

단 보

Pseudomonas fluorescens BB2 균주가 생산하는 단백질성 항생물질에 의한 효모 *Candida* 생육 억제

안경준*

서원대학교 생물교육과

Inhibition of yeast *Candida* growth by protein antibiotic produced from *Pseudomonas fluorescens* BB2

Kyung-Joon Ahn*

Department of Biology Education, Seowon University, Choongbuk 28674, Republic of Korea

(Received November 23, 2015; Accepted December 24, 2015)

ABSTRACT: The bacterial strain that was isolated from chinese cabbage rhizosphere, showed inhibition of yeast growth. This strain was identified as *Pseudomonas fluorescens* BB2 by API 20NE test and 16S rRNA gene sequence analysis. *P. fluorescens* BB2 strain produced antibiotics against yeast as a secondary metabolite effectively when the culture was carried out in YM medium with 3% glucose at 20°C. The protein antibiotic of BB2 strain which was concentrated by ammonium sulfate precipitation and n-butanol extraction inhibited the growth of yeast with the minimal inhibitory concentration of 10 µg/ml against *Candida albicans* KCTC 7965, and the growth of yeast was completely inhibited at 80 µg/ml. The hydrophilic fraction of n-butanol extraction inhibited the growth of *Bacillus cereus* ATCC 21366, showed orange halo on chrome azurol S plate, which means the fraction contained iron chelating siderophore. The results of crystal violet uptake through the cell membrane showed that membrane permeability was increased about 9% than control, when the concentration of hydrophobic antibiotic against yeast *C. albicans* was 60 µg/ml. As a result, the antibiotic produced by *P. fluorescens* BB2 against yeast *Candida* is considered antimicrobial peptide, and this is the first report in the genus *Pseudomonas*.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*, antibiotic, antimicrobial peptide, siderophore, yeast

토양세균에 속하는 *Pseudomonas* 속 세균들은 의학적 감염원이 되거나 식물 병원성, 식품 부패, 그리고 생물학적 조절자로서의 역할을 자연계 내에서 수행하고 있다. 그들은 단순한 영양소를 요구하며 다양한 탄소원을 가지고 생육이 가능하므로 자연계 내에서 흔하게 분포하고 있다.

형광성 *Pseudomonad* 들은 넓은 범위의 항생물질을 생산하는데, 이 화합물들이 다양한 식물 질병에 대한 생물학적 방제에 중요한 역할을 수행하고 있다는 증거들이 늘고 있다 (O'Sullivan and O'Gara, 1992; Van Loon *et al.*, 1998). 이러한 길항세균들은 토양에 존재하는 식물 병원균과의 상호작용을 통해 미생물들의 평형에 중요한 역할을 담당하며, 따라서 생

물학적 질병 통제의 강력한 수단이 될 수 있다. 실제로 다양한 진균성 식물병원균에 대한 길항작용을 수행하는 *Pseudomonas* 균들에 대한 연구가 주목을 받아 왔으며, 이러한 생물학적 방제는 화학적 통제 수단인 살균제에 비해 친환경적이며 내성균의 출현이 적다는 장점이 있다 (Dowling and O'Gara, 1992; Kim *et al.*, 1998; Lee and Kim, 2000).

대부분의 *Pseudomonas* 속 균주들은 한가지 방법 이상의 길항작용을 통해 진균성 병원균들을 억제한다 (Nagarajkumar *et al.*, 2004). 진균의 세포벽에 대한 가수분해효소인 chitinase, β -1,3-glucanase, cellulase에 의한 용균을 일으키거나 (Lim *et al.*, 1991), 대부분의 근권 *Pseudomonas* 속 세균들이 분비하는 철 (Fe^{3+}) 결합 peptide인 pyoverdine (Philson and Llinas, 1982) 이나 phenazine 계열의 방향족 화합물들을 포함하는 siderophore에 의한 식물병원균 생육 억제 (Vandenberg *et al.*, 1983; Linda

*For correspondence. E-mail: kjahn@seowon.ac.kr;
Tel.: +82-43-299-8403; Fax: +82-43-299-8400

et al., 1990; Thomashow and Weller, 1998), 그리고 항진균성 항생물질 생산을 통한 직접적인 생육 저해가 있다. *Pseudomonas* 속 세균들이 생산하는 항진균성 항생물질로는 대부분 2차 대사산물인 pyocyanin (Baron and Rowe, 1981), pyoluteorin (Arima et al., 1964), pyrrolnitrin (Howell and Stipanovic, 1980), 2,4-diacetylphloroglucinol (Shanahan et al., 1992), pseudomonic acid (Fuller et al., 1971)와 CN 화합물(Flaishman et al., 1996)이 잘 알려져 있다.

한편 인체에 유해한 진균류 중에 효모의 일종인 *Candida* 속 일부 균주가 포함되는데, 이들은 건강한 사람의 점막 상재균이지만 면역력이 약화된 환자에게는 기회감염균으로 작용하여 다양한 기관에 표재성 및 심부성 감염을 일으키는 칸디다증을 유발한다. 이러한 진균류에 의한 감염이나 기타 세균 등에 의한 감염에 대항하기 위해 생물 종들은 나름대로 감염균에 대항하는 peptide를 발전시켜 왔는데 포유동물의 cathelicidin 같은 예를 들 수 있다(Benincasa et al., 2006). 그리고 최근에는 해양세균이나 약용식물에서 항균물질을 얻고자 하는 노력들이 이어지고 있다(Kim, 2013; Lee and Kim, 2014; Mondol and Shin, 2014).

이에 본 연구에서는 국내 근권 토양에서 효모의 생육을 억제하는 *P. fluorescens* BB2 균주를 분리하였고, 이 균이 생산하는 항생물질이 효모 *Candida*의 생육을 효과적으로 억제하며 이 항생물질이 *Pseudomonas*속 균에서는 아직까지 보고된 바 없는 단백질 성분의 새로운 항생물질임을 밝히고자 한다.

우선 진균류의 생육을 억제하는 세균을 찾기 위해 충북 청주시 미원면의 배추밭에서 근권 토양을 채취하였다. 채취한 시료는 멸균한 0.85% NaCl 용액에 넣어 교반한 후 LB 평판배지(tryptone 1.0 g, yeast extract 0.5 g, NaCl 0.5 g, agar 1.5 g, D.W. 100 ml)와 YM 평판배지(yeast extract 0.3 g, malt extract 0.3 g, peptone 0.5 g, glucose 1.0 g, agar 1.5 g, D.W. 100 ml)에 도말하여 형태적으로 다른 8개의 균주를 순수분리하였다. 이 균주들의 항균능력을 보기 위하여 평판배지 중앙에 희선 접종을 하고 30°C에서 1일간 배양한 다음, 양쪽에 세균과 효모 균주들을 접종하고 다시 1일간 배양하면서 생육 억제 여부를 관찰하여 이 중에서 효모 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26603과 *Candida albicans* KCTC 7965 균주의 생육을 효과적으로 억제하는 BB2 균주를 선발하였다. 분리한 BB2 균주는 API 20NE kit (bioMérieux)를 이용한 동정시험과 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *Pseudomonas fluorescens*일 확률이 99.0% 이상이어서 *P. fluorescens* BB2로 명명하였다.

P. fluorescens BB2의 항생물질 생산을 위해 YM 액체배지에서 30°C, 240 rpm으로 진탕 배양을 하면서 배양시간 별로 균

생장 정도를 600 nm에서의 흡광도로 측정하였으며, 이중 평판법에 따라 한천 농도를 0.5%로 하여 제조한 55°C의 1.5 ml YM 상층배지에 미리 전 배양한 *C. albicans* KCTC 7965 균액 100 µl를 섞어서 YM 평판배지에 붓고 8 mm stainless cylinder를 놓은 다음, 여기에 배양 상등액 50 µl를 가하여 24시간 배양한 후 나타나는 생육 억제환의 직경을 조사하여 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. *P. fluorescens* BB2 균주의 생장이 대수기를 지나면서 항생물질의 생산이 보이기 시작하여 24시간에서 최대가 되었고 더 이상 증가하지 않았다. 이것으로 보아 BB2 균주가 생산하는 항생물질은 2차 대사산물을 알 수 있었으며, LB 배지에서 배양한 경우에는 항생물질 생산이 보이지 않았다. YM 배지의 glucose 양을 다양하게 한 경우와 진탕 배양 온도를 달리하여 배양한 결과(Table 1) glucose 농도를 3%로 하고 배양온도는 20°C로 유지하였을 때 최대 15 mm의 생육 억제환을 보였으며, glucose를 첨가하지 않거나 4% 이상인 경우 항생물질 생산이 줄었고, 35°C에서는 glucose 농도에 관계 없이 항생물질 생산이 중지되었다. 효과적으로 항생물질을 생산하는 조건에서 배양한 다음, 10,000 × g, 15분간 원심 분리하여

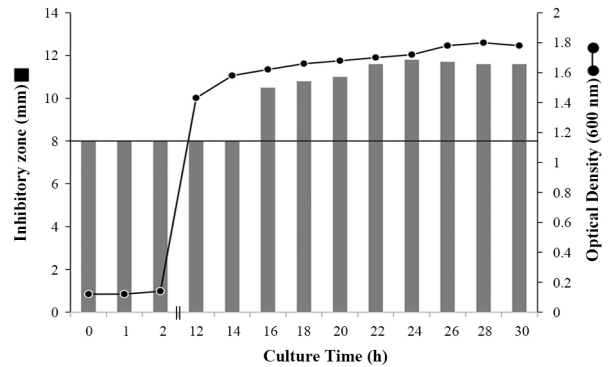


Fig. 1. Antibiotics production by *P. fluorescens* BB2 in YM medium against *C. albicans* KCTC 7965 and growth curve of BB2 according to the culture time.

Table 1. Effect of culture temperature and glucose concentration of YM medium on the antibiotic production of *P. fluorescens* BB2 against *C. albicans* KCTC 7965

Glucose (%)	Antibiotics production				
	Culture temperature (°C)				
	15	20	25	30	35
0	+	+	+	-	-
1	+	++	+	+	-
2	++	++	+	+	-
3	++	+++	++	+	-
4	+	+	+	-	-

+, - : diameter of inhibitory zone (- : no inhibition, + : under 12 mm, ++ : 13-14 mm, +++ : above 15 mm)

얼은 상등액을 농축하기 위하여 n-butanol을 동량 가하여 추출하거나, ammonium sulfate를 배양액의 60%로 첨가하여 침전을 얻었다(Park *et al.*, 2006). N-butanol 추출을 통한 친수성 분획과 소수성 분획을 별도로 농축하였으며, 소수성 분획은 50% ethanol로 녹였고, 친수성 분획과 ammonium sulfate 처리를 통한 침전물은 증류수로 현탁하여 냉장 보관하면서 효모 생육 억제능을 조사하였다. YM 평판에 상기한 2가지 효모와 더불어서 *Paffia rhodozyma* 효모균, 그리고 그람 양성 세균인 *Bacillus cereus* ATCC 21366 를 도말한 다음, 농축한 3가지 시료 50 µl를 각각 paper disk에 가하여 생육 억제 여부를 비교한 결과(Fig. 2), 효모 균주들은 모두 n-butanol 추출에 의한 소수성 분획과 ammonium sulfate에 의한 침전물에 의해 생육이 억제되었으나, *B. cereus* ATCC 21366 균주는 반대로 친수성 분획에 의해서만 생육이 억제되었다. 지금까지 알려진 많은 항진균 항생물질들이 본 연구에서와 같이 소수성을 띄는데, 이는 세포막과 관련된 기작 때문인 것으로 보인다. 한편 ammonium sulfate 침전에 의한 항생물질 농축이 가능한 것은 이 물질이 단백질 성분으로 되어 있음을 보여주는데, 이를 확인하기 위하여 100°C에서 5분 이상 가열하면 효모 생육 억제능이 소실되고, 단백질 분해효소 trypsin이나 chymotrypsin을 처리한 결과 24시간 내에 역시 소실됨을 알 수 있었다. Ammonium sulfate 처리를 통해 얻은 침전물에 포함된 항생물질의 분자량을 알아 보기 위하여 투석과 Vivaspin (Satorius)을 이용한 원심 분리, 그리고 SDS-PAGE를 실시하였다. MWCO 값이 12 kDa인 투석막을 이용하여 4°C에서 24시간 투석한 다음, 투석막 내부와 외부의 시료를 회전 농축하여 투석 전의 부피로 맞추고, *C. albicans*를 대상으로 하여 이중 평판법에 의한 생육 억제 여부를 조사하였다. Fig. 3(1)에서 보는 바와 같이 크기가 12 kDa 이상의 투석막 내부 시료는 억제를 보이지만 크기가 작은 외부의 시료는 효과가 없는 것으로 나타났으며, MWCO 값이 30 kDa인 Vivaspin 원심 분리관에 농축한 항생물질 용액을 넣

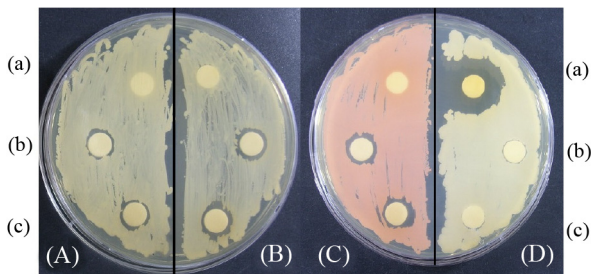


Fig. 2. Growth inhibition of (A) *C. albicans* KCTC 7965, (B) *S. cerevisiae* ATCC 26603, (C) *Paffia rhodozyma*, and (D) *B. cereus* ATCC 21366 by antibiotics of *P. fluorescens* BB2 on YM medium [(a) hydrophilic fraction, (b) hydrophobic fraction, and (c) ammonium sulfate precipitation].

고 5,000 × g로 1시간 원심분리하여 얻은 시료 중에서 분자량 30 kDa 이상의 시료가 효모의 생육을 억제하는 것으로 보아 항생물질의 분자량은 30 kDa 이상인 것으로 추정된다. 또한, 효모에 항균활성을 보이는 시료는 SDS-PAGE에 의한 분자량 측정 결과 Fig. 3(2)와 같이 약 35 kDa와 14.5 kDa의 크기를 가지는 2가지 단백질을 포함하는데, Vivaspin 원심 분리 결과 얻은 30 kDa 이상의 시료가 효모 생육을 억제하였으므로 BB2 균주가 생산하는 항생물질은 약 35 kDa의 단백질로 판단되나, 너무 크기가 크고 투석한 시료에 대한 SDS-PAGE 결과 14.5 kDa의 단백질도 같이 나타나므로 이 단백질들의 세부적인 구조와 기능에 대한 추가적인 조사가 필요하다.

세균의 생육을 억제하는 n-butanol 친수성 분획은 노랑색을 띄며 자외선 하에서 형광을 나타내는 것으로 보아 pyoverdine과 유사한 siderophore로 판단하였다. 실제로 chrome azurol S agar assay (Schwyn and Neilands, 1987)를 통하여 주황색의 halo가 형성됨을 정성적으로 확인하였으며, 수용성인 특성으로 볼 때 catechol형이 아닌 hydroxamate형의 siderophore로 추정된다.

따라서 *P. fluorescens* BB2 균주는 2차 대사산물로 항생물질과 더불어 주변의 철(Fe^{3+})을 효과적으로 흡수하기 위한 siderophore를 동시에 생산하여 Jung과 Song (2015)이 지적한 바와 같이 주위 미생물들의 생육을 다양한 방법으로 억제하는 특성을 보여서 병원균들이 내성을 갖지 못하게 하는 장점을 가졌다. 이러한 다양한 항진균성 억제력이 근근 토양에서 *Pseudomonas* 균주들로 하여금 식물병원균을 억제할 수 있는 생물방제 역할을 가능하게 한다.

항생물질의 농도에 따른 효모 균주의 생육 억제를 보기 위해 전 배양한 *C. albicans* KCTC 7965 균주를 5 ml의 YM 액체

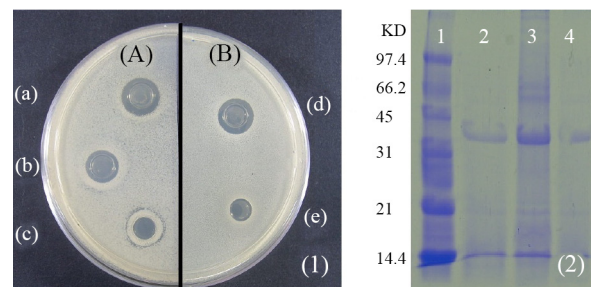


Fig. 3. (1) Growth inhibition of *C. albicans* KCTC 7965 by BB2 antibiotic concentrated with ammonium sulfate followed by (A) dialysis using MWCO 12 kDa dialysis membrane and (B) separation with MWCO 30 kDa Vivaspin centrifuge tube (B) [(a) concentrated antibiotic, (b) > 12 kDa, (c) < 12 kDa, (d) > 30 kDa, and (e) < 30 kDa], (2) SDS-PAGE analysis of antibiotic [Lanes: 1, molecular weight size marker; 2, 3, and 4, rotary evaporated, ammonium sulfate precipitated, and dialyzed antibiotic, respectively].

배지가 들어 있는 T형 tube에 2% 농도로 접종하고 n-butanol로 농축한 소수성 항생물질을 농도 별로 가한 다음, 30°C, 200 rpm으로 진탕 배양하면서 효모 균주의 성장을 600 nm 파장에서 배양 시간 별로 측정하였다(Fig. 4). 첨가한 항생물질의 농도가 10 µg/ml의 경우 균 생장은 대조군과 약간의 차이를 보이며 원활하였으나 그 이상의 농도에서는 억제를 보이면서 80 µg/ml 에서는 생장이 멈추었다. 따라서 *P. fluorescens* BB2가 생산하는 효모 *Candida* 생육 억제 항생물질의 MIC (minimal inhibitory concentration)는 10 µg/ml 정도라고 판단된다.

이상과 같이 조사된 *P. fluorescens* BB2 균주가 생산하는 항생물질은 소수성을 띠는 단백질 성분이며 효모 균주들의 생육을 억제하는 특징을 보이는데, 이는 최근 관심을 모으고 있는 antimicrobial peptide (AMPs)에 속하는 것으로 생각된다 (Bahar and Ren, 2013). 특히 항진균성 AMPs들의 항균 기작을 보면 대부분 진균류의 세포벽이나 세포막에 작용하여 막투과성을 변화시키는 amphipathic한 성질을 나타내므로, 본 연구에서도 이를 확인하기 위하여 Vaara와 Vaara (1981)의 방법을 변형하여 적용하였다. 미리 전 배양한 *C. albicans* KCTC 7965 균주 배양액 50 ml를 10,000 × g, 5분간 원심 분리한 다음, 균체를 2배의 0.5% NaCl로 현탁하여 T형 tube로 5 ml씩 옮기고 농축된 항생물질을 MIC 농도 이상으로 첨가하여 7시간 동안 30°C, 200 rpm으로 진탕 배양을 계속하였다. 이 배양액을 4°C, 10,000 × g에서 1분간 원심분리하여 상등액을 제거한 다음, 10 µg/ml crystal violet이 포함된 5 ml의 0.5% NaCl로 현탁하여 다시 10분간 진탕하였고, 상등액만 취하여 590 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 항생물질을 첨가하지 않은 대조군을 포함하여 효모 세포의 색소 흡수와 방출 정도를 비교한 결과 Fig. 5와 같이 항생물질 농도가 높아질수록 세포막의 투과도를 변화시켜 세포 내로 들어간 색소가 다시 배지로 빠져 나와서 MIC의 6배 농

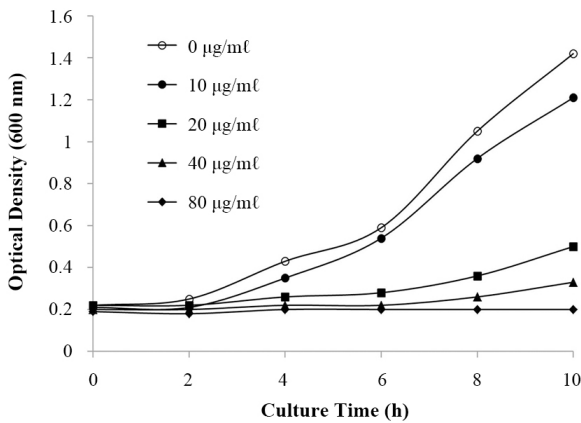


Fig. 4. The growth patterns of *C. albicans* KCTC 7965 in YM medium with addition of different concentration of BB2 antibiotic.

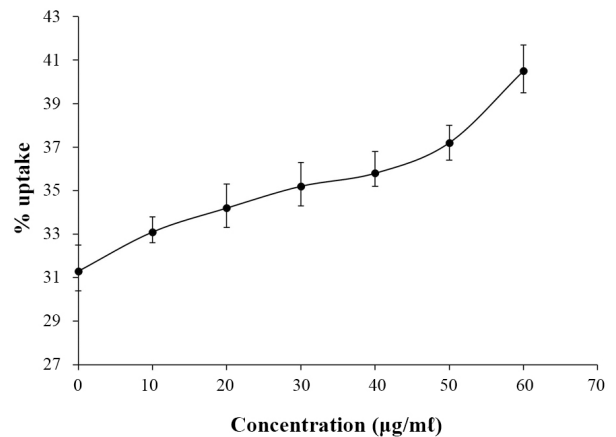


Fig. 5. Uptake of crystal violet by *C. albicans* KCTC 7965 with BB2 antibiotic. The concentration of antibiotic treated were 0, 10, 20, 30, 40, 50, and 60 µg/ml, respectively. Values are means ± SD (error bars) for triplicate.

도에서는 대조군과 비교하여 흡수율이 약 9% 증가하는 것으로 나타났다. 이는 Lee와 Kim (2014)이 *C. albicans*를 대상으로 약용식물 대황의 추출물을 가지고 실험한 결과 MIC의 4배 농도에서 흡수율이 12% 증가되었다는 보고와 유사한 결과이다.

이상과 같은 결과를 종합하면, *P. fluorescens* BB2 균주가 생산하는 항생물질은 효모 균주의 세포막 투과도를 변화시켜 정상적인 생육을 억제하는 소수성 단백질이다. 이와 같은 방식의 항진균성 항생물질들은 대부분 소수성 peptide로 구성되며, 그 길이가 짧을수록 항균효과가 뛰어난 것으로 보고되어 있는데 (Bahar and Ren, 2013), BB2 균주가 생산하는 항생물질은 크기가 비교적 큰 단백질이므로 구조를 변화시켜서 활성을 높이는 과정을 거친다면 더욱 유용한 천연물 항생제가 될 것으로 기대한다.

적 요

효모의 생육을 억제하는 세균을 배추의 근권 토양에서 분리하였다. API 20NE test와 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과 *Pseudomonas fluorescens* BB2로 동정되었다. *P. fluorescens* BB2 균주는 3%의 glucose가 포함된 YM 배지에서 20°C로 배양하였을 때 효모에 대한 항생물질을 2차 대사산물로서 효과적으로 생산하였다. BB2 균주의 단백질성 항생물질은 ammonium sulfate에 의한 침전과 N-butanol 추출에 의해 농축되었으며, 효모의 생육을 억제하는데 *Candida albicans* KCTC 7965에 대한 minimal inhibitory concentration은 10 µg/ml이었고, 80 µg/ml 농도에서는 완전히 억제하였다. N-butanol 추출에 의한

친수성 분획은 *Bacillus cereus* ATCC 21366의 생육을 억제하였으며, chrome azurol S 평판배지에서 주황색 halo를 생성하므로 철과 결합하는 siderophore를 포함한다. 세포막을 통한 crystal violet의 흡수를 조사한 결과 효모 *C. albicans*에 대한 소수성 항생물질 60 µg/ml의 농도에서는 대조군에 비해 막 투과성이 약 9% 증가하였다. *P. fluorescens* BB2 균주가 생산하는 항생물질은 효모 *Candida*의 생육을 억제하는 antimicrobial peptide의 일종으로 보이며, 이는 *Pseudomonas* 속에서는 처음으로 보고되는 것이다.

References

- Arima, K., Imanaka, H., Kousaka, M., Fukuta, A., and Tamura, G. 1964. Pyrrolnitrin, a new antibiotic substance, produced by *Pseudomonas*. *Agric. Biol. Chem.* **28**, 575-576.
- Bahar, A.A. and Ren, D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals* **6**, 1543-1575.
- Baron, S.S. and Rowe, J.J. 1981. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **20**, 814-820.
- Benincasa, M., Scocchi, M., Pacor, S., and Tossi, A. 2006. Fungicidal activity of five cathelicidin peptides against clinically isolated yeasts. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 950-959.
- Dowling, D.N. and O'Gara, F. 1992. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**, 133-141.
- Flaishman, N.A., Eyal, Z., Zilberstein, A., Voisard, C., and Haas, D. 1996. Suppression of *Septoria tritici* blotch and leaf rust by recombinant cyanide-producing strains of *Pseudomonas putida*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**, 642-645.
- Fuller, A.T., Banks, G.T., Mellows, G., Barrow, K.D., Woodford, M., and Chain, E.B. 1971. Pseudomonic acid: an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Nature* **234**, 416-417.
- Howell, C.R. and Stipanovic, R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*-induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics, pyoluteorin. *Phytopathology* **70**, 712-715.
- Jung, T.K. and Song, H.G. 2015. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* TK3 inhibiting causative bacteria of atrophic rhinitis and fowl typhoid. *Korean J. Microbiol.* **51**, 177-180.
- Kim, Y.H. 2013. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by *Coptidis chinensis* through damaging the integrity of cell membrane. *Korean J. Microbiol.* **49**, 17-23.
- Kim, J.M., Lee, M.W., and Han, Y.H. 1998. Antifungal activity of *Pseudomonas* sp. DGUM 5051 against apple bitter-rot causing fungus, *Glomerella cingulata*. *Korean J. Mycol.* **26**, 458-465.
- Lee, E.T. and Kim, S.D. 2000. Selection and antifungal activity of antagonistic bacterium *Pseudomonas* sp. 2112 against red pepper rotting *Phytophthora capsici*. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 334-340.
- Lee, H.S. and Kim, Y.H. 2014. Antifungal activity of *Rheum undulatum* on *Candida albicans* by the changes in membrane permeability. *Korean J. Microbiol.* **50**, 360-367.
- Lim, H.S., Kim, Y.S., and Kim, S.D. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 510-516.
- Linda, S.T., David, M.W., Robert, F.B., and Leland, S.P. 1990. Production of the antibiotic phenazin-1- carboxylic acid by fluorescent *Pseudomonas* species in the rhizosphere of wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 908-912.
- Mondol, M.A.M. and Shin, H.J. 2014. Antibacterial and antiyeast compounds from marine-derived bacteria. *Mar. Drugs* **12**, 2913-2921.
- Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R., and Velazhahan, R. 2004. Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* **159**, 73-81.
- O'Sullivan, D.J. and O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**, 662-676.
- Park, S.M., Jung, H.J., Kim, H.S., and Yu, T.S. 2006. Isolation and optimal culture conditions of *Brevibacillus* sp. KMU-391 against black root pathogens caused by *Didymella bryoniae*. *Korean J. Microbiol.* **42**, 135-141.
- Philson, S.B. and Llinas, M. 1982. Siderochromes from *Pseudomonas fluorescens*. *J. Biol. Chem.* **257**, 8081-8085.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* **160**, 47-56.
- Shanahan, P., O'Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., and O'Gara, F. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent *Pseudomonad* and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 353-358.
- Thomashow, L.S. and Weller, D.M. 1998. Role of phenazine antibiotics from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *J. Bacteriol.* **170**, 3499-3508.
- Vaara, M. and Vaara, T. 1981. Outer membrane permeability barrier disruption by polymyxin in polymyxin-susceptible and-resistant *Salmonella typhimurium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**, 578-583.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse, C.M.J. 1998. Systematic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **36**, 453-483.
- Vandenbergh, P.A., Gonzales, C.F., Wright, A.M., and Kunka, B.S. 1983. Iron-chelating compounds produced by soil *Pseudomonas*: Correlation with fungal growth inhibition. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 128-132.