

농가 자가제조 액비의 발효과정 중 이화학성 및 미생물상 변화*

안난희** · 김용기*** · 이 연*** · 지형진*** · 박종호*** · 홍성준*** · 한은정***

Changes in Chemical Properties and Microbial Population of Farm-Made Organic Liquid Fertilizer during Fermenting Process

An, Nan-Hee · Kim, Yong-Ki · Lee, Yeon · Jee, Hyeong-Jin ·
Park, Jong-Ho · Hong, Sung-Jun · Han, Eun-Jung

This study was conducted to investigate the changes in physicochemical and microbiological properties during fermenting process of farm-made organic liquid fertilizer made of the mixture of organic materials such as blood meal and molasse during fermenting process. The pH level of organic liquid fertilizer during the fermentation decreased from 7.2 to 4.3. The EC of organic liquid fertilizer was increased from 13.9 dS/m to 99.3 dS/m during the fermentation. The total population of aerobic bacteria decreased from 8.2×10^5 cfu/ml to 3×10^4 cfu/ml, but *Bacillus* spp. increased from 2.1×10^2 cfu/ml to 4.2×10^3 cfu/ml during the fermentation. Bacterial isolates were obtained from organic liquid fertilizers and identified by fatty acid-base typing. The Genus *Bacillus* was dominant as fermenting proceeded. The denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profile showed changes of bacterial communities in organic liquid fertilizers.

Key words : *organic liquid fertilizer, fermentation, microorganism, DGGE*

* 본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ006923)의 지원에 의해 이루어진 것임.

** 교신저자, 국립농업과학원 유기농업과(nanhee79@korea.kr)

*** 국립농업과학원 유기농업과

I. 서 론

국내외 환경문제와 관련하여 농업환경보전 및 안전한 먹거리에 대한 소비자의 요구가 커지면서 지속가능하고 환경 친화적인 유기농업의 필요성이 대두되고 있다. 유기농업은 농업과 환경의 조화를 위하여 화학비료 및 농약의 사용을 배제하고 윤작과 휴경, 그리고 녹비작물 등을 재배하여 지력을 증진시키고 유기물 및 농업부산물을 사용하여 작물을 안전하게 재배하는 농법이다(정 등, 2000). 유기농업에서 양분공급은 퇴비와 녹비를 통하여 하는 것을 기본으로 하나 양분이 부족한 경우도 많다. 따라서 유기재배 농가에서는 작물의 부족한 영양분을 보충하기 위해 다양한 유기질 자재를 이용하여 액비를 제조하여 사용하고 있다. 액비 제조 시 사용되는 자재들은 크게 유기물과 무기물로 나누어지며 유기물에는 동물부산물(혈분, 골분, 어분, 생선 등), 식물부산물(깻묵, 쌀겨, 대두박 등), 무기물에는 재, 맥반석, 패화석 등이 속한다. 양분공급 측면에서 질소질 공급을 위해서는 깻묵, 혈분, 생선 등 단백질을 함량이 높은 재료로 만든 액비를 사용하고, 인산을 공급하기 위해서는 골분과 쌀겨를 이용한 액비를 만들어 사용하고 있다(이 등, 2004). 혈분은 친환경육성법에서 사용이 가능한 자재로 도축장에서 나오는 가축의 피에 열을 가하여 응고시킨 다음 건조하여 분쇄한 것으로 건혈(乾血)이라고도 부른다. 총 질소 중 단백태 질소는 80% 정도로 대부분 피브린, 알부민 형태로 존재하며 lysine, arginine, methionine, cystine, leucine의 좋은 공급원으로 동물성사료로 우수한 것으로 알려져 사료첨가제로도 많이 사용된다(김 등, 1997). 또한 속효성이며 질소성분이 높은 자재 중에 하나이다(농촌진흥청, 2009). 그러나 다른 자재에 비해 혈분을 이용한 액비 연구는 없는 실정이다.

따라서 본 연구는 유기 농산물을 생산하기 위하여 혈분을 이용하여 제조한 액비에 대해 발효과정에서 나타나는 화학성분과 미생물상의 변화를 알아보기 위하여 본 시험을 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 액비 수집 및 제조 방법

액비는 유기농 배 재배(성환, 충남) 농가에서 2009년 5월 22일 제조하여 제조 당일, 발효 30일, 70일에 액비를 채취하였다. 액비제조 방법은 600ℓ 고무통에 물 480ℓ를 채우고 혈분 140kg, 당밀 40ℓ, 부엽토(과수원 주변 채취) 10ℓ를 차례로 첨가하여 잘 저은 후 노지에서 발효시켜 사용하였다.

2. 액비의 화학성 분석

액비의 화학성 분석은 농촌진흥청 식물체 및 토양화학 분석법(2000)에 준하여 하였다. 제조된 액비의 pH와 전기전도도는 pH/EC meter(HI 9932, Hanna)로 측정하였고, 유효인산 함량은 spectrophotometer(Cintra 40, GBC Scientific Equipment, Ltd), 치환성 양이온, 미량원소는 ICP(Integra XL Dual, Scientific Equipment, Ltd), 탄소와 질소함량 측정은 원소분석기(US/Vario Max CN, Elementar Analyse system GmbH)를 이용하여 분석하였다.

3. 미생물상 조사

액비내 호기성 세균은 YG배지, *Bacillus* 속은 희석액을 80°C에서 20분간 가열하여 체세포를 사멸시킨 후 호기성 세균 계수에 사용한 YG배지를 이용하여 계수하였다. 평균 배지에 적정 희석액을 접종 도말하고 표면의 수분이 완전히 제거된 후 28°C에서 3~5일간 배양하였다(서, 1997). 각 시료당 미생물 계수는 3개의 petri dish에 나타난 colony를 각각 계수한 평균값을 생균수(colony forming unit)로 계산하였다. 액비에서 분리한 세균의 동정을 위해서는 단일 콜로니를 무작위로 취하여 순수 분리한 후 제조사의 표준방법에 따라 지방산을 추출한 후 Hewlett-Packard Gas chromatography(model 6890)와 Sherlock Microbial Identification System software(Microbial ID, Inc., Newark, Del, USA)를 이용하여 동정하였다.

4. 액비내 세균 군집 분석

액비로부터 total genomic DNA를 추출하기 위하여 FastDNA spin kit (MPbio)를 이용하였다. 추출한 DNA는 16S rDNA의 V3 영역의 염기서열을 증폭하기 위하여 40bp의 GC clamp가 포함된 GC341F와 518R을 사용하여 PCR을 수행하였다(Muyzer 등, 1993). PCR 반응물의 조성은 1×반응용액 (100 mM Tris-HCl, 400 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ 500 μg ml⁻¹ BSA, pH 8.3), 200 μM dNTPs, 0.1 μM primer, 그리고 2.5 U Taq polymerase를 첨가하여 총 50 μl의 혼합물을 만들고, DNA 양이 100 ng이 되도록 첨가한 후 반응을 진행시켰다. PCR은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 95°C에서 denaturation을 1분, 52°C에서 annealing을 1분, 72°C에서 extension을 1분하는 과정을 30회 반복하였다. 최종 PCR 산물은 1% agarose gel에서 EtBr로 염색하여 band를 확인 한 후 사용하였다. PCR 증폭산물은 BioRad Dcode System (Bio-Rad Laboratories, USA)으로 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)를 수행하여 분석하였다. Denaturing gradient gel은 8%의 polyacrylamide에 urea와 formamide 변성제를 40%에서 70%까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 첨가하여 제작하였다. 이와 같이 제작된 겔에 PCR 증폭산물 20 μl를 loading하여 1×TAE 완충용액(40 mM Tris, 20 mM acetic acid,

1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 60 V로 16시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 겔은 EtBr을 사용하여 염색한 후 Image analyzer (Bio-Rad Laboratories, USA)로 확인하였다.

5. 액비 처리가 무 종자 발아와 유묘 생육에 미치는 영향

발아력 검정은 무 종자를 대상으로 petri dish에 여과지를 깔고 종자 30립씩을 치상하였다. 70일간 발효시킨 액비를 농도별로 희석하여 6 ml씩 분주 한 후 온도 25°C 습도 60%로 조절된 배양기(Sanyo MIR 253)내 치상 후 7일째 뿌리와 줄기의 성장상태를 조사하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 액비의 이화학적 특성

액비의 발효기간 중 이화학적 변화는 Table 1과 같다. 액비 제조 시작 직후의 pH는 7.2에서 발효가 진행됨에 따라 4.3으로 산성을 나타냈다. pH는 분해 과정에서 유기산등 중간생성물의 축적과 암모니아의 발생 등의 영향을 받아 변할 수 있다고 알려져 있다(Eliot, 1997). 본 실험에서 제조한 액비의 pH가 산성을 띄는 것은 발효 과정에서 미생물에 의해 유기물들이 분해되는 동안 유기산이 생성되어 pH에 영향을 준 것으로 사료된다. EC는 제조시 13.9 dS/m에서 발효가 진행되면서 계속 상승하여 발효 70일째는 99.3 dS/m로 상승하였다. 액비 발효과정 중 EC의 증가는 발효과정에서 유기물의 무기화작용으로 인해 이온들이 유기물로부터 용액으로 해리되기 때문이라고 보고하였다(주, 2009). 또한 미량 원소 중 Fe 함량이 다른 원소에 비해 높는데 이는 액비 재료로 혈분을 이용했기 때문으로 사료된다. 유기액비의 화학적 성분은 유기액비의 종류에 따라 큰 차이를 보이며 액비 자재의 혼합비율에 따라 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다(주 등, 2010).

Table 1. Chemical properties of farm-made organic liquid fertilizers

Fermentation time (day)	pH	EC	T-C	T-N	P ₂ O ₅	K	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Zn	Cu
	(1:5)	dS m ⁻¹	%							mg kg ⁻¹			
0	7.2	13.9	0.28	0.02	0.02	0.08	0.06	0.03	0.01	35.6	1.7	5.0	0.44
30	5.8	77.4	4.98	0.14	0.15	0.68	0.69	0.18	0.12	280.7	14.3	7.3	0.44
70	4.3	99.3	7.73	0.19	0.22	0.96	0.86	0.21	0.17	371.2	21.4	7.5	0.41

2. 액비 발효과정 중 미생물의 밀도

액비 제조 직후의 총세균수는 8.2×10^5 cfu/ml이었다(Table 2). 그러나 발효가 진행된 30일째에는 4.4×10^6 cfu/ml로 증가하였고 70일째에는 3×10^4 cfu/ml로 감소하였다. *Bacillus*속은 제조 직후 2.1×10^2 cfu/ml에서 30일째에는 2.1×10^3 cfu/ml, 70일째에는 4.2×10^3 cfu/ml로 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였다. *Bacillus*는 내생포자를 형성하기 때문에 다양한 스트레스에서도 생존력이 뛰어난 특성을 지니고 있다. 액비가 발효되는 과정에서 이들 개체군이 증가한다는 것은 액비에는 환경변화에 민감한 미생물이 서식하기에는 어려운 환경으로 변화한 것으로 사료된다. 농가자가제조 액비 제조 시 미생물 생육에 필요한 탄소원 및 질소성분 등 다양한 영양원을 포함하고 있는 자재속에는 세균이 많이 분포하며 특히 작물 생육에 유리하게 작용할 수 있는 *Bacillus*와 *Pseudomonas*가 많다는 결과를 보고한 바 있다(김, 2000).

Table 2. Population density of total bacteria and *Bacillus* spp. in the farm-made organic liquid fertilizers during fermentation process

Fermentation time (day)	Bacteria ($\times 10^5$ /ml)	<i>Bacillus</i> spp. ($\times 10^2$ /ml)
0	8.2	2.1
30	44	21
70	0.3	42

3. MIDI 분석에 의한 액비내 호기성 세균의 군집분석

발효기간 동안 액비로부터 분리한 세균을 MIDI-FAME profiles을 이용하여 속 수준까지 동정한 결과는 Table 3과 같다. 액비 제조 직후 *Bacillus*속이 25%, 발효 30일째는 *Bacillus* 속이 65%, *PaeniBacillus* 속이 5%, *VirgiBacillus* 20%, 발효 70일째는 *Bacillus* 속이 47%, *GeoBacillus* 속이 5%, *PaeniBacillus* 속이 28%, *VirgiBacillus* 속이 13%이었으며, 발효가 진행될수록 *Bacillus* 유사속들이 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한 *Enterococcus*, *Rhodococcus*는 제조 시에만 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 액비 제조 시 다양한 미생물이 존재하는 부엽토를 첨가하지만 발효가 진행될수록 *Bacillus* 유사속들이 우점하는 것을 알 수 있었다.

Table 3. Relative clone abundance of clones from the farm-made organic liquid fertilizers

Genus ^a	Relative clone abundance(%)		
	Fermentation time(day)		
	0	30	70
<i>Bacillus</i>	25	65	47
<i>Enterococcus</i>	40	5	-
<i>GeoBacillus</i>	-	-	3
NM ^b	30	5	8
<i>PaeniBacillus</i>	-	5	29
<i>Rhodococcus</i>	5	-	-
<i>VirgiBacillus</i>	-	20	13

^a Identified based on fatty acid methyl ester analysis and Microbial ID software and TSBA library 6.1.

^b Not identified using Microbial ID software and TSBA library 6.1.

4. 발효과정 중 액비의 세균군집 변화

발효과정 중 채취한 액비 시료로부터 전체 DNA를 추출한 후 PCR을 수행하여 얻은 PCR 산물들을 DGGE에 의해 분리한 결과는 Fig. 1과 같다. DGGE profile에서는 겔상에서 다른 이동도를 나타내는 다양한 밴드들을 관찰할 수 있었고 액비 제조 시에 존재하던 많은 밴드들이 발효가 진행될수록 현저하게 줄어드는 것을 확인하였다. 이는 초기에는 다양한 미생물들이 존재하지만 발효가 진행될수록 특정한 세균만이 액비 내에 존재할 수 있다는 것을 의미한다. DGGE 분석은 많은 샘플에서 전체적인 미생물 종의 수 그리고 양적 변화를 하나의 gel상에서 관찰할 수 있다는 장점이 있다(이, 2006; Kim 등, 2005). 또한 특이적인 밴드의 경우에는 밴드로부터 직접 DNA를 회수한 후 sequencing을 통해 종을 확인할 수 있기 때문에 추후 액비군집의 DGGE profile로부터 밴드를 회수하여 염기서열 분석을 한 결과와 위의 MIDI분석 결과를 비교하는 것이 액비의 발효기간 동안 미생물 군집의 변화를 정확하게 파악할 수 있을 것으로 사료된다.

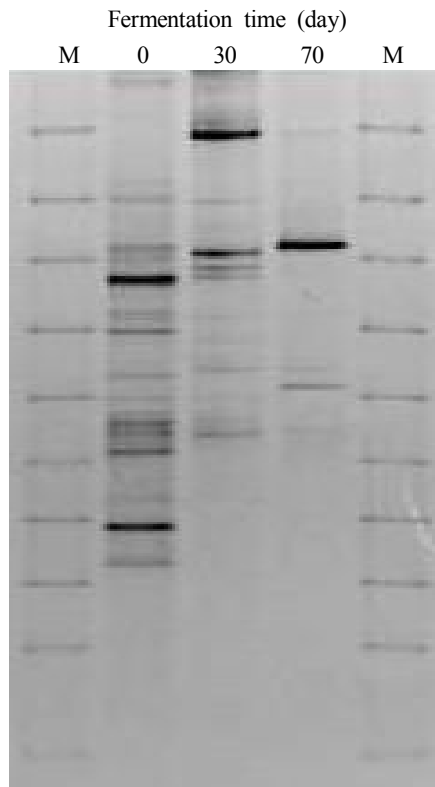


Fig. 1. DGGE profile of 16S rDNA fragments from farm-made organic liquid fertilizers. M: DGGE Marker.

5. 액비 처리가 무 종자 발아와 유묘 생육에 미치는 효과

70일간의 발효과정을 거친 액비를 100배, 500배, 1000배 희석하여 무 종자 발아와 유묘 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 4와 같으며, 원액 처리시 무 종자의 발아가 전혀 되지 않았다(데이타 미제시). 줄기 신장은 대조구 21 mm에 비하여 100배 처리시 43% 증가하였으며 500배, 1000배 처리에도 다소 증가하였다. 뿌리 생장은 500배 처리 시 99 mm로 대조구보다 80% 증가하였다. 액비 처리는 줄기 생육보다는 뿌리 발달을 촉진하였으며 그 효과는 농도에 따라 차이가 있음을 확인하였다.

Table 4. Effect of farm-made organic liquid fertilizer application on development of shoot and root of radish

Treatment	shoot length (mm)	(trt/cont)×100	root length (mm)	(trt/cont)×100
Control	21a*	100	55a	100
1/100 dilution	30b	143	68ab	124
1/500 dilution	26ab	124	99b	180
1/1000 dilution	25ab	119	87ab	158

control: Distilled water treatment.

*: Same letters are not significantly different with DMRT at 5% level.

IV. 적 요

본 실험에서는 유기재배 농가에서 사용되고 있는 액비의 특성을 과학적으로 구명하고자 발효기간 동안 액비의 화학성, 미생물상의 변화, 그리고 액비 처리가 무 생육에 미치는 효과를 조사하였다. 액비의 pH는 발효가 진행됨에 따라 7.2에서 4.3로 감소하였고 EC는 액비 제조 직후 13.9 dS/m에서 계속 상승하여 70일에는 99.3 dS/m에 도달하였다. 액비내 서식하는 세균 밀도는 발효 과정 중 8.2×10^5 cfu/ml에서 3×10^4 cfu/ml로 감소하였으며, *Bacillus* 속은 제조 직후 2.1×10^2 cfu/ml에서 4.2×10^3 cfu/ml로 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 보였다. 액비로부터 분리한 세균은 지방산 분석을 통한 동정 결과, 발효가 진행될수록 *Bacillus* 유사속들이 액비내 우점하는 것을 알 수 있었으며 DGGE profile을 통해 발효과정 동안 액비내 미생물 군집의 변화를 확인하였다. 액비처리에 의한 무 유묘 생육을 살펴본 결과, 줄기보다는 뿌리 발달을 촉진하였다.

[논문접수일 : 2011. 1. 12. 논문수정일 : 2011. 8. 19. 최종논문접수일 : 2011. 9. 23]

참 고 문 헌

1. 김승환. 2000. 유기·자연농업 활용자재의 특성 검토. 농업과학기술원시험 연구보고서. pp. 5-49.
2. 김정태·김광석·정관식·송재성·이승복·우영배·이종윤. 1997. 사료내 어분의 어류농축

단백질 또는 혈분에 의한 부분적 대체가 잉어의 성장 및 오염 부하량에 미치는 영향. 한국영양사료학회. 21(3): 237-244.

3. 농촌진흥청. 2000. 토양 및 식물체 분석법.
4. 농촌진흥청. 2009. 고추 유기재배 매뉴얼.
5. 서장선·신재성. 1997. 논토양 서식 미생물의 다양성에 관한 연구. 한국토양비료학회. 30(2): 200-207.
6. 이종태·이찬중·김희태. 2004. 혼합발효 유기질비료의 발효과정중 이화학적 및 미생물 밀도 변화. 한국토양비료학회. 37(2): 116-123.
7. 이태호. 2006. 분자생태학적 수질관리기법(I)-생물환경공정 관리를 위한 분자생태학적 기법의 동향. 첨단환경기술. pp. 5-11.
8. 주선중. 2009. 유기액비의 조성이 배추와 고추의 생육에 미치는 영향. 충북대학교 대학원 박사학위 논문
9. 주선중·이광재. 2010. 유기관비 액비가 고추 생육 및 과실 품질에 미치는 영향. 한국유기농학회. 18(1): 63-74.
10. 정순재·정원복·김희태·강경희·이중성·오주성. 2000. 유기농 자재의 시용이 토양의 이화학적 특성과 배추의 생육 및 체내성분에 미치는 영향. 한국유기농학회. 8: 131-146.
11. Eliot, E. 1997. The science of composting. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA.
12. Kim, M. S., J. H. Ahn, M. K. Jung, J. H. Yu, D. Joo, and M. C. Kim. 2005. Molecular and cultivation-based characterization of bacterial community structure in rice field soil. J. Microbiol. Biotechnol. 15(5): 1087-1093.
13. Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial communities populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes encoding for 16SrRNA. Appl. Environ. Microbiol. 68: 1882-1892.