

항진균성 길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7의 종자피막용 포자체의 생산과 발아조건

장종원 · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Bacterial Sporulation and Germination of Biocontrol agent *Bacillus subtilis* YBL-7

Jong-Won Chang and Sang-Dal Kim*

Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

Abstract — Biological control of soilborne plant pathogens by the addition of antagonistic microorganisms to the soil may offer a practical supplement or alternative to existing disease management strategies that depend heavily on chemical pesticides. Soil amendment with antagonistic microbes was non-effective because of high cost, low efficacy, and inconvenient usage on the treatment course. Therefore, seed coating formulation for the application of biological seed treatments has been being to apply successful disease suppression for many important crops. The objectives of this study were to investigate the optimal condition for the spore production of biocontrol agent *Bacillus subtilis* YBL-7 and the liquid coating formulation that contained a suspension of a proper aqueous binder, as well as a ground fine solid particulate material. The maximum yield has been obtained from 60 hrs-old culture at 30°C in spore forming (SF) medium containing 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10^{-1} M $MgCl_2$, 10^{-4} M $MnCl_2$, 10^{-5} M dipicolinic acid, and pH 6.5. The optimal condition of dried spore preparation was achieved when cells of *B. subtilis* YBL-7 was heat-dried with 50°C for 2 hrs.

농작물 수확 증대를 위해 사용하는 맹독성 화학농약의 과다사용은 심각한 환경오염 문제로 인해 농작물의 수출입에도 화학농약의 잔류문제에 대한 규제가 심화되고 있다. 화학농약을 사용한 농산물의 소비 기피와 농산물시장 개방에 대비하기 위해서도 생물방제법 개발의 시급함이 강조되어 왔다. 그 중에서도 길항미생물을 이용한 생물학적 방제방법이 토양내에서의 효과적 우점화로 장기간 발병억제능을 가지는 장점으로 주목을 받고 있다. 진균성 식물병원균에 대한 길항작용은 외막가수분해효소 분비에 의한 parasitic 길항작용(1-4)과 siderophore를 분비하여 식물병원균의 생육을 저해하는 경쟁적 길항작용(5-8)이 있으나 병원균의 생육을 직접적으로 억제하는 항생물질의 생산에 의한 길항작용(9-12)이 가장 많이 알려져 있다. 특히 항생물질을 생산하는 세균류에는 포자생성형 세균인 *Bacillus* sp.에 대한 연구가 많이 보고되고 있어 생물농약으로서의 개발 가능성을 높

여주고 있다. 길항미생물의 생물방제 연구 중 식물종자에 길항미생물을 피막화하는 연구가 최근 보고되고 있으나(13, 14) 영양형 균체를 사용하는 경우 피막화 과정 중이나 실제 토양내에서 그 활성이 급격히 떨어지는 경향이 있으므로 길항미생물의 포자체를 피막화해야 할 필요성이 있다. 따라서 본 연구에서는 본인 등에 의해 이미 선발된 바 있는 길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7(15)의 토양내 신속한 우점화와 방제효과를 높이기 위해 최근 시도되고 있는 식물종자에 직접 방제균을 고밀도로 피막화하는 종자피막법(13)을 채택하여 그 피막화에 사용할 길항세균의 포자 생산과 건조포자체 제조의 최적 조건을 조사하고자 하였으며, 종자피막화의 효율을 높이기 위한 길항세균의 자형성과 발아를 향상시킬 수 있는 포자생산용 배지의 개발과, 방제균의 건조포자체 제조방법 등에 관하여 연구하였다.

재료 및 방법

Key words: Seed coating, biological control, antifungal bacillus

*Corresponding author

사용규주

실험에서 사용한 길항세균은 저병해 인삼 경작지의 근권토양으로부터 분리한 토양세균 중에서 식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 억제할 수 있는 길항세균을 선발한 후 60°C에서 90분간 열처리하여 살아남는 포자생성형 길항균주 중에서 그 방제활성이 가장 강한 균주인 *Bacillus subtilis* YBL-7(15)을 사용하였다. 식물병원균은 한국인삼연초연구소에서 분양받은 인삼근부균 *Fusarium solani*를 사용하였다.

항진균성 활성도의 측정

길항세균 *B. subtilis* YBL-7의 식물근부균 *F. solani*에 대한 억제능을 확인하기 위하여 potato dextrose agar(PDA) 평판배지에 멸균된 cork borer($\phi=6$ mm)로 구멍을 뚫고 *B. subtilis* YBL-7의 배양 여액을 100 μ l 넣은 다음 5 cm 거리에 미리 배양시킨 *F. solani* 균사채 한천원판을 놓아 28°C에서 배양하며 그 억제능을 측정하였다.

포자생성용 배지조성의 조사

B. subtilis YBL-7의 포자생성에 적합한 각종 영양물질의 조성 및 무기염의 영향을 조사하였다. 최적의 포자생성용 배지를 마련하기 위하여 nutrient broth(NB)나 포자생성용 배지로 기존에 알려진(16) nutrient yeast extract sporulation medium(NYSM), nutrient sporulation medium(NSM), CCY medium(17) 등의 조성을 기본 조성으로 하고 dipicolinic acid 등 포자형성에 영향을 미칠 여러물질을 각 농도별로 첨가하여 그 포자생성율을 조사하였다. 포자생성율은 Chevanet 등의 방법(16)에 따라 60°C에서 90분간 열처리한 후 멸균생리식염수로 단계별로 희석한 후, nutrient agar(NA) 상에서 그 colony forming unit(cfu)를 계측한 것을 포자수로 하였다.

포자생성의 배양 pH

B. subtilis YBL-7의 포자채 형성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 0.05% yeast extract를 첨가한 NB 배지 즉, nutrient yeast extract broth(NYB) 배지에서 12시간 전배양한 *B. subtilis* YBL-7을 pH 2에서 pH 13까지 pH를 조정하여 길항균 *B. subtilis* YBL-7의 포자생성용 배지(spore forming medium, SF)에 접종한 후 30°C에서 60시간 동안 160 rpm.으로 진탕배양하여 길항균의 총균수와 포자의 수를 상기의 방법으로 측정하였다. 이때 사용한 SF 배지는 본 연구에서 개발한 *B. subtilis* YBL-7 포자채 생산을 위한 최적의 배지로 이하 SF 배지로 칭한다.

포자생성의 배양온도

포자채 형성에 미치는 배양온도의 영향을 조사하기 위하여 SF 배지에 *B. subtilis* YBL-7을 접종한 후 10°C에서 50°C까지 각 온도별로 60시간 동안 160 rpm으로 진탕배양한 후 *B. subtilis* YBL-7의 총균수와 포자수를 계수하였다.

포자생성의 배양시간

B. subtilis YBL-7의 포자형성에 필요한 배양시간을 조사하기 위하여 SF 배지에 *B. subtilis* YBL-7을 접종하고 30°C, 160 rpm으로 진탕배양하여 12시간마다 길항균의 총균수와 포자수를 계수하였다. 이상의 모든 실험 결과들은 3 반복 실험의 평균치를 나타내었다.

결과 및 고찰

길항세균의 항진균성 활성

선발한 길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7(15)의 식물근부균 *Fusarium solani*에 대한 억제력을 확인하기 위해 agar hole 방법을 이용하여 그 생육 억제력의 거리를 조사해 본 결과 Fig. 1에서 나타난 바와 같이 강력한 길항능을 나타내었다. 따라서 이 결과와 김의 보고(15)를 함께 미루어 볼 때 *B. subtilis* YBL-7을 식물종자 피막용 길항세균으로 사용할 수 있다고 생각되었다.



Fig. 1. Agar hole assay for antifungal activity of *Bacillus subtilis* YBL-7 against *Fusarium solani*.

B. subtilis YBL-7 culture filtrate (100 μ l) was poured in the hole apart 5 cm from the *F. solani* mycelium disk on potato dextrose agar (PDA). The plate was inoculated at 28°C for 5 days.

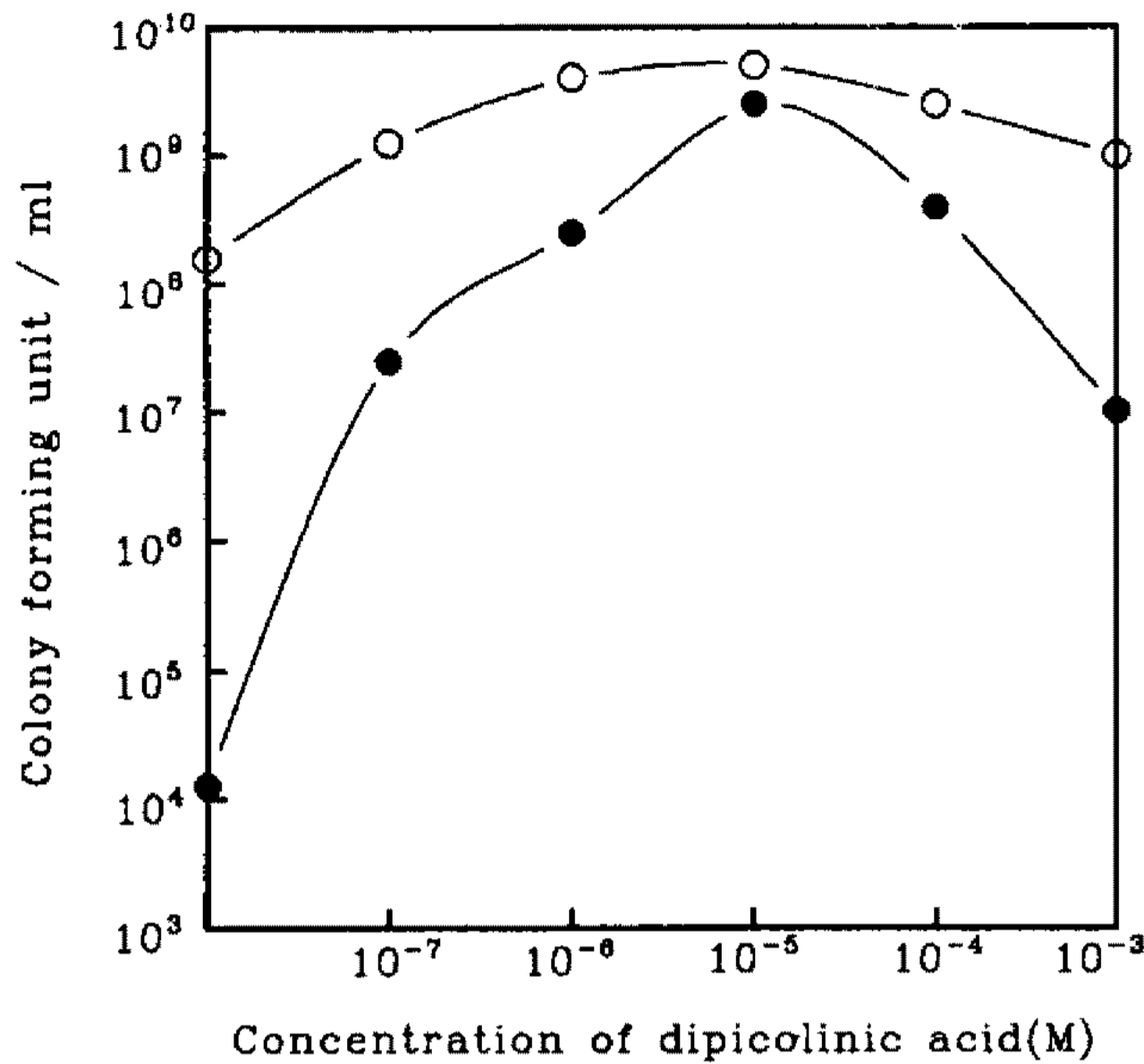


Fig. 2. The effect of dipicolinic acid on the growth and spore formation of *B. subtilis* YBL-7 in basal nutrient yeast extract broth (NYB).

The composition and initial pH of the nutrient yeast extract broth were 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, and pH 6.5.

○-○: Cell growth, ●-●: Sporulation

포자 생성용 배지의 조성

지금까지 알려진 *Bacillus* 속 균주의 포자생성율을 증강시킬 수 있는 배지로는 NYSM medium(16)과 CCY medium(17, 19), nutrient sporulation medium (20) 등 몇가지 배지가 알려져 있으나, 이들은 *Bacillus sphaericus*의 crystal toxin protein의 생성력 증가(16)나 *B. subtilis*에 의해 생산되는 항생물질의 생산 증강(17) 등 모두가 이차대사산물의 생산 증강을 위한 포자형성율을 높이기 위해 개발된 배지일 뿐 건조포자체 그 자체를 만들기 위한 노력으로 개발된 배지는 *Bacillus* 속 균주의 경우 전무한 상태이다. 따라서 기존에 개발된 *Bacillus* 속의 포자생성용 몇가지 배지의 조성을 중심으로 하여, 세균의 포자에서 고농도로 나타나는 Ca⁺⁺과 dipicolinic acid 등 몇가지 무기염의 영향을 조사하고 아울러 무기염의 첨가농도에 따른 포자생성율을 조사하여 *B. subtilis* YBL-7의 포자생성에 가장 적합한 배지의 조성을 조사하였다.

Dipicolinic acid는 영양형 세포와는 달리 일반적으로 포자체에서 최고 12%까지 고농도로 존재하며 Ca⁺⁺과 염을 형성하여 주로 포자의 내열성에 관여하는 물질이다. 따라서 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7의 경우에도 dipicolinic acid가 포자형성에 큰 영향을 미치는 것을 알아보기 위해 그 농도별 영향을 조사해 본 결과 Fig. 2와 같이 본 실험에서 1×10⁻⁵ M의 농

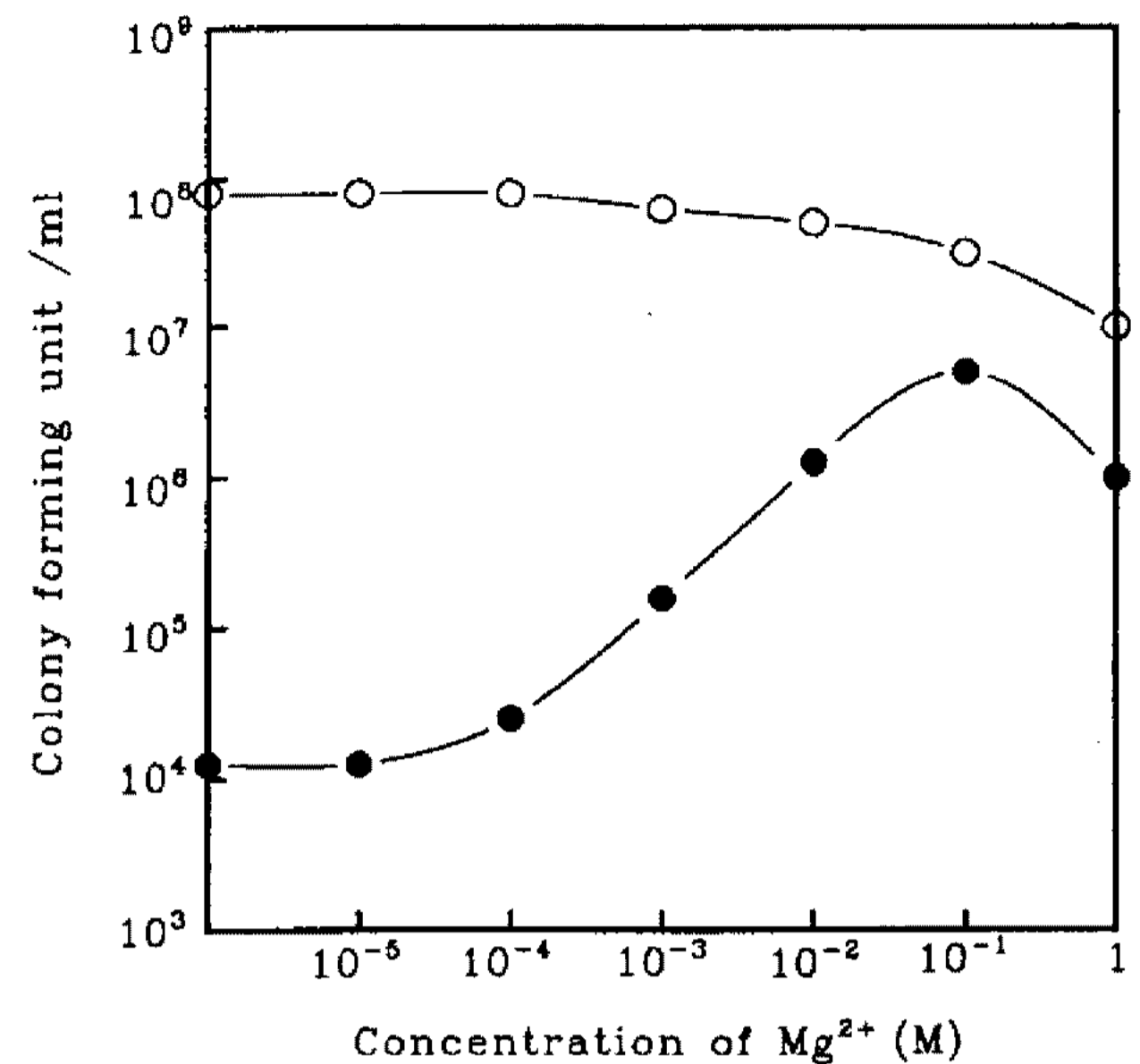


Fig. 3. The effect of Mg⁺⁺ on the growth and spore formation of *B. subtilis* YBL-7 in basal NYB medium.

The composition and initial pH of the nutrient yeast extract broth were 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, and pH 6.5.

○-○: Cell growth, ●-●: Sporulation

도로 첨가하였을 경우 첨가하지 않은 대조구보다 약 100배 이상의 포자체를 형성하였다. 그러나 10⁻⁵ M 이상의 농도로 첨가되었을 경우 오히려 총균수나 포자수에 있어서는 감소되는 경향이 뚜렷했음을 볼 수 있었다. 따라서 생물방제균 *B. subtilis* YBL-7의 경우에 비교적 낮은 농도의 dipicolinic acid 첨가는 포자형성을 크게 촉진시킴을 알 수 있었다.

Ca⁺⁺ 역시 영양형 세포보다 포자체에서 고농도로 존재하며 dipicolinic acid와 염을 형성한다고 알려져 있다. 기존의 포자생성용 배지인 NYSM medium에도 7×10⁻⁴ M 정도 첨가되어 포자형성율을 높인 보고(16)가 있으나 본 길항세균 *B. subtilis* YBL-7에 있어서는 오히려 첨가농도가 높을수록 첨가하지 않은 배지에 비해 균체의 생육이나 포자형성율 모두 저해됨을 보였다(Fig 생략). 그 밖에도 Mn⁺⁺, Mg⁺⁺, Fe⁺⁺ 등의 무기염을 대상으로 해서 같은 방법으로 조사해 본 결과 Mn⁺⁺는 1×10⁻⁴ M(Fig 생략), Mg⁺⁺는 1×10⁻¹ M 등의 농도로 첨가하였을 때 가장 높은 포자형성율을 보였음을 확인할 수 있었다. Mg⁺⁺의 경우는 Fig. 3에서 볼 수 있듯이 기존의 포자생성용 배지인 NYSM 배지의 경우 10⁻³ M을 이용한 것(16)과는 달리 10⁻¹ M에서 가장 높은 포자형성율을 보이는 등 많은 차이를 보였다. 이 결과는 *B. subtilis* YBL-7의 경우 Ca⁺⁺이나 Mn⁺⁺의 효과보다 Mg⁺⁺의 첨가효과가 훨씬 더 크다는 사실을 확인할 수 있

Table 1. Comparison of the growth and spore formation of *B. subtilis* YBL-7 in various medium

Medium	Total Cell (cfu/ml) ^a	Spore Formation (cfu/ml) ^b	Spore Formation Rate ^c	Germination of Dried Spore (cfu/ml) ^d
NB ^{a)}	8.7×10^8	3.6×10^3	4.1×10^{-6}	2.3×10^3
NYSM ^{b)}	1.8×10^9	9.7×10^6	5.3×10^{-3}	9.2×10^6
SF ^{c)}	1.2×10^9	8.2×10^8	6.8×10^{-1}	1.8×10^7

^aTotal viable cell of *B. subtilis* were counted by plating on nutrient agar (NA) after incubation at 30°C for 60 hrs in various medium.

^bThe bacterial spores were obtained by heating at 60°C for 90 min.

^cSpore formation rate=Spore formation (cfu/ml)/Total cell (cfu/ml).

^dThe sporulated cells were dried at 50°C for 2 hrs in dry oven. Germination of the dried spores was investigated by counting the survival cells on NA after 24 hrs incubation at 30°C.

^{a)}Nutrient broth

^{b)}Nutrient yeast extract sporulation medium containing 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 5×10^{-5} M $MnCl_2$, 7×10^{-4} M $CaCl_2$, 10^{-3} M $MgCl_2$ and pH 6.5. (16)

^{c)}Spore forming (SF) medium containing 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10^{-1} M $MgCl_2$, 10^{-3} M $FeCl_3$, 10^{-4} M $MnCl_2$, 10^{-5} M dipicolinic acid and pH 6.5.

Each value represents the mean of three times.

었다.

상기의 결과에 의거하여 dipicolinic acid, Mg^{+2} 외 다른 무기염을 첨가한 후 그 포자형성율을 비교, 검토해 본 결과 Table 1에서 보이는 바와 같이 포자형성용 배지보다 훨씬 우수한 조성의 spore forming (SF) medium을 개발할 수 있었다. NB 배지, NYSM 배지와 상기 조성으로 조제한 SF 배지를 사용하여 같은 조건(pH 6.5, 30°C, 160 rpm, 60시간) 하에서 배양하여 비교하여 보았을 때 SF 배지의 경우 총균수에서는 약 100배, 포자형성수에서는 약 10,000배 이상의 증가율을 보였다. 따라서 SF 배지가 길항세균 *B. subtilis* YBL-7의 포자형성에 가장 적절한 것을 알 수 있었다.

포자생성에 미치는 pH의 영향

B. subtilis YBL-7의 배양시 pH가 포자형성율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 2에서 pH 13까지의 pH 범위에서 60시간 동안 각각 배양시켜 본 결과, Fig. 4에서와 같이 총균수는 pH 5.0에서 pH 8.0까지의 넓은 pH 범위에서 큰 변화를 보이지 않았으나 pH 4.0 이하 pH 9.0 이상에서는 생육에 큰 저해를 받았음을 알 수 있었다. 포자생성에 있어서는 pH 6.5에서 가장 많은 포자수가 형성됨을 알 수 있었다. 따라서 *B. subtilis* YBL-7의 포자생성에 미치는 pH의 영향은 길항균의 생육에 미치는 pH의 영향과 거의 동일하였으나 영양균수와 상대치를 환산해 보면 pH 6.0~6.5에서 가장 높게 나타났다. 이 결과는 일반적으로 세균용 배지의 pH가 7.0 부근인 것에 비해 다소 낮은 pH 영역이 요구된다는 것을 알 수 있다.

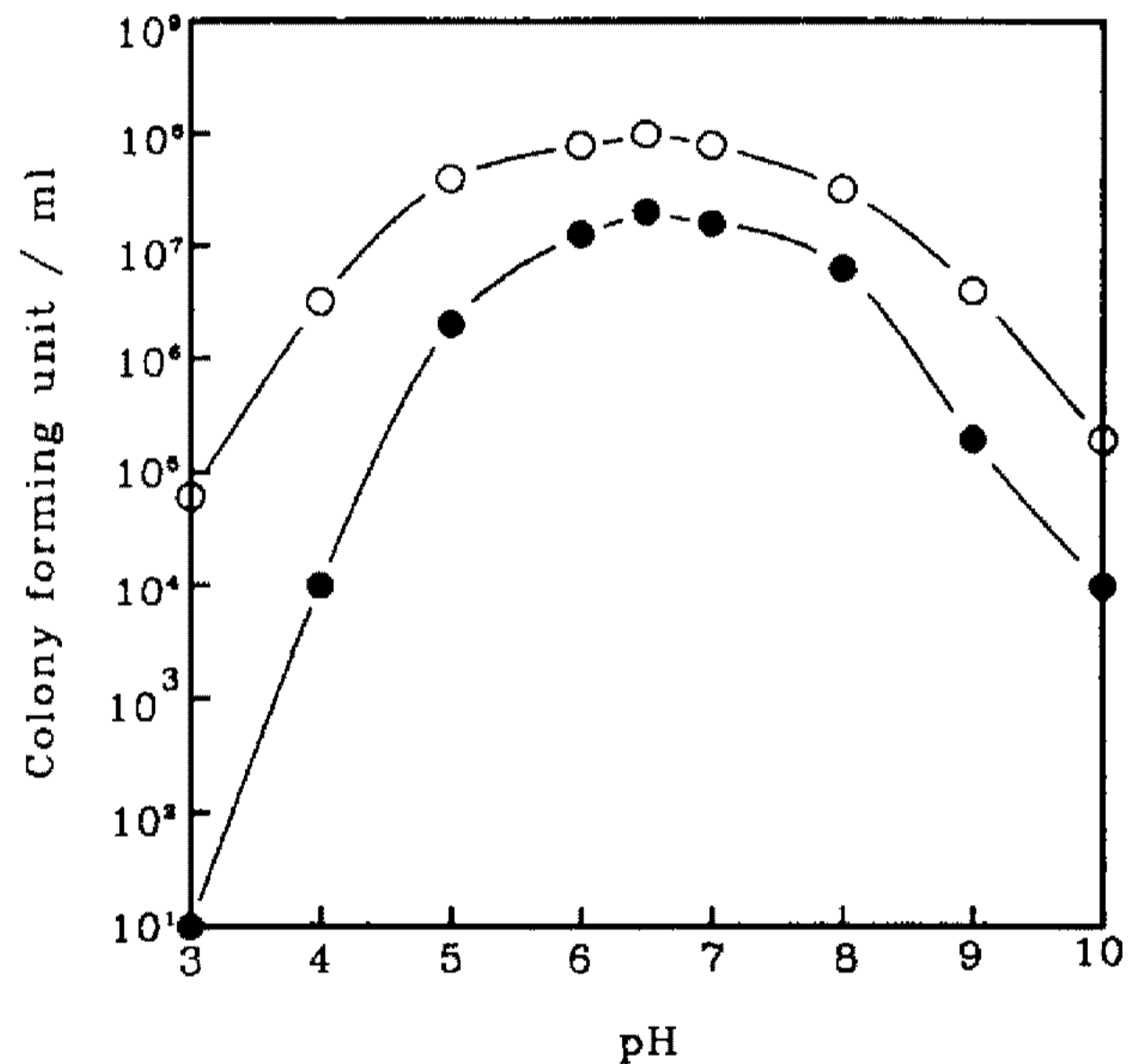


Fig. 4. The effect of initial pH on the growth and spore formation of *B. subtilis* YBL-7 in spore forming (SF) medium.

The composition of the spore forming broth were 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10^{-1} M $MgCl_2$, 10^{-4} M $MnCl_2$ and 10^{-5} M dipicolinic acid.

○-○: Cell growth, ●-●: sporulation

포자생성에 미치는 배양온도의 영향

배양온도가 *B. subtilis* YBL-7의 포자형성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 10°C에서 60°C까지의 넓은 배양온도 범위에서 총균수와 포자수를 조사해 보았다. 그 결과 Fig. 5에서 보는 바와 같이 30°C에서 배양함으로써 총균수 뿐만 아니라 포자의 생성수도 최대로 나타났음을 알 수 있었다. 이 결과는 포자의 형성도 생육의 최적온도에서 가장 잘 일어난다는 것으로 나

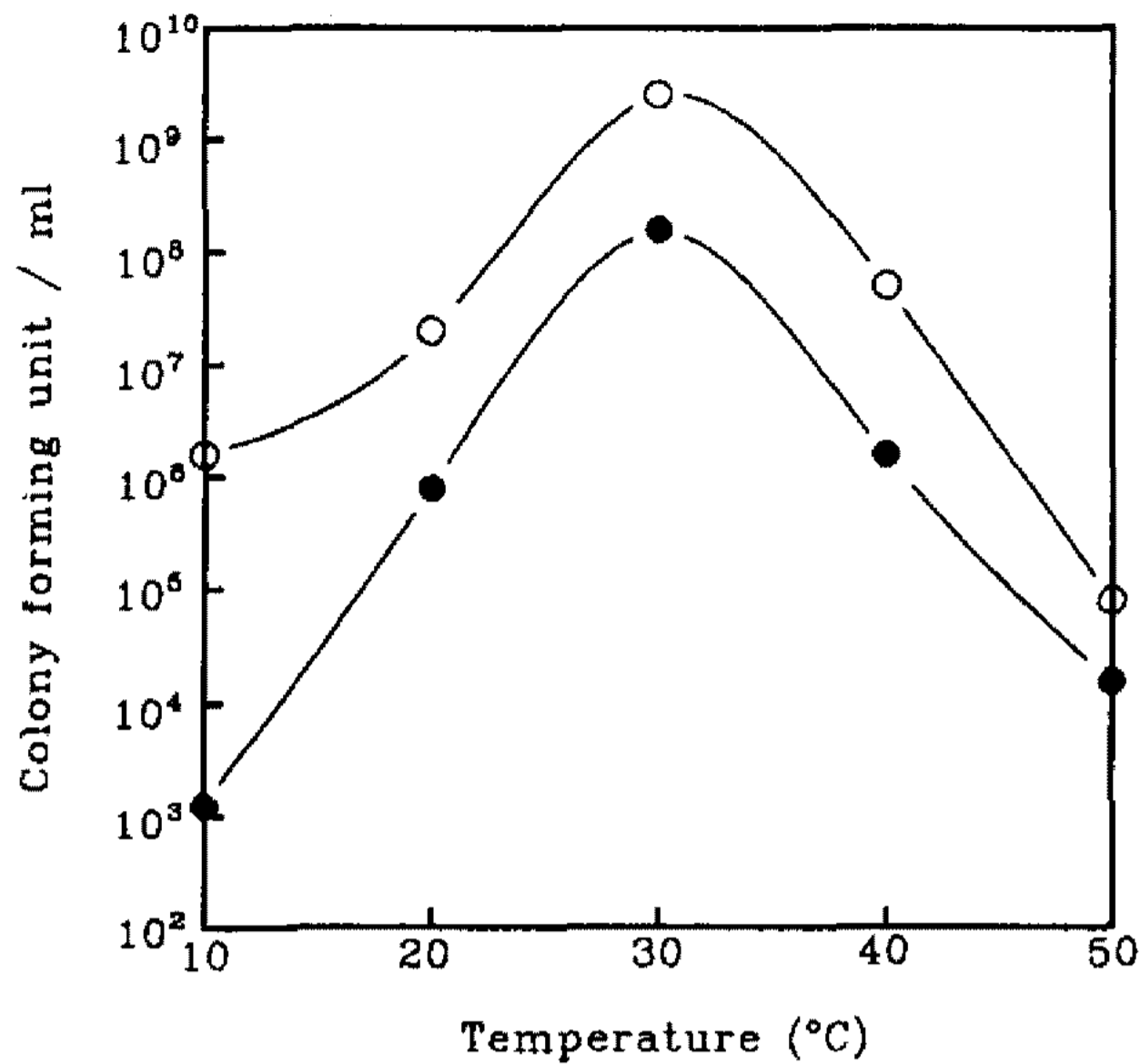


Fig. 5. The effect of temperature on the growth and spore formation of *B. subtilis* YBL-7 in spore forming (SF) medium.

The composition and initial pH of the spore forming broth were 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10⁻¹ M MgCl₂, 10⁻⁴ M MnCl₂, 10⁻⁵ M dipicolinic acid and pH 6.5.

○-○: Cell growth, ●-●: Sporulation

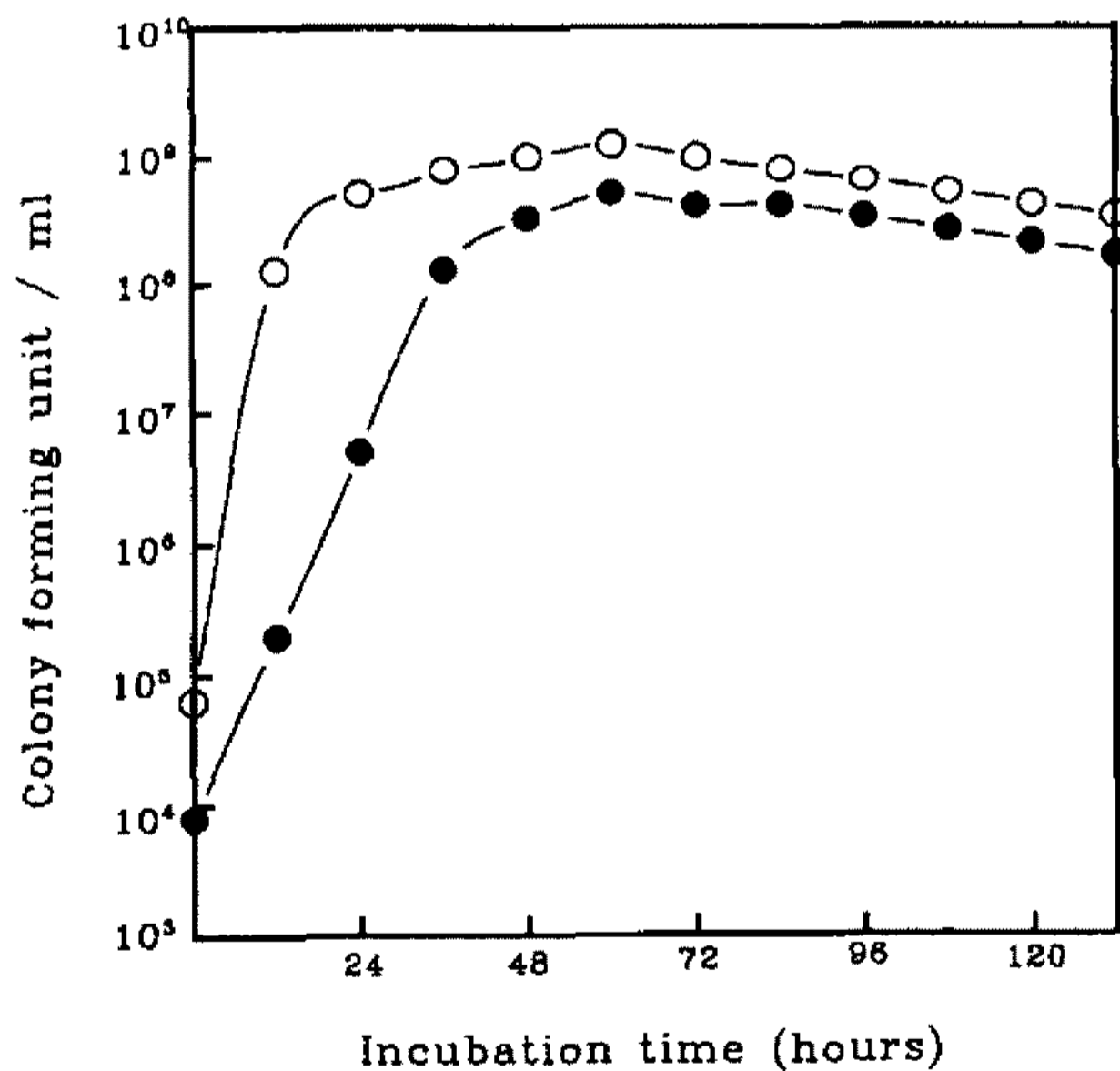


Fig. 6. Growth profile and time course of the sporulation under the optimal culture condition of *B. subtilis* YBL-7 in spore forming (SF) broth.

The composition and initial pH of the spore forming broth were 0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10⁻¹ M MgCl₂, 10⁻⁴ M MnCl₂, 10⁻⁵ M dipicolinic acid and pH 6.5.

○-○: Cell growth, ●-●: Sporulation

타났으나 온도가 증가함에 따라 총균수에 대한 포자수의 비율은 점차 높아졌음을 볼 때 세균의 포자형

Table 2. Effect of drying condition of *B. subtilis* YBL-7 spore on the spore germination

Drying Condition	Spore (cfu/ml)	Germination of Dried Spore (cfu/ml)	Spore Germination Ratio (%)
50°C Heat dry ^{a)}	8.2×10 ⁸	6.49×10 ⁸	79.1
Freezing dry ^{b)}	"	7.40×10 ⁷	9.0
Vacuum dry ^{c)}	"	2.87×10 ⁷	3.5

B. subtilis YBL-7 was grown in SF broth at 30°C for 60 hrs (1.0×10⁹ cfu/ml). The bacterial spores were obtained by heating at 60°C for 90 min. The spores were counted in NA plates after 24 hr incubation at 30°C (8.2×10⁸ cfu/ml). The sporulated cells were collected by centrifugation (9,500 rpm) and then washed three times with sterile distilled water.

^{a)}The sporulated cells were dried at 50°C for 2 hrs in a dry oven.

^{b)}The sporulated cells were frozen and lyophilized for 12 hrs.

^{c)}The sporulated cells were dried for 8 days in a vacuum dessicator.

Each value represents the mean of three times.

성이 고온에서 잘 일어난다는 일반적 사실과 부합되는 경향이였다.

포자생성에 미치는 배양시간의 영향

B. subtilis YBL-7의 배양시 포자수를 최대로 생산할 수 있는 배양시간을 조사하기 위하여 132시간까지 12시간별로 총균수와 포자수를 조사하였는데 그 결과 Fig. 6과 같이 영양형 세포의 경우는 54시간 배양 후 가장 그 수가 많이 나타났으나, 포자체의 수는 60시간 배양하였을 때 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 개발한 포자생산용 SF 배지로 pH 6.5, 30°C 에서 60시간 배양함으로써 가장 많은 포자체를 얻을 수 있었다.

건조포자체 제조 조건

종래의 종자처리에 이용된 길항미생물의 포자체는 agar plate 상에서 배양된 길항균을 spatula나 glass rod로 수집하여 이용하거나, air drier를 이용해 건조한 후 멸균수에 현탁하여 처리하는 방법들이 사용되었다(21, 22). 이러한 방법들은 종자를 피막화하는데 있어서 균일하게 피막처리하기 어렵고 대량으로 건조하기 곤란한 단점들이 있기 때문에 본 실험에서는 건조, 회수 방법이 용이하고 발아율이 우수한 건조

포자체를 제조하는 방법을 조사하였다. 포자체 생성의 최적 조건으로 배양된 포자체를 원심분리로 수거하여 50°C 고온건조, 동결건조, 상온 감압건조 등의 방법을 이용하여 건조한 후 *B. subtilis* YBL-7 건조포자체의 발아율을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 50°C 고온건조에서 가장 높은 포자발아회생율(79.1%)을 나타내었다. 또한 10l의 *B. subtilis* YBL-7을 배양한 배양액에서 회수한 포자체를 건조할 때, 50°C의 고온건조는 약 2시간만에 완전히 건조되었으나 동결건조는 약 12시간, 감압건조는 약 8일 정도의 건조시간이 요구되었다. 따라서 대량생산에 적합한 건조방법은 50°C 고온건조 방법임을 알 수 있었다.

요 약

식물근부균 *Fusarium solani*에 강력한 길항력을 가진 길항세균을 식물종자에 피막화하는 생물방제법의 일환으로 길항세균 *Bacillus subtilis* YBL-7의 건조포자체로 강남콩 종자를 피막화하고자 하였으며, 포자의 생산율을 높이기 위해 배지조성을 조사한 결과 Nutrient broth보다 약 10⁴배, 기존 포자생성용배지(NYSM)보다는 약 10²배 정도의 포자생성율을 증강시킬 수 있는 spore forming(SF) medium(0.8% nutrient broth, 0.05% yeast extract, 10⁻¹ M MgCl₂, 10⁻⁴ M MnCl₂, 10⁻⁵ M dipicolinic acid, and pH 6.5)을 개발할 수 있었으며 포자생성을 위한 최적의 배양조건은 30°C, 60시간이었다. 종자피막화에 처리할 길항균 *B. subtilis* YBL-7의 건조포자체의 제조 조건을 조사해 본 결과 동결건조, 감압건조 등의 방법은 포자발아 회생율이 낮고 건조시간이 오래 걸리는데 반해 50°C 건열건조는 포자발아 회생율이 약 79%로 가장 높을 뿐만 아니라 약 2시간이면 완전히 건조된 포자체를 제조할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1993년 영남대학교 학술연구조성비에 의하여 수행되었습니다.

참고문헌

1. Ordentlich, A., Elad, Y. and Chet, I. 1988. The role of chitinase of *Seratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathol.* **78**: 84-88.
2. Lifshitz, R., Windham, M.Y. and Baker, R. 1986. Mechanism of biological control of preemergence damping-off of pea by seed treatment with *Tri-*

- choderma* spp.. *Phytopathol.* **76**: 720-725.
3. Hadar, Y., Chet, I. and Henis, Y. 1979. Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathol.* **69**: 64-68.
4. Elad, Y., Het, I. and Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: a biological agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathol.* **70**: 119-121.
5. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Schroth, M.N. 1980. *Pseudomonas siderophore*: A mechanism explaining disease suppressive soil. *Curr. Microbiol.* **4**: 317-320.
6. Scher, F.M. and Baker, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathol.* **72**: 1567-1573.
7. Kloepper, J.W., Leong, J., Teintze, M. and Shroth, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature (London)*. **286**: 885-886.
8. Neilands, J.B. and Leong, S.A. 1986. Siderophores in relation to plant disease. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **37**: 187-208.
9. Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1980. Suppression of *pythium*-induced damping-off of cotton seedling by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoloteorin. *Phytopathol.* **70**: 712-715.
10. Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **170**: 3499-3508.
11. Babad, J., Pinsky, A., TurnerGraff, R. and Sharon, N. 1952. An antifungal polypeptide produced by *Bacillus subtilis*. *Nature*. **170**: 618-619.
12. Huang, T.C. and Chang, M.C. 1975. Studies on Xanthobacidin, a new antibiotic from *Bacillus subtilis* active against *Xanthomonas*. *Bot. Bull. Acad. Sinica.* **16**: 137-148.
13. Taylor, A.G., Min, T.G., Harman, G.E. and Jin, X. 1991. Liquid coating formulation for the application of biological seed treatments of *Trichoderma harzianum*. *Biol. Control.* **1**: 16-22.
14. Harman, G.E. and Taylor, A.G. 1988. Improved seedling performance by integration of biological control agents at favorable pH levels with solid matrix priming. *Phytopathol.* **78**: 520-525.
15. Kim, Y.S. 1992. Biocontrol bacteria, *Bacillus subtilis* producing the antifungal antibiotics and genetic improvement. 영남대학교 석사학위 논문.
16. Allan A. Yousten and Elizabeth W. Davidson. 1982. Ultrastructural Analysis of Spores and Parasporal Crystals Formed by *Bacillus sphaericus* 2297. *Appl. and Environ. Microbiol.* **44**(6): 1449-1455.

17. C. Chevanet, F. Besson, and G. Michel. 1986. Effect of various growth conditions of spore formation and bacillomycin L production in *Bacillus subtilis*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 254-258.
18. Stewart, G.S.A.B., K. Johnstone, E. Hagelberg, and D.J. Ellar. 1981. Commitment of bacterial spores to germinate: a measure of the trigger reaction. *Biochem. J.* **198**: 101-106.
19. Offer A. Carmi, Gordon S.A.B. Stewart, Shimon Ulitzur, and Jonathan Kuhn 1987. Use of Bacterial Luciferase to Establish a Promotor Probe Vehicle Capable of Nondestructive Real-Time Analysis of Gene Expression in *Bacillus* spp.. *J. Bacteriol.* **169**(5): 2165-2170.
20. Katsuhiko Babasaki, Toshifumi Takao, Yasutsuga Shimonishi, and Kiyoshi Kurahashi 1985. Subtilisin A, a New Antibiotic Peptide Produced by *Bacillus subtilis* 168: Isolation, Structural Analysis, and Biogenesis. *J. Biochem.* **98**(3): 585-603.
21. Vransky, J., Vancura, V. and Stanek, M. 1981. Control of microorganisms in the rhizosphere of wheat by inoculation of seeds with *Pseudomonas putida* and by foliar application of urea. *Folia. Microbiol.* **26**: 45-51.
22. Carol E. Windels. 1981. Growth of *Penicillium oxalicum* as a Biological Seed Treatment on Pea Seed in Soil. *Phytopathol.* **71**(9): 929-933.

(Received 14 November 1994)