

최            종  
연구 보고서

신소재 및 미생물을 이용한 환경조화형  
고효율 신형비료 개발

Development of sustainable high-efficient fertilizer  
using new materials and microorganism.

연구 기관  
서울대학교

농림부

## 신소재를 이용한 환경조화형 비효조절 비료 개발에 관한 연구

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “신소재 및 미생물을 이용한 환경조화형 고효율 신형비료 개발에 관한 연구” 과제 (세부과제 “신소재를 이용한 환경조화형 비효조절 비료 개발에 관한 연구”)의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12.

주관연구기관명: 서울대학교

총괄연구책임자: 임 선 옥

협동연구기관명: 선문대학교

협동연구책임자: 류 광 경

연 구 원: 송 정 섭

연 구 원: 박 성 혜

연 구 원: 이 계 중

연 구 원: 김 창 속

연 구 원: 차 지 환

연 구 원: 박 희 진

## 요 약 문

### I. 제목

신소재를 이용한 환경조화형 비효조절 비료 개발에 관한 연구

### II. 연구개발의 목적 및 중요성

급속한 경제성장과 인구의 도시 집중 그리고 농산물의 수입개방 등으로 우리의 농업여건이 크게 변화되고 있고 이와 같은 현상은 금후 더 심화되리라고 생각된다. 종전의 우리 농업시책이 식량 자급을 위해 다비에 의한 최대 수확을 추구하였으나, 오늘의 농정 기본 방향은 저비용에 의한 적정 생산과 소비자가 선호하는 고품질의 농산물 생산으로 대폭 전환되고 있다.

다수확을 추구하는 과정에서 비료의 장기간 과다 사용은 토양 생산성의 감퇴, 작물 수량의 감소 및 품질의 저하 등의 부작용을 초래하기도 했다. 특히, 다량의 질소와 인산 비료의 사용은 유실되는 비료 성분량을 증대시켜 하천 등 지표수의 부영양화와 지하수의 오염을 초래하는 결과를 가져오고 있다. 인구 증가와 산업의 발달에 따른 지표수 이용율의 증대에 따라 이러한 부영양화 현상은 매우 심각하며, 최근의 근해 적조현상 등은 부영양화된 지표수의 유입이 그 한 원인으로 생각되고 있다. 따라서, 비료의 생산비 부담이나 시용에 따른 노동력 절감에 더하여 환경보전적 영농 시스템을 지향해야 하는 시점에서 이러한 방향에 부합하는 새로운 형태의 비료 즉 고효율 완효성 비료의 개발은 매우 절실하다. 특히 우리나라 토양은 유기물 함량 및 양분보존능력이 낮아 질소의 이용률이 낮기 때문에 기비 1회 시용으로 작물재배가 가능하며, 양분의 유실이 적어 양분이용률을 높일 수 있고, 작물의 종류에 따라 양분이 적절히 용출될 수 있는 비료를 개발함으로써 농촌 노동력의 고령화, 여성화에 따른 노동력 감소, 겸업 농가의 증대, 농업 인건비의 상승 등에 적절히 대처할 수 있을 것이다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

완효성 비료에 대한 연구는 작물의 양분 요구량에 알맞게 방출되는 형태의 비료 개발에 그 목적을 두고 있으며, 이는 비료 이용률의 극대화를 통한 농업 생산량의 극대화 즉 수량, 품질, 미관, 안전성, 그리고 노동력 감소 (비료 시용 횟수의 감소)를 의미하며, 유실량의 최소화에 따른 환경 오염의 경감에 그 중요성이 있다. 특히 기존의 피복물질이 지니는 난분해성 및 환경 오염성을 극복할 수 있는 새로운 고분자 시스템을 합성하여 이를 질소 비료에 피복시키고, 고분자가 갖는 고유의 분해성에 의하여 비효를 조절할 수 있는 환경 친화형 완효성 비료의 개발이야말로 최근에 사회 문제화 되고 있는 환경오염과 농업 생산성의 저하에 대한 해결책이 될 수 있다.

본 연구에서는 고분자 피복 소재가 토양중에서 미생물에 의하여 쉽게 분해되고, 분해생성 중간체가 생물에 대해 안전하며, 최종적으로는 CO<sub>2</sub> 및 H<sub>2</sub>O로 완전 분해됨으로써 환경오염을 전혀 일으키지 않는 환경 친화형 완효성 비료의 개발을 목표로, 질소반응 제품과 고분자 피복제품 중에서 국내외 특허관계에 의하여 제약을 받지 않는 새로운 고분자 시스템을 합성하고, 이를 과립형 질소비료에 피복함으로써 고분자가 자체적으로 지니는 분해성(생분해 포함)에 의하여 비효를 조절할 수 있는 비료의 개발에 주안점을 두고 있다. 또한 고분자의 분자량과 피복두께를 조절함으로써 작물의 생육주기에 알맞게 비료성분의 용출속도를 제어할 수 있어야 하며, 이러한 완효성 비료의 제조와 운송, 저장을 용이하게 할 수 있도록 적절한 물성 (용융점도, 열안정성, 기계적 강도 등)을 지녀야 한다. 이를 위하여 새로운 고분자 시스템인 ureaform 형태의 고분자를 새로 합성하여 사용하거나, 생분해성을 갖는 것으로 추정되는 1-nylon 시스템을 도입한다. 1-nylon은 잘 알려진 고분자 시스템은 아니나 합성이 용이하고 이의 물성 또한 알려져 있다. 또한 생분해성이 용이한 구조를 포함하고 있기 때문에 비료의 피복재료로 최선의 물질중 하나이다. 특히 저온 음이온 중합으로 중합방법에 따라 분자량의 조절이 용이하기 때문에 기계적 물성 및 비료에 피복되었을 때 완

효성의 조절이 원활히 이뤄질 수 있는 소재이다.

또한 비료의 피복물질은 시비 후 일반적으로 토양중에 매립된 형태로 존재하기 때문에 토양중의 박테리아에 의해 2 ~ 6개월내에 완전 분해가 가능하며, 비교적 가격이 저렴한 고분자 물질로는 polyester계와 blended polyolefin계 (즉, starch나 cellulose와 같은 생분해성 고분자 물질과 polyethylene 등과의 blending 혹은 grafted된 제품)중에서 국내에서 가장 상업화하기 쉬운 조건을 갖추고 있는 aliphatic polyester를 실험실적 방법으로 측정합하고, 이를 이용하여 시판중인 요소비료를 피복하였다.

피복방법은 피복재료를 적절한 유기용매에 녹인 후, 비료인 코아부분이 외부와 접촉되지 않도록 5~20 중량%를 코팅한다. 이 고분자 피복비료는 가장 기술적으로 진보된 것으로 현재는 alkyd계열의 고분자를 주로 사용하며, 피복되어진 완효성 비료에서의 비료성분의 용출은 물이 고분자 피막을 투과하는 정도 및 속도에 의하여 조절된다. 하지만 본 연구에서 사용되는 aliphatic polyester나 1-nylon은 물 분자가 고분자 피막을 투과하여 비료성분이 용출되는 메카니즘 이외에 고분자 피복자체가 토양 박테리아에 또는 수분에 의하여 분해될 수 있는 생분해성을 지닌 것이므로, 환경오염을 유발하지 않고도 충분한 완효성을 부여하여 비료의 효율을 최대화할 것으로 기대된다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

합성된 고분자 물질들은 생분해성이 있는 것으로 파악된 것이어서 본 연구에서는 주로 고분자의 분자량, 피복두께, 고분자 시스템에 따른 실제 토양중에서의 완효성을 측정하였다. 피복실험에서는 고분자 물질을 용해시키는 데 사용되는 유기용매의 비등점이 적어도 80°C 이상이 되어야만 피복이 균일하게 이루어지는 것을 알 수 있었으며, fluidized-bed를 사용한 결과 원하는 피복비료를 얻을 수 있었다. 피복된 비료는 피복량에 비례하여 비효성분의 용출기간이 달라지며 피복량이 18.4중량%를 초과할 경우에는 피복량에 관계없이 용출기간이 비슷함을

알 수 있었다.

피복비료의 상업적 적용을 위하여는 피복재료의 가격과 피복방법에 따른 비용의 최소화에 따른 저렴한 비료의 공급이 필수적이다. 본 연구에서 합성되어 피복에 사용된 고분자 물질이 기존 비료에 대하여 경쟁력을 갖기 위해서는 최대 피복량이 8중량%이하가 되어야만 한다. 현재 water vapor permeability가 낮은 고분자 재료와의 blending을 통한 제조원가의 절감 및 reacted layer technology를 사용하여 피복량을 줄일 수 방안을 추진 중에 있으며, 향후 비료 생산회사와 연계하여 상업화 방안을 모색기로 하였다.

## SUMMARY (영문요약문)

Coated fertilizers represent the fastest growing segment of controlled release fertilizer (CRF) technology. The coating technologies allow perfect coating of fertilizer particles with various polymeric materials, such as polyolefins, polyvinylidene-chloride based latex, and sulfur containing plastics, etc. The flexibility of nutrient release rate and a favorable cost/value equation has also promoted much R&D reactivity in the area of coated fertilizers. However, most plastic materials are not decomposed in environment, and the effects of abandoned plastics on environment can no longer be ignored. Polymeric membranes, used as coatings for CRFs, may accumulate with repeated applications and eventually pollute the soil. The CRF coating is about 20% by weight. The annual load of those organic polymers is thus about  $10\text{g}/\text{m}^2$ , assuming a fertilizer application rate of  $50\text{g}/\text{m}^2$ . Therefore, biodegradable plastics, which are decomposed by microorganism in the soil and water, have been attracting much attention.

This study was undertaken in order to develop new biodegradable coating materials and to evaluate the rate of nutrient release.

Polyhexylisocyanate was produced by low-temperature anionic polymerization and two aliphatic polyesters were prepared by a reduced pressure polymerization process in which dimethyl succinate and 1,2-butanediol were polymerized via polycondensation mechanism. The physical properties of resulting polymers were controlled by chain-extension reactions with hexamethylene diisocyanate (Scheme I, II, and III).

CRF was then prepared by application of a solvent dispersed biodegradable



plastics, such as polyhexylisocyanate and aliphatic polyesters, to fertilizer granules by a method similar to spray painting. The product had coatings which were very uniform in thickness and essentially defect-free (Fig. 21). As a result, virtually all of the nutrient release was by diffusion through the film membrane. Water vapor first diffuses through the polymeric film at a rate dictated by the properties of the polymer and the temperature. Once in contact with the fertilizer core and the core is solubilized. As the pressure increased, dissolved urea begins leaking to the outside of the coated granules (Scheme IV).

The rate of nutrient release from CRF can be controlled by the coating thickness as represented in tables 5 and 6. For instance, the time required to release 80% of urea from coated-urea granules in water at 25°C was 90 days if fertilizer particles were coated with 18wt% aliphatic polyester. while the some release rate was 2 days if the granules were coated with 5wt% polyester.

CONTENTS  
(영문목차)

	page
I. Introduction	I-9
II. Materials and Methods	I-14
1. Synthesis of Coating materials	I-14
2. Preparation of polymer-coated urea	I-20
3. Evaluation of nutrient release from the coated urea	I-23
III. Results and Discussion	I-24
IV. References.	I-29
V. Appendix	I-30

## 제1장 緒論

농산물 수입자유화에 따라 우리의 농업은 현재의 소규모 생산 단위 등 전통적인 시비 관행 등의 영농 시스템으로는 도저히 경쟁력을 가질 수 없을 것이며, 농지를 임대로 한 영농회사의 형식이나 협동 경영의 방식으로 경영 단위를 대규모화하여 생산성을 높여야 할 것이다. 비료의 종류나 사용방법도 따라서 변해야 하고, 비료에서 오는 생산비 부담도 가능한 한 줄이도록 연구되어야 할 것이다. 면 단위 농협에서 비료 대금이 1억이 넘는 경우가 있듯이 비료의 생산비 부담 비율이 상당히 크다. 미국과 같이 대규모 영농체계에서 보면 질소의 경우 액체 암모니아를 사용하고 있는데, 비료 제조 가격에 있어서나 시용 비용에 있어서 가장 값이 싸기 때문일 것으로 생각된다. 농업 생산력이 약화되면 그만큼 국내 비료 소비량은 적어지게 될 것이다. 원료 공급자들은 소비자들이 가장 싼 비용으로 원료를 쓸 수 있도록 원료 단가를 낮추도록 원료를 발전시켜야 한다. 비료는 필수 영농자재이므로 이러한 개선 없이는 21세기 우리 농업은 문을 닫지 않을 수 없을 것이다.

급속한 경제성장과 인구의 도시 집중 그리고 농산물의 수입개방 등으로 우리의 농업여건이 크게 변화되고 있고 이와 같은 현상은 금후 더욱 심화되리라고 생각된다. 종전의 우리 농업시책이 식량 자급을 위해 다비에 의한 최대 수확을 추구하였으나, 오늘의 농정 기본 방향은 저비용에 의한 적정 생산과 소비자가 선호하는 고품질의 농산물 생산으로 대폭 전환되고 있다.

다수확을 추구하는 과정에서 비료의 장기간 과다 사용은 토양 생산성의 감퇴, 작물 수량의 감소 및 품질의 저하 등의 부작용을 초래하기도 했다. 특히, 다량의 질소와 인산 비료의 사용은 유실되는 비료 성분량을 증대시켜 하천 등 지표수의 부영양화와 지하수의 오염을 초래하는 결과를 가져오고 있다. 인구 증가와 산업의 발달에 따른 지표수 이용률의 증대에 따라 이러한 부영양화 현상은 매우 심각하며, 최근의 근해 적조현상 등은 부영양화된 지표수의 유입이 그 한 원인으로 생각되고 있다. 따라서, 비료의 생산비 부담이나 시용에 따른 노동력 절감에 더하여 환경

보존적 영농 시스템을 지향해야 하는 시점에서 이러한 방향에 부합하는 새로운 형태의 비료 즉 고효율 완효성 비료의 개발은 매우 절실하다.

완효성 비료는 그 원리상으로 질소 반응 제품 형태와 피복 제품 형태로 대별된다. 질소 반응 제품 형태란 요소나 암모니아와 같은 화학적 수용성 질소 화합물을 더욱 복잡한 분자구조를 갖는 질소 화합물로 합성하여 토양 중에서 제한적인 용해도를 갖게 하여 서서히 분해되어 식물에 흡수, 동화될 수 있게 만드는 것으로 이 제한된 용해도와 분해 속도가 식물 생육에 대한 질소의 유효도를 조절하는 것이다.

피복 제품 형태는 용해성 비료 성분이 불용성 피막으로 피복되어 비료성분이 물과 접촉되는 것을 제한함으로써 용해속도를 조절하는 제품으로, 유황피복 비료와 고분자 물질 피복비료가 있다. 지금까지 연구되어진 고분자 물질 피복재료로는 대표적으로 polyvinylidene-chloride계, polyolefin계, polyurethane계 등이 있으나 고분자 물질 자체가 지니는 난분해성 및 환경 오염성으로 인하여 점차 사용이 규제되고 있는 실정이다. 또한 경제성 때문에 특수한 작물의 재배에 국한되어 소량 사용되고 있지만, 작물의 생장 시기에 적절하게 맞추어 비료 성분의 용출 속도를 조절할 수 있는 기술등이 미비한 실정이다.

속효성 비료를 물에 녹지 않는 재료로 피복하여 비료 성분의 용출을 제어함으로써 비효의 지속화를 시도한 것은 1960년경부터이며 우리나라에서는 수원농업기술연구소에서 1970년대에 시험 생산한 바 있다.

완효성 비료의 장점은

첫째, 작물의 생육시기에 알맞게 양분을 공급하여 작물이 건전하게 생육함으로써 수량이 높다.

둘째, 비료성분의 용출을 제어함으로써 비료의 이용률이 향상되어 시비량이 감소된다.

셋째, 비료 성분이 효율적으로 용출, 흡수되어 성분의 유실이 적으므로 수질오염이 방지된다.

넷째, 시비 회수를 감소하여 생력재배가 가능하다.

다섯째, 멀칭재배시는 이작 일회 전량 기비로 시용함으로써 생력과 자재의 절감에 기여한다.

여섯째, 축조시비 등 기계시비에 적합하다.

일곱째, 하우스 재배 등 원예 작물 재배지에 있어서 염류집적을 예방한다.

상기와 같은 특성을 갖는 피복비료를 개발하는 데 있어서는 용출을 억제하는 방법과 용출속도를 제어하는 기술, 온도 의존성을 조정하는 기술 등이 연구 개발되어야 한다. 용출을 억제하는 방법으로는 흡습성이 없는 재료를 사용하여 균일한 막으로 피복하는 것이 필요하며, 피막은 유통중에 안정성이 있어야 하기 때문에 유연성을 갖추어야 한다. 이와 같은 조건에 부합되는 재료로는 열가소성 수지로서 Polyolefin계 수지 또는 염화 Vinylidene계 수지가 추천되나 앞에서 언급한 바와 같이 수지 자체가 지니는 난분해성 및 환경 오염성으로 인하여 점차 사용이 규제되고 있는 실정이다.

용출속도는 피막에 형성된 pin hole을 통하여 water vapor가 피복 비료 내부로 침입되게 함으로써 조절된다. water vapor 투과성이 전혀 없는 막으로 피복하였을 때는 비료는 거의 용출되지 않는다. 또한, 피복 비료의 경시적 용출량은 온도 조건에 영향을 받으므로, 될 수 있는 한 온도 의존성이 없는 재료로 피복하여야 하며, 온도 의존성에 관여하는 주요 인자로는 수증기압차, film의 투습계수 및 비료 용액의 확산정수이다. 피복재질이나 피복구조에 따라 수증기 투과성이 다르므로 피복 물질의 선택이 중요하다. 기존 개발된 피복 재질이나 피복 기술로 생산된 피복 비료의 경우 2~3배의 가격 상승으로 경제성에 문제가 생긴다. 따라서 저가의 피복 재질이나 피복 기술의 개발은 매우 필요하다.

모든 산업이 그러하듯이 비료사업도 국내 시장만을 상대로 할 수 없고, 세계가 하나인 시대에 맞게 세계시장을 대상으로 해야 할 것이다.

삼요소에 대한 세계 추세를 살펴보면 1987/88년도에 세계 비료소비량이 6% 증가

했으며, 아시아 태평양지역의 발전도상국에서 가장 급속한 소비를 보였다. 1976년에서 1987년까지 아시아의 비료 소비는 경작면적의 증대로 연간 9%씩 증가하였으며, 여타 세계 평균 소비 증가율의 약 5배에 해당하는 것이었다.

풍부하고 값싼 천연가스 공급이 있는 나라들은 질소비료 생산에 박차를 가해왔으나, 천연가스 가격차의 축소로 그 속도는 늦추어질 것이다. 1987/88에서 2000/01년 사이에 질소 비료의 세계 생산량은 연간 3%씩 증가할 것으로 보고 있다. 아시아와 라틴아메리카에서의 증가는 자국내 소요량을 위해서이고 중동의 생산량 증가는 주로 수출용일 것이다. 1987/88년도 아시아의 발전 도상국들만에서 세계 질소비료 소비량의 30%였으며, 세계 총생산량의 20%였다. 인산비료의 급속한 소비가 개도국에서 예측되는데 비율이 1987/88의 37%에서 2000/01에는 44%로 증가할 것이다. 아시아 농민은 세계 인산비료의 26%를 사용했으나 19%를 생산하였다. 한편, 칼리는 1987/88년도에 세계 소비량의 6%를 접했다.

삼요소외 아시아 개도국의 수요공급 예측치를 보면 질소, 인산, 칼리 모두 상당히 부족하다. 우리나라에서는 완효성 질소질 비료의 제조방법 등의 연구가 바람직하고, 인산, 칼리는 원료가 없는 만큼 이들을 세계 각국의 토양이나 작물의 특성에 맞도록 비료를 절약하면서 생산효율을 극대화할 수 있는 비료의 제형 연구에 힘을 써야 할 것이다. 국제 비료 시장의 개척은 원료의 일차 가공에 끝나서는 안되며, 상당히 고도의 기술이 필요한 효율 증대 제품을 개발하는 데 있다.

공업의 발전은 여러 면에서 공해를 일으키고 생태계 파괴의 위험이 커 가고 있다. 비료의 과다사용-특히 질소비료-은 생태계를 교란시킬 염려가 있으며, 현재 많은 하천과 저수지, 댐 등의 지표수가 부영양화 현상을 보이고 있다. 시비된 요소는 암모니아화 작용으로 암모니아와 이산화탄소로 가수분해되며, 암모니아는 질산화균에 의해 아질산을 거쳐 질산으로 산화되고, 질산 이온은 탈질 작용에 의해  $N_2$ 나  $N_2O$ 의 형태로 대기에 휘산된다. 질산화 과정에 의해 생성된 질산 이온은 토양 교질물에 흡착이 잘 되지 못하고 용탈되어 지하수를 오염시키며, 지하수중의 과다한 질산은 청색증을 유발한다. 또한, 탈질에 의해 생성된  $N_2O$ 는 성층권의 오존을

파괴한다.

따라서 이런 문제를 줄이거나 피할 수 있는 시비법 또는 완효성 질소질 비료의 개발 그리고 적은 양의 시비로 최대의 효율을 거둘 수 있는 토양 미생물의 이용 기술 개발이 필요하다. 특히 우리나라 토양은 유기물 함량 및 양분보존능력이 낮아 질소의 이용률이 낮기 때문에 기비 1회 시용으로 작물재배가 가능하며, 양분의 유실이 적어 양분이용률을 높일 수 있고, 작물의 종류에 따라 양분이 적절히 용출될 수 있는 비료를 개발함으로써 농촌 노동력의 고령화, 여성화에 따른 노동력 감소, 겸업 농가의 증대, 농업 인건비의 상승 등에 적절히 대처할 수 있을 것이다.

완효성 비료에 대한 연구는 작물의 양분 요구량에 알맞게 방출되는 형태의 비료 개발에 그 목적을 두고 있으며, 이는 비료 이용률의 극대화를 통한 농업 생산량의 극대화 즉 수량, 품질, 미관, 안전성, 그리고 노동력 감소 (비료 시용 횟수의 감소)를 의미하며, 유실량의 최소화에 따른 환경 오염의 경감에 그 중요성이 있다. 특히 기존의 피복물질이 지니는 난분해성 및 환경 오염성을 극복할 수 있는 새로운 고분자 시스템을 합성하여 이를 질소 비료에 피복시키고, 고분자가 갖는 고유의 분해성에 의하여 비효를 조절할 수 있는 환경 친화형 완효성 비료의 개발이야말로 최근에 사회 문제화 되고 있는 환경오염과 농업 생산성의 저하에 대한 해결책이 될 수 있다.

본 연구에서는 고분자 피복 소재가 토양중에서 미생물에 의하여 쉽게 분해되고, 분해생성 중간체가 생물에 대해 안전하며, 최종적으로는 CO<sub>2</sub> 및 H<sub>2</sub>O로 완전 분해됨으로써 환경오염을 전혀 일으키지 않는 환경 친화형 완효성 비료의 개발을 목표로, 질소반응 제품과 고분자 피복제품 중에서 국내외 특허관계에 의하여 제약을 받지 않는 새로운 고분자 시스템을 선정하고, 이를 과립형 질소비료에 피복함으로써 고분자가 자체적으로 지니는 분해성(생분해 포함)에 의하여 비효를 조절할 수 있는 비료의 개발에 주안점을 두었다.

## 제2장 實驗 方法

### 제1절 被覆材料의 合成

#### 1) Urea-polymer 合成(sebacoyl chloride + urea)

Monomer인 urea는 55°C 항온조에서 물에 녹여서 포화용액을 제조한 후 감압 여과한다. 감압 여과한 용액을 55°C 항온조에서 다시 한번 용해시킨다. 이 용액을 상온에서 하루정도 방치하면 용액 안에 urea결정이 생성되며, 감압 여과한 후에 vacuum distillation을 하여 정제한다.

sebacoyl chloride와 urea를 이용하여 계면중합으로 polymer를 합성한다. 그 방법은 다음과 같다. 2L 삼각 플라스크에 물 500mL와 urea 16.8g를 잘 혼합한다(①용액). 증류하여 정제한 carbon tetrachloride 300mL와 sebacoyl chloride 59.2mL를 잘 혼합한다(②용액). ①용액에 dropping funnel을 이용하여 ②용액을 한 방울씩 떨어뜨리면서 교반을 하여 준다. ①과 ②용액의 계면에서 하얀 색의 고분자가 생성된다(③용액). ③용액을 감압 여과한 후에 생성된 하얀 색의 고분자는 vacuum에서 건조한다.

고분자의 구조를 알기 위하여  $^1\text{H-NMR}$ 과  $^{13}\text{C-NMR}$ , FT-IR를 측정하였다. 또한 분자량과 밀접한 관련이 있는 점도를 알기 위하여 고분자를 용매인 tetrahydrofuran에 녹여서 농도를 3가지의 종류(0.025g/mL, 0.05g/mL, 0.1g/mL)로 만든 후에, Ubbelohde viscometer를 이용하여 고분자의 점도를 측정하였다.

합성된 urea-polymer의 양: 52.3g

$^1\text{H NMR}$  (in DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  10.81-10.04(br, N-H), 2.19(m, C(=O)CH $_2$ -),  
1.50(m, CH $_2$ ), 1.26(CH $_2$ )

$^{13}\text{C NMR}$  (in DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  170.38(C(=O)), 29.60(C(O)CH $_2$ ), 24.59, 24.48,  
20.43(CH $_2$ )

IR (film):  $\nu$  (N-H) = 3310 $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu$  (C=O) = 1690 $\text{cm}^{-1}$

intrinsic viscosity( $[\eta]$ ) = 3.328



conc.(g/ml)	$\eta_r$	$\eta_{sp}(\eta_r-1)$	$\eta_{sp}/\text{conc.}$
0.025(g/ml)	1.0925	0.0925	3.6990
0.050(g/ml)	1.2152	0.2152	4.3040
0.100(g/ml)	1.5046	0.5046	5.0460

$\eta_r$ : relative viscosity

$\eta_{sp}$ : specific viscosity

<표 1> Viscosity Data of sebacoyl chloride-coated urea

< $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , FT-IR, DTA Data는 별첨>

## 2) Polyhexylisocyanate의 합성

Monomer인 n-Hexylisocyanate를 합성하는 방법은 삼각 플라스크에 물 150mL와 Sodium azide 50g를 혼합한 후에 Cyclohexane을 교반하여 준다(①용액). 얼음물에 ①용액이 들어 있는 삼각 플라스크를 잠기게 한 후에 dropping funnel에 Heptanoyl chloride와 Acetone을 혼합한 용액을 한 방울씩 떨어뜨린다. Dropping funnel에 들어 있는 용액을 전부 떨어뜨린 후에도 5°C를 유지시켜 주면서 교반하여 준다(②용액). ②용액을 분별 깔대기에 옮기면 두 층으로 분리가 되는데 물 층은 버리고 유기층을 사용한다(③용액). ③용액에 anhydrous Magnesium sulfate를 넣어 5°C에서 보관하고, 그 다음에 감압 회전증발기를 사용하여 Cyclohexane과 Acetone을 날려보낸 후에 합성된 n-Hexylisocyanate는 vacuum distillation을 한다. FT-IR과  $^1\text{H-NMR}$ 로 합성된 n-Hexylisocyanate의 구조를 확인하고 -30°C에서 보관한다.

Polyhexylisocyanate를 합성하는 방법은 3구 환플라스크에  $\text{N}_2$  gas를 계속 흘려 보내면서 3구 환플라스크의 내부를 질소분위기 상태로 유지하면서 flame-dry를 하고 난 다음에, mechanical stirrer를 150rpm 정도의 속도로 계속 교반하면서 3구 환플라스크에 N,N-Dimethylformamide 20mL를 넣는다. Dewar flask에 Acetone과 dry ice를 혼합하면 온도는 -78°C가 되도록 하고 여기에 N,N-Dimethylformamide가 들어 있는 3구 환플라스크를 장치한 다음, n-Hexylisocyanate 10mL를 3구 환플라스크에

넣는다. Sodium cyanide와 N,N-Dimethylformamide 포화용액(initiator 역할)을 만든 후에 1ml 주사기를 사용하여 한 방울씩 떨어뜨려 주면서 관찰하여 고분자가 형성되기 시작하면 initiator의 주입을 중단하고 약 2시간 정도 반응을 더 시킨다.

점도가 있는 하얀 색의 용액이 생성되면 Acetyl chloride 3mL를 넣어주어 반응을 종결시키고, Methyl alcohol 100mL를 첨가한 후에 고분자가 포함되어 있는 용액을 감압여과를 하면 polymer를 생성된다. 생성된 Polyhexylisocyanate를 정제하기 위하여, Toluene을 조금씩 넣어주면서 교반하여 점도가 있는 용액으로 만든 다음에 Methyl alcohol을 다량 첨가하여 Polyhexylisocyanate를 침전시키고, 이를 감압여과한 다음에 얻어진 Polyhexylisocyanate는 vacuum dry를 한다.

합성된 Polyhexylisocyanate 고분자의 구조를 알기 위하여 FT-IR을 측정하였다. 또한 점도를 알기 위하여 고분자를 용매인 toluene에 녹인 후에, Ubbelohde viscometer를 이용하여 고분자의 점도를 측정하였다.

합성된 urea-polymer의 양: 8.7g

IR (film):  $\nu(\text{C=O}) = 1697\text{cm}^{-1}$

intrinsic viscosity( $[\eta]$ ) =  $4.752 \times 10^2$

conc.(g/ml)	$\eta_r$	$\eta_{sp}(\eta_r-1)$	$\eta_{sp}/\text{conc.}$
0.00051(g/ml)	1.4431	0.4431	868.885
0.00073(g/ml)	1.7386	0.7386	1011.716
0.001005(g/ml)	2.2474	1.2474	1241.209

$\eta_r$ : relative viscosity

$\eta_{sp}$ : specific viscosity

<표 2> Viscosity Data of Polyhexylisocyanate

<FT-IR, DTA Data는 별첨>

### 3) Esterification of Dimethyl esters

#### ① 1,4-butanediol과 dimethyl succinate의 반응

1,4-butanediol (396.53g, 4.4 mol)을 잘 건조된 1L reaction kettle (별첨 참조)에 주입한다.  $Zn(OAc)_2$  (0.26g, 1.18mmol) 및 dimethyl succinate (292.28g, 2.0 mol)를 반응기에 넣은 후, 온도를 올리기 시작한다. 이때 교반속도는 650rpm을 유지하며, 반응기 내부온도가 150℃가 되면 methanol과 tetrahydrofuran(THF)의 유출이 시작된다. 온도를 서서히 증가시켜 반응기 내부온도가 190℃정도가 되도록 하여 4시간동안 반응시키면, 352g의 methanol/THF가 유출된다. methanol/THF의 유출이 끝나면, 온도를 200℃로 올려 30분간 더 반응시킨 후, 반응장치를 풀고 반응물을 미리 만들어둔 형틀에 부어 냉각시키면, 흰색 고체의 oligomer(327.80g)가 얻어진다. 반응온도가 200℃가 넘을 경우에는 탄화현상이 생기면서 생성물의 색이 변하므로 온도조절에 유의한다.

#### ② 1,4-butanediol과 dimethyl adipate의 반응

1,4-butanediol (396.53g, 4.4 mol)과 dimethyl adipate (348.40g, 2.0 mol)의 반응도 앞에 기술한 ①에서와 같은 방법으로 진행되었다. 그렇지만 ①에서와는 달리 distillates가 195℃에서 유출되기 시작하였으며, 6시간 동안 205℃에서 반응시켜 얻어진 distillates (122.50g)를 제거한 다음, 반응기를 aspirator에 연결하여 반응하지 않은 1,4-butanediol (115.12g)을 증류해 제거하였다. 남아 있는 반응물을 형틀에 부어 냉각시키면, 흰색 고체의 oligomer(467.91g)가 얻어지는 데 ①에서 얻어진 oligomer보다 녹는점이 낮다.

#### ③ ethylene glycol과 dimethyl succinate의 반응

ethylene glycol (273.11g, 4.4 mol)과 dimethyl succinate (292.40g, 2.0 mol)의 반응 역시 ①에서와 같은 방법으로 진행되었다. 반응기 내부온도가 130℃가 되면 distillates (65~90℃)의 유출이 시작되며, 4시간에 걸쳐 185.23g의 distillates가 제거되었다. 연한 갈색의 점성이 큰 oil (364.11g)이 얻어진다.

#### ④ ethylene glycol과 diethyl malonate의 반응

ethylene glycol (273.11g, 4.4 mol)과 diethyl malonate (320.34g, 2.0 mol)를 ②에서와 동일한 방법으로 반응시켜 무색의 점성이 큰 oil (317.34g)을 얻었다.

#### 4) Polycondensation 및 Chain Extension

##### ① 1,4-butanediol/dimethyl succinate (1,4-BD/DMS)

esterification반응을 통하여 얻은 oligomer (400g)를 잘게 분쇄한 다음 교반장치 부속된 중합반응기 (별첨 참조)에 넣는다. 반응기내를 질소로 완전히 치환한 후, 중합촉매로서  $Ti(OPr^i)_4$  (0.15mL, 0.5 mmol)를 가하고 온도를 올린다. 온도 70°C 부근에서 oligomer가 녹으면 교반을 시작하고, 교반속도를 300rpm으로 조절한다. 온도와 진공도를 약 30분간에 걸쳐 각각 230°C, 1mmHg에 맞추고 4시간동안 반응시킨 다음, 반응기내를 질소로 재충전하고 온도를 150°C로 조절한다. 여기에 hexamethylene diisocyanate (3.0mL, 18.5 mmol)을 가한 후, 1시간동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후, 반응기에 질소로 압력을 가하여 점도가 높은 polyester를 토출시켜 물이 담긴 통을 통과하도록 하여 냉각시킨 다음, 생성된 흰색고체의 polyester를 회수하였다. 생성된 aliphatic polyester의 고유점도와, 열적 성질,  $^1H$  및  $^{13}C$  NMR 등을 측정하였다.

##### ② 1,4-butanediol/dimethyl adipate (1,4-BD/DMA)

위에서와 마찬가지로 esterification반응을 통하여 얻은 oligomer (400g)를 잘게 분쇄한 다음 교반장치가 부속된 중합반응기에 넣고 반응을 시켰다. 1,4-BD/DMS oligomer와는 달리 온도 35°C에서 oligomer가 용해되는 것을 볼 수 있었다. 25°C, 1 mmHg에서 3시간동안 반응시킨 후, 질소로 반응기내를 충전하고, 150°C에서 1시간 동안 hexamethylene diisocyanate (3.0mL, 18.5 mmol)와 반응시켜 분자량을 증가시킨다. 반응기에 질소로 압력을 가하여 polyester를 토출시켜 물이 담긴 통을 통과하도록 하여 냉각시킨 다음, 회수된 연한 노랑색의 aliphatic polyester를 분석하였다.

##### ③ ethylene glycol/dimethyl succinate

esterification반응을 통하여 얻은 oligomer (600g)을 중합반응기에 넣고 반응기내를 질소를 치환한 후,  $Ti(OPr^i)_4$  (0.50mL, 1.7 mmol)를 가하고 250°C, 1mmHg에

서 3시간동안 반응시켰다. 다시 질소로 반응기내를 충전하고, 150℃에서 1시간동안 hexamethylene diisocyanate (5.0mL, 30.9 mmol)와 반응시켜 분자량을 증가시켰다. 반응기에 질소로 압력을 가하여 polyester를 토출시켜 물이 담긴 통을 통과하도록 하여 냉각시킨 다음, 생성된 aliphatic polyester를 회수하였다. 1,4-BD/DMS 및 1,4-BD/DMA와는 달리 생성된 polyester의 녹는점이 낮아 상온에서 액체상태였다.

## 5) Aliphatic polyester의 물성분석

### ① DSC에 의한 열분석

실험실에서 합성한 aliphatic polyester의 열적 안정성을 살펴보기 위하여 시차 주사열량계(Differential Scanning Calorimeter)를 사용하여 측정하였다. 그 결과 1,4-BD/DMS polyester의 경우  $T_m$ 이 110℃로 원하는 값을 나타내었으나, 1,4-BD/DMA polyester의 경우에는  $T_m$ 이 51℃로 비교적 낮아 피복재료로서 부적절하다고 판단된다. <별첨 DSC data 참조>

### ② Ubbelohde 점도계에 의한 고유점도측정

선형 고분자(linear polymer)의 분자량 측정에 적합한 고유점도 측정방법을 사용하여 합성된 polyester의 고유점도를 조사하였다. chloroform용매를 사용하여 측정한 결과 1,4-BD/DMS의 경우 고유점도(intrinsic viscosity)가 5.013이었고, 1,4-BD/DMA polyester의 경우에는 고유점도가 8.520으로 매우 높은 값을 나타내었다. <별첨 data 참조>

### ③ $^1\text{H}$ 및 $^{13}\text{C}$ NMR에 의한 polyester분석

Varian 핵자기 공명 분광기(300MHz)를 사용하여 polyester를 분석하였다. 1,4-BD/DMS polyester의 경우  $^1\text{H}$  NMR spectrum에서  $\delta$  4.12-4.11 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-),  $\delta$  2.64-2.63 (-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O-),  $\delta$  1.74-1.70 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)의 peak를 보여주며,  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum (CDCl<sub>3</sub>)에서는  $\delta$  167.72 (-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O-),  $\delta$  59.94 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-),  $\delta$  24.53

(-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O-), δ 20.71 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)의 peak들을 보여준다.

1,4-BD/DMA의 경우에는 <sup>1</sup>H NMR spectrum에서 δ 4.11-4.05 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), δ 2.34-2.28(-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O-), δ 1.73-1.61 (-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O- 및 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-)의 peak들을 보여주며, <sup>13</sup>C NMR spectrum에서는 δ 168.70 (-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O-), δ 59.27 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-), δ 29.30 (-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O-), δ 20.77 (-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-) 및 δ 19.83 (-OC(=O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(=O)O-)의 peak들을 나타낸다. <별첨 참조>

## 제2절 尿素肥料의 被覆

### 1) 회전식 감압 증발기를 이용한 피복실험

5g의 피복 고분자를 methylene chloride(500mL)에 용해시킨다. 요소비료(삼정 동압: 평균직경 3mm) 50g을 삼각 플라스크에 넣고 이를 회전식 감압 증발기에 장착시킨다. 20torr의 감압하에서 삼각 플라스크를 100 rpm으로 회전시키면서 위에서 만든 고분자 용액을 100mL씩 넣어준다. 이때 온도는 25°C를 유지시킨다. 용매가 모두 증발되고 나면 다시 100mL의 polyester-용액을 넣어주며, 이를 총 5회에 걸쳐 반복한다. 마지막으로 온도를 50°C로 올려 30분간 회전시키면서 남아있는 용매를 완전히 제거한다.

피복된 비료의 무게를 재어 피복된 고분자의 피복량(wt%)을 측정한 다음, 비료의 표면을 현미경을 사용하여 조사한다.

용출실험은 위에서 만들어진 피복비료 5g을 20mL의 증류수에 넣어 25°C에서 시간에 따라 용출되는 비료성분을 측정한다.

이렇게 하여 만들어진 비료의 표면을 조사하여 보면, 표면이 매끄럽지 않고 균일하게 피복되지 않은 것을 볼 수 있었다. 용매를 비등점이 비교적 높은 chloroform (61°C)로 바꾸어 사용했을 경우에도 비슷한 결과를 얻었다. 그 결과 증류수에서의 용출실험시 약 48시간이 지나면 요소성분이 완전히 용해되어 나음을 알 수 있었다.

## 2) Primer를 이용한 피복실험

위의 실험에서 극성(polarity)이 아주 큰 urea를 극성이 작은 고분자 시스템으로 직접 피복함으로써 비료표면이 불균일하게 피복되는 것을 방지하고자 여러 가지 primer를 사용하여 1차로 요소비료를 피복시킨 다음, 그 위에 polyester 혹은 poly(alkylisocyanate)를 피복시켰다.

먼저 primer로 사용되는 고분자를 적당한 용매 (별첨 참조)에 용해시켜 1 wt% 정도의 primer용액을 만든 다음, 회전식 감압 증발기를 사용하여 위에서 기술한 방법과 같이 비료를 피복시킨다. 피복된 비료의 primer 피복량을 조사하였더니 0.4 ~ 0.7 wt%였다. <별첨 참조>

primer를 사용하여 1차 피복시킨 요소비료를 다시 합성된 고분자 시스템을 사용하여 2차 피복시켰다. 2차 피복된 고분자의 피복량을 5 ~ 12.8 wt%로 변화시키면서 만들어진 비료의 표면 특성분석과 용출실험을 실시하였다. 그 결과 대부분의 비료들이 25°C 증류수중에서 48시간 내에 용해되어 나음을 관찰할 수 있었으며, 이는 회전식 감압 증발방식에 의하여 만들어진 비료에서 피복재가 비료표면을 균일하게 코팅하지 못한 결과에 기인하는 것으로 여겨진다. <별첨 사진 참조>

## 3) Multiple Dipping방법에 의한 피복실험.

10g의 고분자를 methylene chloride(100mL)에 용해시킨 다음, 요소비료를 이 용액에 담갔다가 꺼내어 용매를 상온의 air stream내에서 증발시킨다. 이때 용매를 너무 빨리 증발시키면 비료표면에 용매의 기포가 생성되므로 air의 flow rate를 조절하여 기포생성을 방지한다. 용매가 모두 증발되면, 이를 여러번 반복하여 보다 균일한 피복이 이루어지도록 한다. 피복이 끝나면 피복량을 측정하고, 광학현미경을 이용하여 피복특성을 조사한다. 그런 다음에 25°C 증류수중에서 48시간동안 방치하여 비료성분이 용출되는 가를 측정한다.

이 방법을 사용하면 비교적 균일한 피복이 된 비료를 얻을 수 있었으며, 증류수

에서의 용출실험에서도 비료성분의 유출이 관찰되지 않았다. 그렇지만 용매의 증발이 너무 빨리 일어날 경우, 미세한 기포가 표면에 존재하는 것이 관찰되었다.

<별첨 사진 참조>

#### 4) fluidized-bed 방식에 의한 피복

비등점이 낮은 Dichloromethane (b.p. 40°C)이 빠르게 휘발됨으로써 생기는 피복 면에서의 기포를 없애고, 고분자 재료에 의하여 표면이 균일하게 피복될 수 있도록 하기 위하여, polyester의 용해도는 Dichloromethane과 비슷하지만 비등점이 상대적으로 높은 1,2-Dichloroethane (b.p. 83°C)을 용매로 사용하였다. 또한 비료의 피복 방법도 개선하여 fluidized-bed type의 장치를 실험실적 방법으로 고안하여 사용하였다.

먼저 요소비료 100g을 sieve(mesh #18 ; aperture 1.0mm)에 넣고 이를 약 50°C의 air stream속에서 장치하여, 비료 알갱이들이 공기중에서 살짝 떠오르도록 한다. polyurethane 0.5g을 20ml의 1,2-dichloroethane에 녹인 용액을 primer로 사용하여 앞에서 장치한 비료 위로 천천히 살포하면서 비료표면에 골고루 피복되도록 저어준다. 이때 용액을 살포하는 속도와 공기의 온도 및 유속, 교반속도에 따라 비료 입자들이 서로 엉겨 agglomerate를 형성하거나, sieve에 달라 붙으므로 주의하여야 한다. primer의 피복이 끝나면, 전체 비료의 무게를 재어 평균 피복량을 측정한다. (본 연구에서는 0.4~0.5%의 코팅량이 측정되었다.)

primer의 피복이 끝난 비료는 다시 sieve에 넣어 air stream속에서 장치한 다음, polyester용액(10g의 polyester를 200ml의 1,2-dichloroethane에 녹인)을 사용하여 같은 방법으로 여러 번 피복시킨다. 반복코팅을 함으로써 보다 균일한 피복표면을 얻을 수가 있었고, 피복두께의 조절도 가능하였다.

피복이 끝난 비료는 완전히 건조시킨 다음 무게를 재어 피복된 polyester의 양을 측정하고, 광학 현미경을 이용하여 표면의 코팅상태를 확인한다. 그 결과 비등점이 상대적으로 높은 1,2-dichloroethane을 용매로 사용하면 비료표면의 polyester피복



에 미세한 기포가 발생하지 않고 매끄럽게 만들어짐을 알 수 있었다.

### 제3절 被覆肥料의 溶出實驗

위에서 만들어진 피복 비료는 잘 건조시킨 다음, 토양에서의 용출실험에 대한 비교실험으로서 연못에서 채취한 물(pH 6.72)을 사용하여 25°C에서 피복량 및 시간에 따른 비료의 용출량을 측정하였다.

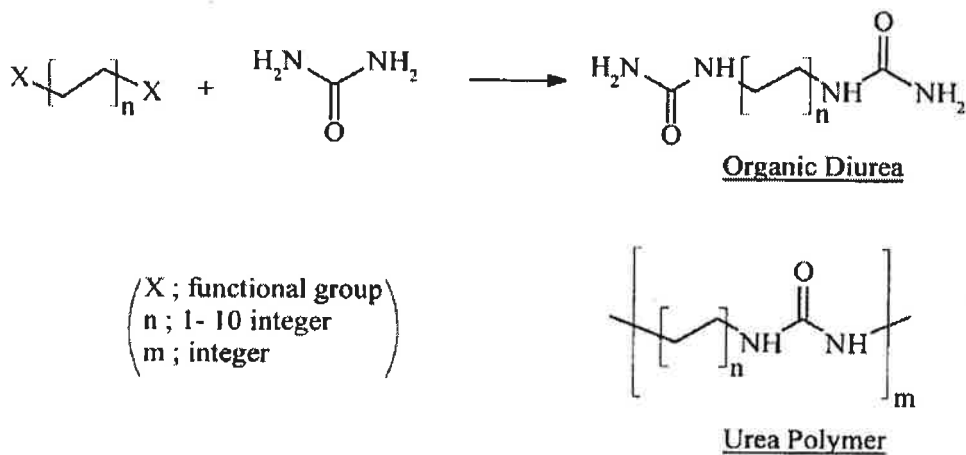
먼저 연못물을 채취하여 부유물을 침전시켜 제거한 후, 100 mL씩을 채취하여 칭량병에 넣고 여기에 실험실에서 만들어진 피복비료 10개씩을 투입한 다음, 뚜껑을 덮고 parafilm으로 다시 봉한 다음 항온조에 넣는다. 동일한 피복량을 갖는 시료에 대하여 3회에 걸쳐서 시간 및 피복량에 따른 비료 성분의 용출 정도를 측정하고, 평균값을 구한다. 실험 결과 polyester의 피복량에 따라 용출속도가 느려지는데, 피복량이 18.4%이상인 경우에는 비슷함을 보여준다. <별첨 참조>

### 제3장 結果 및 考察

앞에서 기술한 바와 같이 피복재료로서 사용되기 위해서는 비료제조와 운송, 저장을 용이하게 할 수 있도록 적절한 물성 (용융점도, 열안정성, 기계적 강도 등)을 지녀야 한다. 즉 합성된 고분자 피복재료의 녹는점( $T_m$ )이  $90^\circ\text{C}$  이상이어야 하며, 충분한 기계적 강도를 갖기 위하여 분자량이 커야만 한다.

본 연구에서는 세 가지의 고분자 피복물질이 합성되었는데 먼저 diurea 혹은 ureaform형태의 고분자 합성은 difunctional alkyl compound와 urea를 이용하여 실험 조건에 따라서 Scheme I에 나타낸 것처럼 urea compound 혹은 ureaform형태의 고분자를 합성했다. 이 고분자는 생분해성을 갖는 linear alkyl polymer를 포함하고 있으며, 동시에 urea성분을 지니고 있어 피복재료 자체에 의한 시비효과도 기대되었는데 예상한 것과는 달리 충분한 분자량을 지니고 있지 않아서(고유점도 = 3.328) 비료의 피복이 균일하게 이루어지지 않았다.

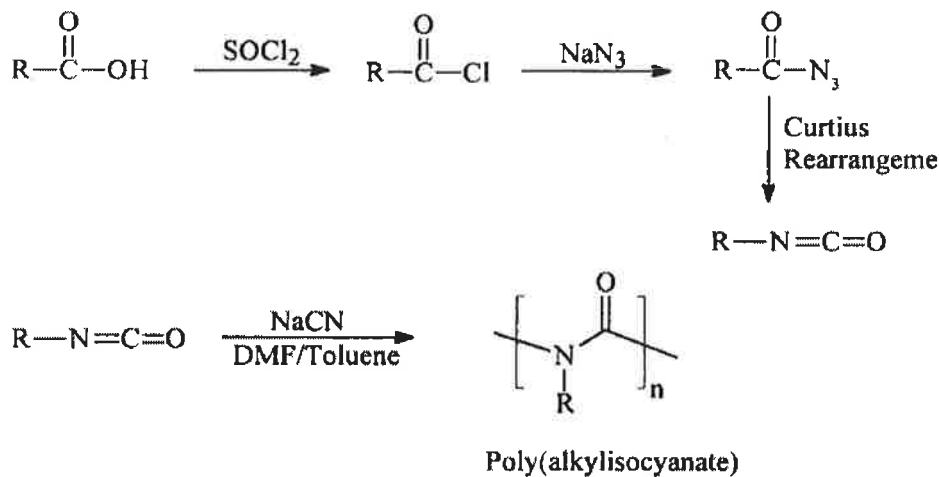
Scheme I



생분해성을 갖는 것으로 추정되는 1-nylon (Polyalkylisocyanate)은 monomer인 alkylisocyanate의 합성으로 출발하여 정제된 monomer를 이용하여 음이온 저온 중합을 실시하여 얻으며 이의 반응은 Scheme II에 정리되어 있다. isocyanate의 합

성은 1848년에 Wurtz에 의하여 처음 시도되었고, 1973에 이의 중합방법이 알려졌다. Polyalkylisocyanate는 열에 의해 분해가 쉬우며 (약 150°C), 분해는 단량체 혹은 이중체(dimer)로도 분해되나 대부분은 삼중체(trimer)로 분해가 일어나므로 피복재료로 사용할 경우 비효조절을 용이하게 할 수 있다, 또한 1-nylon 주쇄의 unit가 peptide 단위를 포함하기 때문에 생분해성을 지니고 있으리라 기대된다.

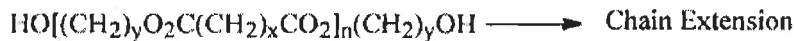
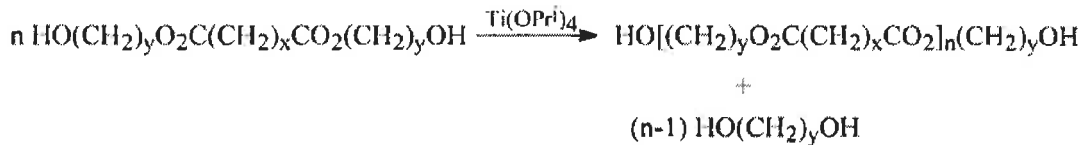
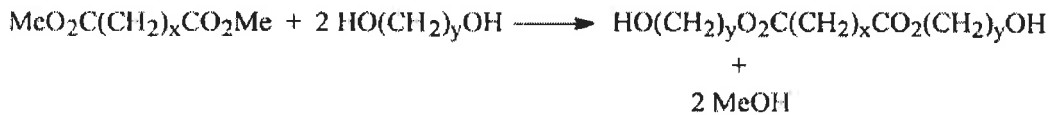
**Scheme II**



마지막으로 aliphatic polyester는 Diacid와 Diol을 직접 축중합하거나, Diacid 유도체(무수물 혹은 에스테르)와 Diol을 축중합시킴으로써 제조되었다(Scheme III). 본 연구에서는 Diacid유도체와 Diol을 축중합시키는 방법을 이용하여, 고분자의 종류와 분자량, 피복두께 등에 따른 비료성분의 용출속도를 측정하기로 하였다. 즉, dimethyl ester 화합물을 Zn(OAc)<sub>2</sub> 촉매하에서 diol과 반응시켜 생성된 ester화합물을 다시 전이금속 촉매하에서 축중합시켜 polyester를 얻는다. 이렇게 하여 얻어진 aliphatic polyester는 일반적으로 분자량이 작아 기계적 강도 및 열적 안정성이 좋지 않으므로, 이를 다시 diisocyanate와 chain extension시켜 분자량을 증가시킨다. 최종적으로 피복실험에 사용된 aliphatic polyester는 dimethyl succinate와 1,4-butanediol을 반응시킨 다음, chain extension을 통하여

기계적 강도를 조절하였다. <별첨 polyester의 물성 참조>

**Scheme III**



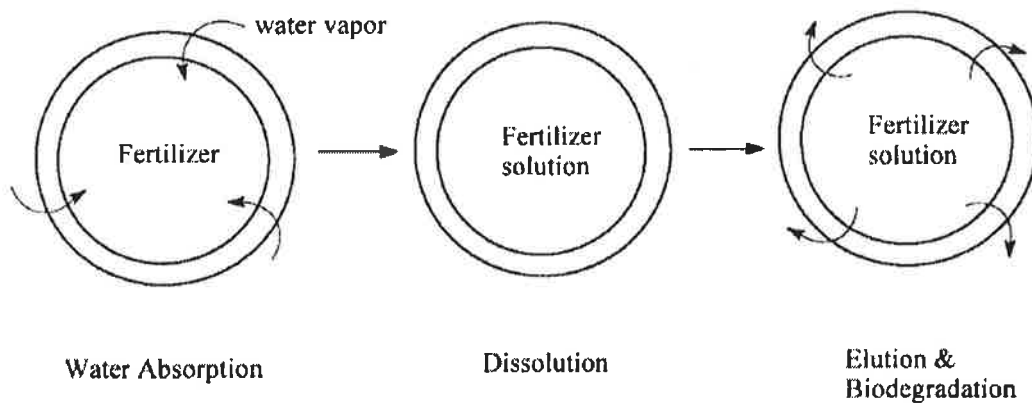
(x, y = 1, 2, 4)

일반적인 완효성 비료의 비효지속기간은 입자크기, 토양수분 함량, 토양의 온도, 토양 pH, 토양 미생물의 활성, 토양 형태 등의 영향을 받으나, 이들 중 입자크기와 수분함량, 온도에 의한 영향이 가장 크다. 특히 Maeda 등의 연구결과에 의하면 열가소성 수지를 사용하여 피복된 완효성 비료는 위에 열거한 여러 요인들 중에서 온도에 따른 moisture permeability의 차이에 의한 영향이 가장 큰 것으로 알려져 있다. (온실에서의 실험결과 polyethylene이 피복된 비료로부터 비료성분의 용출은 온도에 의한 영향이 83%, 습도에 의한 영향이 11%로 측정되었다.)

지금까지 알려진 고분자 피복 완효성 비료의 비효성분 용출 메카니즘은 Scheme IV에서 볼 수 있는 것처럼 먼저 비료의 피복과정에서 용매가 증발되면서 생긴 film membrane의 미세공극을 통하여 water vapor가 확산되어 가는 데 이때의 확산속도는 고분자의 투습계수와 피복량(즉, 피복두께), 온도에 따라 좌우된다. 특히 본 연구에서 사용되어진 생분해성 고분자의 경우에는 여기에 토양 미생물의 활성에 따른 효과가 첨가되어진다. 다음으로 비료의 코아부분과 물이 접촉되어 비효성분의 수

용액이 만들어지고, 마지막으로 비효성분 수용액이 밖으로 확산되어 나오게 되며 polymer membrane은 토양중의 미생물에 의하여 완전히 H<sub>2</sub>O와 CO<sub>2</sub>로 분해되어진다.

Scheme IV



따라서 합성된 생분해성 고분자 피복물질들을 사용하여 여러 가지 방법으로 과립 형태의 요소비료를 피복시키는 실험을 실시하여 가장 적합한 피복 공정을 확립하고, 코팅된 비료를 사용하여 고분자의 분자량과 피복량에 따른 비료성분의 용출속도를 측정하여 이 결과를 바탕으로 최적의 피복두께를 결정하는 데 역점을 두어 완효성 평가를 실시하였다.

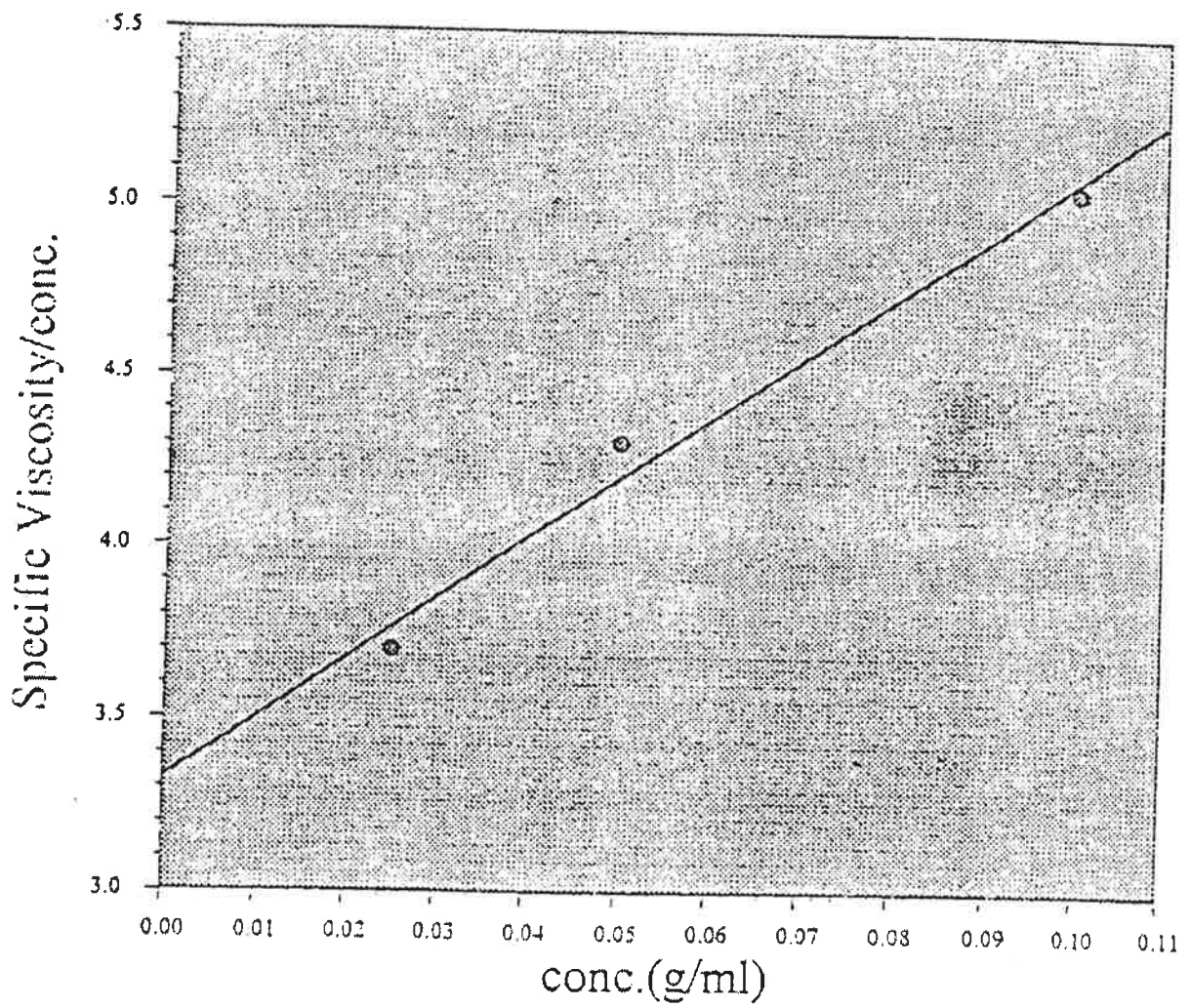
먼저 피복물질의 반복적인 도포를 통하여 다양한 피복량을 갖는 비료를 제조하였는데 비등점이 낮은 용매를 사용하여 피복시켰을 경우에는 피복비료의 표면에 용매가 증발되면서 커다란 기포가 생성되었고, 이를 통하여 water vapor가 비교적 빠른 시간에 침투하여 비료성분이 용출되는 것이 관찰되었으며, 피복량에 따른 용출속도의 변화가 불규칙하였다. 이에 비하여 비교적 비등점이 높은 용매를 사용한 결과 피복면이 균일한 제품을 얻을 수 있었다. 또한 피복방법에 있어서 fluidized-bed를 이용한 방식이 다른 것들에 비하여 균일한 피복표면을 보여 주었으며, primer의 사용은 완효성에 그다지 큰 영향을 미치지 않는다고 하였다. 이는 primer의 사용량이 매

우 적은 데 기인한 것으로 여겨진다. aliphatic polyester의 경우 두 종류의 물성이 다른 고분자를 사용하여 피복비료를 제조하였는데, 두 고분자에 의하여 피복된 제품을 사용하여 연못에서 채취한 물속에서 완효성을 평가한 결과 피복량이 같을 때 비슷한 결과를 얻었는데 이로 미루어 볼 때, polyester의 분자량이 어느 정도 이상이 되면 피복상태와 피복량에 따라서 완효성이 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 피복된 비료는 피복량에 비례하여 비효성분의 용출기간이 달라지며 피복량이 18.4중량%를 초과할 경우에는 피복량에 관계없이 용출기간이 비슷함을 알 수 있었다.

## 제4장 參考文獻

1. H.E. Thompson, R. Kelch: U.S. Patent 5,186,732 (1993).
2. H.E. Thompson, R. Kelch: U.S. Patent 5,089,041 (1992).
3. H.M. Goertz, R.J. Timmons, G.R. McVey: U.S. Patent 5,219,465 (1993).
4. T. Fujita, Y. Yamashita, S. Yoshida, K. Yamahira: U.S. Patent 5,009,696 (1991).
5. T. Fujita, C. Takahashi, S. Yoshida, H. Shimizu: U.S. Patent 4,369,055 (1983).
6. T. Fujita, C. Takahashi, M. Ohshima, T. Ushioda, H. Shimizu: U.S. Patent 4,019,890 (1977).
7. A.T. Gandeza, S. Shoji, I. Yamada: Soil Sci. Soc. Am. J., 55:1462-1467 (1991).
8. S. Shoji, A.T. Gandeza, K. Kimura: Soil Sci. Soc. Am. J., 55:1468-1473 (1991).
9. W.M. Jarrell, L. Boersma: Soil Sci. Soc. Am. J., 43:1044-1050 (1979).
10. A. Shaviv, R. Mikkelsen: Fert. Res., 35:1-12 (1993).
11. J.J. Oertli: Fert. Res., 1:103-123 (1980).
12. S.S. Malhi, M. Nyborg: Fert. Res., 28:263-269 (1991).
13. D.K. Mosdell, W.H. Daniel, R.P. Freeborg: Fert. Res., 11:79-86 (1987).

## 제5장 別添資料



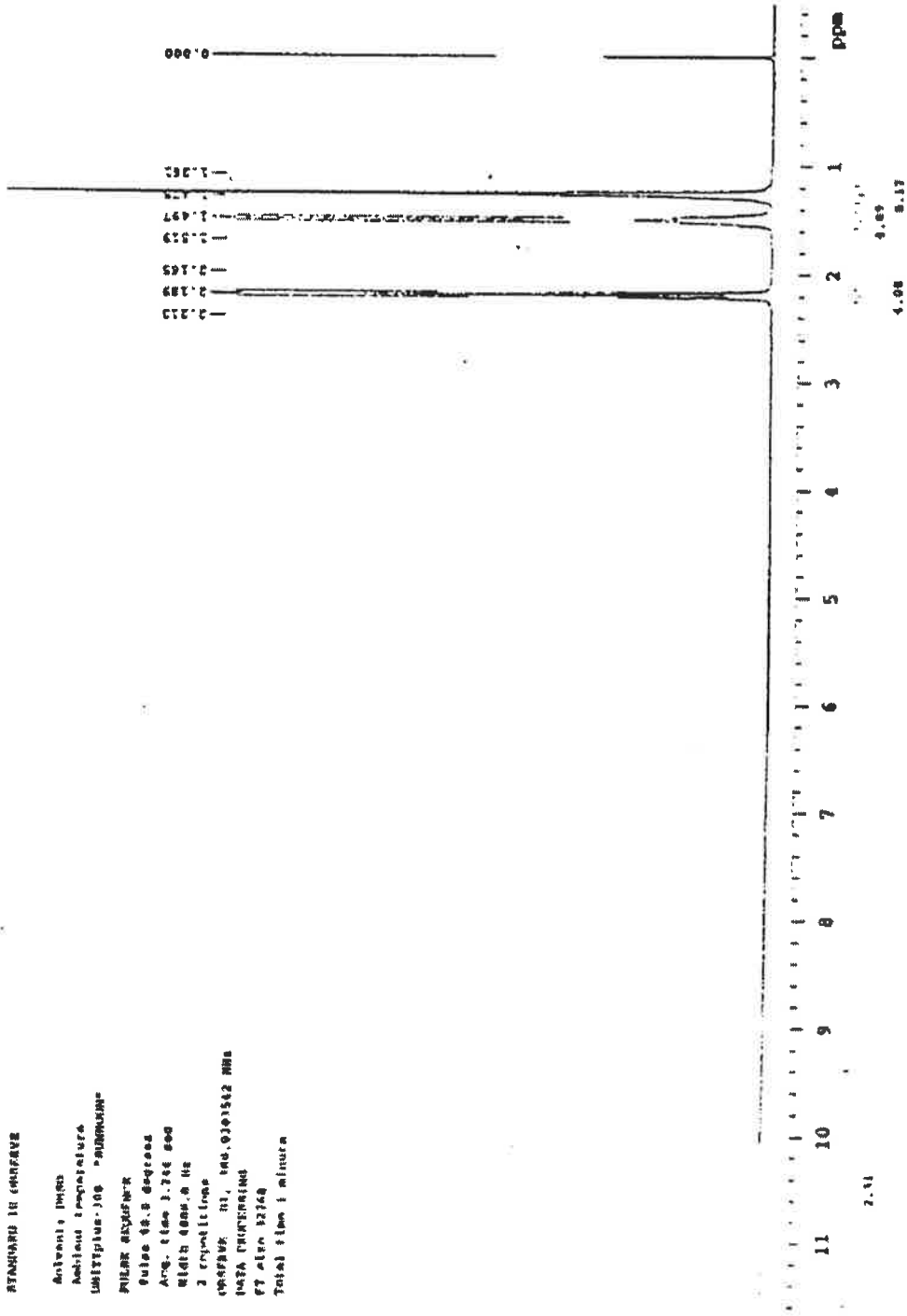
<그림 1> Sebacoyl chloride-coated urea의 고유점도 data



STANDARD 1H CHEMISE

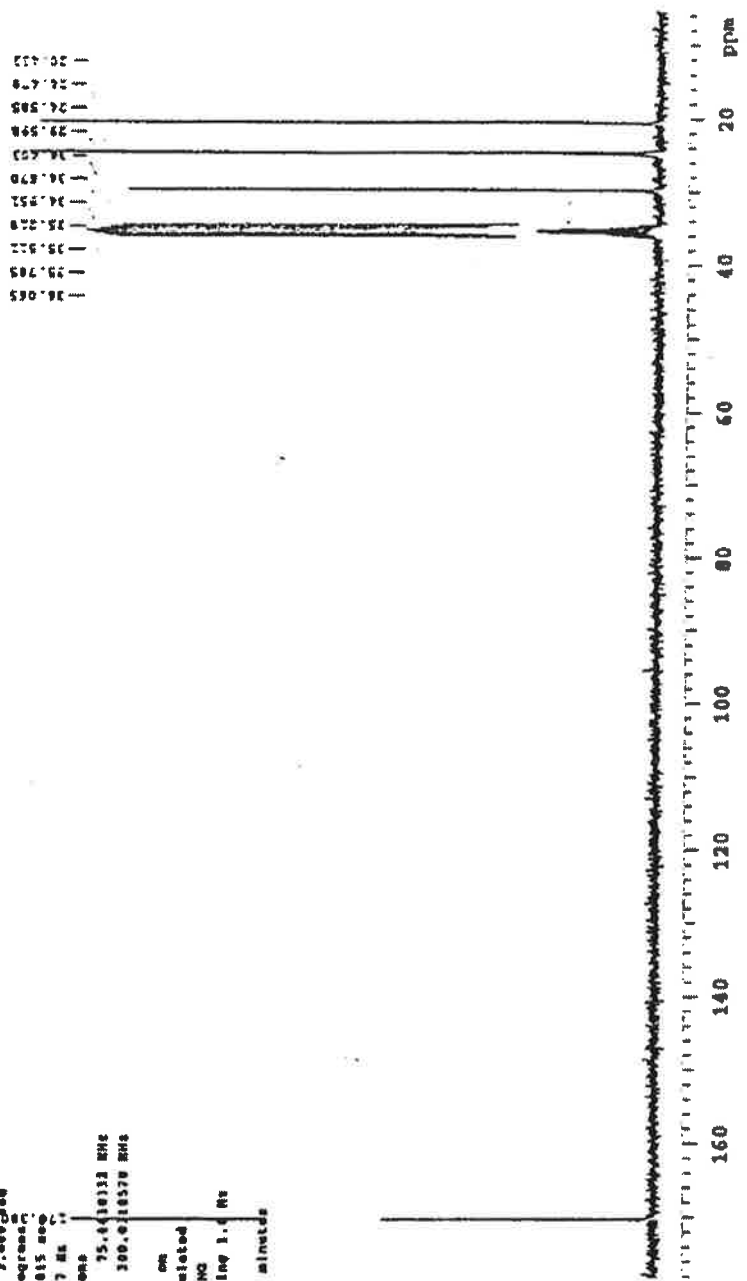
Solvent: DMF  
 Acquisition temperature: 300.2 K  
 Multiplier: 10.0 "AUXILIARY"  
 PULPRO SECTORS  
 Pulse: 12.5 degrees  
 Acq. time: 3.766 sec  
 Width: 4000.0 Hz  
 2 accumulations

CONTRAST: 31, 100.0001512 MHz  
 INSTRUMENT: INOVA  
 FT date: 12/24  
 Total time: 1 minute

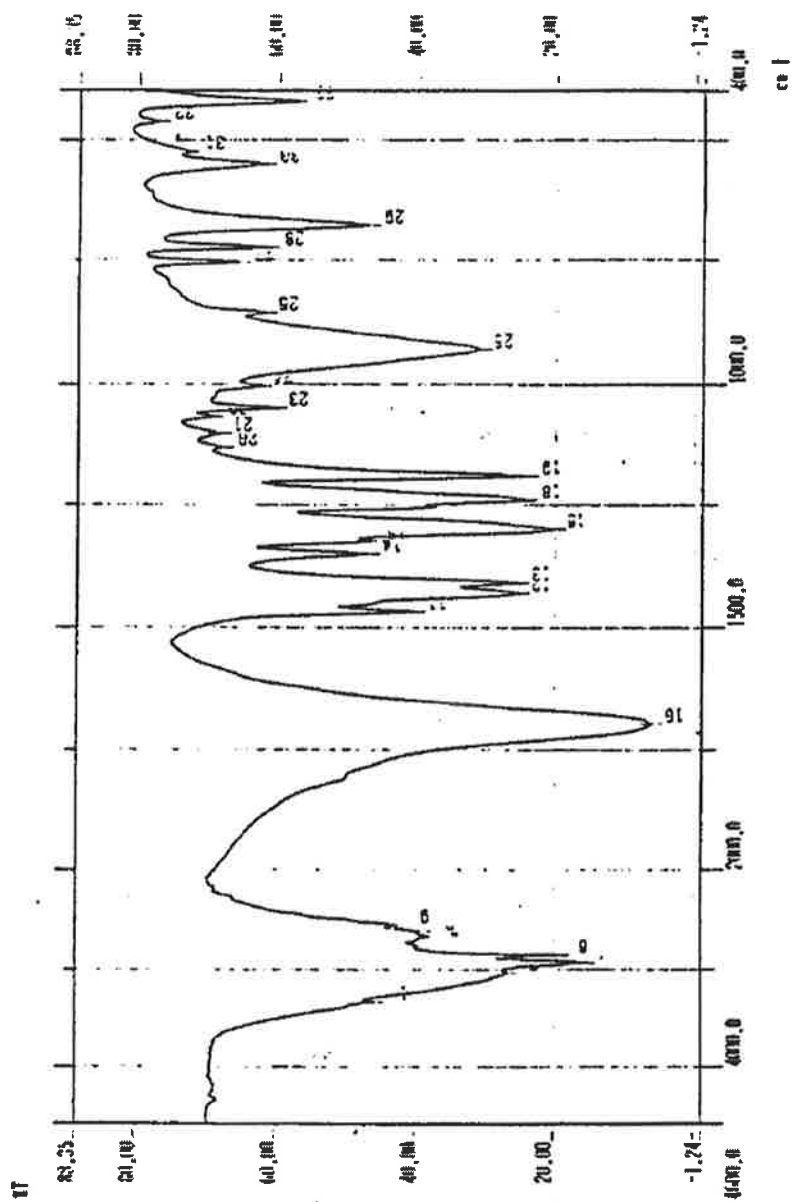


<그림 2> Sebacoyl chloride-coated urea의 <sup>1</sup>H NMR spectrum

polyamide  
 Solvent: DMF0  
 Ambient temperature  
 F1a1: polyamide  
 UNITP1a1: J05 \*SPP00008\*  
 PULS SEQUENCE  
 Relax. delay 3.000000  
 Pulse 33.0 degrees  
 Acq. time 1.015 sec  
 Width 10501.7 Hz  
 726 repetitions  
 OBSERVE C13, 75.418133 MHz  
 DECOUPLE H1, 100.618570 MHz  
 Power 18 dB  
 continuously on  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 1.0 Hz  
 F2 also S526  
 Total time 30 minutes



〈그림 3〉 Sebacoyl chloride-coated urea의 <sup>13</sup>C NMR spectrum

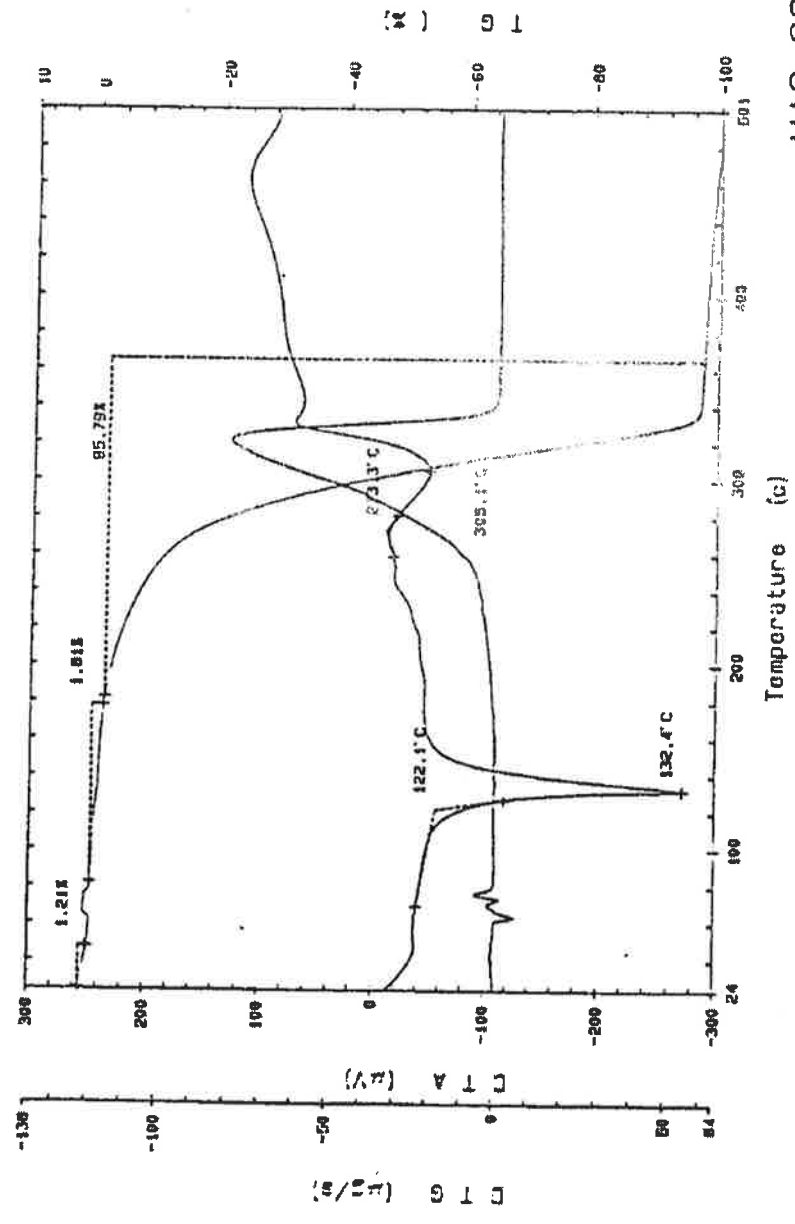


<그림 4> Sebacoyl chloride-coated ureadmi FT-IR spectrum

Sample : Polyamide  
 Amount :  
 Date : 96-10-03 15:56  
 Operator : JMLEE  
 File name : SUNHUN2.RAW

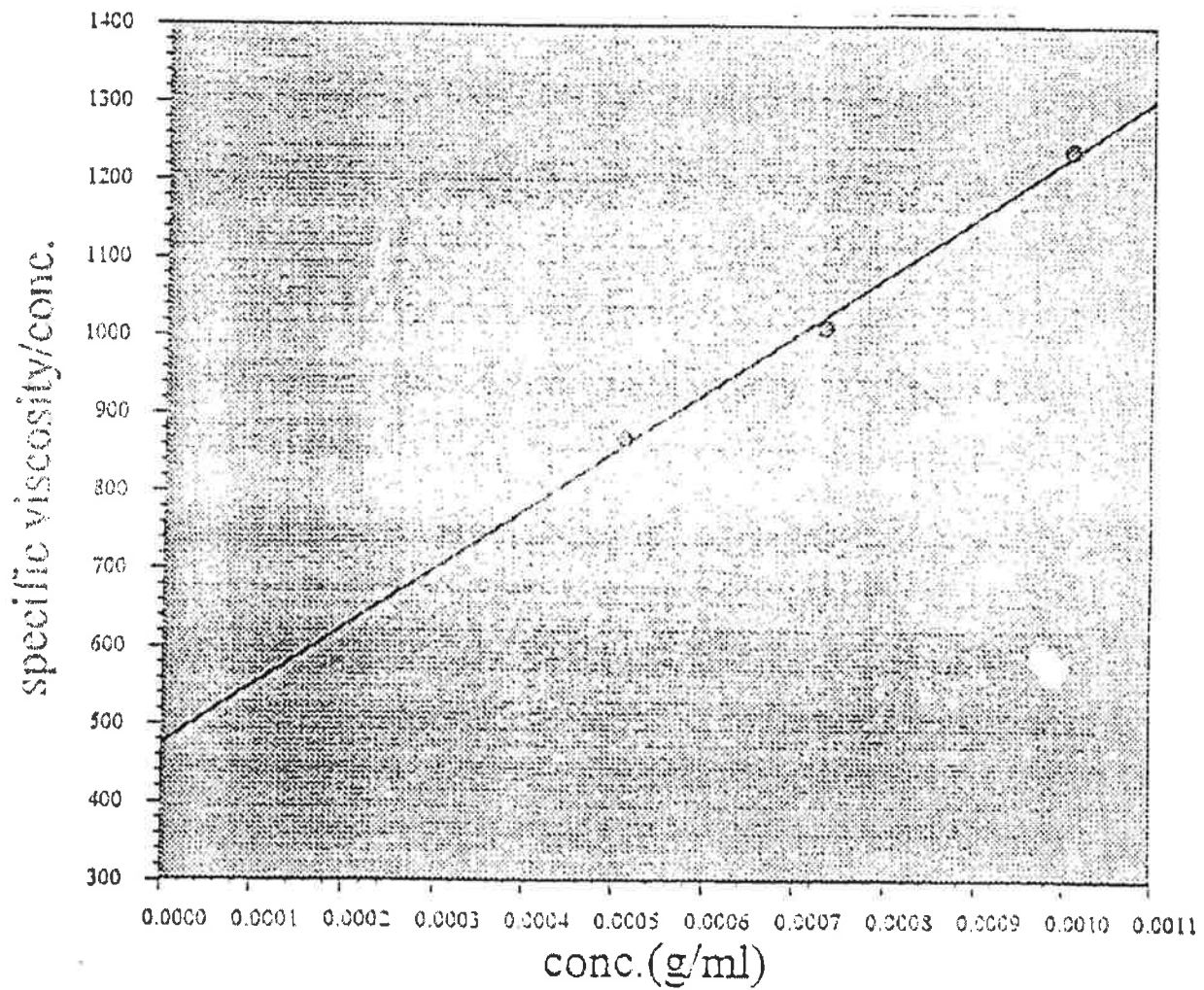
Sampling : 1.0 sec  
 Weight : 9.300 mg  
 Rate : 20.0 deg/min  
 Thermocouple : PL

# TG-DTA

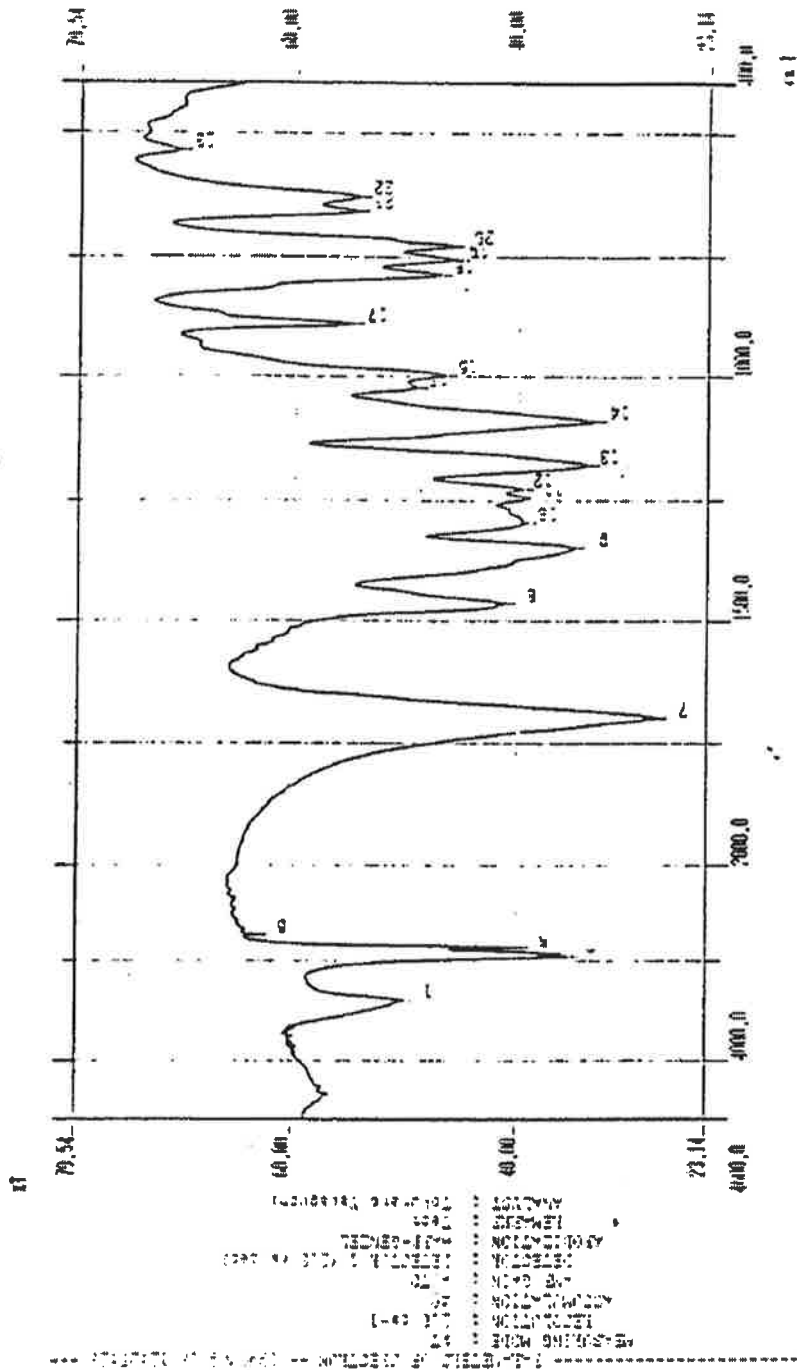


MAC SCIENCE

<그림 5> Sebacyl chloride-coated urea의 DTA data



<그림 6> Polyhexylisocyanate의 고유점도 data

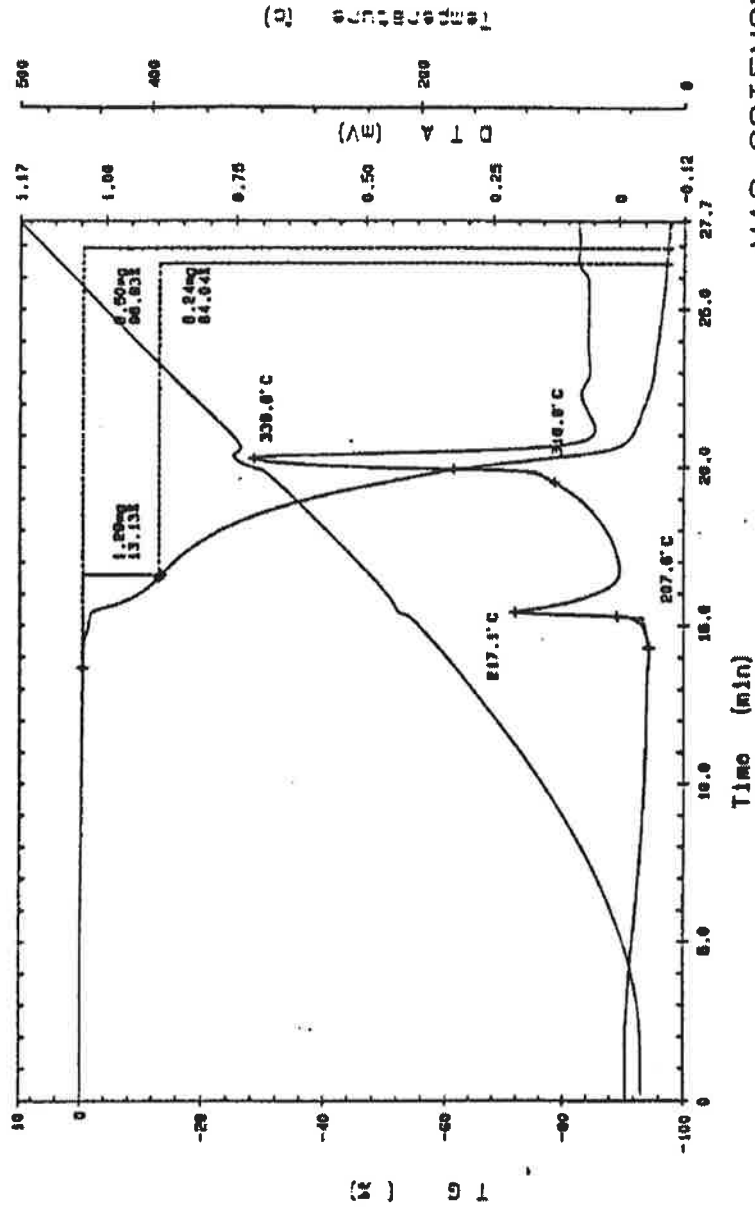


〈그림 7〉 Polyhexylisocyanate의 FT-IR spectrum

Sample : Polyhexyl isocyanate  
 Comment :  
 Date : 96-10-03 15:02  
 Operator : JMLEE  
 File name : SUNMUN1.RAW

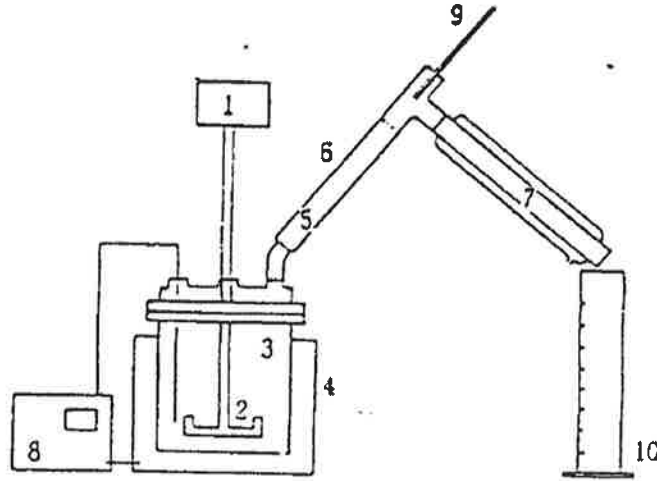
Sampling : 1.0 sec  
 Weight : 9.800 mg  
 Rate : 20.0 deg/min  
 Thermocouple : PL

TG-DTA

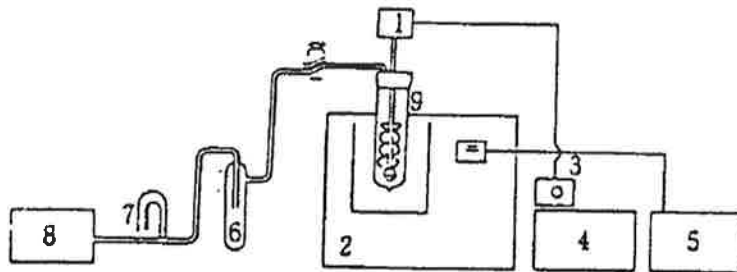


MAC SCIENCE

<그림 8> Polyhexyl isocyanate의 DTA data



에스테르화 장치 : (1) 교반 모터; (2) 교반 축; (3) 에스테르화 resin kettle; (4) 가열 맨틀; (5) 유리 구슬; (6) 분리 깔럼; (7) 냉각기; (8) 온도 조절기; (9) 온도계; (10) 메스 실린더.



축중합 장치 : (1) 교반 모터; (2) 기름 중탕; (3) 모터 조절기; (4) 전압 조절기; (5) 온도 조절기; (6) 트랩; (7) 진공계; (8) 진공 펌프; (9) 유리제 반응기.

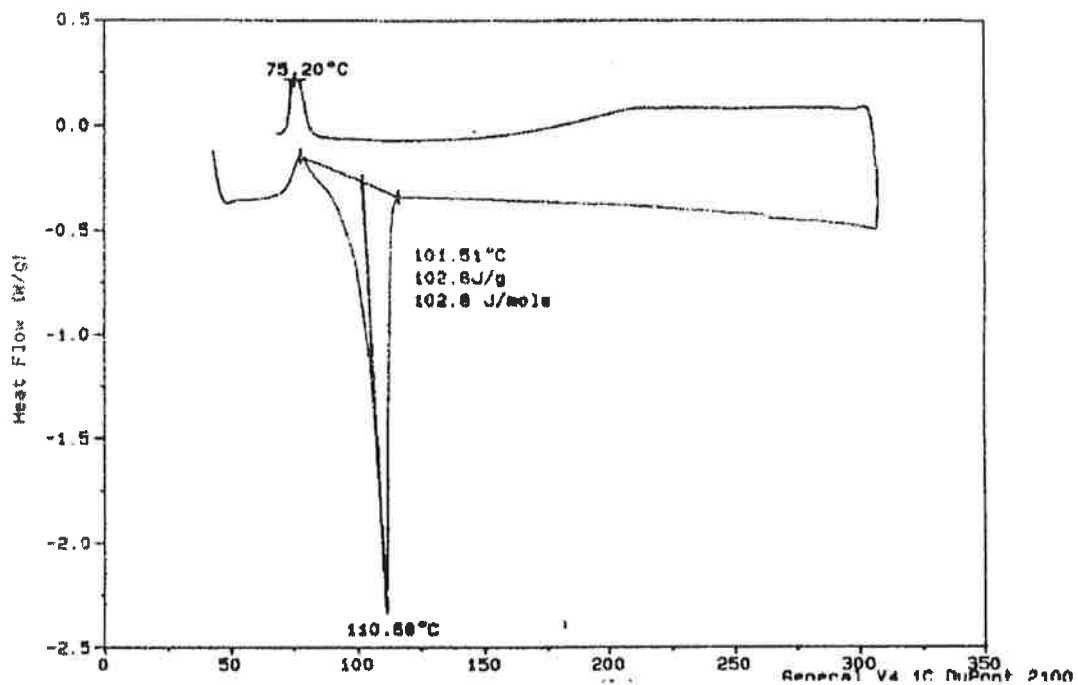
<그림 9> aliphatic polyester의 합성장치



Sample: I-18 (1ST SCAN)  
Size: 5.0700 mg  
Method: 40-300/10 ISO1-40/10  
Comment: G.H.CHOI

DSC

File: C:\DATA-D-4G.001  
Operator: J.H.PARK  
Run Date: 23-Sep-96 12:07

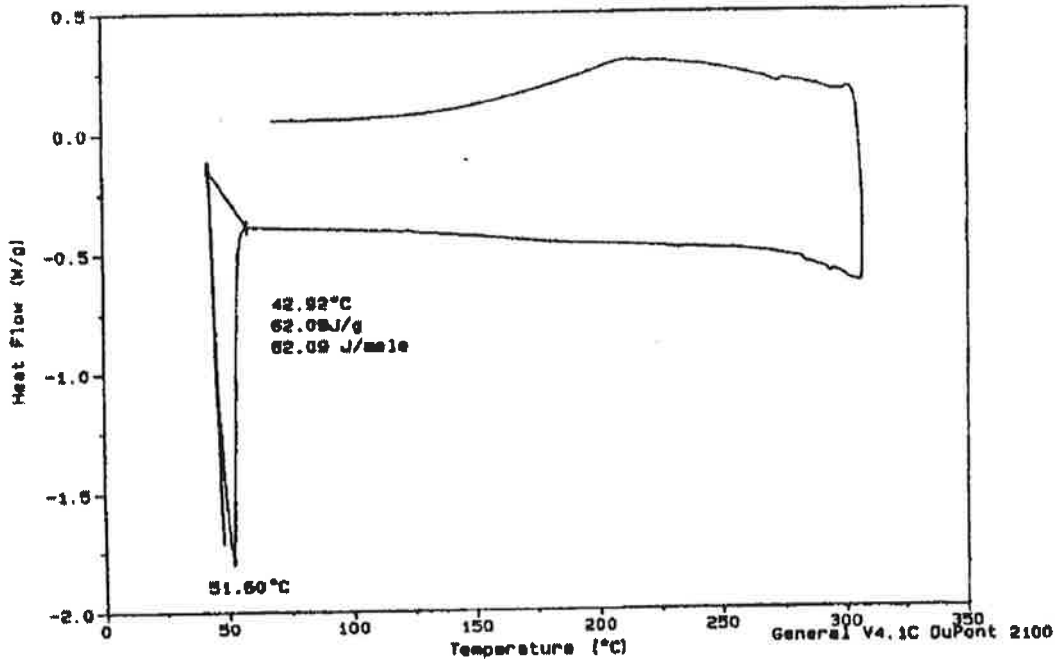


<그림 10> Dimethyl succinate/1,4-butanediol의 DSC data

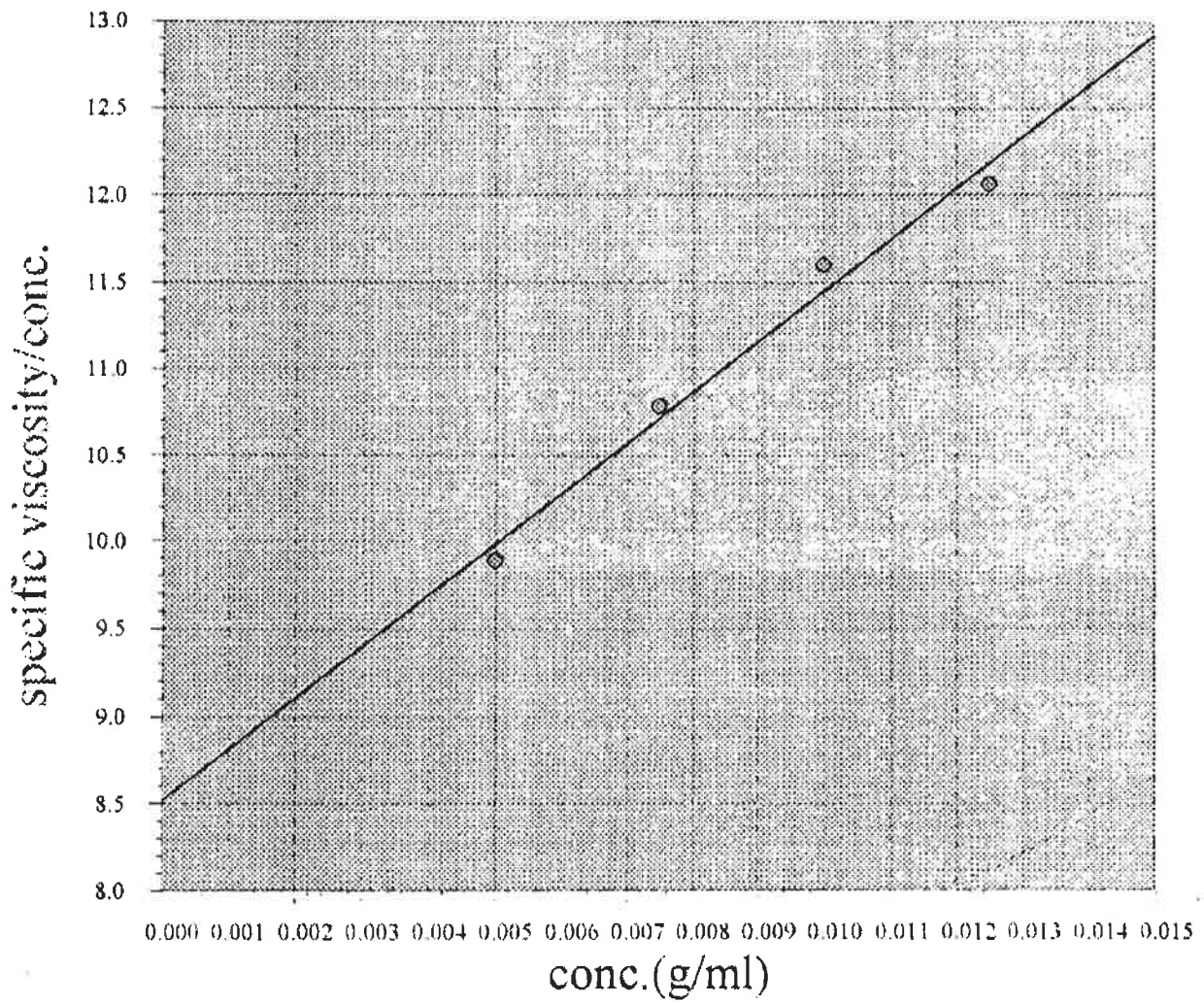
Sample: I-21 (1ST SCAN)  
Size: 6.6600 mg  
Method: 40-300/10 ISO1-40/10  
Comment: G.H.CHOI

DSC

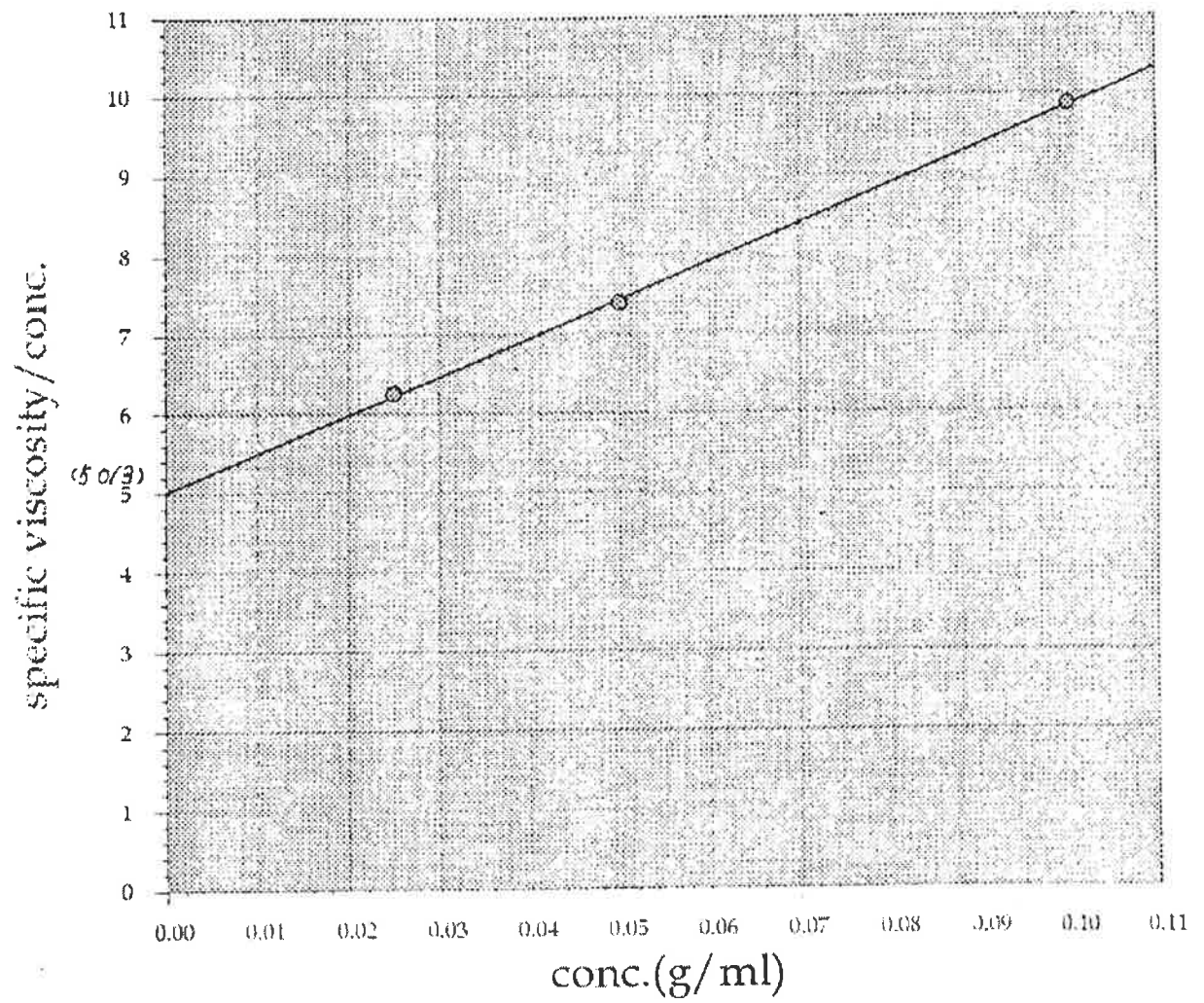
File: C:\DATA-D-4G.002  
Operator: J.H.PARK  
Run Date: 23-Sep-96 12:07



<그림 11> Dimethyl adipate/1,4-butanediol의 DSC data



<그림 12> Dimethyl succinate/1,4-butanediol의 고유점도 data



<그림 13> Dimethyl adipate/1,4-butanediol의 고유점도 data

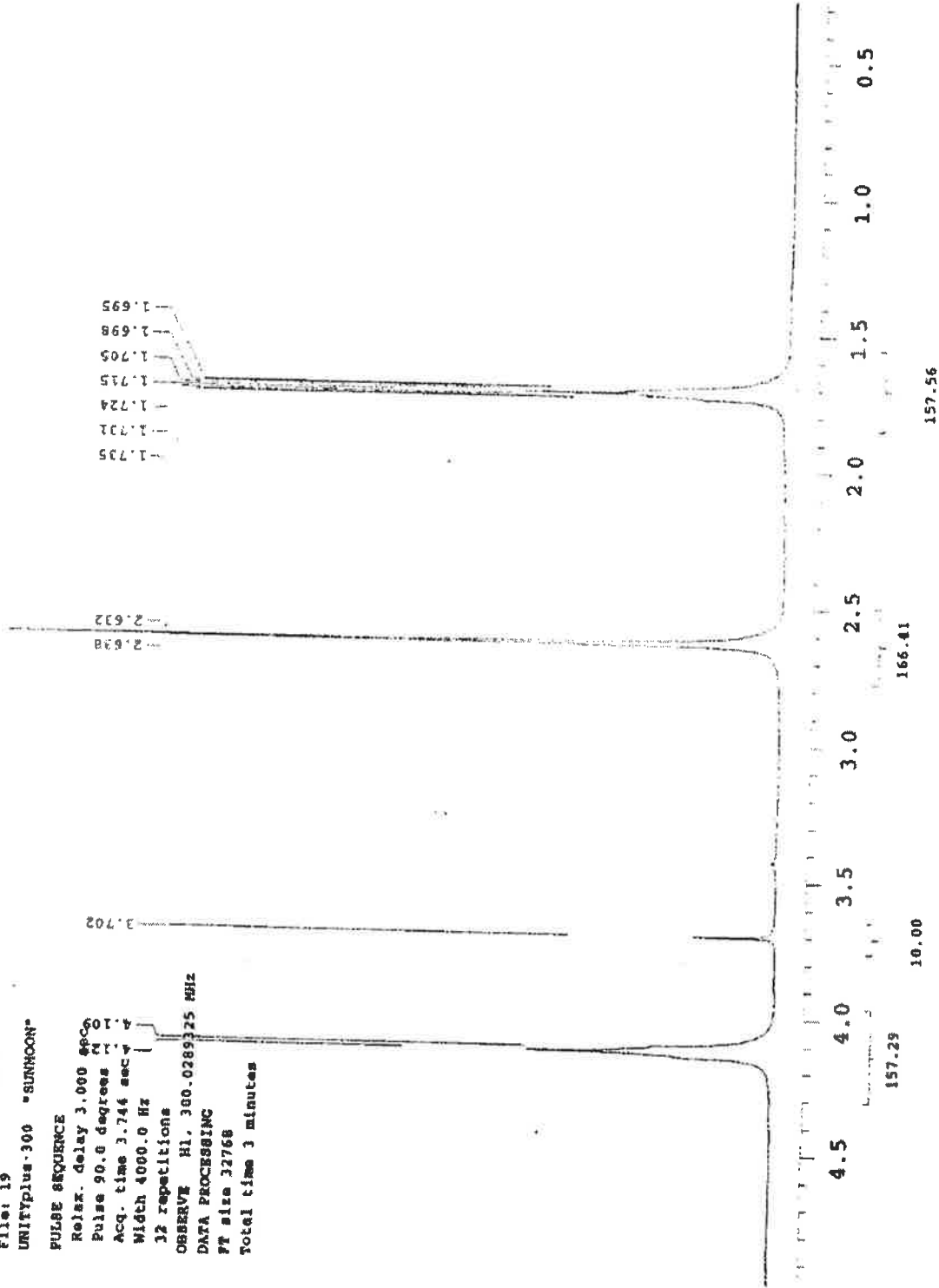
I-18

Solvent: CDCl3  
Ambient temperature  
File: 19  
UNITYplus-300 \*SUNHOON\*

PULSE SEQUENCE

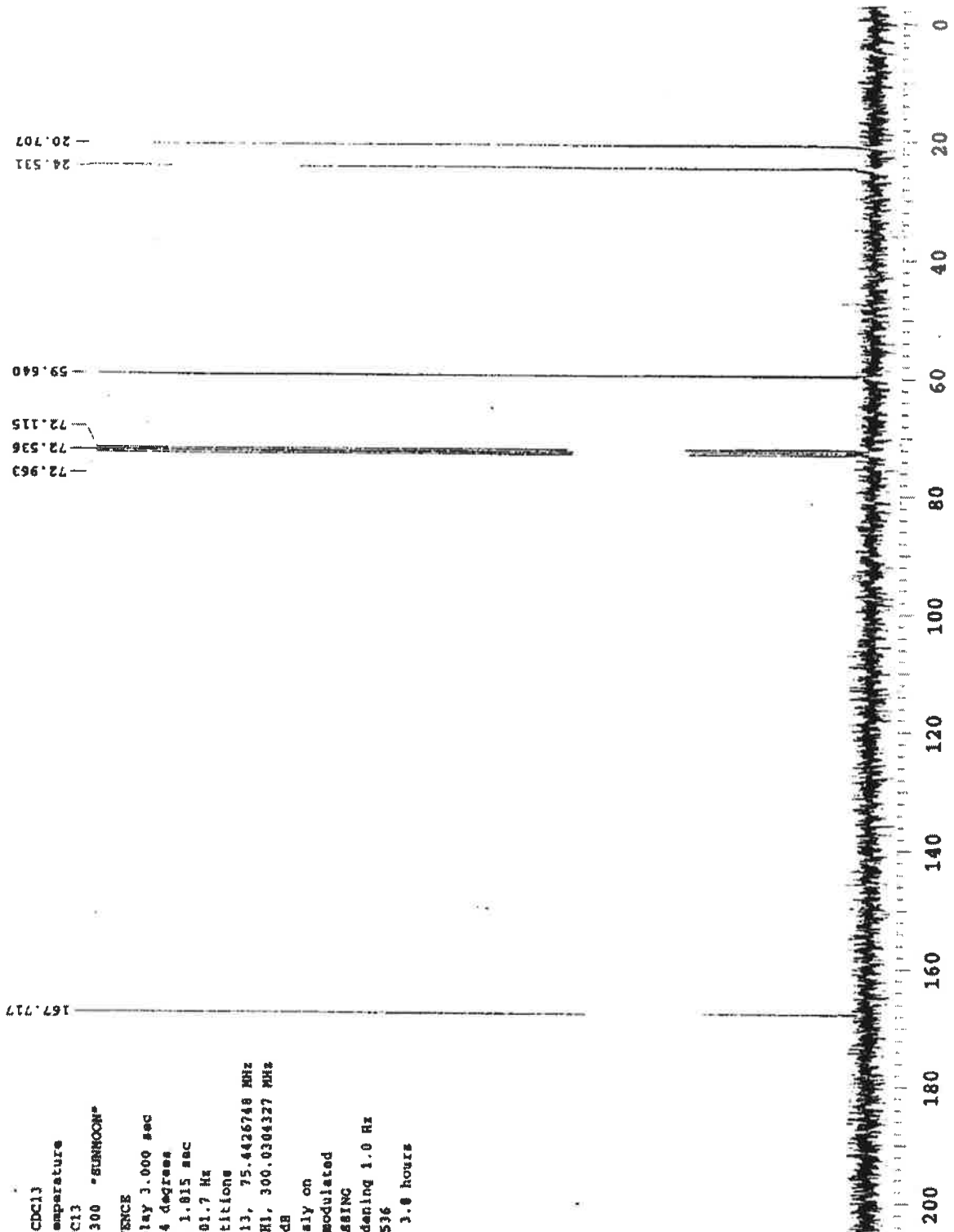
Relax. delay 3.000 sec  
Pulse 90.0 degrees  
Acq. time 3.744 sec  
Width 4000.0 Hz  
32 repetitions

OBSERVE F1, 380.0289375 MHz  
DATA PROCESSING  
PT size 32768  
Total time 3 minutes



<그림 14> Dimethyl succinate/1,4-butanediol의 <sup>1</sup>H NMR spectrum

1 CDC13  
 temperature  
 19C13  
 1-300 °SUNNOON\*  
 N1ENCE  
 delay 3.000 sec  
 1.4 degree  
 1e 1.815 sec  
 501.7 Hz  
 1000000  
 C13, 75.4426748 MHz  
 H1, 300.0304327 MHz  
 dB  
 usly on  
 Modulated  
 EBBING  
 adening 1.0 Hz  
 5536  
 e 3.0 hours



〈그림 15〉 Dimethyl succinate/1,4-butanediol의 <sup>13</sup>C NMR spectrum

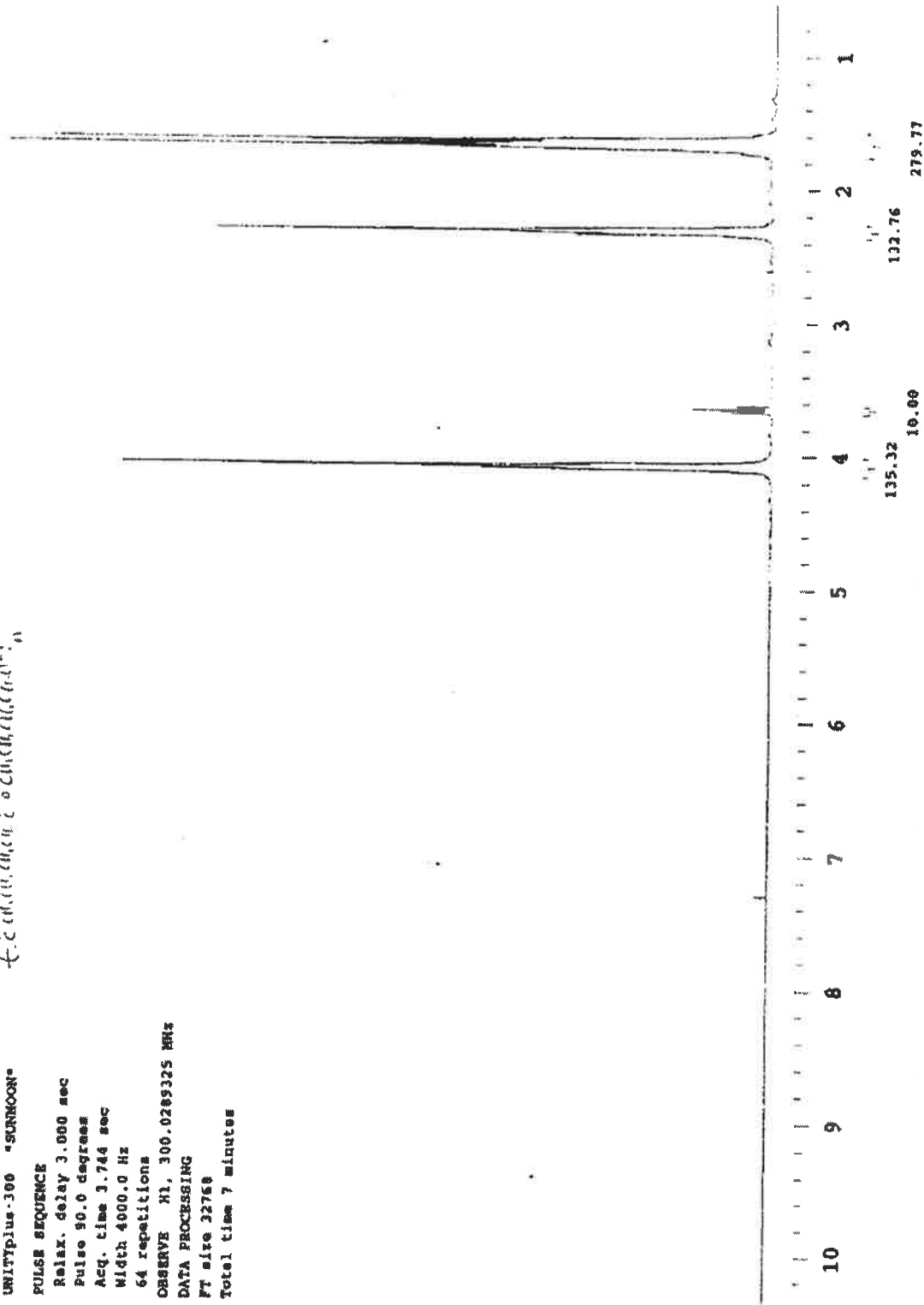
1-21

Solvent: CDCl3  
Ambient temperature  
UNITYplus-300 "SUNNOON"

PULSE SEQUENCE

Relax. delay 3.000 sec  
Pulse 90.0 degrees  
Acq. time 3.744 sec  
Width 4000.0 Hz  
64 repetitions

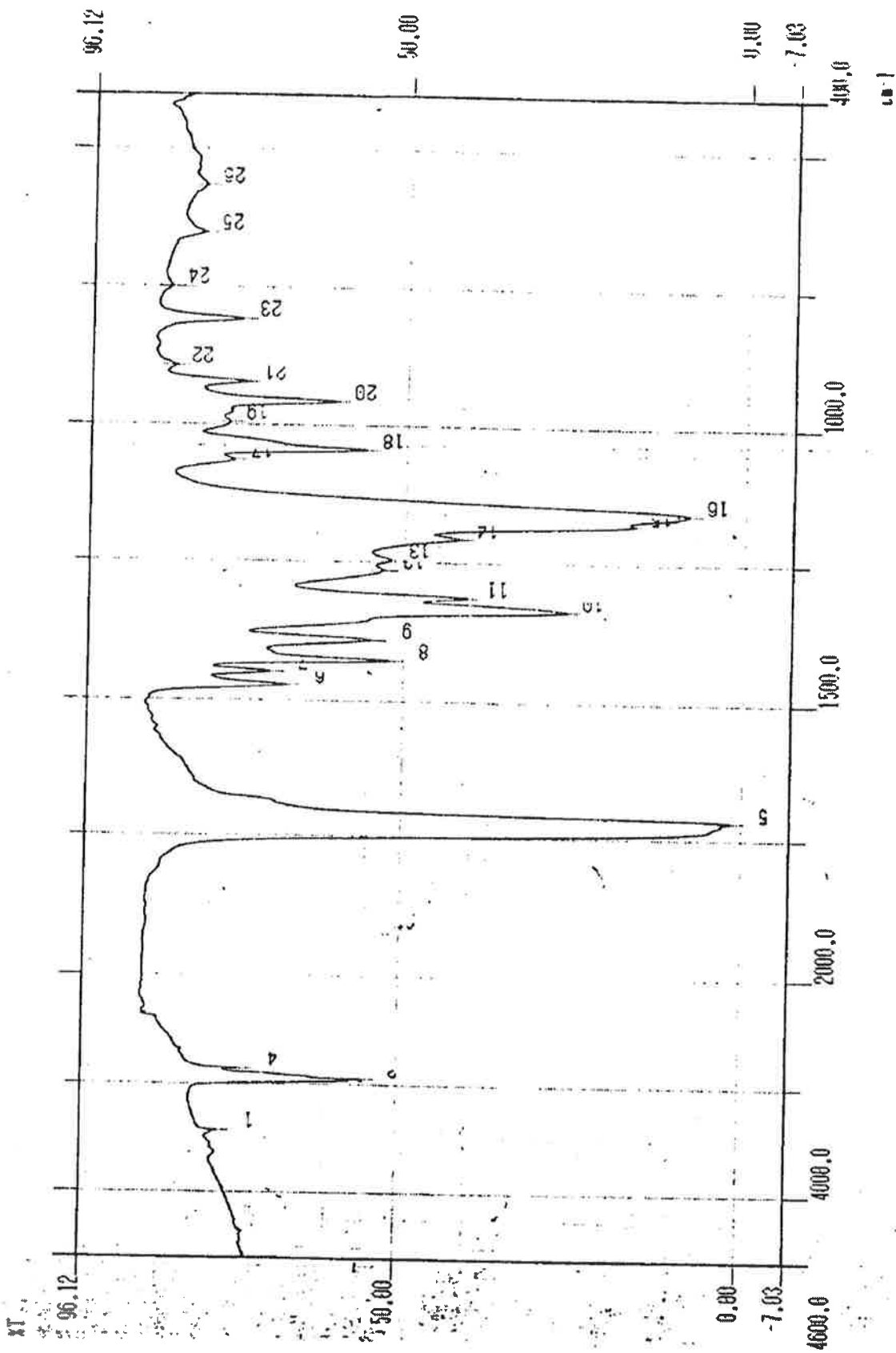
OBSERVE H1, 300.0289325 MHz  
DATA PROCESSING  
Ft size 32768  
Total time 7 minutes



<그림 16> Dimethyl adipate/1,4-butanediol의 1H NMR spectrum







<그림 18> Dimethyl succinate/1,4-butanediol의 FT-IR spectrum

종 류	P-1	P-2
Melt Flow Index (g/10min; @160°C)	7 - 9	7 - 9
T <sub>m</sub> (°C)	90	118
T <sub>g</sub> (°C)	-28	-16
Density (g/cm <sup>3</sup> )	1.22	1.22
Tensile Strength (Kg/cm <sup>2</sup> )	330	410
Flexural Modulus (Kg/cm <sup>2</sup> )	3,300	5,400
Izod Impact Strength notched (Kg · cm/cm)	27	6
Intrinsic Viscosity (in chloroform)	72.384	55.022

<표 3> 완효성 비료제조에 사용된 aliphatic polyesters의 물성

Primer	용 매	피복량(wt%)
Acryl polyol(60%)	Acetone	0.4
Polyester polyol(67%)	Acetone	0.5
Epoxy polyol	THF	0.2
Acryl copolymer(50%)	Acetone	0.6
Polyvinyl acetate(50%)	Acetone	0.5
Polyurethane	Acetone	0.7
Polyurethane(20%)	Methylene chloride	0.4

<표 4> 완효성 비료제조에 사용된 primer의 종류와 용매, 피복량



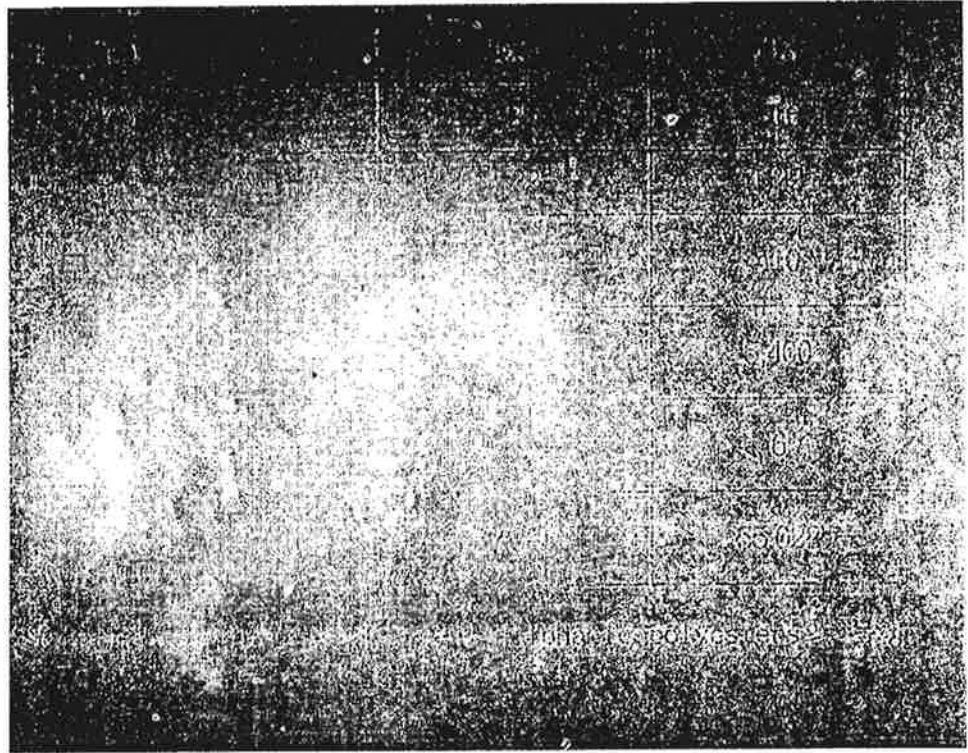
<그림 19> 회전식 감압 증발기를 이용하여 polyester (P-1)를 12.3 wt% 피복시킨 요소비료를 25°C 증류수에서 48시간 방치 후, 광학 현미경(x400 배율)을 사용하여 촬영한 사진. 고분자 피복표면이 매우 거칠고 비료성분이 용출되어 나온 미세한 구멍( $\varnothing$  0.11mm)이 보인다. 이는 비등점이 낮은 용매가 증발되면서 생긴 기포에 water vapor가 침투되어 비료성분이 용해되어 나온 것으로 여겨진다.



<그림 20> Polyvinylacetate를 1차로 0.5 wt% 피복시키고 이를 다시 polyester(P-2)로 2차 피복한(11.7 wt%) 다음, 25°C 증류수에서 용출 실험한 후 광학 현미경(x400 배율)으로 촬영한 사진. <그림 18>에서와 비슷한 표면상태를 보여주며, 미세한 구멍( $\phi$  50 $\mu$ m)이 보인다.



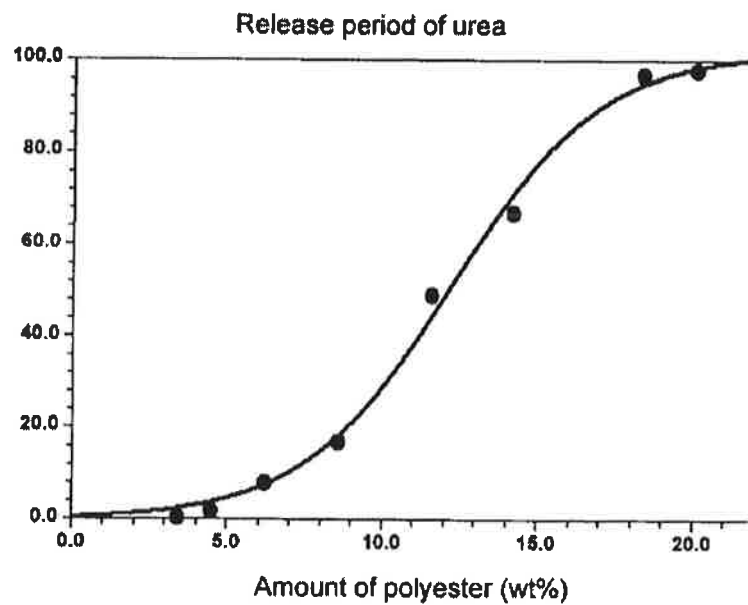
<그림 21> Multiple Dipping 방법에 의하여 polyester(P-1)를 7.8 wt% 피복시킨 요소비료를 25°C 증류수에서 용출실험한 후, 광학 현미경(x400 배율)으로 촬영한 사진. 회전식 감압 증발방법에 의하여 만들어진 시료보다 비교적 균일한 피복상태를 보여주나, 비료표면에서 용매가 너무 빠르게 증발하여 미세한 기포(화살표 부분)와 불균일한 피복표면이 생긴다.



<그림 22> 1,2-dichloroethane을 용매로 하여 fluidized-bed, 50°C air stream에서 1차로 polyurethane을 0.5중량% 피복시킨 다음, 다시 aliphatic polyester (P-1)로 20.1중량% 피복시킨 피복비료의 표면 (x400 배율). 표면이 매우 균일하게 피복되어 있음을 보여준다.

시 료	1	2	3	4	5	6	7	8
코팅된 polyester 양 (wt %)	3.4	4.5	6.2	8.6	11.6	14.2	18.4	20.1
80%의 비료가 용출되는 데 소요되는 시간 (일)	0.5	2	8	17	49	67	97	98
비료중의 평균 질소함량 (wt%)	44	44	43	42	41	40	37	36

<표 5> aliphatic polyester(P-2)의 피복량에 따른 요소비료의 용출기간.  
(25°C, in water)

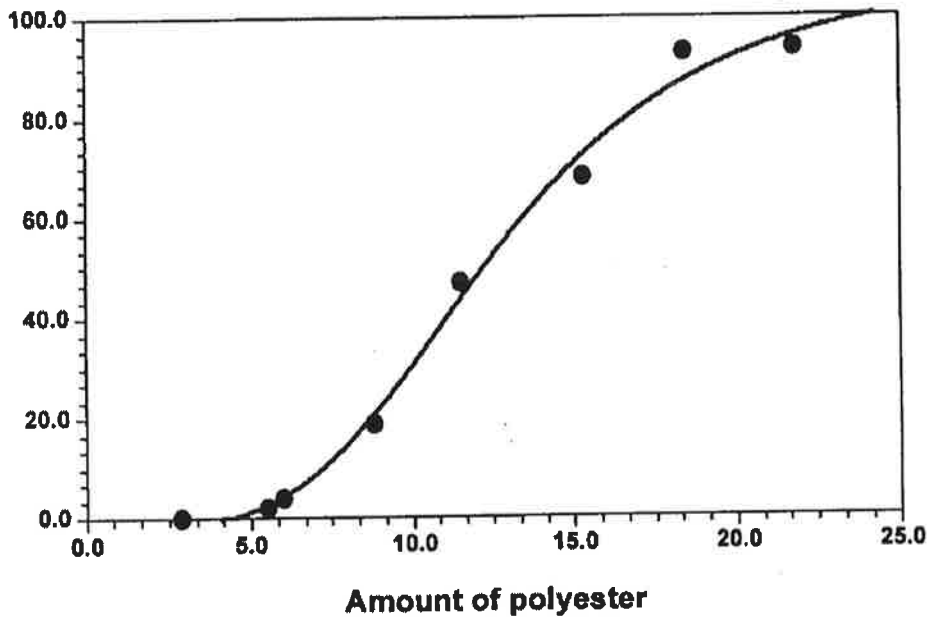


<그림 23> Polyester 피복량에 따른 요소비료의 용출속도 (25°C, in water)

시 료	1	2	3	4	5	6	7	8
코팅된 polyester 양 (wt %)	2.9	5.5	6.0	8.8	11.5	15.3	18.4	21.8
80%의 비료가 용출되는 데 소요되는 시간 (일)	0.1	2	4	19	47	68	93	94
비료중의 평균 질소함량 (wt%)	45	44	43	42	41	39	37	35

<표 6> aliphatic polyester(P-1)의 피복량에 따른 요소비료의 용출기간.  
(25°C, in water)

### Release period of urea



<그림 24> Polyester (P-1) 피복량에 따른 요소비료의 용출속도  
(25°C, in water)



## 비효증진관련 미생물 (인산염 가용화균) 개발

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “신소재 및 미생물을 이용한 환경조화형 고효율 신형비료 개발” (세부  
제 “비효증진 관련 미생물 (인산염 가용화균) 개발”) 의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. .

주관연구기관명 : 서울대학교  
총괄연구책임자 : 임 선 옥  
연 구 원 : 강 선 철  
이 동 규  
최 명 철  
박 현 준  
신 명 호  
황 규 한  
이 복 자

# 요 약 문

## I. 제 목

비효증진 관련 미생물 (인산염 가용화균) 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

토양에 처리된 비료 성분은 생물학적, 화학적 반응을 거쳐 비료 성분의 불용화나 유실 현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 토양 중에서 쉽게 불용화되기 때문에 불용성의 인산을 가용화시킬 수 있는 효소 체계를 가지고 있는 토양미생물의 탐색과 실용화는 비료 성분의 이용 효율성을 제고시킬 수 있는 방법이 된다. 따라서 본 연구의 최종개발목표는 난용성인을 가용화시킬 수 있는 관련 미생물을 개발하여 경제적, 환경조화형, 고효율 생물비료(biofertilizer)를 개발함에 있다.

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 인도 등에서는 일부 실용화되어 사용된 적이 있었지만 국내에서는 아직 연구검토된 적이 없었다. 2000년대에는 환경보존을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 예상되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 효율적으로 공급해 줄 수 있는 biofertilizer의 개발은 대단히 중요한 과제가 된다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 미생물을 이용한 환경조화형 신형 생물비료 개발에 관한 연구의 일환으로 난분해성 인산염에 대한 분해능이 우수한 토양미생물의 선발, 선발된 미생물의 동정 및 배양 특성 연구, 인산가용화 미생물의 발효공정 최적화, 이들 균주들의 장기보존을 위한 증량제 개발, pot와 field에서 미생물 비료를 옥수수에 시비한 후의 효과 검정 등에 관한 연구를 수행하였다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

난분해성 인산염의 분해능이 우수한 토양미생물을 선발하기 위하여 PDA-calcium phosphate 분리용 평판배지를 이용하여 1,000여종의 세균과 200여종의 곰팡이 균주를 1차선별하였다. 이들 균주로부터 인광석을 효율적으로 분리하는 4종의 곰팡이 균주와 3종의 세균을 최종 분리하여 본 연구를 위한 공시균주로 활용하였다. 최종 선발균주의 동정 결과 101과 113 균주는 *Penicillium* sp.로 104 균주는 *Aspergillus* sp.로 각각 동정되었으며, 이들 균주들의 인산분해능은 500 - 1,000 ppm으로 아주 높은 수준이었다. 또한 이들 인산가용화균의 난용성 인산염의 종류에 따른 분해능을 조사해 보면 tricalcium phosphate > rock phosphate > aluminium phosphate > hydroxyapatite 순서로 분해가 잘 되는 것으로 나타났다.

인산 가용화 균주의 공업적 대량배양을 위하여 값싼 고체배지에서의 포자(conidia) 생성능을 조사한 결과 보리, 옥수수, 밀, 쌀겨 등의 곡물배지에서 이들 균주들은 포자를 잘 생성하는 것으로 나타났다. 또한 생산된 포자를 장기보존하기 위하여 zeolite, talc, diatomite, bentonite, kaoline, rice bran 등의 증량제를 첨가하여 4℃에서 6개월 이상 장기 보관했을 때 포자생존률이 90% 이상인 것으로 나타났다.

마지막으로 분리 균주들을 미생물비료로 이용하여 pot와 field에서 옥수수(*Zea mays* Suwon 19) 재배시험을 했을 때 모든 경우에서 대조구에 비해 식물의 생육상태가 월등히 좋아짐을 관찰하였다.

## SUMMARY

Phosphate-solubilizing microorganisms(1,000 bacteria and 200 fungi) were isolated from soil around Kyungnam and Kyungbook regions using potato dextrose agar-calcium phosphate medium. Three fungi with the greatest phosphate-solubilizing activity were selected and identified to *Penicillium* sp. GL-101, *Penicillium* sp. PS-113 and *Aspergillus* sp. PS-104, respectively, based on the morphological characteristics of conidiophore and conidia in malt extract agar and potato dextrose agar media. The optimum temperature and initial pH to solubilize rock phosphate in potato dextrose borth-rock phosphate medium were 25-30°C and pH 6.0-7.0, respectively. In these optimum conditions, phosphate-solubilizing activities of the isolates against four types of insoluble phosphate: tricalcium-phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite and rock phosphate, were quantitatively determined. As results, the fungi highly discharged free phosphates to the culture broth with the concentrations of 500-1,100 ppm.

Barley, corn, wheat, rice bran and compost were tested at various humidities for the mass production of the fungal conidia. The results showed that most of them tested, except compost, could use cheap medium sources.

In order to store the fungal conidia for the long time possibly, some additives like zeolite, diatomite, bentonite, talc, kaoline and rice bran should be developed. At 4°C, the phosphate-solubilizing microorganisms isolated still kept the viability over 90% at all cases.

Finally, the effects of inoculation with phosphate-solubilizing fungi as a biofertilizer were studied in perlite-based pot cropped with *Zea mays* Suwon 19. Inoculation of either *Penicillium* sp. GL-101 or *Aspergillus* sp. PS-104 increase in plant height (1.3-1.4 times), plant weight (1.7-1.8 times) and root length (1.3-1.4 times) at 60-days cultivation compared to Hogland solution either without  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  or displaced  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  to powdered rock phosphate, a phosphorous source. In field trial, we found out similar results on the growth of corn.

## CONTENTS

### 1. Purpose and importance

- A. Purpose of this research
- B. Importance of this research

### 2. Contents and Ranges of this research

- A. Screening and identification of phosphate-solubilizing microorganism
- B. Optimization of cultural conditions
- C. Media development for the mass production
- D. Storage stability of phosphate-solubilizing microorganism
- E. Evaluation of phosphate-solubilizing microorganism as biofertilizer in pot and field

### 3. Results

- A. Screening of phosphate-solubilizing microorganisms
- B. Content analysis of rock phosphate
- C. Optimization of cultural conditions to produce free phosphate
- D. Addition effect of nitrogen sources on the production of free phosphate
  - 1) Changes in free phosphate depending on the insoluble phosphates
  - 2) Changes in free phosphate depending on the nitrogen sources
- E. Mass culture of phosphate-solubilizing microorganism
- F. Long-term storage of phosphate-solubilizing microorganism
- G. Biofertilizer effect of phosphate-solubilizing microorganism

### 4. References

## 목 차

- 연구개발의 목적 및 중요성
  - 가. 연구개발의 목적
  - 나. 연구개발의 중요성
  
- 연구개발 내용 및 범위
  - 가. 균주선발 및 등정
  - 나. 선발균주들에 대한 배양환경 조사 및 배지최적화
  - 다. 공업용 배지의 개발
  - 라. 인산가용화균의 장기보존
  - 마. Pot와 field에서의 비효검정
  
- 연구개발 결과
  - 가. 인산가용화 우수균의 선발
  - 나. 인광석의 성분분석
  - 다. 배양환경에 따른 선발균주들의 인광석 분해능
  - 라. 인산염 가용화 미생물에 대한 배지 최적화
    - 1) 난용성 인산염의 종류에 따른 유리인산 생성능
    - 2) 다양한 질소원의 첨가에 따른 유리인산 생성능
  - 마. 인산가용화균의 대량배양
  - 바. 인산가용화균의 장기보존
  - 사. 인산가용균의 시비효과
  
- 참고문헌

# 비효증진 관련 미생물 (인산염 가용화균) 개발

## 1. 연구개발의 목적 및 중요성

### 가. 연구개발의 목적

토양에 처리된 비료 성분은 여러가지의 생물학적, 화학적 반응을 거쳐 비료 성분의 불용화나 유실 현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 토양 중에서 쉽게 불용화되기 때문에 불용성의 인산을 가용화시킬 수 있는 효소 체계를 가지고 있는 토양미생물의 탐색과 실용화는 비료 성분의 이용 효율성을 제고시킬 수 있는 방법이 된다. 따라서 본 연구의 최종개발목표는 난용성인을 가용화시킬 수 있는 관련 미생물을 개발하여 경제적, 환경조화형, 고효율 biofertilizer를 개발함에 있다. 이것을 달성하기 위하여 1년차의 연구개발 목표는 난분해성 인산염의 가용화 촉진 미생물의 선발에 두었다. 2년차의 연구개발 목표는 난분해성 인산염 가용화 촉진 미생물에 대한 배지 최적화 및 난분해성 인산염 가용화 촉진 미생물의 mass production을 위한 발효공정 최적화에 두었다. 마지막으로 3년차의 연구개발 목표는 난분해성 인산염 가용화 촉진 미생물에 대한 장기 보관방법 개발 및 pot와 field에서의 작물에 대한 인산가용화균 시비효과 검증에 두었다.

### 나. 연구개발의 중요성

미생물을 이용한 비효 증진 방법을 개발하려는 시도는 부단히 이루어져 왔다. 1950년대 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물 (phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며, 평균 10%의 수량 증가를 보았다. 1980년대에는 *Penicillium bilaji* 등의 사



상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다. 이와같은 미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 인도 등에서는 일부 실용화되어 사용된 적이 있었지만 국내에서는 아직 연구검토된 적이 없었다. 2000년대에는 환경보존을 위한 갖가지 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 예상되기 때문에 난용성 인산염을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 효율적으로 공급해 줄 수 있는 biofertilizer의 개발은 대단히 중요한 과제가 된다.

## 2. 연구개발 내용 및 범위

### 가. 균주선발 및 동정

PDA(potato dextrose agar)-calcium phosphate 분리용 평판배지를 이용하여 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있는 미생물을 1차선별하였다. 이로부터 PDB(potato dextrose broth)-인광석 배지를 이용하여 인광석으로부터 유리 인산을 고효율로 방출하는 미생물을 최종선별하여 이들 균주들에 대한 동정을 실시하였다.

### 나. 선발균주들에 대한 배양환경 조사 및 배지최적화

선발균주들의 인산분해와 관련된 최적 배양온도 및 배양 pH 등의 배양환경을 조사하였다. 또한 다양한 질소원의 첨가에 의한 선발균주들의 인산가용화능, 난용성 인산염의 종류에 따른 분해 효과, 균체배양중의 배지의 pH 변화 등을 측정하였다.

### 다. 공업용 배지의 개발

보리, 밀, 쌀겨, 옥수수, 퇴비, 고두밥 등의 값싼 고체배지에서 인산가용화균들을 배양했을 때 각각의 균주에 대한 분생자(conidia) 형성능을 조사하였다.

#### 라. 인산가용화균의 장기보존

인산가용화균들의 분생자를 장기보존(6개월 이상)하기 위한 zeolite, talc, diatomite, bentonite, kaoline 등의 증량제 첨가효과를 검정하였다.

#### 마. Pot와 field에서의 비효검정

인산가용화균들의 생물비료로서의 효과검정을 위하여 pot와 field에서 옥수수(*Zea mays* Suwon 19) 재배시험을 실시하였다.

### 3. 연구개발 결과

#### 가. 인산가용화 우수균의 선발

난분해성 인산염의 분해능이 우수한 토양미생물을 선발하기 위하여 우리나라의 동남지역(대구, 대전, 경상남북도, 충청남북도 등)의 고추, 마늘 주산단지과 시설원예재배지 등의 인산축적지 토양과 제주도 일대의 화산회토와 감귤원 등에서 토양시료를 채취하였다. 균주선별방법은 토양 1g을 0.5% peptone water 용액 5ml에 잘 혼합하여 이를 적절한 농도로 희석(1/10 - 1/1000)하고 PDA-calcium phosphate 분리용 평판배지에 도말하였다. 이것을 30°C에서 1-4일간 배양한 후 균체 주위에 투명대를 형성하는 균체를 난용성인산염 분해능이 있는 균으로 판정하고 그 중에서 상대적으로 분해능이 우수

한 균주를 1차선별하였다. 그 결과 약 1,000종의 세균과 200여종의 사상균 균주를 1차 선별하였다. 1차선별 결과 균주 주변에 투명대가 관찰되었으며, 투명대의 크기가 클수록 대체로 calcium phosphate의 분해능이 우수하였지만 반대로 투명대의 크기가 작아도 분해능이 우수한 경우도 발견되었다. 뿐만아니라 calcium phosphate는 인산염 가용화 균주에 의해 가장 쉽게 분해되기 때문에 1차선별로는 적합하지만 실제 토양내에 존재하는 인산염 중에서 분해가 잘 되지않는 aluminium phosphate, hydroxy apatite, rock phosphate 등의 인산염에 대해서는 각각의 균주가 인산염의 종류에 따라 기질특이성을 보였기 때문에 투명대가 적은 균주도 일부 선별하였다.

다음 단계로 1차선별한 균주를 순수 분리한 후 상업적으로 가장 중요한 인광석을 효율적으로 용해하는 균주를 2차선별의 주대상으로 삼았다. 즉 각각의 균주를 30℃에서 균주에 따라 3-7일간 PDB-인광석(rock phosphate) 액체배지에서 배양하면서 매일 유리인산을 정량하였다. 그 결과 인광석 분해능이 탁월한 4종의 사상균 균주와 3종의 세균을 최종 분리하였다. 분리된 사상균 균주는 일련번호에 따라 각각 101, 102, 104, 113 균주로 명명하였으며, 세균 3종은 분리지명에 따라 각각 palkong, kaya, yangsan 등으로 명명하여 다음 연구를 위한 공시균주로 활용하였다.

최종적으로 선별된 사상균 균주를 동정하기 위하여 Malt agar배지 및 PDA 배지에서 균체를 배양하면서 육안과 광학현미경을 이용하여 형태관찰을 수행하였다. 그 결과 (Table 1) 위의 두 종류의 배지에서 유사한 형태관찰 결과를 얻었으며 101과 113 균주는 균체 색깔과 포자형태 등에서 전형적인 *Penicillium* sp.로, 104 균주는 *Aspergillus* sp.로 동정되었다. 따라서 이들 동정된 균주들은 각각 *Penicillium* sp. GL-101, *Aspergillus* sp. PS-104, *Penicillium* sp. PS-113으로 명명하였다. 그러나 102 균주와 3종의 세균들은 spore를 형성하지 않았기 때문에 보다 자세한 생리생화학 적 분석결과를 얻어야 동정이 가능할 것이다.

#### 나. 인광석의 성분분석

본 연구를 위하여 사용한 인광석은 중국산으로서 이것을 수입하여 인산비료로 가공, 판매하는 (주)경기화학으로부터 공급받았다. 인광석의 성분분석은 비료관리법상

Table 1. Morphological characteristics of phosphate-solubilizing fungi isolated from soil.

Fungus strain	101	102	104	113
Colony morphology	①Front color: white→green ②Reverse color: yellow ③surface: powdery ④entire shape: brush appearance	①Front color: white ②Reverse color: white ③surface: powdery ④entire shape: velvety appearance	①Front color: dark black ②Reverse color: yellowish white	①Front color: white→green ②Reverse color: yellow ③surface: powdery ④entire shape: brush appearance
Microscopic morphology	①conidiophores: branched ②mycellium: septate ③phialides: flask shape	no spore-forming	①conidiophores: - terminally swelling - unbranched ②mycellium: septate	①conidiophores: branched ②mycellium: septate ③phialides: flask shape
Identified name	<i>Penicillium</i> sp. GL-101	Unidentified sp. 102	<i>Aspergillus</i> sp. PS-104	<i>Penicillium</i> sp. PS-113

의 공정분석법에 따라 실시하였으며, 그 결과는 Table 2에 나타낸 것과 같이 총 인산 함량( $P_2O_5$ )이 34.23이었으며 인산,  $CaO(50.21\%)$ ,  $SiO_2(7.16\%)$  등이 주성분으로서 전체의 약 92%를 차지하였다. 이것은 B.P.L(bone of phosphate lime = 총인산함량 $\times 2.185$ ) 기준으로는 76.76의 중급 품질의 인광석으로 판명되었다.

#### 다. 배양환경에 따른 선발균주들의 인광석 분해능

배양온도(25, 30, 37 $^{\circ}C$ )에 따른 선발균주들의 인광석 분해능에 대한 정량적 분석 결과는 Fig. 1과 같다. 이 결과에 의하면 분리균주들은 인광석으로부터 유리인산의 분해능이 균주에 따라 최대 500-800ppm 정도였으며, 배양온도별 유리인산의 생성량에서 2-3배 정도의 차이를 보임을 알 수 있다. 이와같은 인광석 분해능은 최근에 서등이 보고(1995, 한국토양비료학회지)한 균주에서의 인광석 분해능이 *Pseudomonas putida*에서 20ppm, *Penicillium sp.* 에서의 80ppm, *Aspergillus niger*에서 400ppm 등의 수준인 점과 비교했을 때 월등히 높은 결과였다.

초기 pH(pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5)에 따른 곰팡이 균주들의 인광석 분해능에 대한 정량적 분석 결과는 Fig. 2와 같다. 이 결과에 따르면 배양온도를 30 $^{\circ}C$ 로 고정했을 때 인광석으로부터 유리인산의 생성량이 균주에 따라 최대 500 - 1,100ppm까지 증가함을 알 수 있었다. 또한 인광석 가용화균에 의한 배양액의 초기 pH에 대한 최종 pH 변화를 조사한 결과(Table 3) 최종 pH가 낮을수록 유리인산의 생성량이 증가함을 알 수 있다. 따라서 이 균주들은 유리인산 생성의 기작이 이 균주들이 생성하는 유기산에 의한 것으로 생각할 수 있다. 지금까지 알려진 유리인산 생성 기작은 황화수소, 유기산 생성 등 다양한 기작이 알려져 있다. 미생물이 생성하는 유기산의 형태는 oxalic acid, malonic acid, succinic acid, 2-ketogluconic acid, tartaric acid, citric acid 등으로 다양하며, 본 균주가 어떤 종류의 유기산을 생성하는지 알기 위해서는 배양액의 성분분석이 필요할 것이다.

#### 라. 인산염 가용화 미생물에 대한 배지 최적화

**Table 2. Contents of rock phosphate from China**

구 성 성 분	함 량 비 (%)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	34.23
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.52
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.77
CaO	50.21
SiO <sub>2</sub>	7.16
F	3.23
Ignition-loss	3.83
H <sub>2</sub> O	2.55

**Table 3. Terminal pH changes during the culture of phosphate-solubilizing fungi at various initial pHs.**

Fungus Initial pH	<i>Penicillium</i> sp. GL-101 Terminal pH	unidentified sp. 102 Terminal pH	<i>Aspergillus</i> sp. PS-104 Terminal pH	<i>Penicillium</i> sp. PS-113 Terminal pH
6.0	3.2	2.3	3.2	2.9
6.5	4.5	2.4	3.2	2.9
7.0	3.3	2.5	3.2	3.1
7.5	3.0	2.4	3.2	3.1

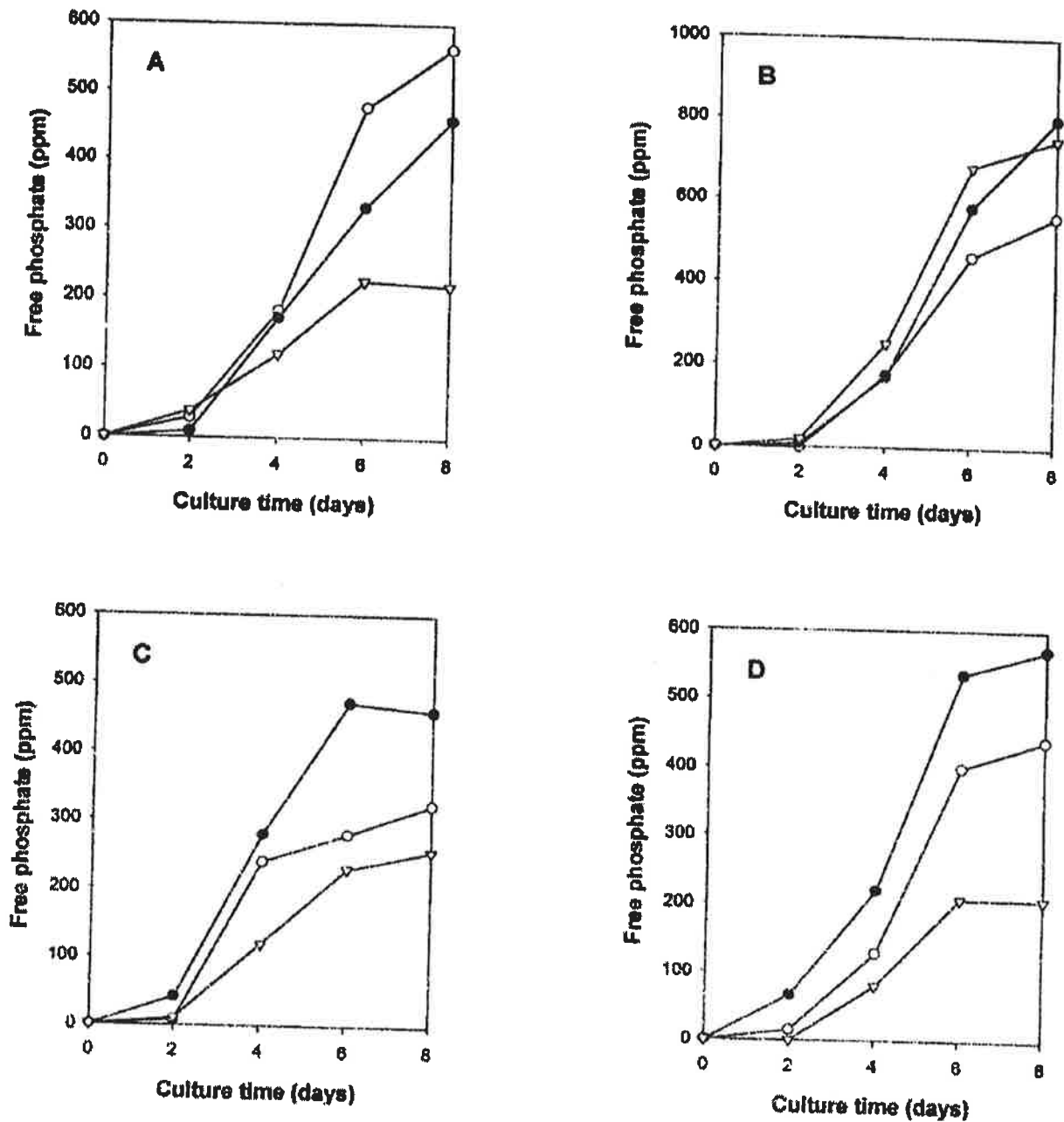


Fig. 1. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of phosphate-solubilizing fungi (A: *Penicillium* sp. GL-101, B: unidentified sp. 102, C: *Aspergillus* sp. PS-104 and D: *Penicillium* sp. PS-113) at various temperatures with time courses. Symbols denote ○-○; 25°C, ●-●; 30°C and ▽-▽; 37°C.



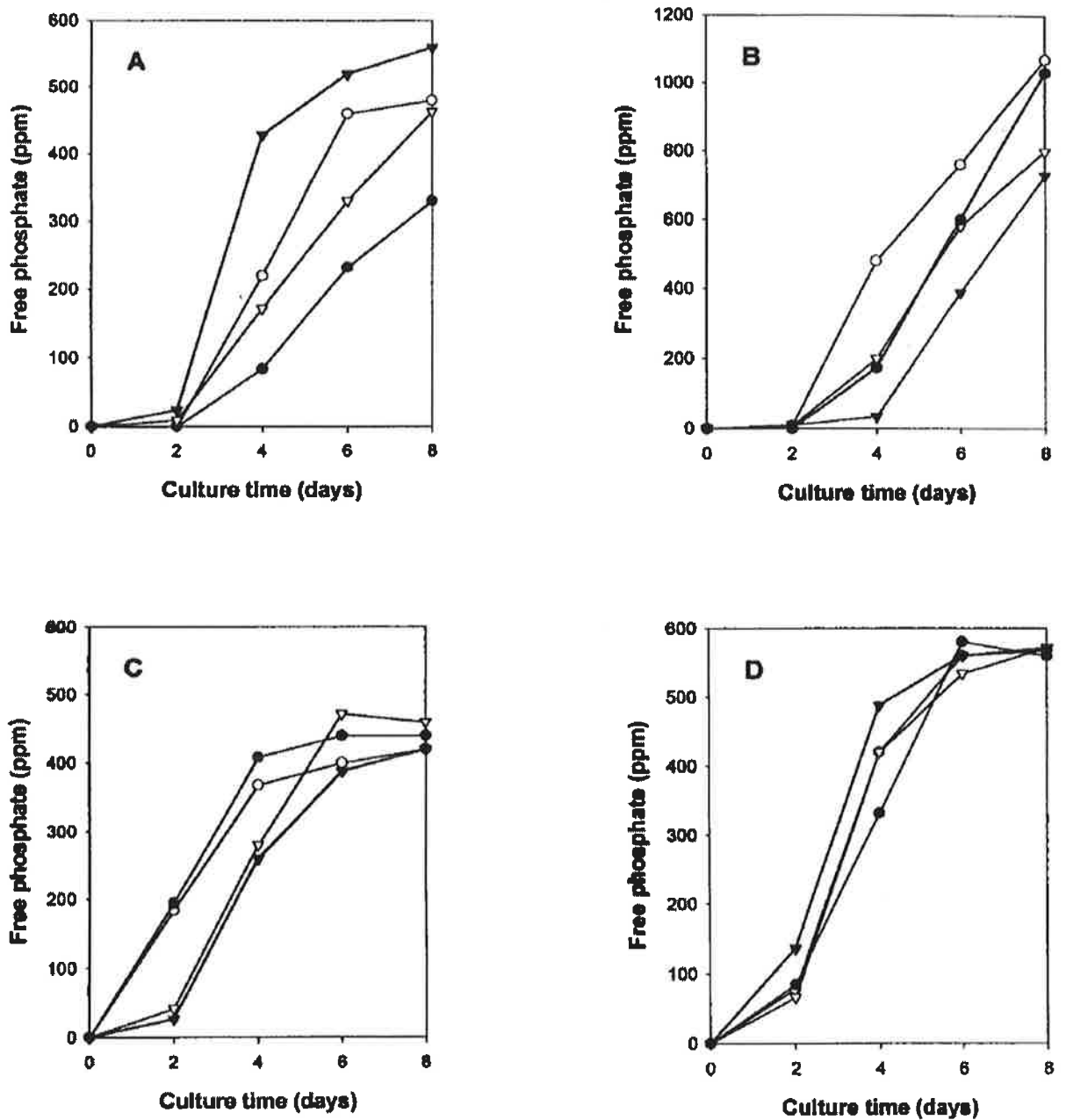


Fig. 2. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of phosphate-solubilizing fungi (A: *Penicillium* sp. GL-101, B: unidentified sp. 102, C: *Aspergillus* sp. PS-104 and D: *Penicillium* sp. PS-113) at various initial pHs with time courses. Symbols denote ▼-▼; pH 6.0, ○-○; pH 6.5, ▽-▽; pH 7.0 and ●-●; pH 7.5.

## 1) 난용성 인산염의 종류에 따른 유리인산 생성능

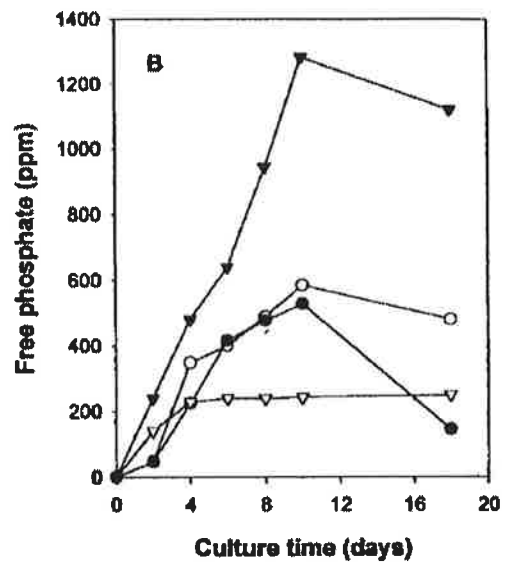
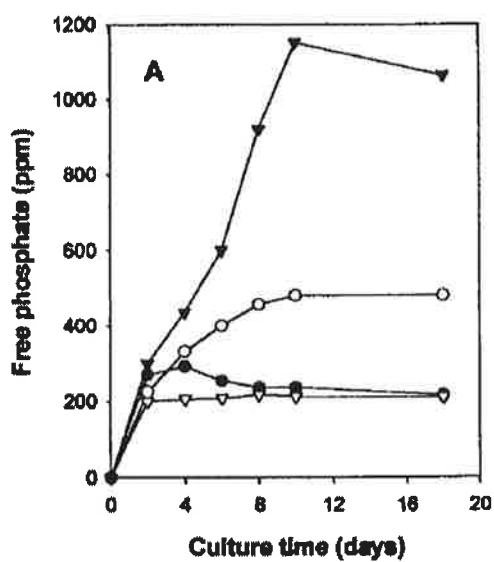
인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. GL-101과 *Penicillium* sp. PS-113 균주의 난용성 인산염(rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite, tricalcium phosphate)에 대한 인산가용화능을 측정된 결과(Fig. 3) tricalcium phosphate > rock phosphate > aluminium phosphate > hydroxyapatite 순서로 분해가 잘 되는 것으로 나타났다.

## 2) 다양한 질소원의 첨가에 따른 유리인산 생성능

인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. GL-101, *Aspergillus* sp. PS-104 및 *Penicillium* sp. PS-113 균주를 질소원으로 각각 potassium nitrate, sodium nitrate, ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium nitrate를 첨가한 후 배양하면서 난용성 인산염들에 대한 분해효율을 조사한 결과는 Fig. 4 - Fig. 6에 나타내었다. 또한 미생물에 의한 배양액 중의 pH 변화에 대해서도 Fig. 7 - Fig. 9에 나타내었다.

## 마. 인산가용화균의 대량배양

인산가용화균의 공업적 대량생산을 위하여 보리, 옥수수, 퇴비 등의 값싼 고체배지를 이용하여 각 배지에 대한 배양시간별 포자(conidia) 생성능을 조사하였다. 실험방법은 50ml conical tube에 분쇄한 보리, 옥수수, 퇴비 등을 10g씩 넣은 후 121℃, 15분간 멸균한 다음 수분함량을 40, 50, 60%로 조절하여 고체배지를 제조하였다. 이 배지에 tube당  $3.6 \times 10^3$ 개의 *Penicillium* sp. GL-101, *Aspergillus* sp. PS-104, *Penicillium* sp. PS-113 균주의 conidia를 각각 접종하여 25℃에서 5, 10, 15, 20일 동안 항온배양하면서 포자수를 측정하였다. 그 결과 *Penicillium* sp. GL-101 (Fig. 10 - 15), *Aspergillus* sp. PS-104 (Fig. 16 - 21) 및 *Penicillium* sp. PS-113 (Fig. 22 - 27)



**Fig. 3. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101(A) and PS-113(B) in the SDB media containing various insoluble-phosphates with time courses.**

○-○; rock phosphate,      ●-●; aluminium phosphate,  
 ▼-▼; hydroxyapatite,      ▼-▼; tricalcium phosphate.

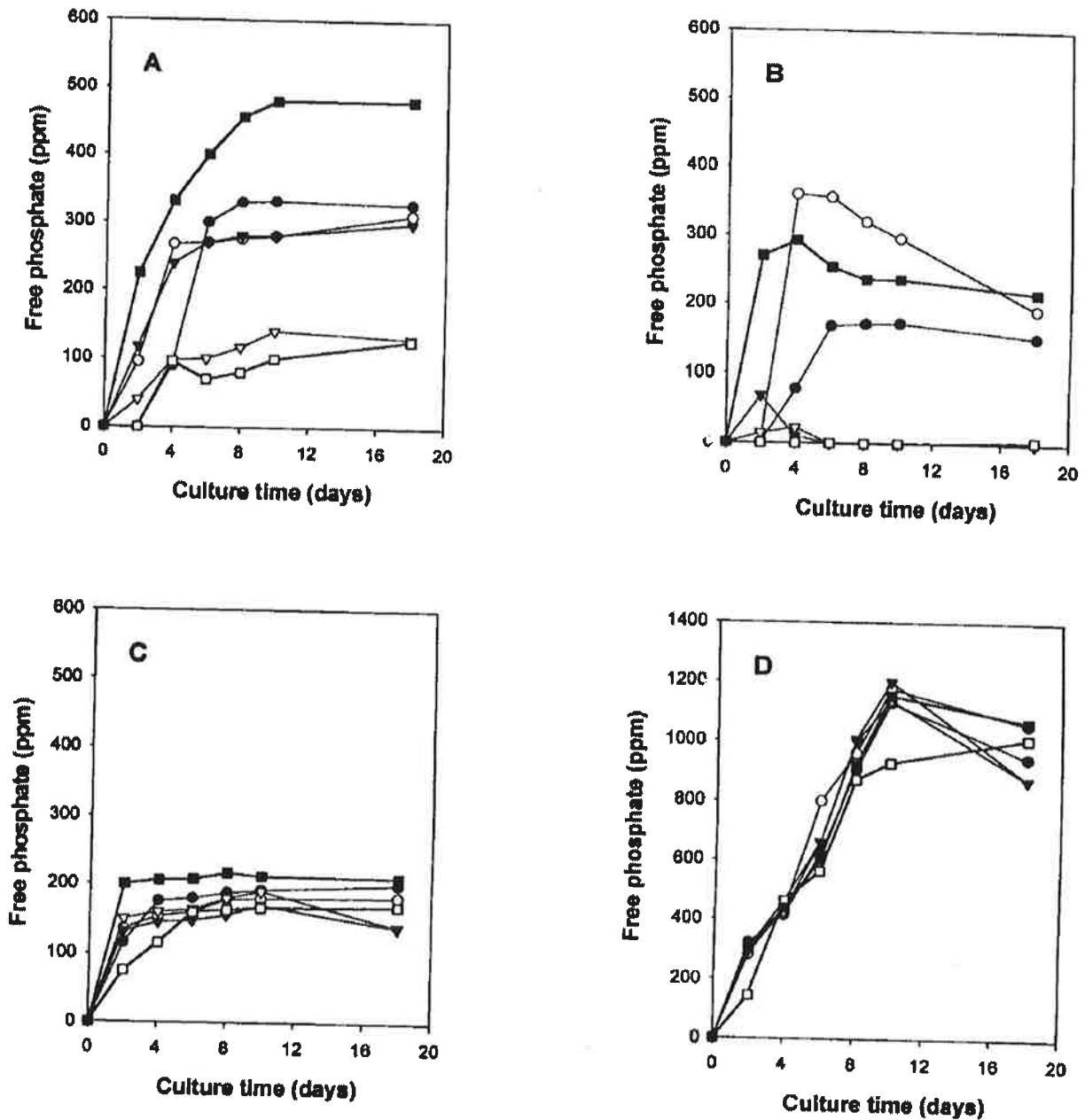


Fig. 4. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101 in the SDB media containing various insoluble-phosphates (A; rock phosphate, B; aluminium phosphate, C; hydroxyapatite and D; tricalcium phosphate) and nitrogen sources with time courses.

○-○; potassium nitrate, ●-●; sodium nitrate, ▽-▽; ammonium chloride, ▼-▼; ammonium sulfate. □-□; ammonium nitrate, ■-■; control.

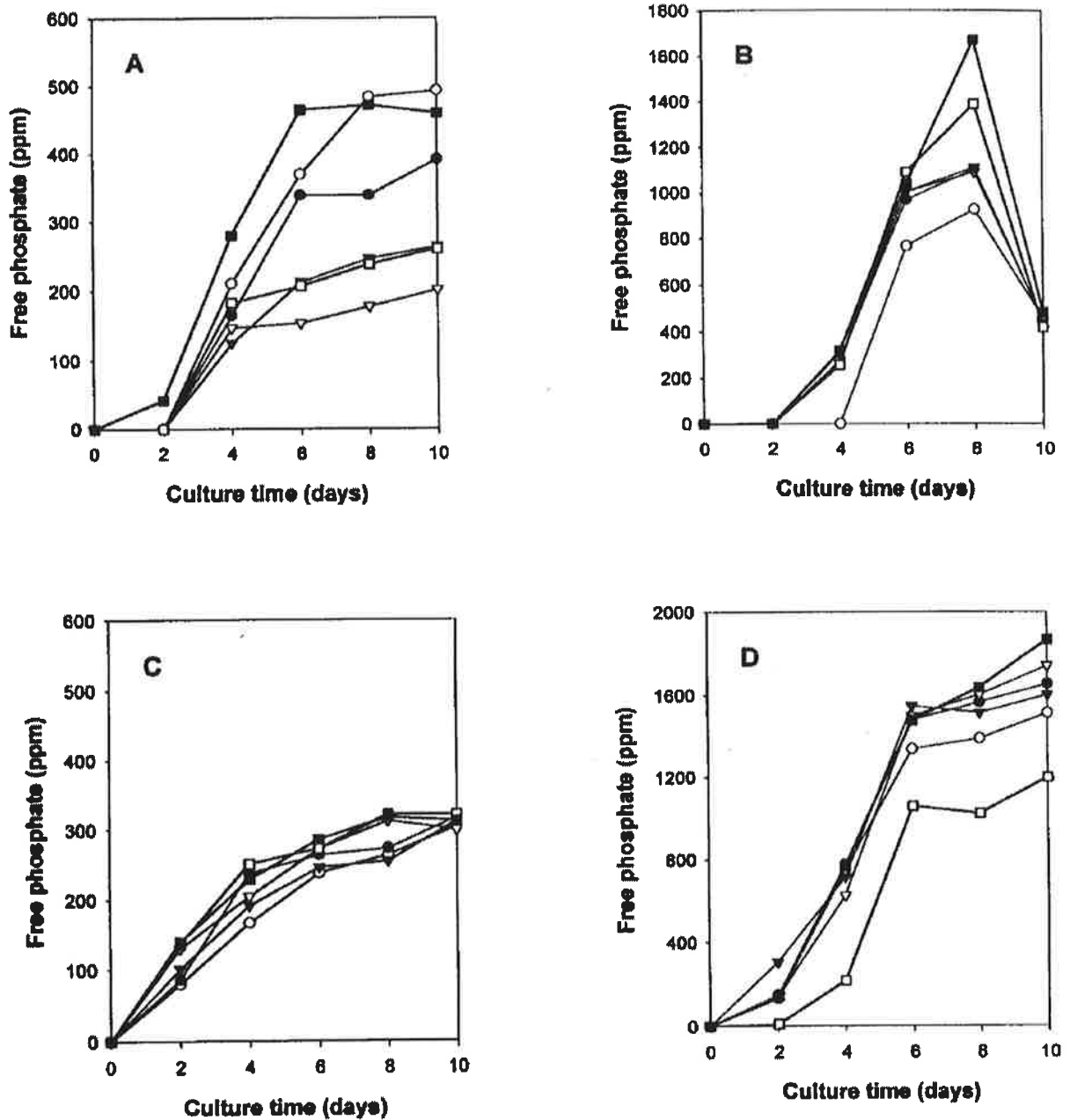


Fig. 5. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Aspergillus* sp. PS-104 in the SDB media containing various insoluble-phosphates (A; rock phosphate, B; aluminium phosphate, C; hydroxyapatite and D; tricalcium phosphate) and nitrogen sources with time courses.

○-○; potassium nitrate, ●-●; sodium nitrate, ▽-▽; ammonium chloride, ▼-▼; ammonium sulfate. □-□; ammonium nitrate, ■-■; control.

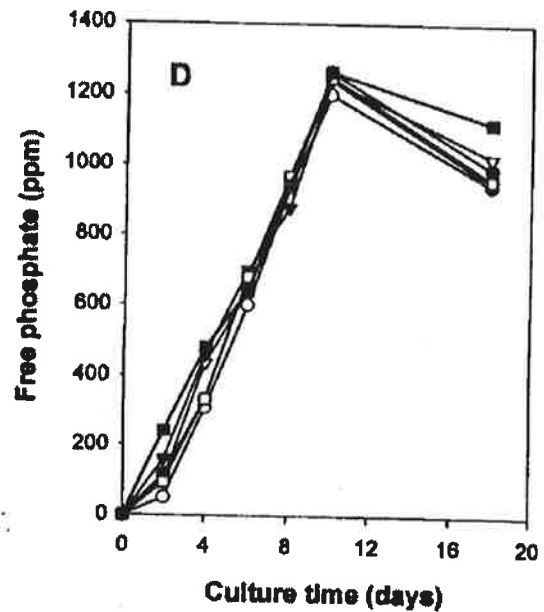
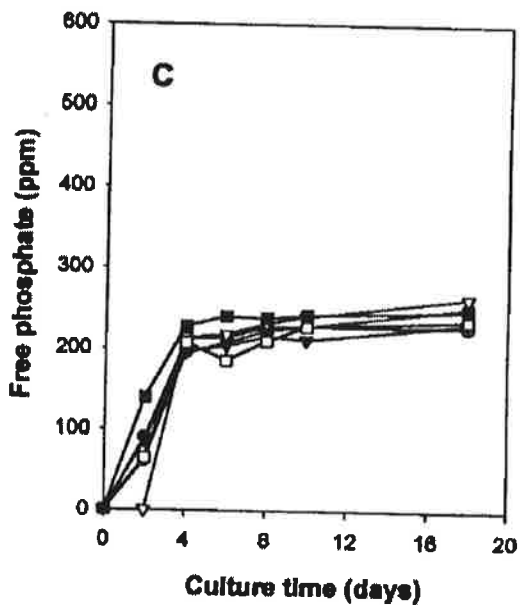
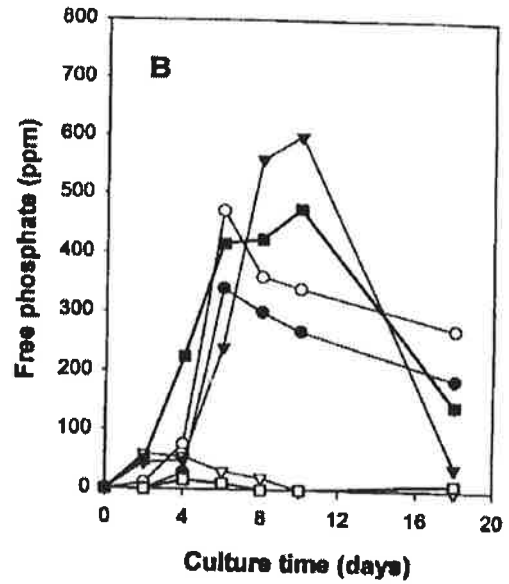
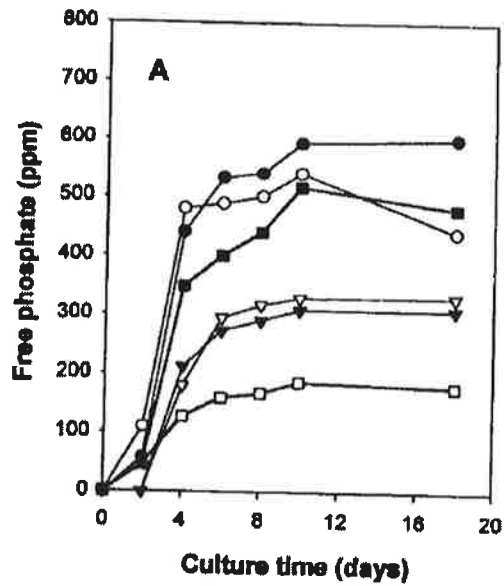


Fig. 6. Changes of free phosphate concentrations during the cultivation of *Penicillium* sp. PS-113 in the SDB media containing various insoluble-phosphates (A; rock phosphate, B; aluminium phosphate, C; hydroxyapatite and D; tricalcium phosphate) and nitrogen sources with time courses.

○-○; potassium nitrate, ●-●; sodium nitrate, ▽-▽; ammonium chloride, ▼-▼; ammonium sulfate. □-□; ammonium nitrate, ■-■; control.

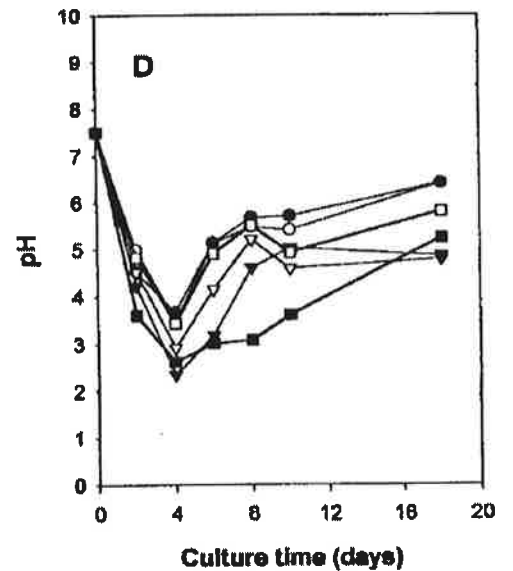
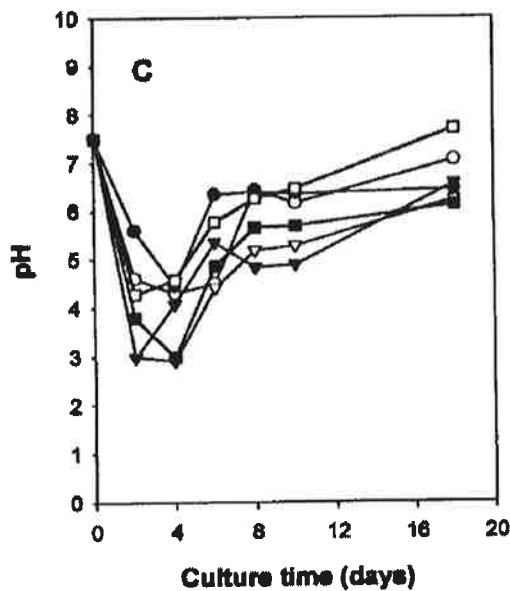
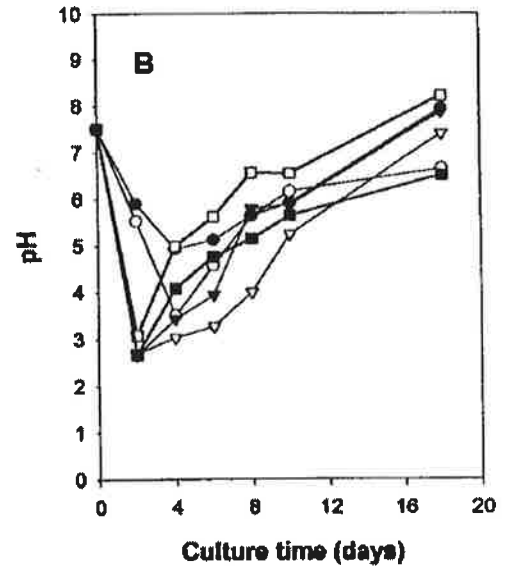
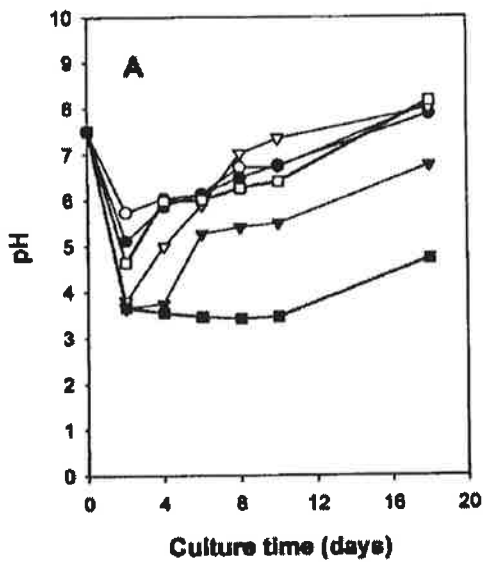


Fig. 7. Changes of pH values during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101 in the SDB media containing various insoluble-phosphates (A; rock phosphate, B; aluminium phosphate, C; hydroxyapatite and D; tricalcium phosphate) and nitrogen sources with time courses.

○-○; potassium nitrate, ●-●; sodium nitrate, ▽-▽; ammonium chloride, ▼-▼; ammonium sulfate. □-□; ammonium nitrate, ■-■; control.

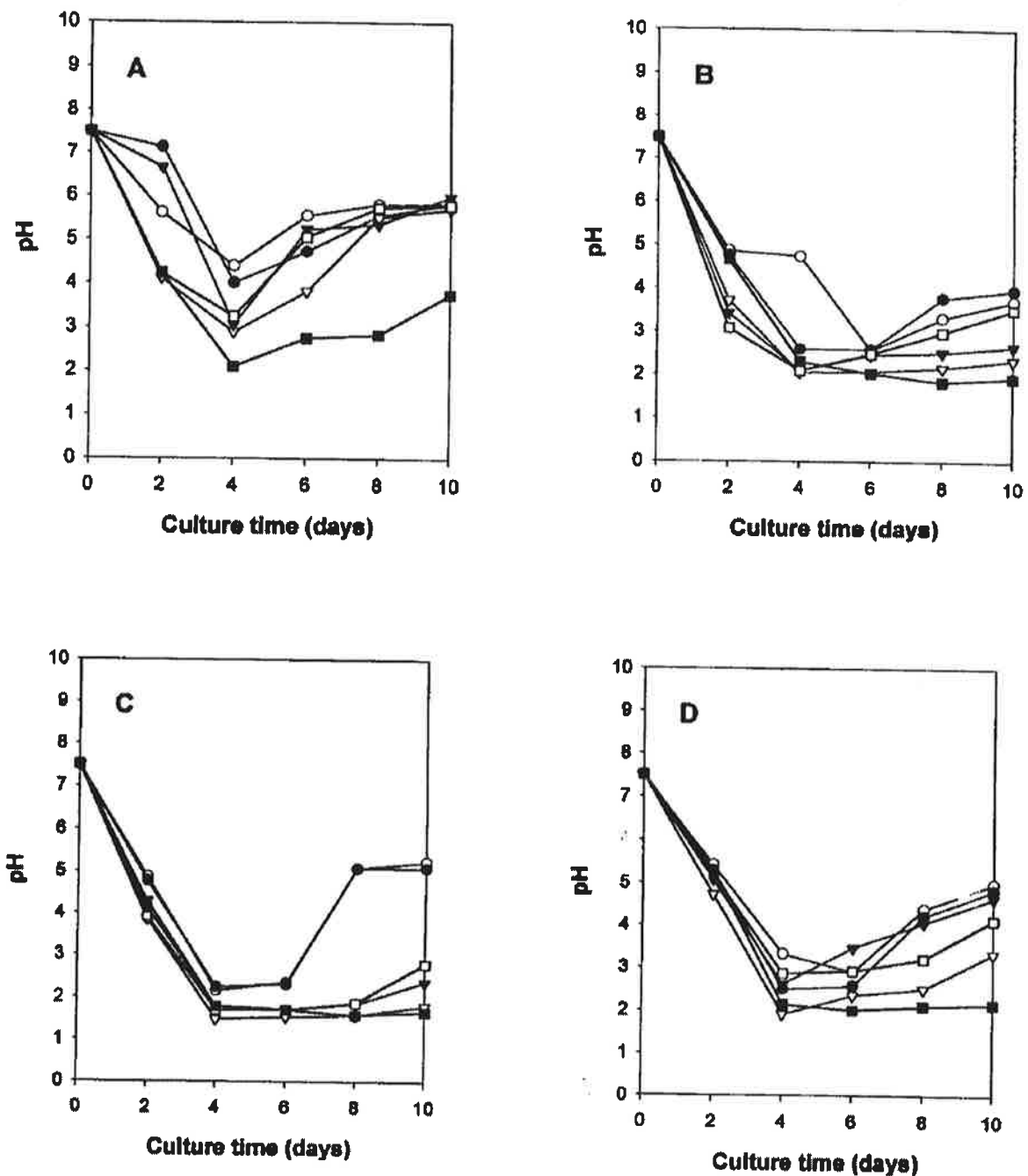


Fig. 8. Changes of pH values during the cultivation of *Aspergillus* sp. PS-104 in the SDB media containing various insoluble-phosphates (A; rock phosphate, B; aluminium phosphate, C; hydroxyapatite and D; tricalcium phosphate) and nitrogen sources with time courses. ○-○; potassium nitrate, ●-●; sodium nitrate, ▽-▽; ammonium chloride, ▼-▼; ammonium sulfate. □-□; ammonium nitrate, ■-■; control.



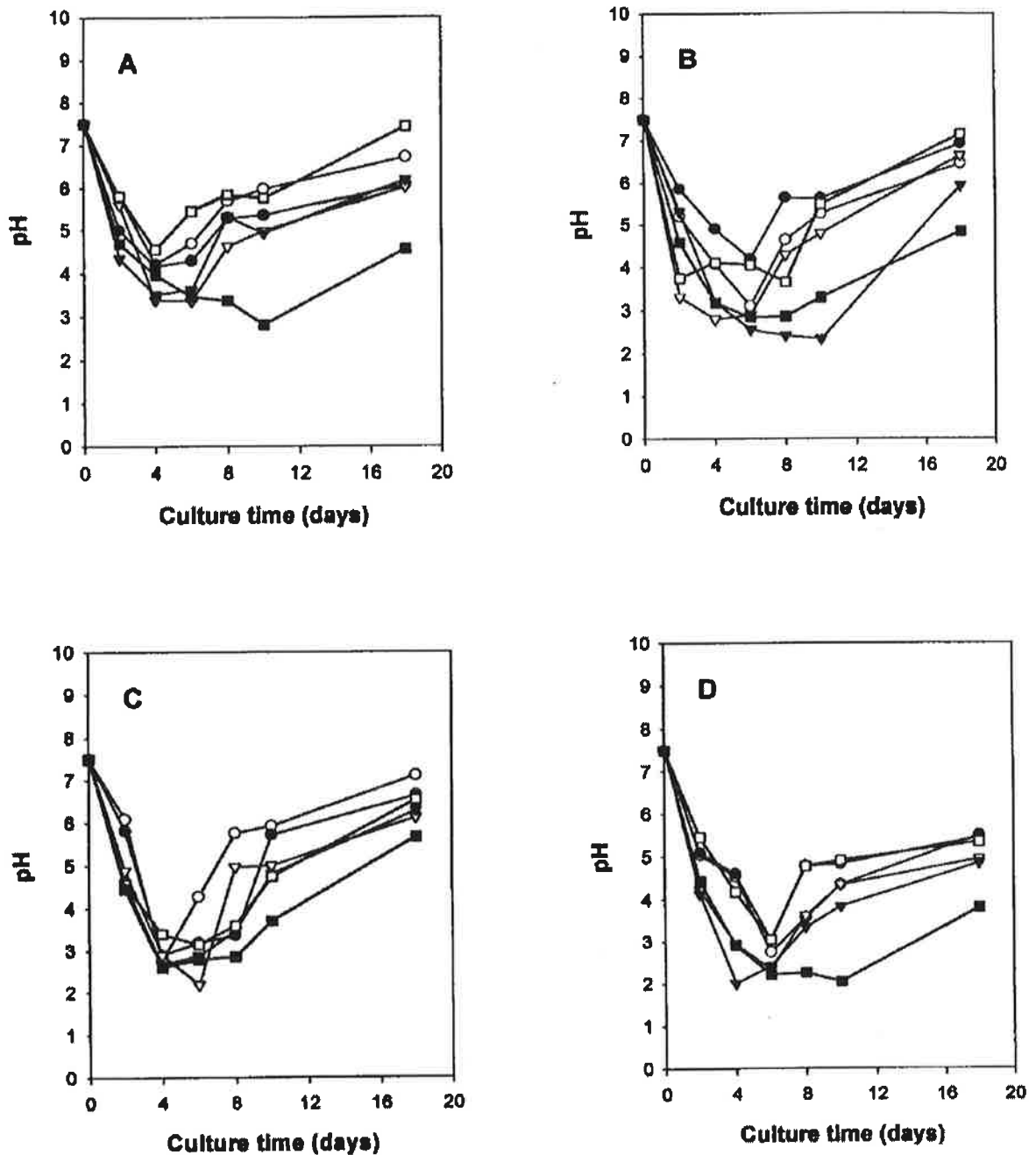


Fig. 9. Changes of pH values during the cultivation of *Penicillium* sp. PS-113 in the SDB media containing various insoluble-phosphates (A; rock phosphate, B; aluminium phosphate, C; hydroxyapatite and D; tricalcium phosphate) and nitrogen sources with time courses.

○-○; potassium nitrate, ●-●; sodium nitrate, ▽-▽; ammonium chloride, ▼-▼; ammonium sulfate. □-□; ammonium nitrate, ■-■; control.

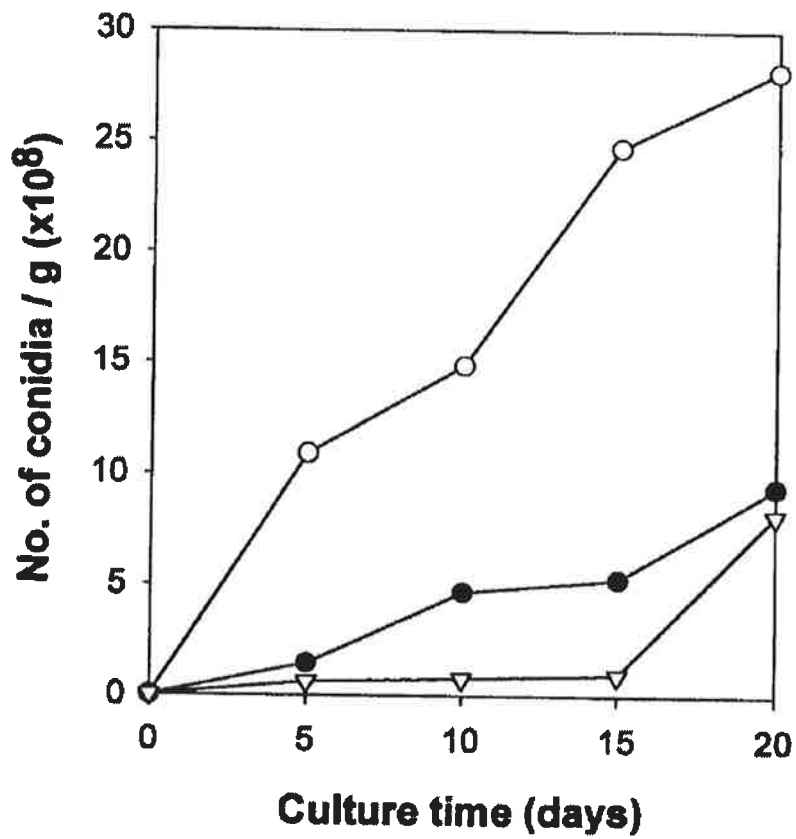


Fig. 10. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 culturing on rice-cooked solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

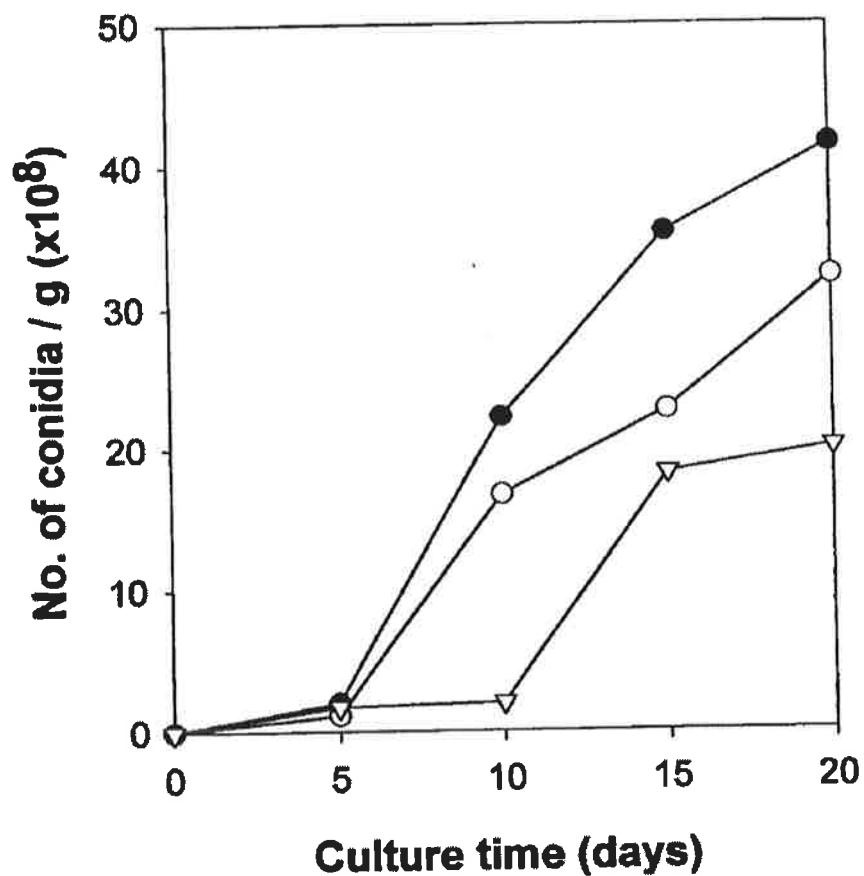


Fig. 11. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 culturing on barley solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

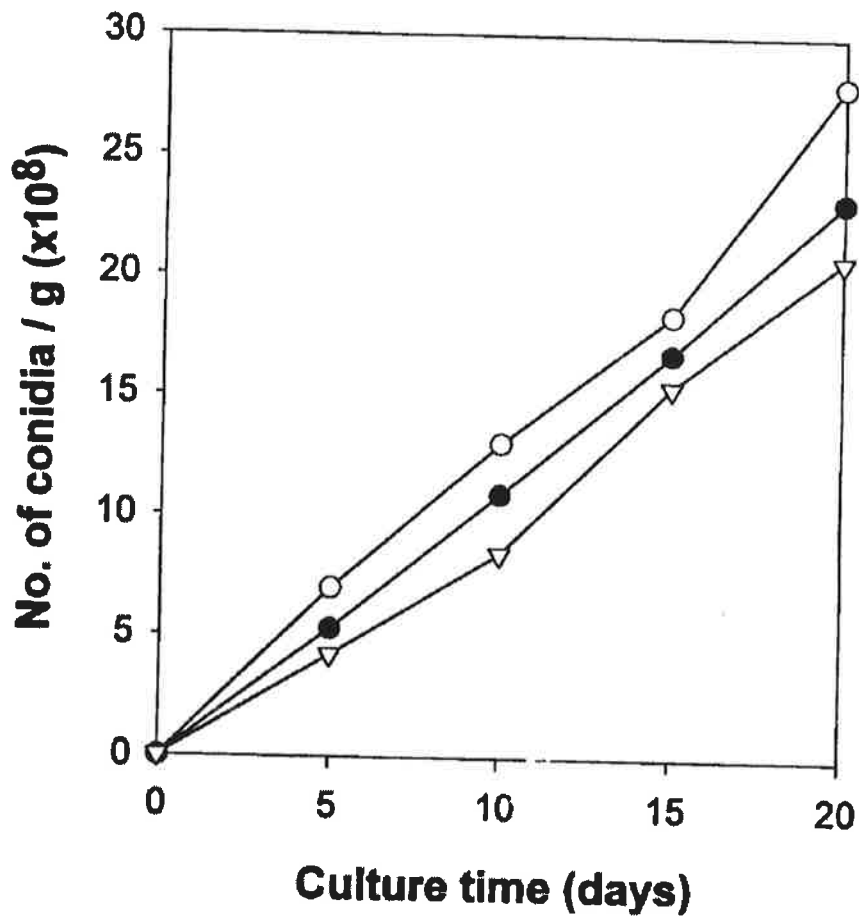


Fig. 12. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 culturing on wheat solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

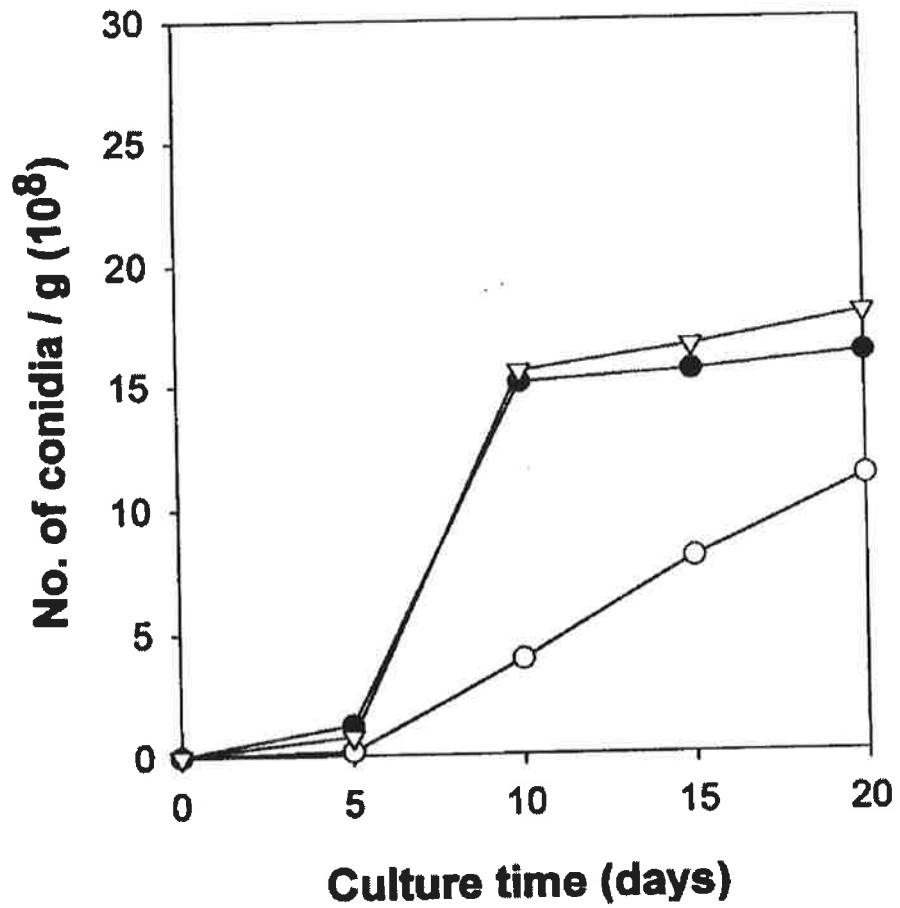


Fig. 13. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 culturing on corn solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

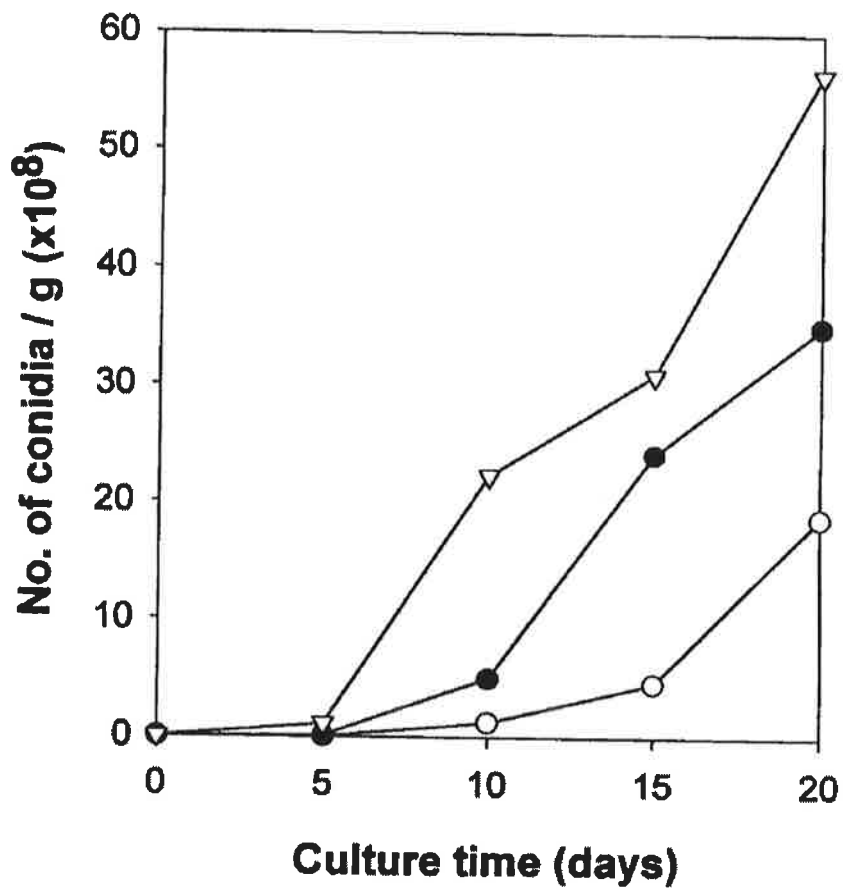


Fig. 14. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 culturing on rice bran solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

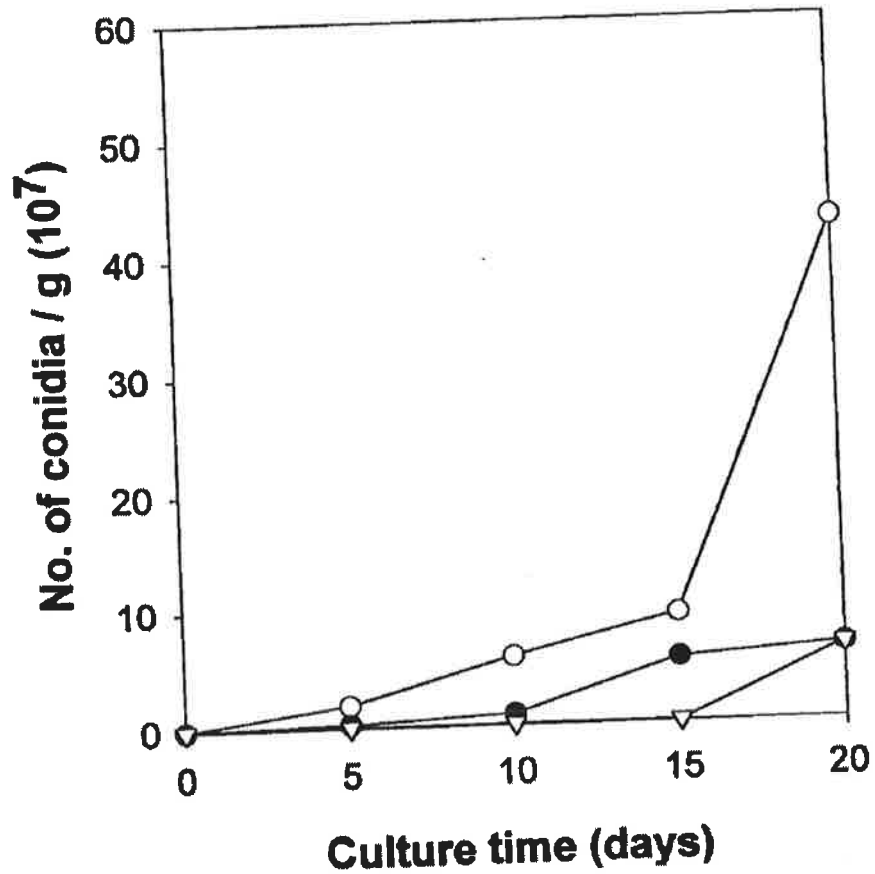


Fig. 15. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 culturing on compost solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

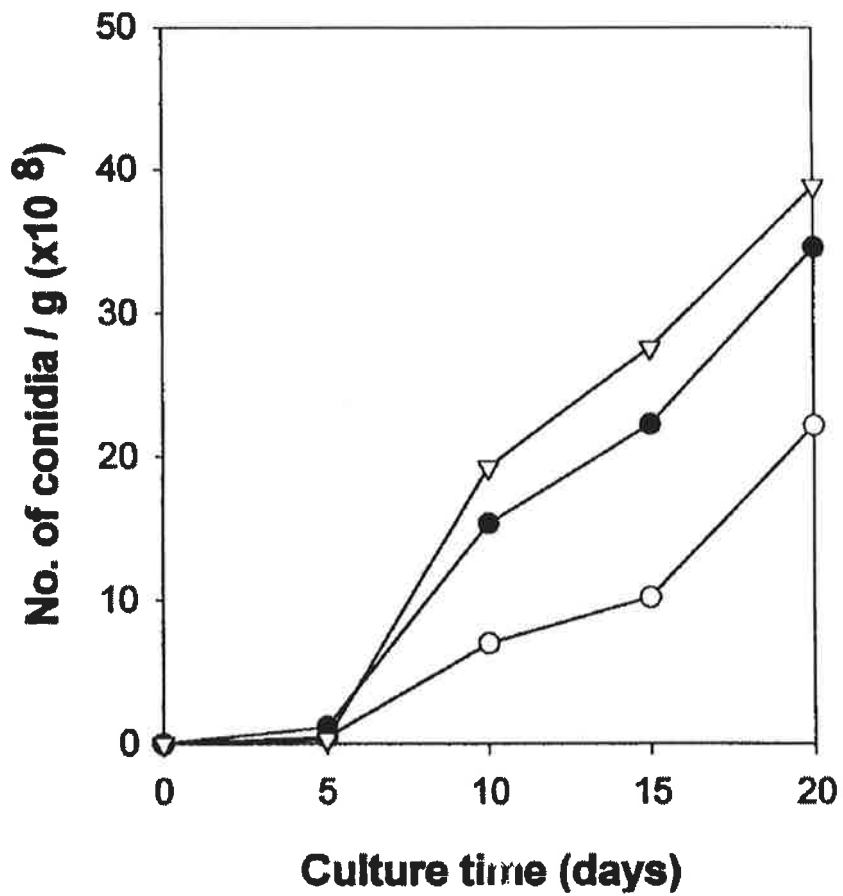


Fig. 16. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 culturing on rice-cooked solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.



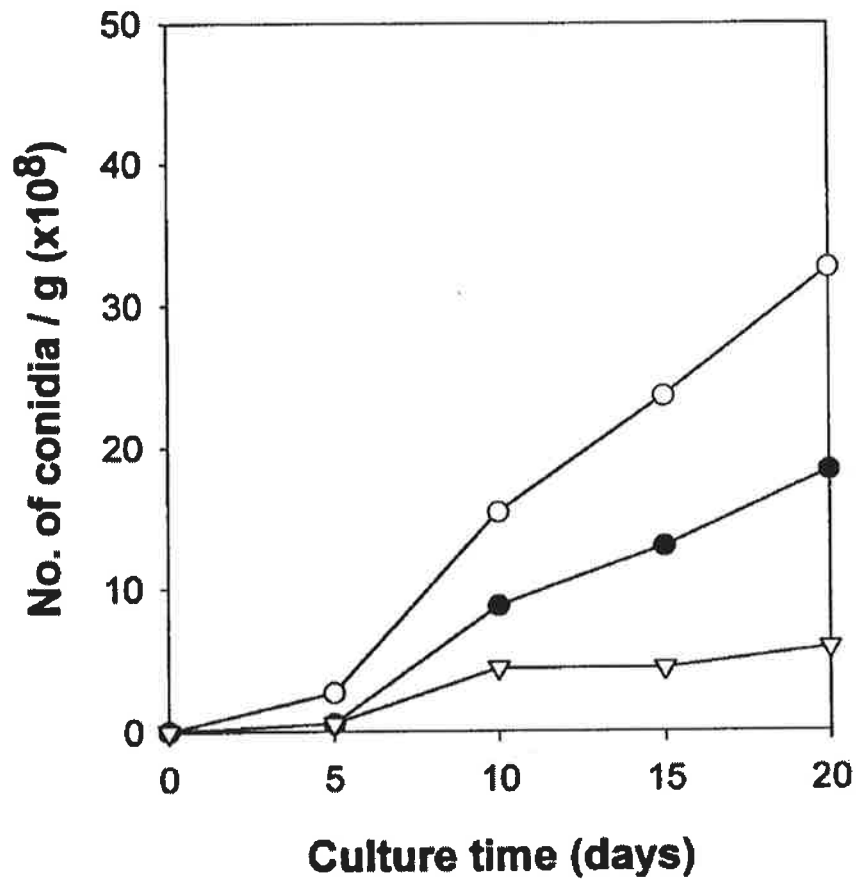


Fig. 17. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 culturing on barley solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

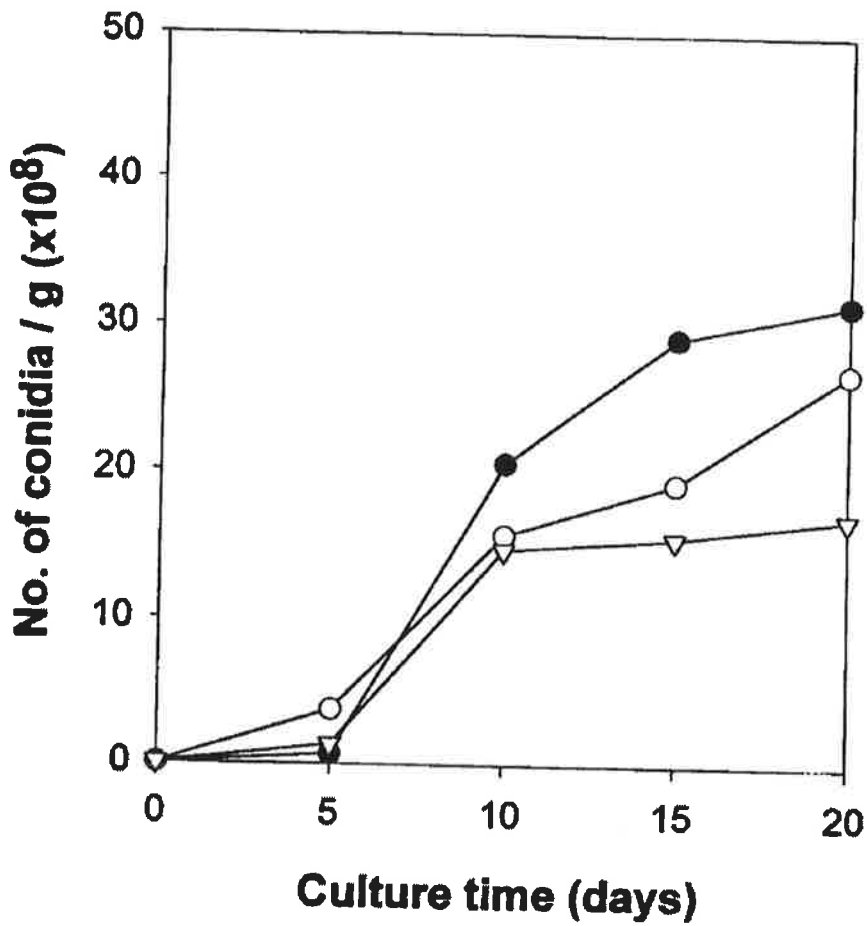


Fig. 18. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 culturing on wheat solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

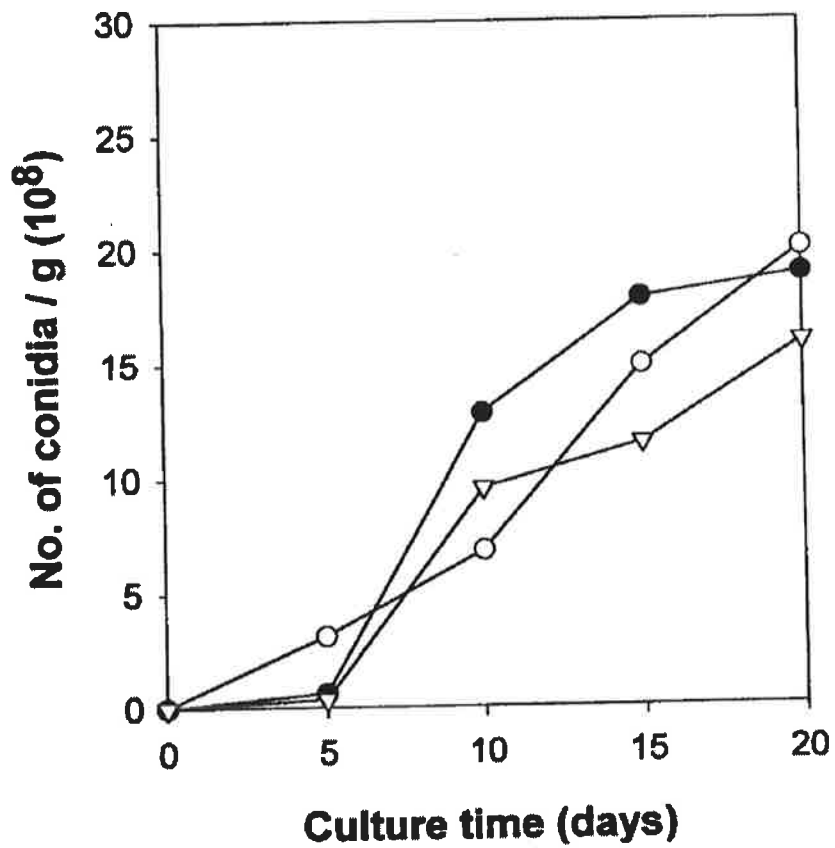


Fig. 19. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 culturing on corn solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

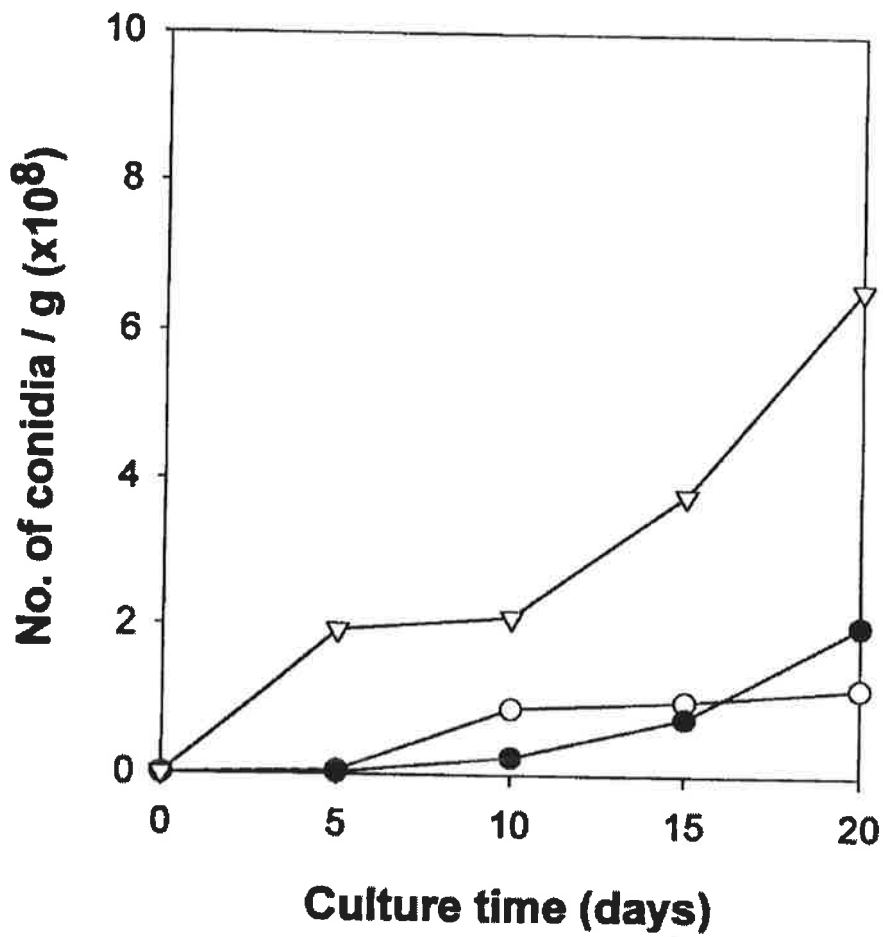


Fig. 20. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 culturing on rice bran solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

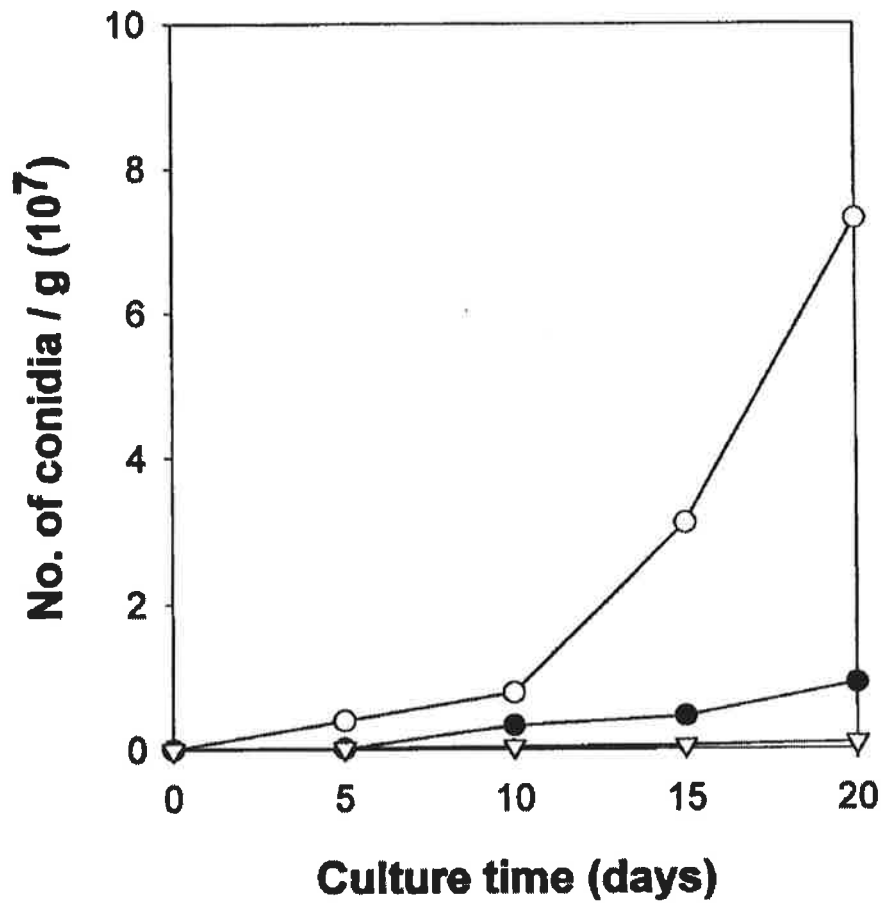


Fig. 21. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 culturing on compost solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

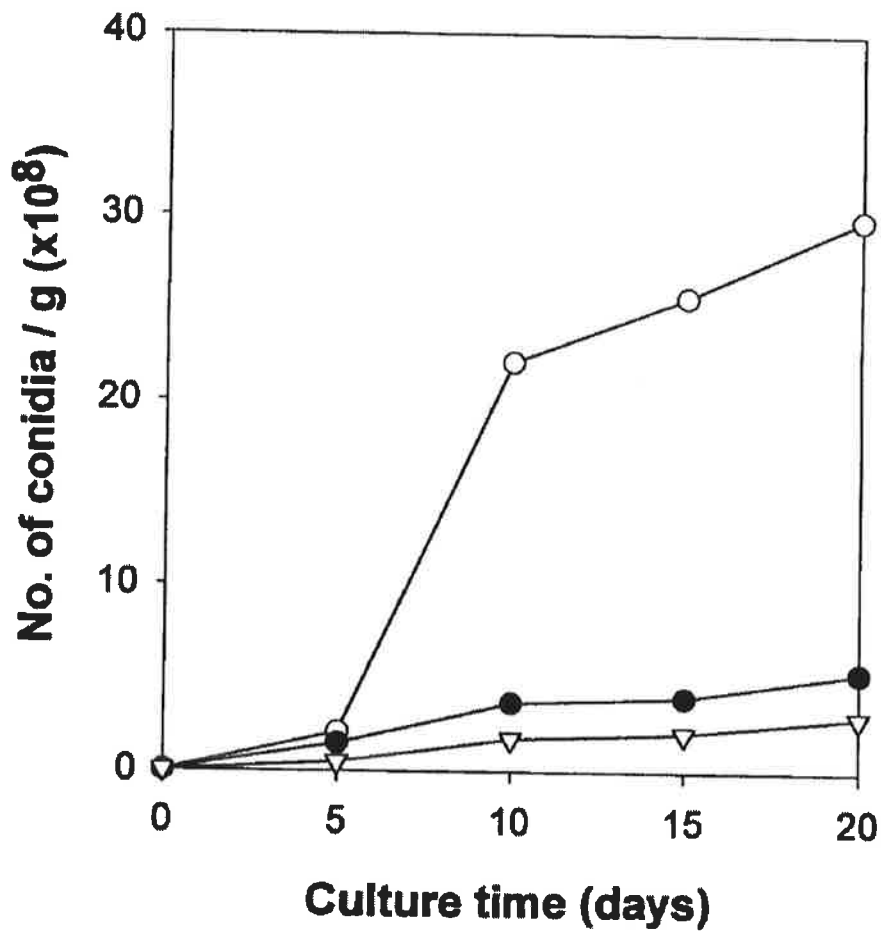


Fig. 22. Conidial numbers of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on rice-cooked solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

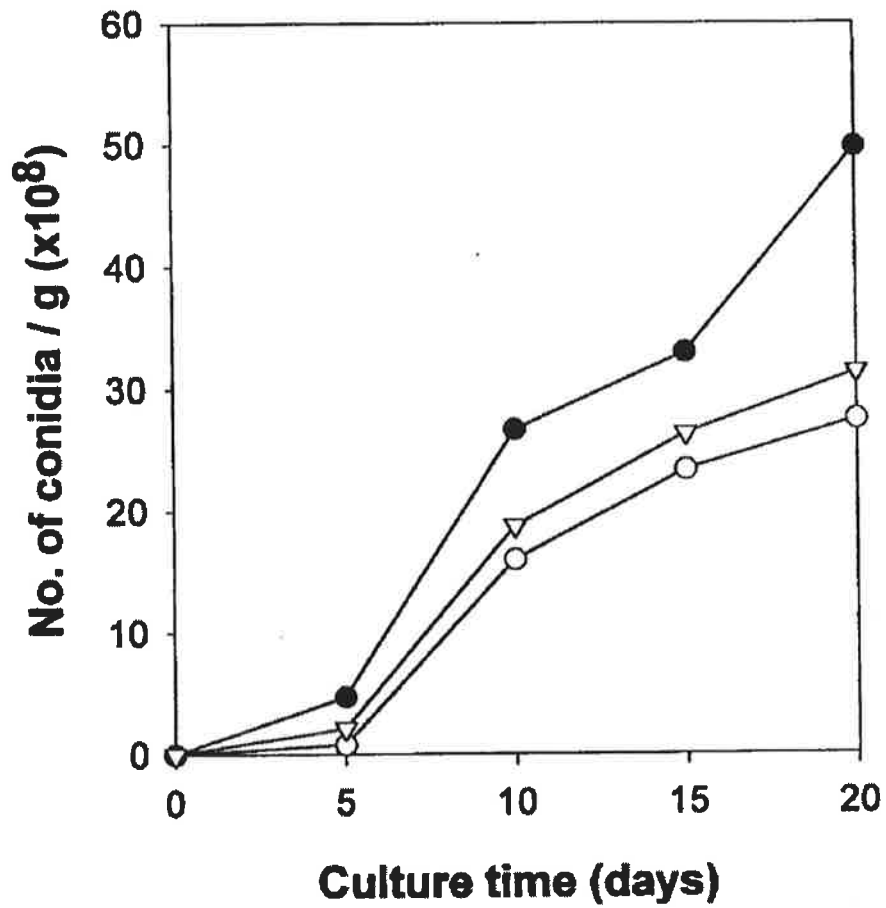


Fig. 23. Conidial numbers of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on barley solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

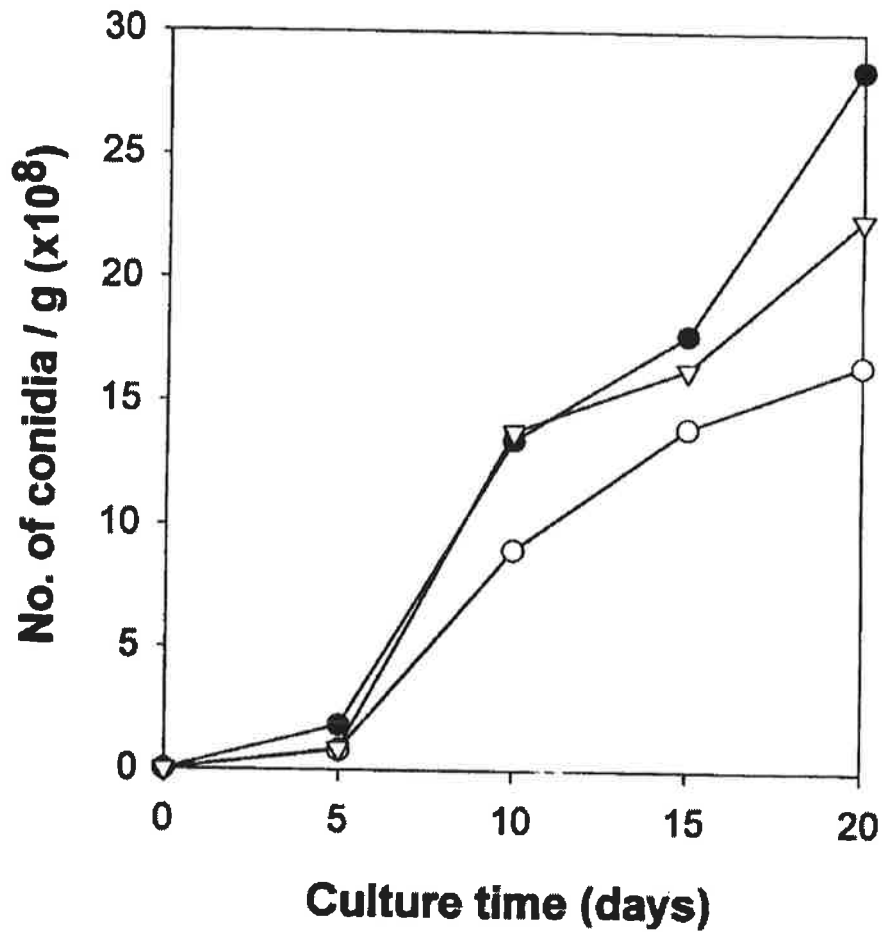


Fig. 24. Conidial numbers of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on wheat solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.



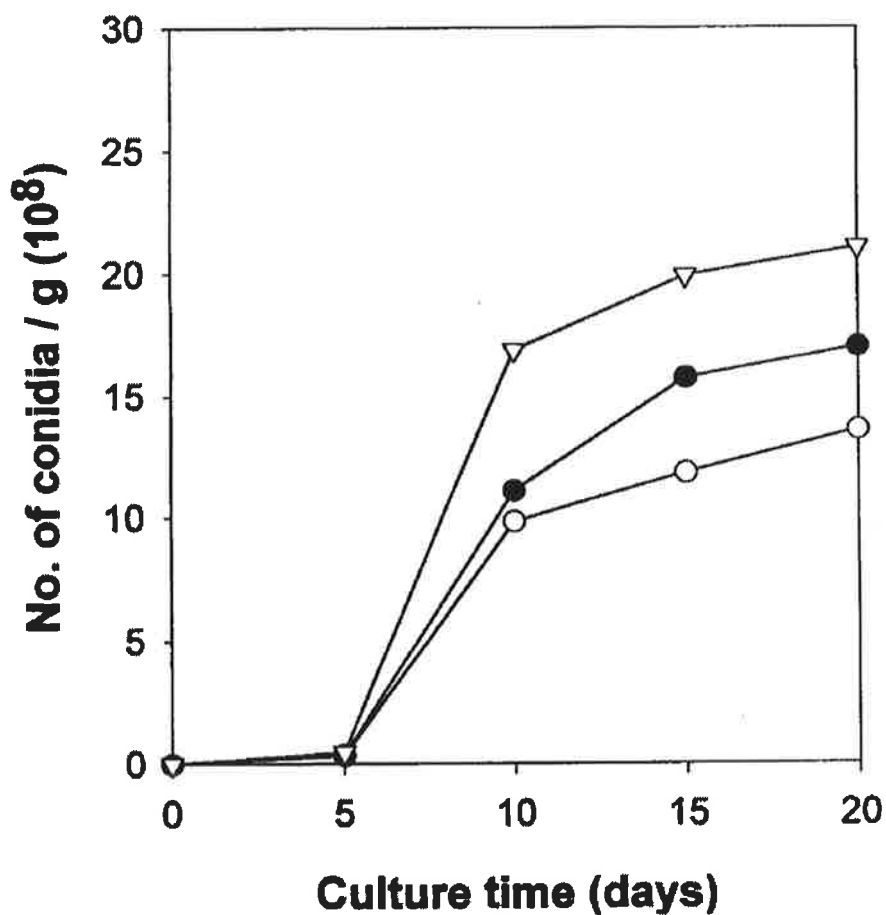


Fig. 25. Conidial numbers of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on corn solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

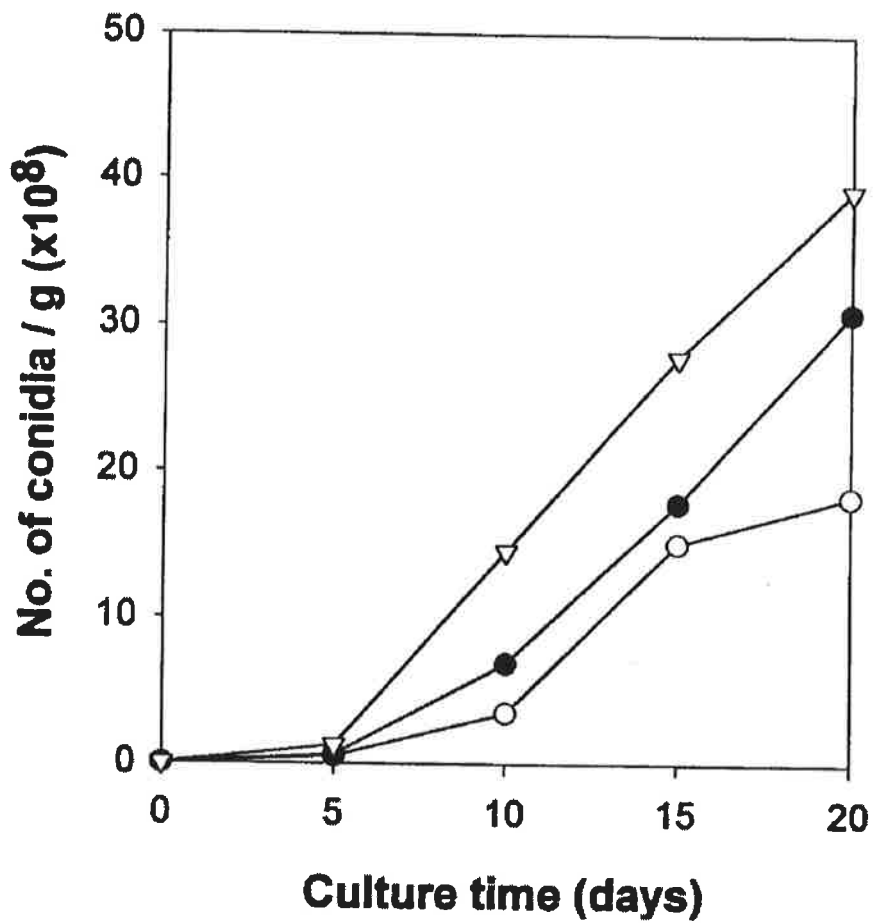


Fig. 26. Conidial numbers of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on rice bran solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

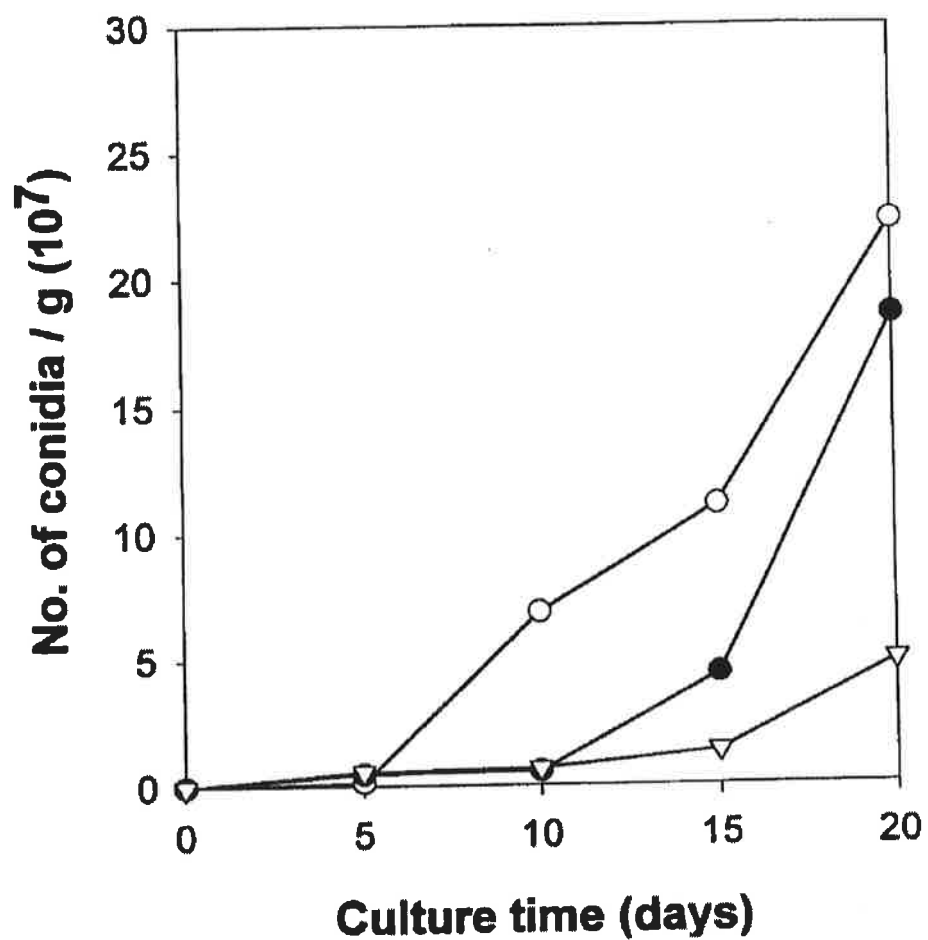


Fig. 27. Conidial numbers of *Penicillium* sp. PS-113 culturing on compost solid media at various humidities. Symbols denote ○-○; 40% humidity, ●-●; 50% humidity and ▽-▽; 60% humidity.

세 균주에서 똑같이 퇴비를 제외한 보리, 옥수수, 밀, 쌀겨 등의 값싼 곡물배지에서 포자형성능이 우수한 것으로 나타났다.

#### 바. 인산가용화균의 장기보존

인산가용화 사상균을 biofertilizer로 실용화하기 위해서는 이들 미생물을 포함하는 미생물제제를 장기보존하는 방법을 개발하여야 한다. 이를 위해서 zeolite, talc, diatomite, bentonite, kaoline, rice bran 등의 증량제를 인산가용화 사상균에 첨가하여 4℃에서 장기보관(6개월)하면서 *Penicillium* sp. GL-101 균주(Table 4-9) 및 *Aspergillus* sp. PS-104 균주(Table 10-15)의 conidia 생존율을 조사하였다. 그 결과 4℃에서 보관할 경우 두 균주는 6개월까지 시험한 모든 종류의 증량제에 대해서 포자 생존율이 90% 이상인 것으로 나타났다.

#### 사. 인산가용화균의 시비효과

인산 가용화 사상균 균주의 생물비료로서의 작물 생육에 대한 생육증진 효과를 조사하기 위하여 pot에서 옥수수(*Zea mays* Suwon 19) 재배시험을 실시하였다(Fig. 28)(Table 16, 17). 실험방법은 옥수수를 양토에서 발아시킨 후 약 250g의 perlite(삼순:국산)를 채운 pot[ $\varnothing 30$ (지름) $\times 30$ cm(높이)]에 옮겨 심은 후 다양한 영양조건하에서 growth chamber를 이용하여 60일간 배양하면서 5일간격으로 성장한 식물의 높이(Fig. 28) 및 최종 수확 후의 무게(Table 16)와 뿌리길이(Table 17)를 측정하여 비교·분석하였다. 그 결과 인산가용화균 *Penicillium* sp. GL-101과 *Aspergillus* sp. PS-104 균주를 첨가한 pot에서의 옥수수 생육상태가 미생물을 첨가하지 않은 대조구에 비해 월등히 좋음을 알 수 있다.

또한 인산가용화균의 field에서의 작물생육에 대한 효과를 시험하기 위하여 9개의 시험포장(60cm  $\times$  5.0m)에서 옥수수 재배시험을 실시하였다. 시험방법은 각 포장의 토양을 잘 부순 후 3개 포장은 그대로, 다른 3개 포장은 인광석(3.5g/포장)을 첨가하며,

Table 4. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 during the storage at 4°C in bentonite as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$6.0 \times 10^{11}$	$6.0 \times 10^{11}$	$6.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$
Barly	$7.3 \times 10^{11}$	$7.3 \times 10^{11}$	$7.3 \times 10^{11}$	$7.3 \times 10^{11}$
Wheat	$7.2 \times 10^{11}$	$7.2 \times 10^{11}$	$7.2 \times 10^{11}$	$7.2 \times 10^{11}$
Corn	$3.1 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$1.3 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$

Table 5. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 during the storage at 4°C in diatomite as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$2.3 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$
Barly	$6.6 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$
Wheat	$1.8 \times 10^{11}$	$1.8 \times 10^{11}$	$1.8 \times 10^{11}$	$1.8 \times 10^{11}$
Corn	$6.2 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$1.9 \times 10^{11}$	$1.9 \times 10^{11}$	$1.9 \times 10^{11}$	$1.9 \times 10^{11}$

Table 6. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 during the storage at 4°C in kaoline as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$1.3 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$
Barly	$5.5 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$1.6 \times 10^{11}$	$1.6 \times 10^{11}$
Wheat	$1.4 \times 10^{11}$	$1.4 \times 10^{11}$	$1.4 \times 10^{11}$	$1.4 \times 10^{11}$
Corn	$4.3 \times 10^{11}$	$4.3 \times 10^{11}$	$4.3 \times 10^{11}$	$4.3 \times 10^{11}$
Rice bran	$6.2 \times 10^{11}$	$6.2 \times 10^{11}$	$6.2 \times 10^{11}$	$6.2 \times 10^{11}$

Table 7. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 during the storage at 4°C in talc as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$3.8 \times 10^{11}$	$3.8 \times 10^{11}$	$3.8 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$
Barly	$1.0 \times 10^{12}$	$9.0 \times 10^{11}$	$8.0 \times 10^{11}$	$8.0 \times 10^{11}$
Wheat	$1.0 \times 10^{12}$	$1.0 \times 10^{12}$	$1.0 \times 10^{12}$	$1.0 \times 10^{12}$
Corn	$2.6 \times 10^{11}$	$2.6 \times 10^{11}$	$2.6 \times 10^{11}$	$2.6 \times 10^{11}$
Rice bran	$2.9 \times 10^{11}$	$2.9 \times 10^{11}$	$2.9 \times 10^{11}$	$2.9 \times 10^{11}$

**Table 8. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 during the storage at 4°C in zeolite as additive.**

Culture Media \ Storage time	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$3.1 \times 10^{11}$	$3.1 \times 10^{11}$	$3.1 \times 10^{11}$	$3.1 \times 10^{11}$
Barly	$1.8 \times 10^{12}$	$1.4 \times 10^{12}$	$4.7 \times 10^{11}$	$4.7 \times 10^{11}$
Wheat	$1.2 \times 10^{12}$	$1.2 \times 10^{12}$	$1.2 \times 10^{12}$	$1.2 \times 10^{12}$
Corn	$1.1 \times 10^{12}$	$9.0 \times 10^{11}$	$8.0 \times 10^{11}$	$8.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$1.8 \times 10^{12}$	$1.7 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$

**Table 9. Conidial numbers of *Penicillium* sp. GL-101 during the storage at 4°C in rice bran as additive.**

Culture Media \ Storage time	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$9.0 \times 10^{10}$	$6.0 \times 10^{10}$	$6.0 \times 10^{10}$	$6.0 \times 10^{10}$
Barly	$5.3 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$
Wheat	$4.3 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$
Corn	$4.3 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$4.6 \times 10^{11}$	$2.3 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$

Table 10. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 during the storage at 4°C in bentonite as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$
Barly	$6.0 \times 10^{12}$	$4.1 \times 10^{12}$	$3.2 \times 10^{12}$	$3.2 \times 10^{12}$
Wheat	$4.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$
Corn	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$4.7 \times 10^{12}$	$4.5 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^{12}$

Table 11. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 during the storage at 4°C in diatomite as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$
Barly	$9.0 \times 10^{11}$	$8.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$
Wheat	$1.7 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^{11}$
Corn	$6.0 \times 10^{11}$	$6.0 \times 10^{11}$	$6.0 \times 10^{11}$	$6.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$4.1 \times 10^{12}$	$4.1 \times 10^{12}$	$4.1 \times 10^{12}$	$4.1 \times 10^{12}$



Table 12. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 during the storage at 4°C in kaoline as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$2.2 \times 10^{12}$	$1.4 \times 10^{12}$	$8.0 \times 10^{11}$	$8.0 \times 10^{11}$
Barly	$5.8 \times 10^{12}$	$4.3 \times 10^{12}$	$2.4 \times 10^{12}$	$2.4 \times 10^{12}$
Wheat	$1.9 \times 10^{12}$	$1.9 \times 10^{12}$	$1.9 \times 10^{12}$	$1.9 \times 10^{12}$
Corn	$5.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$1.5 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$

Table 13. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 during the storage at 4°C in talc as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$3.4 \times 10^{12}$	$3.0 \times 10^{12}$	$3.4 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^{12}$
Barly	$1.6 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$1.6 \times 10^{12}$	$1.6 \times 10^{12}$
Wheat	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$
Corn	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$3.6 \times 10^{12}$	$3.6 \times 10^{12}$	$3.6 \times 10^{12}$	$3.6 \times 10^{12}$

Table 14. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 during the storage at 4°C in zeolite as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$7.1 \times 10^{12}$	$2.8 \times 10^{12}$	$2.1 \times 10^{12}$	$2.1 \times 10^{12}$
Barly	$7.9 \times 10^{12}$	$7.2 \times 10^{12}$	$6.8 \times 10^{12}$	$6.8 \times 10^{12}$
Wheat	$4.7 \times 10^{12}$	$4.7 \times 10^{12}$	$4.7 \times 10^{12}$	$4.7 \times 10^{12}$
Corn	$4.0 \times 10^{12}$	$1.5 \times 10^{12}$	$7.0 \times 10^{11}$	$7.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$7.8 \times 10^{12}$	$5.9 \times 10^{12}$	$3.5 \times 10^{12}$	$3.5 \times 10^{12}$

Table 15. Conidial numbers of *Aspergillus* sp. PS-104 during the storage at 4°C in rice bran as additive.

Storage time Culture Media	No. of conidia at starting point (Control)	No. of conidia after 1 month storage	No. of conidia after 2 months storage	No. of conidia after 6 months storage
Rice	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$	$3.0 \times 10^{11}$
Barly	$4.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$	$4.0 \times 10^{11}$
Wheat	$4.0 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{10}$	$5.0 \times 10^{10}$
Corn	$1.3 \times 10^{12}$	$8.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$	$5.0 \times 10^{11}$
Rice bran	$4.3 \times 10^{12}$	$2.7 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^{12}$	$1.1 \times 10^{12}$

**Table 16. Wet weight(g/plant) of corn(*Zea mays* Suwon 19) influenced by different nutrients with or without phosphate-solubilizing fungi, a microbial fertilizer, after 60 days cultivation. All data were means of three replicate.**

Nutrient	Wet weight (g/plant)
Distilled water	3.1
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	5.6
Hogland sol'n	41.3
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + Rock phosphate	8.8
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + Rock phosphate + <i>Penicillium</i> sp. GL-101	45.5
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + Rock phosphate + <i>Aspergillus</i> sp. PS-104	41.7

Table 17. Root length of corn (*Zea mays* Suwon 19) influenced by different nutrients with or without phosphate-solubilizing fungi, a microbial fertilizer, after 60 days cultivation. All data were means of three replicate.

Nutrient	Root length (cm/plant)
Distilled water	43.0
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	45.3
Hogland sol'n	47.1
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + Rock phosphate	50.6
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + Rock phosphate + <i>Penicillium</i> sp. GL-101	56.9
Hogland sol'n - $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ + Rock phosphate + <i>Aspergillus</i> sp. PS-104	62.4

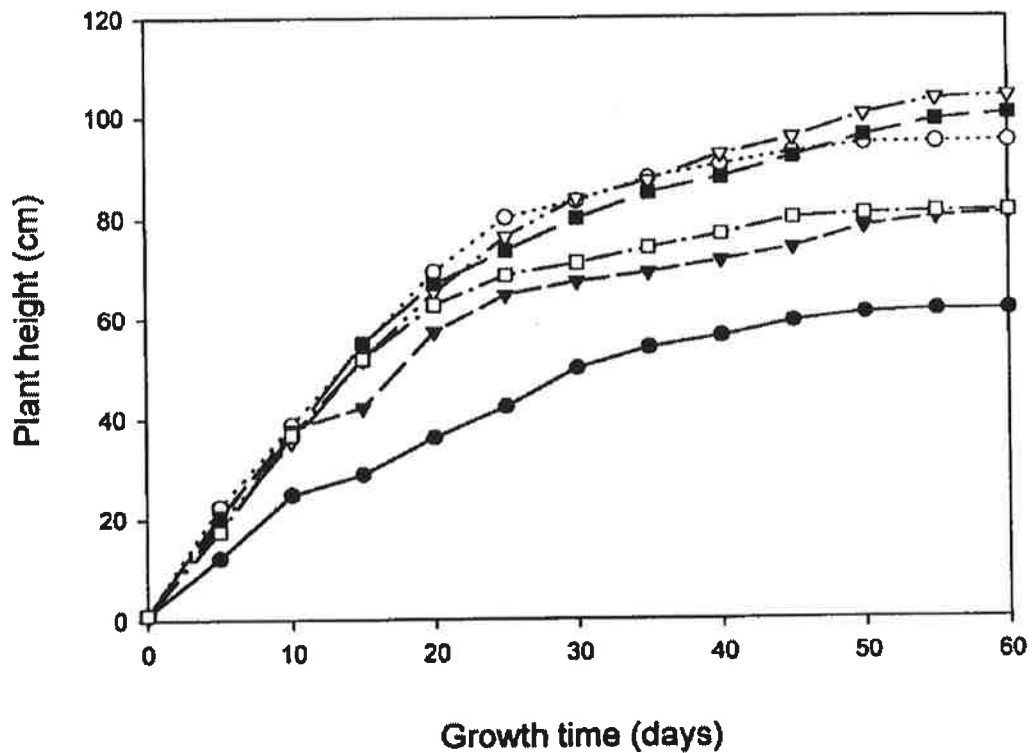


Fig. 28. Time-dependent height of corn (*Zea mays* Suwon 19) influenced by different nutrients with or without phosphate-solubilizing fungi as a microbial fertilizer. All data were means of three replicate. Symbols denote nutrients treated as followings: ●-●, distilled water; □-□, Hogland solution without  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ; ○-○, Hogland solution; ▼-▼, Hogland solution displaced  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  to rock phosphate as a phosphate source; ▽-▽, Hogland solution displaced  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  to rock phosphate as a phosphate source and inoculated with *Penicillium* sp. GL-101; ■-■, Hogland solution displaced  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  to rock phosphate as a phosphate source and inoculated with *Aspergillus* sp. PS-104.

나머지 3개 포장은 과석(1.6g/포장)을 각각 첨가하였다. 또한 3종류의 포장에는 각각 미생물을 처리하지 않은 대조구, *Penicillium* sp. GL-101 균주 첨가구, *Aspergillus* sp. PS-104 첨가구로 나누어 구분하였다. 이때 사용한 사상균의 포자농도는  $3 \times 10^9$  conidia/ml로 조절하였으며, 이들 포자용액을 각각 70ml씩 준비하여 물로 2 liter까지 희석하여 골고루 시비하였다. 그 결과 30일경의 식물생육 정도는 대조구에 비해 인산 가용화 사상균을 시비한 경우가 월등히 양호함을 확인하였다.

#### 4. 참고문헌

- ① Illmer, P. and F. Schinner "Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms" *Soil Bio. Biochem.* (1995) 27(3), 257-263.
- ② Illmer, P., A. Barbato and F. Schinner "Solubilization of hardly-soluble  $AlPO_4$  with P-solubilizing microorganisms" *Soil Bio. Biochem.* (1995) 27(3), 265-270.
- ③ Rice, W. A., P. E. Olsen and M. E. Leggett "Co-culture of *Rhizobium meliloti* and a phosphorus-solubilizing fungus (*Penicillium bilaii*) in sterile peat" *Soil Bio. Biochem.* (1995) 27(4-5), 703-705.
- ④ Varsha, N., T. Jugnu and H. H. Patel "Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*" *Ind. J. Exp.* (1995) 33(2), 91-93.
- ⑤ 서장선, 이상규, 김광식, 성기영 "한국 토양에서 분리된 *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. 및 *Aspergillus niger*에 의한 난용성 인산염의 가용화" *한국토양비료학회지* (1995) 28(3), 278-286.

## 미생물을 이용한 Bioferfizer 개발

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “신소재 및 미생물을 이용한 환경 조화형 고효율 신형비료 개발” (세  
부과제 “미생물을 이용한 biofertilizer 개발”)의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. .

주관연구기관명 : 서울대학교  
총괄연구책임자 : 임 선 욱  
협동연구기관명 : 선물대학교  
협동연구책임자 : 사 동 민  
연 구 원 : 정 중 배  
박 기 용  
양 진 철  
황 윤 태  
김 이 근



# 요 약 문

## I. 제 목

미생물을 이용한 bioferfizer 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

인구 증가와 산업의 발달에 따른 지표수 이용율의 증대에 따라 이러한 부영양화 현상은 매우 심각하며, 최근의 근해 적조현상 등은 부영화된 지표수의 유입이 그 한 원인으로 생각되고 있다. 따라서, 비료의 생산비 부담이나 시용에 따른 노동력 절감에 더하여 환경보전적 영농 시스템을 지향해야 하는 시점에서 이러한 방향에 부합하는 새로운 형태의 비료 즉 고효율 완효성 비료와 미생물 비료의 개발, 그리고 화학 비료의 효율을 높일 수 있는 토양 미생물의 효과적인 이용 기술의 개발은 매우 절실하다. 그러므로 본 과제에서는 논토양에서 질소고정 Cyanobacteria를 분리하여 고효율 질소고정능 균주를 선발하고 분리균주의 특성을 분석하며 분리균주를 다양한 이화학적 토양에 접종하여 토양의 질소고정능의 변화를 측정하여 Cyanobacteria를 생물학적 비료로서 이용하는 방법을 도출하고자 하였다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

토양에서 분리한 300여종의 질소고정력 보유균주를 2차선발하여 동정하고, 각균주의 질소고정력을 gas chromatography를 이용하여 측정비교였으며 분리·동정한 균주의 특이 color pigment (phycocyanine, phycoerythrine, allophycocyanin)의 함량측정 및 수용성 chromophore의 흡광곡선을 측정하여 균주 특성을 비교하였다.

토양의 이화학적 차이에 따른 분리균주의 생존능력을 비교하기 위하여 경기지역 논토양 (15점)의 이화학적 성질을 분석한 후 공시토양중 pH, 인산함량 및 유기물함량이 상이한 토양을 대상으로 분리한 우수질소고정 cyanobacteria를 접종하여 생육정도 및 질소고정능을 비교하였다.

분리균주의 토양내 질소, 인산공급 잠재능을 검토하고자 균주 대량증식후 균체의 전질소 및 전인산 함량을 균체를 건조시켜 습식 산분해 후 측정 비교하였다.

#### IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

다양한 시료로부터 위에서 설명한 방법에 따라 무질소, 무탄소 영양상태에서 생육이 가능한 균주를 선별하여 균주의 형태와 크기 및 현미경관찰(heterocyst의 유무, 위치, trichome의 모양 및 길이, 분자의 유무)을 통하여 동정한 결과 filamentous form의 cyanobacteria 18종 (Genus : Anabaena, Nostoc, Calothrix, Sytonema, Cyldrosprum, Hepalosiphon) 및 unicellular form cyanobacteria 2종 (Genus : Syneochoccus, Gleothece)을 동정하여 명명하였다.

각각의 분리균주의 약체 및 고체 배지에서의 생육 속도는 calothrix spp가 각각의 배지에서 우수하였으며 특히 HC 605가 다른 균주보다 우수한 생육을 나타내었다(표2). 분리한 cyanobacteria는 다양한 토양조건 및 탄소의 영향하에서도 질소고정능은 계속 소유하고 있었으며 기타 균체에 비하여 고농도의 질소를 보유함에 비추어 생물비료로써 활용이 가능하리라 생각되었다.

Cyanobacteria에 의한 질소고정은 토양의 유효 질소 함량을 늘여 적은 량의 화학비료로 작물 생산량을 늘릴 수 있는 방법이다. Cyanobacteria는 외부의 환경 변화 및 stress에 내성이 강하고 적응력이 좋아 비농사를 비롯한 여러 작물 생산 체계에 생물학적 비료로써 이용 가능성이 매우 높다. 세계적으로 여러 나라에서 cyanobacteria가 생물비료로 사용되어 200만 ha 이상의 논을 비옥하게 만든다고 보고되어 있다. 많은 energy가 요구되는 화학 질소비료의 사용을 줄이면 경제적

인 효과와 더불어 최근에 비료 성분 유출에 따른 환경오염 문제를 해결하여 환경친화적 영농방법 개발에도 많은 도움이 될 것으로 생각되므로 국내 토양에 자생하는 질소고정 cyanobacteria를 이용한 생물 비료 개발은 지속적인 학문적 연구와 더불어 작물 생산적 실험이 앞으로 수행될 것으로 기대된다.

## SUMMARY

The high input of nitrogen fertilizers may cause water pollution and a progressive loss of soil quality due to their harmful effect on soil microorganisms. Most of ammonium containing fertilizers may contaminate the ground water via nitrification could be responsible for the eutrophication of the water flowing from the rice field into the drainage channels. The improvement of soil use, by preserving and developing the natural ability of nitrogen fixing organisms for biofertilization, would permit a reduction in the use of nitrogen fertilizers and thus decrease water pollution.

The nitrogen fixing cyanobacteria form a prominent component of microbial populations in rice paddy field where they significantly contribute to fertility as natural biofertilizer. The potential advantage of symbiotic cyanobacteria is that the major fertilizing product ammonia may be produced at a relatively low financial cost and that prevent the loss of applied nitrogen fertilizer.

In this experiments, cyanobacteria having nitrogen fixing activity were isolated from paddy soils to develop biofertilizers. Eighteen filamentous form and two unicellular cyanobacteria were isolated and characterized their nitrogen fixing activity, color pigments and chlorophyll contents.

The nitrogen and phosphorus contents ranged from 42 to 89  $\mu\text{g-N/mg-DW}$  cell and from 4 to 24  $\mu\text{g-P/mg-DW}$  cell, respectively under the nitrogen-free growing condition. After inoculation these cyanobacteria to paddy soils nitrogen fixing activity was maintained for longer than two months in lab growing condition.

These results showed that application of cyanobacteria could increase soil nitrogen content and contribute to reduce the dependency of agriculture on the supply of chemical fertilizer and to develop other sustainable agricultural practices.

# CONTENTS

Abstract .....	III-2
Summary .....	III-5
Contents (English) .....	III-7
Contents .....	III-8
I. Stare of art and Research Goal .....	III-9
II. Research Scopes and Contents .....	III-13
III. Research Results and Application plan .....	III-16
IV. References .....	III-41

## 목 차

요 약 문 .....	III-2
Summary .....	III-5
Contents (영문) .....	III-7
목 차 .....	III-8
제 1 장 연구개발의 목적 및 중요성 .....	III-9
제 2 장 연구개발 내용 및 범위 .....	III-13
제 3 장 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의 .....	III-16
제 4 장 References .....	III-41

## I. 연구개발의 목적 및 중요성

다수확을 추구하는 과정에서 비료의 장기간 과다 사용은 토양 생산성의 감퇴, 작물 수량의 감소 및 품질 저하 등의 부작용을 초래하기도 했다. 특히, 다량의 질소와 인산 비료의 사용은 유실되는 비료 성분량을 증대시켜 하천 등 지표수의 부영양화와 지하수의 오염을 초래하는 결과를 가져오고 있다. 인구 증가와 산업의 발달에 따른 지표수 이용율의 증대에 따라 이러한 부영양화 현상은 매우 심각하며, 최근의 근해 적조현상 등은 부영양화된 지표수의 유입이 그 한 원인으로 생각되고 있다. 따라서, 비료의 생산비 부담이나 사용에 따른 노동력 절감에 더하여 환경보전적 영농 시스템을 지향해야 하는 시점에서 이러한 방향에 부합하는 새로운 형태의 비료 즉 고효율 완효성 비료와 미생물 비료의 개발, 그리고 화학 비료의 효율을 높일 수 있는 토양 미생물의 효과적인 이용 기술의 개발은 매우 절실하다.

미생물을 이용한 비효 증진 방법을 개발하려는 시도는 부단히 이루어져왔다. 1950년대 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물 (phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인산 흡수를 증대시킬 수 있었으며, 평균 10%의 수량 증가를 보았다. 1980년대 *penicillium bilaji* 등의 곰팡이가 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다. 질산화균이나 urease를 분비하는 미생물들에 길항적으로 작용하는 미생물에 대한 연구도 꾸준히 진행되고 있으나, 아직 실용화 단계에는 이르지 못하고 있다.

Cyanobacteria는 지구상에서 가장 광범위하게 분포하고 있는 광합성을 하는 원핵 생물 집단이며, 더위와 추위에 의한 stress, 가뭄, 염분, 질소의 부족 현상, 광산화, 산소의 부족, 삼투압과 자외선 stress 등의 광범위한 환경적 스트레스에서도 생존할 수 있다고 알려져있어 온천지에서 극한지대에 이르기까지 전 세계에 걸쳐 분포되어 있으며, 단독 군집 또는 균류, 식물들과 공생 유기체로 존재하며, 다양한 환경요인에 적응하는 높은 변이성을 갖고 있다.



Cyanobacteria균체는 수중뿐 아니라 지상의 생태계의 중요한 위치를 차지하며 최저  $-7^{\circ}\text{C}$ 에서 최고  $75^{\circ}\text{C}$ 까지의 온도에서도 광합성을 하며, 또한 nitrogenase에 의한 대기중의 질고 고정능력을 갖고있기 때문에 영양물 순환에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 지구의 질소 순환에서 생물학적 질소고정은 대단한 기여를 하며, 가설에 따르면 매년 Cyanobacteria는 연간 3천5백만 톤의 질소를 고정하여 고등식물에 의해 유용하게 사용된다.

질소고정 Cyanobacteria는 습지 토양내 미생물 군집의 중요한 구성원이며, 특히 생물비료로서 열대 및 아열대 집아 논외 토양 비옥도 유지 및 증진에 상당한 기여를 하고 특히, *Azolla-Anabaena* 공생은 습지 토양에서 가장 유망한 생물비료 체계의 하나로서 인정받아 많은 연구가 수행되었다. 몇몇 Cyanobacteria종은 적은 양을 논에 풀어놓아도 빠르게 번성하여 토양 비옥화의 주체가 된다. Cyanobacteria가 암모니아와 적은 양의 질소를 함유한 Polypeptide로 능동적인 성장을 하는 동안 고정된 산물의 대부분은 자기 분해와 부패를 통해 식물체가 이용할 수 있게 만들어지며, 탈질 작용에 의하여 결합된 질소를 잃어 평형을 이룬다.

1939년에 최초로 De는 일부 Cyanobacteria는 논에서 능동적인 질소 고정3자의 역할을 하며, 그 결과 이들의 활성은 논 토양을 비옥하게 한다고 보고하였다. 이후 많은 질소고정 Cyanobacteria가 분리되어 질소 고정에 의한 토양 질소함량증가 가능성이 확인되었으며, 수 세기동안 화학 질소비료 없이 어떻게 벼가 자랄 수 있었는가를 설명할 수 있게 되었다. 몇몇 벼 재배 국가에서 수많은 Cyanobacteria균주는 연못과 탱크에서 단독 또는 몇 가지 균주가 조합을 이루며 자란 후 건조되어, 논 토양에 널리 투여된다. 생물학적 비료로서 사용하기 위해서 생체(100kg/ha) 또는 건조된(10kg/ha) Cyanobacteria가 모내기 후 간단히 논 토양에 처리되면 그곳에서 Cyanobacteria는 자라면서 질소를 고정하게 된다. Cyanobacteria균주는 생물학적 비료로 흔히 사용되는 *A. fertilissimas*, *Anabaena* sp., *Nostoc* sp., *Calothrix* sp., *Scytonema* sp, *Cylindrospermum* sp., *Gloeotrichia*

sp.를 포함해서 광범위한 종이 이용되었다. 논에서 자라 건조된 *A. fertilissimas* 매트는 생물학적 비료로서 광범위하게 사용되었다. 다른 예로서 토양의 성질에 따라 *A. fertilissimas*는 여러 다른 질소고정 *Cyanobacteria*와 혼합 사용되어 새로운 토양조건에 적응하고 다양한 숙주식물과 공생관계를 이루게 된다. 생물비료로 투입된 *Cyanobacteria*균주는 벼의 생육과 함께 증가한다. 생체증가량과 질소고정능은 논 토양에서 계통형태와 환경, 토양 조건에 따라 차이를 나타내며 비료(N과 P) 시용량, 토양pH, 온도, 빛과 논 토양에서 수분상태 등에 따라서 다양하게 나타난다. 질소 추적기술 사용으로 *Cyanobacteria*로부터 고정된 질소는 벼의 생육중에 이용됨을 알 수 있었고 *Cyanobacteria*가 고정하는 질소의 40%는 60일 내에 벼에 의해서 이용되는 것으로 나타났다. 생물학적 비료로서 이용되는 *Cyanobacteria*가 처리했을 때와 화학질소 비료  $30\text{kg ha}^{-1}$ 을 처리한 경우 쌀 수확량은 같다고 보고 되어 있으며, 몇몇 경우에 생물비료로서 *Cyanobacteria*처리가 화학 질소비료와 함께 투입되면  $20\sim 30\text{kg ha}^{-1}$ 의 화학질소 비료를 추가 처리된 경우와 견줄만한 효과를 나타내었다. 몇몇의 실험실내 또는 야외 실험에서 한가지 종류나 또는 몇몇 종이 혼합된 *Cyanobacteria*생물비료는 벼의 초장, 건물량, Chlorophyll a 함유량과 벼의 수확량을 증가시키는 것으로 보고되고 있다.

또한 수생 양치류 *Azolla*는 *Cyanobacterial Anabena* sp.와 공생 공존하며 인도, 중국, 필리핀, 타이완과 같은 나라에서 논외 녹색 비료로서 널리 사용되고 있으며 연간 ha당 100kg 질소를 공급하고 있는 것으로 알려져 있다. 화학적 방법에 의한 질소로부터 암모니아의 생성은 매우 비용이 많이 든다. 공생적인 *Cyanobacteria*의 생물비료로서의 이점은 상대적으로 낮은 비용으로 생산될 수 있다는 것이다.

*Cyanobacteria*에 의한 질소고정은 토양의 유효질소함량을 늘여 적은량의 화학비료시비로 작물생산량을 늘릴 수 있는 방법이다. *Cyanobacteria*는 외부의 환경 변화 및 stress에 내성이 강하고 적응력이 좋아 벼농사를 비롯한 여러 작물 생산체계에 생물학적 비료로써 이용가능성이 매우 높다. 세계적으로 여러 나라에서

Cyanobacteria가 생물비료로 사용되어 200만 ha이상의 논을 비옥하게 만든다고 보고되어있다. 질소는 모든 식물이 가장 많이 요구하는 다량원소이다. 많은 energy가 요구되는 화학질소비료의 사용을 줄이면 경제적인 효과와 더불어 최근에 비료성분 유출에 따른 환경친화적 영농방법 개발에도 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

그러므로 본 실험에서는 논 토양에서 질소고정 Cyanobacteria를 분리하여 고효율 질소고정능 균주를 선발하고 분리균주의 특성을 분석하며 분리균주를 다양한 이화학적 토양에 접종하여 토양의 질소고정능의 변화를 측정하여 Cyanobacteria를 생물학적 비료로서 이용하는 방법을 도출하고자 하였다.

## II. 연구개발 내용 및 범위

- 토양으로부터 질소고정능이 있는 cyanobacteria를 선별하기 위하여 충남 및 경기 지역의 비옥토양, 농업용수 등에서 시료를 채취하였다. 질소고정 unicellular와 filamentous cyanobacteria 탐색 및 분리·배양은 균주가 광합성을 할 수 있는 독립영양균인 특성을 감안하여 탄소원이 전혀 포함되지 않고 약간의 무기염과 미량의 mineral이 포함되어 있는 배지(변형된 BG-II)를 이용하였다. 채취한 시료는 질소원이 제한된 고체배지에 도말한 후 형광등 조명을 이용하여 30℃에서 수일간 배양하였다. 성장한 colony는 순수배양을 시켰으며, 이 과정을 수 차례 반복하였다. 선별된 균주의 동정은 colony형태, morphologic 특성, cell size, 성장속도 등을 비교하는 방법 등으로 시도하였다.
- 토양에서 분리한 300여종의 질소고정력 보유균주를 2차 선별하여 동정하고, 각균주의 질소고정력을 gas chromatography를 이용하여 측정비교하고 분리·동정한 균주의 특이 color pigment (phycocyanine, phycoerythrine, allophycocyanin)의 함량측정 및 수용성 chromophore의 흡광곡선을 측정하여 균주 특성을 비교하였다. 토양에 적용시키기 위한 기본연구로 질소 및 탄소원 및 처리농도가 질소고정력에 미치는 영향을 탐색하였다.
- 분리·동정한 질소고정능이 우수한 Cyanobacteria(filamentous, unicellular form)의 고체 및 액체 배지에서 생육속도를 측정하여 토양에 접종시 생육상태를 예측하였으며 또한 토양의 이화학적 차이에 따른 분리균주의 생존능력을 비교하기 위하여 경기지역 논 토양 (15점)의 이화학적 성질을 분석하였다. 공시토양중 pH, 인산함량 및 유기물함량이 상이한 토양을 대상으로 분리한 우수질소고정 cyanobacteria를 접종하여 생육정도 및 질소고정능을 비교하였다.
- 분리균주의 토양접종량 설정 및 토양 인산 함량에 따른 균주의 생존능력을 검토하기 위하여 배지의 인산농도를 적정농도의 1~3배(0.23mM, 0.46mM, 0.69mM)로 처리하여 경시적으로 배지의 인산함량 변화를 측정하여 균주의 인산 흡수능

Table 1. Physicochemical properties of paddy soil

Location	pH	EC	OM	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K	Ca	Mg	Na	SiO <sub>2</sub>	T-N	C/N
		ms/cm	g/kg	ppm		c.mol/kg			ppm	%	
Suwon	5.9	0.57	22	50	0.35	7.6	3.8	0.26	238	0.118	10.53
Daeheung	5.0	0.34	19	86	0.14	2.4	0.7	0.22	38	0.220	4.95
Bongjum	5.8	0.45	34	168	0.32	5	2.9	0.56	137	0.324	6.07
Songtan	5.0	1.08	42	44	0.56	3.5	3.0	0.96	100	0.323	7.57
Paltan	5.0	0.91	36	84	0.38	3.9	2.5	0.61	96	0.212	9.93
Jangan	5.4	0.97	29	102	0.36	3.9	1.8	0.62	49	0.301	5.6
Ansung-1	5.0	0.62	33	106	0.17	4.2	1.2	0.22	45	.	.
Joam-1	5.2	0.51	28	32	0.18	3.7	1.1	0.35	73	0.195	8.35
Jeongan	5.3	0.40	19	56	0.25	3.8	1.1	0.17	43	0.160	7.07
Ansung-2	5.4	0.34	33	117	0.1	3.9	1.0	0.12	55	0.270	6.98
Joam-2	5.2	0.34	47	46	0.03	5.1	1.4	0.12	56	0.263	10.45
Jeongnam-1	5.1	0.45	29	72	0.19	3.4	0.9	0.17	54	0.245	6.98
Ansung-3	5.5	1.53	39	42	0.38	6.2	4.6	1.21	142	0.238	9.44
Joam-3	5.5	2.27	39	32	0.39	6.6	4.5	1.86	183	0.275	8.31
Jeongnam-2	5.1	1.42	33	19	0.28	5.1	3.6	0.99	97	0.195	9.68

을 비교하고 이에 따른 생육속도를 검토하였다.

- 분리균주의 토양내 질소, 인산공급 잠재능을 검토하고자 균주 대량증식후 균체의 전질소 및 전인산 함량을 균체를 건조시켜 습식 산분해후 Kjeldahl 방법(전질소 함량) 및 ammonium-molybdate법(전인산함량)으로 측정 비교하였다.

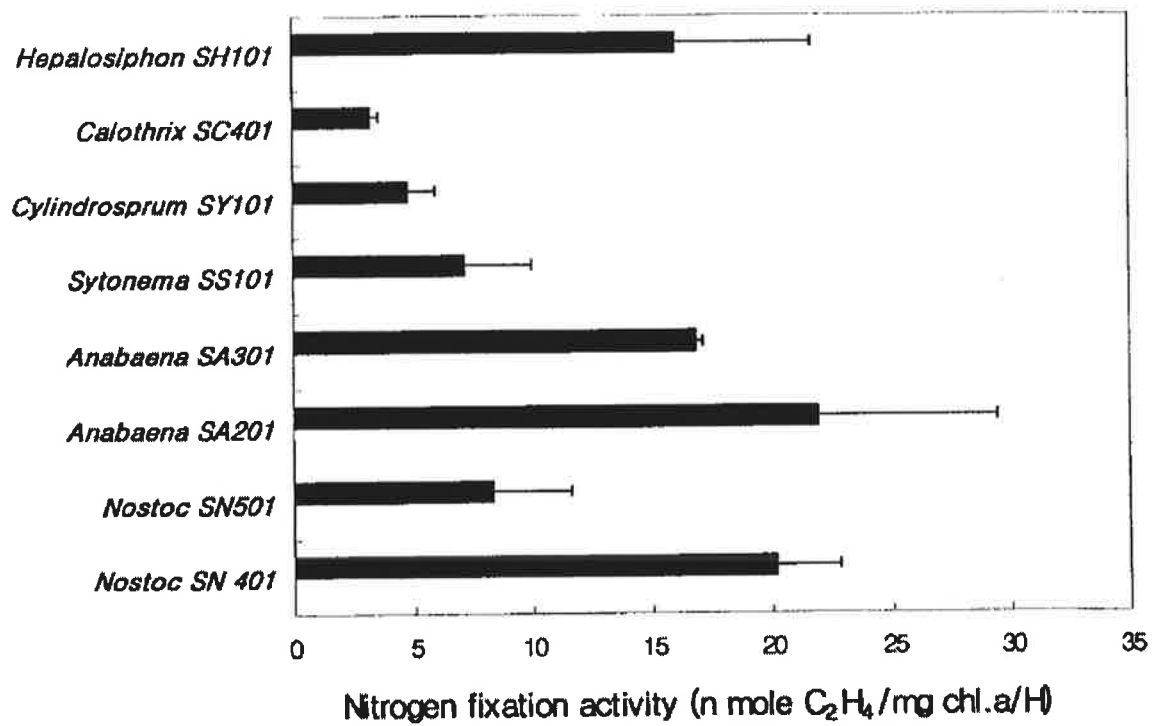
### III. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

- 다양한 시료로부터 위에서 설명한 방법에 따라 무질소, 무탄소 영양상태에서 생육이 가능한 균주를 선별하여 균주의 형태와 크기 및 현미경관찰(heterocyst의 유무, 위치, trichome의 모양 및 길이, 분자의 유무)을 통하여 동정한 결과 filamentous form의 cyanobacteria 18종 (Genus : *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Sytonema*, *Cylindrosprum*, *Hepalosiphon*) 및 unicellular form cyanobacteria 2종 (Genus : *Synechococcus*, *Gleotheca*)을 동정하여 각각 표 2와 같이 명명하였다.
- BGoII 배지에서 성장속도가 빠른 8종의 분리균주(*Hepalosiphon* SH101, *Calothrix* SC401, *Cylindrosprum* SY101, *Sytonema* SS101, *Anabaena* SA301, SA201, *Nostoc* SN 501, SN 401)의 기내 질소고정력을 측정한 결과 질소고정력은  $3.8 \sim 22.4 \text{ n} \cdot \text{mol C}_2\text{H}_4/\text{mg} \cdot \text{chl a}/\text{H}$ 의 범위에 있었고 *Hepalosiphon* SH 101, *Anabaena* SA 301, *Anabaena* 201 및 *Nostoc* SN 401의 질소 고정능력이 우수하였다. (그림 1).
- Cyanobacteria의 대표적인 color pigment인 Phycocyanine, Allophycocyanin 및 Phycoerythrine을 정량한 결과 각각의 Genus 및 Strain에서도 큰 차이를 나타냈다. 균주의 형태학적 차이와 함께 각각의 분리균주가 pigment 함량 및 흡수 파장(그림 2, 3)에 차이가 있음을 나타낸다. Phycocyanine 함량은 12~99 mg/ml cell로 균주에 따라 큰 차이를 나타내었으며 *Anabaena* SA 301 및 SA 201이 체내 Phycocyanine의 함량이 80 mg/ml cell로 크게 나타났다(그림 4). Allophycocyanine의 함량은 12~33 mg/ml cell로 나타났으며 *Sytonema* SS101 및 *Nostoc* SN 401이 30 mg/ml cell 이상이었다(그림 5). Phycocyanine 함량은 *Nostoc* SN 501이 90 mg/ml cell로 매우 높았으며 기타 균주는 40 mg/ml cell로 낮은 것으로 나타났다(그림 6).

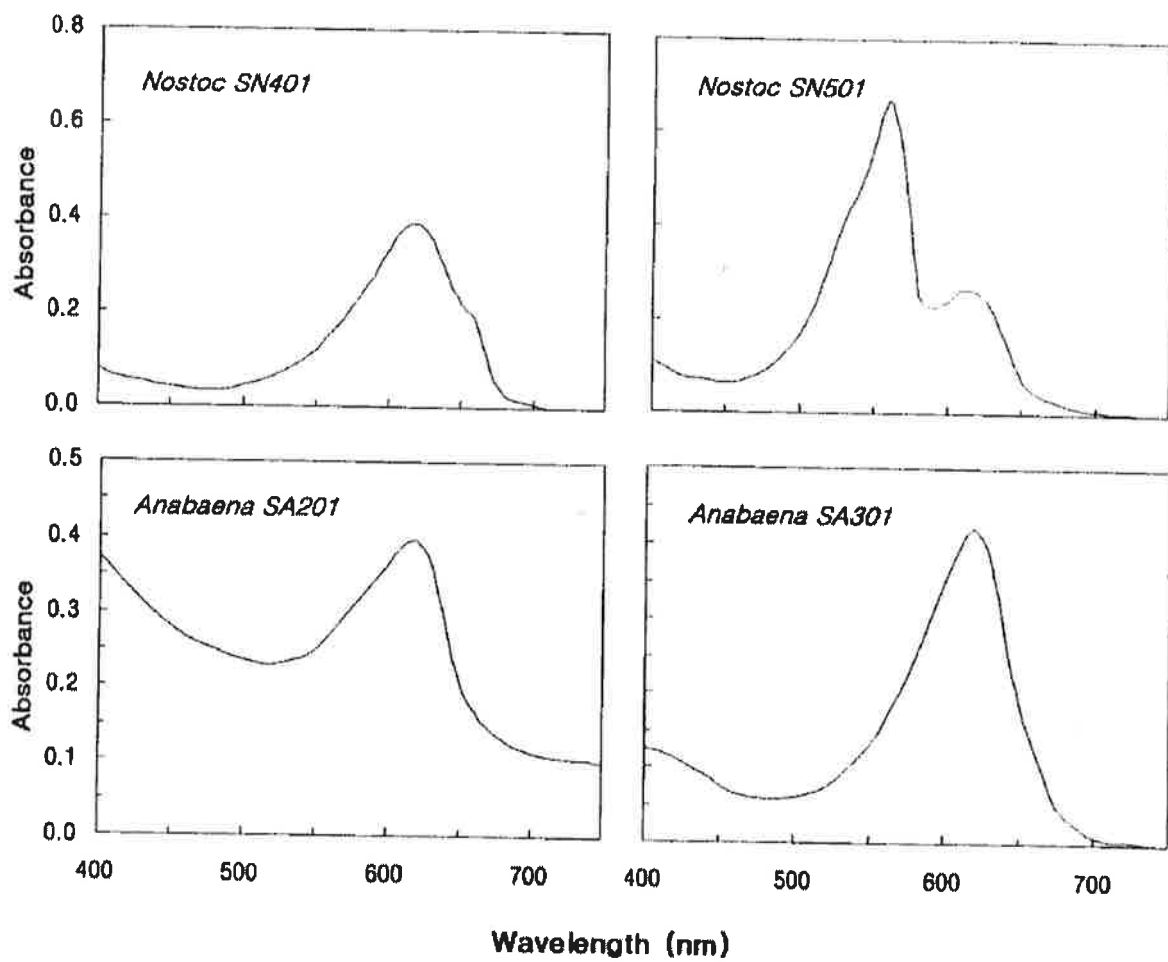
**Table 2. List of cyanobacteria isolated from rice field.**

	<b>Genus</b>	<b>Strain</b>
<b>filamentous cyanobacteria</b>	<b>Anabaena</b>	<b>SA101, SA201, SA301, SA401, SA501</b>
	<b>Nostoc</b>	<b>SN101, SN201, SN301, SN401, SN501</b>
	<b>Calothrix</b>	<b>SC101, SC201, SC301, SC401, SC501</b>
	<b>Sytonema</b>	<b>SS101</b>
	<b>Cylindrosprum</b>	<b>SY101</b>
	<b>Hepalosiphon</b>	<b>SH101</b>
<b>unicellular cyanobacteria</b>	<b>Syneochoccus</b>	<b>MS101</b>
	<b>Gleotheca</b>	<b>MG101</b>





**Fig. 1** Comparison of nitrogen fixation activity of cyanobacteria isolated from rice field. Small bar represents standard deviation (n=3).



**Fig. 2** Absorption spectra of the phycobiliproteins extracted from *Nostoc* SN401, *Nostoc* SN501, *Anabaena* SA201, *Anabaena* SA301.

다. 호밀에 대한 돈분뇨(액비) 시용효과

본 연구는 '99. 11~'00. 4월에 걸쳐 수원에서 시험을 실시하였다. 공시토양은 사양토로서 화학적 성질은 pH 7.6, 유기물 12 g kg<sup>-1</sup>, 유효인산 344

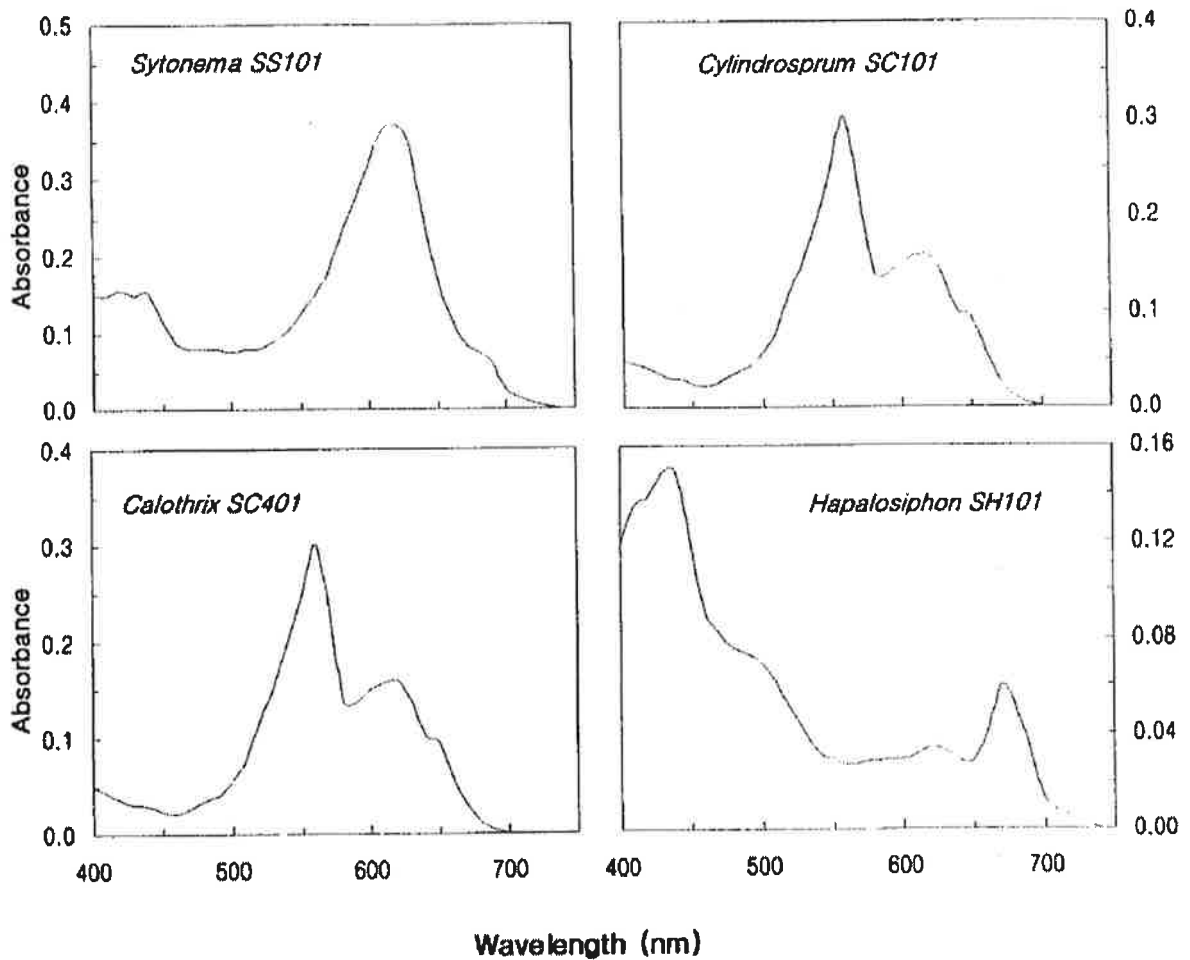


Fig. 3 Absorption spectra of the phycobiliproteins extracted from *Sytonema* SS101, *Cylandrosprum* SC101, *Calothrix* SC401, *Hapalosiphon* SH101.

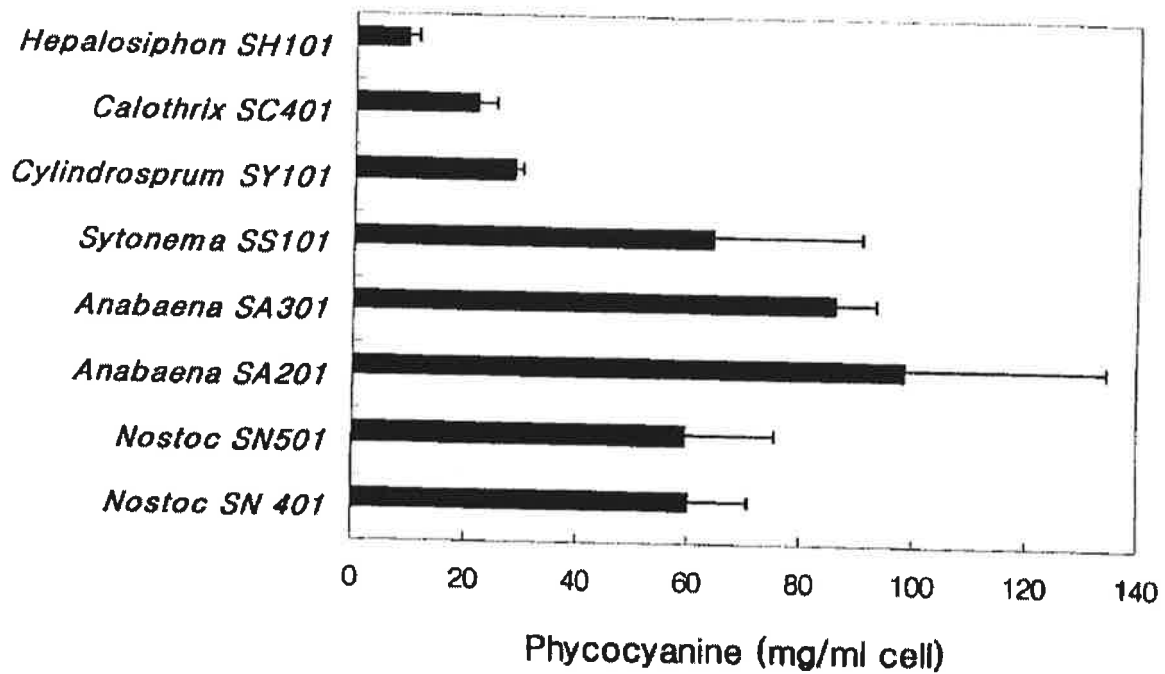
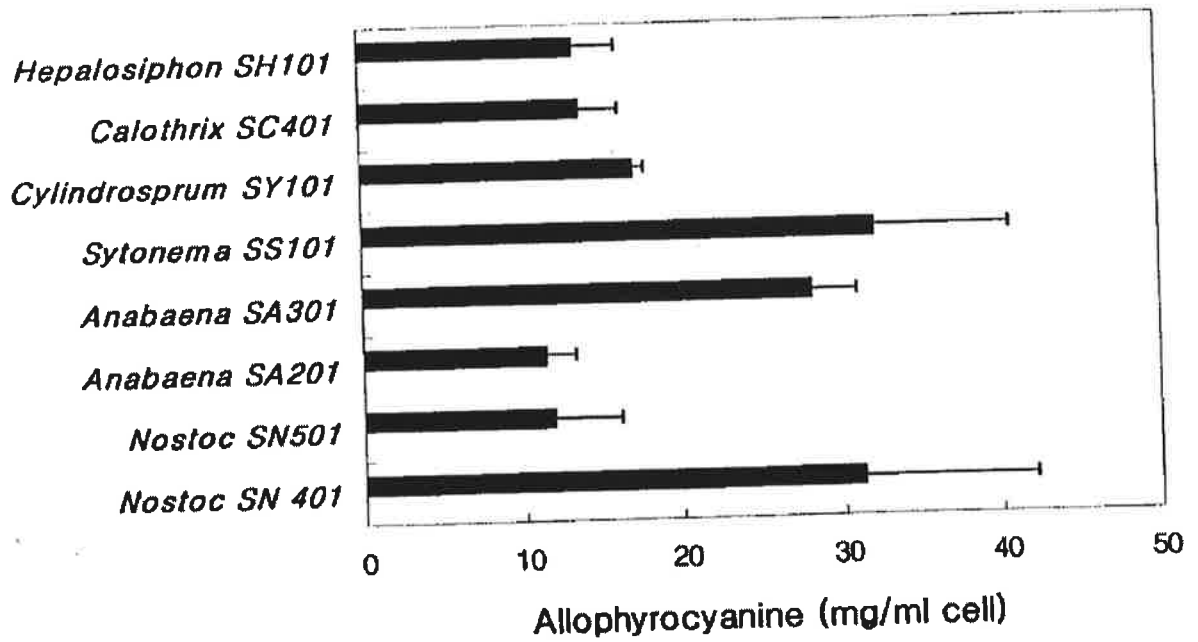


Fig. 4 Comparison of phycocyanine content of cyanobacteria isolated from rice field. Small bar represents standard deviation (n=3).



**Fig. 5 Comparison of allophycocyanine content of cyanobacteria isolated from rice field. Small bar represents standard deviation (n=3).**

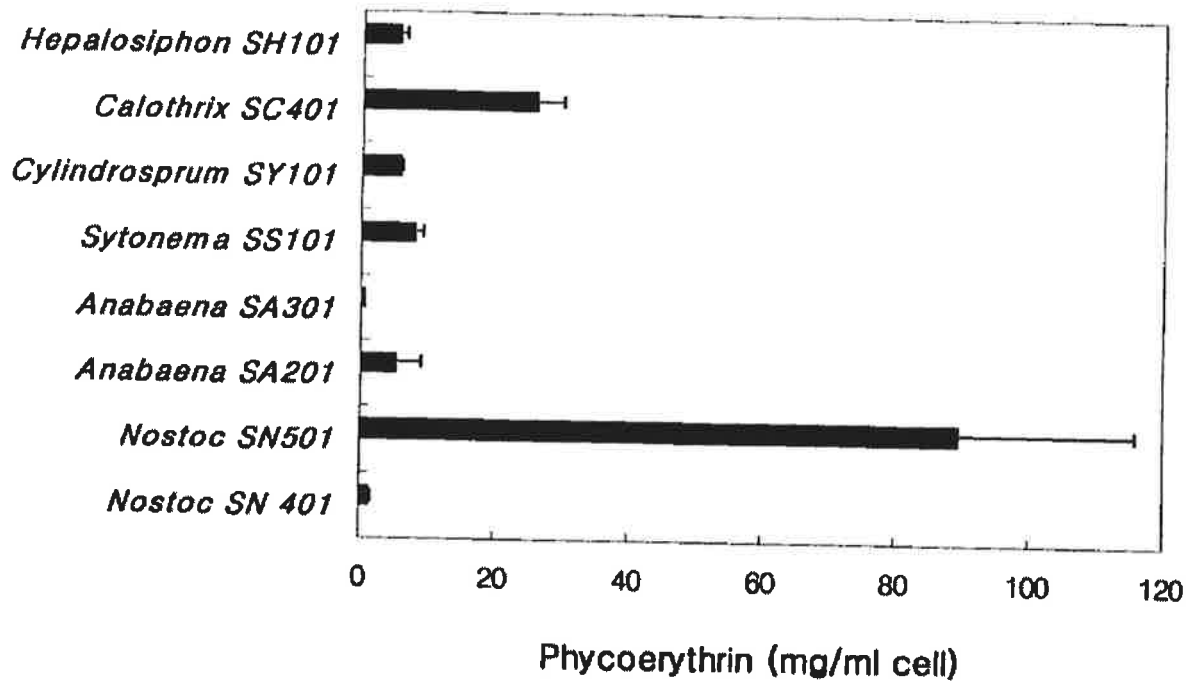


Fig. 6 Comparison of phycoerythrin content of cyanobacteria isolated from rice field. Small bar represents standard deviation (n=3).

- 각각의 분리균주의 chlorophyll a 함량은 2~11.5 mg/ml·cell의 다양한 범위에 있었으며 이는 광 조건에 차이가 있을 것으로 생각되며 광합성 능력과도 관련이 있을 것으로 생각된다.(그림 7).
- 질소고정력이 우수한 *Nostoc* SN 401과 *Anabaena* SA201의 생육시 탄소원이 처리후 질소고정력의 증가현상은 Glucose가 Sucrose보다 효과적이었으며 농도가 증가함에 따라 질소고정력도 증가하였다(그림 8). 토양에는 다양한 탄소원이 존재하므로 광합성 외에도 주변의 탄소원을 효율적으로 사용한다면 생육 및 질소고정에도 많은 도움이 될 것이다.
- *Nostoc* SN 401과 *Anabaena* SA201의 생육시 질소원의 처리 후 질소고정력의 변화는 그림 9와 같다. 암모니아 처리시 24시간 내에 질소고정력이 100% 억제 받았으나 생육이 증가하여 배지의 질소원이 소모된 후 질소고정력은 급격히 증가하여 대조구 수준 또는 그 이상으로 증가하여(그림 9) 토양에 처리하여도 잔존질소의 양에 관계없이 생육 및 질소고정능은 유지가 가능할 것으로 사료되었다. 결합된 질소(질산염이나 암모니아 이온)가 제한될 경우, 대다수 filamentous N<sub>2</sub>고정 cyanobacteria는 생리, 생태, 생화학적으로나 기능상으로 일반 세포와는 다른 특이한 세포(heterocyst)를 만든다. Heterocyst는 호기성 질소고정이 일어나는 유일한 장소이며 vegetative cell과 서로 도움을 주며 성장한다. Heterocysts는 질소고정으로 생성한 질소 물질을 vegetative cell밖으로 내보내고, energy source인 탄소원을 공급받는다. vegetative cell이 heterocyst로 변화하는 과정에서 membrane의 구조가 변하며 외부 세포벽은 산소의 투과성을 줄일 수 있는 구조로 변하게 된다. Heterocysts에 phycocyanine이 결합되어 있음은 이 세포들이 photosystem II의 부족으로 산소를 생성하지 못하게 함을 나타내며 이는 질소고정 효소인 nitrogenase의 활동이 산소에 의해 억제되는 것을 방지하는 것으로 알려져 있다. Heterocyst기능의 다른 특성은 산소가 방출되는 호기적 환경하에서 빛에 의해 생성된 energy를 이용하여 질소 고정을 할 수 있

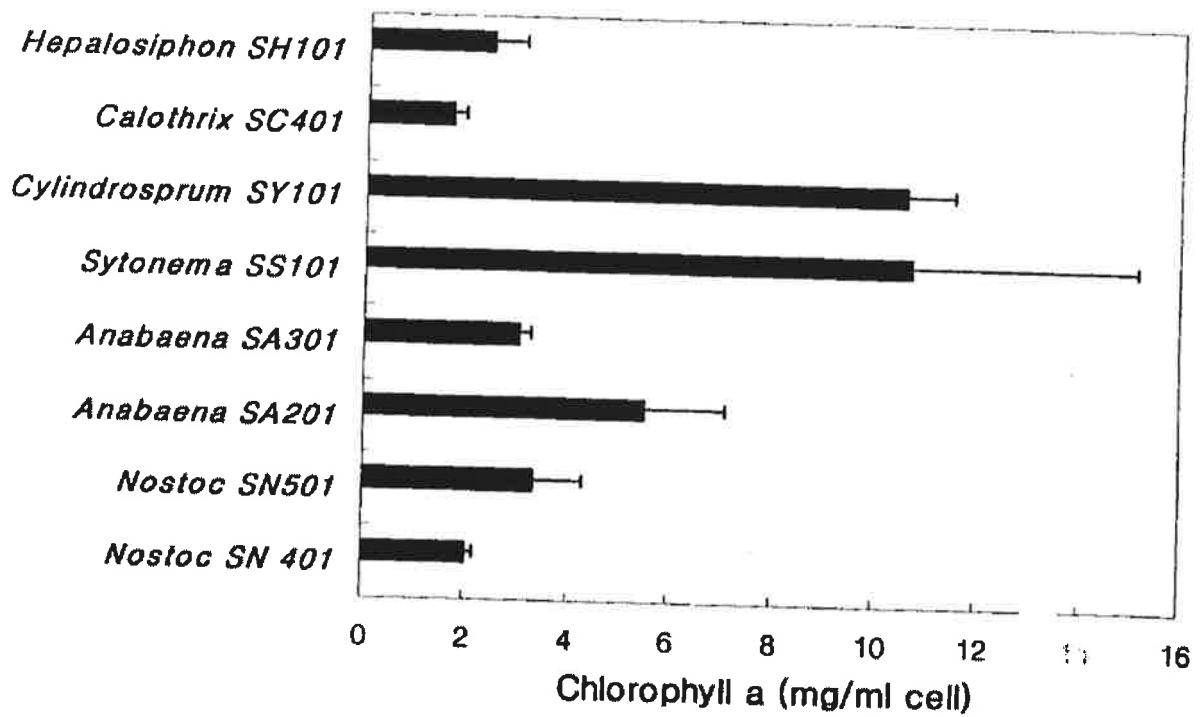


Fig. 7 Comparison of chlorophyll a content of cyanobacteria isolated from rice field. Small bar represents standard deviation (n=3).



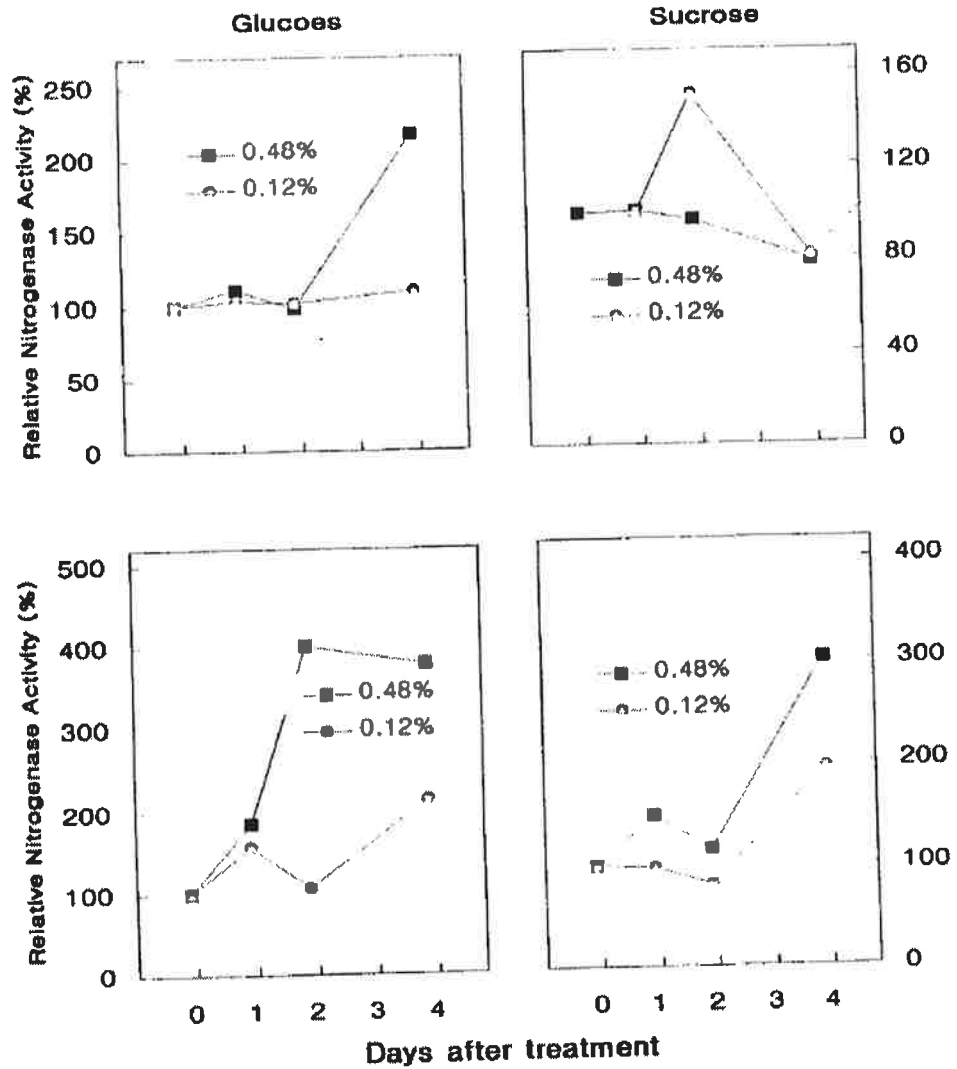


Fig. 8 Effect of carbon sources on nitrogenase activity of *Nostoc* SN401 and *Anabaena* SA201 isolated from rice field.

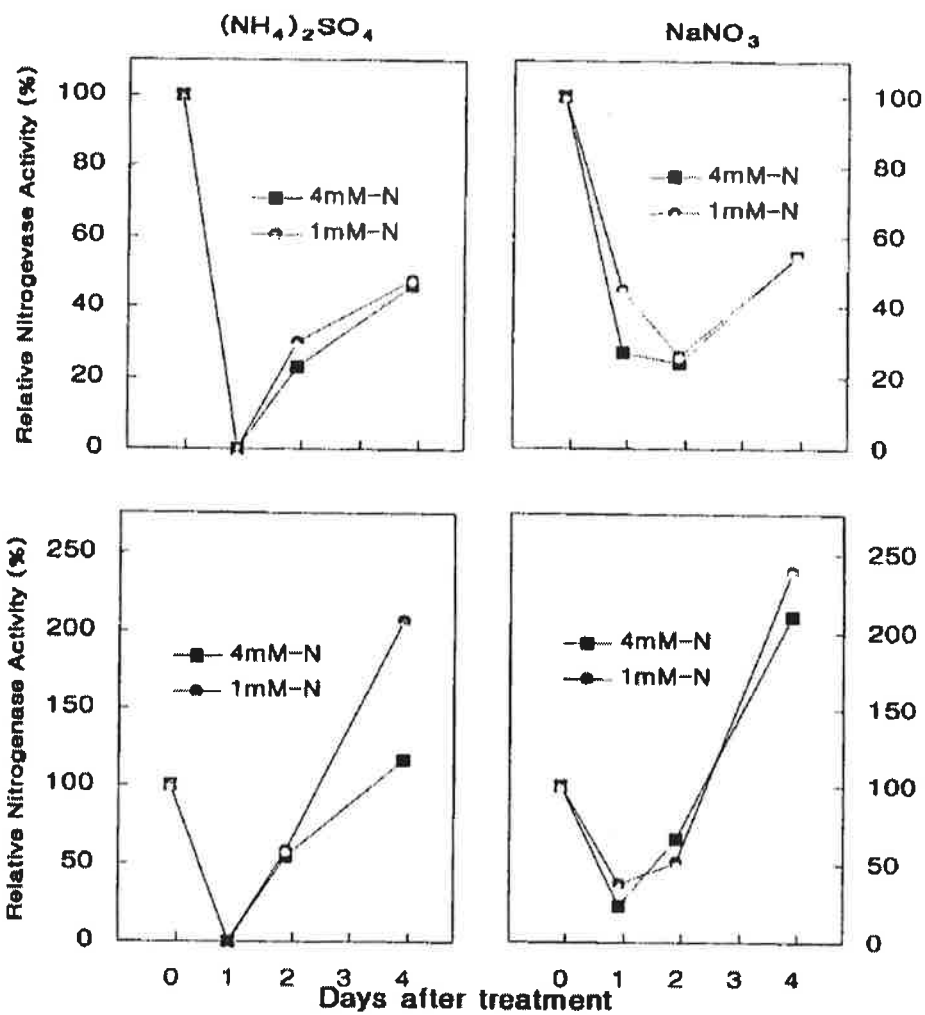


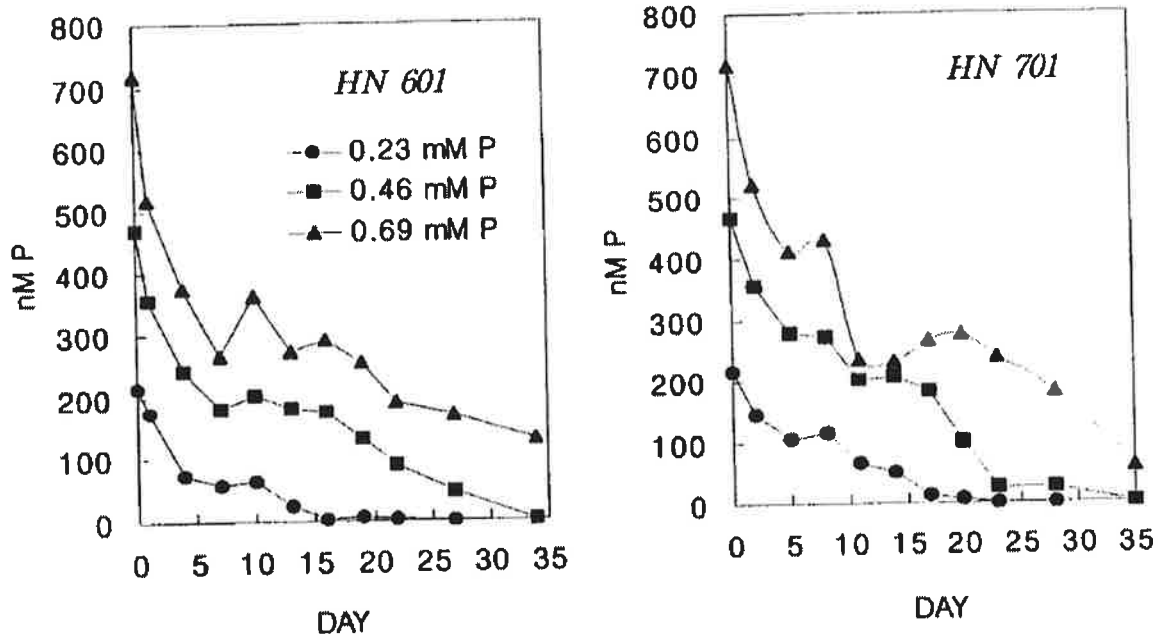
Fig. 9 Effect of nitrogen sources on nitrogenase activity of *Nostoc* SN401 and *Anabaena* SA201 isolated from rice field.

게 되어 있다는 것이다. 또다른 heterocysts의 특징은 nitrogenase활성을 억제하는 체내  $\text{NH}_4^+$ 의 축적을 방지하기 위하여 효과적인  $\text{NH}_4^+$ 동화작용 체계를 가지고 있다는 점이다. 무기질소의 공급원이 제한될 때 많은 cyanobacteria는 nitrogenase복합 효소를 통해서 질소 고정을 할 수 있다.

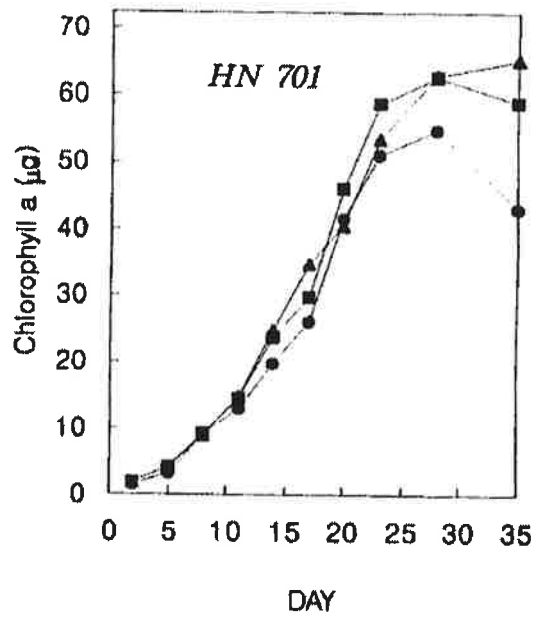
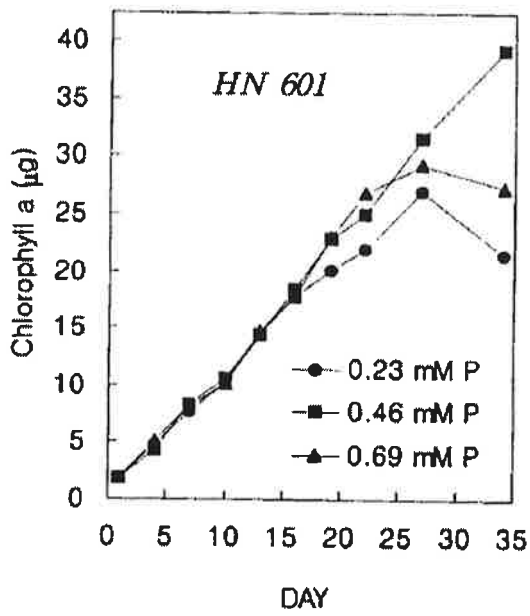
- 각각의 분리균주의 약체 및 고체 배지에서의 생육 속도는 calothrix spp가 각각의 배지에서 우수하였으며 특히 HC 605가 다른 균주보다 우수한 생육을 나타내었다(표2).
- 배양액의 인산농도를 달리하여(1X, 2X, 3X)균체의 인산흡수 속도 및 생육 상태를 비교한 결과(그림 10, 11)인산 농도가 높아짐에 따라 인산흡수 속도는 빨라졌으나 생육속도는 접종 후 20일까지 영향을 받지 않아 토양인산 농도는 균체 생육에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 사료되며 인산의 농도가 높은 토양에서는 균체의 인산보유능이 매우 클 것으로 생각되었다. 균체의 질소 및 인산의 농도는 (그림 12, 13)에 나타내었다. 질소함량은 0.42~0.89%범위에 있으며 RF-7이 가장 높은 질소를 함유하고 있었으며 인산의 경우 평균  $10\mu\text{g-P/mg-DW}$  농도를 나타내었고 HN 601이  $23.5\mu\text{g-P/mg-DW}$ 로 가장 높은 인산을 보유하고 있었다.
- 본 실험에서 사용한 경기지역 논 토양 이화학적 성질은 (표 1)에 나타내었으며 이 토양을 중심으로 질소고정능이 우수한 균주를 접종하여 토양중 질소고정능력을 측정하였다(표 3~8)와 같다. 분리한 cyanobacteria는 다양한 토양조건 및 탄소의 영향하에서도 질소고정능은 계속 소유하고 있었으며 기타 균체에 비하여 고농도의 질소를 보유함에 비추어 생물비료로써 활용이 가능하리라 생각된다.
- Cyanobacteria에 의한 질소고정은 토양의 유효 질소 함량을 늘여 적은 양의 화학비료로 작물 생산량을 늘릴 수 있는 방법이다. Cyanobacteria는 외부의 환경 변화 및 stress에 내성이 강하고 적응력이 좋아 벼농사를 비롯한 여러 작물 생

Table 2. Comparison of Cyanobacterial growth in liquid and solid medium.

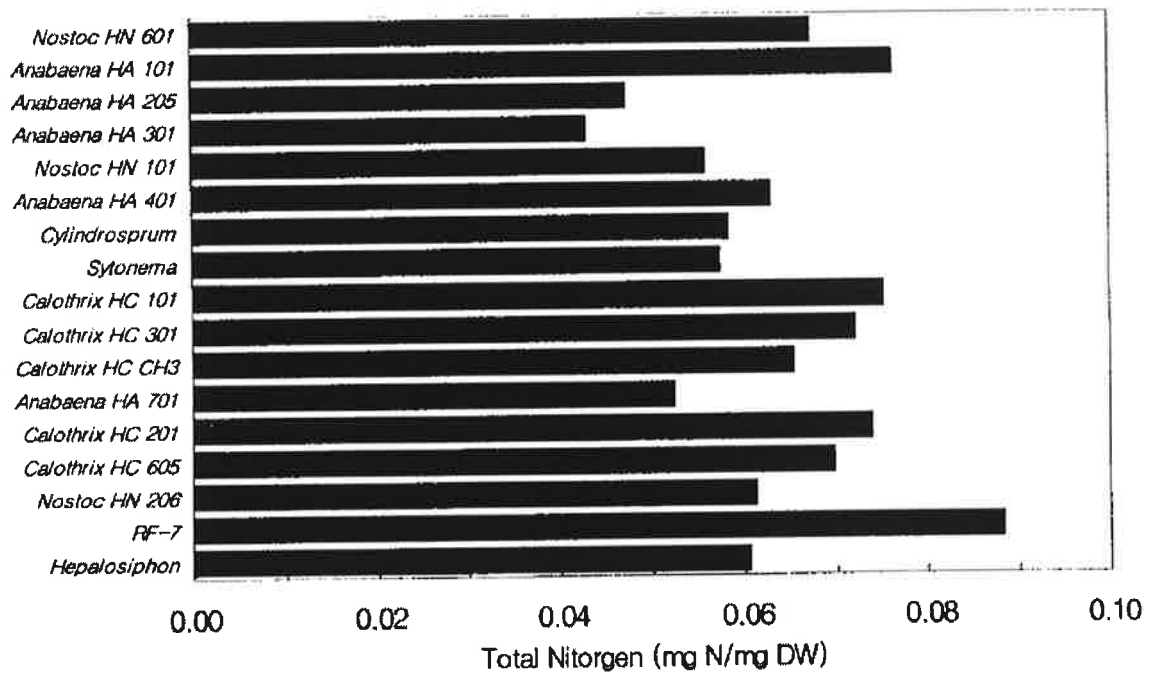
Genus	Strain	liquid medium	solid medium
Anabaena	HA 101	++++	++
	HA 205	+	+
	HA 301	++	+++
	HA 401	+++	+
	HA 701	+	
Nostoc	HN 101	+++	++
	HN 206	++	+
	HN 301		+
	HN 601	+	+++
	HN 701		++
Calothrix	HC 101	+++	+
	HC 201	+++	+++
	HC 301	++	+
	HC 605	+++	++++
	HC CH3	++	+++
Sytonema	HS 101	+++	++
Cylindrosprum	HY 101	+	+
Hepalosiphon	HH 101	+++	+
Synechococcus	RF-7	+++	++



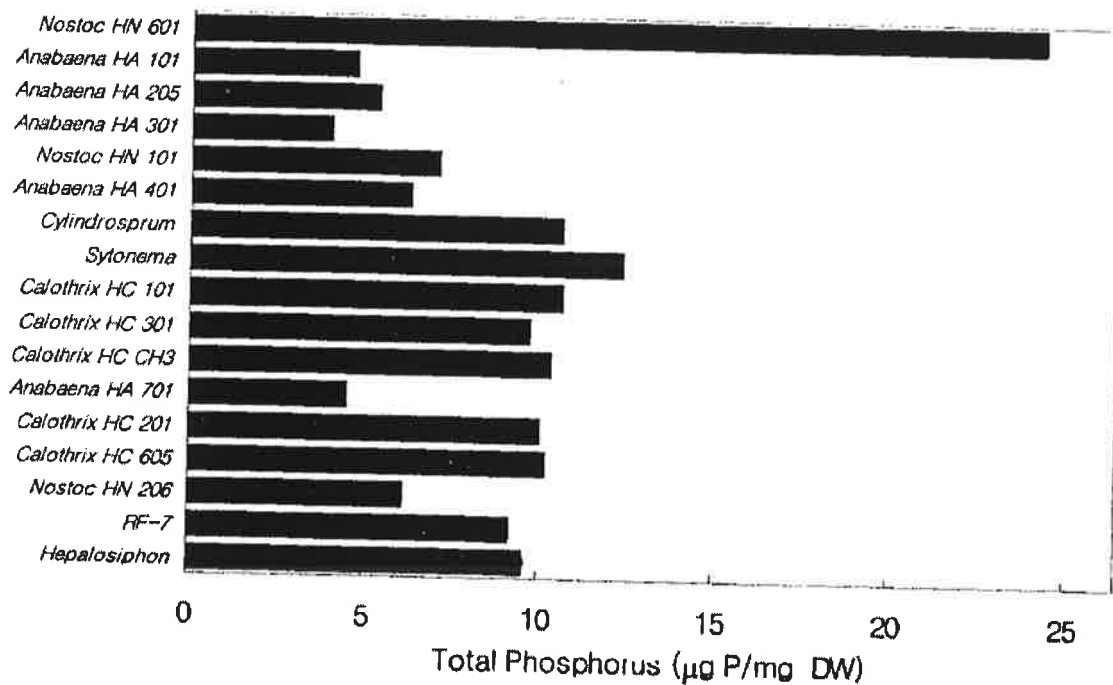
**Fig. 10** Removal of external-phosphorus by cyanobacteria *Nostoc HN601* and *HN 701*.



**Fig. 11** Effect of initial phosphorus content on cyanobacterial (*Nostoc HN601* and *HN 701*) growth.



**Fig. 12 Comparison of total nitrogen content in cyanobacteria isolated from paddy soil.**



**Fig. 13 Comparison of total phosphorus content in cyanobacteria isolated from paddy soil.**





Table 7. Effect of HA 301 inoculation on total nitrogenase activity of soils.

Soil	Days after Inoculation					
	0	7	14	28	42	56
Suwon	4381.0	2549.2	999.5	878.8	903.0	891.9
Daehung	940.8	897.6	870.4	857.4	884.2	876.6
Bongjum	873.8	1511.3	885.2	1339.4	2304.4	1700.1
Songtan	3969.9	5286.6	869.0	3756.6	2196.9	3088.9
Paltan	2034.5	881.8	874.7	874.9	891.5	910.7
Jangan	1805.4	4463.2	1361.0	2694.2	1264.5	1215.1
Ansung-1	966.0	873.3	873.3	881.1	897.0	889.8
Joam-1	1105.4	2461.4	882.9	1650.8	1249.6	892.5
Jeongan	1274.4	2991.7	869.4	873.3	880.1	885.8
Ansung-2	1106.4	968.2	874.9	880.6	897.4	885.4
Joam-2	2185.0	3263.8	927.4	970.8	948.6	936.6
Jeongnam-1	1560.4	2051.4	871.2	879.0	893.2	889.6
Ansung-3	886.3	1498.8	884.7	871.9	881.5	880.0
Joam-3	853.7	867.2	868.2	869.8	887.7	881.8
jeongnam-2	860.5	869.1	870.2	873.1	892.8	890.8

Table 4 Effect of HA 205 inoculation on total nitrogenase activity of soils.

Soil	Days after Inoculation						
	0	7	14	28	42	56	70
	pM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / m <sup>2</sup> soil / hour						
Suwon	852.4	856.7	859.6	859.6	854.6	854.3	872.3
Daeheung	871.6	873.4	868.0	868.7	866.5	867.0	888.6
Bongjum	869.3	867.6	894.9	867.9	868.1	903.3	1705.5
Songtan	876.4	938.7	1045.7	873.6	866.4	864.7	887.2
Paltan	889.1	1039.9	855.1	866.6	871.6	871.2	880.0
Jangan	885.1	1509.7	852.2	939.9	869.7	871.7	883.7
Ansung-1	885.7	867.0	842.8	869.0	866.7	873.5	879.5
Joam-1	883.7	858.5	845.9	865.6	865.4	869.1	883.2
Jeongan	884.3	1035.3	848.3	866.6	865.1	869.6	882.5
Ansung-2	905.5	973.5	929.0	863.2	871.8	870.5	889.0
Joam-2	893.6	863.7	857.2	872.7	875.8	882.5	891.8
Jeongnam-1	906.4	891.8	850.5	871.8	868.3	876.4	881.9
Ansung-3	899.8	867.3	852.3	873.4	859.1	881.4	880.7
Joam-3	935.0	1109.1	845.6	846.7	863.2	868.5	876.8
jeongnam-2	888.7	1109.5	887.3	887.1	870.6	871.8	880.7

Table 6. Effect of HA 101 inoculation on total nitrogenase activity of soils.

Soil	Days after Inoculation						
	0	7	14	28	42	56	
	pM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / m <sup>2</sup> soil / hour						
Suwon	992.8	875.0	878.7	866.4	883.8	883.1	
Daehung	880.9	873.0	883.3	875.3	883.5	877.5	
Bongjum	859.1	871.6	889.4	878.2	883.6	877.5	
Songtan	879.8	868.4	891.7	1735.3	1052.6	1123.3	
Paltan	922.9	870.4	883.6	882.4	883.8	879.1	
Jangan	873.5	867.1	887.2	881.0	885.6	880.3	
Ansung-1	864.0	868.6	865.6	873.0	883.8	875.5	
Joam-1	863.2	869.3	883.7	882.7	889.4	903.7	
Jeongan	876.1	864.7	880.9	878.1	886.9	896.8	
Ansung-2	894.2	867.1	872.8	869.4	887.2	873.9	
Joam-2	885.9	860.3	868.8	880.6	895.0	879.6	
Jeongnam-1	927.5	869.0	879.7	875.7	891.0	880.3	
Ansung-3	859.9	870.8	878.1	884.1	896.6	877.3	
Joam-3	877.4	868.5	879.1	873.5	886.1	877.5	
jeongnam-2	872.4	862.4	912.0	880.8	901.2	893.0	

Table 5. Effect of HN 601 inoculation on total nitrogenase activity of soils.

Soil	Days after Inoculation						
	0	7	14	28	42	56	70
	pM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / m <sup>2</sup> soil / hour						
Suwon	875.2	858.3	871.5	868.6	866.9	869.5	879.7
Daeheung	875.0	872.7	878.9	875.4	881.1	868.4	875.2
Bongjum	852.8	872.8	875.9	879.9	884.3	889.6	908.5
Songtan	871.9	877.0	871.1	873.2	872.2	879.6	894.1
Paltan	874.0	863.3	865.6	877.1	871.2	873.6	842.4
Jangan	879.9	864.7	871.2	871.2	864.8	875.6	881.9
Ansung-1	863.4	868.4	863.1	857.4	871.9	875.1	886.9
Joam-1	876.6	862.6	869.2	867.1	877.3	874.4	884.9
Jeongan	871.0	866.0	870.1	863.3	874.3	884.1	941.3
Ansung-2	868.4	864.6	866.6	878.7	874.6	877.3	892.7
Joam-2	881.9	867.8	870.6	884.3	881.7	884.2	899.0
Jeongnam-1	869.5	861.6	863.0	868.5	875.6	878.8	889.0
Ansung-3	914.7	870.9	872.9	869.0	891.4	906.1	926.1
Joam-3	871.4	867.7	867.4	874.7	875.5	878.5	885.5
jeongnam-2	868.0	868.1	865.9	866.7	866.6	865.9	881.2

Table 8. Effect of HN 701 inoculation on total nitrogenase activity of soils.

Soil	Days after Inoculation					
	0	7	14	28	42	56
	pM C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / m <sup>2</sup> soil / hour					
Suwon	3733.8	872.7	877.8	869.4	881.7	881.7
Daehung	2996.1	872.8	875.0	872.8	891.1	891.1
Bongjum	1019.0	877.0	880.7	887.9	904.4	904.4
Songtan	5400.2	863.3	887.2	889.6	912.4	912.4
Paltan	1299.2	864.7	880.4	846.8	890.5	890.5
Jangan	956.5	868.4	880.3	879.6	893.9	893.9
Ansung-1	1357.4	862.6	886.0	881.8	914.9	914.9
Joam-1	3653.7	866.0	937.7	892.3	918.8	918.8
Jeongan	1470.1	864.6	882.4	882.5	898.3	898.3
Ansung-2	1228.8	867.8	875.6	881.0	897.1	897.1
Joam-2	4812.9	861.6	894.3	1101.4	1044.2	1044.2
Jeongnam-1	1883.3	870.9	873.6	880.8	893.7	893.7
Ansung-3	858.5	867.7	883.3	881.6	900.8	900.8
Joam-3	3791.7	868.1	878.6	882.4	894.8	894.8
jeongnam-2	850.2	868.1	906.7	876.1	897.2	897.2

산 체계에 생물학적 비료로써 이용 가능성이 매우 높다. 세계적으로 여러 나라에서 cyanobacteria가 생물비료로 사용되어 200만 ha 이상의 농을 비옥하게 만든다고 보고되어 있다. 질소는 모든 식물이 가장 많이 요구하는 다량 원소이다. 많은 energy가 요구되는 화학 질소비료의 사용을 줄이면 경제적인 효과와 더불어 최근에 비료 성분 유출에 따른 환경오염 문제를 해결하여 환경친화적 영농방법 개발에도 많은 도움이 될 것으로 생각되므로 국내 토양에 자생하는 질소고정 cyanobacteria를 이용한 생물 비료 개발은 지속적인 학문적 연구와 더불어 작물 생산적 실험이 앞으로 수행될 것으로 기대된다.

#### IV. REFERENCES

- Stewart. W. D. P. (1980) Some aspects of structure and function in N<sub>2</sub> - fixing cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34, 497-536.
- Stewart. W. N. (1983) *paleobotany and the Evolution of Plants*. pp. 28-35. Cambridge University Press. New York.
- Walter. M. R. J. Bauld. D. J. Des Marais and J. W. Schopf (1992) A general comparison of microbial mats and microbial stromatolites bridging the gap between the modern and the fossil. In *The Proterozoic Biosphere* (Edited by J. W. Schopf and C. Klein). PP. 335-338. University Press. Cambridge.
- Fay. P. (1992) Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Rev.* 56, 340-373.
- Tandeau de Marsac. N. and J. Houmard (1993) Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 104, 119-190.
- Stanier. R. Y. and G. Cohen-Bazire (1977) Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 31, 225-274.
- Davey. M. C. (1989) The effect of freezing and desiccation on photosynthesis and survival of terrestrial algae and cyanobacteria. *Polar Biol.* 10, 29-36.
- Spiller. H. C. Latorre. M. E. Hassan and K. T. Shanmugam (1986) Isolation and characterization of nitrogenase-derepressed mutant strains of cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 165, 412-419
- Häder, D. P., R. C. Worrest and H. D. Kumar (1989) Aquatic ecosystems, pp. 39-48. UNEP Environmental Effects Panel Report, Nairobi, Kenya.
- Collos, Y., G. Döhler and I. Biermann (1992) Production of dissolved organic nitrogen during uptake by *Synedra planktonica*: implication for estimates of new production in the oceans. *J. Plankton Res.* 14. 1025-1029
- Venkataraman, G. S. (1972) *Algal Biofertilizers and Rice Cultivation*, p. 75. Today and Tomorrows Printers and Publishers, New Delhi, India.
- Kumar, A. and H. D. Kumar (1988) Nitrogen-fixation by blue-green algae, In *Proceedings of the Plant Physiological Research*(Edited by S. P. Sen), pp. 85-103. Society for plant Physiology and Biochemistry, 1st International Congress of plant physiology, New Delhi, India.



- Sinha, R. P. and A. Kumar (1992) Screening of blue-green algae for biofertilizer. In *Proceedings of the National Seminar on Organic Farming* (Edited by P. S. Patil), pp. 95-97. Pune, India.
- Kannaiyan, S., K. Govindarajan, H. D. Lewin and G. S. Venkataraman (1982) Influence of blue-green algal application on rice crop. *Madras Agric. j.* 69, 1-5
- Mian, M. H. and W. D. P. Stewart (1985) Fate of nitrogen applied as *Azolla* and blue-green algae (cyanobacteria) in waterlogged rice soils-a  $^{15}\text{N}$  tracer study. *Plant Soil* 83, 363-370.
- Watanabe, I. (1987) Summary report of the *Azolla* programme of the international network in soil-fertility and fertilizer evaluation for rice. In *Azolla Utilization. Proceedings of the Workshop on Azolla Use*, pp. 197-205. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Martinez, M. R (1984) Algae: biofertilizer for rice. *Philipp. Counc. Agric. Res. Resour. Dev. (PCARRD) Monit.* 12, 9-12.
- Kuhlbusch, T. A., J. M. Lobert, P. J. Crutzen and P. Warneck (1991) Molecular nitrogen emission. Trace nitrification during biomass burning. *Nature* 351, 135-137
- Watanabe, I. and S. Brotonegoro (1981) Paddy fields. In *Nitrogen Fixation* (Edited by W. J. Broughton), pp. 241-263. Oxford University Press, New York.
- Venkataraman, G. S.(1981)All India co-ordinated project on algae, Annual report(1980-81). Division of Microbiology. Indian Agricultural Research Institute, New Delhi, India.
- Stewart, W. D. P., P. Rowell, J. K. Ladha and M. J. A. M. Sampaio (1979) Blue-green algae (cyanobacteria)-some aspects related to their role as sources of fixed nitrogen in paddy soils. In *Proceedings of Nitrogen and Rice Symposium*. pp. 263-283. International Rice Research Institute, Manila, Philippines.
- Roger, P. A. and S. A. Kulsooriya (1980) Blue-green algae and rice. International Rice Research Institute, Los Banos, Laguna, Philippines.
- Al-Mousawi, A. H. and B. A. Whitton (1983) Influence of environmental factors on algae in rice-field soils from the Iraqi marshes. *Arab Gulf J. Sci. Res.* 1, 237-253.
- Banerjee, M. and H. D. Kumar (1992) Nitrogen fixation by *Aulosira fertilissima* in rice fields. *Naturalia* 17, 51-58.
- Sinha, R. P. (1995) Impacts of UV-B stress on  $\text{N}_2$ -fixing cyanobacteria. Ph.D. thesis, Banaras Hindu University, Varanasi, India.
- Potts, M., J. J. Olie, J. S. Nickels, J. Parsons and D. C. White (1987) Variation in

- phospholipid ester-linked fatty acids and carotenoids of desiccated *Nostoc commune* (cyanobacteria) from different geographic locations. *Appl. Environ Microbiol.* **53**, 4-9.
- Büdel, B. and D. C. J. Wessels (1991) Rock inhabiting blue-green algae/cyanobacteria from hot arid regions. *Algol. Stud.* **64**, 385-398.
- Lange, O. L., G. J. Kidron, B. Büdel, A. Meyer, E. Kilian and A. Abeliovich (1992) Taxonomic composition and photosynthetic characteristics of the 'biological soil crusts' covering sands dunes in the western Negev Desert. *Funct. Ecol.* **6**, 519-527.
- Johansen, J. R. (1993) Cryptogamic crusts of semiarid and arid lands of North America. *J. Phycol.* **29**, 140-147.
- Whitton, B. A. (1992) Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria. In *Photosynthetic Prokaryotes* (Edited by N. H. Mann and N. G. Carr), pp. 1-51. Plenum Press, New York.
- Stal, L. J. (1995) Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytol.* **131**, 1-32.
- Kirst, G. O. and C. Woencke (1995) Ecophysiology of polar algae. *J. phycol.* **31**, 181-199.
- Dodds, W. K., D. A. Gudder and D. Mollenhauer (1995) The ecology of *Nostoc*. *J. Phycol.* **31**, 2-18.
- Rai, A. N. (1990) Cyanobacteria in symbiosis. In *Handbook of symbiotic Cyanobacteria* (Edited by A. N. Rai), pp. 1-7. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Rai, A. N., Rowell and W. D. P. Stewart (1983) Interactions between cyanobacteria and fungus during  $^{15}\text{N}_2$ -incorporation and metabolism in the lichen *Peltigera canma*. *Arch. Microbiol.* **134**, 136-142.
- Duckett, J. G., A. K. S. K. Prasad, D. A. Davies and S. Walker (1977) A cytological analysis of the *Nostoc-bryophyte* relationship. *New Phytol.* **79**, 349-362.
- Dalton, D. A. and J. M. Chatfield (1985) A nitrogen-fixing cyanophyte-hepatic association: *Nostoc and Porella*. *Am. J. Bot.* **72**, 781-784.
- Meeks, J. C., C. S. Enderlin, C. M. Joseph, J. S. Chapman and M. W. L. Lollar (1985) Fixation of  $^{13}\text{N}$   $\text{N}_2$  and transfer of fixed nitrogen in the *Anthoceros-Nostoc* symbiotic association. *Planta* **164**, 406-414.
- Henriksson, E., L. E. Henriksson, J. O. Norrman and P. O. Nyman (1987) Biological nitrogen fixation (acetylene reduction) exhibited by blue-green algae (cyanobacteria) in association with mosses gathered on Surtsey, Iceland. *Arct. Alp. Res.* **19**, 432-436.

- Singh, A. L. and P. K. Singh (1987) Comparative study on Azolla and blue-green algae dual culture with rice. *Isr. J. Bot.* **36**, 53-61.
- Peter. G. A (1991) Azolla and other plant-cyanobacteria symbioses: aspects of form and function. *Plant Soil* **137**, 25-36.
- Lindblad. P., A. Atkins and J. S. Pate(1991) N<sub>2</sub> - fixation by freshly isolated *Nostoc* from coralloid roots of the cycad *Macrozamia riedlei* (Fisch. ex Gaud.) Gardn. *Plant Physiol.* **95**. 753-759.
- Bergman., B. C. Johansson and E. Soderback(1992) The *Nostoc* - *Gunnera* symbiosis. *New Phytol.* **122**. 379 - 400.
- Duong, T., P. and J. M. Tideje(1985) Nitrogen fixation by naturally occurring duckweed - cyanobacterial associations. *Can. J. Microbiol.* **31**. 327 - 330.
- McFadden, B. A.(1973) Autotrophic CO<sub>2</sub> assimilation and the evolution of ribulose diphosphate carboxylase, *Bacteriol. Rev.* **37**, 289 - 319.
- Bothe, H.(1982) Nitrogen fixation. In *The Biology of Cyanobacteria*(Edited by N. G. Carr and B. A. Whitton), pp. 87 - 104. Botanical Monographs, University of California Press.
- Hallenbeck, P. C(1987) Molecular aspects of nitrogen fixation in photosynthetic prokaryotes. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* **14**. 1 - 48.
- Kim, J. and D. C. Rees(1992) Crystallographic structure and functional implications of the nitrogenase molybdenum-iron protein from *Azotobacter vinelandii*. *Nature* **360**, 553 - 560.
- Griffiths, M. S. H., J. R. Gallom and A. E. Chaplin(1987) The diurnal pattern of dinitrogen fixation by cyanobacteria *in situ*. *New Phytol.* **107**, 649 - 657.
- Stal, L. J. and W. E. Krumbein(1985) Isolation and characterization of cyanobacteria from a marine microbial mat. *Bot. Mar* **28**, 351 - 365.
- Mullineaux, P. M. G. R. Gallon and A, E, Chaplin(1981) Acetylene reduction(nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. *FEMS Microbiol. Lett.* **10**, 245 - 247.
- Vanderhoef, L. N., P. J. Musil, C-Y. Huang, R. E. Fiehweg, J. W. Williams, D. L. Wackwitz and K. T. Mason(1975) Diurnal variation in algal acetylene reduction (nitrogen fixation) *in situ*. *Plant Physiol.* **55**, 273 - 276.
- Gallin, J. R., M. A. Hashem and A, E, Chaplin(1991) Nitrogen fixation by *Oscillatoria* spp. under autotrophic and photoheterotrophic conditions. *J. Gen. Microbiol.* **137**, 31 - 39.
- Khamees, H. S., J. R. Gallin and A. E. Chaplin(1987) The pattern of acetylene reduction

- by cyanobacteria grown under alternating light and darkness. *Br. Phycol. J.* **22**, 55 - 60.
- Maryan, P. S., R. R. Eady, A. E. Chaplin and P. R. Gallon(1986) Nitrogen fixation by *Gloeotheca* sp. PCC 6090: respiration and not photosynthesis supports nitrogenase activity in the light. *J. Gen. Microbiol.* **132**, 789 - 796.
- Stewart. W. D. P. and P. Rowell(1977) Modifications of nitrogen-fixing algae in symbiosis. *Nature* **265**, 371 - 372.
- Musgrave, S. C., N. W. Kerby, G. A. Codd and W. D. P. Stewart(1982) Sustained ammonia production by immobilized filaments of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* 27893. *Biotechnol. Lett.* **4**, 647 - 652.
- Sinha, R. P. and D. P. Hader(1996) Response of a rice field cyanobacterium *Anabaena* sp. to physiological stressors. *Environ. Exp. Bot.* **36**, 147 - 155.
- Subramanian, G. and S. Shanmugasundaram(1986) Uninduced ammonia release by the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena*. *FEMS Microbiol. Lett.* **33**, 151 - 154.
- Kerby, N. W, S. C. Musgrave, P. Rowell, P. Rowell, S. V. Shestakov and W. D. P. Stewart(1986) Photoproduction of ammonia by immobilised mutant strains of *Anabaena variabilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 42 - 46.
- Venkataraman, L. V.(1986) Blue-green algae as biofertilizers. in *CRC Handbook of Microalgal Mass Culture*(Edited by A. Richmond), pp. 455 - 471. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Kerby, N. W, P. Rowell and W. D. P. Stewart(1989) The transport assimilation and production of nitrogenous compounds by cyanobacteria and microalgae. In *Algal and Cyanobacterial Biotechnology*(Edited by R. C. Cresswell, T. A. V. Rens and N. Shah), pp.50-90. London Scientific and Technical, England.
- Ladha, J. K., A. T. Padre, G. C. Punzalan and I. Watanabe (1987) Nitrogen-fixing ( $C_2H_2$ -reducing) activity and plant growth characters of 16 wetland rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* **33**, 187-200.
- Venkataraman, G. S. (1979) Algal inoculation in rice fields. In *Proceeding of Nitrogen and Rice Symposium*, pp. 311-321. International Rice Research Institute, Manila Philippines.
- Sigh, A. L. and P. K. Singh (1986) Comparative effects of *Azolla* and blue-green algae in combination with chemical N fertilizer on rice crop. *Proc Ind Acad Sci.* **96**, 147-152.
- Lumpkin, T. A. and D. L. Pluckett (1982) *Azolla as a Grass Manure. Use and Management in Crop Production*. Westview Press, Bowker Publishing Company, Epping, Esse.

- Sinha, R. P., M. Lebert, A. Kumar, H. D. Kumar and D.-P. Hader (1995) Disintegration of phycobilisomes in a rice field cyanovacterium *Nostoc* sp. following UV irradiation. *Biochem. Mol. Biol Int.* 37, 697-706.
- Sinha, R. P., M. Lebert, A. Kumar, H. D. Kumar Anand Hader (1995) Spectroscopic and biochemical analyses on phycobiliproteins of *abaena* sp. and *Nnostoc carmium*. *Bot. Acta* 180. 87-92.
- Peterson, R. B., E. E. Friberg and R. H. Burris (1979) Diurnal variation in N<sub>2</sub> fixation and photosynthesis by aquatic blue-green algae. *Plant Physiol.* 59, 74-80.
- Tandeau de Marsac, N (1977) Occurrence and nature of Chromatic adaptation in cyanobacteria. *J Bacteriol.* 130, 82-91.
- Weiner, D. (1992) Cyanovacteria symbioses(except lichen). In *symbiosis of plants and microbes*(Edited by D werner), pp. 220-247. Chapman and Hall, London.
- Whitton, B. A. (1987) Survival and dormancy of blue-green algae. In *Survival and dormancy of microorganisms* (Edited by Y. Hennis), pp. 109-167. John Wiley and Sons, New York.