

질산화 작용이 있는 *Aeromonas hydrophila*의 동정 및 특성

엄미나[†] · 장재철 · 유영희* · 지의상**

군산대학교 화학과, *삼성에버랜드(주), **안산공과대학 식품공학과

Identification and Characterization of *Aeromonas hydrophila* Producing Nitrification Capability

Mi-Na Um[†], Jae-Chul Jang, Young-Hee Yu and Eui-Sang Ji

Dept. of Chemistry, Kunsan National University

*Samsung Everland Inc.

**Dept. of Food Technology, Ansan College of Technology

Abstract

For the purpose of the isolation of microorganisms which have the capability of nitrification, we isolated the microorganisms in 6 samples collected from the stream of Kyonggi area. 60 strains were isolated.

The selected strain were identified as a *Aeromonas hydrophila* based on the data obtained from the morphological, biochemical and cultural characteristics defined experiments. Among them *Aeromonas hydrophila* (AH-1), (AH-3), (AH-4), (AH-6) showed the highest nitrification capability. All isolates were resistant to amoxillin, ampicillin, cephalothin and ticarcillin. Optimum culture conditions of isolates were 37°C and 1×10^8 cells/ml for 4 hours in the nitrate medium.

Key words : nitrification, *Aeromonas hydrophila*, amoxillin, ampicillin, cephalothin, ticarcillin.

서 론

질소는 자연상태에서 발생되기도 하며 인간 활동에 의해 발생되기도 하는데 자연상태에서 발생하는 양은 자정작용에 의해 순환되거나 제거될 수 있는 양이다. 그러나 고도의 산업화와 인구 증가로 인한 수질 오염에 따라 질소가 과량으로 방출되고 있고 그 문제의 심각성은 날로 더해지고 있는 실정이다. 주로 분뇨, 비료 및 산업폐수 등으로 방출되는 질소는 암모니아 같은 무기물 형태와 요소, 단백질 등과 같은 유기물의 형태로 존재하게 된다. 질소는 생태계의 필수 영양소이나 과량이 방출될 경우 수중에 조류 증식에 의한 부영양화가 발생되고 수중동물에 독성을 끼쳐 수질오염을 유발하게 되고 질산화 과정에서 용존산소를 고갈시키는 등의 수중생태계 파괴로 자연환경에 악영향을 미치게 된다¹⁾. 이러한 부영양화현상을 방지하는 방편의 하나로 도시하수나 공장폐수 등의 유기물은

물론 질소를 제거할 수 있는 폐수처리장 운영이 요구되어지고 있다.

폐하수의 질소 제거 방법으로는 breakpoint, chlorination, ammonia stripping, ion exchange 등의 물리화학적 처리방법과 질화균, 탈질균을 이용하는 생물학적 방법이 있는데 물리화학적 처리보다 유지관리가 용이하고 경제성이 높아 널리 사용되고 있으며 물리화학적 처리는 생물학적 처리공정의 보완공정으로 주로 사용된다²⁾.

생물학적 처리방법을 이용한 질소제거연구는 Ludzack과 Ettinger, Wuhrman, McCarty 등에 의해 보고된 후 지속적으로 연구되고 있으며 원리는 유입 폐하수내의 암모니아와 유기질소 등이 일정조건하에서 질산성 질소와 아질산성 질소로 산화되는 질산화(nitrification)과정과 질산화를 거친 질산성 질소 등이 처리 시스템에서 환원되어 대기 중에 질소가스로 배출됨으로써 질소화합물을 제거하는 과정인 탈질소화

[†] Corresponding author : Mi-Na Um

(denitrification) 과정으로 구분된다^{3,4)}.

질화작용(nitrification)은 대부분 특정부류에 속하는 자가영양적 세균에 의해 산화되는 작용이며 ammonium oxidation과정과 nitrate oxidation과정을 거친다. 첫 번째 단계는 주로 *Nitromonas*와 같은 ammonium oxidizing bacteria가 관여하며, 두 번째 단계는 주로 *Nitrobacter*와 같은 nitrate oxidizing bacteria가 관여한다⁵⁻⁷⁾. 암모니아를 아질산염으로 산화시킬 수 있는 기타 세균 속에는 *Nitrospira*, *Nitrosococcus*, 그리고 *Nitrosobus* 등이 있고 아질산염을 질산염으로 산화시킬 수 있는 기타 세균 속으로는 *Nitrospira*, *Nitrosococcus* 등이 있으나 직접적으로 관여하지 않는다⁸⁾. 그러나 현재 국내 폐수처리장의 생물학적 처리 시스템에서 활용되고 있는 질화미생물에 대한 연구가 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구는 폐수처리 중 생물학적 처리에 활용할 수 있는 질소분해 능력을 가진 미생물을 개발하고자 경기도 지역의 안성천 상류, 중류, 하류 각 3개소별 성환천, 진위천, 입장천의 하천수를 채취하여 이들 시료의 총균수, 대장균 균수를 측정하였다. 또한 이들 시료에서 질화세균을 분리 동정하고자 질소환원력 실험으로 우수한 균을 선별하여 현미경으로 검경한 결과 대부분 그람음성 간균이었으며 *Aeromonas hydrophila*로 동정되었다.

재료 및 방법

1. 재 료

경기도 지역의 안성천 상류(1), 중류(2), 하류(3) 각 3개소별 성환천, 진위천, 입장천의 하천수를 분리원으로 하여 채수병에 채수하여 냉장상태로 운반하여 시료로 사용하였다.

2. 총균수 실험

시료 1 ml를 9 ml의 멸균 PBS(phosphate buffer solution)에 혼합한 후 십진법에 의해 단계 희석한 시료용액을 0.1 ml 씩 취하여 3% NaCl이 첨가된 PCA (plate count agar)배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 생성된 colony를 계수하였다.

3. 대장균군 실험

시료 1 ml를 9 ml의 멸균 PBS에 혼합한 후 십진법에 의해 단계 희석한 시료용액을 0.1 ml씩 취하여 de-soxycollate agar배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 생성된 붉은색 colony를 계수하였다.

4. 질화 세균 순수 분리 및 Nitrate 환원 시험

총균수 실험에서 생성된 colony 중 형태, 색깔, 종류를 육안으로 관찰하고 분류하여 각각의 colony를 PCA 평판배지에 계대 배양한 다음 순수분리한 후 nitrate 배지⁹⁾에 균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 5N-acetic acid에 α -naphthylamine이 들어있는 시약 1 ml와 5N acetic acid에 sulfanilic acid가 들어있는 시약을 각각 1 m씩 가하여 30초 이내에 적색으로 변하면 양성으로 판정하였고 환원력이 강한 균주를 선별하였다.

5. 질화세균 동정

균 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology¹⁰⁾의 분류법에 준하였으며 균주동정을 위한 실험은 Bacteriological Analytical Manual¹¹⁾ 및 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria⁹⁾를 참조하였다.

6. 그람염색 및 현미경 관찰

Nitrate 환원 시험결과 환원력이 강한 순수분리된 균을 그람염색하여 현미경(Zenamed 2, ZEISS, Germany)으로 균의 색깔, 형태를 관찰하였다.

7. Catalase 시험 및 Oxidase 시험

Catalase 시험은 순수 배양한 균을 슬라이드 글라스에 바르고 3% 과산화수 2~3 방울 떨어뜨려 가스 발생 여부를 관찰하였다. Oxidase 시험은 Ewing-Johnson 법⁹⁾에 의해 순수 배양한 균을 여지에 도말하고 1% α -naphthol alcohol 용액과 1% tetramethyl para-phenylene dihydrochloride 수용액을 동량 취하여 혼합한 것을 적하하여 30초 이내에 청색 유무를 관찰하였다.

8. 당 분해 시험

각각의 당을 1% 함유하는 purple broth base에 균을 접종하고 37°C에서 7일간 배양하면서 배지의 변색 유무를 관찰하였다. 배지가 황색으로 변하는 것은 양성으로 판정하였다. 실험에 사용된 당은 glucose, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdalin, arabinose이며 모두 membrane filter (pore size 0.45 um)로 여과한 후 첨가하였다.

9. 아미노산 분해 시험

Decarboxylase medium base에 arginine, lysine,

ornithine, tryptophan을 1% 첨가하여 각각 5ml씩 분주하여 살균한 다음 멸균된 파라핀 오일을 1ml씩 첨가하였다. 여기에 균을 접종하여 37°C에서 7일간 배양하면서 황색을 나타내면 양성으로 판정하였다.

10. 발효 및 산화 시험

멸균된 O-F basal medium에 glucose를 membrane filter(pore size 0.45 μ m)로 여과하여 배지에 10% 되게 첨가하여 만든 후 멸균된 파라핀 오일을 산화시험용 배지에는 첨가하지 않고, 발효시험용 배지에 첨가하여 만들었다. 이 배지에 균을 접종하여 37°C에서 7일간 배양하면서 배지가 황색으로 변색되면 양성으로 판정하였다.

11. Voges-Proskauer 및 Citrate 시험

Voges-Proskauer 시험은 MR-VP 액체배지에 균을 접종 후 37°C에서 24~48시간 배양한 후 α -naphthol 0.6ml와 0.3% creatinine 0.2 ml를 첨가한 40% KOH 용액을 가하여 10분 후 적색을 띠면 양성으로 판정하였다. Citrate 시험은 Simmons's citrate 사면배지에 균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 청색이면 양성으로 판정하였다.

12. Gelatin 액화 시험

Nutrient gelatin 배지를 살균 후 냉각한 다음 천자 배양으로 37°C에서 2주간 배양하면서 시험관을 냉각한 후 기울여 액체 상태 여부를 관찰하였다.

13. 항생제 감수성 시험

시험에 사용된 항생제는 amikacin(이하AN), amoxicillin(AMC), ampicillin(Am), carbenicillin(Cb), cefoxitin(Fox), cefazoline(CZ), cephalothin(Cf), chloramphenicol(Cm), ciprofloxacin(CIP), gentamycin(Gm), kanamycin(Km), nalidixicacid (NA), amikacin(AN), streptomycin(S), tetracycline (Tc), ticarcillin(TIC), tobramycin(Tb) 이며 Disk diffusion method¹²⁾로 실시하였으며 분리 동정된 AH-1, AH-3, AH-4, AH-6균을 Muller-Hinton broth에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 Muller-Hinton agar 평판 배지에 균을 도말 후 sensi-disc dispenser로 disk를 평판상에 부착시켜 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 발육 저지환의 직경을 측정하여 Table 1의 기준과 비교하여 내성 유무를 판정하였다. 대조 균주로는 *E. coli* ATCC 25922와 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923을 함께 실험하였다.

Table 1. Antimicrobial discs used for drug susceptibility test

Antimicrobial substances	Disk potency	Zone diameter (mm)		
		Resistant	Intermediate	Susceptible
Amikacin	30 μ g	≤ 14	15~16	≥ 17
Amoxicillin	10 μ g	≤ 11	12~13	≥ 14
Ampicillin	10 μ g	≤ 11	12~13	≥ 14
Carbenicillin	100 μ g	≤ 17	18~22	≥ 23
Cefoxitin	30 μ g	≤ 14	15~17	≥ 18
Cefazoline	30 μ g	≤ 14	15~17	≥ 18
Cephalothin	30 μ g	≤ 14	15~17	≥ 18
Chloramphenicol	30 μ g	≤ 12	13~17	≥ 18
Ciprofloxacin	5 μ g	≤ 15	16~20	≥ 21
Gentamycin	10 μ g	≤ 12	13~14	≥ 15
Kanamycin	30 μ g	≤ 13	14~17	≥ 18
Nalidixicacid	30 μ g	≤ 13	14~18	≥ 19
Streptomycin	10 μ g	≤ 11	12~14	≥ 15
Tetracycline	30 μ g	≤ 14	15~18	≥ 19
Ticarcillin	75 μ g	≤ 17	15~19	≥ 20
Tobramycin	10 μ g	≤ 12	13~14	≥ 15

* Cultivation was carried out in Muller-Hinton broth on incubator at 37°C and 18 hours.

결과 및 고찰

1. 일반세균 및 대장균군

경기도내 하천 중 6개 지점 하천수에서 질화균과 탈질균을 분리하기 위하여 하천수의 총균수 및 대장균군수를 측정 한 결과는 Fig. 1, 2와 같다. 하천의 총균수는 $1.0 \times 10^5 \sim 10^6$ cells/ml 범위였고 입장천이 3.0×10^6 cells/ml로 가장 높았다. 대장균의 경우는 $1.0 \times 10^2 \sim 10^4$ cells/ml 범위였으며 안성천이 3.3×10^4 cells/ml로 가장 높았다.

2. 질화균 분리 동정 및 특성

질화세균을 분리하기 위하여 총균수 실험에서 생성된 colony를 형태, 색깔, 종류를 육안으로 관찰하여 이중 60개의 colony를 PCA에 계대 배양하여 순수분리한 후 nitrate 배지에 균을 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 5N-acetic acid에 α -naphthylamine이 들어 있는 시약을 1 ml 가하고 5N acetic acid에 sulfanilic acid가 들어 있는 시약을 1 m씩 가하여 30초 이내에 적색으로 변하면 양성으로 판정하고 환원력이 강한 균주를 선별하여 동정한 결과는 Table 2와 같다.

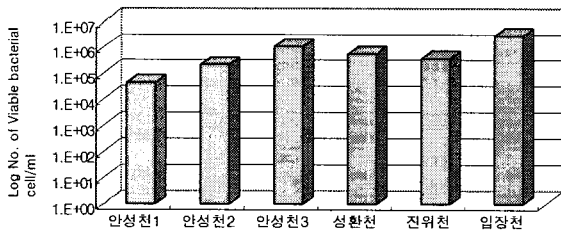


Fig. 1. Viable bacterial cell count of stream. Cultivation was carried out in plate count agar on incubator at 37°C and 48 hours.

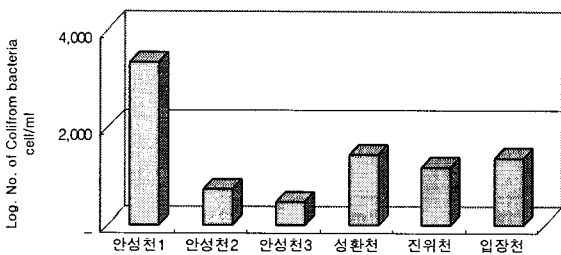


Fig. 2. Number of coliform bacteria of stream. Cultivation was carried out in desoxycollate agar on incubator at 37°C and 48 hours.

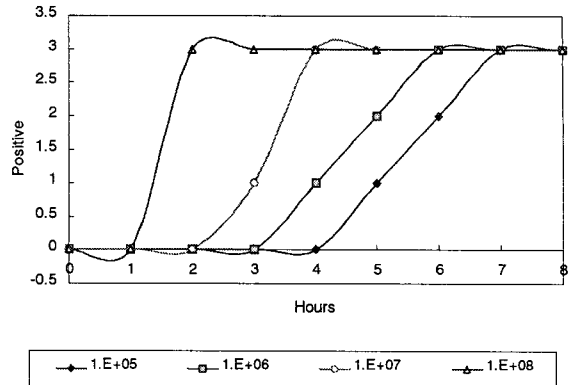


Fig. 3. Nitrification rates of the isolated strain AH-4. Cultivation was carried out nitrate media on incubator at 37°C and 24 hours.

Bacillus-1(B-1), B-3, B-4, B-6은 그람음성으로 운동성을 갖는 간균이었다. Catalase, oxidase 모두 양성이었으며 urease, methyl red(Voges-Proskauer)는 음성이었다. H₂S와 indol은 생성하지 않았으며 citric acid를 이용하지 않았다. Nitrate를 nitrite로 reduction 하였으며 β -galactosidase는 양성이었다. Gelatin의 경우 B-1, B-3, B-6은 분해하였으나 B-4는 분해하지 않았다. 아미노산실험 결과 arginine을 분해하였으며 ornithine과 tryptophan은 분해하지 않았고 lysin의 경우는 B-3만 분해하였고 B-1, B-4, B-6은 분해하지 않았다. 당 이용 실험 결과는 4균주 모두 glucose, mannitol, saccharose, arabinose를 이용하였고 B-1의 경우는 sorbitol과 amygdalin을 이용하였으며 B-4의 경우는 amygdalin을 이용하였고 B-6의 경우는 melibiose와 amygdalin을 이용하여 균주마다 약간의 차이를 보였다. 이상의 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology에 의하여 검색을 할 때 *Aeromonas hydrophila*로 동정되었다. *Aeromonas* 속균은 그람음성 간균으로 전세계에 널리 분포되어 있는 세균으로 토양과 수중에서 흔히 볼 수 있으며 대개가 사물기생으로 존재하고 있다¹³⁻¹⁵⁾. *Aeromonas hydrophila* 크게 비운동성인 *Aeromonas* 속균과 운동성 *Aeromonas* 속균으로 나눌 수 있는데 *Aeromonas hydrophila*는 대표적인 운동성 속균으로 담수성 어류, 양서류, 파충류 및 사람에서 경구 또는 경피를 통하여 급성, 만성 및 잠복감염을 일으킨다고 알려져 있으며¹⁶⁻¹⁹⁾ 용혈소, 세포독소, 장독소의 세포외독소와 protease 효소를 생성한다. 또한 *Aeromonas*는 *Acinetobacter*, *Pseudomonas* 등과 함께 인 제거 관련 세균으로 균체내에 폴리인산을 축적하여 인을 제거하고 유기물을 섭취해서

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the isolated nitrification bacterium

Characteristics	strain			
	B-1	B-3	B-4	B-6
Gram staining	-	-	-	-
Motility	+	+	+	+
Shape	rod	rod	rod	rod
Test of				
Catalase	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-
Methyl red(Voges-Proskauer)	-	-	-	-
H ₂ S production	-	-	-	-
Citric acid	-	-	-	-
Nitrate reduction	+	+	+	+
β -galactosidase	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	+	+
Lysin decarboxylase	-	+	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Tryptopha desaminase	-	-	-	-
Indol production	+	+	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	-	+
Utilization of				
Glucose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Saccharose	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	+
Amygdalin	+	-	+	+
Arabinose	+	+	+	+

PHB(poly- β -hydroxybutyrate)나 글리코겐 등과 같은 물질 축적시 필요한 에너지원으로 폴리인산을 가수분해할 때 인을 방출하는 것으로 알려져 있으며 본 실험에서는 질소 제거능이 가장 우수한 종으로 나타났다.

3. 온도에 따른 질소환원력

질화세균으로 분리 동정된 *Aeromonas hydrophila*-1(AH-1), *Aeromonas hydrophila*-3(AH-3), *Aeromonas hydrophila*-4(AH-4), *Aeromonas hydrophila*-6(AH-6) 균을 각각 온도에 따른 질소환원능을

평가하기 위해 순수 분리된 균을 각각 1.0×10^6 cells/ml당 농도로 nitrate 배지에 접종하여 20°C, 25°C, 37°C에서 배양하면서 시간대별로 질소환원력을 실험한 결과 Fig. 4, 5, 6과 같다. 20°C에서는 AH-1 균주가 가장 먼저 질산화 반응이 일어났으며 배양 후 8시간 후에 질산화 반응이 미홍색으로 나타나기 시작(1+)하여 9시간 후에 적자색인 (3+)반응을 나타냈다. 25°C에서는 AH-4 균주가 가장 먼저 질산화 반응이 일어났다. 배양후 5시간 후에 질산화 반응이 적색으로(2+)반응을 시작으로 6시간 후에 (3+) 반응을 나타냈다. 37°C에서는 AH-4 균주가 가장 먼저 질산화 반응이 일어났

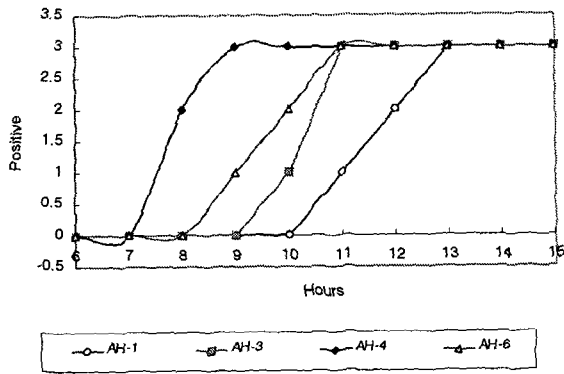


Fig. 4. Nitrification rates of the isolated strain AH-1, AH-3, AH-4, AH-6. Cultivation was carried out nitrate media on incubater at 20°C and 24 hours.

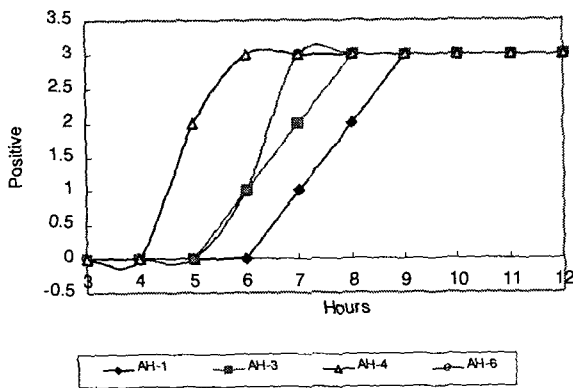


Fig. 5. Nitrification rates of the isolated strain AH-1, AH-3, AH-4, AH-6. Cultivation was carried out nitrate media on incubater at 25°C and 24 hours.

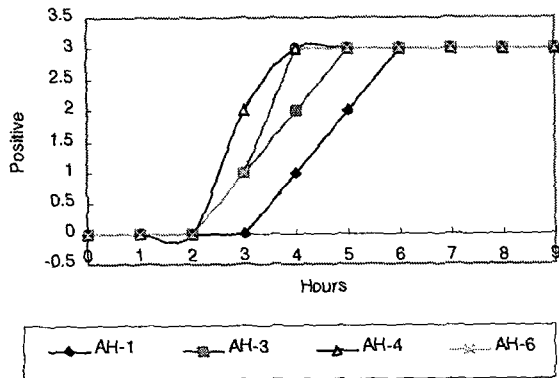


Fig. 6. Nitrification rates of the isolated strain AH-1, AH-3, AH-4, AH-6. Cultivation was carried out nitrate media on incubater at 37°C and 24 hours.

다. 배양 후 3시간 후에 질산화반응이 일어나기 시작 (2+)하여 4시간 후에 (3+)반응을 나타냈다. 이로 미루어 볼 때 nitrate 배지에서 *Aeromonas hydrophila*는 37°C에서 질소제거능력이 가장 우수하였고 그 중 AH-4가 AH-1, AH-3, AH-6보다 우수하였다.

4. 균 농도에 따른 질소환원력

질화세균으로 분리 동정된 AH-4에 대해 균 농도에 따른 질소환원능을 평가하기 위해 순수 분리된 균을 1.0×10^5 , 1.0×10^6 , 1.0×10^7 및 1.0×10^8 cells/ml당 농도로 nitrate 배지에 접종하여 37°C에서 배양하면서 시간대별로 질소환원력을 실험한 결과 Fig. 3과 같다. Nitrate 배지에 균이 1.0×10^8 cells/ml가 있을 경우 1시간 후에 질산화 반응이 미홍색이 나타나기 시작 (1+)하여 2시간 후에 적자색인 (3+)반응을 나타냈다. 1.0×10^7 cells/ml는 2시간 후에 질산화 반응이 일어나기 시작(1+)하여 3시간 후에 (3+)반응을 나타냈다. 1.0×10^6 cells/ml의 경우 3시간 후에 질산화 반응이 일어나기 시작(1+)하여 4시간 후 적색인 (2+)반응을 나타난 후 5시간 후에 (3+)반응을 나타냈다. 1.0×10^5 cells/ml의 경우 4시간 후에 질산화반응이 일어나기 시작(1+)하여 6시간 후에 (3+)반응을 나타냈다.

5. 항생제 감수성 시험

질화세균으로 순수분리 동정된 *Aeromonas hydrophila*의 병원성과 균 특성을 알아보려고 항생제 감수성 실험을 하였다. AH-1, AH-3, AH-4, AH-6 균을 각각 Muller-Hinton broth에 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후 Muller-Hinton agar 평판배지에 균을 도말 후 Sensi-disc dispenser로 disk를 평판상에 부착시켜 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 발육 저지환의 직경을 측정한 결과 Table 3과 같다. 4개 균주 모두 amoxillin, ampicillin, cephalothin과 ticarcillin에 내성을 나타냈으며 amikacin, cefoxitin, ceftriazone, chloramphenicol, ciprofloxacin, kanamycin, nalidixicacid, tetracycline 과 tobramycin에 감수성을 보였다.

요 약

폐수처리 중 생물학적 처리에 활용할 수 있는 질소 분해 능력을 가진 미생물을 분리하여 동정하고자 경기도내 하천 6지점에서 채취한 시료로부터 60개 균주를 선별하였다. 형태학적, 생화학적 및 배양학적 실험 결과 Bergey's manual of systematic bacteriology의 색인을 통하여 *Aeromonas hydrophila*로 동정하였다.

Table 3. Antimicrobial discs used for drug susceptibility test

Antimicrobial substances	Disk potency	Strain			
		AH-1	AH-3	AH-4	AH-6
Amikacin	30 μ g	S	S	S	S
Amoxillin	30 μ g	R	R	R	R
Ampicillin	10 μ g	R	R	R	R
Cefoxitin	30 μ g	S	S	S	S
Cefazolin	30 μ g	I	I	S	R
Ceftriazone	30 μ g	S	S	S	S
Cephalothin	30 μ g	R	R	R	R
Chloramphenicol	30 μ g	S	S	S	S
Ciprofloxacin	5 μ g	S	S	S	S
Gentamycin	10 μ g	S	I	S	S
Kanamycin	30 μ g	S	S	S	S
Nalidixicacid	30 μ g	S	S	S	S
Streptomycin	10 μ g	R	R	R	S
Tetracycline	30 μ g	S	S	S	S
Ticarcillin	75 μ g	R	R	R	R
Tobramycin	10 μ g	S	S	S	S

* Cultivation was carried out in Muller-Hinton broth on incubater at 37°C and 18 hours.

R : Resistant, I : Intermediate, S : Susceptible

Aeromonas hydrophila(AH-1), (AH-3), (AH-4), (AH-6) 균이 질산화 능력이 우수하였다. 4개 균주 모두 amoxillin, ampicillin, cephalothin 과 ticarcillin에 내성을 나타내었다. 본 실험에서 분리한 *Aeromonas hydrophila*의 질산화의 최적조건은 균 농도 1.0×10^6 cells/ml, 배양온도 37°C로 나타났다.

참고문헌

- Barness, D. and Bliss P. J. : Biological Control of nitrogen in wastewater tretment, *Univ. of New South Wales, Australia*. (1983).
- Metcalf and Eddy, Inc. : Wastewater Engineering, 2nd Ed., McGraw-Hill Book Co., New York, (1979).
- Wuhrman, K. : Nitrogen removal in sewage treatment process, *vehr. Int. Ver Limnol.*, 15, pp 580~596 (1964).
- McCarty, P. L. : Stoichiometry of biological reactions, Presented at the summer institute in water pollution control, Biological waste treatment, Manhattan College, New York, May, (1974).
- Boodetier, P. L. E., Libochant, J. A., Blom, C. W. P. M. and Laanbroek, H. J. : Dynamics of nitrification and denitrification in root-oxygenated sediments and adaptation of ammoni-oxidazing bacteria to low-oxygen or anoxic habitats, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4100~4107 (1996).
- Bofmann, A., and Conrud, R. : Recovery of nitrification and production of NO and N₂O after exposure of soil to acetylene. *Biol. Fertil. Soils*, 25, 41~46 (1997).
- Megraw, S. R., and Knowles, R. : Methane dependant nitrate production by a microbial consortium enriched from a cultivated humisol, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 62, 359~366 (1989).
- Focht, D. D. N., and Verstraete, W. : Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *Adv. Microb. Ecol.*, 1, 135~214 (1977).
- Macfaddin Jean F. : Biochemical tests for identification of medical bacteria, Williams & Wilkins, Baltimore /London. (1980).
- Schleifer Karl Heinz : Bergey's manual of systematic bacteriology. Volume 1, Williams & Wilkins, Baltimore, P. 999~1103.
- Bennet, R. W. and Lancette, G. A. : Bacteriological analytical manual, AOAC International, Arlington, 161~190 (1992).
- Balous, A., Hausler, W. J. Jr, Isenberg, H. D. and Shadomy, H. J. : Manual of Clinical Microbiology, 5th ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C. (1991).
- Post, G. : Textbook of fish health, T. F. H Publication, Neptune, pp. 30~40 (1987).

14. Robert, R. J., Fish pathology. Bailliere Tindall, London, pp. 131~149 (1978).
15. Asao, T., Kinoshita, Y., Kozaki, S., Uemura, T. and Sakaguchi, G. : Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.*, 46, 122~127 (1984).
16. Boulanger, Y., Lallier, R. and Cousineau, G. : Isolation of enterotoxigenic *Aeromonas* from fish. *Can. J. Microbiol.*, 23, 1161~1164 (1977).
17. Johnson, W. M. and Lior, H. : Cytotoxicity and suckling mouse reactivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from human sources. *Can. J. Microbiol.*, 27, 1019~1027 (1981).
18. Nicholas, C., Marc, J. G., Claire, L., Bradley, S. R. and James, L. B. : Enterotoxin produced by *Aeromonas hydrophila* Relationship of toxigenic isolates to diarrheal disease. *Infect. Immun.*, 23, 829~837 (1979).
19. Ysable, S., Alicia, E. T., June, L. B., Teresa, P. N. and Tomas, G. V. : Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish. *Infect Immun.*, 56, 3285~3293 (1988).

(2000년 12월 20일 접수)