

# 카드뮴에 特異的인 耐性菌의 分離

朴 燦 性 · 崔 慶 浩

曉星女子大學 食品營養學科

## Isolation of A Bacterial Strain Which Has Specific Tolerance Against The Cadmium.

Chan-Sung Park · Kyoung-Ho Choi

Dept. of Food and Nutrition, Hyosung Women's College.

### Abstract

A bacterial strain which showed a remarkable tolerance against cadmium was isolated from waste water and identified as a member of *Staphylococcus aureus*.

Heavy metal ions, at the concentration of 10 ppm and other than cadmium, inhibited at least by 30 per cent of turbidometric growth of the organism. The organism exhibited a normal pattern of growth with increasing concentration of cadmium up to 50 ppm. However, they were unable to grow in the concomitant presence of cadmium higher than 500 ppm.

In spite of the drastic growth inhibition of cadmium, the organism was able to grow even in the concomitant presence of 500 ppm cadmium when it was previously cultivated for 15 hours with exposing to 10 ppm cadmium or lead.

### 緒 論

cadmium은 亞鉛鑛에 多量 含有되어 있으며 顔料, 도자기 電池의 生産 및 鍍金等に 널리 利用되고 있어서 水銀, 납과 더불어 水資源의 主要 汚染源이 되고있는 바<sup>1)</sup> 이의 生物學的 除去를 目的으로 多數의 cadmium 耐性菌이 分離되고 있다.<sup>2,3)</sup> 한편, 細胞學的 見地에서 cadmium이 生体内 代謝에 미치는 影響을 究明할 目的으로 耐性菌과는 다른 感受性 細菌도 分離되고 있으나<sup>4)</sup> cadmium에 對하여 特異的인 耐性을 報告한 例는 적다.

이러한 點을 감안하여 重金屬 相互間의 關聯性 및 cadmium에 特異的인 酵素系의 存在如否等의 究明에 利用될 수 있는 低濃度의 cadmium에 對하여 特異的인 耐性을 가지는 細菌株를 分離, 同定하였다.

### 材料 및 方法

#### 1. 培地組成

耐性菌의 分離 및 培養에는 金들<sup>2)</sup> 이 使用한 cadmium 耐性菌 分離用 培地에 準하여 glucose 10 g, peptone 5 g, yeast extract 2g, NaCl 1g,  $KH_2PO_4$  500mg,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  300mg을 증류수 1 liter에 溶解하였으며 pH를 調整한 後 (pH7.0) 加壓殺菌(0.75kg×10min)하였다. cadmium은  $CdSO_4 \cdot 8H_2O$ (Kokusen Kagaku)를 使用하였으며, 미리 溶解시킨 것을 殺菌 直前に 添加하였다.

#### 2. 耐性菌 分離 및 同定

大邱 近郊의 工場 地域으로 부터 採取한 廢水를 試

料로 하여 100ppm의 cadmium을 함유한 液体培地에서 返復 培養(5回)함으로써 cadmium에 對하여 耐性이 약한 細菌을 淘汰시킨 後 寒天 平板培地에서 特種적인 colony를 純粹分離하였다.

純粹分離한 耐性菌을 7種(Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> 및 Zn<sup>2+</sup>)의 重金屬을 10ppm 함유한 培地에서 各 各 培養하여 他 重金屬보다 cadmium을 함유한 培地에서 特異적으로 增殖이 빠른 菌株을 分離하였다. 分離한 菌株은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology<sup>6)</sup> 및 微生物의 分類と 同定<sup>7)</sup>에 依據하여 同定하였다.

3. 菌株 培養

分離된 耐性菌 1 白金耳를 液体培地에 接種하여 진탕배양(30°C×15hr) 한 後 이 培養液을 100ml의 液体培地에 接種하였다. 이 때 初發 turbidity는 0.1로 調整하였으며 前培養時와 同一하게 진탕배양하였다. *Escherichia coli* 및 *Bacillus megaterium*은 同一 培地를 使用하여 各 各 37°C 및 30°C에서 진탕배양하였다.

4. 增殖測定

菌體의 增殖은 培養液의 660nm에서의 吸光度(turbidity)로 表示하였다. turbidity는 Spectronic 20 (Shimadzu)을 使用하여 測定하였으며 turbidity가 1.0을 超過하는 경우에는 培地로 희석하여 測定하고 희석倍率을 곱하여 最終 turbidity로 하였다.

5. Cadmium 含量分析

菌體內에 含有된 cadmium은 朴들<sup>8)</sup>의 方法에 準하여 APDC(Ammonium pyrrolidine carbodithionate)-chelation法으로 抽出한 後 原子吸光分析機(Shimadzu, AA 610S)로 定量하였다.

結果 및 考察

1. 廢水中 微生物相

A, B, C의 3 個 工場地域 廢水로 부터 各 各 0.75, 2.38, 0.36ppm의 cadmium이 檢出되었으며 廢水 ml當 各 各 8.4×10<sup>8</sup>, 9.7×10<sup>5</sup>, 5.9×10<sup>6</sup>個의 colony가 生成되었다. 이 colony의 數는 Table 1과 같이 添加한 cadmium의 濃度가 높아질수록 減少하여 10ppm에서는 最初의 50%, 1,000ppm에서는 0.5% 以下の 菌數이 colony를 生成하였다. 特히 急激한 減少는 50ppm과 100ppm사이에서 일어났으며 100ppm 以上の 경우

Table 1. Number of the viable cells in the presence of different concentration of cadmium.

Concentration of Cd <sup>2+</sup> (ppm)	A	B	C
0	100.0	100.0	100.0
5	25.0	61.9	61.0
10	22.6	50.5	49.3
50	9.8	16.5	10.2
100	0.3	1.6	1.2
500	N.D*	0.9	0.8
1000	N.D.	0.5	0.3
Initial cell No. (cell/ml)	8.4×10 <sup>8</sup>	9.7×10 <sup>6</sup>	5.9×10 <sup>6</sup>

1) \*Not detected

2) A 0.75, 2.38 and 0.36 ppm of cadmium was detected from the waste water A, B and C, respectively.

cadmium 汚染度가 높은 廢水 B에서 가장 많은數의 colony가 生成되었다.

以上の 結果는 廢水의 重金屬汚染度가 높을수록 全体 微生物의 數는 減少하나 耐性菌의 數는 相對적으로 增加한다는 것 과 아울러 供試 試料인 廢水中에 있는 細菌의 相當數가 cadmium에 對하여 耐性을 가지고 있음을 나타내고 있다.

汚染度가 높을수록 細菌數가 減少하는 現象은 含硫黃 amino酸에 作用하여 蛋白質의 S-S結合을 阻害하는 cadmium의 毒性發現機構<sup>9)</sup>로부터도 推定可能하며 重金屬의 土壤 汚染度와 土壤 微生物相과의 相關關係를 調査한 達山들<sup>10)</sup>도 비슷한 結果를 報告하였다.

한편 cadmium은 10<sup>-6</sup>M(約 0.1ppm)의 濃度에서도 酵母 *Saccharomyces*의 增殖을 阻害할 程度로 強力한 毒性을 가진<sup>11)</sup>에도 불구하고 約 50%의 細菌이 10ppm의 cadmium 存在下에서도 colony를 生成하였다는 事實은 試料中の 많은 數의 細菌이 cadmium에 對한 耐性을 획득하였음을 나타낸다고 할 수 있겠다.

2. 耐性菌 分離 및 耐性試驗

100ppm의 cadmium을 함유한 平板培地에서 發生된 特徵적인 colony中 cadmium存在下에서는 增殖이 빠르나 他 重金屬에 依하여는 增殖이 阻害되는 菌株(總 12 菌株)를 選擇하여 菌體內 cadmium蓄積量을 分析한 結果 Table 2와 같이 增殖이 가장 빠른 7番 菌株에서 가장 많은 cadmium이 檢出되었다.

本 菌株의 cadmium에 對한 耐性을 代表的 Gram 陰性菌인 *E. coli* 및 Gram 陽性菌인 *B. megaterium*과 比

**Table 2. Isolated bacteria and their ability to grow and to accumulate cadmium.**

Bacteria	Turbidometric doublings/hr		Content of Cd <sup>2+</sup> * (ppm)
	5 hrs	10 hrs	
1	2.72	3.23	1,566
2	2.62	3.23	1,304
3	2.48	2.33	1,091
4	1.68	1.09	1,167
5	2.66	2.83	957
6	1.75	1.86	2,428
7	3.00	3.11	2,765
8	1.86	2.07	1,526
9	1.86	1.82	1,000
10	1.52	1.60	1,220
11	2.90	3.27	1,777
12	1.24	0.98	1,609

\* Cadmium concentration was calculated on the basis of dry cell weight.

較한 結果 Fig. 1과 같이 10ppm의 cadmium存在下에서 *E. coli*는 約 20%, *B. megaterium*은 約 40%의 增殖이 沮害되었으나 分離한 菌株의 경우에는 沮害되지 아니하였다.

한편 本 菌株의 여러 種類의 重金屬에 對한 耐性을 *E. coli*와 比較한 結果 Table 3과 같이 cadmium을 除한 他 重金屬에 依하여는 代數增殖中期에 해당되는 時

**Table 3. Inhibition of heavy metals on the bacterial growth.**

Metal	Isolated bacteria		<i>E. coli</i>	
	5 hrs	10 hrs	4 hrs	8 hrs
control	2.70	5.10	2.16	2.70
Cd <sup>2+</sup>	2.58	5.14	0.83	2.40
Cr <sup>3+</sup>	1.50	3.40	1.46	2.22
Cu <sup>2+</sup>	1.60	3.60	1.30	2.20
Hg <sup>2+</sup>	1.54	3.64	1.46	2.44
Pb <sup>2+</sup>	1.48	3.58	1.46	2.82
Zn <sup>2+</sup>	1.66	4.40	1.52	2.30

- 1) Concentration of each metal was adjusted to 10 ppm.
- 2) Each figure represents the turbidity of cultural broth which was measured after cultivation for several hours as illustrated in the table.

間 培養時까지는 約 40%, 代數增殖末期에 해당되는 10時間까지는 約 30%의 增殖이 沮害되었다. 한편 *E. coli*는 代數增殖中期에 해당되는 4時間 培養時까지는 使用한 重金屬中 cadmium에 依하여 가장 현저히 沮害되었으며 他 重金屬에 依하여서는 約 30%의 增殖이 沮害되었다. 그러나 末期에는 分離菌株의 경우에는 달리 增殖能이 回復되어 Pb<sup>2+</sup>의 경우에는 對照와 同等한 程度의 增殖을 나타내었고 他 重金屬의 경우에도 約 85%의 增殖을 나타내었다.

分離한 菌株의 cadmium에 對한 耐性의 程度를 알기

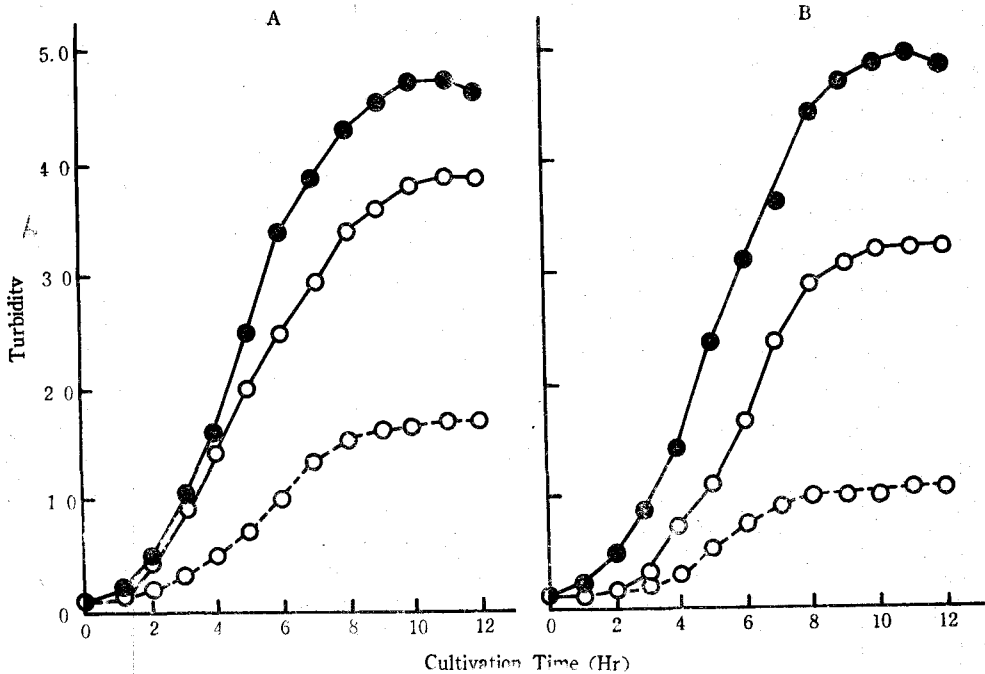


Fig. 1 Growth of isolated bacteria and other two strains of bacteria. Organisms were cultivated with (A) or without (B) addition of 10 ppm cadmium. Symbols represent ●—●: isolated bacteria, ○—○: *E. coli* and ○-○: *B. megaterium*.

爲하여 同 菌株을 여러가지 濃度의 cadmium을 含有한 液体培地에서 培養한 結果 Fig.2와 같이 50ppm까지는 對照와 同等한 増殖을 나타내었다. 100ppm의 경우에도 最高 約 15%의 増殖만이 沮害되었으나 500ppm 以上의 濃度에서는 増殖이 不可能하였다.

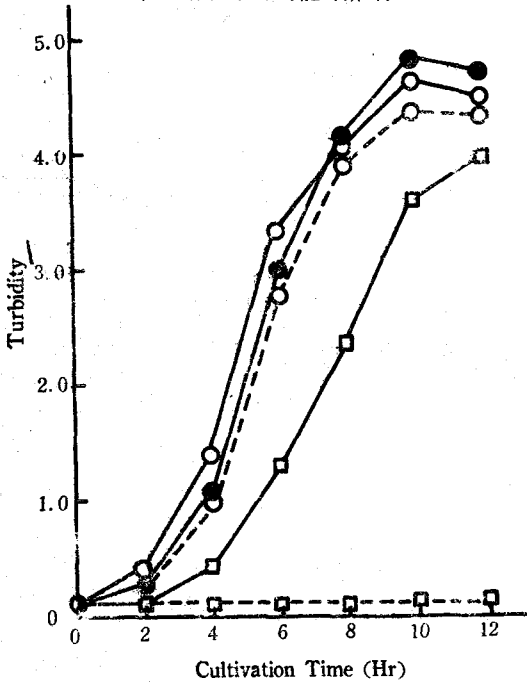


Fig. 2 Growth of the isolated bacteria at various concentrations of cadmium. Organisms were cultivated until they reached to the end of exponential growth. Symbols represent ○—○: control, ●—●: 10 ppm, ○··○: 50 ppm, □—□: 100 ppm and □··□: 500 ppm cadmium.

以上の 結果는 分離한 菌株가 cadmium을 除한 他 重金屬에 依해서는 10 ppm의 濃度에서도 増殖이 상당한 沮害를 받으나 cadmium에 依해서는 50ppm까지는 沮害를 받지 않으며 100 ppm의 濃度에서 까지도 増殖이 可能함을 나타내는 것으로서 分離한 菌株는 一般 細菌株와는 달리 cadmium에 對하여 特異的인 耐性을 가지고 있는 것으로 分析된다.

이것은 分離한 菌株가 cadmium에 對하여서는 細胞 表面에 Gram陰性菌에 特異的인 糖脂質의 膜構造를 가짐으로서 重金屬 또는 抗生物質에 對하여 一般의 높은 耐性을 가지는 *E. coli*보다 높은 耐性을 가지나 他 重金屬에 對하여는 逆으로 耐性이 떨어지는 實驗 結果로 부터도 明確하다. 分離한 細菌株가  $Zn^{2+}$ 에 對하여 cadmium 다음으로 높은 耐性을 나타낸 것은  $Zn^{2+}$ 의 生理作用이 cadmium과 類似함<sup>8)</sup>에 基因한 것으로 分析된다.

### 3. 分離菌株의 同定

分離한 菌株는 Table 4 및 5와 같이 Gram 陽性的인 無孢子 球菌으로서 運動性이 없었으며 catalase와 urease를 分비하였고 oxidase는 生成치 아니하였다.

Table 4. Morphological and cultural characteristics of the isolated bacteria.

- |                                  |   |
|----------------------------------|---|
| A. Morphological characteristics |   |
| 1. Shape and size:               | coccus, 0.5 $\mu$ m   |
| 2. Motility:                     | nonmotile   |
| 3. Growth:                       | aerobic   |
| 4. Endospore:                    | not produced  |
| B. Cultural characteristics      |   |
| 1. Agar plate:                   | a) Form: punctiform<br>b) Elevation: convex<br>c) Margin: filamentous |
| 2. Agar stroke:                  | spread  |
| 3. Agar stab:                    | filiform  |

Table 5. Physiological characteristics of the isolated bacteria.

- |  |  |
|--|--|
| 1. Gram stain:                                 | negative                               |
| 2. Catalase:                                   | produced                               |
| 3. Spore stain:                                | negative                               |
| 4. Oxidase:                                    | not produced                           |
| 5. Indole:                                     | not produced                           |
| 6. Urease:                                     | produced                               |
| 7. Acid from Hugh and Leifson's medium:        | produced aerobically and anaerobically |
| 8. Methyl red:                                 | negative                               |
| 9. Voges-Proskauer:                            | positive                               |
| 10. $H_2S$ from TSI agar:                      | not produced                           |
| 11. Citrate as whole carbon source:            | utilized                               |
| 12. Ammonium sulfate as whole nitrogen source: | utilized                               |
| 13. Acid from the sugars                       |  |
| a) Sucrose:                                    | +                                      |
| b) Trehalose:                                  | +                                      |
| c) Sorbitol:                                   | +                                      |
| d) Lactose:                                    | -                                      |
| e) Arabinose:                                  | +                                      |
| f) Maltose:                                    | +                                      |
| g) Fructose:                                   | +                                      |
| h) Starch:                                     | -                                      |
| i) Xylose:                                     | +                                      |

indole, methyl red test에는 陰性이었으며 O-F test에서 好氣的, 嫌氣的으로 酸을 生成하였고 醱酵性이 있었다. T.S.I. 寒天에서  $H_2S$ 는 發生치 아니하였으며 citrate를 唯一 炭素源으로 利用할 수 있었고 ammonium sulfate를 窒素源으로 利用할 수 있었다. sucrose, sorbitol, arabinose, fructose, xylose, maltose로 부터는 酸을 生成하였으나 lactose와 starch로 부터는 生成하지 않았다.

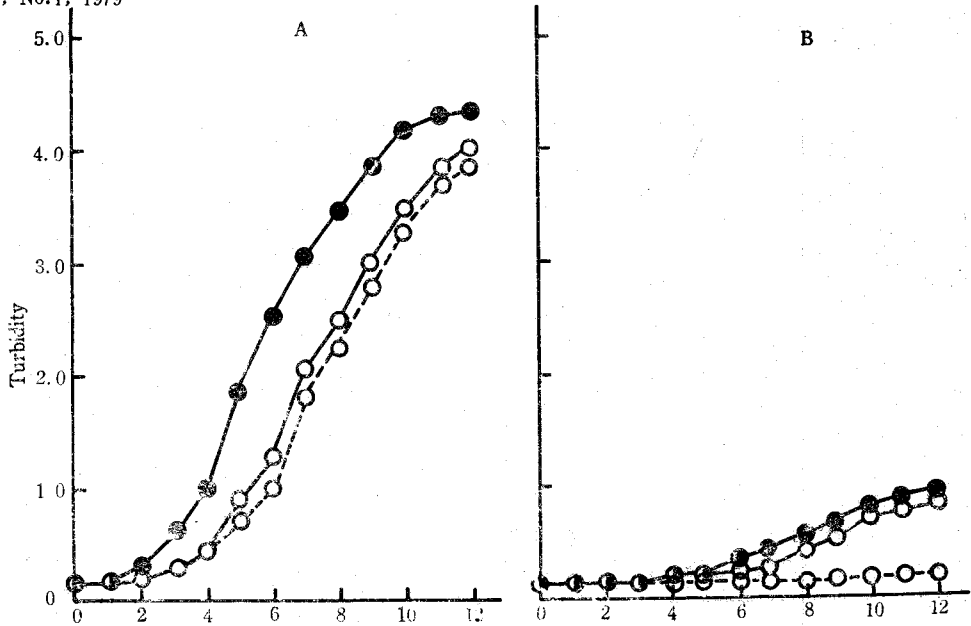


Fig. 3 Effect of pre-cultivation of isolated bacteria with heavy metals on the tolerance of isolated bacteria against cadmium. Organisms were previously cultivated for 15 hours with exposing them to 10 ppm of cadmium and lead, and then, cultivation was continued with exposing to a 100 (A) and 500 ppm (B) cadmium. Symbols represent ○—○: control, ●—●: cadmium and ○—○: lead.

이와같은 培養 및 形態의 特性으로 미루어 同細菌은 *Staphylococcus aureus*의 近緣株로 同定되었다.

重金屬에 對한 耐性菌으로서는 主로 Gram 陰性菌이 分離되고 있으나<sup>2,3)</sup> *Staphylococcus*에서 cadmium에 對한 耐性이 報告된 例<sup>11)</sup>가 있으므로 Gram陽性菌의 경우에도 耐性의 例는 적으나 不可能한 것은 아닌 것으로 判斷된다.

4. 前處理가 耐性에 미치는 影響

低濃度(10ppm)의 cadmium과  $Pb^{2+}$  存在下에서 培養한 細菌을 100 및 500ppm의 cadmium을 含有한 液体培地에서 再培養한 結果 Fig. 3과 같이 100ppm의 경우 (3-A) cadmium으로 前處理한 것은 對照에 比하여 誘導期가 2時間에서 1時間으로 短縮되었고 增殖 또한 促進(約 15%) 되었다. 그러나  $Pb^{2+}$ 로 前處理한 경우에는 이러한 促進效果는 認定되지 아니 하였다. 한편 500ppm에서 培養한 경우(3-B)에는 無處理의 對照는 增殖이 不可能하였으나 前處理한 경우에는 各各 5時間(cadmium), 7時間( $Pb^{2+}$ )의 誘導期를 거친 後부터 增殖이 可能하였다.

以上の 結果는 低濃度의 重金屬으로 前處理함으로써 耐性을 向上시킬 수 있음과 아울러 重金屬 相互間에는 약간의 交換性이 있으나 cadmium에 對한 耐性의 向上을 爲하여는 cadmium으로 前處理함이 가장 合理的인 을 나타내고 있다. Mitra 등<sup>10)</sup>도 *E. coli*에서 前處理에 依한 誘導期의 短縮 및 重金屬相互間의 交換性等 비슷한 現象을 報告하고 있다.

5. 分離菌株의 其他 生育特性

分離菌株의 最適 生育溫度는 30°C였으며 最適 pH는 7.0이었으나 pH 5.0—9.0까지의 넓은 범위에서 增殖이 可能하였다. 最適 溫度, pH에서 培養한 경우 菌體

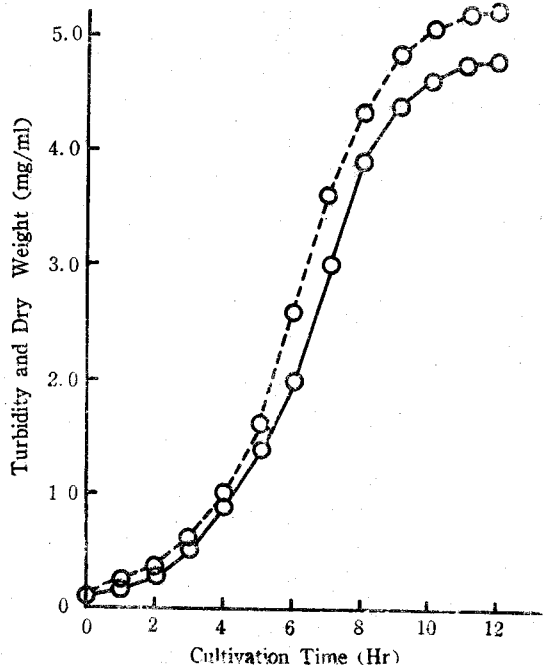


Fig. 4 Growth of the isolated bacteria without concomitant presence of cadmium. Growth was measured by the way of increase in turbidity and dry cell weight. Symbols represent ○—○: turbidity and ○—○: dry weight.

의 乾物重量과 turbidity는 Fig. 4와 같이 비슷한 모양으로 增加하였다.

要 約

工場地域 廢水로부터 cadmium에 對한 耐性菌을 分離하였으며 이것은 *Staphylococcus aureus*로 同定되었다.

同 菌株는 cadmium 以外의 重金屬( $Cr^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  等)에 依하여서는 10ppm의 濃度에서 平均 約 30%의 增殖이 阻害되었으나 cadmium에 依해서는 50ppm까지는 阻害되지 아니 하였다.

同 菌株의 增殖을 完全히 阻害하기 爲하여 500ppm의 cadmium濃度가 必要하였으나 同 菌株를 10ppm의 cadmium 또는  $Pb^{2+}$  存在下에서 15時間 培養한 細菌은 500ppm의 cadmium 存在下에서도 增殖이 可能하였다.

以上の 結果로부터 分離한 菌株는 他重金屬에 依해서는 生育이 쉽게 阻害되나 cadmium에 依해서는 상당한 濃度까지 生育이 阻害되지 아니하는 菌體, 即 cadmium에 特異的인 耐性菌으로 判斷되었다.

文 獻

- 1) 堀口 博 : 公害食品, 三共社, 東京, p. 32-33 (1975)
- 2) 金永培, 李瑞來 : 카드뮴의 耐性菌분리 및 菌체내 蓄積, Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng., 4(3), 111-115(1976)
- 3) 堀津 浩章, 前田 達儀, 友枝 幹夫 : 카드뮴 耐性菌의 分離とその 菌體への 取込について J. Ferment. Technol., 52(1), 14-19(1974)

- 4) Toshihiro Ohata, Shigaezo Udaka: Isolation of Cadmium- and Mercury-sensitive Mutants of *Escherichia coli* and Some Factors Influencing Their Sensitivities, Agric. Biol. Chem., 41(3), 461-466(1977)
- 5) Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams Co., Baltimore, 484-487(1974)
- 6) 長谷川 武治 : 微生物の 分類と 同定, 東京大學 出版會, 203-246(1975)
- 7) 朴今順, 李萬正 : 食品에 添加한 Cadmium의 調理에 依한 含量 變化, J. Korean Soc. Food & Nutr., 8(1), 43~50 (1979)
- 8) 鈴江 綠衣郎 : 水銀カドミウム鉛の生体内 代謝に及ぼす作用, 營養學雜誌, 3, 135-140(1973)
- 9) 達山 和紀, 江川 宏, 山本 廣基, 井上啓一 : 金屬化合物による土壤汚染と微生物相, 日菌報, (Trans. Mycol. Soc. Japan), 15(3), 246-250 (1974)
- 10) Mitra, R. S., R. H. Gray, B. Chin and I. A. Bernstein: Molecular Mechanisms of Accomodation in *Escherichia coli* to Toxic Levels of  $Cd^{2+}$ , J. Bacteriol., 121(3), 1180-1188(1975)
- 11) Kondo Isamu, Ishikawa Tomoaki, Nakahara Hideomi: Heavy Metal Resistance in *Staphylococcus aureus*, Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkd., Infektionskr. Hyg., Abt. 1, Suppl. 217-230(1976)