

# 초음파 조사시간에 따른 *Microcystis aeruginosa*의 성장억제 평가

## Evaluation of Growth Inhibition for *Microcystis aeruginosa* with Ultrasonic Irradiation Time

강은별<sup>1</sup> · 주진철<sup>2\*</sup> · 장소예<sup>3</sup> · 고현우<sup>4</sup> · 박정수<sup>5</sup> · 정무일<sup>6</sup> · 이동호<sup>7</sup>

<sup>1</sup>한밭대학교 건설환경공학과 석사과정, <sup>2</sup>한밭대학교 건설환경공학과 교수, <sup>3</sup>한밭대학교 환경공학과 석사, <sup>4</sup>한밭대학교 건설환경공학과 석사과정, <sup>5</sup>한밭대학교 건설환경공학과 조교수, <sup>6</sup>㈜에드소닉 대표, <sup>7</sup>한밭대학교 모바일융합공학과 교수

Eun Byeol Kang<sup>1</sup>, Jin Chul Joo<sup>2\*</sup>, So Ye Jang<sup>3</sup>, Hyeon Woo Go<sup>4</sup>, Jung Su Park<sup>5</sup>, Moo Il Jeong<sup>6</sup> and Dong Ho Lee<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Master Candidate, Department of Civil and Environmental Engineering, Hanbat National University, Daejeon 34158, Korea

<sup>2</sup>Professor, Department of Civil and Environmental Engineering, Hanbat National University, Daejeon 34158, Korea

<sup>3</sup>Master, Environmental Engineering, Hanbat National University, Daejeon 34158, Korea

<sup>4</sup>Master Candidate, Department of Civil and Environmental Engineering, Hanbat National University, Daejeon 34158, Korea

<sup>5</sup>Assistant Professor, Department of Civil and Environmental Engineering, Hanbat National University, Daejeon 34158, Korea

<sup>6</sup>CEO, Adsonic, Daejeon 34014, Korea

<sup>7</sup>Professor, Department of Mobile Convergence Engineering, Hanbat National University, Daejeon 34158, Korea

Received 01 September 2022, revised 12 September 2022, accepted 20 September 2022, published online 30 September 2022

**ABSTRACT:** The growth inhibitory effect of *Microcystis aeruginosa* according to the ultrasonic irradiation time was evaluated using a large algae sample volume (10 L) for various ultrasonic irradiation times (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 and 3 hr) at a laboratory scale. Based on the analysis of Chl-*a* and cell number of *M. aeruginosa*, algae growth inhibition was observed with the decrease in Chl-*a* and cell number in all experimental groups after the ultrasonic irradiation. For the experimental group (T<sub>B</sub>, T<sub>C</sub>, T<sub>D</sub>) with an ultrasonic irradiation time of less than 2 hours, rapid regrowth of algae was observed after growth inhibition, but the experimental group (T<sub>E</sub>, T<sub>F</sub>, T<sub>G</sub>) with an irradiation time of more than 2 hours successfully inhibited algal growth lasting one or two more days. Based on the comparison of the recovery time to initial cell number the experimental group (T<sub>B</sub>, T<sub>C</sub>, T<sub>D</sub>) took less than 20 days whereas the experimental group (T<sub>E</sub>, T<sub>F</sub>, T<sub>G</sub>) took about 30 days. Correspondingly, the experimental group showed a high first order decay rate ( $\kappa$ ) in proportion to the ultrasonic irradiation time during the growth inhibition period. Additionally, the specific growth rates ( $\mu$ ) during regrowth in the experimental group with irradiation time of more than 2 hours were relatively low compared to those in the experimental group with less than 2 hours. Therefore, ultrasonic irradiation for more than 2 hours is required for long-term (30 days) inhibition of algal growth in stagnant waters. However, the appropriate ultrasonic irradiation time for algae growth inhibition should be determined according to various field conditions such as the volume of stagnant water, water depth, flow rate, algae concentration, etc. Finally, damages to the algal cell surface and cell membrane were clearly observed, and both destruction and disturbance of gas vesicles of *M. aeruginosa* in the experimental group were discovered, indicating the growth inhibitory effect of *Microcystis aeruginosa* according to the ultrasonic irradiation time was confirmed.

**KEYWORDS:** Algae growth inhibition, Irradiation time, *Microcystis aeruginosa*, Regrowth, Ultrasonic irradiation

**요약:** 초음파 (ultrasonic) 조사시간 (irradiation time)에 따른 *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*)의 성장억제 (growth inhibition) 효과를 대용량 (10 L) 조류 시료를 활용하여 다양한 초음파 조사시간 동안 (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 hr) 실험실 규모 (lab-scale)

\*Corresponding author: [jincjoo@hanbat.ac.kr](mailto:jincjoo@hanbat.ac.kr), ORCID 0000-0001-8551-3945

© Korean Society of Ecology and Infrastructure Engineering. All rights reserved.

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.

실험을 진행하였다. Chl-*a*와 *M. aeruginosa* 개체수 (cell number) 분석 결과, 초음파 조사 종료 이후 모든 실험군에서 Chl-*a*와 개체수가 감소되어 조류 성장억제가 관찰되었으며, 초음파 조사시간이 2시간 미만인 실험군 (T\_B, T\_C, T\_D)은 저감 이후 조류의 급격한 재성장 (regrowth)이 관찰되었으나, 조사시간이 2시간 이상인 실험군 (T\_E, T\_F, T\_G)은 2시간 미만 조사한 실험군 대비 조류성장억제가 1 - 2일 더 지속되는 것을 확인하였다. 또한, 조류의 개체수가 초기 개체수까지 회복 시간 (recovery time)을 검토한 결과 조사시간 2시간을 기준으로 실험군 T\_B (0.5 hr)는 7일, T\_C (1 hr)와 T\_D (1.5 hr)는 약 20일, T\_E, T\_F, T\_G ( $\geq 2$  hr)는 약 30일이 소요되어 초음파 조사 종료 후 초기 개체수까지의 회복 시간의 차이를 확인하였다. 비성장속도 ( $\mu$ )와 일차분해속도 ( $k$ )를 도출한 결과, 실험군은 성장억제 기간 동안 초음파 조사시간과 비례하여 높은 일차분해율이 도출되었으며, 조사시간이 2시간 이상인 실험군의 재성장 시 비성장속도 ( $\mu$ )는 2시간 미만인 실험군 대비 비성장속도 ( $\mu$ )가 상대적으로 낮은 것으로 확인되었다. 따라서 정체수역 내 장기적인 (30일) 조류 성장억제를 위해서는 최소한 2시간 이상의 초음파 조사가 필요한 것으로 판단되나, 조류 성장억제를 위한 적정 초음파 조사시간은 정체수역의 규모, 수심, 흐름속도, 조류 농도 등의 다양한 현장조건에 따라 결정되어야 하며, 실제 적용 가능성을 높이기 위한 추가 연구가 필요한 것으로 판단된다. 초음파의 영향으로 인한 *M. aeruginosa*의 세포 표면 및 내부형질 변화를 관찰한 결과, 조류 세포 표면 및 세포막의 손상이 명확히 관찰되었으며, 대조군 대비 실험군의 *M. aeruginosa*의 기낭 파괴 및 교란이 확인되었다.

**핵심어:** 조류 성장억제, 조사시간, *Microcystis aeruginosa*, 재성장, 초음파 조사

## 1. 서론

녹조 (algal bloom) 현상은 부영양화된 정체수역에서 조류의 대량발생으로 수체의 햇빛차단, 용존산소 감소, 독소에 의한 어류 폐사 등 생태학적인 불균형을 유발하며 물의 심미적 가치와 안전성을 저감시킨다 (Kim et al. 2015, Byeon et al. 2018, Paerl and Barnard 2020, Hallegraef et al 2021). 최근에는 기후변화 (climate change)에 따른 수온의 지속적 상승과 도시화 및 산업화로 인한 과도한 영양염류 [질소(N), 인(P)]의 수계 유입과 더불어 수계 내 설치된 다양한 인공 구조물에 의한 정체수역 증가 등의 영향으로 조류가 과다 증식하여 녹조현상의 발생빈도 및 강도가 점점 증가하는 추세이다 (Thackeray et al. 2008, Lee and Lee 2012, Kim et al. 2019, Jang et al. 2021, Meerhoff et al. 2022). 우리나라 수계에서 녹조현상 발생 시 가장 흔하게 문제를 일으키는 남조류인 *Microcystis aeruginosa* (*M. aeruginosa*)의 경우 군체 (colony)를 형성하고, 기낭 (gas vesicle)이 있어 일주성 수직이동 등의 특성이 있으며, 수계 내 독성 물질인 마이크로시스틴 (microcystin)을 배출하여 수생태계 위해성을 유발하여 수자원으로서의 가치를 하락시킨다 (Oh et al. 2001, Codd et al. 2005, Park et al. 2011, Lee et al. 2013, Harke et al. 2016).

이러한 문제점을 야기하는 유해남조류 (Harmful cyanobacteria)의 저감을 위해 최근 연구되어지고 있는 다양한 공법들 중 물리적 공법인 초음파 (ultrasonic)를 활용한 조류 저감 기술은 초음파의 공동현상 (cavitation)

으로 남조류의 미세소기관인 기낭을 파괴하여 조류의 부력조절 능력을 상실시켜 호소 바닥에 가라앉게 하고, 빛을 이용한 광합성작용을 차단함으로써 남조류의 생장을 억제하는 기술이다 (Ahn et al. 2003, Jachlewski et al. 2013, Park et al. 2013, Purcell et al. 2013, Song 2014, Park et al. 2017, Kong et al. 2019, Jang et al. 2022). 또한 초음파는 기낭 파괴를 통한 조류 저감뿐만 아니라 남조류의 세포분열을 억제하여 조류대발생을 예방하고, 남조류가 발생하는 독성물질 (microcystin)의 분해에 효과가 있다고 보고되고 있다 (Ma et al. 2005, Srisuksomwong et al. 2011, Dehghani 2016, Chen et al. 2020). 이러한 초음파를 이용한 기법은 화학약품의 수계 내 주입을 필요로 하지 않아 2차 오염을 유발하지 않으며 수생태계의 위해성이 낮은 친환경적 처리 공법인 동시에 남조류의 성장억제 효과를 얻을 수 있다.

초음파를 활용한 조류 저감을 위하여 기존 선행 연구에서는 초음파의 주파수 (frequency), 출력 (watt), 조사시간 (irradiation time)에 따른 유해남조류의 성장억제에 관한 다양한 연구가 진행되어 왔다. Wu et al. (2012)은 주파수가 낮을수록 *M. aeruginosa*의 성장억제에 효율이 높게 (20 kHz > 580 kHz > 1146 kHz) 도출된다고 보고하였으며, Sim et al. (2006)과 Zhang et al. (2006), Rajasekhar et al. (2012)은 초음파의 출력이 높을수록, 조사시간이 길어질수록 조류 성장억제 효율이 높은 것을 확인하였다. 하지만 이러한 연구들 대부분은 주로 1.5 L 미만의 소량의 시료로 실험이 진행되었고, 단기간의 초음파 조사에 의한 조류 성장억제 효율을 확인하

였으며, 일시적인 조류 성장억제 효과는 관찰하였으나 대규모 수체에서의 장기적 조류 성장억제 효과를 확인하지 못했다는 한계를 가지고 있다.

따라서 본 연구에서는 녹조현상의 주요 원인종인 *M. aeruginosa* 단일종의 시료를 기존 연구 대비 대용량(10 L) 시료를 활용하여 현장 mesocosm과 유사한 실험실 규모 (lab-scale) 실험을 진행하였으며, 선행연구 (Jang et al. 2022)에서 도출된 최적의 초음파 조사 조건 기반 다양한 초음파 조사시간별 *M. aeruginosa*의 성장억제 효과를 조사하였다. 또한 초음파의 조류 성장억제 효과를 검증하고 초음파 조사 종료 후 조사시간에 따른 조류의 재생장 주기 (regrowth period)를 도출하기 위해 (1) 초음파 적용 시간에 따른 시료의 육안 변화, (2) Chlorophyll-*a* (Chl-*a*)와 *M. aeruginosa* 개체수 변화, (3) *M. aeruginosa* 개체수 기반 비성장속도( $\mu$ ) 및 일차분해속도( $k$ ) 산출, (4) 주사전자현미경 (SEM) 및 투과전자현미경 (TEM) 분석을 통한 *M. aeruginosa*의 세포 표면 및 내부 형질 변화를 분석하였다. 이러한 검증 결과를 종합해 초음파 조사시간별 조류의 성장억제 효율 (efficiency)과 지속성 (sustainability)을 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 *M. aeruginosa* 배양

실험 조류인 남조류 *M. aeruginosa*는 경기도 W저수지로부터 채수하여 실험실에서 동정 분리하였다. *M. aeruginosa* 배양은 CB 배지를 사용하였으며, pH 9로 조정된 CB 배지와 일정량의 *M. aeruginosa*를 접종하여 표면적 182.5 cm<sup>2</sup>, 부피 500 mL의 cell culture 플라스크 (VWR, Co., America)에 담아 계대배양 (subculture)하

였다. CB 배지의 구체적인 성분은 Jang et al. (2021)에 제시되었다.

배양조건은 온도 27±1°C, 광량 12 μmol-photons m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup>, 광주기 12 hr :12 hr (light : dark) cycle, 회전속도 28±1 rpm의 조건을 갖춘 조류배양장치에서 약 30일간 배양하여 실험에 사용하였다.

### 2.2 초음파 (Ultrasonic) 발생장치 구성

초음파 조사조건 변화에 따른 *M. aeruginosa*의 성장억제에 미치는 영향 비교 및 분석을 위하여 초음파 발생장치와 진동판 구동회로를 직접 조합하여 제작하였다 (AD Sonic, Co., Korea). 본 실험에서 사용한 초음파 발생장치의 진동판은 9.6 cm<sup>2</sup> 크기의 Hainertec Co. (China) 제품을 활용하였으며, 23 kHz의 고정 주파수가 발생하도록 조정하였다. 그리고 출력은 전원공급장치를 통해 50 W의 고정 출력으로 초음파가 발생하도록 조절하여 실험에 적용하였다.

### 2.3 초음파를 활용한 *M. aeruginosa* 성장억제

본 실험에서는 Fig. 1에 제시되었듯, 20 cm (L)×20 cm (W)×30 cm (H) 규격의 차광된 아크릴 반응조 (acrylic reactor)를 사용하였으며, 기존 연구 대비 비교적 대용량인 10 L의 *M. aeruginosa* 시료를 사용하여 실험을 진행하였다. 초음파 조사 조건은 이전 연구 (Jang et al. 2022)에서 도출된 초음파 조사 조건 (주파수 23 kHz, 출력 6.94 W L<sup>-1</sup>)을 활용하여 각 실험 조건별로 1회 초음파 조사 실험을 진행하였다. 본 연구에서는 초음파 조사시간에 따른 *M. aeruginosa*의 성장억제 효과를 비교·분석하기 위해 다양한 시간별 [0 hr (T\_A), 0.5 hr

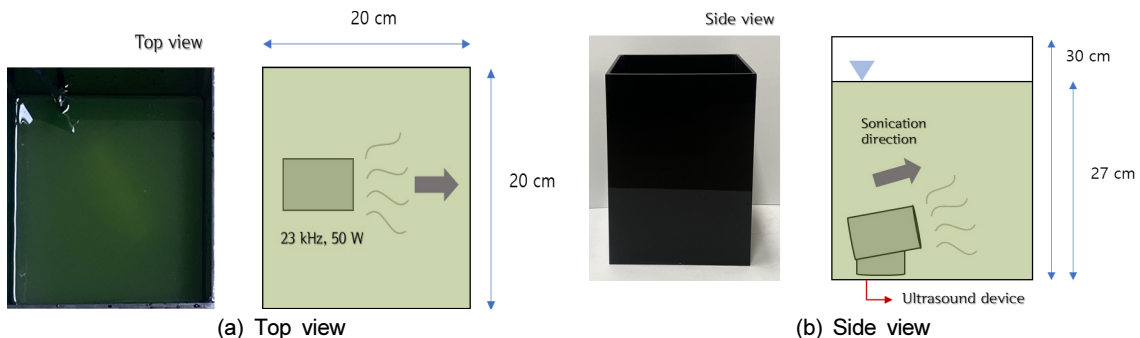


Fig. 1. Schematic diagrams and pictorial view of ultrasonic reactors used in this study: (a) Top view, and (b) Side view.

(T\_B), 1 hr (T\_C), 1.5 hr (T\_D), 2 hr (T\_E), 2.5 hr (T\_F), 3 hr (T\_G)]로 초음파 조사를 실시하였으며 초음파 조사 종료 후 채수를 진행하였다. 시료 채수 시 시료를 충분히 교반 후 채수하였으며, 채수로 인한 부피 변화로 단위 부피당 조사 에너지의 변화를 방지하기 위해 채수 후 출력(Watt)을 조절하여 실험기간 동안 일정한 단위 부피당 조사 에너지(Watt L<sup>-1</sup>)를 유지하였다. 채수한 시료는 일정시간(10 min) 침전 후 표층수로부터 2 cm 미만의 상등액의 Chl-*a* 및 세포수를 측정하였다. 본 연구의 초기 *M. aeruginosa*의 농도는 선행연구에서 초기 조류의 농도가 높을수록 초음파에 의한 조류 성장억제 효과가 명확하게 관측되는 것으로 확인되어 (Lee et al. 2018, Jang et al. 2022), 조류경보제 발령 기준 조류대발생 남조류 농도( $1 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>) 보다 높은 농도( $4.8 \times 10^6$  cells mL<sup>-1</sup>)를 실험에 적용하였다.

## 2.4 시료 분석방법

### 2.4.1 *M. aeruginosa* 개체수 분석

초음파 조사가 *M. aeruginosa*에 미치는 영향을 관찰하기 위해 혈구계수기(Mariefeld, Germany)를 이용하여 *M. aeruginosa*의 개체수(cell number)를 광학현미경(DN-10A, Samwon Scientific Industries, Ltd., Korea)으로 직접 계수하였다. 개체수 측정은 루골용액(lugol's iodine solution)으로 고정된 일정량의 시료를 혈구계수기에 넣고 눈금 안에 보이는 개체수를 현미경으로 측정하여 단위 부피당 개체수(cells mL<sup>-1</sup>)를 계산하는 혈구계수법(hemocytometry)을 사용하여 분석을 진행하였다. 또한 초음파 조사에 따른 개체수의 변화를 통해 *M. aeruginosa*의 비성장률(specific growth rate) 및 일차분해속도(first order decay rate)를 도출하였으며, 다음의 식 Eq. 1과 Eq. 2를 이용하여 계산하였다.

$$\mu(hr^{-1}) = \frac{\ln(N_t \cdot N_0^{-1})}{\Delta t} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$-k(hr^{-1}) = \frac{\ln(N_t \cdot N_0^{-1})}{\Delta t} \quad (\text{Eq. 2})$$

여기서  $\mu$ 는 비성장속도(hr<sup>-1</sup>),  $k$ 는 일차분해속도상수(hr<sup>-1</sup>),  $N_0$ 는 초기 *M. aeruginosa*의 개체수(cells mL<sup>-1</sup>) ( $t=0$ ),  $N_t$ 는 일정시간( $t$ ) 경과 후 *M. aeruginosa*의 개체수(cells mL<sup>-1</sup>), 그리고  $t$ 는 경과시간(hr)을 나타낸다.

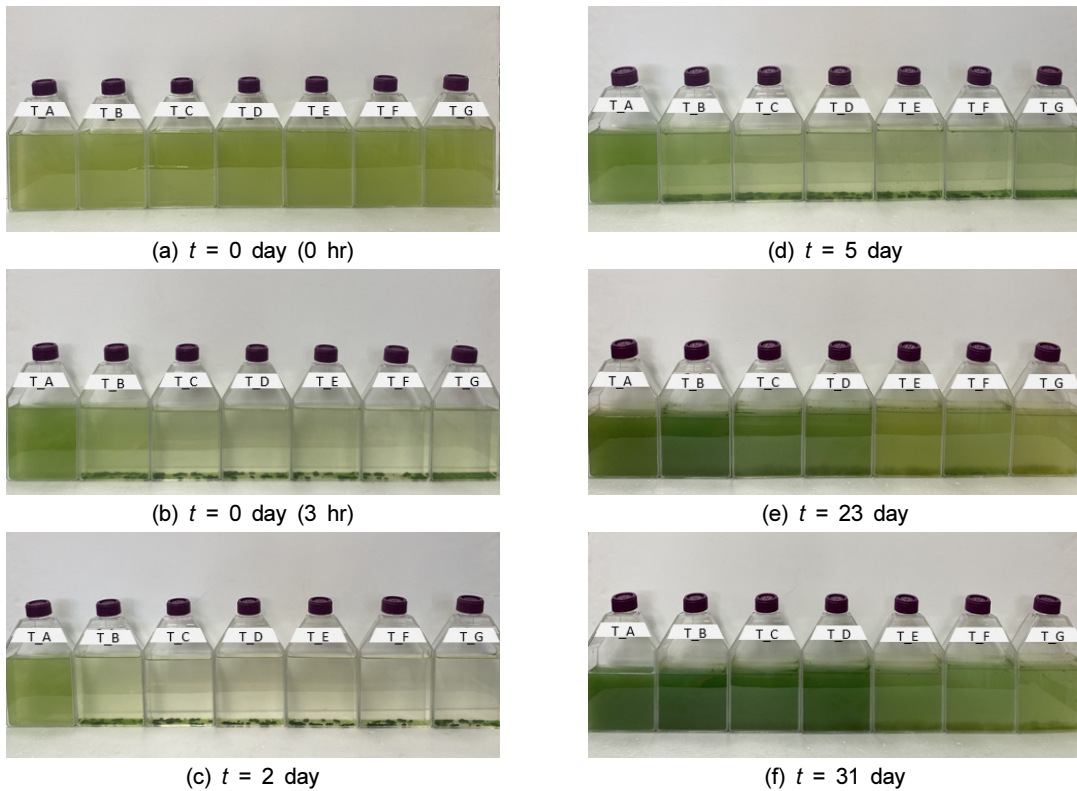
### 2.4.2 초음파에 의한 *M. aeruginosa*의 형태학적 변화 분석

초음파 조사 전후의 *M. aeruginosa*의 형태학적 변화를 분석하고 비교하기 위해 주사전자현미경(scanning electron microscopy, SEM)과 투과전자현미경(transmission electron microscopy, TEM)을 활용하여 분석을 진행하였다. SEM 분석을 위해 남조류 시료를 전자현미경 고정액(Karnovsky's fixative)을 포함하여 5 mL로 12시간 동안 고정하였으며, poly-L-lysine(Ted pella, USA) 코팅된 10 mm 커버글라스에 2시간 부착시켜 0.1 M phosphate buffer로 세정하였다. 세정 후 ethyl alcohol로 탈수하였으며 1.5시간 동안 건조를 진행하였다. 건조된 시료는 Ion coater(EM-ACE600, Leica, USA)를 이용하여 백금(Pt) 코팅 후 FE-SEM(field emission scanning electron microscope)인 MAIA3(TESCAN, Czech)를 사용해 10 kV의 가속전압에서 *M. aeruginosa*의 세포 표면을 관찰하였다. TEM 분석 또한 탈수과정까지의 전처리는 SEM 분석과 동일하게 진행되었으며, 100% ethyl alcohol과 LR White resin을 2:1, 1:1, 1:2로 혼합한 용액을 6시간 간격으로 치환하여 침투시켜 gelatin capsules에 시료와 LR White resin 용액을 넣고 밀봉하여 60°C 오븐에서 18시간 경화시켰다. 그 후 ultramicrotome(EM-UCT, Leica, USA)에 유리 나이프를 장착해 관찰할 범위를 결정 후 다이아몬드 나이프로 절편을 제작하였으며 5% uranyl acetate와 0.5% lead citrate를 이용해 이중염색하였다. 염색된 시료는 건조 후 TEM JEM-1010(JEOL, Japan)을 이용하여 80 kV 가속전압에서 *M. aeruginosa*의 내부 단면을 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 초음파 적용 시간에 따른 육안 변화

초음파 조사시간별 *M. aeruginosa*의 성장억제에 미치는 영향을 비교 및 분석하기 위해 조사시간을 0 hr(T\_A), 0.5 hr(T\_B), 1 hr(T\_C), 1.5 hr(T\_D), 2 hr(T\_E), 2.5 hr(T\_F), 3 hr(T\_G)로 실시한 후 31일간 *M. aeruginosa*의 변화를 관찰하였다. 시료의 육안상 변화를 관찰한 결과(Fig. 2), 대조군(T\_A)은 관찰기간( $t \leq 31$  day) 동안 조류 특유의 녹색과 부유성이 지속적으로 증가하였으며, 실험 시작 후 31일 후에는 조류의 과다



**Fig. 2.** Pictorial view of *M. aeruginosa* in cell culture flask under different ultrasound irradiation times [T\_A (control), T\_B (0.5 hr), T\_C (1 hr), T\_D (1.5 hr), T\_E (2 hr), T\_F (2.5 hr), T\_G (3 hr)].

성장으로 시료의 색이 매우 짙은 녹색으로 변화하는 것을 확인하였다 (Fig. 2 (a)). 실험군 (T\_B, T\_C, T\_D, T\_E, T\_F, T\_G)은 초음파 조사시간이 증가할수록 부유하는 *M. aeruginosa* 대비 침전된 *M. aeruginosa*의 증가로 인해 녹색 저감과 투명도 증가를 관찰하였다 (Fig. 2 (b), (c)). 이후 지속적으로 시료를 관찰한 결과, 모든 실험군에서 재생장이 확인되었으며 T\_B > T\_C > T\_D > T\_E > T\_F > T\_G 순으로 재생장이 빠르게 관찰되었다 (Fig. 2 (d), (e), (f)). 또한, 재생장시 초음파 조사시간이 2시간 이상인 실험군 (T\_E, T\_F, T\_G) 대비 2시간 미만인 실험군 (T\_B, T\_C, T\_D)은 시간 경과에 따라 육안상 더욱 진한 녹색을 띄는 것을 관찰하였다. 따라서 초음파 조사시간별 시료의 육안상 변화를 관찰한 결과, 2시간 이상 초음파 조사가 이루어져야 장기적인 조류 성장억제가 이루어질 것으로 판단된다.

### 3.2 Chlorophyll-a와 *M. aeruginosa*의 개체수 변화

시간 경과에 따른 Chl-a와 *M. aeruginosa*의 개체수

변화를 관찰한 결과 (Fig. 3), 대조군은 관찰기간 동안 Chl-a 농도와 개체수의 지속적인 증가가 관찰되어 조류 성장억제 요인은 없는 것으로 판단된다. 모든 실험군에서는 초음파 조사 종료 이후 Chl-a 농도와 개체수의 저감이 관찰되었으나, 개체수 대비 Chl-a 값이 상대적으로 높음을 확인하였다. 이는 다른 연구 (KICT 1997)에서도 보고된 바가 있으며, 사멸하거나 부력조절 능력을 상실한 개체에서도 Chl-a가 일부 검출되어 개체수 대비 Chl-a 값이 상대적으로 높은 것으로 사료되며, 정확한 측정을 위해 본 연구는 개체수 기반으로 *M. aeruginosa*의 성장억제 평가를 진행하였다.

*M. aeruginosa*의 개체수 변화를 관찰한 결과 (Fig. 3 (a)), 초음파 조사시간이 2시간 미만인 실험군 (T\_B, T\_C, T\_D)은 저감 이후 조류의 급격한 재생장이 관측되었다. 반면, 초음파 조사시간이 2시간 이상인 실험군 (T\_E, T\_F, T\_G)은 2시간 미만 조사한 실험군 대비 조류 성장억제가 약 1-2일 더 지속되는 것을 확인하였다. 또한 조류의 개체수가 초기 개체수로 회복되기까지 소요된 시간을 검토한 결과, 조사시간 2시간을 기준으로



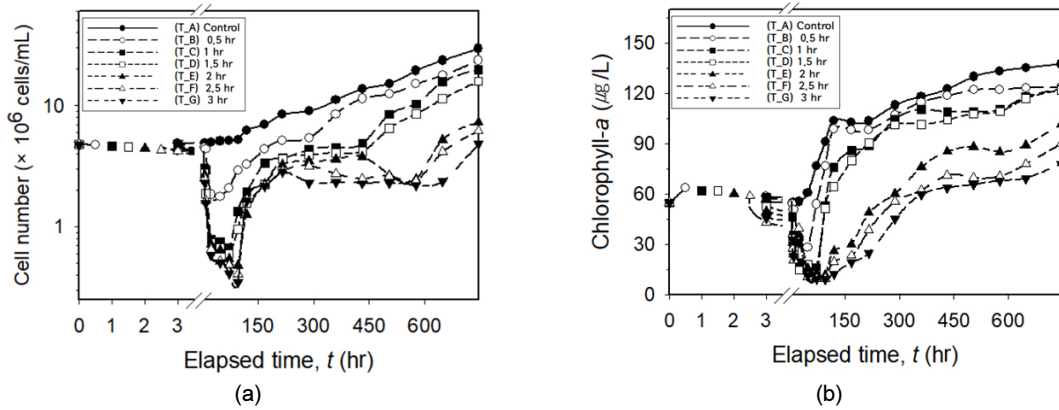


Fig. 3. Effect of ultrasonic irradiation time on (a) cell number and (b) Chl-a of *M. aeruginosa* with time.

Table 1. Summary of growth inhibition period, recovery time to initial concentration, and cell reduction under the various ultrasonic irradiation time

	Irradiation time (hr)	Growth inhibition period (day)	Maximum reduction of Cells (%)	Recovery time to initial concentration (day)
T_B	0.5	2	63	7
T_C	1	3	86	18
T_D	1.5	3	88	21
T_E	2	4	90	27
T_F	2.5	4	91	31
T_G	3	4	93	31

실험군 T\_B (0.5 hr)는 7일, T\_C (1 hr)와 T\_D (1.5 hr)는 약 20일, T\_E, T\_F, T\_G ( $t \geq 2$  hr)는 약 30일이 소요되어 초기 개체수까지 회복 시간의 차이를 확인하였다 (Table 1). 각 실험군의 최대 조류 성장억제 효율을 도출한 결과, 조사시간이 가장 높은 T\_G (3 hr)의 제거율이 93%로 가장 높은 성장억제 효율이 도출되었으며, 조사시간이 증가할수록 성장억제 효율이 높아지는 것을 확인하였다 (Table 1). 따라서 종합적으로 검토하였을 때 조류 성장억제 기간과 초기 개체수까지 회복 시간은 초음파 조사시간과 비례하며, 정체수역 내 장기적 조류 성장억제를 위해서는 2시간 이상 초음파 조사가 필요한 것으로 조사되었다. Sim et al. (2006), Rajasekhar et al. (2012) 등의 선행연구에서도 초음파 조사시간에 비례하여 조류 성장억제 효율이 증가한다는 유사한 연구 결과가 도출되었으나, 단기간 (20 min)의 초음파 조사시에도 즉각적인 조류 성장억제가 관찰되었다. 이는 본 연구 대비 고출력 ( $30 \text{ W L}^{-1}$ ) 혹은 적은 시료량 (<500 mL)으로 실험이 진행되었기 때문에 단위부피당 초음파 에너지 ( $\text{Watt L}^{-1}$ )가 높으며, 적은 용량의 시료 내 높

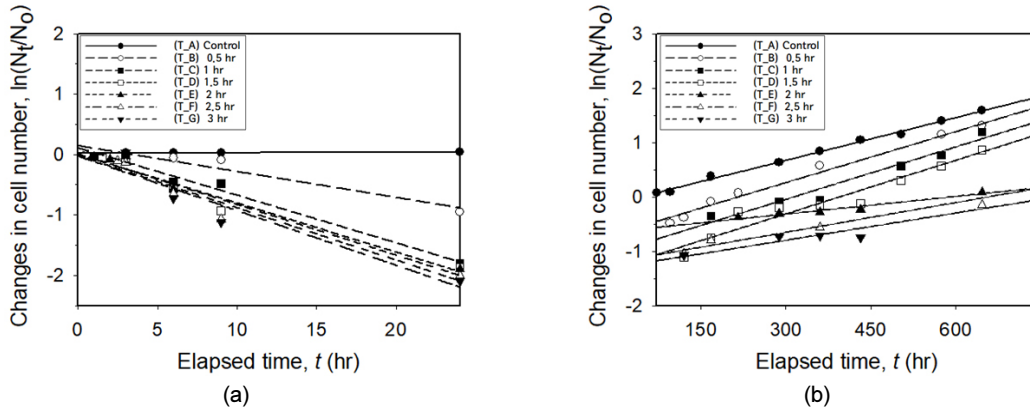
은 밀도의 조류 개체수에서 초음파의 영향을 받는 조류의 개체수가 훨씬 많기 때문인 것으로 판단된다.

### 3.3 성장률과 일차분해율 분석

*M. aeruginosa* 개체수 변화를 통해 비성장속도 ( $\mu$ )와 일차분해속도 ( $k$ )를 도출한 결과 (Table 2, Fig. 4), 관찰기간 동안 대조군은 비성장속도가  $0.7 \times 10^{-3} - 2.6 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ 로 조류의 성장이 확인되어 조류 성장억제 요인은 없는 것으로 판단된다. 실험군은 각각의 조류 성장억제 기간 동안 (T\_B:  $t < 2$  day, T\_C, D:  $t < 3$  day, T\_E, F, G:  $t < 4$  day) 성장률 대비 높은 일차분해속도 ( $\kappa_{T_B} = 43.0 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\kappa_{T_C} = 78.8 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\kappa_{T_D} = 81.3 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\kappa_{T_E} = 83.8 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\kappa_{T_F} = 86.5 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\kappa_{T_G} = 90.5 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ )가 도출되었으며, 초음파 조사시간과 비례하여 높은 일차분해율이 확인되었다. 이러한 결과는 선행연구 Jang et al. (2022)에서도 동일하게 실험군에서 성장률 대비 높은 일차분해속도 ( $k$ )가 도출되었으나, 본 연구에서는 선행연구 ( $4.9 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1} - 13.0 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ) 대비 높은 일차분해속도가 도출되었다. 이

**Table 2.** Summary of specific growth rate ( $\mu$ ) and first order decay constant ( $k$ ) of *M. aeruginosa* under the various ultrasound irradiation time

	Growth inhibition period							Regrowth period						
	T_A (control)	T_B (0.5 hr)	T_C (1 hr)	T_D (1.5 hr)	T_E (2 hr)	T_F (2.5 hr)	T_G (3 hr)	T_A (control)	T_B (0.5 hr)	T_C (1 hr)	T_D (1.5 hr)	T_E (2 hr)	T_F (2.5 hr)	T_G (3 hr)
$\mu$ ( $\times 10^{-3}$ hr $^{-1}$ )	0.7							2.6	3.1	3.2	3.3	1.1	1.8	1.7
$k$ ( $\times 10^{-3}$ hr $^{-1}$ )		43	78.8	81.3	83.8	86.5	90.5							
R $^2$	0.974	0.919	0.986	0.965	0.928	0.946	0.906	0.997	0.990	0.975	0.948	0.948	0.963	0.937

**Fig. 4.** Changes in cell number for *M. aeruginosa* to estimate (a) growth rate ( $\mu$ ) and (b) first order decay constant ( $k$ ) under different ultrasonic irradiation times.

는 Jang et al. (2022)에서 도출된 최적화된 주파수 (23 kHz) 및 출력 ( $6.94 \text{ W L}^{-1}$ )을 활용하여 실험을 진행함에 따라 조류가 효과적으로 빠르게 억제되어 높은 일차 분해속도가 도출된 것으로 판단되나, 최적 초음파 조사에 따른 일차분해속도를 정확하게 도출하기 위해서는 추가적인 검증 실험이 요구된다.

조류 성장억제 기간 이후 재성장 ( $\mu_{T_B} = 3.1 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\mu_{T_C} = 3.2 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\mu_{T_D} = 3.3 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\mu_{T_E} = 1.1 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\mu_{T_F} = 1.8 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ ,  $\mu_{T_G} = 1.7 \times 10^{-3} \text{ hr}^{-1}$ )이 관측되었으며, 초음파 조사시간이 2시간 미만인 실험군(T\_B, T\_C, T\_D) 대비 조사시간이 2시간 이상인 실험군(T\_E, T\_F, T\_G)의 경우 상대적으로 낮은 성장률을 보였다. 이는 장기간 초음파의 영향을 받은 *M. aeruginosa*는 충분한 에너지 전달로 인하여 기낭 등 내부기관과 세포막에 큰 손상을 받아 조류 성장억제 효과가 우수한 반면, 단기간 초음파의 영향을 받은 *M. aeruginosa*는 초음파 파장을 피해 침전되어 있거나 내부기관과 세포막 손상을 초래할 수 있는 임계에너지 이상의 충분한 에너지 전달이 이뤄지지 않아 재성장이 빠르게 일어나는 것으로 사료된다. 이러한 비성장속도와 일차분해속도의 변화를 근거로 조사시간이 길수록 조

류 성장억제 기간과 재성장 주기가 증가되며, 본 연구조건에서 장기적인 조류 성장억제를 위해서는 최소한 2시간 이상 초음파 조사가 임계시간인 것으로 판단된다.

### 3.4 초음파에 의한 *M. aeruginosa*의 형태학적 변화

초음파 조사 전후의 *M. aeruginosa*의 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 SEM과 TEM을 이용하여 세포 표면 및 내부 형질 변화를 비교 분석하였다. SEM 분석 결과, 대조군은 매끄러운 세포 표면 형태를 유지하며, 표면의 손상(rupture)이 관찰되지 않았으나 (Fig. 5 (a)) 실험군(T\_E)은 세포 표면이 불규칙한 구형이며 초음파의 영향으로 인한 명확한 세포막의 손상이 관찰되었다 (Fig 5 (b)). 이는 선행 연구 결과(Li et al. 2014, Li et al. 2019, Peng et al. 2020)와 동일하게 초음파의 공동현상으로 인하여 *M. aeruginosa*의 외부 세포막이 손상되어 세포 주변 환경과의 물질 교환 및 조절이 저해되고 생명 시스템 유지에 필요한 물질수송, 세포운동, ATP 생합성이 교란되어 성장억제로 이어지는 것으로 판단된다. TEM 분석 결과, SEM과 동일하게 초음파에 의한 조류 세포막의 손

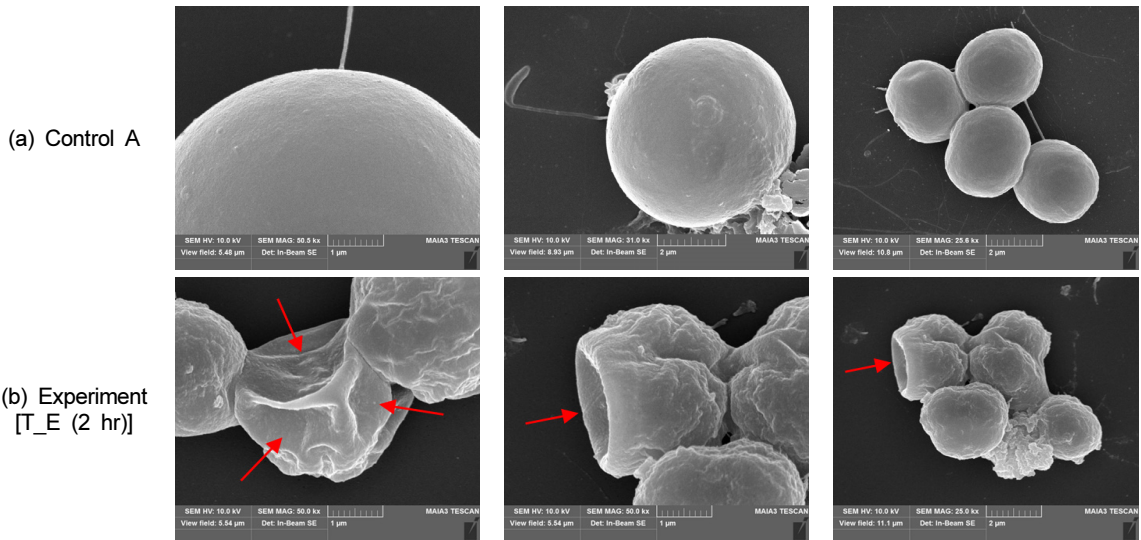


Fig. 5. Scanning electron microscopic images of *M. aeruginosa*. (a) Control (normal cell) after 15 days, (b) 2 hr ultrasonic irradiation (note that arrows indicate ruptured cell membrane of *M. aeruginosa*).

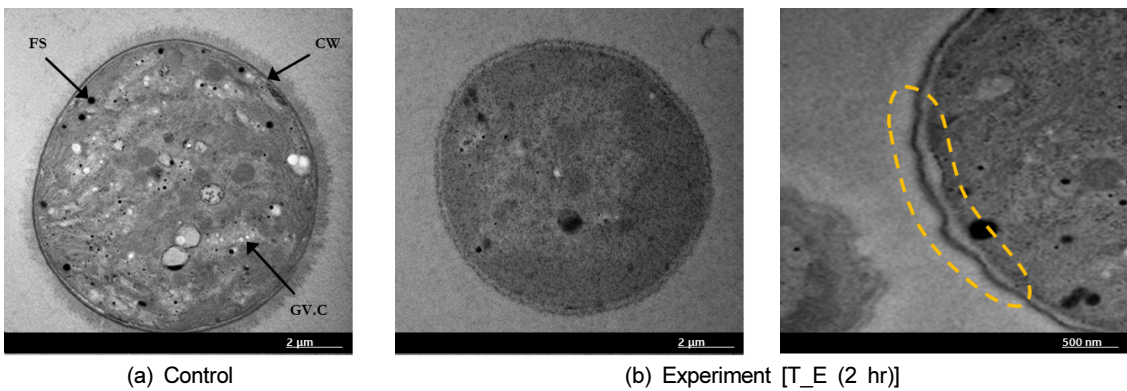


Fig. 6. Transmission electron microscopy images of *M. aeruginosa*. (a) Control (normal cell) after 15 days, (b) 2 hr ultrasonic irradiation (note that dotted line indicates the damage of *M. aeruginosa* cell surface; FS indicates food storage particle; CW indicates cell wall; GV-C indicates gas vesicle in cross-section).

상으로 일부 세포막의 주름진 모습이 관찰되었다(Fig. 6 (b)). 또한 실험군(T\_E)은 대조군 대비 *M. aeruginosa* 세포 내부 구조가 파괴된 것을 관찰하였으며, 조류 세포 내 기낭이 파괴되어 눈에 띄게 감소된 것을 확인하였다(Fig. 6). 이러한 결과와 동일하게 Srisuksomwong et al. (2012), Kong et al. (2019), Park et al. (2019)에서도 초음파 조사로 인한 조류 세포 내 기낭의 감소를 관찰하여 보고한 바가 있다. 초음파에 의한 조류의 기낭 감소는 조류의 부력조절 능력을 상실시켜 조류를 침전시키고, 광합성작용을 차단함으로써 조류 성장을 억제할 수 있다. 그러나, 본 연구에서는 장기적인 관찰을 통해 Lee et al. (2000)에서 보고된 바와 같이 일정기간 경과 후 남

조류 내 기낭의 재생으로 인한 조류의 재성장을 확인하였다. 따라서 정체수역에서 장기적 조류 성장억제를 위해서는 최소한 2시간 이상 초음파 조사를 주기적 간격을 두고 조사할 필요가 있으며, 이를 위해서는 정체수역 내 초음파 조사장치와 조류 모니터링 센서가 연계된 장치를 설치하여 일정농도 이상의 조류가 성장 시기에너지 이상의 초음파를 조사하여 유해남조류의 과도한 성장을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

#### 4. 결론

본 연구는 수생태계의 위해성이 낮으며 유해남조류



의 성장억제가 가능한 초음파 처리 방법을 이용하여 대용량 조류 시료를 대상으로 실험실 규모 실험을 진행하였으며 초음파 조사시간별 조류의 성장억제 효율 (efficiency) 과 지속성 (sustainability) 을 중점적으로 확인하였다.

초음파 적용 시간에 따른 육안상 변화를 관찰한 결과, 초음파 조사시간이 짧을수록 재성장 이 빠르게 관찰되었으며, 재성장시 초음파 조사시간이 2시간 이상인 실험군 (T\_E, T\_F, T\_G) 대비 2시간 미만인 실험군 (T\_B, T\_C, T\_D) 은 시간 경과에 따라 육안상 더욱 진한 녹색을 띠는 것을 관찰하였다.

*M. aeruginosa* 개체수 변화를 관찰한 결과, 초음파 조사시간이 2시간 미만인 실험군 (T\_B, T\_C, T\_D) 은 저감 이후 조류의 급격한 재성장 이 관측되었다. 반면, 초음파 조사시간이 2시간 이상인 실험군 (T\_E, T\_F, T\_G) 은 2시간 미만 조사한 실험군 대비 조류성장억제가 약 1-2일 지속되는 것을 확인하였으며, 조사시간이 길수록 초기 개체수까지 회복 시간이 증가하는 것을 확인하였다.

비성장속도 ( $\mu$ ) 와 일차분해속도 ( $k$ ) 를 도출한 결과, 실험군은 조류 성장억제 기간 동안 성장률 대비 높은 일차분해속도가 도출되었으며, 초음파 조사시간과 비례하여 높은 일차분해율이 확인되었다. 재성장 기간 동안 초음파 조사시간이 2시간 미만인 실험군 (T\_B, T\_C, T\_D) 대비 조사시간이 2시간 이상인 실험군 (T\_E, T\_F, T\_G) 의 성장률이 상대적으로 낮은 것을 확인하였다.

SEM, TEM 분석 결과, 실험군 (T\_E) 은 초음파의 영향으로 인한 *M. aeruginosa* 의 세포 표면 및 세포막의 손상이 명확히 관측되었으며, 대조군 대비 실험군의 *M. aeruginosa* 세포 내 기낭이 파괴되어 감소된 것을 확인하였다.

종합적으로 검토하였을 때, 초음파에 의한 조류 성장억제 효과를 확인하였으며, 조류 성장억제 기간과 초기 개체수까지 회복 시간은 초음파 조사시간과 비례함을 확인하였다. 또한, 장기적인 조류 성장억제를 위해서는 최소한 2시간 이상 초음파 조사가 임계시간인 것으로 판단된다. 따라서 정체수역에서 장기적 조류 성장억제를 위해서는 최소한 2시간 이상 초음파 조사를 주기적 간격을 두고 조사할 필요가 있으며, 이를 위해서는 정체수역 내 초음파 조사장치와 조류 모니터링 센서가 연계된 장치를 설치하여 일정농도 이상의 조류가 성장시 임계에너지 이상의 초음파를 조사하여 유해조류의 과도한 성장을 억제할 수 있을 것으로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 2022년도 중소벤처기업부의 기술개발사업[G21S302588802] 지원에 의한 연구이며, 이에 대해 감사드립니다.

## References

- Ahn, C.Y., Park, M.H., Joung, S.H., Kim, H.S., Jang, K.Y., and Oh, H.M. 2003. Growth inhibition of cyanobacteria by ultrasonic radiation: laboratory and enclosure studies. *Environmental Science & Technology* 37(13): 3031-3037.
- Byeon, M.S., Byun, J.H., Im, J.K., Jin, Y.H., Noh, H.R., Kim, G.S., ... and You, S.J. 2018. Molecular Biological Characteristics of Cyanobacteria Originated Off-flavor in Water (I). Han-River Water Environment Research Center National Institute of Environmental Research.
- Chen, G., Ding, X., and Zhou, W. 2020. Study on ultrasonic treatment for degradation of Microcystins (MCs). *Ultrasonics Sonochemistry* 63: 104900.
- Codd, G.A., Morrison, L.F., and Metcalf, J.S. 2005. Cyanobacterial toxins: risk management for health protection. *Toxicology and Applied Pharmacology* 203(3): 264-272.
- Dehghani, M.H. 2016. Removal of cyanobacterial and algal cells from water by ultrasonic waves-A review. *Journal of Molecular Liquids* 222: 1109-1114.
- Hallegraeff, G., Enevoldsen, H., and Zingone, A. 2021. Global harmful algal bloom status reporting. *Harmful Algae* 102: 101992.
- Harke, M.J., Steffen, M.M., Gobler, C.J., Otten, T.G., Wilhelm, S.W., Wood, S.A., and Paerl, H.W. 2016. A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. *Harmful Algae* 54: 4-20.
- Jachlewski, S., Botes, M., and Cloete, T.E. 2013. The effect of ultrasound at 256 KHz on *Microcystis aeruginosa*, with and without gas vacuoles. *Water SA* 39(1): 171-172.
- Jang, S.Y., Joo, J.C., Kang, E.B., Ahn, C.M., Park, J., Jeong, M.I., and Lee, D.H. 2021. Evaluation of Growth Inhibition for *Microcystis aeruginosa* with Different Frequency of Ultrasonic Devices. *Ecology and Resilient Infrastructure* 8(3): 143-153.
- Jang, S.Y., Joo, J.C., Kang, E.B., Go, H.W., Park, J., Jeong, M.I., and Lee, D.H. 2022. Derivation of Ultrasonic Irradiation Condition to Inhibit the Growth of *Microcystis Aeruginosa*. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers, Eng* 44(4): 101-110.
- KICT. 1997. Research on optimal water quality management of Ilsan Lake
- Kim, G.Y., Joo, J.C., Lee, M.J., Park, J.R., Ahn, C.H., and

- Lee, S. 2019. Evaluation on Growth Inhibition Effect of Harmful Blue Green Algae Using TiO<sub>2</sub>-embedded Expanded Polystyrene (TiEPS) Balls: Lab-scale Indoor/Outdoor Experiments. *Journal of Korean Society Environmental Engineers* 41(11): 637-646.
- Kim, M.K., Moon, B., Kim, T.K., and Zoh, K.D. 2015. A study on production & removal of microcystin, taste & odor compounds from algal bloom in the water treatment processes. *The Korean Journal of Public Health* 52(1): 33-42.
- Kong, Y., Peng, Y., Zhang, Z., Zhang, M., Zhou, Y., and Duan, Z. 2019. Removal of *Microcystis aeruginosa* by ultrasound: Inactivation mechanism and release of algal organic matter. *Ultrasonics Sonochemistry* 56: 447-457.
- Lee, C.S., Ahn, C.Y., La, H.J., Lee, S., and Oh, H.M. 2013. Technical and strategic approach for the control of cyanobacterial bloom in fresh waters. *Korean Journal of Environmental Biology* 31(4): 233-242.
- Lee, H.J., Park, H.K., Heo, J., Lee, H.J., and Hong, D.G. 2018. Colonial Cyanobacteria, *Microcystis* Cell Density Variations using Ultrasonic Treatment. *Journal of Korean Society on Water Environment* 34(2): 210-215.
- Lee, K.H. and Lee, S.H. 2012. Monitoring of floating green algae using ocean color satellite remote sensing. *Journal of the Korean Association of Geographic Information Studies* 15(3): 137-147.
- Lee, T.J., Nakano, K., and Matsumura, M. 2000. A new method for the rapid evaluation of gas vacuoles regeneration and viability of cyanobacteria by flow cytometry. *Biotechnology Letters* 22(23): 1833-1838.
- Li, P., Song, Y., and Yu, S. 2014. Removal of *Microcystis aeruginosa* using hydrodynamic cavitation: performance and mechanisms. *Water Research* 62: 241-248.
- Li, Y., Shi, X., Zhang, Z., and Peng, Y. 2019. Enhanced coagulation by high-frequency ultrasound in *Microcystis aeruginosa*-laden water: Strategies and mechanisms. *Ultrasonics Sonochemistry* 55: 232-242.
- Ma, B., Chen, Y., Hao, H., Wu, M., Wang, B., Lv, H., and Zhang, G. 2005. Influence of ultrasonic field on microcystins produced by bloom-forming algae. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41(2-3), 197-201.
- Meerhoff, M., Audet, J., Davidson, T.A., De Meester, L., Hilt, S., Kosten, S., ... and Jeppesen, E. 2022. Feedback between climate change and eutrophication: revisiting the allied attack concept and how to strike back. *Inland Waters* 1-18.
- Oh, H.M., Lee, S.J., Kim, J.H., Kim, H.S., and Yoon, B.D. 2001. Seasonal variation and indirect monitoring of microcystin concentrations in Daechung Reservoir, Korea. *Applied and Environmental Microbiology* 67(4): 1484-1489.
- Paerl, H.W. and Barnard, M.A. 2020. Mitigating the global expansion of harmful cyanobacterial blooms: Moving targets in a human-and climatically-altered world. *Harmful Algae* 96: 101845.
- Park, H.K., Kim, H., Lee, J.J., Lee, J.A., Lee, H., Park, J.H., ... and Moon, J. 2011. Investigation of criterion on harmful algae alert system using correlation between cell numbers and cellular microcystins content of Korean toxic cyanobacteria. *Journal of Korean Society on Water Environment* 27(4): 491-498.
- Park, J., Church, J., Son, Y., Kim, K.T., and Lee, W.H. 2017. Recent advances in ultrasonic treatment: challenges and field applications for controlling harmful algal blooms (HABs). *Ultrasonics Sonochemistry* 38: 326-334.
- Park, J., Son, Y., and Lee, W.H. 2019. Variation of efficiencies and limits of ultrasonication for practical algal bloom control in fields. *Ultrasonics Sonochemistry* 55: 8-17.
- Park, Y.M., Kwon, O.C., Park, J.W., Chung, G.Y., Lee, J.E., and Seo, E.W. 2013. Effects of low powered ultrasonic wave exposure on *microcystis* sp. (cyanobacteria). *Korean Journal of Environmental Biology* 31(2): 113-120.
- Peng, Y., Zhang, Z., Kong, Y., Li, Y., Zhou, Y., Shi, X., and Shi, X. 2020. Effects of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* cell destruction and release of intracellular organic matter. *Ultrasonics Sonochemistry* 63: 104909.
- Purcell, D., Parsons, S.A., and Jefferson, B. 2013. The influence of ultrasound frequency and power, on the algal species *Microcystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aquae*, *Scenedesmus subspicatus* and *Melosira* sp. *Environmental Technology* 34(17): 2477-2490.
- Rajasekhar, P., Fan, L., Nguyen, T., and Roddick, F.A. 2012. Impact of sonication at 20 kHz on *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena circinalis* and *Chlorella* sp. *Water Research* 46(5): 1473-1481.
- Sim, J.H., Seo, H.J., and Kwon, B.D. 2006. Study on the Efficiency of Algae Removal Using Ultrasonic Waves in Double Cisterns. *Journal of Korean Society of Environmental Engineers* 28(12): 1310-1315.
- Song, I.S. 2014. Domestic and overseas algae control technology, *Konetic report*, 2-10.
- Srisuksomwong, P., Peerapornpisal, Y., Nomura, N., and Whangchai, N. 2012. Comparative ultrasonic irradiation efficiency of *Microcystis aeruginosa* and *M. wesenbergii* from surface bloom and re-flotation behavior. *Chiang Mai J. Sci* 39(4): 731-735.
- Srisuksomwong, P., Whangchai, N., Yagita, Y., Okada, K., Peerapornpisal, Y., and Nomura, N. 2011. Effects of ultrasonic irradiation on degradation of microcystin in fish ponds. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13(1).
- Thackeray, S.J., Jones, I.D., and Maberly, S.C. 2008. Long-term change in the phenology of spring phytoplankton: species-specific responses to nutrient enrichment

- and climatic change. *Journal of Ecology* 96(3): 523-535.
- Wu, X., Joyce, E.M., and Mason, T.J. 2012. Evaluation of the mechanisms of the effect of ultrasound on *Microcystis aeruginosa* at different ultrasonic frequencies. *Water Research* 46(9): 2851-2858.
- Zhang, G., Zhang, P., Wang, B., and Liu, H. 2006. Ultrasonic frequency effects on the removal of *Microcystis aeruginosa*. *Ultrasonics Sonochemistry* 13(5): 446-450.