

세균군집의 구조분석을 통한 장기간 농약사용이 토양생태계에 미치는 영향 평가

윤병준 · 김성현 · 이동현¹ · 오계현² · 강형일*

순천대학교 환경교육과, ¹제주대학교 생명과학과, ²순천향대학교 생명과학부

본 연구는 장기간 동안 지속적인 농약의 사용이 토양생태계에 미치는 영향을 세균군집의 구조분석을 통하여 그 관련성을 평가하고, 이에 대한 기초 자료를 얻고자 수행하였다. 30년 이상 매년 수시로 농약을 사용하였던 제주 지역의 한 감귤원 토양과 비농지 토양에 존재하는 세균군집을 16S rRNA clonal library로부터 얻은 각 100 개 클론의 유전자 염기서열을 기초로 하여 비교 분석한 결과 지속적으로 농약을 사용했던 감귤원 토양에서는 3개의 아문(Proteobacteria α , γ , δ)을 포함하는 Proteobacteria를 비롯한 5개 문 18개의 속 그룹에 포함되는 세균군집의 구조를 보였고, 농약을 사용하지 않은 비농지 토양에서는 4개의 아문(Proteobacteria α , β , γ , δ)을 포함하는 Proteobacteria를 비롯한 12개 문, 44개의 속 그룹에 포함되는 군집구조를 나타냈다. 감귤원 토양에서 가장 많은 분포를 보인 세균은 Proteobacteria γ group에 속하는 것으로 전체 clone의 56%로 상당한 우점현상을 나타내었고, Acidobacteria group에 속하는 균이 25%, Firmicutes group, 5%, Planctomycetes group, 2%, Proteobacteria α 와 δ group이 각 1%, Cyanobacteria group, 1% 등의 순서로 우점현상을 보였다. 반면, 비농지 토양에서는 Acidobacteria group에 속하는 균이 14%, Planctomycetes group, 13%, Proteobacteria α , β , δ group이 각각 10%, 9%, 9%, Firmicutes group, 8%, Verrucomicrobia group, 6%, Actinobacteria group, 6%, Proteobacteria γ group, 3%, Bacteroidetes group, 3%, Gemmatimonadetes group, 3%, Cyanobacteria group이 1% 등의 순서로 장기간 농약을 사용했던 토양에 비하여 훨씬 다양한 미생물군집의 분포빈도를 나타냈다. 이러한 결과는 지속적인 비료 및 농약의 사용이 토양생태계를 구성하는 세균군집의 다양성을 크게 감소시키거나 또는 특정 미생물을 소멸시킬 수 있음을 제시해 주었다.

Key words □ agricultural chemicals, bacterial community, Jeju, 16S rRNA, tangerine orchard

제주도 감귤원 토양의 61%정도는 현무암을 모체로 한 화산회토로 연강우량이 1400~1800 mm나 되어 염기용탈에 의한 양분 유실이 많고 지속적인 살충제, 살균제, 제초제 등의 농약 살포와 과다시비로 인하여 토양 산성화와 토양오염이 심하게 진행되고 있는 것으로 알려져 있다(2). 이러한 토양의 특성으로 말미암아 지속적으로 농약이 사용되어온 감귤원 토양에서는 심각한 미생물 생태계의 변화가 일어났거나 생태계 구조의 전이가 진행되고 있을 것으로 여겨진다. 미생물군집은 자연생태계 내에서 생산자와 소비자로서 이어지는 물질흐름에 있어 분해자의 역할을 수행함으로써 물질의 순환과 생태계내의 한정적인 물질자원의 이용을 극대화시킬 뿐만 아니라 새로운 유기물질을 합성하는데 있어서도 중요한 역할을 하고 있다는 점(20)에서, 지속적으로 농약사용이 이루어지고 있는 과수원이나 논 밭 등에서의 미생물 군집의 분석은 매우 중요한 것으로 여겨진다.

감귤원 토양의 미생물상에 관한 이전 연구결과는 재래식 배양 배지를 사용하여 이루어진 바 있으며, *Bacillus* sp. *Pseudomonas* sp. *Rhizobium* sp., 그리고 몇몇 방선균과 균류의 존재를 보고한

바 있다(2). 그렇지만, 특정 균을 분리하기 위한 배지를 사용하여 미생물상을 분석했다는 점에서 세균상이나 전체 미생물상의 구조를 해석하는데 있어 상당한 한계를 갖고 있다고 할 수 있다. 토양과 작물근계의 미생물 군집은 토양의 이화학적 성질과 밀접한 관계를 맺고 있으며 토양 1g에는 수천종의 미생물이 존재한다고 알려져 있다(16). 토양에 존재하는 전체 미생물중에 실제적으로 배양이 가능한 경우는 환경에 따라 1~5% 정도로 95~99% 이상이 배양될 수 없다고 보고 되어 있다(3, 15, 18). 최근에는 16S rRNA를 분석하여 다양한 환경에 존재하는 미생물의 군집구조를 분석하는 시도가 보편화 되어 있으며, PCR 과정에서 나타나는 chimeric sequence의 출현으로 인한 존재하지 않는 균주의 보고 등 몇몇 문제점에도 불구하고 배양에 어려움에 따른 군집 분석의 제한성을 상당히 해결할 수 있어 많이 사용되고 있다(4, 8).

본 연구에서는 지속적인 농약 사용이 토양에 존재하는 토착 미생물 생태계에 어떻게 영향을 미치는 지를 알아보고 또한 세균 군집에 대한 보다 정확한 기초 자료를 얻고자 30년 이상의 역사를 갖고 있고 지속적으로 gramoxone, paraquat, parathion, benzimidazole과 같은 다양한 제초제, 살충제, 살균제 등의 농약을 사용했던 제주도 서귀포 중문지역의 감귤원 토양과 농약을

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: (061) 750-3385, Fax: (061) 750-3308
E-mail: kahng@sunchon.ac.kr

전혀 사용하지 않은 인근 토양에 분포하는 세균군집의 다양성을 16S rRNA clonal library로부터 얻은 염기서열의 구조를 기초로 하여 비교분석하였다.

재료 및 방법

시료채집 및 토양분석

본 실험을 위하여 화학농약 및 비료에 상당히 오염되어 있는 것으로 알려진 서귀포 중문지역의 30년 이상 운영한 감귤원 토양과 인근 비농지의 토양 표층에서부터 30~50 cm 깊이의 토양시료 1 kg을 멸균된 갈색병에 담아 실험실로 옮겨 4°C에 보관하면서 본 연구를 위하여 사용하였다. 채집된 토양시료의 pH는 Mclean의 방법(12)에 따라 수행하였고, 기타 토질분석은 이미 널리 사용되고 있는 방법(1)에 따라 수행하였다.

세균 개체수의 계수

세균 군집을 구성하는 두 지역 시료 속에 포함된 세균의 개체수를 측정하기 위해서 Waksman 방법(17)을 따라 수행하였고, 방선균은 별도로 Williams와 Wellington의 방법(19)에 따라 토양을 건조시킨 후 희석평판법으로 계수하였다.

Total DNA 분리와 정제

토양시료로부터의 DNA의 분리는 이미 알려진 방법(10)을 부분적으로 변형하여 사용하였다. 채집된 토양시료 0.3 g을 eppendorf tube에 담고 500 mM EDTA(pH 9.4)를 75 μ l 넣어서 1분간 액체질소에 담근 후 바로 60°C에 녹이는 과정을 4번 반복하여 실시한 후 phenol/chloroform 용출기법을 이용하여 DNA를 수확하고 1% agarose 겔 전기영동법으로 DNA를 확인하였다. Total DNA의 정제를 위해 crude DNA를 10ml cesium chloride 용액에서 녹인 후 ethidium bromide를 첨가하고 102,200 \times g에서 20시간 동안 초원심분리하였다. 초원심분리 후 total genomic DNA band를 회수하고 cesium chloride와 ethidium bromide를 제거하기 위하여 0.02 μ m membrane filter를 이용하여 30분간 투석하여 DNA용액을 회수하여 농축한 후 16S rRNA를 증폭하기 위한 표준품으로 사용하였다.

PCR 증폭

분리한 total DNA에서 eubacterial 16S rRNA를 증폭하기 위하여 27f(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1522r(5'-AAG GAG GTG ATC MRC CGC A-3') primer set을 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 다양한 농도(10~100 ng)의 DNA를 주형으로 사용하고 2.5 U *Taq* polymerase, 0.2 μ M primers, 200 μ M dNTPs, 10배 반응용액(100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 500 μ g \cdot ml⁻¹ BSA, pH 8.3)을 첨가하여 최종 부피를 50 μ l로 하여 95°C 5분간 변성 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분의 주기로 33번 순환한 후 최종 72°C에서 10분간 반응을 수행하였다. 1% agarose gel에서 전기영동하여 예상되는 DNA 증폭산물을 확인하고, 16S rRNA clonal library를 만

드는 데 사용하였다. 기타 언급하지 않은 방법은 이미 알려진 방법에 따라 수행하였다(10).

16S rRNA clonal library의 제조 및 DNA sequencing

다양한 토양 미생물로부터 기원되었을 것으로 생각되는 회수된 PCR산물을 pGEM-T vector에 ligation한 후 *E. coli* JM109에 형질전환하였다. 농약에 오염된 감귤원과 비오염 지역에서 얻은 형질전환된 clone중 각각 100개를 임의적으로 선별한 후 T7 promoter primer나 SP6 promoter primer를 이용하여 DNA sequencing을 수행하였다. DNA sequencing은 ABI 373A 자동염기서열 분석기를 이용하였다. 기타 언급하지 않은 방법은 Maniatis방법(11)에 따라 수행하였다.

염기서열분석

밝혀진 염기서열의 분석은 Lasergene program(DNA STAR, Inc., Madison, USA)과 GenBank의 blast search의 database를 이용하였다. 염기의 계통학적 관계를 밝히기 위하여, 이미 알려진 방법에 따라 Lasergene의 Megalign program을 이용하였으며, 이 때 Clustal method에 기초한 분석한 방법을 따라 수행하였다(9).

결 과

감귤원 토양과 비농지 토양표준품의 화학적 생물학적 특성 분석

2000년 9월 채집한 감귤원과 비농지 토양은 모두 화산회토로 양토와 미사질 양토로 구성된 토질로 유사 하였으나, 감귤원 토양의 pH는 4.8 비농지 토양의 pH는 6.0으로 나타났다, 전체 유기물 함량에 있어서는 감귤원 토양이 10.49%로 매우 높게 나타났으나 비농지 토양에서는 3.8%로 훨씬 낮게 나타났다. 본 연구에서 미생물개체수는 세균과 방선균에 한해 조사하였는데, 감귤원 토양에서 호기성 세균 개체수는 g당 27×10^4 , 방선균 수는 5×10^3 , 비농지 토양에서 호기성 세균 개체수는 126×10^6 , 방선균 수는 69×10^4 으로 비농지 토양에서 보다 많은 세균이 분포되어 있음을 제시해 주었다.

장기간 농약사용 감귤원 토양 세균군집의 분포

감귤원 토양의 표층에서 얻은 DNA를 사용하여 얻어진 100개의 16S rRNA clone들에 대한 염기서열 분석을 통해 감귤원 토양에서는 18개의 알려진 속에 포함된 균이 약 55%, Genbank database에 등록된 비배양 세균으로 알려진 Proteobacteria γ 아문에 속하지만 기존의 알려진 속과는 유전자 서열에 있어 차이가 있는 그룹이 37%, 그리고 아직 보고 되지 않은 것으로 기존 database에 있는 그룹과 상동성이 없는 group이 8%의 분포로 나타났다(Fig. 1). 가장 많은 분포를 보인 세균은 Proteobacteria γ group에 속하는 것으로 전체 clone의 56%를 차지하였고, Acidobacteria group에 속하는 균이 25%, Firmicutes group에 속하는 것이 5% 등의 순서로 우점현상을 보였다(Table 1). 이외에

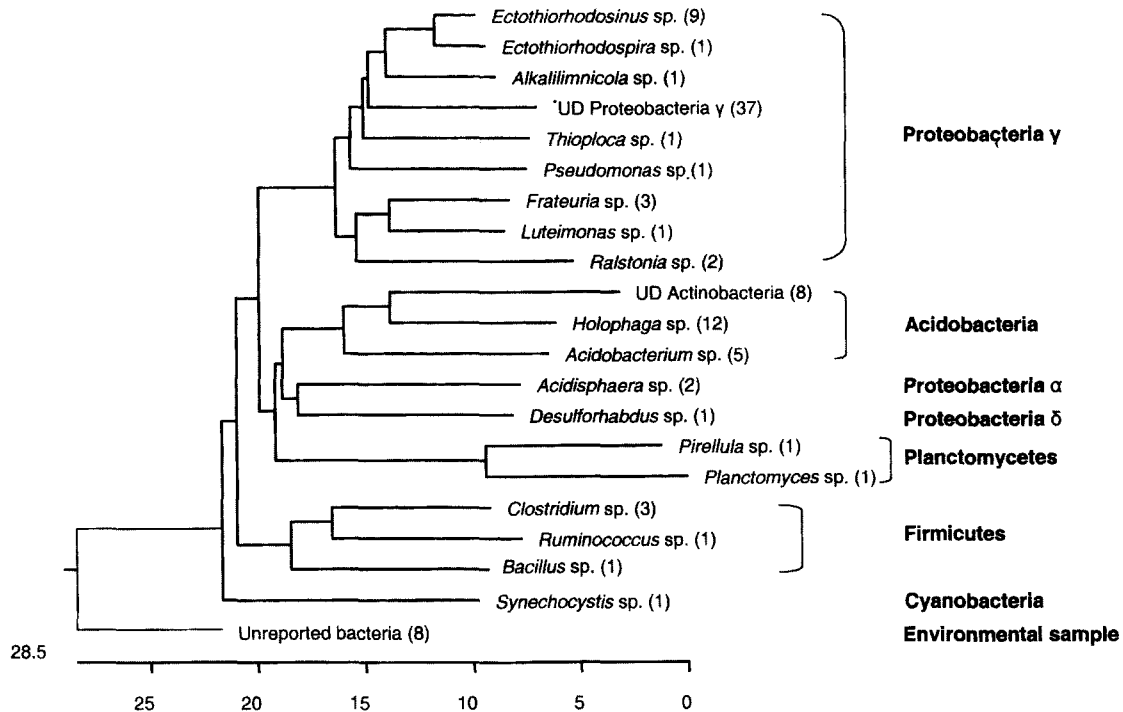


Fig. 1. Phylogenetic tree of 100 bacterial clones from the orchard soil site exposed to agricultural chemicals over 30 years. Numbers within brackets indicate the number of clones occurred among 100 16S rRNA clones examined in this study. The scale bar represents the phylogenetic distances between the bacteria analyzed in this study. *UD indicates the specific group which was not placed into the known genus within the division group.

도, Proteobacteria α group에 속하는 것으로는 유일하게 *Acidisphaera rubrifaciens*와 96%이상의 상동성을 갖는 한 종류의 클론이 약 2% 빈도로 나타났고, Proteobacteria δ group에 속하는 균으로 *Desulforhabdus amnigena*와 95% 이상의 유사성을 가진 균이 1%, Planctomycetes group에 속하는 균이 2%로 *Pirellula* sp.와 *Planctomyces* sp. 두 종류의 속이 나타났다. 또한, Cyanobacteria group의 *Synechocystis* sp.와 가장 가까운 상동성을 갖는 유일한 균이 1% 빈도로 나타났다. 속 수준에서 가장 우세한 균은 *Acidobacterium* sp.로 13%를 차지하였고, *Holophaga* sp. 12%, *Ectothiorhodosinus* sp. 9% 등의 순서로 그 분포가 확인되었다 (Fig. 1).

비농지 토양 세균군집의 분포

비감광원 토양에서는 44개의 알려진 속에 포함된 균이 약 84%, Genbank database에 등록된 *Acidobacteria* 문에 속하지만 유전자 서열에 있어 뚜렷하게 차이는 2 개의 그룹이 4%, 기타 Genbank database에 등록된 것과 전혀 상동성을 찾을 없는 것이 12%를 차지하였다(Table 1). 가장 많은 분포를 보인 것은 *Acidobacteria* group에 속하는 균이 15%, Planctomycetes group에 속하는 균이 13%, Proteobacteria α group에 속하는 것이 10%, Proteobacteria β group에 속하는 균이 9%, Proteobacteria δ group에 속하는 균이 9%, Firmicutes group에 속하는 것이 8%, Verrucomicrobia group에 속하는 것이 8%, Actinobacteria group

Table 1. Comparative analysis of bacterial communities in the level of division occurred in tangerine orchard and non-agricultura soil

Division	% Occurrence		No. of genera (A:B)
	Tangerine orchard soil (A)	Non-agricultural soil (B)	
Acidobacteria	25	15	5:4
Actinobacteria	-	6	0:4
Bacteroidetes	-	3	0:1
Cyanobacteria	1	1	1:1
Firmicutes	5	8	5:5
Gemmatimonadetes	-	3	0:3
Planctomycetes	2	13	2:4
Proteobacteria	59	31	11:24
(subdivision α)	(2)	(11)	(1:8)
(subdivision β)	(-)	(9)	(0:5)
(subdivision γ)	(56)	(3)	(9:3)
(subdivision δ)	(1)	(9)	(1:8)
Verrucomicrobia	-	8	0:2
Unreported group	8	13	-
No. of examined clones	100	93	

에 속하는 것이 6%, Proteobacteria γ group에 속하는 것이 3%, Bacteroidetes group에 속하는 것이 3%, Gemmatimonadetes group

이 3%, Cyanobacteria group이 1% 등의 순서로 매우 다양한 미생물군집의 분포빈도를 나타냈다. 속 수준에서 가장 우세한 균은 Acidobacteria group의 *Acidobacterium* sp.로 13%를 차지하였고, Verrucomicrobia group의 *Verrucomicrobium* sp. 7%, Planctomycetes group의 *Planctomyces* sp. 5%, Proteobacteria β group의 *Sterolibacterium* sp. 5%, Firmicutes group의 *Desulfotomaculum* sp. 3%, Bacteroidetes group의 *Flavobacterium* sp. 3%, Actinobacteria group의 *Ferromicrobium* sp. 3% 등의 순서로 그 분포가 확인되었다(Fig. 2).

감귤원 토양과 비농지 토양에서 얻은 각 100개와 93개의 16S rRNA 클론의 유전자를 속 수준에서 비교 분석한 결과 3% 이상

의 분포빈도를 보이면서 오직 감귤원 토양에서만 나타난 균은 *Clostridium* sp. (3%), *Ectothiorhodosinus* sp. (9%), *Frateuria* sp. (3%), 그리고 *Holophaga* sp. (12%) 등 4개의 속으로 나타났다. 반면, 3% 이상의 분포빈도를 보이면서 오직 비농지 토양에서만 나타난 균은 *Desulfotomaculum* sp. (3%), *Ferromicrobium* sp. (3%), *Flavobacterium* sp. (3%), *Gemmata* sp. (3%), *Gemmimonas* sp. (3%), *Nitrosopira* sp. (3%), *Sterolibacterium* sp. (5%) 등 8개의 속으로 나타났다(Table 2). 특히하게, *Acidobacterium* sp. 는 두 곳에서 모두 조사한 클론 수의 약 6% 빈도로 유사하게 나타났다.

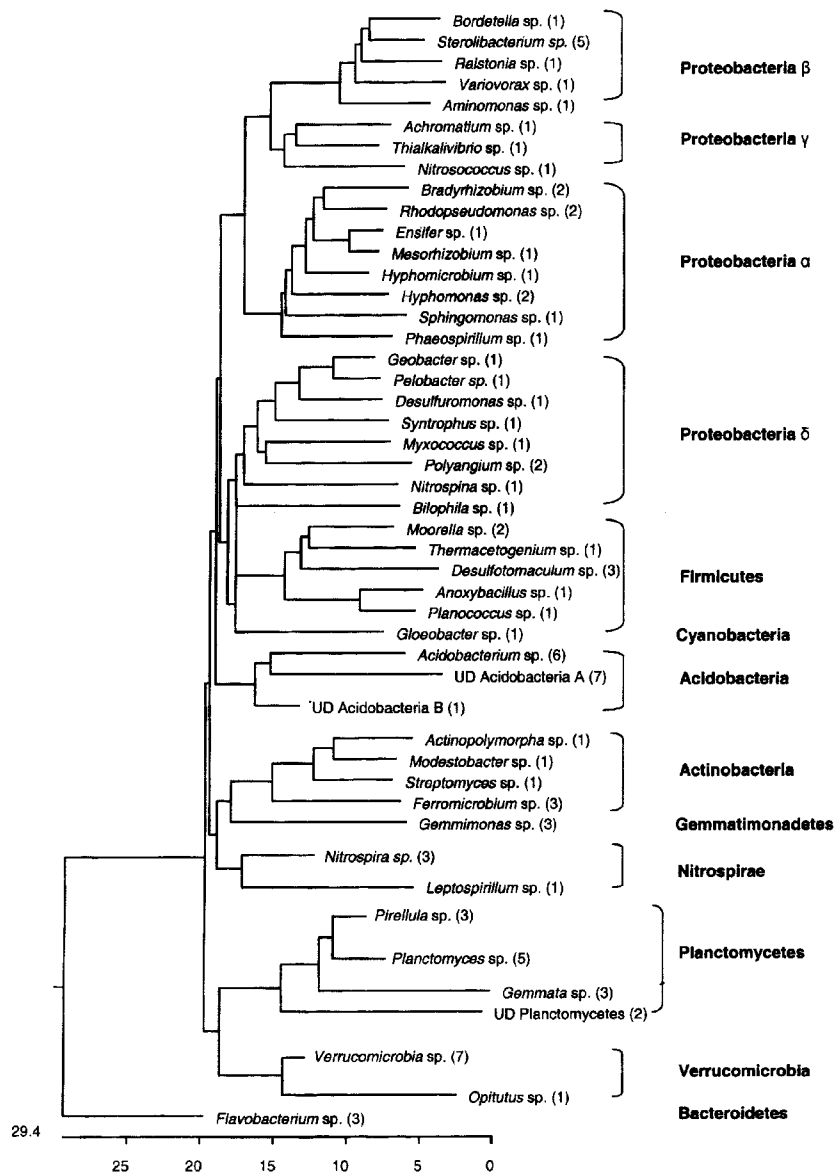


Fig. 2. Phylogenetic tree of 93 bacterial clones from the non-agricultural soil site near the orchard soil site. Numbers within brackets indicate the number of clones occurred among 93 16S rRNA clones examined in this study. The scale bar represents the phylogenetic distances between the bacteria analyzed in this study. * UD indicates the specific group which was not placed into the known genus within the division group.

고찰

본 연구에서 대상으로 한 감귤원은 30년 이상의 역사를 갖고 있는 곳으로, 2,4-D, gramoxone 또는 paraquat 등으로 알려진 제초제, DDT, BHC, 혹은 parathion 등의 살충제, 그리고 benzimidazole, triazole과 같은 살균제 등이 매년 수시로 사용되어 온 곳이다. 이들 농약은 주로 방향족화합물로 그 독성이 매우 높아 토양을 구성하는 미생물생태계에 심각한 영향을 미칠 수 있을 것으로 여겨져 감귤원의 토양(약 30~50 cm 깊이)을 분석 시료로 사용하였다. 감귤원 토양과 인근 토양의 시료를 분석한 결과, 토

양을 구성하는 입자의 종류는 약간의 차이가 있었지만 두 군데 토성이 양토(loam) 내지 미사질 양토(silty loam)가 대부분으로 상당히 유사한 것으로 조사되었지만, 가용성 유기물 함량이나 인량에서는 감귤원 토양에서 각각 19.49%, 0.5 µg/g으로 비농지 토양의 3.8%, 0.26 µg/g보다 많은 양이 나타났다. 또한, 감귤원 토양의 pH는 4.8, 비감귤원 토양에서 6.0이었는데, 이는 지속적인 농약과 비료의 사용으로 인해 나타난 결과로 여겨진다.

감귤원 토양에서 가장 우세한 군으로 나타난 것은 Proteobacteria γ group에 속하는 것으로 나타난 반면, 비농지 토양에서는 Proteobacteria α, β, γ, δ group에 속하는 균들이 매우 고르

Table 2. Comparative analysis of genera occurred in tangerine orchard and non-agricultural soil

Genera	No. of occurrence frequency		Genera	No. of occurrence frequency	
	Tangerine orchard soil	Non-agricultural soil		Tangerine orchard soil	Non-agricultural soil
<i>Achromatium</i> sp.	0	1	<i>Luteimonas</i> sp.	1	0
<i>Acidisphaera</i> sp.	2	0	<i>Mesorhizobium</i> sp.	0	1
<i>Acidobacterium</i> sp.	6	5	<i>Modestobacter</i> sp.	0	1
<i>Actinopolymorpha</i> sp.	0	1	<i>Moorella</i> sp.	0	2
<i>Alkalilimnicola</i> sp.	1	0	<i>Myxococcus</i> sp.	0	1
<i>Aminomonas</i> sp.	0	1	<i>Nitrosococcus</i> sp.	0	1
<i>Anoxybacillus</i> sp.	0	1	<i>Nitrospina</i> sp.	0	1
<i>Bacillus</i> sp.	1	0	<i>Nitrospira</i> sp.	0	3
<i>Bilophila</i> sp.	0	1	<i>Opitutus</i> sp.	0	1
<i>Bordetella</i> sp.	0	1	<i>Pelobacter</i> sp.	0	1
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	0	2	<i>Phaeospirillum</i> sp.	0	1
<i>Clostridium</i> sp.	3	0	<i>Pirellula</i> sp.	1	3
<i>Desulforhabdus</i> sp.	1	0	<i>Planctomyces</i> sp.	1	5
<i>Desulfotomaculum</i> sp.	0	3	<i>Planococcus</i> sp.	0	1
<i>Desulfuromonas</i> sp.	0	1	<i>Polyangium</i> sp.	0	2
<i>Ectothiorhodospinus</i> sp.	9	0	<i>Pseudomonas</i> sp.	1	0
<i>Ectothiorhodospira</i> sp.	1	0	<i>Ralstonia</i> sp.	2	1
<i>Ensifer</i> sp.	0	1	<i>Rhodopseudomonas</i> sp.	0	2
<i>Ferromicrobium</i> sp.	0	3	<i>Ruminococcus</i> sp.	1	0
<i>Flavobacterium</i> sp.	0	3	<i>Sphingomonas</i> sp.	0	1
<i>Frateuria</i> sp.	3	0	<i>Sterolibacterium</i> sp.	0	5
<i>Gemmata</i> sp.	0	3	<i>Streptomyces</i> sp.	0	1
<i>Gemmimonas</i> sp.	0	3	<i>Synechosystis</i> sp.	1	0
<i>Geobacter</i> sp.	0	1	<i>Synthropus</i> sp.	0	1
<i>Gloeobacter</i> sp.	0	1	<i>Thermacetogenium</i> sp.	0	1
<i>Holophaga</i> sp.	12	0	<i>Thi alkalivibrio</i> sp.	0	1
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	0	1	<i>Thioploca</i> sp.	1	0
<i>Hyphomonas</i> sp.	0	2	<i>Variovorax</i> sp.	0	1
<i>Leptospirillum</i> sp.	0	1	<i>Verrucomicrobia</i> sp.	0	7
No. of a total of genera	Tangerine orchard soil		18		
	Non-agricultural soil		44		

One hundred 16S rRNA clones from the tangerine orchard soil and ninety three 16S rRNA clones from the non-agricultural soil were sequenced and placed into the genera based on 90% sequence similarity. Notably, the shaded indicates the genera distributed only in one side of both sites with over five-fold difference in the frequency of occurrence.

게 분포하고 있음을 보여주었다(Table 1, Fig. 1, Fig. 2). 산성조건에서 많이 분포하고 있는 것으로 알려진 Acidobacteria group은 감귤원 토양에서는 25% 빈도로 나타난 반면 비농지 토양에서는 약 14% 빈도로 나타나 농약을 지속적으로 사용해 온 감귤원 토양에서 훨씬 많이 분포하고 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 농약과 비료의 지속적인 사용으로 인한 토양의 산성화와 밀접한 관련이 있을 것으로 추측되었다. Firmicutes group은 감귤원 토양과 비농지 토양에 각각 5%와 8%의 분포로 유사한 비율로 나타났는데, Firmicutes group에 속하는 균은 *Bacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*로 대표되는 그람양성균으로 이들 균들은 다양한 환경에 분포되어 있는 것으로 알려지고 있다. 특이한 점은, Actinobacteria, Bacteroidetes, Gemmatimonadetes, Verrucomicrobia group은 오직 비농지 토양에서만 나타나, 이는 이들 group이 감귤원 토양의 산성화나 다양한 농약의 지속적인 사용으로 인한 독성효과로 말미암아 그 분포가 크게 감소되었거나 사라졌을 가능성이 있음을 보여주었다. 특히, Actinobacteria group은 중금속으로 심하게 오염된 지역의 토양에서 대사적으로 매우 활성을 나타낼 가능성을 보고 된 바 있어(7), 이 group에 대한 정확한 해석은 좀더 심층적인 연구를 통하여 밝혀질 필요가 있다.

세균 군집을 속 수준에서 비교분석한 결과 나타난 가장 큰 차이점은 *Clostridium* sp., *Ectothiorhodospinus* sp., *Frateuria* sp., 그리고 *Holophaga* sp.는 다양한 종류의 농약을 매년 수시로 사용해 온 감귤원 토양에서만 나타난 반면, *Nitrosopira* sp., *Sterolibacterium* sp. 그리고 *Verrucomicrobia* sp.는 오직 비농지 토양에서만 나타났다(Table 2). 특히, 감귤원 토양에서 주요우점 세균 속으로 나타난 *Holophaga* sp.와 *Ectothiorhodospinus* sp.는 농약으로 오염된 토양에서 매우 중요한 역할을 할 가능성을 제시해 주었다. 하지만, 비농지 토양에서 우세종으로 존재하나 감귤원 토양에서 나타나지 않은 세균 속 *Sterolibacterium* sp.와 *Verrucomicrobia* sp.는 지속적인 농약 사용으로 인한 환경충격으로 말미암아 그 개체수가 크게 감소하였거나 멸종했을 가능성이 있음을 보여준다. *Acidobacterium* sp.는 두 곳에서 아주 유사한 분포빈도를 보였는데, 이는 이 세균 속이 서식지의 산성화 등과 같은 외부 환경충격에 비교적 강하게 견딜 수 있으면서 다양한 환경조건에서 살아갈 수 있는 능력을 갖고 있을 가능성이 높음을 제시해준다 할 수 있다.

제조제의 장기간의 사용이 농토를 구성하는 세균 군집과 기능에 미치는 효과에 대한 몇몇 연구는 2,4-D, 2,4,5-T, 그리고 pentachlorophenol 등을 중심으로 심도 있게 이루어져 왔다(5, 6). 이들 중 몇몇 연구결과는 위에서 사용한 제조제나 살충제 등의 농약이 미생군집을 크게 변화시키지는 않는 것으로 제시하고 있다(5, 14). 하지만, 최근의 일련의 연구결과는 농약을 비롯한 다양한 방향족화합물이 미생물생태계에 상당히 영향을 미칠 수 있다는 사실을 보여주고 있다. Seghers 등(13)은 메탄영양 세균을 대상으로 한 PCR-DGGE 연구에서 atrazine과 metolachlor 등의 장기간 사용은 궁극적으로 Type I 과 Type II methanotroph의 감소나 멸종을 가져올 수 있음을 제시하였다. 또한, 본 2,4-D와 2,4,5-T 스트레스가 이들 물질을 분해하는 미생물에 미치는 영향

에 대한 연구에서도, 높은 농도에서는 결국 세포의 죽음을 가져올 수 있다는 사실을 확인한 바 있다(6).

결론적으로, 본 연구를 통하여 장기간 동안 매년 수시로 농약과 비료를 사용해 온 토양의 미생물 군집은 비농지 토양과 비교하여 그 분포에 있어 상당히 전이가 일어나 있었고 균 다양성에서 크게 감소하였음을 보여 주었다. 이러한 결과는 지속적인 농약의 사용은 토양의 환경을 직·간접적으로 변화시킬 수 있으며, 궁극적으로 토양생태계의 변화를 가져올 수 있음을 제시해 주었으며, 보다 심층적인 연구를 통하여 자세한 기작이 밝혀질 필요가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 순천대학교 '03 신진교수연구(자체)사업 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다. 또한 많은 유전자 분석을 위해 지원을 해주신 미국 뉴저지 주립 - Rutgers 대학교 Biotech Center 소속 Jerome J. Kukor 교수에게 깊은 감사를 드립니다.

참고문헌

1. 농촌진흥청. 1988. 토양화학분석법.
2. 좌재호, 이종희, 임한철, 현해남. 1999. 감귤원 표토관리에 따른 토양미생물상 조사. 농촌진흥청 원예연구소 시범보고서. 572-576.
3. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-169.
4. Amann, R., W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. Identification of uncultured bacteria: a challenging task for molecular taxonomists. *ASM News* 60, 360-365.
5. Biederbeck, V.O., C.A. Capbell, and A.E. Smith. 1987. Effects of long-term 2,4-D field applications on soil biochemical processes. *J. Environ. Qual.* 16, 257-262.
6. Cho, Y.-S., H.-Y. Kahng, C.-K Kim, J.J. Kukor, and K.-H. Oh. 2002. Physiological and cellular responses of the 2,4-D degrading bacterium, *Burkholderia cepacia* YK-2, to the phenoxyherbicides 2,4-D and 2,4,5-T. *Curr. Microbiol.* 45, 415-422.
7. Gremion F., A. Chatzinotas, H. Harms. 2003. Comparative 16S rDNA and 16S rRNA sequence analysis indicated that Actinobacteria might be a dominant part of the metabolically active bacteria in heavy metal-contaminated bulk and rhizosphere soil. *Environ. Microbiol.* 10, 896-907.
8. Hugenholtz, P., and T. Huber. 2003. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* 53, 289-293.
9. Kahng, H.-Y., J.C. Mainverni, M.M. Majko, and J.J. Kukor. 2001. Genetic and functional analysis of the *tbc* operons for catabolism of alkyl- and chloroaromatic compounds in *Burkholderia* sp. JS150. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4805-4816.
10. Kang, B.-J., M.-R. Kim, B.-J. Yoon, D.-H. Lee, D.-C. Oh, and H.-Y. Kahng. 2002. Molecular analysis of bacterial communities distributed in sea water of whitening areas of Jeju coast. *Kor. J. Microbiol.* 38, 127-132.
11. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. 1991. Molecular cloning-A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold

- Spring Harbor, N.Y.
12. Mclean, E.O. 1982. Soil pH and lime requirement. In A.L. Page(ed.), *Methods of soil analysis, part 2: chemical and microbiological properties*, 2nd ed. American Society of Agronomy, Soil Society of America, Madison.
 13. Seghers, D., K. Verthe, D. Reheul, R. Bulcke, S.D. Siciliano, W. Verstraete, and E.M. Top. 2004. Effect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. *FEMS Microbiol. Ecol. In Press*.
 14. Somerville, L., and M.P. Greaves. 1987. *Pesticides Effects on Soil Microflora*. Taylor and Francis, New York.
 15. Torsvik, V., J. Giksoyr, and F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 782-787.
 16. Torsvik, V., R. Sorheim, and J. Goksoyr. 1996. Total bacterial diversity in soil and sediment communities a review. *J. Ind. Microbiol.* 17, 170-178.
 17. Waksman, S.S. 1922. Microbial analysis of soil as an index of soil fertility: II. Methods of the of numbers of microorgani in the soil. *Soil Sci.* 14, 321-346.
 18. Ward, D.M., R. Weller, and M.M. Bateson. 1990. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well studied thermal community. *FEMS Microbiol. Rev.* 6, 105-115.
 19. Williams, S.T. and Davies, F.L. 1965. Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbiol.* 38, 251-256.
 20. Woses, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.

(Received October 16, 2003/Accepted December 3, 2003)

ABSTRACT : Evaluating the Impacts of Long-Term Use of Agricultural Chemicals on a Soil Ecosystem by Structural Analysis of Bacterial Community

Byoung-Jun Yoon, Sung-Hyung Kim, Dong-Heon Lee¹, Kye-Heon Oh², and Hyung-Yeel Kahng* (Department of Environmental Science, Suncheon National University, 315 Maegok-dong, Suncheon 540-742, Korea, ¹Department of Life Science, Cheju National University, Jeju 690-752, Korea, ²Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O. Box 97, Asan 336-600, Korea)

In this study bacterial community was analyzed to evaluate the impacts of long-term use of agricultural chemicals on a soil ecosystem as well as to obtain fundamental data on the relationship. Sequences of 16S rRNA clones from a non-agricultural site and a tangerine orchard soil which has a history of long-term use of agricultural chemicals over 30 years were analyzed. This revealed that bacterial community containing 5 divisions and 18 genera was distributed in a tangerine orchard soil, while bacterial community containing 9 divisions and 44 genera was distributed. In a tangerine orchard soil site, the most abundant bacteria in subdivision level were placed into Proteobacteria γ group which occupied 56% of total clones. The other bacterial clones from the orchard soil exposed to agricultural chemicals over 30 years were Acidobacteria group (25%), Fimicutes group (5%), Planctomycetes group (2%), Proteobacteria α (1%), δ group (1%), and Cyanobacteria group (1%). Whereas, the clones were from the non-agricultural site were distributed among the division or subdivision Acidobacteria group (14%), Planctomycetes group (13%), Proteobacteria α (10%), β (9%), δ (9%), Fimicutes group (8%), Verrucomicrobia group (8%), Actinobacteria group (6%), Proteobacteria γ group (3%), Bacteroidetes group (3%), Gemmatimonadetes group (3%), and Cyanobacteria group (1%). This finding suggests the possibility that long-term application of agricultural chemicals or fertilizers on a tangerine orchard might result in drastic reduction or alteration in the composition of the bacterial community in the contaminated soil site.