

# 카드뮴 내성 Staphylococcus aureus 내 카드뮴 분포

玄 思 旻 朴 燦 性\* 崔 慶 浩

〈 曉星女子大學 食品營養學科, \* 信一女子專門大學 食品營養學科 〉

## Distribution of Cadmium in a Strain of Staphylococcus aureus Resistant Against the Metal

Eun-Min Hyun, \*Chan-Seung Pak and Kyoung-Ho Choi

(Dept. Food Science and Nutrition, Hyoseung University)

(\*Dept. Food and Nutrition, Shinil Women's College)

### Abstract

A strain of Staphylococcus aureus resistant against cadmium was cultivated by using a liquid medium containing 10ppm cadmium ion, and then, it was fractionated into several fractions as described in the previous paper. Content of the metal in each fraction was determined through an atomic absorption spectrometry. The results are as follows;

(1) A 690.9 $\mu$ g cadmium was contained in one gram dry cell, (2) A 39.9% of total cadmium was easily extracted by TCA, however a 52.2% was unextractable even by series of extraction with TCA, ethanol-ether, perchloric acid and ammonium water. (3) Among the fractions prepared along the cellular structure, plasma membrane fraction showed a highest content of the metal by containing a 59.1%. (4) The fraction of cytoplasm and cell wall contained a 26.8 and 14.1%, respectively. (5) More than 90% of the metal contained in the cell wall was detected from the fraction of lipopolysaccharide.

It is considered from these results tht at least a 70% of the cadmium up taken by the resistant cell associates with membranous structure in the cell surface.

### I. 緒 論

그價의 重金屬에 屬하는 카드뮴은 重要한 環境汚染物質로 究明됨에 따라 産業廢水로 부터 이를 除去할 目的으로 多數의 카드뮴耐性菌이 分離<sup>1-3)</sup> 되어

왔으며 同 耐性菌體內 카드뮴分佈에 關하여도 活潑한 研究가 進行되어 왔다. 堀津들<sup>4)</sup>은 破碎한 菌體를 遠心分離하여 菌體內에 含有된 카드뮴의 87%가 遠心沈澱 중에 存在한다고 하였고 Mitra들<sup>5)</sup>은 56%의 카드뮴이, 金들<sup>6)</sup>은 60% 以上の 카드뮴이 細

菌 細胞壁에 存在한다고 하였다. 한편, 카드뮴과 類 似한 重金屬의 菌體內 分布에 關하여도 多數의 研究<sup>7,8)</sup>가 있어 왔으나 카드뮴의 경우와 마찬가지로 菌 體의 分劃條件 및 使用 菌株에 따라 顯格한 差異가 있어왔다.

이런 觀點에서 分離된 카드뮴耐性的의 *S. aureus*<sup>3)</sup>를 前報<sup>9)</sup>와 같이 化學成分 및 菌體構造에 따라 分劃하고 各 劃分中의 카드뮴 含量을 調査하였다.

II. 材料 및 方法

1. 菌株 및 培養條件

使用菌株 : 카드뮴耐性 *S. aureus*로서 前報와 同一한 菌株를 使用하였다.

培養條件 : 카드뮴濃도가 10 ppm이 되도록 CdSO<sub>4</sub>를 溶解한 액체培地를 使用한것 以外에는 前報와 同一하였다.

2. 카드뮴 含量分析

朴들<sup>3)</sup>의 方法에 準하여 各劃分에 含有된 카드뮴을 Methyl is is-butylketone에 溶解한 Ammonium pyrrolidine dicarbothioate 로 抽出한 後 原子吸光分析法로 定量하였으며 原子吸光分析器 (Shimadzu, 610 S)의 測定條件 또한 同一하였다.

3. EDTA 處理

代數增殖 中期(10時間培養)의 培養菌에 2%의 EDTA (Ethylene diamine tetra acetic acid)를 加하여 15時間 진탕배양하였다. 이 菌을 Tris-HCl 완충액으로 1回 세척하여 EDTA를 除去하고 5%의 EDTA를 含有한 培地 및 EDTA를 含有치 아니한 培地에 各各 接種하여 5時間 再培養한 後 遠心 上澄液中의 카드뮴 含量을 調査하였다.

III. 結 果

1. 菌體成分別 카드뮴 含量

前報에서 STS法에 準하여 分劃한 各劃分에 있어서의 카드뮴 含量은 Table 1과 같다. 卽 菌體內에 含有된 總 690.9 μg/g의 카드뮴 中 約 53.2%에 相當하는 367.6 μg이 殘渣中에서 檢出되었고 39.9%에 相當하는 275.7 μg이 TCA 可溶性劃分에서, 나머지 9.2%에 相當하는 63.7 μg 만이 脂質, 蛋白質 및 核酸劃分에서 檢出되었다.

2. EDTA 處理에 의한 카드뮴 Chelation

EDTA 로 前處理한 菌을 다시 EDTA를 含有한 培地에 接種한 경우에는 Fig. 1로 表示한 바와 같이 增殖이 阻害되었으나 EDTA를 含有치 아니한 培地

Table 1. Extraction of Cadmium by Using Various Solvents.

	Cadmium content (μg/g dry cell)
Whole cell	690.9
Extracted by	
Cold TCA	263.6
Hot TCA	12.1
Ethanol - Ether	24.2
Perchloric acid	30.2
Ammoniumwater	9.3
Residue	367.6

Organisms were treated orderly with the solvents according to the STS procedure illustrated as Fig. 1. in previous paper. TCA indicates the trichloroacetic acid.

에 接種한 경우에는 對照 (EDTA 로 前處理 하지 아니한 菌)과 對等한 增殖을 나타내었다.

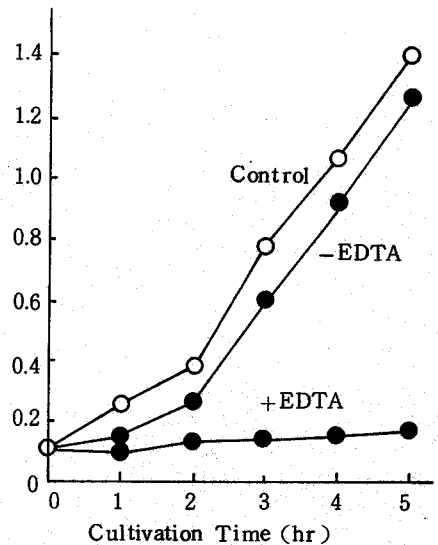


Fig. 1. Recovery of Growing Activity of EDTA-treated Cells After Removing of the Agent.

The cells grown in the presence of 2% EDTA were recultivated with or without addition of 5% EDTA.

한편 EDTA 前處理없이 別途로 培養한 菌을 5% EDTA 와 증류수로 5時間 진탕배양한 후 遠心分離 하였을 때 Table 2 와 같이 各各 505.9, 13.1  $\mu\text{g}$ 의 카드뮴이 원심상등액 중에서 檢出되었다.

Table 2. Extraction of Cadmium with(EDTA)

Extracted by	Cadmium content ( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry cell)
Distilled water	13.1
EDTA	505.9

A 5% (w/v) EDTA was used for the extraction. EDTA treatment was carried at 30°C for 5 hr.

3. 菌體 構造均別 카드뮴含量

菌體 構造物에 따라 分劃한 各 劃分에 있어서의 카드뮴 含量은 Table 3 과 같이 原形質劃分에서 總檢出量의 26.8%가, 原形質膜劃分에서 59.1%, 細胞壁劃分에서 14.1%가 檢出되었고 細胞壁에 含有

Table 3. Distribution of Cadmium in Cellular Structures.

Structures	Cadmium content ( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry cell)	Rate (%)
Cytoplasm	130.0	26.8
Plasmamembrane	286.3	59.1
Cell wall	68.2	14.1

Each fraction was prepared by using a series according to the method as described in previous paper.

Table 4. Distribution of Cadmium in the Cell Wall

Fraction	Cadmium content ( $\mu\text{g}/\text{g}$ dry cell)	Rate (%)
Polysaccharide	76.8	90.7
Reptidoglycan	7.9	9.3

Polysaccharide fraction was prepared by extraction of crude cell wall with hot formamide.

된 總 카드뮴 중 Polysaccharide 劃分에 90.7%가 Peptidoglycan 劃分에 나머지 9.3%가 含有되었다 (Table 4 참조).

N. 考 察

카드뮴耐性 細菌에 있어서 카드뮴은 原形質膜 및 細胞壁과 같은 表層構造物에 主로 分布되는 것으로서 그 含量은 50~90%에 이르는 것으로 알려져 있다<sup>4,5)</sup>. 本 供試菌에 있어서도 原形質膜劃分 및 細胞壁劃分에 各各 59%, 14%의 카드뮴이 含有되어 (Table 3) 表層全體로는 73%의 카드뮴을 含有함으로써 他의 耐性菌株과 近似한 것으로 判斷된다. 한편, 化學的으로 分劃한 Table 1의 結果도 殘渣 및 Ethanol-Ether 劃分 중 含量의 合이 約 58%에 達함으로써 構造物別로 分劃한 上記 結果와 같은 傾向을 나타내는 것으로 分析된다.

그러나 部分的으로 볼 때 原形質膜劃分中の 含有率 57%는 他 菌株에서 提示된 15~30%보다 相當히 높은 數值이며 細胞壁劃分 중 含有率 14%는 相對的으로 낮은 數值이며 이것은 供試菌中 카드뮴 分析狀態가 他 耐性菌과 差異가 있기 때문이 아니라 分劃方法上的 差異에 基因하는 것으로 思料된다.

具體的으로 原形質膜劃分을 얻기 위하여 界面活性劑인 SDS로 處理하였던 바 이때 原形質膜과 아울러 lipid를 主要構成成分으로 하는 細胞 最外層의 lipopolysaccharide가 一部分分解되어<sup>10)</sup> 그 중에 含有되었던 카드뮴이 SDS 可溶性劃分 中으로 移越됨으로 原形質膜劃分중의 카드뮴 含量은 增加한 反面 細胞壁劃分중의 含量은 相對的으로 減少된 것으로 判斷된다.

이러한 判斷은 (1)細胞壁劃分에 含有된 總 카드뮴의 91%가 Lipopolysaccharide 劃分에서 檢出된 點 (Table 4)과 (2)破碎치 아니한 完全菌體를 EDTA로 處理함으로써 約 73%의 카드뮴이 抽出되었다는 點 (Table 2) 및 (3) EDTA 處理菌도 EDTA가 除去되었을 때 正常菌과 같이 增殖 可能하였다는 點 (Fig. 1)에 根據하고 있다.

即, EDTA 處理에 依하여 增殖이 阻害된 菌體에 있어서도 正常的인 代謝機能이 유지되고 있다는 Birdsell 등<sup>11)</sup>의 報告와 EDTA 處理에 依하여 細胞壁를 除去한 Protoplast에 있어서도 正常細胞의 生體高分子 生合成, Bacteriophage 및 胞子形成 등의 機能이 유지된다는 學數的 報告<sup>12,13,14)</sup>로부터 EDTA 處理에 依하여 영향을 받는 菌體部位는 主로 細胞壁部位라는 點은 分明하다.

따라서 本回의 實驗에서 EDTA에 의하여 抽出된 카드뮴이 主로 細胞壁部位에 存在하던 것으로 假定하면 SDS 處理에 의하여 細胞壁劃分으로 부터 原形質膜劃分으로 移越된 量은 200 ~ 280  $\mu\text{g/gdry cell}$  로서 이로 因하여 原形質膜 中 含量은 約 30 ~ 40%가 높아지고 細胞壁 中 含量은 그만큼 낮아진 것으로 考察된다.

### V. 要 約

前報에서 分劃한 카드뮴耐性 *S. aureus*의 各 劃分中에 含有된 카드뮴을 原子吸光法으로 分析하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 菌體 g 당 690.9  $\mu\text{g}$ 의 카드뮴이 含有되었다.
2. 同 카드뮴 中 39.9%에 相當하는 量은 TCA로 容易하게 抽出되었으나 52.2%의 카드뮴은 TCA 抽出 後 Ethanol - Ether, Perchloric acid, Ammonia 水로 順次的으로 抽出하여 抽出되지 아니하고 殘渣中에 殘有하였다.
3. 菌體部位別로는 原形質劃分에 26.8%, 原形質膜劃分에 59.1%, 細胞壁劃分에 14.1%가 含有되었고,
4. 細胞壁에 含有된 카드뮴 中 90% 以上이 Li-popolysaccharide 劃分에서 檢出되었다.

<알 림>

本 研究는 1980 年度 文教部 學術研究支援에 依하여 이루어진 것임.

### 參 考 文 獻

1. Norris, P.R. and Kelly, D.P. (1977): Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*, J. Gen. Microbiol., **99**, 317-324.
2. Heldwein, R. Tromballa, H.W. und Broda, E. (1977): Aufnahme von Cobalt, Blei und Gad-mium durch Backerhafe, Zeit-Zeitschrift fur Allgemeine Microbiologie, **17**, 229-308.
3. 朴燦性, 崔慶浩 (1980): 카드뮴에 特異的인 耐性菌의 分離, 韓國營養食糧學會誌, 第 8 卷, 第 1 號, 25-30
4. 堀津浩章, 前田達儀, 友枝幹夫 (1974): カドミウム耐性菌の分離とその菌體への取込みについて, 醸工, **52**, 14-19
5. Mitra, R.S., Gray, R.H., Chin, B. and Bernstein, I.A. (1975): Molecular mechanisms of accommodation of *Escherichia coli* to toxic level of Cd<sup>2+</sup>, J. Bacteriol., **121**, 1180-1187.
6. 金永培, 李瑞來 (1976): 카드뮴 耐性品 分離 및 菌體內 축적, Kovean J. Appl. Microbiol Eng., **4**, 111~115.
7. Failla, M.L., Benedict, C.D. and Weinberg, E.D. (1976): Accumulation and storage of Zn<sup>2+</sup> by *Candida utilis*, J. Gen. Microbiol., **94**, 24-36.
8. Norris, P.R., Mann, W.K., Huges, M.N. and Kelly, D.P. (1976): Toxicity and accumulation of thalium in bacteria and yeast, Achiev. Microbiol., **110**, 279-286.
9. 崔慶浩, 玄恩旻, 朴今順 (1981): *Staphylococcus aureus*의 菌體分劃, 韓國營養食糧學會誌, 第 9 卷, 第 2 號,
10. Dulaney, T.J. and Touster, O. (1970): The solubilization and gelelectrophoresis of membrane enzyme by use of detergents, Biochem. Biophys. Acta., **196**, 29-34.
11. Bridsell, D.C. and Cota-Robles, E.H. (1967): Production and ultrastructure of lysozyme and ethylenediaminetetraacetate-lysozyme spheroplasts of *Escherichia coli*, J. Bacteriol., **93**, 427-437.
12. Roth, G.H., Shockman, D.D. and Daneo-Moore, L. (1971): Balanced macromolecular biosynthesis in protoplasts of *Streptococcus faecalis*, J. Bacteriol., **105**, 710-717.
13. Weibull, C. (1958): Bacteria protoplasts, Ann. Rev. Microbiol., **12**, 1-26.
14. Choi, K.H. (1978): Biological properties of protoplasts produced by sucrose-induced autolysis of *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*, 韓國食品科學會誌, 第 10 卷 2 號 136 ~ 142.