

## 미생물의 크롬내성과 크롬환원의 상호 비교

오영숙 · 최성찬\*

한림대학교 자연과학대학 환경학과

미생물에 의한 6가이온 크롬의 3가이온으로의 환원은 세균에게 크롬내성을 제공할 수 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 이러한 가설을 확인하기 위하여 크롬오염 토양과 오염되지 않은 토양으로부터 형태적으로 다른 20종의 세균을 순수분리하고 각각의 균주에서 크롬내성과 크롬환원능을 상호 비교하였다. 전자의 공여체로 glucose를 사용했을 때 세포현탁액에 의한 크롬의 환원은 시간당 0.014-0.305 mM Cr(VI)의 범위로 관찰되었으며, 액체배지에서 2 mM의 크롬에 대한 내성은 크롬을 첨가하지 않은 배지에서 배양한 경우와 혼탁도를 비교한 결과 전혀 저해를 받지 않는 경우부터 93.4%의 성장저해를 받는 경우까지 다양하게 관찰되었다. 이러한 결과로부터 상관관계를 분석한 결과 크롬내성과 크롬환원은 전혀 상관이 없는 것으로 계산되었다. 한편 균집수준에서의 크롬내성비교는 크롬오염 토양과 오염되지 않은 토양에서 각각 19.1%와 0.4%로 나타나 크롬의 존재는 내성균주의 선택적 성장을 유도하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 이때 획득된 크롬에 대한 내성은 크롬의 환원에 의해서 제공되는 것이 아님을 상관관계 분석으로부터 알 수 있었다.

KEY WORDS □ Bioremediation, chromium, Cr-resistance, Cr-reduction, heavy metal

여러 중금속 물질 중 특히 크롬은 자연계에 방출되어 낮은 농도로도 생물체에 암을 유발할 수 있는 치명적인 독성을 나타낸다(2, 6, 19, 31). 자연계에 존재하는 크롬은 -2가에서 +6가 이온까지 여러가지 형태로 존재하나, +6가 이온과 +3가 이온이 그 중 가장 안정한 이온 형태이다(27, 28). 전기도금이나 피혁처리 등 다양한 크롬의 이용 공정에서 주로 발견되는 +6가 이온은 물에 대한 용해도가 가장 크고, 세포내로의 흡수가 용이하여 적절한 처리없이 방출되는 경우 주변 환경에 장, 단기적 위험성을 미치게 된다. 반면에 +3가 이온은 중성 pH에서 침전물[Cr(OH)<sub>3</sub>]을 형성하여(16, 18) 크롬 이온의 상수층 및 지하수로의 유입을 제한할 뿐만 아니라, 그 자체의 독성도 상당히 낮아져 미생물을 이용한 돌연변이 유발 시험에서도 +6가 크롬이온과는 달리 무해한 결과를 보여준다(26).

세균의 크롬에 대한 내성은 다양한 기작을 통하여 얻어지는 것으로 알려지고 있다. Ohtake 등(24)은 plasmid를 지니고 있는 *Pseudomonas fluorescens*에서 CrO<sub>4</sub><sup>2-</sup>와 구조적인 유사성을 보이는 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>가 동일한 active transport system에 의하여 세포내로의 흡수가 일어나며 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> transport system의 조절을 이용, 크롬의 흡수를 제한함으로써 크롬에 대한 내성을 획득한다고 보고하였다. 한편 +6가이온 크롬의 +3가이온으로의 환원 또한 크롬이온의 세포내 흡수를 제한하는 일종의 크롬 무독화(detoxification) 과정으로 여겨지고 있다. 이러한 가설을 뒷받침하는 결과로 Horitsu 등(15)은 *Pseudomonas ambigua* G-1 균주를 이용한 실험에서 크롬에 민감한 돌연변이 균주를 얻고 이 균주의 크롬환원능을 시험한 결과 모균주에 비교하여 크롬환원능력이 20% 정도로 감소

한 결과를 얻었다. 그러나 *Pseudomonas putida* AC10 및 *P. fluorescens* LB303을 이용한 유사한 실험에서는 크롬에 대한 내성 감소가 크롬의 환원능에 전혀 영향을 끼치지 않는 것으로 관찰되었다(4).

그러므로 본 연구에서는 현재까지 명확하게 규명되고 있지 않은 크롬내성과 크롬환원간의 관계를 밝히기 위하여 실험의 재료로 자연 토양환경에서 다양한 균주들을 무작위로 순수 분리하였다. 그리고 그들의 크롬에 대한 내성정도를 파악하고 동시에 각 균주의 크롬환원능을 측정하여 두 가지 parameter간의 상관관계를 통계적인 분석을 통하여 상호관계를 규명하고자 하였다. 또한 크롬의 환원이 induce될 수 있는 형질인지 아니면 constitutive하게 발현되는 형질인지를 알아보는 실험을 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 분리과 동정

이 연구에서 사용된 균주는 동두천 일대의 크롬오염 토양(CC; chromium contaminated)과 오염되지 않은 춘천 한림대학교 교내의 토양(UC; uncontaminated)으로부터 분리하였다. 동두천 일대의 토양은 피혁의 처리를 위하여 다량으로 사용되는 크롬으로 인하여 만성적인 오염이 일어나고 있는 토양으로서 채취된 토양에 존재하는 크롬(VI)의 양은 평균 100 ppm 정도로 관찰되었다. 일반세균의 계수 및 분리를 위하여는 Difco사의 Plate Count Agar(PCA) 배지에 적절히 희석된 시료를 도말 접종한 후 1주간 30°C에서 배양하고 나타난 콜로니를 그들의 형태적 특징에 기초하여 무작위로 분리, 순수 배양하였다. 순수 분리된 총 20종의 세균들은 가스크로마토그래프(Hewlett-Packard, Model 5890)를 이용하여 fatty

\*To whom correspondence should be addressed

acid methyl ester(FAME)의 조성을 확인하고 library와 비교하여 종단위까지 동정하였다(3).

### 크롬내성의 측정

시료 중에 존재하는 크롬내성 균주의 균집 크기를 파악하기 위하여 일반세균의 분리에서와 동일한 PCA 배지를 습열 멸균하고 50°C 정도로 식힌 후  $K_2CrO_4$  stock 용액을 membrane filter(pore size 0.2  $\mu$ m, Millipore)로 여과 멸균하고 첨가하여 크롬의 최종농도가 10 mM가 되도록 맞추어 주었다. 준비된 크롬배지에 일반세균의 경우와 동일한 방법으로 접종하고 계수하여 일반세균 중 크롬내성균이 차지하는 비율을 백분율로 나타내었다.

한편 무작위로 순수 분리된 균주들의 크롬내성 정도는 mPlate Count Broth(mPCB, Difco)에 최종 크롬의 농도가 각각 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 및 2.0 mM가 되도록 크롬을 첨가한 5 ml의 배지에 대수기 성장 중인 각각의 균주들을 1 ml씩 접종하였다. 접종된 배지는 30°C로 맞추어진 교반식 배양조(200 rpm)에서 24시간 동안 배양한 후 630 nm에서의 혼탁도를 측정하고 크롬이 전혀 첨가되지 않은 배지에서의 성장정도와 2.0 mM에서의 성장정도를 비교하여 크롬에 대한 내성정도를 파악하였다.

### 크롬환원능의 측정

무작위로 분리된 균주들에 의한 크롬(VI)의 환원은 배지에  $K_2CrO_4$ 를 첨가했을 때 6가 이온의 감소, 즉 3가 이온으로의 환원을 시간별로 측정하여 그 환원 정도를 분석하였다. 이때 크롬(VI)의 감소는 Standard Method(1)에서 제시한 방법에 준하여 우선 원심분리(10,000×g, 10분)를 통하여 부유물질을 제거하고 시료 1 ml당 0.5 ml의 6 N 황산을 가하여 acidification시킨 후, acetone에 녹인 2% diphenylcarbazide 용액 0.2 ml을 넣어 발색 반응시켰다. 반응은 10분간 상온에서 지속시킨 후, UV-visible spectrophotometer(Shimadzu, UV-1601PC)를 이용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 표준 곡선으로부터 시료내에 존재하는 6가 이온 크롬만을 선택적으로 정량 분석하였다(30). 실험에 사용할 균주들은 우선 cell mass를 얻기 위하여 50 ml의 mPCB 배지에서 각각의 균주를 30°C, overnight 배양한 후, 원심분리하여 cell을 회수하였다. 회수된 cell은 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0으로 2회 세척한 후, 최종적으로 얻어진 cell pellet에 10 ml의 동일한 완충용액을 가하여 washed cell suspension을 만들었다. 크롬(VI)의 환원에 필요한 전자의 공여체로 최종농도 200 mM의 glucose를 가한 후, 0.5 mM의 크롬(VI)을 첨가함으로써 크롬(VI) 환원 반응을 시작하였다. 반응은 30°C, 교반식 배양조에서 수행하였으며 0-12시간 동안 일정시간별로 0.5 ml의 subsample을 취하여 원심분리(10,000×g, 10분)하고 상등액에 존재하는 크롬(VI)의 감소를 확인하였다. 이때 크롬(VI)은 수층에만 존재하고 cell pellet에서는 거의 없는 것으로 측정되었다. 환원의 정도는 초기 반응속도, 즉 initial rate를 mM Cr(VI) reduced h<sup>-1</sup>의 단위로 나타내어 각 균주들간의 환원정도를 비교·분석하였다.

### 크롬환원의 유도여부 확인

크롬을 환원시키는 능력이 크롬의 존재에 의하여 induce 되는 형질인지 아니면 constitutive하게 발현되는 형질인지를 알아보기 위하여 분리된 균주들 중 비교적 크롬의 환원능력이 뛰어난 균주(UC-5)와 환원능력이 낮은 (CC-10) 두 종의 균주를 선택하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 우선 선택된 각각의 균주를 0.5 mM의 크롬이 함유된 배지와 크롬이 첨가되지 않은 mPCB 배지에서 연속하여 10회간 계대배양하였다. 계대배양 후 전술된 크롬환원능의 측정과 동일한 방법으로 크롬의 환원을 측정하여 크롬에 계속해서 노출시킨 균주와 그렇지 않은 균주간의 크롬환원능 차이가 존재하는지를 비교 분석하였다. 이때 크롬이 존재하는 상태에서 계대배양시킨 균주의 집종량의 차이에 의한 크롬환원능 감소 가능성을 배제시키기 위하여 washed cell suspension의 혼탁도를  $A_{630}=2.3$ 이 되도록 동일하게 맞추어 주고 실험을 수행하였다.

## 결과 및 고찰

### 분리 균주의 동정

크롬에 만성적으로 오염된 토양과 오염되지 않은 토양으로부터 얻어진 균주 중 실험에 사용한 균주는 총 20종으로서 FAME 분석을 통한 그들의 분류·동정 결과를 Table 1에 요약하였다. 오염되지 않은 토양에서는 분리된 균주의 상당수가 자연토양에서 흔히 발견되는 그람양성의 간균인 *Bacillus*에 속하는 것으로 관찰되었다. 반면에 크롬오염 토양에서는 뚜렷한 우점종은 관찰되지 않았으나 *Pseudomonas*에 속하는 세균이 비교적 많이 관찰되었다. 이러한 결과는 기존에 알려진 크롬내성 균주들중 상당수가 *Pseudomonas*로

**Table 1.** Bacterial identification of the strains isolated from Cr-contaminated(CC) and uncontaminated(UC) soil environments

Culture ID	Identification
UC-1	<i>Bacillus thuringiensis</i>
UC-1-1	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
UC-2	<i>Bacillus sphaericus</i>
UC-3	<i>Brevibacterium acetylicum</i>
UC-3-2	<i>Bacillus megaterium</i>
UC-4-1	<i>Bacillus megaterium</i>
UC-4-2	<i>Bacillus brevis</i>
UC-4-4	<i>Bacillus laterosporus</i>
UC-5	<i>Bacillus thuringiensis</i>
UC-6	<i>Arthrobacter ilicis</i>
UC-8	<i>Paenibacillus pabuli</i>
CC-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
CC-1-1	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
CC-2	<i>Pseudomonas putida</i>
CC-3	<i>Bacillus brevis</i>
CC-4	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
CC-5	<i>Bacillus pasteurii</i>
CC-6-1	<i>Pseudomonas putida</i>
CC-7	<i>Pseudomonas putida</i>
CC-10	<i>Serratia marcescens</i>

**Table 2.** Levels of resistance to Cr(VI). The number of bacteria recovered from both sites on Plate Count Agar decreased in the presence of 10 mM Cr(VI). A higher value of % resistance (19.1%) in Cr-contaminated soil supports the hypothesis that the Cr present in the soils influences natural selection for resistant phenotypes

Soil samples	Total viable counts (CFU/g soil)		% resistance*
	without Cr	10 mM Cr	
Cr-contaminated	$3.2 \times 10^5$	$6.1 \times 10^4$	19.1%
Uncontaminated	$7.0 \times 10^6$	$2.7 \times 10^4$	0.4%

\*% resistance represents the ratio of viable counts on (10 mM Cr plate/plate without Cr)  $\times$  100.

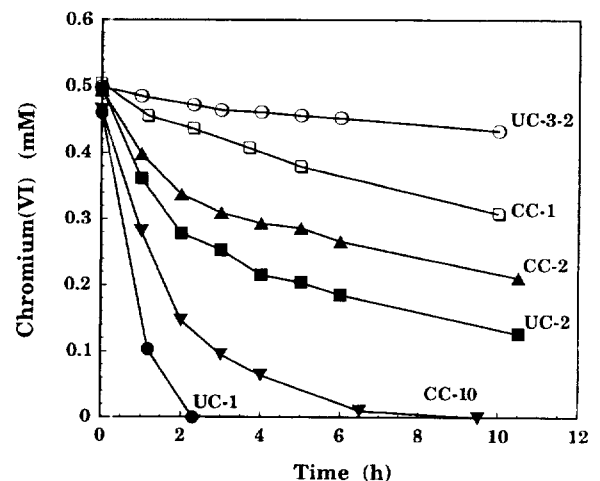
보고된 결과와 일치한다. 현재까지 알려진 크롬내성 균주들은 *P. aeruginosa*(29), *P. fluorescens*(5), *P. ambigua*(14), *Streptococcus lactis*(10), *Alcaligenes eutrophus*(23) 등이 보고되어 있으며 많은 경우에서 크롬에 대한 내성형질이 plasmid에 의해 획득되는 것으로 알려져 있다. 크롬에 노출된 정도에 따라 특이한 종조성을 보이는 본 실험의 결과는 토양내의 크롬 존재에 의하여 내성을 지니는 세균이 상대적으로 selection된다는 가정을 뒷받침하는 결과이며 이러한 결과는 서로 다른 두 가지의 환경에서 측정된 크롬내성 균주의 군집 크기를 비교함으로써 더욱 확실하게 나타났다. 즉 두 지역의 토양으로부터 채취한 시료 중 10 mM의 크롬을 함유하고 있는 배지에서 나타난 크롬내성균수의 전체 콜로니생성균수에 대한 %를 조사한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 크롬 오염 토양의 경우가 19.1%, 그렇지 않은 토양의 경우는 0.4%로 유의한 차이를 보였다. 그러나 하상퇴적물로부터 크롬내성균주의 분포를 관찰한 유사한 다른 연구에서는 전기도금 공장의 폐수가 직접 유입되는 지역과 하류지역간의 차이가 발견되지 않았다(22). 이 경우에 있어서는 시료에 존재하고 있는 크롬이 유기물질과 결합하여 세균에 대한 availability가 없었던 때문으로 해석되었다. 그러나 동일한 연구에서 100 ppm의 크롬에 대한 내성균주의 분포에 있어서 31종 중 18종이 *Pseudomonas*인 우점종으로 관찰된 결과는 본 연구의 크롬오염 토양의 결과와 일치한다. 따라서 크롬에 대한 내성균주의 분포양상은 크롬이 존재하고 있는 시료에 존재하는 유기물의 종류와 양이 크롬의 availability를 변화시키므로 중요한 변수로 작용하지만, 만약 유기물 조성이 유사하다면 크롬에 의한 phenotypic selection이 일어난다고 볼 수 있으며 이때 자연토양에서는 주로 *Pseudomonas*가 내성을 지니고 있는 것으로 파악된다.

### 크롬내성과 크롬환원의 상관관계

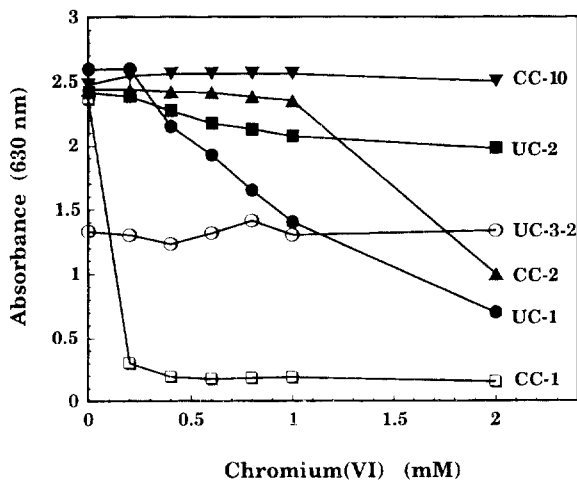
일반적으로 세균의 크롬에 대한 내성은 두 가지 기작에 의하여 획득되는 것으로 알려져 있다. 첫 번째는 특별한 membrane 단백질을 이용하여 크롬을 능동적으로 배출 혹은 세포내로의 축적을 제한시키는 기작이다(9). 이러한 단백질은 돌연변이를 이용한 실험을 통하여 그 정보가 주로 plasmid에 encoding되어 있는 것으로 알려져 있다(8). 두 번째의 기작은 크롬(VI)을 환원시켜 중성 pH에서 불수용성의 Cr(OH)<sub>3</sub>

를 생성함으로써 세포내로 유입되는 것을 방지하는 기작이다(7). 그러나 이러한 기작은 명확한 실험적 근거가 없이 동일한 농도의 크롬(VI)과 크롬(III)을 배지에 첨가하고 그것에 의한 성장저해도를 비교하여 막연히 추정되는 기작이었다. 그러므로 본 실험에서는 크롬의 환원이 실제로 세균의 크롬에 대한 내성을 제공하는데 직접적인 관련이 있는지를 알아보았다. 이를 위하여 자연토양으로부터 무작위로 분리된 총 20종의 균주로부터 washed cell suspension을 제조하여 glucose를 크롬환원에 필요한 전자공여체로 제공하였을 때 크롬의 환원능을 측정된 결과 균주에 따라 상당히 넓은 범위에서 크롬을 환원시킬 수 있음이 관찰되었다(Fig. 1). Glucose를 함유한 phosphate 배지 자체에 의한 크롬의 환원은 배양 12시간 이내에는 1% 미만으로 극히 미미하였으며 Fig. 1의 결과는 배지 자체에 의한 크롬의 환원을 보정한 결과이다. 그리고 세포에 흡착되어 원심분리 시 배양 상등액으로부터 제거되는 크롬의 양도 전혀 없는 것으로 관찰되어 크롬(VI)의 감소가 크롬(III)으로의 환원에 의한 것이라는 사실도 확인하였다. 모든 균주에 있어서 반응이 진행됨에 따라 점차적으로 환원속도가 낮아지는 결과를 볼 수 있었는데 이는 배지내의 전자공여체인 glucose의 점진적인 소모에 의한 것으로 파악된다. 따라서 크롬환원의 범위는 최대환원속도를 나타내는 배양 초기 1시간을 기준으로 계산하였으며 0.014-0.305 mM Cr(VI) reduced h<sup>-1</sup>로 나타났다. 예상과는 달리 크롬오염 토양에서 분리된 균주들과 오염이 안된 토양에서 분리된 균주간에서 유의한 크롬환원능의 차이는 발견되지 않았다.

총 20종의 세균에서 관찰한 크롬에 대한 내성정도 실험의 결과도 역시 균주간 차이가 크게 나타나 2.0 mM의 크롬 존재하에서 전혀 성장저해를 받지 않은 균주(UC-3-2)도 있는 반면 93.4%의 성장저해를 받아 매우 민감한 균주(CC-1)도 있는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이러한 결과를 크롬환원능과

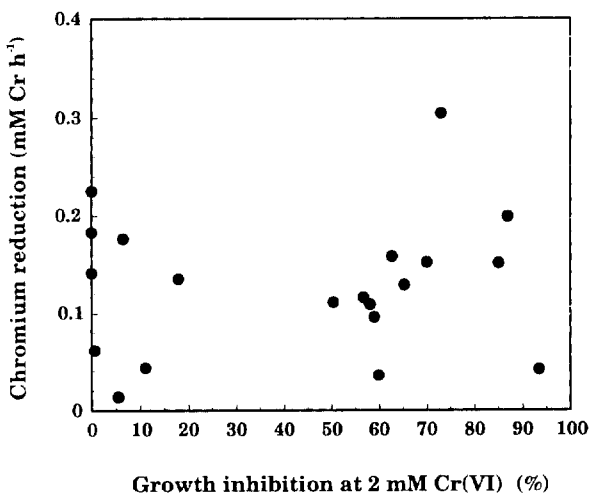


**Fig. 1.** Cr(VI) reducing capabilities of the environmental isolates. The initial rate of Cr reduction (i.e. the amount reduced in the first hour of incubation) for all 20 isolates ranged from 0.014 to 0.305 mM Cr(VI) reduced h<sup>-1</sup>. Data from 6 strains are presented with their culture IDs.



**Fig. 2.** Cr(VI) resistance of the environmental isolates. Cr(VI) resistance was measured by growth inhibition in liquid medium containing various concentrations of Cr(VI). The isolates had a broad range of resistance from no inhibition to 93.4% inhibition of their growth at 2 mM Cr(VI). Data from 6 strains are presented with their culture IDs.

비교하기 위하여 두 가지의 parameter를 Fig. 3에서와 같이 나타내었다. 그 결과 크롬을 환원시킬 수 있는 능력이 뛰어난 균주라고 해서 반드시 크롬에 대한 내성이 탁월하지는 않았으며, 크롬내성이 높더라도 크롬환원능이 낮은 경우가 있는 것으로 나타났다. 만약 크롬을 환원시킴으로써 크롬에 대한 내성을 획득하는 기작이 크롬에 대한 주된 내성 기작이라면 Fig. 3에서 두 가지 parameter간에 명확한 음의 상관관계를 관찰할 수 있었을 것이나 본 실험의 결과는 회귀직선을 그렸을 때 유의한 수준에서 거의 상관관계가 없는 것으로 계산되었다( $r^2=0.01$ ). 이러한 결과는 그 동안 막연하게 추정되어 왔던 크롬의 환원이 크롬내성을 제공한다는 가정



**Fig. 3.** Correlation of Cr(VI) reduction with Cr(VI) resistance. Regression analysis showed no significant relationship ( $r^2=0.01$ ) between the two phenomena, suggesting that the Cr(VI) resistance is not dependent solely on Cr(VI) reduction.

을 부인해 주는 결과이다.

본 연구에서 무작위로 분리된 20종의 균주 중 크롬을 전혀 환원시키지 못하는 균주가 발견되지 않은 것은 특이한 결과이다. 이는 대부분의 연구에서 크롬환원능의 측정을 batch culture를 통하여 확인하였으나 본 연구에서는 washed cell suspension을 사용한 때문으로 사료된다. 즉 batch culture를 통하여 크롬환원을 측정하는 경우에는 만약 주어진 균주가 크롬에 대하여 매우 민감하거나 내성이 전혀 없다면 성장이 불가능하므로 biomass의 부족으로 당연히 크롬을 환원시키지 않는 것으로 판정될 수 있다. 그러나 본 연구에서는 충분한 양의 biomass를 크롬이 없는 배지에서 생성시킨 후 washed cell suspension을 제조하여 크롬을 첨가했을 때 환원정도를 조사하였으므로 두 가지 parameter에 대한 정확한 상호비교가 가능하였다. 한편 모든 균주에서 정도의 차이는 있으나 어느 정도의 크롬환원능력을 지니고 있다는 사실, 특히 크롬오염이 없는 토양에서 분리된 균주들도 크롬을 환원시킬 수 있다는 결과는 크롬의 환원이 특정한 크롬환원효소에 의해서가 아니라 세포내의 필수 대사과정에 관여하는 환원효소에 의하여 촉매될 수 있다는 가능성을 제시하여 준다. 이러한 가능성은 본 연구에서의 크롬환원 유도여부에 관한 실험에서도 동일하게 나타나고 있다.

크롬의 환원은 수용성의 크롬(VI)을 불용성의 크롬(III) 수산화물로 변화시키므로 매립지나 토양으로부터 침출되어 수계로 유입될 가능성이 현저히 낮아지게 된다(12). 그러므로 크롬(VI)의 환원은 상대적으로 크롬(VI)에 의한 환경독성을 저감시키는 과정이다. 따라서 이러한 과정은 크롬오염 토양의 복원기술로 쓰일 높은 가능성이 있으며 이에 대한 기초적인 연구들이 수행되어져 왔다(11, 13, 20, 21, 25). 이 기술의 관건은 효율이 높은 크롬환원능을 지니는 균주의 분리인데 본 연구의 결과를 토대로 할 때 크롬에 높은 내성을 지니면서 높은 크롬환원능을 동시에 지니는 균주는 어느 한 가지 screening 방법으로는 확인할 수 없다는 결과를 제시하여 주며 이러한 결과는 bioremediation을 통한 크롬오염 토양의 복원기술 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

### 크롬환원의 유도여부

크롬에 대한 세균의 내성은 종종 plasmid에 그 정보가 저장되어 있어 크롬에 노출되었을 때 유도되는 특징을 나타낸다(23). 본 연구에서는 크롬의 환원이 constitutive한 형질인지 혹은 크롬내성과 마찬가지로 유도될 수 있는 형질인지를 확인하고자 하였다. 이를 위하여 분리된 20종의 균주 중 크롬환원능이 비교적 높은 균주(UC-5)와 낮은 균주(CC-10)를 각각 크롬이 존재하는 배지에서 10회간 계대배양하고 크롬이 없는 배지에서 동일하게 배양한 대조군과 비교하였다 (Fig. 4). 그 결과 두 균주에서 모두 크롬에 노출시킨 경우와 그렇지 않은 경우가 크롬환원능에 있어서 reduction rate와 lag period의 존재에서 전혀 차이가 나지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 크롬의 환원이 constitutive하게 발현되는 형질임을 제시하며 나아가 크롬의 환원에 관여하는 환원효소는 크롬을 primary substrate로 하지 않고 세포내에서 다른 기능을 담당하는 효소에 의한 2차적인 반응임을 짐작할 수

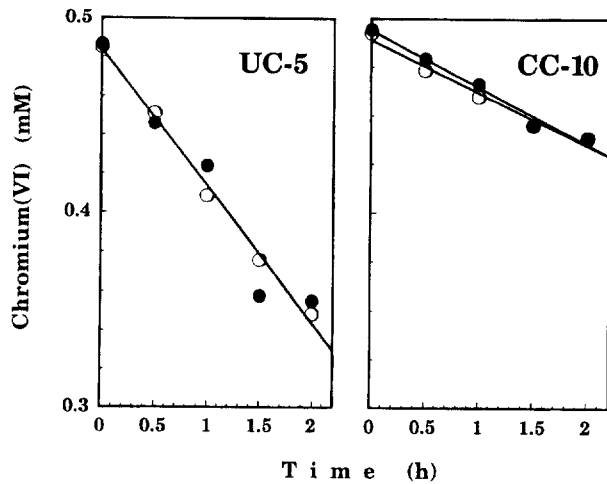


Fig. 4. Inducibility of Cr(VI) reducing capabilities tested with two selected strains(UC-5 and CC-10). There were no significant differences in terms of both reduction rates and duration of lag period between pre-exposed (○) and unexposed (●) to Cr(VI). Thus, Cr(VI) reducing capabilities are constitutively expressed properties. It may be that Cr(VI) reductase activity is a secondary feature of a reductase with a primary role that is not yet identified.

있다. 이러한 추측은 제한된 숫자의 다른 연구에서도 보고된 바가 있으나(4, 17) 자연계로부터 분리한 균주들을 대상으로 연구되기는 최초이다.

본 연구는 주요 환경오염물질 중의 하나인 중금속 크롬과 세균의 상호관계에 있어서 크롬에 대한 내성이 크롬의 환원반으로 획득되는 형질이 아님을 증명하였으며 앞으로의 연구에서는 크롬을 환원시키는 환원효소의 분리정제 및 primary substrate를 확인하는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 이러한 연구를 통하여 궁극적으로는 현재 날로 심화되고 있는 중금속에 의한 토양오염을 회복시키는 bioremediation 기술에 기초자료로 응용될 수 있을 것이다.

### 감사의 말

본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(식물환경과학: 농95-4)에 의하여 연구되었습니다.

### 참고문헌

1. APHA-AWWA-WEF. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed. American Public Health Association. Washington, D.C.
2. Bartlett, R.J. 1991. Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods. *Environ. Health Perspect.* **92**, 17-24.
3. Bergan, T. and K. Sorheim. 1984. Gas-liquid chromatography for the assay of fatty acid composition in gram-negative bacilli as an aid to classification. *Methods Microbiol.* **15**, 345-362.
4. Bopp, L.H. and H.L. Ehrlich. 1988. Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300.

5. Bopp, L.H., A.M. Chakrabarty and H.L. Ehrlich. 1983. Chromate resistance plasmid in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* **155**, 426-431.
6. Burg, R.V. and D. Liu. 1993. Toxicological update: chromium and hexavalent chromium. *J. Appl. Toxicol.* **13**, 225-230.
7. Cervantes, C. 1991. Bacterial interactions with chromate. *Antonie van Leeuwenhoek* **59**, 229-233.
8. Cervantes, C., H. Ohtake, L. Chu, T.K. Misra and S. Silver. 1990. Cloning, nucleotide sequence and expression of the chromate resistance determinant of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pUM505. *J. Bacteriol.* **172**, 287-291.
9. Cervantes, C. and S. Silver. 1990. Inorganic cation and anion transport systems of *Pseudomonas*. p 359-372. In S. Silver, A.M. Chakrabarty, B. Iglewski and S. Kaplan (ed). *Pseudomonas: Biotransformations, pathogenicity and evolving biotechnology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
10. Efstathiou, J.D. and L.L. McKay. 1977. Inorganic salts resistance associated with a lactose-fermenting plasmid in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **13**, 257-265.
11. Fujii, E., K. Toda and H. Ohtake. 1990. Bacterial reduction of toxic hexavalent chromium using a fed-batch culture of *Enterobacter cloacae* strain HO1. *J. Ferment. Bioeng.* **69**, 365-367.
12. Gadd, G.M. and C. White. 1993. Microbial treatment of metal pollution- a working biotechnology. *Trends Biotechnol.* **11**, 353-359.
13. Gopalan, R. and H. Veeramani. 1994. Studies on microbial chromate reduction by *Pseudomonas* sp. in aerobic continuous suspended growth cultures. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 471-476.
14. Horitsu, H., S. Futo, K. Ozawa and K. Kawai. 1983. Comparison of characteristics of hexavalent chromium-tolerant bacterium, *Pseudomonas ambigua* G-1, and its hexavalent chromium-sensitive mutant. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 2907-2908.
15. Horitsu, H., S. Futo, Y. Miyazawa, S. Ogai and K. Kawai. 1987. Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2417-2420.
16. Imai, A. and E.F. Gloyna. 1990. Effects of pH and oxidation state of chromium on the behavior of chromium in the activated sludge process. *Wat. Res.* **24**, 1143-1150.
17. Ishibashi, Y., C. Cervantes and S. Silver. 1990. Chromium reduction in *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2268-2270.
18. Katz, S.A. 1991. The analytical biochemistry of chromium. *Environ. Health Perspect.* **92**, 13-16.
19. Katz, S.A. and H. Salem. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl. Toxicol.* **13**, 217-224.
20. Komori, K. A. Rivas, K. Toda and H. Ohtake. 1990. A method for removal of toxic chromium using dialysis-sac cultures of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 117-119.
21. Komori, K. A. Rivas, K. Toda and H. Ohtake. 1990. Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic

- conditions. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 951-954.
22. **Luli, G.W., J.W. Talnagi, W.R. Strohl and R.M. Pfister.** 1983. Hexavalent chromium-resistant bacteria isolated from river sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**, 846-854.
  23. **Nies, D.H. and S. Silver.** 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* **171**, 896-900.
  24. **Ohtake, H., C. Cervantes and S. Silver.** 1987. Decreased chromate uptake in *Pseudomonas fluorescens* carrying a chromate resistance plasmid. *J. Bacteriol.* **169**, 3853-3856.
  25. **Ohtake, H., E. Fujii and K. Toda.** 1990. Reduction of toxic chromate in an industrial effluent by use of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Environ. Technol.* **11**, 663-668.
  26. **Petrilli, F.L. and S. De Flora.** 1977. Toxicity and mutagenicity of hexavalent chromium on *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 805-809.
  27. **Saleh, F.Y., T.F. Parkerton, R.V. Lewis, J.H. Huang and K.L. Dickson.** 1989. Kinetics of chromium transformations in the environment. *Sci. Total Environ.* **86**, 25-41.
  28. **Shupack, S.I.** 1991. The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ. Health Perspect.* **92**, 7-11.
  29. **Summers, A.O. and G.A. Jacoby.** 1978. Plasmid-determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **13**, 637-640.
  30. **Urone, P.F.** 1955. Stability of colorimetric reagent for chromium, *s*-diphenylcarbazide, in various solvents. *Anal. Chem.* **27**, 1354-1355.
  31. **Wetterhahn, K.E. and J.W. Hamilton.** 1989. Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity: effect on gene expression. *Sci. Total Environ.* **86**, 113-129.

(Received April 30, 1997/Accepted June 15, 1997)

---

#### ABSTRACT: A Comparison between Bacterial Cr(VI) Resistance and Cr(VI) Reduction among Environmental Isolates

**Young-Sook Oh and Sung-Chan Choi\*** (Department of Environmental Science, College of Natural Sciences, Hallym University, Chunchon, Kangwon 200-702, Korea)

Microbial reduction of hexavalent(VI) to trivalent(III) chromium is regarded as one of the mechanisms that confers resistance to bacteria. In order to verify this hypothesis, we compared Cr(VI) resistance with Cr(VI) reduction among 20 phenotypically distinct environmental isolates from Cr-contaminated and uncontaminated soils. With glucose as an electron donor, Cr(VI) reduction by washed cell suspensions ranged from 0.014 to 0.305 mM Cr(VI) reduced h<sup>-1</sup>. Cr(VI) resistance of the isolates were measured by growth inhibitions on a liquid medium containing 2 mM Cr(VI) based on their decrease of A<sub>630</sub> as compared to the controls without Cr(VI). The isolates had a broad range of resistance from no inhibition to 93.4% inhibition of their growth. Upon correlation analysis, there was no significant relationship between those two phenomena. At a population level, a comparison of % resistant viable counts among the Cr-contaminated and uncontaminated soils showed 19.1% and 0.4% of their total viable counts, respectively. The difference of % resistance between two sites strongly suggested that the Cr(VI) present in the soils influences natural selection for resistant phenotypes. However, it is unlikely that the Cr(VI) resistance is dependent solely on the reduction as judged by the correlation analysis.