

## 항진균성 항생물질을 생산하는 *Bacillus thuringiensis* BK4의 항생물질 정제와 토마토 시들음병의 효과적인 방제

임종희 · 정희경 · 김상달\*

영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

### An Antifungal Agent Produced by *Bacillus thuringiensis* BK4, an Antagonistic Bacterium against Fusarium Wilt Disease of Tomato

Lim, Jong-Hee, Hee-Kyoung Jung and Sang-Dal Kim\*

Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do 712-749, Korea

Received November 30, 2006; Accepted March 2, 2007

The optimum production condition for the antibiotic from *Bacillus thuringiensis* BK4 was determined, and the suppression rate of *Fusarium*-wilt by the butanol-extracted antibiotic was verified by employing tomatoes *in vitro* and *in vivo* pot tests. Cell growth and antifungal activity were the best when 0.5% xylose and 0.2% peptone No. 3 were given as carbon and nitrogen sources, respectively, in the presence of 5 mM CaCl<sub>2</sub>. The partially purified antibiotic successfully prevented *Fusarium oxysporum* pathogen in pot experiments. When the pots were treated with both live cells and the partially purified antibiotic, an additive-effect was seen in the suppression of *Fusarium*-wilt, but synergistic effect was not detected. The antibiotic, denoted BK4, purified by Sephadex LH-20 column chromatography was eluted with a single peak at a retention time of 38 min. on prep-HPLC; Minimum inhibition concentration of the homogenous antibiotic was determined to be 50 µg/ml.

**Key words:** Fusarium wilt, *Fusarium oxysporum*, antifungal antibiotic, biocontrol

#### 서 론

최근 농산물 시장개방에 따라 꾸준히 증가하는 수출입 농산물의 안전성을 보장하고 환경생태계와 인류건강의 보호를 위해 화학농약 사용규제가 강력히 요구되고 있고, 농작물의 병충해 방제에 생물농약이나 생물학적 방제법을 이용하는 유기농업의 비중이 점차 높아지고 있다. 따라서 안전하고 지속적인 생물학적 방제방법의 모색을 위해 길항미생물을 이용하여 식물의 병충해를 방제하려는 환경보전형 생태학적 생물방제법의 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>1,2)</sup>

현 생물학적 방제에 이용되는 길항미생물은 토양에서 생존능이 안정하며 그 해당지역의 기후풍토와 토양조건에 토착화되어 있는 우리나라의 토착 길항균주를 대상으로 우선 선발, 육종하고 있으나 길항미생물을 토양내의 직접 투입하는 것만으로는 식물병원성 진균에 대한 방제 효과는 지연적이며 균일하지 못하다.<sup>2)</sup>

토마토 시들음병은 *Fusarium oxysporum*이 원인균으로 토마토 경작지에서 흔히 발병하는 토양전염성 병해로 작형과 상관없이 늘 발생하여 재배농가에 큰 피해를 가져온다. 그러나, 현재까지 토마토 시들음병균인 *F. oxysporum*에 대한 방제나 미생물 제제에 대한 연구는 매우 미진하다.<sup>3,4,5)</sup>

따라서 본 연구에서는 본 연구실에서 이미 선발한 토마토 시들음병에 대한 강력한 길항능력을 가진 우리나라의 토착길항균주를 이용하여 이 균주가 생산하는 항진균성 항생물질의 생산 조건을 조사하고 정제하여 토마토 시들음병을 균주자체와 더불어 조정제 항생물질 수준에서 방제하는 학문적 접근을 시도하고자 하였으며, *in vivo* pot 실험을 통하여 길항물질만으로 처리하는 방법, 그리고 고농도의 길항물질과 길항미생물을 병행 처리하는 방법을 모색하여 화학농약과 동일한 효과를 나타낼 수 있는 천연 길항물질과 그 생산 미생물균체를 이용한 속효성과 지효성을 함께 갖춘 병행생물방제법에 대한 연구를 하고자 하였다.

#### 재료 및 방법

**사용균주.** 본 연구에 사용한 균주는 *Bacillus thuringiensis*

\*Corresponding author  
Phone: +82-53-810-2395; Fax: +82-53-810-4663  
E-mail: sdkim@yumail.ac.kr

BK4 (KACC91160P)로 이미 본 연구실에서 지난해 선발한 토마토 시들음병균인 *Fusarium oxysporum*을 길항하는 항진균성 항생물질을 생산하는 균주이다.<sup>6)</sup>

**항진균성 항생물질의 최적생산 조건.** 항진균성 항생물질을 생산하는 *B. thuringiensis* BK4의 제제화를 위해 항생물질의 대량 생산조건을 조사하였다. 배지에 첨가되는 탄소원, 질소원, 무기염의 종류와 농도에 따른 항생물질 생산성을 조사하기 위해 0.7% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% Sodium citrate, 0.01% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, glucose 0.1% 조성으로 구성된 David minimal 배지에 10종의 탄소원과 11종의 질소원을 각각 0.1%씩 첨가하여 배양한 후 균체생육도와 토마토 시들음병균 *F. oxysporum*의 생육저해율을 측정하였으며, 탄소원과 질소원이 결정된 배지에 13종의 무기염을 첨가하여 균체생육도와 길항력을 측정하였다.<sup>7)</sup>

**항진균성 항생물질의 정제.** *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항진균성 항생물질의 정제를 위해 항생물질 BK4생산용 최적배지인 배지 BK4에서 37°C, 3일 배양시킨 배양여액을 12,000 rpm, 15 min에서 원심분리하여 상등액을 회수하고 동량의 *n*-butanol을 첨가하여 15분간 교반기에서 천천히 교반시켜 배양 상등액의 항진균성 항생물질을 *n*-butanol층으로 추출하였고 수층은 버리고 *n*-butanol층만을 취하여, 이를 다시 1/2량의 증류수를 첨가하여 15분간 교반시키면서 *n*-butanol층으로 추출되지 않은 소량의 항생물질 및 불순물은 수층으로 전이시켜 완전하게 제거하였다. 이 과정을 3회 실시하여 얻은 *n*-butanol층은 감압농축기를 통해 *n*-butanol을 완전히 제거하고 증류수에 녹였으며 본정제의 시료로 사용하였다.<sup>8,9)</sup>

항진균성 항생물질 BK4의 정제는 Sephadex LH-20, Diaion HP-20 gel filtration column chromatography와 prep-HPLC로 행하였다. 조정제된 항생물질 BK4를 Diaion HP-20 column (1×30 cm)에 loading 한 후 MeOH를 0-100%까지 gradient하게 높여주면서 분획을 받았고, 각 분획들은 MeOH를 evaporator로 제거한 후 *F. oxysporum*에 대한 길항력을 paper disc법을 통해 확인하였다. 길항력이 있는 분획은 Sephadex LH-20 column (1.5×50 cm)에 loading하였고 각각의 분획들은 0.5 ml/min의 flow rate로 3 ml씩 받았고, 활성분획을 모아 동일한 조건의 Sephadex LH-20 column에 다시 loading하여 활성이 있는 분획을 취하였다. Sephadex LH-20 column re-chromatography에서 얻은 활성분획은 prep-HPLC를 통해 단일 peak로 정제하였다. 정제과정은 Fig. 1에서 나타내었다.<sup>10,11)</sup>

**항진균성 항생물질의 MIC측정.** Minimum inhibition concentration(MIC) 측정은 prep-HPLC를 이용하여 단일 peak로 정제한 후 회수한 활성분획을 질소가스를 이용하여 잔존하는 유기용매 및 수분 등의 불순물을 완전히 제거한 후 0-2,000 µg/ml 단위로 녹여 사용하였다. 다양한 농도의 항생물질 BK4를 5 mm paper-disc위에 적시고 *F. oxysporum*의 포자를 회수하여 도말한 PDA(potato dextrose agar) 배지 위에 놓고 억제환의 형성여부와 크기로 측정하였다.<sup>9,10)</sup>

**In vivo pot test를 통한 항진균성 항생물질의 방제능 검토.** *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항진균성 항생물질의 방제능 검토를 위해 토마토를 기주 식물로 하여 *in vivo* pot 실험을 실

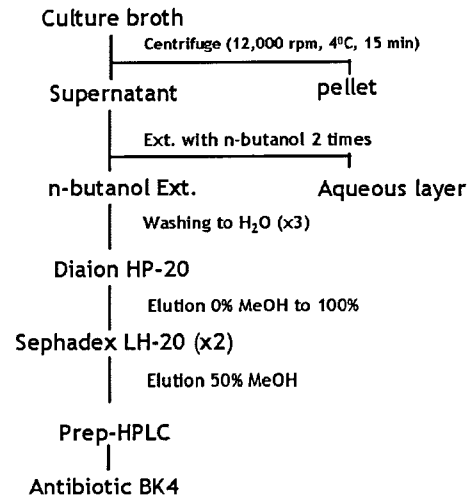


Fig. 1. Isolation and purification procedure of antifungal antibiotics BK4 produced by *Bacillus thuringiensis* BK4.

시하였다. *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항진균성 항생물질은 *n*-butanol로 추출하여 evaporator로 butanol을 제거하고 질소 가스를 이용하여 농축한 후 조정제액을 증류수에 녹여 사용하였고, 배양여액은 3일 동안 30°C에서 최적배지조건에서 키우고 이를 계수하여 그대로 사용하였으며, 토양은 일반 상토(서울농자재)에 발효 : 모래를 2 : 1로 섞은 것을 사용하였다. 또, 토마토 시들음병균인 *F. oxysporum*의 포자는 *F. oxysporum*를 PDB에 접종한 후 28°C에서 4일간 배양한 후 배양여액을 멸균된 거즈로 여과하여 회수하였고, 300개/ml 상당의 포자를 5 ml 관주 집중한 후, 1일간 습실처리하고 여기에 *B. thuringiensis* BK4의 균체 10<sup>7</sup> cfu/ml와 항생물질 BK4를 500 µg/ml의 농도로 각각 5 ml씩 처리하였다. 이를 항온항습실에서 키우면서 주기적으로 발병을 확인하였다.<sup>6,12,13,14)</sup> 한편, 토마토 시들음병의 방제가 계상은 대조구로 아무것도 처리하지 않은 pot와 *F. oxysporum*의 포자만 처리한 pot를 비교하여 %단위로 환산하였고, 방제균의 균체와 항생물질 BK4를 함께 처리한 경우는 단독으로 처리한 경우와 비교하여 방제가 동일한 경우를 상가(相加)효과로 하고 더 높은 경우 상승(相乘)효과로 판단하였으며, 이 모든 실험은 3회 반복실험을 하였다.

## 결과 및 고찰

**항진균성 항생물질 생산 최적배지조건.** 항진균성 항생물질을 생산하는 *B. thuringiensis* BK4의 항 *Fusarium*성 항생물질의 생산 최적배지조건을 조사한 결과 탄소원으로 0.2% xylose, 질소원으로 0.5% Proteose peptone No. 3을 첨가하였을 때 *F. oxysporum*에 대한 길항력이 가장 높았으며, 0.2% xylose, 0.5% Proteose peptone No. 3로 탄소원과 질소원을 고정하고 13종의 무기염을 각각 첨가하였을 때 0.5 mM CaCl<sub>2</sub>가 들어간 배지에서 항생물질 생산성이 가장 높았다(Table 1, 2, 3, Fig. 2).

한편, Table 1에서 보는 것처럼 탄소원으로 Maltose를 첨가한 배지에서 균체생성량이 가장 높았고 길항력도 xylose를 첨가하였을 때보다는 낮았지만, 80%이상의 높은 길항력을 보였

**Table 1. Effect of carbon sources for the production of antifungal antibiotics from *B. thuringiensis* BK4**

Carbon Sources	Cell Growth (cfu/ml)	Inhibition rate (%)
None	$3.4 \times 10^2$	0
Glucose	$4.4 \times 10^6$	22.5
<b>Maltose</b>	<b><math>4.4 \times 10^7</math></b>	<b>80.2</b>
Fructose	$4.7 \times 10^6$	19
Lactose	$3.9 \times 10^6$	16.5
<b>Xylose</b>	<b><math>3.1 \times 10^7</math></b>	<b>85.2</b>
Starch	$10.5 \times 10^6$	25.1
Arabinose	$6.2 \times 10^6$	21.2
Saccharose	$6.9 \times 10^6$	30.5
Galactose	$5.4 \times 10^6$	9.1
Mannitol	$4.9 \times 10^6$	12.2

**Table 2. Effect of nitrogen sources for the production of antifungal antibiotics from *B. thuringiensis* BK4**

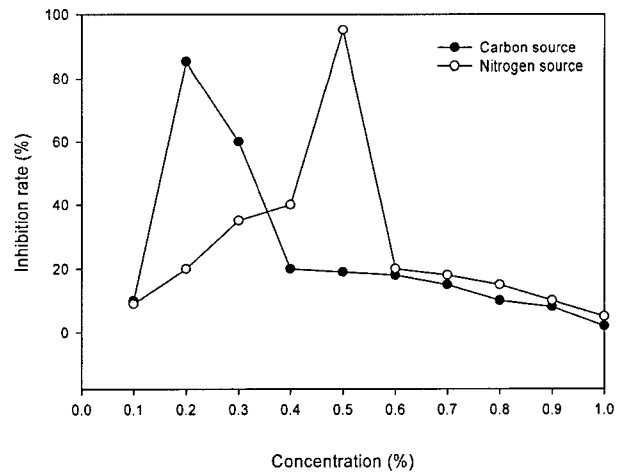
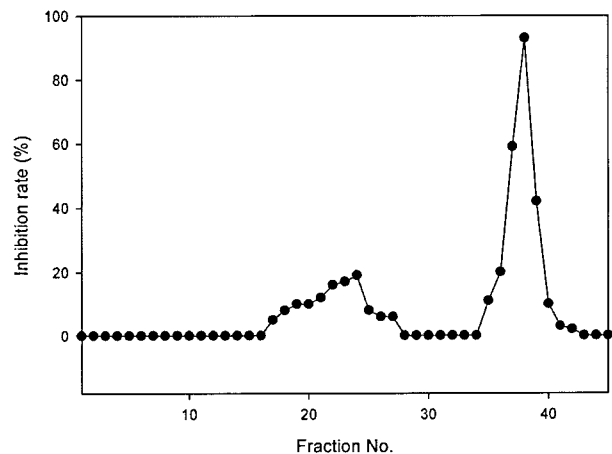
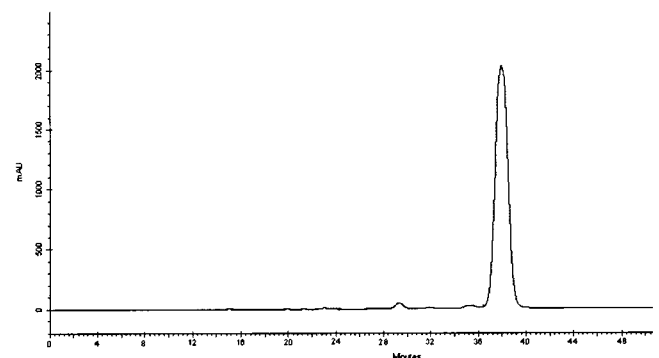
Nitrogen Sources	Cell Growth (cfu/ml)	Inhibition rate (%)
None	$2.4 \times 10^5$	0
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	$5.6 \times 10^6$	17.2
Tryptone	$4.2 \times 10^6$	11.1
Malt extract	$4.7 \times 10^6$	22.5
<b>Protease peptone No. 3</b>	<b><math>5.1 \times 10^7</math></b>	<b>67.7</b>
Yeast extract	$4.1 \times 10^6$	30.6
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	$4.1 \times 10^6$	25.1
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$3.2 \times 10^6$	11.1
$\text{NaNO}_3$	$4.9 \times 10^6$	10.9
Urea	$4.4 \times 10^6$	3.8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$3.9 \times 10^6$	19.1

**Table 3. Effect of inorganic salt sources for the production of antifungal antibiotics from *B. thuringiensis* BK4**

Inorganic salt Sources	Cell Growth (cfu/ml)	Inhibition rate (%)
None	$1.6 \times 10^2$	2
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$4.8 \times 10^7$	55
$\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$4.1 \times 10^7$	38.4
$\text{RbCl}_2$	$5.2 \times 10^7$	60
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$4.9 \times 10^7$	42.1
$\text{CaCO}_3$	$4.8 \times 10^7$	64.9
$\text{ZnSO}_4$	$3.4 \times 10^7$	23
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$3.2 \times 10^7$	11.1
KCl	$5.5 \times 10^7$	70.2
LiCl	$5.1 \times 10^7$	65.8
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	$3.9 \times 10^7$	15.5
NaCl	$5.6 \times 10^7$	65
$\text{CaCl}_2$	$6.1 \times 10^7$	83.2
$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$4.7 \times 10^7$	16.7

다. 하지만, 균체생성량에서 xylose와 큰 차이가 없고 토마토 시들음병균인 *F. oxysporum*에 대한 길항력이 xylose를 탄소원으로 하였을 때가 더 높으므로 *B. thuringiensis* BK4의 항생물질 생산 최적배지조건에서 탄소원은 xylose로 결정하였다.

**항진균성 항생물질의 정제와 MIC 측정.** *B. thuringiensis* BK4의 배양상등액을 n-butanol로 항진균성 항생물질을 추출하고 Diaion HP-20 column을 통해 분리하였다. 50% MeOH 분획에서 *F. oxysporum*에 대한 길항력을 나타내었고 Sephadex

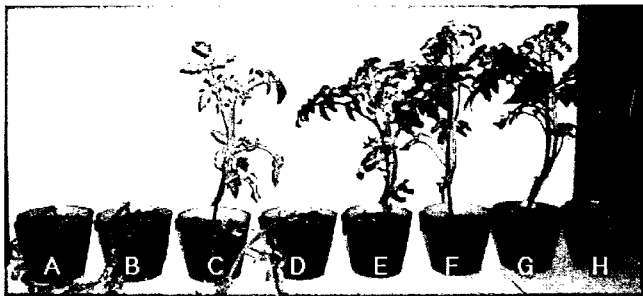
**Fig. 2. Effect of xylose and protease peptone No. 3 concentration on the production of antifungal antibiotics.****Fig. 3. Sephadex LH-20 gel filtration column chromatography of the antibiotic BK4.****Fig. 4. HPLC chromatogram of the antifungal antibiotic BK4. column, C18; solvent, methanol; flow rate, 0.5  $\mu\text{g}/\text{min}$ .**

LH-20 column에 50% MeOH을 이동상으로 하여 이 활성분획을 다시 분리하였다. Fig. 3의 결과와 같이 Sephadex LH-20 column re-chromatography를 통해 42번 분획에서 항진균활성을 확인할 수 있었고, 이를 prep-HPLC를 통해 retention time이 38 min인 단일 peak 항생물질을 얻을 수 있었다(Fig. 4).

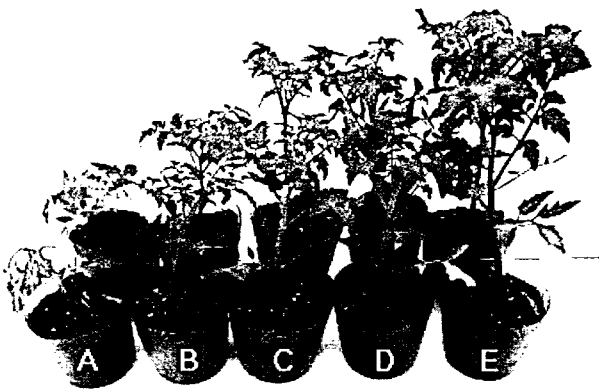
**Table 4.** Antifungal activity of the antibiotic BK4 against *F. oxysporum* for the determination MIC

Antibiotic BK4	Antifungal activity*
500 µg/ml	++
100	+
50	-
10	-
5	-

\*The antifungal activity was measured by disc-paper method. Symbols: ++, strongly antagonistic (>3 mm inhibition); +, weakly antagonistic (<3 mm inhibition); -, not antagonistic.



**Fig. 5.** Fusarium wilt suppression by the antifungal activity of the antibiotic BK4 on *F. oxysporum* infested tomato. A, B, C, D, *F. oxysporum*; E, F, G, H, *F. oxysporum* + antibiotic BK4.



**Fig. 6.** Mixed antifungal activity of the antibiotic BK4 and *B. thuringiensis* BK4 on the fusarium wilt by *F. oxysporum*. A, *F. oxysporum*; B, *F. oxysporum* + antibiotic BK4; C, *F. oxysporum* + *B. thuringiensis* BK4; D, *F. oxysporum* + antibiotic BK4 + *B. thuringiensis* BK4; E, no treatment.

한편, *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항진균성 항생물질의 MIC측정은 prep-HPLC에서 받은 단일 peak를 이용하였고 Table 4에서 보는 것처럼 항생물질 BK4의 *F. oxysporum*에 대한 MIC는 50 µg/ml였다.

**항진균성 항생물질의 토양내 방제능 검증.** *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항진균성 항생물질의 토마토 시들음병에 대한 방제능을 *in vivo* pot test를 통해 검증하고자 하였다. *B. thuringiensis* BK4의 배양여액을 처리하였을 때와 조정제한 항생물질을 처리하였을 때 무처리구가 3일째부터 토마토 시들음병의 병징을 나타내어 쓰러지는 반면, 균체와 조정제한 항생물질을 각각 처리한 실험구에서는 토마토 시들음병의 병징을 나타

내지 않았으며 75% 이상의 방제가를 확인 할 수 있었다(Fig. 5).

**조정제한 항생물질 BK4와 미생물제제의 병용실험.** 본 실험에서는 이미 *in vivo* pot 실험에서 토마토 시들음병에 대한 방제능을 확인된 *B. thuringiensis* BK4 배양액과 조정제한 항생물질 BK4를 병용처리하여 조정제한 항생물질로부터 얻을 수 있는 속효성 방제효과와 미생물균체로부터 얻을 수 있는 지효성 방제효과를 동시에 꺾하고자 시도하였다. 아울러 조정제한 항생물질을 단독으로 처리하였을 경우의 방제능과 비교하여 본 균주를 제제화하여 병용하였을 때 토마토 시들음병을 좀 더 강력하게 방제할 수 있는 방법을 찾고자 하였다. 실험조건은 위의 방제능 재검증 실험과 동일하게 하여 실시하였으며 배양액의 균체수와 조정제한 항생물질의 농도는 각각 가장 높은 방제력을 나타내는 10<sup>7</sup> cfu/ml, 500 µg/ml로 3m<sup>2</sup>씩, 병용으로 6m<sup>2</sup>를 관주접종하였다. 그 결과 접종 3일후부터 토마토 시들음병에 대한 상가(相加)효과를 확인할 수 있었으며, 기대했던 상승(相乘)효과는 확인하지 못하였다(Fig. 6). 이러한 결과로 볼 때 배양액과 조정제한 항생물질 BK4의 병용처리시 배양액의 균체수와 조정제한 항생물질의 농도와 비율을 조절할 필요가 있으며 기주식물인 토마토의 모종의 개수도 늘려야 할 것이다. 또한, 방제능 확인 후 지속적인 관찰을 실시하여 방제능의 유지기간도 관찰하여 병용효과를 재검증해야 할 것이다.

### 초 록

토마토시들음병 방제균주인 *Bacillus thuringiensis* BK4의 항진균성 항생물질의 대량생산조건을 확립하였고, 항생물질 BK4를 조정제한 수준에서 *in vitro*, *in vivo* pot 실험을 통해 실제 토마토 시들음병에 대한 토양내 방제력을 검증하였다. *B. thuringiensis* BK4는 탄소원으로 0.5% xylose, 질소원으로 0.2% peptone No. 3, 5 mM CaCl<sub>2</sub>를 첨가하였을 때 토마토 시들음병균인 *Fusarium oxysporum*에 대한 항진균활성과 균체생산량이 가장 높았으며 또한, *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항진균성 항생물질 BK4를 조정제한 수준에서 *in vivo* pot 실험을 통해 토마토 시들음병균인 *F. oxysporum*에 대한 방제력이 탁월하다는 것을 확인하였다. *B. thuringiensis* BK4의 균체와 조정제한 수준의 항생물질 BK4를 병용처리 하였을 경우 각각을 단독으로 처리하였을 때와 비교하여 상가(相加)효과를 확인할 수 있었으며, 기대했던 상승(相乘)효과는 확인하지 못하였다. *B. thuringiensis* BK4가 생산하는 항생물질 BK4를 Sephadex LH-20 column chromatography와 prep-HPLC를 통해 retention time이 38 min인 단일물질로 정제할 수 있었으며, 정제된 항생물질의 MIC(Minimum Inhibition Concentration)를 측정할 결과 50 µg/ml이었다.

**Key words:** 토마토시들음병, *Fusarium oxysporum*, 항진균성 항생물질, 생물방제

### 감사의 글

본 연구는 전통미생물자원개발 및 산업화센터(TMR센터, 과

제번호 RRC02407)의 연구비지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Chung, B. K. and Hong, K. S. (1991) Biological control with *Streptomyces* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum and *Phytophthora nicotianae* var. parasitica causing sesame wilt and blight. *The Kor. J. Mycol.* **19**, 231-238.
2. Lee, E. T. and Kim, S. D. (1999) Isolation and antifungal activity of chitinase producing bacterium *Serratia* sp. 3095 as antagonistic bacterium against *Fusarium* sp. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 181-187.
3. Chung, B. K. and Ryou, N. Y. (1996) Effect of a soil amendment for controlling fusarium wilt of cucurmerinum. *The Kor. J. Mycol.* **24**, 93-104.
4. Starr, J. L., Jeger, M. J., Marlyn, R. D. and Schilling, K. (1989) Effects of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum on plant mortality and yield of cotton. *Phytopathology.* **79**, 640-646.
5. Dube, H. C. and Podile, A. R. (1989) Biological control of microbial plant pathogens. *Indian Review of Life Sciences.* **9**, 15-30.
6. Jung, H. K., Kim, J. R., Kim, B. K., Yu, T. S., and Kim, S. D. (2005) Selection and Antagonistic Mechanism of *Bacillus thuringiensis* BK4 against Fusarium Wilt Disease of Tomato. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 194-199.
7. Hong, S. H., Lam, J. S., Park, Y. B. and Ha, J. H. (1990) The optimum culture condition for the production of antibiotics KG-1167B produced by *Clostridium* sp. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 292-265.
8. Kim, K. K., Kang, J. G., Moon, S. S. and Kang, K. Y. (2000) Isolation and identification of antifungal N-butylbenzenesulphonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2. *J. Antibiot.* **53**, 131-136.
9. Kim, Y. S., Song, J. K., Moon, D. C. and Kim, S. D. (1997) Isolation and structure determination of antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis* YB-70, a power biocontrol agent. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 62-37.
10. Kim, K. Y. and Kim, S. D. (1997) Biological control of *Pyricularia oryzae* blast spot with the antibiotic substance produced by *Bacillus* sp. KL-3. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 396-403.
11. Leoffler, W. Tschen, J. S., Venittanakom, N., Kugler, M., Knorpp, E., Hsieh, T. F. and Wu, T. G. (1986) Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-293: a comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *J. phytopathology* **115**, 204-213.
12. Siddiqui, I. A., Qureshi, S. A., Sultana, V., Ehteshamul Haque, S. and Ghaffar, A. (2000) Biological control of root rot root knot disease complex of tomato. *Plant and Soil.* **227**, 163-169.
13. Chung, B. K. and Hong, K. S. (1991) Biological control with *Streptomyces* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. vasinfectum and *Phytophthora nicotianae* var. parasitica causing sesame with and blight. *Kor. J. Mycol.* **19**, 231-237.
14. Charudattan, R. and Dinoor, A. (2000) Biological control of weeds using plant pathogens: accomplishments and limitations. *Crop Pro.* **19**, 691-695.
15. Hadar, Y., Chet, I. and Heins, Y. (1979) Biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off with wheat bran culture of *Trichoderma harizianum*. *Phytopathology* **69**, 64-69.
16. Harman, G. E., Chet, I. and Barker, R. (1980) Tricoderma hamatum effects on seed and seedling disease induced in radish and pea by *Phythium* spp. or *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* **70**, 1167-1172.
17. Kim, D. W., Do, K. S. and Choi, S. W. (2001) Antagonistic search for biological control of fusarium wilt in cymbium genus. *J. Kor. Hort. Sci.* **42**, 581-586.
18. Lim, K. S. and Kim, S. D. (1990) Antifungal mechanism of *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 for biocontrol of *Fusarium solani* causing plant root rot. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 81-88.
19. Oostendrop, M. and Sikora, R. A. (1990) *In vitro* interrelationship between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. *Review de Nematologie.* **13**, 269-274.
20. Takeuchi, S., Hirayama, K., Ueda, K., Sasaki, H. and Yonehara, H. (1958) Blasticidin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**, 1-5.