

Enterobacter cloacae K41 plasmid의 중금속 저항성

김영희* · 이상준¹ · 정영기 · 정경태

동의대학교 생명응용과학과, ¹부산대학교 미생물학과

Received May 14, 2005 / Accepted June 22, 2005

Characteristics of Heavy Metal Resistant Plasmid in *Enterobacter cloacae* K41. Young-Hee Kim*, Sang-Jun Lee¹, Yong-Kee Jeong and Kyung-Tae Chung. Dept. of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan, Korea, ¹Dept. of Microbiology, Pusan National University, Busan, Korea – A natural habitat bacterium, *Enterobacter cloacae* K41 was isolated from fresh water plant root and identified. This strain was used to investigate heavy metal resistance. The optimal growth conditions of the bacterium were LB medium containing 1% yeast extract, 1% lactose, 1% NaCl, pH 7.0, at 37°C, and for 24 hours on a shaker. The minimal inhibitory concentration (MIC) of heavy metals against *E. cloacae* KCTC2519 and *E. cloacae* K41 was compared. The MIC of *E. cloacae* K41 was 150 ppm in Cu, 50 ppm in Cd whereas that of the standard strain was 50 ppm in Cu but no growth was observed either Cd or two mixed heavy metal solution. The presence of plasmid was cleared from the isolated strain whereas no possession from the standard strain. The plasmid from *E. cloacae* K41 was transformed into *E. coli* DH5 α . The MIC of transformed strain increased resistance 7 times in Cu and 6 times in Cd by insertion of this plasmid. The metal adsorption of the transformant was increased 1.3 times in Cu and 1.5 times in Cd indicating the plasmid was responsible for heavy metal resistance.

Key words – MIC, Cu, Cd, resistance

중금속은 종류도 다양하고 세포내에서의 역할도 다르다. 그러나 다량 존재 시, 산소와 결합하여 유독성을 나타내며 생물체 내에서 다양한 기전에 의하여 결합하며 유출되기도 한다. 또한 산업 활동으로 인하여 이들 중금속이 환경내로 유출되고 있으며 이로 인한 수질의 오염 및 생물체에 미치는 영향도 매우 심각하며, 이를 해결하기 위한 다양한 시도도 진행 중이다[5,6,14,16].

오늘날 생물공학의 주요 목적중의 하나로 비용이 저렴한 물질을 이용하여 고부가 가치의 생산품을 창조하는데 있다. Nies[11]는 생물 공학적으로 미생물에 의한 중금속 저항성을 응용할 수 있는 세 분야를 제시하였다. 첫째, 미생물에 금속 저항성을 적용시키는 목적이 biotechnological process를 용이하게 하는데 있고, 두 번째로, 중금속 저항성 세균은 고가 금속의 생물채광에도 이용이 가능한데 직접 채광에 이용하거나 또는 산업적 공정 유출물에서 금속물질 회수 시에 사용하는 것이며, 세 번째로 중금속 저항성 세균을 금속으로 오염된 환경의 생물정화(bioremediation)에 사용 할 수 있다는 점 때문이라고 하였다.

이 같은 과정은 중금속 저항성을 가진 미생물을 이용하여 분자 생물학적방법으로 접근 가능한데 중금속 저항성유전자를 특정 세균의 염색체내로 삽입하거나 광범위한 숙주영역을 나타내는 plasmid를 안정적으로 숙주내에 유지시켜 중금속을 제거하는 것이다. 세균의 경우 중금속 저항성을 가진

plasmid가 쉽게 세균군집에 도입 가능하다는 특성이 있으므로 이를 이용하고자하는 노력도 진행 중이다[7,11,12,21]. 특히 자연계에 분포하는 많은 미생물들 중에는 각종 금속에 대한 저항성이 매우 다양하므로 이들의 역할을 밝혀 이용 가능성을 높여야 할 필요가 있으며[3,17,19] 미생물을 이용한 생물학적 중금속 제거 방법은 고효율성과 저비용의 목적으로 환경보호에 적용할 수 있는 가능성이 매우 높다[1,9,10,18,20].

이런 목적에서 본 내용에서는 담수에 분포하고 있는 균 중 중금속 저항성을 나타내는 것으로 나타난 *Enterobacter cloacae*를 선택하여[2,4] 이 세균을 대상으로 중금속인 구리, 카드뮴에 대한 최소생육저지농도에 대한 영향 등을 파악하고 이 균이 가지고 있는 중금속 저항유전자를 찾아내어 생육, 흡착에 미치는 영향 등을 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험의 사용균주는 담수식물인 수초의 근계에서 분리된 여러 균종[8,13]을 대상으로 각종 중금속을 농도별로 첨가하여 저항성을 나타내는 1 균주를 선택하여 자동 동정 시스템 분석기(E-10136, Biolog Microstation, Biolog, USA)를 사용하여 유사값 0.5 이상의 신뢰도 값의 균을 확인 후 생화학 동정과정을 거친 후 표준 균주와 비교하였다. 중금속 저항성 비교 균주로는 표준균주인 *Enterobacter cloacae* KCTC2519를 사용하였으며 형질전환 균주로서 *Escherichia coli* DH5 α (이하 *E. coli* DH5 α)를 사용하였다. 본 실험에 사용한 균주를 배

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-1535, Fax : +82-51-890-1532

E-mail : yhkim@dongeui.ac.kr

양하기 위한 기본배지로는 LB, Nutrient broth (NB) 배지를 사용하였으며, 분리 균의 생육 최적 조건 설정을 위하여 탄소원, 질소원 등을 검토하였다. 모든 배양은 37℃, 24시간 배양하였으며 액체는 진탕배양(150 rpm) 하였다. 중금속 저항성 확인은 구리와 카드뮴의 농도를 달리하여 생육이 확인 되는 경우에만 적용하였다.

사용 중금속 및 정량법

본 실험에 사용된 중금속의 종류는 Cd (NO₃)₂·4H₂O과 Cu (NO₃)₂·3H₂O였으며 이들을 2차 탈 이온 수에 녹여 일정 농도(10-300 ppm)로 맞추어 사용하였다. 중금속 이온 농도는 원자 흡광광도계(Atomic adsorption spectrometry, Shimadzu AA6500series, Japan)를 사용하여 정량하였다. 정량을 위하여 각각의 구리, 카드뮴을 표준 용액으로 희석하여 표준 검량선을 작성하였고 예비 측정을 거쳐 검량선의 측정 가능 농도 범위를 정하였고 시료도 검량선의 측정 범위에 들어가도록 희석하여 측정, 정량하였다.

생육도 측정법

생육도 측정은 균을 최적 배양 조건의 배지에 중금속을 첨가한 후 접종 하고 37℃에서 24시간 전 배양을 행하고, 본 배양을 위하여서는 1% 전 배양액을 본 배양액 200 ml에 진탕 배양하면서 배양시간에 따라 5 ml을 취하여 단계적 희석을 하고 분광광도계(Shimadzu UV-160A, Japan)를 사용하여 600 nm의 파장에서 흡광도를 측정함으로써 생육도를 비교 하였다. 최소 생육저해농도는 고체 배양 배지 내에 각각의 중금속 농도를 100 ppm 단위로 점점 높혀가면서 농도 범위가 정해지면 다시 10 ppm 단위로 첨가한 후 균을 접종한 후 생육 여부를 관찰하였다. 생 세포에 대한 영향을 알아보기 위한 생균수의 측정을 위하여서는 고체배지에 각각의 중금속 농도를 MIC를 기준으로 희석하여 100 μl 을 첨가하고 균을 도말 후 배양하고 중금속이 균의 생육에 영향을 미치지 않는 농도(MIC)를 기준으로 CFU (Colony forming unit/ml)을 확인 하였으며 모든 과정은 3번 이상 반복 실험 하였다. 최소 생육저지 농도 및 생 세포에 미치는 영향은 생균수 측정을 하여 정량하였고 MIC가 결정된 후에는 흡광도 법으로 생육을 정량하였다.

형질 전환 균주 선택 및 유전자 재조합 기술

대장균 host중 중금속 내성이 낮은 균주를 선별하여 Nutrient broth에 중금속을 농도별로 첨가하여 최소생육저해 농도를 측정, 비교하였다. DNA분리, 형질전환 및 유전자 재조합 기술은 Sambrook등[15]의 방법을 사용하였다.

중금속 흡착 실험

형질 전환된 *E. coli* DH5a 균체를 이용한 구리와 카드뮴

흡착평형실험[10,13]은 흡착강도 결정을 위하여 건조균체를 이용하여 표준 금속농도 1000 mg/l 인 용액 100 ml과, 건조균체 0.1 g을 500 ml 삼각플라스크에 넣고 37℃ 진탕기 내에서 150 rpm 으로 교반 시키면서 일정 시간별로 1 ml 의 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 원심분리(12000 rpm, 10분)하여 상등액을 적절히 희석한 후 원자 흡광광도계를 사용하여 각각의 잔존 중금속 이온의 농도를 측정하였다.

결 과

사용균주 선별

본 실험 사용균주는 담수식물인 수초의 근계에서 분리된 균종을 대상으로 자동 동정 시스템 분석기(E-10136, Biolog Microstation, Biolog, USA)를 사용하여 유사값 0.75이상 신뢰도 값의 균을 분리 후 생화학적 과정을 거치고 각종 중금속에 대한 내성을 검토 한 후 표준 균주와 비교한 후 *Enterobacter cloacae* K41로 명명하여 사용하였다.

중금속이 생육에 미치는 영향

최소생육저해 농도별 비교에서는 단일 중금속 노출 시에는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 분리 균은 구리는 150 ppm, 카드뮴은 50 ppm 까지 생육이 가능함을 확인하였다. 두 중금속 혼합 노출 시의 영향은 단일 중금속보다 낮은 생육도를 보였다. 분리균주는 표준균주보다 구리에서는 생육이 3배 정도 높았으나 카드뮴이나 두 중금속 혼합 용액 내에서는 생육을 관찰 할 수 없었다. 이 같은 차이는 미생물이 중금속에 대한 감수성이 다른 때문으로 설명 할 수 있다[11].

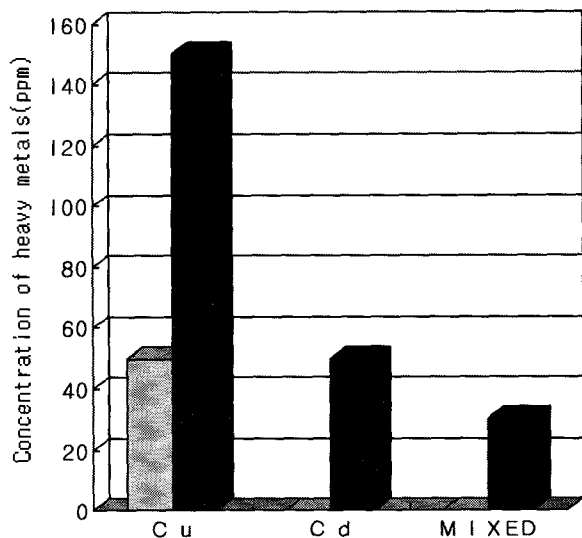


Fig. 1. Comparison of *E. cloacae* KCTC 2519 and *E. cloacae* K41 growth in minimal heavy metal concentration.

■ *E. cloacae* KCTC 2519 ■ *E. cloacae* K41

중금속 농도별 생 세포에 대한 영향

분리 균의 단일 중금속 노출 시 생 세포에 대한 영향은 Fig. 2에서 보는바와 같이 구리는 150 ppm까지 사멸에 영향을 미치지 않다가 그 이상 농도에서 급격히 사멸하는 것을 볼 수 있었다. 카드뮴은 50 ppm, 혼합 중금속 농도별로 생 세포에 대한 영향도 그림에서 보는바와 같이 농도가 높아질수록 5배 이상 사멸하는 것을 볼 수 있었다. 혼합 중금속에서의 미생물 생 세포에 대한 영향은 단일 중금속내에서 보다 더욱 경쟁적으로 생 세포에 영향을 미치는 것으로 보여 졌다.

형질 전환 균주 선별 및 유전자 재조합 기술

대장균 host중 중금속 내성이 낮은 균주인 *E. coli* DH5a를 선별하였으며 *E. cloacae* K41 plasmid 분리는 Sambrook [15] 방법에 의해 실행하여 Fig. 3과 같이 분리하였으며 그 크기는 6.4 Kb 이었다. 표준균주는 plasmid를 가지지 않는 것

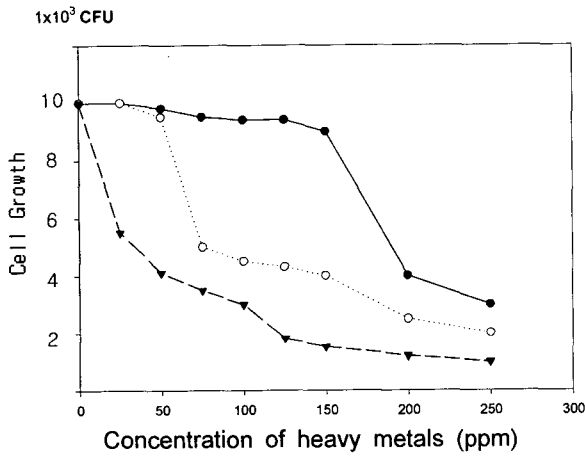


Fig. 2. Efficiency of live cell for cadmium, copper and mixture of copper and cadmium on *E. cloacae* K41. Symbols : ○, Cd ; ●, Cu ; ▼, mixed

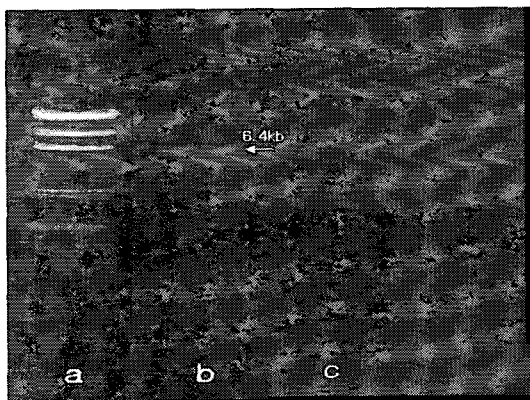


Fig. 3. Electrophoresis of plasmids in *E. cloacae* K41 and *E. cloacae* KCTC2519. a ; *Hind* III marker, b ; *Sal* I digested pEC, c ; *E. cloacae* KCTC2519.

으로 나타났으며 중금속은 고체배지에서 중금속 저해를 나타 내지 않아 pUC18을 이용하여 ampicillin으로 형질 전환된 균주를 선별하였다. 유전자 재조합 방법은 *E. cloacae* K41의 plasmid (이하pEC)와 pUC18을 single cutting 되는 제한효소 *Sal* I을 처리하여 cloning한 후 Fig. 4에서 보는바와 같이 *E. coli* DH5a에 형질 전환된 균주를 선별하여 사용하였다.

중금속이 형질 전환 균주의 생육에 미치는 영향

형질전환균주의 최소생육저해 농도별 비교에서는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 구리 노출 시에는 70 ppm 농도까지 생육이 저지 되지 않았고, 카드뮴 노출 시에는 60 ppm 농도가

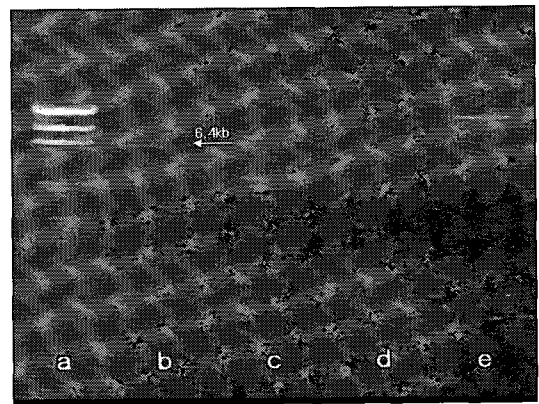


Fig. 4. Electrophoresis of plasmids of *E. coli* DH5a, *E. coli* DH5a/pUC18 and *E. coli* DH5a/pUC18/pEC. a ; *Hind* III marker, b ; *Sal* I digested pEC K41, c ; *Sal* I digested *E. coli* DH5a/pUC18, d ; *E. coli* DH5a free, e ; *E. coli* DH5a/pUC18/pEC

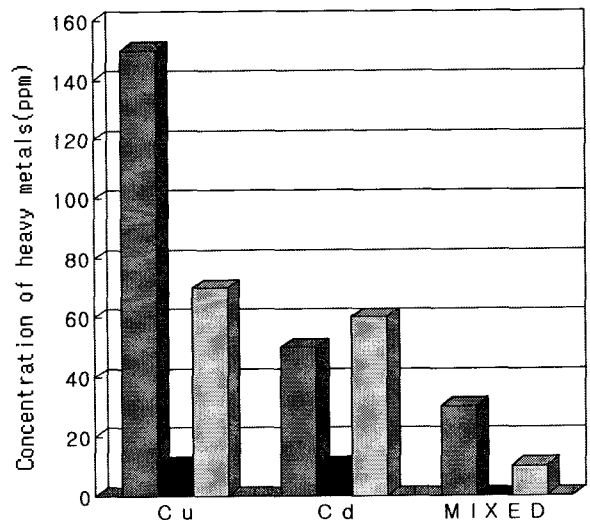


Fig. 5. Comparison of *E. cloacae* K41, *E. coli* DH5a, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC growth in minimal heavy metal concentration.

■ *E. cloacae* K41
 ■ *E. coli* DH5a
 ■ *E. coli* DH5a/pUC18/pEC

지 생육이 저지되지 않았다. 혼합 중금속 노출시 생육에 대한 영향은 단일 중금속보다 낮은 생육도를 보였으며 10 ppm까지 생육이 저지되지 않았다.

pEC의 중금속 저항성 확인

E. coli DH5a, *E. coli* DH5a/pUC18, *E. coli* DH5a/pUC18 / pEC의 생육도 비교는 Fig. 6에서와 같이 구리 70 ppm 첨가 시 *E. coli* DH5a, *E. coli* DH5a/pUC18에 비하여 pEC를 가지고 있는 형질전환 균주는 높은 저항성을 나타냈다. 카드뮴 40 ppm 첨가 시에는 Fig. 7에서 보는바와 같이 *E. coli* DH5a, *E. coli* DH5a/pUC18에 비하여 pEC를 가지고 있는 형질전환 균주는 높은 저항성을 나타냈다. 구리와 카드뮴 혼합 중금속 10 ppm 첨가 시에는 Fig. 8에서 보는바와 같이 *E. coli*

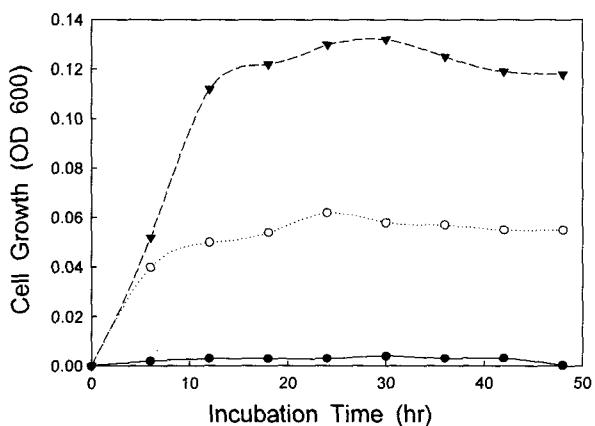


Fig. 6. Growth comparison of *E. coli* DH5a/pUC18, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC and *E. coli* DH5a in medium containing 70 ppm Cu. Symbols: ▼, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC; ○, *E. coli* DH5a/pUC18; ●, *E. coli* DH5a

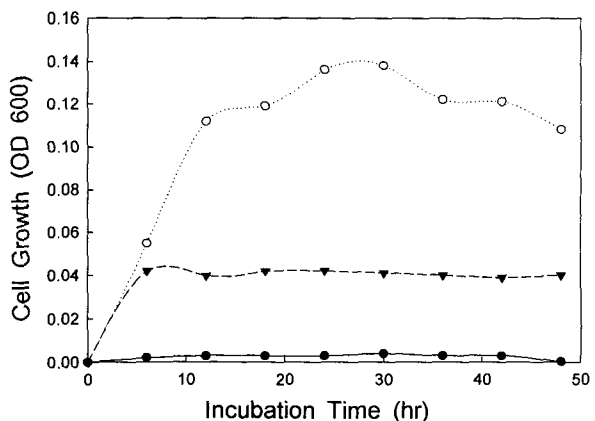


Fig. 7. Growth comparison of *E. coli* DH5a/pUC18, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC and *E. coli* DH5a in medium containing 40 ppm Cd. Symbols: ▼, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC; ○, *E. coli* DH5a/pUC18; ●, *E. coli* DH5a

DH5a, *E. coli* DH5a/pUC18에 비하여 pEC를 가지고 있는 형질전환 균주는 시간이 경과할수록 높은 저항성을 나타냈다.

중금속 흡착 실험

E. coli DH5a와 *E. coli* DH5a/pUC18/pEC의 중금속 흡착률은 건조균체 0.2 g, 28°C, pH 3, 0.1 M NaOH 전처리 시약을 동일하게 사용하여 실험한 결과 Fig. 9에서 보는 바와 같이 형질전환 전의 균주보다 높은 중금속 농도에서 많은 균의 생육이 가능하여 중금속 제거 효율 증가를 볼 수 있었다.

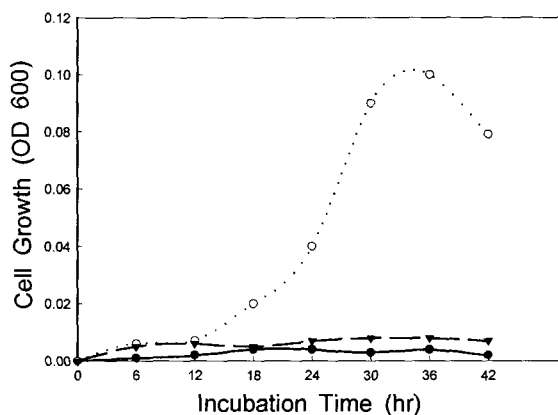


Fig. 8. Growth comparison of *E. coli* DH5a, *E. coli* DH5a/pUC18 and *E. coli* DH5a/pUC18/pEC in medium containing mixture of 10 ppm. Symbols: ●, *E. coli* DH5a; ▼, *E. coli* DH5a/pUC18; ○, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC.

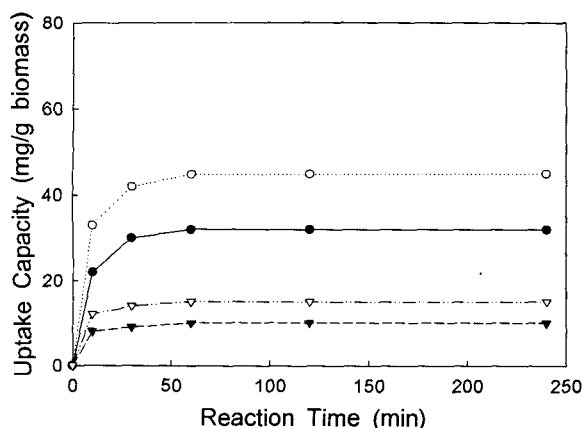


Fig. 9. Uptake capacity of copper and cadmium by wild type and transformed *Escherichia coli* DH5a. Symbols: ○, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC in copper; ●, *E. coli* DH5a in copper; ▽, *E. coli* DH5a/pUC18/pEC in cadmium; ▼, *E. coli* DH5a in cadmium

고 찰

미생물을 대상으로 중금속 흡착 및 오염물질 제거에 관한

가능성에 대한 보고가[6,9,10] 있어 왔다. Nies[11]는 각 미생물마다 특정 중금속에 다른 감수성과 내성을 나타낸다는 자료를 제시하였고 본 내용에서는 담수식물에서 분리된 균주 중 여러 중금속을 대상으로 내성을 검토한 결과 실험 대상균주가 구리와 카드뮴에 감수성을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 농도별로 생육에 영향을 미치는 농도 등을 비교하였을 때 분리균주가 표준 균주보다 중금속 저항성이 높음을 확인 할 수 있었으며 이는 환경내의 미생물이 환경에 적응성이 높으며 유전적으로 이러한 성질을 획득하였을 가능성이 높으며, Dunigan[4], Shim[16]등의 연구에서 이미 이런 미생물들의 오염물질 제거 가능성이 시사되었다.

따라서 분리 균[8,13]들을 대상으로 여러 중금속에 대한 감수성을 비교하고 유전적 특성을 시험하였으나 내성인자를 쉽게 탐색 할 수 없었는데 *E. cloacae* K41만이 구리와 카드뮴에 강한 저항성을 나타내어[8,13] 이에 관여하는 인자일 것으로 추정되는 plasmid를 확인 할 수 있었는데 표준 균주에서는 확인이 되지 않는 차이를 나타내었다. 이는 본 균주가 환경 내에서 이런 유전적 특성을 획득하였을 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

이 분리 균주로부터 중금속 저항성 유전자를 탐색하고자 제한효소 *Sal I*로 처리 시 6.4 Kb에서 절편이 확인되었고 이를 분리하여 구리와 카드뮴에 저항성이 낮은 *E. coli* DH5a 균주를 형질전환 시켜 최소생육저지 농도를 측정된 결과 구리는 3배, 카드뮴은 5배 증가를 나타내어 이 plasmid가 중금속 저항성에 관여하는 인자로 판단되었다. 또한 중금속 흡착율에서도 형질전환 균주가 구리는 1.3배, 카드뮴은 1.5배 증가함을 나타내었는데 앞으로 이 plasmid를 다른 균종에 응용함으로써 오염된 수질내의 중금속을 제거하고, 중금속 폐수 처리에 사용할 수 있을 것으로 기대되며 중금속 저항성을 증가시켜 높은 농도의 조건 내에서 균의 생육을 증가시켜 이용성을 높일 수 있을 것으로 보여 졌다.

본 과정에서는 plasmid 분리만이 확인되었으나 앞으로 염기서열 분석을 통하여 유전적 특성을 규명하고 저항성을 증가시켜 다른 natural habitat의 중금속 제거 능력을 높이는데 이용하여야 할 것이다.

한편 균주의 대량배양이나 공급의 필요성을 감안하여 실험실 최적 조건을 검토한 결과 까다로운 조건은 아니었으며 기본 배지로 LB배지를 사용하였으나 중금속 첨가 시에 침전물이 생성되어 Nutrient 배지를 대신 사용하였는데 전체적인 생육에는 큰 차이를 나타내지 않았다. 자연 환경내의 여러 복잡한 조건은 실험실 조건과는 같을 수는 없겠으나 분리주의 원래 서식지가 자연계이므로 담수에 존재하는 많은 유기질소원에 의해서 충분한 생육이 가능할 것으로 추정되었다[2].

이상의 과정으로 자연계에 분포하고 있는 미생물이 중금속 및 오염물질을 제거 할 수 있는 특성을 가졌음을 일부 확인하는 결과를 얻었으나 자연계의 다양한 환경에 존재하는

균주들을 탐색하여 오염물질을 제거 할 수 있는 균주의 확보에 박차를 가할 필요가 있다. 앞으로 여러 균주를 대상으로 중금속을 제거 할 수 있는 유전적 특성을 검토하여야 하며 최근 식물에 이러한 인자를 도입하는 시도가 이루어지고 있는 점에 주목하여 지속적인 연구가 필요하다고 사료되어 지며 환경정화에 이용 효율을 높일 수 있는 균주 개량에도 관심을 가져야 할 것으로 보인다

요 약

담수 식물 수초의 근계에 부착하는 미생물 중 중금속에 높은 저항성을 가지는 균을 분리하고 이들 중 *Enterobacter cloacae* K41를 대상으로 생육최적조건을 검토한 결과는 LB 배지에 1% yeast extract, 1% lactose, 1% NaCl, pH7.0, 최적 온도는 37℃, 24시간 진탕배양 이었으며 중금속 첨가 시에는 침전을 막기 위하여 Nutrient 배지로 대체하였다. 이 분리균주와 표준균주인 *Enterobacter cloacae* KCTC2519를 대상으로 중금속인 구리와 카드뮴이온에 대한 최소생육저지농도(MIC)를 비교한 결과 분리균주인 *E. cloacae* K41은 구리는 150 ppm, 카드뮴은 50 ppm 농도까지 생육이 확인 되었으나 표준균주는 구리 50 ppm에서 생육이 확인되었으나 카드뮴이나 두 혼합 중금속에서는 확인되지 않는 차이를 나타내었다. 두 균주를 대상으로 유전적 성상을 비교한 결과 분리균주에선 plasmid가 검출되었으나 표준균주에는 없었다. 그리고 분리균주에서 6.4 Kb 절편의 plasmid를 분리하여 구리, 카드뮴의 중금속에 민감한 균주인 *E. coli* DH5a에 형질전환 시켜 생육에 영향을 미치는 정도를 비교하였다. 그 결과 형질전환 균주의 두 중금속에 대한 최소생육저지농도가 구리는 7배, 카드뮴은 6배로 증가한 것을 알 수 있었다. 또한 중금속 흡착률은 형질전환 균주가 *E. coli* DH5a보다 구리가 1.3배, 카드뮴은 1.5배 증가함을 알 수 있었다. 따라서 이 plasmid가 중금속 저항성을 증가시키는데 관여하는 것으로 보였다.

감사의 글

본 논문은 2004학년도 동의대학교 연구년 사업에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Ahn, K. H. and K. H. Suh. 1995. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces uvarum*. *J. of the Kor. Environmental Science Society*. 4, 527-534.
2. Bitton, G. 1994. *Wastewater Microbiology*. pp. 296-303. John Wiley & Sons, New York.
3. Brown, N. L., J. R. Lloyd, K. Jakeman, J. L. Hobman, I. Bontidean, B. Mattiasson and E. Csoregit. 1998. Heavy

- metal resistance genes and proteins in bacteria and their application. *Biochemical Society Transactions*. **26**, 218-221.
4. Dunigan, E. P. 1974. Some preliminary observations on the nitrogen-utilizing microorganisms on the roots of water hyacinth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **37**, 22-24.
 5. Gadd, G. M. 2001. Microbial metal transformations. *The J. of Microbiology*. **39(2)**, 83-88.
 6. Hassen, A., N. Saidi, M. Cherif and A. Boudabous. 1998. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technol.* **65**, 73-82.
 7. Kaur, P. and B. P. Rosen. 1992. Plasmid chromate resistance to arsenic and antimony. *Plasmid*. **27**, 29-40.
 8. Kim, Y. H. 2002. Effects of lead, copper, and cadmium on *Pseudomonas cepacia* KH410. *Kor. J. Appl. Microbiol.* **38(1)**, 26-30.
 9. Lynne, E. M. and A. C. R. Dean. 1984. Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 53-62.
 10. 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.
 11. Nies, D. H. 1999. Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 730-750.
 12. Panichev, N. A., A. O. Diakov and K. V. Kvitko. 1997. Biotransformation of cadmium species by microorganism. *Canadian J. Analytical Sciences and Spectroscopy*. **42(2)**, 16-20.
 13. Park, J. W. and Y. H. Kim. 2001. Characteristics of heavy metal biosorption by *Pseudomonas cepacia* KH410. *The Korean J. of Microbiology*. **37(3)**, 197-203.
 14. Reddy, K. R. and D. E. Busk. 1985. Nutrient removal potential of selected aquatic macrophytes. *J. Environ. Qual.* **14**, 459-462.
 15. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed., *Cold Spring Harbor Laboratory, New York*.
 16. Shim, W. S. and I. S. Han. 1998. Effect of reed-bed using Ulsan-habitated *P. australis*, *T. orientalis*, and *P. aundenacea* on removing pollutants from sewage. *J. of the Kor. Environmental Science Society*. **14**, 76-80.
 17. Silver, S., G. Nucifora, L. Chu and T. K. Misra. 1989. Bacterial resistance ATPases : primary pump for exporting toxic cations and anions. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 76-80.
 18. Tobin, J. M., D. G. Cooper and R. J. Neufeld. 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* **47(4)**, 821-824.
 19. Tsai, K. L., K. P. Yoon, and A. R. Lynn. 1992. ATP-dependent cadmium transport by the *cadA* cadmium resistance in everted membrane vesicles of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 116-121.
 20. Volesky, B. and Z. R. Holan. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnol. Prog.* **11**, 235-250.
 21. Yoon, K. P., T. K. Misra and S. Silver. 1991. Regulation of the *cadA* cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J. Bacteriol.* **173**, 7643-7649.