

Meloidogyne hapla 독성세균의 분리 동정 및 독성물질의 정제

이 광 배

대구보건대학 보건위생과

The Toxin Purification and Isolation Identification of *Meloidogyne hapla* Toxicity Bacteria

Kwang-Bae Lee

Department of Health Hygiene, Taegu Health Collage, Taegu 702-260, Korea

Abstract

The following is experimental result of selecting soil bacteria showing toxicity against Root-knot nematode(*Meloidogyne hapla*). Out of 286 strains isolated from soil, one(NC67) showing toxicity against *M. hapla* is selected. The selected strain(NC67) is identified of *B. thuringiensis* subsp. *indiana*. It proved out that the toxic material against *M. hapla* produce by NC67 strain is an exotoxin. The result of examining the existence of the extercellular toxicity product by the toxic strain(NC67) by using activated carbon column chromatography, Dowex 50W column chromatography and TLC of silical gel etc. proved out that it is a single material.

I. 서 론

우리나라 농촌에서 경작되는 원예작물과 한약재들은 비교적 부가가치가 높아서 농민들의 소득증대에 많은 보탬이 되고 있으나, 각종 식물병원균, 위해동물, 해충 등으로 인하여 수확량이 감소되고 있을 뿐만 아니라 경제적 손실을 초래하고 있는 실정이다. 그 중 식물뿌리혹 선충의 일종인 *Meloidogyne hapla*가 원예작물 및 한약재에 감염되면 뿌리는 혹이 형성되고 성장이 왜소화 될 뿐만 아니라 부생선충과 식물병원균에 의한 2차적인 감염을 조장하여 식물의 생육에 막대한 지장을 초래하고 있다.¹⁾

이러한 피해에도 불구하고 *Meloidogyne hapla*는 현미경적으로 매우 작을 뿐만 아니라 일생의

대부분을 토양이나 식물속에서 보내기 때문에 발견하기가 곤란하고 구제하기가 매우 어려운 실정이다. 뿌리혹선충에 의한 피해는 오래 전부터 알려져 왔으며,^{2,3)} 우리나라에서도 최와 추 등^{4,5)}에 의하여 보고된 바 있다. 특히 최근에는 원예작물의 재배 농가가 증가됨에 따라 뿌리혹선충에 의한 피해는 심각하지만 대부분이 화학약제 투입으로 방제하고 있는 실정이다⁶⁾. 화학제의 과용과 오용에 의한 생태계 파괴 및 공해문제를 감소시키기 위하여 근래에는 식물병원균에 대한 무공해 방제법의 개발이 활성화 되고 있다.^{6,7)} 이러한 노력의 하나로 최근에는 농작물 병충해 방제에 미생물을 이용하는 생물학적 방제법이 활발히 연구되고 있다.^{8,9)} 화학약제의 투입에 의한 뿌리혹선충의 방제는 환경오염 뿐만 아니라 토양내의 유용미생물의 무분

별한 살균작용에 따른 피해가 가중되어 토양을 점차로 척박하게 하는 원인이 되고 있다. 이와 같은 이유로 최근에는 미생물에 의한 뿌리혹선충의 방제가 연구되어 왔으며,^{10,11)} 본인은 유해해충 및 유해동물의 미생물학적 방제의 일환으로 뿌리혹선충인 *Meloidogyne hapla*에 독성을 나타내는 토양세균을 분리 선별하고, 그 물질을 정제함으로써 미생물학적인 방제법의 실용화를 위한 미생물의 효과를 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시선충

실험에 사용된 뿌리혹선충은 경상북도 의성군 의성작약시험장 박소득 박사로부터 분양받은 *M. hapla*를 사용하였다. *M. hapla*의 알(卵)은 토마토 뿌리당 5,000개를 집중하여 온실에서 생육시키면서 필요할 때 마다 감염된 뿌리로부터 알을 분리하여 실험에 사용하였다. 알(卵)의 분리는 Centrifuge Sugar Floatation Method(C.S.F.Method)의 변법¹²⁾에 따라 분리하였다. 또 분리된 알은 0.5% NaOCl로 10분간 표면살균처리하여 멸균된 증류수로 충분히 수세한 후 0℃에 보관하였으며, 부화는 25℃의 항온기에서 10일간량 부화시켜 운동성이 강한 2령유충을 독성균주 선별 실험에 사용하였다.

2. 균 분리 및 선별

영남지방의 뿌리혹선충의 피해가 많은 지역을 중심으로 채취한 토양을 균 원시료로 사용하였다. 토양 1g을 멸균된 증류수 5ml에 현탁하고 토양 덩어리가 없도록 충분히 진탕 하였다. 그 후 토양 현탁액은 부포자균을 제거하기 위해 80℃에서 30분간 열 처리 하였다. 열 처리한 토양 현탁액의 상층액 0.1ml를 TYG한천평판배지¹³⁾ (0.5% Tryptone 0.5% Yeast extract, 0.1% K_2HPO_4 , 1% Glucose, pH 7.0)에 접종하여 30℃에서 3일간 배양시킨 후 형성된 집락을 분리 선별하였다. 분리선별된 균주는 멸균된 증류수 1ml에 약 1.0×10^9 cell이 되도록 현탁한 다음, 항온기에서 부화시킨 2령유충(500마리/ml)에 투여하여 날짜별로 관찰 하면서 독성 균

주를 선별 하였다.

3. 선별균주의 동정

최종 선별된 균주의 형태학적 관찰은 위상차 현미경(Olympus BX40)을 사용하였다. 또한 생화학적인 성질의 검토는 Bergey의 manual (Sneath),¹⁴⁾ Marthin 등¹⁵⁾ Smibert와 Krieg¹⁶⁾ 및 De Barjac과 Frachon의 방법¹⁷⁾에 의거하여 조사하였으며, 편모항원에 의한 응집반응시험은 pauda등의 방법¹⁸⁾에 따라 slide glass상에서 행하였다.

4. 독성물질의 분리

Cheung과 Hammock의 방법¹⁹⁾에 따라 내독소를 분리하였다. 즉 설탕밀도균배법으로 8,500g에서 30분간 원심분리하여 내독소층을 조심해서 분리하였다. 분리된 내독소는 설탕을 제거하기 위하여 0.01% Triton X-100 용액으로 3회 씻은 후 위상차 현미경으로 그 순도를 관찰하였다. 그 후 분리된 내독소는 10mM EDTA용액에 현탁시켜서 -20℃에 보관하면서 유충에 대한 독성도를 조사하였고, 외독소에 대한 활성실험은 TYG액체배지에서 5일간(30℃) 균을 배양시킨 후 원심분리(12,000 rpm, 10min)하여 침전된 세포와 내독소는 버리고 상등액에 대한 독성여부를 조사하였다.

5. 독성물질에 대한 활성측정

분리된 내독소(500 μ g, 건조량)와 균체배양액에 멸균 증류수를 가하여 단계별로 희석한 다음 유충을 투여하여 28℃의 항온기에 넣고 시간별로 관찰하면서 치사된 유충의 수를 계측하였다. 이 때 사용된 유충의 수는 1ml당 500마리 정도로 희석한 2령 유충을 사용하였으며 치사여부는 광학현미경(40X)으로 직접 계측하였다.

6. 독성물질의 정제

6.1 활성탄 흡착 Column chromatography

입상의 활성탄 25g을 증류수로 2-3회 씻어서 분말로 된 활성탄을 제거 시키고 미리 준비된 column(ϕ 2X29cm)에 충전하였다. 충전된 활성탄은 먼저 약 200ml의 증류수로 씻고, 0.1N-HCl로 pH

가 1.0이 될 때 까지 씻은 후, 다시 증류수로 pH가 5.5 정도 될 때 까지 씻었다. 약산성화된 활성탄에 분리된 균체의 배양액을 흡착시키고, 활성탄에 흡착되지 않은 부분과 흡착된 부분으로 나누어서 각각을 뿌리혹선충의 2령유충에 대한 독성시험을 행하였다. 이 때 활성탄에 흡착된 부분은 50% ethyl alcohol로 용출하여 50°C에서 감압 농축하였다.

6.2 Dowex 50W column chromatography

Dowex 50W 약 4g을 증류수로 팽윤시킨 다음 미리 준비된 column(φ1.5X3.5cm)에 충전시켰다. 충전된 Dowex 50W는 1N-NaOH용액으로 씻은 후 증류수로 pH가 7.0이 될 때까지 씻었다. 그 후 1N-HCl용액으로 씻고 다시 증류수로 중성이 될 때까지 씻어서 활성탄으로부터 분리된 독성물질을 Dowex 50W에 흡착시켰다. 이 column으로부터 유출된 흡착되지 않은 물질과 흡착된 물질을 각각 나누어서 2령유충에 대한 독성시험을 행하였다. 이 때 흡착된 부분은 1N-HCl로 용출하고 1N NaOH로 중화시켜서 50°C에서 감압농축 후 생성된 NaCl을 제거하기 위해 80% ethyl alcohol로 재용출하였다. Ethyl alcohol로 재용출된 물질은 다시 50°C에서 감압농축하여 독성시험을 위한 시료로 사용하였다.

6.3 Thin layer chromatography에 의한 분리 및 확인

Dowex 50W로부터 얻어진 뿌리혹선충 *M. hapla*에 대한 독성물질은 다시 Thin layer chromatography에 의해 분리하였다. 이 때 사용된 TLC plate는 silica gel(일본 wak. Co.)이 도말된 제품을 사용하여 5% Ammonium citrate(pH 4.5): Isoamyl alcohol = 1:1이 혼합된 용매로 전개 시켰다. 또한 TLC상에서 물질의 확인은 암실에서 U.V.(350nm)조사로 나타나는 형광반응이나 요드를 밀폐된 용기내에 넣고 기화시켜서 물질의 존재를 확인하였다. 독성물질의 확인은 TLC plate상에서 물질이 존재하는 부위의 silica gel을 칼로 깔아 모으고 증류수로 용출한 다음 상기와 같이 2령유충에 대한 독성시험을 행하였다. 이상의 독성물질 정제과정은 Fig. 1. 과 같다.

Cultured Broth(1L)

Centrifuge(4°C, 20min ; 13,000g)

Supernatant (=crude toxin)

activated carbon column chromatography
eluted with 50% ethanol
rotary vacuum evaporation(50°C)

Dowex 50W column chromatography

Absorbed fraction(260nm)

eluted with 1N-HCl
adjusted pH 5.8-7.0 using NaOH
rotary vacuum evaporation
dissolved at 80°C

Thin layer chromatography

developed with 5% Ammonium citrate(pH 4.5)-
Isoamyl alcohol(1:1)

Active fractions

concentrated in vacuum

Nematocidal toxin

Fig. 1. Procedure of Purification of nematocidal toxin.

III. 결과 및 고찰

1. 균분리 및 선별

영남지방의 토양으로부터 포자형성 세균 268균주를 분리하여, 뿌리혹선충에 독성을 나타내는 균주를 검색한 결과 268균중 3개균주 (strain No. 17, 67, 193)가 뿌리혹선충(*M. hapla*)의 2령유충에 독성이 있는 것으로 추정되었다. 선별된 3개균주 중 경북 달성군 하빈면에서 채취한 토양시료로부터 분리된 No. 67균주가 선충에 대한 독성이 가장 강한 것으로 나타나 이 균주를 독성균주로 선별하였다. 우선 이 균주의 형태학적인 특징을 위상차 현미경으로 조사 해 본 결과, 포자와 구형의 내독소를 생산하는 전형적인 *Bacillus*균주로서 NC67이라고 명명하였다(Photo.1).



Photo. 1. Morphology of strain NC67.
Magnification with phase contrast microscope was 1,000 times.
Symbols : (S) : endospore, (O) : endotoxin, (C) : vegetative cell

2. NC67균주의 생화학적 성질

선별된 균주 NC67의 생화학적 성질을 조사한 결과 Table 1.에서 보는 바와 같이 NC67균주는 대조균의 *Bacillus thuringiensis* 균주들과 생화학적 성질과 아주 유사하였으나 citrate 와 L-arabiose 이용성에서만 다소 차이가 있었다. 따라서 NC67균주는 cuboid모양의 내독소를 함유하는 전형적인 *Bacillus thuringiensis*의 특징을 가지고 있었다.

3. 편모항원에 의한 응집반응

분리선별된 균주의 아종(subspecies)을 알기 위하여 일본 구주대학 생물방제 연구소에서 보관하고 있는 표준균주 27종의 편모항원에 대한 항혈청을 Ohba교수로부터 얻어 slide상에서 NC67균주의 편모와 반응시킨 결과 Table 2.와 같이 NC67균주는 serotype16인 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*의 편모항원에 대한 항혈청과 응집반응이 일어나 선별된 NC67균주는 *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*로 동정되었다.

4. 독성물질의 존재와 유충 치사율

NC67균주가 생산하는 독성물질이 균체내에 존재하는지 혹은 균체밖으로 분비되는 것인지를 알아보기 위하여 운동성이 강한 *M. hapla*의 2령유충

Table 1. Biochemical properties of the strain NC67

Strain \ Biochemical properties	Bti ¹¹	Bt. indiana	NC67
Rod-shaped	+	+	+
Endospores produced	+	+	+
Motile	+	+	+
Gram stain	+	+	+
Parasporal crytals	cuboid	diamond	cuboid
Catalase	+	+	+
Lipase	+	+	+
Nitrate reduced to nitrate	+	+	+
Anerobic growth	+	+	+
Leithinase	+	+	+
β -galactosidase	-	-	-
Arginine dehydrogenase	+	+	+
Lysin decarboxylase	-	-	-
Urease	-	-	-
Tryptophane deaminase	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-
Indol production	-	-	-
Acetion 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 : Bti¹¹ ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *isrealensis*.
Bt. *indiana*²¹ ; *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana*(type strain)
+ ; positive, - ; negative

을 사용하여 독성물질에 대한 유충의 치사율을 조사하였다. 먼저 TYG배지에서 5일 동안 진탕배양된 NC67균주로부터 배양여액과 균체 및 내독소로 나뉘어 2령유충에 대한 독성시험을 하였다. 그 결과 Table 3.에서 보는 바와같이 NC67균주의 균체나 내독소보다 배양여액에서 24시간이내에 거의 100% 치사율을 보여 *M. hapla*에 대한 NC67균주의 독성물질은 현재까지 알려진 곤충에 특이성을 나타내는 내독소가 아니라 균체외로 분비되는 물질임을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 일반적으로 *B. thuringiensis*속의 균주는 단백질성의 내독소(δ -endotoxin 혹은 parasporal crystal)를 생산하는 특징이 있으며, 이들 내독소가 나방이 등의 곤충의 유충에게 특이적인 독성을 나타낸다고 알려져 있다²⁰⁾. NC67균주가 생성한 내독소는 유충을 치사하는데 매우 높은 농도인 3210 μ g/ml(N-NaOH의 용해단백질로 환산)에서 약 90%의 치사율을 보였으나, 저농도의 내독소(200 μ g/ml)에서는 치사되지 않는 현상을 보였다(Fig. 2). 이는 내독소 자체의 독성은 극히 약하지만 다량의 섭취로 약간의 독성을 나타낼 가능성과, 내독소 자체는 전혀 독성은 없지만 다량 존재하면 소수성 이기 때문에 용액상에서는 아주 작은 분말로 팽윤되어 유충의 피부에 부착됨으로서 호흡이 억제되는 물리적인 결과일 가능성도 있다고 사료된다.

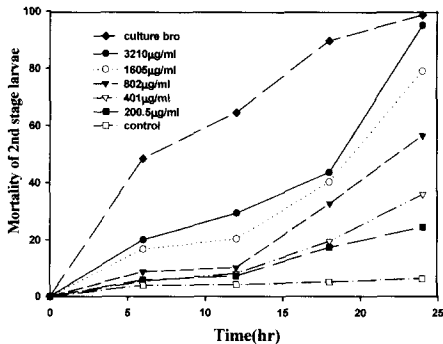


Fig. 2. Mortality of 2nd-stage larva of the root knot nematode by delta-endotoxin and culture broth of the strain NC 67. The strain was cultivated in TYG medium at 30°C for 5days in shaking incubation. The nematod of 2nd-stage larva treated with 0.5% sodium hypochlorite for 3minute before toxicity test.

Table 2. H agglutination of the NC67 isolate with antisera of *Bacillus thuringiensis* serotype

Serotype	Subspecies	Referance ¹⁾	NC67
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>isrealensis</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>	-	-

Notes : Reference¹⁾ : *Bacillus thuringiensis* subsp. *indiana* (type strain),

+ ; positive , - ; negative

5. 독성물질의 정제

5.1 활성탄에 의한 독성물질의 분리

*M. hapla*에 대한 독성물질을 분리 정제하기 위하여 NC67균주의 배양여액을 미리 HCl로 산성화시킨 입상의 활성탄이 함유된 column을 통과시키면서 흡착되지 않은 부분을 fraction collector로 모았다. 그 후 column을 증류수로 충분히 세척하여 흡착되지 않은 물질을 column으로부터 충분히 제거시킨 다음 활성탄에 흡착된 물질은 50% ethyl alcohol로 용출시켰다. 50% ethyl alcohol로 용출된

물질은 50℃에서 감압농축하여 유상의 물질이 될 때까지 물과 ethyl alcohol을 완전히 제거 시켰다. 감압농축한 활성탄에 흡착된 물질은 다시 증류수를 가하여 활성탄에 흡착되지 않은 물질과 함께 *M. hapla* 2령유충에 대한 독성시험을 행하였다. 그 결과 Table 4.에서 보는 바와 같이 독성물질은 활성탄에 흡착된 물질에 존재하였다.

5.2 Dowex 50W에 의한 독성물질의 분리

활성탄에 흡착된 독성물질은 미리 N-HCl로 활성화 시킨 Dowex 50W가 함유된 column에 통과시키고 흡착되지 않은 물질을 모았다. 그 후 Dowex 50W column은 충분히 증류수로 세척한 후 흡착된 물질은 N-HCl로 용출하였다. 이때 흡착된 물질과 흡착되지 않은 물질은 모두 NaOH를 사용하여 pH 6.5-7.5로 적정 한 다음 50℃에서 감압 농축하였다. 감압농축된 흡착된 물질과 흡착되지 않은 물질은 각각 뿌리혹선충의 2령유충에 대한 독성시험을 행하였다. 그 결과, Table 4.에서와 같이 Dowex 50W column에 흡착된 물질에서 선충의 2령유충에 대한 독성이 확인되었다. 이때 Dowex 50W column을 사용한 물질의 분리상태를 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정해 본 결과 Fig. 3.과 같다.

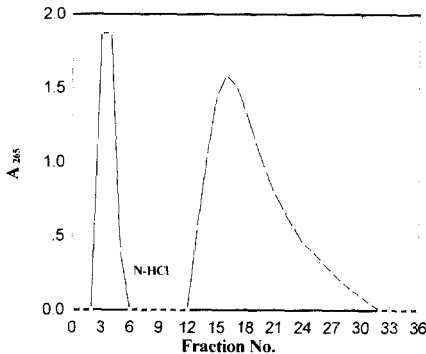


Fig. 3. Fractionation of the nematocidal toxin on Dowex 50W column chromatography.

Table 4. Mortality of the larva during purification of nematocidal toxin.

Treatment	Dilution(times)	Mortality(%)		
		6hr	18hr	24hr
Whole culture	1	18.8	52.7	87.7
Activated carbone				
Absorption part	10	97.0	100	-
None absorption part	5	89.9	95.2	100
Ion exchange column				
Absorption part	16	51.0	75.8	84.5
None absorption part	1	40.9	58.3	60.0
Thin layer column				
Upper part	1	8.6	8.7	7.9
Lower part	32	81.7	85.8	88.7

Percentage mortality was calculated by following Abbott's formula :
 mortality(%)=(X-Y)/X100 ; X-number of survival larvae in control ;
 Y-number of survival larvae in sample.

Table 5. Thin layer chromatography for purification of the nematocidal toxin from Dowex 50W column

Composition of organic solvents	Rf value Nematocidal toxin
5% Ammonium citrate(pH4.5) Isoamyl alcohol= 1 : 1	a : 0.95 b : 0.05

On silica gel thin layer chromatography, the nematocidal toxin spot has a fluorescence UV irradiation at 325nm.

Table 6. purity of the nematocidal toxin from TLC fractionation

Composition of organic solvents	Rf value
n-BuOH : AOAc : Water = 4 : 1 : 5	0.12
Isopropanol : Ammonia : Water = 9 : 1 : 2	0.23
Phenol : Acetic acid : Water = 4 : 1 : 1	0.92

The nematocidal toxin spot has a fluorescence under UV irradiation at 325nm

5.3 Thin layer chromatography에 의한 독성물질의 분리

Dowex 50W column에 흡착된 물질들은 증류수에 용해한 후 silica gel plate상(Whatman Co.)에 모세관으로 다량 농축하여 용매 [5% Ammonium citrate (pH 4.5):Isoamylalcohol= 1:1]로 전개시켰다. 그 후 plate를 건조시키고 암실에서 자외선(λ325nm)을 조사시킨 결과 start line 바로 위에 푸른색의 형광을 나타 내었으며 색소부분은 용매가 도달한 front line에 형성되었다(Table 5). 이들 물질이 함유된 부분의 silica gel을 각각 칼로 끊어 모은 후 증류수로 각각의 물질을 용출시킨 다음 선충의 2령유충에 대한 독성시험을 행하였다. 그 결과 Table 5.에서 보논바와 같이 TLC plate상에서 형광을 나타내는 물질이 독성물질임을 확인하였다.

5.4 TLC에 의한 독성물질의 정제 확인

상기의 TLC로 분리 정제한 독성물질은 용매계를 변화시켜서 단일 물질을 확인하였다. 즉, 용매계 1(Butylalcohol : acetic acid : Water = 4 : 1 : 5),

용매계 2(Isopropanol : Ammonia : Water = 9 : 1 : 2) 및 용매계 3(Phenol : Acetic acid : water = 4 : 1 : 1)를 사용하여 다시 silica gel plate상에 spot한 후 전개시키고 자외선 조사와 요오드를 기화시켜서 Rf치를 조사한 결과 Table 6.에서와 같이 단일 물질임을 확인하였다.

IV. 결론

뿌리혹선충(M.hapla)에 독성을 나타내는 토양세균의 선별을 목적으로 실험을 행한 결과는 다음과 같다.

1. 토양으로부터 분리된 268균주중 M.hapla에 독성을 나타내는 한 균주(NC67)선별하였다. 분리선별된 NC67균주는 형태학적, 생화학적인 특징을 조사해 본 결과 포자와 내독소를 형성하는 전형적인 Bacillus thuringiensis속에 속하였으며, 이균주의 아종은 Bacillus thuringiensis subsp. indiana로 동정 되었다.
2. 분리된 NC67균주가 생성하는 M.hapla에 대한 독성물질은 균체내 독소가 아니라 균체의 독소임을 확인하였다.
3. 독성균주(NC67)가 생성한 세포의 독성물질은 활성탄흡착 chromatography, Dowex 50W column chromatography 및 silical gel의 TLC등을 이용하여 그 존재를 확인해 본 결과 단일물질임을 확인하였다.

감사의 말

본 논문은 대구보건대학 학술연구비에 의하여 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Chai, Y. E. : Workshop on plant parasitic nematodes, Institute of Agricultural Science. Kyupook National University, Korea, 51-55, 1984.
2. Barker, K, P., P. B. Shoemaker, and L. A. Nelson. : Realtionship of initial population

- density of *Meloidogyne incognita* and *M. hapla* to yield of tomato. *J. Nematol.* 8, 232-239, 1976.
3. Olthof, T. H. A. and T. W. Potter. : Effect of population densities of *M. hapla* on growth and yield of tomato. *J. Nematol.* 9, 296-300, 1977
 4. 최영연, 추호열 : 경제작물에 영향을 미치는 뿌리혹선충에 관한 연구. *한국식물보호학회지.* 4, 21-23, 1978.
 5. 최영연 : 뿌리혹선충(*Meloidogyne incognita*)에 대한 토마토 품종 저항성 및 화학적 방제에 관하여. *경북대학교 논문집.* 24, 419-492, 1977.
 6. Baker, R. : *Biological Control in Agriculture IMP System*, Academic Press, Inc., 25-39, 1985.
 7. Cook, R. J. : *Biological Control of pathogens : theory to application.* *Phytopathol.* 75, 25-29, 1985.
 8. Henis, Y. and I. Chet. : *Microbial Control of plant pathogens.* *Adv. Appl. Microbiol.* 19, 85-111, 1975.
 9. Papavizas, G.C. and R. D. Lumsden. : *Biological Control of soilborne fungal propagules.* *Annu. Rev. Phytopathol.* 18, 389-413, 1980.
 10. Stirling, G. R. : *Biological control of Meloidogyne javanica with Bacillus penitans.* *Phytopathology* 74, 55-60, 1984.
 11. Cabanillas, E. and K. R. Barker : *Impact of Pacilomyces lilacinus inoculum level and application time on control of Meloidogyne incognita on tomato.* *J. Nematol.* 21, 115-120, 1989.
 12. Caveness, F. E & Jensen H. J. : *Modification of the centrifugal floatation technique for the isolation and concentration of nematode and their eggs from soil plant tissue.* *Proc. Helminth. Soc. Wash.* 16, 87-89, 1955.
 13. Hwang, J. Y. and K. H., Kim : *Characteristics of hemolysin from Bacillus thuringiensis subsp. israelensis.* *Kor. J. Appl. Microbial. Bioeng.* 15, 425-429, 1987.
 14. Sneath, P. H. A. : *Endospore-forming Gram-positive rods and cocci.* In *Bergey's manual of systematic Bacteriology(Vol.2).* Williams & Wilkins, 1104-1135, 1986.
 15. Marthin, P. A. W., E. B. Haransky, R. S. Travers and C. F. Reichelderfer : *Rapid biochemical testing of large numbers of Bacillus thuringiensis isolates using agar dots.* 1985. *Bio. Tech.* 3, 386-392, 1985.
 16. Smibert, R. M. and N. R. Krieg. : *General characterization.* In *manual method for general bacteriology,* American Society for Microbiology, 417-418, 1981.
 17. deBarjac, H. and E. Frachon. : *Classification of Bacillus thuringiensis.* *Entomophage.* 35, 233-240, 1990.
 18. Pauda, L. E., Ohba and K. Aizawa. : *Serological and bacteriological studies of the three Isolates of Bacillus thuringiensis serotype 10.* In *Annual reports of ICME,* Osaka University. Japan. 169-180, 1978.
 19. Cheung, P. Y. and B. D. Hammock. : *Micro-lipid droplet encapsulation of Bacillus thuringiensis delta-endotoxin for control of mosquito larvae.* *App. Environ Microbiol.* 50, 984-988, 1985.
 20. Aronson, A. I., W. Beckman, and P. Dunn. : *1 and related insect pathogens.* *Microbial Rev.* 50, 1-24, 1986.