



# 폐수 내 고농도 free ammonia(FA)가 미세조류의 성장 및 기질제거에 미치는 영향 평가

## Effect of high free ammonia concentration on microalgal growth and substrate uptake

김은지<sup>1</sup>·조재형<sup>1</sup>·노경호<sup>1</sup>·남귀숙<sup>2</sup>·황선진<sup>1\*</sup>

Eun-ji Kim<sup>1</sup>·Jae Hyung Cho<sup>1</sup>·Kyung Ho Noh<sup>1</sup>·Nam guisook<sup>2</sup>·Sun-Jin Hwang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>경희대학교 공과대학 환경학 및 환경공학과, <sup>2</sup>한국농어촌공사 농어촌연구원

<sup>1</sup>Department of Environmental Science and Engineering, Kyung Hee University, <sup>2</sup>Korea Rural Community Corporation

### ABSTRACT

This study investigated the effect of high concentration of free ammonia on microalgal growth and substrate removal by applying real wastewater nitrogen ratio. To test of this, the conditions of free ammonia 1, 3, 6, 9, 12, 15 mg-N/L are compared. After 3 days of incubation, algal growth of *Chlorella vulgaris* and carbon removal rate are respectively lower in the reactors of FA 12, 15 mg-N/L compared to the others. This indicates that the high concentration of free ammonia, in this case, above 12 mg-N/L, has negative effect on algal growth and metabolic activity. Also, high concentration of free ammonia causes the proton imbalance, ammonium accumulation in algae and has toxicity for these reasons. So, we have to consider free ammonia in applying the microalgae to wastewater treatment system by the way of diluting wastewater or controlling pH and temperature.

**Key words:** Ammonium accumulation, *Chlorella vulgaris*, Free ammonia inhibition, Microalgae, Proton imbalance,

**주제어:** 암모늄축적, 클로렐라 불가리스, free ammonia 저해, 미세조류, 양이온 불균형

## 1. 서 론

1996년부터 공공하수처리시설의 방류수 수질기준 항목에 질소, 인이 추가되었으며, 최종 개정된 방류수 수질기준은 처리수를 I 지역 (하수처리용량 500 m<sup>3</sup>/day 이상)에 방류하는 경우 총질소 20, 총인 0.2 mg-N/L로 규제하고 있다(MOE, 2012). 이와 같이 방류수 수질기준이 나날이 엄격해지고 있어, 기존 처리 공법만으로 해당 기준을 만족시키기에는 한계가 따른다. 따라서 질소 및 인의 제거 효율을 월등히 높일 수 있는 기존 공법의 개선이나 새로운 공법 개발이 필요한 상황이다.

새로운 고도처리공법으로 미세조류를 적용하는 방식이 활발히 연구되고 있다. 미세조류는 질소, 인에 대해 높은 체내 흡수율을 가지므로, 이러한 측면을 이용하여 높은 제거 효율을 기대할 수 있다(L. TRAVIESO et al., 2006; Wilkie and Mulbry, 2002). 더욱이 미세조류는 자연계에 존재하는 태양광이나 수중 영양염류(Nitrogen and phosphorus)를 이용하여 성장 가능하다는 점과 유용 바이오매스로써 가지는 부가가치성 때문에 효과적인 하폐수 고도처리 방법 중 하나로 인정받고 있다(De la Noue and De Pauw, 1988).

한편, 하천 및 호소의 부영양화는 질소, 인과 같은 영양염류가 충분히 처리되지 않고 고농도로 방류되어 발생한다. 이러한 영양염류를 다량 포함하는 대표적인 폐수에는 생활하수로 취급되는 음폐수와 가축분뇨로

Received 28 November 2016, revised 11 December 2016, accepted 12 December 2016

\*Corresponding author: Sun-Jin Hwang (E-mail: sjhwang@khu.ac.kr)

pp. 623-634  
pp. 635-643  
pp. 645-652  
pp. 653-662  
pp. 663-671  
pp. 673-682  
pp. 683-690  
pp. 691-698  
pp. 699-705  
pp. 707-714  
pp. 715-723  
pp. 725-736  
pp. 737-744  
pp. 745-753  
pp. 755-764

발생되는 축산폐수가 있다.

음폐수와 축산폐수는 고농도 유기물 및 영양물질로 이루어져 있으며, 발생량이 매년 증가하고 있는 추세이다. 또한 폐수 배출량은 전국에서 배출되는 총 폐수의 일부에 불과하지만, 그에 비해 오염 부하량은 전체의 상당량을 차지할 정도로 오염이 심각하다(MOAF and MOE, 2004). 특히, 2013년부터 폐수의 해양배출이 전격 금지되면서 육상처리 기술 개발이 더욱 필요해졌고, 그러므로 고농도 폐수를 높은 효율로 처리할 수 있는 방안이 요구되는 실정이다.

이에 본 연구에서는 축산 및 음폐수 처리에 미세조류의 적용 가능성을 검토하고자 한다. 본 폐수 성분에는 공통적으로 다량의 유기물 및 암모니아가 존재한다. 미세조류는 유기물이 존재하는 폐수에서 혼합영양(mixotroph) 대사방식을 택하게 되고, 이는 독립영양(autotroph) 및 종속영양(heterotroph)을 동시·선택적으로 대사할 수 있다고 알려져 있다. 또한 이는 각 단일 기작보다 성장에 효율적인 대사 기작으로 알려져 있다(Lalucat, J. et al., 1984; Katarzyna, C. et al., 2004). 그러므로 고농도 유기물을 함유한 본 폐수 처리에 미세조류의 적용이 탁월할 것으로 판단된다.

한편, 폐수 내 존재하는 고농도의 암모니아는 미세조류 성장을 촉진할 수 있다. 미세조류는 성장에 필요한 아미노산, 핵산, 엽록소 및 질소 함유 유기화합물을 합성하기 위해 질소원을 요구하고, 이 과정에서 원수의 질소가 제거되기 때문이다. 그러나 암모니아는 온도 및 pH에 따라  $\text{NH}_4^+$ (암모늄이온; ammonium ion)와  $\text{NH}_3$ (유리암모니아; free ammonia; FA) 형태로 균형을 이루며 존재하는데, 이 중 고농도의  $\text{NH}_3$ (free ammonia)는 미세조류의 광합성에 부정적인 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다(A. Abeliovich and Y. Azov, 1976; Y. Azov and JOEL C. Goldman; 1982). 그러므로 해당 폐수처리에 미세조류의 적용 가능성을 평가하기 위해서는 조류에 독성을 미칠 수 있는 free ammonia(FA)의 농도에 따른 검토가 반드시 필요하다.

이에 본 연구에서는 free ammonia(FA) 농도에 따라 미세조류에 미치는 영향을 파악하고자 하였다. 현장의 상황을 반영하여 mixotrophic 대사로 운전하였으며, 혐기 소화를 거친 음폐수의 일반적인 질소 비율을 고려하여, 총 암모니아(total ammonia)와 질산성 질소(nitrate)의 농도를 설정하였다. 미세조류 *Chlorella vulgaris* 종을 이용하여 성장량 및 기질 제거에 영향을

미치는 free ammonia(FA) 농도를 도출하였으며, 고농도 FA 환경에서 발생하는 저해 기작을 연구하였다.

## 2. 연구방법

### 2.1 미세조류 배양

본 연구에서는 mixotrophic 대사를 수행할 수 있으며, 다른 종과 비교하여 C, N, P 제거능이 탁월한 것으로 알려진 *Chlorella vulgaris* 종을 연구 대상으로 선정하였다. *Chlorella vulgaris*는 KCTC Korea (Korean collection for type culture)에서 분양받았으며 BG11 배지를 이용하여 배양하였다. BG11 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다. 항온 챔버 및 pH controller를 이용하여 온도 25°C, pH 7.5±0.5를 유지한 환경에서 200 PPFD (L:D=24:0) 광도의 LED를 조사해주었으며, 100 rpm의 속도로 교반하여 배양하였다.

Table 1. Composition of BG11 medium

| BG11 medium  |               |        |
|--|---------------|--------|
| Ingredient   | Concentration | Dosage |
| NaNO <sub>3</sub>                                    | 30g/200ml     | 10ml   |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 1.5g/200ml    | 10ml   |
| K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                       | 0.8g/200ml    | 10ml   |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                 | 0.72g/200ml   | 10ml   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                      | 0.4g/200ml    | 10ml   |
| Citric acid  | 0.12g/200ml   | 10ml   |
| Ferric ammonium citrate                              | 0.24g/200ml   | 5ml    |
| EDTA   | 0.04g/200ml   | 5ml    |
| Trace  |               | 1ml    |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                 | 0.222g        |        |
| MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O                 | 1.81g         |        |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                 | 0.079g        |        |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O | 0.049g        |        |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.39g         |        |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                       | 2.86g         |        |
| Distilled water                                      | 1L            |        |
| Distilled water                                      |               | 1L     |

### 2.2 Free ammonia 농도 산출 및 선정

수중의 총 암모니아는 온도 및 pH에 따라  $\text{NH}_4^+$ (암모늄이온; ammonium ion)와  $\text{NH}_3$ (유리암모니아; free ammonia; FA)의 적정 비율로 존재하며, 같은 양의 암모니아가 존재할 때는 온도, pH가 높을수록 FA 농도



가 증가한다. 전체 암모니아 농도에 따른 NH<sub>3</sub>-N(FA) 농도 산출은 Equation(1)을 통해 계산하였고(Poggi-Valardo, H.M. et al., 1997; Hamed M. El-Mashad et al., 2004), 이 식에 따라 초기 FA 농도 조건은 1, 3, 6, 9, 12, 15 mg-N/L로 설정하였다.

$$NH_3 - N = Total\ ammonia \quad (Eq. 1)$$

$$\times \left[ 1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-(0.1075 + \frac{2725}{T})}} \right]^{-1}$$

### 2.3 실험방법

기본 성분은 BG11 배지를 이용하였으나, 탄소, 질소 및 인 등의 주요 기질은 실험 조건에 맞추어 농도를 변경하였다. Mixotrophic 조건을 조성하기 위하여 무기·유기탄소를 모두 주입하였으며, 각각 NaHCO<sub>3</sub> 0.5, glucose 2.5 g-C/L를 탄소원으로 하였다. 초기 NH<sub>3</sub>-N 농도 조건은 1, 3, 6, 9, 12, 15 mg-N/L로 설정하였으며, 암모늄이온(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N)은 132 mg-N/L로 모든 조건에 동일하게 적용하였다. 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N; nitrate)는 수도권 매립지의 음폐수 혐기소화액 유출수 분석결과인 ammonia(NH<sub>3</sub>+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) : nitrate(NO<sub>3</sub>-N) = 7 : 3 비율을 고려하여(Greenpla; 그린프라(주), 2013) 60 mg-N/L로 설정하였다. 인산염 인(PO<sub>4</sub>-P) 농도는 총 질소의 1/10으로 설정하였다.

원통형 아크릴 반응조에서 working volume 1 L로 실험하였다. 각기 다른 FA 농도를 설정하고 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N 농도는 모두 같게 설정하기 위하여, 반응조의 온도는 동일하지만 pH는 7.1, 7.6, 7.9, 8.1, 8.2, 8.3로 다르게 설정하였다. 이 과정에서 equation(1)을 이용하였다. 초기 *Chlorella vulgaris* 농도는 0.35 OD로 설정하였으며, 교반속도는 100 rpm, 광조건은 white LED 200 PPFD (L:D=24:0)로 운전하였다.

**Table 2.** Experimental conditions

| Reactor | pH                    | NH <sub>3</sub> -N (mg-N/L) | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N (mg-N/L) | NO <sub>3</sub> -N (mg-N/L) | Carbon (g-C/L)  |
|---------|-----------------------|-----------------------------|--|-----------------------------|---|
| Control | reactor 1-6 condition | -                           | -  | 60                          | NaHCO <sub>3</sub> 0.5<br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> 2.5 |
| 1       | 7.13                  | 1                           | 132                                      | 60                          |   |
| 2       | 7.61                  | 3                           |  |                             |   |
| 3       | 7.91                  | 6                           |  |                             |   |
| 4       | 8.09                  | 9                           |  |                             |   |
| 5       | 8.21                  | 12                          |  |                             |   |
| 6       | 8.31                  | 15                          |  |                             |   |

본 실험의 pH 조건은 단지 free ammonia 농도를 조성해주기 위한 부분으로써, 우선적으로 pH 7.1-8.3의 조건 차이가 *C.vulgaris*에 영향을 주는지 control 실험을 통해 평가할 필요가 있다. Control 실험은 pH 여섯 조건 외의 모든 조건은 동일하게 설정하였으며, 질소원은 암모니아 형태를 제외한, 질산성 질소(nitrate)만을 60 mg-N/L씩 주입하였다. 이에 따라 인산염 인(Phosphorous) 농도는 질산성 질소(nitrate)의 1/10로 재 설정하였다. 초기 *Chlorella vulgaris* 농도는 0.5 OD로 working volume을 500 ml로 하여 고농도로 실험을 수행하였으며, 탄소 및 광조건, 교반속도는 본 실험과 같이 설정하였다. 전체 실험 조건을 정리하여 Table 2에 나타내었다.

### 2.4 분석방법

미세조류의 성장량은 순수하게 조류 세포 수만을 측정하기 위해 cell density를 지표로 이용하였다. 대표적인 cell counting 기법인 혈구계수판(hemocytometer)을 이용하였으며, 단위 눈금(grid) 안에 있는 세포를 계수하여 단위 부피당 세포수로 cell density를 산출하였다.

기질 소비는 시료의 여액을 이용하여 IC(inorganic carbon), OC(organic carbon), 총 암모니아(NH<sub>4</sub>-N), 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N), 인산염 인(PO<sub>4</sub>-P)을 각각 평가하였다. 무기탄소는 총유기탄소분석기(TOC-V CSN, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 분석하였고, 유기탄소로 주입된 glucose는 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법으로 수질분석기(HS-3300, Humas, Korea)를 이용하여 575nm 파장에서 측정하였다. 총 암모니아(NH<sub>4</sub>-N)는 수질분석 kit를 이용하여 Water Analyzer(HUMAS, Korea)로 측정하였으며, 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N) 및 인산염 인(PO<sub>4</sub>-P)은 전자동수질분석기(Auto Analyzer 3, 비엘텍코리아, Korea)를 이용하여 분석하였다.

pp. 620-634

pp. 635-643

pp. 645-652

pp. 653-662

pp. 663-671

pp. 673-682

pp. 683-690

pp. 691-698

pp. 699-705

pp. 707-714

pp. 715-723

pp. 725-736

pp. 737-744

pp. 745-753

pp. 755-764

### 3. 실험결과 및 고찰

#### 3.1 Control 조건 운전 결과

본 실험에서 설정한 각기 다른 pH 조건 하에 *Chlorella vulgaris*를 배양할 때 최종 성장량 및 기질 제거능에 유의한 차이가 있는지 알아보려고 하였다. 운전 2.5 day 간 cell density 변화 및 영양염류 N, P 소비량은 다음과 같다(Table 3).

pH가 모두 다른 조건에서 성장 및 영양염류 제거에 유의한 차이가 없었다. 따라서 본 실험에 FA 농도 조건을 설정하기 위해 조절한 pH (7.1-8.3) 구간에서는 pH에 따른 미세조류의 영향이 없는 것으로 보이며, 본 실험을 수행하기에 적합한 것으로 판단된다.

#### 3.2 FA 농도에 따른 성장량

초기 FA 1, 3, 6, 9, 12, 15 mg-N/L의 조건에서 운전 하였을 때, 성장량 변화는 다음과 같다(Fig. 1).

FA 1 조건에서 *Chlorella vulgaris*의 cell density가 가장 크게 증가하였고, 이는 free ammonia로 인한 독성이

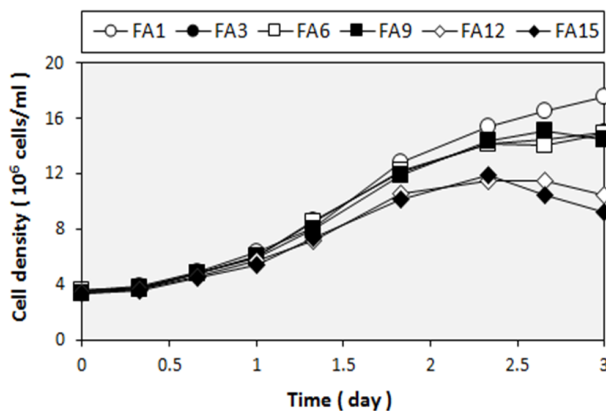


Fig. 1. The effect of free ammonia concentrations on algal cell density.

Table 3. Algal growth and substrate removal of Control experiment

| pH  | Cell density (10 <sup>6</sup> cells/ml) | NO <sub>3</sub> -N (mg-N/L) | PO <sub>4</sub> -P (mg-P/L) | Inorganic carbon (g-C/L) | Organic carbon (g-C/L) |
|-----|---|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------|
| 7.1 | 30.6                                    | 60.0                        | 17.7                        | 0.47                     | 1.6                    |
| 7.6 | 32.2                                    | 59.1                        | 17.4                        | 0.47                     | 1.4                    |
| 7.9 | 32.6                                    | 59.5                        | 17.6                        | 0.42                     | 1.5                    |
| 8.1 | 31.1                                    | 60.0                        | 18.2                        | 0.43                     | 1.3                    |
| 8.2 | 30.9                                    | 60.0                        | 17.8                        | 0.44                     | 1.2                    |
| 8.3 | 31.2                                    | 59.8                        | 18.1                        | 0.45                     | 1.2                    |

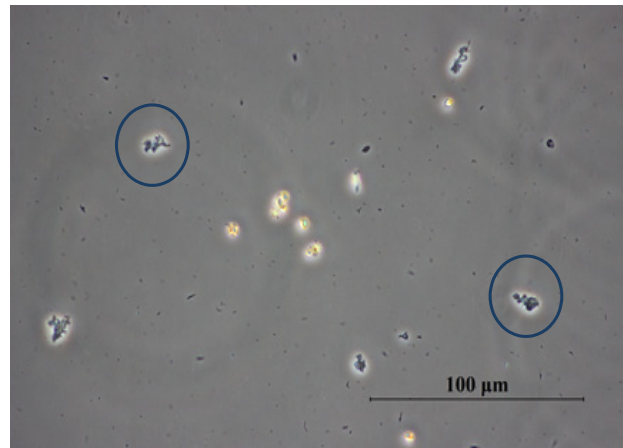


Fig. 2. *Chlorella vulgaris* in FA 15 after 3 days (microscope, ×100)

거의 없는 최적 환경으로 가장 높은 성장률을 보인 것으로 판단된다. 반대로 FA 12 및 FA 15 조건에서는 조류의 성장이 저조하게 나타났으며, 운전 종료 시점에서는 오히려 생체량이 감소하는 추세를 나타냈다. 운전 종료 시점에서 FA 15 조건에서는 현미경 상으로 사멸한 조류의 껍질이 다수 관찰되기도 하였다(Fig. 2).

따라서 *Chlorella vulgaris*는 FA 12 mg-N/L이상의 농도 환경에서 고농도 free ammonia로 인해 성장 저해를 받은 것으로 판단된다.

#### 3.3 FA 농도에 따른 기질 소비

##### 3.3.1 유·무기탄소 소비

초기 FA 농도에 따른 *Chlorella vulgaris*의 유·무기탄소 소비량은 다음과 같으며, 단위세포 당 탄소 소비를 함께 나타내었다(Fig. 3, 4).

FA 1-9 mg-N/L 조건에서 *Chlorella vulgaris*의 단위세포 당 총 탄소 소비 속도는 79.0-88.4 mg-C/10<sup>9</sup>cells/day로 비교적 유사하게 도출되었으나, 고농도 FA 조건인

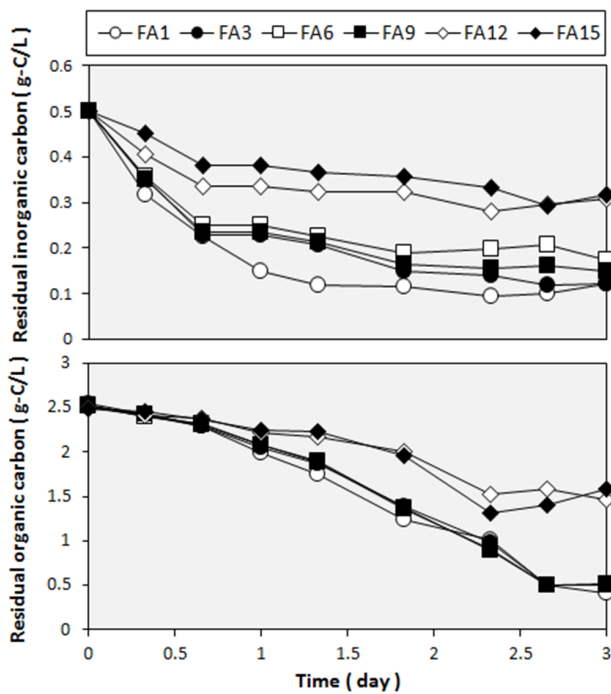


Fig. 3. Inorganic and organic carbon removal by FA concentration

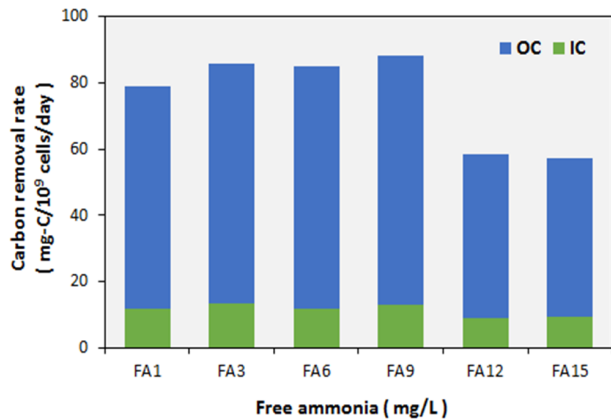


Fig. 4. Carbon consumption rate according to free ammonia concentrations

12, 15 mg-N/L에서는 각각 58.5, 57.1 mg-C/10<sup>9</sup>cells/day로 성장량과 마찬가지로 총 탄소 소비에도 저해를 받은 것으로 나타났다.

유기탄소 및 무기탄소 소비를 별개로 비교하였을 때, 모두 FA 12 mg-N/L의 농도에서부터 탄소 소비에 저해를 받았다. 따라서 고농도 free ammonia는 조류 *Chlorella vulgaris*가 유기탄소를 대사하는 heterotrophic, 무기탄소를 소비하는 autotrophic 대사에 모두 저해를 일으키는 것으로 사료된다.

Gallert C. et al.(1998)에 따르면, 미생물은 고농도 free ammonia에 노출되면 세포 내·외부의 proton imbalance (양이온 불균형)이 발생하게 되는데, 이를 회복하기 위해 에너지를 세포 성장에 이용하지 못하게 되는 것으로 보고된 바 있다. 해당 저해 기작은 질소 대사에서 진행되는 것으로, 조류에서는 autotrophic 및 heterotrophic 대사에 모두 영향을 미칠 수 있다.

이에 더하여, 고농도의 free ammonia는 광합성 생물의 활성에 영향을 주는 것으로도 알려져 있다. 광합성 기작 중 명반응 과정에 관여하는 photosystem II는 물을 산화하여 산소를 방출하는 역할을 한다(Bruce A Diner, 2001; Kristina N. Ferreira et al., 2004). 고농도 FA는 이러한 photosystem II의 기능 손상을 일으킬 수 있으며, PS II의 역할인 물의 광분해 작용을 방해하여 autotrophic 대사를 직접 저해할 수 있다고 발표된 바 있다(Miriam Drath et al., 2008).

### 3.3.2 질소 및 인 소비

초기 FA 농도에 따른 미세조류의 질소(총 암모니아 및 질산성 질소), 인(인산염 인) 소비는 다음과 같다 (Fig. 5).

미세조류 *Chlorella vulgaris*는 모든 조건에서 질소원으로 총 암모니아(NH<sub>4</sub>-N)를 소비한 후, 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N)를 이용하였다. 이는 미세조류의 암모늄에 대한 preference와 암모늄에 의한 질산염 흡수 inhibition 기작에 의한 결과이다.

'Preference' 기작은 질산성질소(nitrate)에 비해 암모니아(ammonia)의 이용이 에너지 측면에서 유리하기 때문에 발생한다(Richard C. Dugdale et al., 2007). Fig. 6에서 보듯이 미세조류는 암모늄 이온(ammonium) 형태의 질소원을 체내에서 이용하기 때문에, 질산성 질소(nitrate)가 이용되기 위해서는 추가 환원 단계를 거쳐야 한다. 그러므로 미세조류는 환원 단계 없이 바로 이용할 수 있는 암모니아를 질소원으로 선호하는 경향이 있다.

암모니아에 의한 질산염 흡수의 'Inhibition'은 미세조류 종 구성이나 광원 등의 다른 환경요인에 따라 매우 다양하게 발생한다(Rita B. Domingues et al., 2011). 대표적인 요인으로 암모니아 농도에 따른 Moco(Molybdenum cofactor)의 활성이 있다. Fig. 6에서 보듯이 질산성 질소(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)가 아질산성 질소(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)로 환원될 때 질산환원효소(nitrate reductase)가 관여하는데,

pp. 620-634

pp. 635-643

pp. 645-652

pp. 653-662

pp. 663-671

pp. 673-682

pp. 683-690

pp. 691-698

pp. 699-705

pp. 707-714

pp. 715-723

pp. 725-736

pp. 737-744

pp. 745-753

pp. 755-764

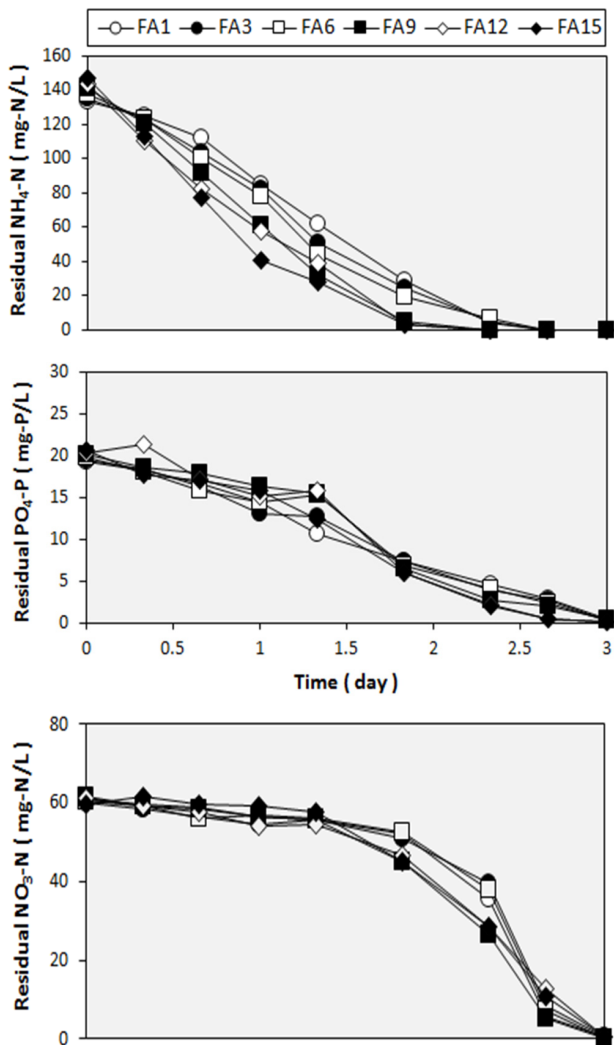


Fig. 5. Nutrients(NH<sub>4</sub>-N, NO<sub>3</sub>-N, PO<sub>4</sub>-P) removal by free ammonia concentrations

해당 효소는 NADH-diaphorase와 FNH<sub>2</sub>-reductase로 분류된다. *Chlorella*를 대상으로 한 연구에서 FNH<sub>2</sub>-reductase는 암모니아가 과다하면 빠르게 비활성화 되어 nitrate uptake에 저해를 일으키는 것으로 보고된 바 있다(M. Losada et al., 1970; Carmelo Rigano and Umberto Violante, 1973). 보다 구체적으로는, molybdenum을 흡수하여 만들어지는 체내의 Moco 활성화와 관련 있다. Miguel R. Aguilar et al.(1991)에 따르면, 다른 질소원과 비교하여 암모니아가 존재할 때 Moco level이 저하됨이 밝혀졌다. 이 때, Moco domain이 필요하지 않은 NADH-diaphorase 효소의 활성은 바뀌지 않으나, Moco domain을 필요로 하는 FNH<sub>2</sub>-reductase 효소의 활성에는 영향을 주어 비활성화 상태로 만드는 것이다.

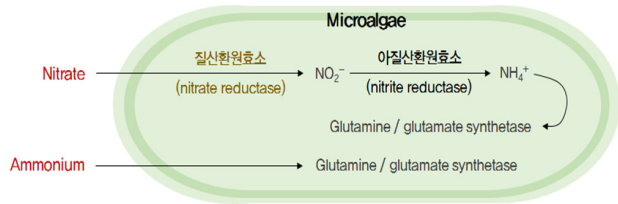


Fig. 6. Assimilation of nitrate and ammonium in algae

그러나 암모니아가 일정 수준 이하의 농도로 남게 되면, FNH<sub>2</sub>-reductase의 활성이 회복되고 질산성 질소(nitrate) 소비는 다시 활발해진다. 본 실험 결과에서도 총 암모니아(total ammonia)가 소비되고 농도가 낮아지면서 질산성 질소(nitrate) 소비가 시작되는 것을 확인할 수 있다.

한편 앞서 나타난 결과로, 고농도 free ammonia 조건에서 성장 및 탄소 소비에 저해가 나타난 반면, 영양염류인 총 암모니아 및 인의 소비는 오히려 증가하였다. 탄소 및 질소, 인은 함께 조류 대사에 이용되어 소비 패턴이 유사하게 나타나는 것이 일반적이나, 본 연구 결과, 고농도 FA로 인해 탄소 소비는 저해되었지만 암모니아 소비는 더욱 빠르게 진행되었다. 본 현상은 FA가 세포 내로 확산되면서 발생하는 proton imbalance 및 pH 변화로 인한 암모늄 이온(ammonium)의 축적에 의한 결과로 추측된다.

Free ammonia(NH<sub>3</sub>)는 지용성으로, 이온 상태인 암모늄 이온(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>)보다 미생물의 cell 내부로 쉽게 확산되는 성질을 갖는다. 따라서 미생물이 고농도 FA 환경에 노출되면 NH<sub>3</sub>가 빠르게 세포 내부로 확산되어 들어온다. 수중에서 pH 및 온도 등의 요인에 의해 NH<sub>3</sub> : NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 존재 비율이 결정되는 것처럼 세포 내부도 마찬가지로 일정한 암모니아 비율을 유지하고자 하며, 따라서 미생물은 다량 유입된 NH<sub>3</sub>의 일부를 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 형태로 바꾸어 평형을 이루고자 한다. 이 때, NH<sub>3</sub>는 세포 외부에 존재하는 H<sup>+</sup>(수소이온)을 끌어와 이용하면서 세포 안팎으로 proton imbalance(양이온 불균형)이 발생하게 된다. 이로 인해 세포 내부의 K<sup>+</sup>가 외부로 이동하는 칼륨 역수송 또한 일어난다(HONG LIN and DAVID RANDALL, 1991; Gallert C. et al., 1998; Rajinikanth Rajagopal et al., 2013) (Fig. 7).

이렇듯 무너진 세포 안팎의 균형을 회복하기 위해, 세포는 생성된 에너지를 계속적으로 이용하게 되면서 암모니아를 다량 소비하게 된다. 또한 미생물은 에너지를 온전히 세포 성장에 이용하지 못하고 불균형을

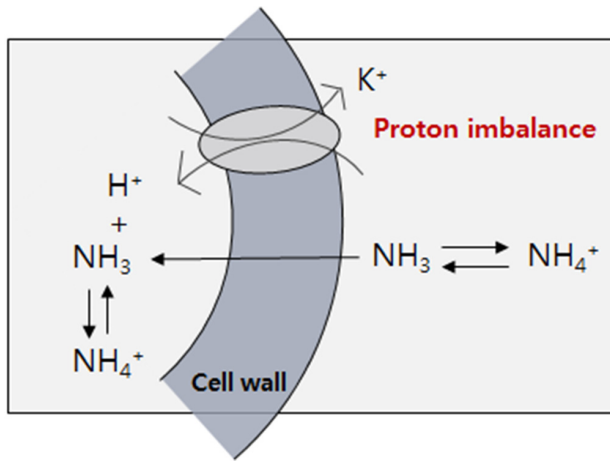


Fig. 7. Free ammonia entering into the cell by diffusion and occurrence of proton imbalance

회복하는 데 씬으로써, 자체의 성장에도 부정적 영향을 미친다. 이 과정에서 세포 밖의 수소 이온을 소모하면 세포 내부의 pH가 외부에 비해 낮아지게 되는데, 이 때 투과효소를 통해 외부의 암모늄 이온 또한 내부로 과다 이동하여 축적될 수 있다(PRIYA C. KADAM and DAVID R. BOONE, 1996; Baris Calli et al., 2005). Ammonium의 세포 내 과다 이동으로 영양염류가 바로 이용되지 못하면 세포 내부에 축적되기 시작하고, 질산성 질소(nitrate)와 달리 암모늄 이온(ammonium)의 축적은 세포에 손상을 줄 수 있다고 알려져 있다(JUNE M NEVIN and CAROL J LOVATT, 1987).

그러므로 총 암모니아(NH<sub>4</sub>-N)와 질산성 질소(NO<sub>3</sub>-N)의 소비를 분류하여 고려하면, 고농도 FA 조건에서 총 암모니아(total ammonia) 소비가 비교적 빠르게 진행되었으므로 이어 발생하는 질산성 질소(nitrate) 소비 또한 저농도의 FA 조건보다 빠르게 시작되었다. 이렇듯 질산성 질소(nitrate) 소비 측면에서 시간의 지연은 발생하였지만, 질산성 질소의 제거 속도에는 조건 간 유의한 차이가 발견되지 않았다. M. Losada et al.(1970)가 발표한 연구 결과와 같이, 녹조류의 경우 NR(nitrate reductase)의 second step인 FNH<sub>2</sub>-reductase의 활성은 가역적이며, 암모니아가 적정 수준 이하까지 소비되면 본 효소 활성이 빠르게 회복되어 질산성 질소(nitrate)를 소비할 수 있는 것으로 판단되기 때문이다.

인의 소비는 free ammonia 조건 간 소비속도 차이가 크지 않았으나, 고농도 FA 조건인 12, 15 mg-P/L 조건에서 속도가 다소 빠른 것으로 보아 *Chlorella vulgaris*

의 인 소비는 탄소보다는 질소 소비에 크게 영향을 받는 것으로 사료된다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 고농도의 질소·인을 함유한 폐수 처리에 미세조류를 적용하는 공법이 효율적일 것으로 판단하고, 본 폐수 처리에 미세조류 적용의 타당성을 검토, 그 가운데 폐수의 주요 특성인 고농도 free ammonia에 의한 영향을 평가하였다.

연구 결과, free ammonia 12 mg-N/L 이상의 농도에서 미세조류 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 탄소 소비 저해가 발생하며, autotrophic 및 heterotrophic 기작에 모두 영향을 받는 것으로 나타났다. 그러나 총 암모니아 소비는 성장량 및 탄소 기질 제거와는 다르게 고농도 free ammonia 환경에서 더 빠르게 진행되었으며, 이는 미세조류 내부로의 free ammonia 확산으로 인해 발생하는 proton imbalance 및 ammonium 과다 축적의 결과로 사료된다. 또한 두 가지 현상은 조류 세포 성장을 저해하는 기작으로 작용하기도 한다.

종합적으로 *C.vulgaris*가 12 mg-N/L 이상의 고농도 free ammonia에 노출될 시 질소 및 인의 소비가 확연히 증가하였지만, 이는 실제로 조류가 이용한 영양염류가 아니며 결론적으로는 성장 및 활성에 부정적 영향을 미치는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 12 mg-N/L 이상의 free ammonia(유리 암모니아)를 함유한 폐수 처리에 미세조류를 적용할 시, 장기적으로 조류 생체량 유지 및 활성에 문제가 발생하여 오히려 조류 사멸로 인한 질소, 인의 방출이 우려된다.

따라서 매우 높은 영양염 농도를 함유한 폐수 처리에 미세조류를 적용한 공법을 설계하고자 할 때, 진단에 희석 과정이나 온도 및 pH를 조절하는 과정을 통하여 free ammonia를 적정수준 아래로 낮출 필요가 있다. 특히 수처리 및 에너지 생산에 대표적으로 이용되는 *Chlorella vulgaris*의 경우, 적정 free ammonia 농도는 12 mg-N/L 미만인 것으로 판단된다.

#### 사 사

본 논문은 한국농어촌공사 기본연구과제인 “미세조류를 이용한 오염하천 수처리 및 조류자원화 기술개발”의 일환으로 수행되었기에 감사를 표합니다.

pp. 623-634

pp. 635-643

pp. 645-652

pp. 653-662

pp. 663-671

pp. 673-682

pp. 683-690

pp. 691-698

pp. 699-705

pp. 707-714

pp. 715-723

pp. 725-736

pp. 737-744

pp. 745-753

pp. 755-764

## References

- A. Abeliovich and Y. Azov (1976) Toxicity of ammonia to algae in sewage oxidation ponds. *Applied Environmental Microbiology*, 31(6), 801-806
- Baris Calli, Bulent Mertoglu, Bulent Inanc, Orhan Yenigun (2005) Effects of high free ammonia concentrations on the performances of anaerobic bioreactors. *Process biochemistry*, 40, 1285-1292
- Bruce A Diner (2001) Amino acid residues involved in the coordination and assembly of the manganese cluster of photosystem II. Proton-coupled electron transport of the redox-active tyrosines and its relationship to water oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1503(1-2), 147-163
- Carmelo Rigano, Umberto Violante (1973) Effect of nitrate ammonia and nitrogen starvation on the regulation of nitrate reductase in *Cyanidium caldarium*. *Archives of Microbiology*, 90, 27-33
- De La Noue and De Pauw (1988) The Potential of Microalgal Biotechnology: a Review of Production and Uses of Microalgae. *Biotechnologia de Microalgas*, 6, 725-770
- Gallert C., Bauer S., Winter J. (1998) Effect of ammonia on the anaerobic degradation of protein by a mesophilic and thermophilic biowaste population. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(4), 495-501
- Greenpla (2013) The composition of digested food waste leachate into wastewater treatment plant of SUDOKWON landfill 2011-2013.
- Hamed M. El-Mashad, Grietje Zeeman, Wilko K.P. van Loon, Gerard P.A. Bot, Gatzke Lettinga (2004) Effect of temperature and temperature fluctuation on thermophilic anaerobic digestion of cattle manure. *Bioresource Technology*, 95(2), 191-201
- HONG LIN and DAVID RANDALL (1991) Evidence for the presence of an electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. *Journal of experimental biology*, 161, 119-13
- JUNE M NEVIN, CAROL J LOVATT (1987) Demonstration of ammonia accumulation and toxicity in avocado leaves during water-deficit stress. *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, 10, 51-54
- Katarzyna, C., Facundo-Joaquin, M.-R. (2004) Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnology*, 3(1), 21-34
- Kristina N. Ferreira, Tina M. Iverson, Karim Maghlaoui, James Barber, So Iwata (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303(5665), 1831-1838
- Lalucat, J., Imperial, J., Pares, R. (1984) Utilization of light for the assimilation of organic matter in *Chlorella* sp. *VJ79. Biotechnology and Bioengineering*, 26(7), 677-681.
- L.TRAVIESO, F.BENITEZ, E.SANCHEZ, R.BORJA, M.F.COLMENAREJO (2006) Production of Biomass (Algae-Bacteria) by Using a Mixture of Settled Swine and Sewage as Substrate. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 41, 415-429
- Miguel R. Aguilar, Jacobo Cardenas, Emilio Fernandez (1991) Regulation of molybdenum cofactor species in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta.*, 1073(3), 463-9
- Miriam Drath, Nicole Kloft, Alfred Batschauer, Kay Marin, Jens Novak, and Karl Forchhammer (2008) Ammonia Triggers Photodamage of Photosystem II in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Plant Physiology*, 147(1), 206-215
- M. Losada, A. Peneque, P.J. Aparicio, J. Mvega, J. Cárdenas, J. Herrera (1970) Inactivation and repression by ammonium of the nitrate reducing system in *Chlorella*. *biochemical and biophysical research communications*, 38, 4, 1009-1015
- MOAF and MOE (2004) Recycling and Management of the Livestock Manure. Ministry of Agriculture and Forestry (MOAF) and Ministry of Environment (MOE)
- MOE(Ministry of Environment) (2012) The effluent standard of wastewater treatment plant
- Poggi-Varaldo, H.M., Rodriguez-Vazquez, R., Fernandez-Villagomez, G., Esparza-Garcia, F. (1997) Inhibition of mesophilic solid substrate anaerobic digestion by ammonia nitrogen. *Applied microbiology and biotechnology*, 47, 284-291
- PRIYA C. KADAM, DAVID R. BOONE (1996) Influence of pH on Ammonia Accumulation and Toxicity in Halophilic, Methylophilic Methanogens. *American Society for Microbiology*, 62(12), 4486-4492
- Rajinikanth Rajagopal, Daniel I. Masse, Gursharan Singh (2013) A critical review on inhibition of anaerobic digestion process by excess ammonia. *Bioresource Technology*, 143, 632-641
- Richard C. Dugdale, Frances P. Wilkerson, Victoria E. Hogue, Albert Marchi (2007) The role of ammonium and nitrate in spring bloom development in San Francisco Bay Estuarine, *Coastal and Shelf Science*, 73, 17-29
- Rita B. Domingues, Ana B. Barbosa, Ulrich Sommer, Helena M. Galvao (2011) Ammonium, nitrate and phytoplankton





interactions in a freshwater tidal estuarine zone : potential effects of cultural eutrophication. Aquatic Sciences, 73, 331-343  
Wilkie AC, Mulbry WW. (2002) Recovery of dairy manure nutrients by benthic freshwater algae. Bioresource

Technology, 81(1), 81-91  
Y. Azov and JOEL C. Goldman (1982) Free Ammonia Inhibition of Algal Photosynthesis in Intensive Cultures. Applied Environmental Microbiology, 43(4), 735-739

|                    |                                  |
|--------------------|----------------------------------|
| pp. 623-634        | <input type="radio"/>            |
| pp. 635-643        | <input type="radio"/>            |
| pp. 645-652        | <input type="radio"/>            |
| pp. 653-662        | <input type="radio"/>            |
| pp. 663-671        | <input type="radio"/>            |
| pp. 673-682        | <input type="radio"/>            |
| pp. 683-690        | <input type="radio"/>            |
| pp. 691-698        | <input type="radio"/>            |
| pp. 699-705        | <input type="radio"/>            |
| pp. 707-714        | <input type="radio"/>            |
| <b>pp. 715-723</b> | <input checked="" type="radio"/> |
| pp. 725-736        | <input type="radio"/>            |
| pp. 737-744        | <input type="radio"/>            |
| pp. 745-753        | <input type="radio"/>            |
| pp. 755-764        | <input type="radio"/>            |