옥수수과 톨페스큐 근권 유래의 메탄 산화 및 아산화질소 환원 세균 컨소시움 특성

이수정[†], 김서영[†], 김예지, 이윤영, 조경숙*
이화여자대학교 환경공학과

Received: February 22, 2021 / Revised: March 24, 2021 / Accepted: March 26, 2021

Characterization of CH₄-oxidizing and N₂O-reducing Bacterial Consortia Enriched from the Rhizospheres of Maize and Tall Fescue

Soojung Lee[†], Seoyoung Kim[†], Ye Ji Kim, Yun-Yeong Lee, and Kyung-Suk Cho*

Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 03760, Republic of Korea

CH₄-oxidizing and N₂O-reducing bacterial consortia were enriched from the rhizosphere soils of maize (*Zea mays*) and tall fescue (*Festuca arundinacea*). Illumina MiSeq sequencing analysis was performed to comparatively analyze the bacterial communities of the consortia with those of the rhizosphere soils. Additionally, the effect of root exudate on CH₄ oxidation and N₂O reduction activities of the microbes was evaluated. Although the inoculum sources varied, the CH₄-oxidizing and N₂O-reducing consortia derived from maize and tall fescue were similar. The predominant methanotrophs in the CH₄-oxidizing consortia were *Methylosarcina*, *Methylococcus*, and *Methylocystis*. Among the N₂O-reducing consortia, the representative N₂O-reducing bacteria were *Cloacibacterium*, *Azonexus*, and *Klebsiella*. The N₂O reduction rate of the N₂O-reducing consortium from maize rhizosphere and tall fescue rhizosphere increased by 1.6 and 2.7 times with the addition of maize and tall fescue root exudates, respectively. The CH₄ oxidation activity of the CH₄-oxidizing consortia did not increase with the addition of root exudates. The CH₄-oxidizing and N₂O-reducing consortia can be used as promising bioresources to mitigate non-CO₂ greenhouse gas emissions during remediation of oil-contaminated soils.

Keywords: Methane, nitrous oxide, bacterial consortium, maize, tall fescue, rhizosphere

서론

대표적인 non-CO₂ 온실가스인 메탄(CH₄)과 아산화질소(N₂O)의 지구온난화 지수(GWP)는 이산화탄소의 28배와 265배로 이들 온실가스 저감의 필요성이 증가하고 있다[1, 2]. CH₄와 N₂O의 2018년 배출량은 1990년에 비해 각각 24% 및 28% 증가하여[1], 이들 온실가스의 배출량을 최소화할 수 있는 다양한 방법들에 대한 연구가 필요하다. CH₄와 N₂O 배출을 저감할 수 있는 다양한 기술 중, 미생물을 이용한 생물학적 저감 기술은 물리·화학적 기술에 비해 경제적이고 환경친화적 방법으로 주목을 받고 있다[3]. 대부분의 생물학적

CH₄와 N₂O 저감기술은 CH₄를 CO₂로 산화하거나, N₂O를 N₂로 환원할 수 있는 세균을 활용하고 있다[4, 5]. 세균에 의한 CH₄ 산화의 최종산물인 CO₂도 온실가스이지만, CH₄의 GWP가 CO₂의 28배이므로, CH₄를 1 mole을 제거하면 CO₂를 28 mole 제거하는 효과가 있다. 비록 CH₄ 산화 혹은 N₂O 환원 세균에 관한 연구가 보고되고 있지만[5, 6], 혁신적인 신기술 개발을 위해서는 새로운 미생물자원 확보를 위한 연구는 지속될 필요가 있다[7, 8].

근권(rhizosphere)은 식물, 토양, 미생물들이 서로 상호작용을 하며 미생물들이 성장할 수 있는 적합한 환경을 제공한다[9, 10]. 특히, 식물의 뿌리는 미생물에게 필요한 영양물질을 제공하여 근권 미생물의 다양성이 높아져 여러가지 다양한 기능을 가진 미생물 자원이 근권에 많이 서식하고 있으므로[9, 10], 근권 CH₄ 산화 혹은 N₂O 환원 세균을 탐색하는 것은 의미가 있다. 낙엽송(*Larix decidua*)의 비근권(bulk)

*Corresponding author

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

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

[†]These authors contributed equally to this work.

토양 및 근권에 서식하는 세균을 분석한 결과, methanotrophs 중 group I에 속하는 *Methylococcus*, *Methylomarinum*, *Methylocapsa*가 비근권 토양보다 근권 토양에서 더 많은 비율로 존재하였다[11]. 벼의 근권 토양의 메탄 산화 세균의 양이 비근권 토양보다 약 7배-18배 많았다[12]. 옥수수 근권 토양에는 N_2O 환원 탈질세균인 *Agrobacterium*와 *Streptomyces*가 많이 존재하였다[13]. 토마토와 기장의 근권에서는 대표적인 탈질세균인 *Pseudomonas*의 비율이 비근권 토양보다 높았다[14, 15]. 이러한 선행연구에서는 비근권 토양에 비해 근권 토양에서 CH_4 산화 혹은 N_2O 환원 세균의 비율이 높음을 보고하고 있지만, 근권 토양으로부터 이들 non- CO_2 온실가스 분해 세균 자원을 확보하고자 하는 연구는 거의 진행되지 않았다.

세균은 수분함량, pH, 온도, 산소 농도, 영양분과 같은 토양 인자들 뿐 아니라 뿌리에 의해서도 영향을 받아 근권과 상호작용을 하며 서식한다[9]. 식물로부터 분비되는 뿌리삼출물은 유기물질, 무기물질 등을 포함하고 있어 근권 세균의 탄소원이나 성장인자로 작용한다[16, 17]. 따라서 근권 토양은 비근권 토양과 구분되는 세균 군집 특성을 보인다[16]. 또한, 뿌리삼출물의 성분은 근권 세균 대사작용에 영향을 미치고, 이로 인해 토양에서 탄소와 질소의 생지화학적 순환의 변화를 야기할 수 있다[18]. 따라서 근권 세균 활성화에 뿌리삼출물이 어떤 역할을 하는지 규명할 필요가 있다.

옥수수(*Zea mays*)와 톨페스큐(*Festuca arundinacea*)는 수염뿌리계(fibrous root system) 식물로, 뿌리가 잘 발달하기 때문에 유류 오염 토양을 정화에 널리 활용되고 있다[19-22]. 근권 세균의 작용으로 유류의 생분해 과정에서 생성되는 CH_4 와 N_2O 의 배출량을 줄일 수 있다면, 유류 오염 정화와 더불어 온실가스 배출량도 저감하는 효과를 얻을 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 옥수수과 톨페스큐 근권 토양을 접종원으로 활용하여 농화배양을 통해 CH_4 산화 세균 컨소시움과 N_2O 환원 세균 컨소시움을 확보하였다. Illumina MiSeq 염기서열 분석법을 사용하여 세균 군집 특성을 분석하여 식물 종류와 농화배양 조건 차이에 따른 군집 특성을 분석하였다. 또한 이들 컨소시움의 CH_4 산화와 N_2O 환원 활성화에 미치는 뿌리삼출물의 영향을 규명하였다.

재료 및 실험방법

비근권 및 근권 토양 시료

서울시 서대문구 소재 이화여자대학교 신공학과 옥상 정원에서 식물이 자라지 않는 부분의 토양을 비근권 토양으로 채취하였다. 동일 공간에서 재배한 옥수수(*Zea mays*)와 톨페스큐(*Festuca arundinacea*)의 뿌리에 붙어있는 토양을 조심스럽게 털어내어 근권 토양으로 사용하였다. 채취한 토양

시료를 실온에서 하루 정도 풍건한 후, 2 mm 크기의 체로 쳐서 입자크기가 큰 것을 제거한 후 얻은 토양 시료를 농화배양을 위한 접종원으로 사용하였다.

CH_4 산화 세균 컨소시움의 농화배양

1,200 ml 혈청병에 옥수수 혹은 톨페스큐 근권 토양 60 g과 CH_4 산화 세균용(MOB) 배지 100 ml를 주입하였다. MOB 배지 조성은 다음과 같다(g/l): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.2; KNO_3 , 1; KH_2PO_4 , 0.272; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 0.717; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.75; trace element 용액 0.25 ml/l. Trace element 용액 조성은 다음과 같다(mg/l): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 200; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 3; H_3BO_3 , 30; $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 20; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1; $NiCl_2 \cdot 6H_2O$, 2; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 3. 부틸 고무마개로 혈청병의 입구를 막은 후, 실린지를 이용해 혈청병 내부의 공기 60 ml를 제거하였다. 고순도 CH_4 가스(99.995%, Gas Valley, Korea) 60 ml를 주입해, 혈청병 상부 가스 중의 CH_4 초기 농도가 50,000 ppm이 되도록 하였다. 혈청병을 30℃에서 교반배양(120 rpm)하면서, 혈청병 상부 가스를 실린지로 채취하여 CH_4 농도를 분석하였다. 혈청병 내 CH_4 농도가 5 ppm 미만이면 배양액에 동일 양의 CH_4 가스를 주입하여 재배양하였다. 이러한 재배양을 반복하는 과정에서 산소, 질소 및 인 성분의 부족으로 2일 이상 CH_4 감소가 관찰되지 않으면, 클린벤치 안에서 혈청병 마개를 열고 혈청병 내부 공기를 2시간 동안 새로운 공기로 치환하였다. 배지 내의 질소와 인을 재 공급하기 위하여 질산 농축액(KNO_3 , 2 g/l)과 인산 농축액(KH_2PO_4 , 0.52 g/l; $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 1.65 g/l)을 각각 1 ml씩 주입한 후, 부틸 고무마개로 혈청병을 밀폐한 후 앞에서 기술한 방법과 동일하게 CH_4 를 주입하였다. 35일 동안 배양한 후, 2개의 혈청병에 1차 배양액을 각각 60 ml씩 넣고 MOB 배지를 60 ml씩 첨가한 후, 12일 동안 상기와 동일한 방법으로 2차 농화배양 하였다. 2차 농화배양액을 20분 동안 정치시켜 토양을 가라앉힌 후 상등액을 취하여, 3개의 혈청병에 각각 2차 배양액 70 ml, MOB 배지 70 ml를 넣고, 20일 동안 3차 농화배양 하였다. 이러한 방법으로 얻은 3차 농화배양액을 본 실험에 사용하였다. 옥수수와 톨페스큐 근권 토양에서 얻은 3차 농화배양액을 각각 ' CH_4 -M 컨소시움'과 ' CH_4 -TF 컨소시움'으로 명명하였다.

N_2O 환원 세균 컨소시움 농화배양

1,200 ml 혈청병에 근권 토양 60 g과 N_2O 환원 세균용(NRB) 배지 100 ml를 주입하였다. NRB 배지 조성은 다음과 같다(g/l): KH_2PO_4 , 0.170; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.571; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.452; EDTA, 0.005; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005; trace element 용액 1 ml. Trace element 용액의 조성은 다

음과 같다(mg/l): ZnSO₄·7H₂O, 0.43; CoCl₂·6H₂O, 0.24; MnCl₂·4H₂O, 0.99; CuSO₄·5H₂O, 0.25; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.22; NiCl₂·6H₂O, 0.19; Na₂SeO₄, 0.21. 탄소원으로 글루코스(C₆H₁₂O₆, 9.4 g/l)와 아세테이트(CH₃COONa·3H₂O, 21.25 g/l) 용액을 10 ml/l씩 배지에 추가하였다. 고순도(99%, Dong-A Specialty Gases Co., Korea) 질소 가스로 혈청병 내부 공기를 약 3분간 치환한 다음 부틸 고무마개로 혈청병의 입구를 막았다. 실린지를 이용하여 N₂O 가스(99%, Dong-A Specialty Gases Co., South Korea) 1.2 ml를 주입해 혈청병 N₂O의 초기농도가 1,000 ppm이 되도록 하였다. 혈청병을 30℃에서 교반배양(120 rpm)하면서 혈청병 상부 가스를 실린지로 채취하여 N₂O 농도를 분석하였다. 혈청병 내 N₂O 농도가 5 ppm 미만이면 혈청병에 동일 양의 N₂O 가스를 주입하여 재배양 하였다. 상기와 동일한 방법으로 질소 가스로 혈청병 내부 공기를 치환, 부틸 고무마개로 밀폐, N₂O를 주입한 후, 11일 동안 배양하여 1차 농화배양액을 얻었다. 1차 배양액을 20분 동안 정지한 후 상등액을 취하여 2개의 혈청병에 각각 50 ml씩 넣고, NRB 배지 50 ml, 글루코스 용액 1 ml, 아세테이트 용액 1 ml를 첨가한 후, 상기와 동일한 방법으로 6일동안 2차 농화배양 하였다. 2차 농화배양액을 3개의 혈청병에 각각 60 ml씩 넣은 후, NRB 배지 40 ml, 글루코스과 아세테이트 용액을 각각 1 ml씩 첨가한 후, 8일 동안 배양하여 얻은 3차 농화배양액을 본 실험에 사용하였다. 옥수수과 톨페스큐 근권 토양에서 얻은 3차 농화배양액을 각각 'N₂O_M 컨소시움'과 'N₂O_TF 컨소시움'으로 명명하였다.

CH₄ 산화와 N₂O 환원 세균 컨소시움의 군집 분석

CH₄ 산화 및 N₂O 환원 미생물 컨소시움의 군집 분석을 위해 Illumina MiSeq Sequencing 방법을 이용하였다. 또한 농화배양에 의한 미생물 군집 변화를 비교하기 위해, 비근권 토양(Non-Rhizo), 옥수수 근권 토양(M), 및 톨페스큐 근권 토양(TF)의 미생물 군집도 분석하였다.

Genomic DNA 추출을 위해 모든 토양시료(Non-Rhizo, M 및 TF 시료)는 풍건 후 2 mm 체로 친 후, 1.5 ml micro-centrifuge tube에 각각 0.3 g씩 소분하였다. CH₄ 산화(CH₄_M, CH₄_TF) 및 N₂O 환원 컨소시움(N₂O_M, N₂O_TF)의 경우, 각각의 농화배양액 1 ml를 1.5 ml micro-centrifuge tube에 넣고 원심분리(11,000 rpm, 2 min)하여 상등액을 제거한 뒤 균체만을 회수하는 과정을 3회 반복하여 시료를 준비하였다. 모든 시료는 genomic DNA 추출 전 까지 -20℃에 냉동보관 하였다. NucleoSpin® Soil Kit (Macherey-Nagel, Germany)와 Bead beater-8 system (Biospec, USA)을 사용하여 시료의 genomic DNA를 추출하였다. 추출 방법은 제조사의 메뉴얼을 따랐고, 최종 용출 부피를 50 µl로 하여 SpectraMax QuickDrop spectrophotometer (Molecular

Devices, USA)를 이용해 추출된 genomic DNA의 농도와 순도를 확인하였다. 미생물 군집 분석을 위해 bacteria의 16S rRNA 유전자 영역을 타겟으로 하여, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA)를 이용하여 수행하였다[19]. 프라이머는 515F (5'-TGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')와 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')을 기본으로 하여[23, 24], 1차 PCR에서는 amplicon 515F (5'-TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3')와 amplicon 806R (5'-GTCTCGTGGGCTCGG-AGATGTGTATAAGAGACAG-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3')을 프라이머로 사용하였으며, pre-adaptor, sequencing primer sequences, specific locus primers는 밑줄, **볼드체**, *이탤릭체*로 표기하였다[19]. 2차 PCR은 제조사의 메뉴얼에 따라 N7XX 및 S5XX 인덱스 프라이머를 사용하였다(NexteraXT FC-131-1001, Illumina Inc., USA). 1차 및 2차 PCR은 Lee 등에서 기술한 방법에 따라 수행하였다[19]. 미생물 군집의 염기서열 분석은 Macrogen Incorporation (Korea)에 의뢰하여, Illumina MiSeq sequencing platform (Illumina Inc.)를 통해 분석하였다. 미생물 군집의 염기서열은 QIIME software version 1.9로 분석하였다[25]. Fastp 프로그램을 이용하여 어댑터 서열을 제거하였으며[26], Fast Length Adjustment of Short reads (FLASH) software version 1.2.11을 통해 염기서열을 하나의 서열로 조립하였다[27]. 이후 길이가 200 bp보다 작고 400 bp보다 큰 DNA 단편을 FLASH software로 제거하였다[27]. CD-HIT-OTU program을 이용하여 chimeric 시퀀스 등을 제거한 후, 97% 이상의 유사성을 갖는 서열을 clustering 하여 Operational Taxonomic Units (OTUs)를 구분하였다[28]. NCBI 16S microbial database를 reference DB로 활용하여 taxonomic assignment를 수행하였다. 연구에서 얻은 미생물 군집의 염기서열 결과는 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archive (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록하였다(Accession number SRP301179). 마지막으로, Chao1, Shannon index, 그리고 Simpson index는 QIIME software version 1.9로 계산되었다[25].

CH₄ 산화 컨소시움 N₂O 환원 컨소시움 활성에 미치는 뿌리삼출물 영향

뿌리삼출물을 만들기 위해 옥수수와 톨페스큐의 뿌리를 3-5 cm의 길이로 자른 뒤 뿌리 10 g 당 멸균수 100 ml를 첨가한 후 50℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이후 상온에서 4시간 정지시킨 뒤 0.45 µm 필터로 여과하여 얻은 여과액을 뿌리삼출물로 사용하였다. 이 뿌리삼출물에 MOB 배지 혹

은 NRB 배지 성분을 첨가하여 배지를 제조하였다.

CH₄ 산화 세균 컨소시움의 CH₄ 산화 활성에 미치는 뿌리삼출물의 영향을 조사하기 위해, 600 ml 혈청병에 CH₄_M 컨소시움 25 ml과 옥수수 뿌리삼출물로 제조한 MOB 배지 25 ml을 첨가하였다. 또한, CH₄_TF 컨소시움 25 ml과 톨페스큐 뿌리삼출물로 제조한 MOB 배지 25 ml을 첨가하였다. 대조군으로 뿌리삼출물을 첨가하지 않는 MOB 배지를 동일량 첨가한 혈청병을 준비하였다. CH₄ 가스 실린더로부터 CH₄ 가스를 총 60 ml 주입한 후, 30℃에서 교반배양(120 rpm)하였다. 3시간 간격으로 혈청병 내부 가스를 채취하여 CH₄ 농도를 분석하였다. CH₄ 분해 반응이 생물학적 반응임을 규명하기 위해 혈청병에 CH₄ 산화 세균용 배지만 50 ml 주입한 조건에서 동일한 실험을 수행하였다. 모든 실험을 3반복 수행하였다.

N₂O 환원 세균 컨소시움의 N₂O 환원 활성에 미치는 뿌리삼출물의 영향 실험도 CH₄ 실험과 유사하게 수행하였다. 600 ml 혈청병에 N₂O_M 혹은 N₂O_TF 컨소시움 배양액 40 ml에 옥수수 뿌리삼출물 첨가 NRB 배지 혹은 톨페스큐 뿌리삼출물 첨가 NRB 배지 60 ml를 넣었다. 대조군으로 각각의 컨소시움 배양액에 뿌리삼출물을 첨가하지 않는 NRB 배지를 동일량 첨가한 것과, NRB 배지만 100 ml 첨가한 혈청병도 준비하였다. 혈청병 내부를 N₂ 가스로 치환 후 부틸 고무마개로 밀봉한 후, N₂O 가스 1.2 ml를 실린지를 이용하여 첨가하였다. 각 혈청병을 30℃에서 교반배양(120 rpm)하면서 3시간 간격으로 N₂O 농도를 분석하였다. 모든 실험을 3반복 수행하였다.

CH₄ 산화 컨소시움의 CH₄ 산화능 평가를 위해 CH₄ 평균 산화 속도와 CH₄ 최대 산화 속도를 다음의 방법으로 계산하였다. CH₄ 산화 평균 속도는 혈청병 내 CH₄의 농도가 약 500 ppm 이하가 될 때까지의 소요된 총 배양시간과 CH₄ 제거량을 이용하여 계산하였다. CH₄ 최대 산화 속도는 지연기 이후 CH₄ 분해가 활발하게 일어나는 기간동안 제거된 CH₄량과 소요시간을 기준으로 계산하였다[29]. N₂O 환원 컨소시움의 N₂O 환원능 평가도 N₂O 평균 환원 속도와 N₂O 최대 환원 속도로 계산하여 비교하였다[30].

CH₄ 및 N₂O 분석 방법

CH₄ 농도 분석을 위해 혈청병의 headspace 가스를 gas-tight 실린지로 100 µl 취하여 가스 크로마토그래피(GC 7890, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 CH₄ 농도를 측정하였다. Flame ionization detector 및 DB-624 capillary column (30 m × 320 µm × 1.8 µm, J&W Scientific Inc., USA)을 사용하였고, 운반기체로는 질소를 1.5 ml/min의 속도로 주입하였다. Split ratio는 50:1의 조건에서 오븐 100℃, 주입부 230℃, 검출부 230℃로 하였다.

N₂O 농도 분석을 위해 혈청병의 headspace 가스를 gas-tight 실린지로 50 µl 취하여 가스 크로마토그래피(HP 6890 Series, Agilent Technologies)를 이용하여 N₂O 농도를 측정하였다. Electron capture detector 및 CHP-PLOT Q column (30 m × 530 µm × 40 µm, Agilent)를 사용하였고, 운반기체로는 질소를 60 ml/min의 속도로 주입하였다. Split ratio는 5:1로 하였고 오븐 50℃, 주입부 230℃, 검출부 250℃로 하였다.

통계 분석

각 시료 별 세균 군집의 유사도를 비교하기 위해 문(phylum), 속(genus) 기준 주성분분석(Principal Composition Analysis, PCA)을 CANOCO 4.5 software (Microcomputer Power, USA)를 이용하여 시행하였다. 또한, 각 시료의 CH₄ 산화 속도 혹은 N₂O 환원 속도의 유의차 분석을 위해 Microsoft Excel 2016 (Microsoft Co., USA)를 활용하여 ANOVA 분석을 하였다.

결과 및 고찰

CH₄ 산화와 N₂O 환원 컨소시움의 세균 군집 특성

세균 군집 다양성. 비근권 토양, 근권토양, CH₄ 산화 컨소시움과 N₂O 환원 컨소시움의 세균 군집분석 결과를 Table 1에 정리하였다. 모든 시료의 goods coverage는 0.9 이상으로 본 분석 결과가 각 시료의 세균 군집을 잘 설명하고 있음을 알 수 있다(Table 1). 토양시료(Non-Rhizo, M 및 TF)의 operational taxonomic units (OTUs)는 1,113–1,323이었으나, 농화배양하여 얻은 컨소시움 시료(CH₄_M, CH₄_TF, N₂O_M, N₂O_TF)의 OTUs는 167–418이었다. OTUs는 간접적으로 종 다양성을 평가할 수 있는 지표로[31], 컨소시움에 비해 토양시료의 종 다양성이 높음을 알 수 있다. 종 다양성 지표인 Chao1, Shannon index 및 Inverse Simpson index 모두 근권토양에 비해 컨소시움 시료에서 낮은 값을 보였다. 이러한 결과는 농화배양하여 얻은 컨소시움의 세균 군집은 점종원에 비해 종 다양성이 감소하는 것을 의미한다.

문(Phylum) 수준의 세균 군집 특성. 토양과 컨소시움 시료의 세균 군집을 문(phylum) 수준에서 분석한 결과를 Fig. 1A에 도시하였다. 문 수준에서 각 시료의 미생물 군집 특성을 비교해보면, 비근권 토양(Non-Rhizo)에서는 *Proteobacteria* (52.66%)가 가장 높은 우점도를 차지하였다(Fig. 1A). N₂O_TF 컨소시움을 제외한 모두 시료에서 *Proteobacteria*의 상대 우점도가 가장 높았다. N₂O_TF 컨소시움에서는 *Proteobacteria*가 두 번째로 높은 우점도(30.71%)를 차지하였다. *Proteobacteria*는 토양과 근권에서 우점하는 것으로 보

Table 1. Operational taxonomic units (OTUs) and alpha-diversity index of bacterial communities.

Sample	No. of OTUs	Chao1 ^a	Shannon ^b	Inverse Simpson ^c	Goods coverage ^d
Non-Rhizo	1323	1549	8.073	0.991	0.993
M	1130	1396	8.134	0.991	0.981
TF	1113	1420	8.151	0.992	0.978
CH ₄ _M	167	270	3.776	0.895	0.998
N ₂ O_M	196	338	4.081	0.905	0.993
CH ₄ _TF	249	343	3.424	0.765	0.999
N ₂ O_TF	418	578	3.485	0.820	0.998

Non-Rhizo, non-rhizosphere soil; M, rhizosphere soil of maize; TF, rhizosphere soil of tall fescue; CH₄_M, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of maize; N₂O_M, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of maize; CH₄_TF, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of tall fescue; N₂O_TF, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

^aThe Chao1 index is used to assess the bacterial population richness.

^bThe Shannon diversity index is used to assess the diversity of the bacterial population and it describes both species abundance and evenness. It is calculated as $H = -\sum (p_i \ln p_i)$, where p_i is the proportion of i^{th} species in total number of species.

^cThe Inverse Simpson diversity index is calculated as $1/D$. $D = \sum p_i^2$, where p_i is the proportion of i^{th} species in total number of species. Simpson's index(D) indicates the probability of two randomly selected individuals coincide as the same species.

^dGood coverage is calculated as $C = 1 - (s/n)$, where s is the number of unique OTUs and n is the number of individuals of each species. The index gives a relative measure of how well the sample represents a large environment.

고되었다[32, 33]. *Proteobacteria*는 생리적 다양성을 가져 탄소, 질소의 생리화학적 순환에 큰 영향을 미친다[34].

농화배양에 따른 세균 군집 변화를 비교해보면, 농화배양 전 시료(Non-Rhizo, M 및 TF)에서 두 번째 및 세 번째 우점종인 *Acidobacteria*와 *Actinobacteria*의 상대 우점도가 농화배양 후의 컨소시움 시료에서 각각 5%와 1% 미만으로 크게 감소하였다. *Acidobacteria*와 *Actinobacteria*는 온화한 환경뿐 아니라, 극한 환경(높은 온도, pH, 염도, 압력)에서도 서식하는 것으로 보고되고 있다[35–37]. 일부 연구에서는 *Acidobacteria*가 토양의 pH가 증가함에 따라 상대적인 풍부도가 감소한다고 밝혔다[38, 39]. 본 연구의 농화배양 컨소시움에서 이들의 비율이 감소하는 것으로 보아 *Acidobacteria*와 *Actinobacteria*는 CH₄ 산화 혹은 N₂O 환원에는 기여하지 않는 것으로 추정된다.

모든 컨소시움 시료(CH₄_M, CH₄_TF, N₂O_M, N₂O_TF)에서 *Proteobacteria* 이외에 *Bacteroidetes*가 5.16–38.91%로 높은 비율을 차지하였다. CH₄ 산화 컨소시움(CH₄_M, CH₄_TF)에서는 *Proteobacteria*와 *Bacteroidetes*가 90% 이상의 비율을 차지하였다. 대부분의 메탄 산화 세균은 *Proteobacteria*에 속하고[40], Héry 등은 *Bacteroidetes*가 CH₄ 산화를 위한 잠재적인 능력이 있다고 보고하였다[41]. 또한 CH₄가 풍부하여 메탄 산화 세균이 상대적으로 많은 영구 동토층 해빙 호수(permafrost thaw pond)의 미생물 군집 중 *Proteobacteria*와 *Bacteroidetes*가 절반 이상을 차지하였 다[42].

N₂O 환원 컨소시움(N₂O_M, N₂O_TF)을 제외한 모든 시

료에서 *Firmicutes*의 상대 우점도는 0.09–4.61%이었다. 그러나, N₂O_M와 N₂O_TF에서 *Firmicutes*의 상대 우점도는 각각 17.77%와 29.07%로 높은 비율을 차지하였다. N₂O reductase인 *nosZ*는 N₂O를 N₂로 환원 가능하게 하는 효소인데[43], *Firmicutes*에 속하는 세균에서 이 효소가 많이 발견되었다[44, 45].

속(Genus) 수준의 세균 군집 특성 비교. 속 수준의 세균 군집 특성 비교를 위해 각 시료별로 상위 10개의 속을 선택하여 Fig. 1B에 도시하였다. 토양(Non-Rhizo, M 및 TF) 시료에서 8개 속 세균(*Sphingomonas*, *Brevitalea*, *Vicinamibacter*, *Luteitalea*, *Gemmatimonas*, *Acidibacter*, *Chthoniobacter*, Unknown)이 공통적으로 존재하였다. Non-Rhizo는 *Sphingomonas* (8.58%), M는 *Vicinamibacter* (7.52%), TF는 *Sphingomonas* (6.86%)의 우점도가 가장 높았다. M, CH₄_M 및 N₂O_M 시료는 옥수수 근권 유래임에도 불구하고 상위 10위 속 수준에서는 공통적으로 존재하는 세균이 없었다. 톨페스큐 토양 유래 시료(TF, CH₄_TF, N₂O_TF)에서도 상위 10위 속 수준에서는 공통적으로 발견되는 세균이 없었다. 이러한 결과는 농화배양 전후 세균 군집 구조는 접종원 종류(특히 식물 종)보다는 CH₄ 산화 또는 N₂O 환원과 같은 특정 환경 변화에 의해 더 많이 영향을 받음을 시사한다.

CH₄ 산화 컨소시움(CH₄_M, CH₄_TF)의 각각 상위 20위 속 세균 중에서 검출된 methanotrophs를 Table 2에 정리하였다. 7개 속의 methanotrophs (*Methylobacter*, *Methylococcus*, *Methylogaea*, *Methylomicrobium*, *Methylomonas*,

Fig. 1. Comparison of the bacterial community structure at the phylum (A) and genus (B) levels. The top 10 genera of each sample were analyzed separately, and the remainders were grouped as 'others'. Non-Rhizo, non-rhizosphere soil; M, rhizosphere soil of maize; TF, rhizosphere soil of tall fescue; CH₄_M, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of maize; N₂O_M, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of maize; CH₄_TF, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of tall fescue; N₂O_TF, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

Methylosarcina, *Methylocystis*) 중, *Methylocystis*를 제외한 나머지는 Group I Gamma *Proteobacteria*에 해당된다. Group I은 포름알데히드 동화를 위해 리볼로스 일인산 경로를 가지는 반면, *Methylocystis*는 Group II alpha

*Proteobacteria*에 해당하며 세린 경로를 통해 포름알데히드를 동화한다[4].

CH₄_M의 경우, 군집 내 31.91%가 methanotrophs이었고, *Methylococcus* (16.93%)와 *Methylosarcina* (12.97%)의 우

Table 2. Relative percentage of seven methanotrophs in the top 20 genera for each sample.

Genus (%)	Non-Rhizo	M	TF	CH ₄ _M	N ₂ O_M	CH ₄ _TF	N ₂ O_TF
<i>Methylobacter</i> ^a	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.37	0.00
<i>Methylococcus</i> ^a	0.00	0.01	0.00	16.93	0.01	4.05	0.00
<i>Methylogaea</i> ^a	0.14	0.21	0.59	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Methylomicrobium</i> ^a	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	2.59	0.00
<i>Methylomonas</i> ^a	0.02	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00
<i>Methylosarcina</i> ^a	0.00	0.00	0.00	12.97	0.02	12.95	0.00
<i>Methylocystis</i> ^b	0.00	0.00	0.00	1.89	0.01	6.79	0.00

Non-Rhizo, non-rhizosphere soil; M, rhizosphere soil of maize; TF, rhizosphere soil of tall fescue; CH₄_M, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of maize; N₂O_M, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of maize; CH₄_TF, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of tall fescue; N₂O_TF, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

^aPhylum of gamma *Proteobacteria* in Group I using RuMP pathway of formaldehyde assimilation.

^bPhylum of gamma *Proteobacteria* in Group II using serine pathway of formaldehyde assimilation.

점도가 높았다. *Methylococcus*는 *Methylococcus capsulatus* (Bath)와 같은 여러 strain들이 대표적인 메탄산화세균으로 알려져있으며[46], *Methylosarcina*는 절대 메탄을 산화세균 (obligate methylotrophs)으로 호기성 조건에서 자랄 수 있고 생장 시 CH₄와 메탄올만을 이용할 수 있어 CH₄ 산화에 효과적이라고 알려져 있다[47]. 이 컨소시움에서 네 번째로 높은 우점도를 보인 *Azonexus* (12.15%)는 대표적인 N₂O 환원 세균이나[48], CH₄가 풍부한 환경에서는 탈질 반응과 더불어 메탄을 산화할 수 있는 것으로 알려져 있다[49]. CH₄_TF에서는 methanotrophs가 전체 군집의 26.77%를 차지하였고, *Methylosarcina* (12.95%)의 우점도가 가장 높았다. 그런데, CH₄_TF에서 methanotrophs에 속하지는 않는 *Methylotenera*가 높은 우점도(45.35%)를 보였다(Fig. 1B).

*Methylotenera*는 호기 조건에서 질산염 탈질을 통해 CH₄를 산화하는 것으로 알려져 있다[50].

한편, CH₄_M와 CH₄_TF의 상위 20위에서 공통으로 존재하는 속은 5개(*Methylococcus*, *Terrimonas*, *Methylosarcina*, *Methylocystis*, *Methylovorus*) 중 *Terrimonas*와 *Methylovorus*를 제외하고 모두 methanotrophs이었다(Fig. 1B). *Methylovorus*는 메틸영양세균(methylotroph)로 분류되었고, *Terrimonas*도 탄화수소를 산화할 수 있고 톨루엔과 메탄이 풍부한 환경에서 많이 발견되어 잠재적인 메탄 산화균 (potential methane oxidizer)으로 보고되고 있어, 이들도 CH₄_M와 CH₄_TF 컨소시움에서 CH₄ 산화에 기여했을 것이라고 추정된다[51–53].

N₂O 환원 컨소시움 시료(N₂O_M, N₂O_TF)의 상위 20위

Table 3. Relative percentage of 11 N₂O-reducing bacteria in the top 20 genera for each sample.

Genus (%)	Non-Rhizo	M	TF	CH ₄ _M	N ₂ O_M	CH ₄ _TF	N ₂ O_TF
<i>Cloacibacterium</i>	0.00	0.02	0.00	0.03	18.11	0.00	34.26
<i>Azonexus</i>	0.00	0.01	0.00	12.16	13.44	0.01	8.50
<i>Clostridium</i>	0.01	0.03	0.01	0.01	2.26	0.00	13.56
<i>Bacillus</i>	0.58	0.78	0.90	0.06	0.18	0.03	5.00
<i>Lentimicrobium</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	3.80	0.01	1.39
<i>Aeromonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	7.10	0.00	0.03
<i>Hyphomicrobium</i>	1.98	1.53	0.98	2.45	0.02	0.16	0.02
<i>Sphingomonas</i>	8.58	5.87	6.86	0.09	0.19	0.41	0.22
<i>Trichococcus</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	13.39	0.00	0.00
<i>Pseudorhodobacter</i>	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.94
<i>Dechloromonas</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	3.45	0.00	0.00

Non-Rhizo, non-rhizosphere soil; M, rhizosphere soil of maize; TF, rhizosphere soil of tall fescue; CH₄_M, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of maize; N₂O_M, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of maize; CH₄_TF, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of tall fescue; N₂O_TF, N₂O-reducing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

내 N_2O 환원 세균을 Table 3에 정리하였다. 공통으로 존재하는 속은 *Cloacibacterium*, *Azonexus*, *Aeromonas*, *Lentimicrobium*, *Clostridium*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, *Hyphomicrobium*인데, 이들은 모두 N_2O 환원능이 있는 것으로 알려져 있다. N_2O 를 N_2 로 환원하는 효소인 N_2O 환원 효소는 *nosZ* clade I과 *nosZ* clade II 유전자에 의해 encoding 되는데[54], N_2O_M 와 N_2O_TF 에서 가장 높은 비율로 나타나는 *Cloacibacterium* (18.11% 및 34.26%)는 대표적인 N_2O 환원 세균으로[48], *nosZ* clade II 유전자를 보유하였다[56]. *Azonexus*는 NO_3^- 를 N_2 로 탈질하는 대표적인 탈질세균이며[57], *nosZ* clade II 유전자를 가지고 있어서 N_2O 환원에 기여한다고 알려져 있다[55]. *Aeromonas*는 *napA* 유전자를 가진 탈질세균으로, N_2O 를 환원할 수 있다고 알려져 있다[58]. *Lentimicrobium*, *Clostridium*, *Sphingomonas*, 및 *Bacillus* 역시 대표적인 탈질 세균으로 N_2O 환원능을 보유하고 있다고 보고되었다[59–62]. 또한 *Hyphomicrobium* 속에 속하는 *H. denitrificans*는 NO_2 환원 효소와 N_2O 환원 효소를 가지고 있어 N_2O 를 환원할 수 있는 것으로 알려져 있다[63]. *Trichococcus* (13.39%)와 *Dechloromonas* (3.45%)는 N_2O_M 에서만 검출되었는데, 이들 역시 N_2O 환원능을 가지고 있는 것으로 보고되었다[64, 65]. *Trichococcus*는 종속 영양 탈질 세균으로 알려져 있으며[66], *Dechloromonas*의 일부는 *nosZ* clade II 유전자를 갖고 있어 N_2O 환원에 기여한다고 알려져 있다[54, 67]. 또한, N_2O 환원능을 가지고 있다고 알려진 *Pseudorhodobacter* (0.94%)는 N_2O_TF 에서만 검출되었다[68]. 이전 연구에 따르면, 옥수수 근권 토양은 독특한 탈질 세균 군집을 보유하고 있으며[13], 이와 함께 탈질

과 관련된 유전자(*narG*, *nirS/nirK*, *norB*, *nosZ*)가 많이 발견되었다고 보고되었다[69].

세균 군집 유사도 분석. 비근권 토양, 근권 토양 및 농화배양을 통해 얻은 컨소시움 시료의 세균 군집의 유사성을 비교하기 위해 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)을 하였다(Fig. 2). 문 수준의 1차 주성분(PC1)은 59.6%, 2차 주성분(PC2)은 31.0%이었고, 속 수준에서의 성분 분석 결과, 1차 주성분은 32.9%, 2차 주성분은 30.1%이었다. 문과 속 수준 모두 세균 군집은 크게 3개 그룹으로 구분되었다. 농화배양을 하지 않은 3종의 토양 시료(Non-Rhizo, M 및 TF), CH_4 산화 컨소시움(CH_4_M 및 CH_4_TF), N_2O 환원 컨소시움(N_2O_M 및 N_2O_TF)으로 구분되었다. 이를 통해 CH_4 산화 컨소시움과 N_2O 환원 컨소시움은 농화배양 전의 미생물 군집과 구별되는 군집 특성을 갖게 됨을 알 수 있었다. 또한, CH_4_M 과 CH_4_TF 가 서로 유사하고, N_2O_M 과 N_2O_TF 가 서로 유사한 결과를 통해 농화배양 조건이 식물의 종류보다 미생물 군집 구조에 큰 영향을 끼쳤다는 것을 알 수 있었다.

CH_4 산화 및 N_2O 환원 컨소시움의 활성에 미치는 뿌리삼출물 영향

CH_4_M 와 CH_4_TF 컨소시움의 메탄 산화 활성에 미치는 뿌리삼출물의 영향을 Fig. 3에 제시하였다. 뿌리삼출물의 첨가 유무에 무관하게 CH_4_M 컨소시움은 2일 이내에, CH_4_TF 컨소시움은 2.5일 이내에 대부분의 CH_4 를 산화하였다. Fig. 3의 그래프의 기울기로부터 CH_4 산화 속도를 계산하여 Table

Fig. 2. Principal component analysis of the bacterial community structures at the phylum (A) and genus (B) levels. Non-Rhizo, non-rhizosphere soil; M, rhizosphere soil of maize; TF, rhizosphere soil of tall fescue; CH_4_M , CH_4 -oxidizing consortium using rhizosphere soil of maize; N_2O_M , N_2O -reducing consortium using rhizosphere soil of maize; CH_4_TF , CH_4 -oxidizing consortium using rhizosphere soil of tall fescue; N_2O_TF , N_2O -reducing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

Fig. 3. Time profile of CH₄ oxidation in the CH₄-oxidizing consortia without and with root exudate. (A) Maize root exudate, (B) Tall fescue root exudate. Close circle, Control (without the consortium); Open circle, the consortium without root exudate; Close inverse triangle, the consortium with root exudate. CH₄_M, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of maize; CH₄_TF: CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

4에 정리하였다. CH₄_TF 컨소시움 대상 실험에서는 통계적인 유의차는 보이지 않았지만, 뿌리삼출물을 첨가한 조건에서 메탄 산화 컨소시움의 활성이 약간 감소하였다. 본 연구 결과와는 상반되게 뿌리삼출물에 의해 CH₄ 산화 활성이 증가한 경우도 있었다. 벼의 뿌리삼출물에 포함된 공급된 말산(malic acid)과 시트르산(citric acid)이 메탄산화세균의 성장을 촉진해 CH₄ 산화능이 향상되었다[70].

본 연구에서 옥수수 혹은 톨페스큐 뿌리삼출물의 첨가가 근권 세균의 CH₄ 산화 속도에 큰 변화에 주지 못한 이유를 다음과 같이 추측해 볼 수 있다. 첫 번째, 뿌리삼출물로부터 공급된 탄소원이 CH₄_M와 CH₄_TF 컨소시움의 많은 비율을 차지하는 methanotrophs의 기질로 이용되지 않았기 때문이다. 토양에서 미생물이 이용할 수 있는 탄소의 근원은 대부분의 경우 뿌리삼출물과 토양 유기물이다[71]. 일반적인

로 뿌리삼출물의 성분은 탄수화물, 아미노산, 유기산, 페놀류 물질, 지방산, 스테로이드 알코올(스테롤), 비타민, 효소, 그리고 무기물 등인데[72], methanotrophs는 메탄과 같은 C1 탄소 화합물들을 탄소원과 에너지원으로 사용한다. 물론 methanotrophs는 메틸영양세균(methylotrophic bacteria)의 일종으로 메탄올, 메틸화된 아민(methylated amines), 할로메테인, 황을 포함한 메틸화된 화합물과 같은 다른 단일 탄소 화합물들을 사용할 수 있다. 그런데 메탄올의 경우 독성을 가지고 있어 이를 생장 기질로 사용되는 경우가 적다[73]. Chen 등은 말산과 시트르산을 포함하고 있는 벼의 뿌리삼출물이 methanotrophs의 풍부도와 활성을 증진시켰다고 보고하였는데[70], 이 경우 methanotrophs가 기질로 이용할 수 있는 CH₄의 농도가 낮기 때문에 말산과 시트르산이 기질로 이용되었기 때문이었다. 그러나, 본 연구에서는 methanotrophs가 이용 가능한 CH₄ 농도가 높기 때문에 추가로 제공된 탄소원의 효과가 거의 없었을 것으로 추측된다. 두 번째 이유는 뿌리삼출물 유래 질소원에 의해 methanotrophs의 활성이 긍정적 영향과 부정적 영향을 모두 받았기 때문이다. Methanotrophs에 미치는 암모늄의 영향은 methanotrophs의 종류에 따라 차이가 있는데, group I에는 긍정적인 효과를, group II에는 반대로 억제하는 효과를 미쳤다[74]. 세 번째 이유는 뿌리삼출물로부터 공급된 탄소원이 다른 종속 영양 근권세균의 성장을 촉진시켰기 때문이다. Methanotrophs는 타 종속 영양 세균과 최종전자수용체인 산소를 두고 경쟁하는데[75], 뿌리삼출물 첨가로 인하여 경쟁이 더욱 심화될 가능성이 있다. 그러나 본 연구는 뿌리삼출물 첨가 전과 후의 컨소시움 군집 분석을 하지 않았기 때문에 뿌리삼출물 첨가로 인한 methanotrophs를 비롯

Table 4. Effect of root exudate on the CH₄ oxidation rate of the CH₄-oxidizing consortium.

Sample	Addition of root exudate	Maximum CH ₄ oxidation rate (μmol-CH ₄ ·l ⁻¹ ·h ⁻¹)
CH ₄ _M	X	1207.0 ± 63.05 ^a
CH ₄ _M	O (Maize)	1114.0 ± 25.80 ^b
CH ₄ _TF	X	1156.9 ± 70.41 ^{ab}
CH ₄ _TF	O (Tall fescue)	1125.2 ± 55.48 ^{ab}

CH₄_M, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of maize; CH₄_TF, CH₄-oxidizing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

Different characters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

Fig. 4. Time profile of N_2O oxidation in the N_2O -reducing consortia without and with root exudate. (A) Maize root exudate, (B) Tall fescue root exudate. Close circle, Control (without the consortium); Open circle, the consortium without root exudate; Close inverse triangle, the consortium with root exudate. N_2O_M , N_2O -reducing consortium using rhizosphere soil of maize; N_2O_TF , N_2O -reducing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

한 세균 군집 변화를 비교하지 못했다는 한계점을 가진다.

N_2O_M 와 N_2O_TF 컨소시움의 N_2O 환원 활성에 미치는 뿌리삼출물의 영향을 Fig. 4에 나타내었다. 두 컨소시움 모두 뿌리삼출물 첨가에 의해 N_2O 환원이 촉진되었다. 특히 N_2O_TF 컨소시움은 N_2O 를 완전히 환원시키는데 약 2.5일 소요되었으나, 뿌리삼출물 첨가한 조건에서는 1.5일 이내에 N_2O 를 환원시켰다. Fig. 4 결과로부터 각 시료의 N_2O 환원 속도를 계산하여 Table 5에 정리하였다. 뿌리삼출물 첨가에 의해 N_2O_M 과 N_2O_TF 의 N_2O 환원 속도는 각각 1.3배와 2.7배 향상되었다.

뿌리삼출물 첨가에 의한 N_2O 환원 속도가 증가한 이유는 뿌리삼출물 유래 탄소원이 종속 영양 탈질 세균의 기질로 이용되었기 때문으로 추정된다[71]. 옥수수 뿌리삼출물에는 당, 아미노산, 유기산, 지방산, 당산, 당 알코올, 인산 등이 함유되어 있다[72]. 톨페스큐 뿌리삼출물에도 당, 아미노산, 페

놀화합물(phenolics), 지방산 등과[76], 벤조산(benzoic acid), 4-히드록시 벤조산(p-hydroxybenzoic acid), 팔미트산(palmitic acid), 스테아르산(stearic acid)와 같은 유기산이 포함되어 있다[77]. Henry 등은 뿌리삼출물에 의해 N_2O 를 N_2 로 환원시키는 탈질세균의 활성이 촉진됨을 보고하였다[78]. 옥수수의 생장을 촉진하는 근권 세균인 *Azospirillum lipoferum* CRT1을 토양에 접종했을 때, 뿌리삼출물이 제공하는 탄소원이 많을 경우 탈질세균과 N_2O 환원세균에 의해 N_2O 의 순생산량이 감소하였다[79]. 본 연구에서는 옥수수 뿌리삼출물에 비해 톨페스큐 뿌리삼출물을 첨가했을 때 N_2O 환원 속도가 더 많이 향상되었다(Table 5). 옥수수와 톨페스큐 뿌리삼출물의 COD는 각각 827, 583 mg-COD/l로, 뿌리삼출물의 유기물 농도가 높을수록 N_2O 환원 속도도 증가하는 비례관계에 있지 않음을 확인하였다. 이는 뿌리삼출물의 유기물 농도보다는 질적인 특성에 의해 N_2O 환원 속도가 영향을 받음을 시사한다. 선행연구에서는 C/N이 높을수록 완전한 탈질이 일어나 N_2O 가 N_2 의 환원이 촉진되었다[80]. Liu 등의 연구에서는 N_2O 를 N_2 로 환원하는 *nosZ* 유전자가 낮은 토양 pH에서 억제됨을 밝혔다[81]. 또한 토양의 pH가 6.4 미만일 때와 6.8 초과일 때 N_2O 환원 효율이 떨어진다고도 알려져 있다[82]. 따라서 뿌리삼출물에 의한 N_2O 환원 활성 향상 기작을 해석하기 위해서는 COD 뿐만 아니라 C/N, pH, 탄소원의 종류 등 다른 인자들을 고려할 필요가 있으나 본 연구에서는 다른 지표를 고려하지 못했다는 한계점이 존재한다. 따라서 CH_4 산화능과 N_2O 환원능에 미치는 뿌리삼출물의 영향 기작을 규명하기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

토양환경은 미소환경(micro-environment)이 형성되므로, pore connection에 따라 호기 조건과 혐기 조건이 동시에 존

Table 5. Effect of root exudate on the N_2O reduction rate of the N_2O -reducing consortia.

	Addition of root exudate	N_2O reduction rate ($\mu\text{mol-N}_2\text{O} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
N_2O_M	X	15.53 ± 0.837^c
N_2O_M	O (Maize)	19.52 ± 0.879^b
N_2O_TF	X	11.37 ± 0.867^d
N_2O_TF	O (Tall fescue)	30.14 ± 2.394^a

N_2O_M , N_2O -reducing consortium using rhizosphere soil of maize; N_2O_TF , N_2O -reducing consortium using rhizosphere soil of tall fescue.

Different characters indicate significant differences between treatments ($p < 0.05$).

재할 수 있다[83, 84]. 이에 따라 자연계에서 CH₄의 생성 및 소멸 반응, 그리고 N₂O의 생성 및 소멸 반응이 동시에 일어날 수 있다[85, 86]. 대부분의 경우, CH₄는 산소가 없는 환경에서 유기물질의 분해 과정에서 생성된다[87]. 그러나 생물학적 CH₄ 산화의 경우 메탄산화세균에 의해 O₂를 이용하여 CH₄를 CO₂로 산화시키기 때문에 산소가 있는 조건에서 반응이 일어난다[88]. N₂O 또한 CH₄와 마찬가지로 토양환경의 산소 조건에 따라 반응이 결정되는데, 호기 조건에서는 질산화 과정이 우세하여 중간산물인 N₂O가 생성된다[89]. 혐기 조건에서는 N₂O 환원효소에 의해 환원된다[89]. 주로 호기조건에서는 N₂O가 생성되고 혐기조건에서는 N₂O가 N₂로 환원되어 소멸되는데, 이러한 호기조건과 혐기조건을 떠는 환경의 경계에서 N₂O 생성이 가장 활발하다[90]. 본 연구에서는 특정 산소 조건을 조성하여 이에 맞게 CH₄ 산화 혹은 N₂O 환원을 할 수 있는 근권토양 미생물 군집을 분석하여 친환경적으로 온실가스를 감축시키는 미생물 자원에 대한 정보를 제공하였다. 하지만 실제 자연환경에서는 토양의 수분함량에 의해서도 산소 조건이 변할 수 있기 때문에 이런 변화에 대응하는 미생물 군집의 적응력에 대한 추가적인 연구가 필요하다[91].

토양환경에서의 온실가스 감축 필요성이 대두되고 있다. 이에 따라 경제적이고 환경친화적인 생물학적 저장 기술에 활용할 수 있는 신규의 미생물자원 확보에 대한 요구가 증가하고 있다. 본 연구는 유류오염 토양 정화기술에 활용되는 옥수수과 톨페스큐 근권 유래 CH₄ 산화 컨소시움과 N₂O 환원 컨소시움을 농화배양 방법을 통해 확보하였다. 고속 염기서열 분석법을 통해 집종원과 컨소시움의 세균 군집 특성을 비교 분석한 결과, 컨소시움의 군집 구조 특성은 집종원보다는 농화배양 조건과 같은 환경조건에 의해 결정됨을 확인할 수 있었다. 또한, CH₄ 산화 컨소시움의 CH₄ 산화능에 미치는 뿌리삼출물의 영향은 거의 없었으나, N₂O 환원 컨소시움의 N₂O 환원능은 뿌리삼출물 첨가에 의해 1.6배-2.7배 향상되었다. 근권 유래 세균 컨소시움의 CH₄ 산화 및 N₂O 환원 활성에 미치는 뿌리삼출물의 영향 기작을 규명하기 위해서는 뿌리삼출물 첨가 전후의 군집 구조 변화, 뿌리삼출물에 함유된 무기물 및 유기물 등이 CH₄ 산화 및 N₂O 환원에 미치는 영향 등에 관한 추가적인 연구가 필요하다. 본 연구를 통해 얻은 정보는 근권세균과 식물의 상호작용을 이해하고, 유류 오염 정화과정에서 non-CO₂ 온실가스 배출을 저감하기 위한 생물학적 기술 개발에 활용 가능하다.

요 약

옥수수(*Zea mays*)와 톨페스큐(*Festuca arundinacea*) 근권 토양을 집종원으로 사용하여 농화배양을 통해 CH₄ 산화

컨소시움과 N₂O 환원 컨소시움을 얻었다. Illumina MiSeq 염기서열 분석법으로 집종원과 컨소시움의 세균 군집 특성을 비교하였고, 컨소시움의 CH₄ 산화와 N₂O 환원 활성에 미치는 뿌리삼출물의 영향을 규명하였다. 집종원이 다름에도 불구하고 옥수수와 톨페스큐 유래 CH₄ 산화 컨소시움 사이의 유사성이 높았고, 2종의 N₂O 환원 컨소시움도 서로 유사성이 높았다. 2종의 CH₄ 산화 컨소시움에서 우점도가 높은 metanotrophs는 *Methylosarcina*, *Methylococcus* 및 *Methylocystis*이었다. 2 종의 N₂O 환원 컨소시움에서 대표적인 N₂O 환원 세균은 *Cloacibacterium*, *Azonexus* 및 *Klebsiella*이었다. 옥수수 근권 유래 N₂O 환원 컨소시움의 N₂O 환원 속도는 옥수수 뿌리삼출물 첨가에 의해 1.6배, 톨페스큐 유래 컨소시움의 N₂O 환원 속도는 톨페스큐 뿌리삼출물 첨가에 의해 2.7배 향상되었다. 그러나 CH₄ 산화 컨소시움의 활성은 뿌리삼출물 첨가에 의해 향상되지 않았다. 본 연구의 옥수수 및 톨페스큐 근권 유래 CH₄ 산화 및 N₂O 환원 컨소시움은 유류 오염 정화과정에서 non-CO₂ 온실가스 배출을 저감하는데 활용 가능하다.

Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Science and ICT (NRF- 2019R1A2C2006701).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Olivier JG, Schure KM, Peters JAHW. 2017. Trends in global CO₂ and total greenhouse gas emissions: 2017 report. *PBL Netherlands Environmental Assessment Agency*, 2674.
- IPCC. 2014. In Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. pp. 151. IPCC, Geneva, Switzerland.
- Saravanan A, Jeevanantham S, Narayanan VA, Kumar PS, Yaashikaa PR, Muthu CM. 2020. Rhizoremediation-A promising tool for the removal of soil contaminants: A review. *J. Environ. Chem. Eng.* **8**: 103543.
- Cho KS, Jung H. 2017. Methane mitigation technology using methanotrophs: A review. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **45**: 185-199.
- Hallin S, Philippot L, Löffler FE, Sanford RA, Jones CM. 2018. Genomics and ecology of novel N₂O-reducing microorganisms. *Trends Microbiol.* **26**: 43-55.
- Jiang H, Chen Y, Jiang P, Zhang C, Smith TJ, Murrell JC, et al.

2010. Methanotrophs: multifunctional bacteria with promising applications in environmental bioengineering. *Biochem. Eng. J.* **49**: 277-288.
7. Tveit AT, Hestnes AG, Robinson SL, Schintlmeister A, Dedysh SN, Jehmlich N, et al. 2019. Widespread soil bacterium that oxidizes atmospheric methane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**: 8515-8524.
8. Yokoyama K, Yumura M, Honda T, Ajitomi E. 2016. Characterization of denitrification and net N₂O-reduction properties of novel aerobically N₂O-reducing bacteria. *Soil. Sci. Plant Nutr.* **62**: 230-239.
9. Seo Y, Cho KS. 2020. Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils and greenhouse gas emission characteristics: A review. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **48**: 99-112.
10. Cho KS. 2020. Plant growth-promoting bacteria for remediation of heavy metal contaminated soil: Characteristics, application and prospects. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **48**: 399-422.
11. Praeg N, Illmer P. 2020. Microbial community composition in the rhizosphere of *Larix decidua* under different light regimes with additional focus on methane cycling microorganisms. *Sci. Rep.* **10**: 1-16.
12. Gilbert B, Frenzel P. 1995. Methanotrophic bacteria in the rhizosphere of rice microcosms and their effect on porewater methane concentration and methane emission. *Biol. Fertil. Soils.* **20**: 93-100.
13. Chèneby D, Perez S, Devroey C, Hallet S, Couton Y, Bizouard F, et al. 2004. Denitrifying bacteria in bulk and maize-rhizospheric soil: diversity and N₂O-reducing abilities. *Can. J. Microbiol.* **50**: 469-474.
14. Lugtenberg BJ, Kravchenko LV, Simons M. 1999. Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environ. Microbiol.* **1**: 439-446.
15. Cao X, Wang J, Liu S, Chen L, Xiang D, Na X, et al. 2020. Effect of different fertilizers on the bacterial community diversity in rhizospheric soil of broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.). *Arch. Agron. Soil Sci.* (in press). <https://doi.org/10.1080/03650340.2020.1849625>
16. Cantó CF, Simonin M, King E, Moulin L, Bennett MJ, Castrillo G, et al. 2020. An extended root phenotype: the rhizosphere, its formation and impacts on plant fitness. *Plant J.* **103**: 951-964.
17. Koo SY, Cho KS. 2006. Interaction between plants and rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal-contaminated soil. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **34**: 83-93.
18. Iannucci A, Canfora L, Nigro F, De Vita P, Beleggia R. 2021. Relationships between root morphology, root exudate compounds and rhizosphere microbial community in durum wheat. *Appl. Soil Ecol.* **158**: 103781.
19. Lee YY, Seo Y, Ha M, Lee J, Yang H, Cho KS. 2020. Evaluation of rhizoremediation and methane emission in diesel-contaminated soil cultivated with tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Environ. Res.* **194**: 110606.
20. Gerhardt KE, Huang XD, Glick BR, Greenberg BM. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci. J.* **176**: 20-30.
21. Tang JC, Wang RG, Niu XW, Wang M, Chu HR, Zhou QX. 2010. Characterisation of the rhizoremediation of petroleum-contaminated soil: effect of different influencing factors. *Biogeosciences* **7**: 3961-3969.
22. Guo M, Gong Z, Miao R, Jia C, Rookes J, Cahill D, et al. 2018. Enhanced polycyclic aromatic hydrocarbons degradation in rhizosphere soil planted with tall fescue: Bacterial community and functional gene expression mechanisms. *Chemosphere* **212**: 15-23.
23. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 5112-5120.
24. Wu L, Wen C, Qin Y, Yin H, Tu Q, Van Nostrand JD, et al. 2015. Phasing amplicon sequencing on Illumina MiSeq for robust environmental microbial community analysis. *BMC Microbiol.* **15**: 1-12.
25. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **7**: 335-336.
26. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics* **34**: i884-i890.
27. Magoc T, Salzberg SL. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**: 2957-2963.
28. Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J. 2012. Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief Bioinform.* **13**: 656-668.
29. Lee EH, Yi TW, Moon KE, Park HJ, Ryu HW, Cho KS. 2011. Characterization of methane oxidation by a methanotroph isolated from a landfill cover soil, South Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **21**: 753-756.
30. Park HJ, Kwon JH, Yun J, Cho KS. 2020. Characterization of nitrous oxide reduction by *Azospira* sp. HJ23 isolated from advanced wastewater treatment sludge. *J. Environ. Sci. Health A* **55**: 1459-1467.
31. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. 2017. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* **11**: 2639-2643.
32. Spain AM, Krumholz LR, Elshahed MS. 2009. Abundance, composition, diversity and novelty of soil Proteobacteria. *ISME J.* **3**: 992-1000.
33. Janssen PH. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1719-1728.
34. Kersters K, De Vos P, Gillis M, Swings J, Vandamme P, Stackebrandt E. 2006. Introduction to the Proteobacteria, pp. 3-37. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E (eds.). *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*, 3rd Ed. Springer, New York. USA.

35. Kielak AM, Barreto CC, Kowalchuk GA, van Veen JA, Kuramae EE. 2016. The ecology of Acidobacteria: moving beyond genes and genomes. *Front. Microbiol.* **7**: 744.
36. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk HP, *et al.* 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**: 1-43.
37. Yadav AN, Verma P, Kumar S, Kumar V, Kumar M, Sugitha TCK, *et al.* 2018. Actinobacteria from rhizosphere: molecular diversity, distributions, and potential biotechnological applications, pp. 13-41. In Singh BP, Gupta VK, Passari AK (eds.), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, 1st Ed. Elsevier, India.
38. Sait M, Davis KE, Janssen PH. 2006. Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 1852-1857.
39. Lauber CL, Hamady M, Knight R, Fierer N. 2009. Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5111-5120.
40. AlSayed A, Fergala A, Eldyasti A. 2019. Enhancement of the cultivation process conditions of mixed culture methanotrophic Proteobacteria phylum enriched from waste activated sludge as the first step for value added recovery process. *J. Biosci. Bioeng.* **127**: 602-608.
41. Héry M, Singer AC, Kumaresan D, Bodrossy L, Stralis-Pavese N, Prosser JL, *et al.* 2008. Effect of earthworms on the community structure of active methanotrophic bacteria in a landfill cover soil. *ISME J.* **2**: 92-104.
42. Crevecoeur S, Vincent WF, Comte J, Lovejoy C. 2015. Bacterial community structure across environmental gradients in permafrost thaw ponds: methanotroph-rich ecosystems. *Front. Microbiol.* **6**: 192.
43. Torres MJ, Simon J, Rowley G, Bedmar EJ, Richardson DJ, Gates AJ, *et al.* 2016. Nitrous oxide metabolism in nitrate-reducing bacteria: physiology and regulatory mechanisms. *Adv. Microb. Physiol.* **68**: 353-432.
44. Harter J, El-Hadidi M, Huson DH, Kappler A, Behrens S. 2017. Soil biochar amendment affects the diversity of *nosZ* transcripts: implications for N₂O formation. *Sci. Rep.* **7**: 1-14.
45. Graf DR, Jones CM, Hallin S. 2014. Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. *PLoS One* **9**: e111418.
46. Chistoserdova L, Vorholt JA, Lidstrom ME. 2005. A genomic view of methane oxidation by aerobic bacteria and anaerobic archaea. *Genome Biol.* **6**: 208.
47. Kalyuzhnaya MG. 2015. *Methylosarcina*. *BMSAB*. 1-7.
48. Conthe M, Parchen C, Stouten G, Kleerebezem R, van Loosdrecht MC. 2018. O₂ versus N₂O respiration in a continuous microbial enrichment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**: 8943-8950.
49. Fan SQ, Xie GJ, Lu Y, Liu BF, Xing DF, Ding J, *et al.* 2020. Nitrate/nitrite dependent anaerobic methane oxidation coupling with anammox in membrane biotrickling filter for nitrogen removal. *Environ. Res.* **193**: 110533.
50. Cao Q, Liu X, Li N, Xie Z, Li Z, Li D. 2019. Stable-isotopic analysis and high-throughput pyrosequencing reveal the coupling process and bacteria in microaerobic and hypoxic methane oxidation coupled to denitrification. *Environ. Pollut.* **250**: 863-872.
51. Govorukhina NI, Trotsenko YA. 1991. *Methylovorus*, a new genus of restricted facultatively methylotrophic bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **41**: 158-162.
52. Luangthongkam P, Strong PJ, Mahamud SNS, Evans P, Jensen P, Tyson G, *et al.* 2019. The effect of methane and odd-chain fatty acids on 3-hydroxybutyrate (3HB) and 3-hydroxyvalerate (3HV) synthesis by a *Methylosinus*-dominated mixed culture. *Bioresour. Bioprocess.* **6**: 1-10.
53. Su Y, Xia FF, Tian BH, Li W, He R. 2014. Microbial community and function of enrichment cultures with methane and toluene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 3121-3131.
54. Yoon S, Nissen S, Park D, Sanford RA, Löffler FE. 2016. Nitrous oxide reduction kinetics distinguish bacteria harboring clade I *NosZ* from those harboring clade II *NosZ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 3793-3800.
55. Conthe M, Wittorf L, Kuenen JG, Kleerebezem R, Hallin S, van Loosdrecht MC. 2018. Growth yield and selection of *nosZ* clade II types in a continuous enrichment culture of N₂O respiring bacteria. *Environ. Microbiol. Rep.* **10**: 239-244.
56. Kim DD, Park D, Yoon H, Song MJ, Yun T, Yoon S. 2019. Development of group-specific *nosZ* quantification method targeting active nitrous oxide reducing population in complex environmental samples. *bioRxiv*. 710483.
57. Quan ZX, Im WT, Lee ST. 2006. *Azonexus caeni* sp. nov., a denitrifying bacterium isolated from sludge of a wastewater treatment plant. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 1043-1046.
58. Zhou S, Zhang Y, Huang T, Liu Y, Fang K, Zhang C. 2019. Microbial aerobic denitrification dominates nitrogen losses from reservoir ecosystem in the spring of Zhoucun reservoir. *Sci. Total Environ.* **651**: 998-1010.
59. Li H, Zhou Z, Liu Q, Dong H, Duan Y, Li C, *et al.* 2015. Biological denitrification in high salinity wastewater using semen litchi as a carbon source. *RSC Adv.* **5**: 92836-92842.
60. Verbaendert I, Boon N, De Vos P, Heylen K. 2011. Denitrification is a common feature among members of the genus *Bacillus*. *Syst. Appl. Microbiol.* **34**: 385-391.
61. Wang H, Chen N, Feng C, Deng Y, Gao Y. 2020. Research on efficient denitrification system based on banana peel waste in sequencing batch reactors: Performance, microbial behavior and dissolved organic matter evolution. *Chemosphere* **253**: 126693.
62. Zhao S, Su X, Wang Y, Yang X, Bi M, He Q, *et al.* 2020. Copper oxide nanoparticles inhibited denitrifying enzymes and electron transport system activities to influence soil denitrification and N₂O emission. *Chemosphere* **245**: 125394.

63. Martineau C, Mauffrey F, Villemur R. 2015. Comparative analysis of denitrifying activities of *Hyphomicrobium nitrativorans*, *Hyphomicrobium denitrificans*, and *Hyphomicrobium zavarzinii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 5003-5014.
64. Kamika I, Tekere M. 2017. Impacts of cerium oxide nanoparticles on bacterial community in activated sludge. *AMB Express* **7**: 63.
65. Sanford RA, Wagner DD, Wu Q, Chee-Sanford JC, Thomas SH, Cruz-García C, et al. 2012. Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: 19709-19714.
66. Han F, Zhang M, Shang H, Liu Z, Zhou W. 2020. Microbial community succession, species interactions and metabolic pathways of sulfur-based autotrophic denitrification system in organic-limited nitrate wastewater. *Bioresour. Technol.* **315**: 123826.
67. McIlroy SJ, Starnawska A, Starnawski P, Saunders AM, Nierychlo M, Nielsen PH, et al. 2016. Identification of active denitrifiers in full-scale nutrient removal wastewater treatment systems. *Environ. Microbiol.* **18**: 50-64.
68. Zhou JH, Yu HC, Ye KQ, Wang HY, Ruan YJ, Yu JM. 2019. Optimized aeration strategies for nitrogen removal efficiency: Application of end gas recirculation aeration in the fixed bed biofilm reactor. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **26**: 28216-28227.
69. Li X, Rui J, Xiong J, Li J, He Z, Zhou J, et al. 2014. Functional potential of soil microbial communities in the maize rhizosphere. *PLoS One* **9**: e112609.
70. Chen Y, Li S, Zhang Y, Li T, Ge H, Xia S, et al. 2019. Rice root morphological and physiological traits interaction with rhizosphere soil and its effect on methane emissions in paddy fields. *Soil Biol. Biochem.* **129**: 191-200.
71. Uchida Y, Clough J. 2015. Nitrous oxide emissions from pastures during wet and cold seasons. *Grassl. Sci.* **61**: 61-74.
72. Naveed M, Brown LK, Raffan AC, George TS, Bengough AG, Roose T, et al. 2017. Plant exudates may stabilize or weaken soil depending on species, origin and time. *Eur. J. Soil Sci.* **68**: 806-816.
73. Tays C, Guarnieri MT, Sauvageau D, Stein LY. 2018. Combined effects of carbon and nitrogen source to optimize growth of proteobacterial methanotrophs. *Front. Microbiol.* **9**: 2239.
74. Bodelier PL, Roslev P, Henckel T, Frenzel P. 2000. Stimulation by ammonium-based fertilizers of methane oxidation in soil around rice roots. *Nature* **403**: 421-424.
75. Turner JC, Moorberg CJ, Wong A, Shea K, Waldrop MP, Turetsky MR, et al. 2020. Getting to the root of plant-mediated methane emissions and oxidation in a Thermokarst bog. *JGR Biogeosciences* **125**: e2020JG005825.
76. Valé M, Nguyen C, Dambrine E, Dupouey JL. 2005. Microbial activity in the rhizosphere soil of six herbaceous species cultivated in a greenhouse is correlated with shoot biomass and root C concentrations. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 2329-2333.
77. Liu W, Hou J, Wang Q, Yang H, Luo Y, Christie P. 2015. Collection and analysis of root exudates of *Festuca arundinacea* L. and their role in facilitating the phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Plant Soil* **389**: 109-119.
78. Henry S, Texier S, Hallet S, Bru D, Dambreville C, Chêneby D, et al. 2008. Disentangling the rhizosphere effect on nitrate reducers and denitrifiers: insight into the role of root exudates. *Environ. Microbiol.* **10**: 3082-3092.
79. Florio A, Bréfort C, Gervais J, Bérard A, Le Roux X. 2019. The responses of NO₂⁻- and N₂O-reducing bacteria to maize inoculation by the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1 depend on carbon availability and determine soil gross and net N₂O production. *Soil Biol. Biochem.* **136**: 107524.
80. Lee YY, Choi H, Cho KS. 2019. Effects of carbon source, C/N ratio, nitrate, temperature, and pH on N₂O emission and functional denitrifying genes during heterotrophic denitrification. *J. Environ. Sci. Health A.* **54**: 16-29.
81. Liu H, Ding Y, Zhang Q, Liu X, Xu J, Li Y, et al. 2019. Heterotrophic nitrification and denitrification are the main sources of nitrous oxide in two paddy soils. *Plant Soil.* **445**: 39-53.
82. Hénault C, Bourennane H, Ayzac A, Ratié C, Saby NP, Cohan JP, et al. 2019. Management of soil pH promotes nitrous oxide reduction and thus mitigates soil emissions of this greenhouse gas. *Sci. Rep.* **9**: 1-11.
83. Chen T, Liu Y, Zhang B, Sun L. 2019. Plant rhizosphere, soil microenvironment, and functional genes in the nitrogen removal process of bioretention. *Environ Sci Process Impacts* **21**: 2070-2079.
84. He X, Yin H, Sun X, Han L, Huang G. 2018. Effect of different particle-size biochar on methane emissions during pig manure/wheat straw aerobic composting: Insights into pore characterization and microbial mechanisms. *Bioresour. Technol.* **268**: 633-637.
85. Topp E, Pattey E. 1997. Soils as sources and sinks for atmospheric methane. *Canadian J. Soil Sci.* **77**: 167-177.
86. Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, Oenema O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1723-1732.
87. Karakurt I, Aydin G, Aydin K. 2012. Sources and mitigation of methane emissions by sectors: A critical review. *Renew. Energy* **39**: 40-48.
88. Koo CW, Rosenzweig AC. 2021. Biochemistry of aerobic biological methane oxidation. *Chem. Soc. Rev.* **50**: 3424-3436.
89. Venterea RT. 2007. Nitrite-driven nitrous oxide production under aerobic soil conditions: kinetics and biochemical controls. *Glob. Change Biol.* **13**: 1798-1809.
90. Wrage N, Velthof GL, van Beusichem ML, Oenema O. 2001. Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide. *Soil Biol. Biochem.* **33**: 1723-1732.
91. Sierra CA, Malghani S, Loescher HW. 2017. Interactions among temperature, moisture, and oxygen concentrations in controlling decomposition rates in a boreal forest soil. *Biogeosciences* **14**: 703-710.