

## 한국에서 분리한 *Bacillus thuringiensis* 균주의 cry형 유전자의 동정

박수일 · 이광용 · 강은영 · 김의나 · 권혁한 · 안성규 · 이형환\*  
건국대학교 이과대학 생명과학과

**Detection of cry-type Genes of *Bacillus thuringiensis* Isolates from Korea.** Park, Sooil, Kwang Yong Lee, Eun Young Kang, Eui Na Kim, Hyuk Han Kwon, Seong Kyu Ahn, and Hyung Hoan Lee\*. Department of Biological Sciences, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea – Twenty-three *Bacillus thuringiensis* strains isolated from Korea were screened to detect the cry-type genes using PCR with 21 specific oligonucleotide primers. Eight strains contained distinct multiple crystal genes; cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 and cry2Aa1. These results indicate that the strains coincided with the *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain. The other 15 strains were not recognised to the 21 specific primers.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, crystal, crystal gene, PCR

*Bacillus thuringiensis*는 그람양성이며 호기성균으로서  $\delta$ -endotoxin과 내생아포를 생산하는 박테리아이다. *B. thuringiensis*는 살충성 박테리아로서 전 세계적으로 미생물 살충제로서 중요성이 인정이 되었으며 질병을 유발하는 매개 곤충과 농작물 유해곤충의 방제를 위한 미생물살충제로서 이용이 되고 있다[6]. 현재까지 알려진 *B. thuringiensis*의 아종은 살충성 단백질을 대량으로 생산하고 있다[5, 17]. 내독소 결정체를 생산하는 유전자는 거의 플라스미드에 위치하고 있으며, 결정체 단백질의 아미노산 상동성 정도에 따라서 cry1~28과 cyt1~2 그룹으로 분류된다[11]. 새로운 *B. thuringiensis* 분리균은 재래적인 방법인 생물검정 또는 편모형원의 결정 등으로 동정을 하나, 이러한 방법은 많은 시간이 걸리고, 또한 동일한 균주를 반복으로 분리하는 문제점이 있다[15]. 또한 새로 분리한 혈청형으로는 cry유전자의 종류를 알 수 없기 때문에 살충성을 알아내기는 어렵다 [1, 12].

최근에는 polymerase chain reaction(PCR) 방법을 이용하여 많은 *B. thuringiensis* 분리균을 동시에 신속히 유전자를 동정하고 분류하여 살충성을 미리 알 수 있게 되었다 [2-4, 7-9, 13, 16, 21]. PCR에 의한 분류 동정을 하기위해선 이미 보고된 cry유전자의 탐침자(primer)를 이용하고 있다 [15]. 본 연구실에서는 이미 한국 토양에서 분리하여 혈청형으로 분류한 23종의 *B. thuringiensis* 균주를 보유하고 있으나[14, 18, 19], 이 균주들의 cry형 유전자에 대한 분류는 아직 결정되지 않아 본 연구를 시도하였다. 본 연구에서는 상기 한국토양에서 분리한 23종의 *B. thuringiensis* 혈청형

에 대한 cry형 유전자를 PCR 방법으로 동정하는 것이 목적이다.

본 연구에 사용한 *B. thuringiensis* 균주는 Table 1에 제시

**Table 1. Cry-type gene profiles of *B. thuringiensis* strains analyzed with the primers by PCR.**

Strain No.	<i>Bt</i> subspecies (serotypes)	cry-type gene recognized
HL-14	<i>mexicanensis</i> (H27)	-
HL-77	<i>mexicanensis</i> (H27)	-
HL-63	<i>israelensis</i> (H14)	-
HL-64	<i>israelensis</i> (H14)	-
HL-85	<i>israelensis</i> (H14)	-
HL-86	<i>israelensis</i> (H14)	-
HL-106	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-107	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-108	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-109	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-110	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-111	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-112	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-117	<i>kurstaki</i> (H3abc)	<i>cry1Aa2, cry1Ab1, cry1Ac1 cry2Aa1</i>
HL-118	<i>toumanoffi</i> (H11ab)	-
HL-78	<i>galleriae</i> (H5ab)	-
HL-120	<i>galleriae</i> (H5ab)	-
HL-1	<i>coreanensis</i> (H25)	-
HL-0	<i>seoulensis</i> (H35)	-
HL-47	<i>konkukian</i> (H34)	-
HL-51	<i>leesis</i> (H33)	-
HL-93	<i>sooncheon</i> (H41)	-
HL-94	<i>yosoo</i> (H18ac)	-

*Bt*: *Bacillus thuringiensis*. (-) : no reaction.

\*Corresponding author  
Tel: 822-450-3426, Fax: 822-452-9715  
E-mail: hhlee@konkuk.ac.kr

되었는데 총 23개의 균주를 검색하였다. 상기 균주는 본 연구실에서 분리하여 프랑스의 Pasteur 연구소와 공동으로 혈청형을 결정된 것이며[17-19], 본 연구실에 보관중인 균주를 사용하였다. 내독소결정체 생산을 확인하기 위한 배지는 glucose-yeast extract-salts(GYS) 액체 배지를 사용하였고 28°C에서 배양하였다[22]. 균주를 20 ml의 영양 배지(NB)에서 접종하여 28°C의 회전 진탕기에서 180 rpm으로 전 배양하였고, 전 배양한 균주 1.0 ml을 GYS 배지 20 ml에 옮겨 48시간을 배양하였다. 48시간 배양한 후 배양액을 3,000 × g에서 20분간 원심분리를 하여 침전을 시킨 후에 멸균한

saline으로 두 번 세척하였다. 현미경 관찰을 위해 saline으로 부유시킨 후 위상차현미경으로 내독소결정체 생산을 관찰하였다.

PCR을 위한 DNA template로 사용할 *B. thuringiensis*의 플라스미드는 Lee 등[20]의 방법과 Wizard plasmid midi kit(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)을 이용하여 분리하였다.

*B. thuringiensis*분리균주의 내독소유전자의 cry형 유전자를 동정하기 위하여 universal primer 12종류와 21종의 specific primer(Table 2)를 사용 하였다. cry1 유전자 8종

**Table 2. Crystal protein gene-specific primers for PCR analysis.**

cry-type genes	Original gene names	Primer sequences	Size of product(bp)	GenBank accession No.
<i>cry1Aa25'</i>	<i>cryIA(a)</i>	5'GAGCCAAGCAGCTGGAGCAGTTTACACC-3'	724	M10917
<i>cry1Ab15'</i>	<i>cryIA(b)</i>	5'TCGAATTGAATTTGTTC	238	M13898
<i>cry1Ac15'</i>	<i>cryIA(c)</i>	5'TCACTTCCCATCGACATCTA	550	M11068
<i>cry1Ba15'</i>	<i>cryIB</i>	5'GTCAACCTTATGAGTCACCTGGGCTTC	902	X06711
<i>cry1Ca15'</i>	<i>cryIC</i>	5'CAACCTCTATTTGGTGCAGGTTTC	288	X07518
<i>cry1Da15'</i>	<i>cryID</i>	5'GGTACATTTAGATATTCACAGCCAC	465	X54160
<i>cry1Ea25'</i>	<i>cryIE</i>	5'CTTAGGGATAAATGTAGTACAG	961	X56144
<i>cry1Fa15'</i>	<i>cryIF</i>	5'CCGGTGACCCATTAACATTCCAATC	383	M63897
<i>cry13'</i>	<i>cryI3'</i>	5'ATCACTGAGTCGCTTCGCATGTTTGACTTTCTC	-	-
<i>cry9Aa25'</i>	<i>cryIG5'</i>	5'ATATGGAGTGAATAGGGCG	235	X58534
<i>cry9Aa23'</i>	<i>cryIG3'</i>	5'TGAACGGCGATTACATGC	-	-
<i>cry2Aa15'</i>	<i>cryIIA5'</i>	5'CAGATACCCTTGCTCGTGTA	1073	M31738
<i>cry2Aa13'</i>	<i>cryIIA3'</i>	5'ATAGGCCCGTGTCCACCAGG	-	-
<i>cry3ABC5'</i>	<i>cryIIIBD5'</i>	5'CCGAACAATCGAAGTGAA	-	-
<i>cry3Aa33'</i>	<i>cryIIIA3'</i>	5'ATAGATGGTCTACTT	1964	Y00420
<i>cry3Ba13'</i>	<i>cryIIIB3'</i>	5'GAATCCTGTGCACCTAA	1359	X17123
<i>cry3Ca13'</i>	<i>cryIIID3'</i>	5'ATTGTTGCCGTCACAA	1135	X59797
<i>cry7Ab15'</i>	<i>cryIIIC5'</i>	5'CCTGAAAATTACAGGCC	1074	U04367
<i>cry3uni3'</i>	<i>cryIIuni3'</i>	5'AATTGATCAATAGAATC	-	-
<i>cry4Aa15'</i>	<i>cryIVA5'</i>	5'CGAGGTGAAAATTTGCTCC	1032	Y00423
<i>cry4Aa13'</i>	<i>cryIVA3'</i>	5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC	-	-
<i>cry4Ba15'</i>	<i>cryIVB5'</i>	5'GGTGCTTCCTATTCTTTGGC	2610	X07423
<i>cry4Ba13'</i>	<i>cryIVB3'</i>	5'ATGGCTTGTTTCGCTACATC	-	-
<i>cry10Aa15'</i>	<i>cryIVC5'</i>	5'ATGAATCCATATCAAAAATAAG	2040	M12662
<i>cry10Aa13'</i>	<i>cryIVC3'</i>	5'AAGAACTTTGTTTAAATTAAC	-	-
<i>cry11Aa25'</i>	<i>cryIVD5'</i>	5'ATGGAAGATAGTTCTTTAGAT	1932	M31737
<i>cry11Aa23'</i>	<i>cryIVD3'</i>	5'CTACTTTAGTAAACGGATT	-	-
<i>cry11a15'</i>	<i>cryV5'</i>	5'ATGAAACTAAAGAATCAA	2174	X62821
<i>cry11a13'</i>	<i>cryV3'</i>	5'GGTAGATTTTAAATCTAC	-	-
<i>cyt1Aa15'</i>	<i>cytA5'</i>	5'TTTAGTATGCCAAAAGGTTTAGAA	280	X03182
<i>cyt1Aa13'</i>	<i>cytA3'</i>	5'GACATTGTATGTGAATTTGTTTG	-	-
<i>cyt2Aa15'</i>	<i>cytB5'</i>	5'CAAATTGCAAATGGTATTCCTAAT	410	Z14147
<i>cyt2Aa13'</i>	<i>cytB3'</i>	5'GCTTTCATTTAACTTCATATCG	-	-

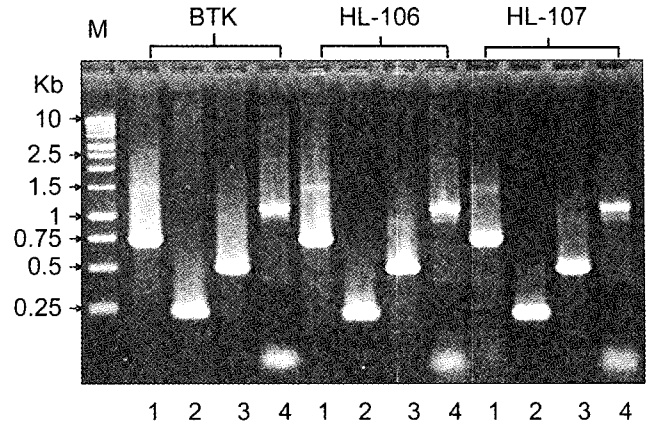
류, *cry2Aa1*, *cry3Aa3*, *cry3Ba1*, *cry3Ca1*, *cry4Aa1*, *cry4Ba1*, *cry7Ab1*, *cry9Aa2*, *cry10Aa1*, *cry11Aa*, *cry11a1*, *cyt1Aa* 및 *cyt2Aa1* 유전자들을 PCR증폭을 위하여 사용하였다(Table 2). Table 2에는 PCR을 위한 기존의 *cry*형 유전자의 specific primers 서열과 PCR 후에 생산될 PCR 산물 DNA 단편의 크기 및 출처를 제시하였다. Oligonucleotide PCR primer는 Bioneer사(Korea)에서 제조하여 사용하였다.

DNA의 증폭은 GeneAmp PCR system 2400(Perkin Elmer Co., Norwalk, CT, USA)를 이용하여 각 primer 마다 35주기씩 수행하였다. 반응액은 완충액 성분과 dNTP 등이 함유된 Premix(Bioneer사)에 주형 DNA 1.0  $\mu$ l, 3'-primer 용액 1.0  $\mu$ l, 5'-primer 용액 1.0  $\mu$ l, 그리고 증류수 17  $\mu$ l를 혼합하여 최종 부피가 20  $\mu$ l로 하여 수행하였다. 주형 플라스미드 DNA는 변성(94°C에서 1분) 시키어, primer DNA와 주형DNA를 42~60°C에서 1분간 연합을 시켰다. 그 다음에 1분 30초 동안 72°C에서 PCR을 진행하여 PCR product DNA를 생산하였으며 각 실험마다 대조균을 만들었다.

PCR 산물 DNA는 0.9% agarose gel에서 전기영동을 하여 분석하였다[23]. PCR로부터 만들어진 분자량은 1.0 kb DNA ladder(Promega Biotec, Madison, WI, USA)를 사용하여 분자의 크기를 측정하였다. 각 primers의 정확성을 알기 위하여 대조균주를 이용하였다. 대조균주는 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1과 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* H14를 사용하였다.

한국토양에서 분리하여 동정한 후에 편모의 항원을 결정하고, 아종명이 부여된 23개의 *B. thuringiensis* 균주(Table 1)에 있는 내독소 단백질 유전자형을 조사하였다. 상기의 23개 균주는 내독소 결정체를 모두 생산하는 것을 위상차 현미경으로 확인하였다(data 생략). 각 균주들이 내독소 결정체를 생산하는 것은 *cry*형 유전자를 가지고 있음을 의미하여 *cry*형 유전자를 탐색하기 위하여 12개의 universal primer와 21개의 특정유전자의 primer(Table 2)를 이용하여 PCR을 수행하였다. 특정유전자 primer는 *cry1*, *cry2*, *cry3*, *cry4*, *cry7*, *cry9*, *cry10*, *cry11*, *cyt1*과 *cyt2* 유전자형이 포함되어있다(Table 2). 각 *B. thuringiensis* 균주의 플라스미드를 주형(template)으로 사용하였으며, PCR을 수행하여 얻은 결과는 Fig. 1에 제시되어있으며, Table 1에 요약이 되어있다.

대조균인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD1(BTK)은 *cry*형 유전자는 *cry1Ab1*, *cry1Aa1*, *cry1Ac1*과 *cry2Aa1*형의 유전자 primer로 PCR을 한 결과 각각 고유의 DNA단편 238 bp, 724 bp, 550 bp, 1074 bp가 전기영동 상에 나타나서 4개의 *cry*형 유전자를 가진 것으로 나타났다(Fig. 1-3). 이 결과는 Kuo & Chak[16]의 보고와 일치하였다. 이 결과는 대조균주에서 정확한 고유의 DNA단편이 PCR에 의해



**Fig. 1. PCR product profiles for detection of *cry*-type gene from *B. thuringiensis* strains HL-106 and HL-107.** *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BTK) is a standard strain. Lane M indicates 1 Kb DNA ladder. Lanes of primers of the *cry*-type gene 1, *cry1Aa2* type gene; 2, *cry1Ab1*; 3, *cry1Ac1*; and 4, *cry2Aa1*.

서 생산되고 정상적으로 실험이 진행되었음을 의미한다. 그러나 *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* H14 대조균주의 플라스미드를 이용한 *cry*형 유전자의 PCR 조사에서는 어떠한 PCR products도 나오지를 안했으며, 이는 사용한 primers의 작용이 제대로 안되었거나 상동성 염기서열이 없을 가능성 높다고 판단된다.

*B. thuringiensis* HL-63, HL-64, HL-85와 HL-86균주도 혈청형은 *israelensis* 균주에 속하나 어떠한 PCR products도 나타나지 않았다(data 생략). 이는 이 균주들이 사용한 primer의 염기서열과 상이한 염기서열을 가지고 있거나, primer가 제대로 작용이 안 되어서 PCR 산물이 나오지를 안했을 가능성이 높으며, 더 많은 primer를 이용한 동정이 필요하다고 생각한다.

*B. thuringiensis* strain HL-106과 HL-107의 *cry*형 유전자의 패턴을 조사 한 것이 Fig. 1이다. HL-106과 HL-107균주는 *cry1Aa2*, *cry1Ab1*, *cry1Ac1* 그리고 *cry2Aa1*형의 유전자를 보유하고 있었으며, 이는 표준균주인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*와 일치하는 것으로 나타났다. *B. thuringiensis* strain HL-108, HL-109, HL-110, HL-111, HL-112 그리고 HL-117의 *cry*형 유전자의 패턴을 조사 한 결과 에서도 각 균주는 *cry1Aa2*, *cry1Ab1*, *cry1Ac1* 그리고 *cry2Aa1*형의 유전자를 보유하고 있어서 Fig. 1과 동일한 패턴을 나타냈다. 이들 또한 대조균주인 *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*의 유전자형과 일치하는 것으로 나타났다. 상기 8균주이외의 나머지 15균주는 Table 2에 있는 특이 *cry*-type 유전자의 primers와는 반응을 나타나지 않았다(data 생략).

본 연구결과에서는 *B. thuringiensis* 분리균주 23균주 중에서 8개의 균주만이 4개의 *cry*형 유전자를 보유하고 있었고, 나머지 15균주는 21개의 *cry*형 유전자에 반응을 하지 않

았으며, 이것은 15개의 균주는 다른 *cry*형 유전자를 보유하거나 primer에 문제가 있음을 의미하며, 더 많은 primers를 이용한 검색이 필요하다고 판단된다.

### 감사의 글

본 연구논문은 한국과학재단의 목적기초연구지원사업 연구비(R01-2000-00140)로 수행되었음.

### REFERENCES

- Aronson, A. I. 1994. *Bacillus thuringiensis* and its use as a biological insecticide. *Plant Breed. Rev.* **12**: 19-45.
- Ben-Dov, E., A. Zaritsky, E. Dahan, Z. Barak, R. Sinai, R. Manasherob, A. Khameraev, A. Troyetskaya, A. Dubitsky, N. Berezina, and Y. Margalith. 1977. Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4883-4890.
- Bourque, S. N., J. R. Valero, J. Mercier, M. C. Lavoie, and R. C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 523-527.
- Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos, G. Pena, M.-E. Nunez-Valdez, M. Soberon, and R. Quintero. 1998. Characterization *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4965-4972.
- Bulla, L. A. Jr., D. B. Bechtel, K. J. Kramer, Y. I. Shethna, A. I. Aronson, and P. C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure physiology and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *Crit. Rev. Microbiol.* **8**: 147-204.
- Burges, H. D. 1981. *Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980*. Academic Press, London.
- Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. V. Warren, S. Evolan, and M. G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3057-3061.
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina, and A. Bravo. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 353-356.
- Ceron, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca, and A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3826-3831.
- Chak, K. F., C. D. Chow, M. Y. Tseng, S. S. Kao, S. J. Tuan, and T. Y. Feng. 1994. Determination and distribution of *cry*-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2415-2420.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 807-813.
- de Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga* **35**: 233-340.
- Juarez-Perez, V. M., M. D. Ferrandis, and R. Flutos. 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 2997-3002.
- Kim, S. Y., M. H. Kang, H. B. Choi, J. U. Lee, J. F. Charles, V. C. Dumanoir, E. Frachon, M. M. Lecadet and H. H. Lee. 1998. Characteristics of thirty-six *B. thuringiensis* isolates and a new serovar. of *Bacillus thuringiensis* ser *kim* (serotype H52). *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 534-540.
- Kumar, P. A., R. P. Sharma, and V. S. Malik. 1996. The insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Adv. Appl. Microbiol.* **42**: 1-43.
- Kuo, W. S., and K. F. Chak. 1996. Identification of novel *cry*-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1369-1377.
- Lecadet, M.-M., E. Frachon, V. Cosmao Dumanoir, H. Ripouteau, S. Hamon, P. Laurent and I. Thiery. 1999. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 660-672.
- Lee, H. H., J. A. Lee, K. Y. Lee, J. D. Chung, H. de Barjac, J. F. Charles, V. Cosmao Dumanoir, and E. Frachon. 1994. New serovars of *Bacillus thuringiensis*: *B. thuringiensis* ser. *coreanensis* (serotype H25), *B. thuringiensis* ser. *leesis* (serotype H33), and *B. thuringiensis* ser. *konkukian* (serotype H34). *J. Invertebrate Pathol.* **63**: 217-219.
- Lee, H. H., J. D. Jung, M. S. Yoon, K. Y. Lee, M. M. Lecadet, J. F. Charles, V. Cosmao Dumanoir, E. Frachon, and J. C. Shim. 1995. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Korea. *Bacillus thuringiensis Biotechnol. Environ. Benefits* **1**: 201-215.
- Lee, H. H., S. H. Hwang, and Y. S. Park. 1990. Transfer of insecticidal toxin gene in plants: cloning of insecticidal protein gene in *Bacillus thuringiensis*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 647-652.
- Masson, L., M. Erlandson, M. Puzstai-Carey, R. Brousseau, V. Juarez-perez, and R. Flutos. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 4782-4788.
- Nickerson, K., W. G. St. Julian, and L. A. Bulla, Jr. 1974.

Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: radiorespirometric survey of carbohydrate metabolism in the 12 serotypes of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* **28**: 129-132.

23. Sambrook, L., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989.

*Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

**(Received Jan. 10, 2005/Accepted May 14, 2005)**