

BFT 시스템 사육 수에서 분리한 *Bosea* sp.의 아질산 제거 특성과 활용

이혜진^{1,4} · 김효원² · 김명희¹ · 김대중² · 김광현³ · 배선헤⁵ · 이규태⁶ · 한창희^{1*}

¹동의대학교 분자생물학과, ²국립수산물품질관리원 양식관리과, ³동의대학교 생명응용학과, ⁴농림축산검역본부 조류질병과,
⁵국립수산물품질관리원 서해수산업연구소 양식산업과, ⁶주네오엔비즈

Nitrite Removal Characteristics and Application of *Bosea* sp. Isolated from BFT System Culture Water

Hye-Jin Lee^{1,4}, Hyo-Won Kim², Myung-Hee Kim¹, Dae-Jung Kim², Kwang-Hyun Kim³, Sun-Hye Bae⁵,
Kyu-Tae Lee⁶ and Chang-Hee Han^{1*}

¹Department of Molecular Biology, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

²Aquaculture Management Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

³Department of Life Science and Biotechnology, Dong-eui University, Busan 47340, Korea

⁴Avian Disease Division, Animal and Plant Quarantine Agency, Gimcheon 39660, Korea

⁵West Sea Fisheries Research Institute, National Institute of Fisheries Science, Taean 32132, Korea

⁶NeoEnBiz corporation, Bucheon Daewoo Technopark, Bucheon 14523, Korea

This study was performed to isolate bacteria that could control the nitrite levels in a biofloc technology (BFT) culture tank. Nitrite-eliminating bacteria were isolated from a BFT culture tank rearing goldfish, and the isolated bacterium exhibiting the most potent nitrite eliminating ability was labeled as the “NOBSB1” strain. Sequencing the 16S rRNA revealed that NOBSB1 is a species in the genera *Bosea*. NOBSB1 had the following characteristics with regard to nitrite removal: (1) it removed nitrite by functioning heterotrophically in the presence of a carbon source (sugars); (2) it eliminated nitrite most effectively within a temperature range of 20-30°C, but its activity decreased at temperatures above 35°C and below 20°C; (3) it had optimum nitrite removal ability within a pH range of 6.0-8.0; (4) it removed nitrite more effectively under hypoxic than aerobic conditions. NOBSB1 inoculation did not decrease ammonia or nitrate levels, but eliminated nitrite in a BFT culture tank rearing common carp (*Cyprinus carpio*). After inoculating the NOBSB1 strain in a BFT culture tank, NOBSB1 controlled and sufficiently reduced the nitrite concentration in the tank.

key word : *Bosea* sp., Nitrite removal, BFT, *Cyprinus carpio*

서론

전 세계적으로 어업에 의한 수산물 생산량은 매년 평균 0.7%씩 감소한 반면, 양식에 의한 수산물 생산은 매년 5.2-7.7%씩 증가하고 있어(FAO, 2013) 수산양식산업은 많은 나라에서 중요한 산업의 한 분야가 되어있다. 우리나라도 연근해 어업 생산량은 최근 10년간 4.7% 감소한 반면 양식생산량은 31.3%나 증가하여(MOF, 2016) 수산업이 어업 위주에서 양식으로 변화하고 있는 추세이다. 그렇지만 이러한 양식 산업의 발전으로 인해 주변 환경의 부영양화에 의한 생태계 파괴 등의 여러 가지 부작용

도 초래되고 있다(Eng et al., 1989; Boyd, 2003). 최근에는 이러한 환경오염에 대한 문제점들을 해결하면서 양식 생산성을 높일 수 있는 방법으로 사육수를 거의 배출하지 않는 순환여과식 양식 시스템이나 biofloc을 활용한 BFT (biofloc technology) 양식 시스템을 활용하고 있다(Bovendeur et al., 1987; Buckling et al., 1993; Funge-Smith and Phillips, 2001; Avnimelech, 2009). 수산동물의 양식장에 사용하는 사료는 대부분 높은 단백질 함유하고 있으며, 이러한 사료를 먹은 양식동물이 내놓은 배설물과 여분의 사료는 양식장 수질 악화의 주요 원인이 되기 때문에 양식생물에게 치명적인 영향을 줄 수도 있다.

<https://doi.org/10.5657/KFAS.2017.0378>



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Korean J Fish Aquat Sci 50(4) 378-387, August 2017

Received 26 May 2017; Revised 16 June 2017; Accepted 5 July 2017

*Corresponding author: Tel: +82. 51-890. 1524 Fax: +82. 505. 182. 6870

E-mail address: chhan@deu.ac.kr

특히 순환 여과식 양식장과 BFT 시스템 양식장은 사육수를 거의 교환하지 않는 폐쇄식 방법이므로 양식생물의 배설물과 생물이 먹지 않고 남은 많은 양의 사료가 그대로 양식장 내에 남아있게 된다. 배설물과 사료에 함유된 유기질소화합물들은 암모니아를 거쳐 아질산이 발생하게 되고, 이러한 아질산은 어류에 심각한 생리장애를 일으킨다(Jensen, 2003; Kroupova et al., 2005). 특히 고밀도로 양식생물을 수용하여 사육할 경우에는 급격히 증가되는 아질산 농도로 인해 양식생물이 대량 폐사가 발생할 수도 있다. 그러므로 폐쇄식 양식시스템의 사육수에서 지속적인 아질산의 제거는 양식생물의 생산성 향상과도 직결되므로 순환 여과식 시스템이나 BFT 양식 시스템과 같은 폐쇄식 양식장에서는 반드시 해결해야할 중요한 문제 중에 하나이다(Avnimelech, 2009).

일반적으로 양식장에서 생성되는 아질산은 질소순환과정에서 세균들이 질화작용과 탈질작용을 통해 자연적으로 생성시키는 중간산물이다. 즉, 아질산은 산소가 공급되는 물에서는 질산으로(질화작용), 산소공급이 되지 않는 물에서는 질소가스로(탈질화작용) 변화한다(Bothe et al., 2000). 따라서 생물학적인 질화작용과 탈질화작용은 양식장의 사육수에서 아질산 성분을 제거하는 아주 중요한 과정이며, 질화작용은 다른 그룹의 세균에 의해 수행되는 2단계로 이루어지고 있다. 즉, 첫 번째는 자가영양세균인 암모니아산화세균(AOB; ammonia-oxidizing bacteria)이 암모니아를 아질산으로 산화시키는 단계이고, 두 번째는 자가영양세균인 아질산산화세균(NO; nitrite-oxidizing bacteria)이 아질산을 질산으로 산화시키는 단계다(Bock et al., 1992). 또한 탈질과정은 산소가 없고 전자공여자인 탄소원이 존재하는 상태에서 타가영양탈질세균에 의해 아질산/질산이 최종적으로 질소가스로 환원되는 과정이다.

지금까지 알려진 AOB에 속하는 자가영양세균에는 *Nitrosococcus*, *Nitrosocystis*, *Nitrosolobus*, *Nitrosomonas*, *Nitrosospora* 등이 알려져 있으며, NOB에 속하는 자가영양세균에는 *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* 등이 알려져 있다(Gerardi, 2002). 최근에는 수많은 종류의 타가영양세균들에 의한 수질정화에 대한 연구가 행해져 왔으며, 이들 중 *Acetobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Denitrobacillus*, *Enterobacter*, *Halobacterium*, *Pseudomonas*, *Spirillum*, *Xanthomonas* 속에 속하는 균주들을 대상으로 연구되었다(Gerardi, 2002). 대부분의 타가영양세균들은 질화과정과 탈질화 과정 둘 다 가지고 있으며(Zumft, 1997), 최근에는 호기적인 조건에서 탈질화과정을 효과적으로 수행하는 세균들도 분리되고 있다(Joo et al., 2006; Zhang et al., 2011; Yao et al., 2013). 또한 저 수온에서도 높은 활성을 가지는 종들도 발견되고 있다(Zou et al., 2014). 따라서 타가영양세균을 이용하면 상지에서 언급한 자가영양세균과는 달리 한 종류의 타가영양세균 만으로도 호기성 조건에서 유기 질소를 제거할 수 있기 때문에 최근에는 타가영양세균에 의한 질소제거에 대한 관심이 더욱 높아지고 있다.

특히 BFT 양식 시스템에서는 많은 양의 사료가 지속적으로 들어가기 때문에 생물에 독성을 갖는 질소화합물의 빠른 제거가 필요하다. 이를 위해서는 질산화 및 탈질화를 수행하는 타가영양세균의 빠른 증식이 이루어져야한다. 이는 사육수조에 질소에 대한 탄소(C/N)의 비율을 높임으로써 해결할 수 있다(Avnimelech et al., 1994, Avnimelech 2007). C/N 비율을 높이면 타가영양세균들의 동화율이 증가하여 양식생물들이 먹이로 활용할 수 있는 biofloc들도 많이 생성되어(Kuenen and Robertson, 1994; Emerenciano et al, 2012), 최근에는 타가영양세균에 의한 BFT 양식 시스템 운영에 많은 관심을 가지고 있다(De Schryver et al., 2008, Crab et al., 2012). 따라서 양식장의 사육수를 교환하지 않는 폐쇄식 양식장을 성공적으로 운용하기 위해서는 수온, pH 등의 물리화학적 요인을 조절하는 것도 중요하지만(Cho et al., 2015), 그 외에 그 양식장으로부터 아질산을 효과적으로 제거할 수 있는 타가영양세균의 균주들을 확보하여 이를 활용하는 것도 필요하다(Crab et al., 2012).

본 연구는 BFT 양식 시스템에 활용할 수 있는 타가영양세균의 균주 확보를 위해 양식장 사육수에서 발생하는 아질산을 효과적으로 제거할 수 있는 타가영양세균의 균주를 순수분리하고, 분리된 균주의 아질산 제거에 대한 특성들을 조사하였다. 그리고 분리된 균주가 어류를 사육하는 BFT 양식 시스템에서 아질산을 효과적으로 제거하는데 활용할 수 있는 지를 조사하기 위해 BFT 양식 시스템으로 잉어(*Cyprinus carpio*)를 사육하였으며, 아질산 농도가 높은 사육수조에서 배양된 균주를 투여하여 아질산 제거 및 잉어의 사육경과 일수에 따른 생존율을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주의 분리 및 동정

동의대학교 생물생산연구소에서 BFT 시스템으로 금붕어를 양식하는 수조로부터 타가영양세균인 아질산분해 균을 분리하기 위해 한국미생물보존센터(KCCM)에서 사용되는 *Nitrobacter winogradskyi* 배양용 KCCM41770 배지를 사용하였다. BFT 수조의 사육수(1.0 mL)를 채취하여 미리 준비된 멸균된 KCCM41770 배지(9 mL)가 함유된 시험관에 넣고 잘 혼합한 후, 새로운 멸균배지에 연속적으로 10배씩 희석시킨 후 28℃에서 2주간 배양시켰다. 가장 많이 희석된 시료에서 생육된 시험관을 취하여 미리 조제된 1% 설탕과 300 µM NaNO₂가 함유된 NB (Nutrient broth)한천배지에 도말(100 µL)한 후 배양(28℃, 1주)하여 형성된 colony들을 분리하였다. 분리된 균주들 중 아질산제거 능력이 있는 분리균주, NOBSB1을 얻었다.

분리균주의 종 동정을 위해 NB배지에서 하룻밤 동안 진탕배양(30℃)시킨 후 원심분리하여 균체를 모은 후 RNA를 추출하고 (주)솔젠트에 의뢰하여 16S rRNA gene에 대한 염기서열을 분석하였다. 이 분석된 유전자서열은 database들(GenBank,

EMBL, DDBJ, PDB)을 이용하여 Align과 Blast search를 행하여 선별된 NOBSB1균주를 동정하였다.

분리균주의 배양

먼저 NB배지 30 mL을 100 mL용 삼각플라스크에 넣고 멸균 후, NOBSB1균주를 접종하여 하루 동안 28℃에서 배양하였다. 다음날 배양된 균주를 원심분리(4℃, 8000 rpm, 10 min)하여 균체를 모았으며, 모아진 균체는 멸균된 PBS (phosphate buffer saline)에 3회 세척한 뒤, 다시 멸균된 PBS에 흡광도(A600)가 2.0이 되게끔 현탁하였으며, 이를 분리균주의 아질산 제거능력 조사에 사용하였다. 그리고 BFT 양식 시스템의 아질산 저감 효과에 적용하는 시험을 위해서는 1 L의 배양용기에 NB배지 500 mL를 넣어 NOBSB1균주를 접종하여 배양하였으며, BFT 시스템 수조에 미생물을 접종할 때는 PBS로 배양액의 흡광도(A600)가 1.0이 되도록 조절하였다. 이때 균체의 세균 수는 평판계수법으로 측정하였으며, 이때 세균 수는 2.8×10^9 CFU/mL이었다.

NOBSB1 균주에 대한 아질산 제거능력 실험

분리된 균주의 아질산 제거능력 실험은 100 mL용 삼각플라스크를 사용하였으며, 삼각플라스크에 300 μ M NaNO₂가 함유된 NB배지 50 mL에 멸균된 PBS에 현탁한 NOBSB1 균주를 각각 10%가 되도록 접종하여 실험하였다. 모든 실험은 5반복으로 실행하였으며, 1-3시간 간격으로 잔존하는 아질산 농도를 측정하였다. 당 농도에 따른 아질산 제거 능력을 조사하기 위해 300 μ M NaNO₂가 함유된 NB배지 50 mL에 sucrose를 0%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0%가 되도록 첨가하여 멸균한 뒤, NOBSB1균주를 접종하고 30℃에서 정지 배양시킨 후 3시간 간격으로 배지에 남아있는 아질산 농도를 측정하였다.

온도에 따른 아질산 제거 능력을 조사하기 위해 0.1% sucrose와 300 μ M NaNO₂가 함유된 NB배지 50 mL에 NOBSB1균주를 접종하고 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃에서 각각 정지 배양하였으며, 배지내의 아질산의 농도는 2시간 간격으로 측정하였다. pH에 따른 아질산 제거 능력을 조사하기 위해 0.1% sucrose와 300 μ M NaNO₂가 함유된 NB배지 50 mL를 HCl과 NaOH를 이용해 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 그리고 8.0으로 pH를 조절하여 멸균한 뒤, 각 실험구마다 NOBSB1균주를 접종하여 30℃에서 정지 배양하였으며, 배지내의 아질산의 농도는 3시간 간격으로 측정하였다.

배양 방식에 따른 아질산 제거 능력을 조사하기 위해 0.1% sucrose와 300 μ M NaNO₂가 함유된 NB배지 50 mL를 pH 6.0으로 조절하고 멸균한 뒤, 각 실험구마다 NOBSB1균주를 접종하고 30℃에서 정지배양과 진탕배양으로 배양하면서 3시간 간격으로 아질산의 농도를 측정하였다.

BFT 양식 시스템에 적용

BFT 시스템 물 만들기는 동의대학교 생물생산연구실 내에 설

치한 3개의 사각수조(100 cm^W × 100 cm^L × 100 cm^H)에 담수 700 L를 넣어 수온을 28℃로 유지하면서 실시하였다. Biofloc 환경을 조성하기 위하여 매일 단백질함량 54%인 배양어사료를 21.0 g씩 넣어주었으며, 수조 내의 C/N ratio가 약 10이 되도록 유지하기 위해 탄소원으로 glucose를 사료 넣을 때 마다 22 g을 넣어주었다. Aeration은 에어 펌프(HIBLOW HP 80)에 의해 발생하는 공기를 사용하였으며, aeration의 강도는 Dwyer사의 공기유량계(RMA-13-SSV)를 이용하여 공기 주입량 9-12 L/min으로 조절하였다.

각 수조마다 물 만들기를 시작하여 약 실험 40일째부터 수질이 안정화되어 암모니아와 아질산의 농도가 각각 0.1 mg/L이하로 유지되었으며, 이후 잉어(*C. carpio*)를 수용하여 50일간 사육 실험을 하였다. 입식된 잉어는 국립수산물과학원 내수면양식 연구센터에서 분양받았으며, 평균체장은 3.09 cm, 평균체중은 0.49 g이었다. 수조 당 380마리 입식하여 사육밀도는 0.27 g/L으로 하였다. 사료는 금붕어사료(단백질함량 44%)를 전체 어류체중의 5%만큼 공급하였으며, 초기에는 각 BFT 수조에 금붕어 사료 10 g, glucose 4 g을 투여하였다. 어체의 성장에 따라 사료 투입량도 증가하였으며, 사료투입량의 변화에 따라 C/N ratio 10이 되도록 glucose의 투여량도 증가하였다. 각 BFT 수조에 투입되는 사료의 양과 glucose의 양은 어체의 생존율에 관계없이 동일하게 투여하였으며, 생존율이 가장 좋은 BFT3의 수조를 기준으로 하였다. BFT 양식 시스템에서 분리균주 NOBSB1(*Bosea* sp.)을 아질산 농도를 저감시키는데 활용할 수 있는지를 조사하기 위해 BFT 물 만들기를 한 수조에 잉어를 사육한 후 아질산 농도가 증가하는 시점에 배양 중인 NOBSB1균주의 배양액이 흡광도(A600)가 1.0이 되도록 희석하여 BFT2와 BFT3수조에 각각 500 mL를 접종하였다.

수질분석

아질산 제거능력을 조사하기 위한 실험에서 아질산의 정량은 BIOXYTECH® Nitric Oxide Assay Kit (Cat. No. 22110)를 사용하였으며, 이때 NaNO₂를 사용한 표준곡선으로 아질산성 질소의 농도를 산출하였다. BFT 물 만들기 과정과 잉어를 사육 중인 BFT 시스템에서 수질의 변화를 신속하게 관찰하기 위해 YSI사의 YSI Professional Plus 수질분석기기로 수온, DO (Dissolved oxygen) 그리고 pH를 매일 측정하였으며, Merck사의 Ammonium Test Kit (HC442704), Nitrite Test Kit (HC431549) 그리고 Nitrate Test Kit (HC674983)를 사용해 주 3회 이상 사육수조내의 암모니아성 질소, 아질산성 질소 그리고 질산성 질소의 농도를 측정하였다.

결 과

NOBSB1 균주의 염기서열 분석 및 동정

분리된 NOBSB1 균주의 16S rRNA의 부분 염기서열 분석


```

GTGGTCGCCTGCCTCCTTGCGGTAGCGCGACGCTTCGGGTAAACCACTCCCAT
GGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGTGGCATGCTGAT
CCACGATTACTAGCGATTCCACCTTCATGTACTCGAGTTGCAGAGTACAATCTGAAC
TGAGACGGCTTTTGGGATTAGCTCCAGGTCACCCCTTCGCTGCCATTGTCACCGC
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCAGCCTGTAAGGGCCATGAGGACTTGACGTCATCC
CCACCTTCCTCGCGCTTATCACCGGCAGTCCCCCTAGAGTTCCCAACTGAATGATG
GCAACTAGGGGCGAGGTTGCGCTCGTTCGCGGACTTAACCAACATCTCACGACA
CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCCGGCCAGCCGAACGAAGAAAGG
CATCTCTGCCGATCAAACCGGACATGTCAAAGCTGGTAAGTTCTGCGCGTTGCTT
CGA ATTAACACACATGCTCCACGCTTGTCGGGGCCCCGTCATTCCTTTGAGTTT
TAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGCTTAAAGCGTAGCTGCGCCACTG
AAGAGCAAGCTCCCAACGGGTGCGATTTCATCGTTTACGGCGTGACATACAGGGT
ATCTAATCTGTTTGTCTCCACGCTTCGCGCCTCAGCGTCAGTATCGGACAGTT
GGCCGCGCTTCGCCACCGGTGTTCTTGCGAATATCTACGAATTCACCTCTACACTCG
CAGTTCACCAACCTCTTCCGAACCAAGACTCCAGTATCGAAGCAATTCAGGG
TTGAGCCCTGGGCTTTCACCCCGACTTAAGAGTCCGCTACGCGCCCTTACGCCC
AGTGATTCGAGCAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCAGCAAGTT
AGCCGGGGCTTATCTTCCGGTACAGTCATATCTTCCCGGACAAAAGAGCTTACA
ACC CTAAGGCTTTCATCACTACGCGCGCATGGCTGGATCAGGCTTGCGCCCATGTC
CAATATTCCTCACTGCTGCCCTCCGTAAGAGTTTGGGCGGTGCTCAGTCCCAATGT
GGCTGATCATCTCTCAGACAGCTACTGATCGTCGCTTGGTGAGCCATTACCTCA
CCAACTAGCTAATCAGACGCGGGCCGATCTTTCGGCGATAAATCTTCCCGCGAAGG
GCGTATCCGGTATTAGTTCAAGTTTCCCTGAGTTATTCGAACCGAAAGGACGTTT
CCACGCGTTACTCACCGCTCTGCCACTAGCTCCGAAGAGCCGTTTCGACTGCATG

```

Fig. 1. 16S rRNA gene sequence of the isolated strain NOBSB1 (*bosea* sp.).

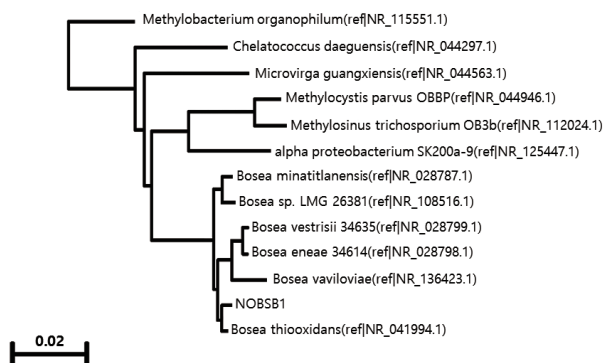


Fig. 2. Phylogenetic dendrogram showing the position of isolate NOBSB1 (*bosea* sp.) among closely related species. Bar represents 0.02 substitution per site.

을 의뢰한 결과 Fig. 1과 같이 총 1361개의 염기서열을 밝혔다. 이 염기서열에 대해 생물정보 database들(GenBank, EMBL, DDBJ)을 이용하여 Align과 Blast Search를 수행하여 계통학적 관계를 조사한 결과 Fig. 2에 나타난 것처럼, 이 균주의 16S rRNA 유전자는 *Bosea thiooxidans* (NR114668.1)의 16S rRNA 유전자와 99.0%의 유전자 일치도를 나타내었으며, 계통발생학적으로 가장 가까운 것으로 나타났다. *Bosea minatitlanensis* strain AMX51 (NR028787.1), *Bosea vestrisii* strain 34635 (NR028799.1) 그리고 *Bosea vaviloviae* (NR136423.1)의 16S rRNA 유전자와도 거의 99.0%의 유전자 일치도를 나타

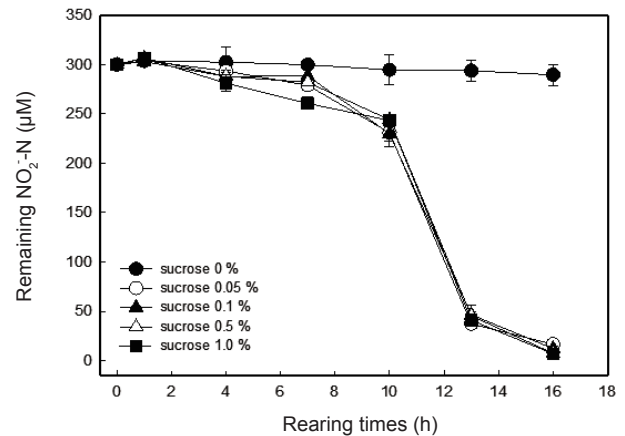


Fig. 3. Effects of sucrose concentration on $\text{NO}_2\text{-N}$ removal by the isolate NOBSB1 (*Bosea* sp.) cultured at pH 6 and 30°C. Values represent mean±standard error of five replicates.

내었다. 반면 그 외의 *Microvirga quanxiensis* strain 25B (NR 044563.1)와 *Chelatococcus daeguensis* (NR044297.1)의 16S rRNA 유전자와는 94%의 일치도를 나타내었으며, 계통발생학적으로도 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 분리된 NOBSB1 균주는 *Bosea* 속에 속하는 균주임을 알 수 있었다.

NOBSB1 균주의 아질산의 제거 능력

당 농도에 따른 효과

Sucrose를 NB배지에 0%에서 1.0%까지 농도별로 첨가한 5개의 실험구를 설정하고, 각 실험구의 배지 내 아질산성 질소의 농도를 측정하여, sucrose 농도에 따른 NOBSB1 균주의 아질산 제거 능력을 조사한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 실험 시작할 때 300 µM이던 아질산성 질소의 농도는 배양 후 4시간까지는 실험구간 농도의 차이는 보이지 않았으나, 배양 후 7시간째부터 sucrose 농도가 1.0%가 되는 실험구가 다른 실험구들에 비해 먼저 유의하게 감소하기 시작하였다. 배양 10시간째부터는 sucrose를 넣은 모든 실험구에서 sucrose를 넣지 않은 실험구에 비해 아질산성 질소의 농도가 유의하게 감소하는 것을 볼 수 있었다. 배양 13시간째에는 아질산성 질소의 농도가 50 µM 이하로 감소하였으며, 16시간째에 sucrose를 넣은 모든 실험구에서 아질산성 질소가 완전히 제거되었다. 그러나 sucrose를 첨가하지 않은 실험구에서는 배양 16시간째가 되어도 아질산성 질소를 제거하지 못했다.

온도에 따른 효과

분리된 NOBSB1 균주가 아질산을 제거하는데 영향을 미치는 온도 범위를 조사하기 위해 10°C에서부터 35°C까지 5°C간격으로 6개의 실험구를 설정하였다. 배양 온도에 따른 배지내의 아질산성 질소의 농도변화에 대한 결과는 Fig. 4에 나타내었다.

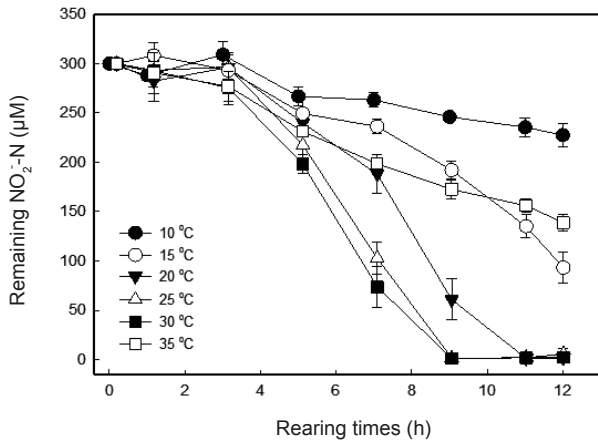


Fig. 4. Effects of temperature on $\text{NO}_2\text{-N}$ removal by the isolate NOBSB1 (*Bosea* sp.) cultured at pH 6. Values represent mean $\pm$ standard error of five replicates.

모든 실험구들의 아질산성 질소 농도에 큰 변화를 보이지 않았으나, 배양 5시간째부터 실험구간 아질산성 질소의 농도 차이를 보이기 시작하였다. 10°C에서 30°C사이의 실험구들에서는 수온이 높음에 따라 아질산성 질소를 제거하는 속도가 빠름을 알 수 있으나, 35°C 실험구에서는 15°C 실험구와 아질산성 질소 제거 속도가 비슷하였으며 배양 12시간째에는 오히려 15°C 실험구보다 아질산성 질소의 제거 능력이 떨어지는 것으로 나타났다. 따라서 본 실험에서 분리균주의 아질산성 질소 제거에 대한 최적 온도는 25°C와 30°C로 나타났다.

pH에 따른 효과

pH에 따른 분리된 NOBSB1 균주의 아질산 제거 능력을 조사하기 위하여 pH 4에서 8까지 5개의 실험구를 설정하여 배지 내의 아질산성 질소의 농도변화를 조사한 결과는 Fig. 5와 같았다. 배양 7시간째까지는 실험구 간 유의한 차이를 보이지 않고 아질산성 질소의 농도가 모두 250 μM 이상 남아있었으나, 10 시간째부터 pH 4와 pH 5 실험구를 제외한 나머지 pH 6 이상의 실험구에서 유의하게 아질산성 질소의 농도가 감소하기 시작하였다.

배양 13시간째에는 pH 6 이상의 모든 실험구에서 아질산성 질소의 농도가 급격하게 감소하였으며, 배양 16시간째에는 아질산성 질소가 거의 제거되었다. 그러나 pH 4와 pH 5 실험구에서는 배양 16시간까지도 아질산이 제거되지 않아 여전히 250 μM 이상의 아질산 농도가 유지되었다.

배양방식에 따른 효과

배양조건에 따른 NOBSB1 균주의 아질산 제거 능력을 조사하기 위하여 분리균주를 각각 정치배양과 진탕배양을 하였으며, 이때 배지내의 아질산성 질소의 농도 변화를 조사한 결과는 Fig. 6과 같았다. 배양 초기부터 진탕배양한 실험구에 비해 정치

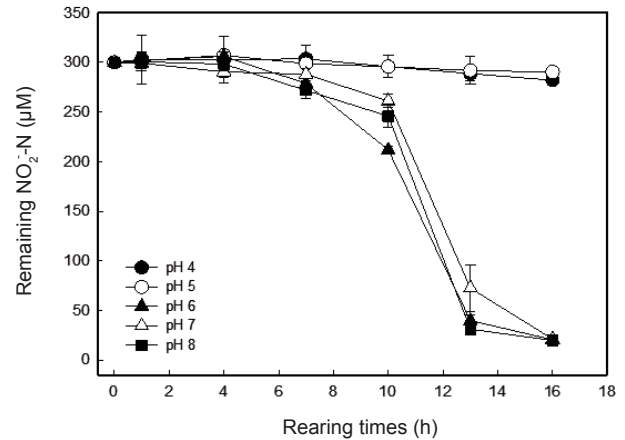


Fig. 5. Effects of pH on $\text{NO}_2\text{-N}$ removal by the isolate NOBSB1 (*Bosea* sp.) cultured at 30°C. Values represent mean $\pm$ standard error of five replicates.

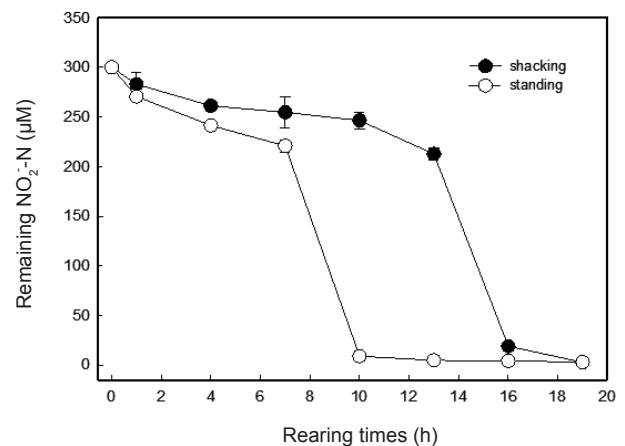


Fig. 6. Changes in the pattern of $\text{NO}_2\text{-N}$ removal by the isolate NOBSB1 (*Bosea* sp.) cultured in shaking and standing culture systems at pH 6 and 30°C. Values represent mean $\pm$ standard error of five replicates.

배양한 실험구가 아질산의 제거를 더 빨리하기 시작하였으며, 배양 4시간째 이후부터 정치배양한 실험구가 진탕배양한 실험구보다 유의하게 빨리 아질산을 제거하는 결과를 보여주었다. 정치배양 조건에서는 배양 10시간째에 배지내의 아질산을 거의 모두 제거하였으며, 진탕배양 조건에서는 16시간 이후에 아질산을 거의 모두 제거되었다.

BFT 양식 시스템에 적용

아질산 제거 능력이 있는 것으로 확인된 분리균주 NOBSB1 (*Bosea* sp.)이 BFT 양식 시스템의 아질산 농도 저감에 활용될 수 있는지를 조사하기 위해 BFT 물 만들기를 한 수조에 잉어

를 사육한 후 아질산 이온의 농도가 증가하는 시점에 배양 중인 NOBSB1균주를 접종하였다. 사육실험 기간 동안 수질 변화는 Fig. 7과 8에 나타내었으며, 잉어의 생존율의 변화는 Fig. 8에 나타내었다.

BFT 1 수조에서는 사육 후 약 30일 이후부터 아질산성 질소의 농도가 증가하기 시작하여 33일째에 30 mg/L까지 최대로 증가 하였으며(Fig. 7), 이때 잉어의 생존율도 23.4%로 급격하게 떨어졌다(Fig. 9). 그 이후 아질성 질소의 농도가 감소하기 시작하여 37일째에는 0.1 mg/L로 낮은 상태가 지속되었으며, 잉어의 생존율도 19.2%로 지속되었다. BFT2 수조에서도 사육 후 약 30일째부터 아질산성 질소의 농도가 증가하기 시작하여 33일째에 20 mg/L까지 증가 하였으며, 이 시점에 배양 중인 NOBSB1균주를 접종하였다(Fig. 7). 그 후 아질산성 질소의 농도는 18.0 mg/L로 떨어지기 시작하여 37일째에는 2.4 mg/L로 떨어졌다. 잉어의 생존율은 아질산성 질소 농도가 20 mg/L인 33일째에 43.8%로 급격히 떨어졌으며, 그 이후는 39.5%로 동일한 생존율을 나타내었다(Fig. 8). BFT3 수조에서는 33일째에 아질산성 질소 농도가 1.7 mg/L로 상승하기 시작하였으

며, 이때 배양 중인 NOBSB1균주를 접종하였다(Fig. 7). 그 이후 아질산성 질소의 농도는 다시 0.2 mg/L로 떨어졌으며 이러한 낮은 수준은 실험 종료시점까지 지속되었으며, 생존율에서도 87.6%로 지속되었다(Fig. 9). 암모니아성 질소와 질산성 질소의 농도에 대한 변화양상은 실험기간 큰 차이는 보이지 않았으며, DO와 pH에 대한 변화도 실험기간 특이한 차이는 보이지 않았다(Fig. 8).

고 찰

본 연구에서 분리된 NOBSB1 균주는 금붕어를 사육하는 BFT 양식 시스템에서 분리하였으며, 16S rRNA의 염기를 분석한 결과 thiosulfate를 산화하는 능력을 지닌 *Bosea thiooxidans* (NR114668.1)(Das et al., 1996)의 16S rRNA 유전자와 가장 유사하였으며, *Bosea minatitlanensis* strain AMX51 (NR028787.1), *Bosea vestrisii* strain 34635 (NR028799.1)과 *Bosea vaviloviae* (NR136423.1)의 16S rRNA 유전자와도 거의 99.0%의 유전자 일치도를 나타내어 본 연구에서 분

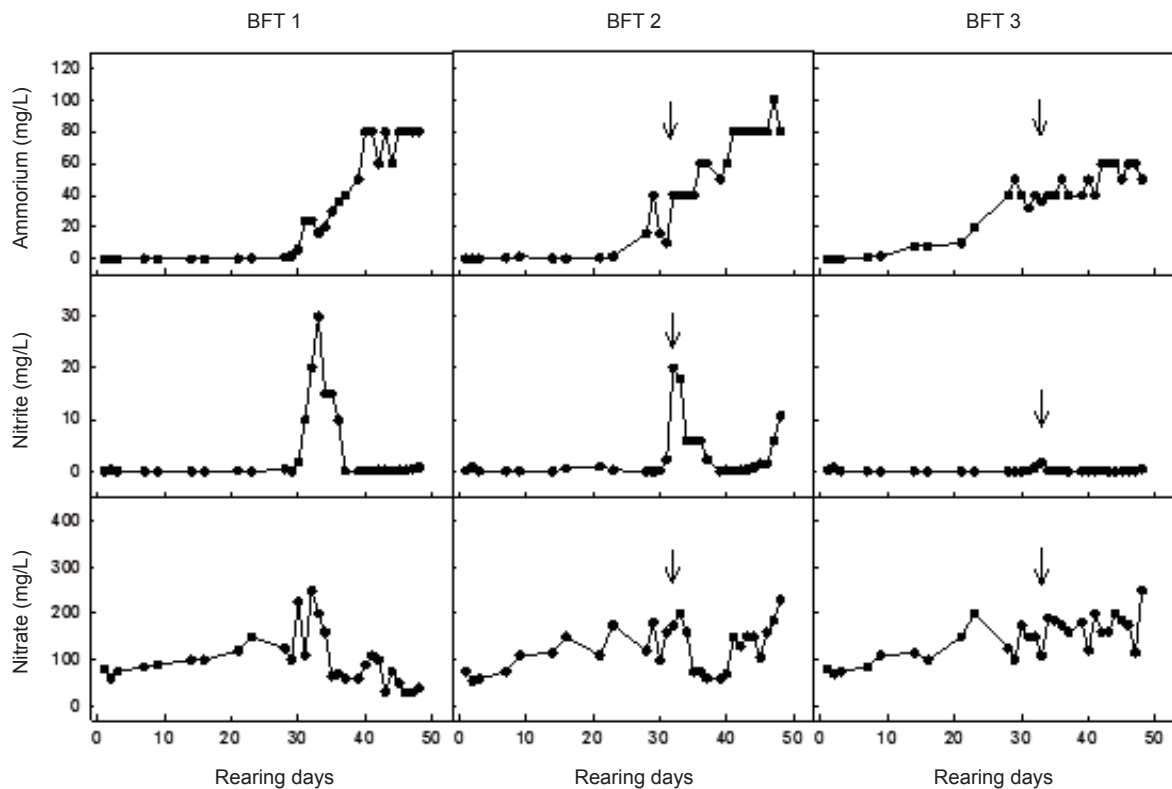


Fig. 7. Changes in NO_2^- -N NO_3^- -N and NH_4^+ -N concentrations in BFT culture tanks(BFT1, BFT2 and BFT3) rearing *Cyprinus carpio*. BFT2 and BFT3 were inoculated with the isolate NOBSB1 (*Bosea* sp.) when the concentration of nitrite was high, but BFT1 was not inoculated. BFT2 was inoculated with the isolate when nitrite was high on day 32, and BFT3 was inoculated with the isolate when nitrite concentration started increasing on day 33. Arrows indicate when the isolate was inoculated into the BFT2 and BFT3 culture tanks.

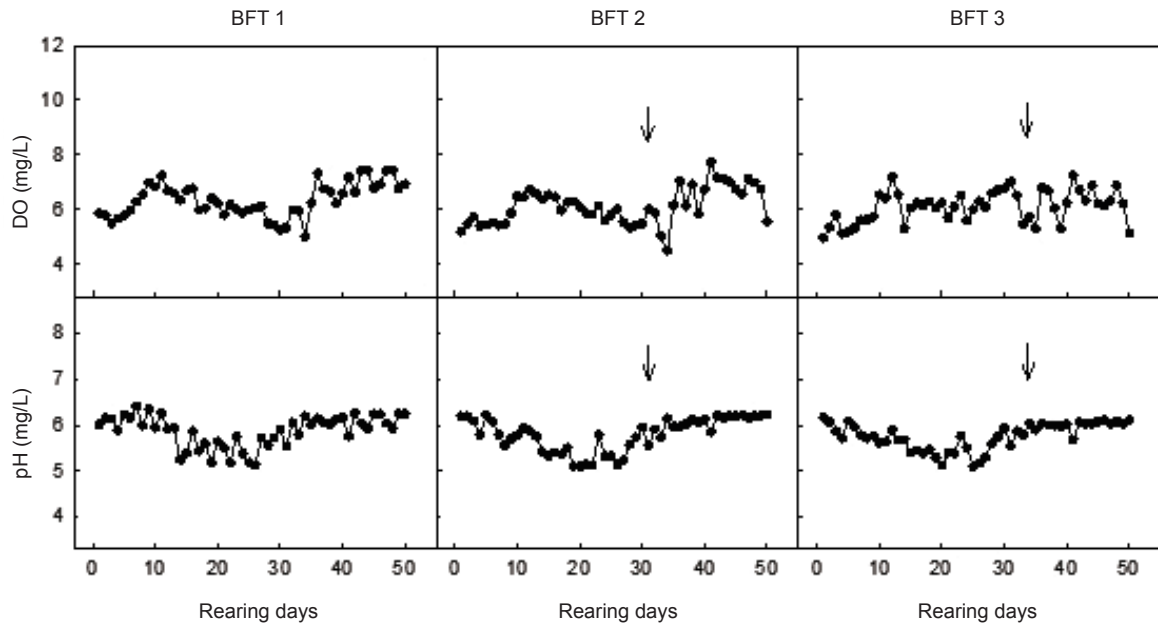


Fig. 8. Changes in dissolved oxygen (DO) concentration and pH in BFT culture tanks (BFT1, BFT2, and BFT3) rearing *Cyprinus carpio*. BFT2 and BFT3 were inoculated with the isolate NOBSB1 (*Bosea* sp.), but BFT1 was not inoculated. Arrows indicate when the isolate was inoculated into the BFT2 and BFT3 culture tanks.

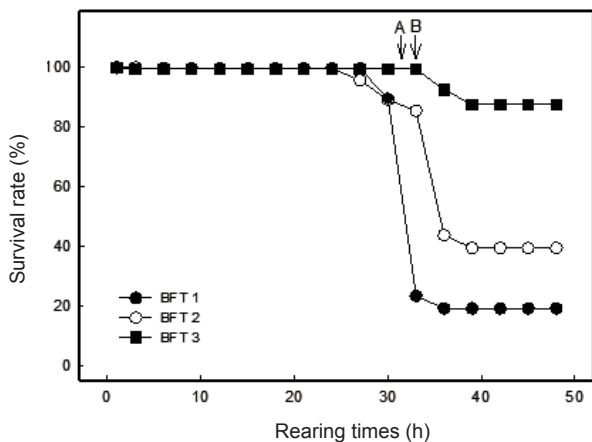


Fig. 9. Changes in the survival rate (%) of *Cyprinus carpio* reared in BFT aquaculture tanks (BFT1, BFT2 and BFT3). BFT2 and BFT3 were inoculated with the isolate NOBSB1 (*Bosea* sp.), but BFT1 was not inoculated. Arrow A and B indicate the day when the isolate was inoculated into the BFT2 and BFT3 tanks, respectively.

리된 균주 NOBSB1도 *Bosea* 속하는 한 종이라고 할 수 있었다. *Bosea* 속은 계통분류학적으로 α -Proteobacteria에 속하며, α -methylserine aldolase를 생성하기도 하고(Thomas et al., 2007), 티오황산염을 산화하거나 N-acyl homoserine lactones

(N-AHLs)을 분해하는 등 특이한 물질대사 특성을 지니고 있다(Das et al., 1996; Stubner et al., 1998). 이들은 최초로 농경지 토양에서 *B. thiooxidans*를 발견하였으며(Das et al., 1996), 그 후 호기적 발효 중인 슬러지에서 *B. minatitlanensis*를 발견한 바가 있다(Ouattara et al., 2003). 그리고 다양한 수 환경과 가축매물지 등에서도 발견되어(Thomas et al., 2007; Park et al., 2013), *Bosea* 속에 속하는 종들은 토양이나 수체환경 등 모든 환경에 분포하고 있는 것으로 보인다.

분리균주 NOBSB1은 당이 존재하지 않는 상태에서는 전혀 아질산을 제거하지 않고 당 농도에 관계없이 당을 첨가한 상태에서는 동일한 상태로 아질산을 제거하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과는 본 분리균주가 유기탄소로부터 전자를 얻어 아질산을 제거하는 특성을 가진 타가영양세균임을 의미함을 알 수 있었다. 일반적으로 biofloc을 활용하여 수질을 조절하는 BFT 양식 시스템에서는 대부분 타가영양세균들에 의해 질소화합물들을 제거하여 수질을 유지하고 있어서(Hari et al., 2006), 본 분리균주는 순환 여과식 양식장이나 BFT 양식 시스템에서 무기질소화합물들의 조절을 할 필요가 있을 때 활용될 가능성이 높아 보인다.

분리균주 NOBSB1의 아질산 제거 활성이 가장 활발한 수온의 범위를 보면 20℃에서 30℃ 사이로 나타나고 있으며, 15℃ 이하나 35℃ 이상의 온도에서는 활성이 떨어지는 것을 볼 수 있었다(Fig. 5). 그리고 20℃와 30℃ 사이에서는 수온이 높을수록 제거효과가 높게 나타났다. 일반적으로 질화 작용하는 세균

들은 온도에 매우 의존적이어서 10℃이하의 저 수온에서는 활성이 억제되며 대부분 최적 수온의 범위가 15℃에서 25℃까지로 알려져 있다(Antoniou et al., 1990; Ilies and Mavinic, 2001; Kim et al., 2006; Sundaresan and Philip, 2008; Rodriguez-Caballero et al., 2012). 본 분리균주의 최적범위가 일반적인 질화세균들보다 다소 높은 온도 범위를 보이지만 대체적으로 일반적인 질화세균들의 최적수온범위와 유사하게 나타났다. *B. minititlanensis*는 37℃에서(Ouattara et al., 2003), *B. thiooxidans*는 30-32℃에서 가장 성장이 좋다고 알려져 있다(Das et al., 1996). 본 연구에서 분리균주 NOBSB1의 성장에 대한 최적 온도에 대해 조사하지는 않았으나 아질산 제거 최적수온에 대한 결과로부터 본 분리균주의 최적 성장 수온도 *B. thiooxidans*와 유사할 것으로 추정되어진다.

pH에 따른 분리균주 NOBSB1의 아질산 제거 활성에 대한 실험에서 pH 4와 5의 조건에서는 전혀 아질산 제거효과가 나타나지 않았으나, pH 6-8에서는 아질산 제거효과가 유사한 양상으로 나타났다(Fig. 6). 일반적으로 질화 작용하는 미생물들의 활성은 pH의 변화와 매우 밀접하게 연관이 있다고 알려져 있다(Shammas, 1986; Groeneweg et al., 1994). 질화 작용에 대한 세균의 최적 pH의 범위는 종류에 따라 다르지만, 일반적으로 pH 7.0에서 9.0사이로 알려져 있다(Chen et al., 2006; Van Wyk and Scarpa, 1999). 따라서 본 분리균주 NOBSB1은 일반적인 질화세균들의 활성범위와 유사하는 것으로 생각되며, 산성 보다는 중성에서 더욱 아질산 제거에 대한 효과가 크다고 할 수 있다.

본 분리균주는 정치배양이나 진탕배양 모두 아질산제거에 효과가 있었으며, 정치배양의 경우가 진탕배양보다 더 빨리 아질산을 제거시키는 효과를 보였다(Fig. 7). 이러한 결과는 본 분리균주가 호기적상태보다 산소가 제한된 상태에서 더 좋은 활성을 보이고 있음을 보여주고 있다. 이는 NOBSB1균주는 산소공급을 하는 동안에도 아질산을 제거할 수 있지만, 제한적으로 산소공급이 잘 되지 않은 곳에서도 아질산 제거가 효율적으로 이루어질 수 있음을 보여주어 바닥에는 많은 biofloc들이 침전되어 혐기적 조건들이 쉽게 형성되는 BFT 시스템의 양식장에 활용하기에 적합하다고 생각된다. 이러한 아질산 제거 특성을 가진 NOBSB1균주를 BFT양식 시스템에서 발생하는 아질산의 농도를 저감시키는데 활용할 수 있는지를 조사하기 위해 BFT양식 시스템을 조성한 후 잉어를 사육하고, 사육기간에 암모니아와 아질산의 농도가 올라가는 시기에 인위적으로 배양한 NOBSB1균을 접종시켰을 때 BFT 시스템 수조 내에서 무기질 소화합물들의 농도의 변화를 조사하였다(Fig. 8). 실험에 사용된 BFT시스템 수조들에서 암모니아성 질소나 질산성 질소의 농도 변동에서는 모든 수조가 동일한 양상을 보였으며, 아질산성 질소의 농도가 올라가는 시기도 거의 비슷하게 나타났다. 이러한 결과들은 실험에 사용된 3개의 BFT양식 시스템에 존재하는 질화 및 탈질화에 관여하는 미생물들의 조성이 비슷하게 이

루어져있다는 것을 알 수 있다. NOBSB1균주를 접종하지 않은 BFT1 수조에서는 사육 30일째 아질산성 질소 농도가 올라가기 시작하여 33일째에 최대 30 mg/L까지 생성되었으며, 잉어의 생존율도 23.4%로 급속하게 떨어졌다(Fig. 9). 그리고 BFT2 수조에서도 사육 30일째부터 아질산성 질소의 농도가 20 mg/L가 되었을 때 NOBSB1균주를 접종한 결과 아질산성 질소의 농도는 더 이상 증가하지 않고 감소하였다. 이러한 결과는 아질산성 질소의 농도가 20 mg/L 정도 높은 상태에서도 NOBSB1균주를 접종함으로써 아질산 농도의 상승을 제어할 수 있음을 보여주고 있었다.

본 사육 실험에서 암모니아성 질소의 농도는 계속 증가하여 사육 40일 이후에도 60-80 mg/L로 높은 수준까지 올라갔지만 잉어의 생존율에 큰 영향을 미치지 않고 있다. 이러한 결과는 사육실험 시 수온의 범위가 28℃, pH의 범위가 6 전후로 유지되고 있어서 독성이 있는 비 이온화된 암모니아(NH₃)의 농도는 0.04-0.06 mg/L 정도로 매우 낮기 때문인 것으로 생각된다. Emerson et al. (1975)은 수용액상에 있는 암모니아성 질소는 독성이 있는 비 이온화된 암모니아(NH₃)와 독성이 없는 이온화된 암모니아(NH₄⁺)의 두 가지 상태가 있으며, 이들 농도들의 비율은 수온과 pH에 따라 다르게 나타난다고 보고하고 있다. 이 보고서에 의하면 수온 28℃, pH 6에서는 독성이 있는 비 이온화된 NH₃는 독성이 없는 NH₄⁺에 비해 0.07% 밖에 존재하지 않는다. 독성이 있는 비 이온화된 NH₃에 대한 잉어의 96hLC₅₀은 체중 5 g인 어체인 경우 0.34 mg/L로 보고되어 있다(Abbas, 2006). 따라서 본 실험에서 암모니아성 질소가 100 mg/L까지 높게 올라가도 잉어들이 생존해 있었던 것은 비 이온화된 NH₃의 농도가 치사한계 이하의 수준이기 때문으로 생각된다. 그리고 아질산성 질소 농도가 20 mg/L 이상 되었을 때 잉어들의 생존율이 급격하게 감소한 것은 Kroupova et al. (2010)의 보고와 같이 잉어 생존에 대한 아질산성 질소 농도의 영향 한계(LOEC=28 mg/L)에 가까이 이르기 때문인 것으로 생각된다.

한편 BFT3에서는 사육 32일째부터 아질산성 질소 농도가 오르기 시작하여 33일째에 아질산의 농도가 1.2 mg/L일 때 NOBSB1균주를 접종한 결과 BFT3 사육수조는 더 이상 아질산성 질소의 농도가 상승하지 않고 0.1-0.2 mg/L의 낮은 상태가 유지되었으며, 잉어의 생존율이 87%로 다른 BFT 수조에 비해 양호하게 나타났다. 이러한 결과는 NOBSB1균주의 접종으로 BFT 양식 시스템의 아질산 생성을 조절할 수 있음을 보여주고 있으며, BFT시스템에서 NOBSB1균주의 접종으로 아질산 함량을 효과적으로 조절하기 위해서는 아질산이 생성되는 초기에 접종하는 것이 좋을 것으로 생각되었다.

사 사

본 연구는 2011년도 동의대학교 연구년 지원사업에 의해 수행되었음.

References

- Abbas HH. 2006. Acute Toxicity of Ammonia to Common Carp Fingerlings (*Cyprinus carpio*) at Different pH Levels. *Pakistan J Biol Sci* 9, 2215-2221.
- Antoniou P, Hamilton J, Koopman B, Jain R, Holloway B, Lyberatos G and Svoronos SA. 1990. Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Water Res* 24, 97-101. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(90\)90070-M](https://doi.org/10.1016/0043-1354(90)90070-M).
- Avnimelech Y, Kochva M and Diab S. 1994. Development of controlled intensive aquaculture systems with a limited water exchange and adjusted carbon to nitrogen ratio. *Bamidgeh* 46, 119-131.
- Avnimelech Y. 1999. Carbon and nitrogen ratio as a control element in aquaculture systems. *Aquaculture* 176, 227-235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00085-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00085-X).
- Avnimelech Y. 2007. Feeding with microbial flocs by tilapia in minimal discharge bioflocs technology ponds. *Aquaculture* 264, 140-147. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.11.025>.
- Avnimelech Y. 2009. *Biofloc Technology-A Practical Guide Book*, 2nd ed. World Aquaculture Society, Baton Rouge, U.S.A.
- Bock E, Koops H-P, Ahlers B and Harms H. 1992. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In H. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed.), *The prokaryotes*, 2nd ed. Springer Verlag, New York, NY, U.S.A., 414-430.
- Bothe H, Jost G, Schlöter M, Ward BB and Witzel K-P. 2000. Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. *FEMS Microbiol Rev* 24, 673-690. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00566.x>.
- Buckling RA, Baird CD, Watson CA and Chapman FA. 1993. Energy use of recycling water aquaculture systems for ornamental fish production. Circular 1095. Florida Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, U.S.A., 5.
- Chen S, Ling J and Blancheton JP. 2006. Nitrification kinetics of biofilm as affected by water quality factors. *Aquacult Eng* 34, 179-197. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2005.09.004>.
- Cho SH, Jeong JH, Kim MH, Lee KT, Kim DJ, Kim KH, Oh SP and Han CH. 2015. The effects of temperature on maintaining the stability of water quality in biofloc-based zero-water exchange culture tanks. *J Life Sci* 25, 496-506. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2015.25.5.496>.
- Crab R, Defoirdt T, Bossier P and Verstraete W. 2012. Biofloc technology in aquaculture: Beneficial effects and future challenges. *Aquaculture* 351-357. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.04.046>.
- Das SK, Mishra AK, Tindall BJ, Rainey FA and Stackebrandt E. 1996. Oxidation of thiosulfate by a new bacterium, *Bo-*
- sea thiooxidans* (strain BI-42) gen. nov., sp. nov.: analysis of phylogeny based on chemotaxonomy and 16S ribosomal DNA sequencing. *Int J Syst Bacteriol* 46, 981-987. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-981>.
- De Schryver P, Crab R, Defoirdt T, Boon N and Verstraete W. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. *Aquaculture* 277, 125-137. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.02.019>.
- Emerenciano M, Ballester ELC, Cavalli RO and Wasielesky W. 2012. Biofloc technology application as a food source in a limited water exchange nursery system for pink shrimp *Farfantepenaeus brasiliensis* (Latreille, 1817). *Aquac Res* 43, 447-457. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02848.x>.
- Emerson K, Russo RC, Lund RE and Thurston RV. 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *J Fish Res Board Can* 32, 2379-2383. <https://doi.org/10.1139/f75-274>.
- Eng CT, Paw JN and Guarin FY. 1989. The environmental impact of aquaculture and the effects of pollution on coastal aquaculture development in southeast Asia. *Mar Pollut Bull* 20, 335-343. [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(89\)90157-4](https://doi.org/10.1016/0025-326X(89)90157-4).
- Funge-Smith S and Phillips MJ. 2001. Aquaculture systems and species. In: Subasinghe RP, Bueno P, Phillips MJ, Hough C, McGladdery SE, Arthur JR (Eds.), *Technical proceedings of the conference on aquaculture in the third millennium*, Bangkok, Thailand, February 20-25, 2000. NACA/FAO, Bangkok/Rome, 129-135.
- Gerardi MH. 2002. *Nitrification and denitrification in the activated sludge process*. publication by John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, U.S.A.
- Groeneweg J, Sellner B and Tappe W. 1994. Ammonia oxidation in *Nitrosomonas* at NH₃ concentrations near Km: effects of pH and temperature. *Water Res* 28, 2561-2566. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0043-1354(94)90074-4).
- Hari B, Kurup BM, Varghese JT, Schrama JW and Verdegem MCJ. 2006. The effect of carbohydrate addition on water quality and the nitrogen budget in extensive shrimp culture systems. *Aquaculture* 252, 248-263. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.06.044>.
- Ilies P and Mavinic DS. 2001. The effect of decreased ambient temperature on the biological nitrification and denitrification of a high ammonia landfill leachate. *Water Res* 35, 2065-2072. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(00\)00477-2](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(00)00477-2).
- Jensen FB. 2003. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. *Comp Biochem Physiol A* 135, 9-24. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00323-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00323-9).
- Joo HS, Hirai M and Shoda M. 2006. Piggery wastewater treatment using *Alcaligenes faecalis* strain No. 4 with heterotrophic nitrification and aerobic denitrification. *Water Res* 40, 3029-3036. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.06.021>.
- Kim DJ, Lee DI and Keller J. 2006. Effect of temperature and free ammonia on nitrification and nitrite accumulation in

- landfill leachate and analysis of its nitrifying bacterial community by FISH. *Bioresour Technol* 97, 459-468. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.032>.
- Kroupova H, Prokes M, Macova S, Penaz M, Barus V, Novotny L and Machova J. Effect of nitrite on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ Toxicol Chem* 29, 535-40. <https://doi.org/10.1002/etc.84>.
- Kroupova H, Machova J and Svobodova Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Vet Med Czech* 50, 461-471.
- Kuenen JG and Robertson LA. 1994. Combined nitrification-denitrification processes. *FEMS Microbiol Rev* 15, 109-117.
- Ministry of Oceans and Fisheries (MOF) 2016. Yearbook of statistical data of oceans and fisheries. Retrieved from <https://www.mof.go.kr/statPortal> on Mar 17, 2017.
- Ouattara AS, Assih EA, Thierry S, Cayol J-L, Labat M, Monroy O and Macarie H. 2003. *Bosea minatitlanensis* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an anaerobic digester. *Inter J Syst Evolu Microbiol* 53, 1247-1251. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02540-0>.
- Park JA, Kang JK, Kim JH and Kim SB. 2013. Biodegradation of dissolved organic matter derived from animal carcass disposal soils using soil inhabited bacteria. *J Kor Soc Environ Eng* 35, 861-866. <https://doi.org/10.4491/KSEE.2013.35.12.861>.
- Rodriguez-Caballero A, Hallin S, Pahlson C, Odlare M and Dahlquist E. 2012. Ammonia oxidizing bacterial community composition and process performance in wastewater treatment plants under low temperature conditions. *Water Sci Technol* 65, 197-204. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.643>.
- Shammas NK. 1986. Interactions of temperature, pH, and biomass on the nitrification process. *J Water Pollut Control Fed* 58, 52-59.
- Stubner S, Wind T. and Conrad R. 1998. Sulfur oxidation in rice field soil: activity, enumeration, isolation and characterization of thiosulfate oxidizing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 21, 569-578.
- Sundaresan N and Philip L. 2008. Performance evaluation of various aerobic biological systems for the treatment of domestic wastewater at low temperatures. *Water Sci Technol* 58, 819-830. <https://doi.org/10.2166/wst.2008.340>.
- Thomas V, Casson N and Greub G. 2007. New *Afipia* and *Bosea* strains isolated from various water sources by amoebal co-culture. *Syst Appl Microbiol* 30, 572-579. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.06.004>.
- Van Wyk P and Scarpa J. 1999. Water quality and management. In: Van Wyk, P., et al. (Ed.), *Farming Marine Shrimp in Recirculating Freshwater Systems*. Florida department of agriculture and consumer services. Tallahassee, 128-138.
- Yao S, Ni JR, Chen Q and Borthwick AGL. 2013. Enrichment and characterization of a bacteria consortium capable of heterotrophic nitrification and aerobic denitrification at low temperature. *Bioresour Technol* 127, 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.098>.
- Zhang JB, Wu PX, Hao B and Yu ZN. 2011. Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresour Technol* 102, 9866-9869. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.118>.
- Zou S, Yao S and Ni J. 2014. High efficient nitrogen removal by coupling enriched autotrophic nitrification and aerobic denitrification consortiums at cold temperature. *Bioresour Technol* 161, 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.066>.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 533-616.