한국현미경학회지 제39권 제1호 2009
Korean J. Microscopy 39(1), 65~72(2009)

Cryo-Methods와 Cryo-SEM을 이용한 Cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803 미세구조 관찰

이은주, 문윤정[1], 오현우[2], 김수진, 정영호[1], 권희석, 김윤중*

한국기초과학지원연구원 전자현미경연구부,
[1]한국기초과학지원연구원 프로테옴연구부,
[2]한국생명공학연구원 산업바이오소재 연구센터

Observations of the Cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 using Cryo-Methods and Cryo-SEM

Eun-Ju Lee, Yoon-Jung Moon[1], Hyun-Woo Oh[2], Su-Jin Kim, Young-Ho Chung[1], Hee-Seok Kweon and Youn-Joong Kim*

Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, Daejeon 350-333, Korea
[1]Proteome Research Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon 350-333, Korea
[2]Industrial Bio-materials Reserch Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea
(Received March 9, 2009; Accepted March 18, 2009)

ABSTRACT

Cryo-SEM which enables specimens to be observed in frozen form has been used to study liquid specimens in their native states. Cryo-methods, sample preparation for cryo-SEM, are quite complex and involve several discrete but vitally interconnected steps which are rapid cooling, fracturing, sectioning, etching and coating. It is important to select practical techniques and to optimize conditions of each steps considering analytic purpose and specimen characters, viz., sample dimension, water contents. In this study, etching methods and sample preparation before freezing had been studied for observation of cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803 using cryo-SEM and their cryo-SEM images were compared to Conventional SEM (CSEM) images treated by chemical fixation. We could observe the improved morphological images of the pili of the surface and membranes of *Synechocystis* sp. PCC 6803 and the three-dimensional architectures of their biofilm, which were difficult to observe using chemical fixation and CSEM. These results suggest that cryo-methods/cryo-SEM are useful techniques for morphological study of biological specimen.

Keywords : Cryo-Methods, Cryo-SEM, Cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803

본 연구는 기초기술연구회 협동과제 “나노 · 바이오 융합소재의 EM분석법 개발”의 지원을 받아 수행되었습니다.
* Correspondence should be addressed to Dr. Youn-Joong Kim, Division of Electron Microscopic Research, Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333 Korea. Ph.: (042) 865-3596, Fax: (042) 865-3939, E-mail: y-jkim@kbsi.re.kr

서 론

수분을 함유하거나 낮은 전도성을 갖는 생물 시료들은 전처리없이 고진공의 전자현미경으로 관찰하기는 어렵다. 이들 시료들은 화학고정, 탈수, 건조, 코팅후 상온의 전자현미경으로 분석하는 것이 일반적인 방법이다. 그러나 이러한 일련의 전처리 과정은 1～2일의 시간소요와 여러 물리, 화학적 과정에 의한 형태의 변화 및 시료 손상이 발생될 수 있다. 최근에 개발, 적용되고 있는 동결 기술(cryo-technique)은 급속 동결법을 이용한 고정 과정을 통해 전처리 시간을 단축시키고 고정 과정중의 변형을 최소화시킴으로써 수분을 함유하는 시료를 가장 자연 상태에 가깝게 분석하는 방법으로 많은 분야에서 연구되고 있다.

동결 기술은 투과전자현미경(Transmission Electron Microscope, 이하 TEM)뿐 아니라 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope, 이하 SEM) 분석에 응용되어 수 μm～mm 크기 시료의 3차원 구조를 상대적으로 빠르고 용이하게 고정하는 방법으로 사용된다. 특히 시료를 동결된 상태로 분석할 수 있는 cryo-SEM은 시료의 3가지 상(phase)을 자연 상태로 분석 가능한 유일한 방법이다. 일반적인 화학 고정에서는 액체상의 제거나 고체상의 변형이 발생하며 동결 건조 경우에도 기체상과 액체상의 구분이 어렵기 때문이다(Echlin, 1992).

Cryo-SEM 분석을 위한 동결 처리 방법(cryo-methods)은 rapid cooling, fracturing, sectioning, etching, coating과 같은 독립되면서도 연관된 여러 과정으로 구성되나 분석 목적에 따라 fracturing이나 sectioning, etching의 과정은 생략되기도 한다. 또한 각 과정은 분석 목적이나 시료 특성, 장비 상태 등을 고려하여 최적의 조건이나 처리 방법을 선택하여야 한다. Rapid cooling은 시료 형태의 변형을 유발하는 얼음 결정의 생성없이 빠르게 동결 고정하는 것이 중요한 과정으로 시료 크기나 특성에 따라 jet cooling, plunge cooling, high pressure cooling, spray cooling 및 impact cooling법을 선택하여 사용한다(Echlin, 1992; Robards AW & Sleytr UB, 1985). 대부분의 SEM 시료는 부피가 크고 TEM 대비 SEM의 분해능이 낮으므로 얼음 결정에 의한 구조 변형의 영향이 무시 가능하여 슬러쉬 상태의 액체질소나 액체 질소(이하 LN_2)를 이용한 quenching cooling법을 사용하기도 하지만 고분해능 FE-SEM을 이용할 경우 동결법은 중요한 요건이 된다. 본 연구에서는 관찰하고자하는 시료의 크기가 1～2 μm이며 관찰의 용이함을 위해 deionized water(이하 D.I. water)에 분산된 다량의 시료를 고압(약 2100 bar)에서 순간적으로 동결하는 방법인 high pressure cooling법을 사용하였다. 이 방법은 다른 급속 동결법에 비해 두꺼운 시편(100 μm～600 μm)을 얼음 결정에 의한 손상없이 고정이 가능한 것으로 알려져 있다(Shimoni & Muller, 1998).

급속 동결된 시편은 진공 상태의 저온 이동장치를 통해 별도의 전처리 장비로 옮긴후 fracturing, sectioning, etching과 coating을 한다. fracturing이나 sectioning은 LN_2로 냉각시킨 knife나 microtome을 이용하여 시료의 파단면이나 절단면을 생성하는 과정이다. 시료 표면의 얼음 입자나 기타 오염물을 효과적으로 제거하여 깨끗한 관찰면을 제공하는 것과 더불어 시료 내부 구조를 관찰할 수 있게 하는 방법이다.

다량의 물을 구성체로 가진 의생물 시료나 액상 시료의 3차원 구조를 보다 효과적으로 관찰하게 하는 etching은 고진공하에서 얼음을 승화시키는 동결 건조 과정으로 승화 과정동안 시료의 녹음이나 수축, 응축이 일어나지 않는 etching 조건의 설정이 중요하다. etching 조건은 분석목적에 따른 etching량을 예상하여 전처리 장비의 진공도와 온도, etching 시간을 결정하는 것이다. 대부분의 전처리 장비는 진공도가 고정되어 있으므로 실제 etching 조건의 설정은 시료 온도에서의 최대 승화 속도와 시료내 얼음의 재결정화 온도를 고려하여 전처리 장비의 stage 온도와 etching 시간을 결정하는 것이다. 실제 승화 속도는 시료중 물의 상(phase)이나 결합 상태, 함량 및 시료의 크기, 모양에 따른 영향이 커서 etching 온도나 시간의 결정은 실험적이고 경험적인 과정을 통해 얻을수 있다.

본 연구는 cryo-SEM을 이용하여 생물시료 남세균(Cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803, 이하 *Synechocystis* sp. PCC 6803)의 표면 및 내부 구조 형태를 관찰하기 위한 cryo-methods 중 etching 조건의 설정과 시료처리 및 cryo-SEM을 이용한 분석 활용에 관한 것으로 연구에 사용된 남세균(*Synechocystis* sp. PCC 6803)은 광합성 및 광운동성을 가진 가장 오래된 생물체로서 다른 남세균과 달리 단세포 형태로 존재하고 게놈 구조가 단순하며 유전자 조작이 용이하여 광합성 및 광신호 전달 연구에 유용한 모델 생물체이다(Kaneko et al., 1996). 최근 수년 동안의 연구결과 *Synechocystis* sp. PCC 6803는 적어도 두 가지 형태의 pili, 즉 세포 표면에 균일하게 분포한 평균직경이 3～4 nm이며 길이가 약 1 μm정도 되는 thin pili와 평균직경이 6～8 nm이며 길이가 4～5 μm인 thick pili를 가지는 것으로 관찰되었다. Thick pili는 많은 gram-negative bacteria에서 발견되는 Type IV pili와 유사하며 광운동 및 형질변환의 주요 기관으로 보고되고 있으나 광운동성에 대한 thin pili의 기능은 아직 분명치 않으며 다만 gram-negative bacteria의 fibril과 같이 세포간의 상호작용 및 다양한 표면에서의 부착을 용이하게 하는 것으로 추정되고 있다(Bahaya, 2000; Yoshihara et al., 2001). *Synechocystis* sp. PCC 6803 pili의 현미경적 관찰은 LM이나 TEM을 통한 phototaxis, motility, photomovement (Choi et al.,1999; Burriesci & Bahya, 2008) 연구에 이용되어

왔으나 SEM을 이용한 분석은 보고된 바 없다. 이는 기존 화학 고정에 의해서는 pili의 보전이 어렵기 때문인 것으로 추정된다.

이에 본 연구에서는 cryo-methods로 처리한후 cryo-SEM을 이용하여 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 효과적 고정과 관찰을 시도하였으며, 관찰 결과를 화학고정법으로 처리한 CSEM 결과와 비교함으로써 생물시료에 대한 cryo-methods 및 cryo-SEM의 활용을 증진하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재 료

본 연구에 사용한 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 배양 조건은 Choi et al. (1999)의 방법을 따랐다. 1.5% 고체 한천 배지에서 자란 야생종을 액체 BG11 배양액에 현탁한 후에 0.4% 고체 한천배지(10 mM glucose) 위에 4 μL씩 떨어뜨렸다. 0.4% 고체 한천배지 상에 떨어뜨린 세포 군체를 백색 형광등 광원이 한쪽 방향으로만 조사되는 조건하에서 28°C에서 5일간 활주운동을 시켰다. Pili 관찰을 위해서는 선단부위에 해당하는 세포들을 조심스럽게 모은 다음 D.I. water에 현탁시켜 사용하였고 내부 구조 및 biofilm 관찰을 위해서는 1.5% 고체 한천배지에서 배양한 야생종을 그대로 사용하거나 D.I. water에 일부 희석하여 사용하였다.

2. 방 법

화학고정법과 CSEM 관찰은 통상적인 방법을 따랐다. 즉 2.5% glutaraldehyde와 2.5% paraformaldehyde로 실온에서 24시간 전고정하였고 0.1 M carcodylate buffer로 세척하였다. 전고정된 *Synechocystis* sp. PCC 6803은 1% OsO_4로 실온에서 2시간 고정하고 D.I. water로 세척한 후 ethanol로 탈수하였다. 탈수 후에 3-methylbutylacetate로 치환하고 critical point dryer로 건조시켰다. 건조된 시편을 gold coating한 후 SEM (LEO1455VP, ZEISS)으로 관찰하였다.

Cryo-methods와 cryo-SEM 관찰을 위하여 *Synechocystis* sp. PCC 6803를 planchet에 담은 후 High Pressure Freezer (HPF010, BAL-TEC)를 이용하여 급속 동결하였다. LN_2하에서 planchet를 분리한 후 −150°C로 미리 냉각시킨 Freeze Fracture System (BAF 060, BAL-TEC)내 cryo stage로 이동, 장착하고 LN_2로 냉각시킨 knife를 이용하여 파단면을 만든 후 etching 온도 및 시간을 변화시켰다. Etching후 cryo stage 온도를 −150°C로 다시 냉각시키고 Pt/C으로 2∼5 nm 두께로 코팅하였다. 코팅된 시료는 이동 장치를 이용하여 −130∼−140°C로 냉각 시킨 ESEM (LEO1455VP, ZEISS)내 cryo stage에 장착한 후 가속전압 10∼20 KV에서 관찰하였다.

결과 및 고찰

1. Etching 조건의 설정

Etching 조건의 설정시 고려해야 할 점은 시료 중 얼음의 재결정화 온도와 시료 온도에 따른 순수 물의 최대 승화 속도이다. 대부분의 전처리 장비는 진공도가 고정되어 있으므로 stage의 온도와 etching 시간을 변화시키며 이미지를 관찰함으로써 최적의 조건을 설정하게 된다. Umrath (1983)는 Knudsen equation을 이용하여 −100°C, 1×10^{-5} Torr일 때 순수 얼음의 승화 속도는 2 nm/s이며 1 μm 두께당 8분 19초의 etching 시간을 제시하였다. 그러나 실제 승화속도는 이러한 이론적 수치와는 차이가 있다. 이는 승화된 물에 의한 수증기의 부분압 영향과 시료 온도와 stage의 온도 차이, 시료중 얼음 결정의 상(phase)이나 물의 결합 상태, 물의 함량 및 시료의 크기와 모양에 따른 열원과의 접촉 정도가 승화 속도에 영향을 주기 때문이다. Robards와 Sleytr (1985)는 이러한 영향을 고려하여 보다 실제적인 최대 승화 속도로서 −100°C에서 100 nm/min을 제시하였다.

이를 바탕으로 본 연구에 사용된 *Synechocystis* sp. PCC 6803는 직경 1∼1.5 μm의 구형으로써 세포의 3차원 형상을 관찰하기 위해서는 stage 온도 −100°C일 때 얼음의 포화 수증기압인 1×10^{-5} Torr 이하의 진공 조건하에서 최소 10∼15분의 etching 시간이 필요함을 알 수 있다. 계산을 근거하여 초기 etching 조건을 stage 온도 −100°C에서 etching 시간 10분을 설정하였다. 관찰한 결과, etching이 거의 되지 않아 세포 외곽만이 관찰되었다 (Fig. 1a). Etching 량을 증가시키기 위해 stage 온도를 상승시키되 얼음의 재결정화가 일어나지 않는 −90°C로 설정하여 동일한 etching 시간으로 처리한 후 관찰하여 보았다. Fig. 1b에서 보는 바와 같이 시료를 덮고 있는 표면의 얇은 얼음층의 승화가 많이 일어났으나 세포의 전반적인 구조를 분명히 관찰할 수는 없었다. 평균 수분 함량을 가진 생물 시료에서의 재결정화 온도는 −80°C로 알려져 있으나 본 연구에 사용된 시편과 같이 다량의 물을 함유한 경우 재결정화 온도는 감소될 수 있으므로 stage 온도를 −90°C로 고정하고 etching 시간을 25분으로 증가시켜 관찰한 결과, Fig. 1c와 1d에서와 같이 세포 전체 형태를 관찰할 수 있었다.

2. 시료 전처리

상기의 etching 조건의 설정 결과 관찰하고자 하는 세포의 전체 형태는 나타나지만 세포를 덮고 있는 exopolymer로 인해 *Synechocystis* sp. PCC 6803 표면의 pili를 관찰할 수 없었다. Cryo-SEM을 이용한 의생물 시료 관찰시에는 이와 같은 masking material의 제거가 중요한데 친수성인 exo-

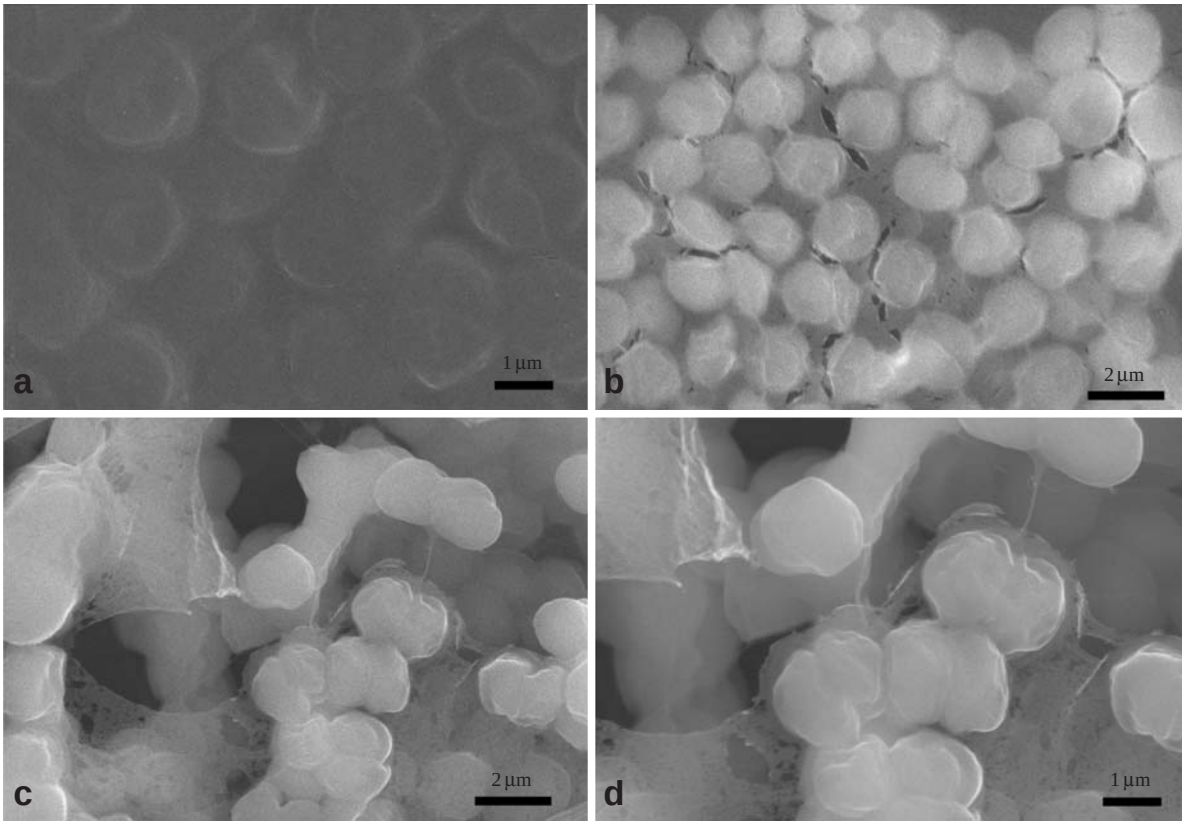

Fig. 1. Cryo-SEM images of surface faces of frozen-hydrated *Synechocystis* sp. PCC 6803 illustrating etching at different conditions. Sample etched at (a) −100°C for 10 min. (b) −90°C for 10 min. (c, d) −90°C for 25 min. (a) Unetched face with little topographic contrast other than cell outlines. (b) Lightly etched surface showing increased topographic contrast of cell outlines. (c, d) Deeply etched sample shows clear cells and exopolymer.

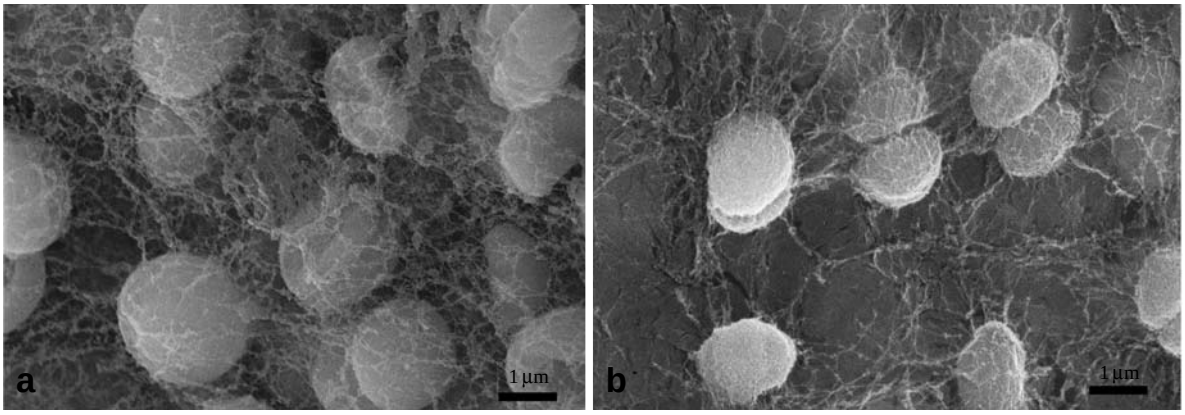

Fig. 2. Cryo-SEM images of the etched face of *Synechocystis* sp. PCC 6803 treated by (a) directly freezing and (b) pre-fixation with 2% glutaraldehyde before freezing.

polymer의 제거를 위해 D.I. water로 세정하고 원심 분리한 후 상기의 cryo-methods로 처리하여 관찰하였다(Fig. 2a). 관찰 결과 exopolymer가 많이 제거되었으나 여전히 잔류되어 있으며 특히 세포 수축 등 변형이 발생되었다. 이는 희석과 세정 과정 및 high pressure cooling에 의한 물리적 영향으로 판단되었으며 이러한 영향을 감소시키기 위하여 동결전 시료를 사전 고정하였다. 사전 고정은 2.0% glutaraldehyde를 이용한 화학 고정으로 희석과 세정 과정에서의 영

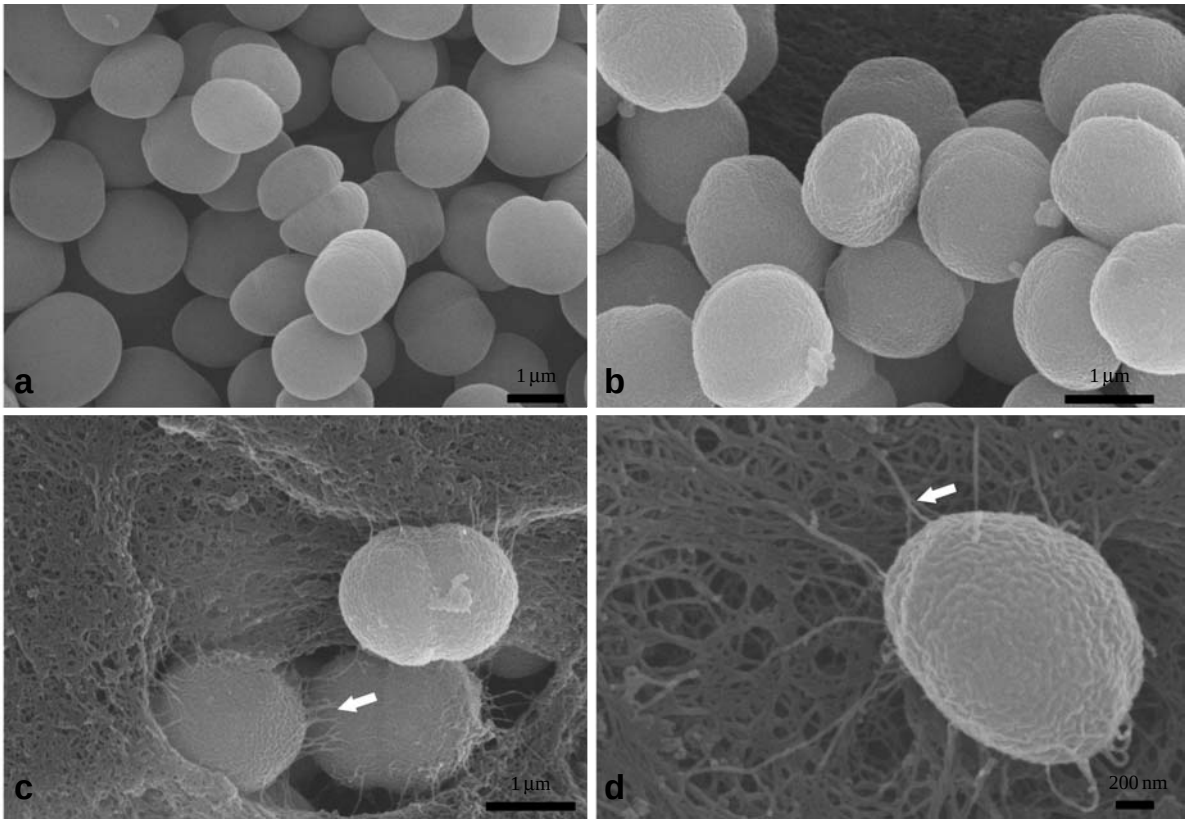

Fig. 3. Conventional SEM images of *Synechocystis* sp. PCC 6803 prepared by chemical fixation. White arrows indicate the thick pili projected from the cell.

향 뿐 아니라 자연 상태로 동결한 시료보다 얼음 결정에 의한 손상이나 관찰 중 전자빔에 의한 영향도 완화되는 것으로 보고된 바 있다(Boyde, 1972). 화학 고정 후 D.I. water로 충분히 세정하였고 상기의 cryo-methods로 처리 후 관찰하여 보았다. 실험 결과 Fig. 2b에 보이는 바와 같이 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 변형없이 분명한 pili 구조을 관찰할 수 있었고 효과적으로 exopolymer도 제거할 수 있었다. 따라서 의생물 시료의 고정에 있어서 시료에 따라 화학 고정법과 동결 고정법의 상보적인 응용이 바람직하다고 사료된다.

3. Pili 관찰

상기의 cryo-methods/cryo-SEM의 활용 예로서 0.4% 고체 배지에서 활주 운동하는 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 pili를 화학 고정후 CSEM분석과 비교 관찰하여 보았다. 관찰 결과, 화학고정/CSEM에서는 세포 표면의 pili는 거의 관찰 되지 않았고 배지에 잔류된 소수의 세포에서만 thick pili가 관찰되었다(Fig. 3). 이는 환경에 민감한 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 pili가 화학 고정 과정에서의 화학적, 물리적 영향에 의해 분리(depolymerization)되어진 것으로 생각되어진다. Cryo-methods/cryo-SEM 관찰 결과에서는 솜털같이 가늘고 짧으며 엉긴 형상의 thin pili와 1～3 μm의 길이로 전방향으로 뻗은 thick pili가 관찰되었으며 이는 negative staining후 관찰한 TEM 결과와 일치하였다(Fig. 4). Thin pili의 경우 액체 배지에서 배양한 *Synechocystis* sp. PCC 6803에서 더 잘 관찰되었고 고체배지에서 활주 운동하는 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 경우 thick pili가 더욱 잘 관찰되었다. 이는 배양 조건에 따른 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 운동성 차이로 해석되며 액체 배지에서 배양된 경우보다 고체배지에서 활주 운동하는 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 경우 운동성과 관련된 thick pili가 더욱 발달된 것으로 사료된다. 또한 이들 pili는 *Synechocystis* sp. PCC 6803 표면 전반에 분포하는 것을 알 수 있었다. *Synechocystis* sp. PCC 6803의 광운동성과 이들 pili의 형태분석은 TEM을 이용한 전자현미경적 방법에 의존해 왔다(Bahya, 2000). SEM은 TEM에 비해 분해능의 한계가 있으나 3차원 구조 분석 및 저배율 관찰이 용이하여 TEM과 더불어 세포 표면의 형태적, 기능적 특성 분석 및 세포간의 상호 작용 관찰에 상보적인 정보를 제공함으로써 *Synechocystis* sp. PCC 6803의

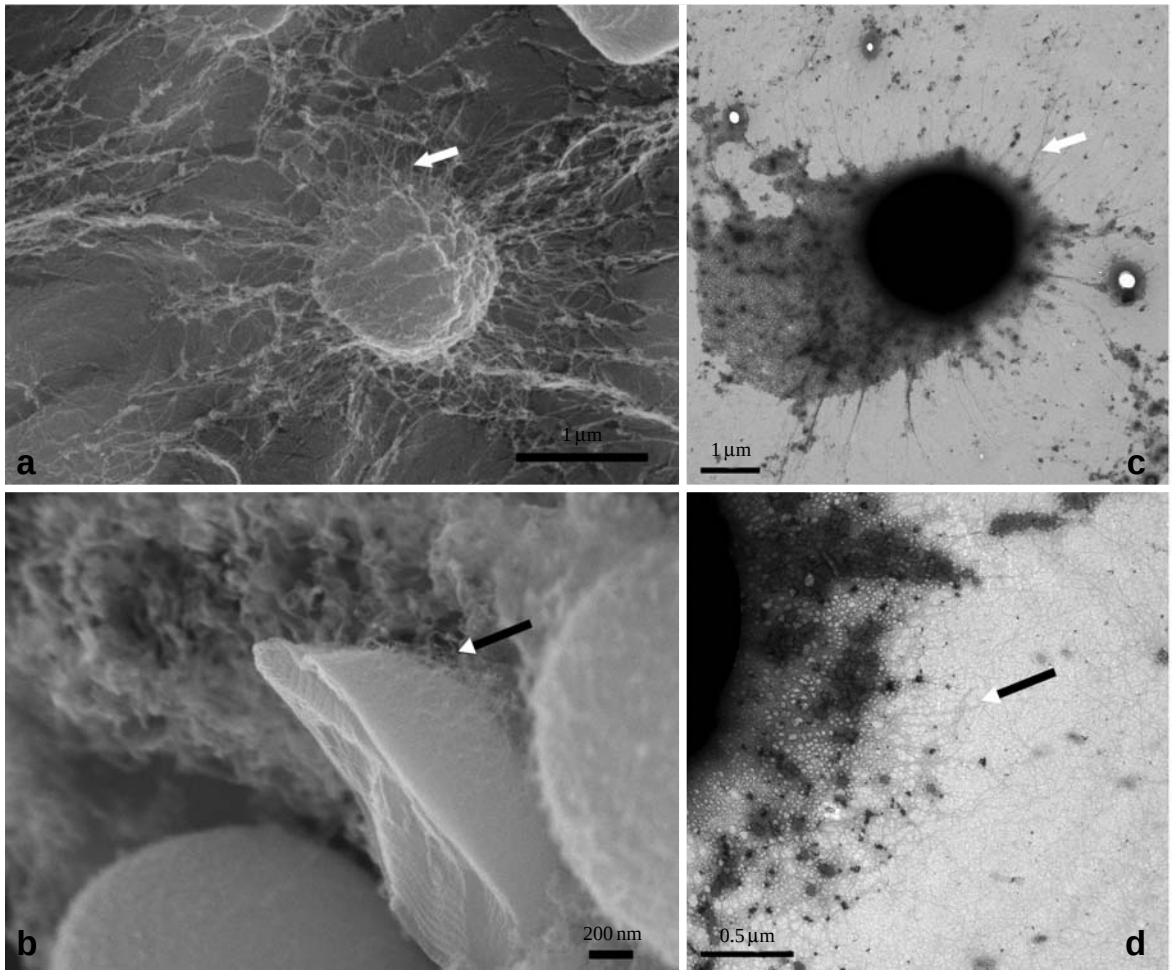

Fig. 4. (a,b) Cryo-SEM images of *Synechocystis* sp. PCC 6803 prepared by cryo-method. (c,d) TEM images of negatively stained cells. White arrows and white arrowheads indicate the thick pili and thin pili, respectively.

광운동성에 대한 분자역학적 연구의 유용한 전자현미경 분석 방법이 될 것으로 사료된다.

4. 내부 구조의 관찰

화학 고정 처리한 의생물 시료를 CSEM으로 분석할 경우 내부 구조를 관찰하기가 쉽지 않다. 화학 고정 전과 후에 시료 변형이나 손상없이 절단하는 것이 까다롭고 고정 과정에서대부분 큰 SEM 시료의 내부까지 화학 고정액이 침투하는 것이 어렵기 때문이다. Cryo-methods는 수분을 함유한 시료의 고정과 절단을 용이하게 함으로써 SEM을 이용한 세포의 내부 구조 관찰을 가능하게 한다. Fig. 5는 HPF로 급속 동결하고 Freeze Fracture System (BAF 060, Bal-Tec)에서 fracturing, etching, coating한 후 관찰한 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 내부 구조로 thylakoid membrane과 cytoplasmic inclusion 등의 구조가 잘 나타났다. 관찰된 이미지에서 thylakoid membrane 간의 부분적인 벌어짐이 관찰되었는데 이는 deep etching시 세포 내 수분 제거로 인한 영향으로 생각된다. 최근 이러한 cryo-methods로 처리한 EM 분석은 *Synechocystis* sp. PCC 6803 membrane들의 정확한 구조 분석과 각 membrane들 간의 물리적 연관성 연구에 응용되고 있다(Allison et al., 2006; Michelle et al., 2006).

5. Biofilm의 관찰

Biofilm은 초기 cell의 부착이나 환경과의 상호작용에 중요한 역할을 하는 것으로 polysaccharide를 주성분으로 하는 exopolymer substance (이하 EPS)로 구성된다. EPS는 수화 상태에 따라 다양한 형태 구조를 가지며 화학 고정법보다 형태 구조의 보전이 양호한 cryo-methods를 이용한 cryo-SEM법이 많이 응용된다(Richards & Turner, 1984). 본 실험에서는 cryo-methods/cryo-SEM를 이용하여 수화 상태에 따른 biofilm 구조를 비교 관찰하여 보았다. Fig. 6은 1.5% 고체 배지에서 배양한 *Synechocystis* sp. PCC 6803를 희석없이

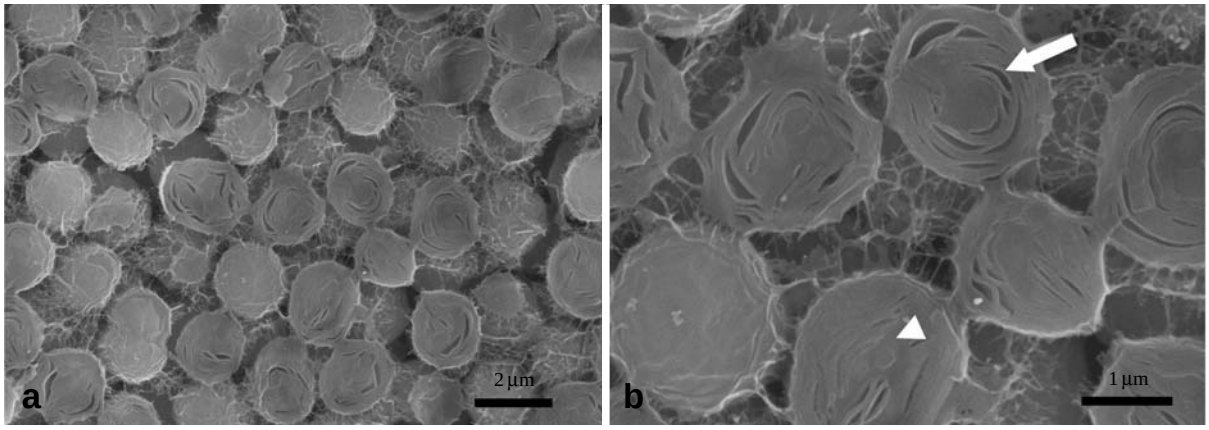

Fig. 5. Cryo-SEM images of the deeply etched fracture face *Synechocystis* sp. PCC 6803 prepared by cryo-methods. The white arrow indicates the thylakoid membranes and the white arrowhead indicates the cytoplasmic inclusion.

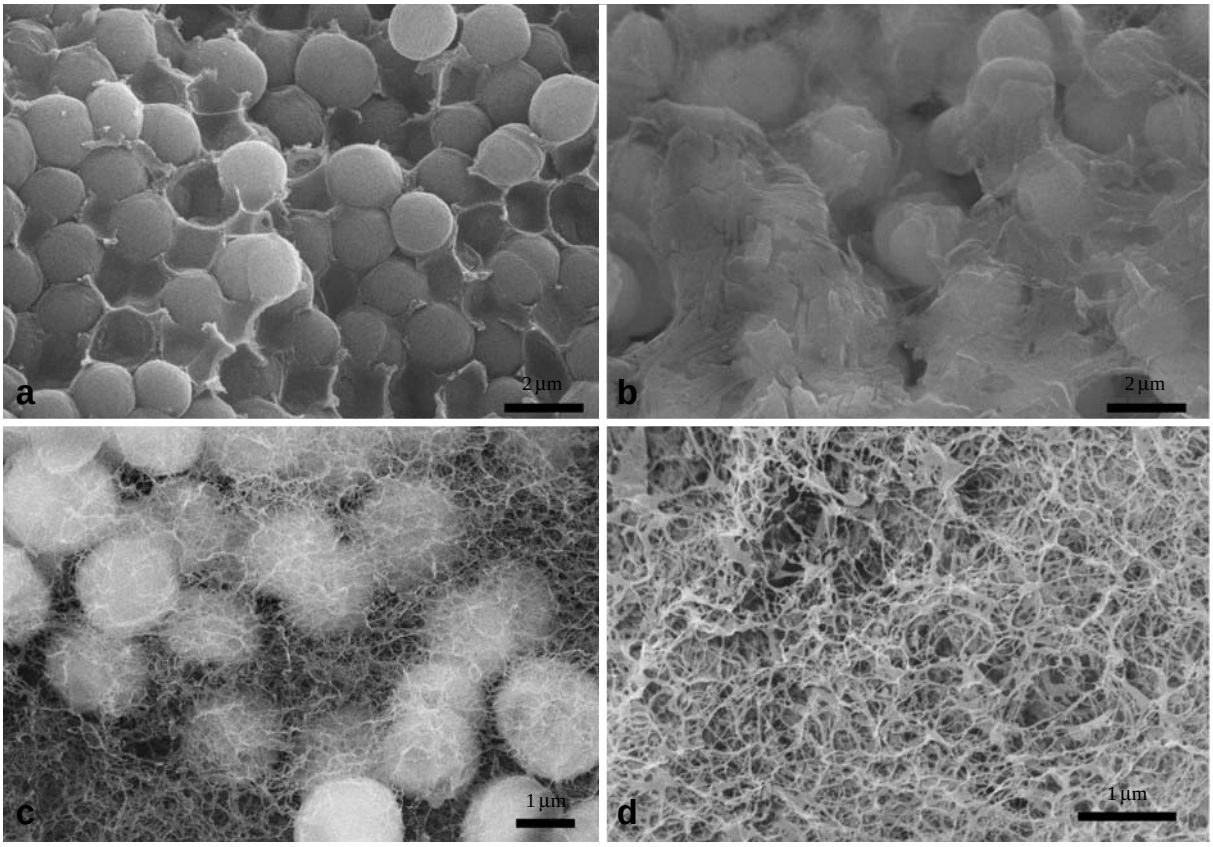

Fig. 6. Cryo-SEM images illustrating three-dimensional architecture of biofilm. The samples were diluted with different water content. The images show that the structures are sensitive to water-related perturbations and that diluted biofilm has characteristic network structure (d).

cryo-methods로 처리한 후 관찰한 cryo-SEM 이미지로 개개의 세포를 덮고 있는 불투명막과 같은 biofilm을 볼 수 있었다. D.I. water 양을 증가하여 수화 상태를 변화시키면 biofilm은 불연속적인 투명한 피막 형태의 구조를 가지며(Fig. 6b) 더욱 희석될 경우 미세 그물망 구조로 변화되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 6c). Cryo-SEM를 이용한 biofilm 연구는 biofilm의 물리, 화학적 성질 분석뿐 아니라 ESEM과 더불어 가장 자연 상태의 형태 구조 분석법으로 사용되어 biofilm의 생성과 microbolite형성 연구에 응용되고 있다(O'Toole & Kolter, 1998; Reid et al., 2000; Handy et al., 2008).

이상으로 cryo-methods/cryo-SEM를 이용한 *Synechocystis* sp. PCC 6803의 형태 구조 분석을 위한 시료 고정 및 분석 조건의 설정과 응용예로서 세포 표면의 pili 및 내부 형태 그리고 biofilm의 구조를 살펴보았다. 이러한 결과로부터 cryo-methods/cryo-SEM은 수분을 함유한 의생물 시료를 용이하게 고정하고 동결된 상태로 관찰함으로써 화학 고정/CSEM의 단점을 보완하는 유용한 분석 방법으로 사료된다.

참 고 문 헌

Bahya D, Bianoco NR, Bryant D, Grossman A: Type IV pilus biogenesis and motility in the cyanobacterium *Synechocystic* sp. PCC 6803. Mol Microbiology 37 : 941-951, 2000.

Bahya D: Light matters: Phototaxis and signal transduction in unicellular Cyanobacteria. Mol Microbiology 53 : 745-754, 2004.

Boyde A: Biological specimen preparation for the scanning electron microscope: an overview Scanning Electron Microscopy : 257, 1972.

Burriesci M, Bahya D: Tracking phototatic responses and modeling motility of *Synechocystic* sp. PCC 6803. J Photochem Photobio B: Biology 91 : 77-86, 2008.

Choi JS, Chung YH, Moon YJ, Kim C, Watanabe M, Song PS, Joe CO, Bogorad L, Park YM: Photomovement of the gliding cyanobacterium *Synechocystic* sp. PCC 6803. Photochem Photobiol 70 : 95-102, 1999.

Echlin P: Low-Temperature Microscopy and Analysis. Plenum Press, New York, pp. 349-411, 1992.

Handley KM, Turner SJ, Campbell KA, Mountain BW: Silicifying Biofilm Exopolymers on a Hot-Spring Microstromatolite: Templating Nanometer-Thick Laminae. Asrobiology 8 : 747-770, 2008.

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asanizu E, Nakamura T, Miyajima N, Hirosawa M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, Tabata S: Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystic* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res 3 : 109-136, 1996.

Liberton M, Berg RH, Heuser J, Roth R, Pakrasi HB: Ultrastrcture of membrane systems in the unicellular cyanobacterium *Synechocystic* sp. strain PCC 6803. Protoplasma 227 : 129-138, 2006.

O'Toole GA, Kolter RP: Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development. Mol Microbology 30 : 295-304, 1998.

Reid RP, Visscher PT, Decho AW, Stolz JF, Bebont BM, Dupraz C, Macintyre IG, Paerl HW, Pinckney JL, Prufert-Bebont L, Steppe TF, DesMarais DJ: The role of microbes in accretion, lamination and early lithification of modern marine stromatolites. Nature 406 : 989-992, 2000.

Richard SR, Turner RJ: A comparative study of techniques for the examination of biofilms by scanning electron microscopy. Water Res 18 : 767-773, 1984.

Robards AW, Sleytr UB: Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 243-307, 1985.

Shimoni E, Muller M: On optimizing high-pressure freezing: from heat transfer theory to a new microbiopsy device. J Microsc 192 : 236-247, 1998.

Umrath W: Calculation of freeze drying times for electron microscopic preparations. In: Robards AW, Sleytr UB, ed, Low Temperature Methods in Biological Electron Microscopy. pp. 247-261, 1985.

Van de Meene AML, Hohmann-Marriott MF, Vermaas WFJ, Roberson RW: The three dimensional structure of cyanobacterium *Synechocystic* sp. PCC 6803. Arch Microbiol 184 : 259-270, 2006.

Yoshihara S, Geng XX, Okamoto S, Yura K, Murata T, Go M, Ohmori M, Ikeuchi M: Mutational analysis of genes involved in pilus structure, motility and transformation competency in the unicellular motile cyanobacterium *Synechocystic* sp. PCC 6803. Plant Cell Physiol 42 : 63-73, 2001.

＜국문초록＞

Cryo-SEM은 수분을 함유하거나 액상 시료를 동결된 상태로 관찰하는 방법으로 rapid cooling, fracturing, sectioning, etching, coating과 같은 다소 복잡한 여러 과정의 전처리(Cryo-methods)로 구성된다. 각 과정에서는 분석 목적이나 시료 특성(예: 시료 크기, 물 함량 등)을 고려하여 최적의 조건을 설정하여야 한다. 본 연구에서는 cryo-SEM을 이용하여 남세균(cyanobacteria, *Synechocystis* sp. PCC 6803)의 표면 및 내부 구조 관찰을 위한 etching time과 시료 처리에 관하여 살펴보았고 cryo-methods로 처리한 후 cryo-SEM으로 관찰한 이미지를 화학 고정한 일반 SEM(CSEM) 결과와 비교하였다. 관찰 결과, 화학 고정한 CSEM에서는 *Synechocystis* sp. PCC 6803 표면에 존재하는 pili가 잘 관찰되지 않았으며 파단된 내부 구조의 이미지를 얻을 수 없었으나 cryo-methods/cryo-SEM에서는 세포 표면의 pili 및 membrane의 형태를 관찰할 수 있었다. 또한 수화 상태에 따라 구조 변형이 일어나는 biofilm의 구조도 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로부터 cryo-methods/cryo-SEM은 수분을 함유하는 의생물 시료의 형태 구조를 분석하는 유용한 방법으로 사료된다.