

지열시스템의 그라우트 및 수온변화가 미생물에 미치는 영향 실험

조윤주¹ · 이진용^{1*} · 김창균² · 한지선²

¹강원대학교 지질학과, ²인하대학교 환경공학과

Effects of Grouts and Temperature Change on Microorganisms in Geothermal Heat Pump

Yun-Ju Jo¹ · Jin-Yong Lee^{1*} · Chang-Gyun Kim² · Ji-Sun Han²

¹Department of Geology, Kangwon National University

²Department of Environmental Engineering, Inha University

ABSTRACT

Objective of this study was to examine the effects of grouts and temperature change on microorganisms in geothermal heat pump. Groundwater samples were obtained from wells in the heat pump system during installation (Oriental medicine hospital) and in the heat pump system under operation (Business incubation center). Grouts are the volclay sodium bentonite. Real-time PCR was used to evaluate total bacterial number and 16S rDNA. The results showed that total bacterial number of groundwater in the heat pump operation was greater than that of non-operation case, which indicates a temperature effect on the bacterial culture. In addition, high concentration of grout showed an elevated bacteria number. In the mean time, a long-term field monitoring is essentially required to confirm the effects of the grouts and the temperature changes.

Key words : Geothermal heat pump, Grout, Bentonite, Water temperature, Microorganism

요 약 문

본 논문은 지열시스템의 설치 시 사용되는 그라우트와 운영에 따른 수온변동이 유발할 수 있는 미생물학적 영향을 실내실험을 통해 살펴보았다. 시료는 지열히트펌프가 아직 가동되지 않는 관정(한방병원)과 지열 히트펌프가 가동 중인 곳(창업보육센터)에서 채취하였다. 실험에 사용한 그라우트는 볼클레이 벤토나이트로 나트륨(Na)계이며 Real-time PCR을 사용하여 각 시료에서 추출된 총 유전자 DNA 중 세균이 가지고 있는 16S rDNA를 정량함으로써 전체 세균의 양을 평가하였다. 실험 결과 지열히트펌프가 가동 중인 지하수에서 총 세균양이 가장 많았으며 벤토나이트를 주입하면서 세균수가 증가하는 경향을 보였다. 한편 그라우트 및 수온영향을 보다 명확하게 파악하기 위해서는 장기적인 현장모니터링이 요구된다.

주제어 : 지열시스템, 그라우트, 벤토나이트, 수온, 미생물

1. 서 론

최근 신재생에너지에 대한 관심이 집중되면서 천부 지열(지중열 및 지하수열)을 이용한 건물 냉난방의 상업화가 활발히 진행되고 있다(이진용 외, 2008; 조윤주 외,

2009; 최현미·이진용, 2009; Lee, 2009). 흔히 이와 같은 설비를 지열히트펌프 시스템(Geothermal Heat Pump)이라 하며 작동유체의 순환방식에 따라 밀폐형(Closed Loop)과 개방형(Open Loop)으로 구분한다. 밀폐형의 경우 일정 심도까지 천공(Borehole)을 한 후에 내부에 지열교환기를

*Corresponding author : hydrolee@kangwon.ac.kr

원고접수일 : 2009. 5. 26 심사일 : 2009. 6. 8 게재승인일 : 2009. 7. 15
질의 및 토의 : 2009. 10. 31 까지

설치하며 보어홀과 지열교환기 사이의 공간은 벤토나이트(bentonite)와 규사(silica sand)의 혼합물(그라우트)로 채우게 된다. 한편 관정형(Standing Column Well, SCW)의 경우 지하수 자체를 냉매로 사용하며 양수한 지하수를 다시 재주입 하게 된다.

지열시스템은 국내외적으로 현존하는 가장 청정한(친환경적인) 냉난방시스템으로 알려져 있다(이진용 외, 2008). 그럼에도 불구하고 부주의한 시스템의 설치 및 운영으로 인해 주변 토양이나 지하수에 영향을 줄 가능성이 있다. 예를 들어 지중 혹은 지하수의 열을 이용할 경우 지중 및 지하수의 열 변화를 유발할 수 있으며 이로 인한 미생물 종(군집)의 변화를 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(김창균 외, 2009; 조운주 외, 2009; York et al., 1998). 본 논문에서는 지열시스템의 설치 시 사용되는 그라우트와 운영에 따른 수온변동이 유발할 수 있는 미생물학적 영향을 실내실험을 통해 살펴보았다.

2. 연구 방법

2.1. 실험개요

지열시스템의 설치 시 사용되는 그라우트(벤토나이트) 및 시스템 가동으로 발생하는 수온변화의 영향을 평가하기 위하여 실내실험을 수행하였다. 실험기간은 2008년 6월 20일에서 8월 27일로 약 2 개월간 진행되었으며 실험에 적용된 지열시스템은 수주지열정(SCW)이다. 실험에 사용된 지하수 시료는 각각 2008년 6월 14일 및 16일에 S대학교 한방병원(대조군)과 창업보육센터(실험군)의 지열시스템에서 채취하였으며 이들은 약 1 km 떨어진 지점에 위치한다. 창업보육센터의 시료(D)는 현재 지열 히트펌프가 가동 중인 곳에서 채취한 지하수(재주입 직전)이며 한방병원(H)은 지열히트펌프가 아직 가동되지 않은 관정(대조군)의 지하수 시료이다(Table 1).

한편 실험에 사용한 그라우트는 볼클레이 벤토나이트 나트륨(Na)계로 수 백만년 전 화산폭발에 의해 생성된 해저 화산재 층이 지층의 용기현상에 의해 형성된 천연의 점토 광물로서 전 세계적으로 분포되어 있는 칼슘(Ca)계나 기타의 벤토나이트와는 달리 미 서남부 와이오밍, 몬티나, 사우스다코다에 걸친 블랙힐 지역에 주로 분포한다. 이러한 볼클레이 벤토나이트는 각 3층 판으로 결합된 다

수의 판상층 구조로 구성되어 있다(볼클레이코리아, 2008).

2.2. 실험방법

벤토나이트의 영향을 살펴보기 위하여 한방병원(H)의 지하수 시료에 벤토나이트 1 g/L (H-1B) 및 10 g/L (H-10B)을 주입한 후 24시간 동안 항온실(22~23°C)에서 배양하였다. Fig. 1은 벤토나이트 주입 전의 한방병원(H) 지하수 시료 및 벤토나이트 상태를 보여준다. 이 때 지하수는 총 1.5 L를 이용하였으며 벤토나이트 주입과 동시에 마그네틱 바(magnetic bar)를 이용하여 교반하였다(Fig. 2). Fig. 2의 우측은 24시간 동안 교반 후의 시료의 모습이다.

한편 벤토나이트 교반 후의 지하수 내 총 미생물의 수를 정량화하기 위하여 다음과 같은 절차를 수행하였다. 우선 지하수 시료(D와 H)는 1 L를 0.2 µm 공극크기의 필터

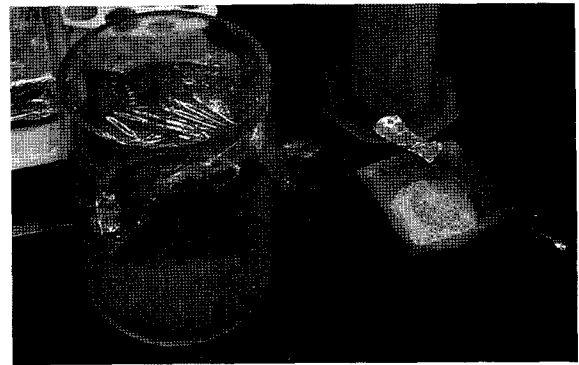


Fig. 1. Groundwater sample (H) and bentonite used in the experiment.

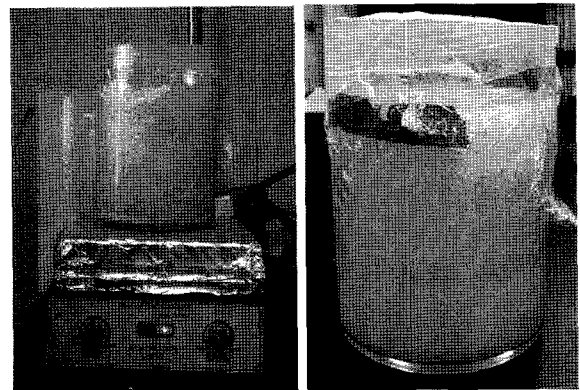


Fig. 2. Agitation mixing of groundwater with bentonite.

Table 1. Groundwater samples used in this experiment (Lee et al., 2008)

Location	Sample ID	Temperature	Sampling
Business incubation center of S Univ. (heat pump), 120 RT	D	23°C	June 16, 2008
Oriental medicine hospital of S Univ. (control), 300 RT	H	15°C	June 14, 2008

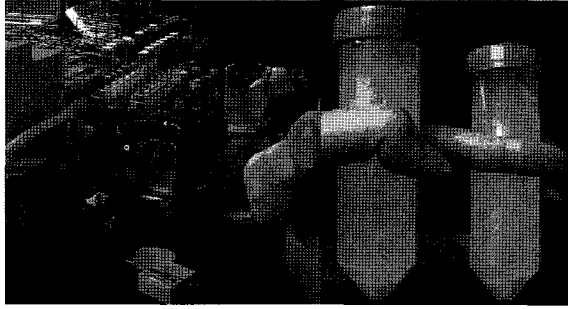


Fig. 3. Filtration and centrifugation of groundwater sample for DNA analysis (after treated by bentonite).

터로 거른 뒤(Fig. 3의 좌측), 여과지에 있는 미생물로부터 DNA를 추출하였으며 벤토나이트 교반 후의 한방병원(H) 시료는 100 mL를 3,000 rpm(분당 회전수)에서 15분간 원심분리(Hanil Science HA-1000-3, 원심분리기)하여(Fig. 3의 우측), 분리된 침전물에서 DNA를 추출하였다. 침전물 또는 여과지에 있는 미생물로부터 세포(cell)를 분리하기 위하여 Fast[®]PrepInstrument (Q-Bio gene)를 이용해 Speed 4에서 5초간 유리구슬로 세포벽을 파괴(bead beating)하여 침전물 입자로부터 세포를 분리시켰다. 그 후 Fast[®]DNASPIN Kit (Bio101 system, Q-Bio gene)를 사용하여 침전물의 총 유전자 DNA를 추출하였다.

Real-time PCR (실시간 증합효소연쇄반응) 방법은 특정 환경 변화에 따른 미생물 영향을 관련된 반응 유전자를 이용하여 빠른 시간 내에 정량 평가하게 되므로 생물학적 거동을 효과적으로 파악하는 데 유용하게 이용되어 왔다. 본 실험에서는 Real-Time PCR (Bio Rad, MiniOpticon Real-time Detection System)을 사용하여 각 시료에서 추출된 총 유전자 DNA 중 세균이 가지고 있는 16S rDNA 유전자를 정량함으로써 전체 세균의 양을 정량 평가하였으며, 실험에 사용된 프라이머(primer) 쌍은 Table 2와 같다.

Real-time PCR (실시간 증합효소연쇄반응) 방법은 기존 PCR 방법에서 더 나아가 목적 DNA를 사이클(cycle)당 2 배씩 증폭시키면서 발현되는 형광물질의 양을 실시간으로 측정하여 표준(standard)과 비교하여 DNA의 초기량을 정량할 수 있는 방법이다. 가장 중요한 인자는 Ct 값으로 이것은 측정 프로브(probe)의 형광(fluorescence)값이 기본 값(base line)과 교접되는 지점의 사이클 수(형광 값이 기본 값을 넘어 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하

는 지점의 주기 수)로서 정량 값을 판별하는 척도가 된다. 절대정량은 미생물의 수를 알고 있는 표준의 Ct를 기준으로 검량선을 작성하여 시료의 DNA를 정량화한다.

세부적인 정량과정은 먼저 시료의 유전자 DNA 0.3 μ L, 목적 프라이머 각 200 μ M, 그리고 유전자결합색소(SYBR Green dye)가 포함된 iQ SYBR Green Supermix (2X, Bio-Rad, USA) 25 μ L에 멸균 증류수를 첨가하여 시료의 총 부피는 50 μ L가 되도록 조정한다. 그 후 50 μ L의 시료를 백색 PCR 튜브에 넣고 Real-Time PCR을 이용하여 증폭과정 중에 생성되는 dsDNA (이중가닥 DNA)로 인해 발광하는 유전자결합색소의 형광 세기를 실시간으로 측정하였다. 실험 결과의 재현성을 높이기 위해 모든 유전자의 정량은 기준 유전자와 함께 2회씩 반복 측정하였다.

한편 창업보육센터(D) 및 한방병원(H) 지하수 시료의 미생물 중분석을 수행하였다. 추출한 총 유전자 DNA에서 종 다양성을 확인하기 위하여 16S 공통 프라이머(27F-5' AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3', 1492R-5' TAC GGY TAC CTT GIT ACG ACT T 3')에 의한 증폭을 수행하였다. PCR 증폭산물은 WinzardSV Gel 및 PCR Clean-Up System (Promega, USA)으로 정제하였으며 정제된 16S rDNA 유전자 PCR 산물을 pGEM-T easy vector (Promega, USA)에 접합시켰다. 접합된 PCR 산물을 숙주세포(*E. coli* XL1-Blue)로 형질전환(transformation)하였고, X-Gal과 IPTG로 처리된 일반영양(Luria-Bertani) 배지에 형질전환된 세포를 배양하여 균주의 접합이 확인된 콜로니(세포집단)의 경우 해당 콜로니의 핵외염색체를 회수하여 특정 세균의 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 미생물 염기서열 분석은 미국 국립생물기술정보센터(NCBI: National Center for Biotechnology Information) 유전자은행에 등록된 데이터베이스에 기초하여 실시하였다.

3. 결 과

3.1. 지하수 및 벤토나이트 주입 후 미생물의 농도분석

본 실험에서 지하수 시료의 유전자 정량을 위해 사용된 표준시료는 PCR 과정 및 정제과정을 통해 제작되었다. Fig. 4는 각각 표준을 10배씩 희석한 시료의 표준곡선(standard curve)을 나타낸다. 또한 본 실험에 사용된 시료의 총 세균 유전자 복제 수는 시료에 존재하는 세균의

Table 2. Primers used for amplification of 16S rDNA gene (Muyzer et al., 1993; Lee et al., 2008)

Target	Primer	Sequence(5'-3')	PCR condition
Bacteria (181 bp)	341f	CCTACGGGAGGCAGCAG	95°C min, 60°C 1 min, 72°C 2 min
	518r	ATTACCGCGGCTGCTGG	

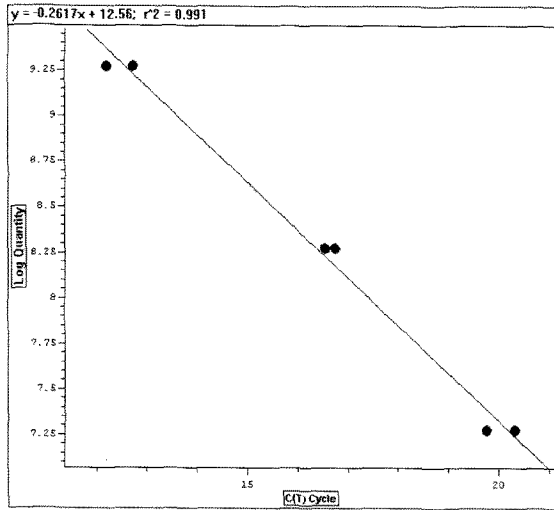


Fig. 4. Fluorescence data of standard sample and standard curve.

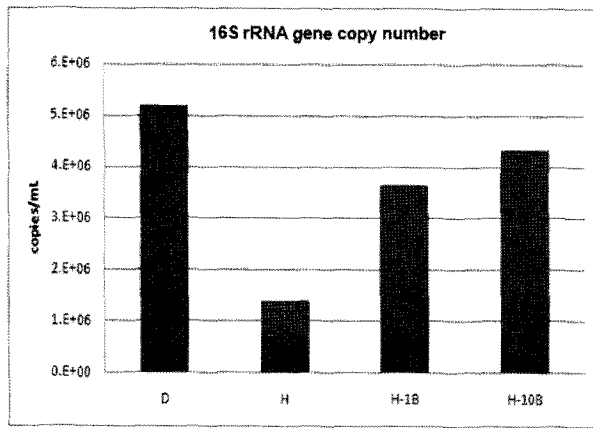


Fig. 5. Quantification results of 16S rDNA gene for D, H, H-1B and H-10B samples.

양과 비례하며 그 결과는 Fig. 5와 같다. 대조군(control)으로 설정한 한방병원(H)과 비교할 때 지열히트펌프가 가동 중인 창업보육센터(D, 실험군) 지하수에서 총 세균양이 가장 많았다. 이는 두 지하수 시료의 다른 조건이 동일하다는 가정 하에 온도 차이에 의한 세균 수 변화가 있음을 시사한다. 또한 벤토나이트를 주입하면서 세균수가 증가하는 경향을 보였고 벤토나이트를 1 g/L 주입하였을 때(H-1B)보다 10 g/L를 주입하였을 때(H-10B) 세균수가 더욱 증가하였다. 이는 부착하여 성장하는 세균 등이 벤토나이트를 주입함으로써 성장이 용이해 질 수 있었던 것으로 사료된다.

3.2. 미생물 종분석

Fig. 6과 Fig. 7의 계통수(phylogenetic tree)는 Mega3

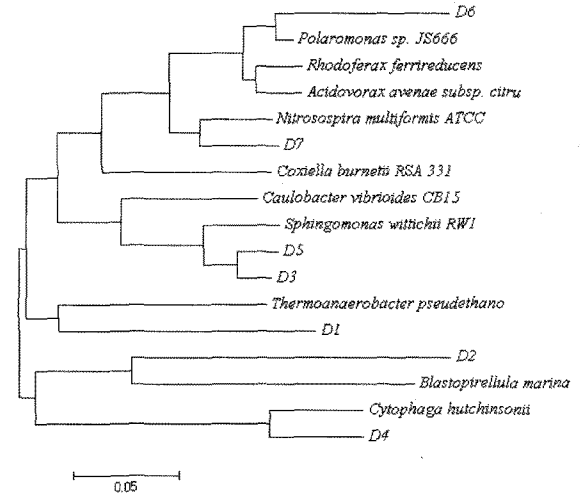


Fig. 6. Phylogenetic tree of D (business incubation center) groundwater sample.

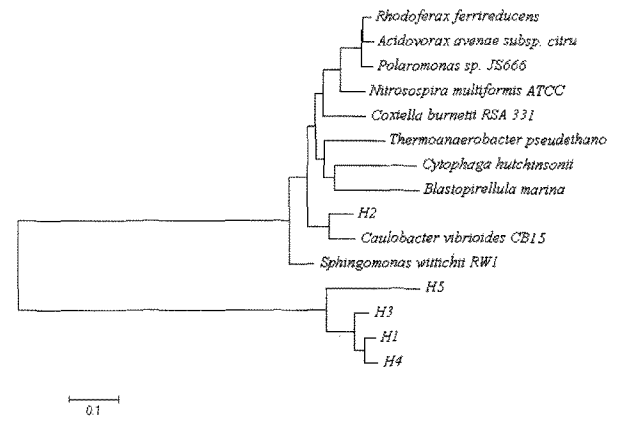


Fig. 7. Phylogenetic tree of H (oriental medicine hospital) groundwater sample.

프로그램을 이용하여 작성하였으며 각 근연종인 미생물에 대한 정보는 미국 국립생물기술정보센터(NCBI)의 게놈 프로젝트의 자료를 이용하였다. 본 실험에서 도출된 미생물의 16S rDNA 유전자는 창업보육센터(D)에서 D1~D7, 한방병원(H)에서 H1~H5와 같다. D1과 근연종인 *Thermoanaerobacter pseudethano*는 고온균으로서 티오황산염(thiosulfate)을 황화수소(hydrogen sulfide)로 환원하는 균으로 알려져 있다(이진용 외, 2008). D3 및 D5의 근연종인 *Sphingomonas wittichii* RW1은 산업폐기물의 소각 및 제초제 등의 중간산물인 디벤조-p-다이옥신(dibenzo-p-dioxin)이나 디벤조퓨란(dibenzofuran)을 탄소원으로 하여 성장할 수 있는 중온균으로 판단된다.

또 D4의 근연종인 *Cytophaga hutchinsonii*은 토양 등에서 쉽게 발견되는 세균으로 여러 난분해성 유기물을 분

해할 수 있다. D6과의 근연종인 *Polaromonas* sp. JS666은 cis-dichloroethane (cDCE)으로 오염된 토양에서 발견되는 균으로 cDCE를 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있다. *Nitrosospira multiformis* ATCC 25196은 암모니아 산화균으로 아질산염을 생성하며 토양에서 쉽게 발견되는 균으로 D7과 근연종으로 나타났다.

한편 지열시스템을 설치 중인 한방병원(H) 지하수로부터 발견된 미생물 중 H1, H3, H4 및 H5의 경우 근연종이 존재하지 않았으며 새로운 종에 속하지만 알려지지 않은 것으로 분류되었다. 이 중 H2는 수환경에서 주로 서식하는 *Caulobacter vibrioides*와 근연종인 것으로 나타났다(Fig. 7). 종의 다양성이 지열시스템이 운영 중인 16S rDNA 유전자에 비해 매우 낮게 나타났다.

4. 결 론

본 실내실험 결과 지열시스템이 운영되는 곳에서 채취한 지하수의 미생물 수가 그렇지 않은 곳보다 많으며 미생물 종이 다양한 것으로 파악되었고 또한 온도와 벤토나이트의 영향(미생물 수 및 종의 변화)을 받는 것으로 추정된다. 그러나 실제 지열시스템이 운영되는 현장에서는 실내실험과 달리 온도변화가 장기적으로 나타나며 벤토나이트의 용출특성(장시간 느리게 용출)이 다를 수 있으므로 본 실험결과만으로 그 영향을 확정하기는 어렵다. 그러므로 향후 지열시스템의 설치가 계획된 현장에 대하여 설치 이전과 설치 후 운영 중에 지하수 시료를 채취하여 미생물 분석 및 일반수질 분석을 수행하는 것이 필요하다. 또한 계절적 변화 평가 및 장기간 운영에 따른 미생물 영향 모니터링이 추가적으로 요구된다.

사 사

본 논문은 환경부(토양지하수과)가 의뢰하고 한국지하

수도양환경학회가 수행한 “지열시스템이 토양·지하수에 미치는 영향에 관한 연구” 결과물의 일부입니다. 이에 감사드리며 논문은 연구자의 의견으로 환경부 및 한국지하수도양환경학회의 의견과 다를 수 있습니다. 좋은 심사의견을 주신 익명의 심사위원님들께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 김창균, 한지선, 윤지윤, 이진용, 임수영, 홍경표, 2009, 지하수히트펌프의 미생물학적 영향에 대한 실내실험, 2009년 한국지하수도양환경학회 춘계학술대회, 고려대학교, p. 285-287.
- 볼클레이코리아, 2008, 볼클레이 소디움 벤토나이트, www.volclay.co.kr.
- 이진용, 이종규, 김정우, 김창균, 2008, 지열시스템이 토양·지하수에 미치는 영향에 관한 연구: 최종보고서, 환경부, 한국지하수도양환경학회, p. 250.
- 조윤주, 이진용, 임수영, 홍경표, 2009, 지열히트펌프시스템이 토양 및 지하수환경에 미치는 영향에 대한 고찰, 지하수도양환경, **14**(3), 22-31.
- 최현미, 이진용, 2009, 녹색정화: 저탄소 토양·지하수오염 정화를 위한 선택, 지하수도양환경, **14**(1), 11-17.
- Lee, J.Y., 2009, Current status of ground source heat pumps in Korea, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **13**(6-7), 1560-1568.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 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.
- York, K.P., Jahangir, Z.M.G.S., Solomon, T., Stafford, L., 1998, Effects of a large scale geothermal heat pump installation on aquifer microbiology. *The 2nd Stockton Geothermal Conference*, Stockton University, p. 8.