

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis를 이용한 매립지 침출수로 오염된 지하수의 세균 군집 분석

김재수 · 김지영 · 구소연 · 고경석¹ · 이상돈 · 조경숙* · 고동찬¹
이화여자대학교 환경학과, ¹한국지질자원연구원 지하수지열연구부

Analysis of Bacterial Community Structure in Leachate-Contaminated Groundwater using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Kim, Jaisoo, Ji-Young Kim, So-Yeon Koo, Kyung-Seok Ko¹, Sang Don Lee, Kyung-Suk Cho*, and Dong-Chan Koh¹. Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, 11-1 Daehyun-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-750, Korea, ¹Ground & Geothermal Resources Division, Korea Institute of Geoscience & Mineral Resources, Gajeong-dong 30, Yuseong-gu, Daejeon 305-350, Korea – This research has been performed to clarify the relationship between hydrogeochemistry and bacterial community structure in groundwater contaminated with landfill leachate. We collected and analyzed samples from 5 sites such as leachate (KSG1-12), treated leachate (KSG1-16), two contaminated groundwaters (KSG1-07 and KSG1-08) and non-contaminated groundwater (KSG1-13). pH was 8.83, 8.04, 6.87, 6.87 and 6.53 in order; redox potential (Eh) 108, 202, 47, 200 and 154 mV; electric conductivity (EC) 3710, 894, 1223, 559 and 169.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$; suspended solids (SS) 86.45, 13.74, 4.18, 0.24 and 11.91 mg/L. In KSG01-12, the ion concentrations were higher especially in Cl^- and HCO_3^- than other sites. The concentrations of Fe, Mn and SO_4^{2-} were higher in KSG1-07 than in KSG1-08, and vice versa in NO_3^{2-} . In the comparison of DGGE fingerprint patterns, the similarity was highest between KSG1-13 and KSG1-16 (57.2%), probably due to common properties like low or none contaminant concentrations. Otherwise KSG1-08 showed lowest similarities with KSG1-13 (25.8%) and KSG1-12 (27.6%), maybe because of the degree of contamination. The most dominant bacterial species in each site were involved in α -Proteobacteria (55.6%) in KSG1-12, γ -Proteobacteria (50.0%) in KSG1-16, β -Proteobacteria (66.7%) in KSG1-07, γ -Proteobacteria (54.5%) in KSG1-08 and β -Proteobacteria (36.4%) in KSG1-13. These results indicate that the microbial community structure might be changed according to the flow of leachate in groundwater, implying changes in concentrations of pollutants, available electron acceptors and/or other environmental conditions.

Key words: Leachate, landfill, bacterial community structure, groundwater, denaturing gradient gel electrophoresis, hydrogeochemistry

지하수 오염은 전 세계적으로 심각한 환경문제를 일으키고 있는데, 특히 음용수원에 심각한 오염을 초래하기도 하고 빈영양환경(oligotrophic environments)에 여러 악영향을 끼치기도 한다[21]. 지금까지 지하수 오염 중에서 매립지로부터 발생한 수많은 오염 발생이 보고 되어왔고[4], 주요 원인은 매립지 침출수로 이미 확인되었다.

한편, 대수층(aquifer)에서 침출수오염물질의 자연저감(natural attenuation)을 이해하는 것은 침출수의 지하수로의 유입사고를 평가, 관측정에서 채취한 지하수시료의 해석 및 적합한 정화방법의 결정을 위해 필수적이다[6]. 자연저감이란 용어는 침출수 plume에서 용해된 오염물질의 농도저감과정을 나타내고 물리적, 물리화학적, 화학적 그리고 생물학적

과정들을 포함한다. 그 예들로는 각각 희석, 흡착과 이온교환, 침전 그리고 분해가 있다.

침출수로 오염된 지하수에 서식하는 주요 미생물들은 메탄생성균(methanogens), 황환원균(SO_4^{2-} -reducers), 철환원균(Fe(III)-reducers), 망간환원균(Mn(IV)-reducers) 그리고 질산환원균(nitrate-reducers) 등이 침출수 plume을 따라 일반적으로 널리 분포하지만 plume지역 밖에서도 흔히 발견된 [3] 미생물에 의한 산화환원반응(redox process)은 침출수 plume을 따라 다양한 양상을 보인다. 이와 같은 산화환원반응을 조절하는 인자들은 탄소원, 경쟁, 저해, 전자수용체의 유용성 등을 들 수 있으나 관련 연구는 아직 미흡한 수준이다.

따라서 오염된 지하수의 미생물 군집구조(microbial community structure)의 분석을 통해 현존하는 미생물 개체군(populations)의 정화능력과 어떻게 이들 개체군들이 환경에 영향을 주며 또는 영향을 받는지에 대한 파악은 자연저감을 예측하고 관측하는데 유용한 도구가 될 것이다[21]. 본 연구

*Corresponding author
Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275
E-mail: kscho@ewha.ac.kr

는 농촌지역의 한 생활폐기물 매립장으로부터 오염된 지하수의 수지화학(hydrogeochemistry)과 미생물 군집구조간의 상호 연관관계를 밝히기 위해 수행되었다. 즉, 오염 지하수의 물리화학적 분석은 오염의 정도와 주요 산화환원반응을 파악하기 위해 수행되었고, 분자생물학적 기법인 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)는 미생물 군집구조를 분석하고 대략적인 미생물군을 파악하기 위해 수행되었다.

미생물군집의 다양성은 배양과 분리라는 전통적인 방법에 의해 오랫동안 조사되어왔고 이러한 방법은 너무 선택적이라서 미생물군집의 크기를 파악할 수 없는 단점이 있다. 왜냐하면 배양되어지는 미생물의 비율은 약 0.1%이며 총미생물수의 약 10%정도로 추정되기 때문이다[2]. 그러므로 전통적인 방법에 의해 얻은 자료들은 미생물군집의 실제적인 구성요소를 대변하지 못한다. 그러므로 본 연구에 사용된 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) 기법은 이러한 전통적인 방법으로 인해 발생된 오류를 줄일 수 있어 좀 더 유효한 정보들을 제공할 것이다.

재료 및 방법

생활폐기물 매립장의 특징

생활폐기물 쓰레기장은 복합적인 오염이 존재하는 향후 지하수와 토양오염을 유발하는 전형적인 중요한 오염원으로서 인식되고 있다. 연구지역인 K 매립장은 전형적인 군단위의 대도시 매립장에 비하면 비교적 작은 생활폐기물 매립장이다. 연구지역의 특성상 산업시설이나 폐기물 유발 시설이 적기 때문에 매립장에 매립되는 쓰레기는 대부분 주민들에 의해 버려지는 음식이나 생활 폐기물이 주를 이루고 있다. 따라서 중금속이나 유기오염물질의 양은 비교적 작은 것으로 조사되었다. 매립장은 1990년대 초반 이전에 매립된 곳은 차수벽이 설치되지 않은 불량매립지이고 이후에 조성된 매립지는 위생매립지로 이루어진 복합 매립지이다. 주변 지역 인구의 증가에 따라 지속적인 쓰레기 증가가 발생되어 매립장 북쪽으로 증설 공사가 현재 진행 중에 있다.

연구지역인 K 매립장과 주변 지역은 매립장 하류부는 논과 인삼밭으로 주로 이루어져 있다. 지형을 살펴보면 낮은 봉우리가 작은 계곡을 따라 남북으로 위치하고 있으며 매립장 하류부 쪽으로는 넓은 논으로 주로 이루어져 있다.

시추분석 자료에 의하면 매립장 하류부의 토양은 2-3 m 정도까지는 점토가 20-30% 정도 섞인 사질 토양이며, 3-4.5 m 사이는 대부분 모래로 이루어져 있다. 최상부의 점토층은 대부분 논을 만들기 위해 조성된 것으로 보이며 사질토양이 많이 섞여 있어 침투율은 비교적 양호한 것으로 판단되었다. 4.5m 이하는 15 m 정도까지 화강암의 풍화도가 형성되어 있으며 그 하부에는 기반암인 화강암이 분포하고 있다. 지하수의 흐름은 지형의 구배를 따라 형성되어 있으며 특기할 만한 것은 매립장 서쪽부 지하수의 흐름이 원지형에 의해 나

뉘짐을 알 수 있었다.

지하수 흐름과 매립장 위치도는 Fig. 1에 도시하였다. 매립장에서 발생하는 침출수는 주기적으로 침출수 처리장에서 처리되어 방류되고 있으나 침출수의 부분적인 유출은 몇 개 지하수 관측공에서 관측되었다.

시료 채취 및 물리·화학적 분석

수리지화학 및 미생물 분석을 위하여 5개 시료 즉 침출수(KSG1-12), 침출수 처리 후 방류수(KSG1-16) 및 오염지하수(KSG1-07, KSG1-08)와 배경지하수(KSG1-13)를 채취하였다.

채취되는 지하수 시료는 관측정의 수리지구화학적 대표성을 나타내기 위하여 양수를 하면서 온도, 수소이온농도(pH) 및 전기전도도(electric conductivity: EC)를 측정하여 이들이 안정된 값을 나타낸 후 시료를 채취되었다. 온도, 수소이온농도(pH) 및 전기전도도(EC)는 현장에서 pH 미터(Orion Co., USA) 및 전기전도도 미터(Horiba Co., Japan)를 이용하여 직접 측정하였으며, 알카리도는 메틸오렌지를 지시약으로 사용하여 적정하여 분석하였다[22]. 산화환원전위(redox potential: Eh) 측정은 현장에서 백금(Pt) 전극을 이용하여 측정하였으며 보정은 Zobell 용액을 이용한다. 실내 분석을 위한 지하수 시료는 0.45 μm 의 멤브레인 필터로 여과한 후 양이온은 질산으로 산처리를 하였고 음이온은 냉장보관하여 실험실로 운반되었다. 실험실로 운반된 지하수 시료는 주요 양이온(Ca, K, Mg, Na, Si)와 중금속(Al, Ba, Fe, Mn, Li, Sr, Zn)은 초음파분무기(Ultrasonic nebuliser)가 장착된 유도 결합플라즈마 원자방출분광분석기(Geoplasma, Jovin Ybon, France)를 사용하여 분석하였으며, Cl^- , F^- , PO_4^{3-} , NO_2^- , NO_3^- , Br^- , SO_4^{2-} 음이온은 이온크로마토그래피(DX-120, Dionex, USA)를 이용하여 분석하였다. $\text{NH}_3\text{-N}$ 과 총 질소의 양은 Portable Spectrophotometer(Hach Co., USA)를 이용하여 현장에서 분석을 수행하였다. 부유물질(suspended solid: SS)은 아래에 언급한 균체의 회수방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

미생물 회수, DGGE 분석 및 유사성 비교

생물량이 많은 것으로 판단되는 시료(KSG1-12)는 원심분리법으로, 생물량이 적은 것으로 판단되는 시료(KSG1-16, KSG1-07, KSG1-08, KSG1-13)는 여과법을 이용하여 각 시료로부터 균체를 회수하였다. 원심분리법에 의해 균체를 회수하기 위해, 멸균된 250 ml 원심관에 지하수 시료를 200 ml에 넣고 9,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 버리고 모아진 균체를 다시 멸균된 1.5 ml tube에 넣어 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 균체를 회수하였다. 여과법에 의해 균체를 회수하기 위해, 멤브레인 필터(pore size: 0.2 μm)로 각 시료를 여과시킨 후 여과지위의 균체를 멸균수를 이용해 씻어내면서 회수하였다. 회수된 현탁액을

1.5 ml tube에 넣어 이를 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하였다.

모아진 균체 0.5 g(습중량)으로부터 BIO101 FastDNA SPIN Kit(Q-Biogene, USA)을 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 DNA를 template로 하고 16S rDNA gene primer인 341fGC[16]와 518r primer[18]를 이용해 PCR을 수행하였다(PCR system 2700, Applied Biosystem, USA)[3]. PCR 산물은 DGGE로 분석하였다. DGGE는 Dcode™ System(Bio-Rad, USA)을 사용하여, 8% polyacrylamide gel을 이용하여 urea 농도를 40~60%(100% denaturant; 7 M urea, 40%(v/v) formamide) 범위로 하여 50V에서 12시간 동안 전기영동 하였다[3]. DGGE fingerprint의 유사성은 Gel ComparII version 3.5 software를 이용해 분석되었고 Jaccard coefficient로 표현하였다.

유전자 서열 및 계통발생적 유사도분석

DGGE fingerprint로부터 대표적인 band 14개를 잘라내어 DNA를 추출한 후, 341f와 518r primer를 사용해 PCR을 수행하였다[3]. PCR 산물은 pGEM-T Vector System(Promega, USA)을 이용해 cloning 한 후 *E.coli* DH5 α 에 형질 전환하였다[3]. 형질전환된 14개의 clone으로부터 plasmid를 추출하여 염기서열을 분석하였다[3]. 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool(Blast) algorithm을 사용하여 GenBank database와 비교하였다[1,3]. 각 시료의 DNA염기서열과 각각의 검색된 1 순위 염기서열을 proBiosys version 1.0(proBionic Co., Daejeon, Korea)의 기본 설정값을 이용하여 계통발생학적 유사도 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

물리 화학적 분석을 통한 지하수의 생지화학적 특성 비교

먼저 pH를 통한 지하수시료의 특징을 살펴보면(Table 1), 침출수인 KSG1-12는 pH 8.83으로 메탄생성기(methanogenic phase: pH 7.5-9)에 해당하고 많은 오염물질이 분해되는 산생성기(acid phase: pH 4.5-7.5)는 이미 지난 상태임을 알 수 있었다[6]. 즉, 침출수는 오염물질의 분해하는 혐기성 산생성균보다는 이미 분해된 유기산 등을 분해하는 메탄생성균

의 우점으로 메탄의 생성과 함께 pH가 높아진 것으로 보인다. 처리수인 KSG1-16의 pH는 8.04로 약알칼리성이었다. 지하수시료인 KSG1-07, KSG1-08 그리고 KSG1-13은 각각 6.87, 6.87 그리고 6.53으로 미생물활성에 적합한 중성 pH 범위(6-8)안에 해당되며[7], 오염된 두 지하수시료가 비오염 지하수의 pH와 비슷하고 중성범위를 벗어나지 않은 것으로 보아 심한 오염은 없었던 것으로 사료된다.

각 시료별 채취 시 수온은 KSG1-12(14.7°C), KSG1-16(11.0°C), KSG1-07(15.0°C), KSG1-08(12.1°C), KSG1-13(10.6°C)로 나타났는데 KSG1-12와 KSG1-07이 상대적으로 수온이 높은 이유는 오염도가 높은 침출수와 침출수에 가장 영향을 많이 받은 지하수이기 때문에 미생물 작용에 의한 대사 에너지의 방출에 기인한 것으로 사료된다. 한편 처리수인 KSG1-16은 공기 중에 노출된 상태에서의 수온이므로 다른 것과의 비교는 무의미하다.

산화환원전위는 KSG1-16과 KSG1-08이 202 mV와 200 mV로 가장 높았고 그 다음으로 KSG1-13(154 mV)과 KSG1-12(108 mV) 순이었고 KSG1-07은 47 mV로 가장 낮았다(Table 1). KSG1-12가 높은 이유는 처리수이기 때문에 지상의 대기와 접함으로 인한 높은 용존산소농도 때문일 것이며, 오염수 중 KSG1-08이 KSG1-01보다 훨씬 높게 나왔는데 매립지로부터 거리가 좀 더 떨어져 분해에 의한 전지수용체 소모현상이 적기 때문으로 생각된다[6].

일반적으로 침출수에는 TCE나 PCE 같은 염소계 화합물과 유기물로 많이 오염돼 있기 때문에 분해된 염소이온(Cl⁻)이나 중탄산염(HCO₃⁻)과 같은 음이온의 밀도가 높는데[6], 본 연구에서도 음이온 밀도가 높게 나타나 이에 비례하는 전기전도도도 침출수(KSG1-12)에서 가장 높게 나왔다(Table 1, 2). 반면 EC값이 매립지로부터 가장 멀리 떨어진 오염 지하수(KSG1-08), 처리수(KSG1-16), 비오염 지하수(KSG1-13)는 비교적 낮게 나타났다. 미생물균체를 포함한 부유물(suspended solid: SS)은 역시 침출수(KSG1-12)에서 다른 시료에 비해 최소한 6배 이상 많았고 그 다음으로 처리수(KSG1-16), 비오염 지하수(KSG1-13), 오염지하수(KSG1-07, KSG1-08) 순으로 나타났다(Table 1). 처리수와 비오염 지하수는 오염지하수에 비해 미생물보다는 다른 부유물질이 더 많이 함유된 것 같고 오염지하수 중에서는 거리가 먼 KSG1-

Table 1. The physico-chemical properties of leachate-contaminated groundwater samples and the concentrations of nitrogen compounds and trace elements.

Sample	pH	Eh (mV)	EC (μ S/cm)	SS (mg/L)	Nitrogen		Trace (μ g/L)						
					NH ₃ -N	TN	Al	Ba	Fe	Li	Mn	Sr	Zn
KSG1-12	8.83	108	3710	86.45	200.5	205	8	53	199	408	267	560	5
KSG1-16	8.04	202	894	13.74	17.2	43	20	24	14	68	133	610	4
KSG1-07	6.87	47	1223	4.18	1	5	11	23	2190	35	10400	1520	20
KSG1-08	6.87	200	559	0.24	0	13	<5	7	7	24	27.7	623	5
KSG1-13	6.53	154	169.9	11.91			<5	4	16	10	12.1	174	10

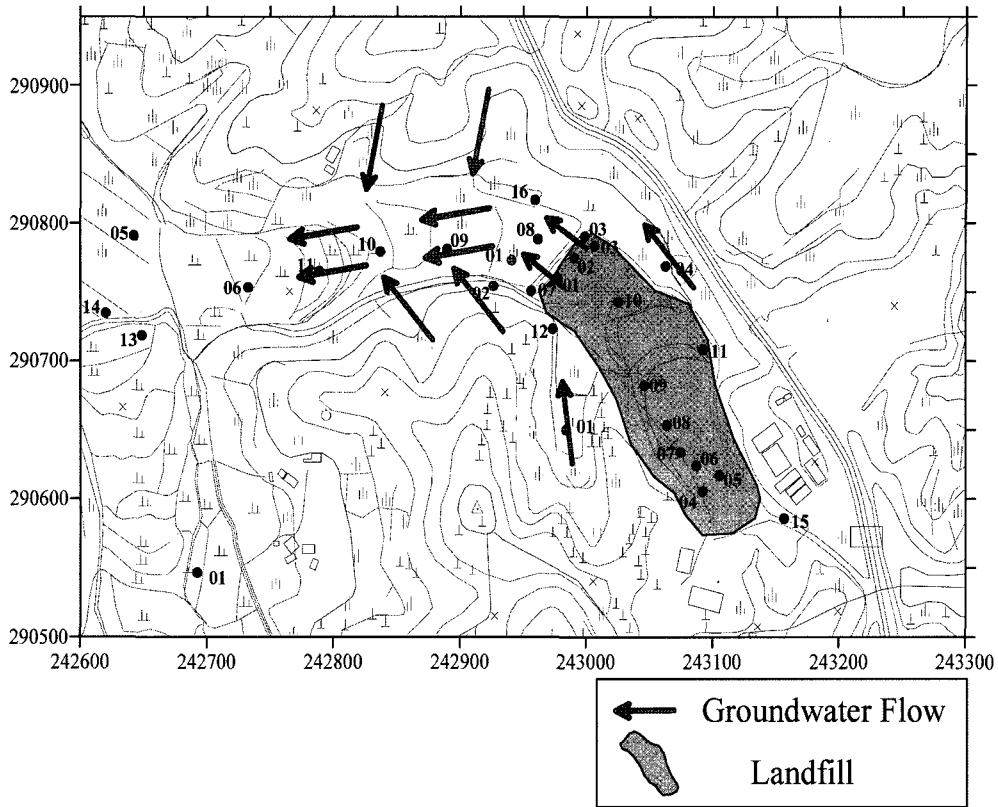


Fig. 1. A map showing the flow directions of groundwater and the location of landfill.

08이 좀 더 정확되어서 균체량의 감소로 KSG1-07보다 적게 나타난 것으로 생각된다.

매립지의 침출수에 의한 지하수오염에서 나타나는 일반적인 산화환원과정은 매립지로부터 메탄생성조건, 황환원조건, 철환원조건, 망간환원조건, 질산환원조건 그리고 맨 마지막으로 호기조건 순서로 분포한다[14, 5]. 본 연구의 오염지하수의 이온분석결과를 보면 가까운 오염지하수인 KSG1-07에서 먼 지하수인 KSG1-08보다 철(Fe), 망간(Mn) 그리고 황산염(SO₄²⁻)이 더 높은 농도로 검출되었고 질산염(NO₃⁻)농도는 반대로 나타나 기준에 보고된 일반적인 경향과 어느 정도 일치됨을 알 수 있었다(Table 1, 2). 한편, 암모니아(NH₃) 농도는 유기물의 분해산물로 침출수(KSG1-12)에 가장 많았고 높은 이온교환 친화도(affinity) 때문에 지하수로 흘러가

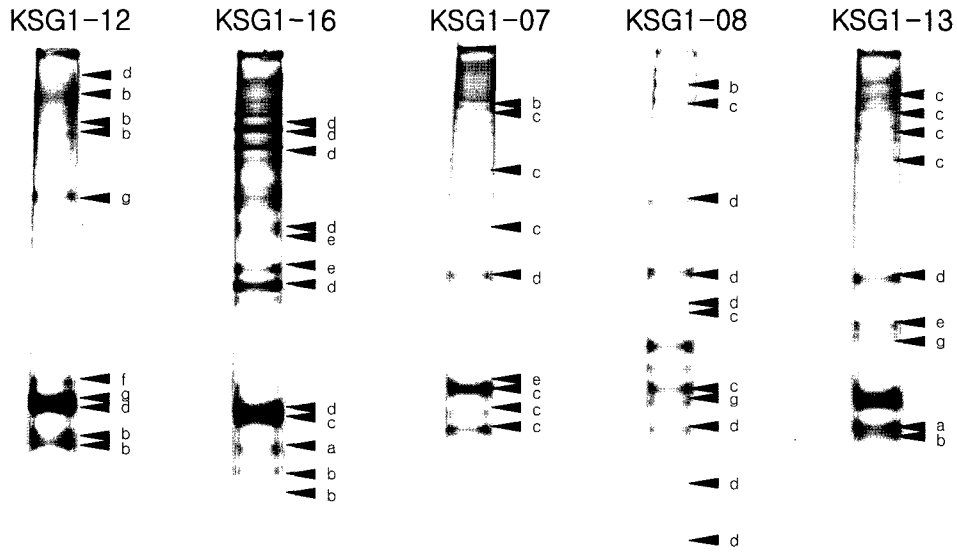
면서 입자표면에 흡착되어 지연되면서 오염 지하수인 KSG1-07과 KSG1-08에서는 거의 검출되지 않은 것으로 여겨진다 (Table 1)[6]. 양이온들 중 K와 Mg는 높은 이온교환 친화력 때문에 침출수(KSG1-12)보다는 지하수(KSG1-07, KSG1-08, KSG1-13)에서 낮은 농도를 보여주는 것 같고 친화력이 높은 Ca가 오염지하수(KSG1-07, KSG1-08)에서 높은 이유는 지형적인 영향인 것 같다(Table 2). Na는 대부분의 양이온들 중에 가장 친화도가 낮아 넓게 퍼지는 편이며 Cl와 비례관계에 있음을 알 수 있다(Table 2)[10].

DGGE에 의한 미생물 군집 특성 비교

지하수 시료로부터 회수한 SS로부터 genomic DNA를 추출하여 전기영동한 결과, KSG1-07, KSG1-12, KSG1-13 및

Table 2. The concentrations of various cations and anions of leachate-contaminated groundwater samples

Sample	Cation (mg/L)					Anion (mg/L)							
	Na	Ca	K	Mg	SiO ₂	Cl	NO ₃	SO ₄	NO ₂	Br	HCO ₃	CO ₃	CO ₂ (aq)
KSG1-12	350	41.6	194.6	36.6	15.3	594.6	54.1	6.6	21.92	1.86	1479.8	36.4	4.2
KSG1-16	69.5	71.9	29.55	15	26.3	169.7	77.0	20.3			120.6	0.4	2.3
KSG1-07	111	133	7.26	18.5	20.3	282.7	1.9	38.1		1.332	479.4	0.1	122.3
KSG1-08	31.4	77.3	2.7	11.1	28.9	119.2	31.0	11.0			170.8		46.1
KSG1-13	13.9	16.9	0.998	2.58	28.2	15.4	32.4	0.6			45.9		25



a: High G+C Gram⁺, b: α -Proteobacteria, c: β -Proteobacteria, d: γ -Proteobacteria
e: CFG group, f: Cyanobacteria, g: Uncultured bacterium

Fig. 2. DGGE profiles of 16S rDNA amplification fragments and corresponding bands for groundwater samples KSG1-12 (a), KSG1-16 (b), KSG1-07 (c), KSG1-08 (d) and KSG1-13 (e).

KSG1-16 시료로부터는 많은 양의 genomic DNA가 추출되었으나, KSG1-08 시료로부터는 극히 소량의 genomic DNA가 추출되었다(결과 미제시). KSG1-08의 경우 SS 농도도 가장 낮았는데, 이러한 결과는 KSG1-08 시료의 미생물 농도가 다른 시료보다 매우 낮음을 시사한다. 이와 같이 KSG1-08이 오염 지하수임에도 불구하고 미생물수가 적게 나온 이유는 KSG1-07보다 멀리 떨어져 정화가 많이 된 상태로 오염도가 매우 낮아 오히려 비오염 지하수보다 유기물 등의 영양성분이 적기 때문인 것으로 사료된다.

KSG1 시료의 DGGE fingerprint(Fig. 2) 유사성을 band 위치를 기준으로 비교해 보면(Table 3), KSG1-07과 KSG1-08, KSG1-12, KSG1-13, KSG1-16과의 유사도가 각각 34.4, 36.4, 39.1, 48.0%로 나타났다. 또한, KSG1-08과 KSG1-12, KSG1-13, KSG1-16과의 유사도는 27.6, 25.8, 37.5%로 나타났다. KSG1-12와 KSG1-13, KSG1-16과의 유사도는 30.0, 40.9% 이고, KSG1-13과 KSG1-16의 유사도는 57.2%로 나타났다. 결과적으로 KSG1-13과 KSG1-16이 57.2%로 가장 높게 나왔고 KSG1-08과 KSG1-13가 25.8%로 가장 낮은 값을 보였다.

비오염 지하수인 KSG1-13과 처리수인 KSG1-16이 가장 높은 유사도를 보인 것은 오염도가 낮은 특성 때문에 오염 물질에 영향을 가장 적게 받은 미생물 군집구조로 여겨지고 특히 위에서 언급한 바와 같이 산소가 많이 포함된 처리수 처럼 아주 먼 거리의 위치한 순수지하수에서 산소농도가 회복됨으로 인해 호기성(aerobic)이나 약호기성(micro-aerobic) 군들의 우점화도 원인이 될 수 있다. 한편, KSG1-08이 비록

Table 3. Similarity analysis (%) of DGGE banding patterns.

Sample	KSG1-12	KSG1-16	KSG1-07	KSG1-08	KSG1-13
KSG1-12	100.00				
KSG1-16	40.91	100.00			
KSG1-07	36.37	48.00	100.00		
KSG1-08	27.59	37.50	34.38	100.00	
KSG1-13	30.00	57.15	39.13	25.81	100.00

오염된 지하수이지만 상당히 정화되었기 때문에 비오염 지하수(KSG1-13)하고 가까운 미생물군집구조를 가질 것으로 예상이 되었는데, KSG1-13과의 유사성은 25.8%로 매우 낮은 것은 매우 특이한 결과이었다. 향후, 이와 관련하여 보다 자세한 연구가 필요하다. 한편 KSG1-08과 KSG1-12의 낮은 유사도(27.6%)는 오염도가 높을 것으로 예상되는 침출수와 거의 정화된 오염지하수의 오염도 차이에 의한 것으로 사료된다.

계통발생학적 유사도 분석

Table 4는 지하수 시료별로 우점하는 미생물종들이 계통 발생학적으로 어떤 집단에 속하는지를 분포비율로 나타내었다. 침출수인 KSG1-12에서는 α -Proteobacteria에 속하는 우점종들이 55.6%로 가장 많았고 uncultured bacterium이 22.2% 그리고 γ -Proteobacteria와 cyanobacteria가 각각 11.1%로 분포하였다. 처리수인 KSG1-16은 γ -Proteobacteria에 속하는 균들이 50.0%로 제일 높았고 α -Proteobacteria와 CFB group이 각각 16.7%였고 high G+C Gram⁺와 β -Proteobacteria가 각각 8.3%로 나타났다. 가까운 오염 지하수시

Table 4. Relative levels of bacterial clones related to various phylogenetic groups in clone libraries from leachate-contaminated groundwater samples

Phylogenetic group	Symbol ¹	% in the following groundwater samples				
		KSG1-12	KSG1-16	KSG1-07	KSG1-08	KSG1-13
High G+C Gram ⁺	a	0.0	8.3	0.0	0.0	11.1
α -Proteobacteria	b	55.6	16.7	11.1	9.1	11.1
β -Proteobacteria	c	0.0	8.3	66.7	27.3	36.4
γ -Proteobacteria	d	11.1	50.0	11.1	54.5	11.1
CFB ² group	e	0.0	16.7	11.1	0.0	11.1
Cyanobacteria	f	11.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Uncultured bacterium	g	22.2	0.0	0.0	9.1	11.1

¹Symbols for fig. 2.²Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides group.

료(KSG1-07)에서 가장 많은 우점종들이 β -Proteobacteria에 속하였고 66.7%의 높은 분포도를 가졌으며 그 외에 α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria와 CFB(Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides) group에 각각 11.1%의 분포를 보였다. 먼 오염 지하수인 KSG1-08은 54.5%의 미생물종들이 γ -Proteobacteria에 속하였고 27.3%가 β -Proteobacteria에 그리고 9.1%가 각각 α -Proteobacteria와 uncultured bacterium에 속하였다. 순수지하수로 추정되는 KSG1-13의 시료에서는 우점하는 미생물종들이 β -Proteobacteria에 36.4%로 가장 많이 분포하였고 나머지는 high G+C Gram⁺, α -Proteobacteria, γ -Proteobacteria, CFB group과 uncultured bacterium에 각각 11.1%의 고른 분포를 나타내었다.

이와 같이 각각의 시료에 따른 계통발생학적 미생물 우점종들의 분포가 모두 달랐는데 이는 각 시료를 채취한 곳의 오염도나 물리화학적 및 수리지질학적 환경이 서로 다르기 때문에 이에 영향을 받은 생물학적 환경이 변함으로 이를 대변하는 미생물분포도가 다르게 나타났음을 예상할 수 있다. 한편 DGGE분석에 의해 유사도가 가장 가까웠던 KSG1-13과 KSG1-16는 가장 우점하는 계통발생군이 다르지만 가장 많은 다섯 개의 군에서 공통으로 분포하는 미생물이 있음을 알 수 있었다. 침출수의 흐름에 따라서 살펴보면 침출수(KSG1-12)에서는 α -Proteobacteria가 가장 많았고 침출수로 바로 오염된 지하수(KSG1-07)에서는 β -Proteobacteria가 좀 더 먼 오염지하수(KSG1-08)에서는 γ -Proteobacteria가 가장 많았으며 아주 더 멀리 순수지하수로 추정되는 KSG1-13에서는 다시 β -Proteobacteria가 가장 많았으나 다른 계통군의 미생물도 골고루 분포하였다. 이러한 우점종들의 군집구조 변화는 오염도와 유용한 전자수용체의 종류에 따라 달라졌을 것이다. 침출수의 경우에는 메탄생성군이 우점 할 것으로 예상되지만 Archaea를 위한 특별 primers를 사용하지 않아 검출이 안 되었다.

Fig. 2는 각 시료의 DGGE band를 나타낸 것으로 서로 겹치지 않는 band들의 염기서열을 분석하여 계통발생학적 군집을 표시하였다. 군집들은 크게 3개의 분류군으로 나뉘었

는데 α -Proteobacteria, β -Proteobacteria 그리고 γ -Proteobacteria 이었다. 좀 더 구체적으로 설명하면, α -Proteobacteria에 속하는 군들은 uncultured bacterium을 제외하고는 제초제(herbicides) 분해를 잘 한다고 알려진 *Sphingomonas*류가 가장 많았는데 이는 농촌지역의 생활폐기물 매립지의 침출수(KSG1-12)라서 제초제가 많이 포함된 연유인 것 같다[12]. β -Proteobacteria에 속하는 미생물 중에 *Gallionella*속에 속하는 3개의 우점종과 *Thiobacillus* sp. 그리고 *Flavobacterium* sp.가 오염지하수인 KSG1-07에서 발견되었다(결과 미제시). *Gallionella* spp.는 매립지의 상류(upstream)에서 발견되었던 우점종으로 일반지하수에 서식하는 종인 것 같은데[21] 가장 오염이 많이 된 것으로 추정되는 KSG1-07에 많은 것으로 보아 오염도가 그다지 심하지 않은 것으로 생각된다. *Thiobacillus* sp.와 *Flavobacterium* sp.는 각각 철환원균[13]과 황환원균[11]에 해당하므로 이곳에서 철환원 및 황환원 과정이 일어났음을 알 수 있었다. 한편 오염도가 낮은 것으로 추정되었던 KSG1-08시료에서 *Aquabacterium* spp.[9]와 *Pseudomonas* spp.[20]의 발견으로 질산환원/탈질이 주를 이루고 *Acinetobacter* sp.[17]의 발견으로 철/망간환원도 역시 일어났음을 알 수 있었다(결과 미제시). 이와 같이 오염된 지하수인 KSG1-07과 KSG1-08사이의 차이점도 미생물종들의 유전자 염기서열의 비교를 통해 Table 1과 2의 자료와 함께 파악할 수 있었고 두 분석자료가 일치함을 알 수 있었다. 한편 순수지하수인 KSG1-13의 우점 미생물종에는 철환원균인 *Rhodospirillum rubrum* sp.[8]와 황환원균 *Flavobacterium* sp.[11]를 비롯하여 염소계페놀(chlorinated phenols)을 잘 분해하는 *Herbaspirillum* sp.[15], *Arthrobacter* sp.[19] 그리고 *Novospingobium* sp.[23]의 발견되었으나(결과 미제시), 현재의 염소농도가 낮아(Table 2) 과거에 주변의 논으로부터 염소계 농약 등의 오염이 있지 않았나 추정된다.

이와 같이 산화환원에 따른 미생물종의 파악은 침출수로 오염된 지하수의 정확에 있어서 자연저감기능의 이해 및 전자수용체의 추가 등의 전략을 구상하는데 매우 유용한 정보를 제공해 줄 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 매립지 침출수로 오염된 지하수에서 수치화학적 분석결과와 미생물 군집구조 사이의 관계를 밝히기 위해 수행되었다. 이 연구를 위해 5개의 시료, 즉 침출수(KSG1-12), 처리수(KSG1-16), 두 개의 오염 지하수(KSG1-07과 KSG1-08), 비오염 지하수(KSG1-13)를 채취하여 분석하였다. 각 시료의 pH는 순서대로 8.83, 8.04, 6.87, 6.87, 6.53이었으며, 산화환원전위(Eh)는 각각 108, 202, 47, 200, 154 mV 이었고, 전기전도도(EC)는 3710, 894, 1223, 559, 169.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 이었으며, 부유물질(SS)의 농도는 각각 86.45, 13.74, 4.18, 0.24, 11.91 mg/L이었다. KSG1-12 시료의 음이온 농도가 전체적으로 높았는데, 특히 염소이온(Cl^-)과 중탄산염(HCO_3^-)이 높았다. 기타 전자수용체와 관련 있는 이온들의 농도에서, 철(Fe), 망간(Mn), 황산염(SO_4^{2-})은 KSG1-08보다 KSG1-07에서 더 높았고 질산염은 반대로 나타났다. DGGE fingerprint 분석을 통한 유사도 비교는 KSG1-13과 KSG1-16이 57.2%로 가장 높았는데, 둘 다 오염도가 낮거나 오염이 전혀 없기 때문으로 추정된다. 한편, KSG1-08은 KSG1-13과 25.8% 그리고 KSG1-12와 27.6%의 유사성을 나타냈는데 이는 오염도의 차이 때문일 것으로 사료된다. 각 시료 별 우점종들의 가장 많이 분포된 계통발생학적 집단을 보면 KSG1-12는 분석된 클론 중 55.6%가 α -Proteobacteria에 속하였고, KSG1-16은 50.0%가 γ -Proteobacteria, KSG1-07은 66.7%가 β -Proteobacteria, KSG1-08은 54.5%가 γ -Proteobacteria, KSG1-13은 36.4%가 β -Proteobacteria에 속하였다. 이러한 결과를 통해 매립지 침출수가 지하수를 따라 흐르면서 미생물 군집구조가 바뀌었음을 알 수 있었는데, 오염물질의 농도변화, 이용 가능한 전자수용체, 및 기타 여러 환경요인들의 차이에 의한 것임을 추측할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 공공기술연구회 정책 과제인 "지하수 환경 특성화를 위한 미생물, 미소생물의 생태학적 적용과 오염물질 거동 특성 연구"의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Aeson, D. A., M. S. Boguski, O. J. Lipman, J. Ostell, B. F. Ouellet, B. A. Rapp, and D. L. Wheeler. 1999. GenBank. *Nucl. Acids Res.* **27**: 12-17.
2. Amann, R. I., W. Ludwig, and K. -H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
3. An, Y. J., Y. H. Joo, I. Y. Hong, H. W. Ryu, and K. S. Cho. 2004. Microbial characterization of toluene-degrading denitrifying consortia obtained from terrestrial and marine ecosystems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**: 611-619.
4. Armeth, J.-D., G. Milde, H. Kerndorff, and R. Schleyer. 1989. Waste deposit influences on groundwater quality as a tool for waste type and site selection for final storage quality, pp. 399-424. In P. Bacci (ed.), *The Landfill* vol. **20**, Springer, Berlin.
5. Bjerg, P.L., K. Ruge, J. K. Pedersen, and T. H. Christensen. 1995. Distribution of redox sensitive groundwater quality parameters downgradient of a landfill (Grindsted, Denmark). *Environ. Sci. Technol.* **29**: 1387-1394.
6. Christensen, T. H., P. Kjeldsen, P. L. Bjerg, D. L. Jensen, J. B. Christensen, A. Baun, H. -J. Albrechtsen, and G. Heron. 2001. Biochemistry of landfill leachate plumes. *Appl. Geochem.* **16**: 695-718.
7. EPA. 2004. In-situ groundwater bioremediation, pp. 1-38. In EPA (ed.), *How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies of Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers*, (EPA 510-R-04-002).
8. Eriksson, S., T. Ankner, K. Abrahamsson, and L. Hallbeck. 2005. Propylphenols are metabolites in the anaerobic biodegradation of propylbenzene under iron-reducing conditions. *Biodegradation* **16**: 253-263.
9. Kalmbach, S., W. Manz, J. Wecke, and U. Szewzyk. 1999. *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three *in situ* dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **49**: 769-777.
10. Kimmel, G.E. and O. C. Braids. 1980. *Leachate plumes in groundwater from Babylon and Islip Landfills, Long Island, New York*. Geological Survey (Geological Survey Professional Paper 1085), Washington, D.C., US.
11. Knittel, K., A. Boetius, A. L. H. Eilers, K. Lochte, and O. P. P. Linke. 2003. Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia Margin, Oregon). *Geomicrobiol. J.* **20**: 269-294.
12. Kohler, H.P.E. 1999. Sphingomonas herbicilovorans MH: a versatile phenoxyalkanoic acid herbicide degrader. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 336-340.
13. Lovely, D.R. 1993. Dissimilatory metal reduction. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**: 263-290.
14. Lyngkilde, J. and T. H. Christensen. 1992. Redox zones of a landfill leachate pollution plume (Vejen, Denmark). *J. Contam. Hydrol.* **10**: 273-289.
15. Mannisto, M. K., M. A. Tiirola, and J. A. Puhakka. 2001. Degradation of 2,3,4,6-tetrachlorophenol at low temperature and low dioxygen concentrations by phylogenetically different groundwater and bioreactor bacteria. *Biodegradation* **12**: 291-301.
16. Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.

17. Neelson, K.H. and D. Saffarini. 1994. Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **48**: 311-343.
18. Neefs J. M., Y. Van de Peer, L. Hendriks, and R. De Wachter. 1990. Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucl. Acids Res.* **18**: 2237-2317.
19. Nordin, K. 2004. *4-chlorophenol biodegradation by Arthrobacter chlorophenolicus A6*. Doctoral Thesis, Stockholm University, Stockholm, Sweden.
20. Philippot, L. 2005. Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 200-204.
21. Roling, W. F. M., B. M. Van Breukelen, M. Braster, and H. W. Van Verseveld. 2000. Linking microbial community structure to pollution: Biolog-substrate utilization in and near a landfill leachate plume. *Wat. Sci. Technol.* **41**: 47-53.
22. Stumm, W. and J. J. Morgan. 1996. *Aquatic Chemistry*. 3rd ed. Wiley InterScience, Chichester, England.
23. Tirola, M., M. K. Mannisto, J. A. Puhakka, and M. S. Kulomaa. 2002. Isolation and Characterization of *Novosphingobium* sp. strain MT1, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a groundwater bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 173-180.

(Received Apr. 10, 2006/Accepted June 9, 2006)