

생물살충제를 위한 곤충병원성균 및 공생박테리아의 *in vitro* 배양

유연수 · 박선호
계명대학교 화학재료공학부
(접수 : 1999. 3. 5, 게재승인 : 1999. 5. 7.)

In Vitro Culture of Entomopathogenic Nematode with Its Symbiont for Biopesticide

Yeon Su Yu and Sun Ho Park†
School of Chemical Engineering & Materials Engineering, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea
(Received : 1999. 3. 5, Accepted : 1999. 5. 7.)

An *in vitro* culture method for entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* was developed. A symbiotic bacterium was isolated from *Steinernema glaseri* and identified as *Xenorhabdus nematophilus*. Phase variation that differed in some biochemical characteristics of symbiotic bacterium was observed. Entomopathogenic nematodes carried only phase I bacterium in their guts. Phase I bacterium could be converted into phase II form in *in vitro* culture medium consisting of 5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O. The optimum temperature for bacterial growth was 28°C. The pH of the culture medium increased up to 9.0-9.5 during the exponential growth period of the culture, regardless of initial pH 6-7. Various culture media such as chicken offal, dog food, bovine liver, peanut, and so on were tested for *in vitro* culture of the nematodes. The best medium for *Steinernema glaseri* production was obtained from concentrated homogenate of bovine liver and the nematode growth was highest at 80% bovine liver. In the co-culture of entomopathogenic nematode with its symbiont, the growth rate of nematodes was 2 times faster than that without its symbiont and the nematode concentration reached about 5.5x10⁴/mL within 15 days.

Key Words · *In vitro* culture, Entomopathogenic nematodes, *Steinernema glaseri*, Symbiotic bacterium, *Xenorhabdus nematophilus*, phase variation

서론

해충 방제를 위해 널리 사용되어온 화학 살충제는 내분비계 교란물질(환경호르몬)이 대부분이며, 이들의 과다사용으로 인해 환경과 생태계에 대한 피해가 점점 심각해지고 있다. 이를 해결하기 위한 방법으로 제시되고 있는 생물학적 방제법은 자연생태계에 존재하는 유용인자를 사용하기 때문에 환경에 대한 오염의 염려가 없으며, 사람이나 가축 또는 야생동물에 대한 부작용이 없고, 천적류에 대한 해충의 저항성 문제도 최소화 할 수 있는 장점이 있다. 특히 선충문(Nemata)중 측미선구강(Secocementea)의 원충목(Rhabditida)에 속하는 *Necaplectana*, *Steinernema*, 그리고 *Heterorhabdus*속 곤충병원성선충(entomopathogenic nematodes)이 현재 생물학적 살충제로서 활발히 연구되고 있는데, 그 이유는 해충에 대한 탐색능력과 치사율이 높을 뿐만 아니라 대량배양과 장기간 보관이 가능하고 기타 포유류 및 식물에는 매우 안전하기 때문이다(1-3).

곤충병원성선충은 장내에 공생박테리아를 보유하여 생물 살충

제로 살포 시 해충의 입, 항문, 기문 등을 통해 유충에 침입한 후 해충의 혈장(hemolymph)에 공생박테리아를 분비함으로써 24-48시간 내에 해충 숙주를 사멸시키는데(Figure 1) 그 효과가 매우 뛰어나고 해충의 활용범위가 매우 넓으며, 이때 분비된 공생박테리아는 독소를 생성하여 해충을 사멸시키고 선충 증식에 필요한 영양소를 공급하는 것으로 알려져 있다(4-5).

곤충병원성선충의 공생박테리아인 *Xenorhabdus* spp.는 Enterobacteriaceae류에 속하며 그람음성균으로 간균(rod-shape) 형태인데 혈장 내에서 유충 시체를 영양원으로 증식하여 life cycle의 정지상까지 성장하여 광역 항균 스펙트럼의 항생제를 포함한 몇가지 생성물을 분비하여 유충 사체 내에서의 다른 미생물의 증식을 억제하기도 한다(6). 또한 *Xenorhabdus*는 *in vitro* 배양 시 phase I에서 phase II의 상태로 변화될 수 있는데 이를 동질이형화(dimorphism)현상이라 부르지만 그 유전적 원인은 아직 밝혀지지 않고 있다. 다만 phase I은 동질이형인 phase II에 비해서 대사가 더 활발하며, *in vitro* 배지에서 phase II로 변화되는데 이로 인하여 감염단계선충(infective juvenile nematodes)의 증식률과 살충효과도 크게 감소시키는 것으로 알려져 있다(7).

곤충병원성선충의 대량배양을 위해서는 꿀벌부채명나방(*Gal-leria mellonella*)의 유충에 병원성이 강한 3-IJs 선충을 접종하여 유충 내부에서 증식시킨 후 수확하는 *in vivo* 배양 방법이

† Corresponding Author 1000 Shindang-dong, Dalseo-gu, Taegu 704-701, Korea
Tel · 053-580-5457, Fax · 053-633-4929
e-mail · park@kmucc.keimyung.ac.kr

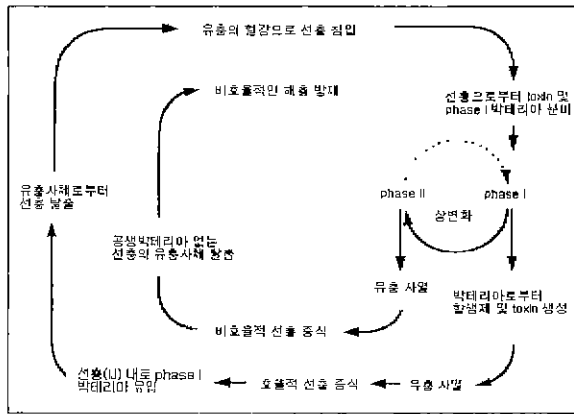


Figure 1 Life cycle of nematode-symbiotic bacteria complex.

국내에서도 확립되어 활용되고 있으나(8), 기주 해충의 지속적인 배양과 선충 증식 및 수확에 필요한 많은 시간과 노동력, 그리고 생산규모 증가에 따른 선충의 수확과 품질관리가 어려운 단점을 지니고 있기 때문에 *in vitro* 배양방법의 개발이 요구되고 있다. 국외의 경우 닭내장과 돼지긴을 혼합한 고체배지를 이용한 배양방법과 소 콩팥과 yeast추출물, 고기 찌꺼기, 간 추출물 등을 이용한 방법 등이 연구되었으나(9) 자세한 배양조건이나 장치 등에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 서식하고 있는 곤충병원성선충 중 *Steinernema glaseri*를 대상으로 *in vitro* 배양방법을 확립하기 위하여 선충과 공생관계에 있는 박테리아를 분리하였으며 이들의 해충에 대한 독성, 상변화특성 및 배양조건을 조사하였다. 또한 선충의 *in vitro* 배양을 위한 최적 배지조성과 분리된 공생박테리아와의 혼합배양 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

곤충병원성 선충으로부터 공생박테리아의 분리 및 동정

본 실험에 사용된 곤충병원성 선충인 *Steinernema glaseri* 종은 국내에서 분리된 것(10)으로 공생박테리아의 분리를 위하여 다음의 세가지 방법을 사용하였다. 첫째, 0.5% NaClO 용액에 10분간 침치시켜 표면살균된 선충을 YS 배지가 첨가된 튜브에 담아 vortexing하여 선충을 파괴시킨 후 28°C shaking incubator에서 48시간 배양한 후 배양액을 nutrient agar, macConkey agar, 그리고 nutrient agar bromothymol blue triphenyltetrazolium chloride (NBTA)에 plate out하여 콜로니를 분리하였다. 둘째, 꿀벌부채명나방 유충의 hemolymph액을 nutrient agar에 무균적으로 몇방울 떨어트린 다음 표면살균된 선충을 그 위에 미량 떨어트려 48시간 배양한 후 선충이 hemolymph액에 분비한 공생박테리아에 의해 생성된 콜로니를 분리하였다. 셋째, 선충을 꿀벌부채명나방 유충에 접종한지 48시간 후 유충 사체를 무균적으로 해부하여 사체 내부액을 plate out하여 콜로니를 분리하였다.

S. glaseri 선충으로부터 nutrient agar, macConkey agar, 그리고 NBTA를 이용하여 순수분리한 콜로니를 BUGM배지에서 2회 배양하여 순수한 콜로니를 생성하였다. 생성된 colony는 0.85% saline에 풀어서 현탁액을 만들고 탁도가 적정 범위에 오

도록 맞췄다. 적정량의 현탁액을 접종하고 24시간동안 배양한 microplate를 Biolog동정시스템에 입력하고 96개 탄소원 각각에 대한 산화능을 측정하였다. 또한 동정시스템에 내장된 566 종/속의 그람 음성균 자료를 이용하여 그 결과를 비교하였다(11-12).

공생박테리아의 최적 배지조성 및 배양조건의 확립

*Xenorhabdus nematophilus*를 NBTA 배지에서 3-5일간 성장한 colony를 250 mL flask에서 working volume 100 mL의 성장배지에 접종하여 shaking incubator에서 28°C, 200 rpm으로 배양하였으며 균체농도는 UV-VIS spectrophotometer (Smart 190DUV)를 사용하여 560 nm에서 증류수를 이용하여 50배 희석하여 O.D (optical density)를 측정하였다.

*Xenorhabdus nematophilus*의 성장배지중 yeast extract의 영향을 조사하기 위해서 0.5% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% NH₄H₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O를 기본배지로 yeast extract의 농도를 0, 0.5, 1, 3, 5, 7%로 증가시켜 배지를 조제하였다. 그다음 *Xenorhabdus nematophilus*를 접종하여 시간에 따른 O.D.와 pH의 변화를 조사하였다.

또한 *Xenorhabdus nematophilus*를 5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.05% NH₄H₂PO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O 배지조성 하에서 flask와 fermentor에서 각각 배양했을 때의 성장과 상변화를 비교하였다. Flask배양에서는 250 mL flask에서 working volume 100 mL로 28°C, 250 rpm 하에서 약 150시간 동안 진탕배양하였으며 fermentor배양에서는 7 L fermentor(KFC, Korea) 시스템에서 working volume을 5 L로 하여 온도 28±0.5°C, 1 L/min air flow rate, 600 rpm 하에서 약 60시간 동안 배양하였다. 이때, pH는 조절하지 않고 배양을 실시하였다. 균주가 flask와 fermentor에서 각각 배양할 경우 발생하는 상변화의 경도를 조사하기 위해서 배양액을 NBTA에 plate out하여 28°C에서 3-5일 배양한 후 콜로니의 색을 확인하였다. 이때 phae I은 BTB(bromothymol blue)를 흡수하여 푸른색 혹은 녹색인 반면, phase II는 붉은색을 보였다.

선충 배양을 위한 각종 인공배지원 조사

곤충병원성 선충의 *in vitro* 배양을 위한 최적 배지를 찾기 위해 bovine liver, chicken offal, dog food 등의 동물성 단백질원과 perilla, bean, peanut 등의 식물성 단백질을 각각 분쇄하여 80% 농축한 후 *S. glaseri*의 3-IJs(Infected juvenile)를 petri dish당 1,500 마리 정도 접종한 후 25°C incubator에서 배양하면서 성장차이를 조사하였다.

곤충병원성 선충의 배지원 중 bovine liver배지의 최적 농도를 찾기 위하여 멸균증류수 100 mL에 bovine liver 10, 20, 30, 40, 50 g씩 넣고 homogenize한 후 sponge 조각(20x 10x 5 mm)을 넣은 후 농축시켜 최종 bovine liver배지의 농도가 20, 40, 60, 80, 100%로 만들었다. Bovine liver가 농축된 sponge 조각을 Ø90 평균 petri dish에 4개씩 넣고 *S. glaseri*로부터 분리동정된 공생박테리아 *Xenorhabdus nematophilus*를 1 loop씩 0.9% NaCl이 1 mL씩 들어있는 E-tube에서 vortex하여 완전히 녹인 후 petri dish당 0.5 mL씩 접종하고 28°C에서 24시간 배양한 다음 3-IJs를 petri dish당 2,500 마리 정도로 접종한 후 25°C incubator에서 7일간 배양하여 증식을 조사하였다.

선충 및 공생박테리아의 혼합배양

근충병원성 선충 *S. glaseri*를 *in vitro* 배양할 때 공생박테리아가 선충 증식에 미치는 영향을 조사하기 위해 *S. glaseri* 선충으로부터 분리한 공생박테리아를 농축 sponge에 먼저 접종하여 배양한 후 3-IJs 선충을 접종한 경우와 공생박테리아를 접종하지 않고 선충을 접종하여 배양한 경우를 비교하였다. 이때 사용한 공생박테리아는 3일간 활성화시킨 후 petri dish당 0.5 mL 씩 접종하고 28°C에서 24시간 배양한 다음 3-IJs를 petri dish당 2,000 마리 정도로 접종한 후 25°C incubator에서 배양하여 선충 증식을 조사하였다.

결과 및 고찰

Steinernema glaseri 선충으로부터 공생박테리아를 분리하기 위한 세가지 방법에서 모두 동일한 균주가 분리되었다. 꿀벌부채명나방 유충에 선충을 접종하여 균주를 분리하는 방법에서는 여러 종의 유충 내 다른 균주도 발견되었으나(11), 이들을 각각 nutrient agar, macConkey agar, 그리고 NBTA에서 성장특성 차이를 이용하여 재분리하였다 또한 순수 분리된 균주를 YS 배양액에서 *in vitro* 배양해본 결과 동일 균주가 두가지 상태로 변화되는 동절이형화 현상(dimorphism)이 발견되었다. Table 1은 분리된 공생박테리아의 상변화(phase variation)된 phase I과 II 균주에 대해 여러 가지 특성들을 각각 비교해 본 결과이다. Colony색을 보면 phase I과 II 모두 nutrient agar에서는 연한 노란색인 반면, macConkey agar에서는 phase I은 적갈색이고 phase II는 분홍색이었다 또한 NBTA에서는 phase I은 푸른색 혹은 녹색을 보였으나 phase II는 붉은색을 보였다. 그러나 이들은 catalase, lecithinase, urease, phosphatase, 그리고 lipolysis 등의 생화학 실험에서는 동일한 결과를 보였으며, morphology 또한 동일하게 간균(rod)의 형태를 보였다. 특히 catalase에 대해 음성적인 특징을 보인 것은 일반적인 Enterobacteriaceae류와는 다른 결과를 보였다. 한편 분리된 균주 phase I과 II를 95개 탄소원을 이용하는 Biolog 동정시스템을 사용하여 내장된

566 종/속의 그람 음성균 database와 비교한 결과, phase I의 경우 유사도가 0.834로 그리고 phase II의 경우 유사도 0.822로 모두 *Xenorhabdus nematophilus* 종의 균주로 동정결과를 보였다(12)

Yeast extract와 같은 유기 질소원은 많은 경우에 무기 질소원보다 미생물의 증식과 효소의 생산에 유리한 것으로 알려져 있다(13-14). Figure 2는 yeast extract의 농도 증가에 따른 *Xenorhabdus nematophilus*의 성장과 pH 변화를 나타낸 것이다 Yeast extract의 농도는 5%까지 증가할 때까지는 최대세포 농도도 함께 증가하였지만 7% yeast extract 농도에서는 거의

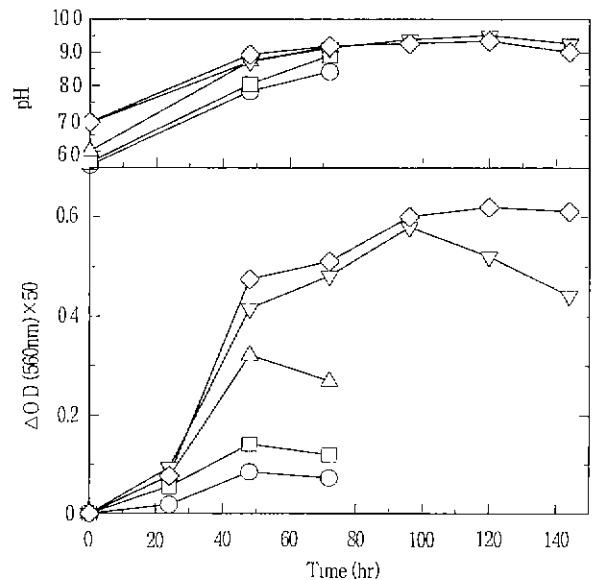


Figure 2. Profiles of pH and cell concentration of *Xenorhabdus nematophilus* varying yeast extract concentration : (○) 0.5%, (□) 1.0%, (△) 3.0%, (▽) 5.0%, (◇) 7.0%. Fermentations were carried out at 28°C for 150 hr in a 250 mL flask.

Table 1. Characteristics of symbiotic bacteria isolated from *Steinernema glaseri*.

Characteristics	Phase I	Phase II
Pigment	yellow	yellow
Bioluminescence	-	-
Insect pathogenicity	+	+
Growth on 37°C	+	-
Colony colour on MacConkey agar	red-brown	bright pink
Adsorption of bromothymol blue	+	-
Catalase	-	-
Lecithinase	-	+
Urease	-	-
Phosphatase	+	+
Lipolysis(tween 85)	-	-

비슷한 최대세포농도를 보였다. 또한 pH는 초기 6.8-7.0 정도에서 균주가 성장함에 따라 pH 9.0까지 증가하였다.

Figure 3은 yeast extract 농도에 대한 *Xenorhabdus nematophilus*의 최대세포농도와 비성장속도를 나타낸 것이다. Yeast extract의 농도가 증가함에 따라 최대세포농도가 증가하는 경향을 보이는데 이는 yeast extract의 농도가 균주 성장에 limiting factor로 작용함을 보여준다. Yeast extract 농도에 대한 비성장속도의 의존도를 Monod equation을 가정하여 비교해본 결과, 최대 비성장속도는 0.13 h^{-1} 이고 Monod 상수값은 2.5%였다.

Figure 4는 5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.02% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 기본배지로 하여 균주를 250 mL flask에서 working volume 100 mL로 28°C, 200 rpm에서 진탕 배양했을 때와 7 L fermentor에서 working

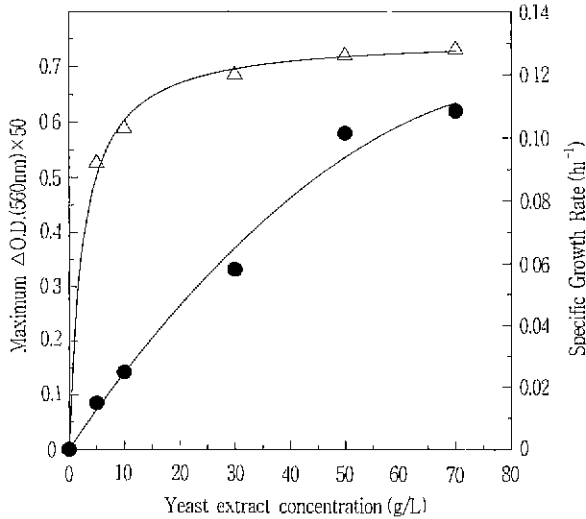


Figure 3 Effect of yeast extract concentration on maximum cell density(●) and specific growth rate(△) of *Xenorhabdus nematophilus*.

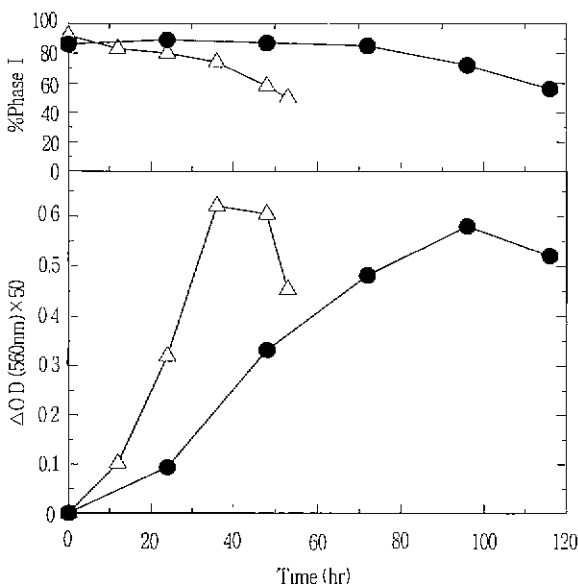


Figure 4. Comparison of cell growth and phase variation between 7 L fermentor(△) and 250 mL flask(●) cultures.

volume 5 L로 배양했을 때의 성장과 상변화를 비교한 것이다. Fermentor배양은 28°C, 600 rpm, 1 L/min air flow rate 조건 하에서 실행되었으며, 균주가 성장함에 따라 pH가 초기 6.8에서 9.2까지 증가하였다(data not shown) 한편 균주의 최대세포농도는 fermentor(0.62)에서 배양한 경우와 flask(0.58)에서 배양한 경우가 비슷한 값을 보였으나 비성장속도에 있어서는 fermentor 배양에서는 약 0.17 h^{-1} 로 flask배양의 0.12 h^{-1} 보다 1.4배 더 큰 값을 보였다. 이것은 fermentor배양에서의 aeration과 mixing 조건이 더 좋은 것 때문으로 생각되며, *Xenorhabdus nematophilus*가 조건적 혐기성(facultatively anaerobic) 균주이지만 호기성조건에서도 잘 성장하는 것으로 생각된다. 그러나 상변화에 있어서는 fermentor에서 배양한 경우가 flask에서 배양한 경우보다 빠르게 phase I에서 II로 진행되었는데 이것은 호기성 조건하에 균주의 성장속도가 빨라수록 상변화도 빠르게 진행되는 것으로 생각된다. 또한 두 배양조건에서 모두 배양초기에는 phase I이 약 80%이상 유지되었지만 대수증식기를 지나 정지상에 접어들면서 더 빠른 속도로 phase I에서 II로 변화되는 것으로 나타났다

Figure 5는 3종류의 동물성 단백질원에서 시간 경과에 따른 3-IJs 선충의 증식과정을 나타낸 것이다. Bovine liver배지에서는 3-IJs 접종 후 7일 경과시점부터 알에서 갓 깨어난 1-IJs가 관찰되었으며 11일 경과 후에는 1-IJ가 1,000마리 정도까지 증식하였으나 그 이후 점차 사멸하였으며, 새롭게 증식된 3-IJs는 14일 경과시점에서 최고 8×10^3 마리로 초기 접종한 3-IJs 보다 약 5배 이상 증식한 것으로 나타났다. 그러나 chicken offal배지에서는 3-IJs가 활성을 잃고 성충이나 1-IJs로 증식하지 못하였으며, dog food에서는 1-IJs가 1,000마리 정도까지 증식하였으나 3-IJs는 접종 때보다 1,000마리 정도 더 많이 증식하였다. 그러나 농축 식물성 단백질원에 3-IJs를 접종하고 7일 배양한 후 새로 증식한 3-IJs와 성충, 1-IJs를 조사한 결과, peanut에서도 3-IJs가 5배 정도 증식하였으며 perilla와 beans 등에서는 3-IJs의 증식 없이 모두 사멸한 것으로 나타났다(data not shown).

Figure 6은 bovine liver 매지의 농도가 선충성장애 미치는 영향을 나타낸 것이다. Bovine liver의 농도가 20, 40%인 경우는 petri dish당 2,500 마리의 농도로 초기 접종한 3-IJs의 대부분이 성충으로 증식하지 못하였지만 60% 농도에서는 초기 접종한 3-IJs의 23%, 80% 농도에서는 25%, 100% 농도에서는 30%

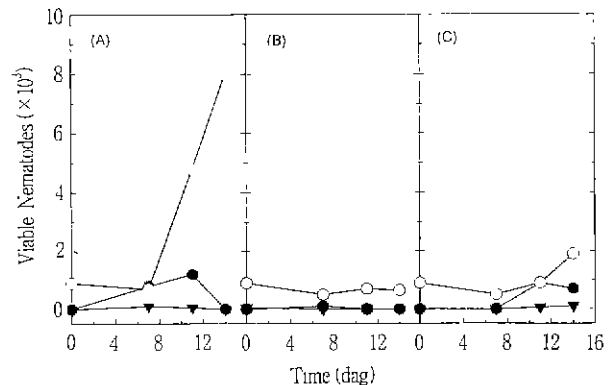


Figure 5. Profiles of nematode growth at various animal protein sources (●) 1-IJ, (○) 3-IJ, (▼) adult. (A) bovine liver, (B) chicken offal, (C) dog food.

까지 성충으로 증식하였다. 또한 3-IJs의 경우는 bovine liver의 농도가 40%이상인 경우는 초기 접종한 3-IJs의 약 80%가 활성이 유지되었지만, 20% 농도에서는 3-IJ가 모두 사멸하였다. 즉 bovine liver 농축매지를 이용한 선충의 *in vitro* 증식을 위해서는 bovine liver의 농도가 최소한 60% 이상 되어야함을 확인하였다. 또한 bovine liver의 농도가 60%인 경우 3-IJs의 활성이 80% 농도에 비해 감소되는 것으로 나타나 bovine liver매지의 최적 농도는 80%로 조사되었다.

Figure 7은 bovine liver매지가 농축된 sponge를 이용한 선충 증식에서 공생박테리아가 선충 증식에 미치는 영향을 조사한 결과이다. *S. glaseri*에 공생박테리아가 접종된 경우에는 3-IJs 접종 후 7일만에 성충의 수가 약 3×10^3 /mL로 증가하였으며, 15일 후에는 3-IJ의 수가 약 5.5×10^4 /mL까지 증가하였다. 그러나 공생박테리아를 접종하지 않은 경우에는 3-IJ 접종 후 7일 후에도 성충 단계로의 증식없이 접종된 3-IJs의 활성만 유지되었다.

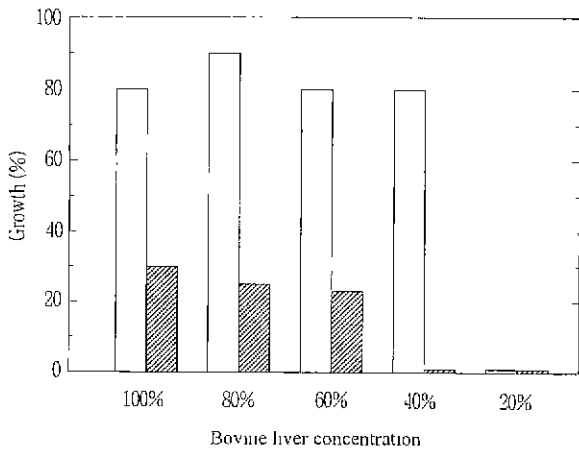


Figure 6. Effect of bovine liver concentration on nematode growth. Nematodes were cultured for 7 days. (□) 3-IJs, (▨) adults

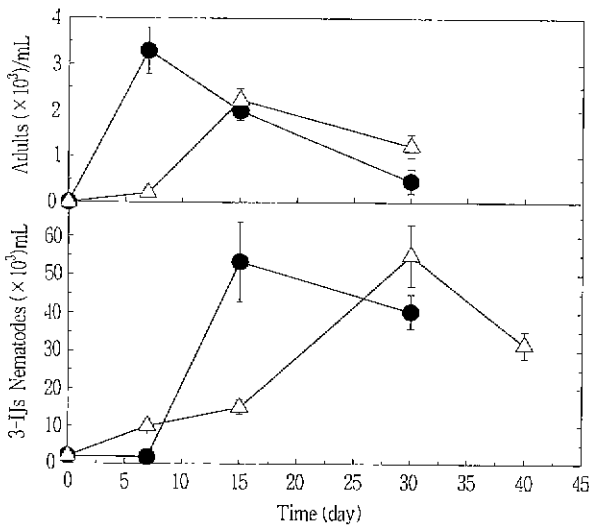


Figure 7 Effect of bovine liver concentration on nematode growth with symbiotic bacteria(●) and without symbiotic bacteria(△)

15일 경과 후에 약 2×10^3 /mL의 성충이 증식하였다. 또한 3-IJs의 수는 30일 경과 후 최대 약 5.4×10^4 /mL까지 증가하였다. 즉 곤충병원성 선충 *S. glaseri*의 *in vitro* 배양에 있어서 공생박테리아 접종에 의한 coculture방법은 선충 증식속도를 증가시킬 뿐만 아니라 공생박테리아가 분비하는 항생물질(6)은 다른 증식도 억제하는 효과도 가져올 수 있기 때문에 현재 nematode-symbiotic bacteria의 공배양 조건을 최적화하기 위한 연구가 수행 중에 있다.

요 약

본 연구에서는 환경친화적인 무공해생물농약 개발을 위하여 곤충병원성 선충의 *in vitro* 배양방법을 개발하였다. 곤충병원성 선충인 *Steinernema glaseri* 종으로부터 공생박테리아를 분리하여 동정한 결과 *Xenorhabdus nematophilus* 종임을 확인하였으며, *Xenorhabdus nematophilus*는 감염단계 선충의 장내에서와 *in vitro* 배양 동안에 그 생화학적 특성에서 차이를 보이는 동절이형화 현상을 나타냄을 확인하였다. 균주의 최적배지 조성은 5% yeast extract, 0.5% NaCl, 0.05% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O이었으며, 28°C가 최적배양 온도였다. 초기 pH 6-7에 관계없이 성장이 진행됨에 따라서 약 9.0까지 증가하였다. Flask배양에 비해서 fermentor배양에서 균주의 성장속도가 1.4배 빠르게 나타났으나, 그에 따른 상변화도 빠르게 진행되었다. 한편 *Steinernema glaseri*의 *in vitro* 배양을 위한 인공매지원으로 chicken offal, dog food, peanut 등이 사용될 수 있으나 최적의 매지는 농축된 bovine liver로 조사되었으며, 그 농도는 80%일 때 가장 높은 증식을 보였다. 또한 곤충병원성선충으로부터 분리된 공생박테리아를 이용한 혼합배양방법은 공생박테리아를 사용하지 않는 경우보다 선충의 *in vitro* 증식속도가 2배 가량 빨랐으며, 15일만에 약 5.5×10^4 /mL의 선충이 수확되었다.

감 사

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비(생물화학공학) 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 박선호, 김도완 (1997), 곤충병원성 선충을 이용한 무공해 생물농약, *한국생물공학회지*, 12(3), 261-268.
2. Gaugla, R. (1988), Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes, *Agric. Ecosystems Environ.*, 24, 351-360
3. Kaya, H. K and R. Gauger (1993), Entomopathogenic Nematodes, *Ann. Rev. Entomol.*, 38, 181-206.
4. Akhurst, R. J. and M. E. Boemare (1990), Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*, Entomopathogenic nematodes in biological control(R. Gaugler and H. K. Kaya, eds.), pp 75, CRC Press, Florida.
5. Bird, A. F. and R. J. Akhurst (1983), The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family *Steinern-*

- ematidae*, *Int. J. Parasitol.*, 13, 599-606.
6. Akhurst, R. J. (1993), Bacterial symbionts of entomopathogenic nematodes the power behind the throne, Nematodes and the biological control of insect pests(R. Bedding, R. Akhurst and H. Kaya eds), pp.127, CSIRO Publication, Melbourne, Australia
 7. Boemare, N. and R. J. Akhurst (1988), Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp.(Enterobacteriaceae), *J. Gen. Microbiol.*, 134, 751-761
 8. 김도완, 박선호 (1998), *Galleria mellonella* 유충을 이용한 곤충병원성 선충의 배양조건, *한국생물공학회지*, 13(1), 31-37.
 9. Bedding, R. A. (1981), Low cost *in vitro* mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* spp.(Nematoda) for field control of insect pest, *Nematologica*, 27, 109-114.
 10. Choo, H. Y., J. B. Kim and D. W. Lee (1996). Entomopathogenic nematodes(*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) from Korea with a key to *Steinernema*, *Korean J. Soil Zoology*, 1(1), 28-36.
 11. 박선호, 유연수 (1998), 꿀벌부채명나방 유충으로부터 *Xanthomonas maltophilia*의 분리 및 동정, *계명대학교 산업기술연구소 논문보고집*, 21(1), 37-46.
 12. 박선호, 유연수 (1999), *Steinernema glaseri* 곤충병원성선충으로부터 공생박테리아의 분리 및 동정, *한국생물공학회지*, 14(2), 198-204.
 13. Li, X., J. W. Robbins, Jr., and K. B. Taylor (1990), The production of recombinant beta-galactosidase in *E. coli* in yeast extract enriched medium, *J. Ind. Microbiol.*, 5, 85-94.