부영양화 해역에서 분리된 *Vibrio* sp. S-1-2균의 특성과 Cd축적에 관한 연구*

이원재 · 윤덕현 · 김무찬 · 박영태

부산수산대학교 미생물학과

Studies on Bacterial Characteristics and Cd Accumulation of *Vibrio* sp. S-1-2, Isolated from Eutrophic Coastal Area

Won-Jae LEE, Duk-Hyun YOON, Mu-Chan KIM and Young-Tae PARK

Department of Microbiology,

National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea.

Vibrio sp. S-1-2 was isolated from seawater in the Masan bay and its bacterial characteristics and bioaccumulation of $CdCl_2$ in the cell were investigated. As the result of microscopic and biochemical test, the S-1-2 strain was identified to *Vibrio* sp. and this strain can be tolerated even in 200 ppm $CdCl_2$ media, however its growth was inhibited. In 25 ppm $ZnCl_2$ media, the growth of Cd resistant *Vibrio* sp. S-1-2 was promoted at later stage of growth. The gorwth of *Vibrio* sp. S-1-2 was inhibited on 25 ppm $CuCl_2$ and $PbCl_2$ media and was not able to grow in 25 ppm $HgCl_2$ media at all. The uptake of cadium in the cells was increased exponentially with increasing concentration of $CdCl_2$ in media. But the uptake rate of cadmium was suddenly inhibited at 50 ppm $CdCl_2$ media. Optimal pH and NaCl concentration for bioaccumulation of $CdCl_2$ were 8-9 and 1-2%, respectively. In the case of pH, maximum dpm value was found at pH 7 after 96 hours culture and in the case of NaCl concentration, it was detected in 2% NaCl media after 36 hours culture.

서 론

마산만은 도시하수, 연안 주변의 공장폐수의 유입, 항해하는 선박에서 버려지는 오염물질 등으로 부영양화되었고, 점차 확산되어 진해만 전체가 3급이상의 수질로 변화되어가고 있다.

Preston *et al.* (1972)은 연안부근의 도시하수나 공장, 산업폐수로 인한 중금속 오염농도는 외양보다

* 본 연구는 한국과학재단 연구비에 의한 일부임. 생명과학연구소 업적 3호

약 10배에서 100배가량 높게 나타나 해양생태계에 직접적인 해를 주거나 먹이연쇄로 인한 생체축적을 통하여 인간에게까지 영향을 줄 수 있다고 하였다.

일반적으로 해양에 유입되는 중금속은 점차 그 농도가 증가되어 해수에 존재하는 다양한 형태의 유기, 무기화합물과 결합하여 착화물을 형성하거나 이온상태로 존재하게 된다.

Diane and Allen(1983)은 미소생물이 생체내에 축적되어 다른 해역으로 이동되기도 하지만 입자상 물질과 결합함으로서 해저토로 침강되는 양도 많게 되어 저층 퇴적물에서의 중금속 오염을 더욱 가속화시키고 있다고 보고하였다.

Moore *et al.* (1979)은 중금속이 유입된 해역의 pH나 염분도, 해수내의 부식질 형태, 용존입자의 양등이 해수에서의 중금속 형태를 결정한다고 보고했으며, Sunda *et al.* (1986)은 해수내에 존재하는 자유 이온상태의 중금속이 중금속 총량보다 독성에 미치는 영향이 더 크다는 내용을 발표하였다. 하지만 중금속의 형태뿐만아니라 생물체 안에서의 결합부위, 생체축적율 그리고 유전자의 무독화 기작도 생물체에 대한 중금속 내성에 영향을 주고 있다는 연구보고(Summers, 1984)도 있어 오염된 해양 생태계에서의 생물적응은 종마다 다양함을 알 수 있으며, 특히 미생물은 다른 생물에 치명적인 중금속 농도에서도 내성을 갖고 있으며 그 기작도 비교적 상세하게 알려져 있는 편이다(Aiking *et al.*, 1982). 일반적으로 해양생태계에서 미생물의 역할은 모든 생물의 직접 또는 간접적인 먹이원이 되고, 유기질을 분해 또는 생성할 수도 있으며, NO_3와 PO_4 등이 영양염과 미량원소의 순환에 관여하는등 생태계 활성을 조절하고 있다. 뿐만아니라 오염된 환경에서 유해물질이나 난분해성 물질을 분해하고 유기오염물을 무기화시킬수 있는 자정능력도 있어 해양미생물에 대한 생태 및 생리특성에 대한 연구는 매우 중요하다.

중금속 축적 미생물들은 먹이연쇄의 초기 단계에서 중금속을 축적한 채 다음 단계로 농축(Biomagnification)되어 결국 인간이 식량으로 이용하는 어류나 패류에 직접, 간접적인 영향을 주고 있음이 알려져(Preston *et al.*, 1972 ; Rudd *et al.*, 1980) 있어 이들에 대한 생체축적율과 무독화 기작에 대한 연구는 더욱 중요하다고 사료된다.

따라서 본 연구는 부영양화 해역인 마산만에서 카드뮴 내성균을 분리하여 분리균의 특징과 중금속의 생체축적을 방사성 동위원소인 $^{109}CdCl_2$를 이용하여 알아본 결과이다.

재료 및 방법

1. 시료채취

본 연구시료는 1986년 7월부터 1988년 8월까지 마산만(Fig. 1)의 5개 정점에서 멸균된 Niskin(개량형) 채수기로 해수를 월 1회 채취하여 순수분리하였다.

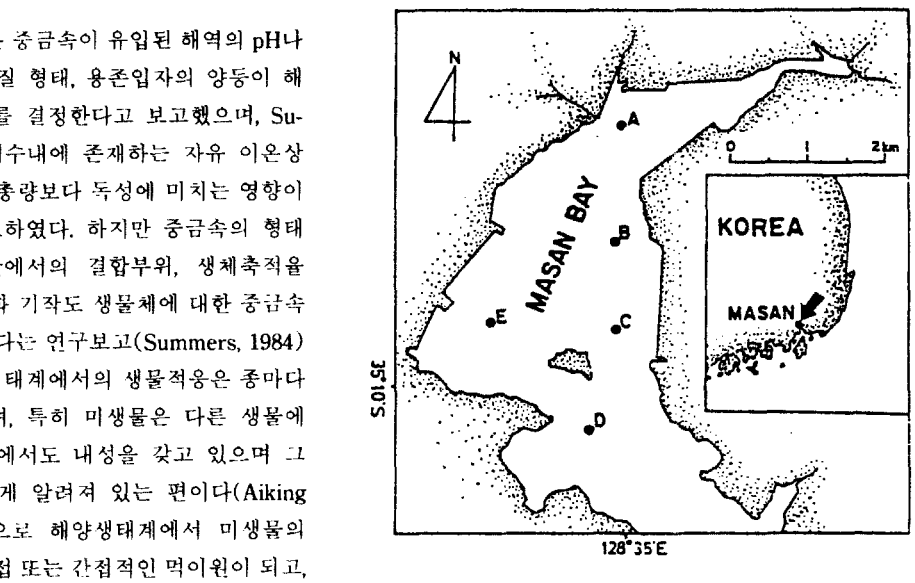

Fig. 1. Location map of the sampling stations.

해수는 각 정점의 표층과 저층에서 각각 취하여 4℃로 보관하였고, 시료는 10진법으로 희석한 후 PPES-II(표 1 ; Taga, 1968)에 평판 도말하고 20℃에서 7일동안 배양하였다.

2. 카드뮴 내성균의 분리 및 분리균의 미생물학적 성질

카드뮴 내성균 분리를 위하여 25 ppm $CdCl_2$가 첨가된 PPES-II 평판배지에 채취된 균을 도말하고 27℃에서 배양시켰으며, 균의 성장을 24시간마다 육안으로 관찰하여 성장된 균을 반복 배양시킨 결과 가장 높은 농도까지 성장을 보인 S-1-2균주를 카드뮴 내성균으로

Table 1. Composition of PPES-II medium(Taga, 1968)

Polypeptone (Difco)	2.0g
Proteose-Peptone No. 3 (Difco)	1.0g
Bacto-Soytone (Difco)	1.0g
Bacto-Yeast extract	1.0g
Ferric Citrate	1.0g
Agar (Difco)	15.0g
Sea water	1.0ℓ
pH	7.6~7.8

판정하였다.

S-1-2균에 대한 카드뮴 내성실험은 성장기에 있는 0.5ml의 균을 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ppm 등으로 조절된 액체배지에 각각 접종하여 Temperature-Gradient Photometer(Toyo Instrument Co.)에서 48시간 배양시킨 성장곡선을 얻음으로서 조사되었다.

또한 S-1-2균의 다른 중금속에 대한 내성을 비교조사하기 위해서 $ZnCl_2$, $HgCl_2$, $PbCl_2$, $CuCl_2$ 등이 각각 25 ppm 함유된 액체배지에 0.5mℓ의 카드뮴 내성균을 접균하여 Temperature-Gradient Photometer에서 48시간 배양한 후 $CdCl_2$ 25 ppm에서의 성장과 비교하였다.

카드뮴 농도에 따른 S-1-2의 생화학적 성질을 비교하기 위하여 arginine, ornithine, lysine등의 아미노산 이용능력을 Bacto Decaboxylase Base Moeller배지에서 혐기적으로 배양한 후 관찰하였으며 glucose, lactose, sucrose, mannitol, salicine, arabinose, cellubiose 등의 당분해능은 Hugh-Leifson배지에서의 반응으로 조사하였다.

3. 카드뮴의 측정

카드뮴의 생체 축적량은 원자흡광법과 $^{109}CdCl_2$를 이용한 방사성 동위원소법을 이용하였다.

3-1. 원자흡광법에 의한 측정

S-1-2균의 카드뮴 농도별 생체축적량을 알기 위하여 5, 10, 25, 50, 75, 100 ppm의 $CdCl_2$가 포함된 PPES-II배지에 균을 접종한 후 27℃의 Environ-shaker Incubator(Lab-Line Co.)에서 48시간 배양시킨 배양균체를 원심분리(6000 rpm, 20 min)하여 건조시킨 후 중량을 재었으며, Yu *et al.* (1986)의 방법에 의해 AA/ae(Instrumentary Laboratory Model 153)을 이용하여 원자흡광도를 측정하였다.

이때 나온 값은 ;

생체내 중금속 측정량

$$= \text{St. 농도} \cdot \frac{\text{Sa. 흡광도} - \text{Bl. 흡광도}}{\text{St. 흡광도}} \cdot \frac{\text{최종액량}}{\text{시료액}}$$

St : Standard, Sa : Sample, Bl : Blank

의 식에 의해 생체내의 축적량으로 계산되었다.

3-2. 방사능 동위원소에 의한 측정

$^{109}CdCl_2$(Amersham Co. Table 3)의 균체 축적량을 알기 위하여 5, 10, 25, 50, 75, 100 ppm의 농도로 액체배지를 만들어 성장기에 있는 S-1-2균을 50μℓ씩 첨가한 후 Environ-shaker Incubator(900 rpm)에서 27℃로 24, 48, 72시간 배양시킨 OD값을 측정한 후 0.4μℓ membrane filter로 균체를 모아 LSC(Liquid Scintillation Counter, LKB)를 이용한 cpm 값을 얻었으며 아래 식에 의해 dpm 값으로 환산되었다.

$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm} - \text{Bl.}}{\text{E} \cdot \text{A}}$$

E : Counting Efficiency of the ^3H channel, here is 0.35

A : Self-absorption correction, here is 0.8

Bl : Blank(Azam, *et al.* 1983)

이때 균체는 증류수로 한번 및 두번까지 씻은 후 균체를 모은 것과 씻지 않은 상태로 균체를 모아 측정한 값을 비교함으로서 순수한 균체에 있는 중금속량을 조사하였다. 또한 시간별로 축적되는 양을 조사하기 위해서 25 ppm $CdCl_2$ 배지에 각각 50μℓ의 S-1-2균을 접균시킨 후 30, 60, 120, 180, 240, 480분 간격으로 상기 방법에 의해 dpm 값을 측정했다.

$CdCl_2$의 생체축적에 적합한 조건을 보기 위하여 pH는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조절하였으며 NaCl은 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10% 등으로 맞춘 후 상기 방법과 동일하게 측정하였다.

결과 및 고찰

카드뮴 내성균 분리를 위하여 5개 정점의 표층과 저층에서 분리된 291균주(표 2)를 25 ppm의 $CdCl_2$가 포함된 배지(이하 카드뮴배지)에 배양한 결과 36균주를 얻었다. 즉 도시하수가 가장 많이 유입되는 A 지점과 선박을 해체하는 과정에서 비롯되는 중금속 오염이 심한 E 지점에서 각각 10, 15균주(전체 내성균주의 약 70%)의 내성균주가 나타나 외부 오염으로부터 직접적인 영향을 받는 곳에서의 생물 적응빈도가 그렇지 않은 곳보다 높은 곳으로 예측할 수 있다(Lee *et al.*, 1986). 이들 36균주를 50ppm $CdCl_2$가 포함된 PPES-II 평판배지에 배양시켜 S-1-2, D-1-4, D-1-8, S-283등 4균주를 분리한 후 75ppm과 100ppm의 카드뮴 배지에 반복 배양한 결과 S-1-2균만이 성장함을 관찰하였다. 따라서 본 실험에서 S-1-2균을 카드뮴 내성균으로 공시하고 균 동정을 위한 미생물학적 성질을 현미경 및 생리, 생화학적 실험을 통하여 알아본 결과 표 4와 같이 *Vibrio* sp. 로 분리동정되었다.

1. 카드뮴 내성균 *Vibrio* sp. S-1-2와 다른 중금속과의 관계

카드뮴 내성균 *Vibrio* sp. S-1-2균의 다른 중금속에 대한 적응은 그림 2와 같다. 그림에서 보듯이 $ZnCl_2$에서의 성장은 중금속이 첨가되지 않은 배지에서 배양한 대조균보다 좋은 것으로 나타났다. 이는 모든

Table 2. Number of bacterial flora from the five stations

Stations / Bacterial flora*	1	2	3	4	5	Total
Acinetobacter spp.	6	15	16	18	17	72
Flavobacterium spp.	10	13	10	12	14	59
Pseudomonas spp.	10	14	8	10	8	50
Vibrio spp.	3	9	9	10	5	36
Moraxella spp.	3	3	9	10	7	32
Escherchia coli	5	6	2	10	4	19
Sarcina spp.	7	1	1	2	1	10
Yeast	2	2			1	5
Fungi	2	2			1	5
Staphylococcus spp.	2	1				3
Unidentifications	(2)	(2)			(4)	(8)
Totoal	50(2)	66(2)	55	61	59(4)	291(8)

Table 3. Characteristics of radioisotope, $CdCl_2$

Decay form	: EC(Electron Captured)
Half life	: 462 days
Energy level	: 3−22 KeV
Activity of sample	: 3.7 MBq(100μCi)
Cocktail solution	: Aqualuma
Stored in 0.1 M−HCl solution	

Table 4. Morphological and biochemical characteristics of the isolated bacteria S-1-2 strain

Shape	: Short rod	Indole	: −
Size	: 0.5~1.0×1.0~1.5μm	Urease	: −
Motility	: motile(++)	KIA	: +
Gram	: negative	H_2S	: −
Catalase	: +	Methyl Red	: +
Oxidase	: +	Lysine	: −
Orinithine	: −	Arginine	: +
Glucose	: +	Xylose	: −
Galactose	: +	Arabinose	: +
Lactose	: −	Raffinose	: −
Sucrose	: +	Maltose	: −
Mannose	: +	Inositol	: +
Malonate	: −	Dulcitol	: −

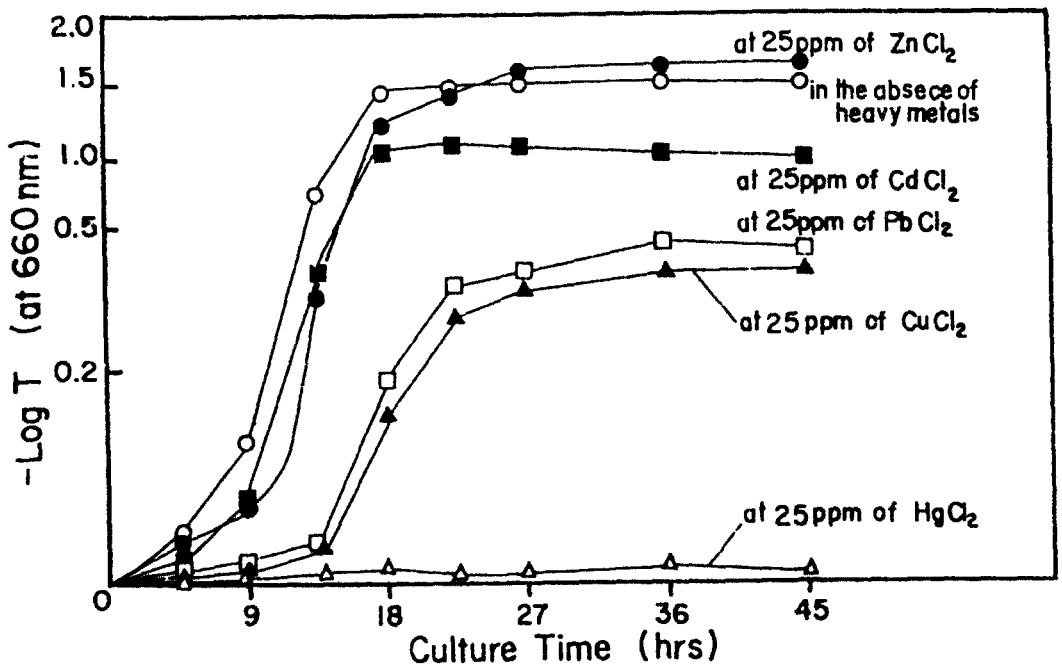

Fig. 2. Growth rates of *vibrio* sp. S-1-2 in different heavy metals in media.

생물체에 있어서 Zn이 필수원소로 작용하기 때문에 (Harrison and Hoare, 1980) 낮은 농도의 Zn첨가는 균의 성장에 도움이 되는 것으로 추측된다.

Cu도 생물에 극미량으로 이용되는 필수 원소이지만 어느 정도 농도 이상에서는 저해요인으로 작용하고 있음이 Nieson and Anderson(1970)등에 의해 보고된 바와 같다. 본 실험에서도 25ppm의 $CuCl_2$가 첨가된 배지에서는 생물에 유해한 Pb나 Cd에서와 비슷하게 성장이 억제됨을 볼 수 있다. Minamata병의 원인인 Hg는 그 독성(Grolle and Kuipper, 1980 ; Singleton

and Guthrie, 1977)과 무독화 기작(Cunningham and Grosch, 1978) 등이 다양하게 알려져 있으나 본 실험의 공시균인 *Vibrio* sp. S-1-2균은 $HgCl_2$가 25ppm 첨가된 배지에서 전혀 성장을 하지 못했다. 이렇듯 카드뮴 내성균인 S-1-2균이 카드뮴 뿐만아니라 아연, 구리 그리고 납에서 내성을 갖지만 수은에 대한 내성이 없는 이유는 수은의 무독화 기작이 주로 penicillinase를 유도하는 plasmid가 독성이 강한 Hg^{2+}를 Hg^0로 환원시키는 mercury reductase를 만들거나(Summers, 1984) 유기수은에 내성을 갖게 하는 organomercurial lyase (Silver, 1976)등과 같은 단백질을 유도하여 무독화시키는 등 분자수준의 기작에 기여하는데 Cd, Cu, Zn, Pb에서의 세포외 기질에는 흡착이라든지 삼투압에 의해 배출되는 등과 같은 물리적인 경우가 많기 때문이며, S-1-2균에서도 plasmid가 분리되지 않는 것으로 보아 유전적인 내성 기작보다는 세포외 기질(extrapolymer)의 흡착에 의한 카드뮴 내성을 보이는 것으로 추정된다.

2. 카드뮴의 생체 축적

카드뮴 내성균인 *Vibrio* sp. S-1-2의 중금속 생체 축적량은 그림 3과 같이 축적되는 총량에 있어서, 25 ppm까지는 균체량과 비례하여 축적량이 증가되었으나 50ppm부터는 고농도의 카드뮴에 의해 성장이 저해되

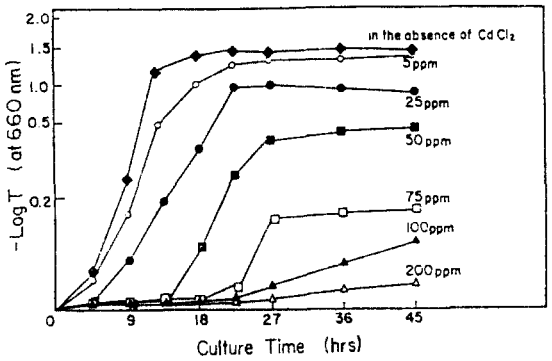

Fig. 3. Effect of $CdCl_2$ concentration on growth rates of *Vibrio* sp.

는 균체량도 감소하였고, 그에 따른 카드뮴 총량도 감소하였다. 그러나 균체 1mg 당 축적량을 보면 그림 4에서 보듯이 5ppm의 배지에서는 14ppm, 10ppm에서는 22.8ppm, 25ppm일때 38.7ppm, 50ppm의 42.3ppm 등과 같이 지속적으로 증가했으나 75ppm이상에서는 더이상의 증가나 감소도 보이지 않고 있다.

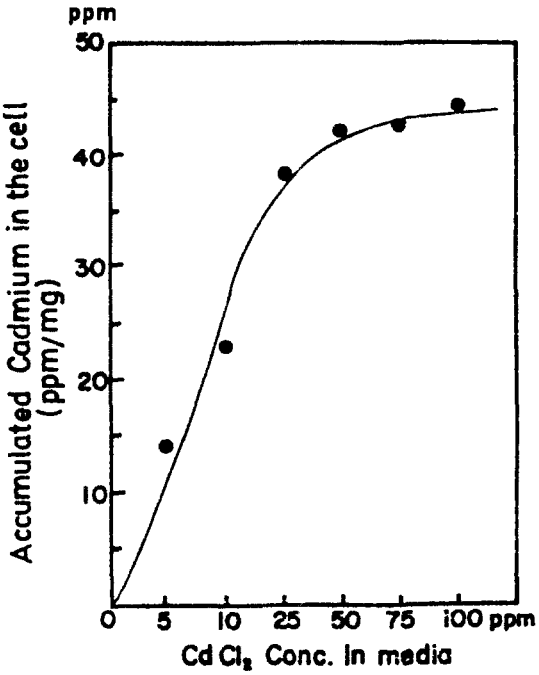

Fig. 4. Cd accumulation in the cell of *Vibrio* sp. S-1-2 cultured at various concentration of $CdCl_2$ in media.

이는 Flatau and Gauthier(1985)등과 Doyle *et al.* (1975)이 보고한 *E. coli, Bacillus cereus, Lactobacillus acidophilus, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecokis* 그리고 *Actinomyces niger*등에 있어서 중금속의 균체 축적량은 주위 농도와 정비례한다는 결과와 유사한 경향이지만 내성균의 생리학적 성질과 배양 환경조건이 다른 이유와 75ppm 배지에서의 균성장이 억제되기 때문에 축적량이 감소하는 것으로 보고되었다(Winner and Gaues, 1986).

본 내성균의 중금속 축적 기원을 밝히기 위해 25ppm $CdCl_2$에서 배양 24시간마다 deionizde water로 균체를 씻어 관찰한 결과 표 4에서 보듯이 균체를 한번 및 두번 씻을 경우 그 측정값이 크게 감소함을 알 수 있었다. 이것으로 보아 *Vibrio* sp. S-1-2균의 카드뮴 내성은 카드뮴이 주로 세포외 기질과 결합함으로써 비롯된다

고 추론할 수 있지만, Beveridge and Koval(1981)등은 *E. coli*와 같은 Gram음성균에 있어 중금속이 phospholipid의 극성부분이나 lipopolysaccharides, polypeptide에 존재하는 산(acid)의 음이온에 우선적으로 결합된다고 보고하였고 세포막에 붙어있는 sulfate reductase에 의해 sulfate가 sulfide로 환원되며 CdS를 형성함으로서 무독화된다든지, oxygen, hydrogen peroxide 등과 같은 산화제의 생합성 과정중 생긴 복합체와 중금속 침전물을 만듦으로서 무독화된다는 결과도 있어 세포외에서의 중금속 동태는 상당히 다양함을 알 수 있다.

중금속 축적에 대한 pH영향은 그림 5와 같은 성향을 보였다. S-1-2균에 대한 카드뮴이 축적은 시간에 따라 pH 5와 pH 6에서 각각 2268×10^3dpm/mℓ, 2409×10^3 dpm/mℓ 그리고 pH 7에서 최대값인 2254×10^3dpm/mℓ 이며, pH 8, 9에서는 점차 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 Strandberg *et al.* (1981)이 *Saccaromyces cerevisiae*에서의 Uranium축적을 관찰한 결과 pH 3.0~4.5 범위에서 가장 많은 축적을 보인 것과는 상당한 차이가 있지만 배지성분, 배양조건과 중금속 종류에 따라 그 변화가 다양하다. 특히 일반적으로 카드뮴같이 이온상태에서 생물체에 미치는 독성이 강한 중금속은 pH가 낮은 경우, 균의 성장을 많이 억제하며 상대적인 축적량도 감소한다고 알려졌지만(Engel and Fowler, 1979). 본 실험에서 NaCl농도에 따른 중금속 축적은

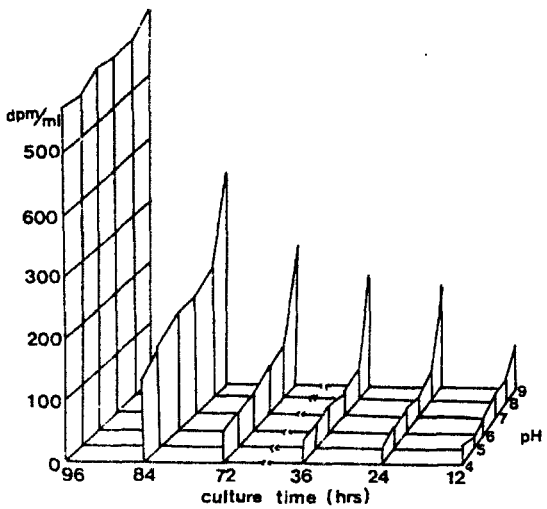

Fig. 5. Effects of pH on Cd accumulation at 25 ppm of $^{109}CdCl_2$.

그림 6과 같이 배양 36시간일때 NaCl 농도 1%, 2%에서 611×10^4dpm/*ml*, 586×10^4dpm/*ml* 등으로 높은 값을 보였고 3, 4, 5, 6, 7%의 NaCl에서도 어느 정도 축적은 하였지만 점차 감소하는 경향을 보였다. 이상과 같은 결과로 볼 때 중금속을 가장 많이 축적한 pH나 NaCl의 값은 마산만 지역의 해수조건과 일치하여 카드뮴 내성균주인 *Vibrio* sp. S-1-2은 지속적으로 오염된 해수에서 고농도의 중금속에 적응된 균주임을 확인하였다.

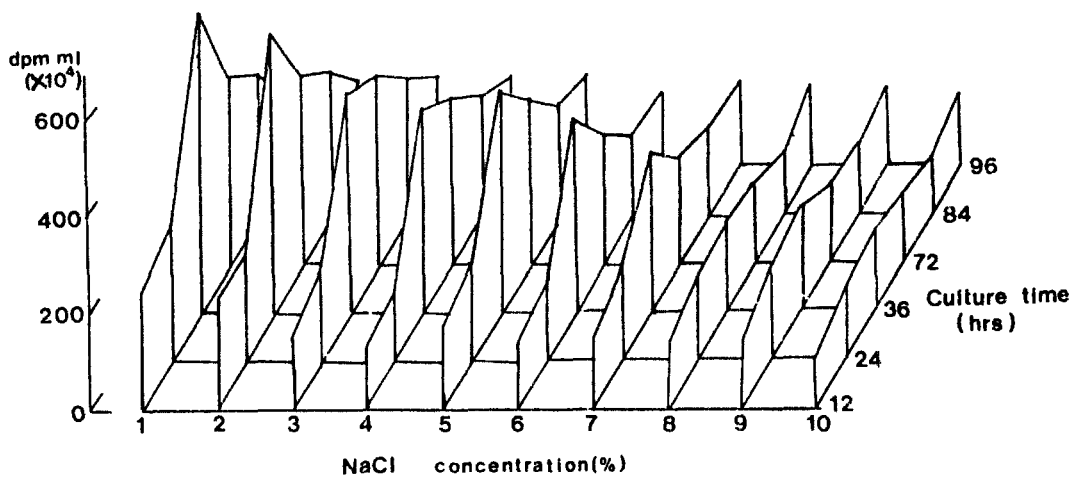

Fig. 6. Effect of pH on Cd accumulation at 25 ppm of $^{109}CdCl_2$.

요 약

부영양화된 해역인 마산만에서 분리된 해양세균중 카드뮴 200ppm에서 내성을 보인 균을 분리배양하고, 미생물학적 성질과 생체 축적량을 방사성 동위원소인 $^{109}CdCl_2$을 이용하여 측정한 결과는 다음과 같다.

1. 분리된 카드뮴 내성균은 Gram음성균이며 단간균으로서 운동성이 있고 생리, 생화학 특성과 TCBS 배지에서의 집락 형태로 보아 *Vibrio* sp.으로 밝혀졌다.
2. 본 균의 다른 중금속에 대한 내성 실험에서 $ZnCl_2$, $PbCl_2$, $CuCl_2$가 25ppm 함유된 배지에서는 서로 비슷한 성장을 보였지만 $HgCl_2$ 25ppm에서는 성장이 거의 안되었다.
3. 균체내의 카드뮴 축적량은 배지에 포함된 카드뮴의 양과 비례하여 증가하여 75ppm에서 43.2*mg/l*로 최고의 축적을 나타내었고, 100ppm에서의 성장이 저해되었지만 균체 축적량이 일정하게 유지되었다.
4. 방사성 동위원소인 $^{109}CdCl_2$를 이용하여 25ppm에서 배양한 후, 중금속 축적조건을 dpm값을 통해 조사한 결과는 96시간 배양시 pH 7에서 최대값인 2554×10^4 dpm/㎖을 나타냈고, NaCl에서는 36시간 배양시 611×10^4dpm/㎖로 최고값을 나타내었다.

참 고 문 헌

Aiking, H., A. Stijman and J. B. Riet. 1984. Inorganic phosphate accumulation and detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in the continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47(2) : 374－377.

Aiking, H., K. Karin and J. B. Riet. 1982. Adaptation to Cd by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of Cadmium Sulgide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(4) : 938－944.

Azam, F., J. Fenchel., J. G. Field, J. S. Gray and F. Thingstad. 1983. The ecological role of water colum microbes in the sea. *Mar. Eco. Prog. Ser.*, 10 : 257－263.

Beveridge, T. J. and S. F. Koval. 1981. Binding of metals to cell envelope of *E. coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 : 325－335.

Cunningham, P. A and D. S. Grosch. 1978. A comparative study of the effects of mercuric chloride on reproductive performance on the brine shrimp. *Artemia salina. Environ. Pollt.*, 15 : 83－89.

Diane, M. D. and H. E. Allen. 1983. Correlation of Copper distribution in a freshwater sediment system to bioavailability. *Bull. Enbiron. Conta. Toxocol.*, 30 : 37－43.

Doyle, J. J., R. T. Mashall and W. H. Pfander. 1975. Effect of cadmium on the growth and uptake of Cd by microroganisms. *Appl. Microbial.*, 294 : 562－564.

Engel, D. W. and B. A. Fowler. 1979. Factors influencing cadmium accumulation and its toxicity to marine organisms. *Environ. Helth. Perspect.*, 28 : 81－88.

Flatau, G. and M. J. Gauthier. 1985. Cadium accumulation by marine bacteria. *Marine Environ. Resear.*, 17 : 159－162.

Grolle, T. and J. Kulper. 1980. Development of marine periphyton under mercury stress in a controlled ecosystem experiment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 24 : 858－865.

Harrison, P. M. and R. J. Hoare. 1980. Metals in Biochemistry. Chapman and Hall.

Lee, W. J., H. D. Chung, C. G. Kang and H. Y. Park. 1986. Isolation and Physiological Properties of Marine bacteria in the Eutropic Coastal Water. 1. Environmental factors and Marine Baterial Flora in the Eutropic Coastal Water. *Bull.* 19 (6) : 586－592.

Moore, R. M., J. D. Burton, P. J. LeB. Williams and M. L. Young. 1979. The behavior of dissolved organic material, ion and managanese in estuariens mixing. Geochim. Gosmochim. Acta. 43 : 919－926.

Nieson, E. S., and S. W. Anderson. 1970. Copper ions as a poison in sea and freshwater. *Mar. Biol.*, 6 : 93－97.

Preston, A., D. F. Jefferies, J. W. R. Dutton, B. R. Harvey and A. K. Steele. 1972. British Isles coastal water : the concentrations of selected heavy metals in sea water, suspended matter and biological indicators-a pilot survey. *Environ. Pollut.*, 3 : 69－82.

Rudd, J. W. M., A. Furutani and M. A. Turner. 1980. Mercury methylation by fish intestinal contents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40 : 777－782.

Singleton, F. L. and R. K. Guthrie. 1977. Aquatic bacterial populations and heavy metal-I. Composition of aquatic bacteria in the presence of copper and mercury salts. *Water Research.*, 11 : 639－642.

Singleston F. L., Guthrie, R. K. and D. S. Cherry. 1977. Aquatic bacterial populations and heavy metals-II. Influence of chemical content of aquatic environments on bacterial uptake of chemical elements. *Water Resear.*, II, 643－646.

Strandberg, G. W., S. E. Shumate II and J. R. Parrotte, Jr. 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals : Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeroginsa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 237－245.

Summer, A. O. 1984. Genetic adaptations involving heavy metals : In current perspectives 'Microbial Ecology' edited by M. J. Klug and C. A. Reddy, *American Society for Microbiology*, pp. 94－104.

Sunda, W. G., D. K. Stoecker and L. H. Davis. 1986. Effects of copper and zinc on two planktonic cilliates. *Mar. Biol.*, 92 : 21－29.

Taga, N. 1968. : Some ecological aspects of marine bacteria in the Kuroshio current. *Bull. Mar. Biol. Inst. Kyoto Univ.* 12 : 65－76.

Yu, T. S., H. I. Song and K. T. Chung. 1986. Characterization of a Cadmium-Ion Tolerant Strain of Hansenula anomala. *KOR, JOUR, Microbial.*, 24 (1) : 57－61.

Winner, W. R., and J. D. Gaues. 1986. Relationship between chronic toxicity and bioaccumulation of Copper, Cadium, and Zinc as affected by water hardness and humic acid. *Aqua. Toxicol.*, 8 : 4146－4161.