(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월04일
(11) 등록번호 10-2118634
(24) 등록일자 2020년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 61/10 (2017.01) *A01G 31/00* (2018.01)
A01G 31/02 (2019.01) *A01K 63/00* (2017.01)
A01K 63/04 (2014.01) *C12N 1/20* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 61/10 (2017.01)
A01G 31/02 (2019.02)
(21) 출원번호 10-2018-0162179
(22) 출원일자 2018년12월14일
심사청구일자 2018년12월14일
(56) 선행기술조사문헌
KR101549217 B1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
경기도
경기도 수원시 팔달구 효원로 1 (매산로3가)
(72) 발명자
이동훈
경기도 양평군 양평읍 남북로 55-8, 104동 608호 (공흥리, 행복마을아파트)
임성률
경기도 이천시 갈산로87번길 10-3, 101동 1506호 (갈산동, 갈산동우성아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 유광열

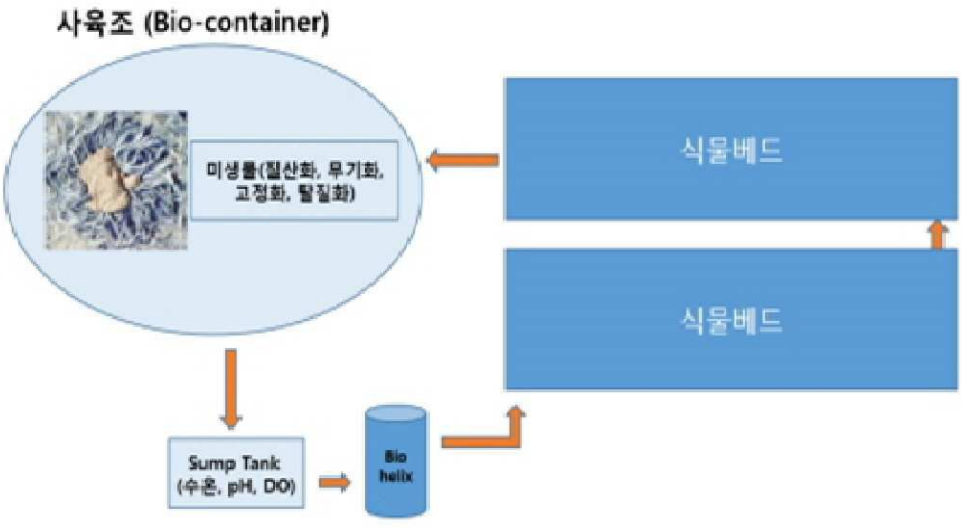
(54) 발명의 명칭 **아쿠아포닉스 시스템을 이용한 저 pH 조건에서 수산생물 양식 및 식물 재배 방법**

(57) 요 약

본 발명은 종속 및 독립영양세균이 혼합된 유용 미생물을 활용한 저 pH 조건에서의 아쿠아포닉스 시스템에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 저 pH 상태에서 종속영양세균의 질산화 과정을 통하여, 암모니아 및 질산염이 동시에 증가되는 안정적인 수질조건에서 수산 생물의 양식 및 식물의 재배가 가능한 저 pH 아쿠아포닉스 시스템에 관한 것이다.

본 발명에 따른 아쿠아포닉스 시스템을 이용할 경우, 식물의 생산성과 수산생물의 생산성의 감소 없이 기존 시스템 대비 시설비를 절약하여 경제적으로 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A01K 63/006 (2013.01)
A01K 63/04 (2018.05)
C12N 1/20 (2013.01)
A01G 2031/006 (2013.01)
Y02P 60/216 (2015.11)

(72) 발명자
김달영
경기도 수원시 영통구 동수원로 316, 4동 109호 (매탄동, 임광아파트)
김진영
경기도 수원시 팔달구 정자천로32번길 27, 152동 1501호 (화서동, 꽃뫼버들마을금강아파트)
김정대
강원도 춘천시 서면 수정1길 21-11 (금산리)
김주민
충청남도 당진시 남부로 200, 110동 1201호 (대덕동, 한성필하우스)

(56) 선행기술조사문헌
KR101648479 B1
KR1020130044604 A
KR101507057 B1
KR1020180004696 A
KR101857327 B1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 118049-03-1-SB010
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치 6차산업 기반형 아쿠아포닉스 모델 개발 및 산업화
연구과제명 아쿠아포닉스 표준모델 및 매뉴얼 개발
기 여 율 35/100
주관기관 경기도농업기술원
연구기간 2018.04.26 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 118049-03-1-HD020
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치 6차산업 기반형 아쿠아포닉스 모델 개발 및 산업화
연구과제명 아쿠아포닉스 전용 사료 및 바이오플락 기술 개발
기 여 율 30/100
주관기관 경기도농업기술원
연구기간 2018.04.26 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 118049-03-1-HD030
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치 6차산업 기반형 아쿠아포닉스 모델 개발 및 산업화
연구과제명 아쿠아포닉스 최적 여과기 개발
기 여 율 35/100
주관기관 경기도농업기술원
연구기간 2018.04.26 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 아쿠아포닉스 시스템을 이용하여 저 pH조건에서 사육수 내의 질산염 농도를 유지하면서 수산생물 사육과 식물재배를 동시에 수행하는 방법:

(a) (i) 어류 사육조를 포함하는 어류 사육시스템; (ii) 식물 재배베드를 포함하는 식물 재배 시스템; 및 (iii) 여과기를 구비하고, 상기 사육 시스템의 사육수는 상기 여과기를 거쳐 상기 식물 재배베드로 유입된 후, 다시 어류 사육조로 순환되는 구조를 가지는 아쿠아포닉스 시스템의 어류 사육조에 어류를 투입하고, 식물재배 베드에 수경재배 식물을 입식시키는 단계;

(b) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 종속 영양세균 및 독립 영양세균을 포함하는 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하고, 유기탄소원을 지속적으로 공급하면서 배양하여 바이오 플락을 형성시키는 단계;

(c) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 유기탄소원 공급을 중단하고, 무기탄소원을 지속적으로 공급하며, 상기 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하면서 배양하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계의 배양시 pH가 6.0 이하로 떨어질 경우, 사육수내 아질산염 농도 변화에 따라 상기 혼합 미생물의 투입을 조절하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (d)단계에서 아질산염 농도가 0.05mg/L를 이상 경우 상기 혼합미생물을 투입하고, 아질산염 농도가 0.05mg/L 미만일 경우 혼합 미생물 투입을 중단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 종속 영양세균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*B. licheniformis*), 바실러스 아미로리퀴파시엔스(*B. amuloliquefaciens*), 셀루모모나 속(*Cellumomona sp.*), 셀룰로모나스 비아조테아(*Cellulomanas biazotea*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*), 및 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 독립 영양세균은 니트로박터 위노그라드스키 (*Nitrobacter winogradskyi.*) 및 니트로소모나스 유트로파(*Nitrosomonas europaea*)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 무기 탄소원은 이산화탄소, 탄산가스, 중탄산염($NaHCO_3$)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 유기 탄소원은 포도당, 당밀, 설탕, 알코올, 메탄올, 식물 전분으로 구성된 군에서 선택

되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아쿠아포닉스 시스템을 이용하여 저 pH 조건에서 수산생물 양식과 동시에 식물을 재배하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 저 pH 조건에서 종속 및 독립 영양세균의 질산화 과정을 통하여, 암모니아 및 질산염이 동시에 증가되는 안정적인 수질조건에서 아쿠아포닉스 시스템을 이용한 저 pH 조건에서의 수산생물 양식 및 식물 재배방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아쿠아포닉스(Aquaponics) 생산 시스템은 어업의 수산양식(aquaculture)과 농업의 수경재배(hydroponics)가 결합된 복합재배 시스템으로, 수산양식 생물의 성장과 생존을 위해 공급된 먹이(사료)가 종속 및 독립영양미생물(heterotrophic and autotrophic microorganism)에 의해 각종 무기물과 질산염으로 분해 및 생성된 것을 식물이 성장 영양소로 흡수하면서 양어수질의 안정화와 식물성장을 이루어지게 하여 사육수의 교환 없이 지속적으로 농수산물을 생산할 수 있는 친환경 생산방법이다(Fisheries and aquaculture technical paper, VOl. 589. 1-19.2014). 아쿠아포닉스 시스템은 우리가 살아가는 자연 생태계가 작동하는 원리를 그대로 채용하고 있으며 농약 등의 화학물질에 취약한 물고기 양식을 위한 친환경 유기 농법에 해당하며, 또한 물이 지속적으로 순환하기 때문에 물 소비량도 최소화할 수 있는 등 기존의 수경재배 농법과 비교하여 많은 장점을 가진다.

[0004] 아쿠아포닉스의 수질관리 방법은 어류의 대사과정에서 발생된 배설물과 허실사료 분해물을 포함하는 양어조의 사육수를 기계적 여과필터로 고형물을 제거하고 질산화 과정을 유도하는 생물학적 여과를 경유한 후 식물 재배지로 유입시킨 후 다시 양어조로 유입시키는 과정을 통해 시스템 내 어류 및 식물이 성장할 수 있는 수질을 유지하게 하는 것이다. 어류 등 수산생물 양식에서 발생되는 오염물의 축적은 농도에 따라서 생물에 치명적인 독성을 나타내기도 한다(Aquaculture Economics & Management, vol 13. 213-230, 2008).

[0005] 아쿠아포닉스 시스템의 일반적인 형태는 수산생물 양식 시 사용되는 사료를 양식되는 생물이 섭취한 후, 이를 체내 동화작용을 걸쳐 뇨 및 분으로 배출(약 30~40%)되는 Waste와 미섭취된 사료가 분해되어 무기화된 오염물(영양분)이 식물의 재배시스템으로 이동하여 식물 생장에 이용되며, 다시 정화된 물이 수산생물 양어조로 이동되어 순환되는 구조이다. 상기 순환되는 구조는 순환여과시스템(RAS) 및 BFT(바이오플락 양식) 양식시스템 2가지 방식이 현재까지 사용되고 있으며, 순환여과시스템(RAS) 및 BFT(바이오플락 양식) 양식시스템 각각에 식물배드를 연결하는 구조로, 2가지 모두 물을 재사용하는 수산양식 방법에 수경재배지를 결합한 것이다.

[0006] 아쿠아포닉스 시스템에서 가장 중요한 요소 중 하나는 어류 등 수산생물이 양식되고 있는 사육수 내 오염원을 제거 및 정화 처리함과 동시에 이를 식물이 성장할 수 있도록 수질을 지속적으로 유지하는 기술이다. 수산양식에서 사육수의 재순환을 통한 양식방법으로 순환여과식(RAS, recirculating aquaculture system)시스템과 바이오플락 기술(BFT, biofloc technology)시스템에 의한 양식이 대표적이다(EIFAC Technical paper, vol 49. 1-27. 1986; The world Aquaculture Society Press. Louisiana. U.S.A., 9-20, 2015).

[0007] 순환여과식 시스템(RAS)은 완전히 물을 재사용하는 것이 아니라 하루에 전체 순환수의 10% 이하가 환수되고 보충되는 시스템이다(Korean Fish. Soc. 34(1). 70-76 2001). 순환여과식 양식(RAS)은 DO부족, 유기물 증가, NH_3-N등의 무기질소 및 CO_2의 축적 등에 의해 어류의 성장저해 및 질병발생 등의 문제가 야기될 수 있어 수질관리가 중요한 것으로 알려져 있으며, 또한 고형물과 NH_3-N의 제거를 위해 여러 장치(침전조, 여과기, 회전원판접촉기, 충전층 반응기, 유동층 반응기, 포말분리기, 자외선살균기 등)가 필요하여, 초기 자본의 투자가 높아 산업적 활용성이 낮은 단점이 있다(Russo RC, Canadian J. Fish. Aqua. Sci. 38. 387-393.1981, Losordo et al.Natl. Res. Inst. Aquaculture. Suppl. 1. 27-36, 1994.).

[0008] 전세계적으로 보편화된 아쿠아포닉스 시스템에 수경재배지를 RAS 시스템이 결합한 방식으로 운영되고 있으나(Scheider, RSRAC Publication. No. 454, 2006), 식물배드, 물리적 장치(여과기 등), 생물학적 장치(생물여과조 등) 많은 투자시설이 수반되어 시설비가 타 양식방법과 비교하여 높으며, 시스템 운영의 복잡성 등의 이유로 국내 내수면 육상수조식 양식에서는 유수식 양식방법에 의한 시설이 많은 편으로 인근 하천수 및 지하수를 취수하여 사육수로 사용하고 간단한 침전시설을 거쳐 배출되는 형태로 경영되고 있으며, RAS 시스템을 구축한

양식장은 뱀장어와 같은 고가의 어류양식에 제한되고 있다.

[0009] 바이오플락 기술(BFT) 시스템은 국내에서 2000년대 도입된 사육수의 재순환 양식방법으로 양어장 내 수산생물에 의해 발생되는 오염물 중 하나인 질산성질소(NH_3-N)를 유기탄소(당밀, 포도당 등)의 사용(C:N비 조절)을 통해 미생물을 증식시키고 미생물총(biofloc) 형성을 유도한 후, 이를 수산생물(어류, 갑각류)이 다시 섭식하게 함으로써 지속적으로 수질을 유지하는 기술이다. 또한 바이오플락(biofloc) 형성에는 질산화, 탈질화, 광합성화에 관여하는 미생물을 포함하여, 식물플랑크톤, 동물플랑크톤, 생물사체, 사료찌꺼기 등 다양한 생물적 요소들이 복합적으로 관여하여 형성된다고 알려져 있다(The world Aquaculture Society Press. Louisiana. U.S.A., 9-20, 2015).

[0010] 그러나 현재의 BFT 양식방법을 이용한 사육수 정화시스템에서는 한계가 있어 새로운 사육수를 지속적으로 공급해야할 필요성이 있으며, 수조에 수용하는 어류의 개체수가 증가하면 사육수 정화효율이 현저히 저하된다. 또한 완전 BFT 양식방법은 종속영양세균을 이용하여 사료에서 유래된 NH_3(암모니아)를 세포증식으로 유도하는 것으로 유기탄소원이 필요하며, 식물생장에 필요한 질소동화의 최종산물인 질산염을 유도하기 위해서는 독립영양세균의 질산화과정이 수행되어야 하며(암모니아→아질산→질산염) 무기탄소원이 필요하다. 또한 BFT 양식에서는 질산화 과정이 아주 미약하게 일어나며, BFT 과정에서 형성된 많은 미생물이 식물뿌리에 필름(film) 현상을 유발하여 식물의 생장을 저해시키는 단점이 있다.

[0011] pH는 식물 성장에 있어 가장 중요한 요소 중 하나로 식물의 영양염 흡수와 직결된다. 수경재배에서 생산되는 식물의 경우, 대다수 다량 영양소(macronutrients, N, p, K, Ca, S, Mg)는 pH 6.5 ~ 7.0 범위에서 잘 흡수되는 반면 미량 영양소(micronutrients, Fe, B, Cu, Zn, Mn, Mo)는 pH 6.5 이하에서 흡수가 잘 되므로 적절 pH 범위를 6.5 이내로 설정하고 있다. 또한 어류의 경우 pH 4.0 이하에서는 생존하지 못하며 pH 4.0 ~ 5.0 범위에서는 성장이 일어나지 않아 생산성이 없고, pH 9.0 ~ 11.0은 성장이 늦고, pH 11이상에서는 폐사개체가 출현한다(Thorarinsdottir RI, *Science and Engineering for a Sustainable Future*, 33-39. 2015. 2015).

[0012] 또한 pH는 질산화 과정과 연관성이 높으며, 암모니아에서 아질산 및 질산염으로 전환되는 질산화 과정에서 수소이온(H^+)이 생성되면서 pH 를 낮추어 물을 산성화시킨다. 이러한 질산화 과정에 참여하는 미생물 중 암모니아를 아질산으로 전환하는 세균은 니트로소모나스 속(*Nitrosomonas sp.*), 니트로소코커스 속 *Nitrosococcus sp.*)와 니트로소스피가 속(*Nitrosospira sp.*)가 있고, 아질산을 질산염으로 산화하는 세균은 니트로박터 속(*Nitrobacter sp.*), 니트로스피나 속(*Nitrospina sp.*), 니트로코커스 속(*Nitrococcus sp.*)와 니트로스피라 속(*Nitrospira sp.*) 들이 대표적이다. 아쿠아포닉스 시스템은 독립영양세균의 질산화 과정으로 이를 유지하기 위해 인위적인 pH 조절제를(KOH, CaOH, H_2CO_3) 사용하고 있으며, 현재까지 정립된 아쿠아포닉스 시스템은 수산생물에 대하여는 pH 6.5~8.0이 가장 좋으며, 식물에 대하여는 6.0~7.0 범위가 안정적인 것으로 알려져 있다.

[0013] 1972년 종속영양성 미생물 *Arthrobacter sp.*가 질산화 과정을 수행하는 것이 알려진 이후, 종속영양성 미생물은 pH의 변화를 균형있게 유지하여 질산화 과정에서 일어나는 산성화 과정을 억제할 수 있음이 알려졌으나, 이를 활용한 안정적인 아쿠아포닉스 시스템은 미미한 실정이다(Marazioti et al, Water. Res. 37. 1239-1251, 2003).

[0014] 이에, 본 발명자들은 종속 및 독립 영양미생물(heterotrophic and autotrophic microorganism)을 활용한 아쿠아포닉스 시스템을 개발하고자 예의 노력한 결과, 저 pH 조건에서 종속 및 독립 영양세균의 질산화 과정을 통하여, 암모니아 및 질산염이 동시에 증가되는 안정적인 수질조건에서 수산생물 및 식물의 생산 효율성이 증대되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0016] 상기 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명의 목적은 종속 영양세균과 독립영양세균을 포함하는 혼합 미생물을 이용한 아쿠아포닉스 시스템을 활용하여 저 pH 조건에서 수산생물 양식 및 식물 재배를 동시에 수행하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) (i) 어류 사육조를 포함하는 어류 사육시스템; (ii) 식물 재배베드를 포함하는 식물 재배 시스템; 및 (iii) 여과기를 구비하고, 상기 사육 시스템의 사육수는 상기 여과기를 거쳐 상기 식물 재배베드로 유입된 후, 다시 어류 사육조로 순환되는 구조를 가지는 아쿠아포닉스 시스템의 어류 사육조에 어류를 투입하고, 식물재배 베드에 수경재배 식물을 입식시키는 단계; (b) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 종속 영양세균 및 독립 영양세균을 포함하는 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하고, 유기탄소원을 지속적으로 공급하면서 배양하여 바이오 플락을 형성시키는 단계; (c) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 유기탄소원 공급을 중단하고, 무기탄소원을 지속적으로 공급하며, 상기 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하면서 배양하는 단; 및 (d) 상기 (c) 단계의 배양시 pH가 6.0 이하로 떨어질 경우, 사육수내 아질산염 농도 변화에 따라 상기 혼합 미생물의 투입을 조절하는 단계를 포함하는 아쿠아포닉스 시스템을 이용하여 저 pH조건에서 사육수 내의 질산염 농도를 유지하면서 수산생물 사육과 식물재배를 동시에 수행하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 아쿠아포닉스 시스템을 이용할 경우, pH 6.0 이하 조건의 수질변화는 암모니아와 질산염이 동시에 증가하며 인산염은 지속적으로 상승하는 것을 특징으로 하며, 저 pH 조건에서도 식물의 생산성과 수산생물의 생산성의 감소 없이 기존 시스템과 비교하여 경제적으로 대량 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 아쿠아포닉스 시스템의 개념도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 아쿠아포닉스 시스템의 구성으로 (A) 식물베드 2개소, (B) 어류사육지 2개소, (C) 섬프수조, (D) 펌프, (E) 여과기(80 L)를 나타낸 것이다.

도 3은 저 pH 아쿠아포닉스 시스템을 이용한 잎이 많은 식물의 생장을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0027] 본 발명에서는, pH 6.0이하 조건에서 혼합미생물 중 독립 영양세균의 활성은 저하되나, 종속 영양세균의 질산화 과정에 통하여 암모니아 및 질산염이 동시에 증가되는 안정적인 수질조건을 갖는 아쿠아포닉스 시스템을 이용할 경우, 엽채류 4종의 경우 23일 경과하여 포기 형태로 수확 가능할 정도로 성장하였으며, 어류의 경우 어체 내 산소 운반 능력을 판단 가능한 지표를 분석한 결과 현저하게 산소 운반 능력이 향상된 것을 확인하였다 (표 3, 표 4).

[0028] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) (i) 어류 사육조를 포함하는 어류 사육시스템; (ii) 식물 재배베드를 포함하는 식물 재배 시스템; 및 (iii) 여과기를 구비하고, 상기 사육 시스템의 사육수는 상기 여과기를 거쳐 상기 식물 재배베드로 유입된 후, 다시 어류 사육조로 순환되는 구조를 가지는 아쿠아포닉스 시스템의 어류 사육조에 어류를 투입하고, 식물재배 베드에 수경재배 식물을 입식시키는 단계; (b) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 종속 영양세균 및 독립 영양세균을 포함하는 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하고, 유기탄소원을 지속적으로 공급하면서 배양하여 바이오 플락을 형성시키는 단계; (c) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 유기탄소원 공급을 중단하고, 무기탄소원을 지속적으로 공급하며, 상기 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하면서 배양하는 단; 및 (d) 상기 (c) 단계의 배양시 pH가 6.0 이하로 떨어질 경우, 사육수내 아질산염 농도 변화에 따라 상기 혼합 미생물의 투입을 조절하는 단계를 포함하는 아쿠아포닉스 시스템을 이용하여 저 pH조건에서 사육수 내의 질산염 농도를 유지하면서 수산생물 사육과 식물재배를 동시에 수행하는 방법에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 (d)단계에서 아질산염 농도가 0.05mg/L를 이상일 경우 상기 혼합미생물을 투입하고, 아질산염 농도가 0.05mg/L 미만일 경우 혼합 미생물 투입을 중단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 유기 탄소원의 공급은 사육수내 아질산염 농도가 0.05mg/L이하 일 경우 중단하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 저 pH 조건은 pH 6.0 이하인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 pH 5.0~6.0인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 종속영양 세균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 아미로리퀴파시엔스(*B. amuloliquefaciens*), 바실러스 리케니포미스(*B. licheniformis*), 셀루모모나 속(*Cellumomona sp.*), 셀룰로모나스 비아조테아(*Cellulomanas biazotea*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*), 및 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*)을 포함하는 것을 특징으로 하는 저 pH 조건에서의 아쿠아포닉스 생산방법인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 독립영양세균은 니트로박터 위노그라드스키 (*Nitrobacter winogradskyi.*) 및 니트로소모나스 유트로파(*Nitrosomonas europaea*)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정된 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 무기 탄소원은 이산화탄소, 탄산가스, 중탄산염($NaHCO_3$)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 탄산가스인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 유기 탄소원은 포도당, 당밀, 설탕, 알코올, 메탄올, 식물 전분으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 포도당인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예에는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0039] **실시예 1: 아쿠아포닉스 시스템 구성**

[0040] 아쿠아포닉스 생산을 위한 실험 시스템은 도 1에 나타난 바와 같이, 어류 사육수조, 식물 베드 및 여과기만으로 구성된다. 구체적으로는 1개 시험구별 어류 사육수조(1.5 x 1.5 x 0.6 m^3) 2개, 식물베드(1.5 x 1.5 x 0.1 m^3) 2개, 펌프(0.5 HP) 1개 및 바이오헬릭스 여과기 1개로 구성되어 4개조의 시험구가 야외에 설치하였다(도 2). 산소공급을 위해 에어공급관을 설치하여 6개의 유니분산기(30 cm)를 사용하였고, 식물베드지에 2개, 어류 사육지 4개로 분리하여 사용하였다. 시스템 내 사육수는 직경(외경) 50 mm PVC관을 통해 어류사육수조, 섬프수조와 여과기를 걸쳐 직경(외경) 25 mm PVC관을 통해 식물베드지로 유입된 후 다시 어류 사육지로 순환되도록 하였다.

[0041] 섬프수조는 시스템 내 수량이 부족하면 보충되고, 과다하면 넘쳐 빠져나가는 기능을 담당하는 수량조절 수조이다. 여과기는 수조내 사멸 미생물과 잔여 유기물과 같은 찌꺼기를 축적하여 쉽게 외부로 배출해주며, 내부 여과재는 또한 식물의 성장에 필요한 무기물을 공급해 주는 특수한 역할을 수행한다. 또한, 우천 시를 대비하여 식물베드 위에 광이 잘 투과되는 비닐을 설치하여 실험기간 동안 유지하였다.

[0043] **실시예 2: 유용미생물을 활용한 저 pH조건의 아쿠아포닉스 시스템**

[0044] 도 2에 나타난 바와 같이, 수산생물과 식물 입식 후 14일간 바이오플락 양식법을 이용하여 유기탄소원인 포도당 제품과 유용미생물(종속영양세균 8종+독립영양세균 2종)(EgeeTech, Ltd., USA)을 수중에 투입하고 배양하여 바이오플락을 형성시킨다. 이 기간동안 사료에 의해 발생되는 암모니아는 감소하나 아질산 및 질산염은 큰 수치적 변화가 없으며, 또한 pH도 변화 증감 폭이 적다. 종속영양 세균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*B. licheniformis*), 바실러스 아미로리퀴파시엔스(*B. amuloliquefaciens*), 셀루모모나 속(*Cellumomona sp.*), 셀룰로모나스 비아조테아(*Cellulomanas biazotea*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*), 및 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*)을 포함하며, 독립영양세균은 니트로박터 위노그라드스키 (*Nitrobacter winogradskyi.*) 및 니트로소모나스 유트로파(*Nitrosomonas europaea*)을 포함한다.

[0045] 14일 이후 유기탄소 공급은 중단하고, 무기탄소원인 이산화탄소(탄산가스)를 자동조절기를 이용하여 일정량을 지속적으로 사육수조에 투입하며, 12톤 수량 기준으로 탄산가스 1통을 10일간 사용한다. pH가 6.0이하로 떨어질 때까지 탄산가스를 투입하며 2~3일 간격으로 지속적으로 유용 미생물을 투입한다. pH가 6.0 이하로 감소하면, 사육수내 아질산염 농도 변화에 따라 혼합 미생물 투입을 조절하여 안정적인 수질을 유지시킨다. pH가 6.0 이하 조건의 수질변화는 암모니아와 질산염이 동시에 증가하며 인산염은 지속적으로 상승하는 것을 특징으로

하며, 저 pH 조건에서도 수산생물(어류)의 성장과 사료섭취 및 식물의 재배에도 영향이 없는 것을 확인하였다.

[0047] **비교예 1: BFT 양식 생산방법을 적용한 아쿠아포닉스 시스템**

[0048] 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtillis*) 균을 활용한 BFT 양식 기반에 아쿠아포닉스 생산에 관한 것이다. 본 사육실험에 적용한 실험에 사용된 4종류의 사료는 조단백질 함량이 45%, 조지방 함량이 7% 전후가 되도록 실험 사료를 설계하였으며, 인 공급원으로 MKP를 각 1, 2, 3 및 4% 첨가하여 사료 내 P와 K 함량이 달리 유지되도록 하였다.설계된 실험사료는 사조동아원㈜ 당진사료공장(충청남도 당진시) 에서 직경 6mm 내외 부상 EP사료로 제작하였으며, 시판되는 상업용 배합사료와 같은 20kg 단위로 포장 후 냉동(-20℃)보관하여 실험에 사용되었다. 또한, 현재 시판되는 상업용 메기 배합사료와 제작사료와의 비교 실험을 위해 양식현장에서 유통되고 있는 3종류(CA, CB, CC)를 선택하여 이용하였다.

[0049] 사료 첨가제 4개 시험구(MKP2, CA, CB와 CC) 8개 수조에 평균 225 g 개체 50마리의 메기가 각각 수용되었으며, 엽채류는 상추(*Lactuca sativa*) 2 품종으로 롤로비온다(Lollo-bionda)와 롤로로사(Lollo-rossa)가 사용되었다.

[0050] 실험기간 4주 동안 사료는 어체중 당 0.7%로 제한하여 1일 2회 급여되었고 수질측정은 1주 2회 용존산소(DO, mg/L), pH, 수온(℃), 전기전도도(EC, ㎲/cm), 탁도(NTU), NO_3-Nmg/L,NH_3-Nmg/L,NO_2-Nmg/L와 P mg/L를 측정하였다. DO, pH, 수온, EC와 탁도는 현장 수질측정기인 YSI PRODSS (YSI Inc., USA)를 사용하였고, 질산성질소(NO_3-N), 암모니아성 질소(NH_3-N), 아질산성 질소(NO_2-N)와 인(Phosphorus, P)는 분석시약(NitraVer® X Reagent Set 2605345-KR, Low Range Ammonia Reagent Set 2604545-KR, NitriVer® 3 Reagent Set 2608345-KR, PhosVer® 3 Phosphater Reagent, HACH Ltd., USA) 과 다목적 수질측정기인 DR5000(HACH Ltd., USA)을 이용한 비색법으로 분석하였다.

[0051] 실험기간 동안 BFT 수질 관리를 위해 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 균이 포함된 미생물 분말 상품인 아다폰(Handong. Ltd. Korea)을 3일 간격으로 적량 투입하였다. 또한, 사료 급여와 함께 유기탄소원인 정제 포도당을 계산한 후 아쿠아포닉스 시스템 내 섬프수조에 투입하여 수질을 유지하였다.

[0053] **비교예 2: BFT 양식 생산방법을 적용한 아쿠아포닉스 수질변화**

[0054] 실험 4주 기간 동안 BFT 양식 생산방법을 적용한 수질변화는 표 1에 나타난 바와 같다. 1~3주는 모래여과기를 사용하였고, 4주는 여과기로 교체하여 사용하였다. BFT 적용 아쿠아포닉스의 경우 질산, 암모니아, 아질산, 인산염 모두 증가하는 경향이 없었으며, 식물의 성장에 필요한 질산염 수치에 변화가 없었다.

표 1

[0056] BFT 양식 생산방법을 적용한 아쿠아포닉스 수질변화

사료	Week	DO(mg/L)	pH	Temp(℃)	EC (㎲/cm)	Turbidity NTU)	NO_3-N mg/L)	NH_3-N (g/L)	NO_2-N (g/L)	P(mg/L)
MKP2	1	8.33	7.86	24.3	167.9	9.88	1.90	0.95	0.020	0.59
	2	8.31	7.97	24.9	194.9	24.5	0.20	1.11	0.012	2.45
	3	8.33	8.07	24.6	235.6	51.7	0.25	1.55	0.021	4.39
	4(4day)	8.23	7.79	24.1	246.8	12.7	0.65	0.54	0.040	4.03
CA	1	8.33	7.87	24.6	167.3	8.23	2.53	0.78	0.030	0.29
	2	8.40	8.02	25.1	197.5	28.9	0.80	1.73	0.040	0.81
	3	8.21	8.10	24.6	230.4	44.3	0.31	1.46	0.012	0.87
	4(4day)	8.22	7.83	24.3	214.6	11.9	0.85	0.60	0.030	0.88
CB	1	8.43	7.88	24.3	166.8	7.31	1.50	0.66	0.030	0.13
	2	8.51	8.02	24.8	198.4	31.1	0.40	1.72	0.010	1.24
	3	8.29	8.04	24.7	219.8	47.5	0.35	1.38	0.017	0.89
	4(4day)	8.27	7.84	24.1	218.2	8.6	0.45	0.76	0.030	1.01
CC	1	8.29	7.87	24.3	173.4	7.68	1.78	0.71	0.030	0.35
	2	8.47	8.04	24.9	201.1	34.5	0.20	1.40	0.010	1.44
	3	8.40	8.01	24.6	240.6	48.8	0.15	1.46	0.016	3.27
	4(4day)	8.38	7.89	24.0	222.1	12.5	0.55	0.33	0.020	2.42

[0058] DO의 경우 각 시험구별 8.21에서 8.51 mg/L, pH는7.8에서 8.10, 수온은 24.0에서 25.1℃의 유사한 범위의 수치를 나타내어 차이점을 발견할 수 없었다. 전기전도도(EC)의 경우 MKP2구는 실험 초기 167.9 ㎲/cm에서 실종 종료 시 246.8 ㎲/cm, CA구는 167.3에서 214.6 ㎲/cm, CB구는 166.8에서 218.2 ㎲/cm, CC구는 173.4에서 222.1 ㎲/cm의 값을 보여 MKP2의 EC값이 실험 종료 시 가장 높았다. 탁도의 경우 MKP2구는 실험 초기 9.9 NTU에서 실험 3주 시점에 51.7 NTU로 가장 높았고, 이 후 12.7 NTU 수치를 보여 다시 하강하는 변화를 보였다. 다른 시험구도 MPK2구와 유사한 경향을 나타내었으며, 실험 종료 시 각 시험구별 11.9 NTU(CA), 8.6NTU(CB), 12.5NTU(CC)의 값을 보였다. NO_3-N의 경우 MKP2는 실험 초기 1.90 mg/L에서 실험 종료 시 0.65 mg/L 값의 범위를 보였고, CA구는 2.53에서 0.85 mg/L, CB구는 1.50에서 0.45 mg/L, CC구는 1.78에서 0.55 mg/L의 값을 나타내었다. 암모니아성 질소(NH_3-N)의 경우 MKP2는 실험 초기 0.95 mg/L에서 실험 종료 시 0.54 mg/L 값의 범위를 보였고, CA구는 0.78에서 0.60 mg/L, CB구는 0.66에서 0.76 mg/L, CC구는 0.71에서 0.33 mg/L로 각 시험구별 유사한 경향을 보였다. 아질산염(NO_2-N)의 경우 MKP2는 실험 초기 0.020 mg/L에서 실험 종료 시 0.040 mg/L 값의 범위를 보였고, CA구는 0.030에서 0.030 mg/L, CB구는 0.030에서 0.030 mg/L, CC구는 0.030에서 0.020 mg/L의 값을 나타내었고, P는 실험 초기 0.59 mg/L에서 실험 종료 시 4.03 mg/L 값의 범위를 보였고, CA구는 0.29에서 0.88 mg/L, CB구는 0.13에서 1.01 mg/L, CC구는 0.35에서 2.42 mg/L의 값을 나타내어 실험 종료 시 P는 MKP2가 가장 높은 값을 나타내었다.

[0059] 실험 4주 기간 동안 모든 시험구에서 pH 수치의 큰 변화폭이 없었고, 아질산성 질소(NO_2-N), 암모니아성 질소(NH_3-N)와 P의 농도 역시 뚜렷한 변화가 없었으며, 질산성질소(NO_3-N)는 실험 초기에 비해 실험 종료 후 큰 폭으로 감소하였다. MKP2구의 사료 내 인산염 첨가 제제는 일인산칼륨(MKP)으로 현재 상업용 3종 사료에 첨가되는 인산염 제제인 인산칼슘 종류(MCP, DCP, TCP) 보다 물속 용해성이 높은 이유로 P의 소폭 상승이 이루어 졌을 것으로 사료된다.

[0060] 앞서 언급한 바실러스 종(*Bacillus sp.*) 등의 종속영양세균이 우점하는 BFT 양식은 유기탄소와 NH_3-N을 이용하여 세포증식에 따른 플록(floc) 형성과 더불어 질산화 및 탈질화를 동시 수행함에 따라 수질을 안정화 시킨 것으로 사료되나 이러한 수질은 식물의 생산을 함께 수행하는 아쿠아포닉스에 큰 결점으로 작용할 수 있다.

[0061] 또한, 탁도 변화에서 실험 종료 4주에서 큰 폭으로 감소하였는데, 이는 실험 초기 7일간 모래여과기를 사용하였으나 수중 내 미생물 플록(floc)의 형성이 높아짐에 따라 여과기 막힘 여상이 발생되어 여과기를 통과하지 않고 실험 3주까지 물을 순환하였으며, 이 후 여과기를 설치하여 탁도를 감소시킬 수 있었다 (도 1).

[0062] 아쿠아포닉스의 pH 환경은 어류와 식물의 생리적 상태를 고려 시 6.5에서 7.0 범위가 적절하나 식물이 성장하기에는 다소 높은 pH 환경이 조성되었고, 탁도 증가에 따라 식물 뿌리에 바이오필름의 현상이 나타났으며, EC는 아쿠아포닉스에서 권장하는 300에서 600㎲/cm의 범위보다 낮아 식물 생산성이 저 pH 아쿠아포닉스 시스템과 비교하여 저조하게 나타난 것으로 사료된다(도 1, 표 3).

[0064] **실시예 3: 유용미생물을 활용한 저 pH 아쿠아포닉스 시스템**

[0065] 4개 시험구 MKP1, MKP2, MKP3와 MKP4(각각 전체 사료 구성에서 차지하는 MKP 비율로 1%, 2%, 3%, 4% 포함, monobasic potassium phosphate) 8개 수조에 평균 186 g 내외 개체 60마리가 각각 수용되었고, 엽채류는 상추 품종 4종류로 롤로로사(Lollo rossa), 아바타(Avatar), 카이피라(Caipira), 흑로메인(Heuk-Romaine)이며 각 시험구별 4종 엽채류 96개체가 사용되었다.

[0066] 사료는 어체중 당 0.5%로 제한하여 1일 2회 급여되었으며, 실험은 10주간 진행되었으나 엽채류 입식은 어류의 사료 적용 6주 후 입식 되어, 10주간의 어류성장 실험과 4주간의 엽채류 성장 실험이 이루어졌다. 수질측정은 1주 6회 실시예 2와 같이 진행되었나, 수질관리는 달리하였다.

[0067] 10종 (*B*바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*B. licheniformis*), 바실러스 아미로리퀴파시엔스(*B. amuloliquefaciens*), 셀루모모나 속(*Cellumomona sp.*), 셀룰로모나스 비아조테아(*Cellulomanas biazotea*), 슈도모나스 스투체리(*Pseudomonas stutzeri*), 슈도모나스 데니트리피칸스(*P. denitrificans*), 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*), 니트로박터 속(*Nitrobacter winogradskyi*) 및 니트로소모나스 속(*Nitrosomonas europaea*)의 유용미생물 제제 BFT-ST(biofloc technology Start-up, seed, geeTech, Ltd., USA)을 활용한 저 pH 아쿠아포닉스 생산 수질관리는 어류입식 후 14일간은 BFT 양식방법을 적용하여 유기탄소원인 포도당과 유용미생물을 수중에 투입하여 사료에 의해 발생된 암모니아를

감소시켰다.

[0068] 이후 유기탄소는 중단하고 무기탄소원인 이산화탄소(탄산가스)를 자동조절기를 이용하여 일정량을 pH가 6.0이하로 떨어질 때까지 지속적으로 사육수조에 투입하였으며, 12톤 수량 기준 판매되는 탄산가스 1통을 10일간 사용하였으며, pH 6.0이하로 유지시 공급을 중단한다. 2~3일간격으로 유용 미생물을 투입하였으나, pH 6.0 이하부터는 유용미생물은 아질산염(NO_2-N)이 증가할 때 투입을 하였고, 안정적인 수질 유지 시 중단하였다.

[0070] **실시예 4: 유용미생물을 활용한 Low pH 아쿠아포닉스 수질변화**

[0071] 실험 10주 기간 동안 유용미생물(종속영양세균 및 독립영양세균)을 활용한 저 pH 아쿠아포닉스 생산의 수질변화는 표 2에 나타내었다. DO의 경우 각 시험구별 7.22에서 8.36 mg/L, 수온은 25.0에서 30.8℃의 유사한 범위의 값을 보였다. pH는 각 시험구별 실험 시작 4주 기간 동안 7.65에서 7.99의 값을 나타내었으나, 이 후 급속히 하강하기 시작하여 6.88에서 5.18의 값을 나타내었다.

[0072] 전기전도도(EC)의 경우 MKP1구는 실험 초기 132.8 ㎲/cm에서 실종 종료 시 630.6 ㎲/cm, MKP2구는 133.0에서 686.2 ㎲/cm, MKP3구는 132.8에서 662.0 ㎲/cm, MKP4구는 132.5에서 619.4 ㎲/cm의 값을 보여 MKP2의 EC값이 실험 종료 시 가장 높았다. 탁도(Turbidity, NTU)의 경우 MKP1구는 0.2에서 2.2 NTU, MKP2구는 0.1에서 2.1 NTU, MKP3구는 0.1에서 2.6 NTU, MKP4구는 0.1에서 2.8 NTU의 값을 나타내었다.

[0073] 질산성질소(NO_3-N)의 경우 MKP1구는 실험 초기 3.30 mg/L에서 실험 종료 시 49.22 mg/L 값의 범위를 보였고, MKP2구는 3.33에서 52.40 mg/L, MKP3구는 3.63에서 48.00 mg/L, MKP4구는 3.60에서 49.60 mg/L의 값을 나타내었다.

[0074] 암모니아성 질소(NH_3-N)의 경우 MKP1구는 실험 초기 0.10 mg/L에서 실험 종료 시 19.12 mg/L 값의 범위를 보였고, MKP2구는 0.12에서 20.40 mg/L, MKP3구는 0.07에서 20.22 mg/L, MKP4구는 0.08에서 18.62 mg/L로 실험 시작 6주부터 수치가 지속적으로 상승하는 경향을 보였다.

[0075] 아질산성 질소(NO_2-N)의 경우 MKP1는 실험 초기 0.216 mg/L에서 실험 종료 시 0.090 mg/L 값의 범위를 보였고, MKP2구는 0.245에서 0.055 mg/L, MKP3구는 0.322에서 0.036 mg/L, MKP4구는 0.320에서 0.061 mg/L으로 실험 시작 6주 후부터 모두 실험구에서 0.1 mg/L 이하의 값을 나타내었다.

[0076] P의 경우 MKP1는 실험 초기 0.48 mg/L에서 실험 종료 시 44.54 mg/L 값의 범위를 보였고, MKP2구는 0.56에서 47.98 mg/L, MKP3구는 0.58에서 46.48 mg/L, MKP4구는 0.56에서 48.48 mg/L으로, 실험 시작 후부터 모든 시험구에서 지속적인 상승 경향을 나타내었다.

표 2

유용미생물을 활용한 저 pH 아쿠아포닉스 시스템의 수질변화

사료 (Diet)	Week	DO(mg/L)	pH	Temp(℃)	EC(us/cm)	Turbidity(NTU)	NO3-N(mg/L)	NH3-N(mg/L)	NO2-N(mg/L)	P(mg/L)
MKP1	1	8.35±0.21	7.87±0.09	25.1±1.3	132.8±5.4	0.6±0.2	3.30±0.37	0.10±0.06	0.216±0.130	0.48±0.23
	2	7.76±0.14	7.84±0.26	29.2±1.1	152.6±7.7	0.2±0.1	3.68±0.48	0.06±0.01	0.228±0.215	0.75±0.15
	3	7.47±0.18	7.99±0.14	30.6±0.3	171.8±4.3	0.2±0.1	4.38±0.76	0.08±0.04	0.047±0.041	0.93±0.08
	4	7.22±0.10	7.76±0.08	30.8±0.6	188.5±4.9	0.4±0.3	6.06±0.58	0.14±0.04	0.115±0.030	1.63±0.30
	5	7.24±0.16	6.81±0.77	30.3±0.8	240.4±35.7	0.6±0.2	13.92±4.62	0.91±0.93	0.118±0.072	6.20±2.97
	6	7.59±0.15	6.00±0.21	27.8±0.6	340.9±25.8	1.6±0.5	24.54±2.49	4.96±1.28	0.044±0.024	20.38±5.91
	7	7.78±0.04	5.60±0.15	27.2±0.4	405.1±11.4	1.5±0.1	31.22±3.00	8.28±0.75	0.083±0.003	32.38±2.07
	8	7.72±0.08	5.66±0.24	27.3±0.5	452±1.5	1.8±0.4	37.20±1.64	10.92±1.51	0.058±0.012	30.10±1.32
	9	7.95±0.07	5.76±0.21	26.9±0.1	512.4±13.3	1.9±0.1	38.20±1.48	13.80±0.34	0.070±0.005	35.44±0.81
	10(3day)	8.11±0.25	5.77±0.11	25.8±1.5	630.6±55.6	2.2±0.6	49.22±5.59	19.12±2.77	0.090±0.034	44.54±3.80
MKP2	1	8.30±0.20	7.80±0.09	25.2±1.4	138.0±5.3	0.5±0.2	3.33±0.48	0.12±0.07	0.245±0.132	0.56±0.19
	2	7.77±0.14	7.56±0.21	29.0±1.0	151.3±7.2	0.1±0.1	3.20±0.80	0.04±0.01	0.397±0.146	0.46±0.07
	3	7.47±0.15	7.84±0.10	30.5±0.4	170.5±4.8	0.1±0.1	4.03±0.97	0.07±0.02	0.092±0.045	0.72±0.12
	4	7.23±0.08	7.65±0.06	30.7±0.6	189.9±6.0	0.2±0.1	6.22±0.70	0.13±0.04	0.099±0.016	1.69±0.37
	5	7.23±0.14	6.69±0.79	30.3±0.8	245.6±36.0	0.6±0.3	14.74±4.23	1.00±1.01	0.101±0.039	7.43±3.59
	6	7.60±0.12	5.83±0.21	27.7±0.6	355.5±30.8	2.0±0.6	24.12±2.10	5.34±1.49	0.046±0.017	26.00±5.69
	7	7.76±0.06	5.40±0.16	27.4±0.6	442.4±18.9	2.1±0.1	34.66±3.45	9.40±0.91	0.026±0.004	38.30±2.50
	8	7.67±0.09	5.26±0.13	27.5±0.3	509.3±18.8	1.9±0.1	41.20±1.48	12.82±0.97	0.032±0.008	38.92±3.48
	9	7.87±0.08	5.30±0.19	27.0±0.3	563.6±11.3	1.9±0.1	39.40±4.77	14.66±0.50	0.045±0.009	41.56±2.06
	10(3day)	8.09±0.28	5.23±0.04	25.5±1.8	686.2±55.9	1.5±0.1	52.40±7.40	20.40±2.81	0.055±0.015	47.98±6.24
MKP3	1	8.36±0.21	7.79±0.09	25.1±1.5	132.8±5.2	0.5±0.3	3.63±0.20	0.07±0.04	0.322±0.199	0.58±0.32
	2	7.79±0.17	7.57±0.20	28.9±1.1	151.4±7.1	0.1±0.1	3.36±0.15	0.03±0.01	0.189±0.103	0.42±0.09
	3	7.50±0.14	7.83±0.07	30.4±0.2	168.9±4.5	0.2±0.2	3.83±0.54	0.07±0.02	0.035±0.018	0.61±0.05
	4	7.33±0.27	7.74±0.06	30.6±0.5	184.8±3.5	0.3±0.2	4.86±0.38	0.10±0.02	0.077±0.021	1.21±0.18
	5	7.26±0.16	6.77±0.78	30.4±0.9	235.3±33.4	0.6±0.3	13.62±5.04	0.70±0.85	0.144±0.038	6.34±3.58
	6	7.67±0.12	5.86±0.22	27.6±0.8	336.5±27.7	1.4±0.3	24.24±2.00	5.10±1.67	0.058±0.035	27.14±5.90
	7	7.83±0.05	5.46±0.10	27.1±0.4	413.7±18.5	1.9±0.5	31.70±3.99	8.56±1.02	0.034±0.010	38.42±2.20
	8	7.74±0.09	5.37±0.15	27.2±0.4	476.6±17.5	2.0±0.2	38.40±2.51	11.80±0.77	0.034±0.009	34.66±1.93
	9	7.93±0.08	5.32±0.20	26.8±0.2	540.6±12.1	2.6±0.3	39.20±3.27	14.42±0.54	0.032±0.008	42.92±1.61
	10(3day)	8.15±0.32	5.23±0.04	25.3±2.0	662.0±56.7	1.6±0.3	48.00±4.74	20.22±3.66	0.036±0.011	46.48±4.37
MKP4	1	8.34±0.22	7.78±0.09	25.0±1.5	132.5±5.8	0.8±0.4	3.60±0.22	0.08±0.05	0.320±0.188	0.56±0.31
	2	7.79±0.16	7.69±0.21	28.8±1.1	151.4±6.9	0.1±0.1	3.16±0.38	0.04±0.01	0.269±0.104	0.39±0.07
	3	7.45±0.13	7.90±0.08	30.4±0.4	168.8±4.3	0.1±0.1	3.72±0.63	0.06±0.01	0.109±0.030	0.55±0.07
	4	7.27±0.09	7.78±0.05	30.6±0.6	184.2±4.1	0.3±0.3	4.42±0.83	0.11±0.03	0.102±0.023	1.13±0.22
	5	7.28±0.17	6.74±0.94	30.1±0.1	233.6±26.5	1.1±0.8	13.26±4.28	0.56±0.63	0.123±0.057	8.29±6.52
	6	7.66±0.15	5.88±0.22	27.5±0.7	325.6±26.5	1.9±0.3	24.30±2.08	4.58±1.73	0.046±0.027	28.84±4.70
	7	7.82±0.05	5.49±0.10	27.1±0.6	407.9±17.4	2.2±0.5	33.48±6.94	8.06±1.06	0.027±0.006	37.28±2.67
	8	7.69±0.08	5.54±0.27	27.3±0.4	456.7±18.4	2.6±0.2	36.00±2.24	11.14±0.85	0.043±0.008	34.68±2.67
	9	7.89±0.09	5.48±0.32	26.8±0.3	499.0±13.5	2.8±0.5	35.80±1.30	12.82±0.62	0.045±0.010	40.58±1.48
	10(3day)	8.11±0.30	5.18±0.06	25.4±1.9	619.4±57.6	1.6±0.2	49.60±9.66	18.62±3.54	0.061±0.030	48.48±5.13

[0077]

[0079] pH는 유기탄소를 중단한 2주 후 지속적으로 감소하여 실험 6주 부터는 모든 시험구에서 6.0이하의 값을 보였는데, 기존 아쿠아포닉스 생산에서 추천하는 pH 6.5~7.0보다 낮은 pH상태 5.18~6.00에서 식물생산과 어류생산이 진행되었으나 양측 생산성에는 문제가 없었다.

[0080] 저 pH 아쿠아포닉스 시스템의 가장 큰 특징은 질산화 과정에 따른 NO_3-N, NO_2-N, NH_3-N의 변화이다. 유기탄소 투입 중단 후, 실험 3주부터 지속적으로 무기탄소인 CO_2를 공급하여 독립영양세균의 질산화 과정 활성을 증대시켰으며, 이에 따라 pH도 감소하였다. NO_2-N은 실험 6주 후부터 어류에게 전혀 독성을 유발할 수 없는 낮은 농도로 일정하게 유지되었으나, NO_3-N 와 NH_3-N은 동시에 증가하였다. Kim et al.(2015)은 종속영양세균의 질산화는 독립영양세균에 비해 활성이 떨어진다고 하였으며, 독립영양세균은 pH 6.0 이하에서는 활성이 저해되어 질산화 과정 중 암모니아를 아질산으로 전환이 어렵다고 했고, 이에 따라 질산염의 수치도 더 이상 증가하지 않는다고 하였다(Thorarinsdottir RI., Science and Engineering for a Sustainable Future, 33-39. 2015), 그러나 본 실험에서 결과는 기존 이론과는 상이하게 암모니아와 질산염이 동시에 상승하였는데 이는 실험에서 사용된 종속영양세균인 바실러스 (*Bacillus*) 3종에 의한 질산화 과정 수행의 결과로 추측된다.

[0081] 물에서 NH_3(암모니아)와 NH_4^+(암모늄)은 pH와 온도에 따라 평형을 이룬다. 두 가지 형태의 합계를 총 암모니아성 질소(TAN)라고 한다(J. Mater. Environ. Sci. 8. 4915-4922, 2017). NH_3와 NH_4가 모두 어류에 독성을 가질 수 있지만, 비 이온화 된 암모니아(NH_3)가 더 독성이 강한 형태인데 이는 전하를 띠지 않고 지용성이라서 이온화되어 전화를 띠는 $NH4^+$이온보다 쉽게 생물막을 통과하기 때문이다. 상업적으로 양식하는 어류에 있어 대부분의 경

우 암모니아성 질소는 1.5 mg/L 이상의 농도에 독성을 지니는 것으로 하고 있으나, 대부분의 경우 이온화 되지 않은 암모니아의 허용 수준은 0.025 mg mg/L에 불과하나, 독성 임계 값은 종, 크기, 미세한 고형물, 내화성 유기물, 표면 활성 화합물, 금속, 질산염, 염분 및 pH에 따라 크게 다를 수 있다(Avnimelech et al.,The world Aquaculture Society Press. Louisiana. U.S.A., 9-20 2015). 현재 실험의 모든 시험구에서 실험 종료 후 높은 암모니아 농도에서도 메기가 생존 및 성장할 수 있었던 것은 대다수 암모니아가 저 pH상태에서 비이온화된 암모니아 보다 이온화된 암모늄($NH4^+$-N)형태로 전환되어 암모니아의 독성을 억제했기 때문이라 사료된다.

[0082] EC도 비교예 1과 달리 지속적으로 상승되어 실험 종류 후 시점에는 수경재배(Hydroponics)에서 사용되는 범위(0.5에서 1.2㎲/cm)에 도달하였고, 탁도도 일정하게 유지되어 식물 뿌리에 바이오필름 현상도 관찰되지 않았다.

[0083] BFT 양식을 적용한 실험 2주기간은 질산염, 암모니아, 아질산, 인산염의 수치변화가 거의 없으나, 2주 후 기존 아쿠아포닉스 시스템에서 권장하는 pH보다 낮은 저 pH이 조건에서 무기탄소인 이산화탄소 투입과 혼합 미생물의 주기적 투입으로 아쿠아포닉스 식물생산에 필요한 질산염과 인산염이 현저히 상승하였으며, 또한 아질산염의 경우 어류의 양식에 피해가 없는 0.05mg/L 이하로 유지되며, 암모니아도 지속적 상승이 되는 것으로 나타났다. 이는 비이온화된 암모니아 보다 이온화된 암모늄($NH4^+$-N)형태로 전환되어 암모니아의 독성을 억제했기 때문이라 사료된다(표 2).

[0084] 종래의 BFT 양식방법을 적용한 아쿠아포닉스 생산에서 식물생산은 수경재배 대비 생산성이 50% 정도로 낮은 문제점이 있었다. 그러나 아쿠아포닉스 생산방법에서 권장하는 pH보다 저 pH 상태로 유지한 본원 발명의 아쿠아포닉스 시스템을 적용 시 엽채류 4종은 초기 종묘 입식 후 23일 경과하여 포기 수확이 가능할 정도로 성장하여, 어류의 배합사료 내 MKP첨가 효과 뿐만 아니라 수질환경 조성도 아쿠아포닉스의 중요한 요소임을 나타낸다 (표 2).

[0086] **실시예 5 : 수산생물의 혈액분석 및 결과**

[0087] 메기의 혈액성상 분석에 보여지는 모든 자료(PCV, Hb, GOT, GPT, GLU, Pi, Na, K와 Cl)의 변수는 SPSS Version 10 (SPSS, 1999) 프로그램의 일원분산분석(one-way ANOVA)을 이용하여 분석하였다. 분석에 앞서 모든 자료의 변량의 동질성(homogeneity of variance)은 Cochran' test(Sokal and Rohlf, Natl. Res. Inst. Aquaculture. Suppl. 1. 27-36, 1994)를 이용하여 확인하였다. 실험구별 각 변수에 대한 유의차가 발견되었을 시, 사후검정은 Duncan' multiple range test 분석을 이용하였으며(Duncan, Biometrics 11, 1-42, 1955), 모든 통계분석의 유의수준은 5% (P<0.05)에서 결정되었다.

[0088] 사료절식 24시간 후, 저 pH 아쿠아포닉스 시스템 실험에서 일일산칼륨(Monobasic potassium phosphate, MKP)이 첨가된 4개 시험구의 메기 혈액성상 변화 조사를 위해 어류마취제인 MS-222 (Wojin B&G Ltd., Korea)로 마취시킨 다음 헤파린(Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa, K3333-10KU, Sigma-Aldrich. Germany)을 처리한 1 cc 주사기를 사용하여 미부정맥에서 시험구 별 6 마리의 혈액을 샘플링하였다.

[0089] 전혈은 헤모글로빈(Hemoglobin, Hb) (g/dL), 적혈구용적백분율(Packed Cell volume, PCV)(%) 분석에 사용하였고, 이 후 4℃, 12,000rpm, 10분간의 조건이 설정된 원심분리기(Centrifuge 5415 R, Eppendorf Ltd., Germany)를 이용하여 혈장(plasma) 분리 후 글루타믹 옥살로아세틱 트랜스아미나제(Glutamic oxaloacetic transaminase, GOT (U/L)), 글루타믹 피루빅 트랜스아미나제(Glutamic pyruvic transaminase, GPT (U/L)), 글루코스(Glucose, GLU (mg/ dL)), 무기인산염(inorganic Phosporus, Pi (mg/ dL)), 나트륨 (Na, mEq/L), 칼륨(K, mEq/L)와 혈액의 삼투현상을 판단하는 Na, K, Cl(mEq/L)의 분석이 이루어졌다. PCV는 HAMATOKRIT 210(Hettich Ltd., Germany)을 이용하여 분석되었으며, Hb 등 다른 혈액 요소는 시판되는 임상진단키트 (Fuji DRI-CHEM slide, Fuji photo flim co. Ltd., Japan)와 함께 혈액분석기(DRI-CHEM 3500 I, Fujifilm Ltd., Japan)를 사용하여 분석되었다.

[0090] 실시예 7의 실험 종료 후, 사료절식 24 시간 후 메기 혈액 샘플을 분석한 결과는 표 3과 같다.

표 3

[0092] 10주간의 저 pH 아쿠아포닉스 시스템에서 일인산칼륨(monobasic potassium phosphate, MKP)의 농도별 메기의 혈액 분석결과

혈액학적 특징	사료 (Diets)			
	MKP1	MKP2	MKP3	MKP4

평균 어체중 (Average Fish weight(n=6))	203.1±26.6[ns]	226.7±25.0	217.2±33.2	212.8±1.5
PCV (%)[2]	45.83±7.31[ns]	45.33±4.23	45.67±4.89	45.33±2.94
Hb (g/dL)[3]	14.13±1.85[ns]	14.03±1.41	14.47±1.99	14.50±1.02
GOT (U/L)[4]	76.83±9.58[ns]	88.33±18.26	81.17±15.32	81.83±8.21
GPT (U/L)[5]	20.83±9.75[ns]	22.33±6.19	19.00±6.99	15.50±5.09
GLU (mg/dL)[6]	65.67±17.22[ns]	55.17±12.29	70.17±17.45	62.33±11.48
Pi (mg/dL)[7]	14.18±0.83[a]	15.72±0.46[b]	15.47±0.52[b]	14.12±0.65[a]
Na (mEq/L)	140.17±1.47[ns]	140.33±1.03	140.83±1.17	141.00±1.10
K (mEq/L)	0.57±0.08[a]	0.80±0.11[b]	0.92±0.19[b]	0.72±0.08[b]
Cl (mEq/L)	119.17±2.32[ns]	119.33±2.94	119.50±1.64	120.67±1.51

[0094] PCV(%)는 45.33±2.94(MKP4)에서 45.83±7.31(MKP1), Hb (g/dL)는 14.03±1.41(MKP2)에서 14.50±1.02(MKP4), GOT(U/L)는 76.83±9.58(MKP1)에서 88.33±18.26(MKP2), GPT(U/L)는 15.50±5.09(MKP4)에서 22.33±6.19(MKP2), GLU(mg/dL)는 55.17±12.29(MKP2)에서 70.17±17.45(MKP3), Pi(mg/dL)는 14.12±0.65(MKP4)에서 15.72±0.46(MKP2), Na(mEq/L)는 140.00±1.10(MKP4)에서 140.83±1.17(MKP3), K는 (mEq/L) 0.57±0.08(MKP1)에서 0.92±0.19(MKP3), Cl(mEq/L)은 119.17±2.32 (MKP1)에서 120.67±1.51(MKP4)의 값을 보였다.Pi와 K의 항목을 제외한 나머지 혈액 항목은 시험구별 유의성이 발견되지 않았으며($P>0.05$), Pi와 K의 값은 MPK2와 MKP3 구에서 유의성 있게 높게 나타났다($P<0.05$).

[0095] 저 pH 아쿠아포닉스 시스템에서 성장한 메기의 혈액 성상 분석 결과, 메기(far eastern catfish)의 혈장 내 PCV 35.3에서 37.7%, Hb 9.0에서 10.4 g/dL, GPT 6.2에서 8.0 IU/L, Pi 11.4에서 13.6 mg/dL보다 높은 수치를 나타내었으며, GOT는 67.2에서 98.3 IU/L의 값과 유사하였다.

[0096] 저 pH 아쿠아포닉스 시스템에서 가장 큰 혈액학적 특징은 PCV와 Hb의 2항목으로 이들 항목은 주로 어체 내 산소 운반능력과 영양학적 빈혈의 판단이 되는 지표이다. 앞서 언급한 여러 연구자들에 비해 2항목의 값이 높은 것은 폐쇄된 환경의 저 pH 상태에서 메기의 생체 대사과정에 필요한 산소운반 능력을 증대시키기 위해 환경 적응된 결과라 사료되며 향후 지속적 연구가 수반되어야 할 것이다. 또한 K의 경우 체내 삼투현상 유지를 위해 혈액 내 K 농도를 낮게 유지한 것으로 사료된다.

[0097] 현재까지 아쿠아포닉스 생산에서 BFT 적용은 식물생산에는 적절한 방법이 아닌 것으로 사료되며, 또한 RAS 기반에 아쿠아포닉스는 시설비 문제와 시스템 운영의 복잡성 문제가 있으나, 본원 발명의 저 pH 아쿠아포닉스 생산 방법은 이러한 기존의 문제점을 보완할 수 있는 대책으로 고려되며, 향후 지속적인 연구를 통해 매뉴얼화한 후 아쿠아포닉스를 희망하는 농어가에 확대 보급해야 할 것이다.

[0099] **실시예 6 : 식물의 생장 분석 방법 및 결과**

[0100] 식물의 생장 분석은 같은 기간에 성장한 엽채류별 엽수, 엽중량을 측정해서 무게로 비교하였으며, BFT와 저 pH 아쿠아포닉스 시스템에서의 각각의 식물의 생장방법을 분석한 결과는 하기 표 4 및 표 5과 같으며, 도 3에 나타난 바와 같이 식물이 생장하는 것을 확인하였다.

[0101] BFT와 저 pH 아쿠아포닉스 시스템에서 사용된 식물의 종류는 각각 2 종류와 1 종류이며, 식물 2 개소 베드지에서 1 베드지가 2.25m^2 이며 BFT에서는 1개소 당 1식물인 반면, 저 pH 실험에서는 4 종류의 식물을 선택하였다. 이중 1차 BFT에서 사용된 롤로로사의 경우 2차에서는 개체수가 1/4로 표현된 것으로, 작은 면적에서도 1차 BFT 실험보다 높은 생산량을 보이는 것으로 확인되었다.

표 4

[0103] BFT 생산기술 및 저 pH 아쿠아포닉스 시스템별 잎이 많은 채소의 성장 비교

사료(Diet)	Species	Growth factor	아쿠아포닉스 생산방법	
			BFT (Species No. 48)	Low pH (Species No. 11)
MKP2	롤로로사	Average weight (g)	31.2 (in 2.25m^2 area)	54.7 (in 0.52m^2 area)
		Total weight (g)	1,868.0 (in 2.25m^2 area)	1,203.3 (in 0.52m^2 area)

표 5

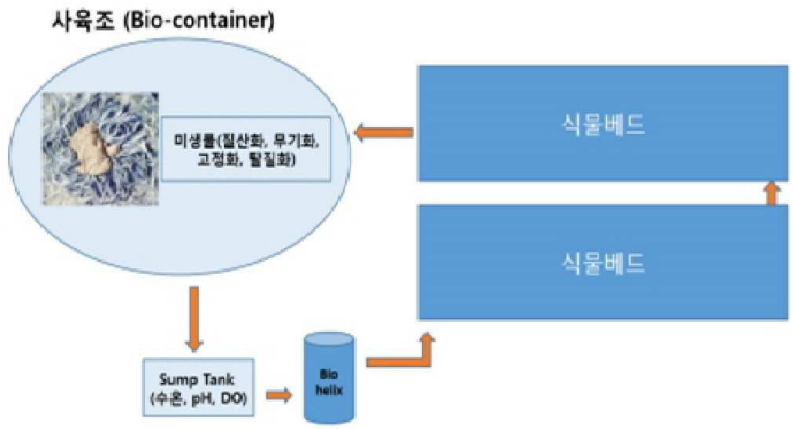
[0105] 저 pH 아쿠아포닉스 시스템에서의 식물의 성장비교

시험구1	개체수	총중량	뿌리	엽수	줄기	엽중량	엽체길이(30개)	엽체부전체 길이(10개체)
롤로로사	26	712.82	63.4	289	26.92	622.5	10.89±0.55	10.16±0.82
아바타	22	910.34	65.45	402	33.83	811.06	12.61±1.16	12.30±1.10
카이피라	24	1245.59	68.82	467	37.59	1139.18	10.26±0.79	12.30±0.825
흑로메인	24	700.48	40.69	340	45.46	614.33	15.60±0.53	16.80±1.31
합계	96	3569.23	238.36	1498	143.8	3187.07		
시험구2	개체수	총중량	뿌리	엽수	줄기	엽중량	엽체길이	엽체부전체 길이
롤로로사	22	1203.33	188.74	262	28.57	986.02	12.76±0.54	13.10±0.39
아바타	26	2687.4	278.36	563	74.94	2334.1	14.81±0.89	15.83±1.05
카이피라	25	2785.64	220	544	58.68	2506.96	12.76±0.54	12.98±0.67
흑로메인	23	2785.43	316.17	405	144.1	2325.16	20.82±1.40	22.83±1.14
합계	96	9461.8	1003.27	1774	306.29	8152.24		
시험구3	개체수	총중량	뿌리	엽수	줄기	엽중량	엽체길이	엽체부전체 길이
롤로로사	25	1478.8	203.55	274	41.95	1233.3	12.62±0.86	13.34±0.89
아바타	24	2576.89	245.18	560	76.96	2254.75	15.52±1.03	15.75±1.31
카이피라	24	2691.17	193.24	497	69.31	2428.62	12.02±0.79	12.01±0.63
흑로메인	23	2661.02	303.37	356	177.38	2180.27	20.59±1.41	23.50±1.48
합계	96	9407.88	945.34	1687	365.6	8096.94	-	-
시험구4	개체수	총중량	뿌리	엽수	줄기	엽중량	엽체길이	엽체부전체 길이
롤로로사	31	1596.33	219.8	342	41.06	1335.47	12.32±0.84	12.75±1.09
아바타	24	2183.58	224.38	496	64.68	1894.52	14.56±1.68	15.03±1.95
카이피라	17	1843.36	152.15	319	51.56	1639.65	11.93±0.66	12.26±0.79
흑로메인	24	2653.92	263.16	363	143.4	2247.36	21.82±1.48	24.76±1.54
합계	96	8277.19	859.49	1520	300.7	7117	-	-

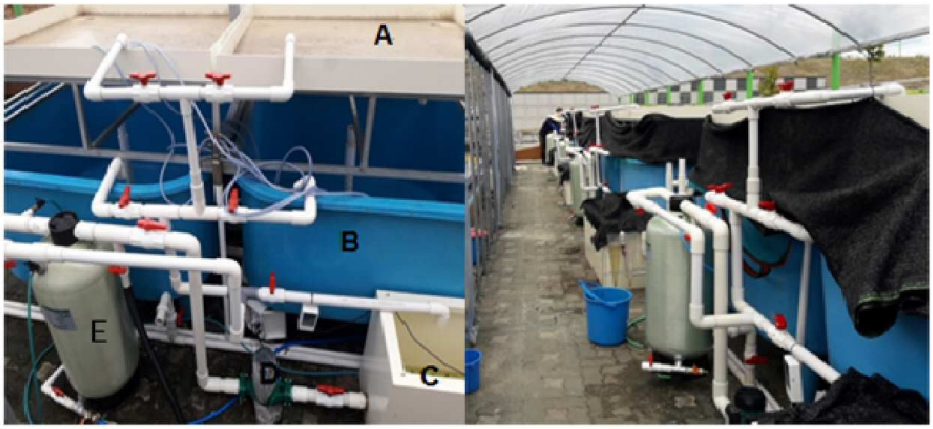
[0107] 이상으로, 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3



MKP2

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

다음 단계를 포함하는 아쿠아포닉스 시스템을 이용하여 저 pH조건에서 사육수 내의 질산염 농도를 유지하면서 수산생물 사육과 식물재배를 동시에 수행하는 방법:

(a) (i) 어류 사육조를 포함하는 어류 사육시스템; (ii) 식물 재배베드를 포함하는 식물 재배 시스템; 및 (iii) 여과기를 구비하고, 상기 사육 시스템의 사육수는 상기 여과기를 거쳐 상기 식물 재배베드로 유입된 후, 다시 어류 사육조로 순환되는 구조를 가지는 아쿠아포닉스 시스템의 어류 사육조에 어류를 투입하고, 식물재배 베드에 수경재배 식물을 입식시키는 단계;

(b) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 종속 영양세균 및 독립 영양세균을 포함하는 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하고, 유기탄소원을 지속적으로 공급하면서 배양하여 바이오 플락을 형성시키는 단계;

(c) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 유기탄소원 공급을 중단하고, 무기탄소원을 지속적으로 공급하며, 상기 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하면서 배양하는 단; 및

(d) 상기 (c) 단계의 배양시 pH가 6.0 이하로 떨어질 경우, 사육수내 아질산염 농도 변화에 따라 상기 혼합 미생물의 투입을 조절하는 단계.

【변경후】

다음 단계를 포함하는 아쿠아포닉스 시스템을 이용하여 저 pH조건에서 사육수 내의 질산염 농도를 유지하면서 수산생물 사육과 식물재배를 동시에 수행하는 방법:

(a) (i) 어류 사육조를 포함하는 어류 사육시스템; (ii) 식물 재배베드를 포함하는 식물 재배 시스템; 및 (iii) 여과기를 구비하고, 상기 사육 시스템의 사육수는 상기 여과기를 거쳐 상기 식물 재배베드로 유입된 후, 다시 어류 사육조로 순환되는 구조를 가지는 아쿠아포닉스 시스템의 어류 사육조에 어류를 투입하고, 식물재배 베드에 수경재배 식물을 입식시키는 단계;

(b) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 종속 영양세균 및 독립 영양세균을 포함하는 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하고, 유기탄소원을 지속적으로 공급하면서 배양하여 바이오 플락을 형성시키는 단계;

(c) 상기 아쿠아포닉스 시스템에 유기탄소원 공급을 중단하고, 무기탄소원을 지속적으로 공급하며, 상기 혼합 미생물을 2~3일 간격으로 투입하면서 배양하는 단계; 및

(d) 상기 (c) 단계의 배양시 pH가 6.0 이하로 떨어질 경우, 사육수내 아질산염 농도 변화에 따라 상기 혼합 미생물의 투입을 조절하는 단계.