

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 감온성  
돌연변이주의 일부특성

김영권 · 유관희 · 이형환 · 이호원\*

건국대학교 생물학과 유전공학연구소 \*경남대학교 생물학과

Partial Characterization of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*  
Temperature-sensitive Mutants

Kim, Young-Kwon, Kwan-Hee Yoo, Hyung-Hoan Lee, Ho-Won Lee\*

Institute for Genetic Engineering, Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul,  
Korea. \*Dept. of Biology, Kyungnam University, Korea

Partial characterization of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* 3ab temperature-sensitive mutants was carried out through biochemical analyses, utilization tests of carbohydrate sources, antibiotic resistant test, hemolytic reaction test, growth measurement of *Fructus gardenia* extract medium and toxicity test against mice. Six ts mutants, ts-U154, ts-U601, ts-U602, ts-U603, ts-U604, and ts-U788 could not produce urease, ts-U603 lost its motility, ts-U154 could not use salicin and cellobiose and ts-U603 not ribose. All ts mutants except ts-U154 and wild type strain were resistant to cephalothin, ampicillin, and penicillin, but ts-U154 was sensitive to the three. Four mutants, ts-U21, ts-U74, ts-U131 and ts-U 154 did not form pigment colonies on the *F. gardenia* medium. All the mutants and wild type strain showed hemolysis reaction on the blood agar. The *B. thuringiensis* and mutants were not toxic to mice.

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*의 감온성 치사 돌연변이체를 Lee and Lee (1983)는 분리하여 42°C의 제한온도에서 치사성이 있는 것을 보고하였다. 이 감온성 치사 돌연변이체들의 특성을 규명하기 위하여 허용온도인 28°C에서 유전인자의 돌연변이 특성을 조사하는 것이 필요하다.

본 연구에서는 상기 돌연변이체들의 생화학적 성상, 탄수화물 분해능, 항생제 내성변이, 용혈성의 변이, 치사 추출액에서의 성장 특성과 각 돌연변이체의 쥐에 대한 독성 등을 조사한 것을 보고한다.

실험재료 및 균주

균주

*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* 3ab K-3 Temperature-Sensitive (TS) mutants (Lee and Lee, 1983)를 본 연구에 사용했으며, 이 균주들은 건국대학교 생물학과 분자생물학 교실에서 보관 중이며, 돌연변이체 균주는 ts-U 21, ts-U 26, ts-U 31, ts-U 32, ts-U 33, ts-U 61, ts-U 71, ts-U 72, ts-U 73, ts-U 74, ts-U 75, ts-U 91, ts-U 131, ts-U 132, ts-U 151, ts-U 154, ts-U 601, ts-U 602, ts-U 603, ts-

604와 ts-U 788이다.

#### 사용한 배지 및 시약

생화학적 성장검사를 위하여 사용한 배지인 *Kligler's ion agar (KIA)*, *SM media*, *MR-VP broth*, *decarboxylase media (lysine, arginine, ornithine)*, *urea test media*, *KCN media*, *phenylalanine agar (PPA)*, *simmon's citrate agar*, *motility test media*, *Blood agar*, *catalase test*, *oxidase test*, *indol test* 배지 (Difco) 등은 121°C의 15Lb 기압에서 15분간 멸균하여 사용하였다.

탄수화물 분해능을 위한 시약인 *glucose*, *lactose*, *sucrose*, *mannitol*, *dulcitol*, *salicin*, *adonitol*, *inositol*, *sorbitol*, *arabinose*, *raffinose*, *galactose*, *sorbose*, *trehalose*, *cellobiose*, *melibiose*, *cellulose*, *xylan*, *melezitose*와  $\alpha$ -methyl-glucoside (Havashi pure chemical Co.) 등을 사용했다.

치자 (*Fructus gardenia*) 추출액은 시장에서 판매되고 있는 건조한 치자 씨앗을 0.1, 0.5, 1.0과 3.0gm을 각각 증류수 100ml에 넣고 30분간 끓여 색소를 추출한 다음 각 농도의 용액에 *Nutrient agar* 1.5gm을 넣고 녹인 다음 121°C의 15Lb 기압에서 15분간 멸균하여 사용했다.

항생제는 아래와 같이 10종의 항생 물질 *paper Disc (BBL)*를 사용했으며, *Muller Hinton agar (MHA)*와 *Trypticase soy broth (TSB)*를 이용하여 조사했다. *Kanamycin (KM)* 30 $\mu$ g, *Tetracyclin (TC)* 30 $\mu$ g, *Chloramphenicol (CM)* 30 $\mu$ g, *Erythromycin (EM)* 15 $\mu$ g, *Amikacin (AN)* 30 $\mu$ g, *Ampicillin (AM)* 10 $\mu$ g, *Cephalothin (CF)* 30 $\mu$ g, *Gentamycin (GM)* 10 $\mu$ g, *Penicillin (P)* 10unit와 *Tobramycin (NN)* 10 $\mu$ g이다.

표준탁도액은 *Mc Farland Nephelometer Standards (Balows, 1976)*에 의한 방법으로 0.36N  $H_2SO_4$  (1% v/v) 99.5ml와 0.048M  $BaCl_2 \cdot 2H_2O$  (1.175% w/v) 0.5ml를 혼합하여 균배양액을 담은 시험관과 동일한 탁도를 내는 시험관을 사용했다.

실험에 사용한 Mouse는 국립 가축위생연구소로부터 분양받은 ICR이며 체중 13~15gm의 것을 암·수 구별없이 매 균주당 5마리씩과 대

조군 5마리를 사용했다.

#### 생화학적 성장검사

*Bacillus thuringiensis*의 정상형 균주와 ts-돌연변이체 21균주를 *Nutrient agar* 사면 배지에 접종하여 28°C의 배양기에서 24시간 배양한 다음 각 균주를 *KIA* 성장, *Indole* 생산 *MR-VP* 반응,  $H_2S$  생산, *citrate* 이용, *KCN* 존재하에서의 반응, *decarboxylase* 생산 (*lysine, arginine, ornithine*), 운동성 조사, *Urease* 생산검사, *catalase test*, *oxidase test*를 위한 당배지에 접종하고 28°C의 배양기에서 7일간 관찰 비교시험하였다 (Cowan and Steel, 1970).

#### 항생제에 대한 감수성조사

항생제에 대한 감수성 조사는 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility test*에 의했다 (Balows, 1976). 순수배양된 평판위에서 잘 분리된 집락을 선택하여 *Trypticase Soy broth*에 1루프씩 접종한 다음 28°C의 배양기에서 약 2~3시간 배양한 다음 균액의 탁도가 표준탁도액과 같도록 멸균된 생리식염수로 희석 조정하였다. 균배양액의 탁도를 마친 후 15분 이내에 멸균된 면봉을 사용하여 표면이 마른 *Muller-Hinton agar*에 고루 문질러 접종하였다. *Disc dispenser*를 이용하여 필요한 *Disc*를 균이 접종된 *Muller-Hinton Agar*위에 놓고 *Disc* 중앙 부분을 가볍게 눌러 평판표면에 완전히 밀착시켰다. *Disc* 중심간의 거리는 24mm 이상 충분히 떨어져야 하며 평판 가장자리로부터 15mm 이상 떨어지게 하였다. 접종배지를 28°C의 배양기에서 16~18시간 동안 배양 후 육안으로 관찰 *Zone reader*를 사용하여 *Disc* 직경 6mm를 포함한 발육억제대를 측정하여 기록 판독하였다. 발육억제대 크기의 해석은 판독표에 따라 감수성 (S), 중농도 감수성 (I), 내성 (R)을 결정하였다. 항생제 *Disc*의 품질관리를 위해서 2~4°C 냉장고에 보관하였으며 감수성 검사의 정확성을 유지하기 위하여 표준균주인 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923과 *Escherichia coli* ATCC 25922로 *Disc*의 반응을 조사하였다. 만약 범위내에 포함되지 못할 때에는 그 검사는

신빙성이 없는 결과로 하였다.

### 돌연변이체 균주들의 특수배지에서의 성장 특징

*Fructus gardenia* 추출배지에서의 성장특징은 치자농도에 따라 만든 Nutrient agar 에 24시간 배양한 균액을 일정한 간격을 두고 백금침으로 접종하여 28°C의 배양기에서 24시간, 48시간 배양 후 집락의 크기와 배지에 생성된 색소의 크기를 각각 측정했다. 대조균은 치자를 첨가하지 않은 Nutrient agar medium을 사용했다.

### 용혈성검사

정성검사는 Nutrient broth 5ml에 균액을 1 루프씩 풀고 28°C의 배양기에서 24시간 배양 후 균액의 탁도를 생리식염수로 일정하게 맞춘 다음 Blood agar plate에 적당한 간격을 두고 균액을 백금침으로 접종하고 28°C의 배양기에서 24시간 동안 배양한 다음 Blood agar plate에 형성된 용혈환의 직경을 측정하였다.

정량검사는 정성검사에 사용하고 남은 균액으로 멸균된 0.85% 생리식염수 0.5ml과 균배양액 0.5ml를 10개의 시험관에 계단희석하고 각 시험관에 5% "O"형 적혈구 0.5ml씩 첨가한 다음 28°C의 배양기에서 2시간 처리 후에 용혈성을 측정한다. 다음 4°C 냉장고에서 18시간 방치 후에 용혈성을 측정하고, 다시 28°C의 배양기에서 2시간 방치 후 용혈성을 또 측정했다.

### Mouse에 대한 독성조사

Nutrient broth 5ml에 각 균주를 1루프씩 풀고 다음 28°C의 배양기에서 24시간 배양한 후에 배양액 ( $1.0 \times 10^8$  cells/ml)을 0.3ml씩 Mouse 5마리씩으로 하였으며 대조 5마리에는 멸균된 Nutrient broth 0.3ml씩 복강내에 주사하였다.

## 결 과

### 돌연변이체 균주의 생화학적 반응

정상형과 돌연변이체 균주는 그람염색 반응에 모두 양성이며, KIA 성장에서는 22균주가 모두 K/A 반응을 나타냈으며, Indole 생산, Methyl-Red 반응, H<sub>2</sub>S 생산, Citrate 이용, KCN 존재하에서의 반응, decarboxylase 생산 반응,

phenylalanine diaminase 생산, malonate 이용 등은 모두 음성반응을 나타냈다. Voges-proskauer 반응에서는 ts-U 21 균주만이 2일 만에 양성반응을 나타냈고, 그외 균주는 모두 1일 만에 양성반응을 나타냈다. Urea 생성시험은 정상형 균주를 포함한 13균주가 1일 만에 양성반응을 나타냈고, ts-U 32, ts-U 33과 ts-U 71 균주가 2일 만에 약하게 양성반응을 나타냈으며, ts-U 154, ts-U 601, ts-U 602, ts-U 603, ts-U 604, ts-U 788은 모두 음성반응을 나타냈다. 운동성은 모든 균주가 양성이었으나 ts-U 603 균주만은 운동성이 없었다. catalase 시험은 모두 양성으로 나타났고, oxidase 시험은 모두 음성으로 나타났다.

탄수화물 분해 시험은 lactose, sucrose, mannitol, dulcitol, adonitol, inositol, sorbitol, arabinose, raffinose, rhamnose, galactose, mannose, sorbose, melibiose, melezitose, cellulose, xylan,  $\alpha$ -methyl-glucoside의 이용에는 모두 음성반응을 나타냈으며, glucose, fructose, trehalose, maltose 등은 모두 양성반응을 나타냈고, salicin은 모두 양성반응을 나타냈으나, ts-U 154 균주만은 음성으로 나타났다.

ribose는 정상형 균주를 포함한 21균주가 양성반응을 나타냈으나, ts-U 603만 음성을 나타냈다. Cellobiose는 정상형 균주를 포함한 14균주가 1일 만에 양성반응을 나타냈지만, ts-U 131, ts-U 601, ts-U 602 균주만이 3일이 지난 후에야 약하게 양성반응을 나타냈고 ts-U 154 균주는 음성반응을 나타냈다.

### 돌연변이체 균주의 항생제 감수성 차이

Kanamycin, chloramphenicol, amikacin, tobramycin, gentamycin과 erythromycin에 모든 균주가 감수성을 나타냈고, tetracyclin에서는 감수성을 나타낸 균주는 정상형, ts-U 31, ts-U 32, ts-U 73, ts-U 74, ts-U 75, ts-U 91, ts-U 154, ts-U 601, ts-U 602, ts-U 603, ts-U 604, ts-U 788의 13균주였으며, 그 외 9균주는 중등도의 감수성을 나타냈다.

ampicillin, cephalothin, penicillin에는 정상형 균주를 포함한 21균주가 내성을 나타냈으나,

ts-U 154 균주만이 3가지 항생제에 감수성을 나타냈다.

### 돌연변이체 균주들의 특수배지상에서의 성장 특징

*Fructus gardenia* 추출배지에서는 Table 1에서와 같이 정상형 균주와 돌연변이체 균주와의 특이한 차이는 없었으나, 대조군에 비해 치자의 농도가 높아짐에 따라 집락의 크기가 차츰 작아졌고 3.0g의 농도의 배지에서는 전혀 성장하지 않았다. 정상형 균주를 포함한 18개의 돌연변이체 균주는 집락 주위에 흑청색 색

**Table 1.** The Comparison of growth rate on the *Fructus gardenia* extract medium of *Bacillus thuringiensis* and its ts mutants.

Mutants	Amounts of <i>F. gardenia</i> extract and culture hours				
	0 % /48	0.1% /48	0.5% /48	1.0% /48	3.0% /24
Wild type	17W	11B	27B	25B	N
ts-U 21	16W	14W	24W	26W	N
ts-U 26	15W	11B	20B	24B	N
ts-U 31	15W	10B	12B	20B	N
ts-U 32	16W	11B	13B	25B	N
ts-U 33	18W	11B	12B	15B	N
ts-U 61	15W	20B	16B	18B	N
ts-U 71	15W	10B	11B	10B	N
ts-U 72	15W	13B	11B	11B	N
ts-U 73	16W	12B	21B	10B	N
ts-U 74	15W	18W	30W	29W	N
ts-U 75	16W	18B	16B	22B	N
ts-U 91	13W	22B	10B	11B	N
ts-U 131	13W	27B	16B	23B	N
ts-U 132	14W	28B	10W	15W	N
ts-U 151	16W	20B	8B	12B	N
ts-U 154	14W	17B	8W	12W	N
ts-U 601	14W	16B	19B	12B	N
ts-U 602	13W	13B	14B	12B	N
ts-U 603	15W	16B	12B	12B	N
ts-U 604	15W	16B	12B	12B	N
ts-U 788	18W	20B	15B	16B	N

Numerals : Colony size (mm) B : Blue-Black color on colony N : Nongrowth W : White colony

**Table 2.** The Hemolysis Zone formed by *Bacillus thuringiensis* and its mutants on Blood Agar Plate.

Mutants	Hemolysis Zone(mm)
Wild Type, ts-U 21, 31, 72, 74, 91, 131	10
ts-U 26, 32, 73, 132, 151, 601, 604	11
ts-U 33, 61, 71, 75, 602	9
ts-U 154, 788	8
ts-U 603	12

소를 생성하였지만 ts-U 21, ts-U 74, ts-U 131, ts-U 154 균주는 색소를 전혀 생성하지 않았다.

### 용혈반응검사

Hemolysin 생성 정성검사에서는 Table 2에서와 같이 모든 균주가 비슷한 성적을 보였으나, ts-U 603 균주는 12mm로 가장 큰 용혈환을 형성했다. 정량검사에서는 Table 3에서와 같이 ts-U 154, ts-U 602 균주는 1:32X, 정상형 균주와 ts-U 32, ts-U 33, ts-U 72, ts-U 74, ts-U 75, ts-U 91, ts-U 131, ts-U 61, ts-U 71, ts-U 73, ts-U 601, ts-U 604 균주는 1:128X, ts-U 23, ts-U 132, ts-U 151 균주는 1:256X, ts-U 603은 1:512X로 가장 많은 용혈반응을 나타냈다.

**Table 3.** Hemolysin titer produced by *Bacillus thuringiensis* and its mutants

Mutants	Hemolysin titer		
	*1	*2	*3
Wild Type,			
ts-U 32, 33, 71, 151, 604	64x	64x	64x
ts-U 21, 31, 61, 73, 601	128x	128x	128x
ts-U 26	128x	256x	256x
ts-U 72	32x	64x	64x
ts-U 74, 75, 788	32x	32x	64x
ts-U 91	32x	64x	64x
ts-U 131	16x	16x	64x
ts-U 132	256x	256x	256x
ts-U 154, 602	32x	32x	32x
ts-U 603	128x	256x	512x

\*1. at 28°C, 2 hrs incubation

\*2. at 4°C, 18hrs incubation after \*1.

\*3. at 28°C, 2 hrs incubation after \*2.

## Mouse에 미치는 *Bacillus thuringiensis* 의 독성효과

복강내에 균배양액을 주사하여 10일동안 관찰하였으나 모두 건강하며 대조군과 비교하여 독성효과가 없었다.

## 고 찰

Lee & Lee (1983)은 *Bacillus thuringiensis* var. *krustaki* 균의 temperature-sensitive mutants를 분리하여 성장의 차이점을 연구 보고하였고 이들 돌연변이체에 대한 생물학적 성상의 유전적 특성을 더욱 자세히 규명하기 위하여 여러가지 실험들을 시행했다.

생화학적 성장실험에서 정상형 균주가 음성반응인데 ts-mutants가 양성반응을 나타낸 결과는 하나도 없었으며 정상형 균주가 양성반응을 나타내는데 ts-mutants가 음성반응을 나타낸 것은 Urease 생산 test로써 ts-U154, ts-U601, ts-U602, ts-U603, ts-U604, ts-U788 등 6개의 돌연변이체균주였고, 운동성이 매우 강한 균주인데 ts-U603 돌연변이체만이 운동성을 상실했다. 탄수화물 이용실험에서 음성반응을 나타낸 돌연변이균주는 salicin에서 ts-U154였고, ribose에서는 ts-U603이었으며, cellobiose에서는 ts-U154였다.

항생제 감수성 조사에서 Lee와 Kim (1983)은 *Bacillus thuringiensis*가 penicillin에 내성을 가지고 있다고 보고했으나, 본 실험에서는 ts-U154 돌연변이주는 penicillin에 감수성을 나타

냈고, ampicillin과 cephalothin에서도 정상형 균주를 포함한 21개 균주가 내성을 나타냈으나, ts-U154 변이주는 감수성을 나타냈다. 이와같이 돌연변이 이후 내성의 균주가 감수성으로 된 경우는 R-plasmid에서 돌연변이가 생겨 유전적 기능의 약화 또는 상실로 항생제 분해효소의 기능이 상실 또는 변화된 것이라 생각된다.

*Fructus gardenia* (치자) 배지에서서의 성장의 차이에 대한 실험은 1955년 Lee와 Kim이 "식물계로부터 출발한 항균소물질에 관한 연구"에서 중국산 한약제 170종을 사용하여 항균소물질에 대한 실험 중 치자색소가 든 배지에 대장균, 연쇄상구균, 포도상구균, salmonella, shigella, cholera, 등을 배양하면 연쇄상구균의 일부와 포도상구균의 일부에서 배지를 암청색으로 변화시킨 현상을 발견하여 이 반응을 Lee's phenomenon이라고 명명하였으며 기타 치자에 대한 연구는 mycobacteria의 착색성에 관한 연구가 보고된 바 있다(Lee 등, 1981).

본 실험에서도 정상형 균주를 포함한 18개 돌연변이균주가 흑청색소를 생산했으며 이 현상은 세균이 생산한 효소에 의한 것으로 생각된다. ts-U21, ts-U74, ts-U131, ts-U154 등 4개의 돌연변이체균주가 색소를 생산하지 못한 것은 유전자에 돌연변이가 일어나 색소생성능이 상실되었다고 생각된다. 용혈성검사에서는 정도의 차이는 있었지만 모든 균주가 용혈성을 가지는 것이 증명되었다.

Mouse에 대한 치사효과는 없었다.

## 적 요

*Bacillus thuringiensis* var. *krustaki* 3ab k-3의 감온성치사돌연변이체에 대한 생물학적 성상의 변이성의 차이를 조사하고 유전적 특성을 규명하기 위하여 생화학적 성장검사, 항생제에 대한 감수성 조사, 용혈성 검사, 돌연변이체균주의 특수배지에서의 성장비교, Mouse에 대한 치사효과를 28°C의 허용온도에서 조사하였다.

Urease를 생산하지 못하는 돌연변이체는 ts-U154, ts-U601, ts-U602, ts-U603, ts-U604, ts-U788 이었다. ts-U603만이 운동성이 상실되었고, ts-U154는 Salicin과 cellobiose를 분해하지 못했고, ribose를 분해하지 않는 균주는 ts-U603였다. 항생제에 대한 반응은 ampicillin, cephalothin, penicillin에는 모두 저항성을 나타냈으나, ts-U154 균주만이 감수성을 나타냈다. *Fructus gardenia* 배지에서 색소를 생산하지 않은 것은 ts-U21, ts-U74, ts-U131과 ts-U154였다. 가장 적은 용혈성을 나타내는 균주는 정상형과 ts-U602였고 가장 많은 용혈성을 나타내는 것은 ts-U603 (1 : 512x) 이었다. Mouse에 대한 치사효과는 전혀 없었다.

## REFERENCES

1. Balows, A. 1976. Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility test. *NCCLS ASM 2*: 1-10.
2. Cowan, S.T. and K.J. Steel. 1970. Manual for the identification of medical bacteria. *Cambridge University, Press*.
3. Lee, H.H. and Lee, H.K. 1983. Growth Patterns of *Bacillus thuringiensis* Temperature-Sensitive Mutants. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 11*: 233-239.
4. Lee, W.J., Lee, H.K., Lee, T.J. Kim, S.J. and W.C. Lee. 1981. An Observation on the blue-black Colonization of Various Mycobacteria spp. by the pigment extracted from *Fructus gardenia*. *J. of Grad. School, Konkuk Univ. 13*: 533-543.
5. 이택주, 손재영. 1955. 식물계로부터 출발한 광독소 물질에 관한 연구. V. *Fructus gardenia* 을 가한 배지에서의 광산균의 태도. *가축 위생 연구소보 3*: 78-81.
6. 이형환, 김기상. 1983. *B. thuringiensis* 미생물 살충제 개발의 기초적 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 11*: 233-243.

(Received July 30, 1985)