

Characterization of Microbial Community Changes in Process Affected by Physicochemical Parameters During Liquid Fertilization of Swine Waste

Mi-Na Shin[†], Jin-Won Kim[†], Jaehong Shim, Heung-Hoe Koo¹, Jai-Young Lee²,
Min Cho, and Byung-Taek Oh*

Division of Biotechnology, Advanced Institute of Environment and Bioscience, College of Environmental and Bioresource Sciences, Chonbuk National University, Iksan, Jeonbuk 570-752, South Korea

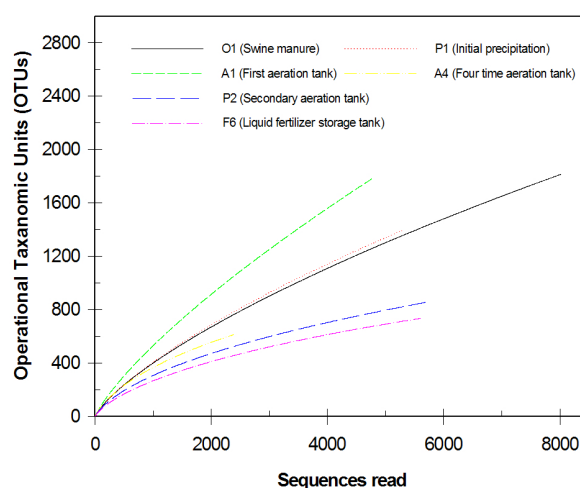
¹*Semyong Engineering, Incheon 405-817, South Korea*

²*Department of Environmental Engineering, The University of Seoul, Seoul 130-743, South Korea*

(Received: May 6 2013, Accepted: May 22 2013)

Livestock wastes are considered as major environmental pollutants because they contain high concentration of organic materials. In 2001, The Environmental Department reported that stock farmers were increasing as 5.1%/year, which resulted in a gradual increase in livestock wastes generation. The direct disposal of livestock wastes create several environmental problems. Thus, several countries banned the disposal of livestock wastes in environment including aquatic systems. Recently, aeration-based liquid fertilization was considered as potential way for the disposal of livestock wastes. In this study, next generation sequencing (NGS) analysis was used to understand the microbial community changes during liquid fertilization of livestock wastes. Microbial community was compared with liquid fertilizer physicochemical analysis such as BOD₅, COD_{Mn}, pH, N (Nitrogen), P (Phosphorus), K (Potassium) etc. The physicochemical parameters and bacterial community results pave the way for producing effective livestock-based fertilizer. By comparing the physical characteristics of the manure with microbial community changes, it is possible to optimize the conditions for producing effective fertilizer.

Key words: Livestock wastes, Liquid fertilization, NGS (next generation sequencing), BOD₅, COD_{Mn}



Influence of fertilization process on microorganisms diversity and physicochemical components such as BOD₅, COD_{Mn} and T-N. The results showed a decrease in microorganisms diversity during liquid fertilization process.

*Corresponding author : Phone: +82638500838, Fax: +82638500834, Email: btoh@jbnu.ac.kr

[†]Both authors contributed equally to this work and are considered as co-first authors

[§]Acknowledgement: This subject is supported by Korea Ministry of Environment(MOE) as "Eco-innovation Program" (Project No. E211-40005-0047-1)

Introduction

2011년도 환경부에서 발표한 “가축분뇨 발생량 및 처리현황 (2011)”에 따르면 젓소, 소 (한우), 말, 돼지, 양, 사슴, 닭, 오리, 개 등 10개 축종에 대하여 조사한 결과 11년도의 경우 10년도 대비 5.1% 만큼 축산농가가 증가하였으며, 전체 사육두수는 0.6% 만큼 증가 된 것으로 보고되었다. 가축 사육두수 증가와 더불어서 가축분뇨발생 증가에 대한 우려가 높아지고 있다. 2011년도 까지 매년 발생하는 상당수의 분뇨는 해양투기가 이루어 졌으나 런던협약 체결로 인하여 2012년도부터 국내에서 발생하는 가축분뇨의 해양투기가 금지됨에 따라 매년 발생하는 분뇨의 처리에 대한 방안 마련이 시급해졌다 (Kim, 2007).

환경 중 가축분뇨 처리문제의 해결방안으로 최근 돈분의 액비화에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Jeong et al., 2012). Hess et al. (2004)에 따르면 가축 분의 퇴, 액비화 과정에서 미생물에 의해 유기물이 분해되어 BOD, COD, T-N 등 유기물 오염지표 농도의 감소 효과를 나타내며, 이때 발생한 고온의 열로 인하여 병원성 미생물이 사멸됨이 알려진바 있다. 이러한 점에서 고농도 유기성 폐기물인 돈분의 처리과정은 생물학적 폐수처리 공정에서 미생물 군집의 역할과 유사하다. 실제로 액비화 과정 및 하수처리과정에서 다양한 미생물들은 분해되기 쉬운 유기물의 분해를 촉진시켜 폐수 내 양분을 안정한 상태로 만들어준다.

현재 국내에서는 폐기가 힘든 가축분뇨 중 85%를 자원화 (퇴비 및 액비) 과정을 거쳐 이용되고 있다 (Kwon et al., 2010). Dong and Reddy (2010)에 따르면 실제 가축분뇨는 농업 작물의 생산을 위한 중요하고 가치 있는 비료임이 확인된 바 있다. 특히 가축분뇨의 경우 식물의 성장에 필요한 다양한 유기 및 무기원소를 포함하고 있어 식물의 생산량을 증대시킬 수 있는 좋은 자원이 될 수 있다고 알려져 있다.

그러나 특별한 처리 없이 비료로서 무분별한 가축분뇨의 사용은 분뇨내 병원성 미생물, 중금속, 잔류오염물질에 의한 2차적인 오염을 발생시킬 수 있다 (Hölzel et al., 2010; Jung et al., 2011). 이와 더불어서 오염지표를 나타내는 BOD, COD 수치가 하수 방류 기준치를 초과하므로 환경 중에 노출 시 하천수 오염, 악취, 적조발생 등의 위험성을 안고 있다.

돈분의 액비화 방법에는 크게 혐기성과 호기성 액비화로 구분된다. 혐기성 액비화의 경우에는 상대적인 슬러지 생성이 호기성 액비화에 비해 적으며, 메탄가스를 발생시킴으로써 에너지로 이용 가능하다는 장점이 있지만, 호기성 액비화에 비해 액비생성을 위한 기간이 3달 이상으로 상대적으로 길다. 반면 호기성 액비화의 경우에는 부속된 액비를 생산하는데 약 30~40일 정도로 완숙된 액비 생산을 위해 상대적으로 짧은 기간을 필요로 한다.

퇴액비화 과정은 일반적으로 세균, 진균, 방선균의 분해 작용을 통해 이루어진다고 알려져 있다. 특히 액비화 초기에는 미생물에 의한 유기물 분해 작용이 활발하여 전체적인 액비 성상에 큰 영향을 미친다. 이렇듯 액비화과정의 주요 인자로 미생물의 대사 작용이 관여하며, 대사 작용의 메커니즘은 우점 하는 미생물의 종류에 크게 좌우된다. 따라서 본 연구 목적은 효율적인 돈분 액비화 공정을 설계하는데 필요한 자료를 활용하기 위함이다.

본 연구에서는 경남 A지역에서 운영되고 있는 가축분뇨 자원화 시설의 각 공정에서 시료를 채취하여 액비화 과정 중 미생물의 역할을 확인하였다. 액비화 시료의 미생물 군집분석을 위해 일반적으로 미생물 배지에 도말 하여 배양 가능한 미생물 및 DGGE (Denature Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 등과 같은 군집분석을 위한 다양한 방법이 제시되었다 (Park et al., 2011). 그러나 배양 가능한 미생물 분석의 경우 자연계에 존재하는 미생물의 90% 이상이 일반적인 실험실 환경에서 배양이 되지 않으므로 제한 점을 가진다. 또한, Adams et al. (2009)에 따르면 DGGE, TGGE, RFLP 등의 배양에 의존하지 않는 방법이 개발되기는 했으나 결과의 데이터베이스화 및 종 (specie)의 정보를 얻는 것이 불가능하고 광범위한 범위의 metagenomics 분석이 힘들다는 점을 감안하여, 본 연구에서는 원분뇨 내 미생물 군집의 분석 신뢰도를 높이기 위한 방법으로 차세대염기서열분석 (Next Generation Sequencing) 기술인 pyrosequencing을 활용하여 분석을 실시하였다.

본 연구에서는 16S rRNA 유전자 기반의 pyrosequencing 분석결과를 통해 얻은 우점하는 미생물의 종류와 액비화 과정의 물리화학적 성상 분석 결과 사이의 비교를 실시하였다. 미생물에 의한 액비화 작용과 액비 성상 변화 사이의 비교를 통하여 최종적으로 각 처리공정에서 다양한 미생물 군집의 생태학적인 특성을 확인하고 추후 더 효율적인 액비화 과정을 위한 기초 정보를 제공하고자 한다.

Materials and Methods

액비화 시설 및 시료채취 본 연구에서 사용된 돈분뇨 및 각 공정의 액비 시료는 다단계, 하향 포기 방식으로 운영되는 경남 A지역의 액비 자원화 시설 (1일 처리용량 약 12톤 규모)에서 이루어졌다. 시료채취 시기는 10월 중순경이었으며, 돈사의 원분뇨 (O1), 1차 침전조 (P1), 폭기조 (1, 4차 A1~A4), 2차 침전조 (P2), 최종 액비 (6차 폭기조 F6)로 분류하여 2 L 체수병에 시료를 채취하였으며, 액비화 시설의 공정도는 Fig. 1에 나타내었다. 채취된 시료는 -4°C 냉장상

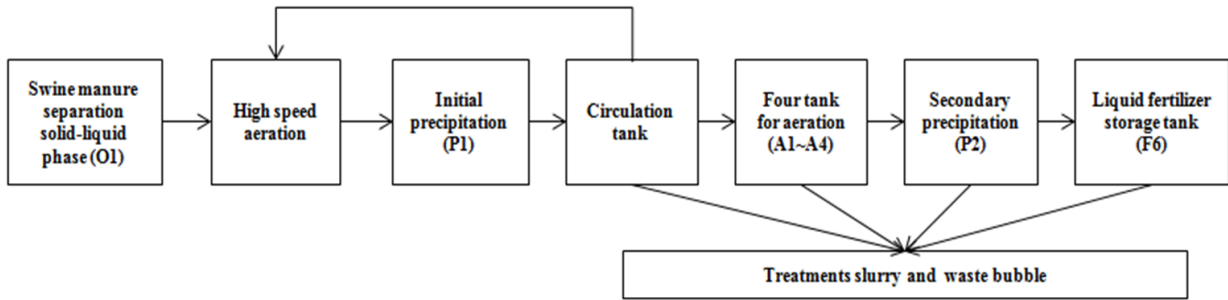


Fig. 1. Schematic diagram of the swine fertilization process by aerations and precipitations.

태로 운반하였으며, -4°C 냉장 상에서 보관하였다.

본 액비 자원화 시설의 액비화 과정은 다음과 같다. 진동형 고액분리기를 통해 고액분리를 거친 돈분 시료는 24시간 동안 5톤 처리용량의 이동식 고속 다단계 폭기조를 거치며, 이후 1차 침전을 통해 생성된 슬러지를 제거한다. 침전을 거친 돈분시료의 상등액은 폭기조로 이동하며, 펌프를 통해 시료를 끌어올려 폭기조 상부로 떨어뜨리는 방식으로 1번 폭기조에서 4번 폭기조까지 1일 6시간 동안 폭기시켜준다. 4차례의 폭기를 거친 시료는 2차 침전조에서 추가적인 침전 과정을 거친 후 상등액은 최종 액비 저장조에서 일정기간 동안 부숙 과정을 거쳐 액비로 사용된다.

액비 성상분석 및 중금속 함량 분석 각 공정별로 채취한 시료 5 mL을 질산 10 mL에 하루 방치한 후 전열판 위에서 흰 침전물이 생길 때까지 서서히 가열하고 방냉하였다. 준비한 Ternary solution (HNO_3 , H_2SO_4 , HClO_4 각각 10 : 1 : 4 비율로 혼합)을 10~50 mL 넣고 시료가 투명하게 될 때까지 가열시켰다. 분해된 시료를 No. 6 여과지로 여과 후 100 mL 매스플라스크에 정량하였다. 희석된 시료는 ICP-OES (Leemans Labs, Inc., Hudson, NH, USA)를 이용하여 Hg, Cr 을 제외한 As, Cu, Zn, Ni, Pb, Cd 6가지 항목에 대해 분석을 실시하였다 (Gutierrez et al., 2010).

수질오염공정시험법에 따라 COD_{Mn} 는 과망간산칼륨법, BOD_5 는 DO meter를 이용하여 5일간 20°C 에서 배양하여 분석을 실시하였고, T-N은 자외선 흡광광도법을 이용하여 분석을 실시하였다.

미생물 분리 각 공정별 배양 가능한 미생물 분석을 위하여 채취한 시료를 멸균된 0.85% saline solution에 10^{-6} serial dilution하여 LB agar배지에 평판 도말을 실시하였다. 도말된 배지는 30°C 에서 2일간 배양하였으며, 도말된 배지에서 생성된 미생물 콜로니의 형태적 특성을 토대로 순수 분리하였다. 분리된 미생물은 개별적으로 LB broth medium에 계대배양 후 10% glycerol stock을 만들어 -80°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다.

DNA 추출 및 미생물 16S rRNA의 pyrosequencing

본 액비화 공정으로부터 채취한 시료 내에서 DNA의 추출방법은 Kim et al. (2010)에 따라 진행하였다. 추출된 시료의 16S rDNA 부분을 PCR을 이용하여 증폭하고자 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 이용하였다 (Reysenbach A.L. et al., 1992). PCR산물은 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, CA, USA)를 사용하여 정제하였다. Nam et al. (2012)에 따라 증폭된 미생물의 16S rRNA 부분에 V1, V2의 hyper variable regions (HVRs) barcoded pyrosequencing 방법을 이용하였으며, Roche 454 pyrosequencing Genome Sequencer FLX Titanium system 염기서열 분석기를 사용하여 pyrosequencing을 진행하였다. Pyrosequencing 분석을 위하여 본 액비화 공정에서 채취된 시료는 국내 sequencing service 회사에서 수행되었다 (Chunlab Inc., Republic of Korea).

통계학적 분석 본 연구에서 실시한 모든 통계학적 분석은 모두 SAS 9.1 (USA) program을 이용하여 진행되었다. 데이터 분석은 일원배치 분산분석 (Oneway-ANOVA)으로 진행되었으며, 개별적으로 $P \leq 0.05$ 유의성 수준에서 Duncan's multi range test (DMRT)를 실시하였다.

Results and Discussion

돈분내 미생물 군집 및 고속폭기 이후 미생물 군집의 분포 양상 돈분의 액비화 과정에 미치는 미생물 군집의 영향을 확인하기 위해 액비자원화 시설로부터 채취한 시료를 16S rRNA를 기반으로 한 pyrosequencing 방법을 이용하여 돈분의 액비화 공정 내 미생물군집 분석을 실시하였다. 2단계 진동스크린을 이용하여 고액분리를 거친 원분뇨 내 미생물 군집을 문 (Phylum) 수준에서 비교하였을 때, *Firmicutes* (37.73%), *Proteobacteria* (28.74%), *Bacteroidetes* (21.16%), *Actinobacteria* (3.14%) 비율이었다 (Table 1).

Kim et al. (2010)과 Unno et al. (2010)에 따르면 인간의

Table 1. 16S rRNA pyrosequencing read analysis of each swine waste fertilization process. O1 (Swine manure), P1 (Initial precipitation), A1 (First aeration tank), A4 (Four time aeration tank), P2 (Secondary aeration tank), F6 (Liquid fertilizer storage tank).

| Phylum | AVE [†] . (%) | O1 (%) | P1 (%) | A1 (%) | A4 (%) | P2 (%) | F6 (%) |
|----------------------------|------------------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Firmicutes</i> | 41.96 | 37.73 | 46.81 | 46.29 | 26.78 | 40.5 | 53.65 |
| <i>Bacteroidetes</i> | 31.58 | 21.16 | 36.04 | 25.78 | 31.5 | 43.87 | 31.12 |
| <i>Proteobacteria</i> | 12.33 | 28.74 | 2.45 | 11.69 | 17.17 | 8.64 | 5.28 |
| <i>Actinobacteria</i> | 3.75 | 3.14 | 1.77 | 2.25 | 11.28 | 2.0 | 2.05 |
| <i>Tenericutes</i> | 1.97 | 0.45 | 3.48 | 2.83 | 2.26 | 0.96 | 1.85 |
| <i>Spirochaetes</i> | 1.67 | 1.1 | 3.97 | 3.36 | 0.33 | 0.05 | 1.23 |
| <i>Synergisetae</i> | 1.3 | 2.49 | 1.81 | 1.29 | 0.75 | 0.23 | 1.25 |
| <i>Deinococcus-Thermus</i> | 1.48 | ND [‡] | ND | 3.56 | 3.88 | 0.83 | 0.59 |

[†]AVE : Average, [‡]ND : Not detected.

분뇨내 박테리아와 가축분뇨에서 주로 발견되는 박테리아는 *Bacteroidetes*, *Firmicutes*이며, 본 실험에 사용된 돈분 시료 내 미생물 분포양상도 이와 유사함을 확인하였다. 그러나 Kim et al. (2010)에 따르면 이러한 결과는 담수, 하수 슬러지 등에서 발견되는 주요 박테리아 문의 50~70%가 *Proteobacteria*인 점을 고려하였을 때, 상이한 분석결과임을 확인 하였다.

1일 5톤의 분뇨 처리용량을 가진 고속 폭기조에서 약 40~60 Km h⁻¹로 24시간 동안 연속적인 폭기를 거친 후 침전시킨 1차 침전조의 시료에서 문 수준의 미생물을 분석한 결과 *Firmicutes* (46.81%), *Bacteroidetes* (36.04%), *Proteobacteria* (2.45%), *Actinobacteria* (1.77%) 비율이었다. 이러한 결과를 통하여 고액분리를 거친 돈분을 약 8일간 고속으로 폭기 해주었을 때, *Firmicutes* 문과 *Bacteroidetes* 문이 크게 증가함을 확인할 수 있었다. 반면, 초기 돈분에서 상대적으로 높은 비율로 우점하였던 *Proteobacteria* 문은 크게 감소하는 경향을 보였는데, 이러한 *Proteobacteria* 문의 감소는 다음과 같은 문의 대부분을 구성하고 있던 *Pseudomonas* (21.53%) 속의 급격한 감소로 인한 결과임을 확인하였다.

Proteobacteria 문의 감소경향과 반대로 *Firmicutes*문의 경우 상대적인 비율이 약 9% 증가됨을 확인할 수 있었다. Sung et al. (2011)에 따르면 *Firmicutes* 문은 내생포자 (endospore) 형성집단이 주로 속하는 문으로 *Clostridium* 속, *Bacilli* 속 등의 미생물 속을 포함하고 있어 고속폭기 동안 불리한 환경에서 내생포자 형태로 존재할 수 있음이 알려져 있다. 실제 시료 내에서 *Firmicutes* 목에 속하는 *Clostridia* 속을 분석한 결과 1차 침전조 시료에서 *Clostridia* 속이 전체 속의 22.78% 차지함으로써 초기 고속으로 폭기 하는 과정에서 우점하고 있음을 확인하였다. 또한, 이러한 내생포자를 형성하는 미생물은 Sung et al. (2011)에 따르면 난분해성 물질의 분해와 악취성분 제거능이 우수하다고 알려져 있다.

이러한 분석 결과는 고속폭기 방식의 이동식 다단계 노즐 폭기조 운용시 미생물 대사 작용에 의해 발생한 열이 *Clostridia* sp.와 같은 내생포자형성 균이 우점 할 수 있는 환경을 조성하였음을 보여준다. 액비화 초기 단계에서 우점하게 될 확률이 높은 *Firmicutes* 문의 *Clostridium* 속, *Bacilli* 속 등의 미생물을 적용할 경우 단기간 내에 우수한 유기물 분해 효과를 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

돈분의 액비화를 진행함에 있어서 병원성 미생물 제어 측면의 장점을 확인하기 위하여 병원성 미생물에 대한 분석을 실시하였다. 분석결과 고액분리를 거친 원분뇨 시료내에서 분변오염의 지표세균인 *Escherichia coli*가 존재함을 확인하였다. 이밖에도 Jung et al. (2011)에 따라 식중독 사고를 일으킬 수 있는 잠재적인 위험성을 가진 6개 종의 미생물 분석한 결과 *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazaki*, *Vibrio* sp. 등은 동정되지 않았다.

고속폭기 이후 미생물 군집의 분포 변화에 따른 액비 성상변화 비교 액비화 초기 단계에서 고속폭기는 미생물 군집 변화와 시료의 성상에 크게 영향을 미치는 것을 확인하였다. 고농도 유기성 폐기물인 돈분뇨 특성상 고액분리를 거친 원분뇨에서 높은 BOD₅, COD_{Mn} 농도를 확인할 수 있었으며, 돈분의 고속폭기 과정 동안 BOD₅, COD_{Mn}의 농도가 크게 감소함을 확인하였다 (Fig. 2). 초기 고속폭기 과정 동안 생물학적 산소요구량을 나타내는 BOD₅는 약 87.8%, 화학적 산소요구량인 COD_{Mn}는 약 94.1%의 감소를 보였다.

BOD₅, COD_{Mn} 등 유기성 오염물의 지표가 감소하는 경향과 더불어서 액비내 총 질소 (T-N)는 약 68.18% 감소하였다 (Fig. 3). 또한, 1차 침전조에서 암모니아태 질소 (NH₃-N)를 분석한 결과 총질소의 대부분이 NH₃ 형태 질소로 구성되어 있음을 확인하였다. 실제 액비내 질소는 대기 중으로 NH₃

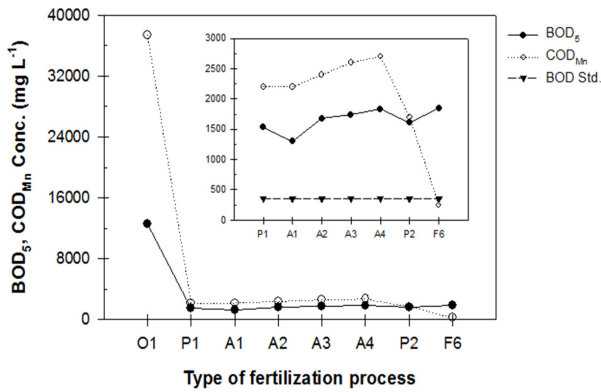


Fig. 2. Influence of fertilization process on BOD₅, COD_{Mn} concentration.

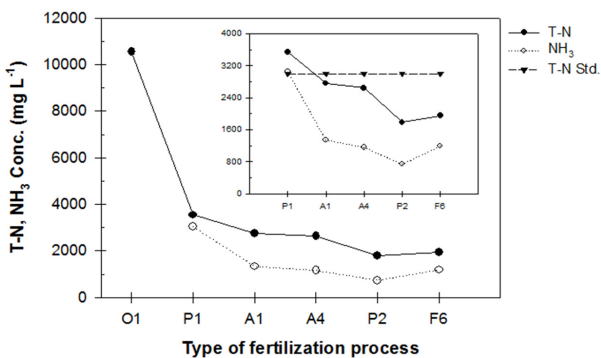


Fig. 3. Influence of fertilization process on T-N, NH₃ concentration.

형태로 휘산되어 액비 내 질소함량이 감소된다고 알려진바 있다.

액비화 과정에서 질소의 이동은 NH₃ 상태에서 *Nitrosomonas* sp.에 의해 NH₄⁺ 형태로 전환과 *Pseudomonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Bacillus* sp. 등의 미생물에 의해 NO₃⁻의 형태로 변화가 이루어짐이 알려져 있다 (Wagner et al., 2002). 이밖에도 액비화 초기 환경조건에 의한 유기산 생성으로 pH 감소가 이루어진 후 유기산 분해 및 질소화합물의 산화로부터 NH₃가 생성될 수 있으며, 이로 인한 pH 증가가 보고되었다 (Ryoo, 2010). 본 연구결과에서도 액비화 과정에서 다음과 같은 반응단계가 진행됨을 확인할 수 있었다.

식물이 대부분 이용하는 질소의 형태는 NO₃⁻의 질산염 형태로 알려져 있다 (Gangwar and Singh, 2011; Gajewska and Sklodowska, 2009). 그러나 Jin et al. (2003)과 Park et al. (1998)에 따르면 NH₄⁺ 형태도 식물에 의해 흡수 될 수 있는데 이러한 형태의 질소는 몇몇 식물에 질산태 질소의 흡수, 세포증식률 저하 등의 증상을 나타낼 수 있음이 알려진바 있으며, 질소의 이용 형태는 식물의 종류마다 다름을 고려하였을 때, 액비 공정 및 단계에 따른 질소 형태분석과 이에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

고속폭기 이후 연속적인 폭기에 따른 미생물 군집의 분포 양상 확인 고액분리를 거친 돈분 시료는 24 시간 동안 고속폭기 및 1회의 침전을 거친 후 폭기조로 이동되었다. 이동된 시료는 1차 폭기조에서 4차 폭기조까지 12톤 처리용량을 가진 각각의 처리조에서 1일 6시간 40~50 Km h⁻¹의 포기량으로 4차례 돈분 시료를 펌프로 끌어올려 떨어뜨리는 방식으로 폭기 시켜주었다.

이러한 과정을 거친 1차 폭기조, 4차 폭기조 시료의 미생물을 문 수준에서 분석한 결과 1차 폭기조의 경우 *Firmicutes* (46.29%), *Proteobacteria* (11.69%), *Bacteroidetes* (25.78%), *Actinobacteria* (2.25%)로 분석되었으며, 4차 폭기조의 경우 *Firmicutes* (26.78%), *Proteobacteria* (17.17%), *Bacteroidetes* (31.5%), *Actinobacteria* (11.28%) 순으로 분석되었다.

4차례의 추가적인 폭기를 거치는 동안 *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* 문의 비율이 크게 증가함을 확인하였다. 특히 침전조 1에서 2.45%까지 감소되었던 *Proteobacteria* 문은 17.17%까지, *Actinobacteria* 문은 폭기조 4번에서 11.28%까지 각각 증가하였다. 다음과 같은 폭기과정 동안 특히 *Actinobacteria* 문이 크게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이것은 액비화 초기 고속분해와 1~4차까지 폭기를 거치며 분해되기 쉬운 양분의 감소로 인한 결과로 해석된다.

1차 폭기 시료에서는 1차 침전조 시료에서 발견되지 않은 *Dinococcus-Thermus* 문의 미생물이 3.56% 비율로 검출되었다. 갑작스런 문 수준의 미생물 개체수 증가 요인은 액비화 공정 원시료의 차이 혹은 외부로부터의 유입 등의 원인으로부터 기여했을 것으로 추측된다. 이러한 문에 속하는 미생물은 극한의 환경조건에서 서식하며, 방사성 물질과 같은 독성물질에 큰 내성을 보유하고 있다고 알려져 있다.

1차에서 4차까지의 폭기과정을 거치면서 *Proteobacteria* 문에 속하는 *Betaproteobacteria* 강에서 원분뇨와 침전조 1에서 검출되지 않은 *Nitrosomonadales* 목의 미생물이 검출되었다. *Nitrosomonadales* 목의 미생물은 하수처리계, 담수, 해수 등에 서식하며 암모니아를 산화하여 아질산염으로 만들고 이렇게 만들어진 질산염의 형태는 식물에 의해 쉽게 이용될 수 있다고 알려져 있다 (Kim and Kim, 2006). 또한, 폭기조 4번 시료의 NGS 데이터베이스에서는 *Alphaproteobacteria* 강에 속하는 *Nitrobacter vulgais* 미생물이 검출되었다. 이러한 미생물은 아질산염을 질산염형태로 산화시킨다고 알려져 있으며, 다음과 같은 미생물들에 의한 암모니아, 암모늄 형태 질소의 산화는 침전조 1에서 급격한 pH 감소와 연관된다 (Fig. 4).

연속적인 폭기 과정에서 NGS 데이터베이스를 바탕으로 병원성 미생물을 분석한 결과 1차 폭기조에서 병원성 미생물인 *Vibrio* sp.가 검출되었으나, 1차폭기 이후 4차 폭기조에서는 검출되지 않았다 (Table 2). 이외 NGS program data상

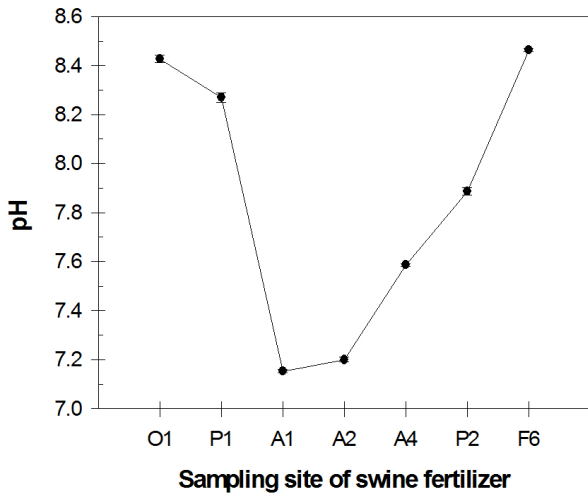


Fig. 4. Influence of fertilization process on pH.

Table 2. Pathogenic bacteria analysis from each swine waste fertilization process.

| | O1 | P1 | A1 | A4 | P2 | F6 |
|-------------------------|----------------|----|----|----|----|----|
| <i>B. cereus</i> | + [†] | - | - | - | - | - |
| <i>E. coli</i> | - [‡] | - | - | - | - | - |
| <i>E. sakazaki</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>L. monocytogenes</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>S. aureus</i> | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> sp. | - | - | - | - | - | - |
| <i>Vibrio</i> sp. | - | - | + | - | - | - |

[†]+ : Detected, [‡]- : Not detected

에서 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazaki*, *Escherichia coli* 등의 병원성 미생물은 모두 검출되지 않았다.

원분뇨 및 기타 액비공정에서 동정되지 않은 *Vibrio* sp. 가 1차 폭기조에서 동정된 것은 원분뇨 성상 차이에 의한 결과로 추측되며, 액비화 공정상에서 폭기에 의해 미생물활성이 증가하고 이때 발생한 열에 의해 사멸된 것으로 보인다. 실제로 Beaudet (1990)에 의하면 돼지 분뇨의 호기성 분해는 대부분의 병원성 미생물, 바이러스, 기생충 등의 사멸효과가 있음이 확인된 바 있다.

연속적인 4차례의 폭기 이후 미생물 군집의 분포 변화에 따른 액비 성상변화 비교 액비화 공정 초기단계에서 고속 폭기를 통한 미생물 군집의 분포 변화와 성상분석 결과에서 급격한 변화를 보인 것과 상이하게 BOD₅의 값은 액비 저장조까지 평균적으로 1500 mg L⁻¹로 일정하게 유지되었다. 그러나 COD_{Mn}의 경우 4차 폭기조를 거친 후 액비 저장조까지 약 90% 감소됨을 확인할 수 있었다. 일반적으로 대부분의 폐수에서 COD_{Mn} 값은 물속에 들어있는 아질산

염, 유기물, 제1철 염 등을 산화시켜 사용된 산화제의 양을 나타내는 값으로 미생물에 의해 분해 가능한 유기물의 산소 소모량을 나타내는 BOD 값보다 크게 나타난다.

그러나 본 연구에서는 4차 폭기조를 거친 이후 COD_{Mn} 값이 급격하게 감소하는 것과 달리 BOD₅ 값은 상대적으로 일정하였는데, 이것은 폭기 과정에서 분석된 *Nitrosomonadales* 속의 미생물 및 *Nitrobacter vulgais* 미생물에 의한 질산화로 비롯되었을 것으로 사료된다. 실제로 액비 시료 내 총 질소의 농도는 감소하는 경향을 보였으나 그 정도는 고속 폭기단계에 비해 낮음을 알 수 있었고, T-N의 농도와 NH₃ 형태의 질소 농도 차이가 증가함을 고려하였을 때, NH₃ 형태의 질소는 대부분 NH₃-N, NO₃-N의 형태로 전환되었을 것으로 추측된다. 이러한 결과는 BOD₅ 수치에 비해 낮은 COD_{Mn} 농도가 분석된 원인으로 사료된다.

2차 침전조 및 최종 액비 저장조에서의 미생물 군집 분포 양상 확인

2차 침전조 시료와 침전조를 거친 후 1일 6시간 40~50 Km h⁻¹의 포기 방식의 액비 저장조에서 시료를 채취하고 미생물 군집의 분포양상을 확인하였다. 분석결과 폭기 후 2차 침전조 시료에서는 *Firmicutes*, *Bacteroidetes* 문이 증가되는 양상을 확인할 수 있었으며, 특히 *Firmicutes* 문의 경우 액비 저장조에서 전체 미생물 문의 절반 이상인 약 53.65% 비율로 우점하고 있음을 확인하였다. 반면에 *Proteobacteria*, *Actinobacteria* 문의 경우 폭기과정 이후 감소하는 경향을 나타내었다.

2차 침전조, 액비 저장조 두 곳에서 농촌진흥청 고시 제 2012-34호에 따라 가축분뇨 발효 액에서 불검출 되어야 하는 *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. 등의 병원성 미생물은 검출되지 않았다. 이외 추가적인 5개 종의 병원성 미생물을 분석한 결과 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter sakazaki*, *Vibrio* sp. 등은 검출되지 않았다.

2차 침전조 및 최종 액비 저장조에서의 액비 성상 확인

전체적인 액비화 공정 및 액비 저장조에서 유해물질에 대한 분석을 실시하였다. 액비내 함유할 수 있는 최대 유해성분의 최대량이 비소 0.5 mg kg⁻¹, 카드뮴 0.5 mg kg⁻¹, 수은 0.2 mg kg⁻¹, 납 15 mg kg⁻¹, 크롬 30 mg kg⁻¹, 구리 50 mg kg⁻¹, 아연 130 mg kg⁻¹, 니켈 5 mg kg⁻¹임을 고려하였을 때, 분석을 실시하지 않은 수은과 크롬을 제외한 모든 분석항목에서 기준치 이하의 농도로 분석되었다 (Fig. 5).

고속폭기 이후 돈분내 미생물 군집의 heat map 분석 및 계통수 확인

각 액비화 공정에서 1% 이상의 양적 비율로 존재하는 미생물의 비교를 위하여 강 (class) 수준에

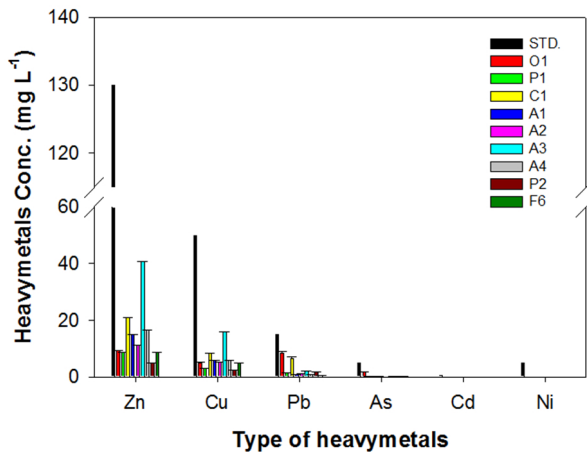


Fig. 5. Heavy metals concentration analysis of nine different fertilization process.

서 Heat map분석을 실시하였다 (Fig. 6). 그래프에서 붉은 색에 가까울수록 공정내 미생물 군집의 개체수가 상대적으로 낮음을 의미하며, 초록색에 가까울수록 처리공정의 미생물 개체수가 상대적으로 높음을 의미한다. 분석결과 개별적인 공정 내에서 3% 이상의 군집 수를 보인 강 수준의 미생물은 *Clostridia*, *Bacteroidia*를 포함한 12개 강이었다.

MEGA 5.1 (USA)를 이용하여 NGS 분석을 통해 얻은 미생물 군집의 data를 바탕으로 계통학적 분류를 실시하였으며, 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 각 공정에서 분석된 미생물 군집을 바탕으로 계통도 분석을 실시한 결과 원분노로부터 각 액비화 단계에 따른 계통학적인 개연성을 확인 할 수 있었다.

고속폭기 이후 돈분내 미생물 군집의 OTUs 분석

Kim et al. (2013)에 따라 Mothur을 이용하여 전체 미생물 군집의 rarefaction과 OTUs의 수를 분석하였다. Song et al. (2012)에 따르면 NGS 분석에서 생성된 read 간의 진화적 거리와 유사도를 근거로하여 액비화 공정시료의 총 미생물 군집의 OTUs (Operational Taxonomic Units), 시료내의 미생물 개체수에 대한 정보를 얻을 수 있으며, 이러한 결과들은 시료내 미생물의 다양성 (Simpson's index), 풍부함 (Chao, abundance-based coverage estimator), 균등성 (Shannon's index) 등의 알파 다양성 수치를 얻을 수 있음을 제시하였다.

본 연구에서는 액비화 공정내 미생물 군집의 richness를 분석하기 위하여 97% 유의성 수준에서 rarefaction curve를 계산하였다 (Fig. 8). Rarefaction curve의 x축은 무작위로 뽑아낸 read 수를 나타내며, y축은 추출한 read들을 클러스터링 했을 때의 OTUs의 수를 나타낸다. 다양한 종이 존재하는 샘플이라면, 무작위로 추출하는 read의 수가 커지면 커질수록 그 안에서 형성되는 클러스터의 수는 계속해서 증가하는 양상을 보이며, 반대로 종 다양성이 낮은 샘플일 경

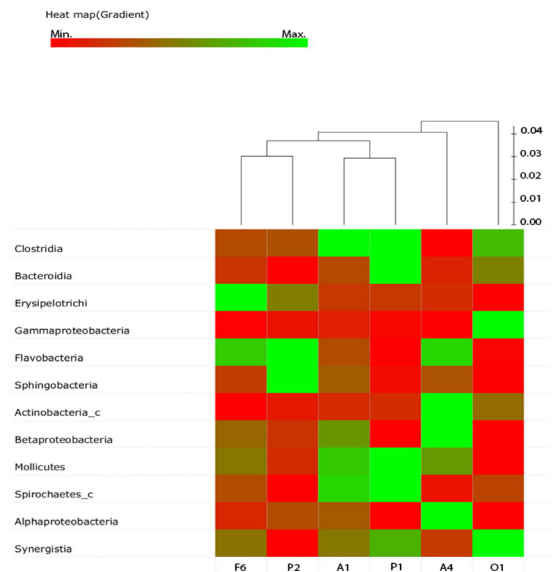


Fig. 6. Heat map analysis of five different process in class level.

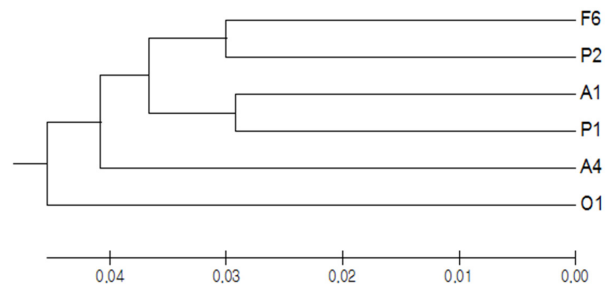


Fig. 7. Relation each process of swine fertilization.

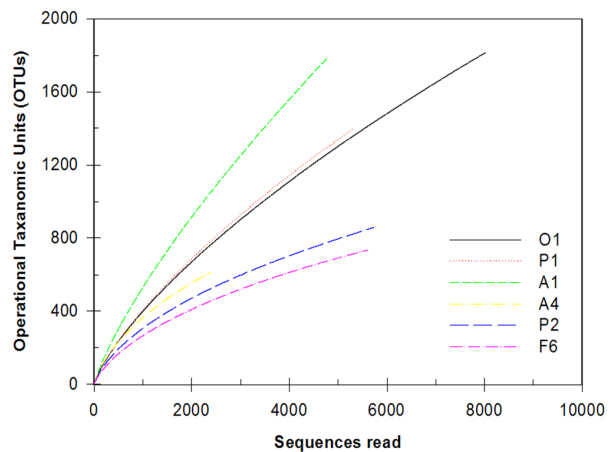


Fig. 8. Rarefaction curve of OTUs analysis in swine waste fertilization process.

우, 무작위로 추출하는 read의 개수가 많아져도 어느 순간부터 더 이상 OTUs의 수는 증가하지 않게 된다.

분석결과 액비화 과정 동안 미생물의 OTUs는 고속폭기 이후 미생물의 상대적인 수는 증가함을 확인하였다. 1차 침

전조 시료는 원분뇨와 유사하였으며, 1차 폭기조에서 가장 높은 미생물군집 다양성을 확인 할 수 있었다. 1차 폭기부 터 4차 폭기조까지 연속적인 폭기를 거친 이후 최종 액비 저장조까지 군집의 다양성은 감소하는 경향을 보였다. 초기 돈분뇨에서 감소된 미생물의 수는 최종액비 저장조에서 가장 많았다.

Conclusions

액비화 과정에서 미생물 군집 변화에 따른 액비의 성상 변화를 확인하기 위하여 경남 지역의 A축사에 설치된 액비화 시설에서 액비화 단계별로 채취한 시료를 대상으로 분석을 실시하였다. 분석결과 경남 A액비자원화 시설 내 액비화 과정의 약 89.6%를 *Firmicutes*, *Bacteroides*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* 4개의 문이 작용함을 확인하였으며, 액비화 초기 고속폭기 동안 액비 내 주요 우점 미생물은 주로 내생 포자를 형성하는 *Firmicutes* 문임을 확인하였다. 그리고 이러한 미생물들이 액비 성상에 미치는 영향은 다음과 같음을 확인하였다.

1. 액비화 초기 고속폭기 동안 미생물에 의한 유기물에 분해 및 침전에 의해 COD_{Mn}의 농도는 약 94.1%, BOD₅의 농도는 약 87.8% 감소를 확인하였으며, 초기에 상대적인 분포비율이 높은 *Firmicutes* 문이 유기물의 감소에 많은 영향을 준 것으로 사료된다.
2. 1~4차까지의 연속적인 폭기 과정에서 *Nitrosomonadales*, *Nitrobacter vulgais* 등의 미생물에 의한 질산화이 이루어지며, 다음과 같은 공정에서 BOD₅ 농도를 분석할 경우 질산화 미생물에 의해 유기물 산화에 필요한 산소량이 증가하여 상대적으로 COD_{Mn}의 농도에 비해 높게 나올 수 있음을 확인 하였다.
3. 또한, 식물의 품종에 따라 이용할 수 있는 질소의 형태가 다를 수 고려하였을 때, 완숙된 액비 내의 질소형태에 영향을 주는 액비화 단계 및 생성된 액비가 작물의 생육에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.
4. 일반적으로 액비화 과정 참여하는 미생물 군집에 영향을 줄 수 있는 환경적인 원인으로는 유입되는 돈분뇨의 성상 및 각 과정상의 온도, pH, 용존산소, 체류시간 등이 있으며, 이러한 환경인자가 미생물의 생장에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구를 통하여 실제적으로 작물 생육에 알맞은 액비의 제조를 기대하는 바이다.

References

Adams, I.P., R.H. Glover, W.A. Monger, R. Mumford, E.

- Jackeviciene, M. Navalinskiene, M. Samuitiene, and N. Boonham. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol. Plant Pathol.* 10:537-545.
- Beaudet, R., C. Gagnon, J. Bisailon, and M. Ishaque. 1990. Microbiological aspects of aerobic thermophilic treatment of swine waste. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(4):971-976.
- Dong, X. and G.B. Reddy. 2010. Soil bacterial communities in constructed wetlands treated with swine wastewater using PCR-DGGE technique. *Bioresour. technol.* 101:1175-1182.
- Gajewska, E. and M. Sklodowska. 2009. Nickel-induced changes in nitrogen metabolism in wheat shoots. *J. Plant Physiol.* 166:1034-1044.
- Gutierrez, J., C.O. Hong, B.H. Lee, and P.J. Kim. 2010. Effect of steel-making slag as a soil amendment on arsenic uptake by radish (*Raphanus sativa* L.) in an upland soil. *Biol. Fertil. Soils.* 46:617-623.
- Gangwar, S. and V.P. Singh. 2011. Indole acetic acid differently changes growth and nitrogen metabolism in *Pisum sativum* L. seedlings under chromium (VI) phytotoxicity: Implication of oxidative stress. *Sci. Hortic.* 129:321-328.
- Hess, T.F., I. Grdzlishvili, H. Sheng, and C.J. Hovde. 2004. Heat inactivation of *E. coli* during manure composting. *Compost sci. Utilization.* 12: 314-322.
- Hölzel, C., K. Harms, H. Küchenhoff, A. Kunz, C. Müller, K. Meyer, K. Schwaiger, and J. Bauer. 2010. Phenotypic and genotypic bacterial antimicrobial resistance in liquid pig manure is variously associated with contents of tetracyclines and sulfonamides. *Appl. Microbiol.* 108:1642-1656.
- Jin, S.N., H.J. Lee, and S.D. Oh. 2003. Growth, leaf nitrogen contents, and nitrate reductase activity in pear (*Pyrus pyrifolia* cv. Niitaka) trees as affected by ammonium and nitrate nitrogen supply. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 44(1):82-86.
- Jung, K.S., S.G. Heu, E.J. Roh, D.H. Lee, J.C. Yun, and K.H. Kim. 2011. Prevalence of pathogenic bacteria in livestock manure compost and organic fertilizer. *Korean J. Soil Sci. Fert.* 44(5):824-829.
- Jeong, K.H., M.A. Khan, C.H. Kim, D.H. Lee, D.Y. Choi, and Y.H. Yu. 2012. Effect of aeration mechanism on livestock manure liquid fertilization. *J. Organic Agri.* 20(4):703-713.
- Kim, D.I. and D.H. Kim, 2006. Bacterial community structure and diversity of the *Zoysia japonica* soil treated with liquid fertilizer containing amino acids. *Korean J. Microbiol.* 42(2):103-110.
- Kim, K.S. 2007. The present conditions and measures for ocean dumping of livestock extra wastes in Korea. *J. Of The Korean Society Of Marine Environmental & Safety.* 13(4):27-35.
- Kim, T.S., H.S. Kim, S.D. Kwon, and H.D. Park, 2010. Analysis of bacterial community composition in wastewater treatment bioreactors using 16S rRNA gene-based pyrosequencing. *Korean J. Microbiol.* 46(4):352-358.
- Kwon, Y.R., J. Kim, B.K. Ahn, S.B. Lee, 2010. Effect of Liquid

- Pig Manure and Synthetic Fertilizer on Rice Growth, Yield, and Quality. *Korea J. of Environmental Agriculture*. 29(1): 54-60.
- Kim, B.C., S. Kim, T. Shin, H. Kim, and B.I. Sang. 2013. Comparison of the Bacterial Communities in Anaerobic, Anoxic, and Oxic Chambers of a Pilot A2O Process Using Pyrosequencing Analysis. *Curr. Microbiol.* 66(6):555-565.
- Nam, Y.D., S.Y. Lee, and S.I. Lim. 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* 155(1-2):36-42.
- Park, H.S., J.H. Sul, and M.H. Chiang, 1998. Effects of ammonium and nitrate on callus growth of tobacco and soybean and activities of nitrogen metabolizing enzymes. *Korean J. Plant Tissue Culture*. 25(1):57-61.
- Park, E.J., J. Chun, C.J. Cha, W.S. Park, C.O. Jeon, and J.W. Bae. 2011. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food microbiol.* 30(1):197-204.
- Reysenbach A.L., L.J. Giver, G.S., Wickham and N.R., Pace. 1992. Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 58(10):3417-3418.
- Ryoo, J.W., 2010. Effects of mixture application of concentrated pig slurry and byproduct liquid fertilizer on the growth and yield of chinese cabbage. *Korean J. of Organic Agriculture*. 18(2):271-282.
- Sung, G.M., D.G. Lee, and S.J. Park. 2011. The bacterial community structure in biofilms of the RABC process for swine butchery wastewater treatment. *Korean J. Microbiol.* 47(1):56-65.
- Song, J.Y., B.K. Kim, S.K. Kwon, M.J. Kwak, and J.F. Kim. 2012. Next-generation sequencing for environmental biology—full-fledged environmental genomics around the corner. *Korean J. Environ. Biol.* 30(2):77-89.
- Unno, T., J. Jang, D. Han, J.H. Kim, M.J. Sadowsky, O.S. Kim, J. Chun, and H.G. Hur. 2010. Use of barcoded pyrosequencing and shared OTUs to determine sources of fecal bacteria in watersheds. *Environ. Sci. Technol.* 44:7777-7782.
- Wagner M., A. Loy, R. Nogueira, U. Purkhold, N. Lee, H. Daims. 2002. Microbial community composition and function in wastewater treatment plants. *Antonie Leeuwenhoek Int. J. Gen. M.* 81:665-680.