

식물병원성 진균에 항균 효과를 지닌 슈도모나스 균주의 항진균 활성 증진을 위한 배양조건의 최적화

장석원^{1,2*} · 최병진² · 홍점규³ · 노용택^{1,2*}

¹영동대학교 바이오지역혁신센터, ²의생명과학과, ³진주대학교 원예학과

Antifungal Activities of *Pseudomonas* spp. Strains Against Plant Pathogens and Optimization of Culture Conditions

Seog-Won Chang^{1,2*}, Byung-Jin Choi¹, Jeum-Kyu Hong³, and Yong-Taek Rho^{1,2*}

¹Bio-Regional Innovation Center and ²Department of Biomedical Science,
Youngdong University, Chungbuk 370-701, Republic of Korea

³Department of Horticultural Sciences, Jinju National University, Kyungnam 660-758, Republic of Korea

(Received August 4, 2010/Accepted September 27, 2010)

To define the optimum conditions for the mass production of four antifungal *Pseudomonas* spp. isolated from soil, we have investigated culture conditions and effects of various nutrient sources on the bacterial growth and evaluated antagonistic activity against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia homoeocarpa*, plant pathogens. The optimum temperature and pH for the growth of these isolates were determined as pH 7.0 and 20°C or 25°C, respectively. Sucrose, tryptone, and K₂HPO₄ generally were more adequate for better growth as carbon, nitrogen and mineral source, respectively. The nutrient sources were also found to be very effective for high antifungal activities against *R. solani* and *S. homoeocarpa*. It was elucidated that YUD-F group (*P. mandelii* and *P. fluorescens*), which inhabit regions at relatively low temperature, had more broad spectrum and higher antifungal activity than YUD-O group (*P. trivialis* and *P. jessenii*) generally against *R. solani* and *S. homoeocarpa*. It is thought that the differences of the average temperature in the various habitats of *Pseudomonas* spp. influence the optimal growth temperature and antifungal activity. Especially, *Pseudomonas* spp. of YUD-O group showed the better antifungal activity against dollar spot caused by *S. homoeocarpa*, but showed relatively weaker antifungal activity against brown patch caused by *R. solani*.

Keywords: antifungal, pathogen, *Pseudomonas*, turfgrass

지속 가능한 친환경농업에 대한 관심이 집중되면서 화학농약의 대안으로 식물병원균에 대한 길항미생물의 생물학적 방제에 의한 연구가 활발하게 진행되고 있다(12, 19). 식물병원균을 대상으로 한 생물학적 방제제는 친환경적이고 살균제 내성 발생 등의 문제가 없어 세계적으로 그 사용이 증가 되고 있는 추세이다(3, 10, 13).

그람 음성 토양 박테리아인 *Pseudomonas* spp.는 생물학적 방제제와 작물비료로 널리 사용되고 있는 균 중의 하나이다(9, 21, 22, 23). 생물학적 방제의 재료로서 *Pseudomonas* spp.는

많은 장점을 가지고 있다(6, 15, 17, 19). 예를 들면, (i) 실험실에서 생장이 빠르고 대량생산 가능, (ii) 빠른 대사 속도로 종자와 뿌리 분비물을 이용, (iii) 근권과 종자 표면 그리고 식물내부에 정착과 증식이 용이, (iv) 항생제, siderophores, 휘발성 물질 및 성장 촉진 물질과 같이 식물병원균에 활성을 보이는 넓은 대사산물 생성 (v) 다른 미생물들과의 경쟁력 우수, 그리고 (vi) 환경 스트레스에 대한 우수한 적응력 등이 있다.

지금까지 분자생물학적 수준에서 항균활성 또는 생육조절과 관련된 *Pseudomonas* 속의 유전자들은 거의 알려진 것이 없다. *Pseudomonas fluorescens*에서 2차대사산물인 2,4-diacetylphloroglucinol(2,4-DAPG)의 생합성과 관련된 *phl* 유전자군이 밝혀졌는데, *phlHGFACBDE* 8개 유전자군이 2,4-DAPG 생합

* For correspondence. (Y.T. Rho) E-mail: rhosong@youngdong.ac.kr; Tel: +82-43-740-1371; Fax: +82-43-740-1299. (S.W. Chang) E-mail: changsw@youngdong.ac.kr; Tel: +82-43-740-1591; Fax: +82-43-740-1599

성에 관여하여 항균 및 생육조절 활성을 나타내는 것과 관련이 있다(2).

동전마름병(dollar spot)은 봄, 가을 기간 동안 *Sclerotinia homoeocarpa* F.T. Bennett에 의해 발생하는 전 세계적으로 가장 흔한 잔디 진균 병해이다(10). 골프장 등 잔디밭에서 병반의 크기는 직경 2.5-5 cm이하이지만 병이 진전되면서 불규칙하게 큰 병반을 형성하기도 한다(16). 이 병은 일반적으로 적절한 경종적 방법과 살균제를 이용하여 관리되고 있다. 특히 *S. homoeocarpa*의 균주 특성상 약제 저항성 발현이 빈번하기 때문에 살균제의 이용보다 친환경적인 방법의 도입이 필요한 실정이다(8, 20).

Rhizoctonia solani AG-1(1B) Kühn에 의해 발병하는 갈색마름병(brown patch)은 한국의 잔디에 심각한 위협을 나타내는 진균 병이다. 높은 온도와 습도에서 발병하며 일반적으로 작은 점에서 시작하여 크기는 약 1 m에 이르는 원형 크기로 바깥쪽으로 확산 된다. 현재 살균제의 사용이 가장 효과적인 방제와 예방법이다. 일단 잔디에 이 병이 발생하면 더 많은 살균제 처리 없이 관리하는 것은 쉽지 않다(4).

이와 같이 우리나라 골프장에서 문제되는 주요 식물병은 주로 농약에 의해 관리되고 있어 환경오염 유발, 병원균의 농약에 대한 내성 증가, 토양 미생물 생태계의 파괴 등 문제점이 야기되고 있다(8, 9, 10). 따라서 미생물을 이용한 생물학적 방제는 그러한 부작용을 줄일 수 있는 대안으로 제시되고 있다(22, 23). 이에 본 연구에서는 잔디 동전마름병의 원인이 되는 *S. homoeocarpa*와 갈색마름병의 원인이 되는 *R. solani*에 대해 항진균 활성이 있는 4종의 *Pseudomonas* spp.의 최적 배양 조건을 조사 검토하였다. 선발된 조건은 향후 대량배양에 적용하여 생물학적 방제제 개발에 활용할 예정이다.

재료 및 방법

식물병원균과 길항균

본 연구에 사용된 4종의 *Pseudomonas* spp. (*P. trivialis*, *P. jessenii*, *P. mandelii*, *P. fluorescens*)는 골프 코스의 잔디 근근 토양에서 수집한 균주로 다양한 식물병원균에 대한 길항력이 보고된 바 있다(4, 5). 공시균주로 갈색마름병균인 *R. solani* AG-1(1B) (KACC-40108)는 농촌진흥청 농업생명공학연구원 한국농용미생물보존센터(Korean Agricultural Culture Collection, KACC)에서 분양 받아 사용하였으며, 동전마름병균인 *S. homoeocarpa*는 2008년 전북 무주 소재 무주골프장에서 분리하였다.

배지 및 배양조건

4종의 *Pseudomonas* spp.에 필요한 최적 배양조건을 알아보기 위해 배양온도, 초기 pH, 질소원과 탄소원의 종류 및 무기염(minerals)이 사용되었다. 기본 배지로 King's B 액체 배지(glycerol 10 g/L, peptone 20 g/L, K₂HPO₄ 1.5 g/L, and MgSO₄ 1.5 g/L)(14)를 사용하였다. 실험과정은 이전 실험결과를 다음 실험결과에 반영하며, 단계별로 적용해 나가는 방법을 사용하

였다. 먼저, 4종의 *Pseudomonas* spp.에 대한 각각의 최적온도를 선발하였고, 결정된 온도조건을 바탕으로 초기 pH 실험을 수행하였다. 도출된 온도 실험 결과와 초기 pH는 탄소원 선정 실험에 반영하였으며, 결정된 탄소원 역시 질소원 선정 실험의 탄소원으로 사용되었다. 무기염 실험 역시 이전 실험 결과를 단계적으로 적용하는 동일한 방법으로 수행하였으며, 각각의 실험 요인(온도, 초기 pH, 탄소원, 질소원, 무기염)마다 길항균 생육과 길항력을 측정하여, 각각의 변수가 두 종의 병원균에 대한 항균 활성에 미치는 영향을 분석, 평가하였다. 최적 온도 조건을 알아보기 위해 4종의 *Pseudomonas* spp.를 King's B 액체 배지에 접종한 후 18시간 배양한 일정 농도(OD값 1.0)의 길항균 배양액을 조제된 액체 배지에 첨가(접종량의 10% v/v)하여 15, 20, 25, 30 및 35°C에서 18시간 진탕 배양하였다. 각 길항균의 생장과 활성에 미치는 초기 pH의 영향은 King's B 액체배지를 pH 5.0-9.0로 각각 조정하여 동일한 방법으로 배양하였다. 탄소원으로는 1% 농도의 fructose, glucose, glycerol, starch 및 sucrose를 각각 King's B 배지의 탄소원 대신에 넣어 주고 질소원으로는 2% 농도의 beef extract, malt extract, peptone, tryptone 및 yeast extract를 King's B 배지의 질소원으로 대신 넣어주었다. 무기염류로는 0.15% 농도의 KCl, K₂HPO₄, NaCl, Na₂HPO₄, 및 Na₂SO₄를 King's B 배지의 무기염 대신에 넣어 준 후 배양액 초기 pH를 7.0으로 조정하여 전배양액을 접종하고 25°C에서 18시간 진탕 배양하였다. 모든 실험구들은 배양이 끝난 후, 즉시 균체의 생육 및 항진균 활성을 측정하였다.

균체의 생육 및 항진균 활성 측정

균체의 생육은 Park 등(2005)의 방법에 따라 실시하였다. 각각의 배지조성과 조건에서 배양된 길항균 현탁액은 UV-Vis Spectrophotometer (Cary-50, VARIAN Inc., USA)를 사용하여 600 nm에서 OD값으로 측정하였다. 식물병원균인 *R. solani*와 *S. homoeocarpa*에 대한 항진균 활성은 4종의 *Pseudomonas* spp. 현탁액을 발육저지대 측정법(pairing plate culture)을 이용하여 측정하였다. 감자한천배지(Potato dextrose agar, PDA)에서 식물병원균과 길항균의 생육저지거리를 측정하기 위하여 각 조건에서 18시간 배양한 길항균 배양액을 plate 중앙에 희석 접종하고 두 종류의 식물병원균을 5 mm 크기의 culture disc를 만들어 중앙에서 일정 거리를 두고 맞은편에 접종하였다(Fig. 1). 25°C에서 7일간 배양한 후 길항균과 병원균 균총간의 거리를 측정하였다.

통계 분석

모든 데이터에 대해서는 분산 분석이 수행 되었는데, 평균값들의 유의차 검정에는 PROC ANOVA 프로그램(SAS Institute Inc., USA)을 이용하여 최소유의차 검정법이 사용되었다. 집단화 데이터의 통계 분석은 유의수준 5%에서 분산분석을 하였다.

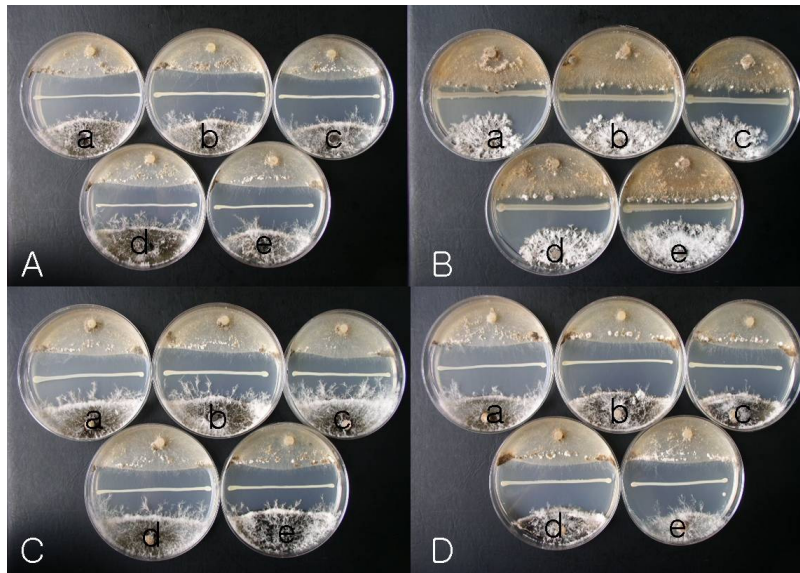


Fig. 1. Mycelial growth inhibition of *R. solani* (upper colony in each Petri dish) and *S. homoeocarpa* (lower colony in each Petri dish) by bacterial strains (A, *Pseudomonas trivialis* YDU-O-5G-1-3; B, *P. jessenii* YDU-O-5G-3-3; C, *P. mandelii* YDU-F-3R-3; D, *P. fluorescens* YDU-F-6F-1) grown under various carbon sources (a, fructose; b, glucose; c, glycerol; d, starch; e, sucrose) with modified King's B broth for 18 h.

결과 및 고찰

Pseudomonas spp.는 국내외에서 식물병 방제제와 작물비료로 널리 사용되고 있는 균 중의 하나이다(1, 22, 23). 본 연구에서 사용된 *P. trivialis*, *P. jessenii*, *P. mandelii*, *P. fluorescens*는 잔디 뿐만 아니라 다양한 식물병원균에 효과가 있는 것으로 보고되었다(4, 5). 또한 국내외적으로 식물병의 생물학적 방제제로서 많은 연구가 이루어지고 있다(6, 7).

본 연구에서 분리, 동정되어 사용된 4가지의 *Pseudomonas* 균주는 일반적으로 샘플, 광천수, 토양, 풀잎 등에서 흔히 분리되는 자연생태계 서식 미생물이고, 인체에 병원성이 없는 것으로 추정되지만 생균을 골프 코스 등에 생물학적 방제제로 사용할 경우 인체 직접 노출, 접촉으로 나타날 기회 감염성의 위해성에 대해서는 별도의 확인 실험이 필요할 것으로 판단된다.

배양온도에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교

배양 온도(15, 20, 25, 30 및 35°C)가 4종 *Pseudomonas* spp.의 생육 및 항진균 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 길항균의 생육정도는 15°C에서 35°C까지 크게 나타났다. 이렇게 넓은 범위의 온도 적응성을 보이는 것은 향후 포장에서 사용될 경우 유리한 특성으로 작용될 것으로 판단된다. 하지만 온도별 길항균의 항진균 활성은 흥미로운 결과를 나타냈다. YUD-O군(*P. trivialis*와 *P. jessenii*)은 25°C 이상의 생육조건에서 동전마름병원균인 *S. homoeocarpa*에 대한 항진균성이 높았으며, YUD-F군(*P. mandelii*와 *P. fluorescens*)은 25°C 이하의 생육조건에서 *R. solani*에 대한 항진균성을 높게 나타냈다. 이러한 사실은 각 균의 특성에 따른 원인으로 판단

된다. 또 다른 가능성은 상대적으로 연평균기온이 낮은 지역에서 분리한 YUD-F(강원 북부지역)군의 *Pseudomonas* spp.가 YUD-O군(강원 남부지역) 길항균보다 낮은 온도에서 생육온도와 항진균 활성에 영향을 주고 있는 것으로 보인다. 여러 연구자들(3, 15)도 *Pseudomonas* 속 균주가 분리환경에 따라 적정 배양온도가 상이하다고 보고한 바 있다. 그러나 갈색마름병원균인 *R. solani*에 대한 항균력은 배양 온도 및 길항균 종에 관계없이 불규칙한 패턴을 나타내었다.

초기 pH에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교

본 실험에 사용된 4종 *Pseudomonas* spp.의 초기 pH에 따른 균체의 생육 및 항진균 활성을 알아 보기 위하여 King's B 배지의 초기 pH를 5.0-9.0으로 각각 조정하여 배양한 결과는 Fig. 3과 같다. 배양된 길항균들은 전체적으로 초기 pH에 관계없이 고르게 잘 자란 것으로 나타났으나 다소 중성인 pH 7.0에서 높은 경향이였다. 이러한 결과는 Cha 등(2002)의 *Pseudomonas* 속 균주가 중성에서 잘 자란다는 보고와 일치하였다. 항진균 활성 또한 전 범위에서 고른 편이었으나 길항균에 따라 다소 다르게 나타났다. 예를 들어 *P. mandelii* YDU-F-3R-3의 경우 초기 pH 9에서 동전마름병원균에 대해 항진균 활성은 가장 양호한 것으로 나타났으나, *P. jessenii* YDU-O-5G-3-3은 초기 pH 5.0에서 동일한 균에 대해 가장 높은 활성을 보였다. 이러한 결과를 볼 때 본 실험에 사용된 4종의 *Pseudomonas* spp.는 초기 pH에 따른 생육과 항진균 활성 정도가 다른 것으로 판단된다. 그러나 갈색마름병원균인 *R. solani*에 대한 항균력은 초기 pH에 관계없이 동일한 길항균에서는 비슷한 값을 나타내었다.

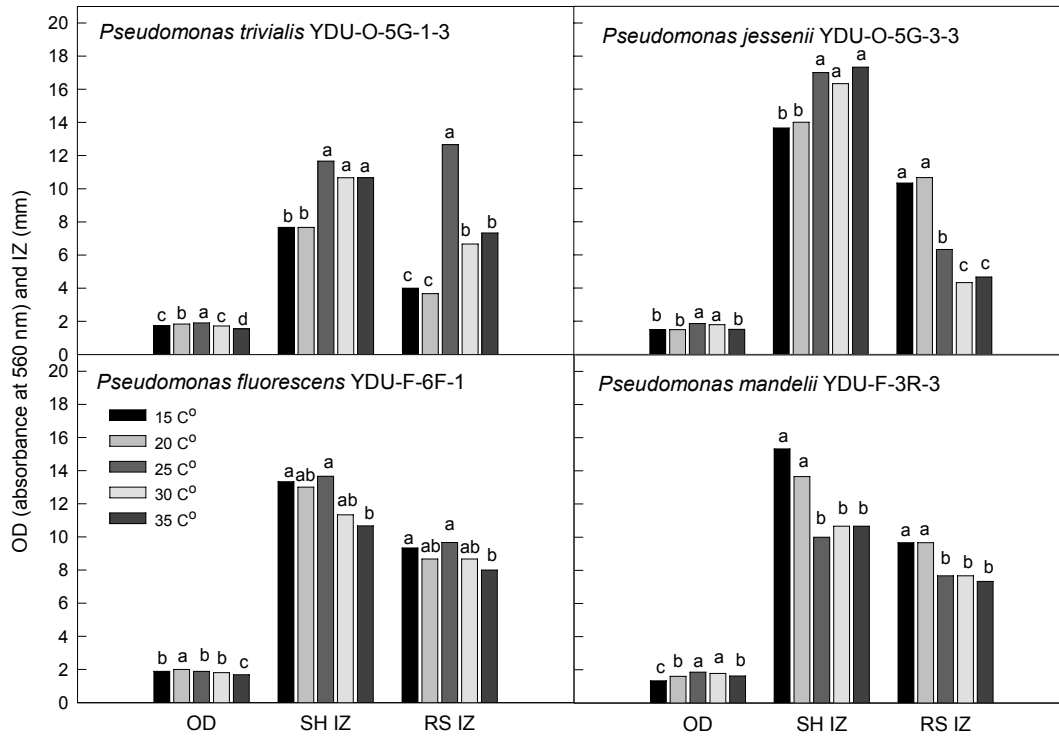


Fig. 2. Growth (optical density, OD) and antifungal activities (inhibition zone, IZ) against *S. homoeocarpa* (SH) and *R. solani* (RS) of four bacterial strains under various temperatures with King's B broth for 18 h. Values in figure with different letters show significant differences at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) test.

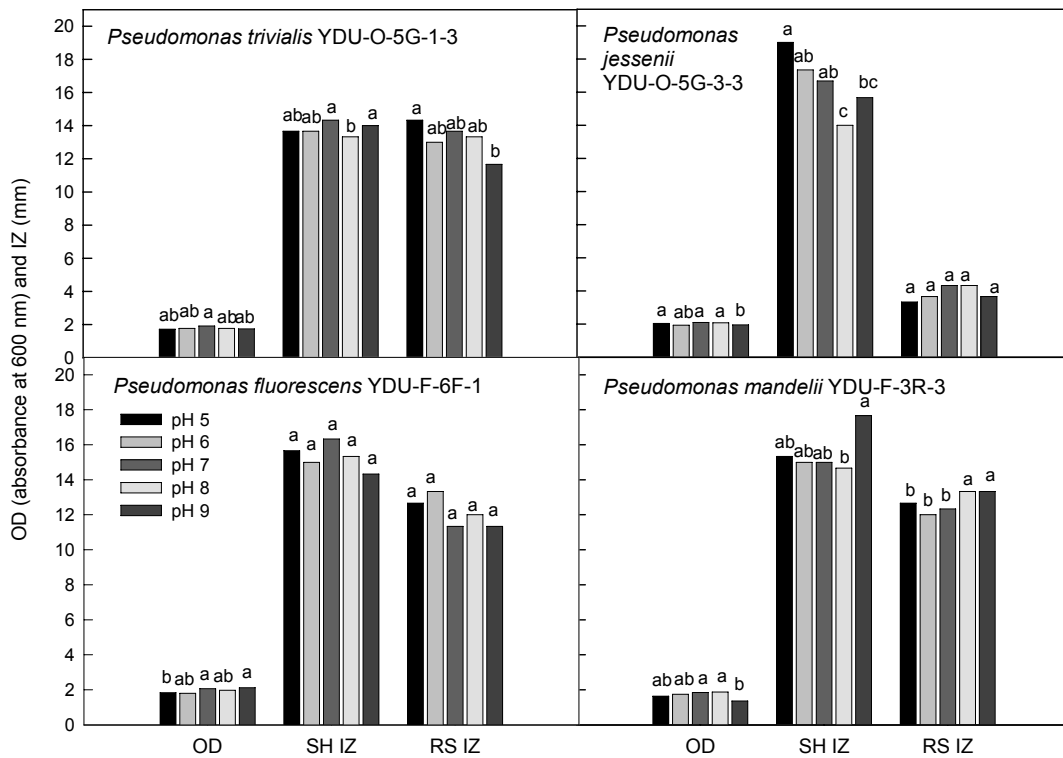


Fig. 3. Growth (optical density, OD) and antifungal activities (inhibition zone, IZ) against *S. homoeocarpa* (SH) and *R. solani* (RS) of four bacterial strains under various pH with King's B broth for 18 h. Values in figure with different letters show significant differences at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) test.

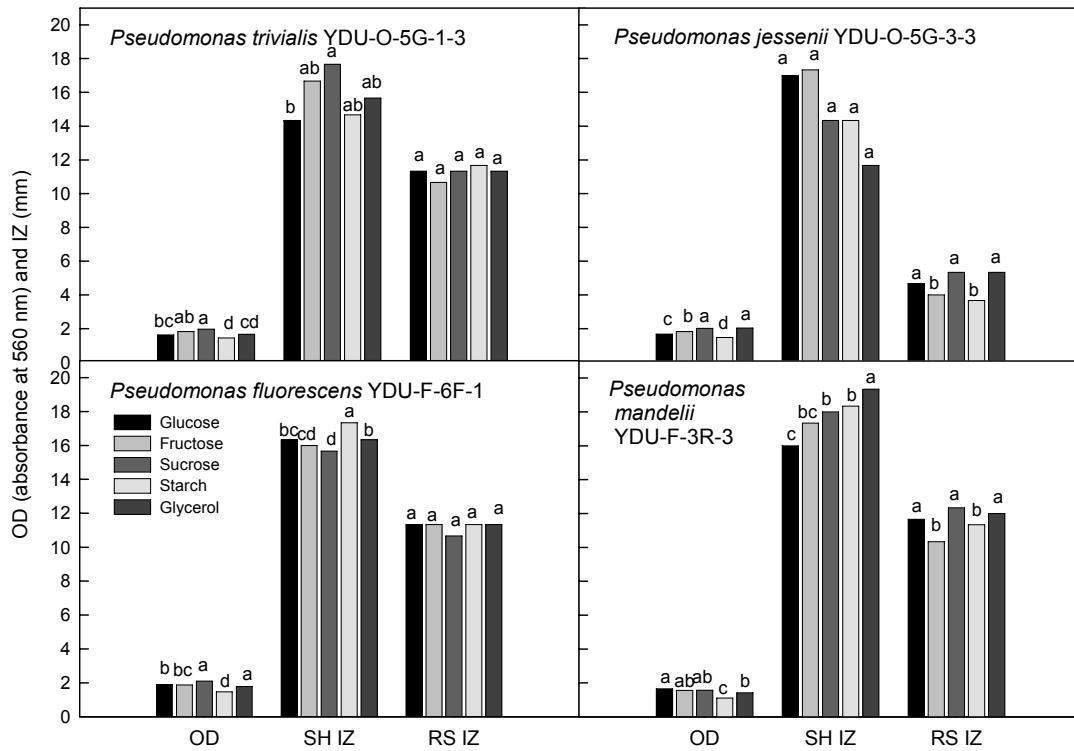


Fig. 4. Growth (optical density, OD) and antifungal activities (inhibition zone, IZ) against *S. homoeocarpa* (SH) and *R. solani* (RS) of four bacterial strains under various carbon sources with King's B broth for 18 h. Values in figure with different letters show significant differences at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) test.

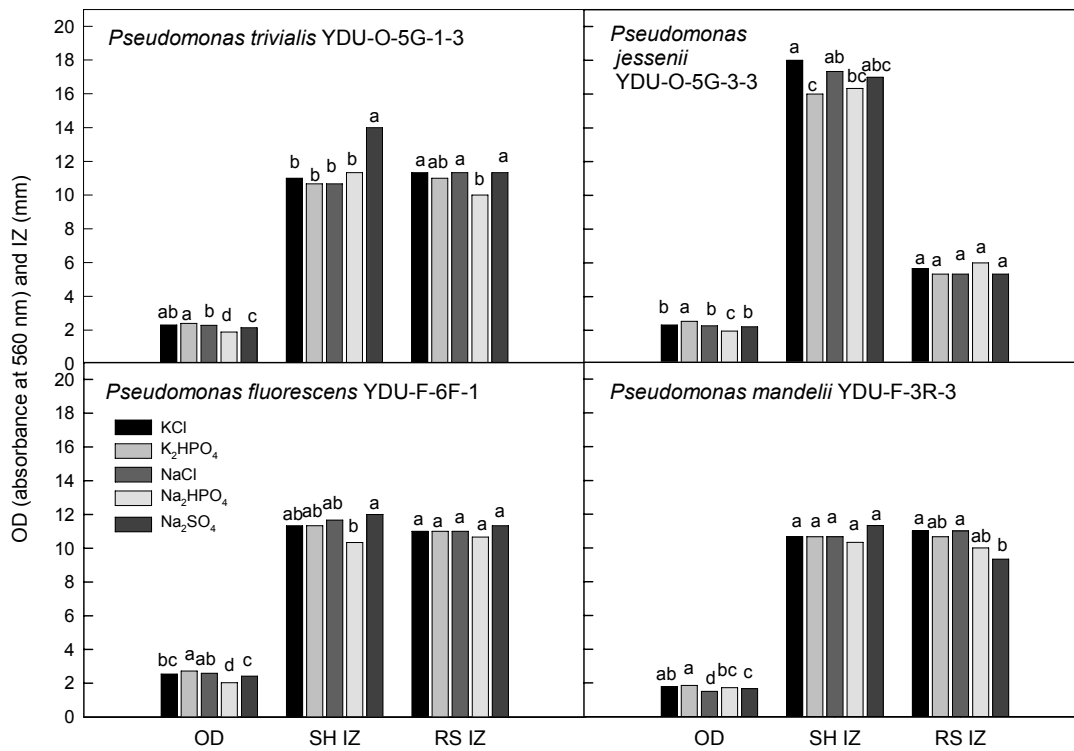


Fig. 5. Growth (optical density, OD) and antifungal activities (inhibition zone, IZ) against *S. homoeocarpa* (SH) and *R. solani* (RS) of four bacterial strains under various nitrogen sources with King's B broth for 18 h. Values in figure with different letters show significant differences at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) test.

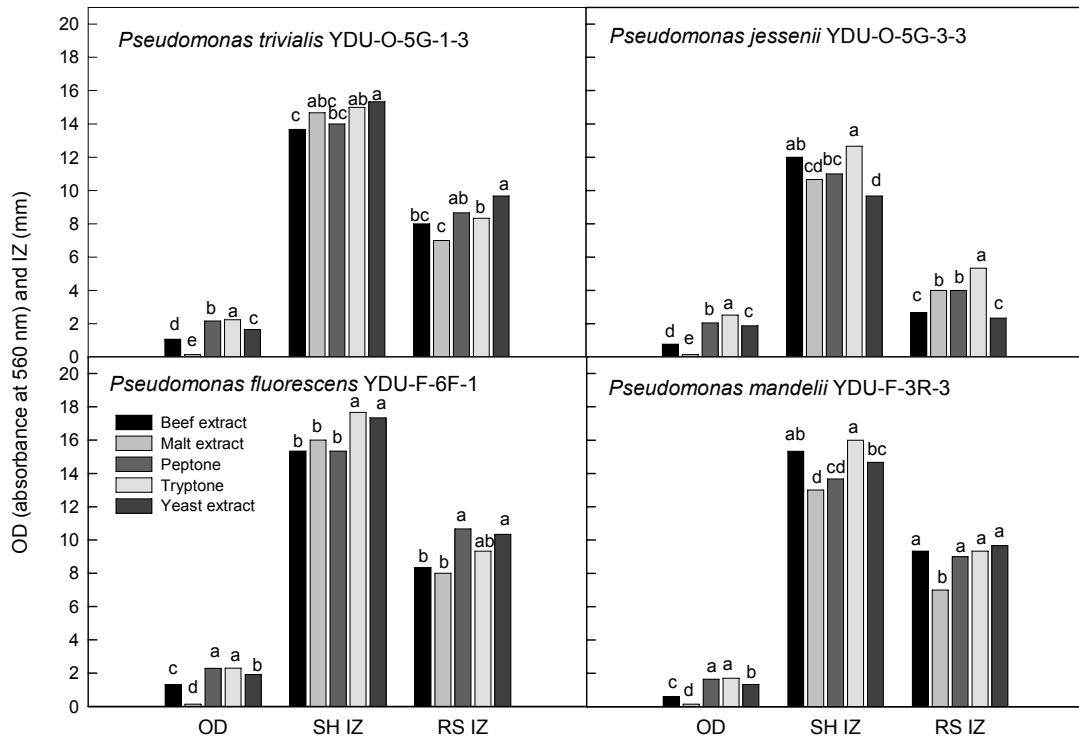


Fig. 6. Growth (optical density, OD) and antifungal activities (inhibition zone, IZ) against *S. homoeocarpa* (SH) and *R. solani* (RS) of four bacterial strains under various salt sources with King's B broth for 18 h. Values in figure with different letters show significant differences at $P=0.05$ according to the Fisher's protected least significant difference (LSD) test.

영양원에 따른 균체 생육 및 항진균 활성 비교

본 연구에서 사용된 영양원은 시중에서 구입이 비교적 용이하고 동일 균을 대상으로 사용이 빈번한 것들을 대상으로 선정하였다. 특히, 생육과 항진균 활성이 유사할 경우 대량배양시 생산비 절감을 고려하여 영양원들을 선발하였다. 탄소원은 미생물 생장에 필요한 에너지원으로 미생물의 생리적 특이성과 차이로 인해 선호하는 탄소원의 종류가 서로 다를 수 있다(15). 탄소원의 종류에 따른 4종의 *Pseudomonas* spp.의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 King's B 배지의 탄소원으로 1% 농도의 glycerol과 glycerol 대신 동일 농도의 glucose, fructose, sucrose, starch를 각각 첨가하여 배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 균체의 생육과 항진균 활성은 종류를 달리한 탄소원을 넣은 모든 배양액에서 비교적 양호하게 나타났으며, sucrose를 사용했을 때 균체의 생육이 가장 높게 나타났고 starch를 사용했을 때 균체의 생육이 가장 저조하였다. 항진균 활성은 균체의 생육정도와 일관성을 보이지는 않았으며 대체적으로 고른 항진균 활성을 보였다.

질소원의 종류에 따른 4종 *Pseudomonas* spp.의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 King's B 배지의 질소원으로 2% 농도의 peptone과 peptone 대신 동일 농도의 beef extract, malt extract, tryptone 및 yeast extract를 첨가하여 배양한 결과는 Fig. 5와 같다. tryptone을 첨가 했을 때 *P. trivialis* YDU-O-5G-1-3과 *P. fluorescens* YDU-F-6F-1의 *R. solani*에 대한 활성을 제외하고는 모든 배양액에서 생육과 항진균 활성

이 가장 양호한 것으로 나타났다. malt extract의 경우에 OD 값이 가장 낮아 균의 생육이 가장 미비한 것으로 조사되었으나 항진균 활성은 낮은 생육에도 불구하고 아주 양호한 것으로 나타났다.

미생물 생장이나 대사과정에 필요한 대표적인 무기염(minerals)은 마그네슘, 인산, 칼슘, 황, 칼륨, 염소 등이며, 각각의 미생물마다 요구량이 다르기 때문에 적절한 농도로 사용되어야 한다(7, 11). 특히, 이들은 pH 완충제 역할을 할 수 있다는 점에서 대량 배양에 매우 중요하다. 미량성분으로서 무기염류의 종류에 따른 4종 *Pseudomonas* spp.의 생육 및 항진균 활성을 검토하기 위하여 King's B 배지에 KCl, K₂HPO₄, NaCl, Na₂HPO₄, Na₂SO₄ 등의 무기염을 0.15% 농도로 넣어주어 배양한 결과는 Fig. 6과 같다. 모든 균에서 생육은 K₂HPO₄가 가장 양호하였으며 항진균 활성은 대부분의 무기염에서 고르게 나타났다. 이상의 결과를 토대로 저자들은 현재 동일한 배지조성을 이용하여 대량배양액을 제제화하여 생물학적 방제제 개발을 위한 온실 실험 및 포장 실험 등을 진행 중에 있다.

적요

골프 코스 잔디 뿌리부근의 토양으로부터 분리된 4종 *Pseudomonas* spp.의 배양조건과 잔디에 갈색마름병의 원인이 되는 *R. solani*와 동전마름병의 원인이 되는 *S. homoeocarpa*에 대한 항진균 활성을 조사하였다. 배양조건으로는 pH 7.0으

로 20-25°C에서 배양할 때 생육도 우수하며 양호한 항진균 활성을 나타내었다. 대량배양을 위한 기본배지로 King's B 배지를 사용하였으며 탄소원으로 sucrose를, 질소원으로 tryptone을, 무기염류로는 K_2HPO_4 를 첨가하였을 때 균의 생육이 가장 우수하며 항진균 활성도 높았다. 갈색마름병과 동전마름병에 대해 전반적인 항진균 활성의 경우, 상대적으로 낮은 온도의 지역에서 생존하는 YUD-F군(*P. mandelii*와 *P. fluorescens*)의 *Pseudomonas* spp.가 YUD-O군(*P. trivialis*와 *P. jessenii*)의 *Pseudomonas* spp. 보다 항진균 활성이 보편적으로 넓게 작용하고 있음을 알 수 있다. 이는 지역별 평균 기온차가 각각의 *Pseudomonas* spp.의 최적 생육온도와 항진균 활성에 영향을 주고 있는 것으로 보여 진다. YUD-O군의 *Pseudomonas* spp.는 동전마름병에 대해 우수한 항진균성을 보이지만, 갈색마름병에 대해선 상대적으로 약한 항진균 활성을 보여주고 있다.

감사의 말

본 연구는 2009년 영동군 고령친화산업 기업지원센터의 지원에 의해 수행되었습니다. 또한 산업자원부 지정 영동대학교 바이오지역혁신센터(RIC) 성과활용사업 지원에 의해 일부 수행되었습니다. 이에 감사드립니다. 그리고 시료 전처리 및 분석에 참여해 준 김현숙, 강경화, 박경숙 연구원께 감사드립니다.

참고문헌

- Adesina, M.F., R. Grosch, A. Lembke, T.D. Vatchev, and K. Smalla. 2009. *In vitro* antagonists of *Rhizoctonia solani* tested on lettuce: rhizosphere competence, biocontrol efficiency and rhizosphere microbial community response. *FEMS Microbiol. Ecol.* 69, 62-74.
- Banger, M.G. and L.S. Thomashow. 1999. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* q2-87. *J. Bacteriol.* 181, 3155-3163.
- Cha, M.S., E.G. Lim, K.H. Lee, S.J. Cho, H.J. Son, and S.J. Lee. 2002. Optimal culture conditions for production of environment-friendly biosurfactant by *Pseudomonas* sp. EL-G527. *J. Environ. Sci.* 11, 177-182.
- Chang, S.W., T.H. Chang, B.J. Choi, J.H. Song, K.S. Park, and Y.T. Rho. 2009. Antagonistic effects of *Pseudomonas* sp. against turfgrass pathogenic soil fungi. *Kor. Turfgrass Sci.* 23, 209-218.
- Chang, S.W., B.J. Choi, and Y.T. Rho. 2010. Isolation, mass production of *Pseudomonas* sp. and antifungal activity against turfgrass soil pathogens. (Abstract presented at the 2010 Annual winter meeting of the Korean Society of Turfgrass, Koyang, Korea, January 27).
- Compant, S., B. Duffy, J. Nowak, C. Clement, and E.A. Barka. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4951-4959.
- Duffy, B.K. and G. Defago. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2429-2438.
- Handelsman, J. and E.V. Stabb. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogen. *The Plant Cell* 8, 1855-1869.
- Hwang, Y.S., J.S. Choi, and Y.H. Kim. 1996. Control effects of microbial products on pythium blight, brown patch and dollar spot of creeping bentgrass. *Korean J. Plant Pathol.* 12, 237-244.
- Jo, Y.K., S.W. Chang, M. Boehm, and G. Jung. 2008. Rapid development of fungicide resistance by *Sclerotinia homoeocarpa* on turfgrass. *Phytopathology* 98, 1297-1304.
- Johansson, P.M. and S.A.I. Wright. 2003. Low-temperature isolation of disease-suppressive bacteria and characterization of a distinctive group of Pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6464-6474.
- Jung, H.K. and S.D. Kim. 2004. Selection and antagonistic mechanism of *Pseudomonas fluorescens* 4059 against phytophthora blight disease. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 312-316.
- Kim, D.W., J.T. Kim, S.W. Choi, K.H. Choi, I.S. So, and C.H. Park. 2002. Characterization and optimal condition for mass production of *Sterptomyces kasugaensis* A12. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 20, 54-59.
- King, E.O., M.K. Ward, and D.E. Raney. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44, 301-307.
- Lee, K.M., O.M. Lee, M.S. Cha, E.H. Park, G.T. Park, H.J. Son, and S.J. Lee. 2002. Production and characteristics of environment-friendly antimicrobial substance by *Pseudomonas aeruginosa* EL-KM. *J. Environ. Sci.* 11, 33-40.
- Le Thu Van, H., M.M. Kim, and S.K. Kim. 2008. Effect of culture conditions on cathepsin B inhibitor production by a marine bacterium, *Pseudomonas* sp. strain PB01. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1115-1120.
- Mathre, D.E., R.J. Cook, and N.W. Callan. 1999. From discovery to use: traversing the world of commercializing biocontrol agents for plant disease control. *Phytopathology* 83, 972-983.
- Park, J.Y., H.W. Kim, H.J. Kim, O.J. Chun, S.J. Jung, W. Choi, S.W. Lee, and B.J. Moon. 2005. Cultivation conditions for mass production of an antagonistic bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* BW-13. *Res. Plant Dis.* 11, 158-161.
- Scherwinski, K., R. Grosch, and G. Berg. 2008. Effect of bacterial antagonists on lettuce: active biocontrol of *Rhizoctonia solani* and negligible, short-term effects on nontarget microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 106-116.
- Shin, T.S., W.C. Jung, K.S. Do, and G.Y. Shim. 2006. Development of antagonistic microorganism for biological control of dollar spot of turfgrass. *Kor. Turfgrass Sci.* 20, 191-201.
- Song, S.K., Y.S. Jeong, and G.T. Chun. 2004. Fermentation studies on *Pseudomonas aeruginosa* producing antifungal secondary metabolite. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32, 52-59.
- Stockwell, V.O. and J.P. Stack. 2007. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control. *Phytopathology* 97, 244-249.
- Weller, D.M. 2007. *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* 97, 250-256.