

Pb ion耐性菌에 의한 Pb의 菌体内 蓄積에 關하여

洪 淳 德 · 金 仁 錫

慶北大學校 農科大學 食品加工學科

Uptake of Lead by the Lead-tolerant Bacteria

Hong, Soon Duck · Kim, In Seok

Dept. of Food Science and Technology, Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

A strain of *Alcaligenes* sp. isolated from the sludge of industrial area was found to uptake 24.1 mg lead/g dried cell during incubation in medium containing 100g/ml of lead.

Analyses of cellular subfractions reveal that fractions of cell wall contain 88.6 percent of lead found associated with the cells and the remainder is found associated with the cytoplasmic fraction.

Ultrastructural examination of the cells cultured in media containing 500 and 1000g/ml of lead showed no major irregularities between cells of the treated and untreated cultures.

緒 論

工業의 發達로 인한 環境汚染 가운데 特히 重金屬이 生物系에 미치는 影響은 크다. 이들 重金屬에 對한 微生物의 耐性機構, 蓄積 및 形態에 미치는 影響등에 關한 研究로서 Cd ion에 對해서는 Novick⁹⁾ Chopra²⁾, 前田友枝⁸⁾ 김⁶⁾, 小田雅夫¹⁰⁾ 등과 Hg ion의 경우 Tonamura,¹⁵⁾ Nelson,¹⁷⁾ Fukui¹⁴⁾ 등 외에도 많은 研究가 報告되어 있다.

重金屬中 Pb化合物은 土壤 및 大氣에 廣範圍하게 分布하여 電池製造, 페인트製造, 肥料製造工業의 廢水로도 排出되어 人體의 胃에 蓄積되어 腹痛, 便秘, 貧血등 局所的 或은 全身的 障礙를 일으킨다.

徐¹²⁾등에 따르면 大邱地方의 河川의 경우

公害 防止法의 排出許容基準인 25ppm 에는 未達이지만 10ppm을 超過하는 곳도 報告되어 있으며 이와같은 Pb ion에 對한 研究로서는 Tonabene¹⁶⁾ 등의 *Micrococcus luteus* 와 *Azotobacter* sp. 에 의한 細胞内 蓄積과 Siverberg¹¹⁾에 의한 Trimethyl lead acetate가 *Aeromonas* sp. 의 微細構造에 미치는 影響등이 報告되어 있을 뿐 國內에서는 이에 對한 研究報告는 거의 없는 실정이다.

따라서 本 研究는 微生物에 의한 Pb ion의 轉換過程과 廢水中的의 Pb ion을 處理하려는 基礎研究로서 Pb ion에 耐性이 강한 菌을 汚泥에서 分離하여 菌体内 蓄積과 Pb ion이 存在할 때의 微細構造 變化등의 結果를 報告하고자 한다.

材料 및 方法

1. 供試菌株

本實驗에 使用한 菌株는 大邱地域의 工業團地內의 廢水 및 汚泥를 採取하여 Pb ion에 대하여 強한 耐性을 가지며 菌體內에 Pb를 가장 많이 蓄積하는 한 菌株(P-77)를 選別하여 本實驗에 使用하였다.

2. 供試試藥

Pb鹽으로는 $Pb(NO_3)_2$ (片山化學 工業株式會社製 試藥一級)을 使用했으며 Pb ion定量時 標準化合物로 和光純藥工業株式會社製 試藥特級인 硝酸鉛($Pb(NO_3)_2$)을 使用하였다.

3. 菌分離 및 培地

Pb ion耐性菌을 分離하기 위하여 beef extract 10g, polypeptone 10g, NaCl 3g, $Pb(NO_3)_2$ 0.799g(Pb ion최종농도 500 $\mu g/ml$) 蒸溜水 11로 만든 培地에 agar 1.8%를 가하여 菌分離用 培地로 하였으며 菌分離는 混和平板公離法²⁾에 따라서 行하였고 細胞內 Pb ion의 蓄積을 調査하기 위해서도 上記의 肉汁液體 培地에 各各 金屬의 濃度를 調節하여 使用하였다.

4. 微生物의 基礎同定

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology¹⁾ 8 ed. 와 微生物의 分類와 同定³⁾에 의했다.

5. Pb ion의 定量

Hitachi 207 atomic absorption spectrophotometer를 使用하여 原子吸光度法⁴⁾으로 定量하였다.

6. 菌의 培養 및 回收

分離菌의 生育度 및 菌體內 蓄積을 檢討하기 위한 菌의 培養時에는 1,000ml 三角flask에 200ml의 培地를 넣고 30°C에서 24시간, 振幅 7 cm, 分當 80stroke의 條件으로 진탕 배양했다. 그리고 培養液에서 菌體의 回收는 Marusan Model 45-CFS 冷凍遠心分離器를 使用하였다.

7. 試料의 灰化

乾燥한 試料를 灰化하는데 electric furnace를 利用하였고 灰化促進劑는 $Al(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ 40g과 $Ca(NO_3)_2$ 20g을 再蒸溜水100

ml에 溶解한 것을 使用하였다.

8. 微細構造 觀察

Pb ion을 濃度別로 添加한 培地에 菌을 接種하여 30°C, 48時間 진탕배양한 後 菌體를 遠心, 集菌한 뒤 Palade⁵⁾ 固定液으로 4°C에서 20時間 固定하여 agar에 包埋한 후 50%, 70%, 80%, 90%, 100% alcohol과 propylene oxide 順으로 脫水시키고 epon으로 包埋, 重合시킨 다음 Porter Blum Ultramicrotome MT-2 B type로 glass knife를 使用하여 薄切하여 Reynolds⁶⁾ 法으로 二重染色한 뒤 Hitachi HU-11C-type 電子顯微鏡으로 觀察하였다.

結 果

1. 耐性菌의 分離 및 Pb ion 耐性

大邱地域의 工業團地內 汚泥 및 廢水 81點을 試料로 하여 Pb ion濃도가 500 $\mu g/ml$ 되게 한 寒天 肉汁培地에 混和平板分離法으로 37°C에서 24時間 培養하여 67株의 細菌을 分離하였다. 純粹分離한 67株의 Pb ion에 對한 耐性을 調査하기 위하여 500, 1000, 1500, 1750, 2000 $\mu g/ml$ 되게 培地에 硝酸鉛을 加한 후 新鮮培養한 分離菌株들을 1白金耳씩 接種한 後 37°C에서 2日間 培養하여 經時的으로 生育을 나타낸 菌株를 表示해 본 結果는 Table 1 과 같으며 2000 $\mu g/ml$ 에서 生育한 6 菌株中 生育이 우수하고 菌體內 蓄積率이 가장 좋은 1 菌株를(P-77) 選別하였다.

Table 1. Lead tolerance of the isolated microorganisms.

Pb ⁺⁺ concn. in medium ($\mu g/ml$)	Number of grown isolates
500	67
1000	59
1500	28
1750	15
2000	6

2. 分離菌株(P-77)의 基礎同定

Pb ion에 對하여 耐性이 가장 強한 分離菌株의 形態的, 培養的 및 生理的 特性을 보면 Table 2 와 같다.

즉, gram陰性的의 無孢子 桿菌으로서 運動性이 있고 好氣的으로 生育하며, oxidase와 catalase가 陽性이고 glucose에서 酸을 生成하지 않으며 O-F test가 陰性이므로 *Alkali-*

Table 2. Morphological and cultural characters of the isolated microorganism.

A. Morphological characters	
1. gram stain	—
2. shape & size	short rod 0.8 by 1.5 μm
3. motility	motile
4. endospore	—
5. growth	aerobic
6. acid fast stain	—
B. Cultural characters	
colony	circular, raised, undulate
agar stroke	fili from
gelatin stab	surface growth
nutrient broth	turbid
C. Physiological characters	
catalase	+
oxidase	+
imvic test	—
indol	—
methyl red	—
voges-proskauer	—
simmons citrate	+
acid from glucose	—
O-F test	—

genes sp. 로 基礎同定하였다.

3. 分離菌株의 生育에 미치는 Pb ion의 影響

100, 1000 μg /ml 의 Pb ion 을 含有한 培地와 Pb ion 을 含有하지 않은 培地에서 本菌의 增殖을 660nm에서의 吸光度(OD) 로서 나타낸 결과 Fig. 1 과 같다.

Pb ion을 100 μg /ml 含有한 培地에서 本菌은 對照區와 비슷한 生長을 나타내었고 1000 μg /ml 를 含有하는 培地에서도 별다른 誘導期가 觀察되지 않았으며 生長도 特記할만한 差異를 나타내지 않았다.

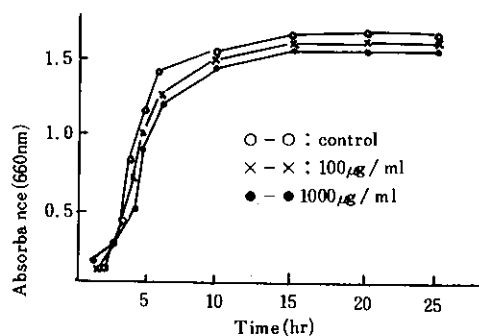


Fig. 1. Growth curves of strain P-77 in lead-containing media at 30°C on a reciprocal shaker.

4. 分離菌株의 Pb ion 蓄積

本菌을 10, 100 μ g/ml의 Pb ion을 含有하는 培地에 各各 培養했을때 細胞內Pb ion의 蓄積은 Fig. 2와 같이 培地區분과 細胞區分으로 나누었으며 各記 乾燥하여 電氣爐로 500 $^{\circ}$ C 以下에서 12時間 灰化했으며 灰化가 不完全할 때에는 材料 및 方法에서 기술한 灰化 促進劑를 使用했다.

灰化가 完全히 끝났을 때 뜨거운 6N HCl로서 溶出하여 뜨거운 再蒸溜水로서 洗滌稀釋

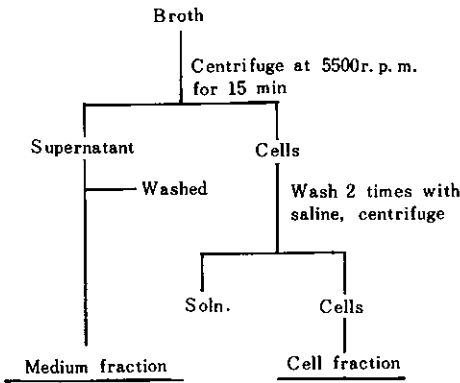


Fig. 2. Preparation of ash samples from broth.

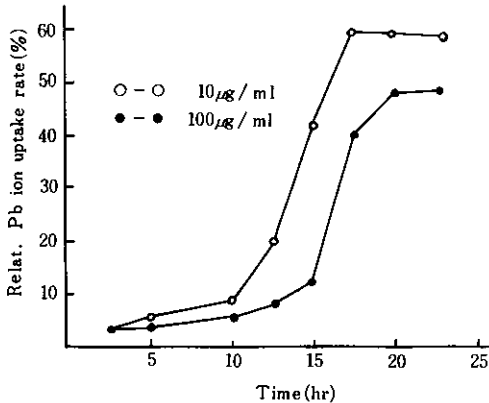


Fig. 3. Rate of lead uptake by the strain P-77 as grown in lead-containing media at 30 $^{\circ}$ C on the reciprocal shaker.

하여 2833 Å 에서 原子吸光光度法으로 Pb ion을 定量한 結果는 Fig. 3과 같다.

10 μ g/ml 含有培地에서 本菌은 培養 18時間에 60%의 Pb ion을 蓄積하였고 100 μ g/ml 含有 培地中에서는 培養 20時間 後에 47%를 蓄積했으며 乾燥菌体 1g당 24.1mg의 Pb ion이 檢出되었다.

5. 分離菌株의 生育에 미치는 二價 重金屬의 影響

本菌의 生育을 完全히 阻害하는 二價 重金屬의 濃度를 調査하기 위하여 여러 濃度の 金屬을 含有한 培地中에 本菌을 1白金耳씩 接種한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2日間 培養하여 經時的으로 生育을 나타내지 않은 濃度는 Table 3와 같다.

Table 3. Toxicity limits of divalent heavy metal ions to the isolated strain p-77

Metal ion	Salt	Toxicity limit (mM)
Hg ⁺⁺	HgCl ₂	2 × 10 ⁻²
Cd ⁺⁺	CdSO ₄ · 8H ₂ O	1 - 1.2
Ag ⁺⁺	AgNO ₃	2.2 - 2.5
Co ⁺⁺	CoCl ₂ · 6H ₂ O	3 - 3.5
Ni ⁺⁺	NiCl ₂ · 6H ₂ O	5 - 6
Cu ⁺⁺	CuCl ₂ · 2H ₂ O	6.5 - 7
Zn ⁺⁺	ZnCl ₂	7 - 8
Pb ⁺⁺	Pb(NO ₃) ₂	14 - 15

本菌의 生育을 Hg⁺⁺가 가장 낮은 濃度에서 阻害했으며 다음에 Cd⁺⁺ > Ag⁺⁺ > Co⁺⁺ > Ni⁺⁺ > Cu⁺⁺ 順이었으며 Pb⁺⁺의 경우 1.4 ~ 1.5 × 10mM에서 生育을 나타내지 않았다.

6. 菌体内 蓄積에 미치는 pH의 影響

1000 μ g/ml의 Pb ion을 含有하는 培地에서 pH를 다르게 하여 30 $^{\circ}$ C에서 20時間 진탕배양한 후 菌体를 回收하여 Pb ion을 定量한 結果 가장 蓄積率이 좋은 pH 7 일때에 對해 百分率로서 나타낸 結果는 Fig. 4와 같

으며 中性部近 (pH6.8~7.2)에서 가장 蓄積率 이 좋았다.

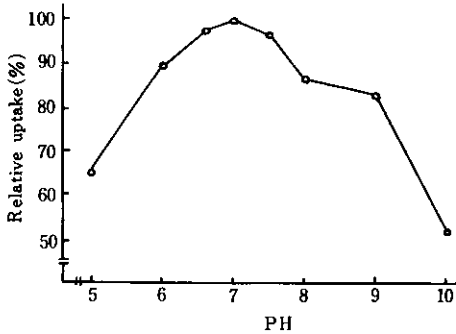


Fig. 4. Effect of culture pH on the rate of lead uptake of the strain p-77.

7. Pb ion의 菌体内 分布

分離 菌株가 蓄積한 Pb ion의 菌体内 分布를 調査하기 위하여 100 μ g/ml의 Pb ion을 含有한 培地에 本菌을 30 $^{\circ}$ C, 20時間 培養한 後 生理食鹽水로 2回 遠心洗滌하여 0.25M-sucrose 溶液으로 本生菌體를 20% (w/v)되게 懸濁하여 막자사발에 海砂를 加하여 破碎한 다음 5,500 r.p.m.에서 15분간 遠心하여 海砂와 未破碎된 細胞를 除去하고 그 上澄液을 15,000 r.p.m.에서 30分間 遠心分離하여 上澄液 部分과 沈澱物 部分을 乾燥, 灰化, 溶出한 뒤 Pb ion을 定量하여 細胞質 劃分과 細胞壁劃分으로 나타낸 結果는 다 Table 4 과 같다.

Table 4. Distribution of lead in cellular subfractions

Fraction	Detected Pb ⁺⁺ (μ g)	Distribution (%)
Cell wall	249	88.6
Cytoplasm	32	11.4

8. 微細構造 觀察

Pb ion이 本菌의 微細構造에 미치는 影響을 調査하기 위하여 500, 1000 μ g/ml의 Pb

ion을 含有하는 培地에서 30 $^{\circ}$ C, 48時間 培養한 菌을 電子顯微鏡으로 觀察한 것으로 Fig. 5는 對照區로서 本菌은 短桿菌으로 細胞壁 및 細胞質이 잘 發達되어 있고 細胞核은 뚜렷하게 나타났으며 Fig. 6은 500 μ g/ml에서 培養한 것으로 形態의으로는 對照區와 별다른 差異를 보이지 않았으나 電子密度가 높은 部位가 觀察되었다. Fig. 7은 1000 μ g/ml에서 培養한 것으로 對照區에 比해 核의 發達이 不振하며 細胞壁의 變化는 認定되지 않으나 電子密度가 높은 部位가 500 μ g/ml에 比해 더 크게 나타났으며 이는 細胞質內에 蓄積된 Pb鹽에 基因하는 것으로 料된다.

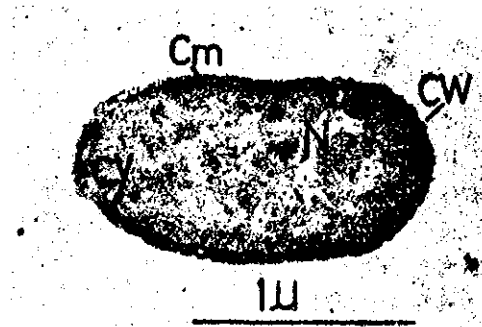


Fig. 5. Thin-section electron micrograph of the isolated strain (p-77) cultured in liquid medium ($\times 75000$)

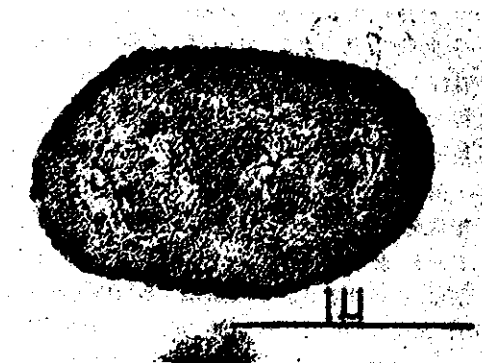


Fig. 6. Thin-section electron micrograph of the isolated strain (p-77) cultured in liquid medium containing 550 μ g/ml of lead ($\times 80000$)

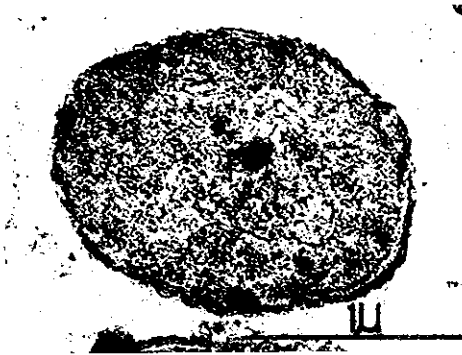


Fig. 7. Thin-section electron micrograph of the isolated strain (p-77) cultured in liquid medium containing 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of lead ($\times 8000$)

考 察

Pb ion은 Cd ion이나 Hg ion에 比해서는 毒性이 적지마는 高等動物에 深刻한 影響을 미치며 微生物에 있어서도 生育에 阻害의 影響을 미치지만 그 種類에 따라서는 耐性의 差異가 觀察되었다.

本 實驗에 使用한 *Alkaligenes* sp.는 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Pb ion을 含有하는 培地 中에서도 別다른 生育의 阻害를 나타내지 않고 빠른 增殖을 보였으나 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이상의 Pb ion을 培地에 添加했을 때 培地와 金屬의 錯體 形成이 過多하여 生育度의 比較가 不適合하나 일정 時間의 誘導期를 지난 후 活潑한 生長을 나타냈으며 이와같은 重金屬 實驗에서 가장 要求되는 것은 金屬과 錯體를 形成하지 않은 培地의 考案이라고 생각된다.

菌体内 Pb ion의 蓄積은 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有 培地에서 47%로 나타나 培養條件등을 調節 하므로 廢水中의 Pb ion 제거에 利用될 수도 있다고 생각된다. Tonabene¹⁶⁾은 Pb ion 蓄積이 菌에 따라 培養時間과 pH가 重要한 因子라고 생각했으나 本 實驗에서는 低濃度의 Pb ion을 含有하는 培地에서의 蓄積을 調査한 결과 培養時間은 長時間 必要하지 않았고 pH는 6.8~7.2 範圍에서 最高의 蓄積을 나타내

었다.

細胞内 Pb의 分布를 調査한 結果 細胞質 部位에서 11.4%로 나타났으며 電子顯微鏡상 에 나타나는 電子密度가 높은 部分이 細胞質 部位에 蓄積된 Pb에 의한 것으로 思料되며, Cd이 菌体内에 蓄積된 mechanism의 경우와 같이 Pb의 경우도 本菌이 陽이온을 吸着하는 colloid로서의 作用이나 菌体内에 吸收되어 菌体内의 SH기와 같은 特定原子團과 結合하여 濃蓄된 것인지, 또는 菌体内 Pb ion을 還元하는 酵素의 作用을 받아 金屬鹽을 析出하여 細胞質内に 蓄積하는지에 對한 것은 앞으로 더욱 研究되어야만 判明되리라 믿어진다.

結 論

Pb²⁺에 耐性이 強한 *Alkaligenes* sp.를 汚泥에서 分離하였으며 本菌은 1,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Pb ion을 含有하는 培地에서도 生育에 別다른 阻害를 받지 않았고 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Pb ion을 含有하는 培地에서는 60%, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Pb ion을 含有하는 培地에서는 47%를 蓄積했으며 乾燥菌體 1g당 24.1mg의 Pb ion이 檢出되었다.

2價重金屬ion 가운데 Hg은 2×10^{-2} mM에서 本菌의 生育을 完全히 阻害했으며 菌体内 蓄積率은 中性部位 (pH 6.8~7.2)에서 가장 좋았으며 細胞内 Pb의 分布는 細胞壁劃分에서 88.6% 細胞質劃分에 11.4%의 分布率을 나타내었다. 또한 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 Pb ion을 含有하는 培地에 本菌을 培養했을 때의 그 微細構造를 觀察하면 特記할 만한 變化는 認定되지 않았다.

引用文献

1. Bucharn, R. E., and N. E. Gibbons. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 8ed. The Willam & Willins Co. Baltimore.
2. Chopra, I. 1971. Decreased uptake of cadmium by a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Microbiol.* 63; 265-267.
3. 長谷川武治. 1975. 微生物の分類と同定. 東京大學出版會. 2ed. 東京
4. Hayakawa, K., I. Kusaka, and S. Fukui. Resistance to mercuric chloride in *Pseudomonas* K-62. *Agr. Biol. Chem.* 39; 2171-2179.
5. 作物分析法委員會編. 1976. 栽培植物分析測定法. pp176-188. 養賢堂. 東京.
6. 金永培, 李端來. 1976. 카드뮴의 耐性菌 분리 및 菌体内 蓄積. *KJAMB.* 4; 111-115.
7. 醫學科學研究所學友會編. 1967. 細菌學實習提要. p93. 九善株式會社. 東京.
8. 前田友枝, 堀津. 1974. *Pseudomonas aeruginosa* による cadmium の 体内蓄積. *醸工.* 52; 14.
9. Novick, R. P., and C. Roth. 1968. Plasmid-linked resistance to inorganic salts in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 95; 1335.
10. 小田雄夫, 南一生. 1978. Cadmium ion 耐性菌の分離と耐性細胞による Cd ion 蓄積. *醸工.* 56; 1-8.
11. Palade, C. E. 1952. A study of fixation for electron microscopy. *J. Exp.* 95; 285.
12. Reynold, E. S. 1963. *J. C. B.* 208; 17.
13. 徐宗德, 李哲熙, 沈弘燮. 1976. 大邱地方河川水の重金屬含量에 關한 研究. 嶺南專門學校論文集第一輯. 31-39.
14. Silverberg, B. A., P. T. S. Wong. and Y. K. Chau. 1976. Ultrastructural examination of *Aeromonas* cultured in the presence of organic lead. *Applied and environmental Microbiol.* 32; 732-735.
15. Tonamura, K., K. Maeda, and T. Futai. 1968. Stimulative vaporization of phenyl-mercuric acetate by mercuryresistant bacteria. *Nature.* 217; 644
16. Tornabene, T. G., and H. W. Edward. 1972. Microbial uptake of lead. *Science.* 176; 1334-1335.
17. Valtuzis, Z., T. D. Nelson, L. W. Wan and P. R. Colwell. 1975. Effects of mercuric chloride on growth and morphology of selected strains of mercuryresistance bacterium. *Applied Microbiol.* 29; 275.