



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0117990
(43) 공개일자 2014년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/02 (2006.01) *G01N 33/497* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0033049
(22) 출원일자 2013년03월27일
심사청구일자 2013년03월27일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김필주
경남 진주시 내동로348번길 10, 101동 501호 (가좌동, 주공그린빌아파트)
(74) 대리인
한윤호, 양기혁, 이인행, 김남식

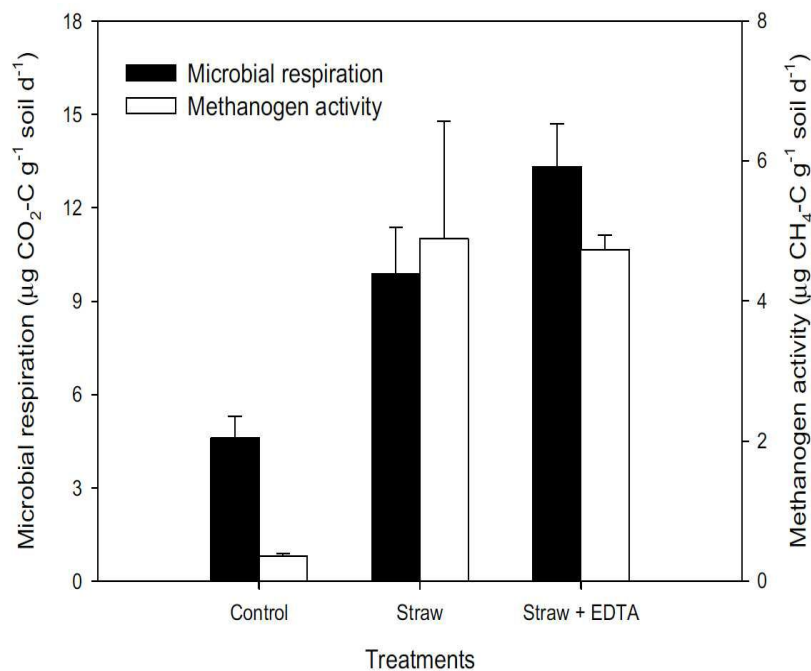
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 혐기성 및 호기성 미생물 활성을 이용한 토양 미생물 생체량 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 논토양과 같이 혐기상태의 토양 내 미생물 총량을 측정하는 방법을 제공하기 위하여, 혐기성 미생물의 활성 및 호기성 미생물의 활성을 지표로 이용하여, 논토양 내 미생물 총량을 측정하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009087

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린21사업(시스템합성농생명공학)

연구과제명 대사공학을 이용한 메탄(CH₄) 가스 발생량 조절기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

논토양과 같이 혐기상태 토양의 메탄생성균 활성 및 기질유도 호흡량을 측정하는 단계; 및

메탄생성균 활성을 제1독립변수 및 기질유도 호흡량을 제2독립변수로 하여 작성된 다중회귀분석 방정식에 상기 측정된 메탄생성균 활성 및 기질유도 호흡량을 대입하는 단계를 포함하는 논토양내 미생물 생체량(microbial biomass)을 측정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 다중회귀분석 방정식은 하기 수학식 5인, 방법:

[수학식 5]

$$MBC = k_{cf}(1.956x_1 + 0.710x_2 + 10.192)$$

(상기 식에서 MBC는 미생물 생체량이고, k_{cf} 는 보정상수로서 2.142 ± 0.337 의 수치이며, x_1 은 메탄생성균 활성(methanogen activity, MA)으로 $\mu\text{g CH}_4\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 의 단위를 갖고, x_2 는 기질유도 호흡량(substrate induced respiration, SIR)으로서 $\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 의 단위를 갖는다.)

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 메탄생성균 활성 및 기질유도 호흡량은 토양 내 탄소 손실량을 통해 측정되는, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 탄소 손실량은 하기 수학식 2를 이용하여 측정되는, 방법:

[수학식 2]

$$\text{탄소 손실량} = [MA \times (12/16)] + [SIR \times (12/44)]$$

상기 수학식 2에 있어서, MA는 호기성 미생물인 메탄 생성균의 활성으로 $\mu\text{g CH}_4\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 을 의미하며, SIR은 $\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 을 의미한다.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 미생물 생체량은 하기 수학식 3에 의해 측정되는, 방법:

[수학식 3]

$$MBC = 2.605 \times (\text{탄소 손실량}) + 10.192$$

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 토양 내 미생물 생체량 및 미생물 활성 측정 방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 혐기성 및 호기성 미생물 활성을 이용한 미생물 생체량 측정 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 토양질(soil quality)을 관리하기 위한 기초자료로 활용하기 위해서는 정량적인 토양내 미생물 총량 및 이를 통한 토양의 질을 판단할 수 있는 방법이 요구되고 있다. 그러나 현재까지 토양 내 미생물 활성은 대부분 미생물의 이산화탄소 호흡량을 측정하여 산정하고 있다.

[0003] 예를 들어, SIR(substrate-induced respiration) 방법은 탄소 유사 재질을 첨가한 후, 토양 내 미생물의 호흡량을 측정하는 방법으로 이용되었는데(Anderson and Domsch, 1978), 단당류는 SIR(substrate-induced respiration)을 결정하는데 이용되는 가장 일반적인 기질로(Wardle, D.A., *et al.*, *Soil Biology and Biochemistry*, 22, 825-834, 1990; Lin, Q., *et al.*, *Soil Biology and Biochemistry* 31, 1969-1983, 1999), 배양 기간 중에 발생한 CO₂ flush (μl g⁻¹ 토양)를 Anderson 및 Domsch의 식을 이용하여 미생물 탄소 함량(microbial biomass c, MBC, μl g⁻¹ 토양)을 계산하는데 이용하였다(Anderson and Domsch, *Soil Biology and Biochemistry* 10, 215-221, 1978): MBC=(40.04 × CO₂) + 0.37). 모든 호기성 및 조건적 호기성 미생물이 호흡과정의 최종 산물로 이산화탄소를 생산하기 때문에, 상기 계산식은 밭 토양(upland soil)과 같이 호기적 상태의 토양에 있어서, MBC와 SIR의 관계를 나타내는데 유용하다.

[0004] 반면, 논토양과 같이 혐기상태 토양에서는 메탄을 생산하는 미생물이 다량 존재하기 때문에 이상의 방법으로 단순 이산화탄소 호흡량만으로 미생물 활성을 평가하는 것은 많은 오차를 가져올 수 있다. 메탄 생성균은 최종 산물로 CH₄, 메탄만을 생성하는 제한된 대사과정을 가지고 있는 혐기성 고세균의 일종이므로, 상기의 호기적 상태의 토양 내 미생물 총량을 계산하는 식을 이용하여 논토양과 같이 혐기상태 토양 내의 SIR로부터 미생물 생체량(MBC)를 측정하는 방법이 적절한지의 확인이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나 이러한 종래의 토양 내 미생물 함량을 측정하는 방법은 주로 호기성 미생물의 작용을 기준으로 측정하였으며, 이러한 방법은 논토양과 같은 혐기성 미생물과 호기성 미생물이 함께 존재하는 침수 토양에는 적용되기 어려운 문제가 있었다.

[0006] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 혐기성 및 호기성 미생물 활성을 이용한 미생물 생체량 측정 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 관점에 따르면, 논토양의 메탄생성균 활성 및 기질유도 호흡량을 측정하는 단계; 메탄생성균 활성을 제1독립변수 및 기질유도 호흡량을 제2독립변수로 하여 작성된 다중회귀분석 방정식에 상기 측정된 메탄생성균 활성 및 기질유도 호흡량을 대입하는 단계를 포함하는 논토양내 미생물 생체량(microbail biomass)을 측정하는 방법이 제공된다.

[0008] 상기 방법에 있어서, 상기 다중회귀분석 방정식은 하기 수학적 5일 수 있다:

[0009] [수학적 5]

$$MBC = k_{cf}(1.956x_1 + 0.710x_2 + 10.192)$$

[0010] 상기 식에서 MBC는 미생물 생체량이고, k_{cf}는 보정상수로서 2.142 ± 0.337의 수치이며, x₁은 메탄생성균 활성(methanogen activity, MA)으로 μg CH₄-C · g⁻¹ 토양 · 시간⁻¹의 단위를 갖고, x₂는 기질유도 호흡량(substrate induced respiration, SIR)으로서 μg CO₂-C · g⁻¹ 토양 · 시간⁻¹의 단위를 갖는다.

- [0012] 상기 방법에 있어서, 상기 메탄생성균 활성 및 기질유도 호흡량은 토양 내 탄소 손실량을 통해 측정될 수 있다.
- [0013] 상기 탄소 손실량은 하기 수학적 2를 이용하여 측정될 수 있다:
- [0014] [수학적 2]

[0015]
$$\text{탄소 손실량} = [MA \times (12/16)] + [SIR \times (12/44)]$$

- [0016] 상기 식에서, MA는 호기성 미생물인 메탄 생성균의 활성으로 $\mu\text{g CH}_4\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 을 의미하며, SIR은 $\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 을 의미한다.
- [0017] 상기 방법에 있어서, 상기 다중회귀분석 방정식은 하기 수학적 3일 수 있다:
- [0018] [수학적 3]

[0019]
$$MBC = 2.605 \times (\text{탄소 손실량}) + 10.192$$

- [0020] 상기 수학적 3에 있어서, 상기 탄소 손실량은 수학적 2를 이용하여 계산된다.
- [0021] 본 발명자는 논토양과 같은 침습 토양의 경우 호기성 미생물의 호흡량만으로는 미생물 총량을 계산하는 것이 오류가 있음을 입증하였다. 또한, 벼 재배 논토양으로부터 실측한 미생물 총량과 본 발명에 의하여 도출된 상기 수학적 5의 혐기성 및 호기성 미생물의 호흡량을 지표로 이용하여 계산된 미생물 총량을 비교하여, 보정률(k_{cf})을 계산함으로써, 상기 수학적 5를 통하여 논토양 내 미생물 총량 측정에 적용할 수 있음을 입증하였다.

발명의 효과

- [0022] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 논토양과 같은 침습 토양내 전체 미생물의 총량을 효과적으로 측정할 수 있어, 효과적으로 토양을 관리할 수 있는 지표를 제공할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 벼 재배시 발생하는 메탄 가스를 측정한 결과로, 벧짚 또는 벧짚+EDTA를 처리하고, 90일 동안 관찰한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 벼 재배에 따른 토양 내 전체 미생물의 수 및 메탄생성균의 수를 PLFA 및 coenzyme M의 농도를 통하여 분석한 결과로서, 벼 이앙 후 20일 째 토양을 채취하여 분석한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 벼 재배에 따른 토양 내 메탄생성균의 활성(도 3a) 및 미생물 호흡량(도 3b)을 토양으로부터 방출되는 메탄가스 및 이산화탄소를 통하여 분석한 결과로서, 벼 이앙 후 20, 40 및 60일째 토양을 채취하여 분석한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 벼 재배에 따른 토양 내 탄소 함량(도 4a) 및 유기물의 무기화 정도(도 4b)를 분석한 결과로서, 벼 이앙 후 20, 40 및 60일째 토양을 채취하여 분석한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 벼논에서 토양 내 미생물체내 탄소량(microbial biomass C)과 미생물의 활성, 그리고 미생물체내 탄소량과 전체 탄소의 손실량 간의 관계를 분석한 결과로서, 벼 이앙 후 20, 40 및 60일째 토양을 채취하여 분석한 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 벼 재배에 따른 메탄생성균의 활성 및 미생물 호흡량을 측정한 결과를 비교한 그래프로, 벼 이앙 후 80일째 토양을 채취하여 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 문서에서 사용되는 용어를 정의하면 하기와 같다.
- [0025] 본 문서에서 사용되는 “논토양(paddy soil)”은 연간 적어도 3~4개월은 담수상태에 있으며, 지하수위가 높은 경우가 많아 관개수와 지하수의 영향을 강하게 받아 밭 토양과는 현저하게 다른 특징을 가진다고 알려져 있다. 또한, 밭토양(upland soil)과 달리 메탄생성균과 같은 혐기성 미생물이 침수된 논토양내에 다수 존재한다는 것

이 알려져 있다.

[0026] 본 문서에서 사용되는 “무기화(mineralization)”는 토양 내 존재하는 유기기질의 무기화를 의미하는 것으로, 작물의 재배 및 성장에 필요한 가용영양분을 조절하는데 중요한 역할을 하며, 미생물 생체량은 이러한 무기화 정도를 결정짓는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

[0027] 본 문서에서 사용되는 “메탄생성균 활성(methanogen activity, MA)”는 토양 내 존재하는 메탄생성균의 활성을 의미하는 것으로, 본 문서에서는 시간당 측정에 이용된 토양을 기준으로 발생한 메탄가스의 양($\text{CH}_4\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 의 단위)로 나타냈으며, 이는 시간당, 토양 중량 대비 CH_4 발생량에 대하여 $0.75(=12/16)$ 을 곱해서 $\text{CH}_4\text{-C}$ 로 환산하였다.

[0028] 본 문서에서 사용되는 “기질유도 호흡량(substrate induced respiration, SIR)”은 글루코오스, 글루탐산, 마니톨 및 아미노산 등의 기질을 첨가한 후 이산화탄소 생성 또는 산소 소비량 측정을 통하여 토양 내 미생물 활성을 정량화에 이용되는 방법이다. 본 문서에서는 시간당 측정에 이용된 토양을 기준으로 발생한 이산화탄소의 양($\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 의 단위)로 나타냈으며, 이는 시간당, 토양 중량 대비 CH_4 발생량에 대하여 $0.75(=12/16)$ 을 곱해서 $\text{CO}_2\text{-C}$ 로 환산하였다.

[0029] 본 문서에서 사용되는 “토양 내 미생물 호흡량(Soil microbial respiration, SMR)은 현재 토양 내 미생물 자체의 호흡량을 의미한다.

[0030] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예 및 실험예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예 및 실험예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0031] 실시예 1: 벼 재배

[0032] 경남 진주 경상대학교 농장의 일반적 벼논에서 토양을 채취하여 자연건조 후 4mm 이하로 사분하여 벼 재배용 Pot(1/2000a 크기의 Wagner Pot)를 제작에 이용하였다. 공시품종으로는 중만생종의 동진벼를 선발하였다. 표준 상토조건에서 파종 후 3주가 경과한 건강한 묘를 선발하여 Pot 당 3개씩 손 이앙하였으며, 농진청의 벼 재배 표준관리법에 따라 약 90일 간 재배하였다. 벼 재배과정 중 벼짚과 EDTA 처리효과를 조사하기 위해 비교구(무처리구), 벼짚 처리구(1.77 g kg^{-1} 토양), 벼짚(1.77 g kg^{-1} 토양)과 EDTA(0.073 g kg^{-1} 토양) 혼용 처리구 설치하였다. 이때 벼짚과 EDTA는 벼 이앙 하루 전에 전량 처리하였다. 그리고 모든 처리구는 농진청 추천시비 기준에 따라 동일하게 시비관리($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}=90\text{-}45\text{-}57\text{kg ha}^{-1}$ 토양)하였다.

[0033] 실험예 1: 메탄 생성량 측정

[0034] 상기 실시예 1의 비교구, 벼짚 처리구, 및 벼짚과 EDTA 혼용 처리구를 약 90일 동안 재배하는 과정 중 간역폐쇄 정태법(Static Chamber Method)으로 매주 1회씩 메탄 배출량을 조사하였다.

[0035] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 벼 재배 전 기간 중 비교구에 비해 벼짚 처리구에서 메탄배출량이 크게 증가하였으며, 벼짚 처리구에 유기성 착화합물 EDTA 처리를 함으로써 메탄 배출량이 크게 감소하는 것을 볼 수 있었다(도 1 참조). 상기 대조군은 벼짚, EDTA 및 화학비료의 살포 없이 일반 토양에서 재배한 벼를 의미한다

[0036] 실험예 2: 토양내 메탄생성균의 활성 측정

[0037] 상기 실시예 1의 비교구, 벼짚 처리구, 및 벼짚과 EDTA 혼용 처리구를 벼 이앙 후 20일 제 각 처리구의 표층에서 토양 시료를 채취하여 토양 내에 존재하는 지방산 함량(PLFA: phospholipid fatty acids) 및 coenzyme M 농도 분석을 통해 전체 미생물 생체량과 및 메탄생성균의 수를 계산하였다. 이때, 벼짚과 벼짚 + EDTA는 이앙 하루 전에 토양에 혼합 처리하였다. 그리고 화학비료는 농촌진흥청의 작물별 시비처방기준에 따라 처리하였다. 즉 질소 50%, 인산 100%와 칼리 70%는 기비로 이앙 하루 전에 처리하고 표층토(15 cm) 토양과 완전 혼합하였다. 벼 이앙 15일 경과 후 20%의 질소를 토양표면에 추비로 살포하였으며, 나머지 질소와 칼리 30%를 이삭거름으로 이앙 50일 경과 후 표면에 살포처리하였다.

[0038] 인지질(phospholipid)은 모든 미생물의 세포막에 존재하며, 세포사멸에 따른 디글리세리드(diglyceride)에 의해

서 빠르게 분해된다고 알려져 있다(White, D.C., *et al.*, *Oecologia*, 40, 51-62, 1979). 따라서 PLFA는 토양 내 미생물 활성을 측정하는 바이오 마커(Biomarker)로 이용될 수 있다. Frostegard 및 Baath는 세포당 평균 1.4×10^{-17} mol 박테리아 PLFA가 존재한다는 것을 계산한 바 있다. 16:0 PLFA(palmitic acid)는 토양 내 박테리아 수를 측정하는 바이오 마커로 이용된다(Frostegard, A., Baath, E., *Biol. Fertil. Soils* 22, 59-65, 1996).

[0039]

구체적으로, PLFA 분석은 n-헥산에 의해서 상기 채취한 토양 샘플로부터 지질 분획물을 추출하고, 하기 문헌에 기재된 프로토콜에 따라 PLFA를 분석하였다(Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1954, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917). 그 후, 상기 PLFA 분획물은 실리카 겔 크로마토그래피(SPE DSC-Si silica tube, SUPELCO, 6 ml, 1 g)를 이용하여 분리하고, 약 알칼리성 메틸화에 의해서 에스테르교환(transesterification)하였다(Zelles and Bai, 1993). PLFA의 메틸 에스테르를 추출하고, 연속 고상추출(two consecutive solid phase extraction)로 분리한 후, 실리카모세관 컬럼이 연결된 HP-5가 장착된 가스 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다. 그리고 상기 PLFA를 동정하고 내부 표준물질로 나노데케인(nanodecane)을 기준으로 정량화하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타냈다.

표 1

[0040]

처리구	반복	PLFA 농도 (ng g ⁻¹)	PLFA 농도 (mol g ⁻¹)	세포수
비교구	1	327.93	1.28×10^{-9}	9.1×10^7
	2	347.69	1.36×10^{-9}	9.7×10^7
	3	339.52	1.32×10^{-9}	9.5×10^7
벚꽃	1	575.38	2.24×10^{-9}	1.6×10^8
	2	429.75	1.68×10^{-9}	1.2×10^8
	3	509.41	1.99×10^{-9}	1.4×10^8
벚꽃 + EDTA	1	247.50	9.65×10^{-10}	6.9×10^7
	2	256.63	1.00×10^{-9}	7.1×10^7
	3	329.44	1.28×10^{-9}	9.2×10^7

[0041]

메탄생성균은 탄소 원자를 메탄(CH₄)으로 전환시키는 대사체계를 가진 고세균(Archae)으로, 메탄생성 과정에서 중간 산물로서 Co-M을 생성한다. 메틸화 중간 산물인 Co-M(Coenzyme M)은 토양 내 메탄생성균을 정량화하는 바이오마커로 이용되어 왔으며(Pramanik, P., Kim, P.J., 2012, *Soil Biology and Biochemistry* 55, 140-145), 메탄생성균 내 Co-M의 농도는 세포당 0.30 mol 이라고 알려져 있다.

[0042]

구체적으로 토양 샘플을 용해 버퍼[100 mM Tris-HCl solution (pH 8.0), 100 mM EDTA solution (pH 8.0) and 1.5 M NaCl solution]를 이용하여 균질화하였으며, 이때 토양 샘플과 버퍼는 1:2(w/v)의 비율로 혼합하고 2분 동안 초음파 분쇄를 수행하였다. 상기 초음파 분쇄는 1분 분쇄 후, 10초간 볼텍싱(vortexing)한 후, 다시 1분 동안 분쇄하여 수행되었다. 그 후, 토양 현탁액을 10분 동안 4,000 rpm에서 원심분리하고, 상층액에 80% 에탄올 수용액이 되도록 에탄올을 첨가하였다. 상기 용액 혼합물은 4℃에서 2시간 동안 방치하고, 10분 동안 4,000 rpm에서 원심분리하였다. 그 후, 침전물을 탈이온수에 녹인 후, 270 nm에서 UV 검출기를 이용한 HPLC 분석에 적합한 부피로 희석하였다(Pramanik, P., Kim, P.J., *Soil Biology and Biochemistry* 55, 140-145, 2012). 아세트나이트릴(acetonitrile)과 0.05 M 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid) 용액을 30:70(v/v)을 혼합한 혼합물을 Co-M 정량화를 위한 이동상으로 이용하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타냈다.

표 2

[0043]

처리구	반복	Co-M 농도(nmol g ⁻¹)	Co-M 농도 (fmol g ⁻¹)	세포수
비교구	1	2.608	2607919.8	6.7×10^6

	2	2.688	2688010.9	6.9×10^6
	3	1.976	1976020.6	5.1×10^6
벗짚	1	5.172	5171592.5	1.3×10^7
	2	5.141	5140772.8	1.3×10^7
	3	3.174	3174376.2	8.1×10^6
벗짚 + EDTA	1	3.411	3411461.0	8.7×10^6
	2	3.681	3691483.3	9.4×10^6
	3	4.933	4933098.8	1.3×10^7

[0044] 상기 PLFA 분석 및 Co-M 분석 결과를 종합한 결과를 도 2에 나타냈다. 하기 도 2에 나타난 바와 같이, 비교구에 비해 벗짚 처리에 따라 세균과 메탄생성균의 수가 크게 증가하였으며, 상대적으로 유기착화합물 EDTA 처리는 세균과 메탄생성균의 활성을 저감하는 효과가 있었다. 세균에 대한 메탄 생성균의 비율이 비교구에 비해 벗짚처리에 따라 크게 증가하였으며, EDTA 처리시 세균에 대한 메탄생성균의 비율이 더 큰 폭으로 증가하는 것을 볼 수 있었다.

[0045] 실험예 3: 메탄생성균 활성 및 기질유도 호흡량(SIR) 측정

[0046] 상기 실시예 1의 비교구, 벗짚 처리구, 및 벗짚과 EDTA 혼용 처리구를 벼 이앙 후 20일, 40일, 60일 제 표층토에서 토양을 채취하여 메탄 생성균의 활성과 기질유도 미생물의 호흡량(SIR)을 조사하였다.

[0047] 메탄생성균의 활성을 측정하기 위하여, 상기 채취한 밀폐형 병에서 토양 샘플, 1% 글루코오스 1 ml 용액, 및 증류수 25 ml를 첨가하고 30℃ 혐기성 조건에서 반응시켰다(Pramanik, P., Kim, P.J., *Chemosphere* (DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.07.008)). 그 이후 밀폐형 병의 헤드 스페이스(head space)의 메탄 농도를 측정하고, 메탄생성균 활성도(methanogen activity, MA)를 $\text{CH}_4 \mu\text{g}/\text{건조 토양 중량(g)}/\text{일(day)}$ 로 나타냈다.

[0048] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, MA는 벗짚 및 벗짚 + EDTA와 같이 유기개량제를 처리한 벼 재배용 논토양에서 현저하게 증가하였으며($P \leq 0.05$), MA 수치 및 상기 MA 수치의 기질유도 호흡량(substrate induced respiration, SIR)과의 합계에 대한 상대적인 비율($=\text{MA}/(\text{MA}+\text{SIR})$)은 60일 벼 재배 기간 동안 증가하였다(도 2b 참조). 상기 결과는 벼 재배가 토양 내 메탄생성균의 증식에 유용하며, 이는 벼 뿌리를 통해서 토양으로 삼출되는 몇 가지 유기산 및 탄수화물을 메탄생성균이 메탄 생성을 위한 탄소질의 에너지원으로 이용하기 때문인 것으로 사료되었다(Lu, Y., et al., *Biogeochemistry*, 47, 203-218, 1999; Thauer, R.K., *Microbiology*, 144, 2377-2406, 1998).

[0049] 기질유도 호흡량(substrate induced respiration, SIR)을 측정하기 위하여, 상기 실험예 3에서 채취한 토양 샘플에 1% 글루코오스 용액 1 ml를 첨가하고 30℃에서 5시간 동안 반응시켰으며, 헤드 스페이스(head space)의 이산화탄소 농도는 가스크로마토그래프(gas chromatography)의 TCD 검출기를 이용하여 측정하였다. 토양 샘플의 중량을 기준으로 생성된 이산화탄소 가스의 양을 SIR로 계산하였다.

[0050] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, 상기 토양 내에서 SIR은 벼 재배기간 동안 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며, 벗짚 처리구 및 벗짚 + EDTA와 같이 유기개량제를 비교구에 비해 벗짚 처리구에서 SIR이 크게 증가하였다. 그리고 동일 벗짚처리구에서 유기성 착화합물 EDTA 처리는 SIR을 다소 감소시키는 효과가 있었다.

[0051] 실험예 4: 논토양 내 미생물 탄소 함량 측정

[0052] 상기 실시예 1의 비교구, 벗짚 처리구, 및 벗짚과 EDTA 혼용 처리구를 벼 이앙 후 20일, 40일, 60일 제 표층토에서 토양을 채취하여 토양 내 미생물 생체 탄소량(microbial biomass carbon, MBC)을 CFE 방법에 의하여 측정하였다(Vance et al, *Soil Biology and Biochemistry*, 19, 703-707, 1987). 훈증 추출 방법(fumigation-extraction)을 이용하여, 토양 샘플을 클로로폼(chloroform)을 이용하여 훈증하고, 상기 훈증된 토양으로부터 탄소를 0.5 M K₂S₂O₄ 용액을 이용하여 추출하였다. 이때, 훈증하지 않은 토양을 대조군으로 이용하였다. 훈증 여부에 따른 토양 샘플 내의 탄소의 함량은 토양 내 미생물 총량을 의미하며, 이는 하기 수학적 식 1에 따라 훈증된

토양 내의 탄소량(Cf)으로부터 혼증되지 않은 토양 내의 탄소량(Cnf)를 뺀 수치를 보정계수(Kc)로 나누어 계산하였다. 이때, 보정계수는 하기 문헌에 기재된 바에 따라 농작물 경작 토양에 대한 수치인 0.45를 적용하였다(Wu *et al.*, *Soil Biology and Biochemistry* 22, 1167-1169, 1990).

수학식 1

$$MBC = \frac{(Cf - Cnf)}{Kc}$$

[0053]

[0054]

그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이, 비교구에 비해 볏짚을 처리함에 따라 크게 증가하였으며($P \leq 0.05$), 이러한 경향은 재배기간 의존적으로 증가하였다(도 4a 참조). 그러나 벼 재배기간 중 토양 내의 SIR과 MBC 사이에서는 명확한 관련성이 관찰되지 않았다($r = 0.439$). 이러한 결과는 벼 재배기간 중 논토양내의 MBC 측정에 있어서 밭 토양과 같이 호기적 상태의 토양 내 MBC 측정에 이용되는 Anderson and Domsch(1978)의 식을 이용하여 호기성 미생물의 호흡 데이터만으로 계산하는 것에 오류가 있음을 시사한다.

[0055]

실험예 5: 논토양 내 유기탄소의 무기화 정도 측정

[0056]

상기 실시예 1의 비교구, 볏짚 처리구, 및 볏짚과 EDTA 혼용 처리구를 벼 이앙 후 20일, 40일, 60일 째 표층토에서 토양을 채취하여 토양 내 탄소 손실량 또는 유기탄소의 무기화율(탄소 손실 g/토양 중량(μ g)/일(d))을 하기 수학식 2를 이용하여 계산하였다

수학식 2

$$\text{탄소 손실량} = [MA \times (12/16)] + [SIR \times (12/44)]$$

[0057]

[0058]

그 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이, 비교구에 비해 토양 내 유기질원, 즉 볏짚을 처리함에 따라 유기탄소의 무기화 잠재력이 크게 증가하였다($p \leq 0.05$). 상대적으로 유기착화물을 볏짚과 함께 처리시 벼 재배초기 유기탄소의 무기화율이 크게 감소시키는 효과가 있었으나 약 60일 이후부터는 거의 효과가 없었다. 상기 도 3 및 도 4의 결과를 종합하여 탄소 손실량과 기질유도 미생물성 호흡량(substrate induced microbial respiration, SMR) 및 유기탄소 손실을 간의 관계를 비교하였다(도 5). 클로로포름 혼증법을 통해 조사된 토양 내 미생물 체량(microbial biomass)이 증가함에 따라 기질유도 호흡량(SMR)이 일정하게 증가하는 경향이었으나, 서로 간 통계적 유의성이 확인되지 않았다(도 6a). 상대적으로 토양 내 미생물 체량(microbial biomass)은 호흡을 통한 이산화탄소(CO_2 -C) 발생량과 혐기적 소화를 통한 메탄(CH_4 -C) 발생량의 합으로 나타내는 총 탄소 손실량(total C loss)와는 고도의 정의 상관관계가 있었다($P \leq 0.05$). 결과적으로 벼논과 같이 혐기토양에서는 미생물의 호흡량, 즉 CO_2 발생량만으로 미생물의 양이나 활성을 측정하는 것은 많은 오차를 가져올 수 있기 때문에, 미생물 호흡량(CO_2 발생량)과 메탄발생량의 합으로 평가해야만 미생물 활성도를 정확하게 평가할 수 있었다. 이러한 관계는 하기 수학식 3으로 나타낼 수 있다(도 5 참조).

수학식 3

$$MBC = 2.605 \times (\text{탄소 손실량}) + 10.192$$

[0059]

[0060]

실험예 6: 논토양 내 미생물 총량의 측정 방법 도출

[0061]

상기 수학식 2와 3을 종합하여 하기 수학식 4를 도출하였으며, 이는 논토양 내의 MBC를 측정하는데 유용하게 적용할 수 있을 것으로 예상하였다.

수학식 4

$$MBC=(1.956 \times MA)+(0.710 \times SIR)+10.192$$

상기 수학식 4가 실제 논토양 내의 MBC를 측정할 수 있는지 확인하기 위하여, 본 발명자는 80일 동안 이식하여 버를 재배한 후, 논 토양내의 MA 및 SIR을 측정하였다.

측정된 MA 및 SIR 데이터를 기반으로 MBC를 계산한 결과와 측정된 MBC의 수치를 하기 표 3에 정리하였으며, 미생물 호흡과 메탄생성균 활성에 관한 결과를 도 6에 나타냈다.

표 3의 결과를 종합해보면 보정률(correction factor) ($k_{cf}=2.142 \pm 0.337$)이 상기 수학식 4에 도입되어야 하며, 이를 반영하여 하기 수학식 5가 도출될 수 있음을 알 수 있다. 하기 수학식 5는 벼논과 같이 혐기적 상태의 토양에서 미생물 체량(microbail biomass C, MBC)을 측정하는데 이용될 수 있음을 시사하는 것이다(표 3 및 수학식 5 참조). 하기 수학식 5에서 x1은 메탄생성균 활성(methanogen activity, MA)으로 $\mu\text{g CH}_4\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 의 단위를 갖고, x2는 기질유도 호흡량(substrate induced respiration, SIR)으로서 $\mu\text{g CO}_2\text{-C} \cdot \text{g}^{-1}$ 토양 $\cdot$ 시간 $^{-1}$ 의 단위를 갖는다.

수학식 5

$$MBC=k_{cf}(1.956x1+0.710x2+10.192)$$

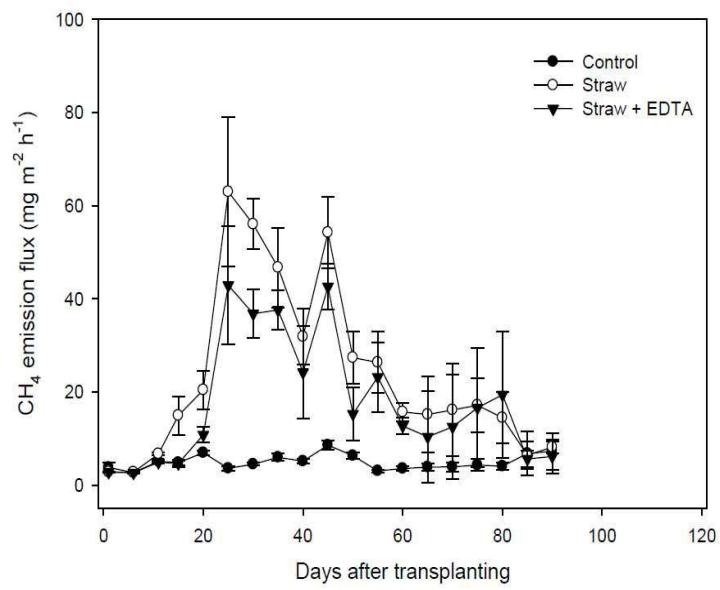
표 3

	반복 회수	메탄 생성균 활 성	미생물 호흡량	미생물 체량 (MBC)		측정된 MBC / 환산된 MBC
				환산된 MBC	측정된 MBC	
대조군	1	0.307	4.019	13.647	27.932	2.01
	2	0.367	4.393	14.029	35.15	2.51
	3	0.383	5.37	14.754	30.402	2.06
벼짚	1	3.356	10.105	23.931	53.315	2.31
	2	6.681	11.254	31.25	62.035	1.99
	3	4.626	8.25	25.097	38.906	1.55
벼짚 + EDTA	1	4.48	12.187	27.607	55.752	2.02
	2	4.804	14.869	30.145	63.892	2.12
	3	4.892	12.913	28.929	78.651	2.72
평균 (measured MBC/ calcaulted MBC)						2.142
표준 편차(measured MBC/ calculated MBC)						0.337

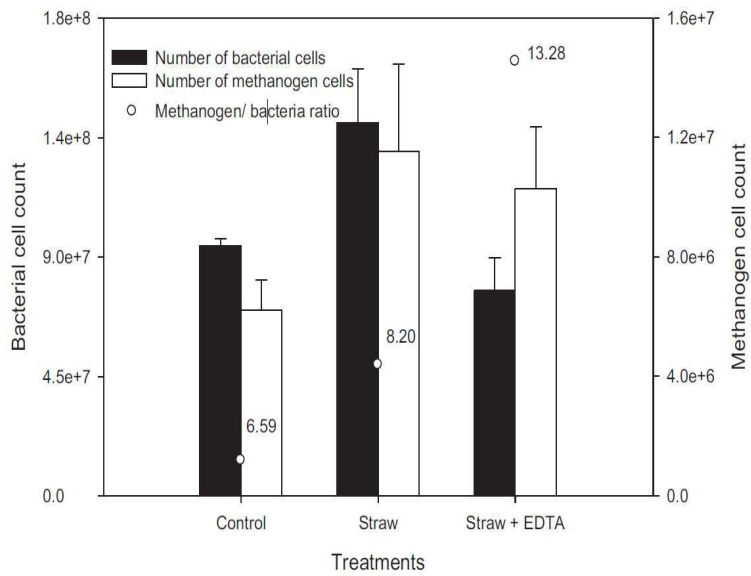
본 발명은 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

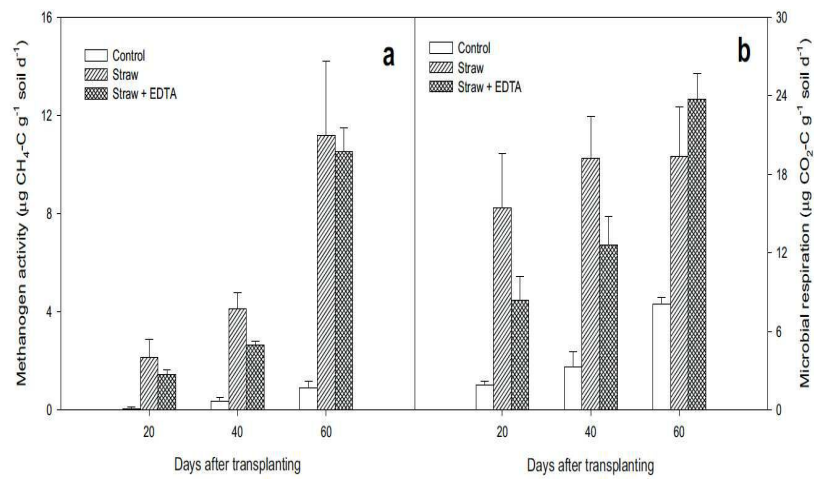
도면1



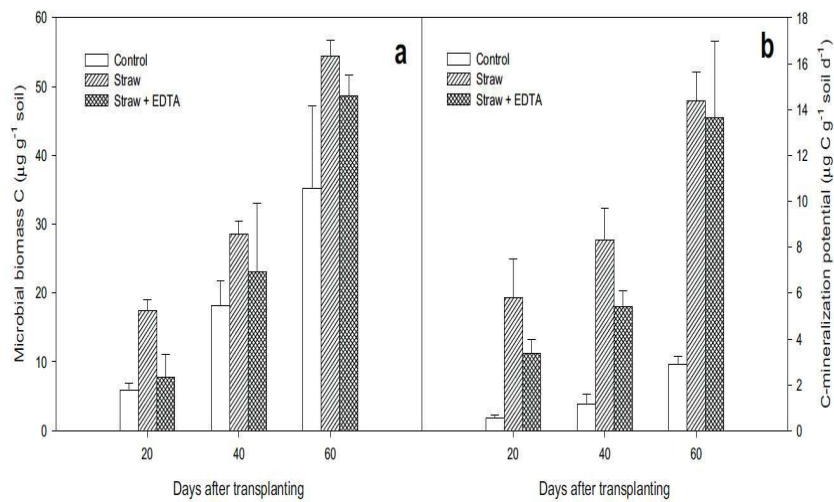
도면2



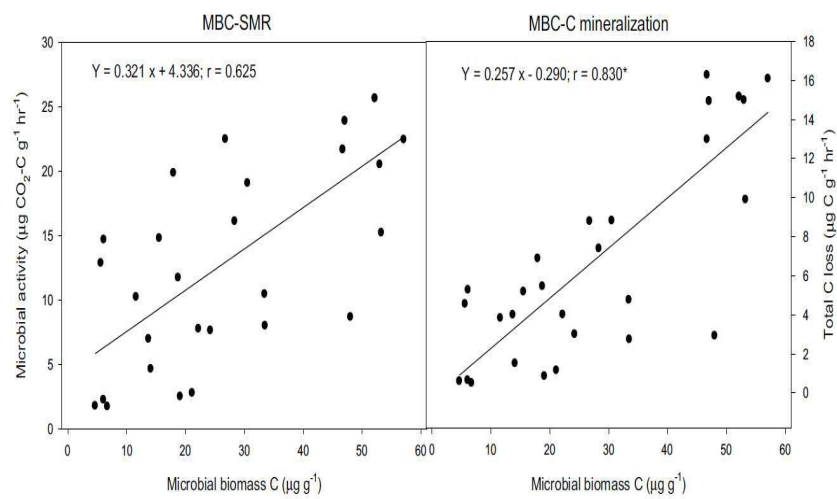
도면3



도면4



도면5



도면6

