Journal of Korean Society on Water Environment, Vol. 33, No. 1, pp. 8-14 (January, 2017)
pISSN 2289-0971 eISSN 2289-098X https://doi.org/10.15681/KSWE.2017.33.1.8

솔잎추출액을 이용한 *Microcystis aeruginosa* 제거 연구

최희정†

가톨릭관동대학교 에너지환경융합학과

Removal of Microcystis aeruginosa using Pine Needle Extracts

Hee-Jeong Choi†

Department of Energy and Environment Convergence, Catholic Kwandong University
(Received 2 September 2016, Revised 22 December 2016, Accepted 29 December 2016)

Abstract

Microcystis aeruginosa (*M. aeruginosa*) is a cyanobacterium species that can form harmful algal blooms in freshwater bodies worldwide. The use of pine needle extract (PNE) to control nuisance algae by allelopathic inhibition will be environmentally friendly and promising. PNE removed successfully upto 98% of *M. aeruginosa* at the following optimal conditions: pH 7, 25 °C of temperature, 100 rpm of mixing rate, 5 min of mixing time. These results was indicated that the amount of 1 g/L PNE was removed 1g dryweight/L of *M. aeruginosa*. The kinetic data showed substrate inhibition kinetics and maximum growth rate was obtained when the *M. aeruginosa* was grown in medium containing 0.5 g/L of initial concentration of PNE. Different substrate inhibition models were fitted to the kinetic data and found the Luong model was best. The model predicted kinetic parameters were in agreement with the experimental findings. The natural extract, PNE, can be a promising inhibition due to its high efficiency and low dose requirements.

Key words : Algal blooms, Cyanobacterium, Inhibition, *M. aeruginosa*, Pine needle extract, Water Treatment

1. Introduction

조류(Algae)는 엽록소를 가지고 독립영양생활을 하는 수생식물이며, 광합성을 하는 미소생물로써 빛, 영양 등 환경적인 요인이 적합할 경우 폭발적인 증식률을 나타낸다(Choi, 2015). 국내에서 발생하는 조류는 계절별로 가을부터 봄까지는 규조류, 늦봄부터 초여름까지는 녹조류 그리고 여름에서 가을에는 남조류가 우점을 이루고 있다(Choi, 2016). 우리나라의 관리대상 남조류는 *Microcystis, Anabaena, Aphanizomenon, Oscillatoria* 4종이며, 이 중에서 여름철 녹조를 일으키는 대표적인 남조류는 *Microcystis* 와 *Anabaena* 이다. 이들은 수온 25°C 이상에서 증식이 매우 활발하며, 특히, *Microcystis aeruginosa (M. aeruginosa)*는 보편적으로 하천이나 호소 등 담수에서 사는 Cyanobacterium이며, Microsystin과 삭시토신이라는 독성을 발생한다(Gu et al., 2016). 우리나라에서는 아직 마이크로시스틴의 독성에 대한 구체적인 피해사례가 보고되고 있지 않지만, 1878년 호주에서 처음으로 녹조로 인해 동물이 폐사했다고 보고했으며, 이후 세계 각지에서 마이크로시스틴의 독소 때문에 가축이나 야생동물의 피해가 발생한 적이 있다(Paerl, 2012). 또한 녹조현상이 증가할수록 녹조류의 광합성 활동으로 인하여 수중의 용존산소가 감소하며, 이로 인하여 물고기와 수중생물에 생장에 악영향을 미칠 수 있다(Pei et al., 2014). 따라서 *M. aeruginosa* 의 제어는 생태계의 건강한 보존을 위하여 반드시 필요한 중요한 이슈이다.

선행연구에 의하면 독성물질을 발생하며, 녹조현상을 일으키는 *M. aeruginosa*를 없애기 위해 다양한 방법들이 연구되고 있다. 전기분해를 이용하여 물 분자(H_2O)를 초미립자(플라스마) 상태로 분해해 녹조를 없애는 방법(Paerl, 2012), 철염이나 알루미늄계열의 화학적 응집제를 이용해 녹조를 응집제거하는 방법(Chen et al., 2012; Qi et al., 2016) 그리고 강력한 초음파를 이용하여 조류의 세포를 파괴함으로써 녹조를 제거하는 초음파 이용방법(Meullemiestre et al., 2016) 등이 있다. 그러나 이러한 방법들은 많은 에너지 비용이 소모되고, 화학적인 응집제가 생태계에 미치는 독성문제, 응집제의 비용 그리고 넓은 지역에 따른 낮은 제거율이 단점이다. 이러한 단점을 보완하고자 수생식물이나, 수중 생태계의 먹이사슬을 이용하여 *Microcystis*를 제거하기 위한 친환경 처리 기술도 등장하였다(Chen et al., 2012). 녹조를 먹이로 삼는 녹조 포식성 생물의 숫자를 인위적으로 늘려 녹조를 제거하는 방식은 녹조 발생을 사전에 차단할 수 있다는 장점 때문에 장기적인 관점에서 가장 우수한 녹조 제거 및 예방 기술로 꼽히고 있다. 그러나 인위적으로 녹조 포식 생물이 대량으로 증가할 경우 발생할 수 있

† To whom correspondence should be addressed.
hjchoi@cku.ac.kr

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.

는 문제점 등을 사전에 파악하기 위한 생태조사를 장기적으로 해야 하기 때문에 많은 시간과 비용을 필요로 한다.

국내에서 가장 많이 사용하는 방법은 황토 살포하여, 황토 입자 내에 존재하는 미세기공에 녹조를 유발시키는 영양물질과 미세조류 등을 흡착시켜 동시에 제거하는 방법이다(Choi, 2015; Sengoco and Anderson, 2004). 그러나 점토광물의 표면은 음전하를 띄고 있어 음전하를 띄고 있는 미세조류의 제거효율이 낮고, 예방 효과가 미미하여 효율적인 수질 관리 및 녹조 제어가 곤란한 실정이다. 따라서 조류대발생을 억제하고 2차 오염 및 생물독성이 없는 천연 조류제어제의 개발이 필요하다.

따라서 본 연구는 솔잎추출액(Pine needle extract; PNE)을 이용하여 *M. aeruginosa* 의 성장제어를 위한 최적 조건을 찾고, 현장적용여부를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 pH, 온도, 교반속도, 혼합시간, PNE의 양이 *M. aeruginosa* 의 제거율에 미치는 영향을 실험하였으며, 다양한 제어모델을 이용하여 PNE를 이용한 *M. aeruginosa* 제어를 분석하였다.

2. Materials and Methods

2.1. *Microcystis aeruginosa* 배양

M. aeruginosa 는 한국해양과학 기술원에서 15 mL를 분양받아 Jaworski's Medium (JM배지)를 이용하여 25 ± 1°C 온도의 항온기에 5일간 증식하여 사용하였다. 미세조류 배양을 위하여 배양기의 광원은 LED (Light Emitting Diode)를 사용하였고, LED에 공급되는 전원은 모델 FP-60-12 파워 공급기(AD & Lighting, Suwon, Kyonggi-Do, Korea)를 사용하였다. 모든 광원은 위에서 아래로 공급하였으며, LED는 white 색상, 조도는 120 μmol/m^2S, 광주기는 16L:8D 그리고 pH 7에서 배양하였다. 구체적인 배양조건과 JM배지의 성분은 Table 1에 나타내었다.

2.2. 솔잎 추출액

솔잎은 강원도 강릉시 소재 산악지역에 자생하는 소나무의 솔잎을 채취하여 사용하였다. 채취한 솔잎은 오염물질 제거를 위하여 증류수로 수차례 세척한 후 약 2 cm 크기로 절단하여 105 °C의 건조기(SJP-125DO, 세종과학, Korea)에서 8시간 건조한 뒤 분쇄하였다. 건조 분쇄한 솔잎 10 g을 100 mL의 80% 에탄올과 혼합한 후 초음파 추출액기를 (JYD-US01, Shenzhen Jiayuanda Technol. Co., Ltd, Guangdong, China) 이용하여 20-kHz로 120분 동안 추출하였다. 추출한 솔잎액은 0.45 μm (Whatman, USA)로 필터링하여 냉장 보관하여 실험에 사용하였다.

2.3. 실험 조건

실험은 Jar-test의 형식으로 실행하였으며, 다양한 농도(0-4 dryweight g/L)의 *M. aeruginosa* 함유용액 500 mL와 다양한 양의 (0-25 g/L) PNE를 실험계획에 따라 혼합하여 유리비커(1 L)에 투입하여 교반속도(0-300 rpm)와 교반시간(0-30 min)을 조절하여 반응을 시켰다. 반응이 끝난 용액은 2500 rpm으로 20분간 원심분리한 후 상등액을 샘플링하여 *M. aeruginosa* 의 제거율을 측정하였다. pH는 3-10까지 0.5 mol의 NaOH와 HCl을 이용하여 조절하였으며, 온도는 *M. aeruginosa* 가 주로 여름철에서 가을철에 우점을 차지하는 조류임을 감안하여 15-40 °C도까지 조절하였다. 모든 실험은 하나의 매개변수의 측정을 위하여 나머지의 매개변수는 고정하였다.

2.4. 분석방법

Chlorophyll-a (Chl-a)은 500 mL를 GF/F (0.45 μm, Whatman) 필터로 여과한 다음, 습기를 제거하고 90% 아세톤으로 암/냉장 하에서 12 시간 동안 색소를 추출하였다. 추출한 엽록소는 형광분석기(TD-700, Turner Designs)를 이용하여 흡광도를 측정한 후, Chl-a 값으로 환산하였다. Chl-a의 농도는 아래의 식 (1)을 이용하여 계산하였다.

$$C_{chl\text{-}a} = 13.95 \times OD_{665nm} - 6.88 \times OD_{649nm} \quad (1)$$

M. aeruginosa 의 제거율은 Chl-a 측정한 후 아래의 식 (2)를 이용하여 계산하였다.

$$R = \{(Chl\text{-}a_2 - Chl\text{-}a_1)/Chl\text{-}a_2\} \times 100\% \quad (2)$$

여기서 Chl-a_1 과 Chl-a_2 는 각각 반응 전의 초기 농도와 반응 후의 농도이다. 미세조류의 생장률(μ)은 아래와 같이 계산하였다.

$$\mu = \ln(X_1/X_0) / (t_1 - t_0) \quad (3)$$

μ 는 생장률(1/h), X_1 및 X_0 는 초기 및 일정 배양 시간 후의 미세조류 농도(g/L), 그리고 t는 배양시간(h)를 나타낸다. *M. aeruginosa* 의 건 중량은 10 mL의 샘플을 GF/C (Wahtmann, 영국)로 여과한 후 105°C에서 24시간 건조한 후 그 질량을 측정하였다.

*M. aeruginosa*의 생장력을 설명할 수 있는 제어모델은 Haldane, Double exponential, Edwards, Luong, Webb, Moser 그리고 Teissier의 모델을 이용하여 분석하였다. PNE의 성

Table 1. Culture medium and cultivation conditions

Microorganism	Cultivation conditions	Culture medium
M. aeruginosa	20 °C, 72 h	JM
Culture mediums	Compositions	
JM medium	$Ca(NO_3)2H_2O$ 4.0 g, KH_2PO_4 2.48 g, $MgSO_47H_2O$ 10.0 g, $NaHCO_3$ 3.18 g, EDTAFeNa 0.45 g, $EDTANa_2$ 0.45 g, H_3BO_3 0.496 g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.278 g, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 0.20 g, Cyanocobalamin 0.008 g, thiamine HCl 0.008 g, biotin 0.008 g, $NaNO_3$ 16.0 g, and $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 7.2 g in 200 mL deionized water	

분분석은 Gas Chromatography (GC-2010AF, Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였으며, pH는 pH-meter (ISTEK, pH-20N)을 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 5번 이상 반복 수행하여 평균 데이터를 사용하였다.

3. Results and Discussions

3.1. 솔잎추출액의 특징

솔잎 추출액의 성분을 분석한 결과 pH는 4.5-5.1 이였으며, α-pinene, β-pinene, camphene 등의 정유성분과 quercetin, kaempferol 등 flavonoid류, 수지 그리고 수분 58.1%, 당질 19.6%, 섬유소 13.3%, 단백질 3.75%, 조 지방 2.93% 과회분 0.6% 정도가 함유되어 있다(Table 2). 이러한 성분들은 항균효과 및 미생물 성장억제 효과가 있다고 보고되어 있다. 그 외에 무기성분으로 칼륨이 534.50 mg%, 칼슘 329.01 mg%, 마그네슘은 88.65 mg%함유되어 있다. 피톤치드의 주요 구성 성분은 α, β-pinene, β-myrcene, limonene, phellandrene, 및 bornylacetate 이며, 이외에 terpenoid, poly terpenoid, phenol류 등 수십 가지의 미량성분을 함유하는 혼합물로서 이들 성분이 항균, 살충작용을 하며 세균의 성장을 저해한다(Hwang et al., 1995; Lee et al., 2005). 솔잎의 정유 성분 함유량은 0.13-1.3%이며, 생장환경과 수확시기에 따라 함유량에 차이가 있다. 정유의 주요 성분인 pinene는 미생물의 생장을 억제하며, terpinene, camphene와 limonene는 항바이러스, 항염작용을 하고, phellandrene는 강한 살충력 작용을 하고, bornylacetate는 항곰팡이, 항염작용을 하는 것으로 알려져 있다(Zeng et al., 2012). 솔잎 추출액을 이용하여 항균 실험을 한 선행연구에 의하면 솔잎 추출물이 그람양성 균(*Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*)과 그람음성균(*Escherichia coli*, *Shigella sonnei, Salmonella typhimurium*)에 대하여 항균 효능이 있다고 보고하였다(Kim, 2012; Krishnaswamy and Orsat, 2015; Wu et al., 2015). 또한 Nakai et al. (2000)은 단지 폴리페놀 성분 7.5 mg/L을 이용하여 *M. aeruginosa*를 61% 제거하였다고 보고하였다. 솔잎에 함유되어 있는 폴리페놀 함유량은 솔잎 정유 성분 100 g 중 1.305 g이 함유되어 있으며, tannin은 ellagic acid와 catechin 등의 성분이 솔잎 정유 성분 100 g 중 0.69 g (약 0.7%)이 존재하는데, 이 성분은 식물체의 미생물 방어와 세포의 성장을 억제하는 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Choi, 2009). PNE에는 폴리페놀 화합물이 많이 함유되어 있어 *M. aeruginosa*를 제거하는데 효율적일 것으로 예상된다.

Table 2. Components of pine needle extract

Components	Content (%)
Moisture	58.1
Carbohydrate	19.6
Cellulose	13.3
Protein	3.75
Crude fat	2.93
Inorganic components	1.72
Crude ash	0.6

3.2. 다양한 매개변수가 미치는 영향

3.2.1. pH

pH가 *M. aeruginosa* 의 제거율에 미치는 영향을 알아보고자 HCl와 NaOH를 이용하여 pH를 3부터 10까지 조절하여 *M. aeruginosa* 의 제거율을 실험하였다. pH 3에서는 30%의 낮은 제거율을 나타내었으나 pH가 상승함에 따라 제거율도 상승하여 pH 7에서는 100%의 제거율을 나타내었다. pH 8에서는 98%의 제거율을 나타내었으나 pH가 8이상으로 증가함에 따라 점차 제거율이 감소하여 pH 10에서는 51%의 제거율을 나타내었다(Fig. 1). 이로 인하여 PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 의 제거를 위한 최적의 pH는 7-8임을 알 수 있었다. 일반적인 호소의 pH가 7.35-9.43의 약알칼리인 점을 감안한다면 PNE를 사용하여 호소의 *M. aeruginosa* 를 제거할 경우 pH의 조절 없이 사용할 수 있을 것으로 사료된다. 일반적으로 pH는 미세조류 증식의 환경적인 면에 많은 영향을 미치는 주요 영향인자이다. 미세조류 제어물질을 사용시에 pH 조절에 영향을 받지 않고 사용할 수 있다는 것은 현장적용이 가능하다는 것을 확인할 수 있다. 호소의 pH조절은 어려운 부분이며, 설령 가능하다고 할지라도 pH 조절을 위한 약품사용에 따른 경제적인 부담 및 호소의 생태적인 환경에 미치는 영향을 고려해야만 한다. 선행연구에 의하면 PNE에 함유되어 있는 폴리페놀 화합물 성분은 중성의 pH에서 가장 활발하게 항균작용을 하는 것으로 보고하였다(Kong et al., 1995). 본 실험결과 PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 를 제거할 경우 PNE에 함유되어 있는 주요 항균작용 물질인 α, β-pinene, β-myrcene, limonene, phellandrene 그리고 bornylacetate 등은 산성 조건보다는 중성이나 약알칼리의 pH에서 반응이 활발하여, 중성의 pH에서 높은 제거율을 나타내었다.

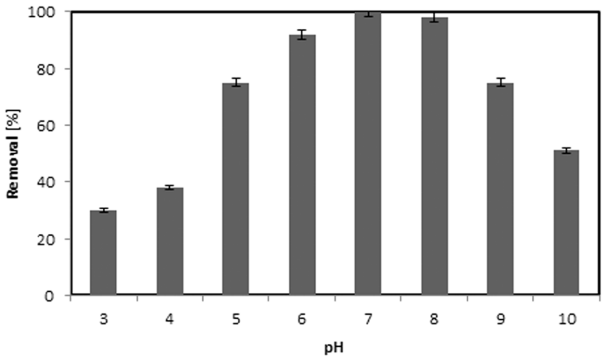

Fig. 1. Effect of various pH on the removal of *M. aeruginosa* in PNE (PNE concentration: 2 g/L, *M. aeruginosa* concentration 1.852 dryweight g/L, mixing rate: 100 rpm, mixing time: 10 min, T: 25°C).

3.2.2. 온도

온도는 pH와 같이 *M. aeruginosa*의 제거율에 영향을 미치는 중요한 인자 이다. 온도에 따른 *M. aeruginosa* 제거율

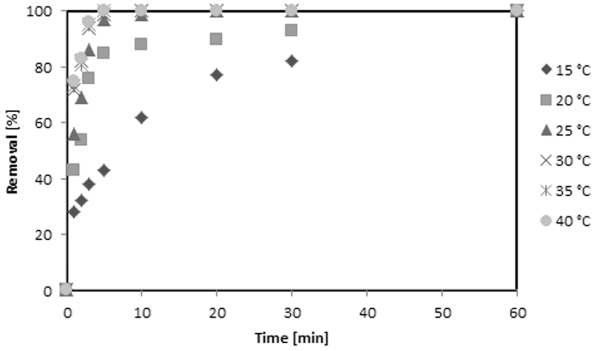

Fig. 2. Effect of temperature on the removal of *M. aeruginosa* by PNE (PNE concentration: 2 g/L, *M. aeruginosa* concentration 1.852 dryweight g/L, mixing rate: 100 rpm, mixing time: 10 min, pH: 7).

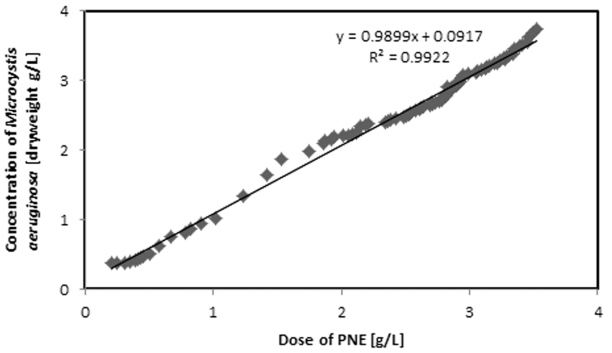

Fig. 3. Relationship between *M. aeruginosa* concentration and PNE dosage (mixing rate: 100 rpm, mixing time: 10 min, pH: 7, T: 25°C).

실험결과 15°C에서는 5분의 반응시간에 43%의 제거율을 나타내었으며 반응시간 60분에는 100%의 제거율을 나타내어, *M. aeruginosa* 의 제거율은 다른 높은 온도와 비교하여 제거속도가 느렸다. 20°C에서는 30분의 반응시간에 93%의 제거율을 나타내었으나, 25°C에서는 10분의 반응시간에 99%의 제거율을 나타내었으며, 20분의 반응시간에 100%의 제거율을 나타내었다. 온도가 상승함에 따라 제거속도와 제거율은 향상되었으나 30°C 이상에서는 거의 차이가 없어 반응시간 5분에 도달했을 때 99% 이상 제거되었음을 알 수 있었다(Fig. 2). 남조류가 등장하는 여름에 호소나 강의 온도가 25°C 전후인 것을 점을 감안한다면 10분의 반응시간으로 *M. aeruginosa* 를 99%이상 제거할 수 있다. Choi (2016)은 카페인을 이용하여 *M. aeruginosa*를 제거한 결과 15°C, 20°C, 25°C, 30°C 그리고 35°C에서 각각 23%, 46%, 78%, 80%, 81%를 나타내어 온도가 상승함에 따라 *M. aruginosa* 의 제거율이 상승하였으나, 25°C와 30°C에서의 제거율에는 큰 차이가 없었다. 일반적으로 대부분의 미세조류는 25°C 전 후의 온도에서 가장 활발하게 증식을 하며, 녹조현상을 일으키는 남조류 또한 여름철 기온이 25°C 이상이였을 때 우점종을 차지하는 것으로 보고되어지고 있다 (Nakai et al., 2000). 따라서 PNE는 25°C에서 높은 제거율을 나타내어, 여름철 남조류 중에서 독성을 함유하고 있는 *M. aeruginosa* 를 제거하는데 적합하며, 현장적용이 가능할 것으로 사료된다.

3.2.3. PNE의 양

pH와 온도의 최적화 실험은 현장적용의 가능성과 경제적 부분에서 중요한 영향인자라면, *M. aeruginosa* 의 제거를 위하여 PNE의 투여하는 양을 최소화시키는 것은 경제적인 면에서 매우 중요한 요인이다. Fig. 3에 PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 를 98%이상 제거한 데이터를 정리하였다. 위의 pH와 온도가 미치는 영향 실험결과를 참조하여 pH는 7, 온도는 25°C에 맞추어 실험하였다. 실험결과 *M. aeruginosa* 의 농도와 PNE의 양과의 상관관계는 0.9922를 나타내어 매우 높았으며, *M. aeruginosa* 의 농도가 높아질수록 PNE의 양도 증가하였음을 알 수 있었다. 상관계수(R^2)를 이용하여 *M. aeruginosa* 제거에 필요한 PNE의 양을 계산한 결과 1 g dryweight/L의 *M. aeruginosa* 를 98% 이상 제거하는데 약 1 g/L의 PNE가 필요하였다. *M. aeruginosa* 의 생태계 및 동식물에 미치는 독성은 이미 전 세계적으로 문제가 되고 있으며, 이에 따라 다양한 제거 방식이 연구되고 있다. Li et al. (2016)은 수생식물인 *Sagittaria trifolia* 의 추출물을 이용하여 *M. aeruginosa* 의 제어를 연구하여 6시간에 90%의 제거율을 보고했으며, Chen et al. (2012)은 수생식물을 이용하여 *Microcystis*를 제어한 결과 19일 동안에 75-82%의 제거율을 보고하였다. 또한 Sengoco and Anderson (2004)는 1000 mg/L의 점토광물을 이용하여 하천이나 호소의 영양염류와 *Microcystis* 제거를 동시에 연구한 결과 22.9%의 낮은 제거율을 보고하였으나, Liu et al. (2010)은 낮은 점토광물의 *Microcystis* 제거율을 보완하고자 hexadecyl trimethyl ammonium bromide를 이용하여 점토광물을 개질하였으며, 이를 이용하여 0.3 g/L의 양으로 92% 제거율을 보고하였다. PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 제거를 실험한 본 연구는 개질에 필요한 화학약품과 긴 시간이 필요로 하지 않으며, 천연물질 그대로 사용할 수 있어 환경 친화적이고, 선행논문과 비교하여 높은 제거율을 나타내었음을 알 수 있다.

3.2.4. 교반시간과 교반속도

시료의 혼합시간과 교반속도의 최적 조건을 찾는 것은 *M. aeruginosa* 를 제거하는 실험에서 에너지 비용을 절약할 수 있다는 점에서 시료의 양만큼이나 중요한 요인이다. Fig. 4에 시료와 PNE의 혼합시간에 따른 *M. aeruginosa*의 제거율을 구체적인 실험조건과 함께 나타내었다. 액상인 PNE은 수용액에서 쉽게 혼합되어 1 min의 혼합시간에 76%의 *M. aeruginosa* 제거율을 나타내었으며 5 min 후에는 완전히 혼합되어 100%의 제거율을 나타내었다. 혼합시간이 짧고 제거율이 높을수록 교반에 따른 에너지 비용은 절약되며, 그에 따른 공정의 비용도 저감할 수 있다. PNE에 함유되어 있는 주요 피톤치드 성분인 α,β-pinene, β-myrcene, limonene, phellandrene 그리고 bornylacetate 등은 살균작용이 강하여 빠른 반응속도를 나타내며, 그에 따른 제거율이 매우 높다.

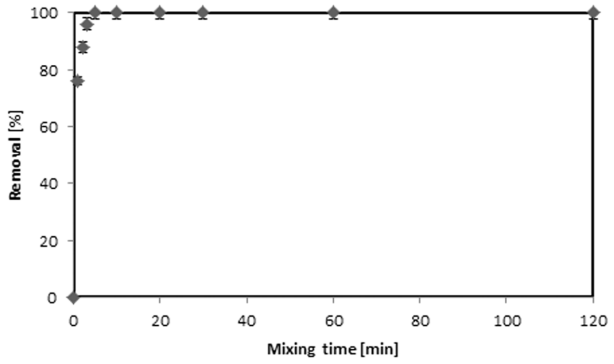

Fig. 4. Effect of mixing time on the *M. aeruginosa* removal using PNE (PNE concentration: 2 g/L, *M. aeruginosa* concentration 1.852 dryweight g/L, mixing rate: 100 rpm, pH: 7, T: 25°C).

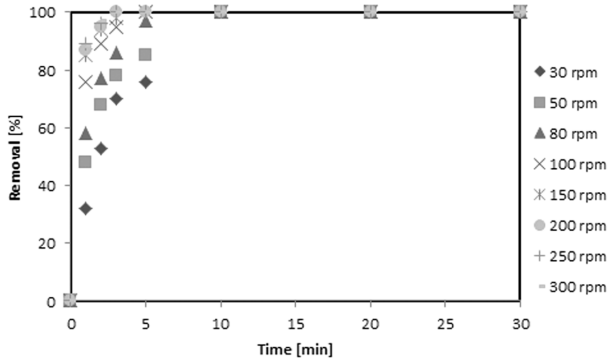

Fig. 5. Effect of mixing speed on the specific growth rate in PNE cultured *M. aeruginosa* (PNE concentration: 2 g/L, *M. aeruginosa* concentration 1.852 dryweight g/L, mixing time: 10 min, pH: 7, T: 25°C).

교반속도의 최적화 또한 혼합시간과 같이 에너지 비용을 절약할 수 있는 요인이 된다. Fig. 5에 교반 속도에 따른 *M. aeruginosa* 의 제거율을 나타내었다. 교반속도가 빠를수록 짧은 시간에 높은 제거율을 나타내었다. 30 rpm 으로 교반했을 경우 10 분 후에 100% 제거율을 나타내었으나, 150 rpm 으로 교반했을 때에는 3분 후에 98%의 *M. aeruginosa* 제거율을 나타내었다. 100 rpm으로 3분 동안 교반했을 때에는 95%이상의 제거율을 나타내었고 100 rpm 이상에서는 제거율이 거의 변화가 없이 비슷하였다. 따라서 PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 를 제거할 경우 경제적인 부분을 감안한다면 100 rpm 의 교반속도가 최적인 것으로 사료된다. PNE의 현장적용시에는 적용대상의 부피와 시료의 양에 따라 Batch-test의 결과를 이용하여 최적화를 해야 한다.

3.3. *M. aeruginosa* 성장제어 모델 분석

PNE의 농도에 따른 비증식 속도 (μ)의 증가와 감소를 계산하여 Fig. 6에 나타내었다. 0.5 g/L 까지는 μ 가 증가하였으나 그 후에는 PNE의 농도가 증가함에 따라 점차 감소하여 2 g/L에서는 0.08 (1/h) 그리고 10 g/L에서는 0.02 (1/h)의 *M. aeruginosa* 의 비증식 속도를 나타내었다. 이는 PNE 농도 0.5 g/L까지는 *M. aeruginosa* 제어에 크게 영향을 미

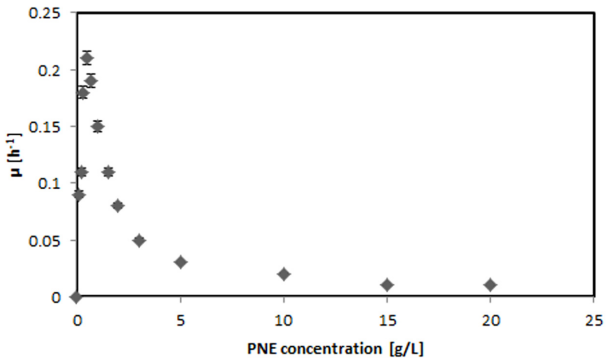

Fig. 6. Effect of PNE concentration on the specific grow rates of *M. aeruginosa* (standard deviation varying ±3%).

치지 못한 것으로 보이며 0.5 g/L이상의 PNE농도에서는 점차 *M. aeruginosa* 의 제어에 작용한 것으로 보인다. 실험결과 μ_{max}는 0.5 g/L의 PNE 농도에서 0.21 (1/h)를 나타내었다.

PNE를 이용한 *M. aeruginosa* 성장제어를 Moser, Tessier, Webb, Haldane, Edwards, Double exponential 그리고 Luong models을 이용하여 분석하였으며 계산한 데이터를 Table 3에 정리하였다. 실험데이터를 분석한 결과 Luong 모델은 R^2를 0.9761 나타내어 다른 모델보다 PNE를 이용하여 *Microcystis* sp.를 생장 실험에 더 적합하였다. μ_m 은 모든 분석 모델에서 0.174-0.231 (1/h)을 나타내었으며, K_s는 0.3394-1.140을 나타내어 PNE의 농도 약 1 g/L에서는 *Microcystis* sp. 성장에 제어되었음을 확인할 수 있었다. Gokulakrishnan and Gummadi (2006)는 카페인을 이용하여 *Pseudomonas* sp. 의 제어를 실험한 결과 약 2.5 g/L 에서부터 카페인이 *Pseudomonas* sp.의 생장에 제어작용을 하는 것을 확인하였으며, Kim et al (2016)은 다양한 Glucose의 농도를 이용하여 *Klebsiella oxytoca*의 성장제어를 실험한 결과 Glucose 농도 50 g/L 이상부터 *Klebsiella oxytoca*의 성장이 제어되는 것을 확인하였다. 본 실험결과 PNE는 약 1 g/L에서 부터 *M. aeruginosa* 성장을 제어할 수 있어 카페인이나 Glucose 보다는 미세조류 성장제어에 효과적인 것으로 사료된다.

M. aeruginosa 제거를 위해서 물리적, 화학적 등 많은 방법이 연구되고 있으나, 물리학적인 방법은 많은 에너지와 시간이 소요되어 실용적이지 못하며, 화학적인 방법은 다량의 화학약품의 사용으로 인하여 생태계에 악영향을 줄 수 있으며, 특히 식수로 사용할 수 있는 물에는 적합하지 못하다. 따라서 최근에는 환경 친화적이고 경제적이며 생태계에 무해한 천연제어제가 연구되고 있다. Xiao et al. (2010)은 보리 짚이 *M. aeruginosa* 제어를 위한 물리적 또는 화학적 처리의 유용한 대안이 될 수 있다고 보고하였으며, 침엽수와 활엽수의 추출액(Park et al., 2006), 감귤 껍질 및 난쟁이 바나나 껍질(Chen et al., 2004), 벼 껍질(Park et al., 2009) 등을 이용하여 *M. aeruginosa* 를 효율적으로 제어 할 수 있다고 보고하였다. 이러한 식물의 부산물을 이용한 *M. aeruginosa*의 성장억제는 주로 식물에 함유되어 있는 탄닌산을 포함한 폴리페놀화합물인 allelochemicals에 기인한다(Chen et al., 2004; Nakai et al., 2000; Park et al.,

Table 3. Estimated parameters of various substrate inhibition models

Model	Equation	Parameters	R2
Moser	$\mu = \mu_m S^n / (K_s + S^n)$	n = 0.6721, K_s = 0.8287, μ_m = 0.207	0.9612
Tessier	$\mu = \mu_m[1-\exp(-S/K_s)]$	K_s = 0.5312, μ_m = 0.172	0.9248
Webb	$\mu = \{\mu_m S[1+(S/K_i)]\} / \{K_s+S+(S^2/K_i)\}$	K_i = 1171, K_s = 0.3394, μ_m = 0.174	0.9321
Haldane	$\mu = \mu_m S/[(K_s+S)+(1+S/K_i)]$	K_i = 1.141, K_s = 1.140, μ_m = 0.203	0.8941
Edwards	$\mu = [\mu_m S/(K_s+S)]\ \exp^{(-S/Ki)}$	K_i = 4.512, K_s = 0.9173, μ_m = 0.228	0.9547
Double exponential	$\mu = \mu_m[\exp(-S/K_i) - \exp(-S/K_s)]$	K_i = 5.623, K_s = 0.687, μ_m = 0.231	0.9532
Luong	$\mu = \mu_m S/(K_s+S)\ (1-S/S_m)^n$	S_m = 20.11, K_s = 0.6012, μ_m = 0.227, n = 2.857	0.9761

where μ and μ_m are the specific growth rate and maximum specific growth rate, respectively. S, K_s and S_m are the limiting substrate concentration (Pine needle extracts in this study), the Monod half saturation constant and the maximum substrate inhibitory concentration at which no growth was observed, respectively. n is the constant which accounts the relationship between μ and S.

2006). 본 연구에서 사용한 PNE는 탄닌산을 포함한 폴리페놀화합물이 벼 껍질이나 감귤의 껍질보다 많아 제거율이 높으며 솔잎은 계절에 관계없이 수확할 수 있어 다른 식물의 부산물을 이용하는 것보다 활용도가 높다. PNE를 이용한 *M. aeruginosa* 의 제거는 제거효율이 높고 환경 친화적이며, 경제적이지만, 다른 물질과 비교하여 많은 양을 필요로 하는 단점이 있으며, 아직까지 PNE를 사용하여 하천이나 호소의 *M. aeruginosa*을 제거할 경우 하천의 다른 미생물과 생태계에 미치는 영향은 조사되지 않았다. 따라서 현장적용을 위해서는 지속적인 연구 검토가 필요하다.

4. Conclusion

PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 의 성장을 제어하기 위한 본 실험의 결과는 아래와 같다. PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 를 제거하기 위해서는 25°C, 교반속도 100 rpm, 혼합시간 10 min, pH 7이 최적 조건이였으며, 1 g dryweight/L 의 *M. aeruginosa* 를 제거하기 위해서는 약 1 g/L의 PNE가 필요했다. μ_{max}는 0.5 g/L의 PNE농도에서 0.21 (1/h)를 나타내었으며, PNE를 이용한 *M. aeruginosa* 성장제어를 Moser, Tessier, Webb, Haldane, Edwards, Double exponential 그리고 Luong models을 이용하여 분석한 결과 Luong 모델은 R^2를 0.9761나타내어 다른 모델보다 PNE를 이용하여 *M. aeruginosa* 를 생장 실험에 더 적합하였다. PNE는 탄닌산을 포함한 폴리페놀화합물이 벼 껍질이나 감귤의 껍질보다 많아 제거율이 높으며 소나무의 잎은 계절에 관계없이 수확할 수 있어 다른 식물의 부산물을 이용하는 것보다 활용도가 높았으며, 현장적용 가능성을 확인하였다. PNE를 이용한 *M. aeruginosa* 의 제거는 제거효율이 높고 환경 친화적이며, 경제적이다.

Acknowledgments

This study was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (2016005271) and supported by research fund by Catholic Kwandong University (CKURF-201604310001).

References

Chen, J. Z., Liu, Z. L., Ren, G. J., Li, P. F., and Jiang, Y. W. (2004). Control of *Microcystis aeruginosa* TH01109 by Batangas Mandarin Skin and Dwarf Banana Peel, *Water SA*, 30(2), 279-282.

Chen, J. Z., Zhang, H. Y., Han, Z. P., Ye, J. Y., and Liu, Z. (2012). The Influence of Aquatic Macrophytes on *Microcystis aeruginosa* Growth, *Ecological Engineering*, 42, 130-133.

Choi, H. J. (2015). Optimization for Microalgae Harvesting using Mg-sericite Flocculant, *Journal of Korean Society on Water Environment*, 31(3), 328-333. [Korean Literature]

Choi, H. J. (2016). Inhibition of the Growth of Harmful Cyanobacterial Blooms, *Microcystis Aeruginosa* Using Caffeine, *KSWST Journal of Water Treatment*, 24(5), 111-122. [Korean Literature]

Choi, H. Y. (2009). Antioxidant Activity and Quality Characteristics of Pine Needle Cookies, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38(1), 1414-1421.

Gokulakrishnan, S. and Gummadi, S. N. (2006). Kinetics of Cell Growth and Caffeine Utilization by *Pseudomonas* sp. GSC 1182, *Process Biochemistry,* 41, 1417-1421.

Gu, N., Gao, J., Li, H., Wu, Y., Ma, Y., and Wang, K. (2016). Montmorillonite-supported with Cu_2O Nanoparticles for Damage and Removal of *Microcystis aeruginosa* under Visible Light, *Applied Clay Science*, In Press, Corrected Proof, Available online 2 July 2016.

Hwang, B. H., Zhao, J., Kwon, H. I., and Song, J. M. (1995). Tepene Components Aalysis on Needle and Pine Cone of *Pinus thunbergii*, *Journal of Korea Foresty Energy*, 15(1), 23-26.

Kim, C. S. (2012). A Comparison Study of Antibacterial Effects of Pine Needle Extracts on Human Skin Pathogens, *Korean Journal of Aesthetic and Cosmetology*, 10(1), 25-30. [Korean Literature]

Kim D. K., Park, J. M., Song, H. H., and Chang, Y. K. (2016). Kinetic Modeling of Substrate and Product Inhibition for 2,3-Butanediol Production by *Kiebsiella oxytoca*, *Biochemical Engineering Journal*, 114, 94-100.

Kong, Z., Liu, Z., and Ding, B. (1995). Study on the Anti-mutagenic Effect of Pine Needle Extract, *Mutation Research Letters*, 347(3-4), 101-104.

Krishnaswamy, K. and Orsat, V. (2015). Insight into the Nanodielectric Properties of Gold Nanoparticles Synthesized

from Maple Leaf and Pine Needle Extracts, *Industrial Crops and Products*, 66, 131-136.

Lee, H. J., Choi, S. P., Kim, S. H., Ham, Y. A., Lee, D. S., and Ham, S. S. (2005). Quality Characteristics of the vaporized Lipid of Water-boiled Pine Needle, *Journal of Korean Society of Food Preservation*, 12(2), 107-111.

Li, J., Liu, Y., Zhang, P., Zeng, G., Cai, X., Liu, S., Yin, Y., Hu, X., and Tan, X. (2016). Growth Inhibition and oxidative Damage of *Microcystis aeruginosa* induced by Crude Extract of *Sagittaria trifolia* Tubers, *Journal of Environmental Sciences*, 43, 40-47.

Liu, G., Fan, C., Zhong, J., Zhang, L., Ding, S., Yan, S., and Han, S. (2010). Using Hexadecyl Trimethyl Ammonium Bromide (CTAB) modified Clays to clean the *Microcystis aeruginosa* Blooms in Lake Taihu, China, *Harmful Algae*, 9(4), 413-418.

Meullemiestre, A., Petitcolas, E., Maache-Rezzoug, Z., Chemat, F., and Rezzoug, S. A. (2016). Impact of Ultrasound on solid-liquid Extraction of phenolic Compounds from Maritime Pine Sawdust Waste. Kinetics, Optimization and Large Scale Experiments, *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, 230-239.

Nakai, S., Inoue, Y., Hosomi, M., and Murakami, A. (2000). *Myriophyllum spicatum*-released allelopathic Polyphenols Inhibiting Growth of Blue-green Algae *Microcystis aeruginosa*, *Water Research*, 34(11), 3026-3032.

Paerl, P. (2012). Climate Change: Links to Global Expansion of Harmful Cyanobacteria, *Water Research*, 46, 1349-1363.

Park, M. H., Hwang, S. J., Ahn, C. Y., Kim, B. H., and Oh, H. M. (2006). Screening of seventeen Oak Extracts for the Growth Inhibition of the Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* Kütz. em. Elenkin, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 77, 9-14.

Park, M. H., Kim, B. H., Chung, I. M., and Hwang, S. J. (2009). Selective bactericidal Potential of Rice (*Oryza sativa* L. var. *japonica*) Hull Extract on *Microcystis* strains in Comparison with Green Algae and Zooplankton, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83, 97-101.

Pei, H. Y., Ma, C. X., Hu, W. R., and Sun, F. (2014). The Behaviors of *Microcystis aeruginosa* Cells and Extracellular Microcystins during Chitosan Flocculation and Flocs Storage Processes, *Bioresource Technology*, 151, 314-322.

Qi, J., Lan, H., Miao, S., Xu, Q., Liu, R., Liu, H., and Qu, J. (2016). $KMnO_4$-Fe(II) Pretreatment to enhance *Microcystis aeruginosa* Removal by Aluminum Coagulation: Does it Work after long Distance Transportation?, *Water Research*, 88, 127-134.

Sengco, M. R. and Anderson, D. M. (2004). Controlling harmful Algal Blooms through Clay Flocculation, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, 169-172.

Wu, Y. P., Liang X., Liu, X. Y., Zhong, K., Gao, B., Huang, Y. N., and Gao, H. (2015). *Cedrus deodara* Pine Needle as a potential Source of natural Antioxidants: Bioactive constituents and Antioxidant activities, *Journal of Functional Foods*, 14, 605-612.

Xiao, X., Chen, Y. X., Liang, X. Q., Lou, L. P., and Tang, X. J. (2010). Effects of Tibetan hulless barely on Bloom-froming Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) measured by Different physiological and morphologic Parameters, *Chemosphere,* 81, 1118-1123.

Zeng, W. C., Zhang, Z., Gao, H., Jia, L. R., and He, Q. (2012). Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oil from Pine Needle (*Cedrus deodara*), *Journal of Food Science*, 77(7), 824-829.