

# 16S rDNA 증폭에 의한 부분염기서열을 이용한 분뇨 발효 관련 고온 호기성 박테리아의 동정\*<sup>1</sup>

김명길\*<sup>2†</sup> · 최돈하\*<sup>2</sup> · 최인규\*<sup>3</sup> · 김병규\*<sup>4</sup> · 송재경\*<sup>4</sup>

## Identification by 16S rDNA Partial Sequencing of Thermophilic Bacteria with Fermentation of Pig Manure\*<sup>1</sup>

Myung Kil Kim\*<sup>2†</sup> · Don Ha Choi\*<sup>2</sup> · In Gyu Choi\*<sup>3</sup> · Byung Gyu Kim\*<sup>4</sup> · Jae Gyung Song\*<sup>4†</sup>

### 요 약

돈분뇨 분해 장치의 발효 속도를 가속화시키는 토착미생물의 확보를 위하여 우리나라 각 지역에서 수집한 균주 중 우수한 균주를 선별하고 16S rDNA 증폭에 의한 동정을 실시하여 돈분뇨 분해에 관여하는 균주의 특성을 확인하기 위해 본 연구에서는 총 23장소(서울, 충청, 강원, 전북, 전남, 경남 지역)에서 28종류의 부숙 퇴비를 수집하여 생균수를 조사한 결과 대체적으로  $1 \times 10^5 \sim 10^8$ 의 분포 밀도를 보였다. 분리한 균주의 효소 생산 역가 결과는 30°C에서보다 55°C에서 배양된 고온호기성박테리아가 상대적으로 높은 섬유소분해효소와 전분분해효소 생산력을 보였고, genomic DNA의 추출에 의한 16S primer로 증폭하여 염기서열을 결정된 결과 돈분뇨 발효에 관여하는 고온호기성박테리아는 15종으로 동정되었다. 그 중 미생물제제를 제조하기 위하여 효소 역가 면에서도 우수성을 보이고 내생 포자를 형성하는 균주는 *Bacillus subtilis*로 확인되었다.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to estimate the identification of thermophilic bacterial with

\* <sup>1</sup> 접수 2005년 10월 21일, 채택 2005년 12월 20일

\* <sup>2</sup> 국립산림과학원 화학미생물과 Dept. of Wood Chemistry & Microbiology, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

\* <sup>3</sup> 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부, Dept. of Forest science, College of Agriculture & Life Sciences, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

\* <sup>4</sup> 농업생명과학원 농용미생물보존센터, Korean Agricultural Culture Collection, National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea

† 주저자(corresponding author) : 김명길(e-mail: mkkim@foa.go.kr)

fermentation of pig manure. To identify the characters of thermophilic bacteria related to fermentation at a high temperature condition, we selected 28 different kinds of original settling thermophilic bacteria that were sampled at different 23 areas. They were distributed  $1 \times 10^5 \sim 10^8$  CFU at medium and the enzyme activity at 55°C incubation condition, especially cellulase and  $\alpha$ -amylase, were higher than those of 30°C. Partial sequencing data for 16S rDNA region were obtained from 28 samples representing 15 different genera. *Bacillus subtilis*, one of those bacteria, has endodermic spores at high fermented condition.

**Keywords:** Fermentation, 16S rDNA, partial sequence, thermophilic bacteria, pig manure

## 1. 서 론

1970년대 이후부터 원핵생물의 계통분류를 하는 데에 있어 16S rDNA를 이용하기 시작하여 현재까지 계속 이용되고 있다. 물론 생리학적, 형태학적 검색도 병행되어야 하고 때로는 16S rRNA 분석만으로는 혼동을 주는 경우도 있어 지방산 분석, 지질 분석 및 아미노산 분석 데이터를 동시에 제시하여 확실한 분류를 요구하기도 하나 여전히 16S rDNA 분석 기법은 세균(bacteria)의 분류에 매우 유용하다(Busse *et al.*, 1996).

16 rDNA sequencing은 DNA 추출 과정, 16S rDNA gene의 증폭 과정이 포함된다. 1.6 kb 16S rDNA 유전 위치에 결합될 수 있는 여러 가지 primer들 중 forward primer로 T7, fd1, p435f, p901f 및 p906f를 사용하고, reverse primer로 p1525r 및 sp6를 사용하여 증폭한 유전자의 염기서열을 결정한다. 이렇게 결정된 염기서열을 바탕으로 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 검색에 들어가는데 다양한 유전자 정보에 대해 데이터베이스에서 확률적으로 높은 것에 조합이 되는 것인데 특히, 16S rDNA를 사용하여 분석하는 기법은 미지의 세균 샘플의 동정에 객

관적인 데이터를 줄 수 있다는 장점을 가지고 있다 (Jones *et al.*, 2005).

한편, 숲 가꾸기 사업 등의 산림작업에 의하여 발생되는 소경 간벌재를 목질칩으로 형상화한 후 축산분뇨를 처리하는 기술을 개발하는 방법을 강구하였다. 기존방법에 의한 축산분뇨처리하는 분뇨 고형분과 분뇨의 분리 과정이 필요하고, 분해 후 남게 되는 슬러지 등은 매립 또는 투기로 제2의 오염을 야기하고 있는 실정이므로 그 자체 내에 공극을 형성하고 있어 수분 흡수력이 우수한 목질칩을 이용하여 미생물이 서식하기 적당한 담체로서의 이용과 분해 후의 목질칩을 퇴비화에 이용하고 자원화하는 기술 강구가 필요하여 시도한 결과, 공극율이 0.71 ml/cm<sup>2</sup>인 소나무 목질칩으로 처리하였을 때 목질칩의 표면층은 어느 정도 미생물에 의해 분해되나 내부는 건전하여 올바른 미생물의 담체 역할도 하면서 목질칩 1톤에 100두 정도의 돈분뇨 일일 배출량 처리도 가능하며 최장 6개월까지 사용 가능한 돈분뇨 분해 정화조를 개발하였다.

본 연구에서는 개발한 돈분뇨 분해 장치의 발효 속도를 가속화시키는 토착미생물의 확보를 위하여 우리나라 각 지역에서 수집한 균주 중 우수한 균주를 선별하고 16S rDNA 증폭에 의한 동정을 하여 돈분뇨 분

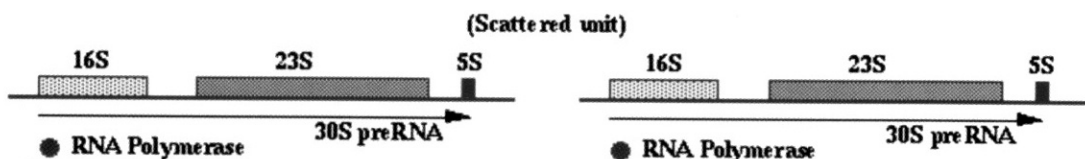


Fig. 1. Scheme of ribosomal RNA.

해에 관여하는 균주의 특성을 살펴보고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시균주 수집 및 선발

서울, 충청, 강원, 전북, 전남 및 경남 지역 23장소에서 28종류의 부숙 퇴비를 수집하였다. 시료 1 g을 증류수 9 ml에 넣어  $10^{-1}$ 에서  $10^{-6}$ 까지 희석하여 분해 균주 선발에 이용하였다. 선발용 배지로 NA (Nutrient agar), AIA (Actinomyces isolation agar) 및 TSA (Tryptic soy broth agar)에 희석된 시료 0.1 ml씩 넣고 배양온도 30°C, 55°C에서 배양하였다. NA 배지의 조성은 bacto beef extract 3 g, bacto peptone 5 g, bacto agar 15 g/l (pH 6.8)이고, AIA 배지의 조성은 bacto casitone 2 g, asparagine 0.1 g, sodium propionate 4 g, dipotassium phosphate 0.5 g, magnesium sulfate 0.1 g, ferrous sulfate 0.001 g, bacto agar 15 g/l (pH 6.5)이며 TSA 배지의 조성은 tryptic soy broth 30 g에 bacto agar 15 g/l (pH 7.0)로 하였다. 균주선발용 배지에서 배양한 후 petri dish상에서 현미경을 이용하여 관찰할 수 있는 colony를 분리하여 재배양하였다.

생균수(C.F.U./g : Colony Forming unit)는 각 시료당 5개의 페트리디쉬에 나타난 colony를 각각 계수한 후 평균값을 내어 건중량 1 g당으로 산출하였다 (황경숙 등, 1996).

분리된 균주의 전분분해효소( $\alpha$ -amylase)는 beef extract 10 g, polypeptone 10 g, NaCl 5 g, starch azure 1 g, corn starch 4 g, agar 20 g/l (pH 6.8) 배지에서, 단백질 가수분해 효소(protease)는 beef extract 10 g, polypeptone 5 g, milk casein 5 g, NaCl 5 g, agar 15 g/l (pH 8.0) 배지에서, 섬유소 분해효소(cellulase)는 carboxymethyl cellulose 5 g, peptone 5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, yeast extract 0.5 g, agar 15 g/l (pH 7.0) 배지에서 측정하였다.

효소역가는 분해 균주 선발용으로 배양한 NA, AIA 배지에서 colony 부분을 직경 0.8 cm로 취하여 각각의 역가 측정용 배지에 접종하여 30°C와 55°C 온도에

서 2일 동안 배양한 후 성장환과 탈색환의 크기로 측정하였다. 효소 역가를 측정된 결과를 바탕으로 우수한 역가를 보이는 균주를 재배양하여 보관하였다.

### 2.2. 균주의 동정 및 분류

#### 2.2.1. Genomic DNA의 추출

배양액 500~700  $\mu$ l를 TE (Tris EDTA) buffer로 씻어 낸 후, SET (Salt EDTA Tris) buffer 400  $\mu$ l를 가하고 lysozyme 12  $\mu$ l를 첨가하여 37°C에서 1시간동안 가열하였다. 10% SDS (sodium dodecyl sulfate)를 첨가하고 Proteinase K 15  $\mu$ l를 가한 후, 55°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 5 M NaCl과 chloroform을 첨가한 후, 상온에서 30분간 방치한 다음 원심 분리하여 상등액을 취하고 isopropanol을 첨가해 DNA를 회수하였다. 이것을 에탄올로 세척하여 진공건조를 시키고 TE buffer를 가해 DNA 용액으로 하였다. 전기영동으로 DNA 추출여부를 확인하였다.

#### 2.2.2. 16S primer를 이용한 PCR (Polymerization Chain Reaction)

PCR 튜브에 증류수 39.6  $\mu$ l, 10 × buffer 5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 3  $\mu$ l, fd1 primer (AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG) 1  $\mu$ l, rp2 primer (AAG GAG GTG ATC CAG CC) 1  $\mu$ l, DNA 1  $\mu$ l에 Taq polymerase 0.5  $\mu$ l를 넣고 PCR profile에 의해 증폭시킨 후, 전기영동으로 증폭여부를 확인하였다.

#### 2.2.3. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)에 의한 균의 분류

PCR 튜브에 증류수 38.5  $\mu$ l, 10 × buffer 5  $\mu$ l, 2.5 mM dNTP 3  $\mu$ l, PELF primer 2, DNA 1  $\mu$ l에 Taq polymerase 0.5  $\mu$ l를 넣고 PCR 조건으로 94°C에서 4분간 1 cycle, 94°C에서 1분간, 58°C에서 1분간 35 cycle로 하고 72°C에서 2분간, 72°C에서 7분간 1 cycle 후, 10°C에서 증폭시킨 후, 전기영동으로 증폭여부를 확인하였다(Rominus *et al.*, 2003).

Table 1. Areas collected bacteria

Kinds of sample	Areas that collected	Reference
Compost in a fermenter (1)	Park of Gaeun Mountain in Seoul	wood chip+man manure
Fermented rice straw compost (2)	Asan, Chungnam	rice straw+cow manure
Compost at a farm (3)	Asan, Chungnam	bran+cow manure
Fermented compost at a grape farm (4)	Cheonan, Chungbuk	sawdust+charcoal+cow manure
Fermented compost at a grape farm (5)	Cheonan, Chungbuk	sawdust+cow manure
Compost at a farm (6)	Jincheon, Chungbuk	rice straw+cow manure
Compost at a farm (7)	Chungju, Chungbuk	bran+cow manure
Compost at a farm (8)	Chungju, Chungbuk	sawdust+charcoal+cotton
Compost at a livestock farm (9)	Heongsung, Kangwon (livestock farm)	sawdust+cow manure
Compost at waste materials of a livestock market (10)	Heongsung, Kangwon (Nongwon Compost)	sawdust+waste materials of a livestock market
Fermented compost of pig manure sludge (11)	Heongsung, Kangwon (Agricultural Cooperatives Federation)	sawdust+a sludge of pig manure (fermenting)
Piled compost of pig manure sludge (12)	Heongsung, Kangwon (Agricultural Cooperatives Federation)	sawdust+a sludge of pig manure (piling)
sludge of waste water (13)	Heongsung, Kangwon (plant of waste water sludge)	sludge of waste water
Cow manure compost at a farm (14)	Kwangju, Kyungki	sawdust+cow manure
sawdust compost fo pigmanure (15)	Kwangju, Kyungki	sawdust+urine of pig manure
Compost at a fermenter (16)	Hwasung, Kyungki	wood chip+urine of pig manure
Bark compost (17)	Namwon, Jeonbuk (Forestry Cooperatives Federation)	bark
Compost (18)	Namwon, Jeonbuk	sawdust+bark+chicken manure+cow manure
Cow manure compost at a farm (19)	Namwon, Jeonbuk	cow manure+bran+rice straw
Compost at a fertilizer plant (20)	Yeosu, Jeonnam	sawdust+bark+waste materials of fish+chicken manure+pig manure
Compost at a fertilizer plant (21)	Sancheong, Kyungnam	sawdust+waste medium of mushroom+cow manure+zeolite
Cow manure compost at a farm (22)	Sancheong, Kyungnam	sawdust+cow manure
Chicken manure compost at a farm (23)	Sancheong, Kyungnam	sawdust+waste medium of mushroom+chicken manure

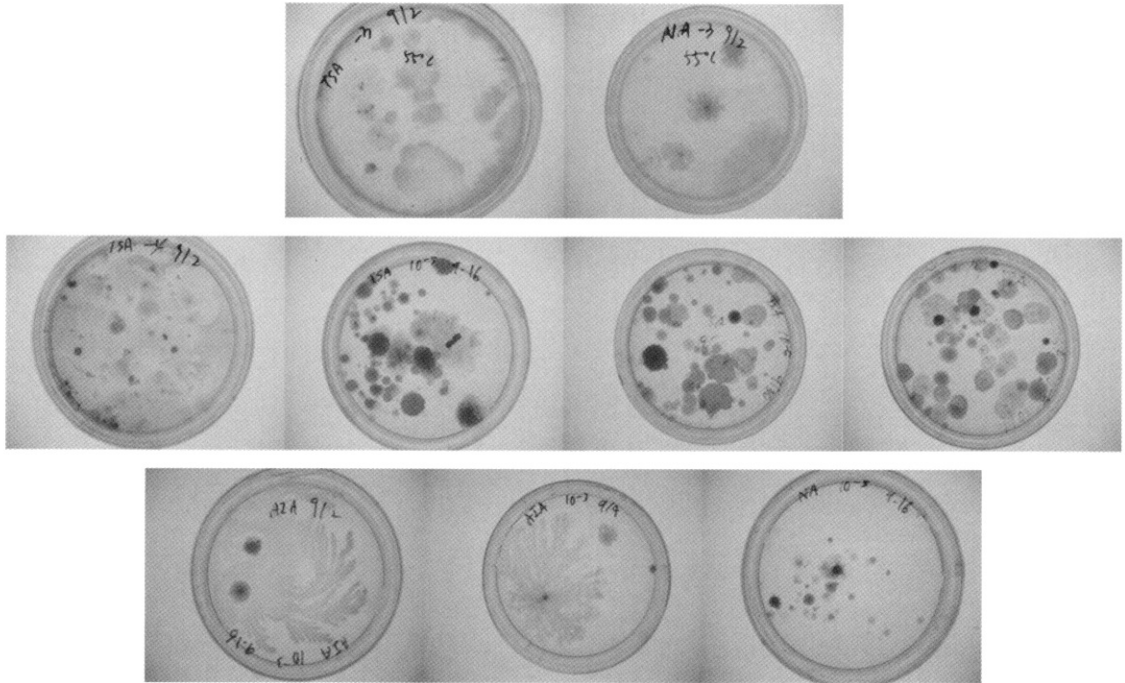


Fig. 2. Differences of bacteria on several media (NA: Nutrient agar, AIA: Actinomyces isolation agar, TSA: Tryptic soy broth agar).

#### 2.2.4. 염기서열 결정

16S PCR산물을 정제하기 위하여 PCR mixture 45  $\mu\text{l}$ 에 증류수 5  $\mu\text{l}$ 를 넣어 에펜도르프 튜브에 옮긴 후, 95% 에탄올 125  $\mu\text{l}$ 와 sodium acetate 5  $\mu\text{l}$ 를 넣어 DNA를 가라앉힌 다음  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 방치하였다. 이것을 원심 분리하여 상등액은 버리고, 70% 에탄올을 가하여 원심 분리하여 세척 후 진공 건조한 다음 멸균수 50  $\mu\text{l}$ 를 넣고 녹여 DNA 2  $\mu\text{l}$ 에 증류수 5  $\mu\text{l}$ , big dye 2  $\mu\text{l}$ , 510R primer (TAT TAC CGC GGC TGC TGG CA) 1  $\mu\text{l}$ 를 가하여 sequencing PCR를 하였다. 이 산물을 ABI 3100 automatic sequencer를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 분석하여 얻은 염기서열을 NCBI (National Center of Biotechnology Information)의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)를 통하여 상동성을 검색하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 공시균주 수집 및 선발

##### 3.1.1. 균주 수집

수집된 균주원 28종류의 장소와 구성 성분은 Table 1과 같다. 균주 수집은 우리나라에서 토착화된 고온 발효 균주를 수집하기 위하여 전국에 걸쳐 수집하였고, 인분, 우분, 돈분, 계분, 생선 잔재물 등 여러 가지의 유기물과 왕겨, 목질칩, 볏짚, 면섬유, 톱밥 및 수피 등을 포함하여 다양한 시료를 채취하는 데에 중점을 두었다. 시료를 채취할 시에는 부숙 온도가  $60 \sim 80^{\circ}\text{C}$  되는 지점에서 실시하여 바로 ice에 보관하여 운반하였다. 주로 농가 부속 퇴비에서 채취한 균주들은 자연 토착화 및 발효에 관여하는 균주였고, 퇴비 공장에서 채취한 시료들은 기존에 판매하는 미생물제

Table 2. C.F.U of microorganism in several media

C.F.U/g	30°C			55°C		
	NA	AIA	TSA	NA	AIA	TSA
1	1×10 <sup>7</sup>	6×10 <sup>7</sup>	4.6×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>6</sup>	23×10 <sup>4</sup>	8×10 <sup>4</sup>
2	1.2×10 <sup>8</sup>	4.2×10 <sup>6</sup>	7×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>7</sup>	2×10 <sup>4</sup>	15×10 <sup>8</sup>
3	4×10 <sup>6</sup>	3.5×10 <sup>3</sup>	3×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>6</sup>	9×10 <sup>3</sup>	7×10 <sup>4</sup>
4	4×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>6</sup>	2×10 <sup>7</sup>	3×10 <sup>6</sup>	4.9×10 <sup>7</sup>	4×10 <sup>7</sup>
5	53×10 <sup>8</sup>	1.6×10 <sup>8</sup>	3.1×10 <sup>8</sup>	8×10 <sup>7</sup>	1×10 <sup>6</sup>	65×10 <sup>7</sup>
6	13×10 <sup>6</sup>	2×10 <sup>7</sup>	2.5×10 <sup>7</sup>	3×10 <sup>6</sup>	1.8×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>6</sup>
7	6.5×10 <sup>7</sup>	3×10 <sup>7</sup>	2.4×10 <sup>7</sup>	6×10 <sup>6</sup>	6×10 <sup>7</sup>	3.2×10 <sup>6</sup>
8	1.4×10 <sup>8</sup>	2.2×10 <sup>6</sup>	7.3×10 <sup>6</sup>	2×10 <sup>3</sup>	6×10 <sup>6</sup>	5×10 <sup>7</sup>
9	1.3×10 <sup>7</sup>	8.5×10 <sup>7</sup>	4.3×10 <sup>8</sup>	6×10 <sup>7</sup>	2.1×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>8</sup>
10	8.5×10 <sup>7</sup>	1.8×10 <sup>9</sup>	2.9×10 <sup>9</sup>	1.6×10 <sup>8</sup>	2.3×10 <sup>8</sup>	4×10 <sup>9</sup>
11	1×10 <sup>6</sup>	2×10 <sup>4</sup>	2×10 <sup>5</sup>	4×10 <sup>7</sup>	3.5×10 <sup>3</sup>	5.2×10 <sup>8</sup>
12	1.3×10 <sup>9</sup>	2.2×10 <sup>8</sup>	4.8×10 <sup>9</sup>	9×10 <sup>6</sup>	7.3×10 <sup>8</sup>	3.5×10 <sup>6</sup>
13	3.5×10 <sup>5</sup>	1×10 <sup>5</sup>	1.4×10 <sup>8</sup>	5.5×10 <sup>6</sup>	1×10 <sup>3</sup>	3.5×10 <sup>4</sup>
14	5.5×10 <sup>7</sup>	1.9×10 <sup>8</sup>	1.4×10 <sup>8</sup>	6×10 <sup>7</sup>	3×10 <sup>5</sup>	3.3×10 <sup>8</sup>

<sup>1</sup> Namwon, Jeonbuk(Forestry Cooperatives Federation), compost of bark  
<sup>2, 3, 4</sup> Namwon, Jeonbuk(Agracultural Cooperatives Federation), sawdust+bark+chicken manure+cow manure  
<sup>5</sup>: Namwon, Jeonbuk, cow manure+bran+rice straw  
<sup>6, 7</sup> Yeosu, Jeonnam, sawdust+bark+waste materials of fish+chicken manure+pig manure  
<sup>8, 9, 10, 11</sup> Sancheong, Kyungnam, sawdust+waste medium of mushroom+cow manure+zeolite  
<sup>12</sup> Sancheong, Kyungnam, sawdust+cow manure  
<sup>13, 14</sup> Sancheong, Kyungnam, sawdust+waste medium of mushroom+chicken manure

제에 사용되는 균주들도 포함되어 있었다.

채취한 시료들로부터 고온호기성박테리아 및 방선균을 선별하기 위하여 NA 및 AIA 배지에서 온도별 (30, 55°C)로 배양한 결과는 Fig. 2와 같다. 단순히 육안으로 관찰 시 일반적으로 박테리아 선발용 배지인 NA배지와 방선균 선발용 배지인 AIA배지 모두에서 박테리아들이 많이 발견되었고, 방선균은 매우 적게 발견되었다. 온도별 배양에서도 30°C와 55°C 차이는 별로 없었으며 특히, 방선균은 30°C보다는 55°C에서 발견되어졌다. 이 결과로부터 얻을 수 있는 것은 효과적인 발효 효율을 얻기 위해서는 박테리아 외 방선균의 역할을 증대하는 조건을 찾는 것이 중요하고 다양한 미생물들의 상승작용에 의한 발효 조건을 가지는 우수한 우리나라 토착 방선균의 선발도 중요한 과제라고 생각되어진다. 또한 다른 연구 결과(Ichida *et al.*, 2001)에서 방선균의 선별을 위해 사용한 선택 배지로 ISS (Inorganic Salts Starch) 배지의 고려도 해 보아야 할 것이며 본 실험에서는 고온 조건에서만 을 고려하여 30°C와 55°C 조건에서 선별하였으나

30°C 이하에서의 균주의 선별이 필요하다고 본다.

### 3.1.2. 생균수 조사

수집한 장소에서 채취한 시료에 균주의 밀도가 어느 정도 되는지에 대한 조사를 하기 위하여 생균수를 조사하였다. 주로 고온호기성박테리아 선발배지인 NA나 TSA배지에서 생균수가 조금 높았고, 방선균용 선택배지인 AIA배지에서는 방선균 외에도 박테리아도 포함하여 생균수를 측정된 결과, 대체적으로 Table 2에서와 같이 생균수가 1×10<sup>5</sup>~10<sup>8</sup>의 분포 밀도를 보였다. 이는 돈분 및 계분을 이용하여 만든 퇴비의 발효 결과(황경숙 등, 1996, 이홍재 등, 1998)와 유사하여 보통의 발효 조건에서의 생균수 분포 밀도와 비슷함을 나타내었다.

### 3.1.3. 효소 생산역가 조사

배양 온도 30°C에서보다 55°C에서 배양된 고온호기성박테리아가 상대적으로 높은 섬유소분해효소와

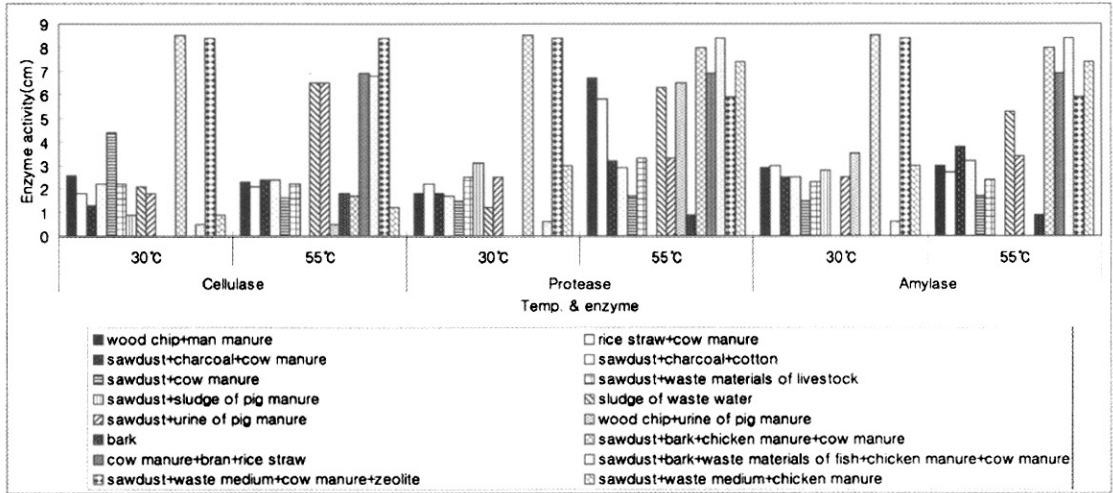


Fig. 3. Enzyme activities of microorganism in several media.

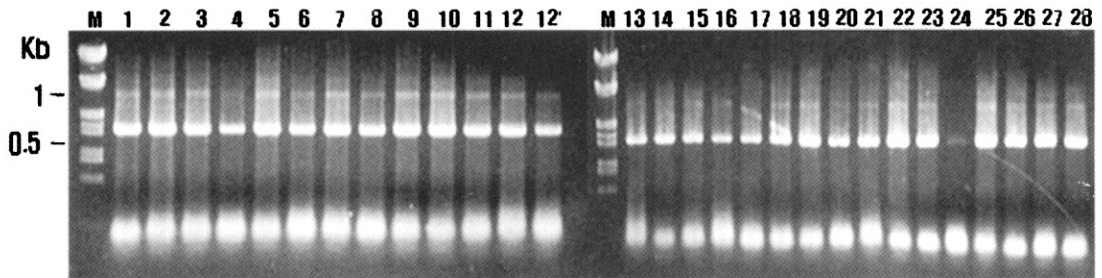


Fig. 4. Genomic DNA band of thermophilic bacteria by 16S rDNA PCR.

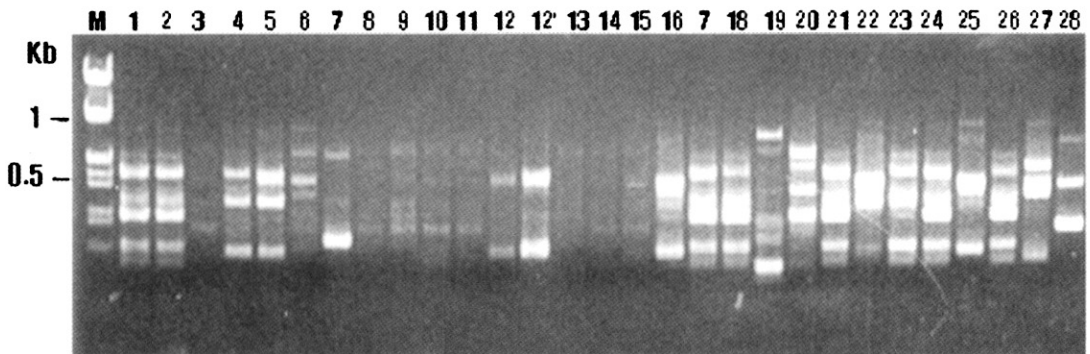


Fig. 5. RAPD band of thermophilic bacteria.

Table 3. Identified bacteria by 16s rDNA amplification

No.	Reading base pair	Name	Homology (%)
1	1 > 290	<i>Sporosarcina ureae</i>	99.3 (270/272)
2	26 > 489	<i>Bacillus licheniformis</i>	100 (485/485)
3	1 > 481	<i>Pseudomonas putida</i>	99.3
4	1 > 486	<i>Staphylococcus lentus</i>	99.8
5	1 > 497	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6 (483/485)
6	1 > 486	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	100
7	1 > 462	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	99.3 (438/441)
8	1 > 495	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	100 (434/434)
9	1 > 482	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	99.6 (469/471)
10	1 > 482	<i>Bacillus subtilis</i>	99.4 (480/483)
11	25 > 453	<i>Thermoactinomyces thalpopophilus</i>	100 (422/422)
12	1 > 496	<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	100 (434/434)
13	1 > 484	<i>Serratia marcescens</i>	99.6 (462/464)
14	26 > 498	<i>Bacillus sp.</i>	99.6 (463/465)
15	1 > 278	<i>Bacillus cereus</i>	99.8

전분분해효소의 생산력을 보였다. 주로 돈분이 포함된 퇴비에서 단백질분해효소 역가가 매우 높았으며 여기에서 얻어진 효소역가를 근거로 각 장소에서 분리한 균주 중 우수 균주를 분리하여 동정에 들어갔다.

효소 생산 역가의 결과로 보면 배양 온도 30°C에 비해 55°C에서 효소 역가가 높으므로 균주의 활력을 높이기 위해서는 정확조 내 발효온도를 고온으로 유지시키는 것이 중요하다고 판단되었다.

### 3.2. 균주의 동정 및 분류

#### 3.2.1. Genomic DNA의 추출에 의한 16S primer를 이용한 PCR (Polymerization Chain Reaction)

Genomic DNA 추출여부를 확인한 전기영동의 결과는 Fig. 4와 같다. 16S PCR에 사용하는 16S primer는 세균의 일반적인 primer 중의 하나로 PCR 산물의 전기영동 결과 모든 균주에서 Genomic DNA가 잘 분리되었다.

#### 3.2.2. RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)에 의한 균의 분류

균의 간단한 분류기법 중의 하나로 추출한 Genomic DNA를 이용하여 RAPD기법에 의한 밴드의 특성을

보고 육안으로 비슷한 밴드 양상을 보인 것들을 우선 1차적으로 계통이 같은 고온호기성 박테리아로 분류하여 Genomic DNA를 sequencing 단계로 들어갔다. Fig. 4에서 살펴보면 28종의 샘플에서 밴드가 유사한 것들을 모아 15그룹으로 나누어 염기서열을 결정하였다. 다른 결과에서와 마찬가지로(Rominus *et al.*, 2003) RAPD기법의 밴드 차이로 속간(genera)의 구별이 가능하였고 간편하게 행해지는 분류 방법이라 할 수 있다.

#### 3.2.3. 분류된 균주의 동정

RAPD기법에 의해 분리된 균주의 16S PCR산물로부터 Genomic DNA의 염기서열은 NCBI BLAST에서 검색하여 동정한 결과 Table 3 및 Index I과 같이 돈분뇨 발효에 관여하는 고온호기성박테리아는 15종으로 동정되었다. 상동성이 99% 이상으로 16S primer에 의한 partial sequence 검색 동정 결과는 양호하였고 대체적으로 그 염기서열의 크기는 278~498 bp이었다. 주로 *Bacillus* 속에 속하는 균주들이 주를 이루었는데 이는 선택 배지에서 육안적, 현미경적으로 나타난 결과와 유사하고, 보통 고온 발효 조건에서 주로 발견되어지는 균주와 일치한 결과를 얻을 수 있었다.(Priest *et al.*, 1989). 또한, 몇 가지의 구균들(*Staphylococcus lentus*, *Rhodococcus rhodochrous*)도 발견되었다. 그리고 샘플을 주로 60~80°C에서 채취



Index I. Partial sequence of genomic DNA of thermophilic bacteria

> gi|6979564|gb|AF202057.1|AF202057  
Sporosarcina ureae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
Score = 523, Identity = (270/272) 99.3%  
Expect = 1e-146

19 cgcctcaggtacaggcagttactcgtactgttcttccctacaacagagctttacga 78  
79 tccgaaaacctcttcaactcagcggcattgctccatcagactttcctcatttgggaag 138  
139 attcctactgctcctccctaggagctcggccgtgtctcagtcacagttggccgat 198  
199 caccctcaggcggctacgcatcgtgaccttggtagaccattaccceaccaactgct 258  
259 aatgcccggcccatcctcagtgacagc 290

> gi|46019048|emb|AJ586341.1  
Bacillus licheniformis partial 16S rRNA gene, strain R-13585

Score = 910, Identity = (459/459) 100.0%  
Expect = 0

1 ggtgcccctattcgaacgctactgttcttcccaacaacagagtttacgacccgaa 60  
61 aaccttcaactcagcggcgttctcgtcagacttctccattgcccgaagattccc 120  
121 tactgctgctccctaggagcttggccgtgtctcagtcaccgttggccgataccct 180  
181 ctacgctcagctacgcatcgtccttggtagccgcttactcaccactagatgacg 240  
241 ccgggctcactctgtaagtgtagctaaaagcaactttatgattgaacctcgggtt 300  
301 caatcaagcactcagctattagccccgtttcccggatttcccagctctacagccaggt 360  
361 taccacagtttactaccctcgcgcgctgacctaaagggagcaagctccctcgtgct 420  
421 ctgacttgcattagtagcagccgcccagcttgcgc 459

> gi|3021614|dbj|D86000.1|  
Pseudomonas putida 16S ribosomal RNA gene, strain: NCIMB 9816,  
partial sequence

Score = 868, Identity = (451/454) 99.3%  
Expect = 0

5 ttctgtcggtta-cgtccaattgcagagatttaactcaaaccttctcccacattaaa 63  
64 gtccttacaactccgaagacttcttcaacacagcggcattggctcaggtttcgc 123  
124 cattgtccaatttcccactgctcctccctaggagcttggaccgtgtctcagttcca 183  
184 gtgtgactgatcatcctcagaccagttacggatcgtccttggtagcattacctc 243  
244 accaactagctaatccgacctaggctcactgtagagcgaagcccaaggtccctgct 303  
304 ttctccgtaggagcattgggtattagcgttcttgcgaacgttgcctcccactacca 363  
364 ggcagattctaggcattactaccctcgcgcgctgaactcagagaagcaagctcttca 423  
424 tccgctgacttgcattgttaggcttgcggcca 457

> gi|21913749|gb|AY126204.1|  
Staphylococcus lentus strain AS3 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

Score = 908, Identity = (465/466) 99.8%  
Expect = 0

15 gacttgttaccgtactaacaatttcttccctacaacagagtttacgactcctaag 74  
75 gaccttcaactcagcggcgttctcgtcagcttccgcatgcccgaagattccc 134  
135 tactgctgctccctaggagcttggaccgtgtctcagttccagttggccgataccct 194  
195 ctacgctcagctacgtattgcttggtaagccgttacctaccactagctaatagc 254  
255 ggcgggttccatctataagtgcagccgaaacgcttcttcaacattgaacctgcccgtc 314  
315 aatatattaccgctattagccccgtttcccggattatccagcttattagtaggtt 374  
375 acccagctgttactaccctcgcgcgctaacatcagagaagcaagcttctcactgttc 434  
435 gctgacttgcattgattagcagcccccagcgttctcacttgcagc 480

> gi|27530897|dbj|AB098578.1  
Bacillus pumilus gene for 16S rRNA, partial sequence

Score = 938, Identity = (483/485) 99.6%  
Expect = 0

7 ctttctggttagct-cgctccaggtgcaagcagttactcttgcacttgttcttccaa 65  
66 aacagagctttacgactccgaaaccttcaactcagcggcgttctcctcagacttt 125  
126 cgtccattgcccgaagatttccctactgctcctccctaggagcttggccgctgtcagt 185  
186 ccagtggtgcccagcaccctcaggtcggctcagcactcgtccttggtagccgtta 245  
246 ctccaccactagctaatgcccgggtccatctgttaagtgcagaccgaaaccttctt 305  
306 catccttgaacctgcccgttcaaggaaactaccggtatagctccggtttcccggagta 365

366 tcccagcttaccagcaggttaccacagcttactaccctcgcgcgctaacatccggg 425  
426 agcaagctcccttctgctccgctcagctgcatgtattagcagccgcccagcttcc 485  
486 tgaac 490

> gi|67079191|gb|AF138739.1|AF138739  
Thermoactinomyces vulgaris KCTC 9076 16S ribosomal RNA gene,  
complete sequence

Score = 938, Identity = (473/473) 100.0%  
Expect = 0

2 cttagtaccgtcaacttccagctgttccgctggaagaaattcttctcaagaacaga 61  
62 gtlttacaaccgaaagcctcactcagcggcgttctcctcagcttccccc 121  
122 ttgggaaaattcctcactgctcctccctaggagcttggccgtgtctcagctccagt 181  
182 ttggccgataccctctcagctcagctcagctcgtccttggtagccgttacctcac 241  
242 caaccagtaatgcccggcggccctcagcaagtgcagccgaaagcccttccctt 301  
302 tcccctgcccgggaaaagagactcggctattagccccgtttcccggattaccgg 361  
362 tttcggcggcaggttcccagcttactacccttccgctggtgactcctaccgaa 421  
422 ggaatgattccctcagcttgcattgattagcagccgcccagcgttctacc 474

> gi|50251196|dbj|AB183422.1  
Rhodococcus rhodochrous gene for 16S rRNA, partial sequence,  
strain: MFC-B

Score = 837, Identity = (438/441) 99.3%  
Expect = 0

1 cagtagccttcaacttccgcttctcctgctgaaagagtttacaaccgaaagccgt 60  
61 catcccacagcggcgtcgtcagcagcttccgcccattgtccaatattcccactgc 120  
121 tgcctccctaggagcttggccgtgtctcagtcaccagctggccgttccctctcagg 180  
181 ccgctaccctcgtcgtcttggtagccattaccaccacaacaagctgatagcccg 240  
241 gctcactcgcagcaaaaacttccaccctccagcancanagaagctcactaccgt 300  
301 attagaccagcttcccagcttaccagagctgagggcagatcaccacagcttactc 360  
361 accgcttcccaatcaccagcaagctgggctcactgctgacttgcattgta 420  
421 ageacgcccagcagcttgcct 441

> gi|22652872|gb|AF515485.1|  
Ureibacillus thermosphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

Score = 860, Identity = (434/434) 100.0%  
Expect = 0

26 ggcagccagctgactgctgcttcttcttccctacaacagagctttacgactcgaag 85  
86 accttctcgtcagcggcgttctcctcagcttccgcccattgtggaagattccct 145  
146 actgctcctccctaggagcttggccgctgtcagtcaccagcttggccgataccctc 205  
206 tcagctcggctacgactcgtccttggtagcccttaccaccacaactagctaatgccc 265

> gi|3135082|emb|AJ006106.1|PST6106  
Pseudomonas stutzeri 16S rRNA gene, strain ATTC 17641, partial

Score = 910, Identity = (469/471) 99.6%  
Expect = 0

5 cttattctgctgta-cgtccaaacagcaagatttaacttactgccccttctcccact 63  
64 taaagtgtttacaatccgaagacttctcacaacagccgctgctgactcaggttt 123  
124 cgccattgtccaatattcccactgctcctccctaggagcttggaccgtgtctcagt 183  
184 tccagttgactgactcctcctcagaccagttacggatcagcagcttggtagcatta 243  
244 ctccaccaactagctaatccgactagctcactgatagcagcaagccgcaaggtcccc 303  
304 tcttctccctaggagcgtatcggctattagctccttccagacgttctcccact 363  
364 accagcagattctaggcattactaccctcggcgtcgaatcagggagcaagctccc 423  
424 ttcaccgctcactgactgtttaggctcggccagcgttcaactgaa 474

> gi|14009325|gb|AY030331.1|  
Bacillus subtilis strain KL-077 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence

Score = 918, Identity = (480/483) 99.4%  
Expect = 0

1 ttctggttagtaccgtccaggt-ccgcccattcgaacgctacttcttccctaa 59

16S rDNA 증폭에 의한 부분염기서열을 이용한 분뇨 발효 관련 고온 호기성 박테리아의 동정

```

60 acagagctttacgatacgaaaacctcactcactcagcggggttgcctcagacttcc 119
120 gtccattgcggaagatccctcactgctgctccgttaggagctgggcccgtgtctcagt 179
180 cccagtggtggccatcacctctcaggctcagctcagcatcgttgccttggtagccgtta 239
240 cctcaccactagctaatgcgcccgggtccatctgtaagtggtagccgaagccaacttt 299
300 tatgttgaaccatcggttcaaaaacacatccggattagcccgggttcccggagtta 359
360 tccagctctacagcaggttaccacagcttactcaccgtccgcgctaatacaggg 419
420 agcaagctcccatctgcccctgacttgcattgattaggcagccgccagcgttcgtcc 479
421 tga 482
    
```

```

> gi|17432163|emb|AJ251777.1|TTH251777
Thermoactinomyces thalophilus partial 16S rRNA gene

Score = 837, Identity = (422/422) 100.0%
Expect = 0
    
```

```

1 aactctcttcagaacagagtttacaacccgaagccgtcactcagcggcatt 60
61 gtcctcagggcttcccatltagcgaatccctcactcgtccctccgtaggagct 120
121 gggcctgtctcagtcaccagtgtagccatcacctctcaggtcagctacgcatcgtcgc 180
181 ctggtagccgttacctcaccactagctaatgcgcccggcccatcgttaagtgcc 240
241 gaagcctttactcttctccatcgggagaagagattatctggtatagaccgggttc 300
301 ccgagttatcccagcttaccggcaggttcccacgttactcaccgctcccgcta 360
361 gggtcgaagacccccgcacgacttgcattgattaggatgcgccagcgttcatcga 420
421 gc 422
    
```

```

> gi|22652872|gb|AF515485.1|
Ureibacillus thermosphaericus 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence

Score = 860, Identity = (434/434) 100.0%
Expect = 0
    
```

```

25 ggcgcagccagtgactgctgcgttcttcccttacaacagagctttacagtcgaag 84
85 acctctctgctcagcggcgttgcctcagccttccgccatttgggaagattccct 144
145 actcgtccctccgtaggagcttggccgctctcagctcccagctgagccatcacctc 204
205 tcagctggctacgcatcgtcgttggtagccgcttaccaccacaactagctaatgcgc 264
    
```

```

265 cgcgggccatcctatagtagcagaacctttcaaccccgaagcagcgttcgg 324
325 tgtttatccggtattagcagcgtttccgcaggttatcccgtctatagggcaggttac 384
385 ccagcttactcaccgtcccgccctaaccaattaaaagaagcttctaatgtgtcc 444
445 gctcgacttgcag 458
    
```

```

> gi|21844529|gb|AY043387.1
Serratia marcescens strain AU1209 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
    
```

```

Score = 904, Identity = (462/464) 99.6%
Expect = 0
    
```

```

14 acgtcattgatgaacgtattaagttcaccacctctcctcgtgaaagtgtttaca 73
74 ccgaagcctcttcaacacggcagctgctcagcttgcgccattgtgcaat 133
134 attcccactgctcctccgttaggagctggaccgtgtctcagttccagtgtagcgt 193
194 catctctcagaccagctaggatcgtcgcctaggtgagcattaccaccactactagct 253
254 aatcccatctgggcaactctgtagcgaagagccgaaggtccctcttggcttgcg 313
314 acgttalgcggtattagctaccgttccagtagttatccccctccatcagcagttccc 373
374 agacattactcaccgtcccgctcgtcaccgggagaagctccctctgctaccgc 433
434 tcgacttgcattgtagcctgcccagcagctcaatctgagc 477
    
```

```

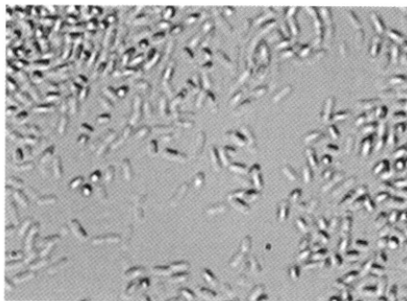
> gi|12057203|emb|AJ276403.1|
BSP276403 Bacillus sp. TH9A partial 16S rRNA gene, strain DSM
12654
    
```

```

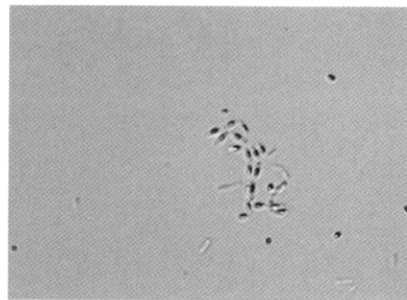
Score = 890, Identity = (451/452) 99.8%
Expect = 0
    
```

```

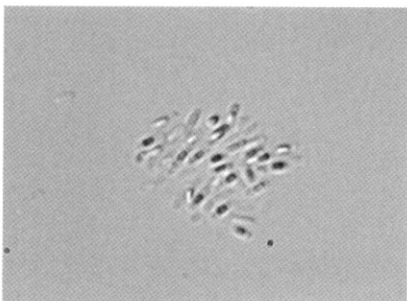
1 gggtagcagcttactaccgacttcttcccttacaacagagctttacagtcgaa 60
61 gacctcttctcctcagcagcgttgcctcagcttccgccatttgggaagattccc 120
121 tactcgtcctccgtaggagcttggccgcttctcagtcagtcagctgagccatcacct 180
181 ctgagctcgtcagcattctgccttggtagccgttaccaccacaactagctaatgcg 240
241 ccgcccggccatcctatagcggtagcagaaccactttcaacaccggagcagcgtccg 300
301 ctgttlatccggtattagcagcgttccgcaggttaccggctatagggcaggtta 360
361 cccagcttactcaccgtcccgctaacctcaataaaaagaagcttccatgaggtc 420
421 cgtcacttgcattgattagcagccgcca 452
    
```



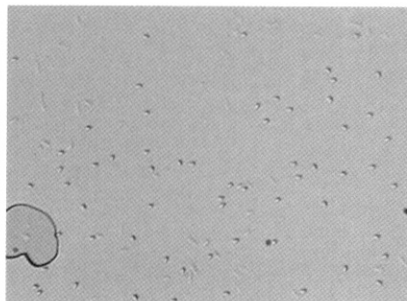
Incubation 1 day



Incubation 3 day



Incubation 5 day



Incubation 7 day

Fig. 6. Endodermic spores of *Bacillus subtilis* at high temperature ( $\times 1,000$ ).

하였기 때문에 *Thermoactinomyces* 속이 동정되었는데 고온 호기성 발효할 시에 이 균을 잘 이용하면 좋으나 역가 측정 결과(여기에서는 데이터가 표시되어 있지 않음)에 따르면 높지 않게 나타났다. 균주 동정이 이루어지면 이 균주를 실용화하는 단계로 미생물 제제를 제조할 시 고온 호기 조건에서 발효하는 조건을 만족하는 것으로 내열성을 가지며 내생포자(휴면포자: endospore)를 형성할 수 있는 균주로는 *Bacillus subtilis*로 결정되었다(Fig. 6).

#### 4. 결 론

본 실험에서 사용한 세균 및 방선균의 선택용 배지는 NA, AIA, TSA로써 일반적으로 균 분리 시 이용되는 것이나, 특징적으로 각각의 배지들에서 선택적으로 세균이나 방선균을 분리되지 않아 앞으로 각 균주들에 대한 선택적 배지를 찾는 것이 중요한 과제라고 판단되었다. 돈분뇨 발효 시 저온 조건(30°C)과 고온 조건(55°C)에서 분리되는 균주의 대부분은 *Bacillus* 속이 주를 이루었고 고온 조건에서 *Thermoactinomyces* 속이 분리되었다. 분리된 균주들을 정하는 데에 있어서도 기존의 Bergey's manual 외에 16S rDNA의 primer를 이용하여 PCR을 하는 방법이 매우 간편하여 genomic DNA가 잘 분리되었으며, 간단한 분류기법 중의 하나인 RAPD기법에 의해 계통이 같은 고온 호기성 박테리아를 분류하였다. 부분염기서열을 근거로 NCBI BLAST에서 검색하여 동정한 결과 돈분뇨 발효에 관여하는 고온호기성박테리아는 15종으로 동정되었다.

#### 참 고 문 헌

1. Busse, Hans-Jurgen, Ewald B. M. Denner, and Werner Lubitz. 1996. Classification and identification of bacteria: Current approaches to an old problem overview of methods used in bacterial systematics. *J. Biotechnology* 47: 3~38.
2. Ichida, Jann M., Lucie Krizova, Coleen A. Lefevre, Harold M. Keener, David L. Elwell, and Edward H. Burt Jr. 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiological Methods* 70: 199~208.
3. Jones, Susan W., Michael E. Dobson, Stephen C. Francesconi, Richard Schoske, and Robert Crawford. 2005. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms. *Croat Med. J.* 46: 522~529.
4. Lee, S. B. and J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. Pp. 282~287. *In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Eds. PCR protocols, A guide to methods and applications. Academic press, Sandiego.*
5. Priest, F. G. 1989. *In: Harwood, C. R. (Ed.). Bacillus, Aerobic endospore-forming bacteria. New York. pp. 27~56.*
6. Ronimus, Ron S., Lynne E. Parker, Nicola Turner, Sushma Poudel, Andreas Ruckert, and Hugh W. Morgan. 2003. A RAPD-based comparison of thermophilic bacilli from milk powders. *International J. Food Microbiology* 85: 45~61.
7. 이홍재, 조주식, 반경녀, 허종수, 신원교. 1998. 하수슬러지의 퇴비화과정 중 이화학적 및 미생물상 변동. *한국환경농학회지* 17: 16~21.
8. 황경숙, 장기운. 1996. 축산폐기물의 퇴비화 과정 중 미생물상의 변동. *한국토양비료학회지* 29: 303~311.