

Bacillus spp.의 원형질체 형성 및 재생

최기춘 · 김광현 · 전우복

Protoplast Formation and Regeneration of *Bacillus* spp.

Ki Chun Choi, Kwang Hyun Kim and Woo Bock Chun

College of Agriculture, Chonnam National University

Summary

This study was to provide the basic data in improving protoplast formation and regeneration of antagonistic bacteria against phytopathogenic fungi and pest.

The antagonistic rhizobacterium, *BS 101*, against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* was isolated and identified as *Bacillus subtilis*. Another bacterium for protoplast formation and regeneration was *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*HD-1 (*BT 37669*) which have insecticidal toxin in the orders Coleoptera, Diptera etc.. Auxotrophic mutants, *BS 1013* and *BT 69*, were isolated by treating with NTG 300 ug/ml for 40 min. at 37°C, and with NTG 300 ug/ml for 30 min. at 37°C, respectively. The *BS 1013* and *BT 69* were converted to protoplas by treating with lysozyme 300 ug/ml for 30 min. at 37°C, and lysozyme 9 mg/ml for 60 min. at 37°C, respectively. The frequencies of the protoplast formation of *BS 1013* and *BT 69* were 90.00 and 92.83%, respectively, after 1~2 day at 37°C. The regeneration frequencies of the protoplasts *BS 1013* and *BT 69* were 0.52 and 0.10%, respectively, after 4~6 days at 37°C.

I. 서 론

사료작물에 대한 재배기술의 발달과 화학비료의 사용은 조사료 증수를 가져왔으나 사료 작물의 연작과 비료의 과다사용은 토양을 황폐화 시키고 토양전염성 병원균의 발생을 증가시켜 사료작물에 많은 병해를 일으키고 있다. 따라서 병해방제를 위한 각종 토양병원균의 생육을 저해시키기 위해 길항미생물을 이용하는 생물학적 방제에 관한 연구가 수행되고 있는데 (Handelsman 등, 1990; Weller, 1988; Savithiry와 Gnanamanickam, 1987; Cook, 1985; Rothrock와 Gottlieb, 1981), 특히 토양전염성 병원균은 토양속에

장기간 생존하여 방제가 매우 어렵기 때문에 토양병원균에 길항력이 우수한 미생물을 개발하여 병원균을 억제시키는 보다 효율적인 방제수단이 절실히 요구되고 있다. 이러한 길항미생물을 이용하면 사료작물의 병해방제, 유용한 천적보존, 유기합성 농약에 따른 피해감소, 생태계의 균형유지 및 환경오염을 최소화시킴으로써 조사료 생산을 증대시킬 수 있을 것으로 기대된다.

지금까지 길항미생물로는 수십종이 알려져 있으나 *B. subtilis*는 토양전염성 병원균에 대한 우수한 길항력을 갖을 뿐 아니라 작물의 성장을 촉진하는 세균으로 2×10^5 CFU/g dry soil 정도로 토양에 서식

하고 있으며, 또한 생체내에 내생포자를 형성하는 호기성 간균으로 내열성이 강하고 환경적응성이 뛰어나며 사람, 가축 등에 병해를 일으키지 않는 안전한 세균으로 널리 알려져 있다(Phae 등, 1992; Phae 등, 1990; Krieg와 Holt, 1984; Utkhede, 1984; Swinburne 등, 1975).

한편 해충의 생물학적 방제에 널리 이용되고 있는 *B. thuringiensis*는 규칙적인 양추형 단백질 결정체인 살충성 독소를 생성하는데 이 독소는 항상 포자형성과 병행하여 이루어지며 나비목, 파리목 등의 곤충에 살충력이 우수하고 사람이나 가축 등에 독성이 없는 세균으로 알려져 있다(Hofte와 Whiteley, 1989; Dulmage, 1970; Goldberg와 Maragalit, 1979; Bechtel과 Bulla, 1976). 그러나 *B. thuringiensis*가 생성하는 살충성 독소는 햇빛이나 생화학적 분해과정에 민감하기 때문에 생물학적 방제의 안정성에 중요한 관심사가 되고 있다. 이와 같은 사실이 확인됨에 따라 작물을 유해곤충의 피해로부터 보호하기 위해 최근에는 이러한 결정성 독소 단백질을 *Bacillus*속과 *Pseudomonas*속 등의 세균에 도입하여 발현시킴으로써 작물병원성 사상균과 각종 유해곤충의 방제를 향상시키기 위한 미생물 육종에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim, 1993; Ogiwara 등, 1993). 특히 세포 융합에 의한 길항 미생물의 육종은 selection marker로 영양요구성 변이주를 유도하여 사용하기 때문에 생물학적 방제제로 자연에서 안전하게 이용될 수 있다. 그러나 원형질체 형성과 재생은 새로운 융합균주를 유도하는데 중요한 요인으로 간주되므로 융합시 많은 관심의 대상이 되고 있다.

따라서 본 연구는 사료작물에 병해를 일으키는 토양전염성 병원균에 길항력이 우수하고 유해곤충에 살충력을 갖는 효율적인 융합균주를 얻기 위하여 원형질체 형성 및 재생조건을 조사하고자 수행되었다.

II. 재료 및 방법

1. 공시균주

목초병해를 일으키는 토양전염성 사상균인 *R. solani*와 *F. oxysporum*에 길항작용을 가지고 있고 목

초의 생육을 촉진하는 것으로 알려져 있는 미생물을 목초재배지의 근권토양에서 직접 분리하여 The Prokaryotes (Starr 등, 1981), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg와 Holt, 1984), Microbiological Method (Collins와 Lyne, 1984)에 기술된 방법에 따라 형태 및 생리·생화학적 성질을 조사한 결과 *Bacillus subtilis* (BS 101)로 동정 하였다. 그리고 *B. thuringiensis kurstaki HD-1* (BT 37669)은 American Type Culture Collection (ATCC)에서, 뿌리썩음병, 잎·줄기마름병 등을 일으키는 병원성 사상균인 *R. solani*와 *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*은 농업기술연구소에서 분양받아 이용하였다.

2. 아미노산 영양요구성 변이균주의 유도

Luria Bertani(LB) broth에 대수 증식기 말까지 증식시킨 다음 균주 배양액을 원심분리하여 tris-maleate 완충용액(Tris 0.25 M, Maleate 0.25 M, pH 6.0)으로 세척하고 적정 농도의 N-methyl-N'-nitro-soguanidine (NTG)를 첨가하여 37°C water bath에서 정치배양 하였다. 이 때 균주의 특성에 따라 NTG의 처리농도와 배양시간을 각각 달리하여 처리하고 이중 가장 적절한 농도와 시간을 선택하였다. 정치배양된 균체를 원심 분리한 다음 동일 완충용액에 현탁하여 전 아미노산을 함유한 최소 영양배지에 접종한 다음 나타난 균체를 Table 1과 같은 아미노산 조합에 따라 일부 아미노산이 첨가된 여러 종류의 최소배지에 replica plating 하여 아미노산 요구성을 검정한 후 변이균주를 선발하였다. 선발된 아미노산 요구성 변이균주는 앞에서 기술한 길항세균의 선발 방법과 동일하게 길항력을 조사하고 안정성을 재 확인한 후 아미노산 요구성 변이균주로 최종 선발하였다.

3. 원형질체 형성 및 재생

아미노산 요구성 변이균주의 원형질체 형성 및 재생은 Akamatsu와 Sekiguchi(1981)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, A-3 broth에 균주를 배양하여 원심분리한 다음 균체를 회수하고 SMM 완충용액(0.5 M sucrose, 0.02 M MgCl₂, 0.02 M Maleate, pH

6.5)으로 현탁하였다. 이 현탁액에 적정량의 lysozyme을 첨가하여 일정온도에서 반응시킨 후 원심 분리하여 원형질체를 회수하고 SMM 완충용액으로 세척하여 순수한 원형질체를 얻었다. 이 때 lysozyme의 농도, 배양시간 및 배양온도를 각각 조사하여 각각의 공시균주에 적절한 원형질체 형성조건을 조사하였다. 이렇게 얻은 순수한 원형질체는 삼투압 안정제 성분이 없는 원형질체 재생배지에 도말하고 (osmotically resistance cells), 한편 회수된 균체에 lysozyme을 첨가하지 않고 SMM 완충용액으로 세척한 후 동일 완충용액으로 현탁하여 LB배지에 도말하였다. 이 때 배지상에 자라난 colony 수 (total

viable cells before lysozyme treatment)를 계수하여 원형질체 형성율을 조사하였다. 그리고 lysozyme에 의하여 형성된 원형질체를 삼투압 안정제 성분이 첨가된 액체 재생배지로 조심히 재현탁하여 삼투압 안정제 성분이 첨가된 완전 원형질체 재생배지에 도말하고 37℃에서 3~5일간 배양하였다(osmotically sensitive cells). 이 때 재생배지 상에 자라난 colony를 계수하여 원형질체 재생율을 조사 하였다. 원형질체 재생은 재생배지의 종류에 따라 각기 재생율이 다르기 때문에 본 시험에서는 각각의 공시균주에 가장 적합한 재생배지인 DM 3 배지를 최종 선택하여 본 시험에 사용하였다(Chang과 Cohen, 1979).

Table 1. Combination groups of amino acids in a minimal agar plate

Group of amino acid	Number of plate			
	1	2	3	4
5	Lycine	Proline	Cysteine	Methionine
6	Histidine	Leucine	Isoleucine	Valine
7	Phenylalanine	Tyrosine	Tryptophan	Threonine
8	Glutamate	Serine	Alanine	Aspartate
9*	-	-	-	-

* Minimal agar plate contains only glucose without amino acids.

The plate contains glucose final concentration 10 mg/ml and the concentration of each amino acid is 20 μg/ml in a plate.

III. 결과 및 고찰

1. 아미노산 영양요구성 변이균주의 유도 및 선발

원형질체 형성 및 재생에 필요한 아미노산 요구성 변이균주를 얻기 위해서 NTG 농도(50, 100, 200, 300, 500 μg/ml)와 처리시간 (20, 40, 60분)을 각각 달리하여 BS 101의 아미노산 요구성 변이균주의 유도조건을 조사한 결과 Fig. 1 과 같다. NTG 농도와 처리시간이 증가됨에 따라 BS 101의 치사율은 높아지는 결과를 보였으며, NTG 농도 300 μg/ml로 40분간 처리했을 때 치사율이 73% 이상이었으며 아미노산 요구성 변이균주의 출현율은 좋은 경향을 나타냈다. 한편 BT 37669의 아미노산 요구성 변이균주 유도는 NTG 농도(50, 100, 150, 200, 300, 400 μg/ml)와

처리시간 (10, 20, 30분)을 각각 달리하여 BS 101의 아미노산 요구성 변이균주의 유도조건과 동일한 방법으로 조사하였는데 그 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다. NTG 농도와 처리시간에 따른 아미노산 변이균주의 출현율은 BS 101과 동일한 경향을 보였으며 NTG 농도 300 μg/ml로 30분간 처리했을 때 치사율은 약 69% 정도였고 아미노산 요구성 변이균주의 출현율도 양호하였다. 따라서 BS 101은 37℃에서 40분간 NTG 농도 300 μg/ml, BT 37669는 37℃에서 30분간 300 μg/ml를 처리한 후 정지배양하여 Table 1에 제시된 각각의 아미노산이 포함되어 있는 최소배지에 replica plating하여 아미노산 요구성 균주를 검정하고 이들 균주를 30회 계대배양하여 안정성을 확인한 다음 nutrient broth에 배양하여 -75℃에 냉동보관하며 필요에 따라 사용하였다.

선발된 이들 아미노산 요구성 변이균주를 병원성

사상균과 PDA 배지상에서 대치배양한 결과 *BS 101*에서 유도된 histidine 요구성 변이균주(*BS 1013*), *BT 37669*에서 유도된 aspartate 요구성 변이균주(*BT 69*)가 병원성 사상균에 대한 길항력이 가장 우수하였으며 따라서 이들 균주를 원형질체 형성 및 재생을 위한 공시균주로 선발하였다.

이들 아미노산 요구성 변이균주의 생리·생화학 적 성질을 조사한 결과, *BS 1013*은 Gram 양성으로 포자를 형성하였으며 catalase test(+), oxidase test(+), starch와 gelatin 가수분해성(+), Voges proskauer(+), 혐기상태에서의 생존(-), lecithinase(-), arginine dihydrolase 활성(-), urease(-), indole test(-), esculin 가수분해성 (+) 및 methyl red(+) 등의 주요 성질 들은 모균주의 *BS 101*과 동일하였으나, 일부 탄소의 이용성에서 차이를 보여 주었다.

*BT 69*는 Gram 양성으로 포자를 형성하였으며 catalase test(+), oxidase test(+), starch와 gelatin 가수분해성(+), Voges proskauer (-), 혐기상태에서의 생존(-), urease(+), indole test(-), esculin 가수분해성(+), methyl red(-) 탄소원 이용성 등의 성질은 모균주인 *BT 37669*와 동일하였으나, lecithinase(-), arginine dihydrolase 활성(-) 및 sucrose(-)등의 일부 성질이 변화되었다.

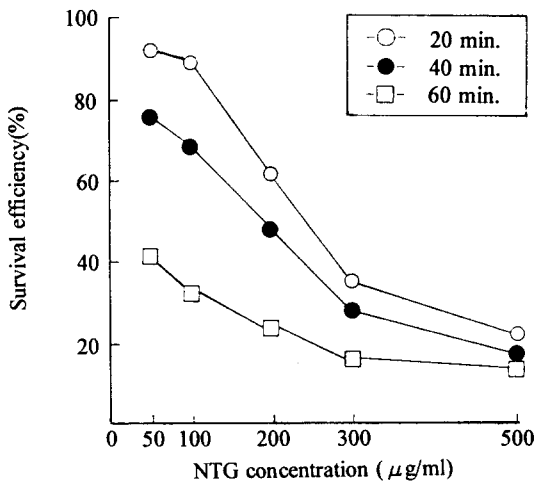


Fig. 1. Effects of NTG concentration and incubation time on survival efficiency of *B. subtilis*

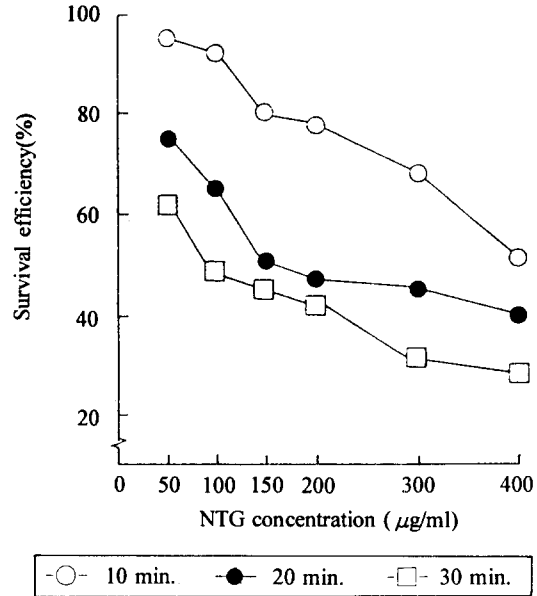


Fig. 2. Effects of NTG concentration and incubation time on survival efficiency of *B. thuringiensis*

2. 원형질체 형성 및 재생

일반적으로 세균으로 부터 최적의 원형질체를 얻기 위해서는 세포벽 분해효소, 세포회수시기, 배양온도, 배양시간 등이 고려되어야 하고, 원형질체의 세포벽 재생은 성장배지, 배양온도, 배양시간, 완충용액 및 삼투압 안정제 등의 여러 요인에 의해 영향을 받는데 본 시험에서는 세포벽 용해에 널리 이용되고 있는 난백 lysozyme의 농도, 배양온도 및 배양시간을 각각 달리하여 각 균주의 원형질체 형성 및 재생을 위한 최적조건을 조사하였다.

Fig. 3은 lysozyme 농도 (100, 200, 300 및 400 µg/ml)에 따른 *BS 1013*의 원형질체 형성을 및 재생율을 나타낸 것으로 lysozyme 농도가 증가함에 따라 원형질체 형성율은 증가하였으며 400 µg/ml의 lysozyme 농도에서 92% 이상의 원형질체 형성율을 나타냈다. 원형질체 재생율은 lysozyme의 농도가 증가함에 따라 점차적으로 감소되는 경향을 보였고 300 µg/ml 처리시 재생율은 0.52% 정도였으나 400

$\mu\text{g/ml}$ 처리시에는 재생율이 0.11%로 약 5배 정도의 급격한 감소를 나타냈다.

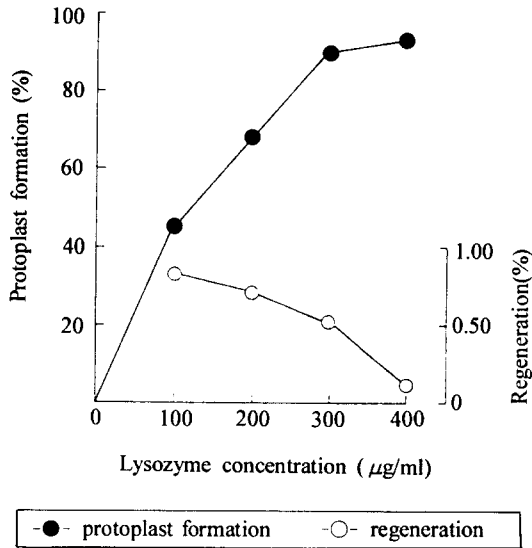


Fig. 3. Effects of lysozyme concentration on protoplast formation and regeneration of *B. subtilis*

배양온도 4, 28, 37 및 42°C에서 각각 배양한 결과 (Fig. 4) 배양온도가 증가함에 따라 원형질체 형성율은 증가하였으며 배양온도 37°C와 42°C에서 90% 이상의 원형질체 형성율을 나타냈다. 원형질체의 재생율은 배양온도 37°C에서 0.52%의 최적 재생효과를 보였으나 42°C에서는 전혀 세포벽 재생이 이루어지지 않았는데 이는 *BS 1013*의 원형질체는 배양온도에 매우 감수성이 높기 때문인 것으로 생각된다.

배양시간 (10, 20, 40 및 60분)에 따른 원형질체 형성율 및 재생율은 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 배양시간이 증가함에 따라 원형질체 형성율은 증가하는 경향을 보였는데 40분 이상 배양함으로써 원형질체 형성율이 약 90% 이상을 나타냈다. 원형질체 재생은 배양시간이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였고, 40분까지 배양했을 때는 완만한 감소를 보였으나 60분 배양시에는 0.3%로 약 2배 이상의 급격한 감소를 나타냈다.

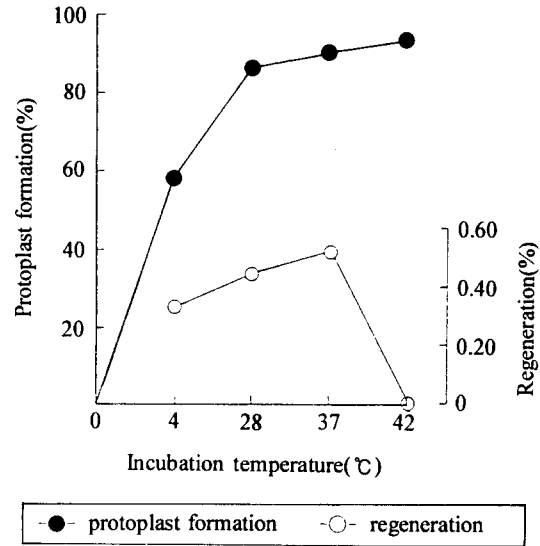


Fig. 4. Effects of incubation temperature on protoplast formation and regeneration of *P. subtilis*

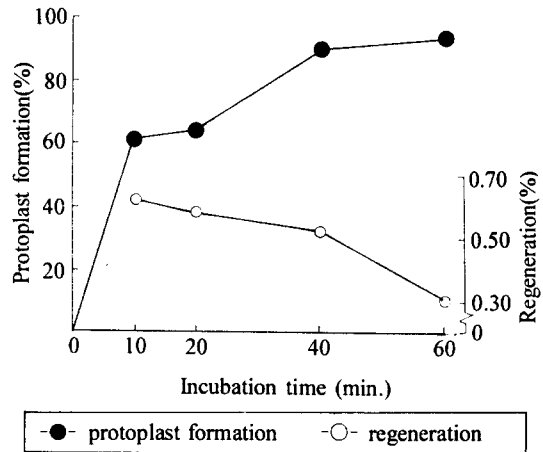


Fig. 5. Effects of incubation time on protoplast formation and regeneration of *B. subtilis*

Lysozyme 농도(7, 8, 9 및 10 mg/ml)에 따른 *BT 69*의 원형질체 형성율 및 재생율(Fig. 6)은 lysozyme 농도가 증가함에 따라 원형질체의 형성율이 증가하였으며 10 mg/ml 이상의 lysozyme 농도의 96% 이상의 원형질체 형성율을 나타냈다. 그러나 원형질체 재생

올은 lysozyme의 농도가 증가함에 따라 점차적으로 감소되는 경향을 나타냈다.

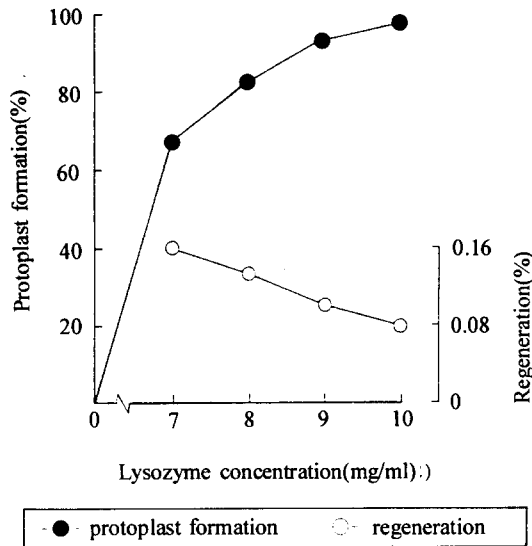


Fig. 6. Effects of lysozyme concentration on protoplast formation and regeneration of *B. thuringiensis*

배양온도 4, 28, 37 및 42°C에서 각각 배양한 결과 (Fig. 7) 배양온도가 증가함에 따라 원형질체 형성율은 증가하는 경향을 보였으며 37°C와 42°C에서 92% 이상의 원형질체를 형성하였다. 원형질체 재생은 각각의 온도에서 세포벽이 재생됨을 알 수 있었으나 *BT 69*의 최적온도인 37°C보다 낮은 28°C에서 가장 좋은 재생율을 나타냈다.

배양시간(20, 40, 60, 90분)에 따른 원형질체 형성율 및 재생율은 Fig. 8에 나타낸 바와 같이 배양시간이 증가함에 따라 원형질체 형성율은 증가되는 경향을 보였으며 60분 이상 배양했었을 때 92% 이상의 원형질체를 형성하였다. 그러나 원형질체 재생율은 배양시간이 증가함에 따라 점차적으로 감소되는 경향을 나타냈다. 이처럼 *BS 1013* 및 *BT 69* 모두 배양시간이 경과됨에 따라 원형질체 재생율이 감소되었는데 이는 효소의 반응시간이 길어지면 재생율이 감소된다고 한 Choi 등 (1989)의 보고와 비슷한 결과를 나타냈다.

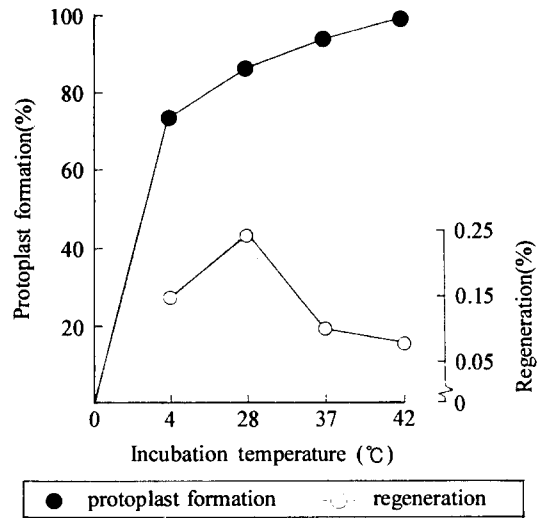


Fig. 7. Effects of incubation temperature on protoplast formation and regeneration of *B. thuringiensis*

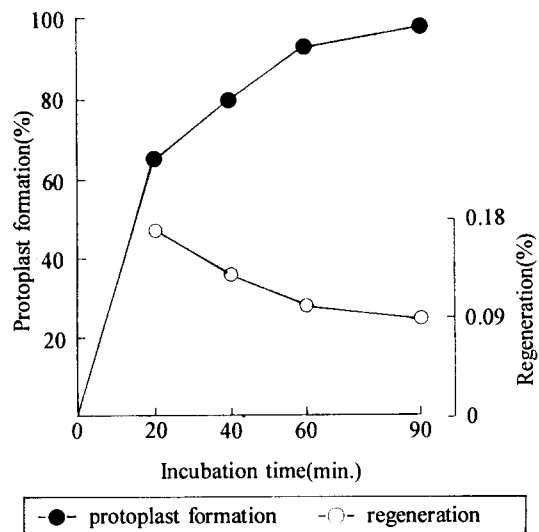


Fig. 8. Effects of incubation time on protoplast formation and regeneration of *B. thuringiensis*

이상의 결과를 요약해 보면 lysozyme 농도, 배양온도 및 배양시간을 각각 달리하여 원형질체 재생을 고려한 원형질체 형성조건 즉, *BS 1013*은 37°C에서 40분간 배양시 300 μ g/ml의 lysozyme 농도를, *BT 69*

는 37°C에서 60분간 배양시 9 mg/ml의 lysozyme 농도를 최적조건으로 확립하였다. 한편 BT 69는 BS 1013 보다 lysozyme 농도가 약 30배 정도 높았을 뿐 아니라 배양시간도 20분 더 소요됐는데 이러한 현상은 균종간의 세포벽 구성 성분과 결합의 차이 때문인 것으로 생각된다. 그리고 BT 69는 BS 1013 보다 상대적으로 원형질체의 재생율이 약 2~5배 정도 낮은 현상을 보여주었다.

Jin 등 (1990), Fodor와 Alfoldi(1976)은 lysozyme만으로 *Bacillus*속 세균의 세포벽을 쉽게 용해하여 원형질체를 얻었는데 본 시험에서도 두 균주 모두 lysozyme으로 쉽게 원형질체를 형성하였다. 그리고 Choi 등(1989) 및 Yoon 등(1987)은 *Bacillus*속 세균의 원형질체 형성시 배양시간이 중요하다고 보고하였는데 본 시험에서도 배양시간이 경과됨에 따라 원형질체 형성율이 증가됨을 알 수 있었다.

Lee-Wichner와 Chassy(1984)은 세포벽 용해효소의 용해시간이 원형질체 재생을 저해한다고 보고하였는데 본 시험에서도 두 균주 모두 배양시간이 길어짐에 따라 원형질체 재생율이 감소되었다. 따라서 Choi 등(1989)이 보고한 것처럼 원형질체 재생빈도를 고려하여 효소농도와 반응시간을 신중히 검토함으로써 원형질체 재생율을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

IV. 적 요

본 연구는 목초의 생산성 향상과 병충해에 대한 효과적인 생물학적 방제를 위해, 토양전염성 병원균에 길항력과 유해곤충에 살충력을 갖는 효율적인 융합균주를 얻기 위하여 원형질체 형성 및 재생조건을 조사하고자 수행되었다. 공시균주인 BS 101과 BT 37669에 NTG를 처리하여 아미노산 요구성 변이균주를 각각 얻었는데 BS 1013은 histidine 요구성 변이주 및 BT 69는 aspartate 요구성 변이주로 나타났다. BS 1013은 37°C에서 30분 동안 lysozyme 300 µg/ml을 처리하고, BT 69는 37°C에서 40분 동안 lysozyme 9 mg/ml 처리하였을 때 각각 90%, 92.83%의 원형질체를 형성하였으며 그리고 재생율은 각각 0.52%,

0.1%로 나타났다.

V. 참고 문헌

1. Akamatsu, T. and J. Sekiguchi. 1981. Studies on regeneration media for *Bacillus subtilis* protoplast. Agric. Biol. Chem., 45:(12)2887-2894.
2. Bechtel, D. B. and L. A. Bulla, Jr. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. J. Bacteriol., 127:1472-1481.
3. Chang, S. and S. N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. Mol. Gen. Gen., 168:111-115.
4. Choi, Y.M., T.K. Lee, B.S. Hong, H.C. Sung and H.C. Yang. 1989. Protoplast fusion of alkaline protease producing *Bacillus subtilis*. J. Kor. Agric. Chem. Soc., 32(4):435-440
5. Collins, C.H. and P.M. Lyne. 1984. Microbiological method(5th ed), Butterworths, London.
6. Cook, R.J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. Phytopath., 75(1):25-29.
7. Dulmage, H.T. 1970. Production of the spore delta-endotoxin complex by variants of *Bacillus thuringiensis* in two fermentation media. J. Invertebr. Pathol., 16:385-389.
8. Fodor, K. and L. Alfoldi. 1976. Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 73:2147-2150.
9. Goldberg, L.J. and J. Margalit. 1979. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News. 37:355-358.
10. Handelsman J., S. Raffel, E.H. Mester, L. Wunderlich and C.R. Grau. 1990. Biological control of damping - off of alfalfa seeding with *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol., 56(3)

- :713-718.
11. Höfte, H and H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *B thuringiensis*. Microbiol. Rev., 53(2):242-255.
 12. Jin, S.H., B.G. Park, M.H. Roh, D.G. Kim and B. H. Ryu. 1990. Production of vitamin B₁₂ by using protoplast fusion between *Bacillus natto* and *Bacillus megaterium*. Kor. J. Food Sci. Technol., 22(6):611-617.
 13. Kim, Y.L. 1993. Development of genetically engineered biological control agents and their application, Ph.D. thesis, Chonnam Natl. Uni.
 14. Krieg, N.R. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore.
 15. Lee-Wickner, L. and B.M. Chassy. 1984. Production and regeneration of *Lactobacillus casei* protoplasts. Appl. Environ. Microbiol., 48:994-1000.
 16. Ogiwara, K., K. Sakanaka and H. Hori. 1993. Simple method to evaluate sterilization of recombinant *Pseudomonas* carrying insecticidal protein gene. Nippon Nogeikagaku Kaishi., 67(6):941-947.
 17. Phae, C.G., M. Shoda and N. Kita. 1992. Biological of crown and root rot and bacterial with of tomato by *Bacillus subtilis* NB22. Ann. Phytopath. Soc., 58:329-339.
 18. Phae. C.G., M. Shoda. and H. Kubota. 1990. Suppressive effect of *Bacillus subtilis* and its products on phytopathogenic microorganisms. J. Ferment. Bioeng., 69:1-7.
 19. Rothrock, C.S. and D.Gottlieb. 1981. Importance of antibiotic production in antagonism of selected *Streptomyces* species to two soil-borne plant pathogens. J. Antibiot., 34:830-835.
 20. Savithiry, S. and S.S. Gnanamanickam. 1987. Bacterization of peanut with *Pseudomonas fluorescens* for biological control of *Rhizoctonia solani* and for enhanced yield. Plant and Soil, 102:11-15.
 21. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper and H.G. Schlegel. 1981. The prokaryotes: A handbook and identification of bacteria. Springer-Verag, Berlin, Heidelberg, New York.
 22. Swinburne, T.R., J.G. Barr and A.E. Brown. 1975. Production of antibiotics by *Bacillus subtilis* and their effect on fungal colonists of apple leaf scars. Trans. Br. Mycol. Soc., 65:211-217.
 23. Utkhede. R.S. 1984. Antagonism of isolated of *Bacillus subtilis* to *Phytophthora cactorum*. Can. J. Bot., 62:1032-1035.
 24. Weller, D.M. 1988. Biological control of soil borne pathogens in the rhizosphere with bacteria. Ann. Rev. Phytopath., 26:379-409.
 25. Yoon, S.H., Y.H. Kim, B.S. Koo, S.S. Oh, J.C. Ryu and T.Y. Chung. 1987. Studies on mutagenesis and protoplast fusion of antagonistic microorganisms against soil-born phytopathogenic fungi. Kor. J. Plant Tissue Culture, 14(1)39-47.
 26. 加藤邦彦. 1987. *Bacillus subtilis* 選擇培地. Abstract of the Japanes society of soil science and plant nutrition, 33:45.