

## 익산 왕궁지역 논 토양에서의 질산화 세균과 질산화 고세균의 미생물학적 작용

김 현 수<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>전북대학교 지구환경과학과

<sup>2</sup>전북대학교 지구환경시스템연구소

## Microbial Activity of Ammonia Oxidizing Bacteria and Ammonia Oxidizing Archaea in the Rice Paddy Soil in Wang-gung Area of Iksan, Korea

Hyun-su Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Earth and Environmental Sciences, Chonbuk National University

<sup>2</sup>The Earth and Environmental Science System Research Center, Chonbuk National University

### ABSTRACT

Spatial and temporal changes in nitrification activities and distribution of microbial population of ammonia oxidizing bacteria (AOB) and ammonia oxidizing archaea (AOA) in paddy soils were investigated. Soil samples were collected in March and October 2015 from rice paddy with and without the presence of confined animal feeding operations. Incubation experiments and quantitative polymerase chain reaction showed that AOA's contribution to nitrification kinetics was much higher in locations where organic nitrogen in animal waste is expected to significantly contribute to overall nitrogen budget, and temporal variations in nitrification kinetics were much smaller for AOA than AOB. These differences were interpreted to indicate that different microbial responses of two microbial populations to the types and concentrations of nitrogen substrates were the main determining factors of nitrification processes in the paddy soils. The copy numbers of ammonium monooxygenase gene showed that AOA colonized the paddy soils in higher numbers than AOB with stable distribution while AOB showed variation especially in March. Although small in numbers, AOB population turned out to exert more influence on nitrification potential than AOA, which was attributed to higher fluctuation in AOB cell numbers and nitrification reaction rate per cells.

**Key words :** Nitrification, Rice paddy, Ammonia oxidizing bacteria, Ammonia oxidizing archaea, Ammonia monooxygenase

### 1. 서 론

미생물에 의해 암모니아( $\text{NH}_3$ )가 순차적으로 아질산염( $\text{NO}_2^-$ )과 질산염( $\text{NO}_3^-$ )으로 변화되는 질산화 과정은 암모니아를 유동성이 매우 높은 질산염으로 변화시켜, 수환경 뿐만 아니라 육지환경에서도 질소 순환계의 중요한 축을 담당한다. 퇴적물 입자의 크기가 작고, 벼의 생육을 위해 가두어놓은 정체성 수체(stagnant water body)의 존재로 인해 논 토양에서는 무산소 환경이 쉽게 조성되지만, 질산화 작용은 이러한 환경에서도 토양표면과 물 사이의 경

계면이나 벼 뿌리의 근권(rhizosphere)에서 광범위하게 발생한다(Buresh and Datta, 1990; Xing et al., 2002). 질산화 작용의 산물로 형성된 질산염은 혐기성 환경의 논토양에서 탈질 작용을 통해 유실되게 되는데, 질산화 및 탈질현상의 연속적 작용으로 인해 유실되는 질소의 양은 토양에 투입된 전체 질소의 40%에 달한다는 보고가 있다(Phongpan and Mosier, 2003; Nicolaisen et al., 2004). 논 토양환경에서는 질산화와 탈질 과정 중 질산화 작용이 속도 제한 반응으로 작용하는 것으로 알려져 있다(Harrison et al., 2011).

\*Corresponding author : hyunkim@jbnu.ac.kr

Received : 2016. 7. 25 Reviewed : 2016. 8. 8 Accepted : 2016. 8. 12

Discussion until : 2016. 10. 31

질산화 작용은 각 단계의 산화작용을 수행하는 두 종류의 독립영양세균에 의해서 전적으로 수행되는 것으로 믿어져 왔으며, 이 중 암모니아를 아질산염으로 변환시키는 작용을 수행하는 세균을 암모니아 산화 세균(ammonia oxidizing bacteria, AOB)으로, 아질산염의 산화작용을 수행하는 세균을 아질산염 산화 세균(nitrite oxidizing bacteria, NOB)이라고 한다. 질산화 작용 중 암모니아의 산화작용을 일으키는 AOB에 대한 연구는 지난 100년이 상 수행되어 왔으나, 최근의 연구결과는 암모니아의 산화작용이 고세균(ammonia oxidizing archaea, AOA)에 의해서도 수행됨을 나타내었다(Konneke et al., 2005; Treusch et al., 2005). AOA와 AOB는 모두 암모니아 산화작용의 초기에 사용되는 암모니아 일산화질소효소(ammonia monooxygenase, *amoA*)를 함유하고 있기 때문에 *amoA* 유전자는 자연환경에서 이 두가지 미생물의 현존량과 다양성을 나타내는 분자생물학적 지시자로 사용되며, 토양에서의 AOA의 존재가 밝혀진 이후 이러한 지시자를 사용한 연구결과는 AOA가 토양 내에서 다수가 존재할 뿐만 아니라, AOB 보다 토양 내 현존량이 더 큰 연구결과가 여러 차례 발표된 바 있다(Leininger et al., 2006; Wessen et al., 2011; Alves et al., 2013).

이렇게 AOA가 토양 내부에서 다수를 차지하며 중요한 역할을 수행함에도 불구하고 토양의 질산화 작용의 과정에서 AOA가 차지하는 역할, 그리고 AOA와 AOB 사이의 상대적인 역학관계에 영향을 미치는 요소가 무엇인지는 잘 밝혀져 있지 않다. 또한, 국내에서는 농업지역, 특히 논 토양에서 질산화 과정에 작용하는 미생물들의 역할에 대한 연구 또는 조사가 거의 이루어지지 않은 상태이다. 현재까지 밝혀진 연구결과는 토양의 pH가 두 미생물 군집의 상대적인 우점도를 결정하는 중요한 요소로, 토양의 산성도가 높은 경우 AOA가 우점하는 것으로 밝혀졌으며(Gubry-Rangin et al., 2010; Lehtovirta-Morley et al., 2011), AOB가 AOA에 비해 토양에서 질소 화합물의 종류에 좀 더 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있지만(Taylor et al., 2013), 토양 내에서 두 미생물의 상대적 활동도(activities)와 우점도를 결정하는 주된 환경적 요소가 무엇인지에 대한 종합적 연구결과는 아직 제시되지 않았다.

본 연구는 투입되는 질소기질의 종류와 양이 다른 벼 재배 논 토양에서 일어나는 질산화 과정과 이를 수행하는 AOA와 AOB의 분포 및 기여도를 파악하기 위해 수행되었다. 특히, 암모니아의 산화작용을 수행하는 AOB와 AOA의 상대적인 활동성을 계절에 따른 변화에 따라 파

악하기 위해서 농업활동과 축산활동이 활발히 수행되고 있는 익산 왕궁지역에서 수행되었다.

## 2. 연구 지역

본 연구지역은 전라북도 익산시 왕궁면 일대이다. 익산시의 2012년 기준 인구는 310,206명이며, 이 중 연구지역인 왕궁면의 인구는 6,028명이다. 익산지역은 우리나라의 전형적인 기후 특성인 몬순 기후군에 속하여 고온다습한 여름과 한랭건조한 겨울 기후를 보인다. 연 평균 강수량은 1,329 mm이며 7월(265 mm), 8월(471 mm), 9월(216.5 mm)에 전체 강수량의 약 72%가 집중되었다. 기온은 최고기온 37°C, 최저기온, -15.4°C, 연 평균기온은 12.7°C이다. 익산시 동부에 위치한 연구지역은 대부분 완만한 구릉지대로 비옥한 평야를 이루고 주요 하천으로 익산천과 왕궁천 및 그 지류인 삼교천이 분포하고 있다. 왕궁면 일대의 토지 이용은 전체 토지의 15%가 밭이고 약 29%가 논으로 구성되어 1:1.9의 비율을 보인다. 과거 왕궁면은 한센인의 집단 거주지로 돼지의 집단사육으로 인한 오염이 문제가 되었다. 현재 왕궁지역의 목장용지는 약 1%의 비율을 차지하고 있으나 대부분의 가정이 소규모의 축사에서 소나 돼지 등의 가축을 사육하고 있어 주거지에서 생활폐수 뿐만 아니라 축산폐수가 유입되기 충분한 조건을 갖추고 있다.

## 3. 연구 방법

### 3.1. 토양시료 채취

연구지역의 주된 질소오염원이 논 재배를 통한 농업활동과 가축사육을 통한 축산폐기물일 것으로 예상되는 바, 이러한 특성을 반영하기 위해 4개 지점의 논 토양에서 시료를 채취하였다(Fig. 1). 지점 IS-1과 IS-2는 논 토양으로 반경 500 m 내에 축사가 존재하지 않는 지점에서 토양시료를 채취하였으며, 지점 IS-3과 IS-4는 역시 논 토양이기는 하나 대규모 축사로부터 반경 5 m 내에 위치하는 지점에서 시료를 채취하였다. 토양 시료는 코어 샘플러를 사용하여 논 경작시 토양의 혼합이 일어나는 깊이 15 cm까지의 시료를 채취하여 혼합하였다. 시료채취는 모내기를 위해 물을 가두기 이전인 2015년 3월과 벼 수확 직후인 10월에 수행했으며, 채취한 토양시료를 풍건(air drying)한 후, 포함되어 있는 식물 뿌리와 가지 등을 제거한 후 2 mm 체(sieve)로 걸러 잘 혼합한 후 토양의 특성을 파악하고 배양실험(incubation experiment)을 수행하였다.

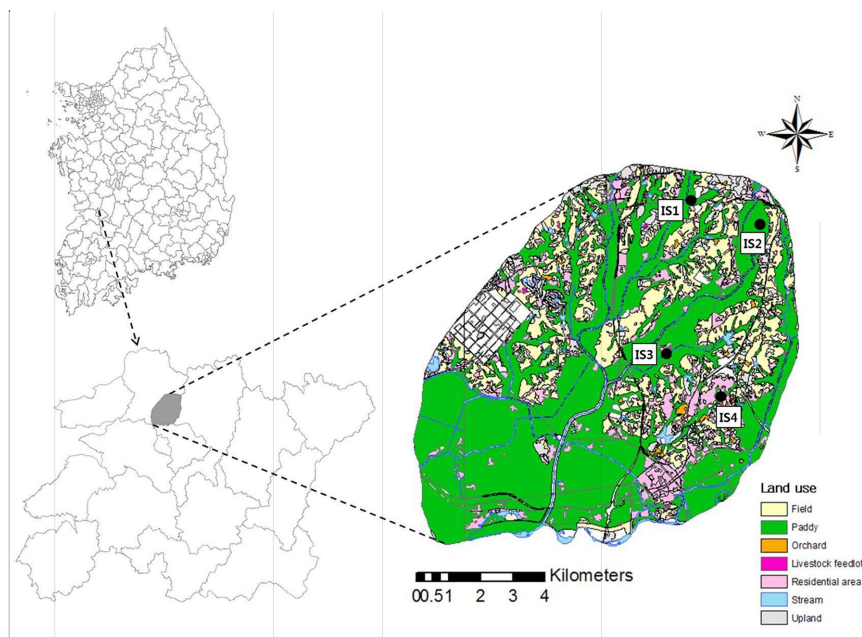


Fig. 1. Land use map of study area and locations of sampling sites.

### 3.2. 질산화 잠재능 배양실험

토양에 존재하는 미생물들의 질산화 잠재능(nitrification potential, NP)은 토양 슬러리를 진동시키며 배양실험을 수행하여 결정하였다(Norton and Stark, 2011). 입도 2 mm 체로 걸러진 토양 시료 15 g을 플라스크에 투입한 후,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 사용하여  $\text{NH}_4^+$  농도를 1 mM로 조절된 TES 완충용액(pH=7.2)을 역시 플라스크에 투입하고 항온진탕조에서 25°C에서 180 rpm의 속도로 진동시키며 24시간동안 배양실험을 수행하였다. 배양 시작 후 2, 4, 12, 24시간 후 현탁액을 채취하여 GF/F 여과지로 여과한 후 질산염과 아질산염 농도를 Ion Chromatography (Dionex ICS-90)을 사용하여 측정하였다.

기술한 NP 실험을 통해 시료에 따른 NP의 차이를 확인한 후, 발현된 NP 중 AOA와 AOB가 차지하는 역할을 분리하여 비교하기 위해 4  $\mu\text{M}$ 의 1-octyne을 사용하여 배양을 수행하였다. 전체적인 배양실험 절차는 위에 기술한 NP 측정방법과 동일하나 1-octyne을 사용한 실험에서는 토양 시료 4.5 g과 30 ml TES 완충용액을 사용하여 배양실험을 진행하였다.

### 3.3. 질산화 회복 잠재능 배양실험

질산화 회복 잠재능(recovery of nitrification potential, RNP) 배양실험은 Taylor et al.(2013)의 실험방법을 참조하여 수행하였다. RNP 실험을 위해서 30 mM TES 완충용액(pH 7.2)을 준비하였다. 준비된 TES 완충용액 60 ml

를 뚜껑에 gray butyl stopper가 장착된 150 ml 실험병에 투입한 후, 습윤 토양 9 g을 집어넣었다. 토양과 완충용액이 혼합된 슬러리를 아세틸렌 가스(0.025 kPa)에 6시간 동안 노출시킨 후, 병 내부에 존재하는 아세틸렌 가스를 진공 펌프를 사용하여 15분간 제거하였다. 아세틸렌 가스가 제거된 후, 각 병들의 뚜껑을 덮고 밀봉하지 않은 상태에서 30°C에서 진동시키며 배양하였다. 아세틸렌이 제거된 후, *amoA*의 합성이 재개되는데 약 24시간이 걸리는 것으로 알려져 있으므로(Taylor et al., 2012), RNP는 배양 시작 후 24시간에서 48시간의 기간 동안 측정되는 질산염과 아질산염의 측정 속도를 계산하여 구하였다. 실험에 사용된 시료 중 일부에는 AOB의 *amoA* 합성을 억제하기 위해, 세균에 의한 단백질 합성을 억제하는 물질인 kanamycin과 spectinomycin을 각각 300 mg/l와 200 mg/l의 농도로 함께 투입하였다. 이 두 화학물질이 투입된 시료에서의 RNP는 AOA에 의한 것으로 간주 하였으며, AOB의 RNP는 효소합성 억제제를 투입하지 않은 시료의 RNP와 AOA의 RNP 차이로 계산하였다.

### 3.4. 실제 질산화 속도 배양실험

실제 질산화 속도(Gross nitrification rates, GNR) 배양실험은 250 ml 삼각 플라스크에 습윤 토양시료 15 g의 수분함량을 1.08 g/g으로 조절한 후 7일간 배양하여 수행하였다. 플라스크는 고무 마개를 사용하여 봉하였으며, 시료로부터 수분의 증발을 방지하기 위해 물을 흡수한 솜을

매달아 두었고, 실험 개시와 종료시 시료로부터 위에 기술한 방법으로 질소화합물을 추출하여 질산염과 아질산염 농도를 Ion Chromatography(Dionex ICS-90)을 사용하여 측정하였다.

### 3.5. 토양 DNA 추출 및 quantitative PCR

현장에서 토양 시료를 채취하여 실험실로 수송한 즉시 시료 20 g을 DNA 추출시까지  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 동결하여 보관하였다. 토양에 존재하는 DNA는 0.25 g의 습윤토양에 대해 MoBio Power Soil DNA isolation protocol(MoBio Laboratories Inc, Carlsbad, USA)에 따라 수행하였다. 추출된 DNA의 농도는 NanoDrop spectrophotometer(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE)를 사용하여 정량화 하였다. AOA와 AOB *amoA* 유전자에 대한 quantitative PCR은 SsoAdvanced SYBR Green Supermix와 CFX CONNECT Real-Time PCR detection system(Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. AOA의 *amoA* 유전자의 정량화를 위해 *amoA19F*와 *amoA643R* primer를 사용 하였으며, AOB의 경우에는 *amoA189F*와 *amoA2R* primer가 사용되었다(Table 1). 최종 25  $\mu\text{l}$ 의 반응 혼합물에는 12.5  $\mu\text{l}$ 의 SsoAdvanced SYBR Green Supermix, 0.5  $\mu\text{M}$ 의 primer 쌍, 추출된 DNA의 10배 희석액 10  $\mu\text{l}$ 가 포함되었다. PCR 증폭과정은  $94^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 predenaturation 과정을 거친 후,  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 denaturation을 45초, annealing과정을 AOA의 경우는  $58^{\circ}\text{C}$ 에서 AOB의 경우는  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 1분, extension과정을  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 45초간 40 cycles에 걸쳐서 수행하였고, final extension을  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 수행

하였다. 각 사이클의 extension step에서 형광강도를 측정하였다. AOA의 경우 반응 효율은 99~104%,  $R^2$  값은 0.990~0.999였으며, AOB의 경우 반응 효율은 99~102%,  $R^2$  값은 0.992~0.999였다.

## 4. 결과 및 토의

### 4.1. 토양 특성

본 연구에서 채취한 시료에 대한 물리, 화학적 특성 분석결과를 Table 2에 도시하였다. 채취한 토양 시료에 대한 입도분석 결과는 4개 조사지점 모두 유사한 물리적 특성을 나타내었다. 평균적으로 점토질 입자가 52.3%, 실트가 39.2%, 모래가 8.5%로 나타났으며 지점별 차이는 크지 않은 것으로 조사되었다. 토양의 pH는 지점별로 차이를 나타내었는데, 주변에 축사 오염원이 존재하지 않는 IS1와 IS2의 경우에는 6.1과 6.3으로 나타난 반면, 대규모 축사 인근 토양인 IS3과 IS4의 경우에는 7.3과 7.7로 높게 파악되었다. 이는 축산폐기물과 같은 유기물질이 유입되는 경우에 비해 무기 비료의 사용이 주를 이루는 지역에서 산성도가 더 크게 나타나는 것을 지시하는 것으로 생각된다. 토양 내 존재하는 유기물질의 양 또한 IS3과 IS4에서 더 높게 나타났는데, 토양에 존재하는 유기탄소의 함량이 상대적으로 높은 IS3과 IS4의 경우 상대적으로 활발한 탈질작용에 의해 pH가 높게 측정되었을 가능성도 있다(Rust et al., 2000). 총 질소 함량은 IS3과 IS4에서,  $\text{NO}_3\text{-N/T-N}$  비율은 축사 오염원이 존재하지 않는 IS1과 IS2에서 높게 나타났는데, 이 비율은 토양에서 질산화 작용이 활발하게 일어나는지 나타내는 척도로 보고된 바 있

**Table 1.** PCR primers used for determining the abundance of *amoA* gene using qPCR

Name	Detection	Sequence (5'-3')	Reference
<i>amoA19F</i>	Archaeal <i>amoA</i>	ATGGTCTGGCTWAGACG	Leininger et al. (2006)
<i>amoA643R</i>		TCCCACTTWGACCARGCGCCATCCA	Leininger et al. (2006)
<i>amoA189F</i>	Bacterial <i>amoA</i>	GGHGACTGGGAYTTCTGG	Habteselassie et al. (2013)
<i>amoA2R</i>		CCTCKGSAAAGCCTTCTTC	Okano et al. (2004)

**Table 2.** Physical and chemical characteristics of tested paddy soils

Sampling sites	pH	$\text{NO}_3\text{-N}$ (mg/kg)	$\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/kg)	T-N (g/kg)	SOC (g/kg)	WHC (%)	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)
IS1	6.1	23.7	2.47	0.89	12.7	76.1	53.2	38.7	8.1
IS2	6.3	28.8	1.96	0.94	11.4	74.7	51.7	40.1	8.2
IS3	7.3	14.2	3.45	1.32	26.9	75.1	52.3	38.6	9.1
IS4	7.7	16.9	3.18	1.27	28.2	73.8	52.1	39.5	8.4

Note) SOC: soil organic carbon, WHC: water holding capacity

다(Lan et al., 2013). 토양의  $\text{NH}_4^+$  농도는 큰 차이를 보이지 않았으므로, 결국 이 비율의 차이는 토양에 존재하는  $\text{NO}_3^-$ 에 의해서 결정되는 것으로 보인다. 이러한 결과는 질산화 작용의 결과 형성된 과량의  $\text{NO}_3^-$ 가 식물에 의해 흡수되지 않고 남아있는 것으로, 축산 오염물과 같은 유기물질에 비해 무기 비료를 투입한 경우가 질산화를 통한 유동성 증가로 토양 내 질소성분의 유실의 가능성이 더 높다는 사실을 지시하는 것으로 보인다.

#### 4.2. 질산화 반응 속도

본 연구에서 수행된 모든 배양실험은 시료별로 2회 수행되었으며, 그 결과 얻어진 평균값을 결과물에 도시하였고 각 실험값은 오차막대로 표현하였다. 질산화 잠재능(NP)은 1 mM의  $\text{NH}_4^+$ 를 기질로 공급하고, 완충용액과 충분히 혼합된 슬러리를 형성시킴으로써 확산현상에 의해 기질의 가용성이 제한받지 않는 조건을 조성한 후, 진동 상태에서 시스템 내에서 일어날 수 있는 질산화 반응의 최대속도를 단기간에 측정하여 구하였다(Fig. 2). 실험이 진행되는 과정에서 투입된 완충용액 내의  $\text{NH}_4^+$  농도는 약 0.6 mM인 것으로 파악 되었으며, 이는 실험 과정에서 토양의 표면에서 일어나는  $\text{NH}_4^+$ 의 흡착작용에 의한 것으로 판단된다(Norton and Stalk, 2011). NP 값은 지점 별로 시료채취 시점에 따라 변화패턴이 다르게 나타났는데, 10월에 채취한 시료의 분석값은 지점에 따른 변화가 상대적으로 작게 나타난 것에 반해, 3월 시료는 뚜렷한 차이를 보여주었다. IS3과 IS4의 경우는 3월과 10월 사이의 반응속도의 차이가 미미하게 나타났으나, IS1과 IS2의 경우에는 평균값을 기준으로 3월 시료의 분석결과가 10월 시료에 비해 72~75% 정도로 낮게 나타났다. 이러한 차이는 벼의 성장을 위해 투입된 비료로 인해 10월 토양의 경우는 상대적으로 질산화 작용의 기질이 풍부하게 존재했던 반면, 3월 시료의 경우는 가을에서 이듬해 봄까지의 휴지기에 IS1과 IS2에서 질소비료의 공급은 이루어지지 않는 상태에서 질산화 작용에 의해 서서히 질소성분의 농도가 낮아졌기 때문인 것으로 생각된다. IS3과 IS4의 경우에는 축산 오염물의 지속적인 유입을 통해 이러한 현상이 나타나지 않아 비교적 안정적인 질산화 작용이 수행되었기 때문인 것으로 판단된다.

1-octyne을 사용한 배양실험에서 얻어진 NP 값은 1-octyne을 사용한 배양실험의 결과는 AOA에 의한 것으로 가정하여 계산하였고, AOB의 NP는 octyne을 사용하지 않은 실험결과와 octyne을 사용한 실험결과 값의 차이를 계산하여 사용하였다(Fig. 3). 전체적인 NP값의 분포는

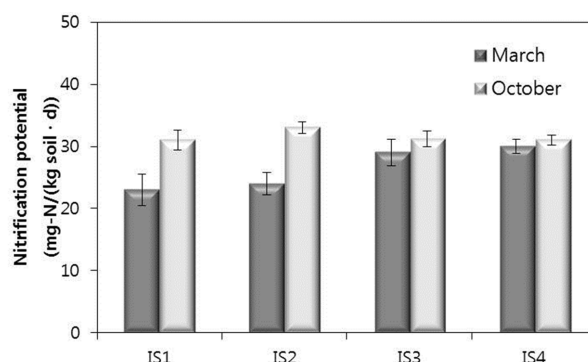


Fig. 2. Nitrification potentials measured from incubation experiments. The values plotted are average of duplicate samples and error bars are the values of each sample measurement.

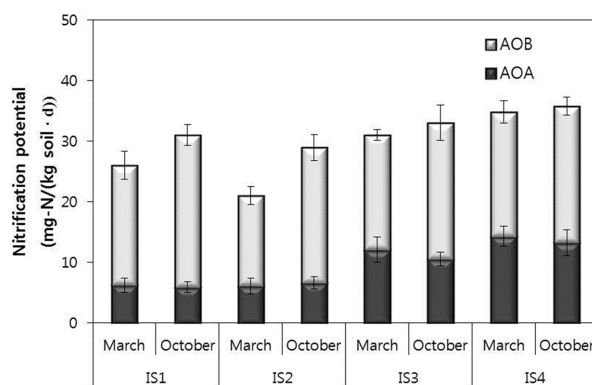


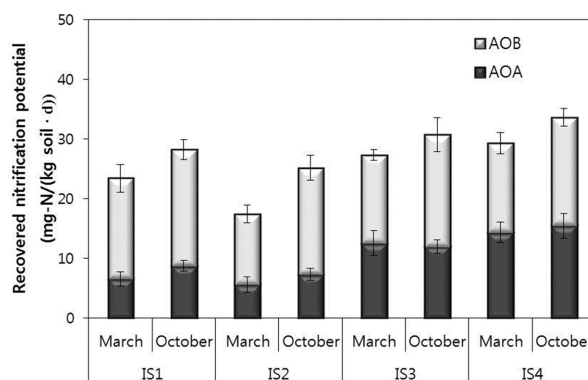
Fig. 3. Nitrification potentials of AOA and AOB measured from incubation experiment with and without 1-octyne. The values plotted are average of duplicate samples and error bars are the values of each sample measurement.

Fig. 2와 유사한 결과를 보여 주었으며, 이 결과는 실험에 사용된 토양과 완충용액의 양이 실험결과에 크게 영향을 미치지 않았음을 나타낸다. NP에 대한 AOA와 AOB의 기여도는 지점에 따른 차이는 있지만 전체적으로 AOB의 기여도가 더 큰 것으로 관찰 되었으며, 이 같은 현상은 IS1과 IS2의 경우에 더 두드러지게 나타났다. 이는 토양의 산성도와 AOA의 우점도가 비례한다는 이전의 연구결과와 배치되는 것으로(Gubry-Rangin et al., 2010; Lehtovirta-Morley et al., 2011), 이러한 결과는 토양 내부에서 AOB와 AOA의 상대적인 우점도가 반드시 반응속도와 직접적인 연관성을 보이지 않을 수 있음을 나타내는 것으로 보인다(Nicol et al., 2008; Myrold et al., 2014). 실험결과 측정된 NP 값의 지점 및 시료채취 시점에 따른 변화는 AOA와 AOB 사이에 차이를 보여 주었는데, 각 지점에서 AOA의 NP는 시료채취 시점에 따른 차이가 크게 나타나지 않았지만 AOB의 경우는 10월과 3

월 사이에 비교적 큰 차이를 나타내었다. AOB의 변화폭이 상대적으로 큰 것으로 파악된 IS1과 IS2의 경우는 주로 무기 비료의 사용을 통한 질소의 공급이 이루어지는데, AOB의 경우 토양 내 질소 농도와 질소 성분의 변화에 좀 더 민감하게 반응하는 것으로 알려져 있다(Shen et al., 2008; Wang et al., 2009; Ai et al., 2013). 무기질 비료의 투입은 벼의 성장기에 집중 되므로 벼 수확 직후인 10월에는 토양에 잔류하는 질산화 작용의 기질의 농도가 상대적으로 높을 것으로 예상이 되고, 이는 이듬해 3월까지의 휴지기 동안 지속적으로 감소할 것으로 예상이 되므로 질소 영양성분의 농도로 인해 IS1과 IS2에서 상대적으로 변화가 크게 나타나는 것으로 보인다. IS3과 IS4의 경우에는 시료 채취지점이 대규모의 축산 오염원과 매우 가깝게 위치하고 있기 때문에 지속적으로 유입되는 축산오염물질로 인해 공급되는 질소화합물의 종류와 그 농도 변화의 영향이 IS3과 IS4에서는 상대적으로 작게 나타날 가능성이 있다.

AOA의 경우에는 지점별로 차이는 있지만 시료채취 시점에 따른 변화는 각 지점에서 미미하게 나타나는 것으로 관찰 되었는데, 이는 IS1과 IS2의 경우는 기질로서  $\text{NH}_4^+$ 에 대한 최대 반응속도(maximum substrate utilization rate)는 느리지만 친화도(affinity)가 상대적으로 높은 것으로 알려진 AOA의 미생물학적 특성에 의한 것으로 보인다(Martens-Habben et al., 2009). 무기질소 비료의 사용이 활발한 경우에는 질산화를 통해 직접 빠르게 사용할 수 있는  $\text{NH}_4^+$ 의 농도가 높게 나타나지만, 추가적인 투입이 일어나지 않는 휴지기에는  $\text{NH}_4^+$ 의 공급이 유기물의 산화를 통해서 천천히 이루어지기 때문에 상대적으로 AOA의 활동이 꾸준히 일어날 수 있는 것으로 판단된다. IS3과 IS4에서 AOA의 역할이 크게 나타나는 현상은 직접적인 무기질소가 투입되는 IS1과 IS2에 비해 유기물질 투입의 비율이 높고, 유기물질의 산화를 통해  $\text{NH}_4^+$ 가 공급되는 경우  $\text{NH}_4^+$ 에 대한 친화도가 높은 AOA의 활동이 더 활발하게 일어날 수 있기 때문인 것으로 보인다.

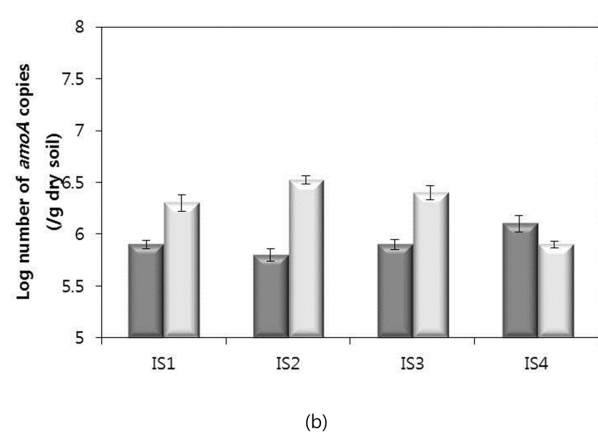
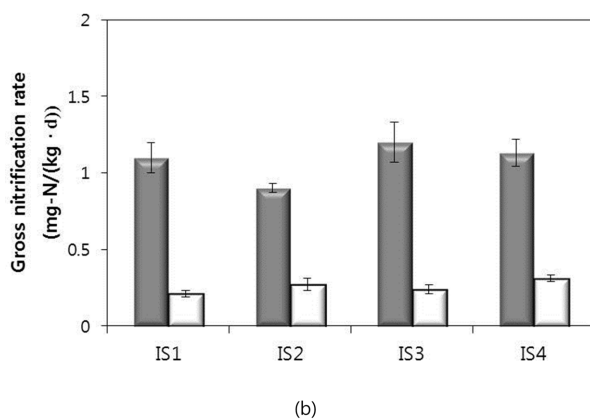
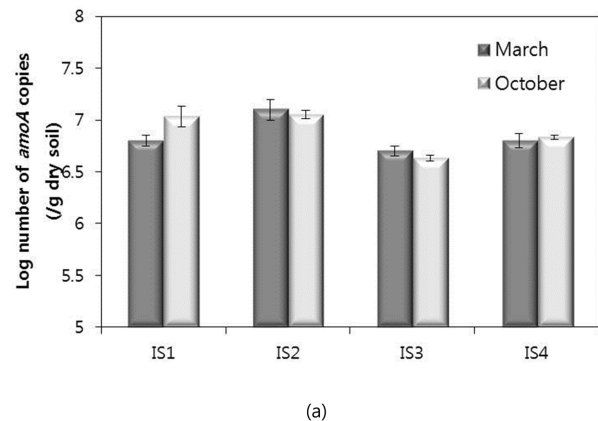
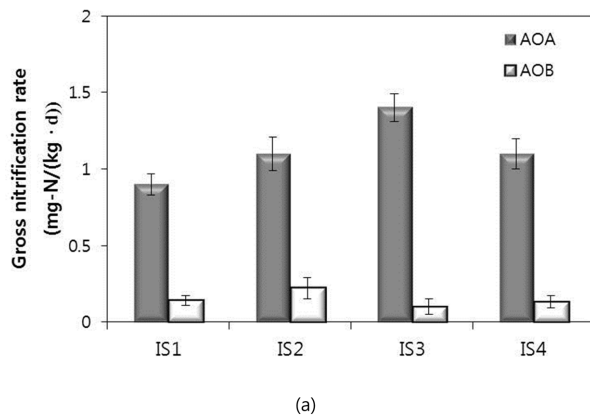
NP 실험과 마찬가지로 RNP 배양실험 역시 토양과 배양액이 잘 혼합된 시스템에서  $\text{NH}_4^+$ 의 농도가 1 mM 일 때 AOA와 AOB에 의한 질산염의 형성을 나타내는 것이다. 전체적으로 배양실험 결과는 RNP는 NP에 비해 약간 감소한 경향을 나타냈지만, 아세트렌의 제거 이후 AOA와 AOB 모두 *amoA* 효소를 합성하여 암모니아의 산화작용을 활발하게 수행하고 있음을 나타낸다(Fig. 4). 그러나, 실험결과는 AOA의 경우에는 RNP와 NP 사이의 차이가 크지 않게 나타났고 시료채취 시점에 따른 차이도 그리



**Fig. 4.** Recovered nitrification potentials and contributions from AOA and AOB from incubation experiment with and without 1-octyne. The values plotted are average of duplicate samples and error bars are the values of each sample measurement.

크게 나타나지 않고 있으나, AOB의 경우 각 채취 지점에서 RNP의 값이 NP에 비해 낮게 측정 되었으며, 이러한 현상은 IS3과 IS4에서 두드러지게 나타났다. 이는 축사 인근의 논 토양에 존재하는 AOB가 농업 및 축산활동을 통해 공급되는 질소 화합물의 종류와 그 농도 차이로 인해 토양 내에서 AOA와의 경쟁압력으로 인해 세포의 생리학적 상태의 차이를 초래하기 때문에 일어났을 가능성이 있다. 퇴적물 내에서 미생물은 오염물질에 대한 노출기간, 다른 미생물군과의 경쟁으로 인해 다양한 압력을 받는 것으로 알려져 있으며(Kim and Jaffé, 2007), 경쟁압력을 통해 미생물의 생리학적 상태가 양호하지 않는 경우 RNP값이 낮게 나타날 가능성이 있다. AOA는 유기물질의 산화를 통해  $\text{NH}_4^+$ 가 공급되는 경우 AOB에 비해 경쟁적 우위를 차지하는 것으로 밝혀진 바 있으므로(Gubry-Rangin et al., 2010; Zhang et al., 2010), 축산 폐기물에 포함되어 있는 유기질소의 함량이 높을 것으로 예상되는 IS3과 IS4의 경우에서 AOB의 RNP가 NP에 비해서 상대적으로 큰 차이를 보이는 것으로 생각된다. 반면, 인근에 축사가 존재하지 않는 논 토양인 IS1과 IS2의 경우에 전체 RNP에서 AOB에 의한 RNP가 차지하는 비중이 상대적으로 더 크며, NP와의 차이도 작게 나타난다.

논 토양에서 실제 일어나는 질산화 속도(GNP)에 대한 측정결과는 외부적인  $\text{NH}_4^+$  투입이 없이 질산화 속도를 측정 하였다. 배양실험에서 측정된 GNP 값은 이전에 기술된 NP 값의 2~9%로 상대적으로 매우 낮게 나타났으며, 거의 대부분 AOA에 의해 이루어진 것으로 파악 되었다(Fig. 5). GNP는 NP에 비해 존재하는 질소 기질의 종류와 농도에 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있으며(Booth et al., 2005), 이러한 특성은 10월 시료에 비해



**Fig. 5.** Gross nitrification rate of AOA and AOB from incubation experiment. (a) samples collected in March, (b) samples collected in October. The values plotted are average of duplicate samples and error bars are the values of each sample measurement.

3월 시료에서 AOB의 GNP가 낮게 나타나는 것을 통해 파악할 수 있다.

#### 4.3. AOA와 AOB의 분포

토양 시료내에 존재하는 *amoA* 유전자 copy number는 시료 채취 지점에 따라 차이를 보였으나, 모든 지점에서 AOA의 copy number가 AOB의 경우에 비해 높게 나타났다(Fig. 6). 토양 시료내의 AOA와 AOB의 *amoA* 유전자 copy number의 비율은 1.7에서 19.9 사이의 값을 나타냈는데, 유기물 유입과 이의 산화를 통한 질소의 방출이 예상되는 IS3과 IS4에서 특히 높은 비율이 관찰되지는 않았다. 농촌 토양에서 AOA의 우점은 AOA의 존재를 처음 밝힌 Leininger et al.(2006)의 결과와 유사한 것이기는 하나, 이후의 연구결과는 질소성분의 농도 및 종류, 다양한 환경조건의 미세한 변화등에 따라 다양한 결과를 나타낸 바 있다(Shen et al., 2008; Offire et al., 2009; Schleper et al., 2010; Jiang et al., 2014a). 시료채취

**Fig. 6.** Abundance of *amoA* gene copies measured from quantitative PCR. (a) AOA, (b) AOB. The values plotted are average of duplicate samples and error bars are the values of each sample measurement.

지점 및 시점에 따른 copy number의 변화양상은 AOA와 AOB에서 다르게 나타났는데, AOA의 경우는 시료채취 지점에 따른 copy number의 차이는 다소 있는 것으로 파악 되었으나, 시료 채취시점에 따른 변화는 거의 없는 것으로 나타난 반면, AOB의 경우는 시료채취 지점 및 시점에 따른 변화가 상대적으로 크게 나타났다. AOB의 경우 배양실험 결과에서 나타난 반응속도 변화 양상과 유사하게 10월에 비해 3월의 시료에서 copy number가 매우 낮게 나타났는데, 특이한 점은 측사 인근의 IS3과 IS4에서 서로 반대되는 개체수 변화 양상을 나타냈다는 사실이다. 이는, 유기질소의 산화작용에 의해  $\text{NH}_4^+$ 가 공급되는 비중이 높을 것으로 예상되는 측사 오염원 인근의 토양에서 관찰된 이전의 연구결과와 반대되는 것이다(Habteselassie et al., 2013). 이 외에도, AOA의 copy number가 IS1과 IS2에서 상대적으로 높게 나타난 현상도 혼합된 거름 또는 토양 유기물에 존재하는 유기질소로부터 산화된 암모늄을 공급한 경우 AOA의 개체수가 증가

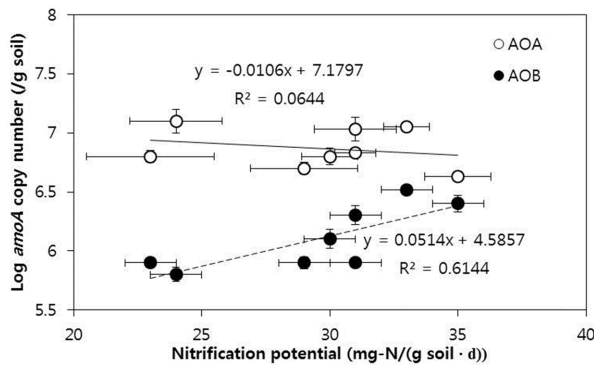


Fig. 7. Relationship between *amoA* gene copies of AOA and AOB and nitrification potential.

하는 것으로 보고된 이전의 연구결과와는 다른 양상을 보인 것이다(Ai et al., 2013; Jiang et al., 2014b). 미생물 군집에 대한 이러한 연구결과에 대한 정확한 분석은 조사 지역의 비료시비 및 축사 오염물질의 유입량 및 패턴에 대한 정밀한 조사를 바탕으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

미생물의 copy number와 NP 사이의 상관관계에 대한 분석 결과는, AOA의 copy number, 즉 개체수는 NP와의 상관성이 존재하지 않는 것으로 나타났으나, AOB의 *amoA* copy number는 본 연구결과 얻어진 NP값의 변화에 중요한 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 7). 이는 *amoA* 유전자 copy number에 대한 분석 결과, AOA가 토양 질산화 미생물 군집에서 우점하고 있는 것으로 나타난 것을 바탕으로 생각할 때 다소 의외의 결과이다. AOA의 개체수와 상관성이 낮은 것은 두가지 측면으로 생각해볼 수 있는데, 첫째로 AOA의 개체수 변화가 AOB에 비해 상대적으로 작고 안정적인 군집을 구성하였기 때문에 이의 변화가 반영되지 않았을 수 있으며, 둘째는 AOA에 비해 AOB의 단위세포당 질산화 수행능력이 훨씬 크기 때문일 수 있다. 이미 기술된 NP 및 GNP의 결과와 AOB의 세포당 암모니아 산화속도가 AOA에 비해 40~200배 높게 측정된 이전 결과(Jiang and Bakken, 1999; Hartzenpichler et al., 2008; Tourna et al., 2011)는 이러한 논거를 뒷받침하고 있으나 본 연구에서는 제한된 숫자의 시료에 대한 분석이 이루어져 이에 대한 정확한 평가는 좀 더 상세한 연구조사 결과를 바탕으로 이루어져야 할 것으로 보인다.

## 5. 결 론

전북 익산시 왕궁지역 논 토양에서 채취한 시료에 대한 질산화 반응속도와 AOB와 AOA의 분포에 대한 분석 결

과, 두 종류의 미생물 분포와 이들에 의한 질산화 반응속도는 토양에 유입되는 질소 오염원 또는 기질의 종류와 농도의 변화에 따른 AOA와 AOB의 미생물학적 반응 특성의 차이에 영향을 받는 것으로 보인다. 즉, 축산폐기물과 무기 비료의 유입 패턴 및 부하량과 다양한 질소오염원에 대한 미생물학적 반응의 특성에 따라 차이를 보이는 것으로 나타났다. AOA의 경우 시료채취 지점별로 반응속도에 다소의 차이를 보였지만 시료 채취시점에 따른 변화는 거의 없는 것으로 나타났는데, 이는 유기질소의 산화과정을 통해 천천히 공급되는 낮은 농도의  $\text{NH}_4^+$ 에 대한 높은 친화도에 의한 것으로 보이며,  $\text{NH}_4^+$ 의 농도가 높은 환경을 선호하는 AOB의 경우는 벼 재배과정에 따라 변화하는 농도변화로 인해 채취지점 및 시점에 따른 변화가 크게 나타났음을 관찰할 수 있었다.

시료 내의 미생물 *amoA* 유전자 copy number는 AOA의 경우가 AOB의 경우보다 큰 것으로 나타났으며, AOB의 copy number의 변화가 AOA에 비해서 지점별 및 시료 채취시점별로 변화가 크게 나타났다. 전체적인 질산화능에 미치는 영향은 AOB가 크게 나타났는데, 이는 AOB의 개체수의 변화가 크고 AOB 단위 세포가 수행하는 질산화 반응속도가 AOA에 비해 크기 때문인 것으로 판단된다.

논 토양내에서 일어나는 미생물에 의한 질산화 과정을 정량적으로 파악하기 위해서는 여러 토양환경적 요소와 투입되는 질소기질의 종류와 양에 대한 정밀한 정량적 파악에 근거한 추가적 연구가 필요할 것으로 판단된다.

## 사 사

본 연구과제는 2015년도 환경부지정 전북녹색환경지원센터의 연구비지원에 의해 수행한 연구과제입니다.

## References

- Ai, C., Liang, G., Sun, J., Wang, X., He, P., and Zhou, W., 2013, Different roles of rhizo-sphere effect and long-term fertilization in the activity and community structure of ammonia oxidizers in a calcareous fluvo-aquic soil, *Soil Biol. Biochem.*, **57**, 30-42.
- Alves, R.J.E., Wanek, W., Zappe, A., Richter, A., Svenning, M.M., Schleper, C., and Urich, T., 2013, Nitrification rates in arctic soils are associated with functionally distinct populations of ammonia-oxidizing archaea, *ISME J.*, **7**, 1620-1631.
- Booth, M.S., Stark, J.M., and Rastetter, E., 2005, Controls on nitrogen cycling in terrestrial ecosystem: a synthetic analysis of



literature data, *Ecol. Monogr.*, **75**, 139-157.

Buresh, R.J. and De, Datta, S.K., 1990, Denitrification losses from puddle rice soils in the tropics, *Biol. Fert. Soils*, **9**, 1-13.

Gubry-Rangin, C., Nicol, G.W., and Prosser, J.I., 2010, Archaea rather than bacteria control nitrification in two agricultural acidic soils, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **74**, 566-574.

Habteselassie, M.Y., Xu, L., and Norton, J.M., 2013, Ammonia-oxidizer communities in an agricultural soil treated with contrasting nitrogen sources, *Front. Microbiol.*, **4**, 326.

Harrison, M.D., Groffman, P.M., Mayer, P.M., Kaushal, S.S., and Newcomer, T.A., 2011, Denitrification in alluvial wetlands in an urban landscape, *J. Environ. Qual.*, **40**, 634-646.

Hatzenpichler, R., Lebedeva, E.V., Spieck, E., Stoecker, K., Richter, A., Daims, H., and Wagner, M., 2008, A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105**, 2134-2139.

Jiang, Q.Q. and Bakken, L.R., 1999, Comparison of Nitrosospiras strains isolated from terrestrial environments, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **30**, 171-186.

Jiang, H., Huang, L., Deng, Y., Wang, S., Zhou, Y., Liu, L., and Dong, H., 2014a, Latitudinal distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in the agricultural soils of eastern China, *Applied and Environ. Microbiol.*, **80**, 5593-5602.

Jiang, Y., Jin, C., and Sun, B., 2014b, Soil aggregate stratification of nematodes and ammonia oxidizers affects nitrification in an acid soil, *Environ. Microbiol.*, **16**, 3083-3094.

Kim, H. and Jaffé, P., 2007, Spatial distribution and physiological state of bacteria in a sand column experiment during the biodegradation of toluene, *Water Res.*, **41**, 2089-2100.

Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A., 2005, Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon, *Nature*, **437**, 543-546.

Lan, T., Han, Y., Roelcke, M., Nieder, R., and Cai, Z., 2013, Effects of the nitrification inhibitor dicyandiamide (DCD) on gross N transformation rates and mitigating N<sub>2</sub>O emission in paddy soils, *Soil Biol. Biochem.*, **67**, 174-182.

Lehtovirta-Morley, L.E., Stoecker, K., Vilcinskas, A., Prosser, J.J., and Nicol, G.W., 2011, Cultivation of an obligate acidophilic ammonia oxidizer from a nitrifying acid soil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**(38), 15892-15897.

Leininger, S., Urich, T., Schloter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G.W., Prosser, J.I., Schuster, S.C., and Schleper, C., 2006, Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils, *Nature*, **442**, 806-809.

Martens-Habben, W., Berube, P.M., Urakawa, H., de la Torre, J.R., and Stahl, D.A., 2009, Ammonia oxidation kinetics determine niche separation of nitrifying archaea and bacteria, *Nature*,

**461**, 976-979.

Myrold, D.D., Zeglin, L.H., and Jansson, J.K., 2014, The potential of metagenomics approaches for understanding soil microbial processes, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **78**, 3-10.

Nicol, G.W., Leininger, S., Schleper, C., and Prosser, J.I., 2008, The influence of soil pH on the diversity, abundance and transcriptional activity of ammonia oxidizing archaea and bacteria, *Environ. Microbiol.*, **10**, 2966-2978.

Nicolaisen, M.H., Risgaard-petersen, N., Revsbech, N.P., Reichardt, W., and Ramsing, N.B., 2004, Nitrification-denitrification dynamics and community structure of ammonia oxidizing bacteria in a high yield irrigated Philippine rice field, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**, 359-369.

Norton, J.M. and Stark, J.M., 2011, Regulation and measurement of nitrification in terrestrial systems, *Methods in Enzymol.*, **486**, 343-368.

Offre, P., Prosser, J.I., and Nicol, G.W., 2009, Growth of ammonia-oxidizing archaea in soil microcosms is inhibited by acetylene, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **70**, 99-108.

Okano, Y., Hristova, K.R., Leutenegger, C.M., Jackson, L.E., Denison, R.F., and Gebreyesus, B., 2004, Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 1008-1016.

Phongpan, S. and Mosier, A.R., 2003, Effect of crop residue management on nitrogen dynamics and balance in a lowland rice cropping system, *Nutr. Cycl. Agroecosys.*, **66**, 133-142.

Rust, C.M., Aelion, C.M., and Flora, J.R.V., 2000, Control of pH during denitrification in sub-surface sediment microcosms using encapsulated phosphate buffer, *Water Res.*, **34**(5), 1447-1454.

Schleper, C. and Nicol, G.W., 2010, Ammonia-oxidising archaea - physiology, ecology and evolution, In: R.K. Poole (ed.), *Advances in Microbial Physiology*, vol. 57, Academic Press Ltd-Elsevier Science Ltd, London, p. 1-41.

Shen, J.P., Zhang, L.M., Zhu, Y.G., Zhang, J.B., and He, J.Z., 2008, Abundance and composition of ammonia-oxidizing bacteria and ammonia-oxidizing archaea communities of an alkaline sandy loam, *Environ. Microbiol.*, **10**, 1601-1611.

Taylor, A.E., Vajjala, N., Giguere, A.T., Gitelman, A.I., Arp, D.J., Myrold, D.D., Saya-vedra-Soto, L., and Bottomley, P.J., 2013, Use of aliphatic n-alkynes to discriminate soil nitrification activities of ammonia-oxidizing thaumarchaea and bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, **79**, 6544-6551.

Taylor, A.E., Zeglin, L.H., Wanzek, T.A., Myrold, D.D., and Bottomley, P.J., 2012, Dynamics of ammonia-oxidizing archaea and bacteria populations and contributions to soil nitrification potentials, *ISME J.*, **6**, 2024-2032.

- Tourna, M., Stieglmeier, M., Spang, A., Könneke, M., Schintlmeister, A., Urich, T., Engel, M., Schlöter, M., Wagner, M., Richter, A., and Schleper, C., 2011, *Nitrososphaera viennensis*, an ammonia oxidizing archaeon from soil, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **108**, 8420-8425.
- Treusch, A., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, Sc.R., Klenk, H.P., and Schleper, C., 2005, Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling, *Environ. Microbiol.*, **7**, 1985-1995.
- Wessen E., Soderstrom, M., Stenberg, M., Bru, D., Hellman, M., Welsh, A., Thomsen, F., Klemmedtson, L., Philippot, L., and Hallin, S., 2011, Spatial distribution of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across a 44-hectare farm related to ecosystem functioning, *ISME J.*, **5**, 1213-1225.
- Wang, Y., Ke, X., Wu, L., and Lu, Y., 2009, Community composition of ammonia-oxidizing bacteria and archaea in rice field soil as affected by nitrogen fertilization, *Syst. Appl. Microbiol.*, **32**, 27-36.
- Zhang, L.-M., Offre, P.R., He, J.-Z., Verhamme, D.T., Nicol, G.W., and Prosser, J.I., 2010, Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 17240-17245.