

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis를 이용한 음식물 쓰레기 퇴비화 세균 군집 분석

류희욱¹ · 조경숙*

¹숭실대학교 화학·환경공학과, 이화여자대학교 환경학과

Bacterial Community Analysis during Composting of Garbage using Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Ryu, Hee Wook¹ and Kyung-Suk Cho*. ¹Department of Chemical and Environmental Engineering, Soongsil University, Seoul 156-743, Korea, Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea – The microbial community during composting of garbage was analyzed using 16S rDNA PCR - DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). *Pseudomonas* spp. was found throughout the process, and thermophilic *Bacillus* spp. was dominated at the thermophilic stage. Six thermophilic bacteria were isolated and identified as *B. caldxylolyticus*, *B. thermoalkalophilus*, and *B. thermodenitrificans*.

Key words: Composting, bacterial community, denaturing gradient gel electrophoresis, garbage

음식물 쓰레기는 함수율이 높고 쉽게 부패하여 악취와 침출수를 유발하기 때문에 소각처리 시 발열량을 저하시키고 매립처리 시 심각한 환경오염을 유발할 수 있다. 현재 대부분의 지자체에서는 음식물 쓰레기를 분리수거하여 퇴비화, 사료화, 소멸화 등의 방법으로 처리하고 있다. 이 중 음식물 쓰레기의 퇴비화 방법은 폐기물을 처리함과 동시에 유용한 자원으로 활용할 수 있다는 측면에서 환경친화적인 처리방법으로 주목 받고 있다[10, 19, 21, 22]. 퇴비화는 조절된 환경 내에서 유기성 폐기물의 생물학적 분해로 정의할 수 있는데, 퇴비화가 활발히 진행되는 동안에 유기물은 호기적으로 분해되어 이산화탄소로 무기화되며 이 과정에서 다량의 열이 발생하고 수분은 수증기로 대기에 방출된다. 또한, 분해 후 최종 생성된 잔류물은 회분과 미네랄로서 완전히 부속되어 퇴비로 이용할 수 있다[10, 19, 21, 22].

호기적 퇴비화 과정은 중온균(mesophilies)과 고온균(thermophilies)에 의한 분해과정으로 초기 단계에는 주로 *Pseudomonas* sp., *Xantomonas* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp. 등의 중온성 세균 및 사상균에 의해 분해된다[3, 6, 8, 17, 20, 23]. 중온균에 의한 분해 과정 중 발생하는 열에 의해 퇴비더미의 온도가 상승하면 중온성균은 *Bacillus* spp., *Stearothermophilis* sp., *Streptomyces* sp., *Thermoactinomyces* sp. 등의 고온성 세균과 방선균으로 대체되어 이들 균들이 우점종을 이루게 된다[6, 8, 13, 17, 20, 23]. 도시 폐기물의 퇴비화 과정에 있어서 미생물수 증식과

활성을 연구한 결과, 퇴비화에 세균과 방선균이 주로 작용한다고 보고하였다[2]. 세균은 수용성 단백질 및 기타 이용 가능한 기질에서 빨리 성장하고 높은 온도를 견딜 수 있기 때문에 퇴비화가 가장 활발하게 진행되는 단계에서 주요한 역할을 수행한다[2, 6, 8, 13, 17, 20, 23]. 퇴비화 동안 방선균류는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌, 키틴, 단백질 등을 함께 응집시켜주는 역할을 하는데, 방선균은 퇴비화의 후기 단계에서 흔히 나타나며, 퇴비화에 있어서 균류는 중요한 역할을 하지 않는 것으로 알려져 있다[2, 6, 8, 13, 17, 20, 23].

이와 같이 음식물 쓰레기와 같은 유기성 폐기물의 퇴비화 동안에 각 단계별로 미생물 군집의 특성과 우점미생물의 종류가 차이가 생긴다[6, 11-13, 17, 23]. 예전에는 퇴비화 공정의 미생물학적 해석은 주로 생균수의 변화에 초점을 맞추어 진행되어왔으나[3, 8, 20], 최근 들어서는 미생물의 호흡 전자전달계에 관여하는 quinone 종류를 분석하거나[27] 세포벽을 구성하는 지방산 profile을 분석하여 퇴비화 미생물 군집의 특성을 연구하고 있다[16]. 또한, 16S rDNA 부분을 증폭하여 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE) 방법이나 oligonucleotide microarray 방법을 활용한 분자생물학적 방법을 이용하여 퇴비화 미생물 군집 특성에 관한 연구가 진행되고 있다[3, 6, 9, 13, 23, 25].

본 연구에서는 음식물 쓰레기를 회전드럼에서 고속발효시킨 후 야적 숙성시키는 방법으로 퇴비화하는 공정을 대상으로, DGGE 방법을 활용하여 퇴비화가 진행되는 동안 세균 군집 특성을 조사하였다. 또한, 퇴비로부터 고온성 세균을 분리 동정하였다.

본 연구에서 조사 대상으로 퇴비화 시설에서는 음식물 쓰레

*Corresponding author

Tel: 82-2-3277-2393, Fax: 82-2-3277-3275

E-mail: kscho@ewha.ac.kr

레기를 다음과 같은 공정을 거쳐 퇴비로 생산하였다. 우선 음식물 쓰레기를 파쇄·선별한 후, 파쇄한 음식물 쓰레기와 부숙재로 우드 칩과 왕겨를 약 1:1(v/v) 혼합 한 후, 여기에 접종원으로 숙성퇴비를 10%(v/v) 첨가하였다. 이를 회전드럼에 넣어 하루 동안 고속 발효시킨 다음, 숙성상자에 넣어 20일정도 일차 숙성시킨다. 일차 숙성시킨 퇴비를 야적하여 약 40-50일 정도 이차숙성 시켜 퇴비를 생산한다.

퇴비화 공정 동안에 세균 군집분석을 위해 음식물 쓰레기 퇴비화 공정 순서에 따라, (1) 고속발효를 위해 회전 드럼에 투입하기 직전의 시료(0일), 음식물 쓰레기+ 부숙재 + 접종용 숙성퇴비), (2) 회전드럼에서 6시간 발효 시킨 시료(6 h), (3) 회전드럼에서 1일간 발효 시킨 시료(1 d), 및 (4) 회전드럼에서 고속 발효 후 숙성상자에서 20일간 발효시킨 시료(21 d)를 채취하였다.

퇴비화 공정 단계별로 채취한 시료 약 0.15 g을 1.2 mL tube에 넣고 시료가 잠길 정도로 phosphate buffer를 주입한 후 균일하게 혼합하였다. 이것을 -70°C와 65°C에서 각각 2분씩 방치하는 것을 3회씩 반복하였다. 각 tube에 lysozyme을 넣고 37°C에서 1시간 방치한 후, 20% SDS 용액을 첨가하고 60°C에서 10분간 방치하였다. 이렇게 전처리가 끝난 시료 0.5 mL을 bead beater용 tube에 넣고 0.1 mm zirconium/silica bead 0.5g을 넣어 5,000 rpm에서 60초씩 bead beating 처리를 2회 반복하였다. Bead beating 처리한 시료를 13,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 분리하였다. 이 상등액에 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24:1, v/v)를 혼합한 후 약하게 혼합한 다음 13,000 rpm 4분간 원심분리를 2회 반복하였다. 원심 분리하여 얻은 상등액을 1.2 mL tube에 옮겨 담고 100% 에탄올을 부피로 2배가 되도록 첨가한 후 약하게 혼합한 후 다음 -70°C에서 30분간 방치하였다.

상기의 시료를 13,000 rpm 8분간 원심 분리하여 얻은 pellet에 70% 에탄올 1 mL을 넣고 8,000 rpm 5분간 원심분리한 후 상등액은 버리고 desiccator에서 20~30분간 건조시킨 다음 멸균한 증류수 100 µl에 재현탁 하였다. DNA의 순도를 높이기 위하여 CaCl₂를 첨가하고 3시간 방치한 다음 13,000 rpm 20분간 원심분리한 다음 상등액만 취하여 isopropanol과 acetate를 이용하여 다시 한 번 불순물을 제거하고 70% 에탄올로 세정한 후, 멸균수 100 µl에 재현탁 하였다.

이렇게 해서 얻은 DNA시료를 template로 하여 다음과 같이 16S rDNA 부분을 증폭하였다. Bacterial universal primer로 341f(5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')과 907r(5'-CCC CGT CAA TTC ATT TGA GTT-3')을 이용하여 다음과 같은 조건에서 PCR을 수행하였다(TECHNE, USA)[1]. 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, denaturation 95°C 1분, annealing 63°C 1분, extension 72°C 1분 과정을 16 cycle 반복하는데, 이 때 annealing 온

도는 2 cycle마다 1°C씩 감소하여 56°C까지 설정하였다. 다음으로 denaturation 95°C 1분, annealing 55°C 1분, extension 72°C 1분 과정을 14 cycle 더 반복한 후 72°C에서 5분 동안 최종 extension한 후 4°C로 holding하였다.

상기 방법으로 증폭시킨 첫 번째 PCR product를 template로 하여 bacterial primer 341fGC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')과 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')를 이용하여 두 번째 PCR을 수행하였다. 두 번째 PCR 조건은 95°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, denaturation 95°C 30초, annealing 60°C 30초, extension 72°C 30초 과정을 28 cycle 반복한 후 72°C에서 5분 동안 최종 extension한 후 4°C로 holding 하였다.

두 번째 PCR products는 DGGE(Dcode™ system, Bio-Rad, USA)로 분석하였다. 8% acrylamide/bis gel을 사용하였으며 urea 변성제의 농도범위는 40-60%이었고, 60°C, 50V에서 16시간 전기영동 하였다. DGGE gel 상의 다양한 위치의 band는 다른 종의 미생물을 나타내므로, 각각의 band를 절단하여 1.5 ml tube에 넣고 멸균수를 20 µl 첨가한 후, -20°C에서 10분간 얼렸다 65°C에서 3분간 녹이는 것을 3회 수행한 후, 원심분리(10,000 rpm, 10 min)하여 상등액 15 µl를 회수하였다. 이렇게 해서 얻은 DNA 시료를 template로 사용하여 bacterial primer 341f와 518r primer를 이용하여 상기의 두 번째 조건으로 PCR을 수행하였다.

이렇게 해서 얻은 PCR 산물을 pGEM-T easy vector system(Promega, USA)을 이용하여 cloning 하였다[1]. Ligation 반응 후, ligation mixture를 *E. coli* DH5α에 형질 전환 하였다. 형질전환 시킨 균체 현탁액을 LB plate(100 µg/ml ampicilline, X-Gal 0.1 mM, IPTG 0.2 mM 첨가)에 도말하여 37°C에서 12시간 배양하였다. White colony를 선별하여 LB 배지(100 µg/ml ampicilline 첨가)에서 37°C에서 12시간 진탕 배양하여 plasmid를 추출하였다(plasmid purification kit, NucleoGen, Korea). 추출된 plasmid DNA를 EcoRI 제한효소로 절단하여 DNA 삽입을 확인하였다. 이 실험을 통해 DNA가 확인된 시료의 plasmid DNA는 염기서열 분석을 위해 plasmid DNA를 template로 하고 T7(5'-TAA TAC GAC TCA CTA CAG GG-3')와 SP6(5'-ATT TAG GTG ACA CTA AGA AT-3') primer를 이용하여 PCR을 수행하였다[1]. PCR product의 염기서열은 DNA sequencer(Perkin Elmer, CA)를 이용하여 분석하였다. 분석된 염기서열은 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST) algorithm과 GenBank database를 이용하여 동정하였다.

퇴비화 우점 미생물을 분리 및 동정하여 향후 퇴비화를 위한 종균으로 활용하기 위해 60°C 전후에서 최적 성장할 수 있는 고온성 세균을 다음과 같이 선별하여 동정하였다. 완숙퇴비 1g(습중량)을 멸균수 99 mL에 넣고 homogenizer

로 5 분간 현탁 한 다음, 현탁액을 멸균수로 희석하여 LB plate에 도말하였다. LB plate 조성은 tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/l, NaCl 10g/L, agar 15 g/L이다. 도말한 LB plate를 60°C에서 4-6일 정도 배양한 후, 생육한 colony의 색과 형태적 특성에 따라 6개의 colony를 선별하였다. 선별한 colony를 LB plate에 serial transfer하여 순수균을 얻었다. 이렇게 해서 얻은 6종의 균주(D1-1, D2-1, D4-1, D5-1, D6-2, D7-2)로부터 genomic DNA를 얻은 후 이를 template로 하고 341f와 907r primer를 이용하여 상기와 동일한 조건으로 PCR을 수행하였다. 정제한 PCR 산물의 염기서열은 BLAST algorithm과 GenBank database를 이용하여 동정하였다.

음식물 쓰레기 퇴비화 공정별로 채취한 시료의 DGGE fingerprint를 Fig. 1에 도시하였다. 퇴비화 공정 단계로 채취한 시료의 DGGE fingerprint는 큰 차이를 보이는 것을 알 수 있는데, 이는 공정 단계별로 세균 군집의 변화가 야기됨을 의미한다. 즉, 초기 0 d 시료는 음식물쓰레기, 부숙재 및 접종용 퇴비가 혼합되어 있는 시료로 다수의 DGGE band가 관찰되었으나, 회전드럼에서 6 시간(6 h) 및 1일(1 d) 처리함에 따라 band 수가 적어졌다. 이는 회전드럼에서 음식물 쓰레기가 급속 고온 발효됨에 따라 미생물 군집상이 초기시료보다는 단순해짐을 의미한다. 회전드럼에서 1일 처리한 시료를 야적장에서 20일 처리한 시료(21 d)에서 DGGE band가 다양화되고 많아지는 것을 관찰할 수 있었다.

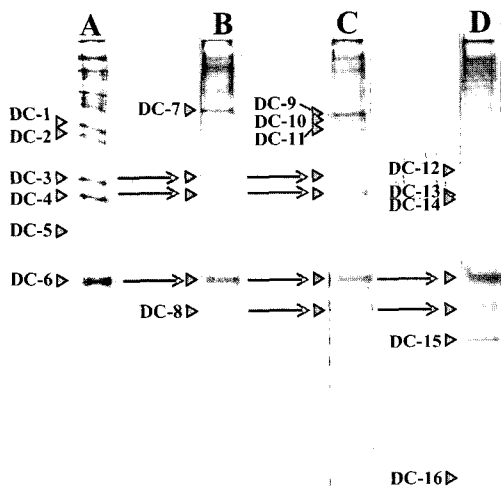


Fig. 1. DGGE fingerprints of 16S rDNA amplification fragments and corresponding bands isolated for sequencing. PCR fragments were separated on a DGGE gel using a denaturant gradient of 40-60%. A, 0 d; B, 6 h; C, 1 d; D, 21 d.

DGGE band로부터 얻은 clone의 염기서열은 BLAST algorithm을 이용하여 GenBank database와 비교 분석하여 가장 유사도가 높은 종을 검색한 결과를 Table 1에 정리하였다. 음식물쓰레기, 부숙재 및 접종용 퇴비가 혼합되어 있는 시료(0 d)의 경우, DGGE band로부터 얻은 clone은 대부분 중온성 세균이 우점종을 차지하고 있는 것으로 분석되었다. Clone DC-1, DC-4 및 DC-6은 *Proteobacteria* gamma subdivision에 속하는 *Pseudomonas* sp.와 가장 유사성이 높았다[28]. Clone DC-2의 염기서열은 알칼리성의 저온에서 생육 가능한 *Bacillus* sp. ikaite c21의 sequences와 96%의 유사성을 나타냈다[26]. Clone DC-3은 유산균인 *Lactobacillus casei*와 가장 높은 유사성을 보였다[24]. 이와 같이 알칼리성 조건에서 생육 가능한 세균이나 유산균이 0 d 시료에 존재하는 것은 퇴비화의 주원료가 염농도가 높은 음식물 쓰레기이기 때문으로 사료된다. Clone DC-5는 저온에 내성을 지닌 *Bacillus psychrotolerans*와 유사성이 높은

Table 1. Summary of phylogenetic diversity of clones based on 16S rDNA sequences.

Clone no.	Closest Relative (accession no.)	Similarity (%)	Ref.
DC-1	<i>Pseudomonas</i> sp. WDL5 (AF538932)	195/195 (100%)	Unpublished
DC-2	<i>Bacillus</i> sp. ikaite c21 (AJ431331)	189/196 (96%)	26
DC-3	<i>Lactobacillus casei</i> (D16553)	188/194 (96%)	24
DC-4	<i>Pseudomonas</i> sp. FSL D1-022 (AF205134)	190/192 (98%)	28
DC-5	<i>Bacillus psychrotolerans</i> DSM 11706 (AJ277983)	164/182 (90%)	Unpublished
DC-6	<i>Pseudomonas</i> sp. FSL D1-022 (AF205134)	191/191 (100%)	28
DC-7	<i>Candida inconspicua</i> (AF201301)	156/159 (98%)	18
DC-8	<i>Alteromonas</i> sp. KT1114 (AF235108)	178/195 (91%)	7
DC-9	<i>Kluyveromyces marxianus</i> (AF201299)	58/162 (97%)	Unpublished
DC-10	<i>Saccharomyces dairensis</i> (Z75579)	159/162 (98%)	14
DC-11	<i>Pseudomonas</i> sp. WDL5 (AF538932)	123/135 (91%)	Unpublished
DC-12	<i>Marinobacter</i> sp. SBS (AF482686)	184/193 (95%)	5
DC-13	<i>Psychrobacter</i> sp. IC008 (U85875)	193/194 (99%)	4
DC-14	<i>Pseudomonas</i> sp. LT1 (AJ007005)	187/195 (95%)	15
DC-15	<i>Bacillus thermodenitrificans</i> T4 (AF114426)	194/195 (99%)	Unpublished
DC-16	<i>Hyperthermophilic bacterium</i> OGL-7B (AF517773)	51/60 (85%)	Unpublished

것으로 분석되었다.

0 d 시료의 DGGE fingerprint에서 상대적으로 가장 진한 DGGE bands를 보인 clone DC-6은 다른 모든 퇴비화 시료에서 가장 진한 DGGE band로 분석되었다. 이는 *Pseudomonas* sp.에 속하는 세균들은 퇴비화 초기부터 숙성이 완료되는 시점까지 퇴비 시료 중에 수적으로 우위를 차지하고 있는 세균임을 의미한다. 실규모 퇴비화 장치를 대상으로 DGGE 기법을 활용하여 미생물 군집 변화를 조사한 Pedro 등[23]은 퇴비화 전 공정에 걸쳐 *Pseudomonas* sp.가 관찰되었다고 보고하였다. 이는 *Pseudomonas* sp.가 음식물 쓰레기 퇴비화 전 공정에 걸쳐 관찰된 본 연구의 결과와 매우 유사하다.

한편, 0 d 시료의 DGGE fingerprint에서 비교적 진한 band를 보인 clone DC-1, DC-2, DC-3 및 DC-4는 퇴비화가 진행됨에 따라 DGGE band의 진한 정도가 약해졌다. 퇴비화가 진행됨에 따라 퇴비시료의 온도가 60-80°C 까지 상승되므로, 이러한 clone의 수는 고온조건에 의해 감소해 가는 것으로 사료된다.

회전드럼에서 6시간 동안 고속 발효시킨 시료(6 h)의 경우, *Lactobacillus*와 유사성이 높은 clone DC-3, *Pseudomonas*와 유사성이 높은 clone DC-4 및 DC-6, 저온에 내성을 지닌 *Bacillus psychrotolerans*와 유사성이 높은 clone DC-5가 관찰되었다. 초기 0 d 시료에서는 관찰되지 않았던 clone DC-7의 염기서열은 곰팡이인 *Candida inconspicua*의 염기서열과 유사성이 98%로 진균류에 속하는 것으로 분석되었다[18].

회전드럼에서 1일 동안 고속 발효시킨 시료(1 d)에서도 6 h 시료와 유사하게 *Lactobacillus*와 유사성이 높은 clone DC-3, *Pseudomonas*와 유사성이 높은 clone DC-4 및 DC-6, 저온에 내성을 지닌 *Bacillus psychrotolerans*와 유사성이 높은 clone DC-5가 관찰되었다. 또한, 이 시료에서만 관찰된 clone인 DC-9 및 DC-10는 각각 *Kluyveromyces* 및 *Saccharomyces*와 가장 유사성이 높은 곰팡이로 분석되었다[14].

회전드럼에서 1일 처리한 시료(A, B, C)와 야적장에서 20일 처리한 시료(D)의 DGGE fingerprint는 다른 시료의 DGGE 시료와는 매우 상이하였다. 비록 앞에서 설명했듯이 이 시료에서 가장 진한 band를 보인 것은 *Pseudomonas*와 유사성이 높은 clone DC-6이었지만, 이 시료로부터 얻은 clone도 다른 시료와는 매우 상이한 특성을 보였다. Clone DC-12는 휴믹물질을 분해하는 *Marinobacter* sp. SBS와 유사성이 가장 높았고[5], clone DC-14는 compost biofilter에서 분리한 *Pseudomonas* sp. LT1과 가장 유사성이 높았다[15]. Clone DC-15는 대표적인 고온성 세균인 *Bacillus thermodenitrificans*와 매우 높은 유사성을 보였다(99%). 또한 clone DC-16의 염기서열도 *Bacillales*에 속하는 hyperthermophilic bacterium OGL-7B의 염기서열과 85%의 유사성을 보였다. 이들 clone들은 DGGE pattern상으로도 비

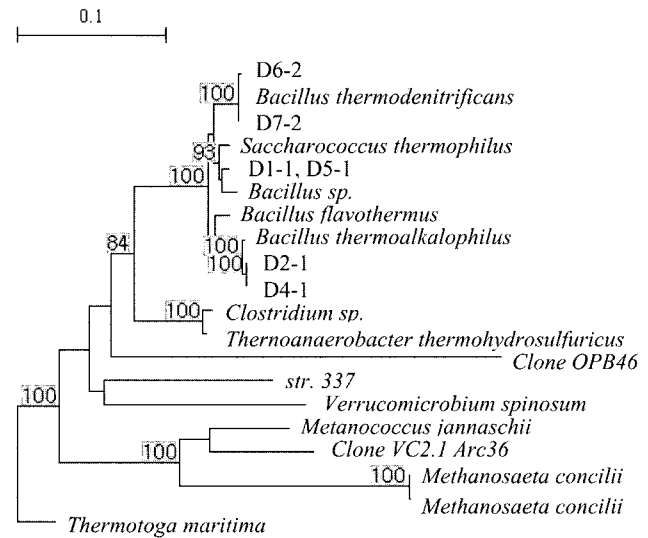


Fig. 2. Phylogenetic tree illustrating the relationships among the closest relatives in the GenBank databases and the isolates. The scale bar represents a 10% estimated sequence divergence.

교적 진한 band를 보여 이들 clone이 숙성퇴비에서 우점 퇴비화 미생물의 하나로써 음식물 쓰레기의 퇴비화에 중요한 역할을 담당하고 있을 것으로 사료되었다.

원속 퇴비로부터 분리한 6종의 고온 세균의 계통발생학적 유연관계를 Fig. 2에 도시하였다. 분리한 균주 6종 모두 고온성 *Bacillus* spp.로 동정되었는데(*B. caldxylolyticus*, *B. thermoalkalophilus*, *B. thermodenitrificans*.), 이는 퇴비화 시료를 DGGE로 분석한 후 얻은 clone을 분석한 결과(Table 1)에서도 고온세균은 *Bacillus* 속 세균으로 밝혀진 결과와 매우 일치되는 결과이다. 또한, 퇴비화 공정의 고온단계에서 *Bacillus* spp.가 우점종을 이루게 된다는 기존의 연구 결과와도 상응된다[6, 8, 13, 17, 20, 23]. 따라서 본 연구에서 분리한 고온성 세균 D1-1, D2-1, D4-1, D5-1, D6-2 및 D7-2는 퇴비화 공정에 있어 매우 중요한 역할을 담당하는 퇴비화 미생물로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2003년도 숭실대학교 교내연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다. 또한, DGGE 분석 및 균주 동정에 도움을 주신 주양희씨와 최정민씨에게 감사드립니다.

REFERENCES

- 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.
- Bae, Y. J., H. Kaneko, and F. Fujita. 1993. Profile of microbial numbers and growth activity in composting

- process. *J KOWREC* **1**: 59-68.
3. Blanc, M., L. Marilley, T. Béla, and M. Aragno. 1999. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16S rDNA) methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**: 141-149.
 4. Bowman, J.P., S.A. McCammon, M.V. Brown, D.S. Nichols, and T.A. McMeekin. 1997. Diversity and association of psychrophilic bacteria in antarctic sea ice. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3068-3078.
 5. Coates, J. D., K. A. Cole, R. Chakraborty, S. M. O'Connor, and L. A. Achenbach. 2002. Diversity and ubiquity of bacteria capable of utilizing humic substances as electron donors for anaerobic respiration, *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2445-2452.
 6. Dees, P. M. and W. C. Ghiorse. 2001. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 207-216.
 7. Eilers, H., J. Pernthaler, F. O. Glockner, and R. Amann. 2000. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3044-3051.
 8. Finstein, M. S. and M. L. Morris. 1975. Microbiology of municipal solid waste composting. *Adv. Appl. Microbiol.* **19**: 113-151.
 9. Franke-Whittle, I. H., S.H. Klammer, and H. Insam. 2005. Design and application of an oligonucleotide microarray for the investigation of compost microbial communities. *J. Microbiol. Methods* **62**: 37-56.
 10. Gajdos, R. 1992. The use of organic waste materials as organic fertilizers recycling of plant nutrients. *Acta Hort.* **302**: 325-331.
 11. Guidi, G., A. Pera, M. Giovannetti, G. Poggio, and M. Bertoldi. 1988. Variations of soil structure and microbial population in a compost amended soil. *Plant Soil* **106**: 113-119.
 12. Herrmann R. F. and J. F. Shann. 1997. Microbial community changes during the composting of municipal solid waste. *Microb. Ecol.* **33**: 78-85.
 13. Ishii, K., M. Fukui, and S. Takii. 2000. Microbial succession during a composting process as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J. Appl. Microbiol.* **89**: 768-777.
 14. James, S. A., J. Cal, I. N. Roberts, and M. D. Collins. 1997. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 453-460.
 15. Juteau, P., R. Larocque, D. Rho, and A. LeDuy. 1999. Analysis of the relative abundance of different types of bacteria capable of toluene degradation in a compost biofilter. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 863-868.
 16. Klamer, M. and E. Baath. 1998. Microbial community dynamics during composting of straw material studied using phospholipid fatty acid analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* **27**: 9-20.
 17. Kowalchuk, G. A., Z. S. Naoumenko, P. J. L. Derikx, A. Felske, J. R. Stephen, and I. A. Arkhipchenko. 1999. Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the L-subdivision of the class Proteobacteria in compost and composted materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 396-403.
 18. Loeffler, J., H. Hebart, S. Magga, D. Schmidt, L. Klingspor, J. Tollemar, U. Schumacher, and H. Einsele. 2000. Identification of rare *Candida* species and other yeasts by polymerase chain reaction and slot blot hybridization. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **38**: 207-212.
 19. Nakasaki, K., H. Yaguchi, Y. Sasaki, and H. Kubata. 1985. Effects of C/N ratio on thermophilic composting of garbage. *J. Ferment. Bioeng.* **63**: 43-45.
 20. Nakasaki, K., M. Sasaki, M. Shoda, and H. Kubota. 1985. Changes in microbial numbers during thermophilic composting of sewage sludge with reference to CO₂ evolution rate. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1118-1124.
 21. Nakasaki, K., M. Shoda, and H. Kubota. 1986. Effect of bulking agent on the reaction rate of thermophilic sewage sludge composting. *J. Ferment. Bioeng.* **64**: 539-544.
 22. Nakasaki, K., Y. Hakano, T. Akiyama, M. Shoda, and H. Kubota. 1987. Oxygen diffusion and microbial activity in the composting of dehydrated sewage sludge cakes. *J. Ferment. Bioeng.* **65**: 43-48.
 23. Pedro, M.S., S. Haruta, M. Hazaka, R. Shimada, C. Yoshida, K. Hiura, M. Ishii, and Y. Igarashi, Y. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analyses of microbial community from field-scale composter. *J. Biosci. Bioeng.* **91**: 159-165.
 24. Sakala, R. M., Y. Kato, H. Hayashidani, M. Murakami, C. Kaneuchi, and M. Ogawa. 2002. *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**(Pt 4): 1151-1154.
 25. Schloss, P. D., A. G. Hay, D.B. Wilson, and L. P. Walker. 2003. Tracking temporal changes of bacterial community fingerprints during the initial stages of composting. *FEMS Microbiol. Ecol.* **46**: 1-9.
 26. Stougaard, P., F. Jorgensen, M. G. Johnsen, and O. C. Hansen. 2002. Microbial diversity in ikaite tufa columns; an alkaline, cold ecological niche in Greenland. *Environ. Microbiol.* **4**: 487-493.
 27. Tang, J. C., T. Kanamori, Y. Inoue, T. Yasuta, S. Yoshida, A. Katayama. 2004. Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Proc. Biochem.* **39**: 1999-2006.
 28. Wiedmann, M., D. Weilmeier, S.S. Dineen, R. Ralyea, and K. J. Boor. 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2085-2095.

(Received Aug. 22, 2005/Accepted Sep. 12, 2005)