

축산분뇨 혐기성 처리수에서 미세조류의 성장특성

임병란 · 이기세* · 노성유** · 박기영**†

서울산업대학교 환경공학과

*명지대학교 환경생명공학부

**건국대학교 사회환경시스템공학과

Characteristics of Microalgal Growth on Anaerobic Effluent of Animal Waste

Byung-Ran Lim · Kisay Lee* · Seung You Noh** · Ki Young Park**†

Environmental Material Education Center, Seoul National University of Technology

*Department of Environmental Engineering and Biotechnology, Myongji University

**Department of Civil and Environmental System Engineering, Konkuk University

(Received 5 March 2008, Accepted 31 March 2008)

Abstract

Characteristics of microalgal growth was investigated using anaerobic effluent from two-phase animal waste digester as substrate. Batch experiments were carried out to investigate the effect of the initial nitrogen and phosphorus concentrations on growth of *Microcystis aeruginosa*, *Chlorella* sp. and *Euglena gracilis*. In 400 times diluted anaerobic effluent (TN 3 mg/L), single cell growth of the *Euglena gracilis* population increased twice without delay, although *Chlorella* sp. and *Microcystis aeruginosa* take over 144 hours. Similar appearance with single cell growth was observed in mixed cultures. However, microalgae population did not increase under condition of 10 times diluted influent (TP 3 mg/L) in both pure and mixed cultures, which was affected by high organic and nitrogen concentration. Logistic growth model successfully fitted to determine biokinetic parameters such as λ : lag time, μ_m : maximal specific growth rate, A: asymptote of growth.

keywords : Algae, Anaerobic effluent, Animal waste, Batch culture, Model parameters

1. 서론

축산분뇨는 1990년대 이후 들어 그 발생량이 현저하게 증가되었으며 축산폐수로 인한 환경 및 수질오염의 문제가 환경보전에 영향을 주는 인자로 대두되었다. 축산분뇨의 가장 큰 문제는 배출되는 폐수의 양은 전국에서 배출되는 폐수의 1%에 불과하지만 오염부하량은 전체의 15%를 차지할 정도로 오염이 심각하다는 점이다(농림부·환경부, 2004). 현재 규제대상 축산농가에서는 주로 퇴비화, 저장액비화 등 자원화 시설(80%)을 설치·운영하여 자체 처리하고 있고 규제미만 농가에서 배출되는 축산분뇨는 자체 퇴비화하거나, 일부는 시·군에서 운영 중인 축산폐수공공처리시설에서 처리하고 있는 실정이다. 그러나 여전히 축산폐수에 의한 오염부하도가 타 폐수에 비해 매우 높고 또한 수거·처리시스템 구축 및 인·질소의 고도처리가 미흡한 관계로 상수원, 하천 및 호소의 부영양화의 주요 원인이 되고 있다(관계부처합동, 2004). 특히 퇴비화 및 액비로의 활용은 비점오염원에 의한 부영양화의 큰 부분을 차지하고 있다.

이러한 축산분뇨를 적절하고 지속가능하게 처리하기 위해서는 여러 가지 최선의 복합기술이 필요한데, 선진국에서는 대기부분에서 축산분뇨는 고농도에 악취가 심하기 때문에 악취방지를 달성하고 에너지 자원화가 가능한 고효율의 혐기성 발효방식이 대규모 처리장을 중심으로 보편화되고 있다(羽賀, 2002; 大野와 小林, 2004; Lincoln and Earle, 1990). 특히 이 처리 방식은 현재 대규모로 진행 중인 바이오매스 활용사업과 연계되어 대규모 투자가 이루어지고 있다. 그러나 혐기성처리는 유기물의 감량과 병원균의 안정을 에너지화를 통하여 달성하는 기술로 지표수 수질오염에 직접적인 영향을 주는 부영양화 원인물질인 인·질소를 제거하지는 못한다. 따라서 선진국에서는 토지가 넓은 나라를 제외하고는 혐기성 처리수를 고도처리하는 것이 일반적이다(原田, 2001). 일본에서는 생물학적 고도처리 기술을 부가하는 경우가 많지만 우리나라는 탄소원의 부재와 운전경험의 미숙으로 공공 하수처리장에서조차 적절히 관리되지 못하고 있는 실정이고 폐바이오매스(sludge) 처분 또한 문제이다. 그런데 고도처리 방법으로 조류처리법(algal treatment)의 경우 혐기성 처리는 축산분뇨에 포함된 영양물질의 조류(algae)에 의한 이용가능성을 증대시켜 조류 생산과 같이 연계하였을 경우 시너지효과가 상당하다고 한다(Travieso et al., 2006; Wilkie and Mulbry, 2002).

† To whom correspondence should be addressed.
kypark@konkuk.ac.kr

조류처리시스템(algal treatment system)은 잘 설계된 시스템에서 조류를 배양하여 영양물질을 유용 단백질 함유 바이오매스로 전환시켜 인·질소 제거는 물론이고 부산물의 가치를 증대시키는 기술이다. 이러한 단백질 함량이 높은 조류를 동물 사료 첨가제로 사용하였을 경우 적소의 경우 오메가-3 지방산 함유량이 많은 우유를 생산하게 되어 우유의 질적 가치를 저비용으로 올리는 결과를 보였다고 한다(Nitsan et al., 1999). 동물사료 첨가제로의 사용은 적소의 예에서 뿐만 아니라 클로렐라와 같은 조류 생산품이 사람의 영양보조제로 쓰이고 있는 상황이니만큼 축산분뇨에서 회수된 조류단백질은 효모단백질을 이용한 다양한 사료첨가제에서 보듯이 여러 가지 용도로 활용될 수 있다고 생각된다(박기영과 정진영, 2003).

따라서 본 연구에서는 축산분뇨에 광범위하게 적용되는 혐기성처리 후 고도처리에 미세조류(microalgae)를 사용하기 위하여 회분실험을 통하여 기초인자를 연구하였다.

2. 연구방법

2.1. 실험재료

축산분뇨는 일반적으로 혐기성 처리후 질산화 탈질의 생물학적 처리를 거치고 최종적으로 물리화학적 산화응집처리를 거쳐 처리되는데 본 연구에서는 폐수에 존재하는 질소, 인 등의 영양물질을 조류시스템을 이용한 제어기법을 탐색하고자 식물플랑크톤을 축산분뇨의 혐기성 처리수에 적용하였다. 실험에 이용된 축산분뇨의 혐기성 처리수는 경기도 축산연구소의 양돈폐수를 이상소화한 소화액이다. 본 연구에 사용된 혐기소화 처리수의 구성성분은 Table 1과 같다.

미세조류의 종류에 따른 영양염 제어능을 확인하기 위해 남조 *Microcystis aeruginosa*와 녹조 *Chlorella* sp. 및 유글레나류 *Euglena gracilis*의 조류를 사용하여 실험하였다. 이들 세 가지 종류의 조류는 대량 배양하기 용이하며 현재 논이나 호소에서 대량 발생을 일으키는 종으로 실제 적용성을 고려하여 선택하였다. 실험에 사용된 식물플랑크톤 *Euglena gracilis* Z (SAG 1224)는 충남대학교에서 분양 받아 AF - 6 배지에서 배양하였으며, *Microcystis aeruginosa* UTEX 2388, *Chlorella* sp.는 한국생명공학연구소에서 분양 받아 Allen 배지에서 배양하였다.

2.2. 실험방법

본 연구에서는 조류를 배양하고자 현장에서 채취한 축산분뇨 혐기성소화 처리수를 10배 및 400배 희석하여 원수 초기 총인 및 총질소 농도가 각각 3 mg/L가 되도록 하여 사용하였다. 배양조건은 온도 25°C, 광도 35~40 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$,

L : D cycle = 12 hr : 12 hr에서 실시하였고, 실험을 위해 식물플랑크톤은 대수성장기 세포를 이용하였다. 대수성장기의 *Microcystis aeruginosa*와 *Chlorella* sp.는 세포들을 2000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 배지를 제거하여 300 mL의 삼각플라스크에 총 부피 150 mL의 폐수시료와 함께 초기 농도는 1×10^5 cells/mL의 농도가 되도록 주입하였다. 식물플랑크톤 중 개체 크기가 큰 *Euglena gracilis*는 초기 농도를 1×10^4 cells/mL의 농도가 되도록 주입하였다. 또한 이들 식물플랑크톤을 혼합하여 어느 식물플랑크톤이 가장 활성도가 높은가를 측정하고자 하였다. 혼합 식물플랑크톤으로는 위에서 사용한 세 가지 조류를 개체 크기 등을 고려하여 적당한 비율로 혼합하여 사용하여 실험하였다. 혼합 식물플랑크톤 실험에서는 각 조류를 2000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 배지를 제거하여 1 L 삼각플라스크에 총부피 500 mL으로 실험하였다. 식물플랑크톤의 초기 농도로 *Microcystis aeruginosa*와 *Chlorella* sp.는 1×10^4 cells/mL, *Euglena gracilis*는 1×10^3 cells/mL의 농도로 접종하였다.

실험은 3배수(triplicate)로 수행하였으며, 매 실험 시 총질산염과 총인산염을 분석하기 위하여 3 mL의 시료를 채취하였으며, 0.45 μm PP syringe filter로 여과한 후, 각각 HACH 영양염 분석 방법을 이용하였다. 식물플랑크톤은 매 실험시 1 mL의 시료를 채취하여 1% glutaraldehyde로 고정 후, Sedgwick-Rafter counting chamber를 이용하여 $\times 400$ 현미경 하에서 계수하였다. 또한 이미지 분석기(image analyzer)를 이용하여 크기를 분석하여 biomass의 점유비율 추정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 저농도 혐기성 소화액

본 연구는 양돈폐수의 혐기성 소화액에 존재하는 영양염류(질소, 인) 성분을 조류를 이용하여 처리하고자 폐수에 대한 성장 특성을 확인하기 위해 남조 *Microcystis aeruginosa*와 녹조 *Chlorella* sp. 및 *Euglena gracilis* 총 3 가지 조류를 선택하여 배양하였다. 300 mL의 삼각플라스크에 총 부피 150 mL의 실제 폐수와 함께 초기 조류의 농도는 1×10^5 cells/mL가 되도록 주입하였다. 원수의 영양염류의 초기 농도는 총질소, 총인 각각 3 mg/L가 되도록 400배 및 10배 희석하여 사용하였다. 양돈폐수 혐기성 소화액의 처리 및 생체량을 증가를 탐색하기 위하여 24시간 주기로 10일간 영양염류(총질소, 총인) 및 식물플랑크톤의 개체수를 조사하였다.

Fig. 1은 원시료인 축산분뇨 혐기소화액을 약 400배 희석하여 총질소 농도를 3 mg/L로 했을 때 세 가지 조류를 각

Table 1. Chemical composition of anaerobic effluent

pH	SS (mg/L)	COD (mg/L)	TOC (mg/L)	T-N (mg/L)	NH ₄ -N (mg/L)	T-P (mg/L)	Alkalinity (mg/L as CaCO ₃)
8.2~8.8	1,050	930~1,400	250~380	1,100~1,350	1,000~1,250	25~60	5,000~6,000

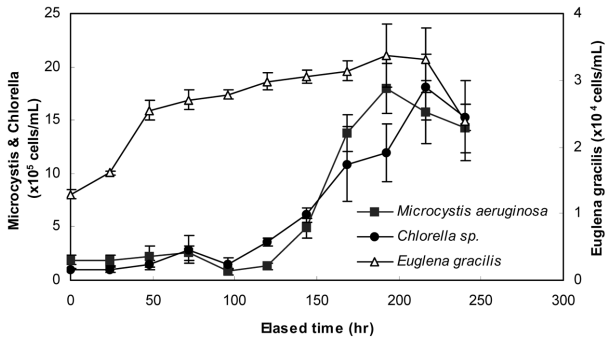


Fig. 1. Microalgae growth pure cultures (1/400 dilution).

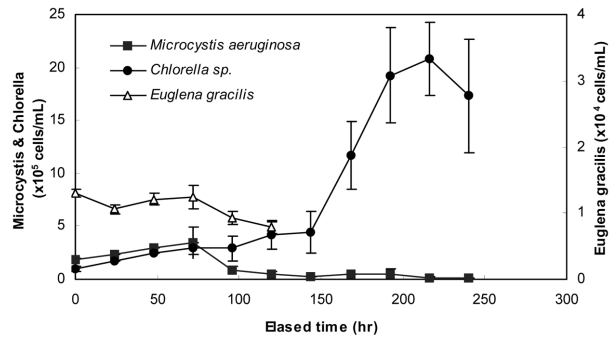


Fig. 3. Microalgae growth pure cultures (1/10 dilution).

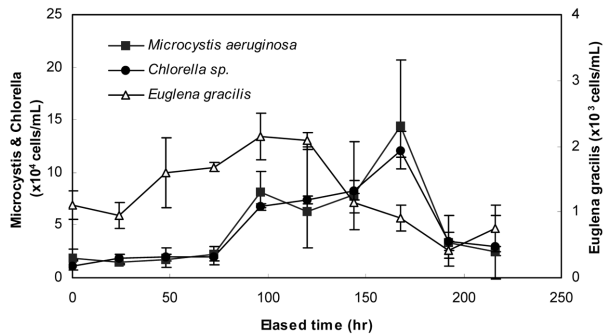


Fig. 2. Microalgae growth mixed cultures (1/400 dilution).

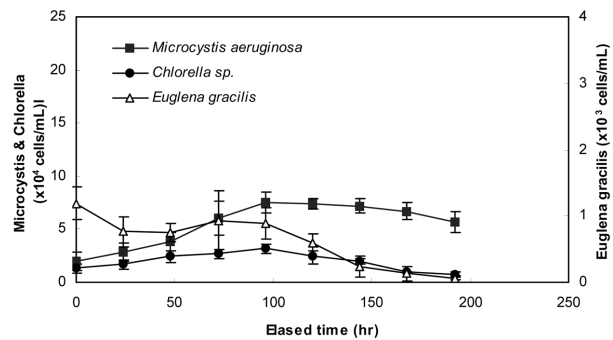


Fig. 4. Microalgae growth mixed cultures (1/10 dilution).

각 순수 배양한 결과를 나타낸 것이다. 조류 개체수는 *Euglena gracilis*의 경우 50시간 후 약 2배로 증식하였으나 *Chlorella*와 *Microcystis aeruginosa*의 경우 144 hr 후 성장이 뚜렷하게 관찰되었다. 그러나 *Chlorella*와 *Microcystis aeruginosa* 사이에는 큰 차이를 보이지 않았으며 지체시간이 필요하였으나 혐기성 소화액에서 성장이 활발하였다. Fig. 2는 동일한 시료에 대하여 세 가지 조류를 혼합하여 배양한 결과를 나타내고 있다. 성장의 양상은 Fig. 1의 순수배양과 동일하게 관찰되었으나 성장 후 사멸기에서 개체수 감소가 훨씬 뚜렷한 것을 보여주고 있다.

3.2. 고농도 혐기성 소화액

Fig. 3 및 Fig. 4는 원시료인 축산분뇨 혐기소화액을 약 10배 희석하여 총질소 120 mg/L 및 총인 농도를 3 mg/L로 했을 때의 결과를 나타낸 것이다. Fig. 3과 같이 조류 개체수는 *Chlorella sp.*의 경우 144 hr 후 성장이 뚜렷하게 관찰되었다. 그러나 *Microcystis aeruginosa* 및 *Euglena gracilis*의 경우에는 큰 차이를 보이지 않고 개체수 증가가 거의 없었다. 이 실험의 경우 조류성장예 따라 *Chlorella sp.*에서만 소화액에서 인 농도가 감소하였고 *Microcystis aeruginosa* 및 *Euglena gracilis*의 경우 영양염류 농도의 변화가 거의 없었다. Fig. 4는 동일한 시료에 대하여 세 가지 조류를 혼합하여 배양한 결과를 나타내고 있다. 혼합배양에서 조류의 성장은 Fig. 3과 달리 *Microcystis aeruginosa*만 약간 성장할 뿐 *Chlorella sp.*는 순수배양에서와 다르게 성장하지 못하였으며 *Euglena gracilis*의 경우도 순수배양과 동일하게 성장하지 못하는 것이 관찰되었다. 따라서 미세조류의 경우 고농도의 혐기성 소화액을 직접 적용하는 경우

유기물농도가 COD 100 mg/L 이상이고 암모니아성 질소 농도도 100 mg/L에 이르러 성장이 방해받을 것으로 예상된다.

3.3. 성장 특성

미세조류의 성장 특성을 비교하기 위하여 회분실험 결과를 성장특성 곡선 모형에 fitting하여 상수값을 비교하였다. 미생물의 회분식 성장 실험은 일반적으로 비성장속도(specific growth rate)가 0에서 시작하여 지체시간(lag time, λ)이라 불리는 일정한 시간이 경과한 후 최대점(μ_m)에 도달하게 된다. 그 후 성장은 멈추게 되는 데 즉 극한 값(A)을 나타내게 된다. 이러한 성장 곡선은 Fig. 5와 같이 나타나게 되는데 이 곡선을 나타내는 모형은 Gompertz 모형을 비롯하여 많은 연구자들에 의하여 제시되어 있다(Zwietering et al., 1990).

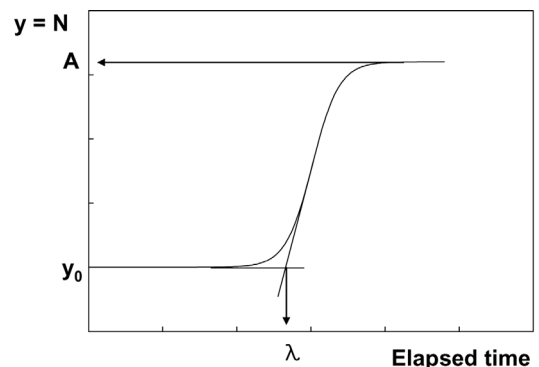


Fig. 5. A growth curve of microorganisms.

세균(bacteria) 성장의 경우 일반적으로 세포 개체량을 로그로 표시하여 그리는 보고가 많다. 그러나 미세조류 성장에 관한 모형은 Golterman and Clymo(1969)에 의하여 로지스틱 모형이 간편하게 적용되었고 이 때 세로축을 개체수로 하는 것이 적합하다고 한다(Jiménez-Perez et al., 2004). 따라서 본 연구에서는 미세조류의 회분 성장의 상수 값들을 다음 식 (1)과 같이 로지스틱 모형을 이용하여 정량적으로 결정하였다. 비선형회귀 분석은 SigmaPlot 9.0을 사용하였다.

$$y = y_0 + \frac{A}{\left\{1 + \exp\left[\frac{4\mu_m}{A}(\lambda - t) + 2\right]\right\}} \quad (1)$$

여기서, y는 개체군의 크기(Cells/mL), t는 경과시간(hr), y₀는 초기 개체량, μ_m는 최대비성장속도(1/hr), A는 성장의 극한 값(Cells/mL), λ는 지체시간(hr)이다.

회귀분석에서는 앞의 실험에서 조류가 제대로 성장한 400배 희석한 시료를 사용하였으며 또한 사멸기의 실험자료는 제외하였다(Fig. 6 참조). 실험 결과에 로지스틱 모형을 적용하여 계산한 결과를 Table 2에 정리하였는데 최대 비성장속도 및 지체시간 등 성장 파라미터들을 비교할 때, 각 조류의 순수배양시 비성장속도는 *Microcystis aeruginosa*가 가장 빨랐으나 *Chlorella* sp.의 지체시간이 더 짧고 *Euglena gracilis*의 경우 거의 지체시간 없이 성장하는 양상을 보였다. 혼합배양의 경우도 순수배양과 동일한 경향을 나타내고 있다.

3.4. 성장조류 형태적 특성

조류의 바이오매스 생산 특성을 관찰하기 위하여 현미경 하에서 계수하고 이것을 이미지 분석기(image analyzer)를 이용하여 크기를 분석하였다. 이것은 각 조류의 크기가 다르므로 바이오매스(biomass) 생산을 추정하는데 이용할 수 있다. Fig. 7은 현미경 사진이고 이 그림을 가공하여 이미지 분석에 사용하였다. 이미지 분석 결과 평균적인 체적이 Fig. 8과 같이 관찰되었다. *Euglena gracilis*의 경우 *Microcystis aeruginosa* 및 *Chlorella* sp.에 비하여 1개 개체당 부피가 8배에 이르렀으며 개체수에 비하여 상당히 많은 바이오매스 생산이 예상되고 일반적으로 미세조류를 이용한 시스템에서의 문제점인 고액분리를 개선하는데 도움이 될 것으로 예상된다.

4. 결론

본 연구는 축산분뇨의 처리과정에서 혐기성 소화의 유출수를 고도처리하기 위하여 미세조류를 적용하는 기초적인 연구로서 일련의 실험을 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

- 1) 혐기소화 처리수를 400배 희석하여 T-N 5 mg/L로 세 가지 조류를 순수 배양한 결과 조류 개체수는 *Euglena gracilis*의 경우 짧은 기간에 약 2배로 증식하였으나 *Chlorella* sp.와 *Microcystis aeruginosa*의 경우 144 hr 후 성장이 뚜렷하게 관찰되었으며 세 가지 조류를 혼합하여 배양한 결과 순수배양과 비슷하게 관찰되었다.
- 2) 축산분뇨 혐기소화액을 약 10배 희석하여 T-P 3 mg/L

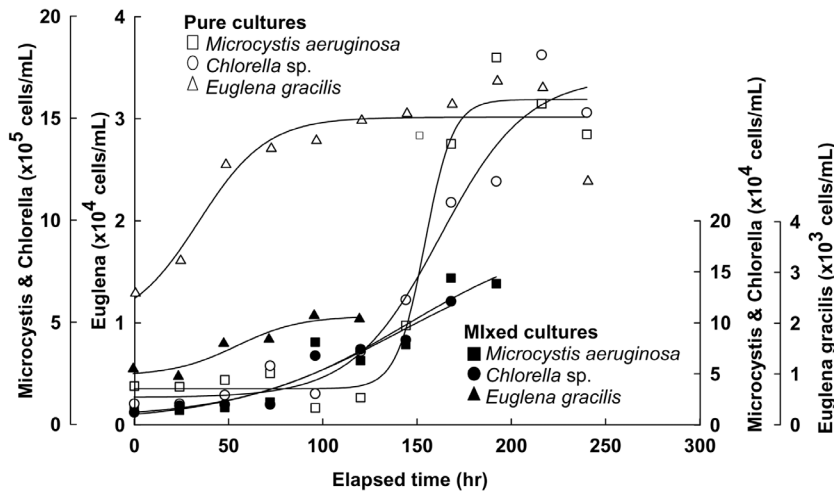


Fig. 6. Growth curve of microalgae fitted with the Logistic model.

Table 2. Growth parameters from algae cultures

	Pure culture			Mixed culture		
	<i>Microcystis aeruginosa</i> (×10 ⁵)	<i>Chlorella</i> sp. (×10 ⁵)	<i>Euglena gracilis</i> (×10 ⁵)	<i>Microcystis aeruginosa</i> (×10 ⁴)	<i>Chlorella</i> sp. (×10 ⁴)	<i>Euglena gracilis</i> (×10 ³)
A (cells/mL)	14.2	15.7	2.04	18.3	17.6	1.17
μ _m (1/hr)	0.47	0.17	0	0.108	0.097	0.017
λ (hr)	139.1	116.0	2.6	59.5	49.4	21.0
R ²	0.966	0.966	0.844	0.902	0.940	0.918

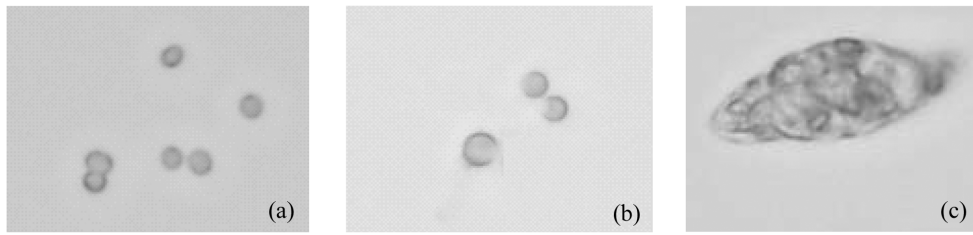


Fig. 7. Microscope photographs of microalgae $\times 400$: (a) *Microcystis aeruginosa*, (b) *Chlorella* sp., (c) *Euglena gracilis*.

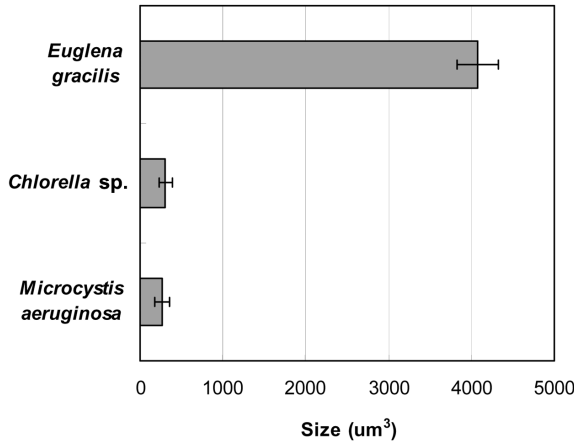


Fig. 8. Size of microalgae calculated by image analyzer.

로 실험한 결과 *Chlorella* sp., *Microcystis aeruginosa* 및 *Euglena gracilis* 모두 경우에서 따라 약간의 차이가 있으나 개체수 성장이 크게 방해 받음을 알 수 있었다.

- 3) 미세조류 성장 특성을 로지스틱 모형을 적용하여 나타낼 수 있었고 미세조류의 회분 성장의 상수 값들을 정량적으로 결정하였다.
- 4) 조류 바이오매스 특성을 관찰하기 위하여 현미경 및 이미지 분석기를 사용한 결과 *Euglena gracilis*를 계수 하였을 경우 성장이 느리지만 크기가 상당히 커서 바이오매스의 수확에 유리할 것으로 예상된다.

사 사

이 논문은 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2006-311-D00131).

참고문헌

관계부처합동(2004). 『물관리 종합대책』의 추진강화를 위한 4대강 비점오염원관리 종합대책. 관계부처합동 (국무조

정실, 행정자치부, 농림부, 산업자원부, 환경부, 건설교통부, 산림청), 경기과천.
 농림부, 환경부(2004). 가축분뇨 관리·이용대책. 환경부·농림부 합동, 경기 과천.
 박기영, 정진영(2003). 식품가공 유기폐수처리 및 미생물 생체 단백질회수를 위한 효모의 이용. 대한환경공학회지, **25**(8), pp. 1004-1009.
 大野高志, 小林郁雄 (2004). 家畜排泄物 管理의 適正化 및 利用促進에 關한 法律과 施設整備. 用水와 廢水, **46**(6), pp. 50-54.
 羽賀清典 (2002). 畜産系排水處理에서 高度處理對策의 動向. 資源環境對策, **38**(8), pp. 36-38.
 原田靖生 (2001). 家畜排泄物の 再資源化 技術動向. 用水와 廢水, **43**(4), pp. 24-29.
 Golterman, H. L. and Clymo, R. S. (1969). *Methods for physical and chemical analysis of freshwaters*, IBP Handbook No. 8 Oxford: Blackwell Scientific Publications.
 Jiménez-Perez, M. V., Sánchez-Castillo, P., Romera, O. D., Fernández-Moreno, D. and Pérez-Martínez, C. (2004). Growth and Nutrient removal in free and immobilized planktonic green algae isolated from pig manure. *Enzyme and Microbial Technology*, **34**, pp. 392-398.
 Lincoln, E. P. and Earle, J. F. K. (1990). Wastewater treatment with microalgae. In: I. Akatsuka, Editor, *Introduction to Applied Phycology*, SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 429-446.
 Nitsan, Z., Mokady, S. and Sukenik, A. (1999). Enrichment of poultry products with $\omega 3$ fatty acids by dietary supplementation with the alga *Nannochloropsis* and mantur oil. *J. Agric. Food Chem.*, **47**(12), pp. 5127-5132.
 Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., Martín, A. and Colmenarejo, M. F. (2006). Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste. *Ecological Engineering*, **28**(2), pp. 158-165.
 Wilkie, A. C. and Mulbry, W. W. (2002). Recovery of dairy manure nutrients by benthic fresh water algae. *Bioresource Technology*, **84**, pp. 81-91.
 Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M. and van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(6), pp. 1875-1881.