

무당벌레(*Harmonia axyridis*) 장내세균의 특성 및 *Staphylococcus* spp. 장내세균이 무당벌레의 발육에 미치는 영향

문청원 · 김기광¹ · 황경숙¹ · 서미자 · 윤영남 · 유용만*

충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, ¹목원대학교 미생물나노소재학과

Characteristics of Enterobacteria from *Harmonia axyridis* and Effects of *Staphylococcus* spp. on Development of *H. axyridis*

Chung Woun Moon, Ki Kwang Kim¹, Kyung Sook Whang¹, Mi Ja Seo, Young Nam Youn and Yong Man Yu*

Department of Applied Biology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon, 305-764

¹Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, Daejeon, 302-729, Korea

ABSTRACT: Enterobacteria were isolated in the gut of the predacious multicolored Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis*, and their effects to the development of *H. axyridis* were examined. Populations of *H. axyridis* in this experiment were collected from Kimjae at Cheonbuk province (JK population), Geumsan at Chungnam province (CK population) and laboratory population at Laboratory of Insect Physiology in Chungnam National University, Daejeon. Thirty-four enterobacteria isolates were purified and isolated from the digestive tract of *H. axyridis*, and a total of 4 strains were classified into group by analysis of 16S rRNA gene sequences. About 70% of total isolates were phylogenetic groups of *Bacillus* genus and *Staphylococcus* genus, and they were commonly separated from the digestive tract of *H. axyridis*. After investigating their susceptibility against antibiotics with 18 representative enterobacteria isolates, ofloxacin and penicillin were selected for examination in this study of their ability to inhibit the growth of all of isolates. In order to remove the enterobacteria from the aphids, ofloxacin and penicillin were given to the green peach aphid, *Myzus persicae*, and the turnip aphid, *Lipaphis erysimi*. These aphids were provided to *H. axyridis* as prey. The weight of pupa, developmental periods of each larval instar, the number of eggs and their hatching ratio of *H. axyridis* with treatment aphids were lower compared with non-treatment aphids. *Staphylococcus saprophyticus* is a representative enterobacteria and commonly isolated from the digestive tract of *H. axyridis*. In the absence of *S. saprophyticus*, the developmental periods of each larval instar increased; however, the weights of pupa, the number of eggs, and their hatching ratio decreased.

Key words: *Harmonia axyridis*, Enterobacteria, *Staphylococcus saprophyticus*, antibiotic

초 록: 포식성 곤충인 무당벌레(*Harmonia axyridis*)의 소화기관 내에 서식하고 있는 장내세균을 순수 분리하여 계통학적 특성을 밝히고 이들 장내세균이 무당벌레의 발육에 미치는 영향을 검토하였다. 시험곤충은 전북 김제(JK), 충남 금산(CK) 그리고 충남대학교 곤충생리실험실(CI)의 무당벌레 개체군을 사용하였다. 무당벌레의 소화기관에서 장내세균 34군주를 순수분리하고 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 총 4개의 계통군으로 분류하였다. 무당벌레 소화기관에서 분리된 전체 분리군주의 약 70%가 *Bacillus*속과 *Staphylococcus*속을 포함하는 계통군이었으며, 시험 무당벌레 소화기관으로부터 공통적으로 분리되는 특징을 보였다. 분리된 장내세균 중 대표세균 18군주를 대상으로 항생제에 대한 감수성 조사를 수행한 결과, ofloxacin과 penicillin이 장내세균의 모두에게 증식을 저해하는 항생제 내성을 나타내어 시험약제로 선택하였다. 무당벌레의 먹이인 복숭아혹진딧물(*Myzus persicae*)과 무테두리진딧물(*Lipaphis erysimi*)에 ofloxacin 과 penicillin을 직접 처리하여 무당벌레를 사육하면서 번데기무게, 유충기간, 성충의 산란력, 부화율 등 생리적 특성을 항생제 무처리구와 비교한 결과 낮게 나타났다. 각 무당벌레 소화기관으로부터 공통적으로 분리된 대표 장내세균 *Staphylococcus saprophyticus*가 무당벌레의 발육에 미치는 영향을 조사한 결과 *S. saprophyticus*의 부재 시 유충기간이 길어졌으며 번데기의 무게 그리고 성충의 산란력은 감소하였다.

검색어: 무당벌레, 장내세균, *Staphylococcus saprophyticus*, 항생물질

*Corresponding author: ymyu@cnu.ac.kr

Received June 8 2011; Revised June 20 2011;

Accepted June 24 2011

곤충들 사이의 생태학적 역할에 있어서 공생미생물은 대부분 곤충 그룹에서 나타나며 상호간 필수적인 역할을 한다

(Baumann, 2005). 곤충들은 공생미생물의 기주가 되는 서식처를 제공하면서 서로 공생적인 역할관계가 일반적인 미생물군집들과 다르게 현저한 차이를 보이는 것이 특징이다. 따라서 공생 관계는 절대적 이익관계에서부터 해로운 기생적 관계까지 여러 다양성을 가지고 나타나는 것으로 보고되고 있다 (Buchner, 1965; Moran, 2006). 곤충들은 장내에서나 표면에서 많은 다른 미생물들과 서로 다양한 방법으로 공존하면서 생활하고 있는데(Steinhaus, 1960; Buchner, 1965; Walker *et al.*, 1999), 넓은 범위에서 공생관계가 있는가 하면 기주의 생리에 아주 밀접하면서 필수적인 관계만을 나타내는 것도 있다. 공생자들은 대부분 곤충의 소화기관 부근에서 발견되어지고 이것은 성장과 발육에 필수적인 아미노산이나 비타민 등을 합성하는 것으로 밝혀지고 있다. 최근에 곤충 장내 공생자 DNA 복제에 유전적 요소로서 중요성을 가진다는 보고도 있다(Ishikawa, 1989).

일반적으로 곤충들은 절대적 또는 선택적 공생자를 갖게 되는데, 진딧물(Buchner, 1965; Baumann and Baumann, 1994; Munson *et al.*, 1991a), 바퀴벌레(Bracke *et al.*, 1979), 노린재(Prado *et al.*, 2006, 2009) 등의 곤충 장내 공생세균에 대한 연구가 가장 활발히 진행되어 왔으며 진딧물과 *Buchnera spp.* 가 대표적인 예로 보고되었다. 이 균은 진딧물의 절대기생균으로 중장외의 기주 밖에서는 절대로 살 수 없고 기주에 영양을 공급하면서 어미에서 새끼로 전달되고 있다(Munson *et al.*, 1991b; Moran *et al.*, 1993). 따라서 진딧물의 먹이에 tetracycline을 처리하여 *Buchnera*균의 성장을 억제하고 제거하였을 때 기주의 생장이 느리고 자손을 생산하지 못하는 것을 보여 주었다(Mittler, 1971). 이러한 현상을 선택적으로 가지는 공생자로 γ -proteobacteria의 PASS, PABS와 α -proteobacteria의 PAR와 *Spiroplasma* 종이 알려져 있다(Chen *et al.*, 1996; Chen and Purcell, 1997; Fukatsu *et al.*, 2000, 2001; Darby *et al.*, 2001; Sandstrom *et al.*, 2001).

주로 해충을 먹으며 포식성 곤충으로 알려진 무당벌레(*Harmonia axyridis*)는 딱정벌레 목(Coleoptera) 무당벌레과(Coccinellidae)에 속하는 곤충으로, 한국, 중국, 대만, 일본, 사할린 및 극동시베리아를 비롯한 아시아 대륙과 일부 유럽지역에까지 널리 분포하고 있는 종이다(Park, 1993). 무당벌레과의 65% 이상은 진딧물을 포식하는 것으로 알려져 있으며 이에 속하는 무당벌레는 진딧물의 주요 천적일 뿐만 아니라 총채벌레, 배추좀나방의 유충, 깍지벌레, 온실가루이 등을 포함한 여러 미소곤충을 포식하는 익충으로 생물적 방제에 활용되고 있다(Hagen, 1962). 포식성 무당벌레는 먹이의 영양성분 특히 단백질의 종류와 조성에 따라 생리적 특성에 심한 차이를 보인다(Okada and Matsuka, 1973; Hukusima and Takeda, 1975; Matsuka and

Okada, 1975). 또한 먹이의 양분조성에 따라 장내에서 분비되는 효소의 종류와 양도 다른 것으로 알려져 있다(Applebaum, 1985; Chapman, 1985; Christopher and Mathavan, 1985).

본 연구에서는 포식성 곤충인 무당벌레의 장내에 존재하고 있는 세균의 분리 및 동정 하여 여러 종류의 장내미생물 중에서 모든 무당벌레에 선택적으로 공생하는 *Staphylococcus spp.* 세균이 무당벌레의 생리, 생물 특성에 미치는 영향을 검토하였다.

재료 및 방법

시험곤충

시험 곤충으로 사용 된 무당벌레(*H. axyridis*)는 2008년 전북 김제(JK), 충남 금산(CK)에서 채집한 개체를 그리고 충남대학교 곤충생리실험실(CI)에서 2년 동안 사육하고 있는 개체균을 본 실험에 사용하였다. JK와 CK에서 채집한 개체균은 장내세균을 분리 및 동정을 하기 위해서만 사용하였다. 한편, CI 개체균은 장내세균을 분리뿐만 아니라 공생세균과의 관계를 실험하기 위하여 사용하였다. 무당벌레는 온도 25±2°C, 광조건 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건에서 누대 사육하여 실험에 사용하였다. 시험에 사용한 유충은 성충에서 받은 알을 부화시켜 1령 시기에 각각 1마리씩 Insect dish(100 × 40 mm diameter, SPL Life science, naechon-myeon Pocheon-city Gyeonggi-do, Korea)에 개체 사육하였고 각각 먹이인 복숭아혹진딧물과 무테두리진딧물은 1종씩만 먹이로 공급하였다. 복숭아혹진딧물(*M. persicae*)과 무테두리진딧물(*L. eryimi*)은 유리온실 및 비닐하우스에서 재배한 무를 먹이로 공급하여 무당벌레와 같은 조건으로 사육하여 무당벌레의 먹이로 공급하였다.

소화기관 분리

지역 무당벌레 성충 3마리의 소화기관을 Heo등(2006)이 사용한 방법을 일부 수정한 방법으로 분리하였다. 각각의 개체균은 -20°C에 5분간 넣어 기절시킨 후 날개를 제거한 후 표면소독을 실시하였다. 표면소독은 1% NaClO₃에 1분간, 그리고 70% (w/w)에탄올에 1분간 침지한 후 충체에 묻어있는 에탄올을 제거하기 위하여 멸균한 insect saline 용액(9.32 g NaCl, 0.77 g KCl, 0.5 g CaCl₂, 0.18g NaHCO₃, 0.01g NaH₂PO₄/ 1L, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세척 후 insect saline 용액이 채워진 파라핀에 올려 핀으로 고정하여 해부현미경 하에서 무당벌레의 장을 분리하였다. 분리된 장은 insect saline 용액 200 μ l가 채워진 2ml eppendorf tube(Axyzen, Central Avenue Union City, USA)

에 3마리의 증상을 넣어 분쇄 하였다. 무당벌레의 유충에 존재하는 세균을 분리하기 위하여 1령, 2령, 3령, 4령 유충의 1마리씩을 위와 같은 방법으로 표면소독을 한 후 충체를 saline solution 200 μ l 가 채워진 2 ml eppendorf tube에 넣어 분쇄 하였다.

장내세균의 분리 및 계통해석

하나의 개체군으로부터 3마리의 곤충의 소화기관을 떼내어 함께 모아 멸균수에 마쇄하고 1/10 NA배지(Difco™ Nutrient Agar), skim-milk 배지(Difco™ Skim milk, Difco™ Agar), CMC배지(Congo red, Difco™ Agar), CMA배지(Chitin power, Difco™ Agar) 등 4종류의 배지에 배양하여 콜로니를 형성하는 균을 순수 분리하였다. 순수 배양된 단일 콜로니를 주형으로 사용하여 PCR 증폭을 하였다. *Escherichia coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGC TCAG-3') primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 이용하였다. PCR은 27 F primer, 1 μ l; 1492 R primer, 1 μ l; EF-Taq polymerase (Solgent, Korea), 0.25 μ l; dNTP, 1 μ l; 10 \times buffer, 5 μ l; band doctor, 5 μ l; H₂O, 36.75 μ l를 0.2 ml PCR tube에 넣고 잘 혼합한 후 94 $^{\circ}$ C 에서 5분간 반응한 다음 94 $^{\circ}$ C 에서 denaturation 1분, 53 $^{\circ}$ C 에서 annealing 1분, 72 $^{\circ}$ C 에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72 $^{\circ}$ C 에서 10분간 final extension의 조건으로 PCR (GeneAMPR PCR System 9700, Applied Biosystems) 반응을 실시하였다. PCR 산물은 전기영동(Mupid-21, Gel documentation system, Bio-Rad)하여 증폭 여부를 확인하였다. 정제된 PCR산물을 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 1.3 μ l, T7 primer 1 μ l, 16S rDNA sample 1 μ l (100ng), 2 \times buffer 3.4 μ l에 멸균 증류수 13.3 μ l를 잘 혼합한 후 cycle sequencing 실시하였다. PCR 산물은 100% ethanol 50 μ l와 3M sodium acetate (pH 5.2) 2 μ l를 첨가한 후 22,040 \times g에서 25분간 침전시키고, 250 μ l의 70% ethanol로 세척하여 건조시킨 후 HiDi Formamide 20 μ l를 첨가하여 95 $^{\circ}$ C 에서 2분 동안 denaturation 한 후 얼음위에서 냉각시키고 ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열의 homology는 DDBJ/ NCBI/GenBank database의 BLAST program을 이용하여 비교하였다.

항생제 처리에 의한 감수성 조사

각각의 배지에서 증식한 콜로니를 멸균된 증류수 10 ml에 넣

고 vortexing하여 일반 NA배지와 항생제가 첨가된 NA배지에 도말 배양하여 억제 정도를 조사하였다. 항생제는 penicillin, quinolone, tetracycline, aminoglycoside 계열에 속하는 각각의 항생제인 penicillin(Sigma, USA), ofloxacin(Sigma, USA), tetracycline(Sigma, USA), streptomycin(Sigma, USA)을 최종 농도가 0.01%가 되도록 배지를 만들어 사용하였다. 배양 결과 penicillin과 ofloxacin이 함유된 배지에서는 분리된 균들이 전부 억제되어 이 항생제들을 선발하였고 온도 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, 광주조건 16L:8D, 상대습도 50~60%의 조건에서 0.1%로 희석한 penicillin액과 ofloxacin액을 분무기를 이용하여 복숭아혹진딧물과 무테두리진딧물에 직접처리 하여 표면으로부터 잡균의 오염을 막아 먹이로 공급하였다.

Staphylococcus spp. 균주가 무당벌레의 발육조사

Staphylococcus spp. 균주와 무당벌레의 공생관계를 조사하기 위하여 복숭아혹진딧물과 무테두리진딧물을 먹이로 무당벌레를 사육하면서 발육기간, 번데기의 무게, 산란율, 부화율 등의 생리적인 특성에 대한 영향을 검토하였다. 무당벌레의 먹이에 ofloxacin항생제를 적정량을 처리한 진딧물 시험구와 무당벌레 유충에서 분리된 *S. saprophyticus*를 2 \times 10⁶ cfu/ml의 농도로 처리한 진딧물 시험구 그리고 무처리군으로 진딧물만을 공급한 개체군 시험구 등 3종류를 조사하였다. 각각의 개체군을 사육하여 얻은 데이터의 통계분석을 위하여 PASW Statistics 17 프로그램의 일원배치분산으로 분석하였다.

결과 및 고찰

무당벌레 장내세균의 분리 및 계통학적 특성

곤충과 미생물과의 관계에 대한 연구는 곤충 병원성균에 의해 발병되는 누에나 벌 등 유용곤충의 보호에 관련되어 시작되었다. 더불어 *Wolbachia*와 *Buchnera*와 같은 장내 미생물과의 상호관계에 대한 연구를 시작으로 곤충 장내 미생물군과 곤충과의 공생관계, 상리공생관계, 편리공생관계, 기생관계 등 곤충과 소화기관 내 장내미생물의 미생물생태학적 연구가 활발히 진행되고 있다(Werren, 1997; Douglas, 1998; Dillon and Dillon, 2004).

본 연구에서는 각 무당벌레 소화기관 시료를 희석평판법에 의거하여 배양한 결과 총 34균주를 순수분리 하였다. 무당벌레 소화기관으로부터 분리된 장내세균 총 34균주를 대상으로 16S

rRNA 유전자 염기서열을 결정하고 PCA(Principal Component Analysis) 분석을 통하여 계통학적 다양성을 검토한 결과, Firmicutes, Proteobacteria, Actinobacteria 그리고 Deinococcus-Thermus의 총 4개 계통군으로 분류되었다. Firmicutes 계통군에는 24군주, Actinobacteria 계통군에는 4군주, 그리고 Proteobacteria 계통군에는 5군주가 분포하고 있는 것으로 확인 보고되었다 (Kim *et al.*, 2011).

각 무당벌레 소화기관 별 장내세균의 계통학적 특성을 검토한 결과, 실험실 4령 유충(CI)에서는 *Staphylococcus* spp. 계의 4종과 *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, *Deinococcus radiodurans* 및 *Brevundimonas vesicularis*가 분리되었고, 충남 금산지역에서 분리된 무당벌레(CK)에서는 *Staphy-*

lococcus spp. 계의 2종과 *Bacillus thuringiensis*, *Enhydrobacter aerosaccus*, *Micrococcus luteus*, *Methylobacterium aquaticum*, 및 *Rhodocista peckingensis*가 분리되었다. 전북 김제지역에서 분리된 무당벌레(JK)에서는 *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis*와 *Bacillus thuringiensis*, *Kocuria palustris* 및 *Arthrobacter oxydans*가 분리되었다. 이상의 결과로부터 무당벌레 소화기관 내에서에서는 *Staphylococcus* spp. 계의 군주와 *Bacillus thuringiensis*가 공통적으로 분리되는 특징을 보였다(Table 1).

무당벌레 유충의 증장에 외래 세균이 언제 유입되는지를 조사하기 위해 무당벌레 성충의 먹이로 복숭아혹진딧물과 무테두리진딧물을 조사하였다. 진딧물을 실험실에서 누대 사육하여 얻은 알을 부화시켜 1령 유충의 증장을 다양한 배지에 접종하고

Table 1. Phylogenetic analysis of enterobacteria isolated from digestive organ of *H. axyridis*

Source	Strain No.	Identification of 16S rRNA	Similarity(%)
CI	SB1-2	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC29971 ^T	100
	CB1-2	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC29971 ^T	100
	CHB1-1	<i>Staphylococcus xylosus</i> ATCC29971 ^T	100
	SB2-1	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM20345 ^T	100
	CHB1-2	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM20345 ^T	100
	CB2-3	<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> DSM20345 ^T	99
	CB2-2	<i>Staphylococcus vitulinus</i> ATCC51698 ^T	98
	CHB1-4	<i>Staphylococcus warneri</i> L37603 ^T	100
	B1-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	100
	CB2-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	99
	CHB1-3	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> DSM10 ^T	100
	SB1-1	<i>Deinococcus radiodurans</i> DSM20539 ^T	98
	CB1-1	<i>Brevundimonas vesicularis</i> ATCC11426 ^T	100
	CK	AJ2-2	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC14990 ^T
CAJ2-1		<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC14990 ^T	100
SAJ3-2		<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> ATCC29974 ^T	100
SAJ1-1		<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	99.4
SAJ2-2		<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	99
CAJ1-6		<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	100
SAJ2-1		<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> ATCC27094 ^T	97.3
SAJ2-3		<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> ATCC27094 ^T	98
AJ1-1		<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698 ^T	100
SAJ3-1		<i>Micrococcus luteus</i> ATCC4698 ^T	99
CAJ1-2		<i>Methylobacterium aquaticum</i> GR16 ^T	98
CAJ2-2		<i>Rhodocista pekingensis</i> 3-p ^T	93.1
JK	CHA3-1	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> L37601 ^T	100
	CHA3-2	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> L37601 ^T	98.9
	AK3-2	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	99
	SAK2-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	100
	SAK3-2	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	99
	CHA1-1	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	100
	CHA1-2	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC10792 ^T	100
	AK3-1	<i>Kocuria palustris</i> DSM11925 ^T	100
SAK3-1	<i>Arthrobacter oxydans</i> DSM20119 ^T	100	

배양하면서 장내세균을 검출하고자 하였으나 어느 배지상에서도 세균은 발견되지 않았다. 이러한 현상은 성충이 진딧물을 전체를 포획하여 먹는 것과는 다르게 무당벌레 어린유충은 진딧물에서 조금씩 흡즙하기 때문인 것으로 사료되었다. 그러나 2령의 복숭아혹진딧물 유충에서는 1개의 세균 콜로니가 형성되었다. 2령 유충에서 순수 분리한 세균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 *Staphylococcus saprophyticus*로 동정되었다.

지금까지 많은 연구자들은 곤충의 장내에 서식하는 여러 종류의 세균을 보고하였다(Buchner, 1965; Werren and O'Neill, 1977; Mrazek *et al.*, 2008). 바퀴벌레의 후장에서 다양한 균이 발견되었으며(Bracke *et al.*, 1979), 진딧물(Tsuchida *et al.*, 2002), 노린재(Prado and Almeida, 2009), 딱정벌레(Schloss *et al.*, 2006) 등의 장내에서도 많은 균들이 분리되었다고 보고되었다. 본 연구에서 무당벌레 소화기관으로부터 분리된 장내세균도 계통학적으로 매우 다양한 세균이 밝혀졌다.

항생제에 대한 무당벌레 장내세균의 감수성

무당벌레 증장에 존재하는 장내세균이 기주에 미치는 영향을 평가하기 위하여 선행연구로 항생제에 대한 무당벌레 장내세균의 감수성에 대하여 조사하였다. Mittler(1971)는 chlorte-

tracycline 계열의 auromycin을 사용하여 진딧물의 절대적 공생세균을 억제시키고 진딧물의 생리적 특성변화를 조사하였으며, Koga 등(2003)은 절대적 공생세균의 부재하에 선택적 공생세균이 미치는 영향을 조사하기 위하여 그람양성균에 강력한 항균력을 나타내는 penicillin 계열의 ampicillin과 ansamycin 계열의 rifampicin을 사용하여 실험을 수행한바있다. 또한 chlortetracycline, doxycycline, kanamycin 등의 항생제가 진딧물에 사용되었다(Wilkinson, 1998). 본 연구에서는 세균의 세포벽 생합성을 저해하며 대부분의 그람양성균에 억제 효과를 나타내는 penicillin과 세균의 DNA합성을 저해하는 ofloxacin, 세균의 단백질 합성을 저해하는 효과를 가지고 그람음성 장내세균에 항균력을 나타내는 aminoglycoside 계열의 streptomycin 및 tetracycline을 이용하였다.

무당벌레 소화기관으로부터 분리된 34개의 장내세균 중 각 계통군을 대표하는 균주 18균주를 대상으로 penicillin, ofloxacin, streptomycin 그리고 tetracycline을 최종농도가 0.01%로 첨가한 NA항생배지에서 배양한 결과 streptomycin이 함유된 배지에서는 *Arthrobacter oxydans*, *Enhydrobacter aerosaccus*, *Kocuria palustris*, *Methylobacterium aquaticum*, *Rhodocista pekingensis*, *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis*, *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri* 및 *Staphylococcus vitulinus*가 streptomycin 내성

Table 2. Comparison of colony formation by 4 antibiotics to enterobacteria from digestive organ of *H. axyridis*

Strains	Penicillin	Ofloxacin	Streptomycin	Tetracycline	NA
<i>Arthrobacter oxydans</i> SAK3-1	-	-	+	-	+++
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> CHB1-3	-	-	-	-	+++
<i>Bacillus thuringiensis</i> B1-1	-	-	-	-	+++
<i>Brevundimonas vesicularis</i> CB1-1	-	-	-	-	+++
<i>Deinococcus radiodurans</i> SB1-1	-	-	-	-	+++
<i>Enhydrobacter aerosaccus</i> SAJ2-1	-	-	+++	-	+++
<i>Kocuria palustris</i> AK3-1	-	-	+++	-	+++
<i>Methylobacterium aquaticum</i> CAJ1-2	-	-	+	-	+++
<i>Micrococcus luteus</i> AJ1-1	-	-	-	-	+++
<i>Rhodocista pekingensis</i> CAJ2-2	-	-	+++	-	+++
<i>Staphylococcus cohnii</i> subsp. <i>cohnii</i> SAJ3-2	-	-	-	-	+++
<i>Staphylococcus epidermidis</i> AJ2-2	-	-	-	-	+++
<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> CHA3-1	-	-	+	-	+++
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-	+++
<i>Staphylococcus sciuri</i> subsp. <i>sciuri</i> SB2-1	-	-	+	+	+++
<i>Staphylococcus vitulinus</i> CB2-2	-	-	+++	-	+++
<i>Staphylococcus xylosus</i> SB1-2	-	-	-	-	+++
<i>Staphylococcus warneri</i> CHB1-4	-	-	-	-	+++

-: no colony,
 +: 1~10 colonies,
 ++: 11~100 colonies,
 +++: over 100 colonies/NAmedia

균으로 나타났으며, tetracyclin이 함유된 배지에는 *Staphylococcus sciuri* subsp. *sciuri* 가 tetracyclin 내성균으로 나타났다. 한편, penicillin과 ofloxacin이 함유된 배지에서는 시험된 어떤 장내세균도 콜로니를 형성하지 못하였고 모두 감수성 균으로 나타났다(Table 2). 이상의 결과로부터 무당벌레 장내세균이 기주에 미치는 생리적인 특성을 조사하기 위한 항생제로 penicillin과 ofloxacin을 최종 선발하였다.

항생제 처리된 진딧물이 무당벌레 발육에 미치는 영향

장내세균이 기주곤충에 미치는 영향을 조사하기 위하여 많은 연구들이 수행되어 왔다. 기주곤충으로부터 장내공생세균을 제거하기 위하여 몇 가지 항생제들을 사용하거나 다른 방법으로 제거한 보고가 진딧물(Mittler, 1971; Wilkinson, 1998; Koga *et al.*, 2003; Jim and Peter, 2007), 바퀴(Bracke *et al.*, 1979), 노린재(Prado *et al.*, 2006) 그리고 콩나방 일종(Visotto *et al.*, 2009) 등에서 보고되었다. 주로 식식성이거나 잡식성인 곤충에서 확인되었다. 이러한 장내세균은 기주 곤충의 발육이나 산란 등의 생리적 특성에 긍정적인 영향을 나타내는 것으로 밝혀졌는데, 대부분의 곤충에서 항생제 처리로 인한 장내세균이 없을 경우에 일반적으로 곤충의 발육기간이나 사충율 등이 증가하고 산란은 감소하는 경향을 보이며 생물학적 특성에 있어 부정적인 영향을 나타내었다. 하지만, 이들 장내세균이 기주곤충, 특히 포식성곤충의 생물학적 특성에 어떠한 기작을 통해 영향을 미치지에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

본 연구에서는 주로 진딧물을 먹이로 하는 포식성 곤충인 무당벌레에 서식하는 장내세균과 이들이 기주곤충에 미치는 영향을 조사하였다. 무당벌레 상에서 분리한 18개의 장내세균을 전부 억제하는 것으로 나타난 penicillin과 ofloxacin을 무당벌레의 먹이인 진딧물에 살포하고 이를 먹이로 제공하여 무당벌레 각 령기별 발육기간, 번데기의 무게, 첫 산란일, 난피의 평균 알

수 및 부화율을 조사하였다. 발육기간과 번데기 무게는 무당벌레의 암컷과 수컷이 생리적인 특성에서 차이를 보이기 때문에 수컷과 암컷을 나누어 비교 분석 하였다. 무처리구의 수컷은 번데기 무게가 35.3 ± 3.0 mg으로 조사되었고 ofloxacin과 penicillin 처리구는 각각 33.2 ± 1.6 mg, 31.0 ± 1.8 mg으로 나타났으며 암컷의 경우 무처리구 42.9 ± 3.8 mg에 비교하면 ofloxacin, penicillin 처리구는 각각 36.8 ± 1.5 mg, 34.3 ± 1.4 mg을 나타내며 항생제 처리에 의해 암수 모두의 번데기 무게가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다(Table 3). 이러한 결과는 진딧물과 콩나방류 등에서 연구된 것과 비슷한 경향을 보여줬다(Visotto *et al.*, 2009). 또한, 유충기간에 있어서도 암컷 무처리구는 10.5 ± 1.0 일로 나타났으나 ofloxacin, penicillin 처리구는 각각 11.3 ± 0.4 일, 11.2 ± 0.5 일로 유충의 발육에 있어 항생제 처리구의 개체들이 다소 시간이 소요되는 것이 확인되었다. 하지만 수컷은 유충기간 조사결과 무처리구와 항생제 처리구간에 수치상으로는 차이가 있었지만 통계분석결과 유의성을 보이지는 않았다(Table 3). 무당벌레 암컷 한 마리당 평균 첫 산란개시일과 산란개시일로부터 15일 동안의 총 산란수를 조사하여 장내세균 부재에 의한 산란력을 조사하였다. 첫 산란개시일은 무처리구는 4.2 ± 0.8 일이며 ofloxacin, penicillin 처리구는 각각 6.6 ± 0.9 일, 5.4 ± 2.2 일로 항생제 처리구가 산란을 개시하는데 약간 오래 걸리는 것으로 나타났다(Table 4). 또한 난피당 평균 알 수는 무처리구는 32.3 ± 16.7 개인데 반하여 ofloxacin, penicillin 처리구는 각각 12.4 ± 9.8 개, 16.9 ± 12.0 개로 항생제 처리에 의해 산란력에 있어 현저한 감소가 나타난 것이 확인되었다. 이와 더불어 부화율에서도 무처리구는 $78.0 \pm 19.7\%$, ofloxacin, penicillin 처리구는 각각 $27.8 \pm 20.3\%$, $21.8 \pm 12.9\%$ 로 항생제 처리에 의해 산란수와 부화율 모두 현저한 감소가 나타났다. 이러한 결과에서 볼 때 무당벌레의 장내에 서식하는 세균의 존재여부에 따라서 기주곤충의 발육이나 생식능력에 있어 차이를 나타냄이 확인되었으며, 특히나 항생제 처리에 의한 장내세균의 부재시 기주곤충의 발육지연, 사망률 증가, 산란개시

Table 3. Effects of antibiotics on development of *H. axyridis*

	Ofloxacin	Penicillin	Control	P
Male				
Weight of pupae (mg)	33.2 ± 1.6 a	31.0 ± 1.8 a	35.3 ± 3.0 b	0.001**
Larval stage (day)	11.3 ± 0.4 ab	11.4 ± 0.8 b	10.8 ± 0.6 a	0.119*
Female				
Weight of pupae (mg)	36.8 ± 1.5 a	34.3 ± 1.4 a	42.9 ± 3.8 b	0.000**
Larval stage (day)	11.3 ± 0.4 b	11.2 ± 0.5 b	10.5 ± 1.0 a	0.019**

*P>0.05 not significantly

**P<0.05

Table 4. Effects of antibiotics on fecundity and hatch of *H. axyridis*

	Ofloxacin	Penicillin	Control	P
1st day of reproduction	6.6±0.9 a	5.4±2.2 ab	4.2±0.8 b	0.013*
Average number of egg per cluster	12.4±9.8 a	16.9±12.0 a	32.3±16.7 b	0.000*
Hatching rate (%)	27.8±20.3 a	21.8±12.9 a	78.0±19.7 b	0.001*

*P<0.05

Table 5. Effects of antibiotics and *Staphylococcus saprophyticus* on development of *H. axyridis*

	Ofloxacin	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Control	P
Male				
Weight of pupae (mg)	32.0±3.9 a	36.4±1.8 b	36.0±1.4 b	0.003**
Larval stage (day)	8.9±0.5 a	8.6±0.4 a	8.7±0.2 a	0.205*
Female				
Weight of pupae (mg)	38.3±3.0 b	42.5±2.6 a	40.6±2.3 a	0.004**
Larval stage (day)	9.4±0.7 b	8.6±0.3 a	8.5±0.4 a	0.035**

**P<0.05

*P>0.05 not significantly

일 지연 및 산란수와 부화율의 감소와 같은 부정적인 결과가 확인되어 이와 관련된 정확한 장내세균의 동정 및 이들의 기작에 관한 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

장내세균 *Staphylococcus saprophyticus*가 무당벌레의 발육 및 생식에 미치는 영향

기주곤충인 무당벌레의 다양한 장내세균이 유입되는 경로, 장내 세균의 생존 이유와 역할에 대하여 조사하였다. 실험실에서 진딧물을 먹이로 누대사육중인 2명의 무당벌레 유충의 장내에서 분리한 *S. saprophyticus* 균주가 기주곤충과의 어떠한 관련이 있는지를 조사하였다. 따라서 장내세균을 모두 죽일 수 있는 ofloxacin과 penicillin의 항생제를 진딧물에 처리하여 무당벌레에 먹이로 공급하였다. 무당벌레 유충의 장내에서 분리한 *S. saprophyticus* 균주는 진딧물에서 유래되는 것으로 확인되었다. 본 실험에서도 다른 곤충에서 연구된 결과와 유사한 경향으로 무당벌레의 발육기간, 번데기의 무게, 산란율 등의 생리적인 특성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이러한 결과가 장내세균의 부재로 인한 결과인지를 판단하기 위하여 특정한 장내세균을 선별하여 실험을 수행하였다. 진딧물과 장내세균과의 이미 보고된 연구에서도 특정 장내세균을 접종하여 진딧물의 생리적인 특성에 대한 연구가 보고된바있다 (Koga *et al.*, 2003). 본 실험에서는 공통적으로 존재하는 균을 선별하기 위해 분리된 18 균주를 조사한 결과 서로 다른 지역에서 채집한 개체군임에도 불구하고 세 개체군 모두에서 *Staphylococcus spp.*을 포함하고

있는 것이 확인되었다. 또한 무당벌레 2명 유충에서도 *Staphylococcus spp.* 균주로서 분리된 *S. saprophyticus*가 확인됨에 따라, 이 균주를 실험균주로 선별하여 균주의 존재여부에 따른 기주곤충의 발육특성 및 생식특성에 미치는 영향을 조사하였다. 대상균주의 부재로 인한 특성을 확인하기 위해 항생제처리구는 ofloxacin을 처리하여 수행하였다.

장내세균의 영향을 평가하기 위하여 대조구로서 정상적인 진딧물을 먹인 수컷 무당벌레와 진딧물에 *S. saprophyticus* 균주를 처리하여 먹인 시험구의 번데기 무게는 각각 36.0±1.4 mg, 36.4±1.8 mg으로 나타났다. 반면에 먹이인 진딧물에 항생제를 처리하여 장내세균인 *S. saprophyticus*를 제거한 시험구의 번데기 무게는 32.0±3.9 mg로 나타나 장내세균의 부재에 의해 번데기 무게가 다소 감소하는 경향을 역시 확인할 수 있었다. 암컷의 경우에도 무처리구와 세균처리구는 각각 40.6±2.3 mg, 42.5±2.6 mg이었으며, 항생제 처리구는 38.3±3.0 mg으로 나타났다. 이러한 결과는 시험된 세균이 존재하는 개체들이 정상개체와 동일한 번데기 무게를 나타내며 정상적으로 발육한 것이 확인되었다 (Table 5). 암컷의 발육기간 또한 무처리구와 세균처리구가 각각 8.5±0.4일, 8.6±0.3일로 나타났으며, 항생제 처리구가 9.4±0.7일로 무처리구와 세균처리구가 같은 분류군으로 분류되어 항생제 처리구와 유의성을 나타내었다. 하지만 수컷의 발육기간은 앞서 실험한 결과에서와 마찬가지로 처리구와 큰 차이를 나타내지 않았다 (Table 5).

다음은 무처리구, 시험균주 처리구와 항생제 처리구의 번데기를 우화시킨 다음 교미를 시켜 난괴의 평균 알 수와 부화율을

Table 6. Effects of antibiotics and *Staphylococcus saprophyticus* on fecundity and hatch of *H. axyridis*

	Ofloxacin	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Control	P
Average number of egg per cluster	18.5±24.0 a	29.7±26.8 ab	40.9±30.1b	0.002*
Hatching rate (%)	36.6±34.9 a	53.7±33.0 a	74.3±20.0b	0.000*

*P<0.05

조사하였다. 조사 결과 난괴의 평균 알 수는 무처리구에서는 40.9±30.1로 나타났으며 항생제처리구에서는 18.5±24.0 로 많은 차이를 나타냈다(Table 6). 반면에 부화율은 무처리구에서는 74.3±20.0로 나타났으며 항생제 처리구와 장내세균 처리구에서는 각각 53.7±33.0, 36.6±34.9로 비교적 낮게 나타났다.

이러한 결과로 볼 때, 본 실험에서 장내세균으로 선발한 *S. saprophyticus*는 무당벌레의 발육기간, 번데기무게, 산란수, 부화율과 같은 발육특성에 있어서는 긍정적인 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 물론 이전 항생제 처리한 개체들과의 비교실험에서는 장내세균의 부재가능성을 통해 기주곤충인 무당벌레의 발육특성이나 생식능력이 저하되는 현상을 확인할 수 있었다. 하지만 본 실험을 통해 선발된 장내세균인 *S. saprophyticus* 이 적절하게 선발되었는지의 여부는 추후 검토가 필요할 것이다. 또한 장내세균처리에 의해서도 검출되지 않은 기타 장내세균에 의한 가능성도 배제할 수 없을 것이다. 한편으로는 발육에 영향을 주었던 *Staphylococcus* spp. 같은 장내세균이 여러 기질을 분해할 수 있는 효소를 분비하여 소화에 긍정적인 영향을 미칠 수도 있을 것이다. 앞으로 이러한 장내세균과 기주곤충과의 상관관계 및 장내세균의 기주곤충에 미치는 영향의 정확한 기작 등을 판단하여, 이들을 이용한 생물적방제인자의 새로운 소재탐색의 가능성을 확인할 수 있기를 기대한다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립 농업과학원의 “해충방제용 미생물 살충제의 현장 활용 평가 기술 개발(PJ006634032011)”과제에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

Literature Cited

Applebaum, S.W. 1985. Biochemistry of digestion. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L.I.), 4: 279-311. Pergamon Press, New York.

Baumann, L. and P. Baumann. 1994. Growth kinetics of the endosymbionts *Buchnera aphidicola* in the aphid *Schizaphis graminum*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 3440-3443.

Baumann, P. 2005. Biology of bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insect. Annu. Rev. Microbiol. 59: 55-89.

Bracke, J.W., D.L. Cruden and A.J. Markovetz. 1979. Intestinal microbial flora of the American cockroach *Periplaneta americana* L. Appl. Environ. Microbiol. 38: 945-955.

Buchner, P. 1965. Endosymbionts of animals with plant microorganisms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.

Chapman, C.F. 1985. Coordination of digestion. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (Edited by Kerkut G. A. and Gilbert L.I.), 4: 213-240. Pergamon Press, New York.

Chen, C.C., B.C. Campbell and A.H. Purcell. 1996. A new *Rickettsia* from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). Curr. Microbiol. 33: 123-128.

Chen, D.Q. and A.H. Purcell. 1997. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. Curr. Microbiol. 34: 220-225.

Christopher, M.S.M. and S. Mathavan. 1985. Regulation of digestive enzyme activity in the larvae of *Catopsilia crocale* (Lepidoptera). J. Insect Physiol. 31(3): 217-221.

Darby, A.C., L.M. Birkle, S.L. Turner and A.E. Douglas. 2001. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. FEMS Microbiol. Ecol. 36: 43-50.

Dillon, R.J. and V.M. Dillon. 2004. The gut bacteria of insect : Nonpathogenic interaction. Annu. Rev. Entomol. 49: 71.

Douglas, A.E. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annu. Rev. of Entomol. 43: 17-38.

Fukatsu, T., N. Nikoh, R. Kawai and R. Koga. 2000. The secondary endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). Appl. Environ. Microbiol. 66: 2748-2758.

Fukatsu, T., T. Tsuchida, N. Nikoh and R. Koga. 2001. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon siphon pisum* (Insecta: Homoptera). Appl. Environ. Microbiol. 67: 1284-1291.

Hagen, K.S. 1962. Biology and ecology of predaceous Coccinellidae. Annu. Rev. Entomol. 7: 289-326.

Heo, S., J. Kwak, H.W. Oh, D.S. Park, K.S. Bae, D.H. Shin and H.Y. Park. 2006. Characterization of an extracellular xylanase in

- Paenibacillus* sp. HY-8 isolated from an herbivorous longicorn beetle. J. Microbiol. Biotechnol. 16: 1753-1759.
- Hukusima, S. and S. Takeda. 1975. Artificial diets for larvae of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), an insect predator of aphids and scale insect. Res. Bull. Agr. Gifu Univ. 38: 49-53.
- Ishikawa, H. 1989. Biochemical and molecular aspects of endosymbiosis in insect. Int. Rev. Cytol. 116: 1-45.
- Jim, H. and Peter, L. 2007. Antibiotic, primary symbionts and wing polyphenism in three aphid species. Insect Biochem. Mol. Biol. 37: 886-890.
- Kim, K.K., S.I. Han, C.W. Moon, Y.M. Yu, and K. S. Whang. 2011. Biodiversity and Isolation of Gut Microbes from Digestive Organs of *Harmonia axyridis*. Kor. J. Microbiol. 47(1): 66-73.
- Koga, R., T. Tsuchida and T. Fukatsu 2003. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. Proc. R. Soc. Lond. B 270: 2543-2550.
- Matsuka, M. and I. Okada. 1975. Nutritional studies of an aphidophagous coccinellid, *Harmonia axyridis* (I) Examination of artificial diets for the larval growth with special reference to drone honeybee powder. Bull. Fac. Arg. Tamagawa Univ. 15: 1-9.
- Mittler, T.E. 1971. Dietary amino acid requirement of the aphid *Myzus persicae* affected by antibiotic uptake. J. Nutr. 101: 1023-1028.
- Moran, N.A., M.A. Munson, P. Baumann and H. Ishikawa. 1993. Molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect host. Proc. R. Soc. Lond. B. 253: 167-171.
- Moran, N. A. 2006. Symbiosis. Curr. Biol. 16: R886-R871.
- Mrazek J., L. Strosova, K. Fliegerova, T. Kott and J. Kopecky. 2008. Diversity of insect intestinal microflora. Folia Microbiol. 53 (3): 229-233.
- Munson, M.A., P. Baumann and M.G. Kinsey. 1991a. *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of aphids. Int. J. Syst. Bacteriol. 41: 566-568.
- Munson, M.A., P. Baumann, M.A. Clark, N.A. Moran, D.J., Voegtlin and B.C. Campbell. 1991. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. J. Bacteriol. 173: 6321-6324.
- Okada, I. and M. Matsuka. 1973. Artificial rearing of *Harmonia axyridis* on pulverized drone honeybee brood. Environ. Ent. 21 (1): 301-302.
- Park, H.C. 1993. Systematics and ecology of Coccinellidae (Insecta: Coleoptera) in Korea. Ph. D. Thesis. Korea University.
- Prado, S.S., D. Rubinoff and R.P.P. Almeida. 2006. Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. Ann. Entomo. Soc. Am. 99: 577-585.
- Prado, S.S., M. Golden, A.F. Peter, P. D. Matthew and R.P.P. Almeida. 2009. Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). Environ. Entomol. 38 (1): 103-109.
- Prado, S.S. and R.P.P. Almeida. 2009. Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbiont. Curr. Microbiol. 58: 64-69.
- Sandstrom, J.P., J.A. Russell, J.P. White and N.A. Moran. 2001. Independent origin and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. Mol. Ecol. 10: 217-228.
- Schloss P.D., J. Handelsman and F.R. Kenneth. 2006. Bacteria associated with the guts of two wood-boring beetles: *Anoplophora glabripennis* and *Saperda vestita* (Cerambycidae). Environ. Entomol. 35(3): 625-629.
- Steinhaus, E.A. 1960. The important of environment factor in the insect microbe ecosystem. Bacteriol. Rev. 24: 365-373.
- Tsuchida T., R. Koga and T. Matsumoto. 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural population of pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. Mol. Ecol. 11: 2123-2135.
- Visotto, L.E., M.G.A. Oliveira, R.N.C. Guedes, A.O.B. Ribon and P.I.V. Good-God. 2009. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean carterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. J. Insect Physiol. 55: 185-191.
- Walker, A.J., D.M., Glen, and P.R. Shewry. 1999. Bacteria associate with the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* are not required for protein degestion. Soil Biol. Biochem. 31: 1387-1394.
- Werren, J.H. 1997. Biology of Wolbachia. Ann. Rev. of Entomol. 42: 587-609.
- Werren J.H. and S.L. O'Neill. 1977. The evolution of heritable symbionts. In Influence Passenger: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction (S.L. O'Neill, A.A. Hoffmann, and J.H. Werren, Eds.), pp. 1-41. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Wilkinson, T.L. 1998. The elimination of intracellular microorganisms from insects: an analysis of antibiotic-treatment in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*). Comp. Biochem. and Physiol. A. 119: 871-881.