

폐기물매립장 침출수내 미생물군집 구조 해석을 위한 T-RFLP의 활용

T-RFLP Analysis of Microbial Community Structure in Leachate from Landfill Sites

유재철 · Tomonori Ishigaki* · Yoichi Kamagata** · 이태호†
 Jaecheul Yu · Tomonori Ishigaki* · Yoichi Kamagata** · Taeho Lee†

부산대학교 사회환경시스템공학부, *일본류코쿠대학 환경솔루션기술학과
 **일본산업기술종합연구원 생물자원 및 기능연구소

School of Civil and Environmental Engineering, Pusan National University

*Department of Environmental Solution Technology, Ryukoku University

**Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

(2010년 2월 1일 접수, 2010년 4월 15일 채택)

ABSTRACT : Microorganisms are key-role player for stabilization of landfill sites. In order to evaluate the availability of T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) for monitoring microbial community variations during stabilization of landfill sites, the phylogenic diversity of microbial community in the leachate from 4 different full-scale landfills was characterized by T-RFLP based on bacterial 16S rDNA. Main population of microbial community analyzed by T-RFLP was significantly similar with that of microbial community analyzed by clone library analysis. The results of T-RFLP analysis for main population of microbial community in the leachate from landfills with different landfill structures, waste types and landfill ages showed apparently different microbial diversity and structures. Therefore, long-term monitoring of microbial community in leachate from landfill sites by using T-RFLP is expected to be available for evaluation of landfill stability.

Key Words : Landfill Leachate, Microbial Community, 16S rDNA, T-RFLP

요약 : 폐기물매립장의 안정화에는 미생물이 중요한 역할을 수행한다. 폐기물매립장에서 미생물군집 변화 모니터링에 말단 제한절편다형성(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; T-RFLP)법의 활용 가능성을 평가하고자 박테리아의 16S rDNA 서열에 기초한 T-RFLP법으로 4개의 폐기물매립장 내부에서 채취한 침출수의 미생물군집 구조를 조사하였다. T-RFLP법을 사용하여 해석한 침출수 내 우점 미생물군집 구조와 일반적으로 널리 사용되고 있는 16S rDNA 클론 해석법에 의한 우점 미생물군집구조는 유사하였다. 또한, T-RFLP법을 이용하여 폐기물매립장의 구조, 매립 폐기물 종류, 운영기간이 다른 폐기물매립장 침출수의 우점 미생물군집 구조가 서로 다르게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 T-RFLP법을 사용하여 폐기물매립장 침출수내 미생물군집 구조를 장기적으로 모니터링 한다면 많은 비용과 시간이 소요되는 클론해석법의 반복적인 수행 없이도 비교적 간단하게 폐기물매립장의 안정화 정도를 평가할 수 있을 것으로 기대한다.

주제어 : 침출수, 박테리아 군집구조, 16S rDNA, T-RFLP

1. 서론

대량생산과 소비로 인하여 생활 및 산업 활동에서 발생하는 고형폐기물량이 급격히 증가하고 있으며, 고형폐기물의 성상 또한 다양해지고 있다. 정부의 재활용 정책의 추진에 힘입어 국내에서 발생하는 고형폐기물의 44%가 재활용되는 것으로 알려져 있으나, 재활용되지 못한 많은 양의 고형폐기

물을 여전히 매립에 의해 처리하고 있다.^{1,2)}

매립된 폐기물은 자체 무게에 의한 압축, 재질의 열화, 부식 등의 물리·화학적인 분해반응과 미생물에 의한 분해반응에 의해 수십 년에 걸쳐 서서히 안정화된다. 미생물에 의한 폐기물의 생분해 과정에서 메탄을 포함한 매립가스가 발생하며, 매립가스를 정제하여 생산된 메탄은 보일러 연료, 터빈을 이용한 발전 또는 천연가스의 대체에너지로서 활용

†Corresponding author : E-mail : leeth55@pusan.co.kr Tel : 051-510-2465 Fax : 051-514-9574

할 수 있다.³⁾ 폐기물매립장에서 일정한 성분의 메탄가스를 대량으로 생산하기 위해서는 매립된 폐기물 내 유기성분의 빠른 안정화가 필요하며, 안정화를 촉진시키기 위하여 침출수를 폐기물매립장으로 재순환하거나 하수슬러지 또는 혐기성 소화슬러지를 첨가하는 등의 방법들이 적용되고 있다. 우리나라에서는 침출수의 재순환이 금지되어 있어 관련 연구가 적지만, 최근 들어 침출수 재순환에 대한 관심이 증가하고 있다.

침출수 재순환은 폐기물매립장의 안정화를 짧게는 2~3년 길게는 십 수 년을 단축시킬 수 있는 것으로 보고되었으며,⁴⁾ 혐기성 소화조 슬러지를 주입한 경우에는 침출수 재순환에 비해 메탄의 발생 시점을 단축시키고, 메탄발생량도 많은 것으로 보고되었다.⁵⁾

그러나 이와 같은 폐기물매립장 안정화 촉진기술의 대부분은 토착미생물의 활성을 높이기 위한 것임에도 불구하고, 폐기물 분해에 핵심적인 역할을 수행하는 미생물 생태에 대해서는 충분한 조사와 연구가 수행되지 않아 불명확한 점이 많다. 또한 폐기물매립장 내 미생물군집은 폐기물매립장 내부의 환경변화에도 민감하게 영향을 받기 때문에 미생물생태학적 측면에서 폐기물매립장 안정화를 평가할 필요가 있다.

전통적인 배양방법을 이용한 미생물군집의 해석은 배양 가능한 미생물만을 조사할 수 있다는 제한 때문에 근래에는 변성제 농도구배 전기영동(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; DGGE)과 말단 제한절편 다형성(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism; T-RFLP)과 같은 유전자지문을 이용한 분자생물학적 방법이 널리 사용되고 있다. 이 가운데서도 T-RFLP 분석이 DGGE 분석보다 미생물군집 분석에 있어 높은 해상도를 나타내는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

본 연구에서는 폐기물매립장의 안정화에 관여하는 미생물군집의 구조와 다양성을 해석하기 위하여 박테리아의 16S rDNA에 기초한 T-RFLP법을 이용하였다. 서로 다른 특성을 갖는 4 곳의 실제규모 폐기물매립장 내부에서 채취한 침출수에 존재하는 미생물의 군집을 비교하였으며, 매립이 진행 중인 폐기물매립장을 대상으로 16S rDNA의 클론 라이브러리 해석을 수행하여 T-RFLP법의 결과와 비교 분석하였다. 본 연구를 통하여 폐기물매립장 안정화 촉진에 관여하는 미생물군집의 평가에 T-RFLP법의 활용 가능성을 제시하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 폐기물 매립장 및 침출수 채취

일본 관서 지역내 소재하는 폐기물매립장 크기, 매립된 폐기물량, 매립된 폐기물 종류가 다른 4 곳(A, B, C, D)의 폐기물매립장에서 시추공을 통하여 침출수 시료를 채취하였다(Table 1). 해양을 매립하여 만들어진 A 폐기물매립장은 1980년대 말에 건설된 용량 3,000,000 m³의 매립장으로 전체용량의 67%가 플라스틱, 유기성 슬러지, 목재, 슬래그 등으로 매립된 상태였으며, 다양한 시추공을 통해서 채취된 침출수의 pH, COD, BOD, TN, TP 농도는 table 2에 나타난 바와 같다. 매립방식은 3 m 높이로 폐기물 매립 후 50 cm의 복토층을 만드는 과정을 반복하는 샌드위치 방식과 구획별로 폐기물 매립 후 복토로 뒤 덮는 셀 방식을 혼용하고 있었다. B 폐기물매립장은 1980년대 초에 건설된 1,500,000 m³의 폐기물매립장으로 매립이 완료된 상태였으며, A 폐기물매립장과 유사한 성분의 폐기물을 샌드위치방식만으로 매립한 매립장이었다. C 폐기물매립장은 1990년대 후반에 건설된 매립용량 200,000 m³의 폐기물매립장으로 재, 슬러그, 무기성 슬러지 등을 전체 용량의 30% 가량 샌드위치 방식 및 셀 방식으로 매립하고 있었다. D 폐기물매립장은 불법폐기물매립장으로 매립연도를 알 수 없었으며, 잡다한 성상의 폐기물이 복토층 없이 불법투기 후 매립된 상태였다. 침출수의 채취는 2002년 5월, 4곳의 폐기물 매립장에서 시추공을 통하여 채취한 침출수를 1 L 용량의 뚜껑이 달린 유리병에 가득 채운 후 냉장 보관한 상태에서 실험실로 운반되었으며, 도착 즉시 핵산을 추출하였다.

Table 1. Characteristics of landfill sites where leachate were sampled

Landfill site	Total volume (1000 m ³)	Landfilled portion (%)	Waste type	Landfill type
A	3,000	67	Plastic, sludge, wood, slag	Sandwich & cell
B	1,500	100	Plastic, sludge, wood, slag	Sandwich
C	200	30	Ash, slag, inorganic sludge	Sandwich & cell
D	-	-	-	Illegal site

Table 2. pH, COD, BOD, TN and TP of leachate from the landfill site A

pH	COD (mg/L)	BOD (mg/L)	TN (mg/L)	TP (mg/L)
7.5-8.4	453-2,600	58-652	552-2,333	0.22-17.8

2.2. 핵산 추출 및 세균 16S rDNA PCR 증폭

침출수내에 존재하는 미생물은 0.22 μm 필터를 사용하여 회수하였으며, 필터를 멸균된 가위를 사용하여 적당한 크기로 절단한 후, bead biting 방법을 적용하는 DNA 추출 kit(BIO101, Inc., Carsbad, CA, USA)을 사용하여 핵산을 추출하였다. 추출된 DNA는 정제한 후 PicoGreen dsDNA quantitation kit(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA)를 사용하여 정량하였다.

추출한 DNA를 주형으로 사용하여 16S rDNA를 증폭시키기 위한 PCR반응을 수행하였다. 일반적인 PCR 방법으로는 시료에 존재하는 박테리아 16S rDNA의 상대적인 양을 전혀 반영할 수 없기 때문에, PCR 산물의 증폭과정을 모니터링할 수 있는 실시간 PCR 장치인 LightCycler(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 PCR을 수행하였다 (Table 3). PCR 산물을 모니터링하기 위하여 5'말단에 형광 BODIFY FL로 표지한 Eub 27f(*E. coli* position 8-27: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 Eub 1406r(*E. coli* position 1389-1406: 5'-ACG GGC GGT GTG TAC AAG-3')를 primer로 사용한 PCR용액을 준비하였다. 이와 동시에 T-RFLP해석을 위한 PCR증폭을 위해 형광 FAM6으로 5'말단을 표지한 Eub 27f와 Eub 1406r을 사용한 PCR용액을 별도로 준비하였다. 또한, cloning 분석용 PCR증폭을 위해 형광물질로 표지되지 않은 Eub 27f와 Eub 1406r를 primer로 사용한 별도의 PCR용액을 준비하였다. 각 PCR용액 25 μl에는 최종농도 0.5 mM의 primer, 160 mM의 각 dNTP, 50 mM의 Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 250 mg/ml bovine serum albumin, 0.5 U의 Tag polymerase (Gene Tag, Nippon Gene Co. Ltd., Tokyo, Japan), 0.32 μl의 TagStart antibody (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA), 각 폐기물매립장의 침출수에서 추출한 30 ng/ml의 DNA 1 μl를 첨가하였다. PCR의 cycle에 따른 BODIPY FL 형광의 quenching된 양을 측정함으로써 PCR 산물의 증가를 모니터링하였으며, PCR산물이 지수함수적으로 증가하는 초기 단계(cycle 23)에서 PCR을 중단함으로써

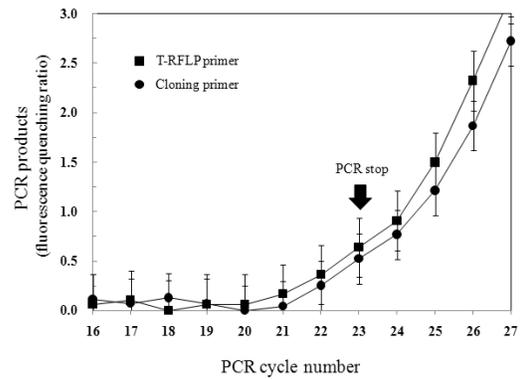


Fig. 1. Real-time monitoring of PCR products as fluorescence quenching ratio at each PCR cycle.

Table 3. PCR conditions for amplification of bacterial 16S rDNA in this study

Primer	PCR conditions
Eub 27f/1406r	9 min at 95°C, followed 23 cycle of 1 min at 95°C, 1 min at 53°C, 2 min at 72°C followed by a 2 min final extension at 72°C

각 DNA 시료에 존재하는 16S rDNA의 상대적인 양을 최대한 반영하고자 하였다(Fig. 1). 이와 같은 실시간 PCR법에 관련된 실험 및 형광 quenching양의 계산은 선행 연구에서 제시된 방법을 따랐다.⁷⁾ 증폭된 PCR산물은 MicroSpin S-400 HR columns (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 정제하였다.

2.3. T-RFLP 분석

T-RFLP분석용 primer에 의해 증폭된 16S rDNA PCR산물에 제한효소(*Hae* III, *Hha* I, *Msp* I 및 상기 3가지 제한효소의 혼합 처리; Takara Inc., Japan) 5 unit을 첨가하여 37°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응산물은 Sephadex G-50 (GE Healthcare Life Science, Japan)로 정제하여 말단제한절편(Terminal Restriction Fragment; T-RF)을 회수하였다. 정제된 T-RF 1 ml와 TAMURA 형광으로 수식된 DNA size marker 1 μl, Formamide 12 μl를 혼합한 후, 95°C에서 2분간 반응시켜 단일사슬 말단제한절편(single-stranded Terminal Restriction Fragment; ssT-RF)를 생성하고 얼음 위에서 식혔다. ssT-RF는 ABI 377 sequencer를 이용하여 gene scan mode로 분석하였다. 각 제한효소에 따른 T-RF들의 형광강도(peak height) 값을 그래프로 나타내었으며, SPSS 14 software (SPSS Inc. USA)를 이용하여 T-RF pattern의 주성분 분석(Principal Component

Analysis; PCA)을 수행하였다. 그리고 미생물 군집구조의 정량적 분석을 위해서 다음 식(1)과 (2)를 이용하여 Shannon-Weiner 종다양성 지수(H)와 Simpson 종다양성 지수(D)를 구하였다.

$$H = -\sum(p_i)(\log_2 p_i) \quad (1)$$

$$D = 1/\sum(p_i)^2 \quad (2)$$

H Shannon-Weiner diversity index
 D Simpson's diversity index
 pi Individual T-RF size/total T-RF size

2.4. 클론해석

클론해석을 위한 primer를 사용하여 증폭된 16S rDNA PCR산물을 pGEM-T vector (Promega, USA)를 이용하여 cloning 하였다. PCR 산물을 vector, ligase, buffer와 혼합한 후 16°C에서 1시간 동안 배양하였다. Ligation mixture는 competent JM109 cell(Invitrogen Co., USA)과 혼합한 뒤 heat shock 과정을 거친 후 900 µl의 SOC 배지를 주입하여 37°C에서 16시간동안 배양하였다. 배양액 중 200 µl를 ampiciline과 IPTG, X-gal을 주입한 LB배지에 도말한 후 37°C에서 16시간동안 배양하였다. white colony만을 선택하여 클로닝된 부분만을 증폭시키기 위해 M 13f(5'-AGT CAC GAC GTT GTA-3')와 M 13r(5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') primer를 사용한 colony PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR산물은 전기영동을 통하여 확인하고 Microspin S-400 HR columns(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용해서 정제하였다. DNA sequencer(Model 377, Applied Biosystem, USA)를 이용해서 클론의 16S rDNA 염기서열을 분석하고, RDP(Ribosomal Database Project)에서 제공하는 CHECK CHIMERA 프로그램으로 chimera artifact를 확인하였다. 분석된 16S rDNA 염기서열들은 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST 검색을 통해서 클론의 염기서열과 가장 가까운 계통그룹과 종을 확인하였다.

2.5. 클론의 T-RF 분석

A폐기물매립장의 침출수 클론해석을 통하여 얻어진 132개의 phylotype(계통형)의 염기서열들은 BioEdit(version

5.0.9)를 이용하여 alignment 하고, 98% 이상 동일한 염기서열을 나타낸 클론들을 그룹으로 묶어 총 63개의 phylotype 그룹을 얻었다.⁸⁾ 이 가운데 3개 이상의 클론이 속하는 phylotype 그룹을 대상으로 대표적인 클론을 하나씩 선택하여 M 13f와 M 13r primer로 클로닝된 16S rDNA를 증폭하였다. 증폭된 PCR산물을 정제 및 희석한 후 이를 template로 하여 T-RFLP해석에 사용한 primer로 PCR증폭하였다. PCR산물은 정제 후, 상기 T-RFLP분석에서 사용한 방법과 동일하게 제한효소(*Hae* III, *Hha* I, *Msp* I 및 상기 3가지 제한효소의 혼합 처리)로 절단하고 T-RF를 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 제한효소에 따른 폐기물매립장 침출수 미생물군집의 T-RF 변화

A 폐기물매립장 침출수의 박테리아 16S rDNA PCR산물을 대상으로 다양한 종류의 제한효소(*Hha* I, *Hae* III, *Msp* I, 상기 3가지 제한효소의 혼합)로 처리하여 미생물군집의 T-RF 패턴 변화를 조사하였다. Fig. 2에 나타낸 바와 같이 제한효소로 *Hha* I을 사용하였을 경우의 우점 T-RF는 48 bp, 50~54 bp, 58~61 bp, 166 bp, 168 bp, 285 bp, 532 bp이었으며, 특히 61 bp의 T-RF가 가장 우점하는 것으로 나타났다. 제한효소로 *Hae* III을 사용하였을 경우에 우점하는 T-RF는 32 bp, 166 bp, 185 bp, 215~216 bp, 286 bp, 912 bp이었고, 286 bp의 T-RF가 가장 우점하였다. 제한효소로 *Msp* I을 사용하였을 경우의 우점하는 T-RF는 48 bp, 99 bp, 123~124 bp, 429~442 bp, 463 bp이었으며, 가장 우점하는 T-RF는 436 bp였다. 한편, 혼합제한효소의 경우에는 매우 단순화된 T-RF경향을 나타냈으며, 우점하는 T-RF는 32 bp, 48 bp, 59~63 bp, 286 bp이었다. 따라서 A폐기물매립장 침출수 미생물군집의 경우, 제한효소로 *Hha* I을 사용할 때 가장 다양한 T-RF를 나타냄을 알 수 있었다. 결과적으로, 사용하는 제한효소에 따라 검출되는 T-RF의 개수와 우점 비율이 달라짐을 알 수 있었으며, T-RFLP해석에 사용하는 제한효소를 선택할 때에는 한 개 이상의 제한효소를 이용해서 T-RF의 개수와 우점비율 파악한 후 신중하게 선택하는 것이 바람직하다고 판단된다. 또한, 제한효소를

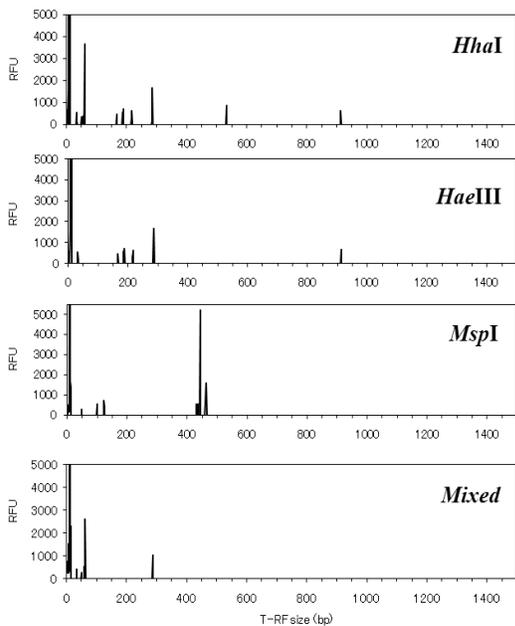


Fig. 2. Bacterial community T-RFLP profiles restricted with 4 different enzymes (Hha I, Hae III, Msp I, and mixed enzymes) in leachate from landfill site A.

혼합하여 처리한 경우에는 T-RF의 패턴을 지나치게 단순화시키기 때문에 미생물군집해석에는 적합하지 않은 것으로 판단된다.

3.2. A 폐기물매립장 침출수 미생물군집의 16S rDNA 클론 라이브러리 해석

해양을 매립해 조성한 A 폐기물매립장의 침출수 미생물군집의 T-RFLP 해석 결과를 검증하기 위하여 침출수 미생물군집의 16S rDNA clone library를 구축하고, 클론 해석을 수행하였다. 총 132개의 클론을 해석하여 98%의 상동성을 보인 클론을 같은 phylotype으로 분류함으로써 총 63개의 phylotype그룹을 얻었다(Fig. 3). 해석한 클론의 53%는 ϵ -Proteobacteria에 속하였으며, 다음으로 9%가 γ -Proteobacteria, 6%가 δ -Proteobacteria로 ϵ -Proteobacteria에 속하는 박테리아가 가장 많이 존재하는 것으로 나타났다.

일반적으로 ϵ -Proteobacteria는 황성분이 풍부하고 산소가 없거나 산소농도가 낮은 해양의 침전물이나 열수구 주변, 해양 유전, 유기화합물 오염지하수, 온천수 등에 많이 존재하는 것으로 알려져 있다.⁹⁾ 순수 분리된 ϵ

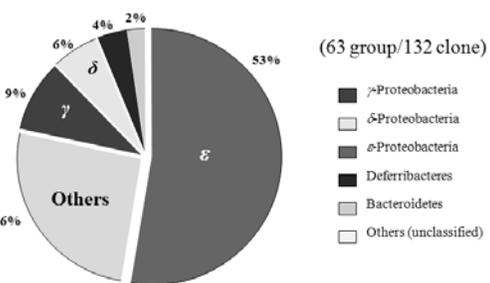


Fig. 3. Analysis of bacterial 16S rDNA clone library of bacterial community in leachate from landfill site A.

-Proteobacterium은 25~60°C로 중온에서 고온의 범위에서 잘 성장하고, 전자공여체로 formate, fumarate 등의 유기물을 사용하는 종도 있지만 주로 수소, sulfide, thiosulphate, 황 원소를 사용하며, 산소가 없는 혐기성 조건에서 황산염, 황, 질산염 등을 전자수용체로 이용하여 이들을 환원하며 성장하는 것으로 알려져 있다.

A 폐기물매립장의 침출수에는 다양한 종류의 ϵ -Proteobacteria가 혼재하는 것으로 나타났다. 존재가 확인된 *Surfurospiliium* sp.는 fumarate를 발효에 사용하고, 질산염과 황원소를 각각 암모니아와 황화수소로 환원하는 해양성 ϵ -Proteobacteria이며,¹⁰⁾ *Acrobacter* sp.는 해양과 육지 모두에서 검출되며, 수소나 황화수소를 전자공여체로 이용하고 질산염, 황원소를 전자수용체로 이용할 수 있다.¹¹⁾ 특히, 황화수소를 황원소로 산화하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, *Thiomicrospira* sp.는 육상에서 주로 검출되었으며, 황화수소와 황원소를 전자공여체로 미량의 산소와 질산염 및 아질산염을 전자수용체로 이용할 수 있다.¹²⁾ 한편, 황환원 능력을 지닌 δ -Proteobacteria그룹의 *Desulfomicrobium* sp.의 존재도 확인되었으며, 유기염소 화합물을 전자수용체로 이용하여 탈염소화하는 미생물 종도 검출되었다. 일반적으로 이들 탈염소화미생물은 황산염 또는 황원소를 전자수용체로 이용하여 환원할 수 있다. Sawamura 등¹³⁾은 일본 폐기물 매립장의 매립 깊이에 따른 미생물 군집을 조사한 결과, 깊이 10 m 이상의 지점에서 δ -Proteobacteria에 속하는 황환원 미생물이 우점화되었다고 보고하였다. 그리고 우리나라 강화 갯벌 퇴적물 내 미생물 군집을 해석한 조혜연 등¹⁴⁾의 연구에 따르면 γ -와 δ -Proteobacteria에 속하는 황화합물 이용 미생물이 전체 미생물 중에서 37.2%를 차지하며, 이들이 갯벌의 유기물 분해

와 황순환에 중요한 역할을 수행한다고 주장하였다. 하지만 ϵ -Proteobacteria에 속하는 미생물은 전체 172개 클론 중에서 2개만이 검출되었다. Mori & Takamizawa¹⁵⁾는 해양매립장의 황산염환원균에 대하여 조사한 결과 δ -Proteobacteria 그룹이 전체 미생물의 7.2~29.9%를 차지한다고 보고하였다. 그러나 그들은 δ -Proteobacteria 그룹만을 정량 PCR로 측정하였기 때문에 ϵ -Proteobacteria 그룹의 존재를 확인하지 못하였다. 따라서 지금까지 육상 및 해양 매립장에서 황원소 순환에 관여하는 미생물은 γ - 또는 δ -Proteobacteria 그룹에 속하는 것으로 알려져 왔다. 그러나 본 연구를 통하여 해양을 매립하여 만든 A 폐기물매립장에는 육상의 폐기물 처리장 그리고 갯벌과는 달리, γ - 또는 δ -Proteobacteria 뿐만 아니라 해양성 ϵ -Proteobacteria를 포함한 다양한 해양성 박테리아 종이 황화합물의 순환에 관여하며 공존하는 것으로 생각된다. 이상과 같은 ϵ -Proteobacteria의 존재와 table 2에 나타난 침출수 성상을 연계하여 해석할 수는 없었다. 다만 BOD 성분은 낮고, 일반적인 해양환경의 황산염의 농도는 약 25~28 mM으로 높기 때문에 해양을 매립하여 만든 A 폐기물매립장 침출수 미생물 군집에서는 황산염을 이용하는 미생물 군집이 높은 비율로 나타난 것으로 판단된다.¹⁶⁾

3.3. A 폐기물매립장 침출수 미생물군집의 16S rDNA 클론의 T-RF 해석

클론해석 결과 얻어진 총 63개의 phylotype 그룹 가운데 3개 이상의 클론이 속하는 13개의 phylotype 그룹을 대상으로 대표적인 클론을 하나씩 임의로 선택하여 4가지 종류의 제한효소 처리에 따른 T-RF를 분석하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 가장 많은 클론이 속하는 phylotype 그룹은 Uncultured ϵ -proteobacterium과 높은 상동성을 보였다. 그리고 각 클론을 제한효소 *Hha* I로 처리하였을 경우에는 61 bp의 T-RF를 나타냈으며, A 폐기물매립장의 침출수를 *Hae* I으로 처리한 T-RFLP 분석 결과(Fig. 2)에서도 61 bp의 동일한 T-RF가 우점화 되는 것을 확인할 수 있었다. *Hae* III로 처리한 경우에는 절단되지 않았고, *Msp* I로 처리한 경우에는 436 bp, 혼합효소로 처리하였을 경우에는 63 bp의 T-RF를 나타내었다. 이들 T-RF는 Fig. 2에서 나타난 각 제한효소로 처리한 경우의 A 폐기물매립장 침출수 미생물군집의 T-RFLP에서 대표적인 T-RF로 모두 확인할

수 있었다.

같은 방식으로 13개 phylotype 그룹의 대표 클론에 대한 제한효소처리 결과를 살펴보면, Table 4에 나타난 바와 같이 제한효소로 *Hha* I을 사용한 경우에는 48 bp, 52~54 bp, 58~61 bp, 163 bp, 532 bp, 1055 bp에 해당하는 단편이 생성됨을 알 수 있었고, *Hae* III을 사용한 경우에는 30 bp, 168 bp, 185~189 bp, 217 bp, 286 bp의 단편이, *Msp* I을 사용한 경우에는 49 bp, 99~100 bp, 123~125 bp, 423~429 bp, 432~436 bp의 단편이 주로 생성되었다. 그리고 혼합제한효소를 사용한 경우에는 30 bp, 37 bp, 49 bp, 56~63 bp, 286 bp에 해당하는 단편이 생성되는 것으로 나타났다. 각 제한효소로 처리함에 따라 생성될 수 있는 주된 단편의 길이가 달랐으며 이들 단편은 Fig. 2에 나타난 T-RFLP 분석결과에서 관찰되는 주된 단편의 길이와 거의 일치하였다. 따라서 T-RFLP법을 사용하여 해석한 침출수 내 미생물 군집구조와 일반적으로 널리 사용되고 있는 16S rDNA 클론 해석법에 의한 미생물 군집구조 사이에 유사성이 높다는 것을 알 수 있었다. 그러므로 침출수 미생물군집 구조 모니터링과 같은 반복적인 미생물군집해석이 필요한 경우에는 적절한 제한효소를 적용한 T-RFLP법을 사용함으로써 반복적인 16S rDNA 클론해석법의 수행에 따른 시간, 비용, 노동력의 소비를 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 그러나 사용한 제한효소에 따라서 T-RFLP의 우점 T-RF가 16S rDNA 클론 분석에서는 우점 group으로 발견되지 않은 경우도 있었다(Fig. 2, *Hha* I, *Hae* III). 그 원인을 명확하게 확인할 수 없으나, 클로닝 과정에서의 손실 등에 의한 것으로 판단된다. 따라서 초기 미생물군집해석시 16S rDNA 클로닝과 T-RFLP를 동시에 수행하여 적절한 제한효소를 선택할 필요가 있다.

3.4. 폐기물매립장별 침출수 미생물군집의 T-RF

T-RFLP법을 이용하여 폐기물매립장의 구조, 매립 폐기물 종류, 운영 기간에 따른 침출수 미생물군집의 변화를 조사하기 위하여 폐기물매립장 규모 및 매립특성이 다른 폐기물매립장 4곳의 침출수 미생물군집의 T-RF 패턴을 분석하였다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 매립장의 특성이 다른 폐기물매립장 침출수에서는 서로 다른 T-RF 경향을 나타냄을 확인할 수 있었다. 제한효소로 *Msp* I을 사용하였을 경우, A 폐기물매립장에서는 450 bp를 전후하여 T-RF들이 존재함

Table 4. Taxonomic identification of 16S rDNA clone sequences and T-RF size of clones digested with 3 different enzymes in the leachate of site A

clone	No. of clones	Closest 16S rDNA sequence	Phylogenetic group	Similarity (%)	T-RF size (bp) digested with;			
					Hha I	Hae III	Msp I	Mixed Encymes
1	27	Uncultured ϵ -proteobacterium	ϵ -Proteobacteria	95	61	-	436	63
2	8	Bacterium DCE25	Unclassified	96	163	30	85	30
3	6	<i>Pseudomonas iners</i> IAM 1419T	γ -Proteobacteria	97	532	286	457	286
4	5	clone 33-FL98B99	ϵ -Proteobacteria	96	58	187	99	61
5	4	Bacterium DCE10	Unclassified	93	55	217	429	57
6	4	Uncultured Bacterium ODPB-B3	ϵ -Proteobacteria	93	59	189	100	62
7	4	<i>Arcobacter</i> sp.	ϵ -Proteobacteria	93	61	189	435	63
8	3	Clone d13	δ -Proteobacteria	97	54	168	125	56
9	3	<i>Desulfomicrobium norvegicum</i>	δ -Proteobacteria	100	52	37	123	37
10	3	Marine bacterium AS-16	γ -Proteobacteria	95	1055	186	49	49
11	3	<i>Sulfurospirillum</i> sp. Am-N	ϵ -Proteobacteria	92	61	217	429	57
12	3	<i>Thiomicrospira</i> sp. CVO	ϵ -Proteobacteria	97	61	-	432	59
13	3	Bacterium SY6-107	Unclassified	94	48	-	423	51

을 확인할 수 있었다. B 폐기물매립장에서도 450~460 bp에서 T-RF를 확인할 수 있었으며, 105 bp와 174 bp에서도 T-RF가 확인되었다. C 폐기물매립장에서는 다른 폐기물매립장에 비해 다양한 T-RF들을 확인할 수 있었으며, 특히 365 bp와 450 bp에서 T-RF가 존재하였다. 한편 불법폐기물매립장인 D 폐기물매립장에서는 상대적으로 단순한 T-RF 패턴을 보였으며, 239 bp와 436 bp, 470 bp 전후의 몇 개 T-RF가 우점하고 있었다.

제한효소 *Msp* I로 자른 T-RF 패턴을 바탕으로 각 매립장 침출수의 종 다양성 지수를 산출하고 비교하였다. 매립이 30% 이루어진 C 폐기물 매립장의 종 다양성(H: 4.47, D: 0.95)이 가장 높게 나타났으며, 매립이 60%이상 완료된 A나 B 폐기물 매립장의 종 다양성(H: 3.55-3.86, D: 0.88-0.91)은 상대적으로 낮게 나타났다. 하지만, 불법폐기물 매립장인 D(H: 4.43, D:0.72)는 다양성은 높지만, 특정 종이 우점화되어 있는 것을 알 수 있다(Table 4).

따라서 T-RFLP법을 이용하여 폐기물매립장의 구조, 매립 폐기물 종류, 운영 기간에 따른 침출수 미생물군집의 구조의 차이를 구별할 수 있음을 확인하였다. Sawamura 등¹³⁾도 T-RFLP를 이용하여 매립장 깊이에 따른 매립폐기물 종류, 온도, 수분, 압력 등에 따라서 미생물 군집 구조가 다르다는 것을 확인하였다. 또한 그들은 폐기물 매립장내의 미생

물군집은 샘플링 지점의 상태, 매립폐기물종류에 따라 차이를 보이므로 현실적인 방법으로 T-RFLP를 이용하여 매립장 침출수내 미생물 군집구조를 모니터링 하는 방법이 매립장의 안정화 정도를 보다 효율적으로 평가할 수 있을 것이라고 제안하였다.

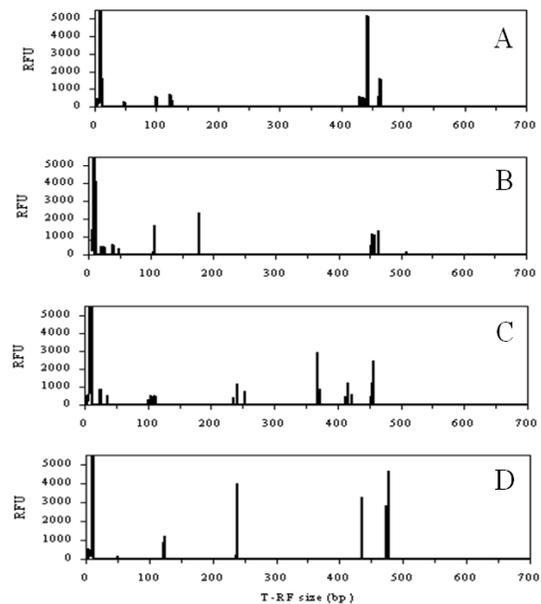


Fig. 4. Bacterial community T-RFLP profiles of leachate from 4 different landfill sites. *Msp* I was used as restriction enzyme.

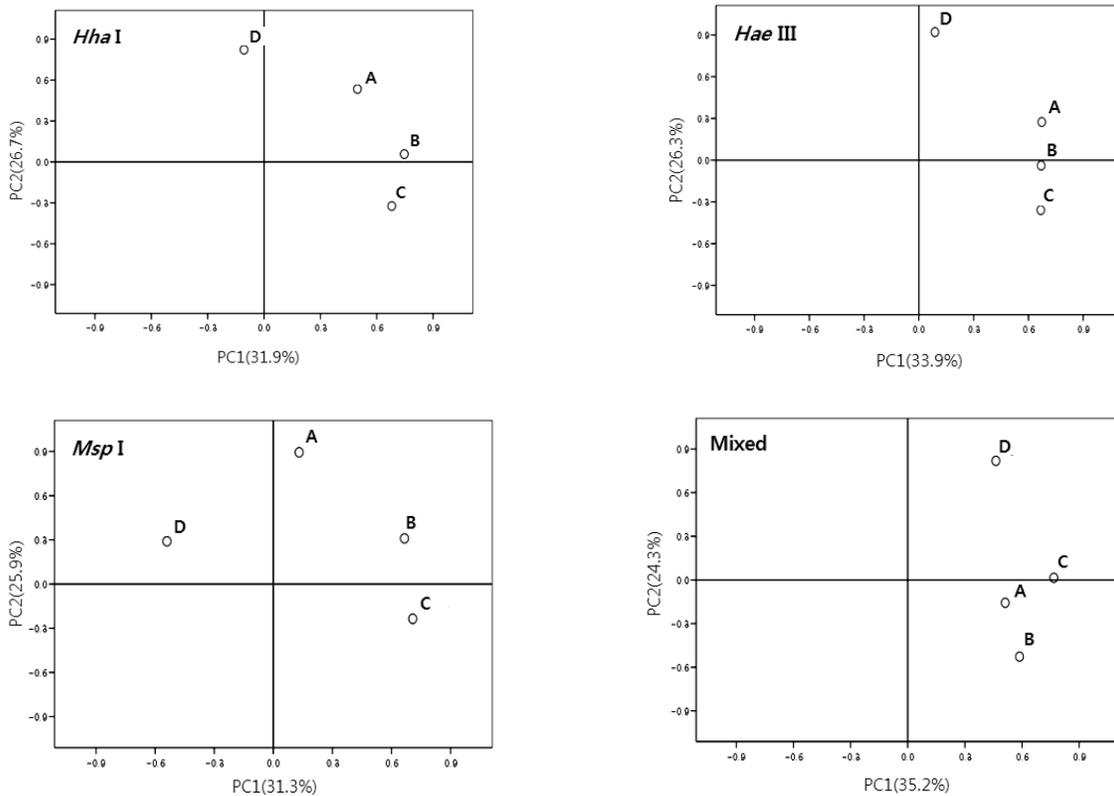


Fig. 5. Principal component analysis ordinations of T-RFLP profiles restricted with *Hha* I, *Hae* III, *Msp* I and mixed enzymes for leachate from 4 different landfill sites A, B, C and D.

Table 5. Phylotype richness and diversity based on *Msp* I T-RFs in leachate from 4 different landfill sites A, B, C and D.

Diversity index	<i>Msp</i> I			
	A	B	C	D
Richness(S)	17	19	26	16
Shannon-Wiener index(H)	3.55	3.86	4.47	4.43
Simpson's index(D)	0.88	0.91	0.95	0.72

매립특성이 다른 폐기물매립장 4곳의 침출수 미생물군집에 대하여 다양한 제한효소로 처리한 경우의 T-RF패턴을 주성분분석을 통하여 해석하고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 주성분분석은 관찰된 여러 변수들 중 서로 연관성이 있는 변수들끼리 묶어 새로운 변수를 찾아서 미생물 군집 유사성을 통계적으로 분석하는 기법이며, 정확도가 떨어질 수는 있으나 전체적인 경향판단은 가능하다.¹⁷⁾ *Hha* I, *Hae* III, *Msp* I 및 상기 3가지 제한효소 혼합처리의 모든 경우에 있어서 불법폐기물매립장의 침출수 미생물군집은 다른 3곳의 폐기물처리장 침출수 미생물군집과 구별되는 것으로 나타났다. 제한효소 가운데에서도 *Hae* III를 사용한 경우에 불법폐기물매립장 침출수의 미생물군집이 다른 곳의 미생물군집과

가장 큰 차이를 보였으며, *Msp* I를 사용한 경우에도 구분은 되었으나, 그 정도가 분명하지 못하였다. 따라서 사용하는 제한효소에 따라 미생물군집해석의 결과의 활용정도가 차이나기 때문에 제한효소의 선정이 중요함을 알 수 있었으며, T-RFLP 분석을 통해서 매립장의 특성이 다른 폐기물매립장 침출수의 미생물 군집구조가 다르다는 것을 확인할 수 있었다.

4. 결론

미생물군집의 정보를 폐기물매립장의 안정화 평가에 활용하기 위하여 매립특성 및 매립폐기물의 성상이 다른 폐기물매립장의 침출수 미생물을 대상으로 분자생물학적 미생물군집해석법인 T-RFLP법을 적용한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

가. T-RFLP를 활용해서 침출수에 존재하는 우점 미생물군집의 상대적 분포비를 확인할 수 있었다.

나. 16S rDNA 클론 해석법을 통해서 확인된 폐기물매립장 침출수내 우점 미생물 군집은 T-RFLP법을 통한 우점 T-RF로 확인할 수 있었다.

다. T-RFLP법을 이용하여 매립장의 구조, 매립 폐기물 종류, 운영 기간이 다른 폐기물매립장 침출수내 미생물군집 구조의 차이를 확인 할 수 있었다.

라. 따라서 T-RFLP법을 사용하여 폐기물매립장의 미생물군집 구조를 장기적으로 모니터링 한다면 많은 비용과 시간을 소요하는 16S rDNA 클론해석법의 반복적인 수행 없이도 폐기물매립장의 안정화 정도를 평가할 수 있을 것으로 기대한다.

KSEE

사 사

이 논문은 2007학년도 부산대학교 교내학술연구비(신임 교수연구정착금)에 의한 연구임.

참고문헌

1. 신연빈, 정진욱, 배우근, 김승진, 백승천, “침출수 재순환과 생물학적 단축질소제거공정을 병합한 매립지 조기안정화 기술연구”, 대한환경공학회지, **29**(9), 1035-1043(2007).
2. 환경부, 환경백서, 환경부(2004).
3. Christensen T. H. and Kjeldsen P., “Basic Biochemical Processes in Landfills, Sanitary Landfilling: Process, Technology and Environmental Impact”, Academic press, 29-49(1989)
4. Pohland F. G., “Accelerated solid waste stabilization and leachate treatment by leachate recycle through sanitary landfills”, *Prog. Water Technol.*, **7**, 753-765(1975).
5. 범봉수, 배재호, 조광명, “혐기성슬러지 및 침출수의 재순환이 모의매립조내 고형폐기물의 메탄 생성에 미치는 영향”, 대한환경공학회지, **24**(8), 1365-1377(2002)
6. Osborn A. M., Moore E. R. B. and Timmis K. N., “An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics”, *Env. Microbiol.*, **2**(1), 39-50(2000).
7. Lee T. H., Kurata S., Cindy H. Nakatsu, and Yoichi Kamagata, “Molecular analysis of bacterial community based

- on 16S rDNA and functional genes in activated sludge enriched with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) under different cultural conditions”, *Microb. Ecol.*, **49**, 151-162 (2005).
8. Bowman J. P. and McCuaig R. D., “Biodiversity community structural shifts and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sedimen”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**(5), 2463-2483(2003).
9. Campbell B. J., Engel A. S., Porter M.L., and Takai K., “The versatile ϵ -proteobacteria: key players in sulphidic habitats”, *Nat.*, **4**, 458-468(2006).
10. Luijten M. L. G. C, de Weert J., Smidt H., Boschker H. T. S., de Vos W. M., Schraa G and Stams A. J. M., “*Sulfurospirillum halorespirans* sp. nov., an anaerobic, tetrachloroethene- respiring bacterium, and transfer of *Dehalospirillum multivorans* to the genus *Sulfurospirillum* as *Sulfurospirillum multivorans*, comb. nov.”, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**, 787-793(2003).
11. McClung C. R., Patriquin D. G. and Davis R. E., “*Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with roots of *Spartina alterniflora* Loisel”, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **33**, 605-612(1983).
12. Voordouw, G., Armstrong S. M., Reimer M. F., Fouts B., Telang A. J., Shen Y. and Gevertz D., “Characterization of 16S rRNA genes from oil field microbial communities indicates the presence of a variety of sulfate-reducing, fermentative, and sulfide-oxidizing bacteria”, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 1623-1629 (1996).
13. Sawamura H., Yamada M., Enod K., Soda S., Ishigaki T., and Ike M., “Characterization of microorganism at different landfill depths using carbon-utilization patterns and 16S rRNA gene based T-RFLP”, *J. Bio. Bioeng.*, **109**(2), 130-137(2010).
14. 조혜연, 이정현, 현정호, “16S rDNA 분석을 이용한 강화도 장 화리 갯벌 퇴적물 내 미생물 군집구조 및 다양성”, 한국미생물학회지, **40**(3), 189-198(2004).
15. Mori K., and Takamizawa K., “Analysis of sulfate-reducing bacterial and methanogens in a landfill site using molecular-biological techniques”, *Japan Soc. Was. Manage. Exp.*, **13**(3), 113-123(2002).

16. 현정호, 이홍금, 권개경, “해양환경의 황산염 환원을 조절요인 및 유기물 분해에 있어 황산염 환원의 중요성”, 한국해양학회지, **8**, 210-224(2003).

17. 이준호, 박갑성, “유류오염대수층 고온공기분사공정시 제한효소 다형성 미생물 군집”, 한국물환경학회지, **24**(1), 19-29(2008).