

산성비가 토양미생물에 미치는 영향

김갑정 · 임진아 · 박성주* · 문형태** · 박경량 · 이인수†

한남대학교 미생물학과
*대전대학교 미생물학과
**공주대학교 생물학과

Effect of Acid Rain in Soil Microorganism

Gab-Jung Kim, Jin-A Lim, SeongJoo Park*, Hyeong-Tae Mun**, Kyeong-Ryang Park and In-Soo Lee†

Department of Microbiology, Hannam University, Taejon 300-791,
*Department of Microbiology, Taejon University, Taejon 300-716,
**Department of Biology, Kongju University, Kongju 314-701, Korea

Abstract

In order to clarify the effects of acid rain on soil microorganisms, the impact of acid to soil microorganisms was surveyed for 14 weeks using soil microcosms from industrial site A and B, Gaejok mountain, and Daechong lake in Taejon area. The acid tolerant-microorganisms in natural soil, using the culturing method were counted to be $5.8 - 8.0 \times 10^6$ CFU/g soil. The number of microorganisms using ATP-biomass analysis for natural soil samples were also analysed and $2.2 - 2.6 \times 10^9$ cell/g soil in industrial site A and B, Gaejok mountain, and Daechong lake were determined. In soil samples, which were treated with artificial acid rain, the number of acid tolerant microorganisms were counted $2.9 - 5.8 \times 10^5$ and $2.8 - 7.5 \times 10^8$, respectively. Therefore, we conformed that the number of soil microorganisms were influenced by acid rain. Also, long term acid tolerant microorganisms were identified as *Rhodotorula* sp. and *Pseudomonas* sp.

Key words : acid rain, soil microorganism, ATP

서 론

산업발달로 야기된 대기오염으로 인해 토양내로 유입되는 산성강하물은 생물지구화학적 순환에 중요한 역할을 담당하는 미생물들의 변동을 초래하여 생태계의 다양성과 생산성을 약화시키는 심각한 문제를 초래한다^{1, 2)}.

산성비는 다량의 H^+ , SO_4^{2-} 및 NO_3^- 등을 비롯하여 구리, 아연, 카드뮴과 납 등의 중금속들이 함유되어 있는 것으로

밝혀졌으며, 이들 오염물질들은 대기이동으로 산성비나 건성강하물의 형태로 삼림^{3, 4)}과 수계^{5, 6, 7)} 및 토양생태계^{8, 9)}에 이입되어 다양한 생물군들에 음성적 영향을 미치는 것으로 보고되고 있다.

일반적으로 산성비는 토양미생물 집단의 구조 및 활성에 영향성이 있는 것으로 알려져 있으나^{10, 11)}, 연구방법과 연구지역에 따라서 그 결과가 상이하여 경우에 따라서는 미생물 집단이 감소되기도 하고²⁾, 산성에 저항성인 균들이

† Corresponding author

우점이 되어 전체적인 집단의 크기가 변하지 않기도 한다⁷⁾. 또한 미생물들의 효소활성이 산성화에 따라 크게 감소하여 유기물의 분해가 지연되기도 하고¹²⁾, 산성화에 적용된 균들로 인해 전체 효소활성이 변화하지 않기도 한다. 즉 탄산염이 많은 잘 완충된 토양에서는 그 영향이 크지 않으나 스칸디나비아와 뉴잉글랜드와 같은 빙하에 의해 형성된 지역의 경우 토양층이 매우 얇고 완충효과가 충분치 않아 그 피해가 큰 것과 같이^{8, 9)} 지역에 따라 다양한 결과를 나타낸다. 그러므로 산성강하물에 대한 영향은 조사지역 토양의 종류 및 성분을 고려해야만 그 지역에 미치는 산성비의 영향을 정확하게 파악할 수 있을 것이다.

그러나 산성강하물이 토양미생물 생태계에 미치는 영향에 대한 기존의 연구들은 대부분 유럽과 북미 지역에서 이루어졌으며^{13, 14)}, 국내에서는 삼림과 수계에 관한 연구가^{15, 16, 17)} 대부분이며, 단지 공단과 대도시 지역에서 산성강하물의 산도를 측정하고¹⁸⁾, 토양의 산성화와 이로 인한 중금속 함량 정도를 파악할 뿐 산성비가 미생물 군집에 미치는 직접적 영향은 보고되고 있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 대전권에 속한 공단 및 기타지역에서 산성비 충격이 토양미생물군집에 미치는 영향을 조사하기 위하여 평판배지를 이용한 배양방법과 ATP를 이용한 생체량 측정법^{19, 20, 21)}으로 토양미생물군집의 개체수 변화를 추적하였고, 이 과정에서 나타나는 산성내성 미생물들을 분리하여 동정하였다.

재료 및 방법

시료채취 및 microcosm 제작

대전광역시 대화공단의 두 지점(A와 B)과 도심권에서 벗어난 계족산의 한 지점(C), 그리고 대청호 주변의 한 지점(D)에서 각각 토양시료를 채취하였다. 실험실로 운반한 토양시료는 체(9 mesh)로 거른 후, 각각 PVC column(직경 100×높이 250mm)에 채워 항온기(25℃)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 사용한 column의 밑면에는 직경이 약 15mm가 되도록 배수통로를 만들었으며, 유리섬유로 채워 토양의 유실을 방지하면서 인공적으로 처리하는 산성비의 배수가 원활히 일어나도록 하였다.

산성비 처리

실험에 사용된 인공산성비는 H₂SO₄ : HNO₃를 1 : 3 molar의 비율로 제조하였고, 최종 pH는 1N NaOH를 이용하여 pH 4.0으로 조정하였다⁹⁾. 인공산성비는 대전지역의 평년 강수량을 고려하여 약 20mm/일(140 mm/주) 정도로 1~2회/주 간격으로 각각의 토양 microcosm에 투여하였다.

산성내성미생물의 분리 및 동정

토양미생물 개체수를 주기적으로 측정하는 과정에서 산성비 처리 초기부터 지속적으로 나타나는 균의 집락을 pH 4.0의 TSA(tryptic soy agar) 배지에서 분리하였다. 그리고 분리된 산성내성미생물은 형태학적, 생리, 생화학적 특성을 “Manual of Methods for General Bacteriology”와²²⁾ “Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteriology”에²³⁾ 준해 검사하였으며, 그 결과를 바탕으로 “Bergey’s manual of Systematic Bacteriology Vol. 1”과²⁴⁾ “The Yeast”²⁵⁾에 의거하여 동정하였다.

토양 Microcosm의 미생물수 조사

주기적으로 산성비가 처리된 토양 microcosm에서 일주일에 1회씩 일정량(약 2g)을 수거하여 100ml의 멸균 생리식염수에 넣고 Waring blender를 사용하여 현탁하였다(1800rpm, 60sec). 준비된 현탁액은 희석하여 10% TSA(pH4)에 접종하고, 25℃에서 48시간 배양한 후 산성 조건에서 생존할 수 있는 종속영양미생물의 수를 측정하였으며²⁶⁾, 또한 토양현탁액의 일부는 ATP 측정법에 이용함으로써 각 토양에 존재하는 미생물들의 총생체량을 조사하였다. ATP 측정은 희석액 0.1ml를 cuvette에 넣고, 0.1ml ATP releasing 시약(ATP Biomass Kit, Bio-orbit 1243-118)을 첨가하여 1분간 반응시키고 0.5ml ATP monitoring 시약을 추가로 첨가하여 luminometer (Turner TD 20 e)로 발광도를 측정하였다. 시료의 ATP량을 가능한 정확하게 추정하기 위해 동일한 cuvette에 10⁶ ATP 표준용액을 넣고 발광도를 측정하였으며, 시료의 ATP 함량은 다음 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{ATP}(\mu\text{g}) = S - B / I \times A$$

S : ATP monitoring 시약 첨가후 발광치

- B ; blank(토양현탁액을 넣지 않은 경우)
- I ; 10 μ l ATP 표준용액 첨가후 발광치
- A ; 첨가된 ATP 표준용액의 ATP량

이와같이 계산된 시료내의 ATP함량은 Chappelle¹⁹⁾이 조사한 20종류 세균의 ATP함량 중에서 가장 높은 값을 갖는 *Mycobacterium smegmatis*의 8.9×10^{-10} μ g/cell과 가장 낮은 *Aerobacter aerogenes*의 0.28×10^{-10} μ g/cell을 제외한 나머지 18종류 세균의 평균치인 1.66×10^{-10} μ g/cell로 나누어 세균수로 환산하였다.

결과 및 고찰

산성 내성균주의 분리 및 동정

각 microcosm에서 토양을 주기별로 채취하여 TSA(pH 4.0)에서 1주일간 배양한 후, 각 시료마다 우점종으로 나타나는 균주를 A지역에서 1균주, C지역에서 2균주, D지역에서 1균주를 각각 분리하였다. 이 과정에서 산성비 처리 초기에는 다양한 종류의 내산성미생물들이 관찰되었으나 지속적으로 산성비를 처리한 결과, 시간이 경과할수록 Panigrahi¹¹⁾의 보고와 같이 균종이 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서 본 실험에서는 14주간의 산성비 처리과정 동안 각 지역에서 계속적으로 나타나는 균종을 최종적으로 분리하였으며, 분리된 균주들을 동정한 결과, A지역의 균주는 *Rhodotorula* sp., D지역의 균주는 *Pseudomonas* sp.로 각각 동정되었고(Table 1), 나머지 두 균주는 미동정되었다. Yeast는 일반적으로 토양내에 존재하는 여러 방향족화합물들을 분해하는 능력이 우수한 균으로서 pH 2.0의 강산에 내성을 지니며²⁷⁾ 그 중에서도 *Rhodotorula*는 gallic acid와 같은 산의 이용능이 우수하다고 알려져 있다²⁸⁾. 그리고 Khan²⁹⁾등의 연구에 따르면 산성 및 알칼리성의 넓은 pH 범위에서 성장능이 있음을 보고하였다. 본 연구에서 분리된 *Pseudomonas* 역시 대표적인 토양미생물로서 인공산성비를 처리한 후 산성조건에서 배양하는 방법으로 분리되었으며³⁰⁾, 산성조건과 함께 토양내에 잔존하는 aluminium 같은 금속에 대한 내성능도 우수하다는 보고에 의하여³¹⁾ *Rhodotorula*와 *Pseudomonas*가 산에 대한 내성능이 있음을 알 수 있다.

산성내성미생물수 측정

TSA(pH 4.0)를 이용한 평판계수법으로 산성 내성미생

물의 생존율을 조사한 결과(Fig. 1) 산성비를 처리하지 않은 토양에서는 공단지역인 A와 B지역에서 모두 5.8×10^6 CFU/g soil 으로 조사되었고, 비공단 지역인 C와 D지역은 각각 7.6×10^6 CFU/g soil과 8.0×10^6 CFU/g soil로 공단지역보다 다소 높게 나타났다. 그리고 14주의 지속적인 인공산성비 처리 후에는 A, B, C 그리고 D지역에서의 결과가 5.8×10^4 CFU/g soil, 2.0×10^4 CFU/g soil, 1.4×10^5 CFU/g soil, 1.2×10^4 CFU/g soil로 나타났다. 이 결과는 Falappi⁸⁾의 연구에서 2개월간 산성비를 처리한 후 조사된 산성내성미생물수인 5×10^6 CFU/g soil 보다는 낮은 결과이다. 또한 산성비 처리 전후를 비교해볼 때 각각 1, 0.34, 0.18, 0.15%만의 생존율을 나타내어 산성비가 토양에 투입되었을 때 토양미생물의 생존에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 한편, 14주간의 산성비 처리시 나타나는 개체수의 감소경향은 초기 1~2주 정도에 약 70% 정도의 수가 감소하였으며, 그 이후에는 점진적 감소가 나타나 산성내성을 소유한 미생물들의 존재를 시사해 주었다. 토양에 존재하는 다양한 물질들이 산성비에 대한 완충작용을 하여 토양미생물들에 급격한 변화를 주지 않는다는 보고와³²⁾ 다르게 본 연구에서는 토양내의 많은 미생물들이 산성비 영향을 초기단계에서 받는 것으로 확인되었다.

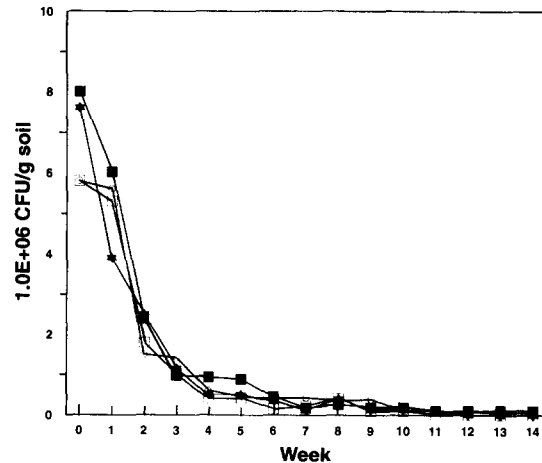


Fig. 1 Number of acid tolerant microorganisms by viable count. ○, industrial site A; □, industrial site B; ★, Gaejok Mt.(C); ■, Daechong lake area (D)

Table 1. Identical characteristics of predominant acid tolerant bacteria from microcosm industrial site and Daechong lake

Characteristics	result	Characteristics	result
galactose	+	Gram	-
xylose	+	DP300	-
xylitol	-	urease	-
erythritol	-	malonate	+
2-keto-D-gluconate	-	inositol	-
lactose	-	arabinose	+
arabinose	-	OFG	+
dulcitol	-	citrate	-
melibiose	-	mannitol	-
urea	+	adonitol	-
sucrose	+	glucose	-
trehalose	-	maltose	-
adonitol	-	xylose	-
cyclohexamide	-	p-coumaric	-
48h culture	-	arabinose	-
maltose	+	acetamide	-
melezitose	+	tryptophan	-
palatinose	+	raffinose	-
glucose	+	H ₂ S	-
cellobiose	-	lysine	-
raffinose	+	esculin	+
glycerol	-	polymixin B	-
inositol	-	sorbose	-
α-methyl-D-glucoside	-	ONPG	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	ornithin	-
sorbitol	-	plant indican	-
nitrate reduction	-	lactose	-
		sucrose	-
		rhamnose	-
		oxidase	-
Strain A-1 ; <i>Rhodotorula</i> sp.		Strain D-1 ; <i>Pseseudomonas</i> sp.	

토양미생물수 측정
 평판계수법만으로는 토양내에 존재하는 미생물의 일부만
 이 검출되는 단점이 있으므로 배양과정을 거치지 않고 토
 양내 미생물수를 직접 결정할 수 있는 ATP 생체량 측정법

으로 조사한 결과(Fig. 2), 14주의 처리기간 동안 지속적
 으로 개체수의 감소를 나타내었다.
 산성비를 처리한 초기에는 급격한 개체수의 감소경향은
 나타나지 않았으나, 최종생존율이 A, B, C 그리고 D지역에

산성비가 토양미생물에 미치는 영향

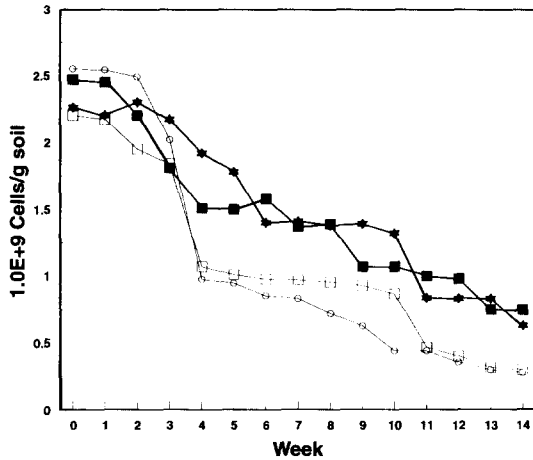


Fig. 2 Number of soil microorganisms by ATP biomass.

○-, industrial site A ; □-, industrial site B ; ★
-, Gaejok Mt.(C) ; ■-, Daechong lake area(D)

서 처리전에 비해 각각 10.9, 13.6, 27.9, 30.2%로, 산성비의 영향에 의한 균의 감소를 보여주었다. 이 결과는 산성비가 토양 및 수계 미생물 군집에서 미생물의 수와 활성에 영향을 미친다는 Francis³³⁾의 보고 및 산성침전물이 토양 균류 군집의 종류와 수적 감소를 일으킨다는 보고¹¹⁾와 같은 경향을 나타낸 것으로 산성강하물이 토양미생물의 군집에 변화를 초래한다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 공단지역인 A, B지점과 비공단 지역인 C, D지역에서의 실험결과를 비교하여 볼때 상대적으로 두드러진 지역적 차이점은 발견할 수 없었다. 이것은 오염이 진행된 것으로 판단되는 공단지역에서 내산성미생물이 높게 분포할 것이라는 생각과 달리 청정지역이라고 여겨지는 계족산과 대청호 인근에서도 유사한 경향을 보여 이미 오염이 진행된 것으로 판단되는 공단지역 뿐만 아니라 대청호 주변의 신탄진 및 계족산 지역도 공단지역은 아니지만 이미 산성비의 영향을 받아왔기 때문에 인공산성비에 의한 미생물군집의 경향성이 유사한 것으로 보여진다. 이 같은 결과는 대전의 공단, 도심, 산림 지역 등에서 최근 수년간 측정된 연평균 비의 산도가 pH5.4 - pH5.7을 기록하고, 1996년의 월별 비의 산도 역시 강우량이 많은 몇 달을 제외하고는 대부분이 산성비로 측정된 환경부가 발표한 보고서의¹⁸⁾ 결과와 일치하는 것으로, 대전 지역은 공단 및 비공단 지역이 모두 산성강하물의 영향을 받는 것으로 판단된다.

따라서 산성비가 토양미생물 군집에 미치는 영향을 정확히 규명하기 위해서는 이미 산성비의 영향을 받은 지역이 아닌 청정지역의 시료와 오염지역의 시료를 비교하여야만 산성비의 영향을 좀 더 확실히 증명할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

산성비가 토양미생물 개체수에 미치는 영향을 조사하기 위하여 대전지역 대화공단의 두 지점과 계족산 및 대청호 주변의 토양을 채취하여 인공산성비를 14주간 처리하고, 그 결과를 비교하였다. 산성비를 처리하지 않은 토양에서는 평판배양법을 이용한 산성내성미생물의 수가 공단 두 지점과 계족산, 그리고 대청호 지역에서 $5.8 - 8.0 \times 10^6$ CFU/g soil로 나타났고, ATP 생체량 측정법을 이용한 총미생물수는 $2.2 - 2.6 \times 10^9$ cell/g soil로 나타났다. 그리고 산성비 처리후의 산성내성미생물은 $2.9 - 5.8 \times 10^5$ CFU/g soil과 $2.8 - 7.5 \times 10^8$ cell/g soil로 조사되어 산성강하물이 미생물수를 감소시키는 것으로 여겨진다. 또한 분리된 산성내성 미생물들을 동정한 결과 *Rhodotorula* sp.와 *Pseudomonas* sp.로 동정되었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비(생물학 : BSRI-96-4442)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Alexander, M. IN T. C. Hutchinson and M. Havis : Effects of acid precipitation on terrestrial ecosystem, pp. 363-373, Plenum press, New York(1980).
- Francis, A. J., Olson D., and Bernastsky R. : Microbial activity in acid and acidified forest soils. BNL 51379, Brookhaven National Laboratory, Upton. N. Y(1981).
- Cape, J. N. : Effects of air pollution on chemistry of surface waxes of scots pine. *Water, Air, and Soil Pollution*. 32, 393(1986).
- Evans, L. S. : Foliar responses that may determine

- plant injury by simulated acid rain. In polluted rain. Yoribara, T. Y., M. W. Miller and P. E. Morrow. pp. 239-254. Plenum Press. New York(1980).
5. Shaw, R. W. : Acid precipitation in Atlantic Canada. *Environmental Science & Technology*, 13, 406(1979).
 6. Vermeulen, A. J. : Acid precipitation in the Netherlands. *Environmental science & Technology*, 12, 1017(1978).
 7. Wright, R. F., Dale T., Gjessing E. T., Hendrey G. R., Henriksen A., Johannessen M. and Muniz I. P. : Impact of acid precipitation on freshwater ecosystems in Norway. First International Symposium on Acid Precipitation and the Forest Ecosystem. Ohio State University(1975).
 8. Falappi, D., Farini A., Ranalli G., and Sorlini C. : Effects of simulated acid rain on some microbiological parameters of subacid soil. *Chemosphere*, 28(6), 1087(1994).
 9. McColl, J. G. and Firestone M. K. : Cumulative effects of simulated acid rain on soil chemical and microbial characteristics and conifer seedling growth. *Soil Sci. Soc. AM. S.*, 51, 794(1987).
 10. Esher R. J., Marx D. H., Ursic S. J., Baker R. L., Brown L. R. and Coleman D. C. : Simulated acid rain effects on fine roots, ectomycorrhizae, microorganisms, and invertebrates in pine forests of the southern United States. *Water, Air, Soil, Pollut.*, 61(3-4), 269(1992).
 11. Panigrahi, A., Chaudhry R., and Mukerji K. G. : Effects of acidic precipitation on soil fungal population. *ACTA Bot. Indica.*, 16(1), 42(1988).
 12. Bewley R. J. F., and Stotzky G. : Degradation of vanillin in soil-clay mixtures treated with simulated acid rain, *Soil Sci.*, 137, 415(1984).
 13. Tan B. : Extent and effect of acid precipitation in northeastern United States and eastern Canada. *Arch Environ. Contam. Toxicol.* 18, 55(1989).
 14. Hallbacken L., Tamm CO : Changes in soil acidity from 1927 to 1982-1984 in a forest area of south-west Sweden. *Scan. J. For. Res.*, 1, 219(1986).
 15. 김명란, 소웅영 : 인공산성비 처리에 대한 은행나무와 곰솔의 생장 반응, *식물학회지*, 31(1), 93(1994).
 16. 장남기, 이윤상, 이수진 : 배기가스로 만든 인공산성수에 의한 식물의 형태적 증상, *한국생태학회지*, 16(1), 17(1993).
 17. 정용승, 김태군 : 충북 청원군 강수의 산성도 연구, *한국환경과학회지*, 1(1), 29(1992).
 18. 환경부 : 전국주요도시 비의 산도 측정, pp. 106, *환경백서*(1996).
 19. Chappelle, E. W. : Use of the firefly bioluminescent reaction for rapid detection and counting of bacteria. *Biochem. Med.*, 2, 41(1968).
 20. Holm-Hansen, O. : Determination of microbial biomass in ocean profiles, *Limnology and Oceanography*, 19, 31(1969)
 21. Karl, D. M. : Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.*, 44, 739(1980).
 22. Gerhardt P., Murray R. G. E., Costilow R. N. Nester E. W., Wood W. A., Krieg N. R., and Phollips G. B. : Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology, N. Y.(1981).
 23. Mac Faddin, J. F. : Biochemical Tests for Identification of medical Bacteria. Williams and Wilkins Co., Baltimore(1980).
 24. Krieg, N. R. and Holt J. G. : Bergey's manual of Systematic bacteriology Vol. I. pp. 141-219, Williams and Wilkins Co. Baltimore(1984).
 25. Rose A. H. and Harrison J. S. : The Yeast, Vol. I, Chapter 2 Classification of Yeast, pp. 5-62, Academic Press(1987).
 26. Steffan, R. J., Goksoyr J., Bej A. K., and Atlas R. M. : Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(12), 2908(1988).
 27. Anderyeva, E. A., Blinova O. P., and Rabotnova I. L. : Production and storage of acid resistant yeast strains. *Mikrobiologiya*, 54(6), 1011(1985).
 28. Deschamps, A. M., and Leulliette L. : Tannin degradation by yeasts from decaying barks. *Int. Biodeterioration Bulletin*, 20, 237(1984).
 29. Khan, M. I., Rehman S., Fahmy M. A., and Shakoori A. R. : Identification, characterization and metal tolerance of a laboratory contaminant pink-pigmented yeast. *Pak. J. Zool.*, 23(2), 175(1991).
 30. Miller, K. W., Cole M. A., and Banwart W. L. : Microbial populations in an agronomically managed mollisol treated with simulated acid rain. *J. Environ. Qual.*, 20(4), 845(1990).
 31. Appanna, V. D., Mayer R. E. and St-Pierre M. : Aluminium tolerance of *Pseudomonas fluorescens* in a phosphate-deficient medium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 55(3), 404(1995).
 32. Michell, R. : Environmental microbiology, pp. 59-81, Wiley-Liss, Inc.(1993).
 33. Fransis, A. J. : Acid rain effects on soil and aquatic microbial processes. *Experientia*. 42(5), 455(1986).