

分離된 카드뮴 耐性細菌의 微生物學의 特性

微生物部 細菌科

裴 清 鎬 · 全 在 植 · 李 相 美

朴 建 用 · 金 秀 珍 · 李 康 文

Microbiological Characteristic of Cadmium-Tolerant Bacterium

Division of Bacteriology

Chung Ho Bae, Jae Sik Jeon, Sang Me Lee

Kun Yong Park, Soo Jin Kim and Kang Moon Lee

=Abstract=

A typically well growing strain of bacteria in Cadmium added medium was isolated from Anyang stream, and examined the morphological, physiological characteristics.

The results were as follows:

1. Bacterium B-1 isolated was rod, gram negative and non motile.
2. It utilized glucose, dulcitol, sorbitol, raffinose, rhamnose, maltose and xylose, but not sucrose, mannitol, adonitol, inositol, arabinose, trehalose and mannitol.
3. Lysine and phenylalanine were utilized, but not arginine and ornithine.
4. The optimum growth condition of Isolated was pH at 7.0, 30°C in temperature in the 50 ppm Cadmium medium.
5. Log period of the strain in 50 ppm Cadmium medium was 15 hrs in optimum condition and maximum optical density was 1.21.

서 론

산업의 발달은 인류에게 풍요한 삶을 갖게 해주었지만 반면 각종 폐기물의 양적 팽창과 다양화 및 질적인 악화는 환경의 파괴속도를 더욱더 가속화 시켰다.

환경은 한번 파괴되면 원상으로 회복하는데 수십년 또는 수백년이 걸리며 인류의 생존은 환경의 관리 여하에 달려있다고 까지 인식되고 있다.

더우기 중금속류의 자연계 배출은 이들의 긴 잔류성, 축적성, 자연생태계에서의 비분해성, 독성, 먹이연쇄에 따른 농축현상 등의 성질 때문에 자칫 생태계의 사슬을

끊는 결정적 요인이 될 수 있다. 중금속류중 특히 Cd은 광산, 제련, 도금, 합금, 안료, 원자로 등의 폐수에 다량 함유되어 하천을 오염시키며 질병을 일으킬 수 있는 체내 축적성 물질로서 1960년에는 이따이이따이 병의 원인물질로 판명되어 공중보건상 가장 주시되는 물질중의 하나로 주목되고 있다.

그러므로 산업폐수중에 배출되는 Cd의 자연계 방출을 저지하기 위하여 지금까지는 물리, 화학적 처리방법으로 Cd의 제거 효과를 가져왔지만⁹⁾ 이 방법의 비용면, 이차오염의 피해가 나타나 근래에 와서는 토양, 하천, 호수 또는 해수 중에서 Cd의 정화능력이 있는 미생물을 이용해 생물학적 방법으로 제거하는 연구가 활발히 진행되

고 있다.^{7,8,10-13} 이들의 연구로서 Babich와 Stotzky^{1,2)}의 Eubacter, Actinomycetes, Fungi에 미치는 Cd의 영향, Hivoyuki³⁾ 등의 Psdomonas aeruginosa에 의한 Cd의 세포내 축적 등의 연구보고가 있으며 이외에도 Mitra⁴⁾ 등은 E. coli에서 Cd의 축적부위는 cell wall에서 56%, Membrane 13%, Cytoplasm에서는 31%의 축적율을 보였다고 보고하였고, MaCaski와 Dean⁵⁾는 Citrobacter sp.가 대수기 성장조건에서 용액중 Cd의 제거 효율이 75%였다고 보고한 바 있다. 또한 국내의 연구에서도 고⁶⁾ 등은 Moraxella sp.중에서 중정도의 내성을 갖는 균주를 분리하였고 50 ppm의 Cd 농도에서 건조균체량은 20.26 mg/g dry cell이었고 축적율은 40.5%였다고 보고하였다.

그러므로 본 연구는 구로공단 산업폐수의 배출하천인 안양천의 하상슬러지에서 내성을 갖는 균주를 분리하여 이 균주의 카드뮴에 대한 성질과 그의 성장조건을 조사 연구하여 몇가지 지점을 얻었기 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1989년 10월중 안양천 5개 지점의 하상 슬러지 20점을 채취하여 순수분리하였다(Fig. 1).

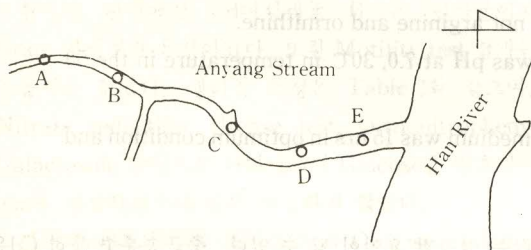


Fig. 1. Sampling sites (A, B, C, D, E).

2. 시험방법

카드뮴 내성균의 분리를 위하여 500 ppm의 Cd(NO₃)₂가 첨가된 Media I(Table 1)의 평판배지에 채취된 시료를 접종하여 30°C에서 배양하고 균의 생장을 24시간마다 육안으로 관찰하여 성장된 균을 분리하여 Media I의 액체배지에서 Cd(NO₃)₂로 Cd²⁺의 최종농도가 1,000 ppm이 되도록 조절하여 30°C 5일간 배양후 500 ppm인 Agar 평판배지에 다시 도말하여 배양된 colony를 분리하여 공시균으로 사용하였다. 이 공시균의 최적생육 조

건을 조사하기 위하여 Media II(Table 1)의 액체배지를 이용하여 온도는 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C로 조정하고 최종 pH는 5, 6, 7, 8, 9로 조정하고 배양하여 생육조건을 조사하였다.

결과 및 고찰

안양천은 경기도 안양시 및 구로공단 등을 거쳐 한강에 유입되는 서울 시내 주요 지천중의 하나이다.

유역면적은 242.38 km²이고 연장은 20.7 km이다. 자연유량은 많지 않고 대부분 인위적인 활동에 의해 배수되는 생활하수와 산업폐수로 이루어져 있다.

Table 1. Composition of media.

Media I	
Glucose	10 g
Peptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g
Cd(NO ₃) ₂	1.05 g
Distilled water	1,000 ml
pH	7.0
Media II	
Glucose	5 g
Peptone	1 g
NH ₃ NO ₃	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.5 g
Yeast extract	0.1 g
Distilled water	1,000 ml
pH	5, 6, 7, 8, 9
pH control: 1N-HCl	
1N-NaOH	

Cd내성세균의 분리를 위해 안양천 5개 지점의 하상 저질의 표층에서 20점의 시료를 채취하여 분리한 124균주를 500 ppm의 Cd(NO₃)₂가 함유된 배지에 배양한 결과 18균주를 얻었다. 이들 18균주를 Table 1(Media I)의 고체배지의 50 ml중에 Cd(NO₃)₂의 농도가 각각 1,000~10,000 ppm으로 조정하여 각 균주를 접종시키고 5일간 배양한 결과 1,000 ppm에서 8균주 2,000~5,000 ppm에서 4균주 6,000 ppm에서 1균주 7,000 ppm 이상에서는 1균주도 생육하지 않았다. 이중 5,000 ppm에서 생육하는 4균주중 가장 colony가 큰 집

락을 선택하여 카르뎀 내성균으로 공시하고(B-1), 이 균의 미생물학적 성질을 현미경 및 생리 생화학적 실험을 통해 알아 보았다.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of the isolated bacterium B-1.

A. Morphological characteristics	
1. Gram stain: negative	
2. Shape: rod	
3. Motility: non-motile	
B. Physiological characteristics	
1. Nitrate reduction: +	
2. Indol production: -	
3. Acid from Glucose: -	
4. MR: -	5. Urease test: +
6. ONPG: +	7. H ₂ S: -
C. Assimilation	
1. Glucose: +	2. Sucrose: -
3. Mannose: -	4. Dulcitol: +
5. Adonitol: -	6. Inositol: -
7. Sorbitol: +	8. Arabinose: -
9. Raffinose: +	10. Rhamnose: +
11. Maltose: +	12. Xylose: +
13. Trehalose: -	14. Mannitol: -
15. Lysine: -	16. Arginine: +
17. Ornithine: +	18. Phenylalanine: -

현미경 관찰에서 Cd내성세균 B-1은 단간균이며 Gram 염색결과 음성이었다. 또한 Motility test 결과는 운동성은 없었다. 생리적 특성은 Table 2와 같으며, Nitrate reduction, Urease test, Orthonitrophenyl Galactoside 양성으로 나타났으며 Glucose를 발효하여 gas를 생성하였으나 산은 생성하지 않았다.

당류의 자화 능력을 조사한 결과 Glucose, Dulcitol, Sorbitol, Raffinose, Rhamnose, Maltose, Xylose, Malonate를 자화하였으나 Sucrose, Mannose, Salicin, Adonitol, Inositol, Arabinose, Trehalose, Manitol의 자화능력은 없었다.

Amino acid중 Argine Ornithine의 자화력은 있었으나 Lysine이나 phenylalanine의 자화능력은 보여주지 않았다. 또한 O/F test 결과 B-1은 통성 혐기성균으로 나타났다.

카드뎀내성세균 B-1의 최적 생육온도를 조사하기 위하여 Cd²⁺ 농도 50 ppm인 액체배지 50 ml에 공시균을 접종하고 배양온도를 각각 20°C, 25°C, 30°C, 35°C,

40°C로 달리하여 48시간 배양하면서 균체의 증식율을 조사한 결과는 Fig. 2와 같았다.

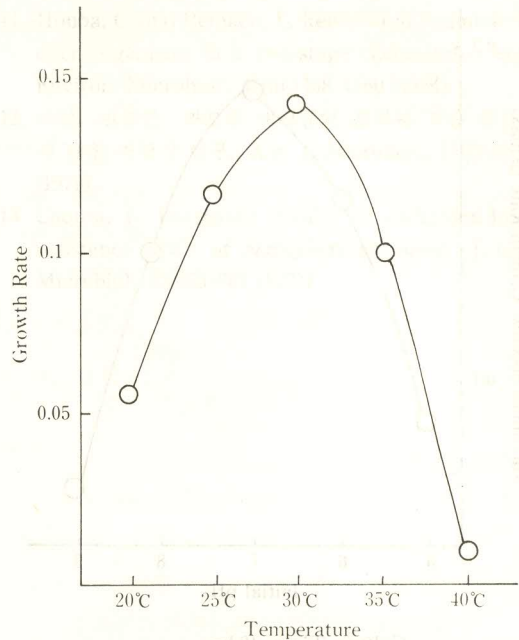


Fig. 2. Effect of temperature on the growth.

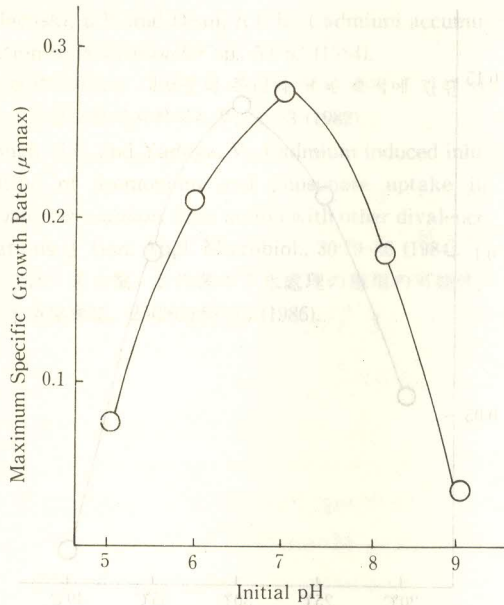
본 균주 B-1은 30°C에서 성장율이 0.14로 가장 증식이 빨랐으며 25°C에서 0.12, 35°C에서 0.09, 20°C에서 0.06, 40°C에서는 일주일간의 배양으로 생육을 관찰할 수 있었다. 이 결과로 보아 분리한 내성세균 B-1의 생육에 필요한 최적온도의 범위는 25°C에서 33°C였으며 20°C에서도 비교적 잘 생육함을 알 수 있었다.

최적 생육 pH를 조사하기 위해서는 카드뎀 농도 50 ppm 배양온도 30°C에서 각 배지의 pH를 5.6, 7, 8, 9.5 단계로 조정하여 48시간 배양하였고 초발 pH가 생육에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같았다. pH 7.0에서 최대 성장율($\mu_{max} \cdot hr^{-1}$)이 0.27로 가장 생육속도가 빨랐고 pH 6.0과 pH 8.0에서도 비교적 증식율이 컸으며 pH 9.0에서는 40시간 배양하였을 때 증식을 관찰할 수 있었지만 시간당 성장율은 미미하였다.

Cd²⁺의 농도가 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 pH 7.0, 배양온도 30°C에서 배지의 농도를 0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 500 ppm으로 각각 조정하여 균체의 밀도를 660 mm에서 측정할 결과는 Fig. 4와 같았다.

카드뎀을 함유하지 않은 배지에서 배양한 생육곡선을 보면 9시간의 유도기를 거쳐 그후 대수증식을 하였고 48

시간에서 최고성장에 도달하여 그때의 균체밀도인 OD 값은 1.31이었다. 그러나 50 ppm의 카드뮴농도에서는



Culture Time; 48 hr
Culture Temperature; 30°C

Fig. 3. Effect of initial pH of medium on the growth.

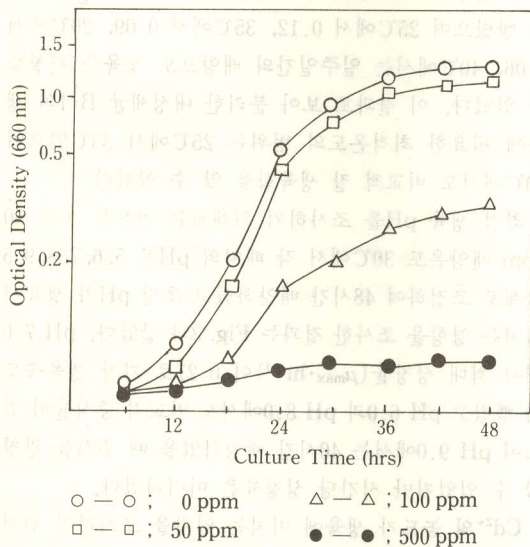


Fig. 4. Effect of cadmium concentration on the growth of isolated bacterium B-1.

유도기에 있어서 12시간이 소요되었으며 그후 대수증식하여 역시 48시간에 최고성장에 도달하였고 OD값은

1.21이었다. 100 ppm 농도에서는 뚜렷한 생육저해 현상이 나타났으며 유도기에 있어서도 다소 긴 15시간이 소요되었으며 그후 대수증식을 하여 역시 48시간만에 최고균체 밀도를 나타내었으나 그 값은 0.27이었다. 500 ppm에서의 증식곡선을 보면 특별한 유도기는 보여주지 않았고 약 18시간 이후 균체의 밀도가 증가하는 듯하다가 42시간에서 OD값이 0.04로 증가하다가 그후 정상상태를 되어 사멸되어 갔다.

이러한 결과로 보아 고농도의 카드뮴은 세균의 증식능력을 저해시켜 긴 유도기를 필요로 하며 카드뮴의 농도가 높을수록 생육저해 현상이 뚜렷하였다.

결 론

안양천에서 분리한 카드뮴 내성세균의 미생물학적 특성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 분리된 내성세균은 간균이었으며 Gram 음성, 비운동성이었다.

2. Nitrate reduction, Urease test, ONPG 양성, Orthonitrophenyl galactoside, Indol production, H₂S 생성 음성이었다.

3. Glucose, Dulcitol, Sorbitol, Raffinose, Rhamnose, Maltose, Xylose의 자화능력이 있으며 Sucrose, Mannose, Adonitol, Inositol, Arabinose, Trehalose, Mannitol은 자화하지 못하였다.

4. Amino acid중 Lysine, phenylalanine의 자화능력이 없었으며 Arginine, Ormithine은 자화하였다.

5. 생육최적 조건은 30°C, pH 7이었으며 카드뮴의 농도가 높을수록 발육이 저지되었다.

參 考 文 獻

- Babich, H. and Stotzky, G.: Sensitivity of various bacteria, including actinomycetes, and fungi to cadmium and the influence of pH on sensitivity. *Appl. Environ Microbiol.*, 33(3):681-695 (1976).
- Babich, H. and Stötzy, G.: Reduction in the toxicity of cadmium to microorganisms by clay minerals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33(3):696-705 (1977).
- Hiroyuki, H., Maeda, T. and Tomoyeda, M.: 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(1):14-19 (1974).

4. Mitra, R.S., Gray, R.H., Chin, B. and Bernstein, I.A.: Molecular mechanisms of accommodation ion *Escherichia coli* to toxic levels of Cd^{2+} . J. Bacteriol., 121(3):1180-1188 (1975).
5. Macaski, L.E. and Dean, A.C.R.: Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp., 53-62 (1984).
6. 고강식: 카드뮴 내성균의 분리와 균체 축적에 관한 연구. 보건대학석사학위논문, 1-23 (1982).
7. Singh, S.P. and Yadaya, V.: Cadmium induced inhibition of ammonium and phosphate uptake in *Anacystis nidulans* inter action with other divalence cations. J. Gen. Appl. Microbiol., 30:79-86 (1984).
8. 森忠洋: 重金屬 耐性菌の下水處理の應用の可能性. 下水道協會誌, 23(267):67-73 (1986).
9. 신석봉, 市川邦介: 미생물에 의한 폐수처리. Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng., 8(2):135-142 (1980).
10. Remacle, J.: Cadmium uptake by freshwater bacterial communities. Water Research, 15:67-71 (1981).
11. Houba, C. and Remade, J.: Removal of cadmium by microorganisms in a two-stage chemostate. Appl. Environ. Microbiol., 47(5):1158-1160 (1984).
12. 이인, 이종근: 카드뮴 내성균의 분리와 각종 중금속에 대한 저항성 연구. Kor. J. Microbiol., 17(2):49-57 (1979).
13. Chopra, I.: Decreased uptake of cadmium by a resistance strain of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 63:265-267 (1971).