

논과 밭 토양의 메탄생성과 메탄생성세균의 군집 비교

김묘선¹ · 김주환² · 박경량^{1*}

¹한남대학교 생명공학과, ²경원대학교 생명과학과

A Comparison of the Methane Production and the Community Structure for Methanogens in Rice Paddy and Dry Field Farming Soils

Myo Sun Kim¹, Joo-Hwan Kim², and Kyeong Ryang Park^{1*}

¹Department of Biotechnology, Hannam University, Daejeon 305-811, Republic of Korea

²Department of Life Sciences, Kyungwon University, Sungnam 461-701, Republic of Korea

(Received November 1, 2010/Accepted November 30, 2010)

The purpose of this study is to investigate the soil compositions, methane production, the number of methanogens, and the community structure of methanogens in rice paddy soils and dry field farming soils in the summer and autumn seasons. As a result of the analysis of soil compositions, any regular tendency to increase or decrease has not been found in most soil samples due to the change of seasons. It has also been found that more methanogens exist in the rice paddy soil that utilize organic farming practices and emptiness farming practices than in the dry field farming soil. The fewer numbers of methanogens utilizing the acetate have been found than those of the methanogens utilizing the hydrogen or the formate. In an experiment of methane production, the methanes increased for two weeks when the acetate was added, but they continued to increase for seven weeks more when the formate and the hydrogen were added. In the phylogenetic analysis using the *mcrA* gene, the methanogens had diverse clusters in the rice paddy soil, whereas the methanogens were concentrated only in a few clusters in the dry field farming soil.

Keywords: methane production, methanogens, MPN, phylogenetic tree, soil composition

미생물에 의한 유기물 분해는 산소를 최종수용체로 사용하는 호기 호흡과 산소가 존재하지 않는 혐기 환경에서 산소 이외의 무기물을 최종 전자수용체로 사용하는 혐기 호흡, 그리고 유기물을 최종 전자수용체로 사용하는 발효 과정으로 구분할 수 있다(31). 이 중 혐기 호흡 과정은 보통 탈질과정, 철과 망간과 같은 금속이온의 환원, 황산염 환원과 메탄 생성 순으로 일어나며, 이때 어떤 과정이 일어날 것인지는 산화 환원전위, 전자공여체와 수용체의 종류, 미생물 종류, 온도 등에 따라 결정된다(25). 그러나 대부분의 물에 잠겨 있는 혐기 환경은 질산염과 금속이온의 농도가 높지 않기 때문에 이들에 대한 생물학적 활성이 감소한다. 따라서 일반적으로 물에 잠긴 혐기 환경에서는 황산염 환원과 메탄 생성이 탄소 순환의 주된 기작으로 작용하지만, 해수는 황산염이 비교적 풍부하게 분포하므로 황산염 환원이, 담수는 황산염의 농도가 낮아 메탄 생성이 주된 유기물 분해 기작으로 나타난다.

최근의 지구온난화와 관련하여 전 세계적인 관심을 받는 메탄이 이처럼 논과 담수환경에서 비교적 많이 발생하므로(29), 중국(15, 28), 일본(7), 태국(19) 등 논농사를 많이 하고 있는 아열대와 열대 지역에서 메탄생성에 관한 연구가 비교적 많이 진행되고 있다. 이들 메탄생성에 관한 연구들로는 유기물의 유입에 따른 메탄생성(30), 기후조건 등 주변 환경조건에 따른 메탄생성(14), 비의 품종에 따른 차이(1, 15), 물 관리에 따른 메탄 생성의 차이(5, 18)에 관한 연구뿐 아니라, 혐기성 폐수 처리조의 메탄생성세균 군집(10, 24), 반추동물의 메탄 생성세균 군집(8, 11, 22), 그리고 담수와 극한 환경에 존재하는 메탄생성세균 군집(4, 6, 21) 등 다양한 환경의 메탄생성세균의 군집구조와 메탄생성에 관한 연구가 외국에서 많이 진행되고 있지만, 국내는 논 토양에서 발생하는 메탄의 양을 직접 측정 한 일부 연구(12, 13, 23)와, 논 토양의 메탄생성 세균 군집의 T-RFLP 패턴에 대한 연구가 있을 뿐(9), 이에 대한 연구가 거의 진행되지 않고 있다.

일반적으로 논과 밭의 토양에 분포하는 미생물은 농약이나

* For correspondence. E-mail: krpark@hnu.kr; Tel: +82-42-629-8770; Fax: +82-42-629-8769

비료가 주입될 경우 이들을 분해하거나 적응하여 생존한다. 따라서 토양의 상층부에 존재하는 호기성미생물은 주변 환경의 변화에 따라 미생물 군집의 변화가 심할 것으로 예측된다. 그러나 토양의 심층부에 속하는 혐기성 토양의 미생물 군집은 주변 환경 변화와 관계없이 미생물 군집이 비교적 일정하게 유지되어 농법에 따른 미생물학적 차이를 일관성 있게 유지할 것이라 생각된다.

따라서 본 논문은 친환경 농법으로 인정받은 유기농법과 무농약 농법, 그리고 농약을 사용하는 관행농법의 토양과 야채와 채소를 재배하는 밭과 비닐하우스의 토양 등 총 5종류의 토양을 작물의 성장이 가장 왕성한 여름과 추수후인 가을에 채취하여, 이들 토양에 존재하는 메탄 생성세균의 수를 MPN (most probable number) 방법으로 확인하고, 각 토양에서 발생하는 메탄 생성량을 측정하여 농법에 따른 메탄생성세균의 활성을 비교하고자 하였다. 또 이들 토양에서 total DNA를 추출하고 메탄생성세균 특유의 조효소인 methyl coenzyme M reductase alpha- subunit (*mcrA*)로(26) 토양 내 메탄생성세균의 군집 구조를 비교하여 추후 농법에 따른 토양 내 미생물 지표로 메탄생성세균이 활용가능한지 여부를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

토양 시료 및 사용 배지

토양시료는 충북 옥창면 가곡리, 석우리, 탑리, 신평리 등에서 친환경 농법으로 인증 받은 유기농법과 무농약 농법 토양, 농약을 사용하는 관행농법 토양, 과일과 채소를 재배한 비닐하우스와 밭 토양 등 총 5종류의 토양시료를 작물의 성장이 가장 왕성한 8월과 추수후인 11월에 2차래에 걸쳐 채취하여 사용하였다. 토양채취는 혐기 상태를 유지하는 깊이 10 cm 이상의 토양을 각 농법마다 한 지역당 각각 3개 지점에서 채취하여 일정비율(1:1:1)로 시료용기에 담아 4°C에서 실험실로 운반하였고, 각 농법별로 3개 장소에서 채취된 토양을 균등하게 섞어 그 농법을 대표하는 대표시료(master)로 사용하였다. 그리고 실험실로 운반된 토양 중 DNA를 분리하기 위한 토양은 -70°C에서, 메탄 생성 세균과 메탄 생성을 측정하기 위한 토양은 4°C에서 보관하며 실험하였고, 메탄생성 세균의 배양은 80% N₂와 20% CO₂로 가스로 충전한 Basal carbonate yeast extract trypticase (BCYT) 혐기배지(27)를 사용하여 실온에서 배양하며 실험하였다.

토양성분 분석

토양내 수분은 건토 중량법으로 건조기(FO-600M, Jeio tech, Korea)에서 110°C에서 24시간 건조한 후 무게를 측정하였고, 총질소(total nitrogen)는 Kjeldahl법으로 측정하여 0.001 N H₂SO₄로 적정하였다. 그리고 시료 내 총 무기인산(total inorganic phosphorus)은 1 g의 시료를 처리하여 1-amino-2-naphthol-4-sulfonic acid로 발색시킨 후 440 nm에서 분광기(Lambda EZ201, Perkin-Elmer, USA)로 비색측정을 하여 결정하였고, 총탄소(total carbon)는 0.05 g의 시료를 탄소 측정기

(SSM-500A, Shimadzu, Japan)를 이용하여 측정하였다.

MPN을 이용한 메탄생성세균 수 조사

9 ml BCYT 배지가 들어있는 혐기배양 시험관(Bellco Glass Inc., USA)에 1 g의 토양을 넣어 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(20), 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 (version 4.04; United States Environmental protection agency, Ohio) 프로그램을 이용하여 균 수를 산정하였다.

메탄 생성량 측정

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

*mcrA*의 PCR (polymerase chain reaction)

Ultra Clean Soil DNA kit (MoBio, USA)을 이용하여 토양 세균의 DNA를 추출한 후, *mcrA* primer를 이용하여 465 bp에서 490 bp 크기의 유전자를 GeneAmp PCR system (9700, Perkin-Elmer, USA)을 사용하여 증폭하였다(17). 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, PCR 반응은 95°C에서 15분간 DNA를 변성시킨 후, 5 cycle은 95°C에서 30초, 55°C에서 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, 55°C에서 30초, 그리고 72°C에서 30초, 마지막 증폭은 72°C에서 7분간으로 실행하였다. 반응이 끝난 후 PCR 반응액 5 µl를 취하여 1.5% agarose gel로 전기영동 하여 크기를 확인한 후, PCR Purification kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 최종 용량이 30 µl가 되도록 정

제, 농축 하여 유전자 분석에 사용하였다.

mcrA 유전자 염기서열 분석

mcrA로 증폭한 PCR product는 pGEM-T Easy Vector (Promega, USA)와 3:1 비율로 적정하고 T4-DNA ligase를 첨가한 다음 manual에 따라 ligation하고, X-gal (20 mg/ml) 1 ml, IPTG (20 mg/ml) 100 µl 그리고 ampicillin (20 mg/ml) 1 ml 이 포함된 LB plate에 도말 한 후, 37°C에서 24시간 배양시키고 blue-white colony 선별법에 의해 clone library를 구축한 후, T7 primer (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')와 SP6 primer (5'TATTTAGGTGACACTATAG-3')를 사용하여 direct PCR을 수행하였다. Direct PCR을 통해 insert가 확인된 clone 의 PCR product는 제한효소 *MnII* (NEB, Ipswich, USA)로 처리하고 4% agarose gel (0.5× TBE buffer, 45 mM Tris-borate, 1 mM EDTA)을 사용하여 전기영동을 한 후 각 clone의 유의성을 비교하였다. 이때 1% 이상의 빈도를 차지하는 group을 선정한 후 ABI3730-XL Capillary DNA Sequencer (Applied biosystems, USA)을 이용하여 염기서열을 분석하고, 이를 GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>)의 데이터베이스 자료와 비교한 후 BLASTN 프로그램으로 상동성 검색을 수행하였다. 그리고 sequence alignment는 CLUSTAL X (version 1.83) program으로 실행하여 검토하고, 정렬된 염기자료행렬은 PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony, ver. 4.10b)를 이용하여 분자계통학적 분석을 실시하였다. 이때 계통학적 분석에서 gap은 missing character로 취급하였고, 채집된 장소별로 얻어진 out group 간의 혈연적 유연관계를 검토하기 위하여 NJ tree (Neighbor-joining tree)를 작성하여 유전적 유사성을 검토하였다. 그리고 Clone libraries는 aRarefactWin (version 1.3; S. Holland, Stratigraphy Lab, University of Georgia, Athens [<http://www.uga.edu/~strata/software/>])을 이용하여 분석하였다.

결과

토양시료의 성분

채집된 토양시료의 성분분석 결과(Table 1) 평균 수분함량은 20.55%, 총 질소 0.119%, 총 탄소 1.56%, 총 무기인산 73.33 mg/kg로 나타났다.

각 성분별로 볼 때 수분함량은 유기농법 토양에서 평균 26.49%, 무농약 농법이 25.22%, 관행농법이 21.42%, 비닐하우스 14.87%, 밭 14.74%의 함유량을 나타냈고, 총질소, 총탄소량 그리고 총무기인산량은 각각 유기농법이 평균 0.134%, 1.60%와 55.65 mg/kg, 무농약 농법이 0.129%, 1.70%와 49 mg/kg, 관행농법이 0.119%, 2.12%와 45 mg/kg, 비닐하우스 0.102%, 1.23%와 105.15 mg/kg, 밭 0.114%, 1.14%와 111.85 mg/kg을 나타냈다. 즉, 수분의 함량은 논농사가 평균 24.37%로 밭과 그린하우스 평균 14.80%보다 약 10%정도 많이 함유하고 있었고, 논 전체 평균 총질소량과 총탄소량은 평균 0.127%과 1.80%로 밭과 비닐하우스 평균 0.119%과 1.56%보다 높게 함유하고 있었지만, 총무기인산량은 논 평균 49.88 mg/kg보다 비닐하우스와 밭이 평균 73.33 mg/kg으로 높게 함유하고 있는 것으로 확인되었다. 그리고 친환경 농법인 유기농법과 무농약 농법 토양과 관행농법 토양을 비교할 때 수분함량, 총질소량, 총탄소량 그리고 총무기인산량의 평균값이 유기농법은 각각 25.86%, 0.131%, 1.65%, 53.33 mg/kg을 그리고 관행농법은 24.37%, 0.119%, 2.115%, 45 mg/kg을 나타내어 Kim 등(9)에서 확인된 것처럼 전체적으로 유기농법의 토양성분이 관행농법보다 더 많은 수분과 원소를 함유하고 있음을 확인하였고, 시기별로 볼 때 일부 성분은 가을로 갈수록 일부 증가하였으나 전체적으로 증가하거나 감소하는 경향은 나타나지 않았다.

이상의 결과 Kim 등(9)의 논문에서 언급한 것처럼 논 토양은 습지와 달리 인위적으로 관수와 배수를 번갈아 하기 때문

Table 1. Chemical composition of rice paddy and dry field farming soils

Field station	Sampling	Moisture (%)	TN (%)	TPi (mg/kg)	TC (%)
Organic farming	August	26.21	0.135	57	1.63
	November	26.77	0.133	54.3	1.57
	Average	26.49	0.134	55.65	1.60
Emptiness farming	August	28.88	0.122	49	1.87
	November	21.55	0.135	49	1.52
	Average	25.22	0.129	49	1.70
Traditional farming	August	21.96	0.112	38.3	1.16
	November	20.87	0.126	51.7	3.07
	Average	21.42	0.119	45	2.12
Greenhouse farming	August	16.42	0.115	118.5	1.36
	November	13.31	0.089	91.8	1.10
	Average	14.87	0.102	105.15	1.23
Dry field farming	August	16.15	0.112	113.2	1.20
	November	13.33	0.115	110.5	1.07
	Average	14.74	0.114	111.85	1.14

TN, total nitrogen; TC, total carbon; TPi, total inorganic phosphorous

Table 2. MPN enumerations of methanogens

Sampling			Enumeration ^a (MPN/g)			Average	
			Acetate-utilizing methanogens	Formate-utilizing methanogens	H ₂ -CO ₂ utilizing methanogens		
Rice paddy	Organic farming	August	3.049×10 ⁷ ±0.026	3.049×10 ⁷ ±0.179	2.398×10 ⁵ ±1.476	3.032×10 ⁷	
		November	1.099×10 ⁷ ±0.086	3.610×10 ⁷ ±0.030	7.357×10 ⁷ ±0.060		
	Emptiness farming	August	1.539×10 ⁶ ±0.114	7.357×10 ⁷ ±0.060	6.024×10 ⁸ ±0.050		1.179×10 ⁸
		November	2.372×10 ⁷ ±0.152	2.599×10 ⁶ ±0.159	3.477×10 ⁶ ±0.182		
	Traditional farming	August	1.099×10 ⁶ ±0.086	4.273×10 ⁶ ±0.211	4.273×10 ⁶ ±0.211		2.213×10 ⁷
		November	4.242×10 ⁷ ±0.210	1.138×10 ⁶ ±0.089	7.357×10 ⁷ ±0.060		
Greenhouse farming	August	1.484×10 ⁶ ±0.110	3.049×10 ⁷ ±0.026	1.950×10 ⁷ ±0.135	2.159×10 ⁷		
	November	1.484×10 ⁷ ±0.110	1.914×10 ⁷ ±0.133	4.408×10 ⁷ ±0.219			
Dry field farming	August	1.950×10 ⁶ ±0.135	3.049×10 ⁷ ±0.026	2.147×10 ⁶ ±1.396	1.634×10 ⁷		
	November	4.408×10 ⁷ ±0.219	1.950×10 ⁷ ±0.135	2.147×10 ⁵ ±1.396			
Average			1.726×10 ⁷	2.478×10 ⁷	8.235×10 ⁷		

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

에 수분 함량은 적게 나타나고, 퇴비 시비 및 작물 재배로 인해 대부분의 토양 성분은 습지에 비해 높게 나타나는 것으로 생각된다. 농법별로는 유기농법보다 관행농법토양의 수분함량도 적었고, 총 무기인산을 제외한 나머지 무기원소 성분도 유기농법토양이 관행농법이나 밭 토양보다 많이 함유하고 있음이 확인되었다.

메탄 생성 세균의 분포

8월과 11월 토양 시료의 아세트산과 포름산, 그리고 수소를 이용하는 메탄 생성세균의 분포를 MPN으로 확인 결과(Table 2), 유기농법 토양 시료에서 평균 3.032×10⁷ MPN/g, 무농약농법에서 평균 1.179×10⁸ MPN/g, 관행농법에서 평균 2.213×10⁷ MPN/g, 비닐하우스 토양에서 평균 2.159×10⁷ MPN/g, 그리고 밭 토양에서 평균 1.634×10⁷ MPN/g의 균이 확인되어, 일반적으로 유기농법의 논 토양에 메탄생성세균이 더 많이 분포하고 있음을 알 수 있었다. 또 아세트산을 이용하는 세균은 평균 1.726×10⁷ MPN/g, 포름산을 이용하는 메탄생성균은 평균 2.478×10⁷ MPN/g, 수소를 이용하는 메탄생성균은 평균 8.235×10⁷ MPN/g으로 나타나, 미국 Florida Everglades의 습지에서의 검출된 아세트산을 이용하는 메탄생성세균 5.24×10⁴ MPN/g과 수소이용세균 2.78×10⁶ MPN/g 보다(3) 약 10배에서 1000배 정도가 논과 밭 토양에 분포하는 것을 확인하였다. 이는 아마도 영양원이 제한된 청정 습지보다 작물을 재배하는 논과 밭 토양의 영양원이 풍부하기 때문 일 것으로 판단된다. 그러나 메탄생성세균이 이용하는 기질로 비교할 때 담수에서는 아세트산을 이용하는 메탄생성세균보다 수소를 이용하는 메탄생성세균의 수가 더 많이 분포하는 경향은 일치함을 확인하였다.

메탄생성

각 토양시료 1 g에 탄소원으로 아세트산과 포름산 그리고 수소를 첨가하고, 대조군으로 토양시료 1 g 대신 증류수 1 ml을

첨가하여 8월(Fig. 1)과 11월(Fig. 2) 토양의 메탄 생성량을 가스 크로마토그래피로 조사하였다.

그 결과 기질로 아세트산을 첨가한 경우 메탄 생성량은 5개의 모든 토양 시료 중 8월의 비닐하우스의 토양과 11월의 유기농법 토양을 제외하고 배양 2주 후까지 메탄 생성량이 증가하였으나 3주 이후부터는 거의 일정량의 메탄만이 검출되었다. 이는 아세트산을 이용한 메탄 생성균은 아세트산이 주어졌을 때 초기의 메탄생성에만 이용될 뿐 일정시간이 경과한 후에는 토양 내 발효세균에 의해 형성된 아세트산을 이용하여 메탄을

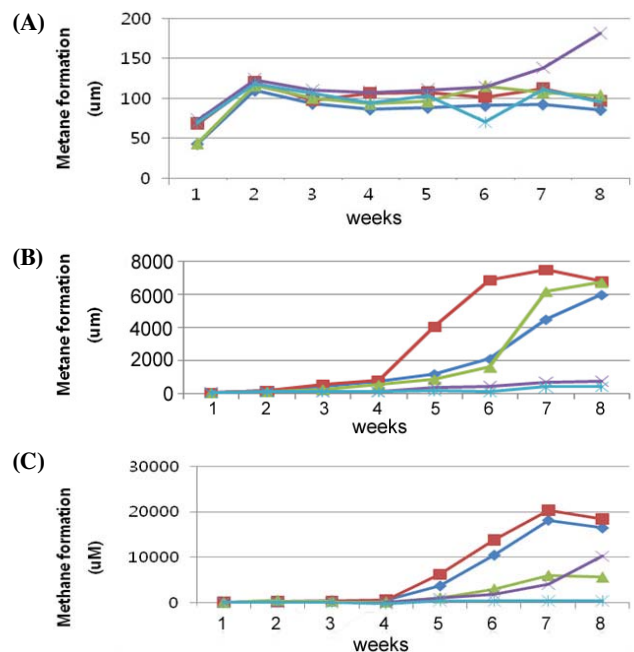


Fig. 1. Methanogenesis from 20 mM acetate (A), 20 mM formate (B), and hydrogen (C) in August soil sample, respectively. Symbols (◇), organic farming; (□), emptiness farming; (△), traditional farming; (X), Greenhouse; (*), dry-field farming soil. Analyses were conducted in triplicate.

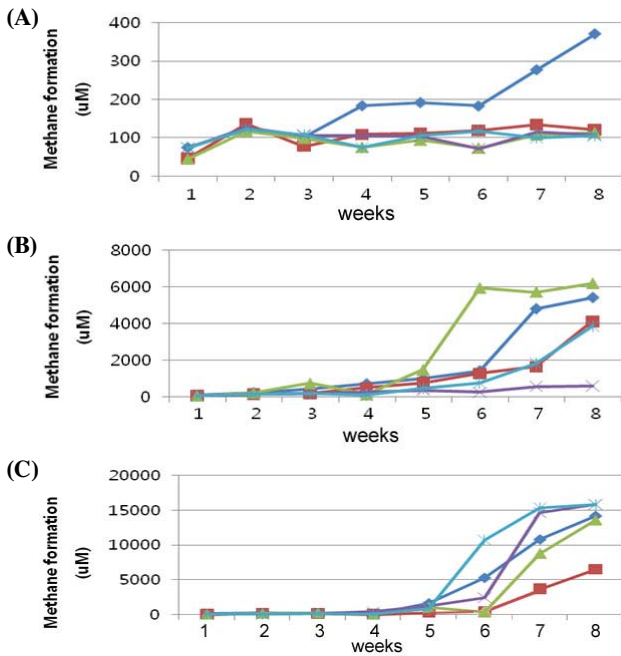


Fig. 2. Methanogenesis from 20 mM acetate (A), 20 mM formate (B), and hydrogen (C) in November soil sample, respectively. Symbols (◇), organic farming; (□), emptiness farming; (△), traditional farming; (X), Greenhouse; (*), dry-field farming soil. Analyses were conducted in triplicate.

생성하기 때문인 것으로 추정된다. 포름산을 첨가한 토양시료에서는 비닐하우스와 밭 토양을 제외하고는 4주 이후부터 메탄 생성량이 급격하게 증가하여 배양 7주 후에 가장 많은 메탄 생성량을 나타내었고, 수소를 첨가하였을 때에도 8월의 밭토양을 제외하고 4주 이후부터 아세트산이나 포름산보다 훨씬 많은 양의 메탄이 생성되어 배양 7주 후에 가장 많은 메탄을 생성함이 확인되었다(Figs. 1 and 2). 그리고 계절적으로는 아세트산, 포름산, 수소 모든 경우 8월 토양이 11월 토양보다 메탄을 많이 생성하는 것으로 확인되었고, 토양의 종류별로 비교할 때 일반적으로 유기농법의 토양이 관행농법이나 밭 토양에 비해 메탄 생성량이 많은 것으로 확인되었다.

이상의 결과 본 실험에서 아세트산을 이용했을 때 평균 0.3 $\mu\text{mol/g/h}$ 의 메탄이, 포름산은 평균 5.1 $\mu\text{mol/g/h}$, 수소를 이용했을 경우 평균 15.3 $\mu\text{mol/g/h}$ 의 메탄이 생성되어, 미국 Florida Everglades 청정지역 습지인 U3지역의 아세트산을 이용한 메탄 생성량 0.008 $\mu\text{mol/g/h}$, 포름산을 이용한 메탄생성 0.005 $\mu\text{mol/g/h}$, 그리고 인으로 오염된 F1지역의 아세트산을 이용했을 경우 발생하는 메탄생성 0.047 $\mu\text{mol/g/h}$, 포름산이 주어졌을 때의 메탄 생성량 0.086 $\mu\text{mol/g/h}$ 보다(2) 매우 많은 양으로, 작물을 경작하는 논과 밭은 유입되는 유기물이 많아 메탄생성세균의 활성이 크고 이에 따라 메탄 생성량이 많아짐을 확인할 수 있었다. 그러나 국내의 농법에 따른 논 토양의 아세트산을 이용했을 때의 평균 0.24 $\mu\text{mol/g/h}$, 포름산의 평균 10.2 $\mu\text{mol/g/h}$, 수소를 이용했을 경우 평균 25.5 $\mu\text{mol/g/h}$ 의 메탄 생성량보다는 적은 것으로 확인되었다. 이는 Kim 등(9)이 논 토양의 메탄

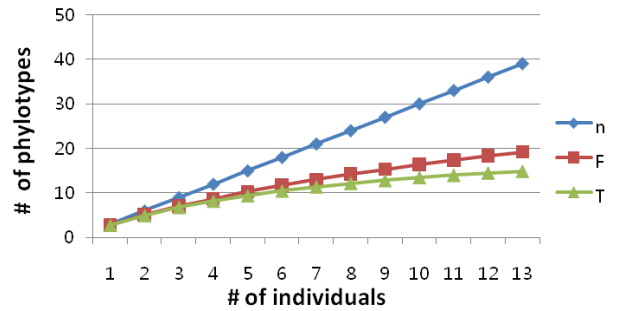


Fig. 3. Rarefaction analysis for *mcr* clone libraries for August samples from traditional rice farming (T) and dry field farming soil (F). N is maximum number.

생성을 과약한 것임에 비해 본 실험은 메탄 생성이 비교적 적은 밭과 비닐하우스 토양의 메탄생성을 같이 비교한 결과로 논 토양만의 메탄 생성량을 비교할 때는 Kim 등(9)의 결과와 비슷하였다.

메탄생성세균 군집구조 분석

논과 밭 토양의 대표시료를 메탄생성세균 특유의 조효소인 *mcrA* 유전자로 증폭하여 465-490 bp 크기의 band를 얻었고, 이를 클로닝하여 논 토양과 밭 토양에서 각각 44개와 50개의 클론을 확보하였다. 그리고 이들 클론들은 논 토양에서 15개의 RFLP 패턴이, 밭 토양에서 20개의 RFLP 패턴이 확인되었고, 이것을 rarefaction curve를 이용하여 curve의 경사를 보고 비교했을 때 밭 토양이 논 토양보다 다양성이 조금 더 높게 나타난 것을 확인하였다(Fig. 3).

논과 밭에서 분리된 총 24개 clones의 유전적 유사도 결과는 메탄생성세균의 outgroup을 *Methanopyrus kandleri*로(17), 비교군으로 13개의 메탄 생성균을 정하여 operational taxonomic unit (OTU) 통해 논과 밭 토양의 pairwise distance를 이용하여 Neighbor-Joining tree를 그린 결과, *mcrA* 유전자를 이용한 계통수에서 6개의 분류군이 확인되었고(Fig. 4), 계통수의 CI (Consistency index)값은 48.5%, RI (Retention index)값은 73.5%로 나타났다.

본 실험에서 나타난 계통수를 분석한 결과, T11 클론이 포함된 MCR-1 cluster는 Methnobacteriales 목과 연관관계가 있고 이와 비슷한 클론들이 논 토양(16)과 매립지(17) 그리고 Florida Evergrade의 청정 퇴적 토양(2)에서도 발견되었다. 그리고 본 실험에서 나타난 주된 유전자들인 MCR-2와 MCR-3 cluster는 Methnomicrobiales 목과 연관관계가 있는 유전자들로, MCR-2 cluster는 주로 논 토양에서, 그리고 MCR-3 cluster는 대부분 밭 토양에서 나타나고 있다. 이들 유전자 그룹들은 아마 논과 밭 토양에 모두 존재하는 것으로 추정되며, 논 토양(16)과 매립지(17), Florida Evergrade의 부영양화된 퇴적 토양(2) 등에서도 확인된다. 또 대부분 밭의 토양에 존재하며 본 실험에서 확인된 또 다른 주된 유전자 그룹인 MCR-4와 MCR-5 cluster는 혐기성 처리조(24)와 Florida Evergrade의 청정 퇴적 토와 부영양화된 퇴적토 모두에서 가장 주된 그룹으로 확인된 유

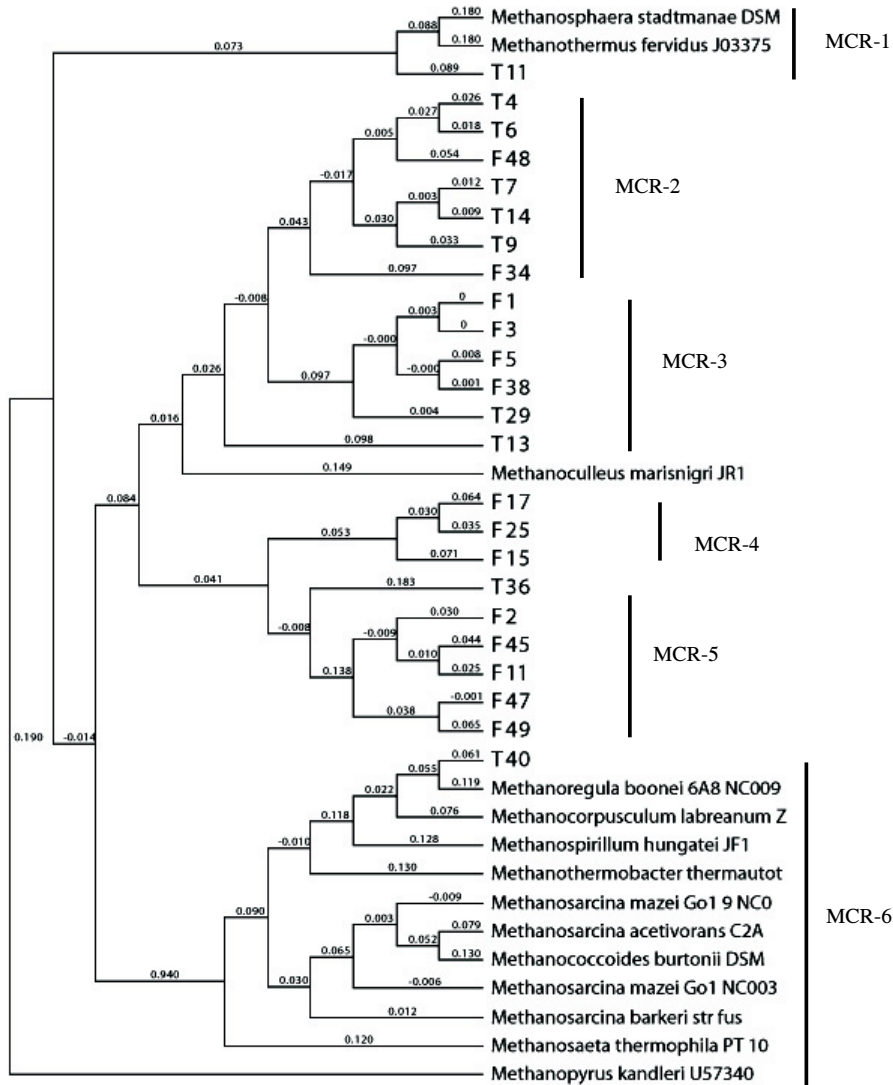


Fig. 4. Phylogenetic tree for representative *mcrA* sequences obtained from a traditional rice farming (T) and dry field farming soils (F). The tree was constructed as a maximum parsimony tree using close neighbor interchange level 1 and bootstrapped with 100 trials. The classification of clusters is based on data described previously by Castro *et al.* (2) and Steinberg and Regan (24).

전자들이다(2). 그리고 *methanosarcina* 관련 있는 논의 T40 클론 역시 논의 토양(16)과 매립지(17), Florida Evergrade의 부영양화된 퇴적 토양(2)에서 확인된 유전자이다.

이상의 결과 논에는 다양한 메탄생성세균이 분포하는 반면 밭 토양에는 일부 cluster에 집중되어 메탄생성세균이 분포하고, 총 24개 클론을 비교했을 때 다양한 종류의 메탄생성세균이 논과 밭 토양에 존재하는 것으로 확인되었다.

적요

여름과 가을의 논과 밭 토양의 토양성분과 메탄 생성, 메탄 생성세균의 분포, 그리고 메탄생성세균의 군집구조를 조사하였다. 토양성분을 분석한 결과, 전체적으로 계절에 따라 큰 변화는 나타나지 않았다. 메탄생성세균의 분포조사에서 밭 토양보다 유기농법과 무농약농법을 사용하는 논 토양에 메탄생성세

균이 더 많이 존재하였고, 수소와 포름산을 이용하는 메탄생성세균에 비해 아세트산을 이용하는 메탄생성세균 수는 상대적으로 적은 것으로 확인되었다. 메탄생성 실험에서 아세트산을 첨가한 경우 배양 2주까지 메탄생성이 증가되었고, 포름산과 수소를 첨가한 경우 배양 7주까지 메탄생성 양이 증가되었다. *mcrA* 유전자를 이용한 계통학적 분석에서 논에는 다양한 메탄생성세균의 cluster가 분포하는 반면, 밭에는 일부 cluster에 집중되어 분포함을 확인하였다.

감사의 말

이 논문은 2010년 한남대학교 학술연구 조성비 지원에 의해 연구되었음.

참고문헌

1. 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.
2. 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.
3. Castro, H., A. Ogram, and K.R. Reddy. 2004. Phylogenetic characterization of methanogenic assemblages in eutrophic and oligotrophic areas of the Florida Everglades. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6559-6568.
4. 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.
5. 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.
6. Goffredi, S.K., R. Wilpiseski, R. Lee, and V.J. Orphan. 2008. Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California. *ISME J.* 2, 204-220.
7. 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.
8. Hook, S.E., K.S. Northwood, A.D.G. Wright, and B.W. McBride. 2009. Long-term monensin supplementation does not significantly affect the quantity or diversity of methanogens in the rumen of the lactating dairy cow. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 374-380.
9. Kim, H.S., J.S. Cho, and K.R. Park. 2009. Methane production and T-RFLP patterns of methanogenic bacteria dependent on agricultural methods. *Kor. J. Microbiol.* 45, 17-25.
10. Krakat, N., S. Schmidt, and P. Scherer. 2010. Mesophilic fermentation of renewable biomass: Does hydraulic retention time regulate methanogen diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6322-6326.
11. Lamendella, R., J.W. Santo Domingo, A.C. Yannarell, S. Ghosh, G. Di Giovanni, R.I. Mackie, and D.B. Oerther. 2009. Evaluation of swine-specific PCR assays used for fecal source tracking and analysis of molecular diversity of swine-specific "Bacteroidales" populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5787-5796.
12. Lee, K.B. 1997. Influence of different rice varieties on emission of methane in soil and exudation of carbohydrates in rhizosphere. *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* 30, 257-264.
13. Lee, K.B. 1999. Methane emission among rice ecotypes in Korean paddy soil. *Korean J. Environ. Agricul.* 18, 1-5.
14. 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.
15. 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.
16. Lueders, T., K.J. Chin, R. Conrad, and M. Friedrich. 2001. Molecular analysis of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage. *Environ. Microbiol.* 3, 194-204.
17. 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.
18. Mitra, A.P., P.K. Gupta, and C. Sharma. 2002. Refinement in methodologies for Methane budget estimation from Rice paddies. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 64, 147-155.
19. 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.
20. Oremland, R.S. and D.G. Capone. 1988. Use of "specific inhibitors" in biogeochemistry and microbial ecology. *Adv. Microbial Ecol.* 10, 285-383.
21. Orphan, V.J., L.L. Jahnke, T. Embaye, K.A. Turk, A. Pernthaler, R.E. Summons, and D.J. Des Marais. 2008. Characterization and spatial distribution of methanogens and methanogenic biosignatures in hypersaline microbial mats of Baja California. *Geobiology* 6, 376-393.
22. Pei, C.X., S.Y. Mao, Y.F. Cheng, and W.Y. Zhu. 2010. Diversity, abundance and novel 16S rRNA gene sequences of methanogens in rumen liquid, solid and epithelium fractions of Jinnan cattle. *Animal* 4, 20-29.
23. Shin, Y.K. and S.H. Yun. 2000. Varietal differences in methane emission from Korean rice cultivars. *Nutr. Cycl. Agroecosyst.* 58, 315-319.
24. Steinberg, L.M. and J.M. Regan. 2008. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6663-6671.
25. Swift, M.J. 1982. Microbial succession during the decay of organic matter. In R.G. Burns and J.H. Slater (eds.) *Experimental microbial ecology*, pp. 164-177. Blackwell, Oxford.
26. Thauer, R.K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology-UK.* 144, 2377-2406.
27. Touzel, J.P. and G. Albagnac. 1983. Isolation and characterization of *Methanococcus mazei* straini MC₃. *FEMS Microbiol. Lett.* 16, 241-245.
28. 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.
29. 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 Microbiol.* Academic Press, London, UK.
30. Wassmann, R. and M.S. Aulakh. 2000. The role of rice plants in regulating mechanisms of methane emissions. *Biol. Fertil. Soils* 31, 20-29.
31. Wind, T. and R. Conrad. 1997. Localization of sulfate reduction in planted and unplanted rice field soil. *Biogeochem.* 37, 253-278.