

폐수처리를 위한 고정화 *Rhodopseudomonas* sp.균의 특성

이범규 · 김상희 · 김종균*

부경대학교 식품생명공학부 생물공학전공

Characteristics of Immobilized *Rhodopseudomonas* sp. for Wastewater Treatment

Bum-Kyu Lee, Sang-Hee Kim and Joong-Kyun Kim*

Major of Biotechnology, Division of Food Science and Biotechnology,
Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

Abstract

Rhodopseudomonas sp. was immobilized in three supports(agar, *k*-carrageenan, and PVA) in order to remove nitrate in wastewater coming from fish farm. Among them 3% agar was the most suitable support when denitrification rate and bead durability were tested. Optimum bead size was 4mm-diameter when the substrate transfer into the bead and shear stress for bead were considered, and optimum cell loading was 25mg dry cells/cm³ gel. Ethanol was the best as a carbon source, and optimum C:N ratio, temperature and pH were 1.5:1, 31°C, and 6, respectively. Under these conditions the maximum denitrification rate in synthetic wastewater was 345 $\mu\text{l N}_2/\text{cm}^3 \text{ gel} \cdot \text{hr}$ and that in modified MYC medium was 450 $\mu\text{l N}_2/\text{cm}^3 \text{ gel} \cdot \text{hr}$.

Key words – Wastewater treatment, *Rhodopseudomonas* sp., Immobilization.

서 론

질소 화합물들은 물의 주요 오염원이며, 이러한 질소 성분이 수중에 과다하게 존재할 경우 부영양화를 가속화시키는 것으로 보고되고 있다[18]. 이러한 질소 화합물들 가운데 특히 질산염은 methemoglobinemia(blue-baby syndrome)의 전구체로 알려져 있고[36], 아민과 반응하여 발암물질로 알려진 nitrosoamine을 생성하며[20], 실험실 동물들의 심장과 행동에 장애를 유발하는 것으로 알려지고 있다[28]. 또한 양식장에서 미생물에 의한 질산화를 통해

축적되는 질산염은 다시 환원되어 아질산염으로 전환되고, 이 아질산염은 어류의 성장 저해는 물론 심할 경우 집단 폐사를 야기시킬 수 있으므로, 이러한 질소 성분들이 제거될 수 있는 공정이 필요하다. 그럼에도 불구하고 지금까지는 질산염이 양식장에 있어서 그 자체가 해롭지 않다고 생각하여, 질산염을 제거하기 위한 연구가 활발하게 이루어지지 않았다[1,35].

이러한 유해성 질산염 제거를 위해 사용되는 방법으로 이온교환법, 역삼투압법, 전기분해법, 화학적 환원법, 그리고 생물학적 탈질법등이 있는데[4,7,29,30], 그 중에서

*Corresponding author

도 탈질균을 이용하여 질산염을 유해성이 없는 N₂ gas로 전환시키는 생물학적 처리법은 경제성을 가진다[3]. 다양한 종류의 유기물을 기질로 이용할 수 있어 고농도의 하수처리 시스템에서 이용되어지는 광합성 세균[17,26]의 일종인 purple nonsulfur bacteria는 자연에 폭넓게 분포하며, 질소와 탄소 그리고 인의 순환에 중요한 역할을 하는데[11, 23], 그 중에서도 몇몇 균주들은 질산염을 N₂ gas로 환원시켜 제거하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다[16,25].

미생물을 이용한 생물학적 하수처리 시스템에 있어서 처리 효율을 높이기 위하여 최근 고정화 공법을 많이 사용하고 있다. 이러한 미생물 고정화 공법은 고농도의 미생물을 반응조 내에 유지시킬 수 있고, 폐수처리 시스템의 침전조에서 고액 분리를 용이하게 하며, pH, 온도, 그리고 부하량 양의 변화와 같은 다양한 환경적 변화에 적게 영향을 받는다는 장점을 가진다[22]. 또한 독성물질에 대한 저해 작용이 적고 활성슬러지처럼 벌킹 현상이 일어나지 않는다. 따라서 본 연구에서는 폐수 중에서도 특히, 양식장 폐수중의 질산염 제거를 위한 미생물 고정화 공법의 기초자료를 마련하기 위하여 탈질 능력을 가진 광합성 세균의 일종인 *Rhodopseudomonas* sp. 균의 고정화를 위한 적합한 support를 선정하고, 고정화된 *Rhodopseudomonas* sp. 균의 최적탈질 반응 조건 및 특성들을 규명하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배양

사용된 균주는 *Rhodopseudomonas palustris*로 photosynthetic sludge로부터 순수분리 되었고[14], 분리된 *Rp. palustris*균은 modified MYC(Table 1) agar plate상에서 한 달 마다 새 배지로 옮겨 보관·유지하였다. Tube culture는 screw-capped tube에 0.2%(w/v) KNO₃를 첨가한 modified MYC 배지를 넣어 멸균한 뒤, agar plate상의 colony로부터 접종하였고, 접종 후 tube의 나머지 부피는 멸균된 배지로 가득 채워 pH 5.5, 31℃, 90rpm 및 5,000lux조건에서 3일간 배양하였다[14]. Flask culture는 동일 배지에 접종량을 10%로 하여, tube 배양 때와 동일한 조건에서 Hungate's technique[2]을 이용하여 2일 동안 혐기적으로 배양하였다.

Table 1. The composition of modified MYC medium

Component	Amount (per liter)
Malic acid	1 g
Yeast extract	3 g
Casamino acid	2 g
Trace element solution [†]	1ml
[†] Trace element solution	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	3.00 g
H ₃ BO ₃	0.01 g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.01 g
MnSO ₄ · H ₂ O	0.02 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.01 g
ZnSO ₄	0.01 g
EDTA	0.50 g

균주의 고정화

1) Agar and carrageenan

2일 동안 혐기적 flask 배양을 통해 얻은 late-log phase의 *Rp. palustris*균을 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 회수한 세포에 45℃의 멸균된 증류수를 10ml 첨가하고, 이것을 다시 멸균된 50ml agar 및 κ -carrageenan 용액에 넣어 최종 농도가 각각 2, 3, 및 4%(w/v)가 되도록 하였다. 이렇게 하여 만들어진 혼합물을 water jacket으로 온도가 유지되는 bead제조 장치에 각각 넣은 후, agar는 soybean oil층을 포함하는 4℃ 이하의 증류수에 그리고 κ -carrageenan는 soybean oil층을 포함하는 2% KCl(w/v) 용액에 각각 적하하여 bead를 제조하였다. 제조된 κ -carrageenan bead의 경우 bead의 강도를 높이기 위하여 2시간 동안 2% KCl(w/v) 용액에 bead를 담구어 둔 후 실험에 사용하였고[12], 만들어진 각각의 bead는 멸균된 증류수로 oil을 씻어 낸 후 실험에 사용하였다.

2) PVA

Agar 및 κ -carrageenan의 고정화시 사용된 동일 양의 *Rp. palustris*균에 10ml 증류수를 첨가한 후, 다시 50ml polyvinyl alcohol(PVA) 용액에 섞어 최종 농도가 각각 9, 12, 그리고 15%(w/v)가 되게 하고 이 혼합액을 peristaltic pump를 이용하여 포화된 boric acid 용액에 떨어뜨려 bead를 만들었고, 만들어진 bead의 강도를 강화시키기 위하여 24시간 동안 boric acid solution에 정지한 후 멸균된 증류수로 세척하여 실험에 사용하였다[9].

탈질능력 측정

0.2% KNO₃를 함유한 20ml의 modified MYC 배지를 bead와 함께 멸균된 50ml 주사기에 넣어 주입된 양에 맞게 주사기 plunger로 막아 공기를 제거하고, 주사기 바늘 쪽은 고무마개로 막아 혐기적 상태로 31°C, 5,000lux에서 배양하였다. 탈질능력은 bead에 의해 발생된 gas가 주사기 plunger를 밀어올리는 양을 측정하여 $\mu\text{l N}_2 / \text{cm}^3 \text{ gel}$ 로 나타내었고, 발생된 gas의 성분은 gas chromatography를 이용하여 분석하였다[14]. 인공합성폐수에서의 탈질능력을 측정하였을 때는 bead를 modified MYC 배지에 36시간 순치시킨 후 실험에 사용하였다.

Batch-type operation 및 누출되는 세포양 측정

Bead의 내구성을 평가하기 위해 탈질능 실험에 이용한 주사기 technique을 이용하여 회분식으로 실험하였다. 탈질에 의해 N₂ gas가 주사기내에 5ml 가량 발생되면 clean bench 안에서 20ml의 modified MYC배지를 포함하는 멸균된 새로운 주사기에 사용된 bead들을 옮겨 넣은 다음 실험을 반복적으로 실시하였다. 실험기간 동안 bead밖으로 누출되는 세포량의 측정은 1회 회분식 실험이 끝날 때마다 주사기로부터 20ml의 배지를 수거하여 5,000rpm에서 원심분리하고, 얻어진 세포에 다시 멸균된 증류수를 첨가한 후, 2회 반복 원심분리하여 얻은 cell을 100°C dry oven에서 12시간 건조 후 건조 균체 중량을 구하여 측정하였다.

결과 및 고찰

고정화 담체의 선정

1) 탈질능력 평가

*Rd. palustris*균에 대한 최적의 고정화 담체를 선정하기 위하여 광합성 세균의 고정화에 널리 이용되고 있는 agar [33,34], κ -carrageenan[6, 10], 그리고 이들 담체에 비하여 가격과 gel strength 면에서 장점을 가지며, 활성 슬러지 고정화에 적합한 담체로 알려져 있는 PVA[9]에 고정화를 실시하여 이들 bead에 대한 각각의 탈질능력을 평가하여 Fig. 1에 나타내었다. 고정화 담체의 탈질능력은 2%와 3%의 agar 및 κ -carrageenan bead에서 유사한 결과를 보인 반면 4% bead의 경우 그 능력이 떨어졌다. 이는 bead 제

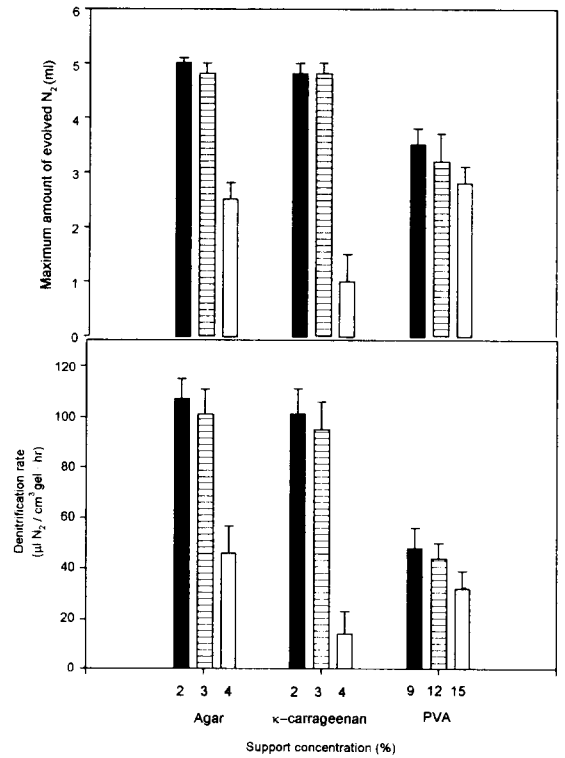


Fig. 1. Denitrification rate and maximum amount of evolved N₂ by immobilized *Rp. palustris* in three supports with cell loading of 10mg dry cells per cm³ gel.

조시 담체의 농도가 증가함에 따라 gel화되는 온도가 높아 지므로 높은 온도에서 bead를 제조할 수 밖에 없어 고온에 의한 cell damage가 있을 것으로 사료되며, 또한 담체의 농도 증가에 따른 bead내로의 기질 확산이 어려운 것에서 기인한 것으로 생각된다[15]. 이때 2% 및 3% agar bead에 있어서 *Rd. palustris*균의 탈질 능력을 살펴보면 syringe내에 약 5ml의 gas가 발생되었는데, 발생된 gas의 G.C 분석결과 대부분이 N₂ gas임이 밝혀졌다[14]. 0.2% KNO₃를 포함하는 20ml의 배지에서의 탈질반응에 있어 질산염이 N₂ gas로 모두 전환된다면 화학양론학적으로 약 5ml의 N₂ gas를 발생시킬 수 있다. 따라서 이 실험 결과는 질산염이 대부분 N₂ gas로 전환되었음을 보여준다. PVA bead의 경우 gel 농도가 낮을 수록 좋은 효율을 보였으나, agar 및 κ -carrageenan bead에 비하여 50%정도

감소한 탈질율을 보였다. 이는 PVA bead 제조시 bead의 강도를 강화시키기 위하여 24시간 동안 세포가 4 이하의 낮은 pH를 가지는 포화된 boric acid 용액에 노출됨으로써 세포 손상이 일어난 것으로 사료된다[9].

2) bead의 내구성 평가

고정화 bead를 이용한 탈질공정에 있어서 고정화 담체가 가져야 할 또 하나의 특성은 장기간에 걸쳐 사용할 수 있도록 내구성을 가져야 한다. 따라서 유사한 탈질능력을 보인 2%와 3% bead 가운데 3%의 agar 및 κ -carrageenan bead에 대하여 이들 담체의 내구성을 평가하여 Fig. 2에 나타내었다. Batch-type operation에 의한 처음 4번의 재사용 동안 bead의 탈질능력이 급격히 증가하였다. 이는 bead의 색깔이 처음에는 분홍색에서 회분색 실험 횟수가 늘어날수록 붉은 색깔을 띄는 것으로 보아 bead 내에서 세포가 성장하여 전체 세포수가 늘어났고 그로 인해 탈질능력이 증가되는 것으로 사료된다. κ -carrageenan bead의 경우 20번의 재사용 이후로 누출되는 세포의 양이 급격히 증가하고 아울러 탈질 속도도 감소하였으며, 30번의 재사용 이후로 bead 표면에 균열이 심화되는 현상을 보였고, 35번째 재사용에 이르러 bead의 구조가 완전히 파괴되었다. 또한 탈질 과정에서 발생하는 N_2 gas가 밖으로 확산되지 못하여 일부 bead가 부유하는 현상이 관찰되었다. 이에 비하여 agar bead는 같은 재사용 횟수에 누출되는 세포의 양이 적고, bead가 부유하는 현상도 일어나지 않았으며, 45번째 재사용 까지 안정적인 탈질능력을 보였다 (Fig. 2). 이 같은 현상은 agar에 비하여 κ -carrageenan의 구조가 더 빨리 파괴된다는 dos Santos등의 실험[5]에서도 찾아볼 수 있다. 따라서 이상의 결과로 보아 탈질을 위한 *Rp. palustris*균의 담체로는 3% agar가 가장 적절하였으며, 이 담체에 *Rp. palustris*균을 고정화하여 그 특성을 알아보았다.

Bead 크기에 따른 탈질능력

담체 내로의 기질의 물질전달 정도는 고정화된 세포 시스템에서 속도제한 인자로서 알려져 있으므로[19], 적절한 bead 크기를 결정하기 위해 직경이 3, 4 그리고 6mm인 bead에 대하여 각각의 탈질능력을 조사하였다. Fig. 3에서 보면 직경이 3과 4mm bead에서는 그 탈질 능력이 유사한 결과를 보인 반면 6mm bead에서는 그 효율이 50%정도

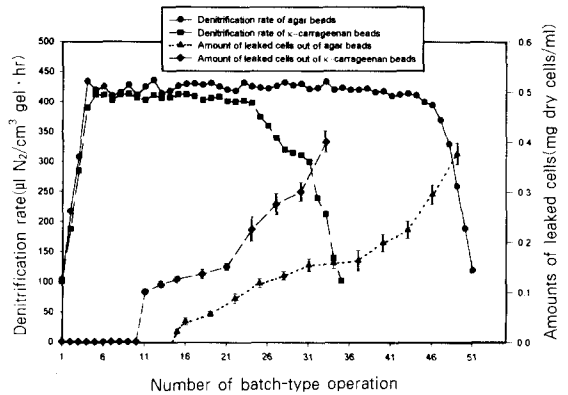


Fig. 2. Durabilities of agar and κ -carrageenan beads in batch-type operation. Amounts of 10mg dry cells per cm³ gel were loaded in each support.

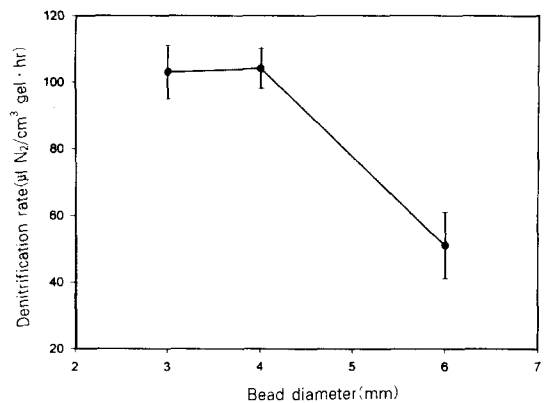


Fig. 3. Effect of bead size on denitrification rate in 3%-agar immobilized cells. Amounts of 10mg dry cells per cm³ gel were loaded.

감소하였는데, 이는 bead내부의 중심부까지 빛이 들어가지 못하고, 기질의 이동 또한 잘 이루어지지 못함으로 인해 bead 내 세포의 성장이 둔화되어 나타난 결과라 사료되며, 이러한 기질 확산의 제한에 따른 탈질능력의 감소는 Nilsson등의 실험[21,22]에서도 보고된바 있다. 따라서 bead내에 탈질 능력, bead내의 *Rd. palustris*균과 기질의 접촉 가능성, 그리고 반응기내의 shear stress를 고려해 볼 때 직경이 4mm인 bead가 가장 적합하였다.

최초 세포 접종량에 따른 탈질능력

Fig. 4는 bead내에 접종되는 초기 세포의 양에 따른 탈질능력을 보여주는데 접종되는 세포의 양이 증가할수록 탈질능력이 증가하였다. 이때 최고 탈질율을 살펴보면 세포 농도가 25mg dry cells/cm³ gel일 때 308μl N₂/cm³ gel · hr의 값을 보였는데, *Rp. palustris* 균의 탈질능력이 최대일 때 bead내의 세포의 양을 측정하기가 어려우므로, 이 값을 균의 초기 고정화 세포양을 기준으로한 탈질율로 환산하면 12.3 μl N₂/mg dry cells · hr의 값이 된다. 이러한 탈질율은 지난번의 연구[14]에서 구해졌던 free cell의 탈질율인 9.3 μl N₂/mg dry cells · hr와 비교하면 조금 높은 값을 가지는데, 초기 고정화 세포양을 기준으로 하지 않고 1회 batch 실험 시간(20시간) 동안 bead내에서의 세포양의 증가에 의한 탈질율을 고려한다면 free cell과 유사하거나 약간 낮은 탈질율을 보일 것으로 사료된다. 그러나 고정화된 세포는 고농도의 미생물을 반응조 내에 유지시킬 수 있고, 폐수처리 시스템의 침전조에서 고액 분리를 용이하게 하며, 활성슬러지처럼 별킹 현상이 일어나지 않는 장점을 가지므로 free cell보다는 고정화 미생물을 이용한 탈질 공정이 산업적으로 훨씬 더 유용하다. 그리고 Fig. 4에서 보면 세포의 농도가 25mg dry cells/cm³ gel 이상에서는 오히려 탈질 능력이 감소하였는데 아마도 이것은 세포의 밀집에 따른 빛의 차단과 기질확산 제한에 기인한 것으로 생각되고, 따라서 적절한 세포 접종량이 필요하다.

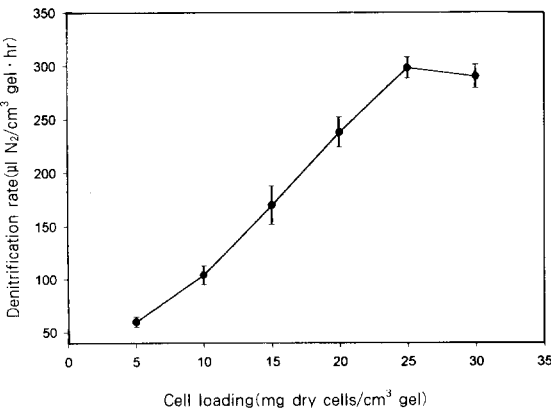


Fig. 4. Effect of cell loading in 3%-agar beads on denitrification rate.

탄소원에 대한 탈질능력

Agar에 고정화된 탈질 광합성 세균을 실제 양식장 폐수에 사용하기 위하여 여러 가지 탄소원에 대하여 탈질능력을 조사하였는데, Fig. 5에서 보여지는 것처럼 methanol을 제외한 모든 기질이 *Rp. palustris*의 탄소원으로 이용될 수 있고, 그 중에서도 acetate, ethanol, lactate, malate, glucose, 그리고 fructose등에서 8μl N₂/mg dry cells · hr 이상의 탈질 능력을 보였다. 따라서 이들 탄소원 중 경제성을 고려해볼 때 ethanol이 가장 적절한 탄소원이라 사료된다. 또한 일반적으로 물고기 사료는 혐기적으로 소화되어 acetate, propionate, butyrate 등의 휘발성 지방산 (volatile fatty acid)로 전환되는데[32], 이들은 탈질반응을 위한 탄소원으로 이용될 수 있고 그 중에서도 acetate는 tricarboxylic acid (TCA) cycle의 중요한 전구체로 알려져 있다[31]. 따라서 agar에 고정화된 *Rd. palustris*균은 acetate를 탄소원으로 하여 양식장 폐수중의 질산염제거에 충분히 적용될 수 있으리라 사료된다.

최적 C:N 비

Ethanol을 탄소원으로 하는 인공폐수(Table 2)에서의 *Rp. palustris*의 최적 C:N (ethanol-C: nitrate-N) 비를 구하기 위해 탈질능력을 살펴보면, Fig. 6에서 보여지는 것처럼 C:N 비가 1.5:1 이상에서 완전한 탈질이 일어났다. 일반적으로 생물학적 탈질 공정에서는 낮은 유기물을 함유하는 폐수가 공급되므로 부가적으로 탄소원을 공급하여 C:N 비를 맞추어야 한다[4,8]. 그러나 과도하게 공급된 탄소원

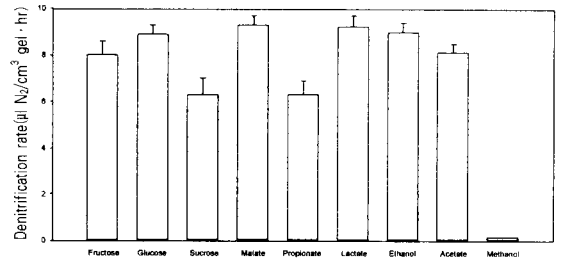


Fig. 5. Effect of various carbon sources on denitrification rate in 3%-agar immobilized cells. Denitrification was performed in malate-basal medium [11] with cell loading of 10mg dry cells per cm³ gel.

Table 2. The composition of synthetic wastewater

Component	Amount (per liter)
Ethanol	1.0 ml
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.2 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.05 g
NaCl	0.1 g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	5.0 mg
Trace element solution ^a	1.0 ml

^aThe composition was the same as that listed in Table 1.

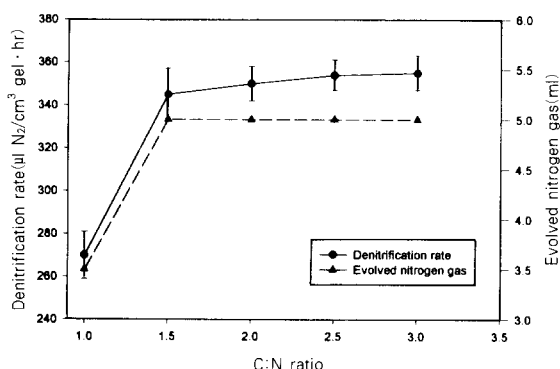


Fig. 6. Effect of C:N ratio on denitrification rate in 3%-agar immobilized cells.

Amounts of 25mg dry cells per cm³ gel were loaded.

이 미생물에 의해 다 소비되지 않을 경우 높은 농도의 유기물을 함유하는 처리수가 방출됨으로 이를 막기 위해서는 질산염과 탄소원 사이에 적절한 C:N 비가 고려되어야 하는데, 이를 고려해 볼 때 탈질을 위한 최적의 C:N 비는 1.5:1이었다. 이때 인공폐수에 첨가된 0.2% KNO₃의 농도는 양식장에서의 질산염의 농도가 181ppm NO₃-N 이상일 때는 물고기에 독성을 미치는 것으로 보고되어 있으므로[13], 이를 고려하여 0.2%의 농도로 첨가하였다.

온도 및 pH에 따른 탈질능력

온도 및 pH에 따른 3% agar에 고정화된 *Rd. palustris* 균의 탈질능력을 알아보았는데(Fig. 7), 온도가 28°C와 34°C 사이에서 안정적인 탈질능력을 보였으며, 31°C에서 295 μl N₂/cm³ gel · hr의 가장 좋은 탈질율을 보였다. pH에 따른 탈질율은 pH 6에서 308 μl N₂/cm³ gel · hr의 가장 좋은 값

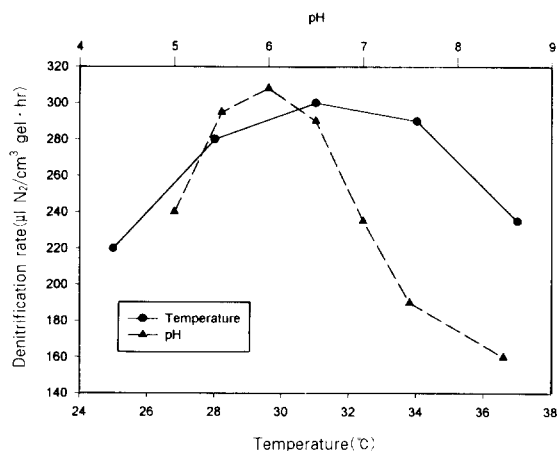


Fig. 7. Effects of temperature and pH on denitrification rate in 3%-agar immobilized cells.

Amounts of 25mg dry cells per cm³ gel were loaded.

을 보였으며, pH가 5.5이하 그리고 6.5이상에서는 그 값이 급격히 감소하였다. 탈질을 위한 최적 pH는 일반적으로 pH 7-8로 알려져 있는데 균주에 따라서 pH 4이하 그리고 pH 11이상에서도 탈질이 일어나는 것으로 알려져 있다 [24].

인공폐수중의 질산염 제거 능력

고정화된 *Rp. palustris* 균을 양식장의 폐수처리에 적용하기 위하여 인공폐수 중에 0.2% KNO₃를 첨가하여 탈질능력을 조사한 결과 최대 탈질율은 345 μl N₂/cm³ gel · hr 이었다. 이는 modified MYC 배지에서의 최대 탈질율인 450 μl N₂/cm³ gel · hr의 값에 비하여 약 24%정도 능력이 감소한 것인데, 이러한 결과는 *Rhodopseudomonas* sp.균에 yeast extract를 첨가하면 세포의 성장이 촉진된다는 Shipman등의 실험결과[27]에서도 나타났듯이, modified MYC 배지에 첨가된 yeast extract가 *Rp. palustris*의 성장을 촉진시킨 것에 기인한 것으로 사료된다. Fig. 8에서 보여지듯이 bead 재사용 횟수가 증가할수록 탈질능력이 감소하다가 N-source의 공급 이후 다시 탈질능력이 회복되었는데, 이러한 결과는 이 균이 질산염을 N-source로 이용하지 못하고 단지 이화적 질산염 환원을 통하여 N₂-gas로 환원시키기 때문이라 사료되며[16], 따라서 수중에 존재하는 질산

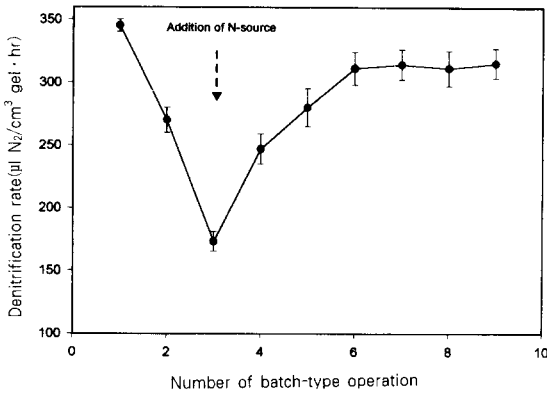


Fig. 8. Denitrification rate in synthetic wastewater along number of batch-type operation with cell loading of 25mg dry cells per cm³ gel. After third batch-type operation 0.5g/L NH₄Cl was added for cell growth.

염을 완전히 제거하기 위해서는 부가적인 N-source의 공급이 필요할 것으로 보인다.

요 약

고정화된 *Rp. palustris* 균을 이용한 양식장 폐수중의 질산염 제거를 위하여 *Rp. palustris* 균의 고정화를 위한 담체를 조사하였는데, 탈질능력과 내구성을 실험한 결과 agar, κ-carrageenan, 그리고 PVA 3종의 담체중 3% agar가 가장 적합한 담체이었다. Agar bead 내부로의 기질 이동 및 shear stress를 고려해볼 때 최적 bead 크기는 직경 4mm 였고, 접종되는 세포의 양은 25mg dry cells/cm³ gel 이었다. 탄소원으로 ethanol이 가장 적합하였고, 최적 C:N ratio는 1.5:1이며, 온도와 pH는 각각 31°C, pH 6 이었다. 이러한 조건에서의 최대 탈질율은 인공합성폐수의 경우 345 μl N₂/cm³ gel · hr 이었으며, modified MYC 배지의 경우는 450 μl N₂/cm³ gel · hr 이었다.

감사의 글

본 연구는 1997년 한국과학재단 연구비(과제 번호: KOSEF 971-0608-059-1) 지원에 의해서 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- Balderston, W. L. and J. M. Sieburth. 1976. Nitrate removal in closed-system aquaculture by columnar denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**(6), 808-818.
- Bryant, M. N. 1972. Commentary on the Hungate's technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**, 1324-1328.
- Dahab, M. F. 1987. Treatment alternatives for nitrate contaminated groundwater supplies. *J. Environ. Syst.* **17**, 65-69.
- Dahab, M. F. and Y. W. Lee. 1988. Nitrate removal from water supplies using biological denitrification. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **60**, 1670-1674.
- dos Santos, V. A. M., E. J. T. M. Leeneu., M. M. Rippoll., C. van der Sluis., T. van Vliet. and J. Tramper. 1997. Relevance of rheological properties of gel beads for their mechanical stability in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.* **56**(5), 517-529.
- Franco, N. and P. M. Vagnais. 1984. Hydrogen production by *Rhodospseudomonas capsulata* cells entrapped in carrageenan beads. *Biotechnol. Lett.* **6**, 639-644.
- Fuchs, W., R. Schatzmayr. and R. Braum. 1997. Nitrate removal from drinking water using a membrane-fixed biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48**, 267-273.
- Gayle, B. P., G. D. Boardman., J. H. Sherrard. and R. E. Benoit. 1989. Biological denitrification of water. *J. Envir. Engng.* **115**, 930-936.
- Hashimoto, S. and K. Furukawa. 1987. Immobilization of activated sludge by PVA boric acid method. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 52-59.
- Hirayama, O., K. Uya., Y. Hiramatsu., H. Yamada. and K. Moriwaki. 1986. Photoproduction of hydrogen by immobilized cells of a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* G-9 BM. *Agric. Biol. Chem.* **50**(4), 891-897
- Hoshino, Y. and H. Kitamura. 1984. Seitai, pp. 2-17, In Kitamura, H., Morita, S., and Yamashita, J. (ed), The photosynthetic bacteria, Gakkai Shuppan Center, Tokyo.
- Ivanova, V., M. Stefanova., A. Tonkova., E. Dovera. and D. Spassova. 1995. Screening of a growing cell immobilization procedure for the biosynthesis of thermostable α-amylase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **50** (3), 305-316.
- Jones, J. R. E. 1964. Fish and River Pollution. Butterworth, London, 203.

14. Kim, J. K., B. K. Lee., S. H. Kim. and J. H. Moon. 1999. Characterization of denitrifying photosynthetic bacteria isolated from photosynthetic sludge. *Aquacult. Eng.* **19**, 179-193.
15. Kim, S. K., J. K. Seo., J. S. Lee., I. S. Kong, and K. H. Suh. 1997. Immobilization of consortium for the removal of ammonium ion in the recirculating aquaculture system. *J. Korean Fish. Soc.* **30**(5), 816-822.
16. Klemme, J. H., I. Chyla. and M. Preuss. 1980. Dissimilatory nitrate reduction by strains of the acultative phototrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 137-140.
17. Kobayashi, M., M. Kobayashi. and H. Nakanishi. 1971. Construction of a purification plant for polluted water using photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol.* **49**, 817-821.
18. Kuenen, J. G. and L. A. Robertson. 1988. Ecology of nitrification and denitrification, pp. 161-218, In J. A. Cole and S. J. Ferguson (ed), *The nitrogen and sulfur cycles*, Cambridge University Press, Cambridge.
19. Lin, Y. F. and K. C. Chen. 1995. Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system. *Wat. Res.* **29**(1), 35-43.
20. Mirvish, S. S. 1977. N-nitroso Compounds, Nitrate, and nitrite: Possible implications for the Causation of Human Cancer. *Prog. Water Technol.* **8**, 195-201.
21. Nilsson, I. and S. Ohlson. 1982. Columnar denitrification of water by immobilized *pseudomonas denitrificans* cells. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 86-90.
22. Nilsson, I., S. Ohlson., L. Haggstrom., N. Molin and K. Mosbach. 1980. Denitrification of water using immobilized *pseudomonas denitrificans* cells. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 261-274.
23. Pfennig, N. 1978. General physiology and ecology of photosynthetic bacteria, pp. 3-18., In Clayton, R. K. and Sistrom, W. R. (ed), *The photosynthetic bacteria*. Plenum Press, New York and London.
24. Prakasam, T. B. S. and R. C. Loehr. 1972. Microbial nitrification and denitrification in concentrated waters. *Water Res.* **6**, 859-869.
25. Shen, J. and O. Hirayama. 1991. Hydrogen production and denitrification by photosynthetic bacteria isolated from lake Nakaumi and its vicinity. *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 338-342.
26. Shen, J., J. Yu., Y. Gu., S. GE., Z. Zhu. and Y. Huo. 1989. Pilot plant research on treatment of citric acid fermentation water by a photosynthetic bacteria method. *Water Technology.* **4**, 187-198.
27. Shipman, R. H., I. C. Kao. and L. T. Fan. 1975. Single-cell protein production by photosynthetic bacteria cultivation in agricultural by-products. *Biotechnol. Bioengin.* **17**, 1561-1570.
28. Shuval, H. I. 1980. Infant Methemoglobinemia and other Health Effects or nitrates in drinking water. *Prog. Water Technol.* **12**, 173-180.
29. Sorg, T. J. 1978. Treatment technology to meet the interim primary drinking water regulation for inorganics. *J. Am. Water Works Assoc.* **70**, 105-111.
30. St. Amant, P. P. and P. L. McCarty. 1969. Treatment of high nitrate waters. *J. Am. Water Works Assoc.* **61**, 695-701.
31. Thauer, R. K., D. Moller-Zinkhan. and A. M. Spormann. 1989. Biochemistry of acetate metabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 43-67.
32. van Rijn, J., N. Fnarev. and B. Berkowitz. 1995. Anaerobic treatment of intensive fish culture effluents: digestion of fish feed and release of volatile fatty acids. *Aquaculture.* **133**, 9-20.
33. Vincenzini, M., R. Materassi. M. R. Tredici. and G. Florenzano. 1982. Hydrogenproduction by immobilized cell. II. H₂-photoevolution and wastewater treatment by agar-entrapped cells of *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodospirillum molischanum*. *Int. J. Hydrogen Energy.* **7**, 725-728.
34. Vincenzini, M., R. Materassi., M. R. Tredici. and G. Florenzano. 1982. Hydrogen production by immobilized cell. I. Light dependent dissimilation of organic substances by *Rhodopseudomonas palustris*. *Int. J. Hydrogen Energy.* **7**, 231-236.
35. Whitson, J. and P. Turk. 1993. Biological denitrification in closed recirculating marine culture system. In: Wang, J. K. (Ed.), *Technique for Modern Aquaculture*, AM. Soc. Agric. Eng., Michigan, 458.
36. Winton, E. F. 1971. Nitrate in drinking water. *Water Works Assoc.* **63**, 95-99.