

역삼투 해수담수화 공정 내 바이오필름 형성 미생물의 부착 및 고압내성 특성

정지연 · 이진욱 · 김성연 · 김인수^{†,*}

광주과학기술원 환경공학과 · *해수담수화 플랜트 사업단

(2008년 11월 20일 접수, 2009년 1월 30일 채택)

Adhesion Characteristics and the High Pressure Resistance of Biofilm Bacteria in Seawater Reverse Osmosis Desalination Process

Ji-Yeon Jung · Jinwook Lee · Sungyouon Kim · In S. Kim^{†,*}

Department of Environmental Science and Engineering, GIST · *Center for Seawater Desalination Plant

ABSTRACT : Biofouling in seawater reverse osmosis (SWRO) desalination process causes many problems such as flux decline, biodegradation of membrane, increased cleaning time, and increased energy consumption and operational cost. Therefore biofouling is considered as the most critical problem in system operation. To control biofouling in early stage, detection of the most problematic bacteria causing biofouling is required. In this study, six model bacteria were chosen; *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, and *Rhodobacter sp.* based on report in the literature and phylogenetic analysis of seawater intake and fouled RO membrane. The adhesion to RO membrane, the high pressure resistance, and the hydrophobicity of the six model bacteria were examined to find out their fouling potential. *Rhodobacter sp.* and *Mycobacterium sp.* were found to attach very well to RO membrane surface compared to others used in this study. The test of hydrophobicity revealed that the bacteria which have high hydrophobicity or similar contact angle with RO membrane (63° of contact angle) easily attached to RO membrane surface. *P. aeruginosa* which is highly hydrophilic (23.07° of contact angle) showed the least adhesion characteristic among six model bacteria. After applying a pressure of 800 psi to the sample, *Rhodobacter sp.* was found to show the highest reduction rate; with 59-73% of the cells removed from the membrane under pressure. *P. fluorescens* on the other hand analyzed as the most pressure resistant bacteria among six model bacteria. The difference between reduction rates using direct counting and plate counting indicates that the viability of each model bacteria was affected significantly from the high pressure. Most cells subjected to high pressure were unable to form colonies even though they maintained their structural integrity.

Key Words : SWRO, Biofouling, RO Membrane, Adhesion, High Pressure Resistance, Contact Angle

요약 : 역삼투 해수담수화(SWRO)공정의 큰 문제점 중 하나인 biofouling 현상을 초기에 감지하기 위한 센서 개발의 선행 연구로써, 본 연구는 역삼투막에 바이오필름을 형성하는 문제성 있는 박테리아를 센서의 타겟 박테리아로 제시하는 것에 중점을 두었다. 문헌조사와 실제 해수담수화 공정에서 사용된 해수 원수와 오염된 역삼투막에 존재하는 박테리아를 계통발생학적으로 분석한 결과를 토대로 *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Mycobacterium sp.*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, 그리고 *Rhodobacter sp.*의 여섯 종의 모델 박테리아를 선정하였고, 선정된 모델 박테리아 중, 막 오염 잠재력을 가진 종을 찾아내기 위해 각각 박테리아의 역삼투막 부착 능력, 고압내성, 그리고 소수성을 비교 분석하였다. 그 결과, 역삼투막 부착능력은 *Rhodobacter sp.*와 *Mycobacterium sp.*가 뛰어났으며 소수성이거나 역삼투막(접촉각 약 63°)과 비슷한 접촉각을 가진 박테리아가 역삼투막에 잘 부착하였다. 800 psi의 고압을 적용 한 후, *Rhodobacter sp.*는 여섯 종류의 모델 박테리아 중 59-73%의 가장 큰 개체수의 감소를 보였고, *P. fluorescens*는 1-29%로 가장 높은 고압내성을 보였다. 부착, 소수성, 고압내성 특성을 통한 역삼투막에 biofouling을 유발하는 영향력 있는 박테리아 선정 실험 결과, 여섯 종류의 모델 박테리아 중 *Mycobacterium sp.*가 부착 능력이 뛰어나고 높은 소수성 특성을 가지며, 800 psi의 고압에서도 50% 이상의 cell의 생물학적 활성능력을 가지고 있어, 막 오염을 유발시키는 가장 잠재력 있는 박테리아로 분석되었다.

주제어 : 해수담수화, Biofouling, 역삼투막, 고압내성 특성, Contact Angle

1. 서론

가속화되는 지구 온난화와 가뭄 등의 기후 변화로 인하여 우리나라를 포함한 많은 나라들이 물 부족의 상황에 처

해 있다. 이런 상황에서 해수담수화 공정은 미래 수자원 확보를 위한 첨단 기술로서 각광 받고 있으며 주로 역삼투막을 이용한 해수담수화 공정(SWRO 공정)이 많이 사용되고 있는 추세이다.¹⁾ 2005년 말 기준 세계적으로 약 4,000 만m³/일의 해수담수화 시설이 운영되고 있고, 역삼투 방식은 그 중 45%를 차지하고 있으며, 2015년까지 61%로 증가할 추세이며, 에너지 소비를 줄이고 생산 수 단가를 내

[†] Corresponding author
E-mail: iskim@gist.ac.kr
Tel: 062-970-2436

Fax: 062-970-2434

리기 위한 대규모 연구도 아울러 진행되고 있다.²⁾ 우리나라의 경우, 도서 지역 물 문제 해결을 위해 약 70개 시설(5,763 m³/일)을 운영 중이고 전체 시설 중 약 83%가 소규모 역삼투 방식을 채택하고 있다.³⁾

역삼투막을 이용한 해수담수화 공정의 문제점 중 하나인 막오염 현상은, 무기물, 입자와 콜로이드, 유기물, 그리고 생물학적 막오염(biofouling)으로 구분된다.⁴⁻⁶⁾ 특히 해수 중에 존재하는 미생물과 미생물이 배출하는 EPS (extracellular polymeric substances)로 인하여 형성된 바이오필름이 심화되면서 생기는 biofouling 현상은 역삼투막을 이용한 해수담수화 공정에서 가장 큰 문제점 중 하나이다.^{7,8)} 막에 형성된 바이오필름 및 biofouling 현상은 플럭스 감소, 막의 부식과 잦은 세척을 유도하고 막의 수명을 단축시키며, 결국 에너지와 비용의 증가를 유발 시키게 된다.^{9,10)} 이런 현상을 유도하는 biofouling은 다음의 과정을 통하여 형성된다.^{8,9,11)}

- (i) 유기물질이 붙은 역삼투막에 미생물의 불가역적인 이동과 부착
- (ii) 부착된 미생물의 성장과 대사, 콜로니의 형성
- (iii) EPS 합성의 증가, 바이오필름의 3차원 구조 형성
- (iv) 미생물의 탈착으로 인한 평형상태 유지

한번 막에 바이오필름이 형성되기 시작하면 미생물이 급속히 콜로니를 형성하게 되므로¹²⁾ 주기적인 세척으로 biofouling이 심화되는 것을 방지하는 것이 필수적이다¹³⁾ 잦은 세척으로 인하여 막의 수명이 단축되는 단점이 있다. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* 등이 해수담수화 공정의 역삼투막에서 주로 발견 되는 박테리아 그룹으로 보고되고 있으며,^{17,21)} 보다 효율적인 biofouling 제어를 위해서 이와 같은 바이오필름 형성 미생물의 조기 감지가 중요하다고 판단된다. 본 연구에서는 이를 위한 선행 연구로 역삼투막의 바이오필름으로부터 분석된 박테리아 그룹 중, 고압내성과 부착 능력의 관점에서 바이오필름 형성을 유발하는 가장 잠재력 있는 박테리아를 선정하고자 하였다.

문헌조사를 통하여 선정한 3종의 박테리아 *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Pseudomonas fluorescens* (*P. fluorescens*)^{11,21-23)}와, 실제 운영중인 해수담수화 플랜트에서 사용된 오염된 역삼투막과 원수로부터 분석한 *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Rhodobacter sp.*를 포함, 모두 여섯 종을 실험을 위한 모델 박테리아로 선정하였다.

선정된 모델 박테리아 중 가장 막 오염 잠재력을 가진 종을 찾아내기 위해 각각 박테리아의 역삼투막 부착 능력, 해수담수화 공정의 고압에 견뎌내는 고압내성 특성을 SEM과 박테리아 계수를 통하여 비교하였고, 모델 박테리아의 소수성을 contact angle goniometer을 이용하여 비교 분석하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 계통발생학적 박테리아 분석을 위한 16S rRNA

유전자 클로닝

100 MIGD (454,600 m³/day)의 담수를 생산하는 중동에 위치한 실제 해수담수화 플랜트의 해수 원수와 역삼투막에 형성된 바이오필름을 계통발생학적 분석을 위하여 16S rRNA 유전자 클로닝과 염기서열 분석을 시행하였다. 시료의 DNA 추출에는 phenol-chloroform-isoamyl alcohol (PCI; 25:24:1)을 이용한 DNA 추출법¹⁴⁾을 사용하였고, 이때 높은 효율을 위하여 유리 beads를 이용하여 박테리아 세포를 물리적으로 깨주었다. 추출된 DNA를 일반적인 박테리아의 프라이머로 사용하는 9F (5'-GAG TTT GAT CCT GGC TCA G-3')와 1512R (5'-ACG GHT ACC TTG TTA CGA CTT-3')¹⁵⁾을 이용하여 PCR (polymerase chain reaction)을 하여 16S rRNA 유전자를 증폭 시킨 후, PCR 산물을 정제를 하였다. 이때 PCR 과정은 94°C에서 10분 denaturation 과정을 거친 후, 94°C에서 30초, 55°C에서 30초, 그리고 72°C에서 1분의 과정을 한 사이클로 34번 반복하고, 72°C에서 7분 extension시켰다. 정제된 PCR 산물은 pGEM T-easy cloning kit (RC001, RBC Bioscience, Taiwan)를 이용하여 클로닝 한 후 competent cell에 형질 전환시켰다. Competent cell을 X-gal과 IPTG (isopropyl β-D thiogalactoside)가 포함된 LB agar에 배양하면 흰색과 파란색 콜로니가 형성되며, 형질전환이 잘 된 cell은 락토오스 유사 물질인 X-gal을 정상 분해하지 못하여 흰색 콜로니를 형성하게 된다. 흰색을 띄는 콜로니만 선별하여 콜로니의 플라스미드를 프라이머 m13F (5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3')와 m13R (5'-TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C-3')로 colony PCR을 한 후 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석 후 데이터의 분석은 Kim et al.¹⁶⁾의 방법을 이용하였다.

2.2. 박테리아 분양 및 배양

실제 해수담수화 플랜트에서 사용된 해수 원수와 역삼투막에 형성된 바이오필름의 16S rRNA 유전자 클로닝 및 염기서열 분석 결과를 토대로 우점 가능한 대표 박테리아와 문헌 조사를 통하여, 실험을 위한 총 여섯 종의 모델 박테리아를 선정 하였다.

한국생명공학연구원 생물자원센터에서 본 연구를 위하여 선정된 여섯 종의 박테리아를 분양 받아 실험을 수행하였다. 각각의 박테리아는 지정된 배지에 배양 하였으며 그 정보는 Table 1에 나타내었다. 박테리아 배양에 사용된 고체 배지는 상용화 되어있는 tryptone glucose extract agar (difco 0002), marine agar (difco 0979), R2A agar (difco 1826-17)를 사용하였고, nutrient agar의 경우 nutrient broth (difco 0003-1)에 agar (Junsei, Japan)를 2%가 되게 섞어서 사용하였다. 그리고 실험에 사용된 액체 배지로는 marine broth, nutrient broth를 사용하였고, tryptone glucose extract agar와 R2A agar는 GF/C를 이용하여 agar를 걸러낸 후 배지로 이용하였다.

Table 1. Model bacteria for SWRO biofouling study

Name	Classification	Growth condition	
<i>Bacillus sp.</i>	Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Bacillaceae; Bacillus	MA ^{a)}	Gram(+)
<i>Mycobacterium sp.</i>	Bacteria; Actinobacteria; Actinomycetales; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae; Mycobacterium	TG ^{b)}	
<i>Flavobacterium sp.</i>	Bacteria; Bacteroidetes/Chlorobi group; Bacteroidetes; Flavobacteria; Flavobacteriales; Flavobacteriaceae	MA	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas	NA ^{c)}	Gram(-)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Bacteria; Proteobacteria; Gamma Proteobacteria; Pseudomonadales; Pseudomonadaceae; Pseudomonas	NA	
<i>Rhodobacter sp.</i>	Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhodobacterales; Rhodobacteraceae	R2A	

^{a)} MA: marine agar, ^{b)} TG: tryptone glucose extract agar, ^{c)} NA: nutrient agar

2.3. 모델 박테리아의 역삼투막 부착 능력 실험

본 실험에는 국내 A사에서 제공한 폴리아미드(polyamide)계로 5,200 GPD (gallons per day)에서 99.65%의 염 제거율과, 32,000 ppm NaCl, 800 psi, 25°C, pH 8, 5 ppm boron의 조건에서 boron 제거율이 86%인 역삼투막을 사용하였다.

각각의 액체배지에 배양한 모델 박테리아를 원심분리기로 (8,000 rpm, 10분) 박테리아 세포를 모은 후, PBS (phosphate buffered saline)를 이용하여 1×10^8 cells/mL로 맞추어 50 mL 코니칼 튜브에 각각 2 mL씩 넣는다. 지름 2 cm로 잘라놓은 역삼투막을 막의 표면(3.14 cm²)이 시료와 닿게 띄워 28°C, 80 rpm의 shaking water bath (HB-205sw, HANBAEK, Korea)에서 48시간 배양 시키면서 박테리아를 막의 표면에 부착시켰다. 이때 박테리아를 1×10^8 cells/mL로 실험을 수행한 이유는 역삼투막에 형성된 biofouling을 연구한 문헌에 의하면 평균 약 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ cells/mL 이상의 박테리아가 해수 원수에 존재 하는 것으로 보고되었기 때문이다.^{17~19)}

2.4. Dead-end filtration cell을 이용한 여섯 종류의 모델 박테리아의 고압내성 실험

SWRO공정에서는 담수를 생산해 내기 위하여 일반적으로 약 60~80 bar의 압력을 이용한다.^{20,21)} 이런 고압의 조건에서도 역삼투막에 biofouling현상이 일어나고 있으며, 본 실험에서는 여섯 종의 모델 박테리아에 고압을 가하여 고압내성 특성을 분석하였다. 공기의 압력을 이용하여 역삼투막에 고압을 가할 수 있도록 설계한 dead-end filtration cell의 모식도를 Fig. 1에 나타내었다. Dead-end filtration cell에 spacer와 미리 모델 박테리아를 부착시켜 놓은 역삼투막을 끼운 후, 실제 해수담수화 공정에서 이용되는 800 psi를 가해 주었다. 압력 없이 박테리아만 부착시킨 역삼투막과 압력을 가한 역삼투막의 표면 이미지를 SEM (scanning electron microscope, HITACHI S-4700, Japan) 이용하여 비교 관찰하였다. SEM을 위한 전처리로 역삼투막을 2% glutaraldehyde에 2시간 처리하여 박테리아를 고정시키고, 50%, 80%, 90%, 그리고 98% 에탄올에 각각 10분씩 탈수

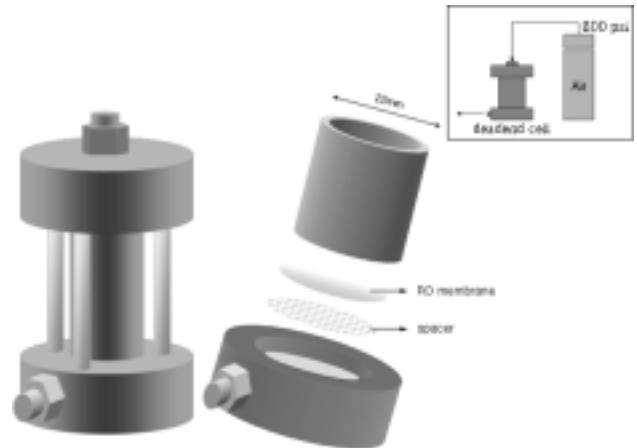


Fig. 1. Illustration and scheme of dead-end filtration cell.

과정을 거친 후 데시케이터에 밤새 건조시켜 수분을 완전히 제거 하였다.

박테리아의 계수를 위하여, DAPI염색 후 형광현미경 관찰을 통한 직접계수법과 지정된 배지를 이용한 평판배양법, 두 가지 방법을 적용하였고, 두 방법의 비교를 통하여 압력을 가한 후 박테리아가 세포의 형태를 유지하고 있지만 생물학적 활성 능력(viability)이 있는지 여부를 분석하였다.

2.4.1. 직접계수법

1 mL의 PBS가 담긴 e-tube에 박테리아만 부착된 역삼투막과 박테리아 부착 후 압력을 가한 역삼투막을 각각 넣고 sonicator (BRANSON 5510E-DTH, USA)를 이용하여 10분 동안 표면에 붙은 박테리아를 떨어냈다. 직접 계수를 위해, 시료를 10배 희석하여 지름이 25 mm인 black polycarbonate membrane (Nuclepore®, USA)으로 여과 한 후, 슬라이드 글라스에 올리고 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)를 이용하여 약 10분 동안 박테리아를 염색을 하였다. 염색된 시료의 이미지 촬영에는 HBO mercury lamp를 light source로 사용하는 CLSM (confocal laser scanning microscope, LSM 5 PASCAL, Carl Zeiss, Germany)을 이용하였으며, 40배 대물 렌즈 (Zeiss, 1.2 W Korr, Germany)

로 각 시료당 183.1 × 137 μm²의 면적을 10군데 이상 무작위로 촬영 후 이미지분석 소프트웨어(i-solution, Korea)로 박테리아를 계수하였다.

2.4.2. 평판배양법

Sonicator를 이용하여 역삼투막으로부터 털어낸 모델 박테리아를 박테리아의 종류에 따라 10~20배 희석하여 각 시료에서 20 μL를 고체배지(Table 1)에 도말 하였다. 28℃ 배양기에서 박테리아의 종류에 따라 24시간 이상 배양 후, 배지 위에 자라난 콜로니의 수를 세어 cm² 단위 당 CFU (colony forming unit)로 환산하였다.

2.5. Contact angle을 이용한 박테리아의 소수성 측정

액체배지 50 mL에 각각의 모델 박테리아(1 × 10⁸ cells/mL)를 48시간 배양시킨 후 공극의 크기가 0.2 μm인 필터를 이용하여 인위적으로 막의 표면이 모두 덮일 정도의 바이오필름을 형성시킨 후, 데시케이터에서 24시간 동안 충분히 건조 시켰다. Contact angle goniometer (model 100, Ramé-Hart, Inc. USA)로 물방울을 2 μL를 건조된 모델 박테리아 바이오필름 위에 떨어뜨려 즉시 물방울의 접촉각을 측정하였다. 이때, 데시케이터에서 건조 시 형성될 수 있는 crack등으로 발생할 수 있는 오차 값을 고려하여, 각 박테리아마다 10번 접촉각을 측정 후 평균을 나타냄으로써 오차를 최소화하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1. 모델 박테리아의 선정

실제로 해수담수화 공정에서 이용된 해수 원수와 오염된 역삼투막의 바이오필름을 16S rRNA 유전자 클로닝을 이용하여 박테리아를 분석한 결과를 Table 2에 나타냈다.

원수에서 분석된 박테리아 중 uncultured bacteria를 제외

하고 Bacteroidetes (22%)와 Alphaproteobacteria (20%)가 가장 많은 부분을 차지하였고, 역삼투막의 바이오필름에 형성된 박테리아 분석 결과, 이외에도 Firmicutes의 Bacillales가 6%로 분석되었다. 이중 원수의 Bacteroidetes의 87.5%가 Flavobacteria로, Alphaproteobacteria 중에서는 Rhodobacteraceae가 46.67%로 가장 많은 부분을 차지하고 있었다 (데이터는 나타내지 않음). 분석된 결과(Table 2)를 근거로 하여 Bacteroidetes의 *Flavobacteria sp.*, Alphaproteobacteria의 *Rhodobacter sp.*, 그리고, Firmicutes의 *Bacillus sp.*을 본 실험을 위한 모델 박테리아로 선정하였다.

이외에도 문헌 조사를 통하여 *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas fluorescens (P. fluorescens)*, *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)*의 3종의 모델 박테리아를 추가로 선정하였다. *Mycobacterium sp.*는 역삼투막에 형성된 biofouling의 초기 진행단계에 연관되어 있고 다른 박테리아 보다 역삼투막에 쉽게 부착하는 종으로 보고하고 있다.²¹⁾ *P. fluorescens*와 *P. aeruginosa*는 ATR-FTIR (attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy)을 이용한 바이오필름 모니터링,²²⁾ 역삼투막에 형성된 바이오필름의 생리학적, 유전학적 연구,¹¹⁾ 바이오필름 형성에 대한 biocide²³⁾ 등 바이오필름 연구에 광범위하게 연구되는 박테리아이다.

3.2. 모델 박테리아의 역삼투막 부착능력과 소수성

여섯 종의 모델박테리아를 이용하여 역삼투막 표면에 부착 실험을 한 결과, *Rhodobacter sp.*가 2.04 × 10⁷ (±0.24) cells/cm²로 가장 많이, *P. aeruginosa*가 4.87 × 10⁶ (±1.69) cells/cm²로 가장 적게 역삼투막에 부착되었음을 알 수 있다(Fig. 2).

서로 다른 모델 박테리아의 역삼투막 부착 능력이 각각 다르고, 이러한 특성이 각각 박테리아 세포의 소수성과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 접촉각을 측정해 보았다. 박테리아의 물리화학적 표면특성이 그 박테리아가 막을 비

Table 2. Phylogenetic analysis using 16s rRNA gene cloning

Phylum	Class	seawater intake		biofilm on RO membrane	
		No. of clones	%	No. of clones	%
Proteobacteria	Alphaproteobacteria	13	20%	31	28%
	Gammaproteobacteria	7	11%	8	7%
	Deltaproteobacteria	1	2%	0	0%
Firmicutes	Bacillales	0	0%	7	6%
Planctomycetes	Planctomycetacia	0	0%	5	4%
Acidobacteria	Acidobacteriaceae	0	0%	0	0%
Bacteroidetes	Sphingobacteria	2	3%	1	1%
	Flavobacteria	14	22%	0	0%
Nitrospirae	Nitrospira	0	0%	0	0%
Deferribacteres	Deferribacteres	0	0%	0	0%
Chloroflexi	Chloroflexi	0	0%	0	0%
	uncultured bacteria	28	43%	60	54%
	sum	65	100%	112	100%

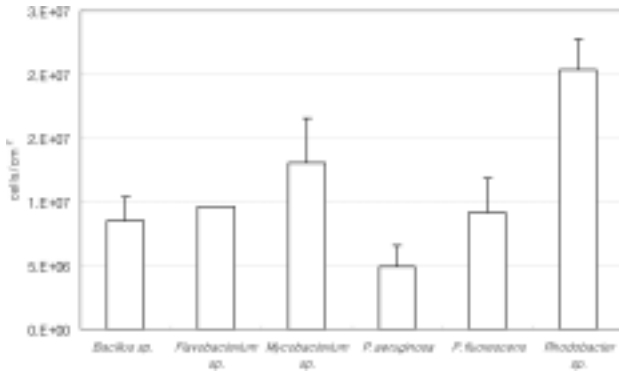


Fig. 2. Adhesion of six model bacteria to RO membrane.

Table 3. Contact angle of RO membrane on six model bacteria

Name	contact angle (°)	standard error (°)
RO membrane	62.91	1.07
<i>Bacillus sp.</i>	33.23	1.20
<i>Flavobacterium sp.</i>	12.31	0.73
<i>Mycobacterium sp.</i>	102.78	0.55
<i>P.aeruginosa</i>	23.07	0.69
<i>P.fluorescens</i>	46.94	1.57
<i>Rhodobacter sp.</i>	35.01	0.85

롯한 여러 표면에 부착하는 능력의 연관성을 연구하기 위하여 소수성, 표면자유에너지, 표면 전하와 zeta potential 등을 주로 연구하고 있으며,²⁴⁾ 접촉각 측정을 통해 알 수 있는 표면의 소수성의 변화는 물방울의 각도로 반영되는 표면에너지의 변화와 직접적으로 연관이 있다고 밝혀져 있다.²⁵⁾ 여섯 종의 모델 박테리아의 바이오필름을 인위적으로 생성시켜 물방울의 접촉각을 측정한 결과, *Mycobacterium sp.*의 접촉각이 102.78 (±0.55)°로 가장 높게 측정되었고, 그 다음이 *P. fluorescens*, *Rhodobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *P. aeruginosa* 순으로 높았고, *Flavobacterium sp.*이 12.31 (±0.73)°로 가장 작은 값으로 측정되었다. 이는 본 연구에서 사용된 역삼투막의 접촉각이 이 62.91 (±1.07)°인 것에 비해 *Mycobacterium sp.*을 제외한 모든 종이 역삼투막보다 친수성 성질을 띠는 것을 확인할 수 있다(Table 3).

역삼투막에 잘 부착하는 *Mycobacterium sp.*과 *Rhodobacter sp.* 경우 상대적으로 소수성이 강하고, 막에 제일 적게 부착되었던 *P. aeruginosa*는 접촉각이 23.07°으로 높은 친수성을 보이고 있다.

3.3. 모델 박테리아의 고압내성 특성

실제 SWRO 공정에서 이용하는 800 psi를 모델 박테리아가 붙어 있는 역삼투막에 가해 주어 그 표면 이미지를 SEM을 통해 관찰 한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. *Bacillus sp.*, *Mycobacterium sp.*, 그리고 *Rhodobacter sp.*는 800 psi의 압력을 가한 후에 셀이 파괴되거나 그 형태가 변형된 이미지를 보이고 있으나, 나머지 3종에서는 외관상 전혀 변함이 없거나 그 차이가 미미하였다.

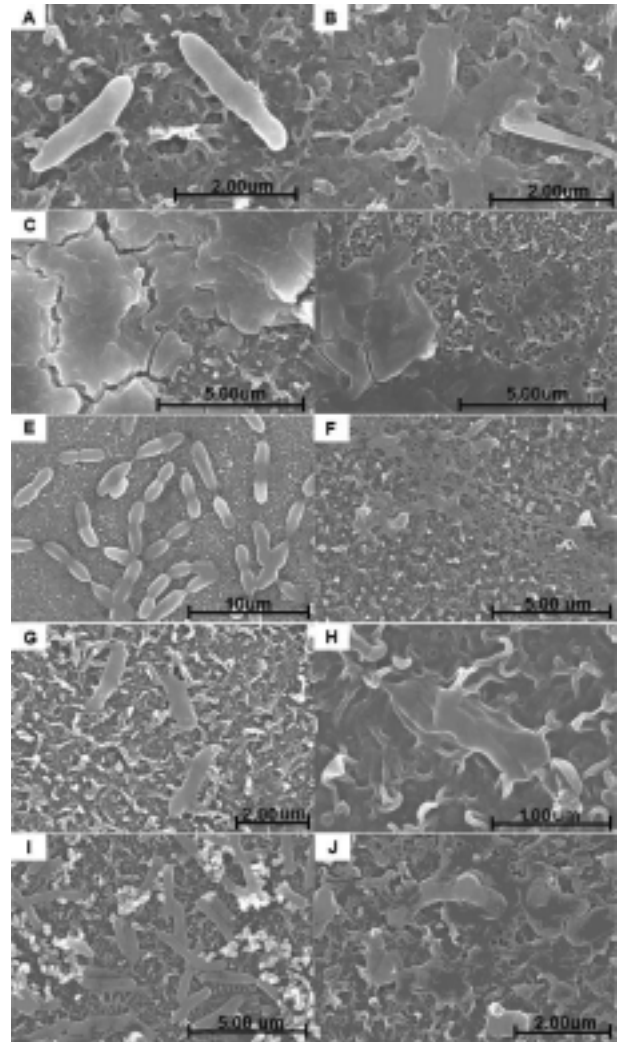


Fig. 3. SEM images of six model bacteria w/, w/o 800 psi application; (A) *Bacillus sp.* w/o pressure, (B) *Bacillus sp.* w/ 800 psi application, (C) *Mycobacterium sp.* w/o pressure, (D) *Mycobacterium sp.* w/ 800 psi application, (E) *Rhodobacter sp.* w/o pressure, (F) *Rhodobacter sp.* w/ 800 psi application, (G) *P. fluorescens* w/o pressure, (H) *P. fluorescens* w/ 800 psi application, (I) *Flavobacterium sp.* w/ 800 psi application, (J) *P. aeruginosa* w/ 800 psi application.

특히 Fig. 3의 D와 F에서 EPS로 추정되는 물질이 실처럼 뻗어있는 현상을 관찰 할 수 있는데 이러한 현상은 control에서는 볼 수 없고 압력을 가해준 sample에서만 나타나고 있었다. 하지만 SEM으로 관찰한 이미지만을 통해서 고압으로 인한 박테리아의 형태 변화나 사멸 정도를 확인하기 어려웠다.

Sonicator를 이용하여 역삼투막에서 박테리아를 털어내어 계수한 것을 Fig. 5와 6에 나타내었다. 시료에 DAPI 형광염색을 한 후 CLSM을 이용하여 박테리아를 직접 계수한 결과(Fig. 4)와 평판배양법을 이용하여 지정된 배지(Table 1)에 박테리아를 도말하여 CFU를 계수한 결과(Fig. 5)는 비교적 비슷한 양상을 보이고 있었다. 본 실험에서

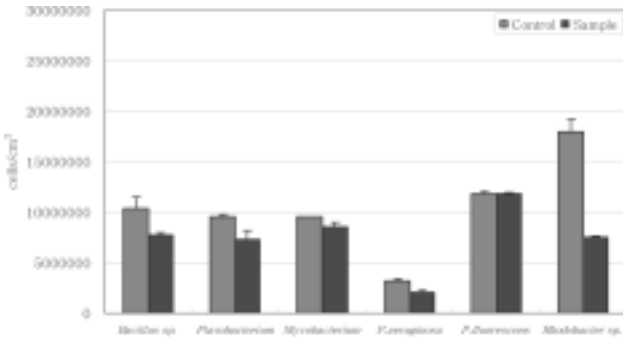


Fig. 4. Direct cell counting using DAPI staining and CLSM of control (w/o 800 psi application) and sample (w/ 800 psi application).

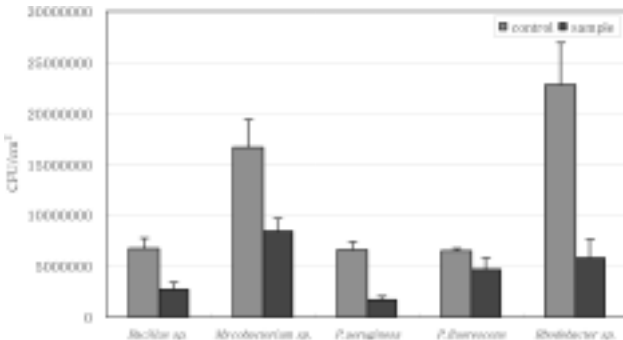


Fig. 5. Plate cell counting of control (w/o 800 psi application) and sample(w/ 800 psi application).

모델 박테리아가 부착된 역삼투막에 압력을 가하지 않은 것을 ‘control’, 800 psi의 압력을 가한 것을 ‘sample’로 표기하였다.

직접계수법과 평판배양법을 이용한 계수 법 모두에서 800 psi의 압력을 가해준 후의 여섯 종류의 모든 박테리아에서 그 수가 줄어들었음을 관찰 할 수 있었으나, 모델 박테리아 마다 감소율의 차이는 있었다. 두 방법을 이용한 계수법에서, 각각의 모델 박테리아가 부착되어있는 역삼투막에 800 psi의 압력을 가한 후에 *Rhodobacter sp.*가 59%, 73%의 가장 큰 감소율을 보였으며, *P. aeruginosa*, *Bacillus sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Mycobacterium sp.*의 순서대로 상대적으로 높은 감소율을 보였다. *P. fluorescens*는 감소율이 1%, 29%로 가장 고압내성이 큰 박테리아로 관찰되었다.

Table 4. Removal rate of six model bacteria after 800 psi application

Name	direct count (%)	plate count (%)
<i>Bacillus sp.</i>	26	59
<i>Flavobacterium sp.</i>	25	.*
<i>Mycobacterium sp.</i>	10	49
<i>P.aeruginosa</i>	37	73
<i>P.fluorescens</i>	1	29
<i>Rhodobacter sp.</i>	59	73

* No data obtained due to experimental error

한편, 이와 같이 직접계수법과 평판배양법에서 여섯 종류 모델 박테리아의 감소율의 양상은 같은 반면에, 각각의 모델 박테리아를 기준으로 직접계수법과 평판배양법을 이용한 계수 결과에는 다소 차이가 있었다. 특히 *Mycobacterium sp.*의 경우, 직접계수법을 통한 계수에서는 10%의 감소율을 보이고 있는 반면에, 평판배양법을 이용한 계수법의 결과에서는 49%의 감소율이 분석되었다. 이는 모델 박테리아가 고압을 받은 후 일부 세포들의 형태는 유지하고 있으나 생물학적 활성 능력(viability)에 영향을 미쳐, 살아있는 형태로서 콜로니가 상대적으로 많이 형성되지 못하였기 때문이라 사료된다.

4. 결론

Biofouling의 빠른 진단을 위한 센서 개발 연구의 타겟 박테리아로, SWRO에서 역삼투막에 바이오필름을 형성시켜 biofouling 현상을 유발 할 수 있는 박테리아를 선정하여 위하여 여섯 종류의 박테리아를 모델 박테리아로 선정하였다. 모델 박테리아의 역삼투막 부착능력, 고압내성, 소수성 등의 실험을 수행 한 결과, 역삼투막 부착능력은 *Rhodobacter sp.*과 *Mycobacterium sp.*이 뛰어났으며, *Mycobacterium sp.*은 102.78°로 가장 소수성이 높은 박테리아로 분석되었다. 또한 23.07°의 상대적으로 높은 친수성을 띄는 *P.aeruginosa*는 가장 낮은 역삼투막 부착율을 보였다. 800 psi를 이용한 고압내성 실험 결과, *Rhodobacter sp.*는 고압에 잘 견디지 못하고 59~73%의 가장 큰 감소율을 보였으며, *P. fluorescens*가 1~29%로 가장 고압내성이 큰 박테리아로 분석되었다.

여섯 종류의 모델 박테리아 중 *Mycobacterium sp.*가 역삼투막에 잘 부착되며, 소수성이 가장 크고, 800 psi의 고압을 가한 후에도 50% 이상의 생물학적 활성 능력을 보여 역삼투막에 바이오필름을 형성하는 비교적 잠재력이 있는 박테리아로 사료된다. Biofouling의 빠른 진단을 위한 센서 개발 연구의 타겟 박테리아 선정을 위한 추가적인 정보를 수집하기 위하여, 역삼투막 부착 능력과 소수성 측정, 고압내성 실험 이외에 SWRO 공정의 전처리 과정 중 antiscalant와 disinfection시 사용하는 화학약품에 대한 여섯 종류의 모델 박테리아의 저항능력을 여러 조건(pH, 온도 등)하에서 평가하는 등의 연구가 추가로 필요하다.

사 사

본 연구는 건설교통부 플랜트기술고도화사업의 연구비지원(07해수담수 B01-03)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Visvanathan, C., Boonthanon, N., Sathasivan, A., and Jegatheesan, V., "Pretreatment of seawater for biodegradable organic content removal using membrane bioreac-

- tor," *Desalination*, **153**, 133~140(2003).
2. Kim, S., Cho, D., Lee, M. S., Oh, B. S., Kim, J. H., and Kim, I. S., "SEAHERO R&D program and key strategies for the scale-up of seawater reverse osmosis (SWRO) system," *Desalination*, in press(2008).
 3. 한국수자원공사, <http://www.kwater.or.kr>, (2008)
 4. Vrouwenvelder, J. S., Kappelhof, J. W. N. M., Heijman, S. G. J., Schippers, J. C., and van der Kooij, D., "Tools for fouling diagnosis of NF and RO membranes and assessment of the fouling potential of feed water," *Desalination*, **157**, 361~365(2003).
 5. Flemming, H.-C., "Reverse osmosis membrane biofouling," *Experimental Thermal and Fluid Science*, **14**, 382~391 (1997).
 6. Herzberg, M. and Elimelech, M., "Biofouling of reverse osmosis membranes: Role of biofilm-enhanced osmotic pressure," *J. Memb. Sci.*, **295**, 11~20(2007).
 7. Yeo, Y. H., Jang, N., Cho, J., Kim, K. S., Kim, I. S., "Identification of the effect of extracellular polymeric substances on bacterial adhesion to the membrane surface in a membrane bioreactor using *Pseudomonas fluorescens*," *Water Sci. Technol.*, **55**, 35~42(2007).
 8. Al-Ahmad, M., Abdul Aleem, F. A., Mutiri, A., and Ubaisy, A., "Biofouling in RO membrane systems Part 1: Fundamentals and control," *Desalination*, **132**, 173~179(2000).
 9. Abd El Aleem, F. A., Al-Sugair, K. A., and Alahmad, M. I., "Biofouling problems in membrane processes for water desalination and reuse in Saudi Arabia," *International Biodeterioration & Biodegradation*, **41**, 19~23(1998).
 10. Jang, N., Shon, H., Ren, X., Vigneswaran, S., and Kim, I. S., "Characteristics of bio-foulants in the membrane bioreactor," *Desalination*, **200**, 201~202(2006).
 11. Herzberg, M. and Elimelech, M., "Physiology and genetic traits of reverse osmosis membrane biofilms: a case study with *Pseudomonas aeruginosa*," *International Society for Microbial Ecology*, **2**, 180~194(2007).
 12. Abdul Azis, P. K., Al-Tisan, I., and Sasikumar, N., "Bio-fouling potential and environmental factors of seawater at a desalination plant intake," *Desalination*, **135**, 69~82(2001).
 13. Spettmann, D., Eppmann, S., Flemming, H.-C., and Winger, J., "Visualization of membrane cleaning using confocal laser scanning microscopy," *Desalination*, **224**, 195~200(2008).
 14. Haunshi, S., Pattanayak, A., Bandyopadhaya, S., Saxena, S. C., and Bujarbaruah, K. M., "A Simple and Quick DNA Extraction Procedure for Rapid Diagnosis of Sex of Chicken and Chicken Embryos," *Poult. Sci.*, **45**, 75~81(2008).
 15. Ten, L. N., Im, W. T., Kim, M. K., and Lee, S. T., "A plate assay for simultaneous screening of polysaccharide-degrading protein-degrading micro-organisms," *Lett. Appl. Microbiol.*, **40**, 92~98(2005).
 16. Kim, K. K., Park, H. Y., Park, W., Kim, I. S., and Lee, S.-T., "Microbacterium *xylanilyticum* sp. nov., a xylan-degrading bacterium isolated from a biofilm," *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 2075~2079(2005).
 17. Baker, J.S., Dudley, L.Y., "Biofouling in membrane systems - A review," *Desalination*, **118**, 81~89(1998).
 18. Ivnitsky, H., Katz, I., Minz, D., Shimoni, E., Chen, Y., Tarchitzky, J., Semiat, R., Dosoretz, C.G., "Characterization of membrane biofouling in nanofiltration processes of wastewater treatment," *Desalination*, **185**, 255~268 (2005).
 19. Schneider, R.P., Ferreira, L.M., Binder, P., Ramos, J.R., "Analysis of foulant layer in all elements of an RO train," *J. Membr. Sci.*, **261**, 152~162(2005).
 20. Brehant, A., Bonnelye, V., and Perez, M., "Comparison of MF/UF pretreatment with conventional filtration prior to RO membranes for surface seawater desalination," *Desalination*, **144**, 353~360(2002).
 21. Ridgway, H. F., Rigby, M. G., and Argo, D. G., "Adhesion of a Mycobacterium sp. to cellulose diacetate membranes used in reverse osmosis," *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 61~67(1984).
 22. Delille, A., Quilès, F., and Humbert, F., "In Situ Monitoring of the Nascent *Pseudomonas fluorescens* Biofilm Response to Variations in the Dissolved Organic Carbon Level in Low-Nutrient Water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy," *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 5782~5788(2007).
 23. Blenkinsopp, S. A., Khoury, A. E., and Costerton, J. W., "Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3770~3773(1992).
 24. Harkes, G., Feijen, J., and Dankert, J., "Adhesion of *Escherichia coli* on to a series of poly (methacrylates) differing in charge and hydrophobicity," *Biomaterials*, **12**, 853~860(1991).
 25. Shi, L., Ardehali, R., Caldwell, K. D., and Valint, P., "Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion," *Colloids Surf., B*, **17**, 229~239(2000).