

2018 강남서초학생탐구발표대회
탐구보고서

산성비가 조류의 생장에 미치는
영향의 분석과 해결방안

출 품 번 호

미기재

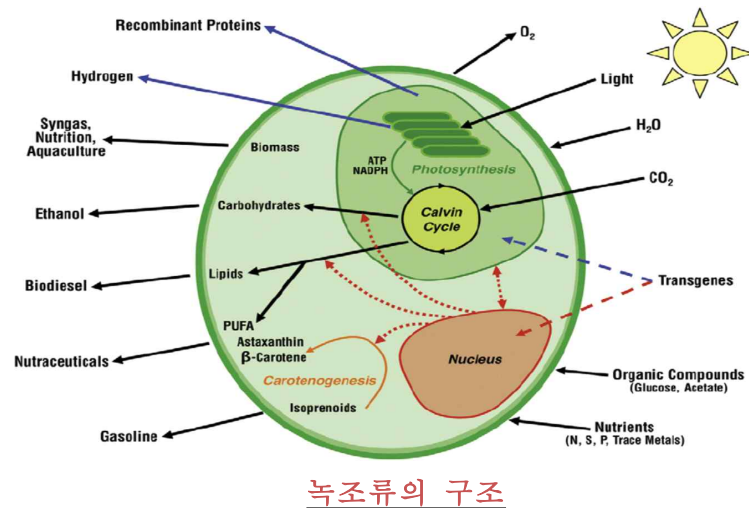
출 품 부 문

환 경

2018. 8. 31 .

1. 탐구동기

강원도의 어느 강에서 물놀이를 하다 손에 이상한 초록색 물체가 손에 묻어 있었다. 집에 도착해 그것이 무엇인지 알아보니 녹조류라는 것이었다. 녹조류는 강에 큰 해를 끼치는 것이었다. 녹조류의 특징은 녹색의 조류로 간세포, 다세포, 비세포성 다핵체 등 여러 가지가 있다.



녹조류가 다른 여러 가지 이유로 이상 증식하게 되면 물로 들어오는 햇빛을 막아 산소가 줄어들어 물고기가 죽게 되고, 신경 독성 물질을 생산한다. 이번 봄 공기가 안 좋을 때 비가 오면 대부분이 산성비였다. 산성비가 내리는 이유는 석탄석유를 태우면 배출하는 이산화황, 자동차가스 성분 중의 이산화질소는 공기 중의 습기를 만나면 황산과 질산이 된다. 이 산성물질인 황산과 질산의 비에 녹아 산성비가 된다. 엄마가 봄에 비가 오면 늘 비 맞지 말라고 하셨는데 그 이유가 산성비를 맞게 되면 피부병이 발생 할 수 있다. 피부가 갈라지거나 간지럼증, 혹은 아토피 등의 질환이 심해질 수 있다. 많은 사람들이 산성비를 맞으면 머리카락이 빠지게 되어 탈모가 발생하다고 하지만 근거가 없는 말이다. 산성비를 맞아서 머리카락이 빠지는 것은 비를 맞고서 씻지 않는 경우 머리가 습해져 머리카락이 빠진다. 탈모는 대부분 유전이다. 또, 산성비는 토양에도 해를 끼친다. 토양이 산성화 되면 토양의 카드뮴, 아연, 납, 철, 망간 등의 금속을 잘 녹게 한다. 중금속들은 수중 생태계에 퍼져 먹이사슬을 통해 생물농축을 일으킨다. 생물농축은 환경 속의 특정한 물질이 생물체 안에 축적되어 먹이 사슬을 거치면서 생체 내의 농도가 증가하는 현상이다.

이러한 산성비가 조류가 성장하는 강에 내리게 되면 조류의 성장과 증식에 어떠한 영향을 주는지는 구체적으로 알려진 바가 없다. 이런 경우 발생하는 여러 현상을 실험을 통해 확인하고, 발생하는 문제를 해결하기 위한 방안을 마련하기 위해 실험을 실시하였다.

2. 재료 및 기구

- **재료:** 산성비, 3차 증류수, 배추씨앗, 녹조가 존재하는 강물(양재천), 원예용 토양, NA, NB배지 파우더, 페트리 접시, 1.5ml 마이크로튜브
- **기구:** 냉장고, 가압증기 멸균기, 클린벤치, 밀폐용 플라스틱 용기, pH 측정용 종이, 마이크로파이펫, 피펫에이드, 전자저울, 항온배양기, UV측광기, 약수저, 삼각플라스크, 플라스틱 접시, 수술용 가위, 핀셋

3. 실험가설 및 방법, 결과

1> 산성비의 채집과 산도 측정

가설 : 채집한 빗물은 pH측정 결과, 과연 3차 증류수와 산성비의 산도의 차이는 어떠할까?

- 1) 비가 오는 날 건물 옥상에 1.5L 용량의 페트병에 깔대기를 꽂아 빗물을 채취하고 사용 전 까지 냉장보관을 통해 오염을 막아 본다.
- 2) 채집한 빗물을 pH측정용 종이에 마이크로파이펫을 이용하여 한방울 떨어뜨린 뒤 pH의 확인을 통해 산성비임을 확인한다.
- 3) 3차 증류수를 pH 측정용 종이에 마이크로파이펫을 이용하여 한방울 떨어뜨린 뒤 pH의 확인을 통해 산성비와의 차이를 비교한다.

▼ 실험결과



그림1) 산성비와 3차 증류수의 pH 측정용 종이를 이용한 산도 측정

이 실험을 통해서 산성비가 일반적인 3차 증류수와 비교하여 산도가 낮은, 즉 산성비임을 확인 할 수 있었다.

2> 산성비 조건에서의 식물의 생장변화

가설 : 산성비가 투여된 토양에서 생장한 식물은 정상조건에서 생장한 것과 어떠한 차이와 변화가 있을까?

- 1) 4cm × 4cm 크기의 소형 페트리 접시에 전자저울을 이용하여 완전히 건조시켜 수분이 제거된 식물 재배용 토양 4g을 약수저를 이용하여 담는다.



- 2) 건조된 식물 재배용 토양이 4g이 들어있는 4cm × 4cm 크기의 소형 페트리 접시에 피펫에이드를 이용하여 3차 증류수 10ml를 5ml씩 두 번에 걸쳐 나누어 넣어 흡수시킨다.

- 3) 10분정도 지나 건조된 식물 재배용 토양에 3차 증류수가 모두 흡수되면 핀셋을 이용하여 배추씨앗을 페트리 접시에 16개씩 심고 플라스틱 밀폐용기에 넣은 뒤 밀폐용기와 페트리 접시

사이에 피펫에이드를 이용하여 3차 증류수 10ml를 넣고 밀폐용기의 뚜껑을 닫아 밀봉하면 1주일 동안 배추가 토양에서 성장하면서 밀폐용기를 열고 수분을 공급하지 않아도 식물의 생장에 필요한 수분이 충분히 공급되므로 외부조건에 노출 시킬 필요가 없게 되어 정확한 실험을 실시 할 수 있는 조건이 된다.



4) 일주일간 상온에서 식물(배추)을 성장시키고, 실험용 가위와 핀셋을 이용하여 10개씩 잎을 채취한 뒤 1.5ml 마이크로튜브에 넣고 80% 에탄올을 마이크로파이펫을 이용하여 1ml를 넣어 식물의 잎에서 엽록소가 추출 되도록 한다.



5) 엽록소가 추출되면 측정 전 까지 냉장 보관한다.

6) 1)~5)의 실험을 실시하되 펄트리 접시와 밀폐용기 사이에 넣는 3차 증류수 대신 산성비로 판명된 빗물을 10ml를 넣고 실험을 실시한다.

7) 엽록소가 추출된 80%에탄올 용액 1ml를 채취하여 흡광도 측정용 큐벳에 넣은 뒤 UV측광기에 넣고 663nm, 645nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 엽록소 a, b의 함량을 측정할 수 있으며, 이를 통해 식물의 생장의 비교가 가능하다.

▼ 실험결과(다음 장에 그림과 그래프로 설명하였다.)

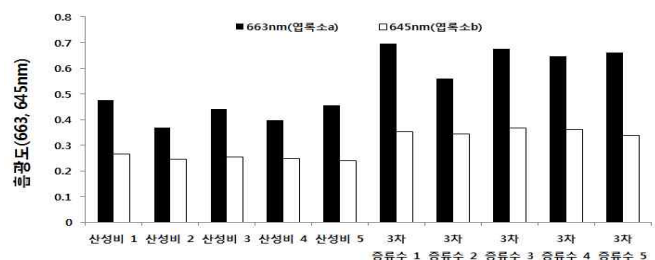
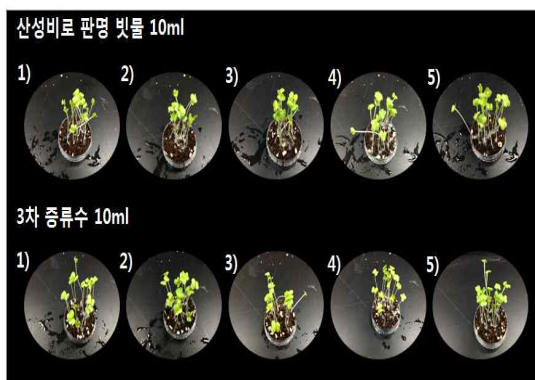


그림2) 산성비가 투여된 조건에서 성장한 식물의 성장변화의 확인

산성비가 투여 된 토양에서 성장한 식물의 경우 외관상으로는 별다른 생장의 차이가 나타나지 않지만, 엽록소 a, b의 함량을 비교한 결과 산성비가 투여된 조건에서 정상 조건에서 성장한 식물의 약 70%정도만 포함하고 있는 것으로 실험결과 확인 되었다. 이는 산성비 조건하에서

식물이 정상적으로 성장하지 못한다는 사실이다. 사람의 경우도 겉모습은 멀쩡하지만 속으로 병들어 있는 경우와 마찬가지로 생각한다.

3> 산성비 조건에서의 식물이 성장한 토양의 혐기성, 호기성 토양박테리아의 성장변화

가설 : 산성비 조건에서 토양의 혐기성 박테리아에 어떠한 변화가 생길까? 토양에 존재하는 혐기성 토양박테리아에 산성비가 투여 되면 어떠한 변화가 생길까?

1) 산성비조건에서 식물이 성장한 토양을 멸균된 약수저를 이용하여 0.1g을 채취하여 1.5ml 마이크로튜브에 넣은 뒤, 무균대(클린벤치)로 옮겨 멸균된 3차 증류수를 마이크로파이펫을 이용하여 1ml를 넣는다. 멸균된 3차 증류수는 세균 배양배지를 제작하는 것과 같이 가압증기멸균이게 넣고 121℃, 2기압의 조건으로 15분간 멸균과정을 거쳐 미생물이 완전하게 제거된 멸균된 3차 증류수를 제작한다.



2) 토양이 들어있는 1.5ml 마이크로튜브를 전동혼합기를 이용하여 멸균된 3차 증류수와 토양을 잘 혼합한 뒤, 원심분리기에 넣고 1분간 6000번의 회전속도로 원심분리를 실시해 토양박테리아가 포함된 토양 상층액을 분리하고, 이들을 무균대(클린벤치)로 옮겨 토양 상층액을 마이크로파이펫을 이용하여 채취한 뒤, 새로운 1.5ml 마이크로튜브에 넣고 실험에 사용하기 전까지 저온 4℃에서 냉장 보관한다.

3) 토양의 혐기성 호기성 토양박테리아의 배양을 위해서는 배양배지가 필요하다.
먼저 NA배지 파우더 23g을 전자저울로 측정해서 2L 용량의 삼각플라스크에 넣는다.

4) NA배지 파우더가 23g 들어있는 2L 용량의 삼각플라스크에 눈금실린더를 이용하여 3차 증류수 1L를 넣고 자석바를 넣은 뒤 삼각플라스크의 입구를 2겹의 알루미늄 호일을 이용하여 밀봉하고, 멸균과정을 거치게 되면 검은 줄이 생성되는 테이프를 알루미늄 호일에 부착한다.



5) 4)의 삼각플라스크를 가압증기 멸균기에 넣고 121℃ 2기압의 조건으로 15분간 멸균을 실시하여 미생물을 모두 제거하는 멸균과정을 실시한다. 실험에서 1L의 배지를 제작하는데 2L 용량의 삼각플라스크를 사용하는 이유는 멸균과정에서 배지가 가열되어 끓게 되는데, 1L 용량이라면 배지가 끓어 넘쳐 버리기 때문이다. 이 과정이 가압증기멸균기의 온도가 상승하고 압력과 온도가 내려가는데 1시간 정도의 시간이 필요하다.

6) 멸균이 끝난 NA배지가 들어있는 2L 용량의 삼각플라스크를 꺼내어 자석 교반기 위에 올려 놓고 자석교반기를 작동 시키면 삼각플라스크안의 자석바가 회전하면서 NA배지가 냉각되게 된다. 자석교반기를 사용하지 않고 온도를 낮추게 되면 배지가 끈고루 온도가 내려가지 않아 배지 덩어리가 생성되기 때문에 반드시 자석 교반기 위에서 온도를 60℃이하로 냉각시킨다.

7) NA배지가 들어있는 삼각플라스크를 손으로 잡을 수 있을 만큼 온도가 내려가게 되면(계절에 따라 다르지만 보통 여름에는 30분, 겨울에는 20분정도가 필요하다) 미리 자외선램프를 작동시켜 멸균 조건을 만들어 놓은 클린벤치로 옮겨 페트리 접시에 2/3씩 부어 넣고 무균대(클린벤치)의 자외선램프를 작동시켜 NA배지에 포함된 아가로오즈 성분에 의해 반 고형 상태가 되도록 건조시킨다.



8) 건조가 끝난 NA배지는 뚜껑을 덮어 클린벤치에서 꺼낸 뒤 비닐랩으로 5개씩 포장하여 사용 전 까지 냉장보관을 실시한다.

9) NB배지의 경우 8g을 전자저울로 측정하여 마찬가지로 2L 용량의 삼각플라스크에 넣은 뒤 멸균과정을 거쳐 배지를 제작한다. 제작이 끝난 NB배지는 액체 상태의 배지이기 때문에 50ml 용량의 원뿔형 관(코니칼튜브)에 넣고 NA배지와 마찬가지로 사용 전까지 냉장보관을 실시한다.



10) 제작된 NA배지에 토양 상층액을 마이크로파이펫을 이용하여 $5\mu\text{l}$ 를 채취하여 접종한 후, 알코올램프를 이용하여 멸균된 스프레더를 이용하여 골고루 문질러 배양을 실시한다. 이 모든 과정은 클린벤치에서 실시한다.

11) 토양 상층액이 접종되어 배양 된 NA배지를 28°C 에서 배양을 실시한다. 이 과정을 통해 토양에서 산소가 포함 된 조건에서 성장하는 호기성 토양박테리아를 배양 할 수 있다. 배양 과정에서 밀폐용 팩에 넣어 산소를 이산화탄소로 바꾸어 주는 약품이 들어있는 팩을 넣고 토양박테리아가 배양된 NA배지를 넣고 밀봉한 뒤 배양을 실시하면 산소가 없는 조건에서 성장하는 혐기성 토양박테리아를 배양 할 수 있다.

12) 15ml 원뿔형 관(코니칼튜브)에 NB배지 3ml를 넣고 토양 상층액을 $5\mu\text{l}$ 를 채취하여 접종한 후, 8°C 에서 배양을 실시한다. 이 과정을 통해 토양에서 산소가 포함 된 조건에서 성장하는 호기성 토양박테리아를 배양 할 수 있다. 배양 과정에서 밀폐용 팩에 넣어 산소를 이산화탄소로 바꾸어주는 약품이 들어있는 팩을 넣고 토양박테리아가 배양된 NB배지를 넣고 밀봉한 뒤 배양을 실시하면 산소가 없는 조건에서 성장하는 혐기성 토양박테리아를 배양 할 수 있다.

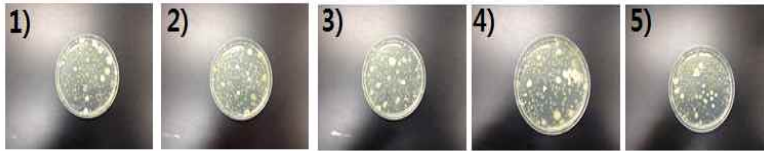


13) NA배지의 경우 혐기, 호기 조건에서 성장한 박테리아의 콜로니를 관찰하고, 액체 배양배지의 경우 1ml를 채취하여 흡광도 측정용 큐벳에 넣은 뒤 UV측광기에 넣고 630nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 혐기성, 호기성 토양박테리아의 성장을 비교 할 수 있다.

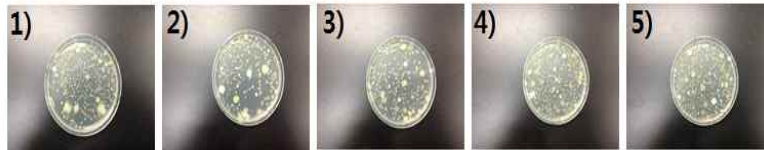


▼ 실험 결과

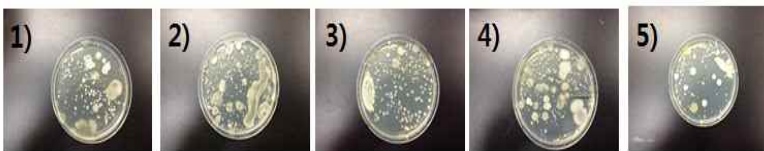
3차 증류수 10ml (호기성 토양박테리아)



산성비로 판명 빗물 10ml(호기성 토양박테리아)



3차 증류수 10ml (혐기성 토양박테리아)



산성비로 판명 빗물 10ml(혐기성 토양박테리아)

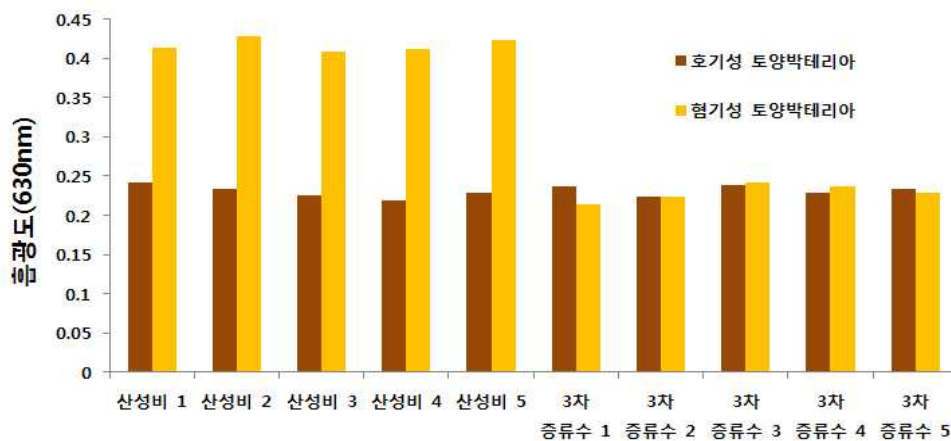
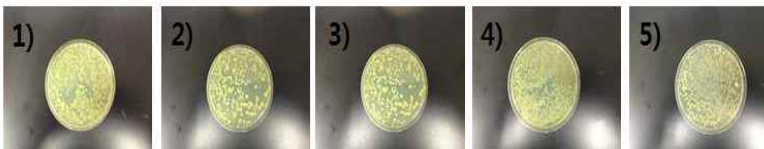


그림3) 산성비가 투여된 조건에서 식물이 성장한 토양에서 혐기성, 호기성 토양박테리아의 성장변화

앞선 실험에서 식물이 정상적으로 성장하는 것처럼 보이지만 엽록소의 함량이 감소한 것을 확인하였다. 산성비 조건에서 토양의 혐기성 박테리아의 수가 크게 감소하였고, 종류도 크게 감소하였다. 이는 산성비의 영향으로 토양의 혐기성 박테리아가 성장에 커다란 문제가 생긴다는 사실을 알게 되었다. 토양에 존재하는 혐기성 토양박테리아에는 질소성분의 순환을 담당하는 질소고정박테리아와 유기물의 분해를 담당하는 중요한 토양 박테리아들이 존재하는데, 이들이 크게 감소했다는 사실은 식물에게 필수조건인 여러 무기물들을 공급 할 수 없다는 사실이다. 즉 산성비가 투여 되면 토양의 혐기성 토양박테리아의 수가 크게 감소하고, 이로 인해 식물의 성장에 문제가 발생한다는 사실을 실험을 통해 확인하였다.

4> 강에서 성장하는 조류의 배양

가설 : 강에서 성장하는 조류가 제작한 성장배지에서 정상적으로 성장하는지 엽록소에는 어떠한 변화가 생길까?

- 1) 녹조가 발생한 강물이나 하천의 물을 채취하여 실험실로 옮긴다.
- 2) 조류(식물성 플랑크톤)을 배양하기 위한 배지를 제작한다.
- 3) 'BG II Broth' 1ml와 'Trace metal mix A5 with CO' 100 μ l, agarose gel 파우더 7.5g, 3차 증류수 100ml를 200ml 용량의 삼각플라스크에 넣고 삼각플라스크의 입구를 알루미늄호일로 밀봉한 뒤 가압증기 멸균기에 넣고 121 $^{\circ}$ C, 2기압의 조건으로 15분간 멸균을 실시한다.
- 4) 멸균이 끝난 배지를 가압증기멸균기에서 꺼내어 냉각시킨 후 조류 배양 배지가 들어있는 200ml 용량의 삼각플라스크를 미리 알코올과 자외선램프로 멸균과 살균을 실시한 무균대(클린 벤치)로 옮기고, 준비된 4cm \times 4cm 크기의 페트리 접시에 2/3씩 부어 넣는다.
- 5) 페트리 접시에 조류 배양 배지가 아가로오스 겔 파우더에 의해 반 고체 상태로 굳게 되면, 페트리 접시의 뚜껑을 닫고 비닐 랩으로 5,10개 단위로 포장하여 사용 전 까지 냉장 보관한다.
- 6) 실험과정에서 아가로오스 겔 파우더 7.5g를 혼합하지 않고 멸균 과정을 실시하면, 광합성 세균을 액체 상태로 배양 할 수 있는 액체 조류 배양 배지를 제작할 수 있다.
- 7) 제작된 조류 배양용 배지에 녹조가 발생한 하천의 물을 100 μ l를 접종하고 액체 조류배양용 배지 3ml에 녹조가 발생한 하천의 물을 100 μ l를 접종하고 상온에서 일주일간 배양을 실시하면, 조류가 성장하는 것을 확인 할 수 있다.



8) 액체 배양배지에서 성장한 조류의 성장정도를 확인하기 위해, 조류가 성장한 배지 1ml를 채취하여 UV측광기에 넣고 663nm, 645nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 엽록소 a, b의 함량을 측정할 수 있으며 이는 광합성을 통해 영양분을 생성하는 조류의 특성을 통해 성장정도를 비교 분석 할 수 있다.

▼ 실험결과

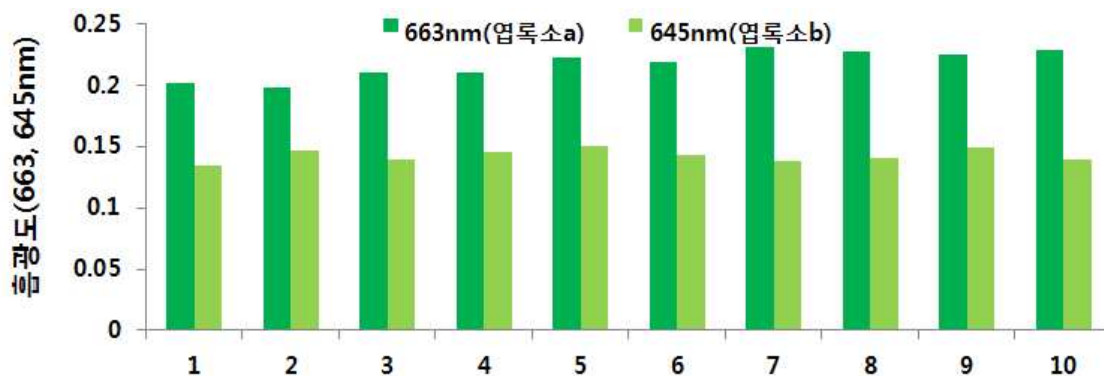


그림4) 강에서 성장하는 조류의 배양 결과

강에서 성장하는 조류(식물성 플랑크톤)가 제작한 성장배지에서 정상적으로 성장한다는 사실을 흡광도 측정 결과 확인 할 수 있었다. 이들도 식물과 같이 엽록소를 가지고 광합성을 통해 성장과 활동에 필요한 물질을 생산하며, 아울러 독소를 생산하는 것으로 알려져 있다. 실험결과 조류가 제작한 배지에서 정상적으로 성장하는 것을 식물과 같이 엽록소 함량을 측정한 결과 확인 할 수 있었다.

5> 산성비가 포함된 조건에서의 조류의 배양 및 수질오염의 변화

가설 : 산성비의 농도에 따라서 과연 조류의 성장에는 어떤 변화와 영향을 끼칠 것인가?

1) 참고 문헌 4를 참고하면, 산성조건에서 조류의 생장이 억제되었다고 한다. 산성비 1ml와 3차 증류수 9ml, 조류배양배지 10ml를 혼합하여 삼각 플라스크에 넣은 뒤, 파라핀 필름으로 입구를 밀봉하고 조류의 생장이 가능한 조건(24-30℃, 형광등 16시간이상)에서 일주일 간 조류를 성장시킨다.



2) 산성비와 3차 증류수의 비율을 1:9에서 9:1의 비율로 조절해 조류를 배양한다.

3) 일주일간 조류를 생장시킨 뒤 액체 배양배지에서 생장한 조류의 성장정도를 확인하기 위해, 조류가 생장한 배지 1ml를 채취하여 UV측광기에 넣고 663nm, 645nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 엽록소 a, b의 함량을 측정할 수 있으며 이는 광합성을 통해 영양분을 생성하는 조류의 특성을 통해 성장정도를 비교 분석 할 수 있다.

▼ 실험결과



그림4) 산성비와 혼합된 배양배지에서 생장한 조류

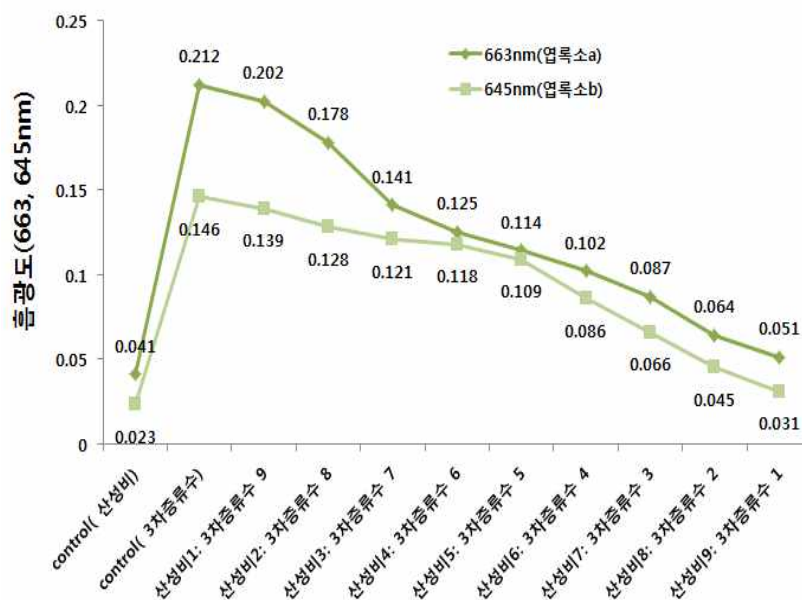


그림5) 산성비가 포함된 조건에서 생장한 조류의 흡광도 측정을 이용한 생장의 변화 확인

산성비와 3차 중류수를 9:1의 비율, 즉 산성비 9ml에 3차 중류수를 1ml를 혼합하여 조류배양 배지에 투여하고 강에서 생장하는 조류를 배양한 결과 엽록소 함량의 분석을 통해 산성비의 농도가 증가할수록 조류의 생장이 억제되는 것으로 확인 되었다.

6> 산성비 조건에서 생장한 조류가 만들어낸 물질의 독성 평가

1) 실험5>에서 생장한 조류와 조류가 배양 된 배양배지를 옮겨 넣은 뒤 원심분리기에 넣고 1분당 8000번의 회전속도로 원심분리를 실시하여 조류와 조류가 배양 된 배양배지를 분리한다.

2) 조류와 분리된 조류배양배지를 마이크로파이펫을 이용하여 채취 한 뒤 새로운 15ml 원뿔형 관(코니칼튜브)에 넣은 뒤 사용 전 까지 냉장 보관을 실시한다.

3) 산성비 조건에서 성장하지 않은 조류가 배양 된 배양배지를 1)~2)의 방법으로 조류와 분리 하여 채취한다.

4) 4cm × 4cm 크기의 소형 페트리 접시에 전자저울을 이용하여 완전히 건조시켜 수분이 제거 된 식물 재배용 토양 4g을 약수저를 이용하여 담는다.

5) 건조된 식물 재배용 토양이 4g이 들어있는 4cm × 4cm 크기의 소형 페트리 접시에 피펫에이드를 이용하여 3차 증류수 10ml를 5ml씩 두 번에 걸쳐 나누어 넣어 흡수시킨다. 실험군으로 산성비 조건에서 성장하지 않은 조류 배양배지 10ml, 조류가 배양 되지 않은 조류 배양배지 10ml, 산성비 조건에서 성장한 조류의 배양배지 10ml를 이용하여 실험을 실시한다.



6) 10분정도 지나 건조된 식물 재배용 토양에 3차 증류수, 산성비 조건에서 성장하지 않은 조류 배양배지 10ml, 조류가 배양 되지 않은 조류 배양배지 10ml, 산성비 조건에서 성장한 조류의 배양배지가 모두 흡수되면 핀셋을 이용하여 배추씨앗을 페트리 접시에 16개씩 심고 플라스틱 밀폐용기에 넣은 뒤 밀폐용기와 페트리 접시 사이에 피펫에이드를 이용하여 3차 증류수 10ml를 넣고 밀폐용기의 뚜껑을 닫아 밀봉하면 1주일 동안 배추가 토양에서 성장하면서 밀폐용기를 열고 수분을 공급하지 않아도 식물의 생장에 필요한 수분이 충분히 공급되므로 외부조건에 노출 시킬 필요가 없게 되어 정확한 실험을 실시 할 수 있는 조건이 된다.

7) 일주일간 상온에서 식물(배추)을 성장시키고, 실험용 가위와 핀셋을 이용하여 10개씩 잎을 채취한 뒤 1.5ml 마이크로튜브에 넣고 80% 에탄올을 마이크로파이펫을 이용하여 1ml를 넣어 식물의 잎에서 엽록소가 추출 되도록 한다.

8) 엽록소가 추출되면 측정 전 까지 냉장 보관한다.

9) 엽록소가 추출된 80%에탄올 용액 1ml를 채취하여 흡광도 측정용 큐벳에 넣은 뒤 UV측광기에 넣고 663nm ,645nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 엽록소a,b의 함량을 측정할 수 있으며, 이를 통해 식물의 생장의 비교가 가능하다.

10) 식물이 성장한 토양을 멸균된 약수저를 이용하여 0.1g을 채취하여 1.5ml 마이크로튜브에 넣은 뒤, 클린벤치로 옮겨 멸균된 3차 증류수를 마이크로파이펫을 이용하여 1ml를 넣는다. 멸균된

3차 증류수는 세균 배양배지를 제작하는 것과 같이 가압증기멸균기에 넣고 121℃, 2기압의 조건으로 15분간 멸균과정을 거쳐 미생물이 완전하게 제거된 멸균된 3차 증류수를 제작한다.

11) 토양이 들어있는 1.5ml 마이크로튜브를 전동혼합기를 이용하여 멸균된 3차 증류수와 토양을 잘 혼합한 뒤, 원심분리기에 넣고 1분간 6000번의 회전속도로 원심분리를 실시해 토양박테리아가 포함된 토양 상층액을 분리하고, 이들을 무균대(클린벤치)로 옮겨 토양 상층액을 마이크로파이펫을 이용하여 채취한 뒤, 새로운 1.5ml 마이크로튜브에 넣고 실험에 사용하기 전까지 저온 4℃에서 냉장 보관한다.

12) 15ml 원뿔형 관(코니칼튜브)에 NB배지 3ml를 넣고 토양 상층액을 5 μ l를 채취하여 접종한 후, 8℃에서 배양을 실시한다. 이 과정을 통해 토양에서 산소가 포함 된 조건에서 성장하는 호기성 토양박테리아를 배양 할 수 있다. 배양 과정에서 밀폐용 팩에 넣어 산소를 이산화탄소로 바꾸어주는 약품이 들어있는 팩을 넣고 토양박테리아가 배양된 NB배지를 넣고 밀봉한 뒤 배양을 실시하면 산소가 없는 조건에서 성장하는 혐기성 토양박테리아를 배양 할 수 있다.



13) NA배지의 경우 혐기, 호기조건에서 성장한 박테리아의 콜로니를 관찰하고, 액체 배양배지의 경우 1ml를 채취하여 흡광도 측정용 큐벳에 넣은 뒤 UV측광기에 넣고 630nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 혐기성, 호기성 토양박테리아의 성장을 비교 할 수 있다.

▼ 실험결과



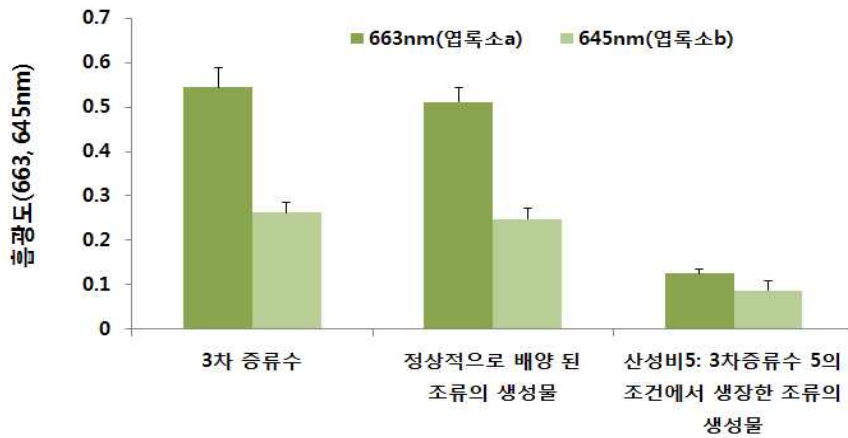


그림6) 산성비가 포함된 조건에서 성장한 조류의 독성 평가

조류의 경우 성장과정에서 여러 가지 독소를 생산해 내는데, 정상적으로 성장한 조류가 만들어 낸 물질을 투여한 결과 식물의 생장에 별다른 문제가 없다는 실험 결과이다. 대조적으로 산성비가 포함된 조건에서 성장한 조류가 발생한 물질을 투여한 결과, 식물의 생장이 심각하게 억제된 것을 실험을 통해 확인하였다.

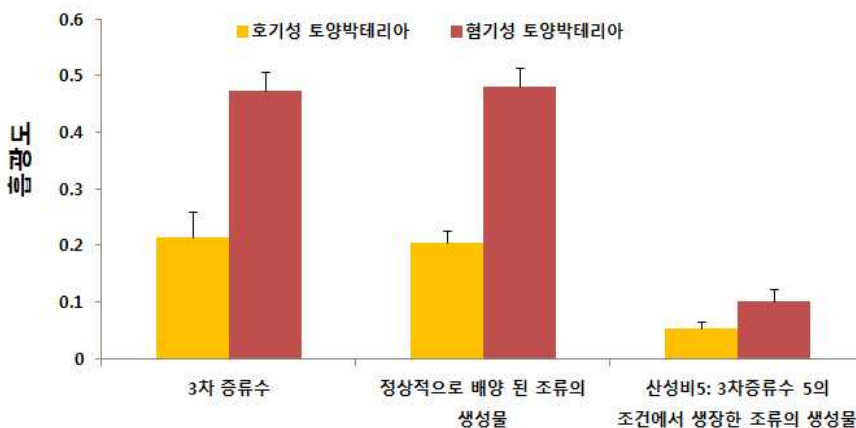


그림7) 산성비가 포함된 조건에서 성장한 조류의 독성 평가

산성비가 포함된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질을 토양에 투여한 결과는 혐기성 토양 박테리아가 크게 감소한 것으로 확인 되었는데, 이는 조류가 산성비조건에서 성장하게 되면 독성 물질 생산량이 크게 증가하는 것을 확인 할 수 있는 실험 결과이다. 본 실험결과는 매우 중요한 결과로, 강에 산성비가 유입되면 조류의 생장은 감소할지 몰라도, 그들이 생산하는 독소의 양은 크게 증가한다는 것을 입증한 실험결과라고 생각한다.

7> 당류(사카린, 글루코오즈, 수크로오즈, 프룩토오즈) 가 포함된 조건에서 조류의 성장변화

1) 참고문헌 7)을 참고하면, 조류의 배양 조건에 다양한 당을 첨가할 경우 조류의 성장과 생산

물질에 변화가 발생한다는 사실을 알 수 있었다. 이러한 사실을 바탕으로, 조류를 배양하는 배지 800 μ l에 각종 당류(0.1% 사카린, 글루코오즈, 수크로오즈, 프룩토오즈) 용액을 200 μ l를 혼합한다.

2) 세포배양용 페트리 접시(12개의 배양 구역이 나누어져 있는 페트리 접시)에 조류 배양을 위한 액체 배양배지 2ml를 넣고 배양 된 조류가 들어있는 액체 배양배지를 마이크로파이펫을 이용하여 100 μ l를 접종하고 상온에서 일주일간 배양을 실시하면, 조류가 성장하는 것을 확인 할 수 있다.



3) 액체 배양배지에서 성장한 조류의 성장정도를 확인하기 위해, 조류가 성장한 배지 1ml를 채취하여 UV측광기에 넣고 663nm, 645nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 엽록소 a, b의 함량을 측정할 수 있으며 이는 광합성을 통해 영양분을 생성하는 조류의 특성을 통해 성장정도를 비교 분석 할 수 있다.

▼ 실험결과

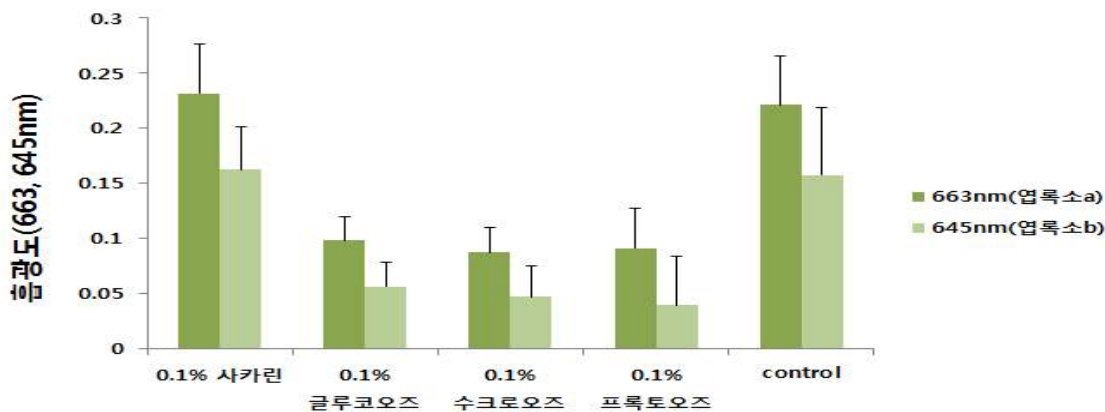


그림8) 당류가 포함 된 조건에서 성장한 조류의 생장의 변화

조류를 배양하는 배양배지에 사카린을 포함한 당류를 첨가하여 배양을 실시한 결과, 다른 당류의 경우는 생장이 억제 되었다. 하지만 0.1% 사카린을 투여한 경우 조류가 정상적으로 성장하는 것을 확인 할 수 있었다. 참고문헌을 참조하면, 조류는 성장과정에서 포함되는 물질에 따라 성장과 증식에 변화가 발생하며, 생산하는 물질도 다양하게 생산된다고 한다. 이러한 실험결과

는 사카린의 투여로 인해 조류의 성장과정과 독소를 포함한 생성물질이 변화했을 것으로 생각되는 실험결과이다.

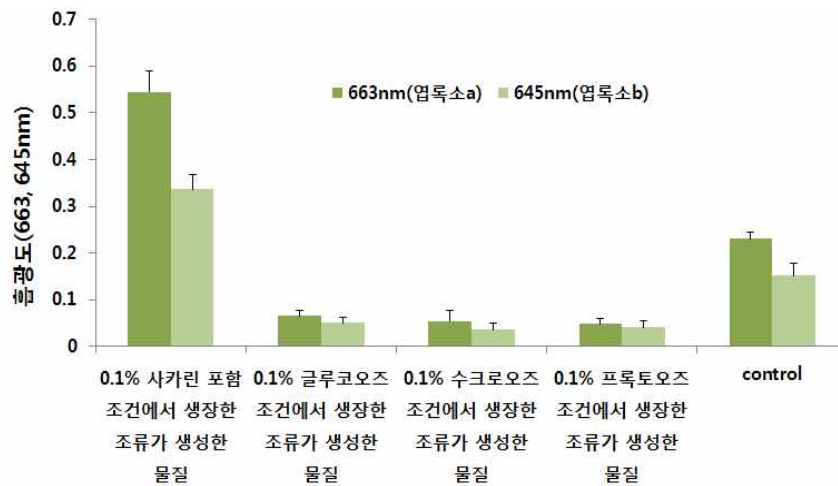


그림9) 당류가 포함 된 물질이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 생성한 물질이 조류의 성장에 미치는 영향

당류가 포함된 배지에서 성장한 조류가 생성한 물질을 실험을 통해 분리하고, 이들을 조류가 성장하는 과정에서 투여한 결과 사카린이 포함된 배지에서 성장한 조류가 생성한 물질이 조류의 성장을 가속화 시키는 것으로 확인 되었다. 이는 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류는 스스로의 성장을 촉진하는 물질을 생산하고 분비하는 것으로 생각된다.

8> 당류가 포함된 조건에서 성장한 조류의 성장촉진 물질의 분리 및 산성비 조건에서 성장하는 조류의 성장에 미치는 영향

1) 당류가 포함된 조건에서 성장한 조류의 배양액을 0.2 μ m크기의 필터로 걸러내어 마이크로파이펫을 이용하여 1.5ml 마이크로튜브로 옮긴다. 무균대(클린벤치)에서 실험을 실시한다.



2) 당류가 포함된 조건에서 성장한 조류가 있는 마이크로튜브를 원심분리를 실시하여 조류와 조류가 성장한 물질이 포함 된 용액을 분리하고, 조류가 배양한 물질이 포함 된 토양 상층액을 마이크로파이펫을 이용하여 새로운 1.5ml 마이크로튜브로 옮겨 넣는다.

- 3) 세포배양용 페트리 접시에 조류 배양을 위한 액체 배양배지를 넣고 배양 된 조류가 들어있는 액체 배양배지를 100 μ l를 접종, 채취하여 냉장 보관 중인 산성비를 접종, 배양한다.
- 4) 일주일간 조류를 성장시킨 뒤 액체 배양배지에서 성장한 조류의 성장정도를 확인하기 위해, 조류가 성장한 배지 1ml를 채취하여 UV측광기에 넣고 663nm, 645nm의 파장으로 흡광도를 측정하면 엽록소 a, b의 함량을 측정할 수 있으며 이는 광합성을 통해 영양분을 생성하는 조류의 특성을 통해 성장정도를 비교 분석 할 수 있다.
- 5) 산성비 조건에서 성장한 조류가 배양 된 배지가 포함된 배양배지를 마이크로튜브로 옮긴다.
- 6) 산성비 조건에서 성장한 조류만 있는 마이크로튜브에 새 조류 배양배지를 넣고 혼합한다.
- 7) 6)의 조류를 세포배양용 페트리 접시(12개의 배양 구역이 나누어져 있는 페트리 접시)에 100 μ l를 접종한 뒤, 당류가 포함된 조건에서 성장하는 조류가 만들어낸 물질이 포함된 용액을 100 μ l를 접종하여 혼합 한 뒤, 조류배양 배지를 800 μ l를 혼합하고 조류를 배양한다.
- 8) 일주일간 조류를 성장시킨 뒤 액체 배양배지에서 성장한 조류의 성장정도를 확인하기 위해, 조류가 성장한 배지를 채취하여 흡광도를 측정하면 엽록소 a, b의 함량을 측정할 수 있으며 이는 광합성을 통해 영양분을 생성하는 조류의 특성을 통해 성장정도를 비교 분석 할 수 있다.
- 9) 8)의 조류가 든 마이크로튜브를 원심분리를 실시하여 조류와 조류가 성장한 물질이 포함 된 용액을 분리하고, 조류가 배양한 물질이 포함된 토양 상층액을 새 마이크로튜브에 넣는다.
- 10) 실험 6)을 참조하여 조류의 독성물질 생성 정도를 파악한다.

▼ 실험결과

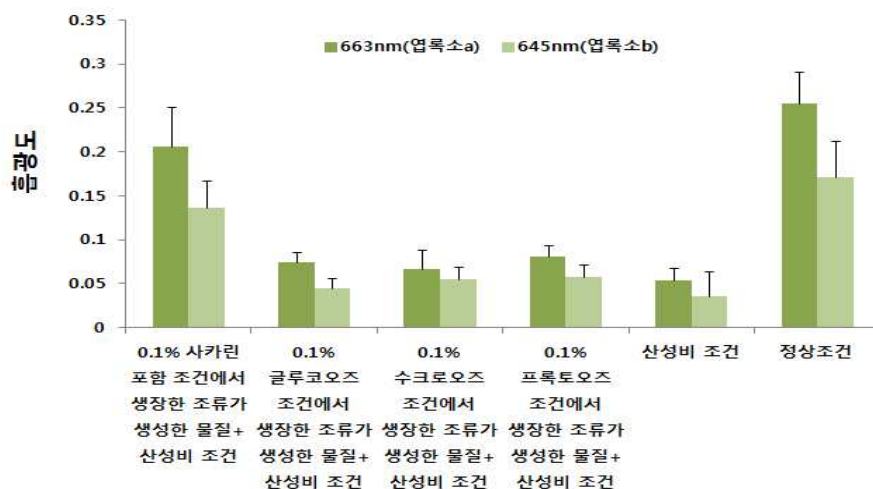


그림10) 산성비가 포함 된 조건에 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질을 투여 한 경우 조류의 성장변화

0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질을 산성비가 포함 된 조건에서 성장하는 조류의 배양 과정에 투여한 결과 조류의 생장이 회복되는 것으로 파악되었다.

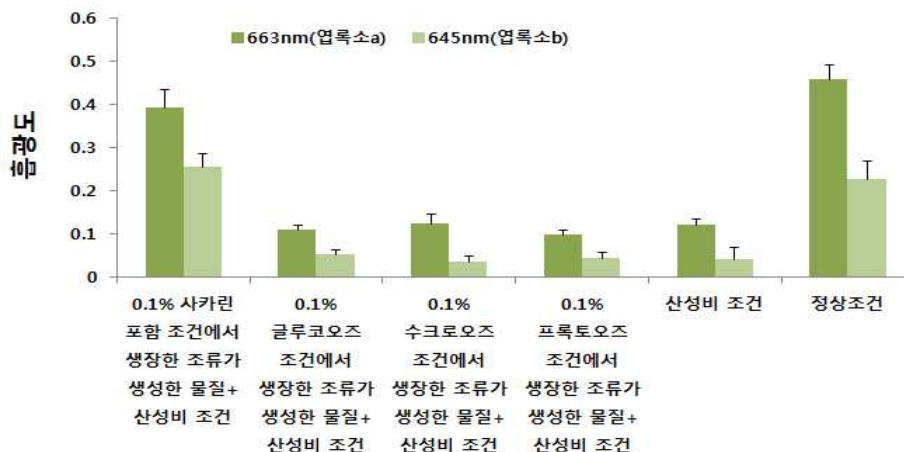


그림11) 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질이 포함된 산성비 조건에서 성장한 조류가 생성한 물질이 식물의 생장에 미치는 영향

0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질이 포함된 산성비 조건에서 성장한 조류가 생성한 물질이 투여된 경우 식물이 정상적인 조건에는 미치지 못했다. 하지만 엽록소의 함량이 회복되는 것을 확인하였다. 이는 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질의 영향으로 조류의 성장과정이 회복되면서 독성물질의 생산이 줄어든 것으로 생각되는 실험결과이다. 참고 문헌에서도 조류가 생장이 억제되는 조건이나 생장에 악조건에 도달하면 독성물질의 생산이 증가한다고 언급하였다. 산성비는 조류의 성장을 억제하고 독성물질의 생성을 촉진하는 역할을 한다. 하지만 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질에는 조류의 성장을 촉진 시키는 물질이 포함 되어 있으며, 이는 산성비조건에서 조류의 성장을 회복시켜 독성물질의 생산을 억제하는 것으로 생각된다.

4. 알게 된 점과 느낀 점

나의 궁금증이었던 녹조류가 생기는 이유를 스스로 생각하여 탐구하고 실험하면서 깨닫게 되었다. 환경의 중요성과 의문점들이 잘 해결된 것 같다.

1. 먼저 첫 번째로 실험한 채집한 빗물을 pH측정용 종이에 한 방울 떨어뜨린 뒤 pH의 확인을 통해 산성비임을 확인하고 3차 증류수를 pH종이에 떨어뜨린 것을 비교해 보았다. 이 실험을 통해 산성비가 일반적인 3차 증류수와 비교하여 산도가 낮은, 산성비임을 확인 할 수 있었다.

2. 산성비 조건에서의 식물의 성장변화를 관찰한 결과 산성비가 투여 된 토양에서 성장한 식물의 경우 엽록소 a, b의 함량을 비교한 결과 산성비가 투여된 조건에서 정상 조건에서 성장한

식물의 약 70%정도만 포함하고 있는 것으로 실험결과 확인 되었다. 이는 산성비 조건하에서 식물이 정상적으로 성장하지 못한다는 사실이다.

3. 산성비 조건에서의 식물이 성장한 토양의 혐기성, 호기성 토양박테리아의 성장변화를 관찰한 결과 식물이 정상적으로 성장하는 것처럼 보이지만 엽록소의 함량이 감소한 것을 확인하였다. 산성비 조건에서 토양의 혐기성 박테리아의 수가 크게 감소하였고, 종류도 크게 감소하였다. 이는 산성비의 영향으로 토양의 혐기성 박테리아가 성장에 커다란 문제가 생긴다는 사실을 알게 되었다. 토양에 존재하는 혐기성 토양박테리아에는 질소성분의 순환을 담당하는 질소고정 박테리아와 유기물의 분해를 담당하는 중요한 토양 박테리아들이 존재하는데, 이들이 크게 감소했다는 사실은 식물에게 필수조건인 여러 무기물들을 공급 할 수 없다는 사실이다. 즉 산성비가 투여 되면 토양의 혐기성 토양박테리아의 수가 크게 감소하고, 이로 인해 식물의 성장에 문제가 발생한다는 사실을 실험을 통해 확인하였다.

4. 다음으로 확인해 본 강에서 성장하는 조류의 배양은 결과가 아주 신기했다. 강에서 성장하는 조류(식물성 플랑크톤)가 제작한 성장배지에서 정상적으로 성장한다는 사실을 흡광도 측정결과 확인 할 수 있었다. 이들도 식물과 같이 엽록소를 가지고 광합성을 통해 성장과 활동에 필요한 물질을 생산하며, 아울러 독소를 생산하는 것으로 알려져 있다. 실험결과 조류가 제작한 배지에서 정상적으로 성장하는 것을 식물과 같이 엽록소 함량을 측정한 결과 확인 할 수 있었다.

5. 산성비가 포함된 조건에서의 조류의 배양 및 수질이 얼마나 오염되었는지 관찰해 보았다. 산성비와 3차 증류수를 9:1의 비율, 즉 산성비 9ml에 3차 증류수를 1ml를 혼합하여 조류배양 배지에 투여하고 강에서 성장하는 조류를 배양한 결과 엽록소 함량의 분석을 통해 산성비의 농도가 증가할수록 조류의 생장이 억제되는 것으로 확인 되었다.

6. 산성비 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질의 독성을 평가해 보았다. 조류의 경우 성장과정에서 여러 독소를 생산해 내는데, 정상적 성장한 조류가 만들어낸 물질을 투여하니 식물의 성장에는 별 문제가 없다는 실험 결과이다. 대조적으로 산성비가 포함된 조건에서 성장한 조류가 발생한 물질을 투여한 결과, 식물의 생장이 심각하게 억제된 것을 실험을 통해 확인하였다.

7. 당류(사카린, 글루코오스, 수크로오스, 프룩토오스)가 포함된 조건에서 조류의 성장변화를 관찰해보았다. 조류를 배양하는 배양배지에 사카린을 포함한 당류를 첨가하여 배양을 실시한 결과, 다른 당류의 경우는 생장이 억제 되었다. 하지만 0.1% 사카린을 투여한 경우 조류가 정상적으로 성장하는 것을 확인 할 수 있었다. 참고문헌을 참조하면, 조류는 성장과정에서 포함되는 물질에 따라 성장과 증식에 변화가 발생하며, 생산하는 물질도 다양하게 생산된다고 한다. 이러한 실험결과는 사카린의 투여로 인해 조류의 성장과정과 독소를 포함한 생성물질이 변화했을 것으로 생각되는 실험결과이다.

8. 마지막으로 당류가 포함된 조건에서 성장한 조류의 성장촉진 물질의 분리를 하고 산성비 조

건에서 성장하는 조류의 생장에 미치는 영향을 확인해보았다. 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질을 산성비가 포함 된 조건에서 성장하는 조류의 배양 과정에 투여한 결과 조류의 생장이 회복되는 것으로 파악되었다. 또, 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질이 포함된 산성비 조건에서 성장한 조류가 생성한 물질이 투여된 경우 식물이 정상적인 조건에는 미치지 못했다. 하지만 엽록소의 함량이 회복되는 것을 확인하였다. 이는 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질의 영향으로 조류의 성장과정이 회복되면서 독성물질의 생산이 줄어든 것으로 생각되는 실험결과이다. 참고 문헌에서도 조류가 생장이 억제되는 조건이나 생장에 악조건에 도달하면 독성물질의 생산이 증가한다고 언급하였다. 산성비는 조류의 성장을 억제하고 독성물질의 생성을 촉진하는 역할을 한다. 하지만 0.1% 사카린이 포함 된 조건에서 성장한 조류가 만들어낸 물질에는 조류의 성장을 촉진 시키는 물질이 포함 되어 있으며, 이는 산성비조건에서 조류의 성장을 회복시켜 독성물질의 생산을 억제하는 것으로 생각된다.

이 실험을 통해 느낀 점은 우리의 강과 호수가 환경오염으로 위협해 지고 있다. 특히 녹조로 인해 산소를 찾기 위해 물위로 떠돌아다니는 물고기나 동식물들이 힘겨워 하고 있다. 환경을 안전하게 보호하고 해결 할 수 있는 방안을 하루 빨리 찾아야 한다. 아직까지 과학자들은 원인까지 밖에 생각해 보지 못했지만 나는 그 다음의 해결과제를 한 번 더 생각하는 계기가 되었다. 나의 이 해결방안이 얼마나 많은 회복을 가져 올 수 있을지는 모르지만 0.1%의 사카린을 포함시키면 조류의 생장이 거의 모두 회복되지 않을까 하는 희망적인 생각이 든다.

5. 참고문헌

1) 네이버, 다음, 구글

2) 유용 미세조류의 배양과 응용 허성범 지음 라이프사이언스 펴냄 | 2006.07.30.

3) 미세조류의 경이로운 세계와 산업적 이용 윤양호 김종덕 외 1 명 지음
전남대학교 출판부 펴냄 | 2012 .02. 20

4) 광합성 미세조류 *Nannochloropsis oculata*의 최적배양 조건

박현진 (신라대학교 공과대학 생명공학과), 진은정 (신라대학교 공과대학 생명공학과), 정태만 (에이엠 바이오(주)), 주현 (인제대학교 생리학교실), 이재화 (신라대학교 공과대학 생명공학과)

공업화학 = Applied chemistry for engineering v.21 no.6 ,pp. 659 - 663 , 2010 , 1225-0112

5) 환경미생물학 안태석, 안승구 외 3 명 지음 신광문화사 펴냄 | 2007.09.10

6) 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산: 다양한 배양기술을 이용한 미세조류 생장 및 지질 축적의 최적화- 김근호 (조선대학교 대학원) 2017 , XIV, 250p, 조선대학교 대학원 , 국내박사

7) 유가식 배양에서 배양조건에 따른 *Chlorella minutissima*의 생육 및 지질생산

오성호 (강원대학교 BT특성화학부대학), 한재건 (강원대학교 BT특성화학부대학), 김나영 (강원대학교 공과대학), 조정섭 (두산에코 비즈넷), 임태빈 (두산에코 비즈넷), 이신영 (강원대학교 공과대학), 이현용 (강원대학교 BT특성화학부대학)

KSBB Journal v.24 no.4, pp. 377 - 382 , 2009 , 1225-7117