

도심 학교 토양의 메탄 산화 및 생성 잠재력 평가

이윤영¹, 김태관¹, 류희욱², 조경숙^{1,3*}

¹이화여자대학교 환경공학과

²승실대학교 화학공학과

³이화여자대학교 환경공학과, Global Top 5 Research Program

Received: January 28, 2014 / Revised: February 3, 2014 / Accepted: February 6, 2014

Evaluation of Methane Oxidation and the Production Potential of Soils in an Urban School

Yun-Yeong Lee¹, Tae Gwan Kim¹, Hee Wook Ryu², and Kyung-Suk Cho^{1,3*}

¹Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Republic of Korea

²Department of Chemical Engineering, Soongsil University, Seoul 156-743, Republic of Korea

³Global Top 5 Research Program, Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Republic of Korea

Methane oxidation and the production potentials of ground soil (soil A) and garden soil (soil B, C, & D) in an urban school were evaluated, and the methanotrophic and methanogen communities in the soil samples were quantified using quantitative real-time PCR. The methanotrophic community in the raw soil A sample possessed a 6.1×10^3 gene copy number/g dry weight soil, whereas those in the raw soils B~D samples were $1.6\text{--}1.9 \times 10^5$ gene copy numbers/g dry weight soil. Serum bottles added with the soil samples were enriched with methane gas, and then evaluated for their methane oxidation potential. The soil A sample had a longer induction phase for methane oxidation than the other soils. However, soil A showed a similar methane oxidation potential with soils B~D after the induction phase. The methanotrophic community in the enriched soil A sample was increased by up to 2.3×10^7 gene copy numbers/g dry weight soil, which had no significantly difference compared with those in soils B~D ($1.2\text{--}2.8 \times 10^8$ gene copy numbers/g dry weight soil). Methane production showed a similar tendency to methane oxidation. The methanogens community in raw soil A (1.7×10^5 gene copy number/g dry weight soil) was much less than those in raw soils B~D ($1.3\text{--}3.4 \times 10^7$ gene copy numbers/g dry weight soil). However, after methane gas was produced by adding starch to the soils, soil samples A~D showed 10^7 gene copy numbers/g dry weight soil in methanogens communities. The results indicate that methanotrophic and methanogenic bacteria have coexisted in this urban school's soils. Moreover, under appropriate conditions for methane oxidation and production, methanotrophic bacteria and methanogens are increased and they have the potential for methane oxidation and production.

Keywords: Methane oxidation, methane production, soil, urban school

서 론

산업혁명에 의해 증가한 대기 중 메탄의 농도는 산업혁명 이전과 대비했을 때 약 2.5배로 증가하였다[22]. 메탄은 주요 온실가스이며, 기후변화에 있어 이산화탄소 다음으로 기여도가 큰 기체이다[20]. 메탄 한 분자에 의한 온실효과는 한 분자의 이산화탄소보다 약 25배 가량 높은 효과를 보인다[2].

토양에서 메탄 생성균에 의해 유기물이 분해되어 메탄이 생성되지만, 호기조건에서 메탄을 탄소원으로 이용하는 메탄 산화균에 의해서 메탄이 분해된다[13]. 즉 토양은 그 조건에 따라 메탄을 발생시키거나 소멸시킬 수 있기 때문에 메탄의 발생원(source)이자 소멸원(sink)으로서의 역할을 하며, pH, 수분 함량, 유기물 함량과 같은 토양의 물리화학적 특성에 의해 메탄의 산화 및 생성 속도에 영향을 받는다[3].

메탄 산화균(methanotrophic bacteria)은 호기적 조건에서 메탄을 탄소원과 에너지원으로 이용하여, 최종적으로 이산화탄소로 광물화시키는 bacteria이다[5]. 메탄 산화균은 methane monooxygenase(MMO) 효소를 이용하여 메탄을

*Corresponding author

Tel: +82-2-3277-2393, Fax: +82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

산화하는데, MMO는 *Methylocella*를 제외한 모든 메탄 산화균에 존재하는 particulate MMO (pMMO)와 일부 메탄 산화균에만 존재하는 soluble MMO (sMMO) 두 종류로 나뉜다 [9]. pMMO는 pmoA, pmoB, pmoC의 subunits으로 구성되어 있으며, 이 중 pmoA를 encoding 시키는 pmoA gene은 메탄 산화균의 군집을 분석하고 정량화하기 위해 가장 널리 이용되고 있다[23]. 메탄 생성균(methanogens)은 혐기적 조건에서 메탄을 생성하는 archaea이다[13]. 모든 메탄 생성균은 methyl-coenzyme M reductase(MCR)이란 효소를 발현하여 유기물 분해의 최종 단계에서 메탄을 방출한다. MCR은 α -(mcrA), β -(mcrB), γ -subunits(mcrG)으로 구성되어 있으며, 모든 메탄 생성균은 최소 한 개 이상의 mcrA operon을 지니고 있기 때문에 이 mcrA gene을 이용하면 메탄 생성균의 군집을 분석하고 정량화할 수 있다[4].

지금까지 습지, 논, 산림토양 또는 매립지 등지에서 메탄 산화 및 생성에 대한 연구는 활발히 이루어졌으나[13], 인간의 간섭이 가장 크다고 할 수 있는 도심 토양의 메탄 산화 및 생성에 대한 정보는 거의 없다. 본 연구에서는 도심 학교에서 채취한 토양의 메탄의 산화 및 생성 잠재력에 대해 평가하고, pmoA 및 mcrA gene을 타겟으로 정량 PCR 방법으로 메탄 산화균과 메탄 생성균을 정량화하였다. 또한, 도심 학교 토양을 대상으로 조사한 결과값을 기존의 다양한 환경 조건의 토양을 대상으로 평가한 결과값과 비교 분석 해보았다.

재료 및 방법

시료 채취

실험에 사용한 토양 시료는 서울 서초구에 위치한 S 고등학교에서 채취하였으며, soil A는 운동장에서 채취한 토양이며, soil B는 운동장 근처 화단에서 채취한 토양으로 진달래, 철쭉 등의 나무가 존재하지만 잔디는 존재하지 않는 토양이다. Soil C는 교정 내 화단에서 채취한 토양으로 잔디가 존재하는 전형적인 화단 토양이며, soil D는 교정 내 메타세키아, 단풍나무, 벚나무 등 키가 큰 나무와 낙엽 등이 있는 토양이다. 표층 10 cm에서 20 cm 사이의 토양을 채취하였으며, 실험에 사용 하기 전에 2 mm 체로 쳐서 굵은 입자를 제거 하였다.

토양의 물리화학적 특성

pH는 토양 시료 10 g과 증류수 25 ml을 50 ml용 test tube에 담고, 30분씩 교반 및 정치시킨 후, pH meter (F-51BW, HORIBA, Japan)를 이용하여 측정하였다. 토양에 함유된 수분 함량은 110°C의 온도에서 2시간 이상 건조한 후, 데시케이터에서 냉각하여 측정하였으며, 유기물 함량은 110°C에서 2시간 동안 건조한 토양 시료를 550°C furnace

(WiseTherm, DAIHAN, Korea)에서 30분간 가열하고 방냉하여 측정하였다.

메탄 산화 및 생성

토양 시료의 메탄 산화 잠재능력을 측정하기 위해 NMS 배지(MgSO₄·7H₂O 1.0 g, CaCl₂·6H₂O 0.2 g, KNO₃ 1.0 g, KH₂PO₄ 0.272 g, Na₂HPO₄·12H₂O 0.717 g, trace element solution 0.15 ml, 1 L distilled water)를 사용하여 회분식 실험을 진행하였다. Trace element solution은 1 L의 distilled water에 FeSO₄·7H₂O 200 mg, ZnSO₄·7H₂O 10 mg, MnCl₂·4H₂O 3 mg, H₃BO₃ 30 mg, CoCl₂·6H₂O 20 mg, CaCl₂·2H₂O 1 mg, NiCl₂·6H₂O 2 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 3 mg를 사용하였다. 실험균으로는 600 ml 크기의 혈청병에 채취한 토양 시료 2 g과 NMS 배지 18 ml을 넣어 섞어 주었으며, 대조균으로는 토양 시료를 넣지 않은 NMS 배지 20 ml를 이용하였다. 각 혈청병은 고무마개로 막아 밀봉한 고순도 메탄 가스(99%, Gas Valley, Incheon, Korea)를 30 ml 주입하여 초기 농도가 50,000 ppm이 되도록 하였다. 하나의 토양 시료 당 9개의 반복수를 두었으며, 메탄의 농도가 500 ppm 이하로 떨어졌을 때 실험을 종료하여 DNA 추출을 위한 sampling을 진행하였다.

토양의 메탄 생성 잠재능력 측정도 600 ml의 혈청병을 이용하여 회분식으로 수행하였다. 혈청병에 토양 시료 2 g과 무기염 배지(KH₂PO₄ 0.6 g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.35 g, NH₄Cl 0.3 g, CaCl₂·2H₂O 0.13 g, MgCl₂·6H₂O 0.1 g, NaHCO₃ 4.0 g, Na₂S·5H₂O 0.017 g, yeast extraction 0.05 g, 1 L distilled water) 18 ml를 넣어 주었으며[1], 탄소원으로는 starch 1.48 g을 넣어주었다. 메탄 생성 측정의 대조균으로는 토양을 넣지 않은 무기염 배지 20 ml가 사용되었으며, 탄소원으로는 starch 1.48 g이 사용되었다. 혈청병은 질소 가스(Seoul Specialty Gases Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용하여 치환해준 후, 고무마개로 막아 밀봉하였다. 하나의 토양 시료 당 9개의 반복수를 두었으며, 메탄 농도 증가가 더 이상 관찰되지 않으면 실험을 종료하여 DNA 추출을 위한 sampling을 진행하였다. 혈청병의 메탄 농도는 주기적으로 1 ml의 gas tight syringe를 이용하여 혈청병 상부로부터 0.3 ml의 가스를 채취하였고, 불꽃 이온화 검출기가 장착된 가스크로마토그래피(2680 series GC system, Agilent, Santa Clara, USA)를 이용하여 농도를 측정하였다. 메탄 가스 분석 조건은 오븐 온도 100°C, 주입부 및 검출부 온도 230°C에서 수행하였다.

메탄 산화균과 메탄 생성균 정량분석

학교 교정에서 채취한 토양 시료를 각각 0.5 g씩 채취하여 멸균된 1.5 ml effendorf tube에 넣었다. 메탄 산화 및 생성

잠재능력 평가 실험 완료 후, 토양 메탄 산화균과 메탄 생성균 정량분석 슬러리 시료를 각 혈청병으로부터 1 ml씩 채취하여 멸균된 1.5 ml effendorf tube에 넣고 원심분리하여 상등액을 제거하였다. NucleoSpin® Soil Kit (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany)를 이용하여 각 토양으로부터 DNA를 추출하였고, 추출된 DNA는 ASP-2680 (ACTGene Inc., Piscataway, USA)를 이용하여 농도를 확인하였다.

메탄 산화균의 정량 분석을 위해 A189f (5'-GGN GAC TGG GAC TTC TGG-3')와 mb661r (5'-CCG GMG CAA CGT CYT TAC C-3') [12]의 primer를 사용하여 정량 PCR을 통해 분석하였다. PCR을 위해 PCR buffer 2.5 µl, dNTP 2 µl, 10 µM의 forward 및 reverse primer 각 0.5 µl, SYBR (50x) 0.2 µl, ROX (50x) 0.5 µl, *Taq* polymerase 0.2 µl와 토양 시료에서 추출한 DNA template 2 µl를 섞어 최종 부피를 25 µl로 하였다. PCR 수행 조건은 95°C에서 3분간 initial denaturation, 95°C에서 15초간 denaturation, 55°C, 72°C에서 각 30초간 annealing 및 extension을 수행하였고, reading step은 82°C에서 30초간 하여 총 40 cycles을 7300 Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA) 및 7300 system software를 이용하여 진행하였다. *pmoA* gene을 10^{-2} 부터 10^{-8} 까지 희석하여 메탄 산화균의 정량을 위한 검량선으로 사용하였으며, 이를 바탕으로 메탄 산화균의 gene copy number를 계산하였다.

메탄 생성균의 정량 분석을 위해 메탄 생성균의 *mcrA* gene에 특이적인 mlas (5'-GGT GGT GTM GGD TTC ACM CAR TA-3')와 *mcrA*-rev (5'-CGT TCA TBG CGT AGT TVG GRT AGT-3') [21]의 primer를 사용하여 정량 PCR을 통해 분석하였다. PCR buffer 2.5 µl, dNTP 2 µl, MgCl₂ 1 µl, Bovin Serum Albumin (BSA) 0.4 µl, 10 µM의 primer set 각 0.625 µl, SYBR (50x) 0.5 µl, ROX (50x) 0.2 µl, *Taq* polymerase 0.2 µl와 토양에서 추출한 DNA template 2 µl를 섞어 최종 부피를 25 µl로 하였다. PCR 수행조건은 95°C에서 3분간 initial denaturation을 수행한 뒤, 40 cycles 동안 95°C에서 15초간 denaturation, 55°C와 72°C에서 각각 40초간 annealing 및 extension을 수행한 후, 82°C에서 30초간 reading step을 수행하여 진행하였다. *mcrA* gene을 10^{-5} 부터 10^{-9} 까지 희석하여 메탄 생성균의 정

량을 위한 검량선으로 사용하였으며, 이를 통해 메탄 생성균의 gene copy number를 계산하였다.

결과 및 고찰

토양의 물리화학적 특성 분석

채취한 토양 시료의 기본적인 물리화학적 특성을 Table 1에 기술하였다. 운동장 토양인 soil A의 경우, pH가 8.26 ± 0.16 으로 약알칼리성을 띠고 있으며, 다른 토양 시료(soil B, C, D)와 비교했을 때 유의한 차를 보였다($p < 0.05$). 다른 연구에서 측정된 학교 운동장 토양의 pH를 살펴보면, 2003년 서울 한강이남 지역의 학교용지에서 토양을 채취하여 pH를 측정된 연구 결과에서는 토양의 pH가 7.8에서 9.8 범위의 값을 나타내었으며[15], 2004년 경남지역 초등학교 운동장 토양을 대상으로 pH를 측정된 연구 결과 역시 평균 pH가 8.52 ± 0.52 를 나타냈다[9]. 즉, 본 연구 결과와 유사하게 학교 운동장 토양의 pH는 약알칼리성에서 알칼리성인 경우가 많았다.

Soil A의 수분 함량은 $15.03 \pm 1.55\%$ 로 soil B, C, D가 약 20.42-30.20%의 수분 함량을 지니고 있는 것에 비해 그 값이 낮다($p < 0.05$). 유기물 함량의 경우에는 soil A가 $0.84 \pm 0.01\%$ 를 나타냈으며, soil B, C, D는 3.93-4.92%의 값을 나타냈다. Soil A의 값은 기존의 다른 연구에서 측정된 운동장 토양의 유기물 함량인 $0.56 \pm 0.34\%$ 보다는 높지만[9], 수분 함량과 마찬가지로 soil B, C, D와 비교했을 때 유의한 차를 보이며 상대적으로 낮은 함량의 유기물을 포함하고 있다($p < 0.05$). 토양의 수분 함량은 토양 내에 존재하는 미생물의 활동에 큰 영향을 끼친다[19]. 토양에 존재하는 수분이 적을수록 산소의 투과가 높아 호기 조건이 되므로[13], soil A는 다른 토양 시료에 비해 좀 더 호기적 환경이라 할 수 있다. 그러나 수분 함량이 낮을수록 토양 내 수분의 이용도와 수분에 포함되어 있는 nutrient 이용도가 낮아지므로[19], 다른 토양에 비해 수분 함량이 낮은 soil A는 토양 미생물의 생장에 상대적으로 불리할 수 있다. 또한 soil A는 soil B, C, D보다 낮은 유기물 함량을 지니고 있으므로, 토양 내 유기물을 분해하여 성장하는 미생물에는 상대적으로 적합하지 않은 환경이라 생각된다.

Table 1. Physicochemical characteristics of soil samples.

	Soil A	Soil B	Soil C	Soil D
pH	$(8.26 \pm 0.16)^a$	$(6.69 \pm 0.02)^b$	$(6.59 \pm 0.01)^b$	$(6.82 \pm 0.12)^b$
Moisture content (%)	$(15.03 \pm 1.55)^c$	$(21.83 \pm 0.74)^b$	$(20.42 \pm 1.11)^b$	$(30.20 \pm 2.76)^a$
Organic matter content (%)	$(0.84 \pm 0.01)^c$	$(3.93 \pm 0.03)^b$	$(4.91 \pm 0.23)^a$	$(4.92 \pm 0.42)^a$

Mean value: a, b, c: the different letter indicate significant differences between groups ($p < 0.05$).

토양의 메탄 산화 잠재 능력

메탄이 산화되기까지 정체되는 초기 지연기를 유도기라 하

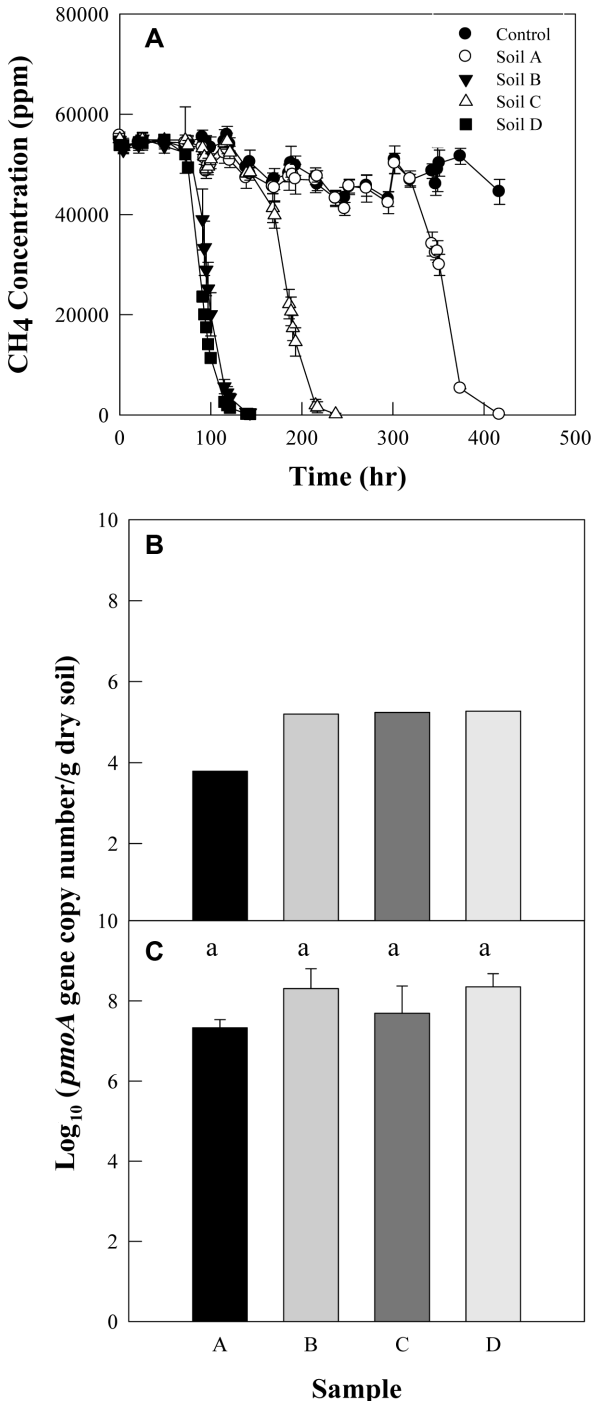


Fig. 1. Methane oxidation of soil samples. (A) Methane oxidation of soil samples enriched with CH₄. Bars represent standard deviation of the mean ($n = 9$), (B) *pmoA* gene copy number in raw soil samples, (C) *pmoA* gene copy number in soil samples enriched with CH₄ ($n = 3$).

며[17], 이 유도기를 지나 메탄이 시간에 따라 비례적으로 산화된다. 채취한 토양의 메탄 산화 잠재 능력을 조사한 결과 soil B, C, D가 약 100-200시간의 유도기를 보인 반면, soil A는 약 400시간이라는 상대적으로 긴 유도기를 보였다(Fig. 1A). 본 연구에서는 토양의 메탄 산화 잠재 능력을 평균 산화속도와 비산화속도의 두 가지 개념으로 나누어 계산하였다. 메탄의 평균 산화 속도는 유도기를 포함하여 초기 메탄 농도 50,000 ppm에서 메탄 농도가 500 ppm 이하로 떨어질 실험을 종료한 시기까지의 메탄 농도의 차를 소요된 시간으로 나눠 구했으며, 반복수 9개의 평균을 사용하였다. 메탄의 비산화 속도는 유도기를 제외하고, 메탄 산화가 급격히 발생한 구간의 최대 속도를 구해주었다($R^2 > 0.92$). 각 토양의 메탄 산화에 대한 평균 산화속도 역시 soil A는 $60.3 \pm 0.8 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, soil B ($181.9 \pm 3.2 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), soil C ($109.5 \pm 2.1 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), soil D ($191.9 \pm 3.0 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)에 비해 메탄 산화의 평균 속도가 느렸으며($n = 9$, $p < 0.05$), 이는 soil A의 메탄 산화 잠재 능력이 다른 토양보다 떨어지는 것을 뜻한다. 그러나 일단 soil A가 메탄 산화를 시작하면, 그 속도는 soil B, C, D와 비교해도 크게 뒤쳐지지 않았다. 토양의 메탄 산화에 대한 비산화속도는 soil A가 $444.5 \pm 20.8 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 였으며, soil B, C, D는 차례로 $530.6 \pm 86.7 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $392.3 \pm 29.6 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $797.0 \pm 18.2 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 비산화속도를 보였다. 운동장 토양인 soil A가 메탄 산화를 시작하면, 오히려 화단 토양인 soil C 보다 빠른 속도로 메탄을 산화하는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 따라서 soil A는 soil B, C, D에 비해 유도기가 길기 때문에 토양의 메탄 산화능은 떨어지지만, 메탄 산화를 위한 적합한 환경이 조성되어 메탄 산화를 시작하면, soil A의 메탄 산화에 대한 능력은 다른 토양에 비교해도 떨어지지 않는 것을 알 수 있었다.

메탄 산화 효소 유전자인 *pmoA* gene을 타겟으로 하여 정량 PCR 방법을 이용하여 토양 중 메탄 산화 세균을 정량 분석하였다. 그 결과 원래의 토양에서의 *pmoA* gene copy number는 soil A (6.1×10^3), soil B (1.6×10^5), soil C (1.7×10^5), soil D (1.9×10^5)의 값을 보여, soil A에서의 메탄 산화균 개체군수는 soil B, C, D에 비해 적은 값을 나타냈다(Fig. 1B, Table 2). 그러나 혈청병에서 메탄 산화가 완료된 시점에서는 soil A의 *pmoA* gene copy number는 $(2.3 \pm 1.1) \times 10^7$ 정도로 크게 증가하였고 토양 B ($(2.8 \pm 1.1) \times 10^8$), C ($(1.2 \pm 1.6) \times 10^8$), D ($(2.3 \pm 1.7) \times 10^8$)와 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1C), ($p > 0.05$). 채취한 토양의 메탄 산화능 측정과 메탄 산화균 정량 결과(Table 2), 네 종류의 토양 모두 메탄 산화균을 가지고 있으며, 메탄 산화를 위한 적합한 환경 하에서는 메탄 산화 개체군이 증가하여, 메탄을 산화할 수 있는 잠재력을 지니고 있음을 알 수

Table 2. Comparison of *pmoA* gene copy number with previous studies.

	Samples	Site	<i>pmoA</i> gene copy number /g dry weight sample	Ref.
Natural source	Göttingen forest soil	Germany	0.8×10^6	[11]
	Deciduous forest soil	Lich, Germany	$(5.0 \pm 0.30) \times 10^6$	[10]
	Boreal forest soil	Uddhahre, Sweden	$(2.9 \pm 0.10) \times 10^9$	[16]
	Moor House peat	UK	$(2.5 \pm 0.3) \times 10^8$	[16]
	Colne estuary sediment	Essex, UK	$(1.8 \pm 0.1) \times 10^7$	[16]
	Cloud forest soil	San Pedro, Peru	$(1.6 \pm 0.2) \times 10^8$	[16]
	Rain forest soil	Tono, Peru	$(1.2 \pm 0.1) \times 10^8$	[16]
Engineered source	Soil biocover (depth 0-82 cm)	Seoul, Korea	10^{10} to 10^{11}	[8]
	E.C biocover (depth 72-82 cm) ^a	Goyang, Korea	10^{10}	[8]
	E.C biocover (depth 0-62 cm) ^a	Goyang, Korea	10^8 to 10^9	[8]
Artificial source	Rice field soil	Hangzhou, China	5×10^7	[14]
	School soil A (raw)	Seoul, Korea	6.1×10^3	This study
	School soil B (raw)	Seoul, Korea	1.6×10^5	This study
	School soil C (raw)	Seoul, Korea	1.7×10^5	This study
	School soil D (raw)	Seoul, Korea	1.9×10^5	This study
	School soil A (enriched with CH ₄)	Seoul, Korea	$(2.3 \pm 1.1) \times 10^7$	This study
	School soil B (enriched with CH ₄)	Seoul, Korea	$(2.8 \pm 2.2) \times 10^8$	This study
	School soil C (enriched with CH ₄)	Seoul, Korea	$(1.2 \pm 1.6) \times 10^8$	This study
	School soil D (enriched with CH ₄)	Seoul, Korea	$(2.3 \pm 1.7) \times 10^8$	This study

^aE.C biocover is Earthworm cast biocover.

있다. soil A의 경우, 다른 토양보다 긴 유도기를 보여 메탄 산화능이 상대적으로 낮았다. 그러나 유도기를 지나 메탄 산화를 시작하면, soil A는 다른 토양에 뒤쳐지지 않는 산화 속도를 보이며, 메탄 산화균의 개체군 역시 다른 토양의 개체군과 유의한 차이를 보이지 않을 정도로 크게 증가하였다. 즉 soil A는 soil B, C, D에 비해 메탄 산화능은 떨어지지만, 메탄 산화균이 성장하여 메탄을 산화할 수 있는 잠재력은 충분히 지니고 있는 것으로 평가된다.

본 연구에서 채취한 네 종류의 토양 내에 존재하는 메탄 산화균의 *pmoA* gene copy number를 다른 토양과 비교한 결과를 Table 2에 나타냈다. 산림 토양, 퇴적물 등을 포함한 자연 환경 토양의 단위 건조 중량 당 *pmoA* gene copy number는 10^6 에서 10^9 범위 수준이었다[10, 11, 16]. 매립지 등에서 메탄 제거를 위해 개발된 토양 및 지렁이 분변토를 이용한 biocover 시스템의 단위 토양 중량 당 *pmoA* gene copy number는 10^8 에서 10^{11} 로[8], 일반적인 자연 환경에서의 *pmoA* gene copy number보다 상대적으로 많다. 대표적인 인위적 간섭을 많이 받는 논 토양의 *pmoA* gene copy number/g dry weight soil은 10^7 수준이었다[14]. 본 연구에서 채취한 학교 토양의 단위 건조 중량 당 *pmoA* gene copy number는 자연 환경 토양과 biocover 시스템에서보다 현저

히 적은 10^3 에서 10^5 수준이었다($p < 0.05$). 특히 운동장에서 채취한 soil A의 *pmoA* gene copy number는 10^3 정도로 다른 토양과 비교했을 때 현저하게 낮았다. 이는 채취한 토양 시료가 유기물 함량이 낮은 척박한 도심 교정의 운동장에서 채취하였기 때문에, 이에 대한 영향으로 상대적으로 적은 양의 *pmoA* gene이 검출된 것으로 판단된다[13]. 그러나 메탄을 산화한 이후에는 soil A를 포함한 네 종류의 토양 모두 *pmoA* gene copy number가 10^7 에서 10^8 정도로, biocover 시스템의 값보다는 낮지만, 일반적인 자연환경의 값과 비교했을 때 큰 차이를 보이지 않는다($p > 0.05$). 따라서 도심 교정 및 인근 용지에서 채취한 네 종류의 토양은 메탄 산화를 위한 적합한 환경 하에서는 메탄 산화균의 개체군이 증가하여 메탄을 산화할 수 있는 능력을 지니고 있음을 알 수 있다. 그 중에서도 특히 soil A의 경우, 토양의 수분 함량과 유기물 함량이 가장 낮은 토양임에도 불구하고 메탄 산화균이 증가하여 메탄을 산화할 수 있는 잠재력을 충분히 지니고 있는 것을 알 수 있다.

토양의 메탄 생성 잠재 능력

토양 시료의 메탄 생성을 Fig. 2A에 도시하였다. Fig. 2A에서 볼 수 있듯이 soil A를 제외한 나머지 세 종류의 토양

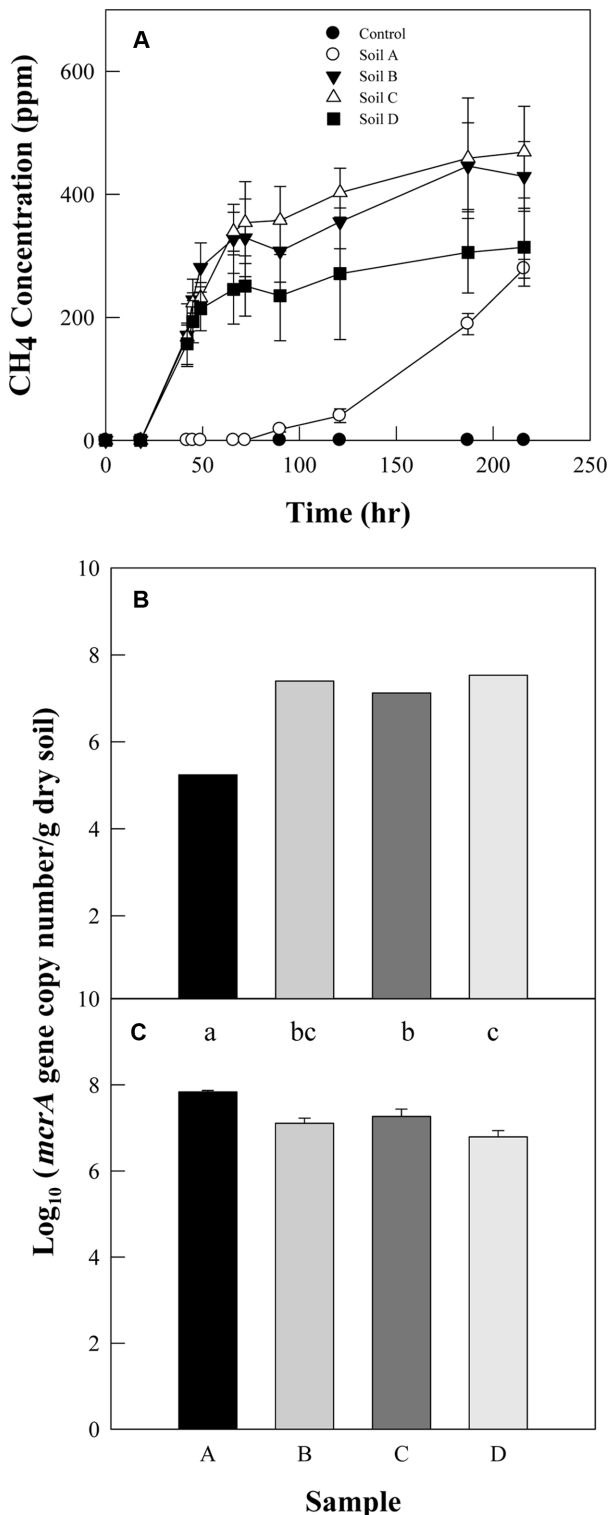


Fig. 2. Methane production of soil samples. (A) Methane production of soil samples amended with starch. Bars represent standard deviation of the mean, (B) *mcrA* gene copy number in raw soil samples, (C) *mcrA* gene copy number in soil samples amended with starch ($n = 3$).

의 경우 50시간 이내에 메탄이 생성되기 시작하여 약 300에서 500 ppm까지 메탄이 발생되었다. 그러나 soil A는 메탄 산화와 마찬가지로 상대적으로 긴 지연기를 나타냈으며, 약 90시간이 지난 후에 메탄을 생성하기 시작하였다. 토양의 평균 메탄 생산속도도 Fig. 2A와 유사한 경향을 보였다. Soil A의 경우, $0.6 \pm 0.03 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 속도로 메탄이 생성되었지만, soil B, C, D는 차례로 $2.2 \pm 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $2.3 \pm 0.4 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $1.8 \pm 0.3 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 속도를 보임으로써 soil A의 평균 메탄 산화 속도가 다른 토양 시료보다 느리게 나타났다. 각 토양 시료의 메탄 생성에 대한 비생성 속도 역시, soil A는 평균 $1.0 \pm 0.1 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 속도를 지녀, 메탄 생성이 시작되더라도 soil B ($4.1 \pm 0.3 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), soil C ($3.1 \pm 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), soil D ($3.5 \pm 0.6 \mu\text{g} \cdot \text{dry soil}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)보다 느리게 메탄을 생성하였다($p < 0.05$). 즉 soil A는 메탄을 생성할 수는 있지만, 메탄을 생성하기까지 다른 토양보다 긴 시간이 소요되며, soil B, C, D에 비해 메탄의 생성능이 상대적으로 떨어지는 것을 알 수 있다. Table 1에 나타냈듯이 soil A는 수분 함량이 약 15% 정도로 다른 토양 시료에 비해 낮으며, 토양의 수분 함량이 낮을수록 토양은 호기적 조건이 된다[13]. 메탄 생성균은 혐기적 조건에서 메탄을 생성하는 통성 혐기성 (facultative anaerobic) 또는 절대 혐기성 (strict anaerobic) 균이다[13]. 따라서 soil A는 soil B, C, D보다 수분 함량이 상대적으로 낮기 때문에 산소의 투과가 다른 토양보다 높았을 것이며, 이에 따라 메탄 생성균이 메탄을 생성하기에 다른 토양에 비해 상대적으로 적합하지 않은 토양이었을 것이다.

mcrA gene을 타겟으로 하여 토양 내 메탄 생성균을 real-time PCR로 정량 분석 하였다(Fig. 2B, 2C). 운동장에서 채취한 soil A의 *mcrA* gene copy number는 단위 건조 중량당 1.7×10^5 로, soil B (2.5×10^7), soil C (1.3×10^7), soil D (3.4×10^7) 보다 적었다($p < 0.05$). 그러나 starch를 첨가하고 메탄 생성이 완료된 후에는 soil A의 *mcrA* gene copy number가 6.8×10^7 로 증가하여 오히려 soil B (1.3×10^7), C (1.9×10^7), D (6.4×10^6) 보다 많았다($p < 0.05$). Soil A의 메탄 생성 잠재 능력이 다른 토양 시료보다 낮았음에도 불구하고, 메탄 생성 세균수가 가장 많았다. Soil A 토양에서는 starch 기질 첨가로 인해 토양 내에 존재하는 메탄 생성균의 개체군이 다른 토양보다 크게 증가하였지만, 메탄 생성균의 활성이 다른 토양에 비해 낮았기 때문에 이러한 결과를 초래한 것으로 생각된다. 따라서 향후 RNA 시료를 template로 하여 각 토양 시료의 메탄 생성균을 비교 평가하는 것이 필요하다.

도심 교정 및 인근 용지에서 채취한 네 종류의 토양 시료에 존재하는 *mcrA* gene copy number를 다른 연구 결과와 비교한 값을 Table 3에 나타냈다. 늪, 습지 등의 자연 토양

Table 3. Comparison of *mcrA* gene copy number with previous studies.

	Samples	Site	<i>mcrA</i> gene copy number /g dry weight sample	Ref.
Natural source	Acidic bog	Migneint, UK	$1.4 \times 10^8 \pm 2.0 \times 10^7$	[7]
	Calcareous fen	Cors Goch, UK	$3.3 \times 10^8 \pm 2.7 \times 10^8$	[7]
	Riparian wetland	Nant Ffrancon valley, UK	$1.8 \times 10^7 \pm 2.2 \times 10^6$	[7]
Engineered source	Biogas reactor ^a	Eichhof, Germany	0.5×10^9 to 2.1×10^9	[6]
	Biogas reactor ^b	Eichhof, Germany	0.9×10^8 to 2.4×10^8	[6]
	Biogas reactor ^c	Eichhof, Germany	0.6×10^8 to 2.0×10^8	[6]
	Biogas reactor ^d	Eichhof, Germany	2.2×10^8 to 4.8×10^8	[6]
Artificial source	Rice field soil	Hangzhou, China	1.7×10^7	[23]
	Cattle pasture	Treinta-y-Tres, Uruguay	10^8	[18]
	Flooded rice field soil	Treinta-y-Tres, Uruguay	10^8	[18]
	School soil A (raw)	Seoul, Korea	1.7×10^5	This study
	School soil B (raw)	Seoul, Korea	2.5×10^7	This study
	School soil C (raw)	Seoul, Korea	1.3×10^7	This study
	School soil D (raw)	Seoul, Korea	3.4×10^7	This study
	School soil A (amended with starch)	Seoul, Korea	$6.8 \times 10^7 \pm 5.6 \times 10^6$	This study
	School soil B (amended with starch)	Seoul, Korea	$1.3 \times 10^7 \pm 3.3 \times 10^6$	This study
	School soil C (amended with starch)	Seoul, Korea	$1.9 \times 10^7 \pm 7.8 \times 10^6$	This study
School soil D (amended with starch)	Seoul, Korea	$6.4 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^6$	This study	

^aAnaerobic reactor fed with casein (2.45 g l^{-1}).

^bAnaerobic reactor fed with casein (8 g l^{-1}).

^cAnaerobic reactor fed with starch.

^dAnaerobic reactor fed with cream.

에서의 *mcrA* gene copy number는 단위 건조 중량당 10^6 에서 10^8 범위였다[7]. 혐기적 조건에서 biogas를 생산해내는 생물반응 시스템에서도 10^8 에서 10^9 범위의 *mcrA* gene copy number/g dry weight soil을 나타냈다[6]. 본 연구에서 채취한 토양 원시료는 soil A (1.7×10^5)를 제외한 soil B (2.5×10^7), soil C (1.3×10^7), soil D (3.4×10^7)의 경우, *mcrA* gene의 copy number에서 자연 토양 및 biogas 생산 시스템과 유의한 차를 보이지 않았다($p > 0.05$). 그러나 starch 기질을 첨가하고 일정 시간 배양한 이후에는 soil A의 *mcrA* gene 수가 크게 증가하여($6.8 \times 10^7 \pm 5.6 \times 10^6$), soil B ($1.3 \times 10^7 \pm 3.3 \times 10^6$), soil C ($1.9 \times 10^7 \pm 7.8 \times 10^6$), soil D ($6.4 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^6$) 보다도 많은 수의 *mcrA* gene이 검출되었으며, 이는 다른 자연 환경에서 검출된 *mcrA* gene copy number와 유의한 차를 보이지 않는다($p > 0.05$). 따라서 도심 교정 및 인근 용지에서 채취한 네 종류의 토양은 모두, 메탄 생성에 적합한 환경이 되면 메탄 생성균의 개체군이 증가하여 메탄을 생성할 수 있는 능력을 지니고 있다. 또한 운동장 토양인 soil A는 네 종류의 토양 중 가장 유기물 함량이 낮아 토양 내 유기물을 분해하여 성장하는 미

생물에 있어 가장 덜 적합한 환경의 토양일지라도, 메탄 생성에 대한 잠재력을 충분히 지니고 있음을 알 수 있다.

기존 연구에서는 습지, 논, 매립지 등의 장소에서 메탄 산화 및 생성에 대한 연구는 활발히 수행되었으나, 이를 벗어나 인간의 간섭이 가장 큰 도심 토양의 메탄 산화 및 생성능을 평가한 사례는 거의 없다. 따라서 본 연구는 도심 학교에서 채취한 토양을 시료로 하여 메탄의 산화 및 생성에 대한 잠재력을 조사하였다. 조사결과 운동장 토양인 soil A는 다른 토양에 비해 메탄 산화에 대한 유도기가 상대적으로 길고, 평균 메탄 산화 속도가 느렸다. 토양 내 메탄 산화균의 정량 분석 결과 역시 soil A에 존재하는 메탄 산화균의 개체군 수는 soil B, C, D에 비해 상대적으로 적은 값을 나타냈다. 그러나 메탄 산화에 대한 비산화 속도는 soil A의 경우 다른 토양 시료에 크게 뒤쳐지지 않았으며, 메탄 산화가 완료된 이후의 메탄 산화균 개체군수 역시 soil A, B, C, D에서 유의한 차가 나타나지 않았다($p > 0.05$). 뿐만 아니라 메탄 산화가 완료된 이후에는, 네 종류 토양에서 메탄 산화균 개체군수가 산림 토양, 습지, 퇴적물 등의 자연 환경과 큰 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 이를 통해 도심 학교에서 채

취한 네 종류의 토양은 적합한 환경 하에서 메탄 산화균의 개체군의 증가하여 메탄 산화를 할 수 있는 잠재능을 가지고 있는 것으로 판단된다.

토양의 메탄 생성 잠재 능력을 분석한 결과, 메탄 산화와 마찬가지로 soil A는 다른 토양 시료보다 메탄 생성에 대한 유도기와 평균 메탄 생성 속도, 비생성 속도가 느리게 나타났다. soil A에서의 메탄 생성균 개체군수 역시 soil B, C, D보다 적었으며, 이를 통해 soil A의 메탄 생성능은 다른 토양 시료에 비해 떨어짐을 알 수 있었다. 그러나 기질을 첨가하여 메탄이 생성되고 난 이후에는 soil A에서의 메탄 생성균 개체군 수가 다른 토양 시료 보다 많게 나타났다($p > 0.05$). 이를 통해 운동장 토양인 soil A에서는 메탄 생성균의 개체군이 다른 토양보다 크게 증가할 잠재능을 지니고 있지만, 메탄 생성균의 활성은 다른 토양에 비해 낮은 것을 알 수 있었으며, 메탄 생성균의 실질적인 활성을 평가하기 위해서는 각 토양 시료의 RNA sample을 통한 평가가 필요하다. 본 연구에서 채취한 네 종류의 토양 모두, 메탄을 생성한 이후의 메탄 생성균 개체군 수가 습지나 biogas 생산 시스템과 유사한 차를 보이지 않았으며($p > 0.05$), soil A, B, C, D는 적합한 환경 하에서 메탄 생성균의 개체군이 증가하여 메탄을 생성할 수 있는 잠재능을 가진 것으로 평가된다.

요 약

본 연구에서는 도심 학교 운동장(soil A)과 화단(soil B, C, & D)에서 채취한 토양의 잠재적인 메탄 산화 및 생성능을 평가하였다. 토양 원시료 중 메탄 산화균 수를 정량 분석한 결과, 운동장 토양(soil A)는 6.1×10^3 gene copy number/g dry weight soil이었으나, 화단 토양(soil B~D)는 $1.6-1.9 \times 10^5$ gene copy number/g dry weight soil이었다. 토양을 넣은 혈청병에 메탄 가스를 주입하여 잠재 메탄 산화능을 평가한 결과, 운동장 토양은 다른 토양보다 메탄을 산화하기까지 긴 유도기를 보였으나, 유도기 이후에는 화단 토양과 거의 유사한 메탄 산화능을 나타냈다. 또한 운동장 토양의 메탄 산화균 수는 2.3×10^7 gene copy number/g dry weight soil까지 증가하여 화단 토양의 메탄 산화균 수($1.2-2.8 \times 10^8$ gene copy number/g dry weight soil)과 유의적 차이를 보이지 않았다. 교정에서 채취한 토양의 메탄 생성 거동도 메탄 산화와 유사한 패턴을 보였다. 토양 원시료의 메탄 생성균 수는 화단 토양($1.3-3.4 \times 10^7$ gene copy number/g dry weight soil)에 비해 운동장 토양(1.7×10^5 gene copy number/g dry weight soil)이 훨씬 적었다. 그러나 토양에 유기물을 첨가한 후 메탄 생성 현상이 발현된 후에는 메탄 생성 균수는 운동장 토양과 화단토양 모두 10^7 gene copy number/g dry weight soil 수준이었다. 본 연구를 통해 도심 교정에서

채취한 네 종류의 토양은 모두 메탄 산화균 및 생성균을 가지고 있으며, 메탄 산화와 생성에 적합한 조건이 되면, 메탄 산화균 및 생성균의 개체군이 증가하여 메탄을 산화하거나 생성할 수 있는 잠재력을 지니고 있음을 알 수 있었다.

Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science, ICT and future Planning (NRF-2012R1A2A2A03046724).

References

1. Amani T, Nosrati M, Mousavi S. 2011. Using enriched cultures for elevation of anaerobic syntrophic interactions between acetogens and methanogens in a high-load continuous digester. *Bioresour. Technol.* **102**: 3716-3723.
2. Archer D, Eby M, Brovkin V, Ridgwell A, Cao L, Mikolajewicz U, Caldeira K, Matsumoto K, Munhoven G, Montenegro A, Tokos K. 2009. Atmospheric lifetime of fossil fuel carbon dioxide. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **37**: 117-134.
3. Cho K-S, Ryu H-W. 2009. Biotechnology for the mitigation of methane emission from landfills. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 293-305.
4. Hallam SJ, Girguis PR, Preston CM, Richardson PM, DeLong EF. 2003. Identification of methyl coenzyme M reductase A (*mcrA*) genes associated with methane-oxidizing archaea. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5483-5491.
5. Hanson RS, Hanson TE. 1996. Methanotrophic bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**: 439-471.
6. Kampmann K, Ratering S, Baumann R, Schmidt M, Zerr W, Schnell S. 2012. Hydrogenotrophic methanogens dominate in biogas reactors fed with defined substrates. *Syst. Appl. Microbiol.* **35**: 404-413.
7. Kim S-Y, Lee S-H, Freeman C, Fenner N, Kang H. 2008. Comparative analysis of soil microbial communities and their responses to the short-term drought in bog, fen, and riparian wetlands. *Soil Biol. Biochem.* **40**: 2874-2880.
8. Kim TG, Moon K-E, Lee E-H, Choi S-A, Cho K-S. 2011. Assessing effects of earthworm cast on methanotrophic community in a soil biocover by concurrent use of microarray and quantitative real-time PCR. *Appl. Soil Ecol.* **50**: 52-55.
9. Kim YB, Park PS. 2004. Analysis of comparative on the regional soil ingredients of grounds in elementary school. *Korean J. Elem. Phys. Edu.* **10**: 157-169.
10. Knief C, Kolb S, Bodelier PL, Lipski A, Dunfield PF. 2006. The active methanotrophic community in hydromorphic soils changes in response to changing methane concentration. *Environ. Microbiol.* **8**: 321-333.
11. Kolb S, Knief C, Dunfield PF, Conrad R. 2005. Abundance and activity of uncultured methanotrophic bacteria involved in

- the consumption of atmospheric methane in two forest soils. *Environ. Microbiol.* **7**: 1150-1161.
12. Kolb S, Knief C, Stubner S, Conrad R. 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmoA*-targeted real-time PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2423-2429.
 13. Le Mer J, Roger P. 2001. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: a review. *Eur. J. Soil Biol.* **37**: 25-50.
 14. Ma K, Qiu Q, Lu Y. 2010. Microbial mechanism for rice variety control on methane emission from rice field soil. *Glob. Change Biol.* **16**: 3085-3095.
 15. Oh HJ, Lee JY. 2003. A study on the characteristic evaluation of metals and fluorine concentrations in the Southern part of Seoul. *J. Soil Ground. Environ.* **8**: 68-73.
 16. Rahman MT, Crombie A, Chen Y, Stralis-Pavese N, Bodrossy L, Meir P, *et al.* 2010. Environmental distribution and abundance of the facultative methanotroph *Methylocella*. *ISME J.* **5**: 1061-1066.
 17. Reay DS, Nedwell DB. 2004. Methane oxidation in temperate soils: effects of inorganic N. *Soil Biol. Biochem.* **36**: 2059-2065.
 18. Scavino AF, Ji Y, Pump J, Klose M, Claus P, Conrad R. 2013. Structure and function of the methanogenic microbial communities in Uruguayan soils shifted between pasture and irrigated rice fields. *Environ. Microbiol.* **15**: 2588-2602.
 19. Skopp J, Jawson M, Doran J. 1990. Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **54**: 1619-1625.
 20. Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, *et al.* 2007. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the Intergovernmental panel on climate change. p.100. *Cambridge University Press*. Cambridge. United Kingdom and New York, NY, USA.
 21. Steinberg LM, Regan JM. 2008. Phylogenetic comparison of the methanogenic communities from an acidic, oligotrophic fen and an anaerobic digester treating municipal wastewater sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 6663-6671.
 22. Yimga MT, Dunfield PF, Ricke P, Heyer J, Liesack W. 2003. Wide distribution of a novel *pmoA*-like gene copy among type II methanotrophs, and its expression in *Methylocystis* strain SC2. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 5593-5602.
 23. Yuan Y, Conrad R, Lu Y. 2009. Responses of methanogenic archaeal community to oxygen exposure in rice field soil. *Environ. Microbiol. Rep.* **1**: 347-354.