

새우양식장에서 분리한 해양세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13에 의한 양식사료에 포함된 질소와 인의 동시제거

천재우 · 마채우 · 강형일¹ · 오계현*
순천향대학교 생명과학부, ¹순천대학교 환경교육과

Simultaneous Removal of Nitrogen and Phosphorus Leached from Farming Feed by the Marine Bacteria, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* CK-13, Isolated from Shrimp Farming Pond. Chun, Jae-Woo, Chae-Woo Ma, Hyung-Yeel Kahng¹, and Kye-Heon Oh*. Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, 336-600, Korea, ¹Department of Environmental Education, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea – A bench-scale feasibility study was conducted with solid farming feed to evaluate a treatment process for microbiological removal of nitrogen (N) and phosphorus (P). Strains, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13, were originally isolated from water samples of shrimp farming pond. Simultaneous removal of N/P in marine media was monitored in the co-cultures, CK-10 and CK-13. As the results, 400 μM NH_4^+ and 400 μM NO_2^- were eliminated within 12 hours and NO_3^- within 36 hours, and 500 μM PO_4^{3-} was completely disappeared within 36 hours from the media. Cultures of CK-10 and CK-13 were applied for removal of N/P leached from shrimp farming feed. HPAEC-PAD system was used to analyze sugars in farming feed, resulting in resolution of various sugars including glucose, galactose, galatosamine, mannose, and fucose. 0.2% (w/v) Pulp densities of the farming feed contained approximately 33.3 μM NH_4^+ , 12.9 μM NO_2^- , 81.5 μM NO_3^- and 248 μM PO_4^{3-} which could dissolved within 72 hours of leaching in aqueous solution followed by bacterial removal. Complete bacterial removal of N/P was achieved within 84 hours at 0.2% of the feed in co-cultures, whereas single cultures removed to incompleteness of N/P during the incubation period. This work demonstrated that test cultures, CK-10 and CK-13 showed effective removal of N/P derived from shrimp farming feed.

Key words: N/P removal, shrimp farm feed, *Bacillus* sp. CK-10, *Bacillus* CK-13

산업의 급격한 발달과 함께 해양환경오염의 커다란 문제로 부각되면서 수산물의 어획량도 감소하고 있는 가운데 고품질의 수산물을 안정적으로 공급하기 위하여 양식에 대한 관심이 크게 고조되고 있다. 많은 나라에서 환경친화적이며 경제성있는 양식에 관하여 많은 연구를 하고 있으나, 양식 환경 개선은 쉽지 않은 것으로 알려져 있다. 우리나라는 삼면이 바다로서 연안의 거의 모든 면적이 양식업으로 이용되고 있으나[14], 양식사료의 과다투여와 이로인한 수질환경 악화가 커다란 문제로 대두되고 있다.

양식 산업에 있어 어체의 중량을 증가시키고 양질의 양식이 생산을 위해 사료 첨가는 필수적이다. 양식사료는 탄수화물, 단백질, 지방의 3대 요소와 조회분, 조섬유, 칼슘, 인으로 구성되어 있으며, 양식이 생장에 따라 조성비가 다른 사료를 사용하고 있다. 특히 어체 중량을 증가시키기 위해서는 단백질과 지방의 함량이 높은 사료를 사용해야 하고,

단백질은 필수 아미노산 공급원으로, 지방은 필수지방산 공급원으로서 중요한 역할을 담당하고 있는 중요한 영양소이다[11, 21]. 그러나 잔존 미섭취 사료는 양식장내에서 생물학적 산소요구량이 증가하고, 높은 농도의 질소와 인을 생성하여 부영양화 또는 조류 대발생, 그리고 독성 물질의 생성 등의 심각한 수질오염을 일으키는 것으로 알려져 있다[8, 16]. 또한 수계내의 잔존 사료에서 발생하는 고농도의 암모니아와 아질산염은 어류에 직접적인 질병을 유발시킨다. 고농도의 비 이온화 암모니아는 어류의 세포를 통과하여, 혈액내 산소 운반 능력과 삼투조절을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 고농도의 아질산염은 정상적인 염화물 수송 기작에 의해 아가미를 통해 들어간 후 메트헤모글로빈을 형성시켜 산소운반 능력을 저해하는 것으로 알려져 있다[2, 7, 9, 20].

최근 양식장내 수질의 악화를 가속화시키고 어류에게 직접적인 독성을 나타내는 질소와 인을 일정농도로 유지시키고, 질소와 인을 포함하는 오염물질로부터 수질환경을 개선할 목적으로 probiotics를 활용한 질소와 인의 미생물학적 제거에 관한 연구들이 보고 되고 있다[3, 13, 21]. Grommen 등[5]은 실험용 양식장내에 질화세균을 이용하여 암모늄과 아

*Corresponding author

Tel: 82-41-530-1353, Fax: 82-41-530-1350

E-mail: kyeheon@sch.ac.kr

질산염을 효과적으로 제거하는 것을 보고하였으며, Mevel 등[12]은 해양에서 분리한 *Bacillus* MS30에 의해 암모늄을 제거하는 것을 확인하였다. 또한 Queiroz 등[17]은 probiotics로서 *Bacillus* 종을 메기 양식장에 투여하여 양식장내 수질이 크게 개선되는 것을 확인하였다.

양식선진국가에서는 양식에서 수질개선 효과를 거두기 위하여 probiotics의 개발 뿐만 아니라 그 적용이 크게 활성화되어 있는데 비하여, 우리나라에서는 이와 비교하여 볼 때 상당히 미미한 실정이다. 현재 우리나라에서는 양식장 수질개선 효과를 위한 probiotics를 외국에서 직접 수입하여 사용함으로써 양식장 수계에 존재하는 미소생태계를 교란시키고 있다[14]. 또한 해외 생물종으로서 우리나라에서는 효율적인 수질개선 효과가 기대하는 만큼 보고되지 않고 있다. 이러한 여러 가지 상황을 고려하여 볼 때 우리나라의 양식장에서 효과적인 probiotics를 발굴하고 특성을 연구하여 이를 국내 실정에 맞는 미생물제제로 상품화하여 양식장 수질환경을 사용할 필요성이 심각하게 제기되고 있다.

본 연구에서는 궁극적으로 새우양식장의 환경개선을 위한 목적으로 해양세균인 CK-10과 CK-13을 분리하여 양식사료에서 유래하는 질소와 인을 제거하는 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

질소와 인 제거 세균의 분리 및 배양조건

충남 태안군 소재 순천향대학교 부설 해양수산 연구소 새우양식장에서 채취한 물시료로부터 질소와 인을 효율적으로 제거하는 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13을 분리하였다. 배양에 사용된 배지는 1 L의 인공해수(aquarium system, Instant Ocean, Sarrebourg, France)에 탄소원으로 2 mM glucose와 2 mM fructose를 첨가하고, 질소원으로 질소원으로서 각각 400 μ M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_2 , 또는 NaNO_3 , 그리고 인원으로서 500 μ M KH_2PO_4 를 첨가하여 분리세균에 의한 질소 또는 인(N/P)의 제거 실험을 실시하였다. 양식사료에서 질소와 인의 제거실험은 기본배지에 양식사료에 포함된 탄소원, 질소원, 인원을 그대로 사용하였으며 별도로 이들 성분을 첨가하지 않았다. 준비된 배지는 0.5 N NaOH를 이용하여 pH 7.0로 조절한 후, 121°C에서 15분간 고압 멸균하였다. 멸균된 배지에 농화된 혼합배양을 접종한 후에 25°C에서 분당 150회로 회전하는 진탕 배양기에서 배양하였다. 세균의 생장은 분광광도계(V-550 UV/Vis Spectrophotometer, Jasco, Japan)를 사용하여 파장 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세균 CK-10과 CK-13은 배지에 접종하여 25°C에서 분당 160 회로 회전하는 진탕배양기에서 배양하였다.

분리 세균의 생리 화학적 특성 조사 및 동정

분리세균 CK-10과 CK-13은 Luria-Bertani(LB) 고체 평판 배지에 도말하여 단일 집락의 형태학적 관찰을 하였고, 그

람 염색 후 위상차 현미경으로 세균의 형태학적 특성을 조사하였다. 분리 세균의 생리 화학적 특성은 알려진 방법에 의하여 실시하였다[4]. 분리세균의 동정을 위하여 BIOLOG 시험과 16S DNA 염기서열을 분석하였다.

질소와 인 측정

분리세균 CK-10 또는 CK-13에 의한 질소제거는 배양액 중에 잔존하는 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 의 양을 측정하여 확인하였다. NH_4^+ 는 발색 정량방법인 indophenol blue 방법[15], NO_2^- 제거는 Griess reaction 방법[6], 그리고 NO_3^- 제거는 brucine 방법을 이용하여 각각 측정하였다[19]. 또한 배양액 중에 잔존하는 PO_4^{3-} 의 양은 molybdate-blue 방법을 이용하여 측정하였다[8].

양식 사료에서 용출되는 질소와 인 측정

양식사료 0.2 g을 100 ml의 인공해수에 넣고 시간이 경과함에 따라 용출되는 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , 그리고 PO_4^{3-} 의 양을 각각 측정하였다. 질소와 인 용출 실험을 위하여 사료 pellet은 멸균하여 직접 이용하거나 막자사발에서 미세한 가루로 만들어 사용하였다. 배지내로 용출되는 질소와 인의 정량적 측정은 이전에 서술된 방법에 의해 실시하였다.

배양에 의한 양식사료의 질소와 인 제거

양식사료 0.2 g을 막자사발에서 미세한 가루로 만들어 100 ml의 인공 해수에 넣어 용출시킨 후, *Bacillus* sp. CK-10이나 *Bacillus* sp. CK-13의 단일배양, 또는 두 균주의 혼합배양(co-culture)을 각각 접종하여 용출된 질소와 인의 제거율을 각각 측정하였다. 각 화합물의 정량적 측정은 이전에 서술한 방법에 의해 실시하였다.

양식사료의 당분석

양식사료에 포함된 당을 분석하기 위하여 산 가수분해를 통해 당을 용출시키고, HPAEC-PAD(high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection)로 분석하였다. 이용된 HPAEC-PAD 시스템은 PED2 pulsed electrochemical detector가 부착된 Bio-LC DX300 & 600(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)이었다. 분석에 이용된 컬럼(column)은 Dionex사의 CarboPac PA1 컬럼(4.6×250 mm, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하였다. HPAEC-PAD 작동조건에서 flow rate는 1.0 ml/min, 분석시간은 20분, detector의 wavelength는 350 nm이었고, PC10 controller에 의해 자동적으로 주입되어 분석되었다. 0.01 g의 사료를 2 M trifluoroacetic acid(TFA) (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 6 N HCl에 녹여 100°C에서 4시간동안 반응시킨 후 건조하여, 100 μ l의 증류수에 녹인 후, 0.45 μ m nylon membrane filter에 여과하여 분석하였다. 당 분석에 사용된 분석용 표준품은 fucose, galactosamine, glucosamine,

galactose, glucose, mannose(Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 였다.

결과 및 고찰

질소와 인 제거 세균의 분리

새우양식장에서 채취한 물시료로부터 농화 배양기법을 통하여 얻어진 미생물 컴소시움에서 질소원으로서 NH_4^+ , NO_2^- , 또는 NO_3^- 를, 그리고 인 원으로서 PO_4^{3-} 을 포함하는 무기 고체 평판 배지에 수 차례에 걸친 계대를 통하여 질소와 인의 제거능을 가지는 두 개의 단일세균인 CK-10과 CK-13을 분리하였다. 분리된 세균들은 N/P 제거 액체 배지에 옮겨 25°C에서 분당 150회로 회전하는 회전 진탕 배양기에서 배양하면서 질소 및 인 제거능을 확인하였다.

분리세균의 형태학적 관찰 및 생리 화학적 특성

두 개의 분리 세균에 대하여 형태학적 관찰과 생리 화학적 특성을 조사를 실시하였다. 분리세균 CK-10과 CK-13은 모두 간상형이었으며 그람 양성으로 나타났다. 생리 화학적 시험에서 두 분리세균은 Indole 형성 유무시험, methyl red 시험, MR-VP 시험에서 음성을 나타내었으며, disulfhydrase에 의한 H_2S 의 형성 시험에서도 음성반응을 나타내었다. 또한 탄소원과 에너지원으로 citrate의 이용여부를 알아보는 citrate 이용시험은 음성으로 나타났으며, lithmus milk 시험에서는 단백질을 분해하였으며, 펩톤화(peptonization)는 되지 않았다. 이들 분리세균은 gelatinase, amylase 그리고 catalase의 존재 여부 시험은 모두 양성반응이었으나, urease의 존재 여부 시험에서 CK-10에서는 음성으로, 그리고 CK-13에서는 양성으로 각각 나타났다.

분리 세균의 동정

형태학적 및 생리학적 특성을 관찰한 분리세균 CK-10과 CK-13에 대하여 동정 하였다. 두 균주 CK-10과 CK-13에 대하여 다양한 탄소원 이용여부를 동정하는 BIOLOG system을 사용하여 동정하였다. 또한 16s DNA 염기서열을 분석하여 동정을 실시한 결과, 이들 분리세균 CK-10과 CK-13은 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus thuringiensis*로 각각 동정되었으며, GeneBank에 각각 [AY941803과 [AY941804]로 등록되었다.

혼합배양에 의한 질소 및 인의 동시 제거

두 가지 분리세균 *Bacillus sp.* CK-10과 *Bacillus sp.* CK-13의 혼합배양을 이용하여 생장, 배양기간중의 pH 변화, 그리고 NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- 와 PO_4^{3-} 의 동시제거 실험을 12시간 간격으로 측정하였다(Fig. 1). 혼합배양은 12시간 지난 후부터 자라기 시작하여 24-36시간 범위 내에서 빠른 생장을 보여주었으며, 균주가 성장하는 동안 pH는 다소 감소하였다

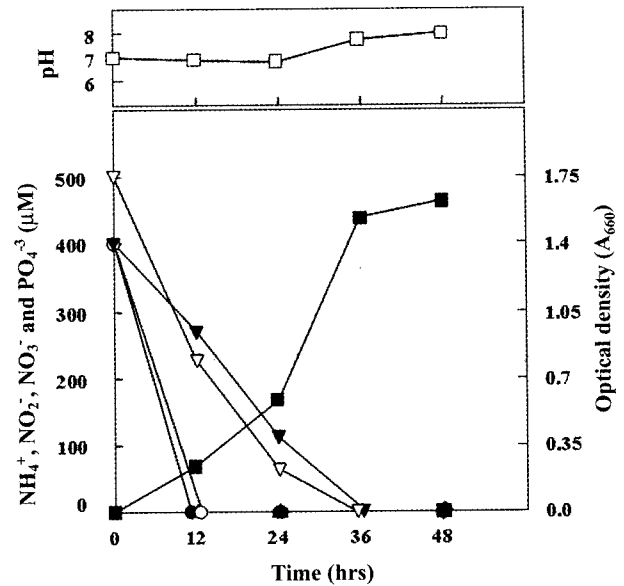


Fig. 1. Changes in concentrations of residual 400 mM NH_4^+ (●), 400 mM NO_2^- (○), 400 mM NO_3^- (▼), and 500 mM PO_4^{3-} (▽) in co-culture, *Bacillus sp.* CK-10 and *Bacillus sp.* CK-13. Growth of the test culture measured as cell density at 660 nm (■) and pH (□).

가 증가하여 48시간 경과 후 8.12로 측정되었다. 400 μM 의 질소와 500 μM 인의 동시제거 실험에서, NH_4^+ 와 NO_2^- 는 12시간 이내에 완전히 제거되었고, NO_3^- 와 PO_4^{3-} 는 36시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다.

Rengpipat 등[18]은 *Bacillus sp.* S11를 실험용 새우양식장에 처리한 후 NH_4^+ 와 NO_2^- 를 측정된 결과, 접종 초기에는 1.67 mg/l의 NH_4^+ 와 2.5 mg/l NO_2^- 로 측정되었지만, 14일 후 NH_4^+ 와 NO_2^- 는 효과적으로 제거하였다고 보고하였으나, 본 실험에서 사용한 CK-10과 CK-13 혼합배양은 400 μM 의 NH_4^+ 와 NO_2^- 를 12시간 이내에 제거시켜 질소 제거면에서 더욱 탁월한 것이 입증되었고, 500 μM 의 PO_4^{3-} 를 36시간 만에 완전히 제거하였다. 이와같이 CK-10과 CK-13 배양은 질소 뿐만 아니라 인도 효과적으로 제거하여 probiotics로 이용이 가능할 것으로 판단된다.

양식 사료의 당분석

양식 사료에 포함된 당을 HPAEC-PAD 시스템을 이용해 정성분석하였다. 양식 사료에는 glucose가 가장 많이 포함되어 있었으며, galactose, galatosamine, mannose 등의 순이었으며, fucose도 소량 포함되어 있는 것이 확인되었다(Fig. 2). 사용된 사료(Woo Sung Feed Co., Daejeon, Korea)의 조성은 조단백질 50%, 조지방 7%, 조회분 17%, 조섬유 3%, 칼슘 1%, 인 2.7% 였다.

양식 사료에서 질소와 인의 용출

새우 양식장에서 사용하는 양식 사료 0.2 g를 100 ml의

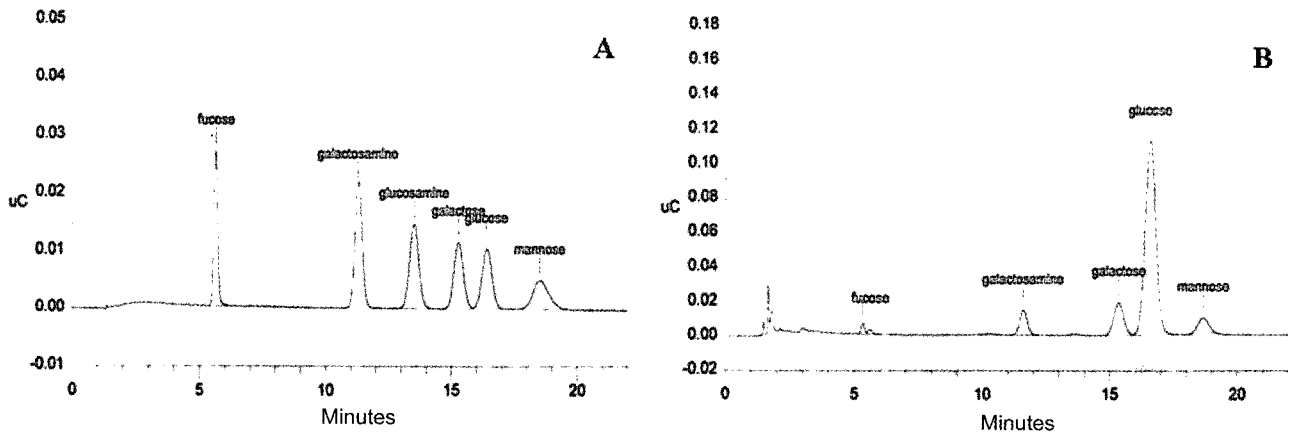


Fig. 2. Sugar analysis of shrimp farming feed by Bio-LC DX; (A) control and (B) shrimp farming feed.

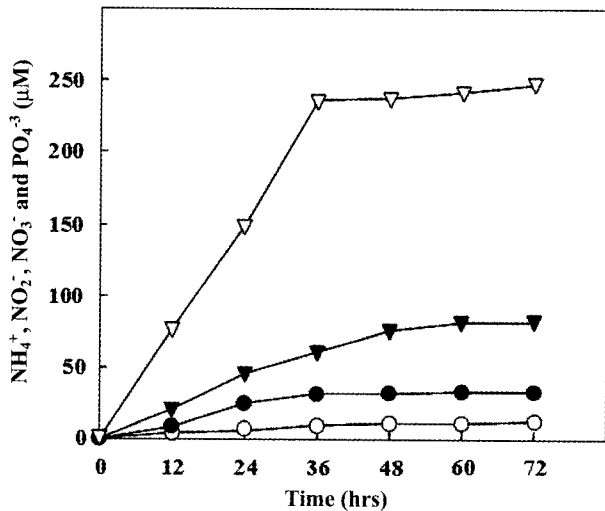


Fig. 3. Dissolution of NH_4^+ (●), NO_2^- (○), NO_3^- (▼), and PO_4^{3-} (▽) in artificial sea water from 0.2% shrimp farming feed.

인공해수에 용해시켜 용출된 질소와 인의 양을 각각 측정하였다. 사료 pellet을 그대로 인공해수에 넣고 72시간 동안 용출시험을 실행한 결과, 질소와 인은 거의 관찰되지 않았다. 그러나 막자사발을 이용해 미세한 가루로 만들어 수행한 용출시험에서 초기에는 미량만이 관찰되던 질소와 인이 시간이 경과하면서 상당량 용출되어, 72시간이 경과한 후 약 $33.3 \mu\text{M}$ NH_4^+ , $12.9 \mu\text{M}$ NO_2^- , $81.5 \mu\text{M}$ NO_3^- , 그리고 $248 \mu\text{M}$ PO_4^{3-} 가 측정되었다(Fig. 3).

양식 사료로부터 질소와 인의 미생물학적 제거

0.2% (w/v)의 양식 사료를 인공해수에 녹인 후 단일배양 *Bacillus* sp. CK-10 또는 *Bacillus* sp. CK-13을 접종하여 시간 경과에 따른 질소와 인의 제거율을 측정하였다. 단일 배양 *Bacillus* sp. CK-10을 접종하여 36시간이 경과한 후 약 $287 \mu\text{M}$ NO_2^- 이 용출되었으며, 배양 72시간 이내에 완전히 제거되었다. NH_4^+ 와 NO_3^- 는 48시간 경과한 후, 약 $975 \mu\text{M}$

과 $428 \mu\text{M}$ 이 각각 용출되었으며, 120시간 이내에 70%와 65% 정도가 각각 제거되는 것이 관찰되었다. 배양 초기 60시간 경과한 후 PO_4^{3-} 는 약 $644 \mu\text{M}$ 이 용출되었으며 108시간 이내에 완전히 제거되었다(Fig. 4A). 또한 단일배양 *Bacillus* sp. CK-13을 접종하여 36시간이 경과한 후 약 $324 \mu\text{M}$ NO_2^- 이 용출되었으며, 배양 60시간 이내에 완전히 제거되었다. NH_4^+ 는 48시간 경과한 후 약 $980 \mu\text{M}$ 이 용출되었으며, 배양 120시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다. NO_3^- 도 60시간 경과한 후 약 $410 \mu\text{M}$ 이 용출되었으며, 배양 120시간 이내에 완전히 제거되었다. 배양 초기 48시간 경과한 후 PO_4^{3-} 는 약 $661 \mu\text{M}$ 이 용출되었으며 배양 120시간 동안에 65% 정도가 제거되는 것이 관찰되었다(Fig. 4B).

0.2%(w/v)의 양식 사료를 인공해수에 녹인 후, *Bacillus* sp. CK-10와 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양(co-culture)을 접종하여 시간 경과에 따른 질소와 인의 제거율을 측정하였다. 혼합배양을 양식 사료가 포함된 배지에 접종한 결과, NO_2^- 와 NH_4^+ 는 배양 초기 24시간 경과한 후 약 $440 \mu\text{M}$ 과 $940 \mu\text{M}$ 이 각각 용출되었으며, 배양 36시간과 72시간 이내에 완전히 제거되었다. PO_4^{3-} 와 NO_3^- 는 36시간 경과한 후 약 $610 \mu\text{M}$ 과 $520 \mu\text{M}$ 이 각각 용출되었으며, 72시간과 84시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다(Fig. 4C).

양식사료에서 용출된 질소와 인의 probiotics로서 사용가능성 있는 미생물학적 제거에 관한 연구는 거의 보고된 바가 없다. 다만 Lim 등[10]은 실험용 대하 양식장에서 5종의 *Bacillus* spp.이 포함된 probiotics를 살포하여 약 $110 \mu\text{M}$ NH_4^+ , $180 \mu\text{M}$ NO_2^- , $50 \mu\text{M}$ PO_4^{3-} 의 초기 질소와 인 잔존 농도가 15일 경과 후, 약 $8 \mu\text{M}$ NH_4^+ , $8 \mu\text{M}$ NO_2^- , $3 \mu\text{M}$ PO_4^{3-} 을 유지하는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 CK-10과 CK-13의 혼합배양에 의한 질소와 인의 제거는 기간과 농도를 고려한 효율적인 면에서 탁월한 결과로 판단되어 양식장 수질환경 개선을 위한 미생물제제로서 응용이 가능할 것으로 사료된다.

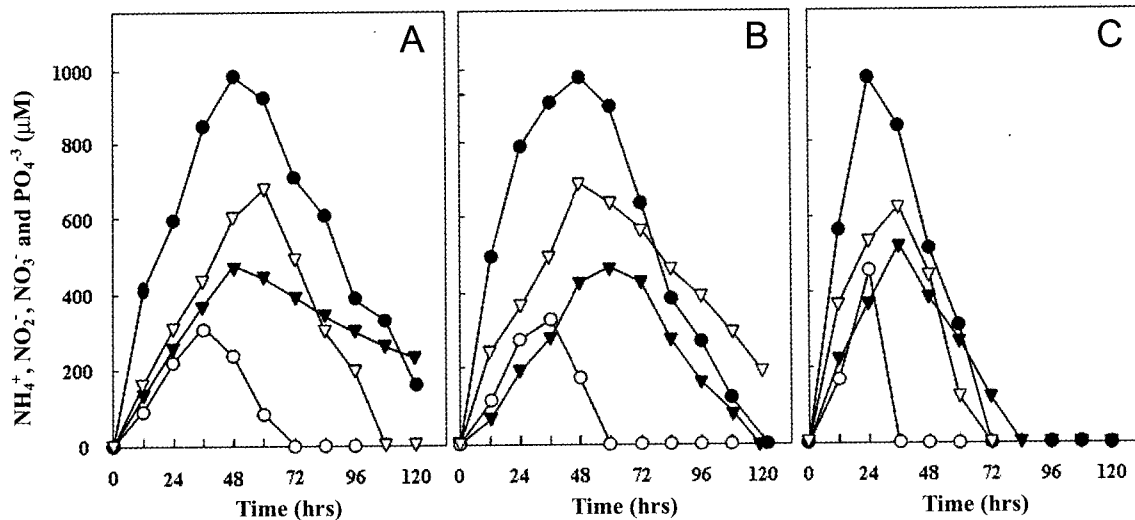


Fig. 4. Removal of NH_4^+ (●), NO_2^- (○), NO_3^- (▼), and PO_4^{3-} (▽) from 0.2% farming feed suspension incubated with single cultures, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13 (B), and co-cultures, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C), respectively.

향후 본 연구는 양식사료로부터 유래하는 질소와 인의 제거에 이용되는 미생물제제의 개발에 초점이 맞추어 질 것이다.

요 약

고형 양식사료에 포함된 질소와 인의 미생물학적 제거 공정을 알아보기 위하여 벤치규모의 실험을 수행하였다. CK-10과 CK-13 균주가 새우양식장의 물시료로부터 분리되었다. CK-10과 CK-13의 혼합배양에서 N/P의 동시제거 실험을 실시하였다. 그 결과, 400 μM NH_4^+ 와 NO_2^- 는 12시간 이내에 제거되었고, NO_3^- 는 36시간 이내에 각각 제거되었으며, 500 μM PO_4^{3-} 도 36시간 이내에 제거되었다. CK-10과 CK-13 배양을 새우양식사료에서 용출된 N와 P의 제거에 적용하였다. HPAEC-PAD 시스템을 이용하여 양식사료의 당을 분석하였으며, glucose, galactose, galatosamine, mammonse, fucose 등의 여러 가지 당이 분석되었다. 세균에 의한 질소와 인 제거를 수행하기 위하여 인공 해수에서 0.2%(w/v)의 양식사료를 용출시켰으며, 72 시간동안 용출된 질소의 양은 대략 33.3 μM NH_4^+ , 12.9 μM NO_2^- , 81.5 μM NO_3^- , 248 PO_4^{3-} 였다. 혼합배양은 0.2% 사료에 포함된 질소와 인을 84시간 이내에 완전히 제거하였으나, 단일배양은 주어진 배양기간동안 질소와 인을 완전제거 하지 못하였다. 이 연구에서 CK-10과 CK-13 배양은 새우양식사료에서 유래하는 질소와 인을 효과적으로 제거하는 것이 입증되었다.

감사의 글

본 연구는 해양수산부의 수산특정연구개발사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn, T. S., S. H. Hong, O. S. Kim, J. J. Yoo, and S. I. Choi. 2001. The changes of *Bacillus* spp. in municipal wastewater treatment plant with B3 process. *Kor. J. Microbiol.* 37: 209-213.
- Barak, Y., E. Cytryn, I. Gelfand, M. Krom, and J. V. Rijn. 2003. Phosphorus removal in a marine prototype, recirculating aquaculture system. *Aquaculture* 220: 313-326.
- Gatesoupe, F. J. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.
- Gerhart, P., R. J. Fellows, D. C. Cataldo, and R. M. Nester, W. A. Wood, N. R. Kreig, and G. B. Phillips. 1981. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. American Society for Microbiology. U.S.A.
- Grommen, R., I. V. Hauteghem, M. V. Wambeke, and W. Verstraete. 2002. An impoved nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria systems. *Aquaculture* 211: 115-124.
- Guevara, I., J. Iwanejko, A. Dembinska-Kiec, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, I. Golabda, S. Bartus, M. Malczewska-Malec, and A. Szczudlik. 1998. Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction. *Clin. Chim. Acta* 274: 177-188.
- Jensen, F. B. 1996. Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*). *Aquatic Toxicol.* 34: 95-104.
- Kim, G. K. and T. J. Jeong. 2003. A study on eutrophication control in coastal area of Gunsan. *J. Environ. Sci.* 12: 957-966.
- Kim, S. K., I. S. Kong, B. H. Lee, L. S. Kang, M. G. Lee, and K. H. Suh. 2000. Removal of ammonium-N from a recirculation aquacultural system using an immobilized nitrifier. *Aquacult. Eng.* 21: 139-150.
- Lim, H. J., J. H. Park, and I. K. Jang. 2004. Effect of

- probiotics on water quality in the shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) ponds. *J. Kor. Fish. Sci.* **37**: 91-97.
11. Lee S. M., S. R. Park, T. J. Kim, J. I. Myeong, and Y. J. Chang. 1998. Effects of deletion of P, Ca, Zn, Mg, Fe, K, Mn, or Se from mineral premix in the diets containing 40% fish meal on growth performance of juvenile Korean rockfish (*Sebastes schlegeli*). *J. Kor. Fish. Soc.* **31**: 252-258.
 12. Mevel, G and D. Prieur. 2000. Heterotrophic nitrification by a thermophilic *Bacillus* species as influenced by different culture conditions. *Can. J. Microbiol.* **46**: 465-473.
 13. Moriarty, D. J. W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* **151**: 333-349.
 14. Paek, N. S., Y. B. Lim, and Y. M. Kim. 2001. Antibacterial activity and growth promotion in aquacultured fish by probiotics. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**: 56-61.
 15. Pai, S. C., Y. J. Tsau, and T. I. Yang. 2001. pH and buffering capacity problems involved in the determination of ammonia in saline water using the indophenol blue spectrophotometric method. *Anal. Chim. Acta* **434**: 209-216.
 16. Porrello, S., M. Lenzi, E. Persia, P. Tomassetti, and M.G. Finoia. 2003. Reduction of aquaculture wastewater eutrophication by phytotreatment ponds system I. dissolved and particulate nitrogen and phosphorus. *Aquaculture* **219**: 515-529.
 17. Queiroz, J. and C. Boyd. 1998. Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds. *J. World Aquacult. Soc.* **29**: 67-73.
 18. Rengpipat, S., W. Phianphak, S. Piyatiratitivorakul, and P. Menasveta. 1998. Effects of a probiotic bacterium on black tiger shrimp *Penaeus mondon* survival and growth. *Aquaculture* **197**: 310-313.
 19. Rhee, J. S., Y. S. Kim, Y. H. Jung, and H. J. Rhee. 1997. A study on the determination of N (NO₂⁻), N (NO₃⁻) and N (NH₄⁺) in environmental samples by flow injection analysis. *J. Kor. Chem. Sci.* **41**: 256-265.
 20. Uemoto, H. and H. Saiki, 1996. Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4224-4228.
 21. Verschuere, L., G. Rombaut, P. Sorgeloos, and W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 655-671.
 22. Won, T. H., I. K. Han, and K. S. Chu. 1994. Effects of dietary energy, protein level and feed processing method on the growth rate, digestibility and pollution load of Israeli carp fed high protein diet. *Kor. J. Anim. Nutr. Feed* **18**: 441-451.

(Received Mar. 10, 2005/Accepted May 20, 2005)