

## 수계종속 영양세균 군집의 종조성 및 세포외 효소의 변화에 미치는 산성화의 영향

최영길 · 한명수 · 김세화<sup>1</sup> · 이 경<sup>2</sup> · 유광일\*

한양대학교 자연과학대학 생명과학과, <sup>1</sup>용인대학교 생명과학과, <sup>2</sup>가톨릭대학교 생물학부

## Effects of Acidification on the Species Composition and the Changes of Extracellular Enzymes of Heterotrophic Bacterial Community

Yong-Keel Choi, Myung-Soo Han, Sewha Kim<sup>1</sup>, Kyung Lee<sup>2</sup> and Kwang-Il Yoo\*

Department of Life Science, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea,

<sup>1</sup>Department of Life Science, Yong-In University, Yongin 449-714, Korea,

<sup>2</sup>Department of biology, The Catholic University of Korea, Puchon 422-743, Korea

**Abstract** - 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. The activities of extracellular enzyme showed the ranges of 0.008~0.292  $\mu\text{M l}^{-1} \text{hr}^{-1}$  in bioreactor system. The enzymatic activities decreased rapidly below pH 5 and then sustained 5~38% at the lower pH values.

**Key words** : acidification, heterotrophic bacteria, pH, extracellular enzyme

### 서 론

동북 아시아 지역의 대기오염 물질 배출량은 이미 서 유럽 및 북미 대륙과 비슷한 수준으로, 2010년 이후에는 세계 최대의 대기 오염물질의 배출 지역이 될 것으로

전망하고 있다(Carmichael *et al.* 1994). 국내에서는 이미 국내의 오염 발생원 뿐 아니라 중국을 비롯한 주변 국가로 부터의 장거리 이동 오염물질에 대한 연구가 활발히 진행중에 있으며(김 등 1990; 강 등 1996, 1997), 국내 생태계에 미치는 산성비의 영향에 대한 연구가 진행중에 있다(송 등 1996; 문 등 1997). 그러나 삼림, 농업 등 육상 생태계에 대한 연구에 비해 수계 생태계에 대한 연구는 상대적으로 매우 미진하다(Ahn *et al.*

\* Corresponding author: Kwang-Il Yoo, Tel. 02-2290-0951, Fax. 02-2299-3495, E-mail. kiyoo@netsgo.com

1995). 이는 국내 호소수 대부분이 부영양화 되었거나 진행중에 있어서 계절적으로 반복되는 수화현상 등의 영향으로 중성에서 염기성으로 변동이 매우 심할 뿐 아니라 (Kim *et al.* 1996), 수계 산성화에 의한 가시적인 피해 사례가 아직 보고되고 있지 않기 때문이다. 하지만 수계 산성화에 의한 피해는 신속하게 나타나거나 급변적으로 발생하지 않고 누적된 오염효과가 서서히 마비 상태로 나타나 대형 피해를 입히는 것이 특징이므로, 산성화에 따른 미생물 생태계의 영향에 대한 예측 연구는 중요하다 (Howells 1995).

일반적으로 생태계의 다양한 환경요인은 군집내 개체 군들의 생태학적 균형 및 안전성 유지에 많은 영향을 미치게 되며, 그 결과가 특정 생태계의 미생물 군집의 다양성으로 표현된다 (Atlas 1984). 특히 수계 종속 영양 세균의 군집 구조의 특성은 영양 물질 순환의 지표로 사용될 만큼 중요한 변수이며 (Rheinhermer 1977), 따라서 산성비에 의한 피해가 심각한 북미와 유럽 등에서는 산성화와 연관된 이들 군집의 동태에 대한 많은 연구가 있어 왔다 (Wassel and Milk 1983; Mills and Mallor 1987).

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 (안 등 1996), 인위적으로 pH 구배가 조성된 회분 배양 시스템에 경기도 왕송 저수지 시료를 적용하였으며, pH 변화에 따른 물리적 화학적 환경요인들의 변화와 종속 영양세균 군집의 동태를 조사하였고, 종속영양세균의 생태적 기능에 미치는 영향을 세포의 효소의 활성도를 중심으로 분석하였다. 이러한 연구는 대기오염에 의한 산성침적이 수서생태계에서의 미생물 군집의 동태 및 생태적 기능에 어떠한 영향을 미치는가를 예측할 수 있게 할 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료 채취 및 회분 배양 시스템

시료는 경기도 왕송저수지에서 하절기에 채수하였다. 회분배양 시스템 (batch culture system)은 멸균한 2l 유리 용기에 1.5l의 시료를 넣은 후 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 및 7.0으로 각각 보정하여 구성하였다. 25

°C에서 10일 동안 배양하면서 48시간 간격으로 시료를 채취하여 분석하였다.

### 2. 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 U10, 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 (American Public Health Association)에 따랐다. 수용성 당류는 Anthrone의 방법 (Ahn *et al.* 1995)으로, 유기물 총량은 Walkey의 방법 (Ahn *et al.* 1995)으로 각각 가수분해 시킨 후 625 nm의 파장에서 정량하였으며, 수용성 당류는 포도당 (glucose) 기준치로 환산하였다.

### 3. 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 ml를 첨가한 후 3분간 염색하고, Sudan black B로 염색된 membrane filter (0.2 μm)에 여과시킨 다음 형광현미경 (epifluorescence microscope, Axioplan, Zeiss, Germany)을 이용하여 membrane filter 상에 형광염료로 염색된 총 세균 20군데 이상을 계수하여 평균치로 계산하였다 (Hobble 1977).

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

### 4. 종속영양 세균의 분리 및 동정

종속영양 세균의 분리는 각 pH 구간 별로 배양된 시료를 각각의 pH로 보정된 10% NA 배지에 접종하고 23일 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<sup>®</sup> system (BiOMerieux, France)의 자료 (data base)를 이용하여 동정하였다.

### 5. 세포의 효소활성도의 측정

종속영양세균의 세포의 효소 활성에 미치는 산성화의

영향을 평가하기 위하여, 각 pH 구간 별로 채취한 시료로부터 lipase, phosphatase, amylase, cellulase,  $\beta$ -glucosidase 및 chitinase의 활성도를 측정하였으며, 이들 세포의 효소의 반응 기질로는 각각 4-methylumbelliferly (MUF) butylate, 4-MUF phosphate, 4-MUF- $\alpha$ -D-glucoside, 4-MUF- $\beta$ -D-cellobio-pyranoside, 4-MUF- $\beta$ -D-glucoside 및 4-MUF-N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminide 등의 형광기질을 사용하였다. 세포의 효소활성의 측정은 각각의 반응기질을 5 mM이 되게 methyl cellosolve에 녹여  $-20^{\circ}\text{C}$ 의 암실에서 보관한 후 시료 5 ml에 각 반응기질을 최종 농도가  $25\ \mu\text{M}$ 이 되게 첨가하였다. 4시간 동안 암실에서 반응시킨 후 효소활성에 따른 형광은 spectrofluorometer (DQ 200, Hofer)을 이용하여 Excitation은 365 nm, Emission은 450 nm의 조건에서 측정하였다 (Hoppe 1983; Somville 1984). 각 효소의 활성 단위 (unit)는 Emission intensity와 기질의 농도 그리고 반응시간을 환산하여  $\mu\text{M l}^{-1}\text{ hr}^{-1}$ 로 나타내었다 (최와 이 1996).

## 결과 및 고찰

### 1. 물리·화학적 특성 및 세균 군집의 변화

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. 왕송 저수지에서 채취한 시료 원수와 pH 구배가 형성된 회분 배양 시스템에서의 시료들에 대한 환경요인들의 변화는 Table 1과 같다. 산성화가 진행됨에 따라 총 유기물양, 수용성 당류 및 탁도가 감소하였으며, 전기 전도도, 암모니아는 증가하였다. 총 세균은  $0.71\text{--}242 \times 10^6\ \text{cells ml}^{-1}$  범주로 변화하였고, 종속영양세균은  $1.33\text{--}62.67 \times 10^4\ \text{cells ml}^{-1}$ 의 범주에서 변화하였다. 총세균은 산성화에 영향을 받지 않았으며 종속영양세균군집의 크기는 pH가 내려갈수록 감소하였다.

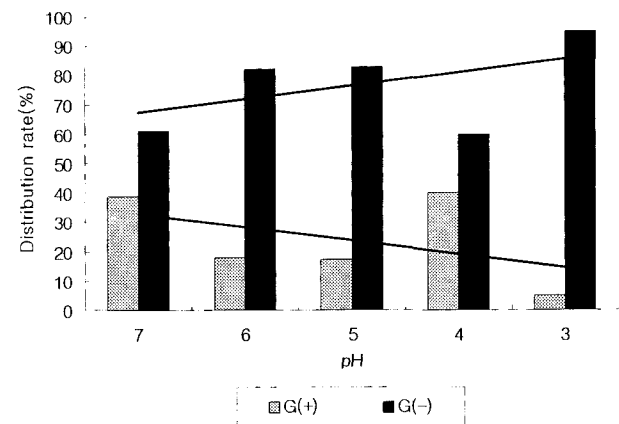
### 2. pH에 따른 종속영양세균 군집의 종조성 변화

산성화에 따라 물리·화학적 환경요인과 개체군 군집이 변화하였는데, 이는 종조성의 변화를 수반하게 된다. 따라서 각 pH 구간별로 출현하는 균주의 생리·생화학적 특성에 따라 속 수준에서 동정하였으며, 이를 산성화의 영향과 관련하여 분석하였다. 분리된 균주의 64%는 그람 음성, 36%는 그람 양성으로 확인 되었다. 그람 양성세균과 그람 음성세균의 pH에 따른 분포 비율을 비

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

	7	6	5	4	3
pH	7.49 <sup>a</sup>	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 <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	517	612	557	467	476
SS (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>c</sup>	0.74	0.79	0.91	0.87	0.77
PO <sub>4</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.42	0.52	0.37	0.51	0.30
NO <sub>2</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.037	0.031	0.019	0.021	0.015
NO <sub>3</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	318	257	134	126	1.8
NH <sub>4</sub> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.01	0.13	2.03	2.32	2.27
Total bacteria (10 <sup>6</sup> cells ml <sup>-1</sup> )	2.42	1.24	1.05	0.77	0.71
Hererotrophs (10 <sup>4</sup> CFU ml <sup>-1</sup> )	6.27	2.23	0.89	0.71	0.13

<sup>a</sup> Mean values, <sup>b</sup> TOM, total organic matter, <sup>c</sup> SS, 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(-),  $y = 4.96x + 0.96$ ; G(+),  $y = -2.32x + 83.82$ .

교한 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 7에서

는 12개의 속이 출현하였으나 pH 3에서는 단지 5개의 속만 출현하여 pH가 감소함에 따라 급격히 속의 다양성이 감소함을 알수 있었다.

Ratray and Logan (1993) 그리고 Jones (1987)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(Mill and Mallory 1987; Schindler et al. 1989). Dugan et al. (1970)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 출현빈도가 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 것 들이며(Fletcher 1979), 특히 *Enterobacteria*과에 속하는 속이 대부분을 차지함으로써 인근 생활하수의 밀접한 영향을 받은 것으로 판단되었다.

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 종속 영양 세균들은 산성화 조건에서도 잘 적응하여 본 연구 대상 지역이 산성화되는 환경에서도 물질순환 기능을 수행하는 주요 군집으로 판단되었다.

### 3. 세포외 효소 활성도의 변화

산성화에 따른 세포외 효소의 활성도 변화는 Fig. 2와 같다. Chitinase의 활성도는  $0.011 \sim 0.055 \mu\text{M l}^{-1} \text{hr}^{-1}$ ,

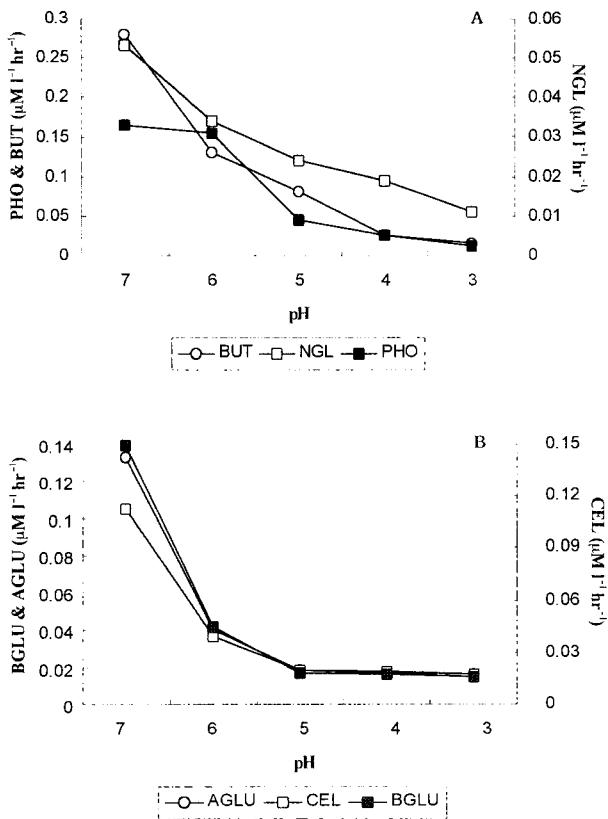
**Table 2.** Summary of the change in size of heterotrophic bacterial population according to pH gradient

	pH 7	pH 6	pH 5	pH 4	pH 3
<i>Proteus mirabilis</i>	3 <sup>a</sup>	0	0	0	0
<i>Proteus vulgaris</i>	3	0	8	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	30	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	10	17	0
<i>Providencia</i> spp.	21	2	0	7	40
<i>Providencia rettgeri</i>	0	28	19	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	13	17	10

<sup>a</sup>Numbers represents the percentage of species in each pH

phosphatase와 lipase의 활성도는 각각  $0.008 \sim 0.169$ 와  $0.015 \sim 0.292 \mu\text{M l}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 의 범주로 나타났다.  $\beta$ -glucosidase 활성도는  $0.01 \sim 0.141 \mu\text{M l}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 의 범주로, pH 6 이하에서 급격히 활성도가 감소하였다. Amylase와 cellulase 활성도는  $0.01 \sim 0.135$  및  $0.011 \sim 0.115 \mu\text{M l}^{-1} \text{hr}^{-1}$ 의 범주로 각각 측정되었다. 산성화에 따라 phosphatase를 제외한 모든 세포외 효소는 pH 6에서 부터 그 활성이 급격히 감소하였으며, pH 5 이하에서는 백분율로 환산하여 비교할 때 5~38%의 활성을 나타내는데 그쳤다.

호소수에는 다양한 경로로 유입된 유기물이 다량 함유되어 있으며, 수계에 분포하는 종속영양세균과 생리적 특성군들이 분비하는 효소들에 의해 분해된다(Hoppe 1983). 유기물의 95% 이상이 단백질, 다당류 및 에스테르 등과 같은 고분자 물질로 구성되어 있으므로, 세포외 효소에 의해 제한적으로 저분자 물질로 분해된 후 세균이 이용하게된다. 이러한 세포외 효소는 일반적으로 수온, pH, 기질의 종류 등과 같은 물리·화학적 수환경의 다양한 환경요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며(Chrost 1989; Sinsabaugh 1994), 본 실험에서는 pH에 의해 세포외 효소의 활성이 크게 억제된 사실을 확인할 수 있었다.



**Fig. 2.** Changes of exoenzymatic activities in pH-gradient bioreactor system. PHO : Phosphatase, NGL : Chitinase, BUT : Lipase, BGLU : β-Glucosidase, AGLU : Amylase, CEL : Cellulase.

따라서 생리적 특정 세균 군집 및 세포의 효소 활성의 변화는 pH에 따라 변화한 각종 환경 요인들의 간접적인 영향 보다는 pH에 의한 직접적인 영향으로 인하여 변화됨을 확인 하였다.

**적 요**

인위적으로 pH 구배가 조성된 회분배양 시스템 (batch culture system) 내에서 산성화에 따른 종속영양 세균 군집의 종조성 변화를 분석하였다. 총세균의 개체수는 산성화에 영향을 받지 않았으며, 종속영양세균 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. 세포의 효소의 활성도는 0.008~0.292 μM l<sup>-1</sup> hr<sup>-1</sup>의 범주로 나타났고, 산성화에 따라 세포의 효소의 활성도는 급격히 감소하여 pH 5 이하에서는 5~38%의 낮은 활성을 나타내었다.

**사 사**

본 연구는 한국학술진흥재단지원 한양대학교 기초과학연구소 연구과제(1998-015-D00231)의 연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

**참 고 문 헌**

강공언, 이주희, 김희강. 1996. 서울지역 강수중 이온 성분 분석자료의 해석. 한국대기보전학회지. 12:323-332.  
 강공언, 임재현, 김희강. 1997. 서울지역 강수 산성도의 장기적인 경향분석. 한국대기보전학회지. 13:9-18.  
 김양균, 강인구, 이민희, 나진균, 이석조, 한의정, 한진석, 신찬기, 김정수, 유승도, 홍윝기, 정준화, 이재인, 박태술, 권오영, 강은희. 1990. 대기오염물질의 장거리 이동과 산성비 강하에 관한 연구II. 국립환경연구원보. 12:341-371.  
 문형태, 박병규, 김준호. 1997. 산성토양 개량제 처리에 따른 식물의 생장반응과 토양성질의 변화. 한국생태학회지. 20(1):43-49.  
 송승환, 최찬섭, 정형근, 권영식. 1996. 산성우에 의한 토양내의 이온 거동에 관한 연구. 한국수질보전학회지. 12:35-45.  
 안영범, 조홍범, 최영길. 1996. 회분배양 시스템에서 산성화에 따른 세균군집의 변화. 한국육수학회지. 29:215-223.  
 최강국, 이진형. 1996. 서천 연안 퇴적토에서 종속영양 세균의 분포와 세포의 효소 활성간의 관계. 미생물과 산업 22:119-126.  
 Ahn YB., HB. Cho and YK Choi. 1995. Effects of hydrogen ion on aquatic population of microbes in Korea. Kor. J. Microbiol. 33:184-190.  
 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.  
 Atlas RM. 1984. Diversity of microbial communities. Advances in Microbial Ecology 7:1-47.  
 Carmichael GR, M Amann, A Azimi, SC Bhattacharya, RM Shrestha, M Chadwick, J Kluylenstierna, S Cinderby,

- W Foell, C Green, JP Hettelingh, L Hordijk, J Shah, MP 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.
- Chrost RJ. 1989. Characterization and significance of  $\beta$ -glucosidase activity in lake water. *Limnol. Oceanol.* 34:660-672.
- Dugan PR, CB MacMillan and RM 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
- Fletcher M. 1979. The aquatic environment. p. 92-114. In JM Lynch and NJ Poole (ed). *Microbial Ecology: A conceptual Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Hobbie JE, RJ Daley and S Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225-1228.
- Hoppe HG. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water : Measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol Prog. ser.* 11:299-308.
- Howells G. 1995. Acid rain and acid waters. Ellis Horwood Limited, New York.
- Jones JC. 1987. Diversity in freshwater microbiology. p. 235-259. In M Fletcher and TRG Gray (ed). *Ecology of microbiol communities*. Society for General Microbiology, Cambridge.
- Kim BC, JH Park, GS Hwang and KS Choi. 1996. Trophic state of reservoirs in Korea. p. 73-80. *Proceedings. '96 Symposium of Korean Society of Limnology*, Seoul, Korea.
- Mills AL and LM Mallory. 1987. The community structure of sessile heterotrophic bacteria stressed by acid mine drainage. *Microb. Ecol.* 14:219-232.
- Rattray J and NA Logan. 1993. Effects of pH and temperature on heterotrophic bacteria in acidified and non-acidified lochs. *J. Appl. Bacteriol.* 75:283-291.
- Rheinheimer G. 1977. *Microbial ecology of a brackish water environment*. Springer-Verlag. Berlin.
- Schindler DW, SE Kasian and RH Hesskin. 1989. Losses of biota from American aquatic communities due to acid rain. *Environ. Monit. Assess.* 12:264-285.
- Sinsabaugh RL. 1994. Enzymic analysis of microbial pattern and process. *Biol. Fertil. Soils.* 17:69-74.
- Somville M. 1984. Measurement and study of substrate specificity of exoglucosidase activity in eutrophic water. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1181-1185.
- Wassel RA and AL Milk. 1983. Change in water and sediment bacterial community structure in a lake receiving acid mine drainage. *Microb. Ecol.* 9:155-169.

(Received 5 December 2001, accepted 28 February 2002)