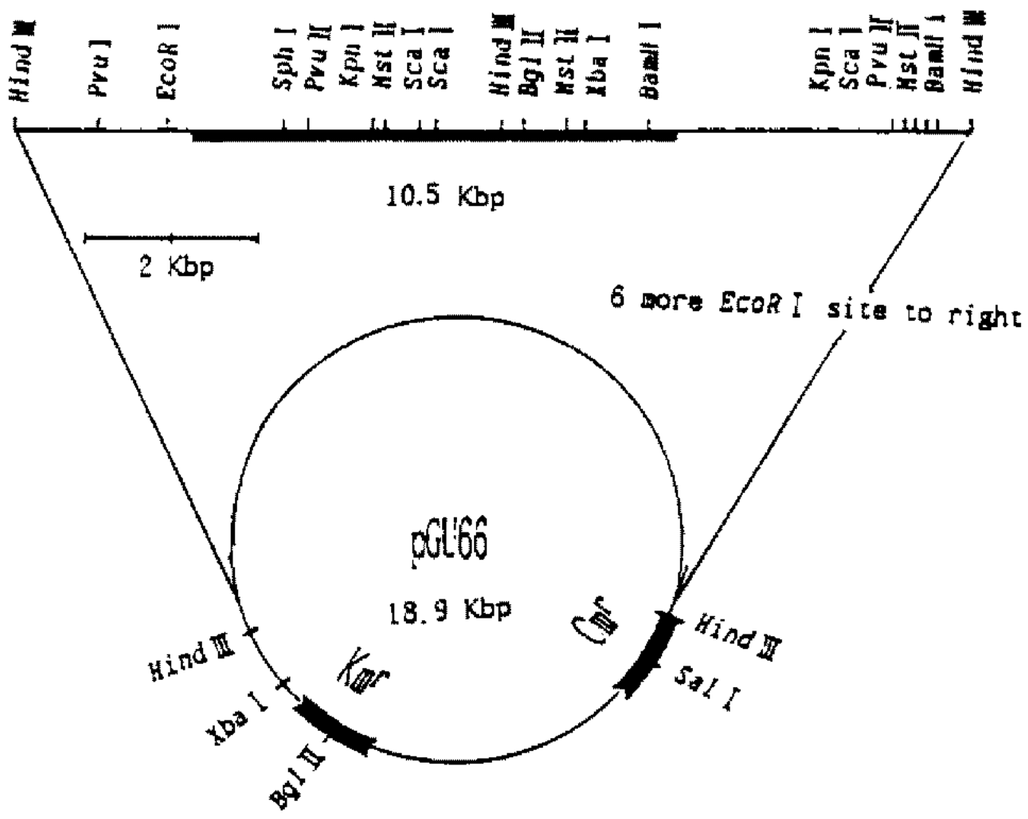


Fig. 1. Restriction map of plasmid pGU66 containing urease gene inserted in pGR71.
Solid bar contains structure and accessory genes for urease production (about 5.0 kb).

내에 어떠한 cryptic plasmid가 내재되어 있는 지를 조사하기 위하여 Birboim(10)의 alkaline lysis miniprep 법으로 plasmid를 분리하였으며, 0.8% horizontal agarose gel 상에서 5 v/cm로 2시간 전기영동시킨 후 plasmid의 수와 크기를 확인하였다. 숙주 *B. sphaericus* 1593이 각종 항생물질에 대해 어떠한 저항성을 가지는 지를 조사하기 위해 각 항생제가 들어 있는 nutrient agar 배지상에서 24시간 배양시켜 항생제 내성을 조사하였고 동시에 감수성 항생물질에 대해서 그 minimal inhibitory concentration(MIC)도 조사하였다.

Plasmid 제거 변이균주의 분리

Nutrient broth 배지를 이용해 30℃에서 12시간 배양시킨 *B. sphaericus* 1593의 배양액을 ethidium bromide(EtBr) 농도별로 첨가된 동일 배지에 1% 되게 접종하여 30℃에서 24시간 배양하며 내재된 cryptic plasmid를 제거하였다. Plasmid 제거 확인 방법은 항생제 streptomycin과 chloramphenicol이 동시에 첨가된 배지와 무첨가 평판 배지상에 EtBr 처리된 균주 일정량을 희석 도말하여 plasmid curing 여부와 curing efficiency를 조사하였고, 항생제 무첨가 배지상의 colony 중에서 plasmid 제거 균주를 선발하였다. 이 선발된 균주를 LB 배지에서 배양한 후 alkaline lysis miniprep 법(10)에 의하여 cryptic plasmid의 소실여부를 확인하였다.

살충성 결정단백질 생산 조사

Cryptic plasmid 제거 균주 *B. sphaericus* 1593와 urease gene이 도입된 *B. sphaericus* 1593(pGU66)이 wild type 균주와 같이 살충성 단백질을 생성하는지 여부를 조사하기 위하여 nutrient agar 평판 배지상에 30℃에서 3일간 배양시킨 후 투사형 전자현미경 TEM (H-600, Hitachi Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 모기살충 결정성 단백질의 생성여부를 확인하였다. 이때 균주의 절박표본은 고정, 탈수, 치환, embedding, 초박절편, 염색의 과정을 거쳐 준비하였다(11).

형질전환

Cryptic plasmid가 제거된 *B. sphaericus* 1593을 숙주로하여 외부 urease 유전자를 도입하기 위하여 원형질체 형질전환 방법(12)을 이용하였다. 즉 원형질체로 제조한 균체에 0.5 m*l*의 SMMP 용액(2배 농도의 SMM buffer 즉 0.5M sucrose, 0.02M malate, 0.02M $MgCl_2$와 4배 농도의 Penassay broth를 동량 혼합)을 첨가하고, *Bacillus*용 vector plasmid pUB110, pGR71, pGB215-110ΔB와 *B. pasteurii* urease gene을 pGR71에 삽입하여 만든 재결합 plasmid pGU66를 첨가한 후 1.5 m*l*의 polyethylene glycol 4,000(SMM buffer에 40% 되게 용해)와 혼합한 후 40℃에서 15분간 방치한 후 SMMP 용액 1.0 m*l*를 첨가하고 30℃에서 2시간 정도 약하게 shaking 하면서 형질전환시켰다. 그 후 각 marker 항생제를 규정농도로 첨가한 mannitol 재생배지상에 도말한 후 30℃에서 5일간 배양시켜 colony 생성여부를 조사하였다(6).

Plasmid 안정성 조사

B. sphaericus 1593이 pGU66 plasmid에 의해 형질전환된 후 그 형질전환체 내에서 plasmid가 어느 정도 안정하게 유지되는 가를 조사하기 위하여 LB 배지상에서 30℃에서 24시간 배양시킨 균주를 적당히 희석하여 chlorampenicol이 들어 있지 않은 LB plate 배지에 도말, 배양하면서, 같은 방법으로 8일간 매일 계대 배양하면서 그 안정성을 확인하였다. 대조구로는 chloramphenicol(50 μg/m*l*)이 든 LB plate 배지를 사용하였고 항생제 함유 배지상의 colony 수와 비교하여 그 상실 빈도를 백분율로 나타내었다.

Urease의 발현 확인

다른 미생물의 유전자로 형질전환된 *B. sphaericus* 1593이 외부의 urease 생산성 유전형질을 효과적으로 안정하게 발현시켜 독소 단백질의 환경을 알카리화 할 수 있는 지를 조사하기 위해 이미 김 등(9)이 *Bacillus pasteurii*의 urease gene을 *Hind*III로 잘라 *Bacil-*

lus-E. coli shuttle vector인 pGR71을 이용하여 cloning 시킨 pGU66 plasmid를 *B. sphaericus* 1593 균주에 형질전환시켰으며, urease gene의 발현여부와 활성도 증가는 Nesslerization 방법(13)으로 생성 ammonia 량을 측정하므로써 urease 활성도를 조사하였다. 한편 도입된 urease gene 함유 plasmid pGU66의 transformant *B. sphaericus* 1593 내에서의 안정성을 조사하기 위해 chloramphenicol 함유치 않은 nutrient agar를 이용하여 계대배양하면서 pGU66의 잔존여부를 chloramphenicol 함유배지로 조사하였다.

결과 및 고찰

Cryptic plasmid의 확인

외부 유전자를 받아들일 숙주균주내에 cryptic plasmid가 존재하면 plasmid 불화합성에 의해 내재된 기존 plasmid는 새로운 외부 plasmid를 배척한다(14). 본 실험에 사용한 wild type의 숙주균주인 *B. sphaericus* 1593은 pUB110, pGB215-110ΔB, pGR71 등 다른 어떤 plasmid vector로도 형질전환시킬 수 없는 plasmid 불화합성의 특징을 가진다는 것을 kanamycin 함유 배지를 이용한 형질전환 방법을 통해 McDonald & Burke에 의해 확인되었다(7). 따라서 숙주로 사용할 모기방제균 *B. sphaericus* 1593 내의 cryptic plasmid가 어떤 크기로 몇가지 내재되어 있는지 확인해 본 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 분자량이 약 20 kb 정도되는 한가지 plasmid가 내재되어 있다는 것을 확인할 수 있었으며, 이 plasmid에 의해 외부의 타 plasmid 도입이 배척되는 것을 알 수 있었다.

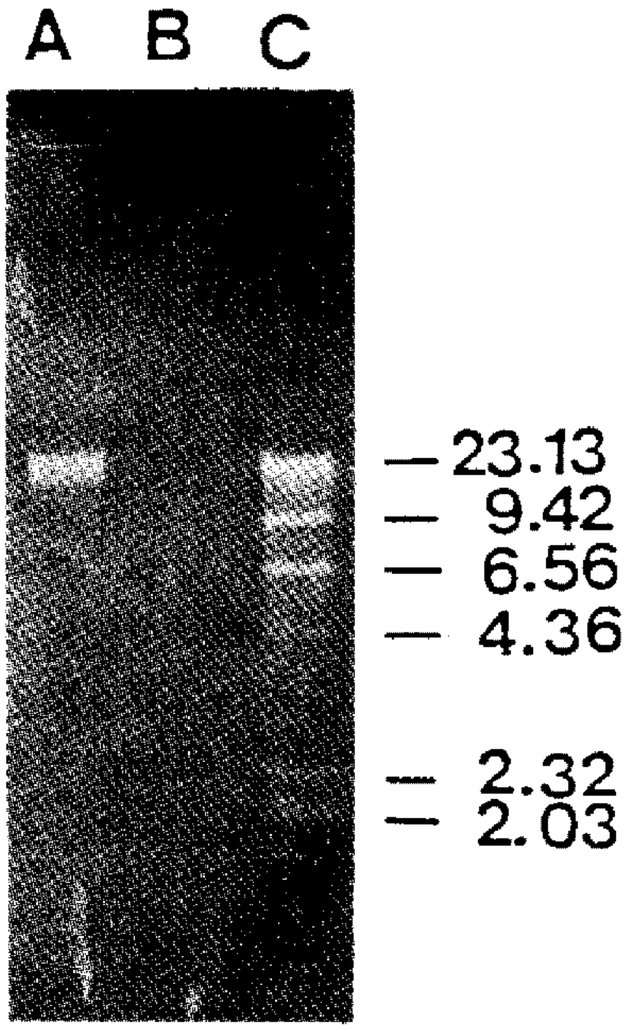


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the cryptic plasmid purified from *B. sphaericus* 1593 and the cured strain.
Lane A: Cryptic plasmid of *B. sphaericus* 1593, B: Cured strain of *B. sphaericus* 1593 by EtBr, C: λDNA digested with *Hind*III

항생물질 내성조사

내재된 cryptic plasmid의 제거를 확인하고, 형질전환에 사용할 plasmid들과 urease gene을 삽입한 recombinant plasmid의 저항성 marker를 선택하기 위하여 plasmid 기인성의 항생물질 저항성을 확인해야 될 필요가 있다. 이를 위해서 모기유충 방제균 *B. sphaericus* 1593 균주의 각종 항생물질에 대한 저항성을 조사한 결과 streptomycin, chloramphenicol, lincomycin, penicillin에 대해서 강한 저항성을 나타내었다. 이러한 결과는 Kalfon 등(15)에 의해 보고된 *B. sphaericus*의 항생제 내성 결과와 비슷한 내성 양상을 갖는 것으로 확인되었다. 또한 *B. sphaericus* 1593에 대한 각종 항생물질의 생육저해 최저농도, MIC를 조사한 결과 Table 1과 같았다. 9종의 항생물질을 대상으로 조사한 결과 streptomycin, chloramphenicol, penicillin, lincomycin의 경우는 200 μg/ml 이상의 항생물질 농도에서도 생육가능하였으나, ampicillin, kanamycin, gentamycin, erythromycin, tetracycline 등의 경우는 대단히 낮은 MIC를 나타낸다는 것으로 조사 되었다. 본 실험에 사용한 *B. sphaericus* 1593 균주는 streptomycin, chloramphenicol, penicillin, lincomycin에는 강한 저항성을 가진다는 것이 확인되었으므로 이들 저항성이 cryptic plasmid에 기인된

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MIC) and resistance of antibiotics against *Bacillus sphaericus* 1593

Antiotics	MIC (μg/ml)	
	B. sphaericus 1593	Cured 1593
Ampicillin	5	2
Kanamycin	2	2
Streptomycin	>400	5
Gentamycin	2	2
Erythromycin	2	2
Chloramphenicol	>200	5
Tetracycline	5	5
Lincomycin	>200	200
Penicillin	>200	5

MICs of 9 antibiotics were determined by agar diffusion test in nutrient agar. These plates were incubated at 30℃ and scored for growth at 48 hr.

것임을 plasmid 제거 균주와 비교하고 이를 이용해서 plasmid 제거를 확인하였다. 그 결과 Table 1과 같이 plasmid를 제거한 균주는 streptomycin, chloramphenicol, ampicillin 항생물질에 대한 저항성을 잃어버렸다. 따라서 plasmid 제거여부를 확인하는 resistance marker로 streptomycin과 chloramphenicol을 사용할 수 있었다.

Cryptic plasmid 소실의 확인

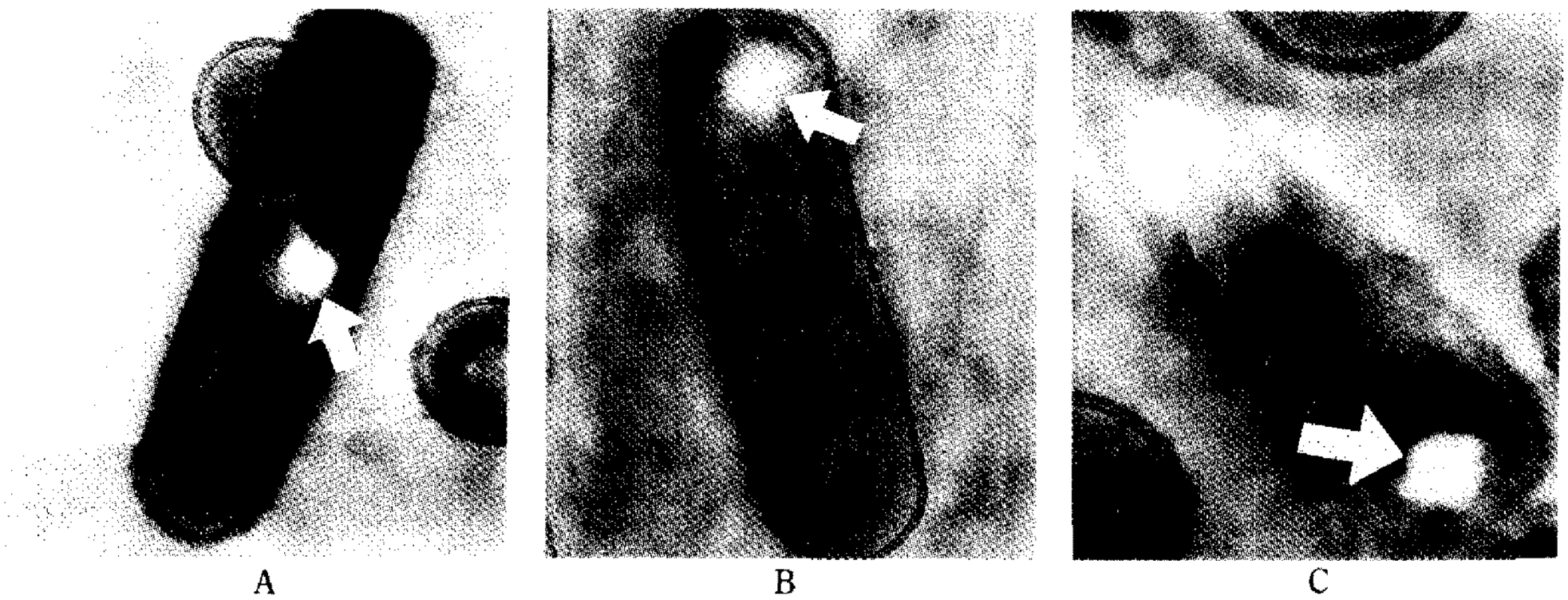
외부 유전자가 손 쉽게 도입될 수 있는 숙주로 만들기 위해서는 plasmid 불화합성인 *B. sphaericus* 1593 내에 내재되어 있는 cryptic plasmid를 제거시켜야 될 필요가 있다. 이를 위해서 돌연변이원인 ethidium bromide(EtBr)를 30 μg/m*l*까지 각 농도 별로 처리하면서 plasmid 제거율을 조사해 보았다. 그 결과 EtBr 15 μg/m*l*에서 60% 이상의 cryptic plasmid 제거율이 나타났으며, 치사율 또한 대단히 높게 나타났다(data not shown). EtBr 처리시간에 따른 plasmid 제거율을 조사해 본 결과 24시간 처리로 가장 높은 제거율을 보였다(data not shown). 이 결과는 김 등(16)의 *Streptomyces bobili* 경우와 서 등(17)의 *Bacillus subtilis* 경우 10 μg/m*l*의 EtBr 농도에서 가장 제거율이 높게 나타난다는 보고와 상이하게 이들보다 약간 높은 농도의 EtBr 존재하에서 plasmid 제거가 가장 잘 일어나는 것으로 나타났다. 한편 실제로 cryptic plasmid 소실 여부를 전기 영동 gel 상에서 확인하기 위하여 alkali lysis mini-prep 법에 의하여 조사해 본 결과 Fig. 2에서 나타난 것과 같이 확실히 plasmid가 제거되었음을 확인할 수 있었다.

Plasmid 제거 균주의 살충성 결정단백질 생산의 확인

모기유충방제균 *B. sphaericus* 1593이 plasmid 제거를 위해 사용한 강력한 돌연변이원인 ethidium bromide로 인해 야기될 수 있는 결정성 단백질 생성 유전자 부위의 손실 여부를 확인하기 위하여 cured *B. sphaericus* 1593의 독소단백 생산여부를 전자현미경으로 확인한 결과 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 결정성 단백질 생산에는 아무런 영향을 받지 않았음을 확인하였다. 또한 이 결과로서 *B. thuringiensis* 해충방제균의 경우 결정성 단백질 형성 유전자가 plasmid DNA 상에 있다는 보고(18)와 달리 *B. sphaericus* 1593 경우는 chromosomal DNA 상에 모기유충 방제의 결정성 단백질 생산유전자가 존재한다는 사실도 확인할 수 있었다.

Urease 유전자에 의한 형질전환

모기유충방제균 *B. sphaericus* 1593의 살충성단백질은 알칼리성 조건에서 활성력이 높아진다(8). 따라서 살충성 단백 주위를 알카리화 시키기 위해 urea의 urease 분해로 얻어지는 ammonia 생성 증가로 인한 pH 변화를 간접적으로 이용하고자 하였다. 이를 위해서는 이미 cloning 된 바 있는(9) *B. sphaericus* 1593과 같은 속인 *Bacillus* 성의 urease 유전자인 호알카리성 *Bacillus pasteurii*의 urease 유전자를 cured *B. sphaericus* 1593에 도입하였든 바 Table 2와 같이



A B C

Fig. 3. Electron microscopy of a thin section showing the inclusion of mosquito larvicidal protein in *B. sphaericus* 1593.

A: *B. sphaericus* 1593 before curing, B: *B. sphaericus* 1593 after curing of cryptic plasmid, C: *B. sphaericus* 1593 transformant (pGU66).

B. sphaericus 1593 were cultured on the nutrient agar at 30℃ for 5 days.

Arrow indicates the inclusion of larvicidal crystal protein.

Table 2. Transformation efficiency of plasmid vectors on the plasmid cured *B. sphaericus* 1593

Plasmid vectors	Size (Kb)	Plasmid conferred phenotype	No. of transformants (μg of DNA)
pUB110	4.5	Km^r	1.8×10^3
pGB215-110ΔB	8.5	Km^r, Amp^r	2.1×10^3
pGR71	8.4	Km^r, Cm^r	1.3×10^3
pGU66[a)]	18.9	Km^r, Cm^r, Ure^+	9.5×10^2

The cells of 8.5×10^8 /m*l* were transformed with various plasmids.
Number of regenerated protoplasts was 5.3×10^5 per m*l*.
Protoplast suspension (0.5 m*l*) were mixed with plasmids, and followed by addition of 3 m*l* of 40% (W/V) PEG4,000 in SMM buffer.
[a)] pGU66 was constructed with *B. pasteurii* urease gene in pGR71.

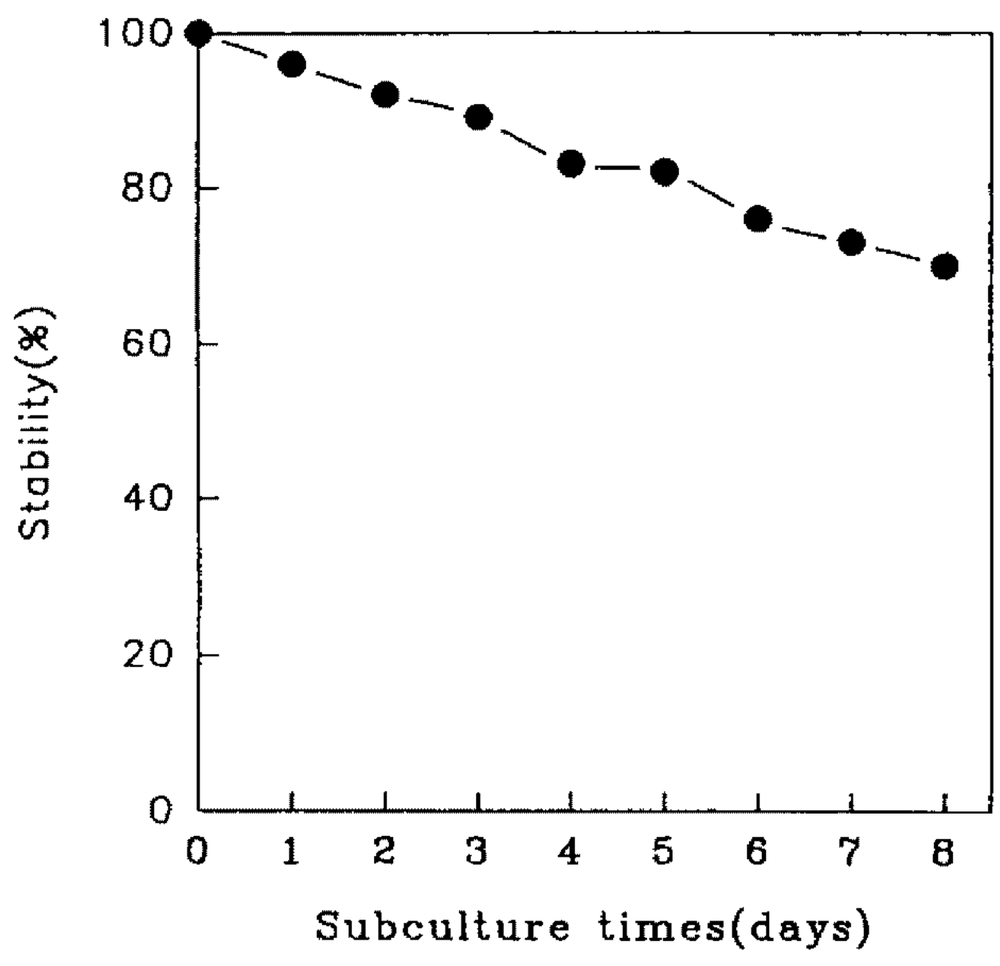


Fig. 4. Stability of the plasmid carrying *B. pasteurii* urease gene in the transformant (pGU66).

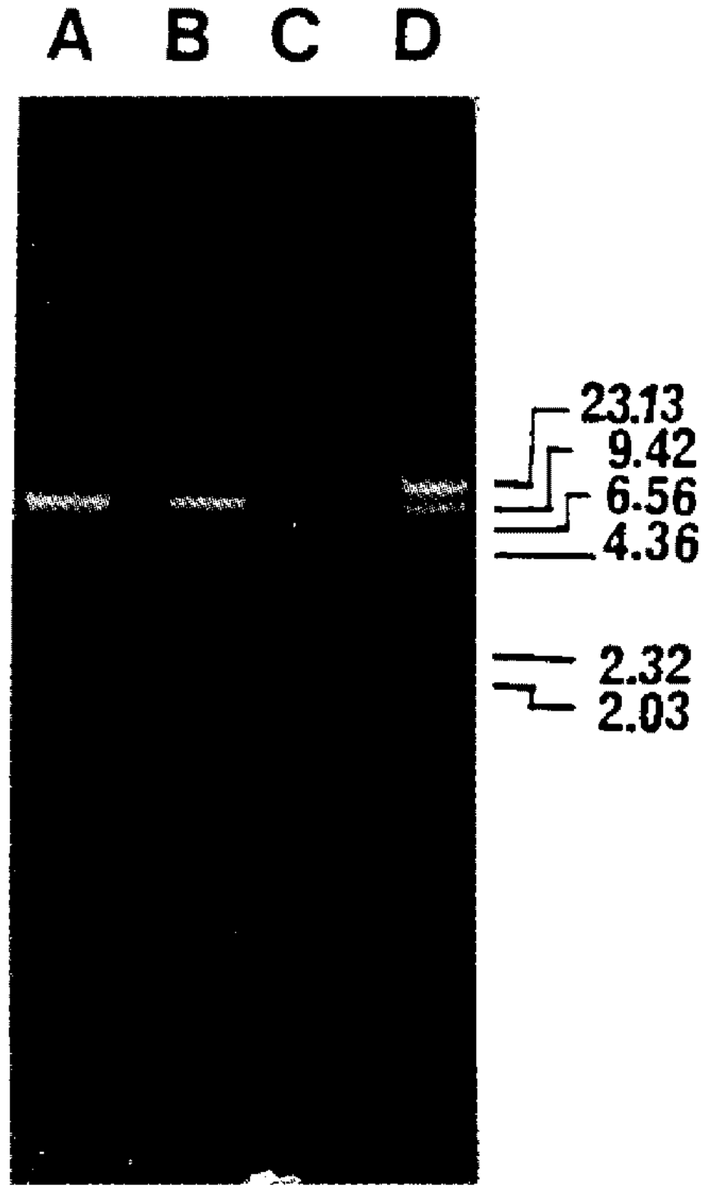


Fig. 5. Analysis of the pGU66 plasmid DNA carring *B. pasteurii* urease gene obtained from the transformant of *B. sphaericus* 1593 (pGU66) by agarose gel electrophoresis.
Lane A: pGU66 plasmid in *B. sphaericus* 1593 transformant, B: Purified pGU66, C: Cured *B. sphaericus* 1593, D: λDNA digested *Hind*III

결과 Fig. 4과 같이 연속적으로 8회 계대배양하여도 70% 이상의 plasmid가 유지되어 도입된 urease 유전자가 *B. sphaericus* 내에서 매우 안정하다는 것을 알 수 있었다. 아울러 *B. sphaericus* 1593 내에 도입된 pGU66의 존재와 변화여부를 확인하기 위해 transformant로부터 plasmid를 정제한 후 그 크기를 조사해 본 결과 Fig. 5와 같이 pGU66 고유 band도 확인할 수 있었다.

Urease 활성도의 증가

모기유충방제균 *B. sphaericus* 1593은 원래 urease를 아주 약하게 생산할 수 있다. 살충독소단백의 활성을 위한 ammonia 농도를 증가시키기 위해서는 아주 강한 urease의 생산성이 요구된다. 세균중 urease 생산성이 가장 강력한 *B. pasteurii*의 urease 유전자가 삽입된 recombinant plasmid pGU66으로 형질전환된 *B. sphaericus* 1593(pGU66)이 wild type 균주에 비해 urease 생산성이 얼마나 증가되었는 지를 조사하여 본 결과 Table 3과 같이 80% 정도나 증가되었음을 알 수 있었다. Urease에 의해 상승된 알카리 조건에 의해 실제 모기유충살충력이 증가하는지는 향 후 *in*

높은 빈도로 형질전환될 수 있음을 알았다. 대조구로 형질전환시켜 본 *Bacillus* 용 vector plasmid 들의 형질전환율 보다는 조금 낮은 9.5×10^2/μg DNA의 형질전환율이 나타났으나, 외부의 urease 유전자가 *B. sphaericus* 1593 내에서 효과적으로 발현됨을 확인하였다.

한편 *B. sphaericus* 1593 내에 도입된 urease 함유 plasmid pGU66이 항생물질이 존재하지 않는 일반배지에서 어느 정도 안정하게 유지되는 가를 조사해 본

Table 3. Urease activity of the *B. sphaericus* 1593 transformant

Strains	Relative activity (%)[a)]
B. sphaericus 1593	100.0
Cured *B. sphaericus* 1593	95.0
B. sphaericus 1593 transformant (pGU66)	181.9

[a)] Urease activity was measured by Nessler's method (13).

vivo 실험을 통해 실제로 살충력 증대를 확인함으로써 고찰할 수 있을 것으로 생각된다.

형질전환체의 살충성 결정단백질 생산의 확인

모기유충 방제균 *B. sphaericus* 1593이 urease 유전자 함유 pGU66 plasmid에 의해 형질전환된 형질전환체 *B. sphaericus* 1593(pGU66) 내에서 살충성 결정단백질이 변함없이 생산되는지 여부를 확인하기 위하여 절박한 표본을 투사형 전자현미경으로 확인하여 본 결과 Fig. 3에서 나타난 것과 같이 살충성 결정단백질이 wild type 균주인 *B. sphaericus* 1593과 비교하여 손상없이 생산됨을 확인할 수 있었다. 따라서 살충성 결정단백질의 주위 환경을 알카리화 시키는데 외부 urease 유전자를 도입하는 모기방제균의 유전적 육종방법의 기초를 마련할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

위생곤충이나 농업해충의 방제목적으로 남용되는 화학살충제의 피해를 줄이기 위해 *Bacillus sphaericus*를 이용하는 생물학적 해충방제법의 연구가 진행되고 있다. 모기유충방제균인 *B. sphaericus* 1593의 살충단백질은 alkali 조건하에서 활성도가 증가된다. Urea의 효소적분해로 ammonia의 생산을 증강하여 독소단백질 주위의 pH를 알카리화 할려는 시도를 하였으며, 이를 위해 세균성 urease의 생산유전자를 *B. sphaericus* 1593에 도입시키고자 하였다. Urease 유전자는 세균 중 urease 생산력이 가장 강한 *Bacillus pasteurii*의 urease 유전자를 cloning 한 재조합 plasmid pGU66을 사용하였다. *B. sphaericus* 1593 내에 있는 cryptic plasmid를 먼저 제거하고 원형질체 형질전환 방법으로 recombinant plasmid pGU66을 도입함으로서 80% 이상의 urease 활성 증가를 이룰 수 있었으며, 도입된 urease가 transformant 내에서 매우 안정하게 발현됨을 확인하였고, 아울러 urease 유전자로 형질전환된 *B. sphaericus* 1593(pGU66) 내에서도 모기유충 살충단백질이 변함없이 생산됨을 전자현미경으로 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Aronson, A.I., Beckman, W. and Dunn, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Reviews* **50**: 1-24.
2. Lois, K. Miller, A.J. Lingg, Lee, A. Bulla, Jr. 1983. Bacterial, viral, and Fungal Insecticides. *SCIENCE* **219**: 715-721.
3. Yousten, A.A. 1984. *Bacillus sphaericus*: microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv. Biotechnol. Processes.* **3**: 315-343.
4. Davidson, E.W. 1981. Bacterial diseases of insects caused by toxin-producing *Bacilli* other than *Bacillus thuringiensis.* In: Davidson. E.W, Held A (eds) *Pathagenesis of Invertebrate Microbial Diseases. N.Y., Osmun Totowa.* Pp. 269-291.
5. Baumann, P., Baumann, L., Bowditch, R.D. and Broadwell, A.H. 1987. Cloning of the gene for the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* 2362: evidence for a family of related sequence. *Journal of Bacteriology.* **169**: 4061-4067.
6. Elizabeth W. Davidson, M. Urbna, J. Payne, Mir S. Mula, H. Darwazeh, T. Dulmage, and J.A. Corra. 1984. Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 Spore Used as Larvicides in the Aquatic Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 125-129.
7. Mcdonald, K.O. and W.F. Burke, JR. 1984. Plasmid Transformation of *Bacillus sphaericus* 1593. *Journal of General Microbiology* **130**: 203-208.
8. Davidson, E.W. and P. Mayers. 1981. Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus. FEMS Microbiol. Lett.* **10**: 261-265.
9. Kim, S.D. and J. Spizizen. 1985. Molecular Cloning and Expression of *Bacillus pasteurii* Urease Gene in *Eschenichia coli. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 297-302.
10. Birnboim, H.C. 1983. A rapid alkaline extriction method for the isolation of plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* **100**: 243-255.
11. Bechtel, D.B. and L.A. Bulla, Jr. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol.* **127**: 1472-1481.
12. Chang, S. and S.N. Cohen. 1979. Transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by Plasmid DNA.

Molec. Gen. Genet. **168**: 111-115.
13. Norris, R. and K. Brocklehurst. 1976. A Coventient Method of Preparation of High-Activity Urease from *Canavalia ensiformis* by Covalent Chromatography and an Investigation of its Thiol Groups with 2,2-Dipyridyl disulphide as a Thiol Titrant and Reactivity Probe. *Biochem. J.* **159**: 245-257.
14. Datta, N. 1979. Plasmid classification; incompatibility grouping. In Plasmid of Medical, Environmental and Commerical Importance(K.N. Timmis and A. Puhler, eds.), Pp. 3-12. Elsevier, Amsterdam.
15. Kalfon, A., J.F. Charles, C. Bourgouin, and H. de Barjac. 1984. Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297: an electron microscope study of crystal-like inclusions, biogenesis and toxicity to mosquito larvae. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 893-900.
16. Kim, S.D. and J.H. Do. 1985. Elimination of R-plasmid in *Streptomyces bobili* (YS-40) by Ethidium Bromide. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **10**: 289.
17. Hong, Y.K. and J.H. Seu. 1985. Curing Action of Antibiotic Resistant Factor in *Bacillus subtilis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **13**: 103.
18. Payne, J.M. and E.W. Davidson. 1984. Insecticidal activity of the crystalline parasporal inclusions and other components of *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex. *J. Invertbr. Pathol.* **43**: 383-388.

(Received 19 April 1995)