

대전 지역의 공단 폐수에서 분리한 수은과 카드뮴 내성 세균 의 분리 및 특성

유경만 · 전희근 · 박준봉* · 이인수* · 박진숙* · 하남주** · 박용근
고려대학교 생명공학원 · *한남대학교 미생물학과 · **삼육대학교 약학과
(1996년 6월 3일 접수)

Isolation and Characterization of Mercury- and Cadmium- Resistant Bacteria isolated from an Industrial Complex Wastewater of Taejon Area

Kyung-Man You, Hee-Keun Jeun, Joon-Bong Park*, In-Soo Lee*,
Jin-Sook Park*, Nam-Ju Hah**, and Yong-Keun Park
Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul, 136-701, Korea
*Dept. of Microbiology, Hannam University, Taejon, 300-791, Korea
**Dept. of Pharmacy, Sahmyook University, Seoul, Korea
(Manuscript received 3 June 1996)

Mercury- and cadmium-resistant bacteria were isolated from an industrial complex wastewater of Taejon area. All of them were motile, gram negative rods. In the results of physicochemical test and VITEK card test, HM1 was identified with *Acinetobacter calcoaceticus*, CM3 was identified with *Comamonas acidovorans*, HM2, HM3, CM1, and CM4 were *Pseudomonas* sp., but HM4 and CM2 were unidentified. They were tested for susceptibility to 14 heavy metals. Mercury-resistant bacteria(HM1, HM2, HM3, and HM4) were sensitive to low concentration(100~400ppm) of Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , and Ni^{2+} , while cadmium-resistant bacteria(CM1, CM2, CM3, and CM4) showed resistance up to the high concentration(600~1,200ppm) of these metal ions. As a result of resistance spectrum test of mercury-resistant bacteria, HM1 was broad-spectrum strain, HM2, HM3, and HM4 were narrow-spectrum strains. Transmission electron microscopic examination of cell wall of HM1 culture grown with and without 100ppm of $HgCl_2$ showed remarkably morphological abnormalities. In the result of atomic absorption spectrometric analysis of cadmium-resistant bacteria grown at 200ppm of $CdCl_2$ for 6h, all of them accumulated cadmium(14ppm~57ppm) in cell. In cadmium-resistant bacteria, CM1, CM2, and CM4 were spared from the inhibitory effect of Cd^{2+} by the addition of Mn^{2+} , CM4 were also spared from the inhibitory effect of Cd^{2+} by the addition of Mn^{2+} as well as Zn^{2+} .

Key words : mercury-resistant bacteria, cadmium-resistant bacteria, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Comamonas acidovorans*.

1. 서론

중금속(heavy metal)은 심해저의 용암분출구, 온천지역, 화산토양과 같은 특수한 환경에 다량 축적되어 있는 경우를 제외한 대부분의 자연환경에는 매우 낮은 농도로 존재하는 것으로 알려져 있다(Summers & Silver, 1978). 그러나 중화학 공업을 비롯한 활발한 산업활동을 통해 지구의 자정작용으로 순환 가능한 양을 훨씬 초과하여 자연환경에 방출 및 축적됨으로써 생태계의 직접 혹은 잠재적 파괴 요인이 되고 있다(Duxbury, 1981). 예를 들면 수은(Hg²⁺)의 경우는 기압계, 압력계, 정류기, 온도계, 항균제, 건전지 등에, 카드뮴(Cd²⁺)의 경우는 플라스틱과 페인트의 색소제, 철의 부식방지제, 소독제, 건전지 등에 필수적인 요소로써 사용되고 있으며 특히 수은의 경우 연간 산업활동을 통해 2~7×10⁴톤이 생물권으로 유입, 축적되는 것으로 추정되고 있다(Beveridge & Doyle, 1989; Trevors et al., 1985).

중금속으로 취급될 수 있는 자연 원소는 65종의 원소가 있으며, 미량원소로 생명체에 필수적인 철, 구리, 코발트, 아연 등의 중금속들도 있는 반면에, 미생물과 동·식물에 대해 강한 독성을 나타내는 카드뮴, 수은, 납 등의 독성중금속(toxic heavy metal)도 있다(Duxbury, 1985). 독성중금속은 생명체에 생장저해, 세포의 형태변이, 생화학적 활성의 변화요인 등에 직·간접적으로 작용하며, 이러한 중금속이 자연계에 지속적으로 유입, 축적됨으로써 독성환경이 형성되어서 결국 생명체가 생존과 성장을 위한 다양한 내성기작을 획득하여 중금속내성 세균이 출현하게 된다(Chakrabarty, 1976; Foster, 1983; Kondo et al., 1974; Summers & Silver, 1972).

현재 중금속 내성기작은 유전적으로 밝혀지고 있으며(Tynecka et al., 1981), 여러 종류의 세균들이 중금속에 내성을 지닌 것으로 알려져 있다. 특히 수은의 경우 *Staphylococcus* 속과 *Bacillus*속 세균을 비롯한 여러 종의 그람양성 세균들과 *Escherichia coli*와 *Pseudomonas*속 등 다수의 그람음성 세균들이 수은내성 세균들로 밝혀졌다(Clark et al., 1977; Misra, 1992; Olson et al., 1979; Robinson & Tuovinen, 1984; Silver, 1992;

Silver & Walderhaug, 1992; Summers & Sugarman, 1974; Tonomura & Kanzaki, 1969; Vaituzis et al., 1975). 카드뮴의 경우에는 *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Alcaligenes* sp. *Pseudomonas aeruginosa*, 그리고 *Staphylococcus aureus* 등이 카드뮴내성 세균으로 밝혀졌으며(Higham et al., 1984; Mcentee et al., 1986; Novick & Roth, 1968), *S. aureus*의 경우 *cadA* 유전자를 함유한 카드뮴내성 플라스미드가 있어서 에너지 소모성 efflux system으로 해독작용이 이루어지는 것으로 알려져 있다(Kondo et al., 1974; Novick & Roth, 1968; Tynecka et al., 1981). 또한 망간(Mn²⁺)의 transport system을 통해 카드뮴이 세포내로 유입되는 현상도 밝혀지는 등(Weiss et al., 1978) 유전자 수준에서도 많은 연구가 이루어져 왔으나, 국내의 경우 중금속내성 세균의 분리와 중금속 내성기작에 관한 연구가 상당히 미흡한 실정이며, 여러 종류의 중금속내성 세균의 확보와 그에 상응하는 세균의 특성연구가 요구되어지는 것으로 사료된다.

따라서 본 연구는 각종 환경 유해물질의 축적이 가능한 공단 폐수로부터 중금속 중에서도 특정유해물질로 분류된 수은과 카드뮴에 내성을 가진 세균을 분리하여 생리생화학적인 방법을 이용하여 동정하고, 이들에 대한 분자생물학적 연구를 위한 기초적인 특성을 밝히고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 사용균주 및 배지

본 연구에 사용한 수은과 카드뮴내성 세균인 총 8균주는 각종 공장들이 밀집되어 있는 대전 지역의 대화공단 폐수로부터 분리하였다. 세균의 분리와 형태 및 생리생화학적 특성, 그리고 각종 중금속에 대한 내성조사에 nutrient broth(NB) 배지를 사용하였으며, 또한 세균의 생리생화학적 특성조사를 위하여 MacConkey 배지와 MR-VP 배지 및 triple sugar iron(TSI) 배지를 사용하였다.

2.2 세균의 분리

시료를 채취하여 동량의 0.85% saline 용액을 첨가하여 진탕한 후 상온에서 20분간 정체를

대전 지역의 공단 폐수에서 분리한 수은과 카드뮴내성 세균의 분리 및 특성

시켰다. 상층액을 수은과 카드뮴이 각각 100ppm과 200ppm이 첨가된 NB 배지에 첨가시켜 30℃에서 48시간 동안 배양하여 세균을 분리하였다.

2.3 세균의 형태, 그람염색 및 운동성 관찰

수은과 카드뮴내성 세균의 형태 및 그람염색은 Bartholomew의 방법(Bartholomew, 1962)을 따랐으며, 대조균주로 그람양성 세균의 경우 *B. subtilis*를 사용하였으며, 그람음성 세균으로는 *E. coli*를 사용하였다. 운동성 관찰은 균주들을 30℃에서 4시간 배양한 후 hanging drop법으로 관찰하였다.

2.4 혐기성 성장 시험

분리된 세균의 혐기적 조건에서의 성장여부를 관찰하기 위하여 우선 각 세균들을 수은과 카드뮴이 첨가되지 않은 배지에 접종한 후, CO₂ gas pack과 indicator, 그리고 catalyst가 장치된 anaerobic jar에 넣어 30℃에서 24시간 배양하여 성장유무로 통성혐기성 및 편성호기성 세균으로 구분하였다.

2.5 Catalase 및 Oxidase 시험

Catalase 시험은 30℃에서 24시간 배양한 신선한 균체를 깨끗한 슬라이드글라스에 옮겨 3%의 과산화수소를 1~2방울 적하한 후, 기포가 발생하는 것을 양성으로 판정하였다. 양성 대조균주는 *E. coli* K12를 사용하였다. Oxidase 시험은 균체를 깨끗한 filter paper에 옮긴 후, 여기에 tetramethyl-phenylene diamine dihydro chloride를 1~2방울 적하한 후, pink-maroon 또는 black으로 변색되는 세균을 양성으로 간주하였다.

2.6 MR-VP 시험

Glucose와 dipotassium phosphate가 첨가된 MR-VP 배지에 균체를 배양한 후, 배양액을 적당량으로 나누어 하나의 배양액에는 methyl red 용액을 5방울 적하하여 붉은색으로 변색되는 배양액을 양성으로 하였다. 다른 하나의 배양액에는 acethylmethylcarbinol 생성능을 알아보기 위하여 Barritt's 반응액을 10방울 첨가하고, 15분 후 분홍색의 환을 형성하는 배양액을 양성으로 판정하였다.

2.7 Nitrate 환원 시험

pH7.0으로 조정된 배지에 세균을 접종하여 배양한 후, 이 배양액에 0.5%의 α -naphthylamine, 0.8% sulfanilic acid, 그리고 zink등을 처리하여 기포의 생성유무를 관찰하여 판정하였다.

2.8 Starch, Casein 및 Gelatine 가수분해 시험

Starch 가수분해 시험으로는 배지에 1%의 potato starch를 첨가하여 세균을 배양한 후, gram iodine 용액을 적하하여 투명대를 형성한 것을 양성으로 하였다. Casein 가수분해 시험으로는 tryptone과 10%의 skim milk를 첨가하여 만든 배지에 세균을 배양한 후 투명대를 형성한 것을 양성으로 하였다. Gelatine 가수분해 시험을 위해서는 15%의 gelatine을 첨가한 액체배지에서 세균을 배양한 후 4℃에서 30분간 방치한 후 액화된 것을 양성으로 판정하였다.

2.9 Haemolysis 시험

양의 혈액이 첨가된 배지에 세균을 접종하여 배양한 후, 생성된 세균집락 주위에 녹색의 투명대가 생성된 것을 β -haemolysis, 맑은 투명대가 생성된 것을 α -haemolysis, 그리고 투명대가 생성되지 않은 것을 γ -haemolysis로 판정하였다.

2.10 Citrate 이용능 시험

0.1% ammonium dehydrogen phosphate, 0.1% dipotassium phosphate, 0.2% sodium citrate, 그리고 0.008% bromothymol blue를 첨가한 배지에 세균을 배양한 후, 배지를 푸른색으로 변색시키는 세균을 양성으로 판정하였다.

2.11 수은과 카드뮴내성 세균의 동정

분리된 수은과 카드뮴내성 세균을 생리생화학적 결과를 기초로 하여 Bergey's manual of determinative bacteriology(Holt et al., 1994)와 VITEK GNI card(VITEK Systems)를 이용하여 동정을 시도하였다.

2.12 중금속에 대한 감수성 조사

Table 1. Phenotypic characteristics of mercury- and cadmium-resistant bacteria

Characteristic	Hg ^r bacteria				Cd ^r bacteria			
	HM1	HM2	HM3	HM4	CM1	CM2	CM3	CM4
Gram stain	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape	short rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Strictly aerobes	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	-	+	+	+	+	+	+	+
Indole	-	-	-	-	+	-	-	-
Methyl-red	+	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrate	+	+	-	+	+	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-
Casein hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-
MacConkey media growth	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose fermentation	-	-	+	-	-	-	-	-
TSI media growth	Alk/Ac	Alk/Ac	Alk/Ac	Alk/Ac	Al/Al	Al/Al	Al/Al	Al/Al
H ₂ S production	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	+	-	+	+	+	+	+
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
Haemolysis	γ	β	γ	β	α	α	γ	α

+, negative reaction; -, positive reaction. α , α -haemolysis; β , β -haemolysis; γ , γ -haemolysis.

중금속에 대한 감수성을 조사하기 위한 각 중금속의 농도는 최소 100ppm부터 시작하여 최고 2000ppm까지 조정하여 측정하였다. 결과는 세균을 접종한 후 30℃에서 1~3일동안 관찰하고, 육안으로 생장여부를 확인하여 감수성의 정도를 결정하였다. 또한 수은내성 세균에 대한 spectrum resistance를 조사하기 위하여 무기수은 화합물로서 mercuric chloride(HgCl₂)를, 유기수은 화합물로서는 phenyl mercuric acetate(PMA)를 각각 사용하였다.

2.13 투과전자현미경 관찰

수은 첨가에 따른 세포의 변화를 알아보기 위하여 100ppm의 농도로 HgCl₂를 첨가한 10ml의 액체배지에서 세균을 배양한 후, 5000rpm에서 10min동안 원심분리하여 균체를 얻었다. 이 세균세포들은 paraformaldehyde-glutaraldehyde와 OsO₄로 전고정 및 후고정을 하고 단계적 아세톤 탈수과정을 거친 후, epon-812 혼합액에 포매하여 60℃에서 3일간 중합반응시키고, ultramicrotome (LKB2088)을 사용하여 은색박편을 제작하였다. 제작한 박편은 동 grid에 부착하여 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하

고, vacuum evaporator(JEE-4X)를 사용하여 탄소코팅을 수행한 후, 투과전자현미경(TEM, Jeol-100S)으로 관찰하였다.

2.14 균체내의 카드뮴 축적량 측정

카드뮴이 200ppm 첨가된 배지에서 세균을 접종하여 24시간 배양한 후, 배양액을 원심분리하여 침전된 균체를 3차 멸균증류수로 다시 3번 원심분리하여 세척하였다. 이 균체를 3차 멸균증류수에 녹여 ultrasonicator(Branson Sonifier 450)로 15분간 초음파 처리하여 투명해진 균체를 100배 희석한 후, 시료로 사용하여 atomic absorption spectrometer(AAS, Varian SpectraA 300/400 System)로 균체내의 축적된 카드뮴의 양을 측정하였다. 대조구로는 카드뮴을 첨가하지 않은 NB 배지를 사용하였다.

2.15 중금속에 대한 성장량 조사

30℃에서 전배양한 배양액을 카드뮴, 망간, 코발트, 그리고 아연이 첨가된 5ml의 동일배지에 1/100의 농도로 접종한 후, 진탕배양(150rpm)하여 6시간 뒤에 성장량을 측정하였다. 성장량을 측정하는 기구는 spectrophotometer (Milton Roy Company, SPECTRONIC 20)를

Table 2. Susceptibility of various heavy metals for mercury- and cadmium-resistant bacteria

Bacterial strains	Heavy metal concentration(×100ppm)													
	Hg	Cd	Mn	Co	Zn	Ni	Li	Cr	Cu	Ce	Mo	Pb	Se	U
Hg ^r bacteria														
HM1	3	0	11	2	4	4	20	3	0	13	12	12	10	10
HM2	2	0	8	0	0	0	20	1	2	13	8	10	10	6
HM3	2	0	8	0	0	0	20	0	2	13	10	10	10	8
HM4	2	0	8	0	0	2	20	1	2	13	8	8	10	8
Cd ^r bacteria														
CM1	0	6	20	12	10	10	20	0	2	13	12	12	10	8
CM2	0	7	20	12	10	10	20	0	2	10	12	12	10	10
CM3	1	9	18	6	10	2	20	1	6	10	12	12	4	8
CM4	0	7	18	6	8	0	20	0	2	13	8	8	4	8

Hg, mercury chloride; Cd, cadmium chloride; Mn, manganese sulfate; Co, cobalt chloride; Zn, zinc chloride; Ni, nickel chloride; Li, lithium chloride; Cr, potassium dichromate; Cu, cupric sulfate; Ce, cesium chloride; Mo, molybdic acid; Pb, lead nitrate; Se, sodium selenite; U, uranyl nitrate.

사용하였고 600nm 파장에서 optical density를 측정하여 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 수은과 카드뮴내성 세균의 형태, 그람염색, 운동성 및 생리생화학적 특성

대전 지역의 대화공단 폐수로 부터 Hg²⁺와 Cd²⁺에 내성을 보이는 세균을 각각 4균주씩 총 8균주를 분리하여 형태, 그람염색, 운동성 및 생리생화학적 특성을 조사하여 Table 1에 나타내었다. 분리된 수은과 카드뮴내성 세균들은 구균에 가까운 구간균인 HM1을 제외한 모든 세균들이 그람음성의 간균으로 모두 활발한 운동성을 보이는 편성호기성으로 나타났다. Oxidase 반응시 HM1을 제외한 모든 세균들이 양성으로 나타났으며, Indole 생성능에서는 CM1을 제외한 모든 세균들에서 음성으로 나타났다. Methyl red의 경우는 HM1 균주가 양성반응을 보인 반면 나머지 세균들에서는 음성반응으로 나타났다. 그리고 분리된 모든 세균들에서 catalase 양성반응을 보였으며, MacConkey 배지에서 모두 성장하였으나 유일하게 HM2 균주만이 lactose를 fermentation함으로써 붉은색 세균 집락을 형성하였다. TSI 배지에서의 성장 결과, 모든 세균들에서 배양시험관의 상부는 알칼리로, 하부는 변화가 일어나지 않는 결과를 얻었으며, 이와 함께 H₂S 생성능이 없는 동일한 결과를 얻었다. 또한 V-P 시험, urease 시험, casein과

starch 가수분해 시험에서도 모두 음성반응으로 나타났다. 본 연구에서 분리한 총 8균주의 수은과 카드뮴내성 세균은 모두 그람음성의 세균으로 판명되어, 그람양성 세균보다 그람음성 세균이 수은과 카드뮴에 내성이 강한 것으로 나타났다. 이러한 생리생화학적 특성과 VI-TEK systems을 이용하여 최종적으로 이 균주들의 동정을 실시한 결과, HM1은 *Acinetobacter calcoaceticus*로, CM3은 *Comamonas acidovorans*로, HM2, HM3, CM1, 그리고 CM4는 모두 *Pseudomonas*속으로 동정되었지만, HM4와 CM2는 동정되지 못하였다.

3.2 수은과 카드뮴내성 세균의 중금속에 대한 감수성 조사

분리한 수은과 카드뮴내성 세균들을 대상으로 중금속에 대한 감수성 조사 결과를 table 2에 제시하였다. 총 14종의 중금속 중에서 모든 세균이 400ppm 이상의 높은농도에서 생장이 가능한 세슘, 리튬, 망간, 몰리브덴, 납, 세레늄, 그리고 우라늄과 같은 중금속들과 특정 세균에 대해서 100ppm 이상의 고농도에서 내성을 보이거나 100ppm 미만의 저농도에서 감수성을 나타내는 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리, 수은, 니켈, 그리고 아연과 같은 중금속들로 나누어지는 결과를 얻었다. 또한 일반적으로 독성이 강한 것으로 알려져 있는 납에 대하여 모든 균주들이 강한 내성을 지니고 있어, 이에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다. 특

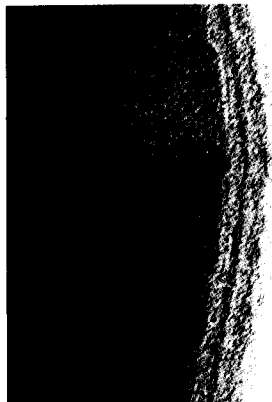
Table 3. Resistance patterns for inorganic mercuric and organomercurial compound in mercury-resistant bacteria

Bacterial strains	Mercury resistance		Resistant spectrum
	HgCl ₂ (200) ^a	PMA(100)	
Acinetobacter calcoaceticus HM1	+	+	Broad
Pseudomonas sp. HM2	+	-	Narrow
Pseudomonas sp. HM3	+	-	Narrow
Unidentified gram-negative rod HM4	+	-	Narrow

^aNumbers in parentheses are final concentration(ppm), after addition to NB agar. +, growth; -, no growth. HgCl₂, mercury chloride; PMA, phenylmercuric acetate.



(a)



(b)

Fig. 1. Transmission electromicrograph of *Acinetobacter calcoaceticus* HM1 cell wall.

(a) Normal cell($\times 160000$) (b) Cell exposed to 100ppm of Hg²⁺ for 12h($\times 160000$)

징적인 것은 수은내성 세균은 카드뮴, 코발트, 아연, 니켈에 감수성을 보이는 반면, 카드뮴내성 세균은 이러한 중금속들에 대하여 높은 내성능을 보였다. 이와 같은 현상은 아마도 Hg²⁺와는 다르게 Cd²⁺의 세포내 유입은 *Alcaligenes eutrophus*(Nies & Silver, 1989)처럼 코발트, 아연, 니켈 등의 transport system을 이용하거나 아니면 서로 밀접한 상호관계가 있을 것으로 여겨진다.

3.3 수은내성 세균의 내성 spectrum 조사

일반적으로 무기수은에서만 내성을 지닌 세균을 narrow-spectrum 균주라고 하고, 무기수은 뿐만 아니라 유기수은에서도 내성을 지닌 세균을 broad-spectrum 균주라고 한다(Clark *et al.*, 1977; Misra, 1992; You *et al.*, 1995). 분리한 수은내성 세균의 내성 spectrum을 조사하기 위하여 무기수은 화합물로는 HgCl₂를 사용하였고, 유기수은 화합물로는 PMA를 사용하였다. 그 결과 HM2, HM3, 그리고 HM4 균주는 narrow-spectrum resistance를 나타내었고, 반면에 HM1 균주는 broad-spectrum resistance를 나타내었다(Table 3). 세균들의 수은 내성능은 플라스미드(plasmid)에 의해 결정되어지는 경우가 많아(Clark *et al.*, 1977; Foster, 1983; Kondo *et al.*, 1974; Silver, 1992), 분리한 4균주를 agarose gel 전기영동을 통해 플라스미드를 분리한 결과, HM1 균주에서 2개의 플라스미드가 존재하였지만 acridine orange로 처리하여 플라스미드를 제거하였는데도 여전히 카드뮴 300ppm에 대하여 내성능을 나타내었다. HM2, HM3, 그리고 HM4 균주에서는 플라스미드가 전혀 발견되지 않아 이 균주들의 수은에 대한 내성인자는 염색체 상에 존재하여 카드뮴에

대전 지역의 공단 폐수에서 분리한 수은과 카드뮴내성 세균의 분리 및 특성

Table 4. The accumulated concentration of cadmium in cadmium-resistant bacteria

Bacterial strains	Concentration($\times 100\text{ppm}$)	Mean Absorbance
Nutrient broth(control)	0.00	-0.003
<i>Pseudomonas</i> sp. CM1	0.14	0.042
Unidentified gram-negative rod CM2	0.45	0.126
<i>Comamonas acidovorans</i> CM3	0.57	0.157
<i>Pseudomonas</i> sp. CM4	0.47	0.131

Cadmium-resistant bacteria were cultured in NB supplemented with 200ppm CdCl_2 at 30°C. The accumulated concentration of cadmium can be measured by AAS after 12h.

Table 5. Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} sparing of growth inhibition by Cd^{2+}

Bacterial strains	Increase or decrease in optical density at 600nm				
	NB	NB+ Cd^{2+}	NB+ Cd^{2+} + Mn^{2+}	NB+ Cd^{2+} + Co^{2+}	NB+ Cd^{2+} + Zn^{2+}
<i>Pseudomonas</i> sp. CM1	0.76	0.083	0.15	0.05	0.055
Unidentified gram-negative rod CM2	0.85	0.11	0.21	0.062	0.17
<i>Comamonas acidovorans</i> CM3	0.79	0.145	0.037	0.02	0.039
<i>Pseudomonas</i> sp. CM4	0.91	0.108	0.13	0.039	0.041

Cd^{2+} , 10ppm; Mn^{2+} , 25ppm; Co^{2+} , 15ppm; Zn^{2+} , 15ppm; incubation time, 6h.

대한 내성을 극복할 수 있도록 균체에 영향을 주는 것으로 판단된다.

3.4 수은 첨가에 따른 세포벽의 변화 관찰

HgCl_2 를 첨가한 배지에서 배양되어진 세포를 TEM으로 관찰한 결과, 수은을 첨가한 배지에서 배양되어진 세포의 세포벽을 일반적인 세포의 세포벽과 비교해 볼 때, 상당한 형태적 변이를 보였다(Fig. 1). 이러한 결과로 미루어 중금속에 대한 내성 또는 적응을 지닐 수 있는 방법의 일환으로 세포의 불투과성을 증가시켜 중금속이 세포내로 유입되는 것을 감소시키는 *B. subtilis* 168(Richard et al., 1985)에서 처럼 HM1 균주도 toxic mercury의 세포내 유입을 막기 위하여 세포벽이 커다란 형태적 변화를 겪은 것으로 사료된다.

3.5 균체내의 카드뮴 축적량 조사

카드뮴 200ppm 첨가된 배지에서 자란 세균의 세포내에 카드뮴의 축적량을 정량분석하여 table 4에 제시하였다. 원자흡광도계로 측정된 결과, 분리한 4균주 모두 배지 중에 첨가된 카드뮴 200ppm 중 최저 14ppm에서 최고 57ppm까지 세포내로 축적하는 것으로 나타났다. 특히 CM1 균주를 제외한 CM2, CM3, 그리고 CM4 균주의 카드뮴 내성기작은 세포내로 카드뮴이 들어오는 것을 철저히 막는 기작이라기 보다는 세포내에 어느 정도는 카드뮴이 유입되어 세포내에 축적시키는 것으로

사료된다. 또한 분리한 4균주의 플라스미드 분리 결과, 모두 플라스미드가 없는 것으로 조사되어 카드뮴에 대한 내성기작이 *S. aureus*처럼 플라스미드상에 존재하는 내성인자에 의해 결정되어 지는 것이 아니고(Kondo et al., 1974; Tynecka et al., 1981), 염색체상의 내성인자에 의하여 이루어지는 것으로 판단된다.

3.6 카드뮴의 생장억제에 대한 망간, 코발트, 아연의 sparing

분리한 카드뮴내성 세균들의 생장은 Cd^{2+} 의 첨가에 의해 억제된다. 그러나 CM3 균주를 제외하고, CM1, CM2, 그리고 CM4 균주는 Cd^{2+} 의 존재시 일어나는 생장 억제효과로부터 Mn^{2+} 을 첨가하였을 때 약 1.2~1.9배까지 생장량이 증가하였다. 또한 CM2 균주의 경우 Mn^{2+} 뿐만 아니라 Zn^{2+} 의 첨가시에도 약 1.5배 정도 생장량이 증가하였다(Table 5). 이러한 결과는 지금까지 보고된 바 있는 *B. subtilis* (Laddaga et al., 1985), *S. aureus*(Perry & Silver, 1982), 그리고 *Lactobacillus plantarum*(Archibald & Duong, 1984) 같은 그람음성 세균들과 마찬가지로 CM1, CM2, 그리고 CM4 균주 역시 세포내로 카드뮴의 유입 경로가 Mn^{2+} 의 active transport system을 이용할 것으로 여겨진다. 그러나 CM3 균주는 망간, 코발트, 또는 아연의 첨가시 카드뮴의 생장 억제효과로부터 생장량이 증가하지 않았을 뿐만 아니라 오히려 생장량이 감소하는 결과를

보였다. 이러한 실험결과는 CM3 균주가 Mn^{2+} 의 transport system이 아닌 전혀 다른 system으로 카드뮴을 세포내로 축적한다는 것을 알려준다. 또한 이러한 사실은 CM3 균주가 분리한 균주들 중에서 가장 많은 양의 카드뮴을 세포내로 축적한다는 사실과도 무관하지 않을 것이다. 따라서 본 실험실에서 분리한 수은내성 세균과 카드뮴내성 세균은 수은과 카드뮴에 대하여 다양한 내성기작을 보이므로, 이들에 대한 지속적인 생태학적, 생리적, 그리고 유전적 특성이 밝혀진다면 산업폐수나 수질오염이 극심한 환경의 복원에 효율적인 균주개발이 이루어 질 수 있을 것이다.

4. 결 론

대전지역의 공단폐수로 부터 수은과 카드뮴에 내성을 지닌 균주들을 분리하였다. 이 균주들은 모두 운동성을 지녔고, 그람음성 간균들이었다. 생리생화학적 특성과 VITEK card test를 이용하여 이 균주들의 동정을 실시한 결과, HM1은 *Acinetobacter calcoaceticus*로, CM3은 *Comamonas acidovorans*로, HM2, HM3, CM1, 그리고 CM4는 모두 *Pseudomonas*속으로 동정되었지만, HM4와 CM2는 동정되지 못하였다. 총 14종류의 중금속에 대한 감수성 조사를 분리된 균주들에게 실시한 결과, 수은내성 세균들(HM1, HM2, HM3, 그리고 HM4)은 Cd^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} 의 저농도(100~400ppm)에서 감수성을 보인 반면, 카드뮴내성 세균들(CM1, CM2, CM3, 그리고 CM4)은 이 중금속들에 대하여 고농도(600~1,200ppm)에서도 강한 내성을 보였다. 수은내성 세균들의 내성 스펙트럼을 조사한 결과, HM1은 broad-spectrum 균주이었고, HM2, HM3, 그리고 HM4는 narrow-spectrum 균주들이었다. $HgCl_2$ 를 첨가하지 않은 배지에서 배양시킨 HM1과 $HgCl_2$ 의 100ppm이 첨가된 배지에서 배양시킨 HM1의 세포벽을 투과전자현미경으로 비교 분석한 결과, 현저한 형태적 차이를 보였다. 카드뮴내성 세균들을 $CdCl_2$ 의 200ppm이 첨가된 배지에서 6시간 동안 배양시켰을 때, 세포내에 Cd^{2+} 를 최소 14ppm에서 57ppm까지 축적하는 것으로 원자흡수광도계 분석 결과 밝혀졌다. 카드뮴내성 세균들 중에서, CM1, CM2, 그리고

CM4는 Mn^{2+} 의 첨가시 Cd^{2+} 의 생장억제효과로 부터 회복되었으며, 또한 CM4는 Mn^{2+} 뿐만 아니라 Zn^{2+} 의 첨가 시에서도 Cd^{2+} 의 생장억제효과로 부터 회복되었다.

감사의 글

이 논문은 교육부 기초과학 지원연구비(1996)로 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

- Archibald, F. S., and M. N. Duong, 1984. Manganese acquisition by *Lactobacillus plantarum*. J. Bacteriol. 158, 1-8.
- Beveridge, T. J., and R. J. Doyle, 1989. Metal ions and bacteria. Wiley Interscience.
- Bartholomew, J. W., 1962. Variables influencing results, and the precise definition of steps in gram staining as a means of standardizing the results obtained. Stain Technol. 37, 139-155.
- Chakrabarty, A. M., 1976. Plasmids in *Pseudomonas*. Annu. Rev. Genet. 10, 7-30.
- Clark, D. L., A. A. Weiss, and S. Silver, 1977. Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. J. Bacteriol. 132, 186-196.
- Duxbury, T., 1981. Toxicity of heavy metals to soil bacteria. FEMS Microbiology Let. 11, 217-220.
- Duxbury, T., 1985. in K. C. Marshall(ed). Advanced in Microbial Ecology. New York, Plenum Press. 185-235.
- Foster, T. J., 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. Microbiol. Rev. 47, 361-409.
- Higham, D. P., P. J. Sadler, and M. D. Scawen, 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. Science 225, 1043-1046.

- Holt, J. G., N. R. Krieg, P. Sneath, J. T. Staley, and S. T. Williams, 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Kondo, I., T. Ishikawa, and H. Nakahara, 1974. Mercury and cadmium resistances mediated by the penicillinase plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 117, 1-7.
- Laddaga, R. A., R. Bessen, and S. Silver, 1985. Cadmium-resistant mutant of *Bacillus subtilis* 168 with reduced cadmium transport. *J. Bacteriol.* 162, 1106-1110.
- McIntee, J. D., J. R. Woodrow, and A. V. Quirk, 1986. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 515-520.
- Misra, T. K., 1992. Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. plasmid 27, 4-16.
- Nies, D. H., and S. Silver. 1989. Metal ion uptake by plasmid-free metal sensitive *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171, 4073-4075.
- Novick, R. P., and C. Roth, 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 95, 1335-1342.
- Olson, B. H., T. Barkay, and R. A. Colwell, 1979. Role of plasmids in mercury transformation by bacteria isolated from the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 38, 478-485.
- Richard, A. L., R. Bessen, and S. Silver. 1985. Cadmium-resistant mutant of *Bacillus subtilis* 168 with reduced cadmium transport. *J. Bacteriol.* 165, 1106-1110.
- Robinson, J. B., and O. H. Tuovinen, 1984. Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercurial compounds : Physiological, Biochemical and Genetic analyses. *Microbiol. Rev.* 48, 95-124.
- Perry, R. D., and S. Silver, 1982. Cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicles. *J. Bacteriol.* 150, 973-976.
- Silver, S., 1992. Plasmid-determined metal resistance mechanisms : range and overview. *Plasmid.* 27, 1-3.
- Silver, S., and M. Walderhaug, 1992. Gene regulation of plasmid- and chromosome-determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* 56, 195-228.
- Summers, A. O., and L. I. Sugarman, 1974. Cell-free mercury(II)-reducing activity in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 119, 242-249.
- Summers, A. O., and S. Silver, 1972. Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 112, 1228-1236.
- Summers, A. O., and S. Silver, 1978. Microbial transformations of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* 32, 637-672.
- Tonomura, K., and F. Kanzaki, 1969. The reductive decomposition of organic mercurials by cell-free extract of a mercury-resistant *Pseudomonad*. *Biochim. Biophys. Acta.* 184, 227-229.
- Trevors, J. T., K. M. Oddie, and B. H. Bellevue, 1985. Metal resistance in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 39-54.
- Tynecka, Z., Z. Gos, and J. Zajac, 1981. Energy-dependent efflux of cadmium coded by a plasmid resistance determinant in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 147, 313-319.
- Vaituzis, Z., J. D. Nelson, JR., L. W. Wan, and R. R. Colwell, 1975. Effects of mercuric chloride on growth and morphology of selected strains of mercury-

- resistant bacteria. *Appl. Microbiol.* 29, 275-286.
- Weiss, A. A., S. Silver, and T. G. Kinscherf, 1978. Cation transport alteration associated with plasmid-determined resistance to cadmium in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. agents Chemother.* 14, 856-862.
- You, K. M., N. R. Cho, W. H. Lee, Y. N. Lee, and Y. K. Park, 1995. Identification and characterization of mercury-resistant bacteria isolated from Anyangcheon. *Korean J. Environ. Biol.* 13, 153-163.