

Bacillus cereus의 RK-溶原 파아지에 관한 研究

李 泰 雨

충주사범대학 생물교육과

Studies on the RK-temperate phage of *Bacillus cereus*

Rhee Tai-Woo

Department of Biological Education, Cheongju University of Education

The RK-temperate phage which infected with *Bacillus cereus* was isolated and the characters were investigated. The induction of RK-temperate phage from host bacterium attained by ultraviolet light irradiation (15W, 30cm, 30-120sec) and mitomycin C treatment (0.2-2 ug/ml). The host range of RK-temperate phage was not revealed with lysogenic and related strains of *B. cereus*. But *B. cereus* (PS) 352 which obtained by N-nitrosoguanidine treatment (1,000 $\mu\text{g/ml}$) to phage infected with host bacteria was sensitive bacteria of RK-temperate phage. RK-temperate phage was stabilized at the condition of nutrient broth (pH 7-8), Tris-buffer (pH 7-8), ammonium buffer (pH 8-9) and Sørensen's phosphate buffer (pH 6-7), but unstabilized at other salt solutions and pH range. Also, thermostability was to 45°C but unstabilized at above 50°C.

At RK-temperate phage, the measurement values of head, neck, mid tail and end tail were 59 nm, $9 \times 16\text{nm}$, $10 \times 189\text{nm}$, and $10 \times 14\text{nm}$ respectively. The morphology of head was regular polyhedron, and the end tail was coneate form. On the one hand, the number of capsid protein layer of tail were consist of 4, 35, and 1 at neck, mid tail, and end tail, respectively. RK-temperate phage was identified with DNA phage and G + C contents were 38.63. The latent time of RK-temperate phage was 30 minutes and the burst size was 70-80. And the host bacteria was lysed in case of multi-infection, above moi 1.

Bordet와 Ciuca (1921), 그리고 Gildemeister (1921)에 의해서 자연계로 부터 분리한 세균내에는 溶原性(lysogenic)의 파아지가 존재한다는 사실이 처음으로 제안되었다. 그후 Bail (1925)과 Bordet (1925)는 비용원성세균이 용원계통이 가지고 있는 파아지에 감염되면, 감염된 균의 일부는 용원되지 않고 계속하여 생존한다는 사실이 발견되었고, 그후 감염된 파아지가 prophage의 상태로 계속적으로 균체내에 존재하여 용원균의 分枝系를 이룬다는 사실도 밝혀졌다. 그리고 이러한 사실을 근거로 하여 인위적인 용원계통도 만들어지게 되었다. 이는 생물체가 특정한 외부로 부터 들어온 입자

에 의해서 특이적인 유전적 성질의 변화가 야기되는 사실을 밝혀낸 최초의 예인 것이다(Lwoff, 1953). 이와같이 비용원성의 세균이 용원 파아지의 감염에 의해서 자신의 세놈에 파아지의 세놈이 부가되어 증식하는 유전적 성질의 변화가 생기므로 경우에 따라서 溶菌性反應과 溶原性反應을 반복하며 생존하는 양상을 나타내게 된다.

용원성의 반응이 나타나는 것은 용원균의 번역성인자인 cytoplasmic factor 즉 repressor의 생성이 방해를 받아 용원상태가 된다고 설명하고 있다. (Jacob & Monod, 1961). 그리고 억제인자의 생성이 저해를 받는 것은 이렇기

시 생리적 조건의 변화에 의해 야기 될 수 있기 때문에 용원성 세균을 배양할 때는 일부 용원이 계속되므로 비용원성 세균에 비해서 수율이 떨어지는 결과를 야기하고 있다.

이와같이 용원파아지의 감염은 생산성을 저하시키며, 일단 용원균이 된 다음 비용원성세균으로의 전환이 매우 어려운 점으로 볼 때 용원파아지의 본질추구는 좀 더 이루어져야 할 것이다.

材料 및 方法

使用菌株 및 培地

숙주균으로는 *Bacillus cereus*를 사용하였고, 배지는 nutrient broth를 사용하였다.

파아지의 분리 및 정량

용원파아지의 유발; 숙주균에 자외선 (15W, 30cm)을 30~120초 동안 조사하여 용균을 유발시키거나, 약제로서 mitomycin C (0.2~2 μ g/ml)를 처리하여 용균을 유발시킨 다음 이를 원심분리하여 파아지액으로 사용하였다.

파아지 감수성 균주의 개발, 감수성 균주의 선별은 既知의 *Bacillus*속 세균과 자연계에서 random하게 분리한 여러 균주를 대상으로 파아지액을 spot하여 용균여부로서 감수성 균주를 선별하였다. 감수성 돌연변이균주의 선별은 자외선을 용원균에 조사하거나 N-nitrosoguanidine을 여러 농도로 처리한 후 spot test하여 용균되는 균주를 선별하였다. 그리고 mitomycin C를 처리하여 비용원성 세균임을 확인하였다.

파아지의 정량; 중층법(double layer method)으로 溶菌斑(plaque)을 형성시켜 정량하였다.

分離한 파아지의 特性

숙주역의 결정; 檢定菌이 파아지에 의해 용균되는가를 알기 위해 spot test하였는데 37°C로 15~24시간 배양시킨 후 판정하였다.

溶原性的 판정; 숙주균을 여러번 순화시켜 배양액내에 독성파아지가 존재하지 않는 것을 확인한 후에 숙주균에 약제를 처리하거나 자외선을 조사하여 용균되는 사실로서 판정하였다.

파아지의 安定性; 희석액내에서의 안정성은 0.2M Tris-buffer로 10¹²PFU/ml되게 농축한

파아지액을 피검액으로 하여 이를 여러가지 희석액으로 10¹⁰PFU/ml되게 희석하여 37°C로 24시간 반응시킨 후 잔존파아지를 정량하였다(Hongo et al., 1965 II).

pH안정성은 배지의 pH를 N-NaOH와 N-HCl로 조정한 후에 10¹⁰PFU/ml의 파아지액 0.1 ml씩을 소정 pH의 배지 9.9ml에 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후에 잔존파아지를 정량하였다(Hongo et al., 1966 IV). 또 여러가지 pH의 완충액(McIlvaine's buffer, Tris-buffer, phosphate buffer, ammonium-acetate buffer)으로 10¹⁰PFU/ml되게 희석하여 37°C에서 24시간 반응시킨 후 잔존파아지를 정량하였다. 溫度不活性化는 파아지액(10¹⁰PFU/ml) 0.1ml를 미리 소정의 온도로 예열시킨 배지 9.9ml 속에 넣고 30분 후에 잔존파아지를 정량하였다.

파아지의 전자현미경적 관찰; 파아지액의 농축 및 정제는 Hongo et al. (1966 III)의 방법을 따랐다. 즉 용균액을 저속원심분리(6000 × g, 15min)하여 殘査는 버리고 上清을 membrane filter (0.45 μ)로 여과한 후 이를 다시 고속원심분리(30,000 × g, 60분)하여 Tris-buffer로 한번 세척하여 고역가의 파아지액을 정제하였다.

전자현미경 시료의 작성은 'electronmicroscopic grid(銅 3mm, 150mesh)에 濕式法으로 collision 막을 덮어 기건한 후 slide glass 위에 옮겨 carbon蒸着하였다. 이 mesh 하나를 잡고 정제 농축한 파아지 용액의 표면에 가볍게 mesh의 표면을 접촉시킨 후 기건시키고, 다시 같은 방법으로 uranyl-acetate용액의 표면에 접촉시킨 다음 관찰하였다. 사용한 전자현미경은 JEM200CX (Japan Electron Optics Laboratory Ltd.)였다.

파아지의 생육특성; 一段增殖實驗은 Ellis & Delbrück (1939)의 방법에 의했다. 즉 균액(1 × 10⁸ cells/ml) 0.9ml와 파아지액(1 × 10⁸ PFU/ml) 0.1ml를 섞어 37°C에서 5분간 흡착시켰다. (感染重度: 10) 이 반응용액에 K=10의 항원정 0.1ml를 넣고 5분간 반응시킨 다음 1:10 배로 희석하여 항원정 10의 작용을 없앤 후 일정시간마다 0.1ml씩을 취해 파아지 plaque 수를 정량하였다(Hongo et al., 1966 V). 이때 파아지

의 용원화를 방지하기 위하여 배지에는 mitomycin C를 0.2 $\mu\text{g/ml}$ 되게 첨가하였고, 자외선(15 W, 30cm, 30sec)도 조사하였다. 파아지에 의한 용원실험은 9 ml의 액체배지를 넣은 T-시험관에 숙주균을 OD₆₆₀ 0.1 되게 접종하여 37°C로 진탕배양 하면서 OD₆₆₀ 0.3이 되었을 때 파아지를 접종시켜 용원정도를 측정하였다(Hongo et al., 1966 IV).

파아지의 핵산; 파아지 농축액을 trypsin (50 $\mu\text{g/ml}$)과 RNase (50 $\mu\text{g/ml}$) 및 DNase (2 $\mu\text{g/ml}$)로 30°C에서 30분간 처리한 후(Hongo et al., 1966 III) 3번 더 원심분리하여 이들 효소를 제거하고 2 $\times 10^{12}$ PFU 되게 Tris-buffer로 현탁시켜 사용하였다. DNA의 추출은 Hirose (1973)의 방법에 의했다. DNA의 2중나선은 온도상승에 따라 변성이 일어나므로(Doty, 1961) 온도변화에 따른 DNA용액의 흡광도를 측정하였다. 방법은 Marmur & Doty (1962)의 방법을 따랐으며 염기 조성율은 G + C = (Tm - 69.3) / 0.41에 의해 계산하였다.

結果 및 考察

*Bacillus cereus*를 액체배지에서 배양할 때 일시적인 생육정체현상 내지는 부분적인 균량 감소의 현상이 나타난다. 이러한 원인을 규명하는 과정에서 이과성, 전파성, 숙주특이성등을 조사하였으나 전형적인 독성파아지의 오염 현상은 없었다. 그러나 본 균주는 UV 조사나 mitomycin C의 처리에 의해 전형적인 용원현상을 나타냈으므로 본 균주가 용원균인 때문에 생육저해현상이 나타난 것으로 판단되었다.

파아지의 命名

*Bacillus cereus*균에 UV를 조사시키거나 mitomycin C를 처리하여 얻은 용원액 속에 포함되어 있는 파아지를 형태적으로 조사한 결과 동일한 파아지로 판단되었으므로 본 균주의 용원 파아지를 RK-용원파아지로 명명하였다.

RK-溶原 파아지의 誘發

Prophage의 유발은 용원세포의 prophage에 대한 면역성인자 즉 세포질인자에 기인하며(Bertani, 1958), 이러한 억제인자는 prophage의 초기단

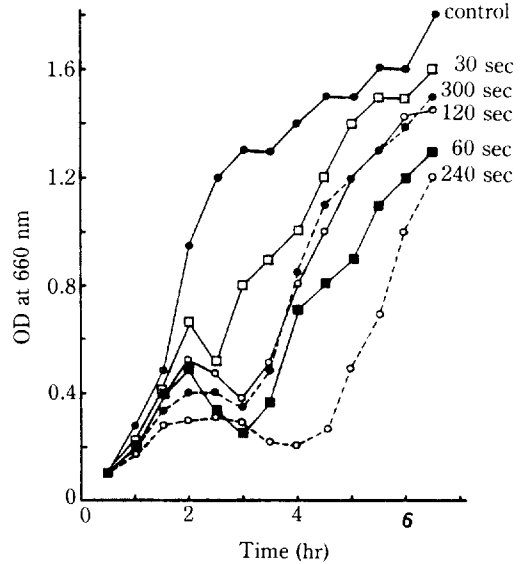


Fig. 1. Effect of ultraviolet light for induction of RK-temperature phage in *Bacillus cereus*.

백집합성을 특이적으로 저해하는데, 자외선이나 약제에 의해 prophage가 유발되는 것은 세포내에 있던 억제인자가 이들에 의해 파괴되어 일시적으로 양이 감소되므로 prophage의 초기 단백질 합성이 시작될 수 있는 때문이라고 한다 (Jacob, & Monod, 1961). 그러므로 본 실험에서는 UV를 조사하거나 mitomycin C를 처리하여 용원파아지를 유발시켰는데 그 결과는 Fig. 1, 2

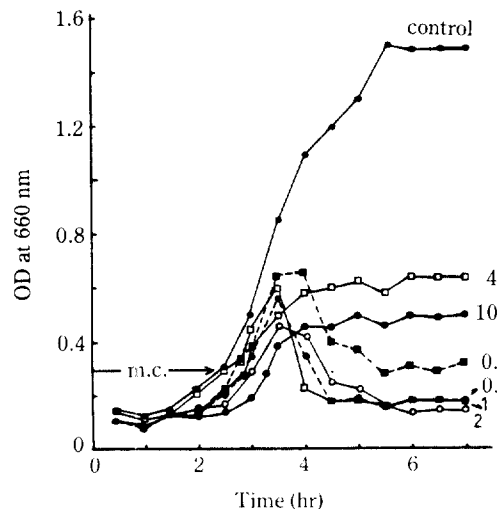


Fig. 2. Effect of mitomycin C for induction of RK-temperature phage in *Bacillus cereus*.

와 같다. 자외선을 조사한 경우에는 (15W, 30 cm) 60초에서 가장 용균이 잘 되었고, mitomycin C를 처리하였을 경우에는 최소 0.2 μ g/ml에서 최고 2 μ g/ml의 농도의 범위에서는 비슷하게 용균되었으나 그 이상의 농도에서는 용균이 일어나지 않았다.

宿主域

독성파아지의 숙주역은 매우 특이적이어서 단일균종내에서도 파아지에 감염되지 않는 저항성의 변종이 존재하기도 하며, 한편 유사균종간에도 감염되는 多重毒性을 나타내기도 한다. (Oki et al., 1964 I) 그러나 용원파아지는 약독성파아지로서 용균능이 약하고 균체내에서 용원화되기 때문에 숙주역이 잘 알려져 있지 않

다. 특히 용원균은 그 면역성 때문에 파아지를 유발시킨 균종도 용원파아지에 용균되지 않는 특성을 나타낸다. 그러므로 용원파아지에 용균될 수 있는 균종은 비용원성의 동일균종이거나 용원균이더라도 면역체계가 다른 균종에 감염된 경우에는 용균될 수 있다. 그러므로 Bacillus속 세균중에서 *B. cereus*와 *B. cereus*의 유연균종인 *B. cereus*, *B. moritai*, *B. thuringiensis* 등에 대해 집중적으로 조사하였다 (Table 1). 왜냐하면 유연균종간에서 독성파아지와 용원파아지가 상호변환되는 상관관계가 있는가의 여부를 판정하기 위해서였다. 그러나 용균된 균종은 찾지 못하였는데 특히 *B. moritai*와 파스티르연구소에서 분양받은 *B. thuringiensis* (F)는 비용원균이었으나 용균되지 않는 것으로 미루어, 본 RK-용원파아지와 이들 균종간에는 숙주관계가 성립되지 않는 것으로 판단되었다. 한편 용원균인 *B. cereus* (F) 역시 용균되지 않은 것은 *B. cereus* (F)에 감염된 용원파아지와 RK-용원파아지는 면역체계가 같은 파아지일 것이다. 그러므로 RK-용원파아지의 숙주역은 특이적으로 *B. cereus*에만 한정되는 것으로 사료된다.

RK-용원파아지 感受性菌株의 개발

RK-용원파아지의 감수성균주를 얻기 위해 본 *B. cereus* 균체내에 감염되어 있는 RK-용원파아지의 DNA를 불활성화 시키고자 시도하였다. 먼저 자외선 (15W, 30cm)을 조사한 경우 300초 이상에서는 본 균주가 용균되지 않는 반응을 나타냈으나 감수성을 나타내는 균주는 검출되지 않았다. NTG (N-nitrosoguanidine)를 처리한 경우에는 여러 농도에서 많은 변이주가 나타났으나 감수성균주는 1,000 μ g/ml의 고농도로 1시간 처리한 경우에 비로소 RK-용원파아지 용액에 용균되는 여러 균주가 나타났다. 그러나 용균되는 균주도 대부분 용원균이었는데 이러한 현상은 파아지의 DNA는 손상받지 않고 숙주의 면역계통에 손상이 생겨서 나타나는 용균현상으로 사료된다. 그러므로 용균되는 여러 균주를 다시 mitomycin C로 처리하여 용원균은 제외시켰으며, RK-용원파아지에 감수성을 나타내는 비용원성균주인 *B. cereus*의 변이주 *B. cereus* (PS) 352를 분리하였다. 본 변이주는 배양

Table 1. Host range of RK-temperate phage of *Bacillus cereus*.

Tested bacteria	RK-temperate phage
<i>Bacillus cereus</i>	--
<i>Bacillus cereus</i> (F)	--
<i>Bacillus cereus</i> (PS) 352	+
<i>Bacillus moritai</i>	--
<i>Bacillus subtilis</i>	--
<i>Bacillus natto</i>	--
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>alesti</i>	--
" var. <i>canadensis</i>	--
" var. <i>darmstadiensis</i>	--
" var. <i>dendrolimus</i>	--
" var. <i>entomocidus</i>	--
" var. <i>finitimus</i>	--
" var. <i>galleriae</i>	--
" var. <i>israelensis</i>	--
" var. <i>kenyae</i>	--
" var. <i>kurstaki</i>	--
" var. <i>morrisoni</i>	--
" var. <i>solto</i>	--
" var. <i>thompsoni</i>	--
" var. <i>thuringiensis</i>	--
" var. <i>thuringiensis</i> (F)	--
" var. <i>tolworthi</i>	--
" var. <i>toumanoffii</i>	--

+ : lysis, -- : no lysis

시 배지를 갈색으로 변화시키는 특징이 있으며 용원화율이 매우 낮은 특징을 나타냈다.

溶菌斑의 형태

용균반의 형태는 0.5mm 이하로 매우 작으며, 주연이 뚜렷하지 않고 또 중심부에 작은 용원균의 colony가 나타나는 특징 때문에 설명하지 못하였다.

파아지 感染能에 미치는 影響

염류용액에서의 안정성 ; 용액내의 양이온은 흡착과정에 필요한 세포벽 구조에 미묘한 변화를 야기시킨다고 한다(Stent, 1963). 이와같이 파아지가 보존되고 있는 용액은 파아지의 안정성유지에 매우 중요하다. 왜냐하면 용액에 따라서는 독성이 계속 유지되지 못하여 감염능이 크게 저하되거나 또는 파아지입자가 파괴되기도 하는데 이는 숙주의 receptor 단백질과 결합하는 파아지단백질이 불안정해지거나 미부단백질이 해리되는 때문이다.

RK-용원파아지는 약독성의 파아지이기 때문에 용균능은 약하나 배지(pH 7) 내에서는 안정하였다. 한편 완충용액내에서는 특히 Tris 완충액, ammonium 완충액, Sørensen의 인산 완충액에서 안정하였으나 초산완충액이나 McIlvaine의 완충액에서는 불안정하였다. 그리고 식염수나 증류수에서는 매우 불안정하였다(Table 2).

pH 안정성 ; RK- 용원파아지의 pH안정성은 배지의 경우 pH 7 - 8의 범위내에서 안정하였는

데 이러한 결과는 숙주균의 생육최적범위와 일치되는 소견이었다. 한편 완충액내에서는 종류에 따라 pH안정성의 범위에 차이가 있었는데 Tris 완충액에서는 배지와 같은 pH 7~8에서 안정하였으나 ammonium 완충액에서는 pH 8~9에서 안정성을 나타냈다. 또 인산완충액의 경우, Sørensen의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{KH}_2\text{PO}_4$ 완충액에서는 pH 6~7에서 안정하였으나 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 완충액에서는 pH 6에서만 비교적 안정하였다. 이와같이 K^+ 이온이 포함된 완충액에서 더 안정하였는데 이는 파아지의 안정성이 pH에 의해서만 단순하게 영향을 받는 것이 아니라 염류용액내에 포함된 ion의 종류가 안정성에 큰 영향을 미치는 때문이다.

온도 불활성화 ; 독성파아지가 불활성화 되는

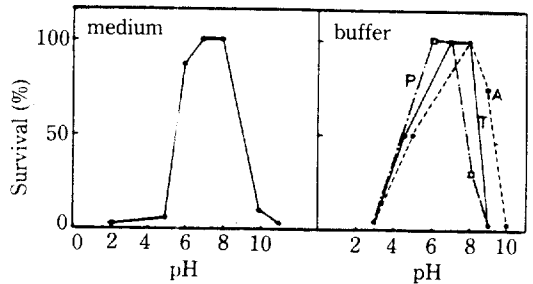


Fig. 3. pH stability of RK-temperate phage in nutrient medium and various buffer solution
P: phosphate buffer
A: ammonium buffer
T: Tris-buffer

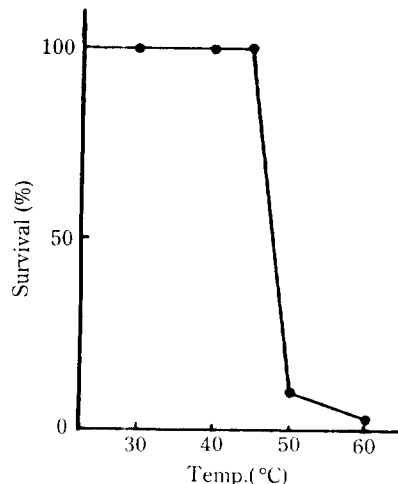


Fig. 4. Thermostability of RK-temperate phage in nutrient broth.

Table 2. Co-factor requirement of RK-temperate phage in various salt solution.

Salt solution	Phage survivals (%)		
	pH ₆	pH ₇	pH ₈
Nutrient broth	95	100	100
Pure water	10	20	20
Physiological salt solution	30	40	40
M/15 Na_2HPO_4 -M/15 KH_2PO_4	100	100	90
M/15 Na_2HPO_4 -M/15 NaH_2PO_4	100	90	80
McIlvaine's buffer	70	95	60
0.02M Tris-buffer	90	100	100
0.02M Tris-buffer · 10 ⁻³ M Mg^{++}	95	100	100
0.1M Ammonium buffer	-	-	100
0.2M Acetate buffer	40	-	-

온도는 대체로 60°C 전후인데 RK-용원파아지는 45°C까지는 별차이 없이 안정되었으나 50°C에서는 용균능이 현저하게 저하되는 결과를 나타냈다. 그러나 65°C에서도 완전히 불활성화되지는 않았다(Fig. 4).

RK-溶原 파아지의 性状

파아지의 형태; RK-용원파아지는 頭部와 尾部로 구분되는 보편적인 형태의 파아지인데 두부의 크기는 Bacillus속 세균들의 여러 파아지에 비해서 비교적 작으며 또 미부에는 終板이나 尾部纖維가 없는 단순한 구조를 나타내고 있다. 그러나 미부의 말단부가 보편적으로 편평한데 비해서 말단부가 쉼기형으로 되어 있는 특징이 있고, 또 頸部도 뚜렷하게 나타나고 있다(Plate 1, 2, Fig. 5). 두부의 크기는 지름이 59nm의 정다면체이고, 미부는 경부와 말단부를 합쳐서 총 길이가 205nm인데, 그중 경부의 길이는 16nm이고 末端尖部의 길이는 14nm이다. 그리고 폭은 경부만 9nm이고 나머지는 10nm였다. 尾長/頭長의 비는 3.47로서 *B. mega-*

*terium*의 G파아지 보다는 작았으나 *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. stearothermophilus* 등 대부분의 Bacillus속 세균의 파아지 보다는 미부가 두부에 비해 긴 편이었다. 한편 미부를 구성하고 있는 capsid 단백질의 층은 말단첨부를 제외하고는 모두 39층으로 되어 있는데 그중 경부가 4층으로 되어 있다.

파아지의 핵산; 파아지의 핵산을 조사한 결과, RK-용원파아지는 DNA 파아지였다. 온도변화에 따른 DNA의 변성을 조사한 결과, Fig. 6과 같이 전형적인 온도변성곡선을 나타냈으므로 이 온도변성곡선으로부터 G+C의 값을 구하였는데 G+C의 값은 36.83이었다. 이러한 G+C의 값은 Bacillus속 세균의 DNA 파아지의 값인 35~45범위내에 해당되는 값이었다.

파아지의 감염 및 증식; 一段増殖實驗은 파아지의 増殖能에 대한 확실한 판정을 위하여는 Ellis & Delbrück(1939)에 의해 고안된 일단 증식실험이 시행된다. 일반적으로 용원파아지의 증식능을 밝히기 위한 일단증식실험은 거의 시

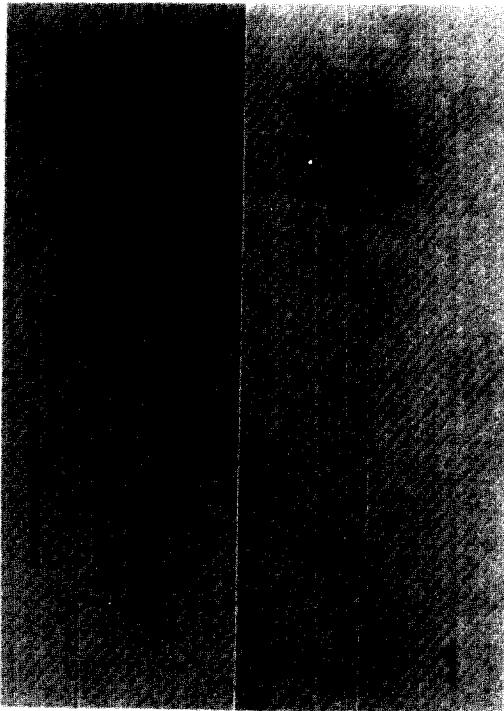


Plate 1. Electron micrograph of RK-temperate phage (scale : 50 nm)

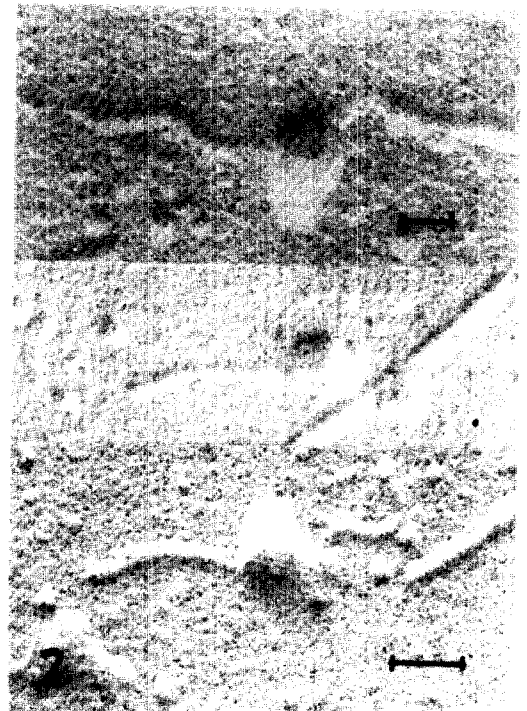


Plate 2. Electron micrograph (metal shadowing) of RK-temperate phage (scale : 100 nm)

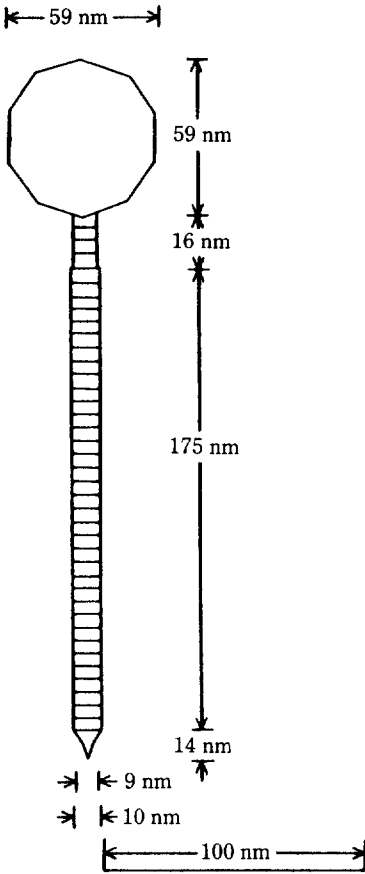


Fig. 5. Schematic morphology of RK-temperate phage

행된 예가 없는데 왜냐하면 용원파아지는 쉽게 숙주균에의 용원화가 일어나기 때문에 정확성을 기하기가 매우 힘들기 때문이다. 그러나 본 실험에서는 숙주균의 용원화를 막기 위해 상·하층 배지에 mitomycin C (2 μ g/ml)를 첨가하였고 또 증충후 즉시 자외선을 조사(15W, 30cm, 30sec) 함으로써 숙주균의 용원화율을 1%이하로 낮출 수 있는 새로운 방법을 고안해 냈기 때문에 정확성을 기할 수 있었고, 특히 배지에 mitomycin C를 첨가함으로써 plaque의 구별이 훨씬 용이하였다.

한편 파아지의 생육조건은 숙주균의 최적생육 조건과 일치하므로 (Rhee, 1979) pH 7, 37°C에서 시행하였다. 그 결과 Fig. 7과 같이 잠복기는 30분이었고 파아지 방출수는 70~80particle/cell이었다.

파아지 감염에 따른 용균양상; 파아지의 증

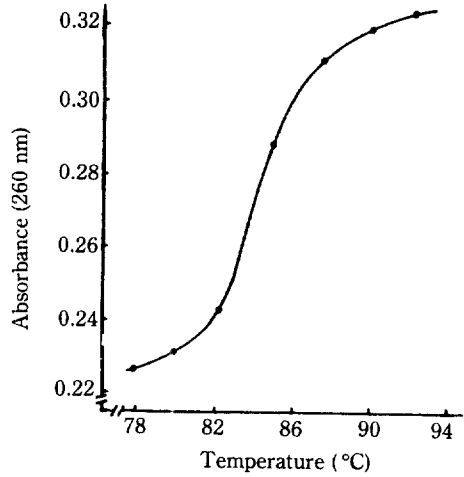


Fig. 6. Thermal denaturation curves of RK-temperate phage DNA.

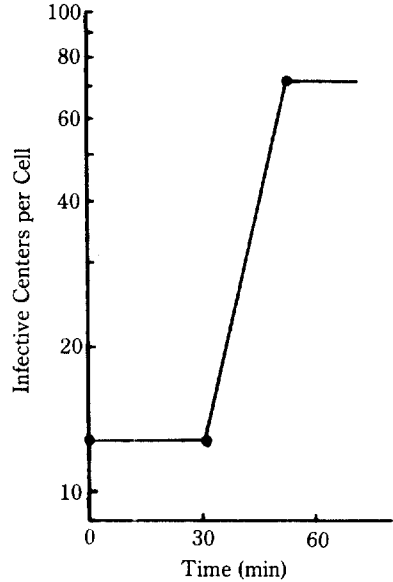


Fig. 7. One-step growth curve of RK-temperate phage.

식은 일단증식실험 이외에도 배양액의 탁도 변화를 조사하여 증식양상을 조사해 낼 수 있다. 대체로 세균배양액내에 파아지가 감염되면 일정한 시간뒤에 탁도가 떨어지는데 이때 탁도가 떨어지는 정도는 숙주균의 수에 대한 감염파아지 수의 비(moi)에 따라서 차이가 생긴다. 특히 독성파아지의 경우에는 이러한 용균현상이 moi에 따라 현저한 차이를 나타내는데, burst size가 큰 경우에는 moi가 작더라도 시간이 경과되면

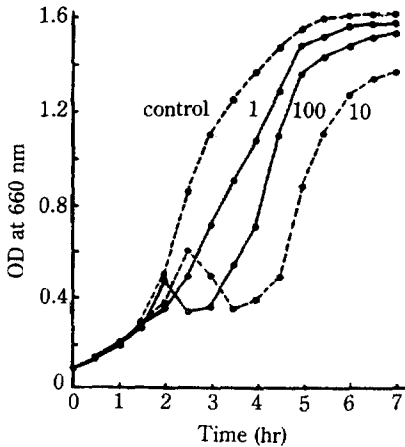


Fig. 8. Lysis of *Bacillus cereus* (PS) 352 by RK-temperate phage at different moi, (—): moi. (phage/bacterium).

摘 要

*Bacillus cereus*에 감염된 RK-용원파아지를 분리하여 그 성상을 조사하였다. RK-용원파아지는 숙주균에 자외선 (15W, 30cm, 30~120sec)을 조사한 경우와 mitomycin C (0.2~2 μ g/ml)로 처리하였을 경우에 유발되었다. RK-용원파아지는 자연상태에서 용원균인 *B. cereus* 및 *B. cereus*와 유연관계가 깊은 모든 *Bacillus*속 세균에 대해서 숙주성을 나타내지 않았다. 그러나 용원균인 *B. cereus*를 N-nitrosoguanidine (1,000 μ g/ml)으로 처리하여 얻은 돌연변이주인 *B. cereus* (PS) 352는 RK-용원파아지에 감수성을 나타냈다. RK-용원파아지는 nutrient broth (pH 7~8)와 0.2M Tris-완충액 (pH 7~8), 0.1M ammonium완충액 (pH 8~9), Sørensen의 $\frac{M}{15}$ 인산완충액 (pH 6~7)에서 안정하였으나, 다른 희석액이나 pH범위에서는 불안정하였다. 또 온도변화에 따른 활성도는 45 $^{\circ}$ C까지는 안정하였으나 50 $^{\circ}$ C 이상에서 부터는 급격히 불활성화되었다. RK-용원파아지의 형태는 정다면체의 두부와 단순하고 긴 미부로 되어 있는데, 미부는 경부와 중간부 및 말단부로 구별된다. 크기는 두부의 지름이 59nm, 경부는 9 \times 16nm, 중간부는 10 \times 189nm, 말단부는 10 \times 14nm의 쉼기꼴을 하고 있다. 한편 미부를 구성하고 있는 capsid단백질의 층은 경부가 4층이고, 중간부가 35층 말단부가 1층으로 되어 있다. 그리고 RK-용원파아지는 DNA파아지이며 G+C의 함량은 36.83이었다. RK-용원파아지의 잠복기는 30분으로 매우 짧았고, burst size는 70~80이었다. 그리고 moi 1 이상의 다중감염의 경우에만 숙주균이 용균되었다.

REFERENCES

- Alpendix, C. 1977. Temperate bacteriophage. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Bail, O. 1925. Der Colistamm 88 von Gildemeister und Herzberg. *Med. Klin.* (Munich), 21:1271.
- Bertani, G. 1958. Lysogeny. *Adv. Virus Research.* 5:151. [46, 296, 304, 320]
- Bordet, J. and M. Ciuca. 1921. Evolution des cultures de Coli lysogenes. *C. R. Soc. Biol.*, 84:747.
- Bordet, J. 1925. Le probleme de L'autolyse microbienne transmissible ou du bacteriophage. *Ann. Inst. Pasteur.* 39:711. [81, 288, 293, 327].
- Charles, L. Saxe III. and N. H. Mendens. 1984. Morphological and genetic characterization of a bacteriophage resistant *Bacillus subtilis* macrofiber producing strain. *J. of Bacteriol.*, 157:109.
- Couturier, M. 1976. The integration and excision of the bacteriophage Mu-1, *Cell*, 7:155.
- Dianne, C. Sympons and B. Hodgson. 1982. Isolation and properties *Bacillus brevis* mutants. *J. of Bacteriol.*, 151:580.

9. Doty, P. 1961. Polynucleotide and nucleic acid. *J. Polymer Sci.*, **55**:1.
10. Edward, A. Brige. 1981. Bacterial and bacteriophage genetics. Springer-Verlag, N.Y.
11. Ellis, E.L., and M. Delbrück. 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.*, **22**:365. [18, 40, 41, 67, 69, 70, 71, 81, 369].
12. Gildemeister, E. 1921. Über das d'Hérellesche phänomen. *Berlin. klin. Wochschr.*, **58**:1355.
13. Hiroaki Kagawa, N. Ono, M. Enomoto, and Y. Komeda. 1984. Bacteriophage Cho sensitivity and motility of *E. coli*. *J. of Bacteriol.*, **157**:649.
14. Hirose, H. 1973. Preparation of bacterial and phage DNA. method in nucleic acid research (2nd ed.) Kyoritsu Shuppan Co., Ltd. 4-8.
15. Hongo, M., and A. Murata. 1965. (II). Enumeration of phages by the application of the plaque count technique and some factors influencing. *Agr. Biol. Chem.*, **29**:1140.
16. Hongo, M., and A. Murata. 1966. (III). Morphology of the twelve HM- phages. *Agr. Biol. Chem.*, **30**:292.
17. Hongo, M., T. Aono, and A. Murata. 1966. (IV). Serological characteristics of the HM-phages. *Agr. Biol. Chem.*, **30**:399.
18. Hongo, M., T. Miyamoto, and A. Murata. 1966. (V). Growth characteristics of the HM-phages. *Agr. Biol. Chem.*, **30**:500.
19. Jacob, F., and J. Monod. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. Mol. Biol.*, **3**:318.
20. John, B. Perkins, and Donald Deam. 1983. Transfection of *Bacillus subtilis* protoplast by bacteriophage. *J. of Bacteriol.*, **156**:931.
21. Hosaka, K., M. Kawarai, and S. Matsui. 1972. Illustrated book of virus. Kotansha. pp 632-640.
22. Lotz, W. 1976. Defective bacteriophage. *Prog. Molec. Subcell. Biol.*, **4**:53.
23. Lwoff, A. 1953. Lysogeny. *Bacteriol. Rev.*, **17**:269.
24. Marmur, J., and P. Doty. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J. Mol. Biol.*, **5**:109.
25. Oki, T., R. Harada, K. Akahoshi, and T. Matui. 1964. Studies on the bacteriophages of L-glutamic acid producing bacteria, *Brevibacterium* species (I). Lysis in L-glutamic acid fermentation and confirmation of bacteriophages *Agr. Biol. Chem.*, **38**:192
26. Renato FANI Giorgio Mastromei, M. Polsinelli, and Gerard Venema. 1984. Isolation and characterization of *B. subtilis* mutants. *J. of Bacteriol.*, **157**:152.
27. Rhee, T.W. 1979. Studies on the bacteriophages of *Brevibacterium lactofermentum*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **17**:97-130.
28. Stent, G.S. 1963. Molecular biology of bacterial viruses, Freeman.

(Received April 30, 1985)