

## Gram 음성 세균인 *Serratia marcescens*에 의한 카드뮴 흡착 기작

이호용 · 민봉희\* · 최영길\*\*

상지대학교 생명과학과, 대구대학교 생물학과\*, 한양대학교 생물학과\*\*

**적 요:** 중금속에 대한 내성을 나타낸 *Serratia marcescens*를 이용하여 카드뮴 흡착 기작에 관하여 조사하였다. 먼저 카드뮴에 대하여 민감성을 나타내는 돌연변이 균주인 PM을 개발하였으며 PM균주는 50 ppm 이상의 카드뮴 농도에서 성장하지 못하였다. 카드뮴을 50 ppm 처리한 균주에서 10회 이상 계대 배양하여 카드뮴에 적응을 유도한 PA균주는 PC, PM균주에 비해 성장 속도가 증가하였으며 세포 내 카드뮴 축적량도 4~5배 증가하였다. PA균주는 100 ppm 카드뮴 처리군에서 처리량 중 23%를 세포 내에 축적하였으며 세포막 부위보다 세포질 부위에 더욱 많은 카드뮴을 축적하였다. 카드뮴 처리시, 전 세포 단백질 양상에서 28 KDa와 64 KDa의 2개의 유도 단백질과 45 KDa의 감소 유도 단백질을 확인하였으며 원자 흡광 분석을 통하여 각각의 유도 단백질에 결합된 카드뮴 양은 단백질 1 g당 318.25  $\mu\text{g}$ , 325.37  $\mu\text{g}$ 이 검출되었다. 세포 내에 축적된 카드뮴을 전자현미경을 이용하여 카드뮴 결합 물질을 확인한 결과, 세포질의 단백질 분획에서 28 KDa 크기의 유도 단백질이 카드뮴과 흡착한 것으로 나타났다. 카드뮴 흡착에 대한 DNA조사 결과 20 Kb 크기의 plasmid가 존재하였으며, curing agent로 plasmid를 제거한 결과 카드뮴 내성을 상실하여 본 분리 균주의 카드뮴 내성 유전자는 plasmid상에 위치하는 것으로 확인하였다.

**검색어:** 생물학적 카드뮴 흡착, *Serratia marcescens*, 유도단백질, 카드뮴 축적.

### 서 론

미생물은 자신의 서식 환경에서 중금속과 방사성 물질을 축적하는 기능이 있다(Volesky 1990, Ji and Silver 1995). 생물학적 중금속 제거 기능(biosorption)은 생 세포와 죽은 세포의 세포 물질 또는 분비 물질인 세포벽 분자, 색소, 다당류, 금속 결합 단백질과 siderophore와 금속 물질이 결합하여 metalloids, organometals, organometalloid들과 metal-containing particulates(Gadd 1992)들을 구성하면서 이루어진다. 생물학적 흡착은 지구의 대부분을 차지하는 수계에 오염된 여러 형태의 독성 및 유용 금속들을 효과적으로 제거함으로써 안전한 생태계를 유지하는 중요한 기틀이 된다(Volesky 1990).

카드뮴은 광산이나 금속 가공업, 아연 공장의 폐기물, 건전지 생산 등에서 주로 발생되며, 산업 근로자를 비롯한 오염된 지역의 주민에게 카드뮴 축적을 초래하여 Itai-Itai 병과 같은 산업 재해의 요인이 된다(Vallee and Ulmer 1972). 카드뮴에 의한 생물체의 질병이나 과사현상은 카드뮴이 세포 내에 유입되었을 경우 카드뮴의 독성에 의한 세포 내 여러 효소계의 활성 저해와 세포막계의 변성 때문인 것으로 알려져 있다(Mitra et al. 1975, Khazaeli and Mitra 1981).

본 연구는 국내 토양 및 수계에서 생물학적 제거제로 유용한 미생물의 탐색과 미생물의 중금속 축적 기작 및 흡착 기작 규명에 목적을 두고 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### 사용 균주

중금속과 항생제 내성이 뛰어난 것으로 밝혀진 *Serratia marcescens*(Yoo and Lee 1992)를 실험의 공시 균주(PC strain)로 선택하였다. 균주의 보관과 배양에는 영양 배지를 사용하였고, 실험에는 LuriaBertani 배지를 사용하였으며 pH 6.0, 30 $^{\circ}\text{C}$ 를 기준으로 배양하였다.

#### 카드뮴 민감성 돌연변이 주와 내성 균주의 개발

카드뮴 내성에 대한 대조 균주로 사용하기 위하여 돌연변이 주를 개발, 분리하였다. Novobiocin과 mitomycin-C를 번갈아 처리한 처리구에서 카드뮴 민감성 돌연변이 주를 가려낸 반면, 카드뮴 내성 증진 균주는 발견하지 못하였다. 분리한 카드뮴 민감성 돌연변이 주를 10회 이상 계대 배양하여 back mutation 여부를 판단하였으며 이 중 가장 카드뮴 처리에 민감하며 색소 형성이 결핍된 한 균주를 골라 PM균주로 명명하였다. 카드뮴에 대한 저항성 증진의 유도를 위해 1,000 ppm 처리구에서 선별한 균주를 대상으로 50 ppm 처리구에서 10회 이상 계대 배양하여 카드뮴에 대한 적응을 유도하였다. 배양 간격별로 성장 속도와 카드뮴 축적량을 측정하였으며 가장 내성이 강한 유도 균주를 PA균주로 명명하여 사용하였다.

흡수량 측정

카드뮴 처리 배양액에서 성장시켜 수확한 세포 내 및 세포막에 존재하는 카드뮴 흡수량은 수질오염 공정 시험법 및 Standard method(APHA, 1989)에 의해 원자흡광광도계 (Varian Spectra AA-30)로 측정하였으며 단백질량은 Lowry 등(1951)의 방법으로 측정하였다.

전자현미경을 통한 세포 내 축적 중금속의 확인

세포 내에 카드뮴이 축적되었음을 원자 흡광 분석을 통하여 알 수 있었으며 그 확인을 위하여 전자현미경적 관찰을 병행하였다. 카드뮴 300 ppm 배양액에서 30℃, 10시간 배양한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후 다시 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 균주 덩어리를 수확한 후 투과형 전자현미경(Hitachi-600)으로 가속 전압 75 KV에서 관찰하였다(Lee et al. 1984).

SDS-PAGE에 의한 단백질 양상 변화

카드뮴 처리에 따른 단백질 양상의 변화를 알아보기 위하여 Laemmli(1970)의 방법에 따라 전기 영동을 실시하였다. 카드뮴 연관 단백질의 위치를 확인하기 위하여 세포질에 존재하는 전체 단백질의 양상을 관찰하였다.

Plasmid DNA의 확인

*S. marcescens*는 plasmid DNA에 항생제에 대한 내성 유전자를 가지고 있으며 비교적 큰 plasmid DNA를 갖고 있는 것으로 알려져 있다(Farrar 1981). 본 실험 균주에 카드뮴 내성 유전자가 있는 것으로 판단하여 alkali 용해 방법(Birnboim and Doly 1979)과 SDS 용해 방법(Godson and Vapnek 1973)을 이용하여 plasmid DNA의 존재를 확인하였으며 curing method에 의해 plasmid를 제거한 균주에서의 카드뮴 내성을 조사하였다.

결과 및 고찰

카드뮴 처리에 따른 각 균주의 생리적 특성

카드뮴 100 ppm 처리구에서 PA균주의 적응성장기간은 대조구에 비해 2배 정도인 4시간이 걸린 반면, PC균주는 4 배 정도인 8시간이 걸렸고 PM균주는 아예 성장을 하지 못하였으며 300 ppm 처리구에서는 PA균주만 성장한 반면 PC와 PM균주는 모두 성장하지 못하였다(Fig. 1). 이러한 결과를 통해 PC, PA, PM균주간에 카드뮴에 대한 내성 정도가 상이한 것을 확인하였다. 특히 PA균주의 경우 Khazaeli와 Mitra(1981)가 밝힌 *Escherichia coli*의 경우와 유사하게 낮은 농도의 중금속을 지속적으로 처리한 결과 내성을 나타내어 이러한 현상이 장내 그램 음성 세균간에 공통적인 특징으로 사료되었다.

세균에 대한 성장 저해는 일반적으로 이들 중금속들이 생물체에 대해 대사상의 독성 효과를 나타내기 때문이며 그 효과는 생물체에 따라 매우 다르게 나타난다(Gadd

1992). *Serratia marcescens*의 경우 중금속에 대한 내성을 갖는다는 보고가 있었으며(Michols et al. 1984, Yoo and Lee 1992), 본 실험에서는 저농도 카드뮴 처리를 통하여 내성이 증가된 것으로 나타났다.

세포 내 카드뮴의 축적과 축적물의 전자현미경적 확인

카드뮴 50 ppm 처리구 100ml에서 48시간 배양한 PA, PC, PM균주를 수확하여 균체 건조 중량 1g 당 축적된 카드뮴의 양을 측정된 결과, 각각 920.7 µg, 133.4 µg, 14.9 µg로 나타나 PA균주의 카드뮴 축적이 가장 뛰어난 것을 알 수 있었다. 이러한 PA균주의 카드뮴 축적 능력은 63 g/mg 단백질을 나타낸 *Saccharomyces cerevisiae*(Inouhe et al. 1989)에 비해서는 뒤떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 효모류에 비해 이들 그램 음성 세균들이 환경에 대한 적응력이 큰 것을 비교한다면 생태계에서의 이들의 역할이 보다 중요한 것으로 판단되었다. 사실 많은 학자들은 살아 있는 세포에 대한 중금속의 독성으로 인해 중금속의 제거가 어렵다고 판단하여 왔다(Brierley et al. 1989). 본 실험에서는 살아 있는 세포의 배양을 통해서 나타난 결과이기에 더욱 중요한 의미를 지니고 있다.

세포 내 카드뮴 축적이 일어나는 장소를 알아보기 위하여 세포질 분획과 세포막 분획으로 나누어 각 분획의 카드뮴량을 측정된 결과, 세포질 분획에서 295 ppm, 82%. 세포막 분획에서 65 ppm, 18%로 나타나 본 실험 균주의 경우 카드뮴의 축적이 주로 세포질 내에서 이루어지는 것으로 판단하였다.

카드뮴에 적응을 유도한 PA균주에 대한 카드뮴 축적 여부를 확인하기 위하여 전자현미경을 이용하여 관찰한 결과, 주로 세포질 부위에 과립 형태로 카드뮴이 축적된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이는 세포질 분획 내에서 카드뮴 축적이 주로 나타난 앞서의 실험 결과와 일치하였다.

카드뮴 처리에 따른 단백질 양상 변화

카드뮴에 대한 저항성이 매우 큰 PA 균주를 대상으로 카드뮴 처리에 따른 단백질 양상 변화를 관찰한 결과, 64 KDa, 28 KDa 등 2개의 유도단백질(a and b)과 45 KDa의 감소단백질(c)의 존재가 확인되었다(Fig. 3). 유도단백질의 양은 카드뮴의 처리량이 증가할수록 증가하였으며 이는

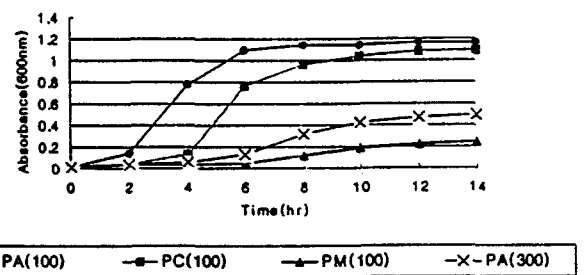


Fig. 1. The changes of growth rate by cadmium in *S. marcescens*.



Fig. 2. Electron Micrograph of *S. marcescens* (Mag:  $\times 80,000$ ). Bar means  $0.5 \mu\text{m}$ . Arrow indicates cadmium deposits.

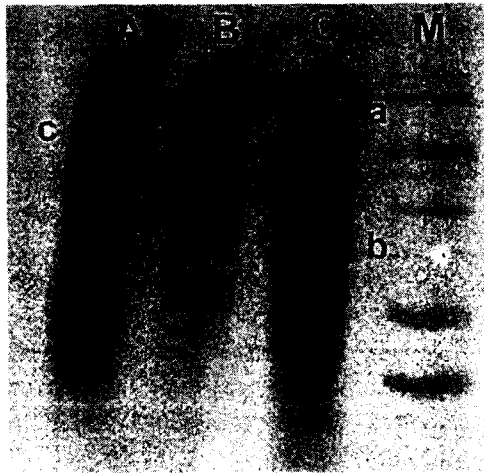


Fig. 3. SDS-PAGE for whole cell proteins of *S. marcescens* strain PA in different cadmium concentrations. A: 50 ppm, B: 100 ppm, C: 300 ppm, M: Marker proteins (97.4 K, 66.2 K, 45 K; 31 K, 21.5 K, 14.4 K). a (64 K) and b (28 K) marks inducible proteins and c (45 K) marks reducible protein.

카드뮴의 독성을 제거시키기 위한 결합 단백질의 일종으로 판단되었다. 이러한 결과는 대장균에서 나타난 48~89 KDa(Morozzi *et al.* 1993)과 39 KDa(Khazaeli and Mitra 1981) 및 *Bacillus acidocaldarius*에서 나타난 23KDa(Capasso *et al.* 1996)의 고분자 카드뮴 결합 단백질 보고와 분자량이 유사하였다.

확인된 유도단백질을 SDS-PAGE gel로부터 분리한 후, 질산으로 용출시켜 원자 흡광 분석을 통한 카드뮴의 양을 측정할 결과, 28 KDa의 단백질에서 단백질 1 g 당 318.25  $\mu\text{g}$ 의 카드뮴이 검출되었고, 64 KDa의 단백질에서는

단백질 1g 당 325.37  $\mu\text{g}$ 의 카드뮴이 검출됨에 따라 이들 단백질이 카드뮴 흡착에 직접적으로 관여하고 있음을 확인하였다.

**중금속 내성 유전자의 확인**

중금속에 대한 미생물의 내성 기작으로는 첫째, 세포막의 투과성을 감소시키거나 세포 표면에 특정 중금속을 흡착시키는 방법, 둘째, metallothionein 등에 의해 중금속을 세포 내로 축적하는 방법, 셋째, 중금속 이온을 보다 휘발성 화합물로 전환시키거나 다른 원자가의 이온으로 변형시키는 방법, 넷째, 배출 기작에 의해 이미 세포 내로 들어온 중금속을 세포 밖으로 배출시키는 방법이 알려져 있다(Ji and Silver, 1995). 이 중 몇몇의 미생물들에 있어  $\text{Cd}^{2+}$  결합 단백질의 유전자가 plasmid와 관련이 있음이 밝혀졌다(Tynecka *et al.* 1981, Nies and Silver 1989, Yoon *et al.* 1991, Lebrun *et al.* 1994).

본 분리 균주가 갖고 있는 카드뮴 흡착 단백질의 유전자 위치를 확인하기 위하여 DNA를 분리하여 전기 영동한 결과 약 20 Kb 크기의 plasmid를 확인하였다(Fig. 4, V~VII). 카드뮴을 100 ppm 처리한 실험군에서는 3개의 band, 처리하지 않은 대조군에서는 2개의 band를 나타내었는데, 이는 각각 서로 다른 plasmid가 2~3개 존재함을 의미한다기 보다는 약 20 Kb plasmid의 concatamer이거나 혹은 동일 plasmid 상에 nick이 생긴 열려진 환상형태 또는 직선 형태일 것으로 판단된다.

카드뮴 내성 유전자의 위치 확인을 위해 curing agent를 처리하는 방법으로 plasmid를 제거하였으며(Fig. 4, I~IV), plasmid가 제거된 균주는 카드뮴 내성을 상실하는 것으로 보아, 본 분리 균주의 카드뮴 내성 유전자는 plasmid 상에 위치하는 것으로 확인되었다. 반면에 *E. coli*에서는 plasmid와는 무관한 것으로 발표된 바 있다(Morozzi *et al.* 1993).

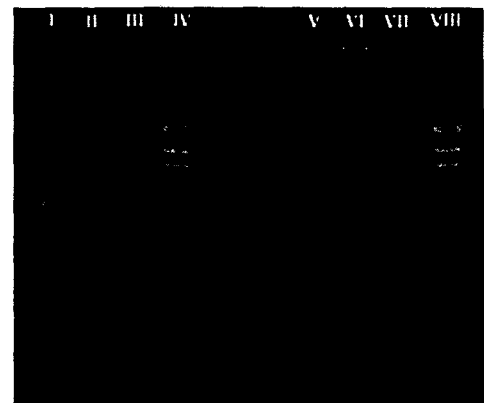


Fig. 4. Plasmid pattern of *S. marcescens*. I and V: pVC19 marker, II: cured PA Cd100, III: cured PA free, IV and VII: Hind III: marker (23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027 bp), VI: PA Cd100, VIII: PA free.

## 인용문헌

- APHA, 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater(16th Ed). Dencer Co.
- Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7: 1513.
- Brierley, C.L., J.A. Brierley and M.S. Davidson. 1989. Applied microbial processes form metals recovery and removal from wastewater. In T.J. Beveridge and R. J. Doyle(eds), *Metal Ions and Bacteria*. John Wiley and Sons, New York. pp. 359-382.
- Capasso C., F. Nazzaro, F. Marulli, A. Capasso, F. La Cara and E. Parisi. 1996. Identification of a high-molecular-weight cadmium-binding protein in copper-resistant *Bacillus acidocaldarius* cells. *Res Microbiol.* 147: 287-296.
- Farrar, W.E. 1981. Evolution among antibiotic resistance plasmids in the hospital environment, In S.B. Levy, R.C. Clows and E.L. Koenig(eds.), *Molecular Biology, Pathogenicity and Ecology of Bacterial Plasmids*. Plenum Press, New York and London. pp. 1-10.
- Gadd, G.M. 1992. Microbial control of heavy metal pollution. In J.C. Fry, G.M. Gadd, R.A. Herbert, C.W. Jones and W.A. Watson-Craik(ed.), *Microbial Control of Pollution*. Cambridge University Press, pp. 59-88.
- Godson, G.N. and D. Vapnek. 1973. A simple method of preparing large amounts of x 174 RF I supercoiled DNA. *Biochem. Biophys. Acta.* 299: 516-520.
- Inouhe, M., M. Hiyama, H. Tohyama, M. Joho and T. Murayama. 1989. Cadmium-binding protein in a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Acta.* 993: 51-55.
- Ji, G. and S. Silver. 1995. Bacteria resistance mechanisms for heavy metals of environmental concern. *J. Indus. Microbiol.* 14: 61-75.
- Khazaeli, M.B. and R.S. Mitra. 1981. Cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 46-50.
- Laemmli, V.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* 227: 680-685.
- Lebrun, M., A. Audurier and P. Cossart. 1994. Plasmid-borne cadmium resistance genes in *Listeria monocytogenes* are present on Tn5422, a novel transposon closely related to Tn917. *J. Bacteriol.* 176: 3049-3061.
- Lee, H.Y., H.B. Cho and Y.K. Choi. 1984. Studies on the microbial pigment(V). The effect of some detergent on pigment formation in *Serratia marcescens* strain: P. Kor. *J. Microbiol.* 22: 191-195.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Michols, C.R., C.R. Furman and J.C. Tsang. 1984. Susceptibility of *Serratia marcescens* to several heavy metal ions. *Microbios Letters* 26: 43-47.
- Mitra, R.S., R.H. Gray, B. Chin and I.A. Bernstein. 1975. Molecular mechanism of accommodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd<sup>2+</sup>. *J. Bacteriol.* 121: 1180-1188.
- Morozzi, G., L. Di Marco, S. Contenti, C. Mangiabene and F. Scardazza. 1993. The presence of high-molecular weight proteins with a strong affinity for cadmium in environmental *Escherichia coli* strains. *Microbios* 75: 7-16.
- Nies, D.H. and S. Silver. 1989. Plasmid-determined inducible efflux is responsible for resistance to cadmium, zinc and cobalt in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 171: 896-900.
- Olafason, R.W. 1984. Prokaryote metallothionein. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 24: 303-308.
- Rayner, M.H. and P.J. Sadler. 1989. Cadmium accumulation and resistance mechanisms in bacteria. In R.K. Poole and G.M. Gadd(eds.), *Metal-Microbe interactions*. IRL Press, Oxford. pp. 39-47.
- Tynecka, Z., Z. Gos and J. Zajac. 1981. Reduced cadmium transport determines by a resistance plasmid in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 147: 305-312.
- Vallee, B.L. and D.D. Ulmer. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* 41: 91-128.
- Volesky, B. 1990. Biosorption by fungal biomass. In B. Volesky(ed.), *Biosorption of Heavy Metals*. CRC Press, Boca Raton. Boston. pp. 139-172.
- Yoo, K.H. and H.Y. Lee. 1992. Resistance of some metal ions on growth of *Serratia marcescens* strain. P. Kor. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 693-698.
- Yoon, K.P., T.K. Misra and S. Silver. 1991. Regulation of the cadA cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pl258. *J. Bacteriol.* 173: 7643-7649.

(1998년 12월 19일 접수)

---

## The Cadmium Biosorption Mechanism in Gram Negative Bacteria, *Serratia marcescens*

Lee Ho Yong, Bong Hee Min\* and Yong Keel Choi\*\*

*Department of Biological Sciences, Sang Ji University*

*Department of Biology, Taegu University\**

*Department of Biology, Hanyang University\*\**

**ABSTRACT:** *Serratia marcescens*, an enterobacterium of gram-negative bacteria, is characterized by resistance of the admium. Cadmium sensitive PM strain did not grow in the medium at cadmium concentration of 50 ppm. PA strain was induced to accommodate to cadmium by cultivating the mother strain (PC strain) in the medium with 50 ppm cadmium. As compared with PC and PM strains, PA strain revealed the excellent growth in cadmium media and accumulated four to five times higher cadmium concentration in cell than other strains. PA strain accumulated 23% of cadmium in cells when cultured in medium treated with 100 ppm cadmium and this cadmium was more accumulated in cytosol fractions than membrane fractions. Analysis by TEM indicated that cadmium was concentrated as a form of granule in cytosol. In protein patterns of cell after the treatment of cadmium, two inducible proteins (28 KDa and 64 KDa) and one reducible protein (45 KDa) were detected by SDS-PAGE. By Atomic Absorption Spectrophotometer, the amounts of cadmium attached to inducible proteins of 28 KDa and 64 KDa were 318.28  $\mu\text{g}$  and 325.37  $\mu\text{g}$  per gram of protein, respectively. It is assumed that these inducible proteins play an important role in the mechanism of cadmium accumulation in cells. A plasmid of 23Kbp was found in *S. marcescens*. The ability of resistance to cadmium in plasmid was confirmed by curing experiments.

**Key words:** Cadmium accumulation, Cadmium biosorption, Inducible proteins, *S. marcescens*.

---