

북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석

Fatty Acids Analysis of Soils around the Arctic Station, Dasan



건국대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “다산과학기지 기반 지질-대기-생태 환경변화 연구”과제의 위탁연구
“북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석”과제의 최종보고서로 제출합니다.



총괄연구책임자 : 이 유 경
위탁연구기관명 : 건국대학교
위탁연구책임자 : 양 영 헌
위탁참여연구원 : 김 정 호
“ : 이 주 희

요 약 문

I. 제 목

북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

빙하 후퇴 지역의 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 유기물 변화를 파악하기 위하여 대표적인 지표인 지방산 분석을 통한 토양 미생물 분석 및 이를 통한 환경/지역 간 미생물 연구

III. 2차년도 연구개발의 내용 및 범위

- 북극 토양 유래의 lipid marker 분석
 - 샘플링이 완료된 토양 시료의 lipid marker의 추출 및 분석
 - Lipid marker를 이용한 미생물 군집 유추
- 북극 토양 미생물의 순수분리 및 지질대사체 분석
 - 북극의 토양 샘플로부터 미생물을 순수분리
 - 균주의 생화학 실험 및 지질 대사체 분석 및 비교

IV. 2차년도 연구개발결과

- 북극 토양 유래의 lipid marker 분석
 - 샘플링 완료된 북극 토양 시료로부터 지질을 출하여 최적화된 컬럼 크로마토그래피를 활용하여 인지질 지방산(PLFA)을 분획
 - 최적화된 유도체화 방법인 Alakline mild methanolysis 방법으로 인지질 지방산(PLFA)을 질량분석기(GC-MS)로 지방산 분석완료
 - 기존 문헌 및 GC-MS 운용상에 분석 가능한 PLFA를 적용하여 PLFA-미생물 간의 상호 관계를 적용함
 - 이러한 lipid marker를 이용하여 총 8개의 site에 대한 미생물 군집

분석을 완료함

- 북극 토양 미생물의 순수분리 및 지질대사체 분석
 - 북극 다산과학기지 주변 토양으로부터 얻은 10여종의 미생물 순수분리 및 기초 활성 테스트를 통한 극지 미생물의 성장 패턴 및 관련 효소 관측
 - 극지 유래 *Pseudomonas sp.* 에 대한 온도, pH, NaCl 농도에 따른 성장 여부 등의 생화학 실험 수행

V. 연구개발결과의 활용계획

- 북극 토양의 lipid marker를 통해 극지 미생물 군집 분석 및 토양 환경을 유추 할 수 있음
- 북극 토양에서 분리한 미생물을 활용하여, 실험적으로 확인한 생화학 실험 결과를 토대로 대사체 분석에 활용



목 차

제 1 장 서론

- * 연구개발의 목적, 필요성 및 범위 등을 기술

제 2 장 국내외 기술개발 현황

- * 국·내외 관련분야에 대한 기술개발현황과 연구결과

가 국·내외 기술개발현황에서 차지하는 위치 등을 기술

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- * 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과를 기술

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

- * 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도 등을 기술

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- * 추가연구의 필요성, 타연구에의 응용, 기업화 추진방안을 기술
- * 연구기획사업 등 사업별 특성에 따라 목차는 변경 가능함.

제 6 장 참고문헌

- * 보고서 작성 시 인용된 모든 참고 문헌을 열거한다.

제 1 장 서론

제 1 절 연구의 목적

본 과제의 목적은 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 대기·유기물·생태계 변화를 파악하고자 하며, 스발바르 및 그린란드의 고환경 특성 및 지질·광물·지구화학 특성 이해하는 것이다.

따라서 이러한 목표를 수행하기 위한 위탁과제로서

**다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를
모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술 수립**

을 과제의 목표로 한다.

제 2 절 연구의 필요성

북극은 지구의 기상 기후 및 해류의 순환 등을 통해 지구의 환경 변화에 중요한 역할 수행한다. 북극에서 지구의 기후를 만들어 내기 때문에 그 지역의 변화가 지구 전체에 중대한 영향을 미치기 때문이다. 지난 1년간 북극에서 관측된 겨울철 평균 기온이 10~15℃ 정도 수준이나 상승하는 변화가 있었다.

최근 발간되는 북극관련 연구결과를 보면 1970년대 초반부터 북극양 중앙부의 바다 얼음의 두께가 30% 이상 감소하였으며 최근 북극 얼음 면적은 매 10년간 4%씩 감소하고 있다고 한다. 이에 따라서 북극의 차가운 대기가 한반도의 기후 변화에 영향을 미치며 기온상승으로 인한 해빙의 감소 및 기류의 변화 등의 기상 이변 현상이 야기되고 있다.

이와 같이 북극의 기후변화가 초국가적 현상으로 영향을 미치므로 이에 대한 관심과 지속적인 연구의 필요성이 제기되며, 기후변화에 대한 예측과 대비가 요구된다.

수많은 빙하가 해빙되고 있는 가운데 몇 만 년 간 얼어있던 북극의 땅이 표출되면서 유기물의 출입이 시작되고 첫 번째로 미생물 군집이 토양을 점령하게 된다. 그렇기 때문에 다산기지 주변의 빙하가 순차적으로 녹고 있는 Midtre Geikiebrean 지역을 모델로 하여 토양 내 지방산 측정을 통한 미생물 군집 분포의 예측을 수행하였다.

제 3 절 연구의 범위 및 연구체계

북극의 유기물의 흐름 및 미생물 군집의 다양성 연구의 필요성에 의해서, 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립한다.

본 과제의 목표를 이루기 위하여

- 빙하 후퇴 지역의 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 유기물 변화를 파악하기 위하여 대표적인 유기물 지표인 지방산 분석 필요
- 극지연구소에 지방산을 정밀하게 분석할 위탁연구 필요



- 토양 시료 내 지방산 표지 인자 분석을 위한 추출 조건 최적화
- 지방산 및 탄소 저장 물질 분석 기술 수립을 통한 다산과학기지 주변 빙하 후퇴 지역 토양 표지 인자 비교 분석
- Nutrient depletion 조건 적용을 통한 극지 미생물의 지방산 표지 및 탄소 저장 물질 인자 분석

이를 통하여 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립할 수 있다.



북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 표지 인자 발굴

1년차

효율적 지방회수
방법 setup

Lipid 분석
최적화

2년차

토양유래 lipid
marker 분석

극지 미생물
lipid 분석

3년차

빙화후퇴시기별 대표
지역간 lipid 비교

극지 미생물 lipid
marker 비교 연구

- 북극 다산과학기지 주변 시료의 지방산 표지 인자 발굴
- 지형·환경에 따른 동토층 및 극지미생물 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술 수립 및 적용

본 연구는 북극 다산과학기지 주변의 토양 샘플로부터 지방산 표지 인자를 발굴하기 위하여 1 년차에 토양으로부터 지질을 효과적으로 회수하는 조건을 확립하고 GC-MS 기기를 이용하여 지질을 분석하기에 적합한 분석조건을 설정하는 것을 목표로 한다. 2 년차에는 확립된 토양 인지질 분석법을 이용하여 토양 유래의 lipid marker를 정성 및 정량 분석함과 동시에 토양으로부터 분리된 극지 미생물의 지질을 분석하는 것이 세부 계획이다. 또한 마지막 년차에는 북극의 샘플링 지역에서 빙하가 후퇴한 시기별 토양의 lipid marker의 프로파일링을 비교함으로써 지구 온난화에 따른 해빙지역의 첫 번째 우점 미생물들의 군집과 유기물의 흐름을 연구하는 것을 계획하고 있다. 이와 더불어 극지 미생물의 lipid marker들을 비교 및 분석하여 새로운 marker를 발굴하여 최종적으로 지형과 환경에 따른 동토층 및 극지미생물 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술을 수립하고 적용할 수 있다.

[연차별 연구목표]

연차	연구 목표	연구 내용
1차년도 (2014)	다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수 기술 개발	효율적 지방회수 방법 setup
		Lipid 생산 조건 최적화
2차년도 (2015)	다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 분석 기술 개발	토양유래 lipid marker 분석
		Total lipid 극지 미생물 지질대사체 분석
3차년도 (2016)	다산과학기지 주변 토양 내 환경 간/지역 간 지방산 변화 비교	다른 환경 간/지역 간 lipid 변화 비교
		종간 비교

당해년도 연구 목표는 다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수기술 개발하는 것이며, 효율적 지방회수 방법을 확립하기 위해 토양 샘플의 사이즈에 따른 적합한 지질 추출 조건을 설정하였으며 Poarl and Alpine Microbial Collection (PAMC)으로부터 얻은 균주를 통해 lipid 생산 조건을 최적화 하는 실험을 진행하였다.

따라서 세부 실험은 토양 시료로부터 효율적 지방 회수 방법 적용을 적용하여 토양 유래 lipid marker를 분석하고 인지질지방산 라이브러리 구축을 통하여 미생물 균집 분석에 활용도록 하였으며 북극권 토양 시료 분석법 구축 및 활용을 통한 실제 적용 개시하였다. 이에 더하여 지미생물 지질 대사체 분석을 통한 극지 미생물 지질 대사체 라이브러리 구축하는 연구를 진행 중이다.

보다 다양한 위치에서의 토양 시료 확보와 이를 통한 집중적인 지방산 분석과 해석을 위하여 추가적인 북극 시료 확보 계획을 고려하고 있다.

제 5 절 성과지표

□ 정성적 성과

성과목표	세부목표		평가지표 (핵심성과 스펙)	검증방법	가 중 치 (%)
1. 북극 토양 지방산 추출하여 얻은 PLFA 분석결과를 토대로 lipid marker 분석 및 비교	1-1	북극 토양으로부터 지방산(PLFA) 분리	- 북극 토양의 지방산 추출 확인 - 사용되는 인지질 지방산(PLFA) 분리	- 분석결과 제시	15
	1-2	GC-MS 분석	- PLFA 수종 이상 분석 정량화	- 분석결과 제시	15
	1-3	기존의 lipid marker를 토대로 비교 및 분석	- 다른 환경/ 지역간 lipid 패턴 변화 비교 분석 - 관련성 연구	- 분석결과 제시	20
2. 북극 토양에서 순수 분리한 미생물의 생화학 특성 및 지질대사체 분석	2-1	북극 토양으로부터 미생물 순수 분리	- 극지 미생물의 순수분리 확인	- 분석결과 제시	10
	2-2	분리한 북극 미생물의 생화학 특성 분석	- 다양한 환경 인자에서 성장한 미생물 특성 연구	- 분석결과 제시	20
	2-3	다양한 북극 미생물의 지질 대사체 분석	- 다양한 북극 미생물간 지질 대사체 비교 연구	- 분석결과 제시 - 논문 투고	20

□ 정량적 성과 (3년)

구분		계획					
		국외			국내		
논문		SCI (주/공동)	기타 (주/공동)	소계 (주/공동)	SCI (주/공동)	기타 (주/공동)	소계 (주/공동)
			3/2	/	3/2	/	/
Proceeding		국외			국내		
단행본(저서)		/					
특허	출원	국외			국내		
	등록				1		
기술실시계약							
세미나개최							
인터넷사이트 개설							
기타사항							

2년차 결과

1. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered Escherichia coli. Bhatia SK, Shim YH, Jeon JM, Brigham CJ, Kim YH, Kim HJ, Seo HM, Lee JH, Kim JH, Yi DH, **Lee YK, Yang YH**. Bioprocess Biosyst Eng. 2015, 38: 1479-1484. (IF: 1.8)

2. Lipase-Catalyzed Production of 6-O-cinnamoyl-sorbitol from D-sorbitol and Cinnamic Acid Esters. Kim JH, Bhatia SK, Yoo D, Seo HM, Yi DH, Kim HJ, Lee JH, Choi KY, Kim KJ, **Lee YK, Yang YH**. Appl Biochem Biotechnol. 2015, 76:244-52. (IF: 1.7)

3. Increased vulnerability to physical stress by inactivation of NdgR in Streptomyces coelicolor. Lee BR, Yi DH, Song E, Bhatia SK, Lee JH, Kim YG, Park SH, **Lee YK, Kim BG, Yang YH**. Appl Biochem Biotechnol. 2015 175:3673-82 (IF: 1.7)

4. Application of diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) derivatization for monitoring of lysine decarboxylase activity, Kim YH, Kim HJ, Shin JH, Bhatia SK, Seo HM, Kim YG, **Lee YK, Yang YH**, Park K, Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 2015, 115: 151 - 154 (IF: 2.7)

5. A MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG) for

total N-glycan analysis, Kim KG, Kim YW, Hwang CH, Park HG, Jeong JH, Choi KY, Yang YH, Koo M, Kim YG, *Biotechnology letters* 2015, Accepted (IF: 1.7)

6. Application of a Non-halogenated Solvent, Methyl Ethyl Ketone (MEK) for Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB-co-HV)] from Bacterial Cells. Yang YH, Jeon JM, Yi DH, Kim JH, Seo HM, Rha C, Sinskey AJ, Brigham CJ. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2015, 20: 291-297 (IF: 1.2)

7. Production and structural characterization of a novel exopolysaccharide from psychrotrophic arctic glacier soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3. Sathiyannarayanan G, Yi DH, Bhatia SK, Kim JH, Seo HM, Kim YG, Park SH, Jeong D, Jung S, Jung JY, Lee YK, Yang YH, *RSC advances* 2015, *accepted*. (IF: 3.84)

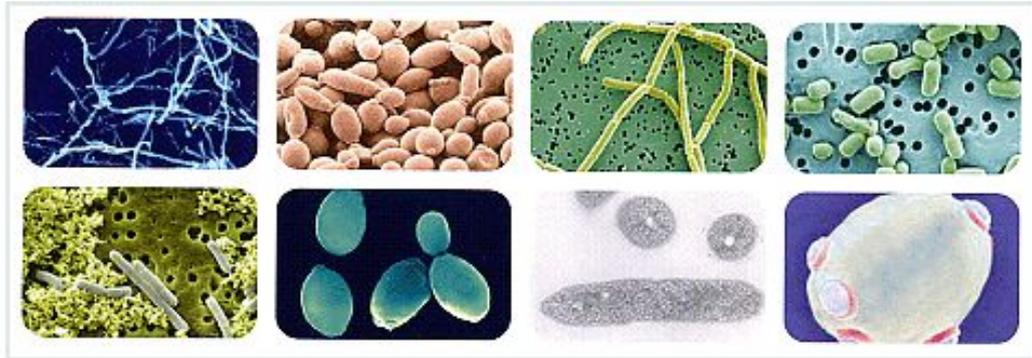


제 2 장 국내외 기술개발 현황

토양은 식생의 분포형태를 좌우하는 중요한 환경인자로 식생에 큰 영향을 미치는 다양한 미생물들을 함유하고 있다. 토양에는 수많은 미생물들이 존재하며¹⁾, 토양으로 유입되는 다양한 유기물들을 효소를 분비하여 분해하여, 단량체를 만들고, 호르몬, 비타민, 식물생장촉진 물질 등을 생산하여 식물의 성장에 도움을 준다. 아울러 미생물은 탄소, 질소, 인산 등의 물질 분해와 순환에 중요한 영향을 주며²⁾, 토양 미생물 개체군과 활성은 유기물 분해, 영양소 순환, 토양구조형성 및 안정성 등을 매개하므로 토양의 질에 미치는 영향이 크며³⁾, 역으로 토양 미생물의 활성은 토양 유형, 토양공극 크기, pH, 온도와 수분함량, 유기물, 중금속 등 생물학적, 비생물학적 요인의 영향을 받아 변화하게 된다⁴⁾. 이러한 토양과 토양미생물의 상호작용을 기반으로 토양미생물의 군집과 활성 분석을 통하여 토양의 상태와 변화를 해석할 수 있으며, 이를 통한 과거의 기후나 생태에 의해 받아왔던 영향을 알 수 있으며, 이러한 토양 미생물의 변화가 토양에 어떤 영향을 미치게 될 것이고, 또한 다시 식생과 기후에 어떠한 영향을 미치게 될 것인지에 대한 연구는 산업적, 학문적 연구가 가능하다고 할 수 있다⁵⁾.

토양미생물은 크게 세균, 방선균, 사상균, 조류, 원생동물 등 5종류로 나눌 수 있다. 이들은 토양 환경에 따라 다양하게 변화하게 되며 또한 토양에게 상호적인 영향을 미치기도 한다. 그러므로 토양 미생물 군집에 대한 연구를 통해서 토양의 상태 및 유기물의 흐름을 추측할 수 있고 나아가 장기적으로 보았을 때 토양에 어떤 영향을 미칠지 예측할 수 있다.

-
- 1) 진현오, 이명중, 신영오, 김정제, 전상근. 1994. 삼림토양학. 향문사. pp.325.
 - 2) 현해남, 좌재호, 2012. 한라산국립공원 자연자원조사. 제주특별자치도 한라산연구소, 1-13
 - 3) 박기춘, 김수정, 2010. 고추재배지에서 퇴비사용에 따른 토양 미생물의 인지질지방산 변화. 한국토양비료학회지 43, 194-199.
 - 4) Manzoni S, Porpotato A. 2007. A theoretical analysis of nonlinearities and feedbacks in soil carbon and nitrogen cycles. *Soil Biol. Biochem.* 39:1542-1556.
 - 5) Paul EA, Clark FE. 1989. In *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA.;Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105:1422 - 2.;Straatsma G, Ayer F, Egli S. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycoll Res* 105:515 - 523.;Torsvik V, Ovreas L, and Thingstad TF. 2002. Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064 - 1066.



- ◎ *Bacillus subtilis* (농촌진흥청 특허균주 포함)
- ◎ *Azotobacter* sp. (질화세균)
- ◎ Phototrophic bacteria (*Rhodospseudomonas* sp.)
- ◎ *Streptomyces* sp. (방선균)
- ◎ *Pseudomonas maltophilia* (항균활성 미생물)
- ◎ *Pseudomonas putida*

그림 1. 토양 내 미생물 종류와 현미경 사진⁶⁾



6) <http://www.obtkorea.com>

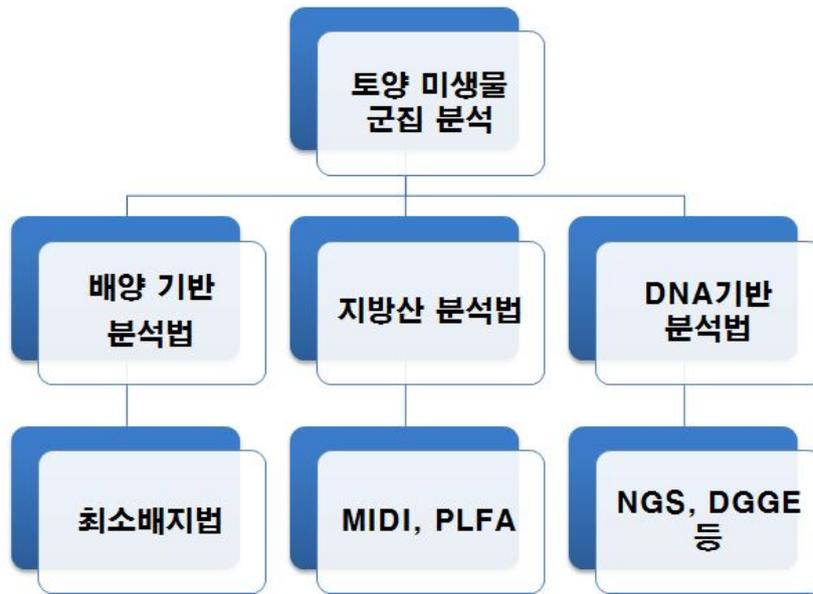


그림 2. 토양 내 미생물 군집 분석 방법들



이러한 미생물의 활성, 군집을 평가하는 방법으로 DNA 기반의 방법들, 배양 기반의 방법들, 인지질 기반의 방법들이 사용되고 있으며, 기술상의 차이로 다양한 방법들이 존재하고 있으나, 원리는 크게 위의 세 가지 방법이 활용된다⁷⁾. DNA 방법으로는 Polymerase Chain Reaction (PCR) 기반의 방법들인 Next Generation Sequencing (NGS), Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 등이 대표적으로 있으며 이러한 방법은 토양으로부터 DNA를 추출하여 특정한 지표 유전자 도구를 사용하여 분석하게 되며, 시간은 다소 걸리나 특정 균주 유래의 특정 DNA를 확인할 수 있는 방법으로 즐겨 쓰인다. 특히 NGS와 같은 최신 기술은 수백에서 수천 개 이상의 균주들을 한 번에 찾아낼 수 있는 기술로 토양뿐만 아니라 장내 세균 연구 등에도 널리 쓰이고 있다⁸⁾. 하지만 방대한 양의 데이터를 제공하고 있지만 아직은 고가의 비용과 상당한 분석 시간, PCR 증폭으로 인한 편향 현상, total viable biomass를 제공하지 못하고 있는 부분에서 보완이 필요한 부분이 있다.



7) Widmera F, Fließbach A, Laczko E, Schulze-Aurich J, Zeyer J.(2001) Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biolog-analyses Soil Biology & Biochemistry. 33, 1029-1036.; Ramsey PW, Rillig MC, Feris KP. Holben WE, Gannon JE. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. Pedobiologia 50:275--280.

8) Pompanon F, Deagle BE, Symondson WO, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing., Mol Ecol. 22: 1931-1950.

NGS Data are Analyzed in Three Phases

Primary Data Analysis - Images to bases

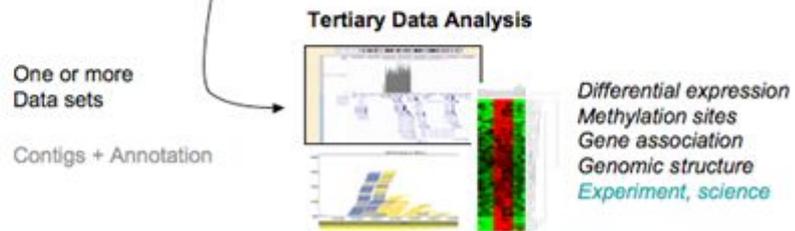
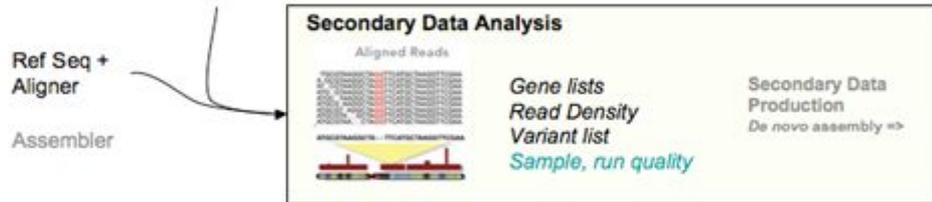


그림 3. NGS data processing (Geospiza)⁹⁾

극지연구소

9) http://lpm.hms.harvard.edu/palaver/sites/default/files/11_03_22_Dennis_Wall_2.pdf

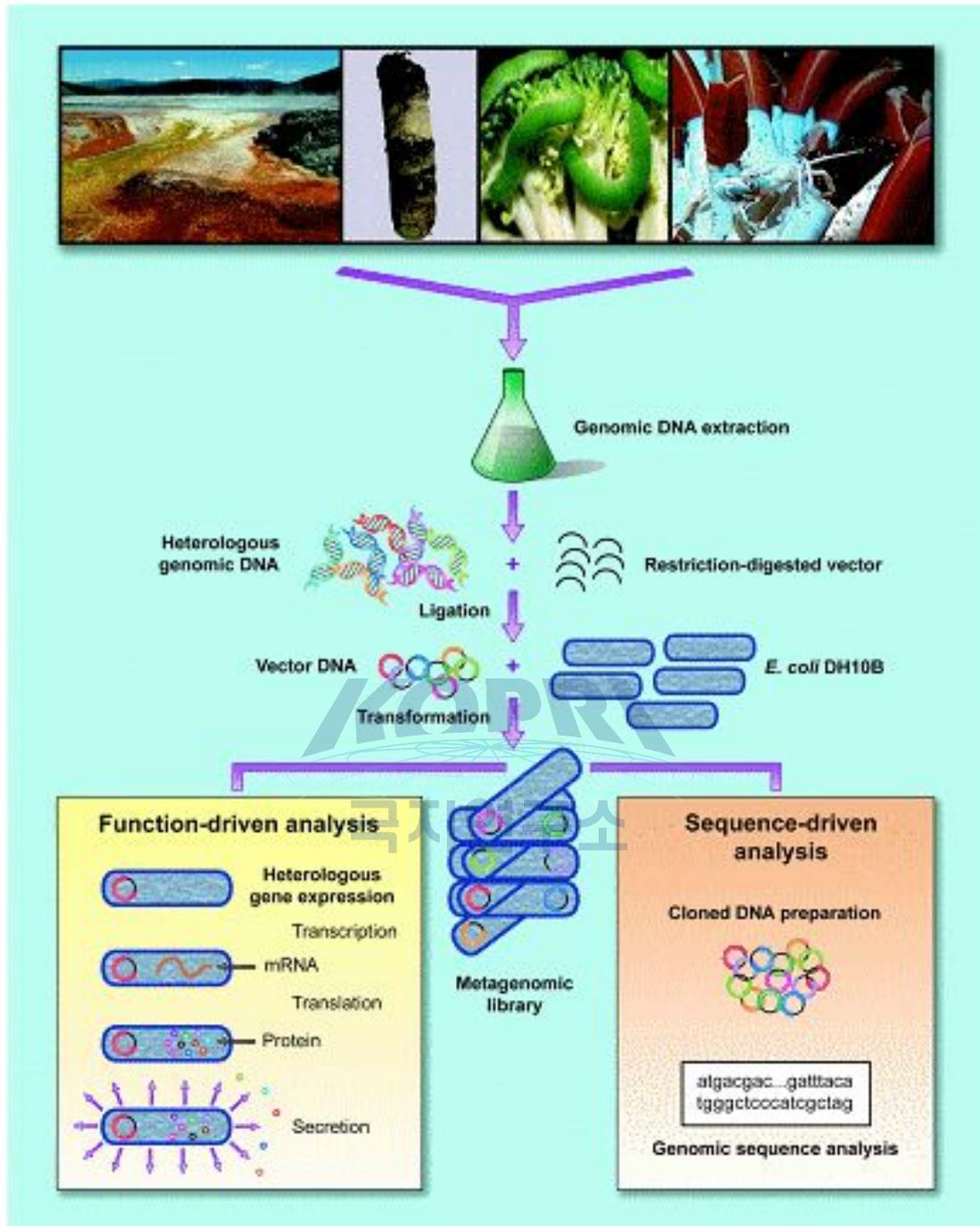


그림 4. 토양 미생물의 메타지놈을 통한 연구방법¹⁰⁾

배양 기반의 방법은 토양 전체의 미생물들을 96 well gram negative plate (BiologTM)에 도달하여 호기성, heterotrophic 미생물의 성장을 지시약의 색변화를 통하여 관찰하여 기질활용과 대사활동에 대한 정보를 얻어 군집의 활동을 유추할 수 있다¹¹⁾. 다양한 기질을

10) Handelsman, 2004)

11) Garland JL. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. FEMS Microbiol Ecol 24:289-300.

함유한 최소배지 기반의 Biolog에 의한 기질 이용성의 차이로 보는 토양 미생물상의 차이는 유기물 사용에 의해 변화된 토양 미생물상의 최종 활동성의 차이를 보여준다¹²⁾. 이러한 방법은 Community Level Substrate Utilization (CLSU) 혹은 Community Level Physiological Profiling (CLPP)라고도 불리며, 많은 데이터와 미생물 군집에 따라 민감하게 관측할 수 있지만, 미생물의 배양을 필요로 하여, 분석을 위해 배양이 잘되는 미생물과 실제 토양에서 잘 자라는 미생물 간의 차이가 발생할 수 있고, 대사 속도로 인한 편향이 해석을 어렵게 한다. Biolog 방법은 다음 장에서도 소개되었지만 96 well plate에 약 1000여개의 다른 대사 물질을 통하여 미생물들을 배양하여 대사 가능 여부를 지시약과 자동화된 장비를 사용하여 빠르게 분석할 수 있는 방법으로 잘 소개되어 있다. 보통의 경우는 한 균주의 대사 경로와 탄소원, 질소원 스크리닝에 사용되거나 영양분에 따른 군집 분석의 방법으로도 활용되고 있다.



12) Gomez E, Ferreras L, Toresani S. 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology* 97 : 1484-1489.



그림 5. Biolog 의 분석법



인지질 지방산을 분석하는 방법은 PCR이나 배양 등의 편향을 일으킬 수 있는 과정이 없어 자연 상태의 데이터를 얻을 수 있으며, 인지질 지방산(PLFA)은 살아 있는 미생물에만 존재하여 배양이 어려운 미생물까지도 정량할 수 있어 미생물의 활성을 평가하는데 유용하다¹³⁾. 토양 미생물상의 관찰은 정성적, 정량적 관찰을 동시에 할 필요가 있을 뿐만 아니라 일반 배지에서 자라지 않는 대부분의 토양 미생물도 관찰할 필요가 있다. 세포막의 구성성분인 인지질지방산(Phospholipid fatty acid: PLFA)을 토양에서 직접 추출하여 GC-MIDI (MIDI Inc., Newark, DE)로 정성·정량적으로 분석하는 방법은 토양미생물을 배지에 배양할 필요가 없을 뿐만 아니라 정성과 정량이 동시에 가능하기 때문에 토양 미생물상 분석의 대표적인 방법으로 활용되고 있다¹⁴⁾. 이들 지방산 중에서 특정 지방산이 특정 토양 미생물군의 지표가 될 수 있는데, 이 지표를 이용하여 각 미생물 군의 차이를 관찰하거나¹⁵⁾ 모든 지방산 구성을 다변량분석으로 미생물 군락의 차이를 육안으로 관찰할 수도 있다(Ludvigsen et al., 1997)¹⁶⁾. 이러한 여러 가지 방법을 단독 혹은 여러 가지 방법을 함께 활용하여 토양 내의 미생물 군집을 보다 확실하게 분석하기 위하여 활용되고 있다.

인지질 지방산 (Phospholipid fatty acids)은 세포의 membrane을 구성하는 주요 지방 성분으로, 미생물의 chemotaxonomic 표지 인자로 활용되어 미생물의 생태에 널리 활용되는 대상 분자이다. 인지질 지방산은 비누화·에스테르화되며 (saponification & esterification) 지방산 분석을 통하여 미생물 총량과 토양에 살고 있는 미생물의 구성 변화를 관측할 수 있게 된다¹⁷⁾. 토양의 어떤 종류의 미생물이 살고 있다면, 그 미생물은 반드시 세포벽을 가지고 있고, 그 세포벽을 구성하고 있는 인지질 지방산은 분석이 되며, 그 인지질 지방산은 미생물의 종류마다 달라서 그 인지질 지방산을 분석하게 될 때 미생물의 종류와 그 양을 관측할 수 있게 되는 원리가 적용 된다 (Fig.2).

이러한 이유로 인지질 지방산 분석은 토양 생태계를 이루는 미생물 분석에 있어 상대적으로 간단하고, 빠르며, 민감하고, 비싸지 않으며, 재현성이 있어 효율적이라 할 수 있다. 하지만 이 방법은 특정한 구성 성분을 자세히 알아 낼 수 없으며, 여러 균종에서 발견되는 지방산 표지인자를 사용하게 되는 가능성의 문제, 인지질 지방산의 불안정성에 기인하는 빠른 분해 등의 문제점들을 안고 있다¹⁸⁾. 그럼에도

13) Green CT, Scow KM. 2008. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeo. J* 8:126-141.

14) Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R, Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Sci.* 89:1103-1112.

15) Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR, Yang ZY. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed *Mikania micrantha*. *Plant Soil.* 281:309-324.

16) Ludvigsen L, Albrechtsen HJ, Holst H, Christensen TH. 1997. Correlating phospholipid fatty acids (PLFA) in a landfill leachate polluted aquifer with biogeochemical factors by multivariate statistical methods. *Fems Microbiology Reviews* 20:447-460.

17) Bossio DA, Scow KM. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbiol Ecol* 35:265-278.

18) Frostegård A, Tunlid A, Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils, *Soil Biology & Biochemistry* 43:1621-1625.; Pratt B, Riesen R, Johnston CG. 2012. PLFA Analyses of Microbial Communities

도 불구하고, 현재까지 300여 편 (NCBI PUBMED¹⁹⁾ 기준)에 달하는 논문들을 통하여 그 활용성과 실험 방법으로써의 안정성은 이미 확보되어 활용되고 있는 방법이다.



Associated with PAH-Contaminated Riverbank Sediment. Microb Ecol 64:680 - 691

19) www.pubmed.com

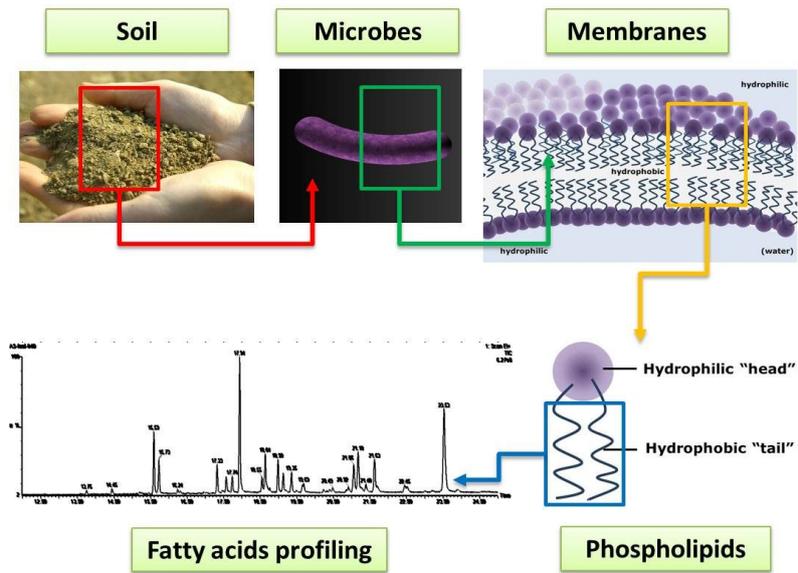


그림 6. 토양 미생물의 막에 존재하는 phospholipid의 지방산 분석.



토양분야에서 매우 중요한 토양 미생물의 분석 방법 중에 인지질 지방산 방법에 대한 연구는 토양 생태계를 이루는 미생물 분석에 있어 상대적으로 간단하고, 빠르며, 민감하고, 비싸지 않으며, 재현성이 있어 효율적인 시스템이다. 또한 이러한 시스템을 통하여 미생물의 군집 분석이나 군락의 구조 분석, 과거 어떠한 환경 하에 토양이 영향을 받아왔는지에 대한 해석이 가능하여 널리 사용되어 왔으나, 국내에서는 상대적으로 DNA나 배양에 의한 방법에 비해 기술적으로 연구자들의 진입장벽이 크다고는 할 수 없으나, Sequencing 회사나 NGS 분석회사들, 배지 판매회사들이 존재하여 과학자들의 연구를 지원하는 시스템이 있는 두 가지 방법에 비해 과학자들이 분석 기관들에 의뢰하기에는 다소간의 어려움이 있어 국내에는 아주 널리 사용 되지 않고 있는 부분이 있다. 그러한 이유로 실험을 위한 분석법 확립이 필요하며, 이를 위한 추출법, 분획법, 분석법, 해석법등에 대한 종합적인 연구가 필요한 실정이다. 하지만 일단 확립이 된 후에는 토양미생물의 군집과 활성 분석과 나아가 토양과 토양미생물의 상호작용에 대한 연구를 통하여 미래의 식생과 기후에 어떠한 영향을 미치게 될 것인지에 대한 연구와, 기후, 식생의 산업적, 환경적, 학문적 파급력이 있다고 할 수 있다.



제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 : 이론적 접근방법

1. 연구 목표에 따른 이론적 접근 방향

빙하 후퇴 지역의 빙하 소멸 시기 및 지형에 따른 유기물 변화를 파악하기 위하여 대표적인 유기물 지표인 지방산을 정밀하게 분석할 위탁연구의 필요성이 제기되었다.

이전 년도에서 수행하였던 일반 토양 시료 내 지방산 분석 및 추출 최적화를 토대로, 북극에서 얻는 토양 시료의 지방산을 분석 및 추출하는 연구하였다. 지방산 분석은 GC-MS를 이용하여 기존의 lipid marker를 토대로 비교 분석했다. 또한 북극 토양 샘플로부터 미생물들을 순수 분리하여 성장 조건별로 지질대사체 분석을 하였다.

2. 샘플링이 완료된 북극 토양 시료의 lipid marker의 추출 및 분석

극지 연구소의 도움 및 실험자들이 북극 다산과학기지 주변의 site에 직접 방문하여 채취한 북극 토양 시료(Midtre Lovénbreen)을 활용하여 토양 샘플의 지질 추출 및 인지질 지방산(PLFA) 분석을 수행하여 PLFA marker를 획득하여 이로부터 미생물 군집별 PLFA 농도와 스트레스 지수를 얻었다. 이를 통하여 빙하의 영향을 다양한 측면에서 관찰 할 수 있다.

3. Lipid marker를 이용한 미생물 군집 유추

북극 다산과학기지 주변 토양으로부터 10여종 이상의 미생물을 순수 분리하여 얻었으며, 5종 이상 미생물에 대한 성장 조건 및 지질 대 사체에 관한 분석을 통한 균주간의 차이를 볼 수 있었다.

극지 토양으로부터 지질을 추출하는 방법과 동일하게 하였고, 크로마토그래피 방법을 활용하여 지방산을 분석함으로써 표지인자를 통해 비교하였다..

제 2 절 : 실험적 접근방법

[확립한 효율적 방법을 이용한 북극 토양으로부터 지질 추출]

북극 다산과학기지 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 12 구역의 토양 샘플 확보하였다(주변의 Date 2014-07-19~30). 과거 빙하로 덮혀 있던 빙하 후퇴 지역인 북극의 Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund 에서 총 12 구역의 토양을 샘플링하였으며 (2014년 7월) 아래의 그림과 같이 Location no. 303 방향이 눈이 녹고 있는 지역이다.

각 구역의 북극 토양의 30 g를 멸균된 튜브에 담고 여기에 메탄올 20 ml, 클로로포름 10 ml, phosphate buffer 10 ml을 차례로 넣은 후 밀봉함. 2분간 vortexing 을 한 후 15분 동안 sonication을 하여 lipid를 solvent로 용출시킨다. 원심분리 (1000 rpm, 3분)를 행하여 유리 피펫으로 상층 액을 빨아들인 후 새 용기에 담는다. 앞의 지질추출 과정을 3-6회 반복한다. 이후 rotary evaporator나 N₂ evaporator를 사용하여 solvent들을 날린 후, 확립된 silicic acid 컬럼 크로마토그래피 방법을 이용해 Phospholipid(PLFA) 분리 후, GC 분석을 위한 유도체화에 적용하여 분석하게 된다.

Procedures

- 1) **Lipid extraction (Bligh&Dyer method)**
- 2) **Column chromatography (Silica gel)**
 - **Neutral lipid (NL)**, eluted by 15 ml chloroform
 - **Glycolipid (GL)**, eluted by 15 ml acetone
 - **Phospholipid (PL)**, eluted by 15 ml methanol
- 3) **Methanolysis**
 - FAME
 - Mild methanolysis
- 4) **Syringe filtering(PVDF)**

그림 7. 토양으로부터 지질을 추출하고 컬럼크로마토그래피를 이용하여 지질을 분리하는 과정

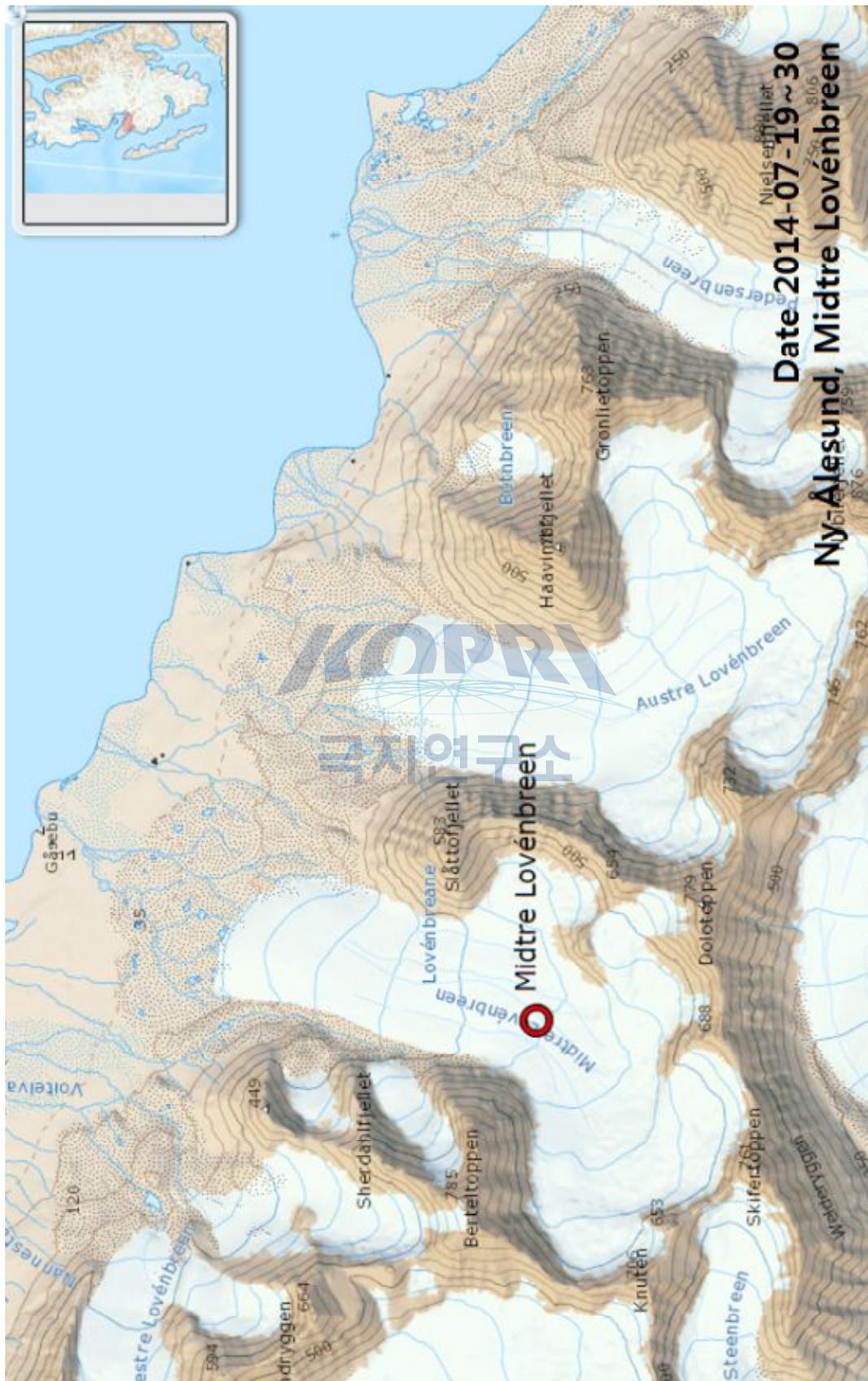


그림 8. 샘플링 사이트의 지도 (Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund from TopoSvalbard)

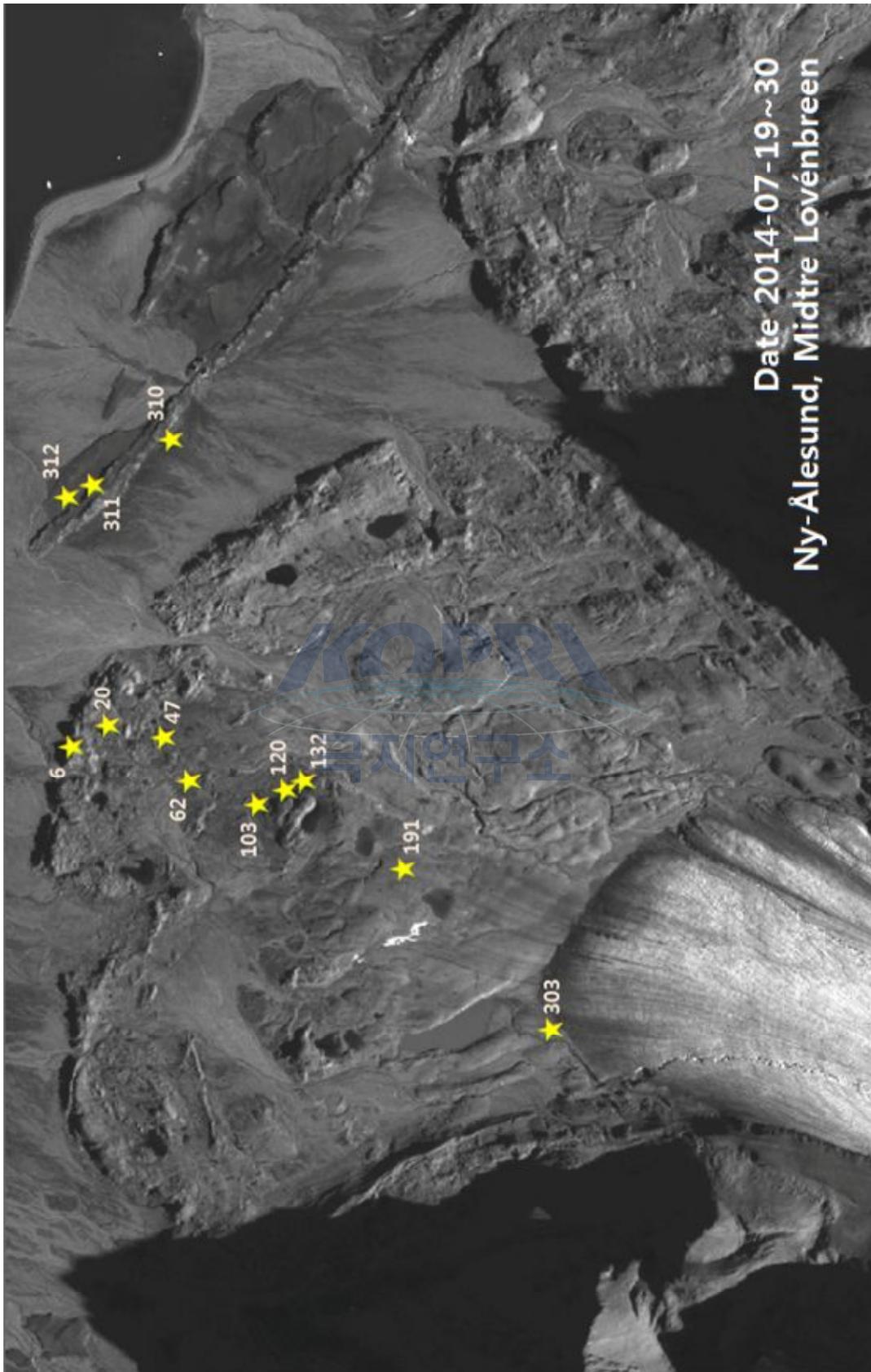
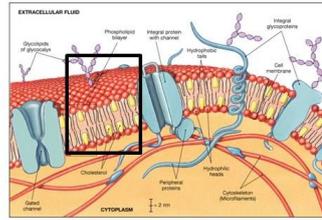


그림 9. 위성 지도에서 샘플링 사이트의 위치 (Midtre Lovénbreen, Ny-Ålesund)



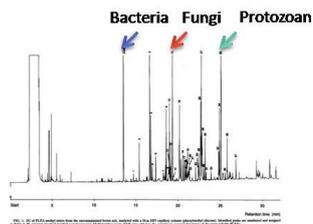
Culturable or
Unculturable
strains



Extraction of Lipid



PLFA analysis



Interpretation

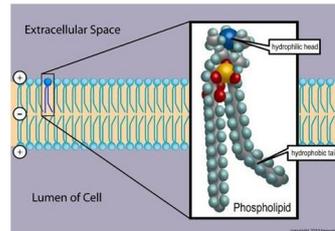


그림 10. 미생물의 막에 존재하는 인지질 분석을 통한 토양 내 미생물 군집분포를 예측하는 과정의 요약



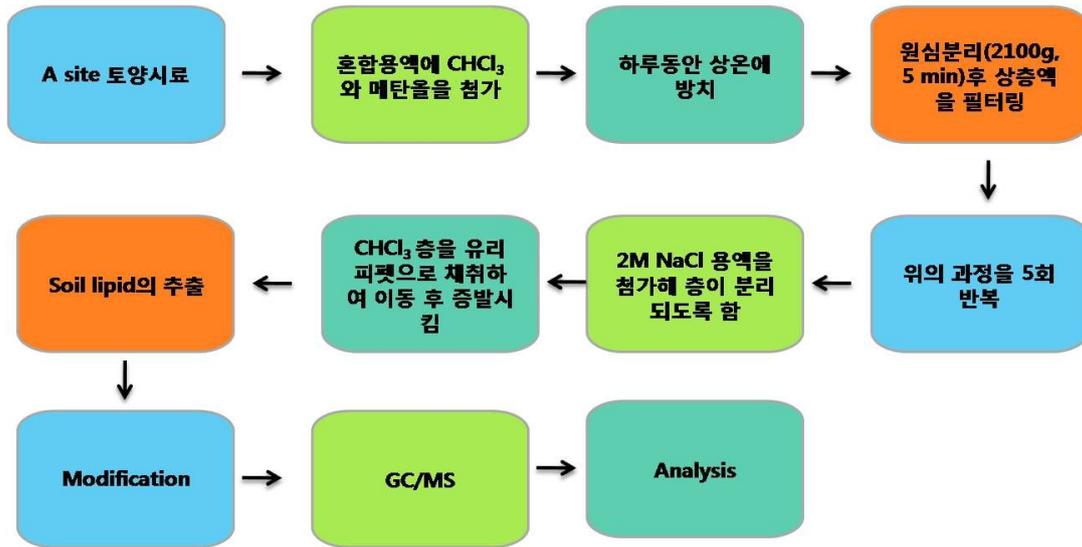


그림 11. 확립한 PLFA 분석 과정의 순서



[지질의 분획을 위한 silicic acid 컬럼 크로마토그래피 및 분석을 위한 유도제화 방법]

지름 1.1 cm glass column을 iron stand에 clamp로 수직으로 단단히 고정시킨 후 솜을 유리막대로 컬럼의 가장 밑 부분까지 밀어 넣은 후 sea sand를 적당량 넣는다. Chloroform 5 ml glass pipet으로 조심스럽게 컬럼 안으로 흘려주어 2-3 번 washing한다. 이 때 솜 아래쪽에 기포가 생기지 않을 때까지 충분히 흘려준다. 기포가 생기면 속도가 매우 느려지고 효율이 좋지 않다.

Silicic acid(100-200 mesh)를 0.3 g 측정해서 200 ml 비커에 넣고 chloroform 5ml 에 불린 후 glass column에 붓는다. 그리고 chloroform으로 packing이 잘 될 때까지 washing해주고 packing이 완전히 될 때까지 20분정도 기다린다.

Column이 무너지는 것을 방지하기 위하여 sea sand를 0.5 cm정도로 silicic acid 위에 넣어 준 뒤, chloroform이 sea sand 바로 윗부분 까지 오도록 밸브를 열어 흘려보내준다.

Lipid sample을 1 ml chloroform에 녹여서 column에 붓고 silicic acid에 샘플을 binding 시킨 상태로 1 분 방치한다.

첫 번째 용매인 chloroform을 5 ml 흘려주면 neutral lipid가 용출되며, 두 번째 용매인 acetone을 5 ml 흘려주면 glycolipid가 용출된다. 그리고 세 번째 용매인 methanol을 5 ml 흘려주면 이 실험에서 목적으로 하는 phospholipid가 용출된다. Phospholipid의 분획을 test tube에 받아서 시린지 질소농축기로 용매를 모두 증발시킨다.

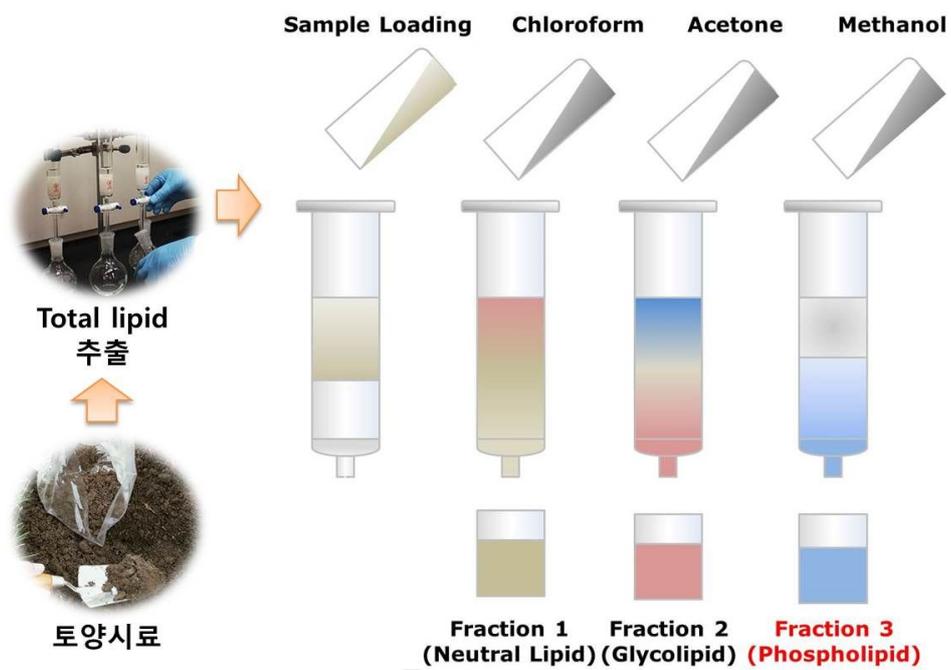


그림 12. 컬럼 크로마토그래피를 활용한 지질의 분리 모식도



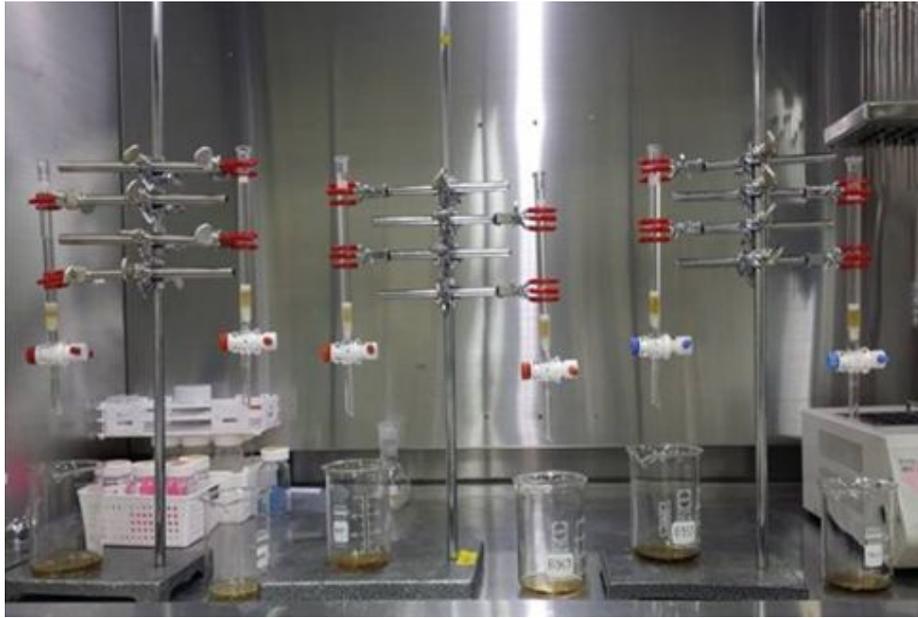


그림 13. 분석법 최적화를 통해 확립한 방법으로 폼 후드에 컬럼을 설치한 모습.



그 다음 최적화된 유도체화 방법인 Mild Alkaline Methanolysis를 이용해 유도체화한다. 유도체화 방법은 먼저 추출된 phospholipid가 담겨있는 test tube에 1 ml methanol/toluene(1:1, v/v)로 녹인다. 그리고 1 ml의 0.2M-methanolic KOH를 넣고 37 °C에서 15분간 반응시킨다(Incubation). 2 ml hexane, 0.3 ml 1M-acetic acid, 2 ml water를 넣고 vortexing하면 층이 분리된다. Hexane(upper)층을 분리 후 2 ml hexane을 추가해서 넣고 한 번 더 extraction 해준다. 시린지 질소농축기에 50 °C 조건에서 20분동안 hexane을 모두 날린다. Test tube에는 유도체화 된 PLFA만 남게 된다.



[GC-MS를 이용한 PLFA 분석법]

이전 연구로부터 쓰여진 미생물 군에 대한 PLFA marker에 대한 정보를 수집하였고, 아래와 같은 표를 얻을 수 있었다. 이들은 각 그룹을 대표하는 지방산으로써 미생물 군집 비율과 정량적인 결과를 도출하는 데에 밑바탕이 되는 자료로 쓰였다.

PLFA 분석을 수행하기 위한 실험법의 대략적인 모식도이다. 크게 샘플링한 토양으로부터 지질을 회수하여 인지질을 분리해내는 과정과 유도체화 반응을 시킨 후 GC-MS로 분석하고 해석하는 과정으로 나뉜다.

현재까지 알려진 PLFA 관련 지방산 표시자는 약 80여개 정도이며, 보고에 따라 다르지만 최소 20여개의 PLFA 정도로 군집 분석이 가능하다. 본 연구팀에서는 50여개의 PLFA를 분석할 수 있었으며, 약 30여개의 미생물과의 연관관계를 맺을 수 있는 표시자들을 사용할 수 있었다. 분석 방법은 높은 감도를 보이는 GC-MS를 활용한 자료 수집이 이루어졌다.



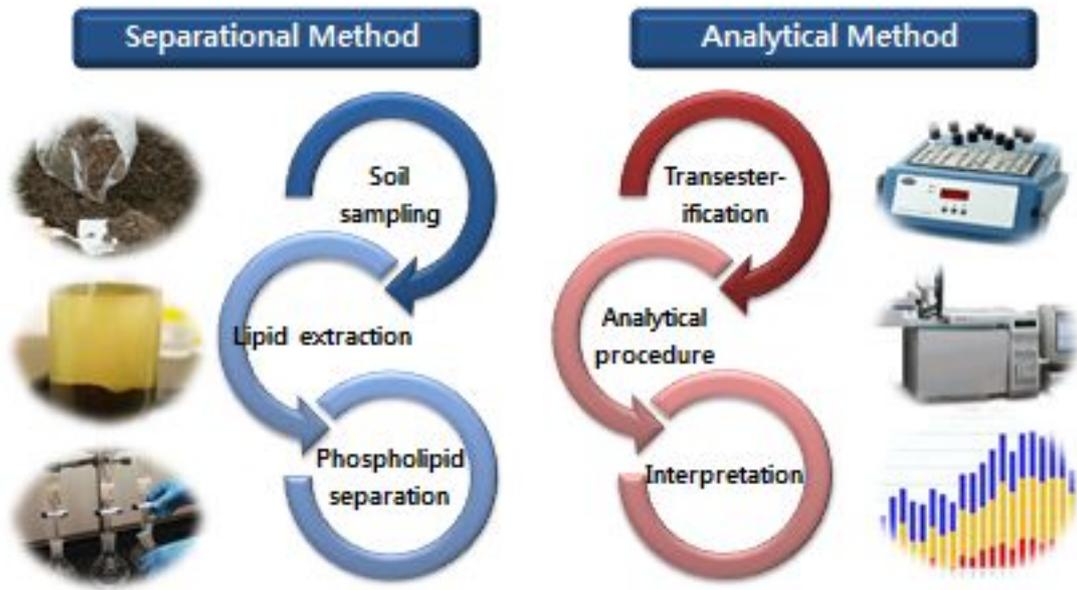


그림 14. PLFA법을 수행하기 위한 분리 및 분석 방법의 모식도



도표 1. 특정 미생물 군집을 나타내는 PLFA marker

Microbial group	Specific PLFA markers	PLFA group
Bacteria	14:0, 15:0, 17:0	Multiple groups
Gram(+)	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0	Branched
Gram(-)	cy17:0, cy19:0, 16:1w7, 17:1w9, 18:1w7, 18:1w5	Cyclopropyl, mono
Fungi	18:2w6,9c, 18:3w6, 18:3w3	Polyunsaturated
Actinomycetes	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0, i17:1w7c	10-Methyl branched
Eukaryote	16:0, 16:1w9c, 16:1w5c, 18:1w9c, 18:1w7c, 18:1w7t, 20:1, 21:0	
Methanobacter	16:1w8c, 18:1w8	
Anaerobe	14:1w7cDMA, i15:0DMA, 16:1w7cDMA, 18:0DMA, 18:2DMA, 19:0cy9,10DMA	
Protozoa	20:2w6, 20:3w6, 20:4w6	Polyunsaturated
Plants	18:1w9c, 18:1w11c, 18:3w3, 20:5w3, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0	Long saturated, straight



이전 연구들에 따르면 각 미생물 군집을 나타내는 PLFA marker들이 있는데 주로 20종 이상의 marker를 이용하여 미생물 군집의 분포를 예측한다. Unidentified bacteria의 경우 지표로써 14:0, 15:0, 17:0의 지방산이 쓰이며, gram(+)균의 경우 i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, 그리고 i18:0처럼 탄소사슬 끝에서부터 첫 번째 또는 두 번째에 메틸기가 달린 branched 형태의 지방산이 이용된다. Gram(-)균의 경우 cy17:0, cy19:0와 같은 cyclo form의 지방산과 16:1, 17:1, 18:1 등의 monounsaturated form의 지방산이 포함된다. 또한 Actinomycetes는 10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0처럼 10번 위치에 메틸기를 포함하는 10-methyl branched form과 i17:1를 marker로써 이용하며 Fungi 그룹은 18:2, 18:3 등의 polyunsaturated form을 포함한다.

다시 한 번 정리하자면, 미생물 분포비율은 미생물마다 활용되는 지방산 지표를 활용하여, 분석된 지방산을 지방산 분석지표에 따라 세균, 방선균, 사상균, 진핵생물, 식물유래 지방산 등으로 분류하여 미생물 단위별 인지질 지방산 값의 총량 및 전체 비율로 나타낼 수 있다²⁰⁾. 일반 박테리아 그룹 양성균은 iso-14:0, i15:0, anteiso-15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0, 그램 음성균은 cyclo-17:0, cy19:0, 16:1 ω 7, 17:1 ω 9, 18:1 ω 7, 사상균은 18:2 ω 6,9cis, 18:3 ω 6, 18:3 ω 3, 방선균은 10-Metyl-16:0, 10-Me17:0, 10-Me18:0, i17:1 ω 7c, 진핵생물은 16:0, 16:1 ω 9c, 16:1 ω 5c, 18:1 ω 9c, 18:1 ω 7c, 18:1 ω 7trans, 20:1, 21:0 등의 지표지방산을 이용하였다. 그람음성세균과 그람양성세균 지방산함량을 더해 세균의 함량을 나타낼 수 있다.

위의 여러 예에서 보았듯이 지방산 표지 인자를 사용하여 분석된 지방산으로부터 미생물 종류와 상관관계를 연결할 수 있으며, 지방산 생물지표를 이용하여 토양 내 미생물 군락의 구조를 예상할 수 있다. 인지질 지방산의 총량을 활용한 viable biomass의 양 측정, 탄소 영양원이 적은 조건에서 탄소 영양원이 풍부한 조건으로 이동 지표로 그람음성세균/그람양성세균(G-/G+)²¹⁾, 토양 유기물함량 지표로 곰팡이/세균 (F/B) ²²⁾스트레스의 상태를 볼 수 있는 단불포화/포화, Trans/Cis, Cyclo/Precursor, Anteiso/Iso 등의 다양한 지방산 지표들이 존재하며 이를 활용한 토양에 대한 해석들이 가능하다 (Table 2).

20) Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR, Yang ZY. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed *Mikania micrantha*. *Plant Soil*. 281:309-324.; Rahman MH, Okubo A, Sugiyama S, Mayland HF. 2008. Physical, chemical and microbiological properties of an Andisol as related to land use and tillage practice. *Soil Till. Res.* 101:10-19.

21) Borga P, Nilsson M, Tunlid A. 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol. Biochem* 26:841-848.; Yao, H, He Z, Wilson MJ, Campbell CD. 2000. Microbial biomass and community structure in a sequence of soils with increasing fertility and changing land use. *Microb Eco* 40:223-237.

22) Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegard A..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.; Frostegard A, Baath E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22:59-65.

도표 2. 지방산 지표들과 군락 구조와의 상관관계

지방산 지표들	지표의 수치	해석
PLFA	높을수록	Viable biomass 양이 높음.
곰팡이/세균	> 1	토양유기물 함량이 높음.
단불포화/포화	> 1	호기성과 높은 기질 농도 조건을 가짐.
Trans/Cis monoenoic	> 1	Toxic한 물질에 노출되었음.
cy19:0/18:1 ω 7c cy17:0/16:1 ω 7c	> 1	불량한 환경적 특성, stress와 toxicity가 증가함, 양분 결핍, 낮은 pH, 중금속 오염, 제초제, 경운, 고온 등의 환경지표
Anteiso/Iso	> 1	Cold stress에 노출되었음.
그램음성균/그램양성균	> 1	탄소영양원이 증가하고 있음, 온도가 낮아짐.



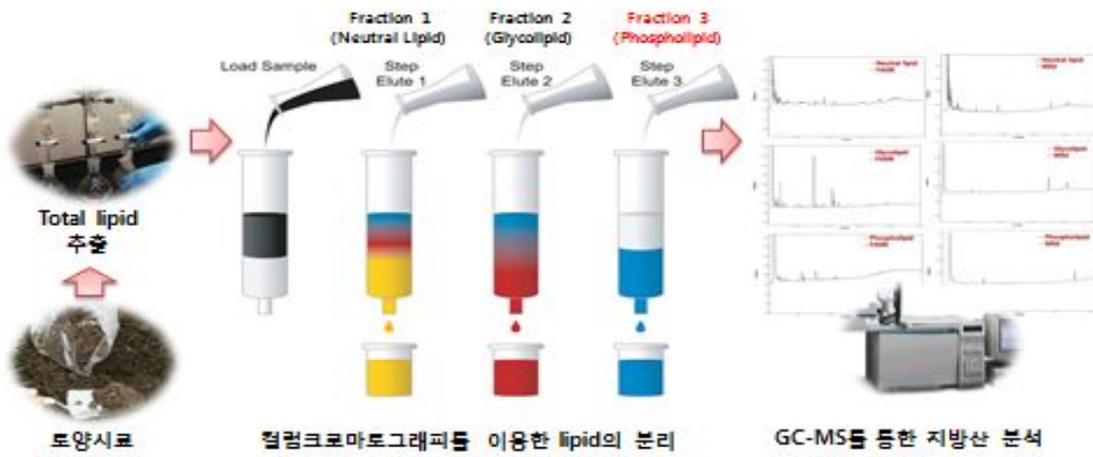


그림 15. 토양시료로부터 lipid를 추출하여 PLFA를 GC-MS로 분석하는 과정.



[GC-MS 분석 조건 및 기준시료 분석]

Gas Chromatography를 이용한 fatty acid 분석 방법을 확립하였으며, GC-MS를 이용하여 standard (FAME mix) 시료를 분석하고 standard 시료에서의 fatty acid의 retention time을 확인하였다. 이를 바탕으로 Bligh & Dyer method를 이용하여 추출한 지방의 fatty acid의 profile을 분석하였다. GC의 분석조건으로 Clarus 680 GC 모델을 이용하여 160 °C에서 2 분간 유지 후 10 °C/ min 의 속도로 300 °C로 승온시킨 후 2 분간 유지하였으며 He gas를 이동상으로하여 1.0 ml/min 속도로 흘려주었다.

Standard 시료는 C4-C24 Even Carbon (Supelco, USA), FAME Mix C14-C22 (Supelco, USA), and NHI-D FAME Mix (Supelco, USA)를 이용하였고, 시료는 methanol과 H₂SO₄, choloform을 첨가한 후 100 °C에서 2시간 30 분간 가열 및 냉각하여 FAME으로 변환하였다.

앞서 언급한 FAME standard 샘플을 각각 10, 100, 1000 ppm의 농도별로 GC-MS로 분석하여 FAME의 RT 값 및 internal standard에 대한 area의 관계식을 도출함으로써 정량 분석을 위한 기반을 확립하였다. 이외에 GC-MS 소프트웨어의 NIST library search를 통하여 얻은 FAME의 RT 값까지 추가하여 총 46개의 지방산이 분석 가능하도록 하였다. 또한 이들 지방산 중 미생물 군집의 PLFA marker로 쓰이는 지표들에 대하여 이전 연구로부터 자료를 수집 하였다.

극지연구소

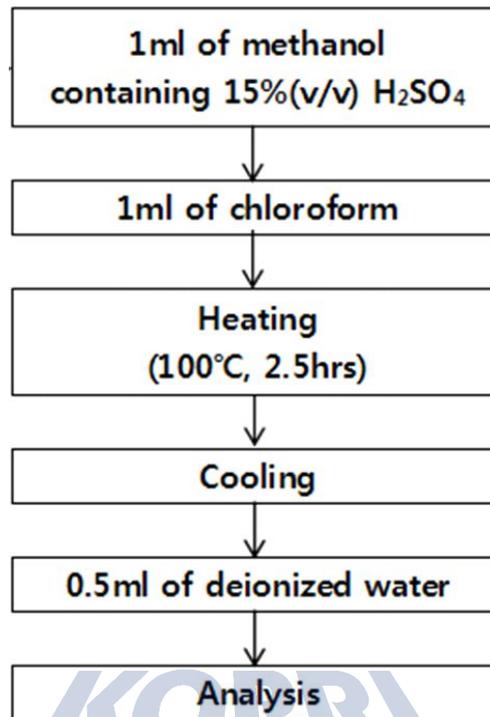


그림 16. FAME (fatty acid methyl esters) 제조를 위한 모식도.

제 2 절 연구 수행 내용 및 결과

1. 샘플링이 완료된 토양 시료의 lipid marker의 추출 및 분석

샘플링 완료된 북극 토양 시료로부터 지질을 추출하여 최적화하였던 silicic acid 컬럼 크로마토그래피법으로 인지질 지방산(Phospholipid-derived Fatty Acids, PLFA)을 분획하였다. 북극 토양 시료는 총 12구역으로부터 샘플링하였고, 분획한 PLFA를 가스크로마토그래프에 분석하기 위해서는 끓는점을 낮춰주는 Alkaline mild methanolysis 방법으로 메틸에스테르화 시킨 후 가스크로마토그래프 질량분석계(GC-MS)를 이용하여 지방산을 측정하였다.

내부표준물질(Internal standard)로 Heneicosanoic acid(21:0)를 이용하여 지방산 프로파일링을 정성 및 정량 분석하였다. 이를 통하여 아래 그림 _과 같은 서로 다른 PLFA 분석결과를 얻을 수 있었다. 이는 북극 토양으로도 효과적으로 PLFA를 분획하고 분석할 수 있다는 것을 보여 줄 수 있었고, 다만 북극 토양은 기존의 실험하였던 일반 토양만큼 미생물 군집이 풍부하지 않기 때문에 GC-MS로 분석할 수 있는 PLFA 양을 늘리기 위해, 토양 샘플을 최소 30 g 이상으로 지질 추출하여야 한다.





그림17. Midtre Lovénbreen 지역의 북극 토양 샘플 채취 장소



2. Lipid marker를 이용한 미생물 군집 유추

북극 토양 샘플의 PLFA 프로파일링 데이터를 토대로, 이전 연구로부터 쓰여진 미생물 군에 대한 PLFA marker에 대한 정보를 수집한 결과가 아래와 같은 표를 얻을 수 있었다. 이들은 각 그룹을 대표하는 지방산으로써 미생물 군집 비율과 정량적인 결과를 도출하는 데에 밑바탕이 되는 자료로 쓰였다. 본 연구팀에서는 분석할 수 있는 PLFA 중에서 약 30 여개의 미생물과 연관관계를 맺을 수 있는 표지자들을 사용하여 미생물 군집을 해석하였다. 다시 말해 기존 문헌 및 GC-MS 운용상에 분석 가능한 PLFA를 적용하여 PLFA-미생물 간의 상호 관계를 적용하여 해석하였다.



Microbial group	Specific PLFA markers	PLFA group
Other Bacteria	14:0, 15:0, 17:0	Multiple groups
Gram(+)	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0	Branched
Gram(-)	cy17:0, cy19:0, 16:1w7, 17:1w9, 18:1w7, 18:1w5	Cyclopropyl, mono
Fungi	18:2w6,9c, 18:3w6, 18:3w3	Polyunsaturated
Actinomycetes	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0, i17:1w7c	10-Methyl branched
Eukaryote	16:0, 16:1w9c, 16:1w5c, 18:1w9c, 18:1w7c, 18:1w7t, 20:1, 21:0	
Methanobacter	16:1w8c, 18:1w8	
Anaerobe	14:1w7cDMA, i15:0DMA, 16:1w7cDMA, 18:0DMA, 18:2DMA, 19:0cy9,10DMA	
Protozoa	20:2w6, 20:3w6, 20:4w6	Polyunsaturated
Plants	18:1w9c, 18:1w11c, 18:3w3, 20:5w3, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0	Long saturated

도표 3. 미생물 군집별 PLFA marker



총 12 군데 북극 토양 site 중에서 PLFA 프로파일링 결과가 비슷한 경향을 보이는 것들을 대표로 8 site를 선정하여 미생물 군집 분석을 실시하였다. 미생물 군집 분석은 위의 미생물 군집별 PLFA 마커에 따른 미생물 군집별 농도와 스트레스 지수를 나타낸 것이다. Total (mg/kg soil)은 토양 내에 살아있는 생물량을 나타는 것이고, 관찰하고자 하는 미생물 군집으로는 그람 양성(+) 박테리아, 그람 음성(-) 박테리아, Fungi, Eukaryote, Protozoa, Actinomycete 의 분포 정보를 확인할 수 있었다.

그리고 미생물 스트레스 지표(Microbial stress indicator)로서 Fungi/Bacteria, Saturated fatty acid/Monosaturated fatty acid, 그리고 Iso form/Anteiso form PLFA 들이 있다. Fungi/Bacteria의 값이 높을수록 토양 내 유기물 함량이 높은 것을 나타내고, Saturated fatty acid/Monosaturated fatty acid의 값이 낮을수록 기질 농도가 높은 것을 나타낸다. 그리고 Iso form/Anteiso form PLFA의 값은 저온 스트레스를 나타내는 것인데, 값이 적을수록 저온 스트레스를 받은 것으로 확인할 수 있다.



Group	Concentration (mg/kg soil)							
	20	47	62	103	120	132	191	303
Microbial PLFA components								
Total (mg/kg soil)	0.9171	4.0765	0.4950	1.0280	1.8901	1.1253	0.5573	0.3155
Bacteria	0.2476	1.2289	0.0865	0.3740	0.7480	0.4340	0.1517	0.0274
G(+)	0.0845	0.1797	0.0185	0.0872	0.1435	0.1248	0.0334	0.0033
G(-)	0.0816	0.4176	0.0277	0.1455	0.2907	0.1935	0.0697	0.0049
Fungi	0.1200	0.9105	0.0540	0.1101	0.2525	0.0666	0.0243	0.0008
Eukaryote	0.4988	1.7927	0.3331	0.5073	0.7986	0.5470	0.3459	0.2794
Protozoa	0.0231	0.0362	0.0069	0.0099	0.0421	0.0190	0.0160	0.0020
Actinomycete	0.0276	0.1083	0.0144	0.0266	0.0489	0.0587	0.0195	0.0057
Microbial stress indicator								
Fungi/Bacteria	0.4849	0.7409	0.6238	0.2944	0.3375	0.1535	0.1599	0.0302
Sat/Monosat	2.0987	0.4724	2.5587	1.0658	0.6759	1.3821	2.1136	6.6369
Iso/Anteiso	2.9126	2.3840	3.7781	2.6587	2.0823	2.5056	2.9949	3.1538

도표 4. 선정된 8개 북극 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 총량 및 스트레스 지수 분석



Group / %	20	47	62	103	120	132	191	303
Bacteria	19.5	27.7	24.9	27.1	28.7	20	23	53.5
G+	20.2	7.9	11.4	16.7	13.1	21.6	15.8	9.2
G-	19.5	18.3	17.1	27.9	26.6	33.5	33	13.6
Fungi	28.7	39.9	33.4	21.1	23.1	11.5	11.5	2.2
Protozoa	5.5	1.6	4.3	1.9	3.9	3.3	7.6	5.6
Actinomycete	6.6	4.7	8.9	5.1	4.5	10.2	9.2	15.9

도표 5. 선정된 8개 북극 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 분류별 총 대비 구성하고 있는 비율



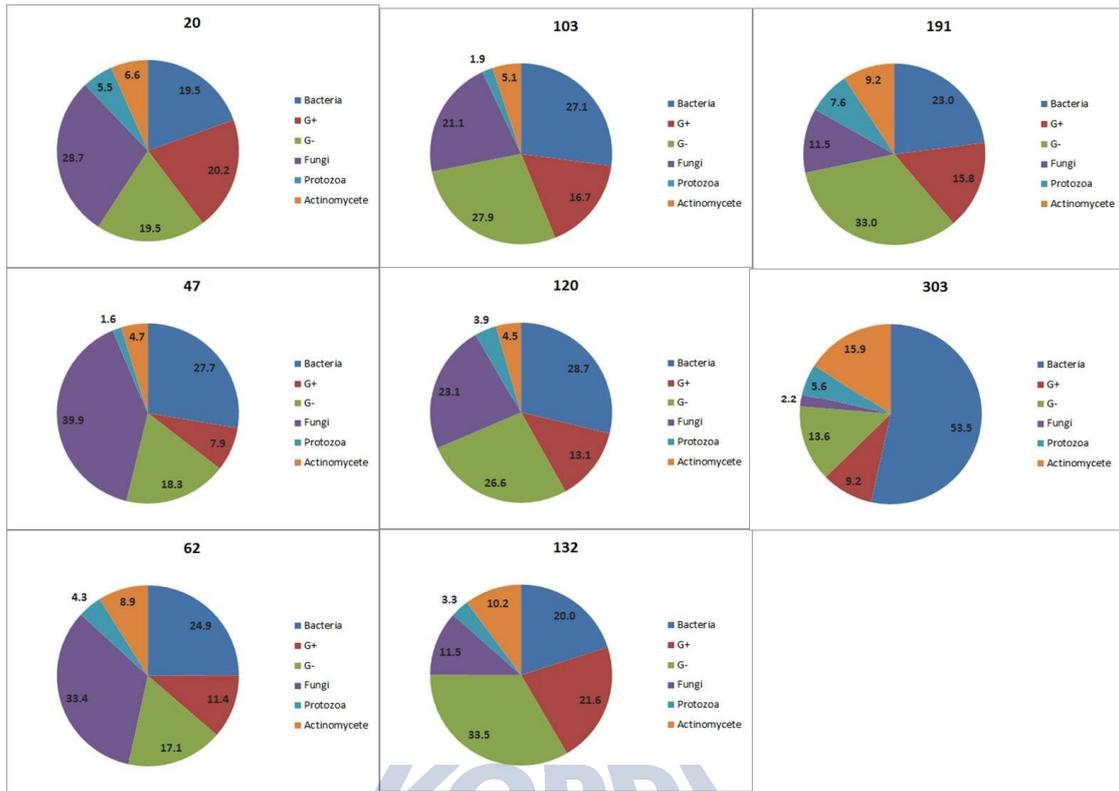


그림 19. 선정된 8개 북극 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 분류별 총 대비 구성하고 있는 비율



3. 북극의 토양 샘플로부터 미생물을 순수분리

북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양으로부터 10여종 이상의 미생물을 순수분리하였다. 순수분리는 대부분의 미생물이 성장한다고 알려져 있고 영양분이 풍부한 배지인 Nutrient agar(영양배지, Peptone 5 g/l, Beef extract 3.0 g/l, pH 6.8)를 이용하여 고체배지를 만들고 그 위 북극토양을 희석한 샘플들을 도말하여 극지 미생물 콜로니(colony, 집락체)들을 얻을 수 있었다. 얻은 극지 미생물 콜로니를 아래의 그림과 같이 다시 분리하여 각각 번호를 매겨 사용하였다.

각각의 미생물들을 특이적인 효소나 성장 조건, pigment 등에 대한 기초적인 실험들을 수행하였다. 이를 통해서 극지미생물의 성장 패턴 및 관련 효소들을 관찰할 수 있다.



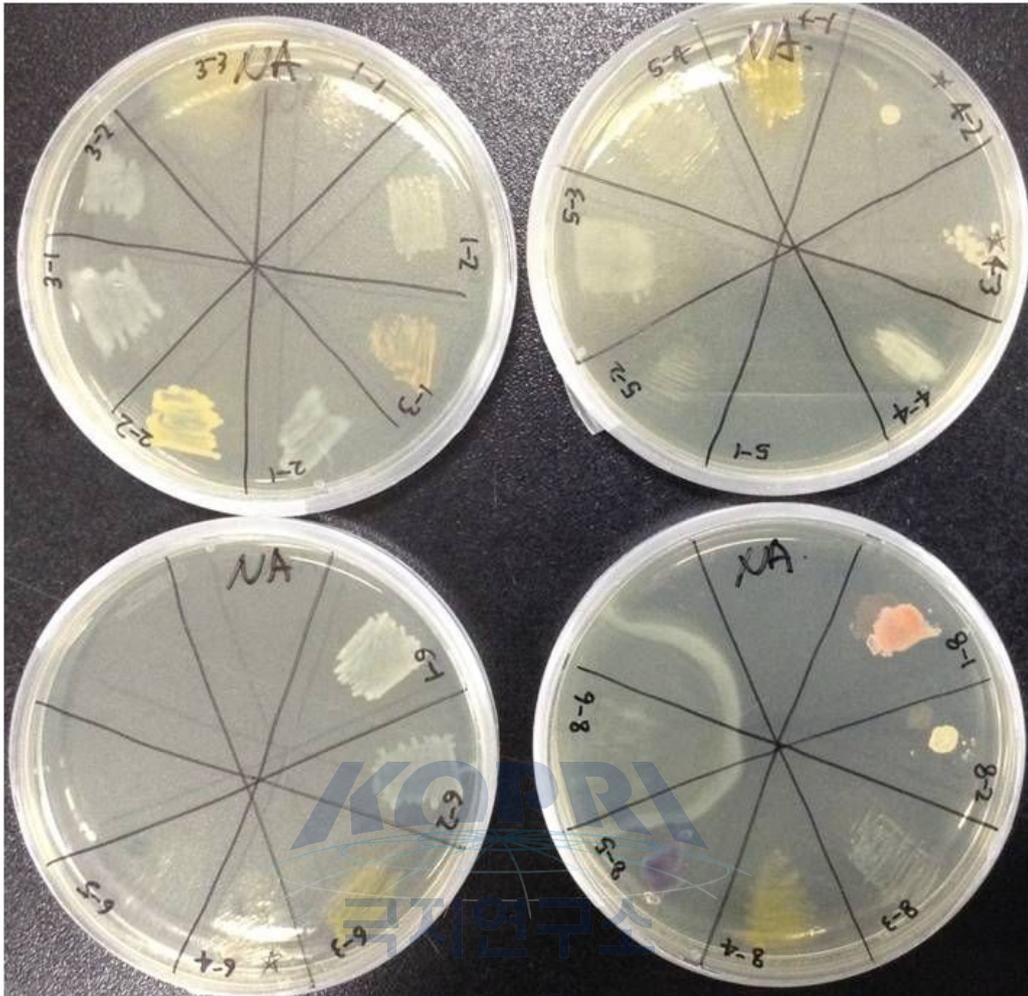


그림 20. 북극 토양 샘플로부터 분리한 미생물

4. 균주의 생화학 실험 및 지질 대사체 분석 및 비교

극지 토양에서 분리한 미생물 중에서 16s rRNA sequencing을 통해 이 미생물의 동정을 하였다. 그 결과 16s rRNA sequencing 통해서도 동정이 되지 않는 미생물들도 있는 반면, 종 또는 속까지 동정이 가능한 미생물들이 있었다. 이 중에서 5가지 미생물(*Pseudomonas sp.* : 8-6, 6-4, psy1, 2, 3)들을 선정하여 온도, pH, NaCl 농도에 따른 성장을 비교하는 생화학 실험을 수행하여 각각 어떤 성장 특성을 가지고 있는지 확인하였다.

미생물 분리에서 사용한 고체배지인 Nutrient broth agar를 사용하여 성장을 비교하였고, '+'가 많을수록 생장이 높은, '+'가 낮을수록 생장이 낮은 것을 나타낸다. '-'로 나타낸 것은 생장이 전혀 없는 것으로 나타내었다. 온도의 조건은 극지 미생물이기 때문에 저온 조건인 4, 20 °C와 일반적인 미생물 배양온도인 30, 37 °C으로 수행하였다. 극지미생물인 만큼 4, 20 °C에서 높은 성장을 보였다. 하지만 일반 미생물 배양온도인 30, 37 °C에서는 생장이 낮아지거나 전혀 자라지 못한 것을 알 수 있었다. 일반적인 *Pseudomonas sp.*의 최적온도인 30 °C와 다른 것을 볼 수 있는데 이는 같은 속의 미생물이어도 극지토양, 즉 저온 환경에서 서식하는 미생물은 그 환경에 적응하여 최적으로 성장할 수 있는 온도가 4 ~ 20 °C인 것을 알 수 있었다.

pH의 경우에는 중성 pH 7 부근에서 생장이 높은 것을 나타내었는데, 산성인 조건인 pH 3 ~ 5보다 보다 염기성 조건인 pH 9 ~ 11에서 더 잘 성장하는 것을 볼 수 있었다. NaCl 농도별 조건에서는 낮은 농도인 0.1 ~ 0.25 M에서 대부분 높은 성장을 나타내었다. 높은 NaCl 농도에서도 성장하는 것을 볼 수 있지만 상대적으로 낮았다. 따라서 이 극지미생물들은 낮은 NaCl 농도에 대한 내성을 가지는 약호염성인 미생물로 볼 수 있다.

Condition	8-6	6-4	psy1	psy2	Psy3
4 °C	+++	+	+++	+++	+++
20 °C	+	+++	+++	+++	+++
30 °C	+	-	+++	++	++
37 °C	-	-	-	-	-
pH3	-	-	-	-	-
pH 5	+	+	+++	+++	+++
pH 7	+++	+	++	-	-
pH 9	+++	+	+++	++	++
pH 11	+++	-	+++	++	++
pH 13	-	-	-	-	-
NaCl 0.1 M	+++	+	+++	+++	+++
NaCl 0.25 M	+++	+++	+++	++	++
NaCl 0.5 M	++	++	-	-	+
NaCl 1.0 M	+	+	+	+	+

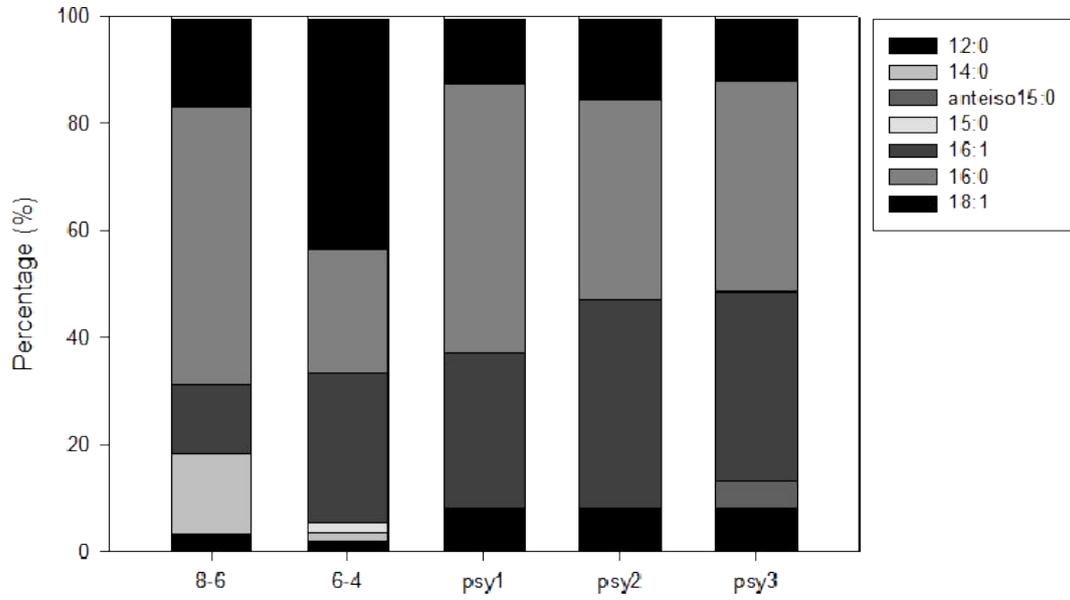
도표 6. 선정된 균주의 생장 조건 비교



위에서 선정된 5개의 극지미생물들의 평균적인 성장 조건에서 배양하여 총 지방산의 구성을 분석하였다. pys1, 2, 3 세 가지 *Pseudomonas sp.*에서는 C14:0 와 anteiso 15:0을 중심으로 하는 지방산 패턴의 결과가 나왔다. 6-4 의 극지미생물은 위 세 가지 극지미생물과 지방산 패턴이 비슷하지만 C12:0의 비율이 상대적으로 높았다. 8-6은 총 지방산의 절반정도가 C14:0 이 차지하였다. 일반적인 환경에서 서식하는 미생물의 지방산 구성요소의 비슷한 경향을 보이고, 불포화 지방산보다는 저온환경에 적응된 포화지방산이 많이 차지하는 패턴이었다. 이를 통해서 분리된 극지 *Pseudomonas* 에 대한 지질 대사체를 분석 수행할 수 있음을 보였다.



Total Fatty Acids Composition



Pseudomonas sp.

그림 21. 선정된 균주의 지질 대사체 분석

KOPRI
극지연구소

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전의 기여도 등을 기술

제 1 절 연도별 연구목표

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수기술 개발	1-1 북극 토양 유래의 lipid marker 분석	북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양 샘플 (샘플링 기간 2014. 07. 19 ~ 2014. 07. 30)을 활용하여 토양 샘플의 지질 추출 및 인지질 지방산(PLFA) 분석을 수행하여 PLFA 마커를 획득하여 이로부터 미생물 군집별 PLFA 농도와 스트레스 지수를 얻었음. 이를 통하여 빙하의 영향을 다양한 측면에서 관찰할 수 있었음.	100%
	1-2 북극 토양 미생물의 수분리 및 지질 대사체 분석	북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양으로부터 10여종 이상의 미생물 샘플을 얻었으며 5종 이상 미생물에 대한 성장 조건 및 지질 대사체에 관한 분석을 통한 균주간의 차이를 볼 수 있었음	100%

제 2 절 평가의 착안점

년도	성과목표	세부목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
2차년도 (2015)	다산과학기지 주변 지방산 분석을 위한 토양 내 지방산 회수기술 개발	○ 북극 토양 유래의 lipid marker 분석	80	1. 북극 토양으로부터 lipid 추출 여부
		○ 북극 토양 미 생물의 순수분리 및 지질대사체 분석	20	2. 북극 토양으로부터 PLFA 분석 후 미생물 군집 분석 여부 3. 북극 토양 미생물의 순수 분리 여부 4. 지질 대사체 분석 여부

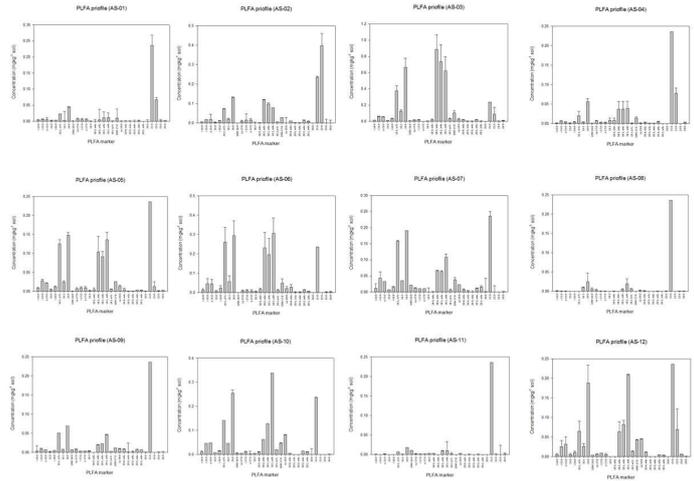


제 3 절 연구수행 세부 내용 및 결과(우수성)

□ 성과목표 : 북극 토양 유래의 lipid marker 분석

○ 세부목표 1: Lipid marker의 분석 및 미생물 군집 분석

연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>샘플링이 완료된 토양 시료의 lipid marker의 추출 및 분석</p>	<p>- 샘플링이 완료된 북극 토양 시료로부터 지질을 추출하여 Silicic acid 컬럼 크로마토그래피법으로 인지질 지방산(PLFA)을 분석</p>  <p><그림. 지역의 북극 토양 샘플 채취 지역></p> <p>- Alkaline mild methanolysis 방법으로 인지질 지방산(PLFA)를 메틸에스테르화 시킨 후 질량분석기(GC-MS)를 이용하여 지방산을 측정</p> <p>- 내부표준물질로 Heneicosanoic acid(21:0)를 이용하여 지방산 프로파일링을 정성 및 정량 분석</p>



<그림. 지역 북극 토양 샘플의 PLFA data>

⇒ 북극 토양으로 부터 효과적인 PLFA 분석 완료 및 GC 분석 완료

Lipid marker를 이용한 미생물 군집 유추

- 기존 문헌 및 GC-MS 운용상에 분석 가능한 PLFA를 적용하여 PLFA-미생물 간의 상호 관계를 적용하였음.

Microbial group	Specific PLFA markers	PLFA group
Other Bacteria	14:0, 15:0, 17:0	Multiple groups
Gram(+)	i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0, i18:0	Branched
Gram(-)	cy17:0, cy19:0, 16:1w7, 17:1w9, 18:1w7, 18:1w5	Cyclopropyl, mono
Fungi	18:2w6,9c, 18:3w6, 18:3w3	Polyunsaturated
Actinomycetes	10Me16:0, 10Me17:0, 10Me18:0, i17:1w7c	10-Methyl branched
Eukaryote	16:0, 16:1w9c, 16:1w5c, 18:1w9c, 18:1w7c, 18:1w7t, 20:1, 21:0	
Methanobacter	16:1w8c, 18:1w8	
Anaerobe	14:1w7cDMA, i15:0DMA, 16:1w7cDMA, 18:0DMA, 18:2DMA, 19:0cy9,10DMA	
Protozoa	20:2w6, 20:3w6, 20:4w6	Polyunsaturated
Plants	18:1w9c, 18:1w11c, 18:3w3, 20:5w3, 20:0, 21:0, 22:0, 23:0, 24:0, 25:0, 26:0	Long saturated

<그림. 미생물 군집별 PLFA marker>

- 이러한 PLFA분석 방법을 적용하여 8개 site에 대한 미생물 군집 분석을 실시하였음.
 - 이를 통하여 Bacteria, Fungi, Eukaryote, Actinomycete 등에 대한 분포 정보를 얻을 수 있었으며, 환경적 요인 지수들인 Fungi/Bacteria, Sat/Monosaturate, Iso/Anteiso 등의 정보들로 토

양의 환경적 요인들을 유추 할 수 있음.

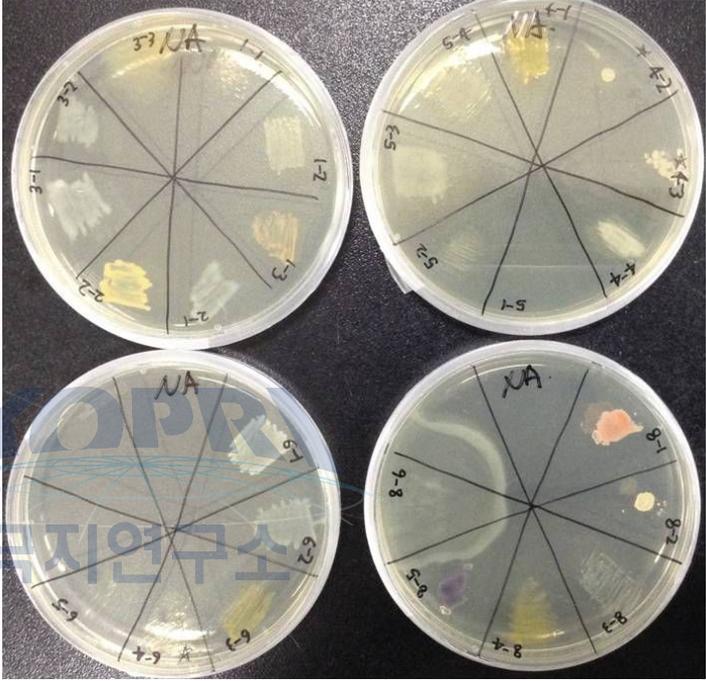
Group	Concentration (mg/kg soil)							
	20	47	62	103	120	132	191	303
Microbial PLFA components								
Total (mg/kg soil)	0.9171	4.0765	0.4950	1.0280	1.8901	1.1253	0.5573	0.3155
Bacteria	0.2476	1.2289	0.0865	0.3740	0.7480	0.4340	0.1517	0.0274
G(+)	0.0845	0.1797	0.0185	0.0872	0.1435	0.1248	0.0334	0.0033
G(-)	0.0816	0.4176	0.0277	0.1455	0.2907	0.1935	0.0697	0.0049
Fungi	0.1200	0.9105	0.0540	0.1101	0.2525	0.0666	0.0243	0.0008
Eukaryote	0.4988	1.7927	0.3331	0.5073	0.7986	0.5470	0.3459	0.2794
Protozoa	0.0231	0.0362	0.0069	0.0099	0.0421	0.0190	0.0160	0.0020
Actinomycete	0.0276	0.1083	0.0144	0.0266	0.0489	0.0587	0.0195	0.0057
Microbial stress indicator								
Fungi/Bacteria	0.4849	0.7409	0.6238	0.2944	0.3375	0.1535	0.1599	0.0302
Sat/Monosat	2.0987	0.4724	2.5587	1.0658	0.6759	1.3821	2.1136	6.6369
Iso/Anteiso	2.9126	2.3840	3.7781	2.6587	2.0823	2.5056	2.9949	3.1538

<그림. 선정된 8개 북극 토양 샘플의 PLFA 분석을 통한 미생물 총량 및 스트레스 지수 분석>

⇒ 북극 토양 8개 site의 PLFA 분석을 통한 미생물 총량 및 분포 확인



○ 세부목표 2: 북극 토양 미생물의 순수분리 및 지질대사체 분석

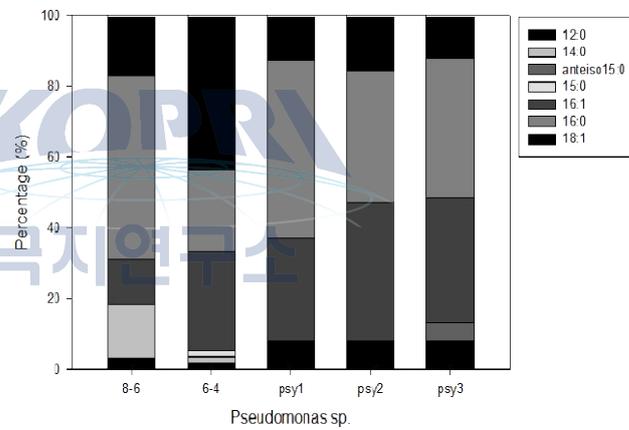
연구 내용	연구 결과(우수성)
<p>북극의 토양 샘플로부터 미생물을 순수분리</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 북극 다산과학기지 주변의 Ny-Ålesund 의 Midtre Lovénbreen 로부터 얻은 토양으로부터 10 여종 이상의 미생물 샘플을 획득 - 특이적인 효소나 성장 조건, pigment 등에 대한 기초적인 실험을 수행  <p><그림. 북극 토양 샘플로부터 분리한 미생물></p> <p>⇒ 극지 유래 미생물 순수 분리 및 기초 활성 테스트를 통한 극지 미생물의 성장 패턴 및 관련 효소 관측</p>
<p>균주의 생화학 실험 및 지질 대사체 분석 및 비교</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 극지 유래 <i>Pseudomonas</i> sp. 에 대한 온도, pH, NaCl 농도에 따른 성장 여부 등의 생화학 실험 수행

Condition	8-6	6-4	psy1	psy2	Psy3
4 °C	+++	+	+++	+++	+++
20 °C	+	+++	+++	+++	+++
30 °C	+	-	+++	++	++
37 °C	-	-	-	-	-
pH3	-	-	-	-	-
pH 5	+	+	+++	+++	+++
pH 7	+++	+	++	-	-
pH 9	+++	+	+++	++	++
pH 11	+++	-	+++	++	++
pH 13	-	-	-	-	-
NaCl 0.1 M	+++	+	+++	+++	+++
NaCl 0.25 M	+++	+++	+++	++	++
NaCl 0.5 M	++	++	-	-	+
NaCl 1.0 M	+	+	+	+	+

<그림. 선정된 균주의 성장 조건 비교>

- 극지 유래 *Pseudomonas* sp. 에 지방산 패턴과 각각의 구성 비율을 측정

Total Fatty Acids Composition



<그림. 선정된 균주의 지질 대사체 분석>

⇒ 분리된 극지 *Pseudomonas*에 대한 지질 대사체 분석 수행

제 4 절 관련분야 기여도

○ 진행중인 국내외 학술지

1. Starch based polyhydroxybutyrate production in engineered *Escherichia coli*. Bhatia SK, Shim YH, Jeon JM, Brigham CJ, Kim YH, Kim HJ, Seo HM, Lee JH, Kim JH, Yi DH, **Lee YK, Yang YH**. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2015, 38: 1479-1484. (IF: 1.8)
2. Lipase-Catalyzed Production of 6-O-cinnamoyl-sorbitol from D-sorbitol and Cinnamic Acid Esters. Kim JH, Bhatia SK, Yoo D, Seo HM, Yi DH, Kim HJ, Lee JH, Choi KY, Kim KJ, **Lee YK, Yang YH**. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015, 76:244-52. (IF: 1.7)
3. Increased vulnerability to physical stress by inactivation of NdgR in *Streptomyces coelicolor*. Lee BR, Yi DH, Song E, Bhatia SK, Lee JH, Kim YG, Park SH, **Lee YK, Kim BG, Yang YH**. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015 175:3673-82 (IF: 1.7)
4. Application of diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) derivatization for monitoring of lysine decarboxylase activity, Kim YH, Kim HJ, Shin JH, Bhatia SK, Seo HM, Kim YG, **Lee YK, Yang YH**, Park K, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2015, 115: 151 - 154 (IF: 2.7)
5. A MALDI-MS-based quantitative targeted glycomics (MALDI-QTaG) for total N-glycan analysis, Kim KG, Kim YW, Hwang CH, Park HG, Jeong JH, Choi KY, Yang YH, Koo M, Kim YG, *Biotechnology letters* 2015, Accepted (IF: 1.7)
6. Application of a Non-halogenated Solvent, Methyl Ethyl Ketone (MEK) for Recovery of Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [P(HB- co-HV)] from Bacterial Cells. Yang YH, Jeon JM, Yi DH, Kim JH, Seo HM, Rha C, Sinskey AJ, Brigham CJ. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2015, 20: 291-297 (IF: 1.2)
7. Production and structural characterization of a novel exopolysaccharide from psychrotrophic arctic glacier soil bacterium *Flavobacterium* sp. ASB 3-3. Sathiyannarayanan G, Yi DH, Bhatia SK, Kim JH, Seo HM, Kim YG, Park SH, Jeong D, Jung S, Jung JY, Lee YK, Yang YH, *RSC advances* 2015, *accepted*. (IF: 3.84)

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

가. 추가 연구의 필요성 및 타연구에의 응용

- 본 연구개발 결과는 연구기간 3년의 과제 중 1년차 결과로 전체 목표인 다산 과학기지 주변 빙하 후퇴 지역에서 지형에 따른 토양 내 유기물 변화를 모니터링 할 수 있는 지방산 표지 인자 분석 기술 수립의 목적 중 1차년도에는 극지 토양내 지방산 회수 및 분획 분석 기술의 확립을 목적으로 수행되었음. 이에 추가 연구 내용으로 다산과학기지 주변에서 수집된 토양에 대한 분석을 수행하여 미생물의 군집을 분석하고 이를 토양,환경 요인들과 함께 상호작용을 연구하고자 함.
- 본 연구에서 수행된 지방산 분석법은 국내 일반토양에도 언제든지 적용할 수 있는 바 친환경 제제나 오염원들에 의한 토양 미생물 군집 변화 연구 등에도 충분히 이용될 수 있음

나. 학술적 파급효과

- 본 연구의 연구결과는 극지 미생물 연구에서 동토층과 극지 미생물 균주들에 대한 체계적인 연구로 토양의 유기물 변화를 모니터링하며, 극지 미생물을 통한 저온 미생물의 기능 및 대사체 분석에 활용될 수 있음.
- 본 연구에서 발견된 지방 표지 인자나 특정 균주의 지방 표지 인자 정보는 이후 기후 온난화 정보 시에 유용한 표지 인자로 활용될 수 있으며, 이를 통한 지구 온난화로 인한 미래 생태계 변화의 예측 등에 활용될 수 있음.
- 지방 대사체 프로파일링 기술을 이용한 신규 극지 미생물의 대사산물 규명을 통해 뛰어난 생리활성을 가진 유용 생물 소재 확보에 적극 활용될 수 있음.
- 본 연구를 통하여 주로 유전체 사업에 초점을 맞춘 국내 극지연구의 다각화에 기여할 수 있으며 산업적으로 중요한 균주 및 단백질의 원천으로써의 극지 연구소의 위상도 올라갈 것으로 보임.

다. 경제적 파급효과

- 전술한 바와 같이 극지 미생물 연구 플랫폼의 구축은 다양한 극지 미생물 연구에 활용되어 극지 미생물 연구의 저변 확대 및 산업적 영향력을 극대화 할 것임. 그 결과로 풍부한 자원의 보고이지만 접근이 쉽지 않고 어렵게 느껴졌던 극지 연구에 대한 인식 전환과 유전체 기반의 극지 연구를 대사체/단백질 기반의

연구들로 다각화 할 수 있는 계기가 될 수 있을 것으로 기대함.

- 동토층의 유기물 변화의 관측은 극지 미생물 및 극지 식물의 성장에 영향을 미치는 인자를 파악할 수 있는 좋은 자료가 됨으로 향후 기후 변화에 따른 영향을 예측할 수 있는 근거가 되어 식량자원이나 관광자원 관련 산업에 큰 영향을 미칠 것으로 사료됨.



제 6 장 참고문헌

Bardgett RD, Hobbs PJ, Frostegard A..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.

Borga P, Nilsson M, Tunlid A. 1994. Bacterial communities in peat in relation to botanical composition as revealed by phospholipid fatty-acid analysis. *Soil Biol. Biochem* 26:841-848.

Bossio DA, Scow KM. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microbiol Ecol* 35:265-278.

Bossio DA, Scow KM, Gunapala N, Graham KJ. 1998. Determinants of soil microbial communities: Effects of agricultural management, season, and soil type on phospholipid fatty acid profiles. *Microbial Ecology* 36:1-12.

Frostegard A, Baath E. 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 22:59-65.

Frostegård A, Tunlid A. Bååth E. 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils, *Soil Biology & Biochemistry* 43:1621-1625

Garland, JL. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:289-300.

Gomez E, Ferreras L, Toresani S. 2006. Soil bacterial functional diversity as influenced by organic amendment application. *Bioresource Technology* 97 : 1484-1489.

Green CT, Scow KM. 2008. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeo. J* 8:126-141.

Hawksworth DL. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res* 105:1422 - 2.

Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R. Kaushik R. 2005. Phospholipid fatty acid - A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Sci.* 89:1103-1112.

Li WH, Zhang CB, Jiang HB, Xin GR. Yang ZY. 2006. Changes in soil microbial community associated with invasion of the exotic weed *Mikania micrantha*. *Plant Soil.* 281:309-324.

Ludvigsen L, Albrechtsen HJ, Holst H, Christensen TH. 1997. Correlating phospholipid fatty acids (PLFA) in a landfill leachate polluted aquifer with biogeochemical factors by multivariate statistical methods. *Fems Microbiology Reviews* 20:447-460.

Manzoni S, Porpotato A. 2007. A theoretical analysis of nonlinearities and feedbacks in soil carbon and nitrogen cycles. *Soil Biol. Biochem.* 39:1542-1556.

Paul EA. Clark FE.. 1989. In *Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego, CA.

Pratt B. Riesen R, Johnston CG. 2012. PLFA Analyses of Microbial Communities Associated with PAH-Contaminated Riverbank Sediment. *Microb Ecol* 64:680 - 691

Peacock AD, Mullen, MD, Ringelberg DB, Tyler DD, Hedrick DB, Gale PM, White DC. 2001. Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biol. Biochem.* 33:1011-1019.

Pompanon F, Deagle BE, Symondson WO, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P. 2012. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing., *Mol Ecol.* 221: 1931-1950.

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.

Ramsey PW, Rillig MC, Feris KP. Holben WE, Gannon JE. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power

compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50:275–280.

Straatsma G, Ayer F, Egli S. 2001. Species richness, abundance, and phenology of fungal fruit bodies over 21 years in a Swiss forest plot. *Mycoll Res* 105:515 - 523.

Torsvik V, Ovreas L, and Thingstad TF. 2002. Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064 - 1066.

Widmera F, Flieûbach A, LaczkoÂ E, Schulze-Aurichd J, Zeyer J.(2001) Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA-, PLFA-, and Biologe-analyses *Soil Biology & Biochemistry*. 33, 1029-1036.

Wu Y, Ding N, Wang G, Xu J, Wu J, Brookes PC. 2009. Effects of different soil weights, storage times and extraction methods on soil phospholipid fatty acid analyses, *Geoderma* 150:171 - 178.

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

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

박기춘, 김수정, 2010. 고추재배지에서 퇴비시용에 따른 토양 미생물의 인지질지방산 변화. *한국토양비료학회지* 43, 194-199.

현해남, 좌재호, 2012. 한라산국립공원 자연자원조사. 제주특별자치도 한라산연구소, 1-13



주 의

1. 이 보고서는 극지연구소 PAP사업 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 PAP 과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.