

순환여과식 양식 시스템에 있어서의 고정화 탈질균에 의한 질산염 제거

김상희 · 김필균 · 김종균*

부경대학교 식품생명공학부 생물공학전공

Nitrate Removal by Immobilized Denitrifying Bacteria in Recirculating Aquaculture System

Sang-Hee Kim, Pil-Kyun Kim, and Joong-Kyun Kim*

Major of Biotechnology, Division of Food Science and Biotechnology,
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

For the nitrate removal in recirculating aquaculture system, a denitrifying bacterium, *Pseudomonas fluorescens*, was isolated from municipal sewage and the cells were immobilized in modified-polyvinlyl alcohol (PVA) gel beads. The immobilized cells in both the fixed- and fluidized-bed reactors showed 98% of denitrification efficiency with 6hr HRT, and the removal efficiency of total organic carbon (TOC) was above 90%. From scanning electron microscopy (SEM) observation, it was known that biofilm formed in fixed-bed reactor was thicker than that formed in fluidized-bed reactor as operation time passed.

Key words – Denitrification, *Pseudomonas fluorescens*, Immobilization, Fixed-bed reactor, Fluidized-bed reactor.

서 론

어류를 고밀도로 사육하는 순환여과식 양식은 어류의 소비가 날로 늘어가고 있는 오늘날 어류 생산력을 증대시킬 수 있을 뿐만 아니라, 수질오염 문제로 인하여 야기되는 양식장에서의 각종 규제를 해결할 수 있는 장점을 지니고 있는 사육시스템이다. 순환 여과식 양식시스템에서 어류의 대사작용에 의해 생성되는 노폐물이나 미섭취되고 남은 사료로부터 생성되는 암모니아 및 아질산염, 질산염

은 어류에게 독성을 미치는데, 암모니아의 경우 신장 기능 부전의 원인이 되는 삼투압 조절 기능의 불균형과 질식, 내인성 암모니아 배설량의 감소, 및 야가미 상피를 손실시키는 것으로 보고되고 있고[16], 아질산염의 경우는 미성어[1], 방어 치어[26], 및 연어과 어류[23,29] 등의 어류에서 그 독성이 보고되었다. 이에 비하여 양식장 미생물에 의한 질산화를 통해 축적되는 질산염은 그 자체가 어류에게 직접적으로 해가 되지 않는다고 생각되어져, 질산염 제거를 위한 연구는 지금까지 많이 진행되지 않았다[3,14,30]. 그

* Corresponding author

러나 축적된 고농도의 질산염은 발암물질로서 알려진 nitrosoamin을 형성하고[18], 아질산염의 전구체로서 유해성을 가지고 있다. 이러한 유해성 질산염 제거를 위해 사용되는 방법으로 이온교환법, 역삼투압법, 전기분해법, 화학적 환원법, 그리고 생물학적 탈질법등이 있는데[10,11, 24,25], 그 중에서도 탈질균을 이용하여 질산염을 유해성이 없는 N₂ gas로 전환시키는 생물학적 처리법은 경제성을 가진다[9].

미생물을 이용한 생물학적 폐수처리 시스템에 있어서 처리 효율을 높이기 위하여 최근 고정화 공법을 많이 사용하고 있는데, 이러한 미생물 고정화 공법은 고농도의 미생물을 반응조 내에 유지시킬 수 있고, 폐수처리 시스템의 침전조에서 고액 분리를 용이하게 하며, pH, 온도, 그리고 부하량의 변화와 같은 다양한 환경적 변화에 적게 영향을 받는다는 장점을 가진다[19].

본 연구에서는 양어 생산 향상을 위하여 순화여과식 양식 시스템을 구축하기 위한 일환으로 하수로부터 분리한 탈질균을 modified-polyvinyl alcohol(PVA) bead에 고정화시킨 다음 고정층 반응기 및 유동층 반응기에 충전하여 그 탈질 효율을 비교하여 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

탈질균의 분리 및 배양

사용된 균주는 *Pseudomonas fluorescens*로서 하수 슬러지로부터 순수 분리하였다. 0.2%(w/v) KNO₃를 첨가한 18 ml modified malate-basal 배지(Table 1)를 20 ml screw-cap tube에 넣어 멸균한 다음, 1 ml의 하수 슬러지를 접종하고, 다시 멸균된 배지를 tube에 가득 부어 tube내에 산소를 최대한 제거하여 30℃에서 3일간 배양한 후 malate-basal agar plate에 평판도말하여 분리하였으며, syringe test를 통하여 분리된 탈질균들 중 탈질 능력이 우수한 균을 선별하였다. 분리된 균은 modified malate-basal agar plate 상에서 한 달마다 새로운 배지로 옮겨 보관 유지하였다. Flask culture는 flask에 0.2%를 첨가한 modified malate-basal 배지를 넣어 멸균한 뒤 Hangate technique[6]을 이용하여 flask 내부를 혐기적인 상태로 만든 후 접종량을 10%로 하여, pH 6.8, 30℃, 및 120rpm에서 18시간 배양하였다.

Table 1. The composition of a modified malate-basal medium and synthetic wastewater

Component of modified malate-basal medium (per liter)		Component of synthetic wastewater (per liter)	
Malate (g)	2.5		
Yeast extract (g)	1		
(NH ₄) ₂ · SO ₄ (g)	1.25		
MgSO ₄ · 7H ₂ O (g)	0.2	KNO ₃ (g)	0.144
CaCl ₂ · 2H ₂ O (g)	0.07	N ₂ HPO ₄ (g)	0.03
FeSO ₄ · 7H ₂ O (g)	0.01	Ethanol(ml)	0.16
EDTA (g)	0.02	Trace element solution [†] (ml)	1
KH ₂ PO ₄ (g)	0.6		
K ₂ HPO ₄ (g)	0.9		
Trace element solution [†] (ml)	1		
[†] Trace element solution			
FeSO ₄ · 7H ₂ O (g)		3	
H ₃ BO ₃ (g)		0.01	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (g)		0.01	
MnSO ₄ · H ₂ O (g)		0.02	
CuSO ₄ · 5H ₂ O (g)		0.01	
ZnSO ₄ (g)		0.01	
EDTA (g)		0.50	

균주의 고정화

혐기적 flask 배양을 통해 얻은 late-log phase의 탈질균을 6,000rpm에서 10분간 원심분리하고 세포는 수거하여 증류수에 현탁한 다음 0.2% sodium alginate(w/v)를 포함하는 PVA 용액에 현탁하여 PVA의 최종농도가 12%(w/v) 되게 혼합액을 제조한다. 이 혼합액을 1% CaCl₂가 녹아 있는 포화된 boric acid 용액에 떨어뜨려 bead(직경, 4.5 ± 0.5mm)를 제조한다. Bead 내부의 Ca-alginate 결합을 용해시켜 bead의 공극율을 높여줌과 동시에 PVA 결합력을 강화시키기 위해 0.5M phosphate solution에 50분간 담구어 두었으며[8], 제조된 bead는 멸균된 증류수에 세척하여 실험에 사용하였다.

반응기의 운전

실험에 사용한 반응기(고정층 및 유동층)는 Fig. 1에 나타내었으며, 각 반응기는 기존에 발표된 논문들의 결과를 기초로 하였으며, 아크릴을 사용하여 실험실 단위의 반응기로 제작하여 실험에 사용하였다. 고정층 반응기는 직경

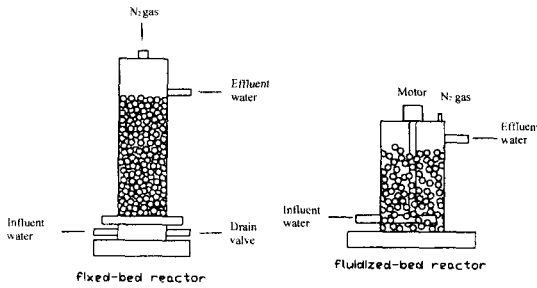


Fig. 1. Apparatus for continuous denitrification by modified PVA-immobilized cells.

이 4.6 cm, 높이 27 cm의 원통형 반응기에 beads를 60% 충전하여 475 ml의 working volume으로 운전하였으며 [20], 유동층 반응기는 직경이 7 cm, 높이 13 cm의 원통형 반응기에 beads를 30% 충전하여 475 ml의 working volume으로 운전하였다[22]. 기질로서는 부경대학교 양어장 유출수의 조성과 유사한 인공배지(Table 1)를 주입하였다. 전체 반응조의 체류시간 (HRT)은 6시간 및 8시간으로 운전하였고[5], C/N비와 pH는 각각 3과 7 ± 0.5 로 유지하였으며[27], DO는 0.2 mg/L 이하로 운전하였다[4].

분석

반응기 내의 유출수의 분석은 1일 1회 sampling하여 pH와 DO의 측정과 함께 total organic carbon(TOC), $\text{NO}_3\text{-N}$ 및 $\text{NO}_2\text{-N}$ 의 양을 분석하였다. pH와 DO는 pH meter 및 DO meter를 이용하여 분석하였고, TOC는 비분산 적외선 gas 분석 방법을 적용한 TOC analyzer를 통해 분석하였다. $\text{NO}_3\text{-N}$ 및 $\text{NO}_2\text{-N}$ 은 IonPac AS14 column이 장착된 DX-120 (Dione Co.) ion chromatography를 이용하여 분석하였다. 운전중에 bead 밖으로 유출된 세포의 수는 희석하여 modified malate-basal agar plate상에 도말한 후 2일 뒤에 생성된 colony 수를 계측하여 구하였다.

Scannig electron microscopy

멸균된 증류수로 씻은 beads를 2.5% glutaraldehyde에 2시간 동안 고정시킨 후, glutaraldehyde 잔여물을 제거하기 위해 고정화된 beads를 멸균된 0.1M phosphate buffer로 씻었다. 그런 다음 beads를 50, 60, 70, 80, 90, 그리고 100% acetone 용액에 각각 30분간 담구어 두어 bead 내부

의 수분을 제거하고 나서 CO_2 가스로 건조하여 beads를 자른 후 coating하여[8] scanning microscopy로 관찰하였다.

결과 및 고찰

고정화 탈질균에 의한 TOC 및 질산염 제거 효율

순환 여과식 양식시스템의 질산염 제거를 위하여 modified-PVA gel bead에 하수에서 분리한 탈질미생물 *Pseudomonas fluorescens*을 고정화하고, 고정층 및 유동층 반응기에서 양식장 유출수와 유사한 성분으로 제조된 인공 폐수 중의 질산염제거 효율을 조사하였다. 이때, KNO_3 의 농도는 20ppm을 사용하였는데, 이는 tilapia 양어의 경우를 고려한 것이다. 먼저, 고정화 탈질균의 최적 C/N비를 조사하여 보았는데, TOC 대 $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 농도비가 3이상일 때 최대의 탈질 반응이 일어났다(Data not shown). 폐수중의 질산염을 효과적으로 제거하기 위해서는 외부에서 인위적으로 탄소원을 공급해 주어야 하는데[13], 일반적으로 경제성을 고려해 볼 때 메탄올이 가장 적합한 탄소원으로 알려져 있다[10]. 그러나 과다하게 공급된 탄소원이 미생물에 의해 다 소비되지 않을 경우 높은 농도의 유기물을 함유하는 처리수가 방출됨으로, 이를 막기 위해서는 질산염과 탄소원 사이에 적절한 C/N비가 고려되어야 한다. 따라서 본 실험에서는 메탄올을 탄소원으로 하는 C/N비가 3인 인공폐수에서 TOC 제거 효율을 조사하였다. Fig. 2에서 보여지는 것처럼 HRT를 8시간으로 했을 때, 고정층과 유동층 모두에서 반응기 운전 시작부터 운전 2일째까지는 TOC가 급격하게 제거되고, 운전 5일 이후에 각각 87%, 93% 이상의 제거 효율을 보였는데 이는 사용된 modified PVA gel bead 내부로의 기질 확산에 문제가 없었으며, 운전시간이 흐름에 따라 bead 내부에 세포의 성장에 따르는 세포수의 증가로 인한 것으로 사료되어진다. HRT를 6시간으로 변경하였을 때는 2일 이후부터 고정층과 유동층에서 각각 86%, 83%이상의 제거 효율을 보이며, 4일 이후에는 두 반응기 모두 안정적으로 93% 이상의 제거효율을 보였는데 이 결과로 볼 때 bead 내부의 세포들은 유입수의 HRT가 바뀌면 안정적 정상상태로 돌아가는데 2일이 소요됨을 알 수 있으며, 새로운 조건에 적응이 되면 안정적으로 유입수가 처리됨을 알 수 있었다.

Fig. 2에서 보여지는 것처럼 HRT를 8시간으로 할 때

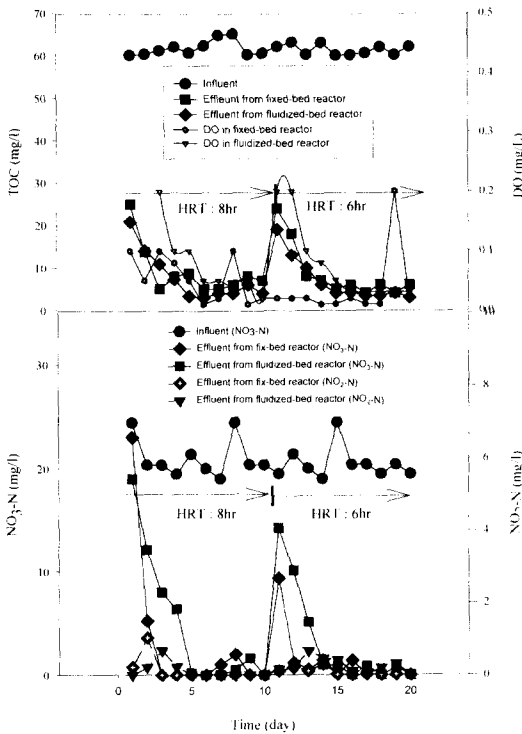


Fig. 2. Profiles of nitrate, nitrite and TOC removals in fluidized-and fixed-bed reactors.

고정층 반응기 및 유동층 반응기의 경우 각각 반응기 운전 전에 98%의 질산염 제거 효율을 보였다. 고정층 반응기의 경우 유동층 반응기에 비하여 운전 초기에 높은 충전율의 bead를 가지고 있으므로 해서 유동층 반응기에서의 제거 효율과 비슷한 결과가 나온 것으로 사료된다. 두 반응기 모두 반응 초기에서 운전시간이 지남에 따라 점차적으로 질산염의 제거 효율이 증가하는 것을 보여주는데 이는 bead 내에 고정화된 탈질균의 증식 및 순치에 의한 것으로 사료되며, 아울러 시간이 지남에 따라 bead 표면의 세포들이 부착하여 어느 정도의 세포막을 형성함으로써 인한 것으로 보인다. 이러한 결과는 27시간의 세포 성장 및 순치 이후에 99.9%이상의 질산염을 제거한 Lin 등(1995)의 실험[15]에서도 보고되었다. 반응기 운전 5일 이후부터 두 반응기 모두에서 98% 이상의 안정된 질산염 제거 효율을 보였기 때문에 반응기 운전 11일째 HRT를 8시간에서 6시간으로 변경하여 질산염 제거 효율을 조사하였는데, HRT

변경 후 3일 정도의 순치 기간 후에 다시 안정적으로 탈질 효율을 보였다. HRT를 6시간으로 바꾸어 주었을 때, 질산염 제거 효율이 안정성을 보이는 기간이 고정층에 비해 유동층이 다소 낮은 이유는 고정층의 경우 DO농도가 거의 0에 가까운 무산소 상태를 잘 유지하지만 유동층의 경우는 교반으로 인해 DO의 농도가 0.2ppm 이하 부근에서 변화를 갖기 때문으로 사료되어진다.

이러한 결과를 다른 연구자와 비교해보면 Nillson의 경우 *Pseudomonas fluorescens* 균을 이용하여 3.63 kg NO₃-N/m³/day의 부하율로 90% 이상의 제거효율을 얻었으며 [19], Vossoughi 등은 *Pseudomonas aeruginosa* 균을 이용하여 fixed-bed 반응기에서 4.72 kg NO₃-N/m³/day의 부하율로 90% 이상의 제거효율을 얻었다[28]. 본 실험의 경우 NO₃-N의 부하율이 0.08 kg NO₃-N/m³/day로 거의 100%의 제거효율을 보였다. 이러한 결과는 다른 연구자에 비하여 NO₃-N의 부하율이 낮는데 이는 양식장의 일반적인 질산염의 농도를 기준으로 하여 부하율을 설정하였기 때문이며, 277 ppm의 고농도에서 syringe를 이용한 repeated-batch 실험의 경우는 부하율이 최대 5 kg NO₃-N/m³/day로 약 97%의 제거 효율을 보였다(Data not shown).

또한 탈질과정의 대사산물인 아질산염이 거의 생성되지 않았는데, 이는 하수 슬러지로부터 분리된 탈질균 *Pseudomonas fluorescens*가 본 탈질실험 조건에서 질산염의 환원보다 아질산염의 환원이 더 빠른 탈질 대사를 하기 때문이다[2]. 아질산염은 암모니아가 질산염으로 생성되는 생물학적 산화의 중간 산물로서 저 농도의 경우에도 독성을 미치는데, 무지개 송어의 경우 96hr LC₅₀은 0.20-0.40 mg NO₂-N/L이며[21], 또한 수중에서 아질산염은 낮은 pH에서 아질산으로 변형되어 아질산염보다 더 큰 독성을 가진다. 따라서, 어류의 건강과 생산력증대를 위해 Westin은 아질산염의 농도를 0.012 mg/L이하로 유지할 것을 제안했으며[30], Meade(1989)는 규제 농도를 최고 0.1 mg/L으로 제안하였다[17]. 이상의 결과들을 볼 때, 실험에 사용한 탈질 미생물 *Pseudomonas fluorescens*는 순환여과식 양식 시스템에 잘 맞는다고 보여진다.

운전시간에 따른 bead 표면 관찰

Modified-PVA gel bead의 미생물 부착 여부와 운전 시간에 따른 bead 표면의 생물막 상태를 보다 정확하게 관

찰하기 위하여 bead의 표면에 대하여 전자현미경(SEM) 사진을 찍어 보았다(Fig. 3). 일반적으로 PVA bead를 충전제로 이용하여 운전되는 반응기의 경우 탈질에 의해 bead 내부에서 발생된 N₂ 가스가 bead밖으로 빠져나가지 못하여 bead가 부유하는 현상이 일어나며, 이러한 현상은 반응기내에 bead가 균일하게 분포하지 못하게 하여 탈질효율의 저하를 야기시킨다[6]. 이러한 bead의 부유 현상을 방지하기 위하여 PVA bead 제조시 0.2% alginate를 첨가한 후 alginate를 0.5M phosphate 용액에 담구어 bead 내부의 Ca-alginate 결합을 파괴[8]함으로써 bead 내부의 공극율을 향상시켰는데, Fig. 3에서 보여지는 것처럼 초기 상태의 bead 표면(Fig. 3. A, B)에서 충분한 공극이 이루어 있음을 알 수 있었다. 또한 반응기 운전 초기에 비하여 반응기 운전 20일 후에 고정층 및 유동층 반응기 모두에서 bead 표면에 많은 세포가 증식되어 있음을 알 수 있었고, 유동층 보다는 고정층에서 보다 많은 세포가 생물막을 형성하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 3. C, D). 이는 유동층 반응기의 경우 교반에 의해서 bead 밖으로 유출되는 세포의 양이 고정층에 비해 많기 때문에 나타난 결과로 사료되어진다. 하지만 두 반응기의 운전효율은 고정층과 유동층 반응기 모두에서 유사한 결과를 보였는데 이는 고정층에서

는 높은 충전율로 인한 많은 세포를 함유할 수 있는 장점을 가지며, 유동층 반응기는 반응기 내에 충전되는 세포가 적은 반면, 세포와 기질간의 접촉이 잘 일어나고 유동층 반응기 특성상 clogging 또는 channelling 현상이 없기 때문에 질산염의 제거가 잘 이루어지는 것으로 사료되어진다[12]. 또한 20일 이후의 계속된 운전의 결과 또한 그림 2와 유사하게 나타났다.

결론

순환 여과식 양식시스템에서의 질산염 제거를 위하여 하수 sludge로부터 분리된 탈질균 *Pseudomonas fluorescens* 을 modified-PVA gel bead에 고정화하여 유동층 및 고정층 반응기에서 탈질효율을 조사하였다. 6시간의 HRT일 때 고정층 및 유동층 반응기 모두에서 약 98%의 탈질효율 및 90%이상의 TOC 제거 효율을 보였다. SEM을 이용하여 bead의 표면을 관찰한 결과 운전 시간이 흐를수록 유동층에 비하여 고정층의 bead 표면에 두꺼운 생물막을 형성하고 있음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 특성화 사업단 연구원 연수지원에 의해 수행되었습니다.

참고 문헌

1. Alcaraz, G. and S. Espina. 1995. Acute toxicity of nitrite in juvenile grass carp modified by weight and temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **55**, 473-478.
2. Almeida, J. S., M. A. M. Reis., and M. J. T. Carrondo. 1994. Competition between nitrate and nitrite reduction in denitrification by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotech. Bioeng.* **46**, 476-484.
3. Balderston, W. L. and J. M. Sieburth. 1976. Nitrate removal in closed-system aquaculture by columnar denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**(6), 808-818.
4. Barnes, D. and P. J. Bliss. 1983. Biological control of nitrogen in wastewater treatment. E. & F. N. Spon, London, pp.146.
5. Borja, R., C. J. Banks., and Z. Wang. 1995. Effect of

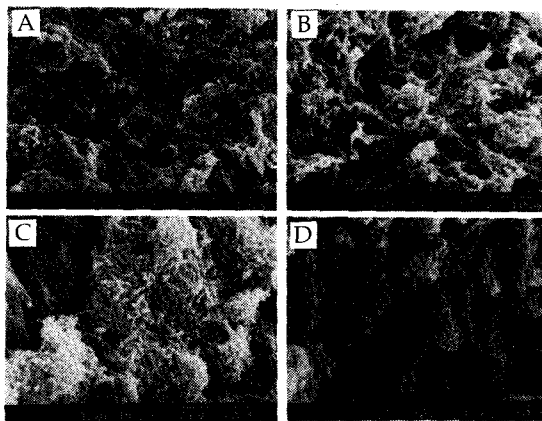


Fig. 3. SEM micrographs showing the surface of modified PVA-gel beads in fixed- and fluidized-bed reactors.

A, Initial state of bead in fixed-bed reactor; B, Initial state of bead in fluidized-bed reactor; C, State of bead when 20 days elapsed in fixed-bed reactor; D, State of bead when 20 days elapsed in fluidized-bed reactor.

- organic loading rate on anaerobic treatment of slaughterhouse wastewater in a fluidized-bed reactor. *Bioresource Technol.* **25**, 1483-1490.
6. Bryant, M. N. 1972. Commentary on the Hungate's technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 1324-1328.
 7. Chen, K. C., Chen, S. J., and Houg, J. Y. 1996. Improvenemt of gas permeability of denitrifying PVA gel beads. *Enzyme Microbi. Technol.* **18**, 502-506.
 8. Catalan-Sakairi, M. A., P. Wang., and M. Matsumura. 1997. High-rate seawater denitrification utilizing a macro-porous cellulose carrier. *J. Ferment. Bioeng.* **83**, 102-108.
 9. Dahab, M. F. 1987. Treatment alternatives for nitrate contaminated groundwater supplies. *J. Environ. Syst.* **17**, 65-69.
 10. Dahab, M. F. and Y. W. Lee. 1988. Nitrate removal from water supplies using biological denitrification. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **60**, 1670-1674.
 11. Fuchs, W., R. Schatzmayr. and R. Braum. 1997. Nitrate removal from drinking water using a membrane-fixed biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 267-273.
 12. Green, M., M. Shnitzer., S. Tarre., and B. Bogdan. 1994. Fluidized bed reactor operation for grown-water denitrification. *Wat. Res.* **29**, 509-515.
 13. Isaacs, S., M. Heaze., H. Saeberg., and M. Kammel. 1994. External carbon source addition as a means to control an activated sludge nutrient removal process. *Wat. Res.* **28**, 511-520.
 14. Kim, J. K., B. K. Lee., S. H. Kim., and J. H. Moon. 1999. Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. *Aquacult. Eng.* **19**, 179-193.
 15. Lin, Y. F. and K. C. Chen. 1995. Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system. *Wat. Res.* **29**, 35-43.
 16. Meade, J. W. 1985. Allowable ammonia for fish culture. *Prog. Fish. Cult.* **47**, 135-145.
 17. Meade, J. W. 1989. *Aquaculture management*. Van Nostrand Reinhold. New York. 190.
 18. Mirvish, S. S. 1977. N-nitroso compounds, nitrate, and nitrite: Possible implications for the causation of human cancer. *Prog. Water Technol.* **8**, 195-201.
 19. Nilsson, I., S. Ohlson., L. Haggstrom., N. Molin and K. Mosbach. 1980. Denitrification of water using immobilized *Pseudomonas denitrificans* cells. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 261-274.
 20. Philips, J. B. and N. G. Love. 1998. Biological denitrification using upflow biofiltration in recirculating aquaculture systems: Pilot-scale experience and implications for full-scale. *Proceedings inter. conf. recircul. aquacult.*, 171-178.
 21. Russo, R. C., C. E. Smith and R. V. Thurston. 1974. Acute toxicity fo nitrite to rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.* **31**, 1653-1655.
 22. Sadick, T., J. Semon., D., Palumbo., P. Keenan., and G. Daigger. 1996. Fluidized-bed denitrification meeting potential nitrogen limits in long island sound. *Wat. Environ. Technol.* **8**, 81-85.
 23. Smith, C. E. and W. G. Williams. 1974. Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.* **103**, 389-390.
 24. Sorg, T. J. 1978. Treatment technology to meet the interim primary drinking water regulation for inorganics. *J. Am. Water Works Assoc.* **70**, 105-111.
 25. St. Amant, P. P. and P. L. McCarty. 1969. Treatment of high nitrate waters. *J. Am. Water Works Assoc.* **6**, 695-701.
 26. Sugiyama, M., H. Tanaka. and K. Fkusho. 1991. Toxicity of total ammonia and nitrite nitrogen to young yellowtail, *Serola quiqueradiata*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.* **19**, 31-33.
 27. Thomas, K. L., D. Loyd., and L. Bodd. 1994. Effects of oxygen, pH, and nitrate concentration on denitrification by *Pseudomonas species*. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**, 181-186.
 28. Vossoughi, M., M. Laroche., J. M. Navarro., G. Faup., and A. Leprince. 1982. Denitrification en continu a l'aide de microorganismes immobilises sur les supports solides. *Water Res.*, **16**, 995-1002.
 29. Westin, A. D. 1974. Nitrate and nitrite toxicity to salmonid fishes. *Prog. Fish. Cult.* **36**, 86-89.
 30. Whitson, J. and P. Turk. 1993. Biological denitrification in closed recirculating marine culture system. In: Wang, J. K. (Ed), *Technique for Modern Aquaculture*, Am. Soc. Agric. Eng., Michigan, pp.458.