



# *Pediastrum duplex*의 single cell 형성에 미치는 영양염류 및 무기탄소의 영향

## Effects of nutrient and inorganic carbon on single cell formation of *Pediastrum duplex*

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

Jae-Hyung Cho<sup>1</sup>·Kyung-Ho Noh<sup>1</sup>·Kyu-Hyun Park<sup>1</sup>·Jung-Seok Jang<sup>2</sup>·Gui-Sook Nam<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

In this study, effects of nutrient and inorganic carbon on single cell emergence during the cultivation of microalgae were observed using colonial green algae, *Pediastrum duplex*. The concentration of inorganic carbon had significant effect on single cell emergence and its growth, but nitrogen and phosphorus concentration showed minor effects. According to *P. duplex* cultivation experiment, single cell started to be emerged around 500~750 mg-C/L of inorganic carbon concentration and it was bloomed dramatically at the higher values. And growth of *P. duplex* was started to be suppressed at the single cell formation concentration. From the results, it could be said that when we operate the microalgae systems for cultivation/harvesting or wastewater treatment, in order to avoid single cell formation, inorganic carbon should be maintained to the proper level.

**Key words:** Inorganic carbon, Microalgae, Nutrient, *Pediastrum duplex*, Single cell

**주제어:** 무기탄소, 미세조류, 영양염류, 페디아스트럼 듀플렉스, 단세포

## 1. 서 론

미세조류는 하천이나 호소 등에 서식하는 독립영양 미생물로서 광합성을 통해 성장하는 미생물이다. 수계에 서식하는 미세조류는 여름철 녹조현상을 발생시켜 경제적, 환경적 측면에서 많은 문제를 야기한다. 이러한 녹조발생의 주된 원인은 고농도 영양염류의 유입에 인한 부영양화이다. 미세조류의 성장은 질소, 인 등의 영양염류의 농도에 따라 영향을 받는데, 일반적으로 수중의 질소와 인의 농도가 높을 경우 조류의 성장량이 증가하는 것으로 알려져 있다 (Li

et al., 2010). 하지만 과도하게 높은 농도의 영양염류는 오히려 미세조류의 성장에 저해를 줄 수 있는 것으로 보고되고 있는데, free ammonia에 의한 미세조류의 성장저해(Azov et al., 1982)등이 대표적인 예이다.

미세조류를 이용한 하폐수고도처리 기술은 미세조류의 성장에 의한 질소, 인, 유기물의 제거 및 처리 후 잉여 미세조류를 수확, 가공하여 바이오 에너지 등으로 활용하는 기술이다. 이러한 일련의 과정 중 수확과정의 경우 전체 공정의 20~30%에 달하는 높은 처리비용을 갖게 되는데, 미세조류의 세포 크기가 커질수록 침강성 등이 증가하고 막여과를 통한 수확에도 용이하기 때문에 세포크기가 큰 미세조류의 이용은 수확

Received 24 January 2018, revised 5 March 2018, accepted 20 March 2018  
\*Corresponding author: Sun-Jin Hwang (E-mail: sjhwang@khu.ac.kr)

pp. 077-087
pp. 089-096
pp. 097-106
pp. 107-113
pp. 115-122
pp. 123-130
pp. 131-143
pp. 145-152
pp. 153-158
pp. 159-168
pp. 169-181
pp. 183-192
pp. 193-200

효율의 향상 및 비용절감 측면에서 필수적이다.

미세조류는 녹조류의 일종인 *Chlorella vulgaris*와 같이 각각의 cell이 독립적으로 부유하며 서식하는 unicellular microalgae와 군체를 이루는 colonial microalgae가 있으며, 본 연구의 대상 종인 *P. duplex*는 colonial microalgae에 속한다. *P. duplex*는 4-128개의 cell이 모여 원형의 군체를 이루며 무성생식과 유성생식을 모두 수행할 수 있는 녹조류이다 (Park et al., 2014). *P. duplex*는 colony의 크기가 15~400  $\mu\text{m}$ 로 크고 높은 질소, 인 제거효율을 갖는다는 측면에서 높은 수처리 효과와 낮은 수확비용을 기대할 수 있는 종으로 사료된다.

하지만 배양조건에 따라 *P. duplex*의 정상적인 colony cell 배양이 이뤄지지 못하고 single cell의 배양이 이뤄지는 현상이 관찰되었는데, 발생한 single cell은 10  $\mu\text{m}$  이하의 cell 크기로 *P. duplex*의 장점인 큰 colony cell을 활용할 수 없는 문제가 발생했다.

*P. duplex*는 pH나 배양기간 등의 조건변화에 따라 cell의 형태와 colony를 이루는 cell의 개수가 바뀐다는 연구는 있지만 (Carmen et al., 2009; Moner, 1954; Neustupa and Hodac, 2005) colonial microalgae인 *P. duplex*가 single cell로 배양되는 현상에 관한 연구는 보고된 바 없다.

수처리 분야에서 *P. duplex*의 효과적인 활용을 위해 안정적인 colony cell 배양 및 single cell의 발생을 줄

일 수 있는 조건에 관한 연구의 중요성으로부터, 본 연구에서는 미세조류 성장의 필수요소인 질소, 인, 무기탄소의 농도에 따른 *P. duplex*의 single cell 발생현상의 관찰 및 발생원인 분석을 통해 *P. duplex*의 안정적인 colony 배양을 위한 조건에 대한 기초적인 연구를 수행하였다.

## 2. 연구방법

### 2.1 *P. duplex*의 분리 및 배양

본 연구에 사용된 *P. duplex*는 경기도 소재 신갈 저수지에서 분리, 배양한 종을 분양받아 자체적으로 배양하여 사용하였다. 실험진행을 위한 전배양은 20 L 원통형 배양조에서 BG11 medium을 이용하였으며, medium의 성상은 아래의 Table 1과 같다

무기탄소의 공급을 위하여 공기를 0.2 vvm으로 폭기해 주었으며, pH는 pH controller(Istek, Korea)를 이용하여 pH 8 로 유지해 주었으며, 온도는 항온 챔버를 이용하여 25 $^{\circ}\text{C}$ 로 유지해 주었다. 광합성을 위한 광원으로는 형광등을 이용하여 광도 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$  (PPFD)로 설정하였으며, 광조사 주기는 12시간(Light) : 12시간(Dark)으로 하여 5일간 배양한 후 실험에 이용하였다.

**Table 1.** Compositions of nutrient medium BG11

Component	Stock Solution Concentration	Amount	Final Concentration
NaNO <sub>3</sub>	30 g/200 mL	10 mL/L	17.6 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.8 g/200 mL	10 mL/L	0.23 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.5 g/200 mL	10 mL/L	0.3 mM
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.72 g/200 mL	10 mL/L	0.24 mM
Citric Acid	0.12 g/200 mL	10 mL/L	0.031 mM
Ferric Ammonium Citrate	0.12 g/200 mL	10 mL/L	0.021 mM
EDTA	0.02 g/200 mL	10 mL/L	0.0027 mM
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.4 g/200 mL	10 mL/L	0.19 mM
BG11 trace material solution		1 mL/L	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86 g/L	-	46 mM
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.81 g/L	-	9 mM
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.22 g/L	-	0.77 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.39 g/L	-	1.6 mM
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.079 g/L	-	0.3 mM
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	49.4 mg/L	-	0.17 mM



## 2.2 반응조 구성

영양염류 농도에 따른 *P. duplex* 배양을 위한 배양조는 총 4기의 원통형 아크릴 반응조로 구성하였다. 부피는 각 2 L이며, 1 L의 working volume으로 배양을 진행하였다. 광조사는 white bar LED를 이용하여 24(L) : 0(D)의 광주기 및 200 PPFD의 광도로 조사해 주었으며, 반응기 내 pH 유지를 위하여 pH controller를 이용하여 pH 8 로 유지해 주었다. 미세조류의 침전을 막기 위해 교반을 해 주었다. 본 연구에서 사용한 광반응조 시스템을 아래 Fig. 1에 사진으로 제시하였다.

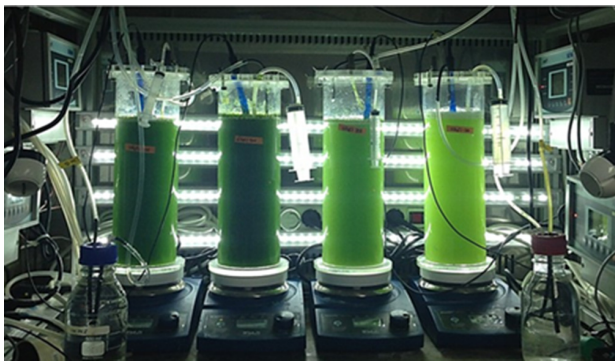


Fig. 1. Photo-bioreactor system used in this study.

## 2.3 실험방법

*P. duplex*의 single cell 발생을 유발하는 인자들 중 영양염류의 농도에 따른 single cell 발생 정도를 확인하기 위해 질소, 인의 농도와 무기탄소의 농도를 각각 고농도와 저농도 조건으로 나누어 실험을 진행하였다.

*P. duplex*의 single cell 발생에 영향을 주는 인자를 파악하고자 조건을 4 가지로 나누어 실험을 진행하였다. 질소, 인의 조건은 N/P ratio와 무기탄소 조건을 각각 고려하여 4 가지 실험조건을 설정하였다. 고농도 조건의 질소, 인, 무기탄소 조건(control 조건), 고농도의 질소, 인과 저농도의 무기탄소 조건(C low 조건), 저농도의 질소, 인과 고농도의 무기탄소 조건(N/P low

조건), 저농도의 질소, 인, 무기탄소 조건(N/P/C low 조건)으로 네 가지 실험조건을 설정하였다. 실험 조건은 아래의 Table 2에 나타내었다.

모든 실험 조건에서 *P. duplex*의 초기 접종농도는 0.05 OD로 동일하게 설정해 주었으며, 총 6일간 실험을 진행하였다.

무기탄소의 농도에 의한 *P. duplex*의 single cell 배양에 관한 실험에서는 무기탄소의 농도에 따른 *P. duplex*의 single cell 발생량을 측정했다. 무기탄소 농도를 250 mg-C/L, 500 mg-C/L, 750 mg-C/L 및 1000 mg-C/L 네 가지로 나누어 실험을 진행하였다. 질소 및 인의 농도는 앞선 실험의 N/P low 조건과 같은 25 mg-N/L 및 2.5 mg-P/L로 네 조건 모두 동일하게 설정해 주었다. C/NP는 fed-batch 방식으로 운전했는데, 하루 한 번씩 초기 농도 값으로 조정해 주면서 운전하였다.

## 2.4 *P. duplex*의 성장량 및 single cell 발생량 분석 방법

*P. duplex*의 single cell 개체수를 측정하여 영양염류 농도조건에 따른 single cell 발생 정도를 파악하였다. Single cell 발생량을 정량적으로 파악하기 위해 혈구 계수기를 이용하여 cell-density를 측정했다. Cell density 측정은 수질오염공정시험기준의 ‘식물성 플랑크톤 현미경 계수법’을 이용했으며, 현미경을 이용하여 계수하였다.

$$\text{개체수 / mL} = \frac{C}{A \times D \times N} \times 1000 \text{ [Eq. 1]}$$

- C = 계수된 개체수의 합
- A = 혈구 계수기 면적 (mm<sup>2</sup>)
- D = 혈구 계수기 깊이 (mm)
- N = 검정한 시야의 횡수

*P. duplex* 성장량은 분광광도기(Optizen POP, Mecasys Co., Ltd, Korea)를 이용해 660 nm 파장에서 optical density를 측정하여 평가하였다.

Table 2. Experimental conditions for single cell formation study

	Control	N / P low	C low	N / P / C low
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N : 250 mg-N/L	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N : 25 mg-N/L	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N : 250 mg-N/L	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N : 25 mg-N/L
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P : 7.1 mg-P/L	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P : 2.5 mg-P/L	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P : 7.1 mg-P/L	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -P : 2.5 mg-P/L
Inorganic carbon	1000 mg-C/L	1000 mg-C/L	250 mg-C/L	250 mg-C/L

pp. 077-087

pp. 089-096

pp. 097-106

pp. 107-113

pp. 115-122

pp. 123-130

pp. 131-143

pp. 145-152

pp. 153-158

pp. 159-168

pp. 169-181

pp. 183-192

pp. 193-200

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 질소, 인 및 무기탄소 농도에 따른 single cell 발생량

광학현미경을 이용하여 *P. duplex*의 dead colony cell과 single cell의 형태를 관찰하였으며, 그 형태는 아래와 같다(Fig. 2).

*P. duplex*의 colony cell은 4~128개의 cell이 모여 하나의 colony 형태를 이루었지만, single cell은 colony를 이루지 않고, 단세포 형태로 배양되는 모습을 보였다.

질소, 인 및 무기탄소의 농도에 따른 *P. duplex*의 single cell 발생량을 확인하였으며, 각 조건에 따른 *P. duplex*의 성장량을 Fig. 3에 나타내었다.

*P. duplex*의 성장량을 비교해 보면, C low 조건과 C/N/P low 조건에서의 성장량이 비슷하게 나타났으며, 다른 두 조건에 비해 높게 나타났다. Control 조건의

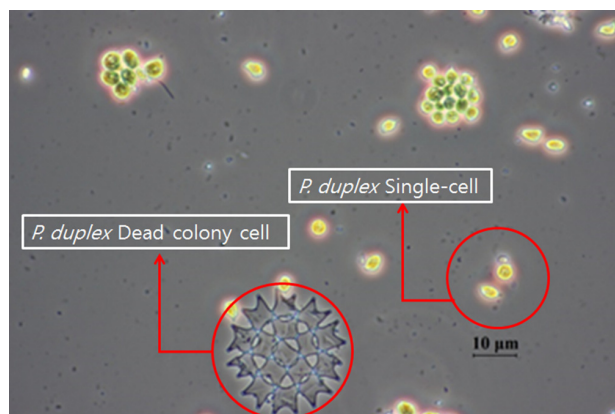


Fig. 2. Single cell and dead colony cell of *P. duplex* (x1000, oil).

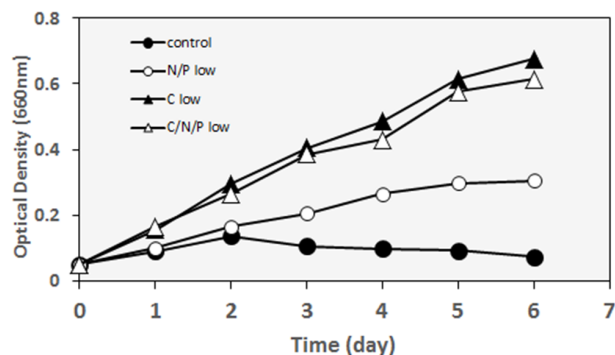


Fig. 3. Optical density of *P. duplex* according to nutrient concentration.

*P. duplex*의 성장은 시간이 지남에 따라 감소했는데, 이는 control 조건에서 사상형 미세조류에 의한 오염이 발생되었고, 응집을 일으키는 사상형 미세조류의 성장 특성에 의해 응집이 발생하여 오차가 발생한 것으로 보인다.

따라서 control 조건을 제외하고 3가지 조건을 서로 비교해 보면, N/P low 조건의 성장량은 C/N/P low 조건과 C low 조건에 비해 전체적으로 낮게 측정되었다. N/P low 조건과 C/N/P low 조건의 차이점은 무기탄소의 농도 차이로써, 이러한 조건간의 성장량 차이는 무기탄소의 농도에 따라 성장속도 차이가 발생한 것으로 보인다. Carvalho et al. (2004)의 연구에 의하면 무기탄소에 의한 미세조류의 성장저해는 미세조류 중에 따라 유의적으로 다를 수 있다고 언급하고 있다. 이러한 사실을 바탕으로 본 연구에서는 고농도의 무기탄소에 의해 *P. duplex*의 성장저해가 발현된 것으로 판단된다.

영양염류 농도에 따른 *P. duplex*의 single cell 발생량을 Fig. 4에 나타내었다. 초기에 집중해 준 *P. duplex*에서는 single cell이 발견되지 않았으며, 3일차까지는 조건간의 유의한 차이가 발견되지 않았다. 그러나 4일차 이후 N/P low 조건에서 single cell의 개체수가 증가하였다. Park et al. (2014)의 연구에 따르면 *P. boryanum*의 life cycle은 3일에서 12일 정도로 언급하고 있는데, 이러한 life cycle에 따라 3일 이후부터 single cell의 발생량 차이가 조건에 따라 상이하게 나타난 것으로 판단된다. 저농도의 무기탄소 조건인 C low 조건과 C/N/P low 조건의 경우 6일차까지 single cell의 발생이 적었지만, 고농도 무기탄소 조건인 control 조건과 N/P low 조건의 *P. duplex*는 single cell 개체수가 비교적 많았다. 이상의 경향으로부터 무기탄소의 농도에 의해 *P. duplex*의 single cell 발생량이 결정되는 것으로 사료된다.

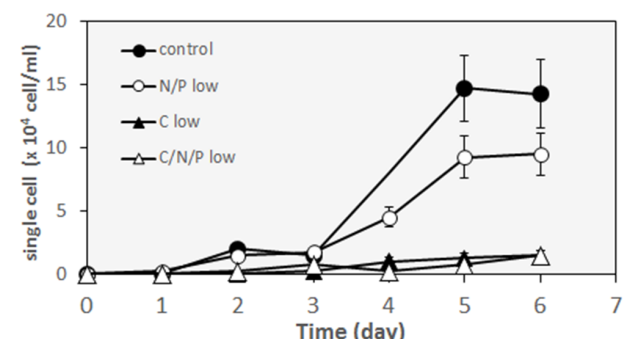


Fig. 4. Single cell counting of *P. duplex* according to nutrient concentration.



### 3.2 *P. duplex*의 single cell이 출현되는 무기탄소 농도

무기탄소의 농도에 의한 *P. duplex*의 single cell 발생이 증가함을 확인하였으며, 이에 따라 무기탄소 농도 조건변화에 따른 *P. duplex* 배양실험을 진행하였으며, 그 결과를 Fig. 5 에 나타냈다.

무기탄소의 농도에 따른 성장량 차이는 250 mg-C/L 조건과 500 mg-C/L 조건에서 큰 차이를 보이지 않았으며, 높은 성장량을 나타냈다. 그러나 500 mg-C/L 이상인 750 mg-C/L과 1000 mg-C/L 조건에서는 성장량이 낮았다. 이러한 결과를 통해 *P. duplex*의 성장을 저해시키는 무기탄소 농도는 본 실험의 경우, 500~750 mg-C/L 사이의 값으로 사료된다.

무기탄소 농도에 따른 single cell 발생을 아래 Fig. 6 에 나타냈다. 앞선 영양염류 및 무기탄소 농도에 대한 실험과 마찬가지로 250 mg-C/L의 조건에서는 single cell의 발생이 적었으며, 무기탄소의 농도가 증가할수록 single cell의 발생이 증가하였다. 500 mg-C/L 조건의

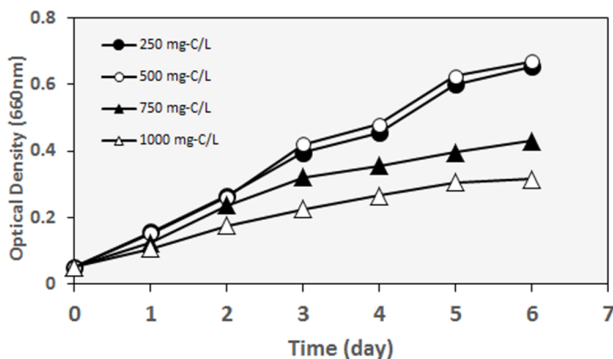


Fig. 5. Optical density of *P. duplex* according to the inorganic carbon concentration.

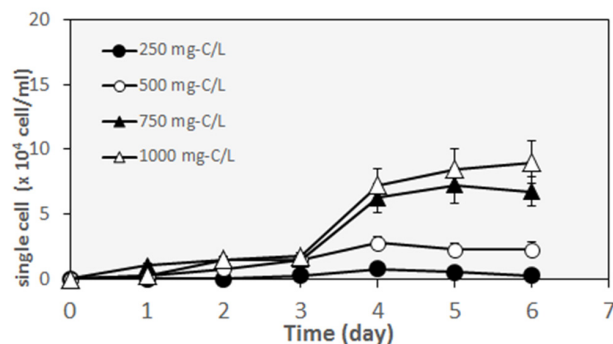


Fig. 6. Single cell of *P. duplex* according to the inorganic carbon concentration.

경우 250 mg-C/L 조건과 같이 전체적인 single cell의 개체수는 적었으며, 두 조건의 cell density 차이는 측정과정에서 발생할 수 있는 오차범위 내의 값으로 사료되며, 두 조건의 single cell 발생량은 유의한 차이로 볼 수는 없으며, 750 mg-C/L 조건에서는 유의한 차이를 보였다. 이에 따라 500~750 mg-C/L 조건에서 single cell의 발생이 증가한 것으로 보인다.

*P. duplex*의 성장량이 감소한 조건과 마찬가지로 750 mg-C/L 조건에서부터 single cell 발생이 증가하는 것으로 확인되었으며, 이에 따라 *P. duplex*의 single cell 발생량 또한 500~750 mg-C/L 사이의 농도에서 증가하는 것으로 사료된다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 colonial green algae인 *P. duplex*의 single cell 배양에 영향을 주는 조건에 관한 연구를 진행하였다. 연구결과, *P. duplex*의 배양과정에서 single cell의 발생 증가는 고농도의 무기탄소에 의한 영향이 큰 것으로 판단되며, 질소 및 인의 농도에 의한 영향은 크게 나타나지 않았다.

*P. duplex*의 single cell 발생을 야기하는 무기탄소 농도는 본 연구의 경우 500~750 mg-C/L로 사료되며, 이 이상의 무기탄소 조건에서는 single cell 발생이 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 또한, 무기탄소 농도에 의한 *P. duplex* 성장량을 비교해 본 결과, single cell 발생을 야기하는 무기탄소 농도와 유사한 500~750 mg-C/L 에서 성장저해가 나타나기 시작했으며, 그 이하의 농도에서는 무기탄소의 고갈이 없다면 농도에 관계 없이 비슷한 성장량을 나타냈다.

무기탄소 농도가 750 mg-C/L 이상으로 증가함에 따라 single cell의 발생량이 증가한 결과에 대한 이유는 현재로서는 선행연구를 포함하여 명확하게 밝혀져 있지 않으나, 배양조건의 악화에 의한 현상 중의 하나로 추정된다. *P. duplex*를 포함한 유성생식이 가능한 미세조류는 주변 환경이 성장에 유리한 조건인 경우, 무성생식을 진행하며, 조건이 악화되어 성장을 저해하는 조건이 되면 유성생식으로 번식을 하게 된다 (De Wreede and Klinger, 1990). *P. duplex*의 single cell 현상은 일반적인 분열방식인 무성생식이 아닌 성장 저해 조건에 의한 유성생식에서 형성되는 것으로 보인다.

- pp. 077-087
- pp. 089-096
- pp. 097-106
- pp. 107-113
- pp. 115-122
- pp. 123-130
- pp. 131-143
- pp. 145-152
- pp. 153-158
- pp. 159-168
- pp. 169-181
- pp. 183-192
- pp. 193-200

그러나, Park et al. (2014)의 연구에 따르면, *Pediastrum sp.*의 유성생식 과정에서 생성되는 생식세포는 2  $\mu\text{m}$  이하의 크기를 갖는다고 보고한데 반해, 본 연구에서 발견된 single cell은 2  $\mu\text{m}$  이상인 사실 등으로부터 이와 관련된 연구가 향후 추가로 진행될 필요가 있는 것으로 사료된다.

본 연구를 통해, 향후 *P. duplex*를 이용한 효율적인 수처리 시스템의 설계 및 배양 등에 있어, single cell 발생 등에 따른 처리효율 저하 등의 문제를 피하기 위해서는 배지나 하폐수 내 무기탄소 농도가 고려되어야 할 필요가 있으며, 무기탄소 농도 500 mg-C/L 이하로 배양된다면 *P. duplex*의 colonial 배양은 효율적으로 수행될 수 있을 것으로 사료된다.

## 사 사

본 연구는 2017년도 한국농어촌공사 기본연구과제 및 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다. (No. NRF-2017R1A2B4008906)

## References

Azov, Y., Goldman, J.C. (1982). Free ammonia inhibition

of algal photosynthesis in intensive cultures, Appl. Environ. Microbiol., 43(4), 735-739.

Carmen R., Segura, M., Rodrigo, M.A. and Salazar, G. (2009). Factors controlling the colonial structure of *Pediastrum tetras* (Chlorophyceae), Hydrobiologia, 617(1), 143-155.

Carvalho, A.P., Malcata, F.M. (2005). Optimization of  $\omega$ -3 fatty acid production by microalgae: Crossover effects of CO<sub>2</sub> and light intensity under batch and continuous cultivation modes, Mar. Biotechnol., 7(4), 381-388.

Li, X., Hu, H.Y., Gan, K. and Sun, Y.X. (2010). Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.*, Bioresour. Technol., 101(14), 5494-5500.

Moner, J.G. (1954). Evidence for a swarming substance which stimulates colony formation in the development of *Pediastrum duplex* Meyen, Biol. Bull., 107(2), 236-246.

Neustupa, J., Hodac, L. (2005). Changes in shape of the coenobial cells of an experimental strain of *Pediastrum duplex* var. *duplex* (Chlorophyta) reared at different pHs, Preslia, 77(4), 439-452.

Park, J.B.K., Craggs, R.J. and Shilton, A.N. (2014). Investigating the life-cycle and growth rate of *Pediastrum boryanum* and the implications for wastewater treatment high rate algal ponds, Water Res., 60, 130-140.

De Wreede, R.E., Klinger, T. (1990). *Plant Reproductive Ecology PATTERNS AND STRATEGIES*, OXFORD UNIVERSITY PRESS, New York, pp.267-284.