

ORIGINAL ARTICLE

*Chlorella vulgaris*를 이용한 양돈폐수 내 영양염류 및 중금속 제거

오은지 · 황인성¹⁾ · 유진 · 정근욱*

충북대학교 환경생명화학학과, ¹⁾충청북도 동물위생연구소 축산물검사과

Removal of Nutrients and Heavy Metals from Swine Wastewater using *Chlorella vulgaris*

Eun-Ji Oh, In-Sung Hwang¹⁾, Jin Yoo, Keun-Yook Chung*

Department of Environmental & Biological Chemistry, College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

¹⁾Animal Products Inspection Division, Chungbuk Livestock and Veterinary Service, Cheongju 28153, Korea

Abstract

Bioremediation has been recognized as a suitable alternative to conventional methods of removing contaminants, and it uses fungi, bacteria and microalgae. In contrast to other organisms, microalgae are unique in that they have the ability to perform photosynthesis like plants and to utilize organic/inorganic carbon substrates, in a process called phytoremediation. Microalgae can populate a reaction site rapidly and enhance the bioremediation efficiency. In this study, *Chlorella vulgaris* was used to evaluate the removal potentials of the nutrients (N and P) and heavy metals (Cu and Zn) from swine wastewater. The optimum growth conditions for *Chlorella vulgaris* and the removal potentials of N, P, Cu, and Zn from synthetic wastewater using *Chlorella vulgaris* were investigated. Based on the results, the applicability of this microalga to on-site wastewater treatment was examined. Optimal growth conditions for *Chlorella vulgaris* were established to be 28 °C, a pH of 7, and light and dark cycles of 14:10 h. As the concentrations of the nutrients were increased, the efficiencies of N and P removal efficiencies by *Chlorella vulgaris* were decreased in the single and binary mixed treatments of the nutrients, respectively. Further, the efficiencies of Cu and Zn removal also decreased as the heavy metals concentrations added were increased, both in the single and binary mixed treatments. In addition, the efficiency of Cu removal was higher than that of Zn removal. Our results indicate that *Chlorella vulgaris* could be used in treatment plants for the removal of nutrients and heavy metals from swine wastewater.

Key words : *Chlorella vulgaris*, Heavy metals, Nutrients, Phytoremediation, Swine wastewater

Received 1 August, 2018; Revised 3 September, 2018;

Accepted 12 September, 2018

*Corresponding author: Keun-Yook Chung, Department of Environmental & Biological Chemistry, College of Agriculture, Life and Environment Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea
Phone: +82-43-261-3383
E-mail: kychung@cbnu.ac.kr

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

산업이 발달하고 국가경제발전예 따른 국민소득 수준의 향상으로 식생활이 변하면서 육류의 소비량이 점점 증가하고 있다. 또한, 1970년대 정부가 추진한 축산장려 정책에 힘입어 1980년대부터 가축의 사육두수가 증가해 왔다(Kim, 2009). 그러나 축산업의 전업화와 기업화에 따라 발생하는 축산폐수는 나날이 증가하고 있으며, 이는 다량의 고농도, 난분해성 수질오염물질을 함유하고 있어 심각한 환경오염 문제가 되고 있다(Park, 2011; Park et al., 2011). 축산폐수의 발생량은 전체 배출되는 오·폐수량의 1%에 불과하나 다른 폐수보다 고농도의 유기물질과 영양염류 등을 함유하고 있어 질소와 인의 유입으로 인한 호소의 부영양화, 녹조 등을 유발하여 수질오염을 일으킨다(Choi, 2007). 따라서 수질오염 부하량 측면에서는 전체 폐수의 37%를 차지할 정도로 수질오염의 주요소로 작용한다(MOE, 2012). 또한, 가축사료에는 가축의 성장과 질병을 예방하기 위하여 구리, 아연, 비소, 코발트, 망간 등이 함유되어 있으며(Tufft and Nockels, 1991; Seo et al., 2011), 사료에 주입된 중금속이 분뇨로 배설되고 있어 가축분뇨 관리의 중요성은 매우 크다(Oa, 2012).

현재, 국내 가축분뇨 관리 정책은 가축분뇨를 퇴·액비로 자원화하고 있으나, 토양에 살포되는 퇴·액비의 양적 측면에서 살포기준이 마련되지 않아 이를 무분별하게 살포함으로써 퇴·액비 내 영양염류와 중금속이 주변 지하수 및 하천, 호소로 유입되어 수질을 악화시킬 우려가 매우 높다(Lee et al., 2004; NIER, 2014).

실제 축분 퇴·액비의 연속 사용으로 토양 내 구리와 아연의 함량이 증가되었다는 결과가 보고되어 왔으며(Lim et al., 2004; Lloveras et al., 2004; Moreno-Caselles et al., 2005), 최근 축산폐수 내 중금속이 지속적으로 검출되는 문제가 발생되고 있다(Chen and Lin, 2004). 중금속은 물리·화학적 특성상 난분해성 및 축적성이 강한 독성물질이기 때문에 반드시 관리가 필요하다. 이러한 물질은 축산환경에 지속적으로 존재할 경우 수질 및 토양을 오염시키고, 생물농축으로 인해 인체 내 다량 축적될 경우 생체 기능의 심각한 장애를 유발하게 된다(Bruins, 2000; Gikas, 2008). 또한 중금속은 심각한 독성을 발현할 수 있는 잠재력을 가지며, 생태계의 자정능

력으로 쉽게 제거되지 않으므로 축산환경의 건전성을 해치는 주범으로 작용할 수 있다(Lee, 2004).

우리나라의 축산 농가 대부분은 소규모 영세 농가이기 때문에 축산폐수처리에 대한 체계적인 관리가 미흡한 실정이다(Choi, 2007). 더욱이 우리나라 가축분뇨의 자원화 및 정화 처리율은 97%이나(NIER, 2012), 실제 축산농가에서 배출된 가축분뇨가 많은 부분에 야적되어 있으며 허가·신고된 개별처리시설의 방치로 인한 가축분뇨의 부적절한 처리 및 무단방류로 인해 악취유발, 토양 및 지하수 오염을 가속화시키고 있다(Jeong et al., 2013). 축산폐수의 처리는 대부분 자원화하며, 그 외 정화하여 방류하는 방법이 이용되고 있다. 축산폐수를 자원화하는 경우 분과뇨의 성상에 따라 퇴비와 액비 형태로 구분하여 처리하고 있으며(Choi, 2007), 정화처리는 물리, 화학 및 생물학적 처리방법으로 나누어 처리하고 있다. 일반적으로 물리·화학적 처리방법이 적용된 후 생물학적 고도처리가 적용되는데 주로 활성 슬러지 공법이 이용되고 있다(Cai et al., 2013). 반면 고도처리 시 탄소원의 공급, 폐 바이오매스 처분 등 높은 유지 관리비에 비하여 낮은 처리효율의 문제가 있어 소규모 축산농가의 자체정화 처리시설 운영에 적합하지 않다. 또한, 고농도의 경우는 유해 슬러지와 부산물과 같은 2차 오염물질을 발생시킨다(Seo et al., 2006). 따라서 소규모 축산농가의 자체정화시설에 적용할 수 있으며, 고농도 영양염류 및 중금속에 대한 처리효율이 높은 친환경적인 생물학적 처리공정에 대한 연구가 필요하다. 최근 비점오염원 제어를 위해 생물을 이용하여 수질을 정화하는 생물학적 복원(bioremediation)에 관한 연구가 주목 받고 있다. 수생식물을 이용한 방법들이 일부 연구되고 있지만 수생식물은 영양물질 흡수에 있어서 효율이 떨어지며, 식물체가 2차 오염원으로 작용할 우려가 있다(Kim et al., 2007). 반면 일반적으로 농업용 배수로나 하천에서 쉽게 발견되는 사상성 부착조류인 미세조류(microalgae)는 종류와 수가 다양하고 2차 오염을 유발하지 않는다(Kim et al., 2007). 또한, 미세조류는 지구온난화의 주요인으로 작용하는 이산화탄소를 이용하여 폐수 내 질소와 인과 같은 영양염류를 기질로 사용하여 제거할 수 있으며, 중금속을 흡착·제거할 수 있다(Hamasaki et al., 1994; Radmer, 1996; Travieso et al., 1999; Park et al., 2008; Nam et al., 2012). 특히 *Chlorella vulgaris*는 질소와

Table 1. Characteristics of swine wastewater used for the experiment

Sample	pH	T-N	T-P	Cu	Zn
		mg/L			
Swine wastewater A	5.8	6,952	867	15.1	59.7
Swine wastewater B	6.3	5,418	990	34.8	74.7
Swine wastewater C	5.6	6,617	491	25.4	40.8

인 함량이 식물에 비하여 높아 영양염류 처리에 유리하며 양돈폐수 처리에도 효과적이라고 알려져 있다(Sevrin-Reyssac, 1998; Kumar et al., 2010; Lim et al., 2010). 또한, 미세조류는 생태계 내 물질순환 고리의 안전성을 유지시킬 뿐만 아니라 바이오디젤 원료를 생산할 수 있어 기계적 수 처리공정에 비해 경제적이다(Sialve et al., 2009; Lim et al., 2010). 따라서 미세조류를 이용한 중금속 흡착, 폐수처리, 이산화탄소의 고정화 등 미세조류의 환경정화 능력이 주목 받고 있으며, 기존의 처리시설과 연계하였을 경우 시너지 효과가 있을 것으로 기대된다(Travieso et al., 2006; Lim et al., 2010; Oh et al., 2015).

한편, 기존의 미세조류를 이용한 하·폐수 내 중금속 제거(Mehta and Gaur, 2005)와 축산폐수 내 영양염류의 제거(Ji et al., 2013)에 관한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 최근 축산폐수 내 빈번한 중금속 검출로 인한 환경오염발생의 가능성이 증가함에도 불구하고, 축산폐수 내 중금속 정화처리에 관한 연구는 부족한 실정이다. 본 연구에서는 미세조류의 일종으로 *Chlorella*과에 속하는 녹조류 *Chlorella vulgaris*의 최적 배양조건을 확립하고, 인공폐수 내 질소, 인 및 중금속(Cu와 Zn)이 *C. vulgaris*에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 최종적으로 도출된 실험 결과를 바탕으로 축산농가 자체정화시설에서 발생하는 실제 양돈폐수에 *C. vulgaris*를 적용시킴으로써 축산폐수 정화처리효율에 대한 *C. vulgaris*의 현장 적용 가능성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에서 사용된 미세조류 *Chlorella vulgaris*는 한국생명공학연구원 생물자원 센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받았으며, 미세조

류의 보존 및 배양을 위하여 BG 11 (Blue Green) medium을 사용하였다(Feng et al., 2011).

2.2. 축산폐수의 선정

축산폐수 A는 충북에 위치한 대규모 양돈단지로부터 공급받았으며, 축산폐수 B와 C는 소규모 양돈 농가시설에서 배출되는 방류수를 채수하였다. 3곳의 축산폐수는 모두 축사시설에서 배출되는 수로로부터 10 m 떨어진 위치에서 채수하였으며, 4°C 저온실에 보관하였다. 시료의 수질 특성은 Table 1과 같으며, 시험 전 헤파물 제거를 위해 여과 처리하였다.

2.3 인공폐수의 처리

폐수 내 영양염류와 중금속 농도에 따른 미세조류의 성장과 오염원의 제거율을 확인하기 위하여 인공폐수를 제조하여 사용하였다. 처리구 설정은 실험배지에 미세조류를 처리하지 않은 blank, 배지에 미세조류만 처리한 대조구, 단일 및 2종 영양염류(T-N과 T-P)를 각각 4개의 농도로 처리한 영양염류 처리구, 단일 및 2종 중금속(Cu와 Zn)을 각각 3개의 농도로 처리한 중금속 처리구로 하였다. 실험에 사용된 질소와 인은 각각 NaNO₃, NH₄Cl 및 K₂HPO₄ 형태를 이용하였으며, 중금속 표준용액은 Cu standard solution, Zn standard solution(1,000 mg kg⁻¹, Kanto chemical Co., Japan)을 사용하였다. 처리구의 농도설정기준은 충북지역 축산 농가들의 양돈폐수에서 검출되는 질소와 인의 평균농도로 설정하였으며, 설정한 농도는 Table 2와 같다. 실험배지에 포함된 2종 영양염류 및 중금속 처리구는 단일 영양염류와 중금속 처리 시 포함된 양과 동일하게 하였다.

2.4. 미세조류 배양

배지는 반응기 내에서 1 L working volume으로 조류의 초기 집중농도는 배지의 10% (v/v)로 조절하였으며, pH 7, 온도 28°C를 유지시키며 배양하였다. 광원은 식물

Table 2. Treatments of the nutrients and heavy metals and their concentrations in synthetic wastewater

Treatment	Concentration (mg/L)
Total nitrogen (T-N)	500, 1,000, 5,000, 10,000
Total phosphorus (T-P)	500, 1,000, 5,000, 10,000
T-N + T-P	500, 1,000, 5,000, 10,000
Copper (Cu)	10, 30, 50
Zinc (Zn)	10, 30, 50
Cu + Zn	10, 30, 50

재배용 주광색 형광램프(FL20SGP)를 이용하였고, 광주기 Light:Dark = 14:10, 광량은 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 로 설정하여 2주간 배양 후 실험에 사용하였다. 배양 시 공기주입은 따로 하지 않았으나, 하루에 3번 손으로 교반하여 증식에 도움을 주었다. 환경조건에 따른 *C. vulgaris*의 성장 특성을 확인하기 위해 250 mL cell culture flask에서 200 mL working volume으로 조류의 접종농도는 배지의 0.5% (w/v)로 조절하였고, 광량은 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 으로 고정하여 세포 성장에 미치는 온도, pH 및 광주기의 영향을 조사하였다. 조류의 최적 배양 온도를 확립하기 위하여 온도는 15, 25, 28, 35 °C 등으로 변화하여 배양하였다. 초기 pH는 3~10까지 2 단위로 1N NaOH와 1N HCl을 이용하여 조절하였으며, pH meter를 이용하여 측정 하였다. 또한 광주기에 따른 미세조류의 성장을 비교하기 위하여 광주기를 10:14 h, 12:12 h, 14:10 h으로 조절하여 실험하였다. 또한, 인공 폐수와 축산폐수 내 영양염류와 중금속이 *C. vulgaris* 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 250 mL cell culture flask에 200 mL working volume으로 하여 접종되는 조류의 양은 배지 내 10% (v/v)를 차지하도록 하였고, 본 연구를 통해 확립된 최적 배양조건 하에서 배양을 실시하였다.

2.5. 미세조류의 생육도 측정

미세조류의 생육도 측정은 환경부의 수질오염공정시험방법에 준하여 Chlorophyll-*a*로 측정하였다. Chlorophyll-*a*는 시료 10 mL를 유리섬유여과지(GF/F, 47 mm)로 여과한 후, 여과지를 조직 마쇄기에 넣고 90% acetone 10 mL를 첨가하여 마쇄한 시료는 원심분리관에 넣고 밀봉하여 4 °C, 암조건 하에서 하룻동안 방치 후 원심분리 하였다. 원심분리하여 회수한 상층액은

UV-VIS spectrophotometer (Model UV Mini 1240 Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 663 nm, 645 nm, 630 nm, 750 nm 파장으로 측정하였다.

2.6. 수질분석

배지 내 총 질소(Total Nitrogen, T-N)는 환경부의 수질오염공정시험방법에 준하여 자외선 흡광도법을 이용하여 분석을 실시하였으며, 총 인(Total Phosphorus, T-P) 분석은 ascorbic acid에 의한 몰리브덴 청법을 변형하여 880 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다(Kim et al., 2016). 초기 및 최종 질소와 인 농도의 비교를 통해 단일 및 혼합 영양염류 처리구 간 영양염류의 제거 효율을 비교 분석하였으며, 배지 내 중금속 분석을 위해 시료를 2일 간격으로 sampling하였다. 채취한 시료는 Whatman 0.45 μm PP syringe filter를 이용하여 여과하였다. 축산폐수 내 중금속 제거율 분석은 수질오염공정시험방법을 기준으로 질산-황산을 이용하여 산 분해 후 ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer, Perkin Elmer)로 분석하였다. 사용된 중금속의 파장범위는 Cu^{2+} (327.393), Zn^{2+} (206.200)이며, 분석조건은 Table 3과 같다.

2.7. 통계분석

실험 결과의 통계분석은 SAS package (Statistical Analysis System, version 9.1, SAS Institute Inc.)를 이용하여 실시하였다. 실험결과의 유의한 차이를 조사하기 위해 ANOVA (Analysis of Variance) 분석과 Tukey's HSD (Honest Significant Difference) test를 실시하였으며, 신뢰구간은 95% 수준으로 설정하였다. 모든 실험은 3반복 실시하였다.

Table 3. Instrumental conditions for the analysis of heavy metal by ICP-OES

Item	Analysis conditions
RF power	1300 KW
Nebulizer	Seaspray
Plasma flow	15 L/min
Auxiliary flow	0.2 L/min
Nebulizer flow	0.65 L/min
Item	Analysis conditions

3. 결과 및 고찰

3.1. *Chlorella vulgaris*의 최적 배양조건 확립

*Chlorella vulgaris*의 최적 배양조건을 확립하기 위해 배양에 필수적인 온도, pH, 광주기의 변화에 의한 미세조류의 성장을 측정하였다(Fig. 1). 미세조류는 빛, 이산화탄소 외에도 배지성분, 교반속도 및 염 농도 등 다양한 성장인자를 요구한다(Park et al., 2010). 온도 변화에 따른 *C. vulgaris*의 성장특성을 확인하기 위해 배양 온도를 15°C, 25°C, 28°C, 35°C로 설정하였으며, 일정한 시간 간격으로 시료를 채취하여 미세조류의 성장을 측정 한 결과, 28°C에서 가장 좋은 성장이 이루어지는 것을 볼 수 있었다. Choi and Lee(2011)는 *C. vulgaris*가 증식 하는데 걸리는 doubling time이 25~35°C에서 가장 높다고 하였으며, 대부분 미세조류의 최적 성장은 25±3°C에서 이루어진다는 이전의 연구결과와 일치하였다(Choi and Shim, 2012). pH가 *C. vulgaris*의 성장에 미치는 영향을 평가한 결과, *C. vulgaris*는 pH 7에서 가장 높은 성장률을 보였으며, pH 3 조건에서는 성장이 이루어지지 않았다. 이러한 결과는 이전의 연구 결과(Kim et al., 2009; Choi and Shim, 2012)에 부합하는 경향을 보였으며, Tadesse et al.(2004)은 미세조류 배양 시 이산화탄소를 지속적으로 공급하게 될 경우 무기탄소의 가용성에 영향을 미쳐 pH가 감소하게 된다고 하였다. 또한 pH는 미세조류의 대사속도에 직접적인 영향을 주기 때문에 미세조류 배양 시 이산화탄소를 공급할 경우 pH를 중성으로 유지하여야 한다고 하였다. 광주기(light:dark cycle)에 따른 *C. vulgaris* 성장특성은 광기간이 길어질수록 미세조류의 성장이 증가하였으며, 14:10 h 조건에서 가장 높은 성장률을 보였다. 이는 광기간이 길어질수록 미세조류의 성장이 증가한다는 기존의 연구결과에 부

합하였다(Choi and Lee, 2011; Choi and Shim, 2012; Kim and Choi, 2014). Richmond(2008)는 미세조류는 Light reaction을 통해서만 대사에 필요한 ATP와 NDAPH를 생성하기 때문에 광 공급기간이 길어짐에 따라 공급되는 빛의 양이 증가되어 ATP와 NDAPH를 충분히 생성시킴으로써 미세조류의 성장이 증가한다고 하였다.

3.2. *Chlorella vulgaris*의 성장에 미치는 영양염류의 영향 및 제거율

*Chlorella vulgaris*에 대한 단일 및 복합 영양염류 제거효율을 확인하기 위해 질소와 인을 각각 농도 별로 처리한 인공폐수 내 미세조류의 성장 및 영양염류 제거율을 측정하였다. 영양염류 단일 처리 시 *C. vulgaris*는 모든 조건에서 성장이 일어났으나, 질소와 인 처리구 모두 500 mg L⁻¹에서 성장이 가장 우수하였고 처리한 영양염류의 농도가 증가할수록 성장이 더딘 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 또한, 영양염류 혼합 처리 시 *C. vulgaris*는 500 mg L⁻¹ 처리구에서 가장 높은 성장을 보였다(Fig. 3). 단일 영양염류 처리구와 비교 시 복합 처리구의 미세조류 성장이 미세하게 높았으나 큰 차이는 나타나지 않았다. Barsanti and Gualtieri(2014)는 질소와 인은 미세조류가 성장하는데 중요한 영양소이며, ADP와 ATP와 같은 에너지 운반물질, 유전물질, 단백질 및 지질 생성에 반드시 필요하다고 하였다. 또한, 질소는 미세조류 세포에 의해 섭취된 nitrate가 nitrite으로 환원되고 다시 nitrite reductase에 의해 nitrite를 ammonium으로 환원시킨다. 그리고 ammonium은 glutamine synthetase와 glutamate synthetase에 의해 aminoacids 형태로 축적되어 제거된다(Jin et al., 2003; Shi et al., 2007; Choi, 2014). 인은 일반적으로 미세조류 내 orthophosphate

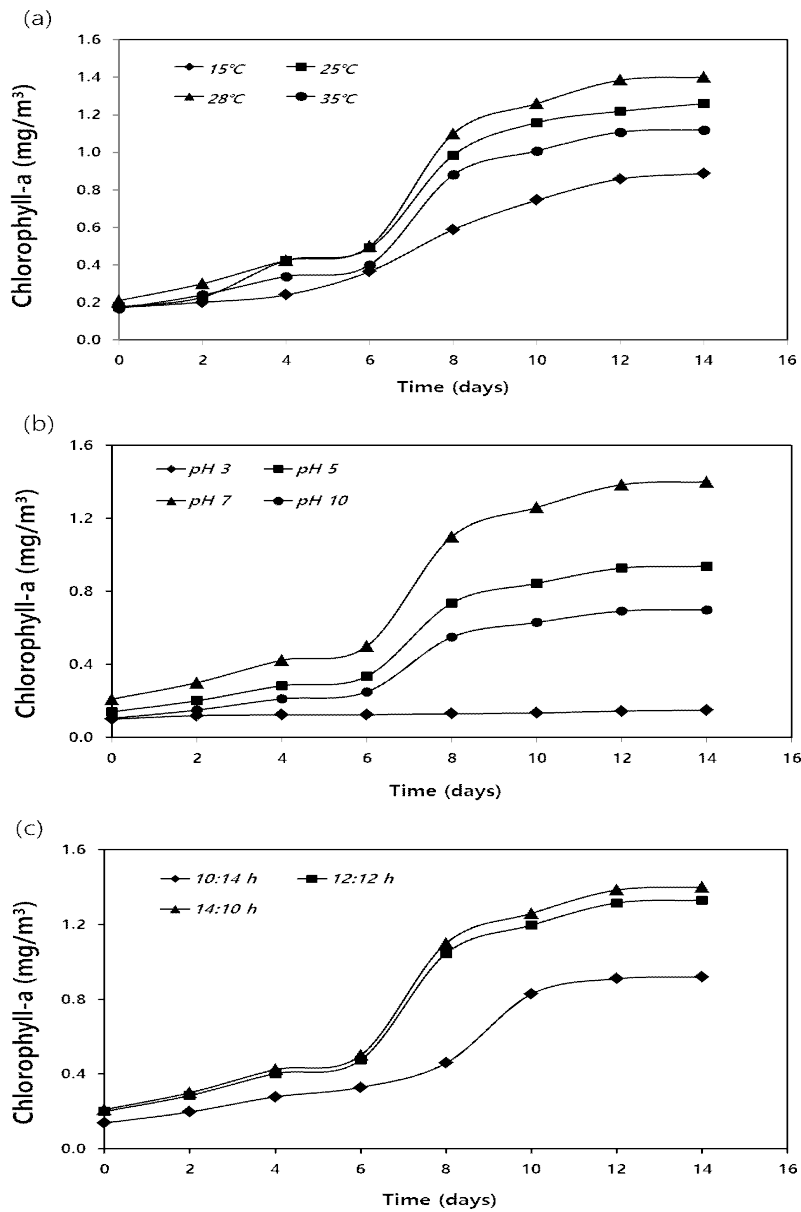


Fig. 1. Growth curves of *Chlorella vulgaris* as affected by the (a) temperature (15, 25, 28 and 35°C), (b) pH (3, 5, 7 and 10) and (c) light:dark ratio(L:D = 10:14 h, 12:12 h and 14:10 h) during the 14 days of incubation.

(PO_4^{2-}) 등의 형태로 흡수되며 내부 및 외부의 인 농도는 미세조류의 탄수화물, 지질 구성에도 영향을 준다 (Borowitzka, 1998; Kim, 2013). 반면, 영양염류의 농도가 증가할수록 *C. vulgaris*의 성장이 저하된 것은 축산 폐수 내 고농도의 유기·무기물질이 *C. vulgaris*의 성장

을 저해시켰다는 이전의 연구결과에 부합하였다(Ji et al., 2013).

단일 및 복합 영양염류 처리 시 *C. vulgaris*의 영양염류 제거효율을 확인하기 위해 초기 영양염류 농도와 최종 영양염류 농도를 측정하였으며, 처리구 별 영양염류

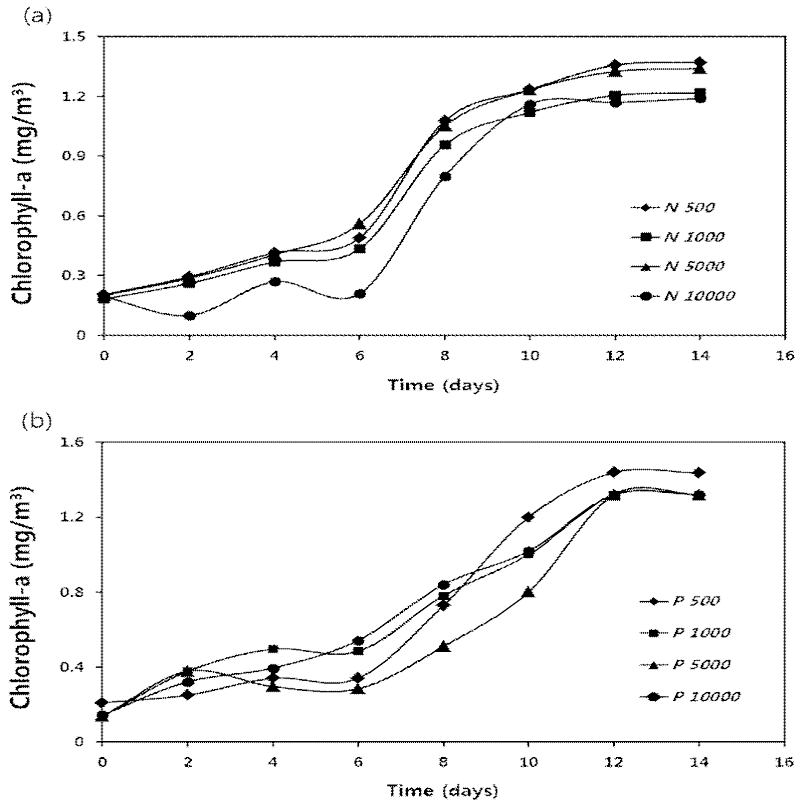


Fig. 2. Growth curves of *Chlorella vulgaris* in synthetic wastewater containing single nutrient; (a) T-N and (b) T-P during the 14 days of incubation.

제거율은 Table 4와 같다. 단일 영양염류 처리 시 농도 (500, 1,000, 5,000 및 10,000 mg L⁻¹)에 따른 *C. vulgaris*의 질소 제거율은 각각 80%, 71%, 23%, 20%로 나타났다. 인 처리구는 질소 처리구와 같이 500 mg L⁻¹에서 50%로 인 제거효율이 가장 높았으며, 5,000 mg L⁻¹와 10,000 mg L⁻¹ 처리구에서 약 18%로 가장 적은 인 제거율을 보였다. 영양염류 혼합 처리 시 각 농도 별 *C. vulgaris*의 영양염류 제거율은 질소와 인 모두 500 mg L⁻¹ 처리구에서 가장 높은 제거율을 보였으며, 처리 농도가 증가할수록 영양염류 제거효율이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 *C. vulgaris*의 성장과 긴밀한 연관이 있다고 사료된다(Fig. 2와 Fig. 3). 또한, 단일 영양염류 처리구와 비교 시 복합 처리구에서 *C. vulgaris*의 영양염류 제거율은 감소하는 것으로 나타났다. Park et al.(1998)의 보고에 따르면 조류의 성장이 배지 내 질소

와 인의 절대적 농도와 N:P 비에 의하여 영향을 받으며, 인의 농도가 고정된 상태에서 배지 내 과량의 질소를 제거할 수 있다고 하였다.

3.3. *Chlorella vulgaris*의 성장에 미치는 중금속의 영향 및 제거율

*Chlorella vulgaris*에 대한 단일 및 2종 복합 중금속 제거효과를 확인하기 위해 Cu와 Zn을 각각 농도 별(10, 30 및 50 mg L⁻¹)로 처리한 인공폐수 내 미세조류의 성장 및 중금속 제거율을 측정하였다. 단일 중금속 처리 시 중금속이 *C. vulgaris*의 성장에 미치는 영향은 Fig. 4와 같다. *C. vulgaris*는 Cu와 Zn을 처리한 즉시 성장이 저해되었으며, 처리한 중금속의 종류와 상관없이 중금속의 농도가 증가할수록 미세조류의 성장이 급격히 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 중금속 2종 혼합 처리 시 단일 처리구와 마찬가지로 중금속의 농도가 증가할수록

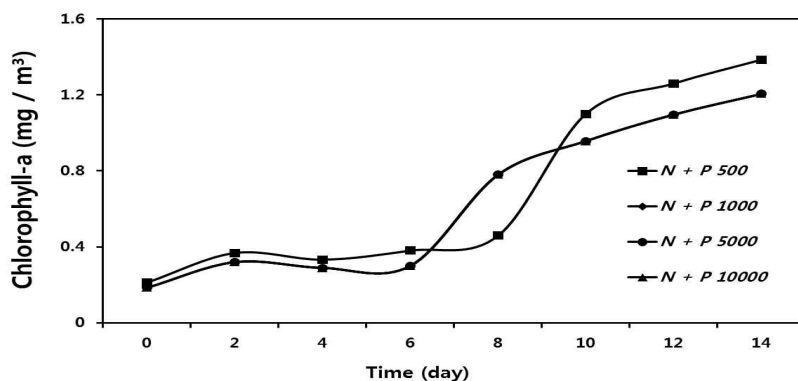


Fig. 3. Growth curves of *Chlorella vulgaris* in synthetic wastewater containing the binary mixed nutrients during the 14 days of incubation.

Table 4. Removal efficiencies of T-N and T-P by *Chlorella vulgaris* in the single and binary mixed treatments, respectively

Treat.	<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Initial conc. (mg/L)	After biotreatment (mg/L)	*RE (%)
single T-N treatment (mg/L)			
500	500 ± 2.08	100 ± 1.53	80.0
1,000	1,000 ± 1.00	290 ± 1.00	71.0
5,000	5,051 ± 1.53	3,914 ± 3.21	22.5
10,000	10,010 ± 2.08	8,059 ± 0.32	19.5
single T-P treatment (mg/L)			
500	500 ± 1.73	250 ± 1.53	50.0
1,000	1,000 ± 1.00	771 ± 1.53	22.9
5,000	5,000 ± 0.66	4,101 ± 0.46	18.0
10,000	10,707 ± 0.19	8,826 ± 0.50	17.6
T-N (500 mg/L) + T-P (500 mg/L)			
T-N	500 ± 2.65	162 ± 2.08	67.6
T-P	501 ± 0.45	250 ± 0.18	50.1
T-N (1 000 mg/L) + T-P (1 000 mg/L)			
T-N	1,005 ± 0.53	700 ± 2.08	30.3
T-P	1,001 ± 1.02	856 ± 1.00	14.5
T-N (5 000 mg/L) + T-P (5 000 mg/L)			
T-N	5,000 ± 1.53	4,000 ± 1.85	20
T-P	5,000 ± 3.06	4,600 ± 1.00	8
T-N (10 000 mg/L) + T-P (10 000 mg/L)			
T-N	10,000 ± 0.58	8,500 ± 1.15	15
T-P	10,000 ± 1.04	9,600 ± 1.11	4

*RE means the removal efficiency.

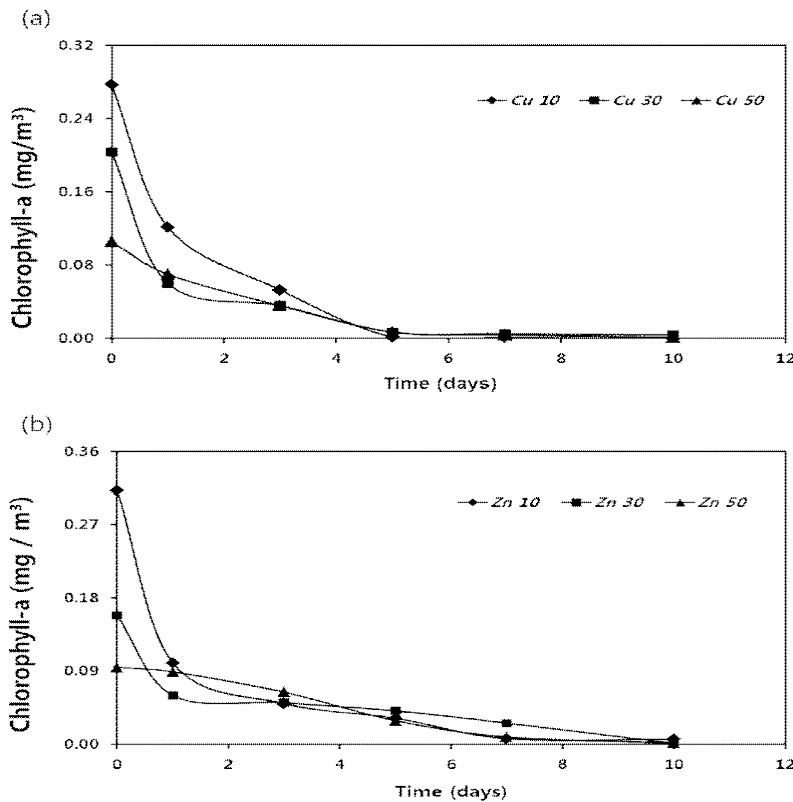


Fig. 4. Growth curves of *Chlorella vulgaris* in synthetic wastewater containing single heavy metal; (a) Cu and (b) Zn during the 14 days of incubation.

*C. vulgaris*의 성장이 저해되는 경향을 보였다(Fig. 5). 중금속 처리에 따른 *C. vulgaris*의 성장 저해효과는 Zn이 Cu보다 강한 것으로 나타났다.

단일 및 2중 혼합 중금속 처리 시 *C. vulgaris*의 중금속 제거율을 평가해본 결과 Table 5와 같다. 처리구별 중금속의 농도변화는 미세조류의 성장이 저해되는 기간 내에도 감소하는 경향을 확인할 수 있었으나 성장이 완전히 멈춘 후에는 어떠한 농도변화도 없었다. 단일 중금속 처리 시 처리한 중금속의 종류와 상관없이 10 mg L⁻¹에서 가장 높은 제거율을 보였으며, 중금속의 농도가 증가할수록 제거율이 감소하는 경향을 보였다. 또한, 중금속 2중 혼합 시 처리농도에 따른(10, 30 및 50 mg L⁻¹) *C. vulgaris*의 중금속 제거율은 Cu는 80%, 23%, 18%였으며, Zn 처리구는 70%, 20%, 16%으로 나타났다. 단일 및 2중 혼합 중금속 처리 시 *C. vulgaris*의 선택성은 Zn

에 비해 Cu가 높은 것으로 나타났다. 반면, 모든 단일 및 복합 중금속 처리구에서 시간이 경과함에 따라서 미세조류의 성장과 중금속 제거율이 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 중금속의 농도가 증가할수록 미세조류의 성장과 중금속 제거율이 감소하였다는 이전의 연구결과와 일치하였다(Kim, 2003; Lim, 2009). 광합성 미생물은 중금속을 물리적 흡착, 이온교환, 화학흡착 및 전자결합 등에 의하여 세포 표면에 축적시킬 수 있으며(Munoz and Guieysse, 2006), Kim et al.(2001)은 일반적인 미생물의 중금속 제거 메커니즘은 대사 의존형 메커니즘과 대사 비의존형 메커니즘이 동시에 작용한다고 하였다. 대사 의존형은 생육에 영향을 미치지 않을 정도의 중금속이 세포 내 축적되는 과정에 의해 중금속이 제거되는 형태(bioaccumulation)이며, 대사 비의존형은 중금속의 농도가 높을 때 세포벽 또는 고분자물질에 중금속이

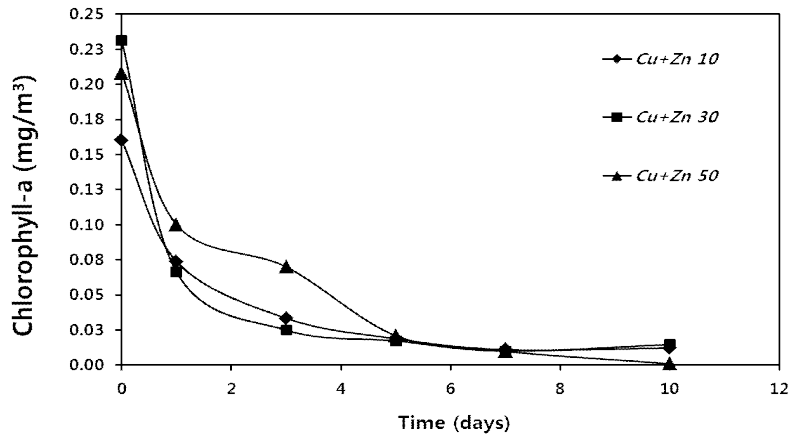


Fig. 5. Growth curves of *Chlorella vulgaris* in synthetic wastewater containing the binary mixed heavy metals during the 14 days of incubation.

부착되어 제거되는 형태(bioadsorption)이다. 따라서, 이러한 결과는 미세조류의 생장이 감소함에 따라 세포 내 축적되는 중금속의 양이 감소하기 때문이라 사료된다.

3.4 양돈폐수 내 *Chlorella vulgaris*의 성장 및 오염원 제거 효과
이전 실험결과를 바탕으로 하여 실제 축산폐수에 대한

Table 5. Removal efficiencies of Cu and Zn by *Chlorella vulgaris* in the single and binary mixed treatments, respectively

Treat.	<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Initial conc. (mg/L)	After biotreatment (mg/L)	*RE (%)
single Cu treatment (mg/L)			
10	10 ± 1.05	4 ± 0.08	62.7
30	30 ± 0.20	23 ± 0.63	23.3
50	51 ± 0.58	43 ± 0.70	15.7
single Zn treatment (mg/L)			
10	10 ± 1.50	5 ± 0.49	50.0
30	30 ± 1.34	24 ± 0.17	20.0
50	50 ± 1.35	42 ± 0.92	16.0
Cu (10 mg/L) + Zn (10 mg/L)			
Cu	10 ± 0.58	2 ± 0.14	80.0
Zn	10 ± 0.40	3 ± 0.03	70.0
Cu (30 mg/L) + Zn (30 mg/L)			
Cu	30 ± 1.00	23 ± 0.15	23.3
Zn	30 ± 0.93	24 ± 0.25	20.0
Cu (50 mg/L) + Zn (50 mg/L)			
Cu	50 ± 0.58	41 ± 0.15	18.0
Zn	50 ± 0.07	42 ± 0.55	16.0

*RE means the removal efficiency.

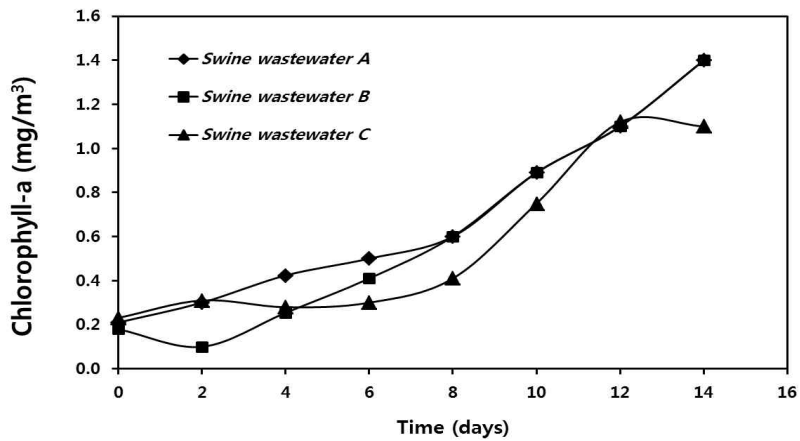


Fig. 6. Growth curves of *Chlorella vulgaris* in (A) swine wastewater A, (B) swine wastewater B and (C) swine wastewater C during the 14 days of incubation.

*Chlorella vulgaris*의 적용 가능성 및 오염원 제거 특성을 평가하였다. 축산폐수 A, B, C 내 *C. vulgaris*의 성장 특성은 인공폐수와 달리 긴 Lag phase가 지속되었으며, *C. vulgaris*가 지속적으로 성장하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 6). A농가의 축산폐수에서 *C. vulgaris*는 8일까지

지 Lag phase가 지속되다가 8일 이후 성장률이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. A농가 축산폐수 내 오염원의 초기 농도는 질소(T-N) 6,952 mg L⁻¹, 인(T-P) 868 mg L⁻¹, Cu 15 mg L⁻¹ 및 Zn 59 mg L⁻¹였으며, 오염원에 대한 *C. vulgaris*의 제거율은 각각 20%, 8%, 60% 및 15%로

Table 6. Removal efficiencies of the nutrients (T-N and T-P) and heavy metals (Cu and Zn) from swine wastewater by *Chlorella vulgaris*

Treat.	<i>Chlorella vulgaris</i>		
	Initial conc. (mg/L)	After biotreatment (mg/L)	*RE (%)
Waste water A			
T-N	6,952 ± 1.80	5,562 ± 1.53	20.0
T-P	868 ± 1.05	798 ± 2.52	8.1
Cu	15 ± 0.26	6 ± 0.58	60.0
Zn	59 ± 0.68	50 ± 0.80	15.3
Waste water B			
T-N	5,418 ± 1.06	4,334 ± 1.53	20.0
T-P	991 ± 0.87	911 ± 0.58	8.1
Cu	35 ± 2.05	27 ± 1.15	22.9
Zn	75 ± 1.47	65 ± 0.67	13.3
Waste water C			
T-N	6,617 ± 1.95	5,294 ± 0.97	20.0
T-P	492 ± 3.53	453 ± 0.81	7.9
Cu	25 ± 1.50	18 ± 0.65	28.0
Zn	41 ± 1.45	35 ± 0.76	14.6

*RE means the removal efficiency.

나타났다. B농가의 축산폐수 내 *C. vulgaris*의 성장특성은 A농가의 축산폐수 내 성장특성과 차이가 유의하지 않았으며, 오염원의 초기농도는 질소(T-N) 5 418 mg/L, 인(T-P) 991 mg L⁻¹, Cu 35 mg L⁻¹ 및 Zn 75 mg L⁻¹으로 측정되었다. 오염원에 대한 *C. vulgaris*의 제거율은 각각 20%, 8%, 23% 및 13%으로 나타났다. C농가의 축산폐수 내 *C. vulgaris*의 성장특성도 이전과 차이가 유의하지 않았으나 A, B농가의 축산폐수에서 미세조류의 성장이 14일까지 증가한 것과 달리 C농가 축산폐수 내 *C. vulgaris*의 성장은 12일에 멈췄다. 오염원의 초기농도는 질소(T-N) 6,617 mg L⁻¹, 인(T-P) 492 mg L⁻¹, Cu 25 mg L⁻¹ 및 Zn 41 mg L⁻¹이며, 오염원에 대한 제거율은 각각 20%, 8%, 28% 및 15%였다. 축산폐수 내 영양염류 및 중금속에 대한 *C. vulgaris*의 성장 및 제거율은 인공폐수와 같이 폐수 내 영양염류 및 중금속의 초기농도가 낮을수록 오염원의 제거율이 증가하는 것으로 나타났다(Table 6). Fig. 6에서 나타낸 바와 같이 *C. vulgaris*가 3곳의 양돈폐수에서 성장이 이루어진 것을 보아 실제 축산폐수에 적용 가능한 종으로 확인할 수 있었다. 성장에 있어서 인공폐수보다 축산폐수에서 Lag phase가 길고 느린 성장속도를 나타냈는데, 이는 실제 축산폐수가 인공폐수와 달리 탁도가 매우 높고 고농도의 축산폐수를 직접 적용하는 경우 부유물에 의해 빛의 전달이 방해받으며, 유기물이나 암모니아성 질소의 농도가 높으면 미세조류의 성장이 저해되기 때문으로 사료된다(Lim et al., 2010). 또한, *Chlorella vulgaris*의 축산폐수 내 영양염류 및 중금속 제거율은 인공폐수와 유사한 경향을 보이는 것으로 나타나 *C. vulgaris*를 이용한 축산폐수 정화처리에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 미세조류는 다른 유지 작물과 달리 빠르게 성장하고 높은 지질 함량을 지니고 있어 바이오디젤 원료로 사용될 수 있으며, 다양한 종류의 단백질, 탄수화물 및 저분자 물질 등을 생성하므로(Guschina and Harwood, 2006) 지질을 추출하고 남아 있는 바이오매스 중 유용한 물질을 추가적으로 얻어낼 수 있어 경제적 가치를 창출할 수 있을 것으로 예상된다.

4. 결론

본 연구에서의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 환경조건 별 *Chlorella vulgaris*의 성장실험을 통해 온도 28℃, pH 7, 광주기(Light:dark cycle) 14:10 h의 최적 배양조건을 확립하였다.

2) 단일 및 복합 영양염류(T-N과 T-P) 처리 시 영양염류의 농도(500, 1,000, 5,000 및 10,000 mg L⁻¹)에 따른 *Chlorella vulgaris*의 제거효율은 처리한 영양염류의 농도가 낮을수록 제거율이 높았다.

3) 중금속(Cu와 Zn)의 농도(10, 30 및 50 mg L⁻¹)에 따른 *Chlorella vulgaris*의 처리효율도 영양염류와 같이 단일 및 2종 혼합 처리구 모두 처리한 중금속의 농도가 낮을수록 제거율이 높았다. 또한, *Chlorella vulgaris*의 중금속 처리효율은 Zn에 비하여 Cu가 높은 것으로 나타났다.

4) *Chlorella vulgaris*를 실제 축산폐수에 적용시켰을 때 농가 별 초기 오염원 농도에 따른 미세조류의 성장, 영양염류(T-N과 T-P)와 중금속(Cu와 Zn)의 처리효율은 인공폐수와 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 본 연구의 결과 축산폐수 내 존재하는 영양염류 및 중금속 제거를 위한 정화처리에 *Chlorella vulgaris*의 적용이 가능하다는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단의 이공학 개인기초연구지원 사업 연구비지원(과제번호 2016R1D1A1B03931634)에 의해 수행되었습니다.

REFERENCES

- Barsanti, L., Gualtieri, P., 2014, Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology, CRC press, U.S.A., 2006.
- Borowitzka, M. A., 1998, Limits to growth, in: Tam, N. F., Wong, Y. S. (Eds.), Wastewater treatment with algae, Springer, Berlin, Heidelberg, 203-226.
- Bruins, M. R., Kapil, S., Oehme, F. W., 2000, Microbial resistance to metals in the environment, Ecotoxicology and Environmental Safety, 45(3), 198-207.
- Cai, T., Park, S. Y., Li, Y., 2013, Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects, Renewable and Sustainable Energy Reviews, 19, 360-369.

- Choi, H. J., 2014, Efficiency of nutrient removal and biomass productivity in the wastewater by microalgae membrane bioreactor process, Journal of Korean Society on Water Environment, 30(4), 386-393.
- Choi, H. J., Lee, S. M., 2011, Effect of temperature, light intensity and pH on the growth rate of *Chlorella vulgaris*, Journal of Korean Society of Environmental Engineers, 33(7), 511-515.
- Choi, S. H., 2007, Treatment and management of the livestock manure, Korean National Committee on Irrigation and Drainage, 14.
- Choi, S. P., Sim, S. J., 2012, Microalgae bioconversion to organic resources form CO₂, KIC News, 15, 11-24.
- Feng, Y., Li, C., Zhang, D., 2011, Lipid production of *Chlorella vulgaris* cultured in artificial wastewater medium, Bioresource Technology, 102(1), 101-105.
- Gikas, P., 2008, Single and combined effects of nickel (Ni (II)) and cobalt (Co (II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review, Journal of Hazardous Materials, 159(2-3), 187-203.
- Guschina, I. A., Harwood, J. L., 2006, Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae, Prog. Lipid Res., 45, 160-186.
- Hamasaki, A., Shioji, N., Ikuta, Y., Hukuda, Y., Makita, T., Hlrayama, K., Matuzaki, H. Tukamoto, T., Sasaki, S., 1994, Carbon dioxide fixation by microalgae photosynthesis using actual flue gas from a power plant, Applied Biochemistry and Biotechnology, 45(1), 799-809.
- Jeong, D. H., Shin, J., Lee, C., Yu, S., Kim, Y., 2013, A Study on the improvement measures of livestock manure management and organic fertilizer use in Nonsan area, Journal of Environmental Impact Assessment, 22(4), 345-359.
- Ji, M. K., Kim, H. C., Sapiroddy, V. R., Yun, H. S., Abou-Shanab, R. A., Choi, J. Y., Lee, W. T., Timmes, T. C., Inamuddin, Jeon, B. H., 2013, Simultaneous nutrient removal and lipid production from pretreated piggery wastewater by *Chlorella vulgaris* YSW-04, Applied Microbiology and Biotechnology, 97(6), 2701-2710.
- Jin, E. S., Polle, J. E., Lee, H. K., Hyun, S. M., Chang, M., 2003, Xanthophylls in microalgae: from biosynthesis to biotechnological mass production and application. Journal of Microbiology and Biotechnology, 13(2), 165-174.
- Kim, D. G., Choi, Y. E., 2014, Microalgae cultivation using LED light, Korean Chemical Engineering Research, 52(1), 8-16.
- Kim, D. H., Yoo, J., Chung, K. Y., 2016, Toxic effects of binary mixtures of heavy metals on the growth and P removal efficiencies of *Alcaligenes* sp., Korean Journal of Environmental Agriculture, 35(1), 79-86.
- Kim, H. W., 2003, Nitrogen removal from anaerobically digested wastewater using microalgae, Master's Thesis, Inha University, Incheon.
- Kim, I. B., Seo, J. H., Lee, H. S., 2001, Biosorption process for removing heavy metals in aqueous solution(II), Korean Society of Environmental Administration, 7(1), 77-85.
- Kim, J. H., Kim, W. I., Lee, J. S., Jung, G. B., Shin, J. D., Sung, J. S., Lee, J. T., Choi, C. M., 2007, Application of microalgae for managing agricultural water quality, Korean Journal of Environmental Agriculture, 26(1), 7-16.
- Kim, T. H., 2013, A Development of next-generation advanced wastewater treatment system using microalgae and LED light source, Ph. D. Dissertation, Kyung Hee University, Seoul.
- Kim, Y. J., Lee, S. H., 2009, A Study on developing the effective management strategies for unregistered animal feeding operations, Gyeonggi Research Institutes, Policy Research, 42, 1-177.
- Kim, Y. M., Kim, M. R., Kwon, T. H., Ha, J. M., Lee, J. H., 2009, Optimum culture conditions for the growth of *Spirulina platensis* NIES 39, Applied Chemistry for Engineering, 20(3), 285-289.
- Kumar, M. S., Miao, Z. H., Wyatt, S. K., 2010, Influence of nutrient loads feeding frequency and inoculum source on growth of *Chlorella vulgaris* in digested piggery effluent culture medium, Bioresource Technology, 101(15), 6012-6018.
- Lee, I. K., Boo, S. M., Lee, S. H., 2004, The diversity and strains of algae, Life Science, 262.
- Lee, M. H., 2004, A Silent environmental bomb! Heavy metals, Journal of the Korean Veterinary Medical Association, 39(7), 616-623.
- Lim, B. R., Jutidamrongphan, W., Park, K. Y., 2010, Comparison of models to describe growth of green algae *Chlorella vulgaris* for nutrient removal from

- piggery wastewater, Journal of the Korean Society of Agricultural Engineers, 52(6), 19-26.
- Lim, B. S., 2009, Effect of competitive interference on the biosorption of heavy metals by immobilized algae, Master's Thesis, Chungbuk National University, Chungbuk.
- Mehta, S. K., Gaur, J. P., 2005, Use of algae for removing heavy metal ions from wastewater: progress and prospects, Critical Reviews in Biotechnology, 25(3), 113-152.
- MOE, 2012, Comprehensive measures for advancement of livestock manure management, Ministry of Environment (MOE), Republic of Korea.
- Munoz, R., Guieysse, B., 2006, Algal - bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, Water Research, 40(15), 2799-2815.
- Nam, G. S., Song, Y. H., Lee, E. H., Bae, Y. S., Kim, M. O., 2012, Water quality improvement by the microalgae in agricultural regions, Water for Future, 45(6), 85-90.
- NIER, 2012, A Pilot investigation on the environmental impact of livestock manure and organic fertilizers, Water Environment Engineering Research, National Institute of Environmental Research (NIER), Republic of Korea.
- NIER, 2014, The study on the status of resource recovery system of livestock manure, Water Pollution Load Management Research, National Institute of Environmental Research (NIER), Republic of Korea.
- Oa, S. W., 2012, Soil adsorption characteristics of heavy metals and antibiotics in piggery waste fertilizer, Journal of Wetlands Research, 14(3), 365-374.
- Oh, S. J., Kwon, H. K., Jeon, J. Y., Yang, H. S., 2015, Effect of monochromatic light emitting diode on the growth of four microalgae species (*Chlorella vulgaris*, *Nitzschia* sp., *Phaeodactylum tricoratum*, *Skeletonema* sp.), Journal of the Korean Society of Marine Environment & Safety, 21(1), 1-8.
- Park, H. J., Jin, E. J., Jung, T. M., Joo, H., Lee, J. H., 2010, Optimal culture conditions for photosynthetic microalgae *Nannochloropsis oculata*, Applied Chemistry for Engineering, 21(6), 659-663.
- Park, J. I., Woo, H. C., Lee, J. H., 2008, Production of bio-energy from marine algae: status and perspectives, Korean Chemical Engineering Research, 46(5), 833-844.
- Park, K. Y., 2011, The study on the treatment of wastewater from mid- and small-size stockbreeding, Master's Thesis, Keimyung University, Daegu.
- Park, K. Y., Lim, B. R., Lee, K. S., Lee, S. K., 2011, Potential use of microalgae *scenedesmus acuminatus* for tertiary treatment of animal wastewater, Journal of the Korean Society of Agricultural Engineers, 53(1), 63-69.
- Radmer, R. J., 1996, Algal diversity and commercial algal products, Bioscience, 46(4), 263-270.
- Richmond, A. (Ed.), 2008, Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology, John Wiley & Sons.
- Seo, Y. C., Lee, H. J., Kim, D. W., 2006, Characteristics of heavy metals biosorption by penicillium biomass, Journal of the Korea Society for Environmental Analysis, 9, 49-54.
- Sevrin-Reyssac, J., 1998, Biotreatment of swine manure by production of aquatic valuable biomasses, Agriculture, Ecosystems & Environment, 68(3), 177-186.
- Shi, J., Podola, B., Melkonian, M., 2007, Removal of nitrogen and phosphorus from wastewater using microalgae immobilized on twin layers: an experimental study, Journal of Applied Phycology, 19(5), 417-423.
- Sialve, B., Bernet, N., Bernard, O., 2009, Anaerobic digestion of microalgae as a necessary step to make microalgal biodiesel sustainable, Biotechnology Advances, 27(4), 409-416.
- Tadesse, I., Green, F. B., Puhakka, J. A., 2004, Seasonal and diurnal variations of temperature, pH and dissolved oxygen in advanced integrated wastewater pond system® treating tannery effluent, Water Research, 38(3), 645-654.
- Travieso, L., Benítez, F., Sánchez, E., Borja, R., Martín, A., Colmenarejo, M. F., 2006, Batch mixed culture of *Chlorella vulgaris* using settled and diluted piggery waste, Ecological Engineering, 28(2), 158-165.
- Travieso, L., Canizares, R. O., Borja, R., Benitez, F., Dominguez, A. R., Valiente, V., 1999, Heavy metal removal by microalgae, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 62(2), 144-151.