[UCI]I804:24011-200000263935

석사학위논문

가축매몰지 침출수에 대한 지구화학 및 분자생물학적 특성에 관한 연구

조선대학교 대학원

첨단플랜트건설공학과

최 은 주

가축매몰지 침출수에 대한 지구화학 및 분자생물학적 특성에 관한 연구

- Characterization of Geochemistry and Molecular Biology in Leachate Derived from Animal Carcass Disposal -

2013 년 8 월 23 일

조선대학교 대학원

첨단플랜트건설공학과

최 은 주

가축매몰지 침출수에 대한 지구화학 및 분자생물학적 특성에 관한 연구

지도교수 박 천 영

이 논문을 공학석사학위 논문으로 제출함.

2013 년 4 월

조선대학교 대학원

첨단플랜트건설공학과

최 은 주

최은주의 석사학위 논문을 인준함.

위원장　　조선대학교 교 수　정 경 훈 印

위　원　　조선대학교 교 수　한 오 형 印

위　원　　조선대학교 교 수　박 천 영 印

2013 년　5 월

조선대학교 대학원

목 차

List of tables ····· i
List of figures ····· ii
List of Appendices ····· iii
Abstract ····· iv

1. 서론 ····· 1
   1.1. 연구배경 ····· 1
   1.2. 연구목적 ····· 6

2. 가축매몰지와 환경오염 ····· 7

3. 시료채취 및 분석방법 ····· 12
   3.1. 대상 가축 매몰지 ····· 12
   3.2. 침출수 채취 및 분석 ····· 12
   3.3. 침출수내 호기성 미생물 배양 및 분리 ····· 15
   3.4. 생화학시험 ····· 17
   3.5. 침출수내 호기성 미생물에 대한 분자생물학적 분석 ····· 18

4. 결과 및 고찰 ····· 20
   4.1. 매몰지 침출수에 대한 물리·화학적 특성 ····· 20
   4.2. 침출수의 특성과 미생물의 관계 ····· 25
   4.3. 침출수내 호기성 미생물에 대한 분자생물학적 분석 ····· 33

5. 결 론 ····· 37

6. 참 고 문 헌 ····· 38

7. Appendices ····· 46

List of Tables

Table 1. The leachate emission for various animal types ····· 8
Table 2. The pathogenic bacteria from the animal carcass disposal sites ····· 11
Table 3. The conditions of animal carcass disposal in this study ····· 13
Table 4. Primers for amplification of 16S rRNA genes in this study ····· 19
Table 5. The physical characteristic of leachate from animal carcass disposal in this study ····· 22
Table 6. The chemical and biological characteristic of leachate from animal carcass disposal in this study ····· 23
Table 7. A comparisons of average concentration between mortality leachate and typical groundwater ····· 26
Table 8. The results of leachate isolation under BAP medium condition from animal carcass disposals ····· 27
Table 9. The results of leachate isolation under MacConky medium condition from animal carcass disposals ····· 28
Table 10. The results of identification for leachate from animal carcass disposal in this study ····· 29
Table 11. A comparisons of average concentration between without B. cereus and with B. cereus ····· 32
Table 12. The results of PCR for leachate from animal carcass disposal in this study ····· 36

List of Figures

Fig 1. The status of the animal carcass disposal sites by foot and mouth disease in January 2011, Korea ····· 2
Fig 2. Installation of the animal carcass disposal sites by foot and mouth disease ····· 4
Fig 3. Sampling of leachate from animal carcass disposal in this study ····· 14
Fig 4. The photograph of aerobic bacteria culture. (a) Blood agar plate, (b) Macconkey agar plate (CDL-9) ····· 16

List of Appendices

Appendices A 46

Appendices B 53

Abstract

- Characterization of Geochemistry and Molecular Biology in Leachate Derived from Animal Carcass Disposal -

By Choi, Eun Ju
Adv. Prof. : Park, Cheon Young
Dept. of Advanced Plant Construction Engineering
Graduate School, Chosun University

The leak of leachate in animal carcass disposal is a significant issue since diseases can be easily spread to humans and other livestock. In this study, the physicochemical properties of leachate and the aerobic bacteria existence in leachate using molecular biology methods for 16 animal carcass disposals in the first stage (been buried 5 months) were analyzed. The result of leachate physicochemical analysis showed higher total coliforms, TOC NH_4^+ and NO_3^- concentration compared to the relevant literature data. Also the concentration of NH_4^+ and NO_3^- in most leachate samples appeared to exceed the Korea guideline value for drinking water. For distribution of leachate using isolation and 16S rRNA sequence analysis in the aerobic condition, high frequency of *Bacillus pumilus*, *Lysinibacillus sphaericus* and *Bacillus sphaericus* was observed, while there were detections of food poisoning bacteria such as *Bucillus cereus*. This study improves our knowledge of the fate and transport in geologic media, treatment, risk analysis on the leachate from animal carcass disposal sites.

1. 서론

1.1. 연구배경

구제역(Foot and mouth disease, FMD)은 소, 돼지, 양, 염소, 사슴 등의 우제류 동물에서 발열 및 입, 혀, 유두 및 발굽 사이에 수포가 생기는 급성 바이러스성 질병이다(Bachrach, 1968). 구제역에 걸린 동물은 수포에 의한 통증으로 발육, 운동 및 비유장애가 유발되고 이에 따라 생산성이 현저하게 저하될 뿐 아니라 구제역이 발생하면 살처분 등 질병방제 비용, 생산성 감소, 동물 및 축산물의 국제적인 교역 제한 등으로 막대한 경제적인 피해가 발생하기 때문에 세계동물보건기구(Office International des Epizooties, OIE)에서 List A 질병으로 분류하고 있고 국내에서도 제1종 가축전염병으로 지정하여 관리하고 있다(Grubman et al., 1985 ; Krystynak and Charlebois, 1987 ; Saiz et al., 2002 ; Yoo, 2011).

국내 구제역은 1917년 처음 발생한 이래 1934년까지는 전국적으로 발생하였다. 이후 2000년 3월에 경기도, 충북 및 충남지역의 소에서 다시 발생하여 182농가에서 2,216두를 살처분 하였고, 25,914농가 1,522,470두의 우제류 동물에 대하여 이동통제 및 예방 접종을 하였고 그 후 2002년 5월 경기도와 충북지역의 돼지에서 발생하여, 162농가 160,155두를 살처분, 매몰하여 근절하였다(농림수산식품부, 2012). 최근에는 2010년 11월 경북 안동에서 최초로 발병 보고된 구제역으로 살처분 가축수 약 340만여 마리, 매몰지는 전국적으로 4,500여 곳 가량이 발생하여(Fig 1), 자치구별로도 제주와 전남을 제외하고 경북, 경기 및 충남 등 11개 광역시도 75개 시군구가 몸살을 앓았다(환경부, 2011).

국제수역사무국(World Organization for Animal Health)에서는 매년 신고된 조류인플루엔자(Avian Influenza, AI) 및 구제역 등과 같은 가축전염병을 토대로 방역 및 질병 전염관리를 실시하고, 가축전염병에 감염되어 죽거나 감염이 의심되어 살처분한 가축 사체에 대해서 혐기성분해, 정제, 퇴비화, 소각, 매몰, 알칼리 가수분해, 젖산 발효, 무처리 방식 등 각 환경에 적합한 방법을 선택하여 처리하였다.

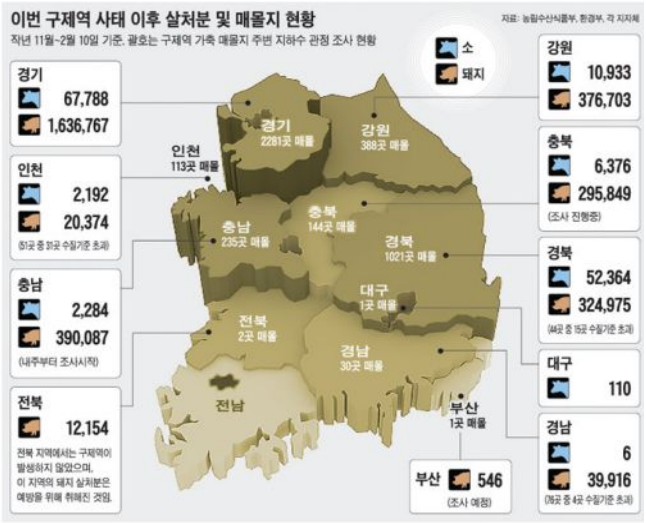


Fig 1. The status of the animal carcass disposal sites by foot and mouth disease in January 2011, Korea

우리나라에서도 가축전염병예방법에 따라 살처분한 가축사체에 대해 신속히 소각 및 매몰을 하도록 하고, 환경부에서 2010년 발표한 가축매몰지 환경관리지침에 따라 철저히 관리하도록 되어있다(Fig 2).

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 환경오염문제를 야기할 수 있다.

가축매몰지 환경지침에서는 매몰지 주변 300m 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 매몰 초기 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 조사결과의 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, 염소 이온, 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. 환경오염 영향여부 판단을 위한 추적물질의 활용 방안을 모색하기 위해 국외 문헌을 중심으로 조사해 본 결과 일부 매몰지역의 지하수에서 높은 수준의 염소이온(Chloride)이 발견되었다.

비록 염소이온의 농도는 일반적으로 다른 오염물질에 비해 낮지만 높아진 염소이온의 농도는 매몰에 의한 오염물질들의 훌륭한 지표로 사용될 수 있을 것으로 판단된다. 또한 염소 농도뿐만 아니라 질소에 의한 수질오염은 박테리아 오염보다

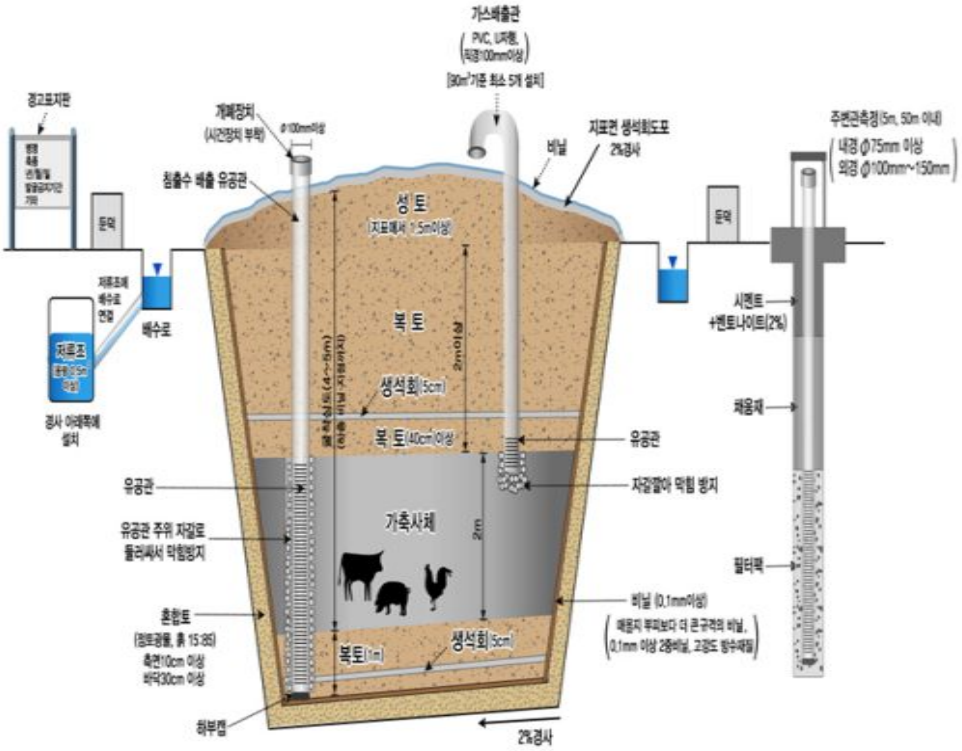


Fig 2. Installation of the animal carcass disposal sites by foot and mouth disease

더 심각한 문제로 간주되어 질소 농도 역시 가축 매몰에 의한 환경 영향을 평가하는데 중요한 지표가 될 수 있다.

가축 매몰 후 토양 내 세균 및 침출수에 대한 사후관리지침에 대해 외국사례 및 지침을 조사한 결과 선진국에서는 소각을 원칙으로 하고 있으며, 일부 지역에서만 매립할 수 없는 악조건일 경우 제한적으로 매몰을 허용하고 있어 일반적인 조건에서는 매몰을 금하고 있다. 문헌고찰에서 살펴 본 바 감염된 동물사체 매몰 시 매몰지에서 병원성요인들(세균, 바이러스, 프리온)이 오랜 기간 잔존해 있을 수도 있으며 매몰지에서 유출되는 침출수에 의해서 병원성요인들이 유출될 가능성이 있다. 매몰지 내 가축 사체에는 병원성 전염균을 포함한 사체 자체에 포함된 약 70% 수분이 함유한 부패성 유기 물질이 존재하기 때문에 사체 매몰 후 부패 과정에서 침출되는 침출수와 여기에 함유되어 있는 각종 오염 물질의 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 인근 하천으로 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(NO_3-N, nitrate nitrogen) 및 암모니아성 질소(NH_4-N, ammonium-nitrogen)등이 높게 조사되었으며, 매몰지내 지하수에서 바실러스균(*Bacillus*)이 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.

1.2. 연구목적

본 연구에서는 구제역에 의하여 매몰된 다양한 국내 가축매몰지내에서 발생되는 침출수에 대한 물리·화학·생물학적 특성을 분석하고, 침출수에 대한 분자생물학적 방법을 이용하여 침출수내 존재하는 호기성 미생물의 분포양상을 알아보는 것이다. 그리고 추가적으로 침출수 특성이 유해미생물의 분포 특성에 미치는 영향을 파악하는 것이다. 이를 통하여 가축 매몰에 따라 발생되는 침출수내 유해 미생물의 종류와 특성에 대한 기초 정보를 제공하는 동시에 환경위해성평가에 기초적 자료로 활용됨에 따라 가축 매몰지 사후관리기법 정립에 도움이 되고자 하는데 그 목적이 있다.

1. 가축매몰지와 환경오염

매몰된 가축 사체는 병원성 전염균이 존재할 수 있고 사체 자체는 약 70% 수분을 함유한 부패성 유기물질이기 때문에 사체 매몰 후 부패과정에서 발생하는 침출수와 여기에 함유되어 있는 오염물질의 영향으로 각종 매몰지 주변의 토양 및 수계 환경의 오염의 위험성 증가하며, 사체 분해로 발생된 침출수는 높은 BOD, COD 농도 특성을 보이고 있어 인근 지하수에서 *Salmonela, Bacillus, Camphylobacter, E. Coli*, NO_3-N, NH_4-N 및 Cl^-가 주요 대상성분으로 검출된다.

정부는 집중관리 대상 가축 매몰지에서 발생하는 침출수를 가축분뇨공공처리시설과 더불어 일반분뇨처리시설 35개와 공공하수처리시설 292개를 활용하여 연계처리를 실시 할 계획에 있으나, 침출수를 가축분뇨공공처리시설에 직접 처리할 경우, 가축분뇨의 BOD는 10,000mg/L이지만 가축매몰지에서 발생하는 침출수의 BOD는 30,000mg/L 이상인 것으로 조사되어 침출수가 가축분뇨공공처리시설 내 생물반응조에 충격부하가 발생될 것으로 판단되는 실정이다.

돼지 1두를 매몰할 경우 시간 경과에 따라 발생하는 침출수량에 대한보고(Carcass disposal: a comprehensive review, 2004)에 의하면, 무게 75kg의 돼지 사체를 매립했을 때에 침출수에 740mg/L의 NH_4-N이 발생하며, 그 양은 85,000L의 물을 US EPA 음용수 기준인 10mg/L 수준으로 오염시킬 수 있는 양에 달하는 것으로 조사된다(Table 1). 가축사체 내에서는 대장균을 포함하여 *Salmonella enterica serotype Typhi* 등의 살모넬라균과 *Camphylobacter jejuni, C. coli, C. fetus* 등의 캄필로박터균과 같은 병원균과 바실러스균속(*Bacillus sp.*)이 가축 매몰지 내부 토양에서 가장 높은 빈도로 발현되고 있는 것으로 조사되었으며, 이러한 균들은 매몰지 토양 및 주변의 지하수가 오염될 수 있으며, 오염된 물을 사람이 섭취할 경우 이들 균에 의한 감염성 질환이 발병될 가능성이 높은 것으로 판단되어진다.

Table 1. The leachate emission for various animal types

animal types	leachate emission (L)	
	after 1 week	after 2 months
cattle (500~600kg)	80	160
calf	10	20
pig (70~100kg)	6	12
pigling	0.4	0.8
sheep	1	2

매몰지 기원 침출수내 존재하는 병원성 미생물에 대한 국내 자료는 거의 전무하며, 이에 관한 국내 법정 전염병의 종류 및 분류는 제1군 6종, 제2군 10종, 제3군 18종, 제4군 19종이다. 이중 4군은 신종 전염병 증후군, 재출현전염병 또는 국내 유입이 우려되는 해외 유해전염병이다. 지정전염병은 1군내지 4군 전염병 외에 유행여부의 조사를 위하여 감시활동이 필요하다고 인정하는 전염병을 뜻한다.

1종, 2종 법정전염병이 발병한 경우, 국내에서는 환자진단 즉시 보건기관에 신고하도록 하고 3종의 경우는 월 1회 보고하도록 되어 있다. Table 2는 국외에서 조사한 AI 발생지역 및 FMD 발생지역에서 예상되는 병원성 미생물의 종류 및 분류표이다.

Davies 와 Wray (1996)는 4가지 세균의 동일 혼합액을 송아지에게 정맥 주사하여 죽인 후 약 8피트 깊이로 매몰하였다. 매몰 후 1주일 만에 주변에서 심각한 토양 오염이 관찰되었다. *Salmonella*는 배수로에 급격히 증식한 후 15주간 계속 분리되었다. *Bacillus cereus*균은 겨울 동안에도 계속 분리되었으며, *Clostridium perfringens*는 봄에 더 자주 관찰되었다.

Turnbull (2001)는 WHO의 인간과 동물의 anthrax 관련 Guidelines에서 다음과 같이 밝히고 있다. 포자 형성 세균은 일반적으로 환경에서 장기간 생존할 수 있다고 알려져 있기 때문에 매몰 환경에서도 잔존해 있을 것이라 생각하지만, 이러한 세균의 유출은 특징적인 매몰 장소, 예를 들면 물과 지질학적인 특성에 따라서 결정이 된다고 하였고 탄저균의 포자 방출은 산소를 필요로 하므로 손대지 않은 사체 내에서는 일어나지 않는다. 따라서 대부분의 나라에서 탄저가 의심되는 경우 동물의 사체부검을 금하고 있다. 또한 사체 내의 증식형 탄저 균은 부패과정을 통해 대부분 며칠 내에 사멸하며 사멸은 온도와 같은 기후조건에 따라서 달라진다. 그러나 탄저균은 사체의 코, 입, 항문의 삼출액을 통해 분출되어 환경을 오염시킬 수도 있다고 하였다.

Bartley et al. (2002)은 동물의 배설물과 감염 전달체에서 구제역 바이러스의 생존을 측정하였다. 연구결과 바이러스는 동물숙주가 없는 상황에서도 생존할 수 있었고, 감염된 가축의 배설 분비물뿐 아니라 오염된 전달체에서도 생존할 수 있었다. 양모에서 2개월, 소 분변에서 2~3개월 동안 4℃에서 생존 가능하며, 눈 쌓인 토양 표면(영하 17.7~5.1℃ 범위)에서도 6개월 이상 생존 가능하다고 보고하였다.

그러나 기온이 올라가면 생존율이 감소하였다.

현재의 국외자료에 의하면 감염된 동물사체를 매몰 시 매몰지에서 병원성 요인들(세균, 바이러스, 프리온)이 오랜 기간 잔존할 수도 있으며 매몰지에서 유출되는 침출수에 의해서 병원성 요인들이 유출될 가능성이 있다.

Table 2. The pathogenic bacteria from the animal carcass disposal sites

classification	pathogenic bacteria
first epidemic diseases	-
second epidemic diseases	*Clostridium tetani, Corynebacterium*
third epidemic diseases	*Avian influenza, Streptococcus, Bacillus anthracis, Leptospira, Mycobacterium Tuberculosis, Cryptosporidium*
fouth epidemic diseases	*Clostridium botulinum, Coxiella burnetii*
designate epidemic diseases	*Campylobacter, Clostridium perfringens, Escherichia coli, Listeria, Salmonella spp, Prion, Scrapie, Compylobactor*

2. 시료채취 및 분석방법

2.1. 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 3에 나타내었다.

2.2. 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 베일러 (bailer)를 이용하여 침출수를 채취하였다(Fig 3). 채취된 침출수는 현장에서 0.45μm 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 4℃이하로 냉장보관 하였다. 양이온 주성분 원소인 Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}에 대한 화학분석은 유도결합플라즈마 (inductively coupled plasma)를 이용하였고, PO_4-P, SO_4^{2-}, Cl^{-}, NO_3-N과 같은 음이온 분석은 이온크로마토그래피 (ion chromatography)를 이용하였다. 그리고 총 유기탄소 (total organic carbon) 함량은 총 유기탄소 분석기 (TOC analyzer)를 이용하였으며, 총대장균군 (total coliforms) 분석은 수질오염공정시험법에 의거하여 최적확수시험법으로 측정하였다.

Table 3. The conditions of animal carcass disposal in this study

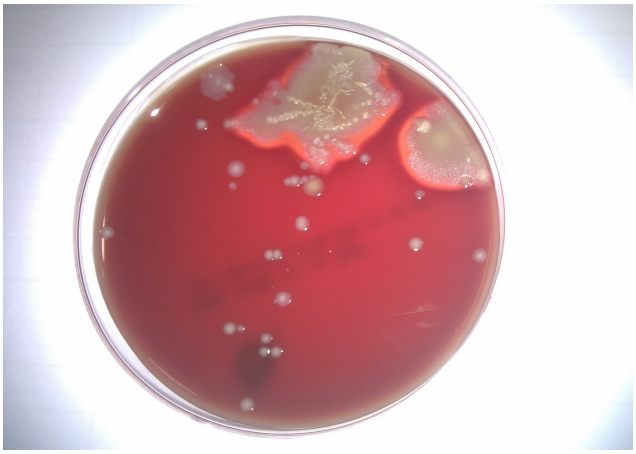
sample No.	construct date	species(unit)			size(m)	
		cattle	pig	total	length	wide
CDL-1	2011.01.06	104	-	104	21	6
CDL-2	2010.12.15	-	422	422	14	7
CDL-3	2010.12.15	6	123	129	12	6
CDL-4	2010.12.15	133	-	133	16	8
CDL-5	2011.01.11	-	3,000	3,000	26	6
CDL-6	2011.01.11	-	625	625	16	5
CDL-7	2011.01.17	72	-	72	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

Fig 3. Sampling of leachate from animal carcass disposal in this study

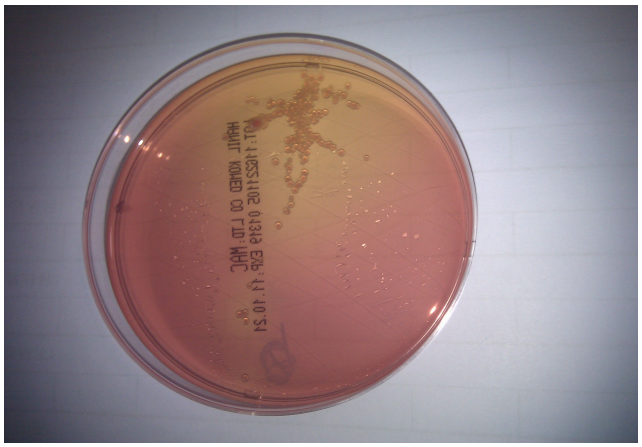
2.3. 침출수내 호기성 미생물 배양 및 분리

총 16개의 침출수 시료에서 1 mL를 취하여 생리식염수 용액 9 mL과 혼합하여 1분간 선회교반(vortex)하였으며, 균질화한 후 10^{-1} ~ 10^{-7}으로 십진 희석하였다. 희석액은 2종류의 선택배지에 각각 도말하여 30℃에서 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 4).



(a)



(b)

Fig 4. The photograph of aerobic bacteria culture.

(a) Blood agar plate, (b) Macconkey agar plate (CDL-9)

2.4. 생화학시험

순수 분리된 미생물에 대하여 5 종류 (Blood agar plate, Macconkey agar plate, Salmonella-Shigella agar, Choco agar 및 thiosulfate citrate bile salts sucrose agar)의 호기성 선택배지를 이용하여 5~8%의 CO_2 조건에서 24시간 동안 호기성 배양을 실시하였으며, 2 종류(Phenylethanol agar 및 Brucella agar)의 혐기성 선택배지를 이용하여 48시간 동안 혐기성 배양을 실시하였다. 본 연구에 사용된 미생물 배양에 이용된 배지(medium)들은 DIFCO Co.(USA)에서 구입하여 사용하였으며, 배양 후 형성된 집락(colony)은 크기, 모양과 색 등의 형태학적 특성에 따라 분류, 무작위로 다수의 콜로니를 선택하였으며, 3회의 계대 배양을 통해 미생물을 순수 분리하였다.

증식된 집락은 catalase시험(Ca.), oxidase시험(Ox.), motility시험(Mo.), *Bacillus cereus* chrome medium 시험(BBC), nitrate 환원검사(NIT), Triple Sugar Iron 반응검사(TSI)와 같은 전통적 생화학 시험에 추가하여 VITEK 2 system (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)으로 동정하였다.

2.5. 침출수내 호기성 미생물에 대한 분자생물학적 분석

침출수내 호기성 미생물에 대한 유전자 염기서열 분석을 목적으로 Genomic DNA extraction은 1mL의 PBS (Phosphate-buffered saline) 용액에 각각의 침출수에서 분리된 미생물을 혼합한 후, 선회교반(vortex mixing)하여 시료를 균질화 시킨다. 원심분리기를 이용하여 8,000rpm, 5분 동안 고액 분리한 후, 상등액을 버리고, Lysis sol. 200μL를 분주하고, 선회교반(vortex mixing)하여 균질화 하는 과정을 총 3회 반복하였다. 100℃의 heat block에서 5분 동안 배양을 거친 시료를 13,000rpm, 10분 동안 원심 분리하였다. 상등액에 대한 농도는 nanodrop (Nanodrop ND-1000)을 이용하여 측정하였다. PCR은 95℃ 5분간의 denaturation 단계, 56℃의 annealing 단계와 72℃의 extension 단계를 각 45초씩 총 38회 시행 후, post-extension을 72℃ 10분간 시행하여 4℃에 보관하고 (Table 4), 5 μL의 PCR 산물을 ethidium bromide가 첨가된 1.8% 아가로오스 (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.

Table 4. Primers for amplification of 16S rRNA genes in this study

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

3. 결과 및 고찰

3.1. 매몰지 침출수에 대한 물리·화학적 특성

매몰지에 대한 침출수의 물리적 특성을 Table 5에 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 생성된 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/환위전위 변화에 큰 영향을 받는다. 침출수의 평균 Eh는 약 -247mV로 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 분석결과를 Table 6에 나타내었다. 총대장균군은 평균 1,226,394.7 MPN/100mL로 검출되었으며, 이는 Yoon 등 (2009)이 돈분뇨에서 분석한 총대장균군 30 MPN/mL이하 보다 약 1,226배 높았으며, 국내 9개의 생활하수로 오염이 예상되는 하류하천에서 분석된 평균 총대장균군 14,948 MPN/100mL 보다 약 82배 높게 검출되었다.

총유기탄소와 암모니아이온은 평균 6,821.9 mg/L와 301.4 mg/L로 매우 높은 값을 나타났다. 가축매몰지 침출수에서 가축사체의 부패에 의한 높은 농도의 총유기탄소와 이에 따른 암모니아 이온은 질소들이 환원 상태에서 용출되어 대부분의 질소가 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 경과년수에 따른 오염부하에서 돼지 1,000마리에 대하여 1년의 매몰 경과 년수에서 총유기탄소와 암모니아이온의 농도는 각각 662mg/L와 80mg/L 이였으나, 본 연구에서 이와 유사한 조건의 CDL-13 매몰지 (돼지 1,147마리) 침출수에서는 높은 27,230mg/L의 총유기탄소와 324.3mg/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.

Table 5. The physical characteristic of leachate from animal carcass disposal in this study

sample No.	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

Table 6. The chemical and biological characteristic of leachate from animal carcass disposal in this study

No.	total coliforms (MPN/100mL)	TOC (mg/L)	Na^{+} (mg/L)	K^{+} (mg/L)	Ca^{+2} (mg/L)	Mg^{+2} (mg/L)
CDL - 1	3,654.00	2,360.00	174.4	139.9	33.6	1,142.20
CDL - 2	100	4,441.00	242.8	203.9	22.9	19.8
CDL - 3	6,405.00	1,300.00	75.6	41.6	105.1	382.8
CDL - 4	310	299.9	735.5	447.1	3,015.80	967.2
CDL - 5	3,448,000.00	2.3	17	1.8	35.1	8.9
CDL - 6	14,136,000.00	1,245.60	216.3	1.3	40	10.8
CDL - 7	127,400.00	2.6	14.5	1.6	33	9.9
CDL - 8	141,400.00	985.2	338.4	0.5	31.1	5.6
CDL - 9	1,414,000.00	785.1	478.7	0.9	22	8.7
CDL - 10	344,800.00	925.1	677.9	2.2	34.2	8.6
CDL - 11	34.8	38,730.00	42.4	125.4	741.6	34.6
CDL - 12	36.2	26,030.00	78.1	94.8	963	83.4
CDL - 13	103.2	27,230.00	65.1	8.8	752.7	107.3
CDL - 14	23	767	218.3	254.4	841.2	47.2
CDL - 15	20.5	2,187.00	121.2	157.9	852.3	13.4
CDL - 16	29	1,860.00	95.6	131.4	753	17.6
mean	1,226,394.70	6,821.90	224.5	100.8	517.3	179.3
Std. Dev	3,557,199.80	12,150.00	225.7	124.3	769.3	355.5
Guideline[(a)]	n.d.[(b)]	-	-	-	-	-

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

Continue in Table 6.

No.	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	2,334.00	9.9	36.9	185.8	21	0.1	2,358.00
CDL - 2	939.7	34.8	30.4	214.9	57.9	0	1,123.10
CDL - 3	384.4	10.3	3.2	81	58.7	0.4	428.1
CDL - 4	17.9	232	317.7	945.3	48.6	0.1	265.2
CDL - 5	0.3	5	5.4	15.1	23.9	0.7	6.9
CDL - 6	15.5	19	35.5	577.8	22.9	0.2	42.9
CDL - 7	0.2	0.3	12.4	39.1	12.6	0.8	1.3
CDL - 8	15.1	10.3	54.3	328	33.5	0	27.6
CDL - 9	14.6	26.2	21.7	214	26.6	0.5	44.6
CDL - 10	5.4	21.6	157.4	619.7	30.6	0.2	30.2
CDL - 11	169.1	23.5	-	20.2	53.8	16.1	23.8
CDL - 12	122.3	37.5	-	38.2	55.7	25.9	23.6
CDL - 13	324.3	42.4	-	18	25.7	6.9	3.4
CDL - 14	150.3	35.6	0.1	26.6	16.2	6.4	0.8
CDL - 15	107.2	41.8	-	35.1	15.1	10.5	0.7
CDL - 16	221.8	49.1	-	29.2	20.4	5.8	0.8
mean	301.4	37.5	61.4	211.7	32.7	4.7	273.8
Std. Dev	592	53.9	95.6	275.9	16.5	7.4	626.2
Guideline[(a)]	0.5	10	200	250	-	-	-

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

3.2. 침출수의 특성과 미생물의 관계

일반적인 가축매몰지 침출수의 화학적 특성은 일반지하수의 특성에 비하여 대부분 상대적으로 매우 높은 농도 특성을 나타냈다(Table 7). 특히 암모니아성 질소(약 12,600배), Alkalinity(약 137배), Cl^-(약 90배), Na(약 62배) 및 SO_4(약 44배)등의 가축사체에 기원이 되는 원소에서 높게 나타난다. 김계훈 등(2011)은 경기도 평택과 충청남도 천안의 매몰지를 선택하여 토양, 지하수 및 미생물을 분석한 결과, 토양에서는 매몰지로부터 15m 이격된 지점 시료에서 암모니아성 질소가 대조구의 약 80배 수준으로 검출되었다고 하였다.

채취된 총 16개 지역의 침출수에 대하여 총 34종의 순수배양을 통한 미생물 분리하고 생화학 검사(Table 8, 9)와 미생물 동정기기를 이용하여 미생물을 동정한 결과, 총 5개의 시료에서 *Bacillus cereus*가 검출되었다(Table 10).

*Bacillus cereus*는 Gram 양성균으로 호기성 조건에서 잘 자라지만 때때로 혐기적 환경에서도 생존하며 다양한 환경에 적응한 포자(pore)를 형성한다. 또한 식중독을 일으키는 열에 안정한 독소를 생성하여 구토 증상, 설사 중상 등 두 종류의 위장질병을 유발한다(Kramer and Gilbert, 1989; Granum, 2001). 구토 중상의 식중독은 peptide 독소인 emetic toxin 때문에 발병되며 cereulide 라고 불리는 이 독소는 열에 안정하며 정지기 (stationary phase)에 생성되고, 감염 후 1~6시 간에 발병된다(Monika et al., 2004). 반면에 설사 증상의 식중독은 지수기 (exponential phase)에 생성되는 diarrhoeal toxin으로 발병되며 열에 민감하기에 56℃, 5분 열처리에 불활성화 된다(Agata et al., 1995; Granum, 1994).

또한 이 균은 여러 종류의 표면에 강한 접착성을 지니며 식품 가공 과정에서 stainless steel 재질 등의 표면에 부착하여 biofilm을 형성한다. 게다가 형성된 biofilm 안에 존재하는 포자는 높은 상대습도(97%나 그 이상)의 대기에 노출되면 포자의 형성을 진행시키기에 식품산업에서 많은 문제를 야기한다(Ryu and Beuchat, 2005). 그리고, Bacillus spp.가 생성하는 extracellular polysaccharide matrix라는 biofilm은 항생제 혹은 항생물질 등으로부터 자신을 물리적으로 보호하는 기능을 하며, 또한 pH, osmotic shock, 건조, 열에 노출될 경우 세균을 보호하는

Table 7. A comparisons of average concentration between mortality leachate and typical groundwater

	Average concentration (mg/L)		ratio (A/B)
	mortality leachate (A)	typical groundwater (B)	
Na	1,800	29	62.069
K	2,300	66	34.848
NH_4-N	12,600	0	-
SO_4	3,600	82	43.902
Cl	2,600	29	89.655
Alkalinity	34,600	253	136.759
Fe	20	0.55	36.364
Mg	40	25	1.600
Zn	2	0	-
Cu	1	0	-

Table 8. The results of leachate isolation under BAP medium condition from animal carcass disposals

Sample	BAP(09.01)	Ca.	Mo.	BBC	NIT
CDL 1-1	p.p	+	-		-
CDL 1-2	yellowish mucoid	+	-		-
CDL 1-3	gray mucoid				
CDL 2-1	spread(1/8)	-	-		+
CDL 2-2	gray	+	+		
CDL 2-3	gray mucoid	+	+		-
CDL 3-1	white-hemo.(1/8)	+	+		+
CDL 3-2	yellowish	+	+	+	+
CDL 4-1	spread	+	+		-
CDL 4-2	white	+	-		-
CDL 4-3	gray mucoid	+	-		-
CDL 4-4	gray	-/+	+		-
CDL 5	spread(all)	+	+		-
CDL 6	spread(4/5)	+	+		-
CDL 7	spread(2/3)	+	+		-
CDL 8-1	spread(1/2)	+	+		-
CDL 8-2	gray	+	+		-
CDL 9	spread(4/5)	+	+		-
CDL 10	spread(4/5)	+	+		-
CDL 11-1	spread(4/5)	+	-		-
CDL 11-2	yellowish	+	+	+	+
CDL 12	spread(all)	+	-		-
CDL 13-1	spread(3/4)	+	-		-
CDL 13-2	yellowish	+	+	+	+
CDL 14-1	white	+	+		+
CDL 14-2	gray mucoid	+	-		+
CDL 14-3	gray	+	+		-
CDL 14-4	gray small	+	+		+
CDL 14-5	gray spread(1/9)	+	+	+	+
CDL 15-1	spread(1/8)	+	+	+	+
CDL 15-2	gray mucoid	+	-		+
CDL 15-3	p.p	-	-		+
CDL 16-1	gray mucoid	+	-		-
CDL 16-2	gray	+	-		+

Table 9. The results of leachate isolation under MacConky medium condition from animal carcass disposals

Sample	MacConky	OX	TSI	MOT
CDL 1-1	NG		K/K	-
CDL 1-2	NG		K/K	-
CDL 1-3	NG		K/K	-
CDL 2-1	NG		A/A	-/+
CDL 2-2	NG		A/A	+
CDL 2-3	NG		K/K	+
CDL 3-1	NG		K/A	+
CDL 3-2	NG		A/A	+
CDL 4-1	spread(A/AG)(+) *Serratia liquefaciens*	-	K/K	-
CDL 4-2	NG	+	K/K	-/+
CDL 4-3	pink mucoid(A/AG)(+)	+	K/K	-
CDL 4-4	pale pink op.(-) *P. putida*	+	K/K	+
CDL 5	NG		K/K	+
CDL 6	NG		K/K	+
CDL 7	NG		K/A	+
CDL 8-1	NG		K/A	+
CDL 8-2	NG		K/K	-
CDL 9	NG		K/A	+
CDL 10	NG		K/A	+
CDL 11-1	NG		K/K	-
CDL 11-2	NG		K/K	-
CDL 12	NG		K/K	-
CDL 13-1	NG		K/K	-
CDL 13-2	NG			
CDL 14-1	pale pink mucoid(A/AG)(+)	+	A/AG	+
CDL 14-2	pale pink op.(-)	+	K/K	+
CDL 14-3	colorless(+) *P. fluorescens*	+	K/K	-/+
CDL 14-4	NG		K/K	+
CDL 14-5	NG		K/K	+
CDL 15-1	NG		K/K	+
CDL 15-2	colorless(+) *P. fluorescens*	+	K/K	+/-
CDL 15-3	NG	+	K/K	+
CDL 16-1	NG		K/K	-
CDL 16-2	colorless *P. fluorescens*	+	K/K	+

Table 10. The results of identification for leachate from animal carcass disposal in this study

No.	Colony		
	A	B	C
CDL - 1	-	-	-
CDL - 2	-	-	-
CDL - 3	*Bacillus cereus*	-	-
CDL - 4	*Pseudomonas putida* *Acinetobacter ursingii*	*Aeromonas hydrophila*	*Serratia liquefaciens*
CDL - 5	-	-	-
CDL - 6	-	-	-
CDL - 7	-	-	-
CDL - 8	*Brevundimonas naejangsanensis*	-	-
CDL - 9	-	-	-
CDL - 10	-	-	-
CDL - 11	*Bacillus cereus*	-	-
CDL - 12	-	-	-
CDL - 13	*Bacillus cereus*	-	-
CDL - 14	*Bacillus cereus*	*Serratia liquefaciens*	*Pseudomonas fluorescens* *Pseudomonas aeruginosa*
CDL - 15	*Bacillus cereus*	*Pseudomonas fluorescens*	
CDL - 16	*Pseudomonas fluorescens*	*Acinetobacter ursingii*	

것으로 보고되어 있다(Marinda et al., 2002).

*Bacillus spp.*는 자연계에 광범위하게 존재하며, 열악한 환경에서도 생존하는 능력을 가지고 있다. *B. cereus*의 경우 다양한 독소들을 생성하고 있으며, 이들 독소 종류에 의해 설사 및 구토를 야기한다. *B. cereus*에 의한 감염은 증상이 심하지 않으며, 수일 내로 자연 치유되는 경우가 많아 병원에 내원하는 경우가 드물어 실제 감염률에 비해 보고되지 않는 경우가 많다. 또한 *B. cereus*의 감염 증상별로 설사를 유발하는 경우에는 *Clostridium perfringens*와 잠복기 및 증상이 유사하며, 구토를 유발하는 경우에는 *Staphylococcus aureus* 독소 감염 증상과 유사하여 정확한 진단 및 원인 병원체 분리에 어려움이 있다. 국내에서 발생하는 *B. cereus*의 감염증에 대한 통계는 질병관리본부 국립보건연구원 급성 설사질환자 실험실 감시망 사업 2007년도 자료에 의하면 전국적으로 5,345주의 설사 유발 세균이 분리되었으며, 이 중 337주의 *B. cereus*가 분리되어 전체 설사 유발 원인균의 6.3%를 보였다(Division of Enteric Bacterial Infections, 2007). 그러나 구토증후군을 유발하는 *B. cereus*에 관한 보고는 없는 실정이다. 1970년대 초반 영국의 중국식 식당에서 조리된 쌀에 의해 감염된 것을 시작으로 1989년 까지 11개 국가에서 200여 건의 구토형 집단발생이 보고되었다(Kramer and Gilbert, 1989). 구토형의 경우 전분이 있는 음식, 파스타, 유아 이유식 등에서 주로 분리가 되며, 특히 생쌀과 조리된 쌀에서 10~100% 구토형 *B. cereus*가 오염되었다(Taylor, 2005). 쌀을 많이 소비하는 국내 실정에서 잠재적인 환자의 발생 위험이 있다. *B. cereus*에 hbl 유전자가 존재할 경우는 34~84% 정도이나, nhe와 entFM 유전자는 92~100% 존재하는 것으로 보고되었다(Rusul and Yaacob, 1995). 또한 구토형의 경우 hbl 유전자가 없으면서 nhe 유전자만이 존재하는 특징을 가진다. 구토를 유발하는 독소는 내열성으로 (D-O-Leu-D-Ala-L-OVal-L-Val)3의 구조를 이루는 1.2 kDa의 단백질이다.

Cereulide는 세포의 미토콘드리아막에서 potassium ionophore와 유사한 작용을 하는 것으로 알려졌다. 단백질이 매우 작고 항원성이 낮은 이유로 인해 독소를 직접적으로 진단할 수 있는 방법이 없다. 가장 보편적으로 독소의 존재 여부를 확인하는 방법으로 cell cytotoxicity를 측정하는 방법과, Hep-2 cell에 공포현상을 확인하는 방법이 있다(Nishikawa 등, 1996).

이들 식중독 원인균의 증식억제를 위한 화학적인 방법으로 차아염소산, hydrogen peroxide, potassium sorbate(Rice and Pierson, 1982), ben-zoic acid(Kim et al., 1997), propionic acid, citric acid, acetic acid, lactic acid 등 유기산(Oh and Marshall,1994 ; Ita and Hutkins, 1991 ; Yonng and Foegding, 1993 ; Fernandes et al., 1998)과 NaCl(Masuda et al., 1998)및 기타 보존제를 단독으로 또는 병용한 실험결과가 많이 보고되고 있다.

Ethanol의 항균작용 효과는 옛날부터 알려져 있었으나 식품중의 미생물을 억제할 목적으로 적극적으로 이용한 것은 1970년대부터이다. 순수 ethanol은 식품의 살포제로서 사용은 불충분하지만 70% ethanol은 표면살균제로 이용되었고, 과일, 와인, 쌀로 만든 주류와 증류주는 식품 조리 시 사용되어 왔으며, 이런 ethanol은 열에 증발되어, 식품을 조리할때 쉽게 제거되는 장점을 가지고 있다. 식염은 첨가제로서 식품의 저장성을 향상시키기 위하여 사용되어 왔으며, 식품의 풍미를 증진시키고 많은 발효식품에서 선택적인 미생물의 번식을 유도하여 젖산발효가 잘 이루어지도록 한다. 식염의 미생물에 대한 번식저해 또는 사멸작용은 탈수작용, 불가역적인 원형질의 분리, 효소활성저해, Cl ion의 독작용, 산소용해도 감소 및 CO_2에 대한 감수성을 높이기 때문인 것으로 알려져 있다(Jang et al., 2003).

침출수의 화학적 특성이 유해 미생물인 *Bacillus cereus*가 존재에 미치는 영향을 파악하고자 침출수의 화학분석결과를 *Bacillus cereus*의 유무에 따라 구분을 지어 분석한 결과, *Bacillus cereus*가 검출되지 않은 지역이 *Bacillus cereus*가 검출된 지역에 비하여 SO_4 와 Cl의 평균 농도가 각각 약 46배와 약 8배 높게 나타남으로써 SO_4와 Cl이 *Bacillus cereus*의 생존에 독성으로 작용했을 것이 라 판단되어 진다(Table 11).

Table 11. A comparisons of average concentration between without B. cereus and with B. cereus

	Average concentration (mg/L)			ratio (A/B)
	total	without *B. cereus* (A)	with *B. cereus* (B)	
Na	224.487	279.018	104.518	2.670
K	100.847	93.226	117.612	0.793
NH_4	301.385	335.163	227.072	1.476
SO_4	61.366	74.641	1.625	45.947
Cl	211.743	291.549	36.169	8.061
HCO_3	32.702	32.157	33.900	0.949
T-N	273.805	356.746	91.335	3.906

3.3. 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 12).

그 외 *Pseudoclavibacter helvolus, Pseudochrobactrum saccharolyticum, Corynebacterium callunae, Paenibacillus lautus, Bacillus arvi, Brevundimonas bullata, Acinetobacter ursingii* 및 *Bacillus psychrodurans*가 동정되었다. 현재 가축매몰지내 악취제거 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).

김계훈 등 (2008)은 AI 발생으로 인해 살처분된 동물 사체를 매몰한 지역에서 시료를 채취하여 미생물의 DNA를 추출한 뒤 연쇄중합반응 (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, Clostrium, Cystobacter, Frankiaceae, Malikia, Ochrobactrum, Polynucleobacter, Rhizosphere, Stenotrophomonas, Sterolibacterium, Virgibacillus, Xanthomonas* 등이 존재하는 것으로 보고하였다.

영국 보건부 (UK Department of Health, 2001)의 연구에 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 2.5m (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 홀씨형성 박테리아이다 (Priest, 1993). *B. pumilus* 홀씨는 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 가죽산업 폐기물로 발생되는 우모 (Feather)를 친환경적 사료로 만드는데 효과적으로 이용가능하다는 연구를 수행하였다. *B. pumilus*를 포함하는 몇몇의 *Bacillus*종 (*B. amyloliquefaciens*과 *B. licheniformis*)들은 음식물내 존재시 독성를 띄게 되어 식중독 또는 구토를 유발하고, 특히 내성포자형태 (Endospore-forming)의 *Bacillus* 종 들은 열에 강한 생존력을 가지고 있어 저온살균법 (74℃, 15-20 sec)과 whey evaporation법 (50-70℃)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 그람양성(Gram positive) 박테리아로써 유충 살충제의 일종으로 모기 유충 방제균으로 사용되는 순수 호기성(Obligate aerobe bacterium) 특성을 띄며, 구형의 내성포자

(Endospores)를 형성한다. *B. sphaericus*는 Culex과 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℃ 에서도 25~35℃에서 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, 깔따구류 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, 생물비료로써의 가능성을 제시하였다. 또한 한길환과 김상달(1995)은 Culex, Anopheles 등 유해 모기의 유충을 강력히 살충할 수 있는 *B. sphaericus* 1593을 보다 더 강력하고 더 넓게 살충하는 모기방제균주로 육종하기 위하여 *B. sphaericus* 1593의 형질전환 조건을 확립하는 연구를 수행하였다.

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 미생물들은 세포벽 구성 성분인 peptidoglycan type이 Alγ인 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 fetide의 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.

Table 12. The results of PCR for leachate from animal carcass disposal in this study

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

4. 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. 그 외 총 유기탄소와 암모니아이온은 기존 연구 (박재우, 2011)에 비하여 높게 검출되었다. 침출수의 호기성 미생물에 대하여 생화학 검사 및 미생물 동정과 분자생물학적 분석을 실시한 결과, 매몰지내 악취제거 목적으로 주입 가능한 EM 미생물이 아닌 가축사체에서 유래된 *Bacillus pumilus, Lysinibacillus sphaericus* 및 *Bacillus sphaericus* 등이 동정되었으며, 설사유발균인 *Bacillus cereus*가 검출되었다. 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.

5. 참 고 문 헌

김계훈, 2008, “가축 매몰에 따른 환경오염관리방안 마련,” 환경부 (In Korean).

김동욱, 박제철, 류재근, 2006, “점오염원 및 비점오염원 발생 생활하수가 하천수역의 총대장균 농도에 미치는 영향의 분석,” *대한상하수도학회・한국물환경학회, 공동 추계학술발표회 논문집*, pp. 981-990 (In Korean).

농림수산식품부. 2012. “구제역 긴급 행동 지침[SOP].” p. 1-245 (In Korean).

박재우, 2011, “가축 매몰지 침출수 특성 및 처리공법,” *지반환경*, Vol. 12(2), pp. 45-56 (In Korean).

박준범, 2011, “구제역 매몰지에 대한 지반공학적 접근,” 한국지반공학회지, Vol. 27(3), 10-21 (In Korean).

이강근, 2011, “구제역과 매몰지 침출수 그리고 지하수 오염,” 지반환경, Vol. 12(2), 6-17 (In Korean).

이승학, 오명학, 2011, “가축매몰 관련 국외 연구사례 및 국내 구제역 매몰지 사후관리 방안,” 한국토목섬유학회지, Vol. 10(2), 24-29 (In Korean).

한길환, 김상달, 1995, “모기유충 방제균 *Bacillus sphaericus* 1593의 형질전환 조건,” 한국미생물생명공학회지, Vol. 23(2), 156-163 (In Korean).

화학교재연구원, 2012, “화화과원리,” p. 84 (In Korean).

환경부. 2011. “가축매몰지 환경관리지침.” p. 1-29 (In Korean).

Abbey. and Mark, S. K., 2004. “Carcass Disposal: A Comprehensive Review, Chapter 1,” Burial National Agricultural Biosecurity Center Consortium USDA APHIS Cooperative Agreement Project Carcass Disposal Working Group, p. 1-7.

Agata, N., Ohta, M., Mori, M., and Isobe, M. A., 1995, “Novel dodecadepsipeptide, cereulide is an emetic toxin of *Bacillus cereus*,” *FEMS Microbiol. Lett.,* Vol. 129, pp. 17-20.

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. Microbol*, Vol. 57, pp. 1117-1125.

Ankolekar, C., Rahmati, T., and Labbe, R. G, 2008, "Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spore in U.S. rice," *Int. J. food microbial*, Vol. 128, pp. 460-466.

Bartley, L. M., Donnelly, C. A., and Anderson, R. M., 2002, "Review of foot-and-mouth disease virus survival in animal excretions and on fomites," *Veterinary Record*, Vol. 151(22), pp. 667-669.

Davies, R. H. and Wray, C., 1996, "Persistence of Salmonella enteritidis in poultry units and poultry food," *British Poultry Science* Vol. 37, pp. 589-596.

Davies, R. H. and Wray, C., 1996, "Seasonal variations in the isolation of *Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis, Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* from environmental samples," *J. Vet. Clin*, Vol. 43(2), pp. 119-127.

Division of Enteric Bacterial Infections, 2007, "Division of Enteric and Hepatitis viruses Division of Malaria and Parasitic Diseases Surveillance Network of Water-borne and Food-borne disease," *National Institute of Health*, Seoul p. 7-31.

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*, Vol. Vol. 47, pp. 125-129.

Fernandes, C. F., Flick, G. J., Cohen, J., and Thomas, T. B., 1998, "Role of organic acids during processing to improve quality of channel catfish fillets," *J. Food Prot,* Vol. 61, pp. 495-498.

Fisher, S. G. and Lerman, L. S., 1983, "DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 80(6),

pp. 1579-1583.

Granum, P. E., 1994, "*Bacillus cereus* and its toxins," *J. Appl. Bacterial. Symp*, Vol. 76, pp. 61-66.

Granum, P. E., 2001, "*Bacillus cereus* In Food Microbiology," *Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, Washington, D.C. pp. 373-381.

Grubman, M. J., Morgan D. O., Kendall J., and Baxt B., 1985, "Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells," *J. Virol,* Vol. 56, pp. 120-126.

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," *J Fish Diseases*, Vol. 32(12), pp. 1007-1016.

Ita, P. S. and Hutkins, R.W., 1991, "Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in trypic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acid," *J. Food Prot*, Vol. 54, pp. 15-19.

Jacobson, K. H., Lee, S. H., McKenzie, D., Benson, C. H., Pedersen, J. A., 2009, "Transport of the Pathogenic Prion Protein through Landfill Materials, *Env. Sci. Tec*, Vol. 43(6), pp. 2022-2028.

Jang, J. H., Jang, J. S., Lee, S. Y., Kim, H. S., Kang S. M., and Park, J. H., 2003, "Growth Inhibition Effects of Ethanol and Sodium Chloride on *Bacillus cereus*," Korean J. Food Sci. Technol, Vol. 35(5), pp. 998-1002.

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 Solublizing Bacterium Isolated from Citrus Orchard Soil," *Korean J. Soil Sci. Fert*, Vol. 40(5), pp. 405-411(In Korea 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 J. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 40(2), pp. 128-134 (In Korea with English abstract).

Kim, D. J., Kwon, O. J., and Byun, M. W., 1997, "Combination effects of benzoate, sorbate and pH for control of *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Hyg. Saf*, Vol. 12, pp. 200-204.

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 J. Microbiol. Biotechnol*, Vol. 39(4), pp. 374-381 (In Korea 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*, Vol. 43(3), pp. 384-389 (In Korea 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*, Vol. 23(3), pp. 331-338 (In Korea with English abstract).

Kramer, J. M. and Gi1bert, R. J., 1989, "*Bacillus cereus* and other Bacillus species," *Marcel Dekker Inc.*, London, pp. 21-70.

Kramer, J. M. and Gilbert, R. J., 1989, "*Bacillus cereus* and other *Bacillus species," Food Borne Bacterial Pathogens,* New York, p. 21-70.

Krystynak, R. H. E., and Charlebois P.A., 1987, "The potential economic impact of an outbreak of foot-and-mouth disease in Canada," Can. Vet. J, Vol. 28, pp. 523-527.

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 p. 305-314.

Marinda, C. O., Bridgitta, S., Jacques, T., Pascal C., Denise L., Alexander V.H., and Volker S.B., 2002, "Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during Biofilm formation," *Appl Environ*

Microbiol, Vol. 68, pp. 2770-2780.

Masuda, S., Hara-Kudo, Y., and Kuagai. S., 1998, "Reduction *Escherichia coli* O157:H7 population in soy sauce a fermented seasoning," *J. Food Prot*, Vol. 61, pp. 657-661.

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*, Vol. 181, pp. 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*. Vol. 267, pp. 4068-4074.

Miller, K. M., Ming, T. J., Schulze, A. D., and Withler. R. E., 1999, "Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): a rapid and sensitive technique to screen nucleotide sequence variation in populations," *Biotechniques*, Vol. 27, pp. 1016-1018.

Miller, L. K., Lingg, A. J., Bulla L. A. Jr., 1983, "Bacterial, Viral, and Fungal Insecticides," *Science*, Vol. 219(4585) pp. 715-721.

Monika, E. S., Fricker, M., and Scherer, S., 2004, "Bacillus cereus the causative agent of an emetic type of food-borne illness," *Mol. Nutr. Food Res,* Vol. 48, pp. 479-487.

Moon, Y. H., Lee, K. B., Kim, Y. J., and Koo, Y. M., 2011, Current Status of EM (Effective Microorganisms) Utilization, *Biotechnol Bioproc E*, Vol. 26, pp. 365-373 (In Korea with English abstract).

Myers. P. S. and Yousten, A. A., 1980, "Localization of a Mosquito-Larval Toxin of *Bacillus sphaericus* 1593," *Appl. Environ. Microbiol*. Vol. 39, pp. 1205-1212.

Nishikawa, Y., Kramer, J. M., Hanaoka, M., and Yasukawa, A., 1996, "Evaluation of serotyping, biotyping, plasmid banding pattern analysis and HEp-2 vacuolation factor assay in the epidemiological investigation of *Bacillus*

cereus emetic-syndrome food poisoning," *Int. J. Food. Microbiol,* Vol. 31 pp. 149-159.

Oh, D. H., and Marshall, D. L., 1994, "Enhanced inhibition of *Listeria monocytogenes* by glycerol monolaurate with organic acids," *J. Food Sci*, Vol. 59, pp. 1258-1261.

Park, J. H., 2011, "Improvement Plan for the Prevention and Biosecurity of Animal Disease," *Journal of Korean Society on Water Quality*, Vol. 27(3), pp. 371-376 (In Korea 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, p. 3-16.

Rice, K. M., and Pierson, M. D., 1982, "Inhibition of *Salmonella* by sodium nitrite and potassium sorbate in frankfurters." *J. Food Sci,* Vol. 47, pp. 1615-1617.

Rondon, M. R., Goodman, R. M., and Handelsman, J., 1999, "The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity," *Trends Biotechnol*, Vol. 17, pp. 403-409.

Rusul, G. and Yaacob, N. H., 1995, "Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA," *Int. J. Food. Microbiol,* Vol. 25 pp. 131-139.

Ryu, J. H. and Beuchat, L. R., 2005, "Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on a stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer," *J. Food Prot*, Vol. 68, pp. 2614-2622.

Saiz, M., Nunez, J. I., Jimenez-Clavero, M. A., Baranowski, E., and Sobrino, F., 2002, "Foot-and-mouth disease virus: biology and prospects for disease control," *Microbes Infect*, Vol. 4, pp. 1183-1192.

Salkinoja-Salonen, M. S., Vuorio, R., Andersson, M. A., Ka¨mpfer, P.,

Andersson, M. C., Honkanen-Buzalski, T., and Scoging, A. C., 1999, "Toxigenic strains of Bacillus licheniformis related to food poisoning," *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 65, pp. 4637-4645.

Stowell, C. and Sazama, K., 2007, "Informed consent in blood transfusion and cellular therapies: patients, donors, and research subjects," *Amercan Association of Blood Banks*, Vol. 62, pp. 3.

Suominen, I., Andersson, M. A., Andersson, M. C., Hallaksela, A. M., Ka¨mpfer, 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*, Vol. 24, pp. 267-276.

Taylor, J. M., Sutherland A. D., Aidoo, K. E., and Logan, N. A., 2005, "Heat-stable toxin production by strains of *Bacillus cereus, Bacillus firmus, Bacillus megaterium, Bacillus simplex* and *Bacillus licheniformis," FEMS Microbiol Lett*, Vol. 7 pp. 242-313.

Turnbull, P. C. B., 1999, "Definitive identification of Bacillus anthracis-a review," *Appl. Microbiol*, Vol. 87, pp. 237-240.

Turnbull, P., 2001, "Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals," *World Health Organization*, New York, p. 99-103

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," *J Environ Sci*, Vol. 16(10), pp. 1203-1208(In Korea with English abstract).

Yonng, K. M. and Foegding, P. M., "Acetic, lactic, citric acid and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH," *J. Appl. Bacteriol*, Vol. 74, pp. 515-520.

Yoo, H. S., 2011, "Foot and mouth disease: etiology, epidemiology and control

measures," *Infect Chemother*, Vol. 43, pp. 178-185.

Yoon, D. H., Kang, D. W., and Nam, K. W., 2009, "The Effect of Yeast(Saccharomyces exiguus SJPAF1) on Odor Emission and Contaminants Reduction in Piggery Slurry," *Korean Journal of Environmental Agriculture*, Vol. 28(1), pp. 47-52 (In Korea with English abstract).

Appendices A

The results of isolation for leachate from animal carcass disposal(CDL 1-16).

```
Accession ID:  1-1
                No matching exams (                    1).
Position:       (000008EBA421) Chonnam Univ. Hp.  SCS-01 Sep 26 19:34:14
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (04.75)
Organism:
Origin:

APPA   -   ADO    -   PyrA   +   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   +
H2S    -   BNAG   +   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    +   OFF    +
BGLU   +   dMAL   -   dMAN   +   dMNE   +   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   +
SAC    +   dTAG   -   dTRE   +   CIT    +   MNT    -   5KG    +
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   +   AGAL   +   PHOS   +
GlyA   -   ODC    +   LDC    +   1HISa  -   CMT    +   BGUR   -
O129R  +   GGAA   +   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      99.00  Serratia liquefaciens group

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Serratia liquefaciens
    Arg.hydr. ( 1)
Serratia proteamaculans
    Arg.hydr. ( 1)
Serratia grimesii
    Arg.hydr. (99)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3093 )
[ iwfA awfN dilP inc04:43:14 ver0255 ]
```

```
Accession ID:  2-1
                No matching exams (                    2).
Position:       (000008EBA421) Chonnam Univ. Hp.  SCS-02 Sep 26 19:34:14
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (06.00)
Organism:       Pseudomonas putida
Origin:         GN Identification

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    +   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    +   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  +   CMT    +   BGUR   -
O129R  +   GGAA   -   1MLTa  +   ELLM   -   1LATa  +

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      98.24  Pseudomonas putida

- Tests contraindicating typical biopattern -
Pseudomonas putida
    dMNE (0.16)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3083 )
[ iwfA awfN dilP inc05:57:11 ver0255 ]
```

Continued

```
Accession ID:  3-1
               No matching exams (                    3).
Position:      (000008EBA421) Chonnam Univ. Hp.  SCS-03 Sep 26 19:34:14
Type:          Gram Negative Identification
Status:        FINAL (05.00)
Organism:      Aeromonas hydrophila
Origin:        GN + Technologist

APPA   +   ADC    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   +   BGAL   +
H2S    -   BNAG   +   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    +   OFF    +
BGLU   ?   dMAL   +   dMAN   +   dMNE   +   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    +   PLE    +   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    +   dTAG   -   dTRE   +   CIT    -   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    +   BGUR   -
O129R  +   GGAA   +   1MLTa  -   ELLM   +   1LATa  -

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      99.00  Aeromonas hydrophila/caviae

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Aeromonas hydrophila
    VP (99)
Aeromonas caviae
    VP ( 1)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3024 )
[ iwfA awfN dilP inc04:57:35 ver0255 ]
```

```
Accession ID:  4-1
               No matching exams (                    4).
Position:      (000008EBA421) Chonnam Univ. Hp.  SCS-04 Sep 26 19:34:14
Type:          Gram Negative Identification
Status:        FINAL (06.00)
Organism:      Pseudomonas putida
Origin:        GN Identification

APPA   -   ADC    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    +   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    +   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  +   CMT    -   BGUR   -
O129R  +   GGAA   -   1MLTa  +   ELLM   -   1LATa  +

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      98.24  Pseudomonas putida

- Tests contraindicating typical biopattern -
Pseudomonas putida
    dMNE (0.16)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3025 )
[ iwfA awfN dilP inc05:56:40 ver0255 ]
```

Continued

```
Accession ID:   5-1
                No matching exams (                    5).
Position:       (000000BE8A421) Chonnam Univ. Hp.  SCS-05 Sep 26 19:34:14
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (04.75)
Organism:
Origin:

APPA   -   ADO    -   PyrA   +   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   +
H2S    -   BNAG   +   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    +   OFF    +
BGLU   +   dMAL   -   dMAN   +   dMNE   +   BXYL   -   BA1ap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    +   TyrA   +   URE    -   dSOR   +
SAC    +   dTAG   -   dTRE   +   CIT    +   MNT    -   5KG    +
1LATk  +   AGLU   +   SUCT   +   NAGA   +   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    +   LDC    +   1HISa  -   CMT    +   BGUR   -
O129R  +   GGAA   +   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      99.00  Serratia liquefaciens group

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Serratia liquefaciens
    Arg.hydr. ( 1)
Serratia proteamaculans
    Arg.hydr. ( 1)
Serratia grimesii
    Arg.hydr. (99)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3026 )
[ iwfA awfN dilP inc04:42:12 ver0255 ]
```

```
Accession ID:   6-1
                No matching exams (                    6).
Position:       (000000BE8A4C1) Chonnam Univ. Hp.  SCS-06 Sep 26 19:34:1
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (09.75)
Organism:
Origin:

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    -   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   +   BXYL   -   BA1ap  +
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    +   MNT    +   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    -   BGUR   -
O129R  -   GGAA   -   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Low Discrimination

Probability  Organism
      50.00  Pseudomonas aeruginosa
      50.00  Pseudomonas fluorescens

- Tests contraindicating typical biopattern -
Pseudomonas aeruginosa
    GGT (0.05)  MNT (0.05)
Pseudomonas fluorescens
    MNT (0.04)

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Pseudomonas aeruginosa
    PYOCYANIN (99)  42C (99)
Pseudomonas fluorescens
    PYOCYANIN ( 1)  42C ( 1)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3027 )
[ iwfA awfN dilP inc09:51:43 ver0255 ]
```

Continued

```
Accession ID:   7-1
                No matching exams (                    7).
Position:       (000008E8A481) Chonnam Univ. Hp.  SCS-07 Sep 26 19:34:14
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (98.00)
Organism:       Pseudomonas fluorescens
Origin:         GN Identification

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   IARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    -   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  ?
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    -   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   +   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    -   BGUR   -
O129R  -   GGAA   -   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      98.07  Pseudomonas fluorescens

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3028 )
[ iwfA awfN dilP inc07:53:08 ver0255 ]
```

```
Accession ID:   8-1
                No matching exams (                    8).
Position:       (000008E8A481) Chonnam Univ. Hp.  SCS-08 Sep 26 19:34:14
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (09.75)
Organism:
Origin:

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   IARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    -   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   -   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    -   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   -   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    -   BGUR   -
O129R  -   GGAA   -   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Low Discrimination

Probability  Organism
      50.54  Aeromonas salmonicida
      49.46  Pseudomonas fluorescens

- Tests contraindicating typical biopattern -
Aeromonas salmonicida
    1LATk (0.01)
Pseudomonas fluorescens
    TyrA (0.01)

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Aeromonas salmonicida
    MOB ( 1)
Pseudomonas fluorescens
    MOB (99)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 3027 )
[ iwfA awfN dilP inc09:51:13 ver0255 ]
```

Continued

```
Accession ID:  9-1
               No matching exams (                    9).
Position:      (000008E8A4E1) Chonnam Univ. Hp.  SCS-09 Sep 26 19:34:14
Type:          Gram Negative Identification
Status:        FINAL (09.75)
Organism:
Origin:

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    -   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    -   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   ?   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    -   BGUR   -
O129R  -   GGAA   -   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Low Discrimination

Probability  Organism
      50.52  Pseudomonas fluorescens
      49.48  Acinetobacter lwoffii

- Tests contraindicating typical biopattern -
Acinetobacter lwoffii
    dMNE (0.29)  CIT (0.13)

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Pseudomonas fluorescens
    MOB (99)  Arg.hydr. (99)  OX (97)  GELATIN (99)
Acinetobacter lwoffii
    MOB ( 1)  Arg.hydr. ( 1)  OX ( 0)  GELATIN ( 1)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0185 3030 )
[ iwfA awfN dilP inc09:50:57 ver0255 ]
```

```
Accession ID:  10-1
               No matching exams (                   10).
Position:      (000008E8A4E1) Chonnam Univ. Hp.  SCS-10 Sep 26 19:34:14
Type:          Gram Negative Identification
Status:        FINAL (09.75)
Organism:
Origin:

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    -   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   -   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    +   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   +
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    -   BGUR   -
O129R  -   GGAA   -   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Low Discrimination

Probability  Organism
      33.33  Acinetobacter lwoffii
      33.33  Pseudomonas aeruginosa
      33.33  Pseudomonas fluorescens

- Tests contraindicating typical biopattern -
Acinetobacter lwoffii
    dMNE (0.29)  TyrA (0.01)
Pseudomonas aeruginosa
    GGT (0.05)  BAlap (0.12)
Pseudomonas fluorescens
    TyrA (0.01)

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Acinetobacter lwoffii
    MOB ( 1)  Arg.hydr. ( 1)
Pseudomonas aeruginosa
    MOB (99)  PYOCYANIN (99)  Arg.hydr. (99)  42C (99)
Pseudomonas fluorescens
    MOB (99)  PYOCYANIN ( 1)  Arg.hydr. (99)  42C ( 1)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0185 3031 )
[ iwfA awfN dilP inc09:50:42 ver0255 ]
```

Continued

```
Accession ID:   11-1
                No matching exams (                    11).
Position:       (000008E8A421) Chonnam Univ. Hp.  SCS-11 Sep 26 19:34:14
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (09.75)
Organism:       Pseudomonas fluorescens
Origin:         GN Identification

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    -   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  ?
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    ?   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    +   MNT    +   SKG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   +   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    -   BGUR   -
O129R  -   GGAA   -   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Very Good Identification

Probability  Organism
      94.84  Pseudomonas fluorescens

- Tests contraindicating typical biopattern -
Pseudomonas fluorescens
    MNT (0.04)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 4534 )
[ iwfA awfN dilP inc09:50:27 ver0255 ]
```

```
Accession ID:   12-1
                No matching exams (                    12).
Position:       (000008E8A421) Chonnam Univ. Hp.  SCS-12 Sep 26 19:34:14
Type:           Gram Negative Identification
Status:         FINAL (09.75)
Organism:       Pseudomonas fluorescens
Origin:         GN Identification

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    -   OFF    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   +   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    -   MNT    -   SKG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  -   CMT    +   BGUR   -
O129R  -   GGAA   -   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      98.15  Pseudomonas fluorescens

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 4535 )
[ iwfA awfN dilP inc09:50:12 ver0255 ]
```

Continued

```
Accession ID:  15-1
               No matching exams (                    15).
Position:      (000008EBA4E1) Chonnam Univ. Hp.  SC8-13 Sep 26 19:34:14
Type:          Gram Negative Identification
Status:        FINAL (65.00)
Organism:      Pseudomonas putida
Origin:        GN Identification

APPA   -   ADO    -   PyrA   -   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   -
H2S    -   BNAG   -   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    +   OPP    -
BGLU   -   dMAL   -   dMAN   -   dMNE   -   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   -
SAC    -   dTAG   -   dTRE   -   CIT    +   MNT    -   5KG    -
1LATk  +   AGLU   -   SUCT   +   NAGA   -   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    -   LDC    -   1HISa  +   CMT    +   BGUR   -
O129R  +   GGAA   -   1MLTa  +   ELLM   -   1LATa  +

Confidence Level: Excellent Identification

Probability  Organism
      98.24  Pseudomonas putida

- Tests contraindicating typical biopattern -
Pseudomonas putida
    dMNE (0.16)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 4536 )
[ iwfA awfN dilP inc05:52:53 ver0255 ]
```

```
Accession ID:  16-1
               No matching exams (                    16).
Position:      (000008EBA4E1) Chonnam Univ. Hp.  SC8-14 Sep 26 19:34:14
Type:          Gram Negative Identification
Status:        FINAL (65.00)
Organism:
Origin:

APPA   -   ADO    -   PyrA   +   1ARL   -   dCEL   -   BGAL   ?
H2S    -   BNAG   +   AGLTp  -   dGLU   +   GGT    +   OPP    +
BGLU   +   dMAL   -   dMAN   +   dMNE   +   BXYL   -   BAlap  -
ProA   +   LIP    -   PLE    -   TyrA   +   URE    -   dSOR   +
SAC    +   dTAG   -   dTRE   +   CIT    +   MNT    -   5KG    +
1LATk  +   AGLU   ?   SUCT   +   NAGA   +   AGAL   -   PHOS   -
GlyA   -   ODC    +   LDC    +   1HISa  -   CMT    +   BGUR   -
O129R  +   GGAA   +   1MLTa  -   ELLM   -   1LATa  -

Confidence Level: Very Good Identification

Probability  Organism
      95.00  Serratia liquefaciens group

- Tests contraindicating typical biopattern -
Serratia liquefaciens group
    5KG (0.15)  GGAA (0.15)

Perform supplementary test.  See Online Product Information for more
information.
- Supplemental tests for species identification -
Serratia liquefaciens
    Arg.hydr. ( 1)
Serratia proteamaculans
    Arg.hydr. ( 1)
Serratia grimesii
    Arg.hydr. (99)

LOT 241200340 EXP DATE 08-Jun-2012 ( 2412 0034 0125 4537 )
[ iwfA awfN dilP inc05:52:57 ver0255 ]
```

Appendices B

The results of PCR for leachate from animal carcass disposal(CDL 1-16).

```
                                                        1-16sRNA

>gb|JN377788.1|  Lysinibacillus sphaericus strain VCRC B545 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
Length=1481

 Score =  734 bits (397),  Expect = 0.0
 Identities = 397/397 (100%), Gaps = 0/397 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    GGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAAATATTGAAAGACGGTTTCGGCTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  144  GGCTAATACCGAATAATCTGTTTCACCTCATGGTGAAATATTGAAAGACGGTTTCGGCTG  203

Query  61   TCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  204  TCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGC  263

Query  121  GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  264  GACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG  323

Query  181  ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  324  ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAA  383

Query  241  CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTCGGTTCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  384  CGCCGCGTGAGTGAAGAAGGATTTCGGTTCGTAAAACTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGT  443

Query  301  ACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  444  ACAGTAGTAACTGGCTGTACCTTGACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTG  503

Query  361  CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT  397
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  504  CCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGT  540
```

```
                                                        2

sample: 2
primer: 16sRNA
result: Bacillus sphaericus (100%)
>dbj|AB271742.1|  Bacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence
Length=1477

 Score =  789 bits (427),  Expect = 0.0
 Identities = 427/427 (100%), Gaps = 0/427 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CCAGTTACTACTGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGAACCGAAATCCTTCT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  452  CCAGTTACTACTGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGAACCGAAATCCTTCT  393

Query  61   TCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  392  TCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTG  333

Query  121  CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  332  CCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTC  273

Query  181  GGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  272  GGCTACGCATCGTTGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGC  213

Query  241  CCATCCTATAGCGACAGCCGAAACCGTCTTTCAGTATTGTCCCATGAGGGACAAAAGATT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  212  CCATCCTATAGCGACAGCCGAAACCGTCTTTCAGTATTGTCCCATGAGGGACAAAAGATT  153

Query  301  ATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAAACTATAGGGTAGGTTGCCCACGT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  152  ATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAAACTATAGGGTAGGTTGCCCACGT  93

Query  361  GTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTCTCTGTTCGCTCGACT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  92   GTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTCTCTGTTCGCTCGACT  33

Query  421  TGCATGT  427
            |||||||
Sbjct  32   TGCATGT  26
```

Continued

3

```
sample: 3
primer: 16sRNA
result: Bacillus sphaericus (100%)

>dbj|AB271742.1|  Bacillus sphaericus gene for 16S rRNA, partial sequence
Length=1477

 Score =  743 bits (402),  Expect = 0.0
 Identities = 402/402 (100%), Gaps = 0/402 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    TTCCCTTACAACAGAGTTTTACGAACCGAAATCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  430  TTCCCTTACAACAGAGTTTTACGAACCGAAATCCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCA  371

Query  61   TCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  370  TCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCG  311

Query  121  TGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  310  TGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCTTGGT  251

Query  181  GAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCTATAGCGACAGCCGAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  250  GAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCCTATAGCGACAGCCGAA  191

Query  241  ACCGTCTTTCAGTATTGTCCCATGAGGGACAAAAGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  190  ACCGTCTTTCAGTATTGTCCCATGAGGGACAAAAGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTC  131

Query  301  CCGGAGTTATCCCAAACTATAGGGTAGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  130  CCGGAGTTATCCCAAACTATAGGGTAGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTA  71

Query  361  ACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTCTCTGTTCGCTCGACTTGCA  402
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  70   ACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTCTCTGTTCGCTCGACTTGCA  29
```

4-1

```
sample: 4-1
primer: 16sRNA
result: Paenibacillus lautus (99%)

>gb|HQ323447.1|  Paenibacillus lautus strain F9 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1523

 Score =  715 bits (387),  Expect = 0.0
 Identities = 396/400 (99%), Gaps = 2/400 (1%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    ACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  412  ACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCC  353

Query  61   TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGTTCACCCTCTCAGGTCGG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  352  TCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGTTCACCCTCTCAGGTCGG  293

Query  121  CTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCAGGCCC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  292  CTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCCCACCAACTAGCTAATGCGCCGCAGGCCC  233

Query  181  ATCCCCAAGTGACAGATTGCTCCGTCTTTCATTATTCCACAATGCTGTGAAATAAATTAT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  232  ATCCCCAAGTGACAGATTGCTCCGTCTTTCATTATTCCACAATGCTGTGAAATAAATTAT  173

Query  241  CCGGTATTAGCTACCGTTTCCGGTAGTTATCCCAGTCTCGAGGGCAGGTTGCCTACGTGT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||
Sbjct  172  CCGGTATTAGCTACCGTTTCCGGTAGTTATCCCAGTCTTGAGGGCAGGTTGCCTACGTGT  113

Query  301  TACTCACCCGTCCGCCGCTAACTC-TCAGGAGTGCAAGCACTCCATCAAGTCCGCTCGAC  359
            |||||||||||||||||||||||| | |||||| ||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  112  TACTCACCCGTCCGCCGCTAAC-CATCAGGAATGCAAGCACTCCATCAAGTCCGCTCGAC  54

Query  360  TTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCC  399
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  53   TTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCC  14
```

Continued

```
                                                                    4-2
sample: 4-2
primer: 16sRNA
result: Paenibacillus sp. (99%)

>dbj|AB257598.1|  Paenibacillus sp. KSM-M126 gene for 16S rRNA, partial sequence
Length=1480

 Score =  872 bits (472),  Expect = 0.0
 Identities = 476/480 (99%), Gaps = 0/480 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AAGTCGAGCGGAGTTAYTTTGAAAGCTTGCTTTCAAARTRACTTAGCGGCGGACGGGTGA  60
            ||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||   ||||||||||||||||||||
Sbjct  32   AAGTCGAGCGGAGTTANTTTGAAAGCTTGCTTTCAAANNNACTTAGCGGCGGACGGGTGA  91

Query  61   GTAACACGTAGGCAACCTGCCCTTCAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  92   GTAACACGTAGGCAACCTGCCCTTCAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATAC  151

Query  121  CGGATAATTTCTTTTTTCTCCTGAGAGAAGAATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  152  CGGATAATTTCTTTTTTCTCCTGAGAGAAGAATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTGAGG  211

Query  181  GATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  212  GATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCG  271

Query  241  TAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  272  TAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  331

Query  301  GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  332  GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  391

Query  361  AGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  392  AGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTA  451

Query  421  ACTGCTATCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  452  ACTGCTATCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  511
```

```
                                                                    4-2(new)
sample: 4-2
primer: 16sRNA
result: Paenibacillus Paenibacillus odorifer. (99%)

>dbj|AB210070.1|  Paenibacillus odorifer gene for 16S rRNA, partial sequence
Length=540

 Score =  867 bits (469),  Expect = 0.0
 Identities = 475/480 (99%), Gaps = 0/480 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AAGTCGAGCGGAGTTAYTTTGAAAGCTTGCTTTCAAARTRACTTAGCGGCGGACGGGTGA  60
            ||||||||||||||| | |||||||||||||||||||| | ||||||||||||||||||||
Sbjct  55   AAGTCGAGCGGAGTYATTTGAAAGCTTGCTTTCAAAATAACTTAGCGGCGGACGGGTGA  114

Query  61   GTAACACGTAGGCAACCTGCCCTTCAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATAC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  115  GTAACACGTAGGCAACCTGCCCTTCAGACTGGGATAACTACCGGAAACGGTAGCTAATAC  174

Query  121  CGGATAATTTCTTTTTTCTCCTGAGAGAAGAATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTGAGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  175  CGGATAATTTCTTTTTTCTCCTGAGAGAAGAATGAAAGACGGAGCAATCTGTCACTGAGG  234

Query  181  GATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  235  GATGGGCCTGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCG  294

Query  241  TAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  295  TAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  354

Query  301  GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  355  GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  414

Query  361  AGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  415  AGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGCCAGGGAAGAACGTCCGGTAGAGTA  474

Query  421  ACTGCTATCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  480
            ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  475  ACTGCTACCGGAGTGACGGTACCTGAGAAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  534
```

Continued

```
                                                    4-3
sample: 4-3
primer: 16sRNA
result: Bacillus arvi (100%)

>ref|NR_025627.1|  Viridibacillus arvi strain LMG 22165 16S ribosomal RNA, partial
sequence
 emb|AJ627211.1|  Bacillus arvi partial 16S rRNA gene, type strain LMG 22165
Length=1505

 Score =  852 bits (461),  Expect = 0.0
 Identities = 464/465 (99%), Gaps = 1/465 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CGTC-AGGTACGTTCAGTTACTAACGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGAT  59
            |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  465  CGTCAAGGTACGTTCAGTTACTAACGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGAT  406

Query  60   CCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGA  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  405  CCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGA  346

Query  120  TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATC  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  345  TTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATC  286

Query  180  ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAGGCCATTACCCCACCAACTAGCTA  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  285  ACCCTCTCAGGTCGGCTATGCATCGTTGCCTTGGTAGGCCATTACCCCACCAACTAGCTA  226

Query  240  ATGCACCGCGGGCCCATCTAGTAGTGACAGCCGAAACCGCCTTTCAGCATTTTGCCATGT  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  225  ATGCACCGCGGGCCCATCTAGTAGTGACAGCCGAAACCGCCTTTCAGCATTTTGCCATGT  166

Query  300  GACAAAATGGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAATCTACTAGGT  359
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  165  GACAAAATGGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAATCTACTAGGT  106

Query  360  AGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAAATCAGAAGAAGCAAGCTTCTTCAT  419
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  105  AGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAAATCAGAAGAAGCAAGCTTCTTCAT  46

Query  420  CATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTC  464
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  45   CATTCGCTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTC  1
```

```
                                                    6-2
sample: 6-2
primer: 16sRNA
result: Brevundimonas bullata (100%)

>emb|AJ717390.1|  Brevundimonas bullata 16S rRNA gene, isolate AC23
Length=1367

 Score =  750 bits (406),  Expect = 0.0
 Identities = 406/406 (100%), Gaps = 0/406 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CGTCATTATCGTCCCCGGTGAAAGAATTTTACAATCCTAAGACCTTCATCATTCACGCGG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  410  CGTCATTATCGTCCCCGGTGAAAGAATTTTACAATCCTAAGACCTTCATCATTCACGCGG  351

Query  61   CATGGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  350  CATGGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA  291

Query  121  GTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  290  GTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCG  231

Query  181  TCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  230  TCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGC  171

Query  241  GATAAATCTTTCCCCCGAAGGGCACATTCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  170  GATAAATCTTTCCCCCGAAGGGCACATTCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCC  111

Query  301  GAACCTAAAGGCACGTTCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTAACCCCGAAGGGTCC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  110  GAACCTAAAGGCACGTTCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTAACCCCGAAGGGTCC  51

Query  361  GTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCGCTCTGAGC  406
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  50   GTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCGCTCTGAGC  5
```

Continued

```
                                                                    6-4
sample: 6-4
primer: 16sRNA
result: Brevundimonas bullata (100%)

>emb|AJ717390.1|  Brevundimonas bullata 16S rRNA gene, isolate AC23
Length=1367

 Score =  754 bits (408),  Expect = 0.0
 Identities = 408/408 (100%), Gaps = 0/408 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CGTCATTATCGTCCCCGGTGAAAGAATTTTACAATCCTAAGACCTTCATCATTCACGCGG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  410  CGTCATTATCGTCCCCGGTGAAAGAATTTTACAATCCTAAGACCTTCATCATTCACGCGG  351

Query  61   CATGGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  350  CATGGCTGCGTCAGGCTTTCGCCCATTGCGCAAGATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGA  291

Query  121  GTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  290  GTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTACTGATCG  231

Query  181  TCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  230  TCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGCTCTAAAGGC  171

Query  241  GATAAATCTTTCCCCCGAAGGGCACATTCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  170  GATAAATCTTTCCCCCGAAGGGCACATTCGGCATTACCACCCGTTTCCAGGAGCTATTCC  111

Query  301  GAACCTAAAGGCACGTTCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTAACCCCGAAGGGTCC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  110  GAACCTAAAGGCACGTTCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTAACCCCGAAGGGTCC  51

Query  361  GTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCGCTCTGAGCCA  408
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  50   GTTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCGCTCTGAGCCA  3
```

```
                                                                    7-1
sample: 7-1
primer: 16sRNA
result: Pseudoclavibacter helvolus (95%)

>gb|HM584267.1|  Pseudoclavibacter helvolus strain CJ-G-TSA2 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
Length=1445

 Score =  702 bits (380),  Expect = 0.0
 Identities = 421/441 (95%), Gaps = 2/441 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    TACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCGTCCC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  440  TACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTAAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCCGTCATCCC  381

Query  61   TCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  380  TCACGCGGCGTTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTC  321

Query  121  CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  320  CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGGTCACCCTCTCAGGCCGGCT  261

Query  181  ACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAGCTGATAGGCCGTGAGCCGAT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||
Sbjct  260  ACCCGTCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACAAGCTGATAGGCCGTGAGCCGAT  201

Query  241  CCATGACCGAAAAAATCTTTCCAGACGCAGAAGATGCCTTCGCGTCACG-TATCCAGTATT  299
            |||| ||| |||||||||||| || ||||   ||||   ||| || | | ||||||||||
Sbjct  200  CCATAACCAAAAAATCTTTCCAAACACAGACCATGCGATCGTGTTA-GATATCCAGTATT  142

Query  300  AGCGTCCGTTTCCGAACGTTATTCCAGAGTCATGGGCACGTTGCTCACGTGTTACTCACC  359
            |||  ||||||||| | ||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141  AGCCACCGTTTCCGGAGGTTATCCCAGAGTTATGGGCACGTTGCTCACGTGTTACTCACC  82

Query  360  CGTTCGCCACTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGC  419
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81   CGTTCGCCACTAATCCACCCAGCAAGCTGGGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGC  22

Query  420  ACGCCGCCAGCGTTCGTCCTG  440
            |||||||||||||||||||||
Sbjct  21   ACGCCGCCAGCGTTCGTCCTG  1
```

Continued

7-3

```
sample: 7-3
primer: 16sRNA
result: Pseudochrobactrum saccharolyticum (100%)

>gb|FJ652596.1|  Pseudochrobactrum saccharolyticum strain PSY-S 16S ribosomal
RNA gene, partial sequence
Length=1385

 Score =  756 bits (409),  Expect = 0.0
 Identities = 409/409 (100%), Gaps = 0/409 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AGTCGACGGTCTCTTCGGAGGCAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTACCGT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  20   AGTCGACGGTCTCTTCGGAGGCAGTGGCAGACGGGTGAGTAATGCATGGGAATCTACCGT  79

Query  61   TCTCTACGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATACGCCCTTTTGGGGAAAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  80   TCTCTACGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATACGCCCTTTTGGGGAAAG  139

Query  121  ATTTATCGGAGAATGATGAGCCCATGTTGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  140  ATTTATCGGAGAATGATGAGCCCATGTTGGATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACC  199

Query  181  AAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200  AAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGG  259

Query  241  CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  260  CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC  319

Query  301  AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGAT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  320  AGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGTGAAGAT  379

Query  361  AATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC  409
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  380  AATGACGGTAACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCC  428
```

7-4

```
sample: 7-4
primer: 16sRNA
result: Corynebacterium callunae (99%)

>ref|NR_037036.1|  Corynebacterium callunae strain NCIMB 10338 16S ribosomal RNA,
partial sequence
 emb|X84251.1|  Corynebacterium callunae 16S rRNA gene, strain NCFB 10338
Length=1494

 Score =  809 bits (438),  Expect = 0.0
 Identities = 448/452 (99%), Gaps = 3/452 (1%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    CGTC-ATATAACTCTTCGTCCCTAGCGAAAGGAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCC  59
            |||| || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  450  CGTCAATGTAACTCTTCGTCCCTAGCGAAAGGAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCATCCCC  391

Query  60   CACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCC  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  390  CACGCGGCGTCGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCC  331

Query  120  CGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTACACCCTCTCAGGCCGGCTA  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  330  CGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGTACACCCTCTCAGGCCGGCTA  271

Query  180  CCCGTCGACGCCTTGGTAGGCCATTACCCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCAGGCTCATC  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  270  CCCGTCGACGCCTTGGTAGGCCATTACCCCACCAACAAGCTGATAGGCCGCAGGCTCATC  211

Query  240  CCACACCGCAAAAGCTTTCCACACACCACCGTAAAGATAGTGTGTCCTATTCGGTATTAG  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  210  CCACACCGCAAAAGCTTTCCACACACCACCGTAAAGATAGTGTGTCCTATTCGGTATTAG  151

Query  300  ACCCAGTTTCCCAGGCTTATCCCAAAGTGCAGGGCAGATTACCTACGTGTTACTCACCCG  359
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  150  ACCCAGTTTCCCAGGCTTATCCCAAAGTGCAGGGCAGATTACCTACGTGTTACTCACCCG  91

Query  360  TTCGCCACTAATCCACCTAGCAAGCTAAGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCAC  419
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  90   TTCGCCACTAATCCACCTAGCAAGCTAAGCTTCATCGTTCGACTTGCATGTGTTAAGCAC  31

Query  420  GCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGAATCAA  451
            ||||||||||| |||||||||||||| ||||
Sbjct  30   GCCGCCAGCGT-CGTCCTGAGCCAGGA-TCAA  1
```

Continued

8-2

```
sample: 8-2
primer: 16sRNA
result: Bacillus psychrodurans (100%)

>gb|JF909578.1|  Bacillus psychrodurans strain CBG_LB134 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=738

 Score =  878 bits (475),  Expect = 0.0
 Identities = 475/475 (100%), Gaps = 0/475 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AGTCGAGCGAATGACGAAGAAGCTTGCTTCTTCTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  21   AGTCGAGCGAATGACGAAGAAGCTTGCTTCTTCTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAAC  80

Query  61   ACGTGGGCAACCTGCCCTGTAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAAT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  81   ACGTGGGCAACCTGCCCTGTAGATTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAAT  140

Query  121  AATCCATTTCCTCACATGGGGAAATGTTAAAAGACGGTCTCGGCTGTCACTACAGGATGG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  141  AATCCATTTCCTCACATGGGGAAATGTTAAAAGACGGTCTCGGCTGTCACTACAGGATGG  200

Query  181  GCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  201  GCCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCC  260

Query  241  GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  261  GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGG  320

Query  301  CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  321  CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGA  380

Query  361  AGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  381  AGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTGAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGC  440

Query  421  TCGTACCTTGACGGTACCTCATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  475
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  441  TCGTACCTTGACGGTACCTCATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC  495
```

9-3

```
sample: 9-3
primer: 16sRNA
result: Pseudomonas sp. (99%)

>gb|DQ337603.1|  Pseudomonas sp. BBTR25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1506

 Score =  793 bits (429),  Expect = 0.0
 Identities = 439/445 (99%), Gaps = 0/445 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    TTAACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCTAAGACCTTCTTCACACACG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  457  TTAACTGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCTAAGACCTTCTTCACACACG  398

Query  61   CGGCATGGCTGGATCAGGGTTGCCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA  120
            ||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  397  CGGCATGGCTGGATCAGGGTTTCCCCCATTGTCCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA  338

Query  121  GGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  337  GGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGATCATCCTCTCAGACCAGTTACGGA  278

Query  181  TCGCAGTCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATCCGACCTAGGCTCATCTAAT  240
            |||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  277  TCGCGGTCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATCCGACCTAGGCTCATCTAAT  218

Query  241  AGCGCAAGGCTCCGAAGAGTCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCTTA  300
            |||| ||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  217  AGCGAAAGGCTCCGAAGAGTCCCCTCCTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCTTA  158

Query  301  CCTTTCGGCAAGTTATCCCCCACTACTAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  157  CCTTTCGGCAAGTTATCCCCCACTACTAGGCAGATTCCTAGGCATTACTCACCCGTCCGC  98

Query  361  CGCTCGTCAGCARAAWAGTAAACTACTCTCTGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCC  420
            ||||||||||| || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  97   CGCTCGTCAGCAGAATAGTAAACTACTCTCTGTTACCGCTCGACTTGCATGTGTTAAGCC  38

Query  421  TGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCA  445
            |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  37   TGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCA  13
```

Continued

```
                                                    11-1
sample: 11-1
primer: 16sRNA
result: Bacillus pumilus (100%)

>gb|JF904523.1|  Bacillus pumilus strain bubt19 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=636

 Score =  750 bits (406),  Expect = 0.0
 Identities = 406/406 (100%), Gaps = 0/406 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    TTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  422  TTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCT  363

Query  61   CCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  362  CCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGG  303

Query  121  CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  302  CCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTT  243

Query  181  GGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  242  GGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCC  183

Query  241  GAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  182  GAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGT  123

Query  301  TTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  122  TTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCG  63

Query  361  CTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGT  406
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  62   CTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATGT  17
```

```
                                                    11-2
sample: 11-2
primer: 16sRNA
result: Brevundimonas naejangsanensis (99%)

>gb|HQ238771.1|  Brevundimonas naejangsanensis strain J9B-8 16S ribosomal RNA
gene, partial sequence
Length=772

 Score =  701 bits (379),  Expect = 0.0
 Identities = 381/382 (99%), Gaps = 0/382 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    TTTTGGTTCGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGAATGTGCCCTTCGGGGGAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  64   TTTTGGTTCGGAATAACTCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGAATGTGCCCTTCGGGGGAA  123

Query  61   AGATTTATCGCCATTAGAGCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAAGCTCA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  124  AGATTTATCGCCATTAGAGCGGCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAAGCTCA  183

Query  121  CCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  184  CCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGGACTGAGACAC  243

Query  181  GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGAC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  244  GGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGAC  303

Query  241  GCAGCCATGCCGCGTGAATGATGAAGGTCTTAGGATTGTAAAATTCTTTCACCGGGGACG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  304  GCAGCCATGCCGCGTGAATGATGAAGGTCTTAGGATTGTAAAATTCTTTCACCGGGGACG  363

Query  301  ATAATGACGGTACCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  364  ATAATGACGGTACCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA  423

Query  361  CGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCG  382
            |||||||||||||||||| |||
Sbjct  424  CGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCG  445
```

Continued

```
                                                                    12
sample: 12
primer: 16sRNA
result: Bacillus pumilus (99%)

>gb|HM103345.1|  Bacillus pumilus strain ZH25 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=1385

 Score =  544 bits (294),  Expect = 2e-151
 Identities = 298/300 (99%), Gaps = 0/300 (0%)
 Strand=Plus/Plus

Query  1    AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  193  AACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA  252

Query  61   CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  253  CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA  312

Query  121  AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  313  AAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTG  372

Query  181  TTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  373  TTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAACTGCTTGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGC  432

Query  241  CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTTCGTGAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| || |||
Sbjct  433  CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGGAA  492
```

```
                                                                    13
sample: 13
primer: 16sRNA
result: Bacillus pumilus (99%)
>gb|HQ670600.1|  Bacillus pumilus strain AIMST 5.Mi.10 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=750

 Score =  702 bits (380),  Expect = 0.0
 Identities = 383/385 (99%), Gaps = 0/385 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    ATCCGAAAACCTTCATCACTCASGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAA  60
            ||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396  ATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAA  337

Query  61   GATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  GATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGA  277

Query  121  TCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276  TCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGC  217

Query  181  TAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCAT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  TAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCAT  157

Query  241  GCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156  GCGGTTCAAGGAACTATCCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAG  97

Query  301  GCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96   GCAGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTC  37

Query  361  TGTCCGCTCGACTTGCATGTGTTAA  385
            ||||||||||||||||||| ||||
Sbjct  36   TGTCCGCTCGACTTGCATGTATTAA  12
```

Continued

```
                                                                    14
sample: 14
primer: 16sRNA
result: Lysinibacillus sphaericus (99%)

>gb|EU741100.1|  Lysinibacillus sphaericus strain 13651U 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1493

 Score =  833 bits (451),  Expect = 0.0
 Identities = 465/472 (99%), Gaps = 0/472 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    GGTACCGTCAAGGTACAGCCAGTTACTACTGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  475  GGTACCGTCAAGGTACAGCCAGTTACTACTGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTT  416

Query  61   ACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  415  ACGATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTG  356

Query  121  GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  355  GAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGC  296

Query  181  CGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  295  CGATCACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACT  236

Query  241  AGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTTATAGCGACAGCCAAAACCGTCTTTCAGTATTTCAC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  235  AGCTAATGCGCCGCGGGCCCATCTTATAGCGACAGCCGAAACCGTCTTTCAGTATTTCAC  176

Query  301  CATGAAGTGAAATAAATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAATTATCCCAAACTAT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  175  CATGAAGTGAAATAGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAAACTAT  116

Query  361  AAGGGAGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAACAAGCTCC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  115  AAGGTAGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCC  56

Query  421  TTTTCTGTTCGCTCGACTTGCATGTATTAAGCACGCCGCCCGCGTTCGTCCT  472
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  55   TTATCTGTTCGCTCGACTTGCATGTATTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCT  4
```

```
                                                                    15
sample: 15
primer: 16sRNA
result: Lysinibacillus sphaericus (98%)

>gb|EU741100.1|  Lysinibacillus sphaericus strain 13651U 16S ribosomal RNA gene,
partial sequence
Length=1493

 Score =  808 bits (437),  Expect = 0.0
 Identities = 458/468 (98%), Gaps = 2/468 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  2    CCGTC-AGGTA-AGCCAGTTACTACTGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGA  59
            ||||| ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  471  CCGTCAAGGTACAGCCAGTTACTACTGTACTTGTTCTTCCCTTACAACAGAGTTTTACGA  412

Query  60   TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAG  119
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  411  TCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAG  352

Query  120  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGAT  179
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  351  ATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGAT  292

Query  180  CACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCT  239
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  291  CACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCT  232

Query  240  AATGCGCCGCGGGCCCATCTTATAGCGACAGCCGAAACCGTCTTTCAGTATTTCACCATG  299
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  231  AATGCGCCGCGGGCCCATCTTATAGCGACAGCCGAAACCGTCTTTCAGTATTTCACCATG  172

Query  300  AAGTGAAATAAATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAATTATCCCAAACTATAAGG  359
            |||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  171  AAGTGAAATAGATTATTCGGTATTAGCCCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAAACTATAAGG  112

Query  360  GAGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAACAAGCTCCTTTT  419
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||| |
Sbjct  111  TAGGTTGCCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCGCTAACGTCAAAGGAGCAAGCTCCTTAT  52

Query  420  CTGTTCCCTCGACTTGCATGGATTAAGCACGCCGCCCGCGTTCGTCCT  467
            |||||| ||||||||||||| ||||||||||||||| ||||||||||
Sbjct  51   CTGTTCGCTCGACTTGCATGTATTAAGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCT  4
```

Continued

```
                                                                    16
sample: 16
primer: 16sRNA
result: Bacillus pumilus (99%)
>gb|JF904523.1|  Bacillus pumilus strain bubt19 16S ribosomal RNA gene, partial
sequence
Length=636

 Score =  771 bits (417),  Expect = 0.0
 Identities = 419/421 (99%), Gaps = 0/421 (0%)
 Strand=Plus/Minus

Query  1    TTACTCTTGCACTTGTTCTTCCCTAACAACARAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  437  TTACTCTTGCACTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCAC  378

Query  61   TCACGCRGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC  120
            |||||| |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  377  TCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTC  318

Query  121  CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  317  CCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCT  258

Query  181  ACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  257  ACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCAT  198

Query  241  CTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTATCC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  197  CTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTATCC  138

Query  301  GGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  137  GGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTA  78

Query  361  CTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  77   CTCACCCGTCCGCCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGCATG  18

Query  421  T  421
            |
Sbjct  17   T  17
```