

가축사체 매몰지 토양의 미생물 군집 분석 Analysis of Microbial Communities in Animal Carcass Disposal Soils

박정안 · 최낙철 · 김성배*[†]
Jeong-Ann Park · Nag-Choul Choi · Song-Bae Kim*[†]

서울대학교 환경기능성물질 및 바이오콜로이드연구실
*서울대학교 지역시스템공학과

Environmental Functional Materials and Biocolloids Laboratory, Seoul National University

*Department of Rural Systems Engineering, Seoul National University

(2013년 4월 4일 접수, 2013년 7월 30일 채택)

Abstract : The aim of this study was to investigate the microbial communities in animal carcass disposal soils to examine the possible threat of pathogens from leachate. DNA extraction was performed for the soils in three carcass disposal sites located in Gyeonggi-do, Korea, and then 16S rRNA pyrosequencing was conducted to identify the microbial communities. Results indicate that, according to phylum classification, *Proteobacteria* (100%) was identified in soil A, *Actinobacteria* (66.4%) > *Proteobacteria* (31.1%) > *Bacteroidetes* (2.1%) > *Acidobacteria* (0.3%) in soil B, and *Actinobacteria* (63.1%) > *Proteobacteria* (36.9%) in soil C. According to genus classification, *Pseudomonas* was dominant in soil A (98%), *Arthrobacter* in soil B (68%) and C (61%). There were no detections of pathogens such as *Salmonella*, *Campylobacter* and *Clostridium perfringens*. However, high concentration of *Ralstonia pickettii* causing bacteremia was observed. Although carcass disposal soils examined in this study were not highly contaminated with pathogens, further monitoring is still needed to examine the potential threat of pathogens in leachate derived from carcass disposal sites.

Key Words : Animal Carcass Disposal Soils, Bacteria, Microbial Community, 16S rRNA Pyrosequencing, Pathogens

요약 : 본 연구의 목적은 가축사체 매몰지 토양의 침출수 오염에 따른 병원성 미생물에 의한 잠재적 위해성을 평가하기 위하여 미생물 군집을 조사하는 것이다. 경기도 지역에 위치한 가축사체 매몰지 세 군데(A, B, C) 토양을 대상으로 DNA를 추출하여, 16S rRNA 염기서열을 분석을 통해 미생물 군집을 조사하였다. 연구결과를 문(phylum)별로 구분해보면, A 토양은 전체 토양미생물이 *Proteobacteria* (100%) 1개의 문으로 동정되었으며, B 토양은 *Actinobacteria* (66.4%) > *Proteobacteria* (31.1%) > *Bacteroidetes* (2.1%) > *Acidobacteria* (0.3%) 순으로, C 토양은 *Actinobacteria* (63.1%) > *Proteobacteria* (36.9%) 순으로 분포하였다. 속(genus)별로 구분해보면, A 토양에서는 *Pseudomonas*가 98% 비율로 나타났고, B와 C 토양의 경우 *Arthrobacter*이 각각 68, 61%로 우점하였다. 세 군데(A, B, C) 토양 미생물 군집의 종 다양성을 Shannon 지수에 근거하여 분석한 결과, B 토양(3.45)과 C 토양(3.43)은 유사한 수준이었으나, A 토양(2.37)은 가장 낮게 계산되었다. 또한, 분석결과 *Salmonella*, *Campylobacter* 그리고 *Clostridium perfringens*과 같은 병원균도 발견되지 않았으나, 세균혈증을 일으키는 *Ralstonia pickettii*가 높은 농도로 관찰되었다. 본 연구에 사용된 가축 매몰지 토양은 침출수에 의한 미생물학적 오염도가 낮은 것으로 판단되지만, 가축매몰에 따른 병원성 미생물에 의한 토양의 잠재적 위해성을 평가하기 위하여 지속적인 모니터링이 필요하다.

주제어 : 가축 매몰지 토양, 세균, 미생물 군집, 16S rRNA 파이로시퀀싱, 병원성 미생물

1. 서론

세계적으로 조류인플루엔자(Avian Influenza, AI) 및 구제역(Foot-and-Mouth Disease, FMD)과 같은 가축전염병으로 인하여 경제적 손실이 발생하고, 사람의 건강이 위협받고 있다. 국제수역사무국(World Organization for Animal Health)에서는 매년 신고된 가축전염병을 토대로 방역 및 질병 전염관리를 실시하고 있다. 각 나라에서는 가축전염병에 감염되어 죽거나 감염이 의심되어 살처분된 가축사체에 대해서, 혐기성분해, 정제, 퇴비화, 소각, 매몰, 알칼리 가수분해, 젖산 발효, 무처리 방식 등 각각의 환경에 적합한 방법을 선택하여 처리하고 있다.¹⁾ 우리나라에서도 가축전염병예방법에 따라 살처분한 가축사체에 대해 신속히 소각 및 매몰을 하도록 하고, 가축 매몰지 환경관리지침²⁾에 따라 관리하도

록 되어 있다. 하지만, 국내 여건상 소각이나 그 밖의 처리는 어려운 실정이므로, 대부분 매몰방법에 의존하고 있는 실정이다.

가축 매몰지에서 발생할 수 있는 위해는 크게 구제역 바이러스의 유출에 따른 위해, 매몰지 침출수(leachate)의 지하수 및 토양 오염에 따른 환경적 위해(BOD, NH₄-N, NO₃-N, Cl⁻ 등), 침출수 내 존재할 수 있는 다양한 병원성 미생물의 보건학적, 식품학적 위해로 나눌 수 있다.³⁾ 구제역 바이러스는 열, 산 (pH 6.5 이하) 및 알칼리 (pH 11 이상)에 민감하여 감염성이 쉽게 약화될 수 있고, 상대습도 50% 이하일 때 급격히 생존력을 상실하므로, 실제로 가축 매몰지 침출수에서 바이러스 자체가 검출되었다는 보고는 현재까지 없다.^{3,4)} 하지만, 매몰 처리된 사체 자체는 약 70%의 수분을 함유한 부패성 유기물질이므로, 가축사체의 부패가 진행됨에 따라

[†] Corresponding author E-mail: songbkim@snu.ac.kr Tel: 02-880-4587 Fax: 02-873-2087

침출수가 발생할 수 있고, 병원성 미생물(*Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Cryptosporidium*, *Giardia* 등)이 침출수와 함께 매몰지 주변 토양 및 지하수로 유입될 수 있는 잠재적인 위험성을 가지고 있다.⁵⁾ 특히, 토양의 경우 미생물의 좋은 서식지로서, 병원성 미생물의 생존율을 증가시키고 활성화 시킬 수 있으므로, 지속적인 감시가 필요하다. Kim 등⁶⁾은 조류인플루엔자 가축사체 매몰지 2곳의 주변 토양 및 지하수 오염도를 평가한 결과, 총 질소(T-N), 질산성 질소(NO₃-N), 암모니아성 질소(NH₄-N) 등이 대조군에 비해 비교적 높게 나타나 가축 매몰지가 환경적 오염부하를 증가시킬 수 있음을 강조하였다. 특히, 이들은 매몰지 주변 토양의 세균분포를 조사한 결과, *Bacillus*가 다량(98%)으로 검출되었다고 보고하였다. Park⁷⁾은 사체매몰 후 부패과정에서 높은 생화학적 산소요구량(biochemical oxygen demand, BOD), 화학적 산소요구량(chemical oxygen demand, COD_{cr}), NH₄-N, NO₃-N, 염소이온(Cl⁻)가 발생하고, 침출수에 구제역바이러스, 대장균, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Leptospira Sp.*, *Cryptosporidium*, *Giardia* 등을 포함한 수인성 미생물이 검출되고 있어, 가축 매몰지 주변에 2차적인 환경오염이 발생할 수 있다고 발표하였다. Choi 등⁸⁾도 매몰된 지 5개월 이내의 초기 가축 매몰지 16개 지점에 대해 침출수의 물리·화학·생물학적 특성을 분석한 결과, 총 유기탄소(total organic carbon, TOC)와 NH₄-N이 높게 검출되었고, 총대장균군은 돈분뇨의 약 1,226배로 나타났으며, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus sphaericus* 및 *Bacillus sphaericus* 등이 주로 동정된 것으로 보고하였다. Lee⁹⁾와 Pratt¹⁰⁾에 따르면, 사체분해로 인하여 발생하는 침출수의 BOD, NH₄-N, 총 용존성고형물(total dissolved solid, TDS), Cl⁻의 농도는 보통의 지하수보다 수십 배에서 수백 배 이상 높게 나타나는 것으로 보고하였다.

기존의 가축 매몰지 관련 연구들은 대부분 침출수 처리 및 유출로 인한 지하수 오염에 집중되어 있다. 또한, 토양환경 영향조사는 지하수 또는 침출수 분석결과 유출이 의심되는 경우에 유기물 및 질소함량에 국한되어 실시하도록 되어 있다.^{2,11)} 2010년 11월에 경북 안동에서 발생한 구제역으로 인하여 전국에 생성된 약 4600개소의 가축 매몰지는 매몰 후 3년 이상 경과하면 발굴 및 경작, 시설물 등의 설치가 가능하다. 따라서, 대량의 가축 매몰지 토양이 환경에 노출되어 2차적인 환경오염을 일으킬 수 있는데, 아직까지 가축 매몰지 토양의 생물학적 안정성과 관련된 조사가 부족하다. 따라서, 본 연구에서는 구제역으로 인하여 조성된 3곳의 가축 매몰지에서 내부 토양을 채취하여, 분자생물학적 방법을 통해 미생물 군집구조를 분석하고, 생물학적 안정성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 대상 가축 사체 매몰지

본 연구에 사용된 3곳의 매몰지는 2011년 1월에 경기도

Table 1. Description of animal carcass disposal sites

| Sites | Parameter | Description |
|-------|----------------------------|---------------------------|
| A | Location | Gyeonggi-do |
| | Type of buried animals | Cattle |
| | Number of buried animals | 58 |
| | Dimension of disposal site | 12 m(L) × 6 m(W) × 6 m(H) |
| | Year of burial | 2011. 1 |
| B | Location | Gyeonggi-do |
| | Type of buried animals | Cattle |
| | Number of buried animals | 123 |
| | Dimension of disposal site | 12 m(L) × 6 m(W) × 6 m(H) |
| | Year of burial | 2011. 1 |
| C | Location | Gyeonggi-do |
| | Type of buried animals | Swine |
| | Number of buried animals | 3,708 |
| | Dimension of disposal site | 13 m(L) × 6 m(W) × 6 m(H) |
| | Year of burial | 2011. 1 |

에 조성된 것이다. 3곳 모두 구제역에 감염된 소와 돼지를 환경부가 고지한 가축 매몰지 환경관리지침²⁾을 기반으로 긴급 매몰한 지역이다. A와 B 지역의 경우 각각 소 58두와 123두를 매몰하였으며, C 지역은 돼지 3,708두를 매몰하였다. 본 연구에서는 2012년 초 가축사체를 재이설하는 과정에서 노출된 매몰지 내부 토양을 채취하여(2012년 4월) 분석하였다. 매몰지의 세부 현황은 Table 1에 제시하였다.

2.2. DNA 추출

토양 미생물의 DNA 추출을 위해 Wizard[®] genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. DNA 추출 여부는 1.2% agarose gel에서 전기영동(electrophoresis)하여 확인하였다. 또한, Quant-iT[™] PicoGreen[®] dsDNA assay kit (Invitrogen, Calrsbad, CA, USA)를 이용한 DNA 정량 및 정성평가를 통해, DNA가 오염되지 않고 성공적으로 추출되었는지 검사하였다.

2.3. 파이로시퀀싱을 이용한 염기서열 및 종다양성 분석

DNA template에서 16S rDNA 유전자 증폭은 V1에서 V3까지의 지점(region)을 목표로, primer 27f (5'-GAGTTTGATC-MTGGCTCAG-3'), 518r (5'-WTTACCGCGCTGCTGG-3')를 기반으로 한 fusion primer를 사용하였고, 각 primer 20 pmol과 추출된 DNA를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. PCR mixture는 template 1 μL, 10xbuffer (w/o MgCl₂) 5 μL, dNTPs mixture (100mM) 1 μL, primers (forward/reverse) 20 pmol 2 μL, Taq polymerase (Roche, Basel, Switzerland) (5 U/μL) 0.25 μL로 구성하였다. DNA 증폭을 위해 2720 thermal cycler 모델(Applied biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 emPCR 증폭(amplification)을 수행하였다. 절차는 initial denaturation (94℃, 4분)을 한 후, denaturation (94℃, 30초), annealing(58℃, 4분 30초), extension (68℃, 30초)한 것을 50 cycle 반복 수행한 후 마지막으로 10℃에서 정지(Hold)하였다. 증폭된 PCR 산물은 각각 bead에 부착하여 PCR을 하고 GS FLX

titanium system (Roche, USA) 염기서열 분석기를 이용하여 파이로시퀀싱(pyrosequencing)을 진행하였다. 얻어진 염기서열은 Hidden Markov Model (HMM)과 blast search를 통해, non-16S read를 제거하고, profile을 생성하여 Eztaxon(<http://www.eztaxon.org>)¹²⁾으로 16S rDNA sequence를 비교 동정하였다. 최소 종 추정치(minimum number of operational taxonomic units)는 ACE¹³⁾와 Chao 1¹⁴⁾를 통해 계산하였으며, 세균의 종다양성 분석은 Shannon 지수(index)¹⁵⁾를 이용하였다. 또한 전반적인 미생물 군집 구성의 차이를 계통발생학적(phylogenetic)으로 비교해보기 위하여 UniFrac 방법을 사용하였다.¹⁶⁾

3. 결과 및 고찰

3.1. 가축사체 매몰지 미생물 분포 및 구조

파이로시퀀싱 결과, A 토양에서는 12,697개, B 토양 6,723개, C 토양 6,868개의 16S rRNA gene sequence를 획득하였다(Table 2). 미생물의 문(phylum) 분류 결과, A 토양의 경우 전체 토양미생물이 *Proteobacteria* (100%) 1개의 문으로 동정되었으며, B 토양의 미생물은 *Actinobacteria* (66.4%) > *Proteobacteria* (31.1%) > *Bacteroidetes* (2.1%) > *Acidobacteria* (0.3%) 순으로, C 토양의 경우에는 *Actinobacteria* (63.1%) > *Proteobacteria* (36.9%)로 분포하였다. 속(genus)별로 구분해 보면, A 토양에서는 *Pseudomonas*가 98% 비율로 나타났고, B와 C 토양의 경우 *Arthrobacter*가 각각 68, 61%로 우점하였다. 또한, B 토양의 경우, *Ralstonia* (29%) > *Pedobacter* (2%) 순으로 추가적으로 검출되었다. C 토양은 *Arthrobacter* 다음으로 *Pseudomonas* (27%) > *Stenotrophomonas* (4%) > *Enterobacter* (3%) > *Ralstonia* (2%) 순으로 나타났다(Fig. 1).

토양은 대체로 미생물의 생육에 적합한 서식지로 담수나 바다보다 발견되는 미생물의 수가 많고, 일반적으로 10⁶~10⁹ cells/g의 세균이 서식하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ A 토양에서 98% 비율로 나타난 *Pseudomonas*의 경우, 기회적(opportunistic) 미생물로 부식질을 이용하지 못하지만, 동물의 배설물, 동물 사체 등의 기질을 이용하여 높은 수준의 활성

Table 2. Comparison of operational taxonomic units, richness and diversity index derived from 16S rRNA genes in animal carcass disposal soils

| | Soil A | Soil B | Soil C |
|--------------|--------|--------|--------|
| Target reads | 12,697 | 6,723 | 6,868 |
| OTUs | 125 | 208 | 194 |
| ACE | 158.6 | 280.6 | 254.1 |
| Chao1 | 158.2 | 281.7 | 242.1 |
| Shannon | 2,370 | 3,452 | 3,432 |
| ESC | 0,996 | 0,990 | 0,992 |

OTUs : operational taxonomic units
 ACE and Chao1 : nonparametric richness estimators
 Shannon : Shannon diversity index
 ECS : estimated sample coverage

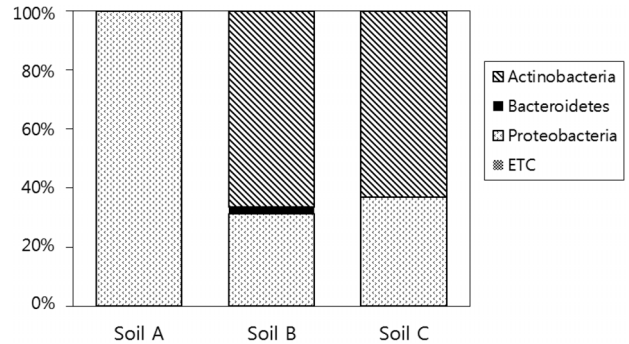


Fig. 1. Bacterial phylum compositions in animal carcass disposal soils.

과 빠른 성장을 보이는 것으로 보고되어 있다.¹⁷⁾ *Arthrobacter*는 토양에서 주로 발견되며, 포자(spore)를 형성하지 않고도 건조하거나 영양이 결핍된 환경에 대해 저항성이 높다. 또한 제초제, 카페인, 페놀, 유기물질 등 다양한 영양물질에 대한 분해능을 가진다.¹⁸⁾ 하수처리장의 활성슬러지에서 *Pseudomonas*는 유기물 제거 및 탈질반응, *Arthrobacter*는 유기물 제거 기능을 담당하는 것으로 알려져 있다.¹⁷⁾ 가축 매몰지 토양의 경우, 가축사체의 부패로 인하여 유기물질 및 질소농도가 높아 *Pseudomonas*와 *Arthrobacter*가 많이 검출되는 것으로 판단된다. *Ralstonia*는 대표적인 수소산화(hydrogen-oxidizing) 박테리아로 수소화 효소(hydrogenase enzyme)를 지니고 있으며, 주로 물과 토양에서 발견된다.¹⁸⁾ 종(species)별로 살펴보면, B와 C 토양에서 *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia mannitolilytica*, *Ralstonia insidiosa* 등이 검출되었는데, B 토양에서 특히 *Ralstonia pickettii*가 전체 종 중 28.2%의 비율로 가장 높게 나타났다. *Ralstonia pickettii*는 비발효성(non-fermentative), 그람음성(gram negative), 간균(rod-type bacteria)으로 기회 감염균(opportunistic pathogen) 중 하나이다. 이들은 비교적 병원성이 낮은 균주로 알려져 있으나, 세균혈증(bacteremia)을 일으킬 수 있고 감염의 범위가 넓으며 최근 관련 피해사례들이 증가하고 있어서 주의를 기울여야 한다.¹⁹⁾

3곳의 토양 미생물 군집의 종 다양성을 비교하기 위하여 굴절곡선(refraction curve)을 분석한 결과(Fig. 2), A 토양이

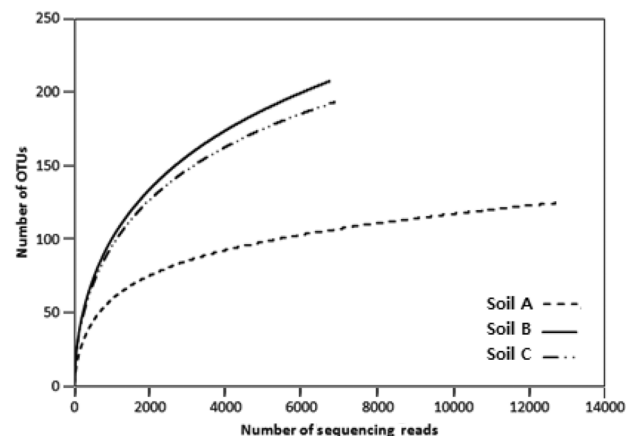


Fig. 2. Refraction curve of operational taxonomic units (OTUs) defined by sequence variation in animal carcass disposal soils.

Table 3. Phylogenetic distribution of isolates from animal carcass disposal soils using EzTaxon-e database.

| Bacteria | Soil A | | Soil B | | Soil C | |
|---------------------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
| | No. of isolate | Distribution rate | No. of isolate | Distribution rate | No. of isolate | Distribution rate |
| <i>Pseudomonas</i> | 12404 | 97.69 | 27 | 0.40 | 1886 | 27.46 |
| <i>Arthrobacter</i> | 0 | 0.00 | 4440 | 66.04 | 4210 | 61.30 |
| <i>Ralstonia</i> | 0 | 0.00 | 1947 | 28.96 | 125 | 1.82 |
| <i>Stenotrophomonas</i> | 0 | 0.00 | 3 | 0.04 | 245 | 3.57 |
| <i>Enterobacter</i> | 0 | 0.00 | 4 | 0.06 | 209 | 3.04 |
| <i>Caulobacter</i> | 152 | 1.20 | 8 | 0.12 | 0 | 0.00 |
| <i>Pedobacter</i> | 0 | 0.00 | 120 | 1.78 | 0 | 0.00 |
| <i>Terrabacter</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 101 | 1.47 |
| <i>Acinetobacter</i> | 86 | 0.68 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Cupriavidus</i> | 0 | 0.00 | 33 | 0.49 | 15 | 0.22 |
| <i>Rhodanobacter</i> | 0 | 0.00 | 17 | 0.25 | 16 | 0.23 |
| <i>Micrococcaceae</i> | 0 | 0.00 | 10 | 0.15 | 13 | 0.19 |
| <i>Rhizobium</i> | 22 | 0.17 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Pseudomonadaceae</i> | 14 | 0.11 | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 |
| <i>Chitinophaga</i> | 0 | 0.00 | 16 | 0.24 | 0 | 0.00 |
| <i>Burkholderia</i> | 0 | 0.00 | 5 | 0.07 | 11 | 0.16 |
| <i>Pantoea</i> | 0 | 0.00 | 9 | 0.13 | 4 | 0.06 |
| <i>Herbaspirillum</i> | 5 | 0.04 | 0 | 0.00 | 6 | 0.09 |
| <i>Micrococcales</i> | 0 | 0.00 | 6 | 0.09 | 4 | 0.06 |
| <i>Pseudomonadales</i> | 5 | 0.04 | 0 | 0.00 | 4 | 0.06 |
| <i>Xanthomonadaceae_uc</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 7 | 0.10 |
| <i>Brevundimonas</i> | 5 | 0.04 | 3 | 0.04 | 0 | 0.00 |
| <i>Ralstonia_f_uc</i> | 0 | 0.00 | 7 | 0.10 | 0 | 0.00 |
| <i>Mesorhizobium</i> | 0 | 0.00 | 7 | 0.10 | 0 | 0.00 |
| <i>HM061812_g</i> | 0 | 0.00 | 6 | 0.09 | 0 | 0.00 |
| <i>Actinobacteria_c_uc_g</i> | 0 | 0.00 | 3 | 0.04 | 2 | 0.03 |
| <i>Pedobacter_g3</i> | 0 | 0.00 | 5 | 0.07 | 0 | 0.00 |
| <i>HM243779_f_uc</i> | 0 | 0.00 | 5 | 0.07 | 0 | 0.00 |
| <i>Variovorax</i> | 0 | 0.00 | 4 | 0.06 | 0 | 0.00 |
| <i>HM243977_f_uc</i> | 0 | 0.00 | 4 | 0.06 | 0 | 0.00 |
| <i>AB240356_g</i> | 0 | 0.00 | 3 | 0.04 | 0 | 0.00 |
| <i>Burkholderiales_uc_g</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>Duganella</i> | 2 | 0.02 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Anaerolinaceae_uc</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>Sphingomonas</i> | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 |
| <i>DQ453805_g</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>Burkholderiaceae_uc</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 1 | 0.01 |
| <i>Gammaproteobacteria_uc_g</i> | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 |
| <i>Actinobacteria_uc_g</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 1 | 0.01 |
| <i>HM748676_g</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>Pseudoxanthomonas</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>AF280846_g</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>Sphingobacteriaceae_uc</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>FM253572_f_uc</i> | 0 | 0.00 | 2 | 0.03 | 0 | 0.00 |
| <i>Phyllobacterium</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>EU335192_g</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>Citricoccus</i> | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 |
| <i>EU861937_g</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>Intrasporangiaceae_uc</i> | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 |
| <i>AY673410_g</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>Agromyces</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>EU335197_g</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>Phycoccus</i> | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 |
| <i>Aminobacter</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>GQ396871_g</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>Rhizobiales_uc_g</i> | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 | 0 | 0.00 |
| <i>Telmatobacter</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| <i>AB240310_g</i> | 0 | 0.00 | 1 | 0.01 | 0 | 0.00 |
| Total | 12697 | 100 | 6723 | 100 | 6868 | 100 |

uc = unclassified, X_f = Genus X is proposed without family relationship

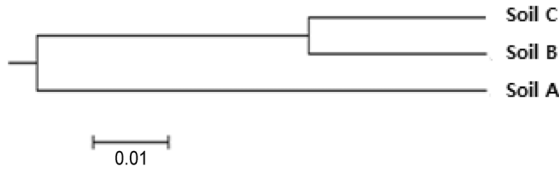


Fig. 3. Comparison of microbial community in animal carcass disposal soils using UniFrac method.

sequencing read에 비해 operational taxonomic unit (OTU)값이 가장 작게 나와(125), 종다양성 정도가 다른 토양보다 낮은 것으로 판단된다. 한편, B 토양과 C 토양의 굴절곡선은 유사한 기울기를 나타내었다. 종 다양성 지수를 Shannon 지수에 근거하여 분석한 결과, A 토양이 2.37, B 토양 3.45, C 토양 3.43으로 나타났다(Table 2). B와 C 토양은 유사한 수준이었으며, A 토양의 Shannon 지수 값이 가장 낮게 나타났다. 최소 중 추정치는 ACE, Chao 1 방법으로 분석하였는데, A 토양에는 158 종, B 토양 281종, C 토양 242-254종이 존재하는 것으로 추정되었다(Table 2). 가축 매몰지 토양 미생물 군집간의 관계를 알아보기 위해 UniFrac 방법으로 분석한 결과를 Fig. 3에 제시하였는데, A 토양보다 B와 C 토양의 미생물 군집이 서로 유사한 것으로 분석되었다.

3.2. 가축매몰지 토양내 병원성 미생물 분포

본 연구에서 분석한 토양에서는, 토양에서 발견되는 균들이 주로 검출되었고 *Salmonella*나 *Campylobacter*와 같은 병원성 미생물은 검출되지 않았다(Table 3). 또한 가축 매몰지 환경관리지침²⁾에서 제시한 생물학적 안정성 평가 지표미생물인 *Clostridium perfringens*도 검출되지 않아서, 본 연구에서 분석한 가축 매몰지 토양은 생물학적 오염도가 낮은 것으로 판단된다. 이는 가축 매몰과정에서 투입된 소독약 및 석회에 의한 발열과 pH의 급격한 상승(염기성화)으로 인하여, 균의 불활성화율이 커지고 병원균이 사멸하였기 때문으로 추측된다.²⁰⁾

국내의 연구결과를 살펴보면, Kim⁶⁾이 조류인플루엔자로 폐기된 닭 사체 매몰지 주변의 토양미생물을 분석한 결과, *Salmonella*와 *Campylobacter*와 같은 병원성 미생물은 검출되지 않았으나, *Bacillus*가 높은 빈도(89%)로 검출되었다. Choi⁸⁾에 의하면, 16개 구제역 가축 매몰지 침출수를 채취하여 호기성 미생물을 분리 동정한 결과, *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Bacillus sphaericus* 등이 주로 발견되었고, *Bacillus cereus*와 *Salmonella*와 같은 식중독균은 검출되지 않았다. Kang³⁾이 가축 매몰지 침출수 내 *Bacillus*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Pseudomonas* 등 일반세균수의 변화를 조사한 결과, 온도와 영양조건에 따라 3월에 5×10^3 CFU/mL로 측정된 후 5-7월에는 그 수가 증가되었다가 11월에 급격히 감소하였다. 또한, 세균이 증식된 5-7월에는 침출수 유기물질의 분해도 빠르게 나타났으며, 세균증식에 따라 pH가 증가하였다.

국외의 경우, 영국보건부는 가축 매몰지 침출수 내에 *E. coli* 0157:H7, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Leptospira*, *Crytos-*

poridium, *Giardia*, *BSE prions* 등의 병원성 미생물이 존재할 수 있다고 보고하였다.²¹⁾ 이 보고에 따르면, 일반 매립지보다 가축 매몰지가 인체에 영향을 미치는 위험도가 훨씬 큰 것으로 발표하였다. 병원성 미생물의 감염경로는 물의 소비나 접촉을 통한 감염이 대부분이나 *Clostridium tetani*의 경우에는 오염된 토양의 접촉을 통해서 주로 이루어진다고 알려져 있다.²¹⁾ Davies와 Wray²²⁾의 연구에 따르면, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* 4종류의 박테리아를 감염시킨 송아지를 2.5 m 깊이로 토양에 묻은 후, 총 88주간 토양에서 미생물을 동정한 결과, 매립 후 1주 이내에 급속히 주변 토양에서 오염이 발생하고, 미생물 유출이 발생하였다. 실험기간 동안 4 종류의 미생물이 꾸준히 관찰되었으며, *Clostridium*은 봄철에 *Salmonella*와 *Bacillus*는 겨울철에 더 우세하게 측정되었다. Chapman²³⁾은 *E. coli* O157:H7의 경우, 소 등의 위장관(gastrointestinal tract)과 분변에 산발적으로 존재하고, 소의 경우 분변의 약 0.3-6.1%에 *E. coli* O157:H7이 검출되며 약 30일 정도 생존할 수 있다고 보고하였다. *Salmonella*와 *Campylobacter*는 음식이나 음용수를 통해 인체에 들어오게 되면, 위장염, 식중독, 패혈증, 장열 등을 일으킬 뿐만 아니라, 환경에서 생존율이 높아 지하수로 유입된다면 이들 균에 의한 감염성 질환이 발병될 가능성이 증가된다.²⁴⁾

4. 결론

본 연구에서는 가축사체 매몰지 토양을 대상으로 미생물 군집 구조를 분석하였다. 분석결과를 문(phylum)별로 구분해보면, A 토양은 *Proteobacteria* (100%), B 토양은 *Actinobacteria* (66.4%) > *Proteobacteria* (31.1%) > *Bacteroidetes* (2.1%) > *Acidobacteria* (0.3%), C 토양은 *Actinobacteria* (63.1%) > *Proteobacteria* (36.9%) 순으로 분포하였다. 속(genus)별로 구분해보면, A 토양은 *Pseudomonas*가, B와 C 토양은 *Arthrobacter*가 우점하였다. Shannon 지수에 의하면, A 토양의 미생물 종 다양성이 가장 낮은 것으로 나타났으며, B와 C 토양은 유사한 수준이었다. 분석결과, *Salmonella*, *Campylobacter* 그리고 *Clostridium perfringens*과 같은 병원균도 발견되지 않았으나, 세균혈증을 일으키는 *Ralstonia pickettii*가 높은 농도로 관찰되었다. 본 연구에 사용된 가축 매몰지 토양은 침출수에 의한 미생물학적 오염도가 낮은 것으로 판단되지만, 가축매몰에 따른 병원성 미생물에 의한 토양의 잠재적 위해성을 평가하기 위하여 지속적인 모니터링이 필요할 것으로 판단된다.

사사

이 논문은 환경부의 재원으로 환경기술진흥원의 지원(토양·지하수오염방지기술개발사업 GAIA Project)을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. Ministry of Environment, Korea, "Environmental pollution management plan for animal carcass disposal," (2008).
2. Ministry of Environment, Korea, "Environmental guidelines for animal carcass disposal sites," (2010).
3. Kang, M. A., Kim, M. S., Choi, B. W. and Son H. Y., "Organic matter analysis and physicochemical properties of leachate from a foot-and-mouth disease landfill site," *Korean J. Micro. Biotechnol.*, **40**(2) 128~134(2012).
4. Park, J. H., Lee, K. N., Kim, S. M. and Ko, Y. J., "Resistance of foot-and-mouth disease virus in various environments," *Korean J. Vet. Publ. Hlth.*, **33**(4), 197~204(2009).
5. Det Norske Veritas., "Independent environmental and public health risk assessment of DEFRA foot and mouth disease disposal site (No. 20073900)," Oslo, Norway, (2003).
6. Kim, K. H., Kim, K. R., Kim, H. S., Lee, G. T. and Lee, K. H., "Assessment of soil and groundwater contamination at two animal carcass disposal sites," *Korean J. Soil Sci. Fert.*, **43**(3), 384~389 (2010).
7. Park, J. W., "Characteristics and treatment techniques for leachate from animal carcass disposal sites," *Korean J. Geo-Environ. Soc.*, **12**(2) 45~56(2011).
8. Choi, N. C., Choi, E. J., Kim, B. J., Park, J. A., Kim, S. B. and Park, C. Y., "Characterization of water quality and aerobic bacterial population in the leachate derived from animal carcass disposal," *J. Eng. Geol.*, **23**(1), 1~10(2013).
9. Lee, K., K., "Foot-and-mouth disease, leachate and groundwater contamination," *Korean J. Geo-Environ. Soc.*, **12**(2), 6~17(2011).
10. Pratt, D. L., "Environmental impact of livestock mortalities burial," M. S. Thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada (2009).
11. Park, J. H., "Improvement plan for the prevention and biosecurity of animal disease," *J. Korean Soc. Water Qual.*, **27**(3), 371-376(2011).
12. Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M, Na, H., Park S. C., Jeon, Y. S., Lee, J. H., Yi H., Won, S., Chun, J., "Introducing EzTaXon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species," *Int. J. Syst. Evol. Micro.*, **62**, 716-712(2012).
13. Chao, A. and Lee, S. M., "Estimating the number of classes via sample coverage," *J. Am. Stat. Assoc.*, **87**, 210~217(1992).
14. Chao, A., "Nonparametric estimation of the number of the classes in a population," *Scand. Stat. Theory Appl.*, **11**, 265~270(1984).
15. Shannon, C. E., "A mathematical theory of communication," *Bell Syst. Technol. J.*, **27**, 379~656(1948).
16. Lozupone, C. and Knight, R., "UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities," *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**(12), 8228~8235(2005).
17. Lee, S. J., Lee, G., Son, H. J. and Lee, T. H., "Contaminants and microorganism," Applied Environment Microbiology, Dongwha, Korea, pp. 125~148 (2009).
18. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. and Clark, D. P., "Microbial diversity," Brock biology of microorganisms, 12th ed, Benjamin Cumming, Menlo Park, CA, USA, pp. 409~456 (2010).
19. Choi, G., Kang, G. W., Park, J. H., Hwang, E. A., Han, S. Y., Park, S. B. and Kim, H. C., "A case of bacteremia from *Ralstonia pickettii* to acute kidney injury patient," 62th Korean Association of Internal Medicine Conference, (2011).
20. Lee, S. H and Oh, m. H., "Foreign and domestic case studies related to foot-and-mouth disease carcass burial sites and management methods," *Korean Geosynthetics Soc.*, **10**(2), 24~29(2011).
21. United Kingdom Department of Health., "A rapid qualitative assessment of possible risks to public health from current foot and mouth disposal options-main report and annexes," (2001).
22. Davies, R. H and Wray, C., "Persistence of *salmonella enteritidis* in poultry units and poultry food," *British Poult. Sci.*, **37**, 589~596(1996).
23. Chapman, P. A., Siddons, C. A., Wright, D. J., Norman, P., Fox, N. J. and Crick, E., "Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7 infection from manured garden," *Lancet.*, **342**, 8867(1993).
24. Gale, P., "Risk assessment: use of composting and biogas treatment to dispose of catering waste containing meat," DEFRA Report, (2002).