

## 토양 세균 군집의 유일탄소원 이용에 의한 지문분석

송인근<sup>1,2</sup> · 안영범<sup>2</sup> · 신규철<sup>1</sup> · 조홍범<sup>3</sup> · 최영길<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>한양대학교 생물학과, <sup>2</sup>서울대학교 분자미생물학연구소, <sup>3</sup>서경대학교 생물공학과

BIOLOG GN microplate를 이용하여 6종의 식생 토양에 따른 토양미생물 군집의 유일탄소원 이용능을 비교 분석하였다. 전체적으로 축합물, 아미노산, 카르복실산 화합물을 잘 이용하였으나, amide의 경우, 낮은 이용능을 보였다. 대응분석을 통해 6 종류의 식생 토양에 따른 토양미생물 군집은 크게 삼림토양, 초지-경작지토양, 비식생 토양의 3가지 그룹의 대사적 다양성의 차이를 보이는 집단으로 분류되었다. 다차원 척도법 분석을 통해 신갈나무 삼림토양의 미생물 군집은 소나무와 떡갈나무 삼림토양의 미생물 군집과는 또 다른 그룹으로 분리되었다. 이러한 식생 토양 형에 따른 미생물 군집의 대사 다양성의 차이로 볼 때, 식생의 천이에 따라 식생에 영향을 받는 미생물 군집의 대사 다양성 또한 식생의 천이에 대응하여 변화하고 있음을 확인하였다.

KEY WORDS □ BIOLOG, metabolic diversity, soil bacteria, vegetation

토양세균 군집은 환경오염원의 분해와 주요영양원의 재순환에 관련된 기본적인 광물화 작용에 중요한 기능을 하고 있다(5). 또한 질소고정, 필수 영양원의 부동화 및 식물호르몬의 생성 등으로 식물 군집의 구조와 기능을 결정하는 열쇠 기능을 한다. 따라서 토양 생태계내에서의 미생물의 기능을 해석하기 위해 많은 연구들이 진행되어 왔으며 전통적인 연구들은 주로 특정 배지에서 배양되는 개체군의 크기와 조성, 그리고 토양으로부터 분리된 미생물들의 생화학적 특성 규명(2)을 통해 특정 토양내에 존재하는 미생물의 구조와 기능에 대한 군집특성을 이해하고자 하였다. 그러나 이러한 접근 방법들은 현재, 자연계에 존재하는 미생물중 극히 일부만이 배양될 수 있는 점에서 볼 때 그 군집의 특성이 편향되거나 왜곡되어질 수 있다(15).

최근에 토양내 미생물의 구조와 기능을 이해함에 있어 개체군의 분리없이 직접 토양으로부터 추출한 지질의 지방산 분석(3)을 하거나 BIOLOG system에 토양시료를 직접 적용하여 대사적 다양성(8, 19)을 분석함으로써 토양생태계의 표현형을 군집수준에서 해석하고자 하는 시도가 활발하다.

이 방법은 전체적인 유일탄소원 이용 정도에 기초한 방법으로 군집의 기능을 특성화시키는 간결한 방법이다. Garland 와 Mills(9)는 군주 동정을 위해 개발된 11개 항목으로 분리되는 95 종류의 서로 다른 탄소원을 함유한 BIOLOG plate (Table 1)의 기질 이용 경향에 의거하여 다양한 토양과 수계 시료로부터 미생물 군집을 분리할 수 있음을 발견했고, Zak 등(21)은 BIOLOG plate를 이용하여 6종의 식물 군집과 관련된 미생물 군집의 기능적 다양성을 추적하였다. Haack 등(10)은 기질 이용에 미치는 요소들을 조사하고 미생물 군집

의 모델에 대한 매우 높은 재현성이 있음을 보고하였다. Bossio와 Scow(5)는 서로 다른 관개 관리 체계를 갖는 경작지와 함께 식물 군집과 생태계가 서로 다른 토양으로부터 세균 군집을 BIOLOG Plate에 적용했을 때, 세균 군집의 탄소원 기질 이용이 분명히 구분되는 경향을 보고하였다. 또한 Zabinski와 Gannon(20)은 환경교란이 일어난 지역과 인접한 청정지역의 토양을 대상으로 토양 미생물 군집의 대사 기능의 변화를 유일탄소원 이용능을 통해 입증하였다.

미생물 생태학적인 관점에서 식생의 천이에 따른 토양미생물의 표현형적 변화양상을 추적하는 보고는 아직 없고, 식생토양에 따른 미생물의 구조와 기능, 토양간의 미생물 다양성의 차이에 대해서는 거의 알려지고 있지 않다. 본 연구에서는 국내의 대표적인 낙엽활엽수인 신갈나무 삼림토양을 주 대상으로 소나무가 우점하는 침엽수림 토양, 경작지 토양, 초지 토양, 그리고 비식생인 나지 토양 등, 천이과정상의 토양간에 미생물군집의 유일탄소원 이용 경향을 비교 분석하여 군집 수준의 표현형적 특성을 해석하고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료의 채집

토양의 채집은 1998년 7월에 실시하였으며, 경기도 하남시에 위치하는 검단산의 신갈나무 식생, 떡갈나무 삼림 식생, 소나무 식생, 초지, 경작지에서 낙엽층을 걷어내고 표층으로부터 20 cm에 이르는 토양을 채집하였으며 한양대학교 운동장에서 전혀 식생의 영향을 받지 않는 나지토양을 채집하여 2 mm 체에 걸러 시료로 이용하였다(Fig. 1).

#### BIOLOG 적용

신갈나무 삼림토양, 떡갈나무 삼림 토양, 소나무 삼림 토

\*To whom correspondence should be addressed  
Tel : 02-290-0952, Fax : 02-293-9230  
E-mail : ykchoi@email.hanyang.ac.kr

Table 1. Sole carbon sources in BIOLOG GN microplate

C sources					
<b>Polymers</b>		<b>Esters</b>		F6	L-Alanine
A2	$\alpha$ -Cyclodextrin	C11	Methyl-pyruvate	F7	L-Alanyl-glycine
A3	Dextrin	C12	Mono-methyl-succinate	F8	L-Asparagine
A4	Glycogen	<b>Carboxylic acid</b>		F9	L-Aspartic acid
A5	Tween40	D1	Acetic acid	F10	L-Glutamic acid
A6	Tween80	D2	cis-Aconitic acid	F11	Glycyl-L-aspartic acid
<b>Carbohydrate</b>		D3	Citric acid	F12	Glycyl-L-glutamic acid
A7	N-Acetyl-D-galactosamine	D4	Formic acid	G1	L-Histidine
A8	N-Acetyl-D-glucosamine	D5	D-Galactonic acid lactone	G2	Hydroxy L-proline
A9	Adonitol	D6	D-Galacturonic acid	G3	L-Leucine
A10	L-Arabinose	D7	D-Gluconic acid	G4	L-Ornithine
A11	D-Arabitol	D8	D-Glucosaminic acid	G5	L-Phenylalanine
A12	Cellobiose	D9	D-Glucuronic acid	G6	L-Proline
B1	I-Erythritol	D10	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	G7	L-Pyroglytamic acid
B2	D-Fructose	D11	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	G8	D-Serine
B3	L-Fucose	D12	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	G9	L-Serine
B4	D-Galactose	E1	p-Hydroxy phenylacetic acid	G10	L-Threonine
B5	Gentiobiose	E2	Itaconic acid	G11	D,L-Carnitine
B6	$\alpha$ -Glucose	E3	$\alpha$ -Keto butyric acid	G12	$\gamma$ -Amino butyric acid
B7	m-Inositol	E4	$\alpha$ -Keto glutaric acid	<b>Aromatic chemicals</b>	
B8	$\alpha$ -D-Lactose	E5	$\alpha$ -Keto valeric acid	H1	Urocanic acid
B9	Lactulose	E6	D,L-Lactic acid	H2	Inosine
B10	Maltose	E7	Malonic acid	H3	Uridine
B11	D-Mannitol	E8	Propionic acid	H4	Thymidine
B12	D-Mannose	E9	Quinic acid	<b>Amines</b>	
C1	D-Melibiose	E10	D-Saccharic acid	H5	Phenyl ethylamine
C2	$\beta$ -Methyl-D-glucoside	E11	Sebacic acid	H6	Putrescine
C3	D- Psicose	E12	Succinic acid	H7	2-Amino thanol
C4	D-Raffinose	<b>Brominated chemical</b>		<b>Alcohols</b>	
C5	L-Rhamnose	F1	Bromo succinic acid	H8	2,3-Butanediol
C6	D-Sorbitol	<b>Amides</b>		H9	Glycerol
C7	Sucrose	F2	Succinamic acid	<b>Phosphorylated chemicals</b>	
C8	D-Trehalose	F3	Glucuronamide	H10	D,L- $\alpha$ -Glycerol phosphate
C9	Turanose	F4	Alaninamide	H11	Glucose-1-phosphate
C10	Xylitol	<b>Amino acids</b>		H12	Glucose-6-phosphate
		F5	D-Alanine		

양, 초지 토양, 경작지 토양, 나지토양의 각 토양시료 5 g에 25% Ringer solution 50 ml을 넣고 2분간 혼합한 후, 교반배양기(Vision KMC-88, Korea)에서 1시간 교반하였다. 교반한 토양시료를 ultrasonic cleaner(Branson, USA)에서 5분간의 초음파 처리를 3회 반복하였다. 10분간 2,000 rpm으로 원심 분리(Hitachi, Japan)하여 상등액을 토양미생물 접종 시료로 취하였다. 토양의 색깔에 의한 간섭 요인을 배제하기 위하여 100배 희석한 후, 150  $\mu$ l를 BIOLOG GN microplate의 96 well에 각각 접종하였다(4). Plate는 25°C에서 배양하였으며 12 시간 간격으로 590 nm에서 microplate Reader(BIOLOG, USA)로 측정하여 Softmax Ver 2.01 프로그램(Molecular Devices, USA)을 이용하여 분석하였다. 배양시간에 따른 average well color development(AWCD)를 비교하여 더 이상의

AWCD 변화가 진행되지 않는 시간을 최적의 배양시간으로 결정하여 분석 자료로 이용하였다.

#### 세균 군집 분석

토양내 총세균의 수는 형광염색법을 이용하여 실시하였다. 시료는 BIOLOG 적용을 위하여 준비한 상등액 1 ml을 glass filter(GF/C,  $\phi$ 47 mm, Whatman Co.)에 prefiltering하였다. 이후 Hobbie 등(13)의 방법에 따라 여과한 시료에 4% formalin 1 ml을 첨가하여 고정한 후 Sudan Black B로 염색된 membrane filter(Nucleopore Co., 0.2  $\mu$ m,  $\phi$ 25 mm)에 filter 하고 acrydine orange 용액(1:10000 in 6.6 mM phosphate buffer, pH 6.7)으로 염색하였다. 염색한 시료를 형광현미경(Axioplan, Zeiss, Germany) 시야에서 20 구간 이상 계수하

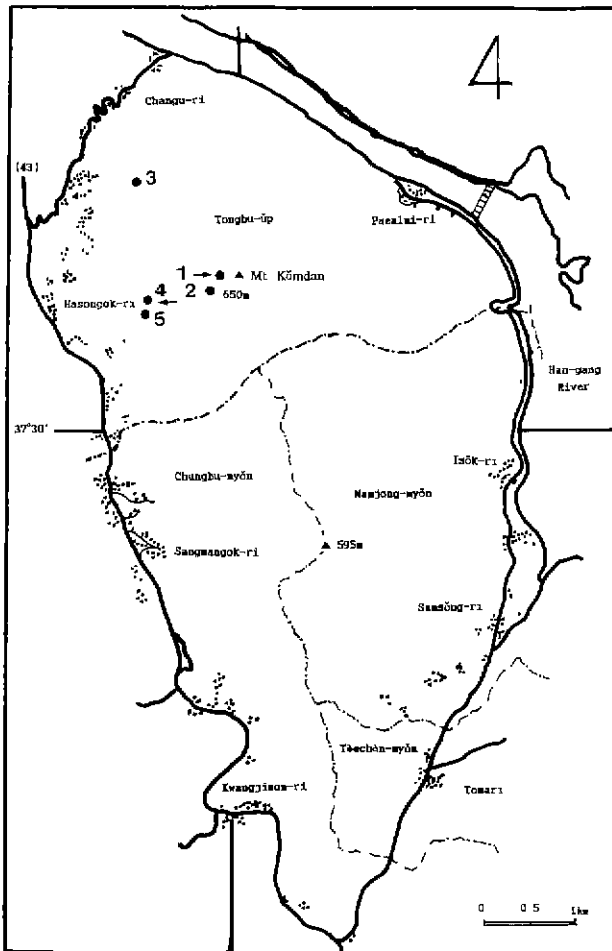


Fig. 1. Map of sampling Sites. Site 1, *Quercus mongolica* vegetation; Site 2, *Quercus dendata* vegetation; Site 3, *Pinus densiflora* vegetation; Site 4, grass land; Site 5 : naked soil.

었다. 종속영양세균은 nutrient agar(NA) plate와 R2A 배지를 이용하여 계수하였다. 희석한 시료 0.1 ml을 NA 배지와 R2A 배지에 도말하여 25°C 항온기에서 7일간 배양한 후 나타난 colony를 계수하였다.

**통계분석**

모든 자료의 평균, 표준편차 등의 기본 통계치와 대응분석(correspondence analysis) 및 다차원척도법(multidimensional scaling, MDS)은 SAS package(16)를 이용하여 분석하였다. BIOLOG Plate로부터 측정된 발색량의 분석치는 각각의 반응 well(R)에서 탄소원이 없는 기준 well(C)의 발색량을 보정한 후, 95 well의 전체 평균값으로 환산한 평균 발색량(AWCD :  $[\sum(C-R)]/95$ )으로 나타내었다(8, 19).

**결 과**

**BIOLOG Plate의 발색반응**

시료의 책 간섭을 배제하기 위하여 접종전 100배 희석하여 1.36(나지토양)-6.38 × 10<sup>4</sup> cells/ml(신갈나무 삼림토양) 범

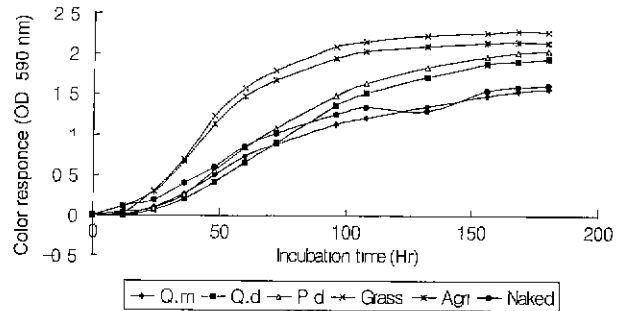


Fig. 2. Color development with incubation. Plots present the color response in six soil bacterial communities according to soil vegetation types. Q.m, *Quercus mongolica* forest soil; Q.d, *Quercus dendata* forest soil; P.d, *Pinus densiflora* forest soil; Grass, grass land soil; Agri, agricultured soil; Naked, non-vegetation soil.

위를 갖는 각 시료를 BIOLOG GN microplate에 적용하여 기질에 대한 발색반응을 보았다. Garland와 Mills(8)는 유기 물질의 함량이 높은 근권 토양과 해수에서 높은 발색반응이 나타났으며 이에 따라 희석된 시료를 plate에 접종했을 때 control well에서 나타나는 발색반응을 줄일 수 있다고 하였다. Control well에서 나타나는 발색 반응을 보정한 평균 발색량(AWCD)과 BIOLOG GN plate의 배양 시간에 따른 결과는 Fig. 2와 같다. 탄소원이 없는 control well(A)에서 발색 반응이 나타났는데, OD<sub>590</sub>에서 발색 반응량은 0.033~0.101의 범위로(0.06±0.02) 나타나 response well에서 나타난 발색 반응량에 비해 매우 낮았다. 각 plate에서의 발색반응의 총비율을 알아보기 위하여 배양시간별로 구분하여 조사한 결과, 발색반응이 선형(linear)으로 변화하여 안정화된 배양시간은 108시간 이후였다. 따라서 108 시간대의 각 plate의 95 기질의 발색반응 값을 총합하여 기질수로 나누어 AWCD값을 설정하였고 이 수치를 근거로 각종 통계 분석을 하였다. 식생토양에 따른 각각의 세균 군집은 S자형(sigmoidal curve)으로 나타났고, 발색 반응의 정도는 접종된 세균의 수와는 비례하지 않았다. 배양 12시간에 이르러 초지와 경작지 토양에서는 급속한 발색 반응의 경향을 보였으나 다른 4종류의 식생 토양에서는 완만한 발색반응의 증가를 보였다. AWCD와 접종 세균 밀도를 대응분석을 통해 Pearson coefficient 상관지수를 구하여 유의성이 95% 이상 추인되는 대응 요인을 알아본 결과, 토양내 총세균 크기는 부의 상관관계(-0.78)를 보였으나 NA배지와 R2A 배지에서 측정된 종속영양세균과 AWCD의 상관지수는 각각 0.81(p<0.05), 0.75(p<0.05)이었다. 이는 총세균의 크기보다는 종조성의 차이와 세균 군집의 각 유일탄소원의 이용 유무와 활성도 차이에 의해 발색 반응의 차이가 있음을 의미한다. 이 결과는 염련의 세균 군집의 BIOLOG profile을 이용한 염련의 세균 군집간의 비교와 특성화 연구에서 종속영양세균에 의한 편향성이 있다는 Heuer와 Smalla(11)의 연구와 유사하다.

**유일탄소원 이용능**

각 식생 토양의 유일탄소원의 이용률을 알아보기 위하여 BIOLOG GN microplate를 108시간 배양한 후, AWCD를 백분율로 환산하여 비교하였다(Table 2). 신갈나무 삼림토양

**Table 2.** Change of Sole-carbon sources utilization(%) in BIOLOG GN microplates by soil bacterial communities according to soil vegetation types

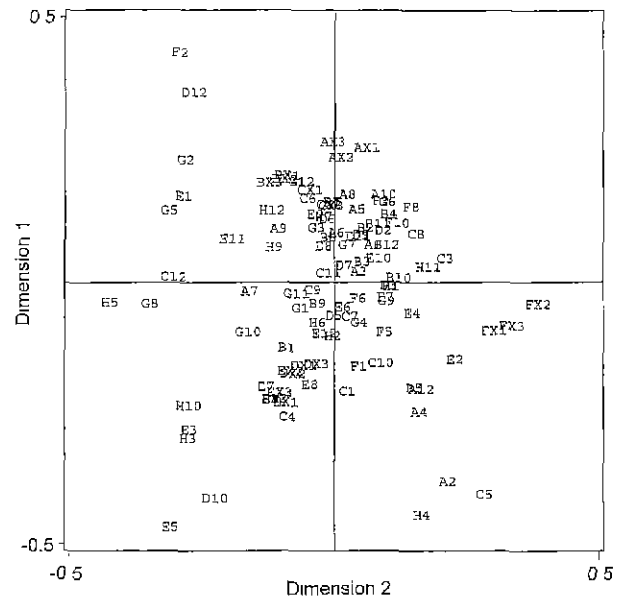
Carbon sources	Vegetation					
	Q.m	Q.d	P.d	Grass	Agri	Naked
Polymers	42.7	55	54.2	80.1	76.7	61.7
Carbohydrates	42.9	60	67.5	79.9	80.7	59.3
Esters	37.7	65	48.2	64.4	79.8	33.9
Carboxylic acids	35.9	44	48.4	56	67.8	36.9
Brominated chemicla	11	20	20.5	30.7	36.7	23.3
Amides	2.92	13	12.8	48.8	47.4	27.8
Amino acids	49.8	57	58.7	75.1	74.4	44.8
Aromatic chemicals	29.2	30	40.8	69.3	68.8	40.4
Amines	37.1	52	57.6	74.2	72.6	23.5
Alcohols	32.4	32	36.9	50.3	53.6	21.1
Phopholyrated chemicals	32	24	28.8	47.7	47.7	20.4
Mean	32.2	41	43.1	60.4	64.2	35.7

Q.m, forest soil of *Quercus mongolica* vegetation, Q.d, forest soil of *Quercus dendata* vegetation; P.d, forest soil of *Pinus densiflora* vegetation; Grass, grass land soil; Agri, agricultured soil; Naked, naked soil as non vegetation-covered soil.

에서는 95개 유일탄소원의 11개 항목중 아미노산(F5-G12)이 49.8%로 가장 높았으며 탄수화물(A7-C10)은 42.9%의 이용능을 보였으나 아마이드(amide) 항목은 2.92%로 이용능이 매우 낮았고 브롬화 화합물 항목 또한 11%의 낮은 이용능을 보였다. 각 식생의 토양미생물 군집이 전체적으로 가장 많이 이용하는 유일탄소원 항목은 탄수화물, 축합물(polymer)(A2-A6), 아미노산의 순으로 나타났다. 아미노산의 이용능이 높은 결과는 안(1)이 보고한 수계 미생물 군집의 pH 구배에 따른 영향 모사 분석에서 나타난 결과와 유사하다. 카르복실산(Carboxylic acid)의 유도체인 아마이드와 ester 항목의 이용능에 있어 ester는, 신갈나무 삼림과 나지토양을 제외한 다른 식생토양에서는 이용능이 높게 나타났다. Amide의 경우에는 2.92-48.8%의 낮은 이용율을 식생토양간에 보여주고 있으며 삼림토양에 대해서 초지와 경작지 토양은 4-20배의 높은 이용률의 차이를 보여주고 있다. 전체적으로 각 식생의 토양미생물 군집이 가장 낮게 이용하는 유일탄소원 항목은 브롬화 화합물로 나타났다.

**대응분석**

대응분석은 한 가지의 단위로 결정되어진 연속된 무작위적 변수들의 두가지 형태의 집합을 하나의 지각도에 표현하는 기법으로 식생형에 따른 유일탄소원의 관련성을 파악하기에 가장 적합하다, 카이제곱( $\chi^2$ )은 74.6879이며 자유도는 470이었다. 가장 큰 고유값(principal inertias)은 0.03264와 0.02017로 나타났고 이에 해당하는 제 1, 제 2 좌표축에 대하여 대응 분석 그림을 제작하기 위하여 행과 열의 좌표점이 계산되어져 있다. 실제 이들 고유값은 전체 고유값 합계인 0.07951의 41.06%와 25.37%를 차지하고 있으며 이들의 합이 66.40%로 Fig. 3에 2차원의 대응관계를 보여준다. 열 범주의 상대적 위치는 식생토양에 따라 세균 군집이 이용하

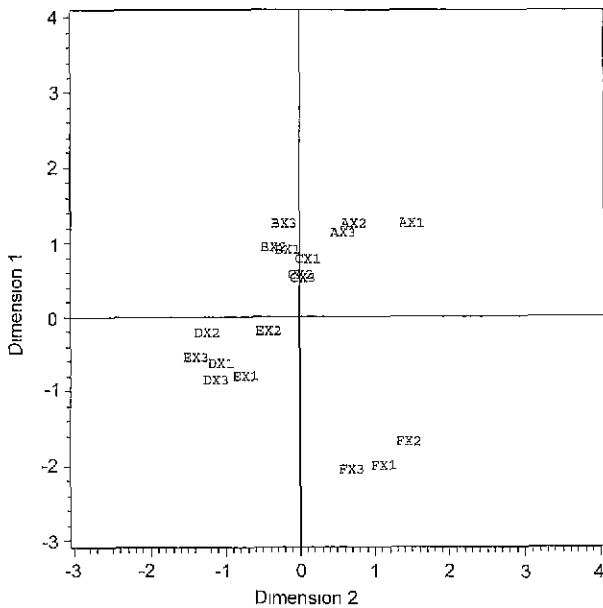


**Fig. 3.** Two dimensional correspondence diagram of absorbance data from the BIOLOG GN plates inoculated with soil bacterial communities of various types of soil vegetation. AX, soil of *Q. mongolica*; BX, soil of *Q. dendata*; CX, soil of *P. densiflora*; DX, grass land soil; EX, agricultured soil; FX, naked soil; 1, 2 and 3 arc triplicate to each soil bacterial communities.

는 유일탄소원의 유사성과 차이점을 보여준다. 신갈나무 삼림토양에서는 A8(N-acetyl-D-glucosamine), A10(L-arabinose), A5(Tween40) 등의 polymer와 carbohydrate 기질 방향과 대응하고 있으며, 떡갈나무 삼림과 소나무 삼림토양에서는 세균 군집이 C12(Mono-methyl-succinate), C11(Methyl-pyruvate)의 ester 화합물, A8(N-Acetyl-D-glucosamine), A9 (adonitol), C6(D-sorbitol), C6(D-sorbitol), B6(D-glucose) D8(D-glucosamic acid) 등의 carbohydrate 등의 기질을 잘 이용하는 것으로 나타났다. 삼림토양의 경우, E5( $\alpha$ -keto valeric acid)와 D10( $\alpha$ -hydroxy butyric acid)와는 부의 대응관계를 갖고 있는 것으로 나타났다. 초지토양에서는 B1(L-Erythritol), F1(Bromo succinic acid), C1(D-Melibiose), C10(Xylitol)과 대응하며, 나지토양에서는 A2( $\alpha$ -cyclodextrin), H4(Thymidine), A4(glycogen) 방향으로 대응하고 있으나, F2(succinamic acid), D12( $\gamma$ -hydroxy butyric acid)와는 대응관계가 매우 미약하였다. 따라서 좌표축상의 식생토양의 위치와 유일탄소원의 위치에서 각 식생토양의 세균 군집이 이용할 수 있는 유일탄소원의 유사성과 차이를 확인할 수 있었다.

**다차원척도 분석법**

다차원척도 분석법(multidimensional scaling)은 대응 분석과 같이 대상을 평가할 수 있는 기준을 가지고 분석하는 방법중의 하나이다. 대응분석과 다른 점은 두 변수 집합간의 유사성 또는 속성에 대한 값들의 비교 척도가 서열자료 또는 등간자료 이상이 되어야 한다는 것이다. 식생토양 각각의 유일탄소원의 이용능을 이용하여 비유사성 행렬(dissimilarity matrix)을 작성하고 이에 따른 식생토양별 분포를



**Fig. 4.** Multidimensional scaling diagram of absorbance data from the BIOLOG plates inoculated with soil microbial communities of various types of soil vegetation

기하학적으로 모식화하였다(Fig. 4). Dimension 1축의 양의 방향과 Dimension 2축의 양의 방향에 신갈나무 삼림토양이 위치하고 있으며, Dimension 1축과 Dimension 2축 중간선의 양의 방향에 떡갈나무 삼림토양과 소나무 삼림토양이 위치하였다. Dimension 1축의 음의 방향과 Dimension 2축의 음의 방향에 초지와 경작지 토양이 위치하였고 Dimension 1축의 음의 방향과 Dimension 2축의 양의 방향에 나지토양이 위치하였다. 따라서 대응분석에서 유기탄소원 이용방향에서 유사성을 보였던 삼림토양중에서 신갈나무 삼림토양이 다른 두 삼림토양과 분리되는 구조를 가지고 있는 것으로 판단되며, 나지토양은 다른 다른 식생토양과 확연히 다른 대사 구조를 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

**고 찰**

BIOLOG GN microplate는 96개의 well 안에 11개 항목, 축합물(polymers)(A2-A6), 탄수화물(A7-C10), esters(C11-C12), 카르복실산(carboxylic acid) (D1-E12), 브롬화 화합물(F1), amides(H1-H4), 아미노산(H5-H7), 알콜(H8-H9) 및 인산화 화합물(H10-H12)의 95가지 기질로 구성되어 있다(8). 각 기질의 well에는 2,3,5- triphenyltetrazolium chloride(TTC)가 들어 있어 접종된 세균들이 유일 탄소원을 이용하여 산화시키면 TTC는 불용성의 triphenylformazan(TPF)으로 환원되어 보라색을 띠게 된다(4). BIOLOG Plate를 이용한 세균 군집의 유일탄소원 이용능 분석은 군집간의 대사적 다양성의 비교분석과 한 생태계 내에서의 환경 요인의 변화에 따른 미생물 군집의 생리 대사적 변화양상을 분석하는데 매우 유용한 방법이다.

세균 군집의 유일탄소원에 대한 이용능의 차이는 주로 개체군 수와 종 조성으로 알려져있다(9, 19). 이 방법을 통하

여 토양, 육수 및 해양 등의 많은 특정 생태계를 대상으로 미생물 군집 수준의 구조적 특성을 파악하는데 이용되어 왔다(19, 21). 특히 식생별 토양을 대상으로 세균 군집의 기능적 다양성과 환경요인의 변화에 따른 구조의 변화를 특성화 하는데 최근에 이용하고 있다(17, 18, 21).

전체적으로 각 토양미생물 군집은 탄수화물, 아미노산, 축합물을 많이 이용하였고 amide는 식생토양간 이용률이 신갈나무삼림 토양에 비해 경작지 토양에서 20배 이상 높이나 나타났으나 전체적인 이용률은 다른 탄소원 항목에 비해 떨어졌다. 이 결과는 Campbell 등(6)의 삼림토양을 대상으로 한 실험보고에서 카르복실산, 탄수화물과 아미노산은 전형적으로 매우 빠르게 이용하나 amide는 초기에는 빠른 발색반응이 보이나 전체적인 발색반응이 진행된 후의 활성도는 낮은 결과와 유사하다.

BIOLOG plate에서의 토양시료의 108 시간의 상대적으로 긴 배양시간은 전체적으로 적은 미생물 군집의 접종량에 의한 생장으로 인한 결과에 기인한 것으로 보인다. 그러나 신갈나무 삼림토양의 접종 밀도가 경작지와 초지에 비해 약 5배 높음에도 불구하고 경작지와 초지의 시료에서 발색반응이 빠르게 나타났다. Haack 등(10)은 개체수가 적음에도 불구하고 초기 발색반응이 빠르게 나타나는 것은 활성도와 성장률에 기인한다고 설명하였다. 또한 다른 요인으로는 BIOLOG GN microplate는 95가지의 유일탄소원을 이용하지만 그람 음성세균을 분류하기 위한 plate로서 시료내의 Gram 양성 세균이나 상대적으로 적은 밀도의 세균들이 기질에 빨리 적응하는 다른 세균들에 의해 경쟁에서 배타되었을 가능성이 있다. 이는 Heuer와 Smalla(11)의 결과에서 PLFA 분석에 의해 온실과 경작지의 엽권 미생물의 조성이 다르다는 것이 확인되었음에도 불구하고 BIOLOG의 유일탄소원 이용능에서 유사한 결과를 얻은 것에서 확인할 수 있다. 따라서 미생물 군집간의 보다 정확한 유일탄소원 이용능의 차이를 보기 위해서는 적은 밀도로 느리게 성장하는 미생물까지도 포함하는 매우 큰 다양성을 선택할 수 있는 기질을 보완해야 한다(6).

그러나 이러한 문제점에도 불구하고 BIOLOG plate를 이용한 유일탄소원 이용능의 미생물 군집의 대사 다양성 비교는 본 연구에서 식생의 천이에 따른 토양미생물 군집의 다양성차이를 잘 보여주고 있다. 식물과 연계된 미생물 군집의 다양성은 생존과 성장에 관련된 형질에 의해 분류될 수 있다. 환경의 변화에 쉽게 적응할 수 있는 미생물과 같이, 영양원의 유용도가 제한 요인이 될 때 영양원의 이용정도는 군집을 파악하기 위한 연구에 이상적인 기여를 하게 되기 때문이다(7).

유일탄소원의 이용능 분석을 위해서는 다양한 분석 방법이 사용되어지는데, 대표적인 분석 방법은 대응분석, 집괴 분석, 다차원척도법, 주성분 분석 등이 있다.

대응분석 결과, 6 종류의 식생별 토양 세균 군집은 식생 유형에 따라 세 종류의 유사한 대사 다양성을 갖는 분류군으로 분석되었고 다차원 척도법으로 분석한 결과 대응분석에서 하나의 유사한 대사 다양성을 갖는 분류군으로 표현되었던 삼림토양의 미생물 군집에서 신갈나무 삼림토양의 미생물 군집이 떡갈나무 삼림과 소나무 삼림토양에서 분리되

는 양상을 보였다.

BIOLOG plate의 유일탄소원 이용능 분석을 이용하여 직접계수와 집락 계수에 의한 미생물 크기와 효소활성도 분석을 통한 식생간 토양미생물의 기능 파악을 벗어나 시료로부터 미생물 군집을 직접 적용하여 분리와 배양을 통하지 않고 구조와 기능의 유사성 및 차이를 확인할 수 있었다.

따라서 이 연구방법은 자연상태의 한 생태계에 존재하는 미생물 군집의 계절에 따른 미생물 군집의 구조와 기능, 어떠한 환경 자극에 기인하는 토양미생물 군집의 구조와 기능의 변화를 추적하는데 매우 적절한 방법이며 자연생태계의 환경변화에 따른 생태계내 미생물 군집의 교란을 쉽게 감지할 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 말

이 논문은 1998년도 한양대학교 교내연구비에 의하여 연구 되었습니다.

### 참고문헌

1. 안영범. 1997. 수계 세균 군집의 구조와 기능에 미치는 산성화 영향 모사 분석. 박사학위논문. 한양대학교.
2. Atlas, R.M. 1983. Diversity of microbial communities. *Adv. Microb. Ecol.* 7, 1-47.
3. Bääth, E., A. Frostegård and H. Fritze. 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in area polluted with alkaline dust deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4026-4031.
4. Beyer, L., C. Wachendorf, D.C. Elsner, and R. Knabe. 1993. Suitability of dehydrogenase activity assay as an index of soil biological activity. *Biol. Fert. Soils* 16, 52-56.
5. Bossio, D.A. and K.M. Scow. 1995. Impact of carbon and flooding on the metabolic diversity of microbial communities in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4043-4050.
6. Campbell, D.D., S.J. Grayston, D.J. Hirst. 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 30, 33-41.
7. Ellis, R.J., P. Thompson, and M.J. Bailey. 1995. Metabolic profiling as a means of characterizing plant-associated microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16, 9-18.
8. Garland, J.L. and A.L. Mills. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level soli-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2351-2359.
9. Garland, J.L. and A.L. Mills. 1994. A community-level physiological approach for studying microbial communities. p. 77-83. *In* K. Ritz, J. Dighton and K.E. Giller (eds) *Beyond the Biomass*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
10. Haack, S.K., H. Garchow, M.J. Klug, and L.J. Forney. 1995. Analysis factors affecting the accuracy, reproducibility, and interpretation of microbial community carbon source utilization patterns. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 273-278.
11. Heuer, H. and K. Smalla. 1997. Evaluation of community-level catabolic profiling using BIOLOG GN microplates to study microbial community changes in potato phyllosphere. *J. Microbiol. Methods* 30, 49-61.
12. Hitzl, W., M. Henrich, M. Kessel, and H. Insam. 1997. Application of multivariate and related techniques in soil studies with substrate utilization tests. *J. Microbiol. Methods* 30, 81-89.
13. Hobbie, J.E., R.J. Daley, and S. Jasper. 1973. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
14. Insam, H., K. Amour, M. Renner, and C. Cepaz. 1996. Changes in functional abilities of the microbial community during composting of manure. *Microbiol. Ecol.* 31, 77-87.
15. Olsen, R.A. and L.R. Bakken. 1987. Viability of soil bacteria: Optimisation of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microb. Ecol.* 13, 59-74.
16. SAS Institute, Inc. 1996. *SAS User's Guide: Statistics*, SAS Institute, Inc., Cary, NC
17. Sharma, S., A. Piccolo, and H. Insam. 1997. Different carbon source utilization profiles of four tropical soils from Ethiopia. pp 132-139. *In* H. Insam, H. Rangger (eds) *Microbial Communities-functional and structural approaches*. Springer-Verlag, Heidelberg.
18. Staddon, W.J., L.C. Dechesne, and J.T. Trevors. 1996. Conservation of forest soil microbial diversity: the impact of fire and research needs. *Environ. Rev.* 5, 79-87.
19. Winding, A.K. 1994. Fingerprinting bacterial soil communities using BIOLOG microtitre plates, p. 85-94 *In* K. Ritz, J. Dighton, K.E. Giller (eds) *Beyond the Biomass*. John Wiley & Sons, Chichester, England.
20. Zabinski, C.A. and J.E. Gannon. 1997. Effects of recreational impacts on soil microbial communities. *Environ. Manage.* 21, 233-238.
21. Zak, C.J., M.R. Willing, D.L. Moorhead, and H.J. Wildman. 1994. Functional diversity of microbial communities: a quantitative approach. *Soil Biol Biochem.* 26, 1101-1108

(Received December 11, 1998/Accepted February 25, 1999)

---

**ABSTRACT: Patterns of Utilizing Sole Carbon Source by Soil Microbes in a Forest Soil**

**In-Geun Song<sup>1,2</sup>, Young-Beom Ahn<sup>2</sup>, Kyu-Chul Shin<sup>1,2</sup>, Hong-Bum Cho<sup>3</sup>, and Yong-Keel Choi<sup>1,2,\*</sup>** (<sup>1</sup>Department of Biology, Hanyang University, Seoul 133-791, <sup>2</sup>Research Center for Molecular Microbiology, Seoul Nat'l University, Seoul 151-742, <sup>3</sup>Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul 136-104, Korea)

This study was carried out utilizing ability of sole carbon sources in soil microbial communities used by Biolog GN microplate. Cluster analysis showed that soil microbial communities were categorized into three groups as forest, non-forest soil and naked soil of microbial group. Soil microbial communities in a forest soil of *Quercus mongolica* was divided into another group microbial communities in *Quercus dendata* vegetation soil and *Pinus densiflora* vegetation soil by Multidimensional scaling(MDS). Generally, sole carbon utilizing abilities were higher in order of polymer, amino acids and carboxylic acids, but it was lower in amides substrates carbon group. From the result, it was supposed that metabolic diversity of microbial communities was corresponded to vegetation succession.