

유기농 복합생태 논습지의 토양 미생물 다양성 증진 효과

한양수·박충배·조정래·박상구·공민재*·남홍식†·손진관***

농촌진흥청 국립농업과학원 농업환경부 유기농업과

*농촌진흥청 국립농업과학원 농산물안전성부 작물보호과

**농촌진흥청 국립농업과학원 농업공학부 에너지환경공학과

Effect of Soil Microbial Diversity in Paddy Wetland under Organic Rice-Fish Mixed Farming System

Han Yangsoo·Park Choongbae·Cho Jung-Lai·Park Sang-Gu·Kong Min-Jae*·Nam Hong-Shik†·Son Jinkwan***

Organic Agriculture Division, Dept. of Agricultural Environment, National Institute of Agricultural Sciences, RDA

*Crop Protection Division, Dept. of Agro-food Safety and Crop Protection, National Institute of Agricultural Sciences, RDA

**Energy and Environmental Engineering Division, Dept. of Agricultural Engineering, National Institute of Agricultural Sciences, RDA

(Received : 26 January 2022, Revised : 11 February 2022, Accepted : 11 February 2022)

요약

본 연구는 상시 담수 상태의 복합생태 논습지에서 유기농 벼-큰장거미새우 복합생산 조건 시 1) 논습지 토양 화학성 및 세균 군집 특성을 파악하여 토양 화학성과 세균 간의 상관관계를 분석하고, 2) 유기농 벼 단작 토양과 관행 벼 단작 토양의 세균 군집과 비교하여 유기농 복합생태 토양의 미생물 다양성을 비교 분석하는 것이다. 토양 화학성의 경우 유기농 복합생산 운영 기간이 길수록 유효인산과 유기물 함량이 증가한다. 모든 토양 시료에서 문(Phylum) 수준의 세균 분석 결과 9개의 주요 문이 분포되어 있으며, 모든 토양 시료에서 *Proteobacteria*가 우점하고 있다. 속(Genus) 수준 분석 결과 37개의 주요 속이 분류되었으며, 벤다이어그램 분석 결과 모든 토양 시료에 존재하는 250개의 OTU가 분류되었고, 유기농 벼재배 토양에 특화된 561개의 OTU가 관찰되었다. 주좌표분석 결과 관행 벼 단작 토양의 세균 군집과 비교하여 유기농 벼 단작 토양과 유기농 복합생태 논습지 토양의 세균 군집 간 유사도가 높은 것으로 나타났다.

핵심용어 : 논습지, 생물다양성, 생태계서비스, 탄소중립, 지속가능

Abstract

In this study, we investigated the bacterial community structure in organic rice-fish mixed farming paddy soil by using high-throughput sequencing technology. The results showed that compared with the organic rice cultivated soil, the content of AP (available phosphorus) increased by 310.23 % and the content of OM (organic matter) increased by 168.83%. The most abundant phyla in paddy soils were *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Chloroflexi*, whose relative abundance was above 47.83%. Among the dominant genera, the relative abundance of *Limisphaera* in paddy soils was observed. Alpha diversity indicated that the bacterial diversity of paddy soils was similar among each other. The bacterial community structure was affected by the relative abundance of bacteria, not the species of bacteria. Principal Coordinated Analysis (PCoA) results showed that the bacterial communities in organic rice-fish mixed farming soil and organic paddy soil were correlated to each other; the bacterial community structure was distinctively grouped by four different systems (paddy soil under organic rice-fish mixed farming system, organic rice cultivation, and conventional rice cultivation), where the first two are closely related to each other than the third one. The results provide basal support for organic agri-cultivation while improving an ecological value at the same time.

Key words : Rice Fields, Biodiversity, Ecosystem Service, Net Zero, Sustainable

To whom correspondence should be addressed.

†Nam Hong-Shik, Organic Agriculture Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA E-mail: +82-63-238-2573, namdalli@korea.kr

††Son Jinkwan, Energy and Environmental Engineering Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA E-mail: +82-63-238-4096, son007005@korea.kr

- Han Yangsoo Organic Agriculture Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA / Post-Doc. (yangsooh@korea.kr)
- Park Choongbae Organic Agriculture Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA / Junior Researcher (imcbpark@korea.kr)
- Cho Jung-Lai Organic Agriculture Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA / Senior Researcher (chojr @korea.kr)
- Park Sang-Gu Organic Agriculture Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA / Dept. Manager (esfsg@korea.kr)
- Kong Min-Jae Crop Protection Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA / Post-Doc. (alswogud@korea.kr)
- Nam Hong-Shik Organic Agriculture Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA / Researcher (namdalli@korea.kr)
- Son Jinkwan Energy and Environmental Engineering Division, National Institute of Agricultural Sciences, RDA / Post-Doc. (son007005@korea.kr)

1. 서 론

한국을 비롯한 동아시아의 담수논은 물을 담아 놓는 구조적인 특성이 습지와 유사하며, 지역의 생물다양성 유지 및 다양한 생태계서비스 기능을 제공해주는 중요한 공간으로 평가받는다(Elphick, 2010; Han et al., 2011; Kong, 2013). 이러한 이유로 국제적 람사르조약(Ramsar Convention)에서 개최한 2008년 제10차 창원 람사르총회에서 인공습지(Human-made wetlands)의 유형 중 관개지(3, Irrigated land)로서 논습지(Rice fields)를 추가하였으며(Ramsar, 2008; 2021), 국내외적으로 논습지의 중요성이 거론되어 해당 공간의 기능을 인간에 긍정적인 혜택으로 제공될 수 있도록 하는 다양한 연구가 진행되고 있다.

유기농 벼-담수어 복합 생산방식은 논에서 벼를 재배하는 동안 물고기, 게, 새우 등 담수어를 생산하는 재배 방법으로 자연 습지와 유사한 형태로 구성되어 있다(Nam et al., 2018). 벼 수확 외에 담수어의 생산이 가능하므로 재배 농가의 추가 소득을 발생시키며, 재배 기간 해충과 잡초 발생량을 감소시켜 화학 농약 사용량을 줄이는 효과를 나타낸다(Smajl et al., 2015; Xie et al., 2011; Zhang et al., 2016).

복합생태 방식으로 운영되는 논은 기존 벼 식재부와 담수어의 서식처를 제공하는 둠벙으로 구성되어 자연 습지와 유사한 생태환경 조성이 가능하다. 둠벙은 자연 연못과 유사하며(Son et al., 2010; Son et al., 2014a; Son et al., 2014b), 담수어의 성장 및 논 습지 생태환경에 중요한 역할을 한다(Han et al., 2010; Han et al., 2011; Kim et al., 2012). 둠벙의 깊이에 따라 상층과 하층의 수온 차이가 나타나며(Wang et al., 2011), 벼-크레이피쉬 복합생산 시 논과 둠벙의 수질 변화가 보고된 바 있다(Yu et al., 2011). 벼-담수어 복합생태 조건은 둠벙의 토양보다 논 토양의 생물다양성이 높게 나타나며(Zhao et al., 2017), 복합생태농업의 재배기간에 따라 생물다양성은 변화가 없거나 오히려 증가한다고 보고되고 있다(Nam et al., 2020; Zhao et al., 2021). 더불어 습지로서 인정된 담수논에서 생물 서식 공간인 둠벙의 구조가 추가되어 생물다양성 뿐만 아니라 지하수함양, 대기조절, 체험을 비롯한 다양한 생태계서비스 기능 증진 효과를 가져온다(Kong et al., 2014; Nam et al., 2018). 하지만 다양한 생태계서비스 기능에 대한 증진 효과는 습지기능평가 및 가치판단 등의 간접적 방법에 의존했으며(Nam et al., 2018; Nam et al., 2020), 정량 평가에 대한 연구는 시작 단계에 있다. 벼-담수어 복합생태농업의 생태환경에 미치는 영향 및 생물다양성 평가는 복합생태농업의 재배 방법, 담수어의 종류, 기상 조건 등 많은 변수가 존재하므로 보다 많은 자료를 축적할 필요가 있다.

본 연구에 대상 어종인 큰장거미새우(Giant river prawn, GRP)는 장거미새우과(*Palaemonidae*)의 민물새우로 아열대성 기후에 최적의 생장률을 나타내며, 성체의 경우 최대 약 40cm의 크기에 최대 중량 400g까지 성장하는 세계 최대의 민물새우이다. 우리나라에서는 미꾸리 단일종만 생태양식 기술이 시도되었으나 큰장거미새우는 고소득 양식품종으로 다른 담수어

에 비해 부가가치가 높을 것으로 기대되고 있다(NIFS, 2018).

한편, 토양은 지구상에서 종 다양성과 군집 크기의 측면에서 가장 크고 복잡한 미생물의 서식지로, 토양 1.0 g에는 $10^9 \sim 10^{10}$ 개의 미생물이 살고 있고, 약 2,000~18,000 개의 유전체가 존재한다(Torsvik et al., 1996; Torsvik and Ovreas, 2002). 또한 세균은 미생물 중 가장 풍부하고 많은 개체군을 형성하며(Acosta-Martinez et al., 2008), 토양 세균은 유기물 분해, 입단화 및 양분 순환에 중요한 역할을 한다(Edwards et al., 2015). 토양 세균 분석에서 대용량 염기서열 분석 기술이 발전하면서 다양한 환경 내 세균 군집 특성에 주목하고 있다(Zecchin et al., 2017). 수서생물의 서식환경과 성장에 토양 세균은 중요 인자 중 하나이며, 유기농 복합생태농업에서 토양 세균의 군집 구조를 이해하는 것은 논습지의 생물다양성을 평가하고 토양의 화학성 변화에 관한 인과관계를 유추하기 위해서 매우 중요하다. 더불어 최근 탄소중립 및 저장에 대한 관심으로 토양과 미생물의 탄소저장과 분해, 흡수에 많은 연구가 진행되고 있다(Bastida et al., 2021; Oliver et al., 2021; Ernakovich et al., 2021).

벼-담수어 복합생태농업에서 사용하는 여러 담수어 중 벼-참게 생태환경 조건에서 토양 비옥도 증진(Hu et al., 2020), 세균 군집 구조 및 생물다양성(Cheng et al., 2017), 등의 결과가 보고되었지만 벼-큰장거미새우 생태환경 조건의 논토양 세균 군집에 관한 연구는 상대적으로 제한적이다.

본 연구는 논습지와 유사한 유기농 복합생태농업을 구성하는 논과 둠벙에서 벼-큰장거미새우의 복합생산 시 토양에 분포한 미생물과 세균들의 특성을 일반 유기농, 관행 벼 단작 토양 세균 군집과 비교하고, 장기 연용 시 토양 세균 군집의 변화를 분석하여, 향후 유기농 복합생태농업 실천에 따른 생태환경 유지, 생물다양성 증진 및 지속 보전 효과를 증명할 수 있는 정보를 제공하고자 수행하였다. 이러한 연구 결과는 복합생태농업 구현에 따른 논습지의 기능 증진 효과 자료로 활용 가능하며, 논농업의 생물다양성 증진, 탄소저감 등 다양한 생태계서비스 기능 향상 기술로 발전되길 기대하고 있다.

2. 조사 및 분석방법

유기농 복합생태 논습지의 토양 미생물 다양성 증진 효과를 알아보기 위하여 복합생태 논습지를 조성하고 토양 시료를 채취, 전처리하는 과정을 수행하였다. 이후 토양의 화학적 특성을 공정시험 방법에 따라 분석하였고, 미생물 중 세균의 다양성 특성을 알아보기 위하여 Pyrosequencing을 수행하였다. 결과는 토양 내 미생물 군집 다양성 차이를 통계적으로 알아보기 위하여 군집 후 분석하였다.

2.1 시험포장 설계, 토양 시료 채취 및 전처리

벼-큰장거미새우 복합생산을 시험하기 위하여 전라북도 완주군 국립농업과학원 유기농 시험 단지에 약 200m²의 시험포장을 2017년과 2020년 각 1개씩 조성하였다. 2020년 6월 5일 벼를 이앙하였고, 9월 28일 수확하였다. 큰장거미새우는 6월

11월 3cm 크기의 치어를 입식 후 벼와 복합생산을 시작하여 10월 5일 수확하였다(Fig. 1). 유기농 벼재배 시험 포장에 같은 단지 내에 조성된 유기농 벼재배 논 토양을 채취하였고, 관행농 벼재배 시험 포장은 전라북도 완주군 국립식량과학원 내 조성된 관행농 벼재배 논 토양을 채취하였다. 토양 시료는 각 시험 포장에서 2020년 7월 7일에 무작위로 세 지점에서 채취하여 최대한 균등하게 섞은 후 두 부분으로 나누어 토양 화학성과 토양 세균 군집 분석에 사용하였다. 토양 화학성 분석을 위해 음건한 토양을 2mm 토양체(sieve)에 통과시키는 전처리 과정 후 분석에 사용하였고, 토양 세균 군집 구조 분석을 위해 채취한 토양 시료를 초저온 냉동고에 보관 후 DNA를 추출하였다. 각 토양 시료의 부가적인 설명은 표 1에 나열하였다.

2.2 토양 화학성 분석 방법

토양 화학성 분석은 농촌진흥청 토양분석법을 적용하였다(NIAST, 2000). 토양산도(pH, Hydrogen ion exponent) 측정에는 토양 시료와 3차 증류수의 비율을 1:5로 추출하여 pH 측정기(Orion Star™ A215 pH meter, Thermo-Scientific,

USA)로 측정하는 초자전극법으로 분석하였다. 전탄소(T-C, Total-Carbon) 및 전질소(T-N, Total-Nitrogen) 함량은 원소분석기(VarioMAX CN, Elementar, Germany)를 이용한 건식연속법으로 분석하였다. 유효인산(Av.P₂O₅, Phosphorus pentoxide)은 Lancaster법으로 하여 720 nm(UV-2600, Shimadzu, Japan)에서 흡광도를 측정하여 분석하였고, 치환성 양이온(Ex. cation)인 칼륨(K⁺, Kalium), 칼슘(Ca²⁺, Calcium), 마그네슘(Mg²⁺, Magnesium)은 1M-NH₄OAc (pH 7.0) 완충 용액으로 추출하여 ICP(Integra XL, GBC Scientific Equipment Ltd, Australia)로 분석하였다.

2.3 토양 미생물 군집의 Pyrosequencing 분석

채취한 토양 시료를 (주)마크로젠(서울)에 의뢰하여 Illumina MiSeq Sequencing system (Illumina Inc., San Diego, CA, USA)을 이용한 차세대 염기서열 분석(NGS: Next Generation Sequencing)을 수행하였다. 토양 시료에서 FastDNA spin kit for Soil (Qiagen, USA)를 이용하여 genomic DNA를 분리하고 DNA 증폭을 위하여 16S rRNA 유전자의 V3와 V4 영역을

Table 1. Description of soil samples used in this study

Farming System	Sample ID	Sample location
Organic Farming	OS	N 35° 49' 29. 0", E 127° 02' 49. 1"
Conventional Farming	CS	N 35° 50' 06. 7", E 127° 02' 42. 6"
Organic Rice-Fish Mixed Farming(GRP*) for 1 year	Omix1yrS	N 35° 49' 29. 7", E 127° 02' 48. 3"
Organic Rice-Fish Mixed Farming(GRP*) for 4 year	Omix4yrS	N 35° 49' 29. 7", E 127° 02' 48. 3"

* GRP : Great river prawn (*Macrobrachium rosenbergii*)



Fig. 1. The Photos for Rice-GRP Mixed Farming Systems. (a), (b) and (c) Rice-GRP field during 1st cultivation; (d) initial GRP; (e) and (f) growth of GRP.

대상으로 하는 프라이머를 사용하였다. 본 연구에서 사용한 프라이머의 염기서열은 다음과 같다: 세균 특화 프라이머 341F(5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')와 805R(5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3')를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 Initial denaturation: 95°C, 3분; Denaturation: 95°C, 30초(25 cycles); Annealing: 55°C, 30초; Extension: 72°C, 30초; Final extension: 72°C, 5분 조건으로 수행하였다. Raw sequence 분석은 Mothur(ver. 1.40) 프로그램을 이용하여 유사 수준 97%의 Operational taxonomic units(OTUs)로 군집화하여 다양성, 상대 빈도수 (Relative abundance), 주좌표분석(Principle coordinate analysis, PCoA)을 분석하였다.

2.4 토양 미생물 군집 다양성 비교 및 통계 분석

토양 세균 군집의 다양성을 비교하기 위하여 alpha-diversity 지표인 Chao 1, Shannon, Simpson, 그리고 good's coverage를 산정하였다. 이 중 Chao 1은 전체 Operational Taxonomic Unit(OTU) 대비 singleton 또는 doubleton의 비율을 통하여 종의 풍부도(richness)를 나타내는 지표로, 수치가 높을수록 분석되지 않은 종이 많아 종 풍부도가 높다고 판단한다(Kielak et al., 2009). Phylogenetic diversity는 계통수에서 노드(node) 간 최단 거리를 합산하여 종 간의 계통학적 차이를 수치화하는 지수로, 종의 다양성과 양의 상관관계가 있다. 세균 군집 간 유사성을 판단하기 위하여 UniFrac method를 이용한 주좌표분석(Principle coordinate analysis, PCoA)을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 연구대상지 토양 화학성 특성 분석 및 비교

관행 및 유기농 벼 단작 토양과 유기농 복합생태 논습지 토양 시료의 화학성 분석 결과는 Table 2와 같다. 수소 이온 농도(pH)는 관행 벼 단작 재배 토양 (pH 6.8)과 유기농 벼 단작 재배 토양(pH 6.0)과 비교하여 유기농 복합생태 논습지 토양 (pH 5.7, pH 5.4)에서 낮게 측정되었다. 특히 유기농 복합생태 논습지의 경우 운영 기간이 길어질수록 수소이온 농도가 낮아지는 경향이 나타났다. 유효인산은 관행 벼 단작 토양(15.5 mg·kg⁻¹)보다 유기농 벼 단작 토양(6.5 mg·kg⁻¹)과 유기농 복합생태 논습지 운영 1년 차 토양(9.5 mg·kg⁻¹)에서 낮게 나타났으나, 복합생태 논습지 4년 차 토양에서 20.3 mg·kg⁻¹로 나타나 토양 내 인의 함량이 증가하였다. 사료 투입은 토양의 영양분

을 증가시키는 원인(Liang et al., 2013; Liu et al., 2019)이며, 벼-참깨 복합생산 조건에서 운영 기간에 따라 TN, TP, AP, AN 등이 증가하므로(Jiang et al., 2021), 지속적인 큰정거미 새우의 사료 투입과 그들의 배설물 등에 의한 원인으로 판단된다. 유기물(OM) 함량도 유효인산과 비슷한 경향으로 유기농 복합생태 운영 기간에 따라 유기물 함량이 25.1 g·kg⁻¹에서 37.2 g·kg⁻¹로 증가하였다. 그러나 본 연구에서 분석한 토양 시료 개수가 적기 때문에 복합생산에 의한 토양 내 영양염류의 축적을 평가하기에 제한적이며, 유기농 복합생산 논습지 토양의 지속적인 화학성 분석 및 재배관리 방안 마련을 위한 연구가 동반되어야 할 것이다.

3.2 연구대상 토양의 파이로시퀀싱 결과 요약

벼-큰정거미새우 복합생산 조건에서 토양 세균 군집의 특성을 확인하기 위하여 총 네 곳의 시험포장에서 토양 시료를 채취하여 Next Generation Sequencing(NGS) 분석을 수행하였다.

Chimera 염기서열 등 불필요한 염기서열을 제거하고 얻은 대용량 염기서열을 바탕으로 문(phylum)과 속(genus) 수준에서 세균 군집의 상대적 빈도수와 상대 비교분석을 하였다(Fig. 3, Fig. 4). 각 계통분류별 총 구성 비율의 1.0% 미만을 차지하는 그룹은 기타(Others)로 분류하였고, 97 % 유사도를 기준으로 속(genus) 수준으로 분류된 각 시료의 총 염기서열 수는 관행 벼 단작 토양 4,986개, 유기농 벼 단작 토양 8,258개, 유기농 복합생태 생산 1년 차 토양 9,546개, 그리고 유기농 복합생태 생산 4년 차 토양 7,945개이다. 각 시료에서 Rarefaction

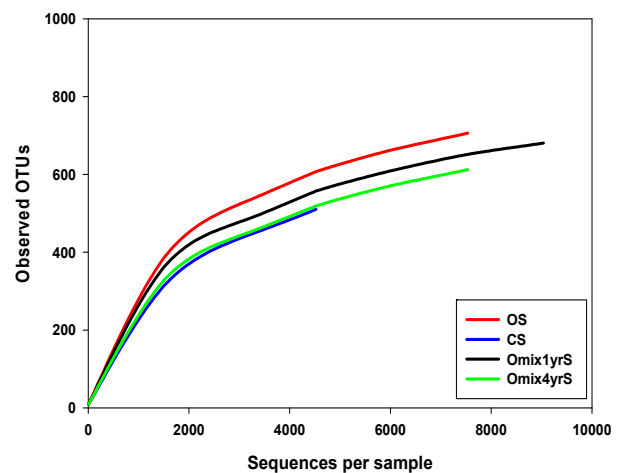


Fig. 2. Rarefaction curves of 16S rDNA in this study.

Table 2. The soil chemical characterization of 4 paddy soils

Classification	pH (1:5)	EC (dS·m ⁻¹)	Av.P ₂ O ₅ (mg·kg ⁻¹)	OM (g·kg ⁻¹)	Ex. cation (cmol·kg ⁻¹)		
					K	Ca	Mg
CS	6.82±0.42	1.08±0.11	15.52±0.24	32.18±0.19	1.16±0.1	8.14±0.1	2.82±0.1
OS	6.03±0.01	0.49±0.03	6.55±0.22	22.07±0.54	0.40±0.2	5.05±0.2	1.48±0.0
Omix1yrS	5.77±0.01	0.41±0.02	9.58±0.14	25.12±0.54	0.40±0.2	5.00±0.1	1.33±0.0
Omix4yrS	5.49±0.01	0.81±0.01	20.32±0.18	37.26±0.62	0.28±0.1	5.77±0.2	1.37±0.0

Table 3. Bacterial diversity estimates in 4 paddy soils

Classification	Numbers of Individual		Richness estimation		Diversity index	
	Read Count	OTUs	Chao1	Shannon DI	Inverse Simpson	Good's Coverage
CS	4,986	532	760.1011	6.9634	0.9710	0.9595
OS	8,258	724	847.4091	7.9768	0.9921	0.9781
Omix1yrS	9,546	689	778.8810	7.7882	0.9908	0.9842
Omix4yrS	7,945	621	787.0825	7.4375	0.9872	0.9773

curve는 모두 saturation 상태에 근접하는 형태로 나타나, 분석된 토양 시료의 read 수가 Operation Taxonomic Unit(OTU)를 얻기 위해 적절함을 확인하였다(Fig. 2). 전체 염기서열에서 singleton을 제외한 OTU로 계산되는 Good's coverage of library는 OS (0.9781%), CS(0.9596%), Omix1yrS(0.9842%), 그리고 Omix4yrS(0.9773%)로 나타나 토양 시료의 분석된 염기서열 수가 세균 군집을 설명하기에 통계적으로 충분하였다(Table 3).

3.3 연구대상 토양 미생물의 문(Phylum) 수준 염기서열 분석

벼-큰장거미새우 복합생산 시 토양 세균의 생태적 특성을 파악하기 위하여 각 토양 시료의 DNA를 기반으로 대용량 염기서열 분석을 수행하였다. 문(Phylum) 수준의 bacterial taxa를 분석하여 1% 미만의 개체수가 나타난 문 수준을 제외한 결과 9개의 주요 문들이 분류되었다(Fig. 3).

*Proteobacteria*가 모든 토양 시료에서 가장 많은 빈도수를 나타낸 가운데 상위 5 문들의 상대적 빈도수를 살펴보면, 관행 벼 단작 토양의 경우 *Proteobacteria* (19.9%), *Bacteroidetes* (18.9%), *Chlorobi* (14.1%), *Chloroflexi* (9.0%), *Actinobacteria* (7.7%), *Verrucomicrobia* (5.4%) 순으로 분류되었고, 유기농 벼 단작 토양의 경우 *Proteobacteria* (34.7%), *Bacteroidetes* (12.6%), *Chloroflexi* (9.4%), *Actinobacteria* (8.5%), *Verrucomicrobia* (8.4%) *Acidobacteria* (7.8%) 순으로 분류되었다. 유기농 복합생산 1년 차 토양의 경우 *Proteobacteria* (30.3%), *Bacteroidetes* (16.6%), *Chloroflexi* (9.4%), *Verrucomicrobia*

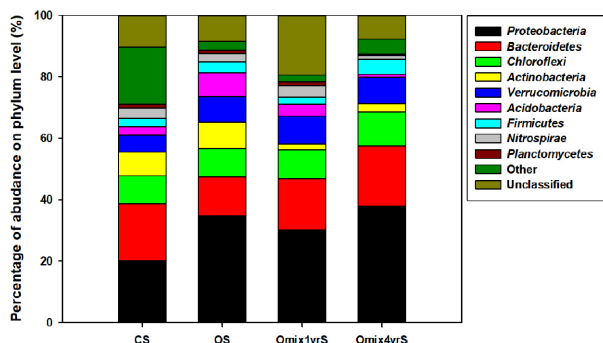


Fig. 3. The average relative abundances on phylum level of soil bacterial communities in organic, convention and organic rice-GRP mixed farming system.

(9.1%) *Acidobacteria* (4.1%), *Actinobacteria* (1.8%) 순으로 분류되었고, 유기농 복합생산 4년 차 토양의 경우 *Proteobacteria* (37.9%), *Bacteroidetes* (19.6%), *Chloroflexi* (11.0%), *Verrucomicrobia* (8.4%) *Actinobacteria* (2.9%), *Acidobacteria* (1.0%) 순으로 분류되었다.

모든 토양 시료에서 우점하게 나타나는 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*는 모든 토양 시료에서 우점하게 분포되어 있는데 농경지 토양, 혐기성 슬러지 및 다른 여러 환경에서 광범위하게 존재하며(Ahring 2003; Fierer and Jackson 2006; Janssen 2006), 질소 제거, 황산화, 탄소화물 대사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Thomsen et al. 2007). 다른 토양 시료보다 유기농 벼 단작 토양에서 우점하게 나타난 *Acidobacteria*는 부엽토 분해 과정에서 탄소순환에 관여하는 것으로 알려져 있으며(Liu et al., 2014), 수분이 적은 환경에서 상대적 빈도수가 높게 나타난다(Zeglin et al., 2011). 본 연구에서도 상시 담수조건 형태인 유기농 복합생산 토양에서 상대적 빈도수가 적은 이유가 동일한 원인으로 판단된다.

관행 벼 단작 토양보다 유기농 벼 단작 토양과 유기농 복합생산 토양에서 높게 우점하고 있는 *Verrucomicrobia*는 퇴적토에서 질소를 고정하고, 메탄 발생을 완화하는 기능이 보고되었으며(Nixon et al. 2019; Dunfield et al., 2007; Chiang et al., 2018), 수분의 영향에 따라 다르게 분포되는 것으로 알려져 있다(Daniel and Thomas 2001).

3.4 연구대상 토양 미생물의 속(Genus) 수준 염기서열 분석

연구대상 토양 세균 군집의 속(genus) 수준에서 분류한 상대적 빈도수를 나타내었다(Fig. 4).

분류되지 않은 속과 각 시료에서 상대적 빈도수가 1.0% 이하인 속들을 제외한 결과 50 속들을 분류하였다. 단, 각 시료에서 하나라도 1.0%의 상대빈도수를 가진 속들은 모두 포함되었다. 관행 벼 단작 토양보다 유기농 벼 단작 토양과 유기농 복합생산 토양에서 우점하는 속(Genus)들은 *Limisphaera*, *Pelobacter*, *Sideroxydans*이며, 이 중 *Limisphaera*는 모든 토양 시료에서 높은 상대적 빈도수를 나타냈다(CS-4.95%; OS-4.90%; Omix1yrS-7.05%; Omix4yrS-7.75%). *Limisphaera*은 AS(III) methylation에 관여한다고 알려져 있으며(Guo et al., 2021), 일반 벼 단작 재배 토양보다 복합생산 토양에서 높은 빈도수를 나타냈다. *Chlorobaculum* (13.86%), *Natronoflexus* (4.87%), *Paeniglutamicibacter* (4.37%) *Tepidisphaera* (1.18%)는

	Relative abundance			
	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS
<i>Acidobacterium</i>	0.18%	1.62%	0.63%	0.05%
<i>Alkaliflexus</i>	1.00%	0.29%	0.12%	0.01%
<i>Alkalitales</i>	1.97%	1.42%	1.27%	1.70%
<i>Anaeromyxobacter</i>	1.26%	2.51%	2.54%	2.04%
<i>Aromatoflexus</i>	0.24%	0.65%	1.54%	1.10%
<i>Beilinia</i>	1.26%	1.74%	3.77%	2.22%
<i>Bradyrhizobium</i>	0.32%	2.17%	0.66%	0.34%
<i>Chlorobaculum</i>	13.86%	0.00%	0.00%	0.04%
<i>Chrysosphaera</i>	1.00%	0.34%	3.26%	0.37%
<i>Clostridium</i>	0.92%	0.59%	0.24%	1.85%
<i>Cyanobium</i>	1.83%	0.02%	0.00%	0.00%
<i>Dechloromonas</i>	0.00%	0.00%	0.02%	1.18%
<i>Desulfobacca</i>	0.40%	0.74%	1.50%	1.15%
<i>Dissulfuribaculum</i>	2.43%	2.54%	1.27%	0.59%
<i>Gallionella</i>	0.00%	0.19%	1.29%	0.00%
<i>Geobacter</i>	0.18%	0.82%	1.34%	0.35%
<i>Geobacter</i>	2.61%	2.62%	0.63%	4.10%
<i>Geothrix</i>	0.04%	1.30%	0.25%	0.00%
<i>Ignisbacterium</i>	0.34%	0.54%	0.35%	2.00%
<i>Intrasporangium</i>	0.88%	1.11%	0.14%	0.03%
<i>Labilibacter</i>	0.04%	0.02%	0.04%	1.71%
<i>Lacunosphaera</i>	0.02%	0.33%	1.23%	0.00%
<i>Lentimicrobium</i>	1.50%	2.14%	2.21%	7.02%
<i>Levilinea</i>	1.50%	1.28%	0.72%	1.85%
<i>Littorina</i>	4.95%	6.90%	7.05%	7.75%
<i>Mangroviaflexus</i>	0.10%	0.35%	0.15%	2.01%
<i>Methyloceanobacter</i>	0.44%	1.26%	0.43%	0.23%
<i>Methylocystis</i>	1.06%	2.13%	0.84%	1.08%
<i>Moorella</i>	1.02%	1.16%	1.04%	1.16%
<i>Mycobacterium</i>	0.30%	1.17%	0.12%	0.25%
<i>Natronoflexus</i>	4.87%	2.66%	0.90%	1.27%
<i>Nitrospira</i>	1.02%	0.57%	0.06%	0.08%
<i>Nocardioides</i>	1.26%	0.24%	0.06%	0.06%
<i>Ornatilinea</i>	0.92%	1.50%	1.01%	1.61%
<i>Paeniglutamicibacter</i>	4.37%	2.45%	0.24%	0.60%
<i>Paludibaculum</i>	2.19%	3.06%	2.03%	0.77%
<i>Pelobacter</i>	0.36%	1.16%	1.20%	1.42%
<i>Pelolinea</i>	0.40%	0.44%	0.36%	2.40%
<i>Prolibacter</i>	0.72%	0.63%	0.61%	1.52%
<i>Pseudobrya</i>	0.64%	3.04%	1.32%	0.44%
<i>Rhodofarax</i>	0.00%	0.00%	0.00%	2.10%
<i>Sideroxydans</i>	0.22%	1.54%	1.00%	3.81%
<i>Syntrophus</i>	2.33%	1.32%	1.40%	5.20%
<i>Tangiafarax</i>	2.13%	1.94%	6.41%	2.14%
<i>Thiobacillus</i>	1.18%	0.92%	0.54%	0.21%
<i>Thermodesulfobacterium</i>	2.37%	1.72%	2.17%	0.76%
<i>Thermodesulfobacterium</i>	0.78%	0.61%	1.11%	0.58%
<i>Thermomarinilinea</i>	2.73%	1.66%	1.54%	1.02%
<i>Thiobacillus</i>	0.46%	0.44%	1.44%	0.97%
<i>Thiobacter</i>	0.12%	0.17%	1.92%	0.08%
Others	18.89%	27.44%	20.70%	23.13%
Unclassified bacteria	10.35%	8.51%	19.30%	7.64%

Fig. 4. The average relative abundances on genus level of soil bacterial communities in organic, convention and organic rice-GRP mixed farming system.

유기농 벼 단작 토양보다 관행 벼 단작 토양에서 상대적 빈도가 높게 나타나 관행 벼 단작 토양에 특화된 세균들로 추측할 수 있다. *Chlorobaculum*은 벼 재배 시 토양 내 카드뮴의 입단화에 관여하여 식물체 흡수를 방해한다고 알려져 있으나(Ma et al, 2021), 본 연구에서 시험한 관행 벼 단작 토양의 중금속 함량은 측정하지 않아 정확한 연관성은 파악할 수 없었다.

주좌표분석(Principal coordinates analysis)을 통해 각 토양 시료의 세균 군집 간의 유사도를 분석하였다(Fig. 5). 관행 벼 단작 토양의 세균 군집과 비교하여 유기농 벼 단작과 벼-큰장거미 복합생태 간의 토양 세균 군집이 근접하게 분포하는 것을 알 수 있다. 이 결과는 관행 벼 재배와 유기농 벼 재배 방법에 따라 토양 세균 구조가 다르게 구성되어 있음을 추정할 수 있지만 본 연구에서 분석한 토양의 시료 표본이 적은 관계로 향후 더 많은 토양 시료에서 세균 군집 구조를 분석하여 비교할 필요가 있다.

97%의 유의 수준에서 분류하여 1,093 OTU를 획득하였다.

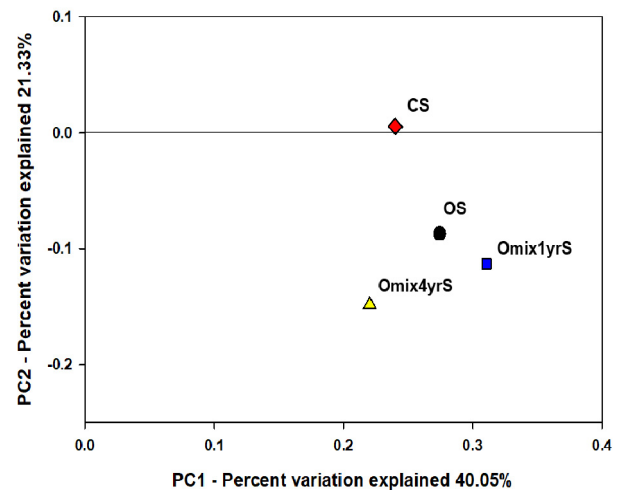


Fig. 5. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of bacterial communities. The bacterial communities were closed similar abundant.

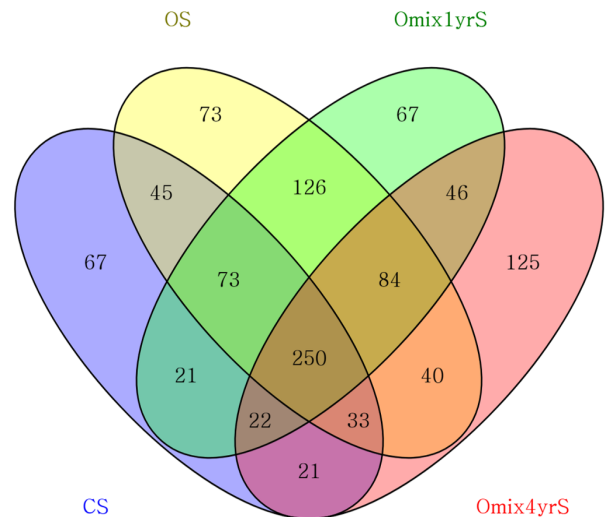


Fig. 6. The Venn-diagram of different samples at OTU level.

유기농 벼-큰장거미세우 복합생태 논습지 토양과 유기농 일반 벼 단작 토양을 비교하여 필수적인 세균 군집을 벤-다이어그램을 이용하여 분석하였다(Fig. 6). 전체 벼 재배 토양 시료에서 총 1,093 개의 Operated Taxonomic Unit(OTU)가 관찰되었고, 이 중 250 OTU가 모든 토양 세균 군집에 존재하였다. 유기농 벼 재배 토양 세균 군집만 분류하면, 유기농 토양에 특화된 561 OTU가 관찰되었고, 84 OTU는 일반 유기농 벼 재배와 벼-큰장거미세우 복합생태 토양에서 로 분류되었고, 유기농 복합생태 논습지 토양의 세균 군집은 생산기간에 따라 유사하게 나타났다.

4. 결 론

본 연구는 국제적으로 중요성이 인정된 논습지에 구조적으로 어류서식 공간을 추가한 복합생태를 운영하는 논에서 벼

와 큰징거미새우를 복합생산 시 토양에 분포하는 미생물과 세균들의 차이를 알아보고자 진행되었다. 향후 유기농 복합 생태농업 실천에 따른 생태환경 유지, 생물다양성 증진 및 지속 보전 효과를 증명할 수 있는 정보를 제공하고자 수행하였다.

유기농 복합생태 논습지의 토양 미생물 다양성 증진 효과를 알아보기 위하여 복합생태 논습지를 조성하고 토양 시료를 채취, 전처리하는 과정을 수행하였다. 이후 토양의 화학적 특성을 공정시험 방법에 따라 분석하였고, 미생물 중 세균의 다양성 특성을 알아보기 위하여 Pyrosequencing을 수행하였다. Pyrosequencing 결과를 바탕으로 종 풍부도, 상대적 빈도수 등을 분석하여 토양 미생물 군집의 다양성 차이를 확인하였다.

분석결과 유기농-벼큰징거미 새우 복합생산 기간이 길어질수록 유효인산과 유기물 함량이 증가하였다. 논습지 토양은 일반 재배 토양과 다른 상시 담수 조건이므로 토양 세균의 군집 구조가 다를 것이라 예상하였다. 실제 각 토양 세균 군집 구조는 종 풍부도의 차이는 확인하였으며, 종 다양성은 미약한 범위로 차이를 확인하였다. 많은 연구 결과와 유사하게 문(Phylum) 수준에서 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chlorobi*가 우점하게 분포되어 있었고, 속(Genus) 수준에서는 모든 토양 시료에서 *Limisphaera*의 상대적 빈도수가 높게 나타나는 것을 확인하였다. 전체적인 분석 결과 관행 재배 논 대비 유기농 재배 논에서 미생물의 총 개체수가 차이가 확인되었으며, 일부 종에서 관행 논과 유기농 논이 차이가 구분되고 있다. 하지만 일반 유기농 재배 논 대비 서식처라는 구조적 특징이 있는 복합생태논의 미생물 개체수 및 다양성은 큰 차이가 확인되지 않은 원인을 설명하지 못한 것은 본 연구의 한계로 거론한다. 본 연구의 한계를 보완하기 위해서는 관행 재배 논 및 유기농 재배 논과 비교 시 동병형 서식처를 따로 구분하여 샘플링 하는 등 조사 범위의 확장이 필요하다고 판단된다.

이러한 연구 결과를 활용하여 복합생태농업 구현에 따른 논습지 및 논농업의 생물다양성 증진, 탄소저감 등 다양한 생태계서비스 기능 향상 기술로 발전되길 기대하고 있다.

사 사

연구는 2022년 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(PJ01493904)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Ahring BK (2003) Perspectives for anaerobic digestion. *Adv Biochem EngBiotechnol* 81:1–30.
- Bastida, F., Eldridge, D.J., García, C. et al. (2021) Soil microbial diversity–biomass relationships are driven by soil carbon content across global biomes. *ISME J* 15, 2081–2091. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00906-0>
- Chiang E, Schmidt ML, Berry MA, Biddanda BA, Burtner A, Johengen TH, Palladino D, Denef VJ (2018) Verrucomicrobia are prevalent in northtemperate freshwater lakes and display class-level preferences between lake habitats. *PLoS ONE* 13(3):e0195112
- Daniel HB, Thomas MS (2001) Environmental factors influencing the distribution of rRNA from Verrucomicrobia in soil. *FEMS Microbiol Ecol* 35(1):105–112
- Dunfield PF, Yuryev A, Senin P, Smirnova AV, Stott MB, Hou SB, Ly B, Saw JH, Zhou ZM, Ren Y, Wang JM, Mountain BW, Crowe MA, Weatherby TM, Bodelier PLE, Liesack W, Feng L, Wang L, Alam M (2007) Methane oxidation by an extremely acidophilic bacterium of the Phylum Verrucomicrobia. *Nature* 450(7171):879–882
- Edwards J, Johnson C, Santos-Medellin C, Lurie E, Podishetty NK, Bhatnagar S, Eisen JA, Sundaresan V (2015) Structure, variation, and assembly of the root-associated microbiomes of rice. *Proc Natl Acad Sci* 112(8):E911–E920
- Elpick CS (2010) Why Study Birds in Rice Fields? *Waterbirds*, 33(sp1), 1–7.
- Ernakovich, J.G., Baldock, J., Creamer, C. et al. (2021) A combined microbial and ecosystem metric of carbon retention efficiency explains land cover-dependent soil microbial biodiversity–ecosystem function relationships. *Biogeochemistry* 153, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10533-020-00736-w>
- Guo T, Williamson G, Haiying L, Yan H, Xianjin T, David B, Jianming X (2021) Periphyton enhances arsenic release and methylation at the soil–water interface of paddy soils. *J. Hazard. Mater.* 409, 1–10.
- Han MS, Kang KK, Na YE, Bang HS, Kim MH, Jung MP, Lee JT, Hong, HK, Yoon DU (2010) Aquatic invertebrate in paddy ecosystem of Korea, NAAS, pp. 1–416. [Korean Literature]
- Han MS, Kim MH, Bang HS, Na YE, Lee DB, Kang KK (2011) Geographical distribution of diving beetles (Dytiscidae) in Korean paddy ecosystem. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 30(2), 209–215.
- Janssen PH (2006) Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* 72(3):1719–1722
- Kielak A, Pijl A S, Van Veen J A, Kowalchuk, G A (2009). Phylogenetic diversity of Acidobacteria in a former agricultural soil. *The ISME journal*, 3(3): 378–382.
- Kim MH, Han MS, Nam HK, Kang KK, Kim MR (2012) Geological Distribution of Aquatic Invertebrates Living in Paddy Fields of South Korea, *Korean J. Soil Sci. Fert.*, 45(6), 1136–1142 [Korean Literature]
- Kong MJ (2013) Value Assessment of the Paddy Field by

- Cultivation Methods According to Wetland Function Assessment System, Master's Thesis, Dankook University, Cheonan-si, Korea [Korean Literature]
- Kong MJ, Kim CH, Lee SM, Park KL, An NH, Cho JL, Kim BR, Lim JA, Lee CW, Kim HS, Nam HS, Son JK (2018) The Effect Analysis of Vegetation Diversity on Rice-Fish Mixed Farming System in Paddy Wetland. *J. of Wetlands Reaserch*, 20(4) 398-409 [Korean Literature]
- Kong MJ, Lee BM, Kim NC, Son, JK (2014) The Analysis of Function and Factors for the Value Assessment of Ecosystem Service at Rice Paddy Wetland. *Journal of Wetlands Research*, 16(2), 251-259 [Korean Literature]
- Liang B, Yang X, Murphy DV, He X, Zhou J (2013) Fate of 15 N-labeled fertilizer in soils under dryland agriculture after 19 years of different fertilizations. *Biol Fertil Soils* 49(8):977-986
- Liu C, Hu N, Song W, Chen Q, Zhu L (2019) Aquaculture feeds can be outlaws for eutrophication when hidden in rice fields? A case study in Qianjiang, China. *Int J Environ Res Public Health* 16(22):4471
- Liu J, Sui Y, Yu Z, Shi Y, Chu H, Jin J, Liu X, Wang G (2014) High throughput sequencing analysis of biogeographical distribution of bacterial communities in the black soils of northeast China. *Soil Biol Biochem* 70:113-122
- Nam HS, Byeon, YW, Parjn KC, Park KL, Lee YM, Han EJ, Ki, CH, Kong MJ, Son JK (2020) Economic Value Evaluation of Ecosystem Services in Organic Rice-Fish Mixed Farming System in Paddy Wetland. *Journal of Wetlands Reaserch*, 22(4), 286-294 [Korean Literature]
- Nam HS, Park KL, An NH, Lee SM, Cho JL, Kim BR, Lim JA, Lee CW, Choi SU, Kim CH, Kong MJ, Son JK (2018) Wetland Function Evaluation and Expert Assessment of Organic Rice-Fish Mixed Farming System. *Journal of Wetlands Reaserch*, 20(2), 161-172 [Korean Literature]
- National Institute of Fisheries Science (NIFS) (2018) Development of eco-friendly aquaculture technology with a gint river prawn, a muddy loach, Report of National Institute of Fisheries Science, 1-46. [Korean Literature]
- NIAST, (2000) *Methods of analysis of soil and plant*, National Institute of Agricultural Science, RDA, Suwon, Korea
- Nixon SL, Daly RA, Borton MA, Solden LM, Welch SA, Cole DR, Mouser PJ, Wilkins MJ, Wrighton KC (2019) Genome-resolved metagenomics extends the environmental distribution of the Verrucomicrobia Phylum to the deep terrestrial subsurface. *Msphere* 4(6):e613-e619
- Oliver, E.E., Houlton, B.Z. & Lipson, D.A. Controls on soil microbial carbon use efficiency over long-term ecosystem development (2021) *Biogeochemistry* 152, 309-325. <https://doi.org/10.1007/s10533-021-00758-y>
- Ramsar. (2008). 10th Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Wetlands, Resolution X.31 : Enhancing biodiversity in rice paddies as wetland systems. Ramsar. (2021). <http://www.ramsar.org>
- Smajgl A, Toa TQ, Nhan DK, Ward J, Trung NH, Tri LQ, Tri VPD, Vu PT (2015) Responding to rising sea-levels in Vietnam's Mekong Delta. *Nat Clim Chang* 5:167-174
- Son JK, Kang BH, Kim NC (2010) The Analysis of Water and Soil Environment at Farm Pond Depression, *J. of the Korean Environmental Restoration Technology*, 13(3), 46-62 [Korean Literature]
- Son JK, Kim MH, Lee SY, Kang DH, Kang BH (2014b) The assessment of caonservation value for agricultural pond wetland using the weighted function of modified RAM, *Journal of Korean Society of Rural Planning*, 20(4), 13-24 [Korean Literature]
- Son JK, Shin MJ, Shin JH, Kang DH, Kang BH (2014a) The Functional Selection for the Assessment of Ecosystem Service at Pond Wetland in Agricultural Landscape, *Journal of Wetland Reserch*, 16(4), 319-325 [Korean Literature]
- Thomsen TR, Kong Y, Nielsen PH (2007) Ecophysiology of abundant denitrifying bacteria in activated sludge. *FEMS Microbiol Ecol* 60(3):370-38
- Torsvik, V. and Øvreås, L., 2002, Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5(3), 240-245.
- Wang A, Wang W, Ma X, Wang Q, Yu Y, Chen W (2011) Study on the changes of water environmental factors in rice-crab culture system. *Hubei Agric Sci* 50(17):3514-3519
- Wikipedia (2022), https://en.wikipedia.org/wiki/Macrobrachium_rosenbergii/.
- Xie J, Hu L, Tang J, Wu X, Li N, Yuan Y, Yang H, Zhang J, Luo S, Chen X (2011) Ecological mechanisms underlying the sustainability of the agricultural heritage rice-fish co-culture system. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E1381-E1387
- Xu J, Hui M, Qing-:ei Z, Cai-yun X, Bocong C (2021) Bacterial communities in paddy soil and ditch sediment under rice-crab co-culture system. *AMB express* 11:163.
- Yu J, Ren Y, Xu T, Li W, Xiong M, Zhang T, Li Z, Liu J (2018) Physicochemical water quality parameters in typical rice-crayfish integrated systems (RCIS) in China. *Int J Agric Biol Eng* 11(3):54-60
- Zeglin LH, Dahm CN, Barrett JE, Gooseff MN, Fitpatrick SK, Takacs-Vesbach CD (2011) Bacterial community structure along moisture gradients in the parafluvial sediments of two ephemeral desert streams. *Microb Ecol* 61(3):543-556
- Zhang J, Hu L, Ren W, Guo L, Tang J, Shu M, Chen X

(2016) Rice-soft shell turtle coculture effects on yield and its environment. *Agric Ecosyst Environ.* 224:116-22
Zhao X, Luo H, Liu Q, Zhao L, Cai L, Dai L, Zhang Z

(2017) Influence of the cultured *Odontobutis obscurus* to the microbial community structure and diversity in rice-fish system. *Freshw Fish* 47(4):8-14 (in Chinese)

Appendix 1. The detection of microbial species at 4 study sites

Taxonomic Species	Number of Species				Ratio of Species			
	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS
<i>Bacteria</i> (Kingdom)								
<i>Acidobacteria</i> (Phylum)								
<i>Acidobacteriia</i> (Class)								
<i>Acidobacteriales</i> (Order)								
<i>Acidobacteriaceae</i> (Family)								
<i>Acidobacterium</i> (Genus)								
<i>Acidobacterium ailaui</i> (Species)	9	134	60	4	0.18	1.62	0.63	0.05
<i>Bryobacteriales</i> (Order)								
<i>Bryobacteraceae</i> (Family)								
<i>Paludibaculum</i> (Genus)								
<i>Paludibaculum fermentans</i> (Species)	109	253	194	61	2.19	3.06	2.03	0.77
<i>Holophagae</i> (Class)								
<i>Holophagales</i> (Order)								
<i>Holophagaceae</i> (Family)								
<i>Geothrix</i> (Genus)								
<i>Geothrix fermentans</i> (Species)	2	107	24		0.04	1.30	0.25	
<i>Actinobacteria</i> (Class)								
<i>Corynebacteriales</i> (Order)								
<i>Mycobacteriaceae</i> (Family)								
<i>Mycolicibacterium</i> (Genus)								
<i>Mycolicibacterium mucogenicum</i> (Species)	15	97	11	20	0.30	1.17	0.12	0.25
<i>Micrococcales</i> (Order)								
<i>Intrasporangiaceae</i> (Family)								
<i>Intrasporangium</i> (Genus)								
<i>Intrasporangium oryzae</i> (Species)	44	92	13	2	0.88	1.11	0.14	0.03
<i>Micrococcaceae</i> (Family)								
<i>Paeniglutamicibacter</i> (Genus)								
<i>Paeniglutamicibacter cryotolerans</i> (Species)	218	202	23	48	4.37	2.45	0.24	0.60
<i>Propionibacteriales</i> (Order)								
<i>Nocardiodaceae</i> (Family)								
<i>Nocardioidea</i> (Genus)								
<i>Nocardioidea mesophilus</i> (Species)	63	20	6	5	1.26	0.24	0.06	0.06
<i>Bacteroidetes</i> (Phylum)								
<i>Bacteroidia</i> (Class)								
<i>Bacteroidales</i> (Order)								
<i>Lentimicrobiaceae</i> (Family)								
<i>Lentimicrobium</i> (Genus)								
<i>Lentimicrobium saccharophilum</i> (Species)	75	177	211	558	1.50	2.14	2.21	7.02
<i>Marinilabiales</i> (Order)								
<i>Marinilabiaceae</i> (Family)								
<i>Alkaliflexus</i> (Genus)								
<i>Alkaliflexus imshenetskii</i> (Species)	50	24	11	1	1.00	0.29	0.12	0.01
<i>Alkalitalea</i> (Genus)								
<i>Alkalitalea saponilacus</i> (Species)	98	117	121	135	1.97	1.42	1.27	1.70
<i>Labilibacter</i> (Genus)								
<i>Labilibacter aurantiacus</i> (Species)	2	2	4	136	0.04	0.02	0.04	1.71
<i>Mangroviflexus</i> (Genus)								
<i>Mangroviflexus xiamenensis</i> (Species)	5	29	14	160	0.10	0.35	0.15	2.01
<i>Natronoflexus</i> (Genus)								
<i>Natronoflexus pectinivorans</i> (Species)	243	220	86	101	4.87	2.66	0.90	1.27
<i>Prolixibacteraceae</i> (Family)								
<i>Prolixibacter</i> (Genus)								
<i>Prolixibacter denitrificans</i> (Species)	36	52	58	121	0.72	0.63	0.61	1.52
<i>Tangfeifania</i> (Genus)								
<i>Tangfeifania diversioriginum</i> (Species)	106	160	612	170	2.13	1.94	6.41	2.14

Appendix 1. Continue

Taxonomic Species	Number of Species				Ratio of Species			
	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS
<i>Chitinophagia</i> (Class)								
<i>Chitinophagales</i> (Order)								
<i>Chitinophagaceae</i> (Family)								
<i>Niabella</i> (Genus)								
<i>Niabella hirudinis</i> (Species)	51	47	6	6	1.02	0.57	0.06	0.08
<i>Cytophagia</i> (Class)								
<i>Cytophagales</i> (Order)								
(Family)								
<i>Chryseolinea</i> (Genus)								
<i>Chryseolinea soli</i> (Species)	50	28	311	29	1.00	0.34	3.26	0.37
<i>Acidobacteria</i> (Phylum)								
<i>Acidobacteriia</i> (Class)								
<i>Acidobacteriales</i> (Order)								
<i>Acidobacteriaceae</i> (Family)								
<i>Acidobacterium</i> (Genus)								
<i>Acidobacterium ailaui</i> (Species)	9	134	60	4	0.18	1.62	0.63	0.05
<i>Bryobacteriales</i> (Order)								
<i>Bryobacteraceae</i> (Family)								
<i>Paludibaculum</i> (Genus)								
<i>Paludibaculum fermentans</i> (Species)	109	253	194	61	2.19	3.06	2.03	0.77
<i>Holophagae</i> (Class)								
<i>Holophagales</i> (Order)								
<i>Holophagaceae</i> (Family)								
<i>Geothrix</i> (Genus)								
<i>Geothrix fermentans</i> (Species)	2	107	24		0.04	1.30	0.25	
<i>Actinobacteria</i> (Class)								
<i>Corynebacteriales</i> (Order)								
<i>Mycobacteriaceae</i> (Family)								
<i>Mycolicibacterium</i> (Genus)								
<i>Mycolicibacterium mucogenicum</i> (Species)	15	97	11	20	0.30	1.17	0.12	0.25
<i>Micrococcales</i> (Order)								
<i>Intrasporangiaceae</i> (Family)								
<i>Intrasporangium</i> (Genus)								
<i>Intrasporangium oryzae</i> (Species)	44	92	13	2	0.88	1.11	0.14	0.03
<i>Micrococcaceae</i> (Family)								
<i>Paeniglutamicibacter</i> (Genus)								
<i>Paeniglutamicibacter cryotolerans</i> (Species)	218	202	23	48	4.37	2.45	0.24	0.60
<i>Propionibacteriales</i> (Order)								
<i>Nocardiodaceae</i> (Family)								
<i>Nocardioidea</i> (Genus)								
<i>Nocardioidea mesophilus</i> (Species)	63	20	6	5	1.26	0.24	0.06	0.06
<i>Bacteroidetes</i> (Phylum)								
<i>Bacteroidia</i> (Class)								
<i>Bacteroidales</i> (Order)								
<i>Lentimicrobiaceae</i> (Family)								
<i>Lentimicrobium</i> (Genus)								
<i>Lentimicrobium saccharophilum</i> (Species)	75	177	211	558	1.50	2.14	2.21	7.02
<i>Marinilabiliales</i> (Order)								
<i>Marinilabiliaceae</i> (Family)								
<i>Alkaliflexus</i> (Genus)								
<i>Alkaliflexus imshenetskii</i> (Species)	50	24	11	1	1.00	0.29	0.12	0.01
<i>Alkalitalea</i> (Genus)								
<i>Alkalitalea saponilacus</i> (Species)	98	117	121	135	1.97	1.42	1.27	1.70
<i>Labilibacter</i> (Genus)								
<i>Labilibacter aurantiacus</i> (Species)	2	2	4	136	0.04	0.02	0.04	1.71

Appendix 1. Continue

Taxonomic Species	Number of Species				Ratio of Species			
	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS
<i>Mangroviiflexus</i> (Genus)								
<i>Mangroviiflexus xiamenensis</i> (Species)	5	29	14	160	0.10	0.35	0.15	2.01
<i>Natronoflexus</i> (Genus)								
<i>Natronoflexus pectinivorans</i> (Species)	243	220	86	101	4.87	2.66	0.90	1.27
<i>Prolixibacteraceae</i> (Family)								
<i>Prolixibacter</i> (Genus)								
<i>Prolixibacter denitrificans</i> (Species)	36	52	58	121	0.72	0.63	0.61	1.52
<i>Tangfeifania</i> (Genus)								
<i>Tangfeifania diversioriginum</i> (Species)	106	160	612	170	2.13	1.94	6.41	2.14
<i>Chitinophagia</i> (Class)								
<i>Chitinophagales</i> (Order)								
<i>Chitinophagaceae</i> (Family)								
<i>Niabella</i> (Genus)								
<i>Niabella hirudinis</i> (Species)	51	47	6	6	1.02	0.57	0.06	0.08
<i>Cytophagia</i> (Class)								
<i>Cytophagales</i> (Order)								
(Family)								
<i>Chryseolinea</i> (Genus)								
<i>Chryseolinea soli</i> (Species)	50	28	311	29	1.00	0.34	3.26	0.37
<i>Chlorobi</i> (Phylum)								
<i>Chlorobia</i> (Class)								
<i>Chlorobiales</i> (Order)								
<i>Chlorobiaceae</i> (Family)								
<i>Chlorobaculum</i> (Genus)								
<i>Chlorobaculum limnaeum</i> (Species)	691			3	13.86			0.04
<i>Chloroflexi</i> (Phylum)								
<i>Anaerolineae</i> (Class)								
<i>Anaerolineales</i> (Order)								
<i>Anaerolineaceae</i> (Family)								
<i>Bellilinea</i> (Genus)								
<i>Bellilinea caldifistulae</i> (Species)	63	144	360	176	1.26	1.74	3.77	2.22
<i>Levilina</i> (Genus)								
<i>Levilina saccharolytica</i> (Species)	75	106	69	147	1.50	1.28	0.72	1.85
<i>Ornatilinea</i> (Genus)								
<i>Ornatilinea apprima</i> (Species)	46	124	96	128	0.92	1.50	1.01	1.61
<i>Pelolinea</i> (Genus)								
<i>Pelolinea submarina</i> (Species)	20	36	34	191	0.40	0.44	0.36	2.40
<i>Thermomarinilinea</i> (Genus)								
<i>Thermomarinilinea lacunifontana</i> (Species)	136	137	147	81	2.73	1.66	1.54	1.02
<i>Cyanobacteria</i> (Phylum)								
<i>Synechococcales</i> (Order)								
<i>Synechococcaceae</i> (Family)								
<i>Cyanobium</i> (Genus)								
<i>Cyanobium gracile</i> (Species)	91	2			1.83	0.02		
<i>Firmicutes</i> (Phylum)								
<i>Clostridia</i> (Class)								
<i>Clostridiales</i> (Order)								
<i>Clostridiaceae</i> (Family)								
<i>Clostridium</i> (Genus)								
<i>Clostridium bowmanii</i> (Species)	46	49	23	147	0.92	0.59	0.24	1.85
<i>Thermoanaerobacterales</i> (Order)								
<i>Thermoanaerobacteraceae</i> (Family)								
<i>Moorella</i> (Genus)								
<i>Moorella humiferrea</i> (Species)	51	96	99	92	1.02	1.16	1.04	1.16

Appendix 1. Continue

Taxonomic Species	Number of Species				Ratio of Species			
	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS
<i>Ignavibacteriae</i> (Phylum)								
<i>Ignavibacteria</i> (Class)								
<i>Ignavibacteriales</i> (Order)								
<i>Ignavibacteriaceae</i> (Family)								
<i>Ignavibacterium</i> (Genus)								
<i>Ignavibacterium album</i> (Species)	17	45	33	159	0.34	0.54	0.35	2.00
<i>Nitrospirae</i> (Phylum)								
<i>Nitrospira</i> (Class)								
<i>Nitrospirales</i> (Order)								
<i>Nitrospiraceae</i> (Family)								
<i>Thermodesulfobrio</i> (Genus)								
<i>Thermodesulfobrio thiophilus</i> (Species)	118	142	207	60	2.37	1.72	2.17	0.76
<i>Thermodesulfobrio yellowstonii</i> (Species)	39	50	106	46	0.78	0.61	1.11	0.58
<i>Planctomycetes</i> (Phylum)								
<i>Phycisphaerae</i> (Class)								
<i>Tepidisphaerales</i> (Order)								
<i>Tepidisphaeraceae</i> (Family)								
<i>Tepidisphaera</i> (Genus)								
<i>Tepidisphaera mucosa</i> (Species)	59	76	52	17	1.18	0.92	0.54	0.21
<i>Alphaproteobacteria</i> (Class)								
<i>Rhizobiales</i> (Order)								
(Family)								
<i>Methyloceanibacter</i> (Genus)								
<i>Methyloceanibacter caenitepidi</i> (Species)	22	104	41	18	0.44	1.26	0.43	0.23
<i>Proteobacteria</i> (Phylum)								
<i>Alphaproteobacteria</i> (Class)								
<i>Rhizobiales</i> (Order)								
<i>Bradyrhizobiaceae</i> (Family)								
<i>Bradyrhizobium</i> (Genus)								
<i>Bradyrhizobium lupini</i> (Species)	16	179	63	27	0.32	2.17	0.66	0.34
<i>Methylocystaceae</i> (Family)								
<i>Methylocystis</i> (Genus)								
<i>Methylocystis echinoides</i> (Species)	53	176	80	86	1.06	2.13	0.84	1.08
<i>Xanthobacteraceae</i> (Family)								
<i>Pseudolabrys</i> (Genus)								
<i>Pseudolabrys taiwanensis</i> (Species)	32	251	126	35	0.64	3.04	1.32	0.44
<i>Betaproteobacteria</i> (Class)								
<i>Burkholderiales</i> (Order)								
(Family)								
<i>Thiobacter</i> (Genus)								
<i>Thiobacter subterraneus</i> (Species)	6	14	183	6	0.12	0.17	1.92	0.08
<i>Comamonadaceae</i> (Family)								
<i>Rhodoferrax</i> (Genus)								
<i>Rhodoferrax saidenbachensis</i> (Species)				167				2.10
<i>Nitrosomonadales</i> (Order)								
<i>Gallionellaceae</i> (Family)								
<i>Gallionella</i> (Genus)								
<i>Gallionella capsiferriformans</i> (Species)		16	123			0.19	1.29	
<i>Sideroxydans</i> (Genus)								
<i>Sideroxydans lithotrophicus</i> (Species)	11	127	95	303	0.22	1.54	1.00	3.81
<i>Thiobacillaceae</i> (Family)								
<i>Thiobacillus</i> (Genus)								
<i>Thiobacillus thioparus</i> (Species)	23	36	137	77	0.46	0.44	1.44	0.97
<i>Rhodocyclales</i> (Order)								
<i>Azonexaceae</i> (Family)								

Appendix 1. Continue

Taxonomic Species	Number of Species				Ratio of Species			
	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS	CS	OS	Omix1yrS	Omix4yrS
<i>Dechloromonas</i> (Genus)								
<i>Dechloromonas hortensis</i> (Species)			2	94			0.02	1.18
<i>Rhodocyclaceae</i> (Family)								
<i>Aromatoleum</i> (Genus)								
<i>Aromatoleum toluclasticum</i> (Species)	12	54	147	87	0.24	0.65	1.54	1.10
<i>Deltaproteobacteria</i> (Class)								
(Order)								
(Family)								
<i>Dissulfurirhabdus</i> (Genus)								
<i>Dissulfurirhabdus thermomarina</i> (Species)	121	210	121	47	2.43	2.54	1.27	0.59
<i>Desulfuromonadales</i> (Order)								
<i>Desulfuromonadaceae</i> (Family)								
<i>Pelobacter</i> (Genus)								
<i>Pelobacter seleniigenes</i> (Species)	18	96	122	113	0.36	1.16	1.28	1.42
<i>Geobacteraceae</i> (Family)								
<i>Geobacter</i> (Genus)								
<i>Geobacter luticola</i> (Species)	9	68	128	28	0.18	0.82	1.34	0.35
<i>Geobacter psychrophilus</i> (Species)	130	216	60	326	2.61	2.62	0.63	4.10
<i>Myxococcales</i> (Order)								
<i>Anaeromyxobacteraceae</i> (Family)								
<i>Anaeromyxobacter</i> (Genus)								
<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> (Species)	63	207	242	162	1.26	2.51	2.54	2.04
<i>Syntrophobacterales</i> (Order)								
<i>Syntrophaceae</i> (Family)								
<i>Desulfobacca</i> (Genus)								
<i>Desulfobacca acetoxidans</i> (Species)	20	61	143	91	0.40	0.74	1.50	1.15
<i>Syntrophus</i> (Genus)								
<i>Syntrophus aciditrophicus</i> (Species)	116	109	134	413	2.33	1.32	1.40	5.20
<i>Verrucomicrobia</i> (Phylum)								
<i>Opitutae</i> (Class)								
<i>Opitutales</i> (Order)								
<i>Opitutaceae</i> (Family)								
<i>Lacunisphaera</i> (Genus)								
<i>Lacunisphaera limnophila</i> (Species)	1	27	117	0	0.02	0.33	1.23	0.00
<i>Verrucomicrobiae</i> (Class)								
<i>Verrucomicrobiales</i> (Order)								
<i>Verrucomicrobia subdivision 3</i> (Family)								
<i>Limisphaera</i> (Genus)								
<i>Limisphaera ngatamarikiensis</i> (Species)	247	570	673	616	4.95	6.90	7.05	7.75
Other	942	2,266	1,976	1,838	18.89	27.44	20.70	23.13
Unclassified	516	703	1,842	607	10.35	8.51	19.30	7.64
Total	4,986	8,258	9,546	7,945	100	100	100	100