

제주도 감귤원 토양의 V.A - mycorrhizae 분포 및 사상균에 의한 인광석의 용해에 관한 연구

金滢玉 · 柳長杰 · 李信燦 · R. M. N. Kucey

Mycorrhizae Distribution and Rock Phosphate Dissolution by Soil Fungi in the Citrus Fields on Jeju-do.

Hyeong-Ok Kim · Zang-Kual U. · Sin-Chan Lee and R. M. N. Kucey

Summary

The mycorrhizae spore densities (spore numbers/100g soil) were measured on six sites of citrus field by the floating method to estimate the mycorrhizae distribution on volcanic ash soil in Jeju-do. Phosphate solubilizing fungi and bacteria in the soils were isolated and selected by the successive pure culture in the potato dextrose agar-calcium phosphate (PDA-P) media. The phosphate solubilizing capacities of the selected fungi were measured after incubating in the liquid media mixed with 200 mg of powdered rock phosphate for one week.

1. The highest spore density (456/100g soil) was observed in the soil from the 6 years citrus field located on Samyang-dong, Jeju-si and the next one (385/100g soil) from the 18 years citrus field at the same place.
The soils from Topyeongdong, Seogwipo-si (1)(2) were found to contain lower mycorrhizae spores than other sampling sites; 256/100g soil at seven years citrus field and 166/100g soil at twenty one years citrus field.
2. Colony radii and halo radii of bacteria measured 4mm-11mm and 6mm-22mm, and colony radii and halo radii of fungi were 8mm-12mm and 14mm-18mm respectively when they were incubated in PDA-P media for one week.
3. The selected fungi, based on the radius size of colony and halo, dissolved 0.46mg-2.64mg P_2O_5 from 200mg of powdered rock phosphate in the liquid media.

I. 緒 論

濟州道の 柑橘園土壤은 大部分이 火山灰土壤인데 火山灰를 母材로 하는 土壤은 形態나 性質에서 特異한 點이 많다. 火山灰土壤은 一般土壤에 比하여 有效磷酸이 부족하며 施用한 磷酸도 쉽게 固定化되어 作物의 根圈內에서 可給態 磷酸의 適正濃度維持가 重要한 問題로

제기되어 왔다. 火山灰土壤의 磷酸吸收係數는 一般土壤의 것 보다 2~2.5배나 되는데 磷酸施肥量을 磷酸吸收係數의 5%로 한다면 火山灰土壤의 磷酸吸收係數가 보통 2,000 mg P_2O_5 /100g 을 上廻하는 경우가 흔하므로 결국 100 kg P_2O_5 /10a에 달하는 量을 施用해야 된다는 것이다.

한편 火山灰土壤에서 水溶性 磷酸보다 溶性磷肥와 같은 枸溶性 磷酸의 施肥가 장려되어 왔지만 溶性磷肥는

磷鑛石으로 부터 제조되는 과정에서 너무 많은 에너지를 사용해야 하므로 생산단가는 매우 높게될 수밖에 없다. 따라서 최근에는 磷鑛石의 직접시용에 관한 연구가 세계적으로 널리 수행되어 왔던바 現在까지의 結果로는 磷鑛石을 직접시용 했을 경우 작물에 의한 利用率이 좋지 못하였고 粉末度 및 施用方法, 磷鑛石의 產地에 따라서 相異한 效果를 나타내고 있기때문에 직접시용에 대한 연구는 더욱 더 개발되어야 할 실정이다. 土壤에 固定되어서 植物에 의한 吸收가 어렵게된 成分들이 土壤微生物의 作用에 의해서 可溶性 成分으로 變하게 되는데, J. I. Sperber²¹⁾는 土壤微生物에 의해서 不溶性 磷灰石(磷酸 3 灰石)의 溶解度를 增加시켰다고 報告한바있고, N. R. Jackson¹¹⁾ 등은 V. A. mycorrhizae 에 의해 옥수수 生産을 약 50% 增加시켰으며, J. P. Ross²²⁾는 大豆實驗에서 mycorrhizae 가 Na, P, Ca, Cu 의 葉中濃度를 增加시켰다고 하였다. 이들 mycorrhizae 는 大部分 植物의 根細胞와 조직에 侵透하여 共生關係를 갖는 Vesicular - Arbuscular(V. A.) mycorrhizae 이며 이들의 菌糸는 植物이 利用하기 힘든 低濃度의 磷酸을 吸收할 수 있고 또한 이들 菌糸가 植物의 뿌리표면에 分布되므로 實質的인 磷酸吸收를 위한 根系表面積을 增加시켜서 결국 磷酸吸收力이 커지게되는 것이

라고 알려졌다.¹¹⁾

그러나 濟州道 火山灰土壤에 대해서는 現在까지 mycorrhizae 分布에 대한 調査가 實施된바 없을 뿐만아니라 不溶性 磷酸을 可溶化시키는 細菌 및 糸狀菌에 對해서도 전혀 알려진바 없는 實情이므로 본 研究에서는 인광석의 施用效果를 增加시킬 수 있는 方案을 模索코져 우선 mycorrhizae의 分布程度와 不溶性 磷酸을 溶解시킬 수 있는 土壤微生物을 選拔하기 위한 基礎調査를 實施하였다.

II. 材料 및 方法

1. 供試土壤

供試土壤은 火山灰土壤인데, 1983年 1月, 6個地域의 柑橘園을 選定하여, 普通温州를 대상으로 해서 地面에서 30cm 깊이의 土深에 分布되어 있는 뿌리부근의 土壤을 약 1.5kg 採取하였다. 試料를 採取한 柑橘園의 位置와 樹齡은 Table 1과 같으며 採取한 土壤은 濕潤狀態로 비닐봉투에 넣어 4℃ 以下에서 保管하여 供試하였다.

Table 1. Description for soil sampling sites.

Soil number	Location	Soil series	Soil association	Water contents(%)	Age of citrus
1	Samyangdong, Jeju-si	Jeju	Brown volcanic ash soil	21.2	6
2	"	"	"	26.7	18
3	Gosung-1-ri, Seongsan	Namweon	Black volcanic ash soil	44.2	3
4	"	"	"	46.7	10
5	Taeheung-1-ri, Namweon	Jungeom	"	40.3	3
6	"	"	"	39.5	12
7	Topyeongdong, Seogwipo-si (1)	Ora	"	36.6	7
8	Topyeongdong, Seogwipo-si (2)	Wimi	"	27.7	21
9	Topyeongdong, Seogwipo-si (3)	Namweon	"	42.1	3
10	"	"	"	41.7	12
11	Aradong, Jeju-si	Ara	"	27.7	5

2. Mycorrhizae의 胞子密度(spore density)

및 크기 測定

Mycorrhizae의 胞子密度는 다음과 같이 浮上分離法(floating method)에 의하여 測定하였다.

濕潤供試土壤 100 g을 500 ml beaker에 넣고 수돗물을 試料가 損失이 되지 않을 정도의 유속으로 직접 떨어뜨려서 약 350 ml 가량 받는다. 이것을 유리막대로 강하게 저어주어 混濁液이 되도록 混合시켰다. 이 試料를 10~15秒 동안 靜置하여 두면 무거운 土壤粒자들은 빨리 沈澱하고 胞子들과 가볍고 微細한 土壤粒자들은 上澄液中에 있게 되므로 이 浮遊物을 漚(44 μm)에 따라 넣었다. 이 過程을 反復處理하여 漚(44 μm)로 옮긴 다음 수돗물을 직접 試料에 닿지 않도록 흘려내리면서 微細한 土壤粒자들을 洗滌하여 제거하였다. 漚(44 μm)에는 胞子보다 크고 거친 土壤粒들과 植物体 부스러기들이 함께 들어 있으므로 이를 제거하기 위해서 漚(44 μm)에 들어 있는 試料를 spatula와 洗滌瓶을 사용하여 beaker로 옮기고 44 μm 漚위에 420 μm 漚를 겹쳐 놓고서 beaker에 들어있는 試料를 재차 걸렀다. 이때 또한 수돗물을 직접 試料에 닿지 않도록 흘려내리면서 洗滌하였다. 44 μm 漚에는 胞子들과 이와 같은 크기의 土壤粒들 및 植物体 부스러기들이 포함되어 있게 된다. 이것을 glycerol 水溶液의 比重이 1.12가 되도록 調製하여 250 ml cylinder에 glycerol 水溶液을 4/5 가량 채운 다음 옮겨 넣어 cylinder 위를 막고 試料와 glycerol 水溶液이 잘 混合이 되도록 뒤집어 흔들어 주었다. 이 cylinder를 30分間 靜置하여 浮上分離시켰다. 土壤粒들은 沈澱되어 있으므로 上澄液만을 漚(44 μm)에 옮겨 걸렀다. 漚(44 μm) 위에 남아 있는 試料는 洗滌하여 beaker에 옮겨 胞子密度 및 크기 測定에 使用하였다. 使用했던 glycerol 水溶液은 回收하여 여지로 거르고 glycerol을 첨가하여 比重을 1.12로 조제한 후 再使用하였다.

顯微鏡을 60倍率로 조절한 뒤에 9.8 cm Petri dish 크기의 백색종이 위에 15개의 동심원을 그려놓고 이 위에 Petri dish를 올려 놓은 다음 試料와 물을 적절히 혼합한 시료 약 10 ml를 넣어 골고루 퍼지도록 하

여 이 원을 따라 檢鏡하면서 胞子密度를 測定하였다. 試料에 植物体 부스러기등이 많이 함유되어 있어서 檢鏡하기 어려운 경우 다음과 같이 處理하여 使用하였다.

50 ml 유리遠心分離管에 比重이 1.12인 glycerol 水溶液 20 ml를 넣고 물 20 ml와 이 試料를 차례로 加하고 glycerol層과 물層이 섞이지 않도록하여 이것을 1000 rpm에서 10分間 遠心分離시켰다. 즉은 胞子和 植物体 부스러기들은 물보다 比重이 낮으므로 물表面에 浮上하게 되며 土壤粒자들은 遠心分離管 밑에 沈澱하나 胞子들은 glycerol 水溶液과 물의 두層 사이에 存在하게 된다. 이것을 피펫으로 採取하여 漚(44 μm)에 옮겨 넣고 수돗물을 흘려내리면서 洗滌하였다.

浮上分離法(Floating method)에 의해서 分離한 試料는 保管時에 0.01 M CaCl₂ 溶液에 넣어 4℃ 以下에서 保管하였다.

胞子の 크기는 micrometer를 利用하여 測定하였다.

3. 磷酸溶解能인 우수한 細菌과 糸狀菌의 選抜 및 이 糸狀菌에 依해서 燐鑛石粉末로 부터 溶出되는 磷酸의 定量

1) Colony 반경(R)과 halo의 반경(H) 및 H/R에 의한 인산칼슘 溶解性 細菌과 糸狀菌의 選抜

Potato-dextrose agar(PDA) 6 g을 증류수 400 ml에 넣고 약한 불로 완전히 녹혀 맑게 한 다음 調製한 10% CaCl₂ 溶液과 10% K₂HPO₄ 溶液을 같이 殺菌器에 넣고 121℃ 15psi에서 10~15分間 殺菌시켰다. PDA의 온도가 70~80℃일때 10% CaCl₂ 溶液 20 ml를 加한 뒤 흔들어 주면서 10% K₂HPO₄ 溶液 20 ml를 加하여 微細한 沈澱粒자가 牛乳狀이 되도록 하였다. 이때 糸狀菌 選擇培地는 0.01% Streptomycin을 첨가하여 調製하였다. 이 단계는 철저한 무균상태를 요하지 않으므로 실험대위에 burner를 켜서 오염을 감소시키면서 殺菌된 petri dish에 調製한 (PDA-P) 培地를 약 15 ml씩 부어 넣었다. 濕潤供試土壤 1g을 稀釋平板法에 의해서 1:10⁻⁷로 稀釋된 溶液을 만들고 이 溶液 0.1 ml를 PDA-P 培地위에 첨가하여 接種시켰으며 同一한 土壤試料溶液에 대해서 5회 反復 실시하였다. 接種된 培地를 약 7日間 20~25℃ 培養器內에

서 培養하여 colony의 주위가 맑게 된(磷酸溶解能 이 있는) 細菌 및 糸狀菌을 골라서 PDA-P 培地에 再 接種하고 7日間 培養후에 이들에 의해서 形成된 colony 반경(R)과 halo 반경(H)을 測定했다. colony의 성장과 磷酸溶解能이 우수한 細菌 및 糸狀菌은 H/R의 크기에 의해서 選擇되었다.

2) 選擇된 糸狀菌의 磷酸石 溶解能 測定

PDA-P 培地로 부터 H/R에 의해 選擇한 糸狀菌 이 粉末 磷酸石에 한층 더 접촉하기 쉽게하기 위해서 液体培地를 다음과 같이 調製하여 使用했다.

NaCl	0.01 %	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.01 %
NH_4Cl	0.04 %	Sugar	1 %
MgSO_4	0.05 %		

糸狀菌을 粉末 磷酸石(주식회사 풍농비료에서 제공 한 미국산으로 40mesh 체를 통과시켜 使用) 200mg 에 50ml의 液体培地를 혼합한 후에 接種하고 20~25 °C 수욕탕에서 7日間 培養한 다음 이 液体培地上澄液 15ml씩을 採取하여 可溶性 磷酸量을 定量했는데 Vanadate 法에 의해서 發色시키고 Spectronic 20 을 使用하여 파장 400nm에서 測定하였다.

III. 結果 및 考察

1. Mycorrhizae의 分布 및 胞子の 크기

供試土壤으로 부터 分離시켜서 胞子數와 크기를 測定한 結果는 Table 2와 같다.

調査園場中에서 높은 胞子密度(胞子數/土壤100g)를 갖는 것으로는 濟州市 三陽洞의 6年生과 8年生의 柑橘園土壤에서 土壤 100g當 456, 385의 胞子密度가 각각 觀察되었고 남원읍 태흥1리의 3年生 柑橘園土壤에서 456, 12年生 柑橘園土壤에서 396의 胞子密度가 觀察되었으며 濟州市 아라동의 5年生 柑橘園土壤에서는 제일 적은 數의 155 胞子密度가 觀察되었다. 同一地域內에서는 樹齡이 많은 園場에서 胞子密度가 적었고 樹齡이 낮은 園場에서 더 많은 胞子密度가 觀察되었다. 그러나 園場의 位置에 따른 氣候條件, 耕作方

Table 2. Spore densities and average size of spores.

Soil	Spore density (Spores/100soil)	Size of spore(um)
1	456	77
2	385	88
3	188	88
4	168	99
5	456	77
6	396	77
7	256	88
8	166	99
9	356	88
10	214	88
11	155	88

法, 土壤條件등의 差異에 의해서도 胞子密度가 달랐는데 이는 樹齡에 의한 變異의 폭보다도 더 컸다. 또한 胞子の 크기는 최저 77 μm에서 최고 99 μm이며 평균 87 μm이었으며 胞子密度가 높은 土壤(土壤番號 1과 5)의 胞子크기가 제일 작고(77 μm) 胞子密度가 매우 적은 土壤(土壤番號 4와 8)에서 胞子の 크기가 제일 큰 것으로 觀察되었다.

2. PDA-P 培地에 의한 磷酸溶解性 細菌 및 糸狀菌의 選擇

純粹培養으로 얻은 細菌과 糸狀菌을 PDA-P 培地에 接種시킨뒤 生成된 colony 반경(R)의 크기를 測定했다. 또 이들 微生物의 代謝生産物이 培地中の 不溶性 磷酸칼슘을 溶解시킴으로 colony주위가 투명하게 變하는데 이를 halo라고 하며 이 halo의 반경(H)도 測定했다. 測定된 R과 H 그리고 H/R의 값들은 Table 3, Table 4와 같다.

細菌의 菌体成長(R)은 4mm - 11mm 溶解程度(H)는 6mm - 22mm로 H/R은 1.5 ~ 2.8이며, 1-2, 5-1, 5-2, 6-2의 試料들은 colony 形成이 매우 적었고 磷酸溶解能이 회박하여 選擇하지 않았다. 糸狀菌에서는 R이 8mm - 11mm, H가 14mm - 18mm 및 H/R은 1.3 - 2.3으로

Table 3. Radii of colony(R) and halo(H), and their ratio(H/R) observed from bacteria cultivation.

Bacteria from each soil	Radius of colony (R: mm)	Radius of halo(H: mm)	H/R
1-1	7	13	1.9
1-2	*	*	
2-1	9	17	1.9
2-2	11	13	1.2
3-1	9	14	1.6
3-2	6	16	2.7
4-1	7	18	2.6
4-2	6	15	2.5
5-1	*	*	
5-2	*	*	
6-1	10	19	1.9
6-2	*	*	
7-1	8	20	2.5
7-2	8	22	2.8
8-1	11	15	1.4
8-2	9	16	1.8
9-1	7	17	2.4
9-2	11	14	1.3
10-1	7	22	3.1
10-2	7	13	1.9
11-1	4	6	1.5

* : too small to measure

測定되었다.

3. 選拔된 糸狀菌들에 대한 液体培地에서의 燐石 溶解能力 比較

PDA-P 培地에서 分離選拔한 糸狀菌을 液体培地에 接種하여, 燐石의 溶解程度를 測定한 結果는 Table 5 와 같다.

燐石으로 부터 溶解된 燐酸의 量은 P_2O_5 로서 0.46 mg - 2.64mg 이었다. 토평동의 土壤에서 選拔된 糸狀菌(8-1)은 1.83mg P_2O_5 를, 그리고 태흥1리의 圃場으로 부터 採取된 土壤에서 選拔된 糸狀菌(5-2)은 2.64 mg P_2O_5 를 溶出し킴으로써 燐石의 溶解能力이 높은 菌주이었는데 이들의 實用性 여부는 더욱 검토되어야

Table 4. Radii of colony(R) and halo(H), and their ratio(H/R) observed from fungi cultivation.

Fungi from each soil	Radius of colony (R: mm)	Radius of halo(H: mm)	H/R
1-1	9	17	1.9
1-2	12	18	1.5
2-1	8	17	2.1
2-2	11	16	1.5
3-1	10	16	1.6
3-2	11	18	1.6
4-1	11	16	1.5
4-2	8	14	1.8
5-1	9	16	1.8
5-2	8	17	2.1
6-1	11	17	1.6
6-2	10	16	1.6
7-1	9	15	1.7
7-2	10	18	1.8
8-1	10	14	1.4
8-2	10	17	1.7
9-1	9	15	1.7
9-2	8	18	2.3
10-1	10	16	1.6
10-2	10	16	1.6
11-1	12	17	1.4

Table 5. Phosphate dissolved from 200mg of rock phosphate by the selected fungi.

Soil	P_2O_5 (mg)	Soil	P_2O_5 (mg)
1-1	0.46	6-2	0.46
1-2	1.03	7-1	0.69
2-1	1.03	7-2	0.46
2-2	1.38	8-1	1.83
3-1	0.69	8-2	1.15
3-2	0.85	9-1	1.15
4-1	0.46	9-2	1.83
4-2	1.03	10-1	0.46
5-1	1.03	10-2	0.47
5-2	2.64	11-1	1.26
6-1	0.23		

할 것이다. 이와 같은 磷鑛石의 溶解能어 큰 糸狀菌을 더욱 광범위한 조사를 통해서 찾아내고 배양조건에 의한 적응성을 利用 더욱 더 効果인 磷鑛石 溶解性 균주를 얻어내는 研究가 계속되어야 될 것인바 本實驗에서는 이 같은 長時間을 要하는 研究의 可能性을 검토코져 단기간의 實驗에서 얻은 結果를 基礎資料로 제시하는 바이다.

摘 要

火山灰를 母材로한 濟州道內 6個 柑橘園土壤에 대한 mycorrhizae 分布를 浮上分離法에 의해서 胞子密度(胞子數/100g 土壤)를 測定하여 알아보았고, 採取한 土壤試料로부터 細菌과 糸狀菌을 Potato-dextrose agar-calcium phosphate (PDA-P) 培地에서 純粹培養하여 磷酸갈슘을 溶解하는 것들을 選拔하였다. 이 중에서 糸狀菌만을 200 mg 粉末 磷鑛石이 들어있는 液

體培地에서 1주일 동안 培養시킨 후 磷酸溶解能力을 測定하였다.

1. Mycorrhizae의 分布程度는 濟州市 三陽洞의 6年生 柑橘園場에서 土壤 100g當 456個의 胞子が 18年生에서는 385個의 胞子が 觀察되어 조사지역중 제일 큰 값이었으며 서귀포시 토평동(1)(2)의 7年生 柑橘園場은 土壤 100g當 256個의 胞子が, 21年生의 土壤에서는 166個의 胞子が 觀察되어 이는 他地域에 비해 가장 낮았다. 同一地域의 圃場에서는 老樹일 수록 胞子密度가 減少하였다.

2. PDA-P 培地에 7日間 培養한 細菌의 colony 반경은 4mm-11mm이었고 halo 반경은 6mm-22mm로 나타났으며 糸狀菌의 경우는 colony반경이 8mm-12mm, halo 반경은 14mm-18mm이었다.

3. PDA-P 培地로부터 選拔된 糸狀菌을 磷鑛石 粉末 200mg이 들어있는 液體培地에서 7日間 培養시켰을 때에 磷鑛石으로 부터 溶解된 可溶性 磷酸量은 0.46~2.64mg P₂O₅이었다.

參 考 文 獻

1. Jackson, N. E., Frankin, R. E. and Miller, R. H., 1972; Effects of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizae on Growth and Phosphorus Content of Three Agronomic Crops, Soil Science Society of America Proceedings, Vol.36 No.1:64.
2. Ross, J. P., 1971; Effect of Phosphate Fertilization on Yield of Mycorrhizal and Non-Mycorrhizal Soybeans, Phytopathology, Vol. 61 No.11:1400.
3. Sperber, J. I., 1958; Solution of Apatite by Soil Microorganisms Producing Organic Acids Aust. J. Agr. Res. 9:782.
4. Subba Rao, N. S., Advances in Agricultural Microbiology: 305-360.
5. 農業技術研究所, 1976; 濟州道 精密土壤圖.