

Confocal laser scanning microscopy image를 이용한 UASB granule의 메탄 생성 능력 측정

이유진, 김효섭, 안영희*, 박성훈

부산 대학교 화학공학과, 환경기술·산업개발연구소*

Tel. (051) 510-2395, Fax. (051) 512-8563

Abstract

Methanogenic activity of granular sludge was monitored by specific methanogenic activity (SMA) assay and confocal laser scanning microscopy (CLSM) during start-up of a thermophilic UASB reactor. Autofluorescence by CLSM could visualize the methanogenic bacterial population inside sludge granules and its intensity was proportional to SMA. Considering the complex procedures of SMA measurement, fluorescence quantification by CLSM can be suggested as a routine technique measuring methanogenic activity in UASB granules.

Introduction

UASB 반응기가 start-up기간을 지나 정상 상태에 도달하였는지는 CH₄ 발생률로 판단된다. 따라서, start-up 기간동안 sludge내 methanogen의 변화를 관찰하는 것이 중요하다. Methanogen의 활성을 직접 측정하는 방법으로 SMA가 일반적으로 사용되고 있는 데, 이것은 기질에 따른 sludge의 CH₄ 발생률을 sludge 무게로 나눈 값이다. 그러나 SMA는 모든 실험 과정이 혐기적으로 이루어져야 하고, 반응기로부터 채취한 sludge를 activation시키기 위한 초기 배양과정을 거쳐야 한다. 또한 실험상의 오차가 높은 기체분석이 필요하다.

CH₄ 생성 세균들은 독특한 몇 가지 cofactor를 가진다. 이 cofactor들 중 F₄₂₀은 CH₄ 발생과정에서 hydrogen carrier 역할을 하는 것으로 산화되면 420nm에서 최대 흡광도 값을 가지고, 이 때 autofluorescence를 낸다. CLSM은 주로 형광으로 label된 미생물을 관찰하기 위해 사용되는 데 높은 해상도의 digital image를 제공하며, CLSM에 설치된 image 분석 program으로 data를 분석할 수 있다. 본 연구에서는 고온 UASB start-up 기간 중 sludge내 methanogen의 autofluorescence를 CLSM으로 관찰하여 이를 정량적으로 분석하였다. 그리고 cofactor F₄₂₀을 추출하여 그 양의 변화도 조사하였다. 또한 이들을 SMA와 비교, 분석하여 그 상관관계를 고찰하였다. 이를 통해 반응기의 start-up동안의 methanogen의 활성을 측정하기 위한 방법으로 SMA를 대체할 수 있는 CLSM image를 통한 정량 분석을 제안하고자 한다.

Materials and Methods

SMA 측정

SMA는 sludge 무게 (VSS)에 대한 기질에 따른 sludge의 CH₄ 발생률로 나타낸다. SMA는

Yukselen [1]에 제안한 방법으로 측정하였으며 기질은 acetate (2.5g COD)를 이용하였다.

CLSM 관찰과 정량 분석

시료의 고정과 탈수, sectioning은 Sekiguchi [2]가 제시한 과정으로 이루어 졌다. CLSM은 LSM 510(Zeiss, Germany)을 이용하였고, 시료를 458nm에 여기한 후 laser intensity 86%, pinhole setting 190 (1.9 Airy units), dectector gain 883의 조건에서 관찰하였다. 관찰된 image는 LSM에 설치된 기본 분석 program (version 2.0)으로 투과광 image (granule 전체 image)와 형광 image를 digital 분석하였다. 그리고 투과광 image의 pixel수를 모두 더하여 전체 미생물 수를 구하였다. 형광 image에서는 brightness를 20단계로 나눈 다음 가장 밝은 곳에 가중치 20을 주어 그 때의 pixel수와 곱하여 autofluorescence의 양을 계산하였다. 이렇게 구한 각각의 값을 부피로 환산하여 전체 미생물에 대한 autofluorescence의 비 (Autofluorescence Index)를 구하였다.

$$Autofluorescence\ Index = \left(\frac{\sum_{i=0}^{20} i \cdot n_i}{n_t} \right)^{\frac{3}{2}} \times 100$$

- i , weighting factor representing autofluorescence brightness divided into 20 ranges based on intensity (1 for 36-46; 2 for 47-57; etc);
- n_i , number of pixel in the i th intensity range;
- n_t , total number of pixels covering granule section

과립 슬러지로부터 F_{420} 추출

F_{420} 은 Dolfing과 Mulder법 [3]에 의해 과립 슬러지로부터 추출하였으며, 추출된 F_{420} 의 양은 $\xi_{420nm} = 40mM^{-1}cm^{-1}$ (pH7.0) [3]을 이용하여 UV spectrophotometer (Lamda 20, PERKIN-ELMER, USA)로 계산하였다.

Results and Discussion

그림 1은 start-up초기부터 정상상태까지 미생물 과립에 존재하는 methanogen의 변화를 CLSM으로 관찰한 사진이다. Autofluorescence가 미생물 과립의 안에서 대부분이 관찰되어 methanogen이 과립의 바깥쪽보다 안쪽에 많이 존재함을 알 수 있었다. 반응기에 접종한 중은 sludge에서도 autofluorescence가 발견되었으나 (data not shown), 60일까지는 그 분포와 밝기가 감소하였다. 이는 미생물들이 온도변화로 인해 성장에 저해를 받아 많은 양의 methanogen이 사멸되었기 때문으로 생각된다. 60일 이후로는 활성이 높은 고온 methanogen이 성장함에 따라 autofluorescence의 분포와 강도가 계속 증가하였다. CLSM image의 autofluorescence를 정량 분석하여 SMA와 비교하였다(그림 2). 미생물 과립이 구에 가까운 형태임을 고려하여 CLSM image를 체적으로 계산하였다. SMA는 미생물 과립내의 1g VSS (volatile suspended solid)당 methane 발생량을 나타내므로 형광 image 체

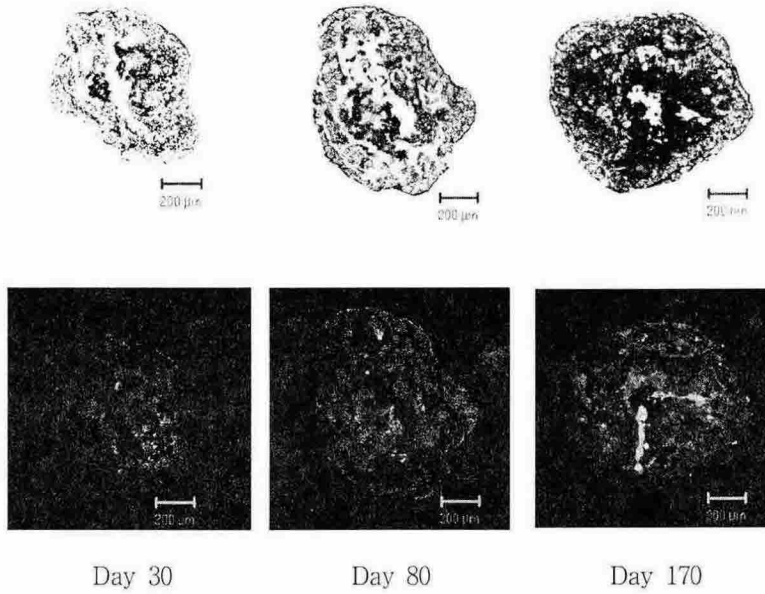


Fig. 1. CLSM pictures of granular sludge during start-up thermophilic UASB reactor. Upper panels, Transmitted light images; lower panels, autofluorescence image.

적을 투과광 image 체적으로 나누어 그 비를 SMA와 비교하였다. SMA는 접종한 직후에는 관찰되지 않았으나 미생물 과립이 온도 변화에 적응하면서 점차 활성을 되찾아 150일 이후에는 정상상태에 이르렀다. CLSM image를 정량화한 *Autofluorescence Index*는 60일 이후 계속 증가하여 170일경에 최고치에 도달하였다. SMA와 *Autofluorescence Index*는 서로 비슷한 경향 (상관 계수 $r^2=0.89$)을 나타내었기 때문에 autofluorescence의 밝기와 분포 정도는 methane 생성균의 활성과 비례적인 관계에 있다고 할 수 있다(그림 2).

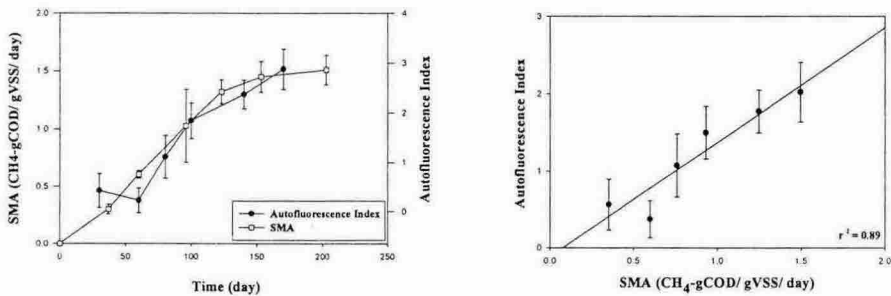


Fig. 2. Comparison of SMA and *Autofluorescence Index*.

미생물 과립에서 추출한 cofactor F_{420} 양과 SMA를 비교하였다 (그림 3). F_{420} 양은 SMA와 유사한 경향으로 증가하여 140일 이후로 일정한 값을 나타냈고, 이들은 서로 직선적으로 비례 ($r^2=0.88$)하였다. 이것은 cofactor F_{420} 이 메탄 발생과정에서 methane 생성균의 활성을 높이는 데 관여하는 coenzyme임을 뒷받침하였다.

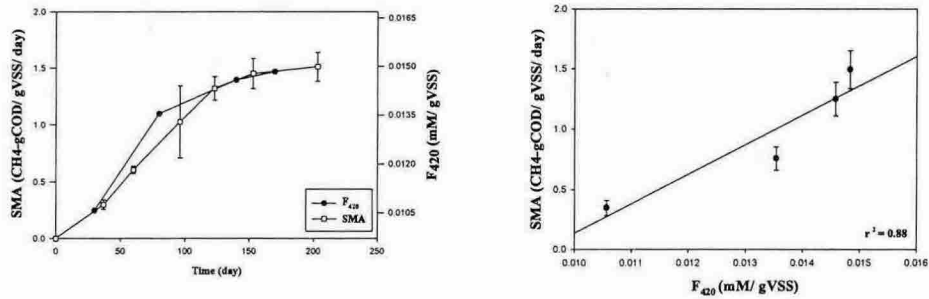


Fig. 3. Comparison of SMA and cofactor F_{420} content.

Summary

반응기의 performance를 결정하는 중요한 요소는 methane 생성균의 활성을 측정하는 것이다. Methanogen의 활성을 측정하는 방법으로 SMA가 유일하게 사용되고 있다. 따라서 본 연구에서는 methanogen의 활성을 측정하는 다른 대안으로 CLSM image의 정량 분석 방법을 확립하였다. CLSM의 결과는 약 5시간 안에 얻을 수 있을 뿐만 아니라, 분자 생물학적인 기술을 많이 요하지 않는다. 또한, sludge내부의 상태와 methanogen의 분포정도를 사진으로 볼 수 있는 장점이 있다. 따라서 SMA와 함께 CLSM image 정량 분석은 UASB반응기의 start-up 동안의 methanogen의 활성을 측정하기 위한 유용한 방법으로 제안할 수 있다.

Reference

1. Yuksenlen, M. A. (1997), Environ. Sci. Health, 32(7), 2069-2087.
2. Sekiguchi, Y. (1999), App. Environ. Micro., 65(3), 1280-1288.
3. Dolfing, J., J. W. Mulder (1985). App. Environ. Micro., 49, 1141-5.

4% paraformaldehyde로 4°C에서 시료를 20분간 고정하여 phosphate buffer saline (PBS

[0.13M NaCl, 10mM Na₂HPO₄, pH7.2)으로 2번 행균 후 50%, 80%, 100% EtOH, 50:50 (v/v) EtOH-xylene, 그리고 100% xylene으로 탈수시켰다. 그리고 녹은 paraffin에 고정시켜 Microtom (HM325, Microm, Germany)을 이용하여 10 μ m 두께의 박편으로 잘랐다. 박편내의 paraffin은 100% xylene으로 녹여낸 후 건조시켰다. Donlon, B. A., E. Razo-Flores, J. A. Field, and G. Lettinga.(1996), *Biotech. Bioeng.*, 51: 439-449. A UASB reactor was inoculated with 35 $^{\circ}$ C grown sludge granules and operated at 55 $^{\circ}$ C with a synthetic wastewater. Initially, no SMA was detected, but gradually increased to reach a plateau on the day 150.