

## 산성토양에서 내산성 종속영양세균과 나프탈렌분해세균의 분포 및 특성

문용석 · 주광일 · 김종설\*

울산대학교 자연과학대학 미생물 · 유전공학전공

울산석유화학공단과 인접한 지역(선암) 및 농촌지역(대암)의 산림토양에서 내산성 종속영양세균 및 나프탈렌분해세균의 분포와 특성을 조사하였다. 토양 pH의 평균은 선암과 대암에서 각각 3.8과 4.6으로 측정되었다. 종속영양세균과 나프탈렌분해세균을 최확수치(MPN)법으로 계수하였으며, 선암의 경우 pH 7.0과 pH 4.0에서 생장하는 종속영양세균 수의 중앙값은 각각  $5.3 \times 10^7$ 과  $3.3 \times 10^7$  MPN/dried soil g이었고, 나프탈렌분해세균 수의 중앙값은 pH 7.0과 4.0에서 각각  $5.6 \times 10^4$ 와  $4.0 \times 10^5$  MPN/dried soil g이었다. 대암에서 측정된 종속영양세균 수의 중앙값은 두 pH 모두 선암에서보다 많았으나 나프탈렌분해세균의 농도는 선암이 대암보다 높았다. MPN 시험관과 농화배양으로부터 17개의 나프탈렌분해세균을 분리하였으며, 이들은 *Sphingomonas paucimobilis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas fluorescens*, *Chryseomonas luteola* 등으로 동정되었다. 분리한 17개 균주 중 6개는, 최소배지에서서의 나프탈렌분해 활성이 pH 7.0에 비해 pH 4.0에서 더 높았으나 영양배지에 접종하였을 때의 생장정도는 pH 4.0이 pH 7.0보다 더 크지 않았다. 배지의 pH가 분리한 세균의 세포막 지방산 조성을 변화시켜 나프탈렌분해 활성에 영향을 주는 것으로 생각된다.

**Key words** □ acidic soil, acidotolerant bacteria, biodegradation, heterotroph, naphthalene-degrading bacteria

대부분 미생물의 최적생장 pH는 6~8의 중성이지만 일부 미생물은 이보다 낮거나 높은 pH에서 최적생장을 하며, 생태계에서 pH는 미생물의 활성과 군집구조에 큰 영향을 준다. 토양 pH의 변화는 산림토양에서 방선균의 분포와 세균 수에 영향을 주었으며, 제철소의 알칼리성 분진이 유입되는 산림지역에서는 토양미생물의 pH에 대한 내성의 변화가 관찰되기도 하였다(7, 17). 산성환경에서 미생물의 활성 및 군집구조에 관한 연구는 주로 산성광산배수와 연관된 지역, 토탄 습지, 산성화된 호수 등에서 행해졌으며, 독립영양의 *Thiobacillus* 속과 *Leptospirillum* 속, 종속영양의 *Acidiphilium* 속 등 호산성 세균을 이러한 환경에서 확인하고 분리할 수 있었다(10, 12, 13, 24, 27). 극한 산성토양에서 미생물 군집의 방향족화합물 분해능은 저탄지역에서  $^{14}\text{C}$ 로 표지된 기질을 사용하여 확인되었으며, 단일 세균보다는 미생물 consortium에 의한 활성임을 제안하였다(25).

국내에서 산성강하물과 이로 인한 산성비가 생태계에 미치는 영향에 대한 연구의 대부분은 토양에서의 식생이나 정체성 수역인 호수에서의 미생물 군집에 관한 것이다(2, 3). 공단과 접한 산림토양의 경우 대기로부터 다양한 오염물질과 함께 질소산화물과 황산화물 등 산성강하물이 지속적으로 유입되며, 이에 따른 미생물 생태계의 교란을 예상할 수 있는데, 공단지역에서 산성강하물이 식물잎권의 미생물 군집구조에 미치는 영향이나 중금속의 농도에 따른 원생동물의 분포 등에 관한 연구결과가 발표되고 있다(1, 4). 하지만 오랜 기간에 걸쳐 오염이 진행되며 오염물

질의 농도가 낮은 공단주변 산림토양에서, 토양산성화에 따른 오염물질의 거동, 생분해 활성, 미생물 군집구조의 변화 등에 관한 연구는 많지 않다.

환경적 특성에 따라 유기오염물질은 토양구성물질과의 흡착이나 화학결합을 통해 다양한 형태로 존재하며, 환경에서의 화학적 구조가 미생물의 분해활성에 영향을 미친다(20). 자연계에 널리 분포하는 오염물질인 다환 방향족화합물은 석유나 석탄의 구성 성분으로 화석연료의 불완전연소에 의해 주로 생성되며, 여러 종의 세균이 이들 화합물을 분해하는 것으로 알려져 있다(11, 26). 자연에서 특정 방향족화합물에 대한 미생물의 분해능도 토착미생물의 활성, 오염물질과 환경의 물리·화학적 특성 등에 의존한다. 하지만 다양한 방향족탄화수소의 생분해능 및 분해미생물에 관한 실험실에서의 연구는 대부분 중성 pH의 배지조건에서 수행되었으며, 산성토양에서 종속영양세균 및 나프탈렌분해세균의 활성이나 호산성 분해세균의 생리와 생태학적 특징에 대해서는 이해가 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 산성강하물의 영향을 크게 받는 석유화학공단 인접지역(3), 그리고 공단과 거리를 두고 있는 농촌지역의 산림토양에서 토양의 산성화 정도를 파악하고 산성토양에서 내산성 종속영양세균과 나프탈렌분해세균의 분포 및 내산성 나프탈렌분해세균의 특성을 살펴보고자 하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료채취

울산석유화학공단과 인접한 선암저수지 주변의 20개 지점, 그리고 대규모 공단과 10 km 이상 떨어진 대암호 주변의 10개 지

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 052-259-2387, Fax: 052-259-1694  
E-mail: jkim@mail.ulsan.ac.kr

점에서 각각 1월과 4월에 0~10 cm 깊이의 표층 토양을 삽으로 채취하였다. 채취지점은 지도상에서 가로와 세로 각 300 m 간격의 격자를 긋고, 산림지역의 서로 다른 격자 중 접근이 가능한 곳으로 하였다(14). 채취한 토양시료는 잡초 등 이물질을 제거한 후, 4°C 냉장용기에 넣어 실험실로 운반하였다. 미생물 수 측정을 위한 접종은 채취 후 48시간 이내에 행하였으며 시료는 4°C에서 보관하였다.

### 물리·화학적 특성 분석

토양 pH는 공기 중에서 건조한 시료를 2 mm 망 크기의 체로 체질한 후, 10 g의 시료에 0.01M CaCl<sub>2</sub> 용액 25 ml을 넣고 1시간 진탕한 후 pH meter (model 310, Orion)를 사용하여 측정하였다(14). 측정방법에 따른 토양 pH의 변화 범위를 파악하기 위해, 세 조사지점의 토양시료를 대상으로 현탁액을 증류수 혹은 0.01M CaCl<sub>2</sub> 용액으로 구분하고, 토양과 현탁액의 비율(w:v)을 1:2.5, 1:5, 1:10으로 달리하여 토양 pH를 측정하였다.

토양의 수분함량은 2 mm 망 크기의 체로 체질한 10 g의 토양 시료를 105°C에서 24시간 건조하여 감소되는 질량을 건조 후의 질량으로 나누어 구하였다(14). 토양의 유기물함량은 작열감량(loss-on-ignition, LOD)법을 이용하여 간접적으로 측정하였으며, 수분함량의 측정과 같은 방법으로 건조한 토양을 450°C에서 6시간 동안 연소시키고 상온에서 식힌 후, 감소되는 질량을 측정하였다(8).

### 미생물의 분포

중속영양세균과 나프탈렌분해세균의 수는 pH 7.0과 pH 4.0에서 성장하는 세균을 구분하여 5-tube MPN 방법으로 측정하였다(16, 21). 중속영양세균의 수를 측정하기 위해 pH 7.0 혹은 pH 4.0의 영양액체배지(peptone, 5.0 g; glucose, 1.0 g; yeast extract, 2.5 g; distilled water 1000mL)에 0.18% sodium pyrophosphate 용액으로 희석한 10<sup>-4</sup>~10<sup>-9</sup>의 토양 시료를 접종하고 상온에서 7일간 배양한 후 혼탁도를 관찰하였으며, 나프탈렌분해세균의 경우 고체상의 나프탈렌(0.1%, w/v)을 첨가한 pH 7.0 혹은 pH 4.0의 최소영양액체배지(K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.4 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.7 g; NH<sub>4</sub>Cl, 2.14 g; MgSO<sub>4</sub>, 0.195 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0.05 g; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.01 g; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.003 g; yeast extract, 0.004 g; distilled water 1000 ml)(9)에 희석한 10<sup>-2</sup>~10<sup>-6</sup>의 토양 시료를 접종하고 상온에서 28일간 배양한 후 배양액의 색깔변화를 관찰하였다. 최초 10 g의 젖은 토양을 95 mL의 희석 용액에 현탁하였으며(10<sup>0</sup>), 각 희석배수를 접종한 배지에서 생장이 일어난 시험관의 수를 세어 1 g의 건조토양 당 MPN 값(MPN/g)을 결정하였다.

### 나프탈렌분해세균의 동정 및 성장 특성

나프탈렌분해세균의 생장이 확인된 농화배양과 MPN 시험관으로부터 나프탈렌분해세균을 분리하였다. 농화배양은, pH 7.0 혹은 4.0의 나프탈렌(0.1%, w/v)을 첨가한 최소영양액체배지 50 mL에 토양시료 1 g을 접종하고 상온에서 1주일 진탕하여 배양한 후, 배양액 1 mL을 새로운 최소영양액체배지에 접종하여 다시 배

양하였고, 이 과정을 3회 반복하여 준비하였다. 순수분리를 위한 최소영양한천배지는 최소영양 액체배지(9)에 agar (1.5%, w/v)를 첨가한 것으로, pH 4.0의 고체배지는 pH 4.0의 액체배지와 agar 용액을 따로 멸균한 후 60°C에서 혼합하여 준비하였다(22). 나프탈렌분해세균의 순수분리를 위해 농화배양 혹은 MPN 시험관의 배양액 0.1 mL을 취하여 pH 7.0 혹은 4.0의 최소영양 한천배지에 도말하고 나프탈렌의 결정을 petri plate 뚜껑에 첨가한 후 플라 스틱 랩으로 봉하여 30°C에서 배양하였다. 생겨난 각 집락은 최소영양한천배지와 나프탈렌을 첨가한 최소영양 한천배지에 각각 접종하여 나프탈렌을 이용한 성장 여부를 확인하였으며, 분해능이 확인된 집락은 동일 pH의 나프탈렌을 첨가한 최소영양한천배지에 2~4주 간격으로 계대배양하여 유지하였다. 분리한 나프탈렌 분해세균의 잠정적인 동정은 API 20NE kit (bioMerieux, France)를 사용하여 제조회사의 매뉴얼에 따라 행하였다.

선암저수지 주변 토양에서 분리한 나프탈렌분해세균의 pH에 따른 성장 특성을 확인하기 위해, 나프탈렌을 첨가한 pH 4.0, 7.0, 9.0의 최소영양액체배지와 최소영양한천배지에서 7일간, plate count agar에서 48시간 배양하면서 액체배지의 색변화와 혼탁도, 그리고 고체배지에서의 집락 생성여부 및 크기를 관찰하여 비교하였다(16). 또한 benzene, biphenyl, anthracene, 3-chlorobenzoate, 혹은 4-chlorobenzoate를 0.1% (w/v) 농도로 첨가한 최소영양액체배지에서 분리한 나프탈렌분해세균을 배양하면서 첨가 기질에 따른 이들 세균의 성장 정도를 비교하였다.

### 상관분석

선암저수지와 대암호 주변의 토양시료에서 물리·화학적 환경 요인과 중속영양세균수 사이의 상호 관계를 파악하기 위해 Windows용 SPSS v.10.0을 사용하여 Spearman의 순위상관계수(r<sub>s</sub>)를 구하였다.

## 결과 및 고찰

### 토양시료의 물리·화학적 특성

선암저수지와 대암호 주변 산림에서 채취한 토양시료의 pH, 수분함량, 작열감량의 평균, 최대값, 중앙값, 최소값을 Table 1에 정리하였다. 토양 pH는 0.01M CaCl<sub>2</sub> 용액을 현탁액으로, 토양과 현탁액의 비율을 1:2.5(w:v)로 하여 측정하였다. 석유화학공단과 인접한 선암저수지 주변 20개 지점의 토양 pH는 평균 3.8로 3.5~4.6의 범위였고, 대암호 주변 10개 지점의 토양 pH는 평균 4.3으로 3.8~5.7의 범위였다(Table 1). 토양시료의 pH 측정값이 주로 현탁액의 종류(증류수 혹은 CaCl<sub>2</sub> 용액) 및 토양과 현탁액의 비율에 따라 변하기 때문에, 이에 따른 pH 측정값의 변화 범위를 결정하였다(Table 2). 작열감량이 서로 다른 세 토양시료(시료 A, B, C)를 대상으로 실험하였으며, 증류수를 현탁액으로 사용하였을 때, 그리고 토양에 대한 현탁액의 비율이 증가할수록 토양 pH는 더 높게 측정되었고, 토양과 현탁액의 비율보다는 현탁액의 종류에 따른 측정값의 변화 범위가 더 크게 나타났다(Table 2). 측정된 토양 pH의 변화 범위는 시료 A, B, C에서 각각

**Table 1.** Average, minimum, median, maximum values of physicochemical parameters at forest soils near Sunam and Daeam Reservoir

Parameters	Average±S.D. (Min./Median/Max.)	
	Soils near Sunam Reservoir (n=20)	Soils near Daeam Reservoir (n=10)
pH	3.8±0.3 (3.5/3.8/4.6)	4.3±0.6 (3.8/4.0/5.7)
Moisture content (%)	17.9±9.0 (6.5/13.9/32.9)	31.5±8.3 (23.7/28.5/47.7)
Loss-on-ignition (%)	10.2±4.2 (2.0/10.9/17.9)	6.0±5.0 (4.1/6.0/20.4)

**Table 2.** Comparison of soil pH between different determination methods

Soil to solution ratio (w/v)	Soil A <sup>a</sup>		Soil B <sup>b</sup>		Soil C <sup>c</sup>	
	CaCl <sub>2</sub>	D.W.	CaCl <sub>2</sub>	D.W.	CaCl <sub>2</sub>	D.W.
1 : 2.5	3.08	3.61	3.12	3.45	3.28	3.75
1 : 5	3.21	3.65	3.20	3.41	3.43	4.03
1 : 10	3.36	3.73	3.32	3.65	3.58	4.17
Average±S.D.	3.22±0.14	3.66±0.06	3.21±0.10	3.50±0.13	3.43±0.15	3.98±0.21

<sup>a</sup>LOI = 17.9%

<sup>b</sup>LOI = 11.2%

<sup>c</sup>LOI = 2.0%

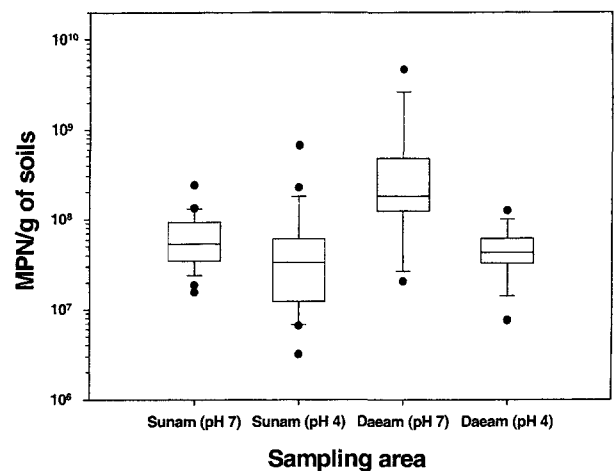
0.65, 0.53, 0.89이었으며, 작열감량이 가장 낮은 시료 B에서 가장 컸다. 따라서 측정방법에 따른 편차를 고려하더라도 Table 1의 토양 pH 결과는, 두 지역 모두 토양 pH의 중앙값이 5.0 이하인 산성토양임을 보여준다. 참고로 환경부 공정시험방법은 토양과 증류수를 1:5 (w:v)로 혼합하여 토양 pH를 측정하게 된다(6). 2001년 환경부의 토양측정방법 운영결과를 살펴보면, 전국망 1500개 지점의 토양 pH는 토지용도에 따라 5.6~7.1의 범위였고, 임야의 평균 pH는 5.6으로 조사되었다(5). 한편 공단과 인접한 선암저수지 주변 토양시료의 pH가 농촌지역인 대암호 주변에 비해 평균과 중앙값이 각각 0.5와 0.2 정도 더 낮았는데, 산성비의 산도 등 특정한 환경요인으로 이러한 차이의 원인을 확인하기는 어렵다. 대암호 주변 농촌지역에서 연간 강수의 pH 평균은 4.6으로 선암저수지 주변의 4.7보다 오히려 더 낮았으며, 산성비의 산도가 두 지역의 토양 pH 차이를 설명할 수는 없었다. 대암호 주변 토양시료의 경우 토양 pH는 수분함량과 양의 상관관계( $r_s = 0.64, p < 0.05, N = 10$ )를 보였으나, 선암저수지 주변 토양시료에서는 유의성 있는 상관관계가 없었다. 일반적으로 토양 pH는 유기물과 양이온의 종류 및 그 양에 의해 조절되지만, 토양 pH와 작열감량 사이에 유의성 있는 상관관계는 없었다.

선암저수지와 대암호 주변에서 채취한 토양시료의 수분함량은 각각 6.5~32.9%와 23.7~47.7%의 범위였고, 평균은 각각 17.9%와 31.5%이었다(Table 1). 수분함량의 평균과 중앙값의 경우 대암호 주변 토양시료가 선암저수지 주변보다 높았는데, 이는 서로 다른 채취일자(4월 5일과 1월 4일)에 의한 계절적인 영향으로 판단되며, 동일지역에서 채취지점에 따른 수분함량의 차이는 지형적인 영향, 토성, 유기물함량 등에 기인한 것으로 생각된다. 한편 토양시료의 수분함량은 작열감량과 양의 상관관계를 나타내었는데, 상관계수는 선암저수지와 대암호 주변에서 각각 0.62( $p < 0.01, N = 20$ )와 0.67( $p < 0.05, N = 10$ )이었다. 토양시료의 작열감량은 선암저수지 주변의 경우 평균 10.2%로 2.0~17.9%의 범위였고, 대암호 주변에서는 평균이 6.0%로 4.1~20.4%의 범위였다

(Table 1). 국내 달성광산 및 인근 지역에서 측정한 작열감량의 지역별 평균은 3.2~7.9%의 범위로(19), 대암저수지 주변과 달리 선암저수지 주변 토양시료의 평균 작열감량은 이들 지역보다 높게 나타났다. 한편 작열감량을 유기탄소 함량으로 환산하면(8), 선암저수지 주변 토양시료의 평균 유기탄소 함량은 4.3%, 대암호 주변의 경우에는 2.3%로 계산되었다.

**미생물의 분포**

선암저수지와 대암호 주변 산림에서 채취한 토양시료의 중속 영양세균 수를 pH 7.0과 4.0의 배지를 사용하여 측정하였으며, 결과는 사분위값(quartile)을 보여주는 box plot으로 나타내었다(Fig. 1). 선암저수지 주변 토양시료의 경우 pH 7.0에서 측정된 중속영양세균 수는, 중앙값이  $5.3 \times 10^7$  MPN/g로 일사분위와 삼



**Fig. 1.** Box plots showing the quartiles of the numbers of heterotrophs in soils near Sunam and Daeam Reservoirs. Error bars indicate 10th and 90th percentiles, and the circles(●) indicate the outliers.

사분위 값은 각각  $3.5 \times 10^7$  MPN/g와  $8.3 \times 10^7$  MPN/g이었고, pH 4.0에서 측정된 종속영양세균 수는, 중앙값이  $3.3 \times 10^7$  MPN/g로 일사분위와 삼사분위 값은 각각  $1.3 \times 10^7$  MPN/g와  $5.9 \times 10^7$  MPN/g이었다(Fig. 1). pH 7.0에서 성장하는 종속영양세균 수의 사분위값에 비해 1.4~2.7배 더 컸으며, 20개 지점 중 17개 지점의 토양시료에서 pH 7.0에서 성장하는 종속영양세균 수가 pH 4.0에서 성장하는 종속영양세균 수와 같거나 더 많았다.

대암호 주변 산림의 토양에서 측정된 pH 7.0에서 성장하는 종속영양세균 수는 중앙값  $1.8 \times 10^8$  MPN/g, 일사분위와 삼사분위 값은 각각  $1.2 \times 10^8$  MPN/g와  $4.6 \times 10^8$  MPN/g이었고, pH 4.0에서 성장하는 종속영양세균 수는 중앙값  $4.3 \times 10^7$  MPN/g, 일사분위와 삼사분위 값은 각각  $3.4 \times 10^7$  MPN/g와  $5.8 \times 10^7$  MPN/g이었다(Fig. 1). pH 7.0에서 측정된 종속영양세균 수의 사분위값이 pH 4.0에서 측정된 것에 비해 3.5~7.9배 더 컸으며, 10개 지점 중 9개 지점의 토양시료에서 pH 7.0에서 성장하는 종속영양세균 수가 pH 4.0에서 성장하는 세균의 수와 같거나 더 많았다.

절대호중성세균, 내산성 호중성세균, 내중성 호산성세균은 pH 7.0 배지에서, 절대호산성세균, 내중성 호산성세균, 내산성 호중성세균은 pH 4.0 배지에서 성장한다고 가정할 경우(18), 두 pH 조건에서 측정된 종속영양세균 수의 차이가 크지 않으므로 선암저수지 주변과 대암호 주변의 산성토양에 서식하는 대부분의 종속영양세균은 pH 7.0과 pH 4.0의 중성과 산성조건에서 성장할 수 있음을 추정할 수 있다. 또한 두 pH 조건에서 측정된 종속영양세균 수의 차이가 주로 절대 호중성세균과 절대 호산성세균 수의 차이를 반영한다고 가정하면, 선암저수지 주변과 대암호 주변의 산성토양에는 종속영양세균 중 절대 호중성세균이 절대 호산성세균보다 더 많은 수로 존재한다고 볼 수 있다. 절대 호중성세균이 pH 5.0이하의 산성토양에서 어떻게 생존하는 지는 불분명하지만, 일부는 생리적 활성이 없는 상태로 존재하거나 pH가 높은 토양의 미세서식처에서 성장할 수 있을 것이다.

선암저수지와 대암호 주변 토양시료에서 측정된 종속영양세균 수의 중앙값을 비교하면, 농촌지역인 대암호 주변이 공단과 인접한 선암저수지 주변에 비해 pH 7.0에서 성장하는 종속영양세균 수는 3.4배, pH 4.0에서 성장하는 종속영양세균 수의 경우에는 1.3배 더 크게 나타났다. 이러한 종속영양세균 수의 차이는 토양과 관련한 환경적 요인, 그리고 서로 다른 채취일자에 따른 계절적 요인에 의한 것으로 생각된다.

토양에서 종속영양세균의 분포에 영향을 미치는 일차적인 환경요인으로 pH를 비롯하여 수분, 유기탄소, 무기영양물질, 통기성, 온도 등을 언급할 수 있다. 대암호 주변 토양시료의 경우 pH 7.0에서 측정된 종속영양세균 수와 수분함량 및 작열감량과의 상관관계는 각각 0.78( $p < 0.01$ ,  $N=10$ )과 0.84( $p < 0.01$ ,  $N=10$ )로 양의 상관관계를 보였으며, pH 4.0에서 측정된 종속영양세균 수는 이러한 상관관계가 없었다. 선암저수지에서 측정된 종속영양세균 수는 수분함량 및 작열감량과 유의성 있는 상관관계를 보이지 않았으며, 두 지역 모두 pH 7.0과 pH 4.0에서 측정된 종속영양세균 수 사이에서 유의성 있는 상관관계를 찾을 수 없었다.

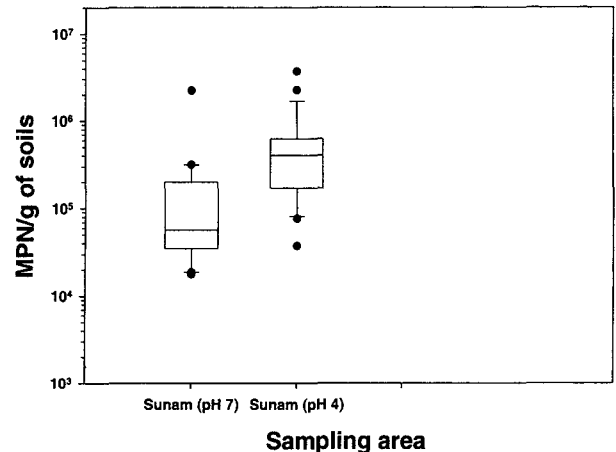


Fig. 2. Box plots showing the quartiles of the numbers of naphthalene-degraders in soils near Sunam Reservoirs. Error bars indicate 10th and 90th percentiles, and the circles (●) indicate the outliers.

선암저수지와 대암호 주변 산림에서 채취한 토양시료의 나프탈렌분해세균 수를 나프탈렌을 첨가한 pH 7.0과 4.0의 최소영양액배지를 사용하여 측정하였다(Fig. 2). 선암저수지 주변 토양시료의 경우 pH 7.0에서 성장한 나프탈렌분해세균 수는, 중앙값이  $5.6 \times 10^4$  MPN/g로 일사분위와 삼사분위 값은 각각  $3.6 \times 10^4$  MPN/g와  $1.8 \times 10^5$  MPN/g이었고, pH 4.0에서 성장한 나프탈렌분해세균 수는, 중앙값이  $4.0 \times 10^5$  MPN/g로 일사분위와 삼사분위 값은 각각  $1.8 \times 10^5$  MPN/g와  $5.9 \times 10^5$  MPN/g이었다(Fig. 2). 종속영양세균의 경우와는 달리 pH 4.0에서 성장하는 나프탈렌분해세균 수의 사분위값이 pH 7.0에서 성장하는 나프탈렌분해세균 수의 사분위값에 비해 3.4~7.1배 더 컸으며, 20개 지점 중 17개 지점의 토양시료에서 pH 4.0에서 성장하는 나프탈렌분해세균 수가 pH 7.0에서 성장하는 나프탈렌분해세균 수와 같거나 더 많았다. 토양에 존재하는 유기물의 형태는 pH에 따라 변하며, 이는 종속영양세균에 의한 생물이용도(bioavailability)에도 영향을 준다(20). 따라서 나프탈렌분해세균이 종속영양세균에 비해 산성 pH에 대한 내성이 더 크게 나타난 것은, 나프탈렌이 작용기가 없는 비이온성 방향족화합물이어서 pH에 따른 생물이용도의 변화가 적다는 것과 관련이 있으리라 여겨진다. 한편, *Streptococcus mutans*의 세포막 지방산 조성 변화가 산성 스트레스에 대한 저항성에 중요하게 작용한다는 보고가 있으며(15), 산성조건에서 세균 세포막 지방산 조성의 변화에 의한 나프탈렌의 투과성 증가의 가능성도 고려할 수 있다. 또한 이 지역의 토양에서는 호산성 나프탈렌분해세균의 수가 호중성보다 더 많이 측정되어, 호산성 나프탈렌분해세균의 분리 가능성도 높으리라 생각되는데, 호중성 세균에 존재하는 분해 혹은 항생제 내성의 플라스미드가 호산성 세균에 전달되어 발현되는 것은 이미 확인되었다(23).

대암호 주변 10개 지점 중 7개 지점의 토양시료에서는 최소토양희석( $10^{-2}$ )을 접종한 pH 7.0의 배지에서도 나프탈렌분해세균의 생장이 관찰되지 않았으며, 나머지 3개 지점의 측정값은  $5.0 \times$

10<sup>2</sup>-6.8 × 10<sup>3</sup> MPN/g의 범위였다. pH 4.0에서 성장하는 나프탈렌분해세균은 10개 지점 중 9개 지점에서 최소토양희석(10<sup>-2</sup>)의 접종에서도 MPN 시험관이 모두 음성이었고, 나머지 1개 지점은 5.8 × 10<sup>3</sup> MPN/g로 측정되었다. pH 7.0과 4.0의 배지에서 측정된 나프탈렌분해세균의 수는 종속영양세균의 경우와는 달리 대암호 주변에 비해 공단과 인접한 선암저수지 주변 토양에서 더 많았는데, 장기간에 걸쳐 공단지역 산업체의 배출가스에 포함되어 대기로부터 유입되는 오염물질의 영향을 추측할 수 있다. Creosote로 오염된 퇴적토시료에서 측정된 나프탈렌분해세균 수는 오염되지 않은 지역에 비해 g당 10<sup>3</sup>배 이상 높았으며(16), 토양에서 오염원으로부터의 거리에 따른 방향족화합물의 농도와 분해미생물의 분포에 관한 추가 조사가 필요하리라 생각된다.

**나프탈렌분해세균의 동정 및 성장 특성**

나프탈렌을 첨가한 pH 7.0 혹은 pH 4.0의 최소영양한천배지에 생겨난 집락을 계대배양하여 나프탈렌분해세균을 순수분리하였으며, API 20NE kit를 이용하여 생리적, 생화학적 특징에 따라 잠정적으로 동정하였다(Table 3). 선암저수지 주변의 토양시료에서 13개의 나프탈렌분해세균을 분리하여 11개를 동정하였으며, 이중 5개 균주는 pH 4.0의 배양으로부터 유래하였다(Table 3). 대암호 주변 토양시료에서는 pH 7.0의 배지로부터 4개의 나프탈렌분해세균을 분리, 동정할 수 있었다(Table 3). 나프탈렌분해세균은 α-proteobacteria의 *Sphingomonas paucimobilis*와 *Brevundimonas vesicularis*, β-proteobacteria의 *Burkholderia cepacia*와 *Ralstonia pickettii*, γ-proteobacteria의 *Pseudomonas fluorescens*와 *Chryseomonas luteola* 등으로 동정되었으며, *B. cepacia*가 5개로 가장 많았고 *R. pickettii*는 3개, *S. paucimobilis*, *P. fluorescens*, *C. luteola*는 각 2개, 그리고 *B. vesicularis*가 1개 등이었다. *B. cepacia*, *S. paucimobilis*, *P. fluorescens* 등은 나프탈렌을 포함한 여러 다환방

**Table 4.** Growth of naphthalene-degrading isolates from Sunam Reservoir on media with different pH

Isolates	Degree of growth <sup>a</sup>			
	Minimal medium with naphthalene		Plate count agar	
	pH 4	pH 7	pH 4	pH 7
UMN-2	+	0	+	+++
UMN-4	0	+++	++	+++
UMN-5	+	+++	+	+++
UMN-6	0	+	+	+++
UMN-7	0	++	+	+++
UMN-12	0	+	0	++
UMN-13	+	0	0	+++
UMN-15	+	0	++	+++
UMN-3	+	0	++	+++
UMN-11	++	0	++	++
UMN-14	+	0	++	+++
UMN-16	+	+	+++	+++
UMN-17	+	0	0	+++

<sup>a</sup>:0, no apparent growth; +, ++, +++, relative growth to 0.

향족화합물을 분해하는 세균으로 잘 알려져 있다(11, 26).

선암저수지 토양시료로부터 pH 4.0의 배지에서 분리한 균주는 *B. cepacia* 3개, *S. paucimobilis*와 *P. fluorescens* 각 1개였으며 (Table 3), 이들 5개 균주와 pH 7.0의 배지에서 분리한 UMN-2의 경우, 성장 및 분해 활성은 나프탈렌을 첨가한 pH 4.0의 최소영양배지에서 pH 7.0의 배지에 비해 더 크게 나타났다(Table 4). 반면 이들 균주를 plate count agar에 접종하여 배양하였을 때, UMN-11과 UMN-16은 pH 4.0과 7.0의 배지에서 비슷한 성장을 보였으나 나머지 균주는 pH 4.0에 비해 pH 7.0의 배지에서 더 큰 성장을 나타내어 최적성장 pH가 사용배지에 따라 다르게 측정되었다(Table 4). 산성조건에서 세균 세포막을 구성하는 지방산의 조성 변화가 산성환경에서 세균의 내성 및 생존능력에 영향을 미친다는 것이 알려져 있으며(15), 산성 pH에서 세포막의 지방산 조성 변화에 따른 나프탈렌 투과성의 증가가 이러한 관찰의 한 가지 원인일 것으로 추측할 수 있다. 서로 다른 배지에서 pH에 따른 나프탈렌분해세균의 분해활성과 세포막 지방산 조성 변화의 연관성에 대한 자세한 분석이 요구된다. 한편 분리한 나프탈렌분해세균의 benzene, biphenyl, anthracene, 3-chlorobenzoate, 4-chlorobenzoate 등의 방향족화합물을 이용한 성장 정도는 나프탈렌과 비교하여 매우 낮았다.

본 연구에서는 배양에 기초한 MPN 방법으로 산성토양에서 내산성의 종속영양세균과 나프탈렌분해세균의 농도를 조사하였으며, 고체배지에서 나프탈렌분해세균을 순수분리하고 동정하였다. 현재의 방법으로 배양할 수 있는 세균이 전체 세균 군집의 일부라는 사실을 고려할 때, 16S rDNA와 나프탈렌분해유전자, 그리고 fatty acid methyl ester profile을 활용한 세균군집의 분석이 필요하리라 판단된다.

**Table 3.** Tentative identification of naphthalene-degrading isolates

Source	pH(medium)	Isolates	Identification	
Sunam Reservoir	pH 7	UMN-2	unidentified	
		UMN-4	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	
		UMN-5	unidentified	
		UMN-6	<i>Chryseomonas luteola</i>	
		UMN-7	<i>Chryseomonas luteola</i>	
		UMN-12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
		UMN-13	<i>Burkholderia cepacia</i>	
	pH 4	UMN-15	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
		UMN-3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
		UMN-11	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
		UMN-14	<i>Burkholderia cepacia</i>	
		UMN-16	<i>Burkholderia cepacia</i>	
		UMN-17	<i>Burkholderia cepacia</i>	
		Daeam Reservoir	pH 7	UMN-30
	UMN-32			<i>Burkholderia cepacia</i>
	UMN-33			<i>Ralstonia pickettii</i>
	UMN-34			<i>Ralstonia pickettii</i>

### 감사의 말

본 연구는 1999년도 한국과학재단의 국산연구기기 활용 지원 사업의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 신만균, 최기룡. 1996. 울산공단 주변의 토양오염에 따른 원생동물의 분포. 한국환경과학회지 5, 187-194.
- 안영범, 조홍범, 최영길. 1998. 수계 세균 군집에 미치는 산성화 영향 모사 분석. 미생물학회지 34, 175-182.
- 이승우, 이수욱. 1995. 울산 공단주변 산림토양의 산성화가 산림생태계의 양묘와 증금속 분포에 미치는 영향. 한국임학회지 84, 286-298.
- 정필문, 신광수, 임종순, 이인수, 박성주. 2001. 16S rDNA 염기서열에 의한 청정지역 및 공단지역 내 식물잎권의 내산성세균 군집의 다양성. 미생물학회지 37, 265-272.
- 환경부. 2002. 2001 토양측정망 운영결과.
- 환경부. 1999. 토양오염공정시험방법, 환경부고시 1999-116.
- Bååth, E., Å. Frostegård, and H. Fritze. 1992. Soil bacterial biomass, activity, phospholipid fatty acid pattern, and pH tolerance in an area polluted with alkaline dust deposition. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4026-4031.
- Ball, D.F. 1964. Loss-on-ignition as an estimate of organic matter and organic carbon in non-calcareous soil. *J. Soil Sci.* 15, 84-92.
- Bedard, D.L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.J. Brennan, M.L. Haberl, and C. Johnson. 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 761-768.
- Bond, P.L., G.K. Druschel, and J.F. Banfield. 2000. Comparison of acid mine drainage microbial communities in physically and geochemically distinct ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4962-4971.
- Cerniglia, C.E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3, 351-368.
- Dedysh, S.N., N.S. Panikov, W. Liesack, R. Großkopf, J. Zhou, and J.M. Tiedje. 1998. Isolation of acidophilic methane-oxidizing bacteria from norther peat wetlands. *Science* 282, 281-284.
- Edwards, K.J., T.M. Gihring, and J.F. Banfield. 1999. Seasonal variations in microbial populations and environmental conditions in an extreme acid mine drainage environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3627-3632.
- Forster, J.C. 1995. Soil sampling, handling, storage and analysis, p. 49-122. In K. Alef, and P. Nannipieri (ed.), *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, London, UK.
- Fozo, E.M., and R.G. Quivey, Jr. 2004. Shifts in the membrane fatty acid profile of *Streptococcus mutans* enhance survival in acidic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 929-936.
- Geiselbrecht, A.D., R.P. Herwig, J.W. Deming, and J.T. Staley. 1996. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3344-3349.
- Hagedorn, C. 1976. Influences of soil acidity on *Streptomyces* populations inhabiting forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 368-375.
- Hallberg, K.B., and D.B. Johnson. 2001. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv. Appl. Microbiol.* 49, 37-84.
- Jung, M.C., I. Thornton, and H.-T. Chon. 2002. Arsenic, Sb, and Bi contamination of soils, plants, waters, and sediments in the vicinity of the Dalsung Cu-W mine in Korea. *Sci. Tot. Environ.* 295, 81-89.
- Knaebel, D.B., T.W. Federle, D.C. McAvoy, and J.R. Vestal. 1996. Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: effects of preadsorption to various soil constituents. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1865-1875.
- Koch A.L. 1994. Growth measurement, p. 248-276. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (ed.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Krieg, N.R. and P. Gerhardt 1994. Solid, liquid/soild, and semi-solid culture, p. 216-223. In P. Gerhardt, R.G.E. Murray, W.A. Wood, and N.R. Krieg (ed.), *Methods for general and molecular bacteriology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Quentmeier, A., and C.G. Friedrich. 1994. Transfer and expression of degradative and antibiotic resistance plasmids in acidophilic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 973-978.
- Schrenk, M.O., K.J. Edwards, R.M. Goodman, R.J. Hamers, and J.F. Banfield. 1998. Distribution of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*: implications for generation of acid mine drainage. *Science* 279, 1519-1522.
- Stapleton, R.D., D.C. Savage, G.S. Saylor, and G. Stacey. 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4180-4184.
- Sutherland, J.B., F. Rafii, A.A. Kahn, and C.E. Cerniglia. 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, p. 269-306. In L.Y. Young and C. E. Cerniglia (ed.), *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss, NY.
- Tranvik, L.J., W. Granéli, and G. Gahnström. 1994. Microbial activity in acidified and limed humic lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 2529-2536.

(Received September 21, 2004/Accepted December 9, 2004)

---

**ABSTRACT : Distribution and Characteristics of Acidotolerant Heterotrophic and Naphthalene-Degrading Bacteria in Acidic Soils****Yong-Suk Moon, Kwang-II Chu, and Jongseol Kim\*** (Department of Microbiology and Genetic Engineering, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea)

The distribution and characteristics of acidotolerant heterotrophic and naphthalene-degrading bacteria were investigated in two forest areas, one near Ulsan petrochemical industrial complex (Sunam) and the other in countryside (Daeam). Average values of soil pH at Sunam and Daeam were 3.8 and 4.6, respectively. When heterotrophic and naphthalene-degrading bacteria were enumerated by most probable number (MPN) procedures at Sunam, the median values of heterotrophs growing at pH 7.0 and pH 4.0 were  $5.3 \times 10^7$  and  $3.3 \times 10^7$  MPN/g, whereas those of naphthalene-degraders were  $5.6 \times 10^4$  and  $4.0 \times 10^5$  MPN/g, respectively. While the medians of heterotrophs at Daeam were larger than those at Sunam, the concentrations of naphthalene-degraders were higher at Sunam compared to those at Daeam. From the MPN tubes and enrichment cultures, we obtained 17 isolates of naphthalene-degraders which were identified as *Sphingomonas paucimobilis*, *Brevundimonas vesicularis*, *Burkholderia cepacia*, *Ralstonia pickettii*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Chryseomonas luteola*. Among them, 6 isolates showed higher naphthalene-degrading activity on minimal media of pH 4 compared to pH 7, whereas the extent of growth was not greater at pH 4 than at pH 7 when they were inoculated on nutrient-rich media. It is plausible that the pH may affect naphthalene-degrading activity of the isolates by changing fatty acid composition of bacterial membrane.