Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 17, No. 5, 454-460 (1989)

하폐수의 자연환경에서 R Plasmid와 재조합 유전자의 전이특성(II)
-전이율의 비교-

이성기 · 김치경*

충북대학교 자연대 미생물학과

Transfer of R Plasmids of Bacterial Isolates and Their Cloned R Genes in Natural Wastewater Environments (II)
— Comparison of Transfer Frequency —

Lee, Sung-Gie and Chi-Kyung Kim*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea

Antibiotics resistance genes both in natural bacterial isolates and the genetically cloned bacteria were comparatively studied for their transfer frequencies by the method of conjugation in several different water environments. The Km^r genes in both kinds of bacteria were transferred more frequently in autoclaved wastewater of laboratory environment than in natural river water, but in Luria Bertani (LB) broth medium under the laboratory conditions the transfer frequences of the genes were much higher than in the autoclaved wastewater. The transfer frequencies at 20°C and 30°C were not much different in any water environments. The Km^r genes of the genetically cloned bacteria and the natural isolates were transferred at the same frequency both in natural river water and in the autoclaved wastewater of laboratory environment, but in LB broth under laboratory conditions the transfer frequencies were lowered by 10^{-3} to 10^{-4} in the genetically cloned cells than the natural isolates. When donors of different cloned cells were conjugated with recipient of a natural isolates, the Km^r genes of different donor cells were transferred at the about same frequency, but the same donor of the cloned cell were conjugated with recipients of different natural isolates, the transfer of Km^r gene of the cloned cell showed some diferences of 10^1 to 10^2 in frequency.

수 많은 항생물질의 남오용 그리고 이들에 의한 자연계의 오염으로 인하여 세균의 저항성은 계속 증가되어 왔고, 수질환경에서 발견되는 저항성세균의 빈도 또한 증가되고 있다는 사실이 Mach와 Grimes (1), Bell등(2), 그리고 Shaw와 Cabelli(3)에 의하여 여러번 지적된 바 있다. 이것은 자연계에서 항생물질 내성유전자를 가지고 있는 plasmid DNA가 여러 세균들 사이에서 상호간에 널리 전이되고 있음을 의미하는 것이다. 그리고 Gram 양성세균에서 주로 나타나고 있던 kanamycin, erythromycin, tetracycline 등에 대한 저항성이 Gram 음성세균에서도 널리 나타나고 있음이 Flint 등(4), Shoemaker와 Salyers (5), 그리고 O'Morchoe 등(6)에 의하여 보고되었다. 또 이들 항생물질 내성유전자가 자연계에서 Gram 음성 및 양성세균들 사이에 광범위하에 전이되고 있음을 Brisson-Noël 등(7)과 Trieu-Cuot(8)이 보고하였으며, 특히 이러한 내성유전자의 전이는 conjugation 방법에 의하여 많이 일어나고 있다는 것이 Buchanan-Wollaston 등(9)에 의하여 연구되었다.

이와 같이 자연계의 수질환경에서 항생물질 내성유전자가 세균들 사이에 널리 전이되고 있다는 것은 보건, 환경 및 생태학적 측면에서 중요한 의의를 내포하고 있다. 특히 유전공학 기법으로 재조합된 미

Key words: R plasmid, R genes, conjugal transfer, water environments
*Corresponding author

생물이 자연계에 방출됨으로써 그들의 hybrid plasmid가 conjugation 등의 transfer 기전에 의하여 광범위하게 전파될 가능성을 지니고 있다는 것이 O'Morchoe 등(6)에 의하여 지적된 바 있다. 또 McPherson과 Gealt(10)는 수 많은 transconjugant들이 plasmid 재조합시 유전자의 rearrangement를 나타낼 수 있고, 이 때 재조합된 미생물은 자연환경에서 상존하는 미생물들과 상호작용하여 재조합된 유전자의 전이를 더욱 용이하게 해줄 수 있다고 지적하였다. 그리고 Gealt 등(11)과 Mancini 등(12)도 하폐수 처리장과 같이 미생물의 밀도가 높은 수질환경에서는 재조합된 미생물과 상존 미생물 사이에 plasmid의 rearrangement가 촉진되어 plasmid profile 자체를 변화시킬 수도 있으며 conjugative하지 않는 plasmid까지도 전이시킬 수 있음을 지적하였다. 또한 자연의 수질환경은 다양한 영양조건, 유속의 변화 등의 환경요인에 의하여 항생물질 내성유전자의 전이는 더욱 예상외로 다르게 일어날 수 있을 것이다. 그러나 이와 같은 문제에 대한 체계적인 연구나 실험보고는 거의 없는 상태이다.

그러므로 본 연구에서는 하폐수 하천수로부터 분리한 장내세균들을 이용하여 그들이 가지고 있는 항생물질 내성유전자들의 전이특성에 대하여 실험하였다. 특히 수질환경이 상이한 조건에서 온도, 세균수, 반응시간 등에 따른 전이특성을 conjugation 방법으로 이미 보고한 바 있으며(13), 본 보에서는 자연계에서 분리한 세균의 R plasmid의 전이율을 조사하는 동시에 유전공학 기법으로 재조합된 항생물질 내성유전자의 전이율을 서로 비교 실험하였다.

재료 및 방법

시험균주

본 실험에 사용한 균주는 청주공단의 하폐수 및 무심천의 하천수로부터 Standard Methods(14)에 따라 분리한 Gram 음성세균들로서 그 중 DK1(*E. coli*), MT1(*Providencia rettseri*), MT2(*E. coli*), MS1(*Pseudomonas* sp.) 균주를 시험균주로 선발하였다. 그들의 항생물질 내성특성은 Kim과 Lee(15)의 보고에서와 같으며, 균주의 동정은 API 20E (API International S.A. France)로 실시하였다. DK1 균주는 donor, MS1 균주는 recipient, 그리고 MT1과 MT2 균주는 donor 및 recipient로 하여 conjugation 실험을 하였다. 자연계로부터 분리한 균주와 비교하여 유전자 조작기법으로 재조합된 내성유전자의 전이를 연구하기 위하여 *E. coli* C600과 *E. coli* HB101과 같은 실험실 환경에 적응된 균주를 Kim과 Lee(15)에서 기술한 방법으로 내성유전자의 재조합 균주를 만드는데 사용하였다. 유전자 조작기법으로 제조된 균주는 Kim과 Lee(15)의 결과에 따라 DKC601과 DKH103을 donor로 사용하였다.

Plasmid DNA의 분리 및 전기영동

항생물질 내성유전자의 전이실험에 사용된 균주와 그 결과 얻어진 transconjugant들의 plasmid DNA는 Silhavy 등(17), Dillon 등(18), Perbal(19)의 alkaline extraction 방법을 응용하여 Kim과 Lee(15)에서 기술한 바와 같이 추출하였다. 이들의 plasmid DNA는 0.7-1% agarose gel과 40-100 V의 전압을 사용하여 Maniatis 등(20)의 방법으로 전기영동을 실시하였다.

Conjugation에 의한 항생물질 내성유전자의 전이

시험균주들에 대한 R plasmid의 전이실험은 DK1 균주를 donor로 하고 MT1과 MT2 균주를 recipient로 하는 mating pair와 MT1 또는 MT2 균주를 donor로 하고 MS1을 recipient로 하는 mating pair를 선정하였다. 그리고 유전자 조작기법으로 제조된 균주(DKC601와 DKH103)를 donor로 할 때에는 자연환경에서 분리한 MT1과 MT2 균주를 각각 recipient로 하는 mating pair를 선정하였다.

전이실험을 위한 수질환경은 Luria-Bertani(LB) 액체배지 또는 멸균한 폐수를 사용하여 실험실 환경에서 실시하는 동시에 무심천 하천수의 자연환경에서 병행하여 실시하였다. 전이실험을 한 수질의 온도는 20℃, 30℃로 구분하였고 donor와 recipient의 세균은 $10^4/ml$-$10^{11}/ml$의 농도로 조정하여, 6-24시간 동안 전이율을 비교 실험하였다. 매 6시간마다 시료를 채취하여 각각의 항생물질을 농도별로 첨가한 LB 또는 Xylose Lysine Deoxycholate 고체배지에 도말배양하여 Breton 등(16)의 counterselection 방법에 따라 transconjugant를 선발하였으며 전이율은 Kim과 Lee(13)의 방법에 따라 계산하였다. 자연의 수질환경에서 *in situ* 실험을 할 때에는 멸균한 dialysis sac(Sigma Co.)에 멸균한 하폐수를 넣고 시험균주를 접종한 후 무심천 하천수에 정치하여 실험하였다. 이 때 채취한 시료는 icebox에 넣어 1시간 내에 운반하여 transconjugants를 선발하였으며 그 외의 실험방법은 실험실 환경에서와 동일하게 실시하였다.

결과 및 고찰

자연계에서 분리한 균주의 내성유전자 전이

Table 1. Conjugal transfer of R genes in bacterial isolates in LB broth.

Mating pairs	Selection markers (μg/ml)	Temp. for mating (°C)	Inocula of donor (cell/ml)	Transfer frequency after mating for (hours)			
				6	12	18	24
DK1×MT1	Km, 50; Ap, 50;	20	4.2×10^6	1.1×10^{-4}	2.1×10^{-4}	1.3×10^{-3}	2.1×10^{-2}
	Tc, 50	30	4.2×10^6	1.3×10^{-4}	2.4×10^{-4}	7.2×10^{-3}	2.8×10^{-2}
DK1×MT2	Km, 50; Ap, 50;	20	4.4×10^6	1.2×10^{-4}	2.1×10^{-4}	3.1×10^{-4}	5.4×10^{-4}
	Tc, 50	30	4.4×10^6	2.3×10^{-4}	6.2×10^{-4}	4.8×10^{-4}	4.1×10^{-4}
MT1×MS1	Cm, 50; Tc, 50;	20	2.5×10^4	1.1×10^{-3}	2.1×10^{-3}	4.2×10^{-2}	6.2×10^{-1}
	Km, 100	30	2.5×10^4	1.3×10^{-3}	4.3×10^{-3}	3.2×10^{-2}	7.2×10^{-1}
MT2×MS1	Cm, 50; Tc, 50;	20	2.4×10^4	2.6×10^{-3}	3.5×10^{-3}	5.6×10^{-2}	3.8×10^{-1}
	Km, 100	30	2.4×10^4	3.2×10^{-3}	4.6×10^{-3}	2.4×10^{-2}	5.1×10^{-1}

Table 2. Conjugal transfer of R genes in bacterial isolates in autoclaved wastewater.

Mating pairs	Selection markers (μg/ml)	Temp. for mating (°C)	Inocula of donor (cell/ml)	Transfer frequency after mating for (hours)			
				6	12	18	24
DK1×MT1	Km, 50; Ap, 50;	20	2.0×10^9	2.5×10^{-9}	5.0×10^{-9}	7.5×10^{-9}	1.5×10^{-9}
	Tc, 50	30	2.0×10^9	6.5×10^{-9}	2.5×10^{-8}	2.0×10^{-8}	1.0×10^{-8}
DK1×MT2	Km, 50; Ap, 50;	20	6.1×10^{11}	0	1.3×10^{-11}	1.7×10^{-11}	0
	Tc, 50	30	6.1×10^{11}	2.0×10^{-10}	1.7×10^{-11}	1.2×10^{-10}	0
MT1×MS1	Cm, 50; Tc, 50;	20	7.1×10^{10}	0	1.4×10^{-8}	2.5×10^{-7}	0
	Km, 100	30	7.1×10^{10}	0	1.6×10^{-7}	1.1×10^{-7}	1.4×10^{-7}
MT2×MS1	Cm, 50; Tc, 50;	20	1.3×10^8	1.8×10^{-6}	1.2×10^{-5}	7.8×10^{-5}	8.6×10^{-5}
	Km, 100	30	1.3×10^8	9.3×10^{-6}	1.1×10^{-5}	2.6×10^{-4}	1.1×10^{-4}

자연환경으로부터 분리한 DK1(Cm^r Km^r Sm^r Su^r)를 donor로 하고 MT1(Ap^r Cm^r Sm^r Su^r Tc^r)과 MT2(Ap^r Cm^r Sm^r Su^r Tc^r)를 recipient로 하는 mating pair를 정하여 실험실 환경의 LB 액체배지에서 항생물질 내성유전자의 전이율을 실험한 결과는 Table 1에서와 같다. DK1×MT1의 경우 Km^r 유전자의 전이는 20℃, 30℃에서 24시간동안 시간이 지날수록 약 10^{-4}에서 10^{-2}으로 전이빈도가 높아졌으나, DK1×MT2의 경우에는 10^{-4}으로 Km^r 유전자의 전이빈도를 나타내어 시간이 지나도 그 빈도는 높아지지 않았다. 그러나 같은 donor이지만 recipient가 MT1일 때에는 10^{-2}의 전이율이 나타났고 recipient가 MT2일 때에는 10^{-4}의 전이율을 나타냈다. MS1(Ap^r Km^r Sm^r Su^r)을 recipient로 한 MT1×MS1 또는 MT2×MS1의 경우에는 donor의 접종량을 10^6 cell/ml로 했던 위에서의 경우에 비하여, donor의 접종량이 10^4 cell/ml인데도 불구하고 Cm^r Tc^r 유전자가 10^{-1}의 높은 전이빈도를 나타내었다. 이는 Kim 등(21)이나 Kim과 Lee(13), Alcaide와 Garay(22)의 보고에서와 같이 각 균주의 특성과 접종량, mating pair에 따라 나타나는 차이라 생각된다.

그러나 동일조건의 실험실 환경으로 멸균한 하폐수의 수질에서 실험한 결과는 Table 2와 같다. DK1×MT1의 경우 donor의 접종량이 10^8 cell/ml까지는 전이가 전혀 일어나지 않았고 접종량을 10^9 cell/ml으로 증가하였을 때부터 전이가 일어나 Km^r 유전자가 10^{-9}-10^{-8}의 전이빈도를 나타내었다. DK1×MT2의 경우에도 donor의 접종량이 10^{10} cell/ml까지는 전이가 일어나지 않다가 10^{11} cell/ml부터 Km^r 유전자의 전이가 일어났다. 또 conjugation의 온도가 20℃일 때에는 12시간 후부터 그리고 30℃에서는 6시간부터 전이가 일어나 18시간 후에는 10^{-11}과 10^{-10}의 전이빈도를 나타내었다. MT1×MS1의 conjugation에서는 접종량을 10^{10} cell/ml으로 증가시킬 때까지 전이가 일어나지 않다가, 10^{10}cell/ml부터 Cm^r Tc^r 유전자의 전이가 일어났다. 이 때에는

Table 3. Conjugal transfer of R genes in bacterial isolates in river water.

Mating pairs	Selection markers (μg/ml)	Temp. for mating (°C)	Inocula of donor (cell/ml)	Transfer frequency after mating for (hours)			
				6	12	18	24
DK1×MT1	Km, 50; Ap, 50;	18-20	4.8×10^{9}	0	1.7×10^{-10}	4.0×10^{-10}	5.4×10^{-10}
	Tc, 50	28-30	4.8×10^{9}	2.6×10^{-10}	2.1×10^{-10}	2.3×10^{-10}	2.9×10^{-11}
DK1×MT2	Km, 50; Ap, 50;	18-20	4.6×10^{11}	0	0	1.1×10^{-11}	1.8×10^{-11}
	Tc, 50	28-30	4.6×10^{11}	0	1.2×10^{-11}	2.8×10^{-11}	4.1×10^{-11}
MT1×MS1	Cm, 50; Tc, 50;	18-20	3.2×10^{10}	0	0	1.2×10^{-10}	4.4×10^{-10}
	Km, 100	28-30	3.2×10^{10}	0	0	5.1×10^{-10}	7.5×10^{-10}
MT2×MS1	Cm, 50; Tc, 50;	18-20	1.8×10^{8}	1.1×10^{-9}	3.2×10^{-9}	6.6×10^{-9}	1.1×10^{-10}
	Km, 100	28-30	1.8×10^{8}	4.6×10^{-9}	9.1×10^{-9}	2.1×10^{-8}	4.5×10^{-9}

20℃나 30℃에서 모두 12시간 이후에야 10^{-8}-10^{-7}의 높은 전이빈도를 나타내었다. MT2×MS1의 경우에는 10^{8} cell/ml의 접종량부터 Cm^{r} Tc^{r} 유전자가 10^{-6}-10^{-4}의 전이빈도를 나타내었다. LB 액체배지의 conjugation결과(Table 1)와 마찬가지로 Table 2의 멸균하폐수에서도 DK1×MT1이나 DK1×MT2의 경우보다 MT1, MT2를 donor로 하고 MS1을 recipient로 하는 conjugation에서 전이빈도가 상대적으로 높았었다. 이는 recipient로 사용한 MS1 균주의 특성으로 생각된다. LB 액체배지에서의 전이실험에서 20℃에서 보다 30℃에서의 전이빈도가 더욱 높게 나타난 것은 Walmsley(23)가 보고한 온도의 영향보다는 균주, 접종량, 매질에 의하여 세균의 밀도가 높아진 때문이라 생각된다(13). 또 LB 액체배지에서보다 멸균하폐수에서 균주의 접종량이 더욱 높았음에도 불구하고 전이빈도는 멸균하폐수 환경에서 더 낮게 나타났다. 이것은 Singleton(24)과 Mach와 Grimes(1)가 지적한 바와 같이 매질에 그 원인이 큰 것으로 보인다.

무심천 하천수에서 원위치 실험방법으로 실시한 전이실험은 Table 3에서와 같이 실험실의 멸균수의 환경과 동일한 접종량, mating 시간 그리고 유사한 온도조건으로 실시하였는데 그 전이빈도는 매우 낮게 나타났다. MT2×MS1 이외에는 20℃에서 6-12시간까지 전이가 나타나지 않았고, MT1×MS1에서는 30℃에서도 12시간까지 전이가 나타나지 않았다. 항생제 내성유전자의 전이는 대체로 20℃에서보다 30℃에서 더 높게 나타났으나 DK1×MT1의 경우에는 Km^{r} 유전자가 30℃에서보다 20℃에서 더 높은 전이빈도를 나타내었다. DK1×MT1에서는 실험실의 멸균하폐수 환경에 비해서는 10^{-1}-10^{-3} 더 낮았고 MT1×MS1, MT2×MS1의 경우에서는 Cm^{r} Tc^{r} 유전자의 전이가 10^{-3}-10^{-5} 정도 낮았으나, DK1×MT2에서는 비슷한 결과가 나타났다. 이러한 결과로부터 R 유전자의 전이빈도는 Kim과 Lee(13)와 Rafii와 Crawford(25)가 지적한 바와 같이 균주 자체의 특성 뿐 아니라 매질이나 세균수 그리고 온도와 시간 등의 환경조건에 따라 달라진다는 것을 알 수 있었다.

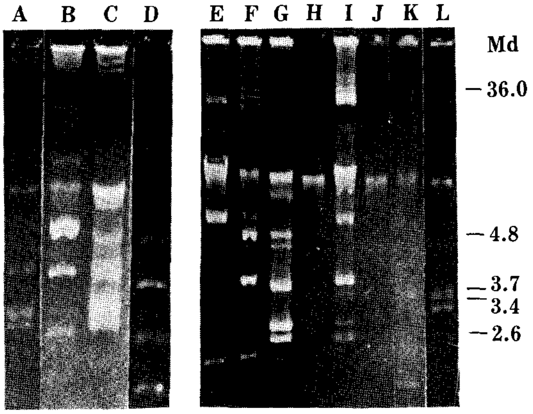

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the plasmids in the bacterial isolates and their transconjugants. Lane A, transconjugant of DK1×MT2; B and F, MT2; C and G, DK1; E, MT1; H, MS1; I, transconjugant of DK1×MT1; J, transconjugant of MT1×MS1; K, transconjugant of MT2×MS1; D and L, *E. coli* V517.

자연계에서 분리한 균주들의 항생물질 내성 plasmid의 profile은 Kim과 Lee(15)의 보고에서와 같았으며 멸균한 하천수의 실험실 환경에서 conjugation에 의하여 그들 사이에 전이된 plasmids는 Fig.1에서와 같이 대표적인 transconjugant들에서 확인할 수 있었다. DK1(Lane C)와 MT2(Lane B)에서 얻은 transconjugant(Lane A)에서는 약 68 kb의

Table 4. Conjugal transfer of the genetically cloned R genes in LB broth.

Mating pairs	Selection markers (μg/ml)	Temp. for mating (°C)	Inocula of donor (cell/ml)	Transfer frequency after mating for (hours)			
				6	12	18	24
DKC601×	Km, 50; Ap, 50;	20	4.5×10^{6}	2.6×10^{-7}	3.2×10^{-7}	4.9×10^{-7}	1.8×10^{-6}
MT1	Tc, 50	30	4.5×10^{6}	2.8×10^{-7}	4.2×10^{-7}	5.8×10^{-7}	2.3×10^{-6}
DKH103×	Km, 50; Ap, 50;	20	4.8×10^{6}	1.6×10^{-7}	2.9×10^{-7}	8.8×10^{-7}	6.1×10^{-6}
MT1	Tc, 50	30	4.8×10^{6}	1.8×10^{-7}	2.6×10^{-7}	9.8×10^{-7}	7.4×10^{-6}
DKC601×	Km, 50; Ap, 50;	20	8.2×10^{6}	0	0	0	1.2×10^{-7}
MT2	Tc, 50	30	8.2×10^{6}	0	0	1.1×10^{-7}	1.5×10^{-7}

Table 5. Conjugal transfer of the genetically cloned R genes in autoclaved wastewater.

Mating pairs	Selection markers (μg/ml)	Temp. for mating (°C)	Inocula of donor (cell/ml)	Transfer frequency after mating for (hours)			
				6	12	18	24
DKC601×	Km, 50; Ap, 50;	20	2.8×10^{10}	0	2.2×10^{-11}	4.1×10^{-11}	2.0×10^{-10}
MT1	Tc, 50	30	2.8×10^{10}	1.8×10^{-11}	2.7×10^{-11}	6.7×10^{-11}	3.1×10^{-10}
DKH103×	Km, 50; Ap, 50;	20	4.1×10^{10}	0	1.3×10^{-11}	1.1×10^{-11}	1.4×10^{-10}
MT1	Tc, 50	30	4.1×10^{10}	1.2×10^{-11}	2.7×10^{-11}	4.2×10^{-11}	1.2×10^{-10}
DKC601×	Km, 50; Ap, 50;	20	8.2×10^{11}	0	0	1.3×10^{-12}	1.8×10^{-11}
MT2	Tc, 50	30	8.2×10^{11}	0	1.4×10^{-12}	2.0×10^{-12}	4.8×10^{-11}

Km^r plasmid가 전이된 것을 볼 수 있고, Lane I에서는 DK1의 Km^r plasmid가 MT1으로 전이된 것을 볼 수 있다. 같은 방법으로 Lane J와 K에서는 MT1과 MT2의 $Cm^r Tc^r$ plasmid가 각각 MS1으로 전이된 것을 발견할 수 있다.

재조합 균주의 내성유전자 전이

자연계에서 분리한 균주의 내성유전자 전이와 비교하기 위하여 유전공학기법으로 제조한 균주들 중 DKC601($Ap^r Cm^r Km^r Sm^r Su^r$), DKH103($Cm^r Km^r Sm^r Su^r$)를 donor로 선정하여, MT1($Ap^r Cm^r Sm^r Su^r Tc^r$)과 MT2($Ap^r Cm^r Sm^r Su^r Tc^r$)를 recipient로 하는 mating pairs로 항생물질 내성유전자의 전이를 실험하였다.

실험실의 LB 액체배지에서 실험한 결과는 Table 4와 같다. DKC601×MT1와 DKH103×MT1에서는 6시간 후부터 Km^r 유전자가 10^{-7}의 전이율을 보이다가 24시간 후에는 10^{-6}의 전이율을 나타냈으나, DKC601×MT2에서는 20℃에서 18시간까지 그리고 30℃에서 12시간까지 전이가 없었으나 각기 24시간부터 Km^r 유전자가 10^{-7}의 전이율을 나타내었다. 이와 같은 결과는 동일한 접종량과 온도조건으로 같은 수질환경에서 비교해 볼 때 자연계에서 분리한 균주에 비하여 유전공학기법으로 재조합된 Km^r 유전자가 10^{-3}-10^{-4} 정도나 낮은 전이율을 나타냈다. 이는 Gealt 등(11), McPherson과 Gealt(10)가 지적한 바와 같이 유전공학기법으로 제작된 세포에서는 형질발현시간 및 환경적응이 늦기 때문인 것으로 추정된다.

멸균된 하폐수의 실험실 환경에서 실시한 DKC601×MT1, DKH103×MT1 그리고 DKC601×MT2의 전이실험결과는 Table 5와 같다. DKC601×MT1과 DKH103×MT1의 경우에는 6시간 후부터 Km^r 유전자의 전이가 일어났으나, DKC601×MT2의 경우에는 12시간이 지난 후에야 전이가 일어나서 24시간 후에는 어느 경우에나 10^{-10}-10^{-11}의 전이율을 나타

Table 6. Conjugal transfer of the genetically cloned R genes in river water.

Mating pairs	Selection markers (μg/ml)	Temp. for mating (°C)	Inocula of donor (cell/ml)	Transfer frequency after mating for (hours)			
				6	12	18	24
DKC601×	Km, 50; Ap, 50;	18-20	2.6×10^{10}	0	1.6×10^{-11}	2.0×10^{-11}	2.1×10^{-10}
MT1	Tc, 50	28-30	2.6×10^{10}	1.1×10^{-11}	1.9×10^{-11}	4.2×10^{-11}	4.3×10^{-10}
DKH103×	Km, 50; Ap, 50;	18-20	2.7×10^{10}	0	1.0×10^{-11}	2.1×10^{-11}	1.0×10^{-10}
MT1	Tc, 50	28-30	2.7×10^{10}	0	2.4×10^{-11}	3.7×10^{-11}	1.3×10^{-10}
DKC601×	Km, 50; Ap, 50;	18-20	8.6×10^{11}	0	0	1.3×10^{-12}	2.8×10^{-12}
MT2	Tc, 50	28-30	8.6×10^{11}	0	0	2.6×10^{-12}	4.2×10^{-12}

냈다. 그리고 20℃와 30℃의 온도는 약 12시간 이후에는 전이빈도에 큰 영향을 주지 않았음을 알 수 있었다. 또한 멸균하천수에서는 자연계에서 분리한 균주의 내성 전이율(Table 2)에 비하여 재조합된 내성유전자의 전이율은 더 낮았다. 그 차이는 LB 액체배지에서보다 멸균한 하천수에서는 훨씬 작았다. 이는 O'Morchoe(6)와 Gasson과 Davies(26)가 지적한 바와 같이 세포의 접촉빈도를 높여주는 세균들의 밀도의 영향으로 사료된다(13).

무심천의 *in situ* 실험에서는 재조합된 내성유전자의 전이실험을 한 결과는 Table 6과 같다. 이 경우에 균주의 접종량은 멸균한 하천수에서의 경우와 같게 했으나 내성유전자의 전이는 실험 후 6시간까지는 거의 일어나지 않았고, DKC601×MT2에서는 12시간 후까지도 전이가 일어나지 않았다. 그러나 20℃와 30℃ 사이의 차이는 거의 없이 18시간 후에는 Km^r 유전자가 10^{-12}의 전이율을 나타냈다. 무심천의 자연환경에서는 자연계 분리균주의 내성유전자의 전이율에 비하여 재조합된 내성유전자의 전이율은 조금 낮았다. 이는 donor로 사용한 재조합 균주를 어떻게 만들었냐에 따라 차이가 있었으며, Gealt 등(11)과 McPherson과 Gealt(10)의 지적과 같이 유전자조작으로 제작된 세포의 환경 적응능력이 제한적이라는 사실이 뒷받침해준다.

이와 같이 유전공학 기법으로 재조합된 세균의 항생물질 내성유전자가 conjugation에 의하여 전이된 chimeric plasmid를 전기영동방법으로 확인한 결과는 Fig.2와 같다. Kim과 Lee(15)에 의하여 클로닝된 균주들(DKC601, DKC602, DKH102, DKH103)의 chimeric plasmid는 각각 Lane B, C, D, E에 나타나 있다. 또 DKC601과 DKH102 그리고 DKH103 재조합 균주들은 LB 액체배지의 실험실 환경에서 MT1과 conjugation시켜 얻은 transconjugants(Lane F, G, H)에서는 재조합된 Km^rCm^r plasmid가 분명히 전이된 사실을 각각 확인할 수 있었다.

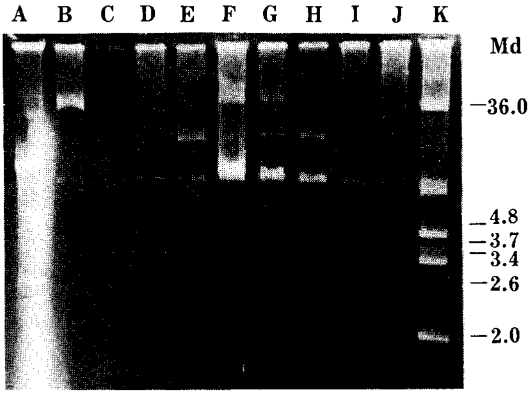

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the chimeric plasmids in the cloned cells and their transconjugants. Lane A, MT1; B, DKC601; C, DKC602; D, DKH102; E, DKH103; F, transconjugant of DKC601×MT1; G, transconjugant of DKH102×MT1; H, transconjugant of DKH103×MT1; I, *E. coli* HB101; J, *E. coli* C600; K, *E. coli* V517.

요 약

자연계로부터 분리한 Gram 음성세균과 함께 유전자 조작기법으로 kanamycin(Km)과 chloramphenicol(Cm)에 대한 내성유전자를 재조합한 균주들에서 그 내성유전자의 전이율을 conjugation 방법으로 몇 가지 상이한 수질환경에서 비교 연구하였다. 자연계로부터 분리한 DK1 균주와 재조합한 DKC601이나 DKH103을 donor로 하고 recipient 및

기타 조건을 같게 했을 때, donor가 가지고 있던 Km^r 유전자의 전이율은 자연환경의 하천수에서 보다 실험실 환경의 멸균한 하폐수에서 더 높았고, 실험실 환경에서는 멸균한 하폐수보다 Luria-Bertani (LB) 액체배지에서 훨씬 높았다. 온도를 20℃와 30℃로 했을 때에는 어느 종류의 균주를 donor로 사용하더라도 전이율에는 큰 차이가 없었으나, 전이가 일어나는 시간은 30℃에서 조금 빨랐다. 하천수의 자연환경에서나 실험실이 멸균하폐수에서는 항생제 내성유전자의 전이율은 두 가지 종류의 균주 사이에 차이가 거의 없거나 재조합된 균주에서 10^{-1} 정도로 낮다. 그러나 실험실 환경의 LB액체배지에서는 전이가 일어나는데 필요한 반응시간이 재조합된 균주에서 더 길 뿐만 아니라, 전이율에 있어서도 10^{-3}-10^{-4} 정도 낮았다. 그리고 MT1 균주를 recipient로 하고 재조합된 균주인 DKC601과 DKH103을 donor로 했을 경우에는 donor에 따라 전이율의 차이가 없었으나, DKC601을 donor로 하고 MT1과 MT2을 각각 recipient로 했을 경우에는 recipient에 따라 전이율이 10^1-10^2 정도 차이가 났다.

참고문헌

1. Mach, P.A. and D.J. Grimes: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1395 (1982).
2. Bell, J.B., W.R Macrae and G.E. Elliott: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 486 (1980).
3. Shaw, D.R. and V.J. Cabelli: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 756 (1980).
4. Flint, H.I., A.M. Thomson and J. Bisset: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 855 (1988).
5. Shoemaker, N.B. and A.A. Salyers: *J. Bacteriol.*, **169**, 3160 (1987).
6. O'Morchoe, S.B., O. Ogunseitan, G.S. Salyer and R.V. Miller: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1923 (1988).
7. Brisson-Noel, A., M. Arthur and P. Courvalin: *J. Bacteriol.*, **170**, 1739 (1988).
8. Trieu-Cuot, P., C. Carlier, P. Martin and P. Courvalin: *FEMS Microbiol. Lett.*, **48**, 289 (1987).
9. Buchanan-Wollaston, V., J.E. Passiatore and F. Cannon: *Nature*, **328**, 172 (1987).
10. McPherson, P. and M.A. Gealt: *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 904 (1986).
11. Gealt, M.A., M.D. Chai, K.B. Alpert and J.C. Boyer: *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 836 (1985).
12. Mancini, P., S. Fertels, D. Nave and M.A. Gealt: *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 665 (1987).
13. Kim, C.K. and S. G. Lee: *Genetic Eng. Research*, **3**, 23 (1989).
14. American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater, APHA, Washington, D.C., 16th ed, (1985).
15. Kim, C.K. and S.G. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**(5), 447 (1989).
16. Breton, A.M., S. Jaoua and J. Guespin-Michel: *J. Bacteriol.*, **161**, 523 (1985).
17. Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist: Experiments with gene fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1984).
18. Dillon, J.R., A. Nasim and E.R. Nestmann: Recombi nant DNA methodology, John Wiley and Sons, Inc., Canada (1985).
19. Perbal, B.: A practical guide to molecular cloning, John Wiley & Sons, Inc., Canada, 2nd ed, (1988).
20. Maniatis, T., E.F. Fritsch and Sambrook: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., (1982).
21. Kim, C.K., S.G. Lee and Y.C. Kim: *Kor. J. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 245 (1986).
22. Alcaide, E. and E. Garay: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 435 (1984).
23. Walmsley, R.H.: *J. Bacteriol.*, **126**, 222 (1976).
24. Singleton, P.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 756 (1983).
25. Rafii, F. and D.L. Crawford: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1334 (1988).
26. Gasson, M.J. and F.L. Davies: *J. Bacteriol.*, **143**, 1260 (1980).

(Received August 14, 1989)