

Leaching Model System에 의한 土壤 靜菌現象의 分析

許鉉·洪仁杓·李敏雄

東國大學校 農科大學 農業生物學科

Quantitative Evaluation of Leaching Model System for Soil Fungistasis

Hyun-Heo, In-Pyo Hong and Min-Woong Lee

Department of Agrobiolgy, College of Agriculture, Dongguk University, Seoul 100, Korea

ABSTRACT: This study was carried out to investigate the germination of four fungi under non-leaching and leaching incubation. The range of germination rates of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*, *Mortierella*, and *Helminthosporium sativa* incubated on sand saturated with various solutions without leaching were 90-99%, 31-45%, 38-62% and 86-98% respectively. The range of germination rates of *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*, *Mortierella* n. sp and *Helminthosporium sativa* incubated on sand undergoing leaching were 51-63%, 13-25%, 15-37% and 47-80%, respectively. The germination rates of the four fungi tested were suppressed under leaching incubation.

KEYWORDS: Leaching, Non-leaching, *Fusarium solani* f. sp. *pisii*, *Fusarium oxysporum*, f. sp. *cucumericum* *Helminthosporium sativa*, *Mortierella* n. sp.

靜菌現象은 원래 포자발아에 적합한 조건하에서 특정 곰팡이 포자가 발아할 수 없는 현상으로 1953년 Dobbs와 Hinson(1953)이 처음 기술했으며 그후 토양생태계의 중요성과 토양 병원미생물의 방제를 위해 많은 연구가 수행되어 왔다(Duggars, 1901). 정균현상은 일반적으로 자연토양을 살균 하였을 때, 자연토양에 영양물질을 첨가시, 식물의 근권하에서, 심층토양하에서, 토양을 건조시키는 등의 조건하에서는 해소될 수 있다고 하였다(Duggars, 1901). 토양내 미생물의 Mycostasis는 휘발성 및 비휘발성물질 미생물의 활성도와 포자의 영양물질과 연관이 있으며 휘발성 물질에는 Ammonia Acetone Ethylene 그리고 Formaldehyde 등이 있으며 이러한 물질은 중성 또는 알칼리 토양에서 생존하며(Hora 등, 1970) 곰팡이 배양으로부터도 형성된다(Griffin, 1962). Hora와 Baker(1970) 휘발성 정균작용 인자가 영양분 손실에 영향을 준다고 하였으며 Smith(1964)는 Ethylene이 정균현상을 Ko와 Lockwood(1967)는 Ammonia가 알칼리 토양에서 정균인자로 보인다고 하였다. 토양내에 생존하는 대

부분의 사상균은 포자발아나 증식에 있어서 자연토양내의 휘발성 및 비휘발성 외에도 여러 미생물의 활성에 의해 정균현상의 영향을 받는다. Lingappa와 Lockwood(1964)는 토양에 포자가 놓이면 포자와 포자분비물이 미생물의 활성을 촉진하며 미생물 활성의 촉진은 포자발아와 밀접한 관련이 있다고 하였다. Ko와 Lockwood(1967) 그리고 Yoder와 Lockwood(1973)는 토양에서 발아할 수 없는 많은 포자는 필수영양분의 부족 또는 미생물과 심한 경쟁 상태에 놓여있는 토양환경에 기인한다고 하였다. Bristow와 Lockwood(1975)는 *Cochliobolus victoriae*의 Conidia를 물과 묽은 염용액으로 Leaching 배양했을 때 그의 발아가 억제되었다고 보고한 바 있으며 Lingappa와 Lockwood(1964)는 포자로부터 침출된 영양물질이 토양미생물에 의해 이용되고 *Glomerella cingulata*의 분생포자가 세균이나 방선균과 함께 배양되었을 때 발아가 억제되었다고 하였다.

본 실험은 Leaching Model System을 이용하여 몇종의 곰팡이 포자의 발아율을 대조로서 Non-lea-

ching처리와 비교 조사하고 Leaching에 의한 영양 물질의 고갈과 발아의 관계가 어떤 관계를 가지는가를 실험하였다.

材料 및 방법

실험에 사용된 균주

동국대학교 미생물연구실에 계대배양 중인 *Fusarium solani* f. sp. *psii*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumericum*, *Helminthosporium sativa*, *Mortierella* n. sp를 실험에 공시하였다.

실험에 사용된 처리액

처리액은 다음과 같은 4가지 종류를 Bristow와 Lockwood(1975)가 사용한 방법에 준하여 사용하였다.

- ① Distilled Water (D, W)
- ② Buffer Solution (0.02 M Potassium phosphate buffer pH 7.0)
- ③ Pfeffer's Solution (P, S)
증류수 1L에 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g, K_2HPO_4 , 0.2g $Ca(NO_3)_2$, 0.8g, KNO_3 , 0.2g KCl , 0.1g을 넣었다.
- ④ 심층 토양의 침출액
1m 깊이의 토양 1kg을 채취하여 증류수 1,000 ml에 넣고 24시간 진탕하여 상등액만 추출하여 사용하였다.

Leaching Model System

Bristow와 Lockwood(1975)가 포자에 영양고갈을 부과하기 위해 고안한 Leaching Model System을 변형한 것에 (90×15 mm) 0.42 mm의 체로 친 모래를 멸균하여 5~7 mm의 높이로 조정하고 그 위에 포자가 $2 \sim 2.5 \times 10^3$ 개가 있는 spore bearing membrane filter(0.4 mm, Nucleopore Corp, U. S. A. Hsu and Lockwood(1973))를 놓은 후 각 처리용액을 80 ml/hr로 12시간 26°C에서 Leaching 배양하였다(Fig. 1).

균주의 증식 및 포자현탁액의 준비

李와 崔(1982)의 방법을 참고로 하여 계대배양 중인 4종의 균주를 P, D, A, 사면배지에 멸균냉각 증류수(5°C)를 10 ml/넣고 초자봉으로 균사를 부드럽게 끊어서 균층상면의 포자만을 떨어지게 한 후 가제를 사용하여 여과시키고 3,500 rpm으로 15분간 3회 원심분리하여 포자를 세척 처리하였다. 원심분리 후 포자를 혈구계산기를 이용하여 1 ml/당 2,000~2,500

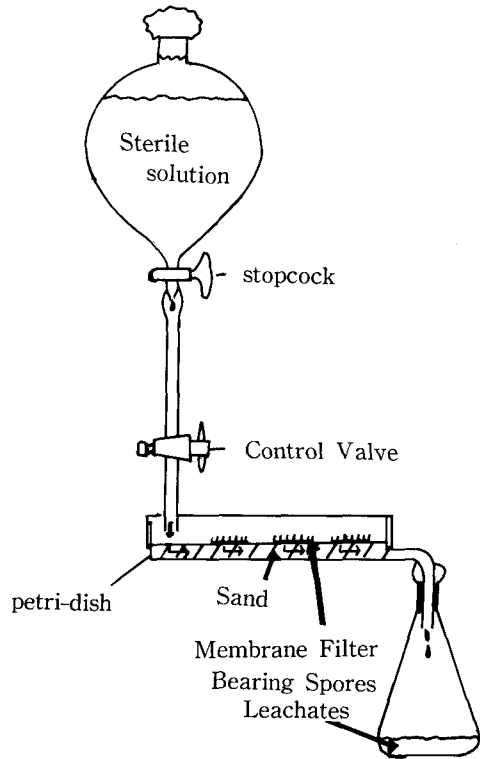


Fig.1. Model System used to impose a nutrient stress on spores.

개로 조정하였다.

포자의 염색

12시간 배양된 포자의 염색은 Lingappa와 Lockwood(1963)의 방법을 참고하여 Phenolic rose bangal액을 만들어 페트리접시(15 cm, dia)에 20메쉬 체로 친 멸균한 모래를 넣고 그 위에 배양처리된 spore bearing membrane filter를 올려놓고 4~5시간 염색시킨 후 검경하였다.

포자의 검경

염색된 spore bearing membrane filter를 slide 유리판 위에 놓고 조광장치(Nicholas, U. S. A.)를 사용하여 400×의 현미경으로 검경하였고 포자의 발아는 발아관이 포자길이의 크기가 되었을 때 발아로 판정하고 200개의 포자를 세어 발아한 포자의 비를 백분율로 구하여 평균하였다(Bristow 등, 1967).

Non-leaching 대조군의 처리

3개의 페트리접시(90×15 mm)에 0.42 mm 체로 친 모래를 멸균하여 각각 5~7 mm를 넣은후 각 처리용액을 30 ml 흡수시키고 $2 \sim 2.5 \times 10^3$ 개의 spore bearing membrane filter를 위의 페트리접시에 놓고 26°C 12시간 배양하였다.

結果 및 考察

Table I에 의하면 *Fusarium solani* f.sp. *pisi*는 Non-leaching배양에서 buffer solution은 99%가 발아하였고 증류수는 98%, subsoil extract는 93.1%, pfeffer's solution은 90%가 발아하였다. 한편 Leaching배양에서 pfeffer's solution이 63% buffer solution이 58.5% 증류수가 53.5% subsoil extract는 51%가 발아하므로 Leaching은 일반적으로 포자 발아가 낮았다.

Table II에 의하면 *Fusarium oxysporium* f.sp. *cucumerium*은 Non-leaching의 경우 buffer solution이 45% pfeffer's solution이 43% subsoil extract는 33.5%의 발아율을 나타냈고 Leaching의 경우 증류수는 25% subsoil extract가 22% buffer solution이 17.5%, pfeffer's solution은 13.5%가 발아하였으므로 Leaching은 포자발아력을 낮게 하는 특징이 있다.

Table I. Germination rates of *Fusarium solani* f. sp. *pisi* spore incubated for 12hr on sand undergoing leaching and non-leaching with various media in flow rate 80 ml/hr.

Media	Germination (%)	
	Non-leaching	leaching
Pfeffer's solution	90.0±1	63.0±7*
0.025M phosphate buffer	99.9±1	58.5±8*
Distilled water	98.0±1	53.5±5**
Subsoil extract	93.1±2	51.0±3**

* The star mark indicates a significant difference in the treatment of solution in row.

Table II. Germination rates of *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumerium* spore incubated for 12hr on sand undergoing leaching and non-leaching with various media in flow rate 80 ml/hr.

Media	Germination (%)	
	Non-leaching	leaching
Pfeffer's solution	43.0±3	13.5±3*
0.025M phosphate buffer	45.0±5	17.5±2*
Distilled water	31.0±3	25.0±6
Subsoil extract	33.5±1	22.0±3*

* The star mark indicates a significant difference in the treatment of solution in row.

Table III. Germination rates *Helminthosporium sativa* conidia incubated for 12hr on sand undergoing leaching and non-leaching with various media in flow rate 80 ml/hr.

Media	Germination (%)	
	Non-leaching	leaching
Pfeffer's solution	93.0±2	72.5±4**
0.025M phosphate buffer	98.0±1	47.0±7*
Distilled water	86.1±7	80.4±2
Subsoil extract	95.0±1	68.0±3*

* The star mark indicates a significant difference in the treatment of solution in row.

Table IV. Germination rates of *Mortierella* n. sp. spore incubated for 12hr on sand undergoing leaching and non-leaching with various media in flow rate 80 ml/hr.

Media	Germination (%)	
	Non-leaching	leaching
Pfeffer's solution	51.0±3	37.5±4
0.025M phosphate buffer	39.7±5	31.0±5
Distilled water	62.5±2	15.0±7**
Subsoil extract	38.5±3	33.3±1

* The star mark indicates a significant difference in the treatment of solution in row.

Table III에 의하면 *Helminthosporium sativa*는 Non-leaching의 경우 buffer solution에서 98% subsoil extract에서 95% pfeffer's solution에서 93% 증류수에서 86.1%의 발아율을 나타냈고 Leaching의 경우 증류수에서 80.4% pfeffer's solution에서 72.5% subsoil extract에서 68% Buffer solution에서 47%가 발아하였는데 Non-leaching보다 Leaching 처리구에서 포자발아력이 낮았다

Table IV에 의하면 *Mortierella* n. sp.는 Non-leaching의 경우 증류수에서 62.5% pfeffer's solution에서 51% buffer solution에서 39.7% subsoil extract에서 38.5%의 발아율을 나타냈고 Leaching의 경우 pfeffer's solution에서 37.5% subsoil extract에서 33.3% 증류수에서 15%의 발아율을 나타냈다.

Ko와 Lockwood(1967)는 토양에서 곰팡이의 포자발아에 필요한 영양물질이 미생물에 의해 경쟁적으로 소모되어 정균상태가 유지된다고 하였다.

Hora(1972) 등은 포자와 특정균의 sclerotia는 물에서 발아하지만 토양에서 세균이나 방선균에 의해서 영양물질이 고갈되기 때문에 발아하지 못한다고 하였다. 한편 Bristow와 Lockwood(1975)는 Leaching System을 고안하여 여기에 *Cochliobolus*의 포자를 Leaching 배양하여 발아율이 낮은 것을 발견하고 이러한 낮은 발아율은 Leaching에 의한 포자의 Nutrient stress에 의한다고 하였다. Sneh와 Lockwood(1975)는 Leaching의 양이 단위 시간당 많으면 많을수록 포자에 Nutrient stress가 크게 부과되어 발아율이 저조하다고 하였다.

본 실험에서는 각 균의 포자를 시간당 80 ml로 Leaching 배양하여 Non-leaching 대조군과 발아율을 조사한 결과(Table I, II, III, IV) Leaching하의 모든 각 균의 포자가 Non-leaching 대조군에 비해 발아가 억제되었다. 이렇게 Leaching하에서 발아가 억제된 것은 포자에 Nutrient stress가 부과되어 발아가 억제되었다는 위의 연구자들의 연구보고와 일치하는 것으로 생각된다.

Gray(1959)는 *Helminthosporium sativum*, *Stemphylium sarcinaeforme* 그리고 *Helminthosporium victoria* 등의 큰 포자는 정균작용에 감수성이 적고 *Aspergillus fumigatus*, *penicillium variable* 등의 포자는 작기 때문에 정균작용에 민감한 반응을 보인다고 하였고 일반적으로 큰 포자는 작은 포자에 비해 많은 에너지를 갖고 있으며 발아시 외부로부터 영양물질을 흡수하지 않고서도 빨리 발아하며 또한 포자의 표면적이 넓어 작은 포자보다 영양물질을 신속하고 다량으로 흡수한다고 한 바 있다. 본 실험에 사용된 균의 포자 크기는 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*이 가장 작았고 그 다음이 *Mortierella*였으며 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*와 *Helminthosporium sativa*의 포자가 비교적 컸다. 발아율도 이들 적은 포자가(Table II, IV) 큰 포자(Table I, III)에 비해 낮았다. 이러한 현상은 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*과 *Mortierella* n. sp.가 포자의 크기가 작고 자체내에 갖고 있는 에너지원도 적기 때문에 Non-leaching 대조군과 Leaching군에서 나타난 것으로 생각되며 Gray(1959)의 연구결과와도 일치하는 것으로 사료된다. 이와 최(1982)는 액체 배지에서의 4가지 종의 공시균의 포자발아율은 2차 증류수에서 높았고 그 다음이 pfeffer's solution이었으며 토양침출액 중에서는 발아율이 가장 낮았다고 했다. Bristow와 Lock-

wood(1975)는 여러가지 배지 조건하에서 포자발아율을 조사하여 무기물에 의해 포자가 영향을 받지 않는다고 하였고 Dobbs와 Stover(1963, 1958)는 토양 침출액은 포자의 발아율이 저조하다고 하였다. 본 실험에서 각 균에 대한 용액별 발아율은 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*의 Non-leaching 대조군의 경우 Buffer solution에서 99%가 가장 높은 발아를 하였고 pfeffer's solution에서 90%의 가장 낮은 발아를 하였다(Table I) *Fusarium solani* f. sp. *pisi*의 Leaching 배양의 경우 pfeffer's solution에서 63%의 가장 높은 발아를 하였고 subsoil extract에서 가장 낮은 발아를 하였다(Table I). *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*의 Non-leaching 대조군의 경우 Buffer solution에서 45%의 발아를 하였고 증류수에서 31%의 가장 낮은 발아를 하였다(Table II). 한편 Leaching배양의 경우 증류수에서 25%의 높은 발아를 하였고 pfeffer's solution에서 가장 낮은 발아를 하였다(Table II).

*Helminthosporium sativa*의 Non-leaching 대조군의 경우 Buffer solution에서 최고 98%의 발아를 하였고 증류수에서 최저 86%의 발아를 하였다(Table III). Leaching배양의 경우 증류수에서 최고 80.4%의 발아를 했고 Buffer solution에서 최저 47%의 발아를 했다(Table III). *Mortierella* n. sp.의 Non-leaching 대조군의 경우 증류수에서 최고 62.5%의 발아율을 나타냈고 subsoil extract에서 최저 38.5%의 발아를 했다(Table IV). 한편 Leaching배양의 경우 pfeffer's solution에서 최고 37%의 발아율이 나타났고 증류수에서 최저 15%의 발아율이 나타났다. 위의 결과를 통해서 *Mortierella* n. sp.와 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*이 Non-leaching 대조군의 토양침출액에서 발아율이 낮았고 Leaching군의 증류수에서 *Mortierella* n. sp.이 최고의 발아율을 보인 것은 이와 최(1982) 그리고 Dobbs(1963)와 Stover(1958) 등의 연구결과와 일치하였으나 그 외의 결과는 상이하였다. Cochrane(1958)은 인이 균의 초기생장에서 급격히 흡수되고 세포내에서 유기화합물로 전환되며 칼륨은 탄수화물 대사작용에 필수적 기능을 한다고 하였으며 마그네슘은 균세포의 정상적인 대사와 생장에 필요한 효소의 활성화 기능을, 칼슘은 곰팡이 등 많은 생물체에서 수소 칼륨 나트륨 등 특정 일가양이온에 의한 해로운 작용을 방어하고 곰팡이와 streptomycetes의 전체량을 증가시킨다고 하였다.

Buffer solution으로 처리한 Non-leaching군에서 *Helminthosporium sativa*과 (Table III) *Fusarium solani* f. sp. *lisi* (Table I)가 발아율이 높았고 pfeffer's solution으로 Leaching한 군에서는 *Fusarium solani* f. sp. *lisi* (Table I)와 *Helminthosporium sativa* (Table III)이 높은 발아를 한 것은 cochrane의 연구와 마찬가지로 Buffer solution이나 pfeffer's solution의 성분이 수소 칼륨 칼슘 마그네슘 등으로 포자가 발아하는 과정에서 이를 이용했기 때문으로 생각된다.

摘 要

4가지 균주의 포자를 4가지의 용액으로 Non-leaching과 Leaching하에서 배양하고 발아율을 조사한 결과 다음과 같다.

Non-leaching배양된 *Fusarium solani* f. sp. *lisi*의 경우 포자발아율은 pfeffer's solution에서 90%로 가장 낮았으며 Buffer solution에서 99%로 가장 높았다. Leaching배양의 경우 subsoil extract에서 51%로 포자발아가 억제되었고 pfeffer's solution에서 63%로 덜 억제되었다.

Non-leaching배양한 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium*의 경우 포자발아율은 증류수에서 31%로 가장 적게 억제되었고 Buffer solution에서 45%로 가장 많이 억제되었다. Leaching배양의 경우 Buffer solution에서 17.5%로 가장 억제되었고 증류수에서 25%로 덜 억제되었다.

Non-leaching배양한 *Helminthosporium sativa*의 경우 증류수에서 86.1%로 발아가 낮았고 Buffer solution에서 98%로 높았다. Leaching배양의 경우 Buffer solution에서 47%로 발아가 억제되었고 증류수에서 80.4%로 덜 억제되었다.

Non-leaching배양한 *Mortierella* n. sp.의 경우 발아율은 subsoil extract에서 38.5%로 낮았고 증류수에서 62.5%로 높았다. Leaching배양의 경우 발아율은 증류수에서 15%로 크게 억제되었고 pfeffer's solution에서 37.5%로 덜 억제되었다.

參考文獻

Bristow, P.R. and Lockwood, J.L.(1975): Soil Fungistasis: Role of spore exudates in the inhibition of nutrient-independent propagules. *Journal of*

General Microbiology 90: 140-146.

Dobbs, C.G.(1963): Factors in soil mycostasis. *Recent progress in Microbiology* 8: 235-243.

Dobbs, C.G. and Hinson, W.H.(1953): A Widespread fungistasis in soils. *Nature, Lond* 172: 117-119.

Doggars, B.M.(1901): Physiological studies with reference to the germination of certain fungus spores. *Bot. Gaz.* 31: 38-66.

Gray W. Steiner and J.L. Lockwood, (1959): Soil fungistasis. *Phytopathology* 59: 1084-1092.

Griffin, G.J.(1962): Production of fungistatic effect by soil microflora in autoclaved soil. *Phytopathology* 52: 90-91.

Hora, J.S. and Baker, R.(1970): A volatile factor in soil fungistasis. *Nature. Lond.* 225: 1071-1072.

Hora, J.S. and Baker, R.(1972): Extraction of volatile factor from soil inducing fungistasis. *Phytopathology* 62: 1475-1476.

Hsu, S.C. and Lockwood, J.L.(1973): Soil fungistasis: behavior of nutrient-independent spores and sclerotia in a model system. *Phytopathology* 63: 334-337.

Ko, W.H. and Lockwood, J.L.(1967): Soil fungistasis-Relation to fungal spore germination. *Phytopathology* 57: 894-901.

Lingappa, B.T. and Lockwood, J.L.(1963): Direct assay of soils for fungistasis. *J. Gen. Microbiol* 26: 473-485.

Lingappa, B.T. and Lockwood, J.L.(1964): Activation of soil microflora by fungus spores in relation to soil fungistasis. *J. Gen. Microbiol.* 35: 215-227.

Smith, P.L. and Green JR. R.T.(1964): Identification and physiological studies of soil bacteria causing fungistasis. *Proc. Indiana Acad. Sci.* 74: 140-148.

Sneh, B. and Lockwood, J.L. (1975) : Quantitative evaluation of the microbial nutrient sink in soil in relation to a model system for soil fungistasis. *Soil Biol. Biochem.* 8: 65-69.

Stover, R.H(1958): Studies on *Fusarium* wilt of bananas III. Influences of Fungitoxin on behavior of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* in soil extract and diffusates. *Can. J. Bot.* 36: 439-453.

Vincent W. Cochrane.(1958). *Physiology of Fungi*, Willy. 300-317.

Yoder, D.L. and Lockwood, J.L.(1973): Fungal spore germination on natural and steril soil. *J. Gen. Microbiol* 74: 107-117.

이민용, 최혜정(1982) : 살균 토양, 자연 토양 및
Glucose-peptone으로 개량한 토양조건이 *Hel-*
*minthosporium victoria*와 *Mortierella*, n. sp.에

미치는 정균작용. 한국 균학회지 **10**: 119-124.

Accepted for Publication 20 January 1988