creative commons

COMMONS DEED

저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

초 록

수처리용 분리막 생물반응기에서 막 오염 저감을 위한 정족수감지 억제 미생물이 고정화된 코팅 비드의 제조

김 정 은

서울대학교 대학원

화학생물공학부

고도의 하폐수 처리기술로 주목 받고 있는 분리막 생물반응기 (membrane bioreactor, MBR)는 미생물이 분리막 표면에 형성하는 생물막에 의한 막오염 (membrane fouling)의 문제점을 지니고 있다. 막오염의 주요 원인으로서 미생물 간의 신호전달 물질을 통한 정족수 감지 (quorum sensing) 기작이 관여한다는 사실이 밝혀져 있다. 따라서 정족수 감지 억제 (quorum quenching)를 이용하여 신호전달 물질을 분해하는 것은 분리막 오염을 효과적으로 저감시키는 가장 근본적인 접근이라 할 수 있다.

최근 미생물 간의 신호전달 물질을 분해하는 효소를 생산해내는 정족수 감지 억제 미생물을 칼슘 알지네이트 비드에 고정화하여 연속공정 MBR 에 적용하여 분리막 오염을 저감시킨 연구가 보고되었다. 하지만 알지네이트는 하이드로겔 (hydrogel) 성질을 가지고 있기 때문에 지속적으로 폐수가 유입되는 MBR 공정에

오랜 시간 적용될 경우 분해되어버리는 단점이 있다. 따라서 칼슘 알지네이트 비드의 지속성을 높이고 내부에 고정화된 정족수 감지 억제 미생물의 활성을 유지시키기 위해 기술적인 개선이 필요하다.

본 연구에서는 기존의 칼슘 알지네이트 비드 표면에 고분자 코팅 층을 형성함으로써 비드 내부에 고정화된 정족수 감지 억제 미생물의 안정도를 높이고자 하였다. 상전이법을 이용하여 폴리술폰(Polysulfone)으로 알지네이트 비드 표면을 코팅하였으며 코팅 층의 두께는 60 ~ 100 μm 이었다. 고분자 코팅 층의 추가로 인해 물리적 강도와 화학적 안정성은 눈에 띄게 향상되었고 비드 내부의 미생물에 대한 영양소의 전달 효율 또한 유지되었다. 정족수감지 미생물이 고정화된 고분자 코딩 비드를 연속공정 MBR 에 50 일 동안 적용하였을 때 분리막 오염을 효과적으로 저감시켰고, 지속적으로 코팅-알지네이트 비드의 물리적 강도와 화학적 안정성을 관찰함으로써 MBR 공정에서의 장기간 적용 가능성을 확인하였다.

주요어: 분리막 생물반응기, 정족수 감지, 정족수 감지 억제 미생물, 막오염, 미생물 고정화, 하폐수 처리

학번: 2012-20938

목차

List of Figures III

List of Tables IX

Chapter 1. 서론 1

1.1. 연구배경 2

1.2. 연구목적 4

Chapter 2. 문헌 조사 5

2.1 분리막 생물 반응기 6

2.1.1. MBR 시스템의 발달 6

2.1.2. MBR 시스템의 장점 및 단점 8

2.1.3. MBR 공정의 상업화 1 1

2.2 MBR에서의 분리막 오염 (Fouling in MBR systems) 1 4

2.2.1. 분리막 오염 억제 방법 1 4

2.2.2. 분리막 재료의 개발 1 7

2.2.3. 유동성 담체를 이용한 분리막 오염 억제 방법 1 9

2.3 정족수 감지 기작 2 4

2.3.1 정의와 메커니즘 2 4

2.3.2 그람 음성균: LuxI/LuxR type QS 2 7

2.3.3 그람 양성균: modified oligopeptide mediated QS 2 7

2.3.4 AI-2 for the interspecies communication 3 3

2.3.5 생물막 형성에서의 QS의 역할 3 4

2.3.6 QS 조절 전략 37
2.3.7 정족수 감지 억제 (quorum quenching, QQ) 44
2.4 미생물 고정화 46
2.4.1 미생물 고정화 방법 46
2.4.2 알지네이트를 이용한 미생물 고정화 48
2.4.3 알지네이트의 구조 48
2.4.4 알지네이트의 특성 51
2.4.5 칼슘 알지네이트 비드 52
2.4.6 칼슘 알지네이트 비드의 형성 메커니즘 53
2.5 상전이법을 이용한 분리막 제조 57
2.5.1 상전이법 57
2.5.2 상전이법의 종류 58
Chapter 3. 실험 방법 60
3.1 유동성 담체의 제조 61
3.1.1 QQ bacteria strains 와 성장 조건 61
3.1.2 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드의 제조 62
3.2 AHL 분해 활성에 대한 생물 검정 68
3.2.1 발광측정기 (Luminometer) 68
3.2.2 코팅-알지네이트 비드의 AHL 분해 활성 69
3.3 코팅-알지네이트 비드의 물리적 강도 측정 70
3.4 평판형 분리막이 침지된 MBR의 운전 조건 71
3.5 현미경을 이용한 분석 75

3.6 분석 방법 7 6
3.7 포도당 측정법 7 7
Chapter 4. 실험 결과 및 고찰 7 8
4.1 코팅-알지네이트 비드의 특징 7 9
4.2 고분자 코팅으로 인한 효과 8 1
4.3 장기간 운전된 연속공정 MBR 에서의 코팅-알지네이트 비드의 안정도 9 0
4.4 평판형 분리막의 특징 9 3
4.5 분리막 오염 억제 결과 9 4
4.6 고분자 코팅 두께에 따른 코팅-알지네이트 비드의 차이 1 0 1
Chapter 5. 결론 1 0 5
참고문헌 1 0 7

List of Figures

Figure 1 Configuration of (a) side stream MBR and (b) submerged MBR system. 7

Figure 2 Mechanical cleaning process (MCP) with granulates. 22

Figure 3 Representative signal molecules involved in bacterial QS. 26

Figure 4 Molecular structure of each AHL autoinducer. 29

Figure 5 LuxI-directed biosynthesis of acyl homoserine lactone autoinducers (Miller and Bassler 2001). 30

Figure 6 Model of acyl-homoserine-lactone mediated QS in a single generalized bacterial cell (Fuqua and Greenberg 2002) 31

Figure 7 A general model for QS in Gram-positive bacteria (Miller and Bassler 2001) 32

Figure 8 Diagram of the *P. aeruginosa* biofilm-maturation pathway. 36

Figure 9 Three strategies to control AHL-type QS system of gram-negative bacteria (Boyen et al. 2009). 38

Figure 10 Enzymatic disruption of AHL autoinducers by quorum quenching enzymes. 43

Figure 11 Methods for immobilization of viable microbial cells (Lehmann et al. 2011). 47

Figure 12 Structure of sodium alginate. 50

Figure 13 Mechanism of formation of alginate bead. 55

Figure 14 SEM image of alginate bead. 56

Figure 15 Schematic diagram of preparing alginate beads. 66

Figure 16 Schematic diagram of preparing polysulfone coating-alginate bead. 67

Figure 17 Schematic diagram of continuous MBRs. 73

Figure 18 Scanning electron microscope image of polymer coating layer. ... 80

Figure 19 Quantitative quorum quenching activity of coating-alginate beads and alginate beads..... 85

Figure 20 Confocal laser scanning microscope image of polymer coating layer part of coating-alginate bead. The cells were stained with SYTO9 (cell; green). Magnification 100 x. 86

Figure 21 Glucose transfer efficiency of coating-alginate beads and alginate beads. 87

Figure 22 Mechanical strength of coating-alginate beads and alginate beads. 88

Figure 23 Cell entrapping capacity of coating-alginate beads and alginate beads. 89

Figure 24 Quorum quenching stability of coating-alginate beads (degradation rate of C8-HSL was determined at 90 minutes). 91

Figure 25 Mechanical strength of coating-alginate beads. 92

Figure 26 TMP profile of continuous MBR: MBR w/o beads vs w/ control-coating alginate beads. 97

Figure 27 TMP profile of continuous MBR: MBR w/ control coating-alginate beads vs w/ QQ coating-alginate beads. 98

Figure 28 Comparison of biofilm formation on the membrane surface (a) TMP profile of continuous MBR and (b) CLSM images of biofilm. The cells were stained with SYTO9 (cell; green). Magnification 100 x..... 99

Figure 29 (a) Total attached biomass of biofilm formed on the membrane surface and (b) extracellular polymeric substance. 100

Figure 30 Comparison of (a) quantitative quorum quenching activity and (b) glucose transfer efficiency of triple coating−alginate beads, coating−alginate beads and alginate beads. 1 0 3

Figure 31 Mechanical strength of triple coating−alginate beads, coating−alginate beads and alginate beads. 1 0 4

List of Tables

Table 1 MBR Membrane Module Products, Bulk Municipal Market..... 1 3

Table 2 BIO−CEL®−MCP in large scale applications 2 3

Table 3 Conditions of experimental MBRs 7 4

Chapter 1. 서론

1.1. 연구배경

분리막 생물반응기 (membrane bioreactor, MBR) 공정이란 일반적인 활성 슬러지 공법 (conventional activated sludge, CAS)에 분리막 공정을 결합하여 각각의 장점을 극대화한 것으로, 수처리 분야에서 최근 이십여 년간 가장 급성장하는 기술 중 하나이다.

MBR 공정은 기존의 활성 슬러지 공법에 비해서 설비 면적이 좁으며 높은 수질의 여과수를 얻을 수 있고 또한 자동화에 용이하므로, GE, Simense, Aquasource, Toray와 같은 다국적 기업뿐만 아니라 제일모직, 코오롱, 한화와 같은 국내 대기업들도 사업에 참여하고 있다.

그러나 MBR 공정은 고액 분리 과정에서 필연적으로 생물막 (biofilm)에 의해 분리막이 오염되는 문제를 지니고 있다. 생물막은 분리막의 여과 성능을 저하시키고 에너지 소모를 가중시키므로 여과수량이 감소하거나 심각한 경우에는 공정을 멈추고 분리막을 세정해야 하는 문제를 초래한다.

따라서 막오염을 완화시키기 위해 에너지, 화학적 측면의 수많은 연구가 진행되어 왔지만 (Drews 2010, Xiong and Liu 2010) 이러한 연구들은 분리막 표면의 생물막 형성을 근본적으로 억제시키는 데에는 분명한 한계점을 지니고 있었다.

생물막 형성은 정족수 감지 (quorum sensing, QS)에 의한 미생물의 집단 행동이라고 알려져 있었기 때문에 (Davies et al. 1998) 정족수 감지 억제 (quorum quenching, QQ)는 생물막 형성을 억제하는 근본적인 접근이라고 할 수 있다 (Choudhary and Schmidt-Dannert 2010). 이러한 미생물의 정족수 감지 개념을

MBR에 적용한 연구가 분리막 오염 억제 기술의 새로운 패러다임으로 등장하였고 (Yeon et al. 2009a), 최근에는 정족수 감지 억제 미생물을 베슬 (Oh et al. 2012), 또는 유동성 담체 (Kim et al. 2013)에 고정화하여 MBR에 적용한 연구가 보고되었다. 이들 중 유동성 담체를 사용하는 공정의 경우, 정족수 감지 억제 미생물로 인한 생물막 형성 억제와 동시에 물리적 세정 효과를 가져오므로 MBR 공정에서 혁신적인 기술로 주목 받을 것으로 기대된다.

따라서 본 연구에서는 MBR 공정에서의 막오염 억제를 위해 새로운 형태의 유동성 담체를 개발하여 이를 적용하고 그 효과를 검증하고자 한다.

1.2. 연구목적

본 연구에서는 기존 연구에서 사용되었던 유동성 담체를 보완한 새로운 형태의 유동성 담체를 제작하여 막오염 억제 효과를 최대화 할 수 있는 방법을 모색하고자 한다. 기존의 유동성 담체의 경우 막오염 억제에 현저한 효과를 보였지만 짧은 수명과 물리적 강도 등의 한계가 있었다.

이와 같은 한계점을 바탕으로 본 연구에서 제시하는 정족수감지 억제 미생물이 고정화된 유동성 담체가 갖추어야 할 조건은 크게 세 가지로 생각할 수 있다. 첫째로 유동성 담체 내부에 있는 정족수감지 억제 미생물들에게 영양분 등의 물질 전달이 원활하게 이루어질 수 있도록 해야 한다. 둘째로는 유동성 담체의 화학적 안정성이 보장되어야 한다. MBR 공정은 일정 유량의 폐수가 지속적으로 공급되기 때문에 유동성 담체가 폐수에 의해 훼손되거나 내부에 담지된 미생물이 죽을 수 있기 때문이다. 마지막으로 유동성 담체의 물리적 강도 또한 중요한 요소이다. 유동성 담체는 MBR 내에서 기포에 의해 끊임없이 움직이며 서로 부딪히기 때문에 만약 담체가 손상된다면 내부에 담지한 미생물이 손실될 수 있기 때문이다.

따라서 본 연구에서는 이와 같은 조건들을 충족시키기 위해 분리막 제조 공법에 사용되는 상전이 기술을 접목하여 새로운 유동성 담체를 제작하였으며, 이를 연속공정 MBR에서 적용하여 효과적인 막오염 억제를 검증하고자 한다.

Chapter 2. 문헌 조사

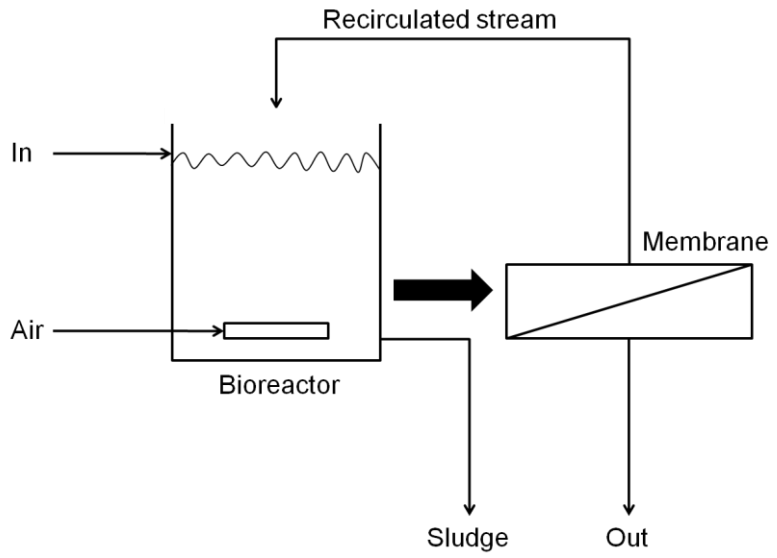
2.1 분리막 생물 반응기

2.1.1. MBR 시스템의 발달

분리막 생물 반응기 (membrane bioreactor, MBR)는 1960 년대 말 경 Dorr-Oliver 에 의해 처음 개발되었다. MBR 은 한외여과막과 전통적인 활성 슬러지 공법 (conventional activated sludge, CAS)의 결합을 통해 시작되었다고 할 수 있다 (Hardt et al. 1970). Dorr-Oliver 에 의한 MBR 시스템은 전통적인 활성 슬러지 공법과 분리막을 결합함으로써 바이오매스 (biomass)를 농축 시키고 동시에 살균 처리가 된 높은 수질의 처리수를 얻을 수 있었다. 비슷한 시기에, 전통적인 활성 슬러지 공법과 결합된 또 다른 실험실 규모의 분리막 시스템이 보고 되었다 (Hardt et al. 1970). 이 시스템은 측류형 분리막 생물 반응기 (side stream MBR)를 기반으로 제작된 형태이며 모식도는 다음과 같다 (Figure 1 (a)).

1980 년에서 1990 년대 초기 일본에서는 Yamamoto, Hiasa, Mahmood & Matsuo 의 선도 연구에 기초하여 정부 주체로 물 재이용 프로그램이 시작되었다 (Yamamoto et al. 1989). 이들은 침지식 MBR (submerged MBR, sMBR) 과 한외여과막을 결합한 형태의 MBR 을 개발하였으며 (Figure 1 (b)), 또한 한외 평막 (flat sheet) 여과막이 결합된 침지식 MBR 을 개발하였다.

(a)



(b)

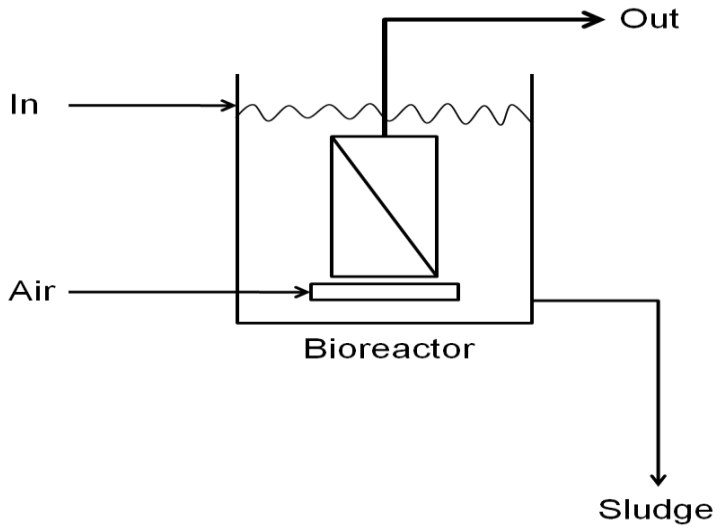


Figure 1 Configuration of (a) side stream MBR and (b) submerged MBR system.

2.1.2. MBR 시스템의 장점 및 단점

MBR 유입되는 폐수는 생물학적 처리인 활성 슬러지 공정과 분리막 공정을 결합한 방식으로 처리된다. 전통적인 활성 슬러지 공법과 비교해 보면 MBR 공정은 정화기 (clarifier), 위어 (weir), 반송 펌프가 필요하지 않아 좀 더 작은 규모의 플랜트를 설치 할 수 있으며 운전 및 운영을 보다 더 쉽게 효과적으로 관리 할 수 있다.

정화기 대신 분리막을 이용하는 MBR 공정에서는 슬러지의 침전능이 크게 중요하지 않으므로, 생물학적 처리는 매우 높은 농도의 혼합액 현탁 고형물 (mixed liquid suspended solid, MLSS)을 유지하며 운전될 수 있다. 일반적으로 MBR 공정에서의 MLSS 농도는 8,000 ppm (mg/ L) 에서 12,000 ppm 으로 전통적인 활성 슬러지 공법에 비해 3 배에서 6 배 정도 높은 값이다. 높은 MLSS 는 수처리의 효율을 높여 줄 뿐 아니라 수처리용 반응조의 크기를 줄여 줄 수 있으며 질산화 미생물을 더욱 잘 배양 할 수 있도록 고형물 체류시간 (solid retention time, SRT)을 조절할 수 있으므로 질소 제거에 더욱 유리하다.

MBR 운전에서는 고형물과 액상의 독립적인 관리가 가능하다. 전통적인 활성 슬러지 공법에서는 고형물의 분리는 침전을 통해서만 가능하였고 침전을 가능케 하기 위해서는 고형물의 크기 (>50 mm)가 충분히 커야 했다. 따라서 이와 같은 제약으로 인해 비교적 긴 수력학적 체류시간 (hydraulic retention time, HRT)을

통해 입자 크기가 자라나야 하는 시간을 확보 해야 한다. 그러나 MBR 시스템에서는 입자의 크기가 분리막의 공극 사이즈보다 크기만 하면 현탁 고형물을 대부분 제거할 수 있다.

MBR 처리수는 매우 낮은 생물학적 산소 요구량 (biological oxygen demand, BOD)을 가지며 특별한 후처리 없이 재 사용이 가능하거나 RO 의 전처리수로 사용 가능하다. 그 외 다른 MBR 의 장점은 다음과 같다.

- SRT 의 증가로 잉여 슬러지량 감소
- 단순한 공정과 자동화된 운전
- 성능향상의 잠재성이 높음
- 공정 단순화
- 규격화된 모듈로 인한 시공성 향상
- 살균 처리 공정의 생략 가능

MBR 공정이 위와 같은 장점을 가지고 있는 반면 전통적인 활성 슬러지 공정에 비해 에너지 소비가 크다는 문제점을 가지고 있다. 1000 L 의 폐수를 처리하는데 소요되는 전력비는 전통적인 활성 슬러지 공법의 경우 0.3 kWh 인 데 반해, MBR 공정에서는 약 3 ~ 5.5 kWh 로 보고되고 있다 (Yamamoto et al. 1989). 하지만 MBR 공정은 부지에 소용되는 비용이 절약되므로 전체적인 비용 면에서는 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보고되고 있다. 한편 분리막 모듈은 높은 가격대를 형성하고 있어 분리막을 교체할 경우 막대한 비용이 들어가게 된다. 그러나

최근에는 분리막의 대량 생산으로 인하여 가격이 하락하고 있어 비용적 부담이 점점 감소되고 있는 추세이다. 또한, 유입 폐수의 유기물 제거는 만족스럽지만 질소, 인의 동시 제거가 어렵다. 특히 질소와 인은 하천과 호수의 부영양화에 직접적인 영향을 주므로 이들의 제거는 필수적인데, MBR 공정을 단독으로 운전하는 경우 질소와 인의 제거율은 낮은 편이다.

이와 함께 MBR 이 가지는 가장 큰 문제점은 MBR 시스템에서 분리막 표면에 형성되는 생물막에 의한 막오염이 발생한다는 것이다. 즉 MBR 을 연속적으로 운전할 경우 분리막 표면에 미생물의 부착 성장이 시작되고 최종적으로는 수 백 μm 두께의 생물막이 형성된다. 생물막 형성은 MBR 의 문제점 중에서 가장 큰 비중을 차지하여 핵심 장애물로 인식되고 있다. 이것은 생물막에 의한 분리막 오염이 투수도의 저하, 분리막 수명 단축, 높은 에너지 소모 등을 초래하여 시스템 운영 비용을 증가시킴으로써 MBR 시스템의 경제성에 부정적인 영향을 미치기 때문이다.

전통적인 활성 슬러지 공법에 비해 MBR 공정은 다음과 같은 단점을 가지고 있다.

- 설치비와 운영비의 증가
- 폭기의 어려움
- 유입수에 따른 민감도
- 분리막의 오염 문제

2.1.3. MBR 공정의 상업화

일본에서의 최초의 MBR 기술의 상업화는 1990 년에 이루어졌는데 주로 소규모의 오수처리 및 재이용과 산업폐수 분야로부터 시작되었다. 캐나다와 유럽에서는 주로 산업폐수와 침출수 폐수 처리에 초점이 맞추어져 있었다. 하수처리에 적용되는 MBR 공정도 일반적인 도시 하수처리의 환경과는 다른 조건 하에서 운전되고 있었는데, 예를 들면 일정한 폐수 유입량, 높은 온도, 부스러기(debris)가 없는 유입수 조건 등이었다. 또한 전통적인 하수처리 공정에 비해 그 처리 용량이 적은 시설이 대부분이었다. 하지만 하수처리 분야에서 운전되거나 건설되고 있는 MBR 공정의 규모는 최근 몇 년 동안 그 처리 규모가 기하급수적으로 증가하고 있는 추세이다.

MBR 공정은 1997 년 Kubota 사가 영국의 Porlock 지역에 폐수처리장 플랜트를 설치하였으며 Zenon 사는 1999 년 프랑스의 Gatinais 지역에 Veolia Biosep®라는 명칭으로 설치하였다. 이 두 개의 플랜트는 최대 유량 용량이 ≤ 2 ML/day (mega liter per day, MLD)로 침지식 MBR 기술의 발전을 보여주는 대표적인 예라고 할 수 있다.

1990 년대의 전반기에는 침지식 MBR 은 크게 3 가지로 나누어 졌는데, 미국과 일본에 의해서만 생산되었다. 그 후 5 년간 7 개국에서 적어도 10 개 이상의 침지식 MBR 이 선보여졌으며 2010 년에는 12 개의 대형 공급사들이 10 MLD

용량이 넘는 MBR 플랜트를 설치하게 되었다. MBR 플랜트를 공급하는 상위 20 개 회사들은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1 MBR Membrane Module Products, Bulk Municipal Market

Installation	Supplier	Date	PDF	ADF
Brightwater, WA, USA	GE	2011	170	117
Qinghe, China	OW/MRC	2011	150	150
North Las Vegas, NV, USA	GE	2011	133	95
Yellow River, GA, USA	GE	2011	111	69
Shiyan Shendinghe, China	OW/MRC	2009	110	110
Aquaviva, Cannes, France	GE	2012	106	59
Bus an City, Korea	GE	2012	100	100
Guangzhou, China	Memstar	2010	100	–
Wenyuhe, Beijing, China	OW/Asahi Kasei	2007	100	100
Johns Creek, GA, USA	GE	2009	94	42
Awaza, Turkmenistan	GE	2011	87	69
Jordan Basin WRF, UT, USA	GE	2012	79	53
Beixiaohe, China	Siemens	2008	78	–
Al Ansab, Muscat, Oman	Kubota	2010	77	55
Cleveland Bay, Australia	GE	2009	75	29
Broad Run WRF, VA, USA	GE	2008	71	38
Christies Beach, Australia	GE	2011	68	27
Incheon, Korea	Econity	2012	65	–
Lusail, Oatar	GE	2011	61	61
Ecosama, Sao Paulo, Brazil	Koch	2012	61	57

(Judd, S., the MBR site, http://www.thembrsite.com/features.php)

(MRC–Mitsubishi Rayon Corporation, OW–Origin Water, PDF–peak daily flow, ADF–average daily flow)

2.2 MBR에서의 분리막 오염 (Fouling in MBR systems)

MBR 공정을 저해하는 요인 중 가장 치명적인 요인은 분리막 오염이다. 이전 단락에서 언급했듯이 분리막 오염으로 인해 투수도 저하, 분리막 수명 단축, 높은 에너지 소비 등이 야기되므로, 분리막의 성능 한계를 극복하기 위해 분리막의 오염에 대한 기작과 분리막 오염 억제 기술들이 활발하게 연구 되어왔다. 대표적으로 물리적 세정 방법과 화학적 세정 방법, 분리막 재질 측면의 접근이 있으며 최근에는 유동성 담체를 이용한 방법도 소개되었다.

2.2.1. 분리막 오염 억제 방법

<u>물리적 세정 방법</u>

MBR 공정에서 분리막 오염을 억제할 수 있는 공학 측면의 요소들에는 폭기 강도, 모듈 디자인 그리고 공정 인자들이 있다. 우선, 폭기는 MBR 내 미생물의 증식을 위해 반드시 주입해줘야 하는 필수적인 운전 인자이다. 또한 기포는 MBR 아래 부분에서 표면으로 올라오며 반응기 내의 슬러지를 교반하는 역할을 한다. 즉, 적정 범위 값의 폭기량은 기포의 교반력으로 인해 분리막 주변의 슬러지를 교반시키므로 생물막이 형성되는 것을 방지하는 효과를 가져온다. Phattaranawik

(Phattaranawik et al. 2007)은 기포 크기 변화 (bubble-size transforming, BST)에 따른 유체의 유동을 확인하는 새로운 산기법을 제시했다. 분리막 모듈 디자인 역시 분리막 주변의 슬러지 유동에 따른 물리적 세정 효과를 향상시키기 위한 방향으로 연구가 진행되었다 (Hai et al. 2008, Yeon et al. 2005).

<u>화학적 세정 방법</u>

앞서 언급한 물리적 세정은 화학적 세정이 보충되어야 비로소 분리막 표면의 생물막 잔해 등을 제거할 수 있다. 분리막 오염을 일으키는 주요 물질들은 작은 콜로이드 (colloid) 물질과 생고분자 (biopolymer)들이라 알려져 있는데, 이러한 오염 물질들은 유기산, 광물질, 가성 소다 또는 차아염소산나트륨 (NaOCl)등의 화학약품을 처리하여 제거한다.

전통적인 MBR 공정에서 사용하는 MF 급 분리막의 공극 크기는 대략 0.04 에서 0.4 μm 정도로, 콜로이드 입자의 크기가 공극의 크기보다 작을 경우 분리막의 공극을 막는 현상이 발생하고, 투수 저항을 증가시킨다.

황산알루미늄 (aluminum sulphate, alum)은 MBR 에 적용하였을 때 대략 0.1 에서 0.2 μm 의 크기를 가지는 작은 콜로이드 입자들을 응집시켜 막오염을 억제한다 (Lee et al. 2001). 또한 염화제이철 (ferric sulfate) 또는 염화알루미늄 (aluminum chloride)와 같은 응집제를 첨가하면 분리막 표면의 겔 (gel) 층을

형성하는 오염물질을 제거할 수 있으며, 막오염 유발 물질을 분리막 표면으로부터 분리시켜 막오염을 억제시킨다는 연구가 보고되었다 (Wu et al. 2006).

분리막 오염에는 미생물의 생리학적 상태가 중요하다는 사실 (Chang and Lee 1998)이 입증된 이후로는 미생물이 생산하는 체외고분자 물질 (extracellular polymeric substance, EPS)이나 용존성 고형 물질 (soluble micro products, SMP)과 같은 생고분자들이 분리막 오염을 일으키는 주요 인자 중 하나로 여겨졌다. 이러한 미생물이 생산하는 생고분자들은 단백질, 다당류, 지방질, 핵산 및 부식산과 같은 물질로 이루어져있다. 일반적으로 하수처리 공정에서는 양극 전하를 띄는 물질들은 막오염을 완화시키는 작용을 한다고 할 수 있지만, 열거된 생고분자들은 대부분이 음극 전하를 띄고 있다. Nalco Company 는 'MPE (membrane performance enhancer)' 라는 양극성 고분자를 개발하여 슬러지 내의 음극 전하를 띄는 체외고분자 물질을 제거함으로써 막오염을 완화시켰다고 보고하였다. MPE 는 체외고분자 물질 중에서도 다당류의 양을 현저하게 줄임으로써 파일롯 (pilot) 및 대용량 규모의 플랜트에 성공적으로 적용시킨 사례로 알려져 있다 (Yoon and Collins 2006).

다른 사례로 Koseoglu (Koseoglu et al. 2008)는 실험실 규모의 MBR 에서 7 가지 종류의 화학약품에 대한 비교 실험을 수행하였는데, 이들 모두 분리막 오염을 억제하였지만 그 중 양이온 고분자가 가장 효과적으로 투수도의 증가를 가져온다고 보고했다.

또한 Di Cagno (Di Cagno et al. 2009)의 연구에 의하면 활성탄을 MBR 에 적용하면 미생물에 의해 생산된 체외고분자 물질이나 작은 콜로이드 물질 등의 유기성 오염 유발 물질들을 흡착하여 처리수의 수질을 높이고 분리막의 투수도를 증가시킨다. 활성탄의 첨가는 슬러지 플럭의 압축률 뿐만 아니라 미생물 플럭 내의 체외고분자 물질을 감소시켜 바이오 케이크 (biocake)에 더 많은 공극 (pore)을 유발하여 결국 분리막의 투수도를 향상시킴을 확인하였다 (Kim and Lee 2003).

2.2.2. 분리막 재료의 개발

MBR 공정에서 분리막 오염의 근본적인 원인은 분리막 표면과 슬러지를 구성하는 미생물, 그리고 다양한 유기성 오염 물질 간의 상호작용이다. 그러므로 분리막 표면의 생물막 형성에 대한 저항성을 증가시킨다면 효과적으로 막오염을 억제할 수 있다.

Futamura (Futamura et al. 1994)의 연구에 따르면 소수성 (hydrophobic) 분리막의 막간차압 (transmembrane pressure, TMP)이 친수성 (hydrophilic) 분리막의 막간차압 보다 빠르게 증가한다고 밝혔다. 이 연구에서는 친수성도 (hydrophilicity)를 다르게 설정한 같은 폴리에틸렌 (polyethylene) 재질의

분리막으로 진행하였다. 즉 이는 기본적으로 분리막 표면에 소수성을 입혀 미생물이 잘 부착되지 못하게 억제한다는 관점에서 시작된 것이다.

Sainbayar (Sainbayar et al. 2001)는 폴리프로필렌 (polypropylene) 재질의 분리막 표면을 오존 (ozone)을 이용하여 그래프트 중합 (graft polymerization) 표면 처리를 하여 2-hydroxy-ethyl methacrylate 를 생성하였다. 개질된 분리막은 혐기성 MBR 에서 향상된 투수도를 나타내었다. Yu (Yu et al. 2007)는 폴리프로필렌 재질의 분리막 표면을 아크릴아마이드 (acrylamide)를 이용하여 광유발 그래프트 중합 (photoinduced graft polymerization) 방법을 이용하여 개질하였다. 이렇게 개질된 분리막 역시 그렇지 않은 분리막에 비해 침지식 MBR 에서 향상된 투수도를 보여주었다.

또 다른 전략으로 분리막 표면에 항균처리를 하여 미생물이 생장하지 못하도록 억제하는 방법이 있다. Tan (Tan and Obendorf 2007)의 연구에 따르면 정밀여과막 (MF) 급의 폴리우레탄 (polyurethane) 분리막의 표면을 N-halamine 전구체와 염소 표백 (chlorine bleaching)을 이용하여 그래프팅 (gafting)으로 개질하여 항균처리를 하였다. 이 분리막은 좋은 항균 효과를 보였지만 MBR 공정에 적용하여 막 오염이 억제되는가에 대해서는 실험하지 않았다.

항균 처리에 대한 다른 예로 분리막 표면을 키토산으로 처리할 경우 항균력이 증가한다는 것이 국내 특허 (특허번호 10-2006-0136445)에 보고된 바 있다. 표면을 키토산 (chitosan)으로 처리한 분리막을 MBR 에 적용하여 30 일 간 운전한

결과 키토산으로 처리한 분리막이 그렇지 않은 분리막에 비해 더 높은 투수도를 갖는 것으로 나타났다.

2.2.3. 유동성 담체를 이용한 분리막 오염 억제 방법

MBR 공정에서 폭기 (aeration)는 절대적으로 중요한 요소 중 하나이다. 수처리용 미생물에게 산소를 공급하기 위해서는 활성 슬러지의 용존 산소량을 일정량으로 유지해야 하며 분리막 표면에 발생하는 막오염을 억제하기 위해서도 지속적인 강한 폭기가 필요하기 때문에 폭기는 MBR 공정에서 절대적으로 필요하다. 따라서 이러한 MBR 공정의 특수성에 맞추어 폭기를 이용한 효과적인 막오염 억제를 위해 유동성 담체를 적용하는 방법이 널리 사용되고 있다 (Lee et al. 2006, Rosenberger et al. 2011).

유동성 담체는 기포의 교반력으로 인해 MBR 내에서 슬러지와 함께 교반되면서 분리막 표면에 수시로 부딪히게 되므로 물리적 세정효과를 가져와 막오염을 억제하는 효과를 가져온다. 따라서 새로운 장치나 설비가 필요하지 않아 기존의 MBR 공정에 리트로피팅 (retrofitting)이 가능하며, 추가적인 에너지 소모가 없다는 장점이 있다.

이러한 장점을 갖는 유동성 담체에 관한 연구는 수십 년간 연구가 진행되어 왔지만, 유동성 담체를 이용하는 공정은 차아염소산나트륨 (NaOCl)을 이용하는 화학적인 세정 방법에 비해 막오염 억제 효과가 떨어졌으므로 초기 MBR 연구에서는 큰 관심을 받지 못하였다.

그러나 최근에는 수처리 분야에 친환경 공정의 필요성이 대두되면서 화학약품에 의한 AOX (absorbable organic halogen compounds)와 같은 유해물질이 발생하지 않는다는 장점을 가진 유동성 담체를 이용한 공정이 다시 주목 받고 있다 (Emmanuel et al. 2004). 실제로 정우이엔티(주)와 같은 국내기업뿐만 아니라 Microdyn-Nadir 사와 같은 다국적 기업도 경제성과 친환경 공정을 내세우며 침지식 MBR 과 유동성 담체를 결합한 BIO-CEL®-MCP 공정 (Figure 2)을 개발하였다. Microdyn-Nadir 사는 Table 2 에 나타나있듯이 BIO-CEL®-MCP 공정을 전세계적으로 상용화하고 있는 추세이다.

이러한 유동성 담체의 경우 단순한 물리 세정 효과만으로 막오염을 억제하지만, 앞서 언급했듯이 분리막 표면에 형성되는 생물막은 미생물 간의 집단 행동의 결과물이므로 물리적 세정 만으로는 막오염을 충분히 억제할 수 없다. Kim (Kim et al. 2013)은 물리적 세정에만 초점이 맞추어져 있던 유동성 담체에 생물막 형성을 억제하는 미생물을 고정화시키는 생물학적 방법을 접목시켜 효과적으로 막오염을 억제하였다. 따라서 본 연구에서는 이러한 기존의 연구를 바탕으로

유동성 담체의 한계점들을 보완한 새로운 형태의 유동성 담체를 만들었고, 이를 MBR 공정에 적용하여 그 성능을 시험하는 데 주력하였다.

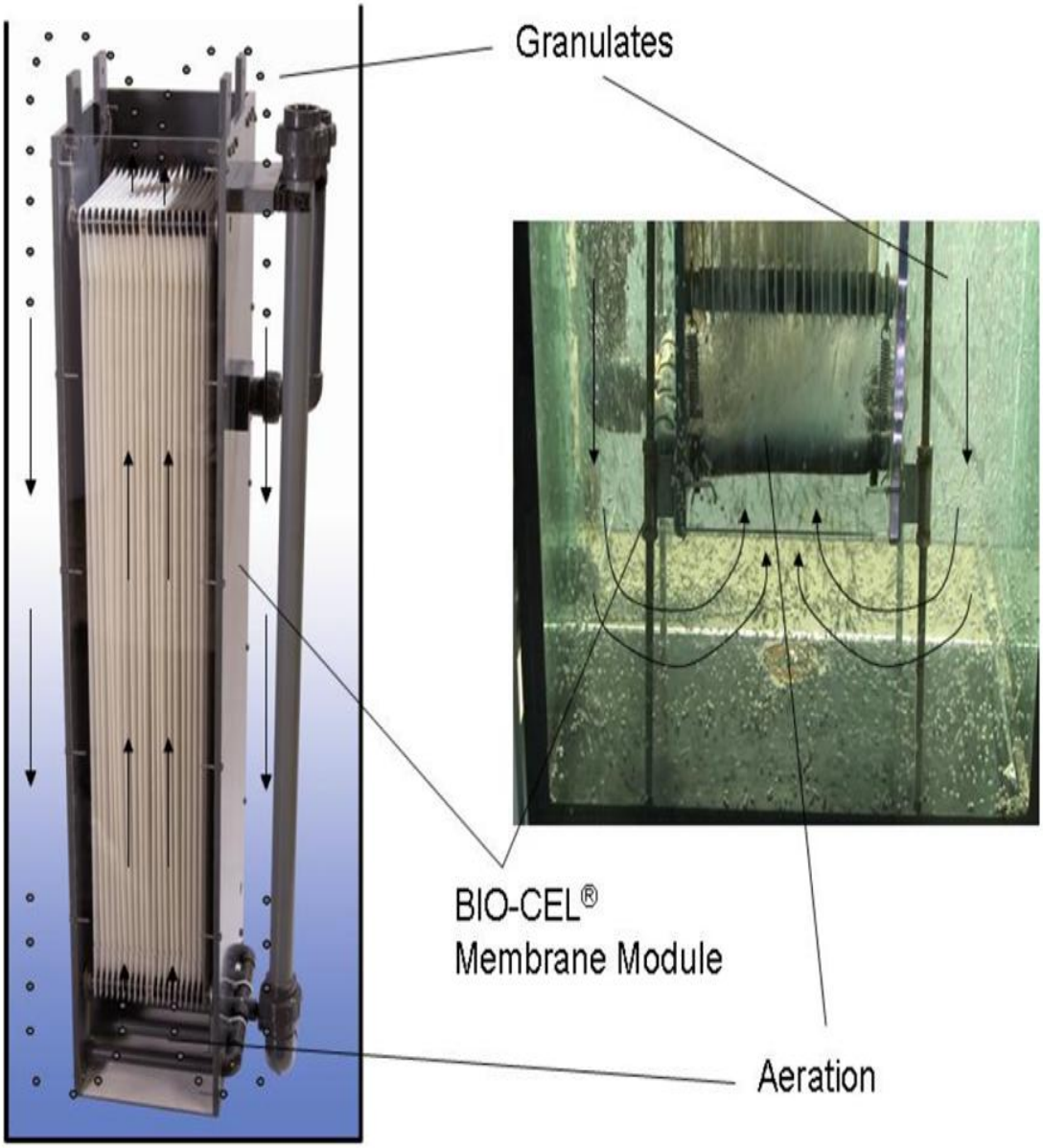


Figure 2 Mechanical cleaning process (MCP) with granulates.

Table 2 BIO−CEL®−MCP in large scale applications

Location	Size of plant	Type of waste water	Date of start up
Canada	200 m^2 (2.73 m^3/h ~ 14 LMH)	Industrial (food industry)	2009
Germany	200 m^2 (6 m^3/h ~ 30 LMH)	Municipal	2010
Greece	300 m^2 (6 m^3/h ~ 20 LMH)	Municipal (shopping center)	2011
Mexico	4000 m^2 in 2 trains (46 m^3/h ~ 12 LMH)	Industrial (fish processing)	2012
Germany	4800 m^2 in 3 trains (108 m^3/h ~ 40 LMH)	Municipal	2012

2.3 정족수 감지 기작

2.3.1 정의와 메커니즘

정족수 감지 (quorum sensing, QS)란 각각의 미생물 개체들이 저분자량의 자가유도물질 (autoinducer)들을 세포 외에 축적하여 상호 개체군의 밀도를 최소한도로 유지하거나 또는 활발한 증식을 유발하게 하여 정족수 (quorum)를 이루게 하는 일련의 현상을 지칭한다. 이 과정에서 확산이 가능한 저분자량의 신호전달 물질 ('자가유도물질' 이라 칭한다.)과 반응조절 단백질 및 sensor kinase 의 활성화가 수반된다. 각 개별적인 미생물의 세포들은 같은 종의 미생물들을 인식하고, 그들과 반응하며 특별한 유전자를 발현한다 (Fuqua et al. 1994, Waters and Bassler 2005, Withers et al. 2001). 따라서 정족수 감지에서는 신호전달 물질의 농도는 미생물의 개체수를 나타내며, 임계수준의 신호전달물질의 인식은 '정족수' 를 의미한다. 이러한 정족수 감지 기작으로 미생들은 독성 (virulence), 생물막 형성 (biofilm formation), 접합 (conjugation), 포자 형성 (sporulation) 등의 집단 행동을 나타낸다.

정족수 감지에 대해 가장 많이 연구된 예는 해양공생세균인 *Vibrio fischeri* 의 생물형광 (bio-luminescence)이다. 이 세균의 배양액은 세포밀도가 낮으면 광택이 없고 어두운 색을 띠지만, 증식을 하여 고농도에 이르게 되면 개체군들이 청녹색 형광을 낸다. 이와 같은 기작으로 *V. fischeri* 와 공생하는 물고기의

몸에서는 형광이 나게 되며, 그 기작은 수용체 유전자 *luxI* (신호발생체)와 *luxR* (반응조절체)의 발현과 이에 따른 저분자물질인 *N*-acyl homoserine lactone (AHL)의 생산과 축적이다. AHL 이 축적됨으로서 *V. fischeri* 는 주위를 둘러싼 개체군의 밀도를 감지하게 되고 이어서 생물형광 유전자발현을 조절한다.

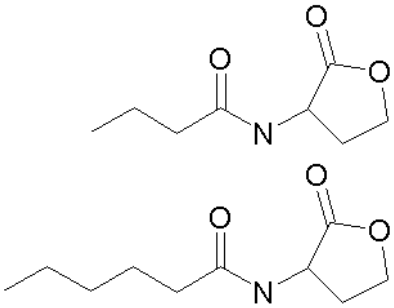
정족수 감지 기작은 자가유도물질의 종류와 형태에 따라 일반적으로 세 가지로 구분된다 (Figure 3).

i. 그람 음성균: LuxI/LuxR type QS

ii. 그람 양성균: modified oligopeptide mediated QS

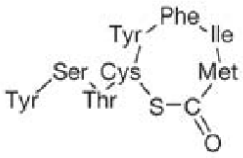
iii. AI-2 for the interspecies communication

N−acyl homoserine lactone (AHL) for gram negative bacteria



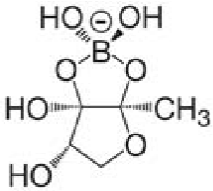
Pseudomonas aeruginosa

Oligopeptide for gram positive bacteria

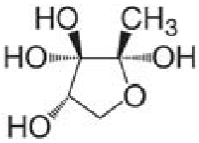


Staphylococcus aureus

Autoinducer−2 (AI−2) for interspecies communication



Vivrio harveyi



Salmonella enterica serovar Typhimurium

Figure 3 Representative signal molecules involved in bacterial QS.

2.3.2 그람 음성균: LuxI/LuxR type QS

그람 음성균의 정족수 감지 기작에서는 *N*-acyl homoserine lactone (AHL)이 자가유도물질로 사용된다. AHL 은 homoserine lactone ring 의 세 번째 탄소에 지방산 (fatty acid)이 결합되어있는 형태로, Figure 4 와 같이 지방산의 탄소 개수에 따라 여러 가지 형태로 존재한다. Lux-I 유사 단백질은 특정한 AHL 신호 분자를 합성하는데, 이 단백질은 S-adenosylmethionine (SAM)과 acyl-acyl 운반 단백질 (acyl-ACP)의 acyl 기 간의 아마이드결합 (amide linkage)을 지시하고, 다음으로 methylthioadenosine 이 관여하며 락톤화 (lactonization)이 일어나면서 AHL 이 형성된다. 이 반응은 Figure 5 와 같이 일어난다. (Miller and Bassler 2001). 그람 음성균의 일반적인 LuxI/LuxR 유형의 정족수 감지 기작은 Figure 6 와 같다 (Fuqua and Greenberg 2002).

2.3.3 그람 양성균: modified oligopeptide mediated QS

그람 양성균도 그람 음성균과 마찬가지로 세포밀도가 높아짐에 따라 다양한 집단행동을 나타낸다. 그러나 AHL 을 자가유도물질로 사용하는 그람 음성균과는 달리, 그람 양성균은 정족수 감지 기작을 위해 펩티드 (peptide)를 분비한다.

일반적으로 정족수 감지에 관여하는 펩티드는 ABC 결합 cassette (ATP-binding cassette, ABC) 운반체를 통해 분비된다.

Figure 7 은 그람 양성균의 일반적인 정족수 감지 기작을 나타낸다 (Miller and Bassler 2001). 그람 양성균에서 펩티드 신호 전구체 유전자는 전구체 단백질로 번역되고 (검은색과 흰색 다이아몬드) 이는 분리되어 (화살표) 연속적인 펩티드 자가유도물질 신호를 생산하도록 유도한다 (검은 다이아몬드). 일반적으로 펩티드 신호물질은 ABC 운반체를 통하여 세포 밖으로 이송된다. 세포 외의 펩티드 신호물질의 농도가 최소 반응 자극 농도보다 높아지면, histidine sensor kinase 단백질이 이를 인식한다. Sensor kinase 는 histidine 기 (H)를 자가인산화하여, 결과적으로 인산기는 유사 반응 조절 단백질로 이동한다. 반응 조절 단백질의 aspartate 기 (D)는 인산화 되고 이는 목표 단백질을 발현시킨다.

그람 음성균과는 대조적으로, 그람 양성균은 자가유도물질을 감지하기 위해 두 개의 반응 단백질 시스템을 이용한다. 이 두 개의 sensor kinase 는 분비된 펩티드 신호물질을 인식하는 데 사용된다. 펩티드 리간드 간의 상호작용이 인산화 반응을 개시하고, 이는 유사 반응 조절 단백질을 인산화시켜 궁극적으로 정족수 감지에 사용되는 목표 단백질을 발현시키는 것이다.

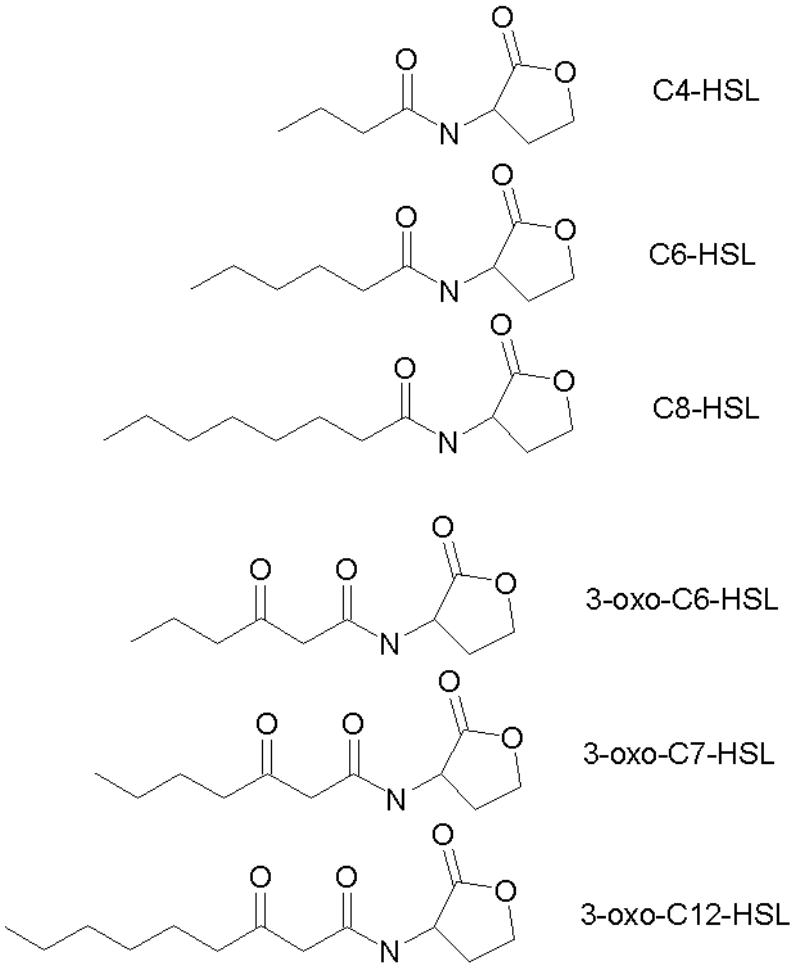


Figure 4 Molecular structure of each AHL autoinducer.

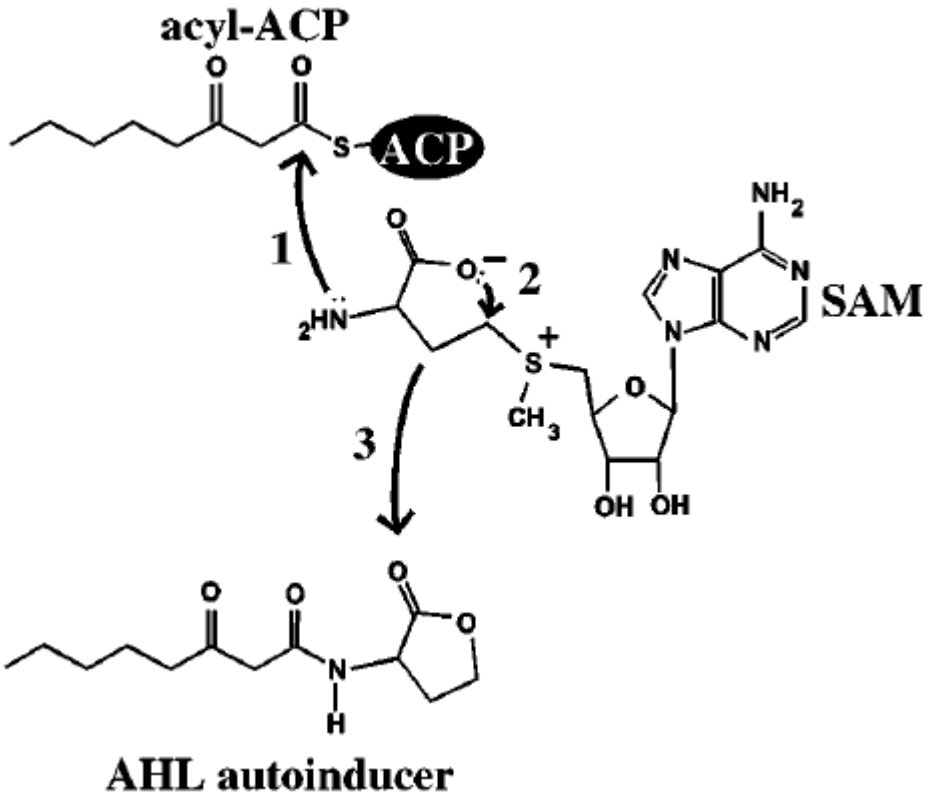


Figure 5 LuxI−directed biosynthesis of acyl homoserine lactone autoinducers (Miller and Bassler 2001).

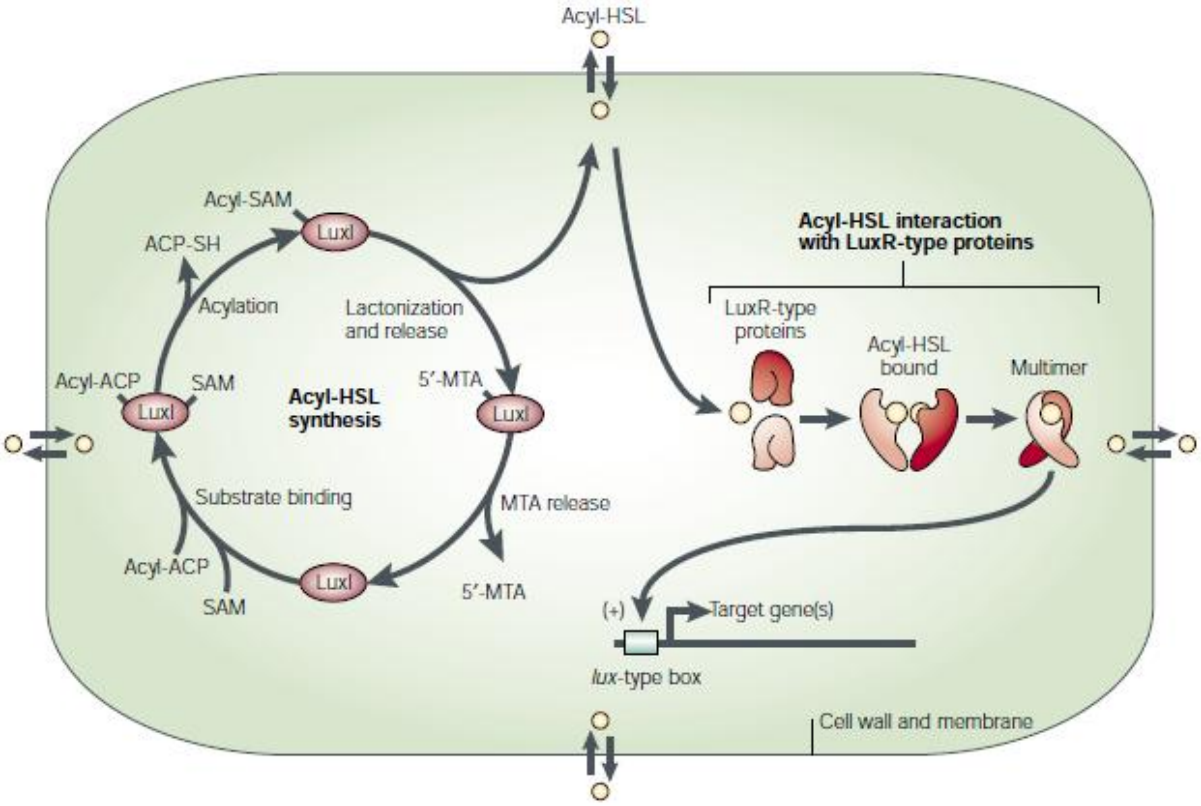


Figure 6 Model of acyl−homoserine−lactone mediated QS in a single generalized bacterial cell (Fuqua and Greenberg 2002).

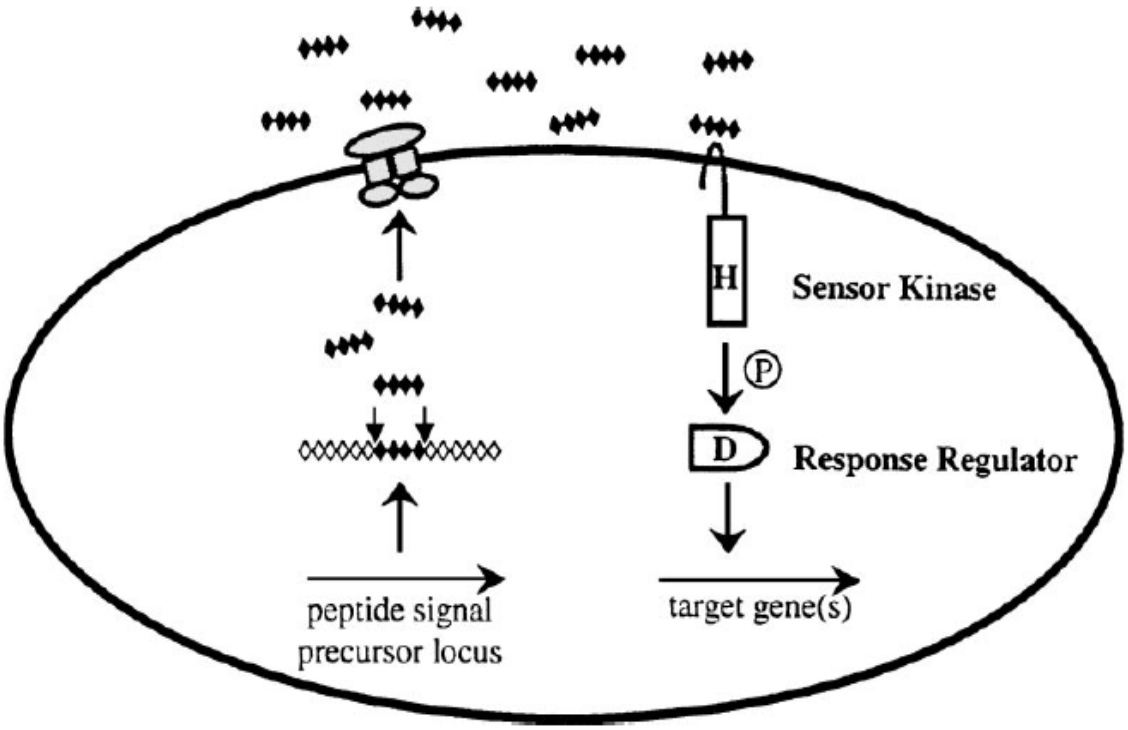


Figure 7 A general model for QS in Gram−positive bacteria (Miller and Bassler 2001).

2.3.4 AI-2 for the interspecies communication

Vibrio harveyi 의 정족수 감지 기작에는 그람 양성과 그람 양성 정족수 감지 기작이 모두 관여한다. 일반적인 그람 음성균과 마찬가지로, *V. harveyi* 는 AHL 을 생산하고 이에 반응한다. 또한 *V. harveyi* 는 그람 양성균이 사용하는 것과 마찬가지로 두 개의 연계된 반응 단백질 시스템을 이용하여 정족수 감지 기작을 한다 (Bassler 1999).

V. harveyi 는 위에서 언급한 신호 분자 이외에도 AI-2 라는 신호 분자를 추가적으로 지니고 있는데 (Bassler et al. 1993, Bassler et al. 1994), 이 신호 분자와 이를 생산하기 위한 유전자가 다양한 그람 음성균과 그람 양성균에 존재한다는 것이 밝혀졌다 (Surette and Bassler 1998, Surette et al. 1999).

AI-2 는 앞에서 언급한 대표적인 두 가지의 정족수 감지 억제 기작을 서로 연결시켜 주는 역할을 한다고 볼 수 있다. 최근 *V. harveyi* 의 AI-2 신호 분자는 기존의 다른 자가유도물질과는 유사성이 없는 furanosyl borate diester 의 구조를 지니고 있다고 밝혀졌다.

2.3.5 생물막 형성에서의 QS의 역할

생물막은 미생물들 간의 정족수 감지 기작에 의해 형성된다. 일반적으로 생물막(biofilm)을 이루고 있는 미생물들은 부유하고 있는 주변 미생물보다 훨씬 높은 밀도의 군집으로 존재하는데, 생물막 형성에 관여하기 시작한 미생물들은 대사 부산물질, 이차 대사물질 또는 기타 체외 배설물 등을 분비한다.

여러 연구 결과에 의하면 미생물들의 유동성과 균질성 (homogeneity), 체외고분자 물질 (extracellular polymeric substance, EPS) 생산 그리고 람노리피드 (rhamnolipid) 생산은 생물막의 구조에 영향을 미친다 (Hentzer et al. 2001)

Labbate (Labbate et al. 2004)에 따르면 자가유도물질인 AHL 을 기반으로 하는 정족수 감지 기작이 그람 음성균인 *Serratia liquefaciens* 의 생물막 형성에 관여한다. 정족수 감지 기작은 *S. liquefaciens* 의 무리 유동 (swarming motility)을 조절함으로써 생물막을 형성한다.

Streptococcus 의 변이체 (mutant)에서의 *LuxS* 타입의 정족수 감지 기작 또한 생물막 형성에 관여한다. *luxS* 의 변이는 생물막 형성을 유도하는데, 이 생물막의 구조는 변이계 (mutant strain)와 다른 양상을 나타낸다. 수산화인회석 (hydroxyapatite) 위에 형성된 변이된 *luxS* 의 생물막은 부드럽고 잘 융합되는 야생형의 생물막에 비해 느슨하고 거칠게 보인다 (Wen and Burne 2004).

많은 연구들이 몇몇 종의 미생물의 생물막 형성에 정족수 감지 기작이 관여한다는 것을 밝혀내었다. 예를 들어 *Pseudomonas aeruginosa* (Parsek and Greenberg 2000) (Figure 8), *Burkholderia cepacia, Aeromonas hydrophila*는 생물막을 형성할 때 AHL 이 연계된 정족수 감지 기작을 사용한다는 것이 알려져 있다 (Davies et al. 1998, Lynch et al. 2002). 따라서 정족수 감지 기작은 만성적인 생물막 형성을 통제하는데 있어 매우 매력적인 화학 요법 중 하나로 응용될 수 있다.

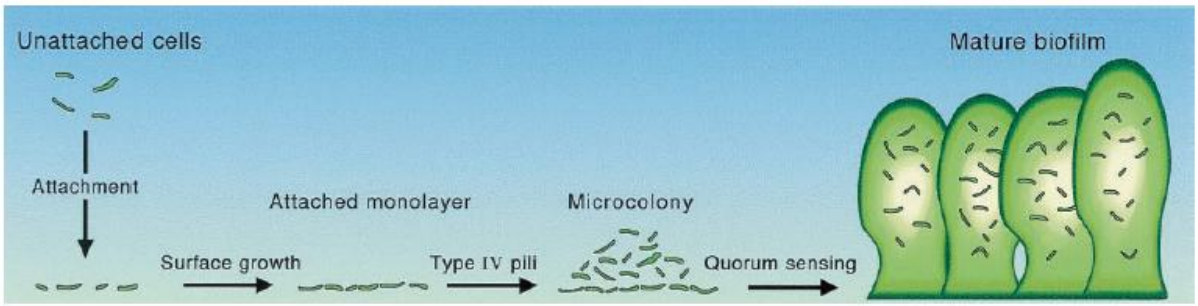


Figure 8 Diagram of the *P. aeruginosa* biofilm−maturation pathway.

2.3.6 QS 조절 전략

그람 음성균의 AHL 을 기반으로 하는 정족수 감지 기작은 세 가지 전략으로 조절될 수 있다 (Figure 9). 정족수 감지 기작 조절의 초점은 아래와 같다.

i. 신호 발생체 (signal generator, LuxI homologue)

ii. 신호 수용체 (signal receptor, Lux R homologue)

iii. 신호 분자 (signal molecule ,AHL)

그러므로, AHL 정족수 감지 억제 전략은 세 가지로 나뉘어진다.

I. AHL 합성 억제 (blockage of AHL synthesis)

II. 신호 수용체 교란 (interference with signal receptor)

III. AHL 분자의 비활성화 (inactivation of AHL molecules)

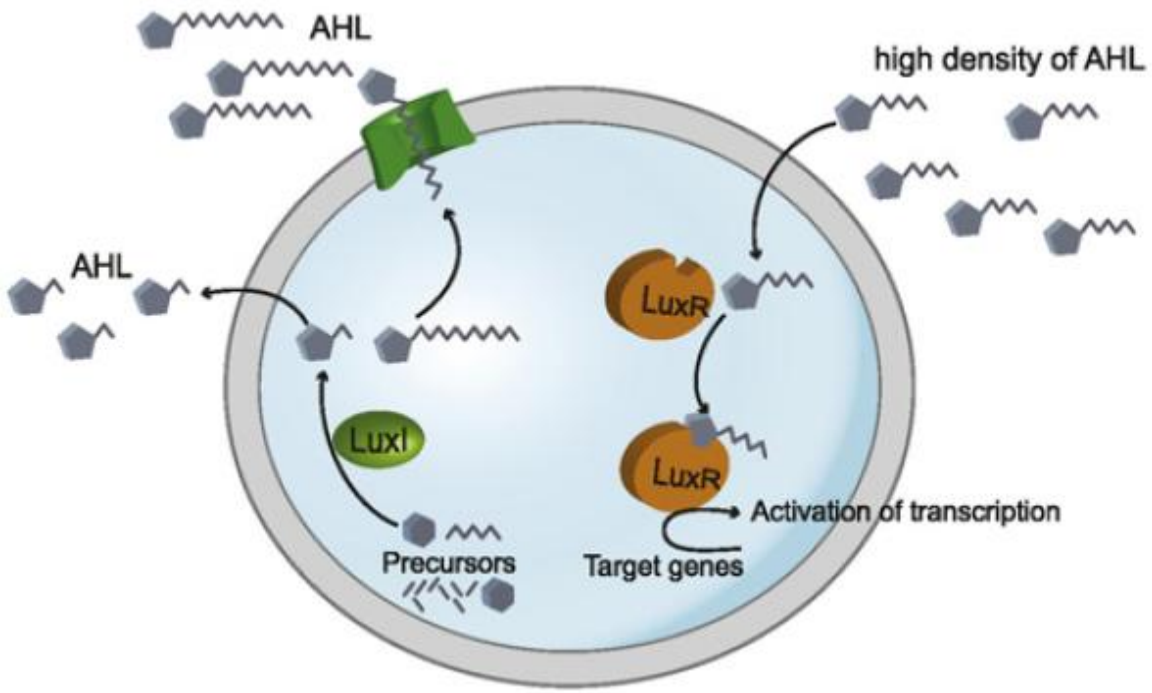


Figure 9 Three strategies to control AHL-type QS system of gram-negative bacteria (Boyen et al. 2009).

I. AHL 합성 억제 (blockage of AHL synthesis)

정족수 감기 기작을 방해하는 데 있어 가장 드물게 이용되는 방법이 AHL 합성을 억제하는 것이다. Figure 5 에서 보듯이 LuxI 단백질은 AHL 을 합성하기 위한 기질로 S-adenosyl-L-methionine (SAM)과 특정한 acyl-acyl 운반 단백질 (acyl-ACP)를 사용한다. LuxI 단백질은 SAM 과 acyl-ACP 사이의 아마이드 결합을 형성하도록 지시하고 이로 인해 methylthioadenosine 이 방출되면서 연속적으로 lactonization 이 일어난다. 따라서 이 과정을 통해 AHL 이 합성된다.

Parsek (Parsek et al. 1999)의 연구에 의하면 시험관 상에서 (*in vitro*) L/D-*S*-adenosylhomocysteine, sinefungin 그리고 butylryl-*S*-adenosylmethionine (butylryl-SAM)은 AHL 생산을 억제한다. 그러나 이들 중 어느 것도 생체 내에서 (in vivo) AHL 합성을 억제하는가에 대해서는 테스트되지 않았다. 또한 커큐민 (curcumin) 역시 PAO1 병원성 인자를 방해하고 AHL 생산을 방해하여 생물막 형성을 억제한다고 알려져 있다. 그러나 커큐민의 정확한 AHL 합성 억제 메커니즘은 밝혀지지 않았다 (Rudrappa and Bais 2008).

II. 신호 수용체 교란 (interference with signal receptor)

정족수 감지 억제인자는 천연물과 화학적 합성을 통해 얻을 수 있다.

천연물로부터 얻은 QS 억제인자

서로 다른 배지에서 자란 50 가지의 *Penicillium* 종의 스크린 작업을 통해, 66%가 정족수 감지를 억제하는 활성을 보인다는 것이 밝혀졌다. 이 중 두 가지 물질은 파툴린 (patulin)과 페니실린산 (penicilic acid)로 밝혀졌으며, 각각 *Penicillium radicicola* 와 *Penicillium coprobium* 으로부터 생산된 것이다.

Diketopiperazines (DKPs)은 사이클린 디펩티드 (cyclin dipeptide)의 한 종류로 미생물을 배양하였을 때 상층액으로부터 분리되는 물질이다. 이러한 미생물의 종류로는 *Pseudomonas aeruginoas, Proteus mirabilis, Cotrobactor freundii* 그리고 *Enterobacter agglomerans* 가 있다. DKPs 는 LuxR 기반의 정족수 감지 기작에서 AHL 의 길항제 역할을 함으로써 정족수 의존적 형질을 가지는 몇몇의 미생물 종들을 조절할 수 있다 (Holden et al. 1999).

화학적 합성을 통해 얻은 QS 억제인자

정족수 감지 기작을 조절하는 방법 중 AHL 분자의 유사체 (analogue)를 적용하는 것은 가장 많이 연구된 방법 중 하나이다. AHL 분자의 유사체는 AHL 을 구성하고 있는 곁사슬 또는 고리를 치환시켜 얻을 수 있다. 3-oxo-C6-HSL 의

유사체는 곁사슬을 치환하여 LuxR 수용체에 접촉하지 못하게 만든 것이다. 그러나 이러한 화합물은 대부분 작용물질 (agonist) 효과 또한 방해하기 때문에 유사체 스스로 정족수 감지 억제인자의 기능을 제한하게 된다 (Schaefer et al. 1996).

곁사슬을 치환하는 것 이외에도 고리 전체를 다른 고리구조로 치환하는 방법이 있다. 예를 들어 2-amino-3-oxo-C12-는 LasI AHL 합성효소의 LasR 의존적 발현을 억제함으로써 LasR 기반의 정족수 감지 기작에 억제자로 사용된다.

III. AHL 분자의 비활성화 (inactivation of AHL signal molecules)

<u>화학적 분해: Lactonolysis</u>

AHL 신호분자를 비활성화시키는 간단한 방법 중 하나는 AHL 의 고리를 개방하여 (lactonolysis) pH 를 7.0 이상으로 높이는 것이다 (Yates et al. 2002). 정족수 감지 미생물의 침입에 대항하기 위해 많은 개체들은 이 전략을 사용한다. 식물이 *Erwinia carotovora* 에 감염되면, 정족수 감지 유전자의 발현 억제와 신호분자의 비활성화로 인해 조직 부양 식물 병원균을 야기하여 pH 가 증가하게 된다 (Byers et al. 2002).

효소를 이용한 분해: 정족수 감지 억제 (quorum quenching, QQ)

몇몇 미생물은 'lactonase' 또는 'acylase'를 생산하는데, 이는 AHL 의 고리형 에스터 (cyclic ester) 또는 아마이드 결합 (amide linkage)을 가수분해시켜 미생물 간의 의사소통을 방해하는 역할을 한다. Figure 10 은 lactonase 와 acylase 각각의 정족수 감지 억제 (quorum quenching, QQ) 경로를 보여준다. 이 두 가지 주요 정족수 감지 억제 효소 이외에도 oxidoreductase 가 존재하는데, 이는 AHL 구조를 변형시킴으로써 정족수 감지 억제 활성을 나타낸다.

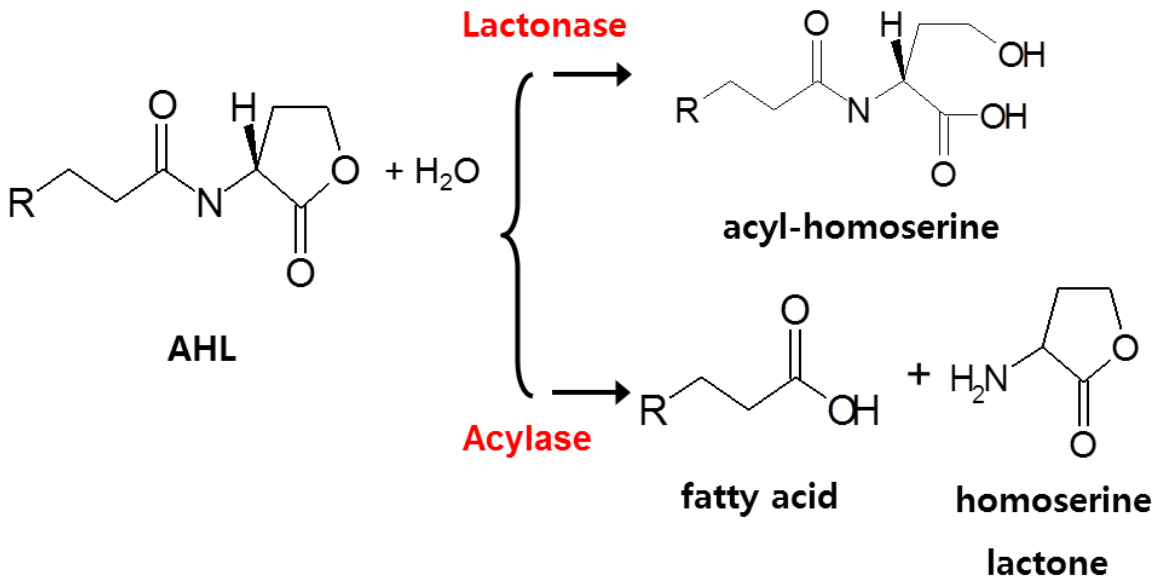


Figure 10 Enzymatic disruption of AHL autoinducers by quorum quenching enzymes.

2.3.7 정족수 감지 억제 (quorum quenching, QQ)

<u>AHL-lactonase 에 의한 QQ</u>

AHL 의 lactonolysis 는 효소를 이용하여 일어난다. *Bacillus* 속 (genus)에 속하는 *Bacillus cereus, Bacillus mycoides* 그리고 Bacillus *thuringiensis* 는 AHL 을 분해는 특정 효소인 AiiA 를 생산한다. 이 효소는 고리 개방 (ring-opening) 반응을 촉진시켜 활성을 가지는 AHL 신호분자의 양을 낮춘다.

Erwinia carotovora strain SCG1 에 *Bacillus* sp. 240B1 의 *aiiA* 유전자를 삽입하면 방출되는 신호분자의 양이 현저하게 감소하는데 (Dong et al. 2000), 이는 *aiiA* 유전자 산물이 *E.carotovora* 의 발병력을 억제한다는 것을 의미한다. 또한 AHL-lactonase 를 발현하는 식물이 정족수 감지 신호전달을 억제하며 *E.carotovora* 감염에 대해 상당한 저항성을 나타냄을 밝혀내었다 (Dong et al. 2001). 생물학적 조절에서 효소를 이용하여 AHL 을 분해하는 것은 매우 유용하며, AHL-lactonase 는 다양한 종의 미생물에서 발견되고 있다.

Lactonolysis 의 약점은 산성 조건의 pH 에서 가역반응을 일으킨다는 점이다. 고리가 개방된 AHL 분자는 염기성 환경이 아니라면 자발적으로 고리 구조를 형성하므로 이를 방지하기 위해 고리가 개방된 AHL 을 화학적으로 변형시키는 방법이 있다 (Camara et al. 2002).

AHL-acylase 에 의한 QQ

AHL 신호분자는 acylase 의 촉매 작용에 의해 아실-아마이드 (acyl-amide) 간의 결합을 분해함으로써 억제될 수 있다. *Ralstonia* 와 *Variocorax* 를 포함한 다양한 미생물 종에서 정족수 감지 억제 acylase 를 생산해낸다고 보고된 바 있다. Xu (Xu et al. 2003)의 연구에 따르면 돼지의 신장에서 추출한 acylase I 은 N-acyl homocerine lactone 을 분해하고 수족관 물 속에 형성된 생물막을 감소시킨다. 또한 Yeon (Yeon et al. 2009b)은 magnetic enzyme carrier (MEC)에 acylase 를 고정화하여 이를 MBR 공정에 적용하였다.

2.4 미생물 고정화

2.4.1 미생물 고정화 방법

특정한 미생물 또는 효소를 담체에 고정화하는 기술은 최근 다양한 연구 및 산업 분야에 적용되고 있는데, 특히 산업 분야에 적용될 때에는 고정화 기술의 경제성이 더욱 중요시 되고 있다.

현재까지의 미생물 고정화 기술은 발효에 많이 이용되어왔고 (Nunez and Lema 1987), 또한 아미노산, 유기산, 항생제, 스테로이드 등 유용한 화합물을 생산하는 생물 반응기에도 적용되어 왔다 (Kawamoto et al. 1991).

다양한 미생물 고정화 기술과 이의 응용에 대해 많은 연구가 있었고, 이 중 상업적으로 성공한 고정화 기술은 제한된 조건에서 수행된 경우가 대부분이다.

'고정화' 라는 단어는 미생물 부착의 여러 가지 다른 형태로 묘사되는데 응집 (flocculation), 표면 흡착 (adsorption), 공유 결합 (covalent bonding), 세포 간의 교차 결합 (cross-linking), 고분자 겔 상의 캡슐화 (encapsulation) 등이 있다 (Figure 11).

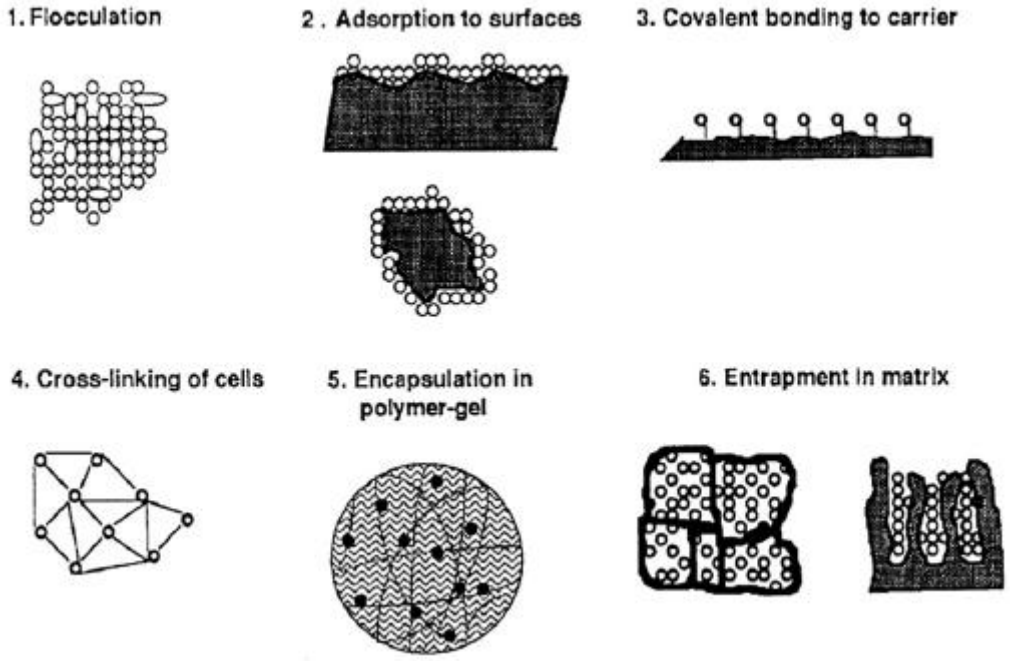


Figure 11 Methods for immobilization of viable microbial cells (Lehmann et al. 2011).

2.4.2 알지네이트를 이용한 미생물 고정화

살아있는 미생물을 고정화하기 위한 방법으로 알지네이트 (alginate) 내부에 미생물을 고정화하는 방법이 널리 이용되고 있다 (Smidsrod and Skjakbraek 1990). 알지네이트는 생체 적합성(biocompatibility)이 우수하며 칼슘 이온과 같은 2 가의 양이온과 쉽게 겔화 (gelation)되므로 미생물 고정화에 많이 이용되고 있다. 알지네이트는 미세번식 (micropropagation)을 위한 식물의 원형질체 (protoplast) 고정화, 단일클론항체 (monodonal antidodies) 생산을 위한 혼성세포 (hybridoma)의 고정화, 인공장기 이식을 위한 동물 세포의 고정화 등으로 널리 쓰이고 있다.

따라서 본 연구에서는 정족수 감지 억제 미생물을 알지네이트에 고정화하여 그 성능을 시험하고 연속 공정 MBR 에 적용하고자 한다.

2.4.3 알지네이트의 구조

알지네이트는 친수성을 띄는 다당류 (polysaccharide)로서 갈조류 (brown algae)에서 처음으로 추출되었으며, 미역 등의 갈색 해조류의 세포벽을 이루는 주요 구성 성분이다 (Davis et al. 2003, Romera et al. 2006). 알지네이트는 여러

종의 갈조류로부터 추출할 수 있으며 상업적으로 생산되는 알지네이트는 Laminaria hyperborean, Macrocystis pyrifera, Ascophyllum nodosum 등의 종에서 주로 추출한다 (Smidsrod and Skjakbraek 1990).

알지네이트는 β-D-mannuronic acid (M)와 α-L-guluronic acid (G)의 1,4 결합으로 이루어진 선형의 공중합체 (copolymer) 구조를 가지고 있다. 추출한 종에 따라서 M 과 G residue 의 비율이 달라지며 그에 따른 물리적 성질 또한 달라진다 (Davis et al. 2003, Romera et al. 2006, Smidsrod and Skjakbraek 1990). 알긴산 (alginic acid)의 내부에 G 의 함유량이 높을수록 좀 더 굳은 다공성 겔의 형성하며, 겔 상태를 오랫동안 유지하는 경향이 강하다. 또한 2 가 양이온으로 가교되어 있는 동안 과도한 팽윤 (swelling)과 수축 (degradation)이 발생하지 않고 본래의 형태를 유지한다 (DeVos et al. 1996). 이에 반해 알긴산의 내부에 M 의 함유량이 높다면 보다 유연해지며 기공이 적은 겔을 형성하여 겔화가 쉽게 일어나는 경향을 나타낸다. 이러한 알긴산의 겔화는 G 가 2 가 양이온과 반응하여 V 모양의 구멍을 가지는 egg-box 모델의 3 차원의 입체구조를 형성함에 따라 일어나는 현상이다 (Grant et al. 1973). M 과 G residue 는 각각 block 을 형성하여 M block 과 G block 을 이루게 되는데 그 형태는 MM block, MG block, GG block 의 형태를 가진다 (Grasdalen et al. 1981, Haug et al. 1974). Figure 12 는 알지네이트 분자의 구조를 나타낸 것이다 (Fijan et al. 2007).

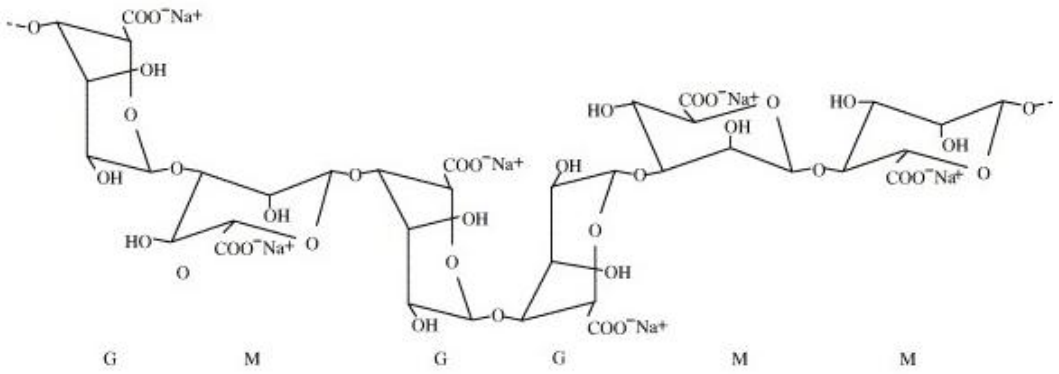


Figure 12 Structure of sodium alginate.

2.4.4 알지네이트의 특성

알지네이트는 찬물에서는 녹지 않으며, 뜨거운 물에는 약간 녹는 약한 유기산의 성질을 가진다. 알지네이트는 Na^{+}, K^{+}, Ca^{2+}, NH^{4+} 등의 양이온과 반응하여 염을 형성하는데 대부분의 생성된 염들은 물에 쉽게 용해되며 강한 친수성을 나타내므로 소량의 수분에 의해서도 덩어리를 형성한다. 하지만 이들 양이온 중 Ca^{2+}에 의해 생성된 염은 물에 거의 녹지 않는 독특한 특성을 지닌다.

알지네이트 수용액의 점도는 농도, 온도, pH, 분자량, 중합도 등에 의해 크게 영향을 받으며, 알지네이트의 종류에 따라 1 % 수용액의 경우 10 cps 에서 2000 cps 까지 다양한 범위의 점도를 갖는다. 또한 온도가 증가하면 점도는 감소하게 되는데 1 ℃ 증가함에 따라 2.5 %의 점도가 감소한다. pH 범위가 4~10 사이에서는 알지네이트 수용액의 점도에 큰 변화가 없으나 pH 가 3.0 이하가 되면 점도가 증가하여 겔화 현상이 나타난다. 낮은 pH 에서의 점도 증가의 원인은 알지네이트 내의 free acid 의 매우 낮은 용해도 때문이며, 결국에는 알긴산 (alginic acid)의 침전이 일어난다. 또한 산성 용액 중의 수소 양이온의 증가로 인해 알지네이트와 수소 양이온은 겔을 형성한다.

겔화의 원인에는 위와 같은 pH 의 저하 이외에도 칼슘이온과 같은 다가 이온들에 의한 알지네이트 수용액의 점도 증가를 생각할 수 있다. 나트륨 알지네이트 (Na-alginate)는 칼슘 이온과 함께 카르복시기와 하이드록시기 사이에 가교결합

(cross-linking)을 형성하는데, 이러한 결합이 반복되면서 큰 분자량을 가지는 삼차원 그물 구조를 가지게 된다. 또한 수용성인 나트륨 알지네이트는 칼슘 이온과 완전히 반응하여 불용성의 칼슘 알지네이트 (Ca-alginate)를 형성하는데, 이러한 성질을 이용하여 수용성의 알지네이트 필름 위에 다가 양이온을 첨가함으로써 막을 제조하기도 한다.

알긴산 자체는 물에 대해 불용성을 나타내기 때문에 주로 수용성인 Na, K, NH_3 염의 형태로 이용된다. 그 중 가장 널리 사용되고 있는 나트륨 알지네이트는 미생물 세포, 식물 및 포유동물 세포와 같은 여러 종류의 세포를 고정화하기 위한 응고제로 널리 이용되고 있다. 또한, 식품 산업에서의 경화제, 첨가제 (Stephen, Phillips et al. 2006) 등의 형태로 이용되고 있으며, 최근에는 뛰어난 생분해성 및 생체 적합성을 바탕으로 약물전달시스템 (George and Abraham 2007), 스캐폴드 (Freitas et al. 2010) 등 의약분야에서의 활용이 활발해지고 있다.

2.4.5 칼슘 알지네이트 비드

알지네이트는 위에서 언급했듯이 기본적으로 β-D mannuronate (M)이라는 물질과 α-L guluronate redidues (G)라는 두 가지 물질이 결합된 구조를 가진다. 여기에 Ca^{2+}, Ba^{2+}, 또는 Al^{3+} 같은 물질들이 삽입되면 반복적인 가교결합에 의해

알지네이트 비드 (bead)를 형성한다 (Bajpai and Sharma 2004, Blandino et al. 2000, Simpson et al. 2004). 이 중에서 칼슘 이온을 첨가한 칼슘 알지네이트 비드 (Ca-alginate bead)는 제작하기 용이하고 생체 적합성이 우수하며 다루기 쉽다는 장점을 가지고 있어 알지네이트 비드를 만드는데 가장 많이 사용된다. 칼슘 알지네이트 비드는 외부에 있는 이온들과 비드 자체 내에 있는 칼슘 이온과의 상호작용으로 인해 비드의 크기가 시간이 지남에 따라 변하게 된다. 이렇게 비드의 크기가 커지는 과정을 팽윤 (swelling)이라 하며, 작아지는 과정을 분해 (degradation)이라고 한다. 일반적으로 알지네이트 비드의 크기는 팽윤을 거쳐 분해 과정에 이르게 된다.

2.4.6 칼슘 알지네이트 비드의 형성 메커니즘

알지네이트는 Figure 13 과 같은 결합이 반복되면서 3 차원의 그물구조를 가지게 되고 (Darget, Smindsrød et al. 2005), 따라서 수용성인 나트륨 알지네이트는 칼슘 이온과 완전히 반응하여 불용성의 칼슘 알지네이트를 형성한다.

Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Sr^{2+}를 경화용액으로 사용할 수 있는데 그 중 Ca^{2+}을 이용한 경화용액으로 만든 비드가 잘 깨지지 않음과 동시에 부드럽고 크기도 적당하여 가장 널리 사용되고 있다 (방, 서 2002).

나트륨 알지네이트와 2 가 양이온인 칼슘으로 제조된 칼슘 알지네이트 비드는 성형 방법을 조절함에 따라 입자경, 입자내부 세공의 분포 그리고 비드 내부의 알지네이트 밀도 등을 조절할 수 있다. 알지네이트 비드의 물성은 알지네이트의 원료, 응고제의 조성에 따라 결정되는데, 비드의 형태는 알지네이트 용액의 점도에 상당한 의존성을 보인다. 구형의 칼슘 알지네이트 비드를 제조하여 형태을 관찰하기 위해 SEM (Scanning Electronic Microscopy)으로 관찰했을 때 Figure 14 와 같이 복잡한 그물구조를 확인할 수 있었으며, 다공성의 칼슘 알지네이트 비드를 확인할 수 있다 (Wang et al. 2009).

칼슘 알지네이트 비드는 이와 같은 형성 메커니즘을 가지므로 내부 활성 물질의 지속적인 방출 및 외부 환경으로부터의 보호 등의 목적으로 사용되기에 적합하기 때문에 의약, 화장품, 환경 등 다양한 분야에서 활용되고 있다 (Kim et al. 1998).

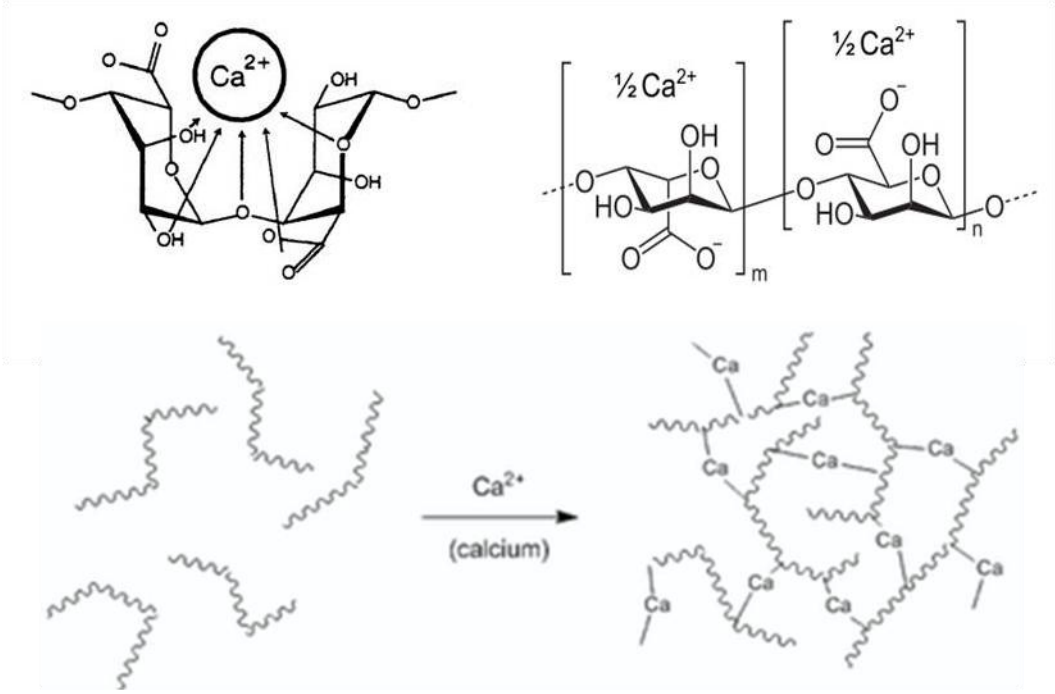


Figure 13 Mechanism of formation of alginate bead.

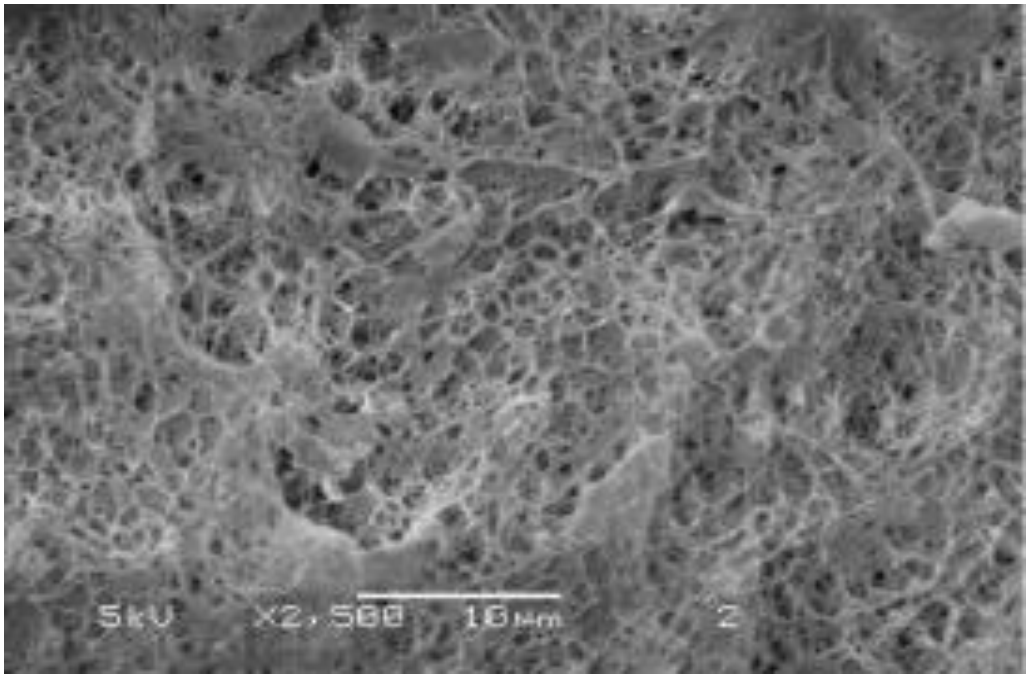


Figure 14 SEM image of alginate bead.

2.5 상전이법을 이용한 분리막 제조

2.5.1 상전이법

상전이법 (phase inversion process)은 비대칭 막 (asymmetric membrane)을 제조하는 데 있어 가장 널리 이용되는 공법이다. 고분자 용액이 여러 방법을 통해서 액상으로부터 고체상으로 변하며 막이 형성되는데, 그 방법으로는 비용매 유도 상전이법 (non-solvent phase separation, NIPs), 열 유도 상전이법 (thermally induced phase separation, TIPs), 증기 유도 상전이법 (vapor induced phase separation, VIPs), 액침 석출법 (immersion precipitation, IP), 공기 주조법 (air-casting) 등이 있다 (Mulder et al., 1996).

상전이법을 이용한 분리막을 제조하는 데 있어 가장 중요한 점은 적합한 용매 시스템을 구축하는 것이다. 용매는 막의 특성과 성능을 궁극적으로 결정짓는 가장 중요한 역할을 한다. 적합한 용매의 선택은 고분자와 용매 그리고 고분자와 고분자 간의 상호작용을 통해 고분자 사슬의 유동성을 높인다. 고분자가 좋은 용매에 쉽게 용해되면 균질한 고분자 용액이 형성되지만, 비적합한 용매를 사용할 경우에는 고분자의 응집 현상이 나타난다.

2.5.2 상전이법의 종류

앞에서 언급한 상전이법의 종류에 대하여 소개하면 다음과 같다.

비용매 유도 상전이법 (non-solvent phase separation, NIPs)은 고분자와 용매가 균일하게 혼합된 고분자용액이 비용매 (응고제)와 만났을 때, 고분자 용액에 함유된 용매가 확산과 대류에 의하여 비용매와 상호 교환됨으로써 고체와 액체의 두 상으로 분리되는 상전이 현상을 이용한 방법이다. 비용매 유도 상전이법을 이용한 분리막 제조에 있어서 고분자의 응고속도는 매우 중요한 요인 중 하나이다 (Reuvers et al. 1987). 고분자의 응고속도는 고분자 용액에 포함된 용매와 외부의 비용매 사이의 교환속도와 밀접한 관련이 있다. 일반적으로 용매와 비용매의 교환속도가 빠르면 (instantaneous demixing) 거대한 기공을 가지는 finger-like 구조의 분리막을 형성한다. 반대로 교환속도가 느리면 (delayed demixing) 미세한 기공을 가지는 sponge-like 구조의 분리막을 형성한다.

열 유도 상전이법 (thermally induced phase separation, TIPs)은 고분자 분리막을 제조할 수 있는 또 다른 유용한 방법이다. 열 유도 상전이법은 고온의 용액이 가지고 있는 열 에너지를 제거함으로써 고분자 용액이 두 상으로 분리되는 현상으로, 용액에 포함된 용매와 외부에서 가한 비용매의 확산을 통한 교환작용으로 상 분리가 일어나는 비 용매 유도 상전이법과 확연히 구분된다. 열 유도 상전이법을 통하여 분리막을 제조할 때도 고분자의 결정화 속도가 분리막의

구조를 결정하는 중요한 요인이다. 고분자 용액의 농도가 높을수록 기공이 작은 분리막을 형성하여 낮은 농도의 고분자 용액보다 낮은 순수 투과 유속을 가지는 분리막을 제조할 수 있다고 연구된 바 있다 (Matsuyama et al. 2003). 열 유도 상전이법은 주로 결정성 고분자를 분리막으로 제조하기 위해 많이 쓰이는 방법으로 다른 상전이법에 비해 비교적 높은 기계적 강도 평균 공경을 가진 대칭 형태의 분리막 제조가 가능하다.

액침 석출법 (immersion precipitation, IP)은 고분자 용액이 지지대 위에 얇은 필름 (film) 형태로 주조된 상태에서 비용매를 가하는데, 고분자 용액에 있던 좋은 용매가 비용매로 교환되면서 석출이 일어나게 된다.

증기 유도 상전이법 (vapor induced phase inversion, VIPs)에서는 용액 내의 비용매 증기의 투과 (penetration)로 인해 상전이가 일어난다.

공기 주조법 (air-casting)에서는 고분자를 휘발성이 강한 용매와 휘발성이 덜 강한 용매가 섞인 용액에 녹이는데, 용매를 증발시키는 동안 고분자의 용해도가 감소하면서 상 분리가 일어난다 (Zeman and Fraser 1993, 1994).

Chapter 3. 실험 방법

3.1 유동성 담체의 제조

3.1.1 QQ bacteria strains 와 성장 조건

정족수 감지 억제 (quorum quenching, QQ) 미생물이 고정화된 칼슘 알지네이트 비드를 만들기 위해 정족수 감지 억제 미생물인 *Rhodococcus sp.* BH4 를 배양하였다.

Rhodococcus sp. BH4 는 실제 폐수처리장의 MBR 플랜트 (옥천, 대한민국)에서 분리해내었다. 실제 MBR 플랜트에서 잘 살 수 있는 정족수 감지 억제 미생물을 찾고자 하여 MBR 플랜트에서 서식하고 있는 토착 미생물 중 정족수 감지 억제 활성이 있는 미생물을 찾았다. 폐수처리장의 MBR 플랜트에서 채취한 슬러지를 증균배양 (enrichment culture)하여 자가유도물질인 AHL 을 소비하는 정족수 감지 억제 미생물을 분리해 낸 후, 이들의 단일콜로니 (single colony)를 분리하여 *Rhodococcus sp.* BH4 를 찾아내었다 (Oh et al. 2012). 고정화에 사용하기 위한 *Rhodococcus sp.* BH4 는 Miller 사에서 구입한 Luria-Bertani broth 에 접종한 뒤 회전식 인큐베이터 (shaking incubator) 내에서 30℃의 온도, 200 rpm 의 속도에 맞추어 24 시간 동안 배양했다 (Kim et al. 2013).

3.1.2 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드의 제조

본 연구에서 사용된 유동성 담체인 코팅-알지네이트 비드의 제조 과정은 알지네이트 비드의 제조와 만들어진 알지네이트 비드의 표면을 고분자 용액으로 코팅하는 과정으로 크게 두 단계로 나뉜다.

I. 알지네이트 비드의 제조

정족수 감지 억제 미생물을 고정화하기 위한 재료로 미생물에 독성을 미치지 않는 천연 고분자인 나트륨 알지네이트 (sodium alginate)를 사용하였으며 이는 Junsei 사로부터 구입하였다. 나트륨 알지네이트와 가교결합을 형성하기 위한 염화칼슘 ($CaCl_2$)은 마찬가지로 Junsei 사로부터 구입하였다. 칼슘 알지네이트 비드를 제조하는 데 있어 나트륨 알지네이트와 염화칼슘 모두 증류수에 녹여 사용하였으며 나트륨 알지네이트는 의 농도는 2% (w/v), 염화칼슘은 4% (w/v)의 농도였다.

Luria-Bertani broth 에서 배양된 정족수 감지 억제 미생물인 *Rhodococcus sp.* BH4 는 12000g 의 속도로 15 분 동안 원심 분리하였고, 상층액을 제거한 뒤 10ml 의 증류수에 재현탁 (resuspension)시켰다. 재현탁된 BH4 용액 안에는

1ml 의 증류수 당 30mg 의 BH4 가 포함되어 있었다. 10ml 의 BH4 용액은 40ml 의 나트륨 알지네이트 용액과 균일하게 섞여 최종적으로 2%의 농도를 가지는 BH4-알지네이트 용액을 만들었고, 이는 알지네이트 용액 1ml 당 BH4 를 6 mg 함유하고 있다.

알지네이트 비드 제조 장치는 Figure 15 에 나타내었다. BH4-알지네이트 용액은 200 rpm 의 일정한 속도로 교반되고 있는 4% (w/v)의 염화칼슘 수용액에 연동 펌프 (peristaltic pump)를 사용하여 1.2 ml/min 의 일정한 속도로 3 mm 의 지름을 가지는 노즐을 통해 떨어뜨렸다. 염화칼슘 수용액 상에서 형성된 알지네이트 비드는 10 시간 동안 경화 시간 (hardening time)을 거친 뒤 증류수로 두 번 세정하였다 (Simpson et al. 2004).

완성된 알지네이트 비드의 평균적인 지름은 3.5 mm, 밀도는 1.5 g/ml 이었으며, 이와 같은 공정은 노즐의 지름 또는 연동 펌프의 속도를 조절하기가 용이하므로 다양한 크기와 밀도를 가지는 비드를 제작할 수 있다 (Kim et al. 2013).

II. 고분자가 코팅된 코팅-알지네이트 비드의 제조

상전이법을 이용하여 알지네이트 비드 표면을 고분자로 코팅하기 위해, 제조된 알지네이트 비드를 증류수에 보관함으로써 비드가 수분을 충분히 함유하도록 하였다.

본 연구에서는 코팅용 고분자로 Solvay 로부터 구입한 polysulfone 을 사용하였으며, 이는 분리막 재료로 널리 쓰이는 고분자이다. 코팅을 위한 polysulfone 용액의 농도는 10% (w/v)로 맞추었으며 용매로는 Sigma-Aldrich 사에서 구입한 N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP)를 사용하였다. Polysulfone 용액은 24 시간 동안 60℃의 온도에서 400 rpm 의 일정한 속도로 교반시켜 균질한 용액이 되도록 하였다.

고분자를 코팅함으로써 알지네이트 비드의 표면에 미세다공성 층(microporous layer)이 형성되는데 (vandeWitte et al. 1996), 상전이법을 바탕으로 한 코팅-알지네이트 비드의 제조 과정은 Figure 16 과 같다.

수분을 충분히 함유하고 있는 알지네이트 비드를 poylsulfone 용액에 잠기게 한 후 10 초 동안 반응을 진행시켰다. 이 과정에서 알지네이트 비드가 함유하고 있던 수분과 polysulfone 용액 내의 유기용매 사이에 상전이가 일어나게 되는데, 이로 인해 polysulfone 이 알지네이트 비드 표면에 석출(precipitation)된다 (Figure 16 의 1st phase inversion).

상전이를 통해 미세다공성 층이 생성된 코팅-알지네이트 비드를 polysulfone 용액에서 꺼낸 뒤 이를 1 시간 동안 증류수에 잠겨있도록 하였다 (Figure 16 의 2nd phase inversion). 이는 polysulfone 용액을 제거함과 동시에 두 번 째 미세다공성 층을 형성하여 결과적으로 내부 미세다공성 층과 외부 미세다공성 층이 생성되도록 한 것이다.

코팅이 완료된 비드는 증류수로 세 번 세정하였고, 잔류하고 있는 유기 용매를 제거하기 위해 24 시간 이상 증류수에 보관한 뒤 MBR 공정에 적용하였다.

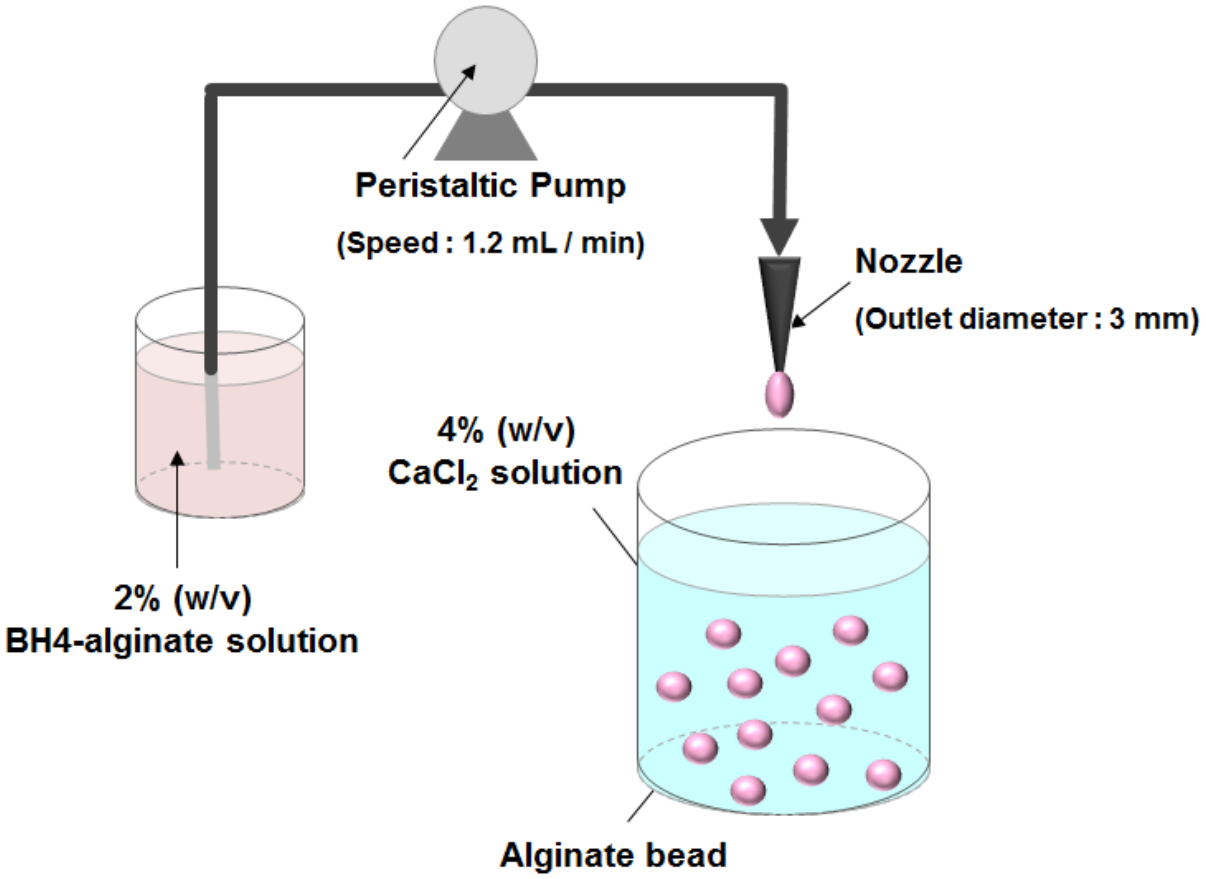


Figure 15 Schematic diagram of preparing alginate beads.

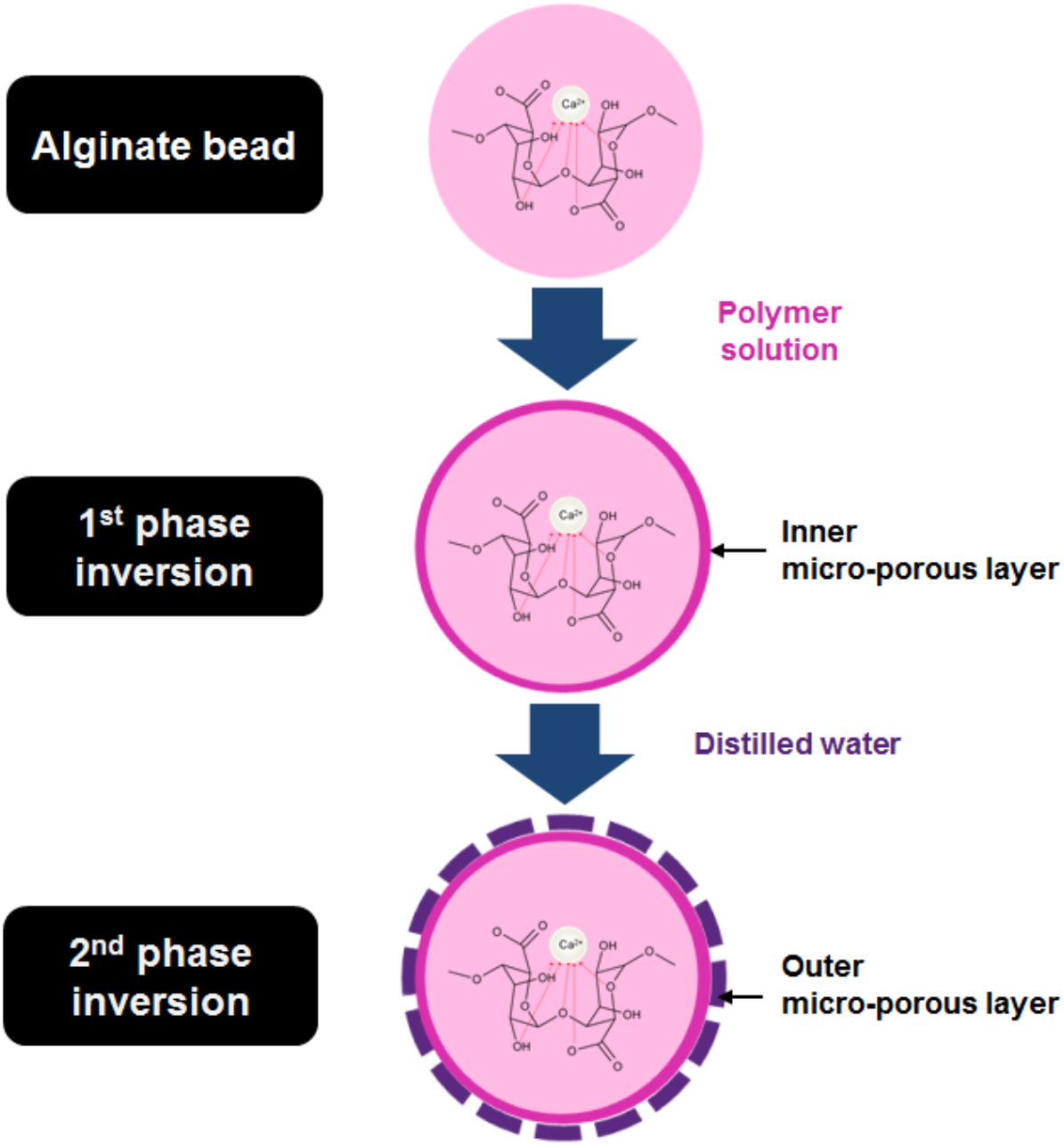


Figure 16 Schematic diagram of preparing polysulfone coating–alginate bead.

3.2 AHL 분해 활성에 대한 생물 검정

3.2.1 발광측정기 (Luminometer)

코팅-알지네이트 비드의 정족수 감지 억제 활성과 안정도는 AHL 의 한 종류인 C8-HSL (N-octonoyl-DL-homoserine lactone)의 분해 정도를 표준으로 삼아 측정한다. C8-HSL 은 폐수처리장의 MBR 플랜트에서 가장 많이 존재하는 신호분자 중 하나이며, 실험에 사용한 C8-HSL 은 Sigma-Aldrich 사로부터 구입하였다.

C8-HSL 의 분해 정도는 Beta-Glo 라는 형광을 내는 기질을 이용한 생물 검정을 통해 정량화할 수 있으며 (Kawaguchi et al. 2008), 이는 Promega 사로부터 구입하였다.

Beta-Glo 를 이용한 생물 검정은 측정하고자 하는 AHL 시료와 리포터 균주 그리고 발광측정기가 필요하다. C8-HSL 을 감지하기 위한 리포터 균주로는 *Agrobacterium tumefaciens* A136(Ti^{-})(pCF218)(pCF372)를 사용하였다. 이 균주는 Luria-Bertani broth 에서 0.25% (v/v)의 streptomycin 과 0.05% (v/v)의 tetracycline 과 함께 회전식 인큐베이터 (shaking incubator) 내에서 30℃의 온도, 200 rpm 의 속도에 맞춰 24 시간 동안 배양했다.

Well-plate 에 95 μl 의 배양된 *A. tumefaciens* A136 와 준비된 AHL 시료 5 μl 를 주입한 다음 90 분 동안 30℃의 인큐베이터에 보관하였다. 90 분 경과 후

인큐베이터에서 꺼낸 Well-plate 에 30 μl 의 Beta-Glo 를 주입한 뒤 상온에서 40 분 간 반응시켰다. *A. tumefaciens* A136 로부터 방출되는 beta-galactosidase 의 양은 oxyluciferin 의 형광 강도와 비례하므로, AHL 시료 내의 C8-HSL 의 양을 형광 강도로부터 유추할 수 있다.

반응이 끝난 후 well-plate 의 형광 강도는 발광측정기 (luminometer)를 이용하여 측정했다 (Synergy 2, Bio-Tek, USA) 각각의 시료 속에 포함되어있는 AHL 의 양은 형광 강도와 C8-HSL 의 표준 농도 간의 검량선 (calibration curve)으로부터 도출했다.

3.2.2 코팅-알지네이트 비드의 AHL 분해 활성

코팅-알지네이트 비드의 AHL 분해 활성은 C8-HSL 의 분해 정도를 통해 측정하였다.

초기 C8-HSL 용액의 농도는 200nM 로 맞추었으며 용매는 증류수를 사용하였다. AHL 분해 활성 측정에 사용된 코팅-알지네이트 비드는 50 개였으며 이를 20 ml 의 초기 C8-HSL 용액에 넣은 뒤 회전식 인큐베이터 내에서 30℃의 온도, 200 rpm 의 속도에 맞추어 반응시켰다. 코팅-알지네이트 비드가 담긴 C8-HSL 용액은 6 회에 걸쳐 채집하였으며 (0, 30, 60, 90, 120, 180 분) 분해되고

남은 C8-HSL 의 농도는 *A. tumefaciens* A136 를 이용한 생물 검정을 통해 도출했다.

3.3 코팅-알지네이트 비드의 물리적 강도 측정

기존의 알지네이트 비드는 MBR 공정에 적용하였을 때 시간이 지남에 따라 알지네이트가 녹으면서 물리적 강도가 감소하며, 장시간이 지나면 물리적 강도 측정이 불가할 만큼 알지네이트가 녹아버리는 문제점이 있다. 따라서 새로운 유동성 담체인 코팅-알지네이트 비드와 기존의 알지네이트 비드의 물리적 강도를 물성측정기 (texture analyzer)로 측정하였다 (CT3 4500, Brookfield, USA). 물성측정기의 여러 가지 측정 방법 중 물리적 압축을 가하는 방법을 이용하였으며, 본래 형태의 50%까지 압축이 일어나도록 설정하였다. 탐침 모델은 TA44 를 이용하였고 속도는 0.5 mm/s 로 코팅-알지네이트 비드에 압력을 가했다.

10 개의 코팅-알지네이트 비드의 물리적 강도를 측정하였으며, 측정 결과 그래프로부터 코팅-알지네이트 비드에 가해진 일 (work)을 계산하였고 이 값으로 강도를 나타내었다. 그래프의 가로축은 탐침이 움직인 거리, 세로축은 가해진 힘으로 제시되었으므로 그래프의 면적을 계산하면 일 값을 얻을 수 있고 이는 코팅-알지네이트 비드가 50%까지 압축될 때까지 필요한 에너지임을 알 수 있다.

3.4 평판형 분리막이 침지된 MBR의 운전 조건

본 연구에서는 평판형 분리막이 내재된 실험실 규모의 두 개의 MBR 을 운전하였으며 각각 정족수 감지 억제 미생물을 고정화한 코팅-알지네이트 비드와 아무것도 고정화하지 않은 코팅-알지네이트 비드를 적용하여 그 효과를 검증하였다.

MBR 운전에 사용된 활성 슬러지는 경기도 소재 시화 하수 처리장에서 채취하였으며 실험실에서 합성 폐수로 6 개월 이상 장기간의 안정화 단계를 거쳐 정상 상태에 도달하게 한 후 연구를 수행하였다. 합성 폐수의 조성은 기존 연구자들이 사용한 조성과 동일하며 다음과 같다: Glucose 0.4 g/L, Yeast extract 0.014 g/L, Bactopeptone 0.115 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.104 g/L, $K_2H_2PO_4$ 0.021 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.032 g/L, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.0001 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.003 g/L, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.003 g/L, $NaHCO_3$ 0.256 g/L.

평판형 분리막은 국내의 Pure-Envitech (퓨어-엔비텍)사의 ENVIS 모델을 실험실 규모의 MBR 에 맞추어 주문 제작하였으며 이는 chlorinated polyvinyl chloride (C-PVC) 재질로 공극의 크기는 0.4 μm 이다. 양면으로 구성된 분리막 모듈의 한 면당 막 면적은 177.5 cm^2 로 모듈 한 개 당 막 면적은 355 cm^2 이며 하나의 MBR 공정에 이러한 모듈을 두 개씩 적용하였으므로 분리막의 총 면적은 710 cm^2 로 운전되었다.

두 개의 MBR 공정 모식도는 Figure 17 과 같으며 코팅-알지네이트 비드 내의 정족수 감지 억제 미생물 고정화 여부만 다를 뿐 실험기간 동안 모든 운전 조건을 동일하게 유지하였다. 각 MBR 에 적용된 코팅-알지네이트 비드는 500 개였으며 이는 수분중량 (moisture weight)으로 계산하면 반응기 총 부피의 0.5%에 해당하는 양이다. 반응기의 부피는 각각 5L 였으며 수리학적 체류 시간 (hydraulic retention time, HRT)은 합성 폐수를 일정 유량으로 지속적으로 공급하여 8 시간으로 유지하였다. 고형물 체류 시간 (solid retention time, SRT)은 30 일로 운전하여 활성 슬러지의 혼합액 현탁 고형물 (mixed liquor suspended solid MLSS)의 농도를 9800 ~ 10200 mg/L 로 유지하였다.

분리막의 오염 정도를 나타내는 막간 차 압력 (transmembrane pressure, TMP)은 30 분 간격으로 분리막 모듈에 연결된 전자식 TMP 게이지 (gauge)를 통해 측정하였다. 약 50 일 동안 MBR 을 운전하였으며 막간 차압이 50kPa 까지 상승할 때마다 분리막 모듈을 MBR 에서 꺼내어 화학적 세정을 해주었고 다시 이를 MBR 에 재사용하는 방식으로 실험이 진행되었다. 평판형 분리막의 화학적 세정은 상온에서 4 시간 동안 500 mg/L 의 NaOCl 과 2% (w/v)의 citric acid 또는 유기산 수용액에 침지시키는 방식으로 진행하였고, 화학적 세정 후 증류수에 2 시간 동안 침지시켜 분리막 표면에 잔존하는 기타 화학 세정 물질들을 제거한 뒤 MBR 에 재사용하였다. 이 밖의 자세한 운전 조건은 Table 3 에 제시하였다.

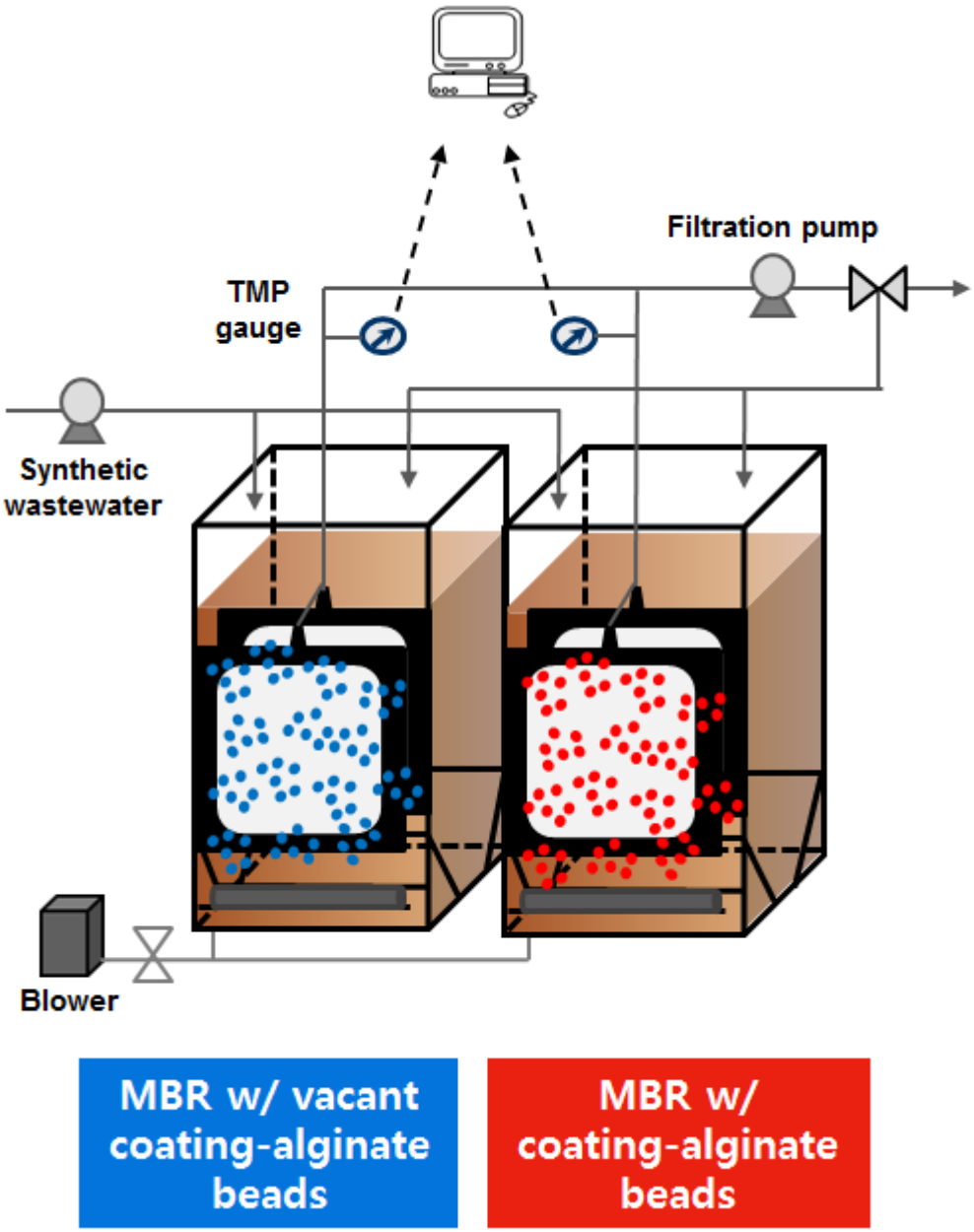


Figure 17 Schematic diagram of continuous MBRs.

Table 3 Conditions of experimental MBRs

Working volume	5 L
SRT	30 days
HRT	8 hrs
Membrane	C-PVC, ENVIS
Membrane area	710 cm^2
Flux	30 $L/m^2/h$
Aeration rate	2 L/min
COD removal efficiency	Broth: 96~97 % Permeate: 96.4~97.7%
MLSS	10000 (±200) mg/L
F/M ratio	0.15~0.16
Feed COD	520 (±20) mg/L
Seed sludge	Si-Hwa
% Volume of bead / Working volume	0.5 %

3.5 현미경을 이용한 분석

코팅-알지네이트 비드의 고분자 코팅 층을 관찰하기 위하여 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)을 이용하였다 (JSM-6701F, JEOL, Japan). 주사전자현미경으로 관찰하기 위해 코팅-알지네이트 비드를 횡단면 (cross-section)으로 자른 다음, 내부의 알지네이트 비드를 제거한 후 고분자 코팅 층을 에탄올 탈수 (ethanol dehydration)시켰다. 탈수시킨 반구형 고분자 코팅 층을 알지네이트 비드와 맞닿는 내부와 그렇지 않은 외부를 관찰하기 위해 마운트 (mount) 위에 각각 내부와 외부가 위를 향하도록 부착했다. 또한 고분자 코팅의 횡단면 경계 부분을 관찰하기 위해 알지네이트 비드를 제거한 반구형 고분자 코팅 층을 에폭시 수지 (epoxy resin)로 메워 반구 형태를 유지하도록 굳힌 다음 마운트에 부착했다. 마운트에 부착된 샘플은 모두 백금 코팅 과정을 거친 후 주사전자현미경으로 관찰하였다.

코팅-알지네이트 비드 내부의 미생물과 분리막 표면에 부착된 미생물을 관찰하기 위한 방법으로는 공초점 레이저 현미경 (confocal laser scanning microscope, CLSM)을 사용하였다 (C1 plus, Nikon, Japan). 관찰하고자 하는 샘플은 Invitrogen 사로부터 구입한 SYTO 9 에 의해 형광 염색되었으며 이 물질은 미생물 내의 핵산과 결합하여 형광을 낸다. 분석한 데이터는 IMARIS 프로그램을 이용하여 이미지화하였다.

3.6 분석 방법

MBR 운전 기간 동안 지속적으로 혼합액 현탁 고형물 (mixed liquor suspended solid, MLSS)과 화학적 산소 요구량 (chemical oxygen demand, COD)을 분석하여 공정의 처리 효율이 일정하게 유지되는지 확인하였으며, 표준측정법으로 측정하였다. 화학적 산소 요구량은 용존 유기물의 농도를 나타내며 이는 중크롬산칼륨 시약 (COD digestion reagent set, HACH, USA)을 사용하였다. 시료를 중크롬산칼륨 시약에 넣고 2 시간 동안 산화시킨 후 실온으로 냉각하여 분광기 (spectrometer, DR4000, HACH, USA)를 이용하여 430nm 의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 부유물 및 미생물의 농도를 측정할 때에는 0.45 μm 공극의 필터 (GF/C, Whatman, UK)를 사용하였다.

분리막 표면에 생성된 생물막은 증류수에 분리막이 완전히 잠기게 한 다음 120 분 동안 초음파 처리 (sonication)를 하여 탈착시켰다. 탈착된 생물막 용액은 0.45 μm 의 공극을 가지는 친수성 필터 (poylestersulfone, Supor450, PALL)로 걸러낸 뒤 30 분 동안 100℃의 오븐에서 건조된 다음 중량을 측정하여 TAB (total attached biomass)값을 얻었다. 탈착된 생물막 용액의 체외고분자 물질 (extracellular polymeric substance, EPS)에 함유된 단백질과 탄수화물의 양은 각각 Lowry method (Schroer and Augsten 1978)와 phenol-sulfuric method (Dubois et al. 1956)를 통해 측정하였다.

3.7 포도당 측정법

정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드가 코팅 층으로 인해 외부와의 물질 교환에 있어 저항력이 생겨 고정화된 미생물의 양분 공급에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 포도당 측정법을 사용했다. 실험에 사용된 포도당은 SAMCHUN 사에서 구입하여 증류수에 녹여 수용액 상태로 이용하였으며 포도당 측정 기기로 농도를 측정하였다 (RQ flex 10, MERCK, Germany).

1000 mg/L 포도당 수용액에 기존의 알지네이트 비드와 코팅-알지네이트 비드를 각각 50 개씩 넣은 뒤 이를 회전식 인큐베이터 (shaking incubator) 내에서 30℃의 온도, 200 rpm 의 속도에 맞추어 24 시간 동안 반응시켰다. 포도당 수용액은 5 회에 걸쳐 채집하였으며 (0, 3, 6, 9, 24 시간) 채집된 샘플은 10 배로 희석하여 포도당 측정 기기를 통해 미생물이 소비하고 남은 잔류 포도당의 농도를 측정하였다.

Chapter 4. 실험 결과 및 고찰

4.1 코팅-알지네이트 비드의 특징

본 연구에서는 분리막 제조법에서 널리 사용되고 있는 비용매 유도 상전이법 (non-solvent induced phase inversion, NIPs)을 응용하여 코팅-알지네이트 비드의 제조에 이용하였다. 알지네이트 비드는 충분한 양의 수분을 함유하고 있으므로 상전이 반응에서 별도의 water bath 가 필요 없었으며 알지네이트 비드 자체가 water bath 역할을 하였다.

주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM)으로 코팅-알지네이트 비드의 코팅 층을 관찰한 결과 층 내부와 외부 모두 미세다공성 층이 형성되었음을 확인했고 Figure 18 에 제시하였다. 알지네이트 비드와 맞닿는 코팅 내부 층은 외부 층보다 더 조밀한 구조를 형성하였는데 이는 water bath 로 이용된 알지네이트 비드와 polysulfone 용액의 유기 용매 사이의 교환속도가 느리기 (delayed demixing)때문이다. 느린 교환속도로 인해 코팅 층은 finger-like 구조를 형성하며 이는 횡단면 이미지를 통해 확인하였다. 코팅 층의 두께는 60 ~ 100 μm 사이로 측정되었으며 일정한 두께로 고르게 형성되지는 않았다. 이는 알지네이트 비드가 평평한 판 형태가 아닌 구형이기 때문에 polysulfone 용액과 모든 표면에서 균일하게 접촉하는 것이 어렵기 때문이다.

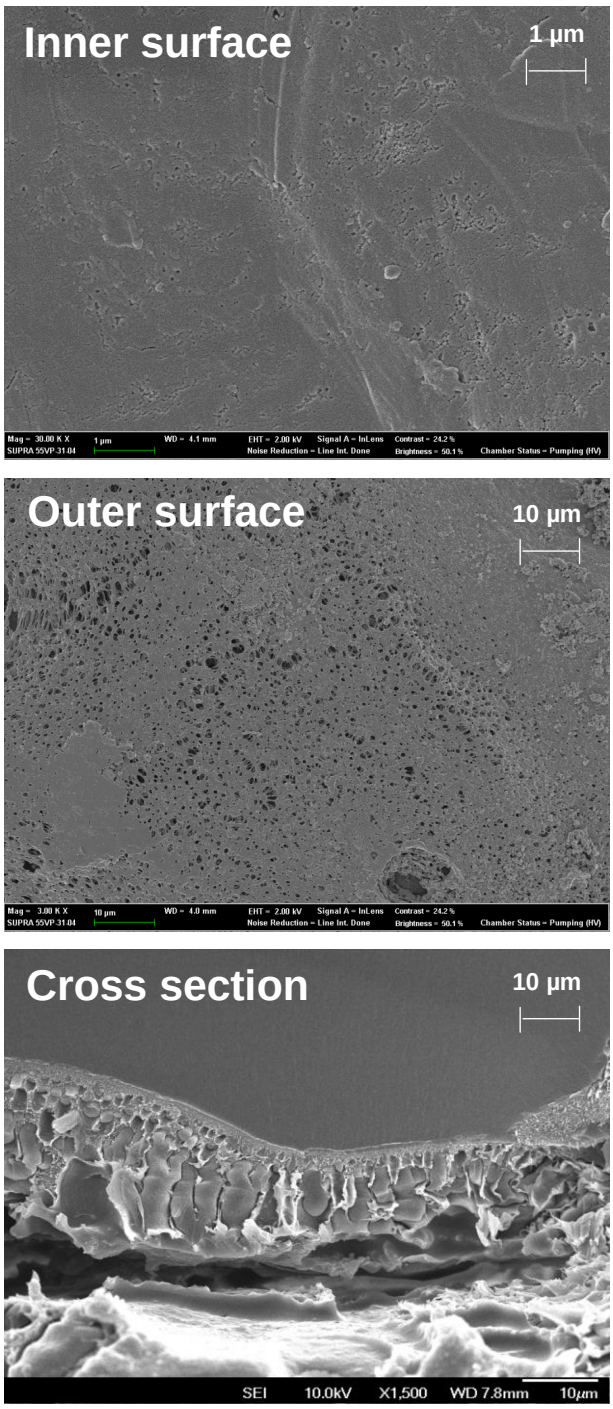


Figure 18 Scanning electron microscope image of polymer coating layer.

4.2 고분자 코팅으로 인한 효과

고분자 코팅으로 인해 나타나는 여러 가지 효과들을 정족수 감지 억제 활성도, 물리적 강도, 고분자 코팅 층의 기능 측면에서 기존의 알지네이트 비드와 비교하여 보았다.

<u>정족수 감지 억제 활성도</u>

코팅-알지네이트 비드의 정족수 감지 억제 활성도는 AHL 의 한 종류인 C8-HSL 의 분해 정도를 표준으로 하는 생물 검정을 통해 측정하였고, Figure 19 에 시간에 따른 C8-HSL 의 분해 정도 그래프를 제시하였다. 코팅-알지네이트 비드의 C8-HSL 분해 정도는 기존의 알지네이트 비드와 비교하였을 때 근소한 차이로 분해 활성이 저하된 것을 보였다. 이러한 활성 저하의 원인으로는 상전이 반응 시 유기용매와의 접촉으로 인해 알지네이트 비드 표면의 미생물이 죽게 되고, 코팅 층 생성으로 인해 물질 전달에 대한 저항력이 발생하였기 때문이다. 먼저 코팅-알지네이트 비드를 공초점 레이저 현미경 (confocal laser scanning microscope, CLSM)으로 관찰한 결과 비드 표면에서 죽은 미생물이 발견되었고 내부의 미생물은 정상적으로 살아있음을 확인했다 (Figure 20). 다음으로 코팅-알지네이트 비드에 고정화된 미생물이 외부에 있는 영양분을 소비하는 정도를

측정함으로써 코팅 층으로 인한 물질 전달에 대한 저항력을 확인하였다. 미생물의 영양분으로는 포도당 수용액을 사용하였으며 포도당 소비 정도를 나타낸 그래프는 Figure 21 과 같다. 포도당 수용액 내에서 48 시간 경과하였을 때, 기존의 알지네이트 비드는 초기에 존재했던 포도당의 65%를 소비하였고 코팅-알지네이트 비드는 47%를 소비하였다. C8-HSL 분해 정도와 마찬가지로 코팅 층으로 인한 저항력으로 물질 전달 능력에 근소한 차이를 보였지만, 미세다공층을 통해 내부 미생물에 충분히 영양분을 공급할 수 있다는 것을 보여준다.

<u>물리적 강도</u>

기존의 알지네이트 비드의 한계점 중 하나는 장기간 MBR 공정에 적용하였을 경우 물리적 강도가 매우 약해진다는 것이다. 따라서 알지네이트 비드를 고분자로 코팅함으로써 향상된 물리적 강도를 기대하였고 측정 결과는 Figure 22 에 제시하였다. 각각 10 개의 비드를 측정하여 평균값을 얻었으며 결과적으로 기존의 알지네이트 비드에 비해 물리적 강도가 약 2 배 증가하였음을 확인했다. 코팅으로 인한 물리적 강도 증가는 MBR 공정에 장기간 동안 적용이 가능하다는 것을 의미하며 분리막에 형성된 생물막에 대한 물리적 세정 효과 또한 향상될 수 있다는 것을 의미한다.

고분자 코팅 층의 기능

기존의 알지네이트 비드는 과량의 1 가 이온 (monovalent ion) 또는 Ca^{2+} 킬레이트제 (Ca^{2+} chelating agent)가 존재하면 쉽게 분해되고 (Gombotz and Wee 1998), 시간이 지날수록 녹는 문제점이 있다. 따라서 일정 유량의 합성 폐수가 지속적으로 공급되는 장기간의 연속 공정 MBR 에 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 알지네이트 비드를 적용할 경우 결국에는 모두 녹아 내부에 고정화된 미생물이 유실된다는 한계점을 지닌다.

알지네이트 비드에 고분자를 이용하여 코팅 층을 형성하여도 시간이 지나면 내부의 알지네이트 비드는 마찬가지로 녹아버리게 된다. 하지만 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드의 경우 알지네이트 비드가 녹아도 미생물은 코팅 층을 빠져나가지 못하고 코팅 층 내부에 보존된다는 것을 확인하였고 Figure 23 에 그 결과를 제시하였다. 알지네이트 비드를 녹이기 위한 조건을 형성하기 위해 30 mM 농도의 EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 25 mM 농도의 시트르산 나트륨 (sodium citrate) 그리고 200 mM 농도의 염화나트륨 (NaCl)을 증류수에 녹여 용액을 만들었다. 이 용액은 알지네이트 비드는 물론 코팅-알지네이트 내부의 알지네이트 또한 녹인다. 기존의 알지네이트 비드와 코팅-알지네이트 비드를 각각 용액 100 ml 에 넣고 상온에서 200 rpm 의 속도로 교반시키면서 알지네이트가 녹아 나오는 것을 60 분 간 관찰했다. 10 분 간격으로 용액을 채집하였으며 채집된 용액은 분광기 (spectrometer, DR4000, HACH, USA)를 이용하여 600 nm 의

파장에서 흡광도를 측정하였다. 용액 내에 미생물이 존재하면 600 nm 의 파장에서 흡광도가 증가하므로 이를 통해 미생물의 보존 여부를 판단할 수 있다. 결과적으로 코팅-알지네이트 비드가 담긴 용액에서 알지네이트가 모두 녹은 후에도 용액의 흡광도가 영점에 가깝다는 것을 확인하였고 미생물이 코팅 층 내부에 보존됨을 검증하였다. 이는 장기간 MBR 공정에 코팅-알지네이트 비드를 적용하는 것이 가능하다는 것을 의미한다.

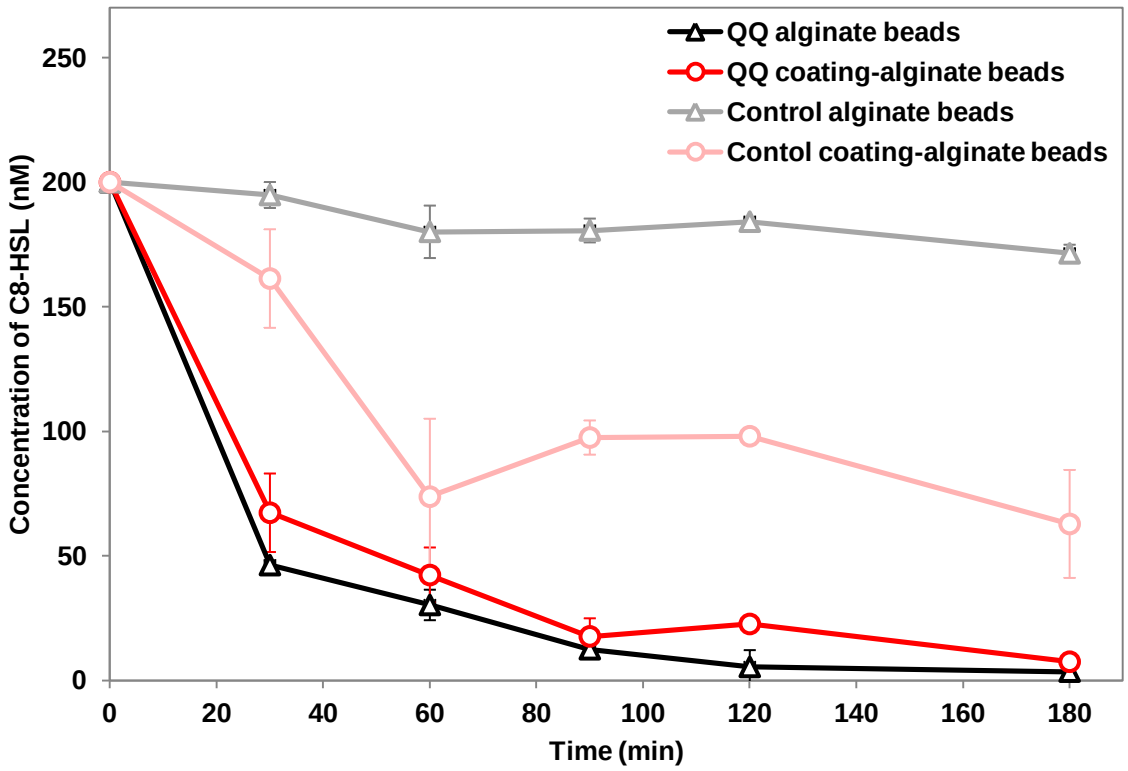


Figure 19 Quantitative quorum quenching activity of coating−alginate beads and alginate beads.

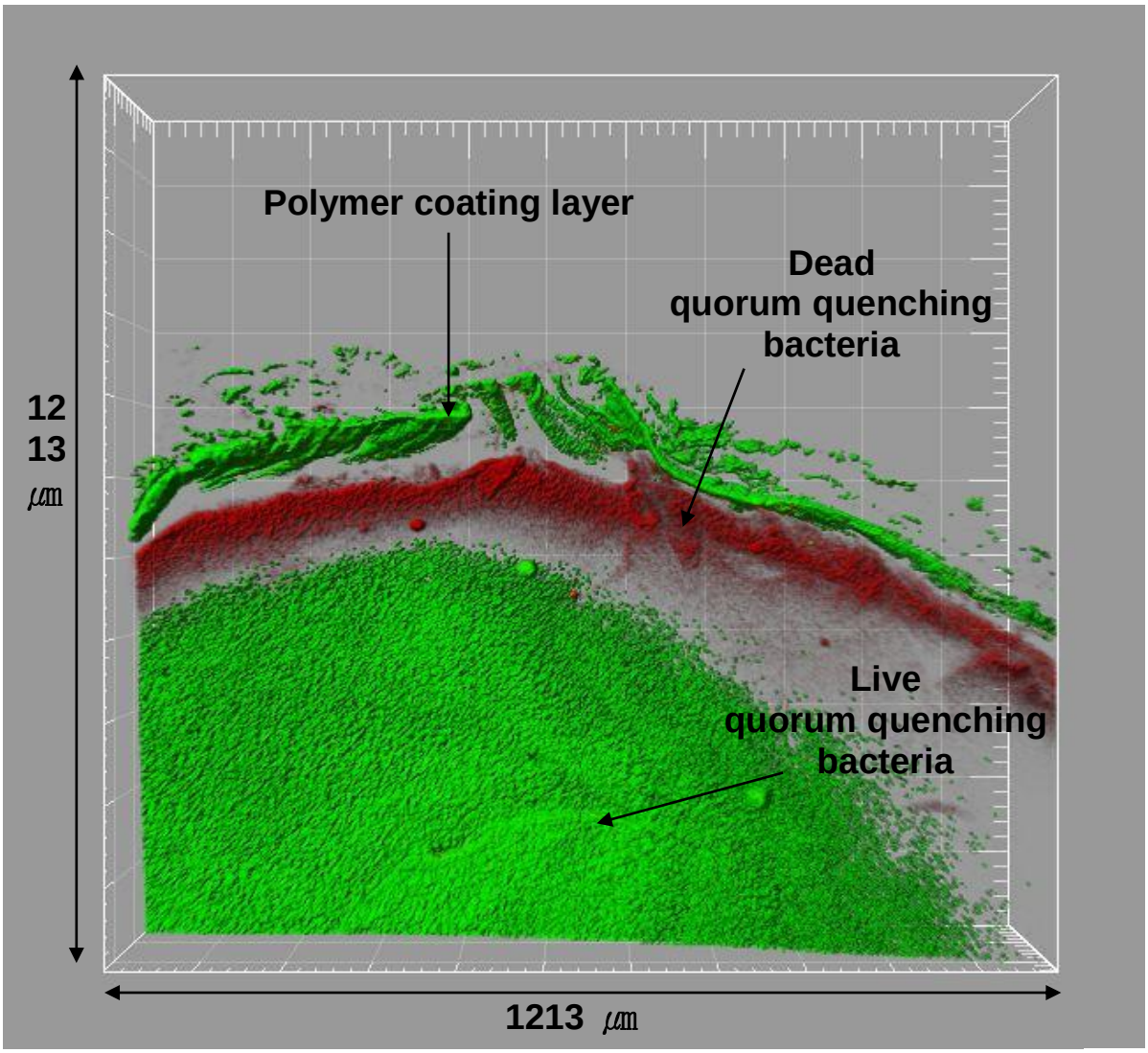


Figure 20 Confocal laser scanning microscope image of polymer coating layer part of coating−alginate bead. The cells were stained with SYTO9 (cell; green). Magnification 100 x.

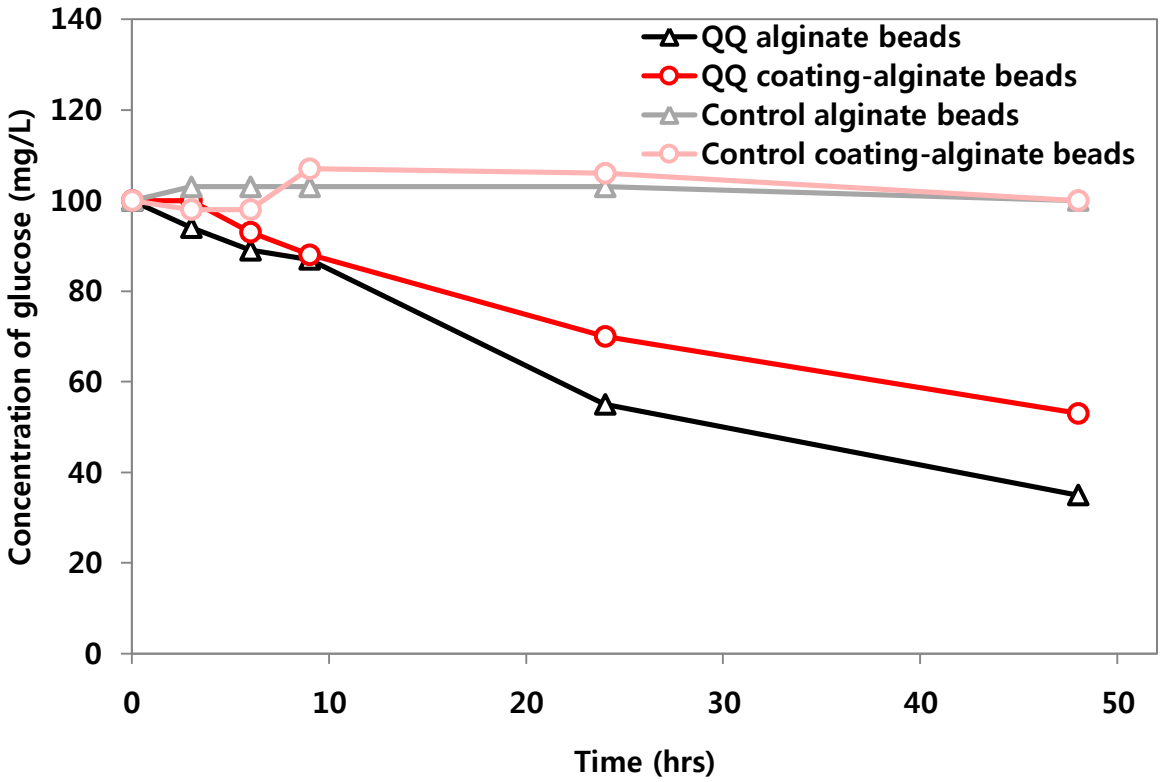


Figure 21 Glucose transfer efficiency of coating−alginate beads and alginate beads.

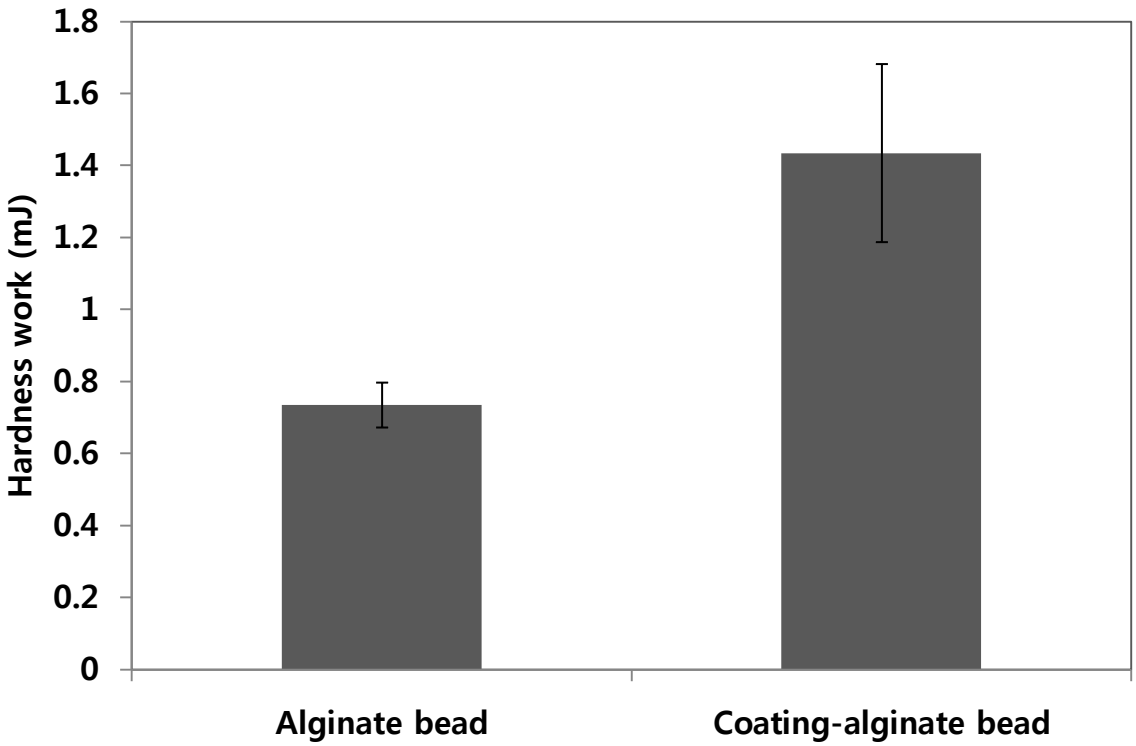


Figure 22 Mechanical strength of coating−alginate beads and alginate beads.

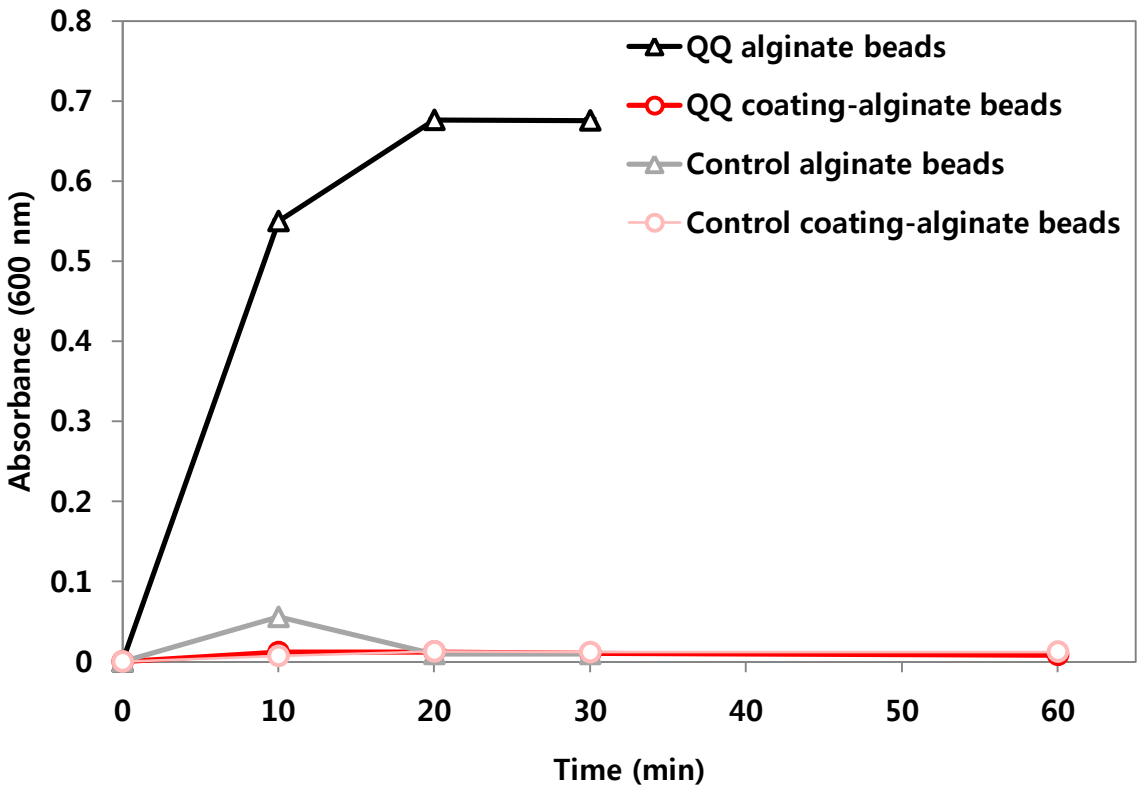


Figure 23 Cell entrapping capacity of coating−alginate beads and alginate beads.

4.3 장기간 운전된 연속공정 MBR 에서의 코팅-알지네이트 비드의 안정도

약 50 일 간의 연속공정 MBR 에 적용된 코팅-알지네이트 비드의 안정도는 정족수 감지 억제 활성도와 물리적 강도 측정을 통해 지속적으로 관찰되었다.

코팅-알지네이트 비드의 정족수 감지 억제 활성도는 MBR 에서 50 개를 꺼내어 증류수로 충분히 씻어내어 표면에 부착된 활성 슬러지를 제거한 다음, 초기 활성도를 측정할 때와 동일한 방법으로 생물 검정을 통해 관찰하였다. 각 3 회씩 측정하여 평균값을 얻었으며 측정이 끝난 비드는 다시 MBR 에 넣어주었다. 약 50 일 간 적용된 코팅-알지네이트 비드의 활성은 초기 분해 능력의 60%를 유지하였다 (Figure 24).

물리적 강도는 MBR 에서 10 개를 꺼내어 측정하여 평균값을 얻었으며 측정이 끝난 후 다시 MBR 에 넣어주었다. 물리적 강도는 시간이 지남에 따라 지속적으로 감소되었으며 약 50 일 뒤 초기 강도를 100% 기준으로 하였을 때 32%로 강도가 감소하였다 (Figure 25).

시간이 지남에 따라 코팅-알지네이트 비드 내의 알지네이트 비드가 녹으므로 물리적 강도는 지속적으로 약해지지만 코팅 층으로 인해 정족수 감지 억제 미생물의 소실을 방지하므로 정족수 감지 억제 활성은 유지된다.

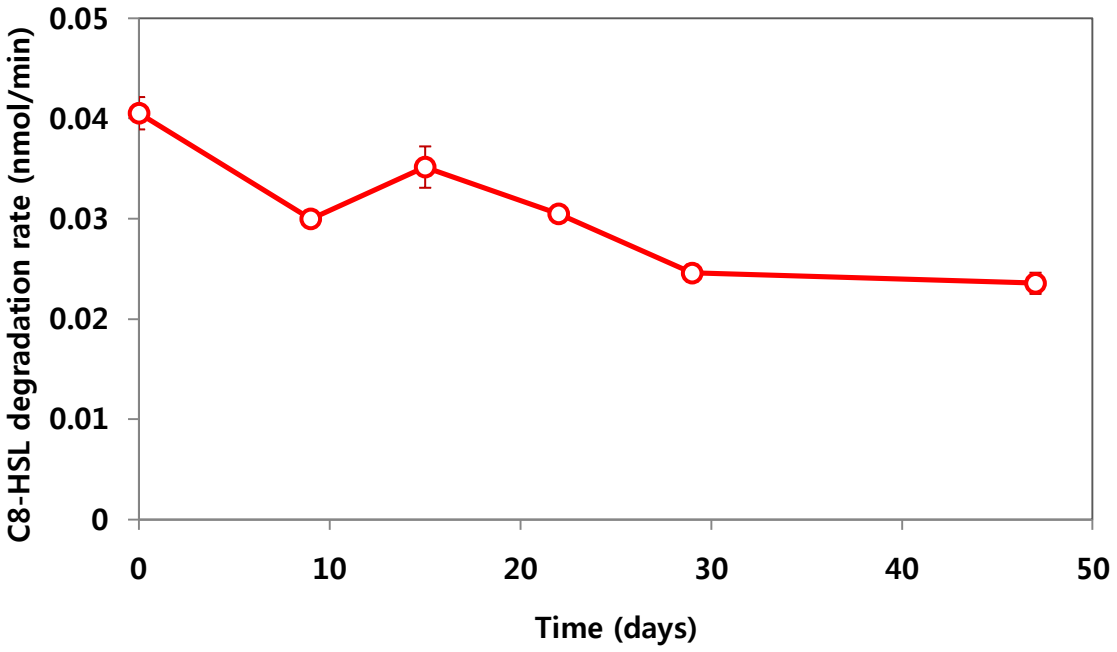


Figure 24 Quorum quenching stability of coating−alginate beads (degradation rate of C8−HSL was determined at 90 minutes).

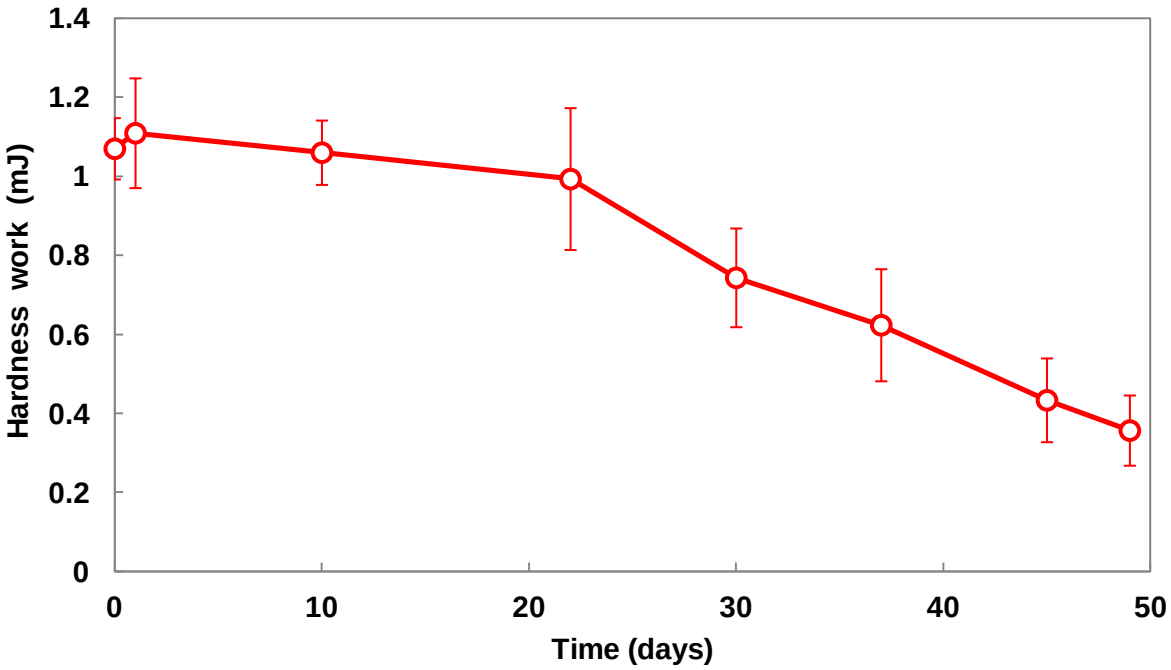


Figure 25 Mechanical strength of coating−alginate beads.

4.4 평판형 분리막의 특징

본 연구에 사용된 MBR 은 양면으로 구성된 평판형 분리막 모듈이 하나의 MBR 당 두 개씩 침지된 형태로 운전되었다. 하나의 MBR 은 총 4 장의 분리막으로 운전되었으며 두 개의 모듈 사이에 폭기를 설치함으로써 분리막 모듈이 배플(baffle) 역할을 함께 수행하도록 하였다. 즉 기포가 분리막 모듈 사이에서 생성되어 수면까지 올라온 다음 배플 역할을 하는 분리막 모듈을 넘어 다시 바닥으로 내려가는 형식으로 폭기와 분리막 모듈을 배치하였다. 코팅-알지네이트 비드는 MBR 내의 활성 슬러지에 비해 밀도가 크므로 폭기를 해주지 않은 상태에서는 바닥에 가라앉으며 폭기를 해주면 기포의 유동과 함께 움직이게 된다. 비드가 바닥으로부터 올라갈 때 분리막 사이를 부딪히며 지속적인 물리적 접촉을 가해주게 되고, 수면으로부터 바닥으로 떨어질 때에도 마찬가지로 반응기 벽면과 분리막 표면 사이를 부딪히며 물리적인 접촉을 가하게 된다. 따라서 양면으로 구성된 분리막 모듈의 분리막 표면에 모두 물리적 세정 효과를 나타내도록 하였다. 분리막의 일반적인 기능인 여과 (filtration)만 수행하는 MBR 과는 달리, 본 연구에서는 분리막 모듈과 폭기의 배치의 조절을 통해 코팅-알지네이트 비드로 인한 물리적 세정효과를 극대화시키고자 하였다.

4.5 분리막 오염 억제 결과

정족수 감지 억제 미생물을 고정화한 코팅-알지네이트 비드와 아무것도 고정화하지 않은 코팅-알지네이트 비드의 분리막 오염 억제 효과를 비교하기 위해 두 개의 MBR 을 운전하였다. 먼저 코팅 알지네이트 비드의 물리적 세정 효과를 알아보기 위하여 비드를 넣지 않은 MBR 과 아무것도 고정화하지 않은 코팅-알지네이트 비드를 넣은 MBR 을 비교하였다. 약 10 일 동안 MBR 을 운전하였으며 코팅-알지네이트 비드를 적용한 MBR 에서 막간차압 (transmemebrane pressure, TMP)이 지연됨을 확인하였고(Figure 26) 양쪽의 막간차압은 각각 44.9 kPa, 28.1 kPa 이었다.

물리적 세정 효과를 확인한 다음 본 연구의 목적인 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드와 아무것도 고정화하지 않은 코팅-알지네이트 비드를 각각의 MBR 에 적용하였다. 약 50 일 동안 운전하였으며 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드를 적용한 MBR 에서 막간차압이 지연됨을 확인하였다 (Figure 27). 약 50 일의 운전 기간 중 아무것도 고정화하지 않은 코팅-알지네이트 비드를 적용한 MBR 의 막간차압은 50kPa 을 기준으로 하였을 때 총 5 회 올랐다. 반면 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 MBR 의 막간차압은 50kPa 까지 총 3 회 올랐다. 분리막 오염으로 인한 화학적 세정은 MBR 운전 비용에 있어 상당한 부분을 차지하므로 세정 횟수를 줄이는 것은 경제성을 높이는 방법 중 하나이다. 결과적으로 정족수 감지 억제 미생물을

적용함으로써 분리막 세정 횟수가 약 60%로 줄었으므로 이는 분리막 오염을 효과적으로 억제했음을 보여준다.

막간차압 데이터를 통해 분리막 오염 억제를 확인한 다음 실제로 정족수 감지 억제 미생물에 의해 분리막 표면에 생물막 형성이 억제되었는지 확인하기 위해 공초점 레이저 현미경 (confocal laser scanning microscope, CLSM)을 이용하여 분리막 표면의 생물막을 관찰하였다. 동일 시간 운전하였을 때 양쪽 MBR 의 분리막을 꺼내어 CLSM 사진을 찍었으며 이때 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드를 넣은 MBR 은 막간차압이 26.7 kPa 이었고 아무것도 고정화하지 않은 코팅-알지네이트 비드를 넣은 MBR 의 막간차압은 54.2 kPa 이었다. Figure 28 (a)에는 막간차압 데이터를 나타내었으며 Figure 28 (b)에는 양쪽 MBR 의 분리막 표면에 형성된 생물막의 CLSM 사진이다. CLSM 사진을 통해 아무것도 고정화하지 않은 코팅-알지네이트 비드를 넣은 MBR 에서 더욱 조밀한 생물막이 형성된 것을 확인하였고, 이는 정족수 감지 억제 기작으로 인해 분리막 표면에 생물막 형성이 효과적으로 억제되었음을 의미한다.

분리막 표면의 CLSM 사진을 찍은 뒤 형성된 생물막의 양을 정량화하기 위하여 TAB (total attached biomass)를 측정하였으며 생물막에 포함된 체외고분자 물질 (extracellular polymeric substance, EPS)을 측정하였다 (Figure 29 (a), (b)). 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅 알지네이트 비드를 적용한 MBR 의 분리막에서 166 mg 의 TAB 가 측정된 것에 반해 아무것도 고정화하지 않은

코팅-알지네이트를 적용한 경우 약 3 배 이상 많은 523 mg 이 측정되었다. 탈착된 생물막에 포함된 체외고분자 물질의 양 또한 정족수 감지 억제 효과로 인해 양쪽 MBR 에서 차이를 보였다. 단백질의 경우 정족수 감지 억제 미생물이 적용된 MBR 과 그렇지 않은 MBR 에서 각각 7.7 mg, 14.7 mg 이 검출되었으며 탄수화물은 각각 11.7 mg, 13 mg 이 검출되었다. 따라서 정족수 감지 억제 기작이 분리막 표면에 형성된 생물막과 이를 이루는 미생물의 체외고분자 물질의 양을 줄여준다는 것을 확인할 수 있었다.

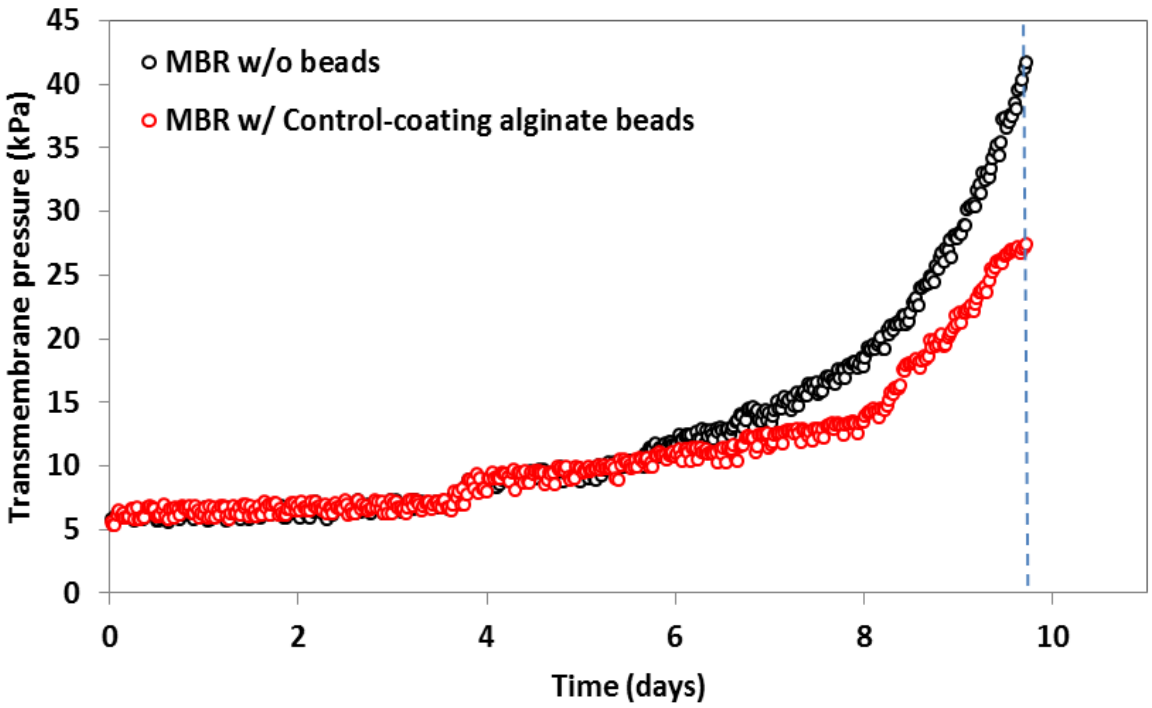


Figure 26 TMP profile of continuous MBR: MBR w/o beads vs w/ control-coating alginate beads.

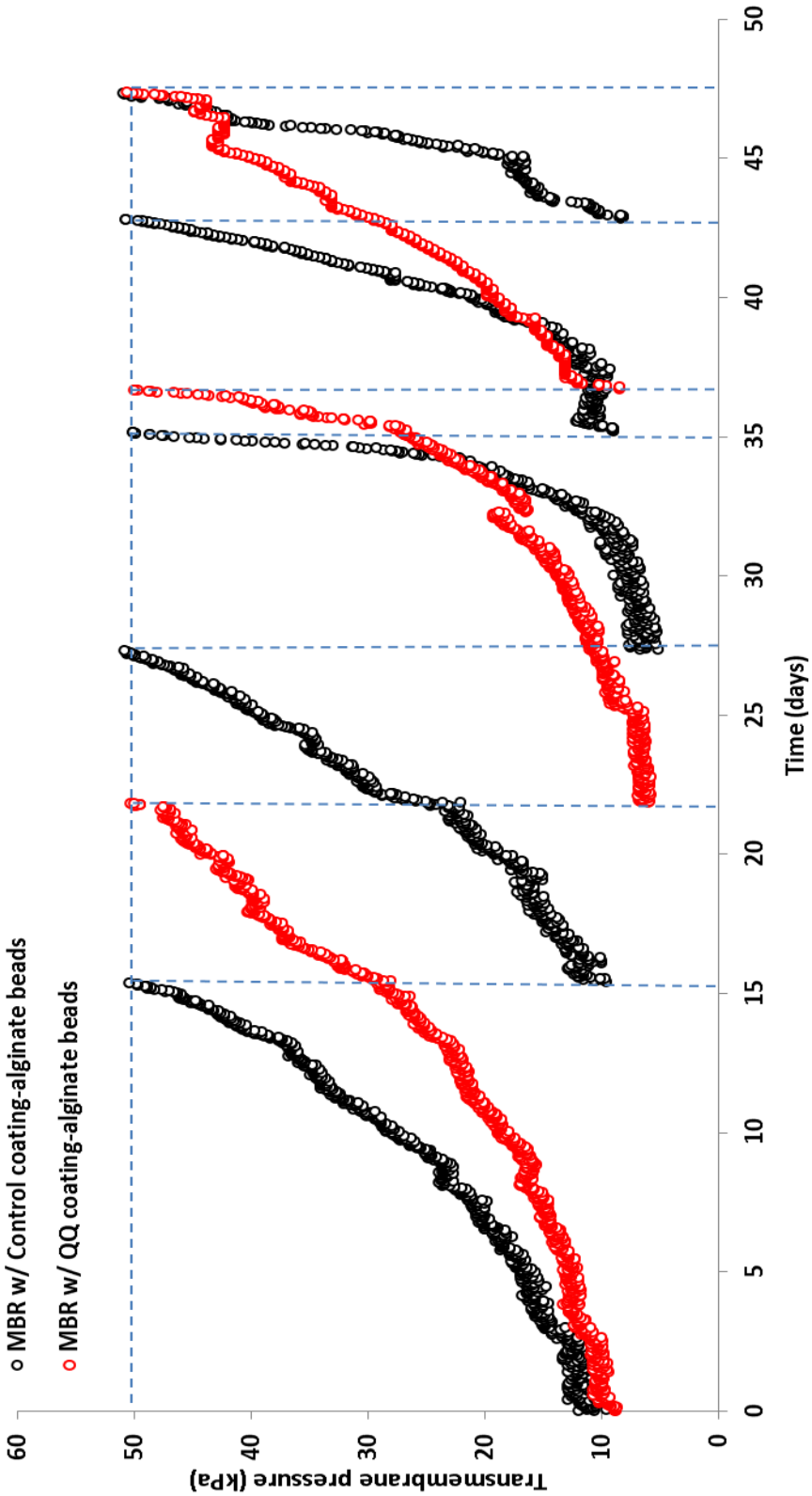
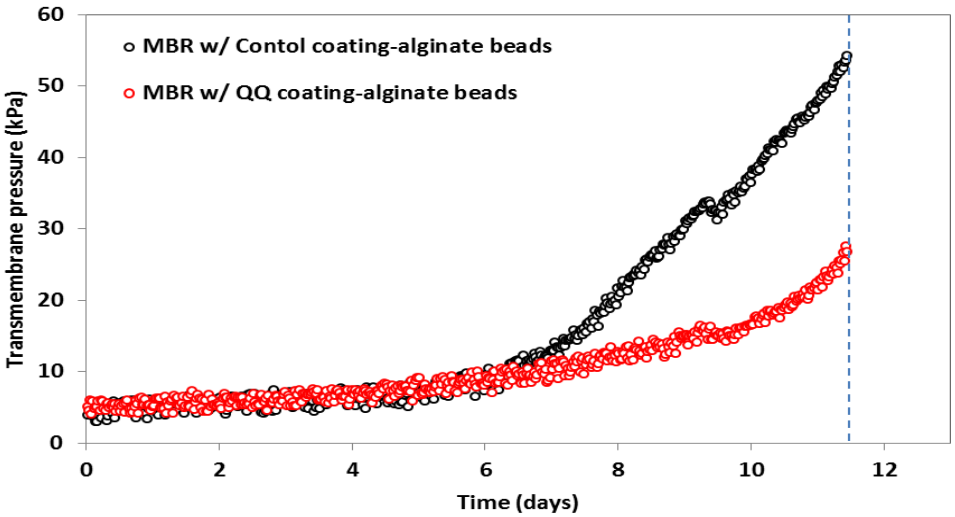


Figure 27 TMP profile of continuous MBR: MBR w/ control coating-alginate beads vs w/ QQ coating-alginate beads.

(a)



(b)

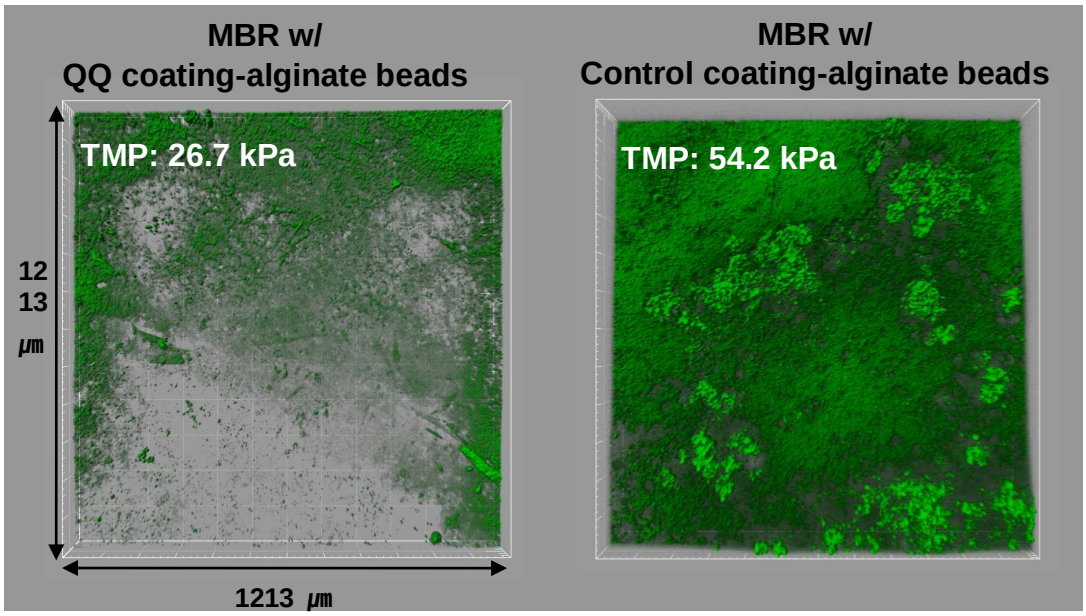


Figure 28 Comparison of biofilm formation on the membrane surface (a) TMP profile of continuous MBR and (b) CLSM images of biofilm. The cells were stained with SYTO9 (cell; green). Magnification 100 x.

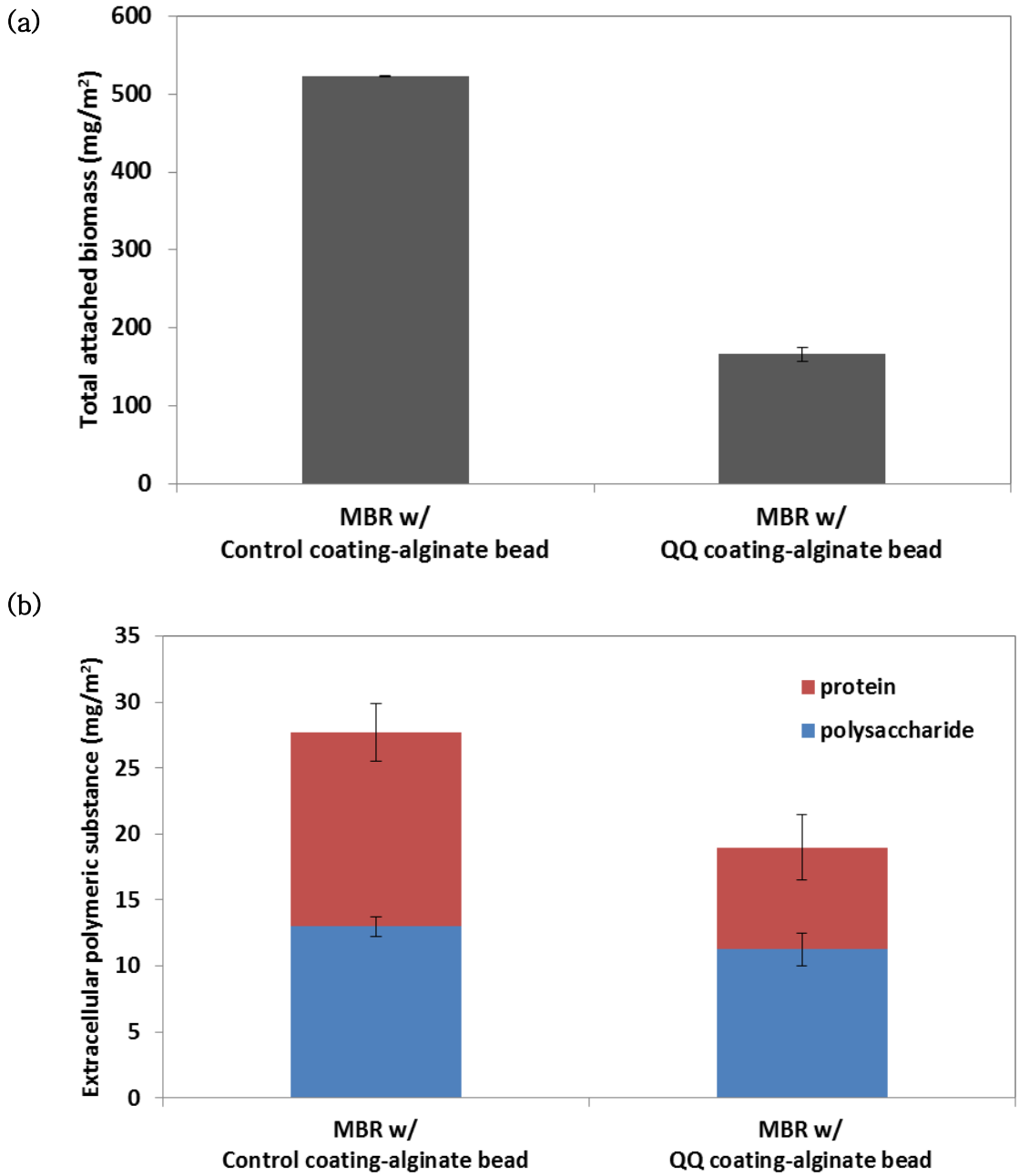


Figure 29 (a) Total attached biomass of biofilm formed on the membrane surface and (b) extracellular polymeric substance.

4.6 고분자 코팅 두께에 따른 코팅-알지네이트 비드의 차이

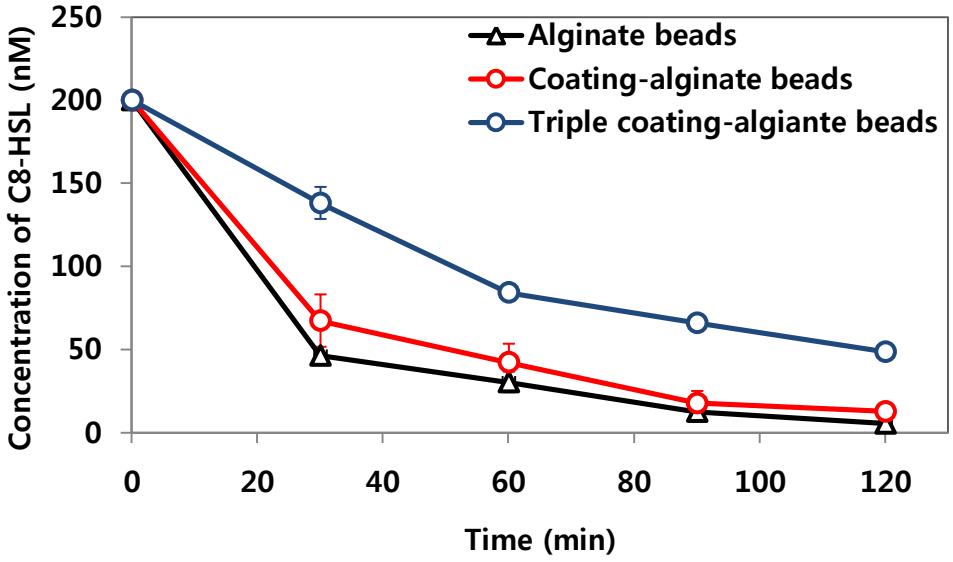
본 연구에서는 기존의 알지네이트 비드 표면을 고분자로 코팅함으로써 나타나는 차이점과 그 효과에 대해 여러 가지 측면으로 검증하였다. 이를 기반으로 코팅 두께를 달리하였을 때는 어떠한 변화가 생기는지 알아보기 위해 코팅 횟수를 3 번으로 늘려 삼중 코팅 층이 형성된 코팅-알지네이트 비드를 제조하였고 그 성능을 알아보았다.

정족수 감지 억제 활성도는 C8-HSL 의 분해 정도를 표준으로 하는 생물 검정을 통해 측정하였고 Figure 30 (a)에 나타내었다. C8-HSL 의 초기 농도를 기준으로 90 분 경과 시 기존의 알지네이트 비드는 95%, 코팅-알지네이트 비드는 90%, 삼중 코팅-알지네이트 비드는 67%의 분해 능력을 나타내었다. 코팅-알지네이트 비드의 분해 능력이 기존의 알지네이트 비드와 근소한 차이를 나타냈던 것은 신호 분자인 C8-HSL 이 단일 코팅 층을 통과하는 것에 큰 저항이 없었다는 것을 의미한다. 이에 반해 삼중 코팅 층은 보다 큰 저항력이 생겨 분해 능력이 저하되었다고 볼 수 있다. 또한 저항력 증가가 물질 전달에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 포도당 측정법을 통해 외부의 영양분을 소비하는 정도를 비교해보았다. 48 시간 경과 시 기존의 알지네이트 비드는 초기 포도당의 65%, 코팅-알지네이트 비드는 47%, 삼중 코팅-알지네이트 비드는 35%를 소비하였고

Figure 30 (b)에 제시하였다. 이로부터 신호 분자와 마찬가지로 영양분 또한 비드 내부의 미생물에게 전달되는 데 있어 단일 코팅 층에 비해 삼중 코팅 층이 더욱 큰 저항력을 나타냄을 확인하였다.

신호 분자의 분해 능력과 영양분을 소비하는 정도는 단일 코팅-알지네이트 비드에 비해 감소하였지만 물리적 강도는 눈에 띄게 향상되었다. Figure 31 과 같이 단일 코팅-알지네이트 비드의 물리적 강도는 기존의 알지네이트 비드에 비해 약 2 배 증가하였고 삼중 코팅-알지네이트 비드는 단일 코팅-알지네이트 비드에 비해 약 2.5 배 증가하였다. 즉 삼중 코팅-알지네이트 비드는 기존의 알지네이트 비드의 5 배에 해당하는 물리적 강도를 가지는 것을 의미하며 이로 인한 물리적 세정 효과의 뚜렷한 향상을 기대해볼 수 있다.

(a)



(b)

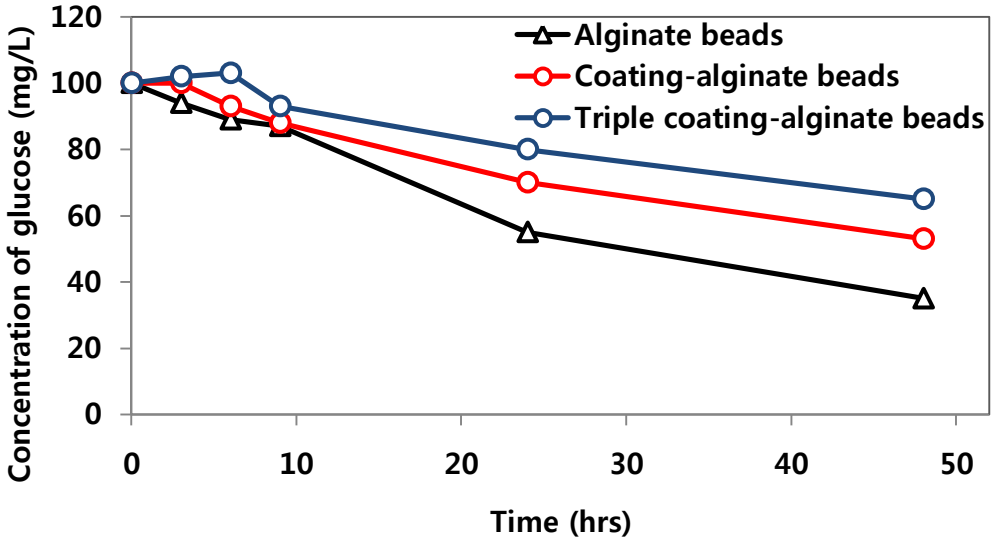


Figure 30 Comparison of (a) quantitative quorum quenching activity and (b) glucose transfer efficiency of triple coating−alginate beads, coating−alginate beads and alginate beads.

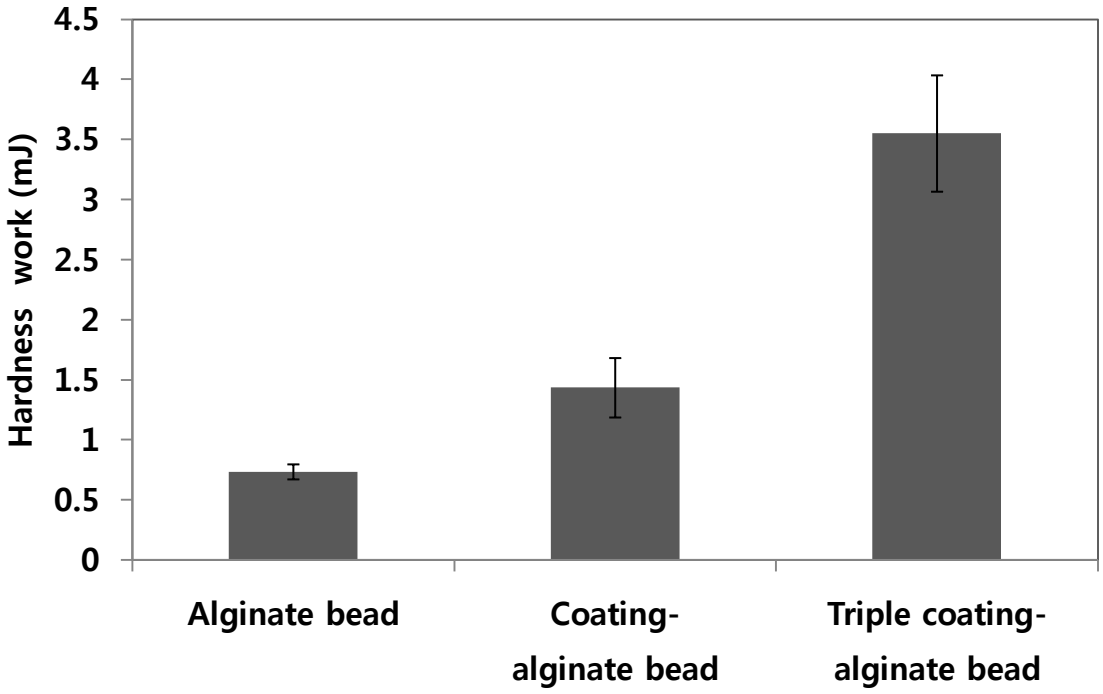


Figure 31 Mechanical strength of triple coating−alginate beads, coating−alginate beads and alginate beads.

Chapter 5. 결론

본 연구의 목적은 하폐수 처리용 분리막 생물반응기에 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드를 적용하여 분리막 오염을 억제하는 것이다. 기존의 알지네이트 비드의 한계점을 보완한 새로운 코팅-알지네이트 비드를 제조하였으며 이를 연속공정 MBR 에 적용하여 분리막 오염 억제 효과를 확인하였고 다음과 같은 결론을 얻었다:

- 상전이법을 이용하여 기존의 알지네이트 비드의 표면을 polysufone 으로 코팅하였으며 미세다공성의 코팅 층이 형성됨을 확인하였다. 코팅 층의 두께는 60 ~ 100 μm 사이로 측정되었으며 finger-like 구조를 형성하였다.

- 제조된 코팅-알지네이트 비드는 기존의 알지네이트 비드에 비해 물리적 강도가 약 2 배 향상되었다. 비드 내부의 미생물이 코팅 층에 의해 보호되었으며 정족수 감지 억제 활성도를 유지한다는 것을 확인하였다.

- 연속공정 MBR 에 정족수 감지 억제 미생물이 고정화된 코팅-알지네이트 비드를 적용하였으며 분리막 오염을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다. 또한 약 50 일간의 MBR 운전 기간 동안 지속적으로 코팅-알지네이트 비드의 성능을 관찰함으로써 장기간 사용 가능성을 확인하였다.

참고문헌

Bajpai, S.K. and Sharma, S. (2004) Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca2+ and Ba2+ ions. Reactive & Functional Polymers 59(2), 129-140.

Bassler, B.L. (1999) How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology 2(6), 582-587.

Bassler, B.L., Wright, M., Showalter, R.E. and Silverman, M.R. (1993) Intercellular Signaling in Vibrio-Harveyi - Sequence and Function of Genes Regulating Expression of Luminescence. Molecular Microbiology 9(4), 773-786.

Bassler, B.L., Wright, M. and Silverman, M.R. (1994) Multiple Signaling Systems Controlling Expression of Luminescence in Vibrio-Harveyi - Sequence and Function of Genes Encoding a 2nd Sensory Pathway. Molecular Microbiology 13(2), 273-286.

Blandino, A., Macias, M. and Cantero, D. (2000) Glucose oxidase release from calcium alginate gel capsules. Enzyme and Microbial Technology 27(3-5), 319-324.

Boyen, F., Eeckhaut, V., Van Immerseel, F., Pasmans, F., Ducatelle, R. and Haesebrouck, F. (2009) Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. Veterinary Microbiology 135(3-4), 187-195.

Byers, J.T., Lucas, C., Salmond, G.P.C. and Welch, M. (2002) Nonenzymatic turnover of an Erwinia carotovora quorum-sensing signaling molecule. Journal of Bacteriology 184(4), 1163-1171.

Camara, M., Williams, P. and Hardman, A. (2002) Controlling infection by tuning in and turning down the volume of bacterial small-talk. Lancet Infectious Diseases 2(11), 667-676.

Chang, I.S. and Lee, C.H. (1998) Membrane filtration characteristics in

membrane-coupled activated sludge system - the effect of physiological states of activated sludge on membrane fouling. Desalination 120(3), 221-233.

Choudhary, S. and Schmidt-Dannert, C. (2010) Applications of quorum sensing in biotechnology. Applied Microbiology and Biotechnology 86(5), 1267-1279.

Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. and Greenberg, E.P. (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science 280(5361), 295-298.

Davis, T.A., Volesky, B. and Mucci, A. (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. Water Res 37(18), 4311-4330.

DeVos, P., DeHaan, B., Wolters, G.H.J. and VanSchilfgaarde, R. (1996) Factors influencing the adequacy of microencapsulation of rat pancreatic islets. Transplantation 62(7), 888-893.

Di Cagno, R., De Angelis, M., Coda, R., Minervini, F. and Gobbetti, M. (2009) Molecular adaptation of sourdough Lactobacillus plantarum DC400 under co-cultivation with other lactobacilli. Research in Microbiology 160(5), 358-366.

Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F. and Zhang, L.H. (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature 411(6839), 813-817.

Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z. and Zhang, L.H. (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of Erwinia carotovora. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(7), 3526-3531.

Drews, A. (2010) Membrane fouling in membrane bioreactors-Characterisation, contradictions, cause and cures. Journal of Membrane Science 363(1-2), 1-28.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. Analytical Chemistry 28(3), 350-356.

Emmanuel, E., Keck, G., Blanchard, J.M., Vermande, P. and Perrodin, Y. (2004) Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater.

Environment International 30(7), 891-900.

Fijan, R., Sostar-Turk, S. and Lapasin, R. (2007) Rheological study of interactions between non-ionic surfactants and polysaccharide thickeners used in textile printing. Carbohydrate Polymers 68(4), 708-717.

Freitas, S.C., Barbosa, M.A. and Martins, M.C.L. (2010) The effect of immobilization of thrombin inhibitors onto self-assembled monolayers on the adsorption and activity of thrombin. Biomaterials 31(14), 3772-3780.

Fuqua, C. and Greenberg, E.P. (2002) Listening in on bacteria: Acyl-homoserine lactone signalling. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3(9), 685-695.

Fuqua, W.C., Winans, S.C. and Greenberg, E.P. (1994) Quorum Sensing in Bacteria - the Luxr-Luxi Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. Journal of Bacteriology 176(2), 269-275.

Futamura, O., Katoh, M. and Takeuchi, K. (1994) Organic Waste-Water Treatment by Activated-Sludge Process Using Integrated Type Membrane Separation. Desalination 98(1-3), 17-25.

George, M. and Abraham, T.E. (2007) pH sensitive alginate-guar gum hydrogel for the controlled delivery of protein drugs. International Journal of Pharmaceutics 335(1-2), 123-129.

Gombotz, W.R. and Wee, S.F. (1998) Protein release from alginate matrices. Advanced Drug Delivery Reviews 31(3), 267-285.

Grant, G.T., Morris, E.R., Rees, D.A., Smith, P.J.C. and Thom, D. (1973) Biological Interactions between Polysaccharides and Divalent Cations - Egg-Box Model. Febs Letters 32(1), 195-198.

Grasdalen, H., Larsen, B. and Smidsrod, O. (1981) C-13-Nmr Studies of Monomeric Composition and Sequence in Alginate. Carbohydrate Research 89(2), 179-191.

Hai, F.I., Yamamoto, K., Fukushi, K. and Nakajima, F. (2008) Fouling resistant compact hollow-fiber module with spacer for submerged membrane bioreactor treating high strength industrial wastewater. Journal of Membrane Science 317(1-2), 34-42.

Hardt, F.W., Clesceri, L.S., Nemerow, N.L. and Washingt.Dr (1970) Solids Separation by Ultrafiltration for Concentrated Activated Sludge. Journal Water Pollution Control Federation 42(12), 2135-&.

Haug, A., Larsen, B. and Smidsrod, O. (1974) Uronic Acid Sequence in Alginate from Different Sources. Carbohydrate Research 32(2), 217-225.

Hentzer, M., Teitzel, G.M., Balzer, G.J., Heydorn, A., Molin, S., Givskov, M. and Parsek, M.R. (2001) Alginate overproduction affects Pseudomonas aeruginosa biofilm structure and function. Journal of Bacteriology 183(18), 5395-5401.

Holden, M.T.G., Chhabra, S.R., de Nys, R., Stead, P., Bainton, N.J., Hill, P.J., Manefield, M., Kumar, N., Labatte, M., England, D., Rice, S., Givskov, M., Salmond, G.P.C., Stewart, G.S.A.B., Bycroft, B.W., Kjelleberg, S.A. and Williams, P. (1999) Quorum-sensing cross talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from Pseudomonas aeruginosa and other Gram-negative bacteria. Molecular Microbiology 33(6), 1254-1266.

Kawaguchi, T., Chen, Y.P., Norman, R.S. and Decho, A.W. (2008) Rapid screening of quorum-sensing signal N-acyl homoserine lactones by an in vitro cell-free assay. Applied and Environmental Microbiology 74(12), 3667-3671.

Kawamoto, T., Uejima, A. and Tanaka, A. (1991) The Operation of Immobilized Biocatalysts in Organic-Solvents. Abstracts of Papers of the American Chemical Society 202, 35-Biot.

Kim, A., Park, S.J. and Lee, J.R. (1998) Stabilization of liquid crystal-in-water dispersion with polymer/surfactant mixture: Nematic curvilinear aligned phase composite film. Journal of Colloid and Interface Science 197(1), 119-125.

Kim, J.S. and Lee, C.H. (2003) Effect of powdered activated carbon on the performance of an aerobic membrane bioreactor: Comparison between cross-flow and submerged membrane systems. Water Environment Research 75(4), 300-307.

Kim, S.R., Oh, H.S., Jo, S.J., Yeon, K.M., Lee, C.H., Lim, D.J., Lee, C.H. and Lee, J.K. (2013) Biofouling Control with Bead-Entrapped Quorum Quenching Bacteria in Membrane Bioreactors: Physical and Biological Effects. Environmental Science & Technology 47(2), 836-842.

Koseoglu, H., Yigit, N.O., Iversen, V., Drews, A., Kitis, M., Lesjean, B. and Kraume, M. (2008) Effects of several different flux enhancing chemicals on filterability and fouling reduction of membrane bioreactor (MBR) mixed liquors. Journal of Membrane Science 320(1-2), 57-64.

Labbate, M., Queek, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M. and Kjelleberg, S. (2004) Quorum sensing-controlled biofilm development in Serratia liquefaciens MG1. Journal of Bacteriology 186(3), 692-698.

Lee, J.C., Kim, J.S., Kang, I.J., Cho, M.H., Park, P.K. and Lee, C.H. (2001) Potential and limitations of alum or zeolite addition to improve the performance of a submerged membrane bioreactor. Water Science and Technology 43(11), 59-66.

Lee, W.N., Kang, I.J. and Lee, C.H. (2006) Factors affecting filtration characteristics in membrane-coupled moving bed biofilm reactor. Water Research 40(9), 1827-1835.

Lehmann, J., Rillig, M.C., Thies, J., Masiello, C.A., Hockaday, W.C. and Crowley, D. (2011) Biochar effects on soil biota - A review. Soil Biology & Biochemistry 43(9), 1812-1836.

Lynch, M.J., Swift, S., Kirke, D.F., Keevil, C.W., Dodd, C.E.R. and Williams, P. (2002) The regulation of biofilm development by quorum sensing in Aeromonas hydrophila. Environmental Microbiology 4(1), 18-28.

Matsuyama, H., Okafuji, H., Maki, T., Teramoto, M. and Kubota, N. (2003) Preparation of polyethylene hollow fiber membrane via thermally induced phase separation. Journal of Membrane Science 223(1-2), 119-126.

Miller, M.B. and Bassler, B.L. (2001) Quorum sensing in bacteria. Annual Review of Microbiology 55, 165-199.

Nunez, M.J. and Lema, J.M. (1987) Cell Immobilization - Application to Alcohol Production. Enzyme and Microbial Technology 9(11), 642-651.

Oh, H.S., Yeon, K.M., Yang, C.S., Kim, S.R., Lee, C.H., Park, S.Y., Han, J.Y. and Lee, J.K. (2012) Control of Membrane Biofouling in MBR for Wastewater Treatment by Quorum Quenching Bacteria Encapsulated in Microporous Membrane. Environmental Science & Technology 46(9), 4877-4884.

Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2000) Acyl-homoserine lactone quorum

sensing in Gram-negative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97(16), 8789-8793.

Parsek, M.R., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E. and Greenberg, E.P. (1999) Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(8), 4360-4365.

Phattaranawik, J., Fane, A.G., Pasquier, A.C.S. and Bing, W. (2007) Membrane bioreactor with bubble-size transformer: Design and fouling control. Aiche Journal 53(1), 243-248.

Reuvers, A.J., Vandenberg, J.W.A. and Smolders, C.A. (1987) Formation of Membranes by Means of Immersion Precipitation .1. A Model to Describe Mass-Transfer during Immersion Precipitation. Journal of Membrane Science 34(1), 45-65.

Romera, E., Gonzalez, F., Ballester, A., Blazquez, M.L. and Munoz, J.A. (2006) Biosorption with algae: A statistical review. Critical Reviews in Biotechnology 26(4), 223-235.

Rosenberger, S., Helmus, F.P., Krause, S., Bareth, A. and Meyer-Blumenroth, U. (2011) Principles of an enhanced MBR-process with mechanical cleaning. Water Science and Technology 64(10), 1951-1958.

Rudrappa, T. and Bais, H.P. (2008) Curcumin, a known phenolic from curcuma longa, attenuates the virulence of Pseudomonas aeruginosa PAO1 in whole plant and animal pathogenicity models. Journal of Agricultural and Food Chemistry 56(6), 1955-1962.

Sainbayar, A., Kim, J.S., Jung, W.J., Lee, Y.S. and Lee, C.H. (2001) Application of surface modified polypropylene membranes to an anaerobic membrane bioreactor. Environmental Technology 22(9), 1035-1042.

Schaefer, A.L., Hanzelka, B.L., Eberhard, A. and Greenberg, E.P. (1996) Quorum sensing in Vibrio fischeri: Probing autoinducer-LuxR interactions with autoinducer analogs. Journal of Bacteriology 178(10), 2897-2901.

Schroer, H.P. and Augsten, K. (1978) Lowry Method of Protein Determination. Zeitschrift Fur Chemie 18(10), 391-392.

Simpson, N.E., Stabler, C.L., Simpson, C.P., Sambanis, A. and Constantinidis, L. (2004) The role of the CaCl2-guluronic acid interaction on alginate encapsulated beta TC3 cells. Biomaterials 25(13), 2603-2610.

Smidsrod, O. and Skjakbraek, G. (1990) Alginate as Immobilization Matrix for Cells. Trends in Biotechnology 8(3), 71-78.

Surette, M.G. and Bassler, B.L. (1998) Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(12), 7046-7050.

Surette, M.G., Miller, M.B. and Bassler, B.L. (1999) Quorum sensing in Escherichia coli, Salmonella typhimurium, and Vibrio harveyi: A new family of genes responsible for autoinducer production. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96(4), 1639-1644.

Tan, K.T. and Obendorf, S.K. (2007) Development of an antimicrobial microporous polyurethane membrane. Journal of Membrane Science 289(1-2), 199-209.

vandeWitte, P., Dijkstra, P.J., vandenBerg, J.W.A. and Feijen, J. (1996) Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. Journal of Membrane Science 117(1-2), 1-31.

Wang, N., Adams, G., Buttery, L., Falcone, F.H. and Stolnik, S. (2009) Alginate encapsulation technology supports embryonic stem cells differentiation into insulin-producing cells. Journal of Biotechnology 144(4), 304-312.

Waters, C.M. and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. Annual Review of Cell and Developmental Biology 21, 319-346.

Wen, Z.T. and Burne, R.A. (2004) LuxS-mediated signaling in Streptococcus mutans is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. Journal of Bacteriology 186(9), 2682-2691.

Withers, H., Swift, S. and Williams, P. (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. Current Opinion in Microbiology 4(2), 186-193.

Wu, J.L., Chen, F.T., Huang, X., Geng, W.Y. and Wen, X.H. (2006) Using inorganic coagulants to control membrane fouling in a submerged membrane

bioreactor. Desalination 197(1-3), 124-136.

Xiong, Y.H. and Liu, Y. (2010) Biological control of microbial attachment: a promising alternative for mitigating membrane biofouling. Applied Microbiology and Biotechnology 86(3), 825-837.

Xu, F., Byun, T., Deussen, H.J. and Duke, K.R. (2003) Degradation of N-acylhomoserine lactones, the bacterial quorum-sensing molecules, by acylase (vol 101, pg 89, 2003). Journal of Biotechnology 102(1), 99-99.

Yamamoto, K., Hiasa, M., Mahmood, T. and Matsuo, T. (1989) Direct Solid-Liquid Separation Using Hollow Fiber Membrane in an Activated-Sludge Aeration Tank. Water Science and Technology 21(4-5), 43-54.

Yates, E.A., Philipp, B., Buckley, C., Atkinson, S., Chhabra, S.R., Sockett, R.E., Goldner, M., Dessaux, Y., Camara, M., Smith, H. and Williams, P. (2002) N-acylhomoserine Lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of Yersinia pseudotuberculosis and Pseudomonas aeruginosa. Infection and Immunity 70(10), 5635-5646.

Yeon, K.M., Cheong, W.S., Oh, H.S., Lee, W.N., Hwang, B.K., Lee, C.H., Beyenal, H. and Lewandowski, Z. (2009a) Quorum Sensing: A New Biofouling Control Paradigm in a Membrane Bioreactor for Advanced Wastewater Treatment. Environmental Science & Technology 43(2), 380-385.

Yeon, K.M., Lee, C.H. and Kim, J. (2009b) Magnetic Enzyme Carrier for Effective Biofouling Control in the Membrane Bioreactor Based on Enzymatic Quorum Quenching. Environmental Science & Technology 43(19), 7403-7409.

Yeon, K.M., Parka, J.S., Lee, C.H. and Kim, S.M. (2005) Membrane coupled high-performance compact reactor: A new MBR system for advanced wastewater treatment. Water Research 39(10), 1954-1961.

Yoon, S.H. and Collins, J.H. (2006) A novel flux enhancing method for membrane bioreactor (MBR) process using polymer. Desalination 191(1-3), 52-61.

Yu, H.Y., He, J.M., Liu, L.Q., He, X.C., Gu, J.S. and Wei, X.W. (2007) Photoinduced graft polymerization to improve antifouling characteristics of an SMBR. Journal of Membrane Science 302(1-2), 235-242.

Zeman, L. and Fraser, T. (1993) Formation of Air-Cast Cellulose-Acetate Membranes .1. Study of Macrovoid Formation. Journal of Membrane Science 84(1-2), 93-106.

Zeman, L. and Fraser, T. (1994) Formation of Air-Cast Cellulose-Acetate Membranes .2. Kinetics of Demixing and Microvoid Growth. Journal of Membrane Science 87(3), 267-279.

Abstract

Membrane bioreactor (MBR) have become increasingly popular in water reuse due to their advantages like high quality effluent, but the membrane biofouling, the main drawback of MBR, still limit their widespread application in water reuse. It is known that quorum sensing (QS) by signal molecules, N-acyl homoserine lactone (AHL), plays an important role in the formation of biofilm on the membrane surface in MBR. In detail, it was proven that bacterial quorum quenching (QQ) of signal molecules of gram-negative bacteria could effectively alleviate membrane biofouling.

Recent study has been reported that calcium alginate beads were adopted as immobilization matrix of quorum quenching bacteria, taking into account their high biocompatibility and easy preparation. Alginate microbial beads demonstrated effective biofouling control in lab-scale MBR with synthetic wastewater, however, they have alginate decomposition problem due to hydrogel properties. Alginate beads need a technical improvement in terms of QQ activity and stability under harsh conditions and long term operation periods in a real MBR plant.

In this study, coating of alginate bead by a membrane-like layer was proposed to promote more stable immobilization of QQ bacteria. Such membrane coated alginate beads were prepared by phase inversion method outside the alginate bead entrapping QQ bacteria. The thickness of polymer coating ranges from 60 to 100 μm. The polymeric coating maintained the nutrient transfer efficiency, also enhanced both mechanical strength and chemical stability to a large extent. A successful anti-biofouling performance of membrane coated alginate beads was confirmed in the continuous operation of MBRs during 50 days.

Keywords: Membrane bioreactor (MBR), Quorum sensing, Quorum quenching bacteria, Biofouling, Cell immobilization, Wastewater treatment

Student number: 2012-20938