

Real-Time PCR 기법을 이용한 반추위 섬유소분해 박테리아의 부착과 조사료 분해에 관한 연구

성 하 군*

상지대학교 동물자원과학과

Study on Roughage Degradation and Adhesion of Rumen Fibrolytic Bacteria by Real-Time PCR

Ha Guyn Sung*

Dept. of Animal Science & Technology, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea

ABSTRACT

The comparisons between cellulolytic bacteria adhesion on rice straw and fiber digestion in time course during rumen fermentation were studied *in situ*. The adhesions of cellulolytic bacteria, *F. succinogenes*, *R. albus* and *R. flavefaciens*, were measured by RT-PCR. When the rice straws were incubated at 0, 2, 4, 8, 12 and 24 hours of the *in situ* rumen, straw was degraded with increasing speed during the incubation and showed the highest disappearance increasing rate (DM g/h) from 8 to 12 hour. The adhesions of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* were achieved above 80% in 1 hour of *in situ* rumen fermentation and then keep adhesive population up after the time of fermentation. When the *in situ* samples were collected at 0, 5, 10, 30 and 60 min to detect the early stages of adhesion on the rice straws ingested into rumen, the numerous adhesive colony of *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* and *R. albus* were detected in 5 min. In case of rice straw treated with 0, 2, 4 and 8% NaOH, all of three cellulolytic bacteria showed the increasing trends of adhesion with increasing DM disappearance of rice straw by higher concentration of NaOH at 12 hour of *in situ*. However, there were showed respectively difference at 24 hour. The present results gave certain evidence that adhesion of cellulolytic bacteria is definitely achieved in early stage of roughage ingestion into rumen, their colony develop the stable communities on roughage in process of rumen fermentation and then fiber degradation is accelerated.

(Key words : *F. succinogenes*, *R. albus*, *R. flavefaciens*, Adhesion, RT-PCR)

I. 서 론

반추동물은 반추위 발효를 통하여 벼짚과 같은 조악한 조사료를 효율적으로 분해하여 에너지로 이용하는데 반추위 발효의 주인공은 혐기성 미생물로서 이들 중 박테리아만도 200 여종이 발견되었다(Russell and Rychlik, 2001). 반추위 박테리아에 의한 반추위내 섬유소 분해 메카니즘에 대한 이해는 많은 학자들의 주요 연구 대상이 되어 왔으며, 이들 연구를 위해 사용되어진 기법은 roll tube culture, MPN(most-probable-number), 현미경 관찰법 등이 있었다(Hungate, 1966; Dehority et al., 1989; Bae et al., 1997). 그리고 최근에 반추위 발효 기간 동안 특정 박테리아를 측정하기 위하여 분자생물학적 기법을 이용하려는 노력이 많이

시행되어 왔다(Stahl et al., 1988; Woese, 1994; Reilly et al., 2002; Koike et al., 2003).

정상적인 사양 시스템에서 사료입자에 부착되어있는 박테리아의 군락이 전체 반추위 미생물 군락의 70~80%를 차지할 정도로 수적으로 우세하다(Craig et al., 1987; Minato et al., 1993; Miron et al., 2001). 그리고 섬유소 분해효소, hemicellulase와 cellulases는 반추위액 보다 반추위 내용물에 부착된 미생물 군락에서 더 높게 나타났다(Williams and Strachan, 1984; Michalet-Doreau et al., 2001). 이러한 결과는 반추위에서 사료 입자에 부착되어 있는 미생물군들이 조사료의 소화 작용에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다. 또한 현미경관찰 연구에서도 조사료 및 사료 입자 표면에 형태학적 다양 미생물들이 군락을 이루고 서식하는

* Corresponding author : Ha Guyn Sung, Dept. of Animal Science & Technology, Sangji University, Wonju, 220-702, Korea
Tel: +82-33-730-0530, Fax: +82-33-738-7805, E-mail: haguyn@hanmail.net

것을 보고하고 있다(Dinsdale et al., 1978; McAllister et al., 1994). 반추위내 섬유소 분해에 있어 미생물 부착의 중요성과 이들 효율에 미치는 다양한 반추위 환경요인에 대하여 많이 보고되어 오고 있다(McAllister et al., 1994; Miron et al., 2001; Sung et al., 2007; Hwang et al., 2008).

F. succinogenes, *R. albus*와 *R. flavefaciens*는 반추위내 조사료 소화 작용에 있어 대표적 섬유소 분해 박테리아로 잘 알려져 있으며(Forsberg et al., 1997), 반추위로 유입된 조사료의 소화는 우선적으로 이들 섬유소 분해 박테리아의 부착이 이루어지고, 그 후 부착된 박테리아들의 증식과 함께 섬유소 소화는 가속화 된다고 보고된 바 있다(McAllister et al., 1994).

따라서 본 연구는 우리나라 대표적 조사료인 볏짚의 소화 과정에 따른 볏짚 표면에 부착하는 반추위 섬유소 분해 박테리아의 군집변화를 관측하기 위하여 반추위 주요 섬유소 분해 박테리아인 *F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*를 대상으로 반추위에서 볏짚의 소화 과정에 따른 볏짚의 표면 부착 박테리아의 군집 변화를 RT-PCR 기법을 이용 관찰하였으며, 볏짚의 가성소다 처리 농도에 따른 볏짚의 소화와 부착 박테리아의 변화를 모니터링 하고자 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배양

RT-PCR 기법을 수행하기 위한 반추위 섬유소 박테리아, *F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*을 사용하였으며, 균주는 39℃ 혐기상태에서 RGC medium(Ogimoto and Imai, 1981)으로 각각 순수 배양되었다.

2. DNA 추출 및 16S rDNA 증폭

섬유소 박테리아의 순수배양액과 *in situ* 배양 후 수거한

볏짚에 부착된 박테리아의 DNA 추출은 Reilly와 Attwood (1998)의 방법에 따라 bead-beating 방법으로 다음과 같이 실시하였다. 순수배양액 및 건조된 볏짚 샘플 100 mg을 1.2 g silica beads(Biospec Products Ltd., USA)가 들어있는 1.5 ml 멸균튜브에 첨가하여 실온에서 12,000×g로 2분 동안 원심분리 하였다. Pellet과 bead를 750 µl의 saline-EDTA solution(0.15M NaCl, 0.1M EDTA)로 부유시켜 Mini-beadbeater(Biospec Products Ltd., USA)에서 초고속도로 2분간 작동 후 2분 동안 얼음에 냉각하는 순으로 2회 반복하여 cell을 파괴하였다. 그리고 Phenol:chloroform:isoamyl alcohol(25:24:1)을 이용하여 단백질을 제거하고 DNA를 추출하였다. 단백질이 제거된 DNA에 ethanol을 부가하여 DNA를 침전시켰으며 4℃에서 10,000×g로 20분간 원심분리 하여 DNA 침전물을 얻었다. 그리고 수거된 DNA는 진공건조한 후 TE buffer에 다시 용해하여 RNAase A(최종농도 1 mg mL⁻¹)를 첨가하여 37℃에서 1시간동안 반응시켰다. 그리고 마지막으로 Phenol:chloroform:isoamyl alcohol를 사용하여 DNA를 다시 추출하였으며, 추출된 DNA는 UV/VIS spectrophotometer (Shimadzu, Japan)를 사용하여 농도를 측정하였다.

각 균주마다 종간 특정 16S rDNA을 증폭하기 위해 PCR에 사용한 specific primers는 Table 1과 같으며(Koike and Kobayashi, 2001), PCR 조건은 94℃에서 30초 동안 변성(denaturation), 60℃에서 30초 동안 결합(annealing), 72℃에서 30초 동안 신장(extension) 순으로 48 cycles 실시하였고, 최초 cycle에서는 9분 동안 denaturation, 마지막 cycle에서는 10분 동안 extension시켰다.

3. Real-Time PCR

섬유소 박테리아의 순수배양액과 *in situ* 배양 후 수거한 볏짚의 표면에 부착한 주요 섬유소분해 박테리아(*F. succinogenes*, *R. flavefaciens*, *R. albus*)의 정량 분석은 Quantitative real-time PCR을 이용하여 실시되었다(Sung et

Table 1. Specific primers of 16S rDNA for Real-Time PCR

Target bacterium	Primer (5'- 3')	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)	Plasmid standardsize (bp)
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Fs219: GGTATGGGATGAGCTTGC Fs654: GCCTGCCCTGAACTATC	60	445	3461
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Rf154: TCTGGAAACGGATGGTA Rf425: CCTTTA AGACAGGAGTTTACA A	55	295	3310
<i>Ruminococcus albus</i>	Ra128: CCCTAA AAGCAGTCTTAGTTCG Ra1439: CCTCCTTGCGTTAGAACA	55	175	3190

al., 2007). Real-time PCR은 iCycler iQ real-time PCR system(Bio-Rad Inc. USA)에서 iQ Syber Green Supermix (Bio-Rad Inc. USA)를 가지고 메뉴얼에 따라 수행되었다. Total DNA는 *in situ* 실험에서 미분해된 잔여 볏짚을 냉동 건조한 샘플로부터 0.5 g을 채취하여 Purdy et al.(1996)의 방법에 따라 추출하였다. 그리고 섬유소분해 박테리아 즉, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*과 *R. albus*를 증폭하기 위한 species-specific primer는 Table 1과 같이 사용하였다 (Koike and Kobayashi, 2001). Real-time PCR의 조건은 Tajima et al.(2001)의 방법을 개량한 94°C에서 30초 동안 변성(denaturation), 60°C에서 30초 동안 결합(annealing), 72°C에서 30초 동안 신장(extension) 순으로 48 cycles 실시하였고, 최초 cycle에서는 9분 동안 denaturation, 마지막 cycle에서는 10분 동안 extension시켰다. 각 섬유소 박테리아의 정량은 16S rDNA의 copy No의 log값(Log copy No)으로 표기하였으며, 이 값은 control plasmid를 사용하여 만들어진 표준곡선으로부터 계산하였다. Control plasmid는 pGEM-T와 pGEM-T Easy Vector System(Promega, USA)를 사용하여 메뉴얼에 따라 각각 섬유소 박테리아의 species-specific primer로 증폭한 specific 16S rDNA 절편을 삽입하여 만들었다. 그리고 각 군주에 대한 표준곡선은 control plasmid의 희석 배수에 따른 threshold cycle(Ct) 값과의 상관관계에 의해 만들어졌다.

4. *In situ* 실험

In situ 실험을 위하여 반추위에 캐놀라가 설치된 550 kg 거세 홀스타인종을 사용하였고, 섬유소 분해율 평가를 위한 시료는 무처리 볏짚과 2, 4, 8% NaOH를 처리한 볏짚을 사용하였다.

In situ 소화율 시험은 nylon bag technique(Mehrez and Orskov, 1977)을 개량하여 100 mesh(0.149 mm) 나일론 천을 9×15 cm 크기로 제작한 nylon bag에 4.0 g 정도의 시료를 넣고 입구를 봉하여 준비하였다. 그리고 준비된 nylon bag 시료는 공시축의 rumen fistula를 통하여 반추위 후부 깊숙이 넣어 시험 목적에 따라 최고 24시간까지 방치하였다. 시간대별 회수한 nylon bag은 흐르는 멸균 증류수에 맑은 물이 나올 때까지 가볍게 세척 후 냉동 건조시켜 측정하였다.

볏짚의 소화 시간에 따른 부착 미생물 군집 변화 및 소화율을 관찰하기 위하여 무처리 볏짚을 사용하였으며, 반추위로부터 nylon bag 시료는 0, 5, 10, 30, 60분, 그리고 2, 4, 8, 12, 24 시간 배양 후 수거하여 시험에 사용하였다.

그리고 가성소다 처리에 따른 볏짚의 소화율 및 부착 미생물 군집 변화를 관찰하기 위하여 0, 2, 4, 8% NaOH를 처리한 볏짚을 사용하였으며, 반추위로부터 nylon bag 시료는 0, 12, 24시간 배양 후 수거하여 시험에 사용하였다.

볏짚 표면에 부착되어 있는 섬유소 분해 박테리아의 군집변화는 Real-time PCR을 이용하여 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*과 *R. albus*의 군집변화를 관찰 하였으며, *In situ* 소화율은 *in situ* 실험에서 수거한 각각의 샘플들을 시험에 따라 냉동 건조 후 샘플의 무게를 측정하여 시험 초기 무게(투입 시료량)에서 감소한 양을 측정하여 백분율로 산정하였다.

5. 통계처리

각각 시험을 통해 얻어진 연구 결과는 실험기간동안 누적 정리 되었고, 모든 자료에 대한 통계분석은 SAS(Statistical Analysis System, 1996)의 General Linear Model procedure를 이용하였으며, 처리 평균치 간의 유의성 분석은 Duncan (1955)의 Multiple Range Test에 의거하여 5% 수준에서 검정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 반추위 섬유소 분해 박테리아의 부착과 조사료의 *in situ* 소실율

반추동물의 주요대사는 반추위내 미생물에 의해 이루어지고 반추위내에 존재하는 주요 미생물은 박테리아, 프로토조아, 곰팡이로서 이중 박테리아가 가장 많이 우점하고 있다. 반추위 박테리아는 현재까지 22속 63종으로 분류되었으며 반추위액 1 ml당 10^{10-11} 정도 존재한다(Krause and Russell, 1996). 일반적인 사양시스템에서는 반추위액에 부유하고 있는 박테리아는 약 20~30% 정도이며, 사료입자에 부착되어 있는 박테리아가 전체 미생물내 75%를 차지한다(Cheng and Costerton, 1980; McAllister et al., 1994). 그리고 Cheng et al.(1991)과 Flint and Forsberg(1995)는 조사료의 소화가 이루어지기 위해서는 미생물 부착이 반드시 필요하다라는 것을 전제조건으로 제시한 바 있다. 따라서 본 연구는 볏짚을 사용하여 반추위내 발효에 따른 부착 미생물의 군집 변화를 관찰하기 위하여 실시하였다.

본 연구를 수행하기 위하여 *in situ* 볏짚 발효를 0, 2, 4, 8, 12, 24시간 실시하였을 때 볏짚의 소화율은 Fig. 1의 A 그리고 B와 같다. 볏짚의 *in situ* 분해율은 Fig. 1의 A에서

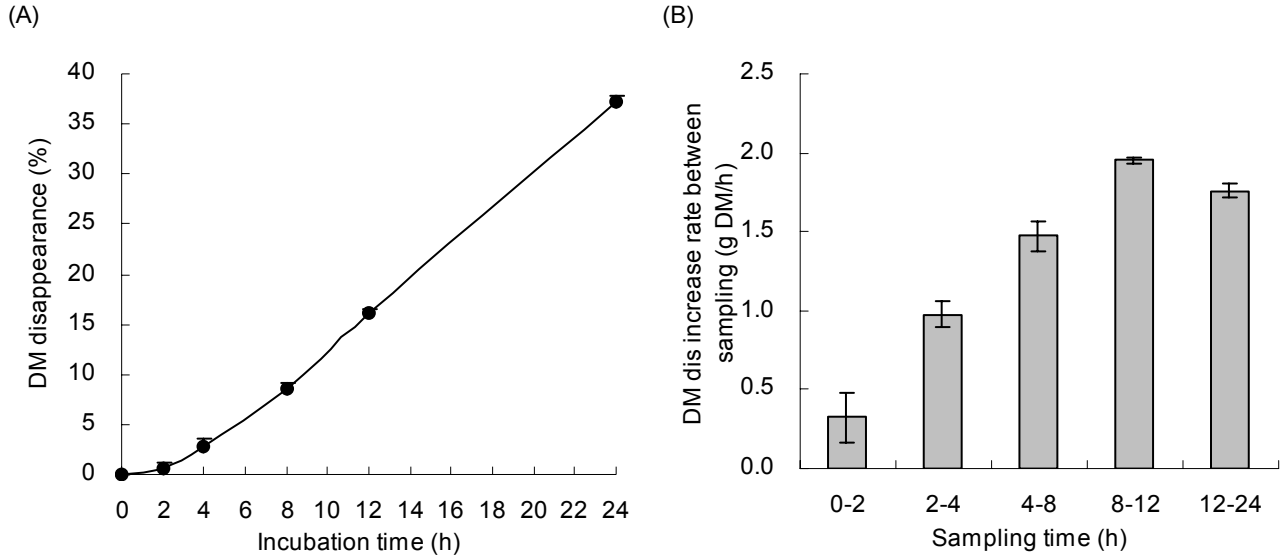


Fig. 1. DM disappearance (A) and DM disappearance increasing rate (B) of rice straw during the *in situ* rumen incubation.

와 같이 발효 시간이 경과함에 따라 계속적으로 증가하여 발효 24시간에는 37.21%를 나타냈다. 그리고 *in situ* 샘플의 채취 구간별 시간당 분해 속도(g DM/h)는 Fig. 1의 B와 같이 발효 초기 0~2시간 사이에 0.32를 나타내었으나, 발효 2~4시간 사이에는 0.98로 증가하였으며, 발효 8~12시간 사이에는 최고치(1.95)에 도달하였다.

볏짚이 반추위내 발효가 진행됨에 따른 부착 섬유소 분해 박테리아의 군집 변화는 각각 섬유소 박테리아의 species-specific primer로 증폭한 specific 16S rDNA 절편을 삽입한 control plasmid의 희석 배수에 따른 threshold cycle(Ct) 값인 Log copy No/g DM은 Fig. 2의 A, B 그리고 C와 같다. 볏짚이 반추위내 *in situ* 발효가 진행되는 동안 볏짚 표면에 부착된 *F. succinogenes*의 군집은 Fig. 2의 A에서와 같이 발효 1과 2시간째 각각 Ct 값이 8.85와 9.36으로 급격히 증가 하였으며, 이후 24시간까지 천천히 낮은 폭으로 증가하여 10.70에 도달하였다. *R. flavefaciens*과 *R. albus*의 경우는 Fig. 2의 B와 C에서와 같이 발효 1시간째 각각 Ct 값이 7.52와 7.19으로 급격히 증가 하였으며, *F. succinogenes*의 경향과 유사하게 24시간까지 천천히 증가하여 각각 8.85와 8.50에 도달하였다. 이상의 결과와 같이 반추위내에서 볏짚의 *in situ* 분해는 발효가 진행됨에 따라 가속화되어 발효 중기(8~12시간)에 최고의 분해 속도를 보여준 반면, 볏짚의 표면에 부착한 섬유소 분해 박테리아인 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*과 *R. albus*는 발효 초기(0-1시간)에 부착이 80% 이상이 완료 되었으며 발효가 진행되

는 동안 일정 수준의 균락을 유지하는 것을 발견할 수 있었다.

Cheng and Costerton(1980) 그리고 McAllister et al. (1994)은 반추위내 서식하고 있는 박테리아는 크게 5가지로 1) 반추위액에 부유되어 있는 박테리아, 2) 사료입자에 약하게 붙어있는 박테리아, 3) 사료입자에 강하게 붙어있는 박테리아, 4) 반추위 상피세포에 존재하는 박테리아, 5) 프로토조아와 곰팡이 표면에 붙어있는 박테리아로 구분하였다. 사료 입자에 부착한 박테리아는 반추위내 미생물에 의한 ATP 생산량의 75%를 담당하고 있으며, 전체 효소중 약 88~91%의 endoglucanase와 xylanase, 75%의 단백질 분해효소를 분비한다고 보고된 바 있다(Minato et al., 1993; Williams and Strachan, 1984). 그리고 이들 부착 박테리아는 반추위액에 포함되어 있는 부유박테리아에 비해서 반추위내 retention time이 높고, 프로토조아에 의해 쉽게 소화되지 않아 조사료를 효과적으로 분해하며, 미생물로부터 유래하는 영양소함량과 질이 훨씬 나은 것으로 알려져 있다(Minato and Suto, 1979; Merry and McAllan, 1983). 또한 사료입자에 부착한 박테리아의 수가 많을수록 CMCase와 xylanase의 역가가 높으며 섬유소 소화율이 증가한다고 하였다. 따라서 본 연구의 결과는 선행 연구들과 함께 반추위내 조사료의 소화 작용에 있어 부착 미생물이 중요한 역할을 한다는 것을 더 명확히 입증함과 동시에 조사료의 반추위 유입시 발효 초기단계에서 조사료 입자 표면에 부착하여 균락을 형성함을 발견할 수 있었다.

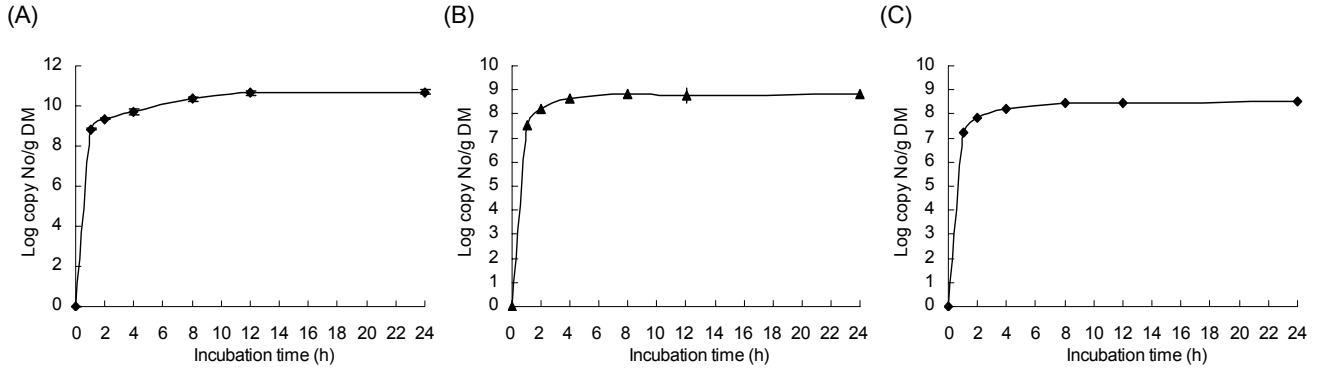


Fig. 2. The population changes of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B), *R. albus* (C) attached on rice straw in time course during the *in situ* rumen incubation.

2. 반추위 섬유소 분해 박테리아의 초기 부착

반추위 박테리아가 섬유소 분해 작용시 조사료 표면에 부착하는 진행 과정을 세부적으로 관찰하기 위하여 발효 초기 단계인 0, 5, 10, 30 및 60분 간격으로 볏짚의 *in situ* 샘플을 채취하여 조사하였다. 반추위내 *in situ* 발효 중인 볏짚의 표면에 부착한 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 분포를 조사하였을 때 결과는 Fig. 3과 같다.

볏짚 표면에 부착된 *F. succinogenes*의 군집은 Fig. 3의 A에서와 같이 발효 5분째 Ct 값이 8.48으로 급격히 증가 하였으며, 이후 10, 30 및 60분째 Ct값은 각각 8.52, 8.60 및 8.85로 낮은 폭으로 증가하였다. 그리고 *R. flavefaciens* 과 *R. albus*의 경우는 Fig. 3의 B와 C에서와 같이 발효 5분째 각각 Ct값이 6.75와 6.38로 *F. succinogenes*의 경향과 같이 급격히 증가 하였으며, 이후 발효 60분 동안 적은 폭으로 증가 경향을 나타내었다. 이상의 결과는 반추위 주요 섬유소 박테리아인 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*는 볏짚의 반추위 유입 후 5분 내에 상당량의 수가

볏짚 표면에 부착함을 보여주었다.

지금까지의 연구보고에 의하면 반추위내 미생물 부착과정은 4단계를 통해서 이루어진다(Pell and Schofield, 1993). 초기단계는 박테리아가 섬유소원으로 이동하는 과정, 2단계로는 박테리아가 기질의 적절한 비특정 부위에 이동하여 부착하는 과정, 3단계로는 박테리아가 파손된 특정 소화부위에 부착하여 분해를 시작하고 마지막 단계로서 식물조직의 특정부위에 부착 박테리아가 많이 증가함에 따라 군체를 형성하고 분해가 이루어진다. 그리고 몇몇 연구에서는 조사료의 소화가 이루어지기 위해서는 미생물의 부착이 반드시 필요하다고 서술한 바 있다(Cheng et al., 1991; Flint and Forsberg, 1995).

따라서 본 연구결과는 Fig. 2와 함께 반추위내 섬유소 소화과정에서 섬유소 분해 박테리아는 조사료의 반추위 유입 후 5분내 사료 표면 부착이 이루어졌으며, 발효가 진행함에 따라 조사료 표면에 안정된 군락을 형성하였고, 섬유소 분해 작용에 중요 역할을 담당 하였다는 사실을 보여주었다.

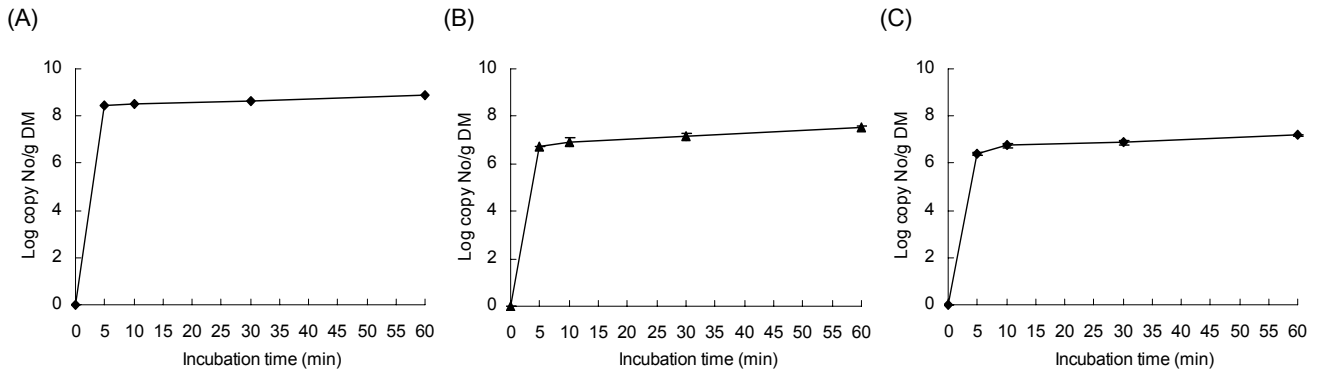


Fig. 3. The population changes of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B), *R. albus* (C) attached on rice straw at the early stage during the *in situ* rumen incubation.

3. 농도별 가성소다 처리볏짚의 섬유소 분해 박테리아 부착 및 *In situ* 소실율

반추위내 조사료의 소화 용이성에 따른 섬유소 분해 박테리아의 부착 정도를 관찰하기 위하여 볏짚의 가성소다 처리 농도에 따른 볏짚의 소화와 부착 섬유소 분해 박테리아의 군집 변화를 관측한 결과는 Fig. 4 그리고 5와 같다.

볏짚의 이용성을 높이기 위한 방법으로 볏짚에 가성소다를 처리하는 것은 여러 선행 연구에서 보고된 바 있다 (Khejornsartand, P. and Wanapat, M. 2010). 본 연구에서도 볏짚에 NaOH를 0, 2, 4 및 8%를 처리하였을 때 *in situ* 소화율은 배양 12 및 24시간 모두 NaOH 처리 농도가 증가함에 따라 증가하였으며, 4% NaOH 처리 볏짚이 가장 높은 소화율을 나타냈다(Fig. 4).

볏짚의 가성소다 처리에 의한 볏짚의 소화율에 따른 부착 박테리아의 군집 변화는 Fig. 5와 같다. *F. succinogenes*는 Fig. 5의 A에서와 같이 배양 12시간에는 NaOH 처리

농도가 증가함에 따라 부착 군집의 수(Ct값)가 증가하였으며, 4% NaOH 처리 볏짚에서 가장 높게 나타났는데 이러한 동향은 *in situ* 소화율의 결과와 같은 경향(Fig. 4)을 보여준 것이다. 그러나 24시간의 Ct값은 NaOH 처리 농도가 증가함에 따라 감소 수치를 나타냈다. *R. flavefaciens*의 경우는 Fig. 5의 B와 같이 배양 12와 24시간 모두 NaOH 처리 농도가 증가함에 따라 부착 군집의 Ct값이 증가하였다. 또한 *R. albus*는 Fig. 5의 C와 같이 배양 12시간에는 NaOH 처리 농도 증가에 따라 부착 군집의 Ct값이 증가하였으며, 4% NaOH 처리 볏짚에서 가장 높게 나타났는데 이는 *F. succinogenes*의 부착 군수의 동향과 같은 결과이었다. 그러나 배양 24시간의 Ct값은 HaOH 처리 농도에 따른 일정한 경향을 나타나지 않았으나 4% NaOH 처리 볏짚에서 가장 높게 나타났다. 이상의 결과들은 볏짚을 NaOH 처리함에 따라 *in situ* 소화율이 증가하였으며, 동시에 볏짚 표면에 부착한 섬유소 분해 박테리아(*F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*)의 수도 증가하였는데 이러한 경향은 12시간 배양물에서 3균주 모두 나타났으나 24시간에서는 각기 다른 특성을 나타냈다.

미생물의 부착을 증가시키고 부착능력을 높이는 것이 조사료의 이용성을 향상시키는 가장 기본적이고 효과적인 방법으로 일부 연구(Hwang et al., 2008; Sung, 2013)에서 보고되고 있으나 조사료 이용성 향상을 위한 미생물 부착에 영향을 미치는 연구는 대부분 기초단계에 머무르고 있다. 미생물의 부착에 관여하는 요인들은 사료의 물리 및 화학적 요인 그리고 반추위내 환경적 요인들에 의해 영향을 받으며(Gong and Forsberg, 1989; Minato et al., 1993; Roger et al., 1990), 박테리아의 섬유소 부착시 파손된 식물체의 특정부위에 박테리아가 부착하여 분해를 시작하는데 이러한 식물체의 손상은 인위적인 물리 및 화학적 처리와 반추동물의 저작을 예로 들 수 있다(Miron et al., 2001; Hwang

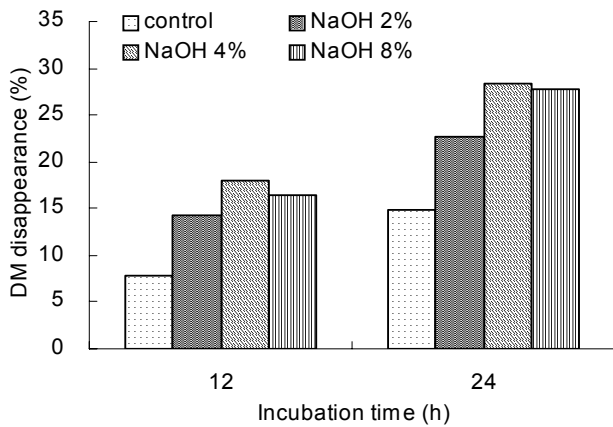


Fig. 4. The *in situ* DM disappearance of rice straw by NaOH treatments.

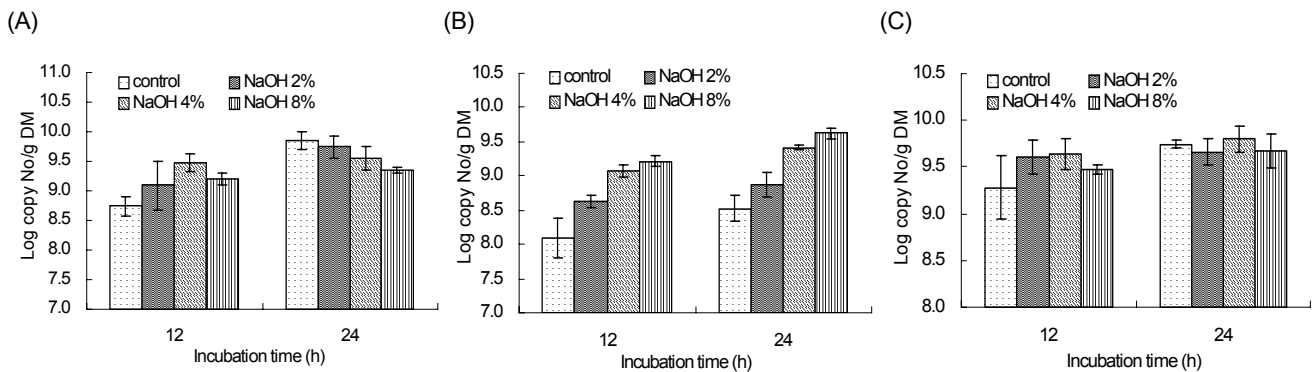


Fig. 5. The attachments of *F. succinogenes* (A), *R. flavefaciens* (B) and *R. albus* (C) on rice straw by NaOH treatments.

et al., 2008; McAllister et al., 1994). 따라서 본 연구에서 나타난 *in situ* 소화율 및 부착 섬유소 박테리아의 증가는 볏짚의 NaOH 처리에 의한 볏짚 표면 및 견고한 섬유소 구조의 파괴 효과로 인하여 나타난 결과로 사료된다. 그리고 이러한 처리 효과는 발효 초기에 미생물 부착에 영향을 주어 균락 형성을 용이하게 하며 이러한 현상은 섬유소 분해에 긍정적 영향을 미친다는 것을 시사한다.

IV. 요약

본 연구는 조사료의 반추위 발효가 진행됨에 따른 볏짚 표면에 부착된 섬유소 분해 박테리아의 군집변화와 섬유소 소화율을 비교 관측하기 위하여 볏짚의 *in situ* 반추 발효를 실시하였다. 그리고 부착 박테리아의 군집 변화를 측정하기 위하여 RT-PCR 기법을 이용하여 *F. succinogenes*, *R. albus*와 *R. flavefaciens*의 군집을 모니터링 하였다.

본 연구를 수행하기 위하여 *in situ* 볏짚 발효를 0, 2, 4, 8, 12, 24시간 실시하였을 때 반추위내 볏짚의 *in situ* 분해는 발효 시간이 진행됨에 따라 가속화되어 발효 8~12시간 사이에 최고 분해 속도를 나타내었으나, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens*과 *R. albus*는 모두 발효 0~1시간 사이에 볏짚 표면에 부착이 80% 이상 완료되어 이후 발효가 계속 진행되는 동안 일정 수준의 균락을 유지하는 것이 발견되었다. 그리고 반추위내 유입된 조사료의 표면에 초기 부착 과정을 관찰하기 위하여 0, 5, 10, 30 및 60분 간격으로 볏짚의 *in situ* 샘플을 채취하여 조사하였을 때 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 균락 모두 볏짚이 반추위 유입 후 5분 내에 상당량의 수가 부착함을 발견하였다. 또한 조사료의 반추위 발효 용이성에 따른 섬유소 분해 박테리아의 부착 정도를 관찰하기 위하여 0, 2, 4 및 8% NaOH를 처리한 볏짚을 12 및 24시간 *in situ* 배양 볏짚의 소화율과 부착 박테리아의 군집 변화를 관측하였을 때, 볏짚의 NaOH 처리 농도가 높아짐에 따라 *in situ* 소화율이 증가하였으며, 동시에 부착된 박테리아 군집의 증가 경향이 *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* 및 *R. albus*의 3균주 모두 배양 12시간에 나타났으나 배양 24시간에서는 각기 다른 양상을 나타냈다.

따라서 본 연구결과는 반추위내 섬유소 발효과정에서 섬유소 분해 박테리아의 부착은 조사료의 반추위 유입 초기에 반드시 이루어지고, 발효 시간이 진행됨에 따라 조사료 표면에 안정된 균락을 형성하며, 섬유소 분해가 가속화된다는 사실을 보여 주었다.

V. REFERENCES

- Bae, H.D., McAllister, T.A., Kokko, E.G., Leggett, F.L., Yanke, L.J., Jakober, K.D., Ha, J.K., Shin, H.T. and Cheng, K.J. 1997. Effect of silica on the colonization of rice straw by ruminal bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 65:165-181.
- Cheng, K.J. and Costerton, J.W. 1980. Adhesive bacteria-Their role in digestion of plant material, urea and epithelial cells. Pages 225-250 in *digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Y. Ruchebusch and P. Thivend, Eds, MTP press Ltd., Lancaster, England.
- Cheng, K.J., Forsberg, C.W., Minato, H. and Costerton, J.W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. In *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, ed. T. Tsuda, Y. Sasaki and R. Kawashima. Academic Press. Toronto, pp. 595-624.
- Craig, W.M., Broderick, G.A. and Ricker, D.B. 1987. Quantitation of microorganisms associated with the particulate phase of ruminal ingesta. *J. Nutr.* 117:56-64.
- Dehority, B.A., Tirabasso, P.A. and Grifo, A.P.Jr. 1989. Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including in the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2789-2792.
- Dinsdale, D., Morris, E.J. and Bacon, J.S.D. 1978. Electron microscopy of the microbial populations present and their modes of attach on various cellulosic substrates undergoing digestion in the sheep rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:160-168.
- Flint, H.J. and Forsberg, C.W. 1995. Polysaccharide degradation in the rumen: biochemistry and genetics. In *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. ed. W.V. Engelhardt, S. Leonhard-Mar, G. Breves and D. Giesecke. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, pp. 43-70.
- Forsberg, D.W., Cheng, K.J. and White, B.A. 1997. Polysaccharide degradation in the rumen and large intestine. In *Gastrointestinal Microbiology*, R.I. Mackie and B.A. White(Eds), Chapman and Hall, New York, U.S.A, p319-379.
- Gong, J. and Forsberg, C.W. 1989. Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* S85 and adherence defective mutants to cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3039-3044.
- Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and Its Microbes*. Academic Press. New York, N. Y.
- Hwang, I.H., Lee, C.H., Kim, S.W., Sung, H.G., Lee, S.Y., Lee, S.S., Hong, H., Kwan, Y.C. and Ha, J.K. 2008. Effects of mixtures of Tween80 and cellulolytic enzymes on nutrient digestion and cellulolytic bacterial adhesion. *Asian-Aust. J. Anim.*

- Sci. 21:1604-1609.
- Khejornartand, P. and Wanapat, M. 2010. Effect of Chemical Treatment of Rice Straw on Rumen Fermentation Characteristic, Anaerobic Fungal Diversity *in vitro*. J. of Animal and Veterinary Advances. 9:3070-3076.
- Koike, S. and Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. FEMS Microbiol. Lett. 204:361-366.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. J. Dairy Sci. 86:1429-1435.
- Krause, D.O. and Russell, J.B. 1996. How many ruminal bacteria are there? J. Dairy Sci. 79:1467-1475.
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A. and Cheng, K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72:3004-3018.
- Mehrez, A.A. and Orskov, E.I. 1977. A study of the artificial bac technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. J. Agr. Sci. 88:645-652.
- Merry, R.J. and McAllan, A.B. 1983. A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from the liquid and solid fractions of rumen digesta. Br. J. Nutr. 50:70.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., Peyron, C., Millet, L. and Fonty, G. 2001. Fibrolytic activities and cellulolytic bacterial community structure in the solid and liquid phases of rumen contents. Reprod. Nutr. Dev. 41:187-194.
- Minato, H. and Suto, T. 1979. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. III. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to starch granules *in vitro* and elution of bacteria attached therefrom. J. Gen. Appl. Microbiol., 25,71-93.
- Minato, H., Mitsumori, M. and Cheng, K.J. 1993. Attachment of microorganisms to solid substrates in the rumen. Pages 139-145 in Proc. MIE bioforum on Genetics, Biochemistry and Ecology of Lignocellulose Degradation. Institut Pasteur, Paris, France.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D. and Morrison, M. 2001. Invited Review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. J. Dairy Sci. 84:1294-1309.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D. and Morrisont, M. 2001. Adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. J. dairy Sci. 84:1294-1309.
- Ogimoto, K. and Imai, S. 1981. Atlas of Rumen Microbiology, Japan Scientific Societies Press, Tokyo.
- Pell, A.N. and Schofield, P. 1993. Microbial adhesion and degradation of plant cell walls Pages 397-423 in Forage Cell Wall Structure and Digestibility. R. D. Hatfield, H. G. Jung, J. Ralph, D. R. Buxton, D. R. Mertens, and P. J. Weimer, eds ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI.
- Purdy, K.J., Embley, T.M., Takii, S. and Nedwell, D.B. 1996. Rapid extraction of DNA and RNA from sediments by novel hydroxyapatite spin-column method. Appl. Environ. Microbiol. 62:3905-3970.
- Reilly, K., Carruthers, V.R. and Attwood, G.T. 2002. Design and use of 16S ribosomal DNA-directed primers in competitive PCRs to enumerate proteolytic bacteria in the rumen. 43:259-270.
- Reilly, K. and Attwood, G.T. 1998. Detection of *Clostridium proteoclasticum* and closely related strains in the rumen by competitive PCR. Appl. Environ. Microbiol. 64:907-913.
- Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S. and Gouet, P. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. Appl. Environ. Microbiol. 56:3081.
- Russell, J.B. and Rychlik, J.L. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. Science. 292:1119-1122.
- Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R. and Montgomery, L. 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 54:1079-1084.
- Sung, H.G. 2013. The Effects of Yeast Culture Utilization on Rice Straw Digestibility and Cellulolytic Bacterial Function in Ruminant. J. Animal Science and Technology. 55:41-49.
- Sung, H.G., Kobayashi, Y., Chang, J., Ha, A., Hwang, I.H. and Ha, J.K. 2007. Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20:200-207.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M. and Benno, Y. 2001. Diet-Dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl. Environ. Microb. 2766-2744.
- Williams, A.G. and Strachan, N.H. 1984. Polysaccharide degrading enzymes in microbial populations from the liquid and solid fractions of bovine rumen digesta. Can. J. Anim. Sci. 64:58-59.
- Woese, C.R. 1994. There must be a prokaryote somewhere: microbiology's search for itself. Microbiol Rev. 58:1-9.

(Received March 6, 2014/Revised March 13, 2014/Accepted March 17, 2014)