

## 토착미생물별 가축분 퇴비화 과정중 생물화학적 특성 변화

한효심 · 이경동<sup>1\*</sup>

순천대학교 생물환경학과, <sup>1</sup>동신대학교 한약재산업학과

### Changes of Biological and Chemical Properties during Composting of Livestock Manure with Isolated Native Microbe

Hyo-Shim Han and Kyung-Dong Lee<sup>1\*</sup>

Department of Bio-Environment & Chemistry, Sunchon National University, Suncheon, 540-742, South Korea

<sup>1</sup>Department of Oriental Medicine Materials, Dongshin University, Naju, Jeonnam, 520-714, South Korea

In order to produce high-quality fermenting composts, bacteria strains with high activities of extracellular enzymes (cellulase, chitinase, amylase, protease and lipase) were isolated from the soils in 6 provinces of Korea, and characterized by 16S rRNA gene sequence analysis and properties. The selected 7 stains inoculated to livestock manure for 2' fermenting time, and experimental treatment divided into 3 groups, B1, B2 and B3, according to microbial activity and enzyme type. Our results showed that microbe applications (B1, B2 and B3) can increase ( $p<0.05$ ) both rhizomes (17-38%) and enzyme activities (50-81%) in compost after fermenting time, respectively, compared to non-microbe treatment (control). The microbe application also decreased significantly ( $p<0.05$ ) the  $\text{NH}_3$  and  $\text{H}_2\text{S}$  gas contents 13.4 and 27.3% compared with control, and the Propionic acid and Butyric acid gas contents 14.5 and 19.6%, respectively, as compared to the control. The microbial degradation rate (%) of pesticides and heavy metals increased significantly ( $p<0.05$ ) after fermenting time, respectively, as compared to the control. Especially, microbe applications were more effective in total rhizomes yields and bioactivities than non-microbe treatment. Thus the results of this study could help in development of potential bioinoculants and composting techniques that maybe suitable for crop production, and protectable for earth environment under various conditions.

**Key words:** Compost, Microbe, Enzyme, Livestock manure, Fermentation

## 서 언

최근 축산업의 규모가 대형화되고 전업화가 가속화되어 다량의 축산분뇨가 발생하고 있으나 이를 적절히 처리하지 못해 환경적 오염이 가속화 되고 있다. 현재의 농업은 자연 농업 또는 유기농이 대세로 급속하게 진행될 것으로 사료되며, 환경오염이 될 소지가 있는 축산분뇨를 활용하여 화학 비료의 대용으로 사용하기 위하여 발효과정을 거치거나 미생물제제를 제조하여 활용하려는 노력들을 하고 있다 (Ham et al., 2010; Han et al., 2010). 국내·외를 막론하고 가축분뇨는 수질오염이나 악취를 일으켜 환경 오염원이 되고 있다 (Hanrahan, 1989; Tyrrell et al., 1988; Van Weerden, 1987). 현재 우리나라의 가축분뇨 발생량은 연간 46,534천 톤이며, 이중 양돈분뇨가 전체 38%인 17,843천 톤을 차지하고 있으며 (MAFF, 2010; Go et al., 2012), 또한 해양 오염방지에

관한 국제협약이 올해부터 발효되어 약 4천만톤의 돈분뇨가 자원화과정 등에 의해서 처리되어야 하는 현실에 직면해 있다. 최근 시화호, 당진의 대호간척지, 화성의 간척지 등에 돈분액비 및 분뇨를 사용하여 사료작물, 조경수 등의 수량 증대 및 화학비료 절감효과 등이 보고 (Park et al., 2008; Jo et al., 2010) 되고 있다. 일반적으로 퇴비화의 초기조건은 C/N비와 수분, 온도, 미생물이 중요한 요인이며 (Jeong et al., 1999; Tchobanoglous et al., 1993), 음식물쓰레기, 농산부산물 등에 효모와 고온성 세균, 유산균 등을 첨가하거나 축진미생물을 넣으면 퇴비화가 촉진됨을 보고 (Hong and Park, 2009; Han et al., 2010)하였다. 특히 퇴비화가 진행되고 있는 동안 cellulose 분해균인 *Trichoderma harzianum*의 처리는 4-12주 까지 퇴비화를 단축시키는 것으로 알려져 있다 (Misra et al., 2003). 이와 같이 기능성을 가진 미생물을 활용한다면 난분해성 부산물의 퇴비화가 가능하고 또는 가축분으로 인한 환경오염을 감소시킬 수 있는 계기가 될 것이다. 따라서 본 연구에서는 퇴비화를 기능적으로 촉진시키거나 또는 다기능적인 역할을 할 수 있는 토

접수 : 2012. 11. 30 수리 : 2012. 12. 12

\*연락처 : Phone: +82613303261

E-mail: leek-d@hanmail.net

착미생물을 활용하여 현재의 퇴비화 속도보다 향상되고 가능성이 뛰어난 발효퇴비를 제조하고자 하였다.

## 재료 및 방법

**토양미생물의 분리** 토착미생물의 분리는 2010년 2-12월까지 전국 6개 도의 17개 시·군에서 513점의 토양시료를 채취하여 확보하였다 (Table 1). 또한 천연배지인 고두밥과 미강 및 비지에 흑설탕을 1:1로 섞어 망사에 넣은 다음 대나무와 낙엽수림 밑에서 부엽토로 덮어 7일간 방치한 후 세균, 방선균, 유산균을 추가로 분리하였다. 분리배지로는 방선균은 starch-casein 한천배지 (Kuster and williams, 1966), 효모균은 YM배지 (yeast extract 3%, malt extract 3%, peptone 5g, dextrose 10%)를, 유산균배지로는 MRS (*Latobacillus* MRS broth, Difco)로 사용하여 분리하였다. 내열성 *Bacillus*균의 분리배지는 PBY (1.0% polypeptone, 0.5% beef extract, 0.2% NaCl, 0.05% yeast extract) 배지를 기본으로 설탕을 첨가하였으며, 일반적인 분리배지는 LB배지 (tryptone 10%, yeast extract 5%, sodium chloride 10%)를 사용하였다. 배양 온도는 22-55°C에서 24시간 동안 BOD 배양기에서 배양하였다. 배양된 균주는 멸균된 tooth pick을 사용하여 균주를 확보하였고 단일 콜로니를 얻기 위하여 순수분리한 후 glycerol stock하여 -70°C에서 보관하였다.

**균주의 동정** 분리균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위해 bacteria에 특이적으로 부착하는 27F (*E. coli* numbering - ; 5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (*E. coli* numbering 1492-1510; 5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하였다 (Lane, 1991). Temperature cycling은 GenAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystem)을 이용하여 pre-denaturation 과정을 94°C에서 3분간 수행하고, denature (94°C, 30초), annealing (50°C, 30초), elongation (72°C, 40초) 반응을 총 30회 반복하고 post-elongation (72°C, 10분)을 수행하였다. 유전자 서열분석용 primer는 800R, 518F 및 1055F를 사용하며, 염기서열 분석은 capillary 방식의 ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)을 사용하였다. Sequencing kit는 ddNTP에 형광물질 label 방식인 BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem)을 사용하였고, 반응조건은 96°C에서 10초, 50°C에서 5초, 60°C에서 4분 (25 cycles)으로 하였다. 염기서열간의 유사도를 확인하기 위하여 NCBI의 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 및 EzTaxon server (<http://147.47.212.35:8080>)을 이용하였다. 결정된 염기서열과 database에 얻어진 염기서열은 PHYDIT program (ver 3.2; <http://plaza.snu.ac.kr/~jphydit/phydit>)을 이용하여 Clustal W multiple alignment로 정렬하여 계통수 제작에 이용하였다. 염기서열간 유전적 거리는 Jukes & Cantor distance model로 사용하여 추정하며,

**Table 1. Number of sampling area and isolated microorganism.**

	Sampling site	No. of samples	Total isolated strains	Selected strains
Jeollanam-do	Goheung-gun	12	150	6
	Gwangyang-si	15	135	58
	Gurye-gun	56	400	117
	Naju-si	84	470	234
	Sunchon	116	750	219
	Wando-gun	4	55	19
	Yeonggwang-gun	4	30	2
	Hwasun-gun	11	80	24
Jeollabuk-do	Iksan-si	28	140	151
Jeju-do	Seogwipo-si	22	250	190
	Andong-si	73	400	188
Gyeongsangbuk-do	Yeongcheon-si	2	170	146
	Uiseong-gun	13	75	20
	Pohang-si	26	200	80
Chungcheongbuk-do	Cheongju-si	2	21	1
Chungcheongnam-do	Dangjin-gun	29	190	131
	Seosan-si	16	240	151
Total		513	3,756	1,737

Neighbor-joining method로 계통수를 작성하였다.

**분리균주의 효소활성** 분리된 균주의 활성정도를 확인하기 위해 섬유소, 키틴, 전분, 고분자, 단백질 분해효소의 분해능을 확인하였다. 실험방법으로 섬유소 분해균은 CMCCase의 활성도는 DNS방법 (Miller, 1959; Lee et al., 1999)에 의하여 CMC로부터 유리된 환원당을 측정하여 분석하였다. 효소의 활성도 1.0 unit는 CMC를 기질로 하여 50°C 조건 하에서 1분 동안에 1.0  $\mu\text{mol}$ 의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. 전분분해효소인  $\alpha$ -amylase는 0.5% soluble starch (Merck)와 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)를 사용하였고, 1.0 unit는 위와 동일한 조건에서 1분 동안에 1.0  $\mu\text{mol}$ 의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다 (Haddaoui et al., 1995; Tonkova et al., 1993). 키틴 분해균은 colloidal chitin을 기질로 하여 assay를 수행하였으며, 표준물질은 N-acetyl-D-glucosamine (NAG, Sigma A8625)를 이용하여 측정하였다 (Kim et al., 2010). 효소의 활성도 1 unit는 colloidal chitin을 기질로 하여 최적온도 조건 하에서 1분 동안에 1  $\mu\text{mol}$ 의 NAG에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. Protease 분비능은 2% skim milk를 첨가한 NA배지에 균주를 접종하여 35°C에서 48시간 배양하고 집락 주위의 clear zone을 관찰하였다 (Kunitz, 1947). Lipase 분비능은 1% tributyrin을 첨가한 NA배지에 균주를 접종하고 35°C에서 48시간 배양한 후 균 주위의 clear zone을 관찰하였다 (Oh et al., 2010). Auxin 생산시험은 세균을 stationary phase까지 배양한 다음 배양액을 10,000 g에서 원심분리하여 균주를 침강시킨 후 상등액을 5 mL를 Salkowski reagent 10 ml에 반응시킨 후 30분간 방치한 다음 535 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Frankenberger and Bruner, 1983). HPLC 분석은 revers-phase에서 수행하였고, 분석 여건은 검출기 254 nm, 컬럼 Hypersil- ODS ( $\text{C}_{18}$ ), 이동상  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (60:40, acidified to pH 3.5 with  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), 유량속도는 1 mL  $\text{min}^{-1}$ 이었다. 효소액의 식물 생육 촉진 효과로는 분리균주가 생산하는 효소를 콩에 처리하고 콩의 생육촉진 효과를 검정하기 위하여 표면 살균하고 petri-dish에 각 10개의 종자를 치상하였다. 이때 미리 배양해둔 분리균을 원심분리하여 상층액을 적당히 희석하여 petri-dish에 접종한 다음 25°C 암실에서 18시간 방치한 다음 6시간마다 발아율을 측정하였다. 그리고 포트시험에서는 살균된 콩 종자를 트레이에서 키워 이식시킨 후 분리미생물을  $1 \times 10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  이상이 되도록 접종하여 유리온실 내에서 75%의 습도, 온도 25°C를 유지 시켜주었으며, 흐린 날은 나트륨등을 켜주었다. 시험구 배치는 난괴법 3반복으로 처리하였고, 균주 접종 후 30일째에 대두를 수확하여 생육특성을 조사하였다.

**퇴비의 제조** 돈분 (SM), 계분 (PM), 페버섯배지 (MW)를 각각 45, 15, 30%의 비율로 혼합하고, 섬유소, 전분, 단백질, 지방 분해능이 우수한 미생물을 분리된 미생물이 함유된 생균제 10%를 첨가하여 퇴비화를 유도하였다. 생균제는 비지, 미강, 당밀이 함유된 배양배지로 미생물의 함량은  $1.0 \times 10^6$  CFU  $\text{mL}^{-1}$  이상으로 제조하여 사용하였다. 처리구는 미생물 특성별 및 효소생성량을 기준으로 3개의 처리구를 디자인하였다. B1처리구의 미생물의 종류는 *B. subtilis* (O-407), *B. licheniformis* (O-524), *B. cereus* (CE), *B. amyloliquefaciens*, *B. mariflavi* (O-93), *B. altitudinis* (O-526), *B. tequilensis* (O-101), *Rhizobium leguminosarum*으로 8종, B2 처리구는 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *Paenibacillus pabuli*, *Providencia vermicola* (O-320), *Saccharomyces cerevisiae*, *Nitrosomonas europaea*으로 8종, B3 처리구는 *B. subtilis*, *B. mariflavi*, *Acetobacter fabarum*, *Serratia quinivorans*, *Pichia deserticola*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Nitrosomonas europaea*으로 7종이 함유되어 있다. 퇴비화과정 중 퇴비의 배양조건은 퇴비사에서 10일 간격으로 3번 뒤집어주고 30일째에 미리 제조된 생균제를 총 양의 10%가 되게 하여 혼합한 다음 20일간 더 발효하였다.

**퇴비화 과정 중 이화학 및 미생물적 성분변화** 채취된 공시퇴비 시료의 화학성 분석은 농촌진흥청 표준분석법 (NIAST, 2000)에 준하여 실시하였으며, 시험전과 후의 분석시료는 음건한 다음 2 mm체를 통과시켜 유기물과 전질소 분석하였다. 퇴비화 과정 중에 퇴비의 부숙을 촉진하는 미생물들의 밀도를 조사하기 위해 채취한 시료는 바로 멸균용 비닐봉기에 넣어 냉장 보관하에서 실험실로 가져왔으며, 희석평판법을 사용하여 당일 내로 해당 배지에 도말하였다. 이때 사용된 배지종류로는 호기성 세균의 분리배지인 yeast glucose 한천배지 (James, 1958), 방선균은 starch-casein 한천배지 (Kuster and Williams, 1966), 사상균은 streptomycin이 함유된 rose bengal 한천배지 (Martin, 1950)에 도말하였고, 배양조건은 세균과 방선균은 28°C, 사상균은 25°C에서 배양 후 계수하였다.

**식물보호제 분해 및 중금속 경감시험** 분리된 균주를 함유한 퇴비를 토양 및 축사에 넣고 농약의 분해정도 및 중금속의 경감정도를 조사하였다. 사용된 농약은 Procymidone, Fluquinconazole, Isoprothiolane이였으며, 가스크로마토그래프 (GC, 2010 plus, Sumadzu)를 이용하여 분석하였다. 분석조건은 컬럼 henomenex DB5, 시료량은 1  $\mu\text{L}$ , 가스는  $\text{N}_2$  ( $60 \text{ mL min}^{-1}$ ), 주입온도는 250°C (split mode 50:1), 컬럼온도는 80-300°C (4분), 검출기는 ECD (320°C)였다. 사용된 중금속은 비소, 카드뮴 등이 함유된 유해중금속으로,

농촌진흥청 표준분석법 (NIAST, 2000)에 준하여 실시하였다.

**암모니아 가스**와 **휘발성 지방산 함량** 변화 퇴비화 과정내 암모니아 (NH<sub>3</sub>)와 황화수소 (H<sub>2</sub>S) 악취가스의 농도를 측정하기 위하여 1차 발효가 끝날 것으로 예상되는 30일 이후에 미생물계제를 처리하고 10일 간격으로 시료를 채취 하였다. 암모니아와 황화수소 가스는 시료 200 g에 1 L 부피의 밀봉된 플라스틱 용기에 넣고 24시간 발효시킨 후, 실온에서 30일 동안 보관하면서 Gas analyser (GA2000, Geotechnical instruments, UK)와 Gastec (Gastec, Japan)으로 측정하였다. 휘발성 지방산은 퇴비를 5 L짜리 배양병에 담고 가스채취용 마개를 닫는 후 12-36시간 방치한 다음 propionic acid과 butyric acid의 함량을 가스크로마토그래피 (GC, 2010plus, Sumadzu Co.)로 분석하였다. 분석조건으로는 검출기는 FFAP, 컬럼의 온도와 유출량은 각각 10-150°C와 45 ml min<sup>-1</sup>였고, 이동상은 N<sub>2</sub>가스로 분석하였다.

**통계처리** 모든 데이터는 통계 프로그램인 CoStat software

(CoHort Software, Monterey, USA)를 사용하여 변이들을 분석하였으며, 모든 처리는 3반복으로 하였다. 각 처리 및 시료군에 대한 유의차 검정은 분산분석을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 최소유의차 검정 [least significant difference (LSD)]을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

**토착미생물의 분리특성 및 활성** 토착미생물의 분리는 전국의 6개 도, 17개 시·군에서 총 513점의 시료를 확보하여 1,837개의 토착미생물을 분리한 내역을 Table 1에 나타내었다. 몇 단계의 선별과정을 통하여 다양한 활성을 가진 50여개의 분리균을 확보하고, 이를 동정하기위해 생화학적 특성정보 확보와 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후, 염기서열의 계통 분석을 통하여 동정한 결과 Table 2에 제시된바와 같이 세균 26종, 방선균 3종, 효모 1종, 질소고정균 4종, Gammaproteo bacteria 18종 등으로 동정되었다. 동정된 미생물들은 세균류가 주류를 이루고 있었고, 동일성

**Table 2. Identification of the isolated strains.**

Strain Name	Phylum or Class	Nearest type strain (EzTaxon server)	Accession no.	Similarity	nt/difference	Total nt	Identification
O-332	Actinobacteria	<i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651(T)	AB279889	99.93	1/1452	1458	<i>Arthrobacter oryzae</i>
C-15	Actinobacteria	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> IFO 15077(T)	AB004722	98.89	16/1437	1459	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>
C-4	Actinobacteria	<i>Promicromonospora aerolata</i> V54A(T)	AJ487302	99.12	12/1369	1437	<i>Promicromonospora</i> sp.
EM-2	Alphaproteobacteria	<i>Acetobacter fabarum</i> 985(T)	AM905849	100.0	0/1417	1427	<i>Acetobacter fabarum</i>
USD-3	Alphaproteobacteria	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> LMG 6138(T)	X66024	100.0	0/1416	1425	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
C-128-C	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370(T)	U29386	99.79	3/1410	1418	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
C-175-G	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobium leguminosarum</i> USDA 2370(T)	U29386	99.79	3/1410	1418	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
CE	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	AE016877	99.87	2/1488	1489	<i>Bacillus</i> sp.
D-11	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	AE016877	99.87	2/1488	1489	<i>Bacillus</i> sp.
NEB17	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	AE016877	100.0	0/1488	1489	<i>Bacillus cereus</i> .
SM1	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	AE016877	100.0	0/1488	1489	<i>Bacillus cereus</i>
SM2	Firmicutes	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579(T)	AE016877	100.0	0/1488	1489	<i>Bacillus cereus</i>
C-13	Firmicutes	<i>Bacillus thuringiensis</i> ATCC 10792(T)	ACNF01000156	100.0	0/1496	1496	<i>Bacillus thuringiensis</i>
BB1	Firmicutes	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366(T)	X60616	99.37	9/1419	1502	<i>Bacillus firmus</i>
BB2	Firmicutes	<i>Bacillus firmus</i> NCIMB 9366(T)	X60616	99.36	9/1419	1502	<i>Bacillus firmus</i>
C-19	Firmicutes	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(T)	CP000002	99.87	2/1500	1501	<i>Bacillus licheniformis</i>
O-335	Firmicutes	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717(T)	AB271743	99.79	3/1476	1482	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
O-333	Firmicutes	<i>Paenibacillus pabuli</i> JCM 9074(T)	AB073191	99.60	6/1481	1491	<i>Paenibacillus pabuli</i>
O-334	Firmicutes	<i>Paenibacillus pabuli</i> JCM 9074(T)	AB073191	99.59	6/1481	1491	<i>Paenibacillus pabuli</i>
O-80	Firmicutes	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771(T)	EU138487	99.86	1/1168	1476	<i>Bacillus</i> sp.
O-93	Firmicutes	<i>Bacillus mariflavi</i> TF-11(T)	AF483624	99.86	2/1473	1477	<i>Bacillus mariflavi</i>
O-101	Firmicutes	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771(T)	EU138487	99.86	1/1168	1476	<i>Bacillus</i> sp.
O-150	Firmicutes	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771(T)	EU138487	99.86	1/1168	1476	<i>Bacillus</i> sp.
O-524	Firmicutes	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(T)	CP000002	99.46	8/1476	1476	<i>Bacillus</i> sp.
O-103	Firmicutes	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771(T)	EU138487	99.86	1/1168	1476	<i>Bacillus</i> sp.
O-132	Firmicutes	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42(T)	CP000560	99.86	2/1424	1424	<i>Bacillus</i> sp.
O-189	Firmicutes	<i>Bacillus tequilensis</i> NRRL B-41771(T)	EU138487	99.86	1/1168	1476	<i>Bacillus</i> sp.

Table 2. Continued.

Strain Name	Phylum or Class	Nearest type strain (EzTaxon server)	Accession no.	Similarity	nt/difference	Total nt	Identification
O-525	Firmicutes	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580(T)	ABQL01000001	99.80	3/1475	1476	<i>Bacillus</i> sp.
O-526	Firmicutes	<i>Bacillus altitudinis</i> 41KF2b(T)	AJ831842	99.93	1/1475	1475	<i>Bacillus</i> sp.
O-407	Firmicutes	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> NCIB3610(T)	ABQL01000001	99.80	3/1475	1475	<i>Bacillus</i> sp.
LP	Firmicutes	<i>Lactobacillus plantarum</i>	GQ461604	99.93	1/1386	1397	<i>L. plantarum</i>
LS	Firmicutes	<i>Lactobacillus salivarius</i>	AF089108	99.93	1/1386	1397	<i>Lactobacillus</i> sp.
O-364	Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter cowanii</i> CIP 107300(T)	AJ508303	99.41	8/1359	1476	<i>Enterobacter cowanii</i>
O-361	Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSM 16688(T)	AJ508302	98.91	16/1467	1476	<i>Enterobacteriaceae</i> sp.
BL	Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter ludwigii</i> DSM 16688(T)	AJ508302	98.91	16/1467	1476	<i>Enterobacteriaceae</i> sp.
A2H	Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter nimipressuralis</i> LMG 10245(T)	Z96077	99.59	6/1460	1474	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>
RL	Gammaproteobacteria	<i>Enterobacter nimipressuralis</i> LMG 10245(T)	AB004749	99.86	6/1460	1474	<i>Enterobacter nimipressuralis</i>
P-1	Gammaproteobacteria	<i>Rahnella aquatilis</i> DSM 4594(T)	AJ233426	99.52	7/1448	1474	<i>Rahnella aquatilis</i>
P-2	Gammaproteobacteria	<i>Rahnella aquatilis</i> DSM 4594(T)	AJ233426	99.52	7/1448	1474	<i>Rahnella aquatilis</i>
P-6	Gammaproteobacteria	<i>Rahnella aquatilis</i> DSM 4594(T)	AJ233426	99.52	7/1448	1474	<i>Rahnella aquatilis</i>
O-368	Gammaproteobacteria	<i>Serratia marcescens</i> subsp. 121(T)	AJ233431	99.86	2/1473	1473	<i>Serratia marcescens</i>
C-2	Gammaproteobacteria	<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4543(T)	AJ233434	99.66	5/1472	1472	<i>Serratia</i> sp.
C-11	Gammaproteobacteria	<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4543(T)	AJ233434	99.66	5/1472	1472	<i>Serratia</i> sp.
C-12	Gammaproteobacteria	<i>Serratia proteamaculans</i> DSM 4543(T)	AJ233434	99.66	5/1472	1472	<i>Serratia</i> sp.
C-3	Gammaproteobacteria	<i>Serratia quinivorans</i> DSM 4597(T)	AJ233435	99.93	1/1474	1474	<i>Serratia quinivorans</i>
C-14	Gammaproteobacteria	<i>Serratia quinivorans</i> DSM 4597(T)	AJ233435	99.93	1/1474	1474	<i>Serratia quinivorans</i>
C-28	Gammaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> e-p10(T)	AJ293463	99.73	4/1485	1493	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
320	Gammaproteobacteria	<i>Providencia vermicola</i> OP1(T)	AM040495	99.59	6/1475	1476	<i>Providencia</i> sp.
362	Gammaproteobacteria	<i>Providencia vermicola</i> OP1(T)	AM040495	99.59	6/1477	1476	<i>Providencia</i> sp.
482	Gammaproteobacteria	<i>Aeromonas eucrenophila</i> NCIMB 74(T)	X60411	99.66	5/1477	1487	<i>Aeromonas</i> sp.
EM1	Yeast	<i>Pichia deserticola</i> NRRL Y-12918	EF550226	99.47	3/557	566	<i>Pichia deserticola</i>

Table 3. Comparison of cellulase, amylase, protease, lipase, chitinase activities and auxin contents from the isolated bacteria.

Selected strains	Extracellular enzyme production					Auxin ppm
	CMCasse	Amylase	Chitinase	Proteinase	Lipase	
	U mL <sup>-1</sup>	U mL <sup>-1</sup>	U mL <sup>-1</sup>	U mL <sup>-1</sup>	U mL <sup>-1</sup>	
O-526	0.73±0.01 <sup>†</sup>	0.32±0.02	0.31±0.01	0.6±0.01	0.2±0.01	48±2.1
CE	0.35±0.01	0.60±0.03	0.25±0.01	1.2±0.03	0.3±0.01	36±1.6
O-524	0.64±0.02	0.78±0.03	0.27±0.01	0.6±0.01	0.3±0.01	42±1.7
O-93	0.39±0.01	0.46±0.02	0.20±0.01	0.4±0.01	0.3±0.01	25±1.2
O-407	0.74±0.02	0.86±0.02	0.20±0.01	1.2±0.08	0.5±0.02	41±1.0
O-101	0.85±0.03	0.95±0.03	0.29±0.01	1.2±0.06	0.5±0.01	48±1.3
O-320	0.26±0.02	0.38±0.03	0.20±0.01	0.1±0.01	0.2±0.01	35±1.1

<sup>†</sup>Treatment means are with ±S.E. of three replications (n=3).

이 98–100%인 것으로 조사되었다. 분리된 균주를 이용하여 섬유소, 전분, 단백질, 지방을 분해하는 균주의 생리활성을 측정하고 Table 3에 제시된바와 같이 *B. subtilis* (O-407), *B. tequilensis* (O-101), *B. licheniformis* (O-524)를 선별하였고, 키틴올리고머를 잘 분해하는 균주로는 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. cereus* (CE), *B. tequilensis*, *B. altitudinis* (O-526) 등이 있었다. 농약 분해균으로는 *B. cereus*, *B.*

*tequilensis*, *Providencia vermicola* (O-320)와 오옥신 분해 균으로는 *B. mariflavi* (O-93), *B. subtilis*, *B. altitudinis*, *B. tequilensis*, *B. cereus*, *B. licheniformis* 등을 선별하였다. 이들 대부분의 균주들은 한두 개의 생리활성을 가지고 있는 것이 아니라 복합적인 활성이 존재하는 것으로 조사되었다. O-101과 O-407의 경우, 다른 선발균주에 비하여 섬유소분해, 전분분해 등 전반적으로 다기능적인 활성을 가진

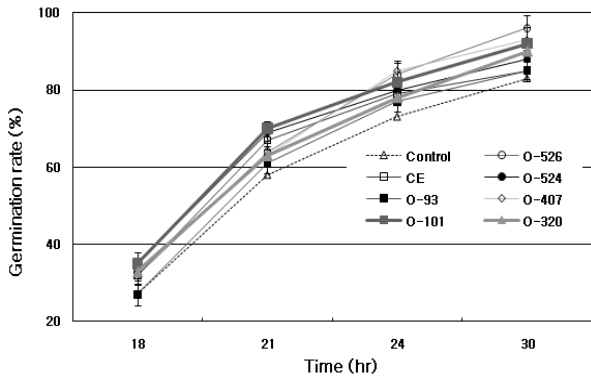
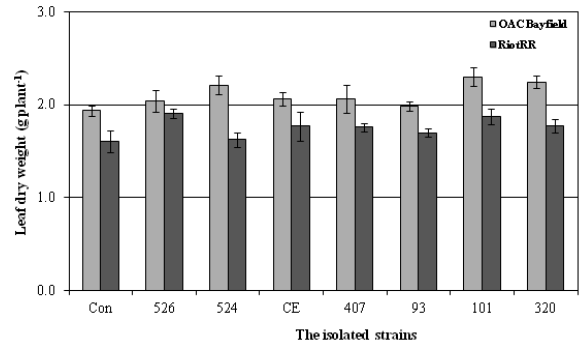


Fig. 1. Germination rate of soybean affected by the isolated strains. Treatment means are with  $\pm$ S.E. of three replications ( $n=3$ ).

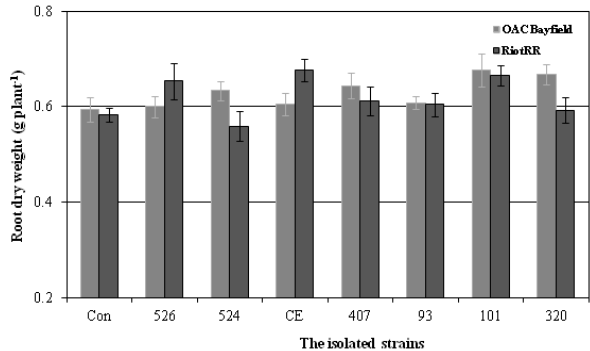
것으로 확인되었다. 이는 Han et al. (2010)에서 하나의 미생물은 여러가지 활성을 나타낼 수 있는 능력이 있으며, 또한 다양한 생물학적 기능성을 부여한다는 보고와 유사하였다.

**대두 발아율과 건물수량** 선발된 균주를 대상으로 식물생장촉진 효과를 조사하기 위해 대두의 발아율을 실험한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 21시간이후 물을 사용한 대조구보다 분리된 균주의 체외 효소를 이용한 처리구에서 발아율이 약 8.6-20.7%가 증가하였다. 그 중에서 O-526, O-101 등의 균주가 발아율이 높았으며, 이는 분리된 균주에서 활성화합물이 생성되어 대두의 발아율에 영향을 미쳤다는 것을 알 수 있었다. 포트실험에서 대두 품종별로 분리된 균주를 접종하고 30일후 수확하여 잎과 줄기의 건조무게를 측정한 결과 Fig. 2에 보는 바와 같이 분리균을 접종한 지상부는 분리균을 접종하지 않는 상태의 대조구에 비하여 건물중의 증수효과가 있었고, 균주 O-524와 O-101 등은 유의한 수준이었다 ( $p<0.05$ ). 뿌리의 건조중 또한 지상부의 무게와 비슷한 경향을 보여 주었으나 O-101, O-524와 CE균주는 RiotRR의 뿌리가 대조구와 차이가 있음을 알 수 있었다.

**퇴비화 동안의 온도변화와 활성균주 처리** 돈분, 계분, 폐버섯배지를 넣고 두엄형태로 쌓아 50일까지 두엄의 온도를 실시간으로 측정된 결과 Fig. 3에 보는바와 같이 1차 발효가 일어나는 20일까지의 온도가 65-76°C 정도여서 선발된 균주를 접종한다면 정상적인 생육이 어려울 수 있어 1차 발효가 끝나는 시점에 분리 균주를 접종하여 2차 발효를 20일간 유도하였다. 2차 발효가 끝난 퇴비는 물리적으로 부드럽고 냄새가 나지 않는 장점을 지니고 있어 전체적으로 분리균을 접종하지 않는 대조구에 비하여 발효퇴비의 품질이 양호하였다. 2차 발효과정 중 10일째 총 탄소, 총 질소 및 C/N율은 Table 4에서 보는 바와 같이 유의성 ( $p=0.05$ )이 없었으나 20일째 무기성분의 두드러진 변화는 총 탄소의 함



(a)



(b)

Fig. 2. Dry weight (a: leaf and b: root) of two soybean cultivar affected by the isolated strains. Treatment means are with  $\pm$ S.E. of three replications ( $n=3$ ).

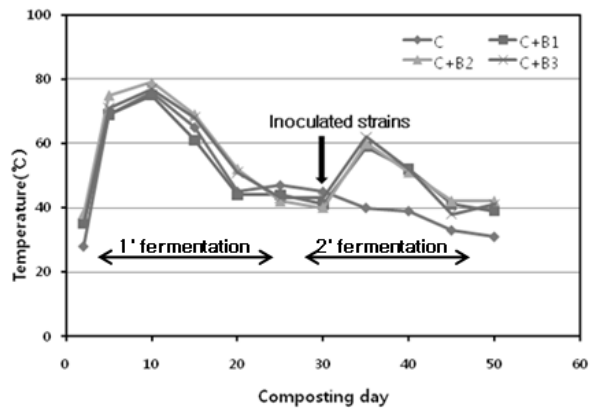


Fig. 3. Change of temperature by the inoculated strains in compost during composting time.

량이 대조구보다 17.2-26.3% 감소하였는데 ( $p<0.05$ ) 이는 섬유소, 키틴, 전분 분해 등 활성이 뛰어난 토착미생물의 왕성한 활동에 기인한 것으로 판단되었다. 섬유소분해 활성은 C+B1, C+B2, C+B3 모든 처리구가 대조구보다 유의성 ( $p<0.05$ ) 있게 차이가 있었으며, 특히 C+B3처리구가 가장 높았다. 그러나 전분분해효소와 키틴분해효소와의 차이는 발생하지 않았다. 완속퇴비를 결정하는 요인들 중에 하나는 C/N율인데 보통 20이하여야 한다. Lim et al. (1991)은 C/N율이 낮으면 질소가 암모니아로 휘산되어 질소부족이 야기

**Table 4. Change of C/N ratio by the inoculated strains in compost during 2' composting time.**

Composting day (2' composting)	Treatment	T-C	T-N	C/N ratio
----- g kg <sup>-1</sup> -----				
10	C	27.6	1.21	22.8
	C+B1	28.5	1.28	22.3
	C+B2	28.6	1.24	23.1
	C+B3	28.1	1.28	22.0
	LSD <sub>0.05</sub> <sup>†</sup>	ns	ns	ns
20	C	23.2	1.18	19.7
	C+B1	18.3	1.09	16.8
	C+B2	17.7	1.12	15.8
	C+B3	19.1	1.08	17.7
	LSD <sub>0.05</sub>	1.1	ns	1.2

<sup>†</sup>Means separation within columns by LSD at 5% level ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )

**Table 5. Changes of microbial population by the inoculated strains in compost during 2' composting time.**

Innoculated day	Treatment	Bacteria ×10 <sup>9</sup> cfu ml <sup>-1</sup>	Atinomyces ×10 <sup>7</sup> cfu ml <sup>-1</sup>	Fungi ×10 <sup>6</sup> cfu ml <sup>-1</sup>
0	C <sup>†</sup>	4.9±0.15 <sup>‡</sup>	3.4±0.17	3.2±0.09
10	C	10.5±0.31	7.3±0.14	4.6±0.07
	C+B1	12.9±0.40	8.6±0.15	4.3±0.10
	C+B2	12.6±0.33	9.1±0.09	4.1±0.06
	C+B3	13.1±0.38	8.3±0.14	4.1±0.11
20	C	11.9±0.19	10.2±0.15	4.0±0.12
	C+B1	15.7±0.27	13.9±0.19	3.5±0.06
	C+B2	15.8±0.33	15.8±0.16	3.0±0.08
	C+B3	14.1±0.24	14.1±0.21	3.7±0.09

<sup>†</sup>C, compost; C+B1, compost+probiotics1; C+B2, compost+probiotics2; C+B3, compost+probiotics3

<sup>‡</sup>Treatment means are with ±S.E. of three replications (n=3).

되고 C/N율이 높으면 미생물이 자체성장을 위한 에너지원으로 사용하기 때문에 퇴비화가 지연됨으로 유기성폐기물의 퇴비화는 C/N율이 25부근이 적당하다고 보고한 바와 같이 본 실험도 12-17정도의 C/N율을 보였다.

**퇴비화 동안의 미생물 밀도 변화와 활성분석** 1차 퇴비화가 진행된 후 30일째에 2차 퇴비화를 유도하기 위하여 분리된 활성미생물들을 접종하였다. 그 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 접종 후 10일째 미생물의 수가 대조구보다 증가하였고, 20일에서는 대조구보다 세균은 32%, 방선균은 54% 정도 미생물의 수가 늘어난 것으로 조사되었다. 그러나 곰팡이 밀도는 상대적으로 세균과 방선균 밀도가 높아짐에 따라 상대적으로 생육이 부진한 결과를 낳았다. Table 6은 섬유소, 전분, 키틴 분해균 모두 퇴비화 동안에 약 2배가 늘어났으며, 미생물을 처리한 처리구중 C+B2처리

**Table 6. Enzyme activities in compost after composting time.**

Treatment	CMCase ----- U g <sup>-1</sup> -----	Amylase	Chitinase	Auxin ug g <sup>-1</sup>
C <sup>†</sup>	0.16c <sup>‡</sup>	0.29b	0.16b	147c
C+B1	0.23b	0.48a	0.25a	280a
C+B2	0.31a	0.59a	0.30a	216b
C+B3	0.29ab	0.54a	0.24a	227b

<sup>†</sup>C, compost; C+B1, compost+probiotics1; C+B2, compost + probiotics2; C+B3, compost+probiotics3.

<sup>‡</sup>Means separation within columns by LSD at 5% level ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ).

구에서 높은 활성 ( $p < 0.05$ )을 나타내었다. 이는 퇴비발효 과정 중 분리균주가 다양한 물질을 분해하거나 유용한 물질을

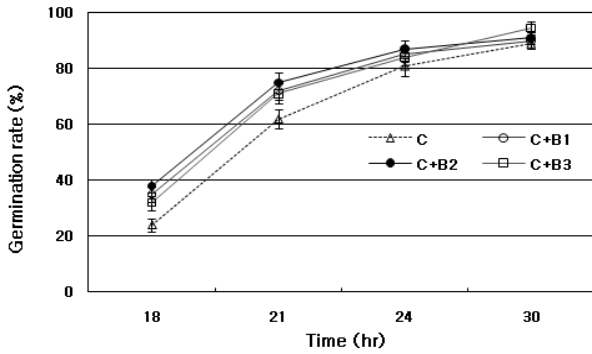


Fig. 4. Germination test using the compost extract. Treatment means are with  $\pm$ S.E. of three replications ( $n=3$ ).

Table 7. Change of  $\text{NH}_3$  and  $\text{H}_2\text{S}$  gas contents by the inoculated strains in compost during 2' composting time.

Compost	Composting day (2' composting)		
	0	10	20
<b><math>\text{NH}_3</math> gas (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>			
C <sup>†</sup>	15.9	14.6	14.9a <sup>‡</sup>
C+B1	16.4	14.0	13.0b
C+B2	15.8	13.7	12.2b
C+B3	16.7	14.1	12.9b
<b><math>\text{H}_2\text{S}</math> gas (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>			
C	9.8	7.9	7.7a
C+B1	9.8	7.4	6.2b
C+B2	9.5	6.5	4.8c
C+B3	9.6	6.9	5.6b

<sup>†</sup>C, compost; C+B1, compost+probiotics1; C+B2, compost + probiotics2; C+B3, compost+probiotics3.

<sup>‡</sup>Means separation within columns by LSD at 5% level ( $p<0.05$ ,  $n=3$ ).

많이 분비한 것으로 좋은 품질의 퇴비가 기대되었다. 오옥신 생산균에서는 전체적으로 분리균을 처리한 처리구에서 오옥신 활성이 유의적 ( $p<0.05$ )으로 증가하였으며, 특히 C+B1처리구가 높은 오옥신 생산량을 보여 작물의 성장을 촉진하는데 유용할 것으로 판단된다. 퇴비화가 진행되는 동안 퇴비내 성장촉진 물질이 얼마나 생산되었는지를 확인하기 위해 대두 씨앗을 petri-dish에 치상하여 발아시킨 결과 Fig. 4에 보는 바와 같이 21시간에서는 대조구보다 14-21%가 증가고, 그 중에 C+B1, C+B2, C+B3 처리구가 우수한 발아력을 보였다.

**암모니아가스과 휘발성 지방산 함량변화** 1차 발효 과정이 끝나는 30일째에 분리균주를 퇴비에 접종한 후 퇴비 종료 시점인 20일째에 악취의 정도를 측정된 결과, Table 7에서 보는바와 같이 대조구에 비하여 암모니아 가스 [ $\text{NH}_3$

Table 8. Changes of Propionic acid and Butyric acid gas contents by the inoculated strains during 2' composting time.

Treatment	Composting day (2' composting)		
	0	10	20
<b>Propionic acid (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>			
C <sup>†</sup>	35.0	34.5	33.7a <sup>‡</sup>
C+B1	34.9	32.1	30.3b
C+B2	36.1	32.4	26.6c
C+B3	35.5	33.2	28.8b
<b>Butyric acid (<math>\text{mg kg}^{-1}</math>)</b>			
C	52.6	51.1	49.9a
C+B1	53.1	50.4	42.4b
C+B2	53.2	50.8	40.7bc
C+B3	51.9	49.3	40.1c

<sup>†</sup>C, compost; C+B1, compost+probiotics1; C+B2, compost + probiotics2; C+B3, compost+probiotics3.

<sup>‡</sup>Means separation within columns by LSD at 5% level ( $p<0.05$ ,  $n=3$ ).

gas ( $\text{mg kg}^{-1}$ )]는 12-18%, 황화수소 [ $\text{H}_2\text{S}$  gas ( $\text{mg kg}^{-1}$ )]의 양이 19-38% 감소되었고, 미생물을 처리한 처리구에서 악취가 적어지는 것을 확인되었으며 이들과의 유의성 ( $p<0.05$ )에 관한 상관관계가 인정되었다. 2차 발효과정 후 20일째에 휘발성 지방산의 일종인 propionic acid와 butyric acid는 분리균주를 접종한 처리구에서 대조구보다 지방산의 분해가 12-18% 증가하였고, 특히 C+B2 처리구에서는 18.1% 정도의 감소율을 보였다 (Table 8). 이는 오일분해, 농약분해 등과 섬유소, 단백질 분해 등의 미생물들이 다양한 효소를 분비하여 악취요인 물질을 분해했기 때문인 것으로 사료되며, 그 결과로 축사 및 두엄의 악취발생을 어느 정도 막을 수 있었다.

**식물보호제 분해 및 중금속 함량 경감** 퇴비화가 끝난 발효퇴비와 농약을 혼용처리한 결과 Table 9에서 보는 바와 같이 살균제인 Procymidone의 미생물적 분해는 30일째 99%이상의 분해력을 보여 주었으나, 분리균을 사용하지 않는 대조구는 83%정도의 분해력을 보였다. 특히, C+B2처리구는 Procymidone처리 10일째에 대조구보다 77%정도의 분해력이 더 큰 것으로 조사되었다. Isoprothiolane의 미생물분해력은 30일째에 C+B2 처리구에서 대조구보다 62%가 높았다. Fluquinconazole은 아졸계로서 살균이 주 목적이며, 미생물분해력은 C+B1과 C+B2가 비슷한 경향을 보였다. 이로서 개발예정인 발효퇴비는 식물보호제 분해능력이 탁월한 것으로 판단되었다. 중금속도 마찬가지로 구리의 초기농도는  $50 \text{ mg kg}^{-1}$ 이었으나 C+B1과 C+B2 처리 후 구리



**Table 9. Microbial degradation rate (%) of pesticides after composting of livestock manure.**

Treatment	Bio-decomposition of pesticide					
	Procymidone		Isoprothiolane		Fluquinconazole	
	10 days	30days	10 days	30days	10 days	30days
C <sup>†</sup>	32c <sup>‡</sup>	85b	27b	55c	13b	67c
C+B1	40b	97a	34ab	74b	20a	79b
C+B2	48a	97a	40a	85a	24a	84a
C+B3	44ab	95a	33ab	79b	24a	78b

<sup>†</sup>C, compost; C+B1, compost+probiotics1; C+B2, compost+probiotics2; C+B3, compost+probiotics3.

<sup>‡</sup>Means separation within columns by LSD at 5% level ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

**Table 10. Microbial degradation content of heavy metals after composting of livestock manure.**

Treatment	Heavy metal content			
	As	Cr	Cu	Zn
	mg kg <sup>-1</sup>			
C <sup>†</sup>	6.1a <sup>‡</sup>	6.3a	50a	174a
C+B1	5.0b	4.6b	42b	160b
C+B2	2.1d	2.2c	27c	114d
C+B3	3.2c	4.2b	31c	128c

<sup>†</sup>C, compost; C+B1, compost+probiotics1; C+B2, compost+probiotics2; C+B3, compost+probiotics3.

<sup>‡</sup>Means separation within columns by LSD at 5% level ( $p < 0.05$ ,  $n=3$ ).

의 농도가 약 16%와 58%가 감소하였다 (Table 10). 아연과 크롬 역시 미생물처리구에서 큰 감소를 가져왔다. 계분에 많이 함유되어 있는 아연의 대조구 초기농도는 174 mg kg<sup>-1</sup>으로 C+B1, C+B2 처리구에 비하여 7.5%와 42%가 감소하였다. 이로서 개발된 발효퇴비는 중금속을 어느 정도 경감시키는데 효과가 인정 ( $p < 0.05$ )되었다. 앞으로 본 시험 결과를 바탕으로 토양별 및 작물별 포장시험을 수행하여 완전한 연구결과가 이루어져야 할 것이다.

## 요 약

다양한 기능을 가진 토착미생물을 분리·동정 후 퇴비화에 적용하여 우수한 기능성을 가진 발효퇴비를 제조하고자 하였다. 7개의 우수 토착미생물을 주축으로 3개의 발효퇴비를 제조하여 생리활성을 조사한 결과, 대두의 발아율 증가, 섬유소, 키틴, 단백질 분해 등의 생리활성이 대조구보다 뛰어나고, 오옥신 생산량이 유의적으로 증가하였다. 퇴비중 암모니아 가스와 휘발성 지방산 함량 역시 2차 발효가 시작되는 20일까지 함량 감소가 있었고, 대두의 건물수량이 증가함을 확인하였다. 또한 식물보호제 분해시험에서도 유의적인 분해율이 있었고, 중금속 함량 역시 유의적으로 감소하였다. 따라서 토착미생물의 다 기능적 활성을 활용한 발효퇴비의 제조는 기존보다 더 향상된 발효퇴비를 농업생산 환경에 적용할 수 있을 것이다.

## 인 용 문 헌

- Frankenberger, W.T. and W. Bruner. 1983. Method of detection of auxin-indole-3-acetic acid in soils by high performance liquid chromatography. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 47:237-241.
- Go, W.R., J.Y. Kim, J.H. Yoo, J.H. Lee, A. Kunhikrishnan, J.M. Lee, K.H. Kim, D.H. Kim, and W.I. Kim. 2012. Monitoring of heavy metals in agricultural soils from consecutive applications of commercial liquid pig manure. *Korean J. Environ. Agric.* 31:217-223.
- Haddaoui, E., M. Françoise, P. Glatron, and R. Chambert. 1995. Characterization of a new cell bound alpha amylase in *Bacillus subtilis* 168 marburg that is only immunologically related to the exocellular alpha amylase. *J. Bacteriol.* 177:5148-5150.
- Ham, S.K., Y.S. Kim, and C.H. Park. 2010. The growth effects of creeping bentgrass by SCB (Slurry composting and biofiltration) liquid fertilizer application, *Korean J. Turf. Sci.* 24:56-61.
- Han, H.S., S. Woo, D.K. Kim, B.G. Heo, and K.D. Lee. 2010. Effects of composts on the growth, yield and effective components of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Korean J. Environ. Agri.* 29:138-145.
- Hanrahan, T.J. 1989. Use of somatotrophin in livestock production: growth in pigs. In: Serjrsen, K., Eds, Use of somatotrophin in livestock production, commission of the

- European communities. Elsevier Scientific, UK.
- Hong, J.H. and K.J. Park. 2009. Composting characteristics of food waste-poultry manure mixture inoculated with effective microorganisms. *J. Lives Hous. & Env.* 15:59-68.
- James, N. 1958. Soil extraction in soil microbiology. *Can. J. Microbiol.* 4: 363-370.
- Jeong, J.Y., K.Y. Jung, and S.S. Nam. 1999. Evaluation of compost qualities with or without microbial inoculation for food waste composting. *Korean J. Environ. Agri.* 18:280-286.
- Jo, N.C., J.S. Shin, S.H. Kim, S.H. Yoon, B.S. Hwang, M.W. Jung, K.D. Lee, W.H. Kim, S. Seo, J.G. Kim, C.E. Song, and K.C. Choi. 2010. Study on summer forage crop cultivation using SCB (Slurry composting-biofiltration) liquid fertilizer on reclaimed land, *J. Kor. Grassl. Forage Sci.* 30:121-126.
- Kim, K.J., Y.J. Yang, and J.G. Kim. 2003. Purification and characterization of chitinase from *Streptomyces* sp. M-20. *J. Biochem. & Mol. Biol.* 36:185-189.
- Kunitz, M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen Physiol.* 30:291-297.
- Kuster, E. and S.T. Williams. 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature.* 202:928-929.
- Lee, K.D., J. Kim, and H. Kim. 1999. Purification and characterization of carboxymethyl-cellulase produced by *Bacillus* sp. KD1014. *Agric. Chem. Biotechnol.* 42:107-112.
- Lim, D.K., Y.H. Moon, I.S. Shin, and K.D. Woo. 1991. Development of organic fertilizer based on the cow dung: 2. Studies on rapid fermentation. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 24:199-205.
- MAFF (Ministry of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries). 2010. Discharges amounts of livestock manure and resource recycling. p.1-30.
- Martin, J.P. 1950. Use of acid, rose bengal and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.* 69:215-233.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Misra, R.V., R.N. Roy, and H. Hiraoka. 2003. On-farm composting methods. p. 1-35. Food and agriculture organization of the United nations (FAO), Rome, Italy.
- NIAST, 2000. Method of soil and plant analysis. Published by National Institute of Agricultural Science & Technology, Suwon, Korea.
- Oh, Y.S., J.E. Park, H.J. Oh, J.H. Kim, M.C. Oh, C.K. Oh, Y.J. Oh, and S.B. Lim. 2010. Isolation and characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Jeju traditional fermented soybean paste (Doenjang). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39:47-53.
- Park, J.H., J.K. Yeo, Y.B. Koo, W.W. Lee, H.C. Kim, and C.H. Park. 2008. Effects of slurry composting and biofiltration liquid fertilizer on growth characteristic of poplar clones in a reclaimed land mounding soil. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 41:318-323.
- Tchobanoglous, G., H. Theisen, and S.A. Vigil. 1993. Integrated solid waste management, p. 689-691 In: Engineering, principles and management issues. McGraw-Hill International Editions.
- Tonkova, A., R. Manolov, and D. Elena. 1993. Thermostable  $\alpha$ -amylase from derepressed *Bacillus licheniformis* produce in high yields from glucose. *Process Biochem.* 28:539-542.
- Tyrrell, H.F., A.C.G. Brown, P.J. Reynolds, G.L. Haaland, D.E. Bauman, C.J. Peel, and W.D. Steinhour. 1988. Effect of bovine somatotrophin on metabolism of lactating dairy cows: energy and nitrogen utilisation as determined by respiration calorimetry. *J. Nutr.* 118:1024-1030.
- Van Weerden, E.J. 1987. Effects of clenbuterol on nitrogen deposition and carcass composition in castrated male pigs. p. 152-162. In: Hanrahan, J.P., Beta-agonists and their effects on animal growth and carcass quality. commission of the European communities. Elsevier applied science, UK.