

불량매립지 안정화 지표 개발을 위한 분자생물학적 기술의 적용

박현아 · 한지선 · 김창균[†] · 이진용*

인하대학교 환경공학과 · *지오그린21

(2005년 12월 20일 접수, 2006년 1월 26일 채택)

Application of Molecular Biological Technique for Development of Stability Indicator in Uncontrolled Landfill

Hyun-A Park · Ji-Sun Han · Chang-Gyun Kim[†] · Jin-Young Lee*

Department of Environmental Engineering, Inha University · *GeoGreen 21 Co., Ltd.

ABSTRACT : This study was conducted for developing the stability parameter in uncontrolled landfill by using a biomolecular investigation on the microbial community growing through leachate plume. Landfill J(which is in Cheonan) and landfill T(which is in Wonju) were chosen for this study among a total of 244 closed uncontrolled landfills. It addressed the genetic diversity of the microbial community in the leachate by 16S rDNA gene cloning using PCR and compared quantitative analysis of denitrifiers and methanotrophs with the conventional water quality parameters. From the BLAST search, genes of 47.6% in landfill J, and 32.5% in landfill T, respectively, showed more than 97% of the similarity where Proteobacteria phylum was most significantly observed. It showed that the numbers of denitrification genes, i.e. *nirS* gene and *cnorB* gene in the J site are 7 and 4 times higher than those in T site, which is well reflecting from a difference of site closure showing 7 and 13 years after being closed, respectively. In addition, the quantitative analysis on methane formation gene showed that J1 spot immediately bordering with the sources has the greatest number of methane formation bacteria, and it was decreased rapidly according to distribute toward the outer boundary of landfill. The comparative investigation between the number of genes, i.e. *nirS* gene, *cnorB* gene and MCR gene, and the conventional monitoring parameters, i.e. TOC, NH₃-N, NO₃-N, NO₂-N, Cl⁻, alkalinity, addressed that more than 99% of the correlation was observed except for the NO₃-N. It was concluded that biomolecular investigation was well consistent with the conventional monitoring parameters to interpret their influences and stability made by leachate plume formed in downgradient around the uncontrolled sites.

Key Words : 16S rDNA, Real-Time PCR, Landfill

요약 : 본 연구에서는 분자생물학적인 방법을 이용하여 침출수 내의 미생물 군집 분석을 통한 매립지의 안정화 정도를 평가하는 기술을 개발하고자 하였다. 국내 사용종료매립지 중 정밀조사대상매립지 244개소를 대상으로 기초자료 조사 및 현장답사를 통해 천안 J 매립지와 원주 T 매립지를 연구대상 매립지로 선정하였다. 각 매립지의 침출수 시료에서 genomic DNA를 추출한 후 PCR을 이용한 16S rDNA 클로닝 과정을 거쳐 매립지 침출수 내에 분포하는 미생물 군집의 유전적 다양성을 확인하였다. 또한 탈질화 및 메탄생성 유전자를 대상으로 competitive PCR과 Real-Time PCR을 이용한 미생물 정량을 실시하여 오염인자와의 상관관계를 확인하였다. 분석된 DNA sequence를 BLAST search한 결과 97% 이상 유사성을 보이는 근연종은 J 매립지, T 매립지 각각 47.6%, 32.5%로 나타났으며 이 중 Proteobacteria phylum이 가장 많이 분포하는 것으로 나타났다. 탈질화 유전자 정량 결과 매립종료 후 경과기간이 13년인 T 매립지에 비해 7년인 J 매립지에서 *nirS* gene, *cnorB* gene이 각각 약 7배, 4배 정도 많이 분포하고 있는 것으로 확인되었다. 또한 메탄생성 유전자 정량 결과 J 매립지 내부 침출수(J1)에서 가장 많이 분포하고 있는 것으로 나타났으며, 매립지에서 지하수 흐름 방향으로 멀어질수록 미생물 개체수가 급격히 감소함을 확인하였다. *nirS* gene, *cnorB* gene 및 MCR gene의 개체수와 TOC, NH₃-N, NO₃-N, NO₂-N, Cl⁻, alkalinity에 대한 비교 분석결과 NO₃-N을 제외하고 최대 99% 이상의 높은 상관관계를 보였다. 불량매립지로부터 침출수의 유출에 의한 경계 영역 주변에 대한 분자생태학적 영향평가 결과 종래 대표적인 수질평가 분석 항목과의 상관관계가 매우 높게 관측되어 분자생물학적 기술을 영향력 설정 및 안정화 지표로서 충분히 활용할 수 있음을 확인하였다.

주제어 : 16S rDNA, Real-Time PCR, 매립지

1. 서론

인구의 증가와 급속한 산업화에 의한 환경오염 문제는 국

가차원을 벗어나 세계적인 문제로 대두되고 있다. 특히 폐기물 처리 및 오염정화에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 매립지의 경우 자연정화에 대부분을 의지하고 있음에도 불구하고 자연정화의 주역인 미생물에 대한 연구 및 가치 평가가 미진한 수준에 있다.

최근 사용종료매립지 실태 조사 결과에 의하면 1986년 폐

† Corresponding author
E-mail: cgk@inha.ac.kr
Tel: 032-860-7561

Fax: 032-865-1425

기물관리법 제정 이전부터 단순 투기식으로 매립되어 사용이 종료된 매립지는 약 1,170개소에 이르는 것으로 조사되었다.^{1,2)} 이 중 침출수를 처리하고 있는 사용종료매립지는 232개소 정도이며, 대부분의 매립지가 침출수 차수, 집수 및 처리시설, 매립가스 포집 및 처리시설 등 환경오염방지시설을 제대로 갖추지 못한 불량매립지인 것으로 알려져 있다.³⁾ 이러한 불량매립지에서 발생된 침출수는 별다른 처리없이 지하수, 하천 및 호소 등으로 유출되어 심각한 수질오염 및 토양오염을 지속적으로 유발하고 있다.

매립지 침출수에 의한 주변 지역의 오염 영향에 대한 기존의 연구동향을 살펴보면 매립폐기물의 성분 분석, 침출수 수질 분석 및 물리화학적 지표를 이용한 다양한 분석 방법들이 연구되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 그러나 이와 같은 기술들은 오염원의 개략적인 거동은 파악할 수 있지만, 오염물질이 주변 생태계에 미치는 직접적인 영향을 파악하기에는 한계가 있다.

기존의 미생물 군집을 해석하는 방법은 자연상태에 존재하는 미생물을 반복적인 분리와 선택적 배양을 통해 순수배양 (pure culture)하는 것이었으나, 자연 서식지에 분포하는 미생물 중 순수배양 되는 미생물의 종류는 지극히 제한적이며 자연에서 매우 중요한 활성을 가지는 미생물의 대부분은 순수배양 되지 않는 난배양성 미생물로 알려져 있다.⁷⁾ 결국 반복적인 분리와 배양을 통한 미생물 분석은 미생물 군집의 초기 특성을 변화시킬 수 있으며, 또한 배양 가능한 특정 미생물이 매립지 생태계를 대표한다고 보기 어렵다.⁸⁾

따라서 본 연구에서는 선택적 배양 없이 매립지 생태계에 존재하는 미생물의 유전체(genomic DNA)를 추출하여 PCR을 이용한 16S rDNA 유전자의 염기서열을 분석하는 분자생물학적 기술을 이용하여 매립지 주변 생태계에 존재하는 미생물의 다양성을 확인하였다. 또한 Real-Time PCR을 이용

Table 1. Comparison of landfill status

Landfills	J Landfill	T Landfill
Location	Cheonan	Wonju
Period of landfilling	1991 - Dec., 1998 (about 7 years)	May, 1982 - Aug., 1995 (about 13 years)
Landfill type	General landfilling	Valley landfilling
Landfilling volume	41,000 m ³	322,000 m ³
Landfilling areas	6,000 m ²	81,000 m ²
Landfilling depth	about 4 m	about 50 m
Waste type	Household wastes	Household wastes

하여 탈질화 및 메탄생성 유전자를 정량하고, 수질인자와의 상관분석 통해 매립지 안정화정도 모니터링 인자로서 미생물 지표를 개발하고자 하였다.

2. 실험방법

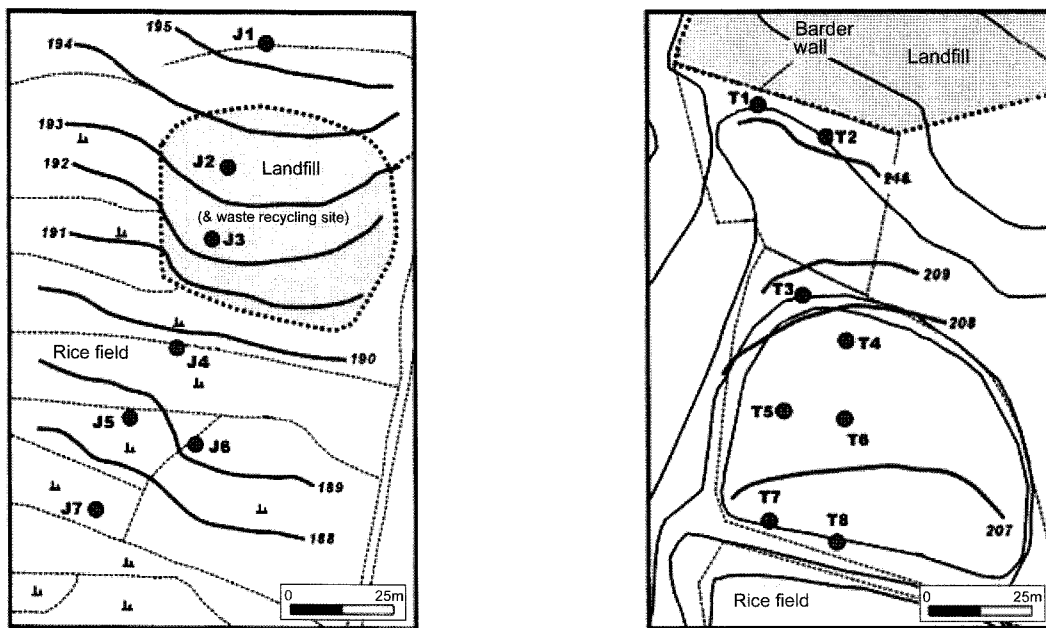
2.1. 연구대상매립지 선정

본 연구에 적합한 매립지 선정을 위해 국내의 사용종료매립지 1,170개소 중 정밀조사 대상매립지로 선정된 244개소에 대한 기초자료 조사 및 현장 답사를 통하여 매립지 2개소 (천안 J 매립지, 원주 T 매립지)를 선정하였다.^{1,2)} 선정된 연구대상매립지에 대한 기본적 현황을 Table 1에 나타내었다.

2.2. 미생물 군집 분석

2.2.1. 매립지 침출수 시료 채취

매립지 침출수 내 미생물의 군집 분석을 위해 폐기물 매립 지역을 기준으로 지하수 흐름 방향으로 100 m 이내에 설치



(a) Cheonan J landfill

(b) Wonju T landfill

Fig. 1. Locations of monitoring wells in landfills.

된 각각 7개(J 매립지)와 8개(T 매립지)의 관측정(지름 2 in)에서 침출수 시료를 채취하였다. 침출수 시료 채취는 각 관측정에서 bailer(Cole-Parmer, USA)를 사용하여 멸균된 1 L 채수병에 head space가 없도록 채수하여 밀봉한 후 4℃ 이하의 냉온 상태로 실험 전까지 보관하였다. 각 매립지의 관측정의 위치를 Fig. 1에 나타내었다.

2.2.2. 16S rDNA cloning

채취된 시료 중 200 mL를 3,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리(HA-1000-3, Hanil Science)하였다. 분리된 농축액 약 500 mg에 FastDNA® SPIN kit(Bio101 system, Q-Bio gene)를 사용하여 FastPrep® Instrument(Q-Bio gene) speed 4에서 5초 동안 bead beating을 한 후 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA를 주형으로 중합연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 실시하였다. 일반 균종을 분석하기 위하여 universal primer 27F와 1492R을 이용하여 16S rDNA를 증폭하였다.⁹⁾ PCR 증폭 산물을 100 mV에서 30분 동안 전기영동(Mupid-a, Japan)을 하여 겔 상에 나타난 16S rDNA 부분을 분리한 후 Winzard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA)을 사용하여 정제하였다. 정제된 16S rDNA PCR 산물을 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 ligation 한 후 competent cell(E.coli XL1-blue)에 형질전환(Transformation)하여 Ampicillin, X-gal/IPTG(Promega, USA)가 처리된 LB(Luria-Bertani) 고체배지에서 선택배양 한 후 Winzard® Plus Minipreps DNA Purification System(Promega, USA)을 사용하여 plasmid를 정제하였다.

2.2.3. 16S rDNA sequencing을 통한 미생물 계통 분석

정제된 plasmid에 대한 염기서열을 분석(3100 Capillary DNA sequencer, Applied Biosystems)한 후 분석된 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 BLAST Network Service를 이용하여 Genebank database 내의 bacterial 16S rDNA sequence와 비교하여 97% 이상의 유사성을 보이는 근연종을 기준으로 시료 중 존재하는 미생물 종류를 분류하였다.

2.3. 탈질 및 메탄 생성 유전자 정량

탈질화 각 단계에 관여하는 효소를 발현하는 유전자를 대상으로 정량을 실시하였다. 탈질화 단계 중 NO₃²⁻에서 NO₂⁻로 환원되는 과정에 관여하는 nitrate reductase는 탈질화 과정뿐만 아니라 질소호흡과정에도 관여한다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 따라서 본 연구에서는 실질적으로 탈질화에 관여하는 NO₂⁻를 NO로 환원시키는 효소인 nitrite reductase를 발현하는 *nirS* gene¹¹⁾과 NO를 N₂O로 환원시키는 nitric oxide reductase 효소를 발현하는 *cnorB* gene, N₂O를 N₂로 환원시키는 nitrous oxide reductase 효소를 발현하는 *nosZ* gene을 Competitive PCR 및 Real-Time PCR 이용하여 정량하였다. *nirS* gene 정량을 위한 primer는 Liu 등¹²⁾이 제안한 것을 적용하였고, *cnorB* gene 정량을 위한 primer는 Baker 등¹³⁾이 제안한 것, *nosZ* gene

을 증폭하기 위해 Scals 등¹⁴⁾이 제안한 것을 이용하였다.

메탄 생성 유전자 정량을 위해서 메탄 생성 기작의 마지막 단계를 촉매하는 methyl coenzyme M reductase(MCR gene) 발현 유전자 증폭을 위한 primer 및 PCR 조건은 Hales 등¹⁵⁾의 방법을 적용하였다.

2.3.1. Competitive PCR을 이용한 정량

Competitive PCR은 ‘competitor DNA’라고 하는 절대적 copy number를 알고 있는 DNA 단편과 정량을 목적으로 하는 target DNA를 비교해서 target DNA의 copy number를 추정하는 방법이다.¹⁶⁾ Competitor DNA는 Competitive DNA Construction kit(TaKaRa, Japan)를 사용하여 제작하였고, competitor DNA 제작에 사용된 primer sequence는 Table 2에 나타내었다.

2.3.2. Real-Time PCR을 이용한 정량

Real-Time PCR 반응은 master mix로 제조된 iQ SYBR Green Supermix(2X, BioRad, USA)를 사용하여 증폭하였다. 정량 목적 DNA가 PCR에 의해 증폭되는 동안 DNA 이중나선에 특이적으로 결합하는 SYBR Green I dye의 형광 신호를 측정하기 위해 iCyber iQ Real-Time Detection System(Bio-Rad, USA)을 사용하였다. 각 gene에 대한 특이적인 DNA의 절대적 정량을 위한 standard curve 작성을 위해 *nirS* gene, *cnorB* gene, *nosZ* gene 및 MCR gene PCR product를 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 삽입하고 competent cell을 이용하여 다량으로 cloning하였다. Spectrophotometer(HP-agilent 8453)를 이용하여 각각의 gene에 대한 plasmid vector의 농도를 측정 한 후 각 gene의 농도에 따른 copy number를 식 (1)과 같이 산정하였다. 한편 멸균된 증류수를 이용하여 각 gene에 대한 copy 수를 5.0*10²~5.0*10⁶ 범위로 희석하여 검량선을 작성하였다. 이 검량선을 이용하여 시료 중 각 gene의 농도를 copy수 기준으로 환산하여 정량하였다.

$$Copies / \mu l = \frac{O.D._{260} * 50ng / \mu l * 10^{-9} * (6 * 10^{23})}{bp * 660} \quad (1)$$

Table 2. Sequence of primer for competitor DNA construction

	Competitor DNA construction primer(5'-3')	Product size
c-nirS-F	TAC CAC CCC GAG CCG CGC GTG TAC GGT CAT CAT CTG ACA C	600 bp
c-nirS-R	AGK CGT TGA ACT TKC CGG TCG GGA ATT GGT AAC ACC ATC GAT	
c-cnorb-F	GAC AAG NNN TAC TGG TGG TGT ACG GTC ATC ATC TGA CAC	304 bp
c-cnorb-R	GAA NCC CCA NAC NCC NGC GCA CTG GTG ACC TGG AAG AG	
H = A+T+C, K = G+T		

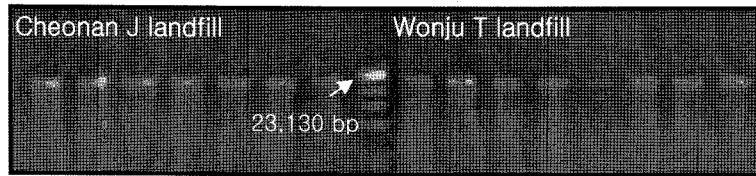


Fig. 2. Extracted genomic DNA from landfill leachate.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물 군집 분석 결과

매립지에서 채취된 침출수를 원심분리하여 얻은 농축 고형물에서 FastDNA[®] SPIN kit(Bio101 system, Q-Bio gene)를 사용하여 bead beating의 강도를 speed 5.5에서 실시한 결과 추출된 genomic DNA가 많이 손상되었다. 재 실험에서 bead beating의 강도를 speed 4로 낮추어 추출한 결과, 보다 순도가 높은 genomic DNA를 추출해낼 수 있었다. 추출된 genomic DNA를 전기영동 겔 상에서 확인한 결과를 Fig. 2에 나타내었고, 크기는 약 23,000 bp로 확인되었다.

증폭된 16S rDNA 유전자를 정제하여 pGEM-T easy vector에 삽입한 후 다시 plasmid를 회수 정제하여 DNA의 염기서열을 분석하였다. J 매립지의 경우 cloning한 DNA 중 sequence가 분석된 것을 BLAST search한 결과 47.6%가 근연종을 확인할 수 있었고, 그 중 53.1%는 난배양성 미생물, 46.9%는 배양성 미생물로 확인되었다. 배양성 미생물 중 Proteobacteria phylum이 53.1%로 가장 많이 분포하였고, Actinobacteria, Flavobacteria, Lactobacillales 등이 분포하는 것으로 확인되었다. T 매립지의 경우 cloning한 DNA 중 sequence가 분석된 것을 BLAST search한 결과 32.5%가 근연종을 확인할 수 있었고, 그 중 85.2%는 난배양성 미생물, 14.8%는 배양성 미생물로 확인되었다. 또한 J 매립지와 마찬가지로 배양성 미생물 중 Proteobacteria phylum이 22.2%로 가장 많이 분포하였고, Actinobacteria, Flavobacteria 등이 분포하는 것으로 확인되었다. 즉, 매립지와 같은 자연환경에는 기존의 순수배양을 통해서 확인할 수 없었던 난배양성 미생물이 더욱 많이 분포하고 있음을 확인하였다. 또한 BLAST search 결과에서 약 59% 정도는 근연종을 확인할 수 없었는데, 이것은 기존에 동정되지 않은 난배양성의 새로운 미생물 종일 가능성이 높다고 사료된다. 이러한 결과를 토대로 전체적으로 J 매립지와 T 매립지에는 각각 78%, 95%의 난배양성 미생물이 분포하고 있다고 사료된다.

3.2. Competitive PCR을 이용한 정량 결과

Competitive PCR을 이용한 *nirS* gene 및 *cnorB* gene의 정량을 위해 competitor DNA를 제작하였다. PCR 산물의 크기가 800 bp인 *nirS* gene의 competitor DNA는 600 bp로 제작하였고, 크기가 380 bp인 *cnorB* gene의 competitor DNA는 304 bp로 제작하였다. 제작된 competitor DNA의 크기를 전기영동으로 확인한 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

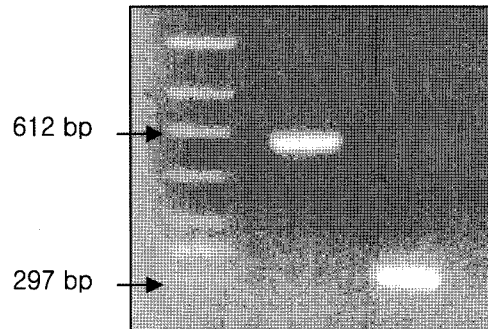


Fig. 3. Competitor DNA ; *nirS* gene(left), *cnorB* gene(right).

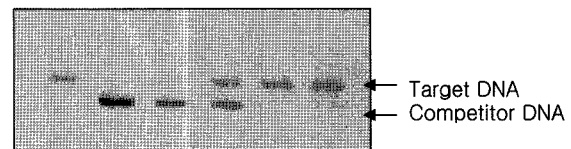


Fig. 4. Target DNA and competitor DNA by competitive PCR.

매립지 침출수에서 추출한 genomic DNA 중에서 정량을 위한 *nirS* gene과 절대적 양을 알고 있는 competitor DNA를 혼합하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 결과 시료에서 추출된 genomic DNA 내에는 다양한 종류의 DNA가 혼합되어 있어서, competitor DNA와 비교하여 *nirS* gene을 정량하는 것이 불가능하였다. 그 원인을 분석하기 위하여 Competitor DNA를 10배, 100배, 1000배 희석해서 PCR 반응시킨 결과 target DNA가 증폭되지 않음을 확인하였다. 따라서 다시 competitor DNA의 희석 배율을 각각 10^5 배, 5×10^5 배, 10^6 배, 5×10^6 배, 10^7 배로 증가시켜 PCR 반응을 수행한 결과 Fig. 4와 같은 결과를 얻었다.

Spectrophotometer(HP-agilent 8453)를 사용하여 260 nm에서 O.D.(optical density)값을 측정하여 식 (1)에 의해 copy number를 계산한 결과 competitor DNA의 copy number는 1.2×10^{10} copies/ μ L이었다.

Fig. 4에 나타난 것과 같이 competitive PCR 결과를 전기영동 겔 상에서 확인할 수 있었다. *nirS* gene의 경우 competitor DNA를 10^5 배 희석한 것부터 target DNA의 증폭 결과가 나타났지만, *cnorB* gene의 경우 competitor DNA를 10^8 배까지 희석하여 반응시켰지만 target DNA의 증폭이 이루어지지 않았다. 이러한 결과는 침출수에서 채취된 genomic DNA는 혼합 DNA(total genomic DNA)이고 이 중 특정 유전자가 차지하는 비중은 매우 작아 상대적으로 미량 존재하기 때문에 순수한 단일 조성의 DNA인 competitor DNA와의

경쟁반응에서 효율적으로 증폭되지 않았기 때문인 것으로 판단되었다. 이러한 결과는 Real-Time PCR법을 통한 정량결과에서 *nirS* gene이 *cnorB* gene에 비해 약 7배 정도 많이 검출된 결과에 의하여 설명될 수 있다. 결과적으로 competitive PCR 정량 결과는 Real-Time PCR 정량 결과에 비해 상대적으로 작은 양이 측정되었다. 이는 competitive PCR법의 경우에는 겔 상에 나타난 DNA 밴드의 단순 비교 분석에 의한 정량법이므로 Real-Time PCR의 경우보다 객관성과 신뢰성이 결여된다고 할 수 있다. 반면에 Real-Time PCR법에 의한 정량의 경우에는 형광 dye를 이용하여 DNA 증폭시에 발광되는 형광량의 측정에 의한 방법이므로 보다 정확한 정량법이라고 할 수 있다.

3.3. Real-Time PCR을 이용한 탈질화 유전자 정량 결과

Fig. 5, 6에 나타난 바와 같이 J 매립지와 T 매립지를 비교해 봤을 때 *nirS* gene은 각각 평균 192,800 copies/ μ L, 26,799 copies/ μ L로 J 매립지에 약 7배 정도 많이 분포하고 있는 것으로 나타났다. *cnorB* gene은 J 매립지와 T 매립지를 비교해 봤을 때 각각 평균 1,596 copies/ μ L, 371 copies/ μ L로 J 매립지에 약 4배 정도 많이 분포하고 있는 것으로 나타났다. 두 매립지의 *nirS* gene과 *cnorB* gene의 분포 경향을 살펴보면 전체적으로 *nirS* gene이 *cnorB* gene에 비해 약 100배 정도 많이 분포하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과

는 *cnorB* gene이 관여하는 NO에서 N₂O로 환원되는 과정보다 *nirS* gene에 의한 N₂O에서 N₂로의 전환이 급속하게 발생하고 있음을 알 수 있다. 이를 확인하기 위해서는 *nosZ* gene의 정확한 정량이 필요했으나 *nosZ* gene의 경우 PCR product 생성과정에서 증폭 중 목적 product 이외에 비특이적 산물이 동시에 다량 증폭 되었다. 이러한 결과는 Real-Time PCR을 이용한 특이적 유전자에 대한 정량 실험에서도 유전자에 따라 신뢰성이 결여된 실험결과를 얻을 수 있음을 나타낸다. 따라서 Real-Time PCR을 이용하여 *nosZ* gene의 보다 더 정확한 정량을 위해서는 보다 더 특이적인 primer의 제작이 필요할 것으로 사료된다.

3.4. Real-Time PCR을 이용한 메탄생성 유전자 정량 결과

Fig. 7에 나타난 바와 같이 J 매립지의 경우 J1, J2, J3 및 J4 지점의 침출수에서 MCR gene이 확인되었고, T 매립지의 경우 T1과 T2 지점의 침출수에서만 확인되었다. J 매립지에서 J1 지점에서는 1,310,000 copies/ μ L로 가장 높게 측정되었지만, J2, J3, J4 지점에서는 각각 101,000 copies/ μ L, 21,500 copies/ μ L, 14,200 copies/ μ L로 급격하게 감소되는 것을 확인하였다. 또한 T1과 T2 지점에서는 각각 5,410 copies/ μ L, 7,280 copies/ μ L로 J 매립지에 비해 약 1/20~1/2배 정도 적게 분포하는 것으로 나타났다. 전체적으로 매립지의 경계영역을 기준으로 지하수 흐름 방향으로 내려감에 따라 메탄

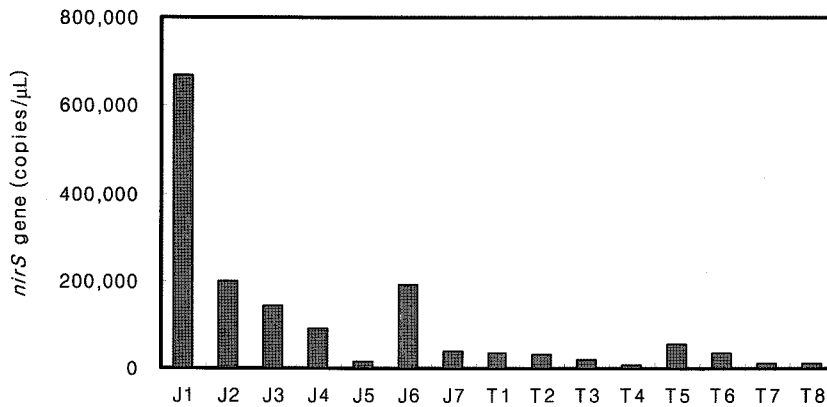


Fig. 5. Absolute quantity of *nirS* gene by Real-time PCR.

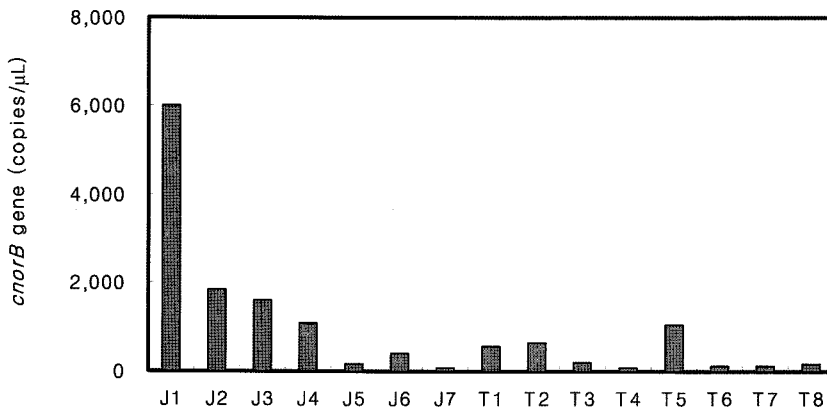


Fig. 6. Absolute quantity of *cnorB* gene by Real-time PCR.

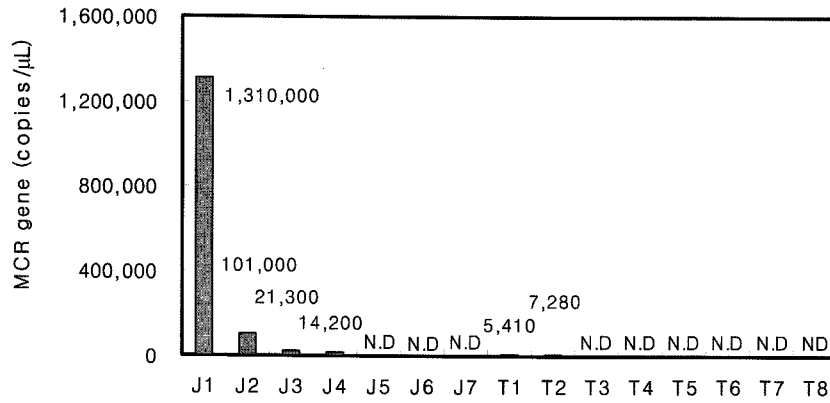


Fig. 7. Absolute quantity of MCR gene by Real-time PCR.

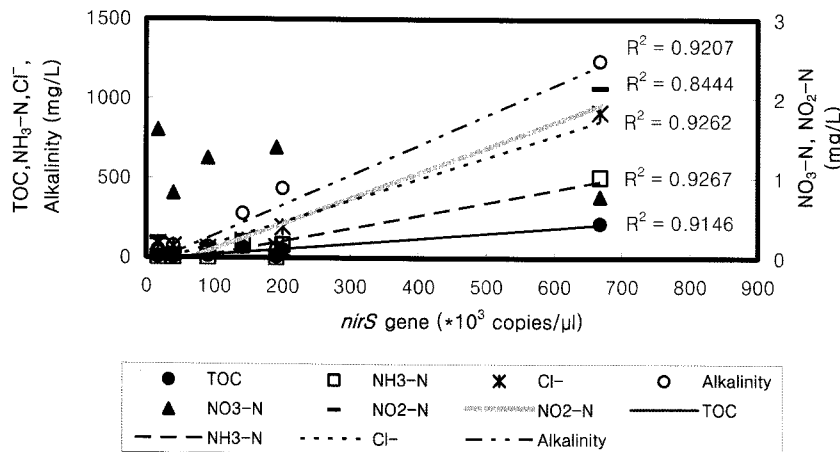


Fig. 8. Correlation between *nirS* gene and water quality parameter in J landfill.

생성 미생물의 개체수가 급격히 감소하는 것을 확인하였다. J1 지점의 경우 다른 지점에 비해 메탄 생성 미생물의 개체수가 약 10~250배 정도 높게 나타났는데, 이러한 결과는 J1 지점의 경우 폐기물 매립지역 내부의 침출수이므로 메탄 생성 미생물이 성장할 수 있는 혐기성 조건이 형성되어 있고 유기물 또한 고농도로 존재하기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 J1 지점을 제외한 나머지 지점의 경우 매립지 내에서 침출수가 유출되어 지하수 흐름방향으로 이동하면서 산소가

유입되고 그에 따라 메탄 생성 미생물이 성장할 수 있는 혐기성 조건이 호기성 조건으로 점진적으로 변화되는 동시에 메탄생성을 위한 유기탄소원이 감소하기 때문인 것으로 사료된다.

3.5. 수질 오염 인자와의 상관관계

Real-Time PCR을 이용하여 정량된 *nirS* gene, *cnorB* gene 및 MCR gene의 개체수와 TOC, NH₃-N, NO₃-N, NO₂-N, Cl⁻,

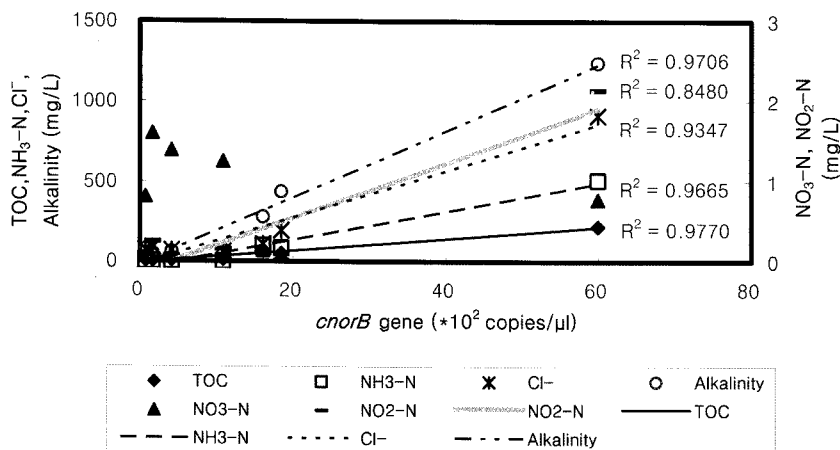


Fig. 9. Correlation between *cnorB* gene and water quality parameter in J landfill.

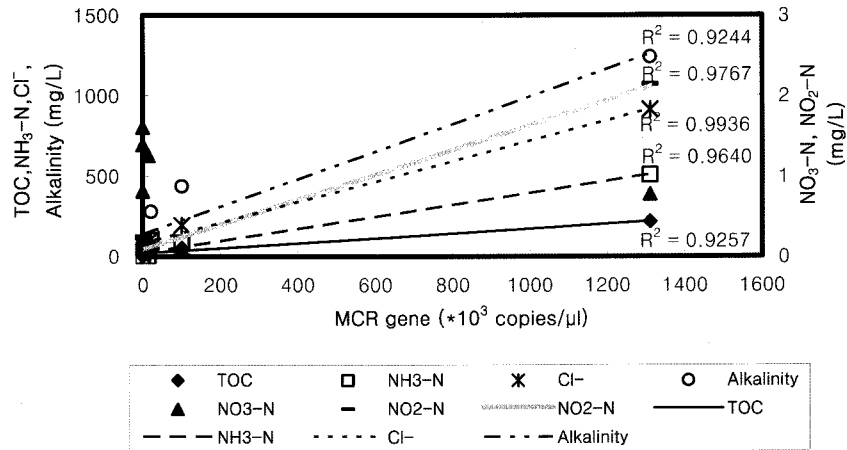


Fig. 10. Correlation between MCR gene and water quality parameter in J landfill.

alkalinity 수질 분석 자료와의¹⁷⁾ 상관관계를 분석하였다. 먼저 J 매립지의 경우 Fig. 8에 나타난 바와 같이 *nirS* gene의 개체수는 NH₃-N와 R 제공값이 0.9267로 가장 높았고, Cl⁻, alkalinity, TOC 순서로 R 제공값이 각각 0.9262, 0.9207, 0.9146을 나타냈다. 그러나 NO₂-N와는 상대적으로 낮은 0.8444의 값을 나타냈다. Fig. 9에 나타난 바와 같이 *cnorB* gene의 개체수는 TOC와 R 제공값이 0.9770으로 가장 높은 상관성을 보였고, alkalinity, NH₃-N, Cl⁻의 순서로 R 제공값이 각각 0.9706, 0.9665, 0.9347으로 나타났다. *cnorB* gene 역시 NO₂-N

와는 상대적으로 낮은 0.8480의 상관성을 보였다. Fig. 10에 나타난 바와 같이 MCR gene의 개체수는 Cl⁻과 R 제공값이 0.9936으로 가장 높은 상관성을 보였고, NO₂-N, NH₃-N, TOC, alkalinity 순서로 R 제공값이 각각 0.9767, 0.9640, 0.9257, 0.9244으로 나타났다. 그러나 *nirS* gene, *cnorB* gene 및 MCR gene 모두 NO₃-N와는 높은 상관성을 보이지 않았다.

한편 T 매립지의 경우 Fig. 11, 12, 13에 나타난 바와 같이 J 매립지에 비해 *nirS* gene, *cnorB* gene 및 MCR gene의 개체수가 약 1/20~1/10배 적게 분포하고 있는 것으로 나타났

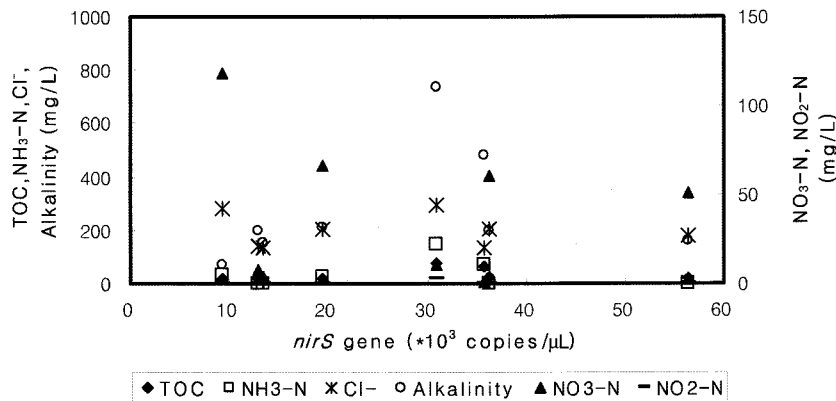


Fig. 11. Correlation between *nirS* gene and water quality parameter in T landfill.

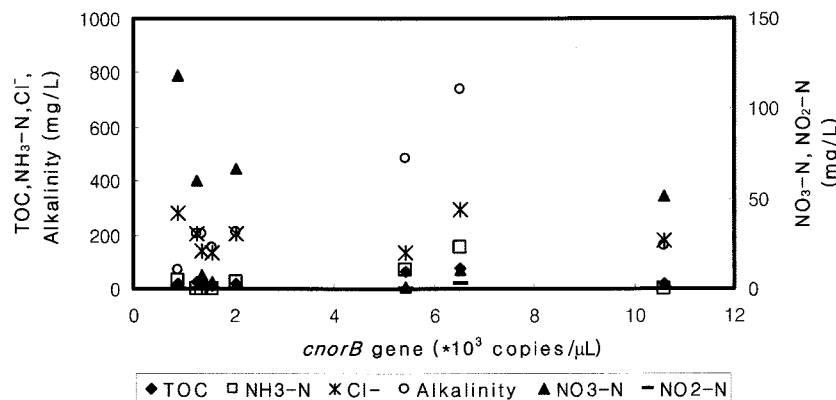


Fig. 12. Correlation between *cnorB* gene and water quality parameter in T landfill.

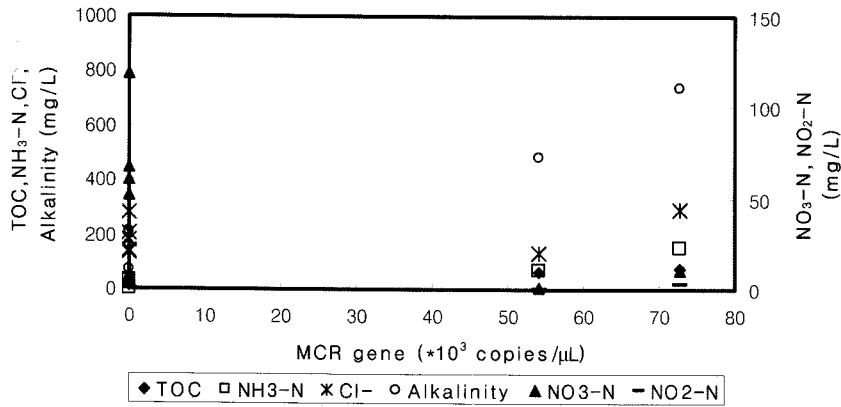


Fig. 13. Correlation between MCR gene and water quality parameter in T landfill.

다. 또한 수질 인자와의 상관관계 분석에서도 뚜렷한 상관성을 보이지 않았다. 이러한 결과는 지질 구조가 점토 성분으로 이루어진 J 매립지에 비해 T 매립지는 모래 성분으로 이루어져 있어 지질 구조가 불균질하고 통기성이 좋아 탈질 및 메탄 생성균이 존재하기에는 부적합한 환경이기 때문이라고 사료된다. 또한 두 매립지의 사용종료 후 경과기간을 비교해 봤을 때 J 매립지, T 매립지 각각 7년, 13년으로 T 매립지는 안정화가 이미 진행된 상태로 본 연구대상 미생물의 개체수가 적게 분포하고 있는 것으로 사료된다.

4. 결론

본 연구에서는 분자생물학적 방법을 사용하여 매립지 침출수 내에 분포하는 미생물의 다양성을 확인하고 탈질 및 메탄 생성에 관여하는 유전자를 정량화하여 오염물질 농도와의 상관관계를 확인하여 분자생물학적인 안정화 지표를 개발하고자 하였다.

1) 분자생물학적 방법을 사용하여 cloning한 16S rDNA 증분석된 DNA sequence를 BLAST search한 결과 97% 이상 유사성을 보이는 근연종은 J 매립지, T 매립지 각각 47.6%, 32.5%이었고, 유사종이 확인되지 않는 DNA sequence를 고려한 난배양성 미생물은 각각 78%, 95%로 확인되었다. 배양성 미생물 중에는 두 매립지 모두 Proteobacteria phylum이 가장 많이 분포하는 것으로 나타났다.

2) Real-Time PCR을 이용한 탈질 미생물의 정량 결과 *nirS* gene과 *cnorB* gene 모두 T 매립지보다 J 매립지에 각각 7배, 4배 정도 많이 분포하고 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 암모니아성 질소의 농도가 높은 J 매립지에서 질산화가 일어남과 동시에 탈질이 활발하게 일어나고 있음을 보여준다.

3) Real-Time PCR을 이용한 메탄 생성 미생물의 정량 결과 매립지 내부인 J1 지점에서 1,310,000 copies/μL로 가장 높게 나타났으며, 지하수 흐름 방향으로 침출수가 이동함에 따라 개체수가 급격히 감소하였다. 이러한 결과는 매립지에서 유출된 침출수가 지하수를 따라 이동하면서 자연포기가 발생하여 메탄 생성 미생물이 성장할 수 있는 조건인 혐기성 조건

에서 호기성 조건으로 점진적으로 변함과 동시에 영양원이 감소하였기 때문인 것으로 사료된다.

4) Competitive PCR과 Real-Time PCR 방법을 통한 미생물 정량 결과 competitive PCR은 침출수에서 채취한 genomic DNA의 경우 수많은 종의 DNA가 혼합되어 있어서 경쟁반응에 의한 PCR 증폭이 잘 이루어지지 않아 정확한 정량이 이루어지지 않았다. 반면에 Real-Time PCR은 형광 dye에 의한 증폭 산물의 실시간 측정으로 적은 양의 DNA도 정량이 가능하였다. 그러므로 환경시료와 같은 혼합 DNA일 경우 Real-Time PCR에 의한 정량이 더욱 신뢰성이 높은 결과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

5) 환경에서 자연정화의 주체가 미생물임을 고려하고 오염물의 농도에 따른 미생물 분포의 상관관계를 확인해 본 결과, 매립지 침출수에 의한 주변 지역의 오염 정도의 확인 및 매립지의 안정화 평가로써 분자생물학 기술을 이용한 미생물 지표의 사용이 가능할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2004년도 환경기술진흥원의 차세대 핵심환경기술개발 사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Status report on policy of environment conservation. MOE (Ministry of Environment, Korea)(2003).
2. 정밀조사대상 매립지 정밀 조사 결과, 환경부(2000).
3. 이남훈, 김 경, 이채영, 전연호, 이철효, “폐기물매립지 안정화 평가기법 개발에 관한 사례연구,” 한국폐기물학회 추계학술연구발표회 논문집, 계명대학교, 대구, pp. 53~56 (2000).
4. Youcai, Z., Zhugen, C., Qingwen, S., and Renhua, H., “Monitoring and long-term prediction of refuse composition and settlement in large-scale landfill,” *Waste Management & Research*, **19**, 160~168(2001).
5. Kumar, D. and Alappat, B. J., “Monitoring leachate

- composition at a municipal landfill site in New Delhi, India," *Int. J. Environment and Pollution*, **19**(5), 454~465(2003).
6. 정승현, 신현무, 정병곤, "매립지 사용기간 경과에 따른 침출수 특성변화," 대한환경공학회 춘계학술연구발표회 논문집, 한국과학기술원, 대전, pp. 984~992(2003).
 7. Amann, R. I., Ludwig, W., and Schleifer, K. H., "Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation," *Microbiol. Rev.*, **59**, 143~169(1995).
 8. 김여원, 민병래, 최영길, "지하수 세균 군집의 유전적 다양성," *Korean J. Environ. Biol.*, **18**(1), 53~31(2000).
 9. Tanner, M. A., Everett, C. L., Coleman, W. J., Yang, M. M., and Youvan, D. C., "Complex Microbial Communities Inhabiting Sulfide-rich Black Mud from Marine Coastal Environments," *Biotechnology et alia*, **8**, 1~16(2000).
 10. Gregory, L. G., Karakas-Sen, A., Richardson, D. J., and Spiro, S., "Detection of genes for membrane-bound nitrate-reductase in nitrate-respiring bacteria and in community DNA," *FEMS Microbiol Lett.*, **183**, 275~279(2000).
 11. Prieme, A., Baker, G., and Tiedje, J. M., "Diversity of nitrite reductase (nirK and nirS) gene fragments in forested upland and wetland soils," *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1893~1900(2002).
 12. Liu, X., Tiquia, S. M., Holguin, G., Wu, L., Nold, S. C., Devol, A. H., Luo, K., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M., and Zhou, J., "Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the pacific coast of Mexico," *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(6), 3549~3560(2003).
 13. Baker, G. and Tiedje, J. M., "Nitric oxide reductase(norB) genes from pure cultures and environmental samples," *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 3476~3483(2003).
 14. Scala, D. and Kerkhof, L. J., "Diversity of nitrous oxide reductase(nosZ) genes in continental shelf sediment," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 1681~1687(1999).
 15. Hales, B. A., Edwards, C., Ritchie, D. A., Hall, G., Pickup, R. W., and Saunders, J. R., "Isolation and identification of methanogen-specific DNA from blanket bog peat by PCR amplification and sequence analysis," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 668~675(1996).
 16. 정량 PCR : cPCR과 Real-Time PCR, Bio. Information Donner, <http://bifido.net>, July(2001).
 17. Lee, J. Y., Cheon, J. Y., Kwon, H. P., Yoon, H. S., Lee, S. S., Kim, J. H., Park, J. K., and Kim, C. G., "Comparison of Hydrogeologic and Hydrochemical Conditions between Two Uncontrolled Landfills," submitted to *Soil and Sediment Contamination*(2005).