

## PVA Boncuklara İmmobilize Edilmiş *Rhodococcus Sp.* BH4 Quorum Quenching Bakterisinin Kullanımı ile Membran Biyoreaktörlerde Membran Biyotıkanmasının Engellenmesi

Börte Köse-Mutlu<sup>1,2</sup>, Tülay Ergön-Can<sup>2</sup>, Halil Hasar<sup>2,3</sup>, Chung-Hak Lee<sup>4</sup>, İsmail Koyuncu<sup>1,2,\*</sup>

1 İstanbul Teknik Üniversitesi, İnşaat Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Ayazağa, İstanbul, Türkiye

2 Prof. Dr. Dincer Topacık Ulusal Membran Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi, İTÜ Ayazağa Kampüsü, Bilim ve Teknoloji Parkı, İstanbul, Türkiye

3 Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Elazığ, Türkiye

4 Seul Ulusal Üniversitesi, Kimya ve Biyoloji Mühendisliği Bölümü, Seul, Güney Kore

\*koyuncu@itu.edu.tr

(Geliş/Received: 30.06.2015;Kabul/Accepted:11.08.2015)

**Özet** Membran biyoreaktörler (MBR)'in biyotıkanma problemine getirilen çözüm önerilerinden en yeni ve en yenilikçilerinden biri olan quorum quenching (QQ) mekanizması, bakteriler arasındaki sinyalizasyonun engellenmesine dayanmaktadır. Bakteriyel quorum quenching mekanizması çeşitli immobilizasyon medyalarının kullanılması ile MBR'lere adapte edilebilmektedir. Bu çalışmada, bir quorum quenching bakterisi olan *Rhodococcus sp.* BH4 bakterisi, bünyesinde ürettiği bir QQ enzimi olan laktonaz enzimini reaktör içersine salabilmesi adına PVA boncuklara immobilize edilmiştir. QQ polivinil alkol (PVA) boncuklar ile gerçekleştirilen 30 günlük QQ MBR işletimi sonucunda membran biyotıkanmasının kontrol altına alınması ile transmembran basıncı artışı önemli ölçüde engellenebilmiştir.

**Anahtar Kelimeler** Evsel Atıksu Arıtımı; Membran Biyoreaktör; Biyotıkanmanın Engellenmesi; Quorum Sensing; Quorum Quenching

### Control of Membrane Biofouling in MBR By Quorum Quenching Bacteria, *Rhodococcus Sp.* BH4, Immobilized in PVA Beads

**Abstract** Quorum quenching mechanism, which is one of the newest and most innovative solution alternatives created for membrane biofouling problem in MBR, is based on the prevention of bacterial signalization. The bacterial quorum quenching mechanism can be adapted to the MBR operations via various immobilization media. In this study, *Rhodococcus sp.* BH4, which is a quorum quenching bacteria, was immobilized into the PVA beads in order to be able to release the lactonase enzyme. It was achieved to prevent the increase in transmembrane pressure by taking the membrane biofouling under the control during the 30 days QQ MBR operation.

**Keywords** Domestic Wastewater Treatment, Membrane Bioreactor; Biofouling Prevention; Quorum Sensing; Quorum Quenching

#### 1.Giriş

Membran biyoreaktör teknolojisi yüksek kalitede çıkış suyu sağlayabilme özelliği ile son yıllarda özellikle evsel ve endüstriyel atıksuların arıtılması alanında dikkat çeken bir alternatif olmuştur [1-4]. Membran biyoreaktör teknolojisi membran teknolojisi ve biyolojik arıtma prosesini kombinleyen bir arıtma teknolojisidir [5-6]. Konvansiyonel aktif çamur sistemleri ile karşılaştırıldığında MBR teknolojisinin pek çok avantajı olmasında rağmen, bu teknolojinin de bir limitleyici özelliği bulunmaktadır. MBR

teknolojisinin en büyük dezavantajı işletim sırasında membranların biyolojik olarak tıkanmasıdır. Membran biyotıkanmasının engellenebilmesi ve kontrol altına alınabilmesi, işletim sırasında gözlenecek akı azalması, basınç yükselmesi ve sonuç olarak işletme maliyetlerinin artması problemlerinin önüne geçecektir.

Günümüzde araştırmacılar bu problemin çözümüne dair pek çok değişik temelli bilimsel araştırmalar gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmaların dayandıkları temeller genellikle, membranlarda ve membran modüllerinde kimyasal/fiziksel modifikasyonlar ya da

mühendislik uygulamaları ile işletim koşullarının değiştirilmesi şeklindedir [7-11]. Fakat bu tarz çözümler genellikle hem yüksek maliyetlidir hem de zaman içerisinde biyotıkanmayı engelleyici özellikleri azaltabilmektedir. Bunun sebebi biyotıkanma sürecinin tamamen biyolojik bir süreç olmasıdır ve bu süreci kontrol altına almak için aynı şekilde biyolojik temelli bir kontrol mekanizması geliştirilmelidir. Son yıllarda, literatürde yer alan biyotıkanma çalışmaları incelendiğinde biyotıkanmanın ana sebebinin “quorum sensing” (QS) olduğunun belirtildiği görülebilir [12-13].

Quorum sensing, türler arasındaki iletişiminin N-açil homoserin lakton (AHL) denilen küçük sinyal molekülleri ile sağlanmasına verilen addır. Ortamdaki AHL konsantrasyonu belli bir seviyeye ulaştığında bakteriler ortamda yeterli sayıya ulaştıklarının farkına varırlar ve biyoluminesans, antibiyotik üretimi, EPS ve SMP salgılanması ve biyofilm oluşturmak gibi grup davranışları için harekete geçerler [14]. Mikroorganizmalar arasındaki iletişimin sekteye uğratılmasına dayanan “quorum quenching” mekanizmasının MBR biyotıkanmasının önüne geçilmesi amacı ile kullanılması amacı ile 2009 yılından günümüze kadar önemli çalışmalar gerçekleştirilmiş ve başarılı olunmuştur.

Quorum quenching mekanizması reaktörler içerisinde üç değişik yol ile sağlanabilir [15]: (1) AHL üretiminin engellenmesi, (2) sinyal molekülünün reseptörler tarafından farkedilmesinin önüne geçilmesi ve (3) ortamdaki AHL moleküllerinin etkisiz hale getirilmesi. Literatürde yer alan QQ MBR uygulamalarının hepsinde ve bu çalışmada gerçekleştirilen mekanizma, (3) no.lu mekanizmaya dayanmaktadır. Quorum quenching enzimi ile ortamdaki AHL molekülü degrade edilmektedir. Bu bağlamda öncelikle serbest QQ enzimi ticari olarak satın alınarak çalışmalarda kullanılmış fakat direkt enzim kullanımında enzimin stabilite problemi ve yüksek maliyeti sebebi ile bu uygulamadan vazgeçilmiştir [16]. Daha sonra bakteriyel QQ uygulamaları olarak tanımlanabilecek, QQ bakterilerinin çeşitli immobilizasyon ortamlarına immobilize edilmesi ile bakterilerin ortama bu enzimleri üretilip salması çalışmalarına geçilmiştir. Bu amaçla mikrobiyal veseller ve

boncuklar immobilizasyon medyası olarak tercih edilmiştir [17-19]. Bu çalışma kapsamında ise, polimer bazlı boncuklar immobilizasyon ortamı olarak tercih edilerek, uzun süreli (30 gün) MBR işletiminde bakteriyel quorum quenching uygulamasının fizibilitesi incelenmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Kimyasallar

Sinyal moleküllerini temsilen ticari C8-HSL kimyasalı Cayman (ABD) Firmasından temin edilmiş ve stok çözeltisinin hazırlanmasının ardından -20°C’de saklanmıştır. Bu çalışmada iki farklı antibiyotik kullanılmıştır. İlki, spektinomisin, toz formunda Sigma Aldrich (ABD)’den temin edilmiş ve stok çözeltisi 4°C’de karanlıkta depolanmıştır. Diğeri yani tetrasiklin ise gene Sigma Aldrich (ABD) Firmasından toz halinde satın alınmış ve C8-HSL kimyasalı gibi -20°C’de saklanmıştır. X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) kimyasalı (Sigma Aldrich, ABD) biyo-test için kullanılmıştır ve toz halinde satın alınan bu kimyasal ve dimetilformamid (DMF, Merck, Almanya) ile X-Gal solüsyonunun hazırlanılmasının ardından -20°C’de ve karanlıkta saklanmıştır. Bakterilerin ekiminde kullanılan Luria Bertani (LB) medyası Miller (US)’den temin edilmiştir. Son olarak, boncukların üretiminde kullanılan polivinil alkol (PVA), kalsiyum klorür (CaCl<sub>2</sub>) ve borik asit Sigma Aldrich (ABD)’den alınmıştır.

### 2.2. Quorum quenching boncukların üretimi

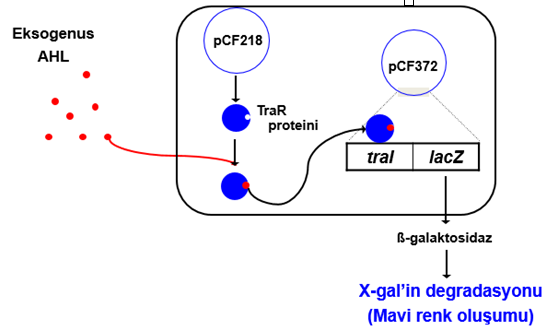
100 mL PVA (%2 a/h) ve 1000 mL borik asit-CaCl<sub>2</sub> (%7 a/h borik asit ve %4 a/h CaCl<sub>2</sub>) solüsyonları hazırlanıp steril edilmiştir. Bu çalışmada QQ bakterisi olarak kullanılan *Rhodococcus sp.* BH4 bakterisi LB medya içerisine ekilmiş ve 24 saat süresince inkübasyona tabi tutulmuştur. 24 saatin sonunda çoğalmış olan *Rhodococcus sp.* BH4 bakterisinin solüsyonu 15 dakika boyunca 12.000 rpm değerinde santrifüje tabi tutulmuştur. Elde edilen bakteri pelleti 10 mL steril fizyolojik su ile resuspende edilmiş ve PVA solüsyonunun içerisine katılmıştır. Elde edilen PVA-bakteri karışımı bir şırınga ucu yardımı ile manyetik

karıştırıcının üzerinde karışmakta olan borik asit-CaCl<sub>2</sub> karışımına damlatılmış ve boncuklar elde edilmiştir. Boncuklar üretiminin ardından geçen 8 saat süresince 4°C sıcaklıkta muhafaza edilerek sertleşmelerine müsaade edilmiştir. 8. saatin sonunda oda sıcaklığına alınarak, MBR işletiminde kullanılmak üzere bekletilirler. Boncukların içerdiği toplam QQ bakteri miktarı yaklaşık 800 mg'dır.

### 2.3. Quorum quenching aktivitesinin belirlenmesi

N-açil homoserin lakton (AHL) sinyal moleküllerinin belirlenmesi için *Agrobacterium tumefaciens* A136 (Ti<sup>-</sup>)(pCF218)(pCF372) bakterisi biyosensör olarak kullanılmıştır [16-17, 20]. *Agrobacterium tumefaciens* A136 bakterisi spektinomisin (50 mg/L) ve tetrasiklin (4,5 mg/L) içeren LB medyası içerisine ekilerek büyütülür. İnkübe edilmiş A136 quorum quenching aktivitesinin belirlenmesi için dizayn edilmiş biyo-test için kullanılır. Bu çalışma kapsamında serbest BH4 bakterilerinin ve PVA boncuklara immobilize edilmiş BH4 bakterilerinin QQ aktiviteleri belirlenmiştir. Bu biyo-test belirleyici agar plakaların kullanılması ile gerçekleştirilir ve Park ve diğerlerinden [21] uyarlanmıştır. Belirleyici agar plakalar LB-agarın gece boyunca inkübe edilmiş A136 ile 9:1 oranında karıştırılması ve X-Gal ilavesi ile hazırlanır. Reaksiyonun gerçekleştiği deney tüplerinden belli zaman aralıklarında alınan numuneler bu belirleyici agar plakalarda açılan numune kuyucuklarına konulur. C8-HSL, A136 ve X-Gal arasındaki zincirleme reaksiyonlar sonucunda mavi renk oluşumu gerçekleşir (Şekil 1). Bilinen konsantrasyonlara sahip standart solüsyonların oluşturduğu zonların çaplarının kullanılması ile ortaya konulan denklem kullanılarak numunelerin bünyesindeki C8-HSL konsantrasyonları hesaplanabilir. Bu sayede zaman içerisindeki C8-HSL konsantrasyonundaki azalma QQ aktivitesini ifade eder.

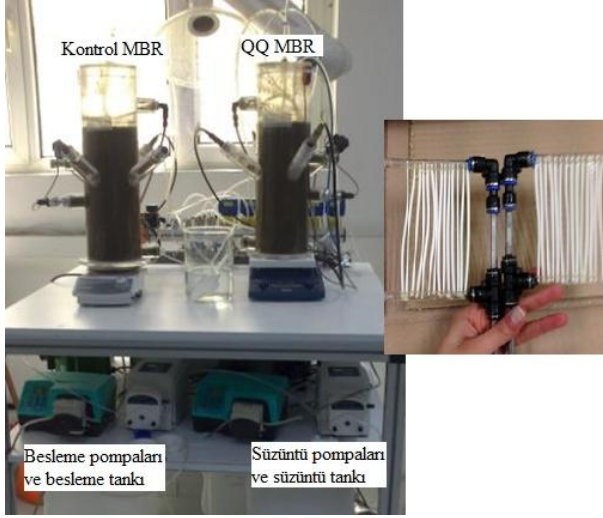
A. *tumefaciens* A136 (Ti<sup>-</sup>)(pCF218)(pCF372): Biyosensör



Şekil 1: A136 türünün AHL varlığının ispatı için kullanılmasını sağlayan biyolojik mekanizma.

### 2.4. Membran Biyoreaktör Sistemi

Quorum quenching MBR çalışması kapsamında, iki adet paralel MBR eş zamanlı olarak ve aynı işletim şartları altında işletilmiştir. Bir MBR, kontrol MBR olarak isimlendirilirken, diğeri QQ MBR olarak isimlendirilmiştir. Kontrol MBR boş PVA boncuklar ile işletilmiştir, QQ MBR'de ise ilave olarak PVA QQ boncuklar bulunmaktadır. MBR'ler sabit akı koşullarında işletilmiş ve transmembran basınçları (TMP) kayıt altına alınmıştır. Bu bağlamda elde edilen TMP profillerinin altında kalan alanlar integral alınması ile hesaplanmış ve QQ boncuk kullanımı ile TMP değerlerinin hangi ölçüde azaltılabildiği ortaya konulabilmiştir. MBR sisteminin ve kullanılan modülün görünümü Şekil 2'de verilmektedir. Aktif çamur Paşaköy İleri Biyolojik Atıksu Arıtma Tesisi'nden alınmış (İstanbul, Türkiye) ve MBR işletiminin öncesinde 1 ay boyunca sentetik evsel atıksu varlığında aklımasyona tabi tutulmuştur. Sentetik atıksuyun bileşenleri şu şekilde listelenebilir (mg/L): glikoz, 400; maya, 14; baktopepton, 115; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 104,8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 21,75; MgSO<sub>4</sub>, 15,63; FeCl<sub>3</sub>, 0,075; CaCl<sub>2</sub>, 2,45; MnSO<sub>4</sub>, 1,8; and NaHCO<sub>3</sub>, 255,5. Kontrol ve QQ MBR'ler bir bilgisayara bağlanmıştır ve SCADA programı yardımı ile su seviyeleri, pH değerleri, sıcaklık, ORP ve çözünmüş oksijen konsantrasyonları istenilen aralıklarda tutulabilmiştir. Bu işletim koşulları ise Tablo 1'de verilmektedir. Membran modülü olarak Philos Co. Ltd. marka (Güney Kore) hollow fiber (ince boşluklu fiber) mikrofiltrasyon membranından üretilmiş bir modül tercih edilmiştir.



Şekil 2: MBR sisteminin genel görünümü ve hazırlanan modüller.

Tablo 1 : MBR sistemi ile ilgili parametreler.

Parametre	Birim	Değer
Toplam hacim	L	4,5
pH	-	6,5~7,5
Çözünmüş oksijen	mg/L	4,2-6,5
ORP	mV	170-190
Sıcaklık	°C	21±2
Çamur yaşı	d	30
Hidrolik bekleme süresi	h	13
Membran alanı	m <sup>2</sup>	0,01
KOİ giderim verimi	%	~ 90
Besleme suyu KOİ konsantrasyonu	mg/L	440

## 2.5. Analitik ölçümler

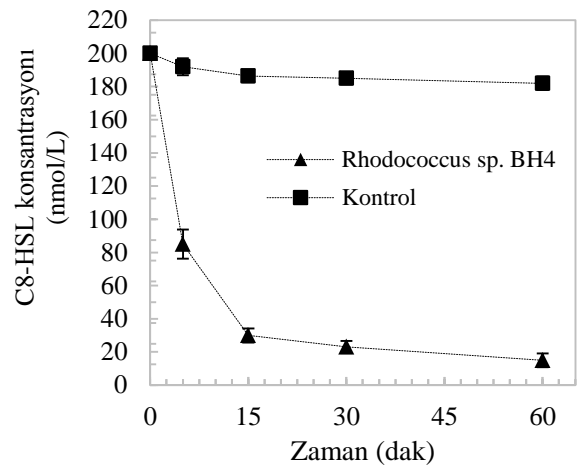
MBR işletimi süresince AKM, KOİ, TKN ve TP analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümler Standart Metotlara göre yapılmıştır [22]. Bunlara ek olarak, EPS ve SMP konsantrasyonları da ölçülmüştür. Öncelikle aktif çamurdan alınan numunede SMP ve EPS ayrılır, ardından bu iki bileşenin protein ve karbonhidrat içerikleri ölçülür. Deney yönteminde 5 mL çamur süspansiyonu alınır, ilk olarak 4000 dev/dak'da 4°C'de 10 dakika santrifüjlenir. Daha sonra üst faz steril bir tüpe alınır ve askıda katıların tamamen gitmesini sağlamak için 13200 dev/dak'ile 4°C'de 20 dakika tekrar santrifüjlenir. Fiziksel ekstraksiyon ile elde edilmiş bu üst fazda çözünmüş protein ve polisakkarit analizleri yapılır. Çözünmüş protein ve polisakkarit bize ortamdaki SMP (serbest EPS)'nin değerini verecektir. Bağlı EPS'yi tespit edebilmek için ilk santrifüjden kalan çökelti

steril distile su ile 5 mL 'ye tekrar süspense edilir. 6 µl formaldehit (%37'lik) eklenir 1 saat 4°C'de bekletilir, daha sonra 0,5 mL NaOH (1 N) eklenir ve 3 saat 4°C'de bekletilir. Bu süspansiyon 13200 dev/dak, 4°C'de 20 dakika santrifüjlenir. Kimyasal ekstraksiyon ile elde edilmiş bu supernatantta da bağlı protein ve polisakkarit analizi yapılır. Bu değerler de bağlı veya ekstrakte edilmiş EPS'nin değerini verir. Protein analizi için Bradford coomassie blue metodu (Lowry metodu) [23] ve polisakkarit analizi için fenol sülfirik asit metodu (Dubois metodu) [24] kullanılmıştır.

## 3.Sonuçlar ve Tartışma

### 3.1.Serbest ve immobilize bakterilerin quorum quenching aktiviteleri

Materyal ve metot kısmında da belirtildiği üzere *Rhodococcus sp. BH4* bakterisinin ekiminden sonra LB medya ve bakteri karışımı santrifüj edilmiş ve besiyerinden bakteriler ayrılmıştır. Elde edilen bakteri pelleti ile biyo-test gerçekleştirilmiş ve saf bakteri kültürünün QQ aktivitesi ortaya konulmuştur. Bu deneyin yapılmasının amacı, her QQ çalışmasında çoğaltılıp büyütülen bakterinin immobilize edilmeden önce yüksek verimlerde QQ aktivitelerine sahip olduğunu kanıtlayabilmektir. Gerçekleştirilen biyo-testin sonuçları Şekil 3'te verilmektedir.



Şekil 3: Serbest QQ bakterinin QQ aktivitesi.

Şekil 3 incelendiğinde çoğaltılan *Rhodococcus sp. BH4* türünün 60 dakika içerisinde ortamdaki C8-HSL konsantrasyonunu

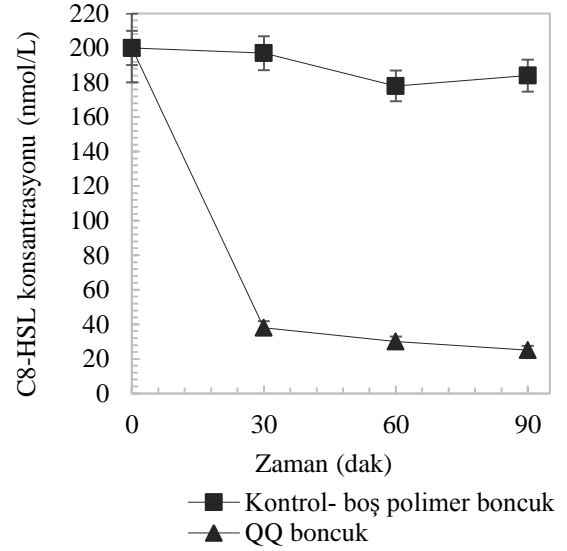
hızlı bir şekilde azaltığı görülebilir. Kontrol amaçlı kullanılan tür ise AHL degradasyon yeteneği olmadığından 60 dakika içerisinde herhangi bir aktivite göstermemiştir. Bakterinin QQ aktivitesinin ortamdaki C8-HSL'nin %80'ini degrade edebilecek seviyede olduğunun kanıtlanmasının ardından, PVA boncuklar üretilmiştir. Üretilen boncuklar Şekil 4'te görülebilmektedir. Homojen ve küresel yapıya sahip boncuklar üretilmiştir. Üretilen boncukların MBR'ye ilavesinden önce QQ aktiviteleri gene aynı yöntemin kullanılması ile belirlenmiştir. Bu biyo-test kapsamında kontrol numunesi olarak boş PVA boncuklar kullanılmıştır. Bu boş PVA boncuklar kontrol MBR'ye ilave edilecek olan boncuklardır. Üretilen PVA boncuklar ile gerçekleştirilen QQ aktivitesi deneyi sonuçları Şekil 5'te görülebilmektedir. Boncukların QQ aktiviteleri sonuçları incelendiğinde, kontrol boncuklarında herhangi bir C8-HSL giderimi gözlenmezken, QQ PVA boncuklar tarafından 200 nM olan C8-HSL konsantrasyonunun 90 dakika içerisinde 25 nM seviyelerine indirilebildiği görülmektedir.



Şekil 4: Üretilen PVA boncukların görünümü.



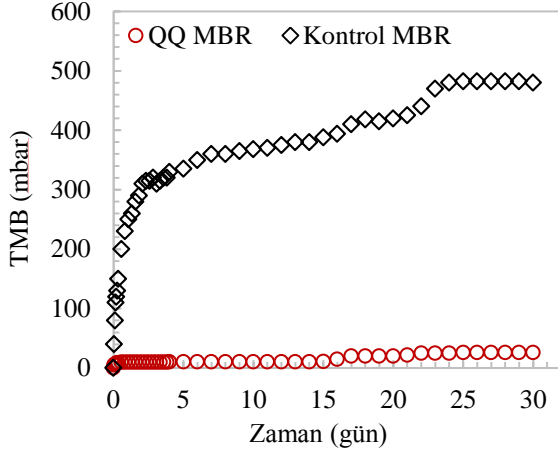
Şekil 6: PVA boncuklarının MBR'deki görünümü.



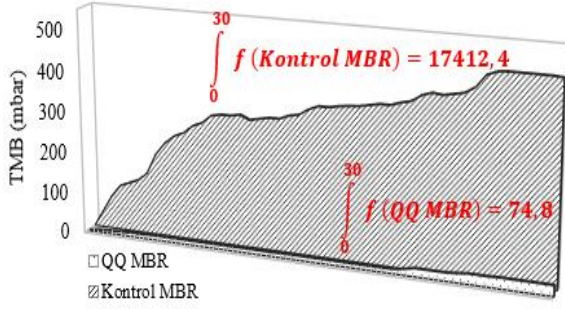
Şekil 5: Üretilen PVA QQ boncuklarının QQ aktivitesi.

### 3.2. Bakteri immobilize edilmiş PVA boncukların biyotıkanmayı engellemesi

Üretilen PVA boncuklar, QQ aktivitelerinin belirlenmesinin ardından MBR'lere ilave edilmiştir (Şekil 6). Kontrol MBR boş PVA boncuklarla, QQ MBR ise QQ PVA boncuklarla işletilmiştir. Bu farkın haricinde her iki reaktör de aynı koşullar altında işletilmiştir. Boncuklar reaktörler içerisinde havalandırma ile beraber tamamen homojen bir şekilde dağılmış şekilde yer alırlar. Kontrol MBR'nin boş PVA boncuklar ile işletilmesinin sebebi boncukların membran üzerinde muhtemel bir fiziksel yıkama etkisinin olabilmesidir. Bu şekilde 30 gün boyunca işletilen iki paralel membran biyoreaktörün TMP değerleri kayıt altına alınmış ve TMP profilleri çizilmiştir (Şekil 7). TMP profillerinin altında kalan alanlar ise integral alınarak hesaplanmış ve TMP azaltım verimi yüzdesel olarak hesaplanabilmiştir (Şekil 8).



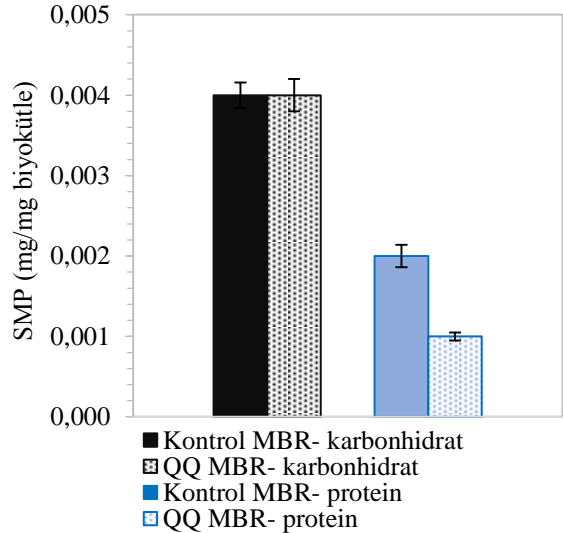
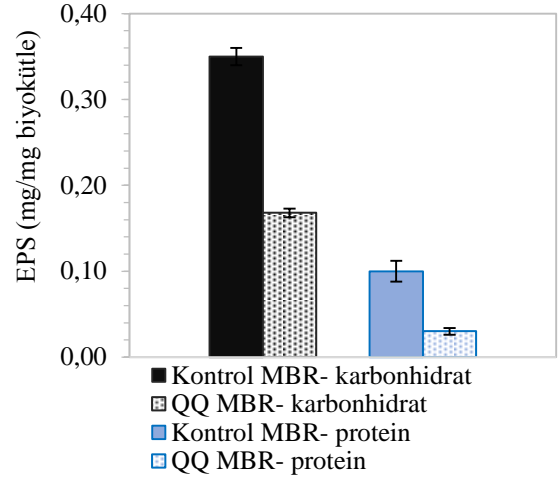
Şekil 7: Elde edilen TMP profilleri.



Şekil 8: TMP grafiklerinden yararlanarak QQ mekanizması veriminin hesaplanması.

Şekil 7 incelendiğinde, Kontrol MBR'deki TMP değerleri hızla artar iken, QQ MBR'deki TMP değerlerinin artmadığı ve düşük basınç değerlerinde uzun süreler boyunca işletimin sürdürülebildiği görülmüştür. Bu çalışmada % 99,6'lık bir QQ verimi elde edilmiştir. PVA boncukların 30 gün boyunca dağılmadan kaldığı ve QQ mekanizmasının sürdürülebilir olduğu görülmüştür. İşletim sonunda reaktörlerden çıkarılan modüllerin görünümü de TMP grafiklerinden elde edilen sonuçları destekler niteliktedir. Kontrol MBR'den çıkarılmış olan membranlarda fiberlerin üzeri yoğun bir şekilde biyofilm olarak kaplanmış iken, QQ MBR'den çıkarılan membranlarda fiberlerin üzerinde ise ince ve yer yer oluşabilmiş bir biyofilm tabakası gözlenmiştir. Başarılı bir quorum quenching uygulaması ile membran yüzeyinde biyofilm oluşumu önemli ölçüde engellenebildiği söylenebilir. Biyotıkanmanın quorum sensing inhibisyonu ile kontrol altına alınmasının bir yan

etkisi de ortamdaki EPS ve SMP konsantrasyonlarının azaltılmasıdır. Bu bağlamda yapılan ölçümlerin sonuçları Şekil 9'da verilmektedir. Quorum quenching mekanizması ile EPS'nin hem karbonhidrat hem de protein içerikleri %50 oranında azaltılmıştır. SMP grafiğine bakıldığında ise sadece protein içeriğinde gözlenen %50'lik azalımdır. Quorum quenching uygulaması ile aktif çamurun bünyesindeki mikroorganizmaların EPS ve SMP salgılamalarının baskı altına alınabileceği söylenebilir. EPS ve SMP konsantrasyonlarının membran biyoreaktörlerde biyotıkanma ile olan direkt ilişkisi gözönüne alındığında bu önemli bir sonuç haline gelmektedir.



Şekil 9: PVA boncuk kullanımının EPS ve SMP üzerindeki etkisi.

### 3.2. Quorum quenching mekanizmasının organik madde giderimine etkisi

Başınç değişimlerinin yanı sıra iki reaktörün eşit koşullarda işletildiğini gözetebilmek amacı ile çeşitli parametreler bazında ilave deneyler de gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, işletme sırasındaki KOİ ve TKN giderim verimleri belirlenmiş ve iki reaktörde de eşit olmak üzere ortalama %88 ve %37 olarak belirlenmiştir. QQ MBR işletiminde quorum quenching mekanizmasının organik madde giderimi üzerinde bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

#### 4. Teşekkür

Bu çalışma finansal olarak TÜBİTAK (Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu) ve KORANET (the Korean Scientific Cooperation Network with the European Research Area) tarafından 112M739 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir. Ayrıca, Tülay Ergön-Can TÜBİTAK 2218-Ulusal Doktora Sonrası Araştırma Bursu Programı'na desteği için teşekkürlerini sunmaktadır.

#### 5. Kaynaklar

[1] Visvanathan, C., Ben Aim, R., Parameshwaran, K. (2015). Membrane Separation Bioreactors for Wastewater Treatment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **30**(1), 1–48.

[2] Judd, S. ve Judd, C. (2006). *The MBR Book: Principles and Applications of Membrane Bioreactors in Water and Wastewater Treatment*. Elsevier, Oxford.

[3] Drews, A. (2010). Membrane fouling in membrane bioreactors—Characterisation, contradictions, cause and cures. *J. Membr. Sci.*, **363**, 1–28.

[4] Le-Clech, P., Chen, V., Fane, A. G. (2006). Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *Journal of Membrane Science*, **284**, 17–53.

[5] Melin, T., Jefferson, B., Bixio, D., Thoeye, C., De Wilde, W., De Koning, J., van der Graaf, J., Wintgens, T. (2006). Membrane bioreactor technology for wastewater treatment and reuse. *Desalination*, **187**(1–3), 271–282.

[6] Stephenson, T., Judd, S., Jefferson, B., Brindle, K. (2000). *Membrane Bioreactors for Wastewater Treatment*, IWA Publishing, UK.

[7] Koseoglu-Imer, D. Y., Kose, B., Altinbas, M., Koyuncu, I. (2013). The production of polysulfone (PS) membrane with silver nanoparticles (AgNP): Physical properties, filtration performances, and biofouling resistances of membranes. *Journal of Membrane Science*, **428**, 620–628.

[8] Xiang, Z. (2001). Optimization of the Operation Parameters on MBR and Membrane Fouling Control. *Water & Wastewater Engineering*, **4**, 013.

[9] Ahmed, Z., Cho, J., Lim, B.R., Song, K.G., Ahn, K.H. (2007). Effects of sludge retention time on membrane fouling and microbial community structure in a membrane bioreactor. *Journal of Membrane Science*, **287**(2), 211–218.

[10] Cornelissen, E. R., Vrouwenvelder, J. S., Heijman, S. G. J., Viallefont, X. D., Van Der Kooij, D., Wessels, L. P. (2007) Periodic air/water cleaning for control of biofouling in spiral wound membrane elements. *Journal of Membrane Science*, **287**, 94–101.

[11] Mansouri, J., Harrison, S., Chen, V. (2010). Strategies for controlling biofouling in membrane filtration systems: challenges and opportunities. *J. Mater. Chem.*, **20**, 4567–4586.

[12] Yeon, K. M., Cheong, W. S., Oh, H. S., Lee, W. N., Hwang, B. K., Lee, C. H., Beyenal, H., Lewandowski, Z. (2009). Quorum sensing: a new biofouling control paradigm in a membrane bioreactor for advanced wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.*, **43**(2), 380–385.

[13] Waters, C. M ve Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **21**, 319–46.

[14] Hammer, B. K. ve Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholera*. *Molecular microbiology*, **50**(1), 101–104.

[15] Zhang, H.B., Wang, L.H., Zhang, L.H. (2002). Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**, 4638–4643.

[16] Yeon, K. M., Lee, C. H., Kim, J. (2009). Magnetic Enzyme Carrier for Effective Biofouling Control in the Membrane Bioreactor Based on Enzymatic quorum quenching. *Environ. Sci. Technol.*, **43**(19), 7403–7409.

[17] Oh, H. S., Yeon, K. M., Yang, C. S., Kim, S. R., Lee, C. H., Park, S. Y., 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.

[18] Jahangir, D., Oh, H. S., Kim, S. R., Park, P. K., Lee, C. H., Lee, J. K. (2010). Specific location of encapsulated quorum quenching bacteria for biofouling control in an external submerged membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.*, **411-412**, 130-136.

[19] Kim, S. R., Oh, H. S., Jo, S. J., Yeon, K. M., Lee, C. H., Lim, D. J., Lee, C. H., Lee, J. K. (2013). Biofouling control with bead-entrapped quorum quenching bacteria in membrane bioreactors: physical and biological effects. *Environ. Sci. Technol.*, **47(2)**, 836-842.

[20] Kawaguchi, T., Chen, Y. P., Norman, R. S., Decho, A. W. (2008). Rapid screening of quorum-sensing signal N-Acyl homoserine lactones by an in vitro cell-free assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **74(12)**, 3667-3671.

[21] Park, S. Y., Lee, S. J., Oh, T. K., Oh, J. W., Koo, B. T., Yum, D. Y., Lee, J. K. (2001). AhlD, an N-acylhomoserine lactonase in *Arthrobacter* sp., and predicted homologues in other bacteria. *Microbiology*, **149**, 1541-1550.

[22] APHA. (2005). *Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*. Washington.

[23] Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193(1)**, 265-275.

[24] Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., Smith, F. (1956). Calorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal. Chem.*, **28**, 350-356.