

## 微生物 殺虫劑의 開發에 關한 研究

(製劑化를 中心으로)

李載球 · 金奇哲 · 金道榮\*

忠北大學校 農科大學 農化學科

\*高麗人蔘研究所 製造部

(1979년 1월 31일 수리)

## A Study on the Development of a Microbial Insecticide

(With special emphasis on formulation)

Jae Koo Lee, Ki Cheol Kim, Do Young Kim\*

Dept. of Agr. Chemistry, College of Agriculture,

Chung Buk National University

Korea Ginseng Research Institute\*

(Received January 31, 1979)

### SUMMARY

For the purpose of developing a microbial insecticide utilizing *Bacillus thuringiensis* Berliner, research was done and the following results were obtained.

1) As the freeze-dried matter of the cocoon-cooked water discarded from the filature contains much crude protein(51.825%) and a lot of inorganic salts, it can make a good nutrition source for the culture of *B. thuringiensis* Berliner.

2) Based on the suspensibility, formula F-5 turned out to be the most suitable for insecticidal use. Its composition includes 0.2 g of the cell-spore-crystal mixture, 25 g of 200-mesh kaolin, 2.5 g of New Kalgen-NX-150, and 2.5 g of glycerine admixed with 8 ml of distilled water and granulated in 80-mesh size.

3) All the components of F-5, F-6 and F-7 are identical except that the amounts of cell-spore-crystal mixture of F-5, F-6, and F-7 are 0.2 g, 0.4 g, and 0.6 g, respectively. Accordingly, their physical properties are almost all the same.

4) Formulas F-5, F-6, and F-7 exhibited an excellent toxicity to *Anomis mesogona* Walker, *Dendrolimus spectabilis* Butler, and *Margaronia perspectalis* Walker at the concentration of 5%.

5) Formulas F-8 and F-9 which contain  $\text{NaHCO}_3$  as one of their components showed a remarkably reduced toxicity to *Anomis mesogona* Walker and *Dendrolimus spectabilis* Butler than F-6 which does not contain  $\text{NaHCO}_3$ .

6) A maximum of  $2.97 \times 10^9$  spores per ml was obtained by incubating B

*thuringiensis* in M-3 which has a pH of 7.05 and comprises 0.2% of ammonium sulphate and 0.8% of glucose dissolved in the cocoon-cooked water, with aeration for 96 hours.

7) Formula F-6 exhibited a somewhat reduced toxicity to *Anomis mesogona* Walker and *Dendrolimus spectabilis* Butler, when stored at room temperature for 70 days after formulation and it is desirable to keep it in a dark and cold place.

8) In field applications, formula F-6 showed a good activity in controlling *Monema flavescens* Walker, *Margaronia perspectalis* Walker, and *Macrosiphum ibarae* Matsumura.

## 서 론

1911년 독일의 Berliner<sup>(4)</sup>는 후에 *Bacillus thuringiensis* 라고 명명된 포자형성 세균에 의하여 야기된 지중해 밀가루 나방(*Anagasta kuehniella* Zell)의 유충의 병에 관하여 보고 하였다. Mattes<sup>(15)</sup>는 이 세균의 포자 형성 세포에서 장사방형의 물질을 관찰하였으며 이것은 1953년 Hannay<sup>(7)</sup>가 *Bacillus* 에서 “Crystalline inclusions” 라고 명명한 것과 동일 물질임이 판명되었다. Hannay<sup>(7,8)</sup>에 의하면 *Bacillus thuringiensis* 는 포자형성시에 diamond 형의 결정을 생성하며 이것은 곤충에 대한 병원성과 관련될 가능성이 있다고 시사하였다. Angus<sup>(3)</sup>는 이 결정성 물질은 곤충에 대하여 독성을 가진 alkali 가용성 단백질이며 누에에 급여시 치사 시킨다고 보고 하였다. 미국에서는 1945년 California 대학교의 Steinhaus 지도하에 Alfalfa 유충의 미생물학적 방제의 가능성을 연구하기 시작하였고 1956년 그는 곤충의 미생물적 방제의 가능성을 발표하였다.<sup>(25)</sup> 또한 다른 포자형성 세균들도 곤충에 병원성을 가진다는 것이 발표되었다.<sup>(24,26)</sup> 이와같은 연구의 기초위에 미생물을 해충방제에 이용하고자 소련, 불란서, 캐나다, 홀랜드 및 미국등 세계각처에서 활발히 연구하고 대규모로 시험을 행하였다. 미생물 살충제는 다른 형태의 생명체에 대하여 독성이 없고<sup>(27)</sup> 잔류독성이 없으며 기주곤충에 대한 비상히 높은 선택성과 한 지역의 방제를 증대시키기 위하여 다른 유기 농약과 혼용이 가능하고 가격이 저렴하며 용이하게 병원균을 생산할 수 있는 점과 곤충에 의한 저항성이 없으며, 낮은 약량으로 효과를 볼 수 있는 것이 장점이다. 그러나 배양 기간이 길고 포자 및 결정성 독성물질이 생성되는데 장시간(10~15일)이 요하며 기타 제제상에 여러가지 문제점이 있다. 본인등<sup>(14)</sup>은 1976

년 제사공장에서 폐기되고 있는 자견수를 가지고 *B. thuringiensis* 를 배양하여 공업적으로 살충제를 생산하는 방안을 연구하였고 배지 및 배양조건에 관하여 검토한 바 있다. Heimpel 등<sup>(9)</sup>은 분제 및 살포제에 관하여 연구하였고 입체를 만들어 사용하는 방안도 다른 연구자<sup>(19)</sup>에 의하여 시도되었다. Raun 등<sup>(20)</sup>에 의하면 *B. thuringiensis* 는 여러가지 과정에 의하여 “encapsulation” 되었을때 생명을 유지하여 유우름 옥수수 벌레(*Ostrinia nubilalis* Hübner)에 대한 병원성을 가지고 있었다고 하며 포장시험에서도 분제 액제 및 유화제로 살포시 효과가 좋았다고 한다. Ahmed 등<sup>(1)</sup>은 *B. thuringiensis* 의 포자를 입체로 제제화 하였을 때 누에에 대한 독성이 “Thuricide” 제제보다 더 독성이 좋았다고 하였다. 또한 Allen 등<sup>(2)</sup>은 담배의 *Heliothis virescens* 방제에 본 세균의 옥수수가루 독먹이를 사용하였다. Jonson<sup>(12)</sup>에 의하면 담배의 *Heliothis virescens* 의 방제시험에서 살포액으로 사용시 *B. thuringiensis* 의 제제인 Dipel, Biotrol XK, Thuricide HP, 및 Thuricide HPO 는 보통 표준 화학 살충제와 동일한 살충효과를 보였다고 하며 Dipel, Thuricide HP 및 Biotrol 2.5의 독력이 제제는 담배의 *Heliothis virescens* 방제에 우수성을 보였다. 또한 Dipel의 *Heliothis virescens* 에 대한 효과는 Dominick<sup>(6)</sup>에 의해서도 인정되었다. 본 연구에서는 다른 제제보다 비교적 저장성이 좋고 기타 야외조건에 안정하다고 생각되는 입체의 제제화를 고안하고 실험실 및 야외 살포로 몇가지 나비목 및 기타 해충의 방제에 관하여 살펴보았다. 그리고 공업적 생산에 있어서도 값싼 배지를 사용하여 단시일내에 독성물질을 생산하는 방법을 아울러 연구하였다.

끝으로 본 연구는 1977년도 문교부 정책과제의 일환으로 연구비 지원을 받아 수행 되었음을 부기해 두며 관계관들에게 심심한 사의를 표하는

바이다.

## 실험재료 및 방법

### (1) 사용균주

캐나다 환경성 곤충병리 연구소의 P.G. Fast 박사로 부터 분양받은 *B. thuringiensis* Berliner 를 사용하였다.

### (2) 자건수의 농축 및 냉동건조

제사공장에서 폐기되는 자건수를 추후 배지로 사용할 목적으로 정주 시내 소재의 남한홍산으로부터 자건수를 얻어 5°C 정도에서 5~6시간 정치하여 윗부분에 응고하는 지방분을 제거한후 glass wool 로 여과하고 hot plate 에서 일차 농축시킨 후 water-bath 상에서 계속 농축시켰다. 거의 건조된 것을 다시 냉동건조시켜 완전히 수분을 제거하여 이후 배지로 사용할 경우에는 물에 용해시켜 사용 하도록 하였다.

### (3) 자건수 냉동건조물의 화학분석

Ca, Mg, K, Na, Mn, Fe, Zn 의 정량 : HClO<sub>4</sub> : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : HNO<sub>3</sub> (1 : 1 : 1) mixture 로 시료 1 gr 을 분해하고 active carbon 으로 탈색한 후 atomic absorption spectrophotometry 에 의하여 분석하였다.

Total Nitrogen 정량 : Micro Kjeldahl 법에 의하여 정량하였다.

PO<sub>4</sub> 정량 : HClO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub> mixture 로 시료 1 gr 을 분해한후 active carbon 으로 탈색하고 sample 3 ml 를 취하여 ammonium molybdate 법으로 525 nm green filter 를 사용하여 비색 정량하였다.

### (4) 고구마의 가수분해

공시세균의 영양원으로 절간 고구마의 사용 가능성을 검토하기 위하여 다음과 같이 가수분해를 행하였다. 즉 절간 고구마 100 g 을 잘게 부순 후 2 l beaker 에 넣고 여기에 2%-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 l 를 가한 후 3~5 시간동안 가열하여 옥소-전분 반응이 없어질때 까지 완전히 가수분해 시켰다. 이 가수분해물에 Celite 545 를 넣고 aspirator 를 사용하여 흡인여과한 후 이 여액을 1N NaOH 로 중화하고 가열농축하여 본 세균배양의 탄소원으로 사용하였다.

### (5) 공시세균의 대량배양

자건수 1 l 에 질소원으로 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2 g 과 탄소원으로 glucose 8 g 의 비율로 6 l 의 배양액을

만들어 Lee 등<sup>(14)</sup>이 고안한 배양병을 사용하여 30 ± 2°C 에서 4 일간 vacuum pump (Fisher Scientific, Patent No. 3, 311, 293) 를 이용하여 강하게 aeration 시키면서 배양하였다.

### (6) 독성물질(배양 고형물질)의 수집

상기와 같이 배양해서 얻은 세포 포자 및 독성물질의 혼합물을 17,000 g 에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 잔사에 acetone 을 넣어 균일하게 현탁시킨후 원심분리하여 상등액을 버린다. 이와같은 조작을 3~4회 반복하여 완전탈수시킨후 -20°C 정도의 냉동실에 저장하고 제제화용으로 사용하였다.

### (7) 제제화(Formulation)실험

다음 Table 1~12 에서 보는 바와같이 각기 다른 조성의 제제를 고안하여 물리적 및 생물적 실험을 행하였다.

Table 1. Formula-1 (F-1)

cell-spore-crystal mixture	0.8 g
200-mesh kaolin	100 g
glycerine	20 g
liquid paraffin	20 g
Sponto-900	20 g

Table 2. Formula-2 (F-2)

cell-spore-crystal mixture	0.8 g
200-mesh kaolin	100 g
New kalgen NX-150	5 g
distilled water	53 ml

Table 3. Formula-3 (F-3)

cell-spore-crystal mixture	0.2 g
200-mesh kaolin	25 g
New kalgen NX-150	1.25 g
distilled water+Acetone(1 : 1)	20 ml

Table 4. Formula-4 (F-4)

cell-spore-crystal mixture	0.4 g
200-mesh kaolin	50 g
New kalgen NX-150	2.5 g
glycerine	2.5 g
distilled water	20 ml

Table 5. Formula-5 (F-5)

cell-spore-crystal mixture	0.2 g
200-mesh kaolin	25 g
New kalgen NX-150	2.5 g
glycerine	2.5 g
distilled water	8 ml

**Table 6.** Formula-6 (F-6)

cell-spore-crystal mixture	0.4 g
200-mesh kaolin	25 g
New kalgen NX-150	2.5 g
glycerine	2.5 g
distilled water	8 ml

**Table 7.** Formula-7 (F-7)

cell-spore-crystal mixture	0.6 g
200-mesh kaolin	25 g
New kalgen NX-150	2.5 g
glycerine	2.5 g
distilled water	8 ml

**Table 8.** Formula-8 (F-8)

cell-spore-crystal mixture	0.4 g
200-mesh kaolin	23.5 g
New kalgen NX-150	2.5 g
glycerine	2.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	1.5 g(1%)
distilled water	8 ml

**Table 9.** Formula-9 (F-9)

cell-spore-crystal mixture	0.4 g
200-mesh kaolin	22 g
New kalgen NX-150	2.5 g
glycerine	2.5 g
NaHCO <sub>3</sub>	3 g(2%)
distilled water	8 ml

**Table 10.** Formula-10 (F-10)

cell-spore-crystal mixture	0.2 g
200-mesh kaolin	25 g
New kalgen NX-150	5 g
glycerine	5 g
distilled water	7 ml

**Table 11.** Formula-11 (F-11)

cell-spore-crystal mixture	0.2 g
200-mesh kaolin	25 g
Emalon APW #3	2.5 g
glycerine	2.5 g
distilled water	10 ml

**Table 12.** Formula-12 (F-12)

cell-spore-crystal mixture	0.2 g
200-mesh kaolin	25 g
Em Lissapol NX	2.5 g
glycerine	2.5 g
distilled water	7 ml

**(8) 제제의 pH 측정<sup>(13)</sup>**

증류수를 삼각 flask 에 취하여 10분간 끓여서 CO<sub>2</sub>를 완전히 제거하고 20°C 로 냉각시킨다. 이 물 80cc 를 100cc 의 mess cylinder 에 넣고 시료 20 gr 을 가하여 1분간 흔들어 혼합시킨후 5분간 정치해서 pH 를 측정하였다.

**(9) 현수성(Suspensibility) 시험<sup>(13)</sup>**

시료 0.5 g 을 100 ml 의 mess cylinder 에 넣고 증류수를 넣어 100 ml 로 정확히 채운다. 2분간 잘 흔탁시킨 다음 1분간 정치한후 증양에서 25 ml 를 hole pipette 로 미리 칭량하여둔 weighing bottle 에 취하여 80°C oven 에서 건조한후 칭량하였다.

**(10) 각 배지의 조성**

짧은 배양기간내에 최대량의 세포 및 포자를 얻는 배지를 만들기 위하여 다음 조성의 배지를 사용하여 배양시간별로 세포수 및 포자수를 계측하였다.

Medium-1 : Glucose 0.8 g 을 자전수에 녹여 100 ml 가 되게한 후 0.2N NaOH 로 pH 7.0 이 되도록 조절하였다.

Medium-2 : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g, yeast extract 0.2 g 및 glucose 0.8 g 을 자전수에 녹여 100 ml 되게한 후 0.2N NaOH 를 사용하여 pH 7.1 로 조정하였다.

Medium-3 : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g 과 glucose 0.8 g 을 자전수에 녹여 100 ml 로 한 후 0.2N-NaOH 를 사용하여 pH 7.05 가 되게 하였다.

Medium-4 : (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 g, 고구마 가수분해물 0.8 g 을 자전수에 녹여 100 ml 이 되게한 후 0.2N NaOH 를 사용하여 pH 7.05 로 조정하였다.

**(11) 세포 및 포자수의 계측<sup>(18)</sup>**

배양중인 각 배양액으로부터 일정량을 무균적으로 취하여 잘 저어 균일하게 현탁시킨 후 살균된 Pipette 으로 1 ml 를 정확히 취하여 일정량의 살균 증류수로 희석시켜 혈구계수기의 일 구획내에 5~6개의 세포가 함유될수 있게한 다음 균일하게 세포가 존재하도록 잘 저어준다. 이 세포 희석액을 Haemacytometer 의 slide glass 상에 적하하고 cover glass 를 얹은 다음 배울 400 배의 현미경으로 측정하였다. 계측방법은 대체로 세포 및 포자가 고르게 퍼져있는 5 구획을 1구간으로 선정하여 1회에 4구간씩 헤아렸으며 한 시료에 대하여 4회 측정하여 평균하였다. 또한 구간선상에

있는 세포는 증선상의 것은 포함시키고 횡선상의 것은 제외하였으며 연쇄상간균은 1개의 세포로 간주하고 일단 분리되어 간균의 형태로 존재하는 것은 각각 한개의 세포로 헤아렸다. 한편 세포수와 포자수의 계측 방법에 있어서는 유리되어 있는 포자도 한개의 세포로 간주해서 계측하였으며 한 세포내에 존재하는 여러개의 포자는 따로따로 한개씩 헤아렸다. 따라서 포자가 세포로부터 거의 전부 분리되어 나왔을 때의 세포수와 포자수의 차이는 포자가 완전히 분리된 빈 세포수를 나타낸다. 계산방법은 우선 1구획내에 들어 있는 세포 및 포자수를 평균해서 계산한 다음 Haemocytometer 1구획의 체적은  $0.00025\text{mm}^3$  이므로 희석액 1ml 중에는 1구획내 세포수  $\times 1,000/0.00025$  개가 있게 된다. 따라서 여기에 희석배수를 곱해주면 균액 1ml 중에 함유된 전체 세포(또는 포자)수가 구해진다.

#### (12) 제제의 실내 독성실험

각 제제의 독성실험에 사용한 곤충은 무궁화잎 밤나방(*Anomis mesogona* Walker), 회양목의 명나방유충(*Margaronia perspectalis* Walker), 송충(*Dendrolimus spectabilis* Butler), 대추나무 또는 장미의 노랑왜기나방(*Monema flavescens* Walker), 그리고 장미의 짙레수염 진딧물(*Macrosiphum ibarae* Matsumura) 등을 사용하였고 제제의 농도는 5%, 10%, 20% 등으로 행하였고 공시충수는 실내실험일 경우 10마리로 하여 각각 먹이를 해당액에 적셔 일정시간 급여한 후에 치사한 것과 생존한 것을 %로 표시하였다.

#### (13) 제제의 저장성

제제적후, 30일, 40일, 70일 후에 독성을 비교함으로써 경시적인 변화를 관찰하였다.

#### (14) 야외실험

1977년 7월중에 platanus의 흰불나방(*Hyphantia cunea* Drury), 회양목의 명나방 유충(*Margaronia perspectalis* Walker), 그리고 대추나무의 노랑왜기나방(*Monema flavescens* Walker)에 대하여 5%, 10% 및 20%의 살포액을 만들어 살포하고 살충여부를 관찰한후 필요한 것은 촬영하였다.

### 결과 및 고찰

#### (1) 자건수 냉동건조물의 분석결과

자건수를 농축하고 냉동건조한 고흥물의 화학

분석 결과는 다음 Table 13에서 보는 바와 같다.

**Table 13.** Chemical Analyses of the Freeze-dried Matter of Cocoon-cooked Water

Chemical components	freeze-dried matter	
	ppm	%
Ca	2417.2	0.242
Mg	4996.85	0.499
K	41800	4.180
Na	970.59	0.097
Fe	87.544	0.0087
Zn	88.41	0.0088
Mn	15.234	0.0015
Total-N	82922	8.292
PO <sub>4</sub>	51705	5.171

Table 13에서 보는 바와같이 자건수 냉동건조물중에 들어있는 전질소의 함량은 8.292%로서 조단백질로 환산하면 51.825%가 된다.

이것은 고치(Cocoon)를 삶는 동안 용의 성분중 대부분이 용출되어 나온다는 것을 의미하며 따라서 이 자건수는 PO<sub>4</sub><sup>---</sup>(5.171%), K<sup>+</sup>(4.18%), Mg<sup>++</sup>(0.499%) 및 Ca<sup>++</sup>(0.242%) 등의 무기염류를 다량 함유함과 동시에 조단백질 함량이 풍부하므로 본세균을 배양함에 있어 질소 및 무기염류의 공급원으로 적당한 배지가 될 수 있음을 말해주고 있다.

#### (2) 각제제의 특성

회양목 명나방 유충 방제용으로 F-1의 살포액을 만들어 야외에서 살포한 결과 회양목에 심한 약해를 일으켰으며 이것은 아마도 Sponto-900에 기인된것 같다. 그러므로 F-1은 제제로서 부적당함을 알수있다. F-2는 glycerine을 함유하고 있지 않으므로 보습성이 없어 미생물 살충제의 제제로서 부적당 하였다.

F-3은 Acetone을 첨가 했으므로 Acetone이 휘발된후 너무 건조하여 바람직하지 않았다. F-4는 New kalgen NX-150과 glycerine의 함량이 F-5에서의 함량의 절반이므로 현수성이 불량하였다. 현수성은 위에서도 알수 있는 바와같이 F-5가 가장 좋으므로 F-5의 조성파 유사한 F-6과 F-7도 F-5와 더불어 훌륭한 제제가 되리라 생각된다.

#### (3) 각 제제의 현수성 비교

각 제제의 현수성을 비교하기 위하여 증류수에 현탁시킨 액 25ml의 건조중량을 보면 Table 14와 같다.

**Table 14.** Dry weight of 25ml of suspensions in which 0.5 gr of each wettable powder was dispersed in 100ml of distilled water

Formula	average dry weight(g)
F-5	0.10822
F-10	0.09760
F-11	0.10266
F-12	0.10194

Table 14에서 F-5와 F-10은 조성은 서로 같고 다만 F-5에서는 New kalgen NX-150과 glycerine 을 각각 2.5gr 사용함에 반하여 F-10에서는 2배 인 5gr씩을 사용한 점이 다르다. 그러나 현수성은 F-5가 오히려 양호한 결과를 보여주고 있다. 또한 F-11에서는 유화제로 Emalon APW#3(Dongnam Chemical Industries LTD)을 사용하였고 F-12에서는 Em Lissapol NX를 사용한 점이 다르고 다른 조성은 F-5와 똑같다. 그러나 F-12도 F-5와 대차없는 현수성을 보여줌으로 살포용으로 사용이 가능하다. 미국<sup>(10)</sup> 및 유유럽<sup>(11)</sup>에 있어서 수화제의 개발에 가장 어려운 문제는 제제가 바로 침전되는 점이었으나 계면활성제의 발달로 오늘날에는 많은 진보를 보여주고 있다.

(4) 각 제제의 무궁화잎 밤나방(*Anomis mesogona* Walker)에 대한 독성실험

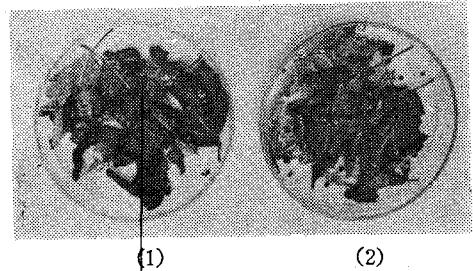
제제 F-5, F-6 및 F-7의 5%와 10% 농도에서의 무궁화잎 밤나방에 대한 살충효과는 다음 Table 15에서 보는 바와 같다.

**Table 15.** Toxicity of formulas to *Anomis mesogona* Walker at the concentrations of 5% and 10%

Formula	conc. (%)	No. of insects tested	alive	dead	mortality (%)
F-5	5	10	4	6	60
	10	10	1	9	90
F-6	5	10	0	10	100
	10	10	1	9	90
F-7	5	10	0	10	100
	10	10	0	10	100

F-5, F-6 및 F-7의 제제상의 차이점은 다른 성분의 함량은 전부 같고 세포 포자 및 독성물질의 양이 F-5에서는 0.2g, F-6에서는 0.4g 그리고

F-7에서는 0.6g이 함유된 점이 다르다. 위 Table 15에서 보는 바와같이 F-6은 5% 농도에서 살충률 100%를 보였으므로 미생물 독성물질을 경제적으로 사용하여 효과적인 살충을 기대할수 있다는 면에서 F-6이 가장 적당한 제제라고 생각되며 실제 사용시에는 5% 정도의 농도로 사용함이 바람직 하다. 또한 F-5와 F-6의 각각 5% 농도에서 무궁화잎 밤나방에 대한 살충효과는 다음 Figure 1에서 보는 바와 같다.



**Figure 1.** Toxicity of F-5(5%) and F-6(5%) to *Anomis mesogona* Walker  
(1) F-5 (5%)  
(2) F-6 (5%)

위의 F-5(5%)에서 완전히 치사되지 않은 것도 중독상태로서 3~4일 후에는 완전히 치사되는 것을 볼 수 있었다.

(5) 보조제의 pH 측정

*B. thuringiensis*의 제제가 곤충의 장내에서 흡수되어 독성을 나타내려면 장내의 pH가 Alkali 성 이어야 하며 특히 Berliner-type에서 얻어진 독성물질은 pH 11.8일 때 용해된다.<sup>(8)</sup> 그러므로 제제의 pH를 높임으로서 살충성을 증가시킬 목적으로  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 와  $\text{NaHCO}_3$ 를 각각 제제에 첨가 가능성을 검토하였다.

참고적으로 이 두화합물의 각 농도의 pH를 보면 다음 Table 16에서 보는 바와 같다.

**Table 16.** pH of solutions of  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{NaHCO}_3$  at the concentrations of 5% and 10%

compound	conc. (%)	pH
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (島久)	5	11.1
	10	11.15
$\text{NaHCO}_3$ (市販)	5	8.0
	10	8.0

위 Table 16에서 보는 바와같이  $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10$

H<sub>2</sub>O의 pH는 5%와 10% 용액에서 각각 11.1과 11.15로서 너무 높아 제제에 영향을 끼칠 우려가 있으므로 제제에 대한 첨가 실험에서는 NaHCO<sub>3</sub>만을 사용하였다.

### (3) 각 제제의 pH측정

각제제에 증류수를 사용하여 5% 현탁액으로 만들어 pH를 측정한 결과는 Table 17에서 보는 바와 같다.

**Table 17.** pH of 5% suspensions of various formulas(pH of distilled water, 6.3)

Formula	pH
F-6	6.83
F-8	10.65
F-9	9.65

Table 17에서 F-6은 세포 포자 및 독성물질의 혼합물(0.4gr)을 200-mesh Kaolin(25 g), New kalgen NX-150(2.5 g) 및 glycerine(25 g) 그리고 증류수(8 ml)를 가지고 만든 제제로서 pH는 6.83이었다. 이에 반하여 F-8은 세포 포자 및 독성물질 혼합물(0.4 g)을 200-mesh Kaolin(23.5 gr) New Kalgen NX-150(2.5gr), NaHCO<sub>3</sub>(1.5 gr), 그리고 증류수(8ml)를 가지고 만든 제제로서 pH는 10.65이었다. 또한 F-9는 세포 포자 및 독성물질 혼합물(0.4gr), 200-mesh Kaolin(2.5 gr), NaHCO<sub>3</sub>(3 g) 및 증류수 8ml로된 제제로서 pH=9.65이었다. 이상과 같이 NaHCO<sub>3</sub>의 함량이 F-6에서는 전혀 없고 F-8에서는 1% 그리고 F-9에서는 2%이며 이로 인하여 pH가 6.83에서 10.65 및 9.65로 상승된 것을 볼수 있다.

### (7) 제제에 있어서 NaHCO<sub>3</sub>의 첨가효과

제제를 만드는데 있어서 NaHCO<sub>3</sub>의 첨가가 살충성에 미치는 영향을 보기 위하여 NaHCO<sub>3</sub>가 첨가되지 않은 제제인 F-6과 NaHCO<sub>3</sub>가 1% 함유된 F-8, 그리고 2% 함유된 F-9를 증류수에 현탁시켜 각각 5% 현탁액을 만든후 무궁화잎 밤나방과 송충에 대하여 독성실험을 행하였다. 즉 무궁화잎과 솔잎을 각각 상기 현탁액에 담가서 액을 문힌후 Petridish에 넣고 그위에 무궁화잎 밤나방과 송충을 각기 10마리씩 넣고 먹이를 먹게 한후 24, 48, 72 및 96시간 후에 생존하는 수와 치사하는 수를 관찰하고 치사률을 계산하였다. 그 결과는 Table 18와 19에서 보는 바와 같다.

Table 18에서 보는 바와같이 무궁화잎 밤나방

**Table 18.** Toxicity of formulas(5%) to *Anomis mesogona* Walker

Feeding period (hrs)	Formula	No. of insects tested	alive	dead	mortality (%)
48	F-6	10	3	7	70
	F-8	10	6	4	40
	F-9	10	3	7	70
72	F-6	10	2	8	80
	F-8	10	5	5	50
	F-9	10	3	7	70

**Table 19.** Toxicity of formulas (5%) to *Dendrolimus spectabilis* Butler

Feeding period (hrs)	Formula	No. of insects tested	alive	dead	mortality (%)
24	F-6	10	0	10	100
	F-8	10	4	6	60
	F-9	10	9	1	10
48	F-6	10	0	10	100
	F-8	10	4	6	60
	F-9	10	9	1	10

에 대한 독성실험에서는 96시간 후에 치사률을 관찰해 보아도 72시간 때와 마찬가지로 여기서는 표시하지 않았다. 여기에서 생존해 있는 벌레라 할지라도 증독상태로서 먹이를 기피하고 있었다. 그리고 NaHCO<sub>3</sub>가 함유되지 않은 제제인 F-6(pH 6.83)은 NaHCO<sub>3</sub>가 1% 및 2% 함유된 F-8(pH 10.65)과 F-9(pH 9.65)보다 무궁화잎 밤나방에 대하여 독성이 약간 강한 것을 볼수 있다.

또한 송충에 대한 독성을 보면 이의 효과는 더욱 뚜렷하게 나타나고 있다. 즉 24시간 후와 48시간 후의 치사률은 동일하며 NaHCO<sub>3</sub>가 함유되지 않은 F-6의 치사률은 100%인 반면 NaHCO<sub>3</sub>가 1% 함유된 F-8의 치사률은 60%이고 2% 함유된 F-9의 치사률은 10%이다. 여기에서 보는 바와같이 제제에 NaHCO<sub>3</sub>를 2% 첨가함으로써 치사률이 100%에서 10%로 저하되는 것은 꼭 재미있는 현상이라 생각된다. 나비목 곤충에 있어서 장액의 pH가 알칼리성인 것이 세균성 질병의 주된 요소라 하지만<sup>(3,7,8)</sup> 제제에 NaHCO<sub>3</sub>를 첨가하여 제제의 pH를 약간 높여도 방제면에 있어서 하등의 효과가 없으며 오히려 역효과를 보인다는 것은

**Table 20.** The number of cells and spores of *B. thuringiensis* per ml of culture media

Incubation period (hrs)	Medium-1		Medium-2		Medium-3		Medium-4	
	No. of cells ( $\times 10^9$ )	No. of spores ( $\times 10^9$ )	No. of cells ( $\times 10^9$ )	No. of spores ( $\times 10^9$ )	No. of cells ( $\times 10^9$ )	No. of spores ( $\times 10^9$ )	No. of cells ( $\times 10^9$ )	No. of spores ( $\times 10^9$ )
24	0.677	—	0.6079	—	1.0578	—	0.7085	—
48	1.325	1.212	1.4762	2.4937	1.3932	1.5152	0.3329	1.2021
72	1.818	1.4544	2.4961	2.4620	1.3030	2.3546	1.3322	1.3249
96	1.3696	1.0948	2.0606	2.0218	1.2837	2.9735	1.6362	1.6362
120	0.8456	0.6901	2.4980	2.4494	1.0109	2.5045	2.1838	2.1643
168	0.6053	0.5626	—	1.9634	—	1.3025	—	1.6459

주목할만한 일이다.

(8) 세포수 및 포자수의 계측

각 배양액으로부터 배양시간 별로 채취하여 계측한 시료의 세포수와 포자수는 다음 Table 20에서 보는 바와 같다.

Table 20에서 보는 바와 같이 Medium-1은 glucose 0.8 gr 을 자전수에 녹여 100 ml 이 되게한 배지로서 배양시간 72시간 일 때 세포수와 포자수는 각각  $1.818 \times 10^9$ 과  $1.4544 \times 10^9$ 으로서 최고치에 달하며 그 이후에는 감소되는 것을 볼 수 있고 포자형성은 95% 이상이 되는 것으로 생각되며 배양 72시간 이후 세포수가 감소되는 것은 autolysis에 의한 것이라 생각된다. Medium-2는  $(NH_4)_2SO_4$  0.2 gr, yeast extract 0.2 gr, glucose 0.8 gr 을 자전수에 녹여 100ml 이 되게한 배지로서 배양시간 120시간일 때 세포수는  $2.4980 \times 10^9$ 으로 최고치이며 포자수에서는 배양시간 48시간일 때  $2.4937 \times 10^9$ 으로서 최고치에 달하였다. 이 경우에는 yeast extract 가 배지중에 존재함으로 영양생장을 계속함으로 위와같은 결과가 나왔다고 본다. 그러나 공업적인 생산면에서 볼 때 배양시간 72시간일 때 세포수는  $2.4961 \times 10^9$  포자수는  $2.4620 \times 10^9$ 으로 대차가 없으므로 이 경우에도 역시 72시간의 배양기간이 적당한 것 같다. 여기서 배양시간 24시간일 때는 포자의 형성은 불완전하므로 따라서 독성물질은 포자형성시에 생긴다는 사실을 감안할 때 이 단계에서는 독성물질의 생성은 불완전한 것으로 생각된다. 그리고 168시간의 배양시간에서는 세포는 이미 Autolysis 되어 찾아볼 수 없고 모든 포자는 세포로부터 유리되어 있었다. Medium-3은  $(NH_4)_2SO_4$ , 0.2gr과 glucose 0.8 gr 을 자전수에 녹여 100ml 되게 한 배지로서 세포수는 배양시간 48시간일 때  $1.3932 \times 10^9$ 으로 최고이며 포자수에 있어서는 배양시간 96시간

일 때  $2.9735 \times 10^9$ 으로서 최고치에 달하였다. 공업적인 생산면에서 볼 때 이 경우에는 96시간 동안 배양하는 것이 독성물질의 함량을 최대한으로 할 수 있는 방법이라 생각된다. 여기에서도 배양시간 24시간에서는 포자의 생성은 빈약하고 배양시간 168시간에서는 세포수는 해아될수 없게 autolysis 되어 있었다. Medium-4는  $(NH_4)_2SO_4$  0.2 gr, 고구마 가수분해물 0.8 gr을 자전수에 녹여 100ml이 되게한 배지로서 세포수 및 포자수가 배양시간 120시간 일 때 각각  $2.1838 \times 10^9$ 과  $2.1643 \times 10^9$ 으로서 최고치를 보이고 있다. 따라서 이 배지로 본세균을 배양할 경우는 독성물질의 최대량을 얻기 위하여 120시간 배양함이 좋을 것으로 생각된다. 이 경우에도 배양시간 24시간일 때는 포자의 형성은 불완전하여 계측할 수 없고 168시간에서는 세포가 autolysis되어 측정 불가 하였다. 위의 결과에서 각 배지간의 차이점을 비교해 보면 Medium-2와 Medium-3이 양호하였는데 Medium-2에서 최고포자수는 48시간 일 때  $2.4937 \times 10^9$ 이고 Medium-3에서는 96시간 일 때  $2.9735 \times 10^9$ 이므로 Medium-3이 좀더 나은 결과를 보여 주었다. 더우기 Medium-2에서는 값비싼 yeast extract를 사용하였으므로 생산가 절약이라는 면에서 볼 때 Medium-3의 사용이 가장 적합하다고 생각된다. 따라서 Medium-3을 사용하여 aeration시키면서 96시간 배양 하는것이 최대의 독성물질을 얻는 방법이라 생각된다. Raun등<sup>(20)</sup>의 실험에 의하면 유우롭 옥수수벌레(European corn borer)에 대한 독성에서 유제로 만든 것은 다소 효과가 좋지만 나머지의 모든 제제는 살아있는 포자를 기준으로 만들어졌을 때 동일한 효력을 보였다. 그러므로 본 실험에서도 배양액 1ml당의 세포수와 포자수가 많을수록 독성이 강하다고 간주하고 1ml중의 세포수와 포자수를 많게하는 배지



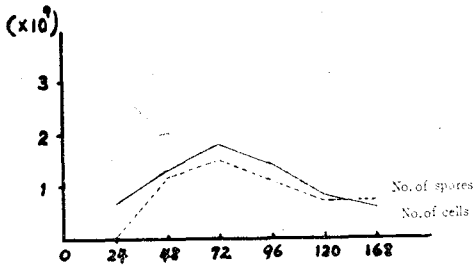


Figure 2. Change in the number of cells and spores of *B. thuringiensis* as a function of incubation period in Medium-1

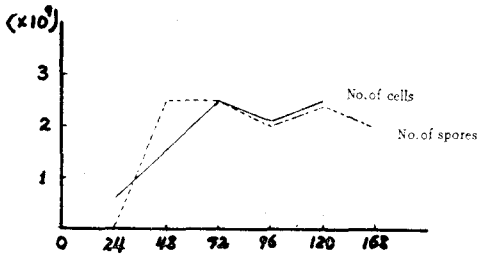


Figure 3. Change in the number of cells and spores of *B. thuringiensis* as a function of incubation period in Medium-2

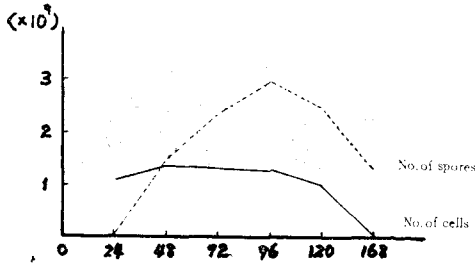


Figure 4. Change in the number of cells and spores of *B. thuringiensis* as a function of incubation period in Medium-3

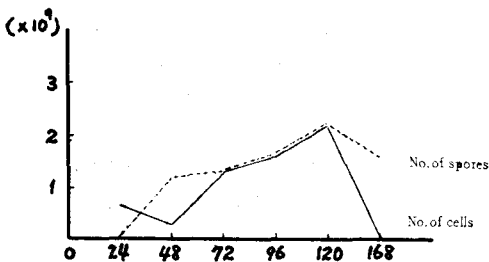


Figure 5. Change in the number of cells and spores of *B. thuringiensis* as a function of incubation period in Medium-4

를 확립 하는데 노력하였다.

Table 20에서 표시한 각 배지의 세포수와 포자수를 배양시간에 따라 도시해 보면 Figure 2, 3, 4, 5와 같다.

#### (9) F-6의 살충성의 경시적 변화

제제 F-6의 살충성의 경시적 변화를 보기 위하여 무궁화잎 밤나방과 송충에 대하여 실험한 결과를 보면 다음 Table 21과 22와 같다.

Table 21. Toxicity of F-6 to *Anomis mesogona* Walker

Storage period (days)	Conc. (%)	No. of insects tested	alive	dead	% mortality 48hrs after feeding
0	5	10	0	10	100
	10	10	1	9	90
40	5	10	3	7	70
	10	10	2	8	80
70	5	10	3	7	70
	10	10	3	7	70

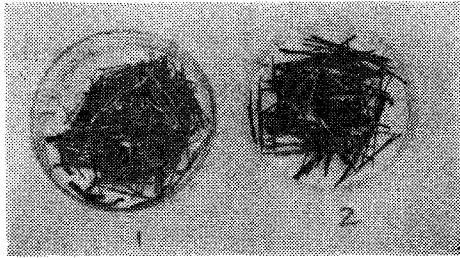
위 결과에서 보는 바와 같이 제제후 바로 사용할 경우에는 5%와 10%에서 각각 100%와 90%의 살충성을 보여 주나 제제후 40일과 70일에는 약간 떨어져 70% 정도를 유지한다. 그러나 생존해 있는 벌레일 지라도 중독상태로서 그 이상 먹이를 먹지 않고 기피하는 현상을 보였다. 이것으로 미루어 보아 제제후 70일 정도까지 실온에서 저장시 약효에 별 변화가 없고 장기간 저장할 필요가 있을 때에는 냉장소에 보관함이 바람직하다 다음 송충에 대한 독성실험 결과를 보면 Table 22과 같다.

Table 22. Toxicity of F-6 to *Dendrolimus spectabilis* Butler

Storage Period (days)	Conc. (%)	No. of insects tested	alive	dead	% Mortality 48hrs after feeding
0	5	10	0	10	100
	10	10	0	10	100
30	5	10	8	2	20
	10	10	2	8	80
70	5	10	8	2	20
	10	10	2	8	80

위 표에서 보면 송충에 대하여는 제제 직후 사

용시에는 5%와 10% 농도에서 각각 100%의 살충률을 보이나 30일과 70일간 저장시에는 5%에서는 살충성이 감소되고 있다. 이런 현상은 미생물 농약에서는 흔히 있는 일이며 농도를 약간 높이면 살충효과를 올릴 수 있고 가능하면 냉암소에서 저장하는 것이 좋을 것으로 생각된다. 또한 F-6의 5% 현탁액을 송충에 급여하고 24시간후 100% 치사된 것을 처리하지 않은 송충과 비교해 보면 Figure 6에서 보는 바와 같다.



**Figure 6.** ① Untreated healthy *Dendrolimus spectabilis* Butler  
② *Dendrolimus spectabilis* Butler of 100% mortality with F-6(5%)

**(10) 회양목 명나방 유충(*Margaronia Perspectalis* Walker)에 대한 방제시험**

제제 F-6 5% 살포액을 만들어 야외에서 회양목 명나방 유충에 살포한 후 치사하는 것을 촬영하였으며 그 결과는 Figure 7에서 보는 바와 같다.



**Figure 7.** Control of *Margaronia perspectalis* Walker by spraying of F-6 (5%)

Figure 7에서 보는 바와 같이 회양목 명나방 유충은 약제를 섭취한 후로는 그 이상 먹이를 먹지 않고 증독상태로 있다가 3~4일 후에는 완전히 치사되었다.

**(11) Platanus의 흰불나방(*Hyphantria cunea* Drury)에 대한 방제시험**

제제 F-6 수화제 5% 살포액을 만들어 야외에

서 살포한 결과 본 해충은 대체로 먹이를 기피하는 경향을 보였다.

**(12) 대추나무와 장미의 노랑뽕기나방(*Monema flavescens* Walker)에 대한 독성**

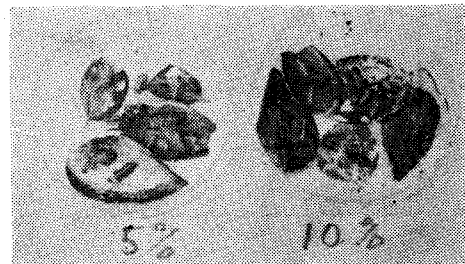
제제 F-6을 실온에서 40일간 보관한 후에 노랑뽕기나방에 대하여 실험실과 야외에서 독성을 실험해본 결과는 다음 Table 23에서 보는 바와 같다.

**Table 23.** Toxicity of formula F-6 to *Monema flavescens* Walker(48hrs after feeding)

Conc. (%)	No. of insects tested	alive	dead	mortality (%)
5	10	0	10	100
10	10	4	6	60

Table 23에서 보면 5%농도일 경우는 치사율이 100%이고 10% 농도에서는 치사율이 60%인 것은 고농도일수록 이 벌레가 먹이를 기피하는 경향이 있어 섭취를 않았기 때문인 것으로 생각된다.

Petri dish내에서 본 곤충의 독성실험을 행한 결과는 Figure 8에서 보는 바와 같다.



**Figure 8.** Toxicity of formula F-6 (5% and 10%) to *Monema flavescens* Walker

또한 야외 살포실험은 대추나무에 직접 제제 F-6의 5% 희석액을 만들어 살포하였다. 2~3일간 관찰한 결과 모두 증독증상을 일으키고 전혀 먹이를 먹지 않고 서서히 죽어가는 것을 관찰할 수 있었다.

**(13) 장미의 짙레수염 진딧물(*Macrosiphum ibarae* Matsumura)에 대한 살충시험**

야외에 있는 장미에 만연된 진딧물에 F-6의 5% 현탁액을 살포하고 24시간후 관찰해본 결과 대부분의 진딧물은 죽어 있었고 섭취하지 않은 것은 약간 생존해 있었다. Figure 9는 그의 모습을 사진으로 보인 것이다.

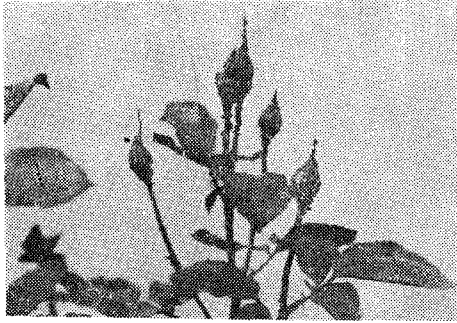


Figure 9. Toxicity of formula F-6 (5%) to *Macrosiphum ibarae* Matsumura

#### (14) 배지의 개발

*B. thuringiensis*가 생산하는 각개 포자형성 세포당의  $\delta$ -endotoxin의 함량은 배지의 종류와 배양조건에 따라 다르다.

즉, 통기를 아주 강하게 하면 결정물의 크기는 작아지는 반면 독성은 증가되고 통기를 약하게 하면 결정물의 크기는 비교적 크게 되나  $\delta$ -endotoxin의 함량이 감소된다고 한다. 또한 glucose의 농도를 증가시키면 독성물질의 함량이 증가되고 따라서 살충성도 증가되며 최대의 수량은 반합성 배지에서 glucose의 함량이 6~8 gr/l의 농도에서 얻어진다고 하였다.<sup>(21)</sup>

Smirnoff<sup>(23)</sup>는 *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner를 14~15°C의 저온으로 한천배지 상에서 배양하면 대대적으로 포자가 형성되지 않고 결정물질이 생성된다고 하였다.

Mechalas<sup>(16)</sup>는 *B. thuringiensis*의 살충제를 생산함에 있어 단백질과 탄수화물의 함량을 적당히 조절함으로써 단시일내에 많은 독성물질을 얻는 방법을 연구하였다.

즉 그는 고체 배지를 사용하여 *B. thuringiensis*를 배양한 후 건조시켜 적당한 크기의 분말로 만들어 직접 살충제로 사용하였다. Drake 등<sup>(6)</sup>은 세포수를 최대 증식시킬수 있는 배지를 만들어 *B. thuringiensis*를 배양한 후 살포건조하여 분말상으로 만들어 사용하였다. 그들은 이외에도 여러가지 배지조성을 가지고 제제화 하는 방법을 개발하였다. Megna<sup>(17)</sup>는 당밀 등을 사용하여 특별히 만족스러운 배지를 고안하였다.

또한 Skvortsova 등<sup>(22)</sup>은 옥수수가루와 사료용 효모를 사용하여 *B. thuringiensis* Gallieriae를 배양하는 방법을 개발하였다. 본 연구에서는 제사공장에서 폐기하고 있는 자전수는 단백질과 무기염류를 다량 함유하고 있으므로 여기에 약간의

영양원을 첨가하여 다음 Table 24에서 보는 배지를 고안하였다.

Table 24. Composition of the proposed medium for the culture of *B. thuringiensis*(Medium-3)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2%
glucose	0.8%
자전수에 녹이고 pH를 7.05로 조정	

위에서 보는 배지조성은 Drake 등<sup>(6)</sup>의 배지에서 처럼 세포의 증식이 활발하지는 않지만 가격이 저렴하고 편리하게 배양할 수 있고 배양시간도 단축할 수 있다는 점에서 바람직하다. 그러나 보다 우수한 배지의 개발에 관한 연구는 현재 계속 중에 있다.

#### 적 요

*Bacillus thuringiensis* Berliner를 이용한 미생물 살충제의 개발을 위하여 연구를 행한바 다음과 같은 결과를 얻었다.

- (1) 제사공장에서 폐기되는 자전수의 냉동 건조물 중에는 조단백질 함량이 51.825%가 함유되어 있으며 기타 무기염류도 다량 함유되고 있어 자전수는 본 세균 배양의 좋은 영양원이 될 수 있다.
- (2) 현수성으로 보아 가장 양호한 제제는 F-5로서 그 조성은 Cell-Spore-Crystal 혼합물 0.2g, 200-mesh Kaolin 25g, New Kalgen NX-150, 2.5g 그리고 glycerine 2.5g을 증류수 8ml의 비율로 혼합하여 80 mesh 입제로 한 것이다.
- (3) F-5, F-6, 및 F-7의 조성중 다른 것은 전부 같고 다만 Cell-Spore-Crystal 혼합물의 함량이 F-5에서는 0.2g, F-6에서는 0.4g, F-7에서는 0.6g인 점이 다르므로 이들 제제의 물리성은 거의 동일하다.
- (4) F-5, F-6 및 F-7은 5% 농도에서 무궁화잎 밤나방, 송충, 회양목 명나방 유충 등에 우수한 살충효과를 보였다.
- (5) 제제의 일 성분으로 NaHCO<sub>3</sub>를 첨가한 F-8과 F-9는 무궁화잎 밤나방과 송충에 대한 독성 실험에서 NaHCO<sub>3</sub>를 함유하지 않은 F-6 보다 현저한 독성의 감소를 보여주었다.
- (6) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2%와 glucose 0.8%를 자전수에 용해하여 pH를 7.05로 조정한 배지인 M-3을

사용하여 aeration 시키면서 96시간 배양하였을 때 포자수는 최고  $2.97 \times 10^9/m^3$ 에 도달하였다.

(7) F-6은 제제후 70일 동안 실온에서 저장시 무궁화잎 밤나방과 송충에 대한 독성이 약간 감소하는 경향이 있었으므로 냉암소에 저장함이 바람직하다.

(8) F-6은 야외 살포로 대추나무의 노랑색기나방 회양목 명나방유충, 장미의 절레수염 진딧물 등의 방제에 좋은 효과를 보였다.

### 인용 문헌

- 1) Ahmed, S.M., Nagamma, M.V. and Majumder, S.K., Pestic. Sci. **4**, 19-23 (1973)
- 2) Allen, N., Kinard, W.S., and Creighton, C.S., Tobacco Sci. **5**, 58-62 (1961)
- 3) Angus, T. A., Nature **173**, 545-546 (1954)
- 4) Berliner, E., Ztschr. f. das Gesam. Getreidewesen, **3**, 63-70(1911)
- 5) Dominick, C.B., Tob. Sci. **19**, 18-19 and Tobacco **177**(4), 65-6 (1975)
- 6) Drake, B. B. and Smythe, C. V., U.S. Patent 3,087,865 (1963)
- 7) Hannay, C. L., Nature **172**, 1004 (1953)
- 8) Hannay, C. L., and Fitz-James, P.C., Can. J. Microbiol. **1**, 694-710 (1955)
- 9) Heimpel, A. M. and Angus, T. A., In Insect Pathology (Steinhaus, E.A., ed). Academic Press, New York, Vol. **II**, 21 (1963)
- 10) Heimpel, A. M., Annual Review of Entomology **12**, 287-322 (1967)
- 11) Herfs, W., Nachr. Deut. Pflanzenschutzdienst (Berlin), **18**, 25-29 (1966)
- 12) Johnson, A. W., J. Econ. Entomol. **67** (6), 755-9 (1974)
- 13) 李成煥 등, 改訂 農藥學, 鄉文社, p.42(1975)
- 14) Lee, J. K. and Kim, K. C., Journal of the Korean Agricultural Chemical Society, **19**, (4), 189-201 (1976)
- 15) Mattes, O., Sitzber. Ges. Befoerder. Ges. Naturw. Marburg, **62**, 381-417 (1927)
- 16) Mechalas, B. J., U.S. Patent, 3, 086,922 (1963)
- 17) Megna, J. C., U.S. Patent, 3,073,749(1963)
- 18) 農藝化學 實驗書, 京都大學 農學部 農藝化學教室 第二卷, 822-823(昭和 35年)
- 19) Raun, E. S., Iowa State J. Sci. **38**, 141-150 (1963)
- 20) Raun, E. S. and Jackson, R. D., Journal of Economic Entomology **59** (3), 620-622 (1966)
- 21) Scherrer, P., Lüthy, P., and Trumpi, B., Applied Microbiology **25** (4), 644-646 (1973)
- 22) Skvortsova, M.M., Freiman, V.B., Glushkova, A. I., Mertsalov, V.M., Lomovskaya, T. F., Sib. Vestn. S-Kh. Nauki, **4** (4), 43-7 (1974)
- 23) Smirnoff, W. A., J. Insect Pathol. **5**, 242-50 (1963)
- 24) Steinhaus, E. A. et al., Nature **173**, 545-546 (1954)
- 25) Steinhaus, E. A., Agr. Food Chem. **4**(8) (1956)
- 26) Steinhaus, E. A. et al., Canadian Journal of Microbiology **2**, 111-121 (1956)
- 27) Steinhaus, E. A., J. Econ. Entomol. **50** (6), 715-20 (1957)