

모기유충에 대한 살충성 *Bacillus thuringiensis* H9B 균주의 특성

이기희 · 김광현* · 김병우
동의대학교 미생물학과

Characterization of Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* Strain H9B

Gee-Hee Lee, Kwang-Hyeon Kim* and Byung-Woo Kim

Department of Microbiology, College of Natural Science,
Donggeui University, Pusan 614-714, Korea

Abstract — One strain of mosquitocidal *Bacillus thuringiensis*, H9B, was isolated from soil. The biochemical characteristics and flagella antigenicity of the strain H9B is similar to that of *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis*. The delta-endotoxin of the strain H9B coincided with that of *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* strain 73E10-2 on agarose double immunodiffusion test. The delta-endotoxin of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* contains hemolysin fragment (28 kd) on SDS-PAGE when the delta-endotoxin was solubilized in alkali, while that of the strain H9B does not contain 28 kd protein. In the biological activity, the delta-endotoxin of strain H9B was 2 or 3 times stronger than that of the strain 73E10-2; The LC_{50} against mosquito larvae (*Aedes aegypti*) of delta-endotoxin from the strain H9B is 70 ng/ml, and that from *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* and the strain 73E10-2 is 26 ng/ml, 186 ng/ml respectively.; The hemolytic activity of delta-endotoxin from the strain H9B has twice stronger than that from the strain 73E10-2.

Bacillus thuringiensis 균주는 그람 양성균으로서 포자 형성기간 동안에 결정성의 단백질(내독소)을 생산하는 특징이 있다. *Bacillus thuringiensis* 균주는 주로 나방류에 독성을 나타내고 있으나, 몇 종의 균주 예를들면 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(9), *morrisoni* PG-14(19), *darmstadiensis* 73E10-2(18), *kyushuensis*(16), *kurstaki* HD-1(26), *galleria*(1) 및 *fukuokaensis*(29)는 모기와 같은 쌍시류에 독성을 나타낸다. 이와같이 내독소가 모기에 독작용을 하는 숙주특이성 때문에 모기유충에 독성을 나타내는 균주들에 대한 면역학적, 생물학적 및 유전학적인 비교연구가 많이 행해졌다(6, 7, 22). 이들 중에는 *B. thuringiensis* subsp. *kyushuensis*의 내독소와 같이 적혈구에 대한 용혈성을 나타내지 않는 균주도 있지만(10), 모기유충에 독성을 나타내는 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*(7, 24), *morrisoni* PG-14(8, 26)와 *darmstadiensis* 73E10-2(5)는 내독소가 적혈구에 대한 용혈성을 나타내고

있으며 이들 내독소에 존재하는 용혈성 단백질의 편은 모두 25~28 kd의 크기에 달한다(5, 28, 7). 또한 용혈성 단백질의 존재는 모기유충에 대한 독작용에 상승효과를 가져온다는 보고(28)가 있으나 모기유충에 독작용하는 균주들 간의 내독소에 함유된 용혈성 단백질에 대한 비교연구는 극히 드물다.

따라서 본인 등은 모기유충에 독작용을 하는 *B. thuringiensis* 균주들 중에서 내독소에 함유된 용혈성 단백질 상호간의 비교연구, 즉 그 구조나 활성의 차이 등을 규명하기 위한 연구의 일환으로 *B. thuringiensis* H9B 균주를 토양으로부터 분리하여 우선 이 균주의 편모에 따른 혈청학적인 분류, 생화학적인 성질 및 *B. thuringiensis* H9B 균주로부터 생성된 내독소의 특성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 재료

본 실험에 사용된 균주는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*(Bti)와 *B. thuringiensis* subsp. *darms-*

Key words: Mosquitocidal delta-endotoxin, *Bacillus thuringiensis*, hemolytic activity

*Corresponding author

tadiensis(Btd) 및 *B. thuringiensis* subsp. *darmstadie-nsis* strain 73E10-2(Btd 73E10-2)였으며, 이들 균주들은 모두 일본 Kyushu대학 생물방제연구소 M. Ohba 박사로부터 분양받았다.

균주분리 및 선별

부산지역의 토양을 채취하여 토양 1g에 멸균수 10 ml를 가하고 80°C에서 10분간 가열처리하였다. 열처리한 토양현탁액을 10배씩 단계별(3단계)로 희석시키고 nutrient 한천배지에 도말하여 27°C에서 3~5일간 배양하였다. 그 후 생성된 colony는 위상차현미경으로 검경하여 결정성의 내독소 유무를 조사하였다.

용혈성 및 모기유충에 대한 독성시험

내독소의 용혈성 측정은 Yu 등의 방법(28)에 의해 rat의 적혈구를 사용하여 측정하였으며, 모기유충에 대한 독력(LC₅₀)측정은 Reed와 Muench의 방법(20)에 따라 산출하였다. 이때 사용된 모기유충은 *Aedes aegypti*의 알을 부화(30°C)시킨 후 4일간 사육하여 Schnell 등의 방법(21)으로 행하였다.

선별균주의 동정

최종선별된 Bt H9B 균주의 생화학적 성질은 Sneath(23) 및 de Barjac과 Frachon의 방법(14)에 의거하여 조사하였고, 항생물질 내성시험은 Muller-Hinton 한천배지상에서 paper disk를 이용하였다. 또한 편모항원성에 따른 응집반응 시험은 Padua 등의 방법(17)에 따라 행하였으며 *B. thuringiensis*의 혈청형분류를 위해 표준균주의 편모항원(H antigen)에 대한 항혈청은 모두 일본 Kyushu대학 생물방제연구소의 M. Ohba 박사로부터 얻었다.

내독소의 분리 및 항체생산

Bt 균주는 28°C에서 3일간 배양시키고 Cheung과 Hammock의 방법(2)에서 설명한 바와 같이 설탕용액으로 원심분리(6,700 rpm, 30 min)하여 내독소를 분리하였다. 내독소에 대한 항체를 생산하기 위해 0.1 N NaOH에 용해하고 용해된 내독소 항원은 Chung과 Kim의 방법(3)에 따라 토끼에 주사하여 항체를 만들었다. 생성된 항체는 DEAE-cellulose column chromatography를 행하여 정제하였다.

이중면역 확산법

내독소에 대한 항체를 사용하여 Johnstone과 Tho-

rpe의 방법(24)에 따라 1.0% agarose gel상에서 침강반응을 행하고, 4°C에서 24시간 동안 방치한 후 생성되는 침강선을 관찰하였다.

SDS-Polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)

내독소를 Chung과 Kim의 방법(3)에 따라 0.1 N NaOH에 용해하고, Laemmli 방법(13)에 따라 15% running gel상에서 전기영동을 행하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 형태 및 생화학적 특성과 항생물질에 대한 저항성

분리된 Bt H9B 균주의 형태학적인 특성은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 그람양성의 간균으로 포자가 형성되고 내독소의 형태는 cuboid형이었다. 이균주의 포자낭과 포자의 평균 크기는 각각 1.4×3.3 μm와 1.0×1.7 μm이었고, Btd(type strain) 균주의 내독소는 전형적인 diamond형이었으며, Bt H9B 균주의 내독소는 cuboid형으로 Btd 균주의 내독소와는 형태학적으로 그 모양이 달랐다.

Bt H9B 균주의 항생물질에 대한 내성시험에서 penicillin계의 항생물질에서는 3균주 모두 동일하게 저항성을 나타내었으나, Bti균주는 trim-prim에 대한 저항성에서 차이가 있었으며, 73E10-2 균주는 tobramycin에 대한 저항성에서 차이를 나타내었다(Table

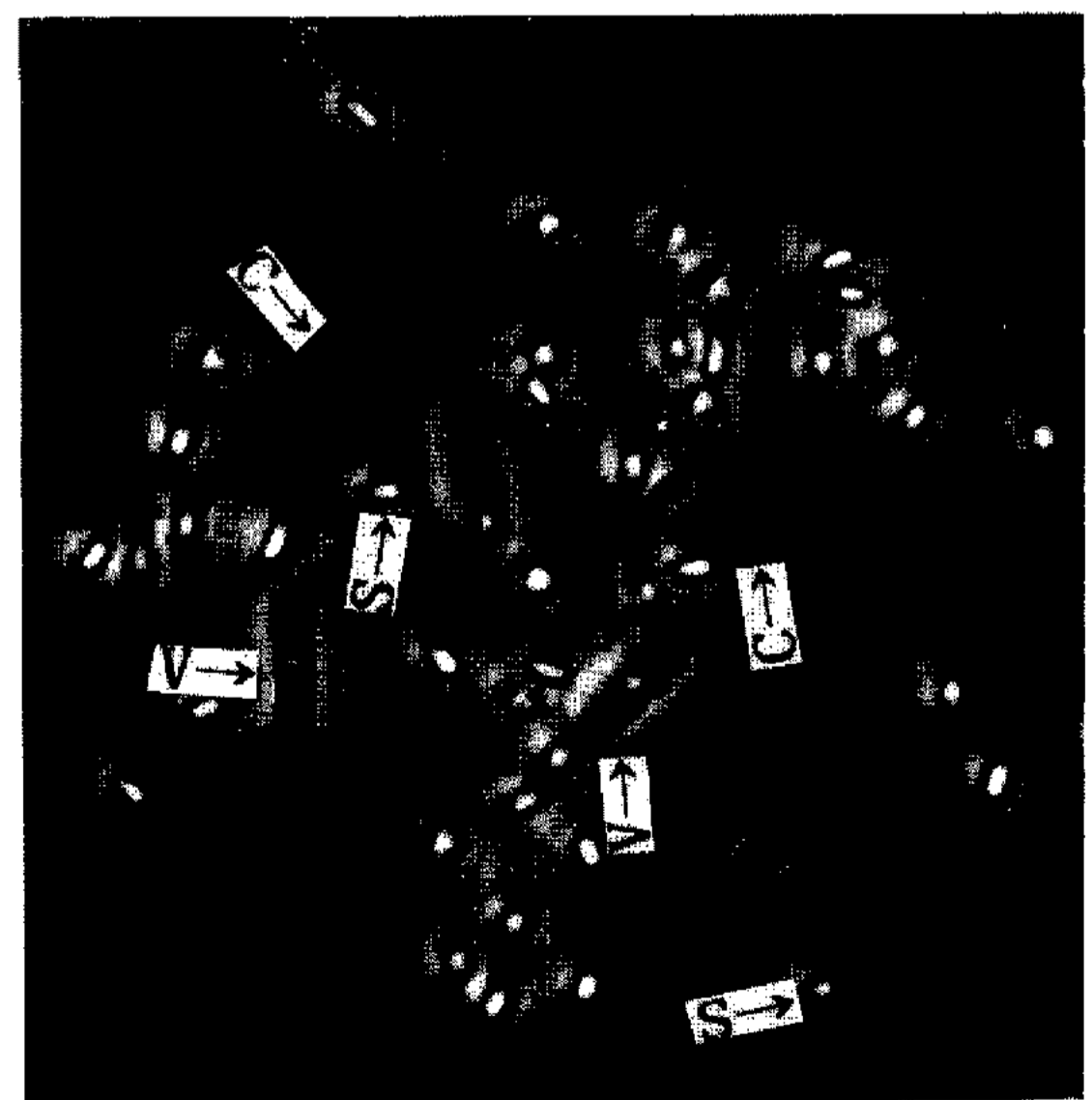


Fig. 1. Morphology of *B. thuringiensis* strain H9B on phase contrast microscope.

Symbols; S: spore, C: delta-endotoxin, V: vegetative cell.

Table 1. Biochemical properties of *B. thuringiensis* strain H9B newly isolated

Biochemical properties	<i>B. thuringiensis</i> strains		
	Btd	H9B	Bti
Rod-shape	+	+	+
Endospores formation	+	+	+
Motile	+	+	+
Gram stain	+	+	+
Parasporal crystal	+	+	+
Growth at pH 5.7(Nutrient broth)	+	+	+
Catalase	+	+	+
Lipase(olive oil)	+	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+
Lecithinase	+	+	+
β-galactosidase	-	-	-
Arginine dehydrogenase	+	+	+
Lysine decarboxylase	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
Indole production	-	-	-
Acetoin production	-	-	+
Citrate Utilization	+	-	+
Gelatin liquification	+	+	+
Glucose fermentation	-	-	-
Oxidative utilization			
Mannitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-
Rhamnose	-	-	-
Sucrose	-	-	-
Melibiose	-	-	-
Amygdalin	-	-	-
Arabinose	-	-	-
Xylose	-	-	-
Glucose	+	+	+
Hydrolysis of			
Esculine	-	-	-
Starch	+	+	+
Salicin	-	-	-
Mannose	-	-	-
Casein	+	-	-

Symbols; Btd; *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (type strain), H9B; *B. thuringiensis* Isolate, Bti; *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

+; positive reaction, -; negative reaction.

3). 또한 Bt H9B 균주의 생화학적 특성에서는 Bti 균주와는 acetoin 생산력과 citrate 이용성에서 차이가 있었으나, Btd 균주와는 citrate 이용성과 casein 분해력에서 차이가 있었다(Table 1).

편모항원성에 따른 항혈청 응집반응

*B. thuringiensis*는 편모항원성으로 현재 34종의 혈청형으로 분류되고 있으나(4), 공통항원을 함유한 혈청형을 제외한 27종을 대상으로 편모항원에 따른 항혈청 응집반응을 행하였다. 각각의 표준 Bt균주의 혈청형의 편모항원에 대한 항혈청과 Bt H9B 균주의 편모항원과의 응집반응을 조사해 본 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 혈청형 Btd의 편모에 대한 항체와 유일하게 응집반응이 형성되었다. 따라서 Bt H9B

Table 2. H agglutination of *B. thuringiensis* H9B with antisera of *Bacillus thuringiensis* serotypes

Serotype	Subspecies	<i>B. thuringiensis</i> strains	
		Btd	H9B
1	<i>thuringiensis</i>	-	-
2	<i>finitimus</i>	-	-
3	<i>alesti</i>	-	-
4	<i>dendrolimus</i>	-	-
5	<i>galleriae</i>	-	-
6	<i>entomocidus</i>	-	-
7	<i>aizawai</i>	-	-
8	<i>morrisoni</i>	-	-
9	<i>tolworthi</i>	-	-
10	<i>darmstadiensis</i>	+	+
11	<i>toumanoffii</i>	-	-
12	<i>thompsoni</i>	-	-
13	<i>parkistani</i>	-	-
14	<i>israelensis</i>	-	-
15	<i>dakoda</i>	-	-
16	<i>indiana</i>	-	-
17	<i>tohokuensis</i>	-	-
18	<i>kumamotoensis</i>	-	-
19	<i>tochigiensis</i>	-	-
20	<i>yunnanensis</i>	-	-
21	<i>colmeri</i>	-	-
22	<i>shandongiensis</i>	-	-
23	<i>japonensis</i>	-	-
24	<i>neoleonensis</i>	-	-
25	<i>coreanensis</i>	-	-
26	<i>silo</i>	-	-
27	<i>mexicanensis</i>	-	-

Symbols; Btd; *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (type strain), H9B; *B. thuringiensis* Isolate, +; positive reaction, -; negative reaction.

Table 3. Susceptibility of *B. thuringiensis* on antibiotics

Antibiotics	<i>B. thuringiensis</i> strains		
	Bti	73E10-2	H9B
Penicilline	R	R	R
Methicillin	R	R	R
Ampicilline	R	R	R
Cephalochin	R	R	R
Erythromycin	S	S	S
Chloramphenicol	S	S	S
Tetracycline	S	S	S
Clidamycin	S	S	S
Cefoperazon	S	S	S
Gentamycin	S	S	S
Kanamycin	S	S	S
Tobramycin	S	R	S
Trim-prim	S	R	R

Symbols; H9B; *B. thuringiensis* Isolate, Bti; *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, 73E10-2; *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* strain 73E10-2, R; resistant, S; sensitive.

균주는 serotype 10에 속한다고 사료된다.

내독소의 SDS-PAGE 전기영동

모기에만 독성을 나타내는 Bti 균주와 Bt H9B 균주의 내독소에 대한 SDS-PAGE를 행한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 Bt H9B 균주의 내독소는 70, 77 및 140 kd의 분자량을 함유하고 있으나, Bti 균주의 내독소(28, 53, 70, 135 Kd)와는 차이가 있었다. 이때 이들 양 균주의 내독소는 동일한 량의 단백질(25 µg/well)을 SDS-PAGE상에 전개시켰다. 특히 Gill 등(8)은 Bti의 내독소내에는 28 Kd의 hemolysin 단편이 존재하고 있다고 하였으며, Drobniewski와 Ellar(5)는 Btd 73E10-2의 내독소내에도 28 Kd의 hemolysin이 함유되어 있다고 보고하였다. 그러나 Bt H9B 균주의 내독소내에서는 28 Kd의 hemolysin이 전기영동상에서 나타나지 않았다. 이는 Bt H9B 균주의 내독소 단백질은 모기유충에 독작용을 하는 다른 Bt 균주의 내독소와 다소 다른 특징이 있으리라고 사료된다.

면역 확산법

분리된 Bt H9B 균주의 내독소와 모기에만 독성을 나타내는 Bti 및 Btd 73E10-2의 내독소에 대한 항원-항체반응을 이중면역확산법으로 조사해본 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 Bt H9B의 내독소는 Btd 73E10-

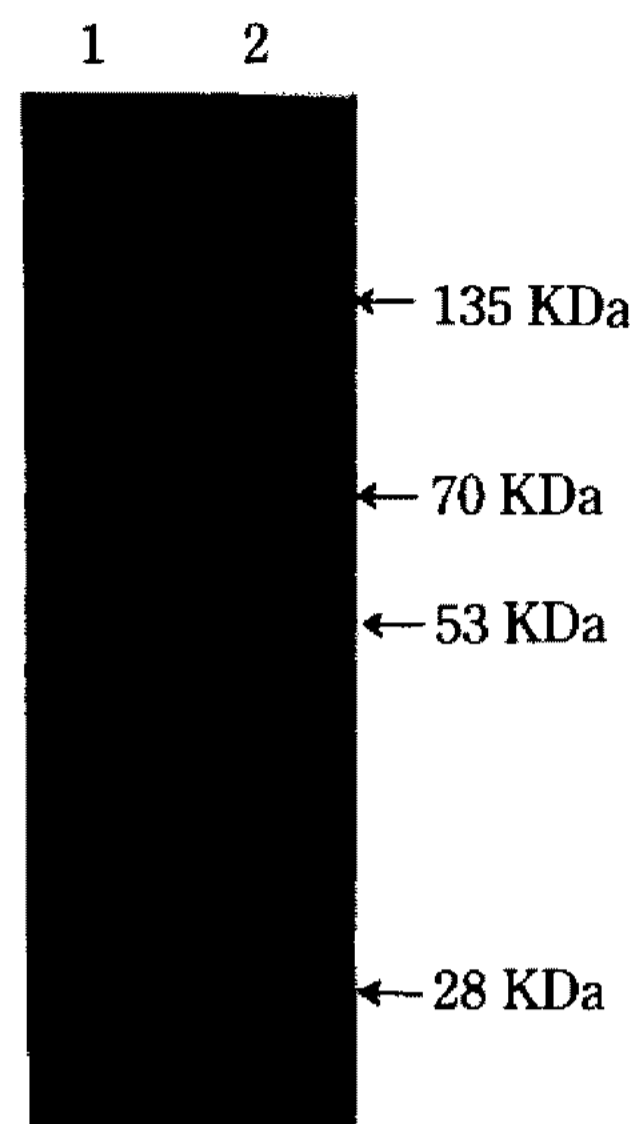


Fig. 2. Pattern of delta-endotoxin on SDS-PAGE. Symbols; lane 1: *B. thuringiensis* strain H9B, lane 2: Bti.

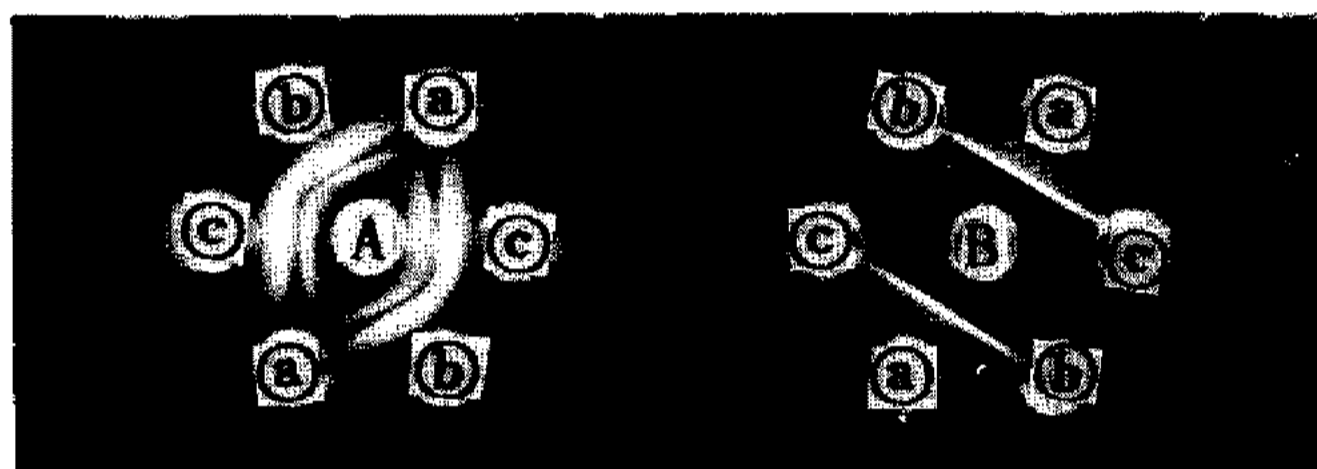


Fig. 3. Immunodiffusion patterns of delta-endotoxin. The center wells contained undiluted antisera against delta-endotoxin of strain Bt H9B (A) and Bti (B), respectively. The wells surrounding the anti-serum contained delta-endotoxin of Bti (a), Btd 73E10-2 (b), and Bt H9B (c).

2의 내독소와 완전히 일치하는 침강선이 형성되었으나, Bti 균주의 내독소와는 부분적으로 일치하는 아주 약한 침강선이 형성되었다. 이는 Ishii와 Ohba(11)가 기술한 바와 같이 Bti와 Btd 73E10-2 균주의 내독소의 immunoblot한 결과 동일한 항원성을 나타내는 단백질 단편이 존재한다는 것과 일치하고 있으며, 이 공통항원은 Bt H9B 균주의 내독소와도 동일하다고 사료되나 Fig. 2의 전기영동상에서 28 Kd의 단백질 단편이 존재하지 않음을 확인하였기 때문에 Btd 73E10-2 균주의 내독소와는 다소 차이가 있다.

모기유충에 대한 활성측정

Bt H9B 균주의 내독소와 모기에만 독성을 나타내는 Bti 및 Btd 73E10-2의 내독소에 대한 독성실험을 행한 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 Bt H9B 균주는 모기유충에 대한 독력이 Bti의 내독소 보다는

Table 4. Mosquitocidal and hemolytic activity of delta-endotoxin from *B. thuringiensis* strain H9B

Strains	LC ₅₀ (ng/ml)	Hemolytic activity (μg/ml)
Bti	26	185
73E10-2	186	405
H9B	70	240

The titer for hemolytic activity was expressed at the lowest protein concentration showing 100% lysis of red blood cells of rat. The LC₅₀ of the toxic crystals for the *Aedes aegypti* larvae was determined by method of Reed and Muench (1938), after being starved at 25°C for 48 hr. Symbols; H9B; *B. thuringiensis* Isolate, Bti; *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*, 73E10-2; *B. thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* strain 73E10-2.

약 3배 정도 약하였으나, Btd 73E10-2의 내독소보다는 약 3배정도 더 강하게 나타났으며, rat의 적혈구에 대한 용혈성 반응에서도 Btd 73E10-2의 내독소보다 Bt H9B 균주의 내독소가 더욱 강한 용혈성을 나타내었다. 따라서 모기유충에 독성을 나타내는 Bti(7)를 비롯하여 *morrisoni* PG-14(8), Btd 73E10-2(5) 및 *fukuokaensis* 균주(29) 등은 모두 25~28 Kd의 단백질 단편을 함유하고 있다고 알려져 있으나, Bt H9B 균주의 내독소에는 단백질 단편에 관계되는 28 Kd이 SDS-PAGE상에서 관찰되지 않지만 용혈성은 강하게 나타나고 있다는 점이 특이하며, 이는 Bt H9B 균주의 내독소 단편(70, 77 및 140 kd)중 어딘가에 용혈성 단백질의 단편이 함유되어 있음을 나타내고 있다고 사료된다.

또한 Yu 등(29)에 의하면 모기유충에 대한 독력의 강한 순서는 Bti>Btd 73E10-2>*kyushuensis*>*fukuokaensis* 균주의 내독소의 순서임으로 Bt H9B 균주의 내독소는 Btd 73E10-2의 내독소보다 약 2~3배 가량 더욱 강한 독성을 나타내고 있으나, *kyushuensis* 균주와 같이 용혈성 단백질을 함유하지 않은 것(10)과는 달리 강한 용혈성을 나타내었으므로 적어도 Bt H9B 균주의 내독소중에 용혈성 단백질의 단편은 모기유충에 독작용하는 다른 균주의 내독소와는 다소 차이가 있으리라고 사료된다.

요 약

모기유충에 독성을 나타내는 *B. thuringiensis* H9B 균주를 토양에서 분리선별하였다. Bt H9B 균주의 생화학적 특성과 편모항원응집 반응시험에서 Btd와

아주 유사하였다. Bt H9B 균주의 내독소는 Btd 73E10-2의 내독소와 이중면역확산시험에서 완전히 일치하는 침강선을 나타내었다. Bt H9B 균주의 내독소와 Bti의 내독소를 0.1 N NaOH 용액에 용해하여 SDS-Polyacrylamide gel상에서 전기영동한 결과 Bti의 내독소에는 용혈성 단백질(28 kd)이 함유되어 있음을 확인하였으나 Bt H9B 균주의 내독소에는 28 kd의 단백질 단편이 존재하지 않았다.

내독소의 모기유충(*A. aegypti*)에 대한 독성시험에서 Bt H9B 균주의 LC₅₀는 70 ng/ml였고, Bti의 내독소와 Btd 73E10-2의 내독소의 LC₅₀는 각각 26 ng/ml와 186 ng/ml로서 Bt H9B 균주의 내독소는 Btd 73E10-2의 내독소에 비해 약 2~3배 정도 모기유충에 대해 강한 독성을 나타내었으며, 또한 적혈구에 대한 용혈성은 Bt H9B 균주의 내독소가 Btd 73E10-2의 내독소보다 약 2배 정도 강하게 나타났다.

감사의 말

이 논문은 1991년도 교육부지원 학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음을 알려드리며, 항체를 제공해주신 일본 구주대학의 Mi-cho Ohba 박사님께 감사드립니다.

참고문헌

- Ahmad, W., C. Nicholls and D.J. Ellar. 1989. Cloning and expression of an entomocidal protein gene from *Bacillus thuringiensis galleriae* toxic to both lepidoptera and diptera. *FEMS Microbiol. Lett.* **59**: 197-202.
- Cheung, P.Y. and B.D. Hammock. 1985. Micro-lipid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 984-988.
- Chung, T.Y. and K.H. Kim. 1990. Immunological characteristics of mosquitocidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73 E10-2. *Kor. J. Appl. Microbiol.* **18**: 301-304.
- De Barjac, H. and E. Franchon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga.* **35**: 233-240.
- Drobniowski, F.A. and D.J. Ellar. 1989. Purification and properties of a 28-kilodalton hemolytic and mosquitocidal protein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* 73E10-2. *J. Bacteriol.*

- 171: 3060-3067.
6. Earp, D.J., E.S. Ward and D.J. Ellar. 1987. Investigation of possible homologies between crystal proteins of three mosquitocidal strains of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **42**: 195-199.
 7. Gill, S.S., G.J.P. Singh and J.M. Hornung. 1987. Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins. *Infect. Immun.* **55**: 1300-1308.
 8. Gill, S.S., J.M. Hornung, J.E. Ibarra, G.J. Singh and B.A. Federici. 1987. Cytolytic activity and immunological similarity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* isolate PG-14. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1251-1256.
 9. Goldberg, L.J. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News* **37**: 355-358.
 10. Held, G.A., C.Y. Kawanishi and Y.S. Huang. 1990. Characterization of the parasporal inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J. Bacteriol.* **172**: 481-483.
 11. Ishii, T. and M. Ohba. 1992. Immunological relationship between parasporal inclusions of *Bacillus thuringiensis* serovar *kyushuensis* and the three other mosquito-specific *Bacillus* strains. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **38**: 385-389.
 12. Kim, K.H., M. Ohba and K. Aizawa. 1984. Purification of the toxic protein from *Bacillus thuringiensis* serotype 10 isolate demonstrating a preferential larvicidal activity to the mosquito. *J. Invertebr. Pathol.* **44**: 214-219.
 13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**: 680-685.
 14. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
 15. Ohba, M. and K. Aizawa. 1978. Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **32**: 303-309.
 16. Ohba, M. and K. Aizawa. 1979. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* possessing 11a:11c flagellar antigenic structure: *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **33**: 387-388.
 17. Paudua, L.E., M. Ohba and K. Aizawa. 1978. Serological and bacteriological studies of the three isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10. pp. 169-180. In Annual Reports of ICME. Osaka University, Japan.
 18. Paudua, L.E., M. Ohba 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.
 19. Paudua, L.E., M. Ohba and K. Aizawa. 1984. Isolation of a *Bacillus thuringiensis* strain (serotype 8a:8b) highly and selectively toxic against mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **44**: 12-17.
 20. Reed, L.J. and H. Muench. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.* **27**: 493-497.
 21. Schenell, D.J., M.A. Pfannenstiel and K.W. Nickerson. 1984. Bioassay of solubilized *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals by attachment to latex beads. *Science.* **223**: 1191-1193.
 22. Sekar, V. 1987. DNA homology between the crystal toxin genes of several mosquito pathogenic *Bacillus thuringiensis* strains. *Curr. Microbiol.* **15**: 287-289.
 23. Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci, Pp. 1104-1139. In Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2. Williams & Wilkins.
 24. Johnstone, A., and R. Thorpe. 1987. *Immunochemistry in practice*(2nd ed). Blackwell Scientific Publication. Pp. 131-133.
 25. Thomas, W.E. and D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal δ -endotoxin: effects on insect and mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Sci.* **60**: 181-197.
 26. Yamamoto, T. and R.E. McLaughlin. 1981. Isolation of a protein from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* toxic to the mosquito larva, *Aedes taeniorhynchus*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **103**: 414-421.
 27. Yu, Y.M., M. Ohba, K. Aizawa and L.E. Padua. 1987. Mosquito larvicidal and hemolytic proteins purified from parasporal inclusions produced by *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8a:8b). *Syst. Appl. Microbiol.* **9**: 320-323.
 28. Yu, Y.M., M. Ohba and K. Aizawa. 1987. Synergistic effects of the 65- and 25-kilodalton proteins of *Bacillus thuringiensis* strain PG-14 (serotype 8A:8B) in mosquito larvicidal activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **33**: 459-462.
 29. Yu, Y.M., M. Ohba and S.S. Gill. 1991. Characterization of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *fukuokaensis* crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1075-1081.

(Received July 16, 1993)