

카드뮴의 耐性菌분리 및 균체내 蓄積

金 永培 · 李 瑞來

韓國原子力研究所 農業生化學研究室

Isolation of Cadmium-tolerant Bacteria and Accumulation of Cadmium into the Bacterial Cell

Young-Bae Kim and Su-Rae Lee

Agricultural Biochemistry Laboratory, Korea Atomic

Energy Research Institute, Seoul, Korea

(Received June 30, 1976)

Abstract

A strain of *Enterobacter cloacae* isolated from soil showed the evidence of growth in medium containing 1,500 ppm of Cd^{++} though its growth was inhibited at high cadmium concentrations. This strain accumulated 59% of cadmium into the cells during incubation in medium containing 0.5 ppm of cadmium and its uptake was nearly proportional to the dry weight of cells, the average being 7.8 mg cadmium per g dry cells. It was also found that 60-70% of cadmium accumulated in cells were distributed in the cell wall fraction.

서 론

공업의 발전에 따라 重金屬에 의한 環境汚染이 커다란 사회문제로 등장하였다. 그 중 카드뮴은 금속공업, 석유화학공업, 초자가공 및 사진재료생산 등의 광범위한 오염원을 가지고 있으며 人體內에 흡수되면 細尿管에 축적되어 장애를 일으키는 “이다이이다이” 病의 원인이 된다고 알려져 있으므로(1) 큰 관심사가 되고 있다.

金등(2)과 황등(3)의 조사에 의하면 한강수역의 카드뮴의 농도는 모두 공해방지법의 배출 허용량인 0.1 ppm을 넘지 않고 있으나 이들의 발생원인 특정공장의 폐수에는 훨씬 높은 농도로 오염되어 있어 하수중에 流入되는 것으로 생각된다. 또한 식품의 카드뮴 오염을 조사한 보고(4-6)에 따르면 아직은 매우 낮은 농도로 검출되지만 계속 주목해야 할 과제라고 주장하고 있다.

최근 외국에서는 미생물을 이용하여 폐수중의 중금속을 제거하려는 연구가 시도되어 水銀에 관하여는 Tonomura등(7) 외에도 많은 연구가 보고되고 있으며 카드뮴에 관하여서는 堀津등(8)이 *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 體內蓄積을 조사한 보고가 있을 뿐이다. 그러나 국내에서는 아직 이에 관한 연구보고를 전혀 찾아볼 수 없다.

따라서 본 연구는 미생물에 의한 카드뮴의 轉換 과정을 알고 더 나아가 폐수중의 중금속을 제거하려는 意圖下에 착수되었다. 그리하여 우선 카드뮴에 耐性이 강한 菌株를 자연계에서 분리하여 이를 同定하였고 선발한 균주의 카드뮴에 대한 성질을 실험하였으므로 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 카드뮴 耐性菌의 分離 및 同定

카드뮴 내성균을 분리하기 위하여 포도당 10 g,

peptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 5 g, Cd(NO₃)₂ 0.42 g (Cd⁺⁺ 최종농도 200 ppm), 증류수 1,000 ml로 만든 한천평판배지 위에 수집한 시료를 도말하여 37°C에서 24시간 배양한 후 발생하는 colony를 취하여 순수분리하였다.

분리한 균주의 카드뮴 내성을 실험하기 위하여는 상기한 組成의 액체배지 10 ml에 Cd⁺⁺의 농도를 단계적으로 높여서 37°C에서 5일간 배양 후 Spectronic 20 spectrophotometer를 사용하여 파장 660 mμ에서의 흡광도를 측정함으로써 균의 成長度를 비교하였다.

선발한 균주는 *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*⁽⁹⁾와 *A Guide to the Identification of Genera of Bacteria*⁽¹⁰⁾에 의하여 同定하였다.

2. 세균의 培養, 回收 및 分劃

카드뮴의 균체내로의 흡수를 조사하기 위하여 上記한 액체배지 100 ml에 Cd⁺⁺농도를 조절하고 분리균을 접종하여 30°C에서 진탕배양한 후 원심분리로 균체를 회수하여 2회 수세하였다.

한편 Cd⁺⁺을 가하지 않은 배지에서 24시간 배양한 균체를 회수하여 100 ppm의 Cd⁺⁺을 함유한 0.9% NaCl 용액 100 ml에 각각 다른 양의 균체를 접종하고 30°C에서 24시간 진탕하여 원심분리로 균체를 회수한 후 2회 수세하였다. 수세한 균체에 대하여 카드뮴 함량을 정량하고 배지로부터의 흡수율을 계산하였다.

카드뮴의 균체내 분포를 조사하기 위하여는 상기와 같이 처리후 회수한 균체 일정량을 15분간 超音波(Sonifier, Branson Instrument Inc., Model LS 75)로 처리한 후 12,000×G에서 20분간 원심분리하고 침전을 2회 수세하여 얻은 혼합 상정액과 침전을 각각 카드뮴 정량에 사용하였다.

3. 카드뮴의 定量

카드뮴의 함량은 dithizone chloroform에 의한 비색법⁽¹¹⁾으로 定量하였으며 cadmium powder (Ventron, Beverly, Mass., USA)를 표준화합물로 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 미생물의 분리 및 카드뮴 耐性

서울市 및 京畿道 지역의 공장지대에서 수집한 토양과 下水 78점을 시료로 하여 200 ppm의 Cd⁺⁺ 함유 배지에서 발육하는 142株의 세균을 분리하였다. 본래 카드뮴과 같은 중금속은 고등동물 뿐만

아니라 미생물에도 나쁜 영향을 주나 그의 종류에 따라서 耐性에는 상당한 차이가 있을 것으로 생각된다. 분리한 142주 세균의 카드뮴에 대한 耐性을 보면 Table 1과 같으며 1,500ppm의 Cd⁺⁺함유배지에서 발육한 8주중 生長율이 가장 우수한 1주를 선발하였다. 선발된 균주의 카드뮴에 대한 耐性은 堀津等⁽⁸⁾이 분리한 *Pseudomonas aerogenosa*와 같은 정도로 나타났다.

Table 1. Cadmium tolerance of 142 isolated microorganisms

Cd ⁺⁺ concn. in medium (ppm)	Number of grown isolates
200	142
500	83
750	43
1,000	33
1,250	16
1,500	8

The isolates were inoculated to the liquid media containing increasing concentrations of cadmium and incubated for 5 days at 37°C. The number of isolates which showed the evidence of growth was counted.

2. 분리균주의 同定

카드뮴에 대하여 耐性이 가장 강한 분리균주의 형태적, 배양적 및 생리적 특성을 보면 Table 2, 3

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated microorganism

A. Morphological characters

1. Gram stain : negative
2. Shape and size : short rod, 0.6 by 1.9 μm
3. Motility : motile
4. Flagella : peritrichous
5. Endospore: : not produced
6. Growth : aerobic
7. Acid fast stain : negative

B. Cultural characters

1. Agar plate
 - a) Form : punctiform
 - b) Elevation : raised
 - c) Margin : lobate
2. Agar stroke : echinulate
3. Agar stab : filiform
4. Nutrient broth : sediment

Table 3. Physiological characteristics of the isolated microorganism

1. Catalase: produced
2. Acid from Hugh and Leifson's medium: aerobically and anaerobically
3. Nitrite from nitrate: produced
4. Voges-Proskauer: positive
5. Methyl red: negative
6. Starch: not hydrolyzed
7. Gelatin: slowly liquefied
8. Pectate: not decomposed
9. Filter paper: not digested
10. Citrate as a sole C source: utilized
11. Growth with KCN: growth
12. H ₂ S from TSI agar: not produced
13. Urease: produced
14. Phenylalanine deaminase: not produced
15. Lysine decarboxylase: not produced
16. Ornithine decarboxylase: produced
17. Arginine dihydrolase: produced
18. Indole: not produced
19. Gas from glycerol: not produced
20. Gas from inositol: not produced
21. Acid from carbohydrates
Arabinose: + Mannitol: +
Fructose : + Sorbitol : +
Glucose : + Starch : -
Inositol : + Sucrose : +
Lactose : + Trehalose: +
Maltose : + Xylose : +

과 같다. 즉 Gram음성의 無孢子桿菌으로서 peritrichous flagella에 의한 運動性이 있었다. Hugh & Leifson의 배지에서 호기적 및 혐기적으로 酸을 생성하였으며 citrate를 唯一탄소원으로 資化하였다. Voges-Proskauer test에 양성이고 methyl red test에 음성이며 pectate를 가수분해하지 아니하였다. KCN 존재하에 성장하였으나 phenylalanine deaminase는 생성하지 않았고 ornithine decarboxylase와 arginine dihydrolase가 존재하고 lactose와 sorbitol에서 산을 생성하며 또한 glycerol과 inositol에서 gas를 생성하지 않는 점 등으로 미루어 *Enterobacter cloacae*로 同定하였다.

3. 분리균주의 生育에 미치는 카드뮴의 영향

분리균주를 100 ppm 및 500 ppm의 Cd⁺⁺을 함유한 배지와 Cd⁺⁺을 함유하지 않은 배지에서 生長度를 600 mμ에서의 흡광도로 비교한 결과는 Fig.

1과 같다. 카드뮴이 없는 배지에서는 배양 12시간만에 최대생장에 도달하였고 100 ppm 농도의 배지에서는 24시간 후 최대생장에 도달하였으나 對照區와 큰 차이가 없는 성장을 기록하였다. 그러나 500 ppm 농도에서는 3-4일 후에 흡광도가 증가하기 시작하는 것으로 나타나 카드뮴의 농도가 높아질수록 誘導期가 연장될 뿐 아니라 生長도 훨씬 阻害되는 것으로 나타났다.

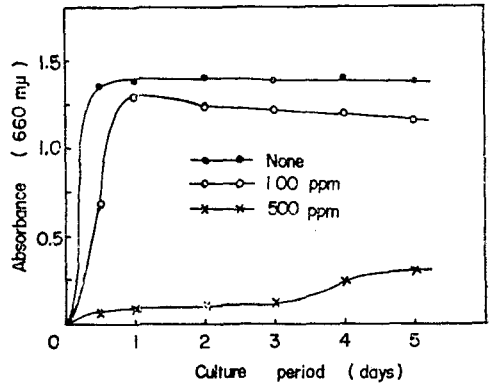


Fig. 1. Growth of the isolated *Enterobacter cloacae* in cadmium-containing media at 30°C

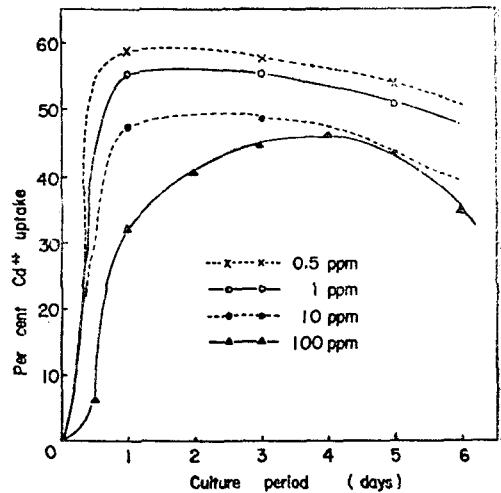


Fig. 2. Rate of cadmium uptake by the isolated *Enterobacter cloacae* as grown in cadmium-containing media at 30°C

4. 카드뮴의 菌체내 蓄積

분리균주를 Cd⁺⁺함유 배지에서 배양하였을 때 배지중의 카드뮴이 菌체내에 축적되는 결과를 보

면 Fig. 2와 같다. 카드뮴의 농도가 0.5, 1 및 10 ppm과 같이 비교적 낮은 경우에는 배양 1일에 최고의 蓄積率을 보였으나 100 ppm에서는 3~4일 후에 최고의 축적율에 도달하였다. 균체내로의 축적율을 보면 카드뮴 농도가 낮을수록 높아서 0.5 ppm에서 최고 59%이었고 100 ppm에서는 46%로서 堀津⁽⁷⁾의 41% 보다는 약간 높은 편이었다. 배지중 카드뮴의 농도에 따라서 균체의 증식량에 차이가 있으며 균체량에 따라서 카드뮴의 흡수량도 달라질 것으로 생각된다. 그러나 100 ppm에서는 균체증식이 크게 억제되지 않았으며 흡수율이 낮았으나 상당량의 카드뮴이 축적된 것으로 나타났으므로 배양조건의 조절에 의하여 폐수중의 카드뮴 제거에 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

한편 Cd⁺⁺을 함유하지 않은 배지에서 배양한 균체를 100ppm의 Cd⁺⁺을 함유한 0.9% NaCl 용액에 30°C에서 1일간 진탕하였을 경우 균체내로의 카드뮴 축적량은 Fig. 3과 같다. 이에 의하면 카드뮴 흡수량은 균체의 乾物量에 거의 정비례하였으며 이때의 균체건물 1g 당 7.8 mg 정도의 카드뮴을 축적하였다. 이와 같이 분리균은 배지에 함유된 카드뮴을 증식에 따라서 흡수할 뿐 아니라 완전히 성장한 균체도 카드뮴 용액에 노출되면 카드뮴을 흡수하여 균체내에 축적하는 것으로 생각된다.

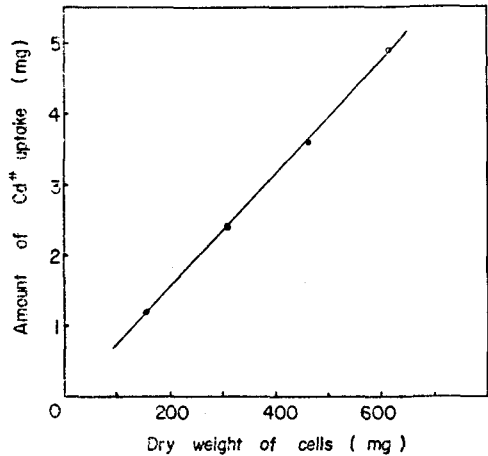


Fig. 3. Relationship between the dry weight of cells and cadmium uptake in 24 hrs at 30°C from 0.9% saline solution containing 100 ppm of cadmium by the isolated *Enterobacter cloacae* grown in a cadmium-free medium

5. 카드뮴의 균체내 分布

축적된 카드뮴의 균체내 분포를 보면 Table 4와 같다. Cd⁺⁺ 100 ppm 함유배지에서 3일간 배양한 균체를 초음파로 파괴후 12,000×G에서 20분간 원

Table 4. Distribution of cadmium in cells of the isolated *Enterobacter cloacae*

Bacterial cells	Fraction*	Relative amount of Cd ⁺⁺ detected (mg)	Distribution (%)
Grown in medium containing 100 ppm Cd ⁺⁺ for 3 days	Whole cell	8.08	
" "	Cell wall	5.07	62.7
" "	Cytoplasm	3.01	37.3
Grown in Cd-free medium and incubated in saline with 100 ppm Cd ⁺⁺ for 1 day	Whole cell	3.61	
" "	Cell wall	2.48	68.7
" "	Cytoplasm	1.13	31.3

*The culture of the organism was washed twice, disrupted by a ultrasonic vibrator and separated into fractions of cell wall (precipitate) and cytoplasm (supernate) by centrifuging 20 minutes at 12,000×G.

심분리하였을 때의 침전물(細胞壁劃分)에서는 축적된 전체 카드뮴의 62.7%가 회수되었다. 또한 Cd⁺⁺이 함유되지 않은 배지에서 1일간 배양한 균체를 100 ppm의 Cd⁺⁺함유 0.9% NaCl 용액에서 1일간 진탕한 균체에서는 68.6%가 침전물에서 회수되었다. 따라서 Cd⁺⁺ 함유배지에서 배양한 경우나 배양 후 카드뮴 용액에 처리한 경우나 큰 차이

없이 약 60—70%의 카드뮴이 細胞壁 물질에 축적되고 나머지는 細胞質劃分に 존재하는 것으로 생각되며 이는 水銀의 경우에도 같은 결과⁽⁸⁾로 알려져 있다. 카드뮴이 세균체내에 축적되는 것은 균체가 양이온을 흡착할 수 있는 colloid로서 작용⁽¹²⁾하고 다른 금속이온에서와 같은 방법으로 체내에 흡수되어 균체내의 SH기와 같은 특정 原子團과

결합하여 농축되는 것으로 생각된다. 그러나 세균의 종류에 따라 카드뮴에 대한 耐性이 다른 원인에 대하여서는 앞으로 계속 追試해야 할 흥미있는 課題라 생각한다.

요 약

자연계에서 카드뮴 耐性菌을 142株 분리하여 그중 1,500 ppm의 카드뮴 함유배지에서 가장 잘 증식하는 1株를 선발하여 *Enterobater cloacae*로 同定하였다. 本菌은 배지중 카드뮴의 농도가 높아질수록 生長이 억제되었으며 0.5ppm의 카드뮴 함유배지에서 최고 59%의 카드뮴을 菌체내에 蓄積하였다. 카드뮴의 축적량은 菌체의 乾物量에 비례하여 菌체 乾物 1 g당 7.8 mg이었으며 菌체내 축적된 카드뮴은 60—70%가 細胞壁劃분에 존재하였다.

참 고 문 헌

- (1) 用水廢水便覽 編集委員會編：用水廢水便覽，改訂二版，丸善株式會社，東京，p. 54 (1972).
- (2) 金聖子，鄭文植，李弘根：공중보건잡지，**10**, 64 (1973).
- (3) 황영식，김정현，백남훈，심영섭，김준택，이유원：국립보건연구원보，**11**, 191 (1974).
- (4) 高仁錫，盧晶培，宋哲，權赫姬，鄭國熙，朱昌栢：국립보건연구원보，**9**, 389 (1972).
- (5) 高仁錫，盧晶培，宋哲，權赫姬，金吉生，延圭奉，俞炳天：국립보건연구원보，**10**, 437 (1973).
- (6) 盧晶培，宋哲，金吉生，沈漢燮，俞炳天：국립보건연구원보，**11**, 171 (1974).
- (7) Tonomura, K., Nakagami, T., Futai, F. and Maeda, K.: *J. Ferment. Technol.*, **46**, 506 (1968).
- (8) 堀津浩章，前田達儀，友枝幹夫：醱酵工學雜誌(日本)，**52**, 14 (1974).
- (9) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. (1974).
- (10) Skerman, V. B. D.: *A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria*, 2nd ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md. (1967).
- (11) 日本分析化學會 關東支部編：公害分析指針 8, 食品編 2-b, 共立出版株式會社，東京，p. 22 (1973).
- (12) McCalla, T. M. : *J. Bacteriol.*, **40**, 23 (1940).