JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE
Vol. 37, No. 1, pp.53-60, JUNE 2010, CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY

Bacillus subtilis PNG-4의 단독 및 *Lactobacillus acidophilus*와의 혼합 사용이 산란계의 건물소화율, 혈액성상 및 계분의 악취 발생에 미치는 영향

김이수[1]·차상우[3]·조성경[2]·김성복[2]·이봉덕[2]·이수기[2*]

Effect of *Bacillus subtilis* PNG-4 with or without *Lactobacillus acidophilus* on malodorous gas emission of excreta in laying hens

Lee-Su Kim[1] · Sang-Woo Cha[3] · Sung-Kyung Cho[2] · Sung-Bok Kim[2] · Bong-Duk Lee[2] · Soo-Kee Lee[2*]

ABSTRACT

Two experiments were conducted to investigate the effect of probiotics on the malodor removal. In experiment 1, dietary effects (several malodorous gas concentration of excreta, dry matter metabolizability, and blood profiles) were determined using laying hens. A total of 30 Hy-line brown layers, 68-wk of age, were randomly allocated into 5 groups with 3 replicates of 2 birds each. The treatments were probiotics free, 0.2% and 0.4 % addition of mixed probiotics (*Bacillus subtilis* PNG-4 +*Lactobacillus acidophilus* LAS), and 0.2 and 0.4 % addition of single probiotics (*Bacillus subtilis* PNG-4). In experiment 2, the effects of mixing of probiotics into the excreta on the malodorous gas removal was investigated. There were three treatments (probiotics free, *Bacillus subtilis* PNG-4 +*Lactobacillus acidophilus* LAS, and *Bacillus subtilis* PNG-4) with three replicates. The malodorous gas concentrations were detected at 0, 3, 7 and 14 day of incubation. In experiment 1, ammonia concentration was significantly decreased by feeding mixed probiotics at 14th day of incubation. However, amines, hydrogen sulfide, ethylmercapthan, and methylmercapthan were not significantly affected by mixed probiotics. Dry matter metabolizability was significantly increased by feeding probiotics, but no significant differences between single and mixed probiotics. There was no significant differences in blood profiles. In experiment 2, mixing of probiotics into the excreta did not affect the concentration of ammonia, amines, hydrogen sulfide, ethylmercapthan, and methylmercapthan. Therefore, these experiments suggested that *Bacillus subtilis* PNG-4 + *Lactobacillus acidophilus* LAS supplementations could improve ammonia gas removal, and dry matter metabolizability in layers. Also, decrease of ammonia concentration was higher in mixed probiotics group compare to the single probiotics group. On the other hand, mixing of probiotics into the excreta appeared not to be a useful method.

Key words : probiotics, malodor, dry matter metabolizability

Ⅰ. 서 론

축산업에 있어 환경보전은 가축의 생산성 못지않게 중요한 문제이며, 축분으로부터의 유해가스의 배출은 관련 업무 종사자 및 축사 내 가축에게 호흡기 등의 장해를 일으킬 뿐 아니라 대기 전체를 오염시켜 환경문제를 유발시키고 있다. 그리하여 2005년 2월부터 악취방지법이 발효되고 있으며 22가지 물질이 악취물질로 지정되었으며, 이들 중 암모니아와 황화수소의 대기 내 허용량은 1-2 ppm 및 0.02-0.06 ppm으로 되어있는 등 엄격히 규제되고 있다(환경부, 2005). 이와 관련하여 근래에는 악취 저감 및 성장 촉진 목적으로 많은 생균을 이용하고 있으며, 그 종류도 매우 다양하다. 따라서 이것을 효율적으로 활용하는 방법이 필요하다고 하겠다.

악취 저감을 위한 시도로서 생균제의 급여(Santoso 등, 1999; 김 등, 2000; 고 등, 2003; Timmerman 등, 2004), 분뇨에 대한 균주의 살포(太田 등, 1979), biofilter의 개발(최 등, 2004; Lee 등, 2006) 등이 있었지만 급여 및 살포 시의 사용환경의 설정, filter의 경제성, 미생물의 2차적 오염 등 아직 많은 문제를 내포하고 있다.

사용 생균제 중 *Bacillus subtillus*는 악취 저감을 목적으로

[1] 우송정보대학 애완동물계열(Department of Pet Animal Science, Woosong Information college, Daejeon 300-715, Korea)
[2] 충남대학교 동물자원생명과학과(Department of Animal Science and Biotechnology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea)
[3] 대전시농업기술센터 (Daejeon Institute of Agricultural Technology, Daejeon 305-803, Korea)
* Corresponding author : 이수기
Tel.: +82-42-821-5775 Fax: +82-42-825-9754
E-mail : leesk@cnu.ac.kr
2010년 4월 9일 투고
2010년 5월 28일 심사완료
2010년 6월 11일 게재확정

많이 쓰이는 균종 중의 하나로서 이에 대한 생산 배지 최적화 실험이 수행 된 바 있으며(Koo 등, 1997; 김 등, 2007), 김 등(2007)은 *Bacillus subtillus*의 암모니아 제거에 있어 최적 조건은 30℃, pH4라고 하였으며 아울러 최적화된 배지의 구성성분에 대하여도 보고하였다. 따라서 *Bacillus subtillus*의 이용은 전술한 내용의 장내 환경을 조성하는데 도움이 되고, 낮은 pH에 적응력이 있는 균종과의 혼합사용이 효과적일 것으로 생각된다. 그리하여 본 연구의 실험 1에서는 새로 개발된 *Bacillus subtilis* PNG-4의 단일균주에 장내 pH를 저하시키는 균종인 *Lactobacillus acidophilus*를 함께 급여하여 계분의 암모니아, 아민류 및 함황가스 발생, 그리고 건물 대사율과 혈액성상에 미치는 영향을 조사하였고, 실험 2에서는 급여시험과 동일한 균주를 닭 배설물에 살포하였을 때의 악취성분의 경시적 변화를 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 1-생균제 급여시험

가. 공시 재료 및 동물관리

공시동물은 갈색의 하이라인 산란성계 30수(68주령, 평균체중 2.1 kg)를 사용하였으며 사육실의 조건은 실온 20-25℃, 습도는 50-60%였으며 점등은 하지 않았고 자연일조에 따랐다. 공시동물은 1단 케이지에 1칸에 2수씩 수용하였다. 사료는 매일 11시에 110 g 씩 급여하였다. 공시사료 및 그의 화학적 조성은 Table 1과 같다.

첨가된 생균제는 청미바이오(주)에서 개발한 *Bacillus subtilis* PNG-4(5×10^{10} cfu/kg)와 *Lactobacillus acidophilus* LAS (3×10^{10} cfu/kg)를 섞은 혼합균주와 *Bacillus subtilis* PNG-4 (5×10^{10} cfu/kg 이상) 단일균주를 사용하였다. 이들 균주는 새롭게 분리 배양된 것으로서, 분리 균주의 형태학적 특성은 광학현미경 (Leica DM1000)으로 1000배로 관찰 및 확인하였다. 또한 분리한 균주의 16S rDNA 염기서열을 분석함으로써 균주를 최종적으로 동정하였다. gDNA prep kit (Genomic cell/tissue spin mini kit, Nucleogene)를 사용하여 분리균주로부터 DNA를 추출한 다음 16S rDNA를 증폭하기 위하여 9F, 5‘-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3’ 프라이머와 1512R, 5‘-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3’ 프라이머를 이용하여 다음 조건으로 PCR하였다. 즉 0.5 μM primer, 50 ng template DNA, 10X 완충액 2.5μl, 2.5 mM dNTP mixture 2.5μl, Taq DNA polymerase 1U가 포함된 PCR mixture를 95℃에서 5분간 변성시킨 후에 95℃에서 1분, 55℃에서 1분, 75℃에서 1분을 30사이클 반복함으로써 PCR 작업을 수행하였다. PCR 작업이 끝난 뒤 PCR 산물 10μl에 loading buffer 2μl를 넣어 혼합한 후, 2-3% agarose gel의 well에 주입하여 100V 전압 (5-20V/cm)으로 30분 동안 전기영동 하였다. 전기영동으로 확인 후 밴드부분을 절단하여 PCR product purification kit (Nucleogene)로 정제하였다. 정제된 PCR 산물의 DNA염기서열 분석은 518F, 800R, 1492R 프라이머와 BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit v3.1 (ABI)을 이용하여 Gene AMP PCR System 9700 (Perkin Elmer, USA)에 의하여 수행되었다. 얻어진 염기서열을 CLUSTAL X (Version 1.8) 프로그램(Thomson 등, 1994)에 의하여 정렬하고, 미생물 종간 염기서열의 상동성을 GenBank 데이터베이스의 Blast 프로그램에 의하여 비교분석 후 근린 결합법(Saitou와 Nei, 1987)에 의하여 분리균주들의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

Table 1. Formula of experimental diets for layers

Ingredients:	%
Yellow corn	60
Soybean meal	25
Rapeseed meal	2
Animal fat	2
DL-Methionine	0.2
Salt	0.3
Limestone	8.5
Dicalcium phosphate	1.7
Min-Vit premix1	0.3
	100.0
Analyzed composition:%, as-fed basis	
Moisture	9.0
Crude protein	16.0
Crude fat	4.6
Crude fiber	2.7
Crude ash	12.0
Calcium	3.7
Phosphorus	0.6
TME[2], kcal/kg	2,750

[1] Provided followings per kg of diet: Cu, 10mg; Fe, 80mg; Mn, 80mg; Zn, 80mg; I, 0.9mg; Se, 0.2mg; Co, 0.5mg. vit. A, 12,000IU; vit. D3, 3,000IU; tocopherol 15mg; vit. K3, 2mg; thiamin, 2.0mg; riboflavin, 6.0mg; pyridoxine, 2mg; vit. B12, 0.03mg; folic acid, 1.0mg; biotin, 0.15mg; niacin, 45mg; D-Ca pantothenate, 15mg; antioxidant, 0.5mg.

[2] Calculated values.

나. 조사항목 및 방법

① 계분의 악취성분은 암모니아, 아민류, 황화수소, 에틸메르캅탄 및 메틸메르캅탄의 농도를 조사하였으며, 측정방법은 head space 개스 채취방법으로 검지관(Gastec, Japan)을 이용하여 측정하였다. 배설물 시료는 9일간의 적응기간을 거친 후 다음날 11시에 수거하여 30 g을 2 L의 삼각플라스크에 넣어 30℃의 인큐베이터에 수용하였고 매일 12시에 잘 혼합하고 공기를 충분히 공급하고 역류방지 트랩이 장착된 마개를 닫아두었다. 악취성분의 측정은 배양 개시 시, 3일, 7일 및 14일 째의 18시에 실시하였다.

② 사료의 고형물 대사율은 악취측정 시료채취 1일 후 3

일간의 대사율을 조사하였다. 사료는 매일 11시에 사료를 급여하고 배설물을 수거하여 건조 후 다음 계산식으로 산출하였다.

$$\text{고형물 대사율(\%)} = \frac{\text{사료섭취량 - 배설물 양}}{\text{사료섭취량}} \times 100$$

③ 혈액 성분은 각 처리당 6수씩 시험 종료일 사료급여 전 진공튜브(BD Vacutainer®)를 사용하여 경정맥에서 3 mL 정도 채취하여 혈액 자동분석기(Selectra 2, Merk Ltd. Co. Netherland)를 이용하여 백혈구(WBC), 적혈구(RBC) 및 임파구(lymphocyte)를 조사하였다.

다. 실험설계 및 통계처리

실험설계는 대조구(무첨가구)와 *Bacillus subtilis* PNG-4 (5×10^{10} cfu/kg) + *Lactobacillus acidophilus* LAS(3×10^{10} cfu/kg) 혼합균주 0.2 % 및 0.4% 첨가구, *Bacillus subtilis* PNG-4 (5×10^{10} cfu/kg 이상) 0.2% 및 0.4% 첨가구의 5처리에 3반복을 두었으며 반복당 2수로 하였다. 통계처리는 분산분석 후 Duncan(1955)의 신다중검정법으로 5% 수준에서의 유의성을 검정하였다.

2. 실험 2–생균제 살포시험

가. 공시 재료

공시재료로서 배설물 시료는 갈색 하이라인 산란성계 30수(평균체중 2.1 kg)로부터 얻었으며, 동물의 관리는 사육실온 25℃, 습도는 50-60%로 유지되었다. 동물은 1단 케이지에 1칸에 2수씩 수용하였고 사료는 매일 11시에 110 g씩 급여하였다. 사료의 원료 및 화학적 조성은 Table 1과 같다.

투여된 생균제는 *Bacillus subtilis* PNG-4(5×10^{10}cfu/kg)와 *Lactobacillus acidophilus* LAS(3×10^{10}cfu/kg)를 섞은 혼합균주와 *Bacillus subtilis* PNG-4(5×10^{10}cfu/kg 이상) 단일균주를 사용하였다.

나. 조사항목 및 방법

① 계분의 악취성분은 암모니아, 아민류, 황화수소, 에틸메르캅탄, 메틸메르캅탄의 농도를 조사하였으며, 측정방법은 head space 개스 채취방법으로 검지관(Gastec, Japan)을 이용하여 측정하였다. 배설물 시료는 오전 11시에 수거하여 건물 기준 15 g을 처리당 3반복으로 준비하고, 여기에 *Bacillus subtilis* PNG-4(5×10^{10}cfu/kg)와 *Lactobacillus acidophilus* LAS(3×10^{10}cfu/kg)의 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4 (5×10^{10}cfu/kg 이상) 한가지만 사용한 단일균주(동결된 균분말)의 5% 수용액 각 1 mL씩을 잘 혼합하였다. 대조구에는 1 mL의 증류수를 혼합하였다. 이 배설물 시료를 2 L의 삼각플라스크에 넣어 30℃의 인큐베이터에 수용하였고 매일 12시에 잘 혼합하여 공기를 충분히 공급하고 역류방지 트랩이 장착된 마개를 닫아두었다. 악취성분의 측정은 배양 개시 시, 3일, 7일 및 14일 째의 18시에 실시하였다.

다. 실험설계 및 통계처리

실험설계는 대조구(무첨가구)와 *Bacillus subtilis* PNG-4 (5×10^{10}cfu/kg) + *Lactobacillus acidophilus* LAS(3×10^{10}cfu/kg) 혼합균주, 그리고 *Bacillus subtilis* PNG-4(5×10^{10}cfu/kg 이상) 단용구의 3처리에 3반복, 반복당 2수로 하였다. 통계처리는 분산분석을 실시한 후 Duncan(1955)의 신다중검정법으로 5% 수준에서의 유의성을 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 실험 1–생균제 급여시험

가. 악취 성분

대조구와 *Bacillus subtilis* PNG-4/*Lactobacillus acidophilus* LAS 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4 단일균주의 첨가수준별 배설물 악취성분의 변화는 Table 2 및 3에서 보는 바와 같다.

배설물의 암모니아 농도의 시일 경과에 따른 변화는 배양 3일은 0일에 비하여 유의하게 증가하였고, 제3일째와 제7일째 사이에는 유의한 차이가 없었으며, 제14일째는 제7일째에 비하여 유의하게 증가하였다. 처리구간의 변화는 0, 3 및 제7일째에는 유의한 차이가 나타나지 않았고 제14일 째는 혼합균주(T2, T3), 단일균주(T4, T5), 대조구의 순으로 유의하게 낮게 나타났다. 그러나 T2구와 T3구, T4구와 T5구 사이에는 유의차는 인정되지 않았다. 본 시험에서는 혼합균주구(T2, T3)가 대조구(T1)나 단일균주구(T4, T5)보다 암모니아 가스의 발생을 감소시키는 작용이 우수하였다고 할 수 있겠다. Santoso 등(1999)은 육계에 *Bacillus subtillus*를 급여하여 분 중 암모니아 가스발생을 줄였다고 하였으며, 고 등(2003)도 *Lactobacillus acidophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus*를 육계에 투여하여 배설물 중 암모니아 발생량이 감소함을 확인 한 바 있다. *Bacillus subtillus*는 nitrate를 분해·이용하여 단백질 이용효율을 높이며, 결과적으로 암모니아 가스 발생을 감소시킬 수 있지만, 사료적 및 장내 환경에 있어 많은 영향을 받는 것으로 생각된다. 김 등(2007)은 *Bacillus subtillus* IB101은 배설물의 암모니아 농도를 감소시킬 수 있는 능력이 있지만 이는 최적 배지조건을 충족할 경우에 한한다고 하였으며, 최적 배양온도는 30℃, pH는 4라고 보고하였다. 본 실험에서 혼합균주구(T2, T3)가 암모니아 감소효과를 보이는 것은 *Lactobacillus acidophilus*

의 투여로 장내 pH가 저하(Underdahl, 1982; Fuller, 1989)되어 결과적으로 *Bacillus subtillus*의 생육 조건이 개선된 것으로 사료된다. 그리하여 균종의 선택도 중요하지만 최적 배지조건을 유지하는 것도 매우 중요한 과제라고 생각된다.

그리고 아민의 배양 일수 경과에 따른 변화는 제7일째까지는 유의하게 증가하다가 제14일째는 유의한 성적은 아니지만 감소하는 경향이었다. 각 처리간에는 유의한 결과를 나타나지 않았지만 대조구가 처리구보다 높은 수준이었으며, 이들 가스는 주로 요산으로부터 대사된 것으로 추정된다.

황화수소는 처리간 및 일수 경과에 따른 유의한 차이 또는 일정한 경향을 보이지 않았다. 라 등(2004)은 *Lactobacillus acidophilus*와 *Bacillus subtillus* 외에 *Bifidobacterium longum* 등 수종의 균주를 혼합하여 육계에 급여하여 배설물의 암모니아 배출량뿐만 아니라 황화수소의 배출도 감소시켰다고 하였다. 이는 본 시험의 결과와는 다소 다른 내용으로서 균종의 조합에 의한 효과인지 그 외의 요인이 존재하는지는 직접 비교하기 어려우며, 이를 위해서는 더욱 다양한 실험이 필요하다 하겠다.

ethylmercapthan과 methylmercapthan의 농도는 배양 제3일째 배출량이 개시 시에 비하여 유의하게 많아졌고, 제7일째와 제14일째에는 제3일째보다 유의하게 감소하였으며,

Table 2. Dietary effect of probiotics on ammonia and amine gas emissin in layer excreta

Treat-ment[1]	Incubation time, days							
	Ammonia				Amines			
	0	3	7	14	0	3	7	14
	ppm							
T1	2±0.3[2,c]	54±6.4[b]	60±5.8[b]	401±26.4[aA]	6±0.52[c]	210±27.6[b]	594±41.4[a]	491±39.4[a]
T2	2±0.2[c]	41±5.1[b]	58±5.1[b]	119±11.3[aC]	6±0.5[c]	245±28.2[b]	531±38.0[a]	441±33.0[a]
T3	2±0.4[c]	46±5.3[b]	50±6.5[b]	106±13.7[aC]	5±0.5[c]	235±26.9[b]	464±36.7[a]	442±33.5[a]
T4	3±0.4[c]	55±6.0[b]	67±6.2[b]	308±24.1[aB]	5±0.6[c]	258±28.1[b]	545±40.0[a]	466±34.1[a]
T5	2±0.3[c]	44±5.5[b]	58±6.4[b]	287±20.8[aB]	5±0.5[c]	247±27.3[b]	515±38.8[a]	460±34.9[a]

[1] See Table 2.
[2] Mean±SE
[a-d] Means within a row with same superscripts are not significantly different(P>0.05).
[A-C] Means within a column with same superscripts are not significantly different(P>0.05).

Table 3. Dietary effect of probiotics on hydrogen sulfide, ethylmercapthan and methylmercapthan gas emissin in layer excreta

Treat-ment[1]	Incubation time, days											
	Hydrogen sulfide				Ethylmercapthan				Methylmercapthan			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
	ppm											
T1	2±0.3[2]	6±0.6	2±0.3	4±0.5	0±0.0[c]	28±2.5[aA]	3±0.3[b]	7±1.2[b]	2±0.4[b]	11±1.4[a]	2±0.3[b]	7±0.6[b]
T2	4±0.4	5±0.5	2±0.3	2±0.3	0±0.0[c]	15±1.7[aB]	3±0.3[b]	8±1.3[b]	2±0.3[b]	9±1.3[a]	2±0.3[b]	2±0.3[b]
T3	2±0.3	3±0.4	2±0.4	4±0.6	0±0.0[c]	15±1.5[aB]	4±0.4[b]	6±0.3[b]	2±0.3[b]	10±1.4[a]	2±0.4[b]	5±0.4[b]
T4	2±0.2	5±0.5	2±0.4	5±0.5	0±0.0[c]	13±1.5[aB]	3±0.4[b]	7±1.3[b]	2±0.3[b]	10±1.3[a]	2±0.3[b]	4±0.4[b]
T5	2±0.4	3±0.5	2±0.3	2±0.3	0±0.0[c]	18±1.6[aB]	8±0.0[b]	9±1.4[a]	2±0.4[b]	12±1.5[a]	4±0.0[b]	5±0.5[b]

[1] See Table 2.
[2] Mean±SE
[a-d] Means within a row with same superscripts are not significantly different(P>0.05).
[A-B] Means within a column with same superscripts are not significantly different(P>0.05).

제7일째와 제14일 째 사이에는 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.

위의 결과에서 보면 *Bacillus subtilis* PNG-4/*Lactobacillus acidophilus* LAS 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4 단일균주 생균제의 분 악취성분에 미치는 결과는 질소화합물에는 다소 긍정적인 영향을 미친다고 볼 수 있으나, 함유황가스의 배출 억제에는 가시적인 영향이 발견되지 않았다. 이에 대해서는 효과의 유무와 함께 요구되는 적정환경의 조성에 관한 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다.

나. 고형물 대사율

대조구와 *Bacillus subtilis* PNG-4/*Lactobacillus acidophilus* LAS 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4 단일균주의 첨가수준별 고형물 대사율의 변화는 Table 4에서 보는 바와 같이 T2 및 T3구가 대조구에 비하여 유의하게 높게 나타났다.

단일균주구인 T4 및 T5는 대조구보다는 높고 혼합균주구(T2, T3)보다는 낮게 나타났으나 이들과 유의한 차이는 아니었으며, 혼합균주 수준 간 및 단일균주 수준 간의 유의한 차이는 없었다. Santoso ea al(1999)도 육계에 B*acillus subtilis*를 급여하여 영양소 소화율을 향상시켰다고 하였으며, 김 등(2001)도 *Bacillus subtilis* 등 혼합균주를 급여하여 육계 생산성을 높였다고 보고한 바 있다. 고 등(2003)은 유산균 등 혼합균주를 급여하여 맹장내의 유산균수를 증가시켜 육계의 생산성을 향상시킨 바 있으며, 라 등(2004)도 백년초 혼합 생균제를 이용하여 육계의 생산성을 높였다고 보고하였다.

이처럼 소화율이 향상되는 것은 생균제를 첨가함으로서 장내 pH를 낮추어 유해균의 생육을 억제시키고 유익한 균종의 정착을 돕기 때문(Underdahl, 1982; Fuller, 1989) 이다. 그리고 *Lactobacillus*는 소화효소를 생산하고(Gilliland and Kim, 1984) 기호성을 증가(김 등, 2001)시킨다고 한다. 이 외에도 생균제는 장내 효소의 활성을 증가시켜 사료의 영양소 이용성을 증가시킨다(Collington et al., 1988; Scheuermann, 1993)고 하며 이것이 악취발생의 감소에도 기여한다고 사료된다.

다. 혈액 성분

생균제 투여시의 혈액분석의 결과는 Table 5에 나타내었다. 각 시험구의 RBC, WBC 및 Lymphocyte의 변화는 유의한 차이가 없었다. Bloksma et al(1981)은 쥐에게 Lactobacillus를 급여하여 면역반응을 향상시켰으며, Perdigon et al(1987)도 쥐에게 *Streptococuus thermophillus*와 *Lactobacillus acidophillus*를 급여하였을 때 대식세포, 임파구 및 장관내 면역세포가 증가되었다고 하였다. 그리고 Lessard and Brisson(1987)은 이유자돈에게 *Lactobacillus* 발효산물을 급여하여 혈액내 IgG 농도를 증가시켰다고 하였다. Tortuero and Femandez (1995)도 *Lactpbacillus* spp.와 *Streptococuus* spp.의 혼합 생균제를 자돈에 급여하였을 때 Lymphocyte의 농도를 증가시켰다고 하였으며, 그 효과는 비육돈 보다는 어린 돼지에서 더 많은 효과가 있었다고 하였다(Jonsson and Conway, 1992). 그러나 본 시험의 성적이 위의 다른 연구자와 다른 결과를 보이고 있는 것은 축종 및 성장단계의 차이에 의한 것으로 추측된다.

Table 4. Dietary effect of probiotics on dry matter metabolizability in layers

Treatment	T1	T2	T3	T4	T5
Dry matter metabolizability, %	------ % ------				
	67.7±0.95[2,b]	69.5±0.88[a]	69.9±0.90[a]	68.0±0.95[ab]	68.6±0.88[ab]

[1] See Table 2.
[2] Mean±SE
[a,b] : Means within a row with same superscripts are not significantly different(P>0.05).

Table 5. Dietary effect of probiotics on change in blood profile in layers

Treatment[1]	RBC, $\times10^6$/mm	WBC, $\times10^6$/mm	Lymphocyte, %
T1	5.9±0.22[2]	16.4±1.21	46.6±2.45
T2	6.0±0.20	17.0±1.34	46.8±3.03
T3	6.1±0.19	17.2±1.30	44.2±2.01
T4	5.9±0.23	16.5±1.40	46.3±3.02
T5	5.9±0.24	16.0±1.38	47.8±2.98

[1] See Table 2.
[2] Mean±SE
NS

본 시험에서 생균제의 급여는 암모니아와 ethylmercapthan의 배출을 감소시켰으며, 혼합균주의 급여효과는 암모니아에서는 긍정적인 결과를 보였으나 ethylmercapthan에는 영향을 미치지 못 하였다. 고형물 대사율에 있어서도 혼합균주가 효과적으로 나타나, 대체적으로 단일균주보다는 혼합균주가 우수한 성적을 나타내었다고 할 수 있으며, 이 들 균주의 효과는 장 내에서의 최적 배지조건이 형성되도록 하는 것이 중요하다고 사료된다.

2. 실험 2-생균제 살포시험

가. 악취 성분

Bacillus subtilis PNG-4(BS)/*Lactobacillus acidophilus* LAS(LA) 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4(BS) 단일균주액을 배설물에 살포하였을 때의 악취성분의 변화는 Table 6 및 7에서 보는 바와 같다.

배설물 암모니아 농도의 시일 경과에 따른 변화는 배양 0, 3, 7, 14일에 있어, 시일이 경과하면서 시험 개시 시와 제3일째, 제7일째와 제14일째에는 유의적인 증가가 있었다. 처리별 변화에 있어서는 생균제 첨가구가 무첨가구에 비하여 배양기간 전반에 걸쳐 다소 낮은 수치를 보이고 있으나 유의한 수준은 아니었으며 혼합균주와 단일균구간에도 유의한 결과를 나타내지 않았다. 이 결과는 실험 1의 제14일째에서 처리구가 무처리구에 비하여 유의하게 낮았던 것에 비하면 다른 결과로서 균주의 배양조건의 변화에 따른 것으로 생각된다. 아민에 있어서는 경과일수에 따른 변화를 보면 실험 개시 시보다 제3일째 및 제7일째로 진행되면서 유의한 증가가 있었으나, 제7일째와 제14일째의 결과는 유의한 차이가 없었으며, 처리구간의 유의성도 보이지 않았다.

황화수소의 농도는 배양일수의 경과 및 처리에 따른 유의한 변화가 없었다. 이 결과는 실험 1에서의 닭에 대한 급여결과와 유사하다고 하겠다. 이러한 성적은 본 실험에 사용된 혼합균주 및 단일균주의 황화수소 산화능력은 본 실험

Table 6. Effect of probiotics on ammonia and amine gas emission in layer excreta

Treatment[1]	Incubation time, day							
	Ammonia				Amines			
	0	3	7	14	0	3	7	14
	ppm							
T1	2±0.3[2,c]	50±6.8[b]	54±6.2[b]	139±15.2[a]	5±0.62[c]	189±18.5[b]	351±44.7[a]	362±40.2[a]
T2	2±0.4[c]	43±4.9[b]	42±6.7[b]	129±14.2[a]	4±0.5[c]	170±16.9[b]	327±48.1[a]	326±47.9[a]
T3	2±0.2[c]	42±5.2[b]	43±7.0[b]	120±15.0[a]	4±0.6[c]	162±17.3[b]	293±45.5[a]	324±45.4[a]

[1] See Table 3.
[2] Mean±SE
[a-c] Means within a row with same superscripts are not significantly different(P>0.05).
[A-C] Means within a column with same superscripts are not significantly different(P>0.05).

Table 7. Effect of probiotics on hydrogen sulfide, ethylmercapthan and methylmercapthan gas emissin in layer excreta

Treatment[1]	Incubation time, days											
	Hydrogen sulfide				Ethylmercapthan				Methylmercapthan			
	0	3	7	14	0	3	7	14	0	3	7	14
	ppm											
T1	2±0.3[2]	4±0.6	3±0.4	6±0.4	0±0.0[b]	15±3.1[a]	8±0.4[b]	7±1.2[b]	2±0.4[b]	11±1.4[a]	23±0.4[b]	8±0.6[b]
T2	2±0.2	3±0.6	4±0.3	5±0.4	0±0.0[b]	13±2.3[a]	6±0.4[b]	8±1.3[b]	3±0.3[b]	8±1.3[a]	19±0.5[b]	8±0.4[b]
T3	2±0.3	3±0.3	4±0.3	4±0.4	0±0.0[b]	13±2.1[a]	6±0.4[b]	2±0.3[a]	2±0.3[b]	10±1.4[a]	13±0.5[b]	6±0.5[b]

[1] See Table 3.
[2] Mean±SE
[a-b] Means within a row with same superscripts are not significantly different(P>0.05).
[A-B] Means within a column with same superscripts are not significantly different(P>0.05).

이 제공한 조건에서는 발현되기 어려운 것으로 사료된다.

ethylmercapthan의 농도는 배양일수의 경과에 따른 변화를 보면 배양 제3일째에 유의하게 증가하였고, 그 이후 제7일째에 유의하게 감소하여 제14일까지 유의한 변화 없이 지속되고 있다. 그리고 처리별 변화는 유의한 차이를 나타내지 않았다. methylmercapthan의 수준에 있어서는 배양 0, 3, 7, 14일에 있어, 제7일째에 유의하게 가장 높은 수준을 유지하였고 0, 3 및 14일째는 유의하게 낮은 수준을 유지하였으며 처리간에 유의한 성적은 보이지 않았다.

Bacillus subtilis PNG-4(BS)/*Lactobacillus acidophilus* LAS(LA) 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4(BS) 단일균주액을 배설물에 살포하였을 때의 악취성분의 변화는 실험1에서의 닭에 급여하였을 때의 결과와 비교하면, 배설물에 대한 살포시의 악취 저감 능력이 저하되는 것으로 생각된다.

Ⅳ. 결 론

본 시험은 *Bacillus subtilis* PNG-4와 *Lactobacillus acidophilus* LAS의 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4 단일균주의 악취저감효과를 조사하기 위하여 실시되었다. 실험1에서는 생균제의 첨가 종류 및 수준이 배설물 악취성분, 고형물 대사율 및 혈액성분에 미치는 영향을 조사하기 위하여 하이라인 산란계 30수를 사용하였다. 시험설계는 대조구, 혼합균주 2수준, 단일균주 2수준의 5처리에 3반복, 반복당 2수로 하였다. 실험 2에서는 생균제를 축분에 살포하였을 때의 악취성분의 농도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실시하였다. 사용 균종은 실험 1에서 사용한 균주와 같으며, 실험설계는 3처리(무처리구, 혼합균주구, 단일균주구), 3반복, 반복당 2수로 하였다. 악취물질의 농도 측정은 배양 0, 3, 7, 14일째에 실시하였다.

실험 1에서, 배설물의 암모니아 농도의 시일 경과에 따른 변화는 배양 제3일은 제0일에 비하여 유의하게 증가하였고, 제14일째는 제7일째에 비하여 유의하게 증가하였다. 처리구간의 변화는 0, 3 및 제7일째에는 유의한 차이가 나타나지 않았고 제14일 째는 혼합균주, 단일균주, 대조구의 순으로 유의하게 낮게 나타났다. 아민의 농도는 제7일째까지는 일수가 경과함에 따라 유의하게 증가하였으나 제7일째 이후 제14일째와는 유의한 변화를 확인할 수 없었다. Ethylmercapthan의 농도는 배양 제3일째 배출량이 개시 시와 제7 및 14일에 비하여 유의하게 많아졌고, 생균제 첨가구가 무첨가구에 비하여 유의하게 감소하는 결과였으나 첨가균종 및 수준간의 유의성은 없었다. Methylmercapthan의 농도 또한 배양 제3일째 배출량이 개시 시와 제7 및 14일에 비하여 유의하게 많아졌고, 각 처리구간의 유의한 결과는 발견되지 않았다. 고형물 대사율은 혼합균주구가 대조구에 비하여 유의하게 높게 나타났다. 단일균주구는 대조구보다는 높고 혼합균주구보다는 낮게 나타났으나 이들과 유의한 차이는 아니었다. 각 시험구의 RBC, WBC 및 Lymphocyte의 변화는 유의한 차이가 없었다.

실험 2에서, 배설물 암모니아 농도는 시험 개시 시와 제3일째, 제7일째와 제14일째에는 유의적인 증가가 있었으나 제3일째와 제7일째는 유의한 차이가 인정되지 않았다. 아민에 있어서는 실험 개시 시보다 제3일째 및 제7일째로 진행되면서 유의한 증가가 있었으나, 제7일째와 제14일째의 결과는 유의한 차이가 없었다. Ethylmercapthan의 농도는 배양 제3일째에 유의하게 증가하였고, 그 이후 제7일째에 유의하게 감소하여 제14일까지 유의한 변화 없이 지속되고 있다. Methylmercapthan의 수준에 있어서는 배양 제7일째에 유의하게 가장 높은 수준을 유지하였고 0, 3 및 14일째는 유의하게 낮은 수준을 유지하였으며 처리구간의 유의성은 보이지 않았다.

본 시험에서의 *Bacillus subtilis* PNG-4와 *Lactobacillus acidophilus* LAS 혼합균주 및 *Bacillus subtilis* PNG-4 단일균주의 첨가 급여는 분 중의 암모니아 방출량을 감소시키고 ethylmercapthan의 방출을 완화하는 효과가 있었으며, 복합균주가 단일균주보다 암모니아 배출량의 감소효과가 우수하였다. 고형물 대사율에 있어서도 혼합균주가 효과적으로 나타나, 단일균주보다는 혼합균주가 악취저감과 생산성 향상에 효율적인 것으로 생각된다. 혼합균주 및 단일균주액을 배설물에 살포하였을 때의 악취성분의 변화는 닭에 급여하였을 때의 결과와 비교하면, 배설물에 대한 살포시의 악취 저감 능력이 저하되는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Bloksma N., Ettekoven H., Hothuis F. M., van Noorle-Jansen L, De Reuver M. J.. Kreeflenberg J. G. and Willers J. M. 1981. Effects of *Latobacillus* on parameters of non-specific resistance of mice. Med. Microbiol. Immunol. 170:45-53.
2. Collington G. K., Parker D. S., Elis M. and Armstrong D. G. 1988. The influence of probios or tyrosine on growth of pigs and development of gastrointestinal tract. Anim. Prod. 46:521 (Abstr.).
3. Duncan D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. Biometrics. 11:1-42.
4. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. 66:365-378.
5. Gilliland S. E. and Kim H. S. 1984. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in human. J. Dairy Sci. 67:1-6.
6. Jonsson E. and Conway P. 1992. Probiotics for pigs. In: R. Fuller(Ed.) Probiotics: The Scientific Basis. Champman & Hall, London. pp. 260-316.

7. Koo J. H., Choi I. J., Nam S. H., Lee H. J., Shin Z. I. and Oh T. K. 1997. Medium optimization for production of thermostable alkaline proteases from Bacillus licheniformis NS70, Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25(2):207-211.
8. Lee S. J., Chang D. I. and Chang H. H. 2006. Effect of biofilter made of composted pine tree bark and perite on reducing odor from pif house. Kor. J. Environ. Agr. 25(2):118-123.
9. Lessard M. and Brisson G. J. 1987. Effect of a Lactobacillus fermentation product on growth, immune response and fecal enzyme activity in weaning pigs. Can. J. Anim. Sci. 67:509.
10. Perdigon G, Nader de Macias M. E., Alvarez S., Oliver G. and Pesce de Ruiz Holgado A. A. 1987. Enhancemet of immune response in mice fed with *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus acidophillus*. J. Diary Sci. 70:919-926.
11. Saitou N.. and Nei M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for instructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
12. Santoso U., Ohtani S., Tanaka K. and Sakaida M. 1999. Dried *Bacillus subtillis* culture ammonia gas release in poultry house. Asian-Aus. J. Anim. Sci. 12:806-809.
13. Scheuermann S.E. 1993. Effect of the probiotic paciflor on energy and protein metabolism in growing pigs. Anim. Feed Sci. Technol. 41:181.
14. Thomson J. D., Higgins D. G. and Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22:4673-4680.
15. Timmerman H. M., Koning C. J., Mulder L., Rombouts F. M. and Beynen A. C. 2004. Monostrain, multistrain and multispecies probiotics: A comparison of functionality and efficacy. Int. J. Food Microbiol. 15;96:219-233.
16. Tortuero F. and Femandez E. 1995. Effects of inclusion of microbial cultures in barley-based diets fed to laying hens. Anim. Feed Technol. 53:255-265.
17. Underdahl N. R., Torres M. A. and Dost A. R. 1982. Effect of *Streptococuus faecium* C-68 in the control of *Escherichia coli*. indused diarrhea in gnotobiotic pigs. J. Vet. Res. 43:227-233.
18. 太田欽幸, 池田貢, 逸見良則. 1979. 鶏はふんの微生物による急速無臭化. 日本 醱酵工學會誌. 57(5):372-379.
19. 고영두, 신재형, 김삼철, 김영민, 박기동, 김재황. 2003. 복합 생균제첨가가 육계 생산성, 유해가스 발생량 및 맹장 내 균총에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지. 45(4): 559-568.
20. 김상호, 박수영, 유동조, 이상진, 강보석, 최철환, 류경선. 2000. 유산균의 첨가 급여가 산란 생산성, 소화기관 미생물 변화 및 계란 품질에 미치는 영향. 한국가금학회지. 27:235-242
21. 김재황, 김영민, 김삼철, 하홍민, 고영두, 김창현. 2001. 복합생균제(Economix®)의 사료 내 첨가가 육계의 생산성 및 계사 내 유해가스 감소에 미치는 영향. 한국동물자원과학회지. 43(1):349-360.
22. 김소영, 노용호, 강성각, 김영범, 장우진, 김동준, 윤현식. 2007. *Bacillus subtilis* IB101을 이용한 암모니아 가스 제거 및 생산배지 최적화. 한국생물공학회지. 22(3):162-167.
23. 라정찬, 한혜정, 송지은, 2004. 백년초 혼합 생균제를 이용한 돼지 및 육계에서의 생산성 향상과 환경개선 효과. 한국수의공중보건학회지. 28(3): 157-167.
24. 최우영, 이수기, 장동일, 2004. 축산 악취경감을 위한 친환경적 생물학적 시스템의 개발. 농림부.
25. 환경부. 2005. 악취방지법. 환경부.