

DHA-INT를 이용한 활성슬러지의 암모니아 저해도

이상민 · 정진영 · 정윤철

한국과학기술연구원 수질환경연구센터

(2000년 1월 25일 접수, 2000년 9월 8일 채택)

Measurement of Ammonia Inhibition of Activated Sludge by DHA-INT

Sang-Min Lee · Jin-Young Jung · Yun-Chul Chung

Water Environment Research Center, Korea Institute of Science & Technology

ABSTRACT

It is a time consuming work to identify the inhibition of unknown chemicals or industrial wastewater. Thus it is needed to establish a fast assay tool for finding a toxicant source. Biomass activity and ammonia inhibition were measured by DHA-INT method. Ammonia inhibition tests were comprised of total ammonia inhibition and free ammonia inhibition. Those inhibitions were carried out by nitrifier and heterotroph each other with nitrifier inhibitor. The ammonia inhibition was proportional to an amount of total ammonia and pH increase. It meant that a free ammonia played a key role for ammonia inhibition, however both total ammonia and free ammonia should be considered for an accurate assay of the ammonia inhibition. Nitrifier was more sensitive than heterotroph when the ammonia concentration above 3,000 mg/L.

Key Words : Ammonia, Dehydrogenase, INT, Nitrification, Toxicity

요약문

폐수의 복합독성과 다수의 미지 화합물의 영향을 평가하는 것은 많은 시간이 요구되고 분석상 어려움이 존재하는 경우가 많다. 그러므로 폐수중 독성을 나타내는 원인물질의 탐색과 처리효과를 평가하기 위한 방법을 확립하는 것이 절실히 요구된다. 본 연구에서는 질산화 저해제를 이용하여 혼합미생물중 질산화 미생물과 종속영양미생물을 구분하여 암모니아 저해도 실험을 수행하였으며, 이때 저해도는 dehydrogenase activity(DHA)를 이용한 미생물활성도의 차이로서 평가하였다. DHA에 의한 암모니아 저해 연구는 총 암모니아의 영향, 유리 암모니아의 영향, 질산화 미생물과 종속영양미생물의 암모니아 저해도에 대해 각각 평가되었다. 암모니아 독성은 총 암모니아 농도와 pH가 증가할수록 크게 나타나 유리 암모니아의 역할이 중요하게 작용함이 밝혀졌으나 미생물의 DHA는 총 암모니아와 유리 암모니아가 함께 고려되어야 정확히 평가될 수 있었다. 3,000 mg/L 이상의 고농도의 암모니아에서는 질산화 미생물이 종속영양미생물 보다 심한 저해를 받는 것으로 나타났다.

주제어 : 암모니아, 탈수소효소, INT, 질산화, 독성

1. 서론

산업이 발달함에 따라 새로운 화학물질이 속출하고 폐수의 성상은 더욱 더 복잡 다양해지고 있다. 더욱이 폐수내 존재하는 독성 혹은 저해물질은 수계 생태계의 급속한 파괴 및 처리장의 처리 효율을 크게 저하시키는 결과를 초래할 수 있으므로 이러한 저해물질의 조기 진단기술은 수계 및 산업폐수 처리장의 악화를 방지하기 위한 사전적 예방기술로서 조속한 개발이 요구된다. Miller 등은 복합물질인 경우 화학적 분석결과 예측되는 독성과 생물학적 검정 결과와는 다르기 때문에 복합물질의 독성평가시에는 생물학적 검정방법의 도입이 필요하다고 하였고¹⁾ Parkhurst 등과 Gasith 등은 *Daphnia*를 이용한 독성실험을 통해 산업폐수중 독성을 나타내는 원인물질의 탐색과 독성물질의 처리효과를 평가하였다.^{2,3)} Pickering 등은 생물학적 평가기법을 이용하여 염료공장 폐수처리 시설의 독성물질 제거효과를 평가하고 이를 위한 독성평가 방법을 확립하기 위한 연구를 수행하였다.⁴⁾ 국내에서는 국립환경연구원에서 공동폐수 처리장에서 유입수 및 방류수에 대한 MicroTox를 이용한 독성실험을 수행하였고⁵⁾ Lee 등이 어류, *Daphnia* 및 Ames' test를 이용한 산업폐수의 환경독성 및 유전독성의 평가를 수행한 예가

있다.⁶⁾

암모니아성 질소는 호소나 해역의 부영양화를 초래할 뿐 아니라 수계의 용존 산소를 고갈시키고 고농도로 존재시 생물체 독성을 야기시키는 대표적인 오염물질이다. 암모니아 저해에 대해 보고된 많은 연구들의 공통된 의견은 이온성 암모니아보다는 유리 암모니아가 직접적인 저해원인인 것으로 보고하고 있다. 종속영양미생물의 경우 시발 저해농도(initial inhibition concentration)가 1,500~4,000 mg NH₄-N/L이고 그 이상의 농도에서는 심각한 저해를 주는 것으로 보고되었다.⁷⁾ Anthonisen 등의 연구에 의하면 유리 암모니아와 유리 아질산에 의한 저해농도는 *Nitrosomonas spp.*의 경우 각각 10~150 mgNH₃-N/L 및 0.2~2.8 mgHNO₂-N/L로 보고하였다.⁸⁾

세포의 호흡과 연관된 작용을 하는 DHA(dehydrogenase activity)는 세포 활성의 지표 역할을 한다고 알려져 왔다.⁹⁾ DHA는 tetrazolium salt의 환원에 따른 formazan 생성과 색깔 변화에 의하여 측정되며 사용되는 tetrazolium salt는 TTC(2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride), INT, MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium chloride), NBT(NitroBlue Tetrazolium) 등이 있으며, 이는 각기 미토콘드리아 내에

서 작용하는 ETS(electron transport system)의 특정 영역에서 작용한다. 본 연구는 DHA를 측정하여 고농도 암모니아 독성이 BNR(biological nitrogen removal) 공정에 미치는 영향을 정량적으로 파악하고자 한다.

2. 탈수소효소의 작용기작

유기화합물의 분해대사 반응은 일련의 산화반응을 통해 이루어지는데 이때 전자와 수소의 손실반응이 함께 발생한다. 이 반응은 수소원자의 제거와 동등한 반응이므로 탈수소화 반응(dehydrogenation)이라 한다. 유기화합물의 산화에 사용되는 여러 가지 기본 탈수소화 효소의 활성도는 생화학적 활성을 측정하는 훌륭한 지표로 사용될 수 있다. 탈수소화 효소는 유기화합물로부터 수소를 제거하는 반응을 촉매하고 중간 전자수용체로서 역할을 하는 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)와 FAD(flavin adenine dinucleotide) coenzymes과 연관되어 있다.¹⁰⁾

DHA는 tetrazolium salt를 biological system에 첨가함으로써 측정할 수 있으며 tetrazolium salt는 대사 중에서 최종 전자수용체로 사용된다. 그러므로 DHA 측정반응은 유기화합물의 산화와 tetrazolium salt의 환원반응이 동시에 발생하면서 불용성의 formazan 결정이 세포내에 형성되게 된다. 반응 메카니즘은 생물체의 호흡대사 중 전자 전달계에서 산소와 경쟁하여 전자를 받아들여 환원되는 반응은 Fig. 1과 같이 수행되고 그 결과 무색의 INT (2-(p-iodiophenyl)-3-(p-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride)는 붉은 색의 INTF (INT formazan) 결정을 형성하게 된다.

3. 실험재료 및 방법

3.1. 암모니아성 질소의 저해도 실험

본 연구에서 암모니아 저해도 실험은 두 가지 방법으로 수행되었다. 첫번째는 Fig. 2에 나타난 SBR

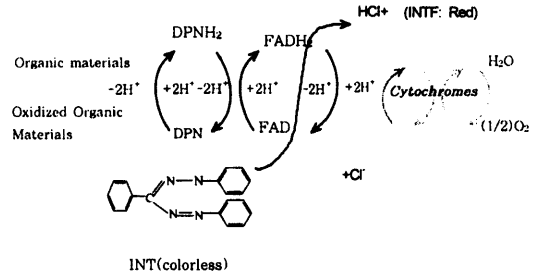


Fig. 1. INTF formation mechanism in ETS (electron transport system).¹¹⁾

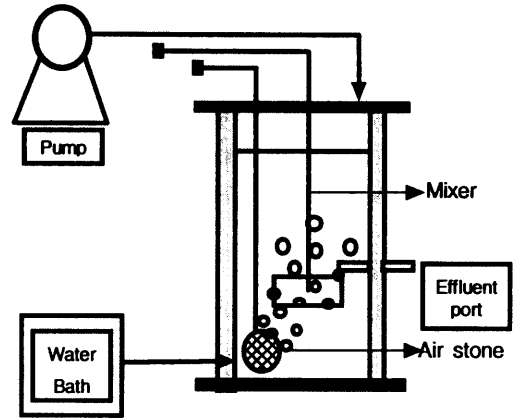


Fig. 2. Schematic diagram of sequencing batch reactor for sludge culture.

(sequencing batch reactor)에서 축산폐수에 순용시킨 슬러지와 활성슬러지 공법으로 운전되는 일반 하수처리장 슬러지에 대해서 DHA를 측정하여 총 미생물에 대한 암모니아 저해도를 실험하였고 다른 가지는 ATU(allythiourea)와 NaClO₃(sodium chlorate)를 사용하여 총 슬러지내의 미생물군을 *Nitrosomonas spp.*와 *Nitrobacter spp.*, 그리고 heterotrophs로 구분하여 각각 암모니아에 대해 저해되는 정도를 측정하였다. 본 연구에서 사용된 ATU는 선택적인 *Nitrosomonas spp.* 저해제로서 최종 농도를 15 mg/L가 되도록 하였고 NaClO₃는 최종 농도를 1,600 mg/L로 조정하면 *Nitrosomonas spp.* 및 *Nitrobacter spp.*만 저해하고 종속 영양미생물은 저해를 받지 않는다고 보고되고 있다.¹²⁾ Positive control은 ATU 및 NaClO₃를 첨가하지 않은 것으로 총 미생물활성을 측정하기 위한 것이고 negative control은 37% formaldehyde를

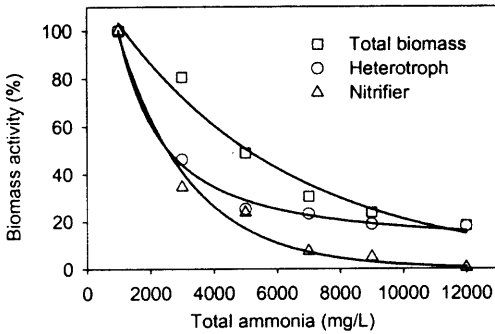


Fig. 3. Ammonia toxicity as to nitrifier and heterotroph.

조내의 미생물군들에게 미치는 영향을 정량화 하기 위해 질산화 저해제인 ATU(allythiourea: *Nitrosomonas spp.* inhibitor)와 NaClO₃(*Nitrosomonas* and *Nitrobacter spp.* inhibitor)를 사용하여 슬러지내의 미생물군을 *Nitrosomonas spp.*, *Nitrobacter spp.*, 그리고 heterotroph로 구분하여 Fig. 3과 같이 암모니아 저해도를 각각 평가하였다. 축산폐수의 pH는 8.2이고 질산화가 발현되지 않은 포기조에서 9.0을 상회하기 때문에 Fig. 3의 합성폐수 pH는 9.0으로 조정 후 실험을 수행하였다.

암모니아 농도에 대한 미생물의 활성은 Table 2와 같이 EC(effective concentration)의 관점에서 살펴보면 EC₂₀은 각각 1,480(nitrifier)~1,500 mg/L(heterotroph)이고 EC₅₀은 2,500(nitrifier)~2,700 mg/L(heterotroph)로 질산화 미생물과 종속영양미생물 사이에 뚜렷한 차이는 보이지 않았지만 암모니아 농도가 3,000 mg/L 이상인 경우는 암모니아성 질소의 농도가 증가할수록 질산화 미생물이 종속영양미생물보다 더 크게 저해를 받는 것으로 나타났다. EC₈₀의 경우 종속영양미생물이 7,000 mg/L이고 질산화 미생물이 4,600 mg/L인 것으로 나타났다.

Fig. 4는 각 미생물군의 DHA를 세 가지 폐수에 대해 정량적으로 계산한 것이다. 사용한 폐수는 축산폐수(2,000 mgNH₄-N/L), 혐기성 유출수(2,000 mgNH₄-N/L), 그리고 합성폐수(2,000 mgNH₄-N/L)이며 이들 각각의 폐수에 대해 암모니아 성분이 미생물 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 동일한 암모니아 농도를 함유하고 있는 세 폐수가 미생물 활성에 미치는 저해도를 살펴보면 축산폐수가 모든 미

Table 2. Effective concentration of ammonia by DHA

Inhibition	Heterotrophs (mg ammonia/L)	Nitrifier (mg ammonia/L)
EC ₂₀	1,500	1,480
EC ₅₀	2,700	2,500
EC ₈₀	7,000	4,600

EC₂₀ : Concentration of inhibitor that 20% of control biomass activity decrease

EC₅₀ : Concentration of inhibitor that 50% of control biomass activity decrease

EC₈₀ : Concentration of inhibitor that 80% of control biomass activity decrease

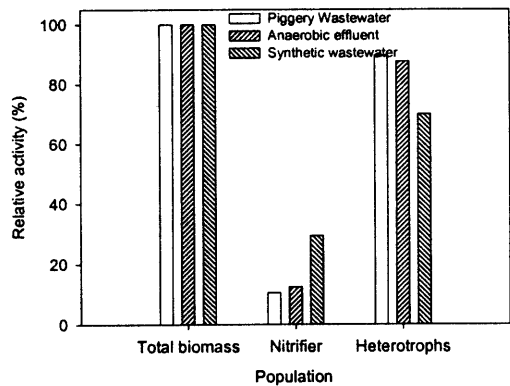


Fig. 4. Relative activity for the different type of microorganism.

생물군에게 가장 큰 저해를 주었고 축산폐수의 혐기성 처리수, 그리고 합성폐수의 순으로 나타났다. 이는 고농도 암모니아가 슬러지내 미생물 활성에 저해를 주는 것은 사실이지만 축산폐수에 의한 미생물 활성저하 현상은 동일한 암모니아성 질소가 단독으로 존재하는 합성폐수보다 크게 나타났다. 이는 축산폐수의 성장에는 암모니아 외에 추가적인 저해물질이 존재함을 의미한다. 축산폐수 및 축산폐수의 혐기성 처리수를 저해물질로 사용했을 경우 질산화 미생물활성이 약 10~11% 정도로 나타나며 동일한 암모니아 부하를 가진 합성폐수의 경우는 질산화 미생물의 활성이 27%로 축산폐수보다 높은 활성을 나타냈다.

Fig. 5는 하수처리장 활성슬러지와 SBR 반응조에서 400~600 mg NH₄-N/L·d의 질소부하로 순용시킨 슬러지를 사용하여 암모니아 저해실험을 수

행한 결과이다. 폐수의 pH를 Tris-HCl buffer용액을 이용하여 9.0으로 조정하였고 총 암모니아성 질소의 농도를 1,000 mg/L에서 12,000 mg/L까지의 범위에서 저해도 실험을 수행하였다. Fig. 5의 X축은 유리 암모니아 농도로 산출한 것이다. 동일한 암모니아 농도에 대한 미생물 활성의 저해는 활성슬러지의 미생물이 SBR 슬러지보다 더 크게 받는 것으로 나타났다. 이는 활성슬러지 미생물은 중량 하수 처리장에서 채취한 것으로 고농도 암모니아 농도에 적응되지 않은 미생물이고 SBR 슬러지는 암모니아 저해도 실험을 하기전에 이미 300 mg/L의 암모니아를 함유한 폐수에 적용된 슬러지를 사용했기 때문에 사료된다. 예를 들어 EC₅₀의 경우 SBR 슬러지 미생물은 유리 암모니아 농도로 5,500 mg/L인 반면 활성슬러지의 경우는 4,000 mg/L 정도로 암모니아 폐수에 적용도에 따라 미생물이 견딜 수 있는 한계 농도는 상당히 증가할 수 있음을 보여주고 있다. 그러나 유리 암모니아 농도가 7,000 mg/L에 도달하자 암모니아에 순응된 미생물(S)도 미생물 활성을 크게 상실하는 결과를 나타내었다.

Fig. 6은 동일 농도의 암모니아 부하를 적용하고 인위적으로 pH를 7과 9로 조정한 후 암모니아 저해도 시험을 수행한 결과이다. 용액의 pH 조정은 phosphate buffer 용액과 Tris-HCl buffer 용액을 사용하여 조정하였다. Fig. 6은 두 가지 중요한 결과를 보여준다. 하나는 기존의 연구에서 밝혀진 바와 같이 동일한 암모니아 농도에서 폐수의 pH가 상승할수록 암모니아 저해도가 증가한다는 것이다. 예를 들어 총 암모니아 농도가 7,000 mgNH₄-N/L 인 경우 pH 7에서 유리 암모니아 농도는 93 mg/L이고 pH 9에서 유리 암모니아 농도는 4,019 mg/L이다. 활성슬러지 미생물을 사용했을 때 저해도는 pH 7에서 34%, pH 9에서 53% 저해도를 나타낸다. 이는 단순히 pH 상승의 영향만이 아니라 pH 상승과 암모니아의 해리도 관계에서 유리 암모니아의 존재비가 증가함에 따라 미생물 활성의 저해가 증가함에 기인한 것으로 사료된다. 다른 한가지는 위에서 언급한 유리 암모니아가 차지하는 중요한 역할에도 불구하고 미생물 활성에 대한 암모니아 저해도는 유리 암모니아만의 함수로 표현되지 않는다는 사실이다. 즉, 유리 암모니아 농도는 낮아도 총 암모니아 농도가 높으면 유리 암모니아 농도만 높은 경우보다 저

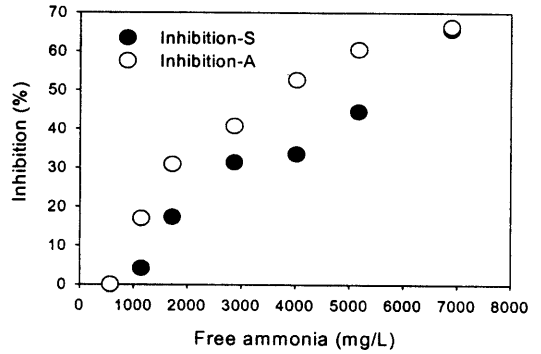


Fig. 5. Ammonia toxicity of free ammonia for the different types of microorganisms (S: SBR sludge, A: activated sludge).

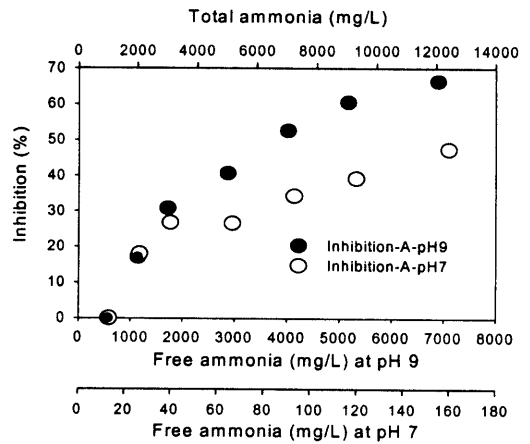


Fig. 6. Ammonia toxicity of free ammonia as a function of pH.

Table 3. Comparison of EC of TA and FA

	EC ₂₀		EC ₅₀	
	TA	FA	TA	FA
pH 7	3,500	50	12,000	160
pH 9	2,000	1,200	7,000	4,000

TA : Total ammonia concentration (mg/L)

FA : Free ammonia concentration (mg/L)

해도가 더 크게 나타날 수 있다는 것이다. Table 3에서 나타난 바와 같이 총 암모니아 농도가 12,000 mg/L이고 pH 7인 경우 유리 암모니아농도가 160 mg/L 정도이지만 pH 9에서는 총 암모니아 농도 5,000 mg/L이고 유리 암모니아 농도가 2,900 mg/L

인 경우 유리 암모니아의 차이에도 불구하고 유사한 저해도를 나타내고 있다. 이는 미생물 활성의 저해도 평가시에 유리 암모니아와 총 암모니아 농도가 함께 고려되어야 함을 의미한다.

5. 결 론

- 1) 총 암모니아 농도 3,000 mg/L(pH 7기준) 이하에서는 질산화 미생물과 종속영양미생물의 저해도의 차이는 크게 나타나지 않았으나 그 이상에서는 암모니아 농도가 증가할수록 질산화 미생물이 종속영양미생물보다 더 크게 암모니아 저해를 받는 것으로 나타났다.
- 2) 동일한 암모니아 농도일 경우 질산화 미생물이 받는 저해도는 축산폐수가 합성폐수보다 더욱 크게 나타났다. 이는 축산폐수가 미생물 활성에 미치는 저해도는 암모니아 농도 외에 다른 요인이 추가로 존재함을 의미한다.
- 3) 유리 암모니아 농도는 낮아도 총 암모니아 농도가 높으면 총 암모니아 농도가 낮고 유리 암모니아농도만 높은 폐수보다 저해도가 더 크게 나올 수 있다. 그러므로 미생물 활성의 저해도는 유리 암모니아 단독으로 결정되는 것이 아니라 총 암모니아 농도와 함께 고려되어야 함을 의미한다.
- 4) 질산화 미생물과 종속영양미생물을 각 단계별로 구분하여 암모니아 저해도 실험을 수행하기 위해 사용된 dehydrogenase assay와 specific nitrification inhibitor를 이용한 방법은 다양한 저해도 실험에도 응용될 수 있는 유용한 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Miller, W. E., Peterson, S. A., Greene, J. C., and Callahan, C. A., "Comparative toxicology of laboratory organism for assessing hazardous waste sites," *J. Environ. Qual.*, **14**, 569~574(1985).

2. Parkhurst, B. R., Gehrs, C. W., and Rubin, I. B., "Value of chemical fractionation for identifying the toxic component of complex aqueous effluents," *ASTM STP*, **667**, 122~130(1979).
3. Gasith, A., Job, K., M., Dickson, L. L., Parkerton, T. F., and Kaczmarek, S. A., "Protocol for the identification of toxic fraction in industrial wastewater effluent," *ASTM STP*, **971**, 204~215(1988).
4. Pickering, Q. H., Shaul, G. M., and Dostal, K. A., "Acute and chronic toxicity to the fathead minnow, *Pimephales promelas* of effluents from a treatment plant receiving dye and pigment processing wastewater," *ASTM STP*, **891**, 395~406 (1985).
5. 국립환경연구원, 폐수의 공동처리시 효율화기법 개발에 관한 연구(I), 과학기술처(1989).
6. Lee, S. K., Shim, J. S., Kim, Y. H., and Roh, J. K., "Ecotoxicological and mutagenicity evaluation of industrial effluent with aquatic organism and Ames' test with salmonella," *J. KSWPRC*, **7**(2), 100~109 (1991).
7. Jiunn-Jyi, L., Yu-You, L., and Tatsuya, N., "The Influence of pH and ammonia concentration on the methane production in high-solid digestion processes," *Water Environment & Technology*, **70**, 1075~1082(1998).
8. Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S., and Srinath, E. G., "Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid," *J. WPCF*, **48**(5), 835~852(1976).
9. Dermer, O. C., Curtis, V. S., and Leach, F. R., Biochemical indicators of subsurface pollution, Ann Arbor Science, Ann Arbor, Mich.(1980).
10. Chung, Y. C. and Neethling, J., "Microbial activity measurement for anaerobic sludge

- digestion." *J. WPCF*, **61**(3), 344~349 (1989).
11. David, L. F., Yang, J. T., and Eckenfelder, W., "Dehydrogenase enzyme as a parameter of activated sludge activities," in *Proceeding of the 21st Purdue university waste conference*, pp. 534~543(1966).
 12. 한동준, 임재명, 강성환, "생물막 공정에 의한 고농도 암모니아 폐수처리시 질소 거동 및 질산화 저해," *한국수질보전학회지*, **13**(2), 129~136(1997).
 13. APHA, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 17th Edn, Washington, D.C.(1989).
 14. MaCarty, P. L., "Salt toxicity in anaerobic digestion," *J. WPCF*, **33**, 399~415(1961).
 15. Randall C. W., Barnard, J. L., and Stensel, H. D., *Design and retrofit of wastewater treatment plant for biological nutrient removal*, Technomic Publishing CO. INC., Water Quality Management Library 5, pp. 38~40(1992).