

Brevundimonas diminuta를 이용한 돈분뇨에서 발생하는 황화합물의 저감

오민환, 이은영*
수원대학교 환경에너지공학과

Received: August 2, 2017 / Revised: September 18, 2017 / Accepted: September 19, 2017

Reduction of Sulfur Compounds Produced from Swine Manure, Using *Brevundimonas diminuta*

Min-Hwan Oh and Eun-Young Lee*

Department of Environmental and Energy Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi 18323, Republic of Korea

Mixed substrate oil cakes are known to emit sulfides, ammonia, and amines. Microorganisms capable of removing odorous gases related to these sulfur compounds were isolated from colonies enriched in vials containing oil cakes and water. Activity tests for hydrogen sulfide and methyl mercaptan reduction were performed to measure the sulfide reduction ratio of the isolates. Control groups were prepared with 0.25 g oil cakes and 10 ml water in a 100-ml vial without inoculation. The experimental groups were prepared similarly, albeit with an inoculum. Hydrogen sulfide removal efficiency of >90% was observed for an isolate, which was identified as *Brevundimonas diminuta* by 16S rDNA sequence analysis. The sequence was deposited in the Korean Collection for Type Cultures under the accession number KCTC11724BP. *B. diminuta* could remove up to 200 ppmv standard hydrogen sulfide in 24 hours and demonstrated a maximum hydrogen sulfide and methyl mercaptan removal efficiency of 100% at 453 ppmv and 98 ppmv, respectively, in vial tests. Furthermore, *B. diminuta* cells in 20% (v/w) medium showed removal efficiency of >85% for sulfur compounds in an odor emission chamber for swine manure.

Keywords: Odor, swine manure, *Brevundimonas diminuta*, H₂S, CH₃SH

서 론

유기물을 대량으로 함유하고 있는 가축분뇨는 최근 가축 사육의 대규모화에 따라 그 발생량이 증가하고 있다. 국내에서 연간 부산되는 가축 분뇨량은 약 4천만 톤에 이른다[1]. 근래에 와서 축산업의 고도성장으로 인한 집약화, 대규모화에 따라 가축분뇨의 생산량은 급증하며, 축산분뇨에서 야기된 수질 환경오염과 악취는 축산산업이 해결해야 할 시급한 과제로 남게 되었다[2]. Rall의 연구진에 따르면 돼지 분뇨에서 분리할 수 있는 미생물은 *Clostridium* sp. *Lactobacillus*, 그리고 *Staphylococcus*로 보고하였으며[3], 돼지 분뇨에서 발

견되는 미생물은 *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, 그리고 *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, 그리고 *Bacillus*로 보고되었다[4]. 혐기적 배양에서 분리된 미생물은 *Eubacterium*, *Clostridium*, 그리고 *Propionibacterium acnes*였으며[5], 이와 유사한 결과는 Russell의 연구에서도 보고되었고 *Streptococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, 그리고 *Megasphaera*도 포함되어 있다[6]. 이러한 결과를 종합해 보면 돼지 분뇨에서 발견되는 미생물은 그람양성 구균(*Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*)과 *Megasphaera* (39%), *Eubacterium* (27%), *Lactobacillus* (20%), 그람음성 간균인 *Escherichia* (8%) 그리고 *Propionibacterium acnes*과 *Bacteroides* (<2%)로 나타난다. 한편 저장시설의 분뇨는 혐기적 상태에서 미생물에 의해 악취를 발생하며, 악취 화합물은 크게 휘발성지방산(R-CH₂COOH), 인돌과(C₈H₇N) 스카톨(C₉H₉N), 암모니아(NH₃)와 아민(R-NH₂), 황화합물

*Corresponding author

Tel: +82-31-220-2614, Fax: +82-31-220-2614

E-mail: ley@suwon.ac.kr

© 2017, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

4가지 그룹으로 분류된다[7]. 휘발성지방산의 발생은 *Eubacteria*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Escherichia*, *Megasphaera*, *Propionibacterium*, *Lactobacilli*, 그리고 *Clostridium*속의 미생물이 관여하여 발생하는 것으로 보고되며, 인돌과 스카톨의 발생은 *Propionibacterium*, *Escherichia*, *Eubacteria*, 그리고 *Clostridia*속의 미생물이 관여한다. 암모니아와 아민의 발생은 *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, 그리고 *Bacteroides*속의 미생물이 관여하며 황화합물의 발생은 오직 *Megasphaera*속의 미생물이 관여하는 것으로 보고된다[8].

2005년 환경부에서 시행한 악취방지법에서 정한 48개의 악취배출시설 중에 하나로 축산시설이 지정되었다. 축산업이 지속가능한 산업으로 발전하기 위해서는 지역 주민과의 갈등요인을 제거하고 점점 강화되는 가축분뇨의 처리 및 악취의 규제 정책에 대한 합리적인 대응 방안이 마련되어야 한다[9]. 이러한 실정임에도 축산농가에서는 가축의 집단화에 따른 열악한 환경문제로 인해 발생하는 질병들을 화학소독[10, 11]과 항생제로만 해결하려고 하고 있다. 화학소독은 저렴하게 악취물질을 처리할 수는 있지만, 토양의 과도한 유기질화로 인한 2차적 오염이 문제가 되며 그에 따라서, 가축사육 개선제 및 분뇨자원화 처리시 발생하는 악취를 저감시키기 위해 국내 축산 농가에서 환경개선제로 미생물제제에 대한 관심이 증가하였으며[12], 많은 농가에서 이용하고 있는 실정이다. 환경개선제 종류로는 미생물제제, 효소제, 추출물제제, 무기물제제 등이 이용되고 있다[13-15]. 현재 생균제로 많이 이용되는 미생물은 *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus bovis*, *Streptococcus intestinalis*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 등이 있다. 토양 중에는 곰팡이, 박테리아, 방선균, 사상균, 조류 외에 바이러스 등 1천여 종의 미생물이 공생하고 있으며, 이 중에서 약 900여 종이 유익 미생물이며 100여 종이 유해 미생물로 분류되고 있다. 화학소독은 유익 미생물까지 박멸하여 결과적으로 유해균이 우점하게 되며 살균 소독을 정기적으로 하는 축산농가에서 호흡기 질환, 설사와 피부병의 증가로 폐사율이 증가하고 가축의 생산성 격감, 사료효율 저하는 물론 환경 관련 민원의 증가로 이어지고 있다. 현재까지 축산악취의 원인 물질인 암모니아를 대상으로 저감하는 방법들이 주를 이루고 있으나[16, 17], 실제로 암모니아보다 최소 감지농도가 적은 황화합물의 악취가 축산악취의 대표물질로 나타나고 있다. 또한, 물리·화학적 방법의 경우 경제성과 안전성의 문제가 제기되어 실제 농가 단위의 현장에서 적용이 활발하지 못한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 축산악취 제거방법 개발 중 생물학적 악취저감제 개발을 목표로 악취저감 능력이 우수한 미생물을 선별하고 이를 이용한 실제적 악취저감제 개발 가능성을 검토한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

악취저감 미생물 탐색 및 분리

유박은 친환경 유기농자재로 분류되는 고농도의 유기질 비료로서 물과 혼합되어 혐기적으로 방치될 때 돈분뇨와 유사한 악취를 발생시켜준다. 악취저감 미생물을 탐색하기 위하여 혼합유박((주)KG케미칼; 피마자박 57%, 채종박 25%, 미강박 18%; C: 40.2%, H: 5.8%, N: 5.3%)을 믹서기로 갈아서 악취발생원으로 사용하였다. 이 때 발생하는 악취는 매번 조금씩 차이가 나기 때문에 충분한 양의 바이얼을 준비한 후 이 중 유사한 농도의 황화수소 및 메틸메르캅탄이 발생된 바이얼을 Gas chromatography/Flame photometric detector (FPD)로 분석 후 선별하여 본 실험에 이용하였다. 100 ml 용량의 유리 바이얼 내에 0.25 g의 혼합 유박가루와 10 ml의 증류수를 넣고, 테프론 코팅된 셉텀이 장착된 마개를 이용하여 밀봉하여 상온에 두었다. 시간이 지남에 따라 분뇨와 유사한 악취가 발생되며 이를 유리 바이얼의 headspace에 발생된 가스 시료를 gas-tight syringe를 이용하여 주기적으로 채취하고 GC/FPD로 시료 내의 황화수소 및 메틸메르캅탄을 분석하였다[18]. 이후 위의 장치를 본 논문에서는 악취 바이얼로 명명하였다. 미생물 접종원으로는 S시에 위치한 하수처리장의 폭기조 활성 슬러지와 완주군에 위치한 국립축산과학원 내 돼지농장의 돈분이 사용되었다. 농화배양을 시작하기 위하여 악취바이알에 각각의 미생물 접종원을 배양액의 10%가 되도록 1 ml와 1 g (wt)씩 주입하여 30°C에서 2일간 진탕 배양하였다. 배양된 유박물 상등액 1 ml를 분취하여 다시 새로운 악취바이알에 접종하여 이를 4 반복하였다. 4차 농화배양 후 유박물 상등액은 nutrient agar, potato dextrose agar 그리고 MRS agar 배지에 도말 평판법으로 배양하였다. 이후 배양된 각각의 콜로니를 순수분리하기 위하여 희석도말법을 이용하여 30°C에서 2일간 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 이와 같은 방법으로 얻은 순수 배양된 콜로니의 악취저감 효과를 확인하기 위하여 상기와 같은 악취 바이알에 분리균 액체배양액 1 ml를 접종하였으며 대조군에는 증류수 1 ml를 주입하여 30°C에서 진탕 배양하였다.

이후 최종 선정된 균주 *B. diminuta* R2-3의 성장 및 악취저감테스트를 다시 수행하였다. R2-3의 성장 및 개체수 변화를 관찰하기 위해서 멸균된 nutrient broth 배지 500 ml에 균주 배양액 5 ml를 접종하고, 30°C 온도와 120 rpm 조건으로 배양하였으며 일별 세포수 변화는 counting chamber를 이용하여 관찰하였다. 호기적 배양은 sili stopper를 이용하여 밀봉하였으며 혐기적 배양은 headspace를 질소가스로 치환하고 실리콘 마개로 밀봉하였다.

R2-3 균주의 황화수소 제거율을 200 ppmv로 제조된 표준가스(Rigas, Korea)를 이용하여 확인하였다. 1 L 용량의 혈

청병에 균주배양액을 10%(v/v)이 되게 주입한 후 황화수소 표준가스를 일정 농도로 희석한 후 최종 농도가 10 ppmv, 50 ppmv, 100 ppmv, 200 ppmv가 되도록 첨가한 후 실리콘 마개와 알루미늄 캡을 이용하여 밀봉하고 120 rpm으로 교반하면서 주기적으로 시료를 채취하여 가스의 농도를 측정하였다.

악취저감 균주 선정 및 동정

분리 균주 중에서 황화합물의 저감효율이 가장 높은 균주를 유전자 동정 방법인 16S rRNA 유전자 염기서열 분석으로 동정을 의뢰하였으며 균주 보관을 위해 KCTC(생명공학연구소 부설 유전자은행)에 기탁하였다(accession number: kctc 11724 bp). 활성이 확인된 단일 콜로니에서 DNA 추출 kit (MPBio, USA; Fast DNA spin kit for soil)을 이용해 genomic DNA를 추출하였고, 추출된 DNA를 template로 하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. DNA template 1 µl와 primer 를 각각 20 pmol씩 넣고 0.5 mg/ml BSA, 0.2 mM dNTP, 2.5 µl의 10× buffer를 넣어 dH₂O로 총 부피를 25 µl가 되도록 하였다. 이때 사용한 primer는 universal primer로 27f(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AC-3')와 1492r(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT-3')이다[19]. PCR 조건은 93°C에서 2분 동안 pre-denaturation한 후, 92°C에서 denaturation 1분, 55°C에서 annealing 1분, 68°C에서 extension 45초 과정을 35 cycle 반복하였다. 그리고 72°C에서 2분 동안 최종 extension한 후 4°C에서 holding 하였다. 증폭된 PCR 산물의 DNA의 염기서열을 결정하여 the National Center for Biotechnology Information (NCBI) website의 basic Local Alignment Search Tool (BLAST) algorithm을 통해 GenBank database와 비교하여 균주를 동정하였다[20].

돈분노 악취반응기에서의 악취저감 효과

분리균주의 돈분노로부터 발생하는 악취 저감 효과를 알아보기 위해서 약 96 L의 부피를 갖는 아크릴 재질의 반응기를 제작하였다(Fig. 1). 반응기 내부에는 소형팬 2개를 부착하여 악취가 고르게 포화되도록 하였으며, 반응기 상단에는 악취 시료 채취관과 액상 배양된 미생물을 분무할 수 있는 노즐을 설치하였다. 반응기 하단에는 돈분노 3 kg을 두고 임펠터를 이용하여 70 rpm으로 서서히 교반하였으며 반응기를 두는 실내환경을 25°C를 유지시켰다[21]. 이 후 반응기내부의 악취 시료를 시료 채취구(Fig. 1(A) 3)에서 매일 채취하여 이를 아래 분석방법에서 설명한 분석기를 이용하여 분석하였다.

분석 방법 및 통계처리

악취바이알 및 악취반응기에서 발생된 황화합물 농도는

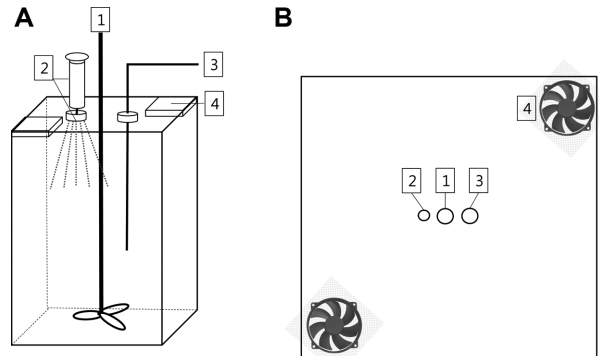


Fig. 1. Schematic diagram of chamber used for the generation of odor produced from swine manure (A), The upper side of chamber (B). 1: impeller, 2: syringe and nozzle, 3: odor sampling port, 4: FAN.

GC/FPD로 분석하였다. GC의 분석조건은 Table 1에 정리하였다. 실험군의 분석결과는 SPSS (PASW Statistics 18)을 이용하여 대조군과 비교하여 등분산 가정에 의한 two sample *t*-test를 수행하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

악취저감 미생물의 탐색 및 분리

돈분 및 활성슬러지를 미생물 분리원으로 이용하여 악취 바이알에 접종한 후 시간을 두고 모니터링한 결과 악취분해 활성이 우수한 배양액을 취하여 고체배지에 도말하여 모양과 색이 각기 다른 균주 30종을 순수 분리하였다.

악취 바이알에 분리 균주를 접종한 실험군과 균주를 접종하지 않은 대조군과 비교하여 황화수소 저감 능력을 알아보기 위하여 악취저감 활성테스트를 진행하였다. 황화수소의 저감율은 아래의 식 (1)을 이용하여 계산하였다.

H_2S removal ratio (%) =

$$\frac{H_2S \text{ concentration of control group} - H_2S \text{ concentration of experimental group}}{H_2S \text{ concentration of control group}} \times 100 \quad (1)$$

Table 1. Analysis conditions of GC/FPD.

Description	Condition
Injector	150 °C
Column	Glass Packed Column, 1,2,3-TCEP / ID: 2.6 mm, L: 2 m
Column flow	N ₂ , 10.1 ml/min
Oven temp.	60 °C (0 min)-130 °C (1 min), 20 °C/min
Detector	FPD, 150 °C

메틸머캅탄의 저감율도 황화수소의 저감율과 동일하게 아래의 식 (2)에 의거하여 계산되었다.

$$\text{CH}_3\text{SH removal ratio}\% = \frac{\text{CH}_3\text{SH concentration of control group} - \text{CH}_3\text{SH concentration of experimental group}}{\text{CH}_3\text{SH concentration of control group}} \times 100 \quad (2)$$

대조군에서 발생하는 황화합물 농도보다 적게 발생하는 실험군 바이알에 주입된 균주가 황화합물 저감 능력이 있는 것

으로 간주하였다. 예를 들어 균주 R2-2, R2-3, R2-4, R2-6, R2-7, R2-8, R2-9는 발생하는 H₂S 약취를 96.7% 이상 제거하였으며, RJE2-1, RJE2-3 등은 95%, 이상 기타 R9 및 RJE2-2, RJE2-7 등의 활성도 84.7% 이상으로 매우 효과적으로 H₂S 약취를 제거하였다.

이들 분리균주의 메틸머캅탄의 저감은 대조군과 비교하여 음의 저감값을 보이는 것도 있었으나, 10% 이하의 낮은 제거 능력을 보이는 균주부터 50% 이상의 제거능력을 보이는 균주도 있었다. 이중, R2-3 균주는 96.2%의 저감 능력을 보

Table 2. Comparative hydrogen sulfide and methylmercaptan removal ratio of isolates in odor vials.

Name	H ₂ S concentration (ppmv)	Removal ratio (%)	CH ₃ SH concentration (ppmv)	Removal ratio (%)	Identity
Control	551.0–680.2	-	201.3–221.3		
R2-1	661.4	-20.0	200	5.2	
R2-2	0.0	100.0	100	52.6	<i>Brevundimonas diminuta</i>
R2-3	0.0	100.0	8	96.2	<i>Brevundimonas diminuta</i>
R2-4	7.0	98.7	120	43.1	<i>Pseudomonas mosselii</i>
R2-6	18.4	96.7	75.7	64.1	<i>Pseudomonas mosselii</i>
R2-7	0.0	100.0	150	28.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
R2-8	0.0	100.0	65.6	68.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
R2-9	0.0	100.0	137	35.1	<i>Bacillus subtilis</i>
R2-10	839.4	-52.3	218	-3.3	
R2-11	751.3	-36.4	220	-4.2	
R2-12	611.4	-11.0	206	2.4	
R2-13	226.2	59.0	159	24.6	
CO1	672.0	-22.0	205	2.8	
CO2	810.0	-47.0	165	21.8	
CO3	753.1	-36.7	176	16.6	
CO4	720.5	-30.8	166	21.3	
0.5R1	869.2	-27.8	170	19.4	
0.5R2	495.5	27.2	128	39.3	
0.5R3	219.1	67.8	91.2	56.8	<i>Bacillus subtilis</i>
0.5R4	885.6	-30.2	108	48.8	
0.5R6	427.6	37.1	129	38.9	
0.5R6-1	780.6	-14.8	108	48.8	
0.5R7	405.9	40.3	102	51.6	
0.5R8	147.1	78.4	152.3	27.8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
0.5R9	74.2	89.1	98.8	53.2	<i>Pseudomonas lurida</i>
0.5R11	535.6	21.3	209	0.9	
RJE2-1	34.2	95.0	109	48.3	
RJE2-2	55.9	91.8	89	56.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RJE2-3	24.7	96.4	110	48.9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RJE2-4	746.7	-9.8	201	4.7	
RJE2-5	891.9	-31.1	179	15.2	
RJE2-7	104.0	84.7	97.7	53.7	<i>Serratia marcescens</i>
RJE2-9	840.8	-23.6	178	15.6	

였다(Table 2).

악취저감 활성 분석 결과, 황화수소의 저감 능력이 90% 이상인 균주는 계대배양 후, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석으로 동정을 의뢰하였다. 동정된 균주에는 *Brevundimonas diminuta*, *Pseudomonas mosselii*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Stenotrophomans maltophilia*, *P. lurida*, *Serratia marcescens*이었다.

동정된 다른 균주들에 비해 *Brevundimonas diminuta* R2-3 균주가 접종 3시간만에 메틸머캅탄을 100% 제거하는 결과를 보였으며 5일 동안 효과가 지속되었다(Table 2).

*B. diminuta*는 통성혐기성 균주로서 Proteobacteria로 분류되며, 30°C의 배양온도에서 pH 5에서 pH 9까지의 범위에서 생육이 왕성하고, 배양온도 20–40°C까지 비슷한 성장 특성을 가진다[22]. 또한 *B. diminuta*는 암모니아성 질소산화율이 우수한 것으로 알려져 있으며, 이용 가능한 탄소원으로 glucose, arabinose, mannitol, n-acetyl-glucosamine, maltose, gluconate와 cytochrome oxidase 등이 알려져 있다[22]. 본 연구의 결과로 *B. diminuta*의 암모니아 제거능력 뿐 아니라 황화합물에 대한 효과적인 제거를 확인되었다.

B. diminuta R2-3의 성장 특징 및 악취 저감 효과

B. diminuta R2-3의 성장특성을 알아보기 위하여 호기적 조건과 혐기적 조건에서 배양하며 10일까지 counting chamber를 이용하여 세포수를 확인하였다. 균주 접종 1일만에 10^8 의 세포수가 확인되었으며 호·혐기 조건 모두 배양 3일째에 10^9 으로 가장 높은 세포수를 나타내며 배양 12일째까지는 호·혐기 조건에서 세포수의 큰 변화를 나타내지 않는다. 배양 10일까지 호·혐기 조건 각각에서 10^9 과 10^8 의 세포수를 나타내어 *B. diminuta*의 배양에는 호·혐기 조건이 큰 영향을 나타내지 않는 것으로 보인다(Fig. 2A).

B. diminuta R2-3의 황화합물 악취저감 능력 및 지속 능력을 알아보았다. 먼저, 고농도의 황화수소를 일정 농도로 희석하여 R2-3 배양액을 주입한 결과, 저농도인 10 ppmv와 50 ppmv의 황화수소는 12시간내에 고농도인 100 ppmv, 200 ppmv의 경우는 24시간내에 모두 제거되는 것으로 나타났다(Fig. 2B).

B. diminuta R2-3의 고농도 악취 저감 능력 및 지속 능력을 알아보기 위하여 악취바이알을 이용하여 실험하였다. 대조 실험을 위하여 본 연구실에서 분변토로부터 분리한 균주로서 황산화세균(Sulfur oxidation bacteria, SOB)으로 보고된[23, 24] *Acidithiobacillus caldus*를 포함하여 진행하였다(Fig. 3).

악취바이알을 이용한 *B. diminuta* R2-3의 황화합물 저감 지속 효과를 실험한 결과 *A. caldus* 접종군에 비해 황화수소 저감 능력은 더 우수하며 1회 균주 접종으로 약 5일의 지속 시간을 나타내었다. 황화수소의 초기 농도 453 ppmv를 접종 2일 후 100% 제거하였으며, 5일간 효과를 지속하였다. 또한 메틸머캅탄의 경우 초기농도 98 ppmv에서 균주 접종 4일차까진 *A. caldus* 접종군보다 더 빠른 저감 효율을 보였으며 6일 후 모두 제거하였다. 일반적으로 SOB는 H_2S 를 황산염으로 산화시켜주는 독립영양성 세균으로 환경기초시설에서 발생하는 황계열의 악취를 제거하는 바이오필터 등에 많이 적용된다. 그러나, 분뇨는 많은 유기물이 함유되어 있는 기질로 독립영양성 세균이 장기간에 걸쳐 우수한 활성을 높게 유지하기 어려운 환경이다.

B. diminuta R2-3의 돈분뇨 악취반응기에서의 악취 저감 효과

분리 균주 *B. diminuta* R2-3의 축산악취 저감 제제로서의 적용가능성을 확인하기 위하여 돈분뇨에 접종 후 악취의 변

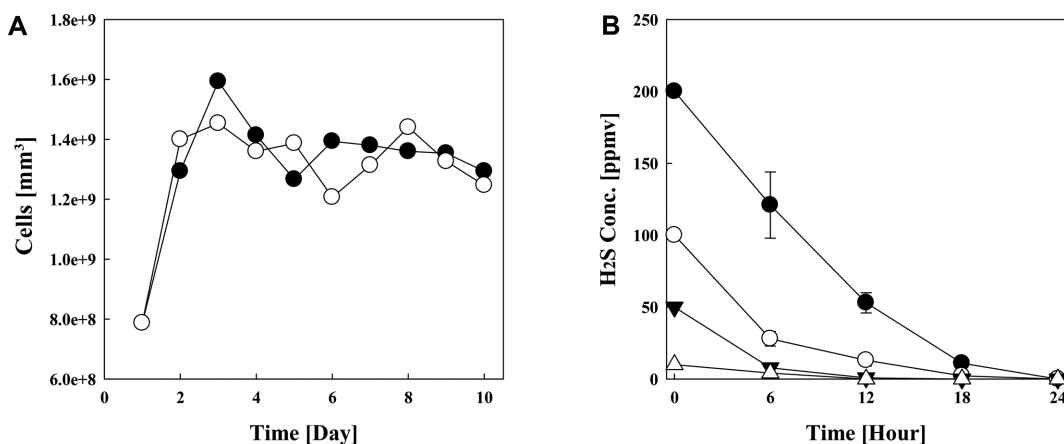


Fig. 2. (A) Growth curve of *B. diminuta* under aerobic and anaerobic conditions, (B) Comparative hydrogen sulfide removal efficiencies of *B. diminuta*. (A) ●, aerobic condition; ○, anaerobic condition, (B) ●, 200 ppmv; ○, 100 ppmv; ▼, 50 ppmv; △, 10 ppmv.

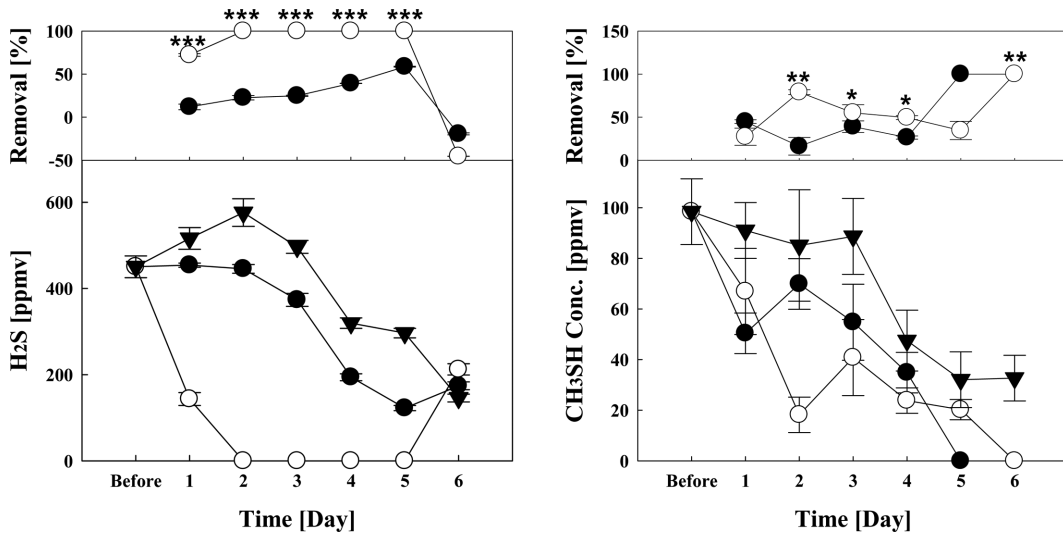


Fig. 3. Comparative sulfur compounds removal efficiencies of *B. diminuta* in odor emission chamber. ▼, Control; ○, *Brevundimonas diminuta*; ●, *SOB, Acidithiobacillus caldus*; *0.01 < p ≤ 0.05; **0.001 < p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001.

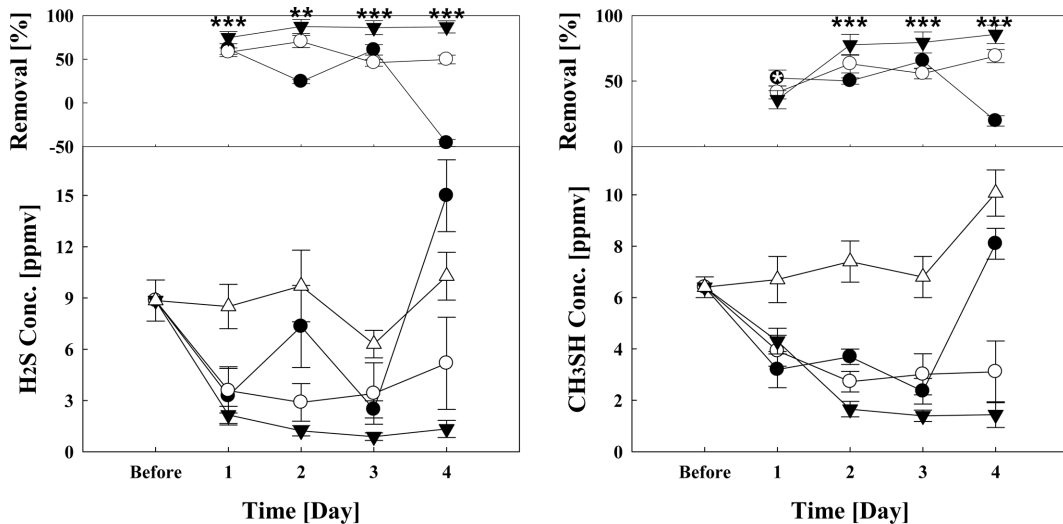


Fig. 4. Comparative sulfur compounds removal efficiencies to inoculation rates of *B. diminuta* in odor emission chamber. (Symbols; △: 0%, ●: 5%, ○: 10%, ▼: 20% of inoculation; *0.01 < p ≤ 0.05; **0.001 < p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001).

화를 살펴보았다(Fig. 1). 악취저감율은 위 식 (1)과 식 (2)에 의거하여 계산하였다. *B. diminuta*의 접종량 별 황화합물 저감 효과를 확인하기 위해서 균주 주입량을 돈분뇨 시료의 5, 10 그리고 20%(v/w)에 해당하는 150, 300 그리고 600 ml의 배양액을 분무하였다. 돈분뇨에서 발생하는 악취 황화수소와 메틸메르캡탄을 측정하였으며, 이를 Fig. 4에서 각 접종량 별 시간의 경과에 따른 저감효과를 알아보았다.

돈분뇨에 *B. diminuta* R2-3의 배양액을 접종하고 총 4일간의 악취모니터링 결과, 20%(v/v) 접종량으로 분무해주었을 때 H₂S를 최대 87%의 제거효과를 가진다. 메틸메르캡탄

의 경우, 20%(v/v)의 균주 접종량에서 유의한 차이로 최대 85%의 제거효율을 갖는 것으로 나타났다(Fig. 4). 따라서, 황화물 중 황화수소와 메틸메르캡탄을 모두 효과적으로 제거하기 위해서는 접종량을 20%로 하는 것이 효과적인 것으로 나타났다. 돈분뇨를 넣은 반응기에는 실제 분뇨 악취가 발생되고 이중에는 암모니아도 포함된다. 5%의 균주 접종량을 분무할 경우 1일만에 초기 농도 5.5 ppmv의 54%를 제거하였으며, 반응 4일째에는 83.6%를 제거할 수 있었다(data not shown). 황화수소로 농화배양되어 분리된 R2-3은 황화합물을 가장 효과적으로 제거하지만 암모니아도 효과적으로

제거함을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 축산악취저감을 위한 악취저감 미생물을 돈분과 폭기조 활성슬러지로부터 분리 및 동정을 실시하였으며 분리 미생물의 황화합물 저감 효과를 분석하였다. 그 결과, *Brevundimonas diminuta* R2-3을 분리하였으며 KCTC에 기탁하여 기탁번호 KCTC11724BP를 부여받았다. 악취바이알에서 *B. diminuta* 균주는 약 453 ppmv의 황화수소 농도에서는 5일동안 100% 저감 능력과 지속시간을 나타냈으며 98 ppmv의 메틸머캅탄의 농도에서 실험 6일째 100% 저감 효과를 나타냈다. 그리고 돈분뇨 시료를 악취 발생원으로 하는 반응기 실험에서는 돈분뇨의 약 20%(v/w)의 균주 배양액을 분무하였을 때 황화수소와 메틸머캅탄의 저감 능력과 지속시간이 각각 95%와 4일 이상으로 매우 높은 저감 효과를 나타내었다.

요 약

혼합유박은 황화물, 암모니아 그리고 아민이 발생하는 것으로 알려져 있다. 악취 저감 미생물을 선별하기 위해 물과 혼합유박이 포함된 바이알을 농화 배양하였다. 황화물 저감 미생물의 분리를 위해 황화수소 및 메틸머캅탄 저감 활성 실험을 수행하였다. 대조군에는 100 ml 바이알에 혼합유박 (0.25 g)과 증류수(10 ml)를 넣어 악취를 발생시켰으며 실험군에는 대조군 바이알과 같은 상태에서 분리균주를 접종하였다. 분리균주 중에서 황화합물의 저감효율이 가장 높은 균주를 일반적인 동정 방법인 16S rRNA sequence 분석으로 동정 결과 *Brevundimonas diminuta*로 동정되었으며 KCTC에 기탁하여 기탁번호 KCTC11724BP를 부여받았다. *B. diminuta*는 황화수소 표준가스를 200 ppmv까지 24시간내에 모두 제거하였다. 또한, 황화수소와 메틸머캅탄의 최대 제거 효율은 바이알 실험에서 453 ppmv와 98 ppmv에서 각각 100% 효율을 나타냈다. 또한 돈분을 이용한 악취발생반응기에서는 접종량 20% (v/weight of swine manure)일 때 황화물 95% 이상 제거 효율을 나타냈다.

Acknowledgments

This work was supported by Korea Institute of Planning and Evaluation for Technology in Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (IPET) through Advanced Production Technology Development Program, funded by Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs (MAFRA) (316012-03-2-WT011).

References

1. Heo D. 2005. A Study on the Direct Payment Pilot Project for Environmental Friendly Livestock Farming in Korea. Korea Rural Economic Institute.
2. Lowe PD. 1995. Social issues and animal wastes: A European perspective. *In: Proceedings of International Livestock Odor Conference.* pp 168-171. Iowa State Univ. College of Agric., Ames.
3. Rall GD, Wood AJ, Westcott RB, Dommert AR. 1970. Distribution of bacteria in feces of swine. *Appl. Microbiol.* **20**: 789-792.
4. Nuru S, Osbaldiston GW, Stowe EC, Walker D. 1972. *Fecal microflora of healthy cattle and pigs*, The Cornell Veterinarian **LXII**: 242-253.
5. Salanitro JP, Blake IG, Muirhead PA. 1977. Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 79-84.
6. Russell EG. 1979. Types and distribution of anaerobic bacteria in the large intestine of pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 187-193.
7. Mackie RI. 1994. Microbial production of odor components. *In: Proc. of International Round Table on Swine Odor Control*, 13-15 June at Ames, IA, USA, pp. 18-19.
8. Zhu J. 2000. A review of microbiology in swine manure odor control. *Agric. Ecosyst. Environ.* **78**: 93-106.
9. Oh CM. 2016. *A study on the technological trends on the odor emission of pig manure.* Master dissertation. Sungkyunkwan University, Suwon, Korea.
10. Watkins BD, Hengemuehle SM, Person HL, Yokoyama M, Masten SJ. 1997. Ozonation of swine manure wastes to control odors and reduce the concentrations of pathogens and toxic fermentation metabolites. *Ozone Sci. Eng.* **19**: 425-437.
11. Wu JJ, Park SH, Hengemuehle SM, Yokoyama M, Person HL, Masten SJ. 1998. The effect of storage and ozonation on the physical, chemical, and biological characteristics of swine manure slurries. *Ozone Sci. Eng.* **20**: 35-50.
12. Lee EY. 2008. Problems and verification system of probiotics as livestock-environment improving agent produced and circulated. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 87-95.
13. Chiang SH, Hsieh WH. 1995. Effect of direct-fed microorganisms on broiler growth performance and litter ammonia level. *Asian-Aus. J. Anim. Sic.* **8**: 159-162.
14. Kim JH, Kim CH, Ko YD. 2001. Effect of dietary supplementation of fermented feed (Bio- $\text{D}^{\text{®}}$) on performance of finishing pigs and fecal ammonia gas emission. *J. Anim. Sci. & Technol.* **43**: 193-202.
15. Jung, J.H., Hong, S.M., Kim, H.Y., Meng, Q.W., and Kim, I.H. 2010. Effect of probiotics in diet on growth performance, nutrient digestibility, fecal microbial count, noxious gases emission from the feces, and blood profile in early-finishing pigs. *J. Anim. Sci. & Technol.* **52**: 23-28.
16. Hayes ET, Leek ABG, Curran TP, Dodd VA, Carton OT, Beattie VE, et al. 2004. The influence of diet crude protein level on odour and ammonia emissions from finishing pig houses. *Biores. Tech.* **91**: 309-315.

17. Zhu J, Riskowski GL, Torremorell MT. 1998. Volatile fatty acids as odor indicators in swine manure-A critical review. *Transactions of the ASAE*. **42**: 175-182.
18. National Institute of Environmental Research. 2007. Official odor test method.
19. Hongoh Y, Yuzawa H, Ohkuma M, Kudo T. 2003. Evaluation of primers and PCR conditions for the analysis of 16S rRNA genes from a natural environment. *FEMS Microbiol*. **221**: 299-304.
20. Sim HS, Kim MD. 2016. Antipathogenic activity of *Bacillus amylo-liquefaciens* isolated from Korean traditional rice wine. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. **44**: 98-105.
21. Lee EY, Lee SJ. 2010. Emission characterization of ammonia produced from swine nightsoil. *Korean J. Microbiol. Biotechnol*. **38**: 308-314.
22. Kwon HG, Jung JO. 2007. Isolation and characteristics of novel ammonia oxidizing bacteria *Brevundimonas diminuta*. *Korean J. Env. Hlth*. **33**: 293-298.
23. Hassan SHA, Van GSW, Kim SM, Yoon SH, Joo JH, Shin BS, et al. 2010. Isolation and characterization of *Acidithiobacillus caldus* from a sulfur-oxidizing bacterial biosensor and its role in detection of toxic chemicals. *J. Microbiol. Methods*. **82**: 151-155.
24. Stefanie M, Jorge V, David H, Mark D. 2011. Sulfur metabolism in the extreme acidophile *Acidithiobacillus caldus*. *Frontiers in Microbiology* **2**: 1664-1681.