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[†]
Jangho Lee · Joonhong Park[†]

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 보급의 필요성이 증가하고 있다.¹⁾ 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 환경바이오매스 중 하나인, 조류는 다른 생물 자원에 비해, 바이오디젤 생산에 필요한 지질 함량이 월등히 높아, 바이오디젤 생산에 효과적이다.²⁾

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.³⁻⁹⁾

또한 세균에 의한 생물학적 인처리도 충분한 인제거가 힘든 반면, 조류는 광합성 작용에 의해 인을 다량 섭취하게 되어 인을 제거 할 수 있다.¹⁰⁾ 이러한 조류-세균 군집의 영양염류 제거와 세균의 하수의 유기물 분해 작용으로 인한 조류-세균 군집의 효과적인 하수처리가 가능하다.¹⁰⁾

또한 조류-세균 군집에 의한 질소와 인의 신진대사는 바이오디젤 생산을 위한 전구물질인 조류 지질 함량과 구성 성분에 영향을 끼친다.^{11,12)} 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 적응 가능하고, 질소와 인의 제거에 효과적인 것으로 나타났다.^{13,14)} 하지만 실제하수조건에서 조류-세균 군집 내에서 조류와 세균 사이

[†] 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 하수적응이 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 생물자원 센터로부터 분양 받았다.¹⁴⁾

2.2. 실험장치의 구성

7개의 5 L크기의 유리 반응조에 1.2 μm 크기의 여과지로 여과된 하수를 5 L씩 넣은 후, 각 반응조에 조류의 엽록소 a 초기농도 31.12 $\mu\text{g/L}$ 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 mL으로 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 반응조 측면에 설치한 후, 132 μE 의 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 엽록소 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 엽록소 a를 구하였다.¹⁵⁾

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-Hexane을 이용하여 지질을 추출하였다.¹⁶⁾ 그리고 빈 플라스크의 질량에서 n-Hexane을 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.^{17,18)} 그 후, 접종된 배지를 20°C에서 3일 동안 배양한 후에 형성된 군집수를 세었다.¹⁹⁾

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_4^+-N), 질산이온(NO_3^--N), 총인(TP), 인산이온($\text{PO}_4^{3-}-\text{P}$)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. 21259-15), 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. 27673-45) (HACH Company, USA)를 사용하였고, 각 인자의 농도측정은 DR 4000 Spectrophotometer (HACH Company, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.¹⁴⁾

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

2.3.5. 활성슬러지 식종량에 따른 세균 군집 분석 방법

하수내의 미생물 군집 분포를 파악하기 위해 채취한 하수 시료의 DNA를 PowerSoil[®] DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories, Inc., USA)를 이용하여 추출하였고, 추출된 DNA로부터 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 primer 27f-FAM (6-FAM-AGAGT TTGAT CATGG CTCAG)와 1492r (TACGG TTACC TTGTTA CGACTT)가 사용되었다.²⁰⁾ PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mM MgCl₂ 1.5 μ L, 10 mM dNTPs 0.5 μ L, 10 μ M 27f -FAM 0.5 μ L, 10 μ M 1492r primer 0.5 μ L, 5 U/ μ L Taq-polymerase 0.25 μ L (Fermentas, Germany)를 template 10 ng/ μ L DNA 2 μ L에 3차 증류수를 첨가하여 최종부피 25 μ L로 실험하였다. 1000[™] Thermal Cycler를 이용하여 PCR (Polymerase Chain Reaction)을 통해 증폭하였으며, 처음 94 $^{\circ}$ C 3분, 그리고 30 cycle 동안 94 $^{\circ}$ C (60초), 55 $^{\circ}$ C (30초), 그리고 72 $^{\circ}$ C (120초)을 반응시켰다. 증폭된 16S rRNA를 QIA quick PCR purification Kit(Qiagen Inc.)로 정제한 후, 이를 3차 증류수, Tango[™] buffer와 10U의 제한효소 HhaI을 사용하여 최종부피 20 μ L에 맞추어 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 반응시켰다.²¹⁾ T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism) 분석을 위해 제한효소로 처리된 DNA는 서울대학교 농업과학공학기기센터(NICEM)에서 단편분석을 하였다(96-capillary 3730xl DNA Analyzer, ABI). 결과로 얻은 electropherogram은 Gene Mapper Software v4.0 (ABI)를 사용하여 peak height와 peak area를 분석하였다.²¹⁾

또한 Cloning Sanger 분석 방법을 통해 각 시료에서 나타난 배지상 군집의 염기서열 분석을 (주)마크로젠에 의뢰하였다. 그리고 RDP (Ribosomal Protein Database Project) II (<http://rdp.cme.msu.edu>)의 Classifier를 이용하여 세균의 군집분석을 수행하였다.

또한 세균시료의 염기서열과 계통학적으로 가장 가까운 세균(reference bacteria)들의 염기서열을 Muscle (<http://www.drive5.com/muscle>)을 이용하여 크기 700 bp로 multiple align시켰다. 이때 reference bacteria의 유전자 정보는 RDP의 결과를 사용하였다. 정렬된 염기서열을 이용하여 MEGA4 프로그램의 neighbor-joining algorithm (1000 replicates)을 사용하여 계통수(phylogenetic tree)를 그렸다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 조류와 세균의 성장

슬러지가 포함된 조류가 슬러지가 포함되지 않은 조류에 비하여 3일과 4일째에 작은 성장속도를 보이나, 5일 이후에는 모든 경우의 조류가 비슷한 성장곡선을 보였으며, 9일 후 조류 성장량도 거의 차이가 없음을 알 수 있었다(Fig. 1). 이는 반응조에 따라 다르게 주입해준 세균의 농도의 차이가 조류의 성장에 영향을 미치지 못했다는 것을 보여준다. 세균의 성장의 경우, 모든 경우에서 감소추세를 보이지만, 조류와 같이 성장한 세균이 있는 반응조가 세균만 성장한 반응조보다 감소추세가 약간 작은 것을 알 수 있었다(Fig. 2).

3.2. 활성슬러지 식종량에 따른 조류의 지질 함량

각 5 L의 반응조에서 9일간 성장한 조류의 질량은 Table 2와 같다. 각 경우의 조류 성장량의 차이가 크게 나지 않았으므로 각 조류의 지질함량을 분석한 결과, 모든 경우에서 단위 조류량당 40% 내외의 지질을 함유하고 있으므로, 본 실험에서 수행된 식종 활성슬러지 양의 차이, 즉 세균 농도의 차이는 조류 지질 생산에 영향을 미치지 않는 것으로 판단

Fig. 1. Time-course changes of algal growth in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Fig. 2. Time-course changes of bacterial growth in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Table 2. Algal lipid contents in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Case	Algal biomass (g-dried eight/L)	Lipid (g/L)	Lipid Contents (%)
A+B+S (500 mL)	0.2527	0.1031	40.80
A+B+S (1,000 mL)	0.2471	0.1069	43.27
A+B	0.2228	0.0917	41.16
A	0.2528	0.0990	39.15

된다. 또한 모두 하수 내에서 기존 연구에서 알려진 *Ankistrodesmus*의 지질함량인 40% 정도의 지질을 생성해 낸다는 것을 알 수 있어, 본 연구에서 수행된 실험 조건이 *A. gracilis*의 지질함량 증감에 영향을 미치지 않는다고 보여진다.²²⁾

3.3. COD 제거

COD의 경우, 거의 모든 조류의 경우, 3일까지는 COD가 감소 혹은 별다른 변화가 없었으나, 3일 이후에 5일까지

Fig. 3. Time-course changes of COD in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Table 3. Results of COD removal in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Case	COD (mg / L)		
	Initial	Final	Removed COD
A+B+S (500 mL)	36.75±0.35	35.25±0.35	1.50±0.70
A+B+S (1,000 mL)	36.75±0.35	30.65±0.92	6.10±1.27
A+B	36.75±0.35	42.10±0.71	-5.35±1.06
A	36.75±0.35	42.25±0.35	-5.50±0.70
B	36.75±0.35	50.55±0.78	-13.80±1.13
B+S (500 mL)	36.75±0.35	44.55±0.07	-7.80±0.42
B+S (1,000 mL)	36.75±0.35	38.55±0.07	-1.80±0.42

증가현상이 나타났다(Fig. 3). 5일 이후에는 각 경우에 따라 증감추세가 다르게 나타났다. 조류와 함께 활성슬러지를 주입한 경우에는 COD가 다시 감소함을 알 수 있었으며, 이는 조류가 배출하는 유기물질을 세균이 섭취하며 성장하여 유기물질을 제거하는 것으로 판단되며, 세균만 존재하는 반응조의 COD가 증가하는 원인에는 초기의 유기물질농도가 낮아서(36.75 mg/L), 유기물의 결핍으로 인하여 세균이 유기물화된 것으로 판단된다(Table 3). 또한 COD제거가 전반적으로 안정적이지 않은 원인에는 조류가 배출하는 유기물질이 세균에게 난분해성 물질 혹은 유해 가능성 때문으로 조류와 세균의 상호작용이 원활하지 않았다고 판단된다.^{23,24)}

3.4. 질소, 인 제거

총 질소의 경우, 시간이 지날수록 모든 조건에서 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 하지만 조류를 포함하고 있는 경우의 총 질소 제거율이 그렇지 않은 경우보다 높은 것으로

나타났다. 이는 조류의 질소 제거가 세균의 질소 제거 보다 높다는 것을 의미한다. 암모늄 이온의 경우, 결과적으로 모든 경우에서 암모늄이온이 거의 제거되었다(Table 4). 세균만 들어있는 반응조의 암모늄 농도는 초기에는 서서히 감소하다가 점점 급격히 감소하여 최종 암모늄 농도가 조류가 들어있는 반응조의 최종 암모늄 농도와 비슷한 값을 보였다(Fig. 5). 조류가 들어있는 반응조의 암모늄 이온이 일정한 속도로 제거되는 반면, 세균만 존재하는 반응조의 경우, 후기에 급격하게 줄어드는 양상을 보이는 것으로 볼 때, 조류의 암모늄 섭취는 초기부터 이루어진다는 것을 알 수 있었다. 하지만 세균의 암모늄 제거 효율이 높아지기 위해서는 조류보다 긴 시간이 소요된다는 것을 말해준다. 또한 세균만 존재하는 반응조는 조류가 존재하는 반응조에 비하여 암모늄 이온 제거 속도가 세균의 농도에 따라 달랐으며(Fig. 5), 활성슬러지(세균의 농도)의 양이 많은 순으로 암모늄 제거가 빠르게 나타났으며, 이는 세균의 농도가 높을수록 암모늄 제거 시간이 작아진다는 것을 알 수 있다. Fig. 6에서 보이는 바와 같이 질산이온의 경우, 조류가 존재하는 반응조에서는 5일까지 증가하다가 서서히 감소하는 반면, 세균만 있는 반응조의 경우, 9일 동안 증가하였다(Table 4). 암모늄 이온의 감소와 질산이온의 증가는 세균의 생물학적 질산화가 일어난다는 증거이며, 조류가 들어있는 반응조에서 질산이온의 농도가 다시 감소하는 원인으로는 조류의 질산이온 섭취를 통한 질산이온의 감소라 판단된다.^{9,10)}

총 질소의 제거와 암모늄이온 질소와 질산이온 질소의 제거를 비교한 결과, 모든 경우에서 제거된 총 질소 중에서 상당부분이 암모늄이온 질소와 질산이온 질소 제거로 없어졌고(Table 4), 이는 총 질소의 농도 변화는 암모늄 이온과

Fig. 4. Time-course changes of TN in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Fig. 5. Time-course changes of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Fig. 6. Time-course changes of $\text{NO}_3^-\text{-N}$ in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

질산이온 농도 변화에 주요한 것으로 판단된다.

총 인과 인산이온 인 분석 결과(Fig. 7과 8), 조류가 존재하는 반응조의 감소량이 그렇지 않은 반응조보다 크다는 것을 알 수 있었고, 인의 제거효율 또한 총 인과 인산이온 조류-세균 군집이 형성된 반응조에서 50% 이상의 높은 효율을 보였다.

총 인 제거량과 인산이온의 제거량을 비교한 결과(Table

5), 제거된 총 인의 대부분이 용존 형태의 인산이온의 제거를 통해서 이루어졌음을 알 수 있다. 이는 관찰된 인의 제거에 관여하는 기작이 조류의 용존 인산이온의 섭취이거나 세균의 용존 인산이온 섭취로 인한 것으로 볼 수 있다. 세균도 성장하면서 인을 섭취하기는 하지만 또한 호기성 조건만 있는 본 연구의 실험조건에서는 세균의 혐기성과 호기성을 반복하여 섭취되는 인 제거기작은 불가능하다고 판

Table 4. Results of N removal in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Case	Total Nitrogen (mg/L)			NH ₄ ⁺ -N+NO ₃ ⁻ -N (mg/L)			NH ₄ ⁺ -N (mg/L)		NO ₃ ⁻ -N (mg/L)	
	Initial	Final	Removed N	Initial	Final	Removed N	Initial	Final	Initial	Final
A+B+S (500 mL)	39.20±0.00	9.05±0.07	30.15±0.07	23.62	0.42	23.20	23.32±0.00	0.07±0.01	0.30±0.01	0.35±0.07
A+B+S (1,000 mL)	39.20±0.00	8.95±0.07	30.25±0.07	23.62	0.24	23.38	23.32±0.00	0.04±0.01	0.30±0.01	0.20±0.00
A+B	39.20±0.00	9.00±0.00	30.20±0.00	23.62	0.53	23.09	23.32±0.00	0.03±0.01	0.30±0.01	0.50±0.00
A	39.20±0.00	9.45±0.07	29.75±0.07	23.62	0.37	23.25	23.32±0.00	0.02±0.00	0.30±0.01	0.35±0.07
B	39.20±0.00	19.90±0.14	19.30±0.14	23.62	4.98	18.64	23.32±0.00	0.23±0.01	0.30±0.01	4.75±0.07
B+S (500 mL)	39.20±0.00	19.45±0.07	19.75±0.07	23.62	4.82	18.80	23.32±0.00	0.37±0.00	0.30±0.01	4.45±0.07
B+S (1,000 mL)	39.20±0.00	19.35±0.07	19.85±0.07	23.62	4.90	18.72	23.32±0.00	0.35±0.00	0.30±0.01	4.55±0.07

Fig. 7. Time-course changes of TP in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Fig. 8. Time-course changes of PO₄³⁻-P in response to different inoculum sizes of activated sludge (A: algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Case	Total Phosphorus (mg / L)			PO ₄ ³⁻ -P (mg / L)		
	Initial	Final	Removed P	Initial	Final	Removed P
A+B+S (500 mL)	3.45±0.07	0.90±0.00	2.55±0.07	3.20±0.00	0.80±0.00	2.40±0.00
A+B+S (1,000 mL)	3.45±0.07	0.75±0.07	2.70±0.14	3.20±0.00	0.70±0.00	2.50±0.00
A + B	3.45±0.07	1.00±0.00	2.45±0.07	3.20±0.00	0.90±0.00	2.30±0.00
A	3.45±0.07	0.90±0.00	2.55±0.07	3.20±0.00	0.75±0.07	2.45±0.07
B	3.45±0.07	2.60±0.00	0.85±0.07	3.20±0.00	2.60±0.00	0.60±0.00
B+S (500 mL)	3.45±0.07	2.25±0.07	1.20±0.14	3.20±0.00	2.15±0.07	1.05±0.07
B+S (1,000 mL)	3.45±0.07	2.80±0.00	0.65±0.07	3.20±0.00	2.75±0.07	0.45±0.07

Fig. 10. Bacterial community structure in response to different inoculum sizes of activated sludge (Genus level; A:algae, B: Bacteria, S: Activated sludge)

Fig. 11. Phylogenetic comparison of 16S rRNA sequences of unclassified Alcaligenaceae (1: Algae + bacteria + sludge (500 mL), 2: Algae + bacteria + sludge (1,000 mL), 3: Algae Bank databases).

단된다.²⁵⁾ 따라서 본 연구에서 관찰된 인 제거의 주 기작은 조류에 의한 용존 인산이온 섭취라고 결론내릴 수 있다.

3.5. 활성슬러지 식중량에 따른 세균 군집 분석

T-RFLP법을 통하여 활성슬러지 식중량에 따른 세균 군집

분석 결과, 식중량 에 따라 미생물 군집 구성이 민감하게 변화함을 알 수 있었다(Fig. 9).

각 경우의 세균 군집 구조를 클로닝 방법을 이용하여 Genus level로 살펴본 결과, 조류가 존재하는 반응조에서 Unclassified Alcaligenaceae의 분포가 다른 반응조에 비교하였을

때 크게 증대됨을 알 수 있었다(Fig. 10). 증가된 unclassified Alcaligenaceae 의 혐기서열을 이용하여, 계통학적으로 비교한 결과(Fig. 11), 시아노균에 의한 부영양화가 생긴 조건에서 동정된 Alcaligenaceae bacterium AKB-2008-KU8- (AM989122)과 조류와 상호작용하여 항균작용을 하는 *Alcaligenes faecalis* subsp. 5659-H (AJ509012)과 유사한 균들이 확인되었다. 따라서 증가된 Unclassified Alcaligenaceae의 경우, 조류 및 시아노균과 관련하여 부영양화 조건에서 성장 가능성 혹은 다른 세균의 성장을 저해할 가능성이 있다고 판단된다.^{26,27)}

4. 결론

본 연구는 하수에서 배양한 조류를 이용한 하수처리와 바이오디젤 생산을 동시 달성할 수 있는 조류-세균 복합군집의 상호작용 규명을 궁극적인 목적으로 하였다. 이를 위해서 조류-세균 복합 군집에 의한 하수 질소 및 인의 저감 거동 규명과 조류와 상호작용하는 세균에 대한 분자생물학적 분석에 대한 연구를 수행하였으며, 그 주요 결과는 아래와 같다.

1) 실제 하수 조건에서 활성 슬러지 점중에 따른 *A. gracilis*의 성장은 슬러지 식종량에 관계없이 일정하게 증가하였고, 세균의 성장은 시간이 지날수록 감소하는 경향을 보였다. 또한 조류의 지질 함량 분석 결과, *A. gracilis* 조류의 지질 생산량은 활성 슬러지 식종량과 관계없이 모든 경우에서 유사한 것으로 나타났다.

2) 조류-세균 복합군집의 하수처리 거동 분석 결과, 활성 슬러지 식종량이 클수록 높은 유기물질 제거율을 보이나, 제거 양상이 일정하지 않은 것으로 나타났으며, 질소와 인의 제거는 점중된 활성슬러지 세균이나 하수 세균만 존재하는 경우보다 조류를 첨가한 경우에 향상되었다.

3) 활성슬러지 식종량에 따른 세균 군집 분석 결과, Unclassified Alcaligenaceae의 분포가 초기에 비해 커졌으며, 그 중, Alcaligenaceae bacterium AKB-2008-KU8 (AM989122), *Alcaligenes faecalis* subsp. 5659-H (AJ509012)과 유사한 균들이 검출되었으며, 이들은 조류의 작용과 연관되어 있음을 알 수 있었다.

본 연구의 결과, 하수 영양물질을 효과적으로 저감하는 조류-세균 복합 군집내에서 조류의 성장 및 신진대사가 특정 세균의 성장에 영향을 주는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과들이 시사하는 점은 하수처리에 효과적인 조류-세균 복합 군집내 질소 및 인 신진대사와 생태학적 상호작용 규명은 조류를 이용한 하수처리 뿐만 아니라 하수로 성장한 조류를 이용해서 바이오디젤 전구물질 생산에 응용하는 것에 중요하다는 것이다.

사 사

본 연구는 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2009-0081153).

KSEE

참고문헌

1. International Energy Agency Homepage, <http://www.worldenergyoutlook.org>, September(2010).
2. Chisti, Y., "Biodiesel from microalgae," *Biotechnol. Adv.*, **25**(3), 294-306(2007).
3. 김한옥, 이우성, 이철균, "미세조류를 이용한 질소제거 장치의 크기," *한국생물공학회지*, **19**(3), 236-240(2004).
4. 노성희, 김선일, "폐석회를 이용한 폐수 중 인 제거 특성," *응용화학*, **6**(2), 735-738(2002).
5. Laliberte, G., Proulx, D., Pauw, N. and Nouee, J. L., "Algal technology in wastewater treatment," *Ergebnisse Limnol.*, **42**, 283-302(1994).
6. Nurdogan, Y. and Oswald, W. J., "Enhanced nutrient removal in high-rate ponds," *Water Sci Technol.*, **31**(12), 33-43 (1995).
7. Oswald, W. J., "My sixty years in applied algology," *J. Appl. Phycol.*, **15**(2-3), 99-106(2003).
8. Fuhrman, J. A., Horrigan, S. G. and Capone, D. G., "Use of ¹³N as tracer for bacterial and algal uptake of ammonium from seawater," *Mar. Ecol. Prog.*, **45**(3), 271-278(1988).
9. Rhee, G.-Y., "Effects of N:P atomic ratios and nitrate limitation on algal growth, cell composition, and nitrate uptake," *Limnol. Oceanogr.*, **23**(1), 10-25(1978).
10. Munoz, R. and Guieysse, B., "Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review," *Water Res.*, **40**(15), 2799-2815(2006).
11. Reitan, K. I., Rainuzzo, J. R. and Olsen, Y., "Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae," *J. PHYCOL.*, **30**(6), 972-979(1994).
12. Piorreck, M., Baasch, K., and Pohl, P., "Biomass production, total protein, chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue-green algae under different nitrogen regimes," *Phytochemistry*, **23**(2), 207-216(1984).
13. Macedo, C. F. and Pinto-Coelho, R. M., "Nutritional status response of *Daphnia laevis* and *Moina micrura* from a tropical rhirvoir to differhnt algal aphits: Scenedhnmus quadricauda and Ank rerodenmus gracilis," *Braz. J. Biol.*, **61**(4), 555-562(2001).
14. 이장호, 박준홍, "실제 하수조건에서 고지질 함량 조류자원의 생체생성과 하수처리 특성 분석," *대한환경공학회지*, **32**(4), 333-340(2010).
15. Sartory, D. P. and Grobbllaar, J. U., "Extraction of chlorophyll a from freshwater phytoplankton for spectrophotometric analysis," *Hydrobiologia.*, **114**(3), 177-187(1984).
16. Li, X., Xu, H. and Wu, Q., "Large-Scale Biodiesel Production From Microalga *Chlorella protothecoides* Through

- Heterotrophic Cultivation in Bioreactors," *Biotechnol. Bioeng.*, **98**(4), 764~771(2007).
17. Reasoner, D. J. and Geldreich, E. E., "A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water," *Appl. Environ. Microb.*, **49**(1), 1~7(1985).
18. Koch, A. L., "Growth Measurement," Methods for General and Molecular Bacteriology, Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A., and Krieg, N. R. (Eds.), American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 254~257(1994).
19. Han, I., Congeevaram, S. and Park, J., "Improved control of multiple-antibiotic-resistance-related microbial risk in swine manure wastes by autothermal thermophilic aerobic digestion," *Water Sci. Technol.*, **59**(2), 267~271(2009).
20. Suzuki, M. T. and Giovannoni, S. J., "Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR," *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**(2), 625~630(1996).
21. 기동원, 박준홍, 이재진, 노백호, "현장 측정된 토양미생물 종 다양성과 생태자연도 등급 자료 간의 통계적 상관관계 평가와 토양생태의 질 산정방안 제안," 대한토목학회 논문집, **27**(6B), 703~710(2007).
22. Ben-Amotz, A., Tornabene, T. G. and Thomas, W. H., "Chemical profile of selected species of microalgae with emphasis on lipids," *J. Phycol.*, **21**(1), 72~81(1985).
23. Daranas, A. H., Norte, M. and Fernandez, J. J., "Toxic marine microalgae," *Toxicon.*, **39**(8), 1101~1132(2001).
24. Havskum, H., Thingstad, T. F., Scharek, R., Peters, F., Berdalet, E., Sala, M. M., Alcaraz, M., Bangsholt, J. C., Zwifel, U. L., Hagstrom, A., Perez, M. and Dotan, J. R., "Silicate and labile DOC interfere in structuring the microbial food web via algal-bacterial competition for mineral nutrients: Results of a mesocosm experiment," *Limnol. Oceanogr.*, **48**(1), 129~140(2003).
25. Tchobanoglous, G., Burton, F. L., and Stensel, H. D., *Wastewater Engineering*, 4th ed., McGraw-Hill, New York, pp. 1064~1066(2004).
26. Berg, K. A., Lyra, C., Sivonen K., Paulin, L., Suomalainen, S., Tuomi, P. and Rapala, J., "High diversity of cultivable heterotrophic bacteria in association with cyanobacterial water blooms," *The ISME J.*, **3**, 314~325(2009).
27. Wiese, J., Thiel, V., Nagal, K., Staufenger, T. and Imhoff, J. F., "Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Laminaria saccharina* from the Baltic sea," *Mar Biotechnol.*, **11**(2), 287~300(2009).