

폐수처리시스템에서의 그람 양성 세균 모니터링 방법

남지현¹ · 배우근² · 이동훈^{1*}

¹충북대학교 미생물학과, ²한양대학교 건설환경공학과

A Rapid Method for Monitoring of Gram-positive Bacteria in Wastewater Treatment Systems

Ji-Hyun Nam¹, Wookeun Bae², and Dong-Hun Lee^{1*}

¹Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Republic of Korea

²Department of Civil and Environmental Engineering, Hanyang University, Ansan 425-791, Republic of Korea

(Received March 14, 2011 / Accepted March 22, 2011)

A simple and rapid method was developed for monitoring of Gram-positive bacteria in the wastewater treatment system. Culture suspensions of 4 Gram-positive and 4 Gram-negative strains were filtrated and stained with a polyethersulfone membrane filter and Toluidine Blue-O. To establish quantitative color image analysis, the intensity value of RGB (red-green-blue) color of a scanned filter image was analyzed with a photographic program. Red and green color values of Gram-positive bacteria were higher than those of Gram-negative bacteria. This method was applied to the activated sludge mixed with the Gram-positive bacteria. Although evaluation was difficult due to the irregular size and shape of flocs, the population of Gram-positive bacteria in the activated sludge could be monitored with floc dispersion technique. The more amounts of Gram-positive bacteria in the activated sludge led to the increase of red and green color values. This method provides a rapid and quantitative measurement of Gram-positive bacteria within the wastewater treatment systems.

Keywords: activated sludge, Gram-positive bacteria, polyethersulfone filter, toluidine blue-O

활성슬러지(activated sludge) 공법은 미생물의 대사기능을 이용하는 환경문제 해결 방법으로, 미생물이 하폐수 내의 오염물질(유기물)을 먹이로 하여 성장과 호흡을 통해 제거함으로써 하폐수를 처리하는 대표적인 생물학적 처리 방식이다. 그러나 미생물이 하폐수 처리공정의 중요 주체임에도 불구하고, 현재까지 활성슬러지 공법의 미생물 군집 조사결과가 실제 활성슬러지 유지 관리 또는 공정 안정화 등에 많이 이용되지 못하고 있다. 이는 활성슬러지의 미생물을 조사하는데 많은 시간이 소요되고, 전문 인력과 장비를 필요로 하며, 실험 결과를 공정 관리에 바로 활용하기 어렵기 때문이다. 특히 전통적인 활성슬러지 분석 방법으로는 복잡한 미생물 생태계의 특징을 이해하고 설명하기 어렵기 때문에 개선된 분석 방법이 요구된다(1, 19).

세균을 염색하는 방법 중 가장 잘 알려진 그람 염색(Gram-staining) 방법은 crystal violet, iodine, ethanol과 safranin을 이용한 감별 염색법이다(2). 그람 염색 방법은 미생물의 분류

및 동정 실험에 중요한 방법 중 하나이며, 활성슬러지 시료의 미생물 군집을 조사하는 방법으로도 사용된다. 특히 폐수처리 미생물 중 그 특성이 자세히 알려지지 않은 Eikelboom 형의 벌킹 사상균을 확인하기 위해서는 기존의 그람 염색 방법이 매우 중요하다(5). Sodell과 Seviour (18)는 폐수처리 시스템에서 그람 양성 세균이 활성슬러지에 거품이 형성되는 문제를 종종 야기한다고 보고하였으나, Wagner 등(4)은 생물학적 인 제거 공정(Enhanced Biological Phosphate Removal process, EBPR)에서 폐수의 인 제거에 그람 양성 세균이 중요하다고 보고하였다. 이러한 연구 결과들은 폐수처리 시스템에서 그람 양성 세균이 갖는 유용성과 문제점을 함께 나타내며, 폐수처리 공정의 효율적인 운영을 위하여 그람 양성 세균의 모니터링이 필요함을 알 수 있다.

최근에는 16S rRNA나 23S rRNA 유전자를 대상으로 하는 유전자 탐침(oligonucleotide probe)을 이용하여 그람 양성 세균과 그람 음성 세균을 모니터링 하거나(6, 10, 13, 20), Hexidium iodide와 같이 핵산과 결합하는 염료나 Live BacLight kit와 같이 형광물질을 이용한 감별염색 후에 현미

* For correspondence. E-mail: donghun@chungbuk.ac.kr; Tel: +82-43-261-3261; Fax: +82-43-264-9600

경을 이용하여 관찰하는 방법이 많이 사용되고 있다(4). 그러나 이러한 방법은 실험과정이 복잡하고 현미경 관찰을 위한 전문 인력 및 고가의 장비가 필요하므로 폐수처리 반응기의 지속적 관찰 등 현장 적용의 어려움이 있다(11).

한편 간편한 그람 염색 방법을 개발하기 위한 다양한 시도가 있었으며, 배양된 콜로니에 KOH 용액을 처리하고 점도를 확인하거나(12), 여과막에 수확된 균체를 염색함으로써 현미경 관찰을 피하는 방법이 제시되었다(14). Binnerup 등(3)은 polycarbonate 여과막을 이용한 그람 염색으로 근권(rhizosphere) 토양의 세균 군집의 특징을 조사하였으며, Sage 등(15)은 혈액에서 배양된 미생물을 빠르게 관찰하기 위하여 여과막을 이용하여 그람 염색을 수행하였다. 여과막을 이용한 그람 염색법은 염색 단계에서 세균의 손실이 큰 전통적인 그람 염색법의 문제점을 해결할 수 있고, 여과 방법이 균체의 슬라이드클래스 도말 방법보다 민감도가 높고 신속한 방법이라고 보고되었다(14). Yazdankhah 등(21)은 우유에서 질병을 유발하는 그람 양성균의 검출을 위한 방법으로 여과막과 Toluidine Blue-O 염색시약을 이용한 여과염색 방법을 제안하였다(21).

컴퓨터와 소프트웨어 기술이 발달하면서 생물학적 영상 분석(image analysis) 방법의 활용도 시작되어, Saida 등(16, 17)은 그람 염색 후에 현미경 카메라 사진을 확보하고 영상 분석을 수행하여 수계생태계 미생물 군집의 특성을 조사하였다. 또한 폐수처리시설에 대한 영상 분석 연구도 활발히 진행되어, 활성슬러지의 침강성을 조사하기 위한 영상 분석(7)과 활성슬러지에서 사상성 세균의 존재를 확인하기 위한 영상 분석법과 자동화 연구가 보고 되었다(8). Pandolfi와 Pons (9)는 활성슬러지의 사상성 세균을 그람 염색하고, 염색된 슬라이드를 분석하는 자동화 색상 영상 분석법을 개발하였다.

현재까지 폐수처리 공정 시료의 미생물 군집을 조사하기 위하여 현미경 관찰과 영상분석 방법을 이용하는 다양한 염색 방법이 제시되었으나, 방법이 불편하고 제한적이어서 활성슬러지를 대상으로 간편하게 그람 양성균을 조사하기 어렵다. 따라서 본 연구에서는 활성슬러지의 전처리를 통한 플록 크기 제어, 여과막을 이용한 그람 염색, 영상 분석 방법에 의한 RGB (Red-Green-Blue) 값을 이용함으로써 활성슬러지의 그람 양성균의 분포 변화를 간편하고 신속하게 모니터링 할 수 있는 그람 염색 방법을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배양

그람 음성균으로 *Acinetobacter calcoaceticus* (KCTC 2357), *Burkholderia cepacia* (KCTC 2966), *Escherichia coli* (KCTC 2441), *Zoogloea ramigera* (KCTC 2531)을, 그람 양성균으로는 *Bacillus megaterium* (KCTC 3007), *Bacillus licheniformis* (KCTC 1918), *Bacillus subtilis* (KCTC 3135), *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916)를 사용하였다. 각 균주는 Nutrient Broth (beef extract 3.0 g, peptone 5.0 g per L,

Table 1. Dispersion methods to break the flocs in activated sludge

Method	Condition
Vortexing	1 min
Bead-beating	1.0 mm Zirconium bead, 10 min
Sonication	degas 5 min, sonication 10 min
Boiling	100°C, 10 min
Freeze-Thawing	-70°C/65°C, 15 min×2 cycles

Difco, USA)에 접종하고, 30°C에서 24시간 배양하였다. 배양된 균주는 600 nm에서 흡광도를 측정하고, Live BacLight™ Bacterial Gram Stain kit (Invitrogen, USA)로 염색 후 형광 현미경(Nikon ECLIPSE 80i, Nikon, Japan)을 이용하여 계수하였다.

활성슬러지 시료의 채취 및 전처리

활성슬러지는 청주 국가산단 폐수종말처리장의 폭기조에서 채취하였다. 활성 슬러지의 플록을 분쇄하기 위한 전처리 과정은 Table 1과 같이 교반(Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc., USA), bead-beating (Microtube Mixer, Tomy Seiko Co., Japan), 초음파처리(Branson 5510, Branson Ultrasonics Corp., USA), 열처리, 동결과 용해의 반복처리 방법을 적용하였다. 플록 크기의 변화는 위상차 현미경(Nikon ECLIPSE 80i, Nikon)을 이용하여 관찰하였고, image scope program (EcoSolutions, Korea)을 이용하여 플록 면적을 측정하였다. 전처리 과정에 의해 플록이 분쇄된 활성슬러지 시료 1 ml와 용액 I (1 M NaCl, 0.3% Triton X-100, 0.1 M EDTA, pH 12.5) 1 ml를 혼합한 후에 여과 공경이 80 µm와 25 µm인 폴리프로필렌 필터로 순차적으로 여과함으로써 그람 염색을 위한 활성슬러지 시료를 준비하였다.

염색 시약 및 여과막

활성슬러지의 세균 염색에 적합한 시약과 여과막의 재질을 선정하기 위하여 그람음성 세균 *E. coli* (KCTC 2441)와 그람 양성 세균 *B. subtilis* (KCTC 3135)를 이용하여 염색결과를 확인하였다. 음성대조균은 세균 배양액과 동량의 인산완충용액을 사용하였다. 염색 시약으로 Toluidine Blue-O (133 µM, Sigma-Aldrich, USA)와 Gram Crystal Violet (BD BBL, USA)을 비교하였다. 여과막의 사양은 여과 공경이 0.2-1.2 µm, 직경이 25 mm였으며, Polyethersulfone (express PLUS, Millipore, USA), Polycarbonate (Isopore, Millipore), Polyvinylidene fluoride (Durapore, Millipore), Nylon (White Nylon, Millipore), Polysulfone (Pall Corporation, USA), Hydrophobic PTFE (LCR membrane, Millipore), Hydrophilic PTFE (Omnipore, Millipore), Polypropylene (Millipore) 및 Glass Fiber (GF/C, Whatman, USA) 재질의 여과막을 사용하였다.

여과 방법을 이용한 그람 염색법

활성슬러지 시료의 그람 염색 방법은 Fig. 1에 흐름도가 제

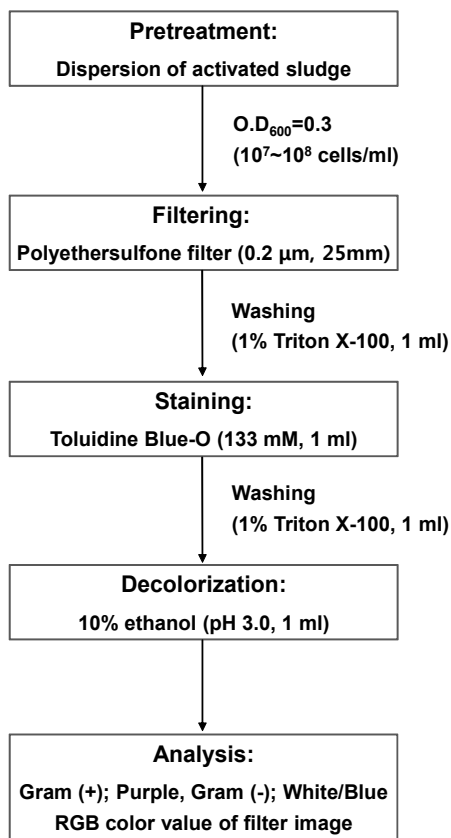


Fig. 1. Flowchart of a modified Gram-staining method for activated sludge sample.

시되어 있으며, Yazdankhah 등(21)의 방법을 변형하여 개발하였다. 표준 균주 혼합 시료 또는 플록 분쇄와 전여과로 준비된 활성슬러지 시료 1 ml을 polyethersulfone 여과막으로 여과하고, 1 ml의 1% Triton X-100으로 필터를 세척하였다. Polyethersulfone 여과막을 1 ml의 133 μ M Toluidine Blue-O로 1분간 염색하고, 1 ml의 1% Triton X-100으로 필터를 세척하였다. 여과막에 색상이 나타나면 1 ml의 10% 에탄올(acetic acid, pH 2.8-3.0)로 탈색하고, 파란색이 남아있으면

그람 양성으로, 탈색되었으면 그람 음성으로 판정하였다. 탈색 과정 전에 필터에 색상이 나타나지 않으면 검출범위 이하의 세균량으로 판정하였다.

영상 분석

염색이 끝난 여과막은 상온에서 건조한 후에, 스캐너 (PowerLook 2100XL, UMAX Technologies Inc., USA)를 이용하여 영상 자료를 확보하였으며, 영상의 RGB (Red-Green-Blue) 값 분포는 Paint Shop Pro v.6 (Corel, Canada)의 칼라 히스토그램 분석 프로그램을 이용하였다.

결과 및 고찰

그람 염색 시약 및 여과필터의 선정

대표적인 그람음성 세균 *E. coli* (KCTC 2441)와 그람양성 세균 *B. subtilis* (KCTC 3135)를 이용하여 전통적인 그람 염색 방법에 사용되는 crystal violet과 Yazdankhah 등(21)의 방법에서 제시된 toluidine blue-O의 염색 효과를 비교하였으며, 9종류의 여과막을 이용하여 여과 속도, 배경 염색 수준, 그람 양성 세균과 그람 음성 세균의 구분 성능 등을 비교하였다 (Table 2).

그람 염색 시약으로 toluidine blue-O를 사용한 경우, 세균 없이 인산완충용액만 여과한 음성대조군의 배경 염색이 적었으며, 그람 양성 세균과 그람 음성 세균의 구분이 더 뚜렷하게 나타났다. 음성대조군의 배경 염색은 crystal violet으로 염색한 경우 polyethersulfone, polycarbonate 여과막에서, toluidine blue-O를 사용한 경우 polyethersulfone, polycarbonate, polyvinylidene fluoride, nylon, polypropylene 여과막에서 낮은 수준의 배경 염색이 확인되었다.

Polyethersulfone, polycarbonate, glass fiber 재료의 여과막을 사용하였을 때 동량의 세균 시료에 대하여 여과 시간이 가장 단축되었다. 여과 공경의 크기와 여과 시간의 상관관계는 관찰되지 않았으며, 공경 크기보다는 여과막의 재질과 적층 구조가 여과 속도에 영향이 크다고 판단된다. 그람 양성 세균과 그람 음성 세균의 구분 성능은 polyethersulfone 여과막과

Table 2. Evaluation of the membrane filters and staining dyes for a modified Gram-staining technique

Filters	Pore size (μ m)	Filtering time	Toluidine Blue-O		Crystal Violet	
			Background ^b	Gram-stain	Background	Gram-stain
Polyethersulfone	0.2	+++ ^a	+++	+++	+++	++
Polycarbonate	0.2	+++	+++	++	+++	+
Polyvinylidene fluoride	0.2	++	+++	+	+	-
Nylon	0.2	++	+++	+	-	-
Polysulfone	0.2	++	++	+	+	-
Hydrophobic PTFE	0.45	+	-	-	-	-
Hydrophilic PTFE	0.45	+	++	+	+	-
Polypropylene	0.6	-	+++	-	++	-
Glass fiber cartridges	1.2	+++	-	-	-	-

^a -, bad; +, normal; ++, good; +++, excellent

^b Background, Background color of the control group: The filters were stained with the dyes after phosphate buffer without bacterial cells was filtrated.

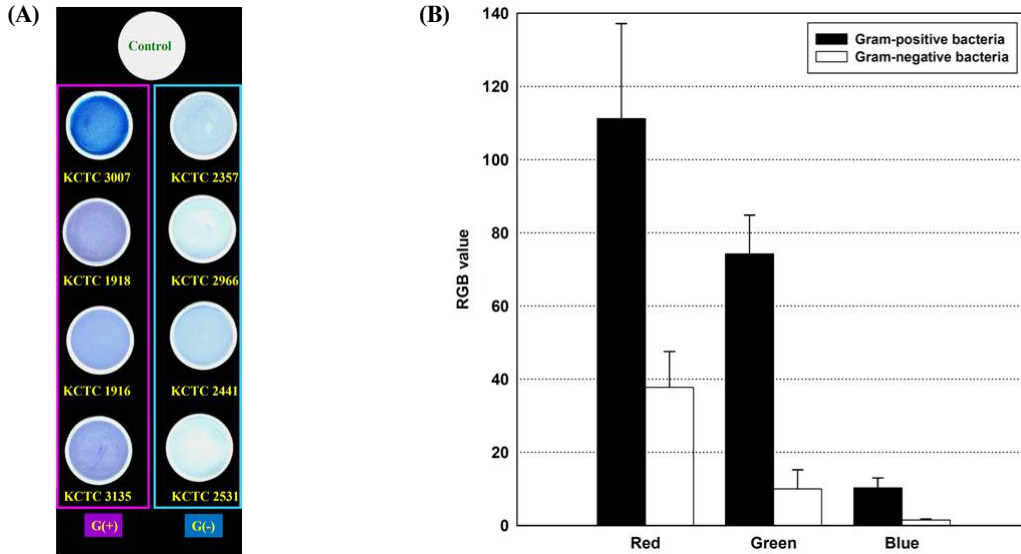


Fig. 2. Staining results of the pure cultures of Gram-positive and Gram-negative bacteria. (A) Photograph of the stained filters, (B) RGB color intensity value of the scanned images. The sample for the control group was phosphate buffer. Data are presented as means and standard errors normalized by the intensity value of the control sample.

toluidine blue-O를 사용한 경우 가장 우수하였으며, polycarbonate 여과막도 비교적 좋은 성능을 나타내었다.

Yazdankhah 등(21)의 연구에서는 polysulfone 재질의 여과막 사용이 추천되었지만, 본 연구에서는 여과 속도, 배경 염색, 그람양성 세균의 구분 성능이 모두 우수한 조합인 polyethersulfone 여과막과 toluidine blue-O를 활성슬러지의 염색 등 향후 실험에 사용하였다.

표준 균주의 그람 염색

그람 음성 균주 *A. calcoaceticus*, *Burkholderia cepacia*, *E. coli*, *Z. ramigera*와 그람 양성 균주 *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *S. aureus*를 배양한 후에 동량의 균체를 polyethersulfone 여과막에 각각 여과하고, toluidine blue-O로 염색한 결과를 Fig. 2A에 나타내었다. 그람 음성 세균은 인산 완충용액을 사용한 음성대조군 보다 약간 진한 하늘색을 나타내었으나, 그람 양성균의 경우 진한 파랑 또는 보라색으로 여과막이 염색되었다. *Bacillus* 속의 3균주가 *S. aureus* 보다 진하게 염색되었으며, *B. megaterium* 가장 진한 파란색을 나타내었다. 그람 음성 세균에서는 *E. coli*와 *A. calcoaceticus*가 연한 하늘색을, *Burkholderia cepacia*와 *Z. ramigera*는 거의 흰색을 나타내었다. 그람 양성 세균 중에서 가장 흐리게 염색된 *S. aureus*도 그람 음성 세균 중에서 가장 진하게 염색된 *E. coli*와 뚜렷하게 구분할 수 있었다.

그람 음성 세균과 그람 양성 세균의 영상 자료를 Paint Shop Pro의 칼라히스토그램 프로그램을 이용하여 RGB 값으로 확인하고 음성대조군의 RGB 값을 빼서 보정한 결과는 Fig. 2B에 막대그래프로 제시하였다. 그람 양성 세균의 RGB 평균값과 표준오차는 빨간색에서 111±26 (Red channel value),

초록색에서 74±10 (Green channel value), 파란색에서 10±3 (Blue channel value)이었다. 그람 양성 세균의 RGB 값은 각각 38±10, 10±5, 2±0.3을 나타내어, 빨간색의 차이가 70 이상으로 가장 크고, 녹색 계열은 60 이상의 차이를 보였으나, 파란색은 큰 차이가 없었다(Fig. 2B). 따라서 빨간색(R)과 초록색(G)의 칼라히스토그램 분석 결과를 이용하면 그람 양성 세균과 그람 음성 세균의 정량적 분석과 구분이 가능함을 알 수 있었다.

*E. coli*와 *B. subtilis*의 개체 농도를 10⁸ cells/ml로 동일하게 하고 각기 다른 비율로 혼합하여, 그람 양성 세균과 그람 음성 세균이 혼재된 모델 균집 시료를 만들어 염색 결과를 비교하였다(Fig. 3). 음성대조군의 RGB 값을 빼서 보정한 결과는 *B. subtilis*가 40%인 시료부터 빨간색(Red channel)에서 13.3±6.7의 큰 차이를 나타내었으며, 60%, 80%, 100%로 증가함에 따라 각각 16.6±7.0, 21.3±7.8, 22.0±7.8로 증가하는 결과를 나타내었다. 영상분석에 의해 확인된 RGB 값의 변화는 그람 양성 세균의 비율에 따라 빨간과 녹색 계열의 색상 차이가 나타남을 알 수 있었으며, 그람 양성 세균의 비율과 빨간색 수치의 회귀분석 상관계수(r²)는 0.94 이상이었다. 따라서 그람 양성 세균과 음성 세균이 혼재된 자연 환경의 시료도 새로운 그람염색 방법을 적용할 수 있다고 예상할 수 있다.

활성 슬러지 플록의 분산 방법

활성슬러지의 세균 균집을 모니터링 하기 위해서는 염색시약의 균일한 투과성, 활성슬러지 고유색에 의한 배경염색 문제 등이 해결되어야 하며, 다양한 염색 방법의 제한 요인인 크고 밀집된 플록의 효과적인 분산 방법이 강구되어야 한다(5).

여과 방법을 이용한 그람 염색 결과에 미치는 플록의 부정

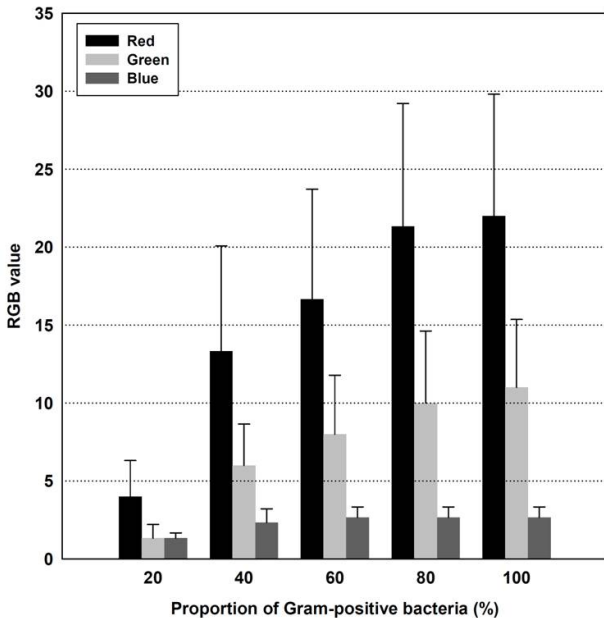


Fig. 3. Staining results of the mixtures of Gram-positive and Gram-negative bacteria. The mixed population of Gram-positive and Gram-negative bacteria was prepared with *B. subtilis* KCTC 3135 and *E. coli* KCTC 2441. RGB color intensity values are presented as means and standard errors normalized by the intensity values of *E. coli* KCTC 2441.

적인 영향을 최소화하고자 활성슬러지 플록의 분산 방법을 모색하였으며, Table 1과 같이 교반, bead-beating, 초음파처리, 열처리 등의 5가지 방법을 적용한 후에 플록 크기의 변화를 관찰하고 면적을 계산하였다(Fig. 4). 분산처리 대조군인 활성슬러지 플록의 평균 면적은 $2430 \pm 740 \mu\text{m}^2$ 였으며, bead-beating 방법에 의한 처리 후에는 플록의 크기가 $810 \pm 130 \mu\text{m}^2$ 로 최소화 되었으며, 초음파 처리와 교반처리 후의 시료는 각각 $900 \pm 270 \mu\text{m}^2$ 와 $1480 \pm 330 \mu\text{m}^2$ 로 bead-beating 방법에 의한 활성슬러지 전처리가 가장 효율적임을 알 수 있었다. 또한 활성슬러지에 열을 가할 경우에는 오히려 플록이 뭉치는 현상이 관찰되어, 플록의 평균 면적이 $2720 \pm 830 \mu\text{m}^2$, $4490 \pm 1620 \mu\text{m}^2$ 로 증가하였다.

활성 슬러지를 적용한 그람 염색법

*B. subtilis*를 배양하고 수확하여 세균수가 10^8 cells/ml이 되도록 인산완충용액으로 희석하고, 그람 음성 세균이 주요 군집을 형성하고 있는 활성슬러지와 플록 전처리 후에 다양한 비율로 혼합하여 그람 양성 세균 *B. subtilis*의 비율이 20%, 40%, 60%를 차지하는 시료를 준비하고 그람 염색실험을 수행하였다(Fig. 5).

활성슬러지의 경우 플록의 고유색과 염색 효과로 인하여 표준균주 실험보다 칼라히스토그램의 RGB 값이 높게 측정되었으나, *B. subtilis*의 비율이 증가함에 따라 여과막의 파란색 염색도 진해지는 결과가 쉽게 확인되었다. 혼합 시료의 RGB 값을 측정하고 대조군인 활성슬러지 시료의 RGB 값과의 차

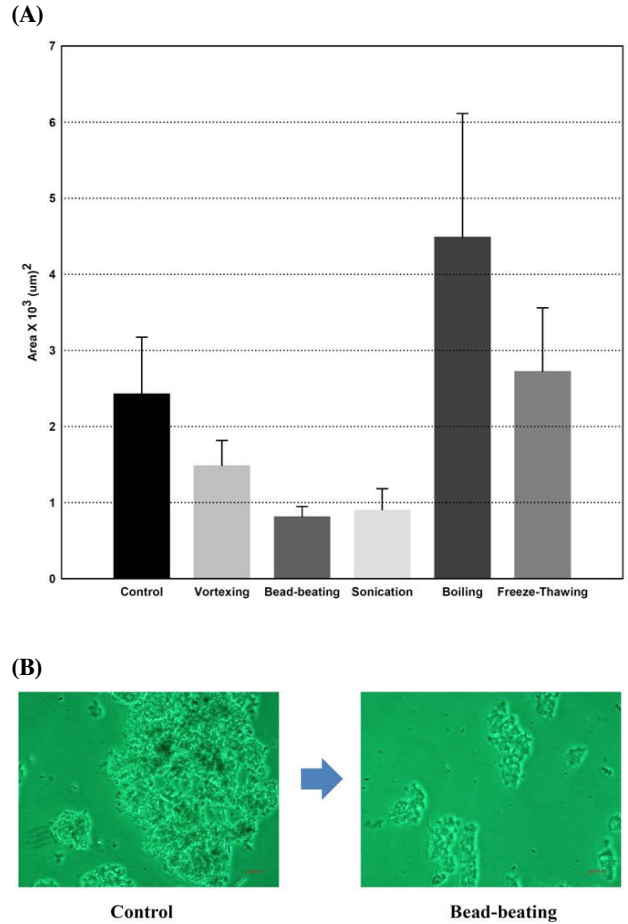


Fig. 4. Evaluation of the floc dispersion methods. (A) The floc size is presented as average area and standard error after pretreatments of the activated sludge, (B) Phase-contrast micrograph ($\times 600$) of the floc broken into smaller pieces by bead beating.

이를 계산한 결과, *B. subtilis*의 비율이 20%, 40%, 60%인 시료에서 빨간색(Red channel)은 각각 12.0 ± 4.0 , 20.3 ± 2.6 , 26.3 ± 5.7 , 초록색(Green channel)은 각각 5.6 ± 2.6 , 18.3 ± 4.3 , 27.0 ± 5.7 로 증가하였다. *B. subtilis*의 추가 비율과 빨간색 증가값의 회귀분석결과 상관계수(r^2)는 0.97 이상이었다.

본 연구에서는 Yazdankhah 등(21)이 우유의 세균 군집을 확인하기 위하여 제시한 그람 염색법을 개선하여 폐수처리장의 슬러지 부상에 관여한다고 알려져 있는 그람 양성균의 증감 변화를 간단하게 확인할 수 있는 방법을 개발하였다. 본 연구의 여과 방법을 이용한 그람 염색법은 육안 관찰 또는 영상분석에 의한 RGB 값을 이용해 활성슬러지에 존재하는 세균의 모니터링을 가능하게 하며, 현장 실무자들이 세균 군집의 변화에 따라 공정을 관리하는데 효율적으로 사용할 수 있을 것이다.

적요

폐수 처리 시스템의 그람 양성 세균을 간편하고 신속하게

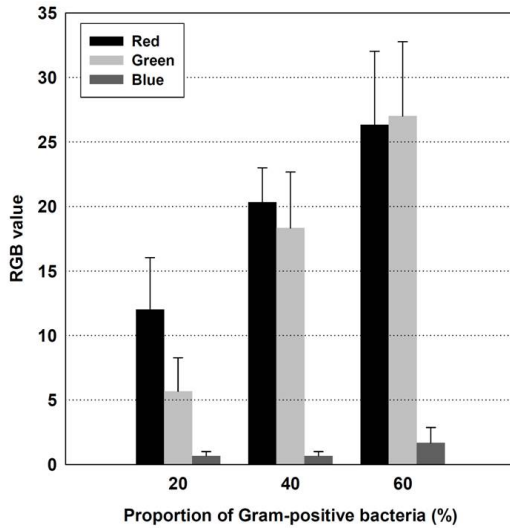


Fig. 5. Staining results of activated sludge mixed with Gram-positive bacteria. The amount of Gram-positive bacteria, *B. subtilis* KCTC 3135, was serially increased, while that of the activated sludge was kept constant. RGB color intensity values are presented as means and standard errors normalized by the activated sludge sample.

모니터링할 수 있는 그람 염색 방법을 개발하였다. 각각 4 종류의 그람 양성 세균과 음성 세균의 배양액을 polyethersulfone membrane filter와 Toluidine Blue-O로 여과 및 염색하였다. 염색된 여과막을 건조시키고 스캔하였으며, 영상 분석 프로그램을 이용하여 빨강색, 녹색, 파랑색의 강도를 측정하는 정량적 색상 이미지 분석법을 개발하였다. 그람 양성 세균의 경우 그람 음성 세균보다 빨간색과 초록색 수치가 높게 나타났다. 본 방법을 그람 양성 세균이 혼합된 활성슬러지에 적용한 결과, 활성슬러지의 경우 플록의 불규칙한 크기와 형태로 측정이 어렵다 할지라도 플록 분산 기술을 이용하여 활성슬러지의 그람 양성 세균의 변화를 모니터링 할 수 있었다. 활성슬러지에서도 그람 양성 세균의 비율이 높아질수록 빨간색과 초록색 수치가 증가하였다. 본 연구에서 개발된 방법은 폐수처리 시스템에 존재하는 그람 양성 세균을 신속하고 정량적으로 모니터링 할 수 있다.

감사의 말

이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

참고문헌

- Amann, R., J. Snaidr, M. Wagner, W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1996. *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* 178, 3496-3500.
- Bartholomew, J.W. and T. Mittler. 1952. The Gram stain. *Bacteriol. Rev.* 16, 1-29.

- Binnerup, S.J., O. Højberg, and J. Sørensen. 1998. Gram characteristics determined on single cells and at the microcolony level of bacteria immobilized on polycarbonate membrane filters. *J. Microbiol. Methods* 31, 185-192.
- Forster, S., J.S. Snape, H.M. Lappin-Scott, and J. Porter. 2002. Simultaneous fluorescent Gram staining and activity assessment of activated sludge bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4772-4779.
- Jenkins, D., M.G. Richard, and G.T. Daigger. 2003. Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, pp. 1-74. 3rd ed. Lewis Publishers, Washington, D.C., USA.
- Manz, W., R. Amann, W. Ludwig, M. Wagner, and K.H. Schleifer. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
- Mesquita, D.P., O. Dias, A.L. Amaral, and E.C. Ferreira. 2009. Monitoring of activated sludge settling ability through image analysis: Validation on full-scale wastewater treatment plants. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 32, 361-367.
- da Motta, M., M.N. Pons, and N. Roche. 2001. Automated monitoring of activated sludge in pilot plant using image analysis. *Water Sci. Technol.* 43, 91-96.
- Pandolfi, D. and M.N. Pons. 2004. Gram-staining characterization of activated sludge filamentous bacteria by automated colour analysis. *Biotechnol. Lett.* 26, 1841-1846.
- Pernelle, J.J., E. Cotteux, and P. Duchène. 1998. Effectiveness of oligonucleotide probes targeted against *Thiothrix nivea* and type O21N 16S RNA for *in situ* identification and population monitoring in activated sludges. *Water Sci. Technol.* 37, 431-440.
- Pernelle, J.J., G. Gaval, E. Cotteux, and P. Duchène. 2001. Influence of transient substrate overloads on the proliferation of filamentous bacterial populations in an activated sludge pilot plant. *Water Res.* 35, 129-134.
- Powers, E.M. 1995. Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 3756-3758.
- Roller, C., M. Wagner, R. Amann, W. Ludwig, and K.H. Schleifer. 1994. *In situ* probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140, 2849-2858.
- Romero, S., R.F. Schell, and D.R. Pennell. 1988. Rapid method for the differentiation of Gram-positive and Gram-negative bacteria on membrane filters. *J. Clin. Microbiol.* 26, 1378-1382.
- Sage, B.H. and V.R. Neece. 1984. Rapid visual detection of microorganisms in blood culture. *J. Clin. Microbiol.* 20, 5-8.
- Saida, H., T. Maekawa, T. Satake, Y. Higashi, and H. Seki. 2000. Gram stain index of natural bacteria community at a nutrient gradient in freshwater environment. *Environ. Pollut.* 109, 293-301.
- Saida, H., N. Ytow, and H. Seki. 1998. Photometric application of Gram stain method to characterize natural bacterial populations in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 742-747.
- Sodell, J.A. and R. Seviour. 1990. Microbiology of foaming in activated sludge plants-a review. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 145-176.
- Steen, H.B. 2000. Flow cytometry of bacteria: glimpses from the past with a view to the future. *J. Microbiol. Methods* 42, 65-74.
- Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K.H. Schleifer. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 792-800.
- Yazdankhah, S.P., H. Sorum, H.J. Larsen, and G. Gogstad. 2001. Rapid method for detection of Gram-positive and -negative bacteria in milk from cows with moderate or severe clinical mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3228-3233.