

# Alfalfa 根瘤菌 接種方法에 따른 着生 根瘤菌數의 變化

賓榮鎬 · 韓鏡秀 · 崔震龍 · 金碩鉉 \*

## Comparison of Inoculation Methods of *Rhizobium* to Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

Bin, Y. H., K. S. Han, Z. R. Choe and S. H. Kim\*

### ABSTRACT

Three levels of inoculum concentration from 10 to 30 percent, three kinds of adhesive materials, gum arabic, methyl cellulose and carboxy methyl cellulose, and five different pelleting materials including 4 different sources of lime and calcium carbonate were compared to investigate an optimum condition for seed inoculation by counting the number of viable rhizobium cells. For a peat-cultured *Rhizobium* inoculant, 10 per cent was found to be an optimum by showing  $3.5 \times 10^9$  viable cells per seed. The highest number of viable cells were observed from gum arabic at 40 per cent, methyl cellulose at 5 per cent and carboxy methyl cellulose at 4 per cent. Among pelleting materials, a dental lime for investment originated from Ransom & Randolph Co. Ohio, U.S.A. resulted best as pelleting material.

### 緒 言

荳科牧草를 栽培하지 않고 있던 野山에 荳科牧草를 導入하려면 根瘤菌을 接種해야 하며, 根瘤菌을 接種하면 성공적으로 荳科牧草를 野山에 定着시킬 수 있다는 報告<sup>2,7,9)</sup>가 있다. 경우에 따라서는 根瘤菌을 接種한 種子에 石灰 등으로 被複을 하면 牧草의 定着率이 더욱 向上된다는 報告<sup>11)</sup>도 있다. 이때에는 接着劑의 種類와 使用量 그리고 被複物質의 種類와 그 量이 問題가 될 수 있다.

우리나라에서 酸性土壤에 alfalfa를 栽培할 目的으로 荳科牧草 種子에 根瘤菌을 接種할 境遇 두 가지 다른 根瘤菌系를 使用하여 比較한 바 있고<sup>3)</sup> 根瘤菌의 種子處理 效果에 대하여 Scott<sup>13)</sup> 및 Vincent<sup>14)</sup>는 根瘤菌 接種濃도에 따라 生存 根瘤菌數에 差異가 있다고 하였으며 Date<sup>4)</sup>, Dawson<sup>5)</sup>, Jordan 등은<sup>8)</sup> 接着劑로서 gum arabic을 使用할 때 20% 수용액을 使

用하는 것이 適合하다고 하였으며, 被複材料로는 calcium carbonate와 micro fine lime을 使用할 수 있으나 酸性土壤에서는 石灰를 使用한 경우에 그 效果가 뚜렷하다는 報告<sup>2)</sup>가 있다. 특히 Lowther et al.<sup>12)</sup>은 種子當 接種된 根瘤菌이 많아야 乾燥한 山地土壤 條件에 地表插種된 荳科牧草의 根瘤菌 형성이 원만하게 이루어진다고 하였으며 Goold et al.<sup>6)</sup>은 酸性土壤에서 荳科牧草의 根瘤菌 형성이 이루어지지 않는 原因중에서 가장 큰 것이 接種된 荳科牧草의 種子當 根瘤菌數가 극히 낮을 때라고 하였다. 그런데 Date<sup>4)</sup>는 호주에서 根瘤菌 형성이 확실히 이루어질 수 있는 適正 根瘤菌數는 最少 300個 이상이 標準이라고 하였으며 보통 商品화된 根瘤菌은 最低 3,000個의 박테리아를 공급할 수 있고 農家에서 그 根瘤菌을 使用할 때는 대략 박테리아의 數가 10,000個 程度이라고 하였으며 Taylor and Lloyd<sup>16)</sup>은 뉴우질랜드에서 種子當 根瘤菌數가 250 以下로 떨어져서는 效果가 없으며 商品화된 根瘤菌은 대체로 種子當 30,000個 이상

\* 慶尙大學校 農科大學 農學科.

\* Dept. of Agronomy, Gyeongsang National University, Jinju 620, Korea.

이 되어야 성공적으로 根瘤菌을 형성할 수 있다고 하였다.

本 試驗에서는 몇가지 被複物質을 使用하여 接着劑의 種類와 濃度에 따른 生存根瘤菌數의 變化를 比較할 目的으로 實施하였다.

## 材料 및 方法

### 〈試驗 I〉 根瘤菌 接種의 效果

使用된 根瘤菌 : New Zealand 産 "Rhizocote"(peat slurry). 종자당 근류균수가 30,000개 이상이 되어야 하는 기준에 합격한 것임.

使用量 : Alfalfa (CV. Wairaw) 種子 100 g當 10g, 20g, 30g 의 3水準으로 하였다.

根瘤菌 接種方法 : 種子和 根瘤菌을 평량하여 비이커에 넣고 증류수를 각 3.75ml씩 加하여 10分間 shaking 한 후 신문지 위에서 陰乾하였다.

使用培地の 製造 : yeast extract mannitol agar without CaCO<sub>3</sub>를 使用하였으며 構成은 表 1 과 같다.

Table 1. Compositional elements for cultural media of yeast extract mannitol agar.

Materials	Concentration	
Yeast extract	0.5	g
C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>	20.0	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5	
MgSO <sub>4</sub>	0.2	
NaCl	0.1	
CaSO <sub>4</sub>	0.16	
Agar	10.0	
Sucrose	2.5	
FeCl <sub>3</sub>	0.02	
Distilled Water	1,000	cc

接種된 根瘤菌의 稀釋과 培養 : 表 1 과 같이 構成 製造된 平板培地를 27 ± 1°C의 incubator에서 12時間 방치 시키고 根瘤菌 接種한 후 1시간 陰乾시킨 후 알팔과種子 10粒을 20分間 shaking 하고 1ml을 취하여 滅菌된 생리식염수로 10배 稀釋하여 10<sup>-7</sup>배까지 稀釋된 유탁액을 培地表面에 straight pipette 으로 1ml 씩 떨어뜨려 항온기(27 ± 1°C) 內에 7日間 培養시켰다.

Plate count : 稀釋된 菌液으로부터 培養된 根瘤菌數가 約 30 ~ 300 × 10<sup>7</sup> 個의 集落이 形成된 平板을 擇하여 4個所의 集落數를 산술平均한 數에 稀釋倍數를 곱하여 計算하였다. 그러나 滴間의 集落數의 差

가 2倍 이상일 境遇에는 小數의 集落이 形成된 것을 擇하여 計算하였으며, 한 개의 培養平板에서 30 ~ 300 × 10<sup>7</sup> 個의 集落이 形成된 것이 없을 境遇에는 低濃度에서 培養된 平板에서 集落數를 擇하여 菌數를 計算하였다.

### 〈試驗 II〉 接着劑 種類 및 使用量의 效果

Gum arabic 30, 40, 50% 溶液, methyl cellulose 3, 4, 5% 溶液, 그리고 carboxy methyl cellulose 3, 4, 5% 溶液을 使用하였다. 根瘤菌 接種濃度를 10% 로 고정하고 接着劑 種別 種子 100個當 10ml씩을 加하여 接着시켰다.

接着劑를 使用하여 接種된 根瘤菌의 稀釋, 培養, 菌數計算法은 試驗 I 과 同一하였다.

### 〈試驗 III〉 被複材料의 種類와 그 效果

#### 1) 被複材料의 種類와 特性

① Lime A: Investment (Ransom & Randolph Co. Ohio, U. S. A.), 熟을 加해도 變形없고 무름, 灰色.

② Lime B: Lime A + Lime D, 白色.

③ Lime C: Gypstone, Japan, 黃色, 強度 最高.

④ Lime D: 齒科用 石膏, 보통 많이 使用, 전석교, Japan, 白色.

⑤ Calcium carbonate (300 mesh).

2) 被複方法 : 種子 100個當 根瘤菌 3.75 ml 을 使用하여 接種시킨 후 接着劑 10ml와 적당한 量의 被複物質로 種자에 接着시켜 10分間 shaking 하여 種자에 被複시켰다.

## 結果 및 考察

### 1. 根瘤菌 稀釋濃度와 接種菌의 着生數

表 2에서 보는 바와 같이 根瘤菌 濃度가 10%에서 30%로 增加할수록 生存 根瘤菌數가 增加하는 傾向이었으나 水準別 有意性은 認定되지 않았고 10% 溶液에서도 355.8 × 10<sup>7</sup> 個로써 標準에 가까운 根瘤菌數를 確保할 수 있었다.

Table 2. Number of *Rhizobium* cells at the different inoculum concentration (× 10<sup>7</sup> Bacteria No./ml).

Inoculum Concentration	Mean ± Standard Error
10 %	355.8 ± 85.16
20	526.0 ± 72.88
30	620.3 ± 154.09

이와같이 10% 濃度에서도 充分한 根瘤菌數를 確保할 수 있다는 事實은 國內에서 根瘤菌 生産段階에서 고려될 수 있을 것이다. 그러나 이러한 성적은 어디까지나 根瘤菌을 接種한 직후의 根瘤菌 生存狀態이므로 生産된 후 시간이 경과한 根瘤菌을 使用하거나 혹은 根瘤菌을 接種한 후 즉시 汚濁할 수 없을 경우에는 보다 높은 濃度로 使用해야 할 것으로 思料된다.

### 2. 接着劑 種類 및 使用量 效果

表 3에서 보는 바와 같이 gum arabic에서는 40% 溶液에서  $176.8 \times 10^7$  個로써 最大根瘤菌 着生數를 確保할 수 있었고 methyl cellulose는 5% 溶液에서, 그리고 carboxy methyl cellulose에서는 4% 溶液에서 最大 根瘤菌 着生數를 確保할 수 있었다.

接着劑의 種類와 濃度에 따른 根瘤菌의 生存에 대한 성적은 그 變異가 심하기 때문에 보다 精確한 조건에서 더 검토해야 할 필요가 있을 것으로 보이지만 methyl cellulose와 같은 接着劑를 使用할 境遇에는 5% 溶液이 다른 接着劑보다 월등히 좋은 성적을 나타낼 수 있을 것으로 보인다.

Table 3. Changes of the number of *Rhizobium* cells in the different concentrations of adhesive materials ( $\times 10^7$  Bacteria No./ml).

Adhesive materials	Concentration	Mean $\pm$ Standard Error
Gum Arabic	30 %	70.5 $\pm$ 8.81
	40	176.8 $\pm$ 63.77
	50	62.0 $\pm$ 14.08
Methyl Cellulose	30	57.3 $\pm$ 15.05
	40	224.5 $\pm$ 81.56
	50	311.5 $\pm$ 26.40
Carboxy Methyl Cellulose	30	90.3 $\pm$ 27.06
	40	100.5 $\pm$ 21.64
	50	77.3 $\pm$ 12.20

### 3. 接着劑 및 被複材料의 效果

表 4에서 보는 바와 같이 全接着劑 處理에서 次과용 석회(Lime A)의 被複이 最大 根瘤菌着生數를 나타내었고 그중에서도 methyl cellulose 5% 溶液에서 次과용 석회(Lime A)를 被複한 것이 最大 根瘤菌着生數를 나타내었다.

석회 A는 次과에서 흔히 매물재로서 使用하는데 가 적은 석회 B, C, D에 比하여 약간 높은 편이나 용

Table 4. Number of *Rhizobium* cells as affected by the different pelleting materials with different adhesive materials ( $\times 10^7$  Bacteria No./ml).

Adhesive materials	Pelleting materials*	Mean $\pm$ Standard Error
Gum Arabic 40%	Lime A	228.7 $\pm$ 45.81
	" B	205.0 $\pm$ 44.06
	" C	125.8 $\pm$ 13.11
	" D	40.9 $\pm$ 20.27
	Calcium Carbonate	18.5 $\pm$ 11.65
Methyl Cellulose 5%	Lime A	278.8 $\pm$ 44.53
	" B	166.3 $\pm$ 22.64
	" C	52.8 $\pm$ 14.44
	" D	16.3 $\pm$ 4.17
	Calcium Carbonate	92.5 $\pm$ 38.95
Carboxy Methyl Cellulose 4%	Lime A	205.8 $\pm$ 28.74
	" B	51.0 $\pm$ 10.12
	" C	38.5 $\pm$ 13.62
	" D	48.5 $\pm$ 16.05
	Calcium Carbonate	49.3 $\pm$ 21.06

\* Lime A, dental investment lime, resistant to heat, soft and grey; Lime B, mixture of Lime A and Lime B, white; Lime C, Gypstone, yellow, utmostly hard; Lime D, common dental lime, hard, white; Calcium carbonate, 300 mesh.

이하계 구입할 수 있다.

석회 B가 성적이 A 다음으로 좋은 것은 아마도 석회 A의 영향으로 생각된다.

석회 C와 D는 石灰 제조용으로 사용되는데 強度가 높다.

結論적으로 석회 A, B가 C, D에 比해서 높은 성적을 나타낸 것으로 보아 荳科牧草의 種子被複用 석회는 그 特性으로 보아 경질보다는 연질이 더 나은 것으로 생각된다.

### 摘 要

荳科牧草의 根瘤菌 接種方法 改善策의 一環으로써 3水準의 根瘤菌濃度, 即 10, 20, 30%; 3種類的 接着劑 即 gum arabic, methyl cellulose 및 carboxy methyl cellulose; 그리고 4種類的 石灰와 calcium carbonate를 포함한 5種類的 被複材料를 使用하여 根瘤菌을 接種한 후에 plate count 法으로 生存하고 있던 根瘤細胞數를 測定하여 그 效果를 評價하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. New Zealand 産 peat slurry의 根瘤菌을 使用할

境遇 根瘤菌을 10%에서  $3.5 \times 10^9$  個로써 標準에 가까운 根瘤菌數를 確保할 수 있었다.

2. 接着劑로서 gum arabic은 40% 溶液에서 methyl cellulose는 5% 溶液 그리고 carboxy methyl cellulose는 4% 溶液으로 使用하였을 때 最大着生數를 나타내었으나 그 중에서 methyl cellulose 5% 溶液이 적합한 것으로 보였다.

3. 被複材料로서 치과용석회(Lime A)는 他材料에 比하여 良好한 結果를 얻을 수 있었다.

### 引 用 文 獻

1. Brockwell, J.(1963) Accuracy of a planting technique for counting populations of *Rhizobium trifolii*. Applied Microbiol. 11:377-383.
2. Choe, Z. R., Kim J. K., and Kim, S. H.(1979) Effects of lime and seed treatments on the nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil. J. of Gyeongsang Nati. Univ. 18: 71-76.
3. Choe, Z. R., J. K. Kim and Y. H. Bin(1980) Effects of two different *Rhizobium* strains on Nodulation and growth of Lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil. Korean Soc. Crop. Sci. 25(2): 38-48.
4. Date, R. A.(1970) Microbiological problems in the Inoculation and Nodulation legumes. Plant and Soil. 32 : 713-725.
5. Dawson, Roy. C.(1970) Potential for incereasing production by legume inoculation. Plant and Soil, 32: 655-673.
6. Goold, G.J., et al.(1967) Establishment of oversown white clover on unimproved North Auckland clay hill country. Proc. N.Z. Grassld. 27: 88-95.
7. Hale, C.N., Hastings, H.(1978) Legume seed inoculation, N.Z.J. Agriculture. 136(7): 26-27.
8. Hiltbold, A.E. Thurlow, D.L., and Skipper, H D.(1980) Evaluation of commercial soybean inoculants by various techniques. Agron. J. 72: 675-681.
9. Jordan, D.C. and Garrard, E. H.(1951) Studies on the legume root nodule bacteria. 1. Detection of effective and ineffective strains. Can. J. Bot. 29:360-372.
10. Kim, M. S.(1974) Effects of inoculation on the growth and dry matter yielded in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties. Theses Collection, Kyung Hee Univ. Seoul, Korea, 8: 413-420.
11. Lowther, W.L. et al.(1970) Clover inoculation for tussock grasslands. T.G. M.L.I. Review. 20: 84-89.
12. Roughley, R. J., Vincent, J. M.(1907) Growth and survial of *Rhizobium* spp. in peat culture, J. appl. Bact, 30 (2), 362-376.
13. Roughley, R. J., Date, R. A. and Walker, M. H. Inoculating and lime pelleting legume seed of article on one-step seed inoculation, prepared for extension purpose by department of Agriculture, N.S.W.
14. Roughley, R. J.(1970) The preparation and of legume seed inoculants. Plant and Soil, 32: 675-701.
15. Scott, D. J. and Hale, C. N.(1976) Legume inoculant usage in New Zealand. N. Z. J. Exp. Agri. 5:675-701.
15. Scott, D. J. and Hale, C. N.(1976) Legume inoculant usage in New Zealand. N.Z.J. Exp. Agri. 5: 35-39.
16. Taylor, G.G., and Lloyd. J.M.(1968) Factors affecting survival of rhizobia on inoculated clover seed. Proc.N.Z. Grassld. Ass., 30: 154-163.
17. Vincent, J. M.(1970) A manual for the practical study of the root nodule bacteria: IPB Handbook No. 15.