

구리 내성균(*Pseudomonas stutzeri*)의 균체내 구리 축적특성

조주식 · 한문규¹⁾ · 이홍재¹⁾ · 허종수¹⁾

경상대학교 공동실험실습관, ¹⁾경상대학교 농화학과

Copper Accumulation in Cells of Copper-Tolerant Bacteria, *Pseudomonas stutzeri*

Ju-Sik Cho(Central Laboratory, Gyeongsang National University, Chin Ju 660-701, Korea), Mun-Gyu Han¹⁾, Hong-Jae Lee¹⁾ and Jong-Soo Heo¹⁾(¹⁾Dept. of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Chin Ju 660-701, Korea)

Abstract : This study was performed to develop the biological treatment technology of wastewater polluted with heavy metals. The copper-tolerant bacteria, *Pseudomonas stutzeri* which possessed the ability to accumulate copper, was isolated from mine wastewaters polluted with various heavy metals. The characteristics of copper accumulation in the cells and the recovery of the copper from the cells accumulating zinc, were investigated.

Removal rate of copper from the solution containing 100mg/ℓ of copper by copper-tolerant bacteria was more than 78% at 2 days after inoculation with the cells.

A large number of the electron-dense granules were found mainly on the cell wall and cell membrane fractions, when determined by transmission electron microscopy. Energy dispersive X-ray spectroscopy revealed that the electron-dense granules were copper complex with the substances binding copper.

The copper accumulated into the cells was not desorbed by distilled water, but more than 80% of the copper accumulated was desorbed by 0.1M-EDTA solution. The residues of the cells after combustion at 550°C amounted to about 23.2% of the dry weight of the cells. EDS analysis showed that the residues were relatively pure copper compound containing more than 78.4% of copper.

서 론

급속한 산업화와 경제 발달에 따른 환경오염은 날로 심화되고 있으며, 특히 각종 산업폐수중 함유되어 있는 중금속등 독성오염물질들은 하천에 유입되어 상수원 및 식수오염을 일으키고 있을 뿐만 아니라 인근의 지하수 및 토양을 오염시키는 등 큰 문제가 되고 있다.

중금속 등이 함유되어 있는 특정폐수의 현행 처리방법은 응집침전법, 이온교환법, 산화환원법 및 중화법 등 주로 물리화학적처리 방법으로 하고 있으나, 이러한 방법들은 에너지소모가 많고 유지관리 경비가 과다할 뿐만 아니라 처리효율이 낮으며 대량의 슬러지가 발생되므로 처리부산물에 의한 2차오염의 가능성도 큰 문제로 대두되고 있다¹⁾.

자연계에는 수계로 부터 여러가지 중금속 이온들을 선택적으로 흡착 또는 흡수할 수 있는 능력을 가진 미생물들이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 미생물들은 자연으로 부터 유용한 금속의 회수와 환경오염의 조절 차원에서 큰 관심을 끌어 왔다. 또한 최근에는 중금속오염폐수의 처리법으로 이용되고 있는 물리화학적 처리법의 단점을 보완하기 위하여 미생물을 이용하여 중금속을 처리하려는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 그 결과 이온교환 수지 혹은 활성탄에 비하여 중금속 처리

효율이 더 높은 미생물들이 발견되고 있다^{2,3)}.

미생물을 이용한 생물학적 처리방법은 저렴한 비용으로 다량의 biomass를 얻을 수 있고,^{4,5)} 미생물에 의한 중금속의 흡수와 탈착반응이 단시간내에 이루어지며,^{6,7)} 고정화된 미생물은 재사용할 수 있을 뿐만 아니라,^{8,9)} 미생물 균체의 폐기처리가 크게 문제시되지 않으므로 현행 물리화학적 처리방법에 비하여 훨씬 더 효과적인 방법이라 할 수 있으며,^{10,11)} 실제 하수슬러지중의 중금속처리시 화학적 처리방법에 비하여 생물학적 처리방법은 비용을 80% 절감한다는 보고도 있다¹²⁾.

따라서 본 연구는 중금속오염폐수처리에서의 미생물 이용 가능성을 검토하기 위하여 구리에 강한 내성을 지니며 균체내 구리 축적능력이 우수한 구리 내성균을 자연계로부터 분리하여 균체내 구리 축적특성, 축적형태 및 균체내에 축적된 구리의 회수방법 등을 조사하였으며, 그 결과를 보고코자 한다.

재료 및 방법

공시 균주 및 배지

공시 구리 내성균주는 본인들이 광산폐수로 부터 이미 분리한 구리 내성균주 *Pseudomonas stutzeri*를 사용하였다. 공시 균주의 배양은 basal medium(glucose 10g, poly-

peptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g, D.W 1000ml, pH 6.0)을 사용하였다.

Biomass 준비 및 구리 처리

Biomass는 Cho 등¹³⁾과 같은 방법으로 수확하였으며, 균체의 구리 처리는 CuSO₄을 Cu²⁺ 농도로서 10,000mg/l 이 되게 조제한 표준용액을 다시 일정한 농도가 되도록 멸균증류수로 희석 조제하여 처리하였다.

구리 정량

균체내에 축적된 구리 축적량과 용액중에 남아있는 구리 잔존량은 Cho 등¹³⁾과 같은 방법으로 시료를 전처리하여 atomic absorption spectrophotometer(Shimadzu AA-680, Japan) 및 inductively coupled plasma spectrometer(ICP, Atomscan 25, TJA, U.S.A.)로 정량하였다.

구리에 대한 내성

구리를 처리하지 않은 배지와 구리 농도를 각각 100, 500, 1,000, 2,000mg/l 되게 처리한 액체배지에 공시균주를 접종한 다음, 30°C에서 진탕배양하면서 배양시간별로 성장도를 비교함으로써 공시균주의 구리에 대한 내성 정도를 조사하였다. 그리고 공시균주와 *E. coli*, *Xanthomonas citri* 및 activated sludge로 부터 분리한 mixed microorganism을 구리가 200mg/l 처리된 기본배지에 각각 접종하여 배양하면서 성장도를 비교함으로써 구리 내성균주의 구리에 대한 내성정도를 다른 미생물들과 비교하였다.

구리 축적 능력

구리가 100mg/l 농도로 처리된 기본배지에 구리 내성균주를 접종하여 30°C에서 4일간 진탕배양하면서 배양시간에 따른 구리 축적량을 조사하였으며, 또한 구리가 처리되지 않은 기본배지에 구리 내성균주를 접종하여 48시간 배양한 다음, 원심분리기로 회수한 균체를 구리가 100 및 200mg/l의 농도로 처리된 용액(pH 6.0) 100ml에 처리하여 30°C에서 진탕시키면서 처리 시간에 따른 균체내 구리 축적량과 용액내 구리 잔존량을 조사하였다.

그리고 공시 구리 내성균주와 *E. coli*, *Xanthomonas* 및 activated sludge로 부터 분리한 mixed microorganism을 구리가 100mg/l 처리된 용액(pH 6.0) 100ml에 건조균체량으로서 100mg되게 각각 처리하여 처리시간에 따른 구리 처리율을 조사함으로써 구리 내성균주의 구리 축적능력을 다른 미생물들과 비교하였다.

구리 축적 균체의 전자현미경 관찰 및 EDS분석

균체내 축적된 구리의 외형적인 축적형태는 Cho 등¹³⁾과 같은 방법으로 시료를 전처리 하여 carbon coated 200 mesh nickel grid에 고정시켜 전자현미경(TEM, Hitachi

H-600) 75KV에서 관찰하였으며, 무기원소의 분석은 TEM에 부착된 energy dispersive X-ray spectroscopy (EDS, Serial II, Noran, U. S. A.) 및 CHNS analyzer (CHNS-932, LECO, U.S.A.)로 분석하였다.

균체내 축적된 구리의 회수

구리가 축적된 균체를 증류수, 0.1M-HCl 및 0.1M-EDTA용액으로 각각 세척하여 세척 횟수에 따른 균체내 축적된 구리의 탈착율을 조사하였다.

그리고 구리가 축적된 균체를 550°C회화로에서 12시간 회화시킨 후 남은 작열잔유화합물을 EDS로 분석하여 작열잔유화합물중의 구리함량을 조사하여 균체내 축적된 구리를 분석 정량함으로써 회수방법의 효율성을 비교 검토하였다.

결과 및 고찰

구리에 대한 내성

구리 내성균주의 구리에 대한 내성을 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 구리를 100mg/l 농도로 처리했을 경우에는 구리를 첨가하지 않았을 때와 생장이 별 차이가 없었다. 그러나 배양액중 구리 농도가 증가할수록 생장이 저해를 받았으며, 500 및 1,000mg/l에서는 비교적 양호한 성장율을 나타냈었으나 2000mg/l에서는 거의 성장하지 못하였으며, 배양액중 구리 농도가 높아질수록 생장이 저해될 뿐만 아니라 유도기도 길어지는 것으로 나타났다.

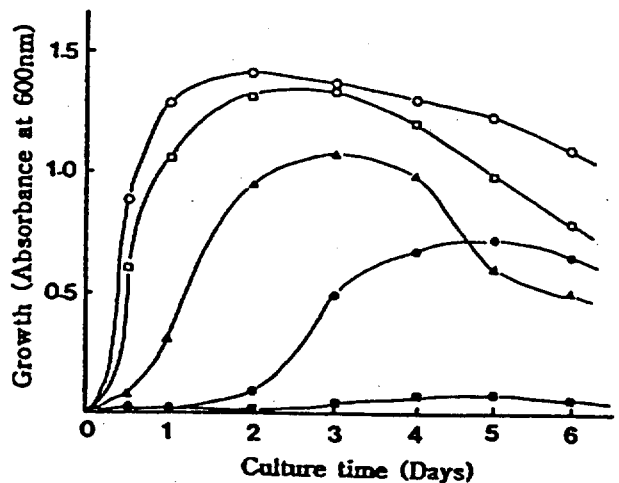


Fig. 1. Growth curves of *P. stutzeri* at various Cu concentrations according to culture time. ○ : Without Cu □ : 100mg/l of Cu △ : 500mg/l of Cu ● : 1000mg/l of Cu ■ : 2000mg/l of Cu

그리고 구리 내성균주의 구리에 대한 내성정도를 다른 미생물들과 비교해 본 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 *E. coli*와 activated sludge에서 분리한 mixed microorganism은 어느정도 성장하였으나 공시균주에 비하여 낮은

생장율을 나타내었으며, *Xanthomonas*는 거의 성장하지 못하였다. 이러한 결과를 미루어 볼때 본 실험에 사용한 구리 내성균주는 구리에 대하여 상당히 강한 내성을 지니고 있는 것으로 생각되었다.

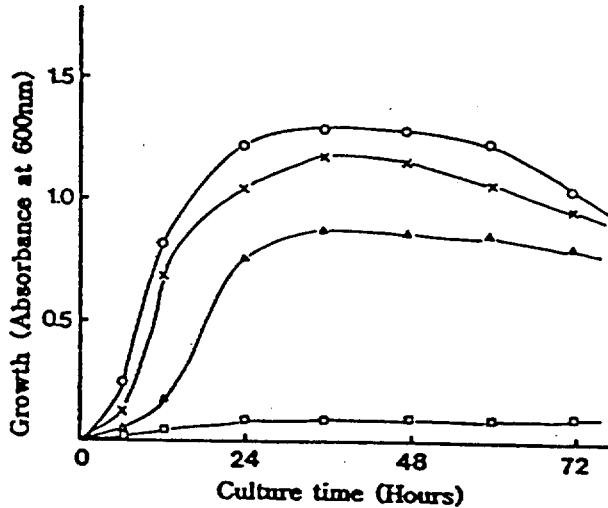


Fig. 2. Growth curves of *P. stutzeri*, *E. coli*, *Xanthomonas* and mixed microorganisms isolated from activated sludge. Cultivation was carried out in 100ml of the basal medium with 200mg/l of Cu with shaking at 30°C or 37°C for 72 hours. ○ : *P. stutzeri* △ : *E. coli* □ : *Xanthomonas* × : mixed microorganisms

구리 축적능력

구리 내성균주를 구리가 100mg/l 처리된 기본배지에 접종하여 배양시간에 따른 구리 축적량을 조사한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 어느정도의 유도기 이후에 축적되기 시작하여 배양 2일 이후에 최대의 축적율을 보였으며, 이때 구리 제거량은 약 44mg/l이었다. 이러한 균체들의 세포형태를 전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과

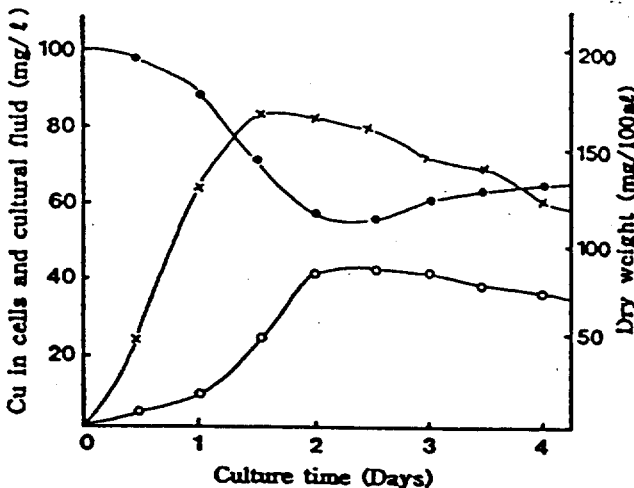


Fig. 3. Changes of Cu accumulation in the cell according to culture time. Cultivation was carried out in 100ml of the basal medium with 100mg/l of Cu with shaking at 30°C for 4 days. × : Dry weight of cells ○ : Cu in cells ● : Cu in cultural fluid

P. stutzeri (Cu)



Photo. 1. Scanning electron microscopic observation of cell surface of *P. stutzeri*.

Photo. 1에서 보는 바와 같이, 세포표면에 많은 electron-dense granule들이 형성되어 있는 것이 관찰되었다.

그리고 구리가 처리되지 않은 배지에서 완전히 성장한 균체를 원심분리로 회수하여 멸균증류수에 구리를 100 및 200mg/l 농도로 처리한 용액(pH 6.0) 100ml에 처리하여 처리시간에 따른 용액내 구리 제거율을 조사한 결과는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 처리 초기인 1시간 이내에 약 30~40%의 제거율을 나타내었으며, 그후 처리시간이 경과함에 따라 점점 증가되어 처리 72시간 후 100 및 200 mg/l 농도에서 각각 약 78% 및 62% 이상의 높은 구리

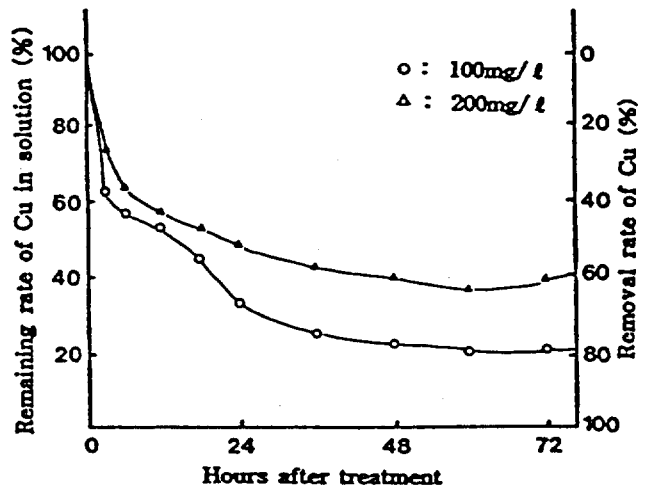


Fig. 4. Removal rates of Cu in solution treated with Cu by *P. stutzeri*. The precultured *P. stutzeri* cells (dry weight ; 225mg) were suspended in 100ml of solution (pH 6.0) treated with 100 or 200mg/l of Cu.

제거율을 나타내어 구리가 처리된 배지에서 배양하였을 경우(Fig. 3)와 비슷한 구리 축적양상을 나타내었다.

Cheng 등¹⁴⁾의 activated sludge에 의한 중금속 흡착실험과 Tsezos 등¹⁵⁻¹⁷⁾의 *Rhizopus arrhizus*를 이용한 중금속 흡착실험에서 미생물에 의한 중금속의 흡착은 2단계 반응메카니즘에 의해 일어나고, 1단계 흡착은 중금속 유입 직후부터 30~60분 사이의 빠른 시간안에 흡착반응이 일어나고, 이 시간은 평형단계에 거의 도달하는 속도 결정단계로서 주로 미생물 세포간의 생성물질에 의한 중금속의 물리적인 흡착과 세포표면에서의 이온 교환에 의해서 일어나며, 2단계 흡착은 미생물 대사활성 또는 증식에 따른 흡착으로서 세포의 성장율에 의해서 결정된다는 보고를 미루어 볼때 본 구리 내성균주에 의한 구리 축적은 세포표면에 존재하는 구리 결합능력이 있는 물질들에 의해 매우 빠른 속도로 강하게 결합되는 물리적인 흡착과정과 미생물 대사작용에 의하여 느린 속도로 세포내로 천천히 흡수되는 과정이 복합적으로 일어나는 것으로 생각되었다. 그리고 처리 6시간 이후의 축적량이 처리 6시간 이내에 축적된 양에 비하여 낮게 나타나 미생물 대사작용에 의한 세포내부로의 흡수보다는 물리적인 흡착과정에 의한 세포표면에서의 흡착이 더 많이 이루어진 것으로 생각되었다.

구리 내성균주의 구리 축적능력을 다른 미생물들과 비교해 본 결과 Fig. 5와 같이 구리 내성균주의 구리 축적능력은 다른 미생물들에 비하여 대단히 높은 것을 알수 있었으며, 특히 구리에 대하여 거의 내성이 없는 것으로 나타난 *Xanthomonas*(Fig. 2)에 의한 구리 제거율이 mixed microorganism과 *E. coli*에 비하여 높게 나타났으며, 이러한 결과는 미생물에 의한 중금속의 흡착은 세포의

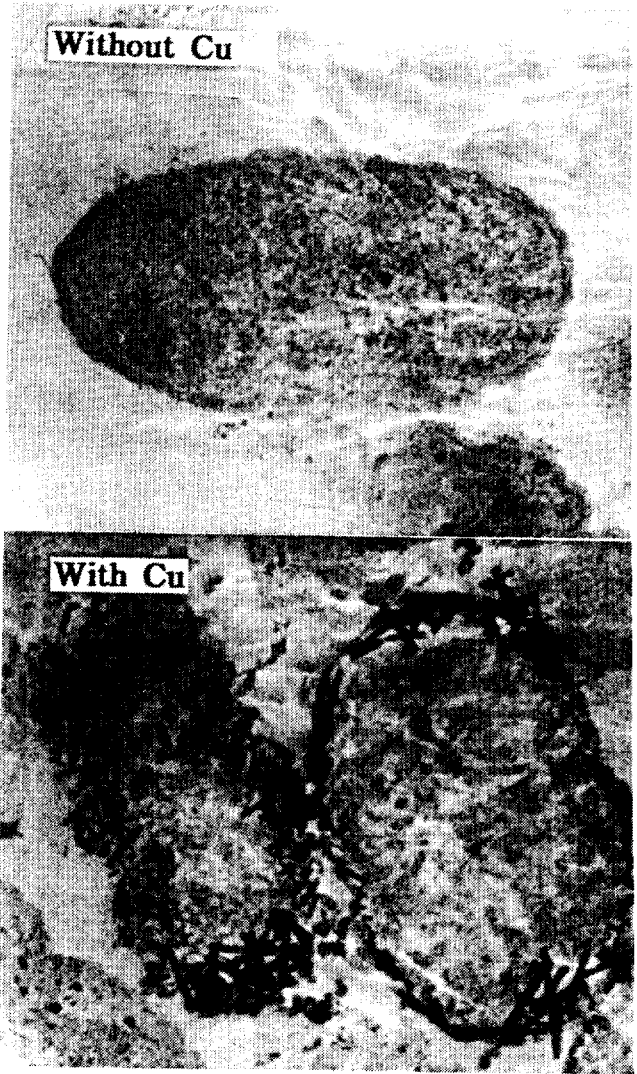


Photo. 2. Electron microphotograph of *P. stutzeri* treated with or without Cu (40,000X).

부에 존재하는 polysaccharide와 같은 미생물 대사산물 등에 결합되는 물리적인 흡착과정에 의해서 중금속에 대한 내성과는 상관없이도 흡착될 수 있으며, 흡착능력도 미생물 종류에 따라 다른 것^{14-16,18)}으로 생각되었다.

구리 축적 균체의 전자현미경 관찰 및 EDS분석 결과 구리가 처리되지 않은 배지에서 성장한 균체와 구리가 200mg/l 처리된 배지에서 성장한 균체의 세포형태 변화 및 구리 축적형태를 전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과는 photo. 2에서 보는 바와 같이, 구리가 처리되지 않은 배지에서 성장한 균체는 정상적인 세포형태를 이루고 있었으나 구리가 처리된 배지에서 성장한 균체는 세포 표면과 세포내부에 많은 electron-dense granule들이 crystal형태로 형성되어 있는 것이 관찰되었으며, 이러한 electron-dense granule들을 EDS 분석한 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 상당량의 구리가 함유되어 있었으며, 미생물의 중금속 축적에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진

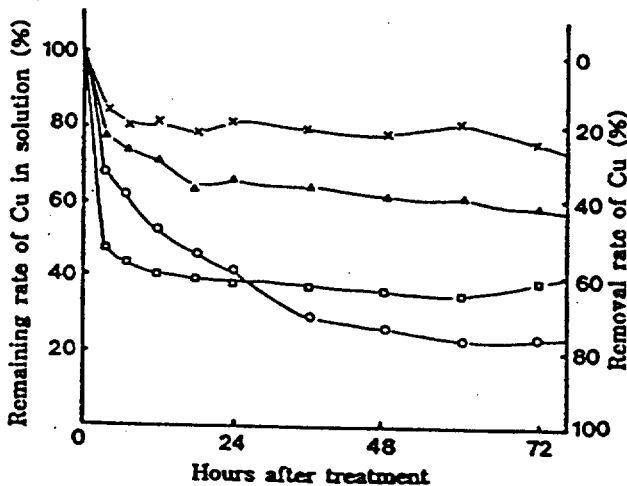


Fig. 5. Removal rates of Cu in solution treated with 100mg/l of Cu by *P. stutzeri*, *E. coli*, *Xanthomonas* and mixed microorganisms isolated from activated sludge. The precultured cells (dry weight 100mg) were suspended in 100ml of a solution(pH 6.0) treated with 100mg/l of Cu. ○ : *P. stutzeri* △ : *E. coli* □ : *Xanthomonas* × : mixed microorganisms

sulfur의 함량이 다른 원소들에 비하여 높게 함유되어 있는 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 CHNS analyzer를 이용한 무기원소의 분석에서도 (Table 1) 마찬가지로 결과를 나타내어 공시 구리내성균주의 세포내에는 metallothionein이 존재할 가능성이 있는 것으로 생각되었다.

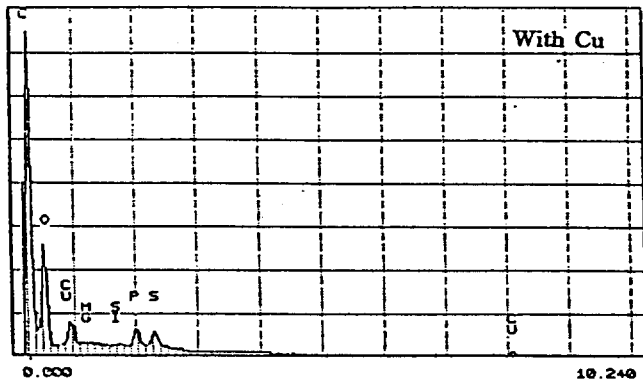
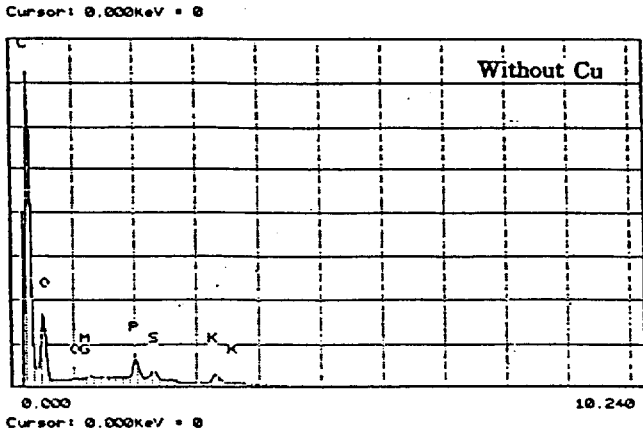


Fig. 6. X-ray energy dispersion spectra of *P. stutzeri* treated with or without Cu.

Table 1. The composition of inorganic elements of *P. stutzeri* analyzed by CHNS analyzer.

Elements	Content of elements in cells(%)	
	Without Cu	After Cu accumulation
C	45.9	45.7
H	6.8	6.9
N	12.3	12.1
S	0.7	0.8
Total	65.7	65.5

따라서 구리 처리균체에서 관찰된 electron-dense granule들은 구리 결합능력이 있는 세포물질과 구리가 서로 complex를 이루고 있는 것으로 생각되었다. 이러한 결과들은 구리 처리시간에 따른 구리 축적양상 (Fig. 4)과 중금속 축적능력이 있는 미생물의 가상적인 polyphosphate : heavy metal complex는 불용성의 colloidal suspension 상태로 세포내에 혹은 세포 표면에 존재하며, 불용성 heavy metal : S complex는 세포 표면에 존재한

다고 이미 보고된 연구 결과들^{14-17,19-21}과 비교검토해 볼때, 본 구리 내성균주에 의한 구리 축적은 주로 cell wall과 cell membrane에서 이루어지며, 미생물 세포간의 생성 물질 및 세포표면에서의 이온교환에 의하여 매우 빠른 시간내에 세포표면에 주로 흡착되는 물리적인 흡착과 미생물 대사과정에 의하여 천천히 세포내부로 흡수되는 과정이 복합적으로 일어나는 것으로 생각되었다.

균체내 축적된 구리의 회수

구리가 축적된 균체를 증류수, 0.1M-HCl 및 0.1M-EDTA 용액으로 처리하여 세척 횟수에 따른 구리 탈착율, 그리고 구리가 축적된 균체를 550°C 회화로에서 회화시킨 후 남은 잔열잔류화합물을 EDS 분석하여 잔열잔유화합물중 구리 함량을 조사하여 균체내에 축적된 구리의 회수방안을 검토한 결과는 각각 Fig. 7, 8 및 Table 2, 3 그리고 Photo. 3에서 보는바와 같다.

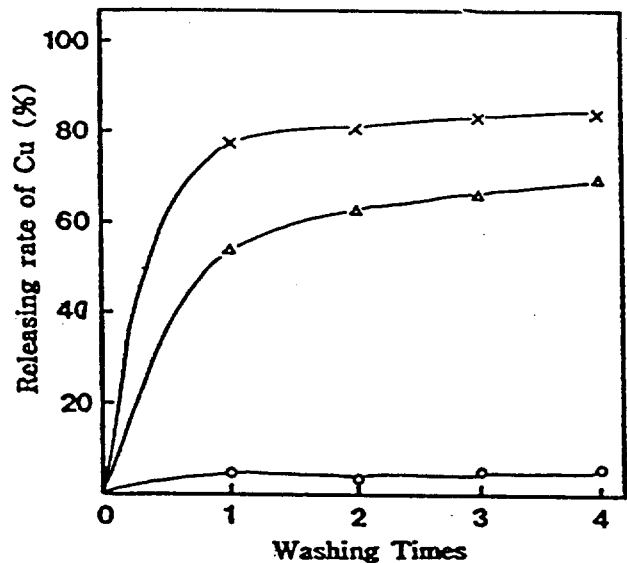


Fig. 7. Release of Cu from Cu accumulated cells treated with distilled water, HCl or EDTA according to washing times.

○ : Distilled water △ : HCl × : EDTA

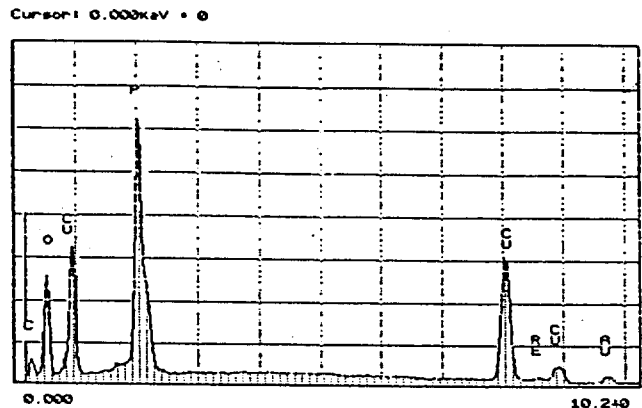


Fig. 8. X-ray energy dispersion spectra of residues after combusting the *P. stutzeri* cells accumulating Cu at 550°C.

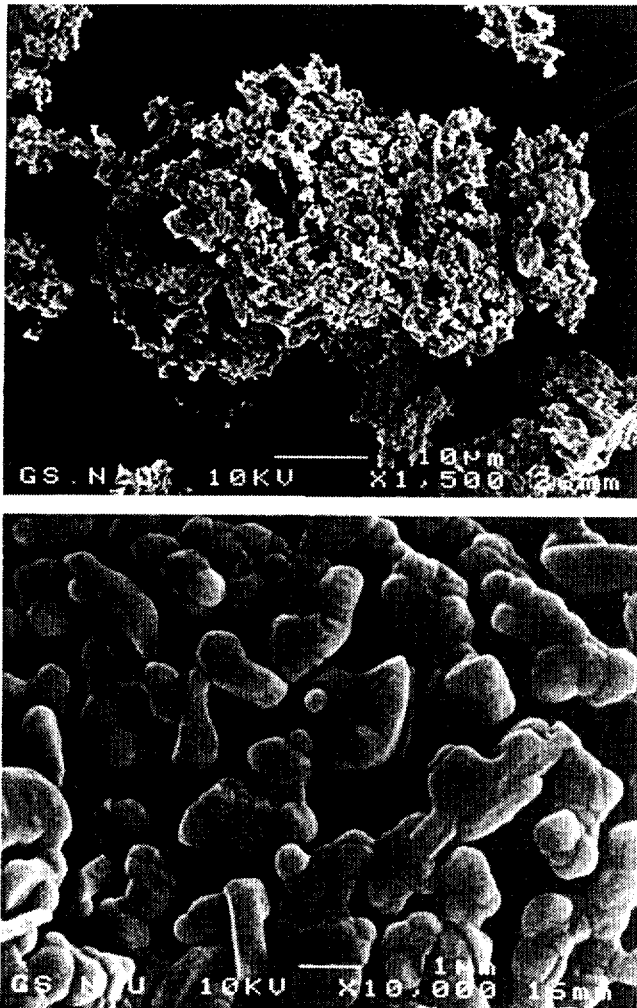


Photo. 3. Electron microphotographs of residues after combusting the *P. stutzeri* cells accumulating Cu at 550°C.

Table 2. Dry weight of cells after Cu accumulation and residues after combusting the cells.

Dry weight of cells		Residues after combusting the cells	
Native (mg)	After accumulation of Cu(mg)	mg	mg/g
1417 (100)	1821 (128.5) (100)	423 (23.2)	232.3

() : Index

Table 3. Elemental compositions of residues after combusting the cells accumulating Cu at 550°C.

Elements	Content of elements in residues (%)
C	0.14
O	6.21
Cl	-
Mg	-
Fe	-
P	13.59
Cu	78.41
Total	100.00

구리가 축적된 균체를 증류수, 0.1M-HCl 및 양이온 킬레이트제인 0.1M-EDTA 용액으로 처리하여 세척 횟수에 따른 균체내에 축적된 구리의 탈착율을 조사한 결과, Fig. 7에서 보는바와 같이 증류수에 의해서는 거의 탈착되지 않았으며, 0.1M-HCl 용액에 의해서는 약 60%, 0.1M-EDTA 용액에 의해서는 약 80% 이상이 탈착되는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어 볼때 균체내 축적된 구리는 불용성의 Cu complex 형태로 존재하며 양이온 킬레이트제인 EDTA에 의해서 쉽게 치환될 수 있는 형태로 ligand에 결합되어 있는 것으로 생각되었다. 그리고 세척 횟수에 따른 탈착율은 1회(1h) 이후 큰 차이가 나지 않았으며, 이러한 결과는 Nakajima 등²²⁾이 *Streptomyces albus*를 이용한 탈착실험에서 흡착된 UO_2^{2+} 의 탈착이 1시간 이내에 완료되었다고 한 보고와 거의 비슷하였다.

구리 내성균주의 구리 축적전과 축적후의 균체량 변화 및 구리가 축적된 균체를 550°C 회화로에서 회화시킨 후 남은 잔류산화합물을 조사한 결과, Table 2에서 보는바와 같이 구리 축적전에 비하여 축적후에 구리 내성균주의 균체량은 약 28.5% 증가되었으며, 이때 증가된 균체량은 초기 용액내에서 제거된 구리의 양과 거의 비슷함을 알 수 있었다. 그리고 구리가 축적된 균체를 550°C 회화로에서 회화시켰을 경우 균체량의 23.2%에 해당하는 잔류산화합물이 생성되었다.

Photo. 3은 이때 생성된 잔류산화합물들의 외형적인 구조를 전자현미경으로 관찰한 것이며, 잔류산화합물들의 원소성분을 EDS로 분석한 결과, Fig. 8에서 보는바와 같이 상당히 많은 양의 구리가 함유되어 있었으며, 특히 중금속 축적에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 phosphorus의 함량이 약 14%로서 구리 이외의 다른 원소들에 비하여 매우 높게 함유되어 있었으며, sulfur는 균체를 그대로 EDS 분석하였을 경우(Fig. 6)에는 검출되었으나, 회화시킨 잔류산화합물에서는 검출되지 않았으며 이는 회화과정중에 산화되어 휘산되었기 때문으로 생각된다.

잔류산화합물을 EDS 분석하였을 경우 검출된 원소들과 구리의 상대적인 함량을 비교해 본 결과, Table 3에서 보는바와 같이 구리 함량이 약 78.4%로서 구리 함량이 매우 높은 화합물인 것으로 나타나 균체내 축적된 구리의 회수 및 재사용 가능성은 충분히 있을 것으로 판단되었으며, 금후 보다 더 효율적인 회수방법에 관한 연구가 있었으면 더욱 좋을 것으로 생각되었다.

적 요

구리 내성균인 *P. stutzeri*의 균체내 구리 축적 특성, 축적형태 및 균체내에 축적된 구리의 회수 방법을 조사한 결과는 다음과 같다.

구리 농도가 100mg/l인 용액중에서 처리 48시간 후 구리 내성균주의 구리 처리율은 약 78% 이상이었다.

구리가 축적된 균체를 전자현미경으로 관찰한 결과, 균체의 cell wall과 cell membrane에 많은 electron-dense granule들이 형성되어 있었으며, electron-dense granule들을 EDS로 분석한 결과, 이 granule들은 copper complex인 것으로 확인되었다.

구리 내성균주의 균체내 축적된 구리는 증류수에 의해서는 거의 탈착이 되지 않았으나 EDTA 처리에 의해서는 약 80% 이상 탈착되었다. 구리가 축적된 균체를 550 °C에서 회화시켰을 때 건조균체량의 약 23.2%에 해당하는 작열잔류화합물들이 생성되었으며, 이 작열잔류화합물들을 EDS로 분석한 결과, 구리가 약 78.4% 이상 함유되어 있는 비교적 순수한 구리 화합물인 것으로 확인되었다.

참고문헌

1. 조순행 (1988). "물리화학적처리", 유해폐기물 관리기술 심포지움. 한국과학기술원.
2. Friis, N. and P. Myers-Keith (1986). Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 21~28.
3. Heo, J.S. and J.S. Cho (1994). Utilization of microorganisms for treating wastewater polluted with heavy metals. *Kor. J. Environ. Agric.* 13, 386~395.
4. Norberg, A.B. and H. Persson (1984). Accumulation of heavy metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 239~246.
5. Kuyucak, N. and B. Volesky (1989). Accumulation of cobalt by marine alga. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 809~814.
6. Flemming, C.A., F.G. Ferris, T.J. Beveridge and G.W. Bailey (1990). Remobilization of toxic heavy metals adsorbed to bacterial wall-clay composites. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(10), 3191~3203.
7. Tsezos, M. (1984). Recovery of uranium from biological adsorbents-desorption equilibrium. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 973~981.
8. Treen-Sears, M.E., B. Volesky, and R.J. Neufeld (1984). Ion exchange/complexation of the uranyl ion by *Rhizopus* bio-sorbent. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1323~1329.
9. Michel, L.J., L.E. Makaskie and A.C.R. Dean (1986). Cadmium accumulation by immobilized cells of a *Citrobacter* sp. using various phosphate donors. *Biotechnol. Bioeng.* 28, 1358~1365.
10. Nakajima, A., T. Horikoshi, and T. Sakaguchi (1981). Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 12, 76~83.
11. 정윤철 외, 응집제 생산을 위한 생물공정기술개발(I) (1989). 과기처 보고서.
12. Jain, D.K. and R.D. Tyagi (1992). Leaching of heavy metals from anaerobic sewage sludge by sulfur-oxidizing bacteria. *Enzyme. Microb. Technol.* 14, 376~383.
13. Cho, J.S., M.G. Han, H.J. Lee and J.S. Heo (1996). Zinc accumulation in the cell of zinc-tolerant bacteria, *Pseudomonas chlororaphis*. *J. Korean Environ. Sci. Soc.*, 5(3), 317~327.
14. Cheng, M.H., J.W. Patterson, and R.A. Minear (1975). Heavy metals uptake by activated sludge. *J. Water Pollut Control Fed.* 47, 362~376.
15. Tsezos, M. and B. Volesky (1982). The mechanism of uranium bio-sorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotech. Bioeng.* 24, 385~401.
16. Tsezos, M. and B. Volesky (1982). The mechanism of thorium bio-sorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotech. Bioeng.* 24, 955~969.
17. Tsezos, M. (1983). The role of chitin in uranium adsorption by *R. Arrhizus*. *Biotech. Bioeng.* 25, 2025~2040.
18. Brown, M.J. and J.N. Lester (1979). Metal removal in activated sludge: The role of bacterial extracellular polymer. *Water Res.* 13, 817~837.
19. Standberg, G.W., S.E. Shumate II and J.R. Parrott, JR. (1981). Microbial cell as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41(1), 237~245.
20. Aiking, H., K. Kok, H. van Heerikhuizen and J. van't Riet (1982). Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 938~944.
21. Cunningham, D.P. and L.L. Lundie, JR. (1993). Precipitation of cadmium by *Clostridium thermoaceticum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(1), 7~14.
22. Nakajima, A. and T. Sakaguchi (1986). Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24, 59~64.