

# 실시간 정량 종합효소연쇄반응을 이용한 광산 배수의 수계 영향 평가

## Evaluation of the Effect of Mine Drainage on the Aquatic Environment by Quantitative Real-time PCR

한지선 · 서장원 · 지원현\* · 박현성\* · 김창균 †  
 Ji-Sun Han · Jang-won Seo · Won-Hyun Ji\* · Hyun-Sung Park\* · Chang-Gyun Kim †

인하대학교 환경공학과 · \* 한국광해관리공단  
 Department of Environmental Engineering, Inha University · \*Mine Reclamation Corp.

(2008년 10월 14일 접수, 2010년 01월 13일 채택)

**ABSTRACT** : Metals and sulfate can be considerably dissolved at low pH condition in the acid mine drainage(AMD) and it would make an environmental problems. There are only few of acid mine drainage treatment systems in Korea which are operating, but these still have an effect on the surrounding stream. In this study, quantification of indicator microorganisms was conducted to judge the environmental impact of AMD on microflora by quantitative real-time PCR in the drainage samples of four mines and the water samples of each surrounding stream. Two species of iron reducing bacteria(*Rhodoferrax ferrireducens* T118 and *Acidiphilium cryptum* JF-5) were selected for indicator bacteria based on 16S rRNA cloning analysis, and sulfate reducing bacteria(*Desulfosporosinus orientus*), iron and sulfur oxidizing bacteria(*Acidothiobacillus ferrooxidans*) and iron oxidizing bacteria(*Leptosprillum ferrooxidans*) were included into indicator since these were found in the previous studies on the mining area. Thereafter, the comparative analysis of four mines were established by the microbiological variation index and it was determined that the biological environment effect of AMD is highest in Samtan mine which doesn't contain treatment system by the value.

**Key words** : 16S rDNA, real-time quantitative PCR, mine drainage, Molecular biological monitoring

**요약** : 산성광산배수(Acid Mine Drainage; AMD)는 낮은 pH조건에서 중금속 및 황산염이온 등이 다량 용존되어 환경오염 문제를 발생시킨다. 국내의 폐광산 일부에서는 산성광산배수를 처리하기 위해 정화시설이 운영되고 있으나 여전히 주변 하천에 영향을 미치고 있다. 본 연구는 산성광산배수 및 영향을 받는 하천에서 지표미생물의 특이적 유전자를 실시간 정량 종합효소 연쇄반응(Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction; Real-time qPCR)을 이용하여 확인 및 정량함으로써 광산배수의 환경영향을 미생물학적으로 판단하고자 수행되었다. 지표 중으로 선정된 미생물은 16S rRNA 미생물 군집분석 결과 발견된 미생물 중 철환원균인 *Rhodoferrax ferrireducens* T118, *Acidiphilium cryptum* JF-5이며 이 외에 기존에 광산에 존재하는 것으로 알려진 미생물 중 호산성 황환원균인 *Desulfosporosinus orientus*, 철산화균인 *Leptosprillum ferrooxidans*, 철 및 황산화균인 *Acidothiobacillus ferrooxidans*이었다. 최종적으로, 본 연구에서 각 광산의 광산배수가 하천에 미치는 영향을 정량적으로 판단하여 비교하기 위해 광산배수로 인한 하천에서의 미생물 변동 지수를 산정하였으며 연구 대상 4개 광산 중 광산배수 처리시설이 없는 삼탄의 광산배수의 경우 주변 방류 하천으로의 미생물학적 환경영향이 가장 큰 것으로 나타났다.

**주제어** : 16S rDNA, 실시간 정량 PCR, 광산배수, 분자생물학적 모니터링

## 1. 서론

석탄은 산업화시대의 주 에너지원으로 오랫동안 사용되어 왔으나 석유의 사용으로 그 이용량이 급격히 감소하여왔고 이에 따라 대부분의 광산들이 폐광되기 시작하였다. 2006년 산업자원부 보도 자료에 따르면 우리나라의 총 광산은 2,006개(가형 광산 730개, 폐광산 1,276개)로 절반 이상이

폐광되어 방치되어 있다. 이 중 적절한 환경오염방지시설을 갖춘 곳은 매우 드물어 대부분이 지속적으로 환경오염을 야기하고 있다. 이러한 폐광산의 광해로 인해 자연환경의 훼손 및 국민건강 침해에 대한 우려로 사회적 관심이 고조되고 있는 실정이다.

폐광에서는 광물의 채굴 혹은 처리과정에서 발생한 황화 광물이 산소 및 물에 의해 산화작용을 받아 유실되면서 지반

† Corresponding author : E-mail : cgk@inha.ac.kr Tel : 032-860-7561 Fax : 032-865-1425

환경이 중금속으로 오염된다. 황철석( $\text{FeS}_2$ , Pyrite)과 같은 황화광물은 지하수나 지표수와 반응하여 산성광산배수를 형성할 수 있다. 이와 같이 생성된 낮은 pH의 광산배수에서는 Fe, Al, Mn, Ca, Mg와 황산이온( $\text{SO}_4^{2-}$ ) 등이 다량 용존하게 되어 수계를 통해 이동하면서 환경문제를 발생시킨다. 이전의 연구에 의하면 산성광산배수 형성에 미생물이 관여하여 반응을 더욱 촉진하는 것으로 알려져 있다.<sup>1)</sup> 유출된 광산폐수 내 용존 철이 공기와 접촉하면 산화된 불용성 침전물( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ )을 형성하여 yellow boy 현상을 유발하며 알루미늄에 의한 수산화알루미늄( $\text{Al}(\text{OH})_3$ )의 침전은 백화현상을 초래하게 된다.

현재 산성광산배수를 처리하기 위해 중화처리공정을 이용하는 물리화학적 처리방법과 소택지 및 SAPS(Succussive Alkalinity Producing Systems)조를 설치하여 광산배수의 체류를 유도하는 자연정화방법이 이용되고 있다. 이와 같이 설치된 광산 배수 정화시설들이 법적 기준 이내로 운전되고 있음에도 불구하고 주변 하천에서는 yellow boy 현상과 같은 시각적인 오염이 빈번히 발생하고 있어 각 시설의 정화효율에 대한 불신이 상존해 있다. 그러므로 방치되어 있는 폐광산 뿐만 아니라 광산배수정화시설이 설치되어 있는 곳의 주변 환경오염에 대한 평가, 특히 생태학적 평가의 기본이 될 수 있는 생물학적 평가는 매우 중요시될 사항으로 여겨진다. 그러나 이러한 광산배수 처리시설의 방류수의 생물학적 모니터링 또는 생물학적 환경 영향에 대한 평가는 국내외 적으로 매우 부족한 실정이다.

광산배수 및 주변 환경으로의 영향을 생물학적으로 모니터링하기 위한 가장 전통적인 방법은 배양법으로 미생물의 분포를 확인하는 것이다. CFU(colony forming unit)을 이용하여 다량의 금속이 함유된 산성광산배수를 처리하기 위한 습지 시스템의 이용가능성을 평가하거나 최확수(MPN, most probable number)산출 실험을 통해 광산배수 처리시설로부터 철산화세균과 황산화세균을 분석하였다.<sup>2,3)</sup> 그러나 이전의 연구에서 전체 세균의 1%정도만이 배양될 수 있는 것으로 밝혀져 배양에 의존하는 방법의 정확성이 매우 낮은 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup> 이에 반해 최근 각광을 받고 있는 분자생물학적 기법은 미생물의 유전자를 대상으로 하기 때문에 기존의 배양법으로는 분리할 수 없는 다양한 미생물 종을 환경으로부터 쉽게 검출할 수 있어 자연생태계에 존재하는 다양한 미생물의 분포를 조사 분석하는데 있어서 전통적인 배양법에 비해 매우 효과적이고 정확한 방법이다. 그 예로서 변성 농도 구배 겔 전기영동(DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

기법 또는 제자리형광잡종화(FISH, Fluorescence *In Situ* Hybridization)법을 이용해 광산배수의 미생물을 연구하려는 시도가 있었다.<sup>5,6)</sup> 또한 가장 많이 이용되는 연구로 16S rRNA 염기서열 분석을 이용한 미생물 종 다양성 분석방법이 있다. 한 연구에서는 광산의 영향을 받는 호수에서 철환원균을 분리 배양하여 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 실시하여 철 환원균을 분석하고 세균의 종을 확인하였다.<sup>7)</sup> 그러나 이와 같은 DGGE와 FISH 및 16S rRNA 염기서열 분석은 특정 유전자를 절대적으로 정량할 수 없어 환경 모니터링 및 평가의 지표로는 쓰이기 힘들다는 한계점을 가지고 있다.

상술한 바와 같이 종래의 폐광산의 오염평가에 관한 기술은 비정량적 미생물 분석에 그쳐 오염된 주변 수계의 환경영향을 결정하기 위한 평가에 사용되기에는 미흡하였다. 따라서 자연적으로 발생하는 중금속의 영향을 평가하기 위해 해당 중금속의 오염도를 실질적으로 반영하는 지표 미생물을 선정해 이를 정량하는 생물학적 평가기술을 도입할 필요성이 있다. 또한 연구 결과를 통해 각 광산의 주변 수계로의 미생물학적 영향 평가를 수치화한다면 이후 연구에서 유용하게 참고 될 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구는 강원도에 위치한 4개의 광산을 대상으로 하여 광산배수 및 방류가 유출되는 하천의 상류와 하류의 미생물 조사 및 지표 미생물의 정량을 수행하였다. 그 결과를 바탕으로 미생물학적 영향 평가를 실시하고 각 광산의 광산배수의 하천에 미치는 영향을 정량적으로 비교하기 위해 미생물 변동지수를 산정 하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1. 연구 대상 광산 배수 처리시설 및 시료 채취

본 연구에서 대상으로 한 광산은 총 4곳이며 모두 강원도에 위치해 있다. 강원도 정선군 고한읍에 위치한 삼탄(S1~S4) 탄광의 경우 광산배수 처리시설이 없이 방치되어 있으며 나머지 세 곳은 처리시설을 갖추고 있다. 강원도 삼척시 도계읍의 유창(Y1~Y3)탄광의 광산배수는 산화조, SAPS조 및 소택지를 순서대로 거쳐 주변 하천으로 방류되고 있으며 같은 도계읍에 위치한 (삼마)태정(T1~T3) 탄광의 배수는 SAPS조, 산화조 및 소택지를 거쳐 하천으로 방류되고 있다. 강원도 태백시 문곡소도동의 함태(H1~H3) 탄광의 배수처리시설은 중화반응조 및 침전조로 구성되어 있다.

수질 분석 및 미생물 분석을 위한 시료 채취는 2008년

**Table 1.** Locations of water samples of the four mines and mine drainage treatment systems

Coal Mine	Sample	Location	Treatment system	Capacity
Samtan	S1	Control stream	No treatment system	
	S2	Leachate of the mine tailing		
	S3	Mine drainage		
	S4	Stream including effluent		
Yuchang	Y1	Control stream	Oxidation pond > SAPS > Constructed wetland	800 m <sup>3</sup> /day
	Y2	Mine drainage		
	Y3	Stream including effluent		
Taejung	T1	Control stream	SAPS > Oxidation pond > Constructed wetland	200 m <sup>3</sup> /day
	T2	Mine drainage		
	T3	Stream including effluent		
Hamtae	H1	Control stream	Neutralization > settling tank	8,000 m <sup>3</sup> /day
	H2	Mine drainage		
	H3	Stream including effluent		

5월과 7월 두 번에 걸쳐 수행 되었으며 1 L 용량의 베일러 (Cole-Parmer, USA)를 이용해 채취할 시료로 3번 세척한 후 광산배수 및 방류되는 하천수를 채취하였다. 시료채취 지점 및 특성은 Table 1과 같다. 채수한 시료 중 100 mL는 0.45 μm pore size의 membrane filter (Whatman, Cat No. 6786 2502)를 현장에서 통과시켰으며 filter는 미생물 분석에 사용하였고 투과수는 50 mL 용량의 tube에 보관하여 황산이온의 기기분석에 사용하였다. 또한 여과하지 않은 시료는 현장분석에 사용하고 1 L를 무균 채수병에 채취하여 4°C 냉암소에 보관하여 실험실로 이동시켜 냉장 보관한 후 금속(Fe, Mn, Al, Cu, Mg, Ni)의 분석에 사용하였다. 2가철 분석용 시료는 산성화하여 따로 갈색병에 채취하였다.

## 2.2. 광산배수 수질 분석 방법

산화환원전위(ORP), 전기전도도 및 pH는 현장에서 측정하였다. 산화환원전위는 ORP meter(Horiba D-52 portable pH/ORP meter, Japan), 전기전도도는 전기전도도 측정기(YSI conductivity meter, Model 30, USA)를 이용하였고 pH는 pH meter(Orion 3-Star portable pH meter, USA)를 이용하여 측정하였다.

생물학적 산소요구량(BOD), 2가철(Ferrous iron)이 Standard Methods<sup>®</sup>에 준하여 분석되었다. SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 농도는 이온 크로마토그래피(IC, Yong Lin Instrument, Water 432 Conductivity Detector, Korea)에 의하여 결정되었다. 중금속 농도는 질산에 의한 분해로 전처리를 한 후 유도 결합플라즈마 방출분광분석기(ICP-OES, Varian, Liberty Series 2, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 2.3. 미생물 종 분석 방법

시료 100 mL를 0.45 μm pore size의 membrane filter로 여과하고 이 membrane filter를 미생물 분석을 위한 시료로 사용하였다. 여지에 남겨진 침전물로부터 FastPrep<sup>®</sup>Instrument(Q-Bio gene, USA) 및 FastDNA<sup>®</sup>SPIN Kit(Bio101 system, Q-Bio gene, USA)를 사용하여 미생물의 총 genomic DNA를 추출하였다. 각 샘플에 존재하는 세균들의 종을 확인하기 위해 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 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하였다(PCR Machine, Techgene). PCR의 증폭산물은 Winzard<sup>®</sup>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(E.coli XL1-Blue)로 형질전환(Transformation)하였다. 그 후 X-Gal과 IPTG로 처리된 LB(Luria-Bertani) 배지에 형질전환 된 세포를 배양하여 균주의 접합이 확인된 콜로니의 경우 해당 콜로니의 플라스미드를 회수하여 특정 세균의 16S rDNA 염기서열을 분석 하였다. 미생물 염기서열 분석은 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 유전자은행에 등록된 데이터베이스와 비교하여 실시하였다.

## 2.4. 실시간 정량 PCR을 이용한 정량 방법

실시간 정량 중합효소 연쇄반응은 정량대상 유전자를 한 cycle당 2배씩 복제하며 발현되는 형광물질의 양을 실시간으로 측정하는 방법으로 환경 변화에 따른 미생물 영향을 관

**Table 2.** Primer sets for quantitative real-time PCR of target bacteria and the temperature condition

Target	Primer	Sequence (5'-3')	PCR condition	Product size (bp)	Reference
Bacteria	338f	CCTACGGGAGGCAGCAG	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 2 min	181	15)
	518r	ATTACCGCGGCTGCTGG			
Desulfosporosinus orientus	Dor-F	GTGGTTTAATTCGACGCAACGCGA	95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec	153	This study
	Dor-R	TGCGGGACTTAACCCAACATCTCA			
Acidithiobacillus ferrooxidans	Afe-F	AGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA	95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec	176	This study
	Afe-R	ACACTCAGTACGCTAGGCACCAAA			
Leptospirillum ferrooxidans	Lfe-F	TCGCATATCAGAACGATGCGGTGA	95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec	131	This study
	Lfe-R	AACACACAAGGCGACCTCTCTCAT			
Rhodoferrax ferrireducens T118	Rfe2-F	ACAGAGGGACAATACGCCAACCAT	95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec	186	This study
	Rfe2-R	CCGGTTGGCAACAAAGATGGTGAT			
Acidiphilium cryptum JF-5	Acr-F	CGGCCGAGAAGTTCATGCACAAAT	95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 30 sec	195	This study
	Acr-R	AGACGATGATCTGCTTGCCGGAAT			

련된 반응 유전자를 정량 할 수 있게 하는 분자생물학적 기술이다. 실시간 정량 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위해 정량 대상으로 설정한 미생물 종에 특이적인 프라이머를 제작 하였으며 각 프라이머의 염기서열은 Table 2와 같다. 각 유전자의 절대정량을 위해서는 검량선을 도시하기 위한 standard DNA가 필요로 하게 된다. Standard DNA는 획득한 총 genomic DNA를 대상으로 각 프라이머에 대하여 PCR에 의한 증폭을 수행하고 정제하여 제작하였다. 정제된 standard DNA는 멸균증류수에 녹여 260 nm의 UV 파장에서 흡광도(O.D.260)를 측정하여 다음 식에 의해 copy number를 계산하였다.

copies/mL =

$$\frac{(O.D.260 \times 50 \mu\text{g/mL for dsDNA})}{(bp \text{ of DNA} \times 660 \text{ g/mole})} \times (6.022 \times 10^{23} \text{ copies/mole}) \times 10^{-6}$$

상기 식을 통해 계산된 copy number의 Log값과 10<sup>2</sup>배, 10<sup>3</sup>배, 10<sup>4</sup>배, 10<sup>5</sup>배 희석된 PCR산물을 실시간 정량 PCR을 하여 얻은 Ct(Threshold cycle)값 사이의 그래프를 그려 검량선을 잡는다. Ct값은 형광(fluorescence)값이 base line 을 지나는 지점의 cycle 수로서 정량 값을 판별하는 척도로 사용된다. 본 연구에서는 MiniOpticon Real-time Detection System(Bio Rad, USA)을 이용하여 각 시료에서 추출된 총 genomic DNA 중 선택한 대표 종에 대한 특이 유전자의 copy number를 정량 하였다.

**Table 3.** Water quality of samples in four mines

Sample	pH	ORP (mV)	Conductivity (uS/cm)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	BOD (mg/L)	Fe <sup>2+</sup> (mg/L)	Fe (mg/L)	Mn (mg/L)	Al (mg/L)	Cu (mg/L)	Mg (mg/L)	Ni (mg/L)
S1	7.1	283	72.1	0.99	0.16	2.66	0.30	0.13	1.15	0.06	9.68	0.00
S2	2.8	551	2036.0	245.70	0.26	7.73	82.54	44.39	202.85	0.49	170.24	4.66
S3	6.6	93	665.0	11.81	0.31	3.75	6.34	5.58	17.76	0.03	92.59	0.00
S4	4.5	381	535.5	17.54	0.37	6.23	37.05	10.39	25.74	1.71	118.53	0.27
Y1	7.1	105	524.0	11.05	1.53	6.20	1.89	7.85	0.72	0.02	155.31	0.00
Y2	6.2	-19	1889.5	62.65	0.12	335.99	156.29	16.86	0.38	0.02	186.27	0.00
Y3	6.7	103	601.0	14.84	0.84	2.71	1.86	1.10	4.84	0.08	126.94	0.00
T1	7.0	-112	199.3	0.94	0.87	2.85	3.09	0.05	2.77	0.03	16.50	0.00
T2	2.7	166	3258.0	45.96	0.39	464.48	628.80	63.56	120.26	0.04	182.56	4.23
T3	6.5	-289	355.0	6.35	0.90	3.46	6.33	1.17	0.72	0.03	51.83	0.00
H1	7.2	-152	1376.0	2.01	1.36	2.30	87.07	8.78	1.89	0.03	107.15	0.00
H2	6.0	-398	1340.5	47.67	1.01	434.78	114.42	14.29	2.01	0.04	187.38	0.24
H3	6.8	-300	504.0	11.42	0.66	5.61	2.66	0.88	2.94	0.04	81.72	0.00

**Table 4.** Identified species of mining area based on 16S rRNA gene sequence analysis

Sampling site	Species (NCBI accession number)	Identities	Gaps
Samtan	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 (NC_007794)	1412/1456 (96%)	15/1456 (1%)
	<i>Pedobacter</i> sp. BAL39 1103467000516 (NZ_ABCM01000001)	1425/1493 (95%)	14/1493 (0%)
	<i>Arcobacter butzleri</i> RM4018 (NC_009850)	1422/1493 (95%)	23/1493 (1%)
	<i>Rhodoferax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1464/1505 (97%)	12/1505 (0%)
	<i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5 (NC_009484)	1397/1465 (95%)	18/1465 (1%)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A (NC_002976)	1514/1514 (100%)	0/1514 (0%)
Yuchang	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> JIP02/86 (NC_009613)	1418/1483 (95%)	12/1483 (0%)
	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419 (NC_009636)	1439/1468 (98%)	11/1468 (0%)
	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i> ATCC 7966 (NC_008570)	1491/1510 (98%)	8/1510 (0%)
	<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 17978 (NC_009085)	1452/1512 (96%)	21/1512 (1%)
	<i>Rhodoferax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1448/1512 (95%)	21/1512 (1%)
Taejung	<i>Rhodoferax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1468/1498 (97%)	4/1498 (0%)
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A (NC_005773)	1475/1506 (97%)	8/1506 (0%)
	<i>Flavobacterium psychrophilum</i> JIP02/86 (NC_009613)	1423/1485 (95%)	19/1485 (1%)
	<i>Yersinia enterocolitica</i> subsp. <i>enterocolitica</i> 8081 (NC_008800)	1463/1493 (97%)	12/1493 (0%)
	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 (NC_008825)	1450/1497 (96%)	4/1497 (0%)
	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D ctg64 (NZ_ABDZ01000009)	1498/1501 (99%)	0/1501 (0%)
Hamtae	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> 1448A (NC_005773)	1475/1507 (97%)	10/1507 (0%)
	<i>Polaromonas</i> sp. JS666 (NC_007948)	1464/1502 (97%)	10/1502 (0%)

세부적인 정량과정은 먼저 시료의 genomic DNA 0.3  $\mu$  L, 목적 primer 각 200  $\mu$ M, 그리고 SYBR Green dye가 포함된 iQ SYBR Green Supermix(2X, Bio-Rad, USA) 25  $\mu$ L에 멸균 증류수를 첨가하여 시료의 총 부피는 50  $\mu$ L가 되도록 조정하였다. 그 후 50  $\mu$ L의 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 다음과 같다. 초기변성(initial denaturation)과정은 95 $^{\circ}$ C 에서 4 분간, 44 cycle의 denaturation, annealing 그리고 extension과 72 $^{\circ}$ C에서 5분간의 final extension으로 구성되었다. 실험 결과의 재현성을 높이기 위해 모든 gene의 정량은 reference gene(standard DNA)과 함께 2회씩 반복 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 광산배수 및 주변 하천의 수질 분석 결과

광산 샘플의 수질분석 결과를 Table 3에 나타내었다. pH는 삼탄의 폐석으로부터 발생된 침출수(S2)와 태정의 광산배수(T2)에서 3 이하로 매우 낮았으며 이 두 시료를 포함하여 유창과 함태의 광산배수(Y2 및 H2) 샘플에서 전기전도도, 황산이온, 제1철 및 대부분의 금속류 농도가 하천에 비해 매우 높게 측정되었다. 삼탄의 경우 침출수가 광산배

수보다 하천에 더 큰 오염을 유발할 수 있는 것으로 조사되었으며 처리시설이 없으므로 침출수 및 광산배수가 하천에 함유하는 지점의 상류(S1)에서와 하천 하류(S4)에서 각각 pH가 7.1에서 4.5, 전기전도도가 72.1에서 535.5  $\mu$ S/cm, 철농도가 0.3 에서 37 mg/L로 급격히 변화였다. 이에 반해 유창, 태정 및 함태 광산은 광산배수 처리시설이 운전되고 있어 각 광산배수 처리시설의 유출구의 하천 상류와 하류에서의 pH변화가 유창 7.1에서 6.7, 태정 7.0에서 6.5, 함태 7.2에서 6.8로 삼탄에 비해 그 변화폭이 낮았으며 이는 철농도의 변화를 통해서도 확인해 볼 수 있는데, 유창은 철농도가 1.89에서 1.86 mg/L, 태정은 3.09에서 6.33 mg/L로 함태는 2.30에서 5.61 mg/L로 역시 그 증가폭이 낮았다. 수질결과를 종합적으로 살펴보아도 삼탄의 침출수와 광산배수가 주변 하천에 가장 큰 변화를 일으켰으며 상대적으로 유창 광산배수의 처리수가 하천에 가장 작은 영향을 주고 있는 것으로 판단된다.

#### 3.2. 미생물 군집 분석 결과 및 정량 대상 미생물 선정

4개 광산에서 샘플링 한 시료에서 발견된 세균 중 NCBI의 gene bank 데이터베이스와 95% 이상 일치하는 종을 Table 4에 나타내었다. 여러 종이 발견되었으나 제2철을 환원하는 *Rhodoferax ferrireducens* T118<sup>9)</sup>은 삼탄, 유창과 태정 광산배수 시료에서 발견이 되었으며 삼탄광산에서는 이전 연구에서 산성광산배수에서 발견되었던 것으로 알려진 호산성 철 환원균인 *Acidiphilium cryptum* JF-5<sup>10)</sup>도 발견되었다.

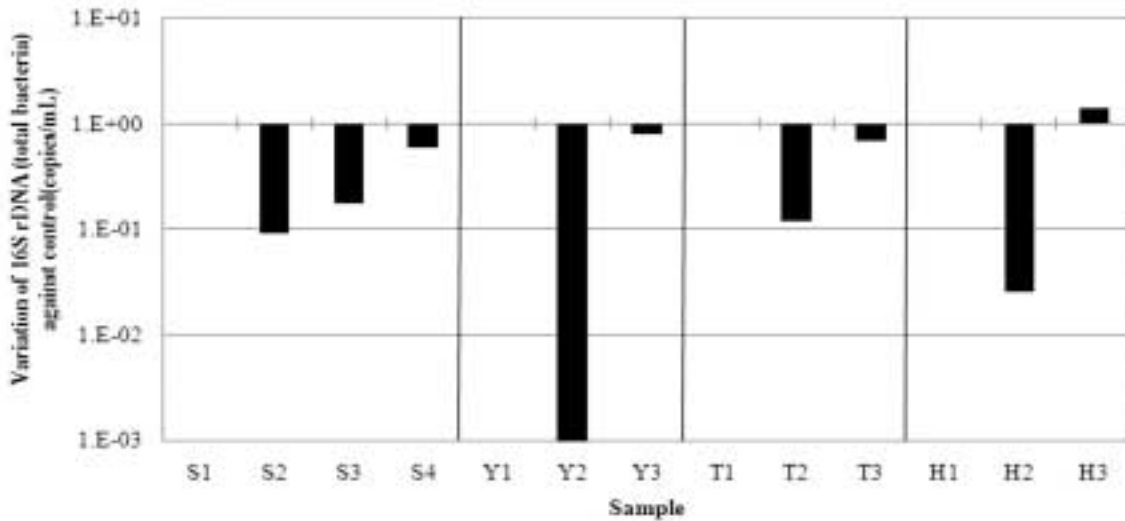


Fig. 1. Variation of copy number of 16S rDNA gene against the control samples(upper stream)

또한 여러 금속류에 저항성이 있는 것으로 알려진 *Ralstonia pickettii* 12D<sup>11</sup>가 태정광산에 존재하였다. 이 외에 여러 종 속 영양균(*Arcobacter butzleri* RM4018, *Staphylococcus epidermidis* RP62A, *Flavobacterium psychrophilum* JIP02/86, *Aeromonas hydrophila subsp. hydrophila* ATCC 7966, *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A, *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 및 *Polaromonas* sp. JS666)도 발견되었다.

미생물 군집분석 결과 발견된 미생물 중 광산의 특성을 나타낼 지표종으로 쓰일 수 있을 것으로 여겨지는 *Rhodoferax ferrireducens* T118, *Acidiphilium cryptum* JF-5를 선정하여 정량하였다. 이 외에 기존에 광산에 존재하는 것으로 알려진 미생물 중 호산성 황환원균인 *Desulfosporosinus*

*orientus*<sup>12</sup>, 철산화균인 *Leptosprillum ferrooxidans*<sup>13</sup> 철 및 황산화균인 *Acidithiobacillus ferrooxidans*<sup>14</sup>를 정량 대상 미생물로 하여 이들을 지표로 광산배수의 주변 수계의 영향을 평가하고자 하였다. 선정된 미생물의 DNA에 특이적인 프라이머를 설계, 제작하였으며 그 염기서열은 Table 2에 나타난 것과 같다. 시료의 총 세균의 양을 함께 측정하기 위해 16S rDNA를 정량할 수 있는 프라이머인 338f와 518r<sup>15</sup>을 사용하였다.

### 3.3. 총 세균의 copy수 정량 결과

Fig. 1은 총 세균을 나타내는 16S rDNA gene을 정량한 결과를 각 광산의 상류에 위치한 청정하천(control)의 시료인 S1, Y1, T1 및 H1을 기준으로 하여 각 시료의

Table 5. Total copy number of specific gene of indicator bacteria

Indicator	16S	<i>D. orientus</i>	<i>A. cryptum</i> JF-5	<i>L. ferrooxidans</i>	<i>R. ferrireducens</i> T118	<i>A. ferrooxidans</i>
R <sup>2</sup> of standard graph	0.997	0.997	0.998	0.998	0.998	0.998
S1	6.45E+08	3.99E+07	2.72E+07	1.18E+05	3.17E+06	2.35E+05
S2	5.87E+07	2.59E+06	1.33E+07	4.04E+05	8.45E+05	3.42E+05
S3	1.14E+08	4.43E+06	7.62E+06	3.17E+04	1.04E+06	2.59E+05
S4	3.80E+08	1.23E+07	9.30E+06	1.08E+05	4.21E+06	5.30E+05
Y1	3.87E+09	1.98E+08	1.13E+07	1.31E+06	7.15E+06	3.48E+05
Y2	2.05E+06	2.05E+05	2.05E+05	3.02E+05	2.05E+05	2.05E+05
Y3	3.13E+09	1.81E+08	1.32E+07	9.89E+05	4.72E+06	1.80E+05
T1	3.22E+08	1.25E+07	2.62E+07	1.46E+05	4.05E+06	1.64E+05
T2	3.86E+07	1.69E+06	5.03E+06	2.95E+05	3.46E+06	3.14E+05
T3	2.19E+08	9.85E+06	2.12E+07	2.91E+05	1.67E+07	1.77E+05
H1	7.24E+08	4.27E+07	1.65E+07	1.96E+05	8.41E+06	6.43E+05
H2	1.85E+07	7.14E+05	1.08E+07	1.10E+05	1.54E+06	2.28E+05
H3	1.03E+09	5.84E+07	7.55E+06	7.06E+04	1.50E+07	4.04E+05

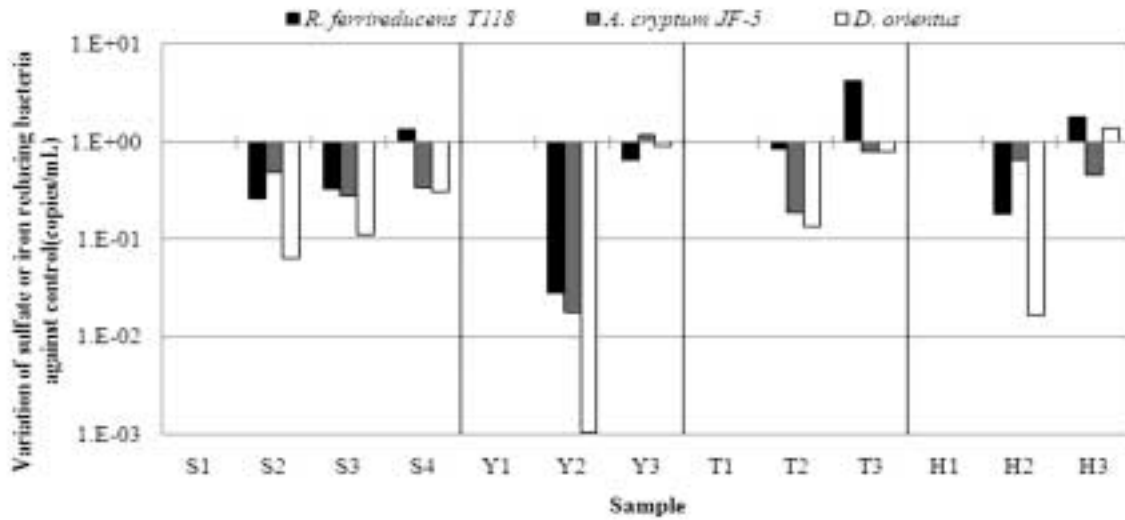


Fig. 2. Variation of copy number of sulfate and iron reduction bacteria against the control samples(upper stream)

copy수와 control의 copy수를 비교한 것이다. Table 5에는 정량된 copy수를 나타내었으며 전체 채취 시료의 평균 값이다. 광산배수 또는 광산배수의 처리수가 각 하천에 미치는 미생물학적인 영향을 평가하기 위해, 광산배수가 하천으로 유출되기 전의 하천상류와 합류 후의 하천하류의 특정 미생물 농도 변화를 확인하였다. 삼탄광산의 경우 침출수 및 광산배수에서 상류 하천에 비해 세균의 16S 유전자 가 약  $10^1$  copies/mL 가량 적었으며 처리시설 없이 하천으로 유입되므로 하천의 미생물 농도가 0.3배정도로 낮아졌다. 유창, 태정 및 함태 광산의 경우 역시 광산배수의 미생물 농도는 그 정도의 차이가 있으나 상류하천에 비해 매우 낮았으며 처리시설을 거친 후 하천에의 영향은 0.8~1.3배로 상대적으로 영향이 적었다. 결과적으로 총 세균의 수를 반영하는 16S 유전자는 처리시설이 설치된 광산에서 방류되는 하천으로의 영향이 처리시설이 없는 곳보다 다소 적었다.

### 3.4. 철, 황산염 환원 세균의 copy수 정량 결과

철 환원균인 *Rhodospirillum rubrum* T118와 또 다른 호산성 철환원균인 *Acidiphilium cryptum* JF-5 및 황산염 환원균인 *Desulfosporosinus orientus*의 특이적인 염기서열을 정량한 결과를 각 상류하천시료를 기준으로 하여 그 차이 값을 Fig. 2에 나타내었다. 실제 정량된 copy수는 Table 5에 나타내었다. 세 미생물 모두 광산배수에서 그 농도가 상류하천보다 낮아 일반하천의 환경보다 광산배수에서의 철 및 황산염 환원균의 생존이 어려운 것으로 판단된다.

방류수가 하천에 합류 한 후 *R. ferrireducens* T118의 경우

는 유창광산을 빼고 모두 하천 하류에서 상류보다 그 양이 증가 하였다. *A. cryptum* JF-5의 개체수 변화는 *R. ferrireducens* T118와 비슷한 경향을 보였으나 하천 하류에서 그 농도가 증가하지 않았다. 이는 *A. cryptum* JF-5의 생장 pH가 3.2~5.8로<sup>10)</sup> 중성조건에서 주로 서식하는<sup>9)</sup> *R. ferrireducens* T118와 달리 하천 하류에서 pH증가에 적응하지 못 해 여전히 낮은 농도를 유지한 것으로 보인다. *D. orientus*의 경우도 비슷한 패턴을 보였으나 함태광산을 제외 하고는 상류보다 하류에서 증가하지는 않았다. 함태광산배수가 하천과 합류한 이후 상류보다 황산염 이온의 농도가 증가하였고 황환원균이 증식하기에 충분한 환원환경이었기 때문에 H3 시료에서 *D. orientus*의 수가 증가한 것으로 생각된다.

전체적으로 철 환원균 및 황산염 환원균의 감소-증가 경향은 총 세균과 유사한 결과를 보였다. pH가 낮고 중금속 농도가 높은 광산배수에서 총 세균, 철환원균인 *R. ferrireducens* T118, *A. cryptum* JF-5 및 황산염환원균인 *D. orientus*의 농도는 모두 하천 상류에 비해 현저히 낮았으며 방류수가 하천에 합류된 후 하천에 다소 영향을 미쳤고 광산배수 처리시설이 없는 삼탄광산의 배수가 합류하는 하천에 가장 큰 미생물 copy 수 변화를 일으켰다. 특히 *R. ferrireducens* T118는 중성인 조건에서 하천의 상류보다 증가한 철을 이용하여 증식한 것으로 여겨진다.

### 3.5. 철 및 황 산화균의 copy수 정량 결과

철 및 황산화균인 *Acidithiobacillus ferrooxidans*와 철산화균인 *Leptospirillum ferrooxidans*의 개체 수는 Fig. 3과 같이 삼탄 및 태정의 광산배수에서 control보다

**Table 6.** Microbiological variation index of mine drainage effect to stream

Microbiological variation index of mine drainage effect to stream	Samtan	Yuchang	Taejung	Hamtae
16S (Total bacteria)	0.029	0.011	0.022	0.020
<i>D. orientus</i>	0.067	0.005	0.014	0.018
<i>A. cryptum JF-5</i>	0.063	0.010	0.012	0.047
<i>L. ferrooxidans</i>	0.008	0.020	0.058	0.084
<i>R. ferrireducens T118</i>	0.019	0.026	0.093	0.036
<i>A. ferrooxidans</i>	0.066	0.052	0.007	0.035
Average	0.042	0.021	0.034	0.040

2~3.4배 높게 관찰되었다. 철산화 세균은 제1철(Fe<sup>2+</sup>)을 제2철(Fe<sup>3+</sup>)로 산화하여 에너지를 얻는데 중성 pH에서는 제1철은 화학적으로 제2철로 빠르게 산화되기 때문에 혐기적 조건에서만 안정적이다. 이런 이유로 Table 3에서와 같이 유창과 함태 광산배수의 경우 pH가 중성이지만 음의 ORP를 갖는 환원환경이므로 제1철의 농도가 336과 435 mg/L로 높게 존재하고 있다. 그러나 산성 pH에서는 호기성 조건에서도 제1철이 안정적으로 존재하므로 산성광산배수에서 철 산화균은 다량 존재하게 된다.<sup>14)</sup> 삼탄과 태정 광산배수(S3 및 T2)는 pH가 각각 2.8과 2.7로 낮아 두 종류의 철산화 세균의 농도가 높았으나 유창과 함태 광산배수(Y2 및 H2)는 매우 높은 제1철을 함유하고 있지만 pH가 6.2와 6.0으로 중성에 가까워 이 두 종의 호산성 철산화균의 농도가 낮았던 것으로 판단된다.

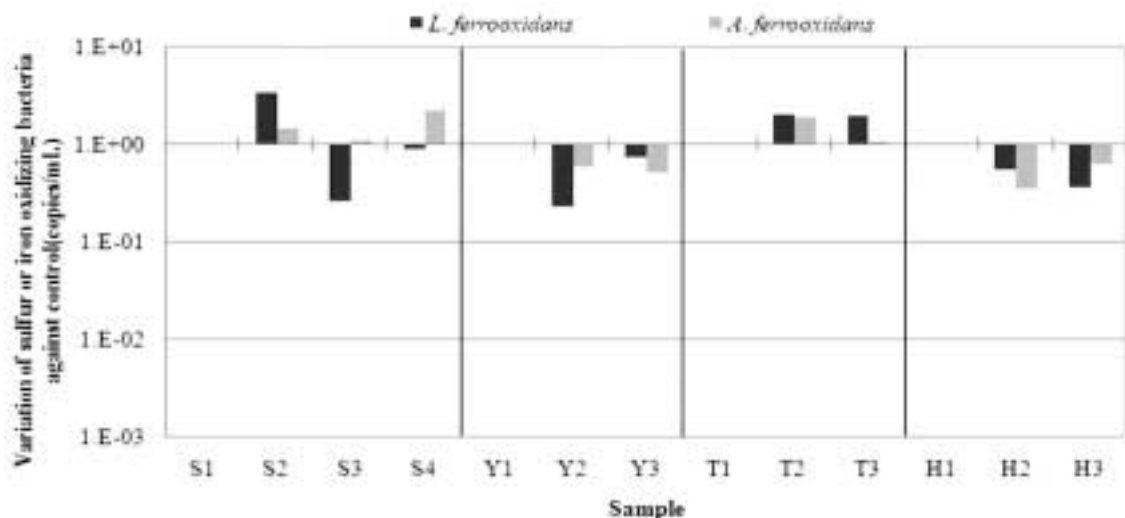
### 3.6. 광산배수의 분자생물학적 환경영향 지수 산정

본 연구에서는 각 광산배수가 하천에 미치는 미생물학적 영향을 정량적으로 판단하기 위해 광산배수로 인한 하천에서의 미생물 변동 지수를 계산하였다. 네 곳의 광산배수가 흘러 들어가는 하천을 대상으로, 각 광산배수가 합류되기 전의 하천 상류 및 하류의 미생물 정량 값의 변화를 확인하기 위한 것이다. 각 지수는 다음의 식으로 계산하였다.

하천에서의 미생물 변동 지수 =

$$\left| \frac{\log(\text{하류의 미생물 copy수}) - \log(\text{상류의 미생물 copy수})}{\log(\text{상류의 미생물 copy수})} \right|$$

그 결과는 Table 6과 같으며 본 연구에서 정량 한 미생물 5종과 총 세균의 16S 유전자 변동 모두의 평균값으로 각 광산



**Fig. 3.** Variation of copy number of sulfur and iron oxidation bacteria against the control samples(upper stream)



의 광산배수 하천유입에 따른 하천에의 생물학적 영향을 판단할 수 있을 것으로 판단된다. 0.04로 그 값이 가장 큰 삼탄광산이 가장 미생물학적 환경영향이 컸으며 0.02의 가장 작은 값을 가지는 유창 광산배수가 하천에 미생물학적 환경영향이 가장 적은 것으로 분석되었다. 이는 수질분석과 일치하는 결과로서, 광산 내의 화학적 작용이 미생물의 작용과 큰 연관성을 가지고 있으며 미생물 변화를 통해 광산배수의 간접적인 생태학적 영향평가가 가능함을 보여주었다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 네 개 광산을 대상으로 광산배수가 그것이 방류되는 하천에 어떤 영향을 미치고 있는지 분자생물학적 방법으로 분석, 평가 하고자 하였다. 따라서 광산배수 원수와 각 광산의 처리수가 방류되는 지점을 중심으로 하천의 상류와 하류의 물시료를 채취하여 16S rDNA 방법으로 미생물 종을 분석하였다. 미생물 종을 분석한 결과와 광산배수에서 발견되는 것으로 알려진 여러 종을 대상으로 실시간 정량 PCR을 이용해 선택한 종을 정량하였으며 수질 분석 결과와 비교하여 각각의 광산에 대한 미생물학적 해석을 하였다. 그 결과, 광산배수의 총 세균의 수를 반영하는 16S 유전자는 그 정도의 차이가 있으나 상류하천에 비해 매우 낮았으며 처리시설이 설치된 광산에서 방류되는 하천으로의 영향이 처리시설이 없는 곳보다 다소 적었다. 철 환원균인 *Rhodoferrax ferrireducens* T118와 또 다른 호산성 철 환원균인 *Acidiphilium cryptum* JF-5 및 황산염환원균인 *Desulfosporosinus orientus*의 정량 결과 모두 광산배수에서 그 농도가 상류하천보다 현저히 낮았으며 전체적으로 철 환원균 및 황산염 환원균의 감소-증가 경향은 총 세균과 유사한 결과를 보였다. *R. ferrireducens* T118는 이용 가능한 산화된 철이 많고 서식에 적절한 중성 환경인 하천 하류에서 그 개체수가 증가하였다. *D. orientus*의 개체수는 함태 광산배수가 하천과 합류한 이후 상류보다 황산염 이온의 증가와 환원조건으로 그 수가 증가하였다. 또한 철 및 황산화균인 *Acidothiobacillus ferrooxidans*와 철 산화균인 *Leptosprillum ferrooxidans*은 삼탄 및 태정 광산배수에서 하천상류보다 매우 높게 측정되었다. 두 광산의 pH가 3 이하로 낮아 두 종류의 철산화균의 농도가 모두 높았으며 유창과 함태 광산배수는 매우 높은 제 1철을 함유하고 있지만 pH가 6 이상으로 이 두 종의 호산성 철산화균의 농도가 낮았다. 결론적으로 본 연구에서는 각 광산의 광

산배수의 하천에 미치는 영향을 정량평가하기 위해 미생물 변동 지수를 산정하였는데 그 결과, 지수 값이 가장 큰 삼탄광산이 미생물학적 환경영향이 가장 큰 것으로 그리고 가장 작은 지수 값을 보인 유창광산배수가 가장 작은 미생물학적 환경영향을 미치는 것으로 평가되었다.

KSEE

#### 사 사

이 연구는 2008년도 한국광해관리공단의 광해방지사업 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

#### 참고문헌

1. Fowler, T. A., Holmes, P. R. and Crundwell, F. K., "Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*," *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2987~5292(1999).
2. Hallberg, K. B. and Johnson, D. B., "Microbiology of a wetland ecosystem constructed to remediate mine drainage from a heavy metal mine," *Sci. Total Environ.*, **338**, 53~66(2005).
3. Benner, S. G., Gould, W. D. and Blowes, D. W., "Microbial populations associated with the generation and treatment of acid mine drainage," *Chem. Geol.*, **169**, 435~448(2000).
4. 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).
5. Church, C. D., Wilkin, R. T., Alpers, C. N., Rye, R. O. and McCleskey, R. B., "Microbial sulfate reduction and metal attenuation in pH 4 acid mine water," *Geochem. Trans.*, **8**(10) (2007).
6. Bond, P. L. and Banfield J. F., "Design and performance of rRNA targeted oligonucleotide probes for in situ detection and phylogenetic identification of microorganisms inhabiting acid mine drainage environments," *Microb. Ecol.*, **41**, 149~161(2001).
7. David, E. C., Frank, C. Jr. and Stefan, S. R., "*Ferribacterium limneticum*, gen. nov., sp. nov., an Fe(III)-reducing microorganism isolated from mining-impacted freshwater lake sediments," *Frank Rosenzweig Arch Microbiol.*, **171**, 183~188 (1999).
8. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th ed., Washington D. C., USA(1988)
9. 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)," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 669~673(2003).
10. Bilgin, A. A., Silverstein, J. and Jenkins, J. D., "Iron respiration by *Acidiphilium cryptum* at pH 5," *FEMS Microbiol. Ecol.*, **49**, 137~143(2004).
  11. Konstantinidis, K. T., Isaacs, N., Fett, J., Simpson, S., Long, D. T. and Marsh, T. L., "Microbial diversity and resistance to copper in metal-contaminated lake sediment," *Microb. Ecol.*, **45**, 191~202(2003).
  12. Luptakova, A. and Kusnierova, M., "Bioremediation of acid mine drainage contaminated by SRB," *Hydrometallurgy*, **77**, 97~102(2005).
  13. Ovreas, L. and Torsvik, V., "Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities," *Microb. Ecol.*, **36**, 303~315(1998).
  14. Madigan, M. T. and Martinko, J. M., *Brock Biology of Microorganisms*, 11th ed, Benjamin Cummings, Pearson education(2005)