
碩士學位論文

濟州道內 水稻와 陸稻 根圈中
窒素固定菌의 分布

濟州大學校 大學院
農化學科



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY
黃多侗娥

1987年 月 日

濟州道內 水稻와 陸稻根圈中
窒素固定菌의 分布

指導教授 柳 長 杰

黃 多 俐 娥

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1987年 12月

黃多俐娥의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審查委員長

金 滄 玉

委

員

康 順 善

委

員

柳 長 杰

濟州大學校 大學院

1987年 12月

THE POPULATION DENSITY OF ROOT-ASSOCIATIVE
NITROGEN-FIXING BACTERIA OF THE UPLAND AND
PADDY RICE FIELDS ON CHEJU-DO

Daria, Hwang
(Supervised by Professor Zang-Kual, U)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1987

목 차

Summary	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	5
III. 결과 및 고찰	11
1. 토양의 화학적 특성	11
2. 수도와 육도 근권 중의 미생물의 밀도	11
가. 수도와 육도 근권중의 미생물 밀도(MPN) 비교	11
나. 뿌리와 토양에서의 미생물 밀도(MPN) 비교	14
다. 지역간의 미생물 밀도(MPN) 비교	15
라. 배지간의 미생물 밀도(MPN) 비교	15
IV. 적 요	20
참고문헌	21

Summary

The distribution and population density of soil microorganisms, especially N_2 -fixing bacteria associated with rice roots, was investigated, the rice plants with soils being taken from the uplands (six sites) and the paddy fields (five sites) on Cheju-do during September in 1987.

To evaluate the population density of root associative microorganisms existing in the rice roots and soils, the Most Probable Number (MPN) was determined in three-parallel experiment on the four different media: potato agar for the general heterotrophics, Döbereiner for N_2 -fixing bacteria requiring malate as carbon source, Döb. +multivitamin for vitamin dependent bacteria, and Azotobacter media (modified Hino-Wilson media) for Azotobacter and Bacillus.

1. The population density of microorganisms existing in the paddy rice roots was similar to that of the upland rice roots. The upland soils showed higher MPN on potato agar and Döbereiner media than the paddy soils. On Azotobacter media, however, the paddy soils gave higher MPN than the upland soils.
2. Regardless of the sampling sites, and the used media, much more microorganisms (general heterotrophic and N_2 -fixing) were observed in the roots than in the soils.
3. In the paddy rice fields, all the sampling sites gave very similar MPN in both the roots and the soils. In the uplands, however, microorganism densities were varied with the sampling sites: Taeheung, Songdang, and Siheung showed higher MPN in the roots and in the soils, than the other sampling sites.
4. There were highly significant differences in MPN depending on the media. Potato agar media showed the highest MPN, which decreased in the order of Döb. +multivitamin media, Döbereiner media, and Azotobacter media.

-
5. Statistically significant correlation was found between the population density of microorganisms in the soils (upland and paddy field) and the soil chemical properties such as organic matter, total N, total P, available P, and pH.



I. 서 론

우리나라의 총 경작지는 21,682.68km²이며 그 중에서 제주도가 차지하는 면적은 427.17km²이다. 그리고 질소질 비료의 연간 소비량이 전국적으로는 414,187%인데, 제주도는 15,021%이다(농수산부, 1986). 이 같은 자료에서 우리나라의 경작지 ha당 질소질 비료의 소비량을 계산해 보면 188kg/ha이 되고, 제주도의 경우는 352kg/ha로서 우리나라 평균 소비량보다 거의 두배나 높다. 한편, 세계적으로 비료를 가장 많이 사용하는 나라로 알려진 농업 선진국 네덜란드의 연간 질소비료 사용량은 561kg/ha이고, 벨지움이 221kg/ha, 서독이 207kg/ha이며, 일본이 126kg/ha이다(Tisdale, 1985). 따라서 우리나라의, 특히 제주도의 질소질 비료 소비량은 매우 높은편에 속한다는 사실을 알 수 있다.

질소질 비료의 다량 소비는 환경적으로 암모니아 합성을 위한 막대한 에너지 자원의 소비는 물론 환경오염문제까지도 초래하게 하는 것이다. 서독, 벨지움, 네덜란드 등 농업선진제국에서는 다량의 질소비료사용에 따른 지하수의 오염문제가 심각하게 대두되고 있는 실정이며 따라서 질소비료사용에 의한 환경오염에 관해서 깊은 관심을 갖고 다방면으로 연구 검토되고 있다. 제주도에서는 질소질 비료에 의한 환경오염이 아직 대두되지 않았으나 질소질 비료의 소비량이 점점 증가 추세에 있으므로 앞으로 이와같은 문제가 생길 가능성이 있다고 본다.

생물학적 질소고정은 공생적인 것과 비공생적인 것으로 나눌 수 있는데, 공생적 질소고정이 대부분 두과작물에 한정되어 있는 반면 비공생적 질소고정은 주로 작물과 기타 여러 식물에서 일어나고 있다. 그렇기 때문에 비공생적 질소고정을 잘 이용하면 영류의 작량작물 생산에 좀 더 경제적인 방법이 제시될 수 있을 것이라 생각된다. 공생적 질소고정원에 대한 연구는 많이 진행되어 온 반면에 비두과 식물-근권생의 질소고정에 대해서는 비교적 최근에 들어와서 연구자들의 관심을 끌게 되었다. 한편, Döbereiner등(1976)에 의해 열대 및 아열대 지역의 콩과 식물에서 *Azospirillum*속의 질소고정균이 발견되었는데, 질소고정균이 식물뿌리 표면에 부착되어 있으면서 뿌리에서 분비되는 유기물을 탄소원으로써 공급받는 반면, 공기중의 질소를 환원시켜 암모니아형태 질소를 만들면 고형작물을 직접 이용하게 된다. Niemann등(1981), Reinhold등(1986, 1987)과 Hurek등(1986)이 Kallar grass를

원에서 *Azospirillum*속을 분리하여 그 생리적 특성을 연구하였고, Cohen등(1980)과 Jain등(1984)은 옥수수, 밀에서도 균권층의 질소고정균을 분리하였다. Hahtela등(1981)은 아일랜드나 열대 작물뿐 만 아니라 추운지방의 spodosols 토양에서도 질소고정균을 분리했으며 Matsuguchi(1976)는 태국의 곳에서 분리한 질소고정미생물과 토양의 화학적 성질과의 관계를 연구하였다. Vlassak등(1978)과 Rannie등(1983)에 의해 이들 세균의 질소고정능이 식물종류에 따라 다르다는 것이 밝혀졌고, 또한 Reynder등(1982)과 Baldani등(1983)에 의해서도 균주의 특성에 따라 질소고정능이 다르다는 것이 밝혀졌다.

본 연구에서는 아일랜드형 기후에 속하는 제주도의 습도와 육묘재배포장에 대한 질소고정균의 밀도분포를 Most Probable Number(MPN)방법(M. Alexander, J.C. de Man, 1975)으로 조사하기 위해 습도는 5개 포장, 육도는 6개 포장에서 균권 토양과 식물재를 함께 채취하여 뿌리와 토양 현탁액을 만들어 potato agar 배지, Döbereiner배지, Döb.+multivitamin배지, 그리고 Azotobacter 배지에 접종했고, 여기에서 증식된 미생물의 밀도와 토양의 화학적 성질과의 상관관계를 검토하였다.



II. 재료 및 방법

1. 공시재료

1987년 9월 5일부터 29일까지 제주도내 11개 지역에서 공시재료를 채취하였다. 수도는 외도, 중달, 강상, 고산, 한림의 5개 지역에서, 육도는 장전, 상가, 지홍, 아라, 태흥, 송당의 6개 지역(Table 1, Fig. 1)으로부터 비와 관원토양(반경 7~10cm, 깊이 15~20cm)을 함께 비닐주머니에 채취하여 실험실로 운반하였다.

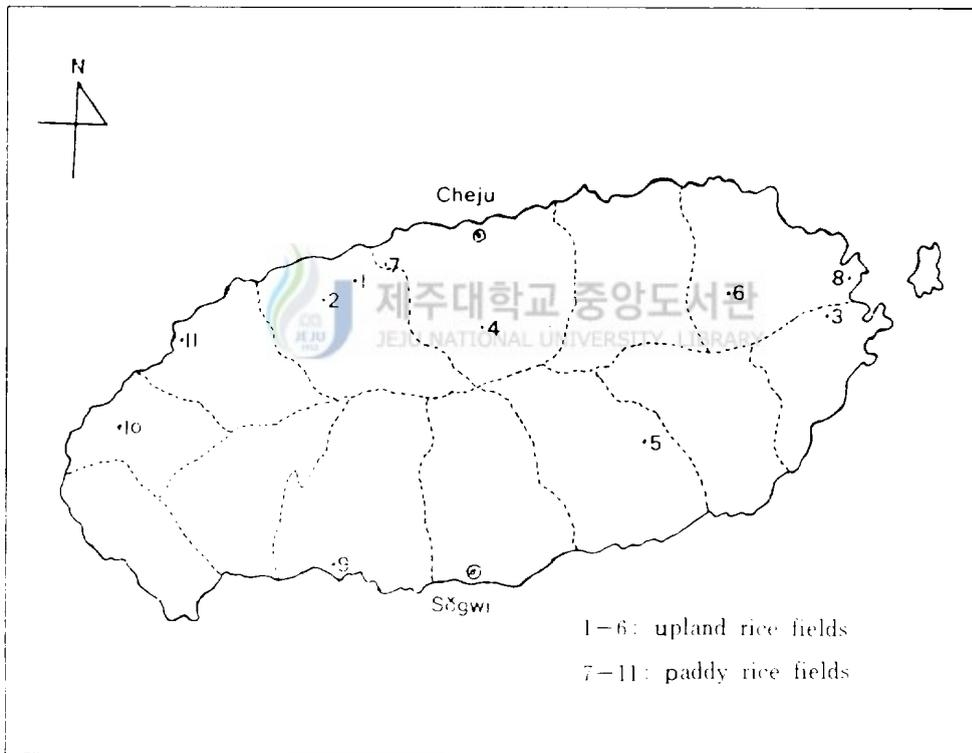


Fig. 1. Location of sampling sites in Cheju-do.

Table 1. Description of soil sampling sites

Sample No	Location	No of sampling sites	Soil series	Soil color	Vegetation
1	Jangjeon(nv*)	4	Donggwi	Dark brown	upland rice
2	Sangga(v*)	4	Ora	Very dark greyish brown	upland rice
3	Siheung(v)	4	Cheju	Very dark greyish brown	upland rice
4	Ara(v)	4	Cheju	Very dark greyish brown	upland rice
5	Taehung(v)	4	Namwon	Black	upland rice
6	Songdang(v)	4	Pyeongdae	Black	upland rice
7	Oedo(nv)	4	Donghong	Dark brown	paddy rice
8	Jongdal(nv)	4	Nakcheon	Greyish brown	paddy rice
9	Gangjeong(nv)	4	Ueolpyeong	Grey	paddy rice
10	Gosan(nv)	4	Gujwa	Very dark greyish brown	paddy rice
11	Hallim(nv)	4	Gueom	Dark yellow brown	paddy rice

* nv: non-volcanic ash soil v: volcanic ash soil

2. 시료의 처리



채취해 온 토양은 즉시 골고루 섞어서 일부를 취하여 mineral solution 50ml, detergent 20 μ l 와 모래 1g이 들어있는 삼각 플라스크에 넣어 무게를 잰 후 1시간 동안 진탕하였다(70~80rpm). 베타리는 흐르는 수돗물로 달라붙어 있는 토양과 불순물들을 제거한 후 100~500mg 정도를 평량하여 멸균된 mortar에 넣고 모래 2g 와 함께 마쇄시킨 후 40ml mess. flask에 옮겨 mineral solution으로 채웠다.

3. MPN방법을 위한 배지 조제

patato agar 배지: Table 2에 감자 200g을 씻어서 0.5cm×0.5cm×0.5cm 크기로 잘은 후 증류수 500ml를 넣어 30분간 삶고 Büchner funnel(Toyo No.2)로 여과한다. malate 2.5g과 KOH 2.0g을 증류수 250ml에 녹인 다음 KOH용액을 사용하여

Table 2. Composition of the potato agar media for non-selective growth

(g)	
Nutrient	Per liter
Potato	200
Malate	2.5
KOH	2.0
Dextrose	2.5
Biotin	0.1 mg
Niacinamide	0.04 mg
Agar	1.5

pH 6.8로 맞추고, dextrose 2.5g, biotin 0.1mg, niacinamide 0.1 μ g을 증류수 150ml로 녹인 후 potato, malate, KOH, 그리고 dextrose 등을 함께 섞어 전체부피가 1 l 되게 한 뒤에 agar를 넣어 auto-clave에서 멸균(120°C, 15psi, 15min.) 했다.

Döbereiner 배지(Table 3)는 malate와 KOH를 함께 녹인 stock solution 20ml, Mg, Na, Ca, Mo, Mn, Fe의 혼합용액 10ml, 그리고 biotin과 K_2HPO_4 혼합액 1 ml를 삼각 플라스크에 넣고, 증류수로 1 l를 채운 뒤, pH를 6.8로 맞추는

Table 3. Composition of the nitrogen-free malate media(Döbereiner media)

(g)	
Nutrient	Per liter
Malate	5.0
KOH	4.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
$CaCl_2$	0.02
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.002
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.09
Fe-EDTA (1.64% w/v, aqueous)	4.0 ml
Biotin	0.1 mg
K_2HPO_4	0.5 mg
Agar	1.5

다음 agar를 넣어 멸균했다.

multivitamin을 함유하는 Döbereiner배지(Döb.+multivitamin 배지)는 Table 4의 조성 성분대로 평량하여 200ml의 증류수에 녹인 후 ultra membrane filter(0.45 μ m)로 여과한 뒤에 전술한 방법으로 조제된 Döbereiner 배지(당, 증류수는 800ml만 넣었다.)에 넣어 11로 만들다.

Table 4. Composition of the multivitamin soln. for vitamin enriched Döbereiner media (Döb.+multivitamin media) (mg)

Vitamin	Per liter
Panthothenate	40
Myo-inositol	200
Niacinamide	40
p-aminobenzoic acid	20
Pyridoxin hydrochloride	40
Riboflavin	20
Thiamine dichloride	4

Azotobacter 배지는 Table 5에 있는 순서대로 sucrose로부터 CaCO₃까지 삼각 플라스크에 넣어 500ml 증류수에 녹이고, p-aminobenzoic acid에서 agar까지는 플라스크에 취하고 증류수 500ml에 녹인 후 각각 멸균하여 혼합하였다.

mineral solution은 Döbereiner 배지에서 malate, KOH와 agar를 제외한 용액이다.

4. 토양의 화학성 분석(Yoshida등, 1972; 농업기술연구소, 1974; Bremmer등, 1965)

채취해 온 토양을 균일하게 섞어서 일부를 취하여 100~110 C에서 건조시킨 뒤 수분함량을 측정했다.

pH 1:5는 2mm체를 통과한 풍진토양 5g에 물 25ml를 가하여 pH meter Metrohm 632에서 측정하였고, 전질소는 macro kjeldahl법으로 정량하였다. 전인산은 0.5%

Table 5. Composition of Azotobacter media for diazotrophic Bacillus and Azotobacter

Nutrient	(g)	
	Per liter	
Sucrose	10	
Glucose	10	
Mg SO ₄ · 7H ₂ O	0.5	
NaCl	0.01	
Fe SO ₄ · 7H ₂ O	0.015	
NaO ₄ · 2H ₂ O	1.0	
CaCO ₃	1.0	
p-aminobenzoic acid	0.01	
Biotin	0.005	
KH ₂ PO ₄	0.13	
K ₂ HPO ₄	0.17	
Agar	0.5	

소산과 진한질산을 사용하여 토양을 분해시킨 후 vanado-molybdate법으로 비색정량(Spectronic 20)하였으며, 유효인산은 Bray No. 1:1:7으로 침출시킨 후 SnCl₂와 ammonium vanadate 용액으로 발색시켜서 비색정량(Perkin-Elmer) 하였다. 유기물은 Walkley-Black법으로 정량하였고, 치환성 염기는 1N-NH₄OAc(pH 7.0)로 토양을 침출한 후에 원자흡광도계(Perkin-Elmer)로 측정하였다.

5. MPN법에 의한 근권중 미생물의 밀도측정(M. Alexander; J. Brockwell, 1980)

MPN측정은 3관분방법으로 수행하였으며 희석배수는 potato agar배지의 경우 토양과 뿌리 모두 10⁻¹, Döbereiner 배지는 토양과 뿌리 모두 10⁻⁷, Döb.+multi vitamin 배지는 뿌리의 경우 10⁻¹, 그리고 토양은 10⁻⁷, Azotobacter 배지는 뿌리와 토양 모두 10⁻⁷까지였다. 이상의 4가지 배지를 사용하여 일개 지역의 뿌리와 토양에 대한 MPN값을 측정하는데 필요한 시험관 총 수는,

$$\text{potato agar 배지: } 2(\text{뿌리와 토양}) \times 9(10^{-1} \sim 10^{-9}) \times 3(\text{관부}) = 54$$

$$\text{Döbereiner 배지: } 2(\text{뿌리와 토양}) \times 7(10^{-1} \sim 10^{-7}) \times 3(\text{관부}) = 42$$

Döb.+multivitamin 배지: [1:뿌리]×9($10^{-1} \sim 10^{-9}$)×3(반복)+[1:토양]×7($10^{-1} \sim 10^{-7}$)×3(반복)=48

Azotobacter 배지: 2:뿌리와 토양]×7($10^{-1} \sim 10^{-7}$)×3(반복)=42로

모두 186이 되는데 한 지역에서 4포기의 버와 토양을 채취했기 때문에 결국 744개의 시험관이 사용되었다.

희석 과정은 뿌리와 토양의 현탁액을 0.5ml씩 취하여 각 배지의 시험관(10^{-1} 에 접종하여 vortex mixer로 충분히 섞어준 후 여기에서 0.5ml를 취하여 다음 희석배수 시험관(10^{-2})으로 옮기고 이와 같은 조작을 반복하여 최종 희석배수인 10^{-7} 또는 10^{-8} 까지 실시하였다.

이렇게 처리된 시험관을 32~33°C에서 배양하면서 매일 관찰하여, 더 높은 희석배수로 colony형성이 진행되지 않는 것을 확인한 뒤에 J. C. de Man(1975)의 MPN포에 의해 미생물수를 계산하고 이를 버뿌리와 토양의 건물 9당으로 환산하여 미생물 밀도를 표시했다. 측정된 미생물 밀도가 지역별, 배지별, 뿌리와 토양, 그리고 수도와 육도간에 차이가 있는지를 알기 위해서 Duncan의 다중검정을 실시하여 유의성 검토를 하였다.

여기에서 사용된 배지는 뿌리와 토양 중에 존재하는 총균수를 알기 위해 potato agar배지를, Azospirillum속과 같이 질소원이 없는 배지에서 자라는 미생물 수를 측정하기 위해서 Döbereiner 배지를, 또 특히 vitamin요구성이 큰 질소고성균을 위해서 Döb.+multivitamin 배지를, 그리고 Azotobacter와 Bacillus속 처럼 glucose와 sucrose를 탄소원으로 이용하는 질소고성균을 위해서 Azotobacter배지를 선택했다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 토양의 화학적 특성

제주도내 수도 및 육도 근권중에 존재하는 미생물의 밀도를 조사하기 위해 채취한 11개 지역(농:5개소, 밭:6개소) 토양의 화학적 성질은 Table 6에서 보는 바와 같다.

밭 토양의 경우, pH는 5.4~6.5로 약산성이었으며, 유기물 함량은 비화산 화토인 장진 지역이 2.75%였고, 화산화토인 나머지 지역은 13~24% 정도로 높은 함량을 보였으며, 전질소, 전인산, 그리고 수분함량은 화산화토 지역이 높은 경향을 띠어 1.1~1.7%N, 1.1~1.8%P 그리고 수분함량은 38~44%이었다. 김(1974), 유등(1984)이 보고한 대로 화산화토는 인산을 흡착 고정하는 능력이 크므로 유효인산 함량은 비화산화토가 16.6ppm, 화산화토가 7~10ppm으로 나타났다. 반면에 치환성 염기(K, Ca, Mg, Na)의 함량은 지역마다 각각 달랐다.

농 토양의 경우, pH는 6.0~7.1로 중성에 가까웠고, 유기물, 전질소, 전인산, 그리고 유효인산의 함량은 거의 비슷한 수준(평균함량: 유기물~4.1%, 전질소~0.57%, 전인산~0.64%, 유효인산~7.2ppm)이었으나 강성 지역만 다른 곳보다 이들의 함량이 높았다(유기물~6%, 전질소~0.7%, 전인산~1.5%, 유효인산~25ppm). 치환성 염기는 중달 지역이 다른 곳에 비해 높게 나타났는데 이 지역은 바다를 막아 만들었으며, 색토를 많이 썼기 때문에 각종 염기가 많은 것으로 생각된다.

2. 수도 및 육도 근권중의 미생물 밀도(MPN)

수도 및 육도 근권중에 존재하는 미생물의 지역별, 매지별 분포는 Table 7에서 보는 바와 같고, 이 표에서 수도와 육도, 뿌리와 토양, 지역별, 그리고 매지별 MPN을 자연 대수로 고치 후 통계 처리하여 비교해 본 결과는 다음과 같다.

가. 수도와 육도의 근권 미생물 밀도(MPN) 비교

수도와 육도에 서의 미생물 분포는 Table 8과 같이 육도지역의 MPN은 뿌리와 토양을 비교하고, 사용한 모든 매지 potato agar 매지, Döbereiner 매지, Döb. + multi-

Table 6. Chemical properties of sampling site soils in Cheju-do

Sampling sites	pH H ₂ O (1:5)	Organic matter(%)	Total N (%)	Total P* (%)	Exchangeable bases(me/100g)				Water content (%)	
					Avail.P (ppm)	Ca	Mg	K		Na
Jangjeon	6.1	2.75	0.36	0.68	16.6	2.15	2.04	0.56	0.15	24.9
Sangga	5.9	9.43	1.05	1.06	7.09	0.64	0.30	0.19	0.48	37.7
Siheung	6.2	12.9	1.38	1.44	9.11	5.95	1.52	0.43	1.11	39.6
Ara	5.4	12.3	1.36	1.15	9.96	0.24	0.14	0.16	0.46	36.9
Tacheung	6.5	23.9	1.68	1.24	3.71	5.49	1.76	0.28	0.57	41.4
Songdang	6.5	13.2	1.61	1.84	8.56	0.38	0.29	0.14	0.31	41.0
Oedo	6.2	4.53	0.47	0.67	5.54	16.0	3.27	0.54	1.43	46.0
Jongdal	7.1	3.24	0.55	0.74	8.23	27.2	6.10	3.36	1.01	45.2
Gangjeong	6.0	5.97	0.61	1.46	24.9	13.0	3.17	0.36	0.53	37.8
Gosan	6.1	3.69	0.51	0.44	4.09	3.75	3.00	0.16	0.13	45.9
Haklim	6.6	5.03	0.75	0.71	10.8	12.7	5.10	0.50	0.33	48.9

* Bray No.1

** 1N NH₄OAc (pH 7) extraction

Table 7. MPN of microorganisms existed in the roots and soils, determined on the various media, sampled from the upland and paddy rice fields on Cheju-do

Sampling sites	(microorganism no. per dry wt. g of root and soil)											
	Potato agar media		Döbereiner media		Döb + multi-vitamin media		Azotobacter media					
	root	soil	root	soil	root	soil	root	soil	root	soil	root	soil
Upland	Jangjeon	4.5×10^8	5.4×10^7	2.3×10^6	3.0×10^4	7.3×10^6	4.7×10^5	8.9×10^6	1.2×10^4			
	Sangga	6.6×10^8	6.7×10^9	6.4×10^4	2.7×10^4	1.3×10^6	1.6×10^6	4.2×10^3	3.2×10^4			
	Siheung	2.0×10^9	6.2×10^9	9.6×10^6	5.6×10^6	2.1×10^9	2.8×10^8	5.0×10^4	7.4×10^3			
	Ara	3.3×10^9	6.7×10^9	8.3×10^9	9.9×10^3	5.0×10^7	1.3×10^7	1.8×10^3	6.3×10^3			
	Taecheung	8.6×10^{10}	1.8×10^{10}	1.5×10^5	1.8×10^4	8.6×10^{10}	1.8×10^8	2.4×10^7	3.2×10^3			
Songdang	3.5×10^{10}	2.0×10^{11}	1.8×10^6	1.5×10^4	7.0×10^{10}	2.8×10^8	2.6×10^5	1.5×10^4				
Paddy	Oedo	1.5×10^9	2.2×10^7	5.7×10^6	3.7×10^4	1.7×10^8	1.0×10^4	1.8×10^6	1.3×10^4			
	Jongdal	1.9×10^9	3.2×10^6	4.7×10^6	7.5×10^4	3.7×10^7	3.1×10^6	6.1×10^6	7.1×10^4			
	Gangjeong	1.9×10^{10}	1.1×10^8	3.0×10^6	4.3×10^4	1.4×10^8	2.0×10^6	7.0×10^5	1.1×10^4			
	Gosan	2.9×10^{10}	4.2×10^8	8.9×10^5	3.4×10^4	1.2×10^{11}	2.0×10^8	3.8×10^5	4.5×10^4			
	Hallim	3.4×10^9	1.1×10^8	5.8×10^5	5.3×10^4	7.5×10^{10}	1.9×10^8	1.8×10^5	1.2×10^4			

Table 8. Comparison of average MPN of the upland and paddy rice fields in various media

(microorganism no. per dry wt. g of root and soil)

		Upland	Paddy
Potato agar media	root	2.1×10^{10}	1.1×10^{10}
	soil**	9.6×10^9	1.3×10^8
Döbereiner media	root	2.3×10^6	3.0×10^6
	soil*	9.5×10^5	4.8×10^4
Döb + multi-vitamin media	root	2.6×10^{10}	3.9×10^{10}
	soil	1.1×10^8	7.9×10^7
Azotobacter media	root	1.5×10^6	1.8×10^6
	soil*	1.3×10^4	3.0×10^4

* Significance at 5%

** Significance at 1%

vitamin 배지, Azotobacter 배지에서 수도보다 높은 값(5%, 1% 유의성)을 보였다. Matsuguchi(1979)는 태국의 논 토양을 대상으로 수행한 연구에서 질소고정균 밀도가 토양의 유기물 함량, 전질소, 전인산, 유효인산, pH와 높은 정의 상관성을 갖는다고 보고하였다. 본 실험에서도 육도지역 토양의 유기물, 전질소, 그리고 전인산 함량이 수도지역보다 높았고(Table 6) 따라서 뿌리 및 근권토양중의 미생물 밀도가 높게 나타났는데 이는 식물 근권토양의 유기물, 전질소, 전인산, 유효인산 함량이 미생물의 밀도와 밀접한 관련성을 가진 것으로 보인다.(Table 12, Table 13)

나. 뿌리와 토양중의 미생물 밀도(MPN) 비교

뿌리중 미생물 밀도는 토양중 보다 높게 나왔으며(Table 9) 그 수치를 보면, potato agar 배지에서 뿌리가 2×10^{10} , 토양이 $10^8 \sim 10^9$ 이었고, Döbereiner 배지에서는 뿌리중에 10^6 정도, 토양에서는 $10^4 \sim 10^5$ 이었으며, Döb.+multivitamin 배지에서는 뿌리가 10^{10} , 토양이 $10^6 \sim 10^8$ 정도였고, Azotobacter 배지에서 뿌리는 10^6 , 토양은 10^4 의 분포를 보였다(1% 유의성). 이 값은 뿌리 혹은 토양의 건물 g당으로 표시된 것으로 뿌리가 토양보다 건물 g당 유기물 함량이 높기 때문에 나타난 결과라고 보

Table 9. Comparison of average MPN of roots and soils in various media
(microorganism no. per dry wt. g of root and soil)

	Potato agar media		Döbereiner media		Döb + multi-vitamin media		Azotobacter media	
	root	soil	root	soil	root	soil	root	soil
Upland	2.1×10^{10} a	9.6×10^9 a	2.3×10^6 a	9.5×10^5 a	2.6×10^{10} b**	1.1×10^8 a	1.5×10^6 b**	1.3×10^4 a
Paddy	1.1×10^{10} b**	1.3×10^8 a	3.0×10^6 b**	4.8×10^4 a	3.9×10^{10} b**	7.9×10^6 a	1.8×10^6 b**	3.0×10^4 a

** Significance at 1%

며, Boyle등(1978), Patriquin등(1978)과 McClung등(1983)이 *Spartina alterniflora*에서 실험한 결과와 Reinhold등(1986)이 Kallar grass에서 실험한 결과에서도 본 실험과 같은 경향을 나타냈다.

다. 지역별 미생물 밀도(MPN) 비교

각 지역별로 미생물의 분포를 비교해 보면 Table 10과 같다.

수도에서의 지역별 분포는 거의 비슷하여 potato agar 배지에서 $10^6 \sim 10^{10}$, Döbereiner 배지에서 $10^4 \sim 6$, Döb.+multivitamin 배지에서 $10^6 \sim 10^{10}$, 그리고 Azotobacter 배지에서 $10^4 \sim 6$ 정도의 밀도를 나타냈다.

한편, 육도에서는 지역별 차이를 보였는데(5%, 1% 유의성), 다른 지역에 비해 송당, 태흥, 시흥에서의 미생물 밀도가 높았고, 배지별로는 potato agar 배지에서 $10^9 \sim 10^{10}$, Döbereiner 배지에서 $10^4 \sim 6$, Döb.+multivitamin 배지에서 $10^8 \sim 10^{10}$, 그리고 Azotobacter 배지에서 $10^3 \sim 5$ 정도를 나타냈다. 이 세 지역의 토양 화학성을 다른 곳과 비교해 보면, pH, 유기물, 전질소, 전인산, 그리고 수분함량이 높는데, 이들 지역의 토양 화학성이 미생물의 밀도를 높이는 인자로 작용했다고 보며, 이는 수도와는 달리 육도를 연작하지 않는 재배방식에서 오는 결과라고 생각된다.

라. 배지별 미생물의 밀도(MPN) 비교

각 배지별로 미생물의 밀도를 비교해 보았을 때 Table 11에서 보는 바와 같이 육도와 수도, 뿌리와 토양을 막론하고 potato agar 배지에서 가장 높은 밀도(뿌리: $5 \times 10^9 \sim 9 \times 10^{11}$, 토양: $3 \times 10^9 \sim 2 \times 10^{10}$)를 나타냈고, 그 다음은 Döb.+multivitamin 배지

Table 10. MPN of microorganisms varied with the different sampling sites in upland and paddy rice fields respectively

Sampling sites	(microorganism no. per dry wt. g of root and soil)									
	Potato agar media		Döbereiner media		Döb + multi vitamin media		Azotobacter media			
	root	soil	root	soil	root	soil	root	soil	root	soil
Upland	Jangjeon	4.5×10^3 *	5.4×10^7 **	2.3×10^6 **	3.0×10^4 *	7.3×10^6 **	4.7×10^5 **	8.9×10^5 **	1.2×10^4 a	
	Sangga	6.6×10^3 a	6.7×10^9 b	6.4×10^4 a	2.7×10^4 a	1.3×10^6 a	1.6×10^6 a	4.2×10^2 ab	3.2×10^4 a	
	Siheung	2.0×10^9 ab	6.2×10^9 b	9.6×10^6 b	5.6×10^6 b	2.1×10^9 b	2.8×10^8 b	5.0×10^4 ab	7.4×10^3 a	
	Ara	3.3×10^9 ab	6.7×10^9 b	8.3×10^4 a	9.9×10^3 a	5.0×10^7 b	1.3×10^7 a	1.8×10^3 a	6.3×10^2 a	
	Tacheung	8.6×10^{10} b	1.8×10^{10} b	1.5×10^5 a	1.8×10^4 a	8.6×10^8 c	1.8×10^8 b	2.4×10^3 a	3.2×10^3 a	
Songdang	3.5×10^{10} b	2.0×10^{10} b	1.8×10^6 ab	1.5×10^4 a	7.0×10^{10} c	2.0×10^8 b	2.6×10^5 b	1.5×10^4 a		
Paddy	Oedo	1.5×10^9 a	2.2×10^7 a	5.7×10^6 a	3.7×10^4 a	1.7×10^8 a	1.0×10^4 a	1.8×10^6 a	1.3×10^4 a	
	Jongdal	1.9×10^9 a	3.2×10^6 a	4.7×10^6 a	7.5×10^4 a	3.7×10^7 a	3.1×10^6 a	6.1×10^6 a	7.1×10^4 a	
	Gangjeong	1.9×10^{10} a	1.1×10^8 a	3.0×10^6 a	4.3×10^4 a	1.4×10^8 a	2.0×10^6 a	7.0×10^5 a	1.1×10^4 a	
	Gosan	2.9×10^{10} a	4.2×10^8 a	8.9×10^5 a	3.4×10^4 a	1.2×10^{11} b	2.0×10^8 a	3.8×10^5 a	4.5×10^4 a	
	Hallim	3.4×10^9 a	1.1×10^8 a	5.8×10^5 a	5.3×10^4 a	7.5×10^{10} b	1.9×10^8 a	1.8×10^5 a	1.2×10^4 a	

* Significance at 5 %

** Significance at 1 %

Table 11. MPN of microorganisms affected by various media in root and soil samples respectively

Sampling sites	root				soil			
	Potato agar media	Döbereiner media	Döb. + multi-vitamin media	Azoto-bacter media	Potato agar media	Döbereiner media	Döb. + multi-vitamin media	Azoto-bacter media
Upland								
Jangjeon	4.5×10^8 a	2.3×10^6 a	7.3×10^6 a	8.9×10^6 a	5.4×10^7 d**	3.0×10^4 b	4.7×10^5 c	1.2×10^4 a
Sanggu	6.6×10^8 b**	6.4×10^4 a	1.3×10^6 b	4.2×10^3 a	6.7×10^9 c**	2.7×10^4 a	1.6×10^7 b	3.2×10^4 a
Siheung	2.0×10^9 c**	9.6×10^6 b	2.1×10^9 c	5.0×10^4 a	6.2×10^9 d**	5.6×10^6 b	2.8×10^8 c	7.4×10^3 a
Ara	3.3×10^9 d**	8.3×10^4 b	5.0×10^7 c	1.8×10^3 a	6.7×10^9 c**	9.9×10^3 a	1.3×10^7 b	6.3×10^3 a
Taeheung	8.6×10^{10} c**	1.5×10^5 b	8.6×10^{10} c	2.4×10^3 a	1.8×10^{10} c**	1.8×10^4 a	1.8×10^8 b	3.2×10^3 a
Songdang	3.5×10^{10} c**	1.8×10^6 a	7.0×10^{10} b	2.6×10^5 a	2.0×10^{10} c**	1.5×10^4 a	2.0×10^8 b	1.5×10^4 a
Paddy								
Oedo	1.5×10^9 b**	5.7×10^6 a	1.7×10^8 a	1.8×10^6 a	2.2×10^7 b	3.7×10^4 a	1.0×10^4 a	1.3×10^4 a
Jongdal	1.9×10^9 b**	4.7×10^6 a	3.7×10^7 a	6.1×10^6 a	3.2×10^6 b**	7.5×10^4 a	3.1×10^6 b	7.1×10^4 a
Gangjeong	1.9×10^{10} c**	3.0×10^6 ab	1.4×10^8 b	7.0×10^5 a	1.1×10^8 c**	4.3×10^4 a	2.0×10^6 b	1.1×10^4 a
Gosan	2.9×10^{10} b**	8.9×10^5 a	1.2×10^{11} c	3.8×10^6 a	4.2×10^8 b*	3.4×10^4 a	2.0×10^8 b	4.5×10^4 a
Hallim	3.4×10^9 b**	5.8×10^5 a	7.5×10^{10} c	1.8×10^5 a	1.1×10^8 b*	5.3×10^4 a	1.9×10^8 b	1.2×10^4 a

* Significance at 5%

** Significance at 1%

(뿌리: $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$, 토양: $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$), 그리고 Döbereiner 배지(뿌리: $2 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$, 토양: $1 \times 10^4 \sim 6 \times 10^6$), Azotobacter 배지(뿌리: $2 \times 10^3 \sim 9 \times 10^5$, 토양: $3 \times 10^3 \sim 7 \times 10^4$)의 순서였다(1% 유의성). McClung 등(1983)이 식물뿌리중의 미생물 밀도를 측정 한 결과에 의하면 *Spartina alterniflora*에서는 Döbereiner 배지에서 미생물 밀도가 Azotobacter 배지에서 보다 10배 높게 나왔고, *Sorghum bicolor*와 옥수수에서는 10^4 배까지 높게 나타났는데, 본 실험에서도 버뿌리중의 미생물 밀도가 Döbereiner 배지에서 $10 \sim 10^2$ 배 높았다. 또한 Döbereiner 배지에 multivitamin을 첨가한 배지에서 Döbereiner에서 보다 $10 \sim 10^4$ 배나 높은 밀도를 보였다. 그리고 Reinhold 등(1986)은 Kalla grass 뿌리중에 vitamin 요구성이 큰 미생물이 2×10^7 존재하고, 토양중에는 1×10^4 존재한다고 보고했는데, 본 실험에서는 뿌리중에 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{11}$, 토양중에 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^8$ 으로 Kallar grass 근권 중에서 보다 10^4 배 높은 밀도를 나타냈다. 이로써 제주도내 수도와 육도 근권중에 존재하는 질소고정 미생물은 특히 vitamin 요구성이 크다는 것을 알 수 있었다.

앞으로 본 실험에서 분리한 질소고정균의 생리적 특성과 식물과의 상호관계를 규명하는 연구를 계속 수행해야 할 것으로 생각한다.



Table 12. Correlation between the chemical properties of the sampled soils and MPN of microorganisms existed in the soils on the different media (Correlation coefficients)

	Potato agar media	Döbereiner media	Döb. + multi-vitamin media	Azotobacter media
pH	-0.40	0.18	0.17	0.33
Water content	-0.10	0.05	0.29	0.18
Organic matter	0.80**	-0.03	0.48	-0.69*
Total	0.89**	0.03	0.59	-0.56
Total P	0.65*	0.12	0.34	-0.44
Available P	-0.28	0.03	-0.43	-0.12
Exchangeable bases				
Ca	0.80*	0.20	-0.33	0.39
Mg	-0.84**	0.16	-0.13	0.43
K	-0.66*	0.15	-0.20	0.56
Na	-0.04	0.70*	0.10	-4.7×10^{-3}

* Significance at 5%

** Significance at 1%

Table 13. Correlation between the chemical properties of the sampled soils and MPN of microorganisms existed in the roots on the different media (Correlation coefficients)

	Potato agar media	Döbereiner media	Döb. + multi-vitamin media	Azotobacter media
pH	0.08	0.43	0.34	0.45
Water content	0.43	0.02	0.61*	-0.10
Organic matter	0.53	-0.44	0.35	-0.77**
Total N	0.48	-0.41	0.35	-0.77**
Total P	0.39	-4.5×10^{-3}	0.13	-0.37
Available P	-0.13	0.27	-0.35	-0.35
Exchangeable bases				
Ca	-0.13	0.53	-0.09	0.55
Mg	-0.08	0.46	0.12	0.63*
K	-0.26	0.38	-0.27	0.49
Na	-0.14	0.34	-0.17	-0.09

* Significance at 5%

** Significance at 1%

IV. 적 요

제주도내 버의 근권에 존재하는 토양 미생물 특히 질소고정균의 분포와 밀도를 조사하기 위해 1987년 9월중에 도내 11개 지역(논 5개소, 밭 6개소)에서 육도 및 수도뿌리와 근권토양을 한 포장에서 4반복으로 채취하였다.

버의 뿌리와 근권토양중에 존재하는 미생물의 밀도를 측정하기 위해 Most Probable Number(MPN) 방법을 실시했고, 배지는 뿌리와 토양중에 존재하는 일반 미생물의 밀도를 알기위해 질소원을 가한 potato agar배지를 사용했으며, malate를 탄소원으로 요구하는 질소고정균을 위해 Döbereiner 배지를, 특히 vitamin 요구성이 큰 질소고정균을 위해서 Döb.+multivitamin 배지를, 그리고 glucose와 sucrose를 탄소원으로 요구하는 질소고정균을 위해 Azotobacter 배지(Hino-Wilson 배지)를 수성탄배지를 사용했다.

1. 수도뿌리중의 미생물 밀도는 육도와 비슷한 수준이었다. 그리고 근권토양의 미생물 밀도는 육도지역이 수도지역보다 potato agar 배지와 Döbereiner 배지에서 더 높았지만 Azotobacter 배지에서는 반대로 논토양이 밭토양보다 미생물 밀도가 더 높았다.
2. 뿌리중의 미생물 밀도는 모든 조사매장 지역에서 토양보다 더 높게 나타났다.
3. 지역간의 MPN값을 보면 수도에서는 시료 채취지역간에 비슷하였는데, 육도에서는 태흥, 송당, 지흥이 다른 곳에 비해 미생물 밀도가 더 높았다.
4. 사용한 배지에 따른 MPN값은 뿌리와 토양에 관계없이 potato agar 배지에서 제일 높았고, Döb.+multivitamin 배지, Döbereiner 배지, 그리고 Azotobacter 배지의 순서로 낮았다.
5. 이와같은 미생물의 밀도 분포는 토양의 화학성 즉, 유기물함량, 전인산, 전질소와 밀접한 정의 상관(5%, 1% 유의성)을 보였고, 치환성 Ca, Mg, K의 양과는 부의 상관(5%, 1% 유의성)을 보였다.

참 고 문 헌

- Alexander, M., Most Probable Number Method for Microbial Populations. pp. 1467-1472. Methods of Soil Analysis Part 2.
- Baldani, V. L. D., J. I. Baldani, and J. Döbereiner, 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.*, 29: 924-929.
- Boyle, C. D., and D. G. Patriquin, 1980. Endorhizal and exorhizal acetylene-reducing activity in a grass (*Spartina alterniflora* Loisel.) diazotroph association. *Plant Physiol.*, 66: 276-280.
- Bremner, J. M., Chemical and Microbiological Properties. 1975. Methods of Soil Analysis. American Society of Agronomy.
- Brockwell, J., 1980. Experiments with Crop and Pasture Legumes-Principles and Nitrogen Fixation. 123-131.
- Cohen, E., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur, and Y. Henis, 1980. Increase in Dry Weight and Total Nitrogen Content in *Zea mays* and *Setaria italica* Associated with Nitrogen-fixing *Azospirillum* spp. *Plant Physiol.*, 66: 746-749.
- De Man, J. C., 1975. The Probability of Most Probable Numbers. *European J. Appl. Microbiol.*, 1: 67-78.
- Döbereiner, J., 1980. Forage Grasses and Grain Crops. pp. 535-555. Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. Wiley and Sons Ltd.
- Döbereiner, J., and J. M. Day, 1976. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. pp. 518-537. In W. E. Newton and C. J. Nyman (ed). Proceedings of the 1st international symposium on N_2 -fixation. Washington State Univ. Press. Pullman.
- Haahtela, K., T. Wartiovaara, V. Sundman, and J. Skujins, 1981. Root-Associated N_2 -Fixation (Acetylene Reduction) by Enterobacteriaceae and *Azospirillum* Strains in Cold-Climatic Spodosols. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 41(1): 203-206.

- 한국 비료공업협회, 1985. 비료연감.
- Hurek, T., B. Reinhold, I. Fendrik, and E. G. Niemann. 1986. Root-Zone-Specific Oxygen Tolerance of Azospirillum spp. and Diazotrophic Rods Closely Associated with Kallar grass. Appl. and Environ. Microbiol., 53 (1): 163-169.
- Jain, D. K., and D. G. Patriquin. 1984. Root Hair Deformation, Bacterial Attachment, and Plant Growth in Wheat-Azospirillum Associations. Appl. and Environ. Microbiol., 48(6): 1208-1213.
- 김형욱, 1974. 제주도 화산회 토양의 인산동태에 관한 연구. 제대농집, 6: 207-215.
- Matsuguchi, T. 1979. Factors affecting heterotrophic nitrogen fixation in submerged rice soils. pp.207-221. Nitrogen and Rice. International Rice research Institute.
- McClung, C. R., P. van Berkum, R. E. Davis, and C. Sloger. 1983. Enumeration and Location of N_2 -fixing Bacteria Associated with Roots of *Spartina alterniflora* Loisel. Appl. and Environ. Microbiol., 45(6): 1914-1920.
- Niemann, E. G., M. Kloss, K. H. Iwannek, and I. Fendrik. 1984. Investigations on the physiological properties of Azospirillum spp. (SST 22) isolated from rhizosphere of Kallar grass (*Leptochloa Fusca* L. Kunth) Proc. Int. Symp. Nitrogen and the Environ.
- 농업기술연구소. 1974. 토양화학 분석법.
- 농수산부. 1986. 농림수산통계연보.
- Rannie, R. J., J. R. Defreitas, A. P. Rushel, and P. V. Vose. 1983. ^{15}N isotope dilution to quantify dinitrogen (N_2) fixation associated with Canadian and Brazilian wheat. Can. J. Bot. 61: 1667-1671.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, S. Thielemans, and J. de Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a Nitrogen-fixing organism Associated with Roots of Kallar Grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). International J. of Systematic Bacteriol., 37(1): 43-51.
- Reinhold, B., T. Hurek, E. G. Niemann, and I. Fendrik. 1986. Close Association

- of Azospirillum and diazotrophic Rods with Different Root Zones of Kallar grass. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 52(3) : 520–526.
- Reynders, L., and K. Vlassak, 1982. Use of Azospirillum brasilense as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil*, 66 : 217–223.
- Tisdale, S. L., W. L. Nelson, and J. D. Beaton, 1985. *Soil Fertility and Fertilizers*. 4th ed. p.2. Macmillan publishing Co. New York.
- Turner, G. L., and A. H. Gibson, Measurement of Nitrogen Fixation by Indirect Means. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation* pp.111–131. John Wiley & Sons.
- 유순호, 송관철, 1984. 입지토양의 특성. 아열대 농업연구소지. 1: 73–102.
- Vlassak, K., and J. Reynders, 1978. Associative dinitrogen fixation in temperate regions. pp.71–89. In isotopes in biological dinitrogen fixation. Proceedings of an Advisory Group Meeting. International Atomic Energy Agency, Vienna.
- Yoshida, S., D. A. Forno, and J. H. Cook, 1972. *Laboratory manual for physiological studies of rice*. 2nd ed. The International Rice Research Institute, Philippines.



謝 辭

본 논문이 이루어지기까지 지도와 격려를 해주신 유장길 교수님께 깊이 감사할 드리며, 또한 항상 많은 가르침을 주신 김형욱 교수님, 강순선 교수님, 고정삼 교수님과 류기승 교수님께도 감사할 드립니다.

실험 여건의 마련과 조련을 해 주신 송성준 선배님과 방사능 이용 연구소 여러분께 특별히 감사할 드리며, 실험 수행을 도와준 허성규 대학원생과 농화학과 오성국, 부영미, 한승갑 학우에게도 감사할 마음 금할 길 없습니다.

저에게 물질적인 도움과 기도로 늘 기억해 주신 이경수 회장님과 강 베로니카님께도 깊은 감사할 드립니다.

항상 기도와 사랑으로 저를 보살펴 주신 어머니께 이 논문을 드립니다.

