Korean Journal of Food Preservation Vol. 10. No. 2, pp.224~229 (2003) 한국식품저장유통학회지

건전 양파 근권으로부터 *Bacillus ehimensis* YJ-4의 분리 및 양파 병원균들에 대한 길항력 조사

주길재 · 이인구
경북대학교 농화학과

Antibacterial Activity of Onion Pathogens and Isolation of *Bacillus ehimensis* YJ-4 from the Rhizosphere of Healthy Onion Roots

Gil-Jae Joo and In Koo Rhee
Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook Nat'l Univ., Daegu 702-701, Korea

Abstract

This study was carried out to isolate of antagonistic bacterium to *Allium cepa* L. pathogens. A total of 250 strains were isolated from *A. cepa* L. roots. The isolates were screened for antagonism to *A. cepa* L. pathogens and the isolated strain No. YJ-4 was selected among these bacteria. It was identified as *Bacillus ehimensis* based on morphological and physiological characteristics according to the Bergey's mannual of systematic bacteriology, Sherlock system of Microbial ID Inc. and 16S rDNA sequences methods. *Bacillus ehimensis* YJ-4 showed broad spectrum of antibacterial and antifungal activities against plant pathogens as *Alternaria porri, Botrytis cinerea, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora, Fusarium oxysporium, Penicillium* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhizoctonia solani, Sclerotium cepivorum , Septoria* sp., *Stemphylium botryosum.* Speially *B. ehimensis* YJ-4 showed high antifungal activity on growth against *F. oxysporium*, the causal agent of onion Fusarium wilt.

Key words : Antagonistic, *Bacillus ehimensis*, onion, identification

서 론

양파 재배시에 주로 발생하는 세균병해는 무름병(*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)과 세균썩음병(*Pseudomonas* sp.) 등이며, 곰팡이병해는 잘록병(*Rhizoctonia solani*), 잎마름병(*Stemphylium botryosum*), 검은무늬병(*Alternaria porri*), 검은점잎마름병(*Septoria* sp.), 잿빛곰팡이병(*Botrytis cinerea*), 노균병(*Peronospora destructor*), 흑색썩음균핵병(*Sclerotium cepivorum*), 시들음병(*Fusarium oxysporium*) 및 푸른곰팡이병(*Penicillium* sp.) 등이 주로 발생되며, 특히 양파 저장 중에 부패를 일으키는 원인 균으로는 *Bortytis allii, Erwinia carotovora* subsp. *carotovora, Pseudomonas marginalis, Aspergillus niger* 등이 알려져 있다(1).

최근 길항미생물을 이용한 식물 병의 생물학적 방제에 관한 연구가 많이 진행되고 있으며, 미생물학적 방제가 환경오염이나 인축의 농약중독을 감소시킬 수 있는 친환경농업으로 인식되면서 각종 미생물 농자재들이 개발되어 등록·시판되고 있다(2).

토양병의 생물학적 방제제로 이용한 길항미생물은 *Agribacterium radiobacter* K 84(3), *Bacillus subtilis*(4,5), *Chaetomium globosum*(5,6), *Gliocladium virens*(7,8), *Penicillium oxalicum*(9,10), *Pseudomonas fluorescence*(11-12) 등이 알려져 있으며, 또한 길항미생물이면서 식물생장촉진미생물(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)(13)은 *Pseudomonas* spp. *Bacillus* spp. *Azotobacter* spp. *Azospirillum* spp. and *Burkholderia* spp. 등이 알려져 있다(14).

외국에서는 이미 PGPR을 활용한 작물생장 촉진 및 생물학적 방제 연구로 감자(15)와 사탕무우(16), 완두콩(17), 봄밀(18) 등에서 연구가 진행되어 부분적으로 제제화되어 있으며, 우리나라에서도 *Bacillus* 속, *Pseudomonas* 속을 이용한 *in vivo* 병방제시험이 수도병(19), 고추역병(20-22), 담배(23), 채소류(24) 등에 대해 이루어져 있다.

본 연구는 양파 병해의 생물학적 방제를 위한 기초실험의 일환으로 양파 뿌리에서부터 근권미생물을 분리하고 무름병균과 시들음병균에 길항력을 가지고 있는 미생물을 선별하여 동정하였으며, 양파의 부패와 관련이 있는 각종 세균성 및 곰팡이성 병균에 대한 길항력을 조사하였기에 보고하는 바이다.

Corresponding author : Gil-Jae Joo, Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook Nat'l Univ., Daegu 702-701, Korea
E-mail : gjjoo@knu.ac.kr

재료 및 방법

근권미생물의 분리 및 보관

균원시료는 경남 함양군과 경북 청도군 일원에서 일반적으로 재배되고 있는 양파의 뿌리를 수집하여 균원시료로 이용하였다. 균원시료인 뿌리를 잘 세척하고 그 크기가 1㎜가 되게 절단하여 그 1g에 0.85% NaCl 멸균수 10㎖를 첨가하고 3단 희석한 후 세균은 nutrient agar (NA) 배지, tryptic soy broth (TSB) 배지에서 37℃ 3일간 배양하였고, 방선균은 yeast extract - malt extract agar (YMA) 배지에서 30℃에서 5일간, 곰팡이는 potato dextrose agar (PDA) 배지에서 28℃에서 7일간 배양하여 순수 독립 colony 만을 분리하여 근권미생물로 사용하였다. 근권미생물의 보관은 각종 분리배지 및 배양조건에서 진탕 배양시킨 후 배양액을 4℃에 보관하거나 동결건조기로 건조하여 분말상태로 보관하면서 사용하였다.

병원균의 배양 및 보관

양파의 병원성 세균은 무름병균 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)과 세균썩음병균 (*Pseudomonas* sp.)으로 본 실험실에서 보관 중인 균주이며 LB 배지에서 37℃에서 2일간 배양하여 4℃에 보관하거나 동결건조기로 건조하여 분말상태로 보관하면서 사용하였다. 또한 양파의 병원성 곰팡이로는 잘록병균 (*Rhizoctonia solani*), 잎마름병균 (*Stemphylium botryosum*), 검은무늬병균 (*Alternaria porri*), 검은점잎마름병균 (*Septoria* sp.), 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*), 흑색썩음균핵병균 (*Sclerotium cepivorum*), 시들음병균 (*Fusarium oxysporium*) 및 푸른곰팡이병균 (*Penicillium* sp.) 등은 실험실에 보유 중이거나 농촌진흥청 식물병리과, 한국과학기술원 유전자은행 (KCTC), 경북대학교 농생물학과 등에서 분양 받아 이용하였다. 이들 병원성 곰팡이 균주는 PDA (Potato Dextrose Agar) 배지 상에서 28℃ 조건으로 7일간 배양한 다음 4℃ 배양기에 넣고 보관하거나 배양배지를 가로 x 세로 1㎝ 단편으로 절단하여 살균된 증류수에 넣고 4℃에서 보관하면서 사용하였다.

길항력조사

양파의 병원균에 대한 길항력이 있는 균의 선발을 위한 길항력 조사는 양파 뿌리 근권미생물과 각종 병원균을 대치배양 (pairing plate culture)하여 생육억제환의 크기로 조사하였다. 즉 병원성 진균과의 길항력은 PDA 배지에서 키운 병원균체 덩어리 (가로 0.5㎝ x 세로 0.5㎝)를 PDA 배지 중앙에 올려놓고 가장자리 4곳에 순수 분리한 근권미생물을 한 백금이씩 접종하여 28℃에서 7일간 배양한 후 병원균의 균사체의 생장억제 정도 (inhibition zone)를 조사하여 생성된 clear zone의 길이(㎜)나 대치배양거리 5㎝에 대한 생육억제 정도 (%)로 길항력을 나타내었다. 또한 병원성 세균의 길항력 조사는 먼저 TSA 배지에 세균을 골고루 도말한 후 가장자리 4곳에 근권미생물을 한 백금이씩 접종하여 37℃에서 3일간 배양한 후 상기 병원성 진균의 길항력 조사와 동일하게 조사하였다.

세균의 동정

길항미생물의 동정은 Bergey's mannual of systematic bacteriology의 방법(25)에 준하여 미생물의 형태학적, 배양학적, 생리·생화학적 특성을 조사하였으며, 미생물의 세포벽의 지방산 조성으로 자동 동정하는 Microbial ID Inc.의 Sherlock system (미생물동정장치, GC : HP Co., 6890 series)을 이용하여 제조사가 추천하는 방법에 따라 분석하였고, 또한 16S rDNA sequence 법(26)은 길항균의 염색체 DNA를 추출한 후 PCR primer로 R14 (5'-ACg ggC ggT gTg TAC-3')와 R15 (5'-gCC AgC AgC CgC ggT A-3')를 이용하여 PCR 산물을 얻고 이를 분석 의뢰하였으며, 그 sequencing data는 ribosomal database (http://rdp.cme.msu.edu/html/ analyses. html)에서 상동성을 검색하여 동정하였다.

결과 및 고찰

양파 근권미생물의 분리 및 길항균의 선발

양파 근권미생물은 경남 함양군 43점과 경북 청도군에 56점 등 총 99점의 양파 뿌리를 균원시료로 하여 각종 미생물 분리 배지에서 약 250여종의 근권미생물을 순수 분리하였다. 이들 근권미생물은 양파의 무름병균 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)과 시들음병균 (*Fusarium oxysporium*)에 각각 서로 대치 배양하여 생육저지대 측정법으로 조사한 후 세균 및 진균에 각각 길항력이 우수한 5종의 미생물을 선별하였다 (Table 1). 이들 5종의 근권 길항미생물은 세균 3종, 방선균 1종, 곰팡이 1종으로서 이들을 다시 2차 시험하여 가장 강한 길항 효과를 나타내는 세균 YJ-4 균주를 최종 선발하였다.

Table 1. Isolation of antagonistic bacteria to *Fusarium oxysporum*[a] causing Fusarium wilt and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*[b] causing sotf rot from onion roots

Sample	No. of samples tested	No. of isolates obtained	No. of antagonistic at two pathogens
Hamyoung-gun	43	67	3
Chungdo-gun	56	189	2
Total	99	256	5

[a] Inhibition zones on dual culture between the rhizobacterium and *Fusarium oxysporum* indicate on the PDA medium after incubation for 10 days. Each values is mean of three replications. [b] Inhibition zones on dual culture between the rhizobacterium and *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* streaking on the TSA medium after incubation for 3 days. Each values is mean of three replications. All values are mean ±SD and the average of three samples.

미생물의 일반적인 동정

상기 선발균주 YJ-4는 Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology에 의거하여 조사한 결과, gram 염색에서 양성이었고, 운동성이 없으며, 전자현미경 관찰 하에서는 여러 개의 편모를 가지고, 내생포자를 형성하는 간균이며, Table 2와 같이 배양학적 특성을 조사한 결과, catalase는 음성, 혐기적 조건에서는 생육이 불가능하였으며, Voges-Prostaure test 양성, D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-mannitol에서는 산을 생성하였고, glucose에서 배양할 경우 가스를 생성하였으며, casein은 가수분해하지 못하고 gelatin, starch를 가수분해하며, tyrosine을 분해하지 못하였고, 또한 nitrate reduction과 citrate 이용성 및 indole 생성능은 음성, 2% NaCl 이하 농도에서는 생육이 가능하며, 45℃까지는 생육하나 50℃에서는 생육하지 못하는 특성을 가지고 있었다. 이러한 결과들을 전형적인 *Bacillus* 속으로 확인되었다.

Table 2. Comparison of the characteristics of an antagonistic bacterial isolate strain No. YJ-4 with the *Bacillus* sp. in Bergey's Mannual [a)]

Characteristics	*B. ehimensis* YJ-37[24)]	YJ-4	*B. polymyxa*	*B. ehimensis*
Cell diameter (>1.0㎛)	-	-	-	-
Spore round	-	-	-	-
Sporangium swollen	-	-	+	-
Catalase	+	+	+	+
Anaerobic growth	-	-	+	-
Voges-Proskauer test	+	+	+	+
Acid from D-glucose	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	+
Gas from glucose	+	+	+	+
Hydrolysis of casein	+	-	-	+
gelatin	+	+	+	+
starch	+	+	+	+
Degradation of tyrosine	-	-	-	-
Nitrate reduced to nitrite	-	-	+	-
Formation of indole	-	-	-	-
NaCl and KCl required	-	-	-	-
Growth of pH 6.8	+	+	+	+
5.7	+	+	+	+
Growth in NaCl 2%	+	+	ND	+
5%	-	-	-	+
7%	-	-	-	-
10%	-	-	-	-
Growth at 5℃	-	-	d	-
10℃	+	+	+	+
30℃	+	+	+	+
40℃	+	+	+	+
50℃	+	-	-	+
55℃	-	-	-	-
65℃	-	-	-	-

[a)] Symbols : +, 90% or more of strains are positive; -, 90% or more of strains negative; d, 11-89% of strains are positive; ND, no data available

Sherlock system에 의한 동정

Sherlock system에 의한 길항균 YJ-4의 세포벽 지방산을 분석한 결과, Fig. 1과 같이 주로 C14:0 iso, C15:0 iso, C15:0 anteiso, C16:1 w7c alcohol, C16:0 iso, C16:1 w11c, C16:0, C17:0 iso, C17:0 anteiso로 이루어져 있으며, 포화지방산인 C15:0 iso (7,74%), C15:0 anteiso (53,96%), C16:0 iso (12.21%) 및 C17:0 anteiso (10.4%)가 많이 포함되어 있었다. 이러한 결과, *Bacillus ehimensis*는 표준균주와 0.778의 유의성 즉, 77.8%의 유사도을 가지는 것으로 확인되었다.

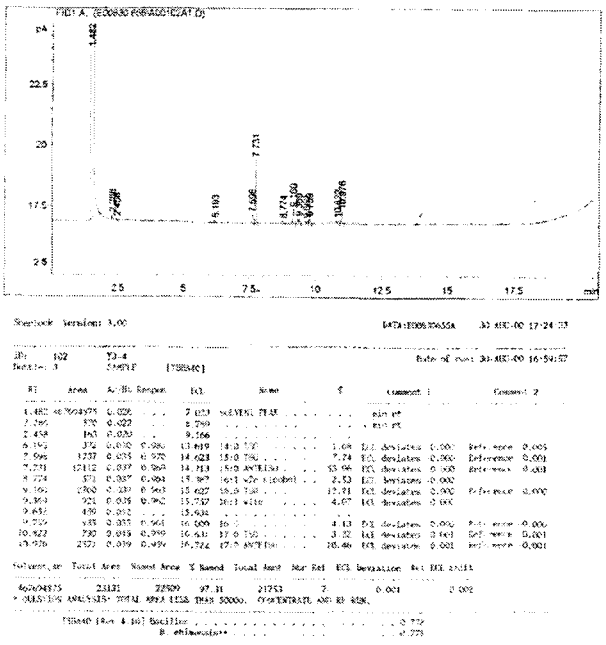

Fig. 1. Identification of isolate YJ-4 by Sherlock system (Microbial I.D. Inc., USA).
The Sherlock system consists of a gas chromatograph equipped with a flame ionization detector, 5% methylphenyl silicone fused-silica capillary column (25m by 0.2㎜), automatic sampler, integrator, computer, and CFA analysis data bank. The isolates were analyzed according to the manufacturer's recommendations.

16S rDNA 염기서열 결정에 의한 동정

상기 YJ-4 균주의 16S rDNA sequence는 일반적인 방법으로 염색체 DNA를 분리하고 PCR primer R14와 R15를 이용하여 PCR 산물을 얻고 이를 분석 의뢰하여 부분 염기서열 609bp를 결정하여 ribosomal database에서 상동성을 검색한 결과, Fig. 2에서와 같이 분리주 YJ-4는 *Bacillus ehimensis*의 표준균주와 98.36%의 높은 유사도를 보였으며, *Paenibacillus koreensis*와 97.36%, *Paenibacillus validus*와 93.90%, *Paenibacillus chibaensis*와 93.17%의 유사도를 나타내었다. 이상의 3가지 동정법에 의해 동정한 결과 근권 길항미생물인 YJ-4 균주는 *Bacillus ehimensis*로 동정되었기에 *Bacillus*

ehimensis YJ-4라 명명하였다.

KOREAN COLLECTION FOR TYPE CULTURES
P.O. Box 115, Yusong, Taejon 305-600, KOREA
TEL: 82-42-860-4610 FAX: 82-42-860-4611 E-mail: ksbae@kribb468ll.kribb.re.kr

S00-21-4 (YJ-4)
1. 결정된 염기서열의 개수: 609 bp.

2. 결정된 염기서열:

AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
TAACTACCGGAAACGGTATGCTAAGACCGGATAAGTGATTCTCTTGCATG
AGAGGATCAAGAAACACGGGGCAACCTGTGGCTTACAGATGGGCCTGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGCAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT
TGCCAGGGAAGAACGTCGTGGAGAGTAACTGCTCTGCGAATGACGGTACC
TGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGC
CGCTTAAGTCTGGTGTTTAAGCCCGAGGCTCAACCTCGGTTCGCACTGGA
AACTGGGTGGCTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCACCTGTAGCG
GTGAAATGC

3. Similarity 분석결과:

Strain	%Similarity
Bacillus ehimensis IFO 15659T	98.36
Paenibacillus koreensis YC300T	97.36
Paenibacillus validus DSM 3937T	93.90
Paenibacillus chibensis NRRL B-142T	93.17

Fig. 2. 16S rDNA partial sequence (609bp) of the isolated strain No. YJ-4.
The PCR primer was R14 (5'-ACg ggC ggT gTg TAC-3') and R15 (5'-gCC AgC AgC CgC ggT A-3'), The sequencing data (609 bp) were analyzed from ribosomal database (http://rdp.cme.msu.edu/html/analyses.html).

*Bacillus ehimensis*는 Kuroshima 등(27)이 chitosanase를 분비하는 고초균으로 토양으로부터 분리·동정하여 처음 보고하였으며, 1999년 일본에 Akiyama 등(28)이 chitosanase의 정제 및 그 유전자를 cloning하여 발표하였고, 2000년 일본에 Shmosaka 등(29)이 그 유전자의 특성에 관하여 발표하였다.

*B. ehimensis*를 이용한 생물학적 방제는 주 등(24)이 채소류의 모잘록병균에 높은 길항력을 가지고 있음을 보고하였다. 그러나 채소류 모잘록병균에 길항균인 *B. ehimensis* YJ-37 균주는 casein 분해력이 있고 50℃에서 생육능이 있는 등 *B. ehimensis* YJ-4와는 몇가지 다른 생리학적 차이점을 가지고 있었고 또한 세포벽의 지방산의 조성도 *B. ehimensis* YJ-37 균주는 주로 C14:0 iso, C14:0, C15:0 iso, C15:0 anteiso, C15:0, C16:1 w7c alcohol, C16:0 iso, C16:1 w11c, C16:0, C17:1 w10c, C17:0 iso, C17:0 anteiso로 이루어져 있어 *B. ehimensis* YJ-4 와는 조금씩 다르게 나타났으며, 16S rDNA의 염기서열도 차이가 있어 동일한 종의 균주일지라도 특성이 조금 다른 유연균으로 판단하였다.

양파의 각종 병원성 진균에 대한 *B. ehimensis* YJ-4 항진균성 조사

양파의 병원성 세균 및 진균에 대한 *B. ehimensis* YJ-4의 항진균성을 조사하였다. 그 결과, Table 3과 같이 세균인 무름병균 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)과 생육억제환의 길이가 2.8㎜로 나타났고 세균썩음병균 (*Pseudomonas* sp.)과는 2.0 ㎜로 길항력을 나타내었고, 병원성 진균인 잘록병균 (*Rhizoctonia solani*)은 18.2㎜, 잎마름병균 (*Stemphylium botryosum*)은 15.0㎜, 검은무늬병균 (*Alternaria porri*)은 20.6 ㎜, 검은점잎마름병균 (*Septoria* sp.)은 7.2㎜, 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*)은 21.3㎜, 흑색썩음균핵병균 (*Sclerotium cepivorum*)은 19.4㎜, 시들음병균 (*Fusarium oxysporium*)은 24.8㎜ 및 푸른곰팡이병균 (*Penicillium* sp.)은 5.1㎜ 등의 길항효과를 나타내었다. 특히 시들음병균인 *Fusarium oxysporium*에 24.8㎜로 가장 높은 길항력을 나타내었으며, 잿빛곰팡이병균, 검은무늬병균, 흑색썩음균핵병균, 잘록병균 순으로 비교적 높은 길항력을 나타내었다.

Table 3. Antagonistic effects of *Bacillus ehimensis* YJ-4 on the onion pathogens

Phytopathogenic bact.	㎜, inhibition of mycelial growth[a)]
Alternaria porri	20.6
Botrytis cinerea	21.3
Erwinia carotovora subsp. *carotovora*	2.8
Fusarium oxysporium	24.8
Penicillium sp.	5.1
Pseudomonas sp.	2.0
Rhizoctonia solani	18.2
Sclerotium cepivorum	19.4
Septoria sp.	7.2
Stemphylium botryosum	15.0

[a)] Inhibition diameter was obtained from clear zone method with 3 replications. All values are mean ±SD and the average of three samples.

시들음병균과 *B. ehimensis* YJ-4의 대치배양에서 시들음병균의 균사는 용해되어 검은 색소를 생성하였으며, 검은무늬병균의 균사는 배지에 접촉되는 부위는 액체 분비물이 생성되었고, 흑색썩음균핵병은 15℃이하에서 배양할 경우 비교적 균사의 생장이 우수하였으나 길항균 *B. ehimensis* YJ-4의 생육은 부진하여 높은 길항력을 나타내지는 않았으나 37℃에서는 흑색썩음균핵병균의 균사의 생장은 현저히 적게 자랐지만 높은 항진균성 효과를 보였다. 결론적으로 *B. ehimensis* YJ-4는 양파에 발생되는 대부분의 각종 세균 및 진균 병원균에 대해 길항력을 가지고 있어 이를 제형화하고 실제 포장에 처리한다면 생물학적 방제 효과를 거둘수 있을 것으로 보고 현재 미생물제제화 실험을 진행 중에 있다.

요 약

양파 근권미생물은 양파 뿌리를 균원시료로 하여 약 250여종의 근권미생물을 순수 분리하였고 이들 중에서 길항미생물은 무름병균인 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*와 시들음병균인 *Fusarium oxysporium*에 각각 서로 대치배양하여 두 병원균 모두에 가장 강한 길항 효과를 나타내는 YJ-4 균주를 최종 선발하였다. 선발균주 YJ-4는 Bergey's mannual of systematic bacteriology 방법에 따라 조사하여 *Bacillus* 속으로 판정하였고, 세포벽 지방산을 분석하여 동정하는 Sherlock system에 의해 *Bacillus ehimensis*와 0.778의 유의성을 확인하였으며, 16S rDNA의 부분 염기서열(609bp)로 *Bacillus ehimensis*와 98.36%의 높은 유사도를 보여 길항균 YJ-4는 *Bacillus ehimensis*로 동정하였다. *B. ehimensis* YJ-4로 명명한 길항균은 세균인 무름병균 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*)과 세균썩음병균 (*Pseudomonas* sp.)에도 길항력을 나타내었고, 진균인 잘록병균 (*Rhizoctonia solani*), 잎마름병균 (*Stemphylium botryosum*), 검은무늬병균 (*Alternaria porri*), 검은점잎마름병균 (*Septoria* sp.), 잿빛곰팡이병균 (*Botrytis cinerea*), 흑색썩음균핵병균 (*Sclerotium cepivorum*), 시들음병균 (*Fusarium oxysporium*), 푸른곰팡이병균 (*Penicillium* sp.) 등에도 길항 효과를 나타내었다. 특히 시들음병균인 *F. oxysporium*에 생육억제환의 길이가 24.8㎜로 가장 높은 길항력을 나타내었다.

참고문헌

1. Chung, H.D. (1982) Control of onion bulb rot during storage at low temperature by postharvest treatment of fungicides. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 23, 17-22
2. David, M.W. (1988) Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 26, 379-407
3. Cooksey, D.A. and Moore, L.W. (1982) High frequency spontaneous mutations to agrocin 84 resistance in *Agrobacterium tumefecience* and *A. rhizogenes*. Physiol. Plant Path. 20, 129-136
4. Aldrich, J. and Baker, R. (1979) Biological control of *Fusarium roseum* f. sp. *dianthi* by *Bacillus subtilis*. Plant Disease Reptr. 54, 446-452
5. Chang, I. P. and Kommedahl, T. (1968) Biological control of seedling blight of corn by coating kernels with antagonistic microorganisms. *Phytopathol.* 58, 1395-1401
6. Wood, R.K.S. and Tveit, M. (1955) Control of plant diseases by use of antagonistic organisms. Bot. Rev. 21, 441-447
7. Howell, C.R. (1982) Effect of *Gliocladium virens* on *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, and damping-off of cotton seedlings. Phytopathol. 72, 496-502
8. Tu, J.G. (1980) *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathol. 70, 670-676
9. Kommedahl, T. and Windels, C.E. (1978) Evaluation of biological seed treatment for controlling root disease of pea. Phytopathol. 68, 1078-1084
10. Wildels, C.E. (1978) Growth of *Penicillium oxalicum* as a seed protectant aganist seedling blight of pea. Phytopathol. 68, 1656-1662
11. Sivasithamparam, K., Paker, C.A. and Edwards, C.S. (1979) Bacterial antagonistics to the take-all fungus and fluorescent pseudomonads in rhizosphere of wheat. Soil Biol. Biochem. 11, 161-167
12. Simmiley, R.W. (1978) Colonization of wheat roots with *Gaumanomyces graminis* inhibited by specific soils, microorganisms and ammonium nitrogen. Soil Bio. Biochem. 10, 175-181
13. Kloepper, J.W. (1991) Plant growth promoting rhizobacteria as biological control agents of soil-borne disease. p142-152. In The biological control of plant disease (Bay-Peterson, J. ed.) Food and Fertilizer Technology Center, Taiwan
14. Tang, W.H. (1994) Yield-increasing bacteria(YIB) and biocontrol of sheath blight of rice. In Improving plant productivity with rhizosphere bacteria (Ryder, M. H., Stephens, P.M. and Bowen, G.D. ed.) Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Adelaide, Australia. 267-278.
15. Lee, Y.H., Shin, G.Y., Lee, E.J. and Mew, T.W. (1990). Evaluation of biocontrol activity of fluorescent pseudomonads against some rice fungal disease in vivo and greenhouse. Kor. J. Plant Pathol. 6, 73-79
16. Kloepper, J.W., Schroth, M.N. and Miller, T.D. (1980) Effect of rhizosphere colonization by plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopathol. 70, 1078-1082
17. Suslow, T.V. and Schroth, M.N. (1982) Rhizoctonia of sugar beets: Effect of seed application and root colonization on yield. Phytopathol. 72, 199-206
18. Dandurand, L.M. and Knudsen, G.R. (1993) Influence of *Pseudomonas fluorescens* on hyphal growth and biocontrol activity of *Trichoderma harzianum* in the spermosphere and rhizosphere of pea. Phytopathol. 83, 265-270
19. Shivanna, M. B., Meera, M. S. and Hyakumachi, M.

(1994) Sterile fungi from zoysia grass rhizosphere as plant growth promoters in spring wheat. Can. J. Microbiol. 40, 637-644

20. Jee, H. J., Nam, C. G. and Kim, C. H. (1988) Studies on biological control of phytophthora blight of red-pepper. Ⅰ. Isolation of antagonists and evaluation of antagonistic activity in vivo and in greenhouse. Kor. J. Plant Pathol. 4, 305-311
21. Lee, E. J., Jee, H. J., Park, K. S. and Kim, C. H. (1990) Studies on biological control of phytophthora blight of red-pepper. Ⅳ. Performance agents in field under polyethylene filmhouse. Kor. J. Plant Pathol. 6, 58-64
22. Nam, C, G., Jee, H. J. and Kim, C. H. (1990) Studies on biological control of phytophthora blight of red-pepper. Ⅱ. Enhancement of antagonistic activity by soil amendment with organic materials. Kor. J. Plant Pathol. 4, 313-319
23. Yi, Y. K., Kim, J. H. and Park, W. M. (1986) Inhibition effect of avirulent *Pseudomonas solanacearum* on the multiplication of vilulent isolate in tobacco plant. Kor. J. Plant Pathol. 2, 114-120
24. Joo, G. J., Kim, J. H. and Kang, S. J. (2002) Isolation and antifungal activity of *Bacillis ehimensis* strain YJ-37 as antagonistic against vegetables damping-off fungi. Kor. J. Life Sci. 12, 242-249
25. Sneath, P. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, G. J. (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 2., The Williams & Wilkins, Baltimore.
26. Loffler, F. E., Sun, Q., Li, J. and Tiedje, J. (2000) 16S rRNA gene-based detection of tetrachoroethene-dechlorinating desulfuromonase and dehaloccoides species. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1369-1374
27. Kuroshima, K., Sakane, T., Takata, R. and Yokota, A. (1996) *Bacillus ehimensis* sp. nov. and *Bacillus chitinolyticus* sp. nov., new chitinolytic members of the genus *Bacillus*. Intl. J. System. Bacteriol. 46, 76-80
28. Akiyama, K., Fujita, T. Kuroshima, K. Sakane, T., Yokota, A. and Takata, R. (1999) Purification and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus ehimensis* EAG1. J. Biosci. Bioengin. 87, 383-385
29. Shimosaka, M., Fukumori, Y., Zhang, X. Y., He, N. J., Kodaira, R. and Okazaki, M. (2000) Molecular cloning and characterization of a chitosanase from the chitosanolytic bacterium *Burkholderia gladioli* strain CHB101. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54, 354-360

(접수 2003년 4월 20일, 채택 2003년 5월 20일)