

고진공주사전자현미경을 리용한 몇가지 미생물의 형태학적관찰방법에 대한 연구

김 은 철

우리는 미생물에 대한 형태학적관찰을 진행할수 있는 고진공주사전자현미경에 의한 시료전처리와 관찰조건들의 영향을 검토하고 그것에 기초하여 대상시료분석을 진행함으로써 일반적인 미생물시료에 대한 주사전자현미경분석방법을 확립하였다.

실 험 방 법

일반적으로 액체배양한 미생물은 고체배양한 미생물보다 시료전처리과정이 복잡하다. 시료전처리과정에서는 보통 용액속에 현탁된 상태로 있는 배양세포를 원심분리에 의한 침전 조작과 세척을 반복하여 현탁액성분을 제거하고 마지막에 세포를 농축한 다음 이것을 폴리-L-리진을 바른 평평한 유리나 합성수지판위에 접착시켜 고정화하는 방법을 쓰고있다.[1] 실험에서는 고체배양된 균그루로서 식료공업과 경공업, 의약품생산에서 글루코아밀라제활성미생물로 널리 리용되고있는 *Aspergillus niger* 8757을, 액체배양된 균그루로서 금속공업 및 채취공업에서 많이 쓰이고있는 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 1333을 선택하고 이 균그루로부터 배양된 미생물의 현미경적시료전처리와 관찰조건들의 영향을 고찰하였다.

Aspergillus niger 8757에서 고체배양된 미생물의 현미경적시료전처리 전도성유리위에 증류수 10 μ L를 떨어뜨리고 그위에 *Aspergillus niger* 8757에서 배양된 미생물을 채취하여 분산시킨 다음 알콜등을 리용하여 10~20s동안 건조시킨다. 다음 자동세밀증착기(《JEC-3000FC》)로 전도성증착을 진행한다. 증착재료로서는 Au를 리용하였다.

Acidithiobacillus ferrooxidans 1333에서 액체배양된 미생물의 현미경적시료전처리 실험에 리용한 균은 pH 2.3인 9K배지에서 배양하였으며 균수는 10⁸개/mL이다. 먼저 원심분리기(《Allegra X-12》)를 리용하여 원심분리를 진행하여 균집물을 얻는다. 다음 pH 2인 류산용액속에 균집물을 넣고 교반방식으로 3회 세척을 진행한다. 원심분리를 진행하고 2% 글루타르알데히드용액에 넣고 혼든 다음 4℃의 온도에서 2h동안 고정화시킨다. 다시 원심분리하고 탈수를 위해 에틸알콜의 농도를 50, 60, 70, 80, 90, 100%로 점차 높이면서 매 농도에서 10min씩 침지시켜 자연건조시킨다. 전도성증착은 자동탄소증착기(《JEC-560》)와 자동세밀증착기로 진행하였다. 실험에서는 고진공주사전자현미경(《JSM-6610A》)을 리용하였다.

실험결과 및 해석

시료의 대전에 미치는 증착조건들의 영향 고체배양된 미생물을 증착할 때 포자나 균실과 같이 크기가 작은것에 비해 수백개 포자들로 이루어진 포자낭은 크기가 크고 결면이 매끈

하지 못하므로 합리적인 증착조건을 설정하는 것이 중요하다. 각이한 증착전류에서 증착시간에 따르는 대전된 시료면적의 변화는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 대전된 시료면적은 증착시간이 길수록 작아지며 증착시간 80s 이상에서는 거의 변화가 없다. 이것은 증착시간이 80s정도이면 거의 모든 시료결면을 증착재료로 덮을수 있다는것을 보여준다.

원심분리조건들의 영향 액체배양된 시료를 채집하기 위한 첫 공정으로서 원심분리공정이 있는데 원심분리조건에 따라 얻어지는 균집물의 량(질량)이 차이나며 이것은 미생물관찰에 영향을 미친다. 원심분리시간에 따르는 얻어진 균집물량의 변화는 그림 2와 같다. 원심분리기의 회전수를 2 000, 4 000, 5 000r/min으로 변

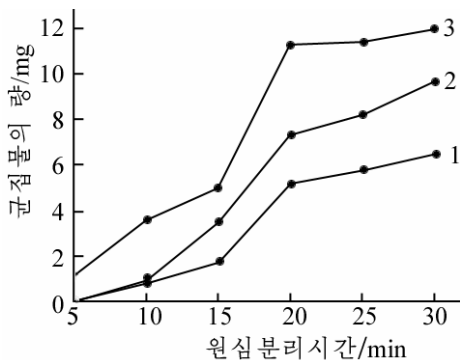


그림 2. 원심분리시간에 따르는 균집물의 량변화

1-3은 회전수가 각각 2 000, 4 000, 5 000r/min인 경우

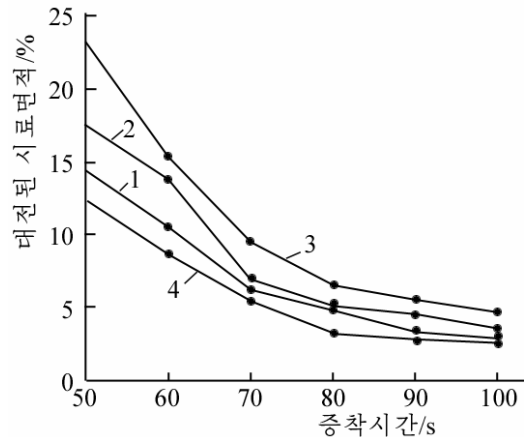


그림 1. 증착시간에 따르는 대전된 시료면적의 변화

1-4는 증착전류가 각각 10, 30, 30, 40mA인 경우

화시키면서 매 회전수에서 균집물의 량변화를 고찰하고 매 경우 시험관에 얻어진 균집물의 량을 전자저울(《AEG-120》)로 측정하였다.

그림 2에서 보는바와 같이 회전수가 2 000, 4 000r/min일 때 시간이 지남에 따라 얻어지는 균집물의 량은 계속 증가하지만 회전수가 5 000r/min일 때에는 원심분리시간 20min부터 균집물의 량이 거의 변하지 않는다는것을 알수 있다. 이것은 배양액속에 들어있는 균이 거의다 가라앉았기때문이라고 볼수 있다.

가속전압의 영향 고진공주사전자현미경을 리용한 생물시료관찰에서 가속전압의 선택은 관찰시 시료에 손상을 주지 않으면서도 시료의 결면을 정확

히 관찰하는데서 중요한 문제로 제기된다.[2] 일반적으로 주사전자현미경에서 가속전압이 작을수록 보다 섬세한 결면구조화상을 얻을수 있다. 가속전압이 높으면 전자선뿔의 침투 및 확산면적이 커지면서 시료안에서 반사전자신호와 같은 불필요한 신호들이 발생하게 되는데 이런 신호들은 화상대조도를 떨어뜨리며 결과 결면에 대한 섬세한 화상을 얻을수 없게 된다. 그러나 가속전압이 너무 낮으면 분해능이 급격히 떨어지게 된다.[3]

미생물관찰에 적합한 가속전압을 설정하기 위하여 가속전압을 각각 10, 15, 20kV로 변화시키면서 상관찰을 진행하였다. 매 가속전압에서 얻은 *Aspergillus niger* 8757에서 고체배양된 미생물의 포자낭에 대한 주사전자현미경사진은 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 가속전압이 15와 20kV일 때 포자낭속의 포자결면의 형태가 섬세하게 관찰되지 않지만 10kV일 때에는 포자결면의 주름까지도 명백하게 관찰되었다. 또한 가속전압이 15kV에서부터 국부적인 부분들의 대전현상도 관찰되었다. 이로부터 미생물시료의 관찰시 가속전압을 10kV로 설정하는것이 적합하다는것을 알수 있다.

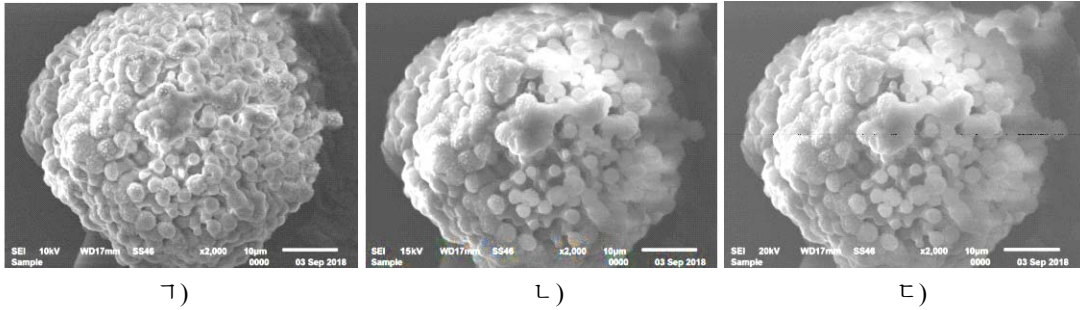


그림 3. *Aspergillus niger* 8757에서 고체배양된 미생물의 포자낭에 대한 주사전자현미경사진
배율 2 000배, 가속전압 ㄱ) 10kV, ㄴ) 15kV, ㄷ) 20kV

대상물분석 우와 같은 전처리 및 관찰조건을 설정한데 기초하여 *Aspergillus niger* 8757에서 배양된 미생물과 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 1333에서 액체배양된 미생물에 대한 형태학적 관찰을 진행하였다. *Aspergillus niger* 8757에서 고체배양된 미생물의 주사전자현미경 사진은 그림 4와 같다.

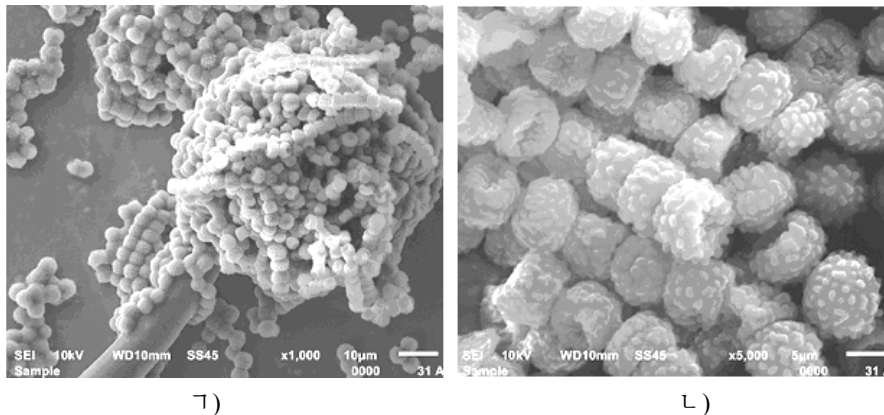


그림 4. *Aspergillus niger* 8757에서 고체배양된 미생물의 주사전자현미경사진
배율 ㄱ) 1 000배, ㄴ) 5 000배

그림 4에서 보는바와 같이 균실과 포자낭, 포자들이 선명하게 관찰되었으며 포자의 크기는 $4\sim 5\mu\text{m}$, 포자겉면의 작은 돌기의 크기는 $0.3\sim 0.4\mu\text{m}$, 모양은 고리형이라는것을 알수 있다. 또한 포자의 겉면은 매끈하지 않으며 많은 작은 돌기들로 덮여져있다.

Acidithiobacillus ferrooxidans 1333에서 액체배양된 미생물의 주사전자현미경사진은 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 1333에서 액체배양된 미생물은 크기가 길이 $1.5\mu\text{m}$, 너비 $1\mu\text{m}$ 정도인 짧은 막대기형이라는것을 알수 있다.

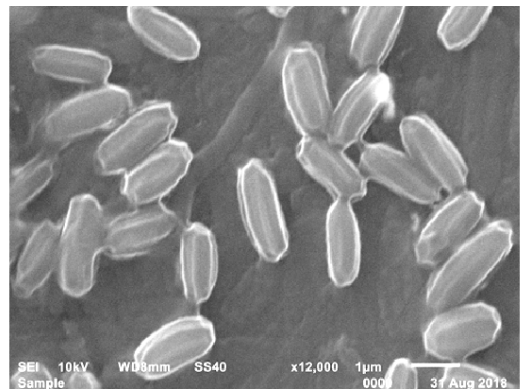


그림 5. *Acidithiobacillus ferrooxidans* 1333에서 액체배양된 미생물의 주사전자현미경사진

맺는 말

고진공주사전자현미경을 리용하여 고체배양 및 액체배양된 미생물의 형태학적 관찰을 진행할 수 있는 합리적인 전처리조건과 관찰조건을 설정하고 그것에 기초하여 *Aspergillus niger* 8757과 *Acidithiobacillus ferrooxidans* 1333에서 배양된 미생물의 형태학적 특성(균모양과 크기)을 밝혔다.

참고 문헌

- [1] 박규희 등; 주사전자현미경분석기술, 김일성종합대학출판사, 229~241, 주체105(2016).
- [2] Kohei Kaneyoshi et al.; Chromosome Science, 18, 23, 2015.
- [3] Karina M. Rebello et al.; Acta Tropica, 127, 191, 2013.

주체108(2019)년 1월 5일 원고접수

On the Morphological Observation Method of Several Microorganisms by Using High-Vacuum SEM

Kim Un Chol

We established the optimum pretreatment and observation conditions for characterizing the morphological structure(shape and size) of the solid and liquid-cultured microorganisms by using the high-vacuum scanning electron microscope.

Key words: SEM, microorganism, morphological structure