

생물방제균 *Bacillus subtilis* YB-70의 외부 Urease 유전자 도입과 길항력 증강

최종규 · 김용수 · 이은탁 · 김상달*
영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

Urease Gene Transfer of Antagonistic *Bacillus subtilis* YB-70 and Increased Antagonistic Effect. Jong-Kyu Choi, Yong-Su Kim, Eun-Tag Lee and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan, 712-749, Korea. -To genetically breed powerful multifunctional antagonistic bacteria, the urease gene of alkaliphilic *Bacillus pasteurii* was transferred into *Bacillus subtilis* YB-70 which had been selected as a powerful biocontrol agent against root-rotting fungus *Fusarium solani*. Urease gene was inserted into the *Hind*III site of pGB215-110 and designated pGU266. The plasmid pGU266 containing urease gene was introduced into the *B. subtilis* YB-70 by alkali cation transformation system and the urease gene was very stably expressed in the transformant of *B. subtilis* YB-70(pGU266). The optimal conditions for the transformation were also evaluated. From the *in vitro* antibiosis tests against *F. solani*, the antifungal activity of *B. subtilis* YB-70 containing urease gene was much efficient than that of the non-transformed strain. Genetic improvement of *B. subtilis* YB-70 by transfer of urease gene for the efficient control seemed to be responsible for enhanced plant growth and biocontrol efficacy by combining its antibiotic action and ammonia producing ability.

식물근부균 *Fusarium solani*의 생육을 강력히 억제하는 생물방제균 한균주를 각종 *in vitro* 및 *in vivo* 검증방법에 의해 저병해 인삼경작지로 부터 분리, 선발하여 *Bacillus subtilis* 근연종이라고 동정한 바 있고, 이 균주의 길항기작이 내열성 저분자 항생물질에 기인됨을 확인한 바 있다(1, 2). 선발된 생물방제균 *B. subtilis* YB-70을 대상으로 토양 정착시 방제균간의 경쟁을 피하고 전달체계를 단순화하기 위하여 다른 방제기작을 유전학적으로 도입 부가함으로써 다기능적 생물방제균을 육종하고자 하였다. 최근 식물병원성 *Pythium*, *Fusarium*, *Phytophthora* 등의 생육을 억제할 수 있는 생물방제균 *Enterobacter cloacae*의 길항기작이 이 균이 토양내에서 생산하는 ammonia라는 것이 밝혀지고 이 ammonia는 주로 urease에 의한 urea 분해 결과 생산된다는 사실이 알려졌다(3-13).

따라서 본 연구에서는 항생물질 생산성 생물방제균 *B. subtilis* YB-70을 다기능적 생물방제균으로 육종하기 위하여 타미생물의 urease 유전자를 유전적으로 도입하고자 하였다. Urease 유전자로서는 세균중 urease 생산성이 가장 강한 *Bacillus pasteurii*의 urease gene library(14)를 사용하여 이미 선발된 생물방제균 *B. subtilis* YB-70(1)에 도입 발현하였고, 형질전환과 발현에 필요

한 최적의 조건과 도입 후 형질전환된 길항기작의 발현에 의한 길항력의 증강에 대해 조사하였다.

재료 및 방법

Urease gene library

Pythium, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* 등 식물병원성 진균의 생육이 *Enterobacter cloacae*가 생산하는 휘발성 암모니아에 의해 강하게 길항된다고 알려져 있다(3-5). 근권 토양내의 암모니아 생성은 토양 세균이 생산하는 urease에 의해 토양내의 비료성분인 urea를 분해함으로써 얻는 방법이 가장 지속적이고 효과적이다. 따라서 ammonia 생성을 위해 사용한 urease 유전자는 토양미생물중 urease 생산능이 가장 강한 호알카리성 *Bacillus pasteurii*의 urease 유전자(14)를 이용하였으며 pBR322의 *Hind*III site에 삽입된 10.7 Kb 정도의 urease gene library를 포함하고 있는 pBU11(15)을 사용하였다.

Vector plasmid의 선정

선발된 길항세균내에 외부 유전자 urease gene을 보다 효율적으로 옮겨줄 vector plasmid를 조사하였다. 길항세균 *Bacillus subtilis*의 형질전환에 이용될 *Bacillus*용 plasmid vector 중에서 효과적인 host-vector system을 결정하기 위하여 pUB110(15-16), pGB215-110(17), pGR71(18) 등을 사용하여 Takashi의 alkali cation competent 처리에 의한 transformation(19) 방법으로 그 유

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319

E-mail: sdkim@ynucc.yeungnam.ac.kr

Key words: *Bacillus subtilis* YB-70, pGB215-110, pGU266, Alkaliphilic *Bacillus pasteurii*, Urease gene

효성을 조사하였다.

Urease gene의 subcloning

생물방제균 *B. subtilis* YB-70에 가장 효과적인 plasmid vector pGB215-110에 제한효소 *Hind*III를 이용해 pBU11로부터 *B. pasteurii* urease gene library를 이전, 삽입하였다. 이때 subcloning을 위해 사용한 host는 *E. coli* HB101이었고, 일반적 유전자 조작방법은 Molecular cloning manual(20)에 소개된 protocol에 준하였으며, plasmid DNA 정제는 Birnboim의 alkaline lysis 방법(21)에 따라 수행하였다.

형질전환 조건 조사

Vector pGB215-110에 urease gene을 subcloning한 recombinant plasmid (pGU266로 명명)를 Takashi의 alkali cation transformation 방법(19)으로 형질전환 시켰다. *B. subtilis* YB-70에 도입할 때 가장 효과적인 형질전환 최적조건을 조사하기 위해 cell membrane 투과성에 관여하는 polyethylen glycol (PEG)의 농도, plasmid DNA의 농도 및 도입된 urease 유전자의 안정성 등을 조사하였다. 아울러 형질전환된 길항균주내의 urease gene 함유 recombinant plasmid의 존재는 alkaline mini preparation(21)으로 정제한 후 agarose gel electrophoresis로 확인하였다.

형질전환체의 암모니아 생성 및 길항력 증감 검증

형질전환체에 의한 urease의 발현과 암모니아 생성은 Christensen urea plate(14)의 적색 colony로의 변색이나 urea R broth(23)의 적색으로의 변색도를 흡광도 550 nm에서 측정하였다. 근부균 생육억제력은 균사체 증식량 측정법이나 agar disk diffusion method 등으로 측정하여 urease gene transfer 되기전의 길항균주 *B. subtilis* YB-70에 비해 그 길항력이 향상 되었는가를 확인하였다.

Urease를 생성하지 못하는 *B. subtilis* YB-70내에서 외부의 urease 유전자가 발현되어서 ammonia를 정상적으로 생산하며, 이렇게 생산된 ammonia에 의해 식물근부균 *F. solani*의 생육이 실제로 억제받는지 여부를 알기 위해서 억제환 측정법과 균체중량법(22)으로 억제력 검증을 하였다.

결과 및 고찰

Vector plasmid의 선정

이미 선발된 생물방제균 *B. subtilis* YB-70에 또 다른 길항기작의 유전자를 전이시켜줄 수 있는 vector plasmid를 선정하고자 하였다. *B. subtilis* YB-70에 암모니아

Table 1. Transformation ratio of *B. subtilis* YB-70 with the treatment by alkali cations

Plasmid	Size (Kb)	No. of transformants / μ g of DNA
pGB215-110*	10.6	3.5×10^3
pGR71*	8.4	1.8×10^3
pUB110	4.5	2.2×10^2
pGU266	21.3	1.2×10^3

**E. coli*-*Bacillus* shuttle vector.

The all data values are the means from three replication.

생성능을 부가하기 위해 *B. pasteurii*의 urease 유전자를 숙주 *B. subtilis* YB-70에 이전할 최적의 vector plasmid를 조사, 선정된 결과 Table 1과 같이 10.6 kb의 pGB215-110(20)가 가장 효율적인 vector plasmid로 확인되었다.

Urease gene의 subclonig

근부성 진균 *Pythium*, *Rhizoctonia* 등의 생육을 강력히 길항하는 생물방제균 *Enterobacter cloacea*의 길항기작이 이들이 토양내에 생산하는 휘발성 ammonia에 기인하며 이들 ammonia는 주로 urease의 작용에 의해 생산된다는 보고(3-5, 24)후 길항세균의 ammonia 생산능이 생물방제 기작들 중 중요한 요인으로 주목되고 있다. 이미 일련의 연구에 의해 선발된 항진균성 항생물질 생산균주 *B. subtilis* YB-70에 또 다른 길항기작인 ammonia 생산능 즉 urease gene을 유전적으로 부가한다면 단일의 다기능 방제균주를 육종하여 실제 토양내의 미생물 개체군간의 경쟁에 의한 불활 위험성을 줄일 수 있는 다기능적 생물방제균주로 육종할 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 생물방제균 *B. subtilis* YB-70에 urease의 생산능을 유전적으로 부가하기 위해서, 토양세균중 urease 생산능이 가장 강한 *Bacillus pasteurii*의 urease gene을 cloning한 urease gene library(14)를 *B. subtilis* YB-70의 vector plasmid로 선발된 pGB215-110에 subcloning하여 Fig. 1과 같은 urease gene 함유 recombinant plasmid(pGU266으로 명명)를 만들 수 있었다. 한편 pGU266에 의해 형질전환된 형질전환체 *B. subtilis* YB-70(pGU266)의 urease 발현을 urea R broth로 조사해 본 결과 Fig. 6과 같이 발현된 urease에 의해 생성된 ammonia의 변색을 확인할 수 있었다. 이로써 urease gene이 정상적으로 *B. subtilis* YB-70(pGU266)에서 발현함을 확인할 수 있었다.

Polyethylen glycol 처리 농도에 의한 형질전환의 영향

Cohen의 PEG induced protoplast transformation (25)에 이용되는 polyethylene glycol(PEG)이 Takashi의 alkali cation competent transformation(19)에

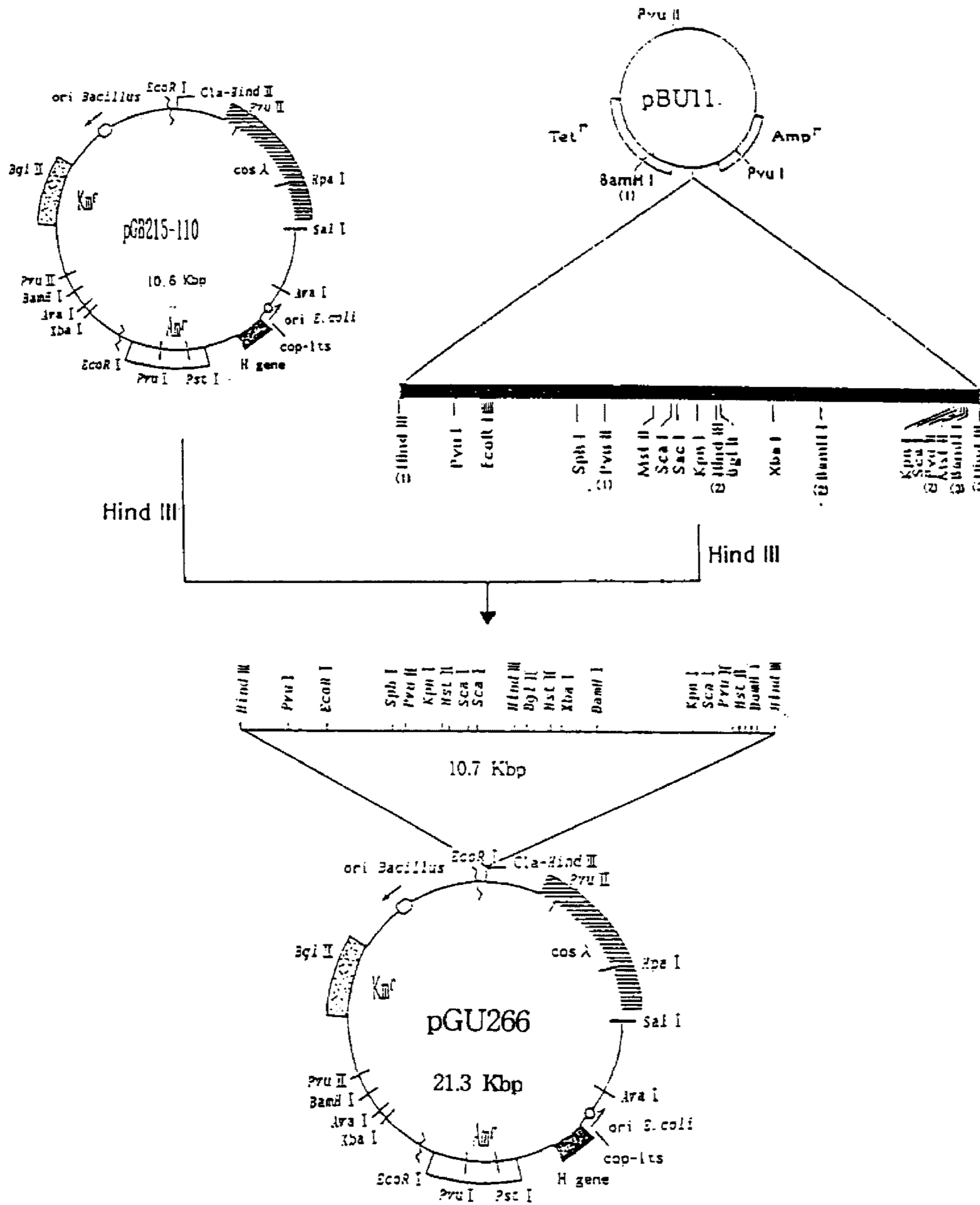


Fig. 1. Restriction map of pGU266 which was constructed with the *B. pasteurii* urease gene library(10.7 kb) and pGB215-110.

도 필요한 것으로 알려져 있는데 이는 PEG가 DNA의 세포막 투과를 유도하거나 DNA 분자의 형태적 변화를 유도한다는 보고(26)가 있다. 따라서 본 실험에서도 sub-cloning 된 urease gene함유 pGU266에 의한 *B. subtilis* YB-70의 alkali cation transformation 과정 중에 PEG (# 4,000)의 농도가 어떠한 영향을 미치는가를 조사해 보았다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 것과 같이 최종농도가 40%되게 첨가하였을때 최고의 형질전환빈도를 나타내었다. 이 결과는 *Streptococcus*(26), *Acholeplasma laidlawii*와 *Streptomyces*(27)의 transformation에서의 각각의 최적 PEG 농도인 22.5%, 36%, 20%와는 약간의 차이가 있고 *Bacillus* sp.의 형질전환시 최적 PEG 농도

가 30%라는 보고(29)와도 상이한 결과이었다. 이로 미루어 보아 *B. subtilis* YB-70의 transformation에서 필요한 PEG의 농도는 타 균종보다는 비교적 높은 농도를 요구한다는 사실을 알았다.

Plasmid DNA 농도에 의한 형질전환의 영향

Urease gene함유 pGU266에 의한 urease 도입에 사용되는 recombinant plasmid DNA 량이 생물방제균 *B. subtilis* YB-70의 형질전환에 미치는 영향을 조사하기 위해 정제된 pGU266 DNA을 각 농도별로 첨가시켜 형질전환하여 보았다. 그 결과 Fig. 4에서 나타난 바와 같이 2.5 μg 이하의 농도에서는 plasmid DNA 첨가량과 비례

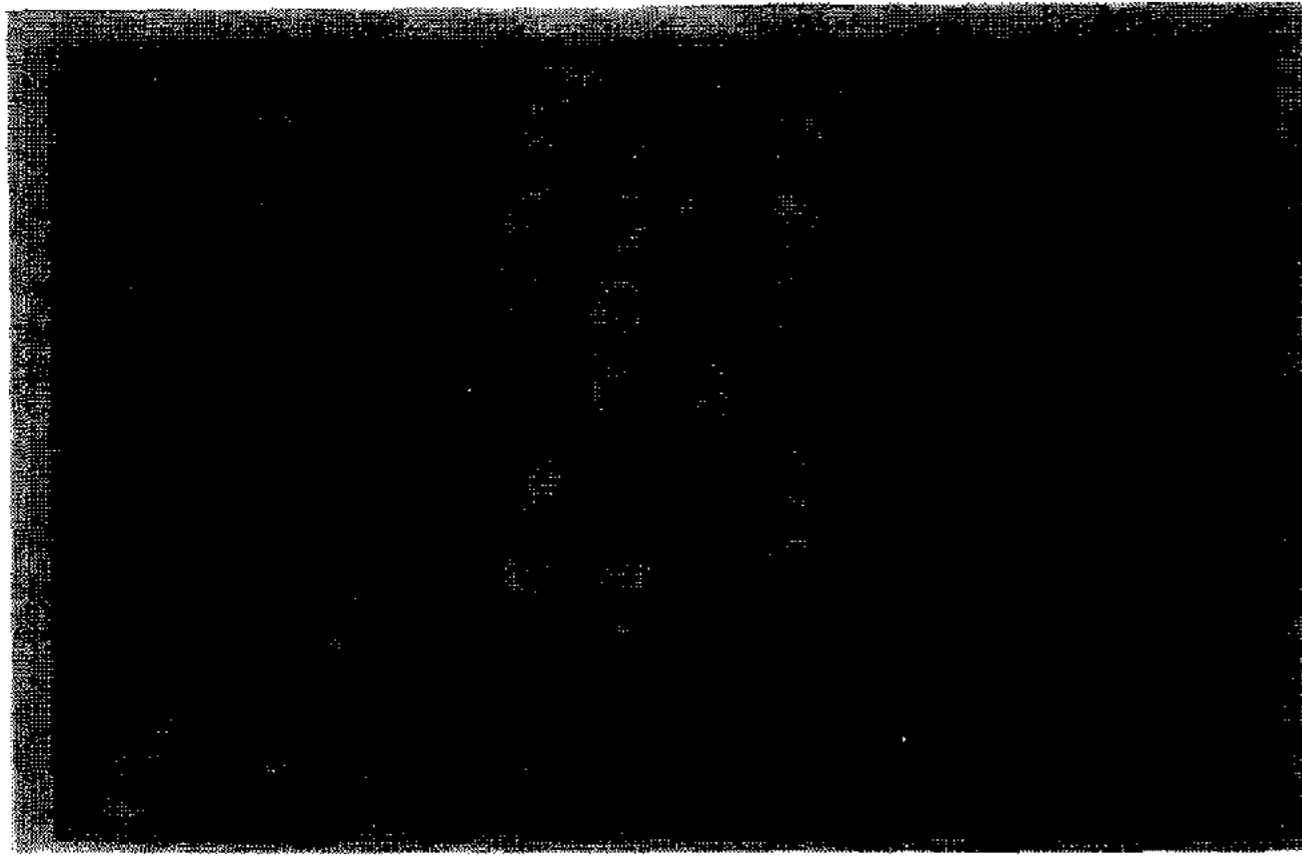


Fig. 2. Expression of urease gene in transformant *B. subtilis* YB-70 (pGU266).

Well 1-A, C, E, G : *E. coli* HB101 (pGU266)
 Well 4-A, C, E, G : *B. subtilis* YB70 (pGU266)
 Well 7-A, C, E, G : *B. subtilis* YB70
 Well 10-A, C, E, G : *E. coli* HB101
 Urease positive were detected with red color in urea R broth.

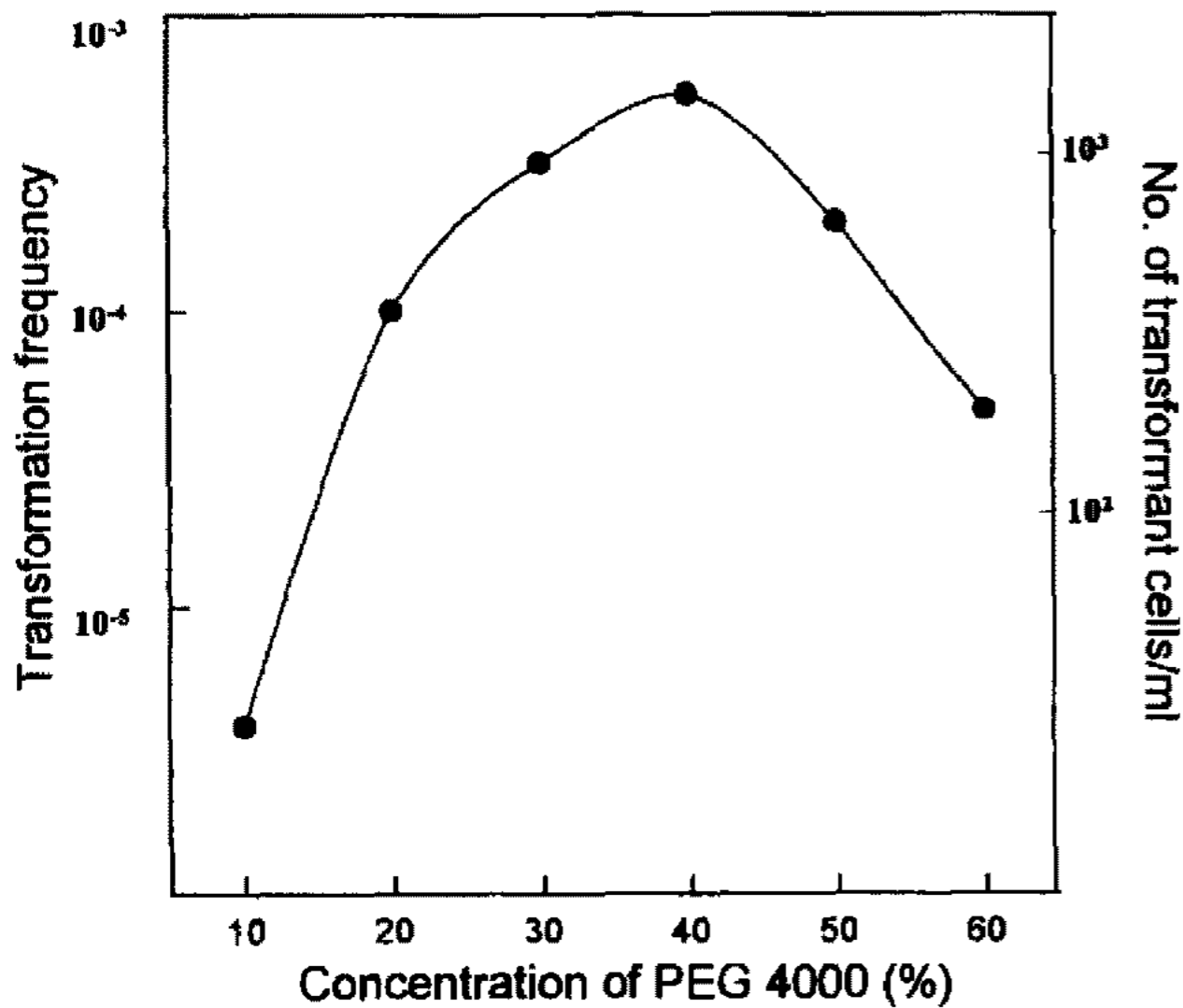


Fig. 3. Effect of PEG concentration in the transformation of *B. subtilis* YB-70 with pGU266 DNA.

The pGU266 DNA (1 µg) was added to cells of *B. subtilis* YB-70 at various PEG 4000 concentration (v/v). Transformation frequency=transformants/non-transformed cells. The all data values are the means from three replication.

하여 형질전환율이 증가하였으나 그 이상 과량으로 plasmid DNA를 첨가했을 때는 더 이상 증가하지 않았다. 이 결과는 pTP4 DNA를 사용한 *Bacillus* 형질전환 연구 (28)에서의 0.5 µg의 plasmid DNA를 첨가할 때까지 형질전환빈도가 증가하다가 그 이상의 농도에서는 증가하지 않았다는 결과와는 약간의 차이가 있고 1.0 µg 이하의 농도에서 plasmid DNA 첨가량과 비례적으로 형질전환율이 증가하였다는 보고(25, 29, 30)와 1.0 µg 이상의 농도에서는 형질전환빈도가 그 이하의 농도에 비해 증가율이 감소하였다는 Vorobjeva 등(30)의 실험결과와 비교

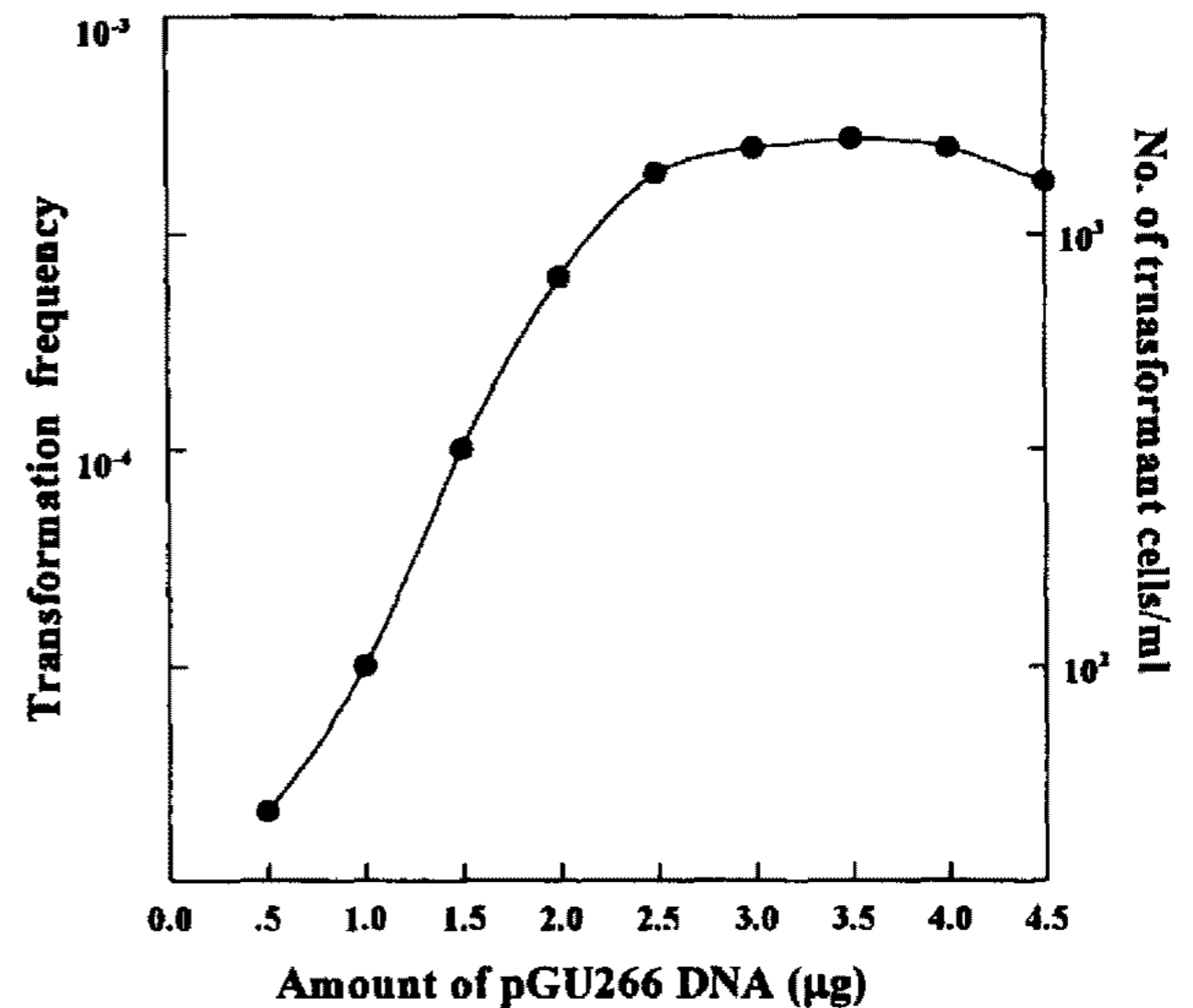


Fig. 4. Transformation frequency of *B. subtilis* YB-70 protoplasts with pGU266 concentration.

The cells were treated by varying concentrations of cells. The all data values are the means from three replication.

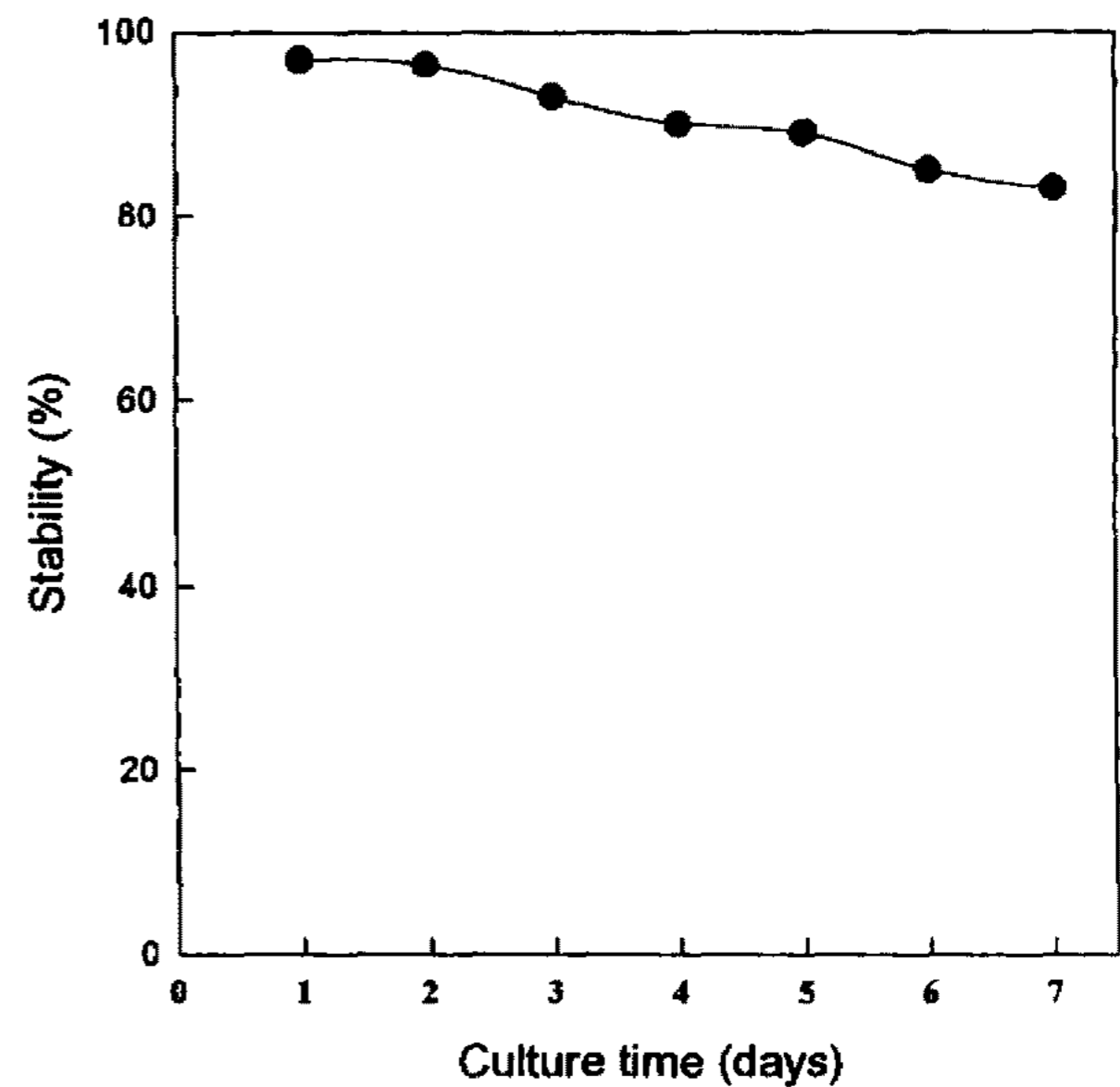


Fig. 5. Stability of pGU266 plasmid in *B. subtilis* YB-70.

B. subtilis YB-70 carrying pGU266 was subculture on NA plate with and without kanamycin (5 µg/ml).

해 볼 때, 비교적 많은 DNA의 양이 요구된다는 것을 알았다.

도입된 urease 유전자의 안정성

형질전환된 urease 유전자 함유 recombinant plasmid pGU266이 생물방제균 *B. subtilis* YB-70 내에서 얼마나 오랫동안 안정하게 유지되며 발현되는지 그 안정성을 조사하여 보았다. 이를 위해 항생제가 첨가되어 있지 않은 nutrient broth에서 계대 배양시키면서 2일간 간격으로 5.0 µg/ml의 kanamycin을 함유한 선택

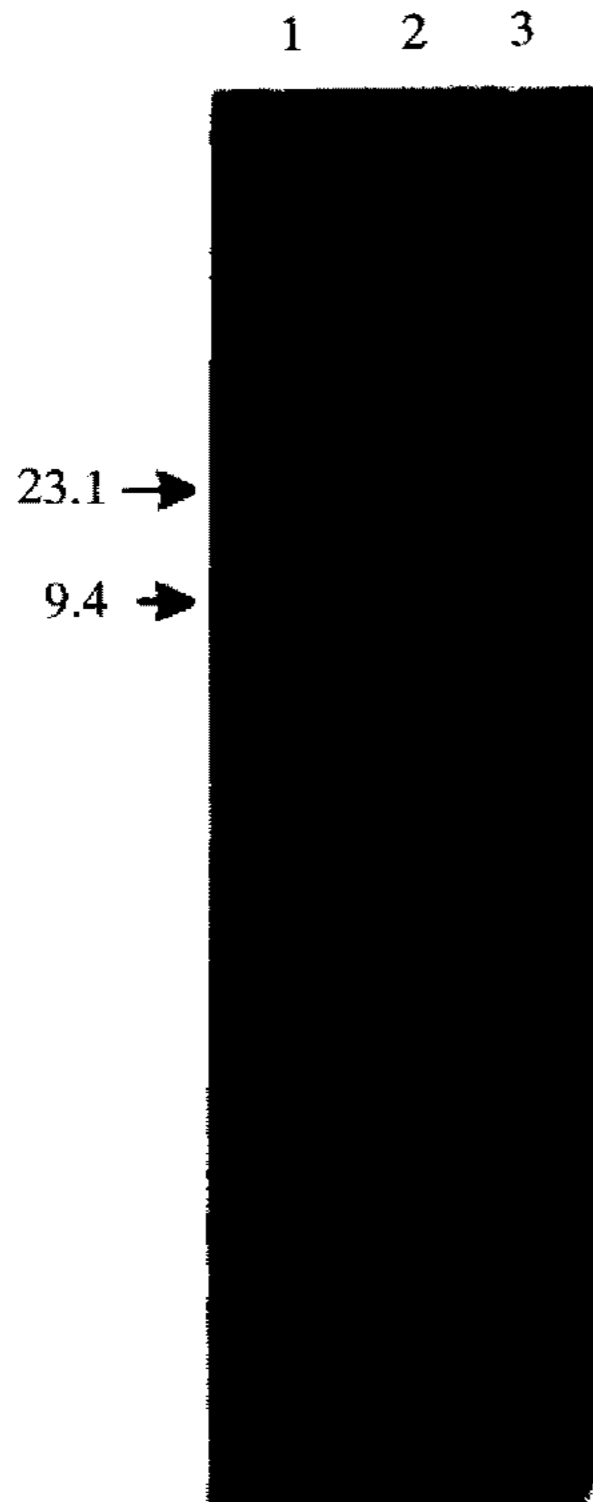


Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from transformant of *B. subtilis* YB-70.

Lane 1; λ -DNA digested with *Hind*III

Lane 2; Purified pGU266

Lane 3; pGU266 from *B. subtilis* YB-70 (pGU266)

배지와 함유하지 않은 비선택배지에 일정비율로 희석하여 도말배양하였다. 이때 비선택배지에서 나타난 kanamycin 저항성 colony(Kmr) 및 urease positive colony 수를 백분율로 하여 안정성을 조사하였으며 그 결과 Fig. 5에서 나타난 것과 같이 7일 경과하여도 80% 이상의 안정성을 유지하였다. 이 결과는 생물방제균 *B. subtilis* YB-70이 도입된 외부의 유전자 *B. pasteurii* urease gene을 장기간 동안 비교적 안정하게 발현시킨다고 추정할 수 있다. 상기 최적의 조건으로 형질전환하여 얻은 형질전환체를 Birnboim 등의 방법으로, 생물방제균 *B. subtilis* YB-70 내에 도입되어 있는 recombinant plasmid pGU266을 분리하여 확인해 본 결과 Fig. 2에서 보는 것과 같이 그 plasmid의 존재도 확인하였다.

형질전환체 *B. subtilis* YB-70 (pGU266)의 urease 생산

Urease 유전자를 내재하는 pGU266으로 형질전환시킨 생물방제균 *B. subtilis* YB-70의 형질전환체가 암모니아 생성 유전자 즉 urease 유전자를 정상적으로 발현시키는가를 조사하기 위해 kanamycin의 최종농도를 5.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 되게 첨가시킨 urea R broth에서 4일간 배양하면서 생성되는 ammonia를 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 이 결과에서 보는 바와 같이 urease 유전자를 함유한

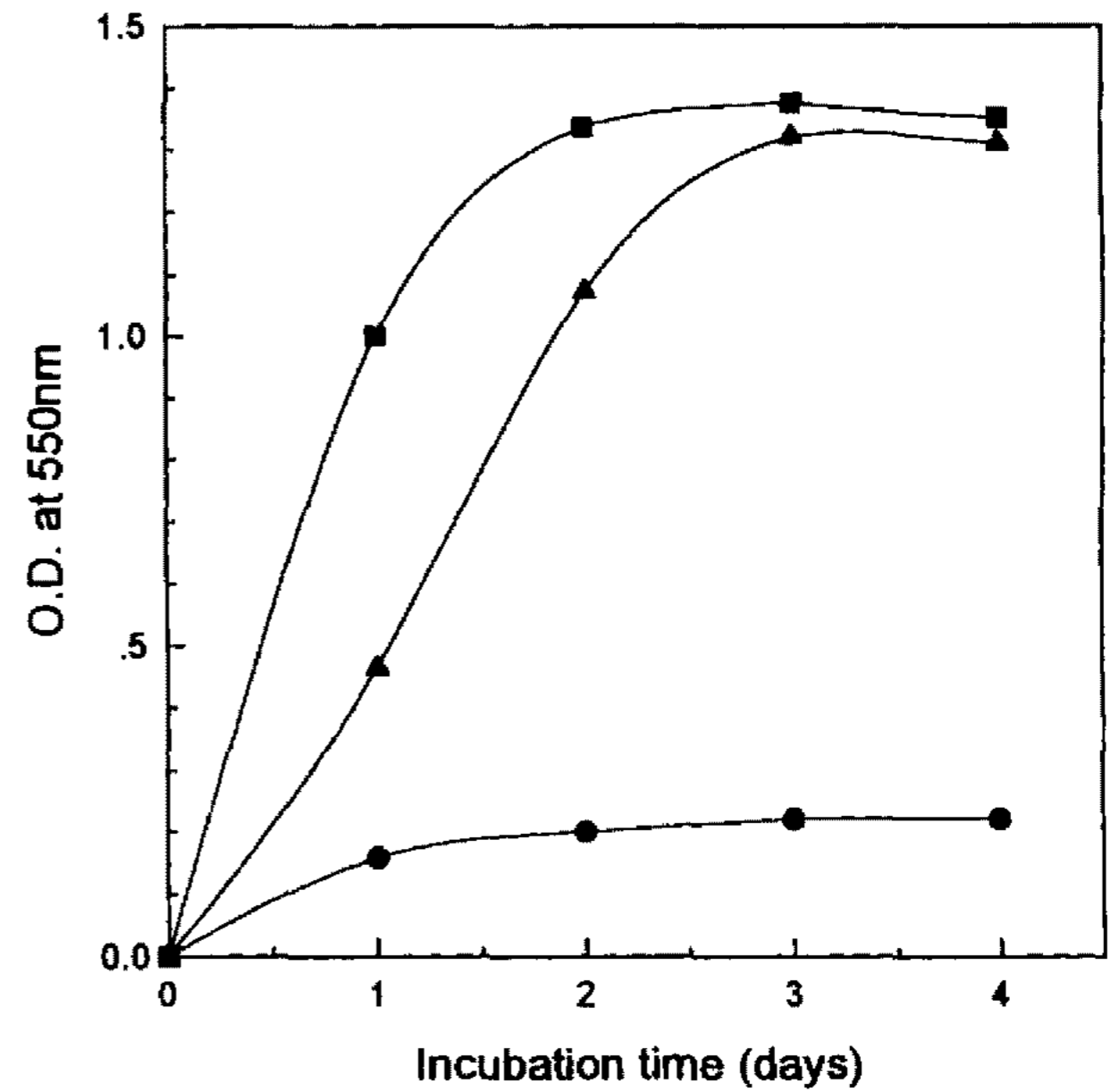


Fig. 7. The ability of urease-expression in the transformant *B. subtilis* YB-70 with pGU266.

Exponentially growing cells of *B. subtilis* YB-70 transformant and *E. coli* HB101 carrying pGU266 were inoculated into the urea R broth containing 2% urea and incubated at 30°C for 4 days. The urease-expression was estimated by spectrophotometric assay at 550 nm.

—●—; *B. subtilis* YB-70, —■—; *E. coli* HB101 (pGU266),

—▲—; *B. subtilis* YB-70 (pGU266)

pGU266에 의해 형질전환된 형질전환체 *B. subtilis* YB-70 (pGU266)에서 암모니아 생성능 유전자가 정상적으로 발현되었다. 그리고 *E. coli* HB101(pGU266)의 urease 유전자 발현력과 비교하여 보았을 때 약 97%의 발현력을 나타냈다. 이 때 pGU266을 도입하지 않은 *B. subtilis* YB-70도 약간 증가하는 듯이 보이나 이것은 배양시 각종 amino기 함유 물질의 분해에 의해 생긴 pH 상승에 기인된 것으로 추정된다.

Urease gene의 전이에 의한 길항력 증강

Urease gene에 의한 암모니아 생성능이 부가된 생물방제균의 형질전환체 *B. subtilis* YB-70 (pGU266)에 의해 식물근부균 *F. solani*의 생육이 실제로 억제받는지 여부를 알기 위해 urease 유전자가 도입된 *B. subtilis* YB-70(pGU266)와 도입전의 숙주균주인 *B. subtilis* YB-70에 대한 근부균 생육억제능을 비교해 보았다. 0.5% urea 함유 potato dextrose broth와 nutrient broth 혼합 배지 (PD/NB)에 *F. solani*와 *B. subtilis* YB-70, *F. solani*와 *B. subtilis* YB-70 (pGU266)을 혼합배양하여 본 결과 Fig. 7, 8 및 Table 2와 같이 무첨가구의 *F. solani*의 생육도에 비해 각각 23.7%, 36.9% 정도 억제되었다. 이 결과에서 urease gene이 발현되는 *B. subtilis* YB-70(pGU266)의 경우는 urease gene의 전이 이전의 방제균 *B. subtilis* YB-70에 비해 아주 강한 억제력을 나타낸

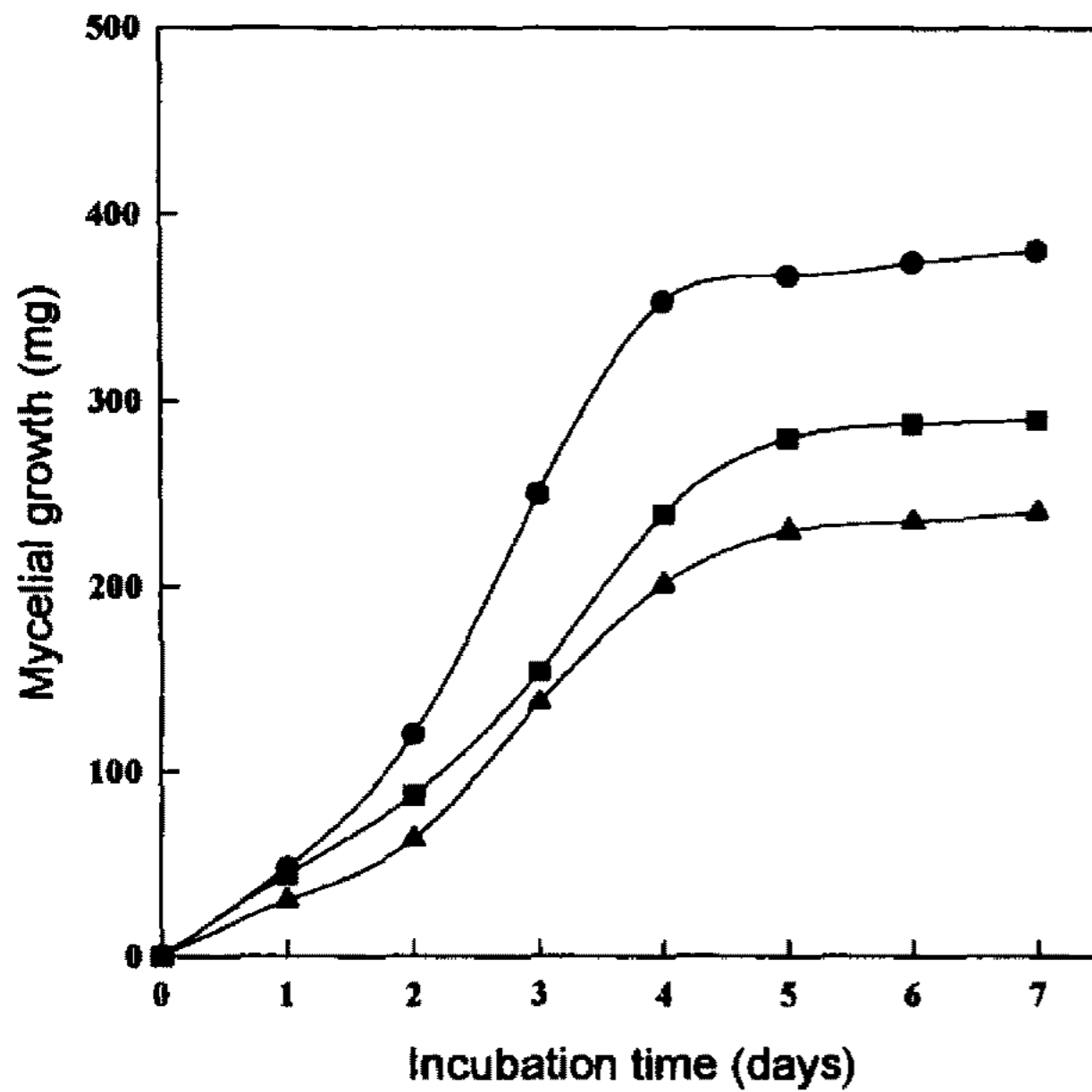


Fig. 8. Effect of *B. subtilis* YB-70 (pGU266) on the growth of *F. solani* in urea-containing media.

—●—; *F. solani* only, —■—; *F. solani* with *B. subtilis* YB-70, —▲—; *F. solani* with *B. subtilis* YB-70 (pGU266)

Table 2. *In vitro* antifungal activity of *B. subtilis* YB-70 containing urease gene (pGU266) against *F. solani*.

Days	Antifungal activity*		
	<i>B. subtilis</i> YB-70	<i>B. subtilis</i> YB-70 (pGU266)	None
1	6	3	6
2	17	12	19
3	22	16	23
4	24	18	27
5	24	19	30

*An agar disk (8 mm in diameter) of *F. solani* inoculum placed at a 3 cm distant from the edges of the bacterial colonies on potato dextrose-nutrient agar (PD/NA) medium containing 0.5% urea. The plates were incubated at 30°C and the antifungal activity was determined by measuring the diameter (mm) of fungal mycelium.

다는 사실을 확인할 수 있었다.

따라서 항진균성 항생물질 생산성 생물방제균 *B. subtilis* YB-70에 외부의 urease 유전자를 도입하여 ammonia 생성능을 추가로 부가함으로써 생물방제력의 상승효과를 거둘수 있는 새로운 다기능적 생물방제균 육종 가능성을 확인할 수 있었다.

요 약

토양내 미생물개체군 중 우점화 능력이 강한 길항균주에 타 길항기작을 추가적으로 부가하여 다기능적 생물방제균을 육종하고자 하였다. 이를 위해 최근 생물방제균으로 주목받고 있는 *Enterobacter cloacae*의 길항기작이 이 균에 의해 토양내에 생산되는 휘발성 암모니아이었다

는 보고를 근거로 하여, 이미 일련의 식물근부균 생물방제연구에서 선발된 식물방제균 *Bacillus subtilis* YB-70에 암모니아 생산에 필요한 urease 유전자를 유전적으로 부가함으로써 식물근부균 *F. solani*에 대한 길항력이 훨씬 강화된 생물방제균을 육종할 수 있었다. Urease 유전자는 토양세균 중 urease 생산능이 가장 큰 *Bacillus pasteurii*의 urease gene library (10.7 Kb)를 *B. subtilis* YB-70에 가장 잘 발현되는 plasmid vector pGB215-110의 *Hind*III site에 삽입하였으며, 이렇게 제작된 urease 함유 recombinant plasmid (pGU266)을 생물방제균 *B. subtilis* YB-70에 alkali cation competent transformation으로 도입시켰다. 이때 transformation의 최적 조건을 조사한 결과 PEG 40% 존재하에 2.5 µg/ml의 DNA첨가로 가장 높은 형질전환율을 얻을 수 있었으며 일단 도입된 urease 유전자는 상당히 안정하게 *B. subtilis* YB-70 내에서 유지되었으며, 그 transformation된 recombinant plasmid의 존재도 Birnboim방법으로 agarose gel 상에서 확인할 수 있었다. 또한 urease 유전자가 도입된 형질전환체 *B. subtilis* (pGU266)은 urease gene이 도입되지 않은 *B. subtilis* YB-70에 비해 식물근부균 *F. solani*에 대한 길항력이 훨씬 증강됨도 확인되었다.

감사의 말

본 연구는 한국과학재단에서 지원한 핵심전문연구비 (과재번호 931-0500-014-2)의 일부로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kim, Y.S. and S.D. Kim. 1994. *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent of *Fusarium solani* causing plant root-rot. *J. Microbiol. Biotech.* 4: 68-74.
2. Kim, Y.S. and S.D. Kim. 1994. Antifungal mechanism and properties of antibiotic substances produced by *Bacillus subtilis* YB-70 as a biocontrol agent. *J. Microbiol. Biotech.* 4: 296-304.
3. Hadar, Y., G.E. Harman, A.G. Taylor, and J.M. Norton. 1983. Effects of pregermination of pea and cucumber seeds and of seed treatment with *Enterobacter cloacae* on rots caused by *Pythium* spp. *Phytopathol.* 73: 1322-1325.
4. Howell, C.R., R.C. Beier, and R.D. Stipanovic. 1988. Production of Ammonia by *Enterobacter cloacae* and Its possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off by bacterium. *Phytopathol.* 78: 1075-1078.
5. Wilson, C.L., J.D. Franklin, and Pusey, P.L. 1987. Biological control of rhizopus rot of peach with *Enterobacter cloacae*. *Phytopathol.* 77: 303-305.
6. Aldrich, J., and R. Baker. 1979. Biological control of

- Fusarium roseum* f.sp. dianthi by *Bacillus subtilis*. *Plant Dis. Repr.* **54**: 446.
7. Gilpatrick, J.D. 1969. Role of ammonia in the control of avocado root rot with alfalfa meal soil amendments. *Phytopathol.* **59**: 973-978.
 8. Lovrekovich, L., H. Lovrekovich, and R.N. Goodman. 1969. The role of ammonia in the wildfire disease of tobacco caused by *Pseudomonas tabaci*. *Phytopathol.* **59**: 1713-1716.
 9. Neal, D.C., and E.R. Collins. 1936. Concentration of ammonia necessary in a low-lime phase of Houston clay soil to kill the cotton root rot fungus, *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathol.* **26**: 1030-1032.
 10. Pavlica, D.A., T.S. Hora, J.J. Bradshaw, R.K. Skogerboe, and R. Baker. 1978. Volatiles from soil influencing activities of soil fungi. *Phytopathol.* **68**: 758-765.
 11. Rush, C.M., and S.D. Lyda. 1978. Effects of anhydrous ammonia on mycelium and sclerotia of *Phymatotrichum omnivorum*. *Phytopathol.* **72**: 1085-1089.
 12. Smiley, R., R.J. Cook, and R.I. Papendick. 1970. Anhydrous ammonia as a soil fungicide against *Fusarium* and fungicidal activity in the ammonia retention zone. *Phytopathol.* **60**: 1227-1231.
 13. Tsao, P.H., and J.J. Oster. 1981. Relation of ammonia and nitrous acid to suppression of *Phytophthora* in soils amended with nitrogenous organic substances. *Phytopathol.* **71**: 53-59.
 14. Kim, S.D., and J. Spizizen. 1985. Molecular cloning and expression of *Bacillus pasteurii* urease gene in *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **3**: 297-302.
 15. Gryczan, T.J., and Dubnau, D. 1978. Construction and properties of chimeric plasmids in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 1428-1432.
 16. Keggins, K.M., Lovett, P.S., and Duvall, E.J. 1978. Molecular cloning of genetically active fragments of *Bacillus subtilis* and properties of the vector plasmid pUB 110. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 1423-1427.
 17. Androil, P.M. 1985. Versatile *Escheria coli*-*Bacillus* shuttle vector derived from runaway replication plasmids related to CioDF13. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 377-380.
 18. Yoshitake, J., Kudo, T., Usami, and horikoshi, K. 1984. Isolation of the fragments from alkalophilic *Bacillus* sp. DNA which are controlled by temperature, pH or NaCl concentration in pGR71 CAT expression system. *Agric. Biol. Chem.* **48**(11): 2621-2626.
 19. Takashi A., K. Akira and S. Makoto. 1990. Transformation of *Bacillus subtilis* with the treatment by alkali cations. *Biotechnology Letters.* **12**: 99-104.
 20. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning, a Laboratory manual 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
 21. Birnboim, H.C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research.* **7**: 1513-1523.
 22. Lim, H.S., Y.S. Kim, and S.D. Kim. 1991. *Pseudomonase stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 510-516.
 23. Kim, S.D. and R.P. Hausinger. 1994. Genetic Organization of the Recombinant *Bacillus pasteurii* Urease Genes Expressed in *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **4**: 108-112
 24. Nelson, E.B., W.L. Chao, J.M. Norton, G.T. Nash, and G.E. Harman. 1986. Attachment of *Enterobacter cloacae* to hyphae of *Pythium uitimum*: Possible role in the biological control of *Pythium* preemergence damping-off. *Phytopathol.* **76**: 327-335.
 25. Chang, S., and S.N. Cohen. 1979. High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA. *Mol. Gen. Genet.* **168**: 111-115.
 26. Kondo, J.K. and Mckay, L.L. 1984. Plasmid transformation to *staphylococcus lactis* protoplasts: Optimization use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 252-259.
 27. Hopwood, D.A. 1981. Genetic studies with bacterial protoplasts. *Ann. Rev. Microbiol.* **35**: 237-272.
 28. Akamasu, T. and Sekiguchi, J. 1982. Transformation to *Bacillus* protoplast by plasmid pTP4 DNA. *Agric. Biol. Chem.* **46**: 1617-1621.
 29. Meyrueis, C.L., K. Fodor, and P. Schaeffer. 1980. Polyethylene glycol-induced transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by bacterial chromosomal DNA. *Mol. Gen. Genet.* **179**: 589-594.
 30. Vorobjeva, I.P., I.A. Khmel, and Alföldi. 1980. Transformation of *Bacillus megaterium* protoplasts by plasmid DNA. *FEMS Microbiol. Letters.* **7**: 261-263.

(Received 18 November 1996)