

토양에서 분리한 *Bacillus thuringiensis*의 특성

이형환 · 박미연 · 이창운

건국대학교 이과대학 생물학과

Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolate HL-15 from Korean Soil

Lee, H.H., M.Y. Park, and C.W. Lee

Department of Biology, Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

**Abstract:** The isolate HL-15 of *Bacillus thuringiensis* had common biochemical characteristics of the 23 serovarieties of *B. thuringiensis*. The isolates formed round endotoxin crystals which killed insect larvae, showed independent serological H antigen to the 23 serotypes, and contained two different DNA elements with over 100 Mdaltons of molecular weights.

**Key Word:** *Bacillus thuringiensis*

살충미생물로서 알려진 *Bacillus thuringiensis*는 병든 누에에서 처음으로 분리되었고 (Ishiwata, 1901), 주모성 편모(이하 H라 함)를 가진 그람 양성 간균이며, 아포를 형성하는 호기성균으로서, 아포 형성시기에 하나 또는 그 이상의 단백질성장방형의 endotoxin crystal을 생성 (Yousten, 1969; Donald, 1976) 하는 것이 주요 특징으로 이는 *Bacillus thuringiensis* 분리 동정 및 분류상의 중요한 자료로 이용되고 있다.

de Barjac (1962)은 H항원을 이용한 혈청학적 분류를 시도하였으며, 그에 따른 생물학적 특성이 많이 밝혀졌다 (Heimpel, 1958, 1960, 1967; de Barjac et al., 1968; Krieg et al., 1968, 1969a, b., 1971). Norris (1964)는 영양세포의 esterase 양상을 겔전기영동법으로 분석하여 혈청학을 기초로한 분류에 많은 가능성을 제시하기도 하였고, Krywienczyk와 Angus (1969)는 인시류와 쌍시류 유충을 죽이는 독성과 관련이 있는 endotoxin crystal에 의한 혈청학적 분류를 시도하여 H항원의 혈청학적 분

류방법과 함께 *Bacillus thuringiensis* 항원에 따른 분류에 이용될 가능성을 시사하였다 (Krywienczyk et al., 1970, 1978, 1980).

현재까지 H항원에 의한 serotype은 23 serovars (de Barjac et al., 1970, 1972, 1982; de lucca II, 1979; Ohba et al., 1978, 1981 a, b; Dean, 1985)가 알려졌으며, 각 serovar는 곤충의 종류에 따라서 살충효과가 다른 것이 보고되어 있다 (Cooksey와 Donminger, 1969; Fast et al., 1970; Padua, 1980; Salama, 1982).

본 실험에서는 지금까지 발견한 serovars의 항원학적 차이를 확인하였으며, 우리나라에서 처음으로 분리한 *Bacillus thuringiensis*를 동정하여 endotoxin crystal 형태와 이들에 대한 생화학적 성상 및 혈청학적 성상을 파악하고 참조균주들과 비교하였다.

## 재료 및 방법

## 재료

## 사용한 균주와 H 항혈청

참조균주는 건국대학교 생물학과 분자미생물

학교실에 보관중인 *Bacillus thuringiensis* serovar. S 1 부터 S23 까지 사용했으며, H항혈청을 serovar 1 부터 12까지는 본 연구실에서 제조를 했고, 또한 프랑스 파스테르연구소(Dr. H. de Barjac)에서 구입한 것도 이용했다. 사용한 균주명과 항체는 다음과 같다.

*Bacillus thuringiensis* serovar. *thuringiensis* 1 K-6, *finitimus* 2 K-7, *alesti* 3a K-8, *kurstaki* 3a3b K-9, *sotto* 4a4b K-10, *kenya* 4a4c K-11, *galleriae* 5a5b K-12, *subtoxicus* 6 K-13, *entomocidus* 6 K-14, *aizawai* 7 K-15, *morrisoni* 8a8b K-16, *tolworthi* 9 K-17, *darmstadtensis* 10 K-18, *toumanoffi* 11a11b K-19, *thompsoni* 12 K-20, *pakistani* 13 K-21, *israelensis* 14 K-22, *indianae* 15 K-23, *dakota* 16 K-24, *tohokuensis* 17 K-29, *kumamotoensis* 18 K-30, *tochigiensis* 19 K-31, *colmeri* 20 K-33.

#### 생화학적 동정배지

참조균주와 분리한 새로운 균주를 동정하기 위하여 Table 2에 있는 배지들을 121°C에서 증기압 멸균하여 사용하였다.

#### 실험동물

국립보건원에서 분양을 받은 건강한 토끼(Zewzealand white rabbit No. 1)를 이용하여 항체를 준비했고, 사육조건은 21°C, 습도 50% 조건인 상태에서 실험용 고형사료를 먹이로 사육하였다.

#### 실험방법

##### 새로운 균의 분리

경상북도 소금강 산에서 멸균된 시약수저로 지표 2-3 cm 깊이에서 채취한 흙 1.0g을 멸균된 nutrient broth(NB) 30ml에 넣고 여기에 penicillin G (30 unit/ml) 용액 0.04ml과 polymixin B (30 unit/ml) 용액 0.04ml를 각각 첨가한 후 28°C에서 10시간 배양하였다. 10시간 배양 후에 3,000×g에서 20분간 원심분리를 하여 상층액을 버리고 침전물을 NB 5ml에 현탁하여 이것을 연속 희석하여 nutrient agar plate (NA)에 도말하여 28°C 항온기에 72시간 동안 배양하였다. 72시간 후에 각 콜로니에 번호를 붙이고 각 콜로니에서 백금으로 세균을 퍼서 슬라이드 유리위에 놓고 물을 한 방울 떨어뜨

린 후에 위상차현미경으로 검경하여 세포내에 내독소 결정체가 있는지를 확인하여 제 1차로 *B. thuringiensis* 균인지를 확인했으며, 다시 그람염색방법과 내독소 결정체와 아포염색을 하여 재확인했다(Lee et al., 1984).

#### 생화학적 특성 조사

Table 2에 나타난 *B. thuringiensis* 생화학적 특성조사는 Cowan and Steel (1974) 방법을 따랐다.

#### Endotoxin Crystal과 Spore의 분리

*B. thuringiensis* 세포내에 있는 endotoxin crystal과 spore를 Kim et al., (1984)의 방법으로 분리하여 관찰했다.

#### *B. thuringiensis* 항원과 항혈청제조

*B. thuringiensis* 편모(flagella)의 운동성을 높이기 위해 반고체배지에 초자관(3×70mm)을 꽂고 백금이를 사용하여 초자관 표면에 균을 접종시켜서(Craigie, 1931), 30°C에서 배양한 후 초자관을 통해 초자관 밖의 배지 표면위로 자란 것을 NB에 계대하고 5-6시간 배양한 다음 여기에 배양액과 동량의 0.6% formalinized saline을 가했다. 이를 4°C에서 하루 방치한 다음 4°C에서 5000×g로 30분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 0.3% formalinized saline으로 2번 세척한 후 McFarland Standard No. 2 (O. D. 0.6, 530 nm)의 탁도에 맞춰면역용 항원으로 사용했으며, 응집시험용 항원은 McFarland No. 1 탁도에 맞춰면역용 항원으로 사용했으며, 응집시험용 항원은 McFarland No. 1 (O. D. 0.3, 530 nm)과 같은 탁도로 부유시켜 사용했다.

토끼면역은 4일 간격으로 항원을 0.5, 1, 2, 3ml로 증가시켜 5차례에 걸쳐 토끼귀 정맥에 주사했으며, 마지막 면역일로부터 일주일 후에 심장에서 채혈했다. 심장에서 채혈한 혈액을 멸균된 튜브(50×20 mm)에 사면으로 담아 37°C 수욕조에 1시간 방치한 후 긴 바늘로 튜브 가장자리를 분리한 다음 4°C에서 12시간 방치한 후 항혈청을 분리하였다. 완전히 분리된 항혈청은 1:10,000 되게 merthiolate를 가한 후 여과지(0.2 μm, 직경 25 mm; Gelman Co.)로 여과하여 2ml씩 분주해 -70°C에 보관하였고,

일부는 0.5ml씩 튜브 (13×100 mm) 에 분주하여 동결 건조시켰다.

H antiserum을 만들기 위해 항원을 100℃에서 2시간 가열한 다음 원심분리하였고 pellet에 OH antiserum을 첨가하여 50℃에서 2시간 동안 가끔 흔들어주면서 OH항원을 흡수시켰다. 이 H 항혈청을 saline으로 1:5 되게 희석한 후 2배씩 계단 희석한 0.5ml 항혈청에 시험용 H 항원을 0.5ml 가해 50℃ 수욕조에서 1시간 반응시켜 면상반응을 관찰하여 H 항원 응집가를 측정하였다. OH antiserum에 대한 H 항원 응집 시험은 1:50 되게 희석한 항혈청을 사용하였다.

#### *B. thuringiensis* soluble H 항원의 정제

Heart infusion broth에서 5-6시간 배양된 *B. thuringiensis* 균을 식염수완충액으로 2회 세척한 후 pellet을 소량의 상기완충액으로 부유시켰다. 이 부유액을 4,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 취하고 다시 5,000×g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 그 상층액을 다시 75,000×g로 45분간 원심분리하여 무색의 pellet을 취하였다.

1:10,000의 merthiolate가 포함된 완충액으로 pellet을 다시 부유시킨 후 이 양의 1/20 되도록 1N HCl을 가해 실온에서 30분간 방치한 다음 80,000×g에서 65분간 원심분리하여 pellet을 취하고 1N NaOH로 중화시켰다. 그 후 냉각된 70%포화 ammonium sulfate 용액을 2배되게 가해 4℃에서 16시간 방치한 후 20,000×g에서 15분간 원심분리하여 pellet을 취하고 여기에 소량의 증류수를 가하고 ammonium sulfate를 제거하기 위해 4℃에서 투석하였다.

투석시킨 후 Lowery (1951) method에 의해 30-40mg/ml 되게 정량하여 gel diffusion 시험용의 soluble 항원으로 이용했다.

#### Double gel diffusion test

슬라이드 유리 (50×75 mm) 위에 1.5 mm 두께가 되도록 0.1% agarose를 붓고 5분동안 굳힌 다음 펀치로 직경 3 mm well을 14개 뚫어 중앙 well에 soluble 항원을 5 μl 적하하여 4℃ 습윤상자에서 3일간 관찰하였다.

*B. thuringiensis* plasmid DNA의 분리와 전기영동

새로 분리한 *B. thuringiensis* 내에 존재하는 plasmid DNA를 분리하여 전기영동 분석을 하였다 (Lee et al., 1984).

#### 흰불나방에 대한 독성 검정

페트리접시 (17×3 cm) 에 멸균된 증류수를 적신 여과지를 깔고 1 cm<sup>3</sup> 크기의 인공사료를 5개씩, 3령이 된 흰불나방 유충을 20마리씩 넣고 사육을 했으며, 독성검정 때에는 *B. thuringiensis* 분리균을 72시간 배양하여 그 배양액을 각 인공사료에 1 ml씩 떨어뜨린 후 사육하면서 치사유무를 조사했다.

## 결 과

### 새로 분리한 *B. thuringiensis* 의 내독소 결정체 생산 동정

경상북도 소금강 산에서 채취한 토양에서 세포 내에 내독소 결정체를 형성하는 한 개의 균주를 분리하였다.

분리균주 HL-15은 둥근 내독소 결정체를 세포 내에 보유하고 있었고 (Fig. 1), 또한 흰불나방 유충을 치사시키었다 (Table 1).

HL-15을 배양하여 초음파 처리를 한 후 Renografin-76 밀도기울기 원심분리법에 의하여 내독소 결정체는 40-50%에서, 아포는 70% 부위에서 밴드를 형성하는 것을 관찰했다.

또한 2일간 배양한 HL-15 균주를 전자현미경으로 관찰한 결과 *Bacillus* 균의 한쪽은 아포

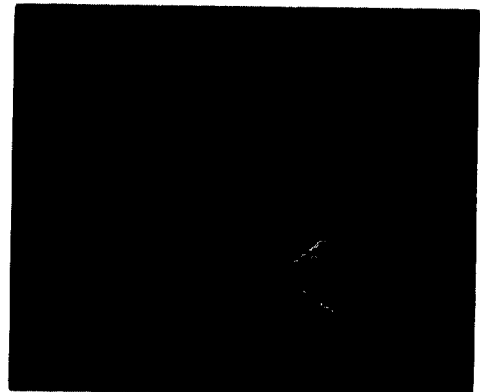


Fig. 1. Endotoxin crystals and spores in *B. thuringiensis* isolate.

S: spore, C: endotoxin crystal, (×2,000).

**Table 1.** Toxicity Assay of *Bacillus thuringiensis* isolate HL-15 against *Hyphantria cunea* larvae.

Strains	No. of larvae tested	No. of larvae killed	Lethality (%)
HL-15	20	20	100
<i>kurstaki</i>	20	20	100

를 형성하고 있었고, 다른 한쪽에는 내독소 결정체가 형성된 것을 관찰했다(Fig. 2).

#### *B. thuringiensis* 분리균주 HL-15의 생화학적 특성

새로 분리한 균주의 생화학적 특징은 Table 2에 나타난 바와 같이 그람염색에 양성이었고, KIA배지에서 산과 알칼리를 생산했으며, methyl-red 검사, VP 검사, 운동성 검사, glucose 발효에서 산을 생산, salicin 이용, 전분 분해, nitrate 환원, catalase 생산, lecithin 분해효소와 용혈검정에서는 모두 양성반응을 나타냈고, 나머지 검정에서는 모두 음성반응을 나타냈다.



Fig. 2. Electron micrograph of *B. thuringiensis* isolate HL-15 ( $\times 40,000$ ).

**Table 2.** Biochemical characteristics of *Bacillus thuringiensis* isolate HL-15.

Characteristics	Phenotypes
Gram reaction	+
KIA medium	K/A
H <sub>2</sub> S production	-
Indole production	-
Methyl-red test	+
Voges-Proskauer test	+
KCN, Citrate utilization	-
Urease production	-
Motility test	+
Lysine decarboxylase	-
Arginine decarboxylase	-
Ornithine utilization	-
Phenylalanine deaminase	-
Malonate utilization	-
Acid from glucose	+
lactose	-
sucrose	-
mannitol, dulcitol	-
salicin	+
adonitol	-
inositol	-
sorbitol	-
arabinose	-
raffinose	-
rhamnose	-
maltose	-
xylose	-
DNase production	-
Gelatin, Starch hydrolysis	+
Nitrate reduction	+
Oxidase production	-
Catalase production	+
Lecithinase production	+
$\beta$ -hemolysis on sheep blood	+
Endotoxin crystal formation	+
Gas from glucose	-
ONPG decomposition	-

Table 3. Homologous and Heterologous Titers<sup>a</sup> of *Bacillus thuringiensis* serovars. Antisera.

Reference strains <sup>b</sup> and isolates		Unabsorbed Antisera											
		K-6	K-7	K-9	K-10	K-12	K-26	K-15	K-16	K-17	K-18	K-19	K-20
<i>thuringiensis</i> S1	K-6	12,800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>finitimus</i> S2	K-7	-	12,800 <sup>c</sup>	- <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>kurstaki</i> 3a3b	K-9	-	-	25,600	800	-	-	800	-	-	-	-	-
<i>sotto</i> 4a4b	K-10	-	-	-	12,800	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>galleriae</i> 5a5b	K-12	-	-	-	-	12,800	-	-	-	-	-	400	-
<i>subtoxicus</i> S6	K-26	-	-	-	-	-	12,800	-	-	-	800	-	-
<i>aizawai</i> S7	K-15	-	-	-	-	-	-	12,800	-	-	-	-	-
<i>morrisoni</i> 8a8b	K-16	-	-	-	-	-	-	-	12,800	-	-	-	-
<i>tolworthi</i> S9	K-17	-	-	-	-	-	-	-	-	12,800	-	-	-
<i>darmstadiensis</i> S10	K-18	-	-	-	-	-	800	-	-	-	12,800	800	-
<i>toumanoffi</i> 11a11b	K-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,800	-
<i>thompsoni</i> S12	K-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,800
HL-15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

a. Tube titrations incubated at 50°C for 1 h.  
c. Reciprocal titer

b. Formalinized antigens  
d. Negative, <200

#### 분리균주와 참조균주의 H 항원과 항체

참조균주(23균주)의 각 항원은 homologous 항혈청에서는 모두 응집이 일어났으며, heterologous 항혈청에서는 몇 균주만 응집을 보였다. 참조균주중 혈청형 1에서 12까지의 균주의 각 면역혈청의 homologous H항원에 대한 응집력은 1 : 12,800 - 1 : 25,600이었으며, 각 항원의 heterologous 항혈청에 대한 응집양상을 보면 serovar. *kurstaki*, *sotto*와 *aizawai* 항혈청은 1 : 800에서 응집이 일어났고, serovar. *galleriae* 항원은 *toumanoffi* 항혈청에서, serovar. *subtoxicus* 항원은 *thompsoni* 항혈청에서, serovar. *darmstadiensis* 항원은 *subtoxicus*와 *toumanoffi* 항혈청에서 각각 1 : 800으로 희석한 시험관 내에서 응집이 일어났다(Table 3).

또한 열처리한 O 항원으로 흡수시켜 1 : 5로 희석한 항혈청에 참조균주 S1에서 12균주까지의 각 항원을 반응시켰을 때 Table 4에서 보는 바와 같이 1 : 3200의 응집가를 나타냈다(Table 4).

Heterologous 항혈청에서의 반응을 보면 serovar. *kurstaki* 항원은 serovar. *aizawai* 항혈

청에서 1 : 200의 응집가를 보였고, serovar. *subtoxicus* 항원은 serovar. *darmstadiensis* 항혈청에서, serovar. *darmstadiensis* 항원은 serovar. *tolworthi* 항혈청에서 1 : 200의 응집가를 나타냈다(Table 4).

한편 분리균주 HL-15를 참조균주 23균주의 항혈청으로 반응시켰을 때 면상반응이 전혀 일어나지 않았다. 분리균주간의 동질 H항원에 대한 각 면역혈청의 응집력은 1 : 25,600이었다.

참조균주 serovar. *toumanoffi* K-19 균주의 soluble H 항원을 정제하여 참조균주 23균주의 항혈청에 대한 반응을 agar gel diffusion 방법으로 관찰한 결과 homologous 항혈청인 K-19 항혈청에만 침강반응을 보였고, 11균주의 heterologous 항혈청에는 반응을 보이지 않았다.

또한 한국에서 분리된 균주 HL-15의 H항원을 정제하여 참조균주 23균주의 항혈청에 대한 침강반응을 보았을 때 모든 항혈청에 반응을 보이지 않았다.

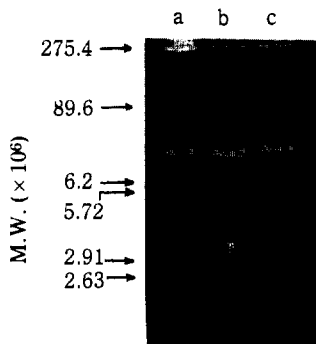
#### 분리균주 내의 plasmid 조사

분리균주 HL-15를 배양하여 분리해낸 plasmid DNA를 0.7% agarose gel에서 전기영동

**Table 4.** Homologous and Heterologous Tube Agglutination Reactions<sup>a</sup> of *Bacillus thuringiensis* serovars. Antisera Absorbed with Homologous Heated O Antigens

Reference strains <sup>b</sup> and isolates		Antisera <sup>c</sup>											
		K-6	K-7	K-9	K-10	K-12	K-26	K-15	K-16	K-17	K-18	K-19	K-20
<i>thuringiensis</i> S1	K-6	3,200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>finitimus</i> S2	K-7	-	3,200 <sup>c</sup>	- <sup>d</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>kurstaki</i> 3a3b	K-9	-	-	3,200	400	-	-	200	-	-	-	-	-
<i>sotto</i> 4a4b	K-10	-	-	-	6,400	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>galleriae</i> 5a5b	K-12	-	-	-	-	6,400	-	-	-	-	-	-	-
<i>subtoxicus</i> S6	K-26	-	-	-	-	-	3,200	-	-	-	200	-	-
<i>aizawai</i> S7	K-15	-	-	-	-	-	-	3,200	-	-	-	-	-
<i>morrisoni</i> 8a8b	K-16	-	-	-	-	-	-	-	6,400	-	-	-	-
<i>tolwothi</i> S9	K-17	-	-	-	-	-	-	-	-	6,400	-	-	-
<i>darmstadiensis</i> S10	K-18	-	-	-	-	-	-	-	-	200	3,200	-	-
<i>toumonoffi</i> 11a11b	K-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,200	-
<i>thompsoni</i> S12	K-20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,400
HL-15		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

e. Antisera diluted 1:5 in saline



**Fig. 3.** Plasmid fractions of *B. thuringiensis* isolate.  
 a: *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* standard plasmid.  
 b,c: isolate, HL-15

을 한 결과 plasmid band가 2개 나왔으며, 각각의 분자량은 100 Mdal 이상이였다 (Fig. 3).

**고 찰**

*Bacillus thuringiensis*는 인시류 및 쌍시류 유충에 대한 독성효과로 인해 생물학적 살충제로서 많은 연구가 진행되어 이들의 생화학적 특성도 일부는 밝혀졌으며 (Norris, 1964; He-

impel, 1967; Krieg, 1969), flagella 항원 (H 항원)에 의한 혈청형도 계속 증가되고 있다. de Barjac과 Bonnefoi (1962)는 H 항원에 의해 serotype 1에서 serotype 8까지 나왔으며, 1964년에 Norris는 serotype 9, Krieg et al., (1968)는 serotype 10에서 12까지 추가시켰는데 현재까지 알려진 것은 23가지나 된다 (Ohbaet al, 1981; Dean, 1985).

*Bacillus thuringiensis*의 생화학적 특성은 균주간에 많은 변화를 보이고 있어 동정 및 분류의 기준이 될 수 있는 실험항목의 정립이 필요하다고 생각된다.

아직까지 우리나라에서 *Bacillus thuringiensis*의 분리 동정 및 분류에 대한 조사 보고가 없어, 처음으로 토양으로부터 1균주의 *B. thuringiensis*를 분리 동정한 결과 구형의 endotoxin crystal을 생산하는 것을 발견하였다.

분리균주 HL-15는 Lee et al., (1986)이 보고한 *B. thuringiensis* 참조균주의 공통특성과 모두 일치함을 발견하였다. 즉 운동성이 있고, 전분을 분해하며 질산염을 환원하고, 포도당 배지에서 산을 생산하고, KIA 배지에서

산과 알칼리를 생산하나, 다른 특성은 Table 2에서와 같이 음성반응을 나타냈다.

Serovariety 사이의 분화된 특성은 HL-15에서도 상이하게 나타났으나, 전체적인 특성은 serovar. *sotto*와 유사했다.

분리균주의 항원학적 분석을 통하여 볼 때 참조균주 23주는 H 항원에 따라 각기 틀리는 혈청형으로 확인할 수 있었다. 참조균주 12균주 (Table 3)로 각각 면역하여 얻은 항혈청에 대한 응집반응 시험에서 12균주 모두 homologous 항혈청에는 1 : 12,800 내지 1 : 25,600의 응집가를 보였으며, serovar. *kurstaki*는 흡수되지 않은 *sotto* 및 *aizawai* OH 혈청에 1 : 800의 응집가를 보였고, serovar. *subtoxicus*는 *darmstadiensis* OH 항혈청에, serovar. *darmstadiensis*는 *subtoxicus* 및 *toumanoffi* OH 항혈청에 1 : 800의 응집가를 보임으로써 균주 간의 공통항원을 함유하고 있는 것으로 생각되었으나 (Table 3), 그 역가가 낮고 각 혈청을 heterologous 항원으로 완전히 흡수시킨 후에 각 항원은 homologous 항혈청에만 응집되었다.

또한 참조균주 12균주 (Table 4)로 면역한 OH 항혈청을 homologous O 항원으로 흡수하여 H 혈청을 만들고 이에 대한 각 homologous 및

heterologous OH 항원의 응집반응을 보았을 때 흡수전의 OH 항혈청의 응집가와 거의 같은 역가의 응집현상을 보였으며 (Table 4), 이는 homologous 항원에 대한 응집가가 flagella antigen-antibody reaction이었음을 확인하는 것이 된다.

참조균주들이 면역된 항혈청에 대해서 분리균주 항원은 모두 반응을 보이지 않았으며, 이것은 분리된 균주 HL-15가 23균주의 참조균주와 다른 serotype임을 시사하고 있다.

Soluble H 항원을 사용하여 agar gel diffusion 방법에 의한 침강반응에서도 serotype을 구분할 수 있는 것이 확인되었고, 우리나라에서 분리된 균주 HL-15는 구형의 crystal이었으며, 이는 *B. thuringiensis* var. *darmstadiensis*와 var. *toumanoffi* 균들의 endotoxin crystal 모양과 유사했다.

우리나라에서 분리한 *B. thuringiensis*의 H 항원에 의한 serotype 결정, crystal의 항원분석, lecithinase 분석 및 여러가지 곤충종에 대한 독성 감수성 등이 앞으로 널리 조사됨으로써 우리나라 현실에 맞는 해충의 생물학적 방제에 큰 발전이 있을 것이다.

## 요 약

분리균주 HL-15는 참조균주 23개의 *B. thuringiensis* serovarieties의 공통된 생화학적 특성과 일치하였으며, 구형의 endotoxin crystal을 세포내에 형성했고, 혈청학적으로 독립된 H 항원을 가진 것을 확인했으며, 100 Mdal-tons 이상의 분자량을 갖는 플라스미드를 2개 보유하고 있었다.

## 감사의 말

본 연구는 아산재단의 연구지원금에 의하여 이루어졌으며, 이에 대하여 감사를 드리는 바입니다.

흰불나방의 유충과 먹이를 제공하여 주신 한국과학기술원의 김정일 박사님께도 감사를 드립니다.

## REFERENCES

1. Cowan, S.T. and K.J. Steel. 1974. Manual for the identification of medical bacteria. p
- 103-116, 2nd Ed. Cambridge University Press.
2. Cooksey, K.E., and C. Donminger, 1969. Nerve-blocking effect of *Bacillus thuringiensis* protein toxin. J. Invertebr. Pathol., 13: 461-462.
3. Craigie, S. 1931. Studies on the serological reactions of the flagella of *Bacillus typhos*. J. Immunol., 21: 417-511.
4. De Barjac, H. 1982. Numbering the H-serotypes of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol., 40: 419.
5. De Barjac, H., and A. Bonnefoi. 1962. Essai

- de classification biochemique et serologique de 24 souches de *Bacillus* de type *Bacillus thuringiensis*. Entomophaga, 7: 5-31.
6. De Barjac, H. 1968. A classification of strains of *Bacillus thuringiensis* with a key to their differentiation. J. Invertebr. Pathol., 11: 335-347.
  7. De Barjac, H. and F. Lemille. 1970. Presence of flagella antigenic subfactors in serotype 3 of *Bacillus thuringiensis* J. Invertebr. Pathol., 15: 139-140.
  8. De Barjac, H., and A. Bonnefoi. 1972. Presence of H antigenic subfactors in serotype V of *Bacillus thuringiensis* with the description of a new type: *B. thuringiensis* var. *canadensis*. J. Invertebr. Pathol., 20: 212-213.
  9. De lucca II, A.J., J. Simonson, and A. Larson. 1979. Two new serovars of *Bacillus thuringiensis* servas dakota and indianan (serovars 15 and 16). J. Invertebr. Pathol., 34: 323-324.
  10. Donald, B.B., and Lee A. Bulla, JR. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bact., 127: 1472-1480.
  11. Fast, P.G., and R. Milne, 1970. *Bacillus thuringiensis* parasporal toxin: Dissolution of crystals with retention of toxicity. J Inverthr. Pathol., 34: 319.
  12. Heimpel, A.M., and T.A. Angus, 1958. The taxonomy of insect pathogens related to *Bacillus cereus* Fr. and Fr. Can J. Microbiol., 4: 531-541.
  13. Heimpel, A.M., and T.A. Angus, 1960. On the taxonomy of certain entomogeneous crystaliferous bacteria. J. Insect. Pathol., 2: 311-319.
  14. Kim, S.Y., K.H. Yoo, and H.H. Lee. 1984. Partial Characterization of four Auxotrophic mutants of *B. thuringiensis*. HG. J. Gen. Eng. 1: 23-28.
  15. Heimpel, A.M. 1967. A taxonomic key proposed for the species of the "crystalliferous bacteria." J. Invertebr. Pathol., 9: 364-375.
  16. Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease). Dianihon san-shikeiho, 9: 1-5. (In Japanese, Translated by K. Aizawa).
  17. Krieg, A. 1969. Transformation in the *Bacillus cereus*—*Bacillus thuringiensis* group. Description of a new subsepcies: *Bacillus thuringiensis* var. *toumanoffii*. J Invertebr. Pathol., 14: 279-281.
  18. Kriga, A. 1969. In vitro determination of *Bacillus thuringiensis* *Bacillus cereus* and related *Bacillus* J. Invertebr. Pathol., 15: 313-320.
  19. Krieg, A., H. De Barjac, and A. Bonnefoi, 1968. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* var. *darmstadiensis*. J. Invertebr. Pathol., 10: 428-430.
  20. Krieg, A. 1971. Concerning  $\alpha$ -exotoxin produced by vegetative cells of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. J. Invertebr. Pathol., 17: 134-135.
  21. Krywienczyk, J., H.T. Bulmage, and P.G. Fast. 1978. Occurrence of two serologically distinct groups with *Bacillus thuringiensis* serotype-3ab var. *kurstaki*. J. Invertebr. Pathol., 31: 372-375.
  22. Lee, H.H., K.H. Yoo, and S.Y. Kim. 1984. Cloning of *B. thuringiensis* var. *kurstaki* insecticidal protein gene. HG. J. Gen. Eng. 1: 29-35.
  23. Lee, H.H., M.Y. Park and C.W. Lee. 1986. Biochemical characteristics of *B. thuringiensis*, 23 serovars. Kor J. Appl. Microbiol. Bioeng. 14: 205-208.
  24. Krywienczyk, J., and T.A. Angus. 1969. Serological investigations of parasporal inclusion protein from *Bacillus thuringiensis* strain 562-5A. J. Invertebr. Pathol., 14: 258-261.
  25. Krywienczyk, J., and J.C. Cunningham. 1970. Comparative effectiveness of different media in serological tests of insect pathogens. J. Invertebr. pathol., 15: 288-290.
  26. Krywienczyk, J. and P.G. Fast, 1980. Serological relationships of the crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Invertebr. Pathol., 36: 139-140.
  27. Lowry, O.H., N.J. Rosebrouch, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement



- with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265-275.
28. Norris, J.R. 1964. The classification of *Bacillus thuringiensis*. J. Appl. Bacteriol., **27**: 439-447.
29. Ohba, M., and K. Aizawa. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. J. Invertebr. pathol., **32**: 303-309.
30. Ohba, M., and K. Aizawa. 1981. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* (serotype 17), J. Invertebr. Pathol., **30**: 309.
31. Ohba, M., K. Ono, K. Aizawa, and S. Iwanami. 1981. Two new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kumamotoensis* (serotype 18) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis* (serotype 19). J. Invertebr. Pathol., **39**: 184-190.
32. Padua, L.E., O. Michio, and K. Aizawa. 1980. The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol., **36**: 180-186.
33. Salama, H.S., and M.S. Foda. 1982. A strain of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* with high potential activity on spodoptera littoralis. J. Invertebr. Pathol., **39**: 110-111.
34. Yousten, A.A., and M.H. Rogoff. 1969. Metabolism of *Bacillus thuringiensis* in relation to spore and crystal formation. J. Bac., **100**(3): 1229-1236.

(Received, Apr. 10, 1986).