

《原著》

분자생물학적 방법을 이용한 지열시스템 관정 및 주변지역 미생물종 모니터링

안창민¹ · 한지선¹ · 김창균^{1*} · 박유철² · 목종구³ · 장범주³

¹인하대학교 환경공학과
²강원대학교 지구물리학과
³(주)지오쓰리에코

Monitoring of Geothermal Systems Wells and Surrounding Area using Molecular Biological Methods for Microbial Species

Chang-Min Ahn¹ · Ji-Sun Han¹ · Chang-Gyun Kim^{1*} · Yu-Chul Park²
Jong-Koo Mok³ · Bum-Ju Jang³

¹Department of Environmental Engineering, Inha University
²Department of Geophysics, Kangwon National University
³Geo3eco Co., Ltd.

ABSTRACT

This study was conducted to monitor microbial species dynamics within the aquifer due to long term operation of geothermal heat pump system. The species were identified by molecular biological methods of 16S rDNA. Groundwater sample was collected from both open (S region) and closed geothermal recovery system (J region) along with the control. J measured and control as well as S measured found *Ralstonia pickettii* as dominant species at year 2010. In contrast, *Rhodoferrax ferrireducens* was dominantly observed for the control of S. In 2011, *Sediminibacterium sp.* was universally identified as the dominant species regardless of the monitoring places and type of sample, i.e., measured or control. The difference in the dynamics between the measured and the control was not critically observed, but annual variation was more strikingly found. It reveals that possible environmental changes (e.g. ORP and DO) due to the operation of geothermal heat recovery system in aquifer could be more exceedingly preceded to differentiate annual variation of microbial species rather than positional differences.

Key words : Geothermal heat pump system, Groundwater, Microbial species, 16S rDNA

1. 서 론

전 세계적으로 유가 급등과 수급의 불안정, 지구 온난화 방지를 위한 화석 연료 사용 제한 등의 이유로 인해 최근 다양한 신재생에너지에 대한 관심이 집중되고 있다. 그 가운데 천부 지열(지중열 및 지하수열)을 이용한 건물 냉난방의 상업화가 주목을 받고 있다. 상업적으로 이와 같은 설비를 지열히트펌프 시스템(Geothermal Heat Pump)이라고 하며 작동유체의 순환방식에 따라 밀폐형(Closed

Loop)과 개방형(Open Loop)으로 구분한다. 지열시스템은 국내외적으로 현존하는 가장 청정한(친환경적인) 냉난방 시스템으로 알려져 있다. 그러나 이용과정에서 지중 및 지하수의 열 변화를 유발할 수 있으며 이로 인한 미생물종(군집)의 변화를 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다(Jo et al., 2009a; Jo et al., 2009b; York et al., 1998). 특히 초창기 지열 시스템이 도입된 외국을 중심으로 장기간에 걸쳐 지열관정내 수질 및 온도 변화를 모니터링하고 그에 따른 미생물 군락의 변화 양상을 관찰한 연구가 활

*Corresponding author : cgk@inha.ac.kr

원고접수일 : 2012. 3. 2 심사일 : 2012. 11. 30 게재승인일 : 2012. 12. 7
질의 및 토의 : 2013. 2. 28 까지

발히 진행되고 있다(Sowers et al., 1997). 그에 반해 국내에서는 지열시스템의 도입이 비교적 최근에 이루어졌고, 그에 따른 관정주변 지하 환경변화에 대한 모니터링 등이 아직은 활발히 이루어지지 않은 실정이다.

일반적으로 지하수 및 토양내 미생물은 매우 다양한 종들이 군집을 이루고 있으며 대부분이 미확인 종이다. 또한 지역적, 계절적으로 나타나는 미생물의 불규칙적인 존재 양상은 지하수와 토양 미생물을 대상으로 하는 환경평가연구의 장애가 된다(Gans et al., 2005). 자연매체를 대상으로 미생물의 다양성을 연구하는 데에는 전통적으로 미생물 배지배양 방법이 널리 사용되고 있다. 그러나 검출되지 않는 미생물 종이 대부분을 차지하는 것으로 알려져 있다(Rappé et al., 2003). 최근 이러한 미생물 배양 방법의 한계를 보완한 분자생물학적인 방법에 의한 군집 전체를 분석하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 기법 중 16S rDNA 분석을 통한 미생물의 군집조사가 최근 많이 사용되고 있다(Muyzer et al., 1993). 16S rDNA는 보존부분(conserved region)과 가변부분(variable region)으로 구분되어, 보존부분은 진화속도가 매우 느려 많은 생물체가 공통적으로 갖는 염기 서열인 반면, 가변 부분은 미생물의 종과 속간의 분화에 따른 다양성이 큰 염기 서열을 포함하고 있어 미생물간의 유연 관계를 파악 하는데 유용하게 사용된다.

따라서 본 연구에서는 분자생물학적 미생물의 동정 방법을 이용해 지열히트펌프 시스템이 설치된 관정지역의 지하수 시료내 미생물종을 조사하고, 관정내 환경 변화가 미생물 종 변화에 미치는 인위적인 인과 관계를 평가하고자 하였다.

2. 실험방법

2.1. 실험대상 시료 채취

미생물 종분석에 사용된 지하수 시료는 지열히트펌프 시스템이 설치된 관정지역(S및 J지점)과 그 영향권 바깥의 대조군을 대상으로 채취하였다. 강원도 원주시 우산동의 S대학교내 위치한 S지점은 2006년 12월에 개방형 시스템이 설치하여 현재까지 운영 중이며, 충청북도 괴산군 괴산읍 J대학교내 위치한 J지점은 2008년 10월에 밀폐형 시스템을 설치하여 운영하고 있다. Fig. 1에 지열관정 설치 위치를 나타내었다. 시료 채취는 2010년 6월(6월17일, 18일 양일간)과 2011년 5월(5월24일, 25일 양일간)에 각각 실시하였다. 밀폐형 시스템인 J지점의 경우는 수증펌프로 지하수 시료를 채취하였고 실험군은 관정하부 30 m 지점에서 대조군은 관정하부 20 m 지점에서 각각 채취 하였다. 개방형 시스템인 S지점의 경우는 배관에서 직접 토출되는 지하수를 실험군 시료로 하였고, 대조군 시료는 관

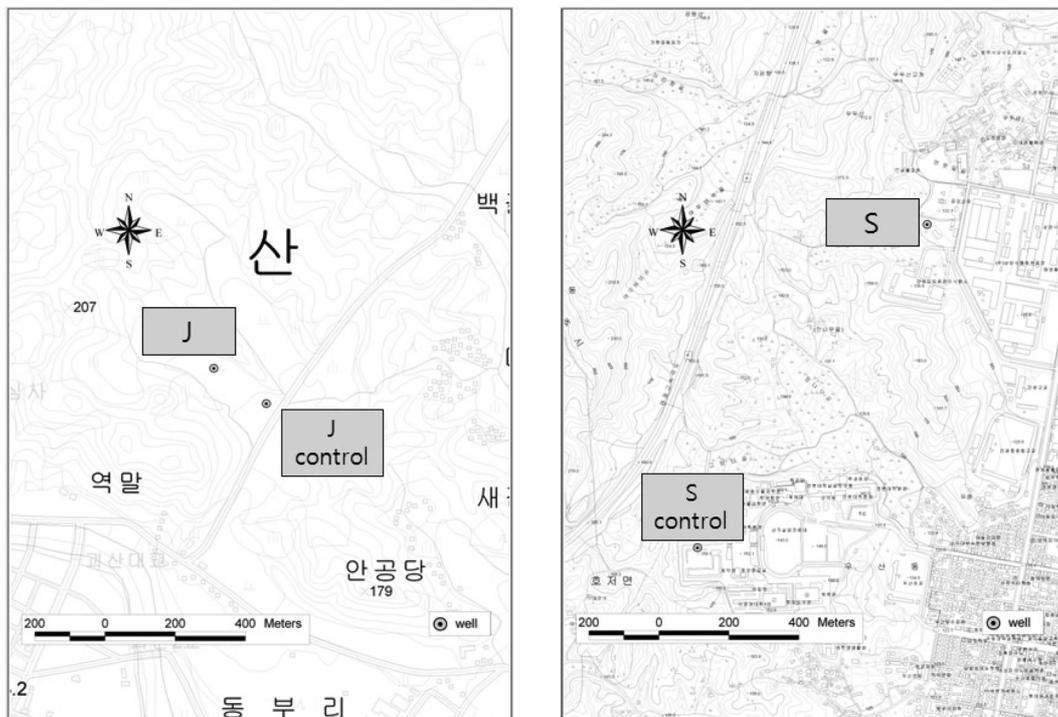


Fig. 1. Locality of measured and control wells in geothermal recovery system.

정하부 10 m 지점에서 채취 하였다. 시료는 2 L의 1회용 채수병(뉴-국제과학상사)에 각각 채수했다. 시료채취 시 지하수의 온도, pH, EC, ORP, DO는 휴대용 측정 장비(HI-9828, Hanna Instruments)를 이용 하여 측정했다.

채취한 지하수는 미생물을 동정하기 위하여 다음과 같이 전처리하였다. 우선 지하수 시료 각 1.5 L를 0.2 µm pore size의 membrane filter(Adventec®, Toyo Roshi Kaisha, Ltd.)로 여과한 후 여과된 침전물에 NaCl 분말(Sodium Chloride, Duchefa Biochemie) 8.5 g을 가한 후 증류수 1 L에 용해시킨다. 그 후 멸균 제조한 0.85% saline solution 50 mL를 가하고 2시간 동안 150 rpm 속도로 교반(Shaking Incubator, VS-8480, Vision Scientific. Co.)하여 침전물을 분리하였다. 분리된 침전물 용액을 3000 rpm에서 15분간 원심분리(Hanil science HA-1000-3, 원심분리기) 한 후 생성된 침전물을 DNA 추출용 시료로 하였다.

2.2. DNA 염기서열분석

분리된 침전물에서 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 침전물 중 genomic DNA를 추출하였다(Jo et al., 2009a; Jo et al., 2009b; York et al., 1998). 추출한 총 genomic DNA에서 미생물 종을 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 PCR 증폭을 수행하였다(PCR Machine, Techgene). PCR 증폭 산물은 Solg™ Gel & PCR Purification System for PCR Purification kit(Solgent Co., Ltd.)를 사용하여 primer-dimer를 제거하였다. PCR 증폭산물은 agarose gel에 loading하고

Power gel extraction kit(Dyne Bio Inc., Korea)를 사용하여 정제하였다. 정제된 증폭산물은 T-Blunt cloning vector(SolGent, Cat No. SOT01-K020)로 ligation시키고 숙주세포(host cell : E.coli XL1-Blue)로 형질전환(Transformation)하였다. 그 후 X-Gal과 IPTG로 처리된 LB(Luria-Bertani) 배지에 형질전환 된 세포를 배양한 후 시료별로 10~20개의 균주의 접합이 확인된 콜로니를 Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA)을 이용해 플라스미드를 회수한후, 1% agarose gel에 loading하여 plasmid와 PCR 산물이 조합된 것만을 16S rDNA 염기서열 분석하였다. 미생물 염기서열은 NCBI(National Center for Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Gene Bank에 등록된 데이터베이스와 비교하였다. 이와 같이 도출된 미생물 종 별 염기서열 정보를 근거로 CLUSTALW(<http://clustalw.genomic.jp/>)를 이용하여 관련 미생물에 대한 계통수(pylogenetic tree)를 작성하고 미생물 중간 유근관계를 파악 하였다.

3. 실험결과 및 고찰

3.1. 채취 지점별 지하수 수질 특성 분석

Table 1은 지하수 시료 채취 당시 관정내 지하수의 수질 특성을 나타낸다. 온도의 경우 지점에 관계없이 대조군과 실험군의 차이는 미미하게 나타났다. pH의 경우 S 지점의 실험군에서 대조군보다 약간 높은 값을 보였다. 그러나 J지점에서는 2010년 측정에서 실험군이 대조군보다 낮은 pH 값을 보였다. 이경우를 제외하곤 pH의 경우 실험군이 대조군보다 전반적으로 높게 나타났다. 이는 관정 구축과정에서 관정내부 되메움재로 사용되는 알칼리성의 불투수성물질의 지하수내 해리에 기인한 것으로 판단되었다. EC의 경우 J지점에서 실험군이 대조군보다 낮은 값을

Table 1. Analysis Results of groundwater in site

Sample	Date	Site Conditions				
		Temp. (°C)	pH	EC (µS/cm)	ORP (mV)	DO (mg/L)
S	2010-06-18	18.2	7.54	233	179.4	7.51
	2011-05-25	18.1	7.25	236	7.0	7.67
J	2010-06-17	14.6	6.20	324	187.2	3.29
	2011-05-24	16.7	7.60	236	11.4	7.35
S control	2010-06-18	18.0	6.91	114	23.1	5.64
	2011-05-24	18.6	6.71	139	12.0	7.62
J control	2010-06-17	15.8	7.61	343	117.8	2.36
	2011-05-24	15.9	7.19	419	6.9	2.93

보였다. 이외는 반대로 S지점은 실험군이 대조군보다 높은 값을 나타냈다. S지점의 경우 개방형으로 이용되고 있어 대기분압하에서 대기와 지하수간의 활발한 이동으로 수중 전해질 농도가 증가한 것으로 판단되었다. 이외는 반대로 밀폐형인 J지점의 경우 대기와의 접촉이 차단되고 단지 지하수의 재순환과정에 있어 침전물 생성 등의 영향으로 용해성 물질이 감소하였기 때문에 실험군의 경우 대조군보다 더 낮은 값을 나타낸 것으로 여겨졌다. ORP의 경우 지점별 또는 실험군/대조군 간의 변화보다 연도별 변화특성이 뚜렷하게 나타났다. 즉 2010년의 경우 2011년의 경우보다 더 높은 값, 즉 산화상태의 값을 보였으나 1년 경과 후 그보다 낮은 산화상태, 즉 1년전과 비교하여 2011년의 경우 상대적으로 환원상태를 나타냈다. DO의 경우 이외는 반대로 2010년의 경우 2011년의 경우보다 더 낮은 농도를 보였다. 즉 DO 농도를 보면 2010년이 더 상대적으로 다소 높은 환원 상태를 나타냈다. J지점 실험군의 경우 2011년에는 2010년에 비해 두 배 이상 DO농도가 높은 것을 알 수 있다. S지점의 대조군도 2011년의 경우 약 2이상 DO농도가 높았다.

3.2. J지점 미생물 종분석

3.2.1. 2010년 6월

Fig. 2는 J지점의 실험군(J)와 대조군(Jcontrol)의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타냈고, Table 2과 3은 그에 대응하는 각각의 염기서열 분석결과를 정리한 것이다. 실험군(J) 시료에서 20개의 clone을 분석하였으며 그 중 11개가 *Ralstonia pickettii*의 근연종으로 우점하는 것으로 확인되었다. *Ralstonia pickettii*은 다양한 중금속이 존재하는 환경에서 발견되는 중온균으로 알려져 있다. 따라서 이 종은 중금속에 대한 저항성이 높다. 그러나 이 균은 오염이 되지 않은 대수층에서도 우점종으로 발견되어 시스템운영과는 특징적인 상관관계는 없는 것으로 판단되었다(Boutros et al., 2002). 시료 중 두 번째로 많이 발견된 *Burkholderia phytofirmans*(4개의 clone이 근연종)는 식물이 병충해에 저항성을 갖도록 하는 중온균이다(Sessitsch et al., 2005). 20개 중 나머지 5개의 clone은 각각 1개의 단일종으로 확인되었다. *Janthinobacterium*은 토양과 물에 존재하는 온대 기후 지역에서 일반적으로 발견되는 호기성 중온균이며(Hashidoko et al., 2008) *Methylococcus capsulatus*는 메탄산화균으로 토양에서 발생하는 메탄을 산화시켜 이산화탄소로 전환한다(Ward et al., 2004). *Ralstonia solanacearum*은 토양에서 주로 발견되며 phytopathogen(식물의 병원균)의 일종으로 중온균이다(Anderson and

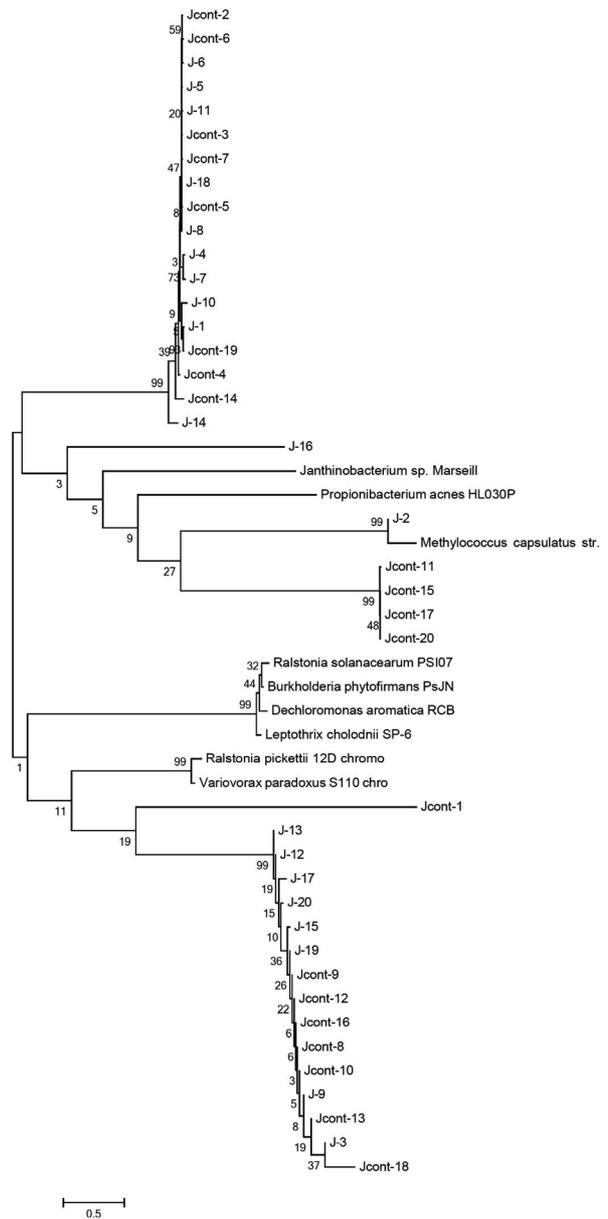


Fig. 2. Phylogenetic tree of clones for the Location J and Jcontrol (June, 2010).

Gardner, 1999). *Variovorax paradoxus* S110은 독립영양 미생물로 수소를 전자공여체로 사용하거나 이산화탄소를 사용하여 광합성을 할 수 있다(Jamieson et al., 2009). 총 20개 종의 균을 분석해보면 신진대사적 기능은 서로 다르지만 모두 중온의 온도에서 성장하는 미생물임을 알 수 있다. 따라서 측정된 지하수의 온도가 낮더라도 시스템의 운영에 따라 발생된 지하수의 지속적이며 국지적인 영향으로 중온 미생물의 활성이 높은 환경이 조성되고 있는 것으로 판단되었다.

대조군인 Jcontrol의 종분석 결과, 실험군과 마찬가지로

Table 2. Sequencing Results of Clones for the Location J (June, 2010)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
J-1	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1320/1415 (93%)	32/1415 (2%)
J-2	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 chromosome (NC_008825)	1359/1533 (88%)	59/1533 (3%)
J-3	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1424/1452 (98%)	7/1452 (0%)
J-4	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 2 (NC_010676)	1317/1376 (95%)	18/1376 (1%)
J-5	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1395/1401 (99%)	4/1401 (0%)
J-6	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1387/1400 (99%)	3/1400 (0%)
J-7	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1344/1403 (95%)	18/1403 (1%)
J-8	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1388/1397 (99%)	1/1397 (0%)
J-9	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1442/1454 (99%)	5/1454 (0%)
J-10	<i>Janthinobacterium</i> sp. Marseille (NC_009659)	1316/1405 (93%)	28/1405 (1%)
J-11	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1392/1404 (99%)	8/1404 (0%)
J-12	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 1 (NC_010681)	1427/1454 (98%)	12/1454 (0%)
J-13	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 1 (NC_010681)	1425/1449 (98%)	7/1449 (0%)
J-14	<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath (NC_002977)	1311/1409 (93%)	28/1409 (1%)
J-15	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1393/1457 (95%)	19/1457 (1%)
J-16	<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07 (NC_014311)	1308/1391 (94%)	41/1391 (2%)
J-17	<i>Variovorax paradoxus</i> S110 chromosome 1 (NC_012791)	1404/1453 (96%)	9/1453 (0%)
J-18	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1396/1397 (99%)	0/1397 (0%)
J-19	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1444/1454 (99%)	6/1454 (0%)
J-20	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 1 (NC_010681)	1419/1452 (97%)	10/1452 (0%)

Table 3. Sequencing Results of Clones for the Location Jcontrol (June, 2010)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
Jcont-1	<i>Propionibacterium acnes</i> HL030PA1 P (ADYB01000002)	1476/1494 (98%)	6/1494 (0%)
Jcont-2	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1393/1398 (99%)	1/1398 (0%)
Jcont-3	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1393/1398 (99%)	1/1398 (0%)
Jcont-4	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1341/1368 (98%)	9/1368 (0%)
Jcont-5	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1387/1401 (99%)	6/1401 (0%)
Jcont-6	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1388/1398 (99%)	1/1398 (0%)
Jcont-7	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1389/1398 (99%)	2/1398 (0%)
Jcont-8	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1447/1454 (99%)	3/1454 (0%)
Jcont-9	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1445/1455 (99%)	5/1455 (0%)
Jcont-10	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1447/1451 (99%)	1/1451 (0%)
Jcont-11	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6 (NC_010524)	1257/1377 (91%)	32/1377 (2%)
Jcont-12	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1448/1454 (99%)	4/1454 (0%)
Jcont-13	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1431/1452 (98%)	6/1452 (0%)
Jcont-14	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB (NC_007298)	1350/1412 (95%)	31/1412 (2%)
Jcont-15	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6 (NC_010524)	1260/1382 (91%)	37/1382 (2%)
Jcont-16	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1446/1455 (99%)	4/1455 (0%)
Jcont-17	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6 (NC_010524)	1260/1378 (91%)	33/1378 (2%)
Jcont-18	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1361/1478 (92%)	44/1478 (2%)
Jcont-19	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1332/1416 (94%)	29/1416 (2%)
Jcont-20	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6 (NC_010524)	1261/1382 (91%)	37/1382 (2%)

20개 중 14개의 clone에서 *Ralstonia pickettii*의 근연종이 우점종으로 나타났다(Boutros et al., 2002). 이 종은 실

험군에서도 우점종으로 나타났다. 이는 지하대수층의 생태계가 지열회수시스템의 운전에도 큰 영향을 받지 않음

을 나타내는 것이다. 그 다음으로 많이 발견된 종은 *Leptothrix cholodnii*(4개의 clone이 근연종)로 철분과 망간을 산화하며 유기물이 풍부한 수중 환경에서 자주 발견되는 중은균이다(Takeda et al., 2005). 그 밖에 단일종으로 검출된 *Propionibacterium acnes*는 가장 일반적인 막대모양의 그람양성균으로 propionic 산을 생산하는 혐기성균이지만 호기성 조건에서도 활성을 나타낸다(Hiramatsu et al., 2003). *Dechloromonas aromatica*는 무산소 조건에서 벤젠 등의 방향족 탄화수소 화합물을 산화제거하는데 이용된다(Salinero et al., 2009).

3.2.2. 2011년 5월

Fig. 3은 시료채취지점 J의 실험군(J)와 대조군(Jcontrol)의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타낸다. Table 4과 5은 각각의 염기서열 분석결과를 나타낸 것이다. 실험군(J)에서는 분석대상 10개 clone 중 7개가 *Sediminibacterium sp.*의 근연종인 우점종으로 나타났다. 이 종은 Gram 음성이며 호기성 상태의 토양부착성장형 미생물이다. 주로 유기물 등이 풍부한 저수조 등지의 침전물속에서 발견된다(Qu and Yuan, 2008). 나머지 단일종으로 관측된 *Pseudomonas aeruginosa*는 Gram 양성의 호기성 미생물이다. 이 종은 일반적인 대기환경이나 지하수 환경(저산소)내에서 발견되는 균종으로 동물이나 인간에게 심내막염, 폐렴, 수막염

등의 질병을 일으키는 균종으로 알려져 있다(Micek et al., 2005). 또한 Fig. 3에서 보는 바와 같이 대장균이나 *Bacillus sp.* 등의 근연종으로도 포함될 수 있다.

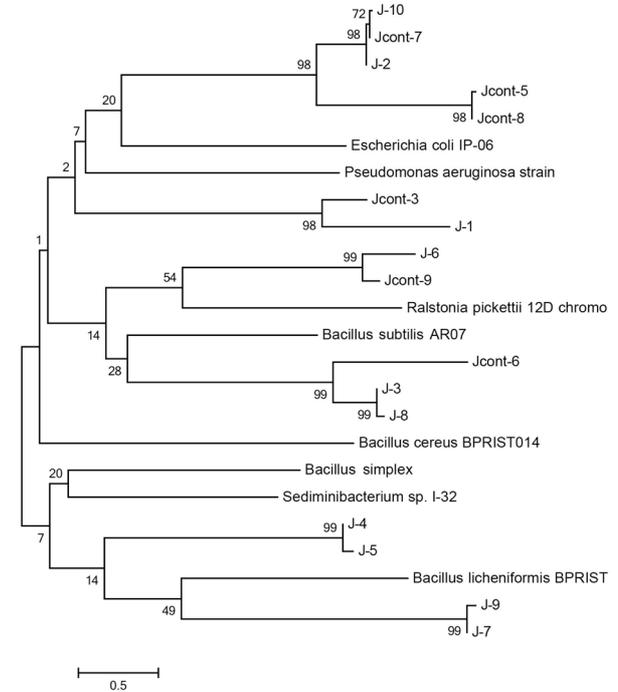


Fig. 3. Phylogenetic tree of Clones for the Location J and Jcontrol (May, 2011).

Table 4. Sequencing Results of Clones for the Location J (May, 2011)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
J-1	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1468/1480 (99%)	6/1480 (0%)
J-2	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1461/1480 (99%)	6/1480 (0%)
J-3	Uncultured bacterium	1454/1507 (96%)	26/1507 (2%)
J-4	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1466/1484 (99%)	10/1484 (1%)
J-5	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1462/1483 (99%)	9/1483 (1%)
J-6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain S164S	1502/1506 (99%)	1/1506 (0%)
J-7	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1462/1483 (99%)	9/1483 (1%)
J-8	Uncultured bacterium	1460/1506 (97%)	25/1506 (2%)
J-9	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1462/1483 (99%)	9/1483 (1%)
J-10	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1461/1484 (98%)	10/1484 (1%)

Table 5. Sequencing Results of Clones for the Location Jcontrol (May, 2011)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
Jcont-3	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1466/1483 (99%)	10/1483 (1%)
Jcont-5	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1462/1481 (99%)	8/1481 (1%)
Jcont-6	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1465/1479 (99%)	5/1479 (0%)
Jcont-7	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1464/1482 (99%)	8/1482 (1%)
Jcont-8	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1455/1499 (97%)	26/1499 (2%)
Jcont-9	<i>Sediminibacterium sp.</i> I-32 (AM990455.1)	1461/1499 (97%)	25/1499 (2%)

대조군인 Jcontrol의 경우, 6개 clone 중 3개의 clone 이 *Sediminibacterium sp.*와 근연종으로 나타났다. 이는 실험군에서도 우점종으로 조사된 바 있다. 따라서 지열회수시스템이 운영되는 장소의 경우 지하대수층의 생태계는 대조군과 유사한 조건, 즉 시스템 운영에 따른 생태학적 영향은 낮음을 알 수 있다.

3.3. S지점 미생물 종분석

3.3.1. 2010년 6월

Fig. 4는 조사지역(S지점)의 실험군 시료(S)와 대조군 시료(Scontrol)의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타낸 것이다. Table 6과 7는 각각의 염기서열 분석결과를 보여준다. 먼저 실험군 시료(S) 분석 결과를 보면, 20개 clone 중 16개가 *Ralstonia pickettii*의 근연종으로 밝혀졌다. 이종은 2010년 6월 J지점의 실험군 및 대조군에서도 우점종으로 측정된 바 있다. 20개 중 2개의 clone과 근연종인 *Methylibium petroleiphilum*는 메탄산화 중온균이다(Nakatsu et al., 2006). 이균은 2010년 6월 J 실험군에서 발견된 *Methylococcus capsulatus*와는 다른 종이지만 동일한 메탄산화능을 갖는 균이다. 그 밖에 *Polaromonas sp.* JS666종은 cDCE를 분해하는 중온균이다(Mattes et al., 2008). 또한 *Leptothrix cholodnii*는 철분과 망간을 산화하며 유기물이 풍부한 수중 환경에서 자주 발견되는 중온균이다(Takeda et al., 2005). 이 균은 2010년 6월 Jcontrol 시료에서도 발견되었다.

대조군인 Scontrol의 종분석 결과, 9개 중 5개의 clone 이 *Rhodoferrax ferrireducens*의 근연종으로 밝혀졌다. 이 균은 유기분자들을 산화하여 불용성 철(3)을 전자 수용체로 이용하여 철을 환원할 수 있는 중온균이다(Finneran et al., 2003). 9개 clone중 2개의 근연종으로 밝혀진 *Novosphingobium aromaticivorans*는 여러 종류의 방향족 탄화 수소를 분해할 수 있다(Bell et al., 2012). 그 밖에 1개의 clone과 근연종인 *Sphingopyxis alaskensis*는 빈영양상태에서 성장하는 미생물로서 크기(일반적으로 0.1 μm 이하)가 매우 작다(Kašmpfer et al., 2002). 또 하나의 단일 Clone의 유연종인 *Methylibium petroleiphilum*은 S지점의 실험군에서도 존재하였다. 이는 호기성 조건에서 메탄산화와 동시에 MTBE를 분해할 수 있는 중온균이다(Nakatsu et al., 2006).

3.3.2. 2011년 5월

Fig. 5는 조사지역 S의 실험군(S)와 대조군(Scontrol)의 계통수(Phylogenetic tree)를 보여준다. Table 8과 9은 그

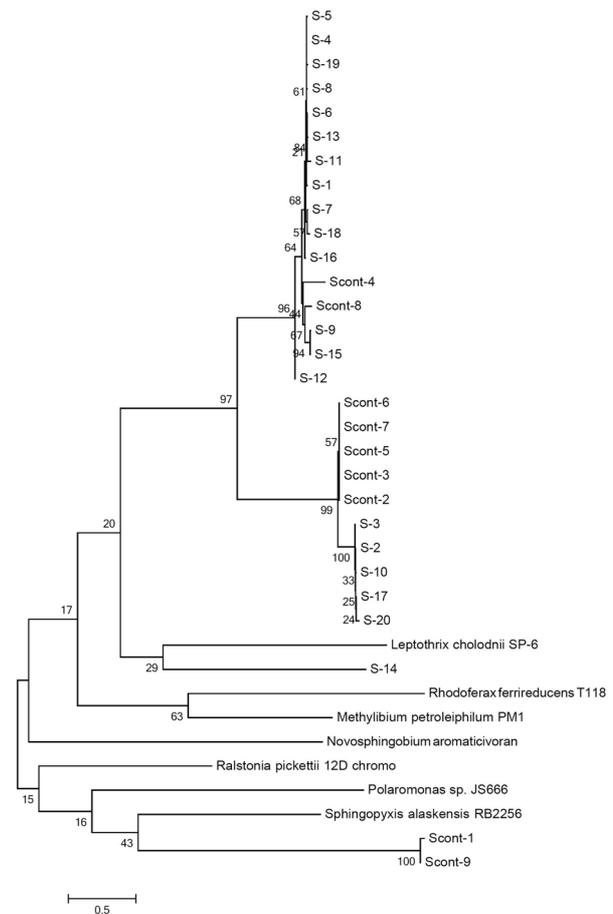


Fig. 4. Phylogenetic tree of clones for the Location of S Scontrol (June, 2010).

에 상응하는 각각의 염기서열 분석결과를 나타내었다. 실험군 S의 clone 3개 중 1개의 clone이 *Sediminibacterium sp.*의 근연종으로 조사되었다. 이 종은 2011년 5월 J지점의 실험군 및 대조군의 우점종으로도 관측되었다. 즉 유기물 등이 풍부한 저수조 등지의 침전물속에서 발견되는 호기성 그람 음성균이다(Qu and Yuan, 2008). 이는 지하수내 미생물 성장에 필요한 영양성분(미네랄 및 수중 유기물)이 풍부하게 존재할 수 있다는 것을 간접적으로 의미한다. 그 외 두 개의 clone은 미확인 균종이었으나 계통도 상(Fig. 5)으로 *Sediminibacterium sp.*의 근연종으로 확인되었다.

대조군인 Scontrol의 경우, 3개의 clone 중 3개 모두 *Sediminibacterium sp.*의 근연종으로 판별되었다. 2011년 J지점의 실험군 및 대조군에서도 우점종으로 확인되 바 있다. 따라서 2011년 J 및 S 지점에서 실험군과 대조군 구분 없이 모두 *Sediminibacterium sp.*가 우점종으로 존재함을 확인할 수 있었다.

Table 6. Sequencing Results of Clones for the Location of S (June, 2010)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
S-1	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1441/1456 (98%)	5/1456 (0%)
S-2	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1389/1403 (99%)	8/1403 (0%)
S-3	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1394/1403 (99%)	6/1403 (0%)
S-4	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1448/1455 (99%)	4/1455 (0%)
S-5	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1445/1454 (99%)	3/1454 (0%)
S-6	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1442/1457 (98%)	7/1457 (0%)
S-7	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1431/1452 (98%)	4/1452 (0%)
S-8	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1442/1452 (99%)	1/1452 (0%)
S-9	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 chromosome (NC_008825)	1332/1474 (90%)	48/1474 (3%)
S-10	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1392/1399 (99%)	2/1399 (0%)
S-11	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1424/1463 (97%)	18/1463 (1%)
S-12	<i>Polaromonas</i> sp. JS666 (NC_007948)	1386/1465 (94%)	38/1465 (2%)
S-13	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1445/1457 (99%)	6/1457 (0%)
S-14	<i>Leptothrix cholodnii</i> SP-6 (NC_010524)	1265/1379 (91%)	32/1379 (2%)
S-15	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 chromosome (NC_008825)	1340/1472 (91%)	46/1472 (3%)
S-16	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1406/1463 (96%)	22/1463 (1%)
S-17	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1392/1400 (99%)	3/1400 (0%)
S-18	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1415/1457 (97%)	10/1457 (0%)
S-19	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1442/1455 (99%)	5/1455 (0%)
S-20	<i>Ralstonia pickettii</i> 12D chromosome 1 (NC_012856)	1377/1404 (98%)	9/1404 (0%)

Table 7. Sequencing Results of Clones for the Location of Scontol (June, 2010)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
Scont-1	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 (NC_007794)	1417/1462 (96%)	20/1462 (1%)
Scont-2	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1364/1407 (96%)	18/1407 (1%)
Scont-3	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1365/1404 (97%)	15/1404 (1%)
Scont-4	<i>Sphingopyxis alaskensis</i> RB2256 (NC_008048)	1294/1423 (90%)	48/1423 (3%)
Scont-5	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1365/1403 (97%)	14/1403 (0%)
Scont-6	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1365/1404 (97%)	15/1404 (1%)
Scont-7	<i>Rhodoferrax ferrireducens</i> T118 (NC_007908)	1365/1401 (97%)	12/1401 (0%)
Scont-8	<i>Methylibium petroleiphilum</i> PM1 chromosome (NC_008825)	1332/1474 (90%)	48/1474 (3%)
Scont-9	<i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 (NC_007794)	1416/1460 (96%)	17/1460 (1%)

Table 8. Sequencing Results of Clones for the Location of S (May, 2011)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
S-3	<i>Sediminibacterium</i> sp. I-32 (AM990455.1)	1464/1477 (99%)	3/1477 (0%)
S-4	Uncultured bacterium (FR853751.1)	1467/1496 (98%)	9/1496 (1%)
S-5	Uncultured bacterium (FR853751.1)	1484/1492 (99%)	2/1492 (0%)

Table 9. Sequencing Results of Clones for the Location of S control (May, 2011)

Sample	Species closely related (NCBI No.)	Identities	Gaps
Scont-2	<i>Sediminibacterium</i> sp. I-32 (AM990455.1)	1459/1484 (98%)	12/1484 (1%)
Scont-3	<i>Sediminibacterium</i> sp. I-32 (AM990455.1)	1462/1488 (98%)	16/1488 (1%)
Scont-4	<i>Sediminibacterium</i> sp. I-32 (AM990455.1)	1464/1482 (99%)	8/1482 (1%)

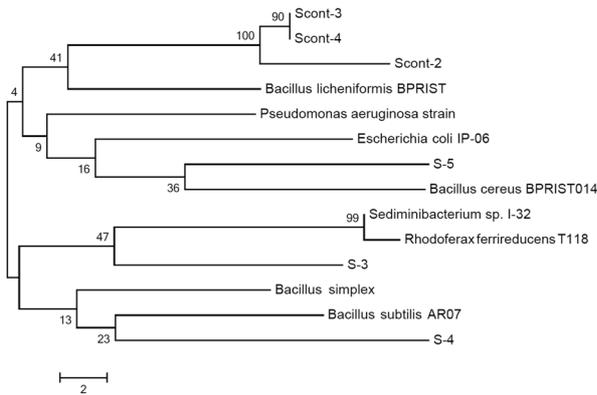


Fig. 5. Phylogenetic tree of clones for the Location of S Scontrol (May, 2011).

4. 결 론

지열 시스템이 설치된 지역과 대조군 지역 지하수 시료를 대상으로 시스템 운영 이후 지하대수층의 생태학적 영향 조사를 위한 분자생태학적 모니터링 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 채취한 지하수 시료 내 미생물 종분석 결과, 2010년의 경우 J 지역 실험군, 대조군과 S 지역의 실험군에서 동일하게 *Ralstonia pickettii*가 우점종으로 확인되었다. 이와 달리 S지역 대조군에서 *Rhodoferrax ferrireducens*가 우점종으로 판별되었다. 2011년의 경우 조사지역별 구분이나 실험군과 대조군 구분없이 모두 *Sediminibacterium sp.*가 우점종으로 확인되었다.

2) 2010년 S지역 대조군의 경우만 실험군과 우점종이 다른 것으로 나타났으나 그 외 지역의 시기나 지역별로 실험군 및 대조군은 동일한 우점종을 나타냈다. 그러나 연도별로 보면 우점종이 *Ralstonia pickettii*에서 *Sediminibacterium sp.*로 미생물상이 천이된 것을 알 수 있었다. 이와 같이 천이가 실험군과 대조군에서 동시에 발생했기 때문에 히트펌프 운영에 따른 지하대수층 생태계의 영향이라고는 판단하기 어렵다. 이는 지열시스템의 운영에 따른 지하대수층의 온도변화에 의한 환경변화보다 실험 대상 두 개 지역(실험군 및 대조군 포함)에 더 큰 불특정된 자연적인 환경변화(i.e. ORP, DO)에 의해 *Sediminibacterium sp.*와 같은 유기물 농도가 풍부한 환경에서 성장하는 미생물이 우점화 된 것으로 판단된다. 즉 시료 채취시 현장에서 측정된 수질 인자 중 ORP 및 DO 농도의 연도별 차이가 크게 나타나는 것을 알 수 있다. 이와 같은 수질 인자에 영향을 미치는 외부적인 원인(지열회수시스템 운영 포함)이 미생물의 다양성에 영향을 미친 것으로 판단되었다.

사 사

본 연구는 환경부 “토양·지하수 오염방지기술개발사업(171-101-011)”의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Andersona, R.C. and Gardner, D.E., 1999, An Evaluation of the Wilt-Causing Bacterium *Ralstonia solanacearum* as a Potential Biological Control Agent for the Alien Kahili Ginger (*Hedychium gardnerianum*) in Hawaiian Forests, *Biol. Control*, **15**(2), 89-96.

Bell, S.G., Yang, W., Yorke, J.A., Zhou, W., Wang, H., Harmer, J., Copley, R., Zhang, A., Zhou, R., Bartlam, M., Rao, Z., and Wong, L.-L., 2012, Structure and function of CYP108D1 from *Novosphingobium aromaticivorans* DSM12444: an aromatic hydrocarbon-binding P450 enzyme, *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.*, **D68**, 277-291.

Boutros, N., Gonullu, N., Casetta, A., Guibert, M., Ingrand D., and Lebrun1, L., 2002, *Ralstonia pickettii* Traced in Blood Culture Bottles, *J. Clin. Microbiol.*, **40**(7), 2666-2667.

Finneran, K.T., Johnsen, C.V., and Lovley, D.R., 2003, *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.

Gans, J., Wolinsky, M., and Dunbar, J., 2005, Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil, *Science*, **309**, 1387-1390.

Hashidoko, Y., Takakai, F., Toma, Y., Darung, U., Melling, L., Tahara, S., and Hatano, R., 2008, Emergence and behaviors of acid-tolerant *Janthinobacterium sp.* that evolves N₂O from deforested tropical peatland, *Soil Biol. Biochem.*, **40**, 116-125.

Hiramatsu, J., Kataoka, M., and Nakata, Y., 2003, *Propionibacterium acnes* DNA detected in bronchoalveolar lavage cells from patients with sarcoidosis, *Sarcoidosis Vasc. Diffus. Lung Dis.*, **20**(3), 197-203.

Jamieson, W.D., Pehl, M.J., Gregory G.A., and Orwin, P.M., 2009, Coordinated surface activities in *Variovorax paradoxus* EPS, *BMC Microbiol.*, **9**(124), 1-18.

Jo, Y.-J., Lee, J.-Y., Lim, S.-Y., and Hong, G.-P., 2009, A Review on Potential Effects of Installation and Operation of Ground Source Heat Pumps on Soil and Groundwater Environment, *J. Soil & Groundwater Env.*, **14**(3), 22-31.

Jo, Y.-J., Lee, J.-Y., Kim, C.-G., and Han, J.-S., 2009, Effects of Grouts and Temperature Change on Microorganisms in Geothermal Heat Pump, *J. Soil & Groundwater Env.*, **14**(4), 22-31.

- Kašpfer, P., Witzemberger, R., Denner, E.B.M., Busse, H.-J., and Neef, A., 2002, *Sphingopyxis witflariensis* sp. nov., isolated from activated sludge, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **52**, 2029-2034
- Mattes, T.E., Alexander, A.K., Richardson, P.M., Munk, A.C., Han, C.S., Stothard, P., and Coleman, N.V., 2008, The Genome of *Polaromonas* sp. Strain JS666: Insights into the Evolution of a Hydrocarbon- and Xenobiotic-Degrading Bacterium, and Features of Relevance to Biotechnology, *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**(20), 6405-6416.
- Micek, S.T., Lloyd, A.E., Ritchie, D.J., Reichley, R.M., Fraser, V.J., and Kollef, M.H., 2005, *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infection: Importance of Appropriate Initial Antimicrobial Treatment, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **49**(4), 1306-1311.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G., 1993, Profiling of complex microbial populations by analysis of polymerase chain denaturing gradient gel electrophoresis reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**(3), 695-700.
- Nakatsu, C.H., Hristova, K., Hanada, S., Meng, X.-Y., Hanson, J.R., Scow, K.M., and Kamagata, Y., 2006, *Methylibium petroleiphilum* gen. nov., sp. nov., a novel methyl tert-butyl ether-degrading methylotroph of the Betaproteobacteria, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **56**, 983-989.
- Qu, J.-H. and Yuan, H.-L., 2008, *Sediminibacterium salmonium* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum Bacteroidetes isolated from sediment of a eutrophic reservoir, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **58**, 2191-2194.
- Rappé, M.S. and Giovannoni, S.J., 2003, The uncultured microbial majority, *Annu. Rev. Microbiol.*, **57**, 369-394.
- Salinero, K.K., Keller, K., Feil1, W.S., Feil1, H., Trong, S., Di Bartolo, G., and Lapidus, A., 2009, Metabolic analysis of the soil microbe *Dechloromonas aromatica* str. RCB: indications of a surprisingly complex life-style and cryptic anaerobic pathways for aromatic degradation, *BMC Genomics*, **10**(351).
- Sessitsch, A., Coenye, T., Sturz, A.V., Vandamme, P., Ait Barka, E., Salles, J.F., Van Elsas, J.D., Faure, D., Reiter, B. Glick, B.R., Wang-Pruski, G., and Nowak, J., 2005, *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **55**, 1187-1192.
- Sowers, L.S., Epstein, C., York, K.P., Van Guilder, B., Jahangir, S., Steinberg, A., Stafford, L., Pierce, J., Brownhill J., and T. Solomon, T., 1997, Impact of a Large Scale Geothermal Project on its Surface and Subterranean Environment, *Proceedings of the 7th International Conference on Thermal Energy Storage MEGASTOCK*: Vol. 1 : 85-90.
- Takeda, M., Makita, H., Ohno, K., Nakahara, Y., and Koizumi, J.-I., 2005, Structural analysis of the sheath of a sheathed bacterium, *Leptothrix cholodnii*, *Int. J. Biol. Macromol.*, **37**, 92-98.
- Ward, N., Larsen, Ø., Sakwa, J., Bruseth, L., Khouri, H., Durkin, A.S., Dimitrov, G., Jiang, L., Scanlan, D., Kang, K.H., Lewis, M., Nelson, K.E., Methé, B., Wu, M., Heidelberg, J.F., Paulsen, I.T., Fouts, D., Ravel, J., Tettelin, H., Ren, Q., Read, T., DeBoy, R.T., Seshadri, R., Salzberg, S.L., Jensen, H.B., Birke-land, N.K., Nelson, W.C., Dodson, R.J., Grindhaug, S.H., Holt, I., Eidhammer, I., Jonassen, I., Vanaken, S., Utterback, T., Feldblyum, T.V., Fraser, C.M., Lillehaug, J.R., and Eisen, J.A., 2004, Genomic Insights into Methanotrophy: The Complete Genome Sequence of *Methylococcus capsulatus* (Bath), *PLoS. Biol.*, **2**(10), 1616-1628.
- York, K.P., Sarwar Jahangir, Z.M.G., Solomon, T., and Stafford, L., 1998, Effects of a Large Scale Geothermal Heat Pump Installation on Aquifer Microbiota, *In 2nd Stockton International Geothermal Conference*, p. 8.