

저곡창고에서 분리된 *Bacillus thuringiensis*의 특성조사

Characterization of *Bacillus thuringiensis* Isolated in Granary Dusts.

김호산¹ · 박현우¹ · 이대원¹ · 유용만² · 강석권¹

Ho San Kim¹ Hyun Woo Park¹, Dae Weon Lee¹, Yong Man Yu² and Seok Kwon Kang¹

ABSTRACT In order to isolate naturally occurring novel *Bacillus thuringiensis* strains, we investigated the distribution of *B. thuringiensis* from granary which exist in Kyong-gi province, Korea. A total of 146 strains of *B. thuringiensis* producing spore and crystal were isolated. The toxicity of *B. thuringiensis* isolates was examined against lepidopteran larvae (*Bombyx mori*), dipteran larvae (*Culex pipiens*) and coleopteran larvae (*Sitophilus oryzae*), respectively. The results showed that a large number of *B. thuringiensis* isolates from granary dusts were isolated and most isolates were toxic to lepidopterous larvae. Also, non-toxic *B. thuringiensis* isolate was common. In order to isolate many *B. thuringiensis*, therefore, it suggested that granary is favorable locality.

KEY WORDS *Bacillus thuringiensis*, *Bombyx mori*, *Culex pipiens*, *Sitophilus oryzae*.

초 **록** 효과적인 미생물 제제로 사용할 수 있는 *Bacillus thuringiensis* 균주들을 분리하기 위하여 경기도 일원의 72군데의 저곡창고에서 먼지를 채취하여 *B. thuringiensis*의 분포와 독성을 조사하였다. 총 411개의 채취된 저곡창고의 먼지에서 포자와 내독소 단백질을 생산하는 146개에 이르는 많은 수의 *B. thuringiensis*가 분리되었다. 저곡창고에서 분리된 146개의 B.t의 독성 분포는 나비목의 누에(*Bombyx mori*)유충에 독성을 띠는 균주가 84%로 가장 많이 분리되었고, 파리목의 빨간 집모기(*Culex pipiens*)유충에는 3%, 나비목과 파리목에 동시에 독성을 띠는 균주는 1%였다. 그러나 딱정벌레목의 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)에 독성을 띠는 균주는 분리되지 않았으며, 내독소 단백질은 형성하지만 독성을 띠지 않는 *B. thuringiensis*가 12%의 비율로 분리되어 흔히 존재함을 알 수 있었다. 이상의 결과로서 저곡창고는 *B. thuringiensis*의 유리한 분포장소임을 알 수 있었다.

검색어 *Bacillus thuringiensis*, 누에(*Bombyx mori*), 빨간 집모기(*Culex pipiens*), 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)

B. thuringiensis(이하 B.t로 약칭)가 생산하는 Parasporal inclusions은 곤충에 독성을 갖는 특성을 보이고 있기 때문에 오래전 부터 농업해충 및 위생해충의 방제를 위한 무공해 미생물제제로서 사용되어 왔다(Aronson *et al.* 1986, Hofte & Whiteley 1989, Luthy *et al.* 1982).

B.t는 Ishiwata(1901)에 의해 누에(*Bombyx mori*) sotto병의 병원체임이 발견된 이래 곤충의 사체(Ishiwata 1901; Berliner 1915), 토양 (DeLucca *et al.* 1981), 양잠농가(Ohba *et al.* 1984), 저장작물(DeLucca *et al.* 1982), 식물체의 잎표면(Smith & Couche

1991), 그리고 연못(Goldberg & Margalit 1977) 등에서 분리, 보고되었다. 최근에는 B.t가 어떤 특정지역에만 편재하는 것이 아닌 세계의 다양한 지역의 자연토양에도 널리 분포하고 있음을 보여 주었다(Ohba & Aizawa 1986a; Martin & Travers 1989; Karamanlidou *et al.* 1991). 이들 지역을 대상으로 새로운 균주가 지속적으로 보고되고 있으나(Tanada & Harry 1993), 국내에서는 위와 같이 여러 지역 별로 나누어 B.t를 분리한 보고가 없었기 때문에 본 실험실에서는 양잠농가(Kim *et al.* in press), 전국의 다양한 토양, 저곡창고 등으로 분리지역을 구분하여

¹서울대학교 농업생명과학대학 (College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University)

²경농 경주연구소 (Kyung-Ju Research Institute, Kyung Nong Corporation)

B.t의 분포와 특성을 조사하기 위해 실험을 수행코자하였다.

따라서 본 연구에서는 저곡창고가 야외에서 해충에 노출되어 자란 저장작물들이 오랫동안 보관되는 장소의 특성상 B.t가 분포하기에 적당한 장소로 간주되어, 일차로 경기도 일원의 저곡창고를 대상으로 B.t를 분리하여 그 분포와 특성을 조사하고 아울러 효과적인 미생물제제로 사용할 수 있는 독성이 강하거나 숙주역이 넓어진 새로운 B.t 균주들을 분리하기 위하여 이 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취

경기도 전역(북부, 중부, 남부, 서부 등)에 존재하는 72개의 저곡창고(양곡창고, 정미소를 중심으로) 주변에서 411개의 먼지를 채취하여 실험에 사용하였다.

2. B.t의 분리

B.t는 Ohba와 Aizawa(1978)의 방법에 의거하여 분리하였다. 시료 1g을 50 ml Conical tube에 넣은 뒤, 멸균증류수 9 ml를 첨가하여 강하게 5분 동안 흔들어서 준다. 이 현탁액의 상층을 새로운 tube에 옮기고, 포자를 형성하지 못하는 세균들을 선택적으로 제거하기 위하여 80°C에서 5분간 열처리하였다. 이 현탁액을 10^{-2} 과 10^{-3} 으로 각각 희석하여 nutrient agar plate에 고르게 도말했다. 이 plate를 28°C에서 4~7일간 배양한 후에 형성된 *Bacillus* 콜로니들 중에서 외형이 B.t와 비슷한 콜로니들만 선발하여 위상차현미경으로 내독소 단백질과 포자를 형성하는 여부를 관찰하였다. 또한 영양세포들, 포자들, 내독소 단백질들의 형태적 특징들을 검정하였다 여기서 내독소 단백질을 형성하는 콜로니만 nutrient agar plate에 옮긴 후, 순수배양하여 4°C에 보관하면서 살충성 조사를 비롯한 기타 실험을 수행하였다.

3. 분리된 B.t의 정량적 독성검정

B.t를 G.Y.S 배지(Nickerson *et al.* 1974)에 접종하여 sporulation이 일어나서 세포내에 포자와 내독소 단백질이 형성되고, 후에 autolysis에 의해 이들이

세포외부로 방출될 때까지 27°C에서 4~7일 동안 배양하였고, 배양중에 위상차현미경으로 계속 세포의 변화를 관찰하였다.

B.t 배양액의 포자농도를 측정된 다음, 10^7 spores/ml의 농도로 접종된 200 μ l를 2g의 인공사료에 첨가하여 각 구당 2령의 누에(*Bombyx mori*)유충 각 20마리씩을 넣고 치사율을 결정하기 위하여 25°C에서 사육하면서 48시간 동안 조사하였다. 대조구로서 나비목에 대표적인 독성을 보이는 *B.t var kurstaki*와 무처리한 것을 사용했다.

또한 이들 B.t를 서울대학교 농업생명과학대학 위생곤충실험실에서 제공된 빨간 집모기(*Culex pipiens*) 유충에 대해서도 독성을 조사하였다. 2령의 모기 유충 20마리를 20 ml의 포자와 내독소 단백질 혼합물(10^7 spores/ml)이 포함된 50 ml Conical tube에 넣고 먹이를 주지 않으면서 25°C에서 48시간 동안 치사율을 조사하였다. 대조구로서 파리목에 강한 독성을 보이는 *B.t var. israelensis*와 무처리한 것을 사용했다. 그리고 딱정벌레목인 쌀바구미(*Sitophilus oryzae*)에 대한 독성검정은 쌀 5g을 10^9 spores/ml의 B.t 배양액에 2시간 동안 침지하고 음전한 후, 20마리의 바구미를 넣어 25°C에서 사육하면서 1주일 간 그 치사율을 조사하였다.

4. 위상차현미경 및 전자현미경 관찰

Sporulation이 일어난 B.t의 포자와 내독소 단백질 혼합물에서 그들의 크기와 형태를 알아보기 위하여 위상차현미경과 전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 위상차현미경(Olympus Model VAN OX)으로 관찰하기 위해서 소량의 B.t 배양액을 slide glass 위에 떨어 뜨린 후, cover glass를 덮고 emulsion oil을 넣고 1500배로 관찰하였다. 한편, 주사전자현미경(Philips SEM 515) 관찰을 위해 시료는 냉동건조하고 알루미늄 원반시료대 위에서 자연건조시킨 후, 탄소로 coating하고 금으로 염색하여 관찰하였다.

결 과

경기도 일원에 존재하는 72개의 저곡창고를 대상으로 B.t의 분포와 특성을 알아보기 위하여 저곡창고 주변의 먼지를 채취하여 존재하는 B.t를 분리하는 실험을 수행한 결과, 경기도의 다양한 지역에서 채

Table 1. Isolation of *Bacillus thuringiensis* in granary dusts

Locality	Number of samples examined	Number of samples with Bt isolate	Number of Bt isolated
Kyonggi-do	411	119	146

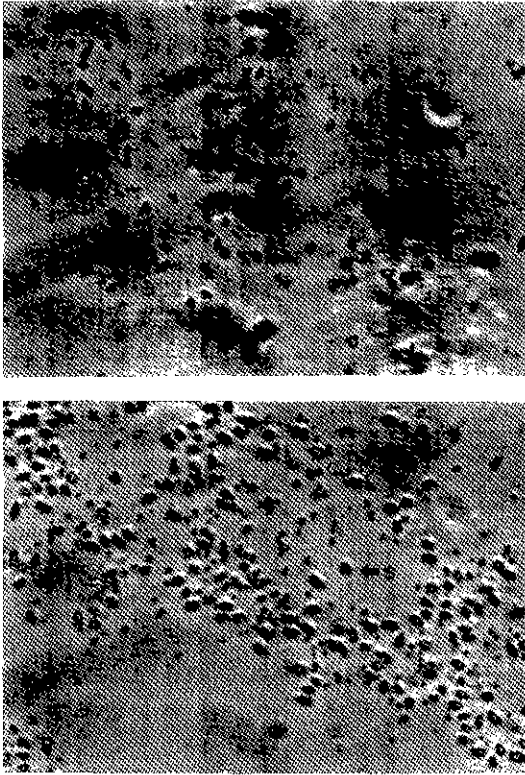


Fig. 1. Phase-contrast photographs of the sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* isolate S; spore C; crystal

취된 총 411개의 시료에서 포자와 내독소 단백질을 형성하는 146개의 B.t를 분리하였다(Table 1). B.t의 분리에 있어서 하나의 plate에 생성되는 전체 콜로니 수는 대략 300여개 정도였으며, 이중 외형상 B.t로 보이는 콜로니들은 *Bacillus* 콜로니중에서 약 5%에 달했다. 이 콜로니들을 위상차현미경으로 관찰하여 포자와 내독소 단백질을 형성하는 콜로니들만 분리하여 B.t로 확정짓고, 또한 영양세포, 포자 그리고 내독소 단백질의 형태적 특성을 조사하였다(Fig. 1). 내독소 단백질의 형태와 크기는 관찰된 콜로니들마다 다양하게 나타났고, 포자는 거의 일정한 달걀형

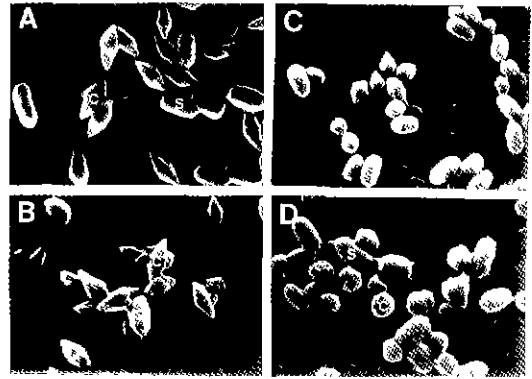


Fig. 2. Crystal-spore mixtures of *Bacillus thuringiensis* isolates were observed by Scanning Electron Microscopy.

S, spore C: crystal

태를 보였으며, 내독소 단백질은 이중피라미드형과 구형을 갖는 균주들이 많이 존재하였다. 그림 2는 주사전자현미경으로 포자와 내독소 단백질 혼합물을 관찰한 결과로서 전형적인 이중피라미드형태를 갖는 균주가 많이 보였고(Fig. 2A, B, C), 구형을 갖는 균주도 관찰할 수 있었다(Fig. 2D). 위에서 분리된 146개의 B.t를 나비목의 누에, 파리목의 빨간 집모기 유충, 딱정벌레목의 쌀바구미에 대해서 독성을 정량적으로 검정하였다(Table 2). 그 결과 나비목에서 84%, 파리목에서 3%, 나비목과 파리목에 동시에 1% 그리고 내독소 단백질은 형성하지만 독성이 없는 균주가 12%의 비율로 나타났고 딱정벌레목에 독성을 띠는 균주는 발견되지 않았다. 분리된 B.t의 독성검정에서 나비목과 파리목 각각에 대해서 100%의 높은 독성을 보이는 균주는 전체의 10%에 해당하고 나머지는 대조구에 비해 독성이 훨씬 떨어지는 결과를 보였다. 나비목 곤충에 대해 대조구로 사용한 *B.t* var. *kurstaki* HD-1의 경우, 누에 유충에 대해 12시간내에 100% 치사율을 보였다. 한편, 파리목의 곤충에 대한 대조구인 *B.t* var. *israelensis*의 경우, 빨간 집모기 유충에 대해 6시간내에 동일효과를 나

Table 2. Toxicities of *Bacillus thuringiensis* isolated in granary dusts against Lepidoptera, Diptera and Coleoptera

Insect order	Isolate	% of B.t isolated
Lepidoptera	595-2, 598-1, 598-2, 598-3, 598-5, 598-6, 599-1, 600-3, 600-4, 604-4, 605-4, 606-1, 606-2, 606-3, 608-1, 610-1, 613-2, 615-3, 622-7, 635-2, 640-3, 645-2, 645-3, 647-2, 648-1, 652-3, 656-2, 725-2, 726-2, 728-3, 733-1, 733-2, 740-2, 741-1, 747-1, 749-1, 753-2, 754-1, 756-2, 756-3, 761-1, 761-2, 763-3, 766-5, 767-1, 768-1, 768-2, 770-1, 771-1, 772-1, 773-1, 773-2, 775-1, 776-1, 780-1, 780-2, 781-1, 783-1, 784-2, 785-3, 786-1, 786-4, 786-5, 787, 788-1, 789-1, 792-1, 793-1, 811-6, 811-7, 812-1, 812-2, 813-1, 813-2, 816-1, 845-1, 846-1, 846-3, 848-2, 852-2, 853-1, 854-1, 854-3, 855-1, 856-1, 857-4, 858-1, 859-2, 863-1, 866-1, 869-1, 871-1, 871-3, 874-1, 875-1, 876-1, 878-2, 878-3, 880-3, 884-1, 889-2, 917-1, 917-3, 918-3, 921-1, 923-1, 949-4, 968-4, 973-1, 976-3, 976-4, 981-1, 981-2, 982-3, 983-2, 984-5, 984-6, 984-7, 987-1, 987-2, 987-3, 991-3	84
Diptera	605-1, 656-3, 777-2, 836-1.	(4) 3
Lepidoptera /Diptera	877-2, 912-2,	(2) 1
Non-toxic	646-3, 662-3, 753-1, 819-2, 821Bt, 841-3, 842-5, 843-3, 862-1, 862-2, 864-1, 879-1, 883-1, 907-1, 918-4, 918-6, 919-1, 927-1	(18) 12
Total	146	100

Table 3. Selection of *Bacillus thuringiensis* isolates having distinguishing properties

Locality	Granary dusts
Insect order	Number of selected B.t (Number of total B.t)
Lepidoptera	10 (122)
Diptera	1 (4)
Lepidoptera/Diptera	1 (2)

타내었다. 이 결과를 기준으로 각 곤충목에 대해 강한 독성을 보이는 균주와 약한 독성을 보이는 균주를 구분할 수 있었다.

이상의 밝혀진 결과를 토대로 내독소 단백질의 형태나 크기가 특이하거나 강력한 독성을 보이는 균주들을 선발하였다(Table 3). 이들의 독성분포는 분리된 146개의 B.t 중에서 나비목에서 4개, 파리목에서 1개, 나비목과 파리목에 동시에 독성을 띠는 2개 균주를 선발하여 총 7개의 새로운 균주일 가능성이 있는 B.t를 분리하였다.

고 찰

저곡창고에서 B.t의 분리에 대한 보고는 Norris (1969), Burges와 Hurst(1977)에 의해 많은 곤충사체를 포함한 저장곡물에서 분리를 시초로 여러 연구자들에 의해 보고되었다. DeLucca 등(1982)은 곡물 운반 승강기의 먼지(Grain elevator dusts)중 공기중에 부유하는 먼지보다는 특히 가라앉은 먼지시료의 55%에서 많은 B.t를 분리, 보고하였다. 여기서 나비목에 독성을 띠는 균주가 대부분을 차지하였고, B.t var. *aizawai*가 우세하게 존재한다고 하였다. 또한 Meadows 등(1992)은 동물사료 창고에서 채취한 먼지 등 시료의 78%에서 B.t를 분리하여 보고하였다. 본 실험에서의 결과는 29%로 이들이 보고한 분리율에는 훨씬 못미치지만, 나비목에 독성을 띠는 균주가 84%의 높은 비율로 분리되어 이들이 얻은 결과와 동일하였다. B.t의 분리에서 각 시료마다 생성된 콜로니들은 대개 B.t가 아닌 *Bacillus*가 압도적으로 그 수가 많았다. 따라서 sodium acetate를 이용, 포자의 발아를 억제하여 B.t를 선택적으로 분리한 Tra-

vers 등(1987)의 결과를 참고하여 B.t를 효과적으로 분리하는 방법의 확립이 필요하다. 한편, 분리된 균주의 내독소 단백질의 형태는 대부분 이중피라미드형으로서, 나비목에 독성을 갖는 균주가 많이 분리된 결과와 일치하였다. 대개 모기에 독성을 보이는 원형의 내독소 단백질은 적게 관찰되었고, 나비목과 파리목의 양쪽에 독성을 띠는 균주의 경우에서도 이중피라미드형이 대부분을 차지하였고 구형을 띠는 균주는 얼마되지 않았다. 또한 위에서 분리된 B.t에 대한 동정을 할 수 있는 분류체계가 갖추어 지지 않아 균주의 동정 및 B.t 균주의 분포상황은 알 수 없었기 때문에 H-antibody와 같은 분류체계가 시급히 마련되어야 한다.

앞의 결과들에서 볼 수 있듯이 저곡창고에서 146개의 많은 B.t가 분리되었는데, 이 결과는 저곡창고가 환경조건이 서로 다른 야외환경에서 수확한 다양한 곡물이 오랫동안 보관되는 장소이며, 폐쇄된 공간에서 B.t가 상당한 시간동안 전지기 때문인 것으로 사료된다. 한편, 분리된 B.t의 독성검정 결과, 나비목에 독성을 갖는 균주(84%)가 월등하게 많이 분리되어 나비목에 독성을 띠는 균주가 다른 곤충목에 비해서 많이 분리되는 일반적인 독성분포와 같은 양상을 보이고 있으며, 또 누에와 모기 유충에 독성이 없는 무독성 B.t 균주도 18개가 분리되어 그 수는 적지만, 자연토양에서 무독성 B.t가 보편적으로 존재한다는 보고와 일치하는 결과를 얻었다(Ohba & Aizawa 1986b, Ohba *et al.* 1988; Martin & Travers 1989). 그러나 이 균주들이 좁은 숙주특이성을 가지고 있어서 조사되지 않은 특정 곤충에 대해서만 독성을 보일 수도 있으므로 대상 곤충을 넓혀서 실험을 더 수행해 볼 필요가 있다. 딱정벌레목에 독성을 보이는 균주는 분리되지 않았는데, 대상 곤충을 확대하여 독성을 조사하고 아울러 딱정벌레목에 독성을 띠는 내독소 단백질 유전자를 probe로 하여 DNA 수준에서 실험을 수행할 계획이다.

Table 3은 독성과 형태면에서 특이한 균주들을 선별한 것으로서 새로운 균주일 가능성이 매우 높다. 이들은 정량적 독성검정에서 치사율 90% 이상의 높은 독성을 보였다. 현재 이들을 대상으로 H-antibody와 내독소 단백질의 antibody를 이용한 분류, 동정의 기초적인 실험과 여러가지 생화학적, 분자유전학적 방법을 이용한 분석이 수행되어지고 있다.

또한 누에, 빨간 집모기, 쌀바구미의 제한된 곤충에 대해서만 독성이 검정되었기 때문에 앞으로 독성검정을 여러가지 주요 농작물 해충에 대해 숙주를 더 넓혀서 수행하면, 특정곤충에 매우 강한 독성을 보이는 B.t 균주를 분리할 수 있을 것으로 예상되므로 이에 대한 연구도 수행중에 있다.

저곡창고외에 B.t가 많이 존재하는 장소로서 인정 받는 양장농가에서의 B.t 분리에 대한 보고는 국내에서도 이루어져 많은 수의 B.t가 분리된 것으로 보고(Kim *et al.* in press)되었다. 이외에 국내의 다양한 토양에서도 많은 종류의 B.t가 분포할 것으로 보고 현재 실험을 수행하고 있다.

이상의 결과를 토대로 볼 때, 경기도 일대의 저곡창고를 대상으로 한 B.t의 분리, 실험결과는 저곡창고가 상당히 효율적인 B.t 분리장소로서 나타나, 앞으로 전국의 저곡창고를 대상으로 실험을 수행하면 새로운 특성을 보이는 균주를 많이 분리할 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

위의 연구는 과기처 국책(UR 대응)사업의 일환으로 과기처와 선양(주)의 연구비 지원으로 수행되어 졌다

인 용 문 헌

- Aronson, A. I., W. Beckman, & P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* **50**: 1-24.
- Berliner, E.. 1915. Über die schlafsucht der Mehlmotenraupe (*Ephestia euhniella* Zell) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n.sp. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **2**: 29-56.
- Burges, H. D., & J. A. Hurst. 1977. Ecology of *Bacillus thuringiensis* in storage moths. *J. invertebr. pathol.* **30**: 131-139.
- DeLucca, A. J., II, J. G. Simonson, & A. D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.* **27**: 865-870.
- DeLucca, A. J., M. S. Palmgren, & A. Ciegler. 1982. *Bacillus thuringiensis* in grain elevator dusts. *Can. J. Microbiol.* **28**: 452-456.
- Goldberg, L. J., & J. Margalit. 1977. A bacterial spore

- demonstration rapid larvicidal activity against *Anopheles serengottii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News*. **37**: 355-358.
- Hofte, H., & H. R. Whiteley 1989 Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* **53**: 242-255.
- Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flacherie (sotto disease) Dainihon Sanshi Kaiho, **9**: 1-5.
- Karamanlidou, G., A. F. Lambropoulos, S. I. Koliais, D. Ellar & C. Kastritsis 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the Olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2277-2282.
- Kim, H. S., H. W. Park, D. W. Lee, Y. M. Yu, J. I. Kim, & S. K. Kang. Distribution and Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of sericultural farms in Korea. *Korean J. Seric. Sci.* in press.
- Luthy, P., J. L. Cordier, & H. M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* as a bacterial insecticide: basic consideration and application. In Microbial and viral pesticide ed. kurstak, E pp.35-74. New York Marcel Dekker.
- Martin, P. A. W., & R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2437-2442.
- Meadows, M. P., D. J. Ellis, J. Butt, P. Jarrett, & H. D. Burges. 1992. Distribution, Frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an Animal Feed Mill. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1344-1350.
- Nickerson, K. W., & L. A. Jr Bulla. 1974. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects minimal nutritional requirements for growth sporulation, and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis* *Appl. Environ. Microbiol.* **28**: 124-128.
- Norris, J. R., 1969. The ecology of serotype 4B of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Bacteriol.* **32**: 261-267
- Ohba, M., & K. Aizawa. 1978 Serological identification of *Bacillus thuringiensis* and related bacteria isolated in Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **32**: 303-309.
- Ohba, M., K. Aizawa, & S., Sudo. 1984 Distribution of *Bacillus thuringiensis* in sericultural farms of Fukuoka prefecture, Japan. *Proc. Assoc. Plant Prot. kyushu.* **30**: 152-155.
- Ohba, M., & K. Aizawa, 1986a. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan *J. Invertebr. Pathol.* **47**: 277-282.
- Ohba, M., & K. Aizawa, 1986b. Insect toxicity of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **47**: 12-20.
- Ohba, M., Y., M. Yu, & K. Aizawa. 1988. Occurrence of non-insecticidal *Bacillus thuringiensis* flagellar serotype 14 in the soil in Japan. *System. Appl. Microbiol.* **11**: 85-89.
- Smith, R. A., & G. A. Couche 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 311-315.
- Tanada, Y., & K. K. Harry 1993. Insect pathology. p. 90-91 Academic press, INC
- Travers, R. S., P. A. W. Martin, & C. F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**(6): 1263-1266.

(1995년 6월 21일 접수)