

수계 종속영양세균 군집의 종조성에 미치는 산성화의 영향

안영범 · 조홍범¹ · 최영길*

한양대학교 생물학과, 서울대학교 분자생물학 연구센터, ¹서경대학교 생물공학과

인위적으로 pH 구배가 조성된 회분배양 시스템(batch culture system) 내에서 종속영양 세균 군집의 종조성 변화에 미치는 산성화의 영향을 수리학적으로 분석하였다. 총세균의 개체수는 산성화에 영향을 받지 않았으며, 종속영양 세균 군집의 크기는 pH가 낮아질수록 감소하였다. 전 pH 구간에서 분리된 종속영양 세균들은 모두 12속 22종으로 나타났으며, 이중 그람음성 세균은 64%, 그람양성 세균은 36%의 비율로 분포하였다. pH가 낮아짐에 따라 그람양성 세균의 분포 비율은 감소하는 반면, 그람음성 세균의 분포 비율은 증가하는 양상을 보였다. 각 pH 구간별 속의 분포 비율은 pH 7에서는 12개 속이 출현하였으나, pH 3에서는 5개 속만 출현하여 pH가 낮아짐에 따라 속의 다양성이 감소하는 양상을 나타내었다. 종 다양성 지수는 1.13-2.37의 범주였으며, pH가 낮아질수록 종 다양성 지수가 낮게 나타났다. 크기가 다른 군집의 다양성 평가를 위해 rarefaction 방법으로 pH에 따른 종 출현의 기대값을 분석한 결과 역시 pH가 낮아질수록 기대값(Expected number)이 낮은 것으로 나타남으로써 종 다양성 지수에 대한 유의성을 검증하였다.

KEY WORDS □ Batch-culture system, acidification, cluster analysis, diversity index

동북 아시아 지역의 대기오염 물질 배출량은 이미 서유럽 및 북미 대륙과 비슷한 수준으로, 2010년 이후에는 세계 최대의 대기 오염물질의 배출 지역이 될 것으로 전망하고 있다(10). 국내에서는 이미 국내의 오염 발생원 뿐 아니라 중국을 비롯한 주변 국가로 부터의 장거리 이동 오염물질에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있으며(1-3), 국내 생태계에 미치는 산성비의 영향에 대한 연구가 진행중에 있다(4,5). 그러나 삼림, 농업 등 육상 생태계에 대한 연구에 비해 수계 생태계에 대한 연구는 상대적으로 매우 미진하다(7). 이는 국내 호소수 대부분이 부영양화 되었거나 진행중에 있어서 계절적으로 반복되는 수화현상 등의 영향으로 중성에서 염기성으로 변동이 매우 심할 뿐 아니라(19), 수계 산성화에 의한 가시적인 피해 사례가 아직 보고되고 있지 않기 때문이다. 하지만 수계 산성화에 의한 피해는 신속하게 나타나거나 급변적으로 발생하지 않고 누적된 오염효과가 서서히 마비상태로 나타나 대형 피해를 입히는 것이 특징이므로, 산성화에 따른 미생물 생태계의 영향에 대한 예측 연구는 중요하다(16).

일반적으로 생태계의 다양한 환경요인은 군집내 개체군들의 생태학적 균형 및 안정성 유지에 많은 영향을 미치게 되며, 그 결과가 특정 생태계의 미생물 군집의 다양성으로 표현된다(9). 특히 수계 종속 영양세균의 군집 구조의 특성은 영양 물질 순환의 지표로 사용될 만큼 중요한 변수이며(28), 따라서 산성비에 의한 피해가 심각한 북미와 유럽 등에서는 산성화와 연관된 이들 군집의 동태에 대한 많은 연구가 있어 왔다(24,33). 이러한 연구들은 전형적으로 다음과 같은 3가지의 방법으로 접근하여 왔다. 첫째, 이미 산성

화된 지역과 산성화되지 않은 생태계를 비교하는 연구(26, 27,32), 둘째, 산성화가 진행 중인 지역을 대상으로 오랜기간동안 생태계의 변화 양상을 추적하는 연구(13,30), 셋째, microcosm을 이용하여 pH 변화에 따른 특정 유기물질의 분해능에 대한 연구(22,23)등 이다.

그러나 국내의 경우 광산 산성 침출수에 의해 직접적으로 영향을 받는 일부 수계를 제외하고는 대기 오염의 산성침적에 의한 산성화 호소수는 보고된 바 없고, 따라서 향후 산성화가 진행되는 과정에서 발생하는 미생물 군집의 종 조성 변화에 대한 연구는 호소수 현장 환경이 재현된 microcosm 내에서 인위적 산성화 구배를 통한 모사(simulation) 연구가 불가피하다. 본 연구에서는 현장 조사 결과를 기초로 하여(6), 인위적으로 pH 구배가 조성된 회분 배양 시스템에 경기도 왕송 저수지 시료를 적용하였으며, pH 변화에 따른 물리 화학적 환경요인들의 변화와 종속 영양세균 군집의 동태를 조사하였고, 분리 균주에 대한 형태학적, 생화학적 특성을 토대로 유사도에 따른 군집 분석(cluster analysis)을 실시하여 종조성 변화에 미치는 산성화의 영향을 분석하였다. 또한 각각의 pH 구간에서 종 다양성 지수를 비교하였으며, rarefaction method를 통해 상이한 표본수에 대한 통계처리의 유의성을 확인하였다.

재료 및 방법

시료 채취 및 회분 배양 시스템

시료는 경기도 왕송저수지(북위 37° 18', 동경 126° 57')에서 1996년 6월에 채수하였다. 회분배양 시스템(batch culture system)은 멸균한 2 l 유리 용기에 1.5 l의 시료를 넣은 후 2N H₂SO₄로 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 및 7.0으로 각각 보정

*To whom correspondence should be addressed

하여 구성하였다. 25°C에서 10일 동안 배양하면서 48시간 간격으로 시료를 채취하여 분석 하였다.

물리·화학적 환경요인의 분석

각각의 pH 구간별로 채취한 시료의 물리 화학적 환경요인은 다음과 같이 분석하였다. pH, DO, 전기 전도도(conductivity)와 탁도(turbidity)는 수질종합분석 측정기(Horiba U-10, Horiba, Japan)로 현장에서 측정하였다. 채수한 시료는 membrane filter(0.45 µm)로 여과하였으며, 암모니아염 질소(ammonia-N), 아질산염 질소(nitrite-N), 인산염 인(phosphate-P)의 정량은 Standard method (8)에 따랐다. 수용성 당류는 Anthrone의 방법(7)으로, 유기물 총량은 Walkley의 방법(7)으로 각각 가수분해 시킨 후 625 nm의 파장에서 정량하였으며, 수용성 당류는 포도당(glucose) 기준치로 환산하였다.

미생물 군집의 분석

총 세균(total viable bacteria)의 계수는 0.2 µm membrane filter에 여과한 0.01% acridine orange 용액 9 ml에 시료 1 ml을 첨가한 후 3분간 염색하고, sudan black B로 염색된 membrane filter(0.2 µm)에 여과시킨 다음 형광현미경(epi-fluorescence microscope, Axioplan, Zeiss, Germany)을 이용하여 membrane filter 상에 형광염료로 염색된 총 세균을 20군데 이상을 계수하여 평균치로 계산하였다(15).

종속영양세균은 희석한 시료 0.1 ml을 nutrient agar(NA) 배지에 도말하여 25°C 항온기에서 3일간 배양한 후 나타난 균체수를 계수하였다.

종속영양 세균의 분리 및 동정

종속영양 세균의 분리는 각 pH 구간 별로 배양된 시료를 각각의 pH로 보정된 10% NA 배지에 접종하고 2-3일 간 배양한 후, 40-50개의 콜로니가 생성된 평판배지로 부터, 콜로니를 모두 순수 분리하는 방식으로 실시하였다. 분리된 균주의 동정은 먼저 그람 염색을 시행한 후 그람음성 세균은 GNI identification card, 그람양성 세균은 GPI identification card를 사용하여 생화학적 특성 시험을 하였으며, 그 결과는 Vitek^R system(BioMerieux, France)의 자료(data base)를 이용하여 동정하였다.

집괴 분석

집괴 분석(cluster analysis)을 위한 변수로서 사용되는 균주의 형질들은 균주 동정시에 분석된 형질 이외에도 Biochemical tests for identification of medical bacteria(21) 및 Bergey's manual of determinative bacteriology(17)를 참고로 형질 인자를 추가로 설정하였다. 총 43가지의 형태학적, 생화학적 특성에 관한 결과들을 토대로 각각의 변수를 양성반응과 배양시는 1로, 음성반응과 배양이 되지 않을 경우는 2로 변환한 2진수 형태(binary form)로 처리하였다.

유사도 지수는 전체 인자 중 같은 결과를 보인 인자의 비율을 백분율로 계산하는 Simple matching coefficient(S_{SM}) 산출식을 이용하여 유사도행렬(similarity index matrix)을 구하였고, 비가중평균결합법(UPGMA)을 사용하여 균주간 유사도의 집괴분석으로 유사도의 수지도(dendrogram)를 작성

하였다(29).

종 다양성 분석

pH 구간별로 분포하는 미생물 군집간의 종 다양성을 비교하기 위하여 종 다양성지수를 구하였다. 풍부도(richness index)는 Menhinick index(R2)로, 다양성 지수(diversity index)는 Shannon index(H'), 균등도(evenness index)는 Pielou index(E1)로 구하였으며(20), 군집간의 개체수를 표준화하는 통계학적인 방법으로 rarefraction method(14)를 적용하여 종의 기대값(E(Sn))을 계산하였다(33).

결과 및 고찰

물리·화학적 특성 및 세균 군집의 변화

저자들은 지난 3년간(1994-1996) 경기도 공단지역의 4개 저수지를 대상으로 지역별, 계절별로 미생물 군집의 동태와 이에 미치는 환경요인들의 영향을 중회귀 분석의 방법으로 분석해왔으며, 그 결과 경기도 왕송 저수지의 경우, 총세균은 40%, 종속영양세균은 68% 수준에서 pH에 의한 군집 구조의 변화가 설명되었다. 그러나 이 지역의 수계 pH의 범주는 pH 6.02-10.24까지로 계절적 변동은 있었으나 산성화 경향은 나타나지 않았다. 따라서 본 실험에서는 pH 3.0에서 7.0까지 농도 구배를 형성한 회분 배양 시스템에 왕송 저수지 시료를 적용하고, 산성화에 따른 제 환경요인의 변화와 종속영양세균 군집의 동태를 분석하였다. 왕송저수지에서 채취한 시료 원수와 pH 구배가 형성된 회분배양시스템에서의 시료들에 대한 환경요인들의 변화는 Table 1과 같다. 산성화가 진행됨에 따라 총 유기물량, 수용성 당류 및 탁도가 감소하였으며, 전기 전도도, 암모니아는 증가하였다. 총세균은 $0.71-2.42 \times 10^6$ cells/ml 범주로 변화하였고, 종속영양세균은 $1.33-62.67 \times 10^4$ cfu/ml의 범주에서 변화하였다. 총세균은 산성화에 영향을 받지 않았으며 종속영양세균군집의 크기는 pH가 내려갈수록 감소하였다.

pH에 따른 종속영양세균 군집의 종조성 변화

산성화에 따라 물리화학적 환경요인과 개체군 군집이 변화하였는데, 이는 종조성의 변화를 수반하게 된다. 따라서

Table 1. Physicochemical characteristics and bacterial population of Wangsong reservoir and pH gradient microcosm

	7	6	5	4	3
pH	7.49 ^a	5.88	4.88	4.19	3.09
Conductivity (mS/Cm)	0.48	0.52	0.57	0.57	1.02
Turbidity (NTU)	124	130	73	55	34
TOM (mg/L) ^b	517	612	557	467	476
SS (mg/L) ^c	0.74	0.79	0.91	0.87	0.77
PO ₄ (µg/L)	0.42	0.52	0.37	0.51	0.30
NO ₂ (µg/L)	0.037	0.031	0.019	0.021	0.015
NO ₃ (µg/L)	318	257	134	126	108
NH ₄ (µg/L)	0.01	0.13	2.03	2.32	2.27
Total bacteria (10 ⁶ cells/ml)	2.42	1.24	1.05	0.77	0.71
Heterotrophs (10 ⁴ cfu/ml)	6.27	2.23	0.89	0.71	0.13

^aMean values, ^bTOM, total organic matter, ^cSS, soluble sugar.

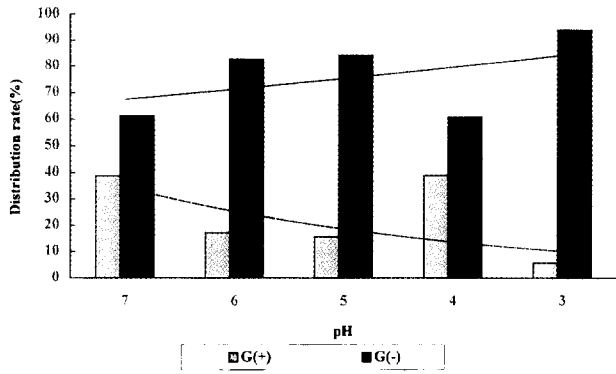


Fig. 1. Comparing the distribution rate between gram negative(G (-)) and gram positive(G(+)) bacteria according to pH gradient. Regression equations are as follows: G(-), $y=4.46 \times +0.96$; G(+), $y=-2.32 \times +83.82$.

각 pH 구간별로 출현하는 균주의 생리·생화학특성에 따라 속 수준에서 동정하였으며, 이를 산성화의 영향과 연관하여 분석하였다. 분리된 균주의 64%는 그람 음성, 36%는 그람 양성으로 확인 되었다. 그람 양성세균과 그람 음성세균의 pH에 따른 분포 비율을 비교한 결과, 그람 양성세균은 pH 4에서 50%로 다소 높은 출현율을 보였으나 전체적으로 pH가 감소함에 따라 분포 비율이 감소하는 경향을 보였으며, 상대적으로 그람 음성세균은 pH가 감소함에 따라 증가하는 양상을 보였다(Fig. 1). 전 pH 구간에서 분리된 총 202개의 종속영양 세균들은 12속 22종(*Providencia*속, *Bacillus*속, *Pseudomonas*속, *Staphylococcus*속, *Proteus*속, *Serratia*속, *Aeromona*속, *Corynebacterium*속, *Actinobacillus*속, *Vibrio*속, *Morganella*속 및 *Enterobacter*속)으로 동정되었으며, 그 분포비율은 Table 2에 나타내었다. pH 7에서는 12개의 속이 출현하였으나 pH 3에서는 단지 5개의 속만 출현하여 pH가 감소함에 따라 급격히 속의 다양성이 감소함을 알 수 있었다.

Rattray와 Logan(27) 그리고 Jones(18)은 산성화된 호소수와 비 산성화된 호소수에서 종속영양세균 군집에 미치는 pH와 온도의 영향을 평가한 결과, 전반적으로 종속영양세균 군집의 다양성에 pH가 별 다른 영향을 미치지 않는다고 하였다. 그러나 미생물은 일반적으로 acidic stress에 민감하게 반응함으로써 군집의 규모, 활성도 및 다양성이 감소하며, 일부 생존 세균은 환경변화에 지속적으로 견딜수 있는 특별한 내성을 갖게 되는 것으로 알려져 있다(24, 31). Dugan 등(11)에 의하면 산성화된 수계에서는 몇 종의 미생물만이 생존하며, 이 환경에 적응하여 견딜수 있는 세균 군집으로 *Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Escherichia*, *Aerobacter*, *Thiobacillus*, *Crenothrix*, *Microsporium* 등을 보고하였다. 본 연구에서는 pH가 낮아질수록 그람음성 세균의 출현 빈도가 높았으며, pH 4 이하의 산성화 환경에서 *Pseudomonas*, *Providencia*, *Proteus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium* 및 *Enterobacter* 속 등이 분리되었다. 이들은 일반적으로 담수환경(freshwater habitats)에서 쉽게 관찰되는 것들이며(12), 특히 *Enterobacteria*과에 속하는 속이 대부분을 차지함으로써 인근 생활하수의 밀접한 영향을 받은 것으로 판단되었다.

Table 2. Summary of the change in size of heterotrophic bacterial population according to pH gradient

	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
<i>Proteus mirabilis</i>	3 ^a	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	11	0	0
<i>Proteus</i> spp.	0	0	0	3	25
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0	0	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3	4	0	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	2	3	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	4	22	34	13	15
<i>Aeromonas sobria</i>	1	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloac</i>	0	0	0	7	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0	0	0	5
<i>Serratia</i> spp.	1	7	0	0	0
<i>Staphylococcus auricular</i>	7	11	3	13	5
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus sciurii</i>	5	0	3	0	0
<i>Staphylococcus haemolytica</i>	3	0	0	0	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	0	0	7	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	7	0	0	9	0
<i>Bacillus</i> spp.	16	9	11	17	0
<i>Providencia</i> spp.	21	2	0	7	40
<i>Providencia reitgeri</i>	0	29	21	0	0
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	0	0	7	0
<i>Actinobacillus</i> spp.	1	2	0	0	0
<i>Vibrio</i> spp.	1	0	3	0	0
<i>Morganella morgnii</i>	1	2	8	0	0
Unidentified	12	11	14	17	10

^aNumbers represents the percentage of species in each pH.

또한 pH 구배에 따라 분포하는 우점종을 분석한 결과, pH 7과 6에서는 *Providencia*속이 각각 21%, 31%, pH 5에서는 *Pseudomonas*속이 37%, pH 4에서는 *Staphylococcus*속과 *Pseudomonas*속이 각각 29, 13% 그리고 pH 3에서는 *Providencia*속이 40%로 가장 많이 분포하였다(Table 2). *Serratia*속과 *Aeromonas*속은 pH 5 이상의 구간에서 10% 미만의 출현율을 나타내었고, pH 4와 3에서는 전혀 출현하지 않음으로써 산성화 조건에 민감한 종으로 판단된다. pH 구간에 따른 우점종의 점유율은 다소 차이가 있었으나, *Providencia*속, *Pseudomonas*속, *Staphylococcus*속 그리고 *Bacillus*속은 거의 전 pH 구간에서 고루 분포 하였으며, 따라서 이들 종속영양 세균들은 산성화 조건에서도 잘 적응하여 본 연구대상 지역이 산성화되는 환경에서도 물질순환 기능을 수행하는 주요 군집으로 판단되었다.

집괴 분석(Cluster analysis)

산성화에 따른 출현균주의 형질들에 대한 유사도 분석 결과를 이용하여 각 pH 구간 별로 수리도를 작성하였으며 (data not shown), 이를 Table 3으로 정리하였다. 분석 결과 유사도 80% 수준에서 총 24개의 집괴(cluster)로 분리되었으며, 이 중 pH 7에서는 22개의 집괴, pH 3에서는 5개의 집괴로 분석됨으로써 산성화가 진행됨에 따라 감소하였다. 각 집괴를 구성하는 종 조성을 분석한 결과는 Vitek[®] system을 이용하여 분석한 종속 영양세균들의 동정 결과(Table 2)와 매우 높은 상관관계를 가지는 것으로 나타났다. 이에 따라

Table 3. Distribution of bacteria among the cluster analysis

Sample	No. of isolates	No. of clusters ^a	Distribution of isolates among clusters ^b
Adjusted pH 7	71	22	16, 13, 7, 4, 3(2), 2(8), 1(8)
Adjusted pH 6	56	18	18, 13, 5, 4, 2(2), 1(12)
Adjusted pH 5	27	12	7(2), 2(3), 1(7)
Adjusted pH 4	29	8	6, 5(2), 2(2), 1(3)
Adjusted pH 3	19	5	14, 2, 1(3)

^aClusters were formed at the 80% level of similarity. ^bNumbers represents the number of individuals in a cluster; that is, the size of the cluster(frequency, if>1). Numbers in parentheses represented the number of clusters of that size.

집괴내 유사도 비교를 통하여 미동정 분리균주들의 형질과 Vitek^R system에 의해 동정된 세균 군집과의 유연관계를 파악할 수 있었다. 즉 pH 7과 pH 6에서의 미동정 세균 군집들은 fermentative, oxidase positive, nonmotile rods의 특징을 갖는 *Providencia*속과 유사도가 가장 높았다.

다양성 지수(diversity indices)는 종의 총 개체수를 나타내는 풍부도(richness)와 종의 분포율을 표시하는 균등도(evenness)를 한가지 척도로 표현한 통계학적인 방법이다. 따라서 풍부도 지수가 높을수록 종의 개체수가 많으며, 균등도 지수가 높을수록 종이 한가지 종에 편향적이지 않고 고루 분포하는 것을 나타낸다. 분리된 균주들의 pH에 따른 풍부도, 다양성, 균등화도는 Fig. 2에 나타내었다. 일반적으로 산성화된 환경에서의 종 다양성 지수는 1.0-3.0의 범위이며(27), 세균의 다양성 지수는 여러 환경 stress의 지표로 이용된다. 즉 특정 환경 stress 하에서는 생물상의 단순화 즉 미생물 군집의 종 다양성이 낮게 나타난다(25). 본 연구 결과에서의 종다양성 지수 역시 pH 7에서 2.37, pH 3에서는 1.13을 나타내어 pH가 낮아질수록 종다양성 지수가 낮아지는 경향을 나타내었다.

크기가 다른 군집에 대한 종 다양성지수의 유의성을 평가

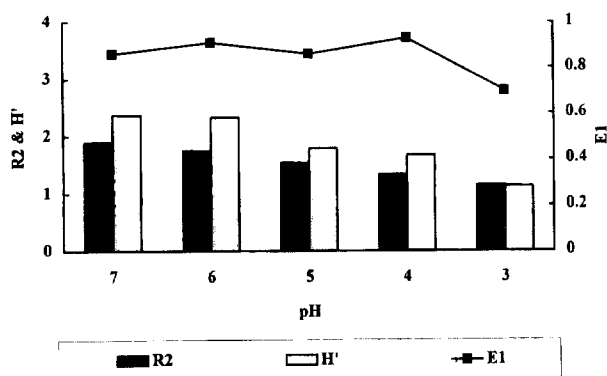


Fig. 2. Comparing the diversity index of heterotrophic microbial communities in batch culture system. R2, richness index; H', diversity index; E1, evenness index.

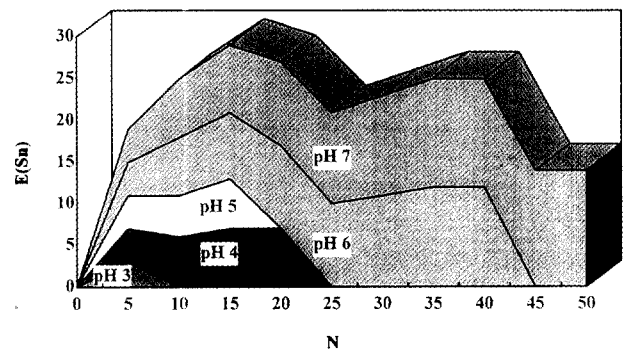


Fig. 3. Rarefaction curves comparing diversity of the 5 communities according to pH gradient. E(Sn), expected number of guilds; N, total samples.

하기 위해 rarefraction 방법으로 종의 기대값(E(Sn))(33)을 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 3과 같다. 군집의 상대적 종 다양성을 평가한 결과 pH 6과 pH 7에서, 그리고 pH 5, pH 4 및 pH 3에서 각각 중첩되어 나타났으며, pH가 낮을수록 종의 기대값이 낮게 나타났다. 이는 clustering 분석 결과와 유의한 양상을 보여, 다양성 지수의 유의성을 검증할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 1997년 교육부 지원 한양대학교 기초과학연구소 연구과제(4436)의 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며, 연구결과 일부는 서울대학교 분자미생물학 연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터의 지원을 받아 수행한 것이다. 두 기관의 연구비 지원에 사의를 표한다.

참고문헌

1. 강공언, 이주희, 김희강. 1996. 서울지역 강수중 이온 성분 분석자료의 해석. 한국대기보전학회지 12, 323-332.
2. 강공언, 임재현, 김희강. 1997. 서울지역 강수 산성도의 장기적인 경향분석. 한국대기보전학회지 13, 9-18.
3. 김양균, 강인구, 이민희, 나진균, 이석조, 한의정, 한진석, 신찬기, 김정수, 유승도, 홍율기, 정준화, 이재인, 박태술, 권오영, 강은희. 1990. 대기오염물질의 장거리 이동과 산성비 강하에 관한 연구II. 국립환경연구원보 12, 341-371.
4. 문형태, 박병규, 김준호. 1997. 산성토양 개량제 처리에 따른 식물의 성장반응과 토양성질의 변화. 한국생태학회지 20(1), 43-49.
5. 송승완, 최찬섭, 정형근, 권영식. 1996. 산성우에 의한 토양내의 이온 거동에 관한 연구. 한국수질보전학회지 12, 35-45.
6. 안영범, 조홍범, 최영길. 1996. 회분배양 시스템에서 산성화에 따른 세균군집의 변화. 한국육수학회지 29, 215-223.
7. Ahn, Y.B., H.B. Cho, and Y.K. Choi. 1995. Effects of hydrogen ion on aquatic population of microbes in Korea. Kor. J. Microbiol. 33, 184-190.
8. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. 1992.

- Standard methods for the examination of water and coast water. 18th ed., American Public Health Association. Washington D.C.
9. **Atlas, R.M.** 1984. Diversity of microbial communities. *Advances in Microbial Ecology* **7**, 1-47.
 10. **Carmichael, G.R., M. Amann, A. Azimi, S.C. Bhattacharya, R.M. Shrestha, M. Chadwick, J. Kuylenstierna, S. Cinderby, W. Foell, C. Green, J.P. Hettelingh, L. Hordijk, J. Shah, M.P. Singh, and D. Zhao.** 1994. An International Collaborative Project on Acid Rain in Asia. p. 4-12. In Workshop for Environmental Science and Technology, The Korean Federation of Science and Technology Societies. Seoul, Korea.
 11. **Dugan, P.R., C.B. MacMillan, and R.M. Pfister.** 1970. Aerobic heterotrophic bacteria indigenous to pH 2.8 acid mine water; predominant slime-producing bacteria in acid streams. *J. Bacteriol.* **101**, 982-988.
 12. **Fletcher, M.** 1979. The aquatic environment. p. 92-114. In J.M. Lynch and N.J. Poole (ed). *Microbial Ecology: A conceptual Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 13. **Harvey, H.H.** 1989. Effects of acidic precipitation on lakes ecosystems. p. 137-164. In D.C. Adriano and A.H. Johnson (ed). *Acidic precipitation*. Springer-Verlag, New York.
 14. **Heribert, D., P.J. Phipps, and R.E. Strange.** 1971. Chemical analysis of microbial cells. p. 266-272. In J.R. Norris and D.W. Ribbons (ed). *Methods in microbiology*, Vol. 5B. Academic Press, London.
 15. **Hobbie, J.E., R.J. Daley, and S. Jasper.** 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 1225-1228.
 16. **Howells, G.** 1995. *Acid rain and acid waters*. Ellis Horwood Limited, New York.
 17. **John, G.H., R.K. Noel, H.A.S. Peter, T.S. James, and T.W. Stanley.** 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed, Williams & Wilkins, Baltimore.
 18. **Jones, J.G.** 1987. Diversity in freshwater microbiology. p. 235-259. In M. Fletcher and T.R.G. Gray(ed). *Ecology of microbial communities*. Society for General Microbiology, Cambridge.
 19. **Kim, B.C, J.H. Park, G.S. Hwang, and K.S. Choi.** 1996. Trophic state of reservoirs in Korea. p 73-80. Proceedings. '96 Symposium of Korean Society of Limnology, Seoul, Korea.
 20. **Ludwig, J.A. and J.F. Reynolds.** 1988. *Statistical ecology*. John Wiley & Sons, New York.
 21. **Macfaddin, J.M.** 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. Williams & Wilkins, Baltimore.
 22. **Matschullat, J. and M. Wyrobek.** 1993. Controlled experimental acidification of lake sediments and resulting trace metal behavior. *Water Air and Soil Pollution* **69**, 393-403.
 23. **McKinley, V.L. and J.R. Vestal.** 1982. Effects of acid on plant litter decomposition in an Arctic lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 1188-1195.
 24. **Mills, A.L. and L.M. Mallory.** 1987. The community structure of sessile heterotrophic bacteria stressed by acid mine drainage. *Microb. Ecol.* **14**, 219-232.
 25. **Mills, A.L. and R.A. Wassel.** 1980. Aspects of diversity measurement for microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 578-586.
 26. **Osgood, M.P.** 1987. *Microbiological studies of three Adirondack streams exhibiting pH gradients*. Ph.D. Thesis, Rensselaer Polytechnic Institute, Troy, New York.
 27. **Ratray, J. and N.A. Logan.** 1993. Effects of pH and temperature on heterotrophic bacteria in acidified and non-acidified lochs. *J. Appl. Bacteriol.* **75**, 283-291.
 28. **Rheinheimer, G.** 1977. *Microbial ecology of a brackish water environment*. Springer-Verlag, Berlin.
 29. **Rohlf, F.J.** 1993. *NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80*, Exeter Software, New York.
 30. **Schindler, D.W.** 1994. Changes caused by acidification to the biodiversity: Productivity and biogeochemical cycles of lakes. p. 153-164. In C.E.W. Steinberg and R.F. Wright(ed). *Acidification of freshwater ecosystems, implications for the future*. John Wiley & Sons, New York.
 31. **Schindler, D.W., S.E. Kasian, and R.H. Hesslein.** 1989. Losses of biota from American aquatic communities due to acid rain. *Environ. Monit. Assess.* **12**, 269-285.
 32. **Stokes, P.M., E.T. Howell, and G. Krantzberg.** 1989. Effects of acidic precipitation on the biota of freshwater lakes. p. 273-304. In D.C. Adriano and A.H. Johnson(ed). *Acidic precipitation*. Springer-Verlag, New York.
 33. **Wassel, R.A. and A.L. Mills.** 1983. Change in water and sediment bacterial community structure in a lake receiving acid mine drainage. *Microb. Ecol.* **9**, 155-169.

(Received August 5, 1997/Accepted August 29, 1997)

ABSTRACT: Effects of Acidification on the Species Compositions of Heterotrophic Bacterial Community in Microcosm

Ahn, Young Beom, Hong-Bum Cho¹ and Yong-Keel Choi* (Department of Biology, Hanyang University, Seoul, 133-791, Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul, 151-742, ¹Department of Biological Engineering, Seokyeong University, Seoul, 136-104, Korea)

In an artificial pH-gradient batch culture system, the author analyzed the effects of acidification on the species composition of heterotrophic bacteria. As the result of this study, it was found that the numbers of total bacteria were not affected by acidification and that the population size of heterotrophic bacteria decreased as pH became lower. The heterotrophic bacteria isolated from all of the pH gradient were 12 genera and 22 species, and among them, gram negative and gram positive bacteria were 64% and 36%, respectively. As pH decreased, the distribution rate of gram negative bacteria increased while that of gram positive bacteria decreased. Regarding to distribution rate of genres in each pH gradient, 13 genres appeared at pH 7 while only 5 genres appeared at pH 3, which means that the diversity of genera decrease as pH decreased. As a result of cluster analysis, diversity indices of species had ranges from 1.13 to 2.37, and decreased as pH decreased. In order to evaluate the diversity of different size samples, we analyzed the expected number of species appearance according to pH by rarefaction method. The statistical significance of species diversity was verified by the fact that the number decreased at lower pH.