

미세조류 옥외 배양시스템을 이용한 도시하수 정화 및 미생물 군집다양성 분석

강시온^{1,2} · 김병혁¹ · 신상윤^{1,2} · 오희목^{1,2} · 김희식^{1,2*}

¹한국생명공학연구원 환경바이오연구센터

²과학기술연합대학원대학교 청정화학 및 생물학과

Municipal Wastewater Treatment and Microbial Diversity Analysis of Microalgal Mini Raceway Open Pond

Zion Kang^{1,2}, Byung-Hyuk Kim¹, Sang-Yoon Shin^{1,2}, Hee-Mock Oh^{1,2}, and Hee-Sik Kim^{1,2*}

¹Environmental Biotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Daejeon 305-806, Republic of Korea

²Green Chemistry and Environmental Biotechnology, University of Science and Technology (UST),
Daejeon 303-333, Republic of Korea

(Received August 29, 2012 / Accepted September 20, 2012)

Microalgal biotechnology has gained prominence because of the ability of microalgae to produce value-added products including biodiesel through photosynthesis. However, carbon and nutrient source is often a limiting factor for microalgal growth leading to higher input costs for sufficient biomass production. Use of municipal wastewater as a low cost alternative to grow microalgae as well as to treat the same has been demonstrated in this study using mini raceway open ponds. Municipal wastewater was collected after primary treatment and microalgae indigenous in the wastewater were encouraged to grow in open raceways under optimum conditions. The mean removal efficiencies of TN, TP, COD-Mn, NH₃-N after 6 days of retention time was 80.18%, 63.56%, 76.34%, and 96.74% respectively. The 18S rRNA gene analysis of the community revealed the presence of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus obliquus* as the dominant microalgae. In addition, 16S rRNA gene analysis demonstrated that *Rhodobacter*, *Luteimonas*, *Porphyrobacter*, *Agrobacterium*, and *Thauera* were present along with the microalgae. From these results, it is concluded that microalgae could be used to effectively treat municipal wastewater without aerobic treatment, which incurs additional energy costs. In addition, municipal wastewater shall also serve as an excellent carbon and nitrogen source for microalgal growth. Moreover, the microalgal biomass shall be utilized for commercial purposes.

Keywords: microalgae, microbial diversity, open culture system, wastewater treatment

산업화와 도시화로 인한 인구집중현상으로 많은 환경문제가 나타났다. 특히 산업·축산폐수 및 도시하수로 인한 수질오염 문제가 심각해지고 있으며 하수처리를 통한 수질정화의 필요성이 높아지고 있다. 도시하수처리는 하수 중에 고형물 또는 용해되어 있는 오염물질을 제거하는 것이며 하수가 처리되지 않은 상태로 하천이나 호수, 바다 등에 방류되면 부패에 의한 산소의 감소, 수중생물의 폐사, 부식성 찌꺼기의 퇴적 등을 초래하여 수질을 악화시킨다. 특히 하수 중의 질소와 인 성분은 하천 및 호수의 부영양화를 초래한다. 하수도 보급률의 증가에 기인한 도시

하수의 오염이 고농도화 되었고, 이로 인한 문제를 해결하기 위해서는 하수처리장 신설, 기존의 하수처리 공법 개선 등의 대책이 요구되고 있다(Park *et al.*, 2009).

기존의 활성슬러지 공법의 문제점을 보완하고자 생물학적 공법에 다양한 공정들을 적용하는 시도들이 증가하고 있다(Park *et al.*, 2009). 막분리(membrane bioreactor) 공법은 2차 침전 및 여과 소독공정이 불필요하고 짧은 체류시간으로 인해 부지면적이 작으며, 고농도 MLSS 유지 및 높은 SS 제거율과 기존 활성슬러지법에 비해 슬러지 발생량이 작은 장점이 있다(Gander *et al.*, 2000; Melin *et al.*, 2006). 그러나, 막분리 공법은 고가의 운영비가 필요하며, 영양물질 및 미생물처리에 대한 명확한 해석과 예측이 쉽지 않아 운전조건의 선택이 어려운 실정이다(Kim

*For correspondence. E-mail: hkim@kribb.re.kr; Tel.: +82-42-860-4326; Fax: +82-42-879-8103

and Yoon, 2001). 또한 대부분의 막분리 공법은 막 오염 방지와 높은 내부 순환률을 위해 과도한 포기를 하여 호기조로부터 혐기조로 유입되는 용존산소와 $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 영향으로 혐기조건의 형성이 어려워 인 방출기작이 원활하지 못한 단점이 있다(Heo *et al.*, 2003).

따라서 이와 같은 기존의 일반적인 하수처리방법 대신에 질소와 인에 대한 높은 제거 효율을 가지는 미세조류를 이용한 처리 공정이 하수처리공법에 적용·시도되고 있다(Carberry and Greene, 1992; Lau *et al.*, 1995; González *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2000; Rectenwald, 2000). 하수처리에 이용되는 미세조류는 광합성을 통해 이산화탄소 등을 이용하여 하수 내의 유기물과 질소, 인 성분을 흡수하여 성장할 수 있기 때문에 환경오염물질을 제거함과 동시에 유용한 바이오매스를 생산할 수 있다(Wilkiea and Mulbry, 2002). 하수처리 과정에서 생산되는 미세조류는 단백질 함량이 높아 고단백 가축사료와 어류의 먹이로도 활용할 수 있다(Soeder, 1980). 특히 최근에는 친환경 재생에너지 개발이 활발해지면서 미세조류에서 바이오디젤을 추출하는 연구가 주목 받고 있다(Guschina and Harwood, 2006; Chisti, 2007; Pittman *et al.*, 2011). 미세조류는 1세대 바이오연료의 원료로 사용된 기존 작물에 비해 번식력이 뛰어나고 단위 면적당 생산량이 높으며, 세계 곡물 가격에 영향을 미치지 않는다는 장점이 있다(Chisti, 2007). 그리고 이산화탄소 고정 능력이 있으며, 바이오디젤을 생산하고 남은 미세조류 부산물을 활용해 수소, 전기, 바이오플라스틱 등을 생산할 수 있다(Aaronson and Dubinsky, 1982; Melis and Happe, 2001). 이러한 이유로 바이오디젤 생산비용을 줄이기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 하·폐수를 이용하여 미세조류를 옥외 배양시스템에서 배양함으로써 미세조류 배양에 소요되는 비용을 줄이는 것이 가장 현실적인 대안이다. 따라서 본 연구에서는 미세조류 바이오매스 획득과 기존 처리법의 단점을 보완할 수 있는 가능성을 알아보고자 유기성 폐수 옥외 수질정화 배양 시스템(mini raceway open pond)을 적용하였다. 또한 미세조류의 성장을 통한 도시에서 발생하는 유기성 폐수의 수질정화 가능성을 탐색하고, 실제 유기성 폐수를 정화하는 미생물 군집과 미세조류의 군집을 분자생물학적 방법을 통해 분석하고자 한다.

재료 및 방법

옥외 배양 시스템

하수종말처리장에 유입되는 유기성 폐수의 수질정화를 위해 미세조류 옥외배양 시스템(mini raceway open pond)을 설치하였다. Mini raceway open pond의 깊이는 약 30 cm, 용적 60 L이며, 폭기는 paddle wheel을 이용하여 약 2 m의 수로를 유속 30 cm/sec로 운전하였다. Open pond 배양액의 온도는 19–22°C를 유지하였다. 광원은 태양광을 이용하였으며 자연적인 변화에 의해 light/dark cycle (L/D cycle)을 주었고, HRT (hydraulic retention time)는 6일로 반연속식으로 운전하였으며, 실험에 사용한 유기성 폐수는 대전시 하수종말처리장의 유입수(1차 침전지를 거쳐 포기조에 들어가기 전)를 이용하였다. 유기성 폐수의

평균 성장(2011년 1월–2012년 3월)은 BOD (biological oxygen demand, ppm): 148.58 (± 19.26), COD_{Mn} (chemical oxygen demand, ppm): 95.38 (± 5.27), TSS (total suspended solids, ppm): 144.60 (± 14.49), TN (total nitrogen, ppm): 38.52 (± 3.12), TP (total phosphorus, ppm): 4.34 (± 0.84)를 나타냈다. Mini raceway open pond에 접종한 토착 미세조류는 1차 침전지 내벽에 서식하는 미세조류를 획득하여 mini raceway open pond에 접종하였다. 접종한 토착 미세조류의 우점시키기 위해, 유기성 폐수의 배출없이 6일간 운전하였으며, 6일 후 접종한 토착 미세조류가 우점하였다. 우점된 토착 미세조류는 대부분 녹조류의 형태를 나타냈다. 본 실험의 mini raceway open pond는 대전 하수종말처리장에서 실험하였다.

수질분석방법

시료는 0.45 μm 마이크로 여과지로 여과한 후 TN, TP, COD_{Mn} , $\text{NH}_3\text{-N}$ 를 측정하였다. TN, TP, COD_{Mn} , 및 $\text{NH}_3\text{-N}$ 는 Standard method를 이용하여 분석하였다(APHA, 1998).

미세조류 성장 측정

미세조류의 성장은 건조중량 및 chlorophyll-*a*로 측정하였다. 건조중량은 mini raceway open pond 배양액 10 ml을 0.45 μm 마이크로 여과지에 거른 후 105°C에서 24시간동안 건조하여 측정하였다. Chlorophyll-*a*는 90% 아세톤으로 추출하여 750 nm, 664 nm, 647 nm, 630 nm의 파장으로 측정하였다(APHA, 1998).

DNA 추출 방법 및 PCR 조건

Mini raceway open pond의 미생물 군집을 분석하기 위하여, 분자·생태학적 기법인 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)를 이용하였다. Mini raceway open pond 운전 14일째의 배양액 1.5 ml로부터 FastDNA Spin kit for Soil (Bio101, USA)을 이용하여 total DNA를 추출하였으며, 미생물 다양성을 확인하기 위하여 시료로부터 얻은 DNA를 주형으로 1차 PCR과 nested-PCR 반응을 수행하였다. 1차 PCR은 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1541R (5'-AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA-3')을 이용하여 50 μl 안에 1× PCR buffer, 20 mM MgCl_2 , 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 μM), template DNA와 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다(Muyzer *et al.*, 1993; Muyzer, 1999). 반응조건은 우선 94°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시킨 후 94°C에서 45 sec denaturation, 56°C에서 45 sec annealing, 72°C에서 45 sec extension을 30 cycles을 수행한 후 72°C에서 7 min 동안 final extension을 수행하였다. 각각의 PCR 산물은 ethidium bromide 염색 후 1% 아가로스겔에서 확인하였다. DGGE 분석을 위하여, 1차 PCR의 증폭산물을 주형으로 2차 PCR을 수행하였으며, 16S rDNA를 증폭하기 위하여 사용된 primer는 40개의 GC-clamp가 붙은 341F-GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 786R (5'-CTA CCA GGG TAT CTA ATC-3')을 이용하였다(Ishii and Fukui, 2001; Jaspers *et*

al., 2001). 또한 18S rDNA를 증폭하고자 SR-4F GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAG CCG CGG TAA TTC CAG CT-3')와 SR-7R (5'-TCC TTG GGC AAA TGC TTT CGC-3')을 각각 사용하였다(Nakayama et al., 1996). 2차 PCR을 위한 PCR mixture는 1차 PCR에 사용된 것과 동일하며, 사용된 PCR 반응조건은 94°C에서 5 min 동안 DNA를 변성시켜, 94°C에서 45 sec denaturation, 60°C에서 45 sec annealing, 72°C에서 45 sec extension하고 72°C에서 7 min 동안 final extension을 수행하였다. Annealing 온도는 초기에는 60°C에서 시작해서 1 cycle 당 0.5°C 감소하게 20 cycles 수행하였고, 그 후 50°C에서 15 cycles을 수행하여 touch-down PCR을 완료하였고, 2차 PCR의 산물을 이용하여 DGGE를 수행하였다(Muyzer et al., 1993).

DGGE 조건

PCR 산물은 Dcode™ System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 DGGE를 수행하였다(Muyzer et al., 1993). Denaturing gradient gel은 10% polyacrylamide (37.5:1=acrylamide: bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 40%~70%까지 농도구배가 형성되도록 첨가하여 제작하였으며, 제작된 DGGE gel에 PCR 증폭산물을 30 µl씩 loading하여 1× TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 115 V로 19시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 DGGE gel은 ethidium bromide (1:10,000)에서 염색한 후, UV로 확인하였다(Muyzer et al., 1993).

염기서열분석

DGGE gel 상에서 다른 위치에 존재하는 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 band를 선택한 후, 잘라내어 3차 멸균수 50 µl를 첨가하고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하여 상등액을 취하였다. Band에서 회수한 DNA를 주형으로 nested PCR에 사용한 primer를 이용하여 재증폭을 수행했으며, PCR 산물은 아가로스 젤에서 전기영동하여 DNA recovery kit (QIAGEN, Germany)로 정제한 후 cloning 하였다. Cloning은 T-Blunt vector (Solgent, Korea)를 이용하였고, manufacturer's protocol을 따라 수행하여 16S rRNA gene과 18S rRNA gene의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다.

결과 및 고찰

Mini raceway open pond의 수질 정화능

본 연구에서는 도시에서 발생하는 유기성 폐수를 이용하여 mini raceway open pond에서 토착 미세조류를 배양 후, 배양액의 잔류 TN, TP, COD-Mn, NH3-N를 분석하여 mini raceway open pond의 유기성 폐수 정화능력을 평가하였다. 또한 mini raceway open pond에 의한 배양액의 수질을 비교하기 위하여 하수종말처리장의 수질분석결과와 비교하였고 도시하수 방류수의 법정기준은 COD: 40 ppm, TN: 20 ppm, TP: 2 ppm이다.

실험에 사용된 1차 침전지 방류수의 TN은 평균 36.45 ppm이며, mini raceway open pond를 이용하여 처리된 처리수의 TN은 평균 7.35 ppm, 활성슬러지 공법에 의해 처리된 최종 방류수의 TN은 평균 17.74 ppm으로 나타났다(Fig. 1A). 또한 활성슬러지 공법의 TN 처리효율은 평균 50.43%이며, mini raceway open pond의 TN 처리효율은 평균 80.18%를 나타내었다(Fig. 2A). 이 결과로부터 미세조류를 이용한 유기성 폐수처리가 질소 제거에 우수한 능력을 가지고 있으며 활성슬러지 공법의 처리효율보다 높은 TN 처리효율을 나타냄을 확인할 수 있었다.

또한 실험에 사용된 1차 침전지 방류수의 TP는 평균 4.31 ppm으로, 활성슬러지 공법에 의해 처리된 최종 방류수의 TP는 평균 0.23 ppm이었다. 반면에 mini raceway open pond를 이용하여 미세조류를 배양한 처리수의 TP는 평균 1.52 ppm으로 활성슬러지 공법으로 처리한 후 방류되는 방류수보다 높은 TP를 보였다(Fig. 1B). 또한 인 제거 처리효율을 비교해 볼 때, 활성슬러지 공법의 TP 처리효율은 평균 94.50%이며, mini raceway open pond의 TP 처리효율은 평균 63.56%를 나타내고 있어 TP의 처리에는 활성슬러지 공법의 처리효율이 높음을 알 수 있었다(Fig. 2B). 하지만 이 결과는 도시하수의 방류수 수질기준에 만족하는 수질정화 수치로서 mini raceway open pond는 인 제거에도 탁월한 결과를 나타낸다고 판단될 수 있다.

유기성 폐수의 COD-Mn는 평균 99.6 ppm이며, 활성슬러지 공

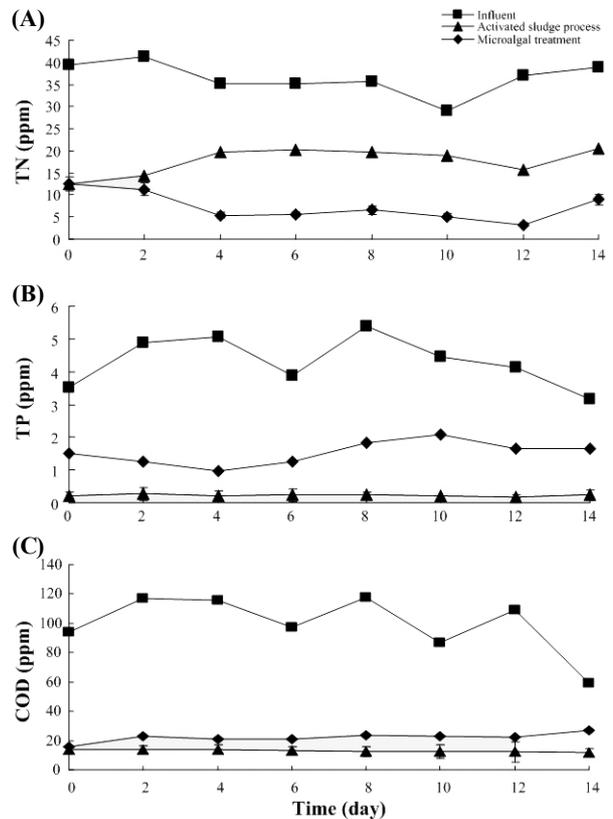


Fig. 1. Remove concentration of total nitrogen (A), total phosphorus (B), and COD-Mn (C). Squire, influent; triangle, activated sludge process; diamond, mini raceway open pond using municipal wastewater.

법에 의해 처리된 방류수의 COD-Mn는 평균 12.98 ppm이었다. 반면에 mini raceway open pond를 이용하여 미세조류를 배양한 처리수는 평균 22.13 ppm으로 활성슬러지 공법으로 처리한 방류수보다 높은 COD-Mn를 보였다(Fig. 1C). 그리고 COD-Mn 제거 처리효율을 비교해 볼 때, 활성슬러지 공법의 COD-Mn 처리효율은 평균 86.44%이며, mini raceway open pond의 처리효율은 평균 76.34%를 나타내고 있어, 활성슬러지 공법의 COD-Mn 처리효율이 높음을 알 수 있었다(Fig. 2C). 하지만 도시하수의 방류수 수질기준에 만족하는 수질기준으로 mini raceway open pond는 COD-Mn 제거에도 탁월한 결과를 나타낸다고 판단될 수 있다.

또한 유기성 폐수의 NH₃-N는 평균 23.1 ppm이며, mini raceway open pond를 이용하여 미세조류를 배양한 배양액의 NH₃-N는 평균 0.58 ppm으로(Fig. 3A) 평균 96.74%의 높은 제거 효율을 보였다(Fig. 3B). Mini raceway open pond를 통한 미세조류의 유기성 폐수의 처리시 NH₃-N의 제거능력이 매우 우수함을 입증한 결과로 판단되며, 이는 미세조류나 미생물이 이용할 수 있는 매우 낮은 농도임을 알 수 있었다. NH₃-N는 미생물들이 바로 체내합성으로 이용이 가능한 형태의 질소로 알려져 있다. 미생물들이 성장하면서 NH₃-N의 농도가 먼저 감소한 뒤에 NO₃-N의 농도가 감소하게 되는데, 이는 nitrate reductase의 합성이 암모니아에 의해 후전사단계에서 억제되기 때문인 것으로 알려져 있다(Morris and Syrett, 1963; Syrett and Morris, 1963; Smith and Thompson, 1971; Guerrero *et al.*, 1981). 즉, NH₃-N와 NO₃-N가 함께 존재하면 NO₃-N 보다 NH₃-N가 먼저 감소된 후, NO₃-N의 농도가 감소하게 된다.

본 연구는 mini raceway open pond를 통한 미세조류 배양으로 유기성 폐수의 수질 정화능을 확인해 본 결과, TN, TP, COD-Mn 항목에서 모두 도시하수 방류수 수질기준에 충족하는

결과를 얻었다. 기존의 도시하수 처리공법인 활성슬러지 공법과 비교하여도 만족할 만한 결과를 보였다. 질소의 제거 효율은 활성슬러지 공법보다도 30% 높은 효율을 나타냈고, 인 제거 역시 방류수 수질기준에 만족하는 수질을 보였으며, COD-Mn 역시 방류수 수질기준에 부합하는 정화능력과 높은 처리효율을 확인하였다. 기존의 활성슬러지 공법은 폐수 내의 인을 제거하기 위하여 화학적 처리를 통하여 응집시키는 공정을 거친다. 반면에 미세조류 배양을 통한 하수처리는 응집제와 같은 화학적 처리가 불필요하며, 추가적인 처리 없이 방류수 수질기준에 부합하는 수질로 인을 제거할 수 있는 장점을 가지고 있다. 이 결과를 통하여 미세조류 배양을 이용한 유기성 폐수처리 공정이, 활성슬러지 공법을 통하여 방류수 수질기준에 부합하게 처리된 방류수와 유사한 수준으로 유기성 폐수를 정화할 수 있는 가능성을 확인하였다.

Mini raceway open pond내의 미생물 군집분석

Mini raceway open pond를 이용한 미세조류 배양으로 유기성 폐수를 정화하는 미생물 군집은 구형의 녹조류인 *Chlorella*와 뿔목말이라 불리며 2개, 4개 혹은 8개 등의 세포들이 배열되어 군체를 이루는 녹조류인 *Scenedesmus*가 우점했다(Fig. 4). 우점한 미세조류의 시간에 따른 성장을 확인하기 위해 건조중량과 chlorophyll-*a*를 측정하였다. 유입되는 유기성 폐수의 건조중량은 평균 0.111 g/L이며, mini raceway open pond내의 건조중량은 평균 0.463 g/L로 유지되는 것을 확인하였다. 또한 유입되는 유기성 폐수의 chlorophyll-*a*는 평균 1.8 mg/L이며, mini raceway open pond는 평균 121.06 mg/L로 유지되는 것을 확인하였다(Fig. 5). Mini raceway open pond내의 미세조류의 건조중량과 chlorophyll-*a*의 측정 결과를 통해 미세조류들이 우점·유지되는 것을 확인할 수 있었다.

Mini raceway open pond 운전 14일째의 배양액으로부터 DNA를 추출하여 박테리아용 universal primer로 알려진 341F-GC와 786R primer를 이용하여 PCR 증폭산물을 얻었고,

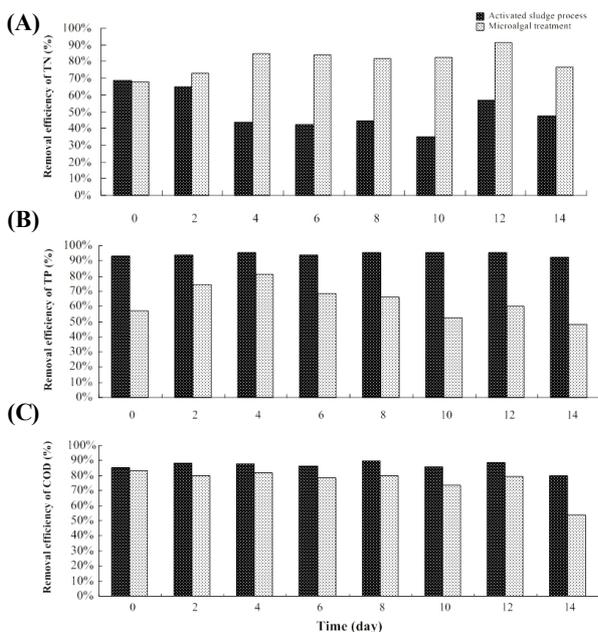


Fig. 2. Removal efficiency of total nitrogen (A), total phosphorus (B), and COD-Mn (C).

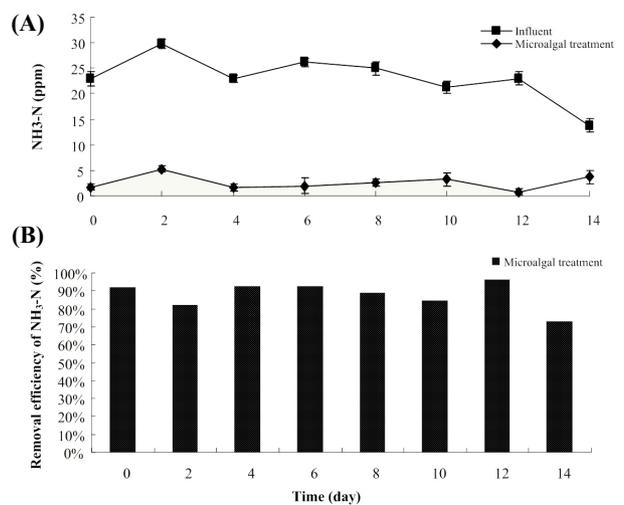


Fig. 3. Concentration & removal efficiency of NH₃-N. Squire; influent, diamond; mini raceway open pond using municipal wastewater.

Table 1. Identity of the bands obtained from 16S rRNA gene and 18S rRNA gene DGGE profile of mini raceway open pond

Band no.	Accession no.	Closest relative	Similarity (%)	
b1	EU580696	<i>Rhodobacter</i> sp. NP25b	96%	16S rRNA gene
b2	EF626688	<i>Luteimonas aquatica</i> strain RIB1-20	91%	
b3	AY559428	<i>Porphyrobacter donghaensis</i> strain SW-132	97%	
b4	AB033326	<i>Agrobacterium sanguineum</i> strain A91	97%	
b5	AJ315681	<i>Thauera aromatica</i> strain S100	99%	
b6	DQ011529	<i>Porphyrobacter dokdonensis</i> strain DSW-74	96%	
b7	EU580696	<i>Rhodobacter</i> sp. NP25b	98%	
e1	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%	18S rRNA gene
e2	FR865738	<i>Scenedesmus obliquus</i> CCAP 279/46	99%	
e3	FR865738	<i>Scenedesmus obliquus</i> CCAP 279/46	99%	
e4	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%	
e5	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%	
e6	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%	
e7	GQ499385	<i>Spizellomyces</i> sp. JEL 549	97%	
e8	FR865683	<i>Chlorella vulgaris</i> CCAP 211/79	99%	
e9	FR865738	<i>Scenedesmus obliquus</i> CCAP 279/46	99%	

아가로스겔 상에서 예상했던 486 bp의 band를 확인하였다(자료 미제시). 미생물군집 다양성을 분석하는데 유용한 기법인 DGGE를 이용하여 미생물 군집의 다양성을 조사해본 결과, Fig. 5와 같이 DGGE gel 상에서 다양한 bands를 확인할 수 있었다. 또한 DGGE profile상의 각 bands로부터 회수한 DNA 염기서열을 결정하여, NCBI의 GenBank를 이용하여 상동성을 비교 검색하였고, Table 1과 같이 분석되었다. 박테리아 16S rRNA gene에 대해서 7개 bands, 진핵생물 18S rRNA gene은 9개 bands에 대한 염기서열을 결정하였다.

박테리아 16S rRNA gene을 분석한 결과, 5종류의 박테리아로 분석되었다. DGGE band b1과 b7은 활성슬러지 내의 COD_{Mn}과 TKN의 제거 효율을 증가시킨다고 보고된(Huang et

al., 2001) 자색비황세균(purple nonsulfur bacteria)인 *Rhodobacter* sp.로 분석되었다. DGGE Band b2는 질소화합물 분해과정에 관여한다고 알려진(Finkmann et al., 2000) *Luteimonas aquatica*로 분석되었다. DGGE band b3와 b6는 남조류와 기질 및 영양원 간에 상호작용을 한다고 알려진(Shi et al., 2009) *Porphyrobacter* 속의 *P. donghaensis*와 *P. dokdonensis*로 각각 분석되었다. 또한 DGGE band b4는 유기성 폐수의 유기물 분해능을 가지고 있다고 알려진(Chen et al., 2009) *Agrobacterium* 속의 *Sanguineum*로 분석되었고, DGGE band b5는 활성슬러지에서 생물학적 인분해작용을 촉매하는 특성(과(Hesselmann et al., 1999; Crocetti et al., 2000) 방향족 탄화수소(aromatic compounds)의 분해능을 가지고 있으며(Philipp and Schink, 2000), 하수처리과정 내의 탈

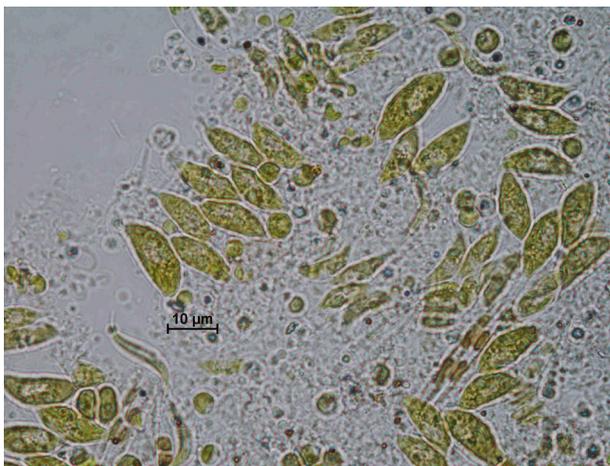


Fig. 4. Photographs of dominant microalgae cells visualized under a light microscope $\times 1000$ in the mini raceway open pond using municipal wastewater. *Scenedesmus* is oval shape and *Chlorella* is a circle. Scale bars: 10 μ m.

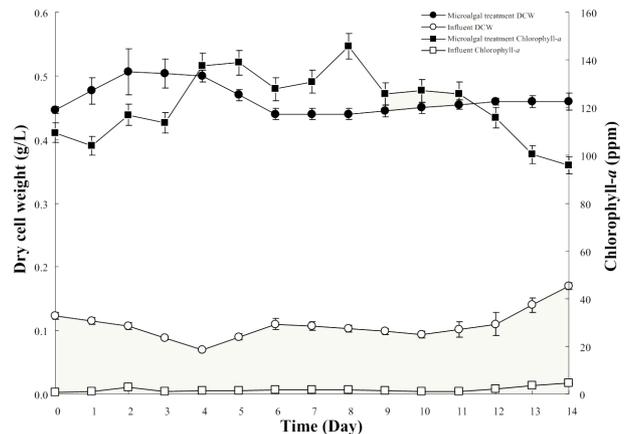


Fig. 5. Dry cell weight & chlorophyll-a according to the operating time of the mini raceway open pond using municipal wastewater. Close circle, DCW by mini raceway open pond using municipal wastewater; open circle, influent DCW; close square, chlorophyll-a by mini raceway open pond using municipal wastewater; open square, influent chlorophyll-a.

질화 과정에 관여하는 *Rhodocyclales* order에 속한 *Thauera aromatica*로 분석되었다(Juretschko *et al.*, 2002).

18S rRNA gene에 대한 9개의 bands를 분석한 결과, 2가지 속의 녹조류와 한가지의 진균으로 분석되었다. DGGE band e1, e4, e5, e6, d8는 *Chlorella vulgaris*로 분석되었고, DGGE bands e2, e3, e9는 *Scenedesmus obliquus*로 분석되었다. 그리고 DGGE band e7은 *Spizellomyces* sp.의 fungi로 분석되었다. *C. vulgaris*는 담수녹조류로서 고농도 이산화탄소에 대한 내성을 가지고 있으며 적응력이 뛰어난 것으로 보고되었다(Yun *et al.*, 1996). 또한 유기성 산업폐수 내의 고농도 NH₃-N에 대한 내성이 우수하며 폐수 내의 NH₃-N, NO₃-N, P의 제거 효율이 높은 것으로 보도되었다(González *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 1997). 그리고 다른 *Chlorella*에 비하여 성장속도가 빠르며 이산화탄소 저장 능력이 높다고 보고되었다(Jeong *et al.*, 2003). *S. obliquus* 역시 유기성 폐수내의 NH₃-N, NO₃-N, P를 제거하는데 높은 효

율을 나타낸다고 알려져 있으며(González *et al.*, 1997; Martínez *et al.*, 2000), 산업폐수의 중금속을 제거하는데 이용할 수 있고, 높은 지질함량을 포함하여 바이오디젤 생산 연구에 이용되고 있다(Cain *et al.*, 1980; Mandal and Mallick, 2009).

최근 미세조류로부터 바이오디젤을 생산하는 기술이 최신 연구로 각광받고 있다(Minowa *et al.*, 1995). 미세조류를 이용한 바이오디젤 생산에는 지질함량과 생산성이 높은 미세조류를 선택하는 것이 중요하다. 특정한 환경하에서 *C. vulgaris*의 경우 건조중량 대비 약 40%의 지질함량을, *S. obliquus*의 경우 약 43%의 지질함량을 나타냈다는 보고가 있으며, *Botryococcus braunii*는 약 86%의 지질함량을 나타냈다고 한다(Mandal and Mallick, 2009). 하지만 *B. braunii*는 성장속도가 매우 느리기 때문에 바이오디젤 생산 효율이 좋지 않아, 성장속도가 빠르면서 지질함량이 높은 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*와 같은 녹조류가 바이오디젤 연구에 주목 받고 있다(Scragg *et al.*, 2003; Mandal and Mallick, 2009).

본 연구는 미세조류의 배양을 통하여 유기성 폐수의 수질정화 가능성을 탐색하고, 유기성 폐수를 정화하는 미생물과 미세조류의 군집을 분자생물학적 방법을 통해 분석하였다. 도시에서 발생하는 유기성 폐수를 mini raceway open pond에서 미세조류 배양 후 잔류 TN, TP, COD_{Mn}, NH₃-N를 분석한 결과, 미세조류 옥외 배양시스템을 통한 유기성 폐수의 수질정화능이 우수함을 확인하였다. 현재 진행되는 유기성 폐수를 이용한 미세조류 배양에 관한 연구는 영양염류인 질소와 인 제거에만 초점이 맞춰져 있으나, 본 연구는 질소와 인의 제거뿐만 아니라, 환경부에서 제시하고 있는 COD_{Mn}를 추가로 조사하여, 방류수 배출기준을 만족하는 수질정화 가능성을 확인하였다. 또한, 도시하수 정화에 사용된 유기성 폐수는 활성 슬러지 공법 중 포기조에서 처리된 처리수이거나, 최종 처리되어 자연으로 방류되는 하수종말처리장의 최종방류수를 사용한 연구가 주를 이루고 있다(Carberry and Greene, 1992; Yun *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2011). 그러나, 본 연구에 사용된 유기성 폐수는 1차 침전지를 거친 유입수를 사용하였으며 mini raceway open pond를 이용하여 환경부에서 고시한 방류수 수질기준(TN, TP, COD_{Mn})을 만족시키는 결과를 얻었다. 특히 mini raceway open pond의 TN 정화능력이 활성 슬러지공법보다 우수함을 확인하였다. 그리고 mini raceway open pond 배양액에서 유기성 폐수 내의 질소, 인 등을 섭취하여 수질정화에 기여하는 미세조류를 동정한 결과, 바이오디젤 생산에 유용한 미세조류인 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*가 우점함을 확인하였고, 우점하는 미세조류들이 수질정화능이 있음을 확인하였다. 또한 *C. vulgaris*와 *S. obliquus*를 통하여 바이오디젤 생산에 필요한 바이오매스를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

적 요

미세조류는 광합성을 통하여 바이오디젤과 같은 부가가치상품을 생산할 수 있으며, 미세조류를 이용한 생명공학 기술이 주목 받고 있다. 그러나 질소원과 탄소원은 미세조류 배양 비용을

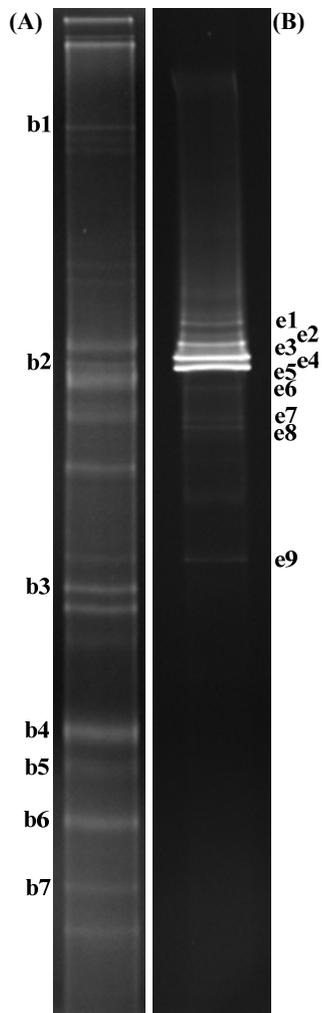


Fig. 6. DGGE profiles based on 16S rRNA gene (A), 18S rRNA gene (B) generated from mini raceway open pond. DGGE condition: 10% polyacrylamide (37.5:1=acrylamide:bisacrylamide), urea, formamide 40%~70%, 60°C, 115 V, 19 h running

높여 충분한 바이오매스 생산에 제한요소가 되고 있다. 미세조류를 배양하는데 도시하수를 이용하는 것은 생산단가를 낮추는 좋은 대안이 될 수 있으며, 본 연구에서는 옥외 수질정화 배양 시스템(mini raceway open pond)을 이용하여 적용했다. 실험에 사용한 도시하수는 하수종말처리장의 1차 침전지를 거친 유입수를 이용하였으며, 토착 미세조류를 mini raceway open pond에서 배양하였다. 체류시간 6일의 운전 후 TN, TP, COD_{Mn}, NH₃-N의 평균 제거 효율은 80.18%, 63.56%, 76.34%, 96.74%로 각각 나타났다. 18S rRNA gene 분석결과 녹조류인 *Chlorella*, *Scenedesmus*가 우점하였으며, 16S rRNA gene 분석결과 *Rhodobacter*, *Luteimonas*, *Agrobacterium*, *Thauera*, *Porphyrobacte*의 5종의 bacteria가 동정되었다. 이러한 결과를 통하여 미세조류를 이용한 호기성 처리나 과도한 발전비용 없이 효과적인 하수처리를 할 수 있는 가능성을 확인하였다. 그리고 도시하수는 미세조류 배양에 필요한 탄소원과 질소원을 제공할 수 있으며 미세조류 바이오매스는 상업적 목적으로 이용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 교육과학기술부 글로벌프런티어사업 차세대 바이오매스 연구단(www.biomass.re.kr)과 한국생명공학연구원(www.kribb.re.kr)의 기관과유사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Aaronson, S. and Dubinsky, Z. 1982. Mass production of microalgae. *Cell. Mol. Life Sci.* **38**, 36–40.
- APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th ed. APHA, Washington, D.C. USA.
- Cain, J.R., Paschal, D.C., and Hayden, C.M. 1980. Toxicity and bioaccumulation of cadmium in the colonial green alga *Scenedesmus obliquus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **9**, 9–16.
- Carberry, J.B. and Greene, R.W. 1992. Model of algal bacterial clay wastewater treatment system. *Water Sci. Technol.* **26**, 1697–1706.
- Chen, Y., Lin, C.J., Jones, G., Fu, S., and Zhan, H. 2009. Enhancing biodegradation of wastewater by microbial consortia with fractional factorial design. *J. Hazard. Mater.* **171**, 948–953.
- Chisti, Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnol. Adv.* **25**, 294–306.
- Crocetti, G.R., Hugenholtz, P., Bond, P.L., Schuler, A., Keller, J., Jenkins, D., and Blackall, L.L. 2000. Identification of polyphosphate-accumulating organisms and design of 16S rRNA-directed probes for their detection and quantitation. *Appl. Environ. Microbiol.* **88**, 1175–1182.
- Finkmann, W., Altendorf, K., Stackebrandt, E., and Lipski, A. 2000. Characterization of N₂O-producing *Xanthomonas*-like isolates from biofilters as *Stenotrophomonas nitritireducens* sp. nov., *Luteimonas mephitis* gen. nov., sp. nov. and *Pseudoxanthomonas broegernensis* gen. nov., sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 273–282.
- Gander, M., Jefferson, B., and Judd, S. 2000. Aerobic MBRs for domestic wastewater treatment: a review with cost consideration. *Sep. Purif. Technol.* **18**, 119–130.
- González, L.E., Cañizares, R.O., and Baena, S. 1997. Efficiency of ammonia and phosphorus removal from a colombian agroindustrial wastewater by the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus dimorphus*. *Bioresour. Technol.* **60**, 259–262.
- Guerrero, M.G., Vega, J.M., and Losada, M. 1981. The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **32**, 169–204.
- Guschina, I.A. and Harwood, J.L. 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* **45**, 160–186.
- Heo, H.W., Sin, G.S., Park, S.G., Park, J.B., JuChoe, E., and Kang, H. 2003. Evaluation of affecting factors for effective anaerobic phosphorus release. *J. KSEE.* **25**, 155–162.
- Hesselmann, R.P.X., Werlen, C., Hahn, D., Meer, J.R.v.d., and Zehnder, A.J.B. 1999. Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 454–465.
- Huang, J.S., Wu, C.S., Jih, C.G., and Chen, C.T. 2001. Effect of addition of *Rhodobacter* sp. to activated-sludge reactors treating piggery wastewater. *Water Res.* **35**, 3867–3875.
- Ishii, K. and Fukui, M. 2001. Optimization of annealing temperature to reduce bias caused by a primer mismatch in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3753–3755.
- Jaspers, E., Nauhaus, K., Cypionka, H., and Overmann, J. 2001. Multitude and temporal variability of ecological niches as indicated by the diversity of cultivated bacterioplankton. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**, 153–164.
- Jeong, M.L., Gillis, J.M., and Hwang, J.-Y. 2003. Carbon dioxide mitigation by microalgal photosynthesis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **24**, 1763–1766.
- Juretschko, S., Loy, A., Lehner, A., and Wagner, M. 2002. The microbial community composition of a nitrifying–denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst. Appl. Microbiol.* **25**, 84–99.
- Kim, K.J. and Yoon, S.H. 2001. Wastewater treatment using membrane bioreactors (MBR). *J. Ind. Eng. Chem.* **12**, 239–248.
- Lau, P.S., Tam, N.F.Y., and Wong, Y.S. 1995. Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environ. Pollut.* **89**, 59–66.
- Mandal, S. and Mallick, N. 2009. Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 281–291.
- Martínez, M.E., Sánchez, S., Jiménez, J.M., Yousfi, F.E., and Muñoz, L. 2000. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* **73**, 263–272.
- Melin, T., Jefferson, B., Bixio, D., Thoeye, C., Wilde, W.D., Koning, J.D., Graaf, J., and Wintgens, T. 2006. Membrane bioreactor technology on wastewater treatment and reuse. *Desalination* **187**, 271–282.
- Melis, A. and Happe, T. 2001. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol.* **127**, 740–748.
- Minowa, T., Yokoyama, S., Kishimoto, M., and Okakura, T. 1995. Oil production from algal cells of *Dunaliella tertiolecta* by direct thermochemical liquefaction. *Fuel.* **74**, 1735–1738.
- Morris, I. and Syrett, P.J. 1963. The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. *Arch. Microbiol.* **47**, 32–41.
- Muyzer, G. 1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**, 317–322.
- Muyzer, G., Waal, E.C.d., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of

- complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
- Nakayama, T., Watanabe, S., Mitsui, K., Uchida, H., and Inouye, I.** 1996. The phylogenetic relationship between the *Chlamydomonadales* and *Chlorococcales* inferred from 18S rDNA sequence data. *Phycol. Res.* **44**, 47–55.
- Park, J.B., Park, S.K., Hur, H.W., and Kang, H.** 2009. Estimation of kinetic coefficient in submerged membrane bioreactor for biological nutrient removal. *J. KSEE* **31**, 109–113.
- Park, J.B., Shin, K.S., Hur, H.W., and Kang, H.** 2011. Development of influent controlled membrane bioreactor for biological nutrient removal on municipal wastewater. *J. KSEE* **33**, 485–491.
- Philipp, B. and Schink, B.** 2000. Two distinct pathways for anaerobic degradation of aromatic compounds in the denitrifying bacterium *Thauera aromatica* strain AR-1. *Arch. Microbiol.* **173**, 91–96.
- Pittman, J.K., Dean, A.P., and Osundeko, O.** 2011. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresour. Technol.* **102**, 17–25.
- Rectenwald, L.L.** 2000. Nutrient removal from wastewater effluent using ecological water treatment system. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 522–526.
- Scrugg, A.H., Morrison, J., and Shales, S.W.** 2003. The use of a fuel containing *Chlorella vulgaris* in a diesel engine. *Enzyme Microb. Technol.* **33**, 884–889.
- Shi, L., Cai, Y., Li, P., Yang, H., Liu, Z., Kong, L., Yu, Y., and Kong, F.** 2009. Molecular identification of the colony-associated cultivable bacteria of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* and their effects on algal growth. *J. Freshw. Ecol.* **24**, 211–218.
- Smith, F.W. and Thompson, J.F.** 1971. Regulation of nitrate reductase in *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **48**, 224–227.
- Soeder, C.J.** 1980. Mass production of microalgae: Results and Prospects. *Hydrobiologia.* **72**, 197–209.
- Syrett, P.J. and Morris, I.** 1963. The inhibition of nitrate assimilation by ammonium in *Chlorella*. *Biochimica et Biophysica Acta.* **67**, 566–575.
- Wilkie, A.C. and Mulbry, W.W.** 2002. Recovery of dairy manure nutrients by benthic fresh water algae. *Bioresour. Technol.* **84**, 81–91.
- Yun, Y.S., Lee, S.B., Park, J.M., Lee, C.I., and Yang, J.W.** 1997. Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 451–455.
- Yun, Y.S., Park, J.M., and Yang, J.W.** 1996. Enhancement of CO₂ tolerance of *Chlorella vulgaris* by gradual increase of CO₂ concentration. *Biotechnol. Tech.* **10**, 713–716.