

碩士學位論文

제주도내 양식장 배출수 연안 퇴적층의  
미생물학적 특성 분석 및 응용



濟州大學校 大學院

水產生命醫學科

張 太 源

2008 年 2 月

제주도내 양식장 배출수 연안 퇴적층의  
미생물학적 특성 분석 및 응용

指導教授 許文洙

張 太 源

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2008 년 2 월

張 太 源의 理學 碩士學位 論文을 認准함.

심사위원장 여 인 규 (인)

위 원 오 덕 철 (인)

위 원 허 문 수 (인)

濟州大學校 大學院

2008年 2月

Analysis of Characteristics and Application of  
Bacteria in Coastal Sediment at aquaculture  
Wastewater Effluence area on Je-ju Island.

Tae-Won Jang

(Supervised by professor Moon-Soo Heo)

A large, faint watermark of the Cheju National University logo is centered in the background. The logo is circular and contains the text 'CHEJU NATIONAL UNIVERSITY' around the top edge and 'SINCE 1952' around the bottom edge. In the center of the logo is a shield-shaped emblem with the Korean characters '제주대' (Jeju University) written inside.

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE

Department of Aquatic Life Medicine

GRADUATE SCHOOL

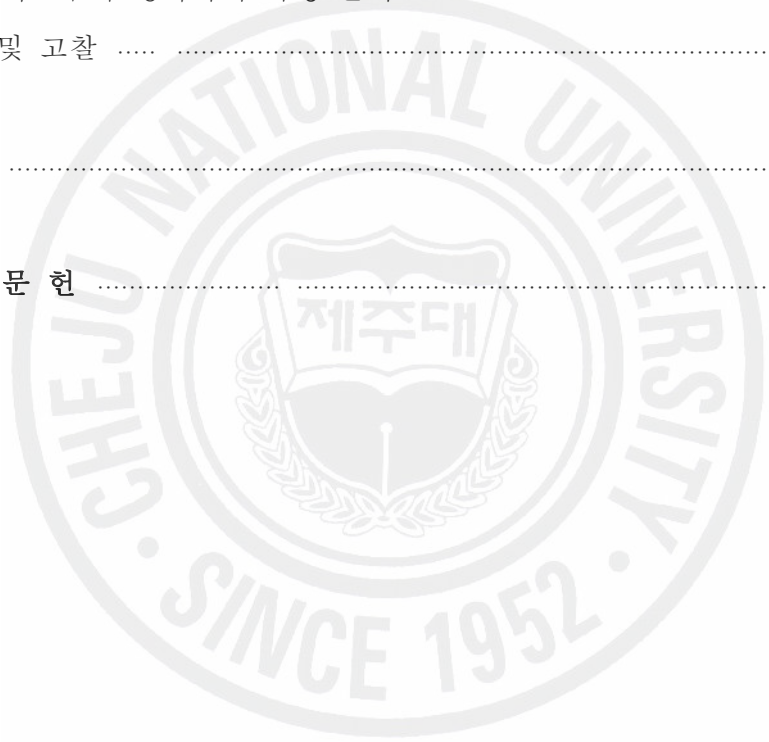
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

Feb. 2008

# 목 차

목 차	i
Summary	iii
I. 서 론	1
II. 양식장 배출수의 이화학적 특성분석	5
1. 재료 및 방법	5
1) 수온, 염분, 용존산소(DO), pH측정	5
2) 화학적 산소 요구량(COD)	5
3) 부유물질 (SS)	5
4) 암모니아성 질소	6
5) 아질산성 질소	6
6) 질산성 질소	6
7) 인산인염	7
2. 결과 및 고찰	8
III. 배출수 연안 퇴적층의 미생물학적 군집 분석	22
1. 재료 및 방법	22
1) 배출수 연안 퇴적층의 월 별 중속영양세균 개체수 측정	22
2) 배출수 연안 퇴적층의 깊이별 중속영양세균 개체수 측정	22
3) 16S rRNA를 염기서열분석을 이용한 미생물 군집 분석	23
2. 결과 및 고찰	24
IV. 배출수 연안 퇴적층 유래의 미생물학적 응용	45
1. 재료 및 방법	45
1) 단백질분해 미생물 분리 및 분해능 측정	45
2) 단백질분해 미생물의 온도별 성장 측정	45

3) Prptease activity 측정 .....	45
4) 다당분해 미생물 분리 및 분해능 측정 .....	46
5) 다당분해 미생물의 온도별 성장 측정 .....	46
6) Amylase activity 측정 .....	46
7) 지질분해 미생물 분리 및 분해능 측정 .....	47
8) 지질분해 미생물의 온도별 성장 측정 .....	47
9) Lipase activity 측정 .....	47
10) 분리균주의 생화학적 특성 분석 .....	48
2. 결과 및 고찰 .....	50
<b>V. 고찰</b> .....	70
<b>VI. 참고 문헌</b> .....	77



## Summary

Aquaculture activities are undergoing a rapid expansion in many parts of the world, inducing an increasing interest and concern for their potential impact on coastal marine environments with important management implications. As a result of this rapidly increasing production, aquaculture activities might affect the coastal environment in a variety of ways. Generally, aquaculture impact has been determined in terms of water column and sediment alterations, as well as changes in the physico-chemical characteristics and structural properties of the biological components, and comparing the impacted area with a control site (Carss, 1990). It has been previously demonstrated that organic inputs associated to fish feeding has a substantial impact on the nutrient load in coastal areas (Beveridge, 1984; Gowan and Bradbury, 1987). Also fish cultivation produces large biodeposits of pseudofaeces and faeces (Grenz, 1989), affecting the quality and quantity of POM available for benthic organisms, and influencing the nutrient recycling (Baudinet and Kaspar 1993) and inducing changes on sedimentary organic matter and on associated infaunal community. In addition, biodeposits stimulate microbial biomass and productivity. In marine sediments benthic bacterial biomass is channelled through protozoan and meiofaunal grazing to higher trophic levels. Bacteriological monitoring is of great importance especially in aquaculture, in fact areas suitable for productive purposes must possess optimal quality levels (Caruso and Del Negro et al., 1993). Consequentially, is important monitoring and controls of microbiological parameters.

Coastal sediments of aquaculture wastewater effluence area were collected at Seoungsan, Wimi, Pyoseon and Daejeoung on Jeju from July to December 2006. Bacterial distribution plate count samples were investigated

by viable cell count and species analysis. The cell number of YM agar was  $1.3\sim 3.7\times 10^7$ CFU/mL in Seoungsan,  $1.9\sim 6.3\times 10^7$ CFU/mL in Pyoseon,  $1.9\sim 2.7\times 10^7$ CFU/mL in Wimi,  $1.2\sim 5.1\times 10^7$ CFU/mL in Daejeong. R2A agar was  $3.5\times 10^7\sim 1.54\times 10^8$  in Seoungsan,  $1.4\times 10^7\sim 2.3\times 10^8$ CFU/mL in Pyoseon,  $1.3\times 10^7\sim 5.6\times 10^8$ CFU/mL in Wimi,  $1.4\times 10^7\sim 4.5\times 10^7$ CFU/mL in Daejeong. MA agar was  $4.5\times 10^7\sim 1.5\times 10^8$ CFU/mL in Seoungsan,  $1.72\times 10^7\sim 1.62\times 10^8$ CFU/mL in Pyoseon,  $1.5\times 10^7\sim 8.0\times 10^8$  CFU/mL in Wimi,  $3.4\times 10^7\sim 9.8\times 10^8$ CFU/mL in Daejeong. NA agar was  $9.3\times 10^6\sim 8.4\times 10^7$ CFU/mL in Seoungsan,  $2.2\times 10^7\sim 6.4\times 10^8$ CFU/mL in Pyoseon,  $2.4\times 10^7\sim 5.1\times 10^8$ CFU/mL in Wimi,  $2.2\times 10^7\sim 9.5\times 10^8$ CFU/mL in Daejeong. Bacterial distribution showed that 12 strains, *bacillus* spp.(2strains), *Staphylococcus* spp.(2strains), *Streptomyces* sp.(1strain), *Micrococcus* sp.(1strain), *Roseovarius* sp.(1strain), *Acinetobacteria* sp.(1strain), *Enterobacter* sp.(1strain), *Pseuisslandalteromonas* spp.(2strains), *Tenabaculum* sp.(1strain) in seoungsan. Pyoseon area distributed that 19 strains, *Shwanella* spp.(2strain), *Vibrio* spp.(1strain), *Krokinobacter* sp.(1strain), *Brevundimonas* sp.(1strain), *Erythrobacter* sp.(1strain), *Jannaschia* sp.(1strain), *Micrococcus* sp.(1strain), *Streptomyces* spp.(3strains), *Paenibacillus* sp.(1strain), *Bacillus* spp.(7strains). Wimi area distributed that 12 strains, *Staphylococcus* sp.(1strain), *Salinicoccus* sp.(1strain), *Bacillus* sp.(1strain), *Streptomyces* sp.(1strain), *Dietzia* sp.(1strain), *Micrococcus* sp.(1strain), *Vibrio* sp.(1strain), *Alterromonas* sp.(1strain), *Shewanella* sp.(1strain), *Roseovarius* sp.(1strain), *Tenacibaculum* sp.(1strain), *Muricauda* sp.(1strain). Daejeong area distributed that 12 strains, *Bacillus* spp.(4strains), *Salinicoccus* sp.(1strain), *Streptomyces* sp.(1strain), *Vibrio* sp.(1strain), *Pseuisslandalteromonas* spp.(4strains), *Tenacibaculum* sp.(1strain).

## 서론

육상시설을 이용하는 양식은 날씨나 해황 변동의 영향을 직접 받지 않는다는 이점이 있어 1970년대 후반부터 보급되기 시작하였다(Lee *et al.*; 2002).

이와 같은 육상 수조식 양식 산업이 지역경제의 성장과 수산업의 발전에 기여하는 바가 큰 것이 사실이지만 양식장 배출수에 의한 연안 환경오염문제 또한 중요한 문제로 대두되고 있는 실정이다. 일반적인 육상 양식시설은 넓은 부지와 다량의 해수를 이용한 사육방식이기 때문에 유지 관리면에서 비경제적이며, 배출수는 그 수량이 막대하고, 오염물질 배출농도의 변화폭이 대단히 크다는 점 등의 제한 요인들에 의하여 기존의 통상적인 물리·화학적, 생물학적인 폐수처리공법의 도입이 거의 불가능한 특성을 가지고 있다(Huh *et al.*, 1995; Yun *et al.* 1999).

최근 우리나라의 연안해역은 육상으로부터 오염물질의 다량유입과 양식장의 자가오염으로 인하여 빈산소수괴가 형성되고, 영양염류의 용출량 증가로 부영양화가 가속화되어 적조 발생과 같은 2차적인 문제가 발생하고 있다. 특히, 양식장 퇴적물은 어패류의 배설물 등에 의한 유기물의 다량 퇴적으로 연안 환경 악화를 초래하는 주원인이 되고 있으며, 수산물 생산에 커다란 장애요인이 되고 있다(Lee *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1998; Takeuchi, 1999).

양식장에서 발생하는 오염물 중 가장 큰 영향을 미치는 것은 사료의 공급에 의한 경로에 의해 발생하는 것으로 미접취 사료와 대사 작용 중 소화하지 못한 영양분, 어분, 뇨 등에 의해 수질이 오염된다(Timmons, 1994).

이처럼 양식장에서 발생하는 오염물의 가장 큰 특징은 고형물질과 암모니아와 같은 용존 물질이 모두 포함되어 있다는 것이다. 이러한 폐쇄적 양식장은 비교적 좁은 사육조에서 많은 어류를 수용하므로 어류의 활동에 의한 수질 등 환경요소의 변화를 가져오기 쉽고, 또 양식 어류의 밀도가 높아짐에 따라 노폐물의 축적이 심각한 문제점으로 대두되고 있다. 사육조내에서는 어류의 대사 배설물이나 먹고 남은 찌꺼기 등이 여러 가지 현탁물질로 부유하고 있으며, 이들 고형물질이 분해되는 과정에서 생성되는 암모니아는 수중생물에 대하여 강한 독성을 야기해 큰 문제점으로 부각되고 있다(Yun *et al.*, 1999).

연안역은 육상환경과 접해 있어서 육상기원 물질의 유입과 기상 조건 등에 따라서 그 해황이나 해양환경특성이 변하며, 계절 변화가 비교적 뚜렷하게 나타난다. 이러한 연안역의 수질은 현대 사회의 급속한 산업발전에 따른 공장폐수나 생활하수의 유입으로 인한 부영양화와 오염생물의 대량번식 등으로 인하여 악화되고 있다.



육상 양식장의 경우에는 주변 해역의 해양환경이 양식 생물의 성장 및 생존에 치명적인 영향을 끼치게 된다. 이와 같이 연안 및 육상의 양식장의 양식어류를 비롯한 유용한 수산자원 생물의 대량폐사로 인하여 수산업계에 커다란 영향을 끼칠 수 있다. 따라서 양식장 주변의 해양환경의 실태와 그 특성을 파악하는 것이 무엇보다도 중요하며, 해역의 효율적인 이용과 관리가 절실히 요구되고 있는 곳이기도 하다. 그러나 현재까지는 양식장 인접 해역과 대조구해역에 대한 조사가 집중적으로 이루어지거나, 양식장 배수구를 중심으로한 해양환경 조사는 미흡한 실정이다(Cho *et al.* 2002).

수생 생태계에서의 미생물은 유기물을 이용하고 분해하여, 물질과 에너지의 순환에 관여한다. 세균과 다른 미생물들이 수생 생태계에서 중요한 역할을 수행한다는 것은 오래 전부터 알려져 있었지만, 이들에 관한 정량적인 연구를 수행하는데에는 어려움이 많았으며, 최근 10여 년 동안에 이루어진 다양한 방법론의 개발을 통하여 많은 성과를 거두고 있다(Watson *et al.*, 1977; Poter and Feig, 1980; Gocke, 1977; Van Es and Myer-Reil, 1982; Newell and Christian, 1981; Fuhrman and Azam, 1982).

해양 미생물 군집은 생태계에서 생산자이면서 분해자로서 생태계의 안정된 동적 평형을 유지시키는 중요한 생물 군집이다. 미생물은 해양생태계에서 동물플랑크톤에 의한 2차 내지는 고차 생산물의 생산에 기여하는 한편 플랑크톤이 생산하는 1차 유기생산물의 50% 이상을 무기영양 물질로 전환시키는 분해자의 역할을 하며(Reinheimer 1985; Jaspers *et al.* 2001), 무기질화 된 최종생산물은 해양 생물의 동화, 이화 작용에 이용할 수 있게 한다(Kim *et al.*, 1998).

이외에도 미생물은 광·화학합성 작용에 의한 1차 생산자 및 각종 질병에 매체가 되기도 한다. 이와 같은 특성 때문에 미생물들은 수 환경에 유입되는 각종 오염물질에 민감하게 반응한다(Brock, 1997).

조간대 퇴적토는 상층수의 물리, 화학적, 성분과 퇴적토 입자의 크기, 유기물의 함량, 지리적 위치 등 여러 환경 요인에 따라 영향을 받는 복잡한 생태계이다. 특히 연안 생태계는 수심이 낮음으로 연안 수계에 존재하는 유기물의 순환은 퇴적층에 의해 지대한 영향을 받는다. 연안 퇴적층에는 다양한 경로로 유입된 유기물이 다량 함유되어 있으며, 이들 유기물들은 상당 기간 동안 분해되지 않고 남아 있다가(Meyer-Reil, 1984), 수계와 퇴적층에 분포하는 중속영양 세균과 생리적 특성 균들이 분비하는 효소들에 의해 분해, 흡수되고(Hoppe, 1983), 그 결과 생성된 미생물은 다시 일차 소비자에게 유기물 공급원으로 제공된다. 이 때 미생물들에 의해 이용될 수 있는 유기물들은 수계와 퇴적토에 분포하는 미생물 군집의 특성에 따라 제한되므로 연안 퇴적층 생태계에서의 에너지 흐름을 파악하는 데

에는 이러한 미생물 군집의 특성을 밝히는 것이 매우 중요하다.

Protease는 동물, 식물, 미생물 등 대부분 생명체의 세포 안과 밖에서 발견되며, 다양한 생리적 역할을 하는 중요한 효소이다. Protease는 활성 부위에서 작용하는 기능기에 의해 serine protease, metal protease(metalloprotease), aspartic protease, cysteine protease 등으로 구분되어지며, 작용 pH에 따라 acid protease, neutral protease, alkaline protease로 분류된다(Chun. *et. al.*, 2002).

단백질분해 세균의 경우, 우유단백질의 대부분을 차지하는 카제인은 세포벽에 부착된 cell-envelope proteinase에 의해서 분해되어 여러 가지 크기의 peptide로 만들어지고 이들의 transport system에 의해서 세포내로 이동된 다음, 세포내 peptidase들에 의해서 분해되어 이용된다고 보고 되었다(Exterkate, 1984; Pritchard *et. al.*, 1993; Smid *et. al.*, 1995; Tan *et. al.*, 1993; Lee *et. al.*, 2002).

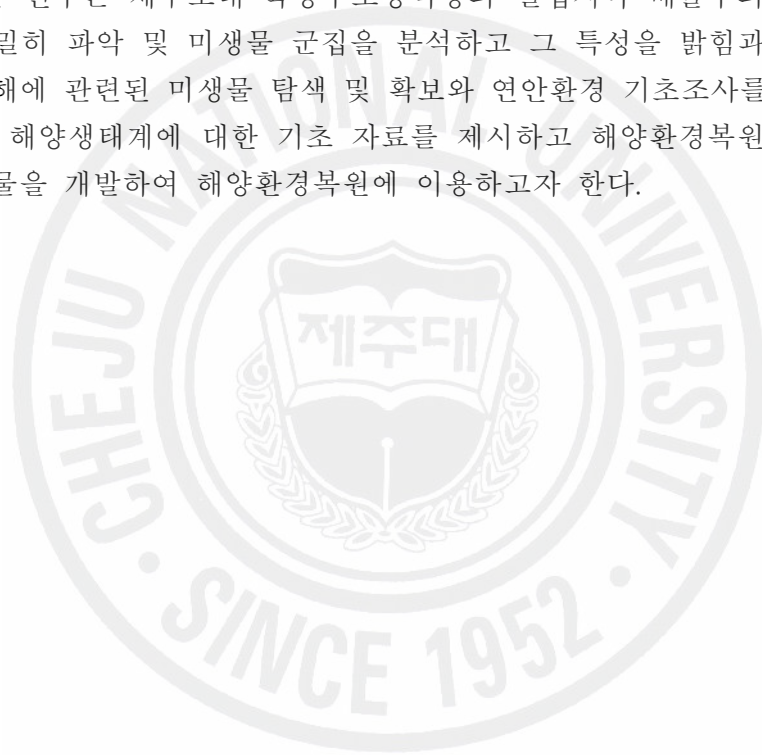
산업적으로 유용한 protease는 방선균, Bacillus, 곰팡이 등 다양한 미생물로부터 발견되었고, 최근에는 새로운 화학적 물리적 조건에 맞는 protease를 산업적으로 이용하기 위해 다양한 서식지로부터 미생물들이 분리되고 있다 (Godfrey *et. al.*, 1996).

Lipase는 아실글리세롤의 카르복실에스테르결합을 가수분해하여 지방산과 글리세롤을 만드는 효소이다(Jaeger, *et. al.*, 1999). Lipase의 기능은 지방의 가수분해이지만 반응조건에 따라 지방 이외의 다양한 에스테르화합물의 가수분해를 수행할 수 있을 뿐만 아니라, 에스테르 합성반응과 트랜스에스테르화 반응 등 다양한 화학반응을 촉매 할 수 있기 때문에 각종 산업에서 널리 사용되고 있다. 미생물이 생산하는 리파제는 다양한 기질특이성, 위치특이성, 입체특이성 등의 유용한 반응 특성을 지니고 있다. 이러한 넓은 기질특이성과 높은 입체특이성질체에 대한 선택성을 이용하여 가수분해반응, 에스테르화반응 및 트랜스에스테르화 반응으로서 다양한 연구가 이루어졌다(Jaeger and Eggert, 2002; Reetz, 2002). 특히 Burkholderia cepacia(formerly Pseudomonas cepacia)가 생산하는 lipase는 수용성환경과 비수용성 환경에서 우수한 효소활성을 나타내어 biocatalyst로서의 이용가능성이 증대되고 있다(Otero *et. al.*, 2005).

Glucose 중합체인 starch는 가장 널리 이용되는 식물체의 탄수화물로서 amylase는 이러한 starch를 분해하는 효소이다. Amylase는  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase와 isoamylase로(Gerrenwood *et. al.*, 1962; Whwlan 1965; Wayne 1965) 크게 구분할 수 있는데  $\alpha$ -amylase(endo-amylase)는 amylose나 amylopectin의  $\alpha$ -1,4결합을 무작위로 가수분해하여 dextrin을 형성

하고  $\alpha$ -amylase의 지속적인 작용에 의해 maltose, maltotriose, maltotetraose 등의 oligosaccharide를 형성한 뒤 glucose와 maltose로 분해하는 효소이다.  $\beta$ -amylase(exo-amylase)는 starch의 비환원성 말단으로부터 maltose 단위로 가수분해하는 효소로서  $\alpha$ -1,6결합을 포함하는 한계 dextrin을 형성한다. Gluconamylase는 starch에 작용하여 amylose와 amylopectin의  $\alpha$ -1,4,  $\alpha$ -1,6 결합을 가수분해하여 glucose를 생성하는 당화효소이며, isoamylase는 starch의  $\alpha$ -1,6 결합에만 작용하는 효소이다(John et. al., 1963; Kung et. al., 1953; John 1972). 이러한 전분의 분해에 관련하는 효소는 효모, 곰팡이, 세균, 맥아 및 동물체내에 널리 존재한다.

따라서 본 연구는 제주도내 육상수조양식장의 밀집지역 배출수의 연안 오염 상태를 정밀히 파악 및 미생물 군집을 분석하고 그 특성을 밝힘과 동시에 퇴적층의 분해에 관련된 미생물 탐색 및 확보와 연안환경 기초조사를 통하여 양식장 주변 해양생태계에 대한 기초 자료를 제시하고 해양환경복원에 이용 가능한 미생물을 개발하여 해양환경복원에 이용하고자 한다.



## II. 양식장 배출수의 이화학적 특성 분석

### 1. 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 배출수는 선정된 양식장을 중심으로 멸균된 1L 무균 채수병을 이용하여 월 1회씩 배출수를 직접 채수하였으며, 채수 후 4℃를 유지하면서 실험실로 운반하여 분석실험을 실시하였다.

시간대별 채수의 경우 선정된 양식장을 중심으로 멸균된 1L 무균 채수병을 이용하여 9:00시, 12:00시, 15:00시, 18:00시에 배출수를 직접 채수하였으며, 채수 후 4℃를 유지하면서 실험실로 운반하여 해양환경공정시험방법(해양수산부, 2002)에 의거하여 수질을 분석하였다.

#### 1) 수온, 염분, 용존산소(DO), pH

YSI 556 MPS(Multi-probe system)의 probe module을 현장의 배출수에 직접 담그고 그 측정값을 산출하였다.

#### 2) 화학적 산소 요구량(COD)

COD는 Chemical oxygen demand의 약칭으로 화학적 산소 소비량, 또는 화학적 산소 요구량이라고도 한다.

배수 중의 유기물, 아초산염, 제1철염 등이 배수 중의 용존산소를 소비하고 수중 생물의 생육을 저해하므로, 이들의 산소 소비량을 화학적으로 정량하여 수질 오탁에 있어서의 하나의 지표로 사용한다. COD의 단위는 ppm으로 표시하고, 값이 작을수록 수질오탁도 작다고 볼 수 있고, 과망간산칼륨과 중크롬산칼륨 소비량으로 측정한다.

화학적 산소 요구량은 시료를 알칼리성으로 하여 과망간산칼륨 일정과량을 넣고 60분간 수욕 상에서 가열반응 시키고 요오드화칼륨 및 황산을 넣어 남아 있는 과망간산칼륨에 의하여 유리된 요오드의 양으로부터 산소의 양을 측정하는 과망간산칼륨 법을 사용했다(해양공정시험방법, 2002).

#### 3) 부유물질(SS)

부유물질(Suspended Particulate Matter, SPM)은 해저나 육지에서 기원된 것이기 때문에 해수의 연직 혼합 및 유동 상태 등 해황을 판단하는데 유용한 지표로 사용될 수 있다. 부유물질은 식물플랑크톤의 광합성과도 관련이 있어 연안역에서의 일차생산력 및 영양염의 분포에 영향을 주는 요인이 된다(Choi,

et. al., 2004).

부유 물질 측정은 미리 무게를 단 유리섬유 거름종이(GF/C)를 여과기에 부착하여 일정량의 시료를 여과시킨 다음 105~110℃에서 건조하여 무게를 달아 여과전·후의 유리섬유 거름종이의 무게차를 산출하여 부유물질의 양을 구하는 방법을 사용했다(해양공정시험방법, 2002).

#### 4) 암모니아성 질소(NH<sub>4</sub>-N)

사육조 내에서 어류의 대사 작용과 미접취 사료의 분해 등으로 인하여 발생하는 암모니아는 어류의 성장을 저해하거나 치사시키는 등 유해한 영향을 끼친다. 사육조 내 암모니아는 비이온성 암모니아(NH<sub>3</sub>)와 이온성 암모니아인 암모늄이온(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)으로 존재한다. 양어장 수중의 비이온성 암모니아는 어류의 세포벽을 통과하여 어류에게 치명적인 피해를 주게 되므로, 미국 환경보호청에서는 사육조 내 비이온성 암모니아를 0.02g/m<sub>3</sub> 이하로 유지하도록 권장하고 있다(EPA, 1976).

암모니아는 해수 중에서 수화상태인 용존 NH<sub>3</sub> 기체와 양이온인 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>로 존재한다. 따라서 정상적인 해수의 경우 94~98%가 양이온인 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>인 형태로 존재한다. 해수중의 암모니아는 혐기성 차아염소산 용액과 산화 반응하여 모노크롤아민을 생성한 후, 페놀과 촉매인 니트로프러시드 그리고 과량의 차아염소산에 의해 푸른색의 인도페놀을 생성하게 된다. 이때 분광광도계 또는 자동분석기(autoanalyzer)로 최대 흡수파장인 640nm에서 최종 발색된 인도페놀의 흡광도를 측정하였다(해양공정시험방법, 2002).

#### 5) 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)

아질산(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)은 암모니아의 산화형태에서 중간 생성물질로서 질산화 세균의 균형이 깨질 때 생물체에 유해한 독성 농도에 도달할 수 있다(Collins et. al., 1975). 하지만, 고밀도 새우 양식장의 경우 아질산 농도가 상당히 증가할 수 있으며, 환경수 중 이러한 아질산 농도의 증가는 생산성에 영향을 주는 탈피 작용에 영향을 주어 성장지연을 야기하며, 극단적인 경우 폐사를 유발할 수 있다(Chen and Tu, 1990; Chen and Chen, 1992).

해수시료중의 아질산 질소는 일차적으로 방향족 질소 화합물인 설페닐아미드와 산성화에 반응하여 디아조늄 이온을 형성한 후 이차적으로 다른 방향족 질소화합물인 나프틸 에틸렌아미드와 반응하여 분홍색의 용액을 생성하게 된다. 이때 분광광도계 또는 자동분석기(autoanalyzer)로 최대 흡수파장인 543nm에서 최종 발색된 용액의 흡광도를 측정하였다(해양공정시험방법, 2002).

#### 6) 질산성 질소( $\text{NO}_3\text{-N}$ )

질산성 질소는 질산염을 그 질소량으로 나타낸 것으로서(Halling and Jorgensen, 1993) 질소의 가장 안정된 형태로 더 이상 산화가 진행되지 않으므로 질소 분해의 최종생성물이다. 그러므로 질산성 질소는 오래된 오염의 흔적을 나타내는 것으로 위생적으로 문제될 것은 없으나 질산성 질소 자체가 인체에 유해하며 유아의 청색증, methemoglobinemia(blue baby)를 일으키는 원인이 된다(Gaylea and Boardman, 1989).

수질환경 생태계에 있어서 질소에 의한 오염 형태는 호소의 부영양화 및 하천의 강부수성 그리고 해역의 적조발생 등이 있다(Wisemann, 1994).

해수시료중의 질산 질소는 구리 촉매로 처리된 카드뮴 환원 관을 이용하여 아질산 질소로 환원시킨 후 아질산 질소의 측정원리에 따라 측정하였다(해양공정시험방법, 2002).

#### 7) 인산인염

인은 인산이온으로써 자연적으로 물이나 폐수에서 발생한다. 수중에서 인의 형태는 ortho-phosphate(정인산:  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ 으로 존재함)와 폴리인산염, 유기인산염 등으로 존재하며(환경화학, 2000), 호수생태계에서 인의 이용률은 식물플랑크톤의 생산력과 종 조성을 조절하는 중요한 요인으로(Cotner and Wetzel, 1992) 부영양화의 주원인이자, 조류증식의 제한 물질이다.

해수시료중의 인산 인은 산성의 몰리브덴산과 반응하여 인산몰리브덴산 착화합물을 형성한 후 안티몬이 첨가된 환원용액인 아스코르빈산에 의해 환원되어 푸른색 용액을 생성하게 된다. 이때 분광광도계 또는 자동분석로 최대 흡수파장인 845nm에서 최종 발색된 용액의 흡광도를 측정한다(해양공정시험방법, 2002).

## 2. 결과 및 고찰

### 1) Sampling 지역의 위치

제주도 관내 양식장 밀집 지역을 4곳으로 나누어 Sampling한 배출수 위치는 Fig.1과 같다.

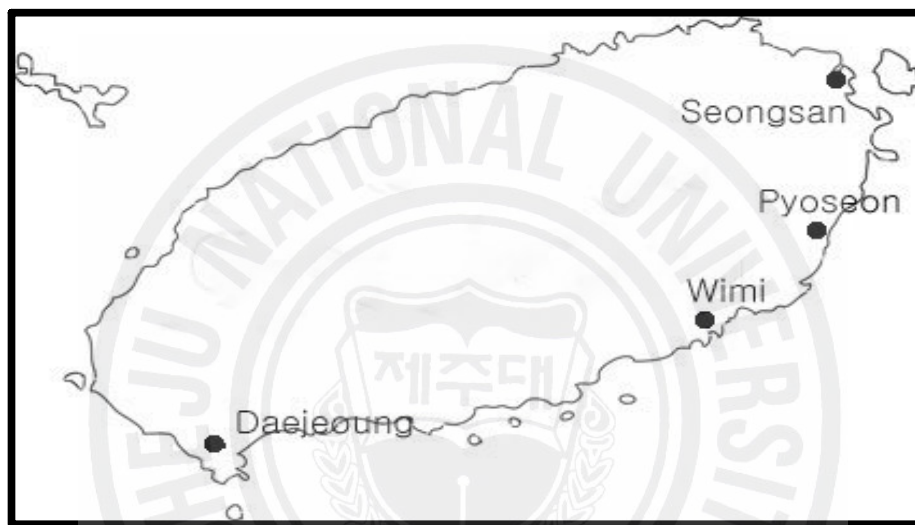


Fig 1. A map showing the sampling station on Jeju island.

## 2) 월별 양식장 배출수의 이화학적 특성분석

제주도내 양식장 밀집 지역을 4곳으로 나누어 2006년 7월부터 2006년 12월까지 채집한 양식장 배출수의 이화학적 특성을 조사한 결과 Fig.2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 와 같았다. 성산지역 양식장 배출수의 평균 수소이온농도(pH)는 7.74로 약염기성으로 나타났다. 성산 지역은 11월의 경우 7.40으로 평월에 비하여 낮게 나타났으나, 12월에 관측결과, 7.74로 평균 수소이온농도 값으로 나타났다. 표선지역 양식장 배출수의 경우 평균 수소이온농도(pH) 값이 7.68로 나타났으며, 9월에 7.60으로 평월에 비하여 가장 낮은 수소이온농도 값을 보였으며, 표선지역의 경우 다른 지역과 달리 매월마다 불규칙한 양상을 나타내는 것으로 관측됐다. 위미지역의 양식장 배출수의 평균 수소이온농도(pH) 값이 7.68로 나타났으며, 위미지역의 양식장 배출수의 경우 7, 8, 9, 10, 12월에는 일정한 값을 보였으나, 11월의 경우 7.48로 평월에 비하여 낮은 농도 값을 보였다. 대정지역의 양식장 배출수의 경우 평균 7.7로 나타났으며, 대정지역의 배출수의 경우, 9월에 값이 7.99로 다른 지역과 달리 유독 높은 수치를 보였으며, 수소이온농도(pH)의 경우 모든 양식장 배출수에서 수치가 약염기성을 띄는 것으로 조사되었다.

염분농도는 일반적으로 담수의 유입정도와 강수량 및 증발량 등의 영향을 받는다. 평균적인 해수의 염분농도는 평균 32.5~34.3‰ 정도로 알려져 있다 (Moon, et. al., 2006) 본 연구의 관측결과 성산, 표선, 위미지역의 양식장 배출수의 평균 염분농도가 일반적인 해수의 염분농도와 유사하게 나타났으나, 대정지역의 양식장 배출수의 경우 평균 염분농도가 28.8‰로 일반적인 해수의 평균염분농도에 비하여 매우 낮은 염분농도 값을 나타냈다. 해양의 염분농도의 경우 외양역은 거의 일정한 수준을 연중 유지하지만 본 조사지역과 같은 연안역, 특히 연안 육상유입수가 많은 해양에서는 육상 담수유입에 의한 저염현상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 하지만 성산, 표선, 위미 지역의 경우 육상 담수유입이 활발히 일어나는 7월과 8월에도 31‰를 상회하고 나머지 조사기간 중에도 염분농도가 31~33‰ 범위로 외양역의 염분특성을 나타내는 것으로 나타났으나, 대정지역의 경우 외양역의 영향보다는 육상수의 유입에 따른 저염현상을 보이는 것으로 사료된다.

해양생물서식에 있어서 없어서는 안 되는 용존산소(DO)는 그 농도가 5mg/L 이상은 되어야만 어류의 호흡에 지장이 없는 것(서귀포시, 1998)으로 밝혀져 있다. 특히 유기물 유입이나 급격한 부영양화로 인하여 식물플랑크톤의 대량 증식에 따른 사후 생물체의 분해과정 중 수중의 용존산소를 급격히 소모할 때



는 해역의 빈 산소 수피나 혐기성 상태가 야기 되어 해역의 부패를 초래한다 (서귀포시, 1998). 본 연구의 각 지역의 용존산소(DO) 측정 결과 성산지역의 양식장 배출수의 경우 7월과 8월에 각 각 5.04, 4.88mg/L의 해역별 수질기준으로 II등급에 이르는 낮은 용존산소(DO) 값이 관측됐을 뿐, 모든 지역의 배출수에서 해역별 수질기준으로 1등급에 이르는 용존산소(DO) 값을 보였다.

성산, 표선, 위미, 대정 지역의 양식장 배출수를 중심으로 수온을 조사한 결과 성산지역의 경우, 7월에 24.6℃로 기록되었으나 동절기인 12월에 들면서 17.8℃로 약 7℃ 가량 감소하였으며, 표선지역의 경우, 하절기인 7월에 23.9℃이었던 수온이 12월에는 16.8℃로 감소하였으며, 위미지역의 배출수의 경우, 7월에 24.1℃이었던 수온이 12월에는 17.1℃로 감소하였다. 대정지역도 다른 지역과 유사하게 하절기인 7월에 24.6℃이었던 수온이 동절기인 12월에는 16.84℃로 감소를 보였으며, 이러한 감소 폭은 성산, 표선, 위미, 대정이 모두 비슷하게 나타났다.

총 질소는 인과 함께 하천과 바다에 존재하는 생물체를 성장시키는 필수 영양소로 작용할 뿐만 아니라 과다한 양이 존재 시 부영양화로 인하여 조류, 세균 등의 대량 발생을 촉발하여 수질을 악화시킨다. 해수에서 총 질소는 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N), 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)의 합으로 나타내는데, 주로 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N)와 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N)가 대부분을 차지한다(Moon, 2006). 본 연구의 총 질소 농도는 성산, 표선, 위미, 대정 지역의 모든 양식장 배출수에서 해역별 수질 등급을 모두 초과 하였다. 성산지역의 경우 총 질소 농도의 평균값이 1.20mg/L, 표선지역의 경우 1.17mg/L로 나타났으며, 위미지역의 경우 0.97mg/L로 다른 지역과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 평균 농도 값을 보였으며, 대정지역의 양식장 배출수의 경우 2.27mg/L로 채수 지역 중 가장 높은 총 질소 농도로 나타났다. 이러한 결과로 비추어 볼 때 질소원을 제어할 수 있는 기술이 시급히 도입되어야 할 것으로 사료된다.

해수의 인산인염 농도는 해양에 존재하는 생물체의 생산력을 제한하는 인자로 작용하는데 저농도의 경우 플랑크톤의 증가를 억제함으로써 바다의 생산력을 제한하는 것으로 알려져 있다(Moon, 2006). 본 연구에서 양식장 배출수에서의 인산인염의 함량을 조사한 결과 성산지역의 경우 평균 0.48mg/L, 표선지역의 경우 0.55mg/L로 나타났으며, 가장 높은 농도를 보인 위미지역의 경우 0.66mg/L로 조사되었으며, 대정지역의 경우 다른 지역과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 0.44mg/L의 농도를 나타냈으며, 10월의 경우 모든 배출수에서 농도가 감소함을 확인 할 수 있었다.

화학적 산소요구량(COD)은 생물학적 산소요구량(BOD)과 더불어 주로 유기 물질의 농도를 간접적으로 나타내는 지표로 이용된다. 하지만 해수에는 무기물이 다량 함유되어 있어 생물학적 산소요구량(BOD) 측정이 불가능하여 화학적 산소요구량(COD)을 그 지표로 사용하고 있다(환경공학개론, 1995). 2006년 7월부터 12월까지 화학적 산소요구량(COD)을 측정한 결과 성산, 표선, 위미 지역에서의 화학적 산소요구량(COD)의 평균농도가 1.5mg/L, 1.8mg/L, 1.6mg/L로 수조식 육상양식시설의 방류수 수질 허용 기준인 2mg/L을 넘지 않는 것으로 나타났으나, 대정지역의 양식장 배출수의 경우, 화학적 산소요구량(COD)의 평균농도가 2.3mg/L로 수조식 육상양식시설의 방류수 수질 허용 기준인 2mg/L을 초과하는 것으로 나타났다.

해역의 부유물질(SS)은 침전되면서 정착성 생물의 표면을 덮음으로써 호흡곤란 상태에 이르고, 부유성 생물에는 호흡기 장애를 유발시키는 요인으로 작용한다. 또한 부유물질(SS) 농도가 높으면 광투과 저하를 가져와 해중생물이나 식물플랑크톤의 광량저하와 광합성 량에도 막대한 지장을 초래하게 된다. 또한 부유물질(SS)의 양은 수조식 육상양식시설의 방류수 수질기준에 평상시 부유물질(SS)은 3mg/L이하로 급이 시에는 10mg/L이하로 각각 규정하고 있다(서귀포시, 1998). 본 연구에 성산, 표선, 위미, 대정지역의 양식장 배출수의 부유물질(SS) 농도를 조사한 결과 성산지역의 양식장 배출수의 경우 평균농도가 19.3mg/L, 표선지역의 경우 평균농도가 다른 지역과 비교시 상대적으로 높은 21.2mg/L, 위미지역의 경우 평균농도가 21.3mg/L로 나타났으며, 대정지역의 경우에는 18.5mg/L의 상대적으로 낮은 농도가 나타났다. 하지만 조사한 모든 지역의 양식장 배출수가 수조식 육상양식시설의 방류 기준을 2배 이상 초과하는 것으로 조사되었다.

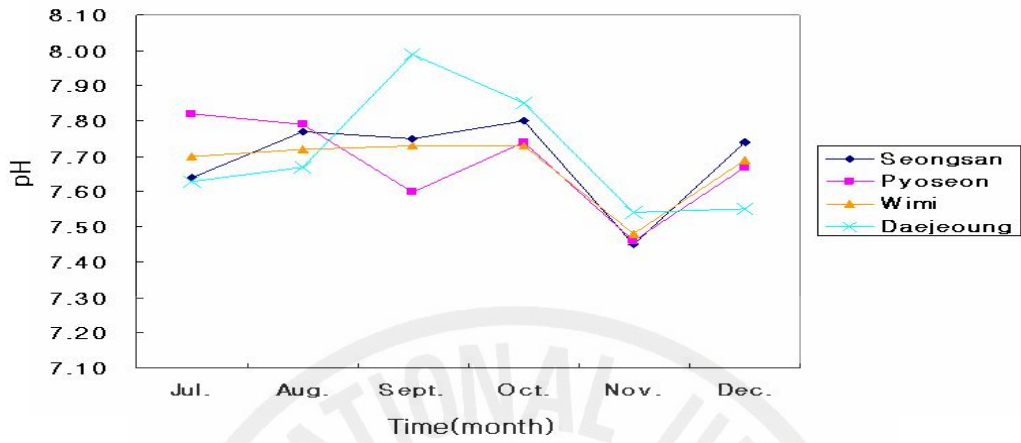


Fig.2. Seasonal variation of pH of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

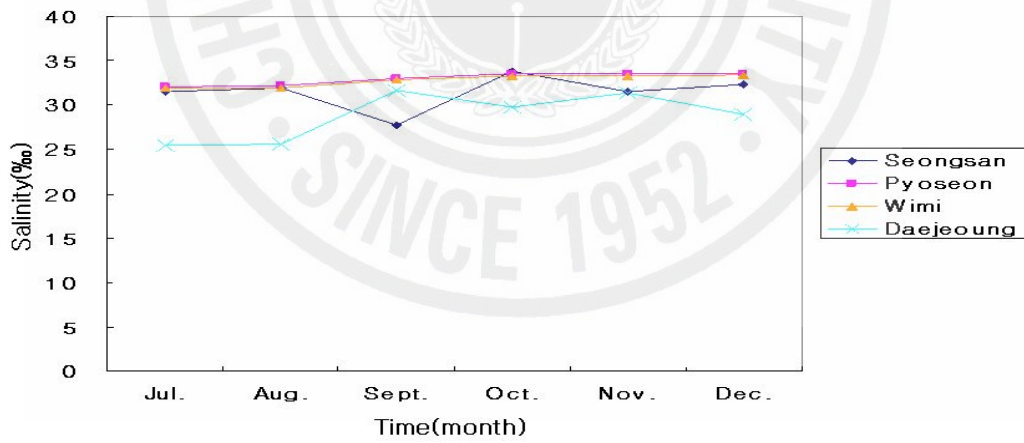


Fig.3. Seasonal variation of salinity of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

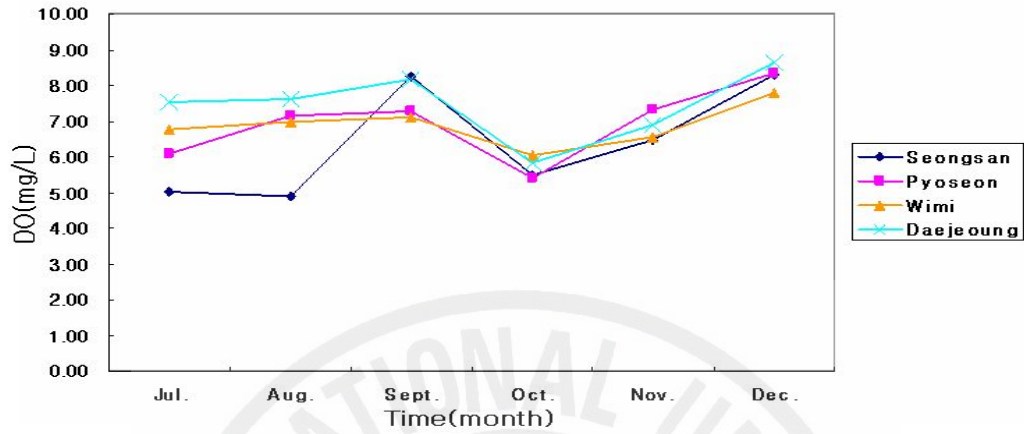


Fig.4. Seasonal variation of DO of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

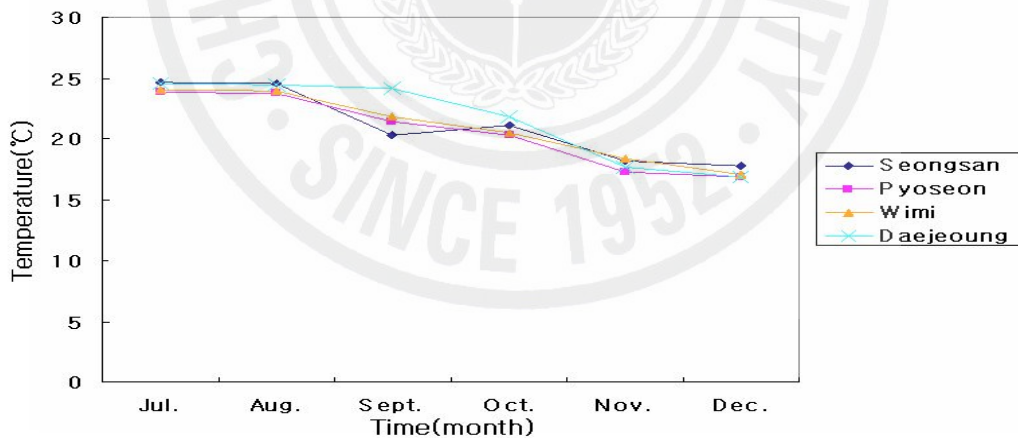


Fig.5. Seasonal variation of Temperature of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

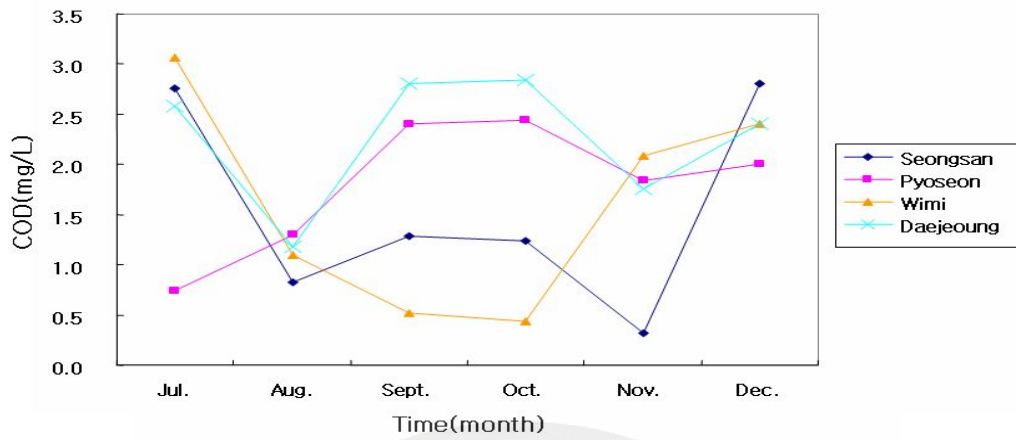


Fig.6. Seasonal variation of COD of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

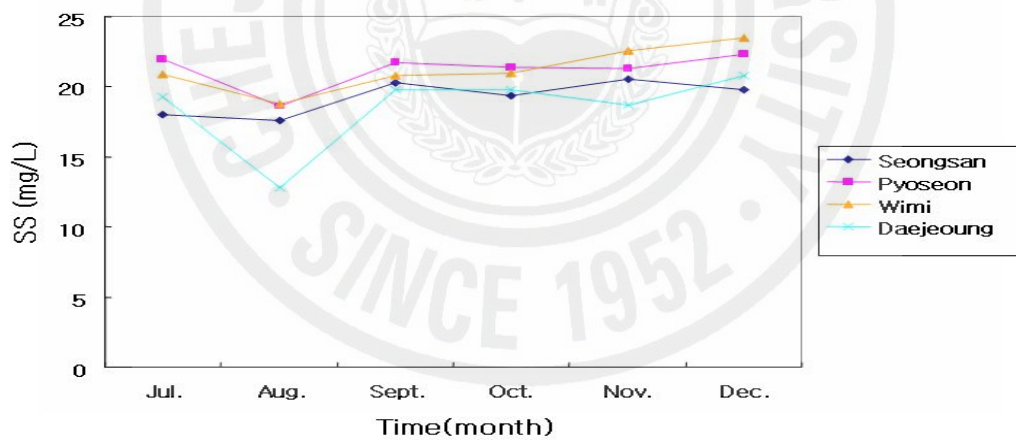


Fig.7. Seasonal variation of SS of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

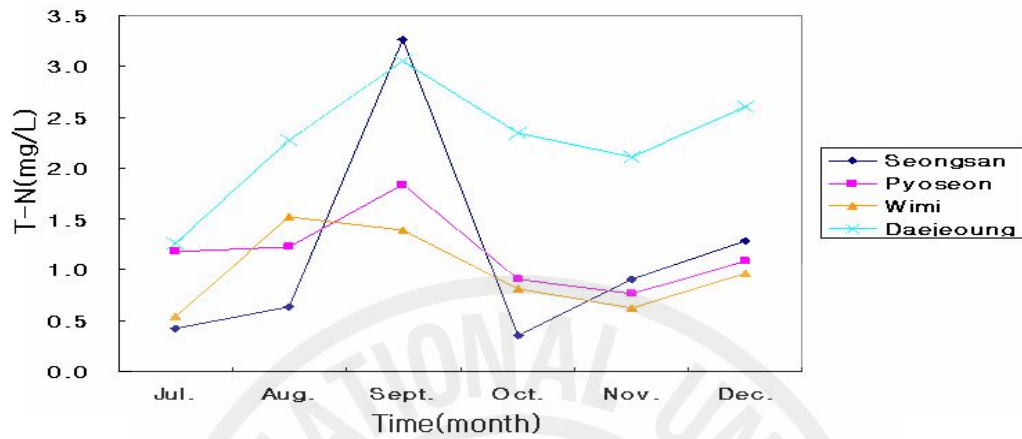


Fig.8. Seasonal variation of T-N of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

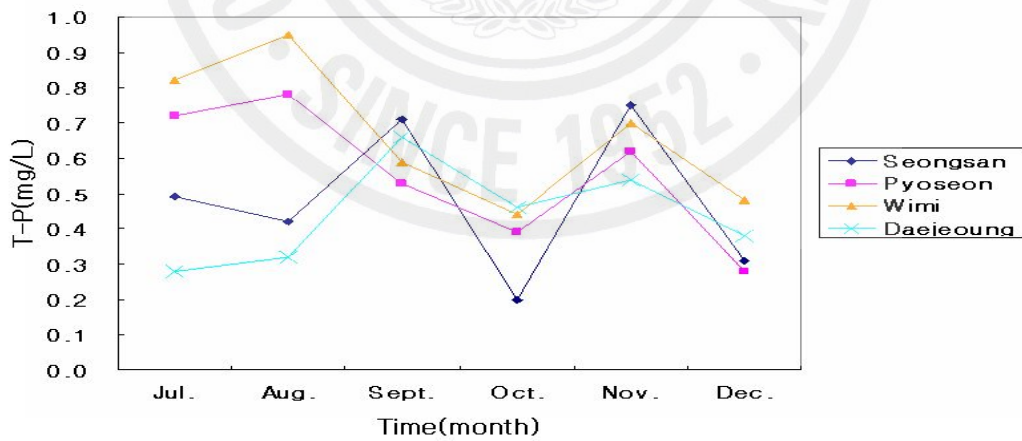


Fig.9. Seasonal variation of T-P of aquaculture waste water on Jeju island from July 2006 to December 2006.

### 3) 시간대별 양식장 배출수의 이화학적 특성분석

제주도내 양식장 밀집 지역을 4곳으로 나누고 각 각의 지역의 양식장 배출수를 9:00, 12:00, 15:00, 18:00시에 각 각 채수하여 시간대별 양식장 배출수의 이화학적 특성을 분석하였으며 결과는 Fig. 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17과 같았다. 평균 수소이온농도(pH)는 성산 지역의 경우 7.74, 표선지역의 경우 7.64, 위미지역의 경우 7.62, 대정지역의 경우 7.62로 모든 지역의 양식장 배출수에서 약염기성으로 나타났으며, 성산, 표선, 위미지역의 배출수의 경우 09:00시부터 15:00시까지의 점차 증가하다가 18:00시에는 전체적으로 감소하는 것으로 나타났으나 대정지역의 배출수에서의 수소이온농도(pH)는 다른 지역과 반대로 18:00시에 급격히 증가하는 양상을 보였다.

염분농도의 경우 시간대별로 큰 차이는 나타나지 않았으나 표선지역의 양식장 배출수에서 33.47‰로 일일 평균 염분농도가 가장 높게 나타났으며, 성산지역의 양식장 배출수의 일일 평균 염분농도는 32.37‰, 위미지역의 경우 33.18‰로 각 각 나타났다. 그리고 대정지역의 경우는 29.76‰로 매우 낮은 염분농도를 나타냈으나 이 농도는 대정지역의 평균 염분농도인 28.81‰ 보다는 높은 수치였다.

해양생물서식에 있어서 없어서는 안 되는 용존산소(DO)는 성산지역의 양식장 배출수의 경우 일일 평균 용존산소(DO)농도가 8.98mg/L로 나타났으며, 표선 지역의 경우 7.87mg/L, 위미지역의 양식장 배출수의 경우 7.47mg/L, 대정지역의 양식장 배출수에서의 일일 평균 용존산소(DO)가 8.47mg/L로 각 각 나타났다. 이러한 일일 평균 용존산소(DO)량은 생물 서식에 필요한 5mg/L을 상회하는 높은 양으로 나타났다.

수온의 경우 4곳 지역의 시간대별 수온 변화는 크게 나타나지 않았으며, 각 지역의 일일 평균 수온을 살펴보면, 성산지역의 배출수의 일일 평균수온은 17.8℃로 상대적으로 가장 높게 나타났으며, 표선지역의 경우 16.9℃, 위미지역은 17℃, 대정지역의 경우에는 16.5℃로 각 각 나타났다.

해역에서 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N), 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)의 합으로 나타내는 총질소의 일일 평균 농도의 경우, 성산지역의 양식장 배출수의 경우 1.03mg/L, 표선지역의 경우 1.12mg/L, 위미지역의 경우 상대적으로 가장 낮은 농도인 0.95mg/L, 대정지역의 경우 4지역 중 가장 높은 농도인 2.64mg/L로 각 각 나타났으며, 성산지역의 18:00시에 채취한 배출수를 제외한 모든 배출수에서 해역별 수질 등급기준을 모두 초과하였으며, 대정, 위미, 표선지역의 경우 총질소의 농도 변화가 거의 나타나지 않았으나, 성산지역

의 경우 일정하던 총질소 농도가 18:00시에 급격히 감소하는 양상을 보였다.

인산인염의 경우 위미지역의 양식장 배출수와 대정지역에서 일일 인산인염의 평균농도가 0.4mg/L로 나타났으며, 나머지 지역인 성산과 표선지역의 평균농도는 0.3mg/L로 나타났다. 이러한 평균농도는 4지역의 양식장 배출수 모두가 해역별 수질 등급기준을 초과하는 수치이며, 성산과 위미지역의 양식장 배출수의 경우 0.38mg/L, 0.48mg/L로 가장 높은 농도를 보이는 12:00시를 기점으로 하여 농도가 0.15mg/L, 0.33mg/L로 각 각 감소하였으나, 표선과 대정지역의 경우 성산, 위미지역과는 반대로 12:00를 기점으로 배출수내 인산인염 농도가 증가하는 것으로 나타났다.

화학적 산소요구량(COD)은 해역의 유기물 오탁지표로 널리 사용되는 방법으로 수조식양식 시설의 방류수 기준인 평상시 2mg/L, 급이시 규정인 5mg/L로 규정하고 있으며, 성산 지역의 경우 09:00시에 3.8mg/L이었던 양식장 배출수가 12:00시 경에 2.4mg/L까지 감소하였다가 15:00시에는 4.6mg/L 까지 상승한 후 18:00시에는 다시 2.0mg/L로 안정화를 되찾았다. 하지만 표선지역의 경우 12:00시경에 최고 농도인 6.2mg/L까지 상승 후 15:00시 경에는 2.2mg/L까지 농도가 떨어지다가 18:00시에 다시 급격한 농도로 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 위미지역의 화학적 산소요구량(COD) 농도는 다른 지역과는 다르게 09:00시에 16.2mg/L까지 상승했던 농도가 계속적으로 떨어지면서 18:00시 경에는 3.4mg/L의 농도까지 감소하였다. 대정지역의 경우 09:00시에 가장 낮은 농도를 보이다가 12:00시에는 10.8mg/L까지 급격히 상승 하였다가 15:00에는 2.4mg/L까지 감소 후 18:00시에는 다시 농도가 증가함을 확인하였다.

부유물질(SS)은 성산지역의 양식장 배출수의 경우 일일 평균농도가 20.5mg/L로 나타났으며, 표선지역의 경우 22.5mg/L, 위미지역의 경우 상대적으로 높은 농도인 23.mg/L로 조사되었으며, 대정지역의 양식장 배출수의 경우 21.1mg/L의 농도를 나타내었다. 각 각의 시간대별로 부유물질(SS)의 농도의 차이가 있었으나, 모든 시간대에 농도가 수조식 육상양식시설의 방류수 수질 기준인 10mg/L을 상회하는 농도분포를 보였다.



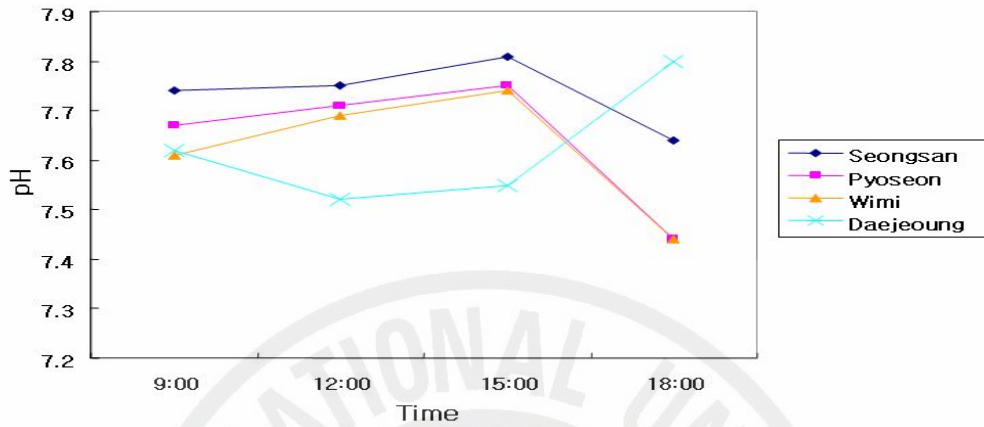


Fig.10. pH change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

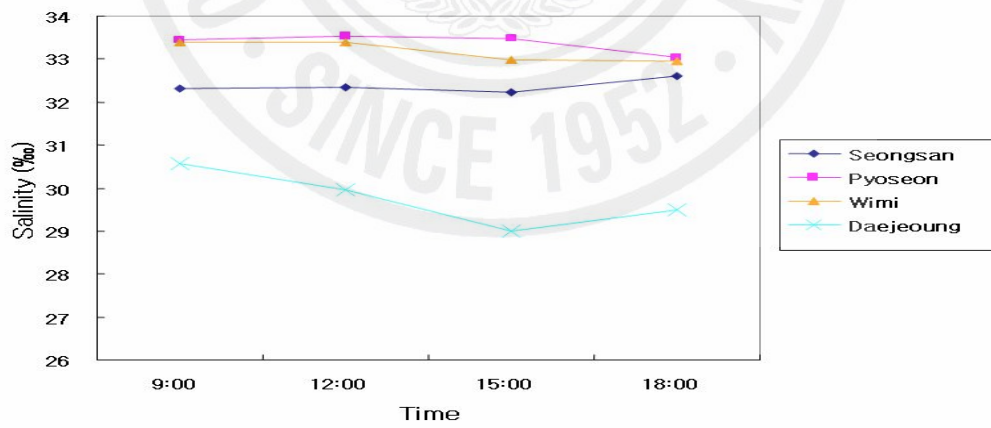


Fig.11. Salinity change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

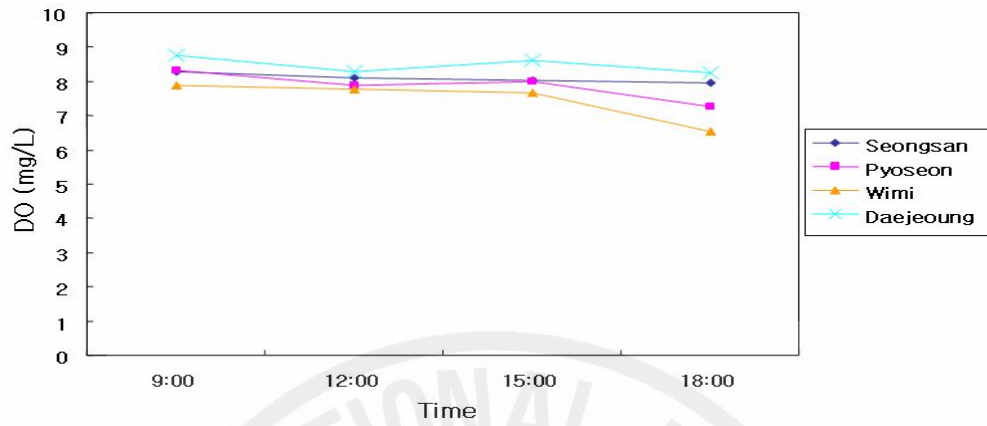


Fig.12. DO change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

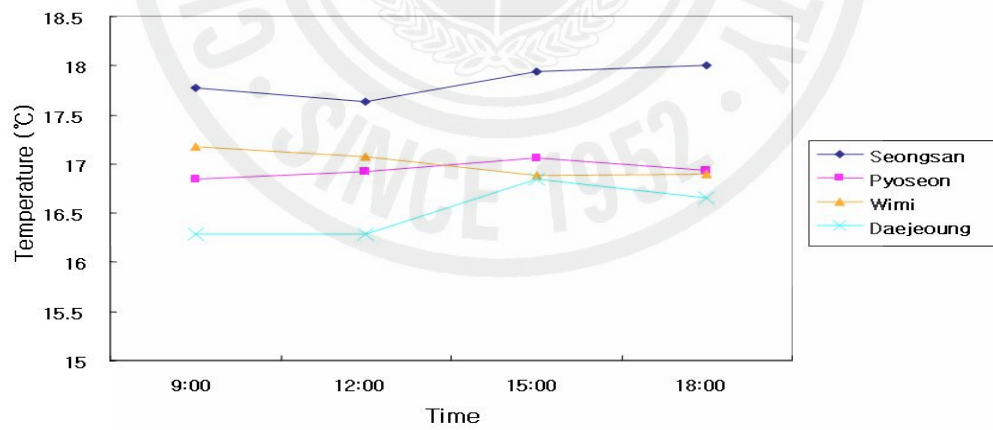


Fig.13. Temperature change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

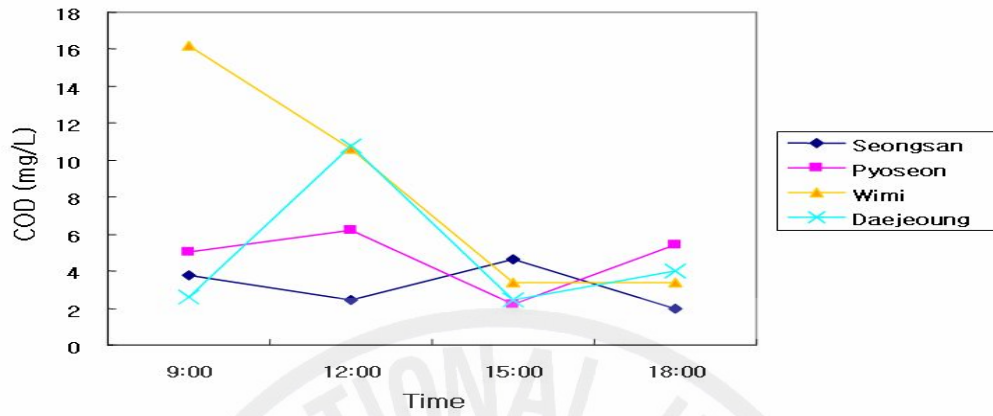


Fig.14. COD change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

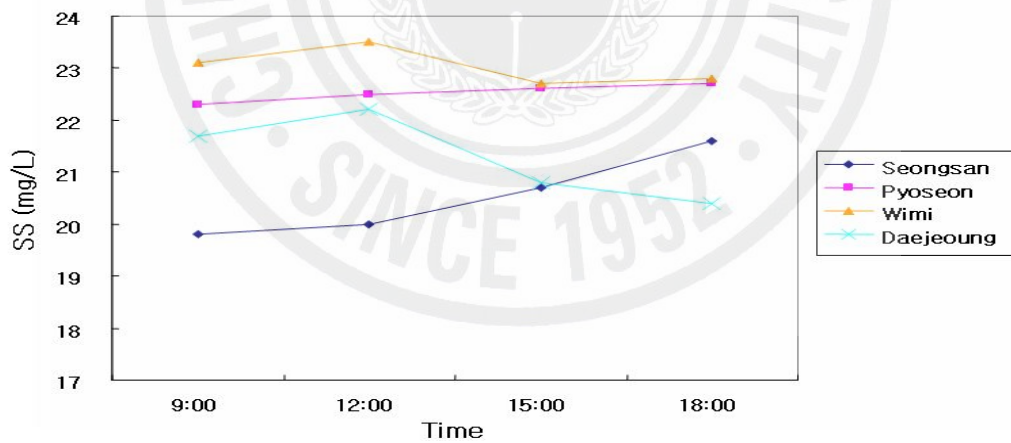


Fig.15. SS change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

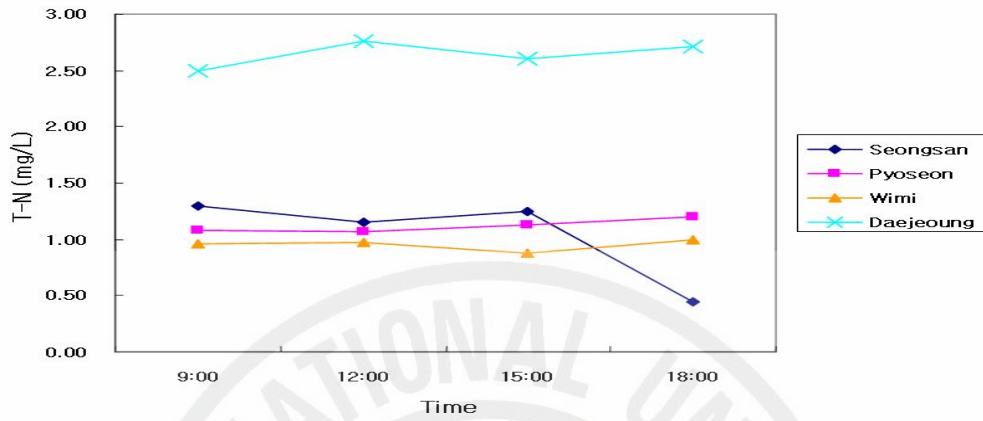


Fig.16. T-N change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

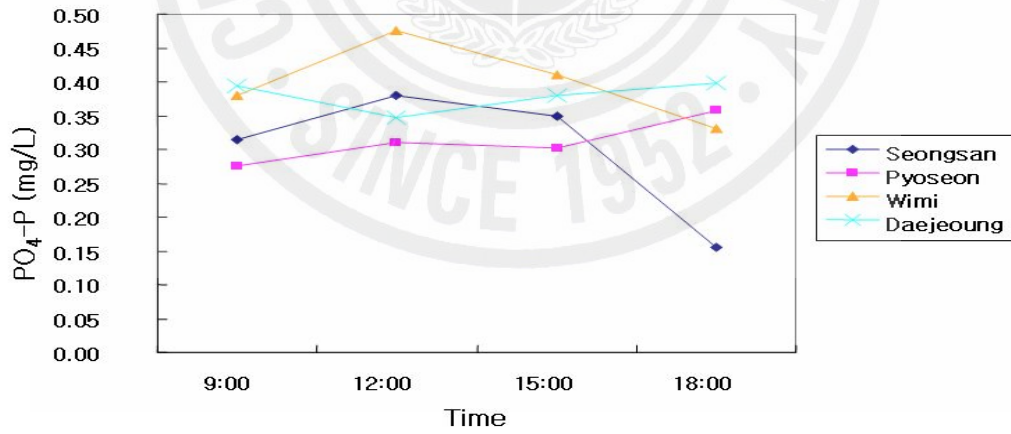


Fig.17. T-P change of aquaculture waste water at different sampling time on Jeju island.

### Ⅲ. 배출수 연안 퇴적층의 미생물학적 균집 분석

#### 1. 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 퇴적층은 선정된 양식장 배출수 연안에 형성된 퇴적층을 멸균된 모종삽을 이용하여 멸균 위생팩에 시료를 넣고 채집 후 4℃를 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다.

깊이별 퇴적층 채집의 경우 선정된 양식장의 배출수 연안에 형성된 퇴적층을 실험에 알맞게 변형시킨 KOVAX-SYRINGE(KOREA VACCINE CO. LTD)를 이용하여 채집하였으며, 채집된 시료는 4℃를 유지하면서 실험실로 운반하여 실험에 이용하였다.

#### 1) 배출수 연안 퇴적층의 월 별 종속영양세균 개체수 측정

각각의 배출수 부근에서 형성된 퇴적층에 분포하는 미생물상을 파악하기 위해 준비된 각각의 배지와 멸균해수는 고압멸균기에서 121℃, 15분간 멸균하여 사용하였다. 종속영양세균의 배양은 Marine agar(MA; Difco)배지에, 성장속도가 느린 세균의 배양은 R2A Agar(Difco) 배지에, 영양이 풍부한 일반적인 배지로 일반세균의 배양을 Nutrient Agar(NA; Difco)배지에, 효모, 곰팡이 또는 내산균의 배양은 YM Agar(Difco) 배지를 사용하였다.

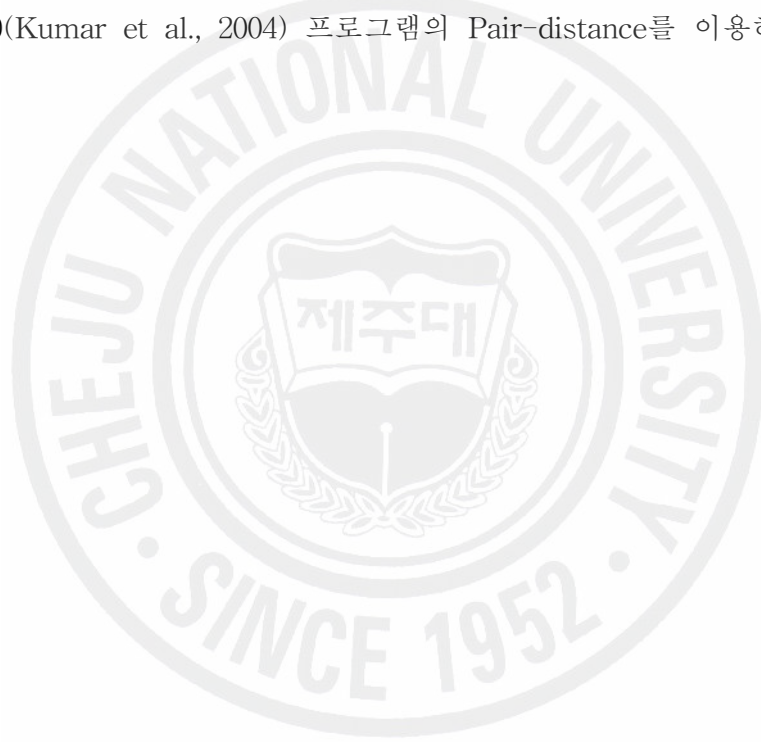
채집한 퇴적층 1g를 멸균해수 9mL에 넣고 충분히 섞어준 후, 이 시료를 원액으로 10단까지 희석하여 6,7,8,9단을 각각의 멸균된 배지에 100μL씩 접종하고 25℃에서 7일간 배양한 후 배지상에 출현한 집락 수(Colony Forming Unit; CFU)를 평판계수법에 따라 계수하였다.

#### 2) 배출수 연안 퇴적층의 깊이별 종속영양세균 개체수 측정

각각의 배출수 부근에서 형성된 퇴적층의 퇴적깊이에 따른 미생물 분포상을 파악하기 위하여 변형된 KOVAX-SYRINGE(KOREA VACCINE CO. LTD)에 채취된 퇴적층을 각각 1cm씩 절단한 후, 1g씩 정량하여 멸균해수 9mL에 넣고 충분히 섞어준 후에 이 시료를 원액으로 10단까지 단계 희석하여 6, 7, 8, 9단을 각각의 멸균된 marine agar(MA; Difco)배지와 nutrient agar(NA; Difco)배지, R2A Agar(Difco) 배지 그리고 YM agar(Difco) 배지에 각각 100μL 접종하고 25℃에서 7일간 배양한 후 배지상에 출현한 집락 수(Colony Forming Unit; CFU)를 평판계수법에 따라 계수하였다.

### 3) 16S rRNA를 염기서열분석을 이용한 미생물 군집 분석

각각의 배지에 출현한 모든 집락을 선별하여 순수분리 후 16S rRNA 염기서열 분석을 통하여 각 균주를 NCBI BLAST 프로그램을 이용하여 가장 상동성이 높은 박테리아를 검색하여 동정하였다. PCR반응에 사용된 Primer는 27F(forward primer; AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)를 사용하였고 ABI 3730XL capillary DNA Sequencer를 이용하여 sequencing 분석을 하였으며, 염기조성, 상호비교(pairwise comparisons)를 위한 염기치환 양상, codon usage 및 각 개체·개체군의 유전자 차이는 MEGA 3.0(Kumar et al., 2004) 프로그램으로 계산되었으며, 미생물 군집 분석에 이용된 계통수는 distance 방법으로 MEGA 3.0(Kumar et al., 2004) 프로그램의 Pair-distance를 이용하여 작성하였다.



## 2. 결과 및 고찰

### 1) 배출수 연안 퇴적층의 월 별 중속영양세균 개체수

본 연구에서는 제주도 지역의 양식장 밀집 지역을 4곳으로 나누어 2006년 7월부터 2006년 12월 에 걸쳐서 배출수 연안 퇴적층의 미생물의 군집을 분석하였다. Fig.18, 19, 20, 21은 2006년 7월부터 12월에 제주도내의 양식장 배출수 연안 4곳의 퇴적층으로부터 배양된 중속영양세균수를 제시한 것으로 효모, 곰팡이 또는 내산균의 배양에 사용된 YM Agar(Difco) 배지에서서의 성산, 표선, 위미,

대정지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물 개체수를 파악한 결과 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 7, 8월에는 개체수가  $2.5 \sim 2.0 \times 10^7$  CFU/mL 의 분포를 보이다가 9월에  $1.4 \times 10^8$  CFU/mL 의 가장 높은 개체수 분포를 보인 후 10월에 급격히 감소하는 양상을 보였다. 표선지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물 분포 양상은 그래프상의 급격한 변화는 보이지 않았으나 8월에  $6.3 \times 10^7$  CFU/mL 의 가장 높은 개체수 분포를 나타내었으며, 동절기로 갈수록 균수가 감소하는 것으로 나타났다. 위미지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물 개체의 분포양상은 표선지역과 같이 8월에  $8.6 \times 10^7$  CFU/mL로 가장 많은 개체수 분포를 보였다. 대정 지역의 경우 9월에  $5.1 \times 10^7$  CFU/mL으로 가장 높은 개체수 분포를 보였으며, YM Agar에서의 미생물 분포를 분석한 결과 전 지역에서 8월과 9월에 가장 많은 개체수를 보였으며, 11월과 12월에는 수온이 하강하는 시기와 맞물려 미생물의 개체수 분포도 급격히 줄어드는 양상을 보였다.

In vitro상에서 비교적 성장속도가 느린 중속영양세균의 배양을 목적으로한 R2A Agar(Difco) 배지의 경우, 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물상 분포는 9월에  $6.8 \times 10^8$  CFU/mL으로 가장 높게 나타났으며, 표선과 위미, 대정 지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물상 분포 역시 성산 지역과 유사하게 9월에 각각  $2.3 \times 10^8$  CFU/mL,  $4.5 \times 10^7$  CFU/mL,  $5.6 \times 10^8$  CFU/mL 으로 가장 많은 개체수를 보였다. 하지만 대정지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 다른 지역과 달리 11월과 12월에 미생물 개체가 증가하는 것으로 나타났다. Marine Agar(MA; Difco) 배지에 배양된 중속영양세균은 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 8월에  $1.54 \times 10^8$  CFU/mL 로 가장 많은 개체수 형성이 일었났으며, 표선지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 9월에  $2.3 \times 10^8$  CFU/mL으로 가장 높게 개체수 형성되었다. 그리고 위미와 대정지역 모두 9월에  $8.0 \times 10^8$  CFU/mL,

$9.8 \times 10^8$  CFU/mL 으로 높은 개체수 분포를 보였다.

일반세균 배양에 이용되는 Nutrient Agar(NA; Difco)에서 자란 일반 세균의 경우, 성산을 제외한 그 밖의 지역에서 9월에 표선지역의 경우  $6.4 \times 10^8$  CFU/mL, 위미지역의 경우  $5.1 \times 10^8$  CFU/mL, 대정지역의 경우  $9.5 \times 10^8$  CFU/mL으로 가장 높은 개체수 분포를 보였으나, 성산의 경우  $8.4 \times 10^7$  CFU/mL으로 8월에 높은 개체수 분포가 나타났다.

배출수 연안 퇴적층의 월별 개체수 분포의 경우 주로 8월과 9월에 가장 많은 개체수 형성이 일어나는 것으로 조사되었으며, 저수온기인 11월과 12월에는 개체수 분포가 현저히 감소하는 것으로 나타났다.





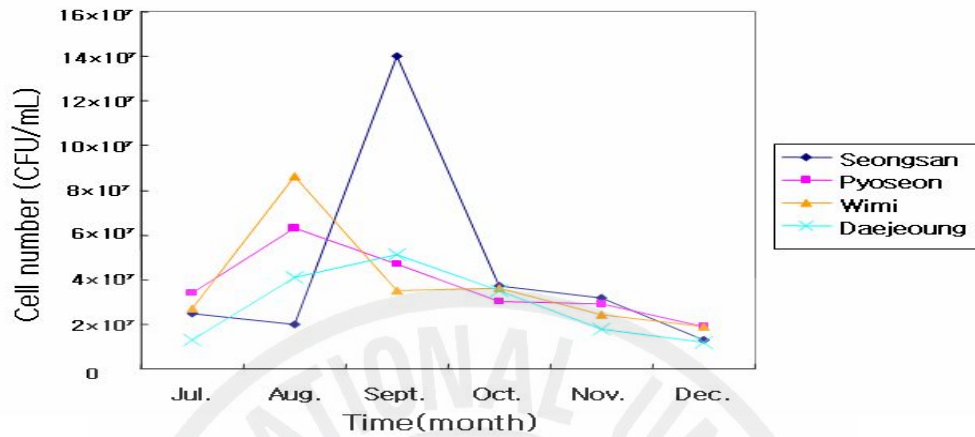


Fig. 18. Bacterial cell count of coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area on YM from July 2006 to December 2006.

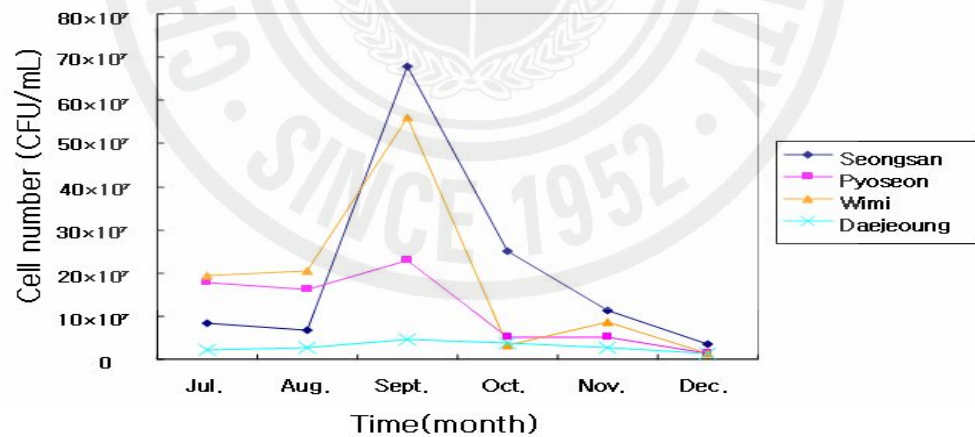


Fig. 19. Bacterial cell count of coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area on R2A from July 2006 to December 2006.

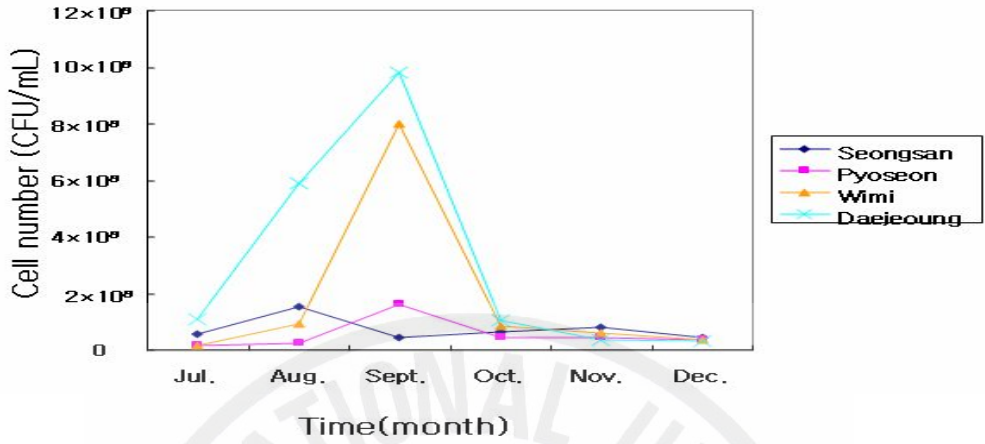


Fig. 20. Bacterial cell count of coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area on MA from July 2006 to December 2006.

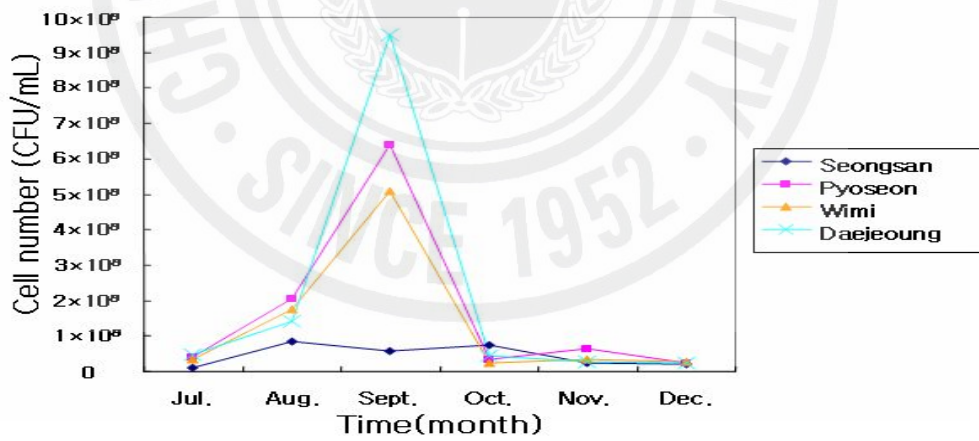


Fig. 21. Bacterial cell count of coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area on NA from July 2006 to December 2006.

## 2) 배출수 연안 퇴적층의 깊이별 중속영양세균 개체수

각 각의 배출수 연안에 형성된 퇴적층의 퇴적깊이에 따른 미생물 분포상을 파악하기 위하여 변형된 KOVAX-SYRINGE(KOREA VACCINE CO. LTD)에 채취된 퇴적층을 각 각의 멸균된 Marine Agar(MA; Difco)배지와 Nutrient Agar(NA; Difco)배지, R2A Agar(Difco)배지 그리고 YM Agar(Difco) 배지에 각 각 출현한 집락수를 계수하여 개체수를 측정하였으며 그 결과는 Fig. 25~35에 나타내었다. 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 표층인 0~1cm에는 YM배지에서만  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL 개체 분포가 나타났으며, R2A배지에서는 2~3cm 구간에서  $1.03 \times 10^8$  CFU/mL로 가장 많은 개체수의 분포를 보였다. NA배지에서는 4~5cm 구간에서  $5.8 \times 10^7$  CFU/mL의 가장 높은 개체수 분포를 나타냈으며 MA배지의 경우 6~7cm 구간에서  $1.24 \times 10^8$  CFU/mL로 가장 많은 개체수의 형성을 보였다.

표선지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 성산지역과는 역으로 최표층인 0~1cm 구간에서도 미생물의 분포상을 R2A배지를 제외한 NA배지와 MA배지 그리고 YM배지에서 각 각  $2.6 \times 10^7$  CFU/mL,  $2.5 \times 10^7$  CFU/mL,  $5.7 \times 10^7$  CFU/mL의 개체수의 형성을 보였으며, R2A배지의 경우 8~9cm 구간에서  $3.6 \times 10^7$  CFU/mL의 가장 많은 개체수 형성이 나타났다. MA배지의 경우 5~6cm 구간과 7~8cm 구간에서  $1.49 \times 10^8$  CFU/mL,  $1.41 \times 10^8$  CFU/mL로 가장 많은 개체수의 분포를 보였다. 반면 9~10cm 구간에서는 성산지역과 동일하게 개체수 분포가 나타나지 않았다.

위미지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 다른 지역과 달리 모든 배지에서 미생물의 분포가 나타났으며, R2A배지의 경우  $1.3 \times 10^7$  CFU/mL, NA배지의 경우  $1.2 \times 10^7$  CFU/mL의 개체 분포가, MA배지의 경우  $3.5 \times 10^7$  CFU/mL 그리고 YM배지의 경우에는  $1.9 \times 10^7$  CFU/mL의 개체 분포가 0~1cm 구간에서 나타났다. 또한 MA배지의 경우 1~8cm에 이르는 구간에 골고루 세균의 분포가 이루어져 있음을 알 수 있었다. 그리고 하층인 9~10cm 구간에서는 성산, 표선 지역과 같이 균의 분포를 확인할 수 없었다.

대정지역의 경우 R2A배지에서 하층인 9~10cm 구간에서  $7.6 \times 10^7$  CFU/mL의 개체수 분포를 확인 할 수 있었으며, NA배지에서는 표층인 1~4cm부근까지 고른 개체수 분포를 확인 할 수 있었으며, MA배지의 경우 6cm 구간과 10cm 구간을 제외한 다른 모든 구간에서 개체수의 분포를 확인 할 수 있었으며, 5cm 구간에서 가장 높은 균의 분포를 나타내었다.

이러한 깊이별 미생물의 분포의 차이는 양식장 배출수 지역의 연안 구조의

차이와 함께 연안의 조석간만 운동 등 다양한 물리적 환경적 차이에 의해서 다양하게 나타나는 것으로 사료되며, 또한 미생물 분포가 확연히 들어나는 깊이에서 유기물 분해 등 다양한 미생물 활동이 일어날 것으로 사료된다.



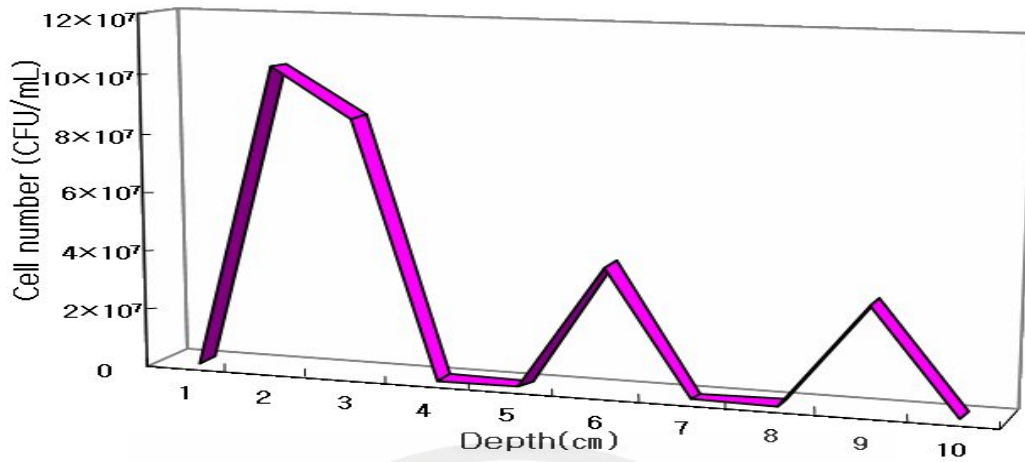


Fig. 22. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Seongsan, Jeju island(R2A).

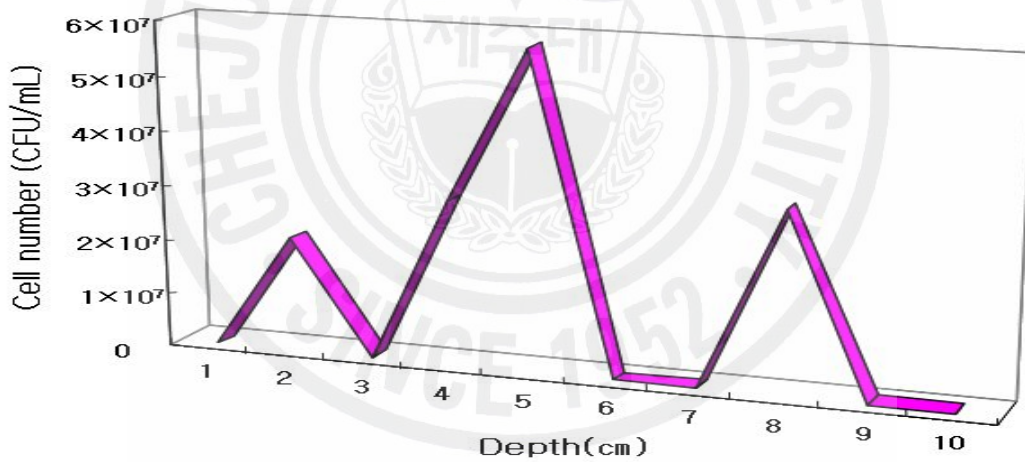


Fig.23. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Seongsan, Jeju island(NA).

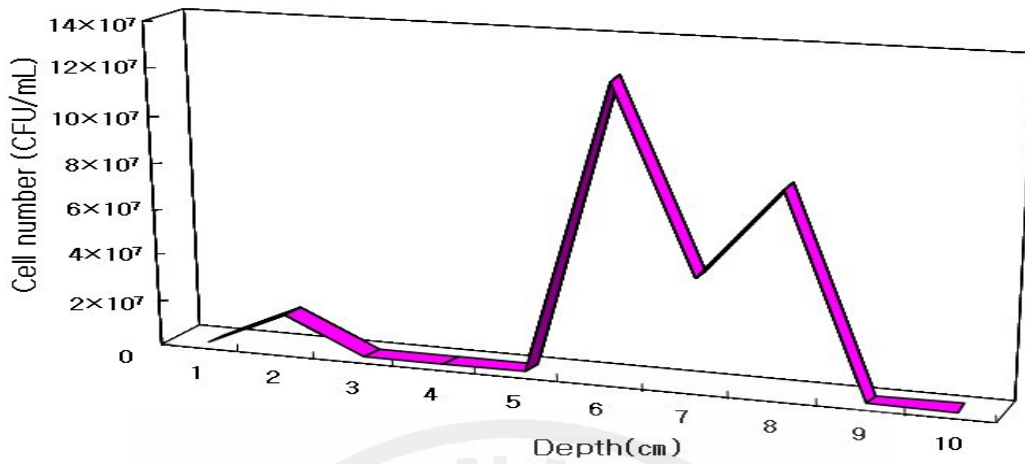


Fig.24. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Seongsan, Jeju island(MA).

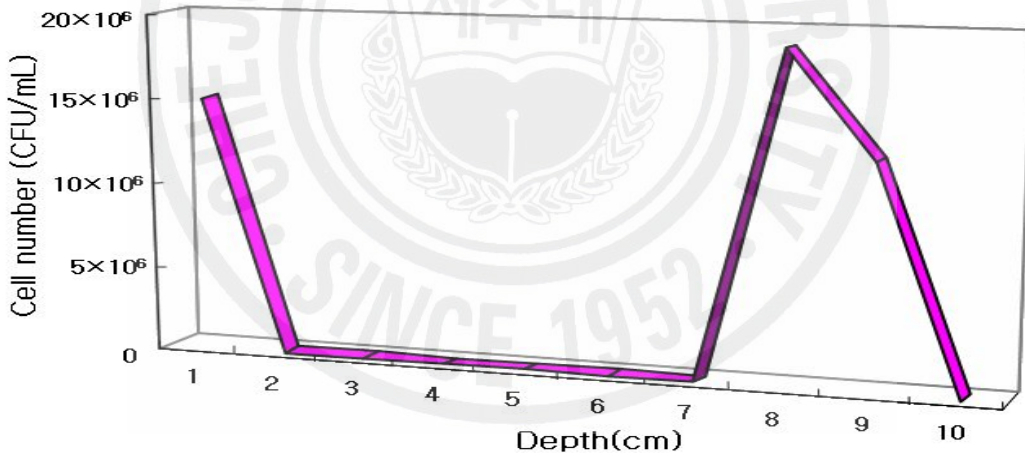


Fig.25. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Seongsan, Jeju island(YM).

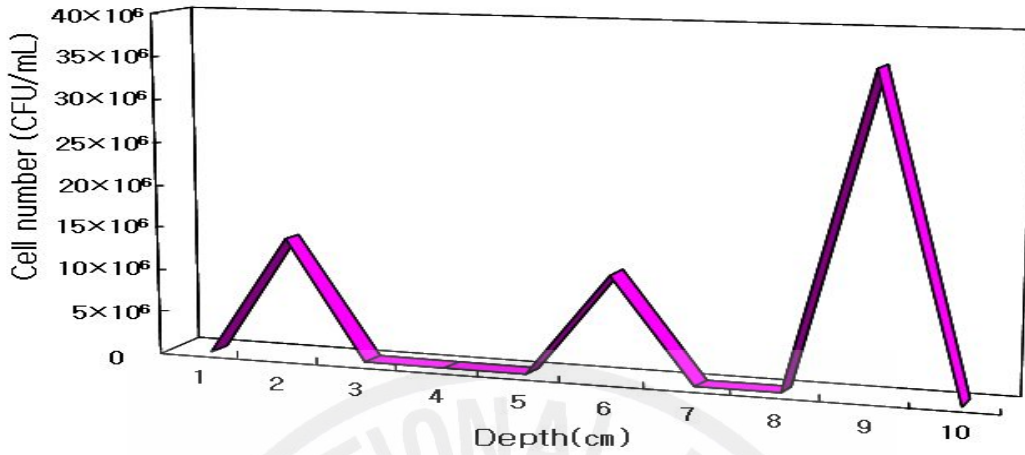


Fig.26. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Pyoseon, Jeju island(R2A).

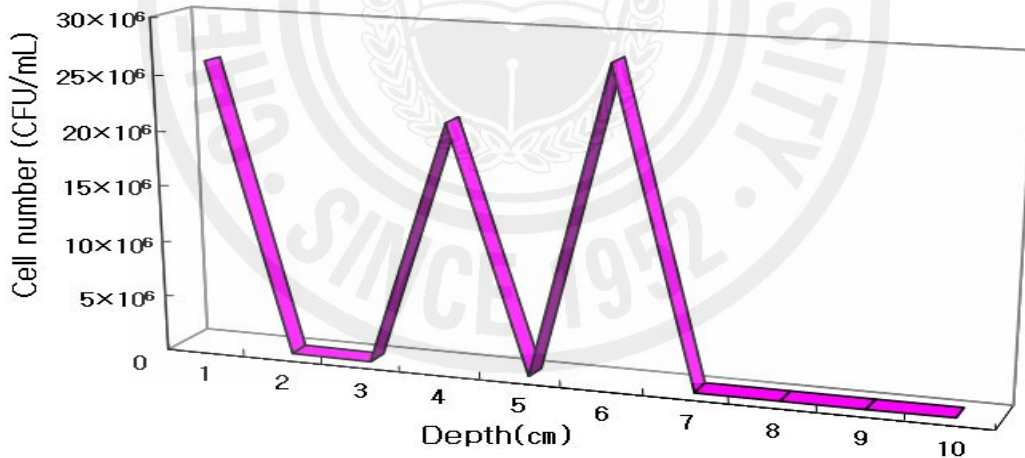


Fig.27. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Pyoseon, Jeju island(NA).

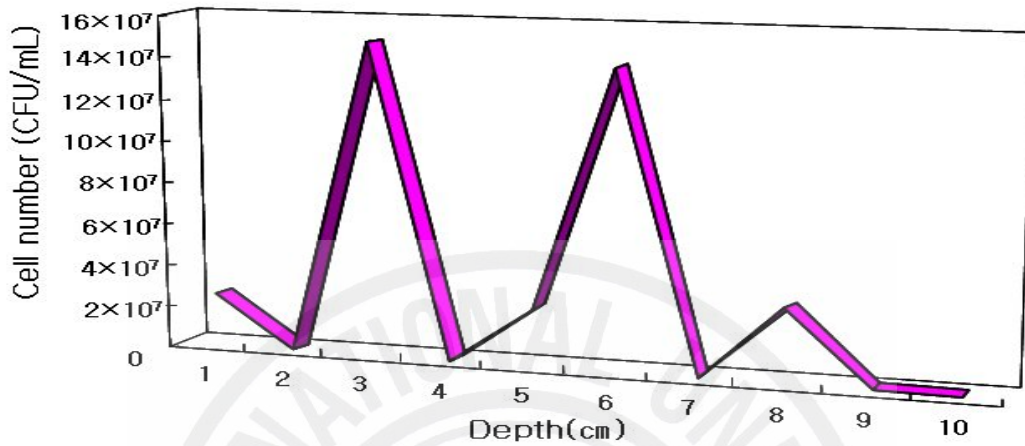


Fig.28. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Pyoseon, Jeju island(MA).

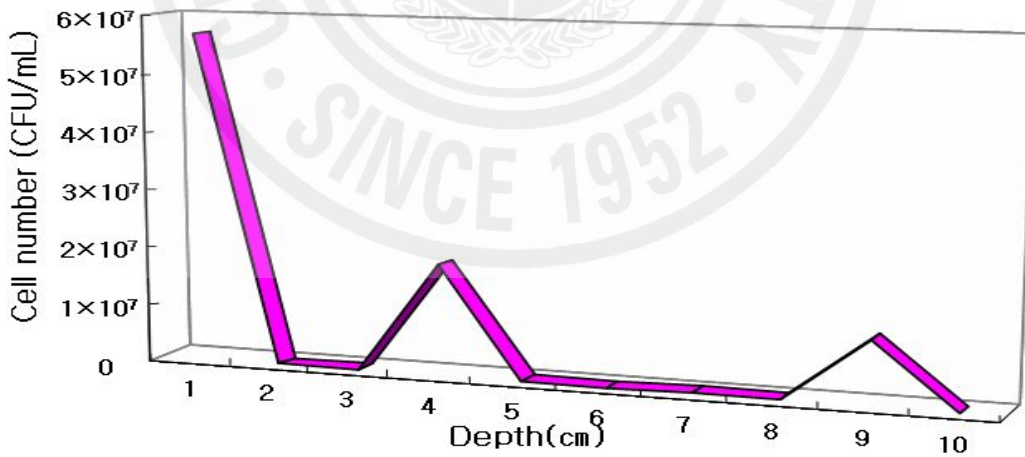


Fig.29. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Pyoseon, Jeju island(YM).



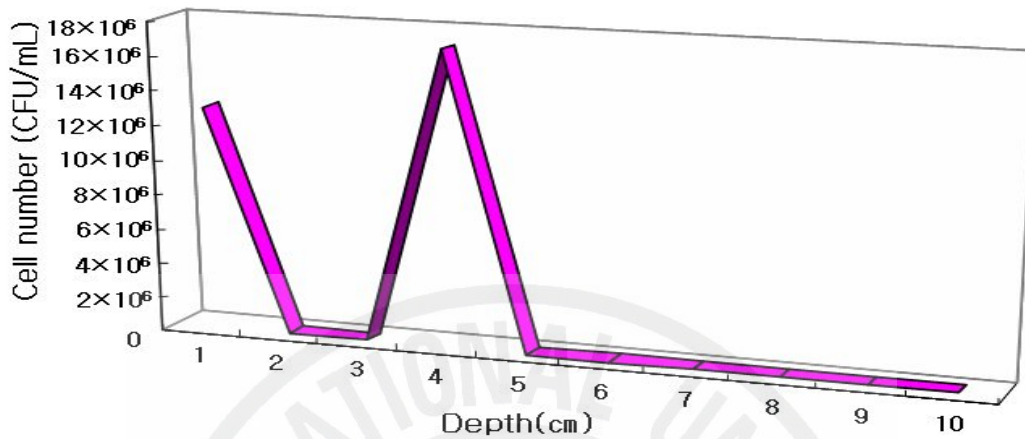


Fig.30. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Wimi, Jeju island(R2A).

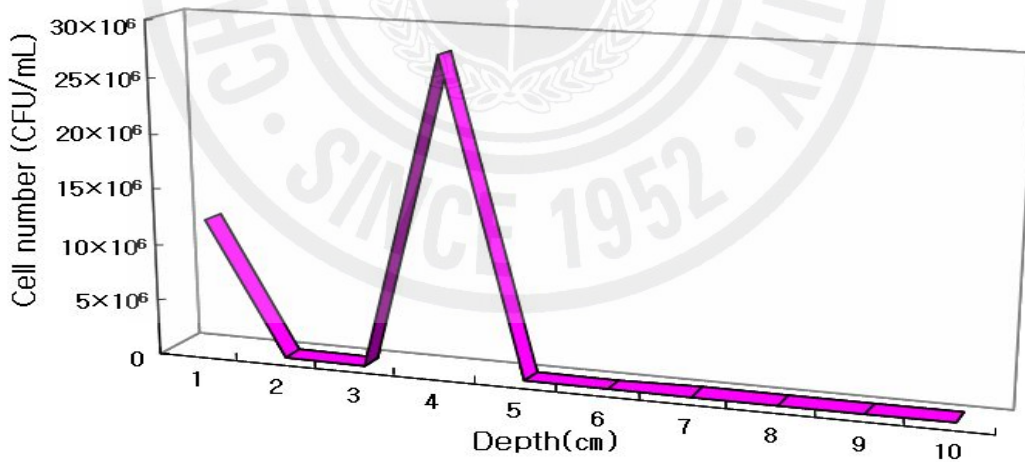


Fig.31. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Wimi, Jeju island(NA).

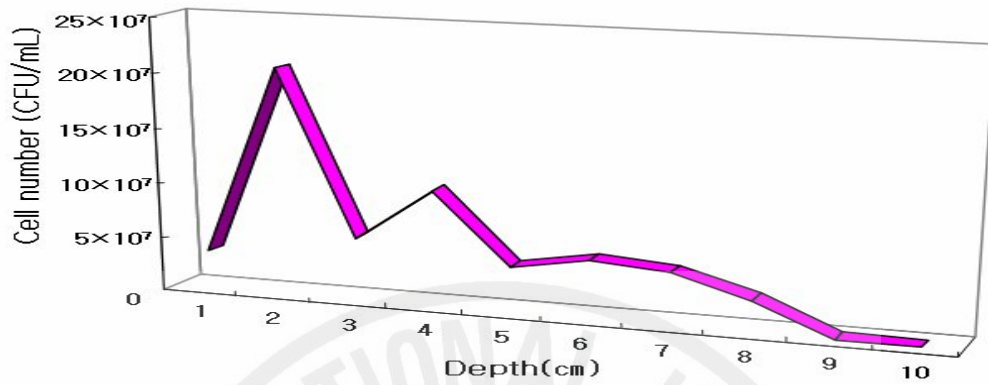


Fig.32. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Wimi, Jeju island(MA).

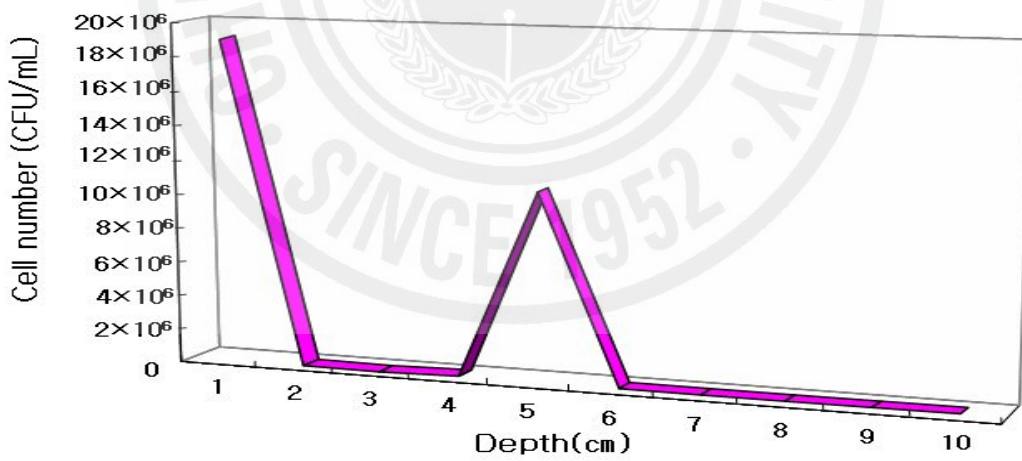


Fig.33. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Wimi, Jeju island(YM)

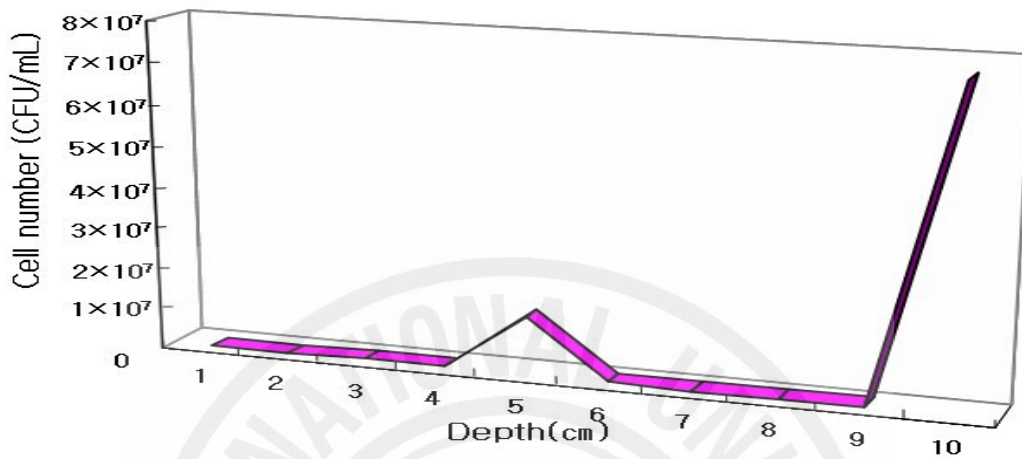


Fig. 34. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Daejeoung, Jeju island(R2A).

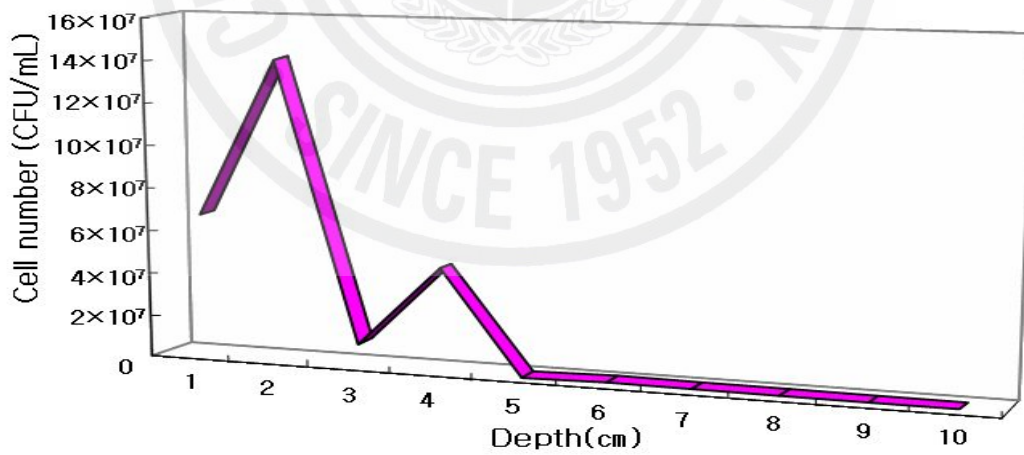


Fig. 35. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Daejeoung, Jeju island(NA).

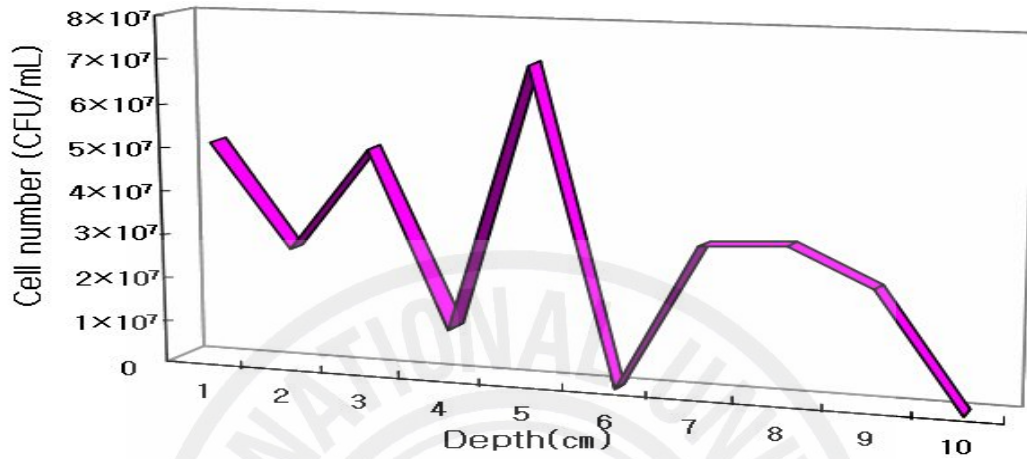


Fig. 36. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Daejeoung, Jeju island(MA).

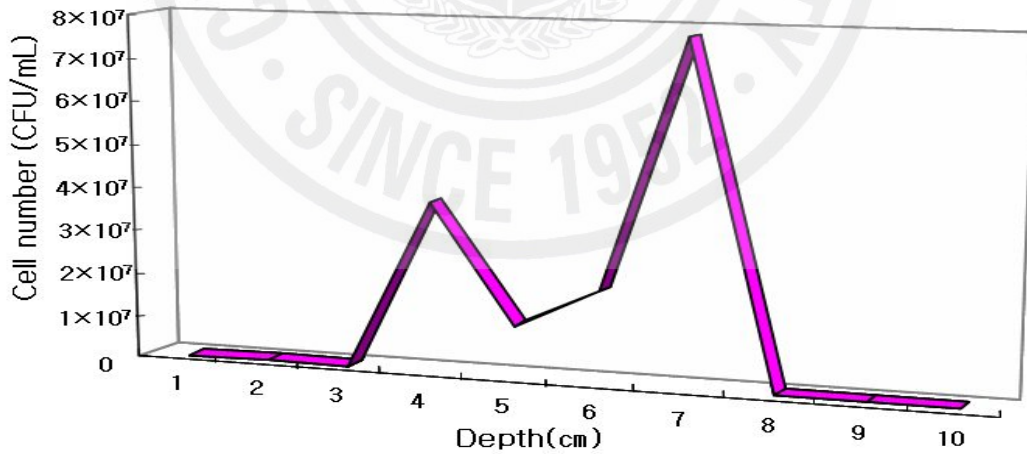


Fig. 37. Vertical distribution of bacteria in coastal sediment at aquaculture wastewater effluence area at Daejeoung, Jeju island(YM).

### 3) 16S rRNA를 염기서열분석을 이용한 미생물 군집 분석

생물의 종에 관련한 연구시에는 형태학적, 생물학적, 생태학적, 계통진화적 개념들의 복합적인 고려를 통해 분류하여야 한다. 특히 미생물의 종간 유연관계의 연구 시 고등 진핵생물은 자연 번식의 기본단위가 주요한 반면, 미생물의 경우 일정수준의 유사성을 통해 종간의 상관관계를 추론하게 된다. 미생물 종간 연구는 미생물의 다양성 및 군집의 구조 이해에 있어 매우 중요한 역할을 하며 최근에는 미생물의 유전학적 다양성 조사를 통하여 주요 분류군을 파악하고 있다. 이러한 분자계통분류학은 환경적인 요인의 영향을 받지 않으며 세균의 분류 기반의 Database화가 유리한 점에 기인한다.

분자계통분류학적 세균종의 분류방법은 ribosome을 구성하는 RNA 유전자(5S, 16S 및 23S rRNA), 단백질을 생산하는 유전자의 DNA (recA, gyrB, rpoR)의 유연관계 특성을 통해 분류한다. 이 중 ribosome을 구성하는 RNA (rRNA)의 염기서열 분석에 의한 생물간 진화학적 유연관계의 연구로부터 정립된 분류 기준이 보편화되었으며 특히 16S rRNA를 coding하는 DNA 염기서열을 측정방법은 세균의 검출과 동정 생태학적 분류에서 매우 유용한 방법으로 활용되고 있으며 이러한 16S rRNA 유전자를 이용한 방법의 장점으로서는 모든 세균에 존재하고 유전자 서열에 variable region과 conserved region이 존재하여 균종간의 유연관계를 파악할 수 있다. 특히 1997년 기준으로 약 3600종의 균주의 염기서열이 Database화 되어 있고 빠른 속도로 Database의 축적이 이루어져 미지의 균의 동정에 유리하다.

현재 세균 분류학에서의 종의 정의는 비슷한 형질 (형태학적, 생리학적 특성 등)을 보이는 개체들의 집단, 16S rRNA gene 염기서열 간 97% 이상의 유사도를 보이는 집단 (Stackebrandt & Goebel, 1994), Genomic species: Genome 간 70 % 이상의 유사도를 보이는 집단 (Wayne et al., 1997)일 경우 일반적으로 동일종으로 여긴다.

본 연구에서는 2006년 7월~12월에 성산, 표선, 위미, 대정 지역의 배출수 연안 퇴적층에서 분리된 세균의 독립된 콜로니를 선별하여 순수분리 하였으며, 이를 통하여 약 130균주를 선별하였고 균주의 16S rRNA를 이용하여 동정하기 위해 추출된 genomic DNA를 PCR을 통해 증폭하였다. 얻어진 PCR산물 중 일정 개수 (700 basepair) 이상의 염기서열이 확보된 것만 분석하였으며, NCBI BLAST 프로그램을 이용하여 상동성을 확인한 후 최종적으로 미생물 군집 분석에 이용하였다.

성산지역의 배출수 연안 퇴적층에서는 9개의 우점종이 확인되었으며

*Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptomyces albidoflavus*, *Micrococcus luteus*, *Roseovarius crassostreae*, *Acinetobacter junii*, *Enterobacter intermedius*, *Pseudoalteromonas* spp., *Tenacibaculum aestuarii* 이었다.

*Bacillus* sp. group에는 *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*로 확인되었으며 토양과 공기에서 쉽게 분리되며 당, 유기산 알코올 등 고분자 물질을 저분자 물질로 분해하는 역할과 함께 N, P를 제거(Kim, 1993)하는 것으로 알려졌다. *Pseudoalteromonas* sp. group에는 *P.mariniglutinosa*, *P.piscicida*, *P.flavipulchra*가 확인되었고 토양, 물 속에 서식하며 동 · 식물유래 요성물질을 분해하는 중요한 분해자로 100개 이상의 유기물을 이용 및 방향족 화합물 분해에 관여하여 화학폐수 처리에 유용하게 이용된다고 알려졌다. *Streptomyces albidoflavus*의 경우 절대 호기성이고 알칼리성이 토양에 서식한다. 당, 알코올, 유기산, 아미노산 등을 탄소원으로 사용하며, 그 외에도 단백질 및 지방등을 체외효소로 분해 후 이용한다.

그 외의 우점종으로는 부영양화의 제어물질인 인의 생물학적인 인 제거공정(BIO-P)에 이용되는 *Acinetobacter junii*, 해면과 녹조류에서 최초로 분리되어 cellulose, agar, chitin과 같은 고분자 물질을 분해하는 것으로 최근 밝혀진 *Tenacibaculum aestuarii*, 적조생물을 살조 시키고 Trichloroethylene과 같은 난분해성 유기화합물을 분해(Kim, 1997)하는 것으로 알려진 해양세균인 *Micrococcus luteus*, 장내세균종인 *Enterobacter intermedius*, *Roseovarius crasso*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus haemolyticus* 등이 검출되었다.

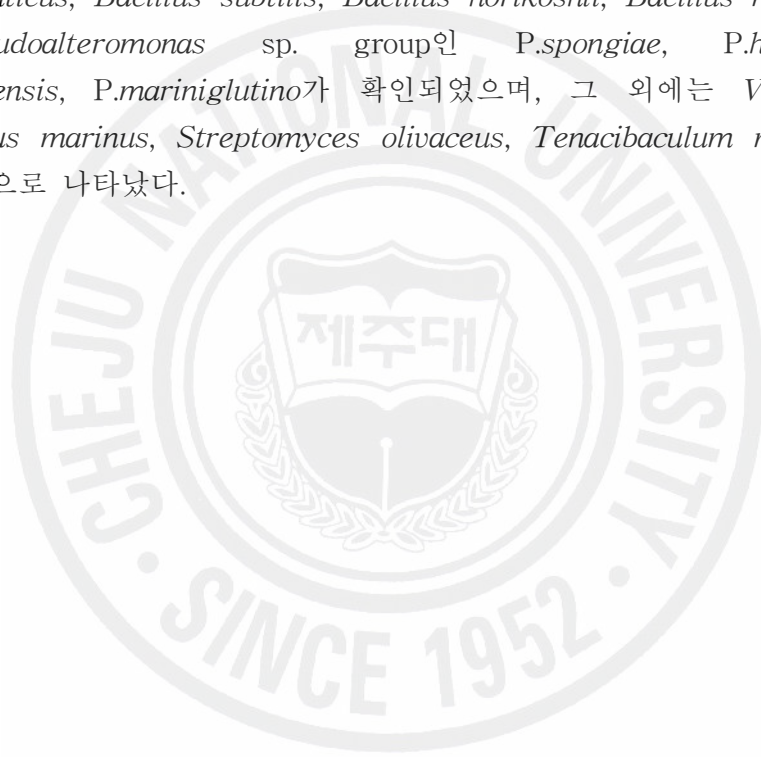
표선지역의 배출수 연안 퇴적층에서는 10개의 우점종이 확인되었으며 *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Shewanella* spp., *Vibrio* spp., *Krokinobacter genikus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Erythrobacter vulgaris*, *Jannaschia cystaugens*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus* sp. 이었다.

*Vibrio* sp.는 해수에 상존하여 해양 동물의 세균군집에서 중요한 위치를 차지하는 세균종이며 *Bacillus* sp. group에는 *B.cereus*, *B.thuringiensis*, *B.horikoshii*, *B. megaterium*, *B.aquimaris*, *B.malacitensis*, *B.pumilus*, *B.icheniformis*로 확인되었다. *Shewanella* sp. group에는 *Shewanella colwelliana*, *Shewanella pneumatophori*가 확인되었으며 우라늄 및 방사성물질의 흡착능을 보유하는 것으로 밝혀졌다. *Brevundimonas vesicularis*의 경우 단백질의 함유된 폐수의 처리능이 우수한 것으로 알려졌다. 그 외에는 *Streptomyces* sp. group의 *Streptomyces sodiiphilus*, *Streptomyces ginsengisoli*, *Streptomyces glomeroaurantiacus* 와 *Krokinobacter genikus*,

*Erythrobacter vulgaris*, *Jannaschia cystaugens*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus* sp. 등이 검출되었다.

위미지역의 연안 배출수 퇴적층에서는 미세조류를 억제하는 능력이 있어 적조발생을 억제(Song, 1999)하는데 유용하다고 알려진 *Alteromonas litorea*, *Vibrio* spp. *Staphylococcus sohnii*, *Bacillus baekryungensis*, *Salinicoccus roseus*, *Streptomyces roseochromogenus*, *Dietzia maris*, *Micrococcus luteus*, *Shewanella pacifica*, *Roseovarius pelophilus*, *Tenacibaculum gallaicum*, *Muricauda aquimarina* 등이 우점종으로 나타났다.

대정지역의 연안 배출수 퇴적층에서는 *Bacillus* spp. group인 *Bacillus polyfermenticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus megaterium* 와 *Pseudoalteromonas* sp. group인 *P.spongiae*, *P.haloplanktis*, *P.byunsanensis*, *P.marini glutino*가 확인되었으며, 그 외에는 *Vibrio* spp., *Salinicoccus marinus*, *Streptomyces olivaceus*, *Tenacibaculum mesophilum* 이 우점종으로 나타났다.



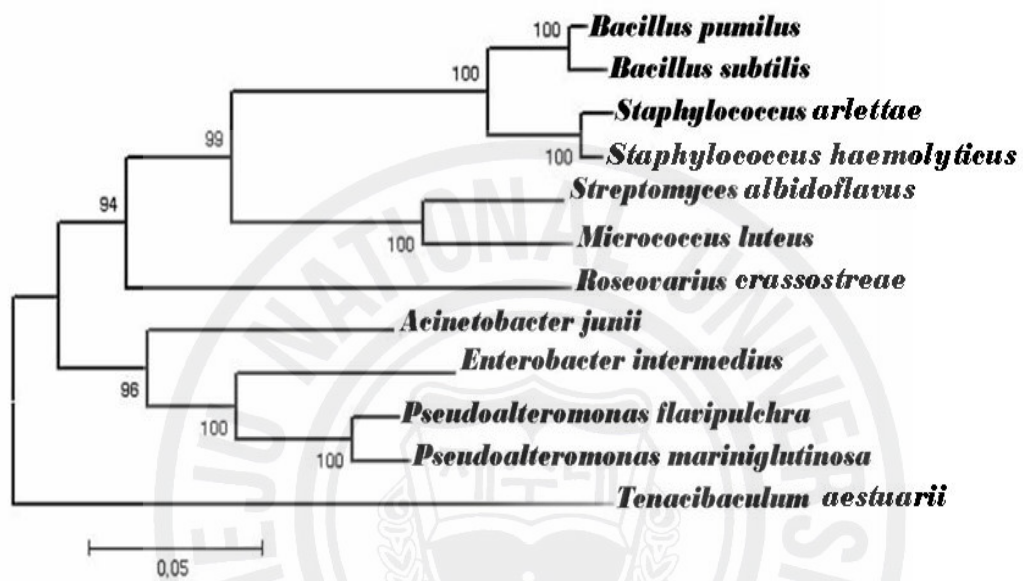


Fig. 38. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences comparing isolated strains from Seongsan coastal sediment, Jeju-do. DNA distance were established by using the neighbor-joining method.



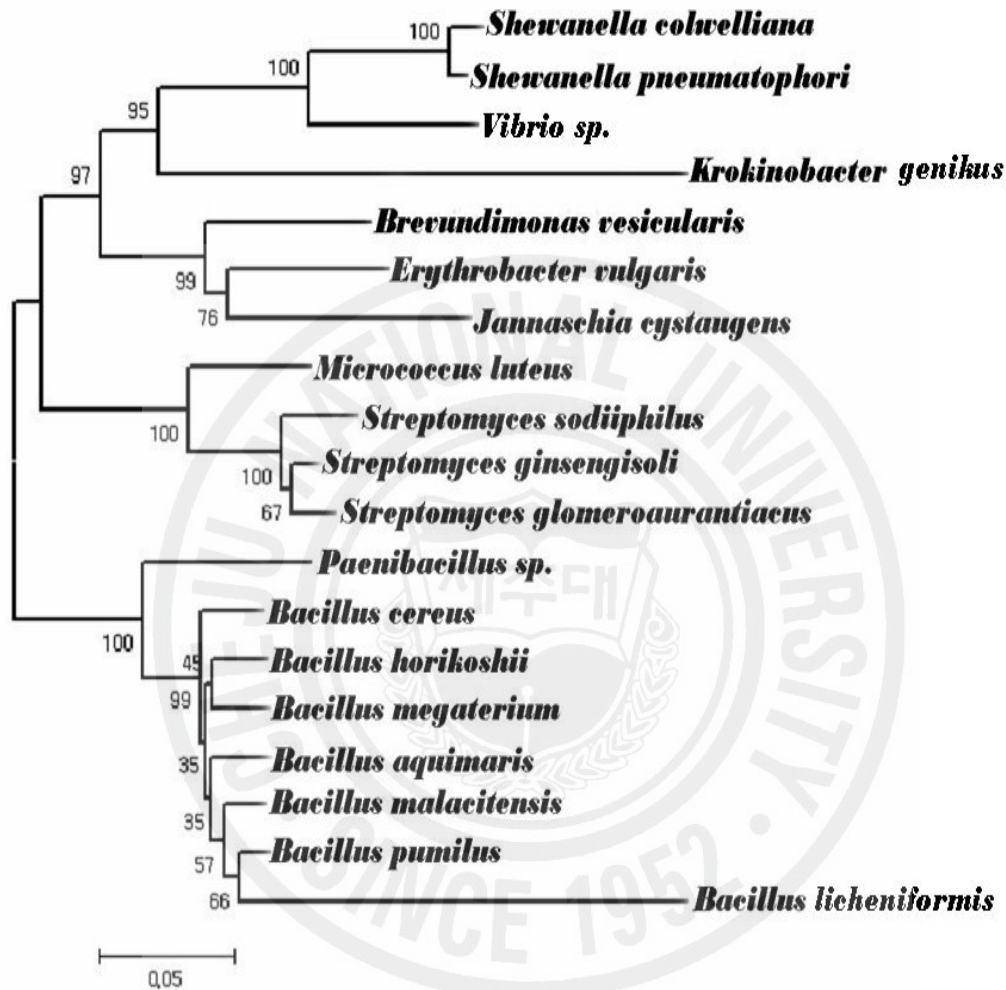


Fig. 39. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences comparing isolated strains from Pyoseon coastal sediment, Jeju-do. DNA distance were established by using the neighbor-joining method.

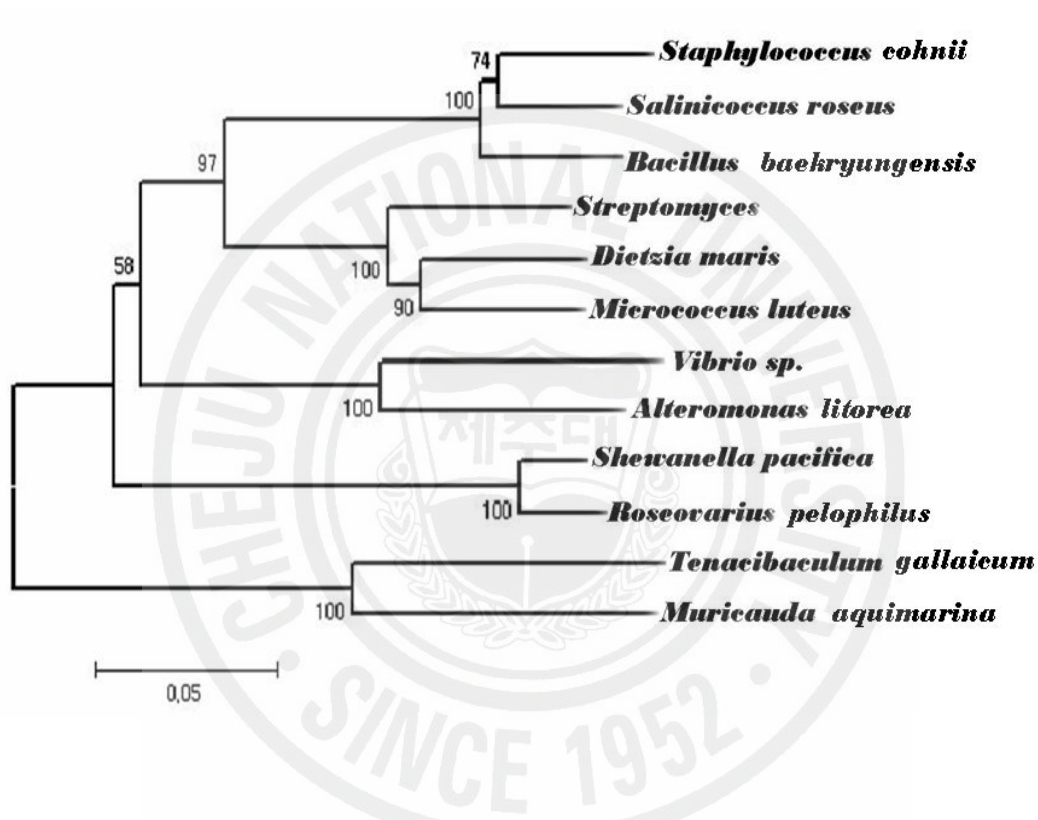


Fig. 40. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences comparing isolated strain from Wimi coastal sediment. DNA distance were established by using the neighbor-joining method.

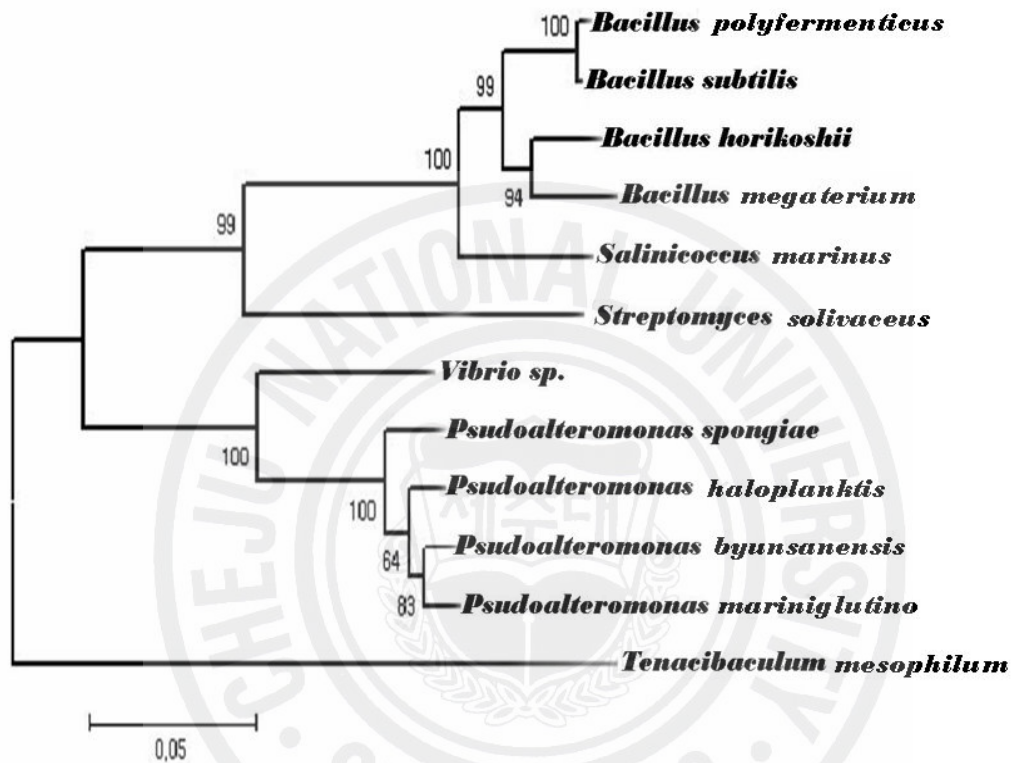


Fig. 41. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences comparing isolated strains from Daejeoung coastal sediment. DNA distance were established by using the neighbor-joining method.

## IV. 배출수 연안 퇴적층 유래의 미생물학적 응용

### 1. 재료 및 방법

양식장 배출수 연안 퇴적층에서 균집분석을 통하여 분리된 미생물을 이용하여 각각의 실험을 실행하였다.

#### 1) 단백질 분해 미생물 분리 및 분해능 측정

높은 단백질 분해효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 연안 퇴적층에서 분리된 200균주를 이용하여 단백질 분해능 측정 실험에 이용하였다.

본 실험의 경우 skim milk agar 배지(skim milk 5g/L, bacto tryptone 10g/L, yeast extract 5g/L, bacto agar 15g/L)를 멸균해수를 이용하여 제조한 후, 각각의 분리된 균종을 백금이를 이용하여 도말하고, 25℃로 48시간 배양하여, extracellular protease에 의해 분해되어 형성된 투명환(Clear zone or halo)을 보이는 균주를 분리하여 본 연구에 이용하였다. 또한 본 균주의 보관을 위하여 멸균된 glycerol stock solution을 사용하여 냉동 보관하였으며, 실험은 extracellular protease의 활성유지를 위해 skim milk 배지에서 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

#### 2) 단백질분해 미생물의 온도별 성장 측정

선별된 균주를 MB broth(Difco, USA)에 배양 후 각각의 시간대별로 배양액을 1mL을 취하여 분광광도계를 이용, 660nm에서 성장도를 측정하였다.

#### 3) Protease activity 측정

선별된 균주는 MB broth(Difco, USA)에 배양 후 시간대별로 배양액을 12,000rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

분리된 균주의 protease 활성은 Anson 방법을 변형하여 측정하였다(Novo Ins., 1990). 즉, 조효소액에 기질로 Azocasein을 50℃에서 10분간 반응시키고, 0.44M TCA를 첨가하여 반응을 정지시킨 후 원심분리 후 Folin 시약을 첨가 후 발색시켜 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소의 활성은 조효소액 1mL이 1분 동안 1 $\mu$ g의 tyrosine을 생성할 때를 1unit으로 하였다.

#### 4) 다당분해 미생물 분리 및 분해능 측정

높은 다당 분해효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 연안 퇴적층에서 분리된 200균주를 이용하여 다당 분해능 측정 실험에 이용하였다.

본 실험의 경우 soluble starch(Difco, USA) 1%를 첨가한 NA(Nutrient Agar, Difco)배지를 멸균해수를 이용하여 제조한 후, 각각의 분리된 균종을 백금이를 이용하여 도말하고, 25℃로 48시간 배양한 후, 배지에 1M요오드용액을 떨어뜨려 전분이 가수분해되어 투명한(Clear zone or halo)을 보이는 균주를 분리하여 본 연구에 이용하였다. 또한 본 균주의 보관을 위하여 멸균된 glycerol stock solution을 사용하여 냉동 보관하였으며, 실험은 전분분해능의 활성유지를 위해 1% soluble starch가 첨가된 NA배지에서 계대 배양하면서 실험에 이용하였다.

#### 5) 다당분해 미생물의 온도별 성장 측정

선별된 균주를 MB broth(Difco, USA)에 배양 후 각각의 시간대별로 배양액을 1mL을 취하여 분광광도계를 이용, 660nm에서 성장도를 측정하였다.

#### 6) Amylase activity 측정

선별된 균주는 MB broth(Difco, USA)에 배양 후, 시간대별로 배양액을 12,000rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

분리된 균주의 amylase 활성은 1% soluble starch 0.1mL에 조효소액 0.1mL를 넣고 37℃에서 5분간 반응시킨 후 생성된 환원당을 DNS법(Miller, 1959)을 변형하여 700nm에서 흡광도에서 분해능을 측정하였다.

#### 7) 지질분해 미생물 분리 및 분해능 측정

높은 지질 분해효소를 생산하는 균종을 분리할 목적으로 연안 퇴적층에서 분리된 200균주를 이용하여 지질 분해능 측정 실험에 이용하였다.

본 실험의 경우 1% 올리브오일과 0.001% Rhodamin B(Sigma, USA)를 첨가한 NA(Nutrient Agar, Difco)배지를 멸균해수를 이용하여 제조한 후, 각각의 분리된 균종을 백금이를 이용하여 도말하고, 25°C에서 48시간 배양 후, UV에서 관찰을 통해 자라난 콜로니 주변에 오렌지색의 환(plaque)을 형성하는 균주를 분리하여 본 연구에 이용하였다.

#### 8) 지질분해 미생물의 온도별 성장 측정

선별된 균주를 MB broth(Difco, USA)에 배양 후 각각의 시간대별로 배양액을 1mL을 취하여 분광광도계를 이용, 660nm에서 성장도를 측정하였다.

#### 9) lipase activity 측정

선별된 균주는 MB broth(Difco, USA)에 배양 후, 시간대별로 배양액을 12,000rpm에서 3분간 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였으며, 기질과 결합된 p-nitrophenol(pNP)이 효소에 의해 유리되는 양을 흡광도의 변화로 측정하는 microplate assay 방법(Ryu et. al., 2006)으로 측정하였다.

Microplate assay는 p-nitrophenyl-ester(pNP-ester)를 기질로 사용하여 유리되는 p-nitrophenol의 양을 분광광도계를 이용한 405nm에서의 흡광도 증가량으로 측정하였다. 효소의 활성은 조효소액 100 $\mu$ L이 1분 동안 1 $\mu$ g의 tyrosine을 생성할 때를 1unit으로 하였다.

#### 10) 분리균주의 생화학적 특성 분석

분리균주의 생화학적 특성 분석은 3%로 KOH를 이용하여 간이그람동정을 한 후, Biolog사(Biolog Inc., USA)의 GN2(Table 1), GP2 Plate(Table 2)를 이용하여 95가지의 기질이용 특이성을 시험하였으며, 분석은 MicroLog™ system(release 4.05) program을 이용하였다.

순수 분리된 균주를 BUGM(Biolog Inc., USA) 사면배지에 접종하여 30℃에서 48시간 배양 한 후 현탁하여 탁도계(Biolog 21907, USA)를 이용하여 균주 현탁액을 각각 GP의 경우 20%, GN의 경우 52~59%가 되도록 조절한 후 GP2와 GN2 Micro plate의 각 well에 150μL씩 접종한 후, 30℃에서 24시간 배양 후 보라색을 발색되는 well을 양성으로 판정하였다.

이때 현탁액은 NaCl 150g, MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 51g, KCl 3.7g을 증류수 912mL에 녹인 MCS stock solution(Noble and Gow, 1998)을 증류수로 10배 희석한 후 멸균하여 사용하였다.



Table 1. Parameter of biochemical characteristics by GP2 Micro Plate.

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 $p$ -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate



## 2. 결과 및 고찰

### 1) 단백질 분해 미생물 분리 및 동정

Skim milk가 함유된 평판 배지에서 투명환을 형성하는 균주를 분리하였고, 이를 SK-2, SK-125로 명명하였다.

분리 균주의 생화학 특성을 조사한 결과 Table 2에 보이듯 SK-2균주의 경우 Glycerol, D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate,  $\alpha$ -Cyclodextrin,  $\beta$ -Cyclodextrin, Arbutin, Maltose, Palatinose, Turanose, Dextrin, D-Cellobiose, Maltotriose, Glycogen, D-Fructose, D-Mannitol 등의 탄수화물이 대사됨을 확인하였다.

SK-125균주의 경우 Table-3에 보이듯 Dextrin, Arbutin, D-Cellobiose, D-Fructose, Maltose, Glycerol 등의 탄수화물이 대사됨을 확인하였다.

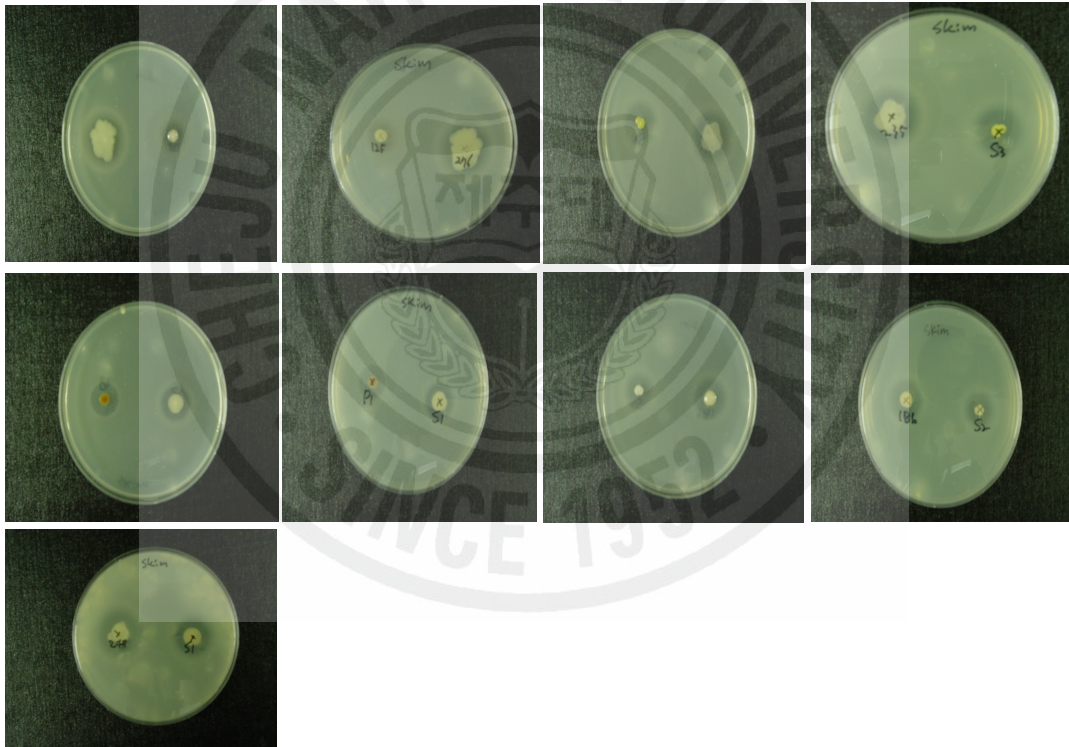


Fig.42. Photos of protease producing bacteria by using skim milk agar plates.

## 2) 배양 온도에 따른 균체증식 및 효소 활성의 영향

분리 균주의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른 단백질 분해 효소 활성의 변화를 조사하였다.

이를 위하여 배양 온도를 20℃에서 40℃까지 10℃간격으로 배양하여 균체의 증식과 분비되는 단백질 효소의 활성을 조사하였다.

SK-2는 초기 배양온도가 20℃에서 배양의 경우 24시간의 유도기를 거친 후, 대수기로 접어들어 72시간대에 가장 높은 미생물 성장을 보였으며, 72시간 이후에는 정체기를 거쳐 사멸기에 접어드는 것으로 나타났다. 하지만 30℃와 40℃의 경우 유도기가 6시간으로 20℃배양 보다 4배 빠르게 나타났으며, 대수증식기의 경우 30℃에서는 24간에 최대 증식을 보였으나, 40℃ 배양에서는 48시간대에 최대 증식을 보였다, 따라서 SK-2의 경우 30℃의 배양에서 가장 빠른 증식을 보이는 것으로 나타났다.

SK-125는 배양온도가 20℃의 경우 48시간의 유도기를 거친 후, 대수기로 접어들어 72시간 이후에 정체기를 거쳐 사멸기에 접어드는 것으로 나타났다. 하지만 30℃와 40℃의 경우 유도기가 6시간으로 20℃배양 보다 8배 빠르게 나타났으며, 대수 증식기의 경우 30℃배양의 경우 24시간에 최대 증식으로 보였으며, 40℃배양의 경우 48시간에 가장 활발한 증식을 보였다. 따라서 SK-125의 경우 40℃배양에서 가장 빠른 증식을 보이는 것으로 나타났다.

분리한 균주의 증식 속도 및 증식에 따른 효소활성의 변화를 알아보았다. SK-2의 경우 20℃배양에서는 Fig. 44에 나타나듯이 효소활성이 변화가 거의 없었다. 하지만 30℃와 40℃의 경우 시간의 흐름에 따라 효소활성 또한 증가하는 것으로 나타났다. 40℃배양의 경우 6시간이후 효소활성이 서서히 증가 하다가 96시간대에 최고의 활성을 보였다. 30℃배양의 경우 12시간까지 효소활성이 감소하는듯 하였으나, 12시간 이후 급격히 활성이 증가하다가 96시간대에는 20, 30℃ 배양보다 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

SK-125의 경우, Fig. 45에 보여지듯이 40℃배양에서 12시간 이후에 효소활성이 증가하는 듯 하였으나 결론적으로는 효소활성이 거의 나타나질 않았으나 20℃와 30.℃에서는 효소활성을 보였으며 이들 중 30℃배양에서 가장 높은 효소활성을 나타내었다.

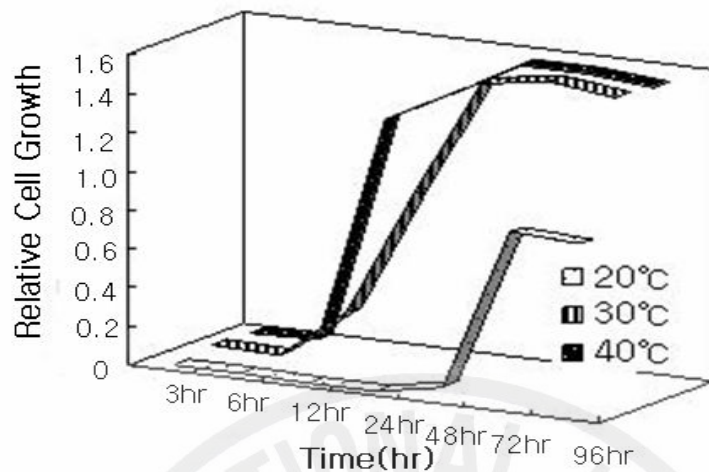


Fig. 43. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of SK-2..

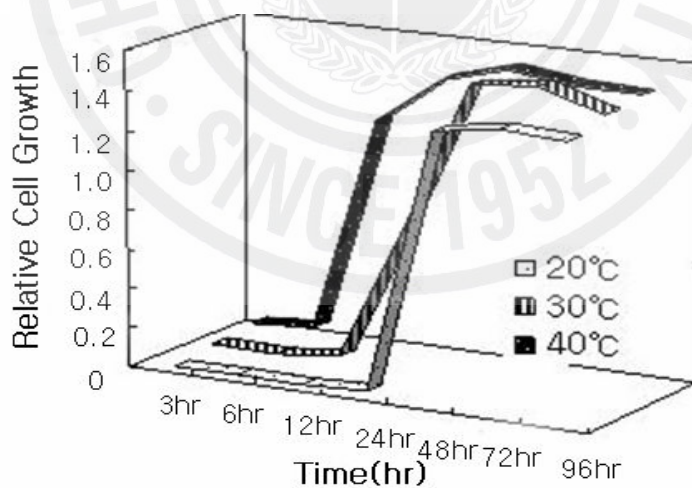


Fig. 43. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of SK-125..

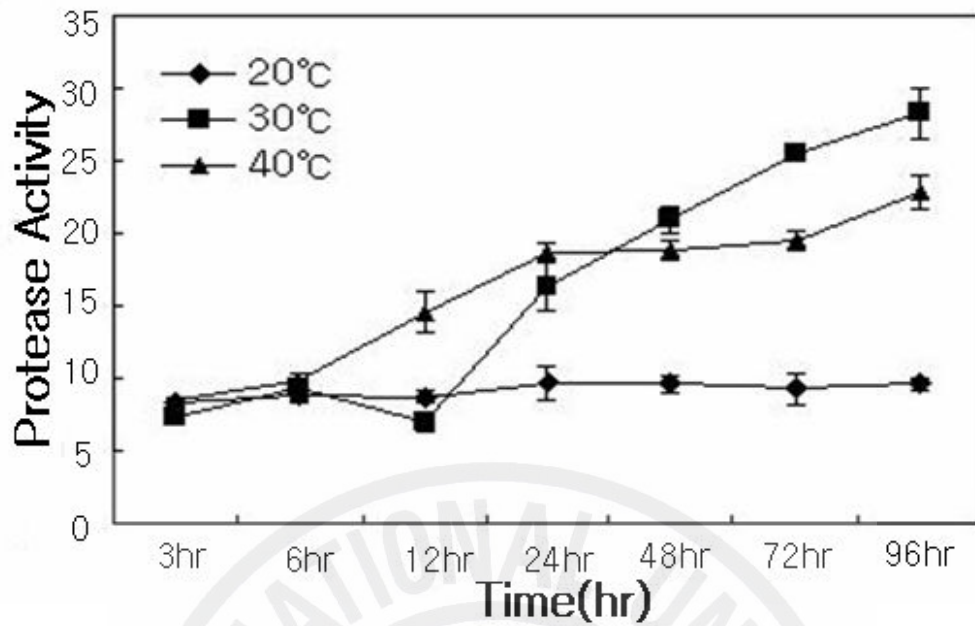


Fig. 44. Effect of temperature on bacterial growth and activity SK-2 produced enzyme by the 96hr culture in Marine Broth.

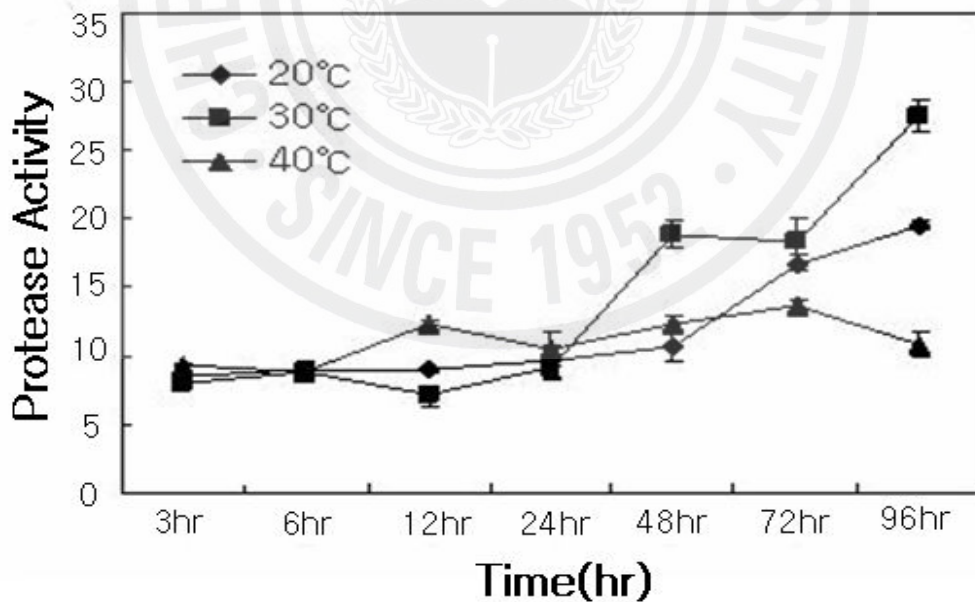


Fig. 45. Effect of temperature on bacterial growth and activity SK-125 produced enzyme by the 96hr culture in Marine Broth.

Table 2. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG(SK-2)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	+	+	+	+	—	—	+	±	±	±	±
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitoll	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fruuctose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
±	—	+	+	+	—	±	—	+	±	+	+
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucooside
—	±	+	+	+	+	—	±	—	—	+	±
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
+	—	+	+	±	—	—	+	±	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 $p$ -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	±
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvatic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	+	+	±	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	±	±	+	+	+	±	+	—	+	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
—	±	+	+	±	—	—	—	—	—	—	+

Table 3. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG(SK-125)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	—	+	±	—	—	—	—	+	—	+
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+	—
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside
—	—	+	+	+	±	—	—	—	—	±	+
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D- Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
—	—	+	+	—	—	—	+	—	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 $p$ -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	—
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	—	±	—	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
±	—	—	—	±	+	—	—	—	—	—	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
+	—	±	+	+	—	±	+	—	+	+	+

### 3) 다당 분해 미생물 분리 및 동정

NA배지에 1%starch를 첨가 후, 30℃에서 48시간 배양한 후 colony 주변위에 0.2%(W/V) KI-I2용액으로 염색하여 clear zone이 생기는 균주만을 amylase 분해능이 있는 균주로 200여 균주 중 10균주를 선별하였으며, 이들 중 가장 amylase 활성이 좋은 균주를 선정하여 ST-63, ST-140, ST-194라 명명하였다.

분리 균주의 생화학 특성을 조사한 결과, Table 4에 보이듯 ST-63 균주의 경우,  $\beta$ -Cyclodextrin, Dextrin, Glycogen, Arbutin, D-Cellobiose, D-Fructose, Maltose, Maltotriose, D-Mannitol, Palatinose 등의 탄수화물이 대사됨을 확인하였다. ST-140 균주의 경우 Table 5에 보이듯, Dextrin, Glycogen, Arbutin, D-Cellobiose, D-Fructose, Gentiobiose,  $\alpha$ -D-Glucose, Palatinose, D-Sorbitol, Thymidine 등의 탄수화물이 대사됨을 확인하였다. 그리고 ST-194 균주의 경우 Table 6에 보이듯, Dextrin, Glycogen, N-Acetyl-DGlucosamine, Arbutin, D-Cellobiose, D-Fructose, Maltose, Maltotriose, Salicin, D-Sorbitol 등의 탄수화물이 대사됨을 확인하였다.

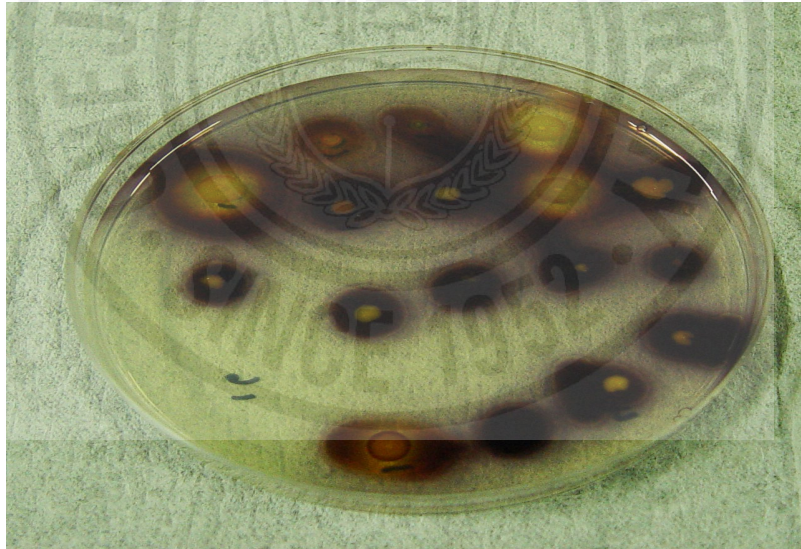


Fig.46. Photos of protease producing bacteria by using skim milk agar plates.

#### 4) 배양 온도에 따른 균체증식 및 효소 활성의 영향

분리 균주의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른 다당 분해 효소 활성의 변화를 조사하였으며, 이를 위하여 배양 온도를 20℃에서 40℃까지 10℃간격으로 배양하여 균체의 증식과 분비되는 다당분해 효소의 활성을 조사하였다.

ST-63은 초기 배양온도가 20℃에서 약 10시간의 유도기를 거친 후, 대수기로 접어들어 24시간대에 가장 높은 미생물 성장을 보였으며, 24시간 이후에는 정체기를 거쳐 사멸기에 접어드는 것으로 나타났다. 하지만, 30℃와 40℃의 경우 유도기가 30℃의 경우 6시간 지속된 반면, 40℃배양의 경우 이보다 짧은 3시간으로 나타났다. 대수증식기의 경우 20℃배양에서는 24시간대에 가장 높은 증식을 보인 후 바로 정체기와 사멸기를 거친 것으로 나타난 반면, 30℃배양의 경우, 30시간대에 최대의 증식을 보였으며, 40℃배양의 경우 다른 온도의 배양보다는 유독히 빠른 대수기를 진행하였으나, 결론적으로 최대 증식량은 30℃배양보다 떨어지고 대수기는 길게 나타났다.

ST-140은 배양온도가 20℃의 경우 36시간의 유도기를 거친 후 대수기로 접어들어 48시간대에 최대 증식량을 보인 후 바로 정체기 없이 사멸기로 접어들었다.

30℃배양의 경우, 6시간의 유도기를 거친 후 대수증식기로 접어들고 48시간대에 최대 증식량을 보였다. 반면, 40℃배양의 경우 30℃배양과 비슷한 시간대에 대수증식기에 접어들었으나 최대 증식량은 30℃배양에 비하여 현저히 낮은 증식량을 보였다.

ST-194의 경우 배양온도가 20℃의 경우 12시간의 유도기를 거친 후 대수기로 접어들었으며, 24시간대에 가장 증식량을 보였으며, 또한 그 증식량이 ST-63 과 ST-140과는 다르게 30℃, 40℃배양온도의 증식량 보다 높게 나타났다.

분리한 균주의 증식 속도 및 증식에 따른 효소활성의 변화를 알아보았다.

ST-63의 경우 Fig. 50에 보이듯 20℃와 30℃배양에서는 시간의 흐름에 따라 amylase 활성이 시간이 흐름에 따라 점차적으로 증가하는 양상을 나타내었으나, 40℃의 경우 최초 3시간에도 amylase 활성이 나타남을 확인 할 수 있었다. 이는 ST-63균주의 40℃배양의 경우 유도기가 거의 없이 바로 대수 증식기로 접어드는 양상을 보였기 때문인 것으로 사료된다.

ST-140의 경우 20℃와 40℃배양의 경우 시간의 흐름에 따라 amylase 활성의 차이는 있었으나, 활성의 점진적으로 증가하는 양상을 보인 반면, 30℃배양의 경우 12시간 까지는 효소활성의 거의 없다가 24시간대에 들면서 급격한 효소활성을 보였다. 이는 대수증식기를 거쳐 최대 증식 시간과 비슷한 양상으로 증가함을 확인 할 수 있었다.

ST-194의 경우 각각의 배양온도에 따른 효소의 활성이 시간의 흐름에 따라 또



한 세균 증식이 이루어짐에 따라 서서히 증가하는 양상을 보였으나, 30℃,40℃ 배양에서는 20℃와는 다르게 3시간대에도 효소활성을 보였으며, 이는 유도기에 있으면서도 효소생산은 서서히 일어나고 있음을 알 수 있다.



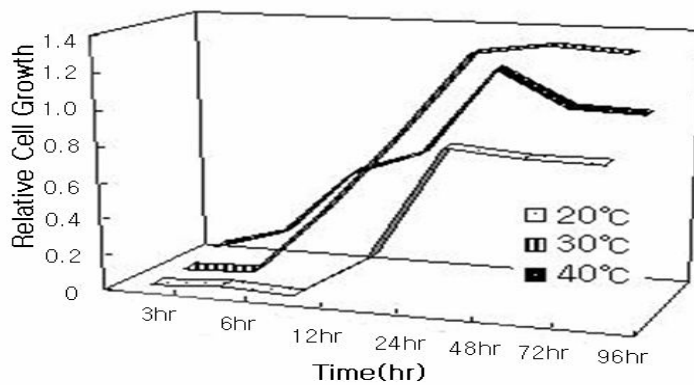


Fig. 47. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of ST-63.

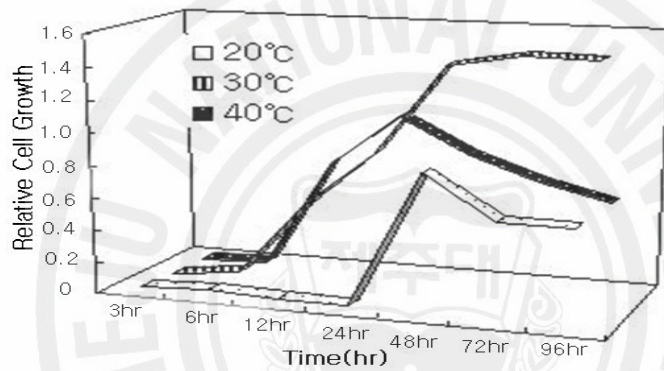


Fig. 48. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of ST-140..

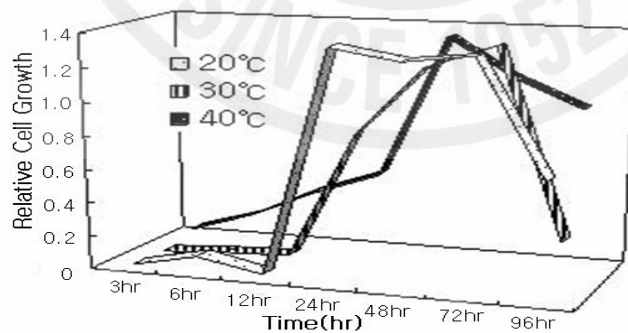


Fig. 49. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of ST-194.

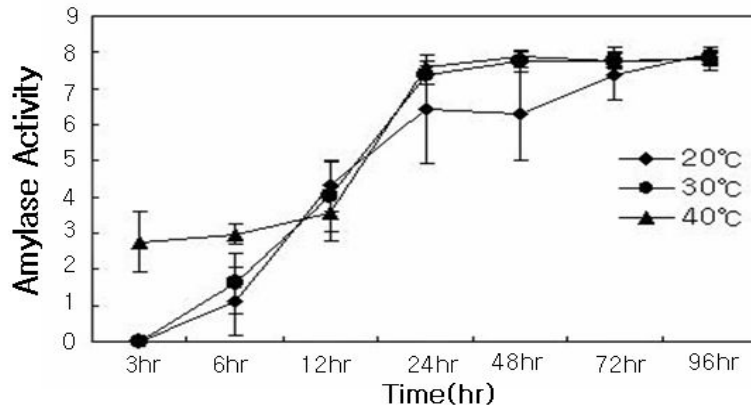


Fig. 50. Effect of temperature on bacterial growth and activity ST-63 produced enzyme by the 96hr culture in Marine Broth.

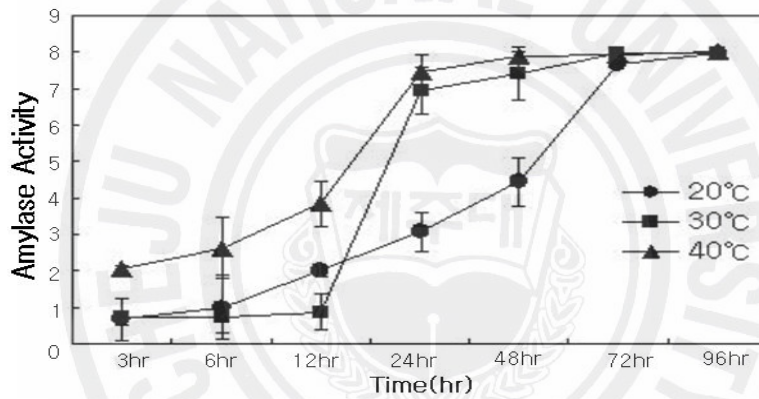


Fig. 51. Effect of temperature on bacterial growth and activity ST-140 produced enzyme by the 96hr culture in Marine Broth.

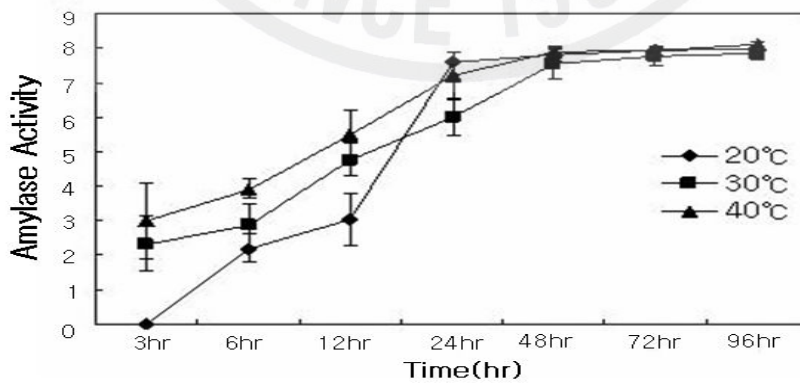


Fig. 52. Effect of temperature on bacterial growth and activity ST-194 produced enzyme by the 96hr culture in Marine Broth.

Table 4. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (ST-63)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	+	+	+	—	—	+	±	±	±	±
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitoll	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	+	+	+	—	±	—	+	±	+	+
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside
—	±	+	+	+	+	—	±	—	—	+	±
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D- Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
+	—	+	+	±	—	—	+	±	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 p-Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	±
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	+	+	±	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	±	±	+	+	+	±	+	—	+	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
—	±	+	+	±	—	—	—	—	—	—	+

Table 5. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (ST-140)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	±	+
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+	—
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside
—	—	+	+	+	+	—	+	—	—	±	+
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
+	—	+	+	±	—	±	—	—	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 $p$ -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	±	—	—	—	—	—	±
F1 Laetamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	—	±	±	+	—	—	±	—	—	—
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
—	—	±	+	+	—	±	+	+	+	+	±

Table 6. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (ST-194)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	±	+
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitoll	B3 Arbutin	B4 D-Cellulose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+	—
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucooside
—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	±	+
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
+	—	+	+	—	—	—	+	—	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 $p$ -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvatic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	—	±	—	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	±	—	±	+	—	—	—	—	—	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
—	—	±	+	+	—	+	±	—	+	+	+

## 7) 지질 분해 미생물 분리 및 동정

Olive oil이 함유된 평판배지에서 투명환을 형성하는 균주를 분리하였고, 이를 LI-68, LI-80로 명명하였다.

분리 균주의 생화학 특성을 조사한 결과 Table 7에 보이듯 LI-68균주의 경우, Maltose, Turanose, 2'-Deoxy Adenosine, Tween 40, Tween 80,  $\alpha$ -D-Glucose, Acetic Acid, Pyruvic Acid, 등의 탄수화물이 대사되었음을 확인하였으며, LI-80 균주의 경우(Table 8) 당대사가 LI-68과 매우 흡사하였으나 L-Lactic Acid, L-Alanyl Glycine, Adenosine,  $\alpha$ -D-Glucose을 추가적으로 대사하는 것으로 확인되었다.



## 8) 배양 온도에 따른 균체증 및 효소 활성의 영향

분리 균주의 증식을 위한 최적 배양온도를 확인하고 증식온도에 따른 다당 분해 효소 활성의 변화를 조사하였으며, 이를 위하여 배양 온도를 20℃에서 40℃까지 10℃간격으로 배양하여 균체의 증식과 분비되는 지질분해 효소의 활성을 조사하였다.

LI-68 균주는 배양온도가 20℃에서 48시간의 유도기를 거친 후 48 시간 이후에 대수기로 접어들었으며, 최대 증식량은 72시간대로 나타났다. 또한 40℃배양의 경우에도 유도기 시간이 20℃와 유사하게 나타났으나, 최종적인 균체의 증식량은 20℃배양보다는 월등히 높았다. 반면, 30℃ 배양의 경우 유도기가 12시간으로 나타났으며, 이후 대수증식기를 거쳐 48시간대에 최대 증식량을 보였으며, 또한 증식량 또한 가장 높게 나타난 것으로 보아 30℃가 최적 배양 온도인 것으로 나타났다.

LI-80 균주의 경우 배양온도가 20℃일 때 48시간의 유도기를 거친 후 72시간대에 가장 높은 증식량을 보였다. 30℃, 40℃배양의 경우 유도기가 각각 24시간으로 나타났으며, 이후 대수증식기로 접어들어서는 40℃배양에서 가장 높은 증균량과 빠른 성장을 보이는 것으로 나타났다.

분리한 균주의 증식속도 및 증식에 따른 효소활성이 변화를 알아보았다. LI-68의 경우, 모든 배양온도에서 24시간대까지는 lipase 활성이 미미하였으나, 24시간을 기점으로 하여 활성이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 40℃배양에서 가장 높은 Lipase 활성을 나타냈다.

LI-80균주의 경우, LI-68균주와 유사한 활성을 보이는 것으로 나타났다. 즉, 24시간대까지는 lipase 활성이 미미하였으나, 24시간을 기점으로 하여 활성이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 40℃배양에서 가장 높은 Lipase 활성을 나타냈다.



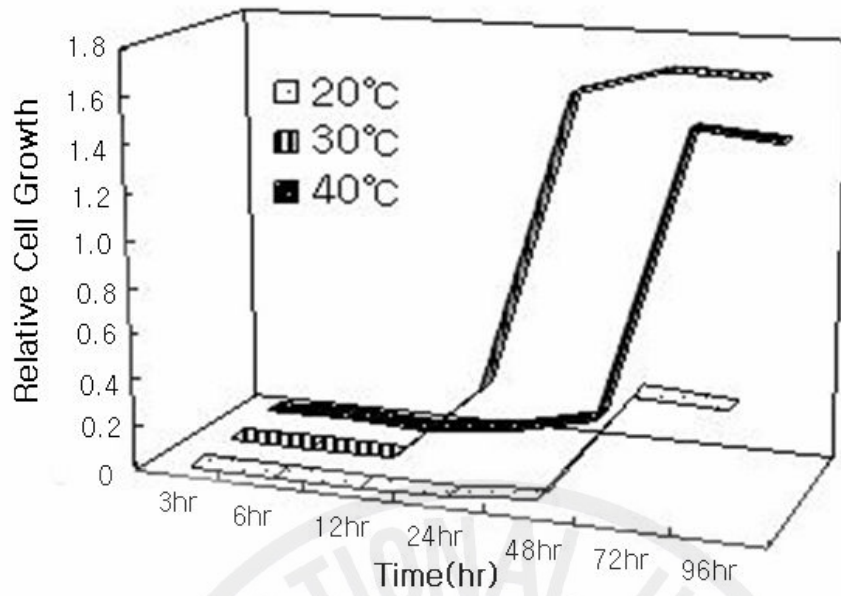


Fig. 53. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of LI-68.

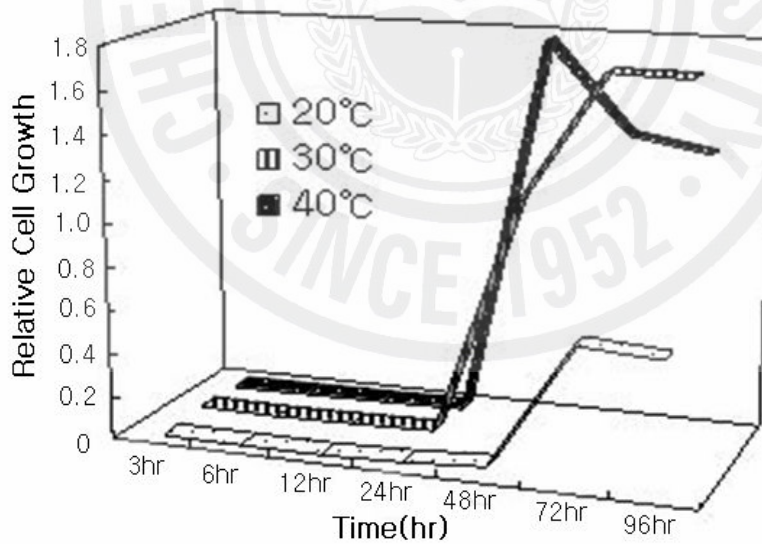


Fig. 54. Effect of temperature in Marine broth medium on the cell growth of LI-80.

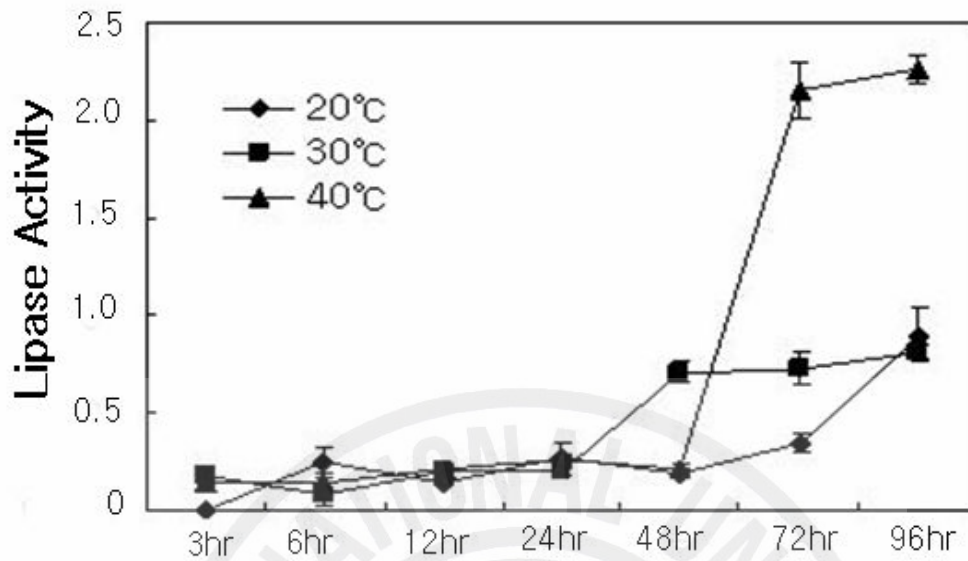


Fig. 55. Effect of temperature on bacterial growth and activity LI-68 produced enzyme by the 96hr culture in Marine Broth.

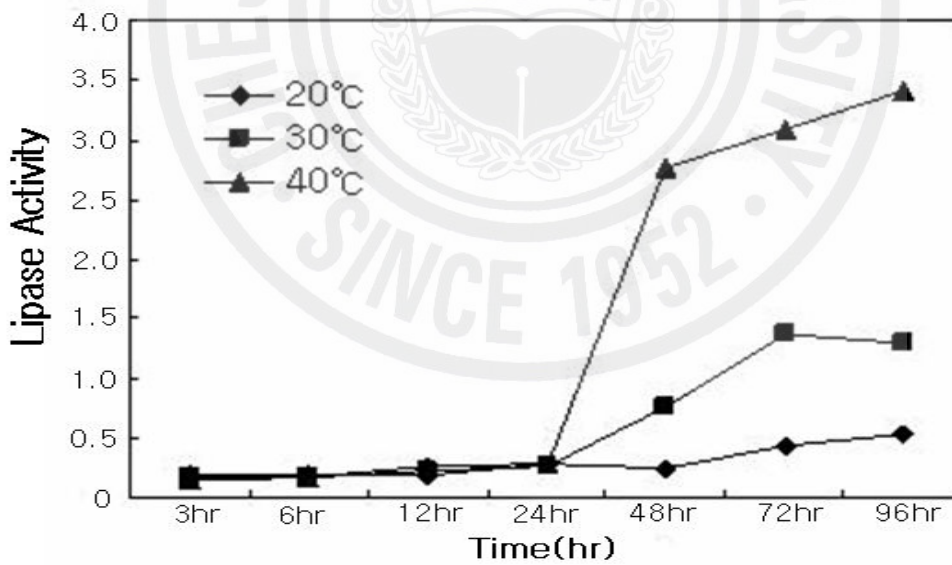


Fig. 56. Effect of temperature on bacterial growth and activity LI-80 produced enzyme by the 96hr culture in Marine Broth.

Table 7. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (LI-68)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	±	+
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitoll	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+	—
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside
—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	±	+
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D- Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Sedoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
+	—	+	+	—	—	—	+	—	+	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turanose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 $p$ -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	—	±	—	—	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl- L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	±	—	±	+	—	—	—	—	—	+
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
—	—	±	+	+	—	+	±	—	+	+	+

Table 8. Biochemical characteristics of isolation strain tested by BIOLOG (LI-80)

A1 Water	A2 $\alpha$ -Cyclodextrin	A3 $\beta$ -Cyclodextrin	A4 Dextrin	A5 Glycogen	A6 Inulin	A7 Mannan	A8 Tween 40	A9 Tween 80	A10 N-Acetyl-D-Glucosamine	A11 N-Acetyl- $\beta$ -D-Mannosamine	A12 Amygdalin
—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
B1 L-Arabinose	B2 D-Arabitol	B3 Arbutin	B4 D-Cellobiose	B5 D-Fructose	B6 L-Fucose	B7 D-Galactose	B8 D-Galacturonic Acid	B9 Gentiobiose	B10 D-Gluconic Acid	B11 $\alpha$ -D-Glucose	B12 m-Inositol
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
C1 $\alpha$ -D-Lactose	C2 Lactulose	C3 Maltose	C4 Maltotriose	C5 D-Mannitol	C6 D-Mannose	C7 D-Melezitose	C8 D-Melibiose	C9 $\alpha$ -Methyl-D-Galactoside	C10 $\beta$ -Methyl-D-Galactoside	C11 3-Methyl Glucose	C12 $\alpha$ -Methyl-D-Glucoside
—	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D1 $\beta$ -Methyl-D-Glucoside	D2 $\alpha$ -Methyl-D-Mannoside	D3 Palatinose	D4 D-Psicose	D5 D-Raffinose	D6 L-Rhamnose	D7 D-Ribose	D8 Salicin	D9 Secoheptulosan	D10 D-Sorbitol	D11 Stachyose	D12 Sucrose
—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+
E1 D-Tagatose	E2 D-Trehalose	E3 Turannose	E4 Xylitol	E5 D-Xylose	E6 Acetic Acid	E7 $\alpha$ -Hydroxybutyric Acid	E8 $\beta$ -Hydroxybutyric Acid	E9 $\gamma$ -Hydroxybutyric Acid	E10 $p$ -Hydroxy-Phenylacetic Acid	E11 $\alpha$ -Ketoglutaric Acid	E12 $\alpha$ -Ketovaleric Acid
—	—	+	—	—	+	+	+	—	—	—	+
F1 Lactamide	F2 D-Lactic Acid Methyl Ester	F3 L-Lactic Acid	F4 D-Malic Acid	F5 L-Malic Acid	F6 Pyruvic Acid Methyl Ester	F7 Succinic Acid Mono-methyl Ester	F8 Propionic Acid	F9 Pyruvic Acid	F10 Succinamic Acid	F11 Succinic Acid	F12 N-Acetyl-L-Glutamic Acid
—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	—	—
G1 L-Alaninamide	G2 D-Alanine	G3 L-Alanine	G4 L-Alanyl-Glycine	G5 L-Asparagine	G6 L-Glutamic Acid	G7 Glycyl-L-Glutamic Acid	G8 L-Pyroglutamic Acid	G9 L-Serine	G10 Putrescine	G11 2,3-Butanediol	G12 Glycerol
—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—
H1 Adenosine	H2 2'-Deoxy Adenosine	H3 Inosine	H4 Thymidine	H5 Uridine	H6 Adenosine-5'-Monophosphate	H7 Thymidine-5'-Monophosphate	H8 Uridine-5'-Monophosphate	H9 D-Fructose-6-Phosphate	H10 $\alpha$ -D-Glucose-1-Phosphate	H11 D-Glucose-6-Phosphate	H12 D-L- $\alpha$ -Glycerol Phosphate
—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—

## VII. 종합 고찰

최근 우리나라의 연안해역은 육상으로부터 오염물질의 다량유입과 양식장의 자가 오염으로 인하여 빈산소수괴가 형성되고, 영양염류의 용출량 증가로 부영양화가 가속화되어 적조 발생과 같은 2차적인 문제가 발생하고 있다. 특히, 양식장 퇴적물은 어패류의 배설물 등에 의한 유기물의 다량 퇴적으로 연안 환경 악화를 초래하는 주원인이 되고 있으며, 수산물 생산에 커다란 장애요인이 되고 있다(Lee et al., 1997; Murakami et al., 1998; Takeuchi, 1999).

양식장에서 발생하는 오염물 중 가장 큰 영향을 미치는 것은 사료의 공급에 의한 경로에 의해 발생하는 것으로 미섭취 사료와 대사 작용 중 소화하지 못한 영양분, 어분, 뇨 등에 의해 수질이 오염된다(Timmons, 1994).

이처럼 양식장에서 발생하는 오염물의 가장 큰 특징은 고형물질과 암모니아와 같은 용존물질이 모두 포함되어 있다는 것이다. 이러한 폐쇄적 양식장은 비교적 좁은 사육조에서 많은 어류를 수용하므로 어류의 활동에 의한 수질 등 환경요소의 변화를 가져오기 쉽고, 또 양식 어류의 밀도가 높아짐에 따라 노폐물의 축적이 심각한 문제점으로 대두되고 있다. 사육조내에서는 어류의 대사 배설물이나 먹고 남은 찌꺼기 등이 여러 가지 현탁물질로 부유하고 있으며, 이들 고형물질이 분해되는 과정에서 생성되는 암모니아는 수중생물에 대하여 강한 독성을 야기시켜 큰 문제점으로 부각되고 있다(Yun et al., 1999).

제주도내 양식장 밀집 지역을 4곳으로 나누어 2006년 7월부터 2006년 12월까지 채집한 양식장 배출수의 이화학적 특성을 조사한 결과, 성산지역 양식장 배출수의 평균 수소이온농도(pH)는 7.74로 약염기성으로 나타났다. 성산 지역은 11월의 경우 7.40으로 평월에 비하여 낮게 나타났으나, 12월에 관측결과, 7.74로 평균 수소이온농도 값으로 나타났다. 표선지역 양식장 배출수의 경우 평균 수소이온농도(pH) 값이 7.68로 나타났으며, 9월에 7.60으로 평월에 비하여 가장 낮은 수소이온농도 값을 보였으며, 표선지역의 경우 다른 지역과 달리 매월마다 불규칙한 양상을 나타내는 것으로 관측됐다. 위미지역의 양식장 배출수의 평균 수소이온농도(pH) 값이 7.68로 나타났으며, 위미지역의 양식장 배출수의 경우 7, 8, 9, 10, 12월에는 일정한 값을 보였으나, 11월의 경우 7.48로 평월에 비하여 낮은 농도 값을 보였다. 대정지역의 양식장 배출수의 경우 평균 7.7로 나타났으며, 대정지역의 배출수의 경우, 9월에 값이 7.99로 다른 지역과 달리 유독 높은 수치를 보였으며, 수소이온농도(pH)의 경우 모든 양식장 배출수에서 수치가 약염기성을 띄는 것으로 조사되었다.

평균적인 해수의 염분농도는 평균 32.5~34.3‰ 정도로 알려져 있다(Moon, et al., 2006) 본 연구의 관측결과 성산, 표선, 위미지역의 양식장 배출수의 평균 염

분농도가 일반적인 해수의 염분농도와 유사하게 나타났으나, 대정지역의 양식장 배출수의 경우 평균 염분농도가 28.81‰로 일반적인 해수의 평균염분농도에 비하여 매우 낮은 염분농도 값을 나타냈다. 해양의 염분농도의 경우 외양역은 거의 일정한 수준을 연중 유지하지만 본 조사지역과 같은 연안역, 특히 연안 육상유입수가 많은 해양에서는 육상 담수유입에 의한 저염현상을 나타내는 것으로 알려져 있다. 하지만 성산, 표선, 위미 지역의 경우 육상 담수유입이 활발히 일어나는 7월과 8월에도 31‰을 상회하고 나머지 조사기간 중에도 염분농도가 31~33‰ 범위로 외양역의 염분특성을 나타내는 것으로 나타났으나, 대정지역의 경우 외양역의 영향보다는 육상수의 유입에 따른 저염현상을 보이는 것으로 사료된다.

각 지역의 용존산소(DO) 측정 결과 성산지역의 양식장 배출수의 경우 7월과 8월에 각각 5.04, 4.88mg/L의 해역별 수질기준으로 II등급에 이르는 낮은 용존산소(DO) 값이 관측됐을 뿐, 모든 지역의 배출수에서 해역별 수질기준으로 보았을 때 1등급에 이르는 용존산소(DO) 값을 보였다.

성산, 표선, 위미, 대정 지역의 양식장 배출수를 중심으로 수온을 조사한 결과 성산지역의 경우, 7월에 24.7℃로 기록되었으나 동절기인 12월에 들면서 17.8℃로 약 7℃ 가량 감소하였으며, 표선지역의 경우, 하절기인 7월에 23.9℃였던 수온이 12월에는 16.8℃로 감소하였으며, 위미지역의 배출수의 경우, 7월에 24.1℃였던 수온이 12월에는 17.1℃로 감소하였다. 대정지역도 다른 지역과 유사하게 하절기인 7월에 24.6℃였던 수온이 동절기인 12월에는 16.8℃로 감소를 보였으며, 이러한 감소 폭은 성산, 표선, 위미, 대정이 모두 비슷하게 나타났다.

본 연구의 총 질소 농도는 성산, 표선, 위미, 대정 지역의 모든 양식장 배출수에서 해역별 수질 등급을 모두 초과 하였다. 성산지역의 경우 총 질소 농도의 평균 값이 1.20mg/L, 표선지역의 경우 1.17mg/L로 나타났으며, 위미지역의 경우 0.97mg/L로 다른 지역과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 평균 농도 값을 보였으며, 대정지역의 양식장 배출수의 경우 2.27mg/L로 채수 지역 중 가장 높은 총 질소 농도로 나타났다. 이러한 결과로 비추어 볼 때 질소원을 제어할 수 있는 기술이 시급히 도입되어야 할 것으로 사료된다.

본 연구에서 양식장 배출수에서의 인산인염의 함량을 조사한 결과 성산지역의 경우 평균 0.48mg/L, 표선지역의 경우 0.55mg/L로 나타났으며, 가장 높은 농도를 보인 위미지역의 경우 0.66mg/L로 조사되었으며, 대정지역의 경우 다른 지역과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 0.44mg/L의 농도를 나타냈으며, 10월의 경우 모든 배출수에서 농도가 감소함을 확인 할 수 있었다.

화학적 산소요구량(COD)를 측정한 결과 성산, 표선, 위미 지역에서의 화학적 산소요구량(COD)의 평균농도가 1.5mg/L, 1.8mg/L, 1.6mg/L로 수조식 육상양식 시설의 방류수 수질 허용 기준인 2mg/L를 넘지 않는 것으로 나타났으나, 대정지역의 양식장 배출수의 경우, 화학적 산소요구량(COD)의 평균농도가 2.3mg/L로

수조식 육상양식시설의 방류수 수질 허용 기준인 2mg/L를 초과하는 것으로 나타났다.

본 연구에 성산, 표선, 위미, 대정지역의 양식장 배출수의 부유물질(SS) 농도를 조사한 결과 성산지역의 양식장 배출수의 경우 평균농도가 19.3mg/L, 표선지역의 경우 평균농도가 다른지역과 비교시 상대적으로 높은 21.2mg/L, 위미지역의 경우 평균농도가 21.3mg/L로 나타났으며, 대정지역의 경우에는 18.5mg/L의 상대적으로 낮은 농도가 나타났다. 하지만 조사한 모든 지역의 양식장 배출수가 수조식 육상양식시설의 방류 기준을 2배 이상 초과하는 것으로 조사되었다.

제주도내 양식장 밀집 지역을 4곳으로 나누고 각 지역의 양식장 배출수를 9:00, 12:00, 15:00, 18:00시에 각 각 채수하여 시간대별 양식장 배출수의 이화학적 특성을 분석한 결과, 평균 수소이온농도(pH)는 성산 지역의 경우 7.74, 표선지역의 경우 7.64, 위미지역의 경우 7.62, 대정지역의 경우 7.62로 모든 지역의 양식장 배출수에서 약염기성으로 나타났으며, 성산, 표선, 위미지역의 배출수의 경우 09:00시부터 15:00시까지는 점차 증가하다가 18:00시에는 전체적으로 감소하는 것으로 나타났으나 대정지역의 배출수에서의 수소이온농도(pH)는 다른 지역과 반대로 18:00시에 급격히 증가하는 양상을 보였다.

염분농도의 경우 시간대별로 큰 차이는 나타나지 않았으나 표선지역의 양식장 배출수에서 33.47%로 일일 평균 염분농도가 가장 높게 나타났으며, 성산지역의 양식장 배출수의 일일 평균 염분농도는 32.37%, 위미지역의 경우 33.18%로 각각 나타났다. 그리고 대정지역의 경우는 29.76%로 매우 낮은 염분농도를 나타냈으나 이 농도는 대정지역의 평균 염분농도인 28.81% 보다는 높은 수치였다.

해양생물서식에 있어서 없어서는 안되는 용존산소(DO)는 성산지역의 양식장 배출수의 경우 일일 평균 용존산소(DO)농도가 8.98mg/L로 나타났으며, 표선 지역의 경우 7.87mg/L, 위미지역의 양식장 배출수의 경우 7.47mg/L, 대정지역의 양식장 배출수에서의 일일 평균 용존산소(DO)가 8.47mg/L로 각각 나타났다. 이러한 일일 평균 용존산소(DO)량은 생물 서식에 필요한 5mg/L를 상회하는 높은 양으로 나타났다.

수온의 경우 4곳 지역의 시간대별 수온 변화는 크게 나타나지 않았으며, 각 지역의 일일 평균 수온을 살펴보면, 성산지역의 배출수의 일일 평균수온은 17.8°C로 상대적으로 가장 높게 나타났으며, 표선지역의 경우 16.9°C, 위미지역은 17°C, 대정지역의 경우에는 16.5°C로 각각 나타났다.

해역에서 암모니아성 질소(NH<sub>3</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N), 아질산성 질소(NO<sub>2</sub>-N)의 합으로 나타내는 총질소의 일일 평균 농도의 경우, 성산지역의 양식장 배출수의 경우 1.03mg/L, 표선지역의 경우 1.12mg/L, 위미지역의 경우 상대적으로 가장 낮은 농도인 0.95mg/L, 대정지역의 경우 4지역 중 가장 높은 농도인 2.64mg/L로 각각 나타났으며, 성산지역의 18:00시에 채취한 배출수를 제외한

모든 배출수에서 해역별 수질 등급기준을 모두 초과하였으며, 대정, 위미, 표선지역의 경우 총질소의 농도 변화가 거의 나타나지 않았으나, 성산지역의 경우 일정하던 총질소 농도가 18:00시에 급격히 감소하는 양상을 보였다.

인산인염의 경우 위미지역의 양식장 배출수와 대정지역에서 일일 인산인염의 평균농도가 0.4mg/L로 나타났으며, 나머지 지역인 성산과 표선지역의 평균농도는 0.3mg/L로 나타났다. 이러한 평균농도는 4지역의 양식장 배출수 모두가 해역별 수질 등급기준을 초과하는 수치이며, 성산과 위미지역의 양식장 배출수의 경우 0.38mg/L, 0.48mg/L로 가장 높은 농도를 보이는 12:00시를 기점으로하여 농도가 0.15mg/L, 0.33mg/L로 각 각 감소하였으나, 표선과 대정지역의 경우 성산, 위미지역과는 반대로 12:00를 기점으로 배출수내 인산인염 농도가 증가하는 것으로 나타났다.

화학적 산소요구량(COD)은 해역의 유기물 오탁지표로 널리 사용되는 방법으로 수조식양식 시설의 방류수 기준인 평상시 2mg/L, 급이시 규정인 5mg/L로 규정하고 있으며, 성산 지역의 경우 09:00시에 3.8mg/L였던 양식장 배출수가 12:00시경에 2.4mg/L까지 감소하였다가 15:00시에는 4.6mg/L 까지 상승한 후 18:00시에는 다시 2.0mg/L로 안정화를 되찾았다. 하지만 표선지역의 경우 12:00시경에 최고 농도인 6.2mg/L까지 상승 후 15:00시 경에는 2.2mg/L까지 농도가 떨어지다가 18:00시에 다시 급격한 농도로 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 위미지역의 화학적 산소요구량(COD) 농도는 다른 지역과는 다르게 09:00시에 16.2mg/L까지 상승했던 농도가 계속적으로 떨어지면서 18:00시 경에는 3.4mg/L의 농도까지 감소하였다. 대정지역의 경우 09:00시에 가장 낮은 농도를 보이다가 12:00시에는 10.8mg/L까지 급격히 상승 하였다가 15:00에는 2.4mg/L까지 감소 후 18:00시에는 다시 농도가 증가함을 확인하였다.

부유물질(SS)는 성산지역의 양식장 배출수의 경우 일일 평균농도가 20.5mg/L로 나타났으며, 표선지역의 경우 22.5mg/L, 위미지역의 경우 상대적으로 높은 농도인 23.mg/L로 조사되었으며, 대정지역의 양식장 배출수의 경우 21.1mg/L의 농도를 나타내었다. 각 각의 시간대별로 부유물질(SS)의 농도의 차이가 있었으나, 모든 시간대에 농도가 수조식 육상양식시설의 방류수 수질기준인 10mg/L를 상회하는 농도분포를 보였다.

해양 미생물 군집은 생태계에서 생산자이면서 분해자로서 생태계의 안정된 동적평형을 유지시키는 중요한 생물 군집이다. 미생물은 해양생태계에서 동물플랑크톤에 의한 2차 내지는 고차 생산물의 생산에 기여하는 한편 플랑크톤이 생산하는 1차 유기생산물의 50% 이상을 무기영양 물질로 전환시키는 분해자의 역할을 하며(Reinheimer 1985; Jaspers *et al.* 2001), 무기질화 된 최종생산물은 해양생물의 동화, 이화 작용에 이용할 수 있게 한다(Kim *et al.*, 1998).

이외에도 미생물은 광·화학합성 작용에 의한 1차 생산자 및 각종 질병에 매체가



되기도 한다. 이와 같은 특성 때문에 미생물들은 수 환경에 유입되는 각종 오염물질에 민감하게 반응한다(Brock, 1997).

제주도 지역의 양식장 밀집 지역을 4곳으로 나누어 2006년 7월부터 2006년 12월에 걸쳐서 성산, 표선, 위미, 대정지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물 개체수를 파악한 결과, YM배지의 경우 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 7, 8월에는 개체수가  $2.5\sim 2.0\times 10^7$  CFU/mL의 분포를 보이다가 9월에  $1.4\times 10^8$  CFU/mL의 가장 높은 개체수 분포를 보인 후 10월에 급격히 감소하는 양상을 보였다. 표선지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물 분포 양상은 그래프상의 급격한 변화는 보이지 않았으나 8월에  $6.3\times 10^7$  CFU/mL의 가장 높은 개체수 분포를 나타내었으며, 동절기로 갈수록 균수가 감소하는 것으로 나타났다. 위미지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물 개체의 분포양상은 표선지역과 같이 8월에  $8.6\times 10^7$  CFU/mL로 가장 많은 개체수 분포를 보였다. 대정 지역의 경우 9월에  $5.1\times 10^7$  CFU/mL으로 가장 높은 개체수 분포를 보였으며, YM Agar에서의 미생물 분포를 분석한 결과 전 지역에서 8월과 9월에 가장 많은 개체수를 보였으며, 11월과 12월에는 수온이 하강하는 시기와 맞물려 미생물의 개체수 분포도 급격히 줄어드는 양상을 보였다.

R2A Agar(Difco) 배지의 경우, 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물상 분포는 9월에  $6.8\times 10^8$  CFU/mL으로 가장 높게 나타났으며, 표선과 위미, 대정지역의 배출수 연안 퇴적층의 미생물상 분포 역시 성산 지역과 유사하게 9월에 각각  $2.3\times 10^8$  CFU/mL,  $4.5\times 10^7$  CFU/mL,  $5.6\times 10^8$  CFU/mL으로 가장 많은 개체수를 보였다. 하지만 대정지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 다른 지역과 달리 11월과 12월에 미생물 개체가 증가하는 것으로 나타났다.

Marine Agar(MA; Difco) 배지에 배양된 종속영양세균은 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 8월에  $1.54\times 10^8$  CFU/mL로 가장 많은 개체수 형성이 일어났으며, 표선지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 9월에  $2.3\times 10^8$  CFU/mL으로 가장 높게 개체수 형성되었다. 그리고 위미와 대정지역 모두 9월에  $8.0\times 10^8$  CFU/mL,  $9.8\times 10^8$  CFU/mL으로 높은 개체수 분포를 보였다.

일반세균 배양에 이용되는 Nutrient Agar(NA; Difco)에서 자란 일반 세균의 경우, 성산을 제외한 그 밖의 지역에서 9월에 표선지역의 경우  $6.4\times 10^8$  CFU/mL, 위미지역의 경우  $5.1\times 10^8$  CFU/mL, 대정지역의 경우  $9.5\times 10^8$  CFU/mL으로 가장 높은 개체수 분포를 보였으나, 성산의 경우  $8.4\times 10^7$  CFU/mL으로 8월에 높은 개체수 분포가 나타났다.

배출수 연안 퇴적층의 월별 개체수 분포의 경우 주로 8월과 9월에 가장 많은 개체수 형성이 일어나는 것으로 조사되었으며, 저수온기인 11월과 12월에는 개체수 분포가 현저히 감소하는 것으로 나타났다.

각 각의 배출수 연안에 형성된 퇴적층의 퇴적깊이에 따른 미생물 분포상을 파

약하기 위하여 변형된 KOVAX-SYRINGE(KOREA VACCINE CO. LTD)에 채취된 퇴적층을 각각의 멸균된 Marine Agar(MA; Difco)배지와 Nutrient Agar(NA; Difco)배지, R2A Agar(Difco)배지 그리고 YM Agar(Difco) 배지에 각각 출현한 집락수를 계수하여 개체수를 측정하였으며 그 결과, 성산지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 표층인 0~1cm에는 YM배지에서만  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL 개체 분포가 나타났으며, R2A배지에서는 2~3cm 구간에서  $1.03 \times 10^8$  CFU/mL로 가장 많은 개체수의 분포를 보였다. NA배지에서는 4~5cm 구간에서  $5.8 \times 10^7$  CFU/mL의 가장 높은 개체수 분포를 나타냈으며 MA배지의 경우 6~7cm 구간에서  $1.24 \times 10^8$  CFU/mL로 가장 많은 개체수의 형성을 보였다.

표선지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 성산지역과는 역으로 최표층인 0~1cm 구간에서도 미생물의 분포상을 R2A배지를 제외한 NA배지와 MA배지 그리고 YM배지에서 각각  $2.6 \times 10^7$  CFU/mL,  $2.5 \times 10^7$  CFU/mL,  $5.7 \times 10^7$  CFU/mL의 개체수의 형성을 보였으며, R2A배지의 경우 8~9cm 구간에서  $3.6 \times 10^7$  CFU/mL의 가장 많은 개체수 형성이 나타났다. MA배지의 경우 5~6cm 구간과 7~8cm 구간에서  $1.49 \times 10^8$  CFU/mL,  $1.41 \times 10^8$  CFU/mL로 가장 많은 개체수의 분포를 보였다. 반면 9~10cm 구간에서는 성산지역과 동일하게 개체수 분포가 나타나지 않았다.

위미지역의 배출수 연안 퇴적층의 경우 다른 지역과 달리 모든 배지에서 미생물의 분포가 나타났으며, R2A배지의 경우  $1.3 \times 10^7$  CFU/mL, NA배지의 경우  $1.2 \times 10^7$  CFU/mL의 개체 분포가, MA배지의 경우  $3.5 \times 10^7$  CFU/mL 그리고 YM배지의 경우에는  $1.9 \times 10^7$  CFU/mL의 개체 분포가 0~1cm 구간에서 나타났다. 또한 MA배지의 경우 1~8cm에 이르는 구간에 끌고루 세균의 분포가 이루어져 있음을 알 수 있었다. 그리고 하층인 9~10cm 구간에서는 성산, 표선 지역과 같이 균의 분포를 확인할 수 없었다.

대정지역의 경우 R2A배지에서 하층인 9~10cm 구간에서  $7.6 \times 10^7$  CFU/mL의 개체수 분포를 확인 할 수 있었으며, NA배지에서는 표층인 1~4cm부근까지 고른 개체수 분포를 확인 할 수 있었으며, MA배지의 경우 6cm 구간과 10cm 구간을 제외한 다른 모든 구간에서 개체수의 분포를 확인 할 수 있었으며, 5cm 구간에서 가장 높은 균의 분포를 나타내었다.

이러한 깊이별 미생물의 분포의 차이는 양식장 배출수 지역의 연안 구조의 차이와 함께 연안의 조석간만 운동 등 다양한 물리적 환경적 차이에 의해서 다양하게 나타나는 것으로 사료되며, 또한 미생물 분포가 확연히 들어나는 깊이에서 유기물 분해 등 다양한 미생물 활동이 일어날 것으로 사료된다.

각지역의 양식장 배출수 연안 퇴적층의 미생물상 분포를 조사한 결과, 성산지역의 배출수 연안 퇴적층에서는 9개의 우점종이 확인되었으며 *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptomyces alibidoflavus*, *Micrococcus luteus*, *Roseovarius crassostreae*, *Acinetobacter junii*, *Enterobacter intermedius*,

*Pseudoalteromonas* spp., *Tenacibaculum aestuarii* 로 나타났으며, 표선지역의 배출수 연안 퇴적층에서는 10개의 우점종이 확인되었으며 *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *Shewanella* spp., *Vibrio* spp., *Krokinobacter genikus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Erythrobacter vulgaris*, *Jannaschia cystaugens*, *Micrococcus luteus*, *Paenibacillus* sp. 이었다.

위미지역의 연안 배출수 퇴적층에서는 *Alteromonas litorea*, *Vibrio* spp. *Staphylococcus sohnii*, *Bacillus baekryungensis*, *Salinicoccus roseus*, *Streptomyces roseochromogenus*, *Dietzia maris*, *Micrococcus luteus*, *Shewanella pacifica*, *Roseovarius pelophilus*, *Tenacibaculum gallaicum*, *Muricauda aquimarina* 등이 우점종으로 나타났으며, 대정지역의 연안 배출수 퇴적층에서는 *Bacillus* spp. group인 *Bacillus polyfermenticus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus megaterium* 와 *Pseudoalteromonas* sp. group인 *P.spongiae*, *P.haloplanktis*, *P.byunsanensis*, *P.mariniglutino*가 확인되었으며, 그 외에는 *Vibrio* spp., *Salinicoccus marinus*, *Streptomyces olivaceus*, *Tenacibaculum mesophilum* 이 우점종으로 나타났다.

양식장 배출수 연안 퇴적층에서 군집분석을 통하여 분리된 미생물을 이용하여 유기물 분해능을 조사한 결과, protease activity의 경우 SK-2와 SK-125가 활성이 뛰어난 것으로 조사되었으며, amylase activity의 경우, ST-63, ST-140, ST-194에서 높게 나타났으며, lipase activity의 경우 LI-68과 LI-80이 높은 효소 활성을 보이는 것으로 조사되었다.

## 참고문헌

Lee, Y. D., Kim, C. Y. and Kang, M. P. 2002 A study on the Water Quality Characteristics of Aquacultural Effluents by Electrolysis, *J. of KTSWT*, 10(1), pp.41~49.

Huh, M and Kang, B. R., 1995 Treatment of Inland Aquaculture Effluent by Biofilm Filtration Process(Ⅱ), *J. of KSEE*, 17(10), pp.964~965.

Yun, C. J., Heo, C. D., Kim, S. W., Kim, I. S., Park, S., C., 1999 Ammonia Removal of Aquacultural Water by Electrochemical Method, *J. of KTSWT*, 21(6) pp. 1171~1177.

Timmons, M.B. 1994, System carrying capacity and flow estimation, Aquaculture Water Reuse System; Engineering design and management. M.B Timmons and T.M Losordo, ed Elsevier, Amsterdam. pp. 4.

이필용, 1997, 내만 양식장 퇴적물중의 유기물 농도분포특성과 양식어장의 환경 개선, 해양수산자원 배양에 관한 연구자 협의회 논문집Ⅱ, 해외어업협력재단, 450~454.

Murakami, K, Y. Hosokawa, and S. Talano, 1998, Monitoring on bottom sediment quality improvement by sand capping in Mikawa bay, *Bull. Coastal Oceanogr.*, 36(1), 83~89.

Takeuchi, T., 1999, Possibility of water quality improvement works for environmental conservation in water areas, *Bull. Coastal Oceanogr.*, 36(2), 508~513.

Cho, K. D., Lee, C. I., Kim, D. S. and Yang, Y. J., 2002, Oceanographic Environment Characteristics in Waters Adjacent to Fish Farm on Land, *J. of the Environmental Sciences*, 11(4), 297~308.

Reinheimer G. 1985, *Aquatic Microbiology*. 3rd ed. Wiley and Sons.

Jasper E, K Nauhaus, H Cypionka and J Overmann. 2001, Multitude and

Temporal Variability of Ecological Niches as Indicated by the Diversity of Cultivated Bacterioplankton, *FEMS Microbiol.*, 36:153~164.

김상진, 이건형, 1998, 해양미생물학, 동화기술, 서울

Brock, T. D., 1997, Microbial Activities in Nature. *In Biology of Microorganism* (8th ed.), Prentic-Hall, Inc., Engle Wood Cliffs, New Jersey, pp.406~456.

Watson, S. W., J. T. Novisky, H. L. Quinby, and F. W. Valios, 1977, Determination of Bacterial Number and in the Marine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 940~946.

Poter, K. G and Y. S. Feig, 1980. The use of DAPI for Identifying and Counting Aquatic Microflora, *Limnol. Oceanor.*, 25, 943~948.

Gocke, K., 1977. Heterotrophic activity. In Microbial Ecology of Brackish-Water Environment(ed. by G. Rheinheimer). pp.198~222. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Van Es, F. B. and L. A. Meyer-Reil. Biomass and Metabolic Activity of Heterotrophic Marine Bacteria. *Adv. Microb. Ecol.*, 6, 111~170.

Newell, Y. S. and R. R. Christian, 1981. Frequency of Dividing Cells as an Estimator of Bacterial Productivity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 23~31.

Fuhrman, J. A. and F. Azam, 1982, Thymidine Incorporation as a Measure of Bacterioplankton Production in Marine Surface Waters. *Mar. Biol.*, 49, 109~120.

Meyer-Reil, L. A. 1984. Seasonal Variations in Bacterial Biomass and Decomposition of Particulated Organic Material in Marine Sediments. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 19, 201~206.

Hoppe, H. G. 1983, Significance of Exoenzymatic Activities in the Ecology of

Brackish Water : Measurements by means of Methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11: 299~308.

Chun, D. S. Kang, D. K. and Kim, H. G., 2002, Isolation and enzyme production of neutral protease-producing strain, *Bacillus sp.* DS-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 30:346~351.

Exterkate, F. A., 1984, Location of Peptidase Outside and Inside the Membrane of *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:177~183.

Pritchard, G. G. and Coolbear, T., 1993, The Physiology and Biochemistry from Proteolytic System in Lactic Acid Bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12:179~206.

Smid, E. J., Poolman, B. and Konings, W. N., 1995, Casein Utilization by *lactococci*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2477~2452.

Tan, P. S. T., Poolman, B. and Konings, W. N., 1993, Proteolytic Enzyme of *Lactococcus lactis*. *J. Dairy Res.* 60:269~286.

Lee, Y. J., Jae, Y. C., Lee, H. J., Chang, H. C., Kim, J. H., Chung, D. K., Kim, Y. S., Cho, S. K. and Lee, D. H., 2002, Identification of Cellenvelope Proteinase of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 116~112.

Godfrey, T and West, S., 1996, Industrial enzymology. 2nd ed. *Macmillan Publishers Inc.* NY. USA.

Jaeger, K. E., S. W. Dijkstra and M. T. Reetz., 1999., Bacterial Biocalysis: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipase. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:315~351.

Otero, C., M. A. Berrendero, F. Cardenas, E. Alvarez and S. W. Elson., 2005, General Characterization of Moncommercial Microbial Lipase in Hydrolytic and Synthetic Reactions, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 120:209~223.

Gerrenwood, C. F. and E. A. Milne, 1965, In Advances in Carbohydrate

Chemistry, *M. L. Wolform, Academic Press, N.Y.*

Whwlan, 1965, In *Methods in Carbohydrate Chemistry, Whistler(eds.), IV, 252*

Wayne W. Umbreit, *Advances in Applied Microbiology, 7, 273, Academic press, N.Y.(1965).*

John R. and Dexter French, 1963, *arch. Biochem. Biophys.*, 100, 451.

J. T. Kung, V. M. Hanraan and M. L. Caldwell, 1953, *J. AM. Chem. Soc.* 75, 5548.

John R. Whitaker, 1972, *Principles of Enzymology for the Food Science, 442, Marccel Dekker Inc. N.Y.*

해양수산부, 2002, 해양환경공정시험방법

Choi, J. Y., S. Y. Kim and H. J. Kang, 2004, Distribution of Suspended Particulate Matters in the East China Sea, Southern Yellow Sea and South Sea of Korea During the Winter Season, *J. Korean Soc. Oceanogr.*, 39(4), 212~221.

EPA(Environmental Protection agency), 1976, *Quality Criteria for Waterm* Washington D.C.

Collins, M. T., Gratzek, J. B., Shotts, E. B., Dawe, D. L., Campbell, L. M. and Senn, D. R., 1975, Nitrification in an Aquatic Recirculating System. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32: 2025~2031.

Chen, J. C. and Chen, S. F., 1992, Effect of nitrite on growth and molting of *Penaeus mondon* juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101C:453~458.

Chen, J. C. and Tu, C. C., 1990, Acute Toxicity of Nitrite to Larval *Penaeus japonicus*. *J. Fish. Soc. Taiwan*, 17:277~287.

Gayle, B. D. and G. D. Boardman, 1989, Biological Denitrification of Water, *J. Enviro. Eng.*, 115, 930~943.

Wisemann, V. 1994, Biological Nitrogen Removal from Waste Water, *Advances in Biochemical Engineering*, 51, 113-121

Cotner, J. B. and R. G. Wetzel. 1992. Uptake of Dissolved Inorganic and Organic Phosphorus Compounds by Phytoplankton and Bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.* 37(2);232~243.

김덕찬, 배재호, 문경환, *환경화학*, 동아기술. 2000, p.678~685.

서귀포시, 중문하수종말처리장 방류수역에 대한 공동어장의 생물상 조사(최종보고서), 1998.

Moon, Y. G. Kim, M. C., Lee, J. B., Song, C. B., Yeo, I. K., Kim, M. J., Park. G. T., Son, H. J., Choi, W. B., and Heo, M. S., 2006, Distribution of Microorganisms and Physico-Chemical Characteristics in the Chagwi-Do Coastal Waters, Jeju Island, *J. of the Environ. Sci.*, 15(3), 271~278.

이동훈, 이명섭, 정경진, 1995, *환경공학개론*, 동화서적.

Novo Industry A/S. Anson Hemoglobin Method for Determination of Bacterial Proteinase Activity. AF 4.2/5, *Novo Industry A/S, Bagsvaerd, Denmark*(1990).

Miler, G. L., 1959, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31:426.

Ryu, H. S., H. K. Kim, W. C. Choi, M. H. Kim, S. Y. Park, N. S. han, T. K. Oh., and J. K. Lee, 2006, New Cold-adapted Lipase from *Photobacterium lipolyticum* sp. nov. that is Closely Related to Filamentous Fungal Lipases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:321~326.

Noble, L. D., and Gow, J. A., 1998, The effect of suspending solution supplemented with marine cations on the oxidation of biolog GN MicroPlate™ substrates by Vibrioceae bacteria. *canadian Journal of Microbiology.* 44:251~258.



## 감사의 글

아버지처럼 언제나 인자한 모습으로 저에게 격려와 사랑을 아끼지 않으셨던 허문수 교수님께 이렇게 논문을 완성할 수 있도록 지도해 주심에 깊은 감사를 드립니다. 그리고 이 논문이 나오기까지 2년 동안 연구 과제를 지도해주신 오덕철 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 이 논문을 세심하게 다듬어 주시고 심사해 주신 여인규 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

그리고 학부생부터 지금까지 많은 가르침을 주신 송춘복 교수님과, 이제희 교수님 그리고 전유진 교수님에게도 깊은 감사를 드립니다.

학부와 대학원을 거치면서 곁에서 응원하고 항상 도움을 주셨던 진도해양수산 사무소의 진창남 소장님, 국립수산물검역소의 고대회 계장님, 해양수산자원연구소의 양병규 연구사님 그리고 언제나 친형처럼 저의 부족함을 채워주었던 영환이형과 철영이형 그리고 연구를 수행하는데 많은 조언을 아끼지 않았던 영건이형과 만철이형과 실험실 후배들 현식, 윤범, 봉근, 용제, 동민, 민욱, 익수, 창영, 승현에게 이 글을 빌어 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 또한 인문학과 철학 사이에서 갈등하던 나에게 과학과 지식을 심어주고 이 자리까지 오게 도와준 철홍이형에게 진심으로 감사의 맘을 전합니다.

그리고 현재 나에게 어류질병 분야로 이끌어 주고계시는 해양수산자원연구소의 강봉조 박사님과 저의 부족함을 다듬어주시는 해양수산자원연구소의 김필연 연구사님과 새로운 환경에 잘 적응하도록 나를 도와주는 창식이형과 언제나 나의 미진한 부분을 채워주는 현정누나와 선영이에게도 이 글을 빌어 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

그리고 학과시절부터 지금까지 수많은 밤을 함께 지새우며 서로에게 힘을 주었던 나의 동기들 주상, 경주, 승홍 송헌, 혜영에게는 깊은 우정을 표합니다.

또한 많은 학과 선배님들과 후배들 그리고 유학생들에게도 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 오늘날까지 나를 보살펴주시고, 걱정해주시고, 믿어주신 어머니와 아버지 그리고 사랑하는 동생들 그리고 신혼시기에 밤늦게까지 나를 기다리고 격려를 아끼지 않았던 사랑하는 나의 아내 영제와 눈에 넣어도 아프지 않을 사랑스런 내 딸에게 이 논문을 바칩니다.