

정량 PCR을 이용한 비위생 매립지의 특정 세균 및 효소 유전자와 수질인자와의 상관관계 평가

한지선 · 성은혜 · 박헌주 · 김창균[†]

인하대학교 환경공학과

(2007년 4월 3일 접수, 2007년 7월 19일 채택)

Comparative Assessment of Specific Genes of Bacteria and Enzyme over Water Quality Parameters by Quantitative PCR in Uncontrolled Landfill

Ji-Sun Han · Sung-Eun Hae · Hun-Ju Park · Chang-Gyun Kim[†]

Department of Environmental Engineering, Inha University

ABSTRACT : As for the increasing demanding on the development of direct-ecological landfill monitoring methods, it is needed for critically defining the condition of landfills and their influence on the environment, quantifying the amount of enzymes and bacteria mainly concerned with biochemical reaction in the landfills. This study was thus conducted to understand the fates of contaminants in association with groundwater quality parameters. For the study, groundwater was seasonally sampled from four closed unsanitary landfills(i.e. Cheonan(C), Wonju(W), Nonsan(N), Pyeongtaek(P) sites) in which microbial diversity was simultaneously obtained by 16S rDNA methods. Subsequently, a number of primer sets were prepared for quantifying the specific gene of representative bacteria and the gene of encoding enzymes dominantly found in the landfills. The relationship between water quality parameters and gene quantification were compared based on correlation factors. Correlation between DSR(Sulfate reduction bacteria) gene and BOD(Biochemical Oxygen Demand) was greater than 0.8 while NSR(Nitrification bacteria-*Nitrospira sp.*) gene and nitrate were related more than 0.9. A stabilization indicator(BOD/COD) and MTOT(Methane Oxidation bacteria), MCR(Methyl coenzyme M reductase), Dde(*Dechloromonas denitrificans*) genes were correlated over 0.8, but ferric iron and Fli(*Ferribacterium limneticum*) gene were at the lowest of 0.7. For MTOT, it was at the highest related at 100% over BOD/COD. In addition, anaerobic genes(i.e., nirS-Nitrite reductase, MCR, Dde, DSR) and DO were also related more than 0.8, which showing anaerobic reactions generally dependant upon DO. As demonstrated in the study, molecular biological investigation and water quality parameters are highly co-linked, so that quantitative real-time PCR could be cooperatively used for assessing landfill stabilization in association with the conventional monitoring parameters.

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

요약 : 매립지를 직접 생태학적으로 모니터링하는 방법을 개발하고자, 매립지 내의 생화학적 반응에 관여하는 세균들과 효소의 양을 정량함과 동시에 지하수 수질인자와 상호 연관성을 조사하여 생태학적 인자와의 연계 이용 가능성을 평가하였다. 이를 위하여 4개의 매립 종료된 비위생 매립지(천안(C), 원주(W), 논산(N), 평택(P) 매립지)에서 계절별로 지하수 시료를 채취하였으며 동시에 16S rDNA 방법을 사용하여 미생물 다양성을 분석하였다. 이를 기반으로, 매립지에서 주로 발견되는 세균과 효소를 대표하는 유전자를 정량하기 위한 특이 프라이머 쌍을 제작하였으며 상관관계에 기초하여 수질인자와 유전자 지표 인자간의 정량적 관련성을 비교하였다. 그 결과 DSR(황환원 세균) gene과 BOD(생화학적 산소요구량)사이의 상관관계는 0.8 이상인데 반해 NSR(질산화 세균-*Nitrospira sp.*) gene과 질산성 질소는 0.9 이상이었다. 안정화지표(BOD/COD)와 MTOT(메탄 산화 세균), MCR(Methyl coenzyme M reductase), Dde(*Dechloromonas denitrificans*) gene들은 0.8 이상의 상관관계를 가졌으나 3가 철과 Fli(*Ferribacterium limneticum*) gene은 0.7로 낮았다. MTOT gene의 경우, BOD/COD과의 관련성이 100%에 가깝게 높았다. 또한, 혐기성 유전자들(nirS-아질산 환원효소, MCR, Dde, DSR)과 DO 역시 0.8 이상으로 나타나 일반적인 매립지 혐기성 반응들이 DO에 크게 의존함을 보였다. 결론적으로 분자생물학적 조사와 수질인자가 높은 상호연관성이 있었으며 real-time PCR이 전통적인 모니터링 인자들과 동시에 상호 보완적으로 모니터링에 사용됨으로써 매립지안정화 및 주변 영향을 평가하는데 효율적으로 사용 될 수 있음을 알 수 있었다.

주제어 : 16S rDNA, 실시간 정량 PCR, 비위생 매립지

1. 서론

환경부의 사용종료 매립지 실태조사에 의하면¹⁾ 1000여개

이상 존재하는 대부분의 매립지가 환경오염 방지시설을 갖추지 못한 비위생 매립지로서 오염물질이 유출될 경우 주변 토양 및 지하수를 오염시킬 수 있다고 보고되고 있다. 그러므로 적절한 처리와 관리가 필수적이며 이러한 매립지의 상태, 오염도 및 안정화 정도를 확인할 수 있는 정확한 모니터링 시스템의 개발이 요구되고 있다.

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

Fax: 032-865-1425

기존의 매립지의 변화를 모니터링하는 시스템에 대한 연구들은 주로 수질분석 및 가스성상의 변화,²⁾ 수리지질학적 방법 등을 이용하여 왔다. 그러나 매립지에서 발생하는 대부분의 오염물질 반응에 관여하는 주체는 미생물이므로 이들의 변화에 따른 자연적인 정화 및 오염물질의 거동 등이 동시에 고려되어야 한다. 이에 따라 매립지의 상태를 생물학적으로 평가하기 위한 여러 가지 방법이 연구되고 있다. 기존의 연구에서는 16S rDNA 방법을 이용하여 미생물의 종류를 확인하거나³⁻⁶⁾ 개체수 계수법⁷⁻⁹⁾ 등을 사용하는 것이 주를 이루었으나, 이와 같은 생물학적 접근법과 오염물질 농도간의 상호관계 분석에 기반한 매립지 평가 분석을 위한 연구는 미미한 실정이다.

본 연구에서는, 네 개 매립지의 내부 및 외부 영향지역의 지하수를 채취한 후 대표적인 미생물의 특이적 유전자와 매립지의 주된 반응에 관여하는 효소를 발현하는 유전자를 real-time PCR을 사용, 정량하여 지하수 수질 인자에 대한 분석 결과와의 상관관계를 분석함으로써 생태학적 분석 기법의 매립지 평가도구로서의 이용 가능성을 평가하고자 하였다.

2. 연구 대상 매립지 및 실험 방법

2.1. 연구 대상 매립지 및 시료 채취

4개의 연구대상 매립지별 운영현황 및 지하수 시료채취 지점 등의 특성을 Table 1과 같이 정리하였다. 매립용량은 W, P, N, C의 순서로 높았으며 이 중 P매립지의 매립종료 시점이 1992년으로 가장 빠르고 N매립지의 경우 현재 AMT 공법을 사용하여 30 톤/일로 침출수를 처리하고 있다.

16S rDNA 방법을 이용한 미생물 종 분석을 위해 2005년 C와 W 사용 종료 비위생 매립지를 선택하여 관측 공에서 계절별로 지하수를 채취하여 미생물 군집 조사를 실시한 후 연구 대상 대표 미생물 종 및 효소유전자를 결정하였다. 그 후 추가로 2006년 P 비위생 매립지와 N 매립지를 본 연구의 대상 매립지로 선정하여 2006년 봄(4월), 여름(7월), 가을(10월)과 겨울(12월)로 구분하여 C와 W 매립지를 포함한 총 4개의 매립지를 대상으로 연구를 수행하였다. 각 매립지에 설치된 지하수 관정에 1 L 용량의 베일러(Cole-Parmer, USA)를 이용해 약 우물 부피의 3배에 달하는 유량을 미리 배제한 후 실험에 이용되는 지하수를 별도로 1 L 무균 채수병에 채취하였다. 그 후 4°C 냉암소에 보관하여 실험실로 이동시켜 실험 개시 전까지 냉장 보관하였다.

Table 1. General conditions on the uncontrolled landfills used for the study(C1~C3, W0 points are inside of landfill)

Landfills	General condition				Sampling points	
	Period		Area (1,000 m ³)	Capacity (1,000 m ³)		Waste
	Start	End				
Pyungtaek(P)	1987	1992	23.7	260	Municipal Solid Waste(MSW)	
Cheonan(C)	1991	1998	6.2	41		
Wonju(W)	1982	1995	81	322		
Nonsan(N)	Operating		42	175		

2.2. 수질 및 미생물 군집 분석 방법

분자생태학적 평가 기법과 비교하기 위한 지하수 수질인자로서 생물학적 산소요구량(BOD), 화학적 산소요구량(COD_{Cr}), 암모니아성질소(NH₄⁺-N), 2가철(Ferrous iron) 및 3가철(Ferric iron) 등이 Standard Methods¹²⁾에 준하여 분석되었다. 용존산소(DO)는 DO meter(YSI 550A Portable DO Meter, USA)를 사용하여 현장에서 측정되었으며 SO₄²⁻, Cl⁻과 NO₃⁻ 등의 음이온 농도는 이온 크로마토그래피(IC, Yong Lin Instrument, Water 432 Conductivity Detector, Korea)에 의하여 결정되었다.

한편 현장에서 채취된 지하수 시료는 채취한지 24시간 이내에 시료 중 100~200 mL를 3,000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil science HA-1000-3, 원심분리기)하여 농축시켰으며 이 중 약 1 g의 분리된 침전물은 미생물 군집분석을 위한 시료로 사용하였다. 침전물로부터 cell을 분리하기 위하여 FastPrep[®] Instrument(Q-Bio gene)를 이용해 Speed 4에서 5초간 bead beating하여 침전물 입자로부터 cell을 분리시켰다. 그 후 FastDNA[®] SPIN Kit(Bio101 system, Q-Bio gene)를 사용하여 침전물의 총 genomic DNA를 추출하고 종 다양성을 확인하기 위하여 16S universal primer(27F-5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3', 1492R-5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3')에 의한 증폭을 수행하였다(PCR Machine, Techgene). PCR 증폭산물은 Winzard[®] SV Gel 및 PCR Clean-Up System(Promega, USA)으로 정제하였으며 정제된 16S rDNA PCR 산물을 pGEM-T easy vector(Promega, USA)에 접합(ligation)시켰다. 접합된 PCR 산물을 숙주세포(host cell : E.coli XL1-Blue)로 형질전환(Transformation)하였다. 그 후 X-Gal과 IPTG로 처리된 LB(Luria-Bertani) 배지에 형질전환된 세포를 배양하여 균주의 접합이 확인된 콜로니의 경우 해당 콜로니의 플라스미드를 회수하여 특정 세균의 16S rDNA 염기서열을 분석 하였다.¹³⁾ 미생물 염기서열 분석은 NCBI(National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene Bank에 등록된 데이터베이스에 기초하여 실시되었으며 이 과정에서 본 연구에 사용된 미생물 대표 종 및 효소 유전자를 결정하였다.

2.3. Real-time PCR을 이용한 DNA의 정량방법

Real-time PCR 방법은 특정 환경 변화에 따른 미생물 영향을 관련된 반응 유전자를 이용하여 빠른 시간 내에 정량 평가하게 되므로 생물학적 거동을 효과적으로 파악하는데 유용하게 이용되어 왔다.¹⁸⁻²⁰⁾ 따라서 본 연구에서는 Real-Time PCR(Bio Rad, MiniOpticon Real-time Detection System)을 사용하여 각 시료에서 추출된 총 genomic DNA 중 매립지를 대표하는 종에 대한 특이 유전자(gene)의 양을 정량 평가하였으며 실험에 사용된 각 primer쌍에 대한 정보는 Table 2와 같다.

Real-time PCR 방법은 PCR 방법에서 더 나아가 목적 DNA를 cycle당 2배씩 증폭시키면서 발현되는 형광물질의 양을 실시간으로 측정하여 standard와 비교하여 DNA의 초기량을 정량할 수 있는 방법이다. 가장 중요한 인자는 Ct(Threshold

Table 2. Primers prepared for real time PCR

Name	Primer sequence(5'-3')	Reference	Annealing T.(°C)	Template(μL)	Product size(bp)	Target
16S	16S-27F GGT CTC AAG CGT TGT TCG GAT	22)	55	0.3	150	Bacterial 16S rDNA
	16S-492R AGT CTC CTC TCC AGT CCT CAA					
nirS	832F TAC CAC CCC GAG CCG CGC GT	23), 24)	65	0.3	796	Denitrification (Nitrite reductase gene)
	1606R AGK CGT TGA ACT TKC CGG TCG					
MCR	ME1-F GCM ATG CAR ATH GGW ATG TC	25)	50	0.3	760	Methane Production (Methyl coenzyme M reductase gene)
	ME2-R TCA TKG CRT AGT TDG GRT AGT					
DSR	DSR-2060F AA CAT CGT YCA YAC CCA GGG	26), 27)	57	0.3	350	Sulfur reduction
	DSR-4R GTG TAG CAG TTA CCG CA					
NSR	NSR-1113F CCT GCT TTC AGT TGC TAC CG	28)	57	0.3	151	Nitrification (<i>Nitospira sp.</i>)
	NSR-1264R GTT TGC AGC GCT TTG TAC CG					
Rfe	Rfe-454F GGC CTG CCC TAA TAC GGT G	From this study	54	0.3	473	Ferric reduction (<i>Rhodoferax ferrieducens</i>)
	926 R CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT					
Fli	Fli-994F CAT GTC CAG AAG CCC TTA GA	From this study	54	0.3	499	Ferric reduction (<i>Ferribacterium limneticum</i>)
	1492R GGT TAC CTT GTT ACG ACT T					
Dde	Dde-210F GGC CTT GCG CTG ATT GTG	From this study	65	0.3	310	<i>(Dechloromonas denitrificans)</i>
	519R GWA TTA CCG CGG CKG CTG					
MTOT	A189-F GGN GAC TGG GAC TTC TGG	29)	52	0.3	491	Methane Oxidation (<i>Methylobacter/Methylosarcina, Methylococcus, Methylosinus group, Methylocapsa, Nitrosococcus</i>)
	Mb661-R GGT AAR GAC GTT GCN CCG G					

cycle)값으로서 이것은 probe의 형광(fluorescence)값이 base line과 교점되는 지점의 cycle number로서 정량 값을 판별하는 척도가 된다. 절대정량은 copy number를 알고 있는 standard의 Ct를 기준으로 검량선(standard line)을 작성하여 시료의 DNA copy number를 정량하게 된다.

세부적인 정량과정은 먼저 시료의 genomic DNA 0.3 μL, 목적 primer 각 200 μM, 그리고 SYBR Green dye가 포함된 iQ SYBR Green Supermix(2X, Bio-Rad, USA) 25 μL에 멸균 증류수를 첨가하여 시료의 총 부피는 50 μL가 되도록 조정하였다. 그 후 50 μL의 시료를 MJ white PCR tube에 넣고 Real-Time PCR을 이용하여 PCR 증폭과정 중에 생성되는 dsDNA로 인해 발광하는 SYBR Green I dye 형광 세기를 실시간으로 측정하였다. 증폭과정은 Table 3과 같다. 실험

결과 재현성을 높이기 위해 모든 gene의 정량은 reference gene과 함께 2회씩 반복 측정하였다.

Table 3. Temperature conditions on Real Time PCR Protocols

Incubate 95°C 4 min	44 Cycles	Initial denaturation
Incubate 95°C 30 sec		Denaturation
Incubate Annealing T 30 sec		Annealing
Incubate 72°C 30 sec		Extension
Plate Read		Reading
Incubate 72°C 5 min		Final Extension
From 60°C to 95°C Read every 0.2°C hold 1 sec		Melting Curve
Incubate 30°C		Keeping

Table 4. Observing frequency of bacteria

NCBI No.	Species	C1	C2	C3	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7	W8
AY651926	<i>Comamonadaceae bacterium MPsc</i>	●										
AF435948	<i>Rhodoferax ferrireducens*</i>		●	●	●	●	●					
AY609198	<i>Rhodoferax antarcticus</i>		●			●						
AJ440986	<i>Antarctic bacterium R-7724</i>							●				
CP000089	<i>Dechloromonas aromatica RCB</i>	●		●								
AF170356	<i>Dechloromonas sp. SIUL</i>			●								
AJ318917	<i>Dechloromonas denitrificans*</i>	●		●								
AB080645	<i>Sulfuricurvum kujiens</i>		●	●								
AJ583090	<i>Pseudomonas fluorescens</i>							●				
AJ581999	<i>Pseudomonas lurida</i>								●			
AY904765	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>							●				
AJ551147	<i>Janthinobacterium An8</i>								●		●	
Y17060	<i>Ferribacterium limneticum*</i>			●				●	●			
AB021385	<i>Vogesella indigofera</i>		●									
AJ585992	<i>Hydrogenophaga atypica</i>			●								
AY625148	<i>Uncultured bacterium clone L-4</i>							●	●			
AF423222	<i>Uncultured 1326-2</i>					●						
AJ583203	<i>Uncultured Geothrix sp</i>			●								
AJ009471	<i>Uncultured SJA-63</i>	●	●		●							
AY050600	<i>Uncultured GOUTB17</i>											
AY050578	<i>Uncultured GOUTA6</i>					●				●		●
AY699582	<i>Uncultured PHE7d8</i>							●				
AY955085	<i>Uncultured 5-1a</i>				●							●
AF072920	<i>Uncultured H2O</i>											●
AY218607	<i>Uncultured KD3-141</i>				●							
AB240471	<i>Uncultured SRRT25</i>			●								
AY622267	<i>Uncultured S-E105</i>								●	●		●
AB240249	<i>Uncultured BS069</i>		●									
AY662038	<i>Uncultured 015C-C11</i>				●	●		●				
DQ067029	<i>Uncultured pLW-45</i>					●						
DQ066965	<i>Uncultured pLW-9</i>					●	●					
AY662039	<i>Uncultured 015B-E09</i>		●		●	●						
AY521561	<i>Uncultured DGGE-type E</i>			●								
AY188321	<i>Uncultured KD6-11</i>							●				

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물 군집 분석 결과 및 대표 유전자 선정

Table 4는 C와 W 매립지의 각 관점에서 측정된 미생물을 종류별로 구분하여 그 관측빈도를 기준으로 매립지 유래 대표 종을 판별하기 위하여 작성되었다. 표에 나타난 미생물 종은 NCBI Database 등록된 종과 본 연구과정에서 분석된 16S rDNA의 염기서열이 서로 98% 이상 일치하는 종을 기준으로 선정된 것이다. 이 가운데 98% 이상 일치하는 uncultured bacteria가 50% 이상 검출되는 것으로 밝혀졌다. 동정된 세균 중 가운데 비교적 높은 관측 빈도를 보인 것은 철환원균인 *Rhodoferax ferrireducens*¹⁴⁾가 5개 지점에서, 역시

철환원균인 *Ferribacterium limneticum*¹⁵⁾은 3개 지점에서, 탈질균인 *Dechloromonas denitrificans*¹⁶⁾은 2개 지점에서 측정되었다.

매립지의 생물학적 안정화 과정에 주로 관여하는 미생물 종인 탈질, 메탄생성 및 황 환원균¹⁷⁾과 불량 매립지 주변에 유출된 침출수의 영향권역에서 발생하는 생물학적 질산화 및 메탄산화 반응에 관여하는 박테리아가 분비하는 specific한 유전자 및 관련 효소를 암호화하는 유전자를 증폭할 수 있는 primer를 Table 5와 같이 제작하였다. 특히 생물학적 철 환원 반응의 경우 본 연구 조사지역에서 빈번하게 동정된 철 환원 균인 *R. ferrireducens*와 *F. limneticum*에 대한 특이적인 primer를 제작하였으며, 탈질 반응을 대표하는 균도 본

Table 5. Representative enzymes and bacteria groups

Reaction	Class	Target gene
Methanogenesis	Enzyme	MCR gene
Denitrification	Enzyme	nirS gene
	Bacteria	<i>Dechloromonas denitrificans</i>
Sulfate reduction	Bacteria	<i>Desulfovibrio et al.</i>
Iron reduction	Bacteria	<i>Rhodoferax ferrireducens</i>
	Bacteria	<i>Ferribacterium limneticum</i>
Nitrification	Bacteria	<i>Nitrospira sp.</i>
Methane oxidation	Bacteria	<i>Methylobacter/Methylosarcina,</i>
		<i>Methylococcus, Methylosinus group,</i>
		<i>Methylocapsa, Nitrosococcus</i>
Total bacteria	Bacterial 16S rDNA	

연구 조사지역에서 가장 빈번하게 관측된 *D. denitrificans*을 선정하여 해당 primer를 제작하여 연구에 이용하였다.

3.2. 지하수 수질 분석결과 및 대표 유전자 정량 결과

3.2.1. 지하수 수질 분석결과

Table 6에 각 매립지별 지하수 수질 인자 및 RT-PCR에 의한 대표 유전자의 정량치를 연간 평균값(계절별 4회 측정치) 기준으로 나타내었다.

수질 분석 결과 C 매립지의 용존 산소 농도가 1.1 mg/L로 가장 낮고 N 매립지의 용존산소 농도가 3.7 mg/L로 가장 높았다. 유일하게 침출수 처리시설을 갖춘 N매립지를 제외하면 P, W 및 C 매립지의 매립종료 시기가 각각 1992년, 1995년 및 1998년으로 매립 종료 후 시간 경과가 짧을수록 용존산소 농도는 낮은 경향을 보였다.

생물화학적 산소요구량(BOD)도 C매립지의 경우 57.97 mg/L로 가장 높았으며 P, W 및 N 매립지 순서로 그 농도가 감소하여 DO 농도 분포와 상호 연관이 있음을 보였다. 폐기물관리법에 의한 매립시설 침출수의 BOD 배출허용기준은 청정지역의 경우 30 mg/L 이하로 W 및 N 매립지의 경우 청정지역의 기준에 만족하는 것으로 나타났으나 C, P는 그보다

높은 값을 보였다. 증크롬산칼륨법에 의한 화학적 산소요구량(COD_{Cr})의 경우 P 및 C 매립지의 경우 각각 185.00, 176.08 mg/L로 모두 높은 값을 나타내었으나 W 매립지 83.83 mg/L, N 매립지 25.41 mg/L 순서로 BOD 농도 분석 결과와 유사한 경향을 보였다. COD_{Cr}의 침출수에 배출허용기준 농도는 청정지역의 경우 400 mg/L 이하로 모든 지점에서 기준을 만족하는 것으로 나타났다.

암모니아성 질소(NH₄⁺-N)의 배출 허용기준은 청정지역의 경우 50 mg/L 이하로 N매립지의 경우 모두 기준을 만족하는 것으로 나타났다. 그러나 P 매립지의 경우 기준을 초과하는 것으로 나타났으며 W매립지의 경우도 매립 발생원 지역과 근접한 W0~W2지점은 50 mg/L을 초과하는 것으로 나타났다. 한편 W 매립지 경계지역 하류에 위치한 W3~W8지점의 경우 모두 50 mg/L 이하로 기준을 만족하는 것으로 나타났다. C지역의 경우 265.18 mg/L까지 검출되어 조사지역 중 가장 높은 농도가 관측되었다. 질산성 질소(Nitrate; NO₃²⁻-N)의 경우 모두 생활용수 및 농업용수의 지하수 수질기준인 20 mg/L 이하로 측정되었으나 W매립지의 경우 W2, W3, W4, W6 지점은 20 mg/L 이상으로 측정되어 조사대상 지점 중 가장 높은 농도분포를 보였다.

황산이온 농도의 경우 C매립지에서 115.82 mg/L로 가장 높게 검출되었으나 다른 세 매립지에서는 모두 100 mg/L이하로 측정되었다. 또한 철의 환원과정을 모니터링 하기 위해 2가철(Ferrous iron ; Fe²⁺)과 3가철(Ferric iron ; Fe³⁺)의 농도를 정량한 결과 2가철과 3가철 모두 C매립지에서 가장 높게 측정되었다.

지하수 수질기준 중 생활용수 이용 목적의 경우 일반 세균수가 100 CFU/mL(2.0 log CFU/L) 이하로 규제되고 있다. C 매립지의 경우 평균 10,000 CFU/mL(4.0 log CFU/L) 이상으로 높은 농도로 존재하는 것이 관찰되었으며 그 외 3개 지역도 모두 100 CFU/mL를 초과하는 것으로 나타났다.

지하수 시료에 대한 일반적인 수질 인자를 조사한 결과 C 매립지의 경우 질산성 질소를 제외하고 모든 측정 항목에서 높은 농도를 나타내었다. 반면 침출수 처리장이 효율적으로

Table 6. Water quality parameters and amount of genes in groundwater(average value ± STD)

Water quality parameters(mg/L)										
Landfill	DO	NO ₃ ⁻ -N	NH ₃ -N	SO ₄ ²⁻	BOD ₅	COD _{Cr}	Bacteria (Log cfu/mL)	Fe ²⁺	Fe ³⁺	BOD/COD _{Cr}
P	2.1±0.3	1.72±1.1	135.49±11.3	45.93±25.1	41.44±2.9	185.00±27.3	3.90±0.2	0.41±0.2	0.16±0.1	0.27±0.1
N	3.7±1.5	3.67±5.2	8.87±0.7	54.29±35.5	3.54±1.8	25.41±5.0	3.08±0.2	0.87±1.2	0.12±0.1	0.28±0.1
W	1.6±0.2	10.17±7.5	53.40±83.6	24.21±15.0	21.98±8.1	83.83±23.5	3.87±0.3	0.62±0.7	0.54±0.4	0.32±0.1
C	1.1±0.3	0.00±0.0	265.18±290.8	115.82±101.4	57.97±18.1	176.08±100.6	4.94±0.1	1.98±0.5	1.30±1.0	0.37±0.1
Quantity of genes(Log copies/μL)										
Landfill	16S	nirS	MCR	MTOT	DSR	NSR	Dde	Rfe	Fli	MCR/nirS
P	6.06±0.1	10.05±0.3	3.20±0.3	4.55±0.2	5.01±0.2	5.40±0.8	1.67±0.2	1.59±0.2	7.98±0.7	0.32±0.02
N	6.19±0.4	9.34±0.2	2.98±0.1	4.70±0.4	4.28±0.3	5.04±1.6	1.47±0.6	2.14±2.1	4.46±3.6	0.32±0.10
W	7.48±0.5	12.08±0.9	4.32±0.7	5.04±0.3	5.28±0.4	8.56±2.7	2.56±0.3	3.10±0.5	8.90±1.2	0.36±0.08
C	7.05±0.3	11.88±0.6	5.09±0.1	5.48±0.3	5.85±0.2	5.04±0.9	2.49±0.2	1.90±0.6	9.75±0.6	0.43±0.09

운영되고 있는 N 매립지 주변 영향지역의 오염도가 가장 낮아 침출수 처리장의 존재 여부가 불량매립지의 주변 지역에 미치는 영향을 최소화할 수 있는 인자로 작용함을 알 수 있었다.

3.2.2. 대표 유전자 정량 분석 결과

16S gene을 정량한 결과는 매립지 내 전체 세균 군집의 특성을 파악하고자 수행하였으며 매립지별로 큰 차이는 없었으나 W에서 가장 높았으며 C, N, P 매립지의 순서로 나타났다. 탈질과정 중 nitrite reductase를 coding하는 nirS 효소 유전자의 경우 그 농도가 W매립지에서 약 $1E+12$ copies/ μ L로 가장 높았으며 N 매립지에서 가장 낮게 나타났다. N 매립지에서 nirS gene의 농도가 가장 낮은 것은 이 지역의 DO가 4개 조사 지역 중 가장 높아(3.67 mg/L) 탈질반응이 일어나기 부적당한 산화환경이기 때문인 것으로 판단되었다. 반면 C 매립지는 W 매립지보다 DO가 낮지만 오히려 nirS gene의 농도는 W매립지의 경우가 더 높게 나타났다. 그 이유는 C 매립지에 비하여 W 매립지의 경우 질산이온 농도가 4개 조사 지역 중 가장 높은 농도가 검출되어 탈질과정의 영양원으로 충분히 이용될 수 있는 조건을 갖추고 있기 때문으로 판단되었다. 한편 탈질균의 일종인 Dde gene의 정량 결과 W, C, P 및 N 매립지 순으로 그 농도가 높게 검출되었으며 이는 nirS gene의 지역별 검출 농도의 경향과 일치하였다.

메탄생성기작에 관여되는 효소 중 methyl coenzyme M reductase(MCR)는 메탄생성과정 중 마지막 단계를 촉매 한다고 알려져 있어 각 매립지별 메탄생성 비교 유전자로 이용하였다. 혐기성 반응인 메탄화 반응 역시 DO가 높은 N매립지의 경우 가장 낮은 값을 보였으나 C매립지의 경우 가장 높은 농도를 나타내었다. 이는 C매립지의 경우 탄소원인 BOD와 COD의 농도가 4개 매립지 중 가장 높고 DO농도가 가장 낮아 상대적으로 메탄생성에 더 유리한 환원성 조건이 형성되었기 때문으로 여겨진다. P 및 W 매립지는 MCR gene의 농도가 N 매립지보다 높고 C 매립지에 비하여 낮아 두 매립지 모두 DO(1.5~2 mg/L)와 탄소원 농도가 그 중간 범위의 값을 갖는 것과 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

메탄 산화에 관여하는 MTOT gene은 *Methylobacter* 등의 메탄 산화균과 연관성이 있으며 메탄 산화반응에 주요하게 참여하는 것으로 알려져 있다. C 매립지의 경우 MTOT gene 농도가 가장 높았으며 W, N 및 P 매립지 순서로 감소하는 것으로 나타났다. MCR gene 경우와 비교해 보면 N 및 P 매립지에 대한 농도가 서로 역전되어 탄소원의 농도가 P지점이 N 지점에 비하여 약 2배 이상 높음에도 불구하고 MTOT gene의 농도가 오히려 P지점이 더 낮은 것으로 나타났다. 이는 결국 DO농도가 N지점이 P지점보다 높은 더 유리한 메탄 산화 조건에 노출되어 있기 때문임을 알 수 있었다.

황환원을 매개하는 DSR gene의 경우 C 매립지에서 가장 높은 값을 나타낸 반면 N 매립지에서 가장 낮은 값을 보였다. 이는 C 매립지의 경우 4개 조사지역 중 가장 높은 농도의 황산이온 농도가 검출되었으며 이와 더불어 가장 낮은

DO농도를 나타내어 황환원 반응을 위한 최적의 조건을 제공하였기 때문으로 판단되었다. 한편 W 매립지의 경우 황산이온 농도가 가장 낮은 24.21 mg/L를 나타내었으나 DSR gene 농도는 4개 매립지 중 2번째로 높은 농도를 나타내었다. 이는 W 매립지의 DO 농도가 다른 두 개의 매립지의 경우보다 상대적으로 가장 낮기(1.6 mg/L) 때문인 것으로 판단되며 결과적으로 DSR gene에 의한 황환원 반응은 황산이온의 농도보다는 용존 산소 농도에 더 의존한다는 것을 알 수 있었다.

일반적인 질산화 균에 대한 primer인 NSR의 경우 매립지별 농도는 W 매립지의 경우 P, N 및 C 매립지의 경우(약 $1E+08$ copies/ μ L)보다 높은 값을 나타내었다. C매립지의 경우 다른 3개 지역보다 매우 높은 암모니아성 질소 농도를 나타내었으나 DO농도가 매우 낮아 질산화를 위한 산화조건의 형성이 충분히 제공되지 못해 NSR의 농도가 W지역의 농도보다도 낮은 값을 나타냄을 알 수 있었다. 한편 P 매립지의 경우도 암모니아성 질소의 농도는 W 매립지보다 높은 평균 135.49 mg/L를 나타내었으나 NSR의 농도는 오히려 더 낮게 나타났다. 이는 P 매립지의 유기 탄소원 농도 지표인 BOD 및 COD 농도가 각각 41.44 및 185.00 mg/L로 W 매립지에 비해 두 배 이상 높은 농도로 존재하여 독립영양균인 질산화박테리아가 유기탄소원을 이용하는 종속영양균들과 경쟁에서 열세이기 때문에 발생한 것으로 보였다.

철환원균인 *Ferribacterium limneticum*(Fli gene)을 정량한 결과 C매립지에서 가장 높은 농도로 검출되었으나 N 매립지의 경우 가장 낮은 농도가 관측되었다. P 및 W 매립지에서는 그 중간 정도 값인 약 $1.0E+10$ copies/ μ L의 개체수가 검출되었다. C 매립지의 경우 철환원균의 기질로 이용되는 3가철의 농도가 가장 높았으며 W 0.54, P 0.16 및 N 매립지 0.12 mg/L으로 Fli gene의 정량 결과와 정확히 일치하였다. 또 다른 철환원균인 *Rhodospirillum rubrum*(Rfe gene)의 경우 Fli gene의 경우와 다르게 W지점에서 가장 높고 C, N 그리고 P 매립지 순서로 감소하는 것으로 나타났다. Rfe gene의 경우 2가철, 3가철 및 DO 등 여러 인자들과 비교하였을 때 상호 연관성이 부족하여 매립지 및 주변 환경변화를 모니터링하기 위한 인자로 사용하기에는 부적합함을 알 수 있었다.

3.3. 매립지별 지하수 수질 분석과 DNA 정량 대표 값의 상관관계

4개 지역에서 분석된 각 유전자 및 미생물 그리고 수질인자간의 상관관계를 평가하였다. 우선 탈질효소인 nirS gene과 탈질균인 Dde gene의 경우 그 상관관계수가 약 0.997로 매우 높은 비례관계를 보였다(Fig. 1(a)). 이는 매립지 전체적으로 탈질효소가 많으면 탈질균인 *Dechloromonas denitrificans*도 비례적으로 높은 농도로 존재함을 의미한다.

Fig. 1(b)는 메탄생성효소인 MCR gene과 메탄산화균인 MTOT gene의 상관관계가 0.963로 매우 높은 값을 나타내었다. 탈질 유전자의 경우와 달리 다소 낮은 상관관계를 보인 것은

메탄생성 및 산화 기작이 탄소원의 농도보다 오히려 DO 농도에 더 민감하게 반응하기 때문에 판단되었다.

황환원균인 DSR gene과 생화학적 산소요구량(BOD)농도를 비교한 결과 상관계수 값은 0.868로 나타났다. 이와 같이 비교적 높은 상관관계는 황환원균이 황산이온 및 acetate 등을 동시에 이용할 수 있는 종속영양 균이므로 황산이온이 부족한 상태에서 BOD만 증가하더라도 황환원균의 양도 증가하였기 때문에 판단되었다. 즉 황산이온(SO₄²⁻)과 DSR gene의 농도의 상관관계를 분석한 결과 약 0.534의 낮은 상관관계를 보였다. 이것은 결국 DSR gene이 주변 환경변화에 따라 황산이온보다는 탄소원을 더 선택적으로 이용하는 것이기 때문에 판단되었다.

Fig. 1(d)은 용존산소의 농도와 분자생물학적 인자 중 nirS, Dde, MCR 및 DSR genes의 농도를 상호 비교한 결과 4개 유전자 모두 0.850 이상의 매우 높은 용존산소와의 상관관계를

를 보였다. 이 가운데 DSR gene은 약 0.974의 가장 높은 용존산소에 대한 상관관계를 보여 4개 지역 모두 DO 농도가 산화 상태를 나타내고 있어 해당 유전자가 혐기성 상태의 황환원보다 호기성 상태의 유기탄소의 산화에 유리함을 알 수 있었으며 이는 BOD와 DSR 상관관계가 황산이온의 경우에 비하여 더 높은 값을 보인 이유를 구체적으로 입증하는 것이다.

한편 질산화균인 NSR gene과 질산성질소(Nitrate nitrogen : NO₃-N)의 상관관계를 분석한 결과 0.936의 높은 상관계수를 얻을 수 있었다(Fig. 1(e)). 이는 NSR gene 이 질산성질소와의 매립지 안정화 및 주변지역 영향 정도를 상호 연계 평가할 수 있는 대표적인 유전자임을 입증하는 것이다.

Fig. 1(f)은 철환원균을 대표하는 Fli gene과 3가철이온 농도간의 상관관계에서 보는 바와 같이 철환원균의 기질이 되는 3가 철이온의 농도가 높을수록 Fli gene의 농도도 대체적

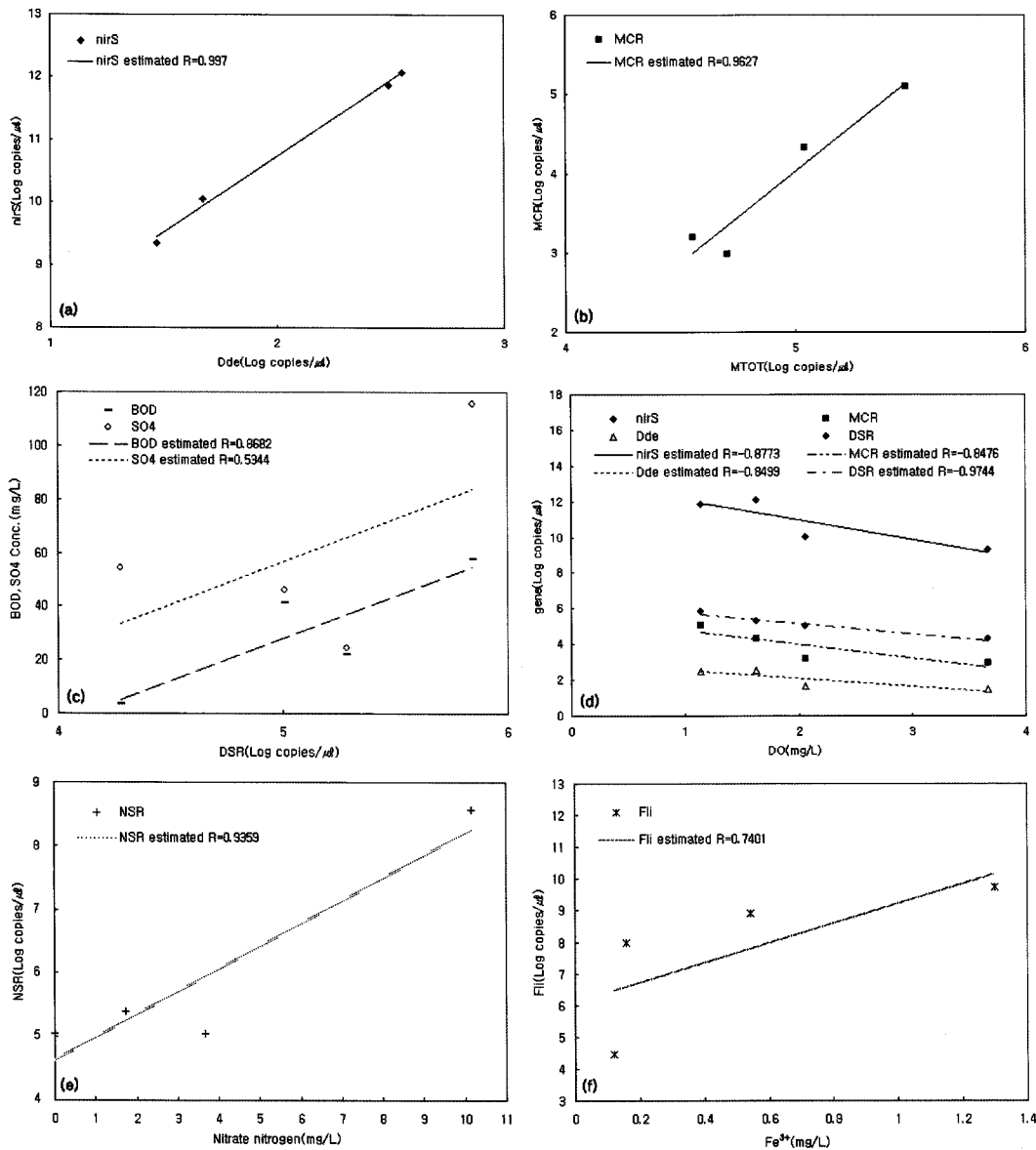


Fig. 1. Correlation in between amount of gene and water quality parameter and in between genes.

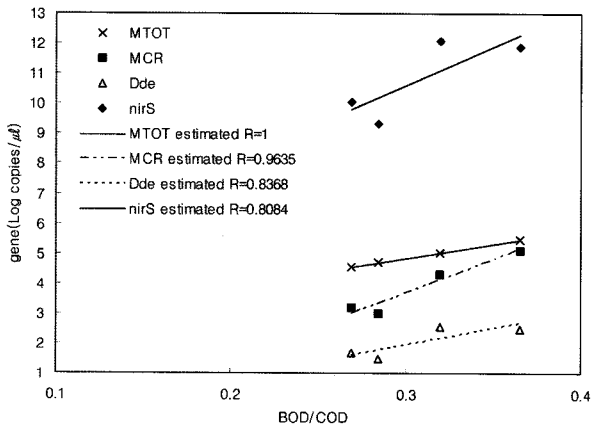


Fig. 2. Correlation of BOD/COD ratio over MTOT, MCR, Dde, nirS genes.

으로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 또 다른 철환원균인 Rfe gene은 상관계수가 거의 0에 가까워 매립지 및 주변지역 상태를 판별하기 위한 수질인자와의 연계 지표로서 사용하기에는 부적절한 것으로 판단되었다.

한편 매립지의 안정화지표인 BOD/COD와 여러 분자생물학적 지표들을 비교한 결과 MTOT, MCR, Dde 및 nirS gene 모두 상관계수가 0.8 이상으로 높았다(Fig. 2). 네 유전자 중 MTOT gene과 MCR gene의 상관계수가 가장 높았으며 메탄산화균인 MTOT의 경우 100%의 상관관계를 보이고 있어 기존 안정화 인자 중 하나인 BOD/COD 비율과 연계하여 안정화를 보다 더 정확하게 판별할 수 있는 분자생물학적 인자임을 확인할 수 있었다.

4. 결론

연구대상으로 선정된 네 개 매립지(P, N, W, C)의 지하수로부터 미생물 종 분석을 실시한 후 대표 미생물 및 특이 효소 유전자를 대상으로 real-time PCR을 수행하여 각 유전자별로 정량하여 지하수 수질분석 데이터와 비교함으로써 매립지의 상태, 오염도 및 안정화 정도를 확인할 수 있는 모니터링 인자로 사용가능성을 평가하고자 하였다.

지하수 수질 조사 결과 N 매립지의 유기물과 질소 등의 오염물질 농도는 대부분 수질기준을 만족하였으나 C 매립지는 대부분의 오염물질의 농도가 가장 높게 검출되었다. 이는 real-time PCR을 사용하여 각 유전자를 정량한 결과와 일치하였다. 즉 N 매립지의 경우 3개의 매립지와는 달리 침출수 처리장이 운영되고 있어 침출수에 의한 영향 및 오염도가 가장 낮은 조건임을 나타내었다.

매립지 지하수 수질분석과 DNA정량 결과의 상관관계를 살펴보면 NSR gene과 질산성질소의 상관계수가 0.9 이상으로 가장 높았으며 DSR gene과 BOD, DO와 nirS, MCR, Dde, DSR gene의 상관계수가 0.8 이상, 3가철이온의 농도와 Fli gene의 상관계수는 0.7 이상으로 질산화와 질산성질소의 농도의 관련성이 매우 높았다. 또한, 황환원과 유기물, 혐기성 반응과 용존산소, 철환원균과 3가철이온의 순서로 상관관계

가 높았다. 또한 안정화지표인 BOD/COD비율과 MTOT의 상관관계는 100%에 달하는 것으로 나타나 가장 높은 연관성을 보였다.

본 연구 결과 수질분석 방법이 매립지 환경을 단편적으로 나타내 주는 한계를 분자생물학적 방법의 결과와 비교함으로써 오염 환경 영향 및 매립지의 생물학적 자연정화 조건에 대한 더 넓은 이해를 가능하게 하였다. 그러나 앞으로 환경 샘플에 존재하는 알려지지 않은 많은 미생물 및 관련 효소들에 대한 다양하고 깊은 연구와 유용한 분자생물학적 기술에 대한 이해가 필요할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 2006년도 환경기술진흥원의 차세대 핵심환경기술개발 사업의 일환으로 수행되었습니다.

참고문헌

1. Status report on policy of environment conservation, MOE (Minister of Environment, Korea), (2003).
2. Watzinger, A., Reichenauer, T. G., Blum, W. E. H., Gerzabek, M. H., Zechmeister-Boltenstern, S., "The effect of landfill leachate irrigation on soil gas composition: Methane oxidation and nitrous oxide formation," *Water, Air, Soil Pollut.*, **164**, 295~313(2005).
3. Lloyd-Jones, G. and Lau, P. C. K., "A molecular view of microbial diversity in a dynamic landfill in Québec," *FEMS Microbiol. Lett.*, **162**, 219~226(1998).
4. Huang, L., Zhou, H., Zhu, S., Qu, L., "Phylogenetic diversity of bacteria in the leachate of a full-scale recirculating landfill," *FEMS Microbiology Ecology*, **50**, 175~183(2004).
5. Huang, L., Zhou, H., Zhu, S., Qu, L., "Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with the leachate of a closed municipal solid waste landfill," *FEMS Microbiol. Lett.*, **242**, 297~303(2005).
6. Yang-jie, T., Hong, Y., Xiu-juan, W., Dao-tang, L., "Molecular analysis of microbial community in a groundwater sample polluted by landfill leachate and seawater," *Tian et al. / J Zhejiang Univ SCI*, **6B**(3), 165~170(2005).
7. Hill, G. T., Mitkowskia, N. A., Aldrich-Wolfe, L., Emelea, L. R., Jurkonie, D. D., Ficke, A., Maldonado-Ramirez, S., Lynch, S. T., Nelsona, E. B., "Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities," *Applied Soil Ecology*, **15**, 25~36(2000).
8. Hale, D. D., Smith, M. C., Gattie, D. K., Das, K. C., "Characterization of microbial populations in landfill leachate and bulk samples during aerobic bioreduction," *Ad-*

- vances in Environmental Research, 5, 285~294(2001).
9. Ludvigsen, L., Albrechtsen, H. J., Ringelberg, D. B., Ekelund, F., Christensen, T. H., "Distribution and Composition of Microbial Populations in a Landfill Leachate Contaminated Aquifer(Grindsted, Denmark)," *Microbial Ecology*, **37**, 197~207(1999).
 10. Cepedaa, C. T., Leiro's, M. C., Seoane, S., Sotres, F. G., "Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution," *Soil Biol. Biochem.*, **32**, 1867~1875(2000).
 11. Zouboulis, A. I., Loukidou, M. X., Christodoulou, K., "Enzymatic treatment of sanitary landfill leachate," *Chemosphere*, **44**, 1103~1108(2001).
 12. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington D. C., USA(1988).
 13. Pavese, N. S., Bodrossy, L., Reichenauer, T. G. Reichenauer, A. Weilharter, A. Sessitsch, "16S rRNA based T-RFLP analysis of methane oxidizing bacteria-Assessment, critical evaluation of methodology performance and application for landfill site cover soils," *Applied Soil Ecology*, **858**, 101~107(2005).
 14. Finneran, K. T., Johnsen C. V., and Lovley, D. R., "Rhodoferrax ferrireducens sp. nov., a psychrotolerant, facultatively anaerobic bacterium that oxidizes acetate with the reduction of Fe(III)," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **53**, 669~673 (2003).
 15. Cummings, D. E., Caccavo Jr, F., Spring, S., Rosenzweig, R. F., "Ferribacterium limneticum, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments," *Arch Microbiol*, **171**, 183~188(1999).
 16. Horn, M. A., Ihssen, J., Matthies, C., Schramm, A., Acker, G., and Drake H. L., "Dechloromonas denitrificans sp. nov., Flavobacterium denitrificans sp. nov., Paenibacillus anaericanus sp. nov. and Paenibacillus terrae strain MH72, N₂O-producing bacteria isolated from the gut of the earthworm Aporrectodea caliginosa," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 1255~1265(2005).
 17. Barker, J. F., Tessmann, J. S., Plotz, P. E., and Reinhard, M., "The organic geochemistry of a sanitary landfill leachate plume," *J. Contam. Hydrol.*, **1**, 171(1986).
 18. Hidenori, T., Naohiro, N., Kazutaka, Y., Shinya, K., Satoshi, T., Akira, H. and Takahiro, K., "Quantification of genetically modified soybean by quenching probe polymerase chain reaction," *Agricultural and Food Chemistry*, A~F(2005).
 19. Hermansson, A., and Lindgren, P. E., "Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR," *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 972~976(2001).
 20. Dionisi, H. M., Harms, G., Layton, A. C., Gregory, I. R., Parker, J., Hawkins, S. A., Robinson, K. G., and Sayler, G. S., "Power Analysis for Real-Time PCR Quantification of Genes in Activated Sludge and Analysis of the Variability Introduced by DNA Extraction," *Appl. Environ. Microbiol.*, 6597~6604(2003).
 21. Kim, H.S, Kim, E.H., Kim, C., "Behaviour of high-rate anaerobic processes treating landfill leachate," *Environ. Eng.*, **6(2)**, 73~79(2001).
 22. 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).
 23. 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).
 24. 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).
 25. 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).
 26. Perez-Jimenez, J. R. and Kerkhof, L. J., "Phylogeography of Sulfate-Reducing Bacteria among Disturbed Sediments, Disclosed by Analysis of the Dissimilatory Sulfite Reductase Genes(dsrAB)," *Appl. Environ. Microbiol.*, 1004~1011(2005).
 27. Geets, J., Borremans, B., Diels, L., Springael, D., Vangronsveld, J., Lelie, D., Vanbroekhoven, K., "DsrB gene-based DGGE for community and diversity surveys of sulfate-reducing bacteria," *Journal of Microbiological Methods*, 128~134(2005).
 28. Hermansson, A., and Lindgren, P. E., "Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR," *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 972~976 (2001).
 29. Kolb, S., Knief, C., Stubner, S., and Conrad, R., "Quantitative Detection of Methanotrophs in Soil by Novel pmoA-Targeted Real-Time PCR Assays," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2423~2429(2003).