

Research Article

Open Access

담수토양에서 메탄생성반응 보조소 니켈의 킬레이팅에 의한 메탄 생산량의 효과적 저감

김태진,¹ 황현영,¹ 홍창오,² 이증주,³ 김건엽,^{4**} 김필주^{1,3*}

¹경상대학교 응용생명과학부, ²부산대학교 생명환경화학과, ³경상대학교 농업생명과학연구원,
⁴농촌진흥청 국립농업과학원 기후변화생태과

Effective Suppression of Methane Production by Chelating Nickel of Methanogenesis Cofactor in Flooded Soil Conditions

Tae Jin Kim,¹ Hyun Young Hwang,¹ Chang Oh Hong,² Jeung Joo Lee,³ Gun Yeob Kim^{4**} and Pil Joo Kim^{1,3*}
(¹Division of Applied Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, ²Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea, ³Department of Life Science and Environmental Biochemistry, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, ⁴Division of Climate Change & Agroecology, National Academy of Agricultural Science, RDA, Wanju-gun 565-851, Korea)

Received: 11 October 2014 / Revised: 21 October 2014 / Accepted: 30 October 2014

Copyright © 2014 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://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.

Abstract

BACKGROUND: Methane(CH₄) is considered as the secondmost potent greenhouse gas after carbon dioxide (CO₂). Methanogenesis is an enzyme-mediated multi-step process by methanogens. In the penultimate step, methylated Co-M is reduced by methyl Co-M reductase (MCR) to CH₄ involving a nickel-containing cofactor F430. The activity of MCR enzyme is dependent on the F430 and therefore, the bioavailability of Ni to methanogens is expected to influence MCR activity and CH₄ production in soil. In this study, different doses of EDTA(Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) were applied in flooded soils to evaluate their suppression effect on methane production by

chelating Ni of methanogenesis cofactor.

METHODS AND RESULTS: EDTA was selected as chelating agents and added into wetland and rice paddy soil at the rates of 0, 25, 50, 75, and 100 mmol kg⁻¹ before 4-weeks incubation test. During the incubation, cumulative CH₄ production patterns were characterized. At the end of the experiment, soil samples were removed from their jars to analyze total soil Ni and water-soluble Ni content and methanogen abundance. Methane production from 100 mmol application decreased by 55 and 78% in both soils compared to that from 0 mmol. With increasing application rate of EDTA in both soils, water-soluble Ni concentration significantly increased, but total soil Ni and methanogen activities showed negative relationship during incubation test.

CONCLUSION: The decrease in methane production with EDTA application was caused by chelating Ni of coenzyme F430 and inhibiting methanogenesis by methyl coenzyme M reductase. Consequently, EDTA application decreased uptake of Ni into methanogen, subsequently inhibited

*교신저자(corresponding author): Pil Joo Kim
Phone: +82-55-772-1966; Fax: +82-55-772-1969;
E-mail: pjkim@gnu.ac.kr

**공동교신저자(Co-corresponding author): Gun Yeob Kim
Phone: +82-063-238-2493; Fax: +82-063-238-3811;
E-mail: gykim1024@korea.kr

methanogen activities and reduced methane production in flooded soils.

Key words: EDTA, Flooded soil, Methanogenesis, Ni

서론

메탄은 이산화탄소에 이어 두 번째로 발생량이 많은 온실 가스로 높은 적외선 흡수능과 대기 중에서의 반응 때문에 이산화탄소의 약 25 배에 달하는 지구온난화지수(Global warming potential, GWP)를 지니고 있다. IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change, 2007)에 의하면 논이나 습지토양과 같은 담수 토양에서 방출되는 메탄의 비율은 전체 발생량의 약 30%를 차지한다고 한다.

메탄생성반응은 메탄생성균에 의해 다단계의 효소 반응을 거쳐 일어난다. 이러한 메탄 생성균은 공통적으로 *mcrA* gene을 가지고 있으며, Intracellular enzyme인 Methyl coenzyme M reductase(MCR)은 메탄생성 과정 중 마지막 단계에서 촉매하는 주요 효소이다(Jaun *et al.*, 2010). MCR은 기질인 methyl coenzyme M(CH₃-S-CoM)과 coenzyme B(CoB-SH)를 메탄과 heterodisulfide (CoB-S-S-CoM)로 전환시키는데 크게 관여하며, 이 효소는 α₂β₂γ₂ oligomer에서 3개의 다른 subunit으로 구성되어있으며 강한 결합으로서 포함되어있으나 비공유결합으로서 2몰의 cofactor F430에 얽매어있다고 알려져 있다(Fig. 1)(Noll and Wolfe, 1986). Schönheit *et al.*(1979)는 1979년에 메탄 생성균의 성장이 니켈에 의존한다는 사실을 발견하였고, Diekert *et al.*(1980), Whitman과 Wolfe(1980)은 coenzyme F430의 합성을 위해 니켈을 요구한다는 사실을 밝혀내었다. Diekert *et al.*(1980)은 F430이 니켈 테트라피롤 구조라는 생합성 증거를 제공하였고 결국 methyl coenzyme M reductase의 보결분자단이라는 사실을 발견하였다(Ellefson *et al.*, 1982).

지금까지 coenzyme F430은 methanogenic archaea에서만 발견되었다. 니켈 원자 배위의 존재와 피롤 고리 체계에서의 환원 위치는 coenzyme F430의 두드러지는 특징을 가지며(Friedmann *et al.*, 1991), coenzyme F430은 MCR이 메탄 생성을 촉매하는데 크게 관여하게 된다.

지금까지 coenzyme F430은 methanogenic archaea에서 오직 발견되어지고 있다. 니켈 원자 배위의 존재와 피롤 고리 체계에서의 환원 위치는 coenzyme F430의 두드러지는 특징을 가지며(Friedmann *et al.*, 1991), coenzyme F430은 MCR이 메탄 생성을 촉매하는데 크게 관여하게 된다.

메탄생성균에 의한 메탄생성 반응으로부터 메탄 생성균체내에 기질 유입량을 조절하여 전구체 Methyl Coenzyme M (CH₃-S-CoM) 양을 저감시키거나, 메탄 생성효소인 MCR의 활성을 조절하여 메탄 발생량을 저감시키는 것이 가능할 것으로 판단되어진다. 메탄 생성균의 니켈 흡수를 방해하여 MCR의 활성을 억제하고 메탄 생성량을 효과적으로 저감시키는 방안으로서 상대 음이온과의 침전, 석회처리를 통한 pH 상승에 따른 니켈 용해도를 감소시키는 방법이 있으며, 킬레이팅 에이전트를 이용한 킬레이팅 결합을 통한 cofactor F430과의 결합을 저해시키는 방안을 고려해 볼 수 있다. 특히 킬레이팅 에이전트는 중금속을 가진 복합체로서 물에 쉽게 용해 가능한 형태로 변형된다고 한다(Chen and Cutright, 2001).

따라서 메탄 생성균의 Intracellular biochemical reaction에 의해 메탄이 생성되기 때문에 EDTA와 같은 유기성 킬레이팅 에이전트로 자유 니켈 (Free Ni²⁺)을 킬레이트화 시키면 Cofactor인 Ni의 미생물체내 흡수를 억제할 수 있어 메탄 생성량을 효과적으로 저감시킬수 있을 것으로 판단되어진다. 본 연구에서는 담수토양 중 논토양과 습지토양에서 EDTA가 enzyme M reductase의 보조소 coenzyme F430 내의 니켈을 킬레이팅하여 효과적인 메탄 저감이 가능한지 평가하고자 하였다.

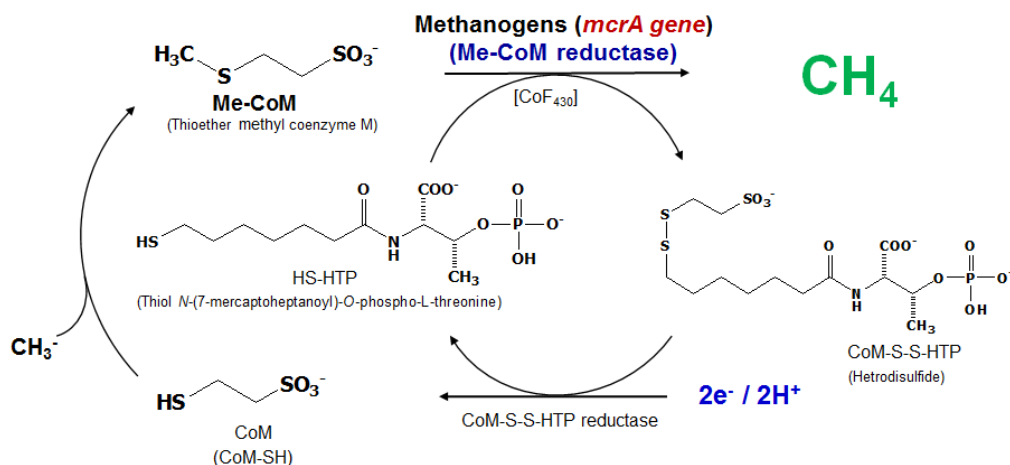


Fig. 1. Methane production pathway and the reaction catalyzed by methyl coenzyme M reductase in methanogens(Ellemann, 1988; Thauer, 1998).

재료 및 방법

공시토양 및 시험준비

킬레이팅 에이전트 처리에 따른 메탄 생산량 저감의 효과를 조사하기 위한 시험을 외부의 간접요인을 차단하기 위해 실내에서 정밀하게 실시하였다. 실험 대상 토양인 벼 재배 논 토양과 습지토양을 채취하여 자연건조 후 사분(<2mm)하여 실내 실험에 이용하였다. 실험에 사용한 논토양은 pH가 6.37로서 국내 논토양 평균 5.5-5.9보다 다소 높았으며(농촌진흥청, 1985), 공시 토양의 이화학적 특성은 Table 1과 같다.

Table 1. Soil properties before the test

Parameters	Paddy soil	Wetland soil
pH (1:5 with H ₂ O)	6.37	6.55
CEC (cmol ⁺ kg ⁻¹)	10.55	5.54
T-N (%)	0.23	0.12
Total heavy metals (mg kg ⁻¹)		
Ni	72.0	85.3
Cu	14.7	14.0
Water-soluble heavy metals (mg kg ⁻¹)		
Ni	0.04	0.04
Cu	0.08	0.21

사분된 토양 25g을 125ml vial병에 넣고, 처리 제제인 킬레이팅 에이전트로서는 Ethylene Diaminetetraacetic acid (EDTA)를 선정하여 이용하였다. 처리량은 토양 무게의 0, 25, 50, 75, 100 mmol의 비율로 0, 0.183, 0.365, 0.548, 0.731 g을 토양 전체와 완전 혼합 후 증류수 50 mL를 넣어 수위를 토양으로부터 3 cm 높이로서 담수상태화 시켰다. vial병 headspace는 폐쇄시킨 뒤 30-35°C의 암 조건에서 인큐베이터를 이용하여 4주간 이루어졌다(Yang and Chang, 1998). 시험 기간 동안 담수상태는 상시 3 cm 높이로 유지하였다.

가스 채취 및 분석

가스 채취는 실내 시험 실시 1일 후부터 나흘간격으로 한 번씩 이루어 졌다. Headspace에서 채취된 가스 시료는 Gas Chromatography(packed with Porapak NQ column (Q80-100mesh) and a flame ionization detector(FID), Shimadzu, GC-2010, Tokyo) 로 분석하였으며, 이때 column 100 °C, injector 200 °C, detector 200 °C로 온도 설정 하였으며 운반 기체로는 헬륨을, 연소기체로는 수소를 이용하였다. 메탄 생산량은 다음 식에 따라서 계산하였다.

$$\text{CH}_4 \text{ Production}(\text{mg kg}^{-1}) = \frac{\text{CH}_4 \text{ Flux}(\mu\text{l L}^{-1}) \cdot d \cdot h}{\text{Soil Weight}(\text{g})}$$

[d= Methane density (0.714 kg m⁻³),

h= Headspace volume(mL)]

토양과 토양수 내 니켈 함량 조사

시험 후 자연 건조시킨 토양을 이용하여 총 니켈 함량을 분석하기 위해 1 g의 토양을 20 ml의 왕수(Aqua regia, HCl:HNO₃, 3:1 v v⁻¹)에 강열 분해시켰으며, 수용성 니켈 함량을 측정하기 위해 토양 2 g에 10 mL의 증류수를 가해 1 시간동안 침출하고 여과한 후 ICP-OES(Inductively coupled plasma-optical emission spectrophotometer, Shelton Connecticut USA)를 이용하여 니켈의 함량을 측정하였다. 토양수는 0.45 μm membrane Filter로서 여과시켜 Ni 함량을 조사 하였다.

메탄생성균 정량

일반적으로 메탄생성균의 정량 분석은 대부분의 메탄생성균에 존재하는 *mcrA* 라는 특이유전자의 개체수로서 정량화하고 있다(Lueders *et al.*, 2001). DNA 추출키트(Fast DNA SPIN Kit for Soil, MP Biomedicals, U.S.A.)를 이용하여 동결 건조된 토양의 DNA를 추출한 후, *mcrA_f* (5'-GGTGGTGTMGATTACACARTAYGCWACAGC-3') / *mcrA_r* (5'-TTCATTGCRTAGTTWGGRTAGTT)를 이용해 Luton *et al.*(2002)의 방법에 따라 quantitative PCR (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad)을 실시하였다(PCR 조건: 95°C에서 5분, 40 cycles로 94, 55, 72°C에서 각각 45초).

통계 분석은 SAS package version 9.2 을 이용하여 실시하였으며 최소유의차 (LSD, Least significant difference)를 이용한 분산분석 (ANOVA, analysis of variance) 방식으로 각 처리구간의 평균값 간의 차이를 비교하였다. 또한 상관관계 분석은 PASW statistics 18.0 을 이용하여 실시하였으며 단순 상관분석(Simple correlation analysis)으로서 Pearson 상관계수 (Pearson correlation coefficient)을 이용하여 각 변수간의 상관관계를 비교하였다.

결과 및 고찰

메탄 생산량 특성

논토양에서는 실내 시험 시작 후 17일 경과까지 메탄 생산량이 증가하지 않았으나, 이후부터 메탄 생산량이 크게 증가함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 이는 벼 재배를 위해 사용되었던 질소 비료에 의해 증가한 질산태 질소가 전자수용체로서 작용하여 일시적으로 메탄 생성균의 활성을 저해시켜 메탄이 17일 경과 후에 증가한 것으로 판단된다(Wang *et al.*, 1992). 또한 17일 경과 후부터 EDTA 처리량이 증가함에 따라 메탄 생산량이 확연히 감소함을 확인할 수 있었다. 그리고 습지토양에서의 경우, EDTA 처리에 따른 메탄 생산량의 변화패턴은 눈에 띄지 않았으며 일정하지 않았다.

EDTA 처리량에 따른 4주간의 총 메탄 생산량은 논토양의 EDTA 0 mmol 처리구에서 182.8 CH₄ mg kg⁻¹, 100 mmol 처리구에서 82.4 CH₄ mg kg⁻¹ 으로 EDTA 100 mmol 처리구에서는 0 mmol 대비 약 55 %의 메탄 생산량이 감소하였다. 습지토양의 총 메탄 생산량은 EDTA 0

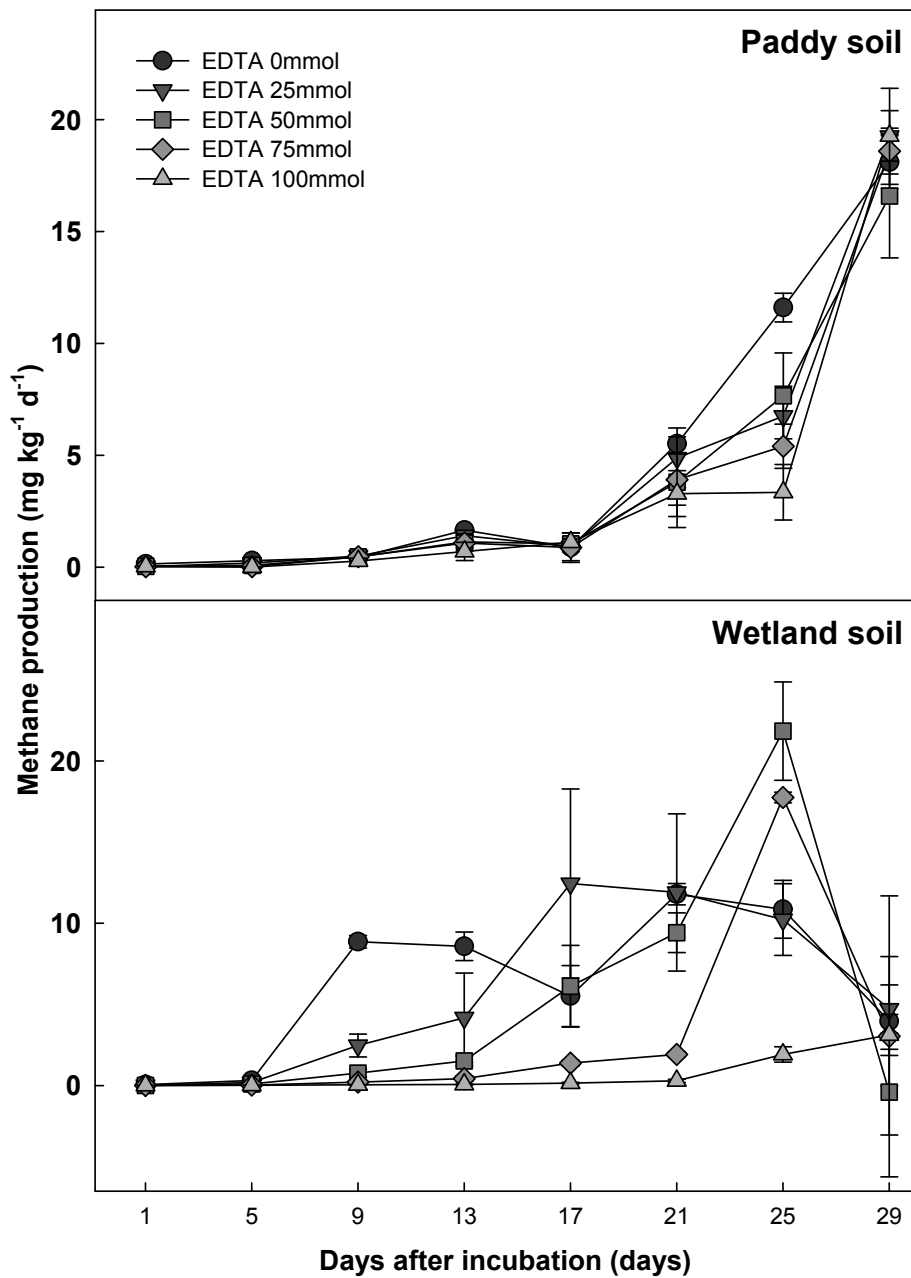


Fig. 2. Changes of methane production rates in EDTA amended paddy soils and wetland soils during incubation test.

mmol 처리구에서 $199.7 \text{ CH}_4 \text{ mg kg}^{-1}$, 100 mmol 처리구에서 $44.7 \text{ CH}_4 \text{ mg kg}^{-1}$ 로서 약 78 %의 메탄 생산량이 저감되었다(Fig. 2). 이상의 결과를 통해 EDTA 처리량이 증가함에 따라 메탄 생산량 저감효과가 증대됨을 확인하였다.

토양 및 토양수 내 니켈 함량

EDTA 처리에 따른 메탄 저감효과에 대한 영향인자를 확인하기 위해 시험 후 토양의 총 니켈 및 수용성 니켈을 측정하였다. 논토양과 습지토양 모두에서 EDTA의 처리량을 증가시키기에 따라 총 니켈 함량이 감소하는 경향을 보였다(Fig.

3). 이는 킬레이팅 에이전트가 니켈 이온과 결합함에 따라 토양 내 존재하는 MCR의 활성이 감소함으로써 토양수로 니켈 이온이 용해된 것으로 고려되어진다. 토양의 총 Ni 함량과는 달리, EDTA 처리량 증가는 토양 내 수용성 니켈 함량을 증대시켰다. 논토양에서 EDTA 0 mmol 처리구 0.04 mg kg^{-1} , EDTA 100 mmol 처리구 0.33 mg kg^{-1} 이며 습지토양에서 EDTA 0 mmol 처리구 0.04 mg kg^{-1} , EDTA 100 mmol 처리구 0.48 mg kg^{-1} 으로 나타났다 (Fig. 3). 이는 니켈이온이 EDTA에 의해 킬레이팅 됨에 따라 MCR이 이용하지 못하여 상대적으로 물 속에서 용해 가능한 니켈이 높아졌기 때

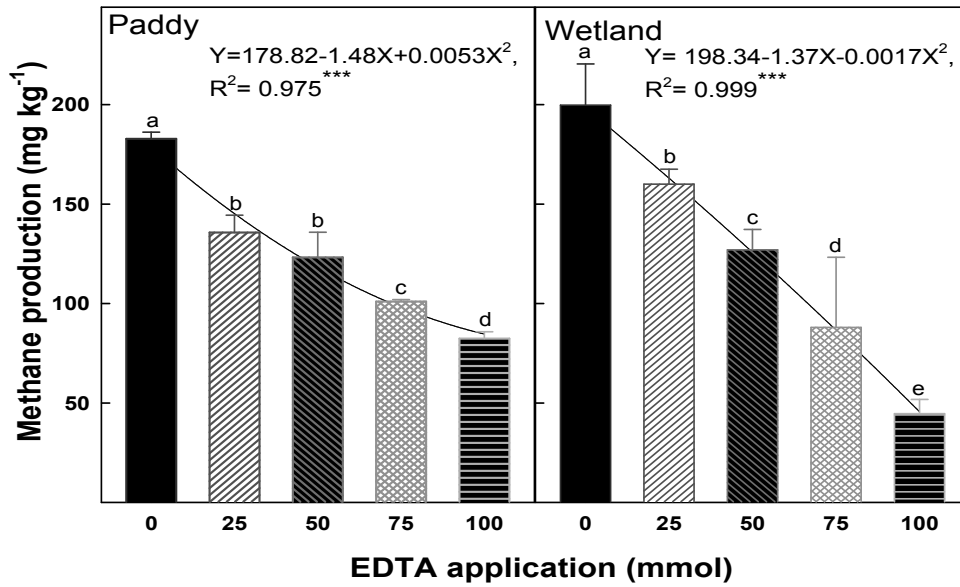


Fig. 3. Cumulative Methane production at different level of EDTA application after incubation test.

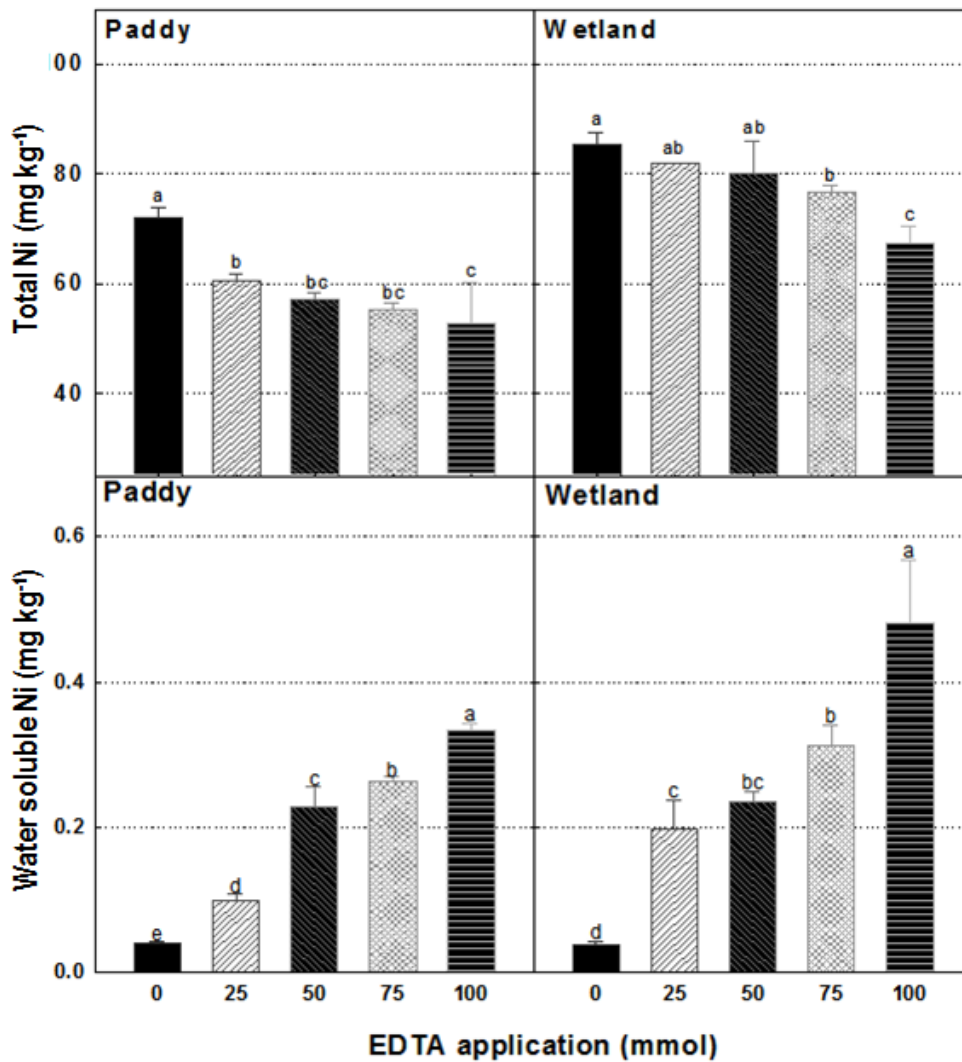


Fig. 4. Change of total and water soluble Ni in submerged soils amended with different rate of EDTA after 4 weeks of incubation.

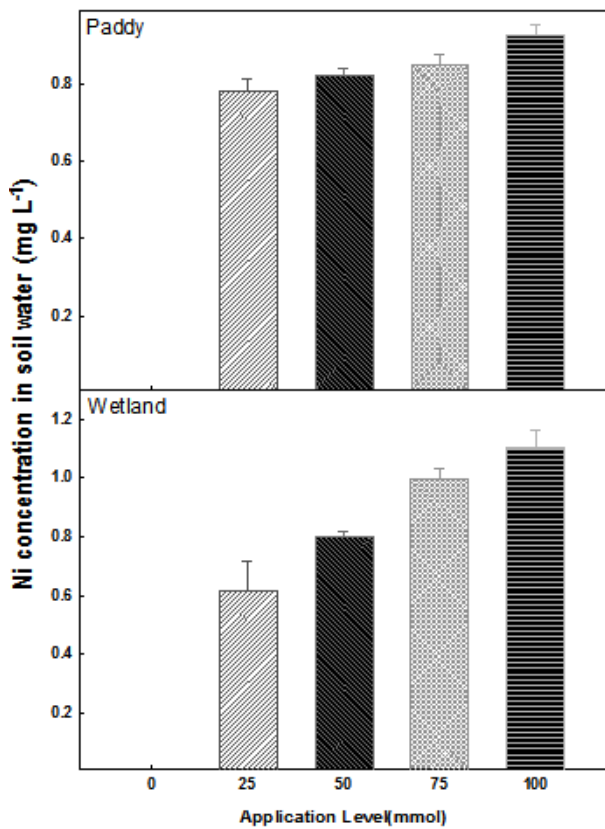


Fig. 5. Change of water soluble Ni in supernatant water applied with different levels of EDTA after incubation test.

문이라고 판단되어 진다(Kosson and Garrabrants, 2000;

Chen and Cutright, 2001).

다른 형태의 토양 내 Ni 함량 조사와 함께 토양수 내 용해된 수용성 니켈 함량을 알아본 결과, EDTA 처리량의 증가에 따라 토양수 내 니켈 함량이 증가하는 경향을 보였다(Fig. 4). EDTA 0 mmol 처리구에서는 논토양과 습지토양에서 니켈 함량이 측정되지 않았다. 그러나 토양수 내 니켈함량은 EDTA 처리를 함에 따라 나타났으며, 논토양은 EDTA 25 mmol 처리구와 100 mmol 처리구 간에 각각 0.78, 0.93 mg L⁻¹로서 0.15 mg L⁻¹의 차이를 보였고 습지토양은 각각 0.61, 1.10 mg L⁻¹로서 0.5 mg L⁻¹의 차이를 보였다 (Fig. 4). 실제 토양수내 용해된 수용성 니켈의 함량은 EDTA 100 mmol 처리구에서 전체 토양수 50 mL에 대하여 습지토양의 경우 0.06 mg이었고 논토양의 경우 0.05 mg이었다. 하지만 총 니켈 함량의 감소량에 비해 토양수 내 용해되어 나온 수용성 니켈 함량 간의 차이는 크게 없었다. 이는 니켈이 수용성 니켈이 아닌 다른 형태로 전환 되었거나 토양 내 EDTA 처리량에 따른 토양부피 증가에 따른 니켈 농도의 희석효과라고 판단되어 진다.

메탄생성균 활성 평가

논토양에서 메탄 생성균의 활성, 즉 mcrA 유전자의 개체수를 Quantitative PCR을 통해 알아본 결과, EDTA 처리량의 증가에 따라 유의적으로 메탄 생성균의 활성이 감소함을 보였다. EDTA 0 mmol 처리구에서 mcrA 유전자의 개체수가 7.08×10⁵ 이며 그에 반해 100 mmol 처리구에서는 6.46×10⁴ 으로 상당히 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 5). 이는 토양 내 메탄 생성균이 흡수 할 수 있는 토양 내 수용성 니켈 함량과 토양수 내 니켈함량이 증가함에 따라 보호소

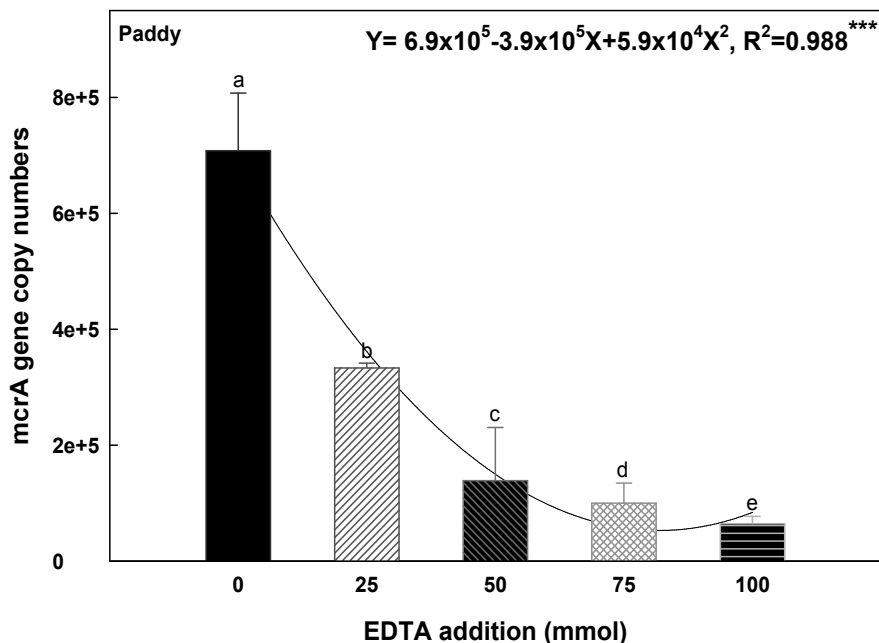


Fig. 6. Methanogen abundance at different level of EDTA application in the flooded soils after incubation test.

Table 2. Correlation among parameters after incubation test

Parameter	Methane production	Total Ni	Water soluble Ni	Soil water Ni	<i>mcrA</i> gene copy number
Methane production	-	-	-	-	-
Total Ni	0.487	-	-	-	-
Water soluble Ni	-0.841**	-0.326	-	-	-
Soil water Ni	-0.730**	-0.474	0.858**	-	-
<i>mcrA</i> gene copy number	0.980**	0.502	-0.863**	-0.971**	-

* and ** denote significance at 5.0 and 1.0% levels, respectively

coenzyme F430 내의 니켈의 미생물 체내 흡수가 억제되게 되고 그에 따라 메탄 생성균의 활성(*mcrA* gene copy number)이 크게 감소되는 것으로 판단되어 진다.

상관관계 분석

EDTA 처리에 따른 메탄 생산량 감소에 영향을 미친 결정적인 요인을 분석하기 위해 각 변수간의 상관관계를 알아보았다. 메탄 생산량과 토양 내 니켈 함량 간에는 총 니켈 함량의 경우 0.487로서 유의한 상관관계를 보이지 않았으나, 토양 내 수용성 니켈 함량과는 상관계수가 -0.841**로서 상당히 유의한 부의 상관관계를 가지고 있는 것으로 나타났으며 토양수 내 니켈 함량과는 상관계수가 -0.730**로서 높은 부의 상관관계를 보였다. 따라서 EDTA 처리에 따라 수용성 니켈이 증가하는 것은 메탄 생산성에 크게 영향을 주었을 것으로 고려되어 진다(Table 2). 또한 토양 내 메탄 생성균의 활성과 인큐베이션 실험 후 메탄 총 생산량은 변수 중에 가장 높은 상관계수인 0.980**로 나타났으며 상당히 유의한 정의 상관관계를 가지고 있는 것으로 보아 메탄생성균의 활성이 메탄 생산량에 가장 큰 영향을 미쳤을 것이라 판단된다.

요 약

담수 토양인 논토양과 습지 토양에 킬레이팅 에이전트 EDTA를 처리하고 실내시험을 실시한 결과, 두 토양 모두에서 메탄 생산량이 확연히 감소함을 알 수 있었다. EDTA 처리량을 증가시킴에 따라 토양수 내 니켈이 증가하였으며 메탄생성균의 활성은 저감되었다. 메탄생성균의 활성이 저감됨에 따라 메탄 생산량은 현저히 감소하였으며 메탄생성균의 활성과 메탄생산량은 상당히 유의한 상관관계를 지니고 있었다. 이러한 메탄 저감 효과는 EDTA처리에 따라 coenzyme F430의 Ni이 EDTA와 킬레이팅 화합물을 형성함에 따라 분자크기가 증대하게 됨으로서 methyl coenzyme M reductase (MCR)에 의한 메탄을 생성하는 반응을 억제 시키는 것이 원인으로 판단된다.

결론적으로 담수토양에서 EDTA처리에 의해 니켈은 메탄 생성균 체내로의 흡수가 억제되었고 이러한 니켈의 흡수저해는 메탄생성균의 활성을 억제시켜 토양으로부터 메탄 생산량을 저감시킨 것으로 확인되었다.

Acknowledgment

This work was carried out with the support of "Cooperative Research Program for Agriculture Science & Technology Development (Project No. PJ009980022014)" Rural Development Administration, Republic of Korea.

References

- Chen, H., Cutright, T., 2001. EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr and Ni uptake by *Helianthus annuus*, *Chemosphere* 45, 21-28.
- Diekert, G., Klee, B., Thauer, R.K., 1980. Nickel, a component of factor F430 from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Arch. Microbiol.* 124, 103-106.
- Ellefson, W.L., Whitman, W.B., Wolfe, R.S., 1982. Nickel containing factor F430 : chromophore of the methyl reductase of *Methanobacterium*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79, 3707-3710.
- Friedmann, H.C., Klein, A., Thauer, R.K., 1991. Biochemistry of coenzyme F430, a nickel porphyrinoid involved in methanogenesis. In Biosynthesis of Tetrapyrroles, *New Comprehensive Biochemistry* 139-154.
- Jaun, B., Thauer, R.K., Reinhard, B., Meike, G., Silvan S., 2010. The key nickel enzyme of methanogenesis catalyses the anaerobic oxidation of methane, *Nature* 465, 606-609.
- Kosson, D.S., Garrabrants, A.G., 2000. Use of a chelating agent to determine the metal availability for leaching from soils and wastes, *Waste Management* 20, 155-165.
- Lueders, T., Chin, K., Conrad, R., Friedrich, M., 2001. Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase α -subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel

- archaeal lineage, *Environmental Microbiology* 3, 194-204.
- Noll, K.M., Wolfe, R.S., 1986. Component C of the methylcoenzyme M methylreductase system contains bound 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate (HS-HTP), *Biochemical and Biophysical Research Communications* 139, 889-895.
- Schönheit, P., Moll, J., Thauer, R.K., 1979. Nickel, cobalt, and molybdenum requirement for growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Arch. Microbiol.* 123, 105-107.
- Wang, Z., Delaune, R.D., Lindau, C.W., Patrick Jr., W.H., 1992. Methane production from anaerobic soil amended with rice straw and nitrogen fertilizers, *Fertilizer Research* 33, 115-121.
- Whitman, W.B., Wolfe, R.S., 1980. Presence of nickel in factor F430 from *Methanobacterium bryantii*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 92, 1196-1201.
- Yang, S., Chang, H., 1998. Effect of environmental conditions on methane production and emission from paddy soil, *Agriculture, Ecosystems and Environment* 69, 69-80.