

토마토 뿌리혹선충 *Meloidogyne incognita*에 치사력이 있는 *Bacillus thuringiensis* BtTH109 균주의 분리 및 특성

이광배¹ · 김광현^{2*} · 김영희²

¹대구보건전문대 위생과. ²동의대학교 미생물학과

Isolation and Characteristics of *Bacillus thuringiensis* Strain BtTH109 which is Toxic against Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita*

Lee, Kwang-Bae¹, Kwang-Hyeon Kim^{2*} and Young-Hee Kim²

¹Department of Hygienics, Taegu Health College, Taegu 702-260, Korea

²Department of Microbiology, College of Natural Science, Donggeui University Pusan 614-714, Korea

Abstract — In order to microbially control root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato, a strain BtTH109 of *Bacillus thuringiensis* producing root-knot nematocidal toxin was isolated. The strain BtTH109 was identified *B. thuringiensis* subsp. *indiana* (serotype 16) based on flagella antigenicity, biochemical properties, and morphological characteristics. The strain BtTH109 have extracellularly produced a root-knot nematocidal toxin, which was very toxic against not only egg-hatch but also the 2nd-nematode larva of root-knot nematode *in vitro*.

오늘날 식물기생선충에 의한 피해가 농작물의 수확량이 감소되는 원인중에 한가지(1-4)로 알려짐에 따라 선충방제의 중요성이 인식되고 있다. 이들중 뿌리혹선충의 기주식물로서는 종에 따라 다소 차이가 있으나 대체로 콩, 배추, 당근, 상치, 토마토, 감자, 담배, 백지, 작약, 인삼, 포도나무등 700여종 이상이 알려져 있으며, 최와 추(5)에 의하면 현재 우리나라에서는 4종의 뿌리혹선충, 즉 *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*, *M. arenaria*가 존재하며 그에 따른 피해도 점차 증가하고 있다고 하였다.

화학적 살충제의 살포가 환경오염을 유발하는 원인이 되고 토양 생태계가 파괴되는 문제점이 있기 때문에 선충구제를 위한 새로운 방법의 일환으로 뿌리혹선충에 대한 미생물 방제가 연구되기 시작하였다(6-11). 최근까지 뿌리혹선충에 대한 생물학적 방제 효과가 입증된 미생물로서는 *Bacillus penetrans*(12), *Paecilomyces lilacinus*(13, 14), *Arthrobotrys oligospora*(15, 16), *Hirsutella rhossiliensis*(17), *Arthrobotrys conoides*(18)등이 알려져 있으나, 이들 대부분은 곰팡이들이다. *Bacillus penetrans*는 분류학상으로도 논의가 많은 절대기생균으로 토양내에서 생육이 불가능하여

숙주인 기생선충과 혼합하여 사용해야 함으로 배양상에서부터 문제점을 가지고 있다.

따라서 본인등은 뿌리혹선충을 미생물학적인 방법으로 구제할 목적으로 토양내에서 생육이 가능하며 지속적인 효과를 기대할 수 있고, 뿌리혹선충의 알이나 유충을 죽이는 미생물중에서도 포자형성 세균인 *Bacillus*속의 균주를 대상으로 선별하던중 뿌리혹선충에 강한 살충력이 있는 균주를 분리하였기에 그 균주에 대한 특성을 기술하고자 한다.

재료 및 방법

사용된 재료

*Bacillus thuringiensis*의 동정용 표준균주와 각 표준균주의 편모에 대한 항혈청은 일본 Kyushu 대학 생물방제연구소의 Dr. M. Ohba로부터 분양받았다. 토마토는 *Lycopersicum pimpinellifolium*(김해종묘 산)을 시중에서 구입하였으며, 뿌리혹선충(Root-knot nematode)은 심하게 감염된 토마토 뿌리를 경북 칠곡군 낙동강 유역의 토마토 재배 농가에서 수집하고 Caviness와 Jensen(19; C.S.F. Method)에 따라 뿌리혹선충의 유충을 분리하였다. 분리된 뿌리혹선충은 Seinhorst 등(20)이 기술한 방법으로 최정연 교수님(경북대 농생물학과)의 도움을 받아 선충의 두부의 모

Key words: Root-knot nematocidal toxin, *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*

*Corresponding author

양과 stylet 모양을 중심으로 동정하였고, 본 실험에서는 분리된 *Meloidogyne incognita*가 사용되었다.

토마토 생육 및 뿌리혹선충의 배양

뿌리혹선충의 배양은 미리 준비한 모래와 흙을 1:1로 혼합하고 이를 습열멸균(120°C, 20분)한 다음 pot (10×13 cm)에 멸균된 토양을 넣고 토마토 씨앗을 파종하였다. 파종 8일 후 본잎이 2~3엽이 나온 모종은 멸균된 토양이 들어 있는 다른 pot(155×24 cm)에 이식하였다. 그로부터 1주일 후 뿌리혹선충의 알을 1m²/당 1,000개가 되도록 희석한 희석액 5m²/을 각 토마토 뿌리 부근에 접종하였다. 뿌리혹선충의 알이 접종된 토마토는 25°C에서 60일간 생육시켜서 배양한 후 상기에서 기술한 바와 같이 토마토의 뿌리나 pot내의 토양으로부터 뿌리혹선충의 알과 유충을 분리하여 본 실험을 행하였다.

균 분리 및 선별

영남지방의 뿌리혹선충의 피해가 많은 지역을 중심으로 채취한 토양을 균 분리용 시료로 사용하였다. 토양 1g을 멸균된 증류수 5m²/에 현탁하고 토양 덩어리가 없도록 충분히 진탕하였다. 그후 토양 현탁액은 포자를 형성하지 않는 균들을 제거하기 위해 80°C에서 30분간 열처리하였다. 열처리한 토양 현탁액의 상층액 0.1m²/를 TYG 한천평판배지(21)에 접종하여 30°C에서 3~5일간 배양시킨 후 형성된 colony를 선별 분리하였다. 분리 선별된 균주는 멸균된 증류수 1m²/에 약 1.0×10⁷ cell이 되도록 현탁한 다음 25°C에서 부화시킨 뿌리혹선충의 2령 유충(1,600마리/m²/)에 투여하여 광학현미경으로 경시적으로 조사하고 이들 중 유충에 치사력이 있는 균주를 선별하였다.

선별균주의 동정

최종 선별된 균주의 형태학적 관찰은 위상차현미경을 사용하였다. 또한 생화학적인 성질의 검토는 Bergey의 Manual(22) 및 Smibert와 Krieg(23)의 방법에 따라 행하였으며, 편모항원에 의한 응집반응시험은 Paudua 등의 방법(24) 및 De Barjac과 Frachon의 방법(25)에 의거하여 조사하였다.

뿌리혹선충에 대한 독성물질 생산 및 정제

독성물질의 생산은 10m²/의 LB배지(26)를 함유한 25m²/용 삼각 flask에 BtTH109 균주를 1백금이 접종하여 30°C에서 하룻밤 동안 진탕배양(130 rpm)시킨 후, 그 배양액 0.5m²/를 100m²/의 TYG 배지에 재접종하여 5일 동안 다시 진탕배양하였다. 배양액은 원

심분리(15,000 rpm, 30 min)하여 상층액과 균체-결정성 내독소의 혼합물로 나누고 내독소는 Cheung과 Hammock 등(27)의 방법으로 분리하였으며, 배양상층액은 Levinson 등(28)이 기술한 바와 같이 먼저 autoclave(15 Lb, 20 min)를 행하고 생성된 침전물은 다시 원심분리하여 제거시킨 다음 상층액은 1/3 정도가 남을 때까지 진공농축하여 50 mM K₂HPO₄로 pH 3.0이 되도록 조정하였다. pH를 조정된 용액은 4°C에서 3시간 방치한 후 생성된 황색의 침전물은 원심분리하여 제거하고 그 상층액을 뿌리혹선충에 대한 조독성물질(Crude toxic substance)로 사용하였다.

뿌리혹선충에 대한 독성시험

미리 뿌리혹선충이 감염된 pot내의 토마토 뿌리에서 C.S.F. method(19)로 분리한 뿌리혹선충의 알은 0.5% NaOCl로 10분간 표면살균하고 멸균된 증류수로 충분히 수세하였다. 뿌리혹선충에 대한 독성시험중에 선충의 알을 사용한 경우는 독성물질(1m²/)과 선충의 알(2m²/; 1,000 eggs/m²/)을 혼합하여 멸균된 소형 cap tube에 넣어서 25°C의 항온실에서 10일 동안 경시적으로 부화되는 상태를 현미경으로 직접 검정하였다. 이때 알 속에 2령유충의 형상이 알 내부에서 관찰되면 부화된 알로 간주하였으며, 그 이외는 미분화된 알로 산출하였다. 또한 선충의 유충이 사용되는 경우는 선충의 알을 미리 부화(25°C, 10 days)시킨 다음 운동성이 강한 2령유충을 25°C의 항온실에서 시간별로 현미경으로 관찰하면서 치사된 유충의 수를 계측하였다. 이때 사용된 유충의 수는 1m²/당 600마리 정도로 희석한 2령유충이 사용되었다.

결과 및 고찰

균 분리 및 선별

영남지방의 토양으로부터 분리한 포자형성 세균중 토마토 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)의 2령유충에 독성이 있는 한 균주의 형태학적인 특징을 위상차현미경으로 조사해 본 결과 포자와 내독소를 생산하는 전형적인 *Bacillus thuringiensis* 균주로서 BtTH 109 균주라고 명명하였다(Fig. 1).

BtTH109 균주의 형태 및 생화학적 성질

뿌리혹선충에 독성을 가진 BtTH109 균주의 생화학적 성질을 조사하였다. 그 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 BtTH109 균주는 표준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *indiana*(Bt indiana)의 생화학적 성질에서 citrate 이용성에서만 차이가 있었다. 그러나 내독소의

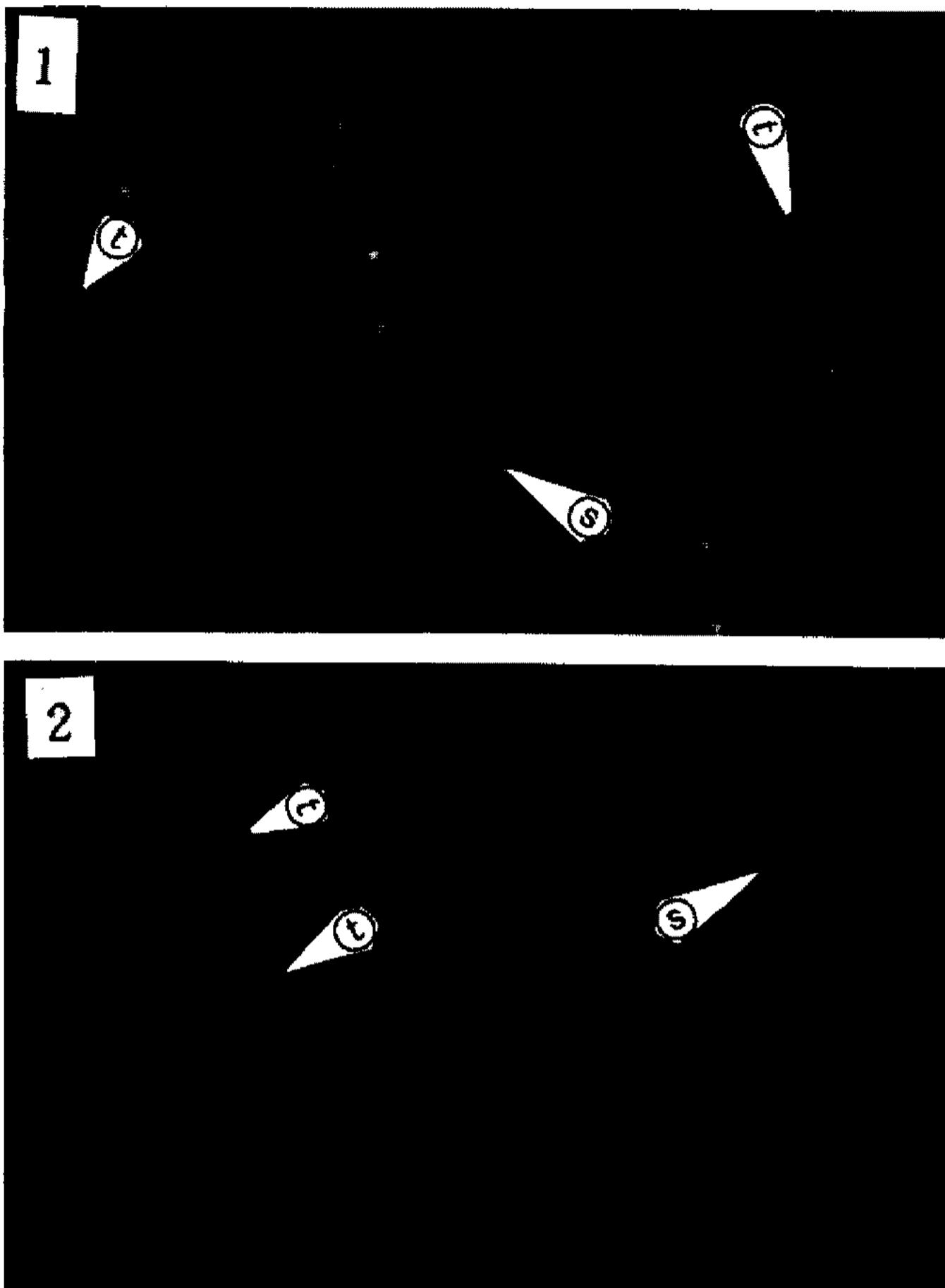


Fig. 1. Morphology of *Bacillus thuringiensis* strain BtTH109 on phase contrast microscope.
 Symbols: (S), endospore; (D), delta-endotoxin; 1, strain BtTH109; 2, *B. thuringiensis* subsp. *indiana*(type strain)

형태에서 표준균주인 *Bt indiana*의 내독소는 diamond과 cuboid형이 혼재되어 있었으나, 분리균주인 BtTH109 균주의 내독소는 모두 cuboid형으로만 구성되어 있어 내독소의 형태학적인 차이가 있었다(Fig. 1).

편모항원에 의한 응집반응

*B. thuringiensis*는 편모항원성으로 현재 34종의 혈청형으로 분류되고 있으나(De Barjac과 Francon ; 1990), 공통항원을 함유한 혈청형을 제외한 27종을 대상으로 편모항원에 따른 항혈청반응을 행하였다. 각각의 표준 *B. thuringiensis* 균주의 혈청형의 편모항원에 대한 항혈청과 BtTH109 균주의 편모항원과의 응집반응을 조사해 본 결과 Table 2와 같이 BtTH109 균주는 serotype 16인 *B. thuringiensis* subsp. *indiana*의 편모에 대한 항체와 유일하게 응집반응이 형성되었다. 따라서 BtTH109 균주는 serotype 16에 속한다고 사료된다.

Table 1. Biochemical properties of *B. thuringiensis* strain BtTH109

Strains\ Biochemical properties	Reference	BtTH109
Rod-shaped	+	+
Endospores produced	+	+
Motile	+	+
Gram stain	+	+
Parasporal crystals	D and C	C
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	-	-
Casein hydrolysis	+	+
Oxidative utilization;		
L-Mannitol	-	-
Inositol	-	-
Sorbitol	-	-
Rhamnose	-	-
Sucrose	-	-
Melibiose	-	-
Amygdalin	-	-
D-Xylose	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Glucose	+	+

Notes: Reference; *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* (type strain), +; positive, -; negative, D; diamond shape, D and C; mixture of diamond and cuboid shape

독성물질의 생성과 뿌리혹선충에 대한 처사율

BtTH109 균주가 뿌리혹선충의 2령유충에 대한 독성물질의 생성을 확인하기 위해 우선 TYG 배지에서 5일 동안 진탕배양한 BtTH109 균주로부터 배양여액과 균체 및 내독소로 나누어서 유충에 대한 독성시험을 행하였다. 그 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 BtTH109 균주의 균체나 내독소보다 배양 여액에서

Table 2. H agglutination of strain BtTH109 with anti-sera of *Bacillus thuringiensis* serotype

Serotype	Subspecies	Reference	Strain BtTH109
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: Reference; *B. thuringiensis* subsp. *indiana* (type strain), +; positive, -; negative.

24시간 이내에 거의 100%의 치사율을 보여 BtTH109 균주는 독성물질을 균체 외로 분비하고 있음을 알았다. 또한 BtTH109 균주의 배양 여액을 Levinson 등 (28)이 기술한 β -exotoxin의 정제방법으로 조정제하고 뿌리혹선충의 알을 시간별로 처리하여 그 부화율을 측정된 결과 Table 4에서 보는 바와 같이 독성물질은 뿌리혹선충의 알의 부화율도 강하게 억제시켰다. 따라서 BtTH109 균주의 뿌리혹선충에 대한 독성물질은 알과 유충 모두에 독작용을 함을 알았다.

일반적으로 *B. thuringiensis*속의 균주는 단백질성의 내독소(δ -endotoxin)를 생산하며, 또한 아종에 따라서는 균체 밖으로 β -exotoxin을 분비하는 특징이 있다. 이들중 내독소는 나방이등의 곤충의 유충에 특이적으로 독성을 나타내고(29), 동물에 기생하는 선충인 *Cooperia punctata*, *C.oncosphora*와 *Ostertagia*

Table 3. Toxicity of cultured broth of the strain BtTH109 against larvae of root-knot nematode

Sample	Mortality(%) after 24 hr
Supernatant	98.7
Delta-endotoxin	24.5
Mixture of cells and delta-endotoxins	23.4
Supernatant + mixture of cells and delta-endotoxins	100
Control	5.5

The strain BtTH109 was cultured in TYG medium at 30°C for 5 days in shaking incubator. 200 μ g/ml of delta-endotoxin was introduced into the 2nd-larva of root-knot nematode for toxicity test. Tap water was used as control.

Table 4. The ratio of nematode egg hatching on exposure time in cultured broth of the strain BtTH109

Incubation time(day) \ Exposure time(hr)	Ratio of nematode egg hatching(%)			
	3	6	9	12
12	12	40	55	82
24	15	42	48	68
48	8	20	42	62
72	3	18	35	45
NC	18	48	65	93
PC	3	5	12	12

Symbols; PC: Crude purified nematocidal toxin from the strain BtTH109 was used. NC: Tap water was used for nematode egg hatching.

ostertapi 등을 치사시킨다(30). 특히, Bone 등(31)에 의하면 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* 균주가 생산한 내독소는 동물기생선충인 *Trichstrongylus colubriformis*의 2령유충이나 그 알에 투여했을 때 LD₅₀는 각각 16 ng/ml와 1.8 ng/ml였다. 그러나, BtTH109 균주가 생산한 내독소는 뿌리혹선충에는 전혀 독작용을 나타내지 못하였으며, BtTH109 균주의 배양액에 존재하는 토마토 뿌리혹선충(*M. incognita*)에 대한 독성물질은 Levinson 등(28)이 보고한 β -exotoxin의 정제방법으로 조정제한 결과 autoclave에 의해 독성이 파괴되지 않는 내열성인 점과, 그 독성물질의 수용액에서 UV 흡수 spectrum을 조사해 본 결과는 λ_{max} = 265와 λ_{min} = 245였으므로 BtTH109 균주의 뿌리혹선충에 대한 독성물질이 핵산유사물질인 β -exotoxin일 가능성이 있다고 사료된다. 또한, Devidas와 Rehberger(32) 및 Hukuhara(33)에 의하면 *B. thuringiensis*

subsp. *thuringiensis*가 생산하는 β -exotoxin은 뿌리혹선충의 알과 유충 모두에 독작용을 한다고 보고하였으며, 본인등이 분리한 BtTH109 균주의 조정제된 독성물질이 뿌리혹선충의 알과 유충 모두에 독작용을 나타낸다는 결과와 잘 일치하였다. 따라서 BtTH109 균주가 생산하는 뿌리혹선충에 대한 독성물질은 β -exotoxin이라고 사료되어지나, 아직까지는 *B. thuringiensis* subsp. *indiana*에 속하는 균주가 β -exotoxin을 생성한다는 보고가 없으므로 BtTH109 균주가 생산하는 뿌리혹선충에 대한 독성물질은 β -exotoxin과 유사한 구조를 가진 다른 유형의 독성물질일 가능성도 있다고 사료된다.

요 약

영남지방의 토마토 경작에 피해를 많이 입히는 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)을 방제할 목적으로 뿌리혹선충의 알이나 유충을 죽이는 미생물 *B. thuringiensis*의 한 균주(BtTH109)를 분리선별하였다. 분리된 BtTH109 균주는 형태학적, 생화학적인 특징 및 편모항원성에 의한 항혈청응집반응의 결과 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(serotype 16)으로 동정되었다. 또한 분리된 BtTH109 균주는 *in vitro* 상에서 뿌리혹선충의 알과 유충을 모두 치사시키는 독성물질을 균체외로 분비하였다.

감사의 말

본 연구를 위해 *B. thuringiensis*의 표준균주와 각 표준균주의 편모에 대한 항체를 제공해 주신 일본 Kyushu 대학의 Michio Ohba 교수와 뿌리혹선충인 *Meloidogyne incognita*의 동정에 조언해 주신 경북대 최영연교수님께 깊이 감사드립니다.

참고문헌

- Barker, K.P., P.B. Shoemaker, and L.A. Nelson. 1976. Relationship of initial population densities of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* to yield of tomato. *J. Nematol.* **8**: 232-239.
- Olthof, T.H.A. and T.W. Potter. 1977. Effect of population densities of *M. hapla* on growth and yield of tomato. *J. Nematol.* **9**: 296-300.
- Stirling, C.R. and R. Mankau. 1979. Mode of parasitism of *Meloidogyne* and other nematode egg by *Daetyrella oviparasitica*. *J. Nematol.* **11**: 282-288.
- Vran, T.C. 1982. Relationship between *Meloidogyne hapla* density and damage to carrots in organic soils. *J. Nematol.* **14**: 50-56.
- 최영연, 추호열. 1979. 경제작물에 영향을 미치는 뿌리혹선충에 관한 연구. *한국식물보호학회지* **17**: 89-98.
- Mankau, R. and N. Prasad. 1977. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes. *J. Nematol.* **9**: 40-45.
- Jatara, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Ann. Rev. Phytopathol.* **24**: 453-489.
- Mankau, R. 1980. Biological control of nematode pests by natural enemies. *Ann. Rev. Phytopathol.* **18**: 415-440.
- Dunn, M.T., R.M. Sayre, A. Carrell, and W.P. Wergin. 1982. Coloization of nematode egg by *Paecilomyces lilacinus*(Thom) Samson as observed with scanning electron microscope. *Scanning electron microscope* **111**: 1351-1357.
- Zari, E.A. and D.S. Bhatti. 1990. In vivo parasitism of *Meloidogyne javanica* by an oviparasitic Fungus, *Paecilomyces lilacinus*. *Nematol. Medit.* **18**: 141-143.
- Kim, G.D. and R.D. Riggs. 1991. Characteristics and efficacy of a sterile Hyphomycete(ARF18), a new biocontrol agent for *Heterodera glycine* and other nematodes. *J. Nematol.* **23**: 275-282.
- Stirling, C.R. 1984. Biological control of *Meloidogyne javanica* with *Bacillus penetrans*. *Phytopathol.* **74**: 55-60.
- Cabanillas, E. and K.P. Barker. 1989. Impact of *Paecilomyces lilacinus* inoculum level and application time on control of *Meloidogyne incognita* on tomato. *J. Nematol.* **21**: 115-120.
- Davide, R.G. and R.A. Zorilla. 1983. Evaluation of a fungus, *P. lilacinus*(Thom) Samson, for the biological control of the potato cyst nematode *Globoderrostochiensis* woll as compard with some nematocidies. *Phil. Agr.* **66**: 397-404.
- Jaffee, B.A. and E.I. Zehr. 1985. Parasitic and saprophytic abilities of the nematode-attacking fungus *Hirsutella rhossiliensis*. **17**: 341-345.
- Tunlid, A. and S. Jansson. 1991. Protease and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Artheobotrys oligospora*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2868-2872.
- Eayre, C.G., B.A. Jaffe, and E.L. Zehr. 1987. Suppression of *Criconemella Xenoplax* by the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis*. *Plant Disease* **71**: 832-834.
- Al-Hazmi, A.S., D.P. Schmitt, and J.N. Sasser. 1982. The effect of *Arthrobotrys conoides* on *Meloidogyne incognita* population densities in corn influenced by temperature, fungus inoculum density and time of fungus introduction in the soil. *J. Nematol.* **14**: 168-174.

19. Caveness, F.E. and H.J. Jensen. 1955. Modification of the centrifugal flotation technique for the isolation and concentration of nematode and their eggs from soil and plant tissue. *Proc. Helminth. Soc. Wash.* **16**: 87-89.
20. Seinhorst, J.W. 1959. A rapid method for the transfer of nematode from fixative to anhydrous glycerine. *Nematologica.* **8**: 29-32.
21. Hwang, J.Y. and K.H. Kim. 1987. Characteristics of hemolysin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**: 425-429.
22. Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming gram-positive rods and cocci, Pp 1104-1135. In J.G. Holt(ed.), *Bergey's manual of systemetic Bacteriology*. Vol. 2, Williams and Wilkins.
23. Smibert, R.M. and N.R. Krieg. 1981. General characterization, Pp 417-418. In P. Gerhardt(ed.), *Manual method for general bacteriology*, American Society for Microbiology.
24. Paudua, L.E., M. Ohba, and K. Aizawa. 1978. Serological and bacteriological studies of three isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10. Pp 169-180. In K. Taguchi(ed.), *Annual Reports of ICME*, Osaka University, Japan.
25. De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis*. *Entomophaga.* **35**: 233-240.
26. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning(a laboratory manual)*, Pp. A1. 2th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
27. Cheung, P.Y. and B.D. Hammock. 1985. Microli-
pid-droplet encapsulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* delta-endotoxin for control of mosquito larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 984-988.
28. Levinson, B.L., K.J. Kasyan, S.S. Chiu, T.C. Currier, and J.M. Gonzalez, Jr. 1990. Identification of β -exotoxin production, plasmids encoding β -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.* **172**: 3172-3179.
29. Aronson, A.I., W. Beckman, and P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**: 1-24.
30. Ciordia, H. and W.E. Bizzel. 1961. A preliminary report on the effects of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis berliner* on the development of the free living stages of some cattle nematodes. *J. Parasitol.* **47**: 41-41.
31. Bone, L.W., K.P. Bottjer, and S.S. Gill. 1985. *Trichostrongylus coluriformis*: egg lethality due to *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Experimental Parasitol.* **60**: 314-322.
32. Devidas, P. and L.A. Rehberger. 1992. The effects of exotoxin(thuringiensin) from *Bacillus thuringiensis* on *Meloidogyne incognita* and *Caenorhabditis elegans*. *Plants and Soil.* **145**: 115-120.
33. Hukuhar, T. 1972. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root knot disease. *J. Invertebr. Pathol.* **20**: 377-378.

(Received March 23, 1994)