

아세트산 칼륨을 활용한 한국 논 토양에서 메탄 생성 미생물 군집 예측

백지현¹, 이평호², 구연종^{1*}

Prediction of Methanogenic Microbial Community in Korean Rice Paddy Soil Using Potassium Acetate

Ji Hyeon Baek ^{1†}, Pyeong Ho Lee ^{2†} and Yeonjong Koo ^{1*}¹전남대학교 농화학과, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 원예특작환경과¹Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea,²Horticultural and Herbal Crop Environment Division, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

* Correspondence: yeonjong@jnu.ac.kr

† These authors were equally contributed.

Abstract: Methane emissions in paddy soils occur through the decomposition of organic matter by anaerobic bacteria, including methanogenic bacteria, under anaerobic conditions maintained by waterlogged soil environments. These methanogenic bacteria produce methane via the acetoclastic pathway or the hydrogenotrophic pathway, making it challenging to determine the primary pathway for methane production. In this study, we supplied potassium acetate (KOAc) instead of additional hydrogen supplements to limit methane production through the hydrogenotrophic pathway, thereby analyzing the conversion of acetate to methane in paddy soils. We investigated the effect of acetate ions on methane production at various concentrations and confirmed methane production upon acetate addition. Furthermore, genetic cluster analysis revealed that Archaea clusters likely respond to acetate ions to produce methane. Soil reaction analysis based on regional soil characteristics revealed significant variations in methane production in response to acetate ions, indicating that methane production pathways in paddy soils may vary regionally.

Keywords: Methane, Methanogenesis, Paddy soil, Potassium acetate<https://doi.org/10.5338/KJEA.2024.43.10>

Korean J. Environ. Agric. 2024, 43, 101-108

Received: March 21, 2024

Revised: April 29, 2024

Accepted: August 31, 2024

Published: September 6, 2024

Online ISSN: 2233-4173

Print ISSN: 1225-3537

Check for
updates

© The Korean Society of Environmental Agriculture 2024



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 언

메탄(CH₄)은 지구온난화의 주범인 온실가스 중 하나로 지구 대기에 존재하는 이산화탄소(CO₂) 다음으로 많이 존재하고 있다[1]. 메탄은 CO₂에 비해 대기에 존재하는 비율은 낮지만, 지구온난화에 미치는 영향을 지수화한 지구온난화지수(global warming potential, GWP)는 이산화탄소 대비 20년 기준 28배, 100년 기준으로는 86배 강력한 물질이다[2]. 인위적인 메탄은 주로 공업 부문에서 화석 연료의 사용으로, 그리고 농업 부문에서 생물학적 반응으로 발생한다[3]. 농업에서의 메탄 배출은

주로 반추동물의 장내 발효, 쓰레기 매립지, 수도작 방식의 논 농사, 폐수의 혐기성 처리 등에서 비롯된다[4]. 농업에서 메탄 배출량이 가장 많은 분야는 축산 분야이며 다음으로는 논 농사가 메탄의 가장 큰 배출원인 것으로 분석된다[1]. 농업 부문 발생 메탄 중 벼를 재배하는 논에서 발생하는 부분은 전세계적으로 8% 수준으로 관측되나 농경지 면적의 50% 이상이 논인 우리나라의 경우 국내 총 메탄 발생량의 약 22%가 벼 재배 과정에서 발생하고 있다[1,5].

메탄이 발생하기에 적합한 혐기성 조건이 갖춰진 벼 재배지는 밭 재배지보다 두 배나 많은 메탄을 배출한다[4,6]. 담수된 논 토양은 산소 공급을 제한하고 혐기성 조건을 유발하여 토양 유기물의 혐기성 발효를 일으켜 메탄을 대기로 방출한다[7]. 논에서 배출되는 메탄의 약 90%는 벼의 특수 조직인 arenchymatous tissue를 통해 대기로 방출되며 벼를 통과하지 못한 경우 폭발성 방출을 일으키거나 물에 녹은 후 확산 과정을 통해 대기로 유입된다[8,9].

생물학적 메탄 발생 과정은 가수분해, 산 생성, 아세트산 생성, 그리고 메탄 생성으로 4단계로 구분하는데[10], 아세트산은 유기물의 혐기성 분해 과정에서 중요한 중간체 및 메탄 생성 전구체로 기여한다[11]. 이 과정에는 가수분해 박테리아, 발효 박테리아, 아세트산 생성 박테리아, 메탄 생성 고세균 4가지 그룹의 미생물이 관여한다[12]. 메탄 생성 고세균이 관여하는 메탄 생성 경로로 아세트산 경로(acetoclastic methanogenesis)와 수소/이산화탄소 경로(hydrogenotrophic methanogenesis)가 주요한 메탄 생산 경로로 알려져 있다[13]. Acetoclastic 경로의 경우 *Methanosarcina*와 *Methanosaeta* 두 속이 주요한 acetoclastic 경로 이용 메탄 생성균으로 알려져 있으며[12,14] 이 미생물들은 acetyl-CoA enzyme을 통해 아세트산을 acetyl-CoA (Acetyl-Coenzyme A, $\text{CH}_3\text{-CO-S-CoA}$)로 활성화한 이후 methyl group은 테트라하이드로메타노프테린(tetrahydromethanopterin, H_4MPT)로 전이하고 carbonyl group은 이산화탄소와 수소로 분리하여 방출한다[11,12]. Hydrogenotrophic 경로에서는 CO_2 가 H_4MPT , 메타노퓨란(methanofuran, MFR), 그리고 2-메르캅토에탄설포네이트(2-mercaptoethanesulfonate, coenzyme M, CoM-SH)과 같은 운반체에 탄소를 결합하여 수소와 coenzyme F_{420} (F_{420}H_2)이 전자공여체로 작용하여 CH_4 로 환원시킨다[15,16]. 따라서 아세트산을 토양에 공급하면 아세트산은 methyl group과 carbonyl group이 각각 acetoclastic 경로와 hydrogenotrophic 경로를 통해 메탄으로 전환된다[17].

본 논문에서는 아세트산 칼륨을 논 토양에 공급하여 토양 내 아세트산을 활용한 메탄 발생 형태를 관측하였다. 아세트산 칼륨을 사용함으로써 추가적인 수소이온의 공급을 제한하고자 하였으며 이를 통해 토양의 acetoclastic 경로를 통한 메탄 생성 능력을 관측하고자 하였으며 또한 acetoclastic 경로에 주로 관여하는 메탄 발생균의 증감도 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

토양 채집

실험을 진행하기 위해 전남대학교에 위치한 논 토양($35^{\circ}10'24.1''\text{N}$ $126^{\circ}53'53.3''\text{E}$) 외에 추가로 전북과 전남지역으로 크게 분류하고 전북지역에서는 완주군($35^{\circ}54'14.4''\text{N}$ $127^{\circ}09'10.9''\text{E}$), 익산시($35^{\circ}54'36.9''\text{N}$ $127^{\circ}00'49.2''\text{E}$), 김제시($35^{\circ}49'32.2''\text{N}$ $126^{\circ}53'31.0''\text{E}$)에서, 그리고 전남지역에서는 해남군의 두 지점($34^{\circ}36'47.6''\text{N}$ $126^{\circ}18'48.9''\text{E}$, $34^{\circ}30'58.2''\text{N}$ $126^{\circ}32'42.9''\text{E}$)와 강진군 한 지점($34^{\circ}37'23.9''\text{N}$ $126^{\circ}46'13.8''\text{E}$)을 선정하였다. 두 지역 모두 10년 이상 매년 벼 농사가 실시된 토양으로 혐기적 토양조건이 잘 형성되어 있고, 특히 전북지역 세 지점의 토양은 우리나라의 곡창지대로 벼농사가 이뤄지는 토양을 대표하며, 전남 해남군의 토양은 적갈색 풍화잔류토(황토)를 기반으로 하는 산화철을 다량 포함하는 점토광물 위주의 토질을 가지는 것으로 알려져 있어 비교군으로 선정하였다[18]. 일반적으로 전북 김제 토양은 중성의 pH를 그리고 황토는 산성의 pH를 가지는 것으로 조사되었다(한국암석학회 발표논문집, 2001). 전남대학교와 지리적으로 가까운 지역으로 담양군의 논 토양($35^{\circ}20'05.1''\text{N}$ $126^{\circ}57'44.2''\text{E}$)도 선정하였다. 각 지점의 논에서 5 m 간격으로 다섯 곳의 논 토양에서 10 cm 깊이의 표토를 주로 채집하였다. 이후 채취한 토양은 -70°C 냉동실에 보관하였다.

논 토양 유래 메탄 포집 및 검출

전남대학교 시험포장에서 채취한 논 토양 20 g을 160 mL의 serum bottle에 넣은 후 증류수로 완전히 포화시켜 담수상태로 만들고 아세트산 칼륨을 0.086 g (20 mM) 또는 0.43 g (100 mM)을 첨가하였다. 이후 메탄 발생의 최적온도인 35°C 인큐베이터에 보관한 뒤 7일 간격으로 3회 serum bottle 공기층 내 메탄 함량을 측정하였다[19]. 또한 전남, 전북지역 간의 메탄 발생량 비교

실험에서는 위와 동일한 방법으로 160 mL의 serum bottle에 20 g의 토양을 넣은 후 아세트산 칼륨을 20 mM 농도로 혼합하고 7일 간격으로 2회 총 14일간 메탄 발생량을 측정 비교하였다. Serum bottle에 포집된 메탄가스는 20 mL 주사기를 사용하여 채취하였고, 감압된 20 mL vial에 주입하여 보관 후 가스 분석을 실시하였다. 메탄가스는 GC-FID (Clarus 680 GC, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)로 정량 분석하였다. GC 검출 조건으로는 HayeSep Q 컬럼을 설치하고 주입구, 컬럼, 검출기 온도를 각각 150°C, 50°C, 300°C로 설정하였다. 기체 이동상으로 수소를, 연소가스로는 에어를 사용하였다.

AS 토양을 사용한 메탄 발생 촉진 실험

전남대학교 시험포장에서 채취한 논 토양에 20 mM의 아세트산 칼륨을 첨가(+KOAc)한 후 3주 동안 배양하여 AS (Activated Soil) 토양을 준비하였다. AS 토양은 아세트산 칼륨의 첨가로 메탄 생성균의 군집이 강화된 토양이다.

박테리아 군집분석

박테리아 군집분석을 위해 아세트산 칼륨을 첨가하고 1주간 배양한 논 토양(+KOAc) 또는 3주간 배양한 serum bottle 내의 토양(AS)을 채취한 뒤, NucleoSpin® 19 soil kit (740780.50, Macherey-Nagel, Düren, Nordrhein-Westfalen, Germany)를 사용하여 gDNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 주형으로 하여 mcrA 유전자 검출을 위해 primer set, mcrA-F (YGGTGTMGDDTTCACMCA RTA)와 mcrA-R (CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT)를 사용하여 1st PCR을 진행하였고 NexteraOverhang_mcrA_F (TCG TCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGYGGTGTMGDDTTCACMCARTA), NexteraOverhang_mcrA_R (GTCTCGTGG GCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT)를 사용하여 2nd PCR을 진행하여 NGS 시퀀싱을 의뢰하였다(마크로젠, 서울, 대한민국)[20].

결과 및 고찰

아세트산 칼륨의 메탄 발생 효과

아세트산은 일부 혐기성 메탄 발생 고세균의 메탄 생합성 원료로 사용된다[12,14]. 아세트산은 *Methanosarcina*와 *Methanosaeta* 등에 의해 methyl group이 acetoclastic 경로로 메탄으로 전환되고 carbonyl group은 이산화탄소와 수소 형태로 방출되어 hydrogenotrophic 경로를 활용하는 세균들에 의해 메탄으로 전환된다. 많은 종류의 다당류들은 토양 미생물에 의해 최종 유기산으로 아세트산을 생성한다. 본 연구에서는 논 토양에서 최종 유기산인 아세트산으로부터 메탄 생성을 관찰하되 아세트산에서 공급되는 수소이온의 양을 제한하고자 아세트산 칼륨을 사용하였고 이를 통해 논 토양에서 Acetoclastic 경로를 통한 메탄 발생 활성을 관측하였다. 아세트산과 아세트산 칼륨은 pKa 값이 4.756(20°C)으로 동일하여 같은 농도의 아세트산 또는 아세트산 칼륨을 공급할 때 같은 농도의 아세트산 음이온이 제공된다. 이러한 가정에 따라 아세트산과 아세트산 칼륨을 각각 20 mM씩 논 토양에 처리하였고 메탄 발생량을 측정한 결과 아세트산(HOAc)을 처리한 토양에서는 처리 후 7일에 7,500 ppm, 14일에 10,600 ppm에 도달하는 반면 아세트산 칼륨(KOAc)를 처리한 토양에서는 처리 후 7일에 1,260 ppm(아세트산 대비 16.8%), 14일에 7,410 ppm(아세트산 대비 70%)이 발생하여 아세트산 대비 메탄 생성량이 낮게 관측되었다(Fig. 1A). 이는 앞서 가정한 수소이온이 추가적으로 공급되지 않아 hydrogenotrophic 경로를 통한 메탄 발생량이 제한되어 감소한 결과로 생각된다. 논 토양에서 아세트산 칼륨 공급으로 생산되는 메탄 발생량을 시간에 따라 측정하면 20 mM의 아세트산 칼륨을 첨가 후 7일, 14일, 21일, 28일이 경과했을 때 메탄이 각각 230 ppm, 450 ppm, 1,310 ppm, 1,790 ppm 측정됐고, 100 mM의 아세트산 칼륨을 첨가했을 때 같은 시점에서 각각 10,170 ppm, 26,400 ppm, 21,700 ppm, 11,000 ppm 발생한 것으로 관측되었다(Fig. 1B). 결과에서 아세트산 칼륨이 20 mM 공급되었을 때 메탄은 28일이 경과할 때까지 비교적 낮은 발생량을 유지하면서 지속적으로 증가하는 것으로 관찰되었지만 아세트산 칼륨을 5배 증가시켜 100 mM이 공급되었을 때는 14일이 경과했을 때 최대 발생량을 보이고, 이후 지속적으로 메탄 발생량이 감소하는 것으로 나타났다. 100 mM의 아세트산 칼륨이 첨가됐을 때에는 메탄 발생량이 20 mM 첨가 대비 14일 기준 60배 이상, 21일 기준에도 15배 이상이 발생하였는데, 이는 공급되는 아세트산이온이 증가함에 따라 메탄 발생량이 증폭되는 효과가 있는 것으로 보인다. 또한 메탄 발생량이 급속히 가속화하는 반면 기질인 아세트산 칼륨이 빠르게 소모되면서 14일 이후 메탄 발생량이 급격히 감소하는 경향을 보인다[21,22].

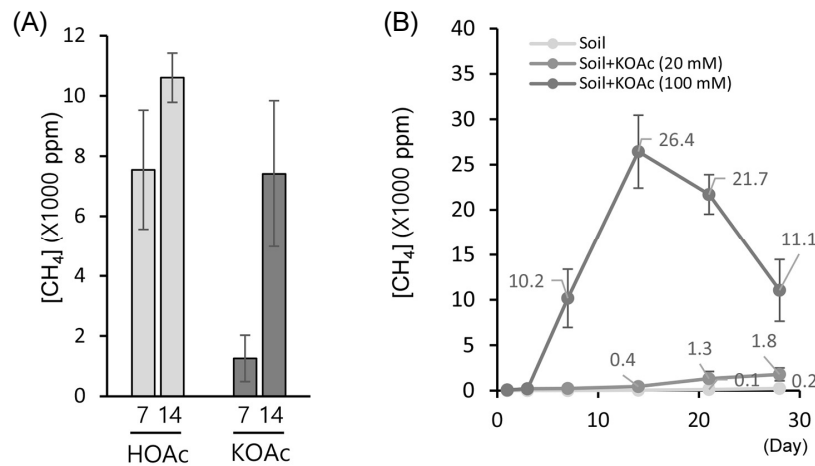


Fig. 1. Trend of methane production in paddy soil by adding potassium acetate.

(A) The methane produced by adding acetic acid (HOAc) or potassium acetate (KOAc) was compared 7 and 14 days after treatment in the paddy soil. (B) Methane was measured every 7 days after the addition of 1% or 5% potassium acetate. All measurements were repeated four times, and the average values are displayed. Error bars indicate the standard deviation.

아세트산염에 의한 메탄 생성 촉진 유도

앞선 실험에서 아세트산 칼륨을 첨가한 토양에서 메탄 발생량은 증가하였고 특히 아세트산 칼륨의 양을 증가시켰을 때는 메탄 발생량이 크게 증폭되는 결과를 확인하였다. 이러한 결과가 acetoclastic 경로를 활용하는 혐기성 고세균의 증가로 인한 것인지 확인하기 위하여 아세트산 칼륨을 첨가하여 3주간 배양한 토양(activation soil, AS)을 제작하고 고세균이 배양된 AS 토양을 10% 포함한 실험구에서 메탄 생성량이 빠르게 촉진될 수 있는지 확인하였다(Fig. 2). 이는 아세트산 칼륨을 첨가한 토양에서 메탄 발생 관련 혐기성 박테리아가 증식되었다면 AS 토양을 배합했을 때 초기의 논 토양보다 더 빠르게 메탄을 생성시킬 수 있을 것이라 가정으로 실험을 설계하였다. 초기 논 토양인 Fresh soil(FS)에 아세트산 칼륨을 첨가 후 4일, 7일, 14일이 경과했을 때 190 ppm, 447 ppm, 1,312 ppm의 메탄이 발생한 데 비해 AS 토양을 10% 첨가했을 경우에는 같은 기간이 경과한 후 781 ppm, 1,496 ppm, 2,641 ppm 수준의 메탄이 발생하여 AS 토양의 메탄 발생 촉진 효과가 확인되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 acetoclastic 경로 활용 메탄 생성 박테리아가 증식된 토양을 이용하여 메탄 생성을 촉진시킬 수 있음을 보여준다[23]. 이와 같은 AS 토양을

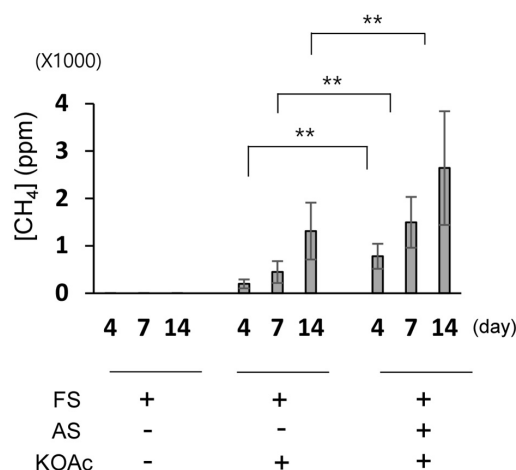


Fig. 2. Comparison of methane production from the soil activated with potassium acetate.

Non-treated paddy soil (FS), the activation soil (AS) treated with potassium acetate (KOAc), and the soil treated solely with KOAc were subjected to assessment for methane production activity. The activation soil was prepared by adding 1% of KOAc into the paddy soil and incubate for 3 weeks. Each measurement was conducted in four times, and the mean value was displayed in the chart. Error bars indicate the standard deviation (SD) of the measurements.

이용한 메탄 발생 촉진 방법은 메탄을 바이오가스로 활용하는 혐기 발효 산업에서 유기물들을 빠르게 메탄으로 전환하기 위한 방법으로 활용될 수 있다. 또한 acetoclastic 경로를 통한 메탄 생성은 혐기성 환경에서 발생하는 메탄의 80%를 차지할 만큼 큰 영향력이 있는 메탄 발생 경로로써 이를 특이적으로 제어하기 위한 방법 개발을 위해 아세트산 칼륨을 적용해 볼 수 있다.

아세트산 칼륨에 의한 메탄 발생 고세균 군집 변화 분석

아세트산 칼륨을 첨가한 전남대학교 내 시험포장 논 토양에서 고세균의 군집 변화를 확인하기 위하여 아세트산 칼륨 첨가 토양과 AS 토양에서 메탄 발생 고세균의 군집을 분석하였다. 메탄 발생 박테리아 분석을 위하여 *mcrA* 유전자의 염기서열 분석 결과 아세트산 칼륨 첨가 후 분류되지 않는 Archaeon이 주로 증가한 것으로 분석되었다(Fig. 3A). Archaeon 군은 아세트산 칼륨을 첨가하지 않은 토양에 비해 약 1.7배 증가하였고 AS 토양에서도 약 30% 증가한 것으로 나타났다. 반면 Methanogenic 군과 soil bacteria 군은 아세트산 칼륨 첨가 후 50% 수준으로 감소한 것으로 나타났으며 AS 토양에서는 대체로 군체 수가 회복되었다(Fig. 3A). 이러한 결과는 Archaeon 군집에는 acetoclastic 경로를 이용해 메탄을 발생시킬 수 있는 고세균이 포함되어 있는 것으로 해당 논 토양에서 아세트산 칼륨 첨가로 발생하는 메탄의 생성에 Archaeon이 역할하고 있음을 의미한다. 한편 acetoclastic 경로를 이용하는 것으로 알려진 메탄 생성 군집인 *Methanosarcinaceae*와 *Methanosaetaceae*의 경우 실험 토양에서는 매우 적은 군체 수를 나타내어 유의미한 분석이 어려웠다. 이러한 결과는 기존에 알려진 acetoclastic 경로 활용 메탄 생성균 외에 다른 종류의 고세균이 분석된 논 토양의 주요 메탄 발생균으로 역할하고 있음을 보여준다[24,25]. 군집분석에 사용된 시료의 유사성을 분석하기 위해 Bray-Curtis 방법으로 PCoA 분석을 실시하였고 무처리 논 토양과 아세트산 칼륨 처리 토양은 서로 다른 집단으로 명확히 구별되었으며 AS 토양은 무처리군과 아세트산 칼륨 처리 토양의 중간적 성질에 위치하여 유의한 군집분석이 이뤄졌음을 보여주었다(Fig. 3B).

전라도 지역 논 토양의 아세트산 활용 메탄 발생 활성 확인

아세트산 칼륨을 활용한 수소이온 공급이 제한된 조건에서 메탄 발생량의 차이를 지역별로 확인하기 위하여 전북과 전남의 논 토양을 채집하여 토양의 메탄 발생균 군집을 분석하고 메탄 발생량을 측정하였다(Fig. 4). 메탄 발생균 군집분석에서 전남지역 세 곳 해남군1, 해남군2, 강진군은 전북지역 세 곳 김제시, 익산시, 완주군에 비해 매우 높은 군체 수의 Archaeon이 검출되었다

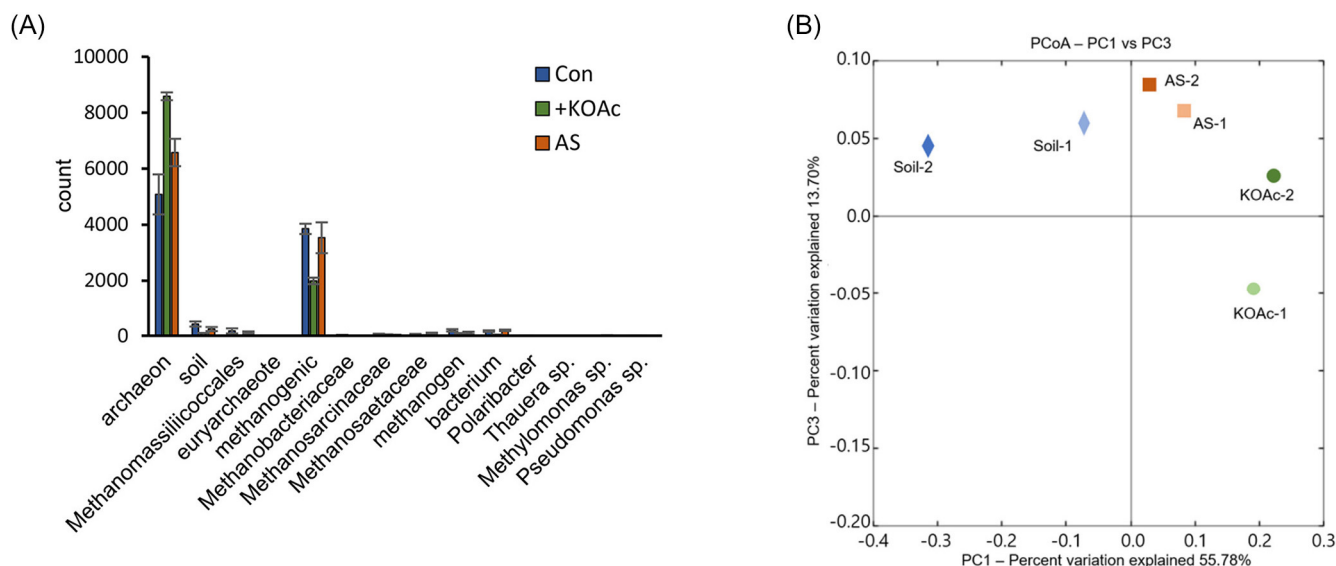


Fig. 3. Methanogen analysis activated by potassium acetate.

(A) To predict the methane generation pathway, the distribution of methanogen archaea in soil treated with potassium acetate (KOAc) and activated soil (AS) was compared with non-treated paddy soil (Soil). The population of methanogens, including various Archaea, was indicated by the count numbers detected through NGS sequencing of the *mcrA* gene. The error bar represents the standard deviation of duplicate sequencing results. (B) The similarity between samples in the metagenome analysis results was calculated using PCoA analysis and visualized as a distance matrix.

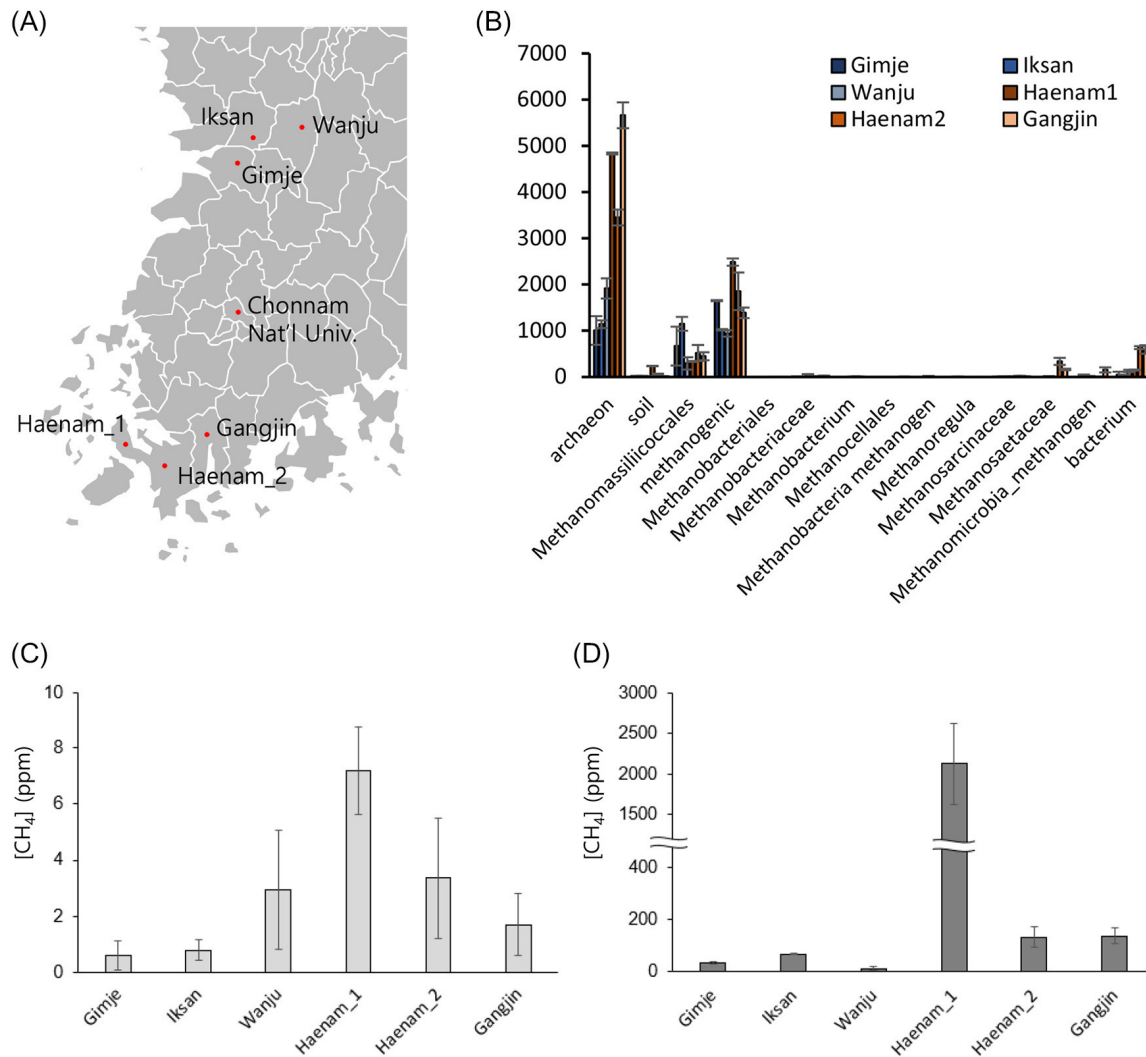


Fig. 4. Comparison of methane production in the various region of paddy soils.

(A) The paddy soil sampling area is indicated on the map of the southern region of South Korea, which is a major rice cropping area. (B) The distribution and abundance of methanogenic archaea in the sampling area were compared. (C) The amount of methane generated from the paddy soils sampled regionally was compared. (D) The comparison of methane production was conducted after adding 1% of potassium acetate to the regional paddy soils. The collected soils were incubated for 14 days in gas-tight serum bottles, and the methane concentration in the headspace of the bottles was measured. All measurements were repeated five times, and the average values are reported. The error bars represent the standard deviation of the measurements.

(Fig. 4B). 해남군 두 지역은 methanogenic 군집에서도 상대적으로 높은 균체수를 나타내었고 해남군2와 강진군에서 *Methanosarcinaceae*와 *Bacterium* 군집의 균체 수가 상대적으로 높게 측정되었다. 전북지역 김제시는 *methanogenic* 군에서 익산시는 *Methanomassiliococcales* 군에서 다소 높은 균체 수를 가지는 것으로 분석되었다. 한편 해당 지역에서 메탄 발생량을 측정한 결과 전북지역 세 곳 김제시(0.6 ppm), 익산시(0.8 ppm), 완주군(3.0 ppm)은 대체로 전남지역인 해남군(7.0 ppm, 3.0 ppm), 강진군(1.7 ppm)에 비해 상대적으로 낮은 메탄 발생량을 나타냈으며(Fig. 4C), 아세트산 칼륨을 첨가했을 때 메탄 발생량은 더욱 큰 차이를 나타내어 완주군(12 ppm), 익산시(67 ppm), 김제시(34 ppm)에 비해 해남군1(2100 ppm), 해남군2(130 ppm), 강진군(140 ppm) 등 전남지역 논 토양에서 아세트산 칼륨에 대한 높은 메탄 발생 반응성을 관찰할 수 있었다(Fig. 4D). 전남지역 토양에서 대체로 높은 Archaeon 균체 수가 발견되고 이 지역의 토양에서 아세트산 칼륨에 대한 높은 메탄 전환 활성이 관찰되는 결과는 전남대학교 시험포장 토양을 이용한 아세트산 칼륨 첨가로 증가하는 Archaeon 균체 수 결과와 일치하는 것으로 생각된다(Figs. 3A, 4B~4D). 추가적으로 해남군1 지점의 경우 아세트산 칼륨 첨가 후 메탄 발생량이 폭발적으로 증가한 것을 볼 수 있는데 이는 해당 지점의 토양이 Archaeon 군과 methanogenic 군 모두에서 가장 높은 수준의 균체 수를 나타내기 때문으로 생각된다. 단지 해남군2

와 강진군의 토양은 비슷한 수준의 아세트산 칼륨에 대한 메탄 전환 활성을 나타내지만(Fig. 4D) Archaeon 군체 수에서 해남군2 지점이 강진군 지점에 비해 낮게 측정되는데(Fig. 4B) 이러한 결과는 Archaeon 군집 내의 고세균 종에 따라 메탄 생성 효율이 다소 상이하게 나타날 수 있음을 예측케 하며 이를 확인하기 위한 추가 연구가 요구된다.

본 연구에서는 아세트산 칼륨의 논 토양에서의 메탄 발생 촉진 효과를 검증하였다. 아세트산 칼륨은 아세트산과 유사하게 메탄 발생을 촉진시킬 수 있으나 메탄 발생 활성 면에서 다소 느린 전환 활성을 보이는데 이는 아세트산과 달리 아세트산 칼륨이 수소이온의 공급이 제한되기 때문으로 해석하였다. 아세트산 칼륨은 아세트산과 마찬가지로 acetoclastic 경로를 통한 메탄 기질로 사용될 수 있으므로 아세트산 칼륨을 활용해 토양 내에서 주로 acetoclastic 경로를 이용해 메탄을 발생시키는 박테리아 군집을 예측하였다. 아세트산 칼륨은 메탄 생성 고세균 중에서도 Archaeon 군집을 특히 발달시켰고, 한국 전라도 지역의 논 토양에서 Archaeon 군집이 특히 발달한 전남지역의 세 지점의 토양에서 아세트산 칼륨에 대한 높은 메탄 생산율을 확인하였다. 이와 같은 결과는 지역 토양의 미생물 환경에 대한 이해를 높일 수 있는 데이터를 제공한다.

Data Availability: All data are available in the main text or in the Supplementary Information.

Author Contributions: J.-H. Baek and P.-H. Lee carried out the experiment and wrote the primary manuscript. Y. Koo designed and conducted the experiment and edited the manuscript.

Notes: The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgment: YK received funding from Technology development Program (RS-2023-00221754) funded by the Ministry of SMEs and Startups (MSS, Korea) and Regional Innovation Strategy (RIS) through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (MOE) (2021RIS-002). PHL received funding from Rural Development Administration of Republic of Korea (PJ01431804).

Additional Information:

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.5338/KJEA.2024.43.10>

Correspondence and requests for materials should be addressed to Yeonjong Koo.

Peer review information Korean Journal of Environmental Agriculture thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work.

Reprints and permissions information is available at <http://www.korseaj.org>

References

1. Saunio M, Bousquet P, Poulter B, Peregon A, Ciais P, Canadell JG, Dlugokencky EJ, Etiope G, Bastviken D et al. (2016) The global methane budget: 2000–2012. *Earth System Science Data Discussions*, 2016, 1–79. <https://doi.org/10.5194/essd-8-697-2016>.
2. Wang J, Ciais P, Smith P, Yan X, Kuzyakov Y, Liu S, Li T, Zou J (2023) The role of rice cultivation in changes in atmospheric methane concentration and the Global Methane Pledge. *Global Change Biology*, 29(10), 2776–2789. <https://doi.org/10.1111/gcb.16631>.
3. Jackson RB, Saunio M, Bousquet P, Canadell JG, Poulter B, Stavert AR, Bergamaschi P, Niwa Y, Segers A et al. (2020) Increasing anthropogenic methane emissions arise equally from agricultural and fossil fuel sources. *Environmental Research Letters*, 15(7), 071002. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab9ed2>.
4. Smith P, Reay D, Smith J (2021) Agricultural methane emissions and the potential for mitigation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, 379(2210), 20200451. <https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0451>.
5. Gwon HS, Choi EJ, Lee SI, Lee HS, Lee JM, Kang SS (2022) Research review of methane emissions from Korean rice paddies. *Journal of Climate Change Research*, 13(1), 117–134. <https://doi.org/10.15531/KSCCR.2022.13.1.117>.
6. Qian H, Zhu X, Huang S, Linquist B, Kuzyakov Y, Wassmann R, Minamikawa K, Martinez-Eixarch M, Yan X et al. (2023) Greenhouse gas emissions and mitigation in rice agriculture. *Nature Reviews Earth & Environment*, 4(10), 716–732. <https://doi.org/10.1038/s43017-023-00482-1>.

7. Nan Q, Xin L, Qin Y, Waqas M, Wu W (2021) Exploring long-term effects of biochar on mitigating methane emissions from paddy soil: A review. *Biochar*, 3(2), 125-134. <https://doi.org/10.1007/s42773-021-00096-0>.
8. de Bont JAM, Lee KK, Bouldin DF (1978) Bacterial oxidation of methane in a rice paddy. *Ecological Bulletins*, 26, 91-96.
9. Horz HP, Yimga MT, Liesack W (2001) Detection of methanotroph diversity on roots of submerged rice plants by molecular retrieval of *pmoA*, *mmoX*, *mxsF*, and 16S rRNA and ribosomal DNA, including *pmoA*-based terminal restriction fragment length polymorphism profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4177-4185. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.4177-4185.2001>.
10. Singh R, Paritosh K, Pareek N, Vivekanand V (2022) Integrated system of anaerobic digestion and pyrolysis for valorization of agricultural and food waste towards circular bioeconomy. *Bioresource Technology*, 360, 127596. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127596>.
11. Yang Z, Sun H, Zhao Q, Kurbonova M, Zhang R, Liu G, Wang W (2020) Long-term evaluation of bioaugmentation to alleviate ammonia inhibition during anaerobic digestion: process monitoring, microbial community response, and methanogenic pathway modeling. *Chemical Engineering Journal*, 399, 125765. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125765>.
12. Wang HZ, Gou M, Yi Y, Xia ZY, Tang YQ (2018) Identification of novel potential acetate-oxidizing bacteria in an acetate-fed methanogenic chemostat based on DNA stable isotope probing. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 64(5), 221-231. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.12.006>.
13. Park SG, Rhee C, Shin SG, Shin J, Mohamed HO, Choi YJ, Chae KJ (2019) Methanogenesis stimulation and inhibition for the production of different target electrobiofuels in microbial electrolysis cells through an on-demand control strategy using the coenzyme M and 2-bromoethanesulfonate. *Environment International*, 131, 105006. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105006>.
14. Guo J, Shi G, Guo X, Zhang L, Xu W, Wang Y, Su Z, Hua J (2015) Transcriptome analysis reveals that distinct metabolic pathways operate in salt-tolerant and salt-sensitive upland cotton varieties subjected to salinity stress. *Plant Science*, 238, 33-45. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.05.013>.
15. Dykema S, Jansen L, Gallert C (2020) Syntrophic acetate oxidation replaces acetoclastic methanogenesis during thermophilic digestion of biowaste. *Microbiome*, 8(1), 105. <https://doi.org/10.1186/s40168-020-00862-5>.
16. Fotidis IA, Karakashev D, Kotsopoulos TA, Martzopoulos GG, Angelidaki I (2013) Effect of ammonium and acetate on methanogenic pathway and methanogenic community composition. *FEMS Microbiology Ecology*, 83(1), 38-48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01456.x>.
17. Gwon HS, Choi EJ, Lee SI, Lee HS, Lee JM, Kang SS (2022) Research review of methane emissions from Korean rice paddies. *Journal of Climate Change Research*, 2022, 13(1), 117-134. <https://doi.org/10.15531/KSCCR.2022.13.1.117>.
18. Mun SW, Kang YS, Park JH, Han MS, Jeong HY (2019) A study on the making properties of natural pigments based on substance characteristics for hwangto in Korea. *Journal of Conservation Science*, 35(6), 600-611. <https://doi.org/10.12654/JCS.2019.35.6.03>.
19. Yang SS, Chang HL (1998) Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 69(1), 69-80. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(98\)00098-X](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(98)00098-X).
20. Qin Y, Qu B, Lee B (2022) A new cell-direct quantitative PCR based method to monitor viable genetically modified *Escherichia coli*. *Korean Journal of Agricultural Science*, 49(4), 795-807. <https://doi.org/10.7744/kjoas.20220073>.
21. Sørensen KB, Finster K, Ramsing NB (2001) Thermodynamic and kinetic requirements in anaerobic methane oxidizing consortia exclude hydrogen, acetate, and methanol as possible electron shuttles. *Microbial Ecology*, 42, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s002480000083>.
22. Nozoe T, Yasuda M (1995) Mechanisms of decomposition of acetic acid by methane-producing bacteria in submerged paddy soil. *Soil Science and Plant Nutrition*, 41(1), 151-155. <https://doi.org/10.1080/00380768.1995.10419569>.
23. Amin FR, Khalid H, El-Mashad HM, Chen C, Liu G, Zhang R (2021) Functions of bacteria and archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production. *Science of the Total Environment*, 763, 143007. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143007>.
24. Ji Y, Liu P, Conrad R (2018) Response of fermenting bacterial and methanogenic archaeal communities in paddy soil to progressing rice straw degradation. *Soil Biology and Biochemistry*, 124, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.05.029>.
25. Wu L, Ma K, Li Q, Ke X, Lu Y (2009) Composition of archaeal community in a paddy field as affected by rice cultivar and N fertilizer. *Microbial Ecology*, 58, 819-826. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9554-4>.