A Simple Method to Determine Soil Microbial Biomass Carbon by Facilitating Gaseous Diffusion of Chloroform into Pores

Jeong Su Lee¹, Yehun Lee¹, Eun-jin Lee², Khok Pros³, Kyoungyoung Kim¹, and Gwang Hyun Han^{4*}

¹Master Student, Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

²Research Scientist, Department of Soil and Fertilizer, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

³Doctoral Student, Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

⁴Professor, Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

*Corresponding author: hangh@cbnu.ac.kr

ABSTRACT

Received: November 2, 2021

Revised: November 8, 2021

Accepted: November 8, 2021

ORCID

Gwang Hyun Han

<https://orcid.org/0000-0001-5572-7360>

Chloroform fumigation and extraction (CFE) has been a widely accepted method for quantifying overall size of soil microbial community, which is a key indicator to assess the quality and health of a given soil. However, the standard procedure of CFE requires careful operations to generate enough CHCl_3 vapors and flush them into soil pores. We suggest a new simple alternative for facilitating gaseous diffusion of CHCl_3 molecules under ambient air pressure conditions. The microbial C values by the new approach, examined for several farmland, forest, and grassland soils, coincided well with those obtained by the standard CFE. The cell lysis and extraction coefficient was also close to that of standard CFE and much higher than that evaluated for a liquid-based CHCl_3 cell lysis.

Keywords: Chloroform fumigation and extraction, Extraction coefficient, Soil health, Soil quality

The microbial C values by the new approach (GD) coincided well with those obtained by the standard CFE, compared with those measured by a liquid-based CHCl_3 cell lysis (LC).

Introduction

토양 미생물은 탄소와 질소를 포함한 수많은 물질들의 전지구적 순환에 매우 중심적인 역할을 수행한다. 하지만, 일반적으로 토양의 유기 탄소 함량은 건조 질량의 1 - 4% 수준이고, 토양 미생물은 다시 토양 유기 탄소 함량의 1 - 3% 미만에 불과한 것으로 알려져 있다 (Anderson and Domsch, 1989; Sparling, 1992). 한편, 미세한 토양 미생물의 양을 정밀하게 측정하는 것은 한 토양의 건강성 혹은 질을 평가하는 데 있어서 필수적인 요소로 고려되고 있다 (Jordan et al., 1995; Yoon et al., 2019; Moon et al., 2020).

토양 미생물의 정량을 위해서 평판 콜로니 계수법 (plate colony counting), 지방산 바이오마커를 활용한 인지질 지방산 (phospholipid fatty acid) 분석법, 그리고 DNA 혹은 RNA 정량법, ATP 정량법 등 많은 방법들이 활용되고 있고 (White et al., 1979; Nielsen and Winding, 2002; Leckie et al., 2004), 각기 장단점이 있어서 범용적 표준으로 받아들여지는 방법은 아직 존재하지 않는다. 하지만, 클로로폼 훈증 항온배양법 (chloroform fumigation and incubation, CFI)과 클로로폼 훈증 추출법 (chloroform fumigation and extraction, CFE)는 다른 측정법들과 달리 토양 미생물의 생체량을 탄소 기준으로 파악할 수 있는 장점이 있어서 널리 사용되고 있다 (Vance et al., 1987; Wu et al., 2000). 특히, CFE는 미생물의 세포 파쇄 (cell lysis) 작용을 하는 훈증 후 탄소 정량이 CFI에 비해 간편한 장점이 있다. 하지만, 이 두 방법 모두, 세포 파쇄 정도가 CHCl_3 기체의 효과적인 토양 공극 내 침투 및 확산 정도에 크게 의존한다. 아울러, CFE는 세포 파쇄물 (cell lysate)을 모두 추출할 수 없으므로 이를 고려한 추출계수를 따로 고려해야 하는 단점이 있다 (Vance et al., 1987). 위 CFE 과정의 단점을 극복하기 위해 혹은 보다 신속/간편한 정량을 위해 변형된 방법들이 제시된 바 있는데, 대표적으로는 토양 시료에 액체 CHCl_3 를 바로 가하는 방법과 (Shibahara and Inubushi, 1995; Witt et al., 2000) 소량의 CHCl_3 를 함유하는 수용성 용액 (K_2SO_4)으로 교반 후 추출하는 방법이 있다 (Fierer, 2003; Fierer and Schimel, 2003). 하지만, 이러한 변형된 방법들은 소수성인 CHCl_3 이 친수성 환경에서 효과적으로 세포에 접근하여 파쇄하는 정도에 한계가 있다.

이에 본 연구는 기존의 CFE 변형법들보다 좀 더 개선된 접근으로, (1) 실리카 기반 고체 매트릭스 표면에 액체 CHCl_3 를 얇게 코팅한 후 토양 시료들과 혼합균질한 다음 항온배양하는 방법을 제시하고, (2) 이 새로운 방법이 표준 CFE 및 기존 직접 액체 추출법과 비교하여 세포 파쇄 정도, 추출 계수, 최종적인 미생물 생체량 결정에서 보이는 차이를 조사하고, (3) 아울러 간편하고 신속한 토양 미생물 생체 탄소량 측정을 위한 적용성을 검증하고자 하였다.

Materials and Methods

토양 시료 농경지, 임지, 초지에서 각 토지이용 형태 별로 비교적 넓은 범위의 미생물 생체 탄소량 비교가 가능하도록, 토양 유기물 함량 차이가 비교적 큰 토양 시료들을 2019년 6월 충북 청주시 충북대학교 캠퍼스 내 10개 지점에서 채취하였다 (Table 1). 미생물 생체량 분석은 채취 후 신선한 시료를 즉시 2 mm 체로 거른 후 실시하였고, 토양 화학성 분석은 시료를 풍건 후 일반적인 과정에 따라 수행하였다.

Table 1. Chemical properties of examined soils.

Land use	Soil	OM (g kg ⁻¹)	Avail. P (mg kg ⁻¹)	Inorganic N (mg kg ⁻¹)	pH (1:5)	EC (1:5) (dS m ⁻¹)
Crop land	C1	4.9 a [†]	17.4 a	16.3 a	6.0 a	0.1 a
	C2	9.5 b	105.4 b	39.2 b	6.2 b	0.1 b
	C3	28.5 c	437.0 c	50.9 c	7.1 c	0.3 b
Forest	F1	4.4 a	7.9 a	12.0 a	6.4 a	0.1 a
	F2	5.0 b	6.1 a	19.4 b	4.9 a	0.1 a
	F3	10.9 b	7.5 a	8.2 c	6.2 b	0.1 a
Grass land	G1	13.0 a	10.7 a	13.0 a	5.1 a	0.1 a
	G2	21.7 a	12.3 b	18.1 a	5.2 b	0.1 a
	G3	22.9 b	11.6 b	17.3 a	5.7 c	0.0 a
	G4	24.0 c	63.6 b	17.2 b	6.8 d	0.1 c

[†] Values with same letters are not significantly different at $p < 0.05$ ($n = 3$, by the Fisher's LSD).

CHCl₃에 의한 cell lysis (세포 파쇄) 세포 파쇄는 a) Vapor fumigation (VF), b) Liquid chloroform (LC), c) Gas diffusion (GD), 등의 세 방법에 의해 수행되었다. 표준 CFE는 진공 상태에서 CHCl₃를 끓여 훈증하는 VF 처리에 해당하고, 기준이 되는 Horwath and Paul (1994)의 방법에 따라 3차례 훈증 갱신 과정을 거친 후 25°C에서 24시간 향온배양하였다. LC는 Fierer (2003)의 방법을 약간 변형하여 토양 약 5 g에 CHCl₃ 4 mL와 0.5 M K₂SO₄ 추출용액 25 mL를 가한 후 4시간 동안 진탕교반하였다. 본 연구에서 새로 시험된 GD는, 40 mL 유리 원심분리 튜브에 시약 등급 sea sand (300 - 600 mm; CAN6433, Wako, Osaka, Japan) 5 g를 넣고 0.4 mL CHCl₃ (ethanol free)를 가하고 볼텍싱 하여 고체 표면에 CHCl₃가 얇게 코팅되도록 하였다. 이어서 즉시 습윤 토양 시료 약 5 g를 넣고 Teflon liner가 장착된 캡으로 밀봉 후 25°C에서 24시간 향온배양하였다. 향온배양 종료 후 CHCl₃ 5 mL를 추가로 가한 후 2분간 초음파 처리 (sonication)한 다음 1시간 동안 상온배양하였다.

추출 및 미생물 생체 탄소량 결정 VF 처리 시료들은 표준 CFE 방법에 따라 데시케이터 내부 진공을 형성/해소하는 과정을 6회 반복하여 CHCl₃을 제거한 후, 0.5 M K₂SO₄ 추출용액을 1:5 비율로 가한 후 1시간 동안 교반하여 추출하였다. LC 처리 시료들은 원심분리 (3,000 rpm, 5분) 후, 상등액을 취해 Fierer (2003)의 방법에 준해 gas blowing concentrator (S-024, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan)로 10분간 N₂ 폭기 (bubbling)하여 용존 CHCl₃를 제거하였다. GD 처리 시료들은 10 mbar 이하의 진공조건에서 1시간 동안 CHCl₃을 제거한 후 표준 CFE와 동일하게 추출하였다. 각 추출된 시료들은 UV persulfate 산화법을 적용한 TOC analyzer (Sievers 5310c, GE, Boston, MA, USA)로 총유기탄소 (total organic carbon, TOC)를 측정하였다. CHCl₃가 처리되지 않은 각 대조구들도 같은 방법으로 분석하였고, 미생물 탄소량은 다음과 같은 계산식으로 결정하였다 (Vance et al., 1987).

$$\text{Soil microbial biomass C} = (E_F - E_{NF}) / K_{EC} \quad (\text{Eq. 1})$$

여기서, E_F 와 E_{NF} 는 각각 CHCl₃가 처리 혹은 무처리된 시료들로부터 추출된 유기탄소 양이다 (단, 추출 비율과 토양 수분함량을 고려하여 토양 건조 질량 단위로 계산함). K_{EC} 는 각 처리의 세포 파쇄 효율 및 추출되는 세포 파쇄물의

정도를 전반적으로 나타내는 계수이고, 표준 CFE 법의 경우, 이 값은 약 0.45로 알려져 있다 (Vance et al, 1987; Joergensen and Mueller, 1996).

토양 화학성 토양 pH와 EC는 시료를 증류수 1:5법으로 측정하였고, 유기물 함량은 표준 중크롬산 분해법으로 분석하였다 (Nelson and Sommers, 1996). 유효인산은 Bray-1 액으로 추출 후 몰리브덴청법으로 측정하였고 (Kuo, 1996), 암모늄태 및 질산태 질소는 토양을 2 M KCl로 추출 후 각각 인도페놀법과 Salicylate nitronation법으로 분석하였다 (Bolleter et al., 1961; Cataldo et al., 1975). 기본적으로 모든 분석은 3반복 실행되었으며, 최소유의차 (LSD) 등의 통계분석은 SAS (ver 9.4, SAS Institute, USA) 프로그램을 이용하였다.

Results and Discussion

세포 파쇄 (cell lysis) 전후에 추출된 TOC의 양 CHCl_3 이 처리되지 않은 대조시료로부터 추출된 TOC (E_{NF})는 시험된 세 방법 모두 동일한 수준의 양을 보였고 (Fig. 1a), 본 연구에서 사용된 시약 등급의 sea sand와 같은 입자 매트릭스는 미생물 생체 탄소량을 측정하는데 안전하게 사용될 수 있음을 확인하였다. 각 토양에서 추출된 E_{NF} 의 양은 일반적으로 토양 유기물 함량이 높을수록 증가하는 경향이였다 (Table 1). 한편, 세포 파쇄 후 추출된 TOC (E_{F})는 세 방법 모두 E_{NF} 보다 크게 증가하였으나 (Fig. 1b), 용액 상태에서 CHCl_3 가 토양에 노출/접촉되는 방법 (LC)에 비해 CHCl_3 를 가스 상태에서 확산시키거나 (GD) 혹은 진공 상태에서 훈증 (VF)하는 경우 유의하게 더 높은 E_{F} 값을 얻을 수 있었다. 이 결과는 VF를 사용하는 표준 CFE 방법에서 셀 파쇄 효율이 CHCl_3 증기의 토양 공극 내 침투/확산 정도에 의존한다는 선행연구들의 해석들과 궤를 같이 한다 (Brookes et al., 1985; Martens, 1995; Jenkinson et al., 2004). 전반적으로 VF법이 가장 높은 수준의 추출 TOC를 보여 가장 높은 셀 파쇄 효율을 보이는 것으로 판단되지만, 본 연구에서 제안된 GD법은 진공상태에서 CHCl_3 를 끓여야 하는 표준 CFE에 비해 매우 간단하고 적은 노력을 요구하는 장점이 있다.

Fig. 1. TOC extracted from soil samples before (a) and after (b) CHCl_3 cell lysis (E_{NF} and E_{F} , respectively). The E_{NF} and E_{F} values were evaluated per dry mass from TOC concentration of each extract multiplied by the extraction ratio (1:5). LC, liquid CHCl_3 ; GD, gas diffusion; VF, vapor fumigation. Error bars represent standard error ($n = 3$). The * symbol indicates a significant difference among the treatments at $p < 0.01$ (by the Fisher LSD test).

CHCl₃ 노출 방법에 따른 추출 계수 (K_{EC})의 차이 표준 CFE 법에 따라 토양 미생물 생체 탄소량을 측정하는 경우, K_{EC} 값은 약 0.45로 알려져 있다 (Vance et al., 1987; Joergensen and Mueller, 1996). 하지만, CHCl₃를 용액 상태에서 토양과 접촉/교반 하거나 (LC), 가스 상태에서 확산시킬 경우 (GD)에는, 각 방법의 셀 파쇄 정도 및 K₂SO₄ 용액으로 추출 가능한 세포 분획을 종합적으로 반영하는 추출 계수 (K_{EC})를 새로 정의하는 것이 필요하다. Table 2에서 보는 바와 같이, LC법과 GD법 모두 표준 VF로 얻어진 세포 추출 유기탄소 ($E_F - E_{NF}$) 양과 매우 높은 정량적 상관관계를 보였고 ($p < 0.001$), 이로부터 구해진 K_{EC} 값은 각각 0.24 그리고 0.40이었다. 하지만, 본 연구에서 제안된 GD법이 표준 CFE와 더 높은 상관관계를 보임은 물론, 계산된 추출 계수 역시 표준법의 0.45에 가까웠다. LC법의 상대적으로 낮은 K_{EC} 는 선행연구에서 보고된 값들과 유사한 수준이었고, CHCl₃/H₂O 혼합액 상태에서 소수성인 CHCl₃이 효과적으로 세포에 접근하는데 제한이 있기 때문으로 여겨진다.

Table 2. Extraction coefficients (K_{EC}) evaluated for facilitated gas diffusion (GD) and liquid chloroform (LC) treatments.

	Regression equation	r^2 (p value)	$K_{EC}^{\dagger}$
GD	$y = 0.89x^{\ddagger}$	0.80 (<0.001)	0.40
LC	$y = 0.53x$	0.66 (<0.001)	0.24

[†]The unknown K_{EC} values were calculated from regression analysis of $E_F - E_{NF}$ for GD or LC against those for the standard CFE, of which K_{EC} is known as 0.45.

[‡]The slopes of each equation reflect the relative magnitude of K_{EC} .

토양 미생물 생체 탄소량의 비교 LC법과 GD법 모두, 각 추출 계수를 적용하여 얻어진 미생물 생체 탄소량에서 표준 CFE로 얻어진 결과와 높은 상관관계가 있었지만 (Fig. 2) LC법은 상대적으로 무작위 편향 (random bias)이 상당히 컸고, 이 바이어스들은 미생물 생체량이 작거나 큰 것에 편중되지 않고 비교적 고르게 분포하였다. 한편, 일반 대기압에서 가스 확산을 이용하는 GD법을 사용해 얻은 미생물 탄소량은 VF를 사용하는 표준 CFE의 결과와 매우 잘 일치하였고 ($r^2 = 0.95, p < 0.001$), 비교적 1:1 선에 잘 수렴하였다. 따라서 본 연구에서 제안된 GD법은 상대적으로 적은 노력과 간편한 토양 미생물 생체 탄소의 측정이 가능할 뿐만 아니라, 표준 CFE에 비해 상대적으로 다소 낮은 정확

Fig. 2. The facilitated gas diffusion (GD) showed a better correlation with the soil microbial C values obtained from the standard CFE than the liquid-based CHCl₃ lysis (LC). The biomass C values were calculated using the extraction coefficients shown in Table 2. The vertical dot lines indicate bias of each LC datum with respect to the 1:1 line.

도에도 불구하고, 간단/신속 측정을 위한 잠재력이 크다고 여겨진다. 향후, 다양한 토양들에 대해 연구를 수행함으로써 보다 정확한 추출 계수를 정의하고, 실제 적용성을 검증하는 노력이 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업 연구과제 (PJ015293042021)의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Anderson, T.H. and K.H. Domsch. 1989. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. *Soil Biol. Biochem.* 21(4):471-479.
- Bolleter, W.T., C.J. Bushman, and P.W. Tidwell. 1961. Spectrophotometric determination of ammonia as indophenol. *Anal. Chem.* 33:592-594.
- Brookes, P.C., A. Landman, G. Pruden, and D.S. Jenkinson. 1985. Chloroform fumigation and the release of soil nitrogen: A rapid direct extraction method to measure microbial biomass nitrogen in soil. *Soil Biol. Biochem.* 17(6):837-842.
- Cataldo, D.A., M. Maroon, L.E. Schrader, and V.L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 6(1):71-80.
- Fierer, N. 2003. Stress ecology and the dynamics of microbial communities and processes in soil. Ph.D. Thesis, University of California, Santa Barbara, USA.
- Fierer, N. and J.P. Schimel. 2003. A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 67:798-805.
- Horwath, W.R. and E.A. Paul. 1994. Microbial biomass. Insects. p. 753-774. In R.W. Weaver et al. (ed.) *Methods of Soil Analysis: Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*. SSSA Book Series 5, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Jenkinson, D.S., P.C. Brookes, and D.S. Powlson. 2004. Measuring soil microbial biomass. *Soil Biol. Biochem.* 36(1):5-7.
- Joergensen, R.G. and T. Mueller. 1996. The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: Calibration of the k_{EC} value. *Soil Biol. Biochem.* 28(1):25-31.
- Jordan, D., R.J. Kremer, W.A. Bergfield, K.Y. Kim, and V.N. Cacio. 1995. Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biol. Fertil. Soils* 19(4):297-302.
- Kuo, S. 1996. Phosphorus. Insects. p. 869-919. In D.L. Sparks et al. (ed.) *Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods*. SSSA Book Series 5, Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin, USA.
- Leckie, S.E., C.E. Prescott, S.J. Grayston, J.D. Neufeld, and W.M. William. 2004. Comparison of chloroform fumigation-extraction, phospholipid fatty acid, and DNA methods to determine microbial biomass in forest humus. *Soil Biol. Biochem.* 36(3):529-532.
- Martens, R. 1995. Current methods for measuring microbial biomass C in soil: Potentials and limitations. *Biol. Fertil. Soils* 19:87-99.
- Moon, J.Y., C.H. Son, K.H. Joung, Y.G. Kim, Y.H. Chang, D.Y. Choi, H.J. Cho, J.Y. Heo, and Y.H. Lee. 2020. Soil microbial communities and growth of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) in paddy and upland soils. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 52(3):196-205.
- Nelson, D.W. and L.E. Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon and organic matter. Insects. p. 1011-1071. In D.L. Sparks et al. (ed.) *Methods of Soil Analysis Part 3: Chemical Methods*. SSSA Book Series 5, Soil Science Society

of America, Madison, Wisconsin, USA.

- Nielsen, M.N. and A. Winding. 2002. Microorganisms as indicators of soil health. NERI Technical Report Vol. 388. National Environmental Research Institute, Roskilde, Denmark.
- Shibahara, F. and K. Inubushi. 1995. Measurements of microbial biomass C and N in paddy soils by the fumigation-extraction method. *Soil Sci. Plant Nutr.* 41(4):681-689.
- Sparling, G.P. 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Aust. J. Soil Res.* 30(2):195-207.
- Vance, E.D., P.C. Brookes, and D.S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19(6):703-707.
- White, D.C., W.M. Davis, J.S. Nickels, J.D. King, and R.J. Bobbie. 1979. Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40(1):51-62.
- Witt, C., J.L. Gaunt, C.C. Galicia, J.C. Ottow, and H.U. Neue. 2000. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Biol. Fertil. Soils* 30(5):510-519.
- Wu, J., Z. He, W. Wei, A. O'Donnell, and J. Syers. 2000. Quantifying microbial biomass phosphorus in acid soils. *Biol. Fertil. Soils* 32:500-507.
- Yoon, Y.E., J.U. Im, J.H. Kim, S.H. Jeon, M.S. Jeong, and Y.B. Lee. 2019. Effect of oil-cake and amino acid fertilizer on soil bio-chemical properties and pepper yield. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 52(3):196-205.