

# 순환여과시스템에서 온도가 질산화 반응에 미치는 영향

박종호\* · 이원호<sup>1</sup> · 연익준<sup>2</sup> · 조규석  
 충청북도내수면연구소, <sup>1</sup>충주대학교 건설도시공학과, <sup>2</sup>충주대학교 환경공학과

## Effect of Temperature on Nitrification in a Recirculating Aquaculture System

Jong Ho PARK\*, Won Ho LEE<sup>1</sup>, Ik Jun YEON<sup>2</sup> and Kyu Seok CHO

Department of Inland Fisheries Research Institute, Chung Cheong Buk-Do, Chung-ju 380-250, Korea

<sup>1</sup>Department of Construction & Urban Engineering, Chung Ju National University, Chung-ju 380-702, Korea

<sup>2</sup>Department of Environmental Engineering, Chung Ju National University, Chung-ju 380-702, Korea

The effects of temperature on nitrification of enriched nitrifiers were investigated by using kinetics and thermodynamics method through the batch test. Aquaculture recirculating water, which was sampled at Chung Cheong Buk-Do Inland Fisheries Research Institute, was analyzed to observe the characteristics of nitrification. Temporal variation of ammonium, nitrite and nitrate concentration was measured at batch experiments. Activation energy was calculated using Arrhenius equation with the oxidation rates of specific ammonium or nitrite ion. These oxidation rates were measured at temperature range of 6-35°C and ammonium concentration range of 0.2-1.8 mg/L. Two distinct activation energy of *Nitrosomonas* sp. at temperature 6-15°C and 15-35°C was 93.1 and 25.0 KJ/mol, respectively. Nitrate accumulation was observed at temperature over 15°C.

Key words: Nitrification, Kinetics, Thermodynamics, Activation energy, *Nitrosomonas*

### 서 론

양식장에서 발생하는 오염물 중 가장 큰 영향을 미치는 것은 사료의 공급에 의해 발생하는 것으로 미섭취 사료와 대사 작용 중 소화하지 못한 영양분, 어분, 노 등에 의해 수질이 오염된다. 사료의 공급에 의해 발생하는 오염물질 중 어류의 성장에 가장 큰 영향을 미치는 오염물은 사료 섭취 후 발생하는 어분, 미섭취 사료에 의해 발생하는 고형물과 어류의 대사 작용과 미섭취 사료 중 단백질 성분의 분해에 의해 발생하는 암모니아등과 같은 질소화합물이며 (Timmons, 1994), 또한 이것이 환경 오염의 원인이 되고 있어 이를 제거하기 위한 여러 가지 방법이 연구되고 있다 (Patiquin and Knowles, 1972; Seitzinger and Garber, 1987; Smith and Duff, 1988; Park et al., 2003).

생물학적으로 질소를 제거하는 기작은 질산화 및 탈질산화에 의한다. 질산화과정에서는 암모니아가 질산성 질소로 전환되고, 탈질산화 과정에서는 질산성 질소가 질소가스로 전환된다 (Bitton, 1994). 따라서 최근 순환여과양식시스템에서 이러한 질소를 제거하기 위한 연구가 국내외에서 활발하게 연구되고 있다 (Kim, 1980; Rogers and Klemetson, 1985; Nijhof and Bonverdeur, 1990; Lee et al., 1999; Oh et al., 2003).

질산화 반응시 온도는 질산화 미생물의 성장률에 중대한 영향을 준다. 질산화 미생물의 최대 비성장률 (maximum specific growth rate)은 온도에 크게 영향을 받는다고 여러

연구자들이 보고하고 있다 (Skinner et al., 1966; Quinlan, 1980; Lee et al., 1995; Weon, 1999). 반응속도 측면에서는 대부분 미생물 세포 내의 생화학 반응시 온도가 증가함에 따라 반응속도가 증가하지만 질산화 미생물의 질산화 반응은 온도가 적온보다 고온이거나 저온일 경우에 반응속도가 떨어지며, 이는 미생물 내의 생화학 반응에 촉매 역할을 하는 효소가 피해를 받는 것으로 설명되어 진다 (Landelout, 1974; Boon and Landelout, 1962). 따라서 질산화 미생물의 질산화 반응에 있어서의 동력학적 반응식은 온도 5-35°C의 제한된 범위에서 적용되고 있다.

본 연구는 양어장순환수의 온도에 따른 질산화 반응의 영향과 질산화 미생물의 성장특성을 규명하는 것이 목적이다.

### 재료 및 방법

#### 질산화 미생물 배양

질산화 미생물을 선택적으로 배양하기 위해서 인근도시 하수처리장으로부터 반응슬러지를 채취하여 아크릴로 제작된 40 L 회분식 반응조에 수돗물 (36 L)을 넣고 Mixed Liquor Suspended Solid (MLSS)가 5,000 mg/L인 활성슬러지를 식중 한 후 폭기시켜 주었다. 회분식 반응조 운영시 주입되는 기질의 농도는 Table 1과 같다. 기질 주입은 2회/일로 하여 2 Cycle/일로 운영하였으며, 30분 침전시켜 상등수를 Solenoid valve를 이용하여 유출시킨 후 같은 양의 기질을 주입하였다. 반응조 내의 온도는 상온 (20-27°C)을 유지하였으며, 용존산소는 산기식 폭기기를 이용하여 3-5 mg/L를 유지하였다. 또한 빛의 영향

\*Corresponding author: jhpark@cb21.net

Table 1. Composition of synthetic substrate for nitrifier culture

Ingredients	Volume
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g (200 mg as NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L)
NaHCO <sub>3</sub>	2.5 g
BOD solution	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.5 g
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.1 g
Phosphate buffer, 2 M	1 mL
Water: Tap water	1,000 mL

을 막기 위해 알루미늄 호일로 빛을 차단하였다 (Alleman, et al., 1987). 반응조의 운영은 유입 (fill) 30분, 폭기 (aeration) 10시간, 침전 (settle) 30분, 배출 (draw)은 30분, 휴지기 (idle) 30분으로 설정하고 운전하였다.

질산화균의 기질로는 유기탄소를 배제한 암모니아성 질소를 주입하였다. 기질로는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이용하였고, 완충액으로는 NaHCO<sub>3</sub>를 이용하였다. 두 혼합물을 수도물에 용해시켜 peristaltic pump를 이용하여 20 L/회씩 주입하였다. 이때 반응조내로 주입되는 배양액의 pH는 7.8-8.5로 유지하였다. 배양시 주입 암모니아성 질소의 농도는 초기 20 mg N/L에서 점진적으로 200 mg N/L까지 증가시켰다.

#### 질산화 미생물의 활성화에너지

온도는 미생물 대사에 두 가지 경로로 영향을 미친다. 첫째는 효소촉매 반응에 영향을 미치는 것이고, 둘째는 세포로의 기질 확산율에 영향을 미치는 것이다. Arrhenius (1889)는 생물학적 반응들의 온도에 대한 영향을 반응속도  $K$ 에 관해 식 (1)과 같이 제안 하였으며 적정 온도 범위의 미생물 반응에서의 반응속도는 Arrhenius식에 제한적으로 적용할 수 있다.

$$K = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right) \quad (1)$$

여기서,  $A$ =값을 볼 또는 지수 앞자리 인자

$E_a$ =활성화에너지 (KJ/mol)

$R$ =이상기체상수 (KJ/mol·K)

$K$ =비반응속도 (1/h)

$T$ =절대온도 (K)

#### 온도 변화에 따른 질산화 반응속도 측정

본 연구에서는 세 가지의 회분식 실험을 수행하였다. 첫 번째 실험은 온도변화에 따른 양어장 사육수에서의 질산화 미생물에 의한 질산화 속도를 측정하여 온도보정계수 및 활성화에너지를 결정하였고, 두 번째 실험에서는 배양된 질산화 미생물을 이용하여 온도변화에 따른 암모니아성 질소의 제거 특성을 관찰하였다. 세 번째 실험에서는 20°C에서 질산화 미생물에 의한 기질 제거속도를 측정하여 질산화 미생물의 동력학 상수를 산정하였다.

온도에 따른 암모니아성 질소의 제거특성을 관찰하기 위한 실험에서는 상기방법으로 배양된 질산화 미생물을 이용하였고, pH는 미생물의 활성도에 영향을 주기 때문에 모든 실험에

서 초기 pH는 7.8(±0.5)로 유지하였다. 배양된 질산화 미생물 슬러지내의 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 및 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N을 배제하기 위해 4시간 공폭기를 실시한 후 침전시켜 증류수로 3회 이상 세척하여 사용하였다. 농축질산화 미생물을 1 L 삼각 플라스크에 500 mg/L 주입하여 증류수를 채워 희석한 후 각각 6, 15, 20, 28, 35°C의 항온조에 옮겨 교반과 함께 폭기시켰다. 이때 용존산소 농도는 질산화에 영향을 주지 않는 범위 3-5 mg/L로 하였다. 온도가 일정온도에 도달된 후 각각 시료를 초기농도 60 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L로 하여 일정시간 간격으로 채취하여 분석하였다. 채취된 시료의 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N 및 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N은 멤브레인필터 ( $\psi=0.45 \mu\text{m}$ , MFS), NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N은 GF/C 여과지 ( $\psi=1.2 \mu\text{m}$ , Whatman)를 이용하여 여과한 후 측정하였다. 실험조건은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Summary of experimental conditions for substrate removal rate analyses

Items	Condition
Mixed Liquor Volatile Suspended Solid	4,000-5,000 mg/L
Temperature range	6-35°C
Initial pH	7.8
Dissolved oxygen	6-8 mg/L
Substrate concentration	60 mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L

마지막으로 질산화 미생물의 동력학 상수를 결정하기 위한 실험에서는 20°C에서 수행하였다. 배양된 질산화 미생물을 상기와 같은 방법으로 희석 후 낮은 MLVSS (200-250 mg/L)에서 기질농도를 변화에 따른 기질제거속도를 구하였다. 기질제거속도는 실험에 이용된 질산화 미생물의 무게로 나누어 미생물 단위무게에 대한 제거속도로 표준화하여 동력학 상수를 산정하였다. 본 연구에 수행된 모든 회분식 실험은 배양조내의 질산화 미생물의 기질 제거 효율이 90% 이상일 때만 수행되었으며 채취된 샘플을 2회 이상 측정하여 평균값을 이용하였다 (Table 3).

Table 3. Summary of experimental conditions for kinetic analyses of nitrifier

Items	Condition
Mixed Liquor Volatile Suspended Solid	200-250 mg/L
Temperature range	20°C
Initial pH	7.8
Dissolved oxygen	3-6 mg/L
Substrate concentration	1-60 mg NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N/L

실험에 사용된 원수는 충청북도내수면연구소 내 양어장 사육수를 그대로 이용하였고, 용존산소 농도는 6-8 mg/L를 유지하였으며, 자동 온도조절기를 이용하여 회분식 실험을 수행하였다. Table 4는 실험에 이용된 배출수의 성상을 나타내었으며, 실험장치는 Fig. 1과 같다.

Table 4. Characteristics of aquaculture wastewater used in batch test (unit: mg/L)

Items	Condition
Total suspended solids	20-30
Total chemical oxygen demand	24-28
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N	0.3-0.4
Nitrate (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)	0.2-0.3
Nitrite (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)	2.6-2.8
pH	7.6-7.8
Alkalinity (as CaCO <sub>3</sub> )	23-25

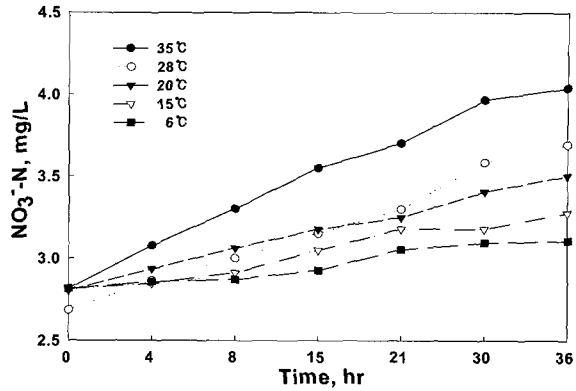


Fig. 2. Variation of nitrate production rate on temperature.

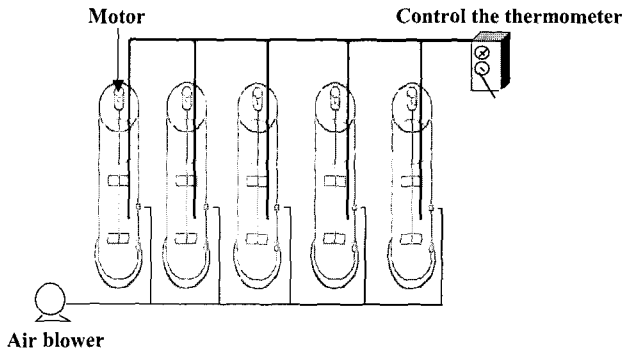


Fig. 1. A schematic diagram of batch test.

**결과 및 고찰**

**양어장사육수내 질산화 미생물의 활성화에너지**

효소의 반응속도에 대한 온도의 영향은 실제적으로 매우 중요하다. 실제 반응을 일으킴에 있어서 적당한 온도범위의 선택이 반응여부를 결정할 수 있다. 미생물 반응에 있어서 온도가 고온이거나 저온일 경우에는 반응속도가 떨어지며, 이는 미생물 세포내의 생화학 반응에 촉매역할을 하는 효소가 피해를 받는 것으로 설명되어 진다 (Landelout., 1974; Boon and Laudelout, 1962; Lee et al., 1995).

사육수의 온도가 증가함에 따라 생성된 질산염의 양은 증가하였다 (Fig. 2). 질산화 미생물의 무게는 동일하다고 가정하고 질산염의 생성속도를 구하여 Arrhenius식(1)에 대입해 활성화에너지 ( $E_a$ )값을 산정하였다 (Fig. 3). 여기서, 암모니아성 질소의 질산화는 *Nitrosomonas* sp.에 의해 아질산염 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>-N)으로 변화되고 *Nitrobacter*에 의해 최종산물인 질산염(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N)을 생성하므로 사육수내의 *Nitrobacter*의 활성화에너지라고 할 수 있다. 온도 6-35°C의 범위에서 하나의 직선적인 기울기를 얻었으며, 이때 활성화에너지 ( $E_a$ ) 값은 34.5 KJ/mol이었다. 따라서 *Nitrobacter*의 반응에 관여하는 효소 중 율속단계 (rate-controlling step)로 작용하는 효소는 온도 6-35°C의 범위에서 동일함을 알 수 있었다.

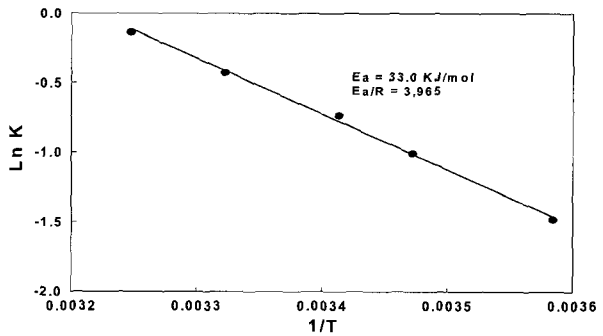


Fig. 3. Determined activation energy of nitrobacter in effluent.

**농축 질산화 미생물의 활성화에너지**

pH 7.8(±0.5)로 운영되는 회분식 배양조로부터 농축질산화 미생물을 채취하여 암모니아성 질소의 소비속도와 질산염의 생성속도를 측정하였다. 먼저 각 반응조의 온도를 6-35°C로 변화시킴에 따라 암모니아성 질소농도가 시간에 따라 직선적으로 감소함을 관찰하였다 (Fig. 4). 이를 질산화 미생물의 단위무게 당 기질소비속도를 구하여 Arrhenius식에 대입하여 직선화 하였다 (Fig. 5). 이때 약 15°C에서 변곡점을 관찰 할 수 있었으며 두 개의 활성화 에너지를 구할 수 있었다. 활성화 에너지 ( $E_a$ )값은 각각 15°C이하에서 93.1 KJ/mol, 15-35°C에서 25.0 KJ/mol이었다. 15°C 이하에서 활성화에너지가 급격히 증가하는 것은 반응에 요구되는 임계에너지가 크을 의미하며 관련하는 효소의 촉매활동이 감소한다고 할 수 있다. 이것은 온도가 상승된 고온 (34°C 이상)에서는 효소분자의 원자가 더욱 큰 에너지를 갖게되어 더 크게 움직이려는 경향을 가지게 되어 결과적으로 열에 민감한 필수 단백질 구조를 유지하려는 작용이 파괴되어 불활성화 되었던 것으로 사료된다.

합성폐수를 이용하여 온도변화에 따른 질화균의 성장을 관찰한 Weon (1999)의 결과에 의하면 pH 8.4에서 *Nitrosomonas* sp.의 활성화에너지 ( $E_a$ )값은 4-11°C에서는 169.5 KJ/mol이며, 11-34°C에서는 20.4 KJ/mol로 보고하였다. 본 실에서 구한 활성화에너지 ( $E_a$ )값은 기보고된 연구결과와 거의 같은 경향

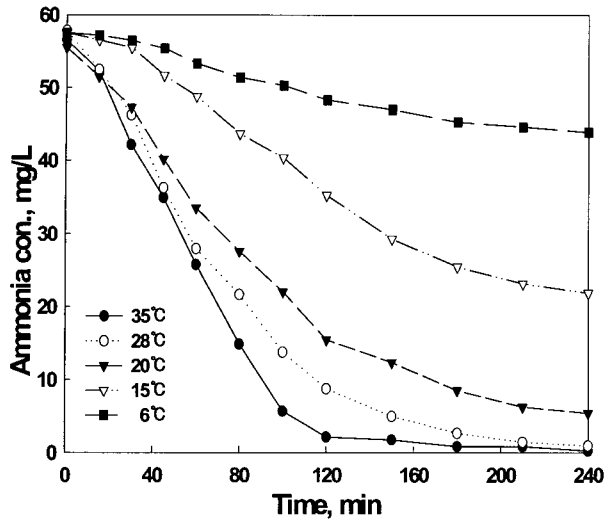


Fig. 4. Variation of ammonia consumption rate on temperature.

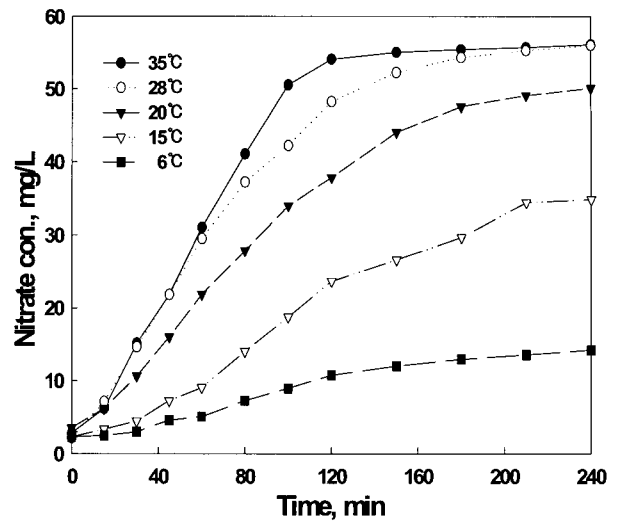


Fig. 6. Variation of nitrate production rate on temperature.

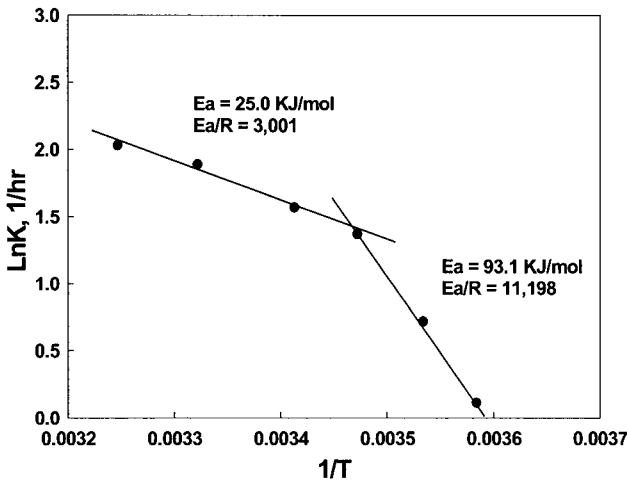


Fig. 5. Determined activation energy using enriched nitrifier (*Nitrosomonas*).

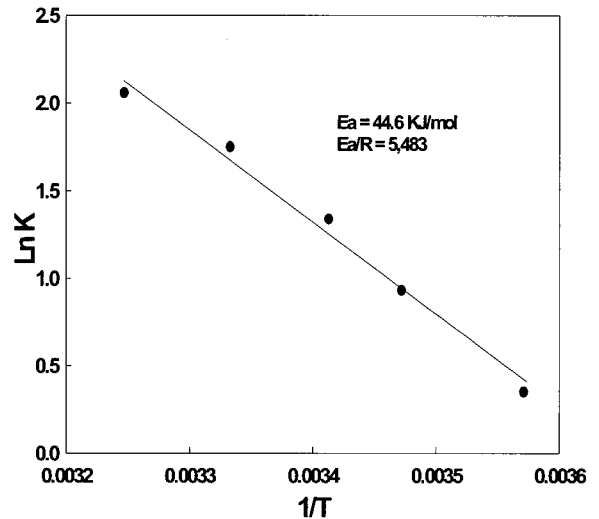


Fig. 7. Determined activation energy using enriched nitrifier (*Nitrobacter*).

임을 알 수 있었다. 결과적으로 온도에 따라 두 개의 활성화에너지를 갖는다는 것은 질산화 반응시 관계하는 효소가 2개 이상임을 의미하며 각각 효소반응의 제한 온도가 다를 수 있다. 따라서 겨울철 저수온에서 양어장사육수 및 순환수를 처리하는 과정에서 질산화 반응이 정지되는 현상으로 설명될 수 있다. 그러므로 질산화와 수반되는 질소를 처리하기 위해서는 온도를 15°C 이상으로 유지해야 효과적인 처리효율을 기대할 수 있을 것으로 사료되며 온도의 조절이 없는 경우는 질산화반응을 완료하기 위해 반응조의 수리학적 체류시간을 증가시켜야 한다.

Fig. 6은 온도변화에 따른 암모니아성 질소농도의 감소를 관찰함과 동시에 질산염 농도의 증가를 보여주고 있다. 이를 질산화 미생물의 단위무게 당 질산염( $\text{NO}_3\text{-N}$ )의 생성속도를

구하여 Arrhenius식에 대입하여 활성화에너지 ( $E_a$ )값을 산정하였다 (Fig. 7). 온도 6-35°C 범위에서 양어장사육수의 질산화 미생물과 동일하게 하나의 직선적인 기울기 값을 얻었다. 이때 활성화에너지 값은 44.6 KJ/mol로 양어장사육수내 질산화 미생물의 활성화에너지값 (33.0 KJ/mol)보다 다소 큰 것으로 나타났다. 이는 하천수내의 질산화 미생물이 질산화 반응시 필요로 하는 임계에너지가 상대적으로 작음을 의미하며 온도에 대한 적응성이 다소 큰 것으로 판단된다.

참고 문헌

Alleman, J.E., V. Keramida and L. Pantea-Kiser. 1987. Light induced nitrosomonas inhibition. Wat. Res., 22,

- 499-504.
- Bitton, G. 1994. Wastewater Microbiology. Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 478.
- Boon, B. and H. Landelout. 1962. Kinetics of nitrate oxidation by nitrobacter Winogradskyi. J. Biochem., 85, 440-447.
- Kim, I.B. 1980. Pilot scale fish production in water recycling system. J. Kor. Fish. Soc., 13(4), 187-194. (in Korean)
- Laudelout, H. 1974. Effect of temperature on the velocity of oxidation of ammonia to nitrite in mixed nitrifier culture. Ann. Microbiol., 125(B), pp. 75.
- Lee, B.H., H.C. Kim and J.S. Kim. 1999. Water treatment recirculating aquaculture culture system by using three phase fluidized bed reactor. 1999, Spring Joint Meeting of the Korean Societies on Fisheries Science. pp. 359-360. (in Korean)
- Lee, S.I., I.S. Seo., S.K. Park and J.H. Lee. 1995. Effect of temperature and toxic substances on the activity of the activated sludge. J. Kor. Soc. Environ. Eng., 17(12), 1235-1244.
- Nijhof, M. and J. Bonverdeur. 1990. Fixed film nitrification characteristics in sea-water recirculating fish culture system. J. Aquacult., 87, 831-849.
- Oh, S.Y., J.Y. Joe and J.M. Kim. 2003. Effect of rotational speed and hydraulic retention time on the ammonia removal of a rotating biological contactor (RBC). J. Aquacult., 16(3), 142-150. (in Korean)
- Park, J.H., W.H. Lee., K.S. Cho and G.D. Hwang. 2003. Nitrification and denitrification by using a sequencing batch reactor system. J. Kor. Fish. Soc., 36(3), 247-253. (in Korean)
- Partiquin, D.G. and R. Knowles. 1972. Nitrogen fixation in the rhizosphere of marine angiosperm. Mar. Biol., 16, 49-58.
- Quinlan, A.V. 1980. The thermal sensitivity of nitrification as a function of the concentration of nitrogen substrate. Wat. Res., 14, 1501-1507.
- Rogers, G.L. and S.L. Klemetson. 1985. Ammonia removal in selected aquaculture water reuse biofilters. Aquacult. Eng., 4, 135-154.
- Seitzinger, S.P. and J.H. Garber. 1987. Nitrogen fixation of the acetylene reduction assay in coastal marine sediments. Mar. Ecol. Prog. Ser., 37, 65-73.
- Skinner, F.A. and N. Walker. 1961. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. Arch. Microbiol., 38, 330-339.
- Smith, R.L. and J.H. Duff. 1988. Denitrification in a sand and gravel aquifer. Appl. Environ. Microbiol., 54(5), 1071-1078.
- Timmons, M.B. 1994. System carrying capacity and flow estimation, In: Aquaculture Water Reuse System: Engineering Design and Management. Timmons, M. B. and T.M. Losordo, eds. Elsevier, Amsterdam, pp. 252.
- Woen, S.Y. 1999. Effect of environmental parameters on nitrification. Ph.D. Thesis, Chungbuk Natl. Univ., pp. 151. (in Korean)

---

2003년 10월 18일 접수

2004년 1월 20일 수리