

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0163699

(43) 공개일자 2023년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 11/06 (2006.01) C12N 1/12 (2006.01)

C12N 11/098 (2020.01)

(52) CPC특허분류

C12N 11/06 (2013.01)

C12N 1/12 (2019.02)

(21) 출원번호 10-2022-0063309

(22) 출원일자 2022년05월24일

심사청구일자 2022년05월24일

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

맹승규

경기도 남양주시 다산중앙로 153, 1502동 2201호
(다산동, 다산자이 아이비플레이스)

노진형

서울특별시 강동구 아리수로93가길 77, 601동 80
5호(강일동, 강동리버스트6단지)

윤선원

서울특별시 광진구 천호대로110길 42, 704호(능동)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 미세조류 비드 고정화 방법

(57) 요약

본 발명은 a)미세조류 바이오 겔을 준비하는 단계; b)준비된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 구형의 미세조류 비드를 형성하는 단계; 및 c)구형의 미세조류 비드를 AHL(*N*-acyl homoserine lactone)에 반응시켜, 미세조류의 자가응집으로 미세조류 비드를 고정하는 단계;를 포함하여, AHL을 이용하여 알지네이트(칼슘-알지네이트)에 고정된 미세조류의 자가응집을 유도함에 따라 미세조류 간 결속력이 상승되어 미세조류의 고정화를 향상은 물론, 알지네이트 미세조류 비드의 유지력을 향상시킬 수 있는 미세조류 비드 고정화 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 11/098 (2022.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169701
과제번호	2021R1A4A3030924
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	다기능 바이오잉크를 활용한 3D 박테리아 프린팅 플랫폼
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

- a)미세조류 바이오 겔을 준비하는 단계;
- b)준비된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 구형의 미세조류 비드를 형성하는 단계; 및
- c)구형의 미세조류 비드를 AHL(*N*-acyl homoserine lactone)에 반응시켜, 미세조류의 자가응집으로 미세조류 비드를 고정하는 단계;를 포함하는 미세조류 비드 고정화 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 a)단계인 미세조류 바이오 겔을 준비하는 단계는,

- a-1)미세조류를 배양용기에서 해당 일정시간 배양하는 단계와;
- a-2)해당 일정시간 경과 후, 배양용기에서 배양된 미세조류만을 수집하는 단계와;
- a-3)수집된 미세조류를 유입수에 재현탁하는 단계와;
- a-4)재현탁된 미세조류를 알긴산나트륨(sodium alginate) 용액에 혼합하여 미세조류 바이오 겔을 제조하는 단계;를 포함하는 미세조류 비드 고정화 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 a-1)단계인 미세조류를 배양하는 단계는,

미세조류인 세네데스무스 쿼드리카우다(*Scenedesmus quadricauda*)를 배양용기에 5일간 배양하는 것을 특징으로 하는 미세조류 비드 고정화 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 a-4)단계인 재현탁된 미세조류를 알긴산나트륨(sodium alginate) 용액에 혼합하여 미세조류 바이오 겔을 제조하는 단계는,

10%(w/v)의 알긴산나트륨(sodium alginate) 용액에 재현탁한 미세조류를 1:1 (v/v)비율로 혼합하여 5% 알지네이트(alginate)의 미세조류 바이오 겔(300mg/30ml)을 제조하는 것을 특징으로 하는 미세조류 비드 고정화 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 b)단계인 준비된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 구형의 미세조류 비드를 형성하는 단계는,

30ml의 바이오 겔 중 20ml의 용량을 시린지에 공기방울 없이 채워 넣은 뒤, 니들(내경 1.45 mm)을 이용하여, 40rpm의 강도로 교반되고 있는 5%(w/v)의 염화칼슘(CaCl_2) 용액에 1ml/min의 속도로 적하시켜 구형의 비드로

형성하는 것을 특징으로 하는 미세조류 비드 고정화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미세조류 비드 고정화 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 N-아실 호모세린 락톤(*N*-acyl homoserine lactone: AHL)을 이용하여 칼슘-알지네이트(Ca-alginate)에 고정된 미세조류의 자가응집을 유도함에 따라 미세조류 간 결속력이 상승되어 미세조류의 고정화를 향상은 물론, 칼슘-알지네이트로 고정된 미세조류 비드의 유지력을 향상시킬 수 있는 미세조류 비드 고정화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 일반적으로 조류는 광합성을 하며 물속에서 자라는 생물로 50 μ m 이하의 단세포 생물을 미세조류라고 일컫는다.
- [0003] 미세조류를 포함한 조류는 광합성 대사를 이용하여 성장하기 때문에 부영양화 현상이나 일사량이 증가 시에 녹조현상 혹은 적조현상을 일으키는 주범으로 알려져 있다.
- [0004] 상기한 미세조류를 포함한 조류는 하·폐수 고도처리에 이용되기도 하는데, 미세조류를 이용한 고도처리는 종래의 재래식 활성슬러지 공법에서 달성하기 힘든 높은 질소, 인 제거율을 달성 가능하도록 한다.
- [0005] 또한, 미세조류는 이산화탄소와 물, 빛 에너지를 이용하여 포도당을 합성하고 산소를 방출하기 때문에 약품 등을 사용하는 다른 고도처리와 달리 친환경적이다.
- [0006] 하·폐수의 오염물질을 기질로써 활용하여 성장한 미세조류는 바이오 디젤, 바이오 에탄올, 바이오 가스 등으로 전환시켜 바이오 퓨엘로써 이용하기도 한다.
- [0007] 하지만, 미세조류를 이용한 고도처리에도 한계점이 존재한다.
- [0008] 미세조류는 눈에 보이지 않을 정도로 크기가 작고 물과 비슷한 밀도를 가지고 있기 때문에 자연적으로 침전시켜 처리된 물과 바이오매스를 분리하기 힘들다는 단점이 있다.
- [0009] 따라서 고액분리 및 미세조류의 회수를 위하여 응집제를 사용하거나 막 여과 공정의 도입 등 추가공정이 요구된다.
- [0010] 또한, 미세조류는 박테리아에 비하여 느린 성장속도를 갖기 때문에 수중에 존재하는 박테리아는 미세조류의 성장을 방해하는 요소로 작용하기도 한다.
- [0011] 느린 침전속도와 성장속도를 갖는 미세조류는 하·폐수처리의 처리효율을 떨어뜨리는 단점으로 이어지며, 후처리 공정의 도입은 하·폐수처리에 경제적이지 않다.
- [0012] 이러한 문제를 해소하기 알지네이트(alginate)에 미세조류를 고정함으로써 해결될 수 있으며 칼슘-알지네이트(Ca-alginate) 결합을 이용하여 미세조류를 고정화시킨 미세조류 비드의 장점은 다음과 같다.
- [0013] 먼저 미세조류 비드는 침전속도가 매우 빠르기 때문에 고액분리 및 미세조류 회수를 위한 추가적인 공정이 필요하지 않고 높은 바이오매스 함량을 유지할 수 있을 뿐만 아니라, 알지네이트 매트릭스(alginate matrix)에 갇혀 기질을 공급받기 있기 때문에 박테리아 오염 등 성장을 억제하는 외부요인으로부터 보호될 수 있기 때문에 오염물질 제거 효율이 높고, 일정한 처리 효율을 보인다.
- [0014] 그리고 알지네이트는 투명도가 높은 폴리머로, 미세조류를 고정할 시 다른 폴리머에 비하여 빛의 투과도가 높아 셀프 셰이딩(self-shading) 효과로 인한 광합성 대사의 저해를 줄일 수 있다.
- [0015] 하지만, 칼슘-알지네이트는 약한 결합력을 갖기 때문에 비드가 팽창되거나 알지네이트가 용해될 수 있고, 이에 미생물이 비드 외로 누출될 수 있다.
- [0016] 알지네이트의 용해는 수처리 중 비드끼리 부딪히거나 수중의 음이온(PO_4^{3-} , NO_3^- 등)의 유입 등 비드에 물리·화학적 압력이 지속적으로 가해짐에 따라 발생할 수 있다.
- [0017] 하·폐수처리의 처리를 위해서는 고농도의 미세조류 농도를 유지함과 동시에 일시적으로 발생 가능한 고농도의 오염물질에 의한 충격부하를 견딜 수 있어야 하는데, 기존 알지네이트를 이용한 미세조류 고정화는 알지네이트

폴립 현상으로 인하여 장시간 반응하는 동안 안정되게 운전하기 어렵다는 문제가 있었다.

[0018] 일부 고정화 기술은 가교과정 동안이나 가교가 완료된 후에 급격한 물리-화학적인 변화가 이루어져 미생물의 활성도에 큰 저해를 일으킬 수 있는 문제점이 있었다.

[0019] 종래기술로는 공개특허 제10-2015-0000757호(2015.01.05)를 참조할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명은 N-아실 호모세린 락톤(*N*-acyl homoserine lactone: AHL)을 이용하여 칼슘-알지네이트(Ca-alginate)에 고정된 미세조류의 자가응집을 유도함에 따라 미세조류 간 결속력이 상승되어 미세조류의 고정화를 향상은 물론, 칼슘-알지네이트로 고정된 미세조류 비드의 유지력을 향상시킬 수 있는 미세조류 비드 고정화 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명에 따른 미세조류 비드 고정화 방법은 a)미세조류 바이오 겔을 준비하는 단계; b)준비된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 구형의 미세조류 비드를 형성하는 단계; 및 c)구형의 미세조류 비드를 AHL(*N*-acyl homoserine lactone)에 반응시켜, 미세조류의 자가응집으로 미세조류 비드를 고정하는 단계;를 포함한다.

[0022] 이때 본 발명에 따른 상기 a)단계인 미세조류 바이오 겔을 준비하는 단계는, a-1)미세조류를 배양용기에서 해당 일정시간 배양하는 단계와, a-2)해당 일정시간 경과 후, 배양용기에서 배양된 미세조류만을 수집하는 단계와, a-3)수집된 미세조류를 재현탁하는 단계와, a-4)재현탁된 미세조류를 알긴산나트륨(sodium alginate) 용액에 혼합하여 미세조류 바이오 겔을 제조하는 단계를 포함한다.

[0023] 여기서 본 발명에 따른 상기 a-1)단계인 미세조류를 배양하는 단계는, 정지기(stationary phase)에 있는 미세조류인 세네데스무스 쿼드리카우다(*Scenedesmus quadricauda*)를 얻기 위해 배양용기에 5일간 배양하는 것이 바람직하다.

[0024] 그리고 본 발명에 따른 상기 a-4)단계인 재현탁된 미세조류를 알긴산나트륨 용액에 혼합하여 미세조류 바이오 겔을 제조하는 단계는, 10%(w/v)의 알긴산나트륨 용액에 재현탁한 미세조류를 1:1 (v/v)비율로 혼합하여 5% 알지네이트의 미세조류 바이오 겔(300mg/30ml)을 제조하는 것이 바람직하다.

[0025] 더불어 본 발명에 따른 상기 b)단계인 준비된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 구형의 미세조류 비드를 형성하는 단계는, 바이오 겔을 시린지에 공기방울 없이 채워 넣은 뒤, 니들(내경 1.45 mm)을 이용하여, 40rpm의 강도로 교반되고 있는 5%(w/v)의 염화칼슘(CaCl_2) 용액에 1ml/min의 속도로 적하시켜 구형의 비드로 형성하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 미세조류 비드 고정화 방법에 의해 나타나는 효과는 다음과 같다.

[0027] N-아실 호모세린 락톤(*N*-acyl homoserine lactone: AHL)을 이용하여 미세조류의 자가응집을 유도시켜, 알지네이트에 미세조류의 고정화를 향상시킬 수 있는 효과를 가진다.

[0028] 그리고 빠른 침전속도로 고액분리 및 미세조류 회수를 위한 추가적인 공정이 필요하지 않고, 높은 바이오매스 함량을 유지하는 미세조류 비드를 제공할 수 있는 효과를 가진다.

[0029] 또한, 하수 내의 독성물질에 대하여 강한 내성을 가지나 약한 결합력을 갖는 칼슘-알지네이트 미세조류 비드의 유지력을 향상시킬 수 있는 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명 미세조류 비드 고정화방법의 일 실시 예에 따른 미세조류 비드 고정화를 개략적으로 보인 참고도이다.

도 2는 본 발명 미세조류 비드 고정화방법의 일 실시 예에 따른 반응기의 배양조건과 운전조건을 보인 모식도 및 실제 운전한 반응기를 보인 참고도이다.

도 3은 반응기 운전기간을 반응기 안정화 단계와, AHL 순응 단계와, AHL 영향분석 단계로 나눈 그래프이다.

도 4a 내지 4c는 가용성 COD, 가용성 N, 가용성 P(n=9)에 따른 수질분석 결과를 각각 나타낸 그래프이다.

도 5a 내지 도 5c는 형광분석으로 (a)DOC, (b)UV₂₅₄, (c)SUVA₂₅₄(n=9)에 따른 유기물 분석 결과를 각각 나타낸 그래프이다.

도 6 a 및 도 6b는 (a)중속영양조건(H_{w/o}, H_{w/}), (b)혼합영양조건(M_{w/o}, M_{w/})(n=2)으로 F-EEM을 이용한 유출수의 형광특성 분석 결과를 각각 나타낸 그래프이다.

도 7은 PFAS 제거 효율(n=4)를 나타낸 그래프이다.

도 8a 및 도 8c는 분리된 비드의 (a)탁도, (b) OD₆₈₀, (c)세포 수(n=11)에 따른 미세조류 농도를 각각 나타낸 그래프이다.

도 9는 운전 전, 후의 미세조류 비드 반응기를 보인 사진이다.

도 10은 (a)운전 전, (b)H_{w/o}, (c)H_{w/}, (d)M_{w/o}, (e)M_{w/}에 따른 운전 전, 후 미세조류 비드를 보인 사진이다.

도 11은 (a)운전 전, (b)H_{w/o}, (c)H_{w/}, (d)M_{w/o}, (e)M_{w/}에 따른 운전 전, 후의 운전한 미세조류 비드를 보인 사진이다.

도 12는 운전 후 비드에 형성된 크랙: (a)H_{w/o}, (b)H_{w/} 및 조각난 비드의 단면 (c)H_{w/o}, (d)H_{w/}, (e)M_{w/o}, (f)M_{w/}을 보인 사진이다.

도 13은 운전 후 크랙이 발생한 비드 수를 나타낸 그래프이다.

도 14는 운전 전, 후 비드 직경(n=3)의 대비를 나타낸 그래프이다.

도 15는 운전 전, 후 (a)DCW, (b)세포 수에 따른 미세조류 농도 대비를 나타낸 그래프이다.

도 16은 중속영양조건(H), 혼합영양조건(M)에 따른 운전 중 총 성장을 나타낸 그래프이다.

도 17은 운전 전, 후의 (a)운전 전, (b)H_{w/o}, (c)H_{w/}, (d)M_{w/o}, (e)M_{w/}에 따른 비드 외부 단면을 공초점 레이저 현미경으로 촬영한 이미지이다.

도 18은 운전 전, 후의 (a)운전 전, (b)H_{w/o}, (c)H_{w/}, (d)M_{w/o}, (e)M_{w/}에 따른 비드 내부 단면을 공초점 레이저 현미경으로 촬영한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 실시 예를 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0032] 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 실시 예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들은 대체할 수 있는 균등한 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0033] 본 발명은 *N*-아실 호모세린 락톤(*N*-acyl homoserine lactone: AHL)을 이용하여 칼슘-알지네이트(Ca-alginate)에 고정된 미세조류의 자가응집을 유도함에 따라 미세조류 간 결속력이 상승되어 미세조류의 고정화를 향상은 물론, 알지네이트 미세조류 비드의 유지력을 향상시킬 수 있는 미세조류 비드 고정화 방법에 관한 것으로, 도면을 참조하여 살펴보면 다음과 같다.

[0034] 도 1 내지 2를 참조한 본 발명의 일 실시 예에 따른 미세조류 비드 고정화 방법은 a)미세조류 바이오 겔을 준비하는 단계와, b)준비된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 구형의 미세조류 비드를 형성하는 단계, 및 c)구형의 미세조류 비드를 AHL에 반응시켜, 미세조류의 자가응집으로 미세조류 비드를 고정하는 단계를 포함한다.

[0035] 먼저, a)단계로, 미세조류 바이오 겔을 준비한다.

- [0036] 이때 미세조류는 겔 형태로 준비되는데, 그 과정을 보다 상하게 살펴보면 다음과 같다.
- [0037] a-1)단계로, 미세조류를 배양용기에서 해당 일정시간 배양한다.
- [0038] 이때 상기 미세조류는 세네데스무스 쿼드리카우다(*Scenedesmus quadricauda*: *S. quadricauda*)인 것이 바람직하고, BG-11 medium의 배지로 배양용기에서 5일간 배양한다.
- [0039] 여기서 상기 미세조류 세네데스무스 쿼드리카우다는 담수에서 흔히 발견되는 녹조강(Chlorophyceae) 때목말속(*Scenedesmus*)의 혼합영양 대사를 하는 미세조류 종이다.
- [0040] 상기 세네데스무스 쿼드리카우다는 2, 4 또는 8 개의 원통형 세포(cylindrical cells)가 일렬로 배열되어 군체(colony)를 형성하고 있는 형태로, 직경 8-20 μ m, 폭 3-6.5 μ m 사이로 다양할 수 있으며, 7-13 μ m 길이의 긴 가시 돌기를 가지고 있는 것이 특징이다.
- [0041] 상기 미세조류는 멸균된 1.6 l 의 BG-11 medium(pH 7.0-7.2)과 함께 25℃의 배양용기(인큐베이터)에서 배양되었다.
- [0042] 미세조류의 원활한 영양소 공급 및 바이오매스 유지를 위해 20일 마다 배지를 교체하였으며, optical density at 680nm(OD₆₈₀) 흡광도를 갖도록 조정한 후 반복배양되었다.
- [0043] 배지의 조성과 배양 조건은 아래의 [표 1] 및 [표 2] 와 같다.

표 1

[0044]

	항목	농도(mg/L)
Macronutrient	NaNO ₃	1500
	K ₂ HPO ₄	58
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	90
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	36
	Citric acid	6
	Ferric ammonium citrate (FeC ₆ H ₅ O ₇ NH ₄ OH)	6
	EDTA · Na ₂ (Na ₂ C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈)	1
	Na ₂ CO ₃	20
Micronutrient	H ₃ BO ₃	2.86
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	1.81
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.222
	NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.39
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.079
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0.049

표 2

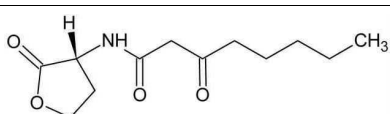
[0045]

항목		운전조건
Reactor type		sequencing photo-bioreactor (SPBR)
Medium		BG-11
Reactor volume		2L
Working volume		1.6L
Aeration	Type	Air mixed with 10 % CO ₂
	Flow rate	40-50 ml/min, continuous aeration
Temperature		25℃
Shaking intensity		120 rpm

Light	Intensity	6500 lux
	cycle	24/0(L/D)
	color	cool daylight (6500 K)

- [0046] 그리고 다음은 a-2)단계로, 해당 일정시간 경과 후, 배양용기에서 배양된 미세조류만을 수집한다.
- [0047] 이때 미세조류를 수집할 시, 정지기 단계에 있는 미세조류(*S.quadricauda*)를 dry cell weight(DCW) 300mg 수집한다.
- [0048] 그리고 다음은 a-3)단계로, 수집된 미세조류를 유입수에 재현탁 한다.
- [0049] 이때 a-2)단계에서 수집한 미세조류는 2500rpm의 강도로 5분간 두 차례 원심분리 하였고, 15ml가 되도록 유입수에 재현탁한다.
- [0050] 그리고 다음은 a-4)단계로, 재현탁된 미세조류를 알긴산나트륨(sodium alginate) 용액에 혼합하여 미세조류 바이오 겔을 제조한다.
- [0051] 이때 10%(w/v)의 알긴산나트륨 용액에 재현탁한 미세조류를 1:1(v/v) 비율로 혼합하여, 5%의 알지네이트(alginate) 미세조류 바이오 겔(300mg/ 30ml)을 제조한다.
- [0052] 상기한 과정을 제조된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 미세조류 비드를 형성한다.
- [0053] 다음은 b)단계로, 준비된 미세조류 바이오 겔을 이용하여 구형의 미세조류 비드를 형성한다.
- [0054] 이때 상기 a)단계의 과정에 의해 준비된 바이오 겔은 염화칼슘(CaCl_2) 용액에 적하시켜 구형의 미세조류 비드를 형성하는데, 준비된 상기 바이오 겔을 시린지에 공기방울 없이 채워 넣은 뒤, 니들(내경 1.45 mm)을 이용하여, 40rpm의 강도로 교반되고 있는 5%(w/v)의 염화칼슘 용액에 1ml/min의 속도로 적하시켜 구형의 비드로 형성한다.
- [0055] 여기서 적하 중 비드 간 엉김 현상을 방지하기 위하여 형성된 비드가 충분히 교반되도록 니들을 염화칼슘 용액이 수용된 수조 중앙에서 일정부분 떨어지게 위치시켰다.
- [0056] 그리고 상기한 과정으로 형성된 구형의 미세조류 비드(200mg/20ml)를 30분간 그대로 두어 경화시킨 뒤, 0.85%의 염화나트륨(NaCl) 용액에 3회 세척한 다음 반응기에 수용시킨다.
- [0057] 다음은 c)단계로, 구형의 미세조류 비드를 AHL에 반응시켜, 미세조류의 자가응집으로 미세조류 비드를 고정한다.
- [0058] 이때 상기 b)단계의 과정에 의해 구형의 미세조류 비드가 수용된 반응기에 AHL을 함유하여 반응시킨다.
- [0059] 상기 AHL은 *N*-(3-Oxo-octanoyl)-L-homoserine lactone: 3OC8-HSL) 호기성 그레놀 슬러지 및 조류-박테리아 그레놀 슬러지의 그레놀 과정에서 가장 높았던 신호로 알려진 것으로, 그레놀 과정에서 발견되는 AHL은 EPS 합성을 유도하고, 과립을 더 안정적으로 만들기 때문에 선택되었다.
- [0060] 상기 AHL에 대한 정보는 아래의 [표 3]과 같다.

표 3

항목	물질 정보
분자량	241.3g/mol
화학적식	$\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_4$
구조	

- [0062] 여기서 AHL에 대해 살펴보면, 외인성 AHL의 농도는 50-5000nM로, 운전기간 동안 배양조건별로 미세조류가 받을 AHL 영향을 동일하게 노출 시킬 수 없고, 두 배양조건에서의 정족수 감지(quorum sensing)를 유도하기 위하여 AHL은 상대적으로 높은 농도인 5uM로 주입되었다.

[0063] AHL은 에탄올에 용해됨에 따라 10mg/ml-ethanol의 농도로 용해시킨 뒤, 3차 증류수에 100배 희석하여 100ml로 저장용액(stock solution)으로 사용하였으며, 유입·유출수 교체 시, 유입수에 주입하여 미세조류 비드에 노출시켰으며, 대조군으로 같은 비율로 희석된 에탄올을 사용한다.

[0064] 이때 배양조건 및 운전조건을 살펴보면, 상기 미세조류 비드는 하수처리를 위하여 회분식 반응기 형태로 운전되었는데, 배양조건(cultivation condition)을 다르게 두어 AHL의 영향을 확인하였으며, 종속영양조건과 혼합영양조건으로 나누어 진행한다.

[0065] 상기 종속영양조건을 위하여 암실조건에서 공기를 지속적으로 주입하였고, 혼합영양조건을 위하여 빛과 10% 이산화탄소를 포함한 공기를 지속적으로 공급하였으며, 공기의 성분에는 이산화탄소가 존재하기 때문에 광합성 대사에 영향을 미칠 수 있으나, 종속영양조건은 암실에서 수행되었기 때문에 미세조류의 광합성 대사가 제한된다.

[0066] 상기 반응기의 배양조건과 운전조건은 아래의 [표 4]와 [표 5]와 같고, 도 2는 모식도와 실제 운전한 반응기를 보인 것이다.

[0067] 도 3을 참조한 상기 반응기 운전기간은 약 한 달로 반응기 안정화 단계와, AHL 순응 단계, AHL 영향분석 단계로 나누어 반응시켰다.

표 4

Light	항목	종속영양조건	혼합영양조건
	Condition	Dark	Light
	Intensity		6500 lux
	Cycle		24/0(L/D)
	Color		cool daylight(6500K)
Aeration		Air	Air mixed with 10% CO ₂

표 5

항목	운전조건
Reactor type	Sequencing batch reactor(SBR)
Influent	Synthetic waste water
Reactor volume	500ml
Working volume	300ml
Temperature	25℃
Shaking intensity	120rpm
Hydraulic retention time	1d
Solid retention time	∞

[0070] 상기 [표 4]는 미세조류 비드 반응기의 배양 조건을 나타내고, [표 5]는 미세조류 비드 반응기의 운전 조건을 나타낸 것이다.

[0071] 또한, 유입수는 인공하수로 COD, N, P 부하를 위해 포도당(glucose; C₆H₁₂O₆), 암모늄이온(ammonium; NH₄⁺), 인산이온(phosphate; PO₄³⁻)의 형태로 제조된다.

[0072] 상기 유입수의 레시피와 수질은 아래의 [표 6] 및 [표 7]과 같다.

표 6

[0073]

항목		유입수	저장용액(Stock solution)	
		농도 (mg/L)	농도(g/L)	주입용량(/1L)
Glucose(BULK)		300	-	-
P-buffer	KH ₂ PO ₄	8.5	34.3	0.25ml
	K ₂ HPO ₄	21.75	88.8	
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	44.61	182.1	

MnSO ₄ · 5H ₂ O	8.15	83.2	0.1ml
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.25	2.6	
CaCl ₂ · 2H ₂ O	30.81	434.0	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	22.5	227.3	
NaHCO ₃	672	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄ (BULK)	262.3*	-	-
*adjust pH 7.2 with NaOH			

표 7

항목	COD	N	P	TOC
	mg/L			
Influent	321±16	59±3.6	9.2±0.2	120±10

[0074]

[0075]

상기 유입수에 주입된 AHL과 과불화화합물은 유입수의 COD와 TOC를 상승시키는데, 이는 용제(solvent)로써 사용된 에탄올과 메탄올의 영향이며, 유입수의 COD와 TOC농도는 548±18mg/L(control: 542±18mg/L), 171±14mg/L(control: 168±14mg/L)로 나타난다(n=9).

[0076]

여기서 본 발명의 일 실시 예에 따른 미세조류 비드 고정화방법에 의해 제조된 비드의 수질 분석 및 비드 분석 실험을 통해 그 효과를 살펴보면 다음과 같다.

[0077]

먼저, 수질분석은 반응기 안정화 기간과 AHL의 순응 단계를 거친 뒤에 운전종료 전까지 매일 측정되었는데, 수질 분석으로 기초수질 분석, 유기물 분석, 과불화화합물 분석, 그리고 탈착 미세조류 농도 분석을 진행한다.

[0078]

기초 수질분석으로써 dissolved oxygen(DO), pH, turbidity, soluble chemical oxygen demand(soluble COD), soluble nitrogen(soluble N), soluble phosphorus(soluble P)에 대하여 분석을 진행하였으며 각 분석항목에 대한 분석 방법은 아래의 [표 8]과 같다.

[0079]

Soluble COD, soluble N, soluble P 분석은 미생물의 대사활동으로 인한 영향을 확인하기 위하여 0.45μm의 공극을 갖는 필터를 이용하여 여과한 후 분석을 진행한다.

표 8

항목	분석 방법	
DO	DO meter	
pH	pH meter	
Turbidity	Turbidity meter	
Soluble COD	Digestion solution for COD vials, High Range	분광광도계
Soluble N	High Range Total Nitrogen, Reagent Set	
Soluble P	High Range Total Phosphorus, Reagent Set	

[0081]

그리고 유기물의 분석으로 dissolved organic carbon(DOC), ultraviolet absorbance at 254nm(UV₂₅₄), specific ultraviolet absorbance at 254nm (SUVA₂₅₄), 그리고 Fluorescence-Excitation Emission Matrix(F-EEM)에 대하여 분석을 진행하였으며 각 분석항목에 대한 분석 방법은 아래의 [표 9]와 같고, 마찬가지로 0.45μm 공극의 필터를 이용하여 여과 후 분석을 진행한다.

표 9

항목	분석 방법
DOC	TOC analyzer
UV ₂₅₄ absorbance	분광광도계
SUVA ₂₅₄	$\frac{UV_{254}(cm^{-1})}{DOC(mg/L)} \times 100$

[0082]

F-EEM	RF-5301 spectrofluorometer
-------	----------------------------

[0083] 여기서 F-EEM은 형광 특성을 갖는 유기물을 검출할 수 있는 분석법으로, 유기물에 대한 정성적인 분석이 가능하다.

[0084] 그리고 분석 시료는 분석 최대강도인 1000AU(arbitrary unit)을 넘지 않도록 3차 증류수를 이용하여 희석한 후 분석을 진행하고, 광원은 아크램프(Arc lamp)를 이용하며, 220-400nm의 excitation wavelength와 280-600nm의 emission wavelength를 각각 10nm, 1nm 의 간격으로 스캔하여 형광특성을 검출하고, Rayleigh와 raman scatter 간섭 효과는 3차 증류수를 동일한 방법으로 측정한 후 분석시료 결과에 빼어 보정한다.

[0085] 아래의 [표 10]과 같이 수집한 파장을 단백질계(protein-like) 유기물과 휴믹계(humic-like) 유기물 영역으로 나누어 검토한다.

표 10

[0086]

Peak name	Excitation (nm)	Emission (nm)	Component
Peak T1	220-240	330-360	Protein-like
Peak T2	270-280	330-360	Protein-like Tryptophan-like
Peak A	250-260	380-480	Fulvic-like
Peak C	330-350	420-480	Humic-like

[0087] 또한, 과불화화합물 분석을 실시하였는데, 과불화화합물(per- and polyfluoroalkyl substances; PFASs)은 총 10종의 PFASs(PFAC-MXA Native PFCAs and PFASs Solution/Mixture, Wellington Laboratories)을 사용한다.

[0088] 10종의 PFASs는 perfluoro-n-butanoic acid(PFBA), perfluoro-n-pentanoic acid(PFPeA), perfluoro-n-hexanoic acid(PFHxA), perfluoro-n-heptanoic acid(PFHpA), perfluoro-n-octanoic acid(PFOA), perfluoro-n-nonanoic acid(PFNA), perfluoro-n-decanoic acid(PFDA), potassium perfluoro-1-butanefluorobutanesulfonate(PFBS), sodium perfluoro-1-hexanesulfonate(PFHxS), sodium perfluoro-1-octanesulfonate(PFOS)이며, 이들의 물리화학적 특성은 아래의 [표 11]과 같고, 또한 PFASs는 경제협력개발기구(Organisation for economic co-operation and development; OECD)의 PFASs 분류법에 따라 탄소가 7개 이상인 perfluoroalkyl carboxylic acid(PFCA) 혹은 탄소가 6개 이상인 perfluoroalkyl sulfonic acid(PFSA)를 긴 사슬 PFAS라고 칭하고, 반대로 탄소 개수가 7개 미만인 PFCA 혹은 탄소 개수가 6개 이하인 PFSA를 짧은 사슬 PFAS 라고 칭한다.

표 11

[0089]

	화학식	분류	분자량 (g/mol)	Log Kow	수용해도 (mg/L)	pKa
PFBA	C ₄ HF ₇ O ₂	짧은 사슬	214.1	2.14	214	0.05, 0.4
PFBS	C ₄ F ₉ O ₃ S		300.1	1.82	344	0.14, -3.27
PFPeA	C ₅ HF ₉ O ₂		264.1	2.81	196.5	0.14
PFHxA	C ₆ HF ₁₁ O ₂		314.1	3.48	27.12	-0.1, 0.569
PFHxS	C ₆ HF ₁₃ O ₃ S	긴 사슬	400.1	3.16	6.174	-0.21, 2.575
PFHpA	C ₇ HF ₁₃ O ₂		364.1	4.14	3.65	-0.17, 0.84
PFOA	C ₈ HF ₁₅ O ₂		414.1	4.81	0.481	-0.2
PFOS	C ₈ HF ₁₇ O ₃ S		500.1	4.49	0.104	-0.22, 2.606
PFNA	C ₉ HF ₁₇ O ₂		464.1	5.48	0.06	0.14
PFDA	C ₁₀ HF ₁₉ O ₂		514.1	6.15	0.008	-0.21, 1.01

[0090] 여기서 PFASs 분석을 위하여 liquid chromatography-tandem mass spectrometry(LC-MS/MS)를 사용하고, 주입된 PFASs의 농도는 100ppt이며, 기기 상에서 검출된 유입수 농도는 아래의 [표 12]와 같다.

[0091] 유입수 분석결과 가장 긴 탄소 사슬을 가지고 있는 PFNA(C=9)와, PFDA(C=10)는 각각 $58 \pm 13 \text{ ng/L}$, $14 \pm 2 \text{ ng/L}$ 로 검출되어 주입 농도와 다소 큰 오차를 보인다.

[0092] 이는 긴 사슬 길이로 인한 소수성 특성의 증가로 간섭이 발생한 것으로 예상되며 해석에서 제외한다.

표 12

항목	유입 농도(ng/L)
PFBA(C=4)	128 ± 3
PFBS(C=4)	119 ± 4
PFPeA(C=5)	99 ± 1
PFHxA(C=6)	110 ± 0
PFHxS(C=6)	125 ± 1
PFHpA(C=7)	124 ± 1
PFOA(C=8)	125 ± 0
PFOS(C=8)	127 ± 2
PFNA(C=9)	58 ± 13
PFDA(C=10)	14 ± 2

[0094] 본 발명의 실험 예에 따른 탈착 미세조류 농도 분석을 살펴보면, 비드로부터 탈착되는 미세조류 농도를 분석하기 위해 유출수의 optical density at 680nm(OD_{680}), cell counts 분석을 진행하였고, 미세조류의 auto-fluorescence인 chlorophylls을 이용한다.

[0095] 본 발명의 실험 예에 따른 반응기 형태는 SBR형태로, 유입·유출수의 교체가 한 번에 이루어지기 때문에 유출수의 미세조류는 비드로부터 탈착된 것으로 볼 수 있으며, OD_{680} 분석은 분광광도계를 사용하였고, chlorophyll-a는 680nm의 파장에서 peak를 보임에 따라 680nm 파장에서의 흡광도를 분석한다.

[0096] Cell counts 분석은 flow cytometry(FCM)를 이용하여 유세포 분석을 진행하고, FCM 분석은 세포가 기기를 통과할 때 레이저를 조사하면 광원이 통과되거나 반사되는 원리를 이용해 세포의 개체 수를 측정하는 방법으로, 488nm의 형광을 조사하는 Cube 6를 사용한다.

[0097] 본 발명의 실험 예에서는 chlorophylls을 이용하여 별도의 염색과정 없이 시료를 분석한다.

[0098] 또한, 유입수는 오염물질이 완전히 용해되어 탁질이 없는 상태이므로 기초 수질 분석항목인 turbidity분석은 탈착 미세조류 농도 분석에 사용된다.

[0099] 본 발명의 실험 예에 따른 비드분석은 운전 전과 후에 진행되었고, 운전 종료 후에 분석된 비드는 약 한달 간 반응된 비드를 사용하고, 비드 분석으로 조각난 비드 수 분석, 비드 직경 및 비드 내 미세조류 농도 분석, 그리고 공초점 레이저 현미경 분석을 진행한다.

[0100] 이때 제조된 비드는 매끈한 표면을 가지고 온전한 구형의 형태를 띠는데, 반응기 운전 중 비드가 조각남에 따라 조각난 비드의 수를 세었고, 조각난 비드는 균열이 일어나 비드 사이가 벌어진 경우(cracked bead), 균열이 일어난 후 분리되어 파편이 생긴 경우(fragment) 두 가지로 관찰된다.

[0101] 조각난 비드를 세는 기준은 균열이 일어난 비드 중 균열의 깊이가 비드의 반지름보다 큰 비드와 파편이 된 모든 비드이다.

[0102] 비드 직경 및 비드 내 미세조류 농도 분석은 운전 전·후 비드의 직경을 디지털 캘리퍼를 이용하여 측정한다.

[0103] 한 시료당 5개 이상의 비드를 측정하고, 운전 전 비드의 직경은 $3.85 \pm 0.09 \text{ mm}$ 로 관찰되고, 상기 비드는 운전 직후 팽창현상에 따라 급격히 증가하였으며 이후 서서히 증가하거나 감소한다.

[0104] 비드 내 미세조류 농도 분석을 위하여 dry cell weight(DCW), cell counts 분석을 진행하였는데, 해당 분석은 20개의 비드를 4% 탄산수소나트륨(NaHCO_3) 용액에 녹여 20ml의 현탁액 상에서 측정한다.

[0105] 그리고 칼슘-알지네이트(Ca-alginate) 비드의 칼슘은 탄산수소나트륨 용액의 CO_3^{2-} 이온과 결합하여 탄산칼슘(CaCO_3)을 형성함에 따라 비드가 용해된다.

[0106] DCW 분석은 용해된 비드의 mixed liquor suspended solids(MLSS) 농도를 측정함으로써 계산되며, cell counts 분석은 탈착 미세조류 농도 분석에서 진행한 방법과 동일하게 진행된다.

[0107] 현탁액 상에서 측정된 DCW와 cell counts는 비드 1개당(/bead) 농도로 표현되었고, 계산식은 아래와 같다.

$$\text{Dry cell weight (mg/bead)} = \frac{(A - B) \times 1000 \text{ (mg)}}{\text{Sample Volume (ml)}} \times \frac{\text{dissolved bead volume (ml)}}{\text{number of bead (bead)}}$$

$$A : \text{cell weight after drying (g)} + \text{GF/C filter weight (g)}$$

$$B : \text{GF/C filter weight (g)}$$

$$\text{Cell counts (cells/bead)} = \text{cell concentration (cells/ml)} \times \frac{\text{dissolved bead volume (ml)}}{\text{number of bead (bead)}}$$

[0110] 운전 전 미세조류 비드의 직경 및 비드 내 미세조류 농도는 아래의 [표 13]과 같다.

표 13

항목	초기조건
Diameter	3.85±0.09mm
Dry cell weight	5.44mg/bead
Cell counts	2.6×10 ⁷ ±1.6×10 ⁴ cells/bead

[0112] 그리고 상기한 비드를 공초점 레이저 현미경으로 살펴보았는데, 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscopy; CLSM) 분석은 시료에 레이저를 쏘아 일정한 파장의 빛을 발생시켜 대물렌즈를 지나게 한 다음, 초점이 맞지 않는 부분은 제외하고 초점이 맞는 빛만을 조리개로 분리한 뒤, 검출기로 받아 디지털 신호로 바뀌 컴퓨터로 관찰하는 원리이다.

[0113] 본 발명에 따른 실험 예에서는 운전 전과 후의 비드 단면을 잘라 단층(2D) 촬영하며, auto-fluorescence 인 chlorophylls(Ex=655nm, Em=667nm)을 이용하고, 사용한 기기 한계 상 단면 전체를 촬영할 수 없어 단면의 바깥 부분과 내부부분으로 나누어 촬영을 진행한다.

[0114] 더불어 본 발명에 일 실시 예에 따른 AHL 노출에 따른 미세조류 비드 반응기의 수질 영향 분석을 실시 하였는데, 실험에 사용된 미세조류(S.quadricauda)는 혼합영양대사를 하는 미세조류로, 고정화시킨 뒤 종속영양 조건(heterotrophic conditions: H)과, 혼합영양조건(mixotrophic conditions: M)으로 나눠 하수처리를 수행한다.

[0115] 또한, 하수처리 중 필연적으로 마주치게 되는 박테리아 AHL을 노출시켰고 그 영향을 확인하기 위해 수질분석을 진행한다.

[0116] 각 수질 결과는 운전 시작 후 비드의 안정화와 AHL 순응(acclimatization)을 거친 결과이고, AHL을 노출시킨 종속영양조건 비드 반응기는 H_{w/}, 혼합영양조건 비드 반응기는 M_{w/}, AHL을 노출시키지 않은 종속영양조건 비드 반응기는 H_{w/o}, 혼합영양조건 비드 반응기는 M_{w/o}로 표기한다.

[0117] 이에 따른 기초수질 분석 및 유기물 분석을 살펴보면, 미세조류의 성장과 비드 유지에 영향을 줄 수 있는 인자인 DO와 pH는 폭기의 영향으로 아래의 [표 14]와 같이 일정하게 유지되었고, M_{w/} 와 M_{w/o}의 pH는 7.0-7.1 로 10%의 이산화탄소가 포함된 공기의 주입으로 이산화탄소가 지속적으로 용해되어 H_{w/} 와 H_{w/o}(8.5-8.6)에 비하여 낮은 수준을 보인다.

표 14

항목	단위	종속영양조건		혼합영양조건	
		H _{w/o}	H _{w/}	M _{w/o}	M _{w/}
DO	mg/L	7.6±0.3	7.7±0.6	7.6±0.3	7.6±0.2
pH	-	8.6±0.1	8.5±0.1	7.0±0.1	7.1±0.2

[0119] 반응기에 잔류하는 soluble COD, soluble N 및 soluble P 농도의 분석결과는 도 4a, 도 4b, 도 4c 및 아래의 [표 15]와 같다.

표 15

항목	종속영양조건		혼합영양조건	
	H _{w/o}	H _{w/}	M _{w/o}	M _{w/}
Soluble COD	93±2.8	92±4.2	93±2.1	94±1.9
Soluble N	24±4.8	26±4.5	40±6.6	38±6.2
Soluble P	42±6.7	38±5.6	95±5.6	96±5.2

[0121] 분석결과는 반응기의 안정화를 거친 후의 분석 결과로 알지네이트로부터 흡착되는 영향은 제외될 수 있다.

[0122] 네 반응기의 잔류 soluble COD 농도는 18-26mg/L로 95-97%의 높은 제거율을 보였는데, 이는 미세조류가 주 유기탄소원인 포도당과 AHL 용제로 사용된 에탄올을 기질로써 쉽게 이용한 것으로 보인다.

[0123] H_{w/o}, H_{w/}의 잔류 soluble N은 44-45mg/L, M_{w/o}, M_{w/}는 36-37mg/L로 각각 24-26%, 38-40%의 제거율을 보였는데, 미세조류는 세포호흡의 중간과정 중 하나인 TCA회로에서 중간생성물인 키토글루타르산염(ketoglutarate)가 암모늄과 결합하여 글루타메이트(glutamate)를 합성하기 때문에 종속영양조건(H_{w/o}, H_{w/})에서 soluble N이 저감되었다.

[0124] M_{w/o}, M_{w/}는 미세조류의 광합성 대사로 H_{w/o}, H_{w/}보다 약 15% 더 높은 제거율을 보였지만, 잔류하고 있는 soluble N이 존재한다.

[0125] 따라서 본 발명에 따른 미세조류는 고정되어 있기 때문에 비드 내부까지 빛이 닿지 않는 셀프-셰이딩(self-shading) 효과의 영향으로 광합성 대사가 저해된 것으로 보이고, 또한 미세조류는 느린 질소(N) 흡수 능력을 보인다.

[0126] H_{w/o}, H_{w/}의 잔류 soluble P는 5.3-5.7mg/L, M_{w/o}, M_{w/}는 0.4-0.5mg/L로 각각 38-42%, 95-96%의 제거율을 보였고, H_{w/o}, H_{w/}의 pH는 8.5-8.6로, 인산이온은 높은 pH(특히 pH>8.5)에서 하수나 비드의 칼슘이온과 결합하여 칼슘인산염(calcium phosphate)의 형태로 침전될 수 있기 때문에, 침전물 형성에 의하여 soluble P가 감소되었다.

[0127] M_{w/o}, M_{w/}는 미세조류(S.quadricauda)의 빠른 인 흡수 능력과 광합성 대사로 인하여 높은 제거율을 보였고, AHL의 노출에 따른 soluble COD, soluble N, soluble P 제거율 차이는 나타나지 않아 안정하게 유지됨을 알 수 있다.

[0128] 따라서 미세조류 비드를 이용한 하수처리 시, 박테리아 AHL의 노출은 처리 효율에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

[0129] 유기물 분석으로 DOC, UV₂₅₄, SUVA₂₅₄ 및 F-EEM 형광분석을 진행하였고, DOC, UV₂₅₄, SUVA₂₅₄ 분석결과는 도 5a 내지 도 5c와 같다.

[0130] 이를 참조하여 살펴보면, DOC 농도는 네 반응기 평균 3.1-3.8mg/L로 98%의 높은 제거율 보였고, 높은 soluble COD 제거율과 마찬가지로 유입수의 유기탄소원을 미세조류가 기질로써 쉽게 이용하였기 때문이다.

[0131] 그리고 네 반응기의 UV₂₅₄ 흡광도 값은 0.11-0.17cm⁻¹을 보였고, 유입수는 인공하수로써 UV₂₅₄ 흡광도에서 반응하지 않았으며 (< 0.001 cm⁻¹), 유입수 대비 증가된 유출수의 UV₂₅₄ 흡광도는 미세조류로부터 유래된 유기물이다.

[0132] 다만, 비드로부터 알지네이트가 용해될 수 있고, 알지네이트는 UV₂₅₄ 파장에 약하게 반응을 보이기 때문에 UV₂₅₄ 상승에 영향을 준다.

[0133] SUVA₂₅₄는 3.61-4.38L/mg-m으로 확인되었고, 조류 유래 유기물질(algal organic matter: AOM)은 높은 비율의 친수성 유기물을 포함하고 있어 2 L/mg-m 이하의 낮은 SUVA₂₅₄ 값을 보이는 것으로 알려져 있는 것에 반해, SUVA₂₅₄는 상대적으로 높은 값을 나타낸다.

[0134] 이는 낮은 잔류 DOC 농도와 조류 유래 유기물질로 인하여 증가된 UV₂₅₄ 흡광도로 인하여 높은 SUVA₂₅₄ 값을 보인다.

것으로 확인된다.

- [0135] AHL의 노출에 따른 DOC 농도 차이는 보이지 않았고, UV₂₅₄와 SUVA₂₅₄ 값은 AHL이 노출된 반응기에서 낮은 값을 보였으나, 그 차이는 통계적으로 유의하지 않는다(p>0.05).
- [0136] 박테리아 AHL의 노출은 미세조류로부터 방출되는 방향족 유기물의 양에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.
- [0137] F-EEM을 이용한 유출수의 형광특성 분석 결과는 도 6a 및 도 6b에 나타내었는데, 유입수와 알지네이트(alginate) 용액은 F-EEM 형광에 반응하지 않았으며 유입수 대비 증가된 유출수의 형광 분석 결과는 미세조류로부터 유래된 유기물이다.
- [0138] 형광분석 결과 네 반응기는 영역 간의 경향이 동일했고(peak T1> peak T2> peak A> peak C), 방향족 단백질 계열인 peak T1, peak T2에서 높은 형광을 띠었다.
- [0139] 이는 intracellular organic matters(IOM), extracellular organic matters(EOM)은 peak T2에서 강한 형광을 띠고, AOM은 peak T1, peak T2, peak A, peak C 순으로 강도가 높았으며, peak T2은 트립토판 계열로, 이 영역은 soluble microbial products(SMP) 유사 영역으로 불리며, 미생물 활성화에 관련이 있고 미생물 활동에 의해 생성이 가능하다.
- [0140] 따라서 해당 유출수의 높은 peak T2은 미세조류로부터 기원된 유기물로 판단이 가능하고, H_{w/o}와 H_w의 형광강도는 서로 비슷한 수준을 보였으나, H_w는 AHL을 노출시키지 않은 두 조건에 비하여 증가한데 반해 M_w는 감소하였다.
- [0141] 그리고 SMP는 미생물이 기질을 섭취하고 생장활동 하면서 생성·방출되거나, 미생물이 사멸하며 발생하는 용해성 물질인데, 상기 SMP는 기질 농도나 바이오매스 농도에 비례하여 생성되며, 기질 농도 및 에너지원의 변화, 삼투압 변화 등 환경적으로 스트레스를 받으면 증가된다.
- [0142] H_w의 미세조류는 AHL이 스트레스로 작용하여 SMP의 생성이 증가 되었고, 이에 따라 peak T1, peak T2의 형광강도도 증가하였다.
- [0143] 또한, M_w는 부착성장이 이루어진 미세조류 응집체와 방향족 단백질 계열인 peak T1, peak T2가 소수성 상호작용으로 흡착되어 형광강도가 감소되었다.
- [0144] 박테리아 AHL의 노출은 배양조건에 따라 다른 F-EEM 결과를 보였고, H_{w/o} 대비 증가된 H_{w/o}의 peak T1, peak T2는 AHL 스트레스로 인한 SMP 증가 영향으로, M_{w/o} 대비 감소된 M_w의 peak T1, peak T2는 형성된 응집체로부터 흡착되어 감소되었다.
- [0145] 과불화화합물(PFASs) 분석결과를 도 7과 [표 16]에 나타내었다.

표 16

항목	분류	잔류 농도(ng/L)
PFBA(C=4)	짧은 사슬	85±13
PFBS(C=4)	짧은 사슬	84±5
PFPeA(C=5)	짧은 사슬	73±11
PFxA(C=6)	짧은 사슬	73±8
PFxS(C=6)	긴 사슬	23±7
PFHpA(C=7)	긴 사슬	62±5
PFOA(C=8)	긴 사슬	56±7
PFOS(C=8)	긴 사슬	23±7
PFNA(C=9)	긴 사슬	7±2
PFDA(C=10)	긴 사슬	9±2

- [0147] 도 7과 [표 16]을 살펴보면, 탄소 개수에 따라 오름차순으로 정렬하였으며 짧은 사슬 PFASs와, 긴 사슬 PFASs로 구분할 수 있고, 배양조건은 AHL 노출 유무에 상관없이 네 반응기 모두 비슷한 제거율을 보였다.
- [0148] 그러나 화합물간 제거율은 상이하였는데, 특히 탄소 개수가 증가함에 따라 제거율이 대체로 증가하는 것을 확인

할 수 있었다.

- [0149] 짧은 사슬의 PFAS인 PFBA(C=4), PFBS(C=4), PFPeA(C=5), PFHxA(C=6)는 네 반응기에 대하여 각각 $34 \pm 10\%$, $29 \pm 4\%$, $26 \pm 11\%$, $34 \pm 7\%$ (n=16)의 제거율을 보였고, 긴 사슬 PFAS인 PFHxS(C=6), PFHpA(C=7), PFOA(C=8), PFOS(C=8), PFNA(C=9), PFDA(C=10)는 각각 $81 \pm 5\%$, $50 \pm 4\%$, $55 \pm 5\%$, $82 \pm 6\%$, $88 \pm 4\%$, $38 \pm 15\%$ (n=16)의 제거율을 보였다.
- [0150] PFASs는 매우 안정한 물질로써 막 공정을 제외하면 주로 흡착에 의해 제거되는 경향으로, 긴 사슬의 PFASs는 소수성 상호작용(hydrophobic interaction), 짧은 사슬의 PFASs는 정전기적인 상호작용(electrostatic interaction)으로 제거되는 것이 지배적이며, 대체로 긴 사슬의 PFASs가 더 높은 제거율을 보인다.
- [0151] 이러한 이유는 긴 사슬의 PFASs는 짧은 사슬의 PFASs 보다 더 많은 C-F 사슬(소수성을 띠는)을 가지고 있어 소수성 특성을 더 많이 띠기 때문이다.
- [0152] 그리고 긴 사슬을 갖는 PFASs 일수록 소수성 특성을 갖는 미세조류 표면에 쉽게 흡착되어 긴 사슬의 PFASs가 짧은 사슬의 PFASs에 비하여 더 높은 제거율을 보인다.
- [0153] 또한, 탄소 사슬 수 8개를 갖는 PFAS 중 PFOA의 제거율은 $55 \pm 5\%$, PFOS의 제거율은 $82 \pm 6\%$ 로, 설펡산(sulfonic acid)을 가지고 있는 PFOS가 카복실산(carboxylic acid)을 가지고 있는 PFOA 보다 제거율이 높은 것을 알 수 있다.
- [0154] 이는 PFOS의 설펡산이 PFOA의 카복실산보다 더 낮은 수용해도(water solubility)를 갖고, PFOS(C₈F₁₇S₃O₃H)가 PFOA(C₇F₁₅COOH)보다 더 많은 C-F 결합을 갖기 때문에, 결국 PFOS가 더 강한 소수성 특성을 보일 수 있는 조건을 만족함으로써 더 강한 흡착력을 보인 것으로 판단된다.
- [0155] 반면에, 짧은 사슬의 PFASs는 긴 사슬의 PFASs(51-81 %)에 비하여 낮은 제거율(26-34 %)을 보였다.
- [0156] 이는 < 3 수준의 낮은 해리 상수 값을 갖는 PFASs는 수처리 과정 중 대체로 음이온의 성격을 띠고, 미세조류(pKa=3.5-5, 미세조류의 세포벽)와 알지네이트(alginate)(=3.5) 또한, 카복실기의 영향으로 음전하를 띠기 때문에 정전기적인 반발력으로 인하여 흡착 저해가 일어난 것으로 판단된다.
- [0157] 또한, 지배적인 기작은 아니나, 비드의 가교제인 Ca^{2+} 이온이 알지네이트의 카복실기(음이온)와 PFASs(음이온) 사이를 잇는 가교역할을 하여 제거에 영향을 줄 수 있다.
- [0158] AHL 노출에 따른 PFASs 제거율 차이는 나타나지 않았는데, 상기 PFASs는 생분해가 아닌 주로 흡착에 의해 제거되는 물질로, 박테리아 AHL 노출은 미세조류 비드의 PFASs 제거에 큰 영향을 주지 않는 것으로 판단되며, 긴 사슬의 PFASs가 미세조류와의 소수성 상호작용으로 짧은 사슬의 PFASs 보다 높은 제거율을 보인다.
- [0159] 탈착 미세조류 농도 분석을 살펴보면, 비드로부터 탈착되는 미세조류 농도를 분석하였고, 도 8a 내지 8c와 [표 17]에 나타내었다.

표 17

항목	$H_{w/o}$ 대비 H_w 감소율	$M_{w/o}$ 대비 M_w 감소율
Turbidity	35%	52%
OD ₆₈₀	34%	42%
Cell counts	44%	42%

- [0161] 도 8a 내지 8c와 [표 17]을 참조한 유입 · 유출수는 회분식으로 교체되므로 유출수의 SS 농도는 비드로부터 탈착되는 미세조류 농도라고 볼 수 있다.
- [0162] $M_{w/o}$ 와 M_w 가 $H_{w/o}$ 와 H_w 보다 더 높은 탈착 미세조류 농도를 보였고, $M_{w/o}$ 의 turbidity, OD₆₈₀, cell counts는 $H_{w/o}$ 에 비해 각각 약 105%, 88%, 742% 더 높은 경향을 보였으며, M_w 는 H_w 에 비하여 각각 50%, 65%, 774% 증가된 경향을 보였다.
- [0163] 이는 종속영양조건에 비하여 혼합영양조건인 미세조류가 더 높은 성장률을 갖기 때문으로 보인고, 배양조건에 대한 미세조류의 성장률 차이는 이전 결과에서도 동일한 경향을 나타냈다.

- [0164] 종속영양조건에서는 미세조류가 지수 성장기를 보이지 않거나 바이오매스 함량이 약간의 감소 혹은 약간의 증가를 보인 것에 반해, 혼합영양조건에서는 최대 8배 가량 증가됨을 보여, 상기 미세조류는 혼합영양조건에서 더 높은 성장률을 가진다.
- [0165] AHL을 노출시킨 $H_{w/}$ 와 $M_{w/}$ 는 노출시키지 않은 $H_{w/o}$ 와 $M_{w/o}$ 에 비하여 탈착 미세조류 농도가 감소하였고, $H_{w/}$ 는 유출수의 turbidity, OD₆₈₀, cell counts에 대하여 $H_{w/o}$ 대비 각각 35%, 34%, 44% 감소율을 보였고($p<0.05$), $M_{w/}$ 는 $M_{w/o}$ 대비 각각 52%, 42%, 42% 감소율을 보였다($p<0.05$).
- [0166] 그리고 AHL 노출은 배양조건에 관계없이 비드로부터 미세조류 탈착량을 감소시켜 유출수의 수질을 높이는 것으로 나타났는데, 좀 더 명확한 AHL의 노출 영향을 분석하기 위해 반응기 운전종료 후 균열이 발생한 비드 수를 세었고, 비드 직경 분석, 비드 내 미세조류 비드 농도(DCW, cell counts) 분석, 공초점 레이저 현미경 분석을 진행하였다.
- [0167] 수질분석 결과 AHL 노출에 따른 오염물질 제거율 차이는 보이지 않았으나 비드로부터 탈착되는 미세조류 농도는 감소되어 유출수의 수질을 높이는 것을 확인하였는데, 이에 좀 더 명확한 AHL 영향을 알기 위하여 비드 분석을 진행하였다. 비드 분석은 반응기 운전 시작 전과 운전 종료 후 실시되었다.
- [0168] 도 9 및 도 10을 참조하면 비드 분석을 진행하기 앞서 운전 전·후 비드의 색이 변화됨을 육안으로 확인할 수 있다.
- [0169] 배양조건에 따라 비드의 색이 달랐으며 $H_{w/o}$ 와 $H_{w/}$ 비드는 운전 전보다 색이 옅어져 비드 내의 미세조류 농도가 감소하여 보였고, $M_{w/o}$ 와 $M_{w/}$ 비드는 비드의 색이 짙어져 성숙되었다.
- [0170] AHL을 노출시킨 혼합영양조건($M_{w/}$) 비드는 바이오필름(biofilm)로 추정되는 끈적한 물질이 비드에 두껍게 붙어 있는 것을 확인할 수 있었다.
- [0171] 촬영된 사진의 밝기가 동일하지 않으므로 AHL의 노출 유무 간 차이를 보는 것은 적합하지 않다.
- [0172] 또한, 조각난 비드 수 분석을 살펴보면, 반응기 운전 전·후 온전한 비드의 형태는 도 11과 같다. 운전 후 조각난 비드는 비드에 금이 가 벌어진 상태인 "균열이 난 비드 (cracked bead)"와 완전히 쪼개져 "파편이 된 비드 (fragment)" 두 가지로 관찰됐으며, 혼합영양조건에서 균열이 난 비드는 발견되지 않았다.
- [0173] 균열이 나거나 파편으로 분리된 비드는 도 12와 같은 형태를 띠었고, 운전에 사용된 비드의 개수는 반응기 당 약 400개로 관찰되었다.
- [0174] 도 12를 참조하면, $H_{w/o}$ 의 조각난 비드의 수는 77개, $H_{w/}$ 는 27개, $M_{w/o}$ 는 9개, $M_{w/}$ 는 3개로 관찰되어 각각 전체 비드 수 대비 19%, 6.8%, 2.3%, 0.8%의 발생률을 보였고, $M_{w/o}$ 와 $M_{w/}$ 가 $H_{w/o}$ 와 $H_{w/}$ 에 비하여 각각 88%, 89% 더 낮은 균열 및 파편 발생률을 보였다.
- [0175] 미세조류의 성장률은 비드의 균열 및 파편 발생 저감에 영향을 미치며, 높은 성장률을 갖는 혼합영양조건에서 더 많이 저감되는 것으로 보인다.
- [0176] 미세조류를 포함하여 대부분의 미생물은 성장이 진행됨에 따라 세포 외로 끈적한 특성을 가진 고분자 물질(extracellular polymeric substances; EPS)을 방출한다.
- [0177] 본 실험의 혼합영양조건 미세조류는 높은 성장률로 인하여 비교적 높은 양의 EPS 방출이 이루어졌고, 미세조류 간 결속력을 키워 비드의 균열 및 파편 발생을 감소시킨 것으로 판단된다.
- [0178] 배양조건에 관계없이 미세조류 비드는 AHL 노출로 균열 및 파편 발생량의 저감을 보였고, $H_{w/}$ 는 $H_{w/o}$ 에 비하여 65%의 감소율(77개 → 27개)을 보였고, $M_{w/}$ 는 $M_{w/o}$ 에 비하여 67%의 감소율(9개 → 3개)을 보였다.
- [0179] 이를 미루어 보아 AHL은 미세조류의 자가응집(self-aggregation)을 촉진시켜 미세조류 간 결속력이 상승되어 비드의 균열이 감소되었다.
- [0180] AHL의 노출에 대한 영향으로 미세조류가 자가응집은 미세조류에 AHL을 노출시킨 결과, 활성 슬러지 플록과 유사한 바이오플록(Bioflocs)이 형성되어 미세조류가 AHL의 영향으로 자가응집이 되었다.
- [0181] 미세조류 비드에 대한 AHL 노출은 자가응집의 영향으로 조각난 비드(균열 및 파편이 발생)의 수를 감소시켜 비

드의 유지력이 향상된다.

[0182] 특히 혼합영양조건에서의 AHL의 노출(M_w)은 미세조류의 높은 성장률과 AHL의 자가응집 영향으로 가장 적은 발생량을 보여 비드를 가장 오랫동안 안정적으로 가용할 수 있다.

[0183] 비드 직경 및 비드 내 미세조류 농도를 분석하면, 반응기 운전 전·후 비드의 직경과 비드 내 미세조류 농도(DCW, cell counts) 분석 결과를 도 14 및 도 15와 아래의 [표 18]과 같다.

표 18

항목	$H_{w/o}$ 대비 H_w 감소율	$M_{w/o}$ 대비 M_w 증가율
Diameter	4.8%	3.7%
DCW	17%	19%
Cell counts	7.2%	16%

[0185] 도 14 및 도 15와 아래의 [표 18]을 참조하면, 운전 후 비드의 직경은 운전 종료 3일 전부터 운전 종료 시까지 측정하여 평균을 낸 값이며, 운전 후 비드 내 미세조류 농도는 비드를 녹인 뒤 현탁액 상태에서 측정한 후 비드 1개당(/bead) 농도로 나눠 표현한 값이다.

[0186] 운전이 종료된 비드는 운전 전 비드에 비하여 직경은 증가(17-32 %)하고, DCW는 감소(13-70 %) 하였다.

[0187] 직경의 증가는 비드의 팽창(swelling) 현상, DCW의 감소는 알지네이트의 용해로 인한 결과로, 하수처리 중 비드끼리 부딪히거나 하수의 음이온(PO_4^{3-} 등)의 유입 등, 비드에 물리적·화학적 압력이 지속적으로 가해짐에 따라 칼레이트 고리를 가지고 있는 칼슘-알지네이트(Ca-alginate) 결합이 약화될 수 있기 때문이다.

[0188] 알지네이트(Alginate)는 음전하를 갖는 폴리머로 높은 pH 에서 팽창될 수 있으나, pH 3-9 범위에서 일정히 유지됨에 따라 정전기적인 인력으로 인한 비드 직경의 변화는 무시될 수 있다.

[0189] 또한, cell counts값은 배양조건 간의 성장률 차이에 따라 초기조건 대비 종속영양조건 비드는 감소(76-78 %)하고, 혼합영양조건 비드는 증가(36-59 %) 하였다.

[0190] $H_{w/o}$ 비드의 직경은 4.72 ± 0.06 mm, $M_{w/o}$ 는 4.89 ± 0.08 mm로, $M_{w/o}$ 가 $H_{w/o}$ 에 비하여 3.6% 더 큰 직경을 가진다.

[0191] 그리고 $H_{w/o}$ 비드의 DCW와 cell counts는 1.99mg/bead, 6.2×10^6 cells/bead, $M_{w/o}$ 는 3.97mg/bead, 4.1×10^7 cells/bead로, $M_{w/o}$ 가 $H_{w/o}$ 에 비하여 99%, 468% 높았다.

[0192] 미세조류는 종속영양조건에 비하여 혼합영양조건에서 더 높은 성장률을 보이기 때문에 $M_{w/o}$ 가 더 높은 미세조류 농도와 직경을 가진다.

[0193] H_w 는 $H_{w/o}$ 에 비하여 비드의 직경과 DCW가 감소하였고, M_w 는 $M_{w/o}$ 에 비하여 직경과 DCW, cell counts 모두 증가하였다.

[0194] 이는 배양조건에 따라 AHL의 영향이 다를 수 있음을 시사하며, M_w 가 더 큰 직경과 더 높은 미세조류 농도를 보이므로 혼합영양조건에서의 AHL 노출은 비드 형상 유지에 도움을 준다.

[0195] 배양조건에 따라 AHL의 영향이 다른은 아래에 서술되었으며, AHL의 노출에 따른 성장률 차이를 보기 위하여 total growth 분석을 진행한다.

[0196] Total growth 분석은 반응기간 동안 비드로부터 탈착된 미세조류 양과 운전 종료 후, 비드 내의 미세조류 양을 더함으로써 계산되었으며, 도 16 및 아래의 [표 19]에 나타내었다.

표 19

항목	$H_{w/o}$ 대비 H_w 감소율	$M_{w/o}$ 대비 M_w 감소율
Total growth	9.5%	0.2%

- [0198] 도 16 및 아래의 [표 19]를 참조하면, H_w 비드의 직경은 $4.49 \pm 0.01\text{mm}$ 으로 $4.72 \pm 0.06\text{mm}$ 의 직경을 갖는 $H_{w/o}$ 대비 4.8%가 감소하였고, H_w 비드의 DCW, cell counts는 각각 1.65mg/bead, 5.7×10^6 cells/bead로, 1.99mg/bead, 6.2×10^6 cells/bead인 $H_{w/o}$ 비드보다 17%, 7.2% 감소하였다.
- [0199] 종속영양조건에서 H_w 의 비드 내 미세조류 농도(DCW)와 비드로부터 탈착된 미세조류 농도가 감소한 것으로 판단되므로, AHL의 노출은 미세조류에 스트레스로 작용하였고 성장이 저해되었으며, 이에 비드 직경이 감소하였다.
- [0200] Total growth 분석 결과 H_w 의 총 성장한 미세조류는 3.1×10^9 cells로 $H_{w/o}$ 미세조류(3.5×10^9 cells)보다 약 9.5% 감소하여 성장이 저해되었다.
- [0201] 박테리아 자가유도물질의 노출에 대한 미세조류의 반응으로 종속영양조건에서는 스트레스 및 성장저해가 있었는데, 미세조류인 클로렐라 레귤라리스(*Chlorella regularis*)와 세네데스무스 오블리쿠스(*Scenedesmus obliquus*)에 AHL 중 하나인 *N*-hexanoyl-DL-homoserine lactone을 노출시킨 결과, 각각 35%, 50% 성장이 억제되었고 스트레스의 영향으로 항산화 효소가 증가되었다.
- [0202] 그리고 종속영양조건에서 미세조류인 *Chlorophyta sp.*에 활성 슬러지로부터 추출한 박테리아 자가유도물질(AI)을 노출시킨 결과, 스트레스의 영향으로 바이오매스 함량이 약 23% 감소되었고 지질 함량이 최대 86% 향상되었다.
- [0203] 따라서 본 발명에 따른 미세조류는 알지네이트에 고정되어 있어 부유하고 있는 미세조류에 비하여 상대적으로 낮은 성장률을 갖고, 외부요인으로부터 보호받을 수 있기 때문에 이전 결과에 비하여 성장 저해의 영향이 상대적으로 적게 나타났다.
- [0204] M_w 비드의 직경은 $5.07 \pm 0.03\text{mm}$ 으로 $4.89 \pm 0.08\text{mm}$ 의 직경을 갖는 $M_{w/o}$ 대비 3.7%가 증가하였다.
- [0205] M_w 비드의 DCW, cell counts는 각각 4.73mg/bead, 4.1×10^7 cells/bead로, 3.97mg/bead, 3.5×10^7 cells/bead인 $M_{w/o}$ 비드보다 19%, 16% 증가하였으며, 혼합영양조건에서 M_w 의 비드 내 미세조류 농도는 증가하고 비드로부터 탈착된 미세조류 농도는 감소한 것으로 보아, AHL의 노출 영향으로 미세조류의 자가응집이 촉진됨과 높은 성장률로 인한 상대적으로 높은 EPS 방출의 영향으로 부착성장이 이루어져, 부착성장이 이루어짐에 따라 비드의 직경이 증가되었다.
- [0206] 혼합영양조건 미세조류의 total growth 분석 결과 M_w 의 총 성장한 미세조류는 22.6×10^9 cells, $M_{w/o}$ 는 22.7×10^9 cells(-0.2% 감소)로 거의 차이를 보이지 않았다.
- [0207] 이에 따라 혼합영양조건의 미세조류는 부착성장의 영향으로 AHL 스트레스에 저항할 수 있다.
- [0208] 박테리아 자가유도물질(AI)의 노출에 대한 미세조류의 반응으로 혼합영양조건에서는 스트레스에 저항할 수 있고, 혼합영양조건에서 미세조류에 혐기성 슬러지에서 얻은 박테리아 자가유도물질(AI)을 노출시킨 결과, 약 2배 더 높은 성장을 보였다.
- [0209] 그리고 박테리아 quorum sensing reporter strains인 *Chromobacterium violaceum*(CV026)를 이용하여, bioassay test한 결과, *C.sorokiniana*가 박테리아 자가유도물질을 억제할 수 있는 2차 대사 산물을 분비함을 확인하였다.
- [0210] 그러므로 박테리아 AHL의 노출로 인하여 미세조류의 자가응집이 촉진됨은 성장 저해와 마찬가지로 AHL 스트레스로 인한 영향으로 보이고, 이처럼 미세조류가 박테리아 AHL의 신호를 이해하고 스트레스로 작용함을 보이는 이유는 미세조류가 박테리아를 기질과 공간을 두고 경쟁상대로 인지할 수 있기 때문이다.
- [0211] 따라서 미세조류의 신호 수용체 단백질(미세조류 LuxR 계열)이 박테리아 AHL을 인지하고 자신을 방어할 수 있는 유전자를 합성하여, 그 결과 자가응집의 영향이 촉진된 것이다.
- [0212] 일례로 일부 미세조류는 박테리아로부터 스스로 방어하기 위하여 AHL 비활성화 효소(lactonase, acylases 등)를 합성하며, 반대로 일부 박테리아는 살조성을 띠는 물질(2-alkyl-4-quinolones 등)을 방출하여 미세조류를 용해시키는 것으로 판단된다.
- [0213] 비드 분석과 비드로부터 탈착된 미세조류 농도 분석을 통하여 AHL은 미세조류에 스트레스로 작용하고 자가응집

을 유발한다.

- [0214] 종속영양조건에서의 AHL 노출($H_{w/}$)은 미세조류에 스트레스로 작용해 비드 내 미세조류 농도와 탈착 미세조류 농도, 직경을 감소시키는 반면, 혼합영양조건에서의 AHL 노출($M_{w/}$)은 부착성장으로 이어져 미세조류 농도와 직경이 증가되고, 탈착 미세조류 농도는 감소하였다.
- [0215] 또한, AHL 스트레스에 저항할 수 있는 것으로 나타나, 안정적으로 미세조류 비드 반응기를 운전할 수 있다.
- [0216] 공초점 레이저 현미경 분석을 살펴보면, 반응기 운전 전·후 비드의 공초점 레이저 현미경(CLSM) 분석을 실시하였다.
- [0217] 도 17 및 도 18은 비드의 외부 단면(바깥부분)과 내부 단면(내부부분)을 보인 것으로, 운전 전 미세조류 비드의 chlorophyll-a 신호는 고르게 분포되어 있고, 운전 후에도 모든 비드는 비드 바깥부분과 내부부분에 chlorophyll-a 신호가 있음을 알 수 있다.
- [0218] 그리고 조류를 고정화시킨 알지네이트 시트(alginate sheet immobilized algae system)의 원활한 기질 확산을 위한 유효깊이(effective thickness, algal sheet)는 2-3mm로 보고되고 있는데, 본 발명에서는 최대 $5.07 \pm 0.03\text{mm}$ 의 구형의 비드 타입으로 모든 방향에서 기질 확산이 가능하기 때문에 비드 내부까지 기질전달이 이루어짐을 알 수 있다.
- [0219] $H_{w/o}$, $H_{w/}$ 비드와 $M_{w/o}$, $M_{w/}$ 비드의 내부부분의 chlorophyll-a 신호 밀도 차이는 없거나 미세하게 $M_{w/o}$, $M_{w/}$ 비드가 높았고, 바깥부분의 chlorophyll-a 신호 밀도는 두드러지게 $M_{w/o}$, $M_{w/}$ 비드가 더 높았다.
- [0220] $M_{w/o}$, $M_{w/}$ 비드의 내부는 셀프 셰이딩(self-shading)효과로 인하여 $H_{w/o}$, $H_{w/}$ 비드와 비슷한 성장률을 이루었다.
- [0221] $H_{w/o}$, $H_{w/}$ 비드의 바깥부분의 낮은 신호의 밀도는, chlorophyll-a는 광합성을 위해 빛을 흡수하는 색소로 미세조류(*S. quadricauda*)는 종속영양조건에서는 엽록소가 발달되지 않아, 그 신호가 감소하였다.
- [0222] $M_{w/o}$, $M_{w/}$ 비드의 조밀한 바깥부분은 미세조류의 높은 성장률로 인한 비드의 변화로, EPS 방출 및 바이오필름 형성에 따른 미세조류 응집이 일어날 것이다.
- [0223] 그리고 이로 인하여 종속영양조건 비드에 비하여 비드의 균열 발생이 더 많이 저감되었고, $H_{w/}$ 비드의 내부부분과 바깥부분의 chlorophyll-a 신호 밀도는 $H_{w/o}$ 에 비하여 감소되었다.
- [0224] 이는 $H_{w/}$ 의 미세조류가 AHL 노출에 의하여 chlorophyll-a 형성이 저해되었거나 성장이 저해됨을 알 수 있고, Chlorophyll-a는 조류 상태를 평가하는데 사용할 수 있는 지표로써 AHL이 미세조류에 스트레스로 작용함을 알 수 있는 반면, $M_{w/}$ 비드의 바깥부분의 chlorophyll-a 신호 밀도는 $M_{w/o}$ 비드보다 밀도가 조밀하고, 밀도의 두께가 증가된 것으로 확인된다.
- [0225] 이는 $M_{w/}$ 의 미세조류는 응집이 촉진되었다는 것에 시각적으로 설명이 가능하다.
- [0226] $H_{w/}$ 비드는 AHL의 영향으로 chlorophyll-a 형성의 저해를 받았음을, $M_{w/}$ 비드는 조밀한 미세조류 응집체가 형성되었음을 CLSM 분석을 통하여 확인하였고, $M_{w/}$ 비드에서 관찰된 응집체가 비드를 안정적으로 결속시켜 혼합영양조건에서의 AHL 노출($M_{w/}$)은 비드 유지에 도움을 주는 것으로 판단된다.
- [0227] 하수처리를 위하여 칼슘-알지네이트(Ca-alginate)로 고정화된 미세조류 비드에 박테리아 AHL을 노출시켜 그에 따른 영향을 살펴보면, 종속영양조건과 혼합영양조건으로 나누어 수행되었고 유출수 수질 평가, 비드 평가를 진행하였다.
- [0228] 다음은 AHL 노출에 따른 미세조류 비드의 영향 연구 결과를 요약하면 아래의 [표 20]과 같다.

표 20

[0229]	$H_{w/}$ (heterotrophic)	$M_{w/}$ (mixotrophic)
기초수질 제거율	차이 없음	차이 없음
운전하지 않은 비드 수	감소	감소
탈착 미세조류 농도	감소	감소

비드 내 미세조류 농도, 비드 직경	감소	증가
성장률	감소	차이 없음
AHL 스트레스	자가응집, 성장의 저해	자가응집, 부착성장, 성장 저해의 영향에 저항

- [0230] 따라서 박테리아 AHL의 노출은 미세조류 비드 반응기의 수질 제거율에 영향을 끼치지 않아 반응기간 동안 안정적인 처리효율을 보였고, 미세조류는 AHL의 스트레스로 인해서 자가응집을 보임을 확인하였다.
- [0231] 그리고 높은 성장률을 가졌던 M_w 에서 부착성장이 이루어져 비드의 유지력을 키울 수 있고, 미세조류 비드를 이용한 하수처리에서 미세조류가 혼합영양조건 등으로 인하여 높은 성장률을 가질 시, 박테리아 AHL 노출은 비드의 지속에 도움을 줄 것이다.
- [0232] 본 발명은 도면에 도시된 실시 예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 본 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시 예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

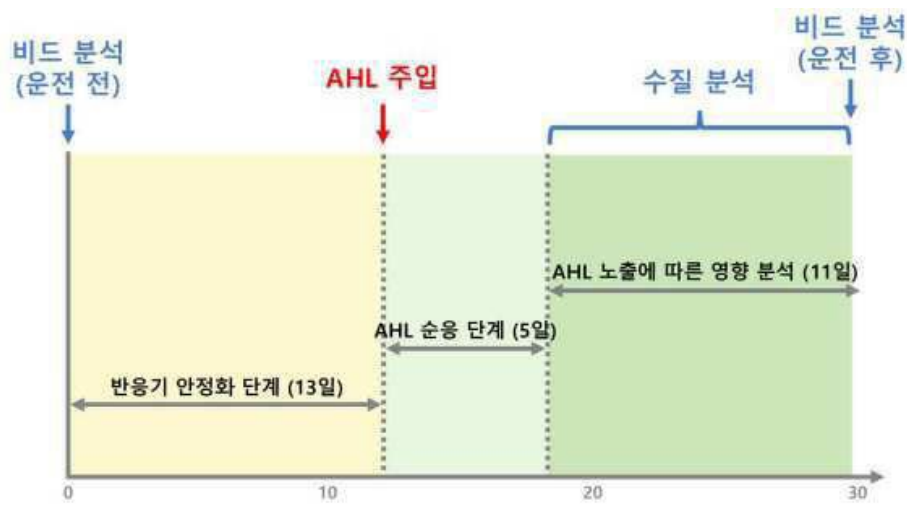
도면1



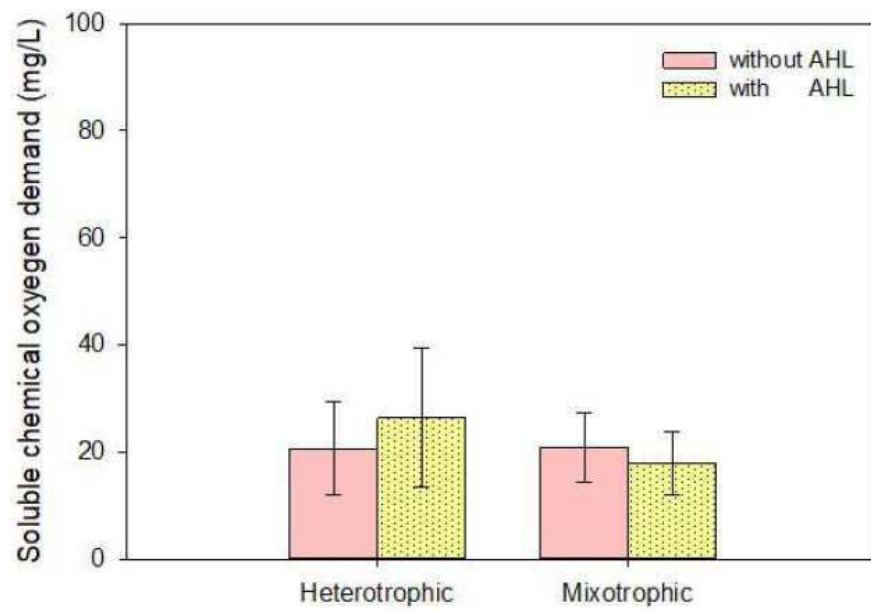
도면2



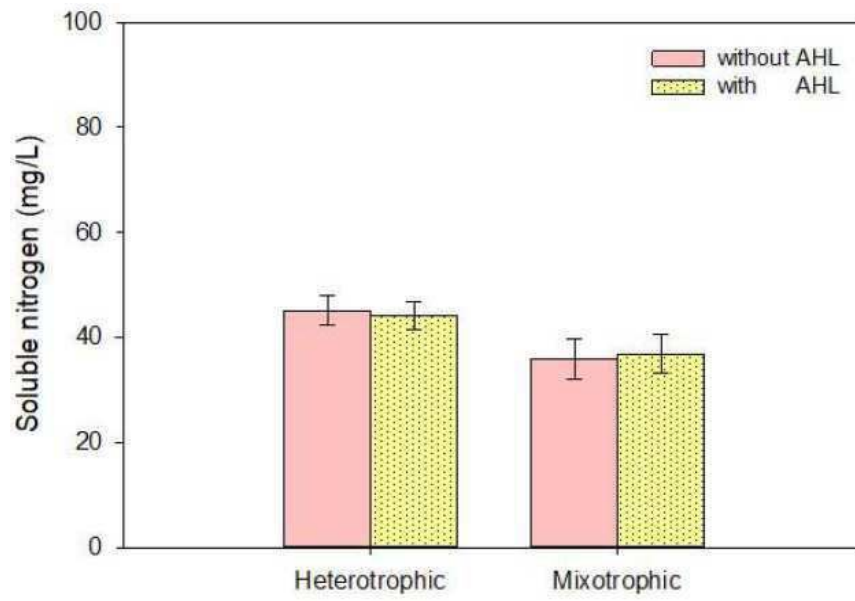
도면3



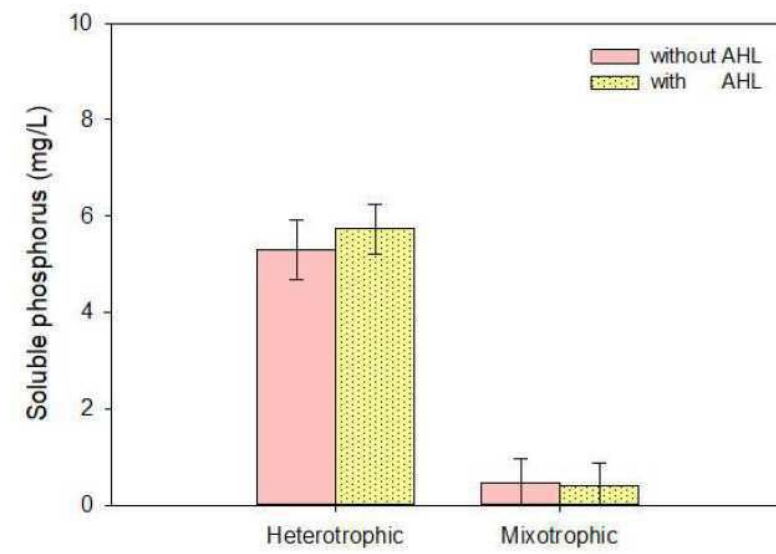
도면4a



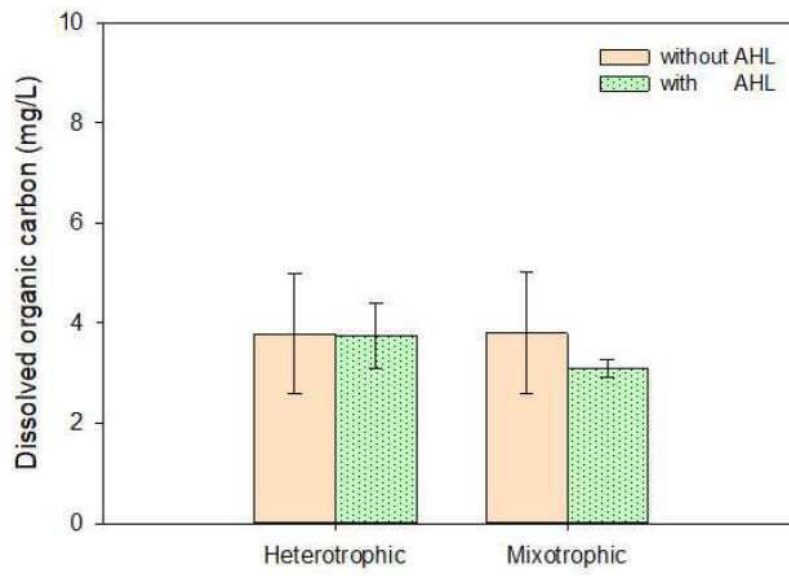
도면4b



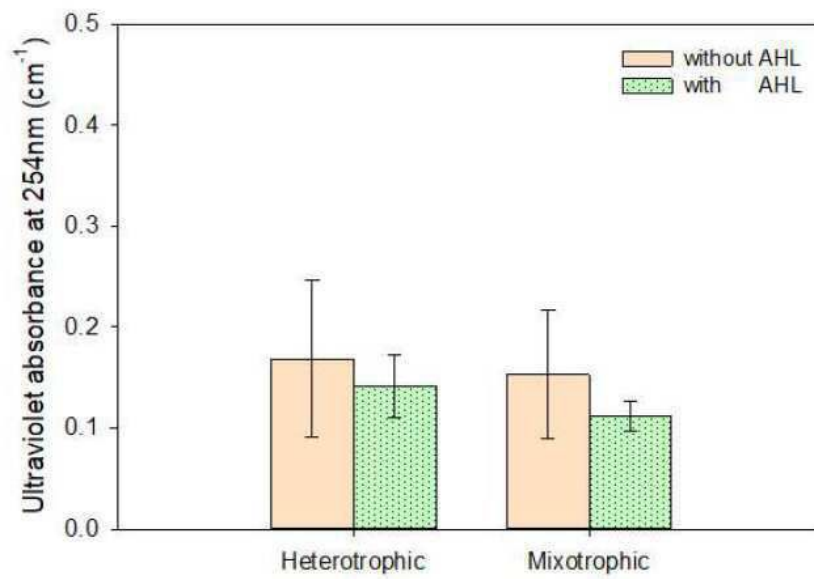
도면4c



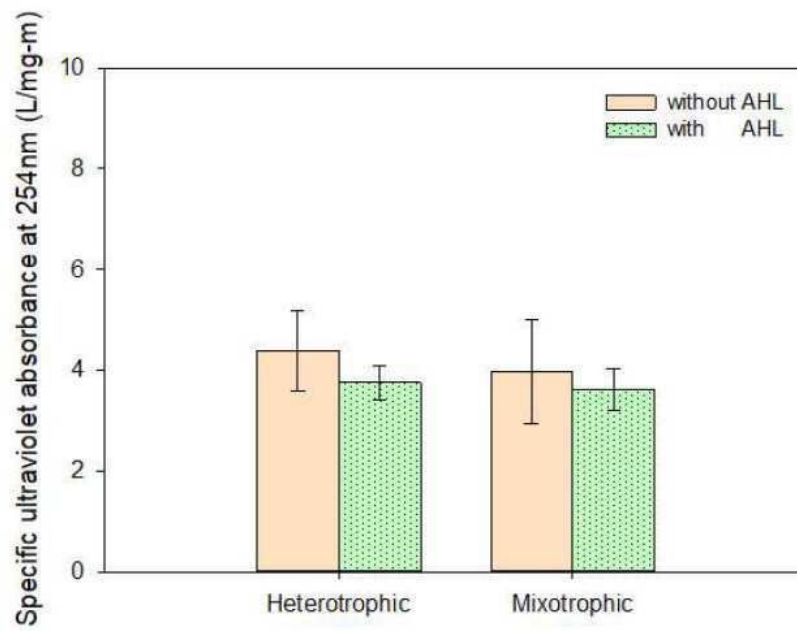
도면5a



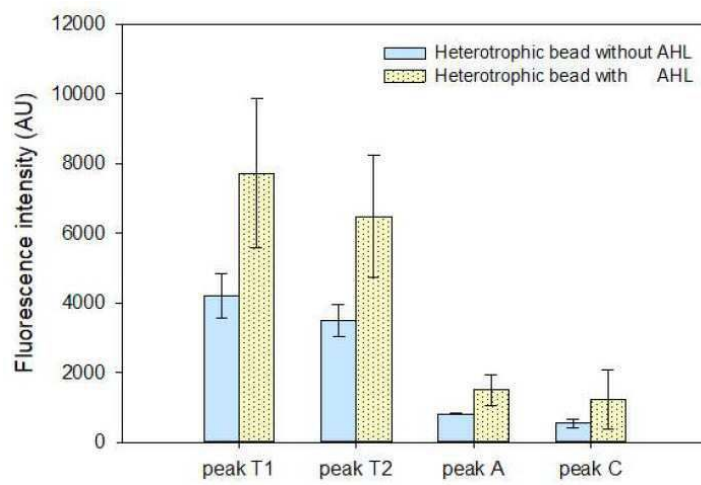
도면5b



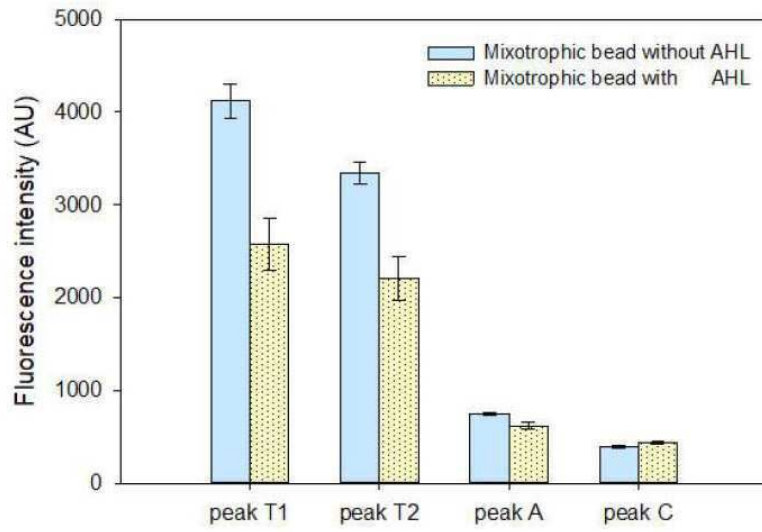
도면5c



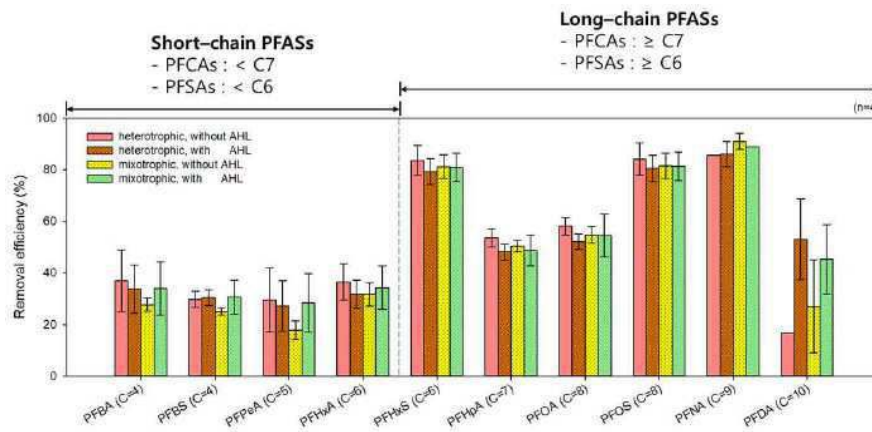
도면6a



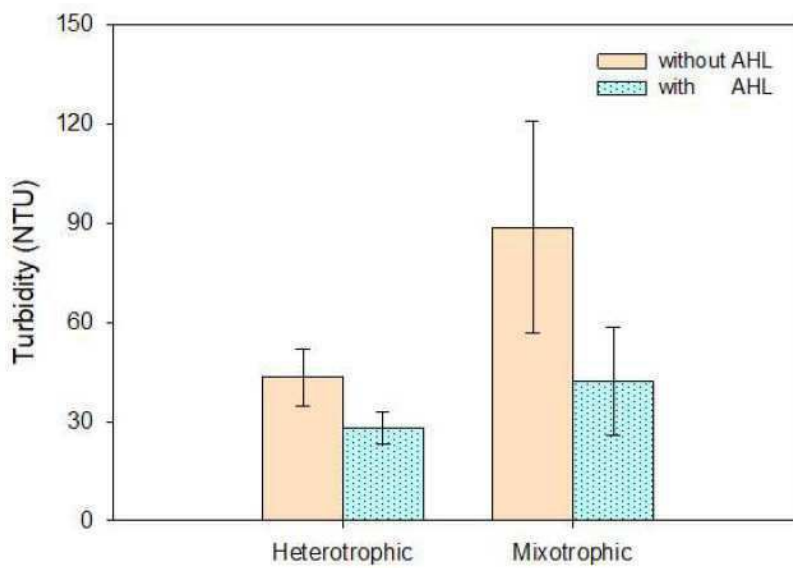
도면6b



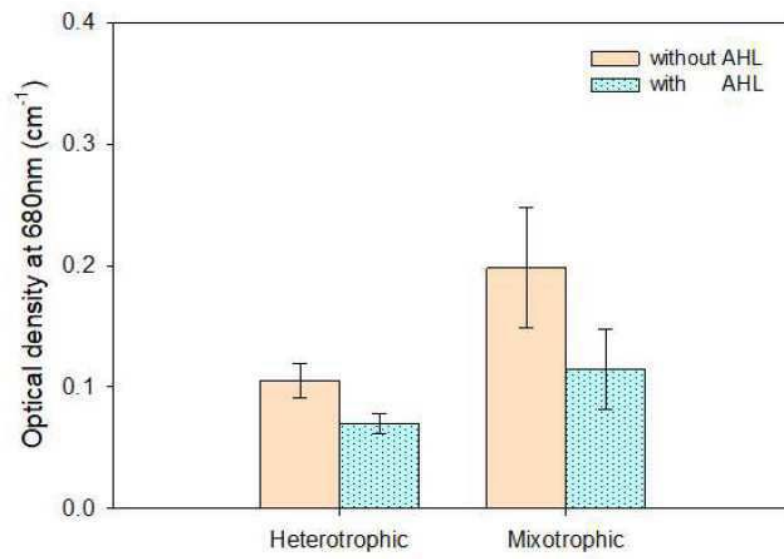
도면7



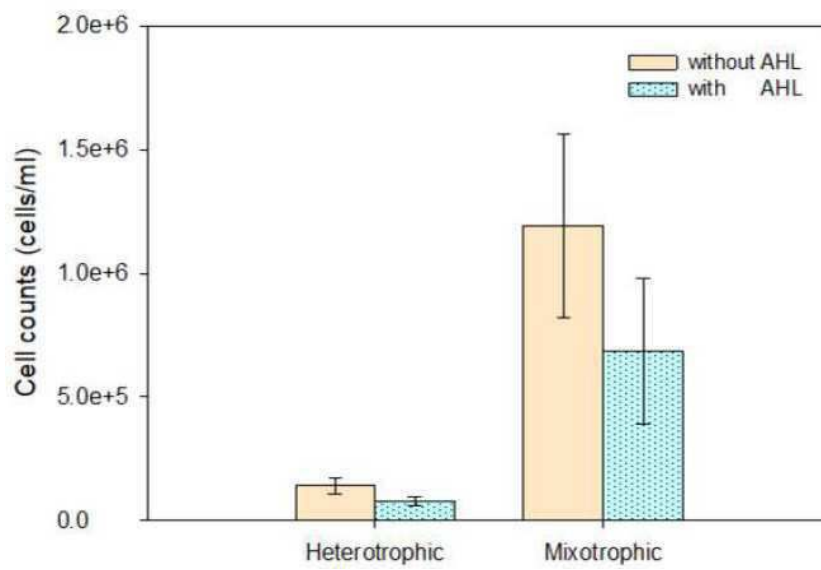
도면8a



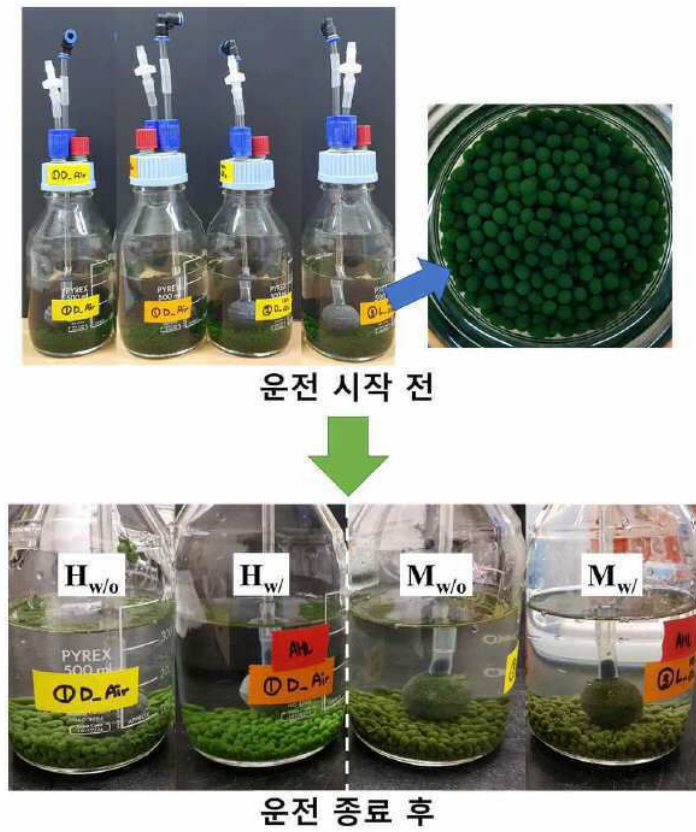
도면8b



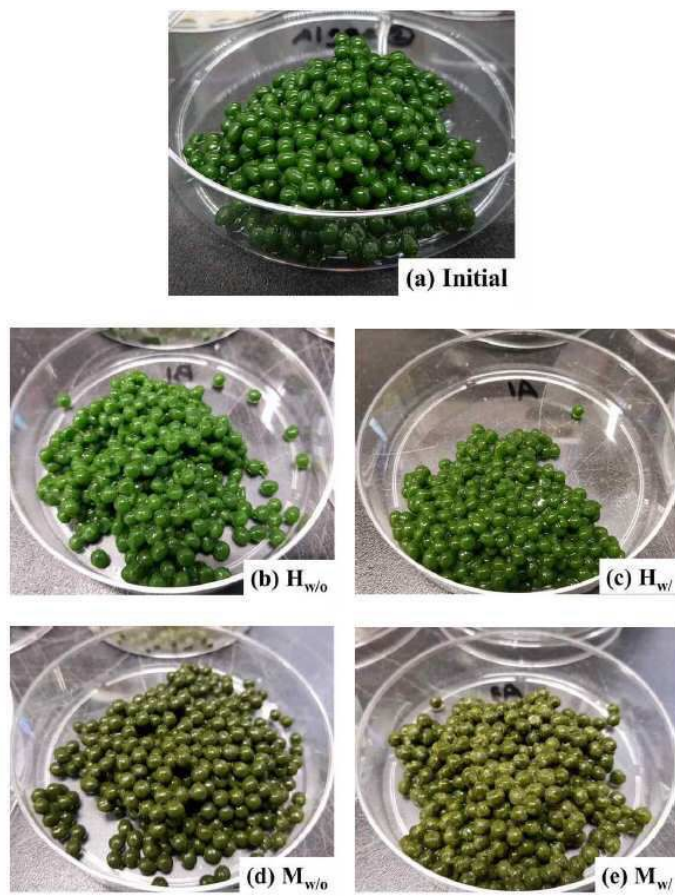
도면8c



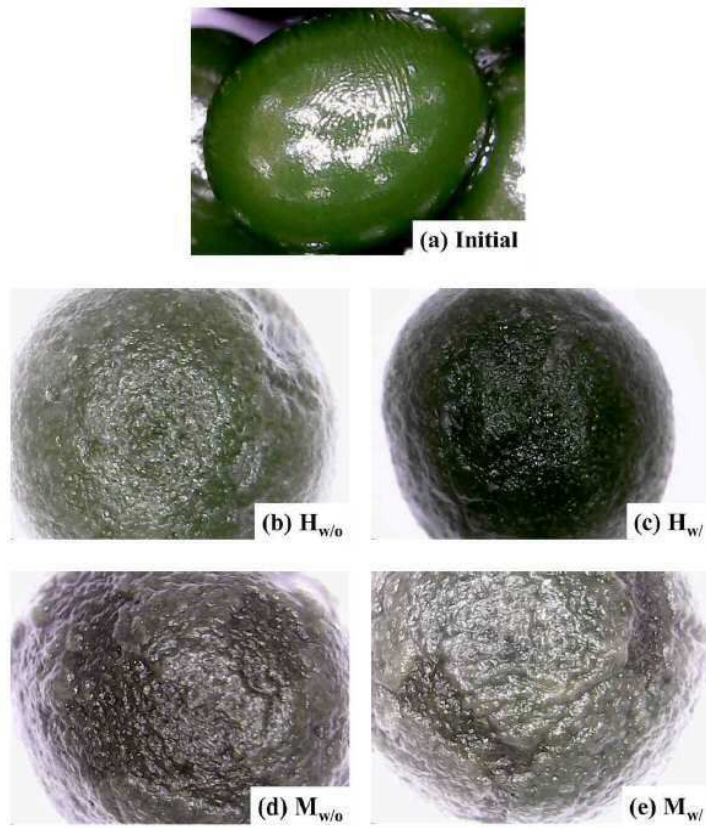
도면9



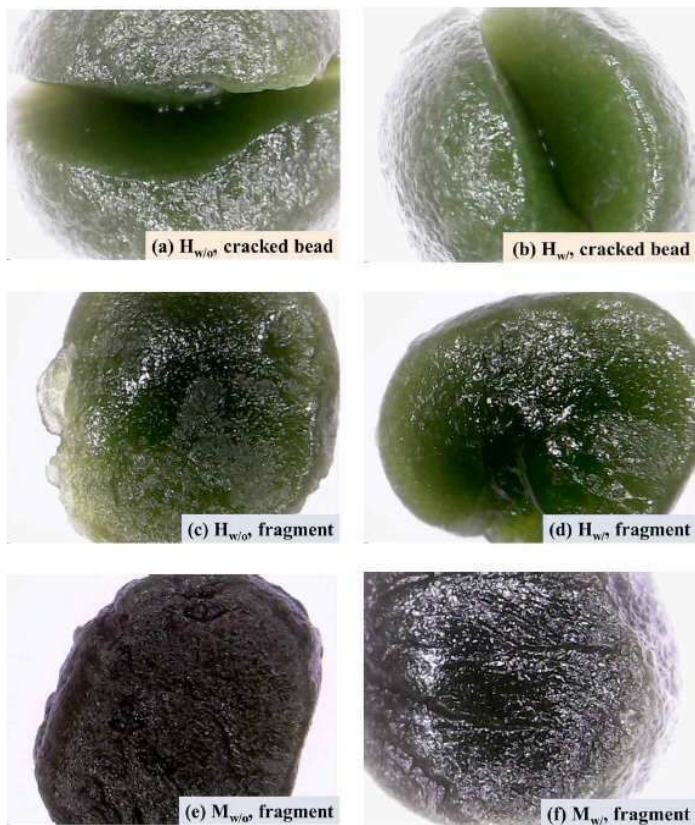
도면10



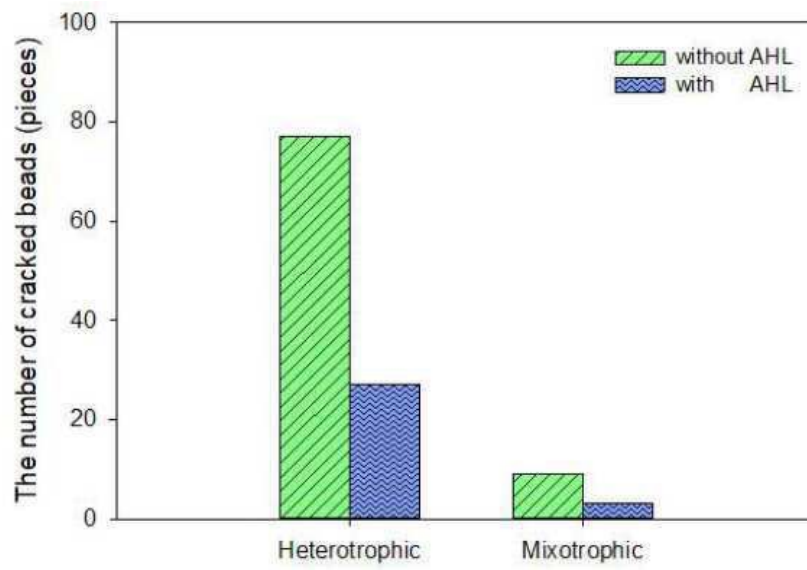
도면11



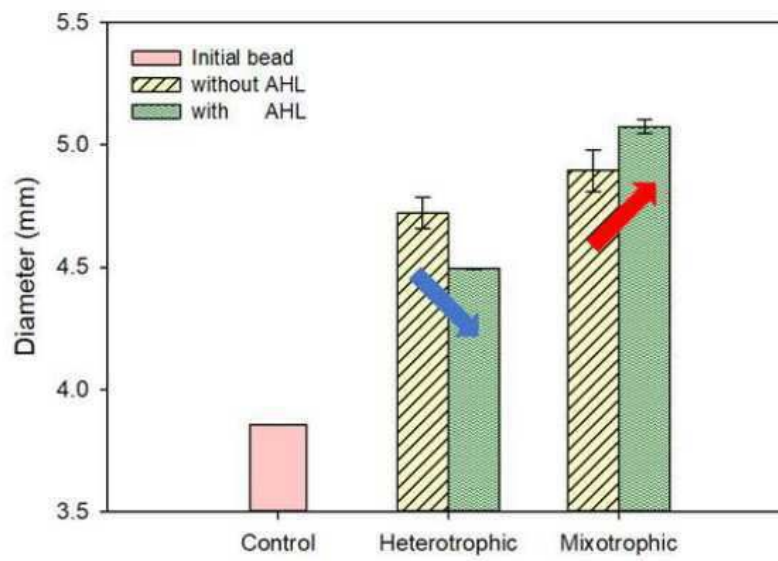
도면12



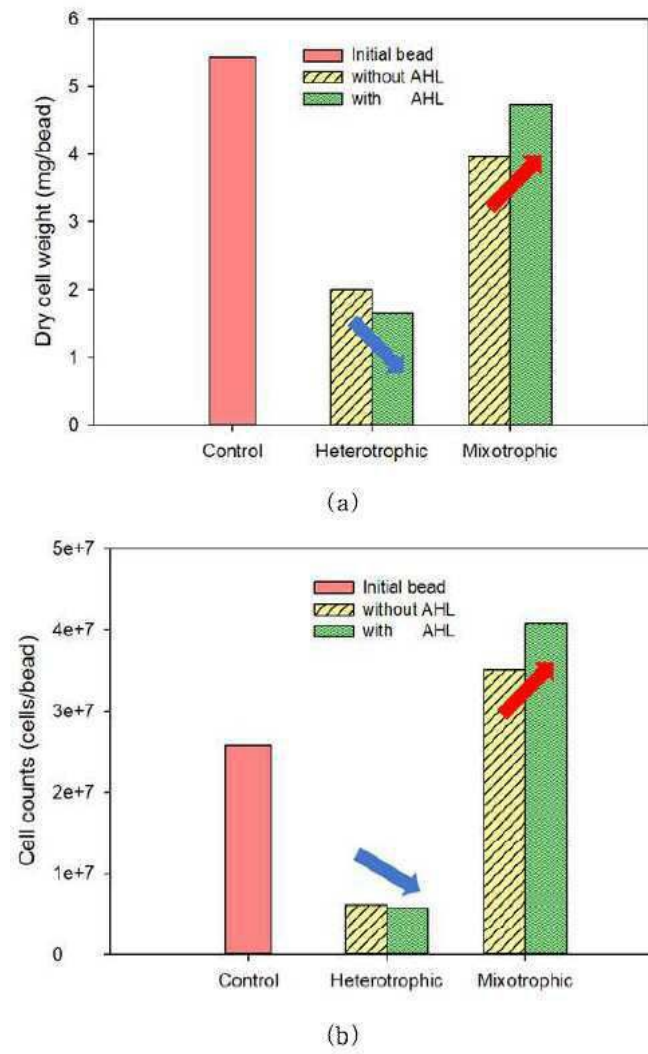
도면13



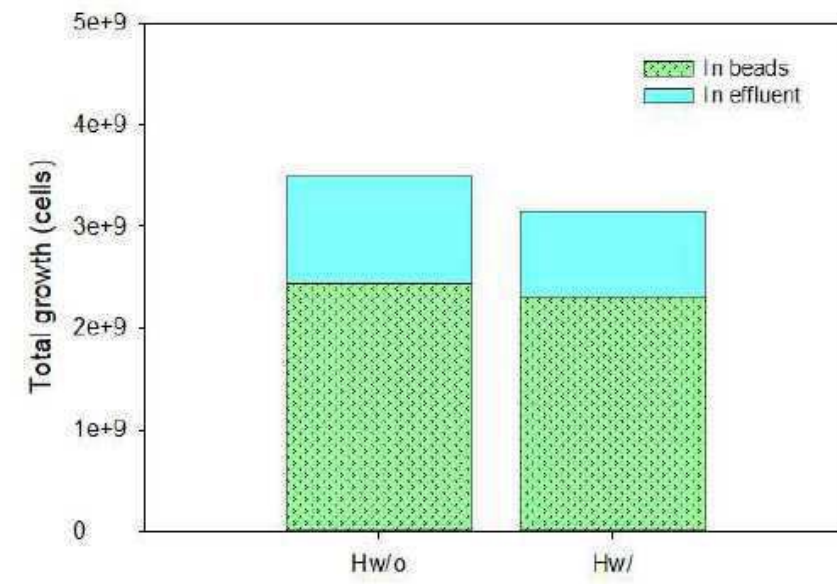
도면14



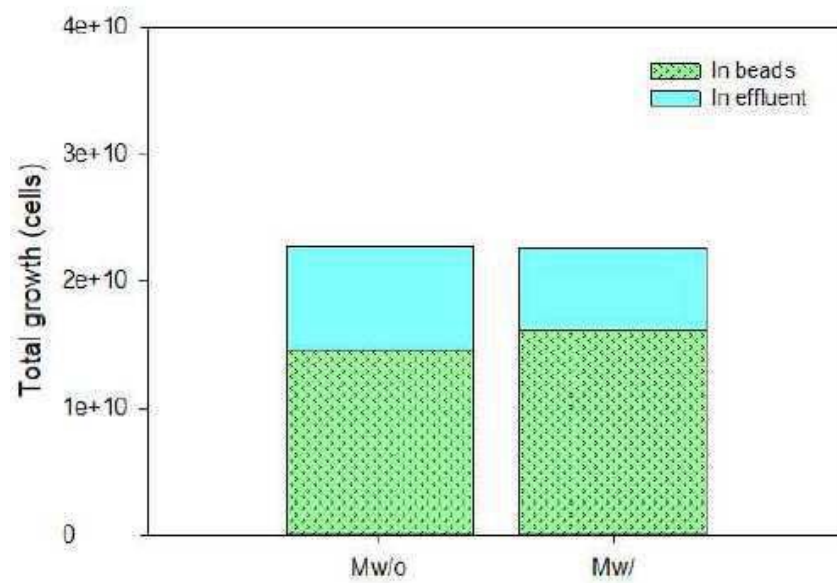
도면15



도면16

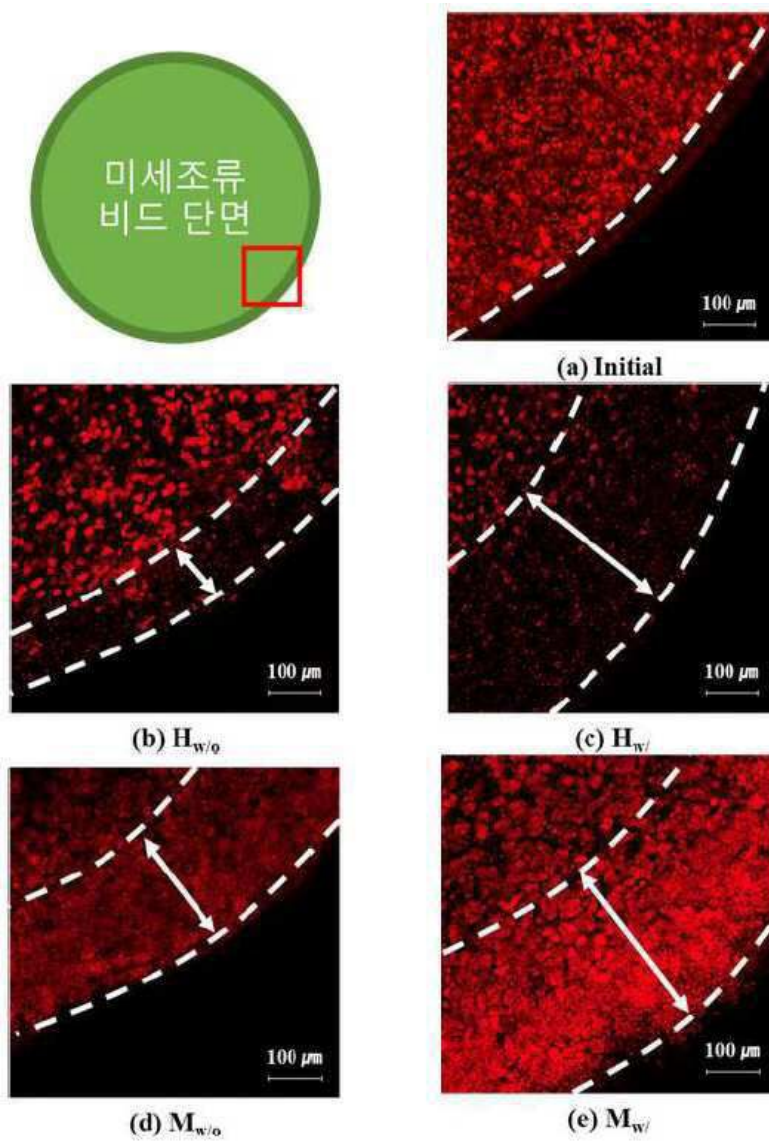


(a)



(b)

도면17



도면18

