



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

博士學位論文

시비방법에 따른 감귤원 토양의
미생물 활성과 군집 다양성

Microbial Activities and Community Diversity as Affected
by Fertilization Management in Citrus Orchard Soil

濟州大學校 大學院

農化學科

左宰昊

2010年 12月

시비방법에 따른 감귤원 토양의 미생물 활성과 균집 다양성

指導教授 玄 海 男

左 宰 昊

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

2010年 12月

左宰昊의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長	Ⓜ
副委員長	Ⓜ
委員	Ⓜ
委員	Ⓜ
委員	Ⓜ

濟州大學校 大學院

2010年 12月

목 차

Abbreviations

List of Figures

List of Tables

Summary

제 1 장 시비방법에 따른 감귤원토양의 시기별 미생물활성

ABSTRACT	1
I. 서 론	2
II. 재료 및 방법	5
1. 시험 수행 방법	5
2. 토양 이화학성 분석	7
3. 인지질 지방산(Phospholipid fatty acid, PLFA)분석	7
가. PLFA 지표 미생물 분포분석	8
나. PLFA 생물학적 지표(Biological index)비율 분석	8
4. 토양 미생물체량	9
가. Microbial biomass C	9
나. Microbial biomass N	10
5. 토양 미생물 호흡량(Soil basal respiration)	10
6. 토양 효소활성 분석	10
가. β -Glucosidase activity	11
나. Dehydrogenase activity	11
다. Urease activity	11
라. Acid phosphatase activity	12
7. 통계분석	12

III. 결과 및 고찰	13
1. 시험토양의 화학성	13
2. 인지질 지방산(PLFA)	14
가. 인지질 지방산 총함량 시기별 변화	14
나. 인지질 지방산함량에 의한 미생물 분포	17
다. 인지질 지방산함량에 의한 생물학적 지표(Biological index)해석..	20
3. 인지질 지방산함량에 의한 미생물군집의 시기별 변화	23
4. 토양 미생물체량 C와 N	26
5. 토양 미생물 호흡량과 대사지수	28
6. 토양효소 활성의 시기별 변화	31
가. Dehydrogenase activity	31
나. β -Glucosidase activity	32
다. Urease activity	34
라. Acid phosphatase activity	34
7. 토양 온도, 수분함량과 미생물활성 지표간의 상관관계	37
IV. 요 약	38
V. 인용문헌	39

제 2 장 감귤원토양의 세균군집구조와 다양성

ABSTRACT	46
I. 서 론	47
II. 재료 및 방법	50
1. 시료채취 및 전처리	50
2. 토양화학성 분석	50

3. 차세대염기서열(Pyrosequencing)분석	51
4. 통계분석	53
Ⅲ. 결과 및 고찰	55
1. 세균군집의 종풍부도와 다양성 지수	55
2. 분류군별 세균군집의 시기별 변화	60
3. 토양화학성과 세균다양성간의 상관관계	67
Ⅳ. 요약	68
Ⅴ. 인용문헌	69

제 3 장 유기물 향온배양이 질소무기화와 미생물활성에 미치는 영향

ABSTRACT	73
I. 서론	74
II. 재료 및 방법	77
1. 시험 수행 방법	77
2. 이화학성분 분석	77
가. 토양	77
나. 유기물	78
3. 인지질 지방산(Phospholipid fatty acid, PLFA)분석	79

4. 토양 효소활성 분석	79
5. 통계분석	79
Ⅲ. 결과 및 고찰	80
1. 토양 pH, C/N ratio 변화	80
2. 토양별 유기물의 질소 무기화	84
3. 인지질 지방산(PLFA)	88
가. 토양, 온도별 인지질 지방산 총합량 시기별 변화	88
나. 인지질 지방산함량에 의한 미생물 분포	90
다. 인지질 지방산함량에 의한 생물학적 지표(Biological index)해석..	94
라. 인지질 지방산 함량에 의한 미생물군집의 시기별 변화.....	96
4. 토양 효소활성 시기별 변화	100
가. β -Glucosidase activity	100
나. Urease activity	103
다. Acid phosphatase activity	105
5. 온도, 토양화학성과 미생물활성 지표간의 상관관계	107
Ⅳ. 요약	108
Ⅴ. 인용문헌	109

Abbreviations

1. APA:Acid phosphatase
2. C/N:Carbon/Nitrogen
3. Com.:Compost
4. FWC:Food waste compost
5. GLU: β -Glucosidase
6. G-/G+:Gram negative bacteria/Gram positive bacteria
7. F/B:Fungi/Bacteria
8. MBC:Microbial biomass C
9. MBN:Microbial biomass N
10. NVBS:Non-volcanic ash brown soil
11. OFPE:Organic fertilizer pellet type
12. OFPO:Organic fertilizer powder type
13. OM:Organic matter
14. OTUs:Operational taxonomic unit
15. PLFA:Phospholipid fatty acid analysis
16. PCR:Polymerase chain reaction
17. PMC:Pig manure compost
18. Unsat/sat:Unmonosaturated/monosaturated
19. URA:Urease
20. VBS:Volcanic ash black soil

List of Figures

Chapter 1. 시비방법에 따른 감귤원토양의 시기별 미생물활성

Fig. 1.	Changes in soil temperature and moisture content during the experimental period in 2007.	6
Fig. 2.	Seasonal changes in soil total phospholipid fatty acid content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil.	16
Fig. 3.	Seasonal changes of relative abundance of microbial group using total PLFA content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil.	19
Fig. 4.	Seasonal changes of biological index ratios of PLFA profiles by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil.	22
Fig. 5.	Principal component and cluster analysis of microbial community using total PLFA content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil.	25
Fig. 6.	Seasonal changes in soil microbial biomass C content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil.	27
Fig. 7.	Seasonal changes in soil microbial biomass N content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil.	27
Fig. 8.	Soil basal respiration rate as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil.	30

Chapter 2. 감귤원토양의 세균군집구조와 다양성

Fig. 1.	Pyrosequencing workflow.	54
Fig. 2.	Rarefaction curves at the 97% sequence similarity level analyzed from the Mothur program in May.	56

Fig. 3.	Rarefaction curves at the 97% sequence similarity level analyzed from the Mothur program in September.	56
Fig. 4.	Seasonal changes of relative abundance of dominant bacterial phylla as affected by 16 years different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil	62

Chapter 3. 유기물 함온배양이 질소무기화와 미생물활성에 미치는 영향

Fig. 1.	Changes in volcanic ash soil pH and C/N ratios during incubation experiment period.	81
Fig. 2.	Changes in non-volcanic ash soil pH and C/N ratios during incubation experiment period.	83
Fig. 3.	Changes in volcanic ash soil nitrogen mineralization rate under different incubation temperature.	86
Fig. 4.	Changes in non-volcanic ash soil nitrogen mineralization rate under different incubation temperature.	87
Fig. 5.	Changes in soil total PLFA content during incubation period. ..	89
Fig. 6.	Relative abundance of microbial group of total PLFA content in volcanic and non-volcanic ash soil treated with organic materials after incubation at 75 days.	91
Fig. 7.	Relative abundance of microbial group of total PLFA content in volcanic and non-volcanic ash soil treated with organic materials after incubation at 270 days.	93
Fig. 8.	Biological index ratio by PLFA profiles in volcanic and non-volcanic ash soil treated with organic materials after incubation at 75 days.	95
Fig. 9.	Principal component analysis of microbial community structures using PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 75 days.	97
Fig. 10.	Principal component analysis of microbial community structures using PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 270 days.	99
Fig. 11.	Changes in soil β -glucosidase activity during incubation period.	102
Fig. 12.	Changes in soil urease activity during incubation period.	104
Fig. 13.	Changes in soil acid phosphatase activity during incubation period.	106

List of Tables

Chapter 1. 시비방법에 따른 감귤원토양의 시기별 미생물활성

Table 1. Application rate of chemical fertilizers in this experiment	6
Table 2. Chemical properties of soil used this experiment in September	13
Table 3. Ratio between microbial biomass contents and soil chemical properties in September	28
Table 4. Seasonal changes in soil qCO ₂ metabolic quotients as affected by different fertilization management practices in citrus orchard volcanic ash soil	31
Table 5. Seasonal changes in soil dehydrogenase and β-glucosidase activities as affected by different fertilization management practices in citrus orchard volcanic ash soil	33
Table 6. Seasonal changes in soil urease and acid phosphatase activities as affected by different fertilization management practices in citrus orchard volcanic ash soil	36
Table 7. Pearson correlation coefficient between soil environment factors and microbial activities	37

Chapter 2. 감귤원토양의 세균군집구조와 다양성

Table 1. Chemical properties of soil used this experiment in May	51
Table 2. Chemical properties of soil used this experiment in September	51
Table 3. PCR mixture	52
Table 4. Bacterial diversity indices and richness estimators as affected by different fertilization management practices in citrus orchard volcanic ash soil	59
Table 5. Relative abundance of dominant bacterial genera by 16 years different fertilization management in citrus orchard volcanic ash	

soil in May	64
Table 6. Relative abundance of dominant bacterial genera by 16 years different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil in September	66
Table 7. Pearson correlation coefficient between physicochemical factors and bacterial richness estimators and diversity indices	67

Chapter 3. 유기물 향온배양이 질소무기화와 미생물활성에 미치는 영향

Table 1. Chemical properties of soil used in this experiment	78
Table 2. Chemical characteristics of four organic matter used in this experiment	79
Table 3. Eigenvalues of the correlation matrix by PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 75 days	97
Table 4. Eigenvalues of the correlation matrix by PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 270 days	99
Table 5. Pearson correlation coefficient between physicochemical factors and soil microbial activities	107

Summary

This study was carried out to evaluate the effect of the long-term different fertilization management on soil microbial activities such as microbial biomass, enzyme activities, phospholipid fatty acid(PLFA) content, bacterial community structures and diversity in volcanic ash citrus orchard soil. Experiment plots composed no-fertilization(Control), Compost, half of recommend application plus Compost(1/2NPK+Compost), recommend application(NPK), recommend application plus Compost(NPK+Compost), 3 times recommend application(3NPK).

Effect of the long-term(13 yrs) different fertilization management on microbial activities and community structures were summarized as follow:

1. Total PLFA content was significantly higher at NPK+Compost than 3NPK in March and May.
2. Distribution of microbial group by using PLFA profiles as biomarkers were high in September and that was in the order of bacteria>fungi>actinomycetes>mycorrhiza. However, Distribution of fungi and mycorrhiza were decreased significantly in control and 3NPK. Biological index such as G-/G+, F/B, cy19:0/18:1 ω 7c, and Unsat/sat ratios were increased with increasing temperature and those were high in September.
3. Principal component analysis of microbial community by PLFA pattern showed that PLFA profiles in 3NPK and Compost were different other treatments in March.
4. Microbial biomass C and N contents were high 1/2NPK(including NPK)+Compost compared with Compost only and chemical fertilizers(NPK, 3NPK). Thus, metabolic quotients(qCO₂) was highest in 3NPK among the other treatments.
5. Soil enzyme activities showed seasonal changes and those that were different significantly between treatments in May. Dehydrogenase activity was two times higher in 1/2NPK+Compost than the Control. β

-Glucosidase(NPK and 1/2NPK+Compost), urease(NPK+Compost), and acid phosphatase(Compost) activities were significantly higher than those of 3NPK and Control treatment.

6. Composition change in microbial community structures, microbial biomass, and enzyme activities affected by fertilization effect and environmental factors such as soil temperature and moisture.
7. In conclusion, Microbial activities were low in 3NPK and the Control compared with NPK(1/2NPK)+Com., which showed difference in community structures.

Effect of the long-term(16 yrs) different fertilization management on bacterial group changes, species richness estimators, diversity indices, and community structures in volcanic ash citrus orchard soil were summarized as follow:

1. Rarefaction curves at the 97% sequence similarity showed that distribution range of a clone and the OTUs were high in 1/2NPK+Compost, which were at 5,769-7,982 and 2,181-4,112 in May, respectively.
2. Species richness estimators of Ace, Chao1, and Shannon diversity indices showed higher in 1/2NPK+Compost than other treatments, which were 19,361, 6,428, 10,906, 7.8, respectively.
3. In phylum level, The most abundant bacterial group were *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* and those occupied at 58.0-82.9% among the soil-borne bacterial community in citrus orchard soil.
4. In genera level, The dominant bacteria group were *Pseudolabrys*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, which were distributed range at 16.1-32.1%. Bacterial diversity showed seasonal changes and that were more diverse in genera than phylum level.
5. Soil pH showed a positive correlated with Ace, Chao1 richness estimators($p < 0.05$) and Shannon diversity indices ($p < 0.01$). But exch. Al was negatively correlated with those ($p < 0.05$).
6. In conclusion, Bacterial community diversity affected by volcanic ash characteristics and pH changes in citrus orchard soil.

Effect of incubation temperature on nitrogen mineralization rate, PLFA content, and enzyme activities during incubation period in volcanic(VBS) and non volcanic ash soil(NVBS) treated with organic materials such as pellet(OFPE) and powder (OFPO)organic fertilizers, pig manure compost(PMC), and food waste compost(FWC) were summarized as follow:

1. Considering on soil pH and C/N ratio, Organic matter decomposition rate was more easily in NVBS than VBS. Nitrogen mineralization rate increased with increasing temperature and that was in the order of OFPO>FWC>OFPE>PMC. OFPO was most highest among the organic matter in both VBS and NVBS.
2. In 75 days, Total PLFA content was higher in NVBS than VBS. That was higher at 270 days in VBS than NVBS.
3. Distribution ratio of microbial group by PLFA profiles were different significantly due to soil characteristics, incubation temperature, and the type of organic matter.
4. Both G-/G+ and F/B ratios were decreased according to the increasing temperature gradually and those reduced more in NVBS than VBS.
5. Principal component analysis using PLFA profiles showed that microbial community structures were composed by soil type at 75 days, but by temperature at 270 days.
6. Urease and β -glucosidase activity were high in NVBS than VBS. Those were decreased gradually during the long-time incubation. Acid phosphatase activity increased according to the increasing temperature and that was higher in organic fertilizers than PMC and FWC.
7. Soil temperature was significantly correlated with acid phosphatase($r=0.728$) in both soil. PLFA was significantly correlated with OM at $r=0.634(p<0.001)$ in NVBS.
8. In conclusion, Soil microbial activities showed relative sensitivity and seasonal changes as affected by soil characteristics, temperature, and organic matter type and those were low in VBS.

제 1 장 시비방법에 따른 감귤원토양의 시기별 미생물활성

ABSTRACT

This study was carried out to evaluate the effect of the long-term(13 yrs) different fertilization management on soil microbial activities and community structures using phospholipid fatty acid(PLFA) content, microbial biomass, soil respiration and enzyme activities in volcanic ash citrus orchard soil. Experiment plots composed no-fertilization(Control), Compost, half of recommend application plus Compost(1/2NPK+Compost), recommend application (NPK), recommend application plus Compost(NPK+Compost), 3 times recommend application(3NPK). Soil samples were taken earlier in March, May, July, and September, 2007.

Total PLFA content was significantly higher at NPK+Compost than 3NPK in March and May. Distribution of microbial group by using PLFA profiles as biomarkers were high in September and that was in the order of bacteria>fungi>actinomycetes>mycorrhiza. However, Distribution of fungi and mycorrhiza were decreased significantly in control and 3NPK. Biological index such as G-/G+, F/B, cy19:0/18:1 ω 7c, and Unsat/sat ratios were increased with increasing temperature and those were high in September.

Principal component analysis of microbial community by PLFA pattern showed that PLFA profiles in 3NPK and Compost were different other treatments in March.

Microbial biomass C and N contents were high 1/2NPK(including NPK)+Compost compared with Compost only and chemical fertilizers(NPK, 3NPK). Thus, metabolic quotients(qCO₂) was highest in 3NPK among the other treatments. Soil enzyme activities showed seasonal changes and those that were different significantly between treatments in May. Dehydrogenase activity was two times higher in 1/2NPK+Compost than the Control. β -Glucosidase(NPK and 1/2NPK+Compost), urease(NPK+Compost), and acid phosphatase(Compost) activities were significantly higher than those of 3NPK and Control treatment.

Our results showed that composition change in microbial community structures, microbial biomass, and enzyme activities affected by fertilization effect and environmental factors such as soil temperature and moisture. In conclusion, Microbial activities were low in 3NPK and the Control compared with NPK(1/2NPK)+Com., which showed difference in community structures.

I. 서 론

감귤은 제주지역에서 재배되는 대표적인 작물로 대부분 화산회토양에서 재배가 되고 있다. 화산회토양은 비옥도가 낮다고 알려져 많은 농가들이 수량증수를 위하여 표준시비량 이상의 토양관리를 하여왔다. 하지만 감귤나무는 격년결과성이 크고 시비반응이 늦게 나타나는 작물이다. 이로 인해 감귤농가 마다 유효인산, 치환성 칼륨 함량이 차이가 많고 양분 불균형이 높게 나타나고 있다(NIAST, 2003). 잘못된 시비관리는 토양의 생태계를 교란하고 토양의 질과 기능을 저하시킬 수 있다. 토양 미생물은 탄소, 질소, 인산 등의 물질순환에 중요한 역할과 기능을 수행한다. 미생물 활성 평가는 토양 건전성을 높이고 비옥도 유지를 위하여 필요하다. 화학비료시비나 토양관리 방법에 따른 미생물 활성평가는 친환경적인 토양관리와 적정시비로 생산비를 줄이고 환경오염 부하를 경감시킬 수 있다.

미생물의 활성에는 여러 가지 요인이 영향을 미친다. 화산회토양은 인산 고정률이 높고 알루미늄 독성으로 미생물활성이 낮기 때문에 유기물은 분해되기 어렵다(Deenik, 2006; Nanzyo, 2002; Song, 1990)고 하였다. 토양 유형(de Ridder-Duine et al., 2005), 온도와 수분함량(Bapiri et al., 2010), pH(Aciego and Brookes, 2009; Bååth and Anderson, 2003; Kemmitt, 2006; Rahman et al., 2008) 등 비 생물학적 요인에 의해 일시적인 변이가 발생하기도 한다.

화학비료나 유기물사용은 토양화학성과 미생물활성(Bossio et al., 1998; Clegg, 2006; Deenik, 2006; Fredrik et al., 2008; Han, 2006; Yu et al., 2006)에 영향을 준다. Han(2006)은 감귤원에서 퇴비와 화학비료 시비량을 다르게 하였을 때 표준시비량 이상의 과다시비는 토양 pH를 낮추고, 과실품질을 나쁘게 하며, 화학비료 과다시비와 높은 유효인산함량은 균근균 밀도를 감소시킨다고 하였다(Han, 2006). 화학비료와 유기물 혼용 포장시험 결과 토양미생물활성이 증가된다(Goyal et al., 1999; Marschner et al., 2003)고 하였고, 농약살포는 미생물군집의 변화와 사상균의 밀도를 감소(Metting, 1992)시키며, 퇴비와 화학비료의 혼용은 퇴비사용효율을 증가시킨다고 하였다(Han et al., 2004). 유기질비료는 토양효소 활성을 높이고(Crecchio et al., 2004), 화학비료는 토양미생물체량과 효소활성에 크게 영향을 주지 않는다(Parham et al., 2003)고 하였다. 토양미생물활성은 토양

건전성과 질을 평가하는 지표로 사용될 수 있으며 유기물 공급, 윤작, 시비 등 토양관리방법에 의해 영향을 받는다고 하였다(Debosz et al., 1999; Sardans et al., 2008; Timothy and Dick, 2004; Yao et al., 2000). Marschner et al.(2003)은 가축분뇨와 화학비료 장기연용이 미생물활성에 크게 영향을 준다고 하였다.

미생물 활성을 평가하는 지표는 미생물상, 효소활성, 미생물체량, 토양 호흡률, 군집구조, 기능 등 다양하다(Bossio and Scow, 1998; Bossio et al., 1998). 전통적으로 토양을 희석평판한 후 계수하여 토양미생물활성을 평가하였으나, 이러한 배양법은 시료 채취, 배양 조건, 배지 종류 등 다양한 요인에 영향을 받는다. 많은 연구자들이 이 방법을 통하여 우리가 배양 할 수 있는 미생물은 전체의 1-5% 밖에 지나지 않으며(Prosser, 2002), 나머지 95-99%는 배양이 되지 않기 때문에, 이 방법을 통해서만 미생물 종류, 분포, 기능, 우점도, 활성에 대해서 아주 제한된 정보만을 알 수 있다.

인지질 지방산(Phospholipid fatty acid, PLFA)은 살아있는 미생물에만 존재하기 때문에 지방산분석을 통하여 배양방법보다 사실에 가까운 미생물의 생태, 군집구조, 기능 등을 평가 할 수 있다(Bossio et al., 1998; Green and Scow, 2008). 여러 연구자들이 인지질 지방산을 미생물체량 지수, 특정 분류군에 대한 미생물학적 스트레스 지표, 군집구성 변화 등의 해석에 사용한 바가 있다(White et al., 1996). 인지질 지방산은 토양상태를 평가하는 강력한 도구(Ibekwe and Kennedy, 1998)로 특히 지방산에 의하여 세균, 방선균, 사상균 등의 분류군을 구별할 수 있으며, 토양미생물 조성변화는 인지질 지방산 패턴의 변화로 알 수 있다. 또한 지표 인지질 지방산을 이용하여 기질이용성(G-/G+, F/B, Unsat/sat)과 환경 스트레스(cy19:0/18:1 ω 7c)에 따른 미생물군집의 생물학적 지표 변화를 해석할 수 있다(Bossio and Scow, 1998; Feng and Simpson, 2009). 미생물군집 구성과 구조는 양분 공급량의 차이나 샘플링 시기에 영향을 받았으며(Rahman and Sugiyama, 2008), Bååth and Anderson(2003)은 Andisol 토양에서 총인지질과 세균 인지질 지방산함량이 높다고 하였다.

토양에 유기물을 시용하면 미생물체량이 증가하며(Dinesh et al., 1998; Ebhin Masto et al., 2006), 미생물체량 C는 토양 변화 평가(Powlson et al., 1987)와 생물학적 활성 지표(Alvarez et al., 1995)로 사용되며, 인지질 지방산, 유기탄소, 총

질소함량과 상관관계가 높다(Yao et al., 2000)고 하였다. 미생물체량 C는 온도가 높을수록 많고(Alvarez et al., 1995), 미생물체량 N은 수분함량이 많을 때 증가한다고 하였다(Nira, 2003). 토양호흡은 토양 대사활동과 생태학적 토양기능 지표로서 토양온도와 수분함량에 영향을 받는다(Cerhanova et al., 2006; Chen et al., 2008). 토양호흡은 통기성, 기질이용성, 미생물 다양성 등에 영향을 받고 유기질 비료 시비구가 높다고 하였다(Cerhanova et al., 2006).

토양에서 미생물은 탄소, 질소, 인산의 순환에 중요한 효소를 생산하며, 유기물을 이용하면 효소활성이 증가한다(Dinesh et al., 1998; Klose and Tabatabai, 2000). 토양효소활성은 자연적, 인위적 교란에 민감하게 반응하며(Dick, 1992), 화산회토양은 allophane 영향으로 효소활성과 기능이 높지 않다고 하였다(Alliso, 2006). Dehydrogenase 활성은 계절적, 장소 특이적 요인에 영향을 받으며(Quilchano and Maranon, 2002), Melero et al.(2009)은 식물잔체가 토양표면에 남아 있을 때 토양 dehydrogenase와 β -glucosidase 활성이 높았으며, urease 활성은 퇴비구에서 높다고 하였다(Hu and Cao, 2007).

제주지역 화산회토양의 화학성과 물리성에 대한 연구는 많지만(Song, 1990), 미생물활성에 대한 것은 거의 없다. 더구나 감골원토양의 미생물활성과 관련한 연구는 실내배양을 통한 미생물 계수가 대부분으로 일반화된 미생물활성을 나타낼 수가 없다. 미생물 활성은 다양한 요인에 영향을 받기 때문에 일반적으로 적용이 가능한 방법으로 평가 할 필요가 있다. 지금까지 시비방법이 화산회토양의 미생물활성과 군집구조에 미치는 영향에 대해서 알려진 바가 많지 않다.

본 연구는 퇴비와 화학비료 시비량을 다르게 하여 장기간 관리되어온 화산회토 감골원 토양에서 인지질 지방산함량, 미생물 분포, 군집구조, 미생물체량, 토양호흡율과 효소활성을 분석하여 시비관리가 시기별 미생물의 활성과 군집구조에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 수행 방법

본 시험은 제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례리(33° 18'22"N, 126° 36'33"E)에 있는 감귤시험장에서 수행되었다. 시험구는 해발 190m에 위치하고 있으며, 35년생 온주밀감이 식재된 노지 재배포장으로 13년간 요소비료를 3월, 6월, 11월에 각각 50, 20, 30%, 염화칼리를 30, 40, 30% 비율로 시비하고, 퇴비와 용성인비는 3월에 전량을 기비 하여 시비관리를 하여왔다. 시험구의 시비관리 내역은 Table 1에 나타냈다. 감귤 재배기간 동안 주요 병해충 방제력에 준하여 시기별로 년 10-12회 약제를 살포 하였고, 제초 및 감귤나무 수체관리는 일반적인 감귤원 관리방법을 따랐다.

시험토양은 입자밀도 2.11 g cm^{-3} , 용적밀도는 0.75 g cm^{-3} 인 미사질양토의 Andisol 화산회토양(정방통)이었다. 토양시료는 2007년 3, 5, 7, 9월초에 처리구별 3-4지점에서 표토(15 cm)에서 채취하고 잘 혼합한 후 2 mm체를 통과시켜 조제하였다. 교란된 토양시료를 안정화시키기 위하여 토양 호흡률은 1주일, 토양 미생물체량과 효소활성은 3주간 4°C 냉장고에 보관한 후 분석에 이용하였다. 인지질 지방산함량은 -20°C 냉동보관 후 동결건조 후 이용 하였다. 토양의 일부는 풍건한 후 토양화학성분 분석을 하였다.

토양환경요인이 미생물활성에 미치는 영향을 분석하고자 표토(15cm)에 온도와 수분측정센서(Watchdog data logger 450, Spectrum Tech.)를 묻고 2시간 간격으로 조사하였다. 시료채취 시점의 토양온도는 7월에 24.0°C로 가장 높았으며, 수분함량은 5월과 9월에 2 kPa로 많았다(Fig. 1).

Table 1. Application rate of chemical fertilizers in this experiment

Treatment	Fertilizer application(kg 10a ⁻¹)
Compost	2,000
1/2NPK + Compost	14-20-14 + 2,000
NPK + Compost	28-40-28 + 2,000
NPK	28-40-28
3NPK	84-120-84
Control	0

Compost:cattle manure compost;

1/2NPK:half of recommended application rate of N, P, K;

NPK:recommended application rate of N, P, K;

3NPK:three times of N, P, K;

Control:no fertilization.

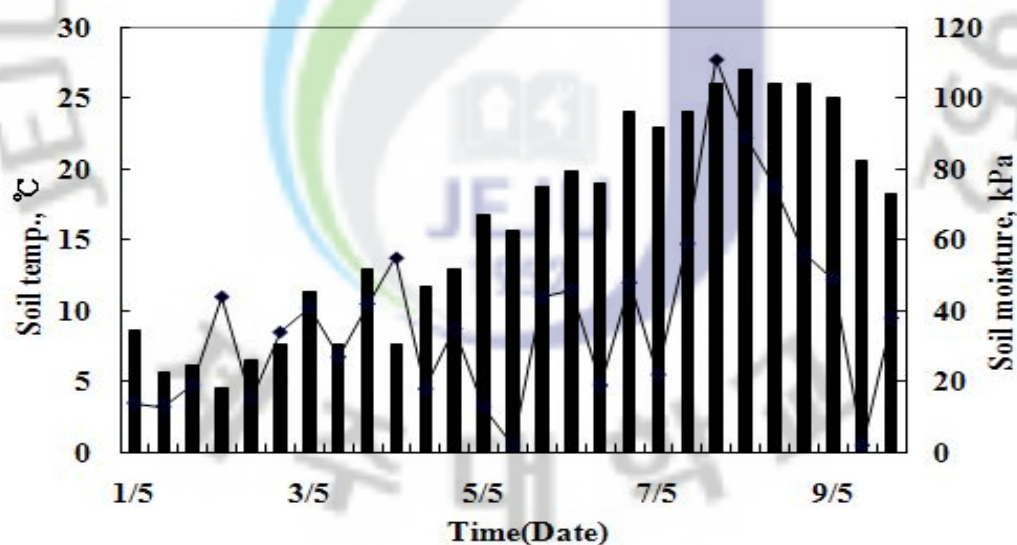


Fig. 1. Changes in soil temperature and moisture content during the experimental period in 2007. Arrow bars indicate sampling time.

2. 토양 이화학성 분석

토양 이화학성분은 9월에 조제한 토양을 농촌진흥청 표준분석법(RDA, 1988)에 준하여 분석하였다. pH는 토양과 증류수의 비율을 1:5로 희석하여 측정하였고, 유기물은 Walkley-Black법, 전 질소함량은 Kjeldahl법을 이용하였다. 유효 인산은 Bray. No-1, 치환성 칼륨과 칼슘은 1N NH_4OAc (pH 7.0), 치환성 알루미늄은 Ammonium oxalate/oxalic acid 방법으로 침출 후 여과하여 ICP(GBC, Integra XL)로 분석하였다.

3. 인지질 지방산(Phospholipid fatty acid, PLFA)분석

인지질 지방산추출은 Bligh and Dyer(1959)의 방법을 이용하였다. 추출된 지방산은 silicic acid column chromatography를 이용하여 중성지질과 당지질을 순서대로 제거한 후 인지질을 분획하였다. 분획된 시료는 methylation시킨 후 MIDI 미생물동정시스템(MIDI Inc., Newark, DE)으로 지방산을 정량하였다. 인지질 지방산 추출은 다음 3가지 과정을 거쳐 수행되었다.

1) 토양 PLFA 추출

동결 건조시킨 시킨 토양 5 g을 3반복으로 평량 한 후, 침출용액 33.25 mL를 첨가하여 2시간 동안 진탕 후 PLFA를 추출하였다. 추출액을 원심분리(2,000 rpm, 30 분)후 상정액을 분액 깔대기로 옮겼다. 이 후 50 mM 인산 완충용액(pH 7.5) 5.24 mL와 CHCl_3 5.38 mL를 첨가하여 2 분 동안 교반하여 16시간 이상 방치하였다. 16시간 후 분액 깔대기 하단부의 용액을 새로운 시험관으로 옮긴 후 32°C 항온조건에서 N_2 가스를 불어넣어 주면서 용매를 휘발시켜 건조시킨 후 다음단계에 들어가기 전까지 -20°C 냉동고에 보관하였다.

2) Silicic acid column chromatography

500 mg silicic acid를 중간크기의 파스테르 피펫에 충전 후 후드에서 3 mL CHCl_3 을 첨가하여 칼럼을 습한 조건으로 만들었다. 건조된 지방산에 1 mL CHCl_3 을 첨가하여 용해시키고 컬럼으로 옮긴 후 중성지질은 CHCl_3 2 mL씩 2회,

당지질은 acetone 4 mL씩 2회 첨가하였다. 마지막으로 methanol 2 mL씩 2회 첨가하여 polar lipids를 분획하여 32°C 항온수조에서 질소가스를 불어 넣어주면서 건조시켰다.

3) Mild alkaline methanolysis

건조된 지방산을 녹이기 위해 toluene:methanol(1:1)과 methanolic KOH 용액 1 mL를 첨가 후 5초간 교반 하여 35°C에서 20분간 배양하였다. 배양액에 hexan:chloroform(4:1) 2 mL 와 1N acetic acid 0.2 mL를 첨가 한 후 pH를 6-7로 조절하고 증류수 2 mL를 첨가한 다음 30초 동안 교반하였다. 이 용액을 2,000 rpm에서 5 분간 원심분리 한 후 상등액을 새로운 시험관으로 옮겼다. 이후 hexan:chloroform(4:1) 4 mL를 배양액 시험관에 첨가하여 지방산을 추출(2,000 rpm, 5 분) 후 내부표준물질로 C19:0가 포함된 hexan 500 uL를 첨가하여 잘 혼합한 후에 FID 검출기가 장착된 GC(HP 5890, Agilent Tech.)로 PLFA를 분석하였다.

가. PLFA 지표 미생물 분포분석

지방산 지표를 이용하여 미생물그룹을 세균, 방선균, 사상균, 균근균으로 분류 후 백분율로 나타냈다(Li et al., 2006; Rahman and Sugiyama, 2008). 그람 양성균은 15:0 iso, 15:0 anteiso, 16:0 iso, 17:0 iso, 17:0 anteiso, 18:0 iso, 그람 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. 세균은 그람 음성균과 양성균 지방산함량을 더해 산출하였다.

나. PLFA 생물학적 지표(Biological index)비율 분석

분석된 지방산을 이용하여 시비, 토양 온도와 수분함량변화가 미생물분포에 미치는 영향에 대하여 다음 4개의 생물지표를 분석하였다. 탄소영양원 이동 지표로 그람음성세균/그람양성세균(G-/G+)(Yao et al., 2000), 유기물함량 지표로 사상균/세균(F/B)(Bardgett et al., 1996), 양분결핍, pH 변화, 제초제, 중금속함량,

고온 등 환경스트레스를 나타내는 지표로 cy19:0/18:1 ω 7c(Bossio and Scow, 1998; Kaur et al., 2005), 호기적조건과 양분농도 지표로 단불포화지방산/포화지방산(Unsat/sat)(Bossio and Scow, 1998; Bossio et al., 1998; Zelles et al., 1992)를 이용하였다.

4. 토양 미생물체량

토양 미생물 몸체를 구성하는 탄소와 질소에 대한 생물량을 분석하였다.

가. Microbial biomass C

토양을 상온에서 7일간 전처리 배양 후 비이커에 건토 20 g 상당량의 습윤토양을 클로로포름과 비등석이 들어있는 25 mL 비이커와 충분한 양의 물이 담긴 용기를 진공데시케이터에 넣고 밀폐하여 클로로포름 훈증 후 25°C에서 24시간동안 정치 배양 하였다(Vance et al., 1987). 훈증배양 된 토양에 3배량의 0.5 M K₂SO₄ 용액 60 mL를 첨가하여 30 분간 진탕 후 여과하였고 여과액 8 mL를 250 mL 둥근바닥 플라스크에 취한 후 66.7 mM K₂Cr₂O₇ 용액 2 mL, 황산과 인산 혼합액(2:1) 15 mL, 비등석을 넣고 잘 혼합하였다. 이 용액은 수냉식 환류냉각관이 연결된 속실텐장치에서 165°C에서 30분간 미생물 유래의 유기탄소를 분해한 다음 증류수 25 mL, 25 mM ferroin indicater를 2-3방울 떨어뜨린 후 40 mM ferrous ammonium sulfate 용액으로 적정하였다. 종말점은 녹색이 담갈색으로 바뀌는 순간으로 하였다. 대조는 훈증하기 전에 침출액으로 추출한 용액을 훈증처리 토양과 같은 방법으로 분석하였다. 미생물체량 탄소는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Biomass C} = 2.64 \times E_c$$

$$E_c = (\text{훈증토양의 유기탄소함량}) - (\text{비훈증토양의 유기탄소함량})$$

클로로포름을 처리하지 않은 토양과 처리된 토양의 유기 탄소량간의 차이를 구하고 전환계수 2.64를(일반적인 토양 유기탄소 함량 중 미생물 유기탄소 비율 0.38)곱하여 미생물체량 C 함량을 구하였다.

나. Microbial biomass N

Biomass N은 biomass C 추출액을 이용하여 가용성 유기태질소의 약 절반을 점유하는 아미노산태 질소량을 구하는 ninhydrin 발색법(Joergensen, 1996)을 이용하여 분석하였다. 추출액 2 mL에 ninhydrin reagent 1 mL를 가한 후 끓는 수조안에서 25 분간 아미노산태질소(+암모니아태 질소)를 발색시킨 후 냉각하여 95% ethanol과 증류수(1:1)혼합액 4.5 mL를 첨가, 혼합 후 UV-Vis spectrophotometer(Cary 100, Varian Inc.)를 이용 750 nm에서 흡광도를 측정한 후 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Biomass N} = 5.0 \times E_N$$

$$E_N = (\text{혼증토양의 ninhydrin 발색량}) - (\text{비혼증토양의 ninhydrin 발색량})$$

5. 토양 미생물 호흡량(Basal soil respiration)

토양미생물 기초 호흡량 분석은 Langer and Gunther(2001) 방법을 변형한 이산화탄소 흡수법(CO₂ absorption method)을 이용하였다. 포장용수량의 수분을 함유한 150 g의 습토와 1 M NaOH 용액 5 mL가 담긴 소형 시험관을 250 mL 유리병에 넣어 25°C에서 30일간 항온배양을 하면서, 소형 시험관에 포집된 CO₂를 3, 10, 30일후에 매번 소형시험관을 바꿔주면서 시료를 채취하였다. 채취된 용액은 포화 BaCl₂용액으로 탄산염을 침전시킨 후 0.1 M HCl용액으로 적정하여 발생한 CO₂-C의 양을 일별 발생량을 적용하여 미생물 기초 호흡량($\mu\text{g CO}_2\text{-C } 100 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil}$)으로 산출 하였다.

6. 토양 효소활성 분석

토양미생물 효소활성은 탄소, 질소, 인산분해에 관여하는 효소를 분석하였다.

가. β -Glucosidase activity

β -Glucosidase는 Garcia-Gil et al.(2000)의 방법에 준하여 분석하였다. 토양 1 g을 50 mL 삼각플라스크에 취하고 4 mL의 0.1 M malate buffer (pH 6.0), 1 mL의 0.025 M p-nitrophenyl- β -D-glucoside용액을 가한 후 플라스크에 마개를 하고 37°C에서 1시간 동안 배양 후 1 mL의 0.5 M CaCl₂용액과 4 mL의 0.1 M THAM완충용액(pH 12)을 첨가 한 다음에 여과하여 UV-Vis spectrophotometer (Cary 100, Varian)를 이용 400 nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. Dehydrogenase activity

Dehydrogenase는 Casida et al.(1964)의 방법에 준하여 분석하였다. 풍건토 5 g에 CaCO₃ 0.05 g와 1 mL의 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 methanol 10 mL씩 2회 추출하여 no.6 filter paper로 여과 후 485 nm에서 UV-Vis spectrophotometer(Cary 100, Varian)로 흡광도를 측정하였다.

다. Urease activity

Urease는 Kandeler and Gerber(1988)의 방법에 준하여 분석하였다. 토양 5 g씩을 50 mL 시험관에 취한 후 20 mL의 borate buffer(0.1 M, pH 10)와 2.5 mL의 720 mM urea 용액을 가하고 밀봉을 하여 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후 2 M KCl용액 30 mL를 첨가하고 30분간 진탕시킨 후 여과시킨 용액에 sodium salicylate/sodium hydroxide 혼합액 5 mL와 39.1 mM sodium dichloroisocyanide 2 mL를 첨가 한 후 UV-Vis spectrophotometer(Cary 100, Varian)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조는 배양 현탁액을 여과하기 전에 720 mM urea 용액 2.5 mL, 2 M KCl용액 30 mL를 첨가 한 후 30분간 진탕시킨 후 여과액에 sodium salicylate/sodium hydroxide 혼합액 5 mL, 39.1 mM sodium dichloroisocyanide 2 mL를 첨가 한 후 흡광도를 측정하여 처리구와 대조구의 차로 효소활성을 측정하였다.

라. Acid phosphatase activity

Acid phosphatase는 농촌진흥청 표준분석법(RDA, 1988)에 준하여 분석하였다. 토양 1 g을 25 mL 시험관에 취한 후 4 mL의 0.1 M malate buffer(pH 6.5), 1 mL의 0.025 M p-nitrophenyl phosphate disodium 용액을 가하고 밀봉을 하여 37°C에서 1시간 동안 배양한 후 20°C에서 15분간 정치 시켰다. 그런 다음 0.5 M CaCl₂ 1 mL과 0.5 M NaOH 4 mL를 첨가한 후 여과시킨 용액의 흡광도를 UV-Vis spectrophotometer(Cary 100, Varian)로 400 nm에서 측정하였다. 대조는 1 mL의 0.5 M CaCl₂ 용액과 4 mL의 0.5 M NaOH 용액을 첨가한 후, 여과하기 직전에 배양 현탁액에 0.025 M p-nitrophenyl phosphate 용액 1 mL를 첨가한 후 여액 중의 p-nitrophenol 함량을 계산하였다.

7. 통계분석

ANOVA 분석은 처리 간에 유의수준 5%로 SAS Enterprise guide 4.2(SAS Inst., Cary, NC, USA)를 이용하였으며, 미생물군집분석은 시료별 1%이상 함유된 인지질 지방산에 대해 주성분과 군집분석을 수행 하였다. 토양 환경요인과 미생물 활성 간에 상관관계를 유의수준 0.1%, 1%, 5%에서 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 시험토양의 화학성

시험토양의 화학성분 함량은 Table 2에 나타냈다. 토양 pH와 질소함량은 처리 간에 차이가 없었다. 하지만 유효인산함량은 처리 간에 차이가 컸으며, 표준시비구 대비 무비료구는 1/3, 퇴비구는 1/2배 적었고, 표준시비 3배구는 2배 이상 많았다. 치환성 칼륨함량은 처리 간에 비슷한 경향이었고 칼슘함량은 무비료구가 다른 처리와 비교하여 2배정도 낮았다. 치환성 알루미늄함량은 처리 간에 차이는 없었다.

표준시비구와 비교하였을 때 무비료구는 토양 pH와 유효인산함량이 낮았고, 표준시비 3배구는 유효인산함량이 높았다.

질소비료는 토양 pH에 가장 큰 영향을 주는데(Han, 2006) 표준시비 3배구가 무비료구보다 pH가 높았던 것은 칼슘에 의한 영향으로 생각된다. 유효인산은 장기간 동일하게 토양을 관리함으로써 무비료구는 강우로 염기가 용탈되고 활성알루미늄에 의하여 고정되어 낮았고, 표준시비 3배구는 인산비료 시비량이 많고 칼슘함량이 높아 불용화된 인산이 적었기 때문으로 생각된다.

Table 2. Chemical properties of soil used this experiment in September

Treatment	pH	T-N %	Av. P ₂ O ₅ mg kg ⁻¹	Exch. Cations		Exch. Al mg kg ⁻¹
				K	Ca	
	1:5	%	mg kg ⁻¹	-- cmol+ kg ⁻¹ --		mg kg ⁻¹
Compost	6.0	0.59	127.2	0.5	8.9	450.6
1/2NPK+Compost	6.2	0.59	227.2	1.1	12.4	412.8
NPK+Compost	6.0	0.60	274.7	1.0	9.9	432.2
NPK	6.3	0.58	202.3	0.8	13.1	474.2
3NPK	6.1	0.56	423.2	1.1	11.7	480.7
Control	5.8	0.59	70.9	0.1	4.7	425.3

2. 인지질 지방산(PLFA)

가. 인지질 지방산 총합량 시기별 변화

인지질 지방산(PLFA)은 살아있는 미생물의 세포막에서 추출되는 것으로 토양미생물의 활성을 측정하는 바이오마커(biomarker)와 군집구조의 지표로 사용될 수 있다(Bossio and Scow, 1998). 지표 지방산에 의하여 세균, 방선균, 사상균 등의 미생물그룹을 구별할 수 있으며, 토양미생물 조성변화는 인지질 지방산 패턴의 변화로 알 수 있다. 인지질 지방산 총 합량은 시기별로 차이를 보였으며, 3월과 5월은 처리 간에 유의성이 있었다(Fig. 2).

3월은 표준시비+퇴비구가 349.2 n mol g⁻¹으로 표준시비 3배구보다 0.5배 많았다. 5월은 3월과 비슷한 경향을 보였으나 1/2표준시비, 표준시비+퇴비구가 각각 237.8, 237.4, 133.1 n mol g⁻¹였으며 인지질 지방산 총합량은 3월보다 낮았다. 7월, 9월은 5월보다 증가하는 경향이었으나 처리 간에 유의성은 없었다.

표준시비+퇴비구, 1/2표준시비+퇴비구에서 인지질 지방산 총 합량이 높은 것은 화학비료의 무기원소와 퇴비의 미량원소가 미생물생육을 도운 것으로 생각된다. Han et al.(2004)은 퇴비와 화학비료의 혼용은 퇴비의 질소무기화를 증가시켜 퇴비이용효율을 증가시킨다고 하였다. 토양에 유기물을 투입하면 미생물체량이 증가하고, 토양효소활성이 증가한다는 결과와 일치하는 경향이였다(Dinesh et al., 1998; Klose and Tabatabai, 2000). 하지만 표준시비량 3배를 시비한 표준시비 3배구는 다년간 많은 양의 시비로 미생물의 군집과 구성이 단순화되었기 때문으로 추측된다. Rahman et al.(2008)은 작물 경작방법은 미생물군집에 영향을 초래하며, 초지에 질소비료의 과잉 시비는 특정그룹의 미생물 활성과 군집구조, 미생물체량을 감소시킨다고 하였다(Clegg, 2006; Fredrik et al., 2008). Lobell(2007)은 질소가 작물수량의 제한요인이 될 수 있다고 하였는데, 기준량 이상의 과다시비는 토양화학성, 미생물활성, 수량에 악영향을 주는 것으로 판단된다. Goyal et al.(1999)은 11년간 포장시험결과 유기물과 화학비료의 혼용은 미생물 활성과 토양 생산성을 높인다고 하였다.

화학비료의 적정시비와 칼슘제의 공급, 퇴비 시용은 토양 pH를 개선시킴으로써 미생물 활성을 높인다(Bååth and Anderson, 2003). 하지만 표준시비 3배구는

갈습의 공급으로 pH가 높았지만 알루미늄의 함량이 높아 미생물 생육에 악영향을 주어 PLFA함량이 낮아진 것으로 생각된다.

토양온도나 수분함량 변화는 미생물의 활성화와 상관관계가 높다. 인지질 지방산 총합량이 시기별로 차이를 나타낸 것은 5월에 수분함량이 많고 지온이 낮은 반면 7월은 수분함량이 많고 지온이 높아 토양환경 변화가 영향을 준 것으로 생각된다. 또한 장마시 병해충 방제력에 의한 약제 살포 등에 의해서 미생물 개체군이 영향을 받은 것으로 생각된다(Metting, 1992). 따라서 화학비료 시비량, 토양 온도, 수분함량 변화로 인지질지방산 총 함량은 시기별로 차이가 나타나는 것으로 생각된다.



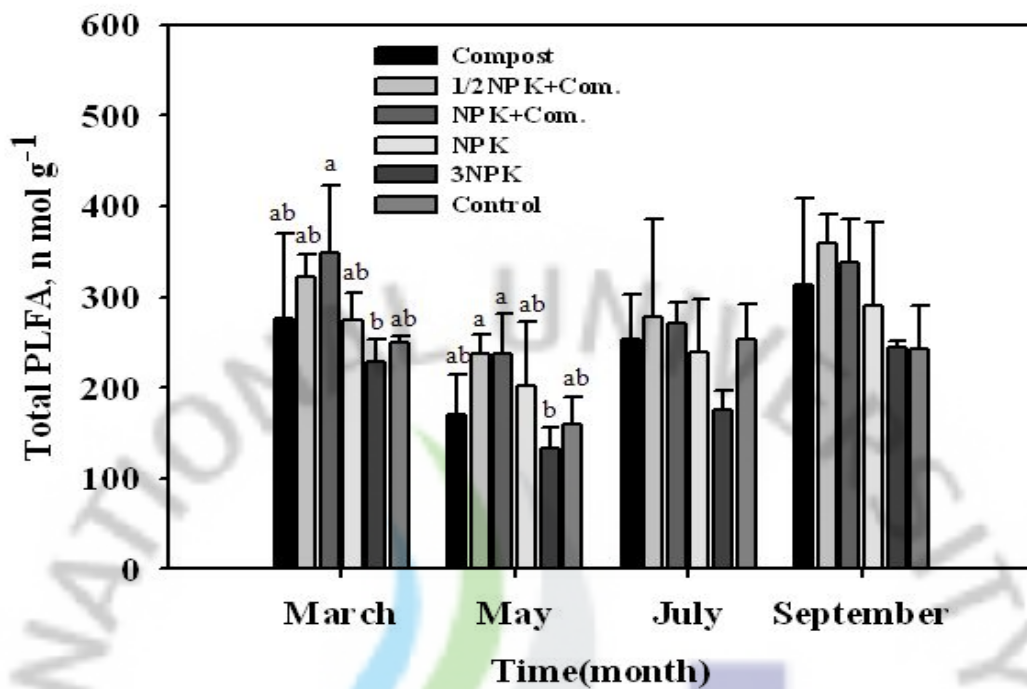


Fig. 2. Seasonal changes in soil total phospholipid fatty acid content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil. The error bars indicate standard deviation. No letters mean not significant at $p < 0.05$ level.

나. 인지질 지방산함량에 의한 미생물 분포

인지질 지방산은 미생물체량 지수, 특정분류군에 대한 미생물학적 스트레스 지표, 군집구성의 변화를 찾는 데 사용될 수 있어 토양미생물 군집분석에 유용하다(White et al., 1996). 인지질 지방산지표를 이용하여 미생물그룹을 세균, 방선균, 사상균, 균근균으로 분류하여 분포비율을 나타냈다(Fig. 3). 세균은 시기별로 약간의 차이를 보였으며, 9월은 퇴비구와 무비료구가 각각 40.3%, 40.7%로 표준시비 3배구 37.3% 보다 높았고 처리 간에 유의성이 있었다. 미생물이 시기별로 차이를 나타낸 것은 시비된 양분의 무기화와 감귤나무의 양수분 흡수, 토양온도와 수분함량의 변화가 영향을 준 것으로 생각된다. 토양 pH와 식물 뿌리 분비물에 의하여 세균의 개체수와 활성이 영향을 받는다(Aciego and Brookes, 2009; Bååth and Anderson, 2003; Kemmitt et al., 2006; Rahman et al., 2008)고 하였는데 5월과 7월에 감귤의 양·수분 흡수와 시비양분의 무기화가 세균의 분포에 영향을 준 것으로 생각된다.

방선균은 3월이 가장 낮았고 9월이 높게 분포하였으나 처리 간에 유의성은 없었다. Nanzyo(2002)는 Andisols 토양은 방선균이 많다고 보고하였는데, 방선균이 3월에 낮고 9월에 높게 나타난 것은 토양 온도와 수분함량이 이들 생육에 영향을 주었기 때문으로 추측된다.

사상균은 3, 5, 7월은 처리 간에 비슷한 경향으로 9월보다 낮았으나 유의성은 없었다. 하지만 9월은 퇴비구가 20.8%로 가장 높았고 무비료구와 표준시비 3배구는 각각 1.4%, 0.8%로 다른 처리구 보다 상당히 낮았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 이것은 3, 5, 7월의 경우 토양환경과 살균제 살포 등의 영향으로 밀도가 감소한 반면, 9월은 양분의 무기화로 흡수가 잘 되고, 약제 살포량이 적었기 때문으로 생각된다. 사상균이 토양 미생물체량에서 차지하는 비율이 높은 점을 감안하였을 때 이러한 결과는 인지질 지방산 총 함량의 시기별 분포와 비슷하였다.

균근균은 5월이 가장 낮게 분포하였으며 7월과 9월은 무비료구가 표준시비 3배구보다 높았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 7월은 무비료구가 2.1%로 표준시비 3배구 1.5% 보다, 9월은 무비료구가 3.9%로 표준시비 3배구 2.8%보다 높았으며 7월보다 분포비율이 증가하였다. 균근균은 불용성 인산을 흡수하기 위하여 인산효소를 생산하고(Besford, 1978), 당 단백질을 생산하여 토양 입단화를 촉진

하며(Rillig, 2004), 감귤과실의 당도증가와 산 함량 감소, 착색을 좋게 하여 품질을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Shrestha et al, 1996). 5월과 7월은 토양온도와 수분함량이 높지만 병해 방제를 위하여 살균제 등 농약을 살포한 결과, 사상균과 균근균의 미생물체량이 감소한 것으로 생각된다. 균근균은 시비 전 3월보다 시비 후 7월에 표준시비 3배구에서 가장 낮았다. 이는 토양의 높은 유효인산함량이 균근균에 영향을 주었기 때문으로 Peng et al.(1993)의 결과와 일치하였다.

사상균의 분포가 9월에 높고 표준시비 3배구에서 감소한 것은 과도한 질소비료의 공급에 기인하는 것으로, Demoling et al.(2008)은 질소비료 시비구에서 사상균 미생물체량은 40%, 미생물활성은 30% 감소하였으며 사상균 PLFA(18:2 ω 6,9)는 세균 미생물체량보다 시비에 의해 더 많이 감소하였다는 결과와 일치하였다. 3월에 표준시비 3배구에서 균근균 비율이 높게 나타난 것은 시비양분의 가용화보다는 시료채취의 공간적인 변이가 영향을 준 것으로 생각된다(Rahman and Sugiyama, 2008).

이상의 결과 토양 미생물그룹은 토양온도, 수분함량, 약제살포, 시비량에 따라 시기별로 차이를 보였으며, 인산시비량은 균근균의 밀도에 영향을 주는 것으로 생각된다.

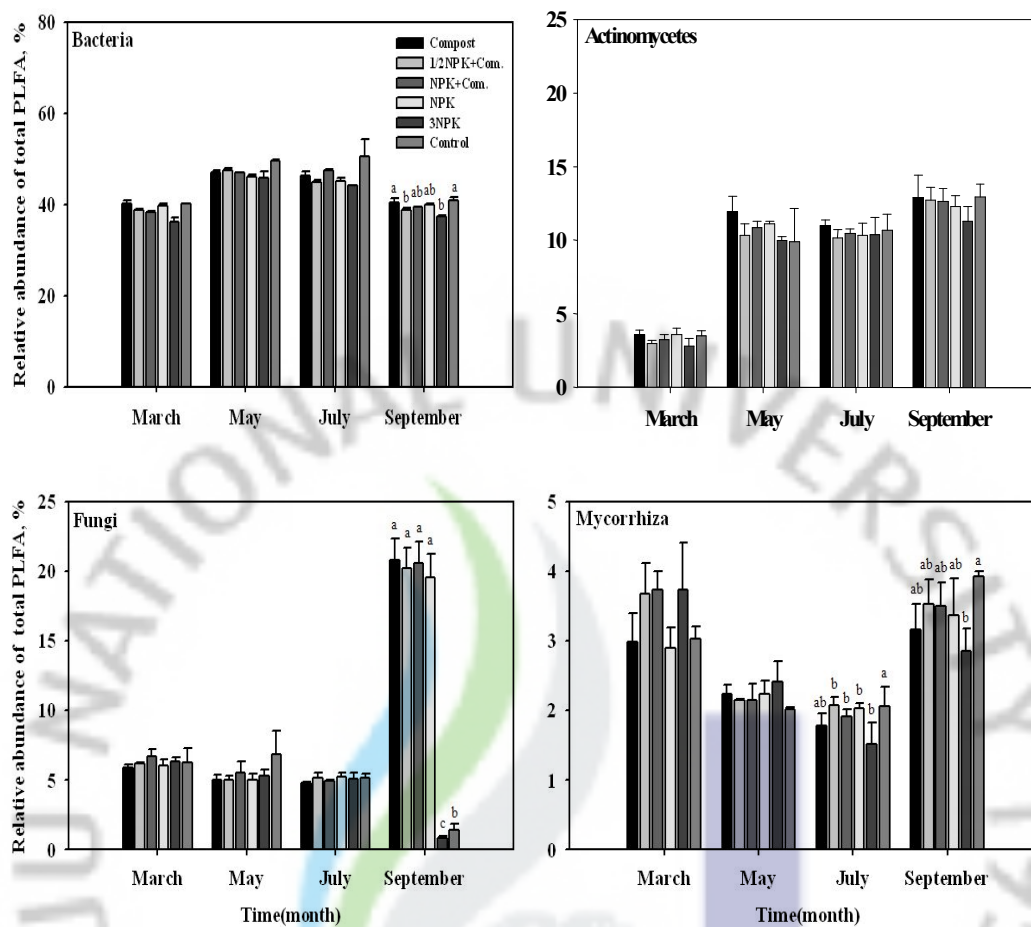


Fig. 3. Seasonal changes of relative abundance of microbial group using total PLFA content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil. See Fig. 2.

다. 인지질 지방산함량에 의한 생물학적 지표(Biological index)해석

인지질 지방산은 특정 미생물그룹에 대한 미생물학적 스트레스 지표, 군집구성의 변화 등의 해석에 사용할 수 있다(White et al., 1996). Feng and Simpson(2009)는 총 인지질 지방산중에서 지표 인지질 지방산간 비율을 이용하여 기질이용성(G-/G+, F/B, Unsat/sat)과 환경 스트레스(cy19:0/18:1 ω 7c)지표를 제시하였다. Fig. 4는 기질이용성과 환경스트레스 지표를 시기별로 처리 간에 비교 분석한 결과를 나타냈다.

G-/G+비는 3월, 5월, 7월로 갈수록 감소하였고 9월에는 높았으나 처리 간에 유의적인 차이는 없었다. G-/G+비는 온도가 올라갈수록 감소하여 탄소영양원이 증가하는 것을 나타내는 데, 토양온도가 높아지면서 양분이 무기화가 되어 미생물의 구성이 변화되어 나타난 것으로 생각된다. 하지만 9월에 높게 나타난 것은 그람 음성균(G-)의 비율이 무비료구는 시기에 상관없이 비슷하였으나 다른 처리구에서 3월 23.8%, 5월 21.7%, 7월 22.2%, 9월 26.6%를 나타내어 9월에 증가하였기 때문으로 생각된다(Feng and Simpson, 2009).

F/B비는 유기물함량을 나타내는 지표로써 9월이 높았으나 시기별로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 무비료구와 표준시비 3배구를 제외한 나머지 처리구가 높게 나타나 시용된 퇴비가 여름 고온기를 거치면서 분해가 되어 토양 유기탄소 함량이 증가하고, 토양 pH가 높아지면서 F/B비가 증가한 것으로 생각된다(Bååth and Anderson, 2003). 양분함량이 적은 무비료구와 많은 표준시비 3배구는 탄소영양원의 변화가 낮아진 반면 표준시비구는 증가하여 적정시비가 미생물 생육에 영향을 주었기 때문으로 적정시비가 중요하다는 것을 시사하는 것으로 생각된다. Marschner et al.(2003)은 가축분뇨, 화학비료 등을 30년간 시용했을 경우 세균군집구조는 토양유기탄소함량에 영향을 받으며, 수분 스트레스는 사상균보다 세균에 더 많은 영향을 준다(Bapiri et al., 2010)고 하였는데 이것은 시기별 토양온도와 수분함량의 변화가 미생물군집에 영향을 준 것으로 생각 할 수 있다.

cy19:0/18:1 ω 7c비는 토양온도, pH 변화에 민감하게 반응하는 지표로서 9월이 가장 높았고, 3월과 5월은 낮았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 3월과 5월은 무비료구가 각각 1.20, 1.77으로 표준시비 3배구 0.88, 1.00보다 높았다. 9월은 표준

시비구, (1/2표준시비, 표준시비)+퇴비구, 퇴비구가 무비료구와 표준시비 3배구보다 높았고 유의적인 차이가 있었다. cy19:0/18:1ω 7c비는 온도가 높아지면 감소하는데 9월이 가장 높아, 고온으로 토양양분의 분해가 촉진되면서 감소한다는 Feng and Simpson(2009)의 결과와 차이가 있었다. 이것은 7월에 낮았다가 9월에 높아진 것으로 유기물이 여름철 고온기를 지나면서 분해되어 토양중의 탄소함량이 증가하고, 토양온도가 낮아지면서 미생물이 환경스트레스에 대하여 적응을 한 것으로 생각된다. 무비료구와 표준시비 3배구는 미생물의 분포비율이 낮은 반면 퇴비구와 표준시비구 등은 일정수준의 미생물밀도를 유지하여 환경변화에 대한 적응과 복원능력이 있는 것으로 추정된다. 감귤재배기간 동안 토양 온도변화, 농약살포, 퇴비와 화학비료 시비량 등은 사상균 지표 인지질지방산 감소에 영향을 준 것으로 생각된다(Kaur et al., 2005). 사상균 지표 인지질지방산(18:2w6)는 살충제 살포(Bardgett et al., 1996)에 의하여 20% 증가한다고 하였는데 9월에 높게 나타난 것은 8월말 병해충 방제력에 의한 약제살포가 영향을 주었기 때문으로 추측된다.

Unsat/sat비는 온도가 높아지면 감소하여 호기적인 조건과 미생물의 양분이 이용성지표로 사용된다. 9월이 가장 높았고, 3월과 5월은 낮았으며 처리 간에 유의성이 있었으나 7월은 유의성이 없었다. 3월은 1/2표준시비+퇴비구, 5월은 표준시비구가 무비료구 보다 높았다. 9월은 퇴비구가 가장 높았으며, 무비료구와 표준시비 3배구가 다른 처리구와 비교하여 10배 이상 낮았다. 이것은 퇴비사용으로 토양의 통기성이 개선된 반면 표준시비 3배구는 장기간 과다시비로 미생물의 구성 변화에 기인한 것으로 생각된다.

인지질 지방산은 토양상태를 평가하는 가장 강력한 도구(Ibekwe and Kennedy, 1998; Puglisi et al., 2005)로 토양온도 상승과 함께 미생물그룹의 변화에 대하여 모니터링 할 수 있다(Frey et al., 2008). 본 시험결과 고온이나 양분투입 전후 토양의 특정 인지질 지방산을 분석함으로써 양분의 가용화 정도와 토양 환경 따른 미생물그룹의 변화를 예측가능 할 것으로 생각된다.

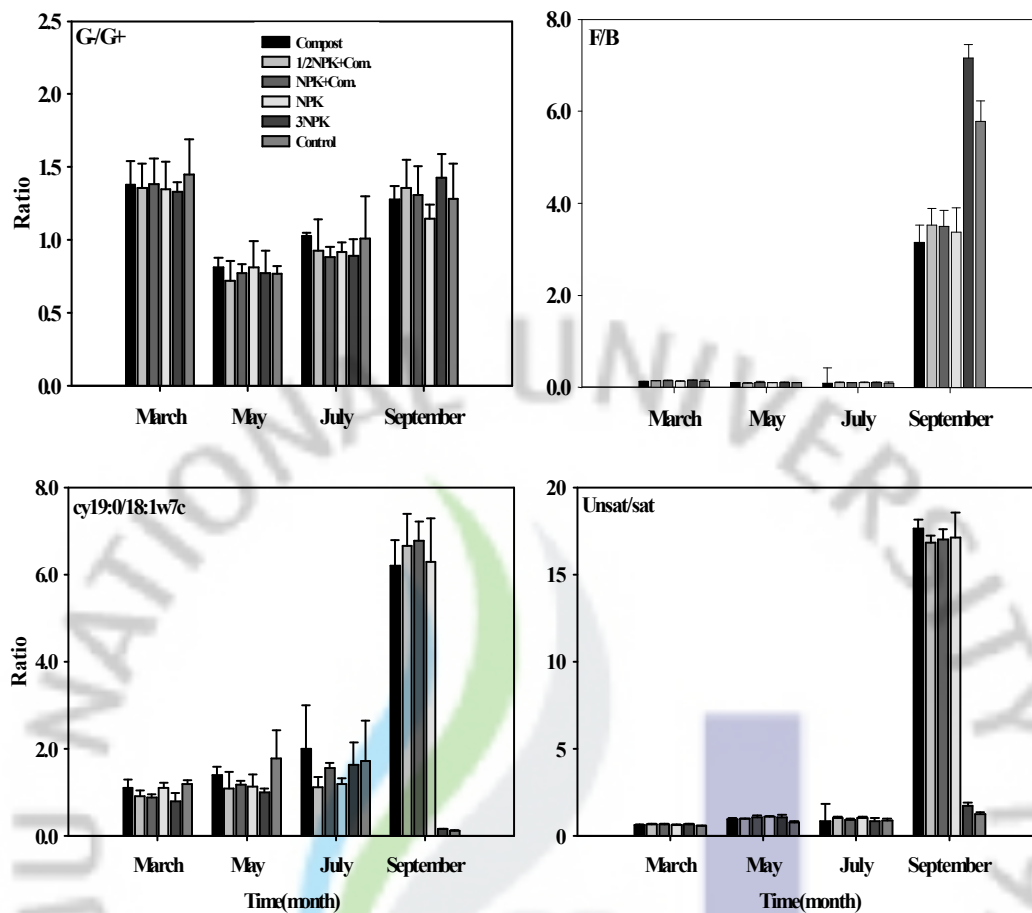


Fig. 4. Seasonal changes of biological index ratios of PLFA profiles by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil. See Fig. 2.

3. 인지질 지방산함량에 의한 미생물군집의 시기별 변화

인지질 지방산은 미생물체량과 군집구성, 생리적, 기능적 미생물특성에 대한 정보를 제공한다(Green and Scow, 2008). 각 처리별 1% 이상 분포하는 인지질 지방산함량에 시기별 주성분과 군집분석을 이용하여 미생물군집을 분석한 결과는 Fig. 5에 나타났다. 3월은 주성분 분석결과 퇴비구와 표준시비 3배구가 다른 처리구들과 다르게 군집구조를 형성하였다. 총변이 중 제 1주성분은 53.3%, 제 2주성분은 18.3%의 변이를 설명 할 수 있었다. 이러한 경향은 표준시비 3배구가 다년간 표준시비량의 3배나 되는 비료를 시비하였기 때문으로 추정된다. 질소비료 시비는 초지토양에서 세균, 방선균, *pseudomonas* 균의 군집구조에 영향을 주며(Clegg, 2006), 세균 보다 사상균 인지질 지방산(18:2ω6,9)이 많이 감소하여 미생물군집구조가 바뀌었다(Fredrik et al., 2008)고 하였다. Bossio et al.(1998)은 계절적 요인, 화학비료 추비, 공간적 변이가 미생물군집에 영향을 준다고 하였는데, 화학비료시비, 시기별 토양온도와 수분함량 변화 등이 미생물 군집구조에 영향을 준 것으로 추측된다(Bååth and Anderson, 2003; Rahman and Sugiyama, 2008). Rahman and Sugiyama(2008)는 양분 저 투입과 고 투입 재배방식에 따라 미생물군집구성이 다르게 나타난다고 하였다. Yao et al.(2000)은 감귤재배 년수가 오래될수록 사상균의 총인지질 지방산 함량이 증가한다고 하였는데 퇴비구와 표준시비 3배구의 사상균 밀도 차이도 군집구성에 영향을 준 것으로 생각된다. 또한 Marschner et al.(2003)은 퇴비와 화학비료시비는 토양미생물 개체수, 기능, 구성에 영향을 주어 미생물군집의 변화를 가져온다고 하였는데 3월 시비전과 시비 후 토양환경의 변화, 양분의 가용화와 흡수 등이 미생물군집에 영향을 준 것으로 사료된다.

군집분석결과 3월은 1/2표준시비+퇴비구와 표준시비+퇴비구 2처리가 1그룹, 표준시비 3배구가 2그룹, 무비료구, 표준시비구, 퇴비구 3처리가 3그룹으로 나누어 졌으며, 특히 표준시비 3배구는 다른 처리와 구별되는 양상을 나타냈다. 5월과 7월은 처리 간에 군집구조를 나타내지 않았다(데이터 제시 안함).

9월은 주성분 분석결과 처리 간에 뚜렷한 군집을 형성하지 않았다. 군집분석결과 1/2표준시비+퇴비구, 표준시비구, 퇴비구 3처리가 1그룹, 무비료구 2그룹, 표준시비 3배구, 표준시비+퇴비구 2처리가 3그룹으로 나누어 졌으며, 특히 무비

료구는 다른 처리와 구별되는 양상을 나타냈다. 화학비료 시비와 농약살포, 토양 온도와 수분함량의 계절적인 변화 등이 미생물군집구성에 영향을 준 것으로 생각되며, 화학비료 장기연용이 토양 미생물군집의 변화에 영향을 준다는 Marschner et al.(2003)의 결과와 일치하는 경향이였다.



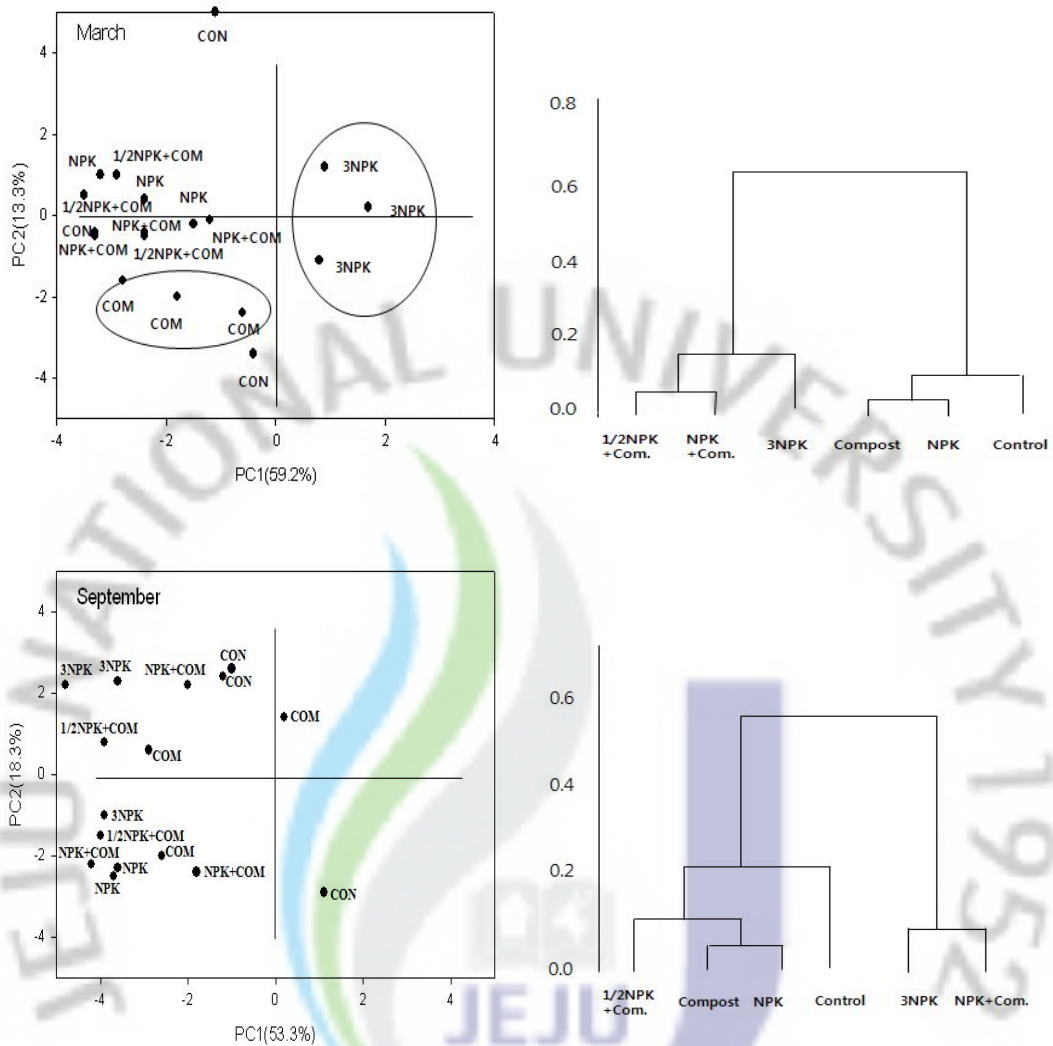


Fig. 5. Principal component and cluster analysis of microbial community using total PLFA content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil(Left:Principal component analysis; Right:Cluster analysis).

4. 토양 미생물체량 C와 N

미생물체량 C는 생물학적 활성 지표(Alvarez et al., 1995)로 사용되며, Hu and Cao(2007)는 장기 포장실험에서 미생물체량은 토양비옥도의 상태를 반영하는 토양질의 생물지표로 사용될 수 있다고 하였다. Vance et al.(1987)의 방법을 이용하여 미생물체량 C를 분석한 결과 3월과 5월은 1/2표준시비+퇴비구가 각각 390.6, 161.8 mg kg⁻¹으로 높았다(Fig. 6). 시기별로 3월에 높았다가 서서히 증가하는 경향이었고 5월에 가장 낮았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 7월과 9월은 표준시비+퇴비구와 1/2표준시비+퇴비구가 각각 286.9, 371.7 mg kg⁻¹으로 표준시비 3배구보다 1.5배, 2배 이상 높았다. 표준시비(1/2포함)+퇴비구가 퇴비구나 화학비료구(NPK, 3NPK)보다 높은 경향을 나타냈다. 이는 화학비료와 함께 사용된 퇴비에 의하여 토양의 pH 완충력이 높아졌기 때문으로 토양 pH와 토양미생물체량 C는 상관관계 높다는 결과와 일치하는 경향을 보였다(Kemmitt et al., 2006). 또한 11년간 화학비료와 유기물 혼용 포장시험 결과 토양 미생물활성과 토지 생산성은 증가하였다(Goyal et al., 1999; Marschner et al., 2003)는 결과와 일치하였다.

미생물체량 N은 미생물의 몸체를 구성하는 성분으로 3월이 가장 높았고 5월이 낮았으며 처리 간에 유의성이 있었다(Fig. 7). 3월은 1/2표준시비+퇴비구가 표준시비 3배구 보다 25%정도 높았으며 처리간 유의성이 있었다. 5월과 7월은 표준시비+퇴비구가 각각 57.0, 82.8 mg kg⁻¹으로 무비료구 보다 2배, 2.5배 이상 높았고 처리간 유의성이 있었다. 9월은 퇴비구가 132.3 mg kg⁻¹으로 표준시비 3배구 보다 2배 이상 높았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 3월에 높게 나타난 것은 겨울철 낮은 온도로 전년도에 시비된 양분의 무기화가 천천히 진행되면서 토양 중의 NO₃-N 함량이 높았기 때문으로 생각된다. Nira(2003)는 수분함량과 미생물체량 N은 상관관계가 높다고 하였는데, 3월에 무비료구에서 높은 것은 화학비료구의 NO₃-N가 이동하여 나타난 결과로 추정된다. 또한 표준시비 3배구가 낮은 것은 화학비료는 토양미생물체량에 크게 영향을 주지 않는다(Parham et al., 2003)는 보고와 일치하는 경향을 나타냈다. 이상의 결과 화학비료시비와 토양적인 특성은 미생물체량에 영향을 주는 것으로 생각된다.

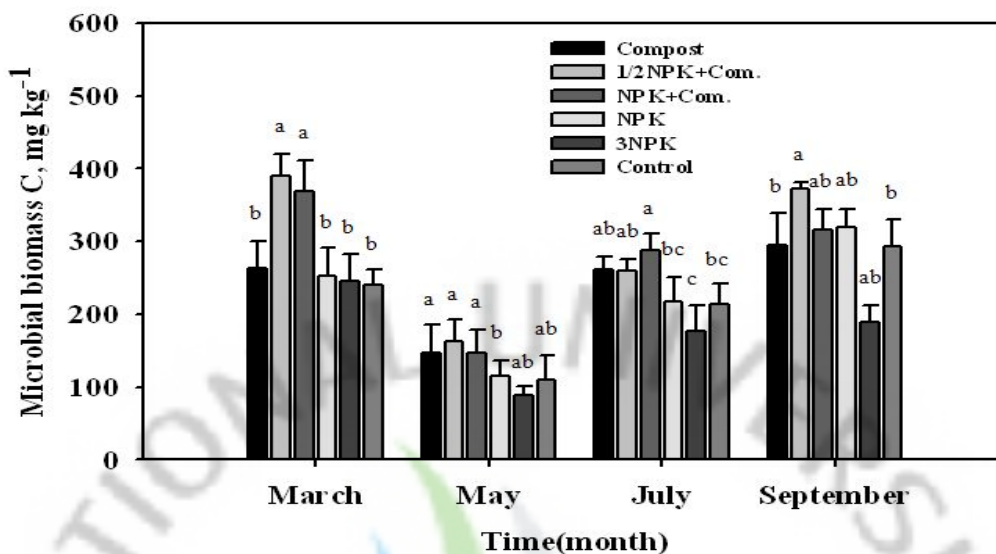


Fig. 6. Seasonal changes in soil microbial biomass C content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil. See Fig. 2.

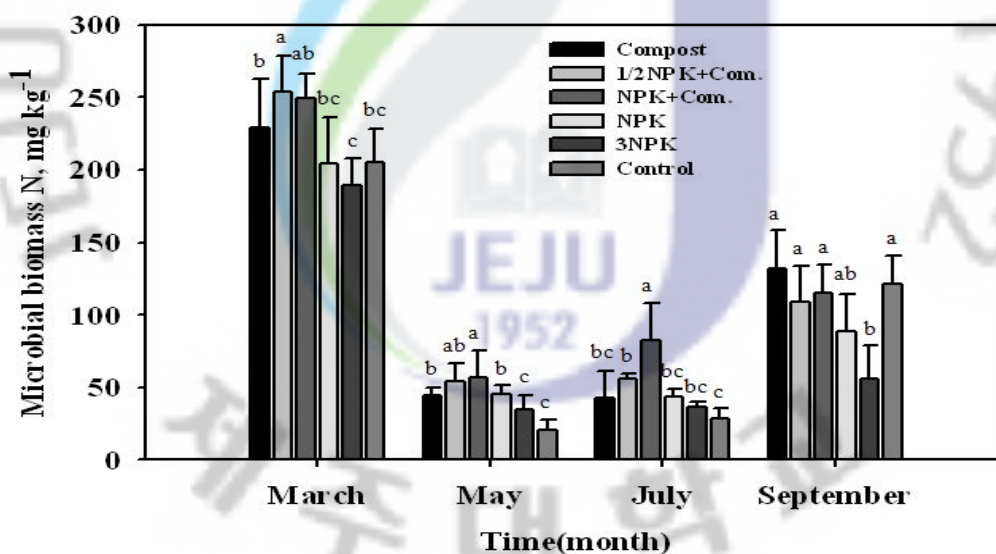


Fig. 7. Seasonal changes in soil microbial biomass N content as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil. See Fig. 2.

토양유기물과 질소함량에서 토양미생물체량이 차지하는 비율은 표준시비 3배구가 가장 낮았다(Table 3). 토양유기물과 미생물체량 C는 1/2표준시비+퇴비구가 표준시비 3배구의 약 2배정도 높았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 토양질소와 미생물체량 N은 퇴비구가 2.23으로 표준시비 3배구 1.07 보다 2배 이상 높았다. 이는 Anderson and Domsch(1989)의 미생물체량 C는 토양 유기탄소의 2-3%를 차지한다는 결과와 비교하여 낮았으며, 표준시비량 이상의 과다시비는 토양 미생물활성에 영향을 주는 것으로 생각된다.

Table 3. Ratio between microbial biomass contents and soil chemical properties in September

Treatment	Biomass C/OM	Biomass N/T-N	Biomass N/C
Compost	0.23±0.04b	2.23±0.78a	0.44±0.05
1/2NPK+Com.	0.28±0.01a	1.85±0.40ab	0.29±0.06
NPK+Com.	0.24±0.02ab	1.93±0.38ab	0.37±0.07
NPK	0.25±0.03ab	1.53±0.42ab	0.28±0.09
3NPK	0.15±0.02c	1.07±0.59b	0.30±0.13
Control	0.22±0.03b	2.06±0.29a	0.42±0.07

Mean ± Standard Deviation.

No letters mean not significant at $p < 0.05$ level.

5. 토양 미생물 호흡량과 대사지수

토양호흡은 미생물 대사활동과 생태학적 지표로 온도와 수분함량에 영향을 받는다(Cerhanova et al., 2006; Chen et al., 2008). 토양 기초 호흡률은 초기 3일에는 증가 하다가 시간이 경과 할수록 점차 감소하여 처리 간에 유의성은 없었다(Fig. 8). 3일은 표준시비+퇴비구 1.83, 무비료구 1.64 $\text{mg CO}_2\text{-C } 100 \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 로 퇴비구, 화학비료구(NPK, 3NPK), 무비료구 보다 높았으며, 30일은 비슷한 경향을 나타냈다. 이것은 토양에 비료나 유기물 등의 지속적인 공급에 의하여 나타난 결과로 생각된다. Hu and Cao(2007)는 장기간 포장실험에서 미생물 호흡률을 측

정한 결과 화학비료구가 무처리 보다 높았다고 하였는데, 본 연구결과와 일치하는 경향이였다. Yao et al.(2000)이 감귤 재배년수가 길수록 토양호흡량은 증가하였다는 결과와 다소 차이가 있었다. 이는 실내시험과 포장시험에서 화학비료와 유기물의 공급차이, 토양교란으로 인한 미생물 활성 감소에 기인하는 것으로 추측된다. Cerhanova et al.(2006)은 토양 호흡은 기질이용성, 미생물 다양성과 풍부성, 토양 이화학적특성에 영향을 받으며, 유기질비료 시용은 토양 기초 호흡량을 높인다고 하였다.



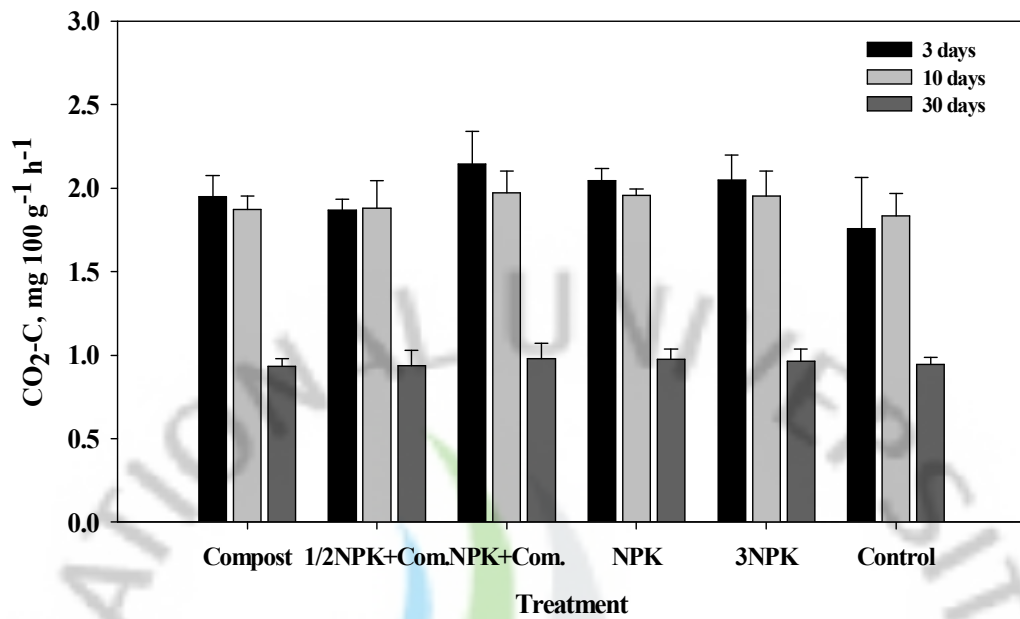


Fig. 8. Soil basal respiration rate as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil(at 25°C, 30 days). See Fig. 2.

미생물 대사지수(토양 기초호흡량: 미생물체량 C의 비)는 토양의 미생물 활성을 평가하는 지표로 미생물체량이 적고 호흡량이 많을 때 높아진다. 미생물 대사지수(qCO_2)는 시기와 상관없이 표준시비 3배구가 가장 높았으며, 표준시비구는 3월에 높았으나 9월에는 낮았다(Table 4). 시기별로 5월>7월>3월>9월 순이었으며, 처리 간에 유의성이 있었다. 표준시비 3배구가 높은 것은 미생물체량이 낮고 호흡률이 높기 때문으로 이러한 결과는 표준시비량 이상의 화학비료 시비는 미생물의 활성을 낮추기 때문에 적정시비가 필요하다는 것을 제시하는 것으로 생각된다. 토양호흡은 미생물의 탄소이용성과 관련되는데 미생물체량 C와 상관관계가 상당히 높아 Alvarez et al.(1995)의 결과와 일치하는 경향이였다.

Han(2006)은 표준시비 3배구는 질소시비로 감귤과실의 착색이 양호하지 않았고 과피 두께가 가장 두꺼웠고, 과실당도, 산 함량과 수량은 차이가 없었으며, 연도별 수량 변동률은 가장 높게 나타났다고 하였는데 감귤의 품질, 수량, 미생물 활성 측면에서 과다시비는 비효율적인 방법이라고 생각된다.

Table 4. Seasonal changes in soil qCO_2 metabolic quotients as affected by different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil

Treatment	March	May	July	September
	----- mg CO_2 -C h^{-1} (g Biomass C) $^{-1}$ -----			
Compost	1.12±0.22ab	2.09±0.76b	1.11±0.14b	0.99±0.12b
1/2NPK+Compost	0.74±0.06c	1.84±0.52b	1.11±0.14b	0.78±0.07b
NPK+Compost	0.85±0.16b	2.15±0.31b	1.08±0.11b	0.98±0.15b
NPK	1.24±0.21a	2.72±0.44ab	1.44±0.21ab	0.96±0.09b
3NPK	1.26±0.26a	3.53±0.75a	1.75±0.25a	1.6±0.08a
Control	1.16±0.13ab	2.66±0.74ab	1.32±0.3b	0.96±0.23b

See Table 3.

6. 토양효소 활성의 시기별 변화

가. Dehydrogenase activity

토양효소활성은 토양비옥도 반영하는 지표가 된다(Hu and Cao, 2007). 토양 유기물 분해를 촉매하여 탄소순환에 관여하는 dehydrogenase와 β -glucosidase 활성은 Table 5에 나타났다. Dehydrogenase활성은 3월에 1/2표준시비+퇴비구와 퇴비구가 무비료구, 표준시비 3배구 보다 높았으며, 5월은 3월과 비슷한 경향으로 처리 간에 유의성이 있었다. 7월은 표준시비구, 9월은 1/2표준시비+퇴비구가 가장 높았으나 처리 간에 유의성은 없었다. Dehydrogenase활성은 칼슘함량이 증가하면 높게 나타나는데 1/2 표준시비+퇴비구는 이를 반영하는 경향을 나타났다. 토양에 유기물을 사용하면 dehydrogenase활성이 증가한다고 하였는데(Dinesh et al., 1998), 1/2 표준시비+퇴비구가 가장 높은 것은 화학비료와 퇴비사용으로 미생물 몸체 구성분인 N, P, K 성분이 공급되어 미생물체량이 증가하면서 높게 나타난 것으로 생각된다. 무기질비료와 유기물 혼용은 토양미생물활성을 증가시키며(Goyal et al., 1999; Marschner et al., 2003), 시기별 효소활성의 변화는 계절적 요인에 영향을 받는다(Quilchano and Maranon, 2002)는 결과와 일치하는 경향이였다.

나. β -Glucosidase activity

β -Glucosidase는 토양 질(Quality)의 평가지표로서 토양관리효과를 평가할 수 있다(Timothy and Dick, 2004). β -Glucosidase 활성은 3, 5, 7월이 9월보다 높았고, 3월은 1/2 표준시비+퇴비구가 무비료구 보다 44%, 5월은 표준시비구와 1/2 표준시비+퇴비구가 각각 54%, 45% 높았으며 처리구간에 유의성이 있었다. 7월은 표준시비+퇴비구, 9월은 표준시비구가 높았으나 처리간에 유의성은 없었다. 3월의 경우 시비양분이 공급되고 5월과 7월에 온도가 높아지면서 퇴비와 감귤나무 낙엽이 분해가 되면서 β -glucosidase 활성이 증가한 것으로 추측된다(Melero et al., 2009). 또한 토양 온도와 수분함량의 변화가 토양효소활성에 직접적으로 영향을 준 것으로 생각된다(Sardans et al., 2008). 이상의 결과 토양시료 채취의 시간적, 공간적 차이는 있지만, 유기물 공급은 토양의 유기물 분해효소 활성을 증가시키는 것으로 사료된다.

Table 5. Seasonal changes in soil dehydrogenase and β -glucosidase activities as affected by different fertilization management practices in citrus orchard volcanic ash soil

Treatment	Dehydrogenase				β -Glucosidase			
	March	May	July	September	March	May	July	September
	----- ug TPF g ⁻¹ 24h ⁻¹ -----				----- ug PNP g ⁻¹ h ⁻¹ -----			
Compost	5.1±3.2	3.6±0.8ab	3.2±0.5	7.2±3.2	34.4±5.2ab	30.3±10.2ab	30.0±5.5	13.9±5.2
1/2NPK+Compost	5.5±1.9	4.3±0.2a	4.2±1.3	10.3±5.9	37.8±2.4a	32.1±2.5a	33.2±2.8	13.7±6.4
NPK+Compost	4.5±1.3	3.1±0.5ab	3.4±1.6	7.5±6.7	29.2±2.7b	30.4±5.4ab	37.3±11.9	10.3±4.1
NPK	4.5±1.2	3.5±1.6ab	4.3±2.8	5.6±3.8	36.5±3.4a	38.2±12.8a	37.2±12.2	14.6±4.0
3NPK	3.9±0.8	2.8±0.8ab	2.5±0.4	3.6±0.0	37.4±6.0a	27.0±6.0ab	30.7±6.0	14.4±4.9
Control	3.2±0.4	2.4±0.4b	2.7±0.6	4.3±1.2	21.2±3.5c	17.5±3.1b	21.4±1.3	7.0±0.9

See Table 3.

다. Urease activity

Urease는 요소를 CO_2 와 NH_3 로 분해되도록 도와주는 질소분해 효소로서 Deenik(2006)은 토양미생물활동으로 토양유기물의 유기태질소가 식물이 이용할 수 있는 무기태질소로 전환된다고 하였다. 토양 urease활성의 시기별 변화는 Table 6에 제시한 바와 같다. Urease 활성은 7월이 가장 높았으며 3월과 9월은 비슷한 경향을 나타냈으나 처리 간에 유의성은 없었다. 7월의 경우 1/2 표준시비+퇴비구가 $1.53 \text{ ug NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 으로 무비료구 $0.44 \text{ ug NH}_4\text{-N g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 보다 3배 이상 높았으며, 표준시비+퇴비구>퇴비구>표준시비구>표준시비 3배구 순으로 낮아지는 경향이였다.

토양에서 $\text{NH}_4\text{-N}$ 은 온도가 올라가면서 발생량이 증가하는데, 3월부터 지온은 상승하기 시작하여 7월의 경우 토양온도가 가장 높아 효소활성이 증가하였다가 온도가 낮아지고 토양수분이 부족한 시기인 9월에는 효소활성이 낮았던 것으로 생각된다. 하지만 저온에서 3주 정도 보관 후 측정하여 저온에 적응하지 못한 미생물의 사멸로 urease 활성이 낮았던 것으로 추측된다. 장기간 포장시험에서 Hu and Cao(2007)는 urease는 화학비료구가 무비료구 보다 높았으며, 퇴비구>화학비료구>무비료구 순이었다고 보고한 결과와 일치하는 경향을 보였다. 토양에 유기물을 시용하면 urease활성이 증가하고(Dinesh et al., 1998), 토양 urease활성의 46%가 미생물체량과 관계가 있다(Klose and Tabatabai, 2000)고 하였는데 유기물의 투입은 토양 미생물밀도를 증가시키고 효소활성을 높이는 것으로 생각된다. 하지만 표준시비구와 표준시비 3배구의 urease활성은 차이가 없어, 암모니아 기반 질소비료 시용량이 증가하면서 urease활성이 감소한다(Dick, 1992)는 보고와 일치하는 경향을 나타냈다.

라. Acid phosphatase activity

Acid phosphatase는 산성조건에서 인산 분해를 촉매 하는 역할을 한다. 3월과 9월은 처리 간에 유의성이 없었다(Table 6). 5월은 퇴비구가 표준시비구보다, 7월은 표준시비구가 무비료구 보다 높았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 이러한 결과는 시용된 유기물의 분해(5월)와 화학비료시비(7월), 토양환경 변화에 의한 영향으로 생각된다. Xu et al.(2007)은 토양중 Cu함량이 많으면 acid

phosphatase 활성이 증가한다고 하였는데 퇴비시용구가 무비료구 보다 높은 것은 퇴비유래의 중금속 함량이 높기 때문으로 추측된다.

시기별 탄소, 질소, 인산 순환에 관여하는 효소활성을 분석한 결과 토양 채취 시기의 토양온도와 수분함량 변화, 화학비료 시비량, 양분의 이용 등에 따라 효소활성이 처리 간에 차이를 보였다. Sardans et al.(2008)은 토양환경의 변화는 효소활성에 영향을 준다고 하였는데, 이는 토양온도, 수분함량의 시기별 변화로 처리 간에 변이가 나타났기 때문으로 생각된다. 시험결과 토양 효소활성은 계절적 차이가 있었으나 처리 간에 유의성은 5월이 가장 잘 나타나 시비관리에 따른 효소활성은 5월에 분석을 하는 것이 가장 효과가 클 것으로 생각된다. Crecchio et al.(2004)은 6년간 생활쓰레기로 제조된 퇴비를 포장 시험한 결과 dehydrogenase(9.6%), β -glucosidase (13.5%), urease(15.4%), phosphatase(9.7%) 활성이 증가하였다고 하였는데, 퇴비구 또는 화학비료+퇴비구가 무비료구 보다 토양효소활성이 높아 일치하는 경향을 보였다.

Table 6. Seasonal changes in soil urease and acid phosphatase activities as affected by different fertilization management practices in citrus orchard volcanic ash soil

Treatment	Urease				Acid phosphatase			
	March	May	July	September	March	May	July	September
	----- ug NH ₄ -N g ⁻¹ 2 h ⁻¹ -----				----- ug PNP g ⁻¹ h ⁻¹ -----			
Compost	0.09±0.02 [†]	0.15±0.04	0.93±0.35	0.12±0.12	82.5±8.7	64.4±5.9a	72.5±12.5c	53.2±7.5
1/2NPK+Compost	0.12±0.04	0.18±0.03	1.53±0.43	0.13±0.02	81.2±9.1	44.5±5.2bc	89.7±13.7b	54.9±1.8
NPK+Compost	0.17±0.09	0.21±0.05	1.47±0.56	0.15±0.05	81.4±6.9	50.3±3.7b	71.5±5.1c	57.0±2.0
NPK	0.13±0.06	0.17±0.05	0.82±0.26	0.07±0.05	81±4.7	37.7±3.6c	97.9±3.2a	53.8±6.0
3NPK	0.08±0.10	0.16±0.15	0.60±0.48	0.09±0.02	69.2±10.7	40.7±6.1bc	79.2±9.8bc	54.0±3.1
Control	0.04±0.02	0.12±0.14	0.44±0.51	0.09±0.04	69.1±6.8	48.9±9bc	54.7±5.4d	54.5±5.2

See Table 3.

7. 토양 온도, 수분함량과 미생물활성 지표간의 상관관계

토양화학성과 미생물활성 지표간의 상관관계를 분석한 결과는 Table 7에 나타났다. 토양온도는 urease와 고도의 정의 상관관계, microbial biomass N과는 부의 상관관계를 나타냈다($p < 0.001$). 토양수분함량은 phospholipid fatty acid, dehydrogenase, microbial biomass C와 고도의 정의 상관관계, β -glucosidase와는 부의 상관관계를 보였다($p < 0.001$). 또한 수분함량과 microbial biomass N은 상관관계가 높았으며, 이는 Nira(2003)결과와 일치하였다.

토양온도와 수분함량은 미생물밀도, 미생물체량, 효소활성과 상관관계가 높아 상당한 영향을 주는 것으로 생각되며, 이러한 환경요인을 적절하게 조절하면 미생물 활성을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

Table 7. Pearson correlation coefficient between soil environment factors and microbial activities (N=18)

Factors	PLFA	APA	URA	DHG	GLU	MBC	MBN
Temperature	ns	ns	0.629 ***	ns	ns	ns	-0.809 ***
Moisture	0.680 ***	ns	ns	0.702 ***	-0.627 ***	0.722 ***	0.484 *

PLFA:Phospholipid fatty acid; APA:Acid phosphatase; URA:Urease; DHG:Dehydrogenase; GLU: β -Glucosidase; MBC:Microbial biomass C; MBN:Microbial biomass N
DMRT: $p < 0.001$, ***; $p < 0.05$, * ; ns, Not significant.

IV 요약

본 연구는 화산회토 감골원 토양에서 인지질 지방산함량, 미생물 분포, 생물학적 지표, 군집구조, 미생물체량, 토양호흡율과 효소활성을 분석하여 시비관리가 미생물의 활성과 군집구조에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다. 시험에 사용한 토양은 퇴비와 화학비료 시비량을 달리 하여 13년간 관리되어온 무비료구, 퇴비구, 1/2표준시비+퇴비구, 표준시비+퇴비구, 표준시비구, 표준시비 3배구에서 2007년 3, 5, 7, 9월초에 채취하여 분석에 이용하였다.

인지질 지방산 총 함량은 3월과 5월에 표준시비+퇴비구가 표준시비 3배구보다 유의성 있게 많았다. 지표지방산을 이용한 미생물 밀도는 9월이 높은 경향으로 세균>사상균>방선균>균근균 순이었으며 무비료구와 표준시비 3배구는 균근균과 사상균 분포비율이 낮았다. 지표 지방산을 이용한 생물학적 지표는 온도가 높아지면 증가하여 G-/G+, F/B, cy19:0/18:1 ω 7c, Unsat/sat비는 9월이 가장 높았다. 지방산을 이용한 주성분 분석결과 3월에 표준시비 3배구와 퇴비구가 다른 처리와 구별되는 군집을 구성하였으며 계절적인 차이를 보였다. 미생물체량 C와 N은 표준시비(1/2포함)+퇴비구가 퇴비구와 화학비료구(NPK, 3NPK)보다 많았으며 시기별로 차이가 있었다. 미생물 대사지수(qCO_2)는 시기와 상관없이 표준시비 3배구가 가장 높았다. 토양 효소활성은 계절적 차이를 보였으며 5월에 처리간에 유의성이 뚜렷하였다. Dehydrogenase는 1/2표준시비+퇴비구가 무비료구 보다 약 2배, β -glucosidase는 표준시비구와 1/2표준시비+퇴비구가 표준시비 3배구, 무비료구 보다 높았다. Urease는 NPK+퇴비구, acid phosphatase는 퇴비구가 표준시비 3배구와 무비료구 보다 높았다. 화학비료시비, 토양온도, 수분변화는 미생물 밀도, 군집구조, 미생물체량과 효소활성에 시기적으로 영향을 주었다. 결론적으로 무비료구나 표준시비 3배구는 표준시비(1/2포함)+퇴비구에 비해 미생물 활성이 낮았고 군집구조가 차이가 있었다.

V. 인용문헌

- Aciego, P. J. C. and P. C. Brookes. 2009. Substrate inputs and pH as factors controlling microbial biomass, activity and community structure in an arable soil *Soil Biol. Biochem.* 41:1396-1405.
- Alliso, S. D. 2006. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochem.* 81:361-373.
- Alvarez, R., O. J. Santanatoglia, and R. García. 1995. Effect of temperature on soil microbial biomass and its metabolic quotient in situ under different tillage systems. *Biol. Fertil. Soils* 19:227-230.
- Alvarez, R., R. A. Diaz, N. Barbero, O. J. Santanatoglia, and L. Blotta. 1995. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from three tillage systems. *Soil Till. Res.* 33:17-28.
- Anderson, T. H. and K. H. Domsch. 1989. Ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 21:471-479.
- Bååth, E. and T. H. Anderson. 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol. Biochem.* 35:955-963.
- Bapiri, A., E. Bååth, and J. Rousk. 2010. Drying-Rewetting Cycles Affect Fungal and Bacterial Growth Differently in an Arable Soil. *Microb. Ecol.* 60:419-428.
- 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.
- Besford, R. T. 1978. Effect of phosphorus supply on acid phosphatase activity in the leaves of tomato plants. *Scientia Horticulturae.* 9:303-309.
- Bligh, E. G., and W. J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.

- Bossio D. A. and K. M. Scow. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Micro. Ecol.* 35:265-278.
- Bossio, D. A., K. M. Scow, N. Gunapala, and K. J. Graham. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effect of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Micro. Ecol.* 36:1-12.
- Casida L. E., D. A. Klein, and T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci* 98:371-376.
- Cerhanova, D., J. Kubat, and J. Novakova. 2006. Respiration activity of the soil samples from the long-term field experiments in Prague. *Plant Soil Environ.* 52:21-28.
- Chen, S. G. L., J. Huang, and M. He. 2008. Responses of soil respiration to simulated precipitation pulses in semiarid steppe under different grazing regimes. *J. Plant Ecology* 1:237-246.
- Clegg, C. D. 2006. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Appl. Soil Ecol.* 31:73-82.
- Crecchio, C., M. Curci, M. D. R. Pizzigallo, P. Ricciuti, and P. Ruggiero. 2004. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biol. Biochem.* 36:1595-1605.
- de Ridder-Duine, A. S., G. A. Kowalchuk, P. J. A. K. Gunnewiek, W. Smant, J. A. van Veen, W. de Boer. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biol. Biochem.* 37:349-357.
- Debosz, K., P. H. Rasmussen, and A. R. Pedersen. 1999. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils: effects of organic matter input. *Appl. Soil Ecol.* 13:209-218.
- Deenik, J. 2006. Nitrogen Mineralization potential in important agricultural soils of Hawai'i. *Soil Crop Manage.* 15:1-5.

- Demoling, F., L. O. Nilsson, and E. Bååth. 2008. Bacterial and fungal response to nitrogen fertilization in three coniferous forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 40:370-379.
- Dick, R. P. 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agric. Ecosyst. Environ.* 40:25-36.
- Dinesh, R., R. P. Dubey, and G. S. Prasad. 1998. Soil microbial biomass and enzyme activities as influenced by organic manure incorporation into soils of a rice-rice system. *J. Agro. Crop Sci.* 181:173-178.
- Ebhin Masto, R., P. K. Chhonkar, D. Singh, and A. K. Patra. 2006. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long-term field trial on a sub-tropical inceptisol. *Soil Biol. Biochem.* 38:1577-1582.
- Feng, X. and M. J. Simpson. 2009. Temperature and substrate controls on microbial phospholipid fatty acid composition during incubation of grassland soils contrasting in organic matter quality. *Soil Biol. Biochem.* 41:804-812.
- Fredrik D., L. O. Nilsson, and E. Bååth. 2008. Bacterial and fungal response to nitrogen fertilization in three coniferous forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 40:370-379.
- Frey, S. D., R. Drijber, H. Smith, and J. Melillo. 2008. Microbial biomass, functional capacity, and community structure after 12 years of soil warming. *Soil Biol. Biochem.* 40:2904-2907.
- Garcia-Gil, J. C., C. Plaza, P. Soler-Rovira, A. Polo. 2000. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32:1907-1913.
- Goyal, S., K. Chander, M. C. Mundra, and K. K. Kapoor. 1999. Influence of inorganic fertilizers and organic amendment on soil organic matter and soil microbial properties under tropical conditions. *Biol. Fertil. Soils* 29:196-200.
- 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.

- Han, K. H., W. J. Choi, G. H. Han, S. I. Yun, S. H. Yoo, and H. M. Ro. 2004. Urea-nitrogen transformation and compost-nitrogen mineralization in three different soils as affected by the interaction between both nitrogen inputs. *Biol. Fertil. Soils* 39:193-199.
- Han, S. G. 2006. Effects of long-term non-fertilization of nitrogen, phosphorus and potassium on soil chemical properties, three nutrition and productivity of Satsuma Mandarin (*Citrus unshiu* Marc.). *Ph. D. Thesis. Cheju National University. Jeju, Korea.*
- Hu, C. and Z. Cao. 2007. Size and activity of the soil microbial biomass and soil enzyme activity in long-term field experiments. *World J. Agri. Sci.* 3:63-70.
- Ibekwe, A. M. and A. C. Kennedy. 1998. Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions. *Soil Biol. Biochem.* 26:151-163.
- Joergensen, R. G. 1996. Quantification of the microbial biomass by determining ninhydrin-reactive N. *Soil Biol. Biochem.* 28:301-306.
- Kandeler, E. and H. Gerber. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soil* 6:68-72.
- Kaur, A., A. Chaudhary, R. Choudhary, and R. Kaushik. 2005. Phospholipid fatty acid-A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* 89:1103-1112.
- Kemmitt, S. J., D. Wright, K. W. T. Goulding, and D. L. Jones. 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 38:898-911.
- Klose, S. and M. A. Tabatabai. 2000. Urease activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biol. Fertil. Soils* 31:191-199.
- Langer, U. and T. Gunther. 2001. Effects of alkaline dust deposits from

- phosphate fertilizer production on microbial biomass and enzyme activities in grassland soils. *Environmental Pollution* 112:321-327.
- 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.
- Lobell, D. B. 2007. The cost of uncertainty for nitrogen fertilizer management: A sensitivity analysis. *Field Crops Rese.* 100:210-217.
- Marschner, P., E. Kandeler, and B. Marschner. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35:453-461.
- Melero, S., K. Vanderlinden, J. C. Ruiz, and E. Madejo. 2009. Soil biochemical response after 23 years of direct drilling under a dryland agriculture system in southwest Spain. *J. Agri. Sci.* 147: 9-15.
- Metting, F. B. Jr. 1992. Soil microbial ecology : applications in agricultural and environmental management. Marcel Dekker. New York.
- Nanzyo, M. 2002. Unique properties of volcanic ash soils. *Glob. Environ. Res.* 6:99-112.
- NIAST. 2003. Monitoring project on agri-environment quality in Korea. *NIAST, RDA.*
- Nira, R. 2003. Microbial, physical, and chemical factors causing higher gross rate and lower net rate of nitrogen mineralization in volcanic ash soils than in alluvial soils in the Tokachi district. *Soil Sci. Plant Nutr.* 49:417-423.
- Parham, J. A., S. P. Deng, and W. R. Raun. 2003. Long-term cattle manure application in soil. Part II: effect on soil microbial populations and community structure. *Biol. Fertil. Soils* 38:209-215.
- Peng, S., D. M. Eissenstat, J. H. Craham, K. Williams, and N. C. Hodge. 1993. Growth depression in mycorrhizal citrus at high-phosphorus supply. *Plant Physiol.* 101:1063-1071.

- Powlson, D. S., P. Brookes, and B. T. Christensen. 1987. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biol. Biochem.* 19:159-164.
- Prosser, J. I., 2002. Molecular and functional diversity in soil microorganisms. *Plant Soil* 244:9-17.
- Puglisi, E., M. Nicelli, E. Capri, M. Trevisan, and A. A. M. Del Re. 2005. A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere* 61:1548-1557.
- Quilchano, C. and T. Maranon. 2002. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biol. Fertil. Soils.* 35:102-107.
- 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.
- Rahman, M. H. and S. Sugiyama. 2008. Dynamics of microbial community in Japanese andisol of apple orchard production systems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39:1630-1657.
- Rillig, M. C. 2004. Arbuscular mycorrhizae, glomalin and soil quality. *Ca. J. Soil Sci.* 84:355-363.
- RDA. 1988. Methods for chemical analysis of soil. Institute of agricultural technology.
- Sardans, J., J. Penuelas, and M. Estiarte. 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Appl. soil ecol.* 39:223-235.
- Shrestha, Y. H., T. Ishii, I. Matsumoto, and K. Kadoya. 1996. Effect of vesicular - arbuscular mycorrhizal fungi on satsuma mandarin tree growth and water stress tolerance and on fruit development and quality. *J. Jpn Soc. Hortic. Sci.* 64:801-807.
- Song, K. C. 1990. Andic properties of major soils in Cheju island. *Ph. D.*

- Thesis. Seoul National University. Suwon, Korea.*
- Timothy, R. K. and R. P. Dick. 2004. Differentiating microbial and stabilized β -Glucosidase activity relative to soil quality. *Soil Biol. Biochem.* 36:2089-2096.
- Vance, E. D., P. C. Brookes, and D.S. Jenkinson. 1987. Microbial biomass measurements in forest soils : the use of the chloroform fumigation incubation method in strongly acid soils. *Soil Biol. Biochem.* 19:697-702.
- White, D. C., H. C. Pinkart, and D. B. Ringelberg. 1996. Biomass measurements: biochemical approaches. In: Hurst, C. J. (Ed.), *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, D. C., pp. 91-101.
- Xu, D. M., W. L. Liu, G. S. Liu, and W. P. Liu. 2007. Effects of Hg and Cu on the activities of soil acid phosphatase. *J. Zhejiang Uni. Science A.* 8:1157-1163.
- 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.
- Yu, G., H. Fang, L. Gao, and W. Zhang. 2006. Soil organic carbon budget and fertility variation of black soils in Northeast China. *Ecolo. Res.* 21:855-867.
- Zelles, L., Q. Y. Bai, T. Beck, and F. Beese. 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 24:317-323.

제 2 장 감귤원토양의 세균 군집구조와 다양성

ABSTRACT

This study carried out to evaluate the effect of the long-term(16 yrs) different fertilization management on bacterial group changes, species richness estimators, diversity indices, and community structures in volcanic ash citrus orchard soil. Experiment plots composed no-fertilization(Control), Compost, half of recommend application plus Compost(1/2NPK+Compost), recommend application(NPK), recommend application plus Compost(NPK+Compost), 3 times recommend application(3NPK). Soil samples were taken earlier in May and September, 2010.

Rarefaction curves at the 97% sequence similarity showed that distribution range of a clone and the OTUs were high in 1/2NPK+Compost, which were at 5,769-7,982 and 2,181-4,112 in May, respectively. Species richness estimators of Ace, Chao1, and Shannon diversity indices showed higher in 1/2NPK+Compost than other treatments, which were 19,361, 6,428, 10,906, 7.8, respectively.

In phylum level, The most abundant bacterial group were *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* and those occupied at 58.0-82.9% among the soil-borne bacterial community in citrus orchard soil. In genera level, The dominant bacteria group were *Pseudolabrys*, *Bradyrhizobium*, *Arthrobacter*, which were distributed range at 16.1-32.1%. Bacterial diversity showed seasonal changes and that were more diverse in genera than phylum level.

Soil pH showed a positive correlated with Ace, Chao1 richness estimators($p < 0.05$) and Shannon diversity indices ($p < 0.01$). But exch. Al was negatively correlated with those ($p < 0.05$).

In conclusion, Bacterial community diversity affected by volcanic ash characteristics and pH changes in citrus orchard soil.

I. 서 론

토양에서 유기물은 분해가 되어 작물과 미생물의 양분이 된다. 미생물은 공급된 양분을 이용하여 개체수가 증가하고 물질순환에 중요한 역할을 수행한다. 질소를 고정하고 유기물을 분해하는 미생물에 대하여 많은 보고가 있었지만, 이러한 미생물이 얼마나, 어떻게 분포하고 있는지에 대한 연구는 아직도 진행 중에 있다(Hill et al., 2003; Morris et al., 2002).

대부분의 미생물은 육안으로 볼 수가 없기 때문에 배지를 이용하여 종류와 개체수를 파악한다. 그러나 배양법은 배지 조성, 배양 방법, 생육조건 등이 미생물의 다양한 생육조건을 충족시킬 수 없기 때문에 전체적인 개체수와 종류를 파악하는데 어렵고 제한적인 정보만 얻을 수 있다(Torsvik et al., 2002).

비배양법은 배양법의 이러한 한계를 극복하고 미생물의 군집구조와 다양성 등을 평가할 수가 있다(Janssen, 2006). 미생물 군집 분석은 시료 속의 미생물 종류와 양을 알아내는 것을 말한다. 여기에는 PCR로 16S rRNA gene을 증폭한 다음에 전기영동을 하는 DGGE, TGGE, t-RFLP, SSCP 등 핵산지문법이 있다. 이들 방법은 전기영동 후 길이나 염기서열 차이에 따라 겔(gel) 상의 밴드나 크로마토그램의 형태가 다르게 나타나는 것을 이용하여 미생물 군집의 다양성과 유형을 평가할 수 있다. 저비용으로 많은 시료를 비교 분석할 수 있지만, 결과를 데이터베이스화하기 어려운 단점을 가지고 있다. 또한 군집 구성의 변화를 볼 때는 유리하지만, 정확한 종의 동정을 위하여 많은 시간과 노력이 소요되며 밴드패턴을 해석하기가 어렵다.

최근에 분자생물학 기술의 발달로 이러한 문제를 해결할 수 있는 기술로 차세대염기서열분석방법이 의학, 환경, 농업 등 다양한 분야에 접목되어 활용되고 있다. 이 방법은 Clone library에 필수적인 대장균을 이용한 클로닝 단계가 필요 없어 기존의 Sanger 분석방법으로 힘든 미생물도 검출이 가능하고, 동시에 많은 양의 시료를 분석할 수 있다. 또한 비용이 훨씬 저렴하고 100-250 bp를 읽을 수 있어 직접적이고 정확한 군집 해석이 가능하다(<http://www.chunlab.com/>).

차세대염기서열(Pyrosequencing)분석방법은 염기서열을 분석하여 미생물의 종류와 분포비율을 평가함으로써 세균과 사상균의 군집구조와 다양성을 해석 하

는 방법이다(Devine et al., 2004; Liu et al., 2007; Huse et al., 2007; Roesch et al., 2007). 시료로부터 사실에 근접한 보다 많은 정보를 정확하게 얻기 위하여 세균이나 사상균의 데이터베이스를 활용할 수 있으며, 미생물의 군집 변화와 다양성을 평가 할 수 있어 시비관리나 토양관리 방법에 따른 미생물의 다양성을 평가 할 수 있는 장점이 있다.

농업은 토양 세균군집구조와 구성에 있어 주요한 변화를 가져온다(Buckley and Schmidt, 2003). 퇴비나 화학비료의 시비량, 장기 연용 등은 세균의 군집과 구성에 영향을 줄 수 있다. 그러나 어떤 종류가 우점 하는지, 시기별 변화나 시비관리에 따른 차이는 어떻게 나타나는지에 대하여 배양의존 방법으로는 알 수가 없다.

세균은 토양에서 가장 풍부하고 다양한 군집을 형성한다(Gans et al., 2005; Lauber et al., 2009). 토양세균군집의 특이적인 변화는 적은 토양 시료 수나 많은 시료수를 분석하는데 맞춰 있어 세균군집구조의 계통도에 대한 정보를 적게 제공하기 때문에 이해하기 어렵다. 토양에서 세균은 종풍부도가 가장 높다(Devine et al, 2004). Gans et al.(2005)에 따르면 세균은 토양 1g 당 2,000-830 만종이 분포하고 있으며, 토양에서 추출된 DNA의 16S rRNA 염기서열 분석과 통계적 추론으로 세균군집의 다양성을 평가 할 수 있다(Gans et al., 2005; Jaspers and Overmann, 2004). 그러나 제한된 시료량으로 특정지점의 세균다양성을 평가하는 데는 많은 어려움이 따른다. 가장 중요한 점은 시료가 대표성을 가지고 있어야 하며 샘플의 크기가 적절해야 한다는 것이다. 이러한 점에서 현재 실내배양 방법을 이용한 세균군집의 평가는 많은 노력이 소요되고 또한 실험수행자의 숙련도, 시료조제, 실험과정에 의해 데이터의 신뢰도가 떨어질 수 있다는 단점이 있다.

Youssef and Elshahed(2008)는 실제에 가까운 종풍부도를 rarefaction curves 와 Ace 풍부도 추정치를 이용하여 산출하였다. 세균의 다양성평가는 총 개체수와 총 종수만을 가지고 군집 상태를 나타내는 균등도(Evenness index), 각 지수의 최대치에 대한 실제치의 비로서 표현되는 종풍부도(Richness index), 조사지점에서 출현하는 각 종들이 편중 또는 분산 여부를 평가하는 우점도(Dominance index) 3가지 방법이 있다. 여러 연구자들이 토양 미생물군집구조(Fierer et al.,

2007), 농경지와 산림토양 간의 미생물군집 다양성 차이, 계절적 변화(Buckley and Schmidt, 2003; Upchurch et al., 2008), 고산토양 세균군집의 계절적 변화(Lipson and Schmidt, 2004), 세균군집을 이용한 생태적 다양성 평가(Hill et al., 2003), 황사와 대기권의 세균군집구조와 다양성(Weon, 2010), 확률적 풍부도 모델을 이용한 세균종수 추정(Chao and Bunge, 2002)에 대하여 보고한 바 있다. 토양관리와 경지이용은 토양 세균다양성에 영향을 주며(Martinez et al., 2008; Roesch et al., 2007), 토양의 세균 다양성은 pH와 상관관계가 높았다고(Lauber et al., 2009)하였다. Fierer et al.(2007)은 토양화학성과 6개 우점 세균문(*Acidobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, α , β -*Proteobacteria*)의 상대적 풍부도간에는 상관관계가 높았으며, 생물학적, 환경적인 요인들은 세균의 생존과 군집구조에 영향을 준다(Langenheder et al., 2006)고 하였다.

토양유형은 근권에서 미생물 군집구조를 결정하는 중요한 요인이 된다(de Ridder-Duine et al., 2005; Nunan et al., 2005). 화산회토양은 알루미늄 독성과, 인산이 부족하기 때문에 미생물활성이 낮다(Deenik, 2006; Nanzyo, 2002). 하지만 토양생태계에서 많은 미생물들이 환경변화에 적응하면서 물질순환에 중요한 역할을 하고 있다.

화학농자재 시용과 토양관리에 따른 미생물의 다양성 평가는 토양의 건전성과 비옥도를 평가하고 토양의 상태를 진단하는데 중요하다. 토양 미생물의 구성과 기능을 알기 위하여 시기별로 토양관리에 따른 미생물의 생태적 변화에 대한 접근이 필요하다. 따라서 기존의 방법보다 시료로부터 많은 양의 데이터를 수집하고, 수집된 정보를 체계적으로 분석하는 신뢰성이 향상된 방법의 적용이 필요하다. 자연계에서 배양되지 않는 수많은 미생물은 염기서열 분석을 통하여 찾을 수 있는데, Tringe et al.(2005)은 특이한 유전자 염기서열을 분석함으로써 환경을 진단하고 해석할 수 있다고 하였다. 시비나 토양관리는 토양미생물의 군집과 다양성에 상당한 영향을 미친다. 화산회토양 감골원의 세균 군집구조와 분포비율, 풍부성, 다양성 등에 관한 생태학적 연구는 거의 없다.

본 연구는 16년간 퇴비와 화학비료 시비량을 다르게 하여 동일하게 관리한 감골원 토양에서 시비관리 방법에 따른 시기별 세균의 개체군, 종풍부도와 다양성 지수, 세균군집 분포에 대하여 평가하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료채취 및 전처리

16년간 퇴비와 화학비료 시비량을 다르게 하여 제1장에서 서술한 바와 같이 관리 되어온 동일 장소에서 토양시료를 채취하여 시험을 수행하였다. 토양시료는 2010년 5월과 9월 상순에 채취 후 잘 혼합하여 2 mm체를 통과 시켜 습토상태로 -80℃에서 냉동보관 후 차세대염기서열분석을 하였으며, 나머지는 풍건 후 토양 화학성 분석에 이용하였다.

2. 토양화학성 분석

토양 이화학성분은 농촌진흥청 표준분석법(RDA, 1988)에 준하여 pH는 토양과 증류수의 비율을 1:5로 희석하여 측정하였다. 유기물함량은 Walkley-Black법, 전 질소함량은 Kjeldahl법, 유효 인산은 Bray. No-1법, 치환성 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등의 양이온은 1N NH_4OAc (pH 7.0)침출법을 이용하였다. 치환성 알루미늄은 토양 10 g에 0.2 M Ammonium oxalate/oxalic acid 용액 50 mL를 넣고 1시간 동안 30℃에서 200 rpm으로 진탕 후 여과하여 ICP(GBC, Integra XL)를 이용하여 분석하였다.

시험에 사용한 토양의 화학적 성질은 시기별로 차이가 뚜렷하였다(Table 1, 2). 우분퇴비를 시용한 퇴비구와 화학비료 시비량이 많은 표준시비 3배구에서 시기별로 pH 변화가 컸다. 유효인산, 치환성 칼륨, 칼슘, 마그네슘함량은 비료를 주지 않은 시험구가 가장 낮았고, 표준시비 3배구에서 높았다. 치환성 알루미늄함량은 9월이 5월보다 많았다.

Table 1. Chemical properties of soil used this experiment in May

Treatment	pH	O.M. g kg ⁻¹	Av.P ₂ O ₅ mg kg ⁻¹	Exch. Cations			Exch.Al mg kg ⁻¹
				K	Ca	Mg	
				-- cmol ⁺ kg ⁻¹ --			
Compost	6.0	137.0	216.0	0.74	8.1	2.0	384.6
1/2NPK+Com.	5.9	137.1	227.3	0.62	10.7	2.8	329.3
NPK+Com.	6.0	128.6	200.3	0.63	12.0	3.1	374.1
NPK	6.0	135.2	290.7	0.45	12.1	2.7	401.8
3NPK	6.2	126.5	349.2	0.56	12.6	4.6	455.9
Control	5.6	133.5	58.7	0.30	3.7	0.9	442.6

Table 2. Chemical properties of soil used this experiment in September

Treatment	pH	O.M. g kg ⁻¹	Av.P ₂ O ₅ mg kg ⁻¹	Exch. Cations			Exch.Al mg kg ⁻¹
				K	Ca	Mg	
				-- cmol ⁺ kg ⁻¹ --			
Compost	5.4	134.0	149.7	0.37	7.2	1.4	526.3
1/2NPK+Com.	6.0	136.0	250.2	0.38	7.3	2.2	489.8
NPK+Com.	5.8	132.9	456.4	0.61	14.5	3.8	459.5
NPK	5.8	135.4	269.0	0.36	12.4	2.7	611.1
3NPK	5.6	133.1	686.5	1.03	20.7	5.6	552.7
Control	5.4	134.6	109.1	0.28	4.4	1.1	552.2

3. 차세대염기서열(Pyrosequencing)분석

가. 토양 DNA 추출

토양 DNA 추출은 Ultra Clean soil DNA isolation 키트(MoBio Inc., USA)를 이용하였다. 동결된 토양 0.3 g을 2 mL bead solution tube에 넣고 5초간 잘 혼합한 후 S1 용액, IRS(Inhibitor Removal Solution)용액, S2 용액 250 uL 첨가하고, 5초 동안 잘 혼합한 후 4°C에서 5분 동안 배양하였다. 이후 키트사용방법에 따라 원심분리를 하고 차례로 S3, S4, S5 용액을 가한 후 DNA를 회수하여 -20°C에 저장하였다.

나. DNA 추출 확인

1% Agarose gel을 제조 후 genomic DNA를 loading하여 100 V에서 2시간 동안 전기영동한 후 Ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다.

다. 16S rRNA PCR 증폭

FLX Amplicon 시퀀싱을 위하여 PCR 혼합물을 Table 3과 같이 조제 후 mixture 49 uL을 PCR tube에 넣었다. 그런 다음 template DNA를 1 uL씩 넣고 잘 섞이도록 피펫 한 후 30초간 잘 혼합하였다. 혼합 후 PCR 기기에 넣고 94°C에서 5분간 초기배양 후 94°C(30초)에서 denaturation, 60°C(45초)에서 annealing 후 72°C에서(1분30초) extention를 10회 수행하였다. 이후 다시 94°C(30초)에서 denaturation, 55°C(45초)에서 annealing, 72°C에서(1분30초) extention를 20회 증폭과정을 거쳐 4°C에서 반응을 종료 하였다. PCR증폭은 세균 16S rRNA 분석을 위하여 특별히 제작된 fusion primers를 사용하였으며 Tags-linker(AC)-27f forward:CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGACGAGTTTGATCMTGGCTCAG, Tags-linker (AC)-518r Reverse:CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGATCAGCACACWTTACCGCGGCTGCTGG를 이용하였다. PCR(PTC-200, Applied Biosystems, USA) 증폭 후 DNA시료를 120 V에서 30분 동안 전기영동하여 PCR이 잘 수행 됐는지 확인하였다. 이후 QIAperp spin kit(QIAGEN Inc.)를 이용하여 PCR산물을 정제하였다.

Table 3. PCR mixture

Ingradiant	Concentration	Volume(uL)
PCR buffer(10 x) + MgCl ₂	10 x	5
dNTPs	10 mM	1
Primers (Forward/Reverse)	20 pM/uL	2
Taq Polymerase	5U/uL	0.25
Template DNA	100 ng	1
ddH ₂ O		40.75
Total		50

라. Pyrosequencing 분석

PCR 증폭 산물을 454 Life science genome sequencer(model FLX Titanium)를 이용하여 Chunlab Inc.(Korea)에서 분석을 수행하였다. Pyrosequencing 분석은 Chunlab (<http://www.chunlab.com/>)에서 제시한 방법을 따랐으며 분석과정을 Fig. 1에 나타냈다.

4. 통계분석

SAS Enterprise guide 4.2(SAS Inst., Cary, NC, USA)를 이용하여 토양화학성과 Ace, Chaol, Shannon 지수에 대하여 유의수준 1%와 5%에서 상관계수를 분석하였다.



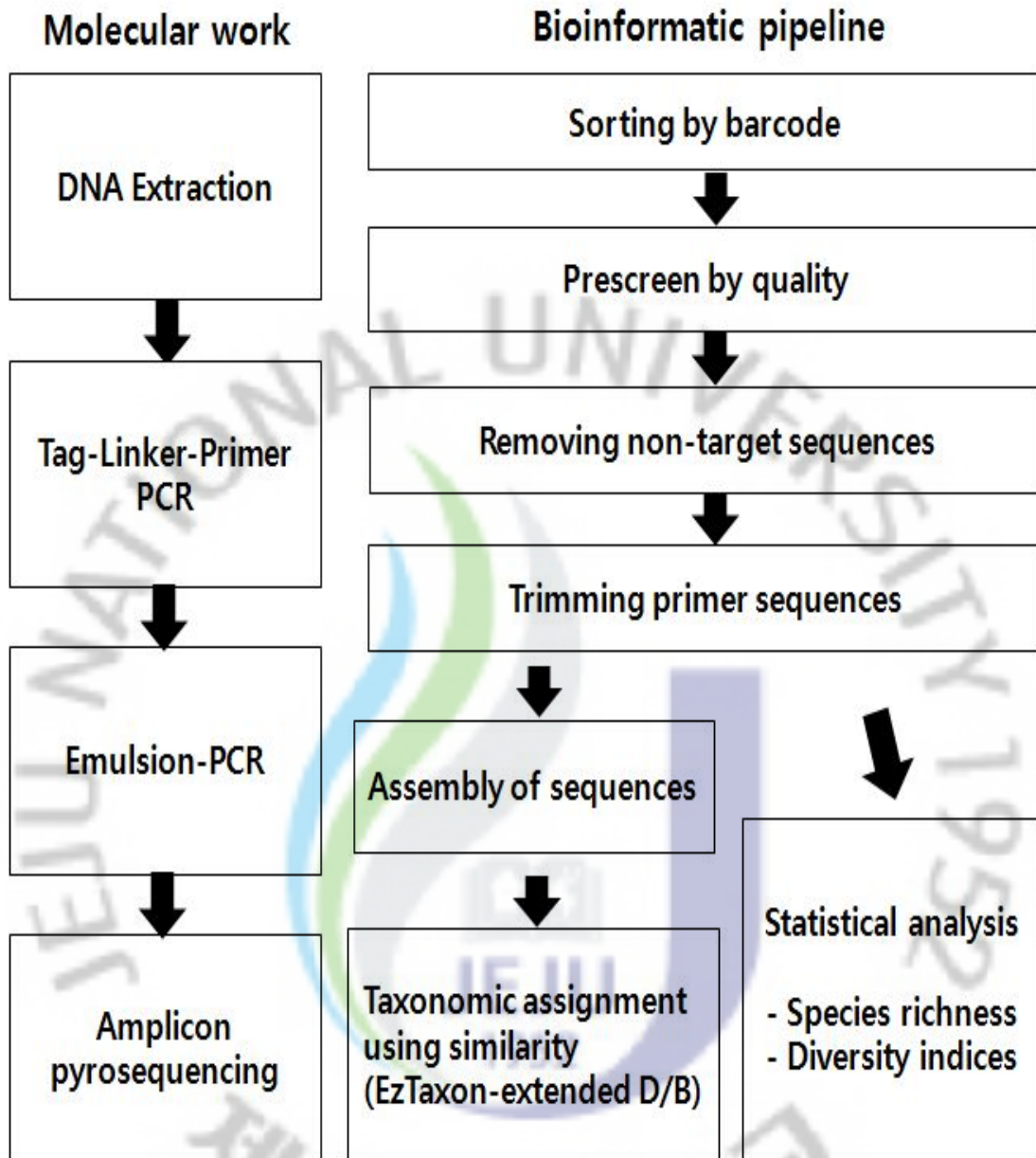


Fig. 1. Pyrosequencing workflow(Left column:Molecular workflow, Right column:Computational workflow).

III. 결과 및 고찰

1. 세균군집의 종풍부도와 다양성 지수

Rarefaction curves는 시료간 분석된 파이로시퀀스를 기반으로 하여 분석된 염기서열 수에 따른 OTU의 개수를 그래픽으로 표현하여 다양성을 직관적으로 관찰할 수 있는 방법이다. 즉 그래프의 기울기가 크고 작게 나타난 정도에 따라 종 다양성이 크고 작은지를 예상 할 수가 있다. OTUs는 염기서열간 유사도를 기반으로 하여 그룹핑한 염기서열 집단으로 특정 분류군의 개념으로 사용된다. 97% 염기서열 유사도를 나타내는 rarefaction curves는 시기별 차이가 크게 나타났다(Fig. 2, 3). 5월에 분석된 파이로시퀀스수(clone)는 5,769-7,982, OTUs는 2,181-4,112개의 분포를 보였다(Fig. 2). Rarefaction curves에서 분석된 시퀀스 당 OTUs(97% 유사도 수준)는 화학비료 표준시비량의 반량을 주고 우분퇴비를 사용한 구에서 가장 많았다. 시험구별로는 표준시비구>표준시비+퇴비구>표준시비 3배구>무비료구>퇴비구 순으로 퇴비구가 가장 적었다.

9월은 염기서열 분석된 파이로시퀀스수는 3,146-6,808, OTUs는 1,320-3,277개의 분포를 나타냈다(Fig. 3). Rarefaction curves의 기울기는 1/2표준시비+퇴비구>표준시비+퇴비구>표준시비구>표준시비 3배구>퇴비구> 무비료구 순으로 비료를 주지 않은 무비료구가 가장 완만하였다.

분석된 파이로시퀀스의 다양성은 시기에 상관없이 1/2표준시비+퇴비구가 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 시기별 토양 온도, 수분함량, 치환성 알루미늄 함량, pH 등의 변화에 기인하는 것으로 생각된다. 토양 온도와 수분함량은 세균의 생존과 군집구조에 영향을 주며(Langenheder et al., 2006; Roesch et al. 2007), 화산회토양은 알루미늄 독성에 의하여 미생물 활성이 낮다(Deenik, 2006; Nanzyo, 2002)고 하였다.

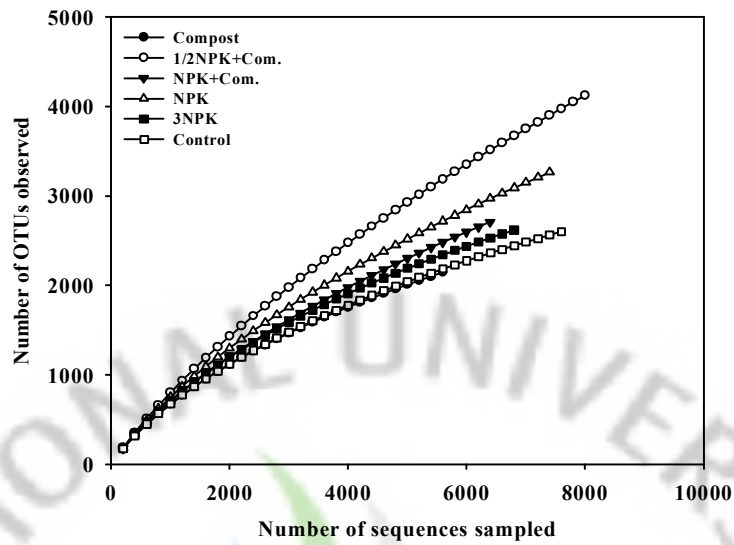


Fig. 2. Rarefaction curves at the 97% sequence similarity level analyzed from the Mothur program in May. Data for the curves represent an average of 1,000 simulations performed using the software Mothur.

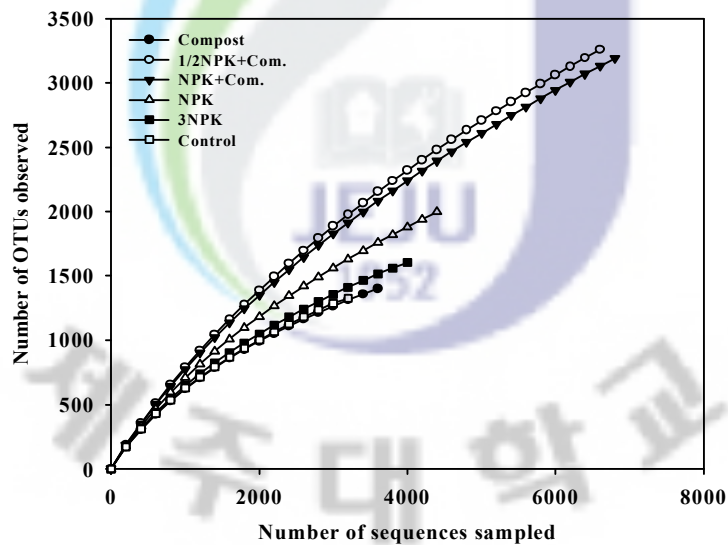


Fig. 3. Rarefaction curves at the 97% sequence similarity level analyzed from the Mothur program in September. Data for the curves represent an average of 1,000 simulations performed using the software Mothur.

Ace, Chaol, Shannon은 종풍부도와 다양성을 나타내는 지수로 사용된다. Table 4는 OTUs, Ace, Chaol, Shannon 등을 이용하여 세균의 종풍부도를 추정하고 다양성지수를 산출한 결과를 나타냈다. 염기서열 분석된 clones수는 5월과 비교하여 9월에 무비료구, 표준시비 3배구, 표준시비구가 많이 감소하였다. 이것은 미생물 몸체구성 성분인 질소, 인산비료의 시비가 미생물생장에 필요한 양분의 공급과 토양화학성에 영향을 주기 때문으로 생각된다. 질소 비료의 지속적인 연용은 세균군집구조에 영향을 주어 세균 미생물체량이 40% 감소하였으며 (Clegg, 2006), Kermmit et al.(2006)은 pH변화가 미생물기능에 크게 영향을 준다고 하였다. 지속적인 시비관리로 미생물군집이 단순화되고, 토양적인 특성에 기인하여 다양성이 낮아진 것으로 생각된다.

종풍부도를 나타내는 Ace, Chaol 추정치와 Shannon 다양성지수는 5월이 9월보다 높았으며 1/2표준시비+퇴비구가 가장 높았다. 5월과 9월에 Ace 추정치는 1/2표준시비+퇴비구가 각각 19,361, 11,042로 표준시비 3배구와 퇴비구보다 3배정도 높았다.

5월에 Chaol 추정치는 1/2표준시비+퇴비구가 10,906로 퇴비구 4,163보다 2배, 9월은 7,317로 퇴비구 2,417 보다 약 3배정도 높았다. Shannon 다양성지수는 5월과 9월에 각각 7.8, 7.6였다. Ace 종풍부도 추정치는 Youssef and Elshahed(2008)가 보고한 사실에 근접한 종풍부도 추정샘플크기 33,912개와 비교하였을 때 상당한 차이를 보였다. 추정 OTU수는 무비료구, 퇴비구, 표준시비 3배구가 1,320-1,599로, 토양 1g 당 세균 2,000-830만종(Gans et al., 2005), 2,000-52,000종(Roesch et al., 2007)이 존재할 것이라는 보고와 비교할 때 다양성은 아주 낮았다. 이것은 화산회토양의 특성, pH변화 등에 기인하는 것으로 판단되며(Deenik, 2006; Martinez et al., 2008; Roesch et al., 2007), 계절적 요인을 감안하여 사실에 가까운 세균 군집 다양성에 대한 정보를 얻기 위하여 최대한 많은 OTUs값을 얻을 수 있도록 하는 것이 중요 할 것으로 사료된다.

Hill et al.(2003)은 Chaol 종풍부도 지수는 분석시료의 세균의 분포양상을 나타낸다고 하였는데 표준시비(1/2포함)+퇴비구가 무비료구, 표준시비구, 표준시비 3배구보다 세균 다양성지수가 높게 나타난 것은 유기물과 화학비료로부터 세균생장에 필요한 미량과 다량 무기원소가 공급되어 세균군집구성에 영향을 준 것

으로 생각된다.

농업은 토양에서 작물재배, 토양관리, 경지이용 등 다양한 활동에 의해 세균 군집구조와 구성에 큰 영향을 주고 있다(Buckley and Schmidt, 2003). 토양 세균과 사상균은 환경적으로 비슷하게 영향을 받아(de Ridder-Duine et al., 2005; Nunan et al., 2005), 사상균 군집구조와 구성도 세균의 경우와 유사할 것으로 추정된다. 이것은 감귤원토양의 미생물 다양성을 높이기 위해서 화학비료 단용보다는 화학비료와 유기물 혼용의 시비관리가 필요하다는 것을 시사한다.



Table 4. Bacterial richness estimators and diversity indices as affected by different fertilization management practices in citrus orchard volcanic ash soil

Community	Total no. of reads		No. of OTUs		Ace		Chao1		Shannon index		Coverage (%)	
	May	Sept.	May	Sept.	May	Sept.	May	Sept.	May	Sept.	May	Sept.
Compost	5,769	3,604	2,181	1,399	5,816	3,220	4,163	2,417	7.1	6.7	78.4	79.0
1/2NPK+Compost	7,982	6,677	4,112	3,277	19,361	11,042	10,906	7,317	7.8	7.6	63.6	68.1
NPK+Compost	6,540	6,808	2,743	3,191	10,086	1,0819	6,249	7,195	7.3	7.6	72.9	70.0
NPK	7,390	4,394	3,257	1,990	11,920	6,428	7,471	4,285	7.5	7.1	71.5	71.9
3NPK	6,936	3,966	2,642	1,599	6,586	4,295	4,744	2,960	7.3	6.8	78.7	76.9
Control	7,699	3,146	2,608	1,320	6,749	3,748	4,636	2,637	7.1	6.7	81.3	75.3

Estimates of Chao1 richness, Ace richness, Shannon index were all based on 3% differences in nucleic acid sequence alignments. Numbers were calculated from the Mothur program.

2. 분류군별 세균군집의 시기별 변화

문(Phylum) 수준에서 처리간 우점세균의 상대적 풍부도 비교는 토양관리와 경지이용, 토양양분의 무기화정도를 이해하는데 사용될 수 있다(Fierer et al., 2007; Martinez et al., 2008; Roesch et al., 2007). 문 수준에서 시기별로 우점세균의 상대적인 풍부도를 분석한 결과는 Fig. 4에 나타났다. 5월에 세균 문별 풍부도는 *Proteobacteria*>*Acidobacteria*>*Actinobacteria*>*Bacteroidetes*>*Chloroflexi*>*Gemmatimonadetes*>*Nitrospirae*>*Planctomycetes*>*Thermobaculum* 순이었다. 주요 세균 문중 *Proteobacteria*는 34.9-41.9%를 점유하였으며, 무비료구에서 41.9%로 가장 높았다. *Acidobacteria*는 15.5-22.7%범위를 보였고, 퇴비구가 22.7%로 높았다. *Actinobacteria*는 10.5-14.9%를 차지하였으며, 처리구 중 표준시비+퇴비구가 14.9%로 높았다. *Bacteroidetes*는 2.5-4.7%, *Chloroflexi*는 2.5-6.2%, *Firmicutes*는 0.7-1.5%, *Gemmatimonadetes*는 2.6-5.2%, *Nitrospirae*는 1.0-4.5%, *Planctomycetes*는 2.2-3.8%, *Thermobaculum*는 0.6-1.5% 범위를 나타냈다. 나머지 8.0-11.4%는 기존의 어떤 문으로도 분류할 수 없는 세균이 차지하였는데, 표준시비+퇴비구가 11.4%로 높았다.

9월은 *Proteobacteria*>*Acidobacteria*>*Actinobacteria*>*Chloroflexi*>*Gemmatimonadetes*>*Planctomycetes*>*Nitrospirae*>*Bacteroidetes*>*Firmicutes*>*Thermobaculum*>*Cyanobacteria*>*Verrucomicrobia* 순으로 분포하였다. 주요 세균 문중 *Proteobacteria*는 37.7-45.4%를 점유하였고, 퇴비구가 45.4%로 가장 높았다. *Acidobacteria*는 12.2-20.4% 분포범위를 보였으며, 무비료구가 20.4%로 높았다. *Actinobacteria*는 8.1-17.1% 를 차지하였고, 표준시비+퇴비구가 17.1%로 높았다. *Chloroflexi*는 5.1-8.1%, *Gemmatimonadetes*는 3.3-5.4%, *Planctomycetes*는 2.1-4.5%, *Nitrospirae*는 1.7-3.9%, *Bacteroidetes*는 1.7-3.6% 범위로 분포하였다. *Firmicutes*는 1.4-1.7%로 1/2표준시비+퇴비구가 높았으며, 퇴비구는 아주 적게 분포하였다. *Thermobaculum*는 1.0-2.2%, *Cyanobacteria*는 무비료구와 1/2표준시비+퇴비구가 1.1%, *Verrucomicrobia*는 무비료구가 1.1% 차지하였다. 나머지는 5.8-8.9%로 퇴비구가 기존의 어떤 문으로도 분류할 수 없는 세균이 차지하는 비율이 높았다. 방선균(*Actinobacteria*)은 5월에 표준시비 3배구가 16%, 9월은 표준시비+퇴비구가 17%로 가장 높았다. 질소순환에 관여하는 *Nitrospirae*은 퇴

비구가 5월에 4.5%, 9월에 3.9%를 차지하였다.

Alphaproteobacteria, *Betaproteobacteria*, *Bacteroidetes*를 농경지토양에서 가장 풍부한 세균그룹으로 보고한 Gans et al.(2005)이 결과와는 차이가 있었다. 조사결과 감귤원 토양은 *Acidobacteria*, *Actinobacteria*의 우점 비율이 높았는데, 이것은 시비방법, 계절적인 요인, pH에 기인하는 것으로 생각된다. Nanzyo(2002)는 Andisol 토양은 혐기성세균과 방선균이 많았으며, Buckley and Schmidt(2003)는 α -*Proteobacteria*, β -*Proteobacteria*, *Actinobacteria* 등 주요 세균그룹은 농업생태계 토양에서 계절적으로 변화하고, 세균군집의 상대적 풍부성은 포장관리 영향을 받는다고 하였다. Lauber et al.(2009)은 *Acidobacteria*, *Actinobacteria*의 분포는 토양 pH에 따라 상당한 차이를 나타냈다고 하였다.

이상의 결과 퇴비와 화학비료 시비량을 다르게 하였을 때 *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria* 세균문은 5월에 60.9-79.5%, 9월에 58.0-82.9%로 전체의 약 58.0-82.9%를 우점하였고, 농경지 이용, 토양관리 등 환경적인 요인들이 세균의 생존과 군집구조에 영향을 주는 것으로 생각된다.

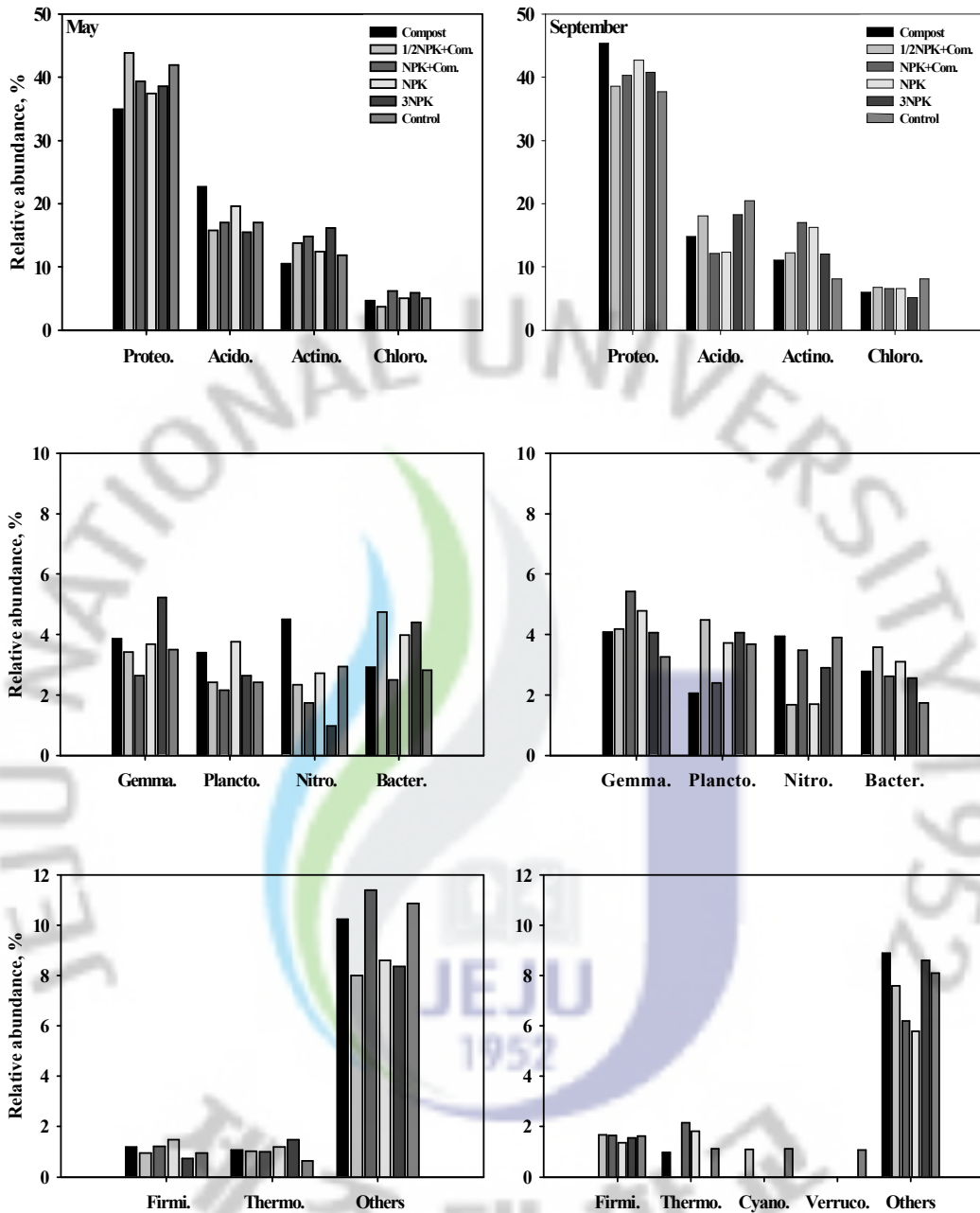


Fig. 4. Seasonal changes of relative abundance of dominant bacterial phylla as affected by 16 years different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil(Proteo.:*Proteobacteria*; Acido.:*Acidobacteria*; Actino.:*Actinobacteria*; Chloro.:*Chloroflexi*; Gemma.:*Gemmatimonadetes*; Nitro.:*Nitrospirae*; Firmi.:*Firmicutes*; Bacter.:*Bacteroidetes*; Plancto.:*Planctomycetes*; Thermo.:*Thermobaculum*; Cyano.:*Cyanobacteria*; Verruco.:*Verrucomicrobia*).

5월에는 지온이 상승하면서 3월에 시비한 양분이 가용화되어 감귤나무의 양수분 흡수가 활발한 시기이다. Table 5는 속(Genera) 수준에서 무비료구 기준 0.1% 이상 점유하는 주요 세균그룹의 상대적인 풍부도 비율을 나타냈다. 5월의 주요 우점 속은 *Pseudolabrys*, *Arthrobacter*, *Acidobacteria*, *Nitrosospira*, *Bradyrhizobium*, *Solibacteres*, *Afipia*였다. *Pseudolabrys*는 2.9-5.6%를 차지하였으며 표준시비+퇴비구가 5.6%로 높았다. *Arthrobacter*는 1.1-3.8% 범위를 차지하였으며 무비료구가 3.8%로 높았다. *Acidobacteria*는 4.1-6.5%, *Nitrosospira*는 0.7-1.9%를 차지하였으며 퇴비구가 각각 6.5, 1.9%로 높았다. *Bradyrhizobium*는 1.0-2.9%, *Solibacteres*는 1.3-4.6 %, *Afipia*는 0.7-2.0%를 점유하였다.

Lipson and Schmidt(2004)는 고산토양의 세균군집은 계절에 따라 변화한다고 하였는데, 토양 양분가용화, 온도, 수분함량 등의 환경요인이 세균분포 변화에 영향을 주는 것으로 생각된다(Langenheder et al., 2006; Roesch et al. 2007). 5월은 속 수준에서 30개 세균그룹이 분포하여 문 수준에서 10개 세균 그룹보다 세균의 다양성이 높게 나타났다. Youssef and Elshahed(2009)는 분류수준(Genera etc.)을 달리 하였을 때 세균다양성과 종풍부도는 다양하였다는 결과와 일치하였다. 하지만 세균 속으로 분류할 수 없는 비율이 5월에 표준시비 3배구 66.3% > 표준시비구 63.0% > 표준시비+퇴비구 62.1% > 1/2표준시비+퇴비구 63.9% > 무비료구 57.0% > 퇴비구 56.9% 순으로 표준시비 3배구가 많았다. 이것은 56.9- 66.3% 정도가 배양할 수 없어, 기존의 어떤 속으로도 분류할 수 없는 세균이 상당히 많다는 것을 의미한다.

Table 5. Relative abundance of dominant bacterial genera by 16 years different fertilization management in citrus orchard volcanic ash soil in May

Genus	Compost	1/2NPK+ Compost	NPK+ Compost	NPK	3NPK	Control
----- % -----						
<i>Pseudolabrys</i>	5.2	4.5	5.6	5.3	2.9	4.5
<i>Arthrobacter</i>	1.2	1.8	1.2	1.1	1.8	3.8
<i>Nitrosospira</i>	1.9	1.0	0.9	1.5	0.7	1.5
<i>Acidobacteria</i> ^a	6.5	2.9	5.9	4.6	4.1	4.3
<i>Koribacter</i> ^a	2.0	1.3	1.8	1.3	0.5	1.9
<i>Solibacteres</i> ^a	4.6	2.2	1.3	3.1	2.3	1.9
<i>Bradyrhizobium</i>	2.0	2.9	1.8	1.5	1.0	2.2
<i>Bradyrhizobiaceae</i>	0.4	1.6	0.6	0.5	0.1	0.3
<i>Rhodospirillaceae</i> ^a	1.5	0.9	2.0	0.9	0.7	1.8
<i>Afipia</i>	1.7	2.2	1.5	1.1	1.2	2.1
<i>Sinobacteraceae</i> ^a	1.6	0.6	1.7	0.9	0.7	1.2
<i>Acidimicrobiaceae</i> ^a	1.0	0.9	1.2	0.8	0.7	0.9
<i>Betaproteobacteriav</i> ^a	1.4	1.5	1.0	2.0	1.9	1.7
<i>Pseudomonas</i>	0.3	1.0	0.9	0.5	1.2	1.3
<i>Tremblaya</i> ^a	1.3	0.6	0.3	0.6	0.6	0.9
<i>Hyphomicrobiaceae</i> ^a	0.8	0.8	0.9	0.6	0.4	0.6
<i>Tepidimonas</i> ^a	1.1	1.0	0.9	0.9	1.3	1.7
<i>Deltaproteobacteria</i> ^a	0.8	0.5	0.4	0.9	0.5	0.7
<i>Pedomicrobium</i>	0.5	0.5	1.0	0.4	0.6	0.6
<i>Burkholderia</i>	0.3	0.6	0.3	0.4	0.3	1.4
<i>Massilia</i>	0.5	0.6	0.4	0.2	0.8	0.9
<i>Planctomycetaceae</i>	0.7	0.4	0.5	0.7	0.5	0.6
<i>Solirubrobacter</i>	0.5	0.4	0.7	0.6	0.6	0.5
<i>Ktedonobacterales</i> ^a	0.2	0.3	0.8	0.5	0.6	0.6
<i>Rhizobiales</i> ^a	0.8	0.9	0.6	1.2	1.2	0.7
<i>Mesorhizobium</i>	0.1	0.5	0.5	0.3	0.7	0.5
<i>Ferruginibacter</i>	0.1	0.6	0.2	0.3	0.7	0.6
<i>Gemmatimonadetes</i> ^a	2.2	1.6	1.3	2.1	2.8	1.6
<i>Rubrobacterales</i> ^a	1.2	1.5	1.5	1.8	2.1	1.3
<i>Holophagae</i> ^a	0.6	0.3	0.4	0.3	0.1	0.6
Other	56.9	63.9	62.1	63.0	66.3	57.0

^aNot classified at the genus level.

9월에 속(Genera) 수준에서 무비료구 기준 0.1% 이상 분포하는 주요세균그룹의 상대적인 풍부도는 Table 6에 나타났다. 주요 세균 우점 속은 *Pseudolabrys*, *Bradyrhizobium*, *Acidobacteria*, *Koribacter*, *Nitrospirae*, *Rhodospirillaceae*, *Afipia*였다. *Pseudolabrys*는 4.8-6.8%, *Bradyrhizobium*는 1.7-3.5% 분포범위를 보였고 퇴비구가 각각 6.8%, 3.5%를 차지하였다. *Acidobacteria*는 1.6-6.8%, *Koribacter*는 0.6-5.0%, *Nitrospirae*는 0.9-2.8%를 점유하였으며, 무비료구가 각각 6.8%, 5.0%, 2.8%로 가장 높았다. *Rhodospirillaceae*는 0.8-2.7%, *Afipia*는 1.1-1.7%를 점유하였고 퇴비구가 각각 2.7%, 1.7%로 높았다.

9월은 여름철 강우와 지온상승으로 토양의 양분 분해와 이동이 활발하게 일어난다. 이 시기를 지나면서 토양 세균의 구성이나 변화가 활발하게 나타난다고 할 수 있다. 건조와 수분공급은 세균생장을 감소시키고(Bapiri et al., 2010), 온도 등 환경조건은 토양미생물 변화에 영향을 준다(Wu et al., 2010)고 하였다. 속 수준에서 0.1%이상 차지하는 세균그룹이 29개로 문 수준에서 12개 세균그룹 보다 세균의 다양성이 높게 나타났다. 하지만 세균 속으로 분류할 수 없는 비율이 표준시비 3배구 73.4% > 표준시비+퇴비구 71.9% > 1/2표준시비+퇴비구 68.3% > 표준시비구 66.1% > 퇴비구 57.3% > 무비료구 53.2% 순으로 표준시비 3배구가 높았다. 이것은 토양특성, 시비관리, 토양 온도와 수분의 변화 때문으로 생각된다. Marschner et al.(2003)은 가축분뇨와 화학비료 등을 30년간 시용한 경우 세균군집구조는 토양유기탄소함량에 영향을 받는다고 하였는데, 화산회토양의 특성에 기인한 토양 온도가 높아지면서 활성 알루미늄 농도가 증가하여 세균군집이 영향을 받은 것으로 추측된다.

이상의 결과 주요 우점 세균 속 *Pseudolabrys*, *Bradyrhizobium*, *Acidobacteria*는 5월에 8.0-15.0%, 9월에 8.1-17.1%를 차지하여 전체의 약 16.1-32.1%를 점유하였다. 토양 양분가용화, 온도, 수분함량의 변화는 세균 속 수준 분포에 시기별로 영향을 주었으며, 세균 속으로 분류할 수 없는 비율이 5월에 56.9-66.3%, 9월에 53.2-73.4%범위를 차지하였다.

Table 6. Relative abundance of dominant bacterial genera by 16 years different fertilization in citrus orchard volcanic ash soil in September

Genus	Compost	1/2NPK+ Compost	NPK+ Compost	NPK	3NPK	Control
----- % -----						
<i>Pseudolabrys</i>	6.8	5.3	5.5	6.1	4.8	5.4
<i>Bradyrhizobium</i>	3.5	2.5	1.9	2.6	1.7	2.7
<i>Acidobacteriia^a</i>	4.6	3.3	2.4	2.9	1.6	6.8
<i>Koribacter^a</i>	2.6	2.9	1.0	2.8	0.6	5.0
<i>Nitrospirae^a</i>	2.7	0.9	1.9	2.0	1.3	2.8
<i>Rhodospirillaceae^a</i>	2.7	1.3	1.0	1.0	0.8	2.2
<i>Afipia</i>	1.7	1.5	1.3	1.6	1.1	1.2
<i>Rubrobacterales^a</i>	2.2	0.7	0.8	0.9	1.5	1.2
<i>Arthrobacter</i>	0.3	1.5	0.9	0.7	1.3	1.0
<i>Acidimicrobiaceae</i>	1.2	0.6	1.3	0.8	0.9	0.7
<i>Pedomicrobium</i>	0.9	0.3	1.3	0.5	0.8	1.0
<i>Hyphomicrobiaceae^a</i>	0.9	0.6	0.8	0.8	1.1	0.6
<i>Tremblaya^a</i>	1.2	0.6	0.6	0.6	0.3	1.8
<i>Sinobacteraceae^a</i>	1.3	0.6	0.6	0.9	0.6	1.1
<i>Rhizobiales^a</i>	1.1	0.7	0.5	0.6	0.6	0.6
<i>Tepidimonas^a</i>	1.4	1.1	1.1	0.8	1.9	1.0
<i>Deltaproteobacteriia^a</i>	0.8	0.6	0.4	0.9	0.3	0.8
<i>Planctomycetaceae</i>	0.2	1.3	0.2	0.6	0.5	0.6
<i>Betaproteobacteriia^a</i>	0.8	0.9	0.6	1.4	1.1	1.1
<i>Streptomyces</i>	0.1	0.6	0.5	0.5	0.8	0.5
<i>Burkholderia</i>	0.8	0.5	0.1	0.7	0.4	0.8
<i>Acidisphaera</i>	0.8	0.7	0.3	0.4	0.1	0.7
<i>Holophagae^a</i>	0.7	0.4	0.4	0.6	0.2	0.7
<i>Pseudomonas</i>	0.6	0.2	0.1	0.5	0.7	0.7
<i>Solibacteres^a</i>	0.6	0.5	0.7	1.0	0.6	1.2
<i>Ktedonobacteriales^a</i>	1.0	1.1	0.6	0.7	0.5	2.4
<i>Conexibacter</i>	0.4	0.1	0.2	0.5	0.2	0.6
<i>Bacillus</i>	0.1	0.1	0.2	0.2	0.3	0.7
<i>Gemmatimonadetes^a</i>	0.7	0.4	0.7	0.6	0.2	1.1
Other	57.3	68.3	71.9	66.1	73.4	53.2

^aNot classified at the genus level.

3. 토양화학성과 세균다양성간의 상관관계

토양이화학성은 미생물 활성에 영향을 준다. Table 7은 종풍부도 추정치와 다양성지수가 토양 pH와 치환성 알루미늄 함량에 상당히 영향을 받는 것을 보여 준다. 종풍부도 추정치 Ace, Chao1($p < 0.05$), Shannon지수($p < 0.01$)는 토양 pH와 정의 상관관계를 보였다. 그러나 치환성 알루미늄 함량과는 부의 상관관계를 나타냈다($p < 0.05$).

토양 pH가 높을수록 Ace, Chao1, Shannon지수는 증가하였지만 치환성 알루미늄 함량이 많을수록 감소하여 화산회토양의 특성인 치환성 알루미늄에 의하여 미생물 활성이 영향을 받는 것으로 생각된다. 토양 pH는 세균다양성에 영향을 주며(Lauber et al., 2009), 미생물 활성은 알루미늄독성에 의해 낮다(Nanzyo, 2002)는 결과와 일치하였다.

이상의 결과 화산회토양 감귤원은 토양 특성에 기인하여 세균 개체수가 적고 다양성은 낮지만, 석회고토나 유기물 시용으로 토양 pH를 개선하면 세균군집의 활성을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다.

Table 7. Pearson correlation coefficient between physicochemical factors and bacterial richness estimators and diversity indices (N=12)

Factors	Ace	Chao1	Shannon
pH	0.578 *	0.586 *	0.728 **
Al	-0.686 *	-0.687 *	-0.634 *

DMRT: $p < 0.01$, **; $p < 0.05$, *.

IV. 요약

본 연구는 화산회토 감골원 토양에서 시비관리 방법에 따른 시기별 세균의 개체군, 종풍부도, 다양성 지수, 세균군집 분포에 대하여 평가하고자 수행하였다. 토양시료는 16년간 퇴비와 화학비료 시비량을 다르게 하여 동일하게 관리한 무비료구, 퇴비구, 1/2표준시비+퇴비구, 표준시비+퇴비구, 표준시비구, 표준시비 3배구에서 2010년 5월과 9월초에 채취하여 분석하였다. 5월에 분석된 파이로시퀀스 수(clone)는 5,769-7,982, OTUs는 2,181-4,112개의 분포를 보였다. 또한 1/2표준시비+퇴비구에서 Ace, Chao1, Shannon 등 세균의 종풍부도 추정치와 다양성 지수가 각각 19,361, 6,428, 10,906, 7.8로 가장 높았다.

문 수준의 우점 세균그룹은 *Proteobacteria*, *Acidobacteria*, *Actinobacteria*로 전체세균의 58.0-82.9%를 차지하였다. 속 수준은 *Pseudolabrys*, *Bradyrhizobium*, *Acidobacteria*로 전체세균의 16.1-32.1%를 차지하였다. 문 수준보다 속 수준에서 세균그룹의 다양성이 높았고 시기별로 차이가 있었다. 토양 pH는 종풍부도 추정치 Ace, Chao1($p < 0.05$), 다양성 지수 Shannon($p < 0.01$)과 정의 상관관계를 보였다. 그러나 치환성 알루미늄 함량과는 부의 상관관계를 나타냈다($p < 0.05$). 결론적으로 감골원 토양의 세균군집의 다양성은 시비관리, 화산회토양 특성, pH 변화에 영향을 받았다.

V. 인용문헌

- Bapiri, A., E. Bååth, and J. Rousk. 2010. Drying–rewetting cycles affect fungal and bacterial growth differently in an arable soil. *Microb. Ecol.* 60:419–428.
- Buckley, D. H. and T. M. Schmidt. 2003. Diversity and dynamics of microbial communities in soils from agro-ecosystems. *Environ. Microb.* 5:441–452.
- Chao, A. and J. Bunge. 2002. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics* 58:531–539.
- Clegg, C. D. 2006. Impact of cattle grazing and inorganic fertiliser additions to managed grasslands on the microbial community composition of soils. *Appl. Soil Ecol.* 31:73–82.
- Deenik, J. 2006. Nitrogen mineralization potential in important agricultural soils of Hawai'i. *Soil Crop Manage.* 15:1–5.
- Devine, M. C. H., K. M. Carney, and B. J. M. Bohannan. 2004. An ecological perspective on bacterial biodiversity. *Proc. Biol. Sci.* 271:113–122.
- de Ridder-Duine, A. S., G. A. Kowalchuk, P. J. A. K. Gunnewiek, W. Smant, J. A. van Veen, and W. de Boer. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biol. Biochem.* 37:349–357.
- Fierer, N., M. A. Bradford, and R. B. Jackson. 2007. Toward an ecological classification of soil bacteria. *Ecology* 88:1354–1364.
- Gans, J., M. Wolinsky, and J. Dunbar. 2005. Computational Improvements Reveal Great Bacterial Diversity and High Metal Toxicity in Soil. *Science* 309:1387–1390.
- Hill, T. C. J., K. A. Walsh, J. A. Harris, and B. F. Moffett. 2003. Using ecological diversity measure with bacterial communities. *Microb. Ecol.* 43:1–11.
- Huse, S. M., J. A. Huber, and H. G. Morrison. 2007. Accuracy and quality of

- massively parallel DNA pyrosequencing. *Genome Biology* 8:R143.
- Janssen, P. H. 2006. Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1719-1728.
- Jaspers, E. and J. Overmann. 2004. Ecological significance of microdiversity: Identical 16S rRNA gene sequences can be found in bacteria with highly divergent genomes and ecophysologies. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4831-4839.
- Kemmitt, S. J., D. Wright, K. W. T. Goulding, and D. L. Jones. 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 38:898-911.
- Langenheder, S., E. S. Lindstrom, and L. J. Tranvik. 2006. Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:212-220.
- Lauber, C. L., M. Hamady, R. Knight, and N. Fierer. 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.
- Lipson, D. A. and S. K. Schmidt. 2004. Seasonal changes in an alpine soil bacterial community in the Colorado rocky mountains. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:2867-2879.
- Liu, Z., C. Lozupone, and M. Hamady. 2007. Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucl. Acids Res.* 35:120:1-10.
- Marschner, P., E. Kandeler, and B. Marschner. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35:453-461.
- Martinez, V. A, S. Dowdb, Y. Sunc, and V. Allen. 2008. Tag-encoded pyrosequencing analysis of bacterial diversity in a single soil type as

- affected by management and land use. *Soil Biol. Biochem.* 40:2762–2770.
- Morris, C. E., M. Bardin, O. Berge, P. Frey-Klett, N. Fromin, H. Girardin, M. H. Guinebretiere, P. Lebaron, J. M. Thiery, and M. Troussellier. 2002. Microbial biodiversity: approaches to experimental design and hypothesis testing in primary scientific literature from 1975 to 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:592–616.
- Nanzyo, M. 2002. Unique properties of volcanic ash soils. *Glob. Environ. Res.* 6:99–112.
- Nunan, N., T. J. Daniell, B. K. Singh, A. Papert, J. W. McNicol, and J. I. Prosser. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils characterized using molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6784–6792.
- RDA. 1988. Methods for chemical analysis of soil. Institute of Agricultural Technology.
- Roesch, L. F. W., R. R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A. K. M. Hadwin, A. D. Kent, S. H. Daroub, F. A. O. Camargo, W. G. Farmerie, and E. W. Triplett. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal* 1:283–290.
- Tringe, S. G., C. von Mering, A. Kobayashi, A. A. Salamov, K. Chen, H. W. Chang, M. Podar, J. M. Short, E. F. Mathur, J. C. Detter, P. Hugenholtz, and E. M. Rubin. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. *Science.* 308:554–557.
- Torsvik, V., L. Øvreas, and T. Thingstad. 2002. Prokaryotic diversity magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296:1064–1066.
- Upchurch, R., C. Y. Chi, K. Everett, G. Dyszynski, D. C. Coleman, and W. B. Whitman. 2008. Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biol. Biochem.* 40:1294–1305.
- Weon, H. Y. 2010. Molecular analyses on bacterial community structures and

- diversity of Asian dust and the atmosphere. *Ph.D. Thesis. Seoul National University. Seoul, Korea.*
- Wu, Y., X. Yu, H. Wang, N. Ding, and J. Xu. 2010. Does history matter ? Temperature effects on soil microbial biomass and community structure based on the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis. *J. Soils Sediments* 10:223-230.
- Youssef, N. H. and M. S. Elshahed. 2008. Species richness in soil bacterial communities: A proposed approach to overcome sample size bias. *J. Microbiol. Methods* 75:86-91.
- Youssef, N. H. and M. S. Elshahed. 2009. Diversity rankings among bacterial lineages in soil. *The ISME Journal* 3:305-313.



제 3장 유기물 함온배양이 질소무기화와 미생물활성에 미치는 영향

ABSTRACT

This study was carried to evaluate the effects of incubation temperature on nitrogen mineralization rate, PLFA content, and enzyme activities in volcanic(VBS) and non-volcanic ash soil(NVBS) treated with organic materials such as pellet(OFPE), powder (OFPO) organic fertilizers, pig manure compost(PMC), and food waste compost(FWC). Experimented soil mixed well after adding water to regulate at 50% of soil moisture content and 2g of four organic materials against volcanic and non-volcanic ash with dried soil 30 g, respectively. And then had incubated at 10°C, 20°C, 30°C, respectively.

Considering on soil pH and C/N ratio, Organic matter decomposition rate was more easily in NVBS than VBS. Nitrogen mineralization rate increased with increasing temperature and that was in the order of OFPO>FWC>OFPE>PMC. OFPO was most highest among the organic matter in both VBS and NVBS.

In 75 days, Total PLFA content was higher in NVBS than VBS. That was higher at 270 days in VBS than NVBS. Distribution ratio of microbial group by PLFA profiles were different significantly due to soil characteristics, incubation temperature, and the type of organic matter. Both G-/G+ and F/B ratios were decreased according to the increasing temperature gradually and those reduced more in NVBS than VBS. Principal component analysis using PLFA profiles showed that microbial community structures were composed by soil type at 75 days, but by temperature at 270 days.

Urease and β -glucosidase activity were high in NVBS than VBS. Those were decreased gradually during the long-time incubation. Acid phosphatase activity increased according to the increasing temperature and that was higher in organic fertilizers than PMC and FWC. Soil temperature was significantly correlated with acid phosphatase($r=0.728$) in both soil. PLFA was significantly correlated with OM at $r=0.634(p<0.001)$ in NVBS.

In conclusion, Soil microbial activities showed relative sensitivity and seasonal changes as affected by soil characteristics, temperature, and organic matter type and those were low in VBS.

I. 서 론

화학비료 과다사용에 의한 토양양분 불균형을 줄이고, 친환경적인 토양관리를 위하여 유기질비료나 축분퇴비를 이용하는 농가가 증가하고 있다. 유기물 사용은 토양 pH를 개선하고, 양분을 공급하며 토양에서 중금속의 유해작용을 감소시키는 역할을 한다(Tisdale et al., 1993). 토양에 유기물이 사용되면 미생물의 작용에 의해 유기탄소 분해와 질소 무기화가 일어난다. 분해된 양분은 토양 미생물과 작물의 영양원으로 이용되고 미생물의 활성을 증가시킨다. 유기물의 분해에는 토양온도, 수분함량, 유기물의 질, 미생물의 활성 등이 중요하게 영향을 미친다. 하지만 유기물사용보다 토양적인 차이로 미생물의 활성이 낮아 유기물의 무기화가 다르게 나타난다. 따라서 토양종류별 미생물의 활성과 유기물의 분해양상을 파악하는 것은 유기물의 적정사용과 토양관리를 위하여 필요하다.

유기물의 분해와 무기화과정은 미생물 개체수, 분해효소활성, 미생물의 양분 요구도 등 생물적 요인과 토양특성, pH, 온도, 수분함량, 유기물의 화학적 조성, 호기적인 조건 등 비 생물적 요인이 복합적으로 상호작용하여 진행된다(Alvarez et al., 1995; Manzoni and Porpotato, 2007; Nobili, 2006; Vernimmen et al., 2007). 토양유형은 미생물의 기능과 군집구조에 영향을 주며(de Ridder-Duine et al., 2005; Nunan et al., 2005; Rosa et al., 2006), 화산회토양은 알루미늄 독성에 의하여 미생물 활성이 낮다고 하였다(Anderson, 1979; Deenik, 2006; Takenaka and Hayano, 1999).

토양 탄소와 질소순환은 환경적인 요인과 생물적 활성에 의하여 진행된다(Agehara and Warncke, 2004; Hadas et al., 1996; Wennman and Katterer, 2006). 토양에 사용된 유기물은 분해되어 pH 완충력을 높이지만, 일시적으로 pH를 낮추기도 하고 작물과 미생물간에 질소 양분경쟁을 일으키기도 한다. 또한 유기물이 분해되는 과정에서 pH는 질소 휘산, 미생물 개체수 변화(Kelly and Henderson, 1978), 미생물군집에 영향을 준다(Kemmitt et al., 2006; Wu et al., 2010). 점토 함량, 토양유형은 질소무기화반응에 영향을 준다(Alvarez et al., 1995; Cobo et al., 2002; Deenik, 2006). 토양 건조와 수분공급은 미생물 개체수와 활성에 영향을 주었으며(Bapiri et al., 2010; Nobili et al., 2006), 건조된 토양

을 이용하여 향온배양을 하였을 때 호기 조건에서 총질소 무기화율이 높았다 (Wang et al., 2001). Marschner et al.(2003)는 가축분뇨 퇴비와 토양을 혼합하였을 때 질소무기화는 빨라졌다고 하였다.

전통적으로 미생물 활성을 평가하는 방법은 선택배지를 이용하여 미생물의 종류와 개체수를 파악하였으나 시료 채취, 배양조건, 배지 종류, 양분요구도 따라 배양되는 미생물의 개체수가 적고 변이가 커 정확도가 떨어지는 단점이 있다. 인지질 지방산은 살아있는 미생물 세포막에 존재하기 때문에 배양이 어려운 미생물까지도 정량할 수 있어 미생물의 활성을 평가하는데 유용하다(Bååth and Anderson, 2003; Green and Scow, 2008). 인지질 지방산(PLFA)은 살아있는 미생물체량 지수, 특정분류군을 위한 미생물학적 스트레스 지표, 군집구성의 변화를 해석하는데 사용될 수 있다(Webster et al., 2006). 미생물군집은 토양유형, 시간, 화학비료 추비, 토양관리, 공간적 변이 등에 영향을 받는다고 하였다(Bossio et al., 1998; Bossio and Scow, 1998; Green and Scow, 2008; Kaur et al., 2005). Rahman and Sugiyama(2008)은 미생물군집 구성과 구조는 양분 공급량 차이나 샘플링 시기에 영향을 받으며, 인지질 지방산 총합량은 pH, 토양 공극율과 상관관계가 높고, pH가 높으면 인지질 지방산 함량이 증가한다고 하였다(Bååth and Anderson, 2003; Cookson et al. 2007).

PLFA는 양분이 부족하거나 고온의 스트레스를 받으면 사상균(18:2w6)과 그람 음성균 유래 지방산이 감소하고, cyclo PLFA는 증가하여 토양비옥도와 질을 평가하는 지표(Puglisi et al., 2005)로 사용할 수 있다. 또한 세균, 방선균, 사상균 등 미생물 그룹은 지표 지방산그룹에 의하여 분류할 수 있으며 미생물 구성 변화는 인지질 지방산조성 변화로 알 수 있다. Feng and Simpson(2009)은 향온배양 시험을 통하여 기질이용성(F/B, G-/G+), 환경스트레스(cy19:0/18:1w7c), 호기적 조건과 고농도 양분지표(Unsat/sat)에 대하여 보고한 바 있다.

토양에 유기물을 시용하면 미생물체량이 증가하고, 탄소, 질소, 인산 분해 효소활성이 증가한다(Bremner and Mulvaney, 1978; Crecchio et al., 2004; Dinesh et al., 1998; Klose and Tabatabai, 2000; Parham et al., 2003; Roscoe et al., 2000). 토양 효소활성은 유기물 시용보다 환경적 요인에 영향을 받는데(Debosz et al., 1999; Dick, 1992), 토양온도, 수분함량은 β -glucosidase와 urease(Sardans

et al., 2008), pH는 dehydrogenase(Quilchano and Maranon, 2002), β -glucosidase, acid phosphatase(Dick, 1992), 유기탄소는 dehydrogenase(Garcia-Gil et al., 2000), β -glucosidase(Eivazi and Tabatabai, 1990)와 상관관계가 높다고 하였다.

토양종류별 항온배양조건에 따른 유기물 분해 양상과 미생물의 활성 분석은 유기물 시용량과 시용시기를 결정하기 위하여 필요하다. 많은 연구자들이 유기물 시용이 미생물활성(Debosz et al., 1999; Dinesh et al., 1998; Klose and Tabatabai, 2000; Marschner et al., 2003), 항온조건에 따른 탄소와 질소 무기화 특성(Agehara and Warncke, 2004; Cordovil et al., 2005), 질소무기화가 양분의 공급력(Sharifi et al., 2008)에 미치는 영향에 대하여 보고를 한 바 있다. 그러나 제주지역 화산회토와 비화산회토양에서 유기물 시용이 질소무기화와 미생물 활성에 미치는 영향에 대한 연구는 많지 않으며, 더구나 유기물 종류별 무기화와 특성에 대한 자료는 거의 없다.

본 연구는 화산회토양과 비화산회토양에 유기물을 항온 배양했을 때 토양과 온도 조건이 질소무기화율, 인지질 지방산함량, 미생물 분포와 군집구조, 효소활성에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험 수행 방법

제주도내 감귤재배농가에서 가장 많이 사용되고 있는 혼합유기질비료(입상과 분상), 돈분퇴비, 음식물퇴비를 흑색 화산회토(미사질 식양토, 송당통, 비경작토)와 암갈색 비화산회토양(미사질식토, 동홍통, 경작토) 30 g 당 2 g을 잘 혼합한 후 밀폐된 플라스틱용기에 옮겼다. 포장용수량 상태의 토양수분 조건을 유지하면서, 10℃, 20℃, 30℃에서 항온배양을 수행하였다. 시험토양은 초기 45일 동안은 7일 간격으로 혼합하였으며 이후 토양을 채취할 때 마다 손가락으로 잘 저어 주었다. 토양 pH, 질소, 유기물 함량은 75, 150, 270일, 토양효소활성은 150, 270일, 인지질 지방산 함량은 75, 270일에 2반복으로 분석하였다. 토양별 질소 무기화율은 15, 30, 45, 75, 150, 240, 270일에 토양을 채취하여 무기태 질소($\text{NH}_4\text{-N}$ 과 $\text{NO}_3\text{-N}$)함량을 분석 하였다.

2. 이화학성분 분석

가. 토양

이화학성분은 토양을 풍건 후 농촌진흥청 표준분석법(RDA, 1988)에 준하여 측정하였다. pH는 토양과 증류수의 비율을 1:5 희석법, 유기물은 Walkley-Black 법, 전 질소함량은 Kjeldahl법, 유효 인산은 Bray. No-1, 치환성 칼륨과 칼슘은 1N NH_4OAc (pH 7.0) 침출법, 치환성 알루미늄은 ammonium oxalate/oxalic acid 방법으로 침출 후 여과하여 ICP(GBC, Integra XL)로 분석하였다. $\text{NH}_4\text{-N}$ 과 $\text{NO}_3\text{-N}$ 은 토양 5 g에 2 M KCl용액 25 mL를 첨가하고 200 rpm에서 1시간 동안 진탕시킨 후 여과하였다. 여과액은 자동원소분석기(Fiastar 5000 autoanalyzer, Foss Tecator, Sweden)로 분석되었고, 분석치는 건토함량으로 환산하였다.

시험에 사용한 비화산회토양은 pH가 5.8 이었고, 유기물, 질소와 유효인산함량은 낮았으며, 치환성 알루미늄함량은 150.5 mg kg^{-1} 이었다(Table 1). 화산회토양은 미사질식양토의 송당통으로, pH는 5.2 였으며, 유기물과 질소함량은 높았고

치환성 알루미늄함량이 968.3 mg kg⁻¹으로 비화산회토양 보다 6배나 높았다.

Table 1. Chemical properties of soil used in this experiment

Soil	pH	O.M	T-N	Av. P ₂ O ₅	Exch. cations			Exch. Al
					K	Ca	Mg	
	1:5	g kg ⁻¹	%	mg kg ⁻¹	-----	cmol _c kg ⁻¹	-----	mg kg ⁻¹
VBS	5.2	145.2	0.59	4.0	0.4	1.0	0.5	968.3
NVBS	5.8	26.9	0.07	9.4	1.7	5.9	2.4	150.5

VBS:Volcanic ash black soil; NVBS:Non-volcanic ash brown soil.

나. 유기물

돈분퇴비(PMC)는 돈분과 톱밥(3:7)이, 음식물퇴비(FWC)는 음식물쓰레기와 톱밥(5:5)이, 분상유기질비료(OFPO)는 골분, 어분, 탈지강, 유박 등이, 입상유기질비료(OFPE)는 유박, 쌀겨, 골분, 어분, 팜박 등이 혼합된 것을 이용하였다.

화학성분 분석은 농촌진흥청 표준분석법에 준하여, Ternary solution 용액 (HNO₃:H₂SO₄:HClO₄=10:1:4) 10 mL를 넣고 180~200°C에서 90분간 가열하고 300°C에서 2시간 동안 분해시킨 후, 여과하여 ICP(GBC, Integra XL)를 이용하여 각 성분을 측정하였다.

유기물은 종류에 따라 화학성분 함량의 차이가 컸다(Table 2). 유기질비료의 질소함량은 음식물과 돈분퇴비 보다 2배 정도 많았고, 인산함량은 입상유기질비료와 돈분퇴비에서 높았다. 칼슘함량은 음식물퇴비, 칼륨함량은 돈분퇴비가 높았고, C/N비는 분상 유기질비료가 19.0으로 돈분퇴비 41.1보다 2배나 낮았다.

Table 2. Chemical characteristics of four organic matter used in this experiment

Organic matter	T-N	P	K	Ca	Na	Zn	Cu	C/N
	----- % -----			-- mg kg ⁻¹ --				
OFPE	2.1	1.1	0.6	5.7	0.36	85.5	42.1	41.1
OFPO	2.5	1.6	3.1	2.7	0.48	478.2	332.1	31.9
FWC	4.8	1.3	1.1	2.3	0.13	63.1	25.9	19.0
PMC	3.8	1.7	1.3	3.1	0.09	62.3	21.3	23.5

OFPE:Organic fertilizer pellet type; OFPO:Organic fertilizer powder type; FWC:Food waste compost; PMC:Pig manure compost.

3. 인지질 지방산(Phospholipid fatty acid, PLFA) 분석

인지질 지방산추출은 Bligh and Dyer(1959)의 방법을 이용하였다. 추출된 지방산은 silicic acid column chromatography를 이용하여 중성지질과 당지질을 순서대로 제거한 후 인지질을 분획하였다. 분획된 시료는 methylation시킨 후 MIDI 미생물동정시스템(MIDI Inc., Newark, DE)으로 지방산을 정량하였다. 인지질 지방산 추출, PLFA 지표 미생물 분석, 생물학적 지표(Biological index)비율은 1장에서 서술한 방법을 동일하게 적용하여 분석하였다.

4. 토양 효소활성 분석

탄소, 질소, 인산분해에 관여하는 β -glucosidase, urease, acid phosphatase 활성의 분석은 1장에서 서술한 방법과 동일하였다.

5. 통계분석

ANOVA분석은 유의수준 5%로 SAS Enterprise guide 4.2(SAS Inst., Cary, NC, USA)를 이용하였고, 미생물군집분석은 시료별 1%이상 함유된 인지질 지방산에 대해 주성분 분석을 수행 하였다. 토양 환경요인과 미생물활성 간에 상관관계는 유의수준 0.1%, 1%, 5%에서 분석하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 토양 pH, C/N ratio 변화

화산회토양에서 온도별 유기물의 항온배양에 따른 시험토양의 pH, C/N ratio 변화는 Fig. 1에 나타냈다. 토양 pH는 돈분과 음식물퇴비가 유기질비료 보다 높았으나 온도와 상관없이 pH 변화가 크지 않았으며, 시험토양보다 pH가 높아졌다. 분상유기질비료는 온도별 차이가 없었다. 입상유기질비료는 온도가 높고 시간이 경과할수록 pH는 낮아졌으나 변화폭은 크지 않았고 시험토양보다 pH가 낮아졌다. 유기물은 일정한 온도와 수분조건이 유지되면 미생물에 의하여 분해가 일어나며 토양 pH가 높아졌다가 낮아지는 것은 유기물의 분해가 일어나면서 토양중 NO₃-N 함량과 H⁺ 이온의 감소와 증가에 기인하는 것으로 토양에서 유기물의 무기화와 유기화가 동시에 일어나는 것으로 추정된다(Dinesh et al., 1998). 이는 유기물 분해에 의한 pH변화가 미생물활성에 영향을 끼친다는 것을 의미한다(Kelly and Henderson, 1978).

C/N비는 돈분과 음식물퇴비가 10℃처리에서 유기질비료 보다 높았으나 시간이 경과하면서 낮아지는 경향을 보였다. 20℃처리에서 돈분과 음식물퇴비는 유기질비료 보다 낮았다가 점차 높아졌고, C/N비는 입상유기질비료에서 감소 폭이 컸다. 30℃처리에서 돈분과 음식물퇴비는 유기질비료 보다 높았으나 점차 낮아졌으며, 분상유기질비료는 C/N비가 비슷하게 나타났다.

이것은 풍건토를 시험토양으로 이용함으로써 항온배양과정에서 미생물의 개체수와 활성이 영향을 받았기 때문으로(Hadas et al., 1996; Nobili, 2006), 온도, 유기물 종류와 형태, 분석시기에 따라 C/N비가 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

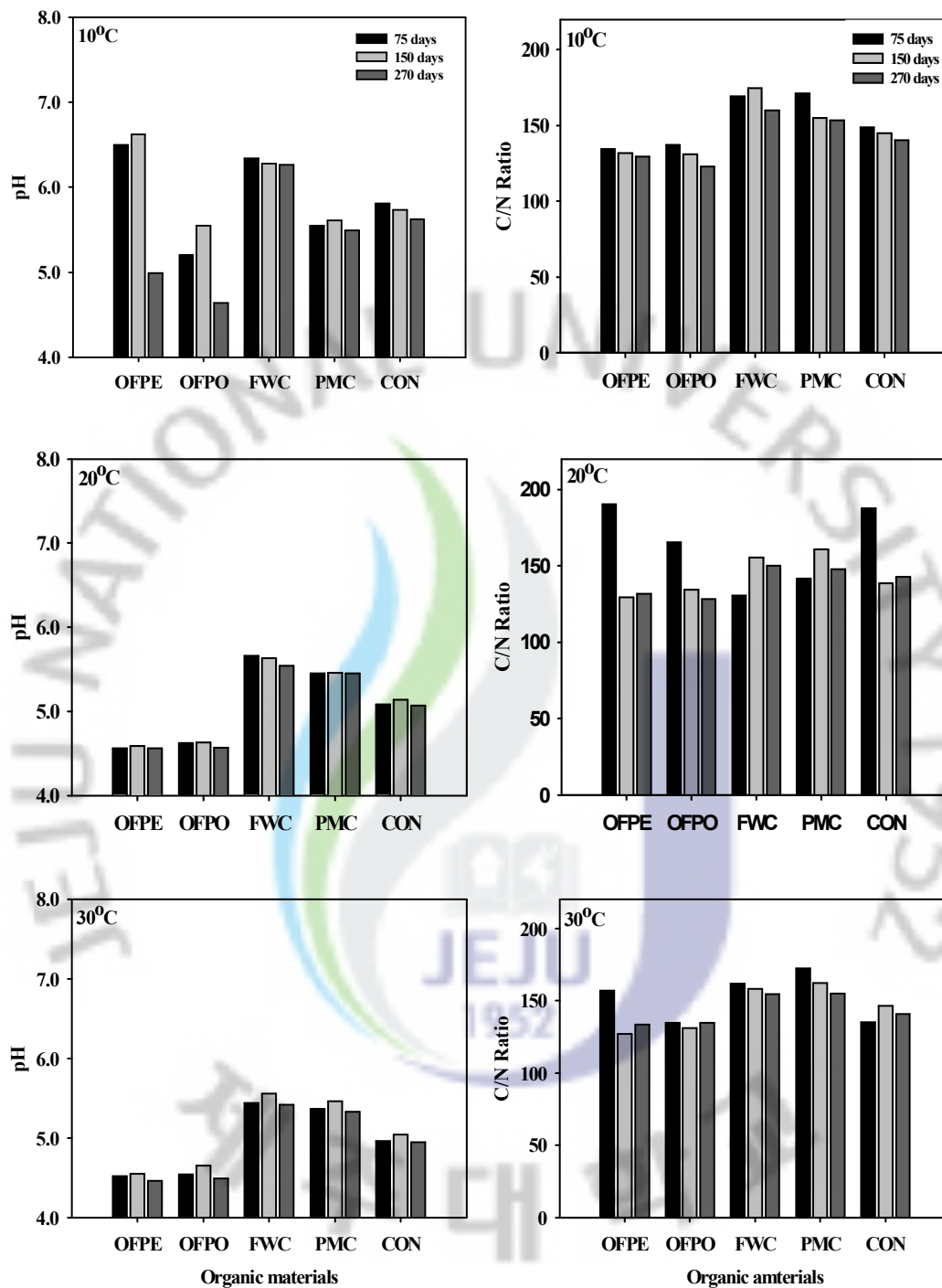


Fig. 1. Changes in volcanic ash soil pH and C/N ratios during incubation experiment period. PMC:Pig manure compost; FWC:Food waste compost; OFPO:Organic fertilizer powder type; OFPE:Organic fertilizer pellet type.

비화산회토양에서 돈분퇴비와 음식물퇴비는 온도에 상관없이 토양 pH 변화가 크지 않았다(Fig. 2). 분상유기질비료는 온도가 높아짐에 따라 pH가 낮아졌으나 20°C와 30°C처리는 비슷한 경향이였다. 입상유기질비료는 시간이 경과하면서 pH가 낮아졌고 변화폭이 컸으며 고온으로 갈수록 낮아졌다. 유기물 분해는 pH 영향을 받는데(Matyka-Sarzynska and Sokolowska, 2005), 유기질비료의 원료구성과 형태는 무기화에 영향을 주어 토양 pH의 변화를 가져오는 것으로 생각된다.

C/N비는 토양의 탄소와 질소 비율을 나타내는 것으로 미생물 몸체구성분인 미생물체량과 관계가 깊으며, 유기물 분해정도를 측정하는 지표로서 토양 유기물이 분해가 되면 C/N비는 낮아진다(Dinesh et al., 1998). 돈분퇴비는 10°C처리, 75일에서 가장 높았으며 시간이 경과 할수록 낮아졌다. 20°C, 30°C처리도 같은 경향을 보였다. 음식물퇴비는 10°C처리에서 돈분퇴비와 같은 경향을 나타냈으나, 20°C처리는 270일에 약간 높았으며, 30°C처리는 차이가 없었다. 분상과 입상유기질비료는 10°C와 20°C처리에서 비슷한 경향을 보였으며, 분상유기질비료는 30°C처리에서 150일에 낮았다가 270일에 높았고, 입상유기질비료는 30°C처리에서 점차 낮아졌다.

토양 C/N비는 30°C처리에서 시간이 경과할수록 낮아졌다. 이러한 결과는 저온보다 고온에서 질소무기화가 빠르게 진행되는 되는 것을 의미하며, 질소함량이 높아 미생물활성이 높을 것으로 생각된다. Cobo et al.(2002)은 C/N비로 질소무기화를 예측할 수 있는데, 토양 질소함량이 낮으면 미생물활성이 낮다고 하였다.

비화산회토양의 pH가 화산회토양 보다 높은 것은 유기물이 무기화가 진행되면서 $\text{NH}_4\text{-N}$ 의 함량이 증가하고 일부는 토양입자에 흡착되었기 때문으로 생각된다(Deenik, 2006). 반면에 화산회토양은 미생물의 활성이 낮아 탄소와 질소 무기화율이 낮기 때문에 유기물의 분해가 느리게 진행된 것으로 추측된다(Saito, 1990; Takenaka and Hayano, 1999). 토양특성, 온도, C/N비를 고려할 때 비화산회토양이 화산회토양보다 유기물 분해가 잘 되는 것으로 생각된다.

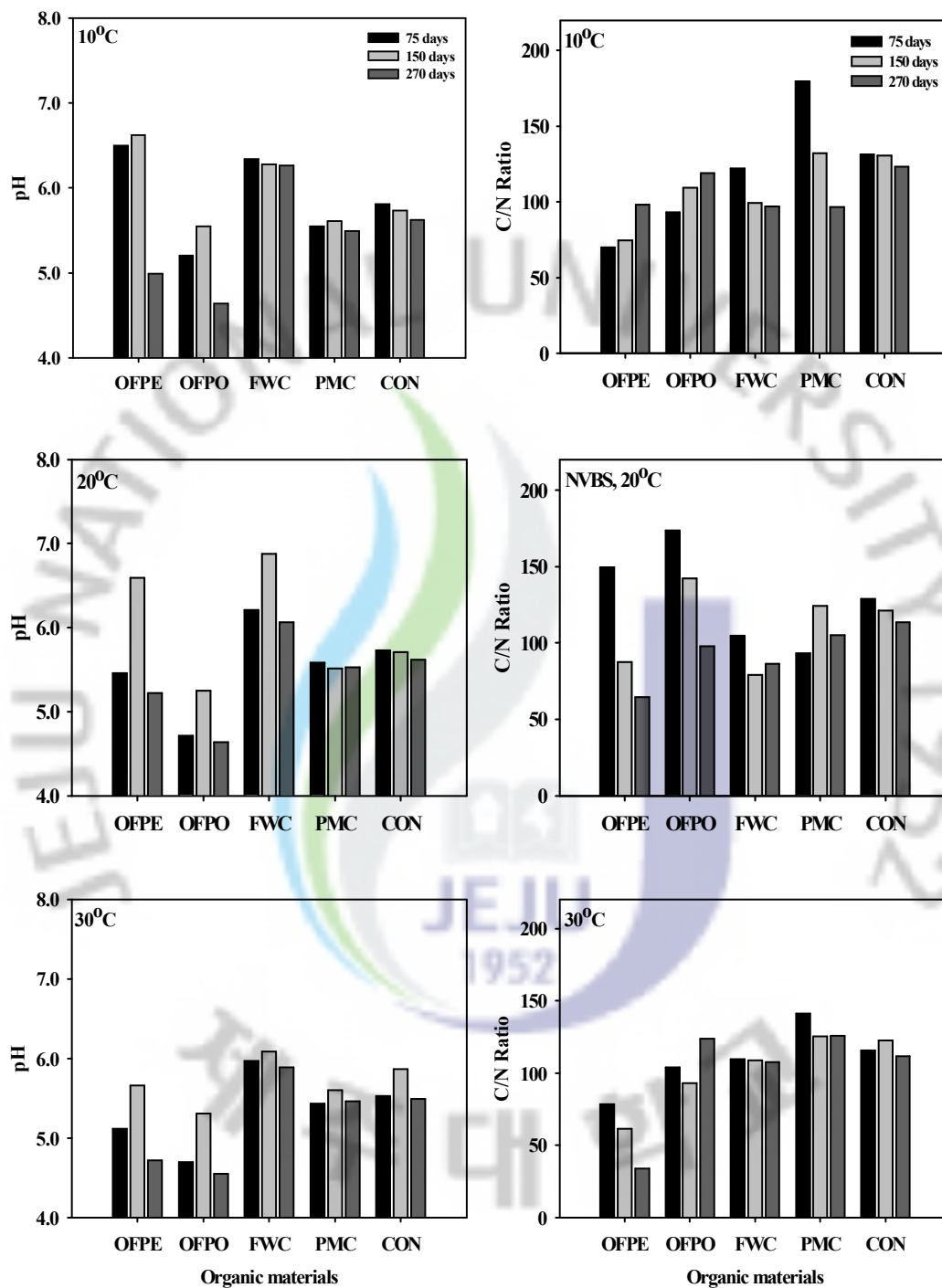


Fig. 2. Changes in non-volcanic ash soil pH and C/N ratios during incubation experiment period. See Fig. 1.

2. 토양별 유기물의 질소 무기화

화산회토양의 항온온도별 유기물의 유기태질소가 무기태질소($\text{NH}_4\text{-N}$ 과 $\text{NO}_3\text{-N}$)로 전환된 비율은 Fig. 3에 나타냈다. 온도에 상관없이 분상유기질비료가 질소 무기화율이 가장 높았다. 분상유기질비료는 유기물의 질소가 무기화된 후 토양 유기태 질소의 3.6%가 더 무기화된 것으로 분석되었다.

비화산회토양은 화산회토양과 비슷한 경향을 보였으며, 온도에 상관없이 분상유기질비료에서 질소 무기화율이 가장 높았고, 온도가 높을수록 질소무기화는 빠르게 진행되었다(Fig. 4).

시험결과 화산회토양이 비화산회토양보다 질소 무기화율이 약간 빨랐으며, 온도가 높을수록 질소 무기화율이 높았고 유기물은 분상유기질비료>음식물퇴비>입상유기질비료>돈분퇴비 순이었다.

토양온도가 30-35℃일 때 질소무기화는 최대가 된다는 결과와 일치하는 경향이 있었다(Deenik, 2006). 유기질비료는 화산회토양에서 입상보다는 분상형태가 3배, 비화산회토양에서 5배 빠르게 무기화가 진행되었고, 음식물퇴비는 돈분퇴비보다 화산회토양에서 1.5배, 비화산회토양에서 5배(10℃), 7배(20℃, 30℃)빠르게 무기화가 진행되었는데, 이는 퇴비구성 물질인 음식물과 톱밥의 무기화정도가 다르기 때문으로 생각된다(Manzoni and Porpotato, 2007). 온도가 높을수록 무기화가 빠르게 나타나 온도가 유기태질소의 무기화에 영향을 준 것으로 생각된다(Agehara and Warncke, 2004; Reichstein et al., 2005). 유기질비료와 돈분퇴비는 화산회토양이 온도가 높을수록 무기화가 빠르게 나타났으며, 음식물퇴비는 토양별로 차이가 없었다. 토양종류별 질소 무기화율은 차이가 크지 않았으나 화산회토양이 비화산회토양보다 질소 무기화율이 2배정도 낮았다(Deenik, 2006; Saito, 1990)는 보고와는 다른 경향이였다. 이것은 풍진된 토양을 사용하고 시험토양의 질소함량이 비화산회토양이 6배나 낮고 점토함량이 높아 통기성이 불량하고 혐기적 상태이기 때문에 무기화율이 낮아진 것으로 생각된다(Wang et al., 2001). Sharifi et al.(2008)은 비경작지토양에서 이분해성 무기화 질소함량이 관행경작지보다 높았다고 하였는데, 경작토와 비경작토, 건토와 습토, 토양 C와 N함량 차이 등은 토양 유기물 분해에 영향을 주는 것으로 생각된다. Deenik(2006)은 토양에 있는 점토의 함량과 형상은 질소무기화에 영향을 주는데, 유기물함량이 많은 화산회토양

에서는 높은 질소무기화율을 가지는 경향이 있어, 같은 알로펜 토양이라도 점토 함량에 따라 질소 무기화량이 다르게 나타났다고 하였다. 따라서 유기물이 분해되면서 토양 pH가 변화하여 무기태 질소 발생에 영향을 주는 것으로 생각된다 (Kemmit et al., 2006). Manzoni and Porpotato(2007)는 토양에서 질소순환은 환경적인 요인과 생물적 활성에 영향을 받고, 유기물의 화학적 조성파 미생물의 양분요구도가 영향을 준다고 하였다. Wang et al.(2001)은 건조된 토양을 이용하여 배양하였을 때 호기적 조건은 총질소 무기화율에 영향을 주지만 혐기적 조건에서는 항상 높지 않다고 하였다.



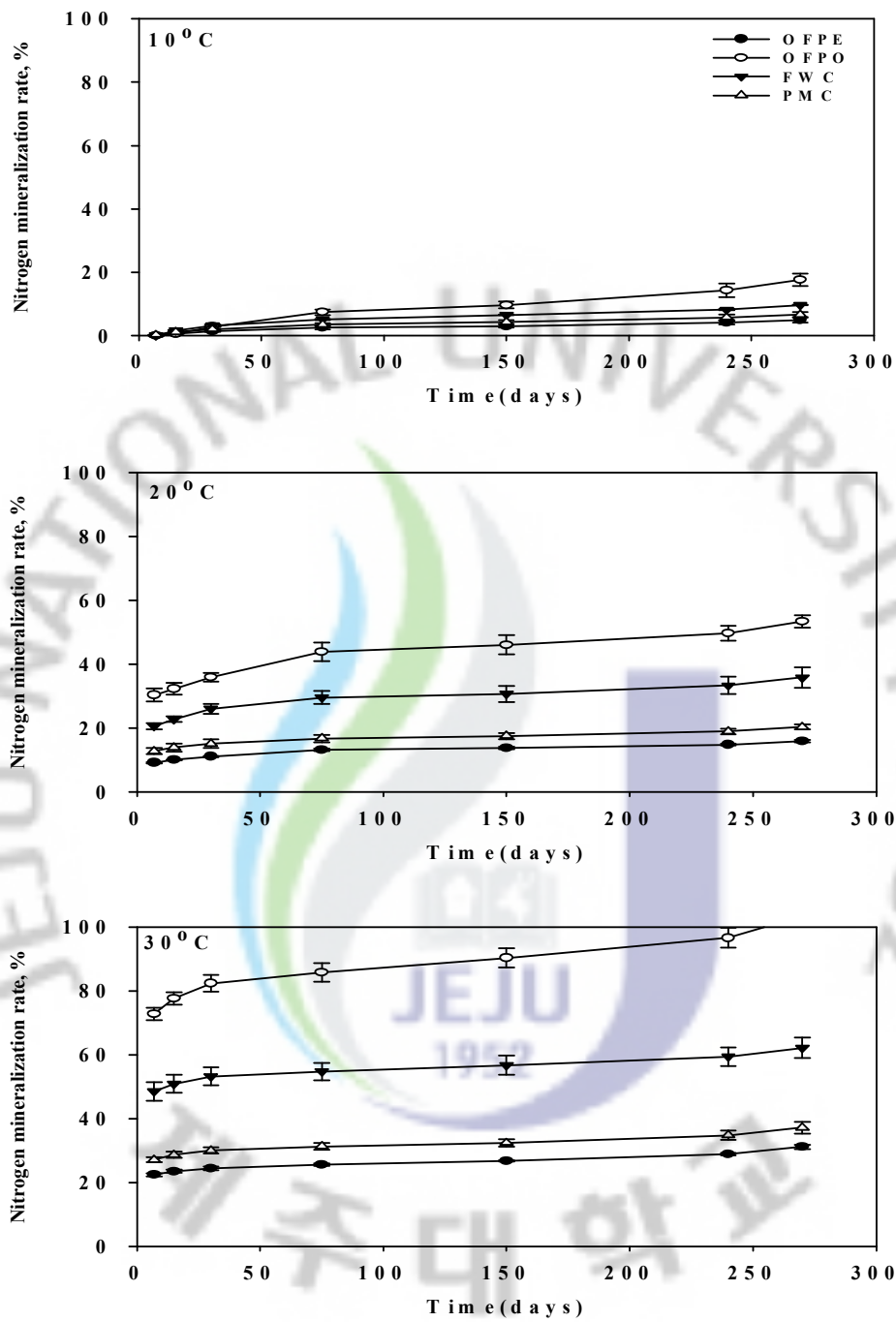


Fig. 3. Changes in volcanic ash soil nitrogen mineralization rate under different incubation temperature. See Fig. 1.

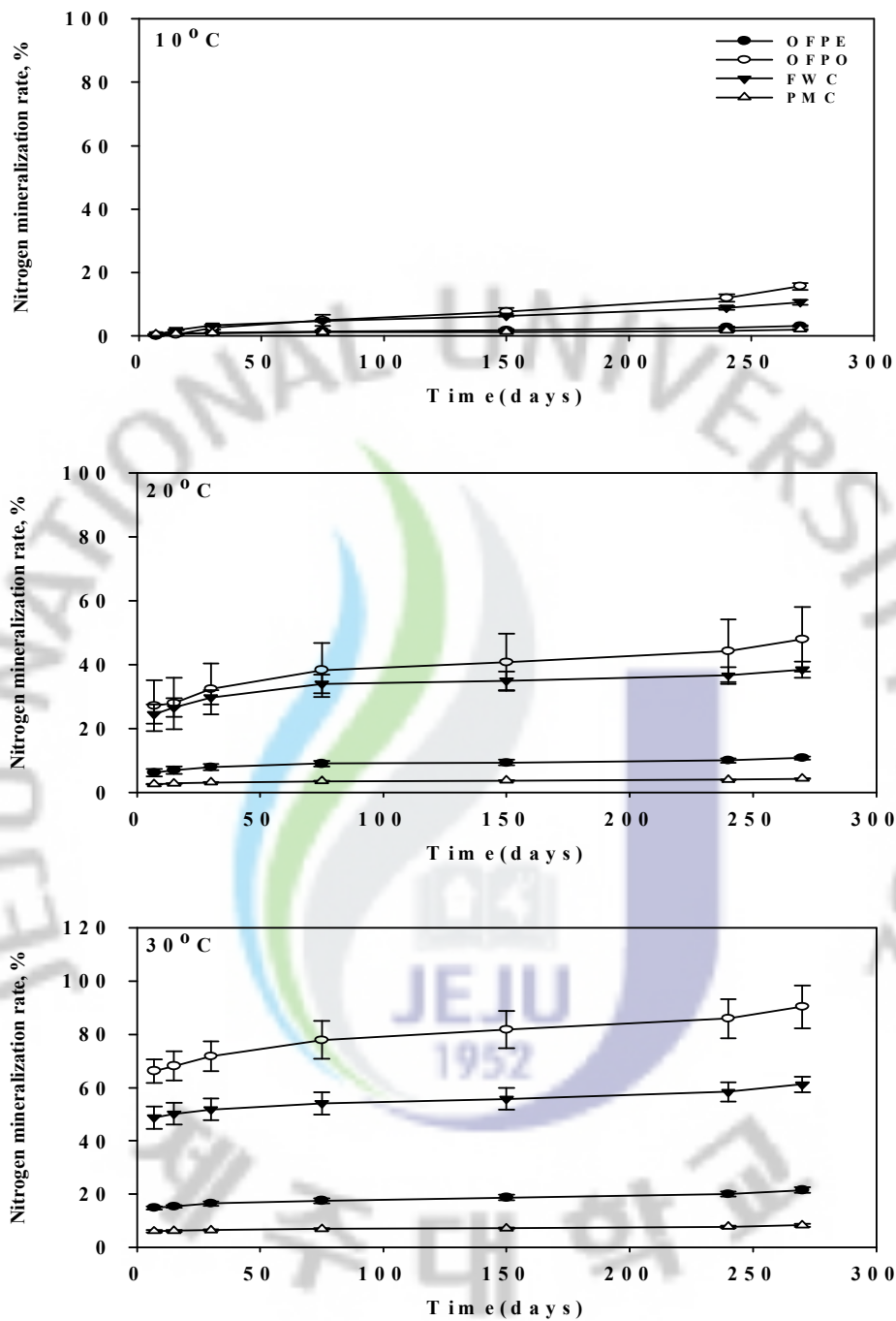


Fig. 4. Changes in non-volcanic ash soil nitrogen mineralization rate under different incubation temperature. See Fig. 1.

3. 인지질 지방산(PLFA)

가. 토양, 온도별 인지질 지방산 총함량 시기별 변화

화산회토양에서 향온배양 75일에 인지질 지방산 총 함량은 10°C 처리에서 입상유기질비료가 164.3 n mol g⁻¹으로 20°C와 30°C 처리에서는 음식물퇴비가 각각 170.5, 157.5 n mol g⁻¹으로 가장 높았다(Fig. 5). 270일은 75일 보다 증가하는 경향을 보였는데, 10°C는 분상유기질비료가 169.4 n mol g⁻¹, 20°C는 음식물퇴비가 167.2 n mol g⁻¹, 30°C는 돈분퇴비가 153.6 n mol g⁻¹으로 많았다.

비화산회토양에서 향온배양 75일에 인지질 지방산 총 함량은 10°C 처리에서 입상유기질비료가 73.6 n mol g⁻¹으로 돈분퇴비 20.9 n mol g⁻¹ 보다 3배 이상 많았다. 20°C와 30°C 처리는 입상과 분상유기질비료가 각각 203.5, 84.6 n mol g⁻¹으로 가장 높았다. 270일은 75일보다 인지질 지방산 총 함량이 감소하는 경향이 있었다. 10°C와 20°C 처리는 분상과 입상유기질비료가 각각 127.4, 83.0 n mol g⁻¹으로 돈분퇴비 53.6, 35.9 n mol g⁻¹ 보다 2배 이상 많았다. 30°C 처리는 음식물퇴비가 82.6 n mol g⁻¹를 나타냈다.

결론적으로 PLFA 총량은 비화산회토양에서 향온 75일에 20°C 처리를 제외하고 화산회토양 보다 높았으며, 270일에는 화산회토양이 모든 유기물처리에서 높게 나타났다.

이러한 결과는 향온초기에 미생물밀도가 낮은 건조토양을 이용함으로써 유기물 분해에 따라 비화산회토양에서 인지질 지방산 함량이 높았으나 시간이 경과하면서 화산회토양에서 유기태질소가 무기화되고, 통기성이 양호하여 증가한 것으로 생각된다. Rahman and Sugiyama(2008)는 인지질 지방산 총 함량은 토양 공극율과 상관관계가 높다고 하였다. pH가 높아지면 PLFA 함량도 증가한다고 하였는데(Bååth and Anderson, 2003; Kemmitt, 2006), 270일에 비화산회토양의 pH가 화산회토양 보다 높았으나 인지질 지방산함량이 낮은 것은 용적밀도가 크고 점토함량이 많아 통기성이 불량하여 혐기상태 되었기 때문으로 생각된다. Cookson et al.(2007)은 배양온도, 토양 pH, 유기물함량은 인지질 지방산패턴에 크게 영향을 준다고 하였는데, 질소 무기화 포텐셜이 높은 유기물은 인지질 지방산함량을 증가시키는 것으로 생각된다.

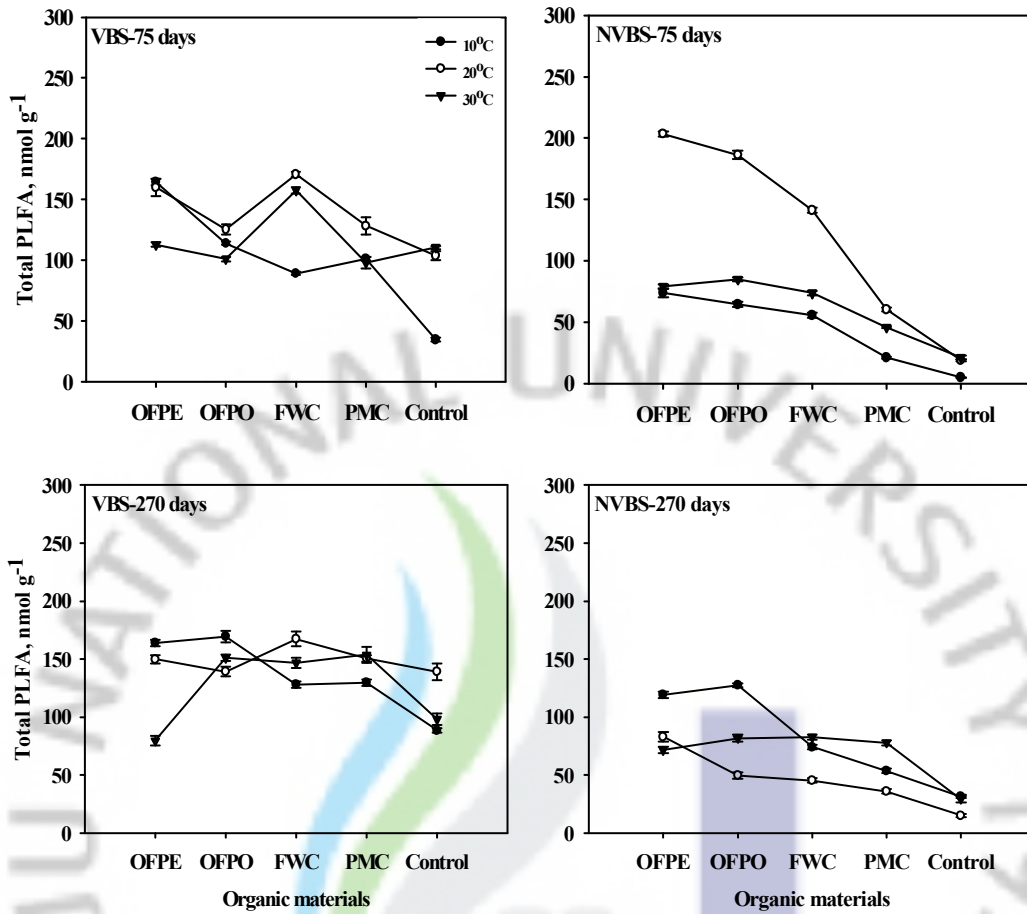


Fig. 5. Changes in soil total PLFA content during incubation period(VBS: volcanic ash; NVBS:non-volcanic ash).The error bars indicate standard deviation.

나. 인지질 지방산함량에 의한 시기별 미생물 분포

인지질 지표 지방산을 이용한 항온배양 75일 후 미생물 분포는 Fig. 6에 나타났다. 화산회토양의 세균 유래 지방산 비율은 온도가 높을수록 증가하는 경향이 있었다. 유기물처리에서 비율은 돈분퇴비에서 높았으며 처리 간에 유의성이 있었다. 방선균 유래 지방산은 돈분과 음식물퇴비에서 많았으며, 유기질비료에서는 감소하였다. 사상균 유래 지방산은 입상유기질비료에서 많았으나 분포비율은 온도와 상관없이 없었다. 균근균 유래 지방산은 무처리와 돈분퇴비에서 높았고 분포비율은 비슷하였다.

비화산회토양의 세균 유래 지방산 비율은 온도가 높을수록 증가하는 경향이었고, 30℃처리에서 입상유기질비료가 59.9%로 높았다. 하지만 방선균 유래 지방산은 감소하는 경향을 나타냈고 10℃처리에서 무처리가 16.7%로 높았다. 사상균 유래 지방산은 10℃처리에서 분상유기질비료가 27.0%로 가장 높았다. 균근균 유래 지방산은 20℃처리에서 무처리가 2.2%로 높았고 처리 간에 유의성이 있었다.

이상의 결과를 요약하면 화산회토양에서 세균은 비슷하였고, 방선균은 무처리에서 증가하였으며, 유기질비료(입상, 분상)에서 감소하였다. 사상균은 유기질비료에서 증가하였으며, 균근균은 비슷한 경향을 나타냈다. 비화산회토양에서 세균은 10℃(무처리)와 30℃(입상유기질비료)처리에서 높았으며, 방선균은 무처리에서 높았다. 사상균은 음식물퇴비와 유기질비료에서 높았으며, 균근균은 비슷한 수준이었다. Wu et al.(2010)은 토양을 채취한 지역의 온도 등 환경조건이 미생물 분포나 군집에 영향을 준다고 하였는데, 온도가 높아지면서 미생물군집을 구성하는 세균이나 사상균 인지질 지방산조성이 변화하면서 미생물의 분포도 차이가 나타난 것으로 생각된다.

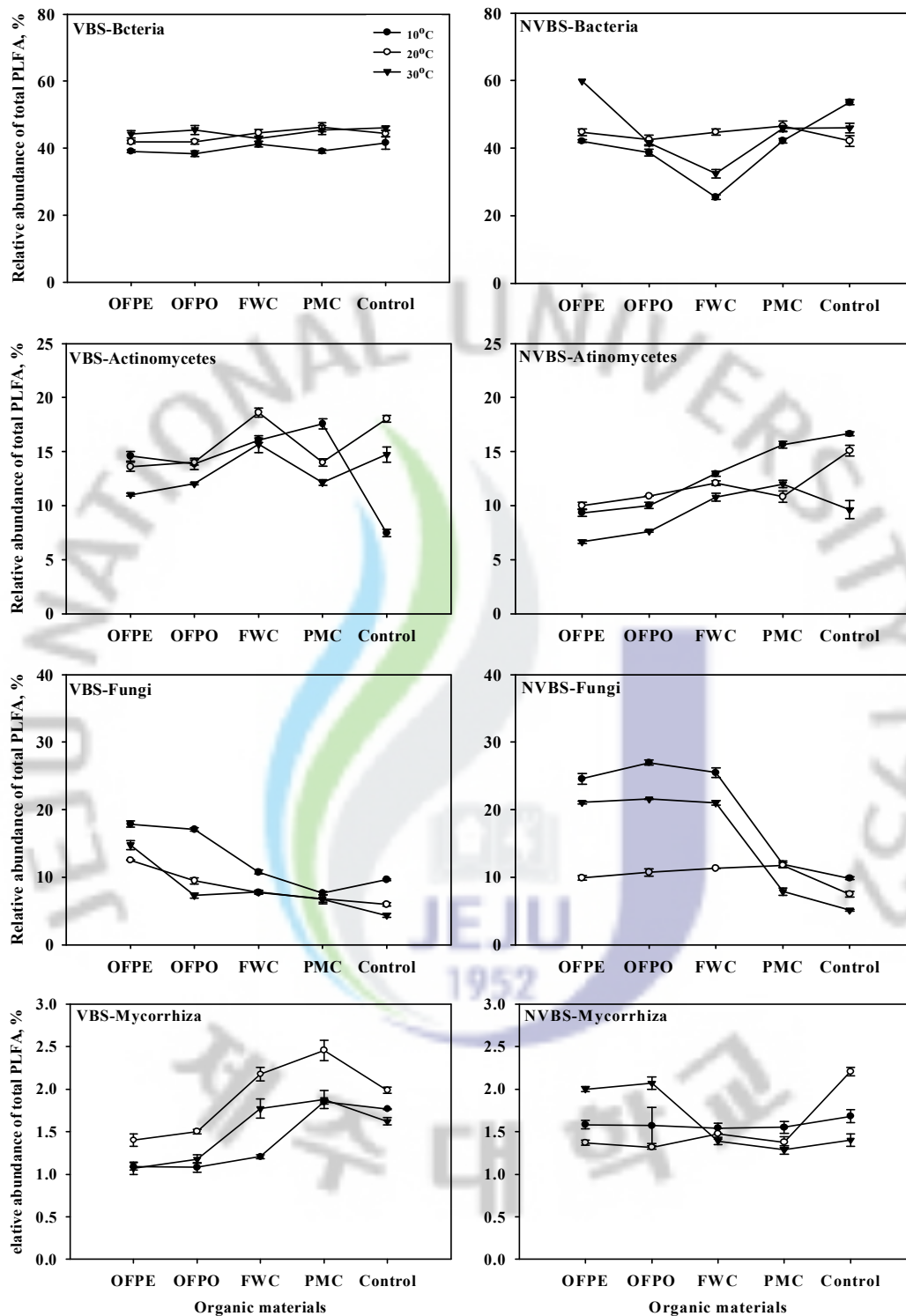


Fig. 6. Relative abundance of microbial group of total PLFA content in volcanic and non-volcanic ash soil treated with organic materials after incubation at 75 days. See Fig. 5.

인지질 지표 지방산을 이용한 항온배양 270일후 미생물 분포는 Fig. 7에 나타났다. 화산회토양에서 세균유래 지방산은 10℃처리에서 처리 간에 유의성이 없었으나 20℃와 30℃처리는 돈분퇴비와 무처리에서 높았다. 방선균 유래 지방산은 10℃처리에서 돈분퇴비, 20℃와 30℃처리는 음식물퇴비에서 높았다. 사상균 유래 지방산은 온도와 상관없이 입상유기질 비료에서 높았다. 균근균 유래 지방산은 10℃, 20℃, 30℃처리에서 각각 무처리, 돈분퇴비, 음식물퇴비가 높았으며 처리 간에 유의성이 있었다.

비화산회토양은 세균 유래 지방산은 10℃처리에서 돈분퇴비(51.9%), 20℃와 30℃처리는 입상유기질비료(52.5%, 50.8%), 방선균 유래 지방산은 10℃처리에서 무처리(11.7%), 20℃처리는 입상유기질비료(12.2%), 30℃처리는 돈분퇴비(13.5%)가 높았다. 방선균 유래 지방산은 온도가 10℃ 높아질수록 증가하는 경향을 보였다. 사상균 유래 지방산은 10℃, 20℃, 30℃처리에서 음식물퇴비(29.1%, 11.5%, 32.7%)가 높았으며, 온도간에 차이가 컸다. 균근균은 10℃처리에서 무처리(1.2%), 20℃처리에서 입상유기질비료(1.3%), 30℃처리는 돈분퇴비(1.9%)가 높았으며 온도가 높을수록 균근균 유래 지방산은 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과 화산회토양에서 세균 유래 지방산은 비슷하였으나 10℃처리에서 많았고, 방선균유래 지방산은 음식물퇴비 처리에서 온도가 높아질수록 증가하였다. 사상균 유래 지방산은 유기질비료 처리에서 증가하였고, 균근균 유래 지방산은 유기질비료 처리에서 낮았으나 처리간에 유의성이 있었다. 비화산회토양에서 세균 유래 지방산은 돈분퇴비(10℃)와 입상유기질비료(20℃, 30℃)처리에서 높았으며, 방선균 유래 지방산은 온도별로 변동폭이 컸다. 사상균 유래 지방산은 음식물퇴비(10℃, 30℃)와 분상유기질비료(30℃)처리에서 높았으며, 균근균 유래 지방산은 처리간 유의성이 있었다. 하지만 배양기간이 길어지면서 유기물에 따라 차이가 있지만 미생물의 분포비율이 감소하는 경향을 보였다. 이는 온도별로 인지질 지방산 조성과 함량변화에 따라 미생물 분포가 다르게 나타나는 것으로 생각된다.

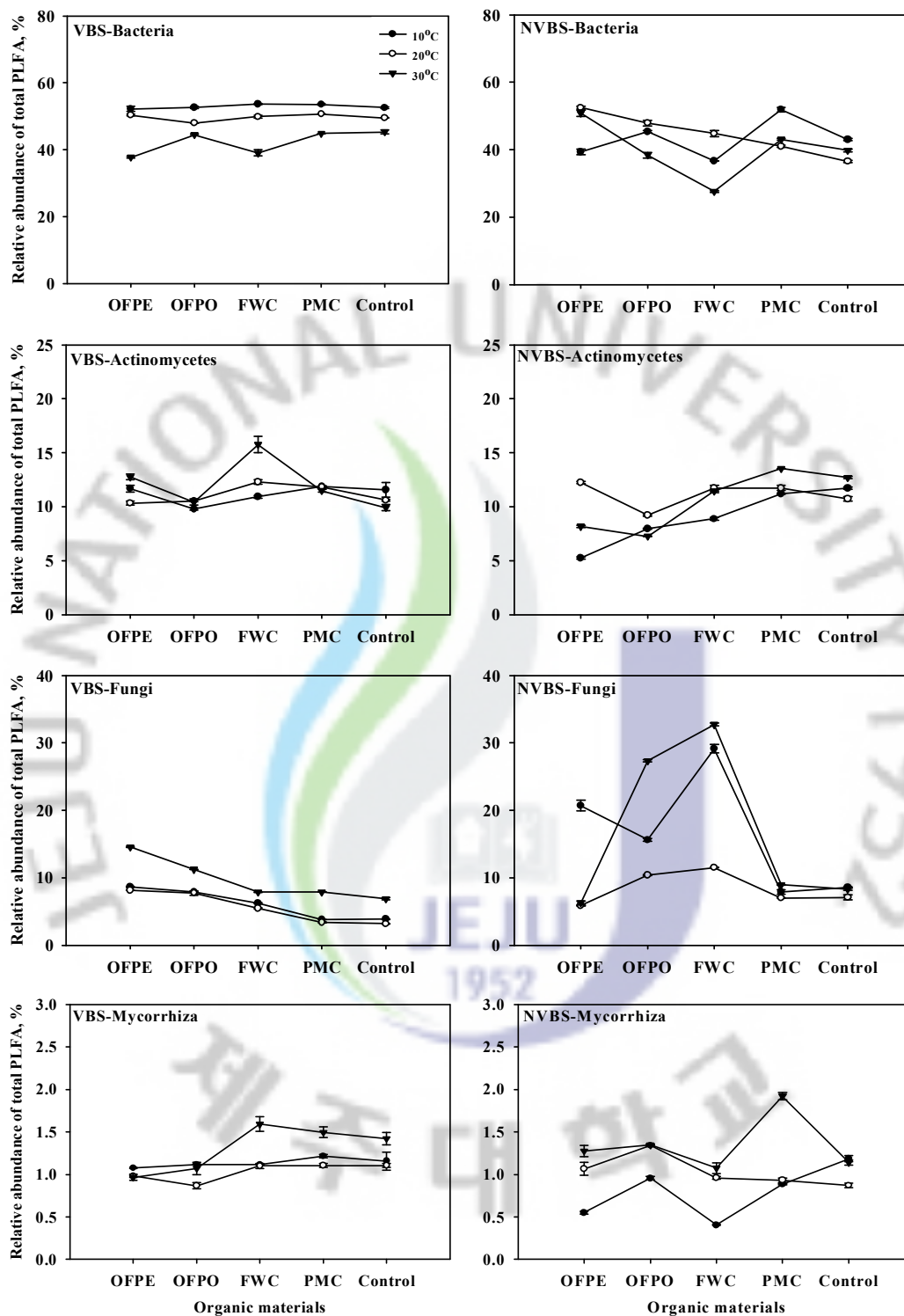


Fig. 7. Relative abundance of microbial group of total PLFA content in volcanic and non-volcanic ash soil treated with organic materials after incubation at 270 days. See Fig. 5.

다. 인지질 지방산함량에 의한 생물학적 지표(Biological index)해석

토양별 항온배양 75일후 지표 인지질 지방산을 이용한 기질이용성과 환경스트레스지표 변화를 분석한 결과는 Fig. 8에 나타냈다. 화산회토양에서 G-/G+비는 온도가 높을수록 감소하였으며 10℃처리는 음식물퇴비가 3.35, 20℃처리는 분상유기질비료가 1.06, 30℃처리는 무처리가 0.65 으로 높았다. F/B비는 G-/G+비와 같은 경향을 보였으며, 10℃처리는 분상유기질비료가 0.48, 20℃와 30℃처리는 입상유기질비료가 각각 0.33, 0.35 으로 높았다. cy19:0/18:1ω7c비는 증가하였으며, 10℃와 20℃처리는 무처리가 각각 3.16, 3.65 으로 높았고, 30℃처리는 입상유기질비료가 2.65 으로 높았다. Unsat/sat비는 온도가 높을수록 감소하는 경향을 보였으며, 10℃처리는 입상유기질비료가 1.49, 20℃와 30℃처리는 음식물퇴비에서 각각 1.18, 0.84 으로 높았다.

비화산회토양은 G-/G+비가 온도가 높을수록 감소하였으며 10℃처리는 음식물퇴비가 2.87, 20℃처리는 입상유기질비료가 1.06, 30℃처리는 음식물퇴비가 0.64 으로 높았다. F/B비는 10℃처리에서 분상유기질비료가(0.73), 20℃와 30℃처리는 음식물퇴비가 각각 0.28, 0.68로 높았다. cy19:0/18:1ω7c비는 온도가 높을수록 증가하는 경향이었고 10℃와 30℃처리에서 돈분퇴비가 각각 1.81, 4.09였으며, 20℃처리는 입상유기질비료가 2.47로 높았다. Unsat/sat비는 10℃처리는 입상유기질비료가 2.18, 20℃처리는 무처리가 1.29, 30℃처리는 분상유기질비료가 1.09로 높았다.

G-/G+, F/B비는 토양에 상관없이 온도가 올라가면서 감소하였으며 비화산회토양에서 감소비율이 높았다. 이는 고온에서 유기물의 분해가 활발하게 진행되어, 탄소 영양원이 풍부해졌기 때문으로 생각되며, Feng and Simpson(2009)이 보고한 결과와 일치하였다. 또한 Kaur et al.(2005)은 온도변화가 미생물군집에 스트레스를 주어 지방산 조성을 변화시킨다고 하였는데, 사상균과 그람음성세균 유래 지표지방산이 감소하였기 때문으로 추측된다.

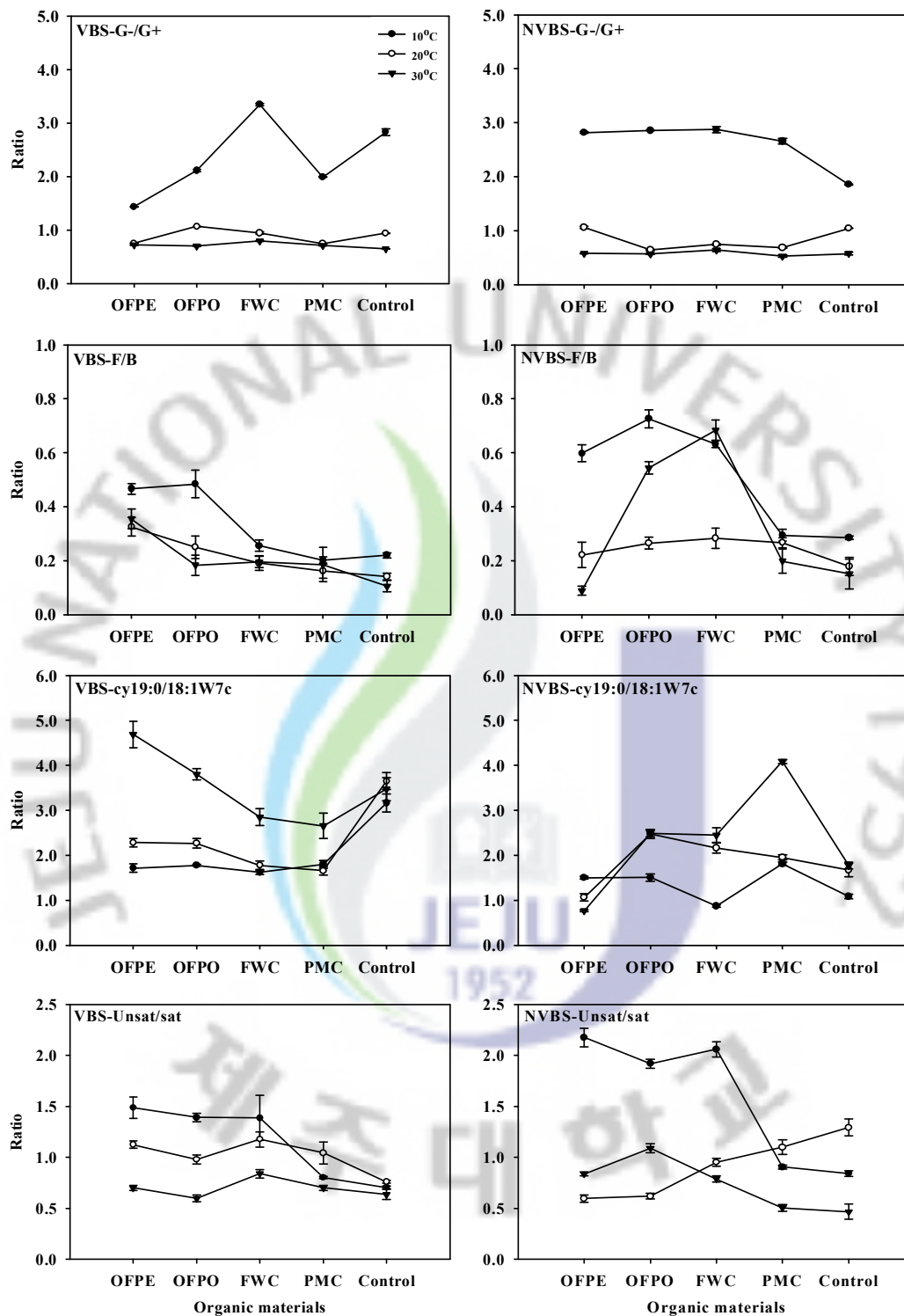


Fig. 8. Biological index ratio by PLFA profiles in volcanic and non-volcanic ash soil treated with organic materials after incubation at 75 days. See Fig. 5.

라. 인지질 지방산 함량에 의한 미생물군집의 시기별 변화

토양유형(Green and Scow, 2008)은 미생물군집이 분명하게 차별화 되어 인지질 지방산은 미생물 군집구조의 지표로 활용할 수 있다(Bossio et al., 1998; Bossio and Scow, 1998; Kaur et al., 2005). 토양유형과 온도조건이 인지질 지방산 함량과 조성에 미치는 영향에 대하여 주성분 분석을 한 결과는 Fig. 9와 10에 나타냈다. 75일에 분석된 인지질 지방산 함량은 온도보다는 토양별로 군집을 형성하였으며, 총 변동 중 제1 주성분은 22.0%, 제 2주성분은 19.2%를 설명할 수 있었다(Fig. 9). 고유값이 1이상인 변수가 8개로 전체적으로 84.3%를 설명할 수 있었다(Table 3). Rosa et al.(2006)은 미생물군집구조는 토양간 차이가 크게 나타난다고 하였는데 건조된 토양에 유기물을 처리하였을 때, 초기의 미생물 군집구조는 온도보다는 토양의 화학성, 통기성 등 토양특성의 영향을 받는 것으로 생각된다. de Ridder-Duine et al.(2005)과 Nunan et al.(2005)은 토양적인 특성이 미생물군집구조 형성에 크게 영향을 준다고 하였다.

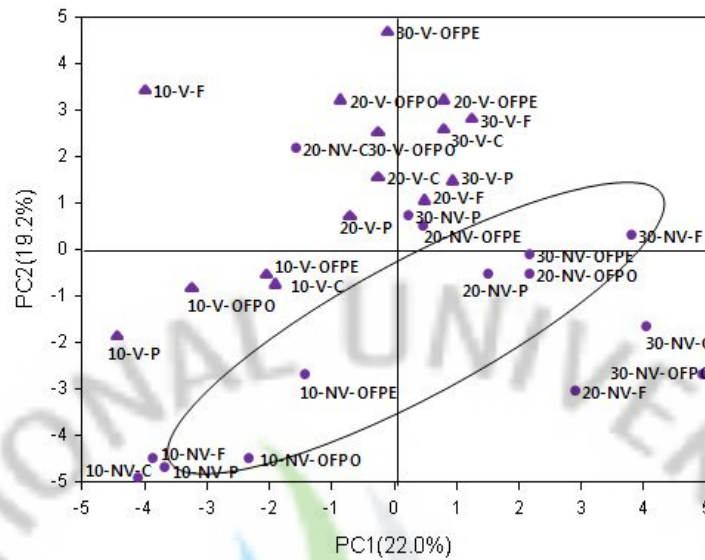


Fig. 9. Principal component analysis of microbial community structures using PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 75 days(10:10°C; 20:20°C; 30:30°C; V:volcanic ash soil; NV:non-volcanic ash soil; C:control; P:PMC; F:FWC).

Table 3. Eigenvalues of the correlation matrix by PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 75 days

Parameter	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
	----- % -----			
1	6.825	0.865	0.220	0.220
2	5.959	1.644	0.192	0.412
3	4.314	1.824	0.139	0.551
4	2.490	0.206	0.080	0.632
5	2.283	0.474	0.073	0.705
6	1.809	0.507	0.058	0.764
7	1.302	0.128	0.042	0.806
8	1.173	0.229	0.037	0.843

270일에 분석된 인지질 지방산 함량은 토양보다는 온도별로 군집을 형성하였는데, 총변동 중 제1 주성분은 26.0%, 제 2주성분은 20.4%를 설명 할 수 있었다 (Fig. 10). 고유값이 1이상인 변수가 7개로 전체적으로 82.4%를 설명할 수 있었다(Table 4). Wennman and Katterer(2006)는 온도와 수분함량이 높아질수록 탄소무기화가 증가하였다고 하였는데, 건조된 토양에 유기물을 혼합하여 처리하였을 때 일정시간이 지나고 나면 미생물이 유기물을 분해하여 영양원을 섭취하기 때문에 토양특성보다는 온도의 영향이 큰 것으로 생각된다. 또한 일정기간 지난 후 미생물 군집이 안정화되면서 온도 등의 환경이 군집구조와 구성에 영향을 준 것으로 생각되며, Wu et al.(2010)이 토양 환경조건은 미생물군집 형성에 크게 영향을 준다는 결과와 일치하는 경향을 보였다.

이상의 결과 토양 유형간에는 미생물군집이 분명하게 차별화 되어 인지질 지방산을 미생물 군집구조를 해석하는 지표로 적용이 가능 할 것으로 생각된다.

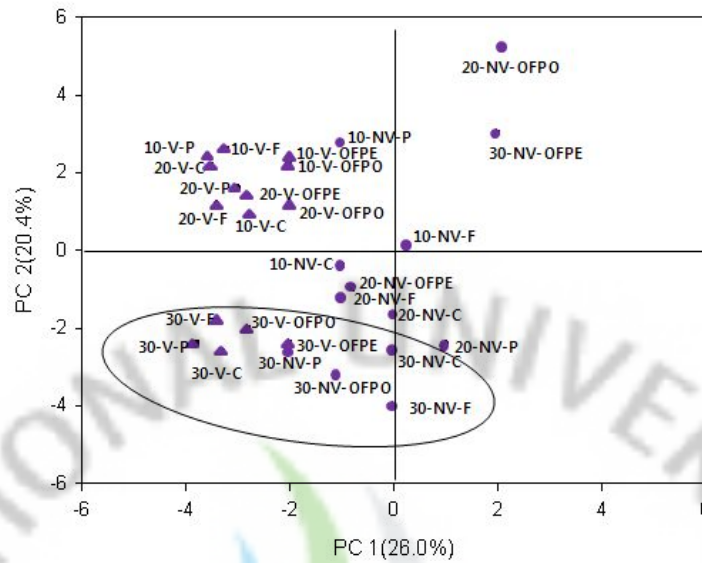


Fig. 10. Principal component analysis of microbial community structures using PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 270 days. See Fig. 9.

Table 4. Eigenvalues of the correlation matrix by PLFA profiles between soil type and temperature after incubation at 270 days

Parameter	Eigenvalue	Difference	Proportion	Cumulative
			----- % -----	
1	7.544	1.628	0.260	0.260
2	5.916	2.479	0.204	0.464
3	3.436	0.956	0.118	0.582
4	2.480	0.711	0.085	0.668
5	1.768	0.332	0.061	0.729
6	1.436	0.103	0.049	0.778
7	1.332	0.430	0.046	0.824

4. 토양효소활성 시기별 변화

가. β -Glucosidase activity

Fig. 11은 유기물 분해에 관여하는 β -glucosidase의 활성 변화를 나타낸 것으로 비화산회토양이 화산회토양보다 효소활성이 높았다. 비화산회토양은 150일에 10°C와 20°C처리는 분상유기질비료가 76.0, 35.3 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 돈분퇴비보다 각각 3배, 1.5배 이상 높았다. 30°C처리는 음식물퇴비가 돈분퇴비보다 약 3배정도 높았으며 처리간 유의성이 있었다. 돈분과 음식물퇴비는 20°C, 유기질비료는 10°C처리에서 높았고 온도가 낮을수록 효소활성은 낮아졌다.

270일은 150일보다 높았으며 10°C처리는 분상유기질비료가 34.8, 39.5 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 돈분퇴비보다 각각 5배, 2배 이상 높았다. 30°C처리는 음식물퇴비가 28.2 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 돈분퇴비 9.8 ug PNP g⁻¹ h⁻¹보다 3배정도 높았다.

화산회토양은 150일에 10°C와 20°C처리는 분상유기질비료가 46.4, 35.3 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 돈분퇴비보다 각각 3배, 1.5배, 30°C처리는 분상유기질비료가 22.7 ug PNP g⁻¹ h⁻¹로 무처리보다 2배정도 높았다. 돈분과 음식물퇴비는 20°C처리에서 높게 나타났으며 유기질비료는 10°C처리에서 높았고 온도가 낮을수록 효소활성은 낮아졌다. 270일은 150일보다 낮았으며 분상유기질비료가 높았고 10°C, 20°C, 30°C처리에서 각각 15.5, 25.7, 14.6 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 돈분퇴비보다 약간 높았다.

β -Glucosidase 활성은 비화산회토양이 화산회토양보다 높았고 온도가 높을수록 유기물에 따라 다소 차이가 있지만 감소하였고, 시간이 경과할수록 낮아졌다. 유기물별로는 유기질비료>음식물퇴비>돈분퇴비 순으로 감소하였다. 유기질비료는 150일과 270일에 각각 10°C와 20°C처리에서 높았으며, 음식물퇴비는 비화산회토양의 30°C처리에서 높게 나타났다. 토양에 투입된 유기물은 미생물에 쉽게 분해가 되거나 분해 저항성을 나타내는데(Alvarez et al., 1995), 톱밥을 많이 포함한 돈분퇴비보다 이분해성 유기물이 포함된 골분, 어분 등의 유기질비료가 쉽게 분해가 되는 것으로 생각된다. Sardans et al.(2008)은 겨울에 토양온도와 β -glucosidase 활성은 정의상관을 나타내며, 온난화는 겨울에 토양효소활성을 증가시키지만 토양유기물 함량의 변화를 가져오지 않는다고 했다. 이것은 온도 증

가는 효소의 활성을 높이지만 유기물분해 잘 이루어지기 위해서는 토양 pH, 수분함량, 유기물의 질, 미생물활성 등 여러 가지 요인이 충족되어야만 한다는 것을 의미한다(Agehara and Warncke, 2004; Matyka-Sarzynska and Sokolowska, 2005). 따라서 실제 포장상태에서 온도증가가 유기물의 분해를 촉진할 수 있지만 유기물의 분해가 잘 일어나기 위해서는 토양환경과 비 생물적인 조건이 충족되어야 할 것으로 보인다. 화산회토양에서 β -glucosidase 활성이 낮은 것은 Anderson(1979)이 Al^{3+} 등 금속이온이 효소활성에 영향을 주어 유기물분해를 저해시킨다고 보고와 일치하는 경향이였다.



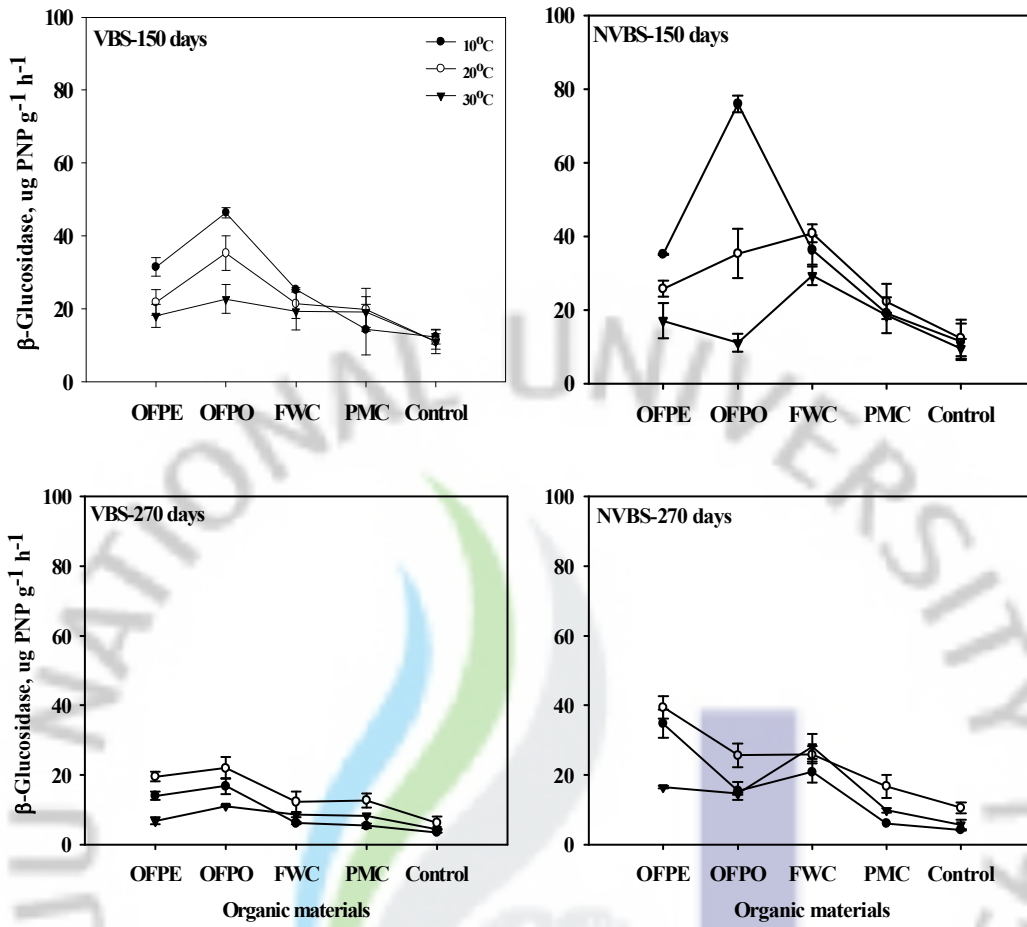


Fig. 11. Changes in soil β -glucosidase activity during incubation period. See Fig. 5.

나. Urease activity

토양에 유기물을 첨가하면 미생물체량과 효소활성이 증가하며 토양 pH, 유기탄소, 질소함량은 urease활성과 상관관계가 높다(Dinesh et al., 1998). Urease는 요소를 CO₂와 NH₃로 분해하는 효소로 토양별 유기물처리에 따른 urease활성의 변화는 Fig. 12에 나타냈다.

화산회토양은 150일에 10℃처리에서 urease활성이 높았으며 입상유기질비료가 18.9 ug NH₄-N g⁻¹ 2 h⁻¹으로 높았으며 처리간 유의성이 있었다. 20℃처리는 처리 간에 유의성이 없었고, 30℃처리는 음식물퇴비가 2.2 ug NH₄-N g⁻¹ 2 h⁻¹으로 높았다. 270일은 150일보다 urease활성이 낮았고, 10℃와 30℃처리는 처리간 유의성이 없었다. 20℃처리는 음식물퇴비가 입상유기질비료 보다 2배정도 높게 나타났다. 토양에 유기물을 첨가하면 유기태 질소는 무기화되면서 NH₄-N을 방출하는데 NH₄-N는 초기에 높고 분해시간이 길고 온도가 높을수록 낮게 나타나며 urease 활성은 증가한다(Klose and Tabatabai, 2000)는 결과와 일치하는 경향이였다.

비화산회토양은 150일에 모든 온도처리에서 입상유기질비료가 가장 높게 나타났다. 온도에 상관없이 입상유기질비료가 높았고 10℃와 20℃처리에서 75.0, 16.3ug NH₄-N g⁻¹ 2 h⁻¹으로 돈분퇴비 보다 각각 25배, 4배 높았으며 온도가 낮을수록 효소활성은 낮아졌다. 270일은 150일보다 상당히 낮았으며, 입상유기질비료와 10℃처리에서 높게 나타났다.

항온배양 시험결과 urease 활성은 비화산회토양에서 높았으며, 유기질비료>음식물퇴비>돈분퇴비 순으로 감소하는 경향이였다. 온도별로는 10℃처리에서 높았으나 시간이 경과할수록 모든 처리에서 낮아졌다. 10℃처리에서 높게 나타난 것은 30℃보다 질소 무기화가 느리게 진행되었기 때문으로 생각된다. 하지만 유기질비료는 urease활성을 증가시킨다(Bremner and Mulvaney, 1978; Roscoe et al., 2000)는 보고와 일치하는 경향을 보였으며, 화산회토양은 allophane 영향으로 효소활성이 높지 않다(Alliso, 2006)는 결과와 일치하였다. 따라서 효소활성을 증가시키기 위하여 유기질비료 등 유기물의 공급이 필요할 것으로 생각된다.

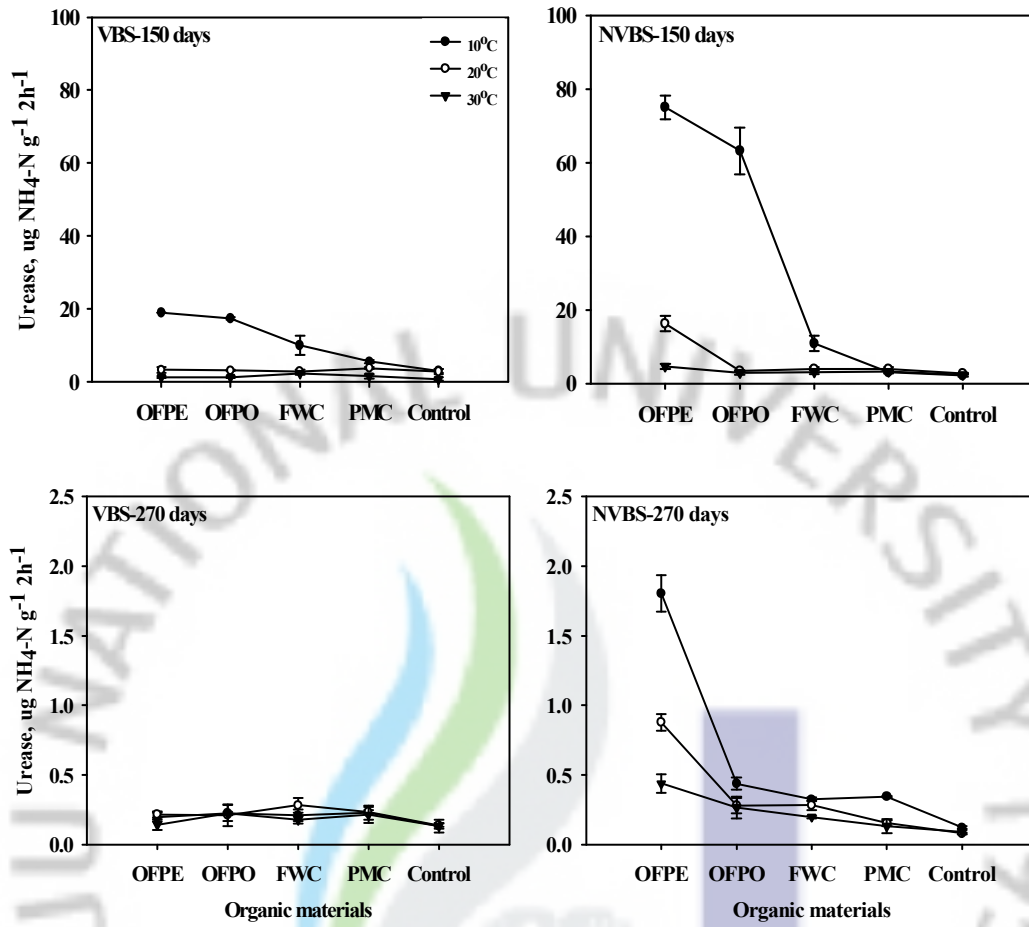


Fig. 12. Changes in soil urease activity during incubation period. See Fig. 5.

다. Acid phosphatase activity

토양별 acid phosphatase 활성 변화는 Fig. 13에 나타났다. 화산회토양은 75일에 10°C 처리에서 입상유기질비료, 20°C와 30°C 처리는 분상유기질비료가 무처리보다 높았으며 처리간 유의성이 있었다. 270일은 10°C 처리에서 입상유기질비료가 72.5 ug PNP g⁻¹ h⁻¹, 20°C와 30°C 처리는 분상유기질비료가 각각 74.1, 90.1 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 무처리보다 높았으며 처리간 유의성이 있었다.

비화산회토양에서 75일은 10°C, 20°C, 30°C 처리에서 분상유기질비료가 각각 42.3, 92.6, 98.1 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 무처리보다 높았고 처리간 유의성이 있었다. 270일은 10°C, 20°C, 30°C 처리에서 분상유기질비료가 각각 56.4, 93.6, 90.8 ug PNP g⁻¹ h⁻¹으로 무처리 38.7, 49.3, 64.4 ug PNP g⁻¹ h⁻¹보다 높았으며 처리간 유의성이 있었다. 토양종류에 상관없이 온도가 높을수록 인산효소활성은 높게 나타났다으며, 유기물처리 중에서는 유기질비료(입상, 분상)에서 높았다. 이러한 결과는 토양에 유기물을 공급하면 효소활성이 증가한다는 보고와 일치하였으며 (Dinesh et al., 1998), 분상유기질비료는 유기태 인산함량이 높고 분해가 빠르게 진행되어 활성이 높게 나타난 것으로 생각된다.

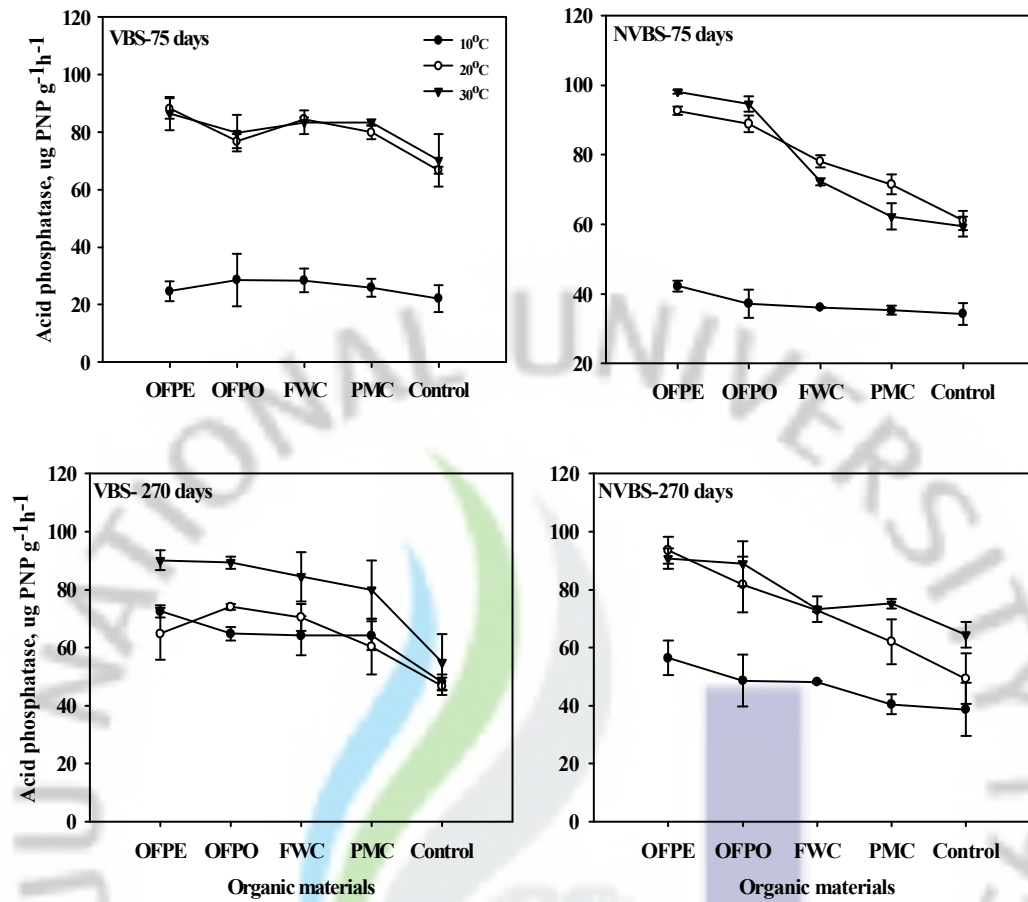


Fig. 13. Changes in soil acid phosphatase activity during incubation period.

See Fig. 5.

5. 온도, 토양화학성과 미생물활성 지표간의 상관관계

토양화학성은 미생물활성 지표와 높은 상관관계를 나타냈다(Table 5). 토양 온도는 토양종류에 상관없이 acid phosphatase($r=0.728$)와 고도의 정의 상관관계를 나타냈다($p<0.001$). 유기물과 PLFA는 화산회토양은 부의상관($r=-0.493$), 비화산회토양은 정의상관($r=0.634$) 관계를 보였는데, 화산회토양의 유기물함량은 미생물 활성에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 비화산회토양에서 유기물은 urease, β -glucosidase와 높은 상관관계를 보였다. 화산회토양에서 urease와 acid phosphatase는 부의 상관, β -glucosidase는 고도의 정의 상관관계를 보였다($p<0.001$). Acid phosphatase와 urease는 토양종류에 상관없이 각각 PLFA, β -glucosidase와 높은 정의 상관관계를 보였다.

Table 5. Pearson correlation coefficient between physicochemical factors and soil microbial activities (N=30)

Soil	Factors	PLFA	APA	URA	GLU
VBS	Temp.	ns	0.728***	-0.420*	ns
	O.M.	-0.493**	ns	ns	ns
	NO ₃ -N	ns	0.464**	ns	0.546**
	NH ₄ -N	ns	-0.462**	ns	ns
	APA	0.360*	ns	ns	ns
	URA	ns	-0.606***		0.733***
NVBS	Temp.	ns	0.728***	ns	ns
	O.M.	0.634***	ns	0.382*	0.488**
	NO ₃ -N	0.492**	0.684***	ns	ns
	NH ₄ -N	0.555**	ns	ns	0.422*
	APA	0.491**	ns	ns	ns
	URA	ns	ns	ns	0.615***

PLFA:Phospholipid fatty acid; APA:Acid phosphatase; URA:Urease; GLU: β -Glucosidase.

DMRT: $p<0.001$, ***, $p<0.01$, **, $p<0.05$, *, ns:Not significant.

V. 요약

본 연구는 토양과 온도조건이 질소무기화율, 인지질 지방산함량, 미생물 분포와 군집구조, 효소활성에 미치는 영향을 평가하고자 수행하였다. 화산회토양과 비화산회토양 30 g에 혼합유기질비료(입상과 분상), 돈분퇴비, 음식물퇴비를 각각 2 g씩 잘 혼합한 후 10°C, 20°C, 30°C에서 항온배양을 하면서 토양화학성, 인지질 지방산 함량, 토양효소활성을 분석하였다.

토양 pH, C/N비를 고려할 때 유기물 분해율은 화산회토양에 비해 비화산회토양에서 높았다. 질소 무기화율은 온도와 비례하여 증가하였고, 유기물 종류별로는 분상유기질비료>음식물퇴비>입상유기질비료>돈분퇴비 순으로 낮아졌다.

인지질 지방산 총함량은 항온배양 초기(75일)에는 비화산회토양에서 후기(270일)에는 화산회토양에서 높았다. 지방산 유래 미생물 그룹의 분포는 토양, 온도, 유기물종류에 따라 차이를 보였다. G-/G+, F/B비는 토양에 상관없이 온도가 올라가면서 감소하였으며 비화산회토양에서 감소비율이 높았다. PLFA 함량을 이용하여 주성분 분석을 한 결과 초기(75일)는 토양특성, 후기(270일)는 온도요인에 따라 미생물군집구조를 보였다.

β -Glucosidase와 urease는 화산회토양에 비해 비화산회토양에서 높았고, 시간이 경과할수록 낮아졌다. acid phosphatase 활성은 배양온도에 비례해 높았으며, 유기질비료 처리에서 가장 높았다. 토양온도는 acid phosphatase($r=0.728$)와 높은 상관관계를 보였다($p<0.001$). 비화산회토양에서 PLFA는 유기물($r=0.634$)과 고도의 정의 상관관계를 나타냈다($p<0.001$).

결론적으로 미생물 활성은 토양종류, 온도, 유기물 종류에 따라 상대적인 민감도와 시기별로 차이를 보였으며, 화산회토양에서 낮았다.

VI. 인용문헌

- Alliso, S. D. 2006. Soil minerals and humic acids alter enzyme stability: implications for ecosystem processes. *Biogeochem.* 81:361-373.
- Agehara, S. and D. D. Warncke. 2004. Soil moisture and temperature effects on nitrogen release from organic nitrogen sources. *Am. J. Soil Sci. Soc.* 69:1844-1855.
- Anderson, D. W. 1979. Processes of humus formation and transformation in soils of the Canadian Great Plains. *Euro. J. Soil Sci.* 30:77-84.
- Anderson, T. H. and K. H. Domsch. 1989. Ratio of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 21:471-479.
- Alvarez, R., O. J. Santanatoglia, and R. García. 1995. Effect of temperature on soil microbial biomass and its metabolic quotient in situ under different tillage systems. *Biol. Fertil. Soils* 19:227-230.
- Bååth, E. and T. H. Anderson. 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biol. Biochem.* 35:955-963.
- Bapiri, A., E. Bååth, and J. Rousk. 2010. Drying-rewetting cycles affect fungal and bacterial growth differently in an arable soil. *Microb. Ecol.* 60:419-428.
- Bligh, E. G. and W. J. Dyer. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911-917.
- Bossio, D. A., K. M. Scow, N. Gunapala, and K. J. Graham. 1998. Determinants of soil microbial communities: effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microb. Ecol.* 36:1-12.
- Bossio D. A. and K. M. Scow. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbial Ecology* 35:265-278.

- Bremner, J. M and R. L. Mulvaney. 1978. Urease activity in soil. In: Burns RG(ed) Soil enzymes. *Academic Press, London, pp 149-196.*
- Cobo, J. G., E. Barrios, D. C. L. Kass, and R. Thomas. 2002. Nitrogen mineralization and crop uptake from surface-applied leaver of green manure species on a tropical volcanic-ash soil. *Biol. Fertil. Soils 36:87-92.*
- Cookson, W. R., M. Osman, P. Marschner, D. A. Abaye, I. Clarke, D. V. Murphy, E. A. Stockdale, and C. A. Watson. 2007. Controls on soil nitrogen cycling and microbial community composition across land use and incubation temperature. *Soil Biol. Biochem. 39:744-756.*
- Cordovil, C. M. D. S., J. Coutinho, M. Goss, and F. Cabral. 2005. Potentially mineralizable nitrogen from organic materials applied to a sandy soil: fitting the one-pool exponential model. *Soil Use Management 21:65-72.*
- Crecchio, C., M. Curci, M. D. R. Pizzigallo, P. Ricciuti, and P. Ruggiero. 2004. Effects of municipal solid waste compost amendments on soil enzyme activities and bacterial genetic diversity. *Soil Biol. Biochem. 36:1595-1605.*
- de Ridder-Duine, A. S., G. A. Kowalchuk, P. J. A. K. Gunnewiek, W. Smant, J. A. van Veen, W. de Boer. 2005. Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biol. Biochem. 37:349-357.*
- Debosz, K., P. H. Rasmussen, and A. R. Pedersen. 1999. Temporal variations in microbial biomass C and cellulolytic enzyme activity in arable soils : effects of organic matter input. *Appl. Soil Ecol. 13:209-218.*
- Deenik, J. 2006. Nitrogen mineralization potential in important agricultural soils of Hawai'i. *Soil Crop Manage. 15:1-5.*
- Dick, R. P. 1992. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agric. Ecosyst. Environ. 40:25-36.*
- Dinesh, R., R. P. Dubey, and G. S. Prasad. 1998. Soil microbial biomass and enzyme activities as influenced by organic manure incorporation into soils

- of a rice-rice system. *J. Agro. Crop Sci.* 181:173-178.
- Eivazi, F. and M. A. Tabatabai. 1990. Factors affecting β -Glucosidase and galactosidase activities in soils. *Soil Biol. Biochem.* 22:891-897.
- Feng, X. and M. J. Simpson. 2009. Temperature and substrate controls on microbial phospholipid fatty acid composition during incubation of grassland soils contrasting in organic matter quality. *Soil Biol. Biochem.* 41:804-812.
- Garcia-Gil, J. C., C. Plaza, P. Soler-Rovira, and A. Polo. 2000. Long-term effects of municipal solid waste compost application on soil enzyme activities and microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 32:1907-1913.
- 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.
- Hadas, A., L. Kautsky, and R. Portnoy. 1996. Mineralization of composted manure and microbial dynamics in soil as affected by long-term nitrogen management. *Soil Biol. Biochem.* 28:733-738.
- Kaur, A., A. Chaudhary, R. Choudhary, and R. Kaushik. 2005. Phospholipid fatty acid-A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* 89:1103-1112.
- Kelly, J. M. and G. S. Henderson. 1978. Effects of nitrogen and phosphorus additions on deciduous litter decomposition. *Am. J. Soil Sci. Soc.* 42:972 - 976.
- Kemmitt, S. J., D. Wright, K. W. T. Goulding, and D. L. Jones. 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 38:898-911.
- Klose, S. and M. A. Tabatabai. 2000. Urease activity of microbial biomass in soils as affected by cropping systems. *Biol. Fertil. Soils* 31:191-199.
- 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.
- Marschner, P., E. Kandeler, and B. Marschner. 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35:453-461.
- Matyka-Sarzynska, D. and Z. Sokolowska. 2005. Empirical equation to describe the effect of pH on organic matter release from mucks. *Int. Agrophysics* 19:323-328.
- Nobili, D. M., M. Contin, and P. C. Brookes. 2006. Microbial biomass dynamics in recently air-dried and rewetted soils compared to others stored air-dry for up to 103 years. *Soil Biol. Biochem.* 38:2871-2881.
- Nunan, N., T. J. Daniell, B. K. Singh, A. Papert, J. W. McNicol, and J. I. Prosser. 2005. Links between plant and rhizoplane bacterial communities in grassland soils characterized using molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6784-6792.
- Parham, J. A., S. P. Deng, and W. R. Raun. 2003. Long-term cattle manure application in soil. Part II: effect on soil microbial populations and community structure. *Biol. Fertil. Soils* 38:209-215.
- Puglisi, E., M. Nicelli, E. Capri, M. Trevisan, and A. A. M. Del Re. 2005. A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere* 61:1548-1557.
- Quilchano, C. and T. Maranon. 2002. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biol. Fertil. Soils* 35:102-107
- Rahman, M. H. and S. Sugiyama. 2008. Dynamics of microbial community in Japanese andisol of apple orchard production systems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 39:1630-1657.
- RDA. 1988. Methods for chemical analysis of soil. Institute of agricultural technology.
- Reichstein, M., T. Katter, O. Andren, P. Ciais, E. D. Schulze, W. Cramer, D.

- Papale, and R. Valentini. 2005. Temperature sensitivity of decomposition in relation to soil organic matter pools: critique and outlook. *Biogeosciences* 2:317-321.
- Roscoe, R., C. A. Vasconcellos, A. E. F. Neto, G. A. A. Guedes, and L. A. Fernandes. 2000. Urease activity and its relation to soil organic matter, microbial biomass nitrogen and urea-nitrogen assimilation by maize in a Brazilian Oxisol under no-tillage and tillage systems. *Biol. Fertil. Soils*. 32:52-59.
- Rosa, M., J. A. Pascuala, C. Garciaa, M. T. Hernandeza, and H. Insam. 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biolo. Biochem.* 38:3443-3452.
- Saito, M. 1990. Nitrogen mineralization parameters and its availability indices of soils in Tohoku district, Japan: Their relationship. *Soil Sci. Plant Nutr.* 61:265-272.
- Sardans, J., J. Penuelas, and M. Estiarte. 2008. Changes in soil enzymes related to C and N cycle and in soil C and N content under prolonged warming and drought in a Mediterranean shrubland. *Appl. soil Ecol.* 39:223-235.
- Sharifi, M., B. J. Zebarth, D. L. Burton, C. A. Grant, S. Bittman, C. F. Drury, B. G. McConkey, and N. Ziadi. 2008. Response of potentially mineralizable soil nitrogen and indices of nitrogen availability to tillage system. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 72:1124-1131.
- Takenaka, M and K. Hayano. 1999. Investigation on the influence of the global warming on the mineralization of soil organic matter. *Research Outcomes, Agriculture, Forestry Fishery Technology Bureau.* 339:232-236.
- Tisdale, S. L., W. L. Nelson, J. D. Beaton, and J. L. Havlin. 1993. Soil Fertility and Fertilizers. 5th ed. P. F. Corey, ed. MacMillan Publishing Co., New York, NY.

- Trasar-Cepeda, M. C. and F. Gil-Sotres. 1987. Phosphatase activity in acid high organic matter soils in Galicia. *Soil Biol. Biochem.* 19:281-287.
- Vernimmen, R. R. E., H. A. Verhoef, J. M. Verstraten, L. A. Bruijnzeel, N. S. Klomp, H. R. Zoomer, and P. E. Wartenbergh. 2007. Nitrogen mineralization, nitrification and denitrification potential in contrasting lowland rain forest types in Central Kalimantan, Indonesia. *Soil Biol. Biochem.* 39:2992-3003.
- Wang, W., C. J. Smith, P. M. Chalk, and D. Chen. 2001. Evaluation chemical and physical indices of nitrogen mineralization capacity with an unequivocal reference. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65:368-376.
- Webster, G., L. C. Watt, J. Rinna, J. C. Fry, R. P. Evershed, R. J. Parkes, and A. J. Weightman. 2006. A comparison of stable-isotope probing of DNA and phospholipid fatty acids to study prokaryotic functional diversity in sulfate-reducing marine sediment enrichment slurries. *Environ. Microb.* 8:1575-1589.
- Wennman, P. and T. Katterer. 2006. Effects of moisture and temperature on carbon and nitrogen mineralization in mine tailings mixed with sewage sludge. *J. Environ. Qual.* 35:1135-1141.
- Wu, Y., X. Yu, H. Wang, N. Ding, and J. Xu. 2010. Does history matter? Temperature effects on soil microbial biomass and community structure based on the phospholipid fatty acid (PLFA) analysis. *J. Soils Sediments* 10:223-230.

감사의 글

언젠가는 거쳐야 할 과정이고 해야 할 일이지만 훌가분한 마음이 듭니다. 대학을 졸업하고 농업 연구직으로 직장생활을 하면서 토양미생물 분야와 인연을 맺은지 15년이나 됐습니다. 그동안 많은 도움과 가르침을 주신 모든 분들에게 지면으로나마 진심으로 감사의 말씀을 드립니다.

무엇보다 많이 부족한 저를 감싸고 지켜보면서 격려를 해주시고 학위과정 동안 책으로 배울 수 없는 많은 것을 느끼게 해주신 현해남 교수님께 감사드립니다. 바쁘신 가운데 귀중한 시간을 내어 많은 조언과 격려를 해주신 송창길 교수님, 전용철 교수님, 김동순 교수님 정말 고맙습니다. 같은 미생물 분야를 연구하면서 동료로서 친구로서 이번 학위 논문완성에 많은 도움을 준 원항연 박사에게 감사의 마음을 전합니다. 직장생활을 하면서 토양미생물 분야와 연을 맺게 하고 많은 기대와 도움을 주신 임한철 소장님께도 감사의 말씀을 드립니다.

학부와 대학원 과정 동안 항상 격려와 인생의 이정표가 될 좋은 말씀을 하여주신 류기중 교수님, 故 고정삼 교수님, 김찬식 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 미생물연구를 하면서 많은 도움을 주신 서장선, 강위금 과장님, 논문이 잘되고 있는지 물어봐주시고 여러 가지로 신경을 써주신 전승중 연구관님, 고상욱 연구관님, 성기철 연구관님, 문경환, 강경하 박사님에게도 감사의 말씀을 드립니다. 논문완성에 많은 도움을 주신 한승갑 박사님, 김광식 장장님, 김용호, 현재욱, 박남건 연구관님, 이종언 박사님에게도 감사의 말씀을 드립니다. 가까이 있으면서 긴장을 풀고 함께 웃을 수 있게 해준 문두경, 김성철, 안울균 박사님, 김천환, 송은영, 임찬규 연구사님, 박종한 연구관님 고맙습니다. 논문준비를 하는데 많은 도움을 준 농업생태실험실 김형순, 전옥경, 고혁만님과 무기분석실 문경환 선생에게 고맙다는 말씀을 드립니다.

김갑병, 송상헌, 조상욱, 김정익, 양현국 친우와 비단회 친구들에게도 고맙다는 말씀을 드립니다. 아울러 논문발표에 많은 도움을 준 고석형 박사와 토양학 실험실 선 후배님들에게도 감사의 말씀을 드립니다.

말이 필요 없는 사랑하는 아내 진숙영, 공부하는 아빠 모습이 좋다는 두 아들 승윤, 승헌아 고맙다. 앞으로 건강하게 자라서 이 나라의 꼭 필요한 인재가 되어줬으면 좋겠다. 농업, 농촌 발전에 많이 기여하신 자랑스런 아버님과 어머니, 형님, 형수님, 동생, 제수들에게도 감사의 말씀을 드립니다. 늘 격려해주시고 든든한 버팀목이 되어주시는 장인, 장모님, 처제, 동서들에게도 고맙다는 말씀을 드립니다.

학위논문을 하면서 배우고 느낀 점을 생활 속에 실천하면서 즐겁게 살겠습니다.

2011. 1. 20 좌재호