

## 카드뮴 내성균의 分離, 同定 및 菌體內 카드뮴 蓄積 特性

曹周植 · 韓文圭 · 許鍾秀

### Isolation of Cadmium-Tolerant Bacteria and Characterization of Cadmium Accumulation into the Bacteria Cell

Ju-Sik Cho, Mun-Gyu Han, Jong-Soo Heo

#### Abstract

Of the cadmium-tolerant 162 bacterial strains isolated from soils, river waters or active sludges of waste-water disposal plants in the Gyeongnam province a strain C1, which showed considerably higher growth rate in the agar plate containing 2000 ppm than any other strains isolated, was identified as a *Pseudomonas putida* or its similar strain when analyzed by taxonomical characteristics.

Optimum pH and temperature for the growth of the *P. putida* were 7.0 and 30°C, respectively. This strain was resistant to antibiotics (ampicillin, chloramphenicol and streptomycin), and heavy metals (lithium, copper, lead and zinc). This strain utilized salicylate, naphthalene or xylene as a sole carbon source.

The rate of cadmium accumulation in *P. putida* cell was enhanced at low concentration of Cd in the growth media. The maximum cadmium absorption by this strain grown in 1 and 10 ppm of Cd was respectively 78% and 60% 24 hrs after culture, but in 100 ppm Cd, 40% 48 hrs after culture.

Addition of a non-ionic surfactant Triton X-100 (0.1%) to the medium enhanced the accumulation of cadmium in the *P. putida* up to approximately 37%.

#### 緒 論

중금속오염은 인체에 직접적인 피해를 줄 뿐만 아니라 미생물에 의한 오염물질의 분해를 저해함으로써 자정작용을 지연시키는 원인이 되는 등 생태

계에 미치는 영향이 크므로 이에 대한 대책이 절실히 요구되고 있다.<sup>1)</sup> 특히 카드뮴은 2가의 중금속으로서 금속공업, 석유화학공업, 초자가공, 사진재료 생산 및 광산지역 등 광범위한 오염원을 가지며 인체내에 흡수되면 세뇨관에 축적되어 장애를 일으키

慶尙大學校 農科大學 農化學科

Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Gyeongsang National University, Chin Ju 660-71, Korea.

는 "itai-itai"병의 원인이 되는 것으로 널리 알려져 있다.

중금속은 일반적으로 대부분의 생물체에 대해 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 특히 카드뮴은 독성이 매우 강하여 *Saccharomyces cerevisiae*에 대하여는 코발트보다 100배 더 강한 독성을 나타내며,<sup>2)</sup> 생쥐의 간 세포에 100 $\mu$ M의 카드뮴이 존재하면 RNA합성에 저해를 받는 것으로 보고되고 있다.<sup>3)</sup> 그러나 어떤 생물체는 중금속에 노출되었을 때 중금속 이온과 결합하여 침전시킬 수 있는 대사산물을 생성하거나 중금속 이온의 원자기를 변형시켜 승화시키거나 혹은 중금속 이온에 대한 세포막의 불투과성을 증가시키는 등 여러가지 방법으로 적응 또는 해독(adaptation/detoxification)기작을 운행함으로써 독성이 강한 중금속의 높은 농도에서도 성장할 수 있는 것으로 알려지고 있다.<sup>4,5,6,7,8,9,10,11,12)</sup>

최근 외국에서는 미생물을 이용하여 폐수중의 중금속을 제거하려는 연구가 시도되고 있으며 수은에 관하여는 Tonomura 등<sup>13)</sup>외에도 많은 연구가 보고되고 있고, 카드뮴에 관해서는 Horitsu<sup>7)</sup>가 *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 체내축적을 조사한 바 있다. 그러나 국내에서는 김 등<sup>9)</sup>이 *Enterobacter cloacae*에 의한 카드뮴의 체내축적을 조사한 바 있으며 유 등<sup>14)</sup>은 진핵세포인 *Hansenula anomala*에 의한 세포내 카드뮴의 축적특성에 관한 보고가 있을 뿐이다.

본 연구는 미생물을 이용하여 폐수중의 카드뮴을 효과적으로 제거시키기 위하여 경남 및 부산일대의 오염된 하천수, 공단폐수처리장의 폐수 및 sludge 그리고 공단주변지역의 토양으로부터 카드뮴에 내성이 강한 균주를 분리, 동정하였으며, 분리균주의 생육에 미치는 카드뮴의 농도별 영향을 조사하였고 균체내 카드뮴축적을 촉진시킬 수 있는 방법을 조사하였으며 그리고 세포내 카드뮴의 농도별 흡수량을 조사하였다. 이에 그 결과를 보고하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 카드뮴 내성균의 분리 및 동정

자연으로부터 카드뮴 내성균을 분리하기 위하여 경남 및 부산일대의 오염된 하천수, 공단폐수처리

장의 폐수 및 sludge 그리고 공단주변지역의 토양 시료를 채취하여 카드뮴이 100ppm의 농도로 들어 있는 기본배지(glucose 10g, polypeptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, D.W.1000ml, pH 6.0)에 접종하여 30°C에서 진탕배양하여, 이를 동일조성의 고체배지에 다시 접종하여 2~3일간 배양한 후 단일 colony를 분리하였다. 분리된 colony를 카드뮴의 농도를 점차적으로 높여가면서 배양하여 카드뮴이 2,000ppm의 농도로 들어있는 한천평판배지에 접종하여 성장하는 colony를 순수분리하였다.

순수분리된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology(Krieg et al., 1944)에 준하여 동정하였고, 보조자료로서 The prokaryotes(Starr et al., 1981), Biochemical tests for identification of medical bacteria(Mcfaddin, 1980) 및 Manual for the identification of medical bacteria(Cowan et al., 1985)를 이용하였다.

### 2. 분리균주의 생육에 미치는 카드뮴의 영향

분리균주의 생육에 미치는 카드뮴의 영향을 조사하기 위하여 카드뮴을 첨가하지 않은 배지와 카드뮴을 100ppm, 500ppm, 1000ppm 및 2000ppm이 되도록 농도별로 첨가한 액체배지에 각각 균을 접종하여 30°C에서 6일간 진탕배양하면서 시간별로 Spectronic 21D Spectrophotometer를 사용하여 균의 성장을 비교하였다. 또한 카드뮴외의 다른 중금속들에 대한 내성을 조사하기 위하여 분리균주를 액체영양배지에서 대수기까지 배양한 다음, Carleen Libert(1980)의 방법에 따라 mercuric chloride(HgCl<sub>2</sub>), lithium chloride(LiCl), cupric sulfate(CuSO<sub>4</sub>), silver nitrate(AgNO<sub>3</sub>), lead nitrate(PbNO<sub>3</sub>), chromium nitrate(Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 및 zinc chloride(ZnCl<sub>2</sub>)가 각각 농도별로 첨가된 영양한천배지에 접종한 후 30°C에서 48-72시간 배양하면서 colony의 생성여부에 따라 내성유무를 판단하였다.

### 3. 세포내 카드뮴흡수량 측정

균체내로의 카드뮴흡수량과 배양액중의 카드뮴

제거율을 조사하기 위하여 기본배지 100ml에 카드뮴을 1ppm, 10ppm 및 100ppm되게 농도별로 첨가한 다음, 분리균을 접종하여 30°C에서 4일간 진탕배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하여 3회 水洗한 다음 crucible에 넣어 105°C에서 48시간 건조시켜 건조균체량(mg)으로 성장량을 나타내었고, 세포내 카드뮴 함량은 직접법(日本分析 化學會, 關東支部, 1973: 武內 등, 1979: 日本 化學會, 1977)에 의하여 전처리하여 원자흡광법으로 정량하였다. 즉 건조균체를 490°C에서 4시간 회화시킨 후 미회화물질의 분해를 위하여 HNO<sub>3</sub>와 HClO<sub>4</sub>를 각각 5 ml씩 가하여 완전히 분해될 때까지 가열, 산화시켰다. 이를 냉각후 0.1N-HCl 용액 100ml에 용출시킨 다음 Automic Absorption Spectrophotometer(Hitachi-208)로 카드뮴을 측정하였다.

4. 균체내 카드뮴축적 촉진

균체내에 다량의 카드뮴을 축적시키기 위한 방법으로 카드뮴의 농도가 100ppm되도록 첨가한 기본배지에 계면활성제(8종)를 각각 0.2%씩 첨가하여 원심분리한 다음 균체를 회수하여 균체내 카드뮴함량을 정량 비교하였다.

結果 및 考察

1. 카드뮴 내성균의 분리 및 동정

경남 및 부산일대의 오염된 하천수, 공단폐수처리장의 폐수 및 sludge 그리고 공단주변지역의 토양으로부터 카드뮴에 내성이 있는 162균주를 분리하였으며, 이들 균주를 다시 카드뮴이 2,000ppm의 농도로 첨가된 한천평판배지에 접종하여 30°C에서 7일간 배양하여 가장 잘 생육하는 6균주를 2차 선별한 후, 다시 100ppm의 카드뮴이 첨가된 기본배지에 접종하여 30°C에서 6일간 진탕배양한 후 이 배양액을 원심분리하여 균체를 침전시킨 후 그 상등액을 Atomic Absorption Spectrophotometer(Hitachi-208)를 이용하여 배지중의 카드뮴함량을 측정하였다. 그 결과 균체성장량과 배지내의 카드뮴 제거율이 가장 우수한 1균주를 선별하여 분리균주 C1이라 명명하였다(Fig. 1). 분리균주 C1의 최적 성장온도는 30°C였고 최적성장 pH는 7.0이었으며,

항생제인 ampicillin(Ap), chloramphenicol(Cm) 및 streptomycin(Sm)에 강한 내성을 지니고 있었으며, salicylate, naphthalene, xylene과 같은 방향족탄화수소를 단일탄소원으로 이용하였다.

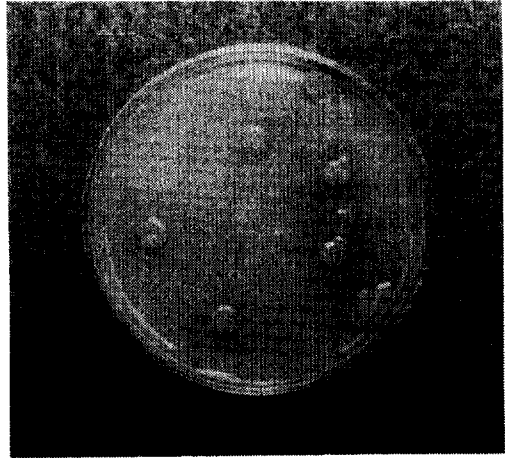


Fig. 1. The cell suspension of the strain C1 was streaked on a gradient agar plate containing 500 ppm of cadmium. The isolated strain C1 was grown at 30°C for 7 days.

카드뮴에 내성이 가장 강한 선별균주 C1을 분류, 동정하기 위하여 그 형태학적, 생리적 및 생화학적 특성을 조사한 결과는 각각 Table 1, 2와 같다. Table 1 및 2에서 보는 바와 같이 C1은 Gram음성균으로서 간상형의 호기성세균이었으며 peritrichous flagella에 의한 운동성이 있었고, oxidase test가 양성이었으며 citrate를 유일탄소원으로 자화하였다. VP test와 methyl red test에 음성반응을 나타냈으며 pH 3.6인 배지에서는 생장

Table 1. Morphological characteristics of cadmium tolerant bacterium.

Characteristics	C1
Cram stain	negative
Shape	rod
Motility	+
Flagella	polar

**Table 2.** Physiological & Biochemical characteristics of cadmium tolerant bacterium.

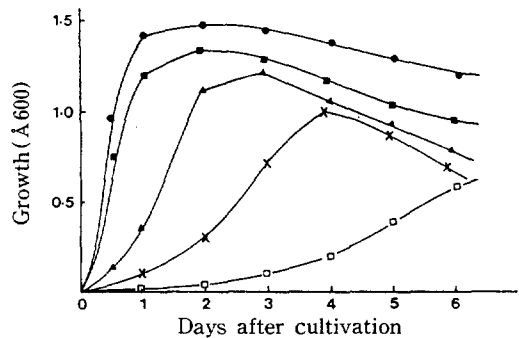
Characteristics	Cl
Catalase	+
Oxidase	+
O/F(Glucose)	○
Growth at 42°C	-
Arginine dihydrolase	+
Gelatin hydrolysis	-
Starch hydrolysis	-
Levan formation	-
Denitrification	-
Pigment	
fluoresin	-
pyocyanin	-
Lipase	-
H <sub>2</sub> S formation	-
Methyl Test	-
VP Test	-
Indole formation	-
Utilization of	
Glucose	+
Mannose	+
Arabinose	-
Maltose	-
Mannitol	+
D-Fructose	+
D-Xylose	-
Lactose	-
Citrate	+
L-Valine	+
Alanine	+
m-Inositol	-
Arginine	+
Identification	<i>Pseudomonas putida</i>

O/F : Oxidative & Fermentative  
 VP : Voges-Proskuer  
 Symbols+ : positive - : negative

하지 못하였다. Nitrate를 환원시키지 못하였고 42°C에서 성장하지 못하였으며 lecithinase를 생성하지 않는 것으로 보아 *Pseudomonas putida* 또는 그 유연군임을 최종적으로 알 수 있었다.

**2. 분리균의 생육에 미치는 카드뮴의 영향**

분리균의 생육에 미치는 카드뮴의 영향을 조사하기 위하여 카드뮴을 첨가하지 않은 배지와 카드뮴을 농도별로 첨가한 배지에서 배양하여 생장을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다.



**Fig. 2.** Growth curves of *Pseudomonas putida* Cl in various cadmium concentrations at days after cultivation.

● ; without Cd    ■ ; with Cd(100ppm)  
 ▲ ; with Cd(500ppm)    × ; with Cd(1000ppm)  
 □ ; with Cd(2000ppm)

카드뮴을 첨가하지 않은 배지에서 배양했을 때에는 배양 1일 후에 최대생장에 도달했으며 카드뮴이 100ppm 함유된 배지에서는 2일 후에 최대생장에 도달했으나 카드뮴을 첨가하지 않았을 경우와 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 카드뮴 500ppm 농도에서는 3일 후에 최대생장을 나타냈으며, 카드뮴 1,000ppm과 2,000ppm농도에서는 약 3-4일간의 정지기 이후에 성장하는 것으로 나타났으며, 이는 카드뮴의 농도가 높을수록 유도기가 연장될 뿐만 아니라 성장도 훨씬 저해되는 것으로 볼 수 있었다.

카드뮴 이외의 다른 중금속에 대한 내성을 조사하기 위하여 mercuric chloride(HgCl<sub>2</sub>), lithium chloride(LiCl), cupric sulfate(CuSO<sub>4</sub>), silver

nitrate(AgNO<sub>3</sub>), lead nitrate(PbNO<sub>3</sub>), chromiumium nitrate(Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>) 및 zinc chloride(ZnCl<sub>2</sub>)를 이용하여 내성을 조사한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 Hg와 Ag를 제외한 다른 중금속에 대해서는 내성을 보였으며 특히 Hg 100ppm의 농도에서 심한 저해를 받았다.

Table 3. Heavy metals resistance of *Pseudomonas putida* C1.

Heavy metals (ppm)	<i>Pseudomonas putida</i> C1	
Hg	50	+
	100	-
	200	-
Li	100	+
	500	+
	1000	+
Cu	100	+
	500	+
	1000	-
Ag	100	+
	500	-
	1000	-
Pb	100	+
	500	+
	1000	+
Cr	100	+
	500	+
	1000	-
Zn	100	+
	500	+
	1000	-

Symbols Hg : HgCl<sub>2</sub> Li : LiCl Cu : CuSO<sub>4</sub>  
 Ag : AgNO<sub>3</sub> Pb : PbNO<sub>3</sub> Cr : Cr(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
 Zn : ZnCl<sub>2</sub>

3. 균체내 카드뮴흡수량

균체내로의 카드뮴흡수량을 조사하기 위하여 기본배지 100ml에 카드뮴을 1ppm, 10ppm 및 100

ppm의 농도별로 첨가하여 배양한 후 원심분리로 균체를 회수하여 균체내 카드뮴을 측정된 결과는 각각 Fig. 3, Fig. 4 및 Fig. 5와 같다.

배양액중 카드뮴의 농도가 1ppm 및 10ppm으로 비교적 낮은 경우에는 배양 1일 후에 최고의 축적율을 보였으나 100ppm으로 카드뮴 농도가 높은 경우에는 배양 2일 이후에 최고의 흡수량을 보였다. 균체내로의 카드뮴흡수율은 배양액중 카드뮴 농도가 낮을수록 높아 1ppm에서는 최고 78%, 10ppm에서는 60%이었고 100ppm에서는 약 40%의 흡수율을 보였다.

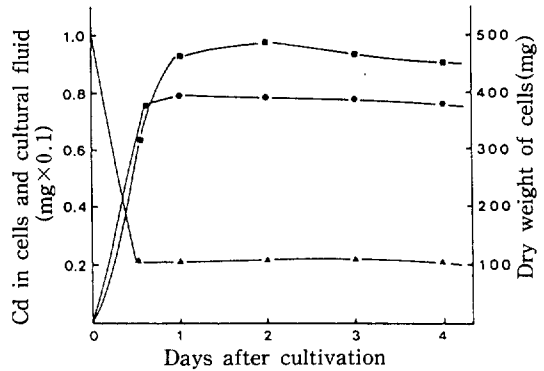


Fig. 3. Cd in cells and cultural fluid, and dry weight of cells at days after cultivation with 1ppm of Cd.

■ ; dry weight of cells ● ; Cd in cells  
 ▲ ; Cd in cultural fluid

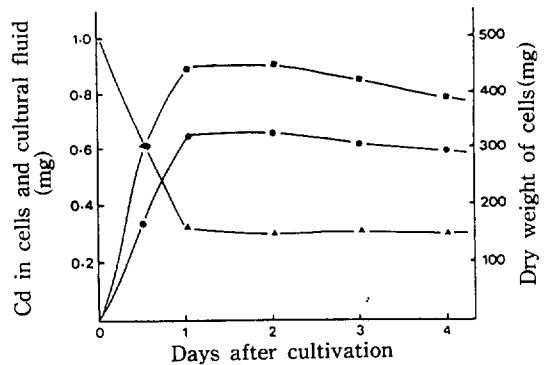


Fig. 4. Cd in cells and cultural fluid, and dry weight of cells at days after cultivation with 10ppm of Cd.

■ ; dry weight of cells ● ; Cd in cells  
 ▲ ; Cd in cultural fluid

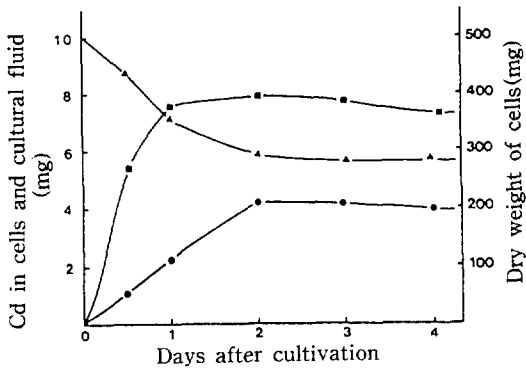


Fig. 5. Cd in cells and cultural fluid, and dry weight of cells at days after cultivation with 100ppm of Cd.

■ ; dry weight of cells    ● ; Cd in cells  
▲ ; Cd in cultural fluid

배지중 카드뮴의 농도가 높을수록 균체량은 감소되었으며 균체량이 감소할수록 카드뮴의 흡수량은 감소되었다. 그러나 카드뮴 100ppm의 농도에서도 균의 생육이 크게 억제되지 않았으며 카드뮴의 흡수율은 낮았으나 상당량의 카드뮴이 흡수된 것으로 나타났다.

4. 균체내 카드뮴축적 촉진

균체내에 카드뮴의 축적을 촉진시키기 위한 방법으로 카드뮴을 100ppm의 농도로 첨가한 기본배지에 계면활성제를 각각 0.2%씩 첨가하여 배양한 후 균체내 카드뮴함량을 조사한 결과는 Table 4와 같다.

계면활성제는 분자내의 이온성에 따라 양이온계, 음이온계, 양성이온계 및 비이온계로 분류된다. Table 4에서 보는 바와 같이 양이온계 계면활성제

Table 4. Effect of surfactants on accumulation of cadmium in the cells.

Surfactants	Growth (g/100ml)	(Index)	Amount of cadmium(mg/100ml)				Percentage of Cd uptake by cells
			Fluid	(Index)	Cell	(Index)	
None	0.388	(100.0) <sup>1)</sup>	5.60	(100.0) <sup>1)</sup>	4.20	(100.0) <sup>1)</sup>	42.0
CTAB <sup>2)</sup>	0.014	(3.7)	9.91	(176.9)	0.03	(0.7)	0.3
Aersol OT	0.025	(6.6)	9.70	(173.2)	0.23	(5.5)	2.3
SOS <sup>3)</sup>	0.297	(78.1)	9.65	(172.3)	0.28	(6.7)	2.8
LAS <sup>4)</sup>	0.323	(85.0)	8.26	(147.5)	1.62	(38.6)	16.2
ABS <sup>5)</sup>	0.137	(36.1)	8.93	(159.4)	1.01	(24.0)	10.1
Triton X-100	0.452	(118.9)	5.63	(100.6)	5.30	(127.0)	53.6
Trueen BO	0.432	(113.6)	5.22	(93.2)	4.74	(112.9)	47.4
Silicone KM-70	0.518	(136.3)	6.28	(112.1)	3.68	(87.6)	36.8

1) ; Index 2) ; Cetyltrimethyl ammonium bromide 3) ; Sodium dodecyl sulfate 4) ; Linear alkyl sulfonate 5) ; Alkylbenzene sulfonate *Pseudomonas putida* Cl was grown in 100ml of the basal medium containing 100ppm of cadmium and 0.2% various surfactants at 30°C for 48 hours.

인 CTAB(cetyltrimethylammonium bromide) 및 음이온계 계면활성제인 Aersol OT, LAS (linear alkylsulfonate), ABS(alkylbenzene sulfonate)는 균체의 생육 뿐만 아니라 균체내 카드뮴축적을 크게 저해하였으나, 비이온계 계면활성제인 Triton X-100과 Tween 80은 균생육 뿐만 아니라 균체내 카드뮴축적량을 크게 증가시켰다. 이와같은 결과는 Triton X-100의 처리가 세포막의

투과성에 영향을 주기 때문이라 생각되었다. 한편 소포제로 널리 쓰이는 Silicone KM-70은 균의 생육은 크게 증가시켰으나 균체내 카드뮴축적량은 상대적으로 감소시켰다. 양이온계 계면활성제인 CTAB 및 음이온계 계면활성제인 Aersol OT에 의한 균생육 저해현상은 이들 계면활성제의 일부가 미생물의 세포막 파괴 및 효소단백질의 변화를 일으키므로 소독제로도 사용되고 있으므로 당연한 결

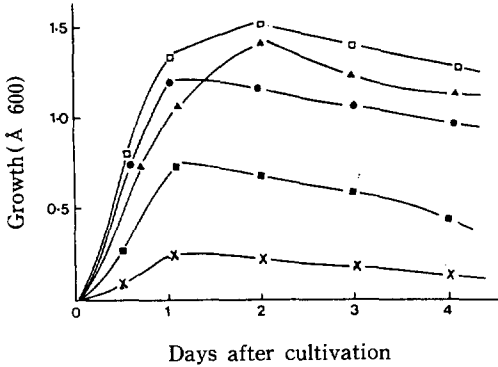


Fig. 6 Effect of concentrations Triton X-100 on the growth of *P. putida* C1. 100 ppm of the basal medium containing 100 ppm of cadmium and Triton X-100 of various concentrations was cultivated at 34°C for 4 days.

● ; none    □ ; 0.1%    ▲ ; 0.2%  
 ■ ; 0.5%    × ; 1.0%

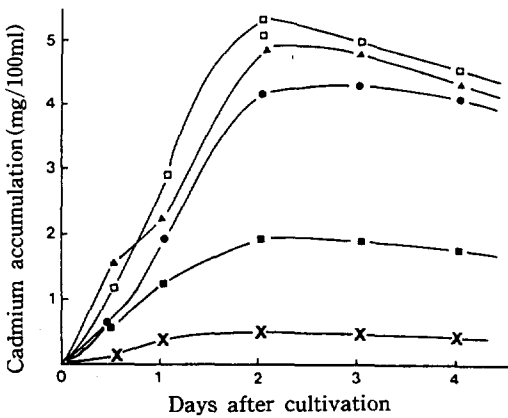


Fig. 7. Effect of concentrations Triton X-100 on the accumulation of cadmium in cells. 100ml of the basal medium containing 100ppm of cadmium and Triton X-100 of various concentrations was cultivated at 30°C for 4 days.

● ; none    □ ; 0.1%    ▲ ; 0.2%  
 ■ ; 0.5%    × ; 1.0%

과로 생각되었으며, Silicone KM-70의 첨가로 균생육이 양호한 것은 소포제로서 산소의 투과성과 관련이 있는 것으로 생각되었다.

그리고 균의 생육과 균체내 카드뮴 축적을 증가시키는 Triton X-100의 농도에 따른 균생장과 균체내 카드뮴축적량을 조사한 결과는 각각 Fig. 6 및 Fig. 7과 같다. Triton X-100을 0.1% 되게 배지중에 첨가했을 경우 균생육 뿐만 아니라 균체내 카드뮴축적이 가장 양호했으며, 이 농도에서의 카드뮴축적은 Triton X-100을 첨가하지 않았을 경우에 비하여 약 37% 증가되었다. 그러나 Triton X-100을 1.0%되게 첨가하였을 경우 균생육과 카드뮴 축적에 심한 저해를 받았다.

### 摘 要

폐수중의 카드뮴을 효과적으로 제거하기 위하여 경남 및 부산지역의 오염된 하천수, 공단폐수처리장의 폐수 및 sludge 그리고 공단주변지역의 토양으로부터 카드뮴에 내성이 있는 미생물 162균주를 분리하여, 이들 균주중 2,000ppm의 카드뮴이 함유된 한천평판배지에서 생장이 우수한 6균주를 선별한 후 이들 균주의 카드뮴 흡수량을 조사하여, 그중에서 카드뮴 흡수가 가장 우수한 1균주를 선별하여 동정한 결과 *Pseudomonas putida* 또는 그 유연균으로 밝혀졌으며, 그 분리균의 최적생장 온도는 30°C였고, 최적 pH는 pH 7.0이었다.

분리균주의 항생제 내성, 중금속 내성 및 탄화수소 자화능을 조사한 결과, 항생제인 ampicillin (Ap), chloramphenicol (Cm) 및 streptomycin (Sm)과 중금속인 Li, Cu, Pb 및 Zn에 내성을 나타내었다. 그리고 탄화수소인 salicylate, naphthalene 및 xylene을 단일탄소원으로 이용하였다.

분리균의 카드뮴 농도에 따른 생장을 조사한 결과 카드뮴이 첨가되지 않은 배지에서는 배양 1일 후에 최대생장에 도달했고, 카드뮴 100ppm의 농도에서는 2일 후에 최대생장에 도달하였으며 대조구(카드뮴 무첨가 배지)와 큰 차이가 없었다. 카드뮴의 농도가 높을수록 균의 생장이 심히 저해되었다.

균체내의 카드뮴흡수량은 카드뮴농도가 낮을수록 증가되었다. 배지중 카드뮴농도가 1ppm과 10ppm인 경우에는 배양 1일 후에 최고의 흡수량을 보였

고 100ppm에서는 배양 2일 후에 최고의 축적율을 보였다. 균체내 카드뮴 흡수율은 배지중에 카드뮴 농도가 1ppm인 경우에는 최고 78%, 10ppm에서는 60%, 그리고 100ppm에서는 약 40%의 흡수율을 보였다.

균체내에 다량의 카드뮴을 축적시키기 위하여 배양시 계면활성제를 넣어 배양한 결과, 비이온계 계면활성제인 Triton X-100을 0.1% 첨가했을 때 약 37%의 카드뮴축적 증가를 보였다.

參考文獻

1. Nagayama, T. and T. Kurechi, 1979. The effects of heavy metals on the microorganisms in river water. *Eisei Kagaku*. 25, 289~294.
2. Aiking, H., A. Srijman, C. Van Heerikhuizen and J. Van Triet, 1984. Inorganic phosphate accumulation and cadmium detoxification in *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 growing in continuous culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 374~377.
3. Gadd, G.M. and A.J. Griffiths, 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.* 4, 303~317.
4. Aiking, H., K. Kok, H. Van Heerikhuizen, and J. Van't Riet, 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 438~944.
5. Heldwein, R., H.W. Tromballa und E. Broda, 1976. Aufnahme von cobalt, blei und cadmium durch backerhefe, zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologia. 17, 299~308.
6. Hayashi, Y. and E. Mikami; FEBS letters 123, 265(1981).
7. Horitsu, H., H. Kato and M. Tomoyeda, 1979. Uptake of cadmium by a cadmium chloride-tolerant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ferment. Technol.* 57, 273~279.
8. Khazaeli, M.B. and R.S. Mitra, 1981. Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accomodation to low levels of this ion. *Appl. Environ. Microbiol.* 41, 46~50.
9. Kim, Y.B. and S.R. Lee, 1976. Isolation of cadmium-tolerant bacteria and accumulation of cadmium into the bacteria cell. *Korean. J. Appl. Microbial. Bioeng.* 4, 111~115.
10. Vallee, B., and D.D. Ulmer, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead, *Ann. Rev. Biochem.* 41, 91~128.
11. Macaskie, L.E., and A.C.R. Dean, 1984. Cadmium accumulation by a *Citrobacter sp.*, *J. Gen. Microbiol.* 130, 53~62.
12. Horitsu, H., T. maeda, and M. Tomoyeda, 1974. Isolation of a cadmium nitrate-tolerant microorganism and the incorporation of the heavy metal ion into the cells of the microorganism, *J. Ferment. Technol.* 52, 14~19.
13. Tonomura, K., Nakagami, T., Futai, F. and Maeda, K.: *J. Ferment. Technol.*, 46, 506(1968).
14. Yu, T.S., H.I. Song and K.T. Chung, 1986. Characterization of a cadmium-ion tolerant strain of *Hansenula anomala*, *Kor. Jour. Microbiol.* 24, 57~61.
15. Yu, T.S., M.H. Kim and H.I. Song, 1980. Nutritional and cultural characteristics of cadmium-ion tolerant microorganism, *Erwinia Sp.*, C-7, Kemyung University, Kwaharnon Jip 6, 41~49.
16. Yu, T.S. and M.H. An, 1981. The effect of cadmium on the growth of *Hansenula anomala* Var. *Anomala*, *J. Institute of Natural Science*, 1, 17~21.



17. Yu, T.S., J.M. Park and H.I. Song.  
1987. Effect of Triton X-100 on intracellular accumulation of cadmium in *Hansenula anomnla*, Kor. Jour. Microbiol. 25, 110~116.
18. Yu, T.S., H.I. Song and K.T. Chung,  
1989. Intracellular accumulation of cadmium by intact cadmium tolerant yeast cells. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng. 17, 29~34.
19. Kimura, A., K. Arima and K. Murata,  
1981. Biofunctional change in yeast cell surface on treatment with Triton X-100. Agric. Biol. Chem. 45, 2627~2629.