

한라산국립공원 자연자원조사

2012. 12

제주특별자치도 한라산연구소

토양미생물

조사위원 : 현해남, 좌재호

1._ 서 론

2._ 조사범위 및 방법

- 가. 시료채취
- 나. 분석방법

3._ 결과 및 고찰

- 가. 한라산국립공원 등산로 코스별 토양효소 활성
- 나. 한라산국립공원 등산로 코스별 토양미생물 분포
- 다. 한라산국립공원 등산로 코스별 토양 PLFA 생물학적 지표

4._ 요 약

5._ 참고문헌

1. 서론

제주도는 해발고도에 따른 식생대의 구분이 뚜렷하여 식생의 이동, 숲의 변화, 식물 종 다양성의 변화 등을 관찰할 수 있는 최적의 조건을 갖추고 있다. 토양은 식생의 분포형태를 좌우하는 여러 가지 환경인자 중의 하나로 볼 수 있지만 가장 중요한 인자가 될 수도 있다. 특히 산림토양은 경작지토양과는 다른 독특한 미기후와 다양한 미생물들이 존재한다. 또한 임상의 형태는 토양의 화학적 성질이나 토양비옥도와 관련성이 크기 때문에 산림토양에서 중요시되는 부분이다(진 등, 1994). 토양생태계에서 미생물은 탄소, 질소, 인산 등 물질분해와 순환에 중요한 역할을 한다. 유기물의 분해는 미생물의 개체수, 유기물 분해효소활성 등 생물적 요인과 토양특성, pH, 온도, 수분함량, 유기물의 화학적 조성 등 비생물적 요인이 복합적으로 상호작용하여 일어난다(Manzoni and Porpotato, 2007). 미생물의 활성은 토양 유형, 토양공극 크기, pH, 온도와 수분함량, 유기물, 중금속 등 생물학적, 비생물학적 요인의 영향을 받는다. 토양미생물의 활성을 측정함으로써 토양의 건전성을 평가할 수 있다. 미생물의 활성을 평가하는 방법으로 미생물의 종류와 개체수를 이용하는 방법은 시료 채취시기, 미생물 배양 배지 종류, 양분요구도 등에 영향을 받아 변이가 크고 정확도가 떨어지는 단점이 있다. 인지질 지방산(PLFA)은 살아있는 미생물에만 존재하기 때문에 배양이 어려운 미생물까지도 정량할 수 있어 미생물의 활성을 평가하는데 유용하다(Green and Scow, 2008). 토양 효소 활성은 토양 유기물 함량, 토양 중금속 종류, 지온 등 여러 환경요인에 의하여 영향을 받는다. 특히 토양유형은 토양미생물의 기능과 활성에 크게 영향을 주며, 화산회토양은 유기물과 allophane이 복합체를 형성하여 알루미늄 독성에 의하여 토양미생물의 활성이 낮다(Satti *et al.*, 2007; Song, 1990; Ugolini and Dahlgren, 2002). 화산회토양의 알로팬(Allophane)을 전자현미경으로 보면 직경이 35-50Å인 가늘고 둥근모양의 입자이다. 이들 입자는 입자 스스로 또는 다른 구성물들과 다양한 모양과 크기의 입단을 형성한다. <0.2µm의 점토의 알로팬은 SiO₂/Al₂O₃ 비가 1-2범위에 있다. 4배 배위결합 알로팬의 알루미늄 함량은 SiO₂/Al₂O₃ 비와 비례하여 증가하며 총알루미늄의 50%를 차지한다(Henmi and Wada, 1976). 본 연구의 목적은 한라산국립공원 등산로 코스별로 토양미생물의 분포와 효소활성을 측정하여 추후 기후변화에 대응한 미생물 변동상을 평가하는데 기초 자료로 활용하고자 수행하였다.

2. 조사범위 및 방법

가. 시료채취

본 토양조사는 2012년 3월부터 수행되었으며 한라산국립공원에 위치한 어리목, 영실, 성판악, 관음사 및 돈내코 등산로를 중심으로 낙엽층을 제거한 후에 표토(0~15cm)를 채취하였다. 시료채취 지점은 그림 1과 같다. 토양시료는 총 51점으로 토양분야와 동일한 지점에서 채취하였다.



그림 1. 한라산국립공원 등산로 토양미생물 시료 채취지점

나. 분석방법

1) 인지질 지방산 분석

2mm체로 선별한 토양을 동결건조 후 인지질 지방산(Phospholipid fatty acid, PLFA)함량은 Bligh/Dyer first-phase extraction(Bligh and Dyer, 1959) 방법을 이용하여 미생물 세포막 지방산을 추출한 다음 Silicic acid column chromatography를 이용하여 중성지방과 당지방을 순차적으로 제거한 후 인지질을 분획하였다. 분획된 시료는 methylation시킨 후 MIDI Sherlock Microbial Identification System(MIDI Inc., Newark, DE)으로 지방산을 정량

하였다.

2) 토양 PLFA 지표 미생물 분석

미생물 분포비율은 분석된 지방산을 지방산 분석지표를 이용하여 세균, 방선균, 사상균, 균근균으로 분류하여 처리별 PLFA 값은 총 PLFA의 퍼센트 비율로 나타냈다(Li *et al.*, 2006; Rahman and Sugiyama, 2008). 그램 양성균은 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso, 17:0 anteiso, 18:0 iso, 그램 음성균은 17:0 cyclo, 18:1 w7c, 19:0cycω 8c, 17:1 ω 8c, 방선균은 TBSA 10me18:0, 10Me16:0, 10Me17:0, 사상균은 18:2 w6,9c, 18:1 w9c, 균근균 16:1ω 5c를 지표 지방산으로 이용하였다. 그램음성세균과 그램양성세균 지방산함량을 더해 세균의 함량을 나타냈다.

3) 토양 PLFA 생물지표(Biological index) 비율 분석

분석된 지방산 생물지표를 이용하여 탄소 영양원이 적은 조건에서 탄소 영양원이 풍부한 조건으로 이동 지표로 그램음성세균/그램양성세균(G-/G+) (Borga *et al.*, 1994; Yao *et al.*, 2000), 토양 유기물함량 지표로 곰팡이/세균 (F/B) (Bardgett *et al.*, 1996; Frostegard and Baath, 1996) 등 2개의 생물지표의 변화를 분석하였다.

4) 탈수소효소활성(Dehydrogenase activity)

Dehydrogenase는 Casida *et al.*(1964)의 방법을 이용하여 풍건토 5g에 CaCO₃ 0.05g와 1ml의 3% triphenyl tetrazolium chloride(TTC) 용액을 가하여 잘 혼합한 후 37°C 항온수조에서 24시간 배양하였다. 배양 후 생성된 2,3,5,-Triphenyl formazan(TPF)에 Methanol을 10ml씩 2회 추출하여 No.6 Filter paper로 여과 후 485nm에서 UV-Visible Spectrophotometer(Cary 100, Varian)로 흡광도를 측정하였다.

5) 산성인산효소활성(Acid phosphatase activity)

토양 1g을 25ml 시험관에 취한 후 4ml의 0.1M Malate buffer(pH 6.5), 1ml의 0.025M p-nitrophenyl phosphate disodium용액을 가하고 밀봉을 하여 37°C에서 1시간 동안 배양 후 20°C에서 15분간 정치 후 0.5M CaCl₂ 1ml과 0.5M NaOH 4ml를 첨가하여 여과 후 UV-Visible Spectrophotometer(Cary 100, Varian)를 이용 400nm에서 측정하였다(Tabatabai and Bremner, 1969). 대조구로 1ml의 0.5M CaCl₂ 용액과 4ml의 0.5M NaOH용액을 가한 후 배양 현

탁액을 여과하기 직전에 1ml의 0.025M p-nitrophenyl phosphate용액을 가한 것을 사용하여 여액 중의 p-nitrophenol 함량을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 한라산국립공원 등산로 코스별 토양효소 활성

한라산 등산로별(돈내코는 1,000m지점에서 100m간격으로 남벽분기점, 성판악은 800m지점에서 100m간격으로 1900m 지점, 어리목은 1,000m지점에서 100m간격으로 1900m지점까지) 토양탈수소효소와 인산효소활성을 분석하였다(표 1).

표 1. 한라산 등산로 코스별 토양효소활성

구 분	Dehydrogenase ($\mu\text{g TPF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$)			Acid phosphatase ($\mu\text{g PNP g}^{-1} \text{h}^{-1}$)		
	평균	최소	최대	평균	최소	최대
돈내코	19.6	12	42.6	1.5	0.4	2.2
성판악	35.7	2.6	86.2	1.8	1.5	2.2
어리목	7.8	2.2	17.2	2.1	1.7	2.6

토양탈수소효소는 토양 유기물 분해를 촉매 하여 탄소순환에 관여하며, 산성 인산효소는 산성조건에서 인산 분해를 촉매 하는 역할을 한다. 3개 등산로 코스별 평균 토양탈수소 효소활성은 성판악지역이 $35.7 \mu\text{g TPF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ 로 가장 높았고 어리목지역은 $7.8 \mu\text{g TPF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ 로 성판악지역보다 약 5배나 낮게 나타났다. 시료채취지점의 유기물함량에 따라 탈수소효소활성이 다르게 나타난 것으로 사료되며 이것은 토양자체의 유기물함량보다는 식생의 분포에 따라 영향을 받은 것으로 생각된다.

평균인산효소활성은 등산로 코스별로 비슷한 경향을 보였다. 인산효소활성이 낮게 나타난 것은 토양중 인산함량과 인산을 가용화하는 토양 미생물의 밀도가 낮은 것으로 생각되며 이것은 화산회토양에 기인하는 것으로 사료된다. 또한 토양 채취시기의 토양온도와 수분함량 변화 등이 효소활성에 영향을 준 것으로 보인다.

나. 한라산국립공원 등산로 코스별 토양미생물 분포

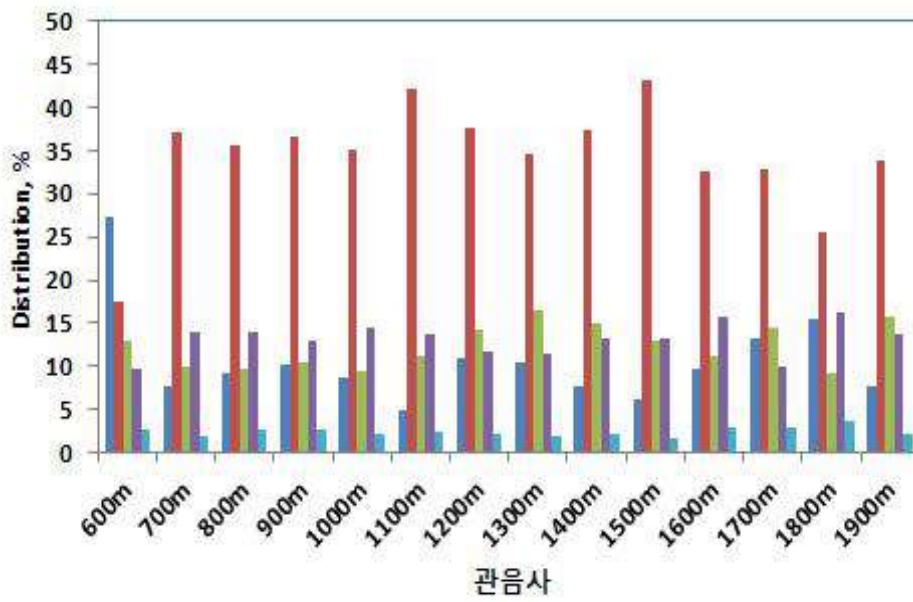
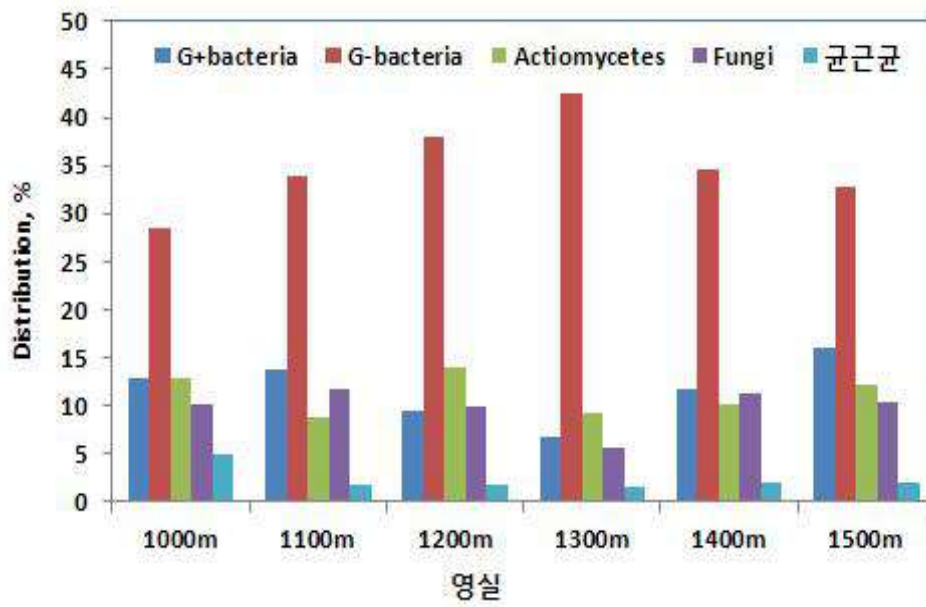
토양미생물은 온도, 수분함량, 양분 등 토양환경조건에 많은 영향을 받고 토양내에서 물질순환에 중요한 역할을 한다. 한라산 등산로별로 인지질지방산함량을 이용한 미생물의 분포비율을 조사한 결과를 표 2에 나타냈다.

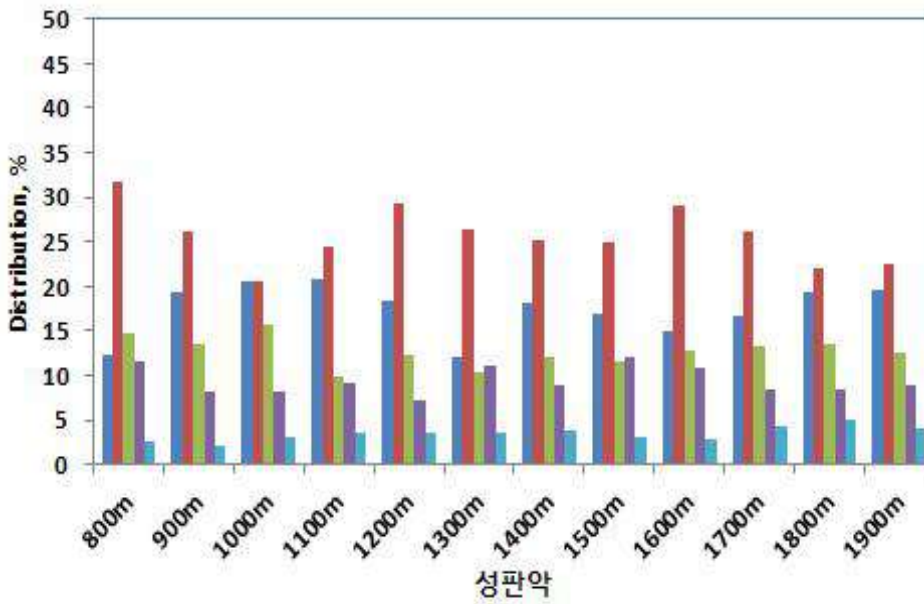
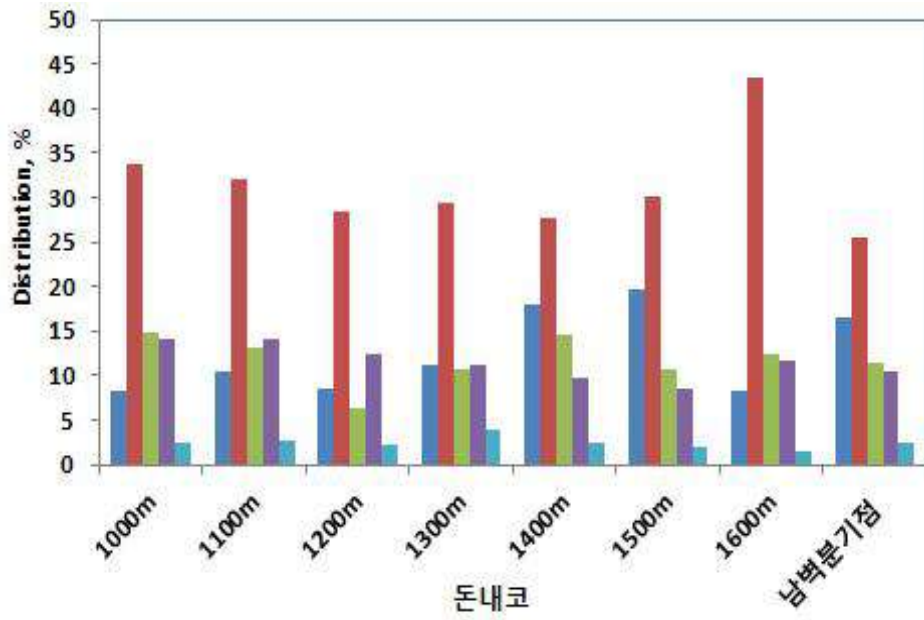
표 2. 한라산 등산로 코스별 인지질 지방산함량을 이용한 토양미생물 분포(%)

구 분	그람양성세균	그람음성세균	방선균	곰팡이	균근균
영실	12.1	34.5	11.4	10.3	2.4
관음사	10.7	34.4	12.4	13.1	2.4
돈내코	12.6	31.3	11.7	11.5	2.4
성판악	17.4	25.7	12.7	9.4	3.4
어리목	16.9	25.4	9.9	12.6	2.9

그람양성세균, 방선균, 균근균은 성판악지역이 각각 17.4%, 12.7%, 3.4%로 가장 높게 분포하였으며 곰팡이는 관음사지역이 13.1%로 성판악지역 9.4%보다 높았다. 그람음성세균은 영실과 관음사지역이 각각 34.5, 34.4%로 성판악과 어리목지역보다 약 9% 정도 높게 분포하였다. 이상의 결과는 5개 등산로 코스별 채취지점에 따라 미생물이 서식하기에 적합한 환경조건에 따라 고도별로 차이를 보였기 때문으로 생각된다. 특히 성판악지역의 그람양성세균이 제일 높고, 곰팡이 분포비율이 낮아 토양 중 유기물함량이 높아도 미생물이 이용할 수 있는 탄소영양원의 분포비율이 낮아 토양중 유기물의 분해에는 방선균 등이 많이 관여하는 것으로 생각된다. 균근균은 불용성 인산을 흡수하기 위하여 인산효소를 생산하며, 당 단백질을 생산하여 토양 입단화를 촉진하는 역할을 한다. 성판악지역의 균근균 분포비율이 높게 나타나 이 지역의 식생분포나, 토양 화학성분이 균근균의 밀도에 영향을 준 것으로 생각되며 추후 자세한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

등산로 코스별 100m 간격으로 인지질 지방산 유래 토양미생물의 분포비율을 조사한 결과 그람음성세균이 가장 높았고 균근균이 낮았으며 한라산 고도별로 채취지점에 따른 분포는 일정한 경향을 보이지 않았다. 토양의 온도는 미생물의 밀도와 활성에 영향을 주는데 이것은 채취시기의 토양환경 조건에 기인한 것으로 생각된다(그림 2).





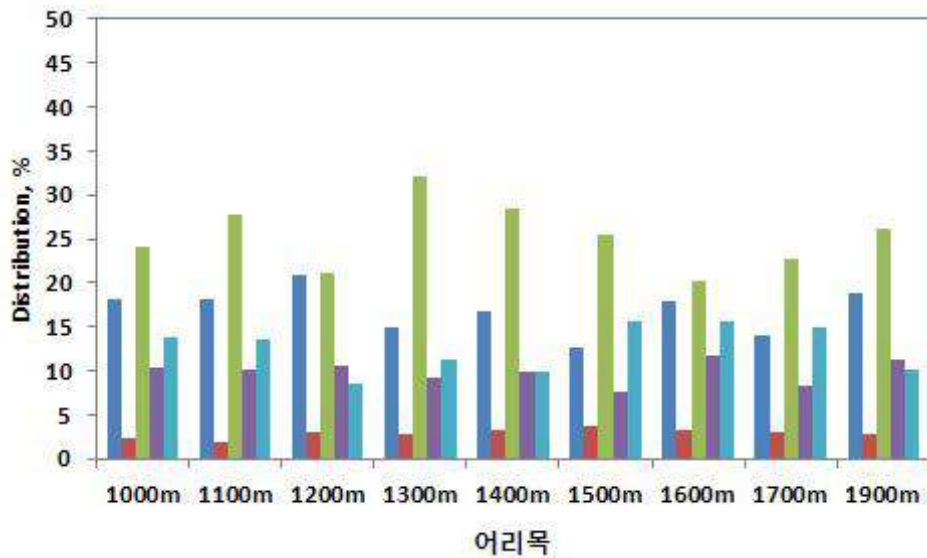


그림 2. 시료채취 지점별 인지질 지방산함량을 이용한 토양미생물 분포(%)

다. 한라산국립공원 등산로 코스별 토양 PLFA 생물학적 지표

한라산 등산로 코스별 인지질 지방산함량을 이용한 생물학적 지표는 그림 3에 나타났다. 탄소 영양원 이동 지표인 (G-/G+)비는 관음사지역이 4.0으로 성판악과 어리목지역보다 약 2.5배 높게 나타났다. 이것은 관음사지역의 토양 중 탄소 영양원이 증가하는 반면에 성판악과 어리목지역은 감소하는 것으로 생각된다. 온도가 높아지면 그람음성세균/그람양성세균 비가 낮아지는데 이들 지역은 토양채취시기에 토양의 온도가 한라산 고도별 영향으로 낮은 것도 있지만 등산로 코스별로 조사지점의 토양 중 그람음성세균의 비율이 낮거나 식생의 분포, 일조량 등 토양환경 조건이 영향을 준 것으로 생각된다.

유기물함량 지표인 F/B비는 영실지역과 성판악 지역이 각각 4.8, 4.7로 높았으며 관음사와 어리목지역이 3.5로 낮게 나타났다. 성판악지역이 G-/G+비가 낮고 F/B비가 높은 것으로 보아 토양 중 유기물함량이 높지만 미생물이 이용 가능한 탄소영양원이 낮아 채취지점의 토양온도, 수분함량 등 고도별로 물리적인 환경이 다르고, 토양유기물함량에 영향을 주는 식물체의 뿌리, 낙엽 등을 고려할 때 식생의 영향을 받은 것으로 생각된다.

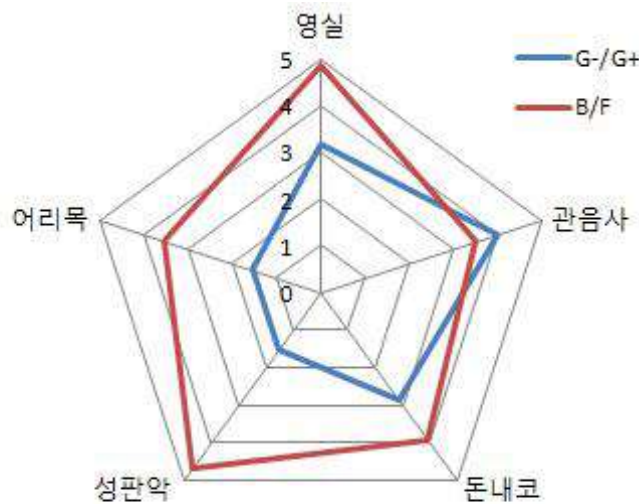


그림 3. 한라산 등산로 코스별 인지질 지방산함량을 이용한 생물학적 지표

이와 같은 결과를 바탕으로 향후 토양온도, 기상자료 등 추가적인 데이터가 보강되어 해석한다면 토양 및 토양미생물 상태를 평가하는 중요한 지표가 될 수 있을 것으로 판단된다.

4. 요약

본 연구의 목적은 한라산국립공원 등산로 코스별로 토양미생물의 분포와 효소활성을 측정하여 미생물 변동상을 평가하는데 기초 자료로 활용하고자 수행하였다. 등산로 코스별로 100m 간격으로 토양시료 표토(0~15cm)를 채취하여 토양효소활성과 인지질 지방산 함량을 분석하였다.

3개 등산로 코스별 평균 토양탈수소 효소활성은 성판악지역이 $35.7\mu\text{g TPF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ 로 가장 높았고 어리목지역은 $7.8\text{g TPF g}^{-1} 24\text{h}^{-1}$ 로 성판악지역보다 약 5배나 낮게 나타났다. 인지질지방산함량을 이용한 미생물 분포비율은 성판악지역이 그람양성세균, 방선균, 균근균이 각각 17.4%, 12.7%, 3.4%로 가장 높게 분포하였으며 곰팡이는 관음사지역이 13.1%로 성판악지역 9.4%보다 높았다. 탄소 영양원 이동 지표인 (G-/G+)비는 관음사지역이 4.0, 유기물함량 지표인 F/B비는 영실지역과 성판악 지역이 각각 4.8, 4.7로 높았다.

5. 인용문헌

- Bardgett, R. D., P. J. Hobbs, and A. Frostegard. 1996. Changes in soil fungal: bacterial biomass ratios following reductions in the intensity of management of an upland grassland. *Biol. Fertil. Soils* 22:261-264.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Borga, P., M. Nilsson, and A. Tunlid. 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol. Biochem.* 26:841-848.
- Casida L. E., D. A. Klein, and T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci* 98:371-376.
- Frostegard, A. and E. Baath. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22:59-65.
- Green, C.T. and K.M. Scow. 2008. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeo. J.* 8:126-141.
- Henmi, T. and K. Wada. 1976. Morphology and composition of allophane. *Am. Mineral.* 61:379-390.
- Li, W. H., C. B. Zhang, H. B. Jiang, G. R. Xin, and Z. Y. Yang. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed *Mikania micrantha* H. B. K. *Plant Soil.* 281:309-324.
- Manzoni, S. and A. Porpotato. 2007. A theoretical analysis of nonlinearities and feedbacks in soil carbon and nitrogen cycles. *Soil Biol. Biochem.* 39:1542-1556.
- Rahman, M. H., A. Okubo, S. Sugiyama, and H. F. Mayland. 2008. Physical, chemical and microbiological properties of an Andisol as related to land use and tillage practice. *Soil Till. Res.* 101:10-19.
- RDA. 1988. Methods for chemical analysis of soil. Institute of Agricultural Technology.
- Satti, P., M.J. Mazzarino, L. Roselli, and P. Crego. 2007. Factors affection soil P dynamics in temperate volcanic soils of southern argentina.

Geoderma 139:229-240.

Song, K. C. 1990. Andic properties of major soils in Cheju island. Ph. D. Thesis. Seoul National University. Suwon, Korea.

Ugolini, F.C. and R.A. Dahlgren. 2002. Soil development in volcanic ash. Glob. Environ. Res. 6:69-81.

Yao, H., Z. He, M.J. Wilson, and C.D. Campbell. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. Microb. Eco. 40:223-237.

진현오, 이명종, 신영오, 김정제, 전상근. 1994. 삼림토양학. 향문사. pp.325.