

# 카드뮴 耐性菌株의 分離 및 微生物學的 性質

微生物科

秦成鉉 · 趙顯哲 · 李美玉 · 李榮南 · 沈宗煥 · 李秉圭

## Isolation and Microbiological Characteristics of Cadmium-tolerant Bacteria

Microbiology Division

S. H. Jin, H. C. Joe, M. O. Lee, C. N. Lee, J. H. Shim, B. G. Lee

### Abstract

This Study was designed to the Characteristics of Cadmium-tolerant Bacteria isolated from sludge. A Strain which showed the highest tolerance to cadmium ion was selected by screening. By the taxonomical Characteristics of this strain, it was identified *Klebsiella pneumoniae*.

### I. 緒 論

高度産業社會의 副産物인 重金屬에 의한 環境汚染은 커다란 社會問題로 登場하였다. 그중 카드뮴에 의한 重金屬 汚染은 鑛山地域, 製鍊, 電氣鍍金, 金屬工業, 石油化學工業, 寫眞材料 및 電子加工業體 等の 廣範圍한 汚染源을 가지고 있으며, 人體내에 吸收되면 細尿管에 蓄積되어

障碍을 일으키는 itaitai病의 原因物質로 잘 알려져 있다<sup>1)</sup>. 이와 같이 人間 및 環境을 汚染시키는 重金屬은 産業廢棄物에 多數 存在하며 이를 보다 效譯的으로 除去하기 위한 일련의 研究 중에는 化合物과 結合 및 吸着에 의해 除去하는 方法과 微生物을 利用하여 重金屬의 含量을 減少시키는 方法등이 多數 報告 되어져 왔다<sup>2)</sup>. 카드뮴에 대해 耐性を 가지며 菌體내에 카드뮴을 蓄積하는 것으로 알려진 微生物로서는 *Citrobacter*<sup>3)</sup>, *Enterobacter*<sup>4)</sup>, *Pseudomonas*<sup>5)</sup>, *Staphylococcus*<sup>6)</sup>, *E. coli*<sup>7)</sup>, *Klebsiella*<sup>8)</sup> 등의 細菌과 *Fungi*<sup>9)</sup> 및 *Yeast*<sup>10)</sup> 등이 있다.

現在 微生物에 대한 重金屬의 毒性과 그의 耐性機構에 이르기까지 상당한 研究가 進行되고 있으며 카드뮴의 境遇, *S. aureus*에서 *Cad A* encoded *Efflux System*(energy dependent manganese transport system)의 境遇에 의하여 吸收되는 Cd이온의 細胞내의 蓄積을 減少시키므로써 耐性を 나타낸다고 하였고<sup>11)</sup> *P. aeruginosa* 이의의 그람음성균은 Cd binding protein<sup>12)</sup>, *Citrobacter sp.*는 不容性的 Co phosphate의 形成에 의한 無毒化에 의해서 耐性を 나타낸다고 하였으며<sup>13)</sup> *K. aerogenes*는 1mM 濃度の cd에서 혐박균이 비혐박균보다 더욱 成長 할 수 있는 能力을 갖고 있다고 하였다<sup>14)</sup>.

오늘날 重金屬에 의한 環境汚染이 심각한 問題로 擡頭되고 이러한 耐性菌株를 利用하여 廢水中의 重金屬을 除去하려는 研究가 試圖되어 Brown과 Lester<sup>15)</sup>가 活性汚泥를 利用하여 效果的으로 重金屬을 減少시킨 것을 비롯하여 술과 추는 *Enterobacter colaceae*가 0.5ppm의 카드뮴 添加에 의해 59%의 카드뮴을 菌體내에 蓄積하였음을 報告하였고 Aiking 등<sup>16)</sup>은 *Klebsiella aerogenes*가 重金屬에 耐性を 가지며 0.6mM의 카드뮴에 耐性を 나타내었음을 보고 하는 등 많은 研究가 進行되고 있다. 따라서 本 研究는 廢水中의 重金屬을 除去하려는 意圖下에서 着手되어 우선 카드뮴에 耐성이 강한 菌株를 工團地域內 河川·슬러지에서 分離하여 이를 同定하였고 選拔한 菌株의 cadmium에 대한 微生物學的 性質을 檢討한 結果를 報告하고자 한다.

## II. 材料 및 實驗方法

### 1. 공시균주의 分離

카드뮴에 耐성이 강한 菌株를 分離하기 위하여 釜山地域의 동천, 은천천, 삼막천, 학장천 및 괴정천의 슬러지를 各各 採取하여 10ppm의 카드뮴이 添加된 最少液體培地 100ml에 슬러지 10g을 接種하여 30℃, 5일간 진탕배양(kukje scientific instrument/Eng Co., LTD, Model SH-919, speed control 50) 했으며, cadmium의 濃도를 10ppm되게 添加한 完全固體培地에 평균

도말배양(30°C, 48시간)을 反復하여 光學顯微鏡으로 觀察하여 純粹한 耐性菌을 分離한 後 이들 각각의 耐性을 檢討하기 위하여 cadmium-濃度 10ppm의 最少液體培地에 分離된 菌을 接種하여 30°C에서 24시간 진탕배양한 液을 spectrophotometer(HP8452 A, Diode array spectrophotometer)을 使用하여 660nm의 흡광도를 測定한 다음 菌의 成長度가 좋은 菌株을 選拔하여 이들에 대한 카드뮴의 菌體內로의 吸收를 調査하기 위하여 完全液體培地 20ml에 cadmium의 濃度を 調節하고 分離된 菌들을 接種하여 30°C에서 48시간 振盪培養한 後 培養液을 遠心分離(8000×g, 5min)하여 그 상등액을 취하여 카드뮴의 含量을 測定 比較하여 最終적으로 SH-3 菌株을 分離하여 本 實驗에 使用하였다.

## 2. 培地의 調劑

菌株의 分離를 위한 完全培地(complete medium)는 glucose 10g, peptone 10g, yeast extract 5g, NaCl 5g/l, PH 7.0으로 調節한 다음 滅菌한 後 따로 滅菌한 CdCl<sub>2</sub>를 10ppm되게 添加한 다음 使用하였다. Macaskie와 Dean 등<sup>20)</sup>의 方法에 따라 最少培地(Minimal medium)는 FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.32mg, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.063g, KCl 0.62g, glycerol-2-phosphate(disodium salt hydrate) 0.67g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.96g, Tris 12.0g glucose 1.5g/l, PH 7.0으로 調節한 다음 使用하였다.

## 3. 菌株의 同定

分離株 SH-3의 同定은 Bergey's Manual of systematic Bacteriology<sup>21)</sup>, Manual of Clinical Microbiology<sup>22)</sup> 및 API 20E Kit(API system S. A., La balme Les Grottes-Appareil etproce' de'sd' Identification, France)를 使用하였다.

## 4. Cadmium의 分析

cadmium의 定量은 原子흡광법에 의하여 定量하였다.<sup>23)</sup> 試料의 前處理는 黃酸 및 질산溶液으로 濕式分解 하였으며 이와 같이 調製된 檢液을 使用하여 DDTc-MIBK法에 의한 溶媒抽出法<sup>24)</sup>으로 抽出한 後 Tabel 1의 條件으로 atomic absorption spectrophotometer(Model varian spectra A-30)으로 cadmium의 濃度を 測定하였다. 그리고 별도로 標準溶液을 가지고 上記 操作에 準하여 測定한 흡광도로부터 作成한 檢광선에 依據하여 cadmium의 濃度を 算出하였다.(Fig.1)

Table 1. Conditions for determination of cadmium using atomic absorption spectrophotometer.

Instrument Parameters	
Lamp position	4
Lamp current(mA)	4
Slit width(nm)	0.5
Slit height	Normal
Wavelength(nm)	228.8
Flame	Air-acetylene
Sample introduction	Manual
Replicates	1
Measurement time(sec)	1.0
Delay time(sec)	0
Background correction	ON

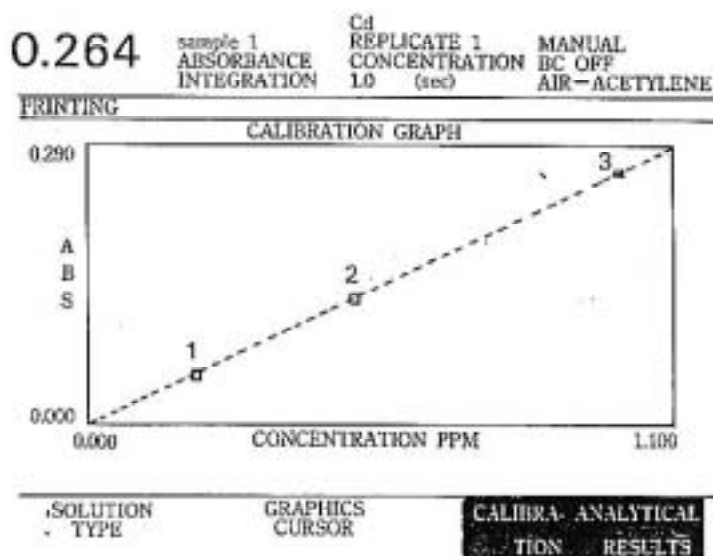


Fig. 1. The calibration curve for the determination of cadmium

※ Calibration No.	conc.	Absorbance
1	0.2	0.048
2	0.5	0.132
3	1.0	0.264

### III. 結果 및 考察

#### 1. 菌株의 分離 및 카드뮴耐性

카드뮴 耐性菌의 分離는 Fig 2와 같은 地点을 選定하여 行했다. 5개 河川의 슬러지를 試料로 하여 最少液體培地에서 30℃에서 5일간 培養한 後 이것을 完全固體培地에 平均도말배양을 反復하여 光學顯微鏡으로 觀察하여 단일균주임을 確認한 後 1차 選別하여 完全固體培地에 계대 배양 하였다. 5개 河川에서 1차 分離한 菌株는 총 78주였으나 이 中에서 10ppm의 最少液體培地에서 分離된 菌을 接種하여 30℃에서 24시간 진탕배양한 後 스펙트로포토미터를 使用하여 660nm의 흡광도를 測定하여 菌의 成長度가 좋은 13菌株를 先發한 後 이들 中 同一菌株의 分離를 確認하기 위하여 API 20E Kit를 使用하여 檢索하였을 時 aeromonas spp., Entrobacter spp., citrobacter spp., Klebsiella spp., Pseudomonas spp., E. coli의 細菌으로 나타 났다. 同一菌株의 分離를 確認한 6菌株에 대한 cadmium濃度를 달리하여 生育度를 比較한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2. Strains of cadmium Ion-Tolerant and Optial density

Strains	O. D <sup>660</sup>			
	none	10ppm cd <sup>2+</sup>	100ppm cd <sup>2+</sup>	500ppm cd <sup>2+</sup>
Aeromonas sp.	0.842	0.794	0.501	0.0
Entrobacter sp.	0.902	0.842	0.339	0.0
Citrobacter sp.	1.032	0.960	0.432	0.0
Klebsiella sp.	1.131	1.090	0.549	0.0
Pseudomonas sp.	1.158	1.030	0.482	0.0
E. coli	0.933	0.892	0.310	0.0

A) : Optical Density

한편 카드뮴 耐性試驗에 生育度가 좋은 6菌株에 대한 카드뮴의 菌體內로의 吸收를 調査하기 위하여 完全液體培地에 cadmium의 濃度를 調節하고 菌株를 各各 接種하여 30℃에서 48시간 진탕배양한 後 배양액을 遠心分離하여 그 上等液에 대한 카드뮴의 減少된 量을 測定하여 比較한 結果는 Table 3과 같으며 상등액의 cadmium의 濃度가 가장 많이 減少된 菌株인 Klebsiella spp.로 推定되는 菌株를 最終적으로 選擇하여 이것을 SH-3으로 命名하였다.

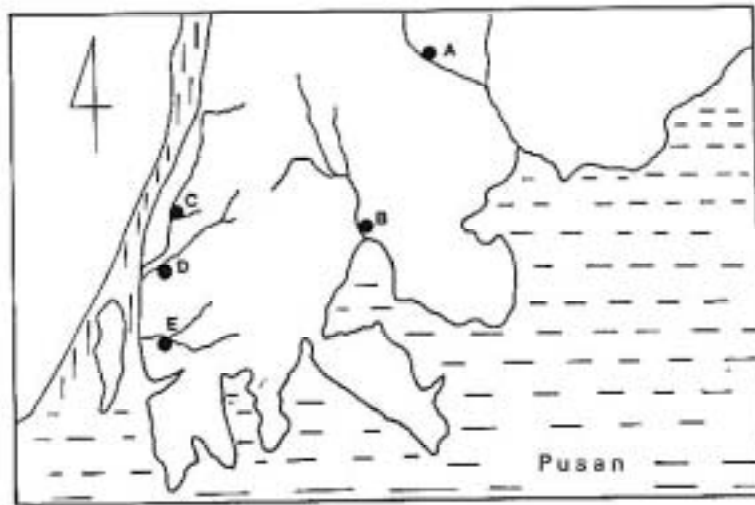


Fig. 2. Sampling points for isolate Cadmium Ion-Tolerant Microorganisms, Busan

Sampling sites :

A : On cheon cheon

B : Dong Cheon

C : Sam Rag cheon

D : Hag jang cheon

E : Goi jeong cheon

Table 3. Removal Efficiency of Cadmium Ion concentration in medium

Strains	Removal	Efficiency (%)
	10ppm Cd <sup>2+</sup>	
Aeromonas sp.		29.1
Entrobacter sp.		15.3
Citrobacter sp.		18.9
Klebsiella sp.		33.8
Pseudomonas sp.		23.0
E. coli		14.7

## 2. 分離菌株의 同定

강원도 周邊의 河川슬러지에서 分離한 SH-3菌株의 分類同定을 行하기 위하여 그 形態學

的, 生理學의 特性을 調査한 結果를 Table 4.5에 나타냈으며 Gram染色하여 顯微鏡 寫眞 撮影한 結果는 Fig.3과 같다.

分離株 SH-3의 形態學의 特性은 Gram陰性의 杆狀으로 運動性이 없는 棒狀桿形의 菌株였으며 colony의 特性이 Mucoid하였다.

Table 5에서와 같이 分離株 SH-3은 oxidase 活性이 없었고 炭水化合物을 모두 利用하여 酸을 生成할 수 있었고 糞便係 大腸菌 試驗에 있어 44.5°C에서 Lactose를 分解하여 Gas를 生成하였다. Bergey manual<sup>28</sup>을 보면 *K. oxytoca*, *terrigena*, *planticola*는 10°C에서도 生育할 수 있으나 分離株 SH-3은 生育이 不可하였다. 한편으로 市販 API 20E Kit를 利用하여 分離株 SH-3의 生化學的 特性을 調査한 結果는 Table 6과 같이 判讀되어 Index No. 1215773인 *K. pneumoniae*로 98.8%의 확률을 나타내었다. 따라서 以上의 結果를 綜合하여 볼 때 分離株 SH-3은 *K. pneumoniae*로 同定되었다.

Table 4. Morphological characteristic of strain SH-3

characteristics	record
Gram staining	negative
Shape of cell	Rods
width of cell( $\mu$ m)	0.8
Length of cell( $\mu$ m)	1.3
Motility	non motile
Growth	Facultatively anaerobic
colony	mucoid

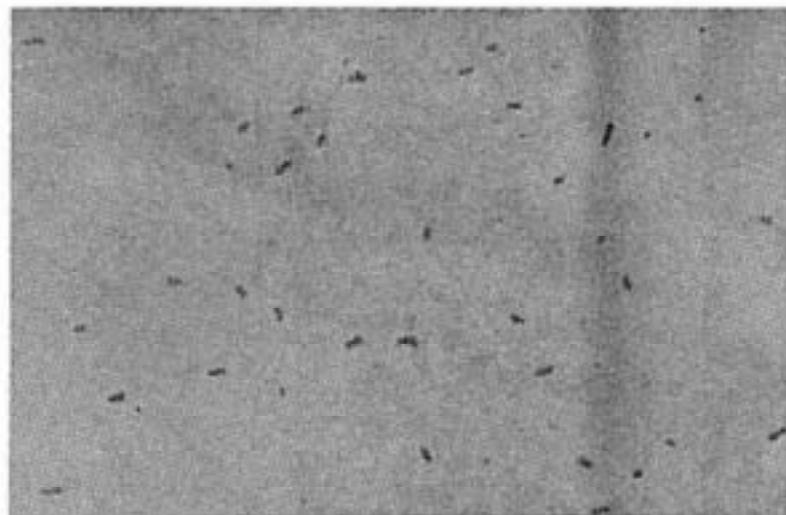


Fig. 3. Photograph of strain SH-3 isolated.

Table 5. Physiological characteristics of strain SH-3

characteristics	record
oxidase	-
Indol production	-
Voges - proskauer	+
Methyl red test	-
Utilization of :	
citrate(simmons')	+
Malonate	+
Phenylalanine deaminase	-
DNase	-
Urease	+
ONPG	+
H <sub>2</sub> S production(TSI)	-
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	+
Ornithine decarboxylase	-
Fecal coliform test	+
(gas production from lactose at 44.5°C)	
Growth at 10°C	-
Acid from :	+
(glucose, adonitol, arabinose, dulcitol, glycerol, inositol, lactose, maltose, mannitol, raffinose, rhamnose, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, xylose)	



Table 6. Identification of the selected strain with API 20E Kit

characteristics	strain SH-3 <sup>a</sup>
Beta-galactosidase	+
Arginine dihydrolase	-
Lysine decarboxylase	-
Ornithine decarboxylase	-
Citrate utilization	+
H <sub>2</sub> S Production	-
Urease	+
Tryptophane deaminase	-
Indole production	-
Acetoin production	+
Gelatinase	-
Glucose	+
Mannitol	+
Inositol	+
Sorbitol	+
Rhamnose	+
Sucrose	+
Melibiose	+
Amygdalin	+
Arabinose	+
Cytochrome Oxidase	-

K. Pneumoniae = 1215773(98.8%)

<sup>a</sup>: Was determined by API 20E Kit

### 3. 分離菌株의 生育에 미치는 카드뮴의 影響

分離菌株를 10ppm, 100ppm, 250ppm, 500ppm의 cd<sup>2+</sup>를 含有한 最少培地와 cd<sup>2+</sup>를 含有하지 않은 培地에서 生育度를 660nm의 흡광도를 經시적으로 測定하여 比較한 結果는 Fig4와 같다.

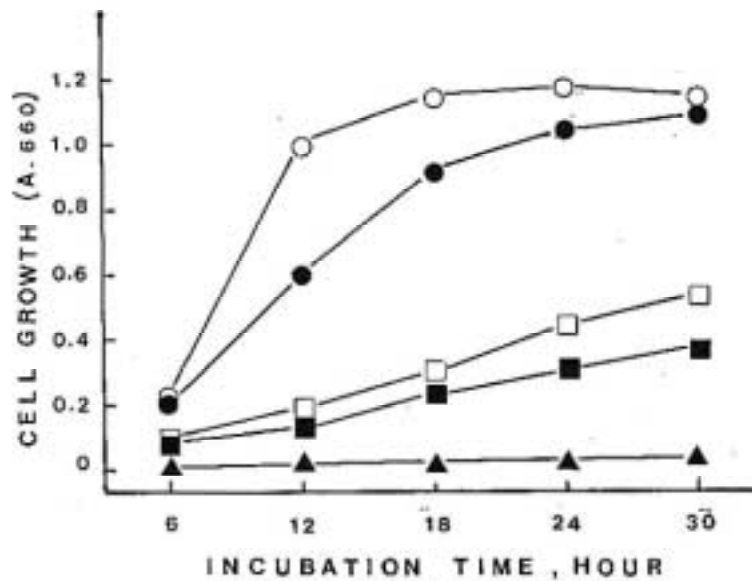


Fig. 4. Growth of the Isolated Strain SH-3 minimal medium at 30°C

- : None
- : 10ppm Cd<sup>2+</sup>
- : 100ppm Cd<sup>2+</sup>
- : 250ppm Cd<sup>2+</sup>
- ▲—▲ : 500ppm Cd<sup>2+</sup>

카드뮴이 함유되지 않은 배지에서는 배양 18시간 만에 最大 生長에 到達하였으며 10ppm 濃度의 배지에서는 24시간 後 最大生長에 到達하였으나 무첨가구와는 큰 差異가 없는 生長을 記錄하였다. 그러나 100ppm이상의 카드뮴이 添加된 배지에서는 무첨가구에 비해 약 50% 이하의 生育度를 나타내었으며 500ppm이 添加된 배지에서는 30시간 培養하여도 生長이 되지 않았다. 이는 高濃度의 카드뮴이 菌體 細胞蛋白의 SH기와 강하게 結合하여 菌體의 蛋白質 合成을 妨害하여 細胞分裂의 阻害를 받으므로 生育度의 低下가 일어나며 한편 阻害물질에 대한 耐性이 生成되어 增殖期間이 다소 延長 되는 것으로 생각된다.<sup>23,24</sup> 한편 耐性菌은 이와 같은 阻害작용에 대한 感受성이 낮은가 cadmium의 膜透過性 低下에 의하여 Cd<sup>2+</sup>耐性を 나타낸다고 推測할 수 있으나 細菌의 種類에 따라 耐性이 다른 原因과 아직 많은 疑問점들은 남는다.

#### 4. 培養時間에 따른 카드뮴의 除去效率

分離된 菌株에 대한 카드뮴이 含有된 液體培地 中の 카드뮴의 除去效率를 보기 위하여 카드뮴이 10ppm 含有된 完全培地에서 培養하였을 때의 菌體를 除去한 上澄液 中の cadmium의 含量을 調査하였다.

fig.5에서 보는 바와 같이 培養 48시간 만에 cadmium의 除去效率를 最大로 到達하여 이후는 緩慢하게 減少하였다. 이와 같은 結果는 카드뮴에 耐性을 가지는 菌株가 카드뮴을 吸着한 다음 排出하는 特異性을 報告한 Tynecka 등<sup>2)</sup>의 結果와 一致하였다. 이상의 結果를 볼 때, 菌體를 除去한 上澄液의 cadmium이 除去 되었다는 것은 細菌 體内に 蓄積 또는 吸着 되는 것으로 생각 될 수 있으며, 이는 菌體가 양이온을 吸着할 수 있는 colloid로서 作用<sup>2)</sup>하고 菌體내의 SH기와 같은 특정원자단과 結合하여 濃縮 되는 것으로 생각된다.

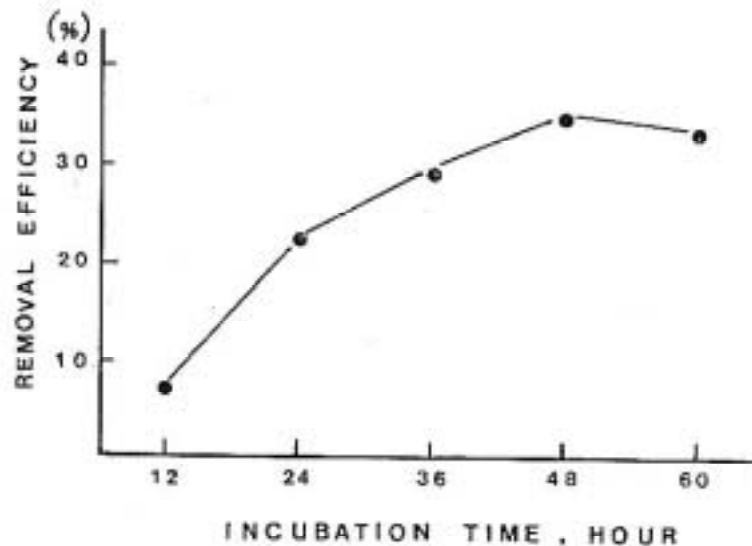


Fig. 5. Removal Efficiency of the isolated strain SH-3 in complete medium at 30°C

#### 5. 生育最適溫度 및 pH

分離菌株를 10ppm의 카드뮴을 添加한 完全液體培地에서 生育 最適溫度와 pH를 調査한 結果 分離菌株의 最適溫度는 30°C-38°C의 中溫菌에 속하는 것으로 나타났으며 生育 最適 pH는 7.0에서 가장 生育度가 높은 것으로 나타났다.

## 6. 카드뮴 이외의 重金屬의 影響

重金屬으로 汚染된 廢水는 카드뮴과 같이 單一 成分만이 含有된 것으로는 볼 수 없는 까닭에 본 分離菌株를 cadmium 이외의 重金屬에서의 生育度を 檢討하기 위하여 HgCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, PbCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, SnCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>를 各各 10ppm 添加한 完全배지에서 菌體의 相對 生育度を 調査한 結果는 Table 7과 같으며 대조구로는 카드뮴을 添加한 培地를 使用하였다.

Table 7. Effect of Various heavy metal on the growth of the strain K. pneumoniae

Metal ions	Relative growth (%)
cd <sup>2+</sup>	100.0
Hg <sup>2+</sup>	80.9
Zn <sup>2+</sup>	104.1
Pb <sup>2+</sup>	98.2
Cu <sup>2+</sup>	94.9
Sn <sup>2+</sup>	39.6
Cr <sup>2+</sup>	95.1

The strain K. pneumoniae was grown at 30°C for 36hours by shaking in the complete medium with various metallic ions of 10ppm

각종 重金屬 10ppm를 添加한 完全液體培地에 本 分離 菌株인 K. pneumoniae를 接種하여 30°C에서 36시간 培養한 다음 카드뮴 10ppm 添加한 培地와 菌體의 生育度を 比較시 Pb<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, 및 Cr<sup>2+</sup>가 添加된 境遇 81~104%로 대조구에 비해 큰 差異가 없으나 Sn<sup>2+</sup>을 添加한 培地에서는 대조구에 비해 生育도가 크게 低下되었다.

이와 같은 結果는 Sn<sup>2+</sup>이 細胞내의 溶性의 蛋白質의 SH기 및 不溶性의 糖蛋白質이나 복합인산기와 강한 結合에 의해 菌體내에 蓄積됨에 따라 生育의 저해가 일어 난 것으로 생각된다. 카드뮴 이외의 重金屬의 菌體內 蓄積效果에 대하여 Venkateswerlu와 Stotzky<sup>20</sup>가 Cunninghamella blakesleeana의 細胞壁에 각종 重金屬이 結合하여 있음을 보고 하였으며 Horitsu 등<sup>21</sup>은 Pseudomonas aeruginosa에 吸收된 카드뮴 중 88%가 가용성 蛋白質 및 불용성의 복합인산이나 糖蛋白質에 蓄積되며 그의 구리, 크롬, 수은 등의 重金屬에 耐性を 갖는다고 報告하였는데 이와 같은 報告들은 本 實驗의 結果와 類似 傾向을 나타내었다. 따라서 本 分離 菌株는 Sn<sup>2+</sup>에 대하여 대조구와 比較해 볼 때 약 60% 程度의 生育沮止 現像이 나타났으나 다른 重金屬에 대해서는 cadmium과 같이 대단히 耐성이 낮은 特徵的인 菌이었다. 이와 같은 特性은 重金屬으로 汚染된 廢水 處理에 多目的으로 使用이 可能하리라 믿으며 今後 重金屬으로 汚染된 廢水 處理를 微生物學的인 側面에서 淨化하기 위해 繼續 追求해야 할 課題라 생각한다.

## IV. 結 論

本 研究는 廢水 中에 含有된 카드뮴을 微生物學的인 方法으로 淨化하기 위한 基礎研究로서 河川슬러지에서 cadmium耐性菌株를 分離, 鑒定하고 cadmium의 除去效率에 대하여 實驗하였다. 分離菌株 中 cadmium除去效率이 가장 優수한 菌株인 SH-3를 選拔하여 鑒定한바 *K. pneumoniae*로 鑒定되었다. 分離株의 生育 最適 PH는 7.0, 溫度는 30~38°C이었으며 500 ppm의 카드뮴 濃度에서는 生育저해를 받았다. 카드뮴 이외의 重金屬의 影響을 檢討하였을 때  $\text{Sn}^{2+}$ 을 除外한  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ 의 重金屬은 大조구에 비해 큰 差異가 없는 것으로 나타났다. 또한 10ppm의 cadmium이 含有된 培地에서의 本 分離 菌株를 接種하여 배양하였을 때 33.8%의 카드뮴 除去 效率을 보았다.

## 참 고 문 헌

1. Kobayashi, J. (1970) : Relation between the "itai itai" disease and the pollution of river water by cadmium from amine. In *Advances in Water Pollution Research*, 1-25 /1-1-25/8. Edited by S. H. Jenkins. Oxford : Pergamon
2. Yu, T. S. (1979) : Microbial Characteristics of heavy metal ion tolerant microorganisms, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 7, 183-190.
3. Sterritt, R. M. and Lester, J. N. (1980) : Interactions of heavy metals with bacteria, *Science of the total Environment*, 14, 5-17.
4. Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R. (1984) : Cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp., *J. Gen. Microbiol.*, 130, 53-62.
5. Dolye, J. J., Marshall, R. T. and Pfander, W. H. (1975) : Effects of cadmium on the growth and uptake of cadmium by microorganisms, *Applied Microbiology*, 29, 562-564.
6. Horitsu, H., H. Kato and M. Tomoyeda (1979) : Uptake of cadmium by a cadmium chloride-tolerant bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Ferment. Technol.*, 57(4), 273-279.
7. Chorpa, I. (1975) : Mechanism of plasmid-mediated Resistance to *Staphylococcus aureus*, *Antimicrobial Agents and chemotherapy*, 7(1), 8-14.
8. Khazaeli, M. B. and R. S. Mitra (1981) : Cadmium-binding Component in *Escherichia coli* During Accommodation to Low Levels of this ion, *Applied and Environmental Microbiology*, 41, 101-105.

- tal Microbiol., (41), 46-50.
9. Harry Aiking, Karin Kok, Harm van Heerikhuizen and Jan Riet (1982) : Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* Growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide, *Applied and Environmental Microbiol.*, 44(4), 938-944.
  10. Babich, H. and Stotzky, G. (1977) : Sensitivity of various bacteria, including Actinomyces and fungi to cadmium and the influence of PH of sensitivity, *Appl. Environmental Microbiol.*, 33, 681.
  11. Norris, P. R. and Kelly, D. P. (1977) : Accumulation of cadmium and cobalt by *Saccharomyces cerevisiae*, *Journal of General Microbiol.*, 99, 317-324.
  12. Perry R and Silver S (1982) : cadmium and manganese transport in *Staphylococcus aureus* membrane vesicle. *J. Bacteriol* 973-976.
  13. Khazaeli MB and Mitra R S (1981). cadmium-binding component in *Escherichia coli* during accommodation to low levels of this ion, *Appl. Environ. Microbiol* 41 : 46-50.
  14. Macaskie L. E. and Dean A. C. R. (1984) : cadmium accumulation by a *Citrobacter* sp. *J. Gen. Microbiol.*, 13 : 53-62.
  15. Bitton G and Freihafer V(1978) : Influence of extracellular polysaccharides on the toxicity of copper and cadmium towards *Klebsiella aerogenes*. *Microb. Ecol.* 4 : 119-125.
  16. Brown, M. J. and Lester, J. N. (1979) : Metal removal in activated sludge : the role of bacterial extracellular polymer, *Water Res.*, 13, 817-837.
  17. Aiking, H. A. Sterkenburg and D. W. Tempest (1977) : Influence of specific growth limitation and dilution rate on the phosphorylation efficiency and cytochrome content of mitochondria of *Candida utilis* NCYC 321, *Arch. Microbiol.*, 113, 65-72.
  18. Macaskie, L. E. and Dean, A. C. R. (1984) : cadmium, accumulation by a *Citrobacter* sp., *J. Gen. Microbiol.*, 130, 53-62.
  19. Holt, J. G. (1984) : *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1, William and Wilkins Co., Baltimore.
  20. Edwin, H. Lennette, A. Balows, W. Hausler J. R. and H. J. Shadomy (1985) : *Manual of Clinical Microbiology*, 4th edn., American Soc. for Microbiol., Washington DC.
  21. 式内次末, 鈴木正己 (1969) : 原子吸光分光分析 : 南紅堂, 東京.
  22. 日本分析化學會 關東支部編 (1973) : 公害分析指針 8, 食品編 2-6, 公立出版株式會社, 東京, 22.

23. Hewitt, E. J. and Nicholas, D. J. D. (1963) : "Metabolic Inhibitor, Vol. 2" Academic prees, new york and London, 372.
24. Goodman, I. and Hiatt, R. B. (1963) : Biochem. pharmacol., 13, 871.
25. Tynecka, Z., Zakac, J. and Gos, Z. (1975) : plasmid dependent impermeability barrier to cadmium ion in staphylococcus aureus, Acta microbiologica palonica, series A, 7, 11-20.
26. McCalla, T. M. (1940) : J. Bacteriol, 40, 23.
27. Venkateswerlu, G., Yoder, M. J. and Stotzky, G. (1989) : Morphological Ultra structural and chemical changes induced in Cunninghamella blakesleeana by copper and cobalt, Appl. Microbiol. Biotechnol., 32, 654-662.