

가축 매몰지 침출수에 대한 수질 특성 및 호기성 미생물 분포에 관한 연구

최낙철¹ · 최은주² · 김봉주² · 박정안¹ · 김성배¹ · 박천영^{2*}

¹서울대학교 지역시스템공학과, ²조선대학교 에너지자원공학과

Characterization of Water Quality and the Aerobic Bacterial Population in Leachate Derived from Animal Carcass Disposal

Nag-Choul Choi¹, Eun-Ju Choi², Bong-Ju Kim², Song-Bae Kim¹, Jeong-Ann Park¹, and Cheon-Young Park^{2*}

¹Department of Rural Systems Engineering/Research Institute for Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

²Department of Energy and Resource Engineering, Chosun University, Gwangju, Korea

가축 매몰지내 침출수의 누출은 인간과 다른 가축들에게 쉽게 질병을 확산시킬 수 있는 중요한 문제이다. 본 연구에서는 매몰된지 5개월 이내의 초기 16개 가축매몰지에 대한 침출수의 물리화학적 특성과 분자미생물학적 방법을 이용하여 침출수내 존재하는 호기성 미생물을 분석하였다. 총대장균군, 총유기탄소, 암모니아이온 및 질산성질소가 관련된 참고 문헌자료에 비하여 높게 나타났다. 또한 암모니아 이온과 질산성질소는 국내 먹는물 기준치를 초과하여 나타났다. 16S rNA 서열 분석법을 사용하여 호기성 조건에서 침출수의 미생물 분포를 분석한 결과, 높은 빈도의 *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus sphaericus* 및 *Bacillus sphaericus*이 관찰되었지만, *Bucillus cereus*와 *Salmonella*와 같은 식중독 미생물은 발견되지 않았다. 본 연구는 가축매몰지로부터 형성되는 침출수에 대한 지질 매체 내에서의 거동특성, 처리 및 위해성 평가에 대한 기초자료로 활용 가능할 것이다.

주요어 : 가축 매몰지, 침출수, 호기성 미생물, 수질, 분자 생물학적 분석

Leakage of leachate from animal carcass disposal is a significant issue because disease can easily spread to humans and other livestock. In this study, we analyzed the physicochemical properties of leachate and tested for the presence of aerobic bacteria in leachate using molecular biology methods, for 16 animal carcass disposals in the first stage (after burial for 5 months). Leachate physicochemical analysis revealed higher total coliforms, TOC, NH_4^+ , and NO_3^- concentrations compared with previously published data. In most leachate samples, the concentrations of NH_4^+ and NO_3^- exceeded the Korean guideline values for drinking water. In 16S rRNA sequence analysis of the distribution of leachate under aerobic conditions, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus sphaericus*, and *B. sphaericus* were observed with high frequency, whereas no food-poisoning-related bacteria such as *B. cereus* or *Salmonella* were detected. The present findings improve our knowledge of the transport of leachate from animal carcass disposal sites through geologic media, and are useful in risk analysis and for subsequent studies.

Key words : animal carcass disposal, leachate, aerobic bacteria, water quality, molecular biology method

*Corresponding author: cybpark@chosun.ac.kr

© 2013, The Korean Society of Engineering Geology

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

우리나라는 2010년 11월 경북 안동에서 최초로 발병 보고된 구제역으로 살처분 가축수 약 340만여 마리, 매몰지는 전국적으로 4,500여 곳 가량이 발생하여, 자치구 별로도 제주와 전남을 제외하고 경북, 경기 및 충남 등 11개 광역시도 75개 시군구가 몸살을 앓았다. 우리나라는 가축전염병예방법에 따라 살처분한 가축사체에 대해 신속히 소각 및 매몰을 하게 되어 있으나, 국내 여건상 소각의 어려움 때문에 거의 대부분 매몰방법에 의한 처리방법을 택하고 있다. 그러나 매몰과 매몰지역관리가 부실한 곳이 많아 식수원오염 등 심각한 2차 피해가 염려되고 있다. 매몰처리 된 가축사체의 부패에 따른 침출수 및 악취로 인해 토양, 지하수 및 주변 환경을 오염시킬 수 있으며, 전염병의 전파 차단을 위해 발생지역 근처에 시행한 대규모 매몰처리 방법은 사후환경관리가 제대로 이뤄지지 않으면 더욱 더 심각한 2차 환경오염 문제를 야기할 수 있다.

가축 매몰지 환경지침에서는 매몰지 주변 300 m 이내에 위치하는 이용 중인 지하수 관정, 매몰지 필지 및 이와 경계한 인접 필지 내에 위치한 지하수 관정, 상수원 이용 하천 등에 인접하거나 주민이 집단적으로 거주하는 지역에 위치한 지하수 관정을 우선적으로 고려하여 조사관정을 선정하고 염소이온, 암모니아성질소, 질산성질소, 총대장균 그리고 바이러스 등의 항목을 매몰초기 1년까지 분기 1회, 2-3년까지는 반기별 1회(단, 염소이온과 암모니아성질소가 최초 동반 검출되는 경우 월 1회 조사 및 조사기간 연장 등을 실시) 등 총 3년간 모니터링을 실시하도록 하고 있다. 또한 주변 지하수 조사관정 선정 시 조사결과와 대표성이 확보될 수 있도록 다수의 지하수 관정을 조사, 가급적 침출수 영향 및 지하수 흐름방향 등을 고려하여 지자체 상황에 맞게 관정을 선정하고, 대조군으로 배경수질을 판단할 수 있는 지하수 관정도 선정하도록 권고(지하수 흐름 방향으로 상류지역에 위치한 관정)하는 등 주변 지하수 모니터링을 통한 음용지하수 안전성 확보정책을 추진하고 있다. 또한 지하수 또는 침출수 분석결과, 질산성 질소, 염소이온, 암모니아성 질소 등 조사항목 또는 현장측정 수치가 급격하게 증가 또는 변동하는 경우, 매몰지로부터 침출수가 주변 토양으로 유출되어 지하수오염 영향이 있을 것으로 판단되는 경우 주변지역 토양 환경영향조사를 실시하도록 하고 있다.

매몰지 내 가축 사체에는 병원성 전염균을 포함한 사

체 자체에 포함된 약 70% 수분이 함유한 부패성 유기물질이 존재하기 때문에 사체 매몰 후 부패 과정에서 침출되는 침출수와 여기에 함유되어 있는 각종 오염물질의 영향으로 매몰지 주변의 토양 및 수계 환경은 잠재적인 오염 위험성을 안고 있다. 특히, 대규모로 매몰된 가축사체에서는 고농도로 오염된 대량의 침출수가 유출되기 때문에 토양 및 지하수에 많은 악영향을 미칠 수 있다. 가축 매몰지 침출수의 유출에 의한 주변 지하수 및 토양의 환경적인 위험성에 관한 연구는 국외에서 몇 차례 수행되었다. Jacobson 등(2009)은 침출수내 존재하는 유해 물질인 prion의 거동에 관한 연구를 수행하여 차수시설이 존재하지 않는 일반매립장내 가축사체를 매립하는 경우, prion이 인근하천으로 방류되는 상황을 초래함으로써 차수벽의 필요성을 강조하였다. 국내에서는 Kim 등(2010)이 가축 매몰지 2개 지점에 대하여 주변의 토양 및 지하수의 오염도를 평가한 결과, 매몰지 주변의 지하수에서 대조구에 비하여 총질소(T-N, total Nitrogen), 질산성 질소(NO₃-N, nitrate nitrogen) 및 암모니아성 질소(NH₄-N, ammonium-nitrogen)등이 높게 조사되었으며, 매몰지내 지하수에서 바실러스균속(Bacillus)가 발견되었다. Kang 등(2012)은 가축 매몰지 침출수의 특성을 매몰시간 경과에 따라 조사한 결과는 침출수의 화학적 특성은 기온에 영향을 받으며, 유기물은 전형적인 분뇨연계 시설 방류수와 유사하게 나타났다. 그 외 매몰지내 침출수에 대한 사후관리 및 처리방안에 관한 연구가 다양하게 수행되었다. 하지만 국내에서는 다양한 가축 매몰지의 매몰특성에 따른 침출수의 물리·화학·생물학적 특성분석이 아직 국한적이다. 그리하여 본 연구에서는 구제역에 의하여 매몰된 다양한 국내 가축매몰지내에서 발생하는 침출수에 대한 물리·화학·생물학적 특성을 파악하는 것이다. 그리고 추가적으로 침출수에 대한 분자생물학적 방법을 이용하여 침출수내 존재하는 호기성 미생물의 분포양상을 알아보는 것이다.

시료채취 및 분석방법

대상 가축 매몰지

연구대상 가축 매몰지는 2010년 12월부터 2011년 1월까지 구제역으로 인하여 폐사된 가축을 대상으로 2010년 11월 환경부가 고지한 “가축 매몰지 환경관리지침”을 기반으로 조성되었다. 대상 매몰지는 전국 5개도 지역 내 총 16개 매몰지이며, 구체적인 현황은 Table 1에 나타내었다.

Table 1. Conditions of animal carcass disposal.

SampleNo.	Construct date	Species			Size	
		Cattle (unit)	Pig (unit)	Total (unit)	Length (m)	Wide (m)
CDL-1	2011.01.06	250	3,900	104	21	6
CDL-2	2010.12.15	-	422	422	14	7
CDL-3	2010.12.15	6	123	129	12	6
CDL-4	2010.12.15	133	-	133	16	8
CDL-5	2011.01.11	-	3,000	3,000	26	6
CDL-6	2011.01.11	-	625	625	16	5
CDL-7	2011.01.17	72	-	72	30	6
CDL-8	2011.01.21	-	4,925	4,925	40	12
CDL-9	2011.01.18	2	1,299	1,301	31	7
CDL-10	2011.01.31	34	-	34	14	4
CDL-11	2011.01.25	-	7,381	7,381	86	13
CDL-12	2011.01.25	-	293	293	11	5
CDL-13	2011.01.25	-	1,147	1,147	25	6
CDL-14	2011.01.15	21	-	21	8	6
CDL-15	2011.01.12	10	-	10	7	6
CDL-16	2011.01.07	12	-	12	7	5

침출수 채취 및 분석

대상 가축 매몰지내 침출수의 물리·화학·생물학적 특성을 파악하기 위하여, 매몰 초기(매몰 종료후 약 5개월경과)인 2011년 5월과 6월 기간 동안 매몰지내 설치되어 있는 관측공에서 지하수 채수에 사용되는 배일러(bailer)를 이용하여 침출수를 채취하였다. 채취된 침출수는 현장에서 0.45 µm 기공 크기를 가지고 있는 필터를 이용하여 부유물질을 제거한 후, 수소이온농도(pH, TOA HM-14P), 산화환원전위(Eh, TOA HM-12P), 전기전도도(EC, TOA CM-14P), 용존산소(DO, YSI 95), 그리고 총고용물질(TDS, HACH COS50)을 측정하였다. 그리고 침출수 시료는 화학분석을 위해 4이하로 냉장보관하였다. 양이온 주성분 원소인 Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺에 대한 화학분석은 유도결합플라즈마(inductively coupled plasma)를 이용하였고, PO₄-P, SO₄²⁻, Cl⁻, NO₃-N과 같은 음이온 분석은 이온크로마토그래피(ion chromatography)를 이용하였다. 그리고 총유기탄소(total organic carbon) 함량은 총유기탄소 분석기(TOC analyzer)를 이용하였으며, 총대장균군(total coliforms) 분석은 수질오염공정시험법에 의거하여 최적화수 시험법으로 측정하였다.

침출수내 호기성 미생물 배양 및 분리

총 16개의 침출수 시료에서 1 mL를 취하여 생리식염수 용액 9 mL과 혼합하여 1분간 vortex하였으며, 균질화한 후 10⁻¹ ~ 10⁻⁷으로 십진 희석하였다. 희석액은 2종류의 선택배지에 각각 도말하여 30°C에서 48시간 이상 배양하였으며, 사용된 배지는 미생물 분리를 위한 Blood agar plate와 Macconkey agar plate를 사용하였다.

본 연구에 사용된 미생물 배양에 이용된 배지는 DIFCO Co. (USA)에서 구입하여 사용하였으며, 배양 후 형성된 콜로니(colony)은 크기, 모양과 색 등의 형태학적 특성에 따라 분류, 무작위로 다수의 콜로니를 선택하였으며, 3회의 계대 배양을 통해 미생물을 순수 분리하였다(Fig. 1).

침출수내 호기성 미생물에 대한 분자생물학적 분석

침출수내 호기성 미생물에 대한 유전자 염기서열 분석을 목적으로 Genomic DNA extraction은 1 mL의 PBS (Phosphate-buffered saline) 용액에 각각의 침출수에서 분리된 미생물을 혼합한 후, vortex mixing하여 시료를 균질화 시킨다. 원심분리기를 이용하여 8,000 rpm, 5분 동안 고액 분리한 후, 상등액을 버리고, Lysis sol. 200 µL를 분주하고, vortex mixing하여 균질화 하는 과

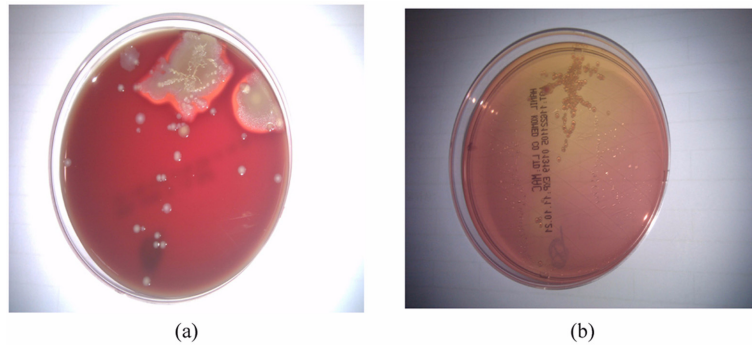


Fig. 1. Photographs of aerobic bacteria culture. (a) Blood agar plate, (b) MacConkey agar plate (CDL-9).

Table 2. Primers for amplification of 16S rRNA genes.

Genes	Primers (5' → 3')	Amplicon
16S rRNA	F : ACTTTGATCCTGGCTCAG	527 bp
	R : GTATTGCCGCGGCTGCTG	

Table 3. Physical characteristics of leachate from animal carcass disposal.

SampleNo.	Water depth (m)	pH (-)	EC (mS/m)	TDS (mg/L)	Eh (mV)	DO (mg/L)
CDL-1	2.2	7.40	0.61	6.51	-358	0.72
CDL-2	1.0	5.75	0.22	5.60	-215	0.52
CDL-3	2.0	6.77	94.90	14.77	-330	0.20
CDL-4	2.6	5.92	0.31	0.90	-242	0.88
CDL-5	1.6	6.67	30.05	38.70	-314	0.04
CDL-6	2.6	6.11	2.23	12.50	-281	0.11
CDL-7	2.2	6.01	1.99	21.40	-334	0.20
CDL-8	3.8	5.57	0.23	16.40	-239	0.14
CDL-9	2.9	6.52	1.13	10.50	-257	0.13
CDL-10	1.2	6.50	0.88	25.40	-266	0.12
CDL-11	0.4	6.87	0.39	3.72	-214	0.10
CDL-12	0.9	5.68	0.79	6.70	-139	0.04
CDL-13	1.2	5.70	1.99	7.08	-134	0.21
CDL-14	0.2	6.45	0.31	12.72	-194	0.82
CDL-15	0.6	6.88	0.89	0.64	-225	0.64
CDL-16	0.8	6.81	0.99	12.08	-215	0.21
mean	1.64	6.35	8.62	12.23	-247	0.32

정을 총 3회 반복하였다. 100°C의 heat block에서 5분 동안 배양을 거친 시료를 13,000 rpm, 10분 동안 원심 분리하였다. 상등액에 대한 농도는 nanodrop (Nanodrop ND-1000)를 이용하여 측정하였다. PCR은 95°C 5분간의 denaturation 단계, 56°C의 Annealing 단계와 72°C의 extension 단계를 각 45초씩 총 38회 시행 후, post-extension을 72°C 10분간 시행하여 4°C에 보관하고

(Table 2), 5 µL의 PCR 산물을 ethidium bromide가 첨가된 1.8% 아가로스(agarose)에서 전기 영동하여 확인하였다. 증폭된 PCR 산물은 Geneall kit를 이용하여 분리하였으며, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)와 GenBank database를 이용하여 염기서열을 비교분석 하였다.

결과 및 고찰

매몰지 침출수에 대한 물리·화학적 특성

매몰지에 대한 침출수의 물리적 특성을 Table 3에 나타내었다. pH는 5.57(CDL-8)에서 7.40(CDL-1)의 범위와 평균 6.35로 우리나라 지하수 수질기준인 생활용수(pH 5.8~8.5)와 농업용수(pH 6.0~8.5)의 범위에 대부분 만족하나 일부 매몰지에서는 약산성의 값을 보이고 있었다. 매몰지 조성시 유해 미생물 사멸을 목적으로 사용된 생석회에 의하여 침출수내 높은 pH가 예상됨에도 불구하고 pH가 낮게 나온 이유는 매립 초기에 내부조건이 혐기성 상태로 이미 존재하던 유기산 생성균이나 자체 효소에 의해 유기산에 의한 것으로 판단되어진다.

특정 지역 지하수·지표수 등의 수용액내 Eh는 주변 환경 및 산소 농도 변화에 매우 민감하므로 pH와 더불어 지하수의 Eh값은 매우 중요하게 취급되는 지화학적 인자이다. 대부분의 용존 이온의 거동특성(용해도 및 흡착도)은 그 수용액의 pH 및 산화/환원전위 변화에 큰 영향을 받는다. 침출수의 평균 Eh는 약 -247 mV로 환원환경임을 나타내었다. 이러한 이유는 매몰지내 오랜 기간 산소의 유입이 되지 않았고, 가축사체로부터 유래된 미생물의 대사작용에 의하여 환원상태를 유지하고 있었음을 가리킨다. 본 연구에서의 일반적인 지하수의 용존산소(4~5 mg/L)보다 낮은 평균 0.32 mg/L의 용존산소 측정 결과가 미생물에 의한 산소소비 과정을 간접적으로 증명해 주었다.

침출수에 대한 화학·생물학적 특성을 파악하기 위하여 총대장균군을 포함한 총 13개 항목에 대한 분석 결과를 Table 4에 나타내었다. 총대장균군은 평균 1,226,394.7 MPN/100 mL로 검출되었으며, 이는 Yoon 등(2009)이 돈분뇨에서 분석한 총대장균군 30 MPN/mL 이하 보다 약 1,226배 높았으며, 국내 9개의 생활하수로 오염 예상되는 하류하천에서 분석된 평균 총대장균군 14,948 MPN/100 mL 보다 약 82배 높게 검출되었다.

총유기탄소와 암모니아이온은 평균 6,821.9 mg/L와 301.4 mg/L로 매우 높은 값을 나타냈다. 가축매몰지 침출수에서 가축사체의 부패에 의한 높은 농도의 총유기탄소와 이에 따른 암모니아 이온은 질소들은 환원 상태에서 용출되어 대부분의 질소는 암모니아성 질소의 형태로 존재하기 때문이다. MacArthur와 Miline (2002)는 구제역으로 매몰된 가축매몰지내 침출수에서 매몰된 지 1주일 만에 암모니아이온의 농도가 1,000~2,000 mg/L에서 2,000~4,000 mg/L로 증가한다고 했다. 가축 매몰 시

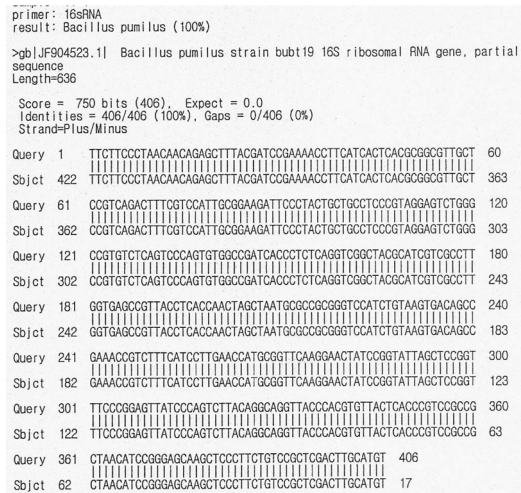


Fig. 2. Results of PCR analysis for indigenous bacteria (CDL-9).

경과년수에 따른 오염부하에서 돼지 1,000마리에 대하여 1년의 매몰 경과 년수에서 총유기탄소와 암모니아이온의 농도는 각각 662 mg/L와 80 mg/L이었으나, 본 연구에서 이와 유사한 조건의 CDL-13 매몰지(돼지 1,147 마리) 침출수에서는 높은 27,230 mg/L의 총유기탄소와 324.3 mg/L의 암모니아이온의 농도가 분석되었다.

그 외 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 황산염 및 염소이온 등의 기원은 가축사체의 분해에 의한 것으로 판단되어진다. 인간의 체중에 따른 성분비로 분류하였을 때, 인간은 주로 수소(63%), 산소(25.5%), 탄소(9.5%) 및 질소(1.3%)와 1% 미만의 칼슘(0.31%), 인(0.22%), 염소(0.06%) 황(0.05%), 나트륨(0.04%), 칼륨(0.03%), 마그네슘(0.01%)로 이루어져 있다고 하였다. 고농도의 칼슘이온은 가축사체 뿐만 아니라 매몰시 혼합된 생석회의 용해에 따른 칼슘이온 증가로 생각되어진다.

침출수내 호기성 미생물에 대한 분자생물학적 분석

매몰지내 침출수의 호기성 미생물에 대한 16S rRNA를 이용하여 분석한 결과, 축종에 관계없이 호기성 미생물이 동정되었으며, 빈도순으로 *Bacillus pumilus* (4지점), *Lysinibacillus sphaericus* (3지점), *Bacillus sphaericus* (2지점)으로 나타났다(Table 5). 그 외 *Pseudoclavibacter helvolus*, *Pseudochrobactrum saccharolyticum*, *Corynebacterium callunae*, *Paenibacillus lautus*, *Bacillus arvi*, *Brevundimonas bullata*, *Acinetobacter ursingii* 및 *Bacillus psychrodurans*가 동정되었다. 현재 가축매몰지

Table 4. Chemical and biological characteristics of leachate from animal carcass disposal.

Sample No.	Total coliforms (MPN/100mL)	TOC (mg/L)	Na ⁺ (mg/L)	K ⁺ (mg/L)	Ca ²⁺ (mg/L)	Mg ²⁺ (mg/L)	NH ₄ ⁺ (mg/L)	NO ₃ -N (mg/L)	SO ₄ ²⁻ (mg/L)	Cl ⁻ (mg/L)	HCO ₃ ⁻ (mg/L)	PO ₄ -P (mg/L)	T-N (mg/L)
CDL - 1	3,654,000	236,000	174,370	139,908	33,554	1,142,248	23,339	9,924	36,881	185,775	20,982	0,058	2,358,015
CDL - 2	100,000	444,100	242,839	203,937	22,887	19,781	939,64	34,825	30,403	214,893	57,945	0,047	1,123,120
CDL - 3	6,405,000	130,000	75,578	41,553	105,055	382,774	384,41	10,336	3,171	81,962	58,659	0,364	428,089
CDL - 4	310,000	299,900	735,452	447,117	3,015,766	967,218	17,939	231,998	317,704	945,311	48,551	0,106	265,199
CDL - 5	3,448,000,000	2,300	17,000	1,803	35,113	8,914	0,338	4,976	5,410	15,097	23,896	0,653	6,919
CDL - 6	14,136,000,000	124,555	216,345	1,328	39,994	10,830	15,465	18,961	35,541	577,755	22,922	0,168	42,880
CDL - 7	127,400,000	2,598	14,506	1,636	32,951	9,912	0,167	0,335	12,351	39,117	12,565	0,785	1,334
CDL - 8	141,400,000	985,249	338,398	0,490	31,088	5,563	15,088	10,320	54,337	328,003	33,546	0,010	27,561
CDL - 9	1,414,000,000	785,147	478,738	0,879	22,972	8,747	14,643	26,178	21,719	213,950	26,585	0,543	44,588
CDL - 10	344,800,000	925,076	677,873	2,225	34,160	8,583	5,424	21,562	157,427	619,684	30,610	0,180	30,240
CDL - 11	34,781	387,300	42,440	125,412	741,631	34,645	169,10	23,485	-	20,227	53,780	16,100	23,792
CDL - 12	36,199	260,300	78,092	94,796	963,026	83,377	122,34	37,491	-	38,247	55,686	25,869	23,580
CDL - 13	103,178	272,300	65,125	8,793	752,680	107,261	324,34	42,430	-	18,029	25,707	6,853	3,353
CDL - 14	22,981	767,000	218,295	254,370	841,159	47,209	150,25	35,603	0,078	26,573	16,221	6,358	0,757
CDL - 15	20,524	2,187,000	121,153	157,934	852,267	13,420	107,24	41,758	-	35,054	15,135	10,545	0,682
CDL - 16	28,998	1,860,000	95,583	131,367	753,962	17,567	221,78	49,112	-	29,205	20,439	5,812	0,772
mean	1,226,394,73	6,821,93	224,49	100,85	517,27	179,25	301,4	37,46	42,19	211,74	32,70	4,65	273,81
Std. Dev	3,557,199,8	12,150,0	225,7	124,3	769,3	355,5	592,0	53,9	95,6	275,9	16,5	7,4	626,2
Guideline ^(a)	n.d. ^(b)	-	-	-	-	-	0,5	10	200	250	-	-	-

※ ^(a) - drinking water guideline in Korea (2012, Ministry of environment in Korea), ^(b) - not detected.

Table 5. Results of PCR for leachate from animal carcass disposal.

No.	species
CDL - 1	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> / <i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> / <i>Corynebacterium callunae</i>
CDL - 2	<i>Paenibacillus lautus</i> / <i>Paenibacillus sp.</i> / <i>Bacillus arvi</i>
CDL - 3	-
CDL - 4	<i>Brevundimonas bullata</i> / <i>Acinetobacter ursingii</i>
CDL - 5	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
CDL - 6	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
CDL - 7	<i>Bacillus pumilus</i>
CDL - 8	<i>Bacillus pumilus</i>
CDL - 9	<i>Bacillus pumilus</i>
CDL - 10	<i>Bacillus pumilus</i>
CDL - 11	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>
CDL - 12	<i>Bacillus sphaericus</i>
CDL - 13	<i>Bacillus sphaericus</i>
CDL - 14	<i>Bacillus psychrodurans</i>
CDL - 15	<i>Pseudomonas sp.</i>
CDL - 16	-

내 약취제거 목적으로 사용되고 있는 EM (Effective microorganisms)의 조성은 효모균, 유산균, 누룩균, 광합성균, 방선균 등으로 이루어져 있으며, 본 연구에서 동정된 미생물과는 상이함으로 가축사체와 매몰지내 토양에서 유래된 것으로 판단되어진다(Moon 등, 2011).

기존연구에서는 AI 발생으로 인해 살처분된 동물 사체를 매몰한 지역에서 시료를 채취하여 미생물의 DNA를 추출한 뒤 연쇄증합반응(PCR) 및 자동염기서열 분석을 통해 매몰지에 존재하는 미생물을 동정하였다. 그 결과 매몰지의 내부토양에서 *Bacillus*와 *Caryophanon*를 확인하였고 *Bacillus*는 높은 빈도(88.9%)로 관찰되어 우점종으로 나타났다. 또한 매몰지의 외부 토양에서 분리한 균주를 분석한 결과, *Acidovorax*, *Actinoplanes*, *Agricultural*, *Archangium*, *Bacillus soli*, *Bacillus sp.*, *Bacterium*, *Bradyrhizobium*, *Chromobacterium*, *Enterococcus*, *K. flaccidum*, *Lactobacillus*, *Lechevalieria*, *M. purpureochromogenes*, *Methylobacter*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Paracoccus*, *Parkia*, *Phenylobacterium*, *Ralstonia*, *Rhizobium*, *Rhodanobacter*, *Solirubrobacter*, *Sphingomonas*, *Stenotrophomonas* 등의 미생물을 동정하였으며, 매몰지 침출수에서는 *Acidovorax*, *Alcaligenes*, *Alicyclobacillus*, *Bacterium*, *Beta-proteobacterium*, *Clostridium*, *Cystobacter*, *Frankia-*

ceae, *Malikia*, *Ochrobactrum*, *Polynucleobacter*, *Rhizosphere*, *Stenotrophomonas*, *Sterolibacterium*, *Virgibacillus*, *Xanthomonas* 등이 존재하는 것으로 보고하였다. 영국 보건부(UK Department of Health)의 연구(2001)에 따르면 매몰지 침출수 내에는 *E. coli* 0157, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Cryptosporidium*, *Giardia* 등의 미생물이 존재하는 것으로 알려져 있다. Davies와 Wray (1996)는 4가지 미생물의 동일 혼합액을 정맥 주사하여 송아지를 죽인 후 약 2.5 m (8 feet) 깊이로 매몰하여 매몰지 주변 토양 오염을 관찰한 결과, *Salmonellae*, *Bacillus cerus*, *Clostridium perfringens* 등의 병원성 미생물을 확인하였으며 *Salmonellae*, *Bacillus cerus*의 경우 겨울 동안에도 계속 해서 토양에서 분리되는 것이 관찰되었다. Turnbull (1999)은 WHO의 인간과 동물의 anthrax 관련 Guidelines에서 *Bacillus anthracis*과 같은 포자 형성 미생물은 일반적으로 환경에서 장기간 생존할 수 있다고 알려져 있기 때문에 매몰 환경에서도 잔존해 있을 것으로 생각하지만, 이러한 미생물의 유출은 특징적인 매몰 장소와 지질학적 특성에 따라서 결정된다고 밝힌 바 있다.

침출수내 총 4지점(CDL-7, 8, 9, 10)에서 동정된 *B. pumilus*는 보통 토양에서 발견되는 그람-양성, 호기성 및 포자 형성 박테리아이다(Priest, 1993). *B. pumilus* 포자

는 일반적으로 자외선 노출, 건조 및 과산화수소 등의 같은 산화제 존재시와 같은 환경장애조건에서도 강한 저항성을 보인다. 블랙 타이거 새우(Black tiger shrimp)에서 동정된 *B. pumilus*는 비브리오 알지놀리티쿠스(*Vibrio alginolyticus*)등의 해양병원균의 성장을 억제하고 고염분에 내성이 있음이 밝혀졌다(Hill et al., 2009). 국내에서는 Woo 등(2007)은 *B. pumilus* RS7가 닭이나 도축부산물 또는 가축산업 폐기물로 발생하는 우모(Feather)를 친환경적 사료로 만드는데 효과적으로 이용가능하다는 연구를 수행하였다. *B. pumilus*를 포함하는 몇몇의 *Bacillus* 종(*B. amyloliquefaciens*과 *B. licheniformis*)들은 음식물 내 존재시 독성을 띄게 되어 식중독 또는 구토를 유발하고, 특히 내성포자형태(Endospore-forming)의 *Bacillus* 종 들은 열에 강한 생존력을 가지고 있어 저온살균법(74°C, 15-20 sec)과 whey evaporation법(50-70°C)에서도 독성을 보유하고 있다(Mikkola et al., 2000; Salkinoja-Salonen et al., 1999; Suominen et al., 2001; Mikkola et al., 2004).

침출수내 총 2지점(CDL-12, 13)에서 동정된 *B. sphaericus*는 막대모양의 그람 양성(Gram positive) 박테리아로써 유충 살충체의 일종으로 모기 유충 방제균으로 사용되는 순수 호기성(Obligate aerobic bacterium) 특성을 띄며, 구형의 내성포자(Endospores)를 형성한다. *B. sphaericus*는 *Culex*과 *Anopheles* 등의 모기 유충을 살충할 수 있고 인체에 무독성인 결정성 독소 단백질을 생산한다는 사실이 알려진 이래 *B. sphaericus*의 살충성 독소 단백질의 뛰어난 효력과 수계 및 토양에서의 양호한 생육, 다른 방제균과 달리 자외선에 대한 강한 내성 등의 살충특성을 가지고 있다(Miller et al., 1983; Myers and Yousten, 1980; Elizabeth et al., 1984). 또한 10°C에서도 25~35°C에서 나타나는 정도의 살충 효력을 유지한다. *B. sphaericus* 포자의 생존과 잔효 효과는 길어서 9개월 후에도 토양에서 이 미생물이 발견되며, *B. sphaericus*는 기타 수서생물(예: 갑각류, 하루살이류, 파리류, 갈파구류 및 어류 등)에는 영향을 주지 않는다(Stowell and Sazama, 2007). 국내에서 Joa 등(2007)은 토양에서 분리한 *B. sphaericus* PSB-13가 토양내 존재하는 난용성 인산염을 가용화 시키는데 효과적이며, 생물비료로서의 가능성을 제시하였다.

침출수내 총 3지점(CDL-5, 6, 11)에서 동정된 *Lysinibacillus sphaericus*이 속해져있는 *Lysinibacillus* 속 균주는 Ahmed 등(2007)이 제안하여 *Bacillus* 속으로부터 재분류된 미생물로서 대부분의 *Bacillus*속 미생

물들은 세포벽 구성 성분인 peptidoglycan type이 A1인 반면에 *Lysinibacillus*속 미생물들은 A4α type인 lysine (Lys)-aspartic acid (Asp)으로 구성된 interpeptide bridge를 가지고 있어 *Bacillus*속으로부터 재분류 되었으며, 표준 균주로는 *L. boronitolerans*, *L. fusiformis*, *L. sphaericus* 그리고 *L. parviboronicapiens* 등이 알려져 있다. Kim 등(2011)은 16주 동안 사육한 지렁이 *Eisenia fetide*의 장내 미생물을 분리 및 동정한 결과, 약 15%의 *L. sphaericus*이 존재한다는 연구 결과를 제시 하였으며, Kim 등(2011)은 유용미생물과 흡착제가 함유되어 있는 수질정화용 건축자재 특성에 관한 연구에서 수질정화용 유용 미생물을 획득과정에서 복합 폐수내 *L. sphaericus*이 분리 동정되었다.

결 론

구제역으로 인하여 매몰된 가축 매몰지내 발생되는 침출수의 성상을 파악하기 위하여 매몰초기(매몰종료 약 5개월 경과)의 총 16개 지역에 대한 가축 매몰지의 침출수에 대한 물리·화학·생물학적 특성을 분석하였다.

침출수의 물리·화학 분석 결과, 가축사체에서 유래한 미생물에 의하여 일부 약산성의 매몰지를 제외하고, 중성 pH 환경으로 나타났다. 총대장균군은 돈분뇨의 약 1,226배 정도 높게 나타났으며, 이로 인하여 산소결핍의 환원 환경으로 나타났다.

침출수의 호기성 미생물에 대한 분자생물학적 분석을 실시한 결과, 매몰지내 악취제거 목적으로 주입 가능한 EM 미생물이 아닌 가축사체에서 유래된 *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus sphaericus* 및 *Bacillus sphaericus* 등이 동정되었다. 본 연구를 통해, 가축 매몰지의 침출수 특성을 파악함으로써 가축 매몰지 침출수에 의하여 주변 수계 오염 복원 또는 침출수 처리시 중요한 자료로 활용 될 수 있을 것이라 판단되어 진다.

사 사

이 논문은 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다 [NRF-2008-359-C00045].

References

Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., and Fujiwara, T., 2007, Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen.

- nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 1117-1125.
- Davies, R. H. and Wray, C., 1996, Persistence of *Salmonella enteritidis* in poultry units and poultry food, *British Poultry Science* 37, 589-596.
- Elizabeth, W. D., Urbina, M., Payne, J., Mula, Mir. S., Darwazeh, H., Dulmage, H. J., and Correa, J. A., 1984, Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 Spores Used as Larvicides in the Aquatic Environment, *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 125-129.
- Hill, J. E., Baiano, J. C. F., and Barnes, A. C., 2009, Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens, *Journal of Fish Diseases*, 32(12), 1007-1016.
- Jacobson, K. H., Lee, S. H., McKenzie, D., Benson, C. H., and Pedersen, J. A., 2009, Transport of the Pathogenic Prion Protein through Landfill Materials, *Environmental Science and Technology*, 43(6), 2022-2028
- Joa, J. H., Lim, H. C., Han, S. G., Chun, S. J., and Suh, J. S., 2007, Characteristics of *Bacillus sphaericus* PSB-13 as Phosphate Solubilizing Bacterium Isolated from Citrus Orchard Soil, *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*, 40(5), 405-411(In Korean with English abstract).
- Kang, M. A., Kim, M. S., Choi, B. W., and Sohn, H. Y., 2012, Organic Matter Analysis and Physicochemical Properties of Leachate from a Foot-and-Mouth Disease Landfill Site., *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 40(2), 128-134 (In Korean with English abstract).
- Kim, E. S., Hong, S. W., and Chung, K.S., 2011, Comparative Analysis of Bacterial Diversity in the Intestinal Tract of Earthworm (*Eisenia fetida*) using DGGE and Pyrosequencing, *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(4), 374-381 (In Korean with English abstract).
- Kim, K. H., Kim, K. R., Kim, H. S., Lee, G. T., and Lee, K. H., 2010, Assessment of Soil and Groundwater Contamination at Two Animal Carcass Disposal Sites, *Korean J. Soil Sci. Fert.*, 43(3), 384-389 (In Korean with English abstract).
- Kim, W. J., Choi, K. J., and Park, J. S., 2011, An Experimental Study on Water-Purification Properties in Cement Bricks Using Effective Micro-Organisms and Zeolite, *Journal of the Korea Concrete Institute*, 23(3), 331-338 (In Korean with English abstract).
- MacArthur, A. J. and Milne, J. C., 2002, Leachate Characteristics and Management Requirements Arising from the Foot & Mouth Operations in Scotland. *Proceedings Waste 2002 Integrated Waste Management and Pollution Control: Research, Policy and Practice* 305-314.
- Mikkola, R., Andersson, M. A., Grigoriev, P., Teplova, V. V., Saris, N. E., Rainey, F. A., and Salkinoja-Salonen, M. S., 2004, *Bacillus amyloliquefaciens* strains isolated from moisture-damaged buildings produced surfactin and a substance toxic to mammalian cells, *Arch. Microbiol.* 181, 314-323.
- Mikkola, R., Kolari, M., Andersson, M. A., Helin, J., and Salkinoja-Salonen, M. S., 2000, Toxic lactonic lipopeptide from food poisoning isolates of *Bacillus licheniformis*, *Eur. J. Biochem.* 267, 4068-4074.
- Miller, L. K., Lingg, A. J., and Bulla L. A. Jr., 1983, Bacterial, Viral, and Fungal Insecticides, *Science*, 219(4585) 715-721.
- Moon, Y. H., Lee, K. B., Kim, Y. J., and Koo, Y. M., 2011, Current Status of EM (Effective Microorganisms) Utilization, *Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal*, 26, 365-373 (In Korean with English abstract).
- Myers. P. S. and Yousten, A. A., 1980, Localization of a Mosquito-Larval Toxin of *Bacillus sphaericus* 1593, *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 1205-1212.
- Park, J. H., 2011, Improvement Plan for the Prevention and Biosecurity of Animal Disease, *Journal of Korean Society on Water Quality*, 27(3), 371-376 (In Korean with English abstract).
- Priest, F. G., 1993, Systematics and Ecology of *Bacillus*, In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, editors. *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology, and Molecular Genetics. Washington, D.C.: ASM Press, 3-16.
- Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Kämpfer, P., Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., and Scoging, A. C., 1999, Toxicogenic strains of *Bacillus licheniformis* related to food poisoning, *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4637-4645.
- Stowell, C. and Sazama, K., 2007, Informed consent in blood transfusion and cellular therapies: patients, donors, and research subjects, *American Association of Blood Banks*, 62, 3.
- Suominen, I., Andersson, M. A., Andersson, M. C., Hallakselä, A. M., Kämpfer, P., Rainey, F. A., and Salkinoja-Salonen, M., 2001, Toxic *Bacillus pumilus* from indoor air, recycled paper pulp, Norway spruce, food poisoning outbreaks and clinical samples, *Syst. Appl. Microbiol.* 24, 267-276.
- Turnbull, P. C. B., 1999, Definitive identification of *Bacillus anthracis*-a review, *Journal of Applied Microbiology*, 87, 237-240.
- UK Department of Health. 2001, A rapid qualitative assessment of possible risks to public health from current foot & mouth disposal options-main report and annexes.
- Woo, E. O., Kim, M. J., Son, H. S., Ryu, E. Y., Jeong, S. Y., Son, H. J., Lee, S. J., and Park, G. T., 2007, Production of Keratinolytic Protease by *Bacillus pumilus* RS7 and Feather Hydrolysate As a Source of Amino Acids, *Journal of the Environmental Sciences*, 16(10), 1203-1208(In Korean with English abstract).
- Yoon, D. H., Kang, D. W., and Nam, K. W., 2009, The Effect of Yeast(*Saccharomyces exiguus* SJP AF1) on Odor Emission and Contaminants Reduction in Pig-gery Slurry, *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 28(1), 47-52 (In Korean with English abstract).

원고접수일 : 2013년 2월 14일

수정본채택 : 2013년 3월 19일

게재확정일 : 2013년 3월 21일

최낙철

151-921 서울시 관악구 대학동 농업생명과학대학
3217호

서울대학교 지역시스템공학과

Tel: 02-880-4595

Fax: 02-873-2087

E-mail: nagchoul@empas.com

최은주

501-759 광주광역시 동구 서석동 375

조선대학교 에너지·자원공학과

Tel: 062-230-7878

Fax: 062-230-2110

E-mail: rosaria-ju@hanmail.net

김봉주

501-759 광주광역시 동구 서석동 375

조선대학교 에너지·자원공학과

Tel: 062-230-7878

Fax: 062-230-2110

E-mail: nega6495@hanmail.net

김성배

151-921 서울시 관악구 대학동 농업생명과학대학
3217호

서울대학교 지역시스템공학과

Tel: 02-880-4595

Fax: 02-873-2087

E-mail: songbkim@snu.ac.kr

박정안

151-921 서울시 관악구 대학동 농업생명과학대학
3217호

서울대학교 지역시스템공학과

Tel: 02-880-4595

Fax: 02-873-2087

E-mail: pjaan720@snu.ac.kr

박천영

501-759 광주광역시 동구 서석동 375

조선대학교 에너지·자원공학과

Tel: 062-230-7119

Fax: 062-230-2110

E-mail: cybpark@chosun.ac.kr