

# 실제 하수조건에서 조류-세균 복합군집의 생태적 상호작용 및 영양염류 제거 특성 규명 Characterization of Algal-Bacterial Ecological Interaction and Nutrients Removal Under Municipal Wastewater Condition

이장호 · 박준홍<sup>†</sup>  
Jangho Lee · Joonhong Park<sup>†</sup>

연세대학교 사회환경시스템공학부  
School of Civil and Environmental Engineering, Yonsei University

(2011년 2월 25일 접수, 2011년 5월 23일 채택)

**Abstract :** Algal biomass cultivated by wastewater is potentially useful resource for biodiesel production. However, little is known about algal nutrient metabolism and microbial interaction with bacteria under real municipal wastewater condition. In this work, we characterized nitrogen and phosphorus removals of municipal wastewater by a representative wastewater-growing algal population. *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2, and analyzed its ecological interaction with wastewater bacterial communities. Compared to wastewater sludge itself, algal-bacterial co-culture improved nutrient removal. According to bacterial community analysis with 16S rRNA genes, a selective and dominant growth of a Unclassified Alcaligenaceae population resulted from algal growth in the algal-bacterial co-culture. The selectively stimulated bacterial population is phylogenetically close to *Alcaligenes faecalis* subsp. 5659-H, which is known to be co-present interact with algae in aquatic environment. These findings suggest that algal growth/metabolism may have effects on selection of a specific bacterial population in algal-bacterial co-cultures that can efficiently remove nutrients from municipal wastewater.

**Key Words :** Algae, Bacteria, Microbial interaction, Nutrient removal, Biodiesel

**요약 :** 하수를 이용해서 배양된 조류는 바이오디젤 생산에 유용한 자원이다. 그러나 실제 하수에서 조류의 영양염류 신진대사와 하수 세균과의 상호작용에 관한 연구는 미흡하다. 본 연구에서는 하수로 배양되는 대표적 조류균주인 *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2에 의한 하수 내 질소, 인 제거 거동을 평가하였고, 조류와 상호작용하는 하수 내의 세균 군집을 분석하였다. 하수 슬러지 세균 군집과 비교하였을 때, 조류-세균 복합 군집은 하수 내보다 높은 영양염류 제거를 보였다. 16S rRNA 유전자 분석 결과, 조류-세균 군집에서 조류가 성장함에 따라 Unclassified Alcaligenaceae 세균이 선택적으로 우점됨을 알 수 있었고, 조류에 의해서 선택적으로 우점화된 하수세균은 자연 수질 환경에서 조류와 공생적으로 상호작용 하는 것으로 알려진 *Alcaligenes faecalis* subsp. 5659-H와 계통학적으로 가까운 것으로 밝혀졌다. 본 연구의 결과, 하수 내의 높은 영양염류 제거를 보이는 조류-세균 복합 군집에서의 조류의 성장 및 신진대사가 특정 세균의 분포에 영향을 주는 것을 알 수 있었다.

**주제어 :** 조류, 세균, 미생물 상호작용, 영양물질 저감, 바이오디젤

## 1. 서론

지구 온난화에 의한 기후변화에 따라 저탄소 녹색성장의 필요성이 대두되고 있다. 또한 화석 연료 사용의 한계와 그에 따른 에너지 수요 증가의 대안으로 신재생에너지의 개발 및 공급의 필요성이 증가하고 있다.<sup>1)</sup> 환경에서 나오는 유해 폐기물, 슬러지 등을 환경 바이오매스라 하는데, 갈수록 증가하는 환경 바이오매스를 사용하여 에너지를 생산하는 것은 이러한 녹색 성장의 필요성과 더불어 폐자원의 재생적인 측면에서도 매우 효율적이라 할 수 있다. 이러한 환경 바이오매스 중 하나인, 조류는 다른 생물 자원에 비해, 바이오디젤 생산에 필요한 지질 함량이 월등히 높아, 바이오디젤 생산에 효과적이다.<sup>2)</sup>

하수처리 관점에서 기존 생물학적인 하수처리 방법은 높은 유기물 제거에 비교하여, 질소 및 인의 처리는 효과적이지 못하지만, 조류의 이용은 하수 내의 질소와 인의 효과적

인 제거가 가능하며, 세균의 질산화에 따른 암모늄 제거와 세균-조류 군집에 의한 질산성 질소의 제거가 가능하다.<sup>3-9)</sup> 또한 세균에 의한 생물학적 인처리는 충분한 인제거가 힘든 반면, 조류는 광합성 작용에 의해 인을 다량 섭취하게 되어 인을 제거 할 수 있다.<sup>10)</sup> 이러한 조류-세균 군집의 영양염류 제거와 세균의 하수의 유기물 분해 작용으로 인한 조류-세균 군집의 효과적인 하수처리가 가능하다.<sup>10)</sup>

또한 조류-세균 군집에 의한 질소와 인의 신진대사는 바이오디젤 생산을 위한 전구물질인 조류 지질 함량과 구성 성분에 영향을 끼친다.<sup>11,12)</sup> 하수 환경 내 영양염류의 농도 조건에 따라 조류의 지질 함량과 구성 성분은 차이를 보이며, 이는 최적 바이오 디젤 생산을 위한 중요한 인자가 된다.

지질 함량이 높은 조류종인 *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2은 선행 연구 결과, 실제하수조건에서 적용 가능하고, 질소와 인의 제거에 효과적인 것으로 나타났다.<sup>13,14)</sup> 하지만 실제하수조건에서 조류-세균 군집 내에서 조류와 세균 사이

<sup>†</sup> Corresponding author E-mail: parkj@yonsei.ac.kr Tel: 02-2123-5798 Fax: 02-312-5798

의 질소 및 인의 신진대사에 대한 충분한 지식이 부족하며, 이에 따른 조류와 상호작용하는 세균 종에 대한 정보도 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 실제 공정에 적용 및 하수처리 공정에서의 효율상승을 위하여 하수적용이 가능한 *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2의 조류-세균 복합 군집에 의한 하수 영양물질 저감 거동을 살펴보고, 조류의 성장에 따라서 어떠한 세균들이 선택적으로 상호작용을 하였는지를 분자생물학적 기법으로 분석하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 실험재료

조류를 배양하기 위하여 서남 하수처리장에서 하수 유입수 시료를 채취하였으며(3월), 채취한 시료내에 존재하는 조류를 제거하기 위해 1.2 µm 크기인 47 mm GF/C Glass filter (Whatman plc, UK) 로 여과를 하였다. 실험에 사용된 조류 종은 기존 연구 결과로 선정된 *Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2이고, 한국생명공학연구원(KRIBB)의 생물자원센터로부터 분양 받았다.<sup>14)</sup>

### 2.2. 실험장치의 구성

7개의 5 L크기의 유리 반응조에 1.2 µm 크기의 여과지로 여과된 하수를 5 L씩 넣은 후, 각 반응조에 조류의 염록소 a 초기농도 31.12 µg/L 인 조류 (*Ankistrodesmus gracilis* SAG 278-2)와 활성슬러지를 0~1,000 mL의 다른 농도로 주입하였다. 주입 슬러지 세균 군집의 영향을 보기 위해서 1~3번 반응조에서는 활성슬러지 접종량을 500 mL과 1,000 mL 및 0 mL로 변화하였다. 조류만의 영향을 보기 위해서 4번 공시료를 준비하였다. 하수내 세균군집의 영향만을 분석하기 위해서 5번 공시료를 준비하였다. 조류가 없는 경우 하수내 세균과 활성슬러지내 세균 간의 상호작용을 분석하기 위해서 6번과 7번 실험을 준비하였다(Table 1). 총 7개의 반응조에 110 rpm의 속도로 교반을 해주었으며, 공기펌프를 이용하여 공기 0.3 vvm로 유지하였고, 열선을 반응을 반응조 측면에 설치한 후, 132 µE의 광도로 9일 동안 적용하여 1일 간격으로 각 반응조의 시료를 채취했다.

### 2.3. 실험방법

#### 2.3.1. 조류의 성장 측정 방법

조류의 성장은 1~4번 반응조의 조류를 시간의 변화에 따라 염록소 a를 통하여 관찰 하였다. 채취된 시료의 흡광도(649, 665, 750 nm)를 T 60 UV / VIS Spectrophotometer (PG Instruments Ltd., UK)를 이용하여 각각 측정하였다. 측정된 흡광도를 아래의 식에 적용하여 염록소 a를 구하였다.<sup>15)</sup>

#### 2.3.2. 하수 배양된 각 조류의 지질 함량 분석 방법

조류가 주입된 1~4번 반응조에서 9일 동안 성장한 조류를 수거하여 각 조류의 지질 함량을 분석 하였다. 각 시료를 동결 건조한 후, Cellulose Extraction Timbles Filter (Whatman plc, UK)에 넣고, Soxhlet 추출기에 유기용매 n-Haxane을 이용하여 지질을 추출하였다.<sup>16)</sup> 그리고 빈 플라스크의 질량에서 n-Haxane을 증발 시킨 후 남아있는 지질이 포함된 플라스크의 질량 차를 이용하여 조류의 지질 함량을 도출 하였다.

#### 2.3.3. 세균의 성장 측정 방법

세균의 성장 분석은 1~3번, 5~7번 반응조의 세균을 시간별 시료 내 배양된 세균을 정량적으로 검출하기 위해서 시료를 이용하여 배양된 집락을 확인하는 평판확산법(spread plate method)을 이용했다. 하수 안의 중속영양세균을 배양하기 위해 상대적으로 낮은 탄소를 가지고 있는 R2A Agar를 사용하여 환경시료를 접종하였다.<sup>17,18)</sup> 그 후, 접종된 배지를 20°C에서 3일 동안 배양한 후에 형성된 군집수를 세었다.<sup>19)</sup>

#### 2.3.4. 활성슬러지 식종량에 따른 조류-세균 군집의 하수 처리 거동 분석 방법

모든 반응조의 운전시간 변화에 따른 시료수로 사용된 하수의 용존 COD, 총질소(TN), 암모늄이온(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N), 질산이온(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N), 총인(TP), 인산이온(PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P)을 측정하였다. 채취된 시료를 공극이 0.2 µm 크기인 Nylon Filter로 여과한 후, HACH 발색법을 사용하였다. 주요 오염 인자는 COD, 총질소, 암모늄이온, 질산이온, 총인, 인산이온이며, 이를 측정하기 위해 HACH에서 제공하는 COD Digestion vial(Cat. 21 259-15), Total Nitrogen Reagent Set (Cat. 27141-00), Nitrogen-Nitrate Reagent Sets(Cat. 26053-45), Nitrogen-Ammonia Reagent Set(Cat. 26069-45), Total Phosphorus Reagent Set (Cat. 27426-45), Orthophosphate Phosphorus, Reactive (Cat. 276-73-45) (HACH Company, USA)를 사용하였고, 각 인자의 농도측정은 DR 4000 Spectrophotometer (HACH Company, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.<sup>14)</sup>

Table 1. Experimental set-up

Case	1	2	3	4	5	6	7
Alage ( <i>Ankistrodesmus gracilis</i> SAG 278-1)	500 mL	500 mL	500 mL	500 mL	N,I,*	N,I,*	N,I,*
Bacteria (wastewater)	Y	Y	Y	N,I,*	Y	Y	Y
Bacteria (Activated Sludge)	500 mL	1,000 mL	N,I,*	N,I,*	N,I,*	500 mL	1,000 mL
Total wastewater volume				5,050 mL			

\*N,I, indicate Non-Inoculated