

Alfalfa 根瘤菌接種劑 生産 및 利用에 關한 研究

II. Alfalfa 根瘤菌劑의 調製方法 및 保管溫度가 菌密度變化에 미치는 影響

崔基準 · 朴根濟 · 許 燁* · 林英哲 · 朴炳勳

Studies on the Production and Utilization of *Rhizobium* Inoculants for Alfalfa (*Medicago sativa* L.)

II. Effects of preparation and preservation methods of carriers on the *Rhizobium* population of the carriers as *Rhizobium* inoculants

Gi Jun Choi, Geun Je Park, Hoon Heu*, Young Chul Lim and Byung Hoon Park

Summary

This experiment was carried out to select a carrier as *rhizobium* inoculant for alfalfa. The *Rhizobium* inoculants were produced in main materials(organic and inorganic materials) and submaterial(CaCO₃ and sucrose), and than the changes of *Rhizobium* population of inoculants were scrutinized from directly after the production to 12 months at 4℃ and 25℃.

Directly after the production of inoculants, their *Rhizobium* numbers were 4-9 × 10⁹/g inoculant in organic materials and 1-8 × 10⁸/g inoculant in inorganic materials.

When they were stored at 25℃, most of inoculants was being started in reduction of *rhizobium* numbers after 2 months and was reduced by tenfold of initial *rhizobium* number after 4-6 months, but inoculant of bentonite + vermiculite + sucrose 1% was not reduced by tenfold after 12 months.

When they were stored at 4℃, most of inoculants was being started in reduction of *rhizobium* numbers after 4 months but was not reduced by tenfold of initial *rhizobium* number after 12 months, and the effect of sucrose addition to bentonite + vermiculite did nearly not appear.

Preservation of *Rhizobium* inoculants was more effective at 4℃ than 25℃. The *Rhizobium* inoculant produced in bentonite + vermiculite(1:3 w/w) + sucrose 1% was not only high *Rhizobium* population(8.3 × 10⁸/g inoculant) but also survival effect of *rhizobium* in being stored at 25℃.

I. 緒 論

알팔파(*Medicago sativa* L.)는 飼料價値가 높고 家畜에게 嗜好性이 좋은 뿐만아니라 深根性 牧草이기 때문에 乾燥에도 잘 適應하는 荳科牧草이다(박 등, 1982; Miller, 1984).

최근 酪農家の 糞소능력이 向上됨에 따라 高品質의 粗飼料를 必要로 하게 되었고 飼料價値가 높은 알

팔파에 대한 關心도 점차 높아지고 있다. 그러나 現在 國內 알팔파 生産은 低調하고 대부분 알팔파 乾草, 큐브 및 펠렛형태로 外國에서 輸入하여 家畜에 給與하는 農家가 대부분인데, 큐브 및 펠렛만 하더라도 年間 10만8천톤으로 每年 增加趨勢이다(貿易統計年譜 '94). 이러한 알팔파 需要의 增加와 粗飼料輸入에 對處하기 위해서는 農家가 알팔파를 直接 生産하여 家畜에 給與하는 方案이 摸索되어야 할 것이다.

畜産技術研究所(Grassland and Forage Crops Division, National Livestock Research Institute, RDA, Suwon 441-350, Korea)

* 忠北大學校 農科大學(Dept. of Agricultural Biology, Chungbuk National University, Chongju 360-763, Korea)

現在 國內에서 알팔파를 栽培하기 위해서는 土壤改良이 必要한데, 즉 石灰를 中和量 施用하고 土壤의 磷酸含量이 200ppm정도 되게 施用하고 硼砂를 ha當 20kg 施用하는 물론 窒素固定力이 優秀한 알팔파 근류균을 接種함으로써 成功的인 栽培가 可能하며(임 등, 1992), 接種方法은 有機物이 豊富한 材料에 근류균을 培養한 培養土를 播種時 種자와 함께 散布하거나 播種後 種자와는 별도로 氣候條件이 좋은 날 散布하는 것이 가장 效果的이라고 하였다(임, 1992). Rogers 등(1982)은 종자코팅이 아닌 粒劑로 된 根瘤菌劑를 種子接種으로 失敗한 圃場에 再接種하는 方法을 究明하였다. 또한 알팔파 품종과 근류균 strain간에 特異性이 있어(Hardarson, 1981, 1982; Burton과 Wilson, 1938) 窒素固定力이 優秀한 근류균의 利用效率을 높이기 위해서는 알팔파 품종과 근류균 strain간에 適合性이 높은 근류균을 接種해 주는 것이 바람직하다.

알팔파 근류균은 그람음성의 桿狀이며 好氣性 細菌으로서 內生孢子(endospore)를 形成하지 않기 때문에 外部 惡條件에 대처능력이 약한 편이다(Vincent, 1970). 그러므로 根瘤菌劑 調製時 毒性이 없고 材料의 均一性이 좋은 재료에 菌을 培養하는 것이 중요하다. 根瘤菌劑의 菌密度 變化는 재료의 性질 및 보관 온도에 따라 크게 左右되는데 Vincent(1970)는 菌劑의 生菌數가 10倍 減少하는데 걸리는 시간이 25℃에 保管時 8周, 5℃에 保管時 18周였다고 하였고, 균을 YMA에 培養後 種子接種을 위하여 懸濁液 調製時 10% 蔗糖(sucrose)溶液을 사용하므로써 근류균의 生存率이 向上되었다고 하였다.

현재까지 根瘤菌 培養用 材料로 주로 사용되어온

泥炭(peat)은 生成地域의 環境與件에 따라 有機物 含量이 20~90%로 多樣할 뿐만 아니라(조 등, 1979) pH가 强酸性이기 때문에 탄산칼슘(CaCO₃)으로 pH를 矯正해야 한다(Roughley 등, 1963). 이러한 短點을 補充하는 材料의 選抜이 필요한데, Chao와 Alexander (1984)은 鑛物質土壤으로 根瘤菌劑의 生産 및 利用可能性이 높다고 하였다. 따라서 쉽게 구입이 가능한 有機質 및 鑛物質材料를 利用하여 알팔파 근류균제를 조제하고 調製直後부터 12個月까지 調製 및 保管方法別 근류균의 密度變化를 調査함으로써 알팔파 근류균제의 生産, 保管 및 利用에 필요한 情報를 얻기 위하여 本 試驗을 遂行하였다.

II. 材料 및 方法

1. 調製方法

本 試驗은 1993年 1月부터 1995年 2月까지 畜産 技術研究所에서 遂行하였다.

알팔파 根瘤菌劑 生産을 위한 擔體調製用 供試材料은 有機質材料로서 泥炭(peat), 堆肥, 발효우분톱밥, 鑛物質材料로서 벤토나이트(bentonite)와 버미큘라이트(vermiculite)를 사용하였고 이들 材料의 物理化學的 特性은 表 1과 같다.

供試根瘤菌은 KAIST에서 分讓받은 *Rhizobium meliloti* 1061을 사용하였다.

擔體調製方法은 各 材料의 性質에 따라서 調製方法을 달리하였다. 有機質材料인 泥炭은 재료의 pH가 4.78로 酸性이 강하기 때문에 탄산칼슘(CaCO₃)을 재료무게의 5%를 添加하였고, 퇴비와 우분발효톱밥은

Table 1. Physical and chemical characteristics of materials as carriers for *Rhizobium* inoculants

Materials	Moisture content (%)	pH (1:5 H ₂ O)	Organic matter content (%)	Passing sieve size (mm)
Peat	9	4.78	49.4	0.08
Compost	1	7.05	23.5	2.00
FSC*	1	7.92	68.2	2.00
Bentonite	7	10.10	0.0	0.08
Vermiculite	7	6.68	0.0	2.00

* Fermented sawdust with cattle dung.

酸度矯正을 하지 않았다. 鑛物質材料인 벤토나이트와 버미큘라이트는 재료의 pH가 각각 10.1과 6.68이었는데, 벤토나이트는 다른 재료와 달리 水分含量을 많이 함유할때 粘性이 있어 벤토나이트와 버미큘라이트를 무게비율로 0:1, 1:23, 1:3, 1:4 混合하여 根瘤菌劑를 조제한 후 4℃에서 6개월까지 根瘤菌의 密度變化를 調査하여 가장 適定하다고 판단된 1:3의 比率로 혼합한 混合材料를 사용하였으며, 버미큘라이트는 酸度矯正 없이 單用으로 하였다.

處理內容은 表 2와 같이 各各의 殺菌된 材料 100g

에 根瘤菌 純粹培養液 25ml를 無菌的으로 接種하여 調製한 것과 各各의 材料에 炭素原으로 蔗糖(sucroes)을 有機質材料에는 무게의 0.5%, 鑛物質材料에는 1%를 添加한 後 根瘤菌培養液를 接種한 것을 28℃ 恒溫器에서 1~2周間 培養하였다.

알팔과 根瘤菌接種劑의 水分調節은 재료의 水分吸收能力에 따라 재료의 滅菌作業 前에 하였고, 재료의 滅菌方法은 두께가 0.03mm인 polypropylen봉지에 材料를 넣고 蒸溜水로 水分을 調節한 후 120℃ 高壓滅菌器에서 90分間 2回 間歇滅菌하였다.

Table 2. Preparation methods of carriers for *Rhizobium* inoculants

No. of treatment	Preparation method	Moisture content of carriers (%)
11	Peat + Liquid culture (Lc)	45
21	Compost + Lc	35
31	FSC* + Lc	50
41	Bentonite + Vermiculite(1:3 w/w) + Lc.	35
51	Vermiculite + Lc	45
12	Peat + CaCO ₃ 5% + Sucrose 0.5% + Lc	45
22	Compost + Sucrose 0.5% + Lc	35
32	FSC + Sucrose 0.5% + Lc	45
42	Bentonite + Vermiculite(1:3 w/w) + Sucrose 1% + Lc.	35
52	Vermiculite + Sucrose 1% + Lc	45

* FSC : Fermented sawdust with cattle dung.

2. 보관방법

조제한 根瘤菌劑의 保管溫度는 25℃와 4℃에 보관하였으며 保管期間은 調製 直後부터 7, 14, 28日, 2, 4, 6, 12個月이 經過時 根瘤菌擔體의 菌密度變化를 經時的으로 調査하였다. 이때 알팔과 根瘤菌의 生菌數는 稀釋平板分離法(dilution plate method)을 利用하여 YMA 培地가 들어있는 petridish에 形成되는 根瘤菌의 菌叢(colony)數를 調査하여 CFU(colony forming unit)로 表記하였다.

III. 結果 및 考察

1. 25℃ 保管時 根瘤菌劑의 菌密度變化

여러가지 有機質材料 및 鑛物質材料로 調製方法을 달리하여 조제한 근류균제를 25℃에 12個月까지 保管한 후 菌密度의 經時的變化는 表 3에서와 같다. 調製直後 菌密度는 有機質材料가 10⁸/g 接種劑를 維持하였고 鑛物質材料는 10⁸/g 接種劑를 維持하였다. 保管後 약 1個月까지는 큰 變化없이 維持되다가 2個月이 지나면서 漸次 菌密度가 減少하여 대부분의 菌劑가 4~6個月이 지나면서 最初菌密度의 10배가 減少하였다. 그러나 조제한 菌劑의 材料와 蔗糖 添加有無에 따라서 若干의 차이가 있었다. 즉 25℃ 보관시 蔗糖의 添加에 따라서 유기질제제는 차이가 적었으나 광물질제제의 경우에는 蔗糖의 添加效果가 있었는데, 벤토나이트와 버미큘라이트 混合材料에 자당

Table 3. Population changes of *Rhizobium* inoculants produced by different preparation methods when were preserved at 25°C for 12 months

No. of treatment	<i>Rhizobium</i> numbers (cfu × 10 ⁸ /g inoculant)							
	weeks				months			
	0	1	2	4	2	4	6	12
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21	40.2	34.0	25.2	27.2	17.3	7.5	6.3	2.4
31	56.6	57.2	56.4	62.9	47.4	18.0	4.4	1.0
41	7.8	7.7	7.5	5.3	1.8	0.7	0.5	0.5
51	1.4	1.5	1.3	0.9	0.8	0.5	0.3	0.2
12	35.4	12.2	14.9	14.8	17.5	5.3	4.0	0.5
22	34.2	31.1	23.2	17.1	21.4	14.1	11.7	6.7
32	85.7	91.8	86.9	80.4	77.5	24.1	8.3	0.8
42	8.3	8.4	8.8	8.5	8.2	5.5	2.8	1.0
52	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LSD (0.05)	28.3	-	-	18.1	20.8	12.7	6.3	-

1%를 첨가한 근류균제는 보관 2, 4, 6, 12개월 경과시 균밀도가 각각 8.2, 5.5, 2.8, 1.0 × 10⁸/g 접종제를 유지하였으나 자당을添加하지 않은 것은 1.8, 0.7, 0.5, 0.5 × 10⁸/g 접종제를 유지하였다.

근류균제의 균밀도는 지속성이 높아서調製後 기간이 오래되어도 균의 활성이 높아야 하며 특히 근류균의 지속성에不利한 25°C에서 지속성이 크면 근류균제 流通過程이나 보관잘못에 의한 근류균의 활성減少를 줄일 수 있다는 점에서 중요하다. 本實驗에서 근류균제 조제후 25°C에서 12個月까지 보관하여도 最初菌密度的 10배까지 감소하지 않은 材劑는 벤토나이트+버미큘라이트(1:3 w/w) 混合材料에 蔗糖 1%를 添加한 것이었다.

2. 4°C 保管時 根瘤菌劑의 菌密度變化

根瘤菌劑調製後 4°C에서 12個月까지 保管한 根瘤菌의 密度變化는 表 4와 같다. 4°C에 保管한 菌劑의 菌密度變化는 25°C에 保管한 것과는 다른 樣相을 나타내었다. 25°C 보관에서는 蔗糖添加效果가 있었으나 4°C 보관에서는 거의 없었다. 根瘤菌密度的 減少時期가 25°C 保管에서는 2個月 後부터 菌밀도가 減少하였으나 4°C 保管에서는 4개월이 지나면서 약간의 감소가 있었고 12個月이 경과하여도 모든 處理

에서 最初菌密度的 10배까지 減少가 없었다. 25°C 保管時 菌密度的 持續性이 높았던 벤토나이트+버미큘라이트(1:3 w/w)+蔗糖 1%는 4°C 保管時에도 12個月後 3.5 × 10⁸/g 接種劑를 維持하였다.

이상의 結果를 볼 때, 알팔과 근류균의 保管溫度는 4°C 冷藏庫에 保管하는 것이 有利하고, 알팔과 근류균제의 조제는 재료의 均一성과 菌密度的 持續性을 고려할 때 벤토나이트+버미큘라이트 混合材料에 蔗糖 1%를 添加하여 조제하는 것이 安定的인 根瘤菌密度가 維持되는 根瘤菌擔體를 生産할 수 있을 것으로 忖料된다.

IV. 摘 要

本試驗은 優秀한 알팔과 근류균제를 生産하기 위한 擔體를 選拔하기 위하여 有機質 材料와 鑛物質材料를 主材料로 하고 탄산칼슘(CaCO₃)과 蔗糖(sucrose)을 副材料로 하여 根瘤菌擔體를 調製하였고 이들 재료로 조제된 근류균제의 調製方法 및 保管溫度에 따른 菌密度變化를 調製直後부터 12個月까지 經時的으로 調査한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 調製直後 根瘤菌劑의 菌密度는 有機質材劑가 4~9 × 10⁸/g 接種劑, 鑛物質材劑가 1~8 × 10⁸/g 接種

Table 4. Population changes of *Rhizobium* inoculants produced by different preparation methods when were preserved at 4°C for 12 months

No. of treatment	<i>Rhizobium</i> numbers (cfu × 10 ⁸ /g inoculant)							
	weeks				months			
	0	1	2	4	2	4	6	12
11	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
21	40.2	34.7	28.9	37.5	38.4	24.5	19.5	11.4
31	56.6	61.2	57.3	56.5	57.7	45.2	26.9	10.3
41	7.8	8.3	8.7	7.5	6.7	5.0	4.8	2.3
51	1.4	1.3	1.2	0.9	0.9	0.6	0.5	0.3
12	35.4	30.9	38.0	30.4	29.4	17.7	13.3	9.0
22	34.2	30.3	32.2	25.9	18.6	14.2	14.5	14.0
32	85.7	96.7	91.8	78.3	75.4	44.8	36.5	15.8
42	8.3	8.6	9.1	8.6	7.6	4.9	5.1	3.5
52	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
LSD (0.05)	28.3	-	-	29.2	31.9	20.3	20.0	-

劑였다.

2. 25°C 保管時 2個月이 經過하면서 균밀도의 減少가 시작되어 대부분의 菌劑가 4-6個月이 經過하면서 最初菌密度的 10배까지 감소가 일어났으나 벤토나이트+버미큘라이트에 蔗糖 1%를 添加한 處理는 12個月에도 最初菌密度的 10배까지 減少하지 않았다.

3. 4°C 保管時에는 4個月이 經過하면서 균제의 균밀도가 減少하였으나 대부분의 菌劑가 12個月後에도 最初菌密度的 10배까지 감소하지 않았고, 蔗糖添加效果는 거의 없었다.

4. 根瘤菌劑의 保管은 4°C 冷藏庫에 保管하는 것이 效果的이었다.

5. 벤토나이트+버미큘라이트(1:3 w/w)에 蔗糖 1%를 添加하여 조제한 根瘤菌劑는 調製直後 菌密度가 8.3 × 10⁸/g 接種劑로 높을 뿐만아니라 保存에 不利한 溫度인 25°C에서도 菌密度 維持에 效果的이었다.

V. 引用文獻

- Burton, J.C. and P.W. Wilson. 1938. Host plant specificity among the *Medicago* in association with root-nodule bacteria. *J. Agric. Res.* 56:293-303.
- Chao, W. L. and M. Alexander. 1984. Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(1):94-97.
- Hardarson, G., G.H. Heichel, C.P. Vance and D.K. Barnes. 1981. Evaluation of alfalfa and *Rhizobium meliloti* for compatibility in nodulation and nodule effectiveness. *Crop Sci.* 21:562-566.
- Hardarson, G., G.H. Heichel, D.K. Barnes, and C.P. Vance. 1982. Rhizobial strain preference of alfalfa populations selected for characteristics associated with N₂ fixation. *Crop Sci.* 22:55-58.
- Miller, D.A. 1984. Forage crops. McGraw-Hill Book Co. 267-290.
- Rogers, D.D., R.D. Warren, Jr., and D.S. Chamblee. 1982. Remedial post emergence legume inoculation with *Rhizobium*, *Agron. J.* 74:613-619.
- Roughley, K.J. and J.M. Vincent. 1963. Growth and survival of *Rhizobium* spp. in peat culture. *J. Appl. Bact.* 30:362-376.
- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria, IBP Handbook No. 15 44-48. 115-116.

9. 貿易統計年報. 1994. 關稅廳. 韓國關稅研究所.
10. 朴贊浩, 李鐘烈, 金東岩. 1982. 飼料綠肥作物學. 鄉文社. 100-113.
11. 이화선, 한홍전, 양종성, 이종열, 김동암. 1973. 석회 및 붕소시용이 Alfalfa의 착협 및 종자생산에 미치는 영향. 농사시험연구보고 제15집(축산편): 89-93.
12. 林英哲, 朴鐘先, 尹世炯, 崔基準, 黃石重. 1992. 山地草地 Alfalfa 栽培에 관한 研究. I. 山地草地에서 根瘤菌 接種方法이 알팔파의 初期生育에 미치는 影響. 農試論文(축산편) 34(2):51-56.
13. 趙成鏞, 朴天緒, 嚴大翼. 1979. 土壤學. 鄉文社. 55-57.