*Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*
Vol. 29, No. 1, 37–42 (2001)

# *Phytophthora capsici*를 길항하는 *Pseudomonas fluorescens* 2112가 생산하는 항진균 항생물질 2,4-diacetylphloroglucinol

이은탁 · 김상달*
영남대학교 자연자원대학 응용미생물학과

**An Antifungal Substance, 2,4-Diacetylphloroglucinol, Produced from Antagonistic Bacterium *Pseudomonas fluorescens* 2112 Against *Phytophthora capsici*. Lee, Eun-Tag and Sang-Dal Kim*.** *Department of Applied Microbiology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea* – An antifungal substance was purified from culture broth of *Pseudomonas fluorescens* 2112 that showed a broad-spectrum antagonistic activity against various phytopathogenic fungi including *Phytophthora capsici*. The substance was identified as 2,4-diacetylphloroglucinol based on NMR analysis. The 2,4-diacetylphloroglucinol showed antibiotic activity in broad acidic range from pH 1.0 to pH 9.0. About 83% of initial activity was remained after incubation for 30min at 60°C, however, the activity was dropped up to 50% after 30 min incubation in 80°C. When the nucleotides of *P. capsici* treated with 2,4-diacetylphloroglucinol were labeled with [$^3$H]-Adenine, the newly synthesized and radioactive-labeled RNA was significantly reduced than those of untreated *P. capsici*, indicating that the 2,4-diacetylphloroglucinol inhibits RNA synthesis.

**Key words:** Antagonistic bacterium, *Pseudomonas fluorescens* 2112, antifungal, biocontrol, 2,4-diacetylphloroglucinol

식물병을 방제하기 위해 사용되는 유기화학농약은 생태계 파괴와 토양오염 등 심각한 환경문제를 야기하고 있다. 특히 토양전염성 식물 진균병을 방제하기 위해 토양내 살포되는 화학살균제는 그 사용량이나 독성의 문제점이 한계에 도달했다. 따라서 길항미생물을 이용하여 식물질병을 방제하는 생물학적 방제법 연구가 필연적으로 대두되었으며 최근에는 정부차원에서도 친환경적 무공해농법을 상수도 보호지역이나 환경농업지구를 중심으로 권장하고 있는 실정이다.

현재는 화학농약이 세계농약시장의 대부분을 차지하고 있지만 멀지 않은 미래에는 이들을 대체할 수 있는 무독성 내지 저독성 생물농약, 즉 식물이나 미생물들로부터 유래된 저독성 천연물질이나 유용한 길항미생물 제제들을 이용하는 생물학적 병충해 방제법의 연구 개발과 실용화가 활발해질 것으로 예측된다[11,14,18]. 전세계 농약시장 중 생물농약시장은 아직 2%정도로 미약하지만, 앞으로 연 평균 성장률이 10%에 이를 것으로 예측되어 생물방제법 개발의 중요성이 급속히 증가하고 있으며, 이중 길항미생물을 이용한 생물방제법의 성장속도는 연 20% 정도로 제일 빠른 편이며, 2005년대까지 약 4억 달러의 시장 형성이 예측된다.

그동안 우리나라에서는 일부 수입된 미생물제제를 이용한 생물방제법이 시도된 바도 있으나 우리나라 기후풍토와 토양환경에 적응능력이 결여되어 그 활성을 발휘하지 못한 경우가 대부분이었다. 따라서 우리지역의 환경에 쉽게 적응되어 토양내 복원, 우점화가 용이한 우리나라 토양의 고유한 토착 길항미생물을 선발하고 이를 활용한 생물방제법이 요구되고 있다. 이러한 생물방제법 중에서 항진균성 항생물질에 의한 생물방제 연구는 오랜 역사를 가지고 연구되어 왔으며 여러가지 미생물을 대상으로 항진균성 항생물질에 의해 식물병원균의 생육을 저해시키는 항생작용을 연구해 오고 있다[1,4,12,13,15]. 특히 *Pseudomonas* sp.의 항생물질에 대한 연구는 여러 가지 종들에 대해 연구를 진행해오고 있으며, 특히 생물방제에 관심이 높아지면서 더욱더 외국의 연구사례를 많이 접하게 되었다[2,3,5,10,17].

따라서 본 연구에서는 고추역병의 원인균인 *Phytophthora capsici*에 강력한 길항력을 가지는 생물방제균주로 분리·선발된 *Pseudomonas fluorescens* 2112 균주[16]가 생성하는 길항물질인 항진균성 항생물질의 방제기작을 조사하고 정제를 통해 물질적 특성 구명을 실시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 생물방제균의 계대배양

실험에 사용된 생물방제균 *Pseudomonas fluorescens* 2112 [16]의 계대는 King's B 한천배지(Difco® proteose peptone No. 3 2%, $K_2HPO_4$ 0.15%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, glycerol 1.5%,

*Corresponding author
Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@yeungnam.ac.kr

agar 1.5%)를 사용하여 30°C에서 2일간 배양한 후 4°C에서 보존하면서 사용하였고, 장기 보존을 위해 King's B broth를 이용하여 30°C에서 1일간 배양한 후 15%가 되도록 멸균한 glycerol을 첨가하여 -70°C에서 동결 보존하였다.

### 항진균성 항생물질의 생산

길항세균 *P. fluorescens* 2112으로 부터 항진균성 항생물질을 얻기 위하여 King's B broth에 균을 접종한 뒤 28°C에서 4일간 180rpm에서 진탕배양 하였다. 이를 8,000×*g*에서 20분간 원심분리하여 상등액을 회수하였으며, 이 상등액을 항진균 활성검사에 사용하였다.

### 항진균성 활성의 조사

길항물질의 정제를 위한 항균활성 검정은 여지 disc 방법으로 조사하였다. PDA 배지에 고추역병균인 *Phytophthora capsisi*의 유주자를 도말한 후, 직경 6 mm disc에 여과 살균한 항진균 활성 분획을 침적시켜 28°C에서 2~4일간 배양하면서 *P. capsisi*의 균사생장을 억제하는 disc 주위의 항진균성 억제환의 유무로 조사하였다.

### 항진균성 항생물질의 정제

길항세균 *P. fluorescens* 2112로부터 생산된 항진균성 항생물질을 대량으로 분리, 정제하기 위하여 배양액 9 l를 4°C, 8,000×*g*에서 20분간 원심분리한 후 상등액에 동량의 *n*-butanol을 첨가하여 활성물질을 *n*-butanol층으로 이행시킨 후 전용된 항균활성물질을 50°C이하에서 감압농축하였다. 이를 100% methanol에 녹인 후 감압농축하고, 다시 100 % methanol에 녹인 후 ethyl acetate를 동량 첨가하여 분획하여 ethyl acetate층에 녹아있는 항생물질을 회수할 수 있었다[14].

감압농축된 ethyl acetate 추출물을 methanol에 녹인 후 Diaion HP-20 column(2.5×80cm)에 충진하고, 0, 50, 100%의 methanol로 각각 1 l씩 용출시켰다. Diaion HP-20 column chromatography에 의해서 얻은 활성분획을 감압농축한 후 이를 Sephadex LH-20 column(2.5×50 cm)에 충진한 후 100% methanol로 튜브 당 10 ml 씩 분획한 후 항균활성이 나타나는 분획을 모아 상기 과정을 2회에 걸쳐 반복하였다. Sephadex LH-20 column chromatography에 의해서 얻은 활성분획을 TLC로 분리하기 위하여 *n*-butanol:acetic acid:water(4:2:4)의 전개용매로 전개시켜 항진균 활성이 있는 $R_f$치가 약 0.89 부근인 band로부터 항진균 활성물질을 추출하였으며, silica-gel TLC에 의해서 얻은 시료를 HPLC하여 정제도를 검증하였다[13]. 이때 HPLC 분석조건으로는 LC-$NH_2$ colmun을 이용하였으며, 용출 용매는 75% acetonitrile를 사용하여 11.0 ml/min의 속도로 용출시키면서 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 정제시 각 단계별 활성측정은 각 분획을 농축한 뒤 10% methanol에 녹여 여지 disc 방법으로 항균활성을 조사하여 항진균 활성을 나타내는 분획을 모아 감압농축하였다[4]. 이를 NMR(BRUKER, Germany)과 FAB-Mass를 실시하여 분석하였다.

### 항진균성 항생물질의 특성조사

길항세균 *P. fluorescens* 2112이 생성하는 항진균성 항생물질의 pH에 따른 안정성을 검토하기 위하여 세균 배양액 1 l를 상기 정제과정의 ethyl acetate 추출까지 실시한 후 70 ml의 3차수에 녹여 1N HCl과 NaOH로 pH 1~pH 13까지 조정한 후 4°C에서 17시간 동안 전처리하고 다시 pH 7로 조정한 후 *P. capsici*의 포자를 접종한 45 ml의 PDB 배지에 5 ml씩 첨가하여 30°C에서 2일간 진탕배양 하였으며, 이를 미리 건조시켜 중량을 측정한 Whatman No 2 여과지로 배양된 병원성진균을 여과하여 80°C에서 건조시켜 함량시킨 후 증가된 중량을 측정하는 생육균체량 측정법으로 길항활성의 변화를 검증하였다.

온도에 대한 안정성은 20°C~121°C까지의 온도범위에서 30분간(단 121°C의 경우는 20분) 처리한 후 항진균성 활성 감소를 생육균체량 측정법으로 조사하였다.

### 길항기작 규명 및 방제현상 해명

정제된 항생물질을 이용하여 식물병원성 진균에 대한 항진균 활성을 고추역병균 *P. capsici*를 시험균주로 하여 그 생육 과정별로 분자생물학적으로 규명하기 위하여 단백질, 핵산, 세포벽 합성 전구체로 각각 [$^3$H] Leucine, [$^3$H] Adenine, [$^{14}$C] Glucose를 이용하여 Hideyo Yamaguchi 등이 실시한 방법[8]으로 실험하였다. 즉 20% 희석한 PDB 0.85 ml에 정제된 항생물질(대조구는 50% methanol을 첨가)과 *P. capsici*의 포자현탁액 0.1 ml을 접종하여 30°C에서 1시간 전배양을 하였으며, 여기에 각각의 labeled pre-cursor를 20 ml 첨가하여 24시간 진탕 배양시켰다.

**[$^3$H] Leucine의 조사**

Hot trichloroactic acid(TCA)-insoluble material에 포함된 labeled leucine의 혼입량으로 결정하였다. 반응은 10% TCA 동일 부피를 첨가하고 90°C 15분간 가열하고 그 반응액에 포함된 불용성물질을 glass microfiber filter (Whatman®, GF/A)로 수거하고 2회 세척한 후 air dry하였다. 이 filter에 포함된 radio activity를 측정하였다.

**[$^3$H] Adenin의 조사**

Cold TCA-insoluble(RNA plus DNA) material에 포함된 labeled adenin의 혼입량으로 결정하였다. 반응은 10% cold TCA 1 ml를 첨가한 후 cold TCA-insoluble(RNA plus DNA)를 glassfiber filter로 수집하였다. 또 다른 sample에 1 ml 1N KOH를 첨가하고 60°C 2시간 처리 후 1.8 ml의 20% cold TCA를 첨가 침전시킨 후 0°C에서 overnight 시킨후 glass microfiber filter로 수거하여 이 filter에 포함된 radioactivity(DNA)를 측정하였다.

### [$^{14}$C] Glucose의 조사

1N NaOH를 1 ml 첨가한 후, boiling water에 20분간 분해한 후 glass microfiber filter로 수거하였다. 이를 멸균수로 2회 세척하였으며, 공기로 건조시켜 이 filter에 포함된 radioactivity를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 항진균 항생물질의 정제

토착 길항미생물 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항진균 항생물질을 정제하기 위하여 원심분리한 배양여액을 *n*-butanol과 ethylacetate를 이용하여 용매 전이법으로 길항물질을 추출하고 농축한 후 이를 다시 100% methanol에 녹여 정제에 사용하였다. 이때 각 단계마다 용매에 녹지 않는 물질은 Whatman No. 2로 여과하여 제거하였으며, 용해성 물질과 비용해성 물질 각각에 대하여 길항력을 확인한 결과 대부분의 길항력이 용해성 분획에서 관찰되었다. 이 용해성 분획을 Diaion HP-20 흡착 chromatography를 행한 결과 50% methanol에 용출된 분획에서 대부분의 길항력을 확인할 수 있었다. 이 분획을 50°C에서 감압농축하여 Sephadex LH-20 gel chromatography를 하고, 각 분획별로 길항력을 검증하여 길항물질을 분리 정제하였다. 길항력을 가진 활성분획을 모아 50°C에서 감압농축하여 silica-gel prep-TLC를 이용하여 $R_f$치가 0.89인 분획물질을 분리하여 최종 정제하였으며, 이를 HPLC를 통해 정제순도를 검증하였다(Fig. 1). 이상의 정제과정을 요약하면 Fig. 2와 같다. 이때 각각의 활성은 *P. capsici*의 유주자를 대상으로 PDA 배지에서 실시하였으며, 포자를 배지에 도말한 후 6 mm 여지 disk에 길항물질을 흡습시켜 놓아 그 주위에 억제환의 형성 유무로 확인하였다(Fig. 3).

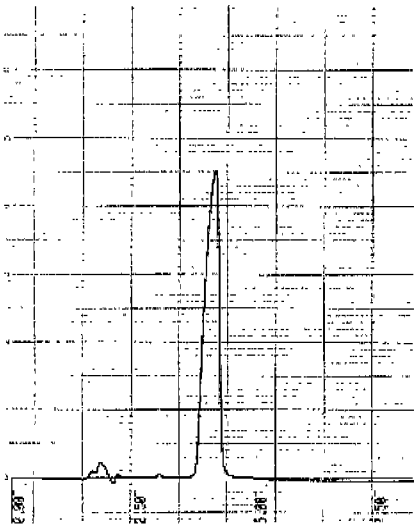

**Fig. 1. HPLC pattern of bioactive compound LP2112 purified from antagonistic *Pseudomonas fluorescens* 2112.**

### 항진균성 항생물질의 pH 안정성

*P. fluorescens* 2112가 생산하는 항생물질을 0.2N HCl과 0.2N NaOH 용액을 사용하여 pH 1~11로 조정하고 4°C에서 17시간 동안 전처리한 후 다시 pH 7.0으로 중화한 뒤

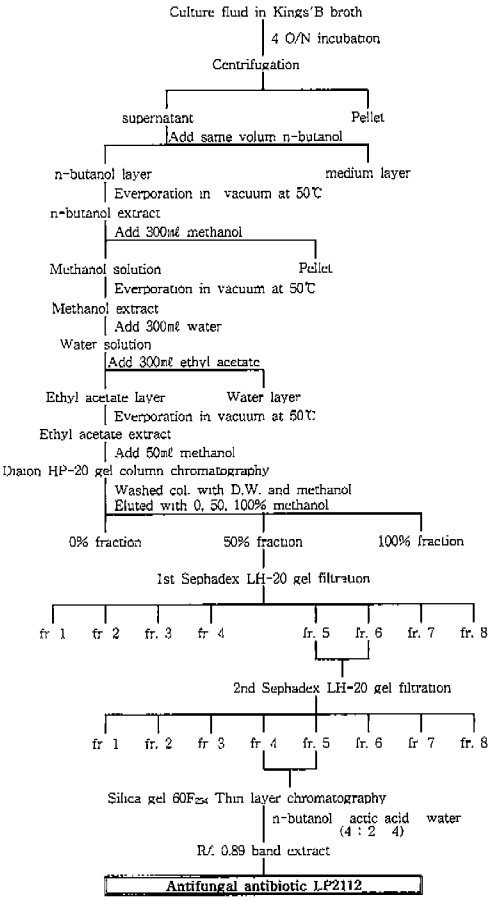


**Fig. 2. Purification scheme of active antifungal compound LP2112 produced from *Pseudomonas fluorescens* 2112.**

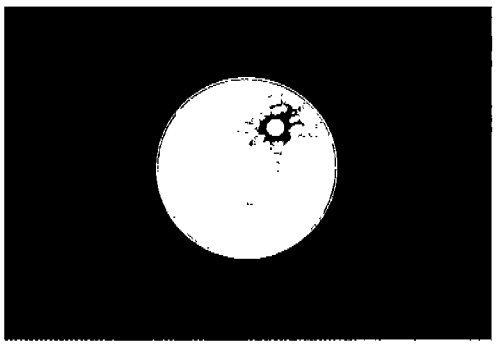

**Fig. 3. Paper-disc antifungal activity test of antibiotic produced from *Pseudomonas fluorescens* 2112 against *Phytophthora capsici* zoospore.**

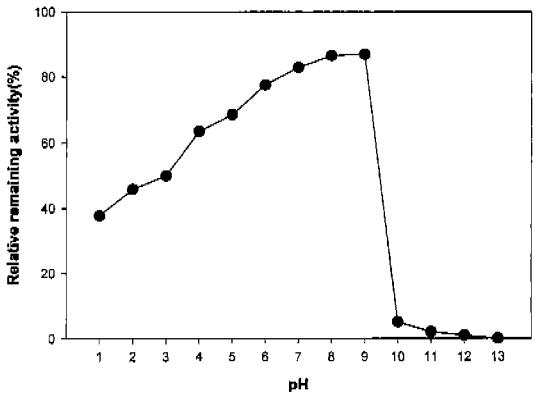


**Fig. 4. pH stability of antifungal compound LP2112 produced from *Pseudomonas fluorescens* 2112.**

잔존한 항진균 활성을 생육균체량 측정법으로 조사한 결과 Fig. 4에서 보는 바와 같이 본 항생물질은 산성 pH 조건에서는 매우 안정하였으나 알칼리성 조건에서는 불안정한 것으로 판단되었다. 이를 보아 산성화되어 있는 우리나라 토양에서 실제적 방제기작을 보일 수 있을 것으로 추정된다.

### 항진균성 항생물질의 열 안정성

*P. fluorescens* 2112의 항생물질을 40°C, 60°C, 80°C, 100°C에서 30분 그리고 121°C에서는 15분간 열처리한 후 *P. capsici*에 대한 항진균 활성을 생육균체량 측정법으로 조사한 결과 Table 1에 나타낸 바와 같이 열에 비교적 안정하여 80°C까지 30분 동안 열처리하여도 50%이상의 항균활성을 유지하였으나, 100°C 이상에서는 불안정하였다. 따라서 본 항생물질은 열에 비교적 안정한 성질이 있음을 확인되었으므로 실제 포장의 토양환경에서도 그 항진균 활성을 발휘하는데 문제가 없을 것으로 생각된다.

### 식물병원성 진균에 대한 항균 spectrum

본 항생물질은 고추역병균 *P. capsici*에 강한 항균효과를 나타내는 것으로 조사되었지만 다른 식물병원성 진균에 대한 방제력을 검증하기 위하여 항균활성 범위를 생육균체량 측정법으로 조사한 결과를 Table 2에 나타내었다. 핵과류 잿빛곰팡이 병원균 *Monilinia froeticola*, 잿빛곰팡이 병원균 *Botrytis cinerea*, 도열병균 *Pyricularia oryzae*, 탄저병균 *Colletotrichum gloeosporiocides*, 문고병균 *Rhizoctonia solani* 등의 시험균주에 대해서는 약 80%에 가까운 강한 생육저해활성을 나타내었다. 그러나 시들음병균 *F. oxysporum*과 배 검은무늬병균 *Alternaria kikuchiana*에 대해서는 각각 30%와 60%의 저해력을 나타내었으며, 근부병균 *Fusarium solani*에는 10% 미만의 약한 저해활성을 보였다. 따라서 길항미생물 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항진균 항생물질은 그 항균범위가 매우 넓은 광범위 항진균 항생물질임을 확인하였지만, *Fusarium* 속에 대해서는 약한 활성을 보였다.

**Table 1. Thermal stability of the antifungal compound LP2112 produced from *Pseudomonas fluorescens* 2112**

| Temperature (°C) | Relative remaining inhibition (%) |
|---|---|
| 40 | 86.5 |
| 60 | 83.3 |
| 80 | 50.5 |
| 100 | 0.0 |
| 121 | 0.0 |
| None | 100.0 |

*Antibiotic was treated in each temperature for 30 min.

### 항진균성 항생물질의 구조분석

토착 길항미생물 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항진균성 항생물질의 구조분석을 행한 결과 이미 알려진 *Pseudomonas* 속이 생성하는 항진균 물질인 acetylphloroglucinol 계 물질[2,5,10,17]과 유사하여 기존의 보고를 근거로 mass 및 NMR spectrum을 비교 분석하였다. Mass spectrum (MS)과 $^{1}$H-NMR, $^{13}$C-NMR spectrum을 근거로 해서 추정해 본 결과, George 등[7]이 보고한 mass spectrum data 결과의 분자식 $C_{10}H_{10}O_5$의 분자이온(molecular ion, $M^+$)인 210.0531, 195.0293(M-$CH_3$), 177.0187(M-$CH_3$-$H_2$0)과 잘 일치하였으며, 또한 Brian 등[3]에 의해 보고된 NMR spectrum과 비

**Table 2. Antifungal spectrum of compound LP2112 produced from *Pseudomonas fluorescens* 2112**

| Strain | Plant diseases | Inhibition(%) |
|---|---|---|
| *Phytophthora capsici* | 역병 (Fluit rot) | 93.1 |
| *Rhizoctonia solani* | 문고병 (sheath blight) | 85.8 |
| *Pyricularia oryzae (Magnaporthe grisea)* | 도열병 (rice blight) | 83.6 |
| *Monilinia froeticola* | 핵과류잿빛 무늬병 (brown rot) | 82.9 |
| *Botrytis cinerea* | 잿빛 곰팡이병 (gray mold) | 82.4 |
| *Colletotrichum gloeosporioides* | 탄저병 (Anthracnose) | 82.1 |
| *Alternaria kikuchiana* | 배검은무늬병 (black spot) | 60.6 |
| *Fusarium oxysporum* | 시들음병 | 32.3 |
| *Fusarium solani* | 근부병 | 9.4 |
| *Fusarium oxysporum* sp. *lycopersici* | 토마토 시들음병 | 0 |

**Table 3. Mode of action of the antifungal compound LP2112 against *Phytophthora capsici***

| Cellular constituents | Labeled precursor | Data (CPM) | |
|---|---|---|---|
| | | Control | Treated with antibiotic 2112 |
| DNA and RNA | [$^3$H]Adenine | 991,782 | 324,349 |
| DNA | [$^3$H]Adenine | 61,285 | 57,435 |
| Protein | [$^3$H]Leucine | 2,644,208 | 335,252 |
| Cell wall | [$^{14}$C]Glucose | 35,805 | 37,439 |

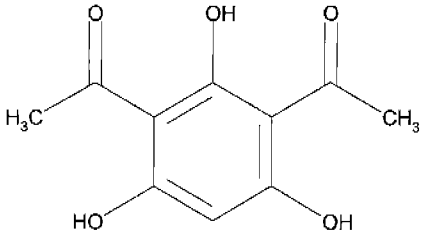


**Fig. 5. Putative molecular structure of the antifungal compound LP2112 isolated from *Pseudomonas fluorescens* 2112.**

교한 결과 $^1$H-NMR에서 5.8 ppm과 2.6 ppm $^{13}$C-NMR에서 204.56, 172.69, 170.06, 104.67, 95.62 및 32.76 ppm등 모두가 LP2112의 NMR spectrum에서 확인할 수 있었다. 또한 Biomolecular NMR spectroscopy[9]와 Introduction to spectroscopy[6]의 표준 spectrum과도 비교하여 최종적으로 *P. fluorescens* 2112가 생성하는 항진균 항생물질인 LP2112는 분자량 210인 2,4-diacetylphloroglucinol ($C_{10}O_5H_{10}$)으로 최종 동정이 하였고, 그 구조는 Fig. 5에 나타내었다.

### *P. fluorescens* 2112 항생물질의 작용기작

*P. fluorescens* 2112가 생성하는 항진균 물질이 고추역병균 *P. capsici*의 생육 과정중 어느 단계에서 저해 작용하여 길항기작을 일으키는지를 확인하기 위하여 [$^3$H] Adenine, [$^3$H] Leucine, [$^{14}$C] Glucose 등의 radioisotope labelling precursor를 이용한 항진균 기작 실험을 실시한 결과 Table 3에서 볼 수 있는 것과 같이 RNA와 DNA 모두를 회수하여 측정한 것과 DNA만을 회수하여 측정한 결과를 비교하여볼 때 DNA만을 회수한 경우 거의 변화가 없는 것과 단백질의 합성이 저해된 것으로 보아 병원성 진균의 RNA 합성을 억제하여 이로 인한 단백질 합성의 양이 저하된 것으로 추정하였다.

## 요 약

우리 지역 토양환경에 토착해 살고 있는 토착 길항미생물을 분리, 선발, 육종하여 다시 지역토양으로 돌렸을 때 우점 능력이 크고 적응력이 큰 토착 생물방제균을 선발하고자 경북 경주지역에서 자연농법을 수행하고 있는 저병해 경작지로부터 토착 길항미생물을 분리하였다. 이들 중 고추역병균 *Phytophthora capsici*의 생육을 강력히 길항하는 항생물질과 siderophore를 동시에 생산하는 복수 길항기작의 토착 길항세균 *Pseudomonas fluorescens* 2112를 선발하였고, 이 균주로부터 우선 항진균성 항생물질을 생산, 정제한 후 그 특성을 조사하였다. 이 항생물질은 산성 pH 조건에서는 매우 안정하였으나 알칼리성 용액에서는 불안정한 물질로 판단되었고, 또한 열에 비교적 안정하여 80°C까지 30분 동안 열처리하여도 항균활성을 50% 정도 유지하였다.

*P. fluorescens* 2112로부터 이 균주의 중요 생물방제 기작인 항진균 항생물질을 단일물질 수준으로 분리하여 그 구조를 분석해 본 결과 선발된 균주가 생산하는 항생물질은 다른 *Pseudomonas* sp.에서도 생산되는 것으로 알려진 2, 4-diacetylphloroglucinol로 동정이 되었다.

고추역병균 *P. capsici*의 생육을 억제하는 토착 길항세균 *P. fluorescens* 2112가 생산하는 항진균 항생물질의 항균범위를 조사해 본 결과 다양한 식물병원성 진균에 방제력을 가지는 광범위 항생물질임을 확인할 수 있었지만, *Fusarium* 속에 대해서는 큰 활성을 볼 수 없었다. 이 항진균 항생물질을 이용해 저해기작을 고추역병균 *P. capsici*의 포자를 대상으로 radioisotope labelling precursor [$^3$H] Leucine, [$^{14}$H] Glucose, [$^3$H] Adenine 등으로 조사한 결과, 그 길항기작이 RNA합성 저해로 추정되었다.

## 감사의 글

본 논문은 1995년도 농림부 농림특정연구과제의 연구비 지원에 의하여 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다

## REFERENCES

1. Arima, K., H. Imanaka, M. Kousaka, A. Fukuta, and G. Tamura. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **28**: 575–576.
2. Bonsall, R. F., Weller, D. M., and Thomashow, L. S.. 1997. Quantification of 2,4-Diacetylphloroglucinol Produced by Fluorescent *Pseudomonas* spp in-Vitro and in the *Rhizosphere* of Wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(3): 951–955.
3. Brain, N. T., and J. G. Steven. 1994. Production of 2,4-diacetylphloroglucinol by the biocontrol agent *Pseudomonas*

*fluorescens* Pf-5. *Can. J. Microbiol.* **40**: 1064–1066.
4. Chang J. W. and S. D. Kim. 1995. Seed coating for the application of biocontrol *Bacillus subtilus* YBL-7 against phytopathogen. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*. **23**: 243-247.
5. Cronin, D., Moenneloccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D. N., and Ogara, F. 1997. Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol in the Interactions of the Biocontrol Pseudomonad Strain F113 with the Potato Cyst-Nematode Globodera-Rostochiensis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**(4): 1357–1361.
6. Donald, L. Pavia, Gary, M. Lampman, and George, S. Kriz. 1996. Introduction to Spectroscopy(a guide for students of organic chemistry), second edition. *Saunders College publishing.*
7. George, M. S., E. W. Ronald, and J. K. Douglas. 1978. Phloroglucinol Derivatives from *Aeromonas hydrophila. J. antibiot.* **31**(11): 1201–1202.
8. Hideyo, Y., H. Tamio, I. Kazuo, and Y. Yoshimasa. 1982. Studies on the Mechanism of Antifungal Action of Aculeacin A. *J. Antibiotic.* **35**(2): 210–219.
9. Jeremy, N. S. Evans,. 1995. Biomolecular NMR spectroscopy. *Oxfor University press.*.
10. Keel, C., Weller, D. M., Natsch, A., Defago, G., Cook, R. J., and Thomashow, L. S. 1996. Conservation of the 2,4-Diacetylphloroglucinol Biosynthesis Locus Among Fluorescent *Pseudomonas* Strains from Diverse Geographic Locations. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2): 552–563.
11. Kim, H. J., G. J. Park, S. G. Lee, Y. L. Jeong and J. H. Lee. 1984. Biological control of Ginseng root-rot. Korea Ginseng Research Institute.
12. Kim S. U., S. Y. Lee, S. K. Kim, K. H. Son, Y. K. Kim, S. S. Moon and S. H. Bok. 1996. Isolation and characterization of antifungal compound produced by *Aspergillus candidus* F1484. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**: 574-577.
13. Kim, Y. S., J. K. Son, D. C. Moon and S. D. Kim. 1997. Isolation and structure determination of antifungal antibiotics from *Bacillus subtilis* YB-70, a powerful biocontrol agent. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **25**: 60-63.
14. Korean association of agrochemical industry. 1993. Reduction by pest and pathogen in non-agrochemical cultivation. Agrochemicals Information, **14**(6): 13–15.
15. Leoffler, W., J. S. M. Tschen, N. Vanittanakom, M. Kugler, E. Knorpp, T. F. Hsieh, and T. G. Wu. 1986. Antifungal effects of bacilysin and fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3 : a comparison with activaties of other *Bacillus* antibiotics. *J. Phytopathol.* **115**: 204–213.
16. Lee, E. T. 1999. Antifungal Mechanisms and Genetic Development of Antagonistic Bacterium on the Phytopathogenic Fungi. *Yeungnam University. Ph. D. thesis.*
17. Nowakthompson, B., Gould, S. J., Kraus, J., and Loper, J. E. 1994. Production of 2,4-Diacetylphloroglucinol by the Biocontrol Agent *Pseudomonas Fluorescens* PF-5. *Can. J. Microbiol.* **40**(12): 1064–1066.
18. The Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries. 1991. *Production, Sales and Import of Agrochemical.* pp 68-71. Annual statistic report of Agriculture, Forestry, and Fisheries, 68–71.

**(Received Nov. 3, 2000/Accepted Dec. 28, 2000)**