

농법에 따른 메탄생성과 메탄생성 세균의 T-RFLP 패턴

김훈수¹ · 조주식² · 박경량^{3*}

¹주)휴마스 부설연구소, ²순천대학교 생명과학부, ³한남대학교 생명공학과

농법에 따른 토양의 토양 성분과, 메탄생성량, 메탄생성 세균의 수, 그리고 terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 패턴을 계절별로 조사하였다. 조사기간 동안의 대부분 토양 성분은 큰 차이를 나타내지 않았고, 토양내 물 함량은 5월 시료 보다 10월 시료가 높게 나타났다. 그리고 most probable number (MPN) 방법을 이용한 메탄생성 세균 계수에서, 모든 논토양에 메탄생성 세균이 비교적 많이 존재하였으나 수소를 이용하는 메탄생성 세균과 포름산을 이용하는 메탄생성 세균에 비해 아세트산을 이용하는 메탄 세균수가 상대적으로 적은 것을 확인하였다. 또 포름산 이용 실험에서 대부분 토양이 1주부터 빠른 포름산 이용능을 보여, 4주에는 미량만이 검출되었으나, 아세트산을 첨가한 실험에서는 3주까지 아세트산이 증가된 후, 그 이후에야 아세트산이 이용되어 감소됨을 확인하였다. 그리고 수소를 첨가해준 모든 시료에서는 많은 양의 메탄생성이 있음을 확인하였다. 또 *Sou96I*을 처리한 *mcrA* 유전자의 T-RFLP 패턴을 분석한 결과, 농법에 따라 토양성분이 크게 차이가 없는 것과 같이 농법과 계절에 의해서도 뚜렷한 차이를 나타내지 않았지만 일부 통계분석 자료는 유의성이 있음을 확인하였다. 따라서 토양 미생물의 군집비교 기법을 미생물학적 지표로 활용할 수 있다고 판단된다.

Key words □ agricultural methods, methane production, methanogens, MPN, soil components, T-RFLP

세계 3대 작물의 하나로 우리나라와 이웃 중국과 일본의 주식인 쌀은 물을 가두어 재배한다. 따라서 논토양이 물에 잠기고 산소가 점점 고갈되어 혐기 상태로 변화되면 최종 전자 수용체에 따라 발효 또는 혐기 호흡 기작으로 유기물이 분해되어 원소가 순환된다(25).

혐기상태에서 일어나는 혐기호흡은 보통 탈질, 철과 망간의 환원, 황산화환원, 메탄생성 순으로 일어나며, 이때 어떤 과정이 일어날 것인지는 전자 수용체와 전자 전달체의 종류와 농도, 그리고 탄소원, 산화 환원전위, 온도, 미생물 군집 등에 의해 결정된다. 보통 물에 잠겨 있는 환경에서는 질산염 농도가 매우 낮고, 철과 망간은 낮은 농도와 고체로 존재하기에 생물학적 활성이 감소한다. 따라서 물에 잠기는 곳은 메탄생성과 황 환원이 탄소 순환의 주된 작용을 하게 된다.

일반적으로 논과 늪지 등의 담수는 황산염의 농도가 낮아 메탄 생성이 주된 유기물 분해 기작으로 작용하기 때문에, 논에서는 비교적 많은 양의 메탄이 발생된다(22). 더구나 메탄은 지구의 온난화와 관련되어 있기 때문에 최근에 논농사를 많이 하고 있는 나라를 중심으로, 중국(9, 11, 21), 일본(6), 태국(18), 아열대지방과 열대성 논(21) 등에서 메탄생성에 관한 일부 연구들을 진행하고 있다. 그러나 이들 연구의 대부분은 벼의 품종에 따른 차이(1, 11, 26), 물 관리에 따른 메탄생성량의 차이(5, 9, 11, 16), 유기물의 유입(5, 11, 16, 23) 그리고, 기후조건(9) 등에 따른 메탄생성에 관한 연구로, 메탄생성에 관여하는 메탄생성 세균

의 군집구조 해석에 관한 연구는 미국 Florida 주 Everglade (2)를 비롯한 일부 연구가 있을 뿐 이에 관한 연구는 매우 적다. 우리나라도 발생하는 메탄량을 논토양에서 직접 측정된 일부 연구가 있을 뿐(7, 8), 논토양의 메탄생성 세균 군집에 대한 연구가 거의 없다.

더구나 최근에는 웰빙(well being) 바람을 타고 유기농산물에 관한 관심이 높아지고 있다. 우리나라는 1993년 12월부터 품질인증제에 따라 유기농산물(Organic farming), 전환기 농산물(Transition), 무농약 농산물(Emptiness), 저농약 농산물(Low traditional)로 분류 인증하고 있다. 유기농법은 전환기 농법이 유기합성농약과 화학비료를 일체 사용하지 않고 다년생 작물은 3년, 그 외 작물은 2년간의 재배를 했을 때 인증 받는 농법이고, 전환기 농법은 1년 이상 유기합성농약과 화학비료를 일체 사용하지 않고 재배한 것을, 무농약 농법은 유기합성농약은 일체 사용하지 않고, 화학비료는 가급적 권장하나 시비량을 1/3 이내를 사용하는 것을, 저농약 농법은 화학비료는 가급적 권장시비량의 1/2 이내 사용하고 농약 살포횟수는 농약 안전사용기준의 1/2 이하로 제조제는 사용하지 않고 식품의약품 안전청장이 고시한 농산물의 농약잔류허용기준의 1/2 이하인 농법으로, 이들 농법으로 생산되는 농산물을 모두 유기농산물로 분류한다. 그리고 이 인증을 원하는 생산자가 신청한 서류 심사, 농장의 토양과 수질의 중금속과 잔류농약 적합 여부 심사, 생산과정과 시판품 조사 순으로 인증 절차가 진행된다. 따라서 중금속이나 잔류농약들은 시간이 경과하면 미생물에 의해 전환되거나 분해되므로 이 인증방법에 의한 유기농산물 인증은 부정확할 경우가 많다. 이에 비해 토양에 서식하는 미생물은 농약이나 비료가 주입될

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-629-8770, Fax: 82-42-629-8769
E-mail: krpark@hnu.kr

경우 이들을 분해하거나 적응하여 생존하므로, 친환경 농법으로 재배되는 토양과 관행농법으로 재배된 토양 미생물의 군집구조는 차이가 있을 것으로 생각되어, 이들 미생물을 친환경 농산물 인증의 지표로 사용할 수 있을 가능성이 대두된다.

따라서 본 논문은 농법에 따른 미생물 지표의 가능성 여부를 확인하기 위한 연구의 일환으로 모내기부터 추수까지 최소 6개월 이상 물에 잠겨 혐기환경이 유지되는 논토양의 친환경농법과 관행농법에 따른 토양 성분과 메탄생성 세균수, 메탄생성과 기질소모 그리고 메탄생성 세균의 조효소인 *mcrA* 유전자를 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism)로 분석하여 메탄생성 세균의 차이를 농법별, 계절별로 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

토양 시료 및 사용 배지

5월의 봄철 모내기 때와 8월 여름철과 10월 추수 전까지 3차례에 걸쳐 유기농(Organic farming), 전환기농(Transition), 무농약농(Emptiness), 저농약농(Low traditional)의 친환경 농법과 농약을 사용하는 관행농법(Traditional) 등 총 5종류의 농법을 구분하여, 각 농법별로 세 지역의 토양을, 한 지역 당 세 곳에서 채취하여 일정비율(1:1:1)로 섞어 실험에 사용하였다. 각 농법별 토양은 충청도 일원에서 채취하였고, 유기 농법 토양은 충청남도 당진군 도이리, 예산군 불원리, 청양군 기덕리에서, 전환기 농법 토양은 충청북도 청원군 품곡리, 충청남도 예산군 귀곡리, 청양군 기덕리에서, 무농약 농법 토양은 충청남도 예산군 불원리, 청양군 기덕리, 청양군 기덕리에서, 저농약 농법 토양은 충청남도 당진군 도이리, 당진군 사성리, 청원군 구룡리에서, 관행농법 토양은 충청남도 당진군 도이리, 충청북도 청원군 품곡리, 청원군 품곡리에서 채취하였다. 이때 각 농법별 채취 장소는 친환경농법으로 인증된 장소를 인터넷으로 검색하여 무작위로 토양을 채취하였고, 농약을 사용하는 관행농법은 충청도 지역에서 3곳을 무작위로 선택하여 채취하였다.

그리고 채취한 토양의 메탄생성 세균의 배양은 Basal carbonate yeast extract trypticase (BCYT) 혐기배지(20)를 사용하여 실온에서 배양하였다.

토양시료 채취

유기농으로 인증 받은 충청 남·북도의 친환경 농법 토양과 관행농법 토양을 5월부터 10월까지 3차례에 걸쳐 채취하였다. 각 지역의 토양은 같은 농법의 토양을 3지점에서 채취하여 각각 동일비율로 시료용기에 담아 4°C에서 운반하였다. 그리고 각 농법별로 3 장소에서 채취된 토양은 균등하게 섞어 그 농법을 대표하는 대표시료(master)로 사용하였다. 실험실로 운반된 토양 중 DNA를 분리하기 위한 토양은 -70°C, 메탄생성 세균수와 메탄생성을 측정하기 위한 토양은 4°C에서 보관하여 실험하였다.

토양성분 분석

토양내 수분은 건토 중량법으로 건조기(FO-600M, Jeio tech,

Korea)에서 110°C에서 24시간 건조한 후 무게를 측정하였고, 총 질소(total nitrogen)는 Kjeldahl법으로 측정하여 0.001 N H₂SO₄로 적정하였다. 그리고 시료 내 총 인산(total phosphorus)은 과염소산 분석법을 이용하여 470 nm에서 분광기(Lambda EZ201, Perkinelmer, USA)로 비색측정을 하여 결정하였고, 총 탄소(total carbon)와 총 유기탄소(toral organic carbon)는 0.05 g의 시료를 탄소 측정기(SSM-500A, Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다. 그리고 총 무기인(total inorganic phosphorus)은 1 g의 시료를 처리하여 1-amino-2-naphtol-4-sulfonic acid로 발색시킨 후 440 nm에서 분광기(Lambda EZ201, Perkin Elmer, USA)로 측정하였고, 암모니아(extractable ammonium)는 토양 시료 10 g을 건토화하여 침출액을 넣어 항온 배양기(SI 900R, Jeio Tech., Korea)에서 추출하고, 여과한 후 0.001 N H₂SO₄로 적정하여 정량하였다.

MPN (most probable numbers)을 이용한 메탄생성 세균수 조사

1 g의 토양을 9 ml BCYT 배지가 들어있는 혐기배양 시험관(Bellco Glass Inc., USA)에 넣고 고무마개를 막고 aluminum seals로 밀봉한 후, 멸균된 주사기로 각각 20 mM의 아세트산과 포름산을 주입하였다. 그리고 수소를 이용하는 메탄 세균은 19.2%의 CO₂를 H₂로 균형을 맞춘 가스를 30초간 충전하여 실험하였다. 이때 모든 시험관에 황산염 환원을 저해하는 2 mM의 molybdate를 첨가하였고, 대조군은 각 희석단계에 따라 세 개씩의 시험관을 더 준비하여 기질대신 증류수를 주입하였다. 이들 시험관들은 실온에서 2달간 배양 후에 메탄생성과 대기압을 측정하여 대조군과 비교한 후, 양(positive)의 값이 나오는 것을 '+'로 하여, most probable numbers calculator (version4.04; United States Environmental protection agency, Ohio) 프로그램을 이용하여 균수를 산출하였다.

메탄생성과 기질 소모량 측정

1 g의 토양을 9 ml의 BCYT 배지가 들어있는 혐기배양 시험관에 넣고, 메탄생성 세균수 조사와 동일하게 아세트산과 포름산 그리고 수소와 molybdate를 첨가하였다. 그 후 이 시험관을 상온의 어둠속에서 정치 배양하며, 7주간 매주 digital pressure indicator (DPI 705, Druck, USA)를 이용하여 압력을 측정하고, capillary column (DB-1, J & W Scientific, USA)과 불꽃 이온화 검출기(flame ionization detector)가 부착된 gas chromatography (DS 6200, Donam, Korea)을 이용하여 메탄 농도를 측정하였다. 이때 운반가스로는 질소를 사용하였으며 유속은 2 psi로 하였고, 공기와 수소는 각각 5 kgf/cm²로 조정하였다. 그리고 컬럼의 온도는 160°C로, injector는 110°C, detector는 110°C로 조정 하였고, 혐기시험관 내의 가스를 25 µl씩 주입하여 메탄량을 분석하였다.

기질 소모량은 RSpak column (Shodex, Japan)이 부착된 HPLC (High performance liquid chromatography; Series 1100, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 아세트산과 포름산의 잔존량을 측정하였다. 이때 운반체로는 100 mM H₃PO₄에 3% acetonitrile이 첨가된 용액을 이용하였고, 분당 속도는 0.4 ml로

조정하였다. 그리고 검출기의 파장은 210 nm 조정 하였으며, 혐기시험관 내의 배지용액 20 μ l를 주입하여 분석하였다.

Methyl coenzyme M (*mcrA*)의 PCR (polymerase chain reaction)

Ultra Clean Soil DNA kit (MoBio, USA)을 이용하여 토양세균의 DNA를 분리한 후, *mcrA* primer를 이용하여 465 bp에서 490 bp 크기의 유전자를 PCR (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, USA)을 사용하여 증폭 하였다(14). 이때 primer는 *mcrA*-f (5'-GGT GGT GTM GGA TTC ACA CAR TAY GCW ASC GC-3')와 *mcrA*-r (5'-TTC ATT GCR TAG TTW GGR TAG TT-3')을 사용하였으며, *mcrA*-f는 형광으로 표지한 6-FAM (carboxyfluorescein)을 이용하였다. 그리고 PCR 반응은 95°C에서 15분간 DNA를 변성시킨 후, 5 cycle은 95에서 30초, 53에서 30초, 그리고 72°C에서 30초간 유지하였다. 이때 증폭단계인 72°C에서 30초 조건에서는 primer의 degeneracy 때문에 ramp 기능을 이용하여 초당 0.1°C씩 온도를 상승시켰다. 그 후 30 cycle은 95°C에서 30초, 53°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초, 마지막 증폭은 72°C에서 7분간으로 실행하였다.

반응이 끝난 후 PCR 반응액 5 μ l 취하여 1.5% agarose gel로 전기 영동하여 크기를 확인한 후, PCR Purification kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 최종 용량이 30 μ l가 되게 정제, 농축 하였다.

제한효소 처리와 T-RFLP 분석

100 ng에서 150 ng 사이의 PCR 산물을 5 units의 제한효소와 제한효소 완충용액, 그리고 증류수를 넣어 최종 용량이 10 μ l가 되게 하였고, 이를 37°C의 항온배양기에서 하룻밤 동안 반응시

킨 후 T-RFLP를 분석하였다. 이때 *mcrA* 유전자의 제한 효소로 *sau96I* (BioLabs, England)을 사용하였고(2), T-RFLP 분석은 Genetic Analyzer (ABI PRISM® 3100, Applied Biosystems, USA)를, T-RFLP 분석을 통해 얻은 signal data는 Genotyper (Version 3.7NT, Applid Biosystem, USA)를 이용하여 각 bp의 peak area를 구한 후, Excel (version 2002, Microsoft Corporation, USA)로 옮겨 noise등을 제거한 후 변환하여, Minitab (Release 14.1, Statistical software, USA)과 SAS (SAS Institute Inc., USA)로 주성분 분석(PCA; principal component analysis)과 판별분석(discriminant analysis)을 실행하였다.

결 과

토양 시료의 성분

토양 시료의 성분분석 결과(Table 1) 평균 수분함량이 29.24%, 총 질소 0.14%, 총 탄소 1.35%, 총 인 4187.61 mg/kg, 총 무기인산 327.65 mg/kg, 암모니아는 8.25 mg/kg, 총 유기탄소는 1.44%로 확인 되었다.

각 성분별 분석에서 수분함량은 유기농법에서 평균 30.89%, 전환기 농법이 29.37%, 무농약 농법이 29.32%, 저농약 농법이 31.05%, 관행농법이 25.58%의 함유량을 나타내고, 총 질소도 유기농법에 평균 0.15%, 전환기 농법 0.13%, 무농약 농법 0.13%, 저농약 농법 0.15%, 관행농법 0.14%의 함유량을 갖고 있어 농법별 차이는 크게 나타나지 않았다. 그러나 총 탄소량과 총 유기탄소량은 각각 평균 유기농법이 1.54%와 1.54%, 전환기 농법이 1.72%와 1.72%, 무농약 농법이 1.80%와 1.79%, 저농약 농법이 0.95%와 1.27%, 그리고 관행농법이 0.72%와 0.89%를 나타내 친

Table 1. Chemical composition of agricultural soils

Field station	Sampling month	Moisture content (%)	TN (%)	TC (%)	TP (g/kg)	TPi (mg/kg)	NH ₄ ⁺ (mg/kg)	TOC (%)
Organic farming	May	25.88	0.13	1.49	3.80	357.52	6.95	1.49
	August	30.95	0.13	1.33	4.74	446.40	16.48	1.33
	October	35.85	0.19	1.80	6.49	381.88	12.12	1.79
Transition	May	25.88	0.12	1.80	4.41	385.08	10.26	1.80
	August	29.80	0.15	1.76	3.93	509.20	7.92	1.75
	October	32.42	0.12	1.61	6.10	340.03	4.17	1.61
Emptiness	May	26.40	0.12	1.49	3.44	238.32	8.45	1.49
	August	33.59	0.11	1.70	3.00	302.96	10.17	1.67
	October	27.97	0.16	2.22	4.60	234.65	4.30	2.22
Low traditional	May	28.77	0.09	1.00	3.84	281.12	8.66	1.00
	August	28.93	0.14	0.03	3.27	368.40	10.95	0.98
	October	35.46	0.21	1.82	5.23	313.85	4.00	1.82
Traditional	May	25.67	0.10	0.01	4.28	210.64	6.93	0.52
	August	26.59	0.11	0.90	1.87	288.68	9.19	0.90
	October	24.47	0.21	1.25	3.84	256.07	3.21	1.24

The count of different substances is expressed per kilogram (dry weight) of soil. TN, total nitrogen; TC, total carbone; TP, total phosphorus; TPi, total inorganic phosphorus; NH₄⁺, extractable ammonium; TOC, total organic carbon

Table 2. MPN enumerations of methanogenic bacteria

Sampling station		Enumeration ^a (MPN/g)			
		Acetate-utilizing methanogens	H ₂ -CO ₂ utilizing methanogens	Formate-utilizing methanogens	Average
Organic farming	May	7.233×10 ³ ± 5.891	3.850×10 ⁵ ± 1.330	3.610×10 ³ ± 3.024	8.93×10 ⁴
	August	3.361×10 ⁴ ± 1.791	1.099×10 ⁴ ± 0.8594	9.531×10 ⁴ ± 7.524	
Transition	May	2.398×10 ⁴ ± 1.476	2.398×10 ⁵ ± 1.476	3.850×10 ⁴ ± 1.933	5.8×10 ⁴
	August	3.477×10 ⁴ ± 1.821	3.61×10 ³ ± 3.024	7.357×10 ³ ± 5.984	
Emptiness	May	4.242×10 ⁴ ± 2.080	9.315×10 ³ ± 7.372	2.861×10 ⁵ ± 1.667	2.852×10 ⁵
	August	7.488×10 ⁵ ± 5.395	2.398×10 ⁵ ± 1.476	3.85×10 ⁵ ± 1.933	
Low traditional	May	5.257×10 ⁴ ± 2.851	3.850×10 ⁵ ± 1.933	1.099×10 ⁶ ± 0.757	2.701×10 ⁵
	August	5.257×10 ⁴ ± 2.851	3.008×10 ³ ± 2.541	2.861×10 ⁴ ± 1.667	
Traditional	May	1.152×10 ⁵ ± 0.883	<3.610×10 ³ ± 3.024	9.531×10 ⁴ ± 7.524	1.037×10 ⁶
	August	2.398×10 ⁶ ± 1.476	4.273×10 ⁵ ± 2.114	2.147×10 ⁶ ± 1.396	
Average		3.509×10 ⁵	1.707×10 ⁵	4.186×10 ⁵	3.196×10 ⁵

^a All values are expressed in units of MPN per gram (wet weight) of soil and each value represents the average of three independent experiments.

환경 농산물의 평균 탄소량이 비교적 높음을 확인하였고, 총 인과 총 무기인의 함량은 평균 유기농법에서 각 5.01 g/kg과 395.27 mg/kg이, 전환기 농법이 4.81 g/kg과 411.44 mg/kg, 무농약 농법이 3.68 g/kg과 258.64 mg/kg, 저농약 농법이 4.12 g/kg과 321.12 mg/kg, 그리고 관행 농법이 3.33 g/kg과 약 251.80 mg/kg으로 확인되어 시료에 따라 일부 차이는 있지만 일반적으로 총 인은 친환경 농법일수록 함량이 높으나 총 무기인 함량은 농법에 따라 일관성이 없는 것으로 확인되었다. 그리고 암모니아의 함량은 평균 유기 농법이 11.85 mg/kg, 전환기 농법이 7.45 mg/kg, 무농약 농법이 7.64 mg/kg, 저농약 농법이 7.87 mg/kg, 관행 농법이 6.44 mg/kg으로 나타나 역시 친환경농법에서 평균 함량이 높은 것으로 나타났다.

시기 별로 수분함량과 총 질소, 총 인, 총 탄소와 총 유기 탄소는 대부분 봄에서 가을로 갈수록 증가하였다. 그러나 수분 함량은 무농약 농법이 여름철까지 26.4%에서 33.59%로 7.19% 증가하다가, 가을철에 27.97%로 여름철에 비해 5.62% 감소하고, 총 질소는 전환기 농법에서 봄철 0.12%에서 여름철 0.15%로 0.03% 증가 하다가 가을철 0.12%로 여름철에 비해 0.03% 감소하였고, 총 탄소와 총 유기 탄소의 함량에서는 전환기 농법만이 감소 추세를 나타냄을 확인 하였다. 그리고 총 무기인의 함량은 친환경 농법 4가지와 관행농법에서도 여름철에 가장 큰 값을 나타냈고, 암모니아의 함량은 전환기 농법에서만 봄철에서 가을철로 가면서 감소 추세를 보였을 뿐, 나머지 농법에서는 여름철에 가장 큰 값을 나타내었다.

메탄생성 세균 분포

5월과 8월 토양 시료의 아세트산과 포름산, 그리고 수소를 이용하는 메탄생성 세균의 분포를 MPN으로 확인 결과(Table 2), 유기 농법 토양 시료에서 평균 8.93×10⁴ MPN/g, 전환기 농법에

서 평균 5.8×10⁴ MPN/g, 무농약 농법에서 평균 1.13×10⁵ MPN/g, 저농약 농법에서 평균 2.701×10⁵ MPN/g, 그리고 관행농법에서 평균 1.037×10⁶ MPN/g의 군이 존재함을 확인 하였다. 기질별로는 아세트산을 이용하는 메탄생성 세균은 평균 3.509×10⁵ MPN/g, 포름산을 이용하는 메탄생성 세균은 평균 4.186×10⁵ MPN/g, 수소 이용 메탄생성 세균의 수는 평균 1.707×10⁵ MPN/g으로 나타나, 전체적으로 수소를 이용하는 세균이 비교적 적게 분포하는 것으로 확인되었다. 그리고 일부 여름 토양에서 포름산을 이용하는 메탄생성 세균의 분포 경향이 일치하지 않지만, 일반적으로 아세트산과 포름산을 이용하는 메탄생성 세균의 수는 친환경농법일수록 적은 경향을 나타냈고, 수소를 이용하는 메탄생성 세균은 뚜렷한 농법별, 계절별 차이를 확인할 수 없었다.

메탄생성과 기질 소모

농법별 토양의 5월(Fig. 1)과 8월(Fig. 2) 토양 시료에 포름산과 아세트산을 기질로 첨가하였을 때의 기질 소모와 메탄생성량을, 그리고 수소를 첨가하였을 때의 메탄생성량을 조사하였다.

20 mM의 아세트산을 첨가한 배지는 5월과 8월 시료 모두(Fig. 1A, 2A) 배양 3주까지 각각 평균 약 30.45 mM과 31.70 mM로 아세트산의 함량이 증가한 후 감소되어, 배양 7주 후에도 각각 평균 약 22.81 mM과 22.41 mM의 아세트산이 남아 있었다. 그러나 20 mM의 포름산을 첨가한 배지에서는 두 시료 모두(Fig. 1B, 2B) 배양 1주부터 포름산 농도가 급격히 감소하여 배양 4 주부터 평균 약 3 mM에서 2 mM의 아주 낮은 농도의 포름산이 검출되었다.

메탄생성은 아세트산을 첨가해 준 5월 시료에서는 배양 3주까지 모든 시료의 메탄생성량이 비슷하였으나, 배양 4주부터 유기 농법의 시료가 다른 농법보다 메탄생성량이 크게 증가하여, 농법 별로는 큰 차이는 없었으나 일반적으로 친환경 농법일수록 아세

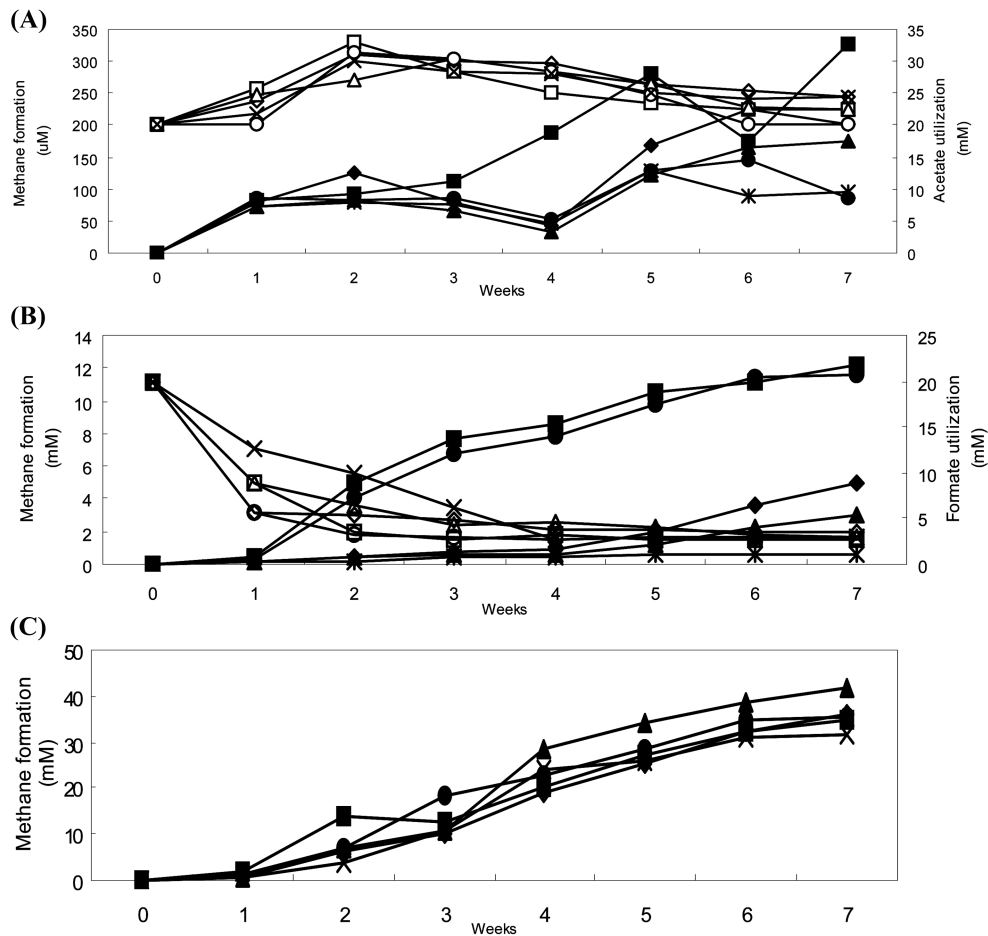


Fig. 1. Methanogenesis from acetate (A), formate (B), and hydrogen (C) in May soil sample. Quantification of weekly depletion of 20 mM spiked acetic acids (open symbols), formic acid (open symbols), and hydrogen in soils leading to formation of methane (filled symbols). Symbols (□) organic farming; (◇) Transition; (△) emptiness; (○) low traditional; (×) traditional. Analyses were conducted in triplicate.

트산 이용세균에 의한 메탄생성이 증가됨을 확인하였다(Fig. 1A). 그리고 포름산이 첨가된 배양에서 유기 농법과 저농약 농법이 다른 농법에 비해 포름산의 소모가 빠르고, 배양 7주에 각각 12.14 mM과 11.63 mM의 메탄이 생성되었지만, 그 외의 농법에서는 큰 차이를 발견할 수 없었다(Fig. 1B). 또 수소를 첨가한 배양에서도 배양 2주까지는 유기 농법의 메탄생성이 좋았으나, 배양 4주 이후 무농약 농법이 가장 많은 메탄을 생성하여(Fig. 1C), 역시 정확한 농법별 비교는 어렵지만 일반적으로 친환경 농법의 메탄생성이 비교적 우수함을 확인하였다.

아세트산을 첨가한 8월 시료의 메탄생성실험에서는 다른 4가지 농법에서보다 전환기 농법의 토양이 많은 메탄을 생성하였으며(Fig. 2A), 포름산을 넣어준 메탄생성실험에서는 5월 시료와 같이 유기 농법과 저농약 농법에서 메탄생성이 우수하고, 나머지 농법도 5월 시료보다는 메탄생성량이 많아짐을 확인하였다(Fig. 2B). 또 수소를 첨가한 8월 시료는 배양 7주에 평균 약 33.68 mM의 메탄이 생성되었고, 5월 시료와 비슷하게 무농약 농법의 메탄생성이 가장 높고 관행 농법이 가장 적게 나타나는 경향을 보였다(Fig. 2C).

농법간 T-RFLP 분석

계절별, 농법별로 메탄생성 세균의 군집의 유연관계를 *Sau96I* 으로 처리한 *mcrA* 유전자의 T-RFLP data를 이용하여 주성분분석과 판별분석으로 조사하였다. 5월 시료의 경우 유기 농법과 저농약 농법의 시료 하나씩이 다른 13개 시료들과는 큰 차이를 보여 이 두 값을 제거한 후 PCA profile을 조사하였다. 그 결과, 무농약 농법과 저농약 농법 그리고 농약 간에는 분류가 가능하였으나 유기 농법 그룹이 관행농법의 그룹에 들어가 있었고, 전환기 농법의 경우는 무농약 농법과 관행농법에 그룹들이 겹쳐져서 나타났다(Fig. 3). 8월 시료의 경우 친환경 농법 4가지와 관행 농법이 모두 그룹들이 겹쳐져 나타나(Fig. 4), 농법간 그룹을 분리하기에는 무리가 있었다. 그리고 10월 시료에서도 5월 시료에서처럼 저농약 농법의 시료 하나의 값이 다른 14개 시료들과 매우 차이가 커, 이 data를 제거한 후 다시 실험한 결과 무농약 농법을 제외한 다른 농법간은 그룹이 확연히 구분됨을 확인하였다(Fig. 5). 그리고 각 토양의 대표 시료를 이용한 분석에서는 유기 농법을 제외한 전환기 농법과 무농약 농법, 저농약 농법, 관행 농법이 어느 정도 그룹으로 구분이 됨을 확인하였다(Fig. 6). 또

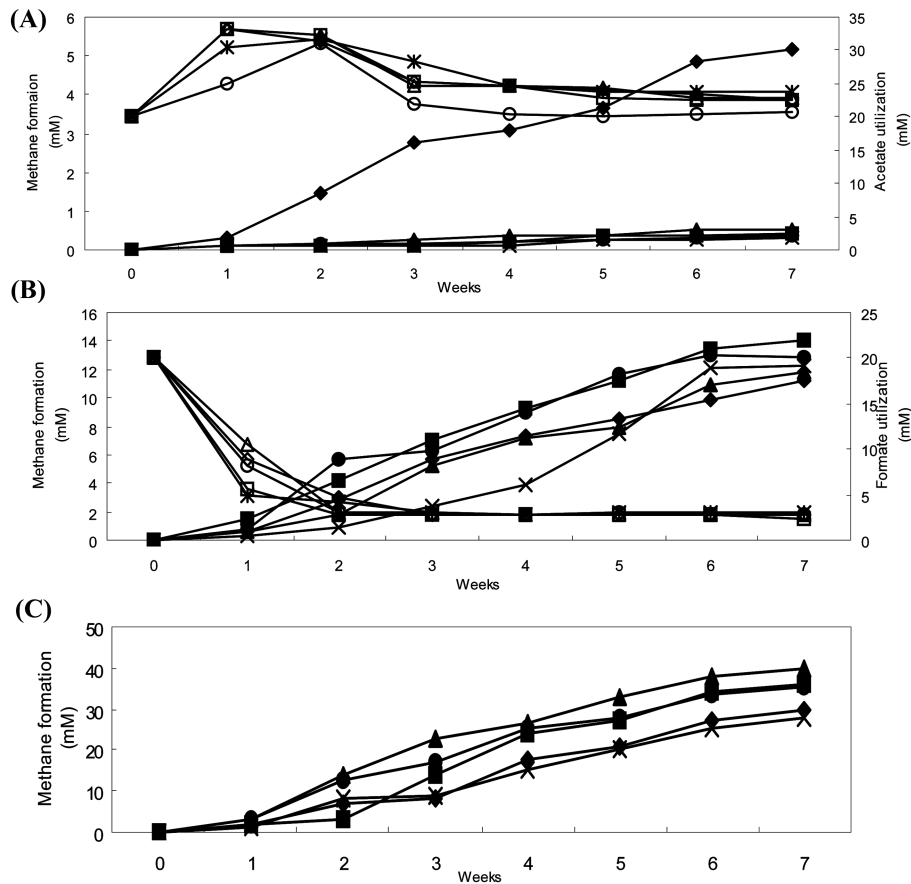


Fig. 2. Methanogenesis from acetate (A), formate (B), and hydrogen (C) in August soil sample. Quantification of weekly depletion of 20 mM spiked acetic acids (open symbols), formic acid (open symbols) and hydrogen in soils leading to formation of methane (filled symbols). Symbols: (□) organic farming; (◇) Transition; (△) emptiness; (○) low traditional; (×) traditional. Analyses were conducted in triplicate.

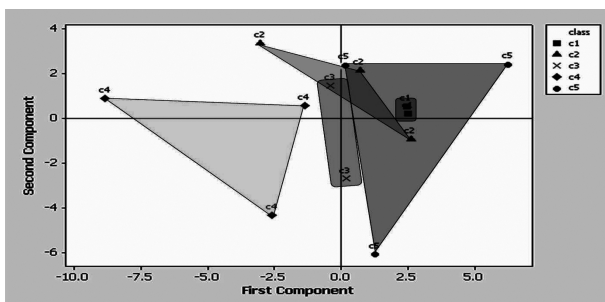


Fig. 3. PCA ordering generated from T-RFLP profiles for *mcrA* gene of in soil samples, which were selected in May. Symbols: C1, Organic farming; C2, Transition; C3, Emptiness; C4, Low traditional; C5, traditional.

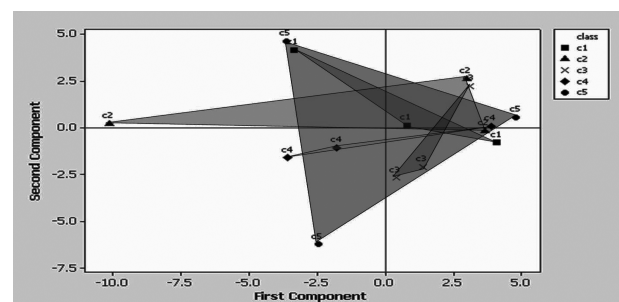


Fig. 4. PCA ordering generated from T-RFLP profiles for *mcrA* gene of in soil samples, which were selected in August. Symbols: C1, Organic farming; C2, Transition; C3, Emptiness; C4, Low traditional; C5, traditional.

주성분 분석으로 각 계절별 시료의 중요도가 높은 변수를 이용하여 비교 분석한 결과, 5월 시료는 54, 55, 56, 59, 73, 80, 92, 105, 205, 389, 431, 463, 464, 482의 14개의 bp 차이로 분류되었고, 이때 1차 주성분이 58.785%, 2차 주성분은 17.761%였다. 8월 시료는 201, 217, 365, 437의 4개의 bp에서의 차이로 분류되었고 1차 주성분은 48.30%, 2차 주성분은 21.35%였고, 10월

시료는 49, 51, 59, 71, 72, 80, 81, 199, 201, 203, 368, 371, 460, 465의 14개의 bp에서의 차이로 분류되었고 이때의 1차 주성분은 51.97%, 2차 주성분은 17.43%로 나타났다(자료 미제시).

그리고 *mcrA* 유전자의 T-RFLP data를 이용한 판별분석 결과 각 농법간의 5월, 8월, 10월 토양의 농법간 오분류는 각각 53.33%, 73.33%, 46.67%로, 그리고 각 계절별 오분류는 각각

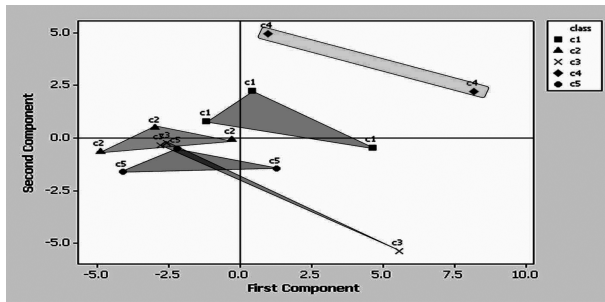


Fig. 5. PCA ordering generated from T-RFLP profiles for *mcrA* gene of in soil samples, which were selected in October. Symbols: C1, Organic farming; C2, Transition; C3, Emptiness; C4, Low traditional; C5, traditional.

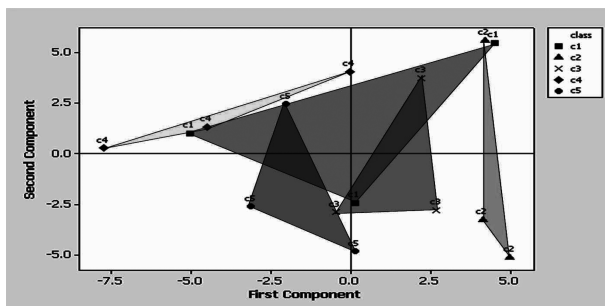


Fig. 6. PCA ordering generated from T-RFLP profiles for *mcrA* gene of master samples. Symbols: C1, Organic farming; C2, Transition; C3, Emptiness; C4, Low traditional; C5, traditional.

20%, 40%, 20%로 나타났다(자료 미제시).

고 찰

본 연구는 현재 우리나라에서 인증하고 있는 4종류의 친환경 농법(유기 농법, 전환기 농법, 무농약 농법, 저농약 농법)과 농약을 사용하는 일반적인 관행 농법에 따른 논토양의 메탄생성량과 메탄생성 세균의 군집을 파악하려는 연구로, 벼의 품종에 따른 메탄생성 세균 군집은 차이가 없다는 연구(21)에 따라 벼 품종에 따른 차이는 고려하지 않고 농법의 차이에 따른 메탄생성에 관한 연구를 수행하였다.

농법별 토양 성분을 분석한 결과, 국내에서 조사된 논토양 성분과 비슷하였으나(7, 8), 미국 Florida 주 Everglade 습지 토양의 성분과 비교할 때 습지와 논토양의 성분 차이가 크다는 것을 확인할 수 있었다(2). 즉 습지와 달리 논토양은 인위적으로 관수와 배수를 번갈아 하기 때문에 수분 함량이 적게 나타나고, 퇴비 시비 및 벼 작물의 재배로 대부분의 토양 성분이 습지에 비해 높게 나타나는 것으로 생각된다. 농법별로 일반적으로 수분 함량은 관행농법을 제외한 다른 농법들에서 비슷하고, 총 인과 총 무기인 함량은 농법간 차이를 찾을 수 없었으나, 총 탄소와 총 유기탄소의 함량에서 농약과 화학 비료를 사용하는 저농약 농법과 관행 농법이 다른 친환경 농법보다 상대적으로 적은 값

을 나타내 비록 시료에 따라 일부 차이가 있지만 친환경 농법 토양이 관행농법에 비해 유기물과 생명체가 많다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

계절에 따른 토양성분 비교에서 8월 토양 시료의 토양 성분이 유난히 증가 혹은 감소하는데, 이는 우리나라의 기후 특성상 8월은 장마 기간으로 물질들의 유입과 유실 등이 많아지고, 또 이 시기가 광합성 등 벼의 생장속도가 가장 빠른 시기로 벼 생육에 의한 영향이 크기 때문인 것으로 추정된다(23). 또 5월에 비해 10월 토양의 수분 함량이 높아지는 것을 볼 수 있는데, 이는 논농사의 특성상 겨울철 논에 물을 빼놓았다가 봄에 물을 채워놓기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 물의 관개 및 배수는 메탄생성의 주된 변수로 작용하고(10, 11, 13, 17), 물이 빠진 공기층에서 살아남은 메탄생성 세균이 물이 차면 혐기환경에서 다시 메탄을 생성하므로(13, 15) 물의 관개와 배수를 이용한 메탄생성 억제에 관한 연구도 진행되고 있다(11, 21).

논토양에 메탄생성 세균의 조사에서 아세트산을 이용하는 메탄생성 세균의 수는 Florida Everglade 습지보다 많고, 수소를 이용하는 메탄생성 세균의 수는 약 10배 정도 적은 것으로 확인되었다(2). 그리고 논토양의 근권에 존재하는 혐기성미생물 수를 비교할 때(19) 논토양에는 적지 않은 수의 메탄생성 세균이 존재함을 알 수 있었다. 그리고 메탄생성과 기질 소모와의 실험에서 아세트산의 함량이 배양초기에 증가한 것은 토양 내에 존재하던 유기물 등을 혐기 상태에서 미생물들이 발효하여 아세트산을 합성했기 때문이라 생각된다. 또 전체적으로 5월 토양시료보다 8월의 토양 시료가 기질 소모와 메탄생성이 증가하는 것은 물이 차고 여름으로 가면서 토양 내 혐기생태계가 안정화 되고, 온도가 높아져 미생물 활성도 증진되기 때문일 것으로 생각된다.

판별분석은 분류의 적합성을 평가하거나 집단 간의 차별을 가장 잘 나타낼 수 있는 양적 변수들의 선형결합 세트를 발견하는 것을 목적으로 하는 분석방법이다. 본 연구에서 농법에 따른 메탄 생성세균의 군집구조 확인을 위해 *mcrA* 유전자의 T-RFLP data를 이용하여 판별 분석한 결과, 5월, 8월, 10월 토양시료의 농법간 오분류가 각각 53.33%, 73.33%, 46.67%로 나타나 농법별로 정확히 구분되지 않았다. 이는 비록 관행농법이라 하더라도 농약과 화학비료를 적게 쓰는 요즘의 농법의 추세가 반영되었기 때문이라 생각된다. 그리고 각 시료의 error율이 각각 20%, 40%, 20%로 나타났는데, 이는 봄철의 5월 토양은 전년도 가을에 형성된 메탄생성 세균의 군집이 반영되고, 여름철의 8월 토양은 벼의 생장과 함께 광합성과 비료 등의 유기물의 유입에 의해 메탄생성 세균의 군집이 일부 혼돈된 상태이고, 가을철 10월 토양은 봄철부터 시작된 혐기 환경이 자리를 잡아감으로써 메탄생성 세균의 군집이 안정되어 나타난 결과라고 생각된다. 따라서 비록 45개의 적은 수의 시료로 분석하였기에 이 결과를 완전히 받아들일 수 없다 해도, 추후 더 많은 토양 시료를 채취하여 자료를 보강한다면 토양 내 미생물 군집을 통계적 방법으로 분석할 수 있다는 가능성은 시사해 준다.

주성분 분석은 자료에 포함된 사례들의 펼쳐져있는 방향 또는 경향을 발견하기 위한 고전적 통계기법으로, 본 연구에서는 변수

들의 선형결합과 유용한 변수의 선택, 잠재적 변수의 발견을 위해 *mcrA* 유전자를 이용한 T-RFLP data를 이 분석에 사용하였다. 그 결과 5월 토양은 14개의 bp 차이로 분류되었으며 1차 주성분은 58.785%, 2차 주성분이 17.761%였고, 8월 토양은 4개의 bp 차이로 1차 주성분은 48.30%, 2차 주성분은 21.35%로 나타났고, 10월 토양은 14개의 bp 차이로 1차 주성분은 51.97%, 2차 주성분은 17.43%로 나타나 Everglades 습지에서의 메탄생성 세균 1차 주성분이 30.4%, 2차 주성분이 17.5%가 나온 것 보다(2) 더욱 유의성이 있음이 확인되었다.

따라서 현재까지 *mcrA* 유전자를 이용한 계통 분류학적 군집 비교(4)와 T-RFLP 기법을 이용한 메탄생성 세균의 군집 비교를 시도한 연구는 있었으나(12, 13, 24), *mcrA* 유전자를 이용한 T-RFLP로 배 재배 방법의 비교를 한 연구는 없으므로, 추후 더 많은 토양 시료를 이용하여 메탄생성 세균의 유전자를 이용한 군집구조 분석 자료를 보완한다면, 현재의 화학적 성분을 이용한 친환경 농법의 분류에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말

이 논문은 2008년도 한남대학교 학술연구 조성비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

- Aulakh, M.S., J. Bodenbender, R. Wassmann, and H. Rennenberg. 2000. Methane transport capacity of rice plants. II. Variations among different rice cultivars and relationship with morphological characteristics. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 58, 367-375.
- Castro, H.F. 2003. Microbial ecology of anaerobic terminal carbon mineralization in Everglades soils, with emphasis on sulfate reducing prokaryotic assemblages. Ph. D. thesis. University of Florida, Gainesville, Florida, USA.
- Chauhan, A., A. Ogram, and K.R. Reddy. 2004. Syntrophic-methanogenic associations along a nutrient gradient in the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3475-3484.
- Chin, K.J., T. Lueders, M.W. Friedrich, M. Klose, and R. Conrad. 2004. Archaeal community structure and pathway of methane formation on rice roots. *Microb. Ecol.* 47, 59-67.
- Escoffier, S., B. Ollivier, J. LeMer, J. Garcin, and P. Roger. 1998. Evidence and quantification of thiosulfate reducers unable to reduce sulfate in rice field soils. *Eur. J. Soil Biol.* 34, 69-74.
- Harada, N., M. Nishiyama, and S. Matsumoto. 2001. Inhibition of methanogens increases photo-dependent nitrogenase activities in anoxic paddy soil amended with rice straw. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 231-238.
- Lee, K.B. 1997. Influence of different rice varieties on emission of methane in soil and exudation of carbohydrates in rhizosphere. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 30, 257-264.
- Lee, K.B. 1999. Methane emission among rice ecotypes in Korean paddy soil. *Korean J. Environ. Agric.* 18, 1-5.
- Li, J., M. Wang, H. Yao, and Y. Wang. 2002. New estimates of methane emissions from Chinese rice paddies. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 64, 33-42.
- Liesack, W., S. Schnell, and N.P. Revsbech. 2000. Microbiology of flooded rice paddies. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 625-645.
- Lu, W.F., W. Chen, B.W. Duan, W.M. Guo, R.S. Lantin, R. Wassmann, and H.U. Neue. 2000. Methane emissions and mitigation options in irrigated rice fields in southeast China. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 58, 65-73.
- Lu, Y., T. Lueders, M.W. Friedrich, and R. Conrad. 2005. Detecting active methanogenic populations on rice roots using stable isotope probing. *Environ. Microbiol.* 7, 326-336.
- Lueders, T. and M.W. Friedrich. 2002. Effects of amendment with ferrihydrite and gypsum on the structure and activity of methanogenic populations in rice field soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2484-2494.
- Luton, P.E., J.M. Wayne, R.J. Sharp, and P.W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology* 148, 3521-3530.
- Min, H., Y.H. Zhao, M.C. Chen, and Y. Zhao. 1997. Methanogens in paddy rice soil. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 49, 163-169.
- Mitra, A.P., P.K. Gupta, and C. Sharma. 2002. Refinement in methodologies for Methane budget estimation from Rice paddies. *Nutrient Cycling Agroecosystems* 64, 147-155.
- Mphande, A.C., R.K. Malik, and P. Tauro. 1995. Methane emission and methanogen status of Indian rice soil. *Biores. Technol.* 55, 155-158.
- Nakagawa, F., N. Yoshida, A. Sugimoto, E. Wada, T. Yoshioka, S. Ueda, and P. Vijarnsorn. 2002. Stable isotope and radiocarbon compositions of methane emitted from tropical rice paddies and swamps in Southern Thailand. *Biogeochemistry* 61, 1-19.
- Satoh, A., M. Watanabe, A. Ueki, and K. Ueki. 2002. Physiological properties and phylogenetic affiliations of anaerobic bacteria isolated from roots of rice plants cultivated on a paddy field. *Anaerobe* 8, 233-246.
- Touzel, J.P. and G. Albagnac. 1983. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* strain MC₃. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 241-245.
- Wang, Z.Y., Y.C. Xu, Z. Li, Y.X. Guo, R. Wassmann, H.U. Neue, R.S. Lantin, L.V. Buendia, Y.P. Ding, and Z.Z. Wang. 2000. A four-year record of methane emissions from irrigated rice fields in the Beijing region of China. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 58, 55-63.
- Ward, D.M. and M.R. Winfrey. 1985. Interactions between methanogenic and sulfate reducing bacteria in sediments, pp. 141-179. In H.W. Jannasch and P.J. Williams (eds.), *Advances in Aquatic Microbiology*. Academic Press, London, UK.
- Wassmann, R. and M.S. Aulakh. 2000. The role of rice plants in regulating mechanisms of methane emissions. *Biol. Fertil. Soils* 31, 20-29.
- Weber, S., T. Lueders, M.W. Friedrich, and R. Conrad. 2001. Methanogenic populations involved in the degradation of rice straw in anoxic paddy soil. *FEMS Microbiol. Microbiol. Ecol.* 38, 11-20.
- Wind, T. and R. Conrad. 1997. Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice field soil. *Biogeochemistry* 37, 253-278.
- Yao, H., K. Yagi, and I. Nouchi. 2000. Importance of physical plant properties on methane transport through several rice cultivars. *Plant Soil* 222, 83-93.

(Received February 6, 2009/Accepted February 24, 2009)

ABSTRACT : Methane Production and T-RFLP Patterns of Methanogenic Bacteria Dependent on Agricultural Methods

Hun Soo Kim¹, Ju Sik Cho², and Kyeong Ryang Park^{3*} (¹Research Center, Humas Co., Ltd., Daejeon 305-811, Republic of Korea, ²Department of Biological Environment, Sunchon National University, Suncheon 540-742, Republic of Korea, ³Department of Biotechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea)

We studied soil components, methane production, the number of methanogens, and T-RFLP patterns dependent on agricultural methods with the change of seasons. There is no regular increase or decrease tendency of the most soil components followed by sampling period. And the water content in soil was higher in October than May. Also a lot of methanogens existed in soil, and acetotrophs were relatively of smaller number than hydrogenotrophs and formate utilizing methanogens using MPN (most probable number) enumeration. In the experiment using the formate, it was used from the first week, and only a minute amount was detected after four weeks. However in the acetate, it was increased until the third week, and after that was consumed. And there was higher methane production for all soil samples which administered with the hydrogen spike. The activity of methanogens was higher in the organic and low-agrichemical agricultural method samples, and the organic agricultural method had high methanogen activity among the other samples. A result of T-RFLP pattern of *mcrA* gene digested with *Sau96I*, methanogen community have a little relation with agricultural methods and seasons. This results also agreed to no critical difference the soil components dependent on agricultural methods, but some analytical data have a positive relationship with a agricultural methods. Therefore we could conclude that the comparison study of community for soil bacteria sufficiently could be useful for the microbiological indicator.