한국농화학회지 Vol. 19, No. 4, Dec., 1976
J. Korean Agricultural Chemical Society

미생물 살충제의 개발에 관한 연구

李 載 球·金 敎 昌
忠北大學 農化學科
(1976년 11월 1일 수리)

A Study on the Development of a Microbial Insecticide

Jae-Koo, Lee and Kyo-Chang, Kim
Dept. of Agricultural Chemistry,
Chung Buk National University
(Received November 1, 1976)

SUMMARY

In an effort to develop a microbial in secticide, *B. thdringiensis var. thuringiensis* was cultured in the medium composed of cocoon-cooked water from a filature. The results obtained are summarized as followss :

① *Bacillus thuringiensis* is a bacterium producing a δ-endotoxin especially toxic to lepidopterous insects and a thermostable exotoxin harmful to dipterous insects.

② With a view to utilizing the cocoon-cooked water discarded from the filature, as a nutrient source in the *B. thuingiensis* culture, it was analyzed to contain large amounts of various minerals and protein (7.5 mg/ml) believed to be extracted from the pupae.

③ A large amount of the δ-endotoxin can be obtained most cheeply by using cocoon-cooked water instead of distilled water in preparing GYS and citrate salts media.

④ The largest amount of a mixture of the vegetative cells, spores, and crystals was obtained by addition of 8 gr/l of glucose to the GYS medium.

⑤ The growth of the bacterium was far better, when leucine, isoleucine, and valine were added all together to the citrate salts medium to the concentration of 1.25×10^{-3} M.

⑥ The best growth was observed by addition of Na-glutamate to the citrate salts medium to the concentration of 2.5×10^{-3}M.

⑦ The optimal culture time ranged from 9 to 15 days.

⑧ The highest mortality was shown in *Pieris rapae Linnê* with a pH of the total body extract of 8.4, whereas *Dendrolimus spectabilis Butler* and *Bombyx mori Linné* with lower pH's were less susceptible to the δ-endotoxin.

⑨ The presence of the thermo stable exotoxin was confirmed by the fact that the supernatant of the culture was very toxic to the *Drosophila melanogaster* tested,

서 론

해충 방제에 미생물을 이용하고자 하는 노력은 약 100년전부터 세계 각국에서 시도되어 왔다. 1911년 Berliner[5]는 밀가루나방(*Anagasta kühniella* Zell)으로 부터 *Bacillus thuringiensis*를 분리하였고 Mattes[36]와 더불어 이 세균의 포자형성 세포에서 장사방형의 물질을 관찰한 이후 1953년에는 Hannay[18]가 *Bacillus*에서 "Crystalline inclusions"를 보고 하였으며 이는 전자와 동일물질임을알게되었다. 다른 병원체와 더불어 다량의 *Bacillus thuringiensis* Berliner가 1920년대 후반으로부터 1930년대 초기에 이르는 동안 유우럽 옥수수벌레(*Pyrausta nubilalis Hbn*)방제 연구에 사용되어 왔다. 그러나 곤충병리학에 있어서 기초연구의 강화가 곤충병원체를 합리적인 방법으로 이용할 수 있는 충분한 지식을 우리들에게 제공하여준 것은 다만 최근 20년내이다. 이것은 생장과 증식기의 말기에 휴지포자를 형성하는 간상(rod-shaped)의 세균임으로 수년동안 *Bacillus cereus*와 근사하다고 믿었다.

Hannay[18]는 이 세균은 포자형성시에 diamond형의 결정을 생성하며 이 결정은 곤충에 대한 본 세균의 병원성과 관련이 있을런지도 모른다고 암시한바 있다. 독자적으로 연구하던 Angus[1]는 이결정성 물질은 곤충에 대하여 참으로 독성을 가진 alkali 가용성 단백질이라 시사하였고 이 crystal toxin을 누에에 투여하였을때 누에가 치사하는 것을 보여주었다. 이 결정물질을 생성하는 이 세균은 곤충을 살해할수있는 독성 물질을 적어도 5가지는 생성한다고 한다. 화학분석 결과를 보면 그중 결정물질은 16.5%N, 0.09%P, 0.5% 탄수화물, 그리고 0.03~0.4% Si를 함유하며 많은 종류의 amino산으로 구성되어 있다. 따라서 이 결정물질은 단백질로 구성되어있고 핵산은 함유치 않는 것을 알 수 있다.[19,20] 이것은 pH11.8에서 용해되는 매우 불활성인 물질이며 sodium thioglycollate 같은 환원제 존재하에서는 pH 9에서 용해될수 있는 점으로 보아 유황결합으로 되어 있을런지도 모른다고 한다.[30]

이 세균은 미국, 독일, 불란서, 체코, 소련을 위시한 세계각국에서 농약으로 간주되고 있으며 나비목(*Lepidoptera*), 파리목(*Diptera*), 그리고 벌목(*Hymenoptera*)의 137개 이상의 종에 대하여 방제시험을 행한바 그 결과는 매우 고무적 이었다.

이 *B. thuringiensis*는 사물기생인 호기성 세균으로 염가의 단백질 급원과 몇개의 염류및 물을 함유한 액체나 고체의 인공배지 상에서 매우 신속히 생장하며 이 살충제의 장점은 곤충에 따라 선택성을 가지며 포유류에 대하여 독성이 없다는 것이다. 반면 이 세균은 생산과 표준화에는 약간의 문제점을 가지고 있으나 OILB (Organisation Internationale de la Lutte Biologique) 및 그 협력자들은 제품의 비교를 위한 공통적 근거를 마련하고저 노력하는 중이다. 본 실험에서는 주로 현재 우리나라의 제사공장에서 폐기되는 자견수를 이 세균의 배양에 필요한 단백질(또는 Amino산) 및 무기염류의 급원으로 이용하여 가격 저렴한 살충제를 대량 생산 할수있는 방법을 연구하는데 목적이 있으며 몇가지 흥미있는 자료를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

실험자료 및 방법

(1) **사용균주** : 일본 동경대학 미생물 연구소로부터 분양받은 *Bacillus thuringiensis var. thuringiensis IAM* 11056을 가지고 주로 사용하였으며 국내에서는 이병누에(*Bombyxmori*)로부터 분리한 세균에 대하여 검토 하였다.

(2) **균의 보존** : Slant culture로 냉장고 내에서 4°C로 보존하였다.

(3) **자연용수와 자견수의 분석** : 고치를 삶기 전후의 물을 분석하여 내용물의 성분 변화량을 비교검토하였다. 각 성분의 분석은 다음 조작에 따라 행하였다.

시료 : 청주시내에 있는 남한홍산으로부터 자견용수와 자견수를 얻어서 자견용수는 그대로 화학분석을 행하였으며 자견수(cocoon-cooked water)는 2시간 정도 5°C에서 정치하여 표면에 응고하는 지방분을 일차 제거한후 14,000g에서 5분간 원심분리하고 glass wool로 그 상등액을 decantation에 의하여 여과하여 불순물과 침전하는 단백질등을 제거한후 공시액으로 사용하였다.

Ca, Mg, K, Na, Mn, Fe, Zn정량 ; $HClO_4 : H_2SO_4 : HNO_3$(1 : 1 : 1)의 mixture로 일정량의 시료를 분해하고 active carbon으로 탈색한 후 Atomic Absorption Spectrophotometry에 의하여 분석하였다.

SO_4정량 ; 일정량의 시료를 HCl로 분해한후 active carbon으로 탈색후 $BaCl_2$에 의한 비탁법으로 분석함.

PO_4정량 : 상기 $HClO_4-H_2SO_4-HNO_3$ mixture로분해한후 active carbon으로 탈색하고 sample 3ml를 취하여 ammonium molybdate법으로 525 nm green filter를 사용하여 비색 정량하였다.

NH_4^+-N의 정량 ; 250ml 삼각 후라스크에 sample 10ml MgO와 3gr을 넣고 증류하여 정량하였다.

NO_3-N의 정량 ; 250ml 삼각 후라스크에 sample 10ml를 넣고 0.5gr의 Devarda's Alloy extra pure를 가한후 MgO 3gr을 넣어 증류하여 정량하였다.

COD(Chemical oxygen demand)측정 ; 250ml 삼각 flask에 reflux를 달고 여기에 0.2gr sample을 넣고 50ml $K_2Cr_2O_7$ 용액과 30ml 증류수를 넣은 다음 20ml conc. H_2SO_4를 넣어 1시간 동안 가열한 후 냉각하여 250ml mess flask에 넣어 눈금을 맞춘다. 이 중에서 10ml를 500ml 삼각 flask에 옮긴 후 증류수 100ml와 Conc. H_2SO_4 20ml를 가하여 0.5 N ferro-ammonium sulfate로 적정하며 indicator로 orthophenanthrolin을 사용하여 정량함.

(4) 자견수에 함유된 단백질 정량 : 시료 조작중 원심분리 정도에 따른 단백질 함량의 변화를 보기위하여 각기 다른 relative centrifugal force에서 원심분리를 행한후 그 상등액의 단백질을 정량하였다. 또한 autoclaving의 회수에 따른 단백질 함량 변화를 검토하고 일정시간 냉동후 다시 녹여서 원심분리한후 그 상등액의 단백질을 정량하여 냉동의 회수에 따른 변화도 아울러 검토하였다.

단백질은 Lowry등[33]의 방법에 의하여 folin reagent를 사용하여 정량하였다.

(5) 배지 조성 :

Table 1. Medium A[11]

Soln. 1

KNO_3	7.5	gr
Na_2SO_4	0.112	gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.093	gr
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	0.16	gr
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.0017	gr
$Fe_2(SO_4)_3$	0.015	gr
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.011	gr
Peptone	4.4	gr
Nutrient broth	1.2	gr

dissolved in 1*l* distilled water

Soln. 2

KH_2PO_4	10.2	gr
KOH	0.248	gr

dissolved in 1*l* distilled water

Soln. 1과 Soln. 2를 각기 따로 121°C, 15lbs에서 15분간 autoclaving한후 무균실에서 1 : 1로 혼합하여 배지로 사용하였다. (pH=7.0).

Table 2. Medium B

K_2HPO_4	0.5	gr
KH_2PO_4	0.5	gr
Thiamine-HCl	0.0002	gr
$NaNH_4$ HPO_4 $4H_2O$	0.15	gr
Na_3 $C_6H_5O_7$ $2H_2O$	0.3	gr
Nutrient broth	0.1	gr

자견수 100ml에 용해

Medium C : Medium B의 thiamine-HCl을 riboflavin으로 대치

Table 3. Medium D

K_2HPO_4	0.5	gr
KH_2PO_4	0.5	gr
Thiamine-HCl	0.0002	gr
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.005	gr
$MnSO_4$ $4H_2O$	0.003	gr
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.001	gr
$CaCl_2$ $2H_2O$	0.005	gr
$NaNH_4$ HPO_4	0.15	gr
$Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	0.3	gr
Nutrient broth	1	gr

자견수 100ml에 용해

Medium E : medium D의 nutrient broth 1gr을 0.1gr으로함.

Medium F : medium D에서 nutrient broth를 제외

Medium G : medium D에서 자견수대신 증류수를 사용

Medium H : medium B에서 thiamine-HCl 0.0002 gr을 제외

Table 4. Medium I

$(NH_4)_2$ SO_4	2.0	gr
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.5	gr
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	gr

$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.05	gr
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.08	gr
Yeast extract :	2.0	gr
Glucose :	8	gr

증류수 1l에 용해(pH 7.3)

Medium J : meduium I의 yeast extract 2.0gr을 제외하고 증류수대신 자견수를 사용

Medium K : medium I의 증류수대신 자견수를 사용

Medium L : glucose 8gr을 자견수 1l에 용해함 (pH=7.0)

Medium M : 자견수(다른 영양원은 첨가치 않음)

Medium N : medium D에 glucose 0.8gr을 추가하고 자견수 대신증류수를 사용함(pH=7.0)

(6) 배양시간에 따른 공시세균의 소장 :

Medium D(이때 자견수는 변성 단백질등을 완전히 제거하기 위하여 17,000g에서 5분간 원심분리한후 그 상등액에 무기염류를 용해시켰음)를 각 시험관에 15ml씩 넣고 3반복으로 하여 15lbs(121°C)에서 15분간 고압살균한후 1백금니씩 균을 접종하여 30±2°C에서 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21일 동안 진탕 배양한후 17,000g에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 잔사를 증류수에 균일하게 현탁시켜 20ml로 한후 그중 1ml를 planchet에 취하여 93°C에서 10시간 동안 건조시킨후 칭량하고 20을 곱하여 전체의 무게를 계산하여 비교하였다.

(7) 공시세균의 대량배양 :

Medium D의 조성을 가진 배지를 6l 만든 다음 Figure 1과 같은 장치로 30±2°C에서 15~20일간 vacuum pump(Fisher제)를 이용하여 aeration 시키면서 배양하였다.

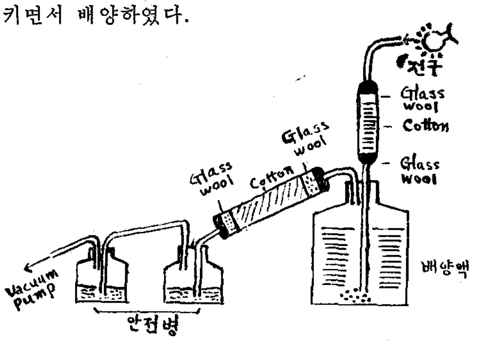


Fig. 1. The apparatus used for the culture of *B. thuringiensis*

(8) 공시세균의 고체배양

Crystal을 정제하기 위하여 500ml Povitsky flask 5개에 agar배지(Bacto-beef extract 3gr, Bacto-peptone 5gr, Bacto-agar 15gr을 1l의 증류수에 용해시켰음)를 넣고 살균후 접종하여 30±2°C에서 16일간 배양한후 백금니로 꺼내어 물로 세척한 후 14,000g에서 5분간 원심분리하여 상등액은 버리고 그 잔사를 얻었다.

(9) Parasporalbody(Crystal)[40]의 정제 :

30±2°C에서 20일간 배양한후 원심분리에 의하여 spore와 crystal의 혼합물을 수집한후 증류수로 3회 세척하고 다시 염수(5.85gr/100ml)로 세척하였다. 이것을 증류수에 다시 현탁시킨후(50mg wet wt./ml) 현탁액 35ml에 1% Na_2SO_4 30ml와 CCl_4 35ml의 비율로 homogenizer에서 7,000~8,000r.p.m.으로 2.5분간 혼합하고 분액여두에 옮겨 하룻밤동안 정치한후 siphon에 의하여 물층을 분리하여 (35%yield) 3,000r.p.m.에서 20분동안원심분리한후 침전물을 실온에서 진공으로 silica gel위에서 건조시켰다. (96~98% purity).

(10) Crystal로부터 Alkali-Soluble protein의 추출 :

누에에 대한 독성을 비교하기 위하여 순수하게 얻은 crystal 53.1mg을 10ml의 0.05N−NaOH에 현탁시킨후 24°C에서 1.5시간 방치하여 용해시킨다. 다음 이 현탁액을 17,000g에서 15분간 원심분리한후 상등액을 0.04M universal buffer[7]중에서 16시간동안 투석한후 alkali-soluble protein으로 사용하였으며[3] 31.55mg이 상등액중에 용존해 있고 21.55mg은 잔사로 남아 있었다.

(11) Amino산 첨가의 영향 :

① leucine, isoleucine, valine의 영향 ; Medium G(pH=7)에서 thiamine-HCl과 Nutrient broth를 제외하고 여기에 leucine, isoleucine, valine을 각각 첨가하여 1.25×10^{-3}M과 2.5×10^{-4}M의 두 농도에서 공시 세균의 생육에 미치는 영향을 관찰하였다. blank는 1개를 만들고 나머지는 각각 3반복씩 시험관에 15ml씩 넣어 30±2°C에서 72시간 배양후 Self-Recording Serial Colorimeter, Automatic 36(ATAGO Optical Works Co, LTD)를 사용하여 파장 610nm에서 absorbance를 측정하여 그 평균치를 취해 생육의 정도를 비교하였다.

② Na-glutamate의 영향 ;

leucine, isoleucine, valine때와 동일한 배지를 사용하고 시료로는 monosodium glutamate를 사용

하였다. 첨가농도는 2.5×10^{-3}M, 1.25×10^{-3}M, 2.5×10^{-4}M, control(none)의 4 수준으로 하였다. 기타 방법은 leucine등의 실험과 동일하게 행함.

(12) 곤충의 전체추출액(Total body extract)의 pH측정 :

나비목(*Lepidoptera*)곤충중에서 회양목 명나방 유충(*Margaronia perspectalis* Walker), 배추흰나비 유충(*Pieris rapae* Linné), 송충(*Dendrolimus spectabilis* Butler), 담배나방 유충(*Chloridea assulta* Guénée), 누에(*Bombyxmori* Linné)등을 4~5령기의 것을 골라 15마리 씩을 40ml 증류수와 함께 homogenizer로 3분간 마쇄한후 가제로 여과하여 Trisher Accumet Model 230 pH/ion Meter로 pH를 측정하였다. 측정방법은 증류수만의 pH를 동시에 측정하여 곤충 전체 추출액의 pH를 보정하였다.

(13) 나비목 곤충에 대한 Crystal의 독성 실험

회양목 명나방 유충 ; 회양목잎에 배양해서 얻은 crystal, spore 및 세포의 혼합물을 피복하여 샤레안에서 24시간 동안 굶은 유충 5마리씩에게 먹이고 독성을 관찰하고 48시간후에 촬영하였다.

배추흰나비 유충 ; 배추잎에 crystal등의 혼합물을 피복하고 위와 동일한 방법으로 하여 살충성을 관찰함.

송충 ; 솔잎에 crystal등의 혼합물을 피복한후 송충에게 먹이고 위와 같이 독성을 관찰함.

담배나방 유충 ; 담배잎에 crystal등의 혼합물은 피복한후 유충에게 먹이고 동일한 방법으로 독성을 관찰함.

누에 ; 5령기의 누에를 24시간 굶긴후 뽕잎에 crystal등의 혼합물을 피복하여 먹이고 위와 동일하게 독성을 관찰함.

(14) 초파리(*Drosophila melanogaster* Meigen)에 대한 독성실험[24] :

B. thuringiensis var. thuringiensis Berliner의 배양액의 상등액중에는 열에 안정한 "fly-toxin"[37]이 존재함으로 초파리에 대한 독성 실험을 행하였다. 상등액을 원액 그대로 사용한 것과 5배와 10배로 희석한 3 level의 농도로 하여 시험관에 초파리의 배지를 일정량씩 넣고 초파리의 유충을 10마리씩 넣어 용화과정을 관찰하였다.

Table 5. Composition of the medium for *Drosophila melanogaster* Meigen

Distilled water	1,130	ml
Corn meal	119	gr
Dextrose	69	gr
Sucrose	34	gr
Yeast	24	gr
Propionic acid	5~7	cc
Agar	6~8	gr
Streptomycin	250	mg

배양병 100개용

결과 및 고찰

(1) 자견용수와 자견수의 성분 :

자견용수와 자견수의 성분 함량을 비교해 보면 Table 6과 같다.

Table 6. Chemical composition of water for filature and cocoon-cooked water

	자견용수(ppm)	자견수(ppm)
pH	6.35	6.8
Ca^{++}	10.0	21.3
Mg^{++}	26.0	83.3
K^+	25.0	333.3
Na^+	45.0	53.3
Fe^{++} & Fe^{+++}	trace	1.3
Zn^{++}	none	0.7
Mn^{++}	0.5	0.4
Cl^-	none	none
$SO_4^{=}$	24.3	11.4
$PO_4^{\equiv}$	8.0	50~60
NH_4^+-N	—	35.35
NO_3^--N	—	1.02
COD	—	2040

Table 6에서 보는 바와같이 자견용수의 pH6.35가 견(cocoon)을 삶은 후에 6.8로 된 것은 용중에 함유되어 있는 여러가지 무기염류가 추출되어 나온 때문이라 생각되며 Ca^{++}, Mg^{++}, K^+, Na^+, Fe^{++}, Fe^{+++}, Zn^{++}, $Po_4^{\equiv}$등의 함량이 견을 삶은 후에 모두 증가된 것도 마찬가지라 생각된다. Mn^{++}은 별로 변화가 없고 $SO_4^{=}$는 24.3ppm에서 11.4ppm으로 감소한것은 삶는 과정에서 나온 다른 Ca^{++}과 불용성 침전을 형성하여 원심분리를 하는 과정에서 많이 감소된 것으로 생각된다. 따라서 Ca^{++}함량도 본래는 분석치보다 많았을 것으로 생각된다. 여하튼 제사과정에서 견을 삶을 때에는 용중에 함유되어 있는 성분들이 많이 용출되어 나오므로 본 세균을 배양하는데 좋은 영양원이 될 것으로 사료

된다.

(2) 자견수중의 단백질 함량

시료를 만들때 원심분리의 relative centrifugal force (R.C.F.)를 달리 했을 때의 protein 함량의 변화를 살펴보면 Table 7과 같다.

Table 7. Amounts of protein in the cocoon-cooked water with differeit relative centrifugal forces

R. C. F.	Time(min.)	Content of Protein (mg/ml)
14,000g	5	7.50
18,000g	5	7.45
20,000g	5	7.42
23,000g	5	7.40

Table 7에서 보는 바와같이 배양액을 만들때 14,000g에서 5분간 원심분리를 행하였는데 단백질 함량은 7.50mg/ml로서 0.75%의 protein이 이 용액중에 들어있는 셈임으로 본 실험의 세균을 배양하는데 좋은 영양원이 된다고 볼수 있다. 그리고 R.C.F.를 올려도 protein의 감소는 약간 있을뿐 대차는 없는 것을 알수 있다. 다음은 autoclaving의 회수에 따른 자견수중의 단백질 함량의 변화를 보면 Table 8과 같다.

Table 8. Amounts of protein in the cocooncooked water with the increased number of autoclaving

Number of autoclaving	Protein content(mg/ml)
1	7.46
2	7.45
3	7.42

Table 8에서도 보는 바와같이 autoclaving의 회수를 증가함에따라 단백질이 변성되어 침전되어 나오는 것을 알수 있으나 그 정도는 크지는 않은 것 같다.

다음은 냉동시의 단백질 함량의 변화를 보면 Table 9와 같다.

Table 9. Amounts of protein in the cocoon-cooked water with the increased number of freezing

Number of freezing	Amounts of protein (mg/ml)
1	7.3
2	5.0

냉동시에는 많은 량의 단백질이 변성되어 침전됨으로 그 함량의 감소가 큰 것을 알수있다. 그러므로 이 결과는 반대로 자견수 중의 단백질을 회수하는 한 방법으로 냉동을 여러번 되풀이 함으로서 많은량을 얻을수 있으리라 생각된다.

(3) 각 배지에 있어서의 *B. thuringienlis*의 증식 :

Medium A, 자견수 그리고 medium A에서 증류수대신 자견수를 사용한 3가지 배지 각각 100ml를 가지고 30±2°C에서 19일간 진탕 배양한후 14,000 g에서 5분간 원심분리하여 균체와 crystal 혼합물을 얻어 건조하지 않은 채로 칭량하여 비교해 보면 Table 10과 같다.

Table 10. Comparison of the growth of *B. thuringiensis* on various media

Media used	Wet weight(spore+crystal+cell) (gr)
Medium A	0.213
자견수	0.437
Medium A+자견수	0.426

Table 10에서 보는 바와같이 자견수만을 배지로 사용했을 경우가 가장 성적이 좋은 점으로 보아 이것은 좋은 배지가 될수 있음을 말해주며 medium A+자견수에서 약간 작은 수치를 보인 것은 영양과다에서 오는 결과가 아닌가 생각된다.

(4) 각 배지의 비교(I) :

*B. thuringiensis*의 생장에 미치는 배지의 효과를 보기위하여 각 조성의 배지 15ml씩을 3반복으로 시험관(길이 30cm×내경 2.2cm)에넣고 공시 세균을 1백금니씩 접종하고 30±2°C에서 150시간동안 진탕배양한후 원심분리하여(14,000g에서 5분) 균체와 crystal의 혼합물의 무게를 건조하지 않은

Table 11. Comparison of the growth of *B. thuringiensis* on various media(I)

Media	Wet weight(gr) (cell+crystal+spore)
B	0.19354
C	0.13854
D	0.32708
E	0.18949
F	0.17403
G	0.14135
H	0.14229

채로 칭량하여 그 평균치를 취하여 생육의 정도를 비교하였다. 그 결과는 Table 11과 같다.

Table 11의 medium B, C 및 H의 차이점은 B에는 thiamine-HCl이 들이있고 C에는 riboflavin이 들어 있으며 H에서는 thiamine-HCl과 riboflavin이 모두 들어있지 않은 것이다. medium B에서는 019354gr로서 medium C의 0.13854gr과 Medium H의 0.14229gr보다 휠씬 큰것은 thiamine-HCl의 첨가는 공시세균의 생장을 촉진한다는 것을 보여주나 riboflavin의 첨가는 오히려 생장을 저해한 결과를 나타내었다. 다음 medium D와 E의 차이점은 medium D에서는 nutrient broth의 함량이 1%인 반면 medium E에서는 nutrient broth의 함량이 0.1%이다. 따라서 medium D에서는 0.32708gr으로서 medium E의 0.18949gr보다 훨씬 큰것은 영양원으로서 nutrient broth의 함량을 크게하면 본 세균의 생육도 왕성하게 된다는 것을 보여준다. 다음 medium D와 medium G를 비교해보면 medium D에서는 영양원을 자견수에 용해하여 medium을 만든반면 medium G에서는 증류수에 용해하여 만든것이다. medium D의 0.32708gr은 medium G의 0.14135gr보다 2배 이상의 무게를 보이고 있는 것은 자견수의 영양원으로서의 가치를 여실히 증명해 주고 있으며 자견수를 본 세균의 배양에 사용하고 저하는 본 연구의 의도를 고무적으로 충족시켜 주고있는 것이다. medium E와 F의 차이점은 E에서는 nutrient broth가 0.1% 함유되어있는 반면 F에서는 nutrient broth를 제외시킨 것이다. 그러나 두 경우 전부 자견수로 만들어져 있기 때문에 단백질등의 영양분은 공급되어 있으며 medium E의 경우는 0.18949gr이고 F의 경우는 0.17403gr으로서 별차이가 없는것은 자견수를 배지조제에 사용하는 한 0.1% 정도의 nutrient broth의 첨가효과는 별로 나타나지 않음을 보여주고 있는 것이다. 이상의 결과로 보아 thiamine-HCl 0.0002%와 nutrient broth 1%를 함유한 자견수로 만들어진 medium D가 가장 공시세균의 생육을 촉진시킨다는 것을 알수있다.

(5) **각 배지의 비교(Ⅱ)**:

Medium I,J,K,G,L,M,N을 각기 15ml씩 3반복으로 시험관에 넣은후 *B. thuringiensis* 1백금니씩을 접종하여 30±2°C에서 48시간 배양후 원심분리(14.000g에서 5분)하여 상등액을 버리고 잔사를 건조하지 않은채로 칭량한 결과는 Table 12와 같다.

Table 12. Comparison of the growth of *B. thuringiensis* on various media(Ⅱ)

Medium	Wet weight (gr)(cell+crystal+spore)
I	0.18819
J	0.32156
K	0.53537
G	0.22769
L	0.31921
M	0.30642
N	0.31546

Table 12에서 보는 바와같이 medium I와 K의 차이는 I에서는 용매로 증류수를 사용하였고 K에서는 자견수를 사용한 GYS배지이다. I에서 0.18819gr인 반면 K에서는 0.53537gr으로서 상당한 생육상의 차이를 보인 점은 영양원으로서 자견수의 효과를 보여주고 있는것이다. medium I(GYS배지)[61]와 medium G(citrate salts medium)[9]는 각각 0.18819gr과 0.22796gr으로서 medium G가 약간 좋은 생육상을 보여주었다. medium G(0.22796gr)에 glucose(0.8%)를 첨가한 것이 medium N (0.31546gr)로서 glucose를 첨가할 경우 공시세균의 생육은 증가되는 것은 알수있다. medium M은 자견수만을 사용한 배지로서 medium I, G보다도 좋은 생육을 보여주고 있어 자견수중에 함유된 단백질과 무기물등이 좋은 영양원이 되고 있음을 보여주고 있다. 또한 medium J는 medium I의 값비싼 yeast extract를 빼고 증류수대신 자견수를 사용한 것으로서 I의 0.18819gr에 비하여 0.32156gr로서 많은 무게를 보이는 점으로 보아 yeast extract대용으로 자견수의 사용 가능성을 시사해 주고있다. medium J와 K는 다같이 GYS 배지의 용매로 사용된 증류수대신 자견수를 사용한 점은 같으나 차이점은 J에서는 yeast extract를 제외한 점이다. J는 0.32156gr이고 K는 0.53537gr임으로 yeast extract를 첨가하면 영양원이 많아짐으로 세균이 잘 증식됨을 알수있다. medium L (0.31921gr)은 medium M (0.30642gr)보다 큰것으로 보아 자견수만의 배지에 0.8%의 glucose를 첨가시 본 세균의 생육은 약간 증가함을 알수 있으나 그 차이는 별로 크지 않다. 여기에서 얻은 결과로 보아 가장 많은 균체와 crystal의 혼합물을 얻기위하여 GYS배지에서 증류수대신 자견수를 사용하는 것이 좋으며 따라서 많은 량의 crystal도 얻을수 있으리라 기대된다.

(6) Glucose함량의 영향 :

GYS배지인 medium I에서 glucose함량을 다음과 같이 각기 달리하여 3반복으로 15ml씩 취하여 공시세균 1백금니씩 접종하고 30±2°C에서 48시간 배양후 14,000g에서 5분간 원심분리하여 위와 동일한 방법으로 칭량한 결과는 Table 13과 같다.

Table 13. Change in the growth of *B. thturingiensis* as a function of glucose concentrations

Levels of glucose added (g/l)	Wet weight(gr) (cell+spore+crystal)
0	0.05896
2	0.10625
4	0.14827
6	0.15919
8	0.17905
10	0.17772
12	0.17123

공시 세균의 증식을 왕성하게 하기위하여 glucose를 첨가하는것이 필요함을 알수있으며 glucose함량의 증가에 따라 본세균의 생육도 왕성해지나 8(gr/l)일때 최고에 달하고 그후로는 점차적으로 감소됨을 알수있다. 이와같은 경향은 Scherrer등[42]의 실험과도 잘 일치함을 알수있다.

(7) 배양시간에 따른 공시세균의 소장 :

배양시간 별로 측정된 균체와 crystal 혼합물의 건물중은 다음 Table 14, Figure 3과 같다.

Table 14와 Figure 3에서 보는 바와 같이 배양후 9일에서 15일 사이에 최고에 달하고 15일이후

Table 14. Change in the growth of *B. thuringiensis* as a function of culture time

Incubation Period(days)	Dry weight (gr)
3	0.0558
6	0.0617
9	0.0890
12	0.0892
15	0.0894
18	0.0735
21	0.0673

부터는 감소하는 것을 알수있으며 감소되는 이유는 균체가 자가분해(autolysis)되는 때문이라 생각된다.

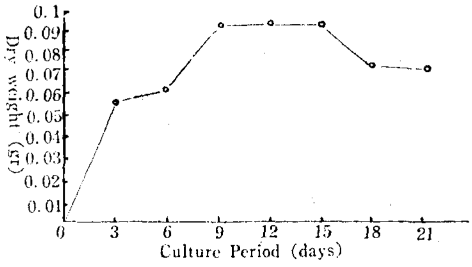


Fig. 2. Change in the growth of *B. thuringiensis* as a function of culture time

(8) Leucine, Isoleucine, Valine의 영향 :

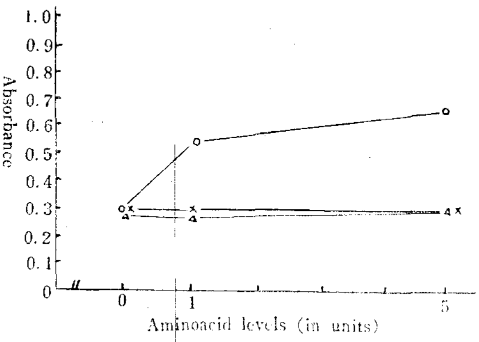
이들 amino산을 각 농도별로 첨가했을 경우의 결과는 다음 Table 15와 Figure 4와 같다.

Table 15. Effects of amino acids on the growth of *B. thhuringiensis* at various levels of Concentration

Amino acids added	Concentration	Average absorbance
leucine+isoleucine+valine	1.25×10^{-3}M	0.64
leucine+isoleucine	1.25×10^{-3}M	0.28
valine	1.25×10^{-3}M	0.285
leucine+isoleucine+valine	2.5×10^{-4}M	0.553
leucine+isoleucine	2.5×10^{-4}M	0.278
valine	2.5×10^{-4}M	0.293
none		0.318

Singer등[43,44]은 glucose-salts basal medium에 기지농도의 amino acids를 첨가하여 실험한 결과 amino acids중의 valine group에 속하는 valine, leucine, isoleucine에 있어서 isoleucine은 *B. thuringiensis*의 생육은 저해하고 leucine은 약간 저해하지만 valine은 이 세균에 대한 생육저해에

대하여 길항작용은 한다고 하였다.[43] 그러나



1 unit=2.5×10^{-4}M; 5 units=1.25×10^{-3}M
•—• (leucine+isoleucine+valine)
▲—▲ (leucine+isoleucine)
×—× (valine)

Fig. 3. Main effects of varying the concentration of leucine, isoleucine, and valine, individually or combined, on growth (average absorbance) of *B. thuringiensis var. thuringiensis* in defined media

valine 단용시 (2.5×10^{-4}M)에는 이 *Bacillus*의 생육에 무관하다고 하였다.[44]

Conner등[10]에 의하면 basal citrate-salts용액에 amino acids를 첨가한 defined media에 있어서 *B. thuringiensis var. thuringiensis*는 valine이 존재할 때는 언제나 생장한다고 하였으며 그농도를 증가함에 따라 효과적으로 생육은 증진된다고 하였다.

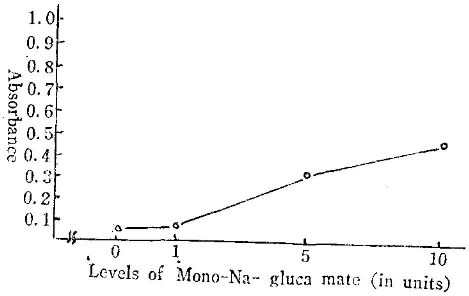
leucine 또는 isoleucine이 단독으로나 또는 조합되어 존재할 때는 valine이 존재한 때에만 이 세균이 생장한다고 하였다. 이 일반적인 생장양상은 아미노산의 상대적인 농도에 무관하다고 하였다. 본 실험에서는 leucine+isoleucine+valine을 배지에 1.25×10^{-3}M되도록 첨가했을 때 평균 absorbance가 0.64로서 control의 0.318 보다 훨씬 높았으며 이 농도보다 5배 희박한 2.5×10^{-4}M에서는 0.553으로서 역시 control보다 큰것을 볼 소있었다. 그에 반하여 leucine+isoleucine은 1.25×10^{-3}M과 2.5×10^{-4}M에서 똑같이 control 보다 작았으며 이는 leucine과 isoleucine을 함께 배지에 첨가했을 때에는 오히려 이 균의 생장을 저해한다고 볼수 있다. 이와같은 사실은 Singer등[43,44]의 실험과도 잘 일치하고 있다. 그러나 Singer등[44]은 valine만을 배지에 첨가했을때는 이 *Bacillus*의 생장에 아무런 영향이 없었다고 하나 본 실험에서는 valine의 농도가 1.25×10^{-3}M일때는 평균 absorbance가 0.285이며 2.5×10^{-4}M에서는 0.293으로서 control의 0.318보다 작은 것으로 보아 역시 생육이 억제된 것을 알수 있다. 이에 반하여 leucine+isoleucine+valine에서만은 생육이 월등히 좋았던 것은 Singer등[43]의 결과에서 보는 바와같이 leucine과 isoleucine에 의한 생육저해에 대하여 valine이 일종의 길항작용을 한 것으로 생각된다.

(9) Na-glutamate의 영향 :

Monosodium glutamate를 배지에 첨가하여 얻은 결과는 Table 16과 Figure 5에서 볼수 있다.

Table 16. Effect of varying the concentration of monosodium glutamate on growth (average absorbance) of *B. thuringiensis* in defined media

Glutamate conc.	Absorbance
2.5×10^{-3}M	0.467
1.25×10^{-3}M	0.36
2.5×10^{-4}M	0.037
Control (none)	0.016



1 units=2.5×10^{-3}M
5 units=1.25×10^{-3}M
10 units=2.5×10^{-3}M

Fig. 4. Effect of varying the concentration of monosodium glutamate on growth (average absorbance) on *B. thuringiensis* in defined media

Table 16에서 2.5×10^{-3}M인 가장 높은 농도에서 가장 생육이 좋은 것을 볼수있으며 control과는 상당히 차이가 있다. Conner등[10]에 의하면 glucose-salts배지에서는 *B. thuringiensis*는 citrate, aspartate, 또는 glutamate를 절대적으로 요구한다 고하며 이와는 대조적으로 citrate-salts배지에서는 glucose가 없어도 이 세균은 잘 자란다고 하였다. 본 실험에서는 glucose salts배지가 아닌 citrate-salts 배지상에서 glutamate를 첨가했을 경우에도 그 효과는 2.5×10^{-3}M과 1.25×10^{-3}M에서 2.5×10^{-4}M때 보다 훨씬 크게 나타난 것을 볼 수 있다.

(11) 곤충의 전체추출액(Total body extract)의 pH와 Crystal의 독성 :

몇몇 나비목 곤충의 total body extract의 pH는 Table 18에서 보는 바와같다.

Table 17. pH of the total body extracts of selected lepidopterous larvae

Lepidopterous larvae	pH
Margaronia perspectalis Walker	7.9~8.0
Pieris rapae Linné	8.4
Dendrolimus spectabilis Butler	7.95~8.00
Chloridea assulta Guénée	7.96
Bombyx mori Linné	7.55~7.9

Table 18에서 보는 바와같이 *Lepidoptera*의 total body extract는 alkali성을 띄우며 중장액의 pH와도 거의 일치하는 경향을 보여주고 있다. Figure 5과 Figure 6은 *Pieris rapae* Linné가 crystal을 섭취하기 전후의 모습을 보여주고 있다.

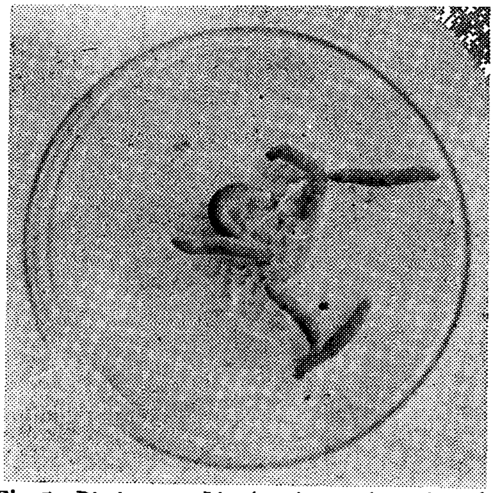


Fig. 5. *Pieris rapae* Linné prior to ingestion of the δ-endotoxin of *B. thuringiensis*

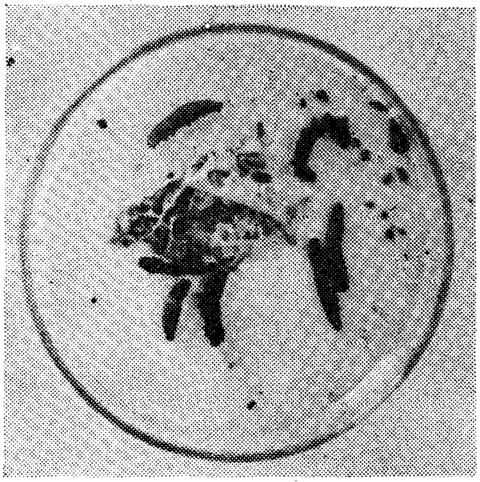


Fig. 6. *Pieris rapae* Linné after ingestion of the δ-endotoxin of *B. thuringiensis*

나비목에는 일반적으로 2가지의 유형이 있다. 하나는 쇠약하거나 탈바꿈할때 또는 용(蛹)의 기간을 제외하고는 유충의 전 생활과정을 통하여 중장액의 pH가 9.0 이상을 유지하여 이 높은 pH[46,34,21]때문에 침입한 세균의 생장을 저하시키는 것이다. 또 하나의 유형은 상기의 변태기[47,48,45,12,13,21] 동안을 제외하고는 중장액의 pH가 9.0이하를 유지하나 통상 7.0이상인 것이다. 다른 요소들을 고려하지 않는다면 상기 제2유형의 나비목 해충이 세균에 대한 감염이 더 용이하게 된다. 본 실험에서 사용된 나비목 곤충들은 total body extract의 pH가 7.55—8.4로서 대체로 제2유형에 속한다고 볼수 있을것이다. *Bacillus thuringiensis*에 속하는 여러 균주들의 병원성은 부분적으로는 이들 세균에 의하여 생성되는 단백질성 "parasporal inclusion body"에 의존한다고 알려졌고[22,23,4] 특히 나비목 유충에 대한 독성은 이 crystal과 관련되어 있다고 하였다.[1,2,3,51] 일반적으로 곤충의 장내에 있어서 parasporal crystal의 용해와 관련된 생체내적반응을 설명하기 위하여 2가지 가설이 제안되었다. 즉 Lecadet등[27,29]은 *B. thuringiensis*의 결정은 *Pieris brassicae*의 소화액이나 유미(chyle)에 의하여 용해된다는 것을 보였으며 이것은 protoxin[3]인 이 crystal의 변화를 야기하는 효소작용일 것이라 시사하였고 그들은[28] *Pieris brassicae*의 소화관으로 부터 독성 parasporal crystal을 가수분해할수있는 효소제품을 얻었다고 보고하였다. 그리고 이것은 이 결정을 각기 다른 분자량을 갖는 여러개의 peptide fraction으로 가수분해하는 효소를 함유한다고 하였다. 이들은[31] *B. thuringiensis*가 생성하는 crystal을 효소에 의하여 가수분해시킨후 유충의 hemocoel속으로 주사할때 직접적으로 독성을 일은키는 가용성 단백질을 유리시킨다는 것을 보여 주었고 Angus[3]와 Martouret[35]에 의하여 제안된 crystal protoxin의 가설을 확인하였다. 이 crystal 분자는 구성단백질 chain간의 disulfide bonds[50,30]의 형성에 의하여 응집되어 있으며 그 구조는 *P. brassicae* Proteases의 작용에 민감한 일정수의 peptide linkages가 그들의 특이성에 따라 직접 이들 효소의 작용점에

접근하는 방식으로 되어 있는것 같다.[31]

단백질성 부분의 총가수분해물이나 그 구성분은 경구적으로나 또는 주사에 의하여 투여하였을때 그 결정 자체의 섭취에서 오는 결과와 동일한 증상을 나타내며 그 투여량은 유충당 1μg/g로서 극히 유독한 물질이라 할수있다.[31]

crystal protoxin을 true toxin으로 변화시키는 이 효소작용의 면은 활성화의 보다 일반적인 문제를 야기시킨다.[31] 불활성 전구체(precursor)로 부터 출발하여 단백질 분해작용에 의하여 생물학적 활성을 지닌 분자를 형성하는 예는 생물학적 새활조건하에서는 흔히 볼수있다.[25,39]

효소에 의한 독성요소의 유리는 Yamvrias[49]의 실험에 의하여 결정적으로 확증되었다. 즉 그는 *P. brassicae*의 유미(chyle)에 의한 crystal의 가수분해 산물은 경구적으로나 주사에 의하여 투여되었을때 Mediterranean flour moth(*Anagasta Kühniella*)의 유충에 대하여 극히 유독한 반면 Crystal 자체는 이 곤충에는 불활성이라는 것을 지적하였다. 환언하면 곤충의 species에 따라 각기 다른 독성을 나타내는 것은 생체내에 있어서의 결정의 효소적 가수분해의 가능성과 관계되어 있는 것 같다. 그 다음으로 Faust등[15]은 parasporal crystal의 최초의 용해는 곤충의 장내에서 비효소적 alkali성 물질에 의해서만 이루어지며 아마도 2차적으로 장내의 효소의 작용을 받는다고 하였다. 규소(0.3~0.4%)가 parasporal crystal의 구성분중의 하나이며 규산염을 용해시키는데 일반적으로 사용되는 선택성 alkali system이 효소가 존재하지 않는 상태에서 이 crystal을 용해시키는데 역시 매우 효과적이라는 사실은 그들의 제안을 뒷받침해주고 있다. 그러므로 Faust등[16]에 의하면 Leacadet등[28]은 *Pieris brassicae*의 유충의 소화관으로부터 얻은 정제된 단백질 분해효소의 실험에서 0.05M bicarbonate buffer (pH 9.5)를 사용하였으므로 순수한 효소만의 작용이라고 볼수 없다고 주장하였다. 왜냐하면 이 Buffer용액은 그 자체로도 crystal을 14.28%나 용해시키기 때문이라고 한다. 본 실험에 사용된 나비목 곤충중에서 *Pieris rapae Linné*가 crystal에 대하여 가장 예민한 독성을 보인것은 total body extract의 pH가 8.4로서 공시 곤충중에서 가장 높은 pH치를 보인다는 사실과 일치하고 있다. 즉 Faust등의 가설에 따르면 독성을 나타내기 위하여 일차적으로 곤충의 장내에서 용해가 되어야함으로 Alkali성이 높은 *Pieris rapae* Linné가 예민한 것으로 생각된다.(Figure 6).

Margaronia Perspectalis Walker도 전체추출액의 pH가 7.9—8.0으로서 상당히 예민한 반응을 보인다. 누에에 있어서는 좀 반응이 늦은 감이 있는데 이는 5령기의 유충을 사용했으므로 보다 어린누에에서 보다 덜 예민한 것으로 생각되며[41] 본래 본 공시세균은 누에에는 낮은 독성을 가지고 있다. 송충에 있어서는 total body extract의 pH가 7.95~8.00으로서 alkali성을 띄고 있으나 crystal에 대하여 과히 민감하지 못한 것은 침엽수에 들어있는 항세균성 물질인 phenol화합물의 영향때문이 아닌가 생각된다.[26] 곤충의 중장내에서 "parasporal body"가 용해함으로서 야기되는 일차적인 독작용은 이 crystal을 섭취한후 수분내로 장의 마비를 초래한다.[18,19]고 하며 Louloudes등[32]에 의하면 toxic crystal의 누에에 대한 작용방식은 먼저 세포막이 변화를 받고 이어 세포내의 대사가 완전히 붕괴되고 마지막으로 basement membrane에 변화를 일으켜 소화관으로부터 혈액속으로 carbonate ion등이 유입하여 전면적인 마비를 일으킨다고 한다.

(12) *B. thuringienlis* exotoxin의 초파리 (*Drosophila melanogaster Meigen*)에 대한 독성실험 :

Table 18. Mortality of *Drosophila melanogaster* Meigen by the exotoxin of *B. thuringiensis*

Concentration	Mortality(%)
Original supernatant	100
5 times dilute supernatant	100
10 times dilute supernatant	90

Table 19에서 보는 바와같이 *B. thuringiensis var. thuringiensis* Berliner의 배양액의 상등액은 파리류에 상당히 독성이 강한 것을 알수있으며 파리방제에 매우 효과적으로 이용할수있다. Cantwell 등[9]은 *B. thuringiensis var. thuringiensis* Berliner와 그의 variety의 어떤것은 적당한 배지위에서 배양시키면 exotoxin을 생성한다고 보고한바 있다. 즉 집파리의 용화를 방해하는 이 현저한 독성을 가진 물질은 포자형성기나 dipicolinic acid의 존재하에 배양액중에 생성된다. 28 variety를 시험한 결과 단지 *B. thuringiensis var. thuringiensis* 만이 72시간 배양후에 exotoxin을 생성한다고 한다. 1959년 McConnell등[37]은 *B. thuringiensis*

var. thuringiensis Berliner를 nutrient broth나 liver broth에서 10일이상 배양할때 열에 안정하고 투석되는 toxin이 생성된다고 보고하였다. Hall 등[17]은 실험실에서 배양한 *B. thuringiensis var. thuringiensis*의 0.25gr의 전 배양액은 비저항성 파리와 DDT와 malathion에 저항성을 가지는 파리의 유충에 90~100% 살충률을 가진다고 하였다. Briggs[6]는 *B. thuringiensis var. thuringiensis* 와 *B. thuringiensis var.* sotto Ishiwata의 포자 상품을 이용하여 집파리의 유충을 가지고 실험하였는데 McConnell등[37]과 동일한 의견을 말하였다. Burgerjon등[8]은 여러 곤충에 관하여 실험을 행하였는데 *B. thuringiensis var. thuringiensis*는 꽤 많은 량의 exotoxin을 생성하며 그 상등액은 다량을 요한다고 보고하였다. Briggs[6], Dunnr[14], Mechalas등[38]은 *B. thuringiensis*의 제품을 병아리와 소에 투여했을때 그 배설물중에 집파리의 유충과 용을 살해하는 toxin이 변하지 않은 채로 남아 있었다고 보고하였다. Mechalas등[38]에 의하면 *B. thuringiensis var. thuringiensis*는 30시간 배양했을때 최고로 exotoxin을 생성한다고 한다.

Cantwell등[9]은 exotoxin의 생산방법, 생물학적 검정방법, 분리정제의 예비적 시험, 분리된 물질의파리류에 대한 효과등에 관하여 보고하였다. 또한 "McConnell-Richards toxin" 또는 "flytoxin" 이라고 알려진 이 toxin은 crystal을 형성하는 세균들의 거의 반에 의하여 생성되며 이것은 집파리의 변태(metamorphosis)에 대하여 특수작용을 가졌으며 이에 관련하는 hormone을 방해하는것 같다. 이 toxin의 주된 요소는 calcium이라 한다.

적 요

공업폐수를 이용하여 미생물 살충제를 생산하기 위하여 배양방법, 배양조건 및 생물학적 검정을 행한 결과는 다음과 같다.

① *B. thuringiensis avr. thuringiensis*는 특히 나비목 해충에 유효한 δ-endotoxin과 파리목에 유효한 fly-toxin을 생산하는 세균이다.

② 제사공장에서 폐기되는 자견수를 영양원으로서 본 세균배양에 이용할 목적으로 분석한 결과 많은 량의 무기물과 단백질이 용으로부터 추출되어나왔음을 알았다.

③ GYS 배지와 citrate salts배지를 만들때 물대신 자견수를 사용하면 가장 경제적으로 많은 량의 δ-endotoxin을 얻을수 있다.

④ GYS 배지에 8gr/l의 glucose 첨가시 균체와 crystal의 혼합물 생산량이 가장 많았다.

⑤ 아미노산중 leucine + isoleucine + valine을 1.25×10^{-3}M 농도로 citrate salts 배지에 첨가시 공시세균의 증식이 훨씬 좋았다.

⑥ Na-glutamate를 citrate salts배지에 2.5×10^{-3}M 첨가시 가장 좋은 증식을 보였다.

⑦ 본 세균의 배양시간은 9일에서 15일 사이가 좋다.

⑧ 공시 나무목 해충중에서 total body extract의 pH가 가장 높은 *Pieris rapae* Linné(pH 8.4)에서 가장 좋은 살충효과를 보이고 *Dendrolimus spectabilis* Bulter와 *Bombyx mori* Linné에서는 효과가 낮았다.

⑨ 본 세균의 배양 상등액은 초파리에 대하여 높은 살충률을 보여 열에 안정한 exotoxin의 존재를 확인하였다.

본 연구는 1975년도 과학기술처 지원 사업임을 부기해 둔다.

Literature cited

(1) Angus, T.A. 1954, Nature, **173**, 545

(2) Angus, T.A. 1956, Can.J. Microbiol. **2**, 122

(3) Angus, T.A. 1956, Can.J. Microbiol., **2**, 416

(4) Angus, T.A., and Heimpel, A.M. 1959, Can. Entomologist, **91**, 352

(5) Berliner, E, 1915, Z. Angew. Entomol., **2**, 29

(6) Briggs, J.D. 1960, J. Insect. Pathol., **2**, 418

(7) Britton, J. 1942, Hydrogen Ions, **1**, 300

(8) Burgerion, A., and De Barjac, H. 1960, Comp. Rend., **251**, 911

(9) Cantwell, G.E., Heimpel, A.M., and Thompson, M.J., 1964, J. Insect Pathol. **6**, 466

(10) Conner, R.M. and Hansen, P.A., Journal of Invertebrate Pathology, **9**, 12 (1967)

(11) Cooksey, K.E., Biochem. J. **106**, 445(1968)

(12) Day, M.F., and R.F. Powning, Australian J. Biol. Sci. **2**, 175 (1949)

(13) Day, M.F., and Waterhouse, D.F., In K.D. Roeder [ed.], Insect physiology, 311 John Wiley & Sons, Inc., New York (1953)

(14) Dunn, P.H., J. Insect pathol., **2**, 13 (1960)

(15) Faust, R.M., and Estes, Z.E., J. Inrertebrate Pathol., 8, 141 (1966)
(16) Faust, R.M., Adams, J.R., and Heimpel, A.M., Journal of Invertebrate Pathology **9**, 488 (1967)
(17) Hall, I.M., and Arakawa, K.Y.,J. Insect Pathol., **1**, 351 (1959)
(18) Hannay, C.L., Nature, **172**, 1004 (1953)
(19) Hannay, C.L., and Fitz-James, P., Can.J. Microbiol., **1**, 694 (1955)
(20) Hannay, C.L. (1956), In Bacterial Anatomy, ed. by E.T.C. Spooner & B.A.D. Stocker, p. 318. Cambridge : University Press.
(21) Heimpel, A.M., Can. J. Zool. **33**, 99 (1955)
(22) Heimpel, A.M., and Angus, T.A., Proc. Intern. Congr. Entomol., 10th, Montreal, 1956, **4**, 711 (1958)
(23) Heimpel, A.M., and Angus, T.A., J. Insect Pathol., **1**, 152 (1959)
(24) Krieg, A., Eut. Exp., & Appl. **9**, 185 (1966)
(25) Kunitz, M., J. Gen. Physiol., **32**, 265 (1947)
(26) Kushner, D.J., and Harvey, G., J. Insect Pathol. **4**, 155 (1952)
(27) Lecadet, M.M., and Martouret, D., Compt. Rend. Acad. Sci., **254**, 2457 (1962)
(28) Lecadet, M., and Dedonder., Compt. Rend. Acad. Sci., **258**, 3117 (1964)
(29) Lecadet, M.M., Thèse Doctorat d'Etat, Fac. Sciences., Paris (1965)
(30) Lecadet, M.M., Compt. Rend. Acad. Sci., **262**, 195 (1966)
(31) Lecadet, M.M. and Martouret, D., J. Invertebrate Pathol. **9**, 322 (1967)
(32) Louloudes, S.J., and Heimpel, A.M., J. Invertebrate Pathol. **14**, 375 (1969)
(33) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., J. Biol. Chem., **193**, 265 (1951)
(34) Lysenko, O., J. Gen. Microbiol. **18**, 774 781 (1958)
(35) Martouret, D., Proc. 11th Intern. Congr. Entomol., Vienna, **2**, 849 (1960)
(36) Mattes, O., Sitzber Ges. Befoerder. Ges. Naturw. Marburg., **62**, 381 (1927)
(37) McConnell, E., and Richards, G.A., Can. J. Microbiol., **5**, 161 (1959)
(38) Mechalas, B.J., and Beyer, O., Develop. Ind. Microbiol., **3**, in Press (1963)
(39) Northrop, J.H., Kunitz, M., and Herriott, R. "Cristalline Enzymes," 2nd ed. Columbia Univ. Press, New York (1948)
(40) Pendleton, I.R., and Morrison, R.B., Nature, **212**, 728 (1966)
(41) Ridet, J. M., Entomophaga, **11**, 355 (1966)
(42) Scherrer, P., Lüthy, P., and Trumpi, B., Applied Microbiology, **25**, 644 (1973)
(43) Singer, S., and Rogoff, M.H., Bacteriol. Proc., p. 8(1964)
(44) Singer, S., and Rogoff, M.H., Unpublished text of paper presented at the 64th Ann. Meeting, Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C., May 3, (1964)
(45) Staudenmeyer, T., and Stellwaag, F., Z. Angew. Entomol. **26**, 589 (1940)
(46) Stephens, J.M., Can. J. Zool. **30**, 30 (1952)
(47) Waterhouse, D.F., Australian J. Biol. Sci. Ser. B, **2**, 428 (1949)
(48) Waterhouse, D.F., Australian J. Biol. Sci., **5**, 444 (1952)
(49) Yamvrias, C., Entomophaga, **7**, 101 (1962)
(50) Young, E., and Fitz-James, P.C., J. Biophys. Biochem. Cytol., **6**, 483 (1959)
(51) Yousten, A.A., and Rogoff, M.H., J. Bacteriol., **100**, 1229 (1969)