

Staphylococcus epidermidis를 이용한 납 이온의 축적에 관한 연구

김종혜 · 김말남

상명여자대학교 자연과학대학 생물학과

수용액으로부터 Pb^{2+} 의 흡수와 분리를 *Staphylococcus epidermidis*를 이용하여 조사하였다. 흡수된 Pb^{2+} 의 양을 초기 Pb^{2+} 의 양에 대한 비율로 나타낸 것을 흡수율이라고 정의할 경우, 세균체의 농도가 높을수록 흡수율은 증가하였으며 세균체 단위 중량당 흡수율은 감소하였다. Pb^{2+} 의 흡수율은 수용액의 pH가 상승함에 따라 점차 증가하다가 최고치를 나타낸 후 감소하는 경향을 보였으며, Pb^{2+} 의 농도가 증가할수록 흡수율의 최고치는 더 낮은 pH에서 나타났다. HCl과 EDTA는 효과적인 탈착제로 작용하였으며 흡수와 탈착 cycle의 횟수에 따른 세균체의 Pb^{2+} 에 대한 흡수 능력에는 거의 변화가 없었다. Pb^{2+} 이 다른 중금속 이온과 함께 혼재할 경우 세균체내의 결합 위치에 대한 경쟁적인 흡수로 인하여 Pb^{2+} 의 흡수율이 변화하였으며, 공존하는 중금속 이온의 이온 반경이 작을수록 Pb^{2+} 의 흡수율이 더 크게 감소하였다.

KEY WORDS □ *Staphylococcus epidermidis*, Pb^{2+} , absorption, desorption, coions.

현대 사회는 공업의 발달과 인구의 도시 집중에 따라 여러가지 폐기물에 의한 환경오염이 급속히 진행되어 심각한 분제로 대두되고 있다. 우라늄과 토륨, 라듐 등의 방사성 동위원소는 방사성 물질의 농축 및 정제 과정에서 배출될 수 있으며(19), 공장 폐수에는 크롬, 카드뮴, 납, 수은, 로발트, 구리 및 아연 이온등이 함유되어 있으므로 이들을 분리하여 처리하는 기술의 개발이 절실히 요구된다. 이와 같은 목적을 위하여 사용되어 온 기존의 화학적 처리 방법들은 화학물질의 산화와 환원 반응 혹은 침전, 여과를 이용하여 분리하거나 수분 증발에 의한 농축 혹은 이온 교환 수지를 이용하여 분리하였다(5, 21). 1966년 Polikarpov(13)가 해수속의 방사성 물질을 해양 미생물이 흡수하여 축적한다고 보고한 이래 미생물을 이용하여 중금속을 분리하는 방법에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다.

미생물은 저렴한 가격으로 다량 얻을 수 있고(12), 미생물을 이용하여 수용액으로부터 중금속을 분리하면 중금속의 흡수와 탈착이 단시간내에 이루어지며(18), 중금속의 선택적 분리가 용이하고(4, 9), 미생물 균체의 폐기 처리가 크게 문제시되지 않으므로(9) 기존의 화학적 방법보다 더 효율적이다. 미생물이 중금속 이온을 체내에 축적하는 현상은 미생물 자체의 물질대사와는 전혀 무관하다. 이는 중금속의 흡수량은 sodium azide나 dinitrophenol과 같은 물질대사 저해제의 첨가와와는 무관할 뿐만 아니라(4), dead cell의

흡수량이 living cell보다 더 많다는 보고(2)로부터도 알 수 있다. 중금속 이온의 흡수 속도는 미생물과 중금속 이온의 종류 및 반응 조건에 따라 다르게 보고되어 있다(14, 17). 중금속 이온이 높은 pH의 수용액에서 수산화물로 침전된 상태로 단순히 미생물 세포 표면에 흡착되기 때문이라는 보고(20)와 세포내의 각종 관능기와 결합한다는 보고가 있다(17). 중금속 이온이 흡수되는 과정의 평형 상태는 pH에 크게 의존하므로 수용액의 pH는 중금속 분리에서 중요한 인자일 것으로 예상된다. 미생물에 의한 중금속 이온의 분리에는 배양된 세포 자체(8, 15)와 고정화된 미생물이 사용되어 왔다(6, 7).

본 연구에서는 *S. epidermidis*를 이용하여 수용액으로부터 Pb^{2+} 을 분리하는 과정에서 흡수와 탈착의 반응 조건과 흡수-탈착 cycle의 반복에 따른 미생물의 중금속 흡수와 탈착 능력의 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

균주와 배양 배지

Staphylococcus epidermidis EVANS ATCC 12228의 모균주 보존을 위한 고체 사면 배지는 nutrient agar를 사용하였고, 액체 배지는 nutrient broth를 사용하였다. 액체 배양을 위하여 모균주에 멸균 증류수 5 ml를 주입하고 Vortex mixer(Scientific Industries K550G)를 이용하여 균일한 세균 현탁액을 만들었다. 이 세균 현탁액을 전부 취하여 200 ml 액체 배지에 접종한 후에 37°C, 180 rpm의 Rotary shaker (Lab-Line 3579)에서 12시간 배양시켰다.

이 논문은 1991년도 교육부 지원 한국학술진흥재단의 자유공모과제 학술연구조성비에 의하여 연구되었음.

세포 건조량의 측정

세균 현탁액 1 ml를 취하여 50 ml 액체 배지에 접종한 후 Rotary shaker에서 배양시켰다. 각 시간 별로 Spectrophotometer(600 nm, Shimadzu UV-120-02)에서 흡광도를 측정하여 증식 곡선을 작성하였다. 세포의 건조량은 배양한 세균을 3-4회 원심분리(Beckman J2-21)하여 배지 성분을 완전히 제거한 후, 24시간 전건조시킨 여과지에 여과(Millipore filter, pore size 0.45 μm)하여 건조기(Samhwa DO 221)에서 105°C, 24시간 동안 건조시켜 측정하였다. 정밀한 건조량의 측정을 위하여 동일한 실험을 수회 반복하여 평균값을 취하였다.

미생물에 의한 수용액으로부터의 Pb²⁺ 흡수

삼각 플라스크 250 ml에 48 ml의 무이온 멸균 증류수와 실험에 사용하고자 하는 농도로 준비된 1 ml의 납이온 용액 (Pb(NO₃)₂)을 주입한 후에 1 N H₂SO₄와 1 N NaOH를 이용하여 pH를 조절하였다. 반응기에 세균 현탁액 1 ml(세포 건조량 20 mg)를 첨가하여 Rotary shaker에서 1시간 동안 Pb²⁺을 흡수시켰다. 흡수반응이 완료된 후 4354×g 에서 15분간 2회 원심분리하여 균체와 반응여액을 분리하였다.

미생물 체내로부터 Pb²⁺의 탈착

반응기에 0.1, 0.5, 1 M의 HCl, EDTA, Na₂CO₃, NaHCO₃ 용액 49 ml를 넣고 흡수 반응에 사용한 세균체(세포 건조량 20 mg)를 첨가한 후 Pb²⁺을 흡수한 미생물로부터 Pb²⁺의 탈착 정도를 조사하였다.

흡수-탈착 Cycle

세균체(세포 건조량 50 mg)를 1시간 동안 Pb²⁺의 흡수를 진행한 후 즉시 1시간 동안 탈착을 계속하였

다. 탈착이 끝난 세균체는 충분한 세척을 통해 세포 표면에 잔류하는 Pb²⁺을 제거한 후에 다음의 흡수 과정에 사용하였다. 이것을 10회 반복하였다.

Coion의 효과

Pb²⁺의 흡수반응에 있어서 타 이온의 영향을 알아보기 위하여 최종 농도 1.0×10⁻⁴ M로 준비된 AgNO₃, Cd(NO₃)₂, Cr(NO₃)₃, Cu(NO₃)₂, CoSO₄, FeSO₄, Hg(NO₃)₂, MnSO₄, Ni(NO₃)₂, ZnSO₄ 용액을 준비하였다. 무이온 멸균 증류수 47 ml에 배양된 세균 현탁액 1 ml(세포 건조량 20 mg), Pb²⁺ 용액(최종 농도 1.0×10⁻⁴ M) 1 ml 및 상기의 각 이온 용액 1 ml를 첨가하여 흡수거동을 조사하였다.

Pb²⁺ 농도의 정량 분석

세균체내에 축적된 Pb²⁺의 양은 흡수 여액의 Pb²⁺ 농도를 Atomic Absorption Spectrophotometer (Shimadzu AA670)를 이용하여 정량 분석한 것으로부터 계산하였다. AAS는 wave length 283.3 nm, HC lamp current 5 mA, slit의 폭 1.0 nm, flame air C₂-H₂, fuel gas의 flow rate는 2.0 l/min의 조건으로 분석하였으며, 1% absorption concentration은 약 0.5 ppm 수준으로 나타났다.

결과 및 고찰

흡수 시간에 따른 *Staphylococcus epidermidis*의 Pb²⁺ 흡수율을 조사한 결과(Fig. 1) 1시간 이내에 수용액내에 존재하던 Pb²⁺의 88%가 세균체내 흡수되어 세균체 g당 0.044 g의 Pb²⁺이 축적되었음을 알 수 있다. 따라서 *S. epidermidis*는 매우 우수한 Pb²⁺의

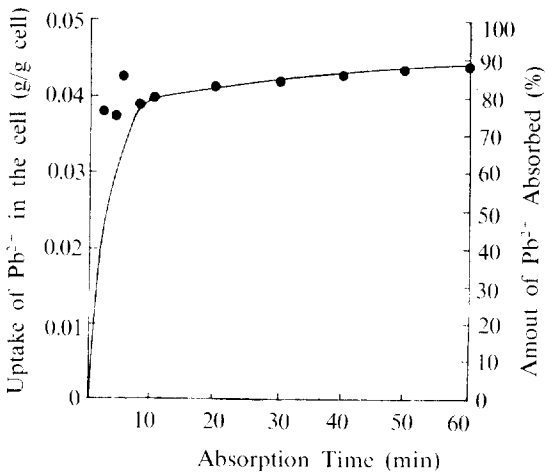


Fig. 1. Time course of uptake of Pb²⁺ by *S. epidermidis*.
 Pb²⁺ concentration: 1.0×10⁻⁴ M
 pH : 6
 temperature : 25°C
 cell weight : 20 mg (dry basis)

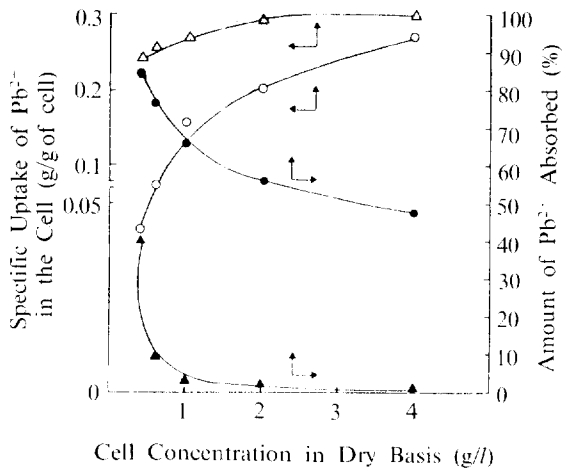


Fig. 2. Uptake of Pb²⁺ as a function of cell concentration.
 ●—●, ○—○ : concentration of Pb²⁺ was 1.0×10⁻³ M
 ▲—▲, △—△ : concentration of Pb²⁺ was 1.0×10⁻⁴ M

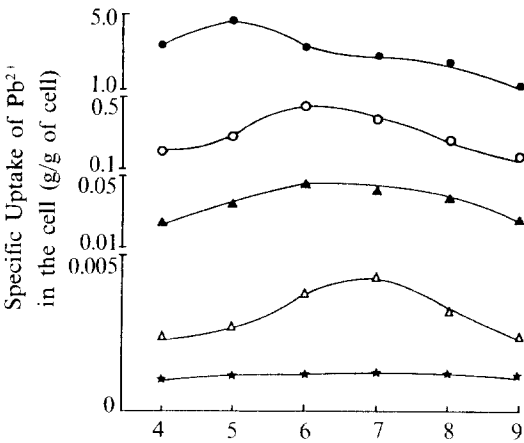


Fig. 3. Effect of pH on the absorption of Pb^{2+} by *S. epidermidis*.

●—●: 1.0×10^{-2} M, ○—○: 1.0×10^{-3} M,
▲—▲: 1.0×10^{-4} M, △—△: 1.0×10^{-5} M,
★—★: 1.0×10^{-6} M

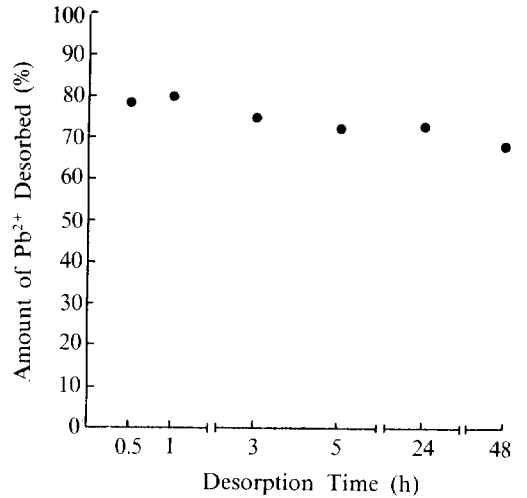


Fig. 5. Desorption time course of Pb^{2+} by *S. epidermidis*.

Desorption tests were carried out at $25^\circ C$ with 1 M HCl solution. The Pb^{2+} concentration during the absorption procedure was 1.0×10^{-4} M.

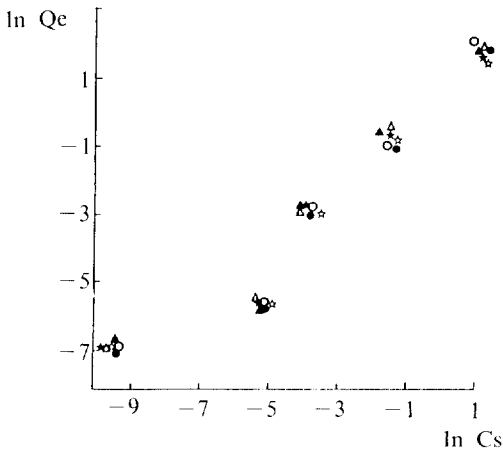


Fig. 4. Representation of equilibrium uptake of Pb^{2+} with *S. epidermidis* in Freundlich isotherm, where Q_e is in g/g of cell and C_s is in molar unit, respectively.

●—●: pH 4, ○—○: pH 5, ▲—▲: pH 6, △—△: pH 7, ★—★: pH 8, ☆—☆: pH 9

흡수제임을 알 수 있으며, 흡수는 대부분 10분 이내에 거의 이루어졌으나 본 실험에서는 흡수 시간을 1시간으로 고정하여 흡수 거동을 조사하였다.

Fig. 2는 균체량의 증가에 따른 Pb^{2+} 축적율의 변화를 나타낸다. 균체량이 증가할수록 Pb^{2+} 의 총흡수량은 증가하지만 세포의 단위 중량당 Pb^{2+} 의 흡수량은 감소함을 알 수 있으며, 이는 세균체의 농도가 높은 경우 세균체내에 흡수되지 않고 수용액내에 잔

류하는 Pb^{2+} 의 농도가 낮아져서 흡수 평형이 이동한 때문으로 생각된다.

중금속 이온의 흡수에 있어서 pH의 영향은 매우 크다. 이는 중금속 이온이 높은 pH의 수용액에서 수화물 형태로 침전할 수 있으므로 생물체내로 흡수되지 못하거나 중금속 이온과 세포내 관능기의 결합 과정에 대한 평형 상태는 수용액의 수소 이온 농도에 크게 의존하기 때문이다(2, 17). Fig. 3은 Pb^{2+} 의 농도와 흡수 용액의 pH에 따른 Pb^{2+} 의 흡수 거동을 나타낸 것으로 Pb^{2+} 의 농도가 높을수록 더 낮은 pH에서 흡수량의 극대치가 나타남을 알 수 있다. 이는 알칼리성 pH에서 수용액중의 Pb^{2+} 이 OH와 결합하여 $Pb(OH)_2$ 의 형태로 침전되어 Pb^{2+} 이 미생물체내로 흡수되지 못하기 때문인 것으로 보인다. Fig. 4는 pH에 따른 Pb^{2+} 의 흡수 평형을 Freundlich isotherm 형태로 표시한 것으로서 직선 관계로부터 벗어나는 것은 Pb^{2+} 의 농도가 높을 때 Pb^{2+} 이 수화물로 침전되기 때문이다.

수용액으로부터 중금속 이온을 분리하여 체내에 축적하고 있는 미생물을 그대로 폐기하면 유해 중금속들도 함께 폐기될 수 있으므로 미생물 세포의 용적등을 고려할 때 미생물 체내에 축적되어 있는 중금속을 다시 탈착시킴으로써 유해 중금속만을 회수하여 폐기하는 것이 유리할 뿐만 아니라 세균체를 재사용할 수 있는 장점이 있다. Fig. 5는 세균체에 이미 흡수된 Pb^{2+} 을 1M HCl을 탈착제로 하여 탈착시킨 결과를 보여주며, 탈착 1시간에서 약 80%의 탈착이 이루어졌다. Nakajima와 Sakaguchi(11)의 경우도 *Streptomyces albus*에 흡수된 UO_2^{2+} 의 탈착이

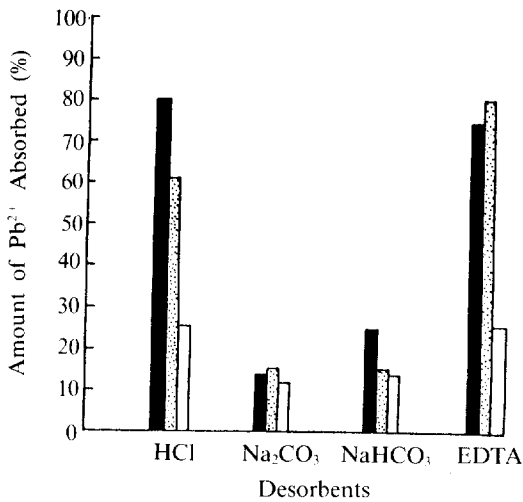


Fig. 6. Desorption of Pb²⁺ from *S. epidermidis* at 25°C.

Desorption time; 1 hour

■: 1 M desorbent, □: 0.5 M desorbent, ▨: 0.1 M desorbent

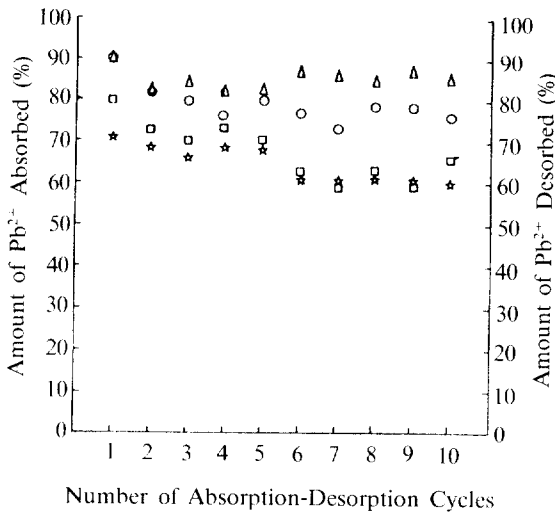


Fig. 7. Repetition tests of Pb²⁺ absorption-desorption by *S. epidermidis* cells. Absorption tests were carried out by suspending cells of *S. epidermidis* (dry weight 50 mg) in 50 ml Pb²⁺ solution (1.0 × 10⁻⁴ M, pH 6) for 1 h. Pb²⁺ absorbed on the cells was desorbed with 1 M HCl and 0.5 M EDTA solution, and then the cells were washed thoroughly with deionized water. These cells were reused for the subsequent absorption tests.

○—○: 1 M HCl absorption, □—□: 1 M HCl desorption, △—△: 0.5 M EDTA absorption, ☆—☆: 0.5 M EDTA desorption

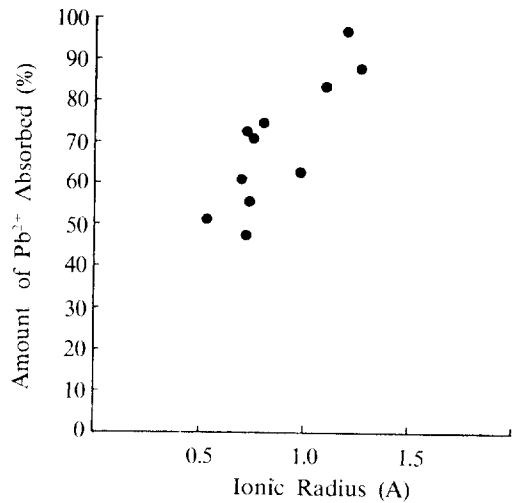


Fig. 8. Correlation between reduction of Pb²⁺ uptake and ionic radius of the competing metal ions.

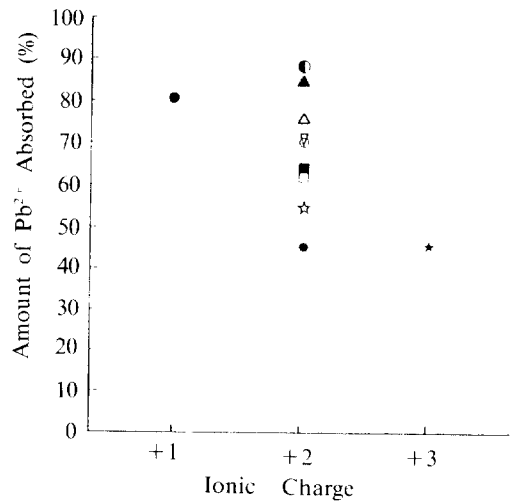


Fig. 9. Correlation between amount of Pb²⁺ absorbed and ionic charge of the competing metal ions.

●: Ag⁺, ■: Cd²⁺, ★: Cr³⁺, *: Co²⁺, ▽: Cu²⁺, ☆: Fe²⁺, ▲: Hg²⁺, △: Mn²⁺, □: Ni²⁺, ○: Zn²⁺, ●: absence of the competing metal ions

1시간 이내에 완료되었으며, Flemming 등(1)은 Ag⁺, Cu²⁺, Cr³⁺의 탈착이 6-12시간내에 이루어짐을 보고하였다. Fig. 6은 0.1 M, 0.5 M, 1 M의 농도를 가지는 HCl(pH 1-2), EDTA(pH 4-5), Na₂CO₃(pH 7.5-8.5), NaHCO₃(pH 8)를 대상으로 하여 탈착을 진행한 결과를 나타내며, 1 M HCl과 0.5 M EDTA가 가장 큰 탈착 효과를 나타냄을 보여주고 있다. 1 M EDTA보다 0.5 M EDTA가 더 우수한 탈착 효과를 나타내었으며 Flemming 등(1)도 유사한 결과를 보고하였

다. 산성의 pH를 나타내는 HCl이 더 우수한 탈착제로 작용한 것은 H^+ 이 중금속 이온 대신 관능기와 결합하여 치환하는 것으로 설명될 수 있다. 흡수에 사용된 세균체가 탈착과정을 거치는 동안 Pb^{2+} 의 흡수와 탈착 능력에 변화가 있는지를 조사하여 Fig. 7에 나타내었다. *S. epidermidis*에 Pb^{2+} 을 흡수시킨 후 HCl 혹은 EDTA로써 탈착하는 과정을 10회 반복한 결과 Fig. 7에 나타낸 바와 같이 흡수와 탈착 능력에는 거의 변화가 없었다. 흡수 및 탈착 cycle을 거치는 동안 균체의 손실과 마모 여부를 조사한 결과 탈착제를 HCl로 했을 때 10회의 탈착 후 균체량은 40%가 감소되었고, EDTA 사용시는 35%가 감소되었다.

미생물에 의한 중금속 이온의 선택적 흡수는 금속 이온들간의 상호 경쟁에 의해 결정되며(3), Tobin 등(17)은 *Rhizopus arrhizus*를 대상으로 10종류의 이온에 대한 흡수력을 조사한 결과 이온 반경이 큰 것일수록 흡수율이 증가하고, 수화물의 반경이 커지면 이온의 흡수가 감소함을 보고하였다. Fig. 8은 competing ions의 반경 (16)과 Pb^{2+} 의 흡수율 감소와의 상관관계를 나타낸다. Pb^{2+} 의 흡수량 감소가 수용액내에 공존하던 중금속 이온의 이온 반경과 큰 상관 관계를 가지고 있으며 이온의 반경이 작을수록 Pb^{2+} 의 흡수율은 크게 저하됨을 보여주고 있다. Fig. 9는 공존하는 중금속 이온의 하전량과 Pb^{2+} 의 흡수율 감소와의 상관 관계를 표시한 것이다. 중금속 이온의 하전량이 동일하더라도 중금속 이온의 종류가 서로 다른 경우는 Pb^{2+} 의 흡수율 감소 정도가 서로 다르게 나타남을 알 수 있다.

참 고 문 헌

1. Flemming, C.A., F. G. Ferris, T. J. Beveridge and G. W. Bailey, 1990. Remobilization of toxic heavy metals absorbed to bacterial wall-clay composites. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 3191-3203.
2. Friis, N. and P. Myers-Keith, 1986. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 21-28.
3. Gadd, G.M. and C. White, 1989. Removal of thorium from simulated acid process streams by fungal biomass. *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 592-597.
4. Horikoshi, T., A. Nakajima and T. Sakaguchi, 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XIX. Accumulation of uranium by microorganisms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 90-96.
5. Kiff, R.J. and D.R. Little, 1986. Biosorption of heavy metals by immobilised fungal biomass. p. 71-86. In H. Eccles and S. Hunt(ed.), Immobilization of ions by biosorption, Society of chemical industry, Ellis Horwood Ltd. London.
6. Kuhn, S.P. and R.M. Pfister, 1989. Adsorption of

mixed metals and cadmium by calcium-alginate immobilized *Zoogloea ramigera*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 613-618.

7. Macaskie, L.E. and A.C.R. Dean, 1990. Trimethyl lead degradation by free and immobilized cells of an *Arthrobacter* sp. and by the wood decay fungus *Phaeolus schweinitzii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 81-87.
8. Mullen, M.D., D.C. Wolf, F.G. Ferris, T.J. Beveridge, C.A. Flemming and G.W. Bailey, 1989. Bacterial sorption of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3143-3149.
9. Nakajima, A., T. Horikoshi and T. Sakaguchi, 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 76-83.
10. Nakajima, A., T. Horikoshi and T. Sakaguchi, 1982. Recovery of uranium by immobilized microorganisms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 88-91.
11. Nakajima, A. and T. Sakaguchi, 1986. Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 59-64.
12. Norberg, A.B. and H. Persson, 1984. Accumulation of heavy metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 239-246.
13. Polikarpov, G.C., 1966. In: Radioecology of aquatic organisms. North Holland, New York.
14. Ross, I.S. and C.C. Townsley, 1986. The uptake of heavy metals by filamentous fungi, p. 49-58. In H. Eccles and S. Hunt(ed.), Immobilization of ions by biosorption, Society of chemical industry, Ellis Horwood Ltd. London.
15. Scott, J.A. and S.J. Palmer, 1990. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **33**, 221-225.
16. Spedding, F.H. and K. Gschneider, 1989. In: Handbook of chemistry and physics. (70 th ed.) F187. CRC.
17. Tobin, J.M., D.G. Cooper and R.J. Neufeld, 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 821-824.
18. Tsezos, M., 1984. Recovery of uranium from biological adsorbents-desorption equilibrium. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 973-981.
19. Tsezos, M. and B. Volesky, 1981. Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 583-604.
20. Tsezos, M. and B. Volesky, 1982. The mechanism of thorium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 955-969.
21. Volesky, B., 1987. Biosorbents for metal recovery. *Trends. Biotechnol.*, **5**, 96-101.

(Received July 16, 1992)

(Accepted August 10, 1992)

ABSTRACT: The Uptake of Lead Ion with *Staphylococcus epidermidis***Kim, Jong-Hye and Mal-Nam Kim** (Department of Biology, Sang Myung Women's University, Seoul 110-743, Korea)

Absorption of Pb^{2+} from aqueous solution was studied using *Staphylococcus epidermidis*. Cells of exponential phase were employed as absorbents. Uptake ratio defined as the ratio of amount of Pb^{2+} absorbed to that of initial Pb^{2+} . Absorption of Pb^{2+} increased with increase in cell concentration, while amount of Pb^{2+} per unit cell mass decreased. Uptake ratio of Pb^{2+} augmented and then diminished after exhibiting a maximum as the pH of the solution increased. Equilibrium absorption of Pb^{2+} deviated from Freundlich isotherm especially at higher concentration of Pb^{2+} due to the precipitation phenomena. HCl and EDTA were founded to desorb Pb^{2+} more effectively than Na_2CO_3 or $NaHCO_3$. After 10 cycles of absorption and desorption, Pb^{2+} absorption capability remained almost unchanged and the biomass had leaked out 30-40 wt/%. Uptake ratio of Pb^{2+} decreased in the presence of other heavy metal ions due to the competitive absorption. The inhibition of Pb^{2+} absorption appeared to have a strong correlation with ionic radius of the competing ions. Especially Cr^{3+} , Co^{2+} or Fe^{2+} having smaller ionic radius depressed more significantly the uptake of Pb^{2+} than any other metal ions tested.