

미세조류를 이용한 질소제거 장치의 크기

김 한 옥 · 이 우 성 · † 이 철 균

인하대학교 생물공학과

(접수 : 2004. 5. 17., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

Size Estimation of Microalgal System for Nitrogen Removal

Hanuk Kim, Woosung Lee, and Choul-Gyun Lee†

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received : 2004. 5. 17., Accepted : 2004. 6. 24.)

Korean wastewaters have higher nitrogen concentrations than typical wastewaters of other countries. Most treatment processes such as activated sludge processes will need to supplement extra carbon sources for a complete removal of remaining nitrogen after the initial wastewater treatment. Because of these difficult matters, we have searched wastewater treatment methods that require no additional carbon sources. Wastewater treatment by microalgae in photobioreactors, using a green eukaryotic microalgae, *Chlorella kessleri*, showed a promising results and thus was selected to study further. This system is not intended to replace the conventional system but is to assist the existing biological treatment systems as a supplemental nitrogen removal process. Thus the secondary treated livestock wastewater was tested. Column type photobioreactors developed in our laboratory were used. When aerated with 5% CO₂ balanced with air at 1 vvm and illuminated at 100 μmol/m²/s under 25°C and pH 7-8 by CO₂ buffering effect, the maximum nitrogen removal rate was 2.6 mg/L/hr. The results confirmed a possibility of microalgal wastewater treatment system as a secondary system to remove extra nitrogen sources. Based on these experimental results, the size of the optimal microalgal wastewater system was calculated. For the wastewater whose initial nitrogen concentration of 150 mg/L, the optimal batch system was found to be a 2 stage system with a combined retention time of 4.6 day. From the continuous experiments, nitrogen removal rates were examined under different dilution rates and 2 stage system was also found to be the optimal system. The combined retention time for the continuous system was 3.5 days. It is expected that conventional biological wastewater treatment systems followed by microalgal systems would reliably decrease the nitrogen concentration below the government criteria even for the livestock wastewater with low C/N ratio.

Key Words : Microalgae, wastewater, photobioreactor

서 론

기존의 생물학적 폐수 처리는 활성슬러지법, 생물막법, 혐기성처리법 등이 있다. 그 가운데 활성슬러지법은 1999년 현재 우리나라 하수 종말 처리장의 전체 150개소 중 127개소에서 채택되어 가장 널리 사용되고 있는 방법이다. 활성슬러지를 이용하여 처리한다면 BOD의 90% 이상이 제거가 가능하다. 그러나 질소 제거율은 16-42% 정도의 낮은 처리율을 가지므로 활성슬러지로 처리된 후에도 여전히 많은 양의 질소

가 남아있게 된다(1).

특히, 우리나라의 하수는 탄소원에 비해 질소원의 비율이 상대적으로 높은 특성을 보이기 때문에 기존의 미생물을 이용하여 하·폐수 처리 방법으로 질소를 제거하기에는 효율이 낮은 단점을 가진다. C/N 비 (탄소원의 농도 대 질소원의 농도의 비)가 낮기 때문에 기존의 방법으로 처리 했을 때 그 비는 더욱 낮아지게 된다.

하·폐수에 포함되어 있는 질소가 충분히 제거되지 않는 상태에서 수계에 방류된다면 질소로 인하여 발생된 부영양화 현상 때문에 경제적인 피해는 물론 생태계의 교란이 야기될 수 있다(2-4).

이런 문제를 해결하기 위해 에탄올이나 포도당과 같은 별도의 외부 유기 탄소원을 투입하여 C/N 비를 높여 질소를 제거 하거나, 화학적인 처리 방법을 이용하였다. 그러나 이러

† Corresponding Author : Department of Biological Engineering,
Inha University, Incheon 402-751, Korea
Tel & Fax : +82-32-860-7518
E-mail : leecg@inha.ac.kr

한 방법은 탄소원 투입에 따르는 추가 비용이 발생하고 특히 화학적인 처리 방법은 전체 공정비의 50-90%를 차지하여 개선의 여지를 보여준다.

이런 환경문제를 해결하기 위해 폐수 내 질소를 biomass로서 그리고 비료로써 고정화하는 방법이 있다. 이를 위해 미세조류가 적합하다. 미세조류는 광합성을 하여 성장하는 미생물로서 유기 탄소원의 공급이 필요 없고 이산화탄소를 탄소원으로 이용하여 성장하므로 C/N 비가 낮은 폐수에서 질소를 고정화 할 수 있다. 미세조류는 지구의 태고 시절부터 산소의 공급자였으며 많은 유용한 물질의 생산자이기도 하다. 식량으로는 물론이고 화장품, 의약품, 사료 그리고 환경 분야 등의 개발 가능성이 앞으로의 시대에 큰 기여를 하리라고 기대되어 진다(5). 또 미세조류를 폐수처리에 이용할 때는 산업적으로 배출되는 이산화탄소의 이용이 고려될 수 있다. 점점 증가되는 이산화탄소의 농도로 지구 온난화가 환경문제로 대두 된 것은 이미 오래 전이며 도쿄협약 등을 통해 국제적으로 이산화탄소의 제거를 위한 움직임이 있다(6). 따라서 대기의 이산화탄소 제거와 폐수 내의 질소를 제거하는 두 가지 효과를 얻는 장점을 미세조류를 이용한 폐수처리장치에서 얻을 수 있을 것으로 생각된다. 그 외 미세조류는 대체 연료로써 사용이 가능하다. 화석 연료의 매장량이 한계가 있고 화석연료의 연소 시 이산화탄소가 발생하여 지구 온난화를 일으키는 등 문제점 때문에 대체 에너지의 연구가 진행 중이다. 생물학적인 새로운 연료로써 ethanol, methanol 그리고 methane 등이 있는데 미세조류가 그런 생물학적 연료를 생산하는 재료가 될 수 있다. 미세조류는 수소와 ethanol과 methanol을 생산 할 수 있으며 특히 *Botryococcus braunii*로부터 bio-diesel의 생산은 많이 연구 되었다(7, 8). 이미 옥외에서 광합성을 통한 미세조류의 배양이 이루어지고 있다(9). 그러나 기후 등의 조건이 미세조류가 성장하는데 저해를 주거나 최적 조건이 되지 못해서 옥외에서 광합성에 의해 성장하는 미세조류는 최고의 생산성을 위해 0.5-0.7 g/L의 낮은 농도를 갖는다(10).

따라서 이 연구의 목적은 C/N 비가 낮은 폐수 내의 질소를 제거하기 위해, 기존에 사용되고 있는 폐수처리 장치의 단점을 극복하는 폐수처리 장치를 개발하는 것이다. 이때 사용된 미세조류인 *Chlorella kessleri* 의 질소 제거 능력을 알아보고 *Chlorella*의 단일 균으로 폐수 내 질소 제거 장치의 가능성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 재료

본 연구에 사용된 미세조류는 *Chlorella kessleri* UTEX 398 로 Culture Collection of Alga at the University of Texas, TX, USA로부터 분양받았다. *C. kessleri*는 가장 흔히 볼 수 있는 미세조류로 잘 응집되지 않고 평균 diameter는 5-10 mm로 석탄이나 cellulose의 분말과 비슷한 크기를 가지고 있다(7, 11). 보통 heterotrophic 생장이 광합성 성장보다 느린 비성장 속도를 보이는데 *C. kessleri*는 광합성 최대 비성장 속도와 heterotrophic 최대 비성장 속도가 비슷한 미세조류중의 한가지이다. 또한 다른 미세 조류들에 비해 높은 농도의

영양염류에서 성장할 수 있는 특징을 갖고 있다.

인공폐수

인공폐수는 기본적으로 N8 배지를 사용하였고 Table 1에 그 조성을 나타내었다. Table 1에 보이는 것처럼 N8 배지에는 유기탄소원이 전혀 들어있지 않다. 그리고 실험에 사용된 modified N8 배지는 N8 배지와 다른 성분은 모두 같고 질소 농도만 달리해 주었다. 미세조류의 단일 세포에 의한 결과를 얻기 위해 인공폐수를 121°C에서 15분간 autoclave하여 사용하였다.

Table 1. Composition of artificial wastewater (N8 Medium)

	Components	Molecular weight (g/mol)	Stock concentration (mg/L)
N8	KNO ₃	101.11	1000
	KH ₂ PO ₄	136.09	740
	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	142.06	260
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	246.48	50
	CaCl ₂	110.99	10
	FeNa EDTA	376.10	10
	Micronutrients		1
Micronutrients	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287.54	3200
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	125.84	12980
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	249.70	1830
	Al(SO ₄) ₃ · 8H ₂ O	342.10	3580

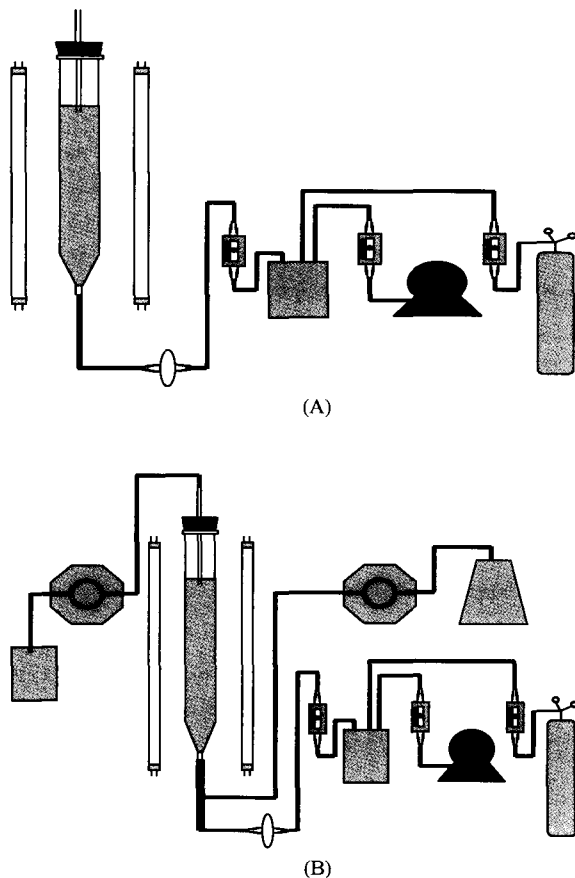


Figure 1. Scheme of experimental system ((A) photobioreactor for the batch experiment (B) photobioreactor for the continuous experiment).

배양방법

본 연구를 위해 bubble column photobioreactor를 실험실 자체 제작하여 실험에 사용하였다. 이 때 working volume은 400 mL로 하였다. 배양방법은 batch와 continuous로 실시하였다. 광원으로 반응기 사이에 형광등을 부착하여 광도를 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 로 하였고 5% 이산화탄소를 공급하기 위해 이산화탄소와 air pump에서 나온 공기를 혼합하여 사용하였다. Batch experiment는 위에서 설명한 인공폐수를 이용하여 질소의 농도를 각 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 500 그리고 600 mg/L로 하여 시간대 별로 미세조류의 성장과 질소의 제거량을 측정하였다. Continuous experiments는 Batch experiments와 동일한 광반응기를 사용하나 다른 점은 peristaltic pump를 사용하여 유입량과 유출량을 조절하여 연속적으로 처리한다는 점이다. 실험은 총 66일간 진행하였다. 실험 초기부터 5.6일까지는 batch culture 하였고 5.6일부터 24.7일까지는 0.07, 0.035, 0.018 (hr)의 회석속도로 140 mg/L 질소 농도의 인공폐수를 이용하여 continuous experiments를 수행하였고 24.7일부터 40.8일까지는 유입되는 질소의 농도를 기존보다 10배 높은 1400 mg/L로 해주었다. 40.8일부터는 다시 유입되는 질소농도를 140 mg/L로 해주고 대신 회석속도를 0.05, 0.025, 0.012 (hr)로 조정하여 실험하였다. Batch experiment와 continuous experiment의 개요도는 Fig. 1에 나타내었다.

폐수처리장치의 크기 계산

Batch experiment의 다양한 질소 농도에서의 실험을 통해 얻은 data를 가지고 질소농도별 최대 질소 제거 농도를 구하여 그 값들을 역수 취한 값과 질소 농도의 관계를 graph로 그려 폐수처리장치를 design 하였다. Continuous experiment를 통해 얻은 data를 미세조류의 생장이 Monod equation을 따른다고 할 때 Monod equation 식(a)와 Lineweaver-Burk plot 식(b)에 적용하여 μ_m 값과 K_s 를 구하고 식(c)에 의해 최적 D값을 구한 뒤 유출 질소 농도를 구하는 식을 이용하여 체류 시간을 구하였다

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S} \quad (\text{a})$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_m S} + \frac{1}{\mu_m} \quad (\text{b})$$

$$D_{\text{opt}} = \mu_m \left(1 - \sqrt{\frac{K_s}{K_s + S_0}} \right) \quad (\text{c})$$

μ_m : maximum growth rate

μ : specific growth rate

K_s : half-saturation constant

S: nitrogen concentration

S_0 : initial nitrogen concentration

분석방법

세포 농도 (cell/mL)와 크기 (fL/mL)는 Coulter Counter (model Z2, Coulter Electronics, Inc., Hialeah, FL, USA)를 이용하여 측정하였다. 질소 측정에서는 인공폐수의 질소원으로 nitrate가 사용되었으므로 nitrate를 측정하였다. Nitrate의 농도 (mg/L)를 측정하는 방법은 spectrophotometer (Model HP82 341, Hewlett Packard, Inc., USA)를 이용하는 방법을 사용하였다. 시료를 원심 분리하여 상등액 0.1 mL과 1 N HCl 0.9 mL을 혼합하여 250 nm와 270 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고 구해진 값을 미리 구한 calibration curve에 적용하여 nitrate 농도를 얻었다. 광도는 Quantum sensor (model Q25746, LI-COR, Inc., NE, USA)와 Datalogger (model LI-1400, LI-COR, Inc., NE, USA)를 이용하여 반응기의 표면 광도를 측정하였다. pH는 pH meter (model 720P, Istek, Inc., Seoul, Korea)를 이용하여 측정하였고 온도는 알코올 온도계를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

Batch experiment

Batch experiment에서는 인공폐수 내의 질소 농도가 0, 10, 20, 40, 50, 60, 80, 100, 150, 200, 500 그리고 600 mg/L인 다양한 폐수에서의 질소 제거능력을 실험하였다. 시간별로 미세조류에 의한 다양한 농도의 폐수 내에서 질소의 제거량에 대한 data를 구하고 각 질소 농도별로 시간당 부피당 최대 질소 제거 농도량에 대한 data를 구해 Fig. 2에 나타낼 수 있었다. 그 값들은 0 mg/L일 때 4.6 mg/L/d, 10 mg/L일 때 10.4 mg/L/d, 20 mg/L일 때 12.8 mg/L/d, 40 mg/L일 때 33.0 mg/L/d, 50 mg/L일 때 31.8 mg/L/d, 60 mg/L일 때 48.2 mg/L/d, 80 mg/L일 때 46.3 mg/L/d, 100 mg/L일 때 49.2 mg/L/d, 150 mg/L일 때 62.8 mg/L/d, 200 mg/L일 때 96.8 mg/L/d, 500 mg/L일 때 92.9 mg/L/d, 600 mg/L일 때 101.6 mg/L/d였다.

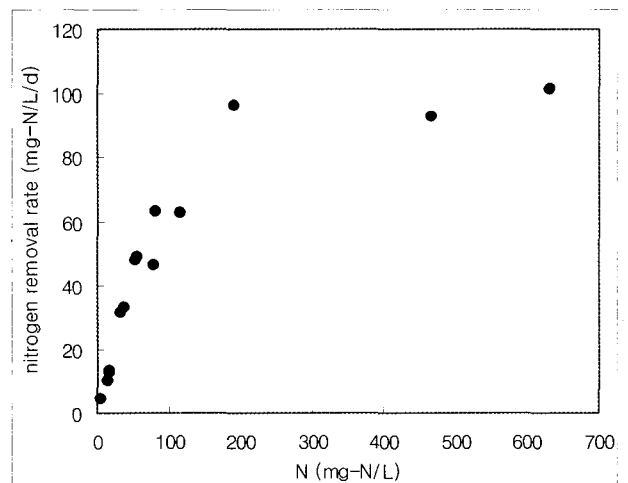


Figure 2. Nitrogen removal rate each nitrogen concentration.

그 값을 역수 취한 값과 질소 농도의 관계를 Fig. 3에 나타내었으며 이 graph를 통해 폐수처리장치의 크기를 계산하였다. x축은 질소의 농도로 사각형의 밑변에 해당하고 그 값은 유입된 폐수의 초기 질소 농도와 유출되는 질소 농도의 차이에 해당하며 y축은 질소 제거 속도를 역수 취한 값으로서 사각형의 높이에 해당하고 그 값은 유출되는 질소 농도에서의 값으로 하였다. 이렇게 그려진 사각형의 넓이가 유입된 임의의 질소 농도를 미세조류에 의해서 또 다른 임의의 유출된 질소 농도로 떨어뜨리는데 걸린 체류시간이 된다. 구해진 data를 통해 계산 해볼 때 만약 150 mg/L의 유입 질소 농도를 17.8 mg/L의 유출 질소 농도로 떨어뜨리기 위해 single stage로 설계한다면 9.8일의 체류시간을 갖게 된다. 2 stage로 설계한다면 첫번째 stage에서 150 mg/L의 유입 질소 농도에서 54.2 mg/L로 떨어뜨리는데 1.9일 그리고 다시 두번째 stage에서 54.2 mg/L의 폐수를 17.8 mg/L로 떨어뜨리는데 2.7일이 걸려 총 4.6일의 체류시간을 갖는 반응기를 설계 할 수 있다. 따라서 2 stage로 설계할 때가 1 stage로 설계할 때 보다 5.2일의 체류시간이 단축되므로 폐수처리장치의 부피로 계산해 보면 2 stage의 부피가 1 stage일 때의 47%에 불과하게 되는 것을 알 수 있다.

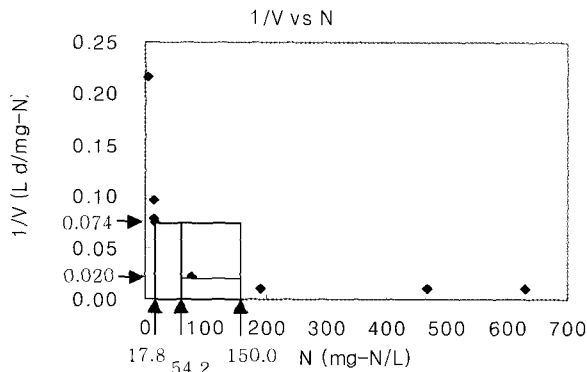


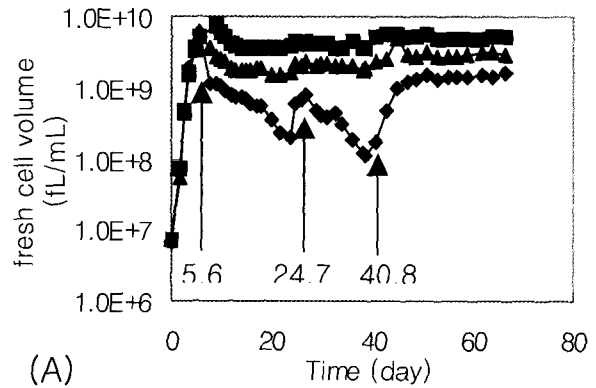
Figure 3. Comparison of single stage system and two stage system from batch experiments.

1 stage: 9.8 days
 2 stages: 1.9 days + 2.7 days = 4.6 days

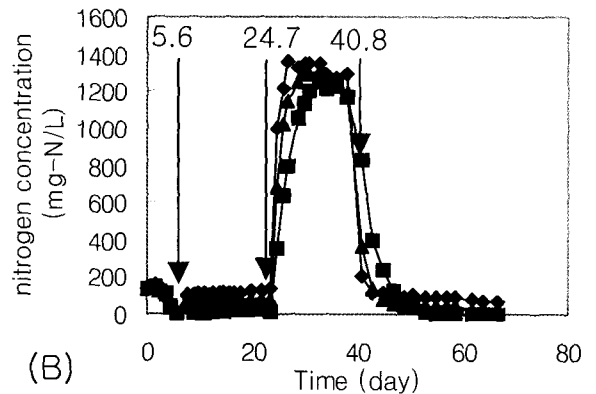
Continuous experiment

실험은 총 66일간 진행되었다. Fig. 4에서 나타내어지는 것처럼 실험 초기부터 5.6일까지는 batch culture 하였고 세포상태가 stationary phase인 5.6일부터 continuous culture를 시작하여 24.7일까지는 0.07, 0.035, 0.018 (1/hr)의 희석속도로 140 mg/L 농도의 인공폐수를 이용하여 continuous experiments를 수행하였고 24.7일부터 40.8일까지는 유입되는 질소의 농도를 기존보다 10배 높은 1400 mg/L로 해주었다. 40.8일부터는 다시 유입되는 질소 농도를 140 mg/L로 해주고 대신 희석속도를 0.05, 0.025, 0.012 (1/hr)로 조정하여 실험하여 66일째에 실험을 종결하였다. Fig. 4에서 보는 바 같이 첫번째 구간인 5.6일부터 24.7일까지 그리고 두번째 구간인 24.7일부터 40.8일까지에서 희석속도를 0.07/1hr로 한 경우에는 세포의 세출현상을 볼 수 있었다. 반면

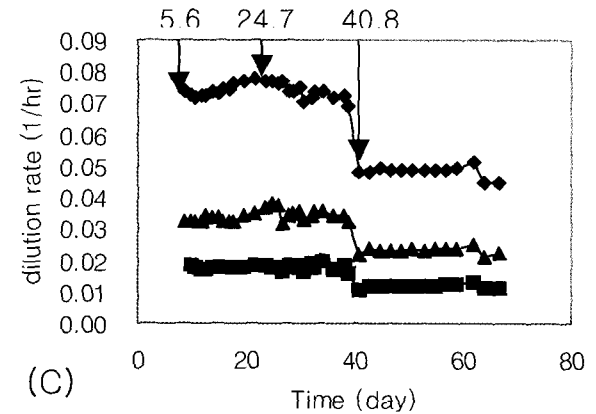
그보다 낮은 희석 속도에서는 세포의 농도가 일정하게 유지됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 희석 속도를 0.07/1hr 이하로 하여야 하는 것을 알 수 있다. 또한 희석 속도가 느릴수록 시간당 질소의 제거량이 많은 것을 알 수 있었다. 또한 24.7일부터 40.8일까지는 1400 mg/L의 높은 질소 농도 부하를 견뎌왔음에도 40.8일 이후 세포의 농도나 질소 제거율이 정상적으로 유지되었음을 보였다. 따라서 미세조류 시스템이 높은 질소농도의 부하에도 견딜 수 있는 안전한 장치임을 증명하였다.



(A)



(B)



(C)

Figure 4. Profiles of cell of nitrogen concentrations under various dilution rates: (A) fresh cell volume (fL/mL); (B) nitrogen concentration profile (mg-N/L); (C) dilution rate (1/hr).

Continuous experiment를 통해 얻은 data를 Monod equation 식(a)와 Lineweaver-Burk plot 식(b)에 적용하여 μ_m 값과 K_s 을 구하고 식(c)에 의해 최적 D값을 구한 뒤 유출 질소 농도를 구하는 식을 이용하여 체류 시간을 구할 수 있었다. 이때 Table 2에서 나타낸 것처럼 반응기를 2 stage로 설계한다면 질소 농도 140 mg/L가 유입될 때 첫번째 반응기의 체류시간을 30.3시간으로 하면 시간당 1 리터에 2.84 mg의 질소제거 속도로 질소농도를 49.4 mg/L로 떨어뜨리고 52.6시간의 체류 시간을 갖는 두 번째 반응기에서 시간당 1 리터에 0.53 mg을 제거하는 속도로 49.4 mg/L의 질소를 21.4 mg/L로 낮추게 된다. 이때 총 체류시간은 3.5일로 계산되었다.

Table 2. Calculation of retention time from continuous experiments

	1 stage	2 stage
So	140.0	49.4
mm(hr)	0.075	0.075
Ks (mg/L)	63.53	63.53
Dopt(hr)	0.033	0.019
S(mg/L)	49.4	21.4
Retention time (hr)	30.3	52.6
N-removal rate(mg/L/hr)	2.84	0.53
Total retention time(day)	3.45	

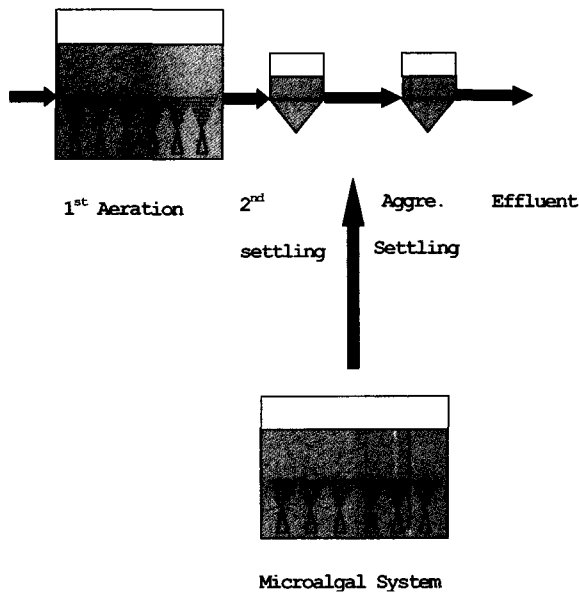


Figure 5. Application of microalgal system.

이렇게 설계된 미세조류 system을 Fig. 5처럼 기존의 폐수 처리 장치에 부가하면 기존의 장치보다 더 안전하고 효율적인 폐수처리 장치가 될 것으로 사료된다.

요 약

Batch experiment에서 다양한 질소 농도에서 구해진 질소 제거 속도와 비 성장속도 등의 데이터를 토대로 4.6일의 체류시간을 갖는 2단 처리 장치를 설계하였다. 그리고 continuous experiments에서는 3.5일의 체류시간을 갖는 2단의 처리 장치를 설계하였다. 두 가지 값에 차이는 있지만 실제 현장에서 폐수 처리 장치를 설계할 때 충분한 자료가 되리라고 판단한다. 따라서 위의 결과를 토대로 기존 시스템에 미세조류 시스템을 부가한다면 기존공정의 단점인 잉여질소 제거 장치로서 충분히 역할을 수행해 배출 기준치를 만족시키는 안전한 폐수처리장치가 되리라고 판단한다

감 사

본 연구를 위해 인하대 서해연안환경연구센터 (RRC)와 대경엔텍(주)의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

- Choi, E. S. and H. J. Hwang (1993), A study on nutrient removal from the wastewater treatment plant sidestream, *J. KSWQ*, **9**, 201-207.
- Chevalier, P. D. Proulx, P. Lessard, W. F. Vincent, J. de la Noije (2000), Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment, *J. Appl. Phycol.* **12**, 105-112.
- Abe, K., A. Imamki, and M. Hirano (2002), Removal of nitrate, nitrite, ammonium and phosphate ions from water by the aerial microalga *Trentepohlia aurea*, *J. Appl. Phycol.* **14**, 129-134.
- JO, S. Y., C. H. Kim, and H. S. Kim (1996), A study on the phosphorus behavior in activated sludge processes, *J. KSWQ*, **12**, 377-382.
- Pulz, O. (2001), Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 287-293.
- Yun, Y. S., S. B. Lee, J. M. Park, C. I. Lee, and J. W. Yang (1997), Carbon dioxide fixation by algal cultivation using wastewater nutrients, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **69**, 451-455.
- Illman, A. M., A. H. Scragg, and S. W. Shales (2000), Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium, *Enzyme Microb. Technol.* **27**, 631-635.
- Hirano, A., R. Ueda, S. Hirayama, and Y. Ogushi (1997), CO₂ fixation and ethanol production with microalgal photosynthesis and intercellular anaerobic fermentation, *Energy*, **22**, 137-142.
- Baumgarten, E., M. Nagel, and R. Tischner (1999), Reduction of nitrogen and carbon content in swine waste with algae and bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 281-284.
- Travieso, L., D. O. Hall, K. K. Rao, F. Benítez, E. Sánchez, and R. Borja (2001), Ahelical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode, *Int. Biodeteriol. Biodeg.* **47**, 151-155.
- Post, A. F., I. Cohen, and E. Romem (1994), Characterization of two *Chlorella vulgaris* (chlorophyceae) strains isolated from wastewater oxidation ponds, *J. Phycol.* **30**, 950-954.