

## 優良窒素固定菌의 探索分離 및 生理的 特性

朴愚喆 · 李光熙 · 金進鎬 · 李麟九 · 曹晉基

慶北大學校 農科大學 農化學科

### Isolation and Physiological Characteristics of *Rhizobia* with Good Nitrogen Fixation Ability

Park Woo-Churl, Lee Kwang-Hee, Kim Jin-Ho, Rhee In-Koo, Jo Jin-Ki

Dept. of Agricultural Chemistry, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

#### Summary

This experiment was conducted to search for *Rhizobia* with good nitrogen fixation abilities and to investigate their physiological characteristics isolated from 12 soybean cultivars and the affinities of root nodule bacteria with soybeans. The results obtained were as follows; Based on colors, *Rhizobia* grown on YMA medium were divided into 3 groups, i. e., white, translucent and transparent, amounting to 60, 30 and 10 %, respectively.

In litmus milk reaction, the strains which produced alkali, acid serum, alkaline serum and acid reached to 51, 29, 9 and 11 %, respectively.

Strains, S022, and S096 were slow-growers and produced alkali, while strains, S080, S-090, and S118 were fastgrowers and produced acid.

The growth of root nodule bacteria on YMA medium was favorable between the initial pHs of 6.0~7.0.

Glutamine, asparagine and allantoin as nitrogen sources enhanced the growth of root nodule bacteria.

All the strains tested formed nodules on the soybean roots, and the strains with good symbiotic nitrogen fixation abilities that had white color, small colony, nitrate reduction abilities and no nitrite reduction abilities showed comparatively high nitrogen fixing activities.

Some strains varied in nitrogen fixing activities according to soybean cultivars, and a few strains formed ineffective nodules which showed no nitrogen fixing activity.

※ 本 研究는 文教部 學術研究助成費에 依하여 이루어 졌음.

## 緒 論

空氣中 窒素를 固定하는 微生物은 Free living bacteria와 Symbiotic bacteria 및 Blue green algae로 大別할 수 있을 것이다. 그중 콩과식물은 根瘤菌과 共生으로 空氣中の 窒素를 固定 同化한다는 것은 周知의 事實이다. 콩과식물과 根瘤菌과의 共生에 依한 窒素固定量은 主要作物인 大豆의 경우 約 60~120kg·N/ha/year이고, 主要 콩과 牧草인 alfalfa나 clover의 경우 20~850kg N/ha/year로 報告되어 있다.<sup>1)</sup>

根瘤菌이란 콩과植物的 뿌리에 根瘤를 形成하여 空氣中の 窒素를 固定하는 好氣性 細菌<sup>2)</sup>으로서, 콩과植物的 根瘤菌은 1887年 Beijerincks가 처음 分離한 以後 많은 研究者들에 依해서 研究되어 왔다.

窒素固定菌中 共生系를 이루는 根瘤菌科에 屬하는 好氣性, 非胞子性, 鞭毛性, 그람陰性的 桿菌으로 宿主特異성에 따라 6種으로 分類하고 있으나, Yeast extract manitol培地(以下 YEM培地라 略함)에서의 生育速度와 pH變化에 依하여 Fast-growing rhizobia와 Slow-growing rhizobia로 兩分하기도 하며<sup>3)</sup>, 近來에 와서는 Slow-growing rhizobia인 *R. japonicum*을 Slow-growing 型과 Fast growing 型으로 區分해서 說明하기도 한다.<sup>4)</sup>

Graham과 Parker等(1964)<sup>5)</sup>은 根瘤菌의 生理實驗 結果, *Rhizobium japonicum*의 境遇 Litmus milk反應은 alkali性이고 serum zone을 形成하지 않았고, 2% NaCl에서 耐性이 없었다고 報告하였으며, Elkan(1971)<sup>6)</sup>에 依하면 *Rhizobium japonicum*은 YEM培地에서의 生育速度가 느리고, rhamnose와 xylose培地에서 酸을 生成하지 않았다고 하였다.

한편 最近에 와서는 *R. japonicum*을 生理學的, 培養學的 特性에 따라 여러 型으로 分類하였으며, 宿主植物인 大豆에 對한 菌의 共生的 特性에 따라 菌株를 specific strain과 effective strain으로 다시 나누고 있다.<sup>7)</sup>

鎌田(1962)<sup>8)</sup>는 根瘤菌의 窒素固定能力은 大豆의 品種에 따라 다르다고 報告하였으며, 林(1970)<sup>9)</sup>은 여러 品種의 大豆로부터 分離한 根

瘤菌의 生理的 特性 및 根瘤形成性을 調査한 結果, 菌株에 따라서 炭水化合物의 利用性, 有機酸 生産性, hydrogenase 活性 및 indole acetic acid 生成力에 많은 程度의 差異가 있었으며, 根瘤形成能力에도 差異가 있어서 接種한 25個 菌株中 5個 菌株는 根瘤를 形成하지 못했다고 報告하였다.

崔와 金等(1979)<sup>10)</sup>은 Alfa lfa 根瘤菌의 生理實驗 結果, 各 菌株는 Yeast mannitol broth 및 agar上에서의 生育狀態 및 增殖速度가 달랐으며 congo red에 依한 着色程度에도 差異가 있었다고 報告하였다.

Ham과 Johnson等(1971)<sup>11)</sup>은 根瘤菌을 接種하여 콩을 栽培했던 土壤에 다시 根瘤菌의 接種試驗을 實施한 結果, 子實重 및 蛋白質 含量增加에 有意性을 나타내지 않았으며, 柳等(1983)<sup>12)</sup>은 土壤肥沃度가 極히 낮은 新開墾地에 있어서 根瘤菌接種과 土壤改良劑施用으로 窒素固定量이 顯著히 增加하였으며, 콩 收量도 4~10% 增大되었다고 報告하였다.

한편, 大豆의 安全多收穫을 爲해서는 根瘤菌의 接種이 必須的이라고 報告되고 있으며<sup>13)</sup>, 우리나라에서도 根瘤菌의 接種效果에 對해서 여러 研究者들에 依해서 研究되어 왔다.<sup>14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22)</sup>

根瘤菌을 接種하였을때 接種效果는 菌株自體의 窒素固定力과 宿主植物과 共生할 수 있는 親和力<sup>23, 24, 25, 26, 27)</sup>, 土壤條件<sup>28, 29)</sup>, 施肥<sup>30, 31)</sup> 및 栽培環境<sup>32, 33)</sup>에 따라서 달리 나타난다고 한다.

이러한 觀點에서 窒素固定力이 높고 宿主植物과의 接種親和性이 優秀한 優良窒素固定菌을 確保하기 爲하여 여러 品種의 大豆로부터 分離한 窒素固定菌의 生理的 特性을 調査한 바 몇가지 結果를 얻었기에 이에 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 窒素固定菌의 系統分類

分離源: 施肥 및 接種條件을 달리해서 栽培한 光敎를 비롯한 12品種으로부터 開花期 前後의 大豆에 着生한 根瘤를 分離源으로 하였다.

培地: Yeast-extract mannitol agar培地(YMA培地)를 使用하였다.<sup>34)</sup>

分離方法: Vincent<sup>13)</sup>의 방법에 準하여 分離하였다. 卽, 大豆의 뿌리로부터 根瘤를 떼어낸 다음, 95% ethanol에 잠시 담갔다가 0.1% 酸性昇永水(HgCl<sub>2</sub> 1g, conc. HCl 5ml, H<sub>2</sub>O 1l)에 3~8 分間 浸漬하여 殺菌한 後 殺菌水로 6 回以上 反復 洗滌하여 表面에 殘留하는 HgCl<sub>2</sub>를 除去하고 난 다음 無菌의으로 破碎한 汁液을 YMA plate上에 白金耳를 塗抹하여 28±1℃로 調節된 恒溫器에서 1 週間 培養하여 純粹 分離하였다.

#### 標準菌株

日本 名古屋大學 植物營養學教室에서 分離받은 *Rhizobium japonicum* 007, 011 및 *Rhizobium meliloti* 105, *Rhizobium trifolii* 201과 日本 北海道十勝農試에서 分讓받은 *Rhizobium japonicum* 019를 本 實驗의 標準菌株로 使用하였다.

#### 窒素固定菌의 生理實驗

Litmus milk 試驗은 Graham의 方法<sup>14)</sup>, 窒酸 및 亞窒酸 還元試驗은 Griess-Ilosvay 方法<sup>15)</sup>, Oxidase 試驗은 Kovac의 方法<sup>16)</sup>으로 調査하였으며, 그 外의 一般의 性質은 常法에 準하였다.

#### 根瘤形成 試驗

精選한 大豆(*Glycine max. cultivar Kwangk-yo*) 種子를 水洗하고 95% ethanol에 잠시 담갔다가 꺼낸 다음 0.2% 酸性昇永水에 3~8 分間 浸漬하여 殺菌한 後 殺菌水로 充分히 洗滌하여 殘留하는 HgCl<sub>2</sub>를 除去하고난 다음 미리 殺菌시킨 土壤을 채워 놓은 直徑 12cm, 높이 15cm pot

에 6 粒을 播種하였다.

供試土壤의 土性은 loamy sand 였고, pH는 6.5 였으며, 全窒素는 0.18%로 낮은편이었다.

播種 後 1 週에 되는 날 液体培養시킨 *Rhizobium japonicum*을 plant 當 1×10<sup>6</sup> cells 程度로 接種했다. 播種 4 週 後에 根瘤의 形成狀態를 調査하였다.

#### 窒素固定菌 과 宿主와의 親和性 檢定試驗

試驗方法은 根瘤形試驗과 同一하며 處理內容은 表 1과 같다.

#### 窒素固定力 測定

窒素固定力 測定은 Gas Chromatograph (Hitachi model 663~50 Flame Ionization Detector)를 使用한 acetylene 還元法<sup>17)</sup>에 依하여 測定하였다.

Gas Chromatograph 作動條件은 0.3×2m stainless steel column을 使用하였고, 溫度는 55℃, injection 및 FID 溫度는 65℃로 하였으며 carrier gas (N<sub>2</sub>) 流速은 50ml/min로 하여 測定하였다.

#### 結果 및 考察

##### 窒素固定菌의 探索分離 및 探索

既知의 宿主植物에 形成된 根瘤, 特히 leghemoglobin의 含量이 많은 開花期 前後의 根瘤로부터 窒素固定菌을 分離하였다.

光教 等 12 個 品種의 大豆로부터 分離한 144 個

Table 1. Treatments included in the experiment

Rhizobial strains	soybean cultivars	Treatments
<i>Rhizobium japonicum</i> S022	Kwangkyo	Soil sterilization, Inoculation.
S045 S080 S090	D - 4	
S096 S107 S118	Kwangkyo × D - 4	Soil Non - sterilization Inoculation.
007 011 019	Namcheon	
	Hwangkeum	

Table 3. Growth of nitrogen fixing bacteria in Yeast extract mannitol broth O.D. (660nm)

Rhizobia	Culture time (hr)	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108
<i>R. japonicum</i>	S 022	0.06	0.07	0.08	0.10	0.25	0.52	0.74	0.80	0.83	0.83
	S 045	0.06	0.08	0.15	0.32	0.49	0.70	0.86	0.92	0.92	0.92
	S 080	0.06	0.07	0.17	0.40	0.62	0.81	0.85	0.85	0.85	0.85
	S 090	0.06	0.07	0.18	0.35	0.58	0.79	0.84	0.86	0.87	0.87
	S 096	0.06	0.06	0.07	0.09	0.23	0.49	0.64	0.79	0.84	0.84
	S 107	0.06	0.08	0.19	0.37	0.63	0.78	0.82	0.82	0.82	0.82
	S 118	0.06	0.07	0.20	0.38	0.62	0.74	0.78	0.78	0.78	0.78
	007	0.06	0.08	0.15	0.34	0.59	0.78	0.94	0.94	0.94	0.94
	011	0.06	0.06	0.07	0.08	0.21	0.48	0.88	0.88	0.95	0.95
	019	0.06	0.06	0.07	0.11	0.27	0.54	0.89	0.89	0.98	0.98
<i>R. meliloti</i>	105	0.06	0.07	0.17	0.40	0.68	0.87	0.96	0.96	0.96	0.96
<i>R. trifolii</i>	201	0.06	0.08	0.19	0.44	0.72	0.90	0.92	0.92	0.92	0.92

Table 4. pH changes in Yeast extract mannitol broth of nitrogen fixing bacteria

Rhizobial strains	Final pH	O. D. (660nm)	
<i>R. japonicum</i>	S 022	6.9	0.83
	S 045	6.1	0.92
	S 080	6.4	0.85
	S 090	6.2	0.87
	S 096	7.0	0.84
	S 107	6.1	0.82
	S 118	6.4	0.78
	007	6.1	0.94
	011	7.2	0.95
	019	6.9	0.98
<i>R. meliloti</i>	105	6.5	0.96
<i>R. trifolii</i>	201	6.0	0.92
control	6.8	0.06	

\* Initial pH : 6.8

對한 結果도 이러한 觀點에서 解釋되어야 할 것이다.

窒酸 및 亞窒酸還元反應은 *Rhizobium japonicum* S group의 境遇 陽性·陰性이 63%, 陽性·陽性이 33%, 陰性·陰性이 4%로 나타났으며, K group의 境遇 陽性·陰性은 52%, 陽性·陽性이 33%, 陰性·陰性이 15%로 나타났다.

Oxidase 生成反應은 *Rhizobium japonicum* S group과 K group 供히 60%以上이 陽性을, Catalase 生成反應과 Methylene Blue 還元反應은 99% 以上이 陽性으로 나타났다.

#### 나. 生育速度 및 pH 變化

*Rhizobium* 을 YM 培地에서의 生育速度와 pH 變化에 依해 Fast-growing *rhizobia*와 Slow-growing *rhizobia*로 分類가 되는데 Fast-grow-

ing *rhizobia* (*R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*)는 YM 培地에서의 生育速度가 빠르고 酸을 生成하며, Slow-growing *rhizobia* (*R. lupini*, *R. japonicum*)는 生育速度가 느리고 alkali를 生成한다. 그러나, 近來에 와서는 Slow-growing *rhizobia*인 *Rhizobium japonicum*을 Slow-growing 型과 Fast-growing 型으로 區分하고 slow-growing *rhizobia*는 *Bradyrhizobia* 구분하고 있다.<sup>3,4)</sup>

本 實驗에서 分離한 菌株 및 日本에서 導入한 菌株에서 代表的인 몇 個 菌株을 選擇해서 YM 培地에서의 生育速度와 pH 變化를 調査한 結果는 表 3, 4에 나타냈다.

調査한 菌株中 S 022, S 096, 011, 019는 生育速度가 느리고 alkali를 生成하는 典型的인 Slow-growing *Rhizobium japonicum*으로 나타났으며, S 045, S 080, S 090, S 107, S 118, S 007은 生育速度가 빠르고 酸을 生成하는 Fast-growing *Rhizobium japonicum*으로 나타났는데, 이러한 結果는 Keyser 等(1981)<sup>2)</sup>의 結果와 一致하였다.

#### 다. 初期 pH의 影響

YM 培地의 初期 pH를 3.0에서 10.0까지 調節한 後 培養한 結果는 그림 1에 나타난 바와 같이 pH 6.0~7.0 範圍에서 높은 生育度를 나타냈으며, *Rhizobium meliloti* 105의 境遇 *Rhizobium japonicum* S 022, S 080, S 019보다는 pH가 낮은 範圍에서는 生育이 不良하고, pH가 높은 範圍에서는 生育이 良好한 것으로 나타났고, S 080의 境遇에는 다른 菌株보다도 보다 넓은 範圍의 pH

菌株의名稱은 *Rhizobium japonicum* S001~ S144 (S group)로命名하였으며, 이菌株를 다시光敎에接種했을때形成된根瘤로부터分離한菌株의名稱은 *Rhizobium japonicum* K001~K114 (K group)로命名하였다.

### 窒素固定菌의生理的 特性

#### 가. 窒素固定菌의 探索分離

窒素固定力을 높이기 爲하여는 根瘤菌 自体의 높은 窒素固定力과 宿主植物로부터 充分한 糖供給을 받을 수 있는 親和性 與件이 必須的인 것이다. 이에, 強力한 窒素固定能을 가지는 窒素固定菌을 確保할 目的으로 各種 大豆의 根瘤로부터 純粹 分離한 根瘤菌의 生理特性을 實驗한 結果를 要約하면 表2 와 같다.

YMA培地에서 孳란 根瘤菌은 色相은 *Rhizobium japonicum* S group과 K group 供히 白色相이 60% 以上으로 가장 많았으며, 30% 程度가 半透明色相, 10% 程度가 透明色相으로 나타났다. Colony 크기는 *Rhizobium japonicum* S group 은 74%, K group 은 82%가 直徑이 2mm以下인 小

型이었다.

Litms milk反應은 *Rhizobium japonicum* S group의 境遇 alkali가 51%, acid serum이 29%로 大部分을 차지하였으며, alkali serum과 acid 도 各各 9%, 11%로 나타났다.

*Rhizobium japonicum* K group도 이와 비슷한 傾向이었다. 이러한 結果는 *Rhizobium japonicum*의 境遇 Litmus milk反應이 alkali로 나타난다는 報告<sup>4,11)</sup>들과는 一致하지 않았다.

그러나, *Rhizobium japonicum*은 一般的으로 Slow-growing rhizobia로 알려져 있지만, Keyser等(1981)<sup>12)</sup>이 中國에서 採取한 大豆의 根瘤로부터 典型的인 Slow-growing *Rhizobium japonicum*과는 다른 Fast-growing *Rhizobium japonicum*을 分離한 以後, *Rhizobium japonicum*을 典型的인 Slow-growing *Rhizobium japonicum*과 生理的인 性質이 Slow-growing rhizobia (*R. lupini*, *R. japonicum*)보다도 Fast-growing rhizobia (*R. meliloti*, *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*)와 비슷한 傾向을 나타내는 Fast-growing *Rhizobium japonicum*으로 區別하고<sup>13)</sup>있으며, 本 實驗에서 나타난 Litmus milk 反應에

Table 2. Physiological Characteristics of nitrogen fixing bacteria

		<i>R. japonicum</i> S group *	<i>R. japonicum</i> K group **
Color	White	61	60
	Translucent	29	32
	Transparent	10	8
Colony Size	Small ***	74	32
	Large	26	18
Litmus Milk	Alkaline no serum	51	47
	Alkaline serum	9	6
	Acid no serum	11	10
	Acid serum	29	37
Nitrate and Nitrite Reduced	Positive, Negative	63	52
	Positive, Positive	33	33
	Negative, Negative	4	15
Oxidase Produced	Positive	63	69
	Negative	37	31
Catalase Produced	Positive	99	99
	Negative	1	1
Methylene Blue Reduced	Positive	97	96
	Negative	3	4

\* Strains isolated from nodules of 12 soybean cultivars including Kwangkyo

\*\* Strains isolated from nodules of Kwangkyo after inoculation of *R. japonicum* S group

\*\*\* Small colony (< 2mm)

에서 生育이 良好한 것으로 나타났다.

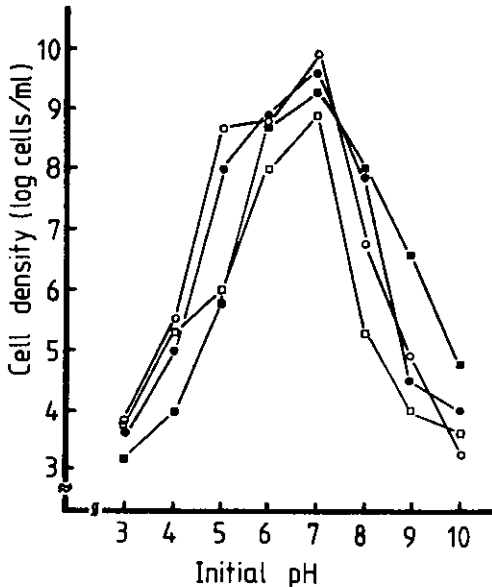


Fig. 1. Effect of the initial pH on the growth of nitrogen fixing bacteria

○ □ *Rhizobium japonicum* S022  
○ ○ " " S080  
● ● " " 019  
■ ■ *Rhizobium meliloti* 105

#### 라. 窒素源의 影響

YM培地에 各種 窒素源을 10mM, 20mM, 30 mM 添加하여 培養한 結果는 表 5와 6에 나타난 바와 같이, *Rhizobium japonicum* S 080의 境遇 窒酸, 尿素 等은 YM培地에서 生育에 影響을 미치지 못했으나, Glutamine, Asparagine, Allantion의 添加는 生育을 促進시켰다.

*Rhizobium japonicum* 019는 尿素의 添加도 生育이 促進되었으며, 다른 窒素源의 影響은 *Rhizobium japonicum* S 080과 비슷한 傾向을 나타냈다. 以上の 結果는 林(1970)<sup>10)</sup>과 Chakrabarti等(1981)<sup>4)</sup>의 報告와 一致하는 傾向을 보였다.

#### 根瘤形成 試驗

分離한 菌株의 根瘤形成 程度 및 窒素固定能力을 調査해 본 結果, 選抜菌株 全部가 根瘤를 形成했으며, 選抜菌株 144個中 21個 菌株의 生理

Table 5. Effect of nitrogen sources on cell growth of *Rhizobium japonicum* S080

Nitrogen sources	cell growth(O. D. 660nm)		
	10mM	20mM	30mM
HNO <sub>3</sub>	0.42	0.25	0.17
KNO <sub>3</sub>	0.47	0.26	0.18
NH <sub>4</sub> Cl	0.45	0.38	0.30
NaN <sub>3</sub>	0.09	0.09	0.08
N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.13	0.09	0.08
Urea	0.41	0.35	0.28
Glutamine	0.56	0.68	0.48
Asparagine	0.66	0.72	0.55
Allantion	0.52	0.55	0.50
control	( 0.44 )		

Table 6. Effect of nitrogen sources on cell growth of *Rhizobium japonicum* 019

Nitrogen sources	cell growth(O. D. 660nm)		
	10mM	20mM	30mM
HNO <sub>3</sub>	0.44	0.44	0.43
KNO <sub>3</sub>	0.33	0.28	0.16
NH <sub>4</sub> Cl	0.42	0.43	0.47
NaN <sub>3</sub>	0.08	0.06	0.06
N <sub>2</sub> H <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.09	0.08	0.08
Urea	0.55	0.70	0.50
Glutamine	0.54	0.59	0.53
Asparagine	0.68	0.61	0.57
Allantoin	0.50	0.54	0.65
control	( 0.42 )		

的 特性과 窒素固定力을 比較해 본 結果는 表 8에 나타낸 바와 같이 菌의 色相이 白色이고, colony가 小型이며, 窒酸還元力이 있고 亞窒酸還元力이 없는 菌株가 대체로 높은 窒素固定力을 나타냈으며, 그 다음으로 上記 것과 같으나 亞窒酸還元力이 있는 菌株로서 窒素固定力은 中間程度였고, colony가 大型인 菌株는 窒素固定力이 낮은 것으로 나타났다. 以上の 結果에서 *Rhizobium japonicum*은 形態 및 生理의 特性으로 볼때 3型으로 分類할 수 있으며 이것은 石澤(1980)<sup>11)</sup>의 結果와 一致하며 첫번째 Group이 A型, 두번째의 것이 B型, 세번째의 것이 C型과 비슷하다.

#### 窒素固定菌과 宿主와의 親和性 檢定 試驗

窒素固定菌은 同 一菌株라도 宿主植物에 따라 根瘤의 形成성과 窒素固定力이 달라 有效菌株와 無效菌株로 區分하고 있다. 또한 有效菌株도 宿主植物의 品種에 따라 根瘤의 形成성과 窒素固定

Table 7. Cultural characteristics of the indigenous stains nodulated on soybean roots their activities of nitrogen fixation on the Kwangkyo cultivar.

Strain no.	Color	Colony Size	Litmus Milk	Nitrate Reduction	Nitrite Reduction	Nodule no. /plant	Nodule wt. (g) /plant	ARA (nmole)/ plant/hr.
007	W	S	Ac	+	-	27	0.21	1352.13
S025	W	S	Al	+	-	34	0.18	1212.38
S029	W	S	Al	-	-	39	0.24	1192.50
S080	T	S	As	+	-	57	0.17	1282.50
S090	W	S	As	+	-	38	0.14	1318.38
S093	W	S	As	+	-	26	0.20	1152.75
S118	W	S	Ac	+	-	40	0.18	1857.35
S008	P	L	As	+	+	92	0.15	675.75
S031	W	S	Ac	+	-	83	0.16	612.15
S045	W	S	Ac	+	+	50	0.17	884.88
S085	T	S	Al	+	-	15	0.08	771.15
S088	W	S	Al	+	+	6	0.04	616.13
S096	T	S	Al	+	-	37	0.14	645.78
S090	W	S	As	+	-	45	0.15	794.38
011	W	S	Al	+	-	33	0.11	406.88
019	W	S	Al	+	-	33	0.10	405.33
S003	W	S	Al	+	+	12	0.06	413.40
S035	W	S	Al	-	-	6	0.03	248.44
S036	T	L	Al	+	-	29	0.09	383.58
S073	W	L	Al	+	-	23	0.02	9.94
S081	W	S	As	+	-	52	0.12	59.44

W : White, T : Translucent, P : Transparent, S : Small colony (< 2mm),  
L : Large colony, Al : Alkali, Ac : Acid, As : Acid serum.

能力이 다르기 때문에 實際로 窒素固定菌을 接種하는데 있어서는 接種菌株과 栽培品種間の 親和性を 檢討하여 選定되어야 할 것으로 생각된다. 이러한 觀點에서 光敎를 비롯한 5個 品種의 大豆와 接種菌株와의 親和性を 調査해보기 爲하여 實施한 pot試驗 結果는 表 8, 9에 나타난 바와 같다.

光敎에 대한 *Rhizobium japonicum* S 022를 비롯한 10個 菌株의 接種親和性은 表9에 나타난 바와 같이 土壤을 殺菌시켰을 境遇에는 S 045가 가장 높은 窒素固定力을 나타냈으나, 土壤을 殺菌시키지 않았을 境遇에는 窒素固定力이 떨어지는 것으로 나타났는데, 이는 土壤을 殺菌시키지 않았을 境遇 土壤中에는 大豆 根瘤菌 뿐만 아니라 다른 一般共存微生物이 棲息하고 있기 때문에 人工的으로 培養增殖된 接種大豆 根瘤菌과 一般共存微生物間에 相互拮抗作用이 일어났던 結果인 것으로 생각되며, *Rhizobium japonicum* 011의 境遇 土壤을 殺菌했을때 보다 殺菌하지 않았을 때가 더 높은 窒素固定力을 나타냈는데, 이는 接種根瘤

菌과 土壤中の 共存微生物間에 相互 共力 作用이 일어났던 結果인 것으로 推測된다.

Vincent (1974)<sup>11)</sup>에 依하면 根瘤菌의 接種效果는 土壤中の 環境 條件에 따라서 서로 다르게 나타나지만 地域的인 條件으로서 土壤中에 棲息하는 土着根瘤菌이 적고, 菌의 活性이 낮고 自然的인 接種이 不可能할 때 콩 収量の 增加나 土壤 窒素의 增加面에서 有利하고 또한 土壤環境外에 接種한 宿主植物의 特異性, 接種菌의 活性, 接種方法 및 土壤肥沃도가 重要하다고 하였다.

한편, 根瘤菌을 人工接種하였을 때, 土壤中에서는 接種根瘤菌, 土着根瘤菌, 一般共存微生物間에 相互共力 또는 相互拮抗作用이 일어날 可能性이 있다.

그러므로 大豆에 對한 根瘤菌의 接種效果는 이들 微生物들이 어떻게 作用 하느냐에 따라서 큰 差異가 있을 것으로 推測된다.

表 8, 9에 나타난 바와 같이 S 045 菌株는 土壤을 殺菌시켰을 境遇, 光敎를 비롯한 4個品種에는 大體的으로 높은 窒素固定力을 나타냈으나,

南川에는 窒素固定력이 낮은 것으로 나타났는데, 이는 同一菌株라도 大豆의 品種間에 따라서 親和性이 달라서 窒素固定력이 다르게 나타날 수 있다는 것을 意味하며 石澤(1954)<sup>11)</sup>에 依해서도 이와 類似한 結果가 報告된 바 있으며, 金과 崔 等(1978)<sup>12)</sup>도 光教에 여러 種의 大豆根瘤菌을 接種했던 結果, 供試品種과 親和力이 없는 菌株, 根瘤는 形成되나 宿主植物의 生育에 影響을 주지 못하는 無效菌株 및 宿主植物의 生育을 크게 促進시키는 有效菌株로 區分할 수 있었다고 報告하였다.

한편, 日本 名古屋大學으로부터 分讓받은 *Rhizobium japonicum* 007은 殺菌土壤에서 적은 양이지만 어느 程度의 根瘤를 形成했으나, 光教, D<sub>1</sub>, 光教×D<sub>1</sub> 等 3 個品種의 大豆에서는 窒素固定能力

이 전혀 없었으며, 黃金, 南川 等 2 個品種의 大豆에서도 窒素固定력이 매우 낮은 것으로 나타났다. 또, S 107의 境遇, 黃金에서는 어느 程度의 窒素固定력을 나타냈으나 光教, D<sub>1</sub>, 光教×D<sub>1</sub> 等에서는 窒素固定력이 낮았으며, 南川에서는 窒素固定력이 전혀 나타나지 않았는데, 이와 같이 根瘤가 形成되었음에도 不拘하고 窒素固定력이 없는 것은 이 根瘤가 窒素를 固定하지 못하는 無效根瘤인 것으로 생각되어 지는데, 이는 窒素固定能力이 없는 無效菌株에 依해서도 根瘤가 形成된다는 Thornton (1929)<sup>13)</sup>의 報告와 一致하였다.

全般的으로 보았을 때 宿主作物에 對한 窒素固定菌의 反應은 小粒種인 D<sub>1</sub>에서는 窒素固定력이 낮았으며, 光教×D<sub>1</sub>, 黃金에서는 大體的으로 窒素固定력이 높은 것으로 나타났으며, 優良菌株別

Table 2. Nodulation of soybeans by inoculation with nitrogen fixing bacteria

cultivar	treatment	strain no.	S022	S045	S080	S090	S096	S107	S118	007	011	019
Kwangkyo	fresh wt. (g)	S*	4.27	5.74	5.61	5.19	4.82	5.66	6.35	5.96	4.89	5.79
		N.S**	5.20	8.35	2.44	5.93	4.78	6.04	6.94	5.58	3.60	4.01
	nodule no.	S	75	128	59	56	100	33	110	11	22	63
		N.S	83	74	6	34	13	25	72	54	33	6
	nodule wt. (g)	S	0.15	0.26	0.19	0.19	0.15	0.10	0.28	0.04	0.11	0.25
		N.S	0.22	0.20	0.01	0.22	0.04	0.15	0.24	0.19	0.12	0.13
D - 4	fresh wt. (g)	S	4.72	3.34	3.69	3.52	2.62	4.88	3.04	3.68	2.17	6.55
		N.S	3.58	3.37	5.32	4.26	5.83	3.97	4.59	5.87	4.98	3.42
	nodule no.	S	81	80	35	33	85	19	52	5	9	38
		N.S	13	31	30	75	78	17	48	23	12	20
	nodule wt. (g)	S	0.23	0.17	0.12	0.16	0.15	0.06	0.18	0.02	0.05	0.17
		N.S	0.06	0.09	0.13	0.15	0.17	0.10	0.17	0.19	0.11	0.05
Kwangkyo/D-4	fresh wt. (g)	S	4.87	5.28	8.39	6.42	7.78	8.06	7.43	7.18	4.46	5.42
		N.S	2.80	8.29	2.65	9.05	9.47	6.57	5.75	5.07	7.56	8.58
	nodule no.	S	74	65	64	73	101	66	94	16	27	60
		N.S	20	54	19	57	59	38	85	22	68	41
	nodule wt. (g)	S	0.21	0.29	0.23	0.25	0.37	0.17	0.39	0.03	0.19	0.28
		N.S	0.03	0.17	0.03	0.20	0.20	0.21	0.23	0.10	0.27	0.22
Hwangkeum	fresh wt. (g)	S	4.04	4.68	4.39	4.30	4.60	5.37	7.69	7.94	4.49	9.59
		N.S	6.03	3.34	5.35	6.42	6.23	5.90	7.52	8.90	4.01	5.73
	nodule no.	S	50	85	79	72	82	51	120	17	33	85
		N.S	75	28	79	70	62	44	88	64	49	87
	nodule wt. (g)	S	0.15	0.21	0.19	0.17	0.23	0.22	0.33	0.08	0.14	0.34
		N.S	0.25	0.06	0.25	0.15	0.16	0.15	0.26	0.24	0.15	0.23
Namcheon	fresh wt. (g)	S	4.05	5.15	6.23	6.44	5.32	2.98	6.64	6.36	5.43	5.03
		N.S	4.03	4.30	5.13	6.03	4.54	6.19	7.36	9.59	7.58	6.06
	nodule no.	S	55	116	108	86	98	22	108	11	34	84
		N.S	60	48	22	103	44	22	38	40	55	58
	nodule wt. (g)	S	0.14	0.18	0.31	0.28	0.20	0.03	0.26	0.07	0.10	0.28
		N.S	0.10	0.11	0.12	0.28	0.17	0.19	0.15	0.18	0.37	0.21

\*: Soil sterilization, \*\*: Soil Non-sterilization.



Table 9. Nitrogen fixing activities of soybeans nodule by inoculation with nitrogen fixing bacteria

cultivar	treatment	strain no.	S022	S045	S080	S090	S096	S107	S118	007	011	019	control
Kwangkyo	nmole/ plant	S*	457	1716	869	938	526	91	434	-	45	938	-
		N.S**	480	434	-	938	114	505	755	503	497	-	29
	nod. no.	S	6.18	13.40	14.73	16.75	5.26	2.77	3.95	-	2.08	14.89	-
		N.S	5.79	5.87	-	27.59	8.80	20.13	10.48	9.32	15.08	-	3.81
		S	3184	6730	4461	5066	3525	882	1547	-	423	3800	-
nod. wt.	N.S	2215	2132	-	4235	2867	3448	3201	2715	4294	-	1362	
	S	343	366	125	137	91	68	125	-	34	572	-	
D-4	nmole/ plant	N.S	331	400	400	612	446	251	560	354	183	57	286
		S	4.23	4.57	3.59	4.16	1.07	3.61	2.42	-	3.81	15.05	-
	nod. no.	N.S	25.52	12.91	13.34	8.16	5.72	35.96	11.68	15.42	15.25	2.86	13.62
		S	1494	2093	1019	884	631	1100	719	-	683	3286	-
		N.S	5521	4555	3011	4043	2640	2509	3282	1848	1625	1036	1356
Kwangkyo xD-4	nmole/ plant	S	606	1338	869	1441	1750	91	2563	-	514	1155	-
		N.S	22	240	34	514	594	640	720	170	811	926	652
	nod. no.	S	8.19	20.59	13.58	19.74	17.33	1.38	27.26	-	19.07	19.26	-
		N.S	1.14	0.38	0.71	9.03	10.08	16.86	8.48	7.80	11.94	22.60	29.64
		S	2867	4654	3712	5748	4692	530	6561	-	2652	4136	-
nod. wt.	N.S	854	1407	1036	2535	2923	3009	3121	1698	2964	4152	2734	
	S	1418	1075	1247	1167	800	869	1292	68	148	1476	-	
Hwang- keum	nmole/ plant	N.S	1412	171	1178	560	640	686	915	709	469	1224	1224
		S	28.37	12.65	15.78	16.20	9.76	17.05	10.77	4.03	4.50	17.36	-
	nod. no.	N.S	18.83	6.12	14.91	8	10.33	15.60	10.40	11.08	9.57	15.30	16.54
		S	9757	5059	6495	6909	3437	3894	3906	818	1061	4282	-
		N.S	5607	2964	4674	3635	4083	4595	3469	2932	3208	5325	3790
Namcheon	nmole/ plant	S	377	343	1052	1098	732	-	1064	205	22	892	-
		N.S	171	366	469	938	686	846	492	995	853	812	629
	nod. no.	S	6.86	2.95	9.74	12.77	7.47	-	9.85	18.72	0.67	10.62	-
		N.S	2.86	7.62	21.32	9.10	15.60	38.48	12.94	24.88	10.61	14	8.28
		S	2636	1868	3367	3930	3600	-	4118	2971	2222	3186	-
nod. wt.	N.S	1724	3260	4002	3353	3970	4535	3194	5427	1586	3885	2135	

\*: Soil sterilization, \*\*: Soil Non-sterilization.

大豆品種에 對한 窒素固定力 反應은 光敎인 境遇 에는 S 045, S 080, S 090, 019 등이, D. 에서는 S 022, S 045, 019가 光敎×D, 에서는 S 045, S 090, S 096, S 118, 019가 黃金에서는 S 022, S 045, S 080, S 090, S 118, 019가 南川에서는 S 080, S 090, S 118가 宿主植物과의 親和力이 좋 아서 窒素固定力이 높은 것으로 나타났다.

以上の 結果를 綜合해서 불매 優良窒素固定菌 으로는 Fast-growing 型에서 S 080, S 090, S 118 이고 Slow-growing 型에서는 S 022와 S 096 으 로 推定된다. 또한 同一菌株라도 大豆의 品種에 따라서 窒素固定能力에 差異가 있었으며, 窒素固定能力이 없는 無效根瘤를 形成하는 菌株도 있었다. 또한 土壤을 殺菌했을 때와 殺菌하지 않았을 境遇, 接種菌株과 大豆品種에 따라서 窒素固定力 에 差異가 있었는데. 이는 接種菌株과 土壤內

에 存在하는 微生物들 間의 拮抗 또는 共力作用의 結果인 것으로 推測되나, 이에 對해서는 보다 더 具體的인 研究가 繼續되어야 할 것으로 생각된다.

## 摘 要

光敎를 비롯한 12個品種의 大豆根瘤로부터 探索分離한 窒素固定菌의 生理的 特性 및 宿主作物과의 接種親和性을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. YMA培地에서 자란 窒素固定菌의 色相은 白色相, 半透明色相, 透明色相이 各各 60%, 30%, 10%였으며 Litmus milk 反應은 alkali, acid serum, alkali serum, acid가 各各 51%, 29%, 9%, 11%로 나타났다.

2. 優良窒素固定菌의 YM培地에서의 生育速度

및 pH의 변화는 S 022, S 096이生育速度가 느리고, alkali를生成하였으며 S 080, S 090, S 118은生育速度가 빠르고 酸을生成하였다.

3. YM培地の初期 pH가 6.0~7.0의範圍에서 *Rhizobia*의生育이 가장 좋았다.

4. 窒素源으로서 glutamine, asparagine, allantion 등은 *Rhizobia*의生育을促進시켰다.

5. 分離한 菌株 全部가 大豆에 根瘤를 形成시

켰으며, 優良窒素固定菌株은 그중 色相이 白色이고 colony가 小型이며 窒酸還元力이 있고 亞窒酸還元力이 없으나 比較的 높은 窒素固定力을 나타냈다.

6. 同一菌株라도 宿主作物의 親和性에 따라서 窒素固定能力에 差異가 있었으며, 窒素固定能力이 없는 無效根瘤를 形成하는 菌株도 있었다.

### 引用 文 獻

1. 農村振興廳 : 1967, 大豆 根瘤菌 接種效果 試驗, 農試研究, pp: 75.
2. Alexander, M. : 1977, Introduction to the soil microbiology, 2nd ed. John wiley & Sons Inc., pp315.
3. Brill, W. J. : 1975, Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation, Annu. Rev. Microbiol., 29 : 109-129.
4. Buchman, R. E., and N. E. Gibbons : 1974, Bergeys manual of determinative bacteriology, 8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, pp261.
5. Caldwell, B. F., and G. Vest : 1970, Effect of *Rhizobium japonicum* strains on soybean yields, Crop Sci., 10 : 19-21.
6. Chakrabarti, S., M. S. Lee, and A. H. Gibbon : 1981, Diversity in the nutritional requirements of strains of various *Rhizobium* species, Soil Biol. Biochem., 13 : 349-354.
7. 崔彰烈, 金忠洙 : 1971, 大豆 省力栽培에 關한 研究 I. 大豆 撒播栽培에 있어서 栽植密度가 大豆의 生育과 收量에 미치는 影響, 忠南大學校大學院 院友會 論文集. 37 : 7-14.
8. 崔宇永, 金聖烈 : 1979, Alfalfa 根瘤菌의 分離 및 窒素固定力의 比較, 韓農化誌 22 : 166-172.
9. Eaglesham, A. R., S. Hassouna, and R. Seeger : 1983, Fertilizer-N effects on  $N_2$ -fixation by cowpea and soybean, Agronomy J., 75 : 61-66.
10. Elkan, G. H. : 1971, Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of *Rhizobium japonicum*, Plant & Soil, Special vol. 1 : 85-104.
11. Fred, E. B., : 1921, The fixation of atmospheric nitrogen by inoculated soybean, Soil Sci., 1 : 469-177.
12. Gibbs, B. M., and D. A. Shapton : 1978, Identification methods for microbiologists, Academic press, pp49.
13. Graham, P. H., and C. A. Parker : 1970, Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes, Plant & Soil, 20 : 383-396.
14. Ham, G. E., V. B. Cardevell. and H. W. Johnson : 1971, Evaluation of *Rhizobium japonicum* inoculation in soils containing naturalized population of *rhizobia*, Agronomy J., 63 : 301-303.
15. Hardy, R. W. F., R. C. Burns, and R. D. Holsten : 1973, Application of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation, Soil Biol. Biochem., 5 : 47-81.
16. Harrigan, W. F., and M. E. McCace : 1976, Laboratory methods in food and dairy microbiology, Academic Press, pp71
17. 홍은희 : 1967, 大豆根瘤菌의 接種效果試驗, 作試報告書, 田作編 pp527.

18. 石澤修一：1954, 豆科植物の根粒菌に関する研究(II), 日土肥誌, 25 : 4-8.
19. 石澤修一：1980, 微生物と植物生育, 博文社, pp97.
20. 放射線農業研究所：1970, 根瘤菌接種試験, 研究開發報告書, pp30.
21. Israel, D. W. : 1981, Cultivar and *Rhizobium* effect on nitrogen fixation and remobilization by soybeans, *Agronomy J.*, 73 : 509 - 516.
22. 日本土壤學會編：1982, 根粒の窒素固定-ダイズの生産向上のために-, 博文社, pp69.
23. Karlen, D. L., P. G. Hunt, and T. A. Matheny : 1982, Accumulation and distribution of K, Ca, and Mg by selected determinate soybean cultivars grown with and without irrigation, *Agronomy J.*, 74 : 1067 - 1070.
24. Keyser, H. H., B. B. Bohlool, T. S. Hu and D. F. Weber : Fast-growing *Rhizobia* isolated from root nodules of soybean, *Science*, 215 : 1631 - 1632.
25. 金聖烈, 崔宇永：1978, 완두 및 大豆根瘤菌의 分離 및 窒素固定能力의 比較, 忠南大學校農技研報, 5 : 136-144.
26. 鎌田悦男：1962, マメ科作物における根粒形成に関する生物形態學的研究, VII. ダイズ根粒菌株の根粒形成能力とダイズ品種との關係, 日作紀, 31 : 78-82.
27. Kovacs, N. : 1976, Identification of *Pseudomonas pyochanca* by the oxidase reaction, *Nature*, 178 : 703 - 709,
28. Kremer, R. J., and H. L. Peterson : 1981, Field evaluation of selected *Rhizobium* in an improved legume inoculant, *Agronomy J.*, 75 : 139 - 143.
29. 이재만, 김만수：1968, 大豆根瘤菌接種試験, 江原農振報告書, pp307.
30. 林善旭：1970. 豆科作物根瘤菌에 對한 生理 및 生化學的 研究, I. 根瘤菌의 特性과 接種試驗, 韓農化誌, 13 : 51 ~ 57.
31. Lindemann, W. C., G. W. Randall, and G. E. Ham : 1962, Tillage effects on soybean nodulation,  $N_2$  ( $C_2H_2$ ) fixation, and seed yield, *Agronomy J.*, 74 : 347-354,
32. Lindemann, W. C., G. E. Ham, and G. W. Randall : 1982, Soil compaction effects on soybean nodulation,  $N_2$  ( $C_2H_2$ ) fixation and seed yield, *Agronomy J.*, 74 : 307 - 311.
33. Munevar, F., and A. G. Wollum : 1982, Response of soybean plants to high root temperature as affected by plant cultivar and *Rhizobium* strain, *Agronomy J.*, 74 : 138 - 141.
34. Neves, M, C. P., R. J. Summerfield, F. R. Mindin, P. Hadley, and E. H. Roberts : 1982, Strain of *Rhizobium* effects on growth and seed yield of cowpeas (*Vigna unguiculata*), *Plant & Soil*, 68 : 249 - 260.
35. Noel, R. K., and J. G. Hol : 1984, Bergey's manual of systematic bacteriology Williams and Wilkins Co., U. S. A. pp. 235 - 240.
36. 朴愚喆：1984. 根瘤菌의 人工接種이 大豆의 몇가지 形質에 미치는 影響, 慶北大學校論文集, 37, 243 - 274.
37. Quispel, A. : 1974, The biology of nitrogen fixation, North Holland Publishing Co., pp. 265.
38. 柳震彰, 李相奎, 李赫浩, 洪鍾雲, 趙武濟 : 大豆根瘤菌의 窒素固定에 關한 研究, III. 新開墾地 土壤에서 根瘤菌의 接種 및 改良劑 施用이 窒素固定과 大豆收量에 미치는 效果, 韓土肥誌, 16 : 188 - 194.
39. Sparrow, S. D., and G. E. Ham : 1983, Nodulation,  $N_2$  - fixation and seed yield of navy beans as influenced by inoculant rate and inoculant carrier, *Agronomy J.*, 75 : 20 - 24.
40. Stowers, M. D. and A. R. J. Eaglesham; 1984, Physiological and symbiotic characteristic of fast-growing *Rhizob-*

- ium japonicum*, Plant & Soil, 77 : 3-14.
41. Talbott, H. J., W. J. Kenworthy, and J. O. Legg : 1972, Field comparison of the N-15 and difference method of measuring nitrogen fixation, Agronomy J., 74 : 769-804.
42. Thornton, H. G. : 1929, The inoculation of lucerne (*Medicago sativa L.*) in Great Britain, Agri. Sci., 19 : 48-70.
43. Vincent, J. M. : 1970, A manual for the practical study of the root nodule bacteria, Blackwell Scientific Publications Oxford and Edinburgh, pp. 7.
44. 尹漢大 : 1982, 大豆根瘤菌의 窒素固定에 關한 研究, I. 大豆根瘤菌의 分離 및 接種試驗, 慶尙大 論文集 (生論界編), 21 : 95-100.