

누에(*Bombyx mori*) 무름병을 야기하는 병원성 세균 *Staphylococcus gallinarum*의 동정

김길호 · 박영진¹ · 김용균^{1,*}

상주대학교 농학부 잠사곤충학과, ¹안동대학교 자연과학대학 농생물학과

Identification of a Pathogenic Bacterium, *Staphylococcus gallinarum*, to *Bombyx mori*

Gilho Kim, Youngjin Park¹ and Yonggyun Kim^{1,*}

Department of Sericulture & Entomology, Sangju University, Sangju, 742-711 Republic of Korea

¹School of Bioresource Sciences, Andong National University, Andong, 760-749 Republic of Korea

ABSTRACT : Flacherie symptom was found in the fifth instar larvae of silkworm, *Bombyx mori*. The bacterial pathogen was isolated from the hemolymph of the infected silkworm and identified. The isolated bacteria caused a significant flacherie pathogenicity to the fifth instar larvae of *B. mori* when 5×10^6 cfu (colony-forming unit) of the bacteria was injected into each larva. The infected larvae began to die at 6 days after injection and resulted in complete mortality at 10 days. The bacterium was identified as *Staphylococcus gallinarum* based on the morphological and physiological characteristics described in Bergey's manual. This identification was further supported by the characters of carbohydrate utility analyzed from a bacterial identification system (MicroLog[®]) and also by the molecular structure of 16S-23S rDNA internal transcribed spaces. As an insecticidal action, *S. gallinarum* caused hemolymph septicemia by its cytotoxic effect on the hemocytes of *B. mori*.

KEY WORDS : *Bombyx mori*, *Staphylococcus gallinarum*, Flacherie, Septicemia, Entomopathogenic bacteria

초 록 : 누에(*Bombyx mori*) 5령 유충에서 무름병 증상이 발견되었다. 세균성 병원균이 감염 누에 혈액에서 분리되었고, 본 연구에서 동정되었다. 분리된 세균을 각각의 누에 5령 유충에 5×10^6 cfu (colony-forming unit) 농도로 혈강 주사되었을 때, 뚜렷한 무름병 증상을 유발시켰다. 이렇게 감염된 유충들은 접종 6일 후부터 죽기 시작하여, 10일 경과 후 처리된 유충 모두 사망하였다. Bergey의 세균동정집에 기록된 형태적 및 생리적 형질을 기준으로 이 곤충병원세균이 *Staphylococcus gallinarum*으로 판명되었다. 이 판정은 탄소원 분석 미생물동정장치(MicroLog[®]) 분석 결과와 16S-23S rDNA internal transcribed space 구조에 의해서 확인되었다. 이 세균이 발휘하는 살충 기작의 일환으로서, 감염 후 누에 유충 혈구에 세포치사 효과를 주어 패혈증을 유발하는 것으로 분석되었다.

검색어 : 누에, *Staphylococcus gallinarum*, 무름병, 패혈증, 곤충병원세균

척추동물과 같이 후천적으로 외래인자에 특이적으로 발현될 수 있는 정교한 항원-항체 면역 반응체계는 가지고 있지 않지만, 곤충들은 자신들의 생명력 유지를 위해 다양한 방법의 세포성 및 체액성 면역 기작

*Corresponding author. E-mail: hosanna@andong.ac.kr

을 발휘하고 있다(Ratcliffe *et al.*, 1985). 그러나 이러한 곤충들이 가지고 있는 효과적인 면역 체계에도 불구하고 병원성 미생물들은 계속해서 이를 효과적으로 극복하면서 자신들의 생명력을 유지하게 된다. 곤충을 감염시키는 병원체들의 종류는 바이러스, 세균 및 진핵생명체에 이르기까지 다양하다. 이들이 곤충의 면역 방어체계를 극복하는 방법도 단순히 기주의 비자기 인식을 회피하는 전략으로부터 적극적으로 이에 맞서 면역 체계를 극복하려는 전략까지 다양하다(Strand and Pech, 1995; Gillespie and Kanost, 1997).

다양한 곤충 병이 누에(*Bombyx mori*)에서 알려져 있고, 이중 발생 피해빈도에서 일반적으로 무름병이 가장 큰 피해를 주고 있다(Krieg, 1987). 누에에 발생하는 무름병은 일반적으로 세균에 의한 것이 주이지만, 바이러스에 의해서도 기인된다(Kim *et al.*, 1986; Tanada and Kaya, 1993). 세균에 의해 발생하는 누에의 무름병 종류는 크게 소화기 계통의 무름병과 패혈증이 있다(Park *et al.*, 1977).

누에의 소화기 계통의 무름병을 야기하는 것으로 알려져 있는 세균들은 *Bacillus sotto*, *B. prodigiosus*, *Streptococcus* spp. 등이 대표적이며, 이들 세균이 누에의 소화관 안에 기생 번식하여 발병한다(Iwanami and Ono, 1963). 이러한 소화기 계통의 무름병은 병징에 따라서 공두병, 축소병, 설사병, 졸도성 무름병, 그리고 적사병과 녹사병 등으로 구분할 수 있다. 일반적으로 무름병을 야기하는 세균에 감염된 누에들의 전반적인 병징은 몸의 색깔이 검은색 또는 갈색으로 변하거나, 흙갈색의 작은 반점들이 나타나며 죽게 되면 몸이 풀러지는 특징을 보인다.

반면에 누에의 혈강에서 세균들이 번식하여 발생하는 무름병인 패혈증이 있다. 패혈증을 유발하는 세균은 *Serratia*, *Psuedomonas*, *Aeromonas*, *Streptococcus*, 그리고 *Clostridium*속의 균들이 있다(Iwanami and Ono, 1963). 패혈증의 진행경과는 주로 *Bacillus sotto*와 *B. prodigiosus*의 경우 급성이고, *Streptococcus*에 감염되었을 경우에는 만성으로 나타난다. 특히 패혈증에 감염된 누에는 죽기 전 혈액에서 많은 세균을 발견할 수 있다.

본 연구에서는 잠실에서 누에를 사육하는 과정중 주로 5령 시기의 누에에서 많이 발생하여 잠업농가의 피해를 주는 누에의 무름병 가운데서 혈액에서 패혈증을 유발시키는 병원성 세균을 분리하였고, 이를 동정하여 보고한다.

재료 및 방법

누에 품종과 사육

경상북도 농업기술원 잠사곤충사육장에서 인공사료로 사육된 장려품종 칠보잠(잠107×잠108)을 분양 받아 사용하였다. 시험에 사용한 누에는 3령부터 23-25°C, 70-80% 상대습도에서 뿔이로 사육하였고, 5령기에 무름병 증상이 있는 누에를 선발하여 세균을 분리하였다. 병원성 검정에 이용한 누에는 4령을 이용하였다.

세균 분리

무름병 증상이 있는 누에를 수거하여 75% 에타놀과 1% sodium hypochloride 용액으로 표면 살균한 후, 혈액을 1.5 ml 회전용기에 수거하였다. 수거된 혈액은 NA (nutrient agar, Difco, USA) 평판배지에 치상되어, 28°C 배양기에서 48시간 동안 배양되었다. 자라난 균총들은 각각 분리하여 세균현탁액 상태로 분석이 이뤄질 때까지 상온에서 보관되었다.

병원성 조사

분리된 균주는 0.7% NaCl 용액을 이용해 10^9 cfu (colony forming unit)/ml 농도의 현탁액으로 만들어 병원성 검정용 접종원으로 사용하였다. 병원성 검정은 4령 1일된 누에를 이용하였으며, 유충의 몸을 70% 에타놀이 흡수된 여과지를 이용해서 표면 소독하였다. 분리된 세균의 접종은 Park *et al.* (1999)의 방법에 따라서 세균 현탁액 5 μ l를 10 μ l 용량의 미량주사기(Hamilton, USA)를 이용해서 복부 마지막 복지를 통해 혈강으로 주사하였다. 세균이 접종된 누에는 28°C 배양기에서 5령때까지 사육되었다.

세균 동정

분리된 병원성 세균의 특성을 Bergey의 세균동정집(Holt *et al.*, 1994)의 기록에 따라서 비교하였다. 그리고 병원성 세균의 당류 이용성을 조사하기 위해서 BUGB 배지(BUG agar 57 g)에 치상하여, 28°C에서 48시간 배양한 후 MicroLog system (BioLog, USA)에 입력된 결과와 비교하였다. 균체의 형태는 2% phosphotungstic acid (pH 7.0)에서 5분간 염색한 후, 투과

전자현미경(Zeiss E. M. 109, Germany)에서 관찰하였다.

16S-23S rDNA space 분석

동정된 세균의 분자학적 구조 분석을 위해 중간 변이가 높은 rDNA 영역중 16S-23S internal transcribed site (ITS)가 PCR로 증폭되었다. 이때 이용된 primer들은 16S와 23S의 각 영역에서 중간 변이 없이 매우 일정한 DNA 염기서열을 유지하는 부위에서 제작되었다(Jensen et al., 1993). 16S primer는 forward primer로서 5'-GAAGTCGTAACAAGG-3'이고, 23S primer는 reverse primer로서 5'-CAAGGCATCCACCGT-3'이었다. PCR 반응 조건은 94°C에서 1분간, 47°C에서 1분간, 72°C에서 2분간으로 전체 35회 증폭되었다. 최종 증폭시기에 72°C에서 10분 동안 처리하여 마무리 DNA 합성이 가능하게 했다.

혈구세포 조사

분리된 병원성 세균이 누에의 혈장 내의 혈구세포에 미치는 영향을 조사하기 위해서 Park and Kim (2000)의 방법과 같이 세균을 접종한 후 24시간 간격으로 누에의 혈액을 10 µl씩 추출하여 0.04% trypan blue 시약 10 µl와 같이 혼합한 후 광학현미경(Olympus, Japan)에서 시간별로 생존하는 혈구세포를 관찰하였다. 생존 혈구는 염색시약의 세포내 존재 유무로 (Ribeiro et al., 1999) 판단하였다.

결 과

병원세균의 병원성

무름병 증상을 보이는 누에가 부속농장 잠실(경북 상주시 상주대학교내)에서 발견되었다. 몸이 연화되면서 죽은 후에 암갈색으로 변화하였다(Fig. 1). 무름병 증상이 있는 누에 혈액에서 분리한 세균을 4령 1일된 누에에 접종하였을 때, 접종 후 2일까지 병원성이 나타나지 않았으나, 6일 이후 치사 효과가 나타나더니, 접종 후 10일에서는 100%의 사망률을 확인할 수 있다(Fig. 2). 이를 통해 분리한 세균이 병원성을 가지고 있는 세균임을 알 수 있었다. 특히 이러한 인위적 접종 후 죽은 누에들의 몸 표면은 일반적인 누에의 무

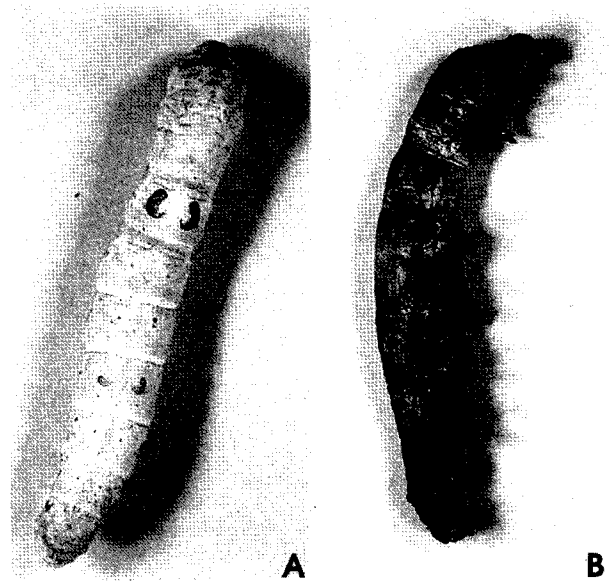


Fig. 1. *Bombyx mori*: (A) normal or (B) flacherie-diseased fifth instar larva.

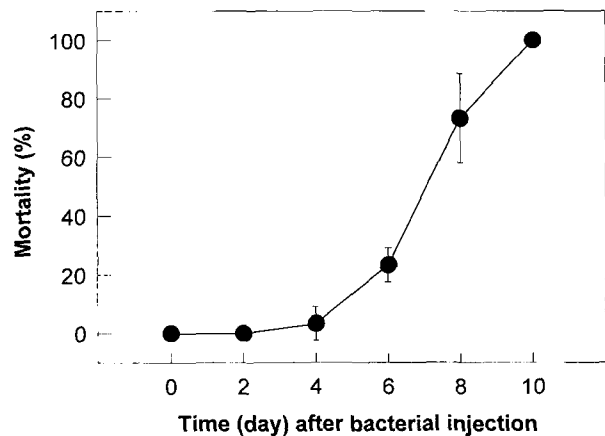


Fig. 2. Pathogenicity of the bacteria isolated from the larval hemolymph of *Bombyx mori* showing a flacherie symptom. The pathogenicity was analyzed by mortality-time course of the infected larvae. Each measurement was replicated three times independently with ten larvae per replication.

름병 증상과 동일하게 물러지는 것을 발견하여 세균이 분리되기 전의 자연적 병징과 일치하였다.

병원세균의 동정

분리된 병원성 세균을 투과전자현미경으로 관찰한 결과, 편모가 없고 염주알 처럼 연결된 구균이었으며, 균체의 크기는 $0.4 \times 0.7 \mu\text{m}$ 를 나타냈다(Fig. 3). 분리한 균주를 Bergey의 세균동정집에 따라 세균학적 특

성을 비교 조사한 결과, 혐기성 생육 이외에 *Staphylococcus* 속의 8가지 생리학적 특성과 일치하였다(Table 1). *Staphylococcus* 속으로 동정된 균주를 Bergey 세균 동정집에 기록된 *S. gallinarum*의 특성과 비교하였다. 그 결과, 누에에서 분리한 세균은 *S. gallinarum*과 생리학적 특성이 일치하였다(Table 2). 또한 MicroLog system (BioLog, Release 4.0)에 의해 분리된 세균의 탄소원 이용성을 조사한 결과, *S. gallinarum*와 69.9%의 유사도를 나타내었다. 따라서 본 실험을 통해서 누에에서 분리된 세균은 *Staphylococcus gallinarum*으로 동정되었다.

동정된 세균의 분자생물학적 특징 규명을 위해 rDNA의 16S와 23S 유전자 사이에 존재하는 internal transcribed site (ITS)가 분석되었다(Fig. 3). 다섯 가지 서로 다른 PCR 산물(2100, 880, 570, 480, 380 bp)이 증폭되었다. 이는 *Staphylococcus gallinarum*에서 ribo-

somal DNA의 ITS가 최소한 4종류 이상의 다형을 보유하고 있음을 내포하고 있다.

Table 2. Species identification of the pathogenic bacteria isolated from *Bombyx mori*

Characteristics	Present isolate	<i>Staphylococcus gallinarum</i>
Colony pigment	yellow	white or yellow
Colony shape	crenate edge	crenate edge
Growth at 45°C	+ ^b	+
Nitrate reduction	+	+
Acid production from:		
D-Xylose	+	+
L-Arabinose	+	+
D-Cellobiose	+	+
D-Fucose	+	w
Raffinose	+	+
Salicin	+	+
Sucrose	+	+
Maltose	+	+

^aDetails of *Staphylococcus gallinarum* were described in Bergey's manual (Holt *et al.*, 1984).

^b+ ' positive reaction, '-' negative reaction, and 'w' weak reaction.

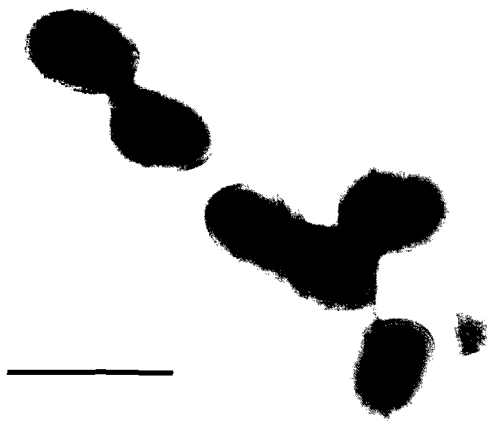


Fig. 3. A transmission electron micrograph of *Staphylococcus gallinarum* isolated from *Bombyx mori* with a flacherie symptom. The scale bar indicates 1 μm.

Table 1. Characteristics used to identify genus of pathogenic bacteria the isolated from hemocoel of *Bombyx mori*

Characteristics	Present isolate	<i>Staphylococcus</i> ^a
Gram strain	+ ^b	+
Anaerobic growth	+	+
Oxidase	-	-
Catalase	+	+
Cell size (μm)	0.4-0.7	0.5-1.8
Cell shape	cocci	cocci
Cell arrangement	clusters/pairs	clusters/pairs
Flagella	none	none
Motility	-	-

^aDetails of *Staphylococcus* were described in Bergey's manual (Holt *et al.*, 1984).

^b+ ' Positive reaction, '-' negative reaction.

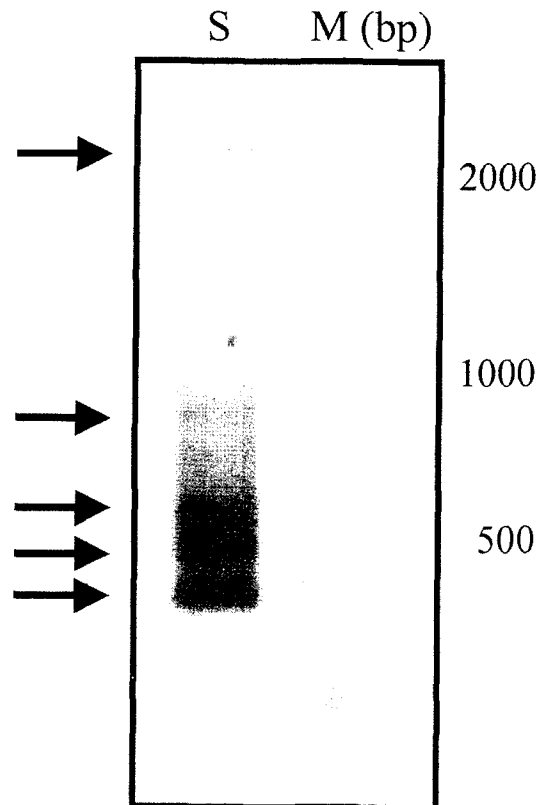


Fig. 4. PCR-amplified 16S-23S rDNA spacer region ('S') of *Staphylococcus gallinarum*. Ten μl of the product was loaded on 0.9% agarose gel, stained with ethidium bromide after electrophoresis, and photographed on UV light. 'M' indicates 100 bp ladder molecular weight marker.

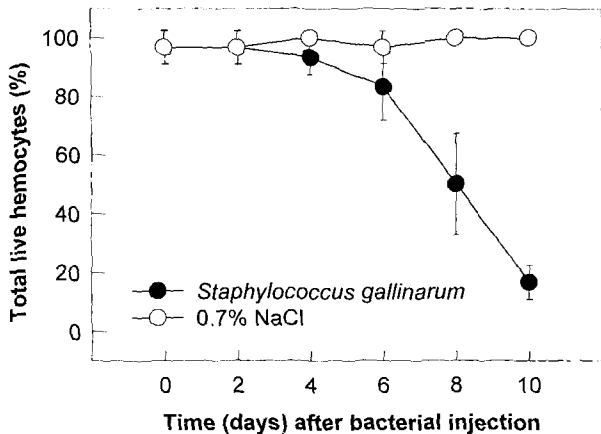


Fig. 5. Cytotoxic effect of *Staphylococcus gallinarum* on the hemocytes of *Bombyx mori* larvae. The hemocytes, which did not absorb 0.04% trypan blue dye (1 : 1, v/v), were regarded as living cells. Each measurement consisted of five replications (= larvae).

*Staphylococcus gallinarum*의 혈구세포 치사 효과

병원력 기작 분석의 일환으로, 이 세균의 증식 장소인 혈강으로 세균을 접종시킨 후 시간별로 혈액 채취하여 혈구의 형태적 및 기능적 분석을 실시하였다. *S. gallinarum*을 4령 1일째 누에에 접종한 후 혈액 속의 혈구세포를 조사한 결과 세균 접종 후 4일까지는 혈구세포가 치사되지 않았지만, 6일째부터 약 20%의 혈구세포가 기능을 잃어 대조군으로 접종한 0.7% NaCl과 뚜렷한 차이가 나기 시작하였으며($P < 0.05$), 10일째에 80%로 대부분의 혈구세포들이 치사되었다(Fig. 4). 따라서 *S. gallinarum*이 접종된 누에는 세포치사 효과가 나타났으며, 이는 궁극적으로 패혈증과 연결된다고 확인할 수 있었다.

고 찰

본 연구는 실제 잠실 농가에서 발병하여 경제적 손실을 주고 있는 무름병에 대한 병원체 원인 규명 필요성에 따라 실시되었다. 일반적으로 이러한 무름병은 세균성과 바이러스성에 의해 유발된다. 특별히 바이러스에 의해 감염되는 바이러스성 무름병은 직경 27 nm 크기의 연화병 바이러스(flacherie virus: FV)에 의해 감염되고 국내 잠엽 농가에서 주요 무름병의 원인으로 지적되어왔다(Kim et al., 1991). 그러나 많은 무름병이 또한 세균성에 기인된다고 보고되고 있다(Iwan-

ami and Ono, 1963).

무름병을 보이고 있는 누에에서 분리된 세균은 건전한 누에 4령 혈강에 주입할 때 동일한 무름병 병징을 나타냈다. 그리고 이 세균 감염 이후 시간별 사망을 조사한 결과 처리 6일 후부터 뚜렷한 사망을 보이기 시작하여 10일만에 처리한 모든 누에가 사망하였다. 세균에 접종된 누에가 초기에 죽지 않고 10일인 5령 6일째에 죽은 것은 흔히 누에를 사육하는 잠실에서 볼 수 있는 무름병의 대표적인 영향이다(Park et al., 1977). 이것은 대개 이 시기에 무름병으로 죽는 누에들이 대부분 4령 1일째를 전후로 무름병을 야기하는 세균에 감염이 되는 것으로 알려진다. 또한 세균들은 스스로 증체의 체강내로 침입하기 어렵기 때문에(Thomas, 1979), 누에의 사육기간 중 이 시기에 발생되는 상처에 의해서 이 세균의 감염이 이루어지는 것으로 이해된다. 이러한 결과는 분리된 세균이 누에의 혈액에서 증식이 가능하며, 이러한 증식을 통해 병원력 및 살충력을 발휘한다는 점을 시사한다. 다양한 과에 속한 세균들이(Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Bacillaceae 등) 곤충의 병을 유발하고 있다(Krieg, 1987). 누에에서는 이들 이외에도 Micrococcaceae와 Achromonadaceae에 속한 세균들도 병을 유발하고 있다(Park et al., 1977).

보다 정확한 동정을 위해 Bergey의 세균동정집에 기록되어 있는 생리적 및 형태학적 분류 형질을 중심으로 분석하였고, 또한 세균의 탄소원 이용 능력을 중심으로 제작된 미생물동정장치를 이용하여 종 동정을 한 결과 *Staphylococcus gallinarum*으로 판정되었다. 또한 종간 변이가 커서 *Staphylococcus* 속의 종 구분에 이용되고 있는 16S-23S rDNA ITS 구조 분석에서 기존에 보고된 *S. gallinarum*의 양상과 유사하게 나타났다. 일반적으로 이 균주 속에 속한 종들은 104-771 bp 크기의 ITS를 1-8개 소유하고 있는 것으로 나타나고 있다(Mendoza et al., 1998). 본 연구에서 나타난 2100 bp 크기의 증폭물은 이러한 일반적 경향에서 예외적 현상이라 볼 수 있다. 그러나 유전자의 구조만으로 이 종을 동정하기 위해서는 이 증폭물들의 DNA 염기서열을 밝힌 후에야 가능하다. 이에 대한 추후 연구가 필요하다.

이 균은 주로 가금류의 표피층에 존재하는 것으로 보고되었다(Holt et al., 1994). 이 속에 속한 유사한 균주로서 인체에 병을 유발하는 *S. aureus*가 누에의 혈강으로 주입한 결과 뚜렷한 병원력을 발휘한다고 보

고하였다(Kaito *et al.*, 2002). 기존의 연구에서 *Staphylococcus* 속의 세균에 감염된 꿀벌부채명나방(*Galleria mellonella*)에서 전체 혈구세포수가 48시간 안에 급격하게 감소된다고 보고가 되었다(Werner and Jones, 1969; Pathak, 1993). 그러나 본 실험에서 분리된 세균은 접종한 후 4일째까지는 혈구세포가 거의 세균의 영향을 받지 않아서 잠복기간이 길어지는 특성을 보여주며, 이러한 영향에 의해서 누에 사육 기간중 5령 시기에 치사하는 누에가 많은 가장 많이 발생하는 것으로 여겨진다. 그러나 4령 이전에 감염된 누에의 경우 누에의 크기와 무게가 상대적으로 많이 적기 때문에 4령 이전에 감염된 누에의 경우는 치사기간이 더 짧아질 가능성도 있을 것으로 생각된다.

분리한 세균에 접종된 누에가 치사하는 과정과 혈구세포의 영향을 비교하면 누에의 사망률이 가장 높은 시기인 5령 6일째에 혈구세포가 가장 많이 파괴되는 것으로 누에의 치사원인이 패혈증인 것으로 판단된다. 일반적으로 비병원성 세균이 혈강에 침입할 경우 곤충의 혈강에서는 세포성 면역 반응으로서 소낭 형성 또는 포식작용에 의해 이들 외래인자들이 제거될 수 있으며, 이후 체액성 면역 기작으로 항세균성 단백질(예: lysozyme, cecropin, attacin)이 발현되어 세균의 증식이 억제된다(Gillespie and Kanost, 1997). 그러나 본 세균의 경우에는 이러한 기주 누에의 면역 반응을 억제시키거나, 극복하여 병원력을 발휘한다는 점에서 병원성 기작 연구가 필요한 단계이다. 이를 통해 이러한 병원체의 효과적 제어 기술이 개발될 것으로 사려된다.

Literature Cited

- Gillespie, J.P. and M.R. Kanost. 1997. Biological mediators of insect immunity. *Annu. Rev. Entomol.* 42: 611~643.
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.A. Sneath, J.T. Stanley and S.T. Williams. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Willians & Wilkins, Baltimore.
- Iwanami, S. and M. Ono. 1963. Identification of bacteria isolated from gut juice of flacherie-diseased silkworms. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 7: 26~30.
- Jensen, M.A., J.A. Webster and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 945~952.
- Kaito, C., N. Akimitsu, H. Watanabe and K. Sekimizu. 2002. Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microbial Pathogen.* 32: 183~190.
- Kim, K.Y., S.K. Kang and J.C. Lee. 1986. Studies on the flacherie and denonucleosis virus in the silkworm, *Bombyx mori* L. *Korean J. Seric. Sci.* 28: 48~51.
- Kim, K.Y., S.W. Kang, S.K. Kang and R. Sang. 1991. Characterization of flacherie virus of the silkworm, *Bombyx mori*, isolated in Korea. *Korean J. Seric. Sci.* 33: 13~20.
- Krieg, A. 1987. Diseases caused by bacteria and other prokaryotes. pp. 323~355. *In Epizootiology of insect diseases*, eds. by J.R. Fuxa and Y. Tanada. 512 pp. Wiley, New York.
- Mendoza, M., H. Meugnier, M. Bes, J. Etienne and J. Freney. 1998. Identification of *Staphylococcus* species by 16S-23S rDNA intergenic space analysis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 1049~1055.
- Park, B., C. Yoon and R. Kim. 1977. *Silkworm-anatomy, physiology, and pathology*. pp. 276. Hyangmoon Press. Korea.
- Park, Y., Y. Kim and Y. Yi. 1999. Identification and characterization on the symbiotic bacterium of *Steinernema carpocapsae* collected in Korea. *J. Asia-Pacific Entomol.* 2: 105~111.
- Park, Y. and Y. Kim. 2000. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, a symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae*. *J. Insect Physiol.* 46: 1469~1476.
- Pathak, J.P.N. 1993. *Insect immunity*. Kluwer academic publishers, India.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald and C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity-basic concepts and recent advances. *Invertebr. Rev. Cytol.* 97: 183~350.
- Ribeiro, C., B. Duvic, P. Oliveira, A. Givaudan, F. Palha and N. Simoes. 1999. Insect immunity-effects of factors produced by a nematobacterial complex on immunocompetent cells. *J. Insect Physiol.* 45: 6577~685.
- Strand, M.R. and L.L. Pech. 1995. Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationship. *Ann. Rev. Entomol.* 40: 31~56.
- Tanada, Y. and H. Kaya. 1993. *Insect pathology*. 666 pp. Academic Press. New York.
- Thomas, B. 1979. *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall. New Jersey.
- Werner, R.A. and J.C. Jones. 1969. Phagocytic haemocytes in unfixed *Galleria mellonella* larvae. *J. Insect Physiol.* 15: 425~437.

(Received for publication 29 August 2002;
accepted 27 November 2002)