

## 새우양식장에서 분리한 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13에 의한 질소와 인의 제거

천재우 · 마채우 · 이상현 · †오계현

순천향대학교 생명과학부

(접수 : 2005. 2. 22., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

## Removal of Nitrogens and Phosphorus by *Bacillus* sp. CK-11 and *Bacillus* sp. CK-13 Isolated from Shrimp Farming Pond

Jae-Woo Chun, Chae-Woo Ma, Sang-Hyun Lee, and Kye-Heon Oht†

Department of Life Science, Soonchunhyang University, Asan, Chung-Nam 336-745, Korea

(Received : 2005. 2. 22., Accepted : 2005. 4. 23.)

The feasibility of using bacterial cultures with the ultimate aim for the marine environmental clean-up was explored. The present study reports on the bacterial elimination of nitrogens and phosphorus by strains CK-10 and CK-13 isolated from shrimp farming pond. The strains were identified as genus *Bacillus* on the basis of BIOLOG test, and designated as *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13, respectively. Removal of nitrogens ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , or  $\text{NO}_3^-$ ) or phosphorus ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) as single N or P source was studied with single cultures under aerobic conditions. Complete elimination of all nitrogens in the concentration range of 100-400  $\mu\text{M}$  was achieved in single cultures as well as co-cultures within the given incubation period. Similar results were obtained from the test cultures containing 125-599  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$ . Simultaneous removal of all N/P was monitored in the co-cultures. As the results, 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$  and  $\text{NO}_2^-$  were eliminated within 12 hrs and 400 $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  and 500  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$  were completely disappeared within 36 hrs from the media. The work demonstrated that co-cultures improved the concurrent removal of N/P from the media.

**Key Words** : N/P removal, probiotic, *Bacillus* sp. CK-10, *Bacillus* CK-13

### 서론

질소와 인은 단백질, 핵산, 아미노산 그리고 유기화합물을 이루는 중요한 원소이며, 생물체의 생장에 중요한 역할을 하는 영양염류로 알려져 있다. 산업의 급속한 발전과 인구 증가, 집약적 농업으로 인하여 많은 양의 질소와 인은 수생태계로 방출되어 부영양화 (eutrophication) 또는 조류 대발생 (algae blooms) 등 심각한 수질오염의 주된 원인이 된다(1, 2). 최근에 양식장에서 질소와 인으로 인한 수질오염으로 양식어류의 성장 환경이 악화되어 국민건강에 영향을 미칠 뿐만 아니라 생산성의 악화로 인한 사례들이 발표되고 있다.

양식장내 환경은 물의 유동이 적고, 폐쇄성이 강한 지역

으로서 유기물과 질소와 인의 영양염류 농도가 높고, 양식어류의 밀도가 높기 때문에 수질이 악화되기 쉬운 환경에 처해있는 경우가 많다(3). 더욱이 양식어류의 성장과 관련하여 질소와 인은 주로 양식 사료의 단백질로 공급되어지고 적절하게 처리되지 못한 여분의 사료와 양식어류의 분변에서 유래되어 수질 오염을 더욱 가속화 시키는 것으로 알려져 있다(4, 5). 또한 높은 농도의 질소와 인은 독성으로 작용하여 양식어류에게 직접적으로 질병을 유발시킨다. 고농도의 비이온화 암모니아는 양식어류의 아가미를 손상시키고, 혈액내 산소 운반 능력을 감소시키며, 적혈구와 조직에 손상을 가져와 어류내 삼투조절을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 고농도의 아질산염은 정상적인 염화물 수송 기작에 의해 아가미를 통해 들어간 후 혈액내 헤모글로빈내 철을 산화시켜 메트헤모글로빈이 형성시키고, 메트헤모글로빈이 많아지면 산소운반 능력을 저해하여 집단 폐사의 원인이 된다(6-8). 질산염은 무기질소 화합물 중 독성이 가장 적은 것으로 알려져 있지만, 고농도의 질산염도 어류의 삼투압 조절과 산소운반 능력을 저해시켜 독성을 나타내는 것으로 보

† Corresponding Author : Department of Life Science, Soonchunhyang University, P.O.Box 97, Asan, Chung-Nam 336-600, Korea

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

E-mail : kyeheon@sch.ac.kr

고되었다(9).

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 관하여 많은 관심이 집중되고 있다(10-12). Grommen 등(13)은 실험용 양식장내에 10 mg/L의  $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_2^-$ 를 처리하고 질화 세균 컨소시엄 (nitrifying microbial consortium)을 접종하여 4일 이내에 완전히 제거되었다고 보고하였다. 또한 Queiroz 등(14)은 probiotic으로 *Bacillus* 종을 메기 양식장내에 접종한 결과, 양식장내 수질이 개선되어 메기의 생산과 생존율이 증가하는 것을 확인하였다.

현재 양식이 발달한 일부 국가에서는 probiotics를 개발하여 이를 양식장의 수질환경 개선에 적용시켜 생산성 증대에 크게 기여하고 있는 것으로 알려져 있으나, 우리나라에서는 상대적으로 매우 미미한 실정이다. 우리나라의 양식산업에서 필요로 하는 probiotics는 주로 외국에서 수입하여 사용하고 있으며 이에 의한 국내 양식장 수계의 미생물계가 교란된다는 보고가 있다(15). 해외 생물종으로서 우리나라에서는 효율적인 수질개선 효과가 기대하는 만큼 보고 되어 있지 않은 실정이다. 이러한 여러 가지 상황을 고려하여 볼 때 우리나라의 양식장에서 효과적인 probiotics를 발굴하고 특성을 연구하여 국내 실정에 맞는 미생물제제로 상품화하여 양식장 수질환경을 사용할 필요성이 심각하게 제기되고 있다.

본 연구에서는 새우양식에 질소와 인을 효율적으로 제거하는 유용한 probiotics를 개발할 목적으로 국내 양식장에서 CK-10과 CK-13을 분리하여 특성조사를 하였으며, 질소와 인의 미생물학적 제거 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 세균의 확보 및 배양 조건

충남 태안군 소재 순천향대학교 부설 해양수산 연구소 새우양식장에서 채취한 물시료로부터 질소와 인을 효율적으로 제거하는 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13을 분리·동정하였다. 배양에 사용된 배지는 1 L의 인공해수(aquarium system, Instant Ocean, Sarrebourg, France)에 탄소원으로 2 mM glucose와 2 mM fructose를 첨가하여 기본배지로 사용하였으며, 여기에 질소원으로 각각 200  $\mu\text{M}$ -400  $\mu\text{M}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NaNO}_2$ , 또는  $\text{NaNO}_3$ , 그리고 인원으로 125  $\mu\text{M}$ -500  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 첨가하여 분리세균에 의한 질소 또는 인(N/P)의 제거 실험을 실시하였다. 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 160회로 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, 그람 염색 후 위상차 현미경으로 세균의 형태학적 특성을 조사하였다. 분리 세균의 생리 화학적 특성은 알려진 방법에 의하여 실시하였다(16).

분리 세균 JK-8의 동정은 여러 가지 생리생화학적 시험과 GP2 Microplate™ Identification System (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 동정하였다. 사용된 배지는 BUG agar와 5%의 sheep blood를 혼합한 plate에서 순수 배양한 균주를 GP inoculation fluid에 옮겨 현탁하였다. 세균 현탁액을 Biolog Turbidimeter (BIOLOG, Hayward, USA)를 이용하여 20%까지 맞추고 GP2 MicroPlate의 96개의 well에 각각 150  $\mu\text{l}$ 씩 분주하였고, 30°C에서 4-6시간 동안 배양하였다. 배양된 MicroPlate의 결과는 직접 확인하였으며, MicroLog™ database software를 통해 동정하였다.

### 질소와 인 측정

분리세균 CK-10 또는 CK-13에 의한 질소제거는 배양액 중에 잔존하는  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ 의 양을 측정하여 확인하였다.  $\text{NH}_4^+$ 는 발색 정량방법인 indophenol blue 방법(17),  $\text{NO}_2^-$  제거는 Griess reaction 방법(18), 그리고  $\text{NO}_3^-$  제거는 brucine 방법을 이용하여 각각 측정하였다(19). 또한 배양액 중에 잔존하는  $\text{PO}_4^{3-}$ 의 양은 molybdate-blue 방법을 이용하여 측정하였다(5).

## 결과 및 고찰

### 질소와 인 제거 세균의 분리

새우양식장에서 채취한 물시료로부터 농화 배양기법을 통하여 얻어진 미생물 컴소시엄에서 질소원으로  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , 또는  $\text{NO}_3^-$ 를, 그리고 인원으로  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 포함하는 무기 고체 평판 배지에 수 차례에 걸친 계대를 통하여 질소와 인의 제거능을 가지는 두 개의 단일 세균을 분리하고 이들 균주를 각각 CK-10과 CK-13으로 명명하였다. 이렇게 선별된 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 CK13은 모두 간상형이었으며 그람 양성으로 나타났다. 생리 화학적 시험에서 두 분리세균은 indole 형성 유무시험, methyl red 시험, MR-VP 시험에서 음성을 나타내었으며, disulfhydrase에 의한  $\text{H}_2\text{S}$ 의 형성 시험에서도 음성반응을 나타내었다. 또한 탄소원과 에너지원으로 citrate의 이용여부를 알아보는 citrate 이용시험은 음성으로 나타났으며, litmus milk 시험에서는 단백질을 분해하였으며, 펩톤화(peptonization)는 되지 않았다. 이들 분리세균은 gelatinase, amylase 그리고 catalase의 존재 여부 시험은 모두 양성반응이었으나, urease의 존재 여부 시

험에서 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 사용하였고, 그 결과를 Table 1과 Table 2에 각각 나타내었

**Table 1.** Physiological and biochemical characterization of the isolate CK-10 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests			
Water	-	D-Tagatose	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	+	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	+	D-Xylose	-
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	+	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	-
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
N-Acetyl-D-mannosamine	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	+
amygdain	+	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Alabinose	-	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	+
Arbutin	+	L-Lactic acid	+
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	+
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	+	Mono-methylsuccinate	+
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	-
Gentiobiose	+	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	+	Succinamic acid	+
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	+
m-Inositol	-	N-Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	-
Lactulose	-	D-Alanine	+
Maltose	+	L-Alanine	+
Maltoriose	+	L-Alanyl-glycine	+
D-Mannitol	+	L-Asparagine	+
D-mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	+	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	+	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-serine	+
$\beta$ -Methyl d-galactoside	-	Putrescine	-
3-Methyl glucose	+	2,3-Butanediol	+
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	+	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	+
Palatinose	+	Inosine	+
D-Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	+
L-Rhamnose	-	adenosine-5'-monophosphate	-
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	+
D-Salicin	+	Urudine-5'-monophosphate	-
Sedohepulosan	-	Fructose-6-phosphate	-
D-Sorbitol	+	Glucose-6-phosphate	-
Stachyose	+	Glucose-6-phosphate	-
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	+

다. MicroLog™ database software를 이용하여 분석한 결과, CK-10은 *Bacillus subtilis*로 CK-13은 *Bacillus thuringiensis*로 각각 동정되었으며, 본 연구에서는 이들 분리 세균에 대하여 *Bacillus* sp CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13으로 명명하였다.

### 단일배양과 혼합배양에 의한 $\text{NH}_4^+$ 의 제거

단일배양 또는 혼합배양에 의한 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 또는 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ 의 제거율을 조사하였다. 단일배양 *Bacillus* sp.

**Table 2.** Physiological and biochemical characterization of the isolate CK-13 using the BIOLOG Analysis System

Physiological & biochemical tests			
Water	-	D-Tagatose	-
$\alpha$ -Cyclodextrin	-	D-Trehalose	+
$\beta$ -Cyclodextrin	-	Turanose	+
Dextrin	+	Xylitol	-
Glycogen	+	D-Xylose	+
Inulin	-	Acetic acid	+
Mannan	+	$\alpha$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 40	+	$\beta$ -Hydroxybutyric acid	+
Tween 80	+	$\gamma$ -Hydroxybutyric acid	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	$\rho$ -Hydroxyphenyl acetic acid	-
N-Acetyl-D-mannosamine	+	$\alpha$ -Ketoglutaric acid	-
amygdain	-	$\alpha$ -Ketovaleric acid	+
L-Alabinose	+	Lactamide	-
D-Arabitol	-	D-Lactic acid methylester	+
Arbutin	-	L-Lactic acid	+
Cellobiose	+	D-Malic acid	-
D-Fructose	+	L-Malic acid	+
L-Fucose	-	Methylpyruvate	+
D-Galactose	-	Mono-methylsuccinate	+
D-Galacturonic acid	-	Propionic acid	+
Gentiobiose	-	Pyruvic acid	+
D-Gluconic acid	-	Succinamic acid	-
$\alpha$ -D-Glucose	+	Succinic acid	-
m-Inositol	-	N-Acetyl L-glutamic acid	+
$\alpha$ -D-Lactose	-	Alaninamide	+
Lactulose	-	D-Alanine	+
Maltose	+	L-Alanine	+
Maltoriose	+	L-Alanyl-glycine	+
D-Mannitol	-	L-Asparagine	+
D-mannose	+	L-Glutamic acid	+
D-Melezitose	-	Glycyl-L-glutamic acid	+
D-Melibiose	-	L-Pyroglutamic acid	+
$\alpha$ -Methyl D-galactoside	-	L-serine	+
$\beta$ -Methyl d-galactoside	-	Putrescine	+
3-Methyl glucose	+	2,3-Butanediol	+
$\alpha$ -Methyl D-glucoside	-	Glycerol	+
$\beta$ -Methyl D-glucoside	-	Adenosine	+
$\alpha$ -Methyl D-mannoside	-	2-Deoxyadensine	-
Palatinose	+	Inosine	+
D-Psicose	+	Thymidine	+
D-Raffinose	+	Uridine	+
L-Rhamnose	-	adenosine-5'-monophosphate	+
D-Ribose	+	Thymidine-5'-monophosphate	+
D-Salicin	+	Urudine-5'-monophosphate	+
Sedohepulosan	-	Fructose-6-phosphate	+
D-Sorbitol	-	Glucose-6-phosphate	-
Stachyose	-	Glucose-6-phosphate	+
Sucrose	+	D-L- $\alpha$ -Glycerolphosphate	+

CK-10의 경우 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NH}_4^+$ 를 36시간 이내에 제거하였고, 300  $\mu\text{M}$ 과 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ 를 48시간과 60시간 이내에 완전히 제거하였다(Fig. 1A). 또한 단일배양 *Bacillus* sp. CK-13에서는 200  $\mu\text{M}$ 과 300  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NH}_4^+$ 를 12시간 이내에, 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NH}_4^+$ 를 24시간 이내에 완전히 제거하였다. CK-13은 CK-10에 비하여 높은  $\text{NH}_4^+$  제거능을 나타내었다(Fig. 1B). 반면에 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양 (co-culture)에 의한  $\text{NH}_4^+$  제거율을 조사한 결과 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NH}_4^+$ 는 배양 12시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다. 혼합배양에 의한  $\text{NH}_4^+$  제거는 단일 배양에 의한 것보다 탁월한 것으로 조사되었다(Fig. 1C).

### 단일배양과 혼합배양에 의한 $\text{NO}_2^-$ 의 제거

단일배양 또는 혼합배양에 의한 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 또는 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ 의 제거율을 조사하였다. 단일배양 *Bacillus* sp. CK-10에서 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_2^-$ 를 24시간 이내에 제거하였고, 300  $\mu\text{M}$ 과 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_2^-$ 를 36시간 이내에 완전히 제거하였다(Fig. 2A). 단일배양 *Bacillus* sp. CK-13에서는 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_2^-$ 를 12시간 이내에 완전히 제거하였다. 본 연구를 통하여  $\text{NH}_4^+$ 에서와 마찬가지로 CK-13은 CK-10에 비하여  $\text{NO}_2^-$ 의 제거율에서도 높은 것으로 나타났다(Fig. 2B). 반면에 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양에 의한  $\text{NH}_4^+$  제거율을 조사한 결과, 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  그리고 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_2^-$ 는 배양 12시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다.

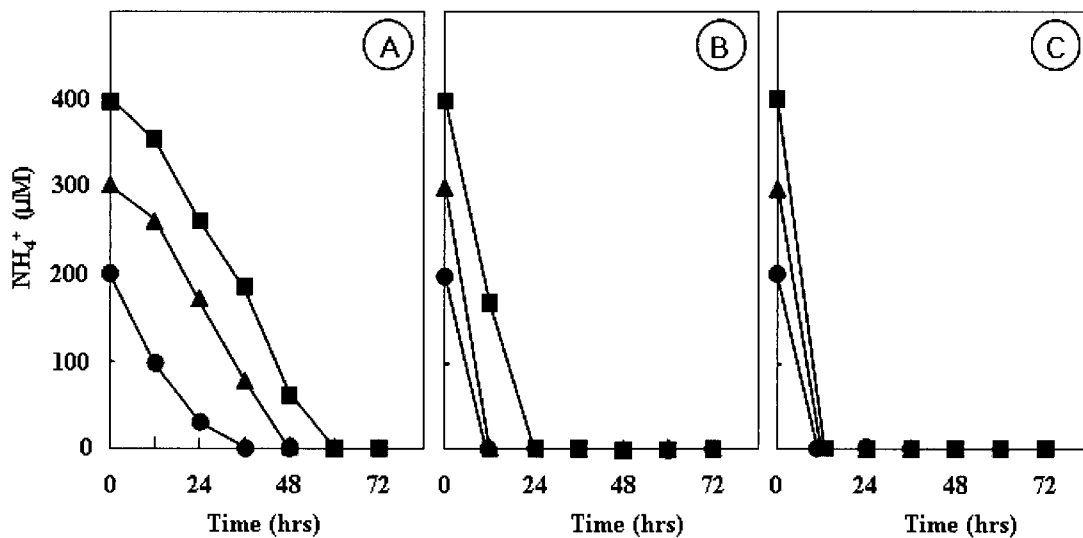


Figure 1. Changes in concentrations of residual  $\text{NH}_4^+$  in the single culture, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13, and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with 200  $\mu\text{M}$  (●), 300  $\mu\text{M}$  (▲), and 400  $\mu\text{M}$  (■)  $\text{NH}_4^+$  as nitrogen source.

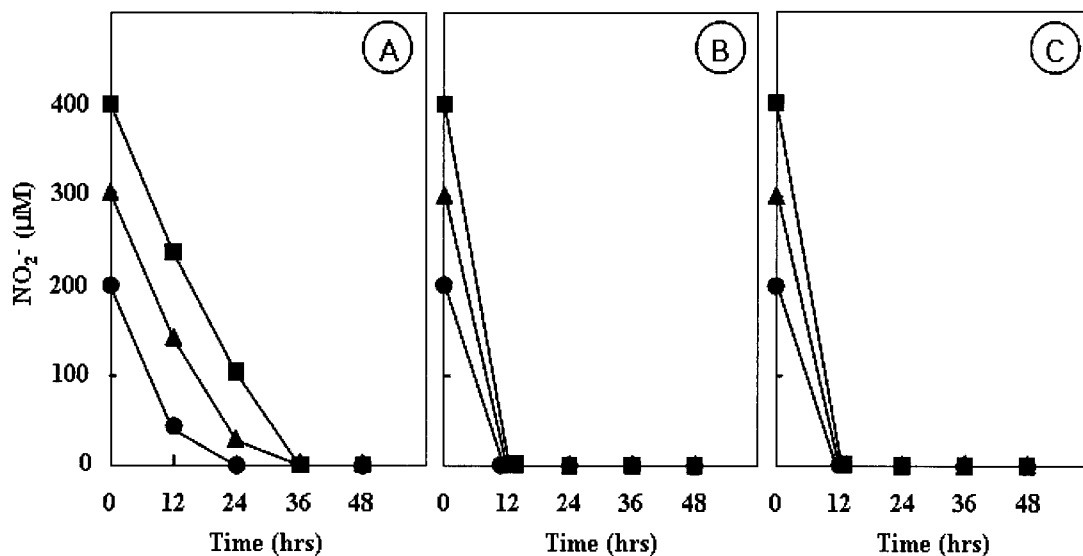


Figure 2. Changes in concentrations of residual  $\text{NO}_2^-$  in the single culture, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13, and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with 200  $\mu\text{M}$  (●), 300  $\mu\text{M}$  (▲), and 400  $\mu\text{M}$  (■)  $\text{NO}_2^-$  as nitrogen source.

본 연구에서 혼합배양에 의한  $\text{NO}_2^-$  제거와 CK-13의 제거 능이 동일하게 조사되었다(Fig. 2C).

#### 단일배양과 혼합배양에 의한 $\text{NO}_3^-$ 의 제거

단일배양 또는 혼합배양에 의한 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$ , 또는 400  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ 의 제거율을 조사하였다. 단일배양 *Bacillus* sp. CK-10에서 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 60시간 이내에 제거하였고, 300  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 72시간 이내에 완전히 제거하였다. 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 는 72시간 지난 후 약 80%가 제거되었다(Fig. 3A). 단일배양 *Bacillus* sp. CK-13에서는 200  $\mu\text{M}$ , 300  $\mu\text{M}$  그리고 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 36, 48 그리고 60시간 이내에 각각 완전히 제거하였다. 본 연구를 통하여 CK-13은 CK-10에 비하여 높은  $\text{NO}_3^-$ 의 제거능을 나타내었다(Fig. 3B). 반면에 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양에

의한  $\text{NH}_4^+$  제거율을 조사한 결과, 200  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 를 24시간 이내에 완전히 제거하였고, 300  $\mu\text{M}$ 과 400  $\mu\text{M}$ 의  $\text{NO}_3^-$ 는 배양 36시간 이내에 완전히 제거되었다. 본 연구에서 혼합배양에 의한  $\text{NO}_3^-$  제거는 단일 배양에 의한 것보다 월등히 높은 것으로 조사되었다(Fig. 3C).

#### 단일배양과 혼합배양에 의한 $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거

단일배양 또는 혼합배양에 의한  $\text{PO}_4^{3-}$ 의 제거율을 조사하였다. 단일배양 *Bacillus* sp. CK-10에서 125  $\mu\text{M}$ 과 250  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 12시간과 24시간 이내에 제거하였고, 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 48시간 이내에 완전히 제거하였다(Fig. 4A) 단일배양 *Bacillus* sp. CK-13에서는 125  $\mu\text{M}$ 과 250  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 24시간과 36시간 이내에 각각 제거하였고, 500  $\mu\text{M}$ 의  $\text{PO}_4^{3-}$ 를 60시간 이내에 완전히 제거하였다. 본 연구를 통하여 CK-10은

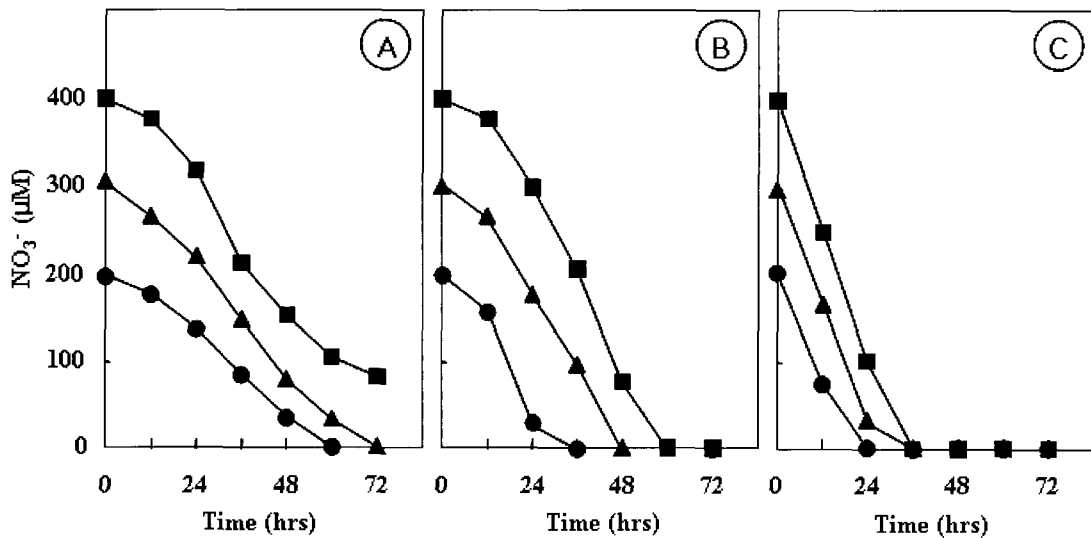


Figure 3. Changes in concentrations of residual  $\text{NO}_3^-$  in the single culture, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13, and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with 200  $\mu\text{M}$  (●), 300  $\mu\text{M}$  (▲), and 400  $\mu\text{M}$  (■)  $\text{NO}_3^-$  as nitrogen source.

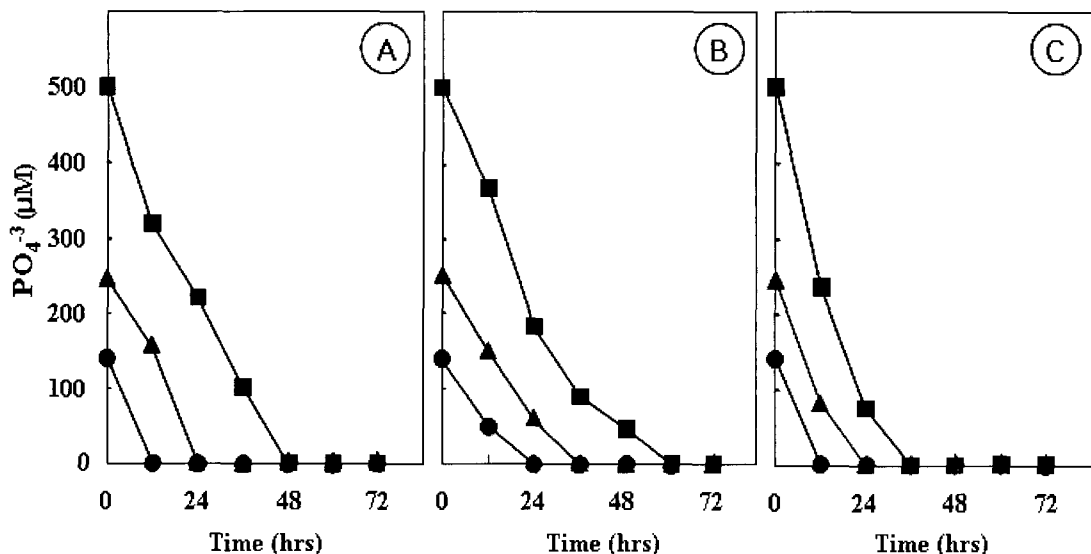


Figure 4. Changes in concentrations of residual  $\text{PO}_4^{3-}$  in the single culture, *Bacillus* sp. CK-10 (A) or *Bacillus* sp. CK-13, and co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13 (C) growing with 125  $\mu\text{M}$  (●), 250  $\mu\text{M}$  (▲), and 500  $\mu\text{M}$  (■)  $\text{PO}_4^{3-}$  as phosphorus source.

CK-13에 비하여 높은  $PO_4^{3-}$ 의 제거능을 보여주었다(Fig. 4B). 반면에 두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양 (co-culture)에 의한  $NH_4^+$  제거율을 조사한 결과, 125  $\mu M$ 과 250  $\mu M$ 의  $PO_4^{3-}$ 를 12시간과 24시간 이내에 완전히 제거하였고, 500  $\mu M$ 의  $PO_4^{3-}$ 는 배양 36시간 이내에 완전히 제거되는 것이 관찰되었다. 이 실험을 통하여 혼합배양은 단일배양에 비하여  $PO_4^{3-}$ 를 효율적으로 제거하는 것으로 조사되었다(Fig. 4C).

**혼합배양에 의한 질소 및 인의 동시 제거**

두 가지 분리세균 *Bacillus* sp. CK-10과 *Bacillus* sp. CK-13의 혼합배양을 이용하여 성장, 배양기간 중의 pH 변화, 그리고  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ 와  $PO_4^{3-}$ 의 동시제거 실험을 12시간 간격으로 측정하였다(Fig. 5). 혼합배양은 12시간 지난 후부터 자라기 시작하여 24-36시간 범위 내에서 빠른 성장을 보였으며, 균주가 성장하는 동안 pH는 다소 감소하였다가 증가하여 48시간 경과 후 8.12로 측정되었다. 400  $\mu M$ 의 질소와 500  $\mu M$  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(Fig. 5).

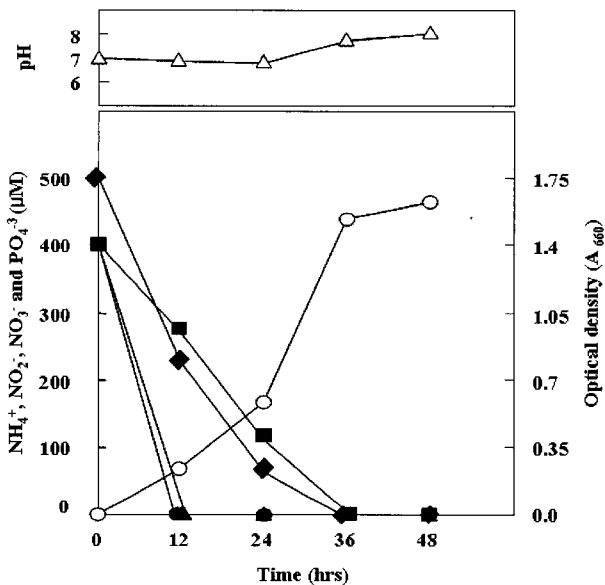


Figure 5. Changes in concentrations of residual 400  $\mu M$   $NH_4^+$  (●), 400  $\mu M$   $NO_2^-$  (▲), 400  $\mu M$   $NO_3^-$  (■), and 500  $\mu M$   $PO_4^{3-}$  (◆) in co-culture, *Bacillus* sp. CK-10 and *Bacillus* sp. CK-13. Growth of the test culture measured as cell density at 660 nm (○) and pH (△).

최근에 미생물을 이용한 probiotics의 장점이 세계적으로 주목받고 있으며, 이를 이용하여 양식장내의 수질을 개선하는 미생물에 대한 연구가 진행되고 있다(20). 본 연구에서 질소와 인 제거를 위해 분리된 균주 CK-10과 CK-13은 BOLOG사의 GP2 Microplate™ system을 이용하여 세균의 특성을 각각 분석하여, *Bacillus subtilis*와 *Bacillus thuringiensis*로 동정되었다. 일반적으로 *Bacillus* 속은 내생포자를 형성하는 간균으로서 분해능이 왕성하여 단백질, 전분, 지방 등을 빠르게 분해시키고, 부유물질에 대한 흡착성 및 점착성이 있어 플록 (floc)이 형성되어 분해를 촉진시키며 암모니아,

황화수소, 아민류 등을 직접 이용 또는 분해하여 질소, 인 및 악취제거에 유용하게 사용될 뿐만 아니라 해수에서 영양염의 순환을 향상시켜 세균과 미세조류 간의 균형을 유지시켜 주며 양식생물에게 적합한 수질환경을 만들어주는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(21).

분리세균 CK-10과 CK-13을 단일배양으로 이용하여 질소 성분 ( $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ )과 인( $PO_4^{3-}$ )의 제거능을 확인한 결과, CK-10은 500  $\mu M$ 의  $PO_4^{3-}$ 를 48시간 내에 완전히 제거하여 CK-13보다 인 제거율이 높았으며, CK-13은 위에 동일한 조건에서  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$ 를 각각 24시간, 12시간, 60시간내에 완전히 제거하여 CK-10보다 질소성분 제거율이 높은 것으로 확인되었다. CK-10은 인을 효율적으로 제거하였으며, CK-13은 질소를 효율적으로 제거하는 것으로 확인되었으며, 이 두 가지 균주를 혼합배양 (co-culture)하였을 경우에 질소와 인을 제거하는데 있어서 시너지 효과 (synergic effect)를 나타내는 것으로 생각된다. Rengpipat 등(22)은 1.67 mg/L  $NH_4^+$ 와 2.5 mg/L  $NO_2^-$ 가 포함된 소규모의 새우양식장에 *Bacillus* sp. S11를 처리하여, 7일이 경과한 후  $NH_4^+$ 와  $NO_2^-$ 는 거의 제거되었다고 보고하였다. Hoffmann 등(23)은 *Bacillus subtilis*가 혐기적 조건에서 nitrite reductase에 의해  $NO_3^-$ 를  $NO_2^-$ 와  $NH_4^+$ 로 전환시키고,  $NO_2^-$ 를  $NH_4^+$ 로 전환시켜 이용한다고 확인하였으며, Mevel 등(24)은 해양에서 분리한 호열성 (thermophilic) *Bacillus* sp. MS30은 최적온도 상태에서  $NH_4^+$ 를 1.13  $\mu M$ 씩 흡수하여 100  $\mu M$ 의  $NH_4^+$ 를 배양 24시간 이내에 완전히 제거하는 것을 확인하였다. 이러한 연구들에서 보여주는 바와 같이, 지금까지 미생물학적 N/P 제거에 관한 많은 연구가 발표되어 왔으나 사용된 N/P의 농도가 상대적으로 낮아서 실제 양식장에 적용하는데 경제성 문제가 제기되어왔다. 이러한 측면에서 본 연구에서의 CK-10과 CK-13은 고농도의 질소를 제거하는데 많은 장점이 있을 것으로 판단된다.

또한 Ghigliazza 등(25)은 *Acinetobacter lwoffii*는 900  $\mu M$ 의  $PO_4^{3-}$ 을 8일동안 약 85% 정도 제거하는 것을 보고하였다. 본 실험에서 사용한 분리균주 CK-10은 500  $\mu M$ 의  $PO_4^{3-}$ 을 48시간 만에 완전히 제거시켰는데, 이 결과는 단위시간에  $PO_4^{3-}$ 의 제거율이 *Acinetobacter lwoffii*에서의 결과보다 우수한 것으로 입증되었다. 더욱이 CK-10과 CK-13은 동시에  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ ,  $NO_3^-$  등의 질소도 효율적으로 제거시키기 때문에 매우 유용한 probiotics로 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

혼합배양은 각 단일배양이 가지는 N/P의 제거능력보다도 상당히 향상된 시너지 효과를 가져오는 것을 알 수 있다. 본 연구에서도 CK-10과 CK-13의 혼합배양이 각 단일배양에 의한 N/P의 제거능력보다도 동일 농도에서 제거기간을 상당히 단축시켜 N/P에 오염된 양식장의 수질환경을 빠르게 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구는 향후 이들 분리세균을 실제 양어장에 적용시켜 수질환경개선을 위한 probiotics로 활용하는 방향으로 진행될 것이다.

**요 약**

세균배양이 해양환경정화를 궁극적인 목적으로 사용 가능한지에 대하여 조사하였다. 본 연구는 새우양식장에서 분리

한 균주 CK-10과 CK-13을 이용하여 질소와 인을 제거하는 연구이다. BIOLOG 시험을 통하여 세균들은 *Bacillus subtilis* CK-1과 *Bacillus* sp. CK-13으로 각각 명명되었다. 호기적 조건하에서 단일 N/P 원으로서 질소 ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ )와 인 ( $\text{PO}_4^{3-}$ )의 제거에 대한 연구가 CK-10이나 CK-13의 단일배양에 의하여 수행되었다. 주어진 배양기간 이내에 100-400  $\mu\text{M}$  농도범위에 있는  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , 또는  $\text{NO}_3^-$ 의 완전제거가 단일 배양과 혼합배양에서 이루어졌다. 125-599  $\mu\text{M}$  농도의  $\text{PO}_4^{3-}$ 을 포함하는 배양에서 유사한 결과가 얻어졌다. 혼합배양에서 N/P의 동시제거 실험을 실시하였다. 그 결과, 400  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ 와  $\text{NO}_2^-$ 는 12시간 이내에 제거되었고,  $\text{NO}_3^-$ 는 36시간 이내에 각각 제거되었으며, 500  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$ 도 36시간 이내에 제거되었다. 이 연구를 통해서 혼합배양은 N/P의 동시 제거율을 크게 향상시키는 것으로 확인되었다.

## 감 사

본 연구는 해양수산부의 수산특정연구개발사업의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

- 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.
- Kim, G. K. and T. J. Jeong (2003), A study on eutrophication control in coastal area of Gunsan, *J. Environ. Sci.* **12**, 957-966.
- Kang, Y. H. and T. H. Yoon (2004), Nitrogen dynamic and growing of shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) in the high density aquaculture ponds, *J. Kor. Fish. Sci.* **37**, 24-32.
- Kioussis, D. R., F. W. Wheaton, and P. Kofinas (2000), Reactive nitrogen and phosphorus removal from aquaculture wastewater effluents using polymer hydrogels, *Aqua. Eng.* **23**, 315-332.
- Sudo, S., A. Yamada, K. Kokatsu, N. Nakamura, and T. Matsunaga (1997), Development of a phosphate-removal system using a marine photosynthetic bacterium *Chromatium* sp., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**, 78-82.
- 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, *Aquacultural Engineering* **21**, 139-150.
- Uemoto, H. and H. Saiki (1996), Nitrogen removal by tubular gel containing *Nitrosomonas europaea* and *Paracoccus denitrificans*, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4224-4228.
- 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.
- Jensen, F. B. (1996), Uptake, elimination and effects of nitrite and nitrate in freshwater crayfish (*Astacus astacus*), *Aquatic Toxicol.* **34**, 95-104.
- Gatesoupe, F. J. (1999), The use of probiotics in aquaculture, *Aquaculture* **180**, 147-165.
- 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.
- Sauthier, N., A. Grasmick, and J. P. Blancheton (1998), Biological denitrification applied to a marine closed aquaculture system, *Water Res.* **32**, 1932-1938.
- Grommen, R., I. V. Hauteghem, M. V. Wambeke, and W. Verstraete (2002), An improved nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria systems, *Aquaculture* **211**, 115-124.
- Queiroz, J. and C. Boyd (1998), Effects of a bacterial inoculum in channel catfish ponds, *J. World Aquaculture Soc.* **29**, 67-73.
- 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.
- Gerhart, P., R. J. Fellows, D. C. Cataldo, R. M. Nester, W. A. Wood, N. R. Kreig, and G. B. Phillips (1981), Methods for General and Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology USA.
- 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.
- 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.
- Rhee, J. S., Y. S. Kim, Y. H. Jung, and H. J. Rhee (1997), A study on the determination of N ( $\text{NO}_2^-$ ), N ( $\text{NO}_3^-$ ) and N ( $\text{NH}_4^+$ ) in environmental samples by flow injection analysis, *J. Kor. Chem. Sci.* **41**, 256-265.
- Moriarty, D. J. W. (1997), The role of microorganisms in aquaculture ponds, *Aquaculture* **151**, 333-349.
- 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.
- 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.
- Hoffmann, T., N. Frankenverg, M. Marino, and D. Jahn (1998), Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on *resDE*, *J. Bacteriol.* **180**, 186-189.
- 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.
- Ghigliazza, R., A. Lodi, and M. Rovatti (1999), Phosphorus removal in aerated stirred tank reactor, *Bioprocess Engineering* **20**, 257-262.