

수질환경에서 일어나는 항생물질 내성유전자의 전이와 재조합

김치경 · 이성기 · 김영창

충북대학교 자연대학 미생물학과
(1986년 5월 8일 수리)

Transfer and genetic recombination of antibiotic resistance genes occurring in water environment

Kim, Chi-Kyung, Sung-Gie Lee, and Young-Chang Kim

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University.
(Received May 8, 1986)

Antibiotic resistant bacteria isolated from the river water in Cheongju City were studied on the transfer of their R-plasmids in water environment. The R-plasmids were transferred by conjugation between the isolates at the frequencies of 1.1×10^{-6} to 1.2×10^{-7} under laboratory condition and 1.2×10^{-7} to 1.0×10^{-9} in natural environment. The R-plasmids isolated from those bacteria were also transferred into the recipient cells of *E. coli* HB101 at the frequencies of $1.7-6.7 \times 10^{-6}$. The $AP^rCm^rTc^r$ -plasmid of isolate T-44 which were transferrable by conjugation and transformation was determined to be 9.01 kilobases in molecular size. When the $AP^rCm^rTc^r$ -plasmid DNA was treated with restriction endonuclease, the plasmid appeared to have one restriction site for *EcoRI* and *BamHI*, respectively, and three sites for *Pst I* endonuclease.

수 많은 抗生物質의 개발과 함께 그 남오용으로 인하여 自然界에서 발견되는 많은 微生物은 각종 항생제에 대한 耐性이 증가되고 있다는 사실은 널리 알려져 있다. 이는 자연계에서 세균들 사이에 R-플라스미드가 傳播된다는 점과 R-플라스미드의 轉移에 의하여 보다 내성이 높은 병원균이 출현된다는 것을 의미하므로^(1,2), 이는 保健學上 심각한 문제라 아니할 수 없다.

자연환경에서 분리한 *Salmonella* spp. 와 *Shigella* spp. 의 항생제 내성플라스미드가 35°C 의 실험실 환경에서 *E. coli* 에 전이된다는 것을 Bell 등⁽³⁾ 과 Shaw 등⁽⁴⁾ 이 확인하였으며, 22°C 이하의 실험실 환경에서도 R-플라스미드의 轉移가 일어났음을 Singleton⁽⁵⁾ 은 보고하였다. 그리고 Mach 등⁽⁶⁾ 은 廢下水 처리장의 수질환경에서도 장내세균 사이에 R-플라스미드의 전이가 일어났음을 보고하였다. 그러나 보건학상 문제가 되는 세균들 사이에서 일어나는 R-플라스미드의 전이를 河川水와 같은 自然環境에

서 연구한 예는 많지 않으며 그들 유전자의 分子生物學的인 특성에 대한 연구는 거의 없었다.

그러므로 본 연구에서는 몇가지 항생물질에 대하여 내성을 나타내는 Gram 음성세균을 도시 하천수와 공단 폐수로 부터 분리한 후 形質轉換과 接合의 방법으로 R-플라스미드의 전이를 實驗室環境과 河川水의 자연환경에서 연구하였다. 또 자연환경에서 전이되는 R-플라스미드를 純粹分離하여 制限酵素로 처리분석함으로써 그 플라스미드 DNA 의 제한 효소지도를 작성하였다.

材料 및 方法

試驗菌株의 항생제 耐性檢定

渭州市 無心川의 하천수와 大田 第二工團 폐수로 부터 APHA⁽⁷⁾ 와 Difco Manual⁽⁸⁾ 에 따라 Gram 음성 시험균주를 분리하였다. Ampicillin (Ap), chloramphenicol (Cm), kanamycin (Km), streptomycin

(Sm), tetracycline (Tc), sulfadiazine (Su) 등의 항생물질에 대하여 내성을 나타내는 세균의 分離頻度는 replica plating 및 toothpick에 의한 picking 방법으로 조사하였으며 선발된 균주에 대한 항생제별 MIC (Minimum inhibitory concentration)는 Gonzalez 등⁽⁹⁾과 Mach 등⁽¹⁰⁾의 방법에 따라 결정하였다.

플라스미드 제거

항생제 내성유전자의 存在를 확인하기 위한 제거 검사는 Mach 등⁽⁶⁾의 방법을 응용하였다. 시험세균을 acridine orange 또는 ethidium bromide가 함유된 LB 배지의 시험관에 접종하여 1 일간 배양한 후 curing agent의 농도와 배양액의 탁도가 동시에 높은 시험관을 선정하여 그 배양균을 LB배지 (Mach 등⁽⁶⁾; Gonzalez 등⁽⁹⁾) 에 도말하였다. 35°C에서 1 일간 배양한 후 나타난 콜로니를 대조배지와 항생제 첨가배지에 옮겨 다시 배양하였을때, 대조배지에서는 나타났으나 항생제 배지에서는 나타나지 않는 콜로니를 선발하였다.

접합과 形質轉換에 의한 항생제 내성유전자의 傳移

접합에 의한 플라스미드의 전이를 알아보기 위하여 실험실에서의 *in vitro* 실험은 Mach 등⁽⁶⁾의 방법에 따라 시험균주중에서 3.8×10^7 cell/ml의 공여체균주와 3.4×10^8 cell/ml의 수용체균주 또는 2.4×10^8 cell/ml의 공여체균주와 9×10^8 cell/ml의 수용체균주를 Mueller-Hinton broth에 혼합하여 1~12 시간 동안 접합을 시켰다. 접합체는 replica 방법과 counterselection 방법으로 선발하였으며 colony의 형태에 의한 구별도 병행하였다. 이때 사용한 각 항생물질의 농도는 Ap를 50 µg/ml, Cm를 30 µg/ml, Tc를 15 µg/ml, Km을 100 µg/ml로 하였다. 하천수에서의 *in situ* 실험은 실험실에서 확인된 균주를 Mach 등⁽⁶⁾과 Gonzalez 등⁽⁹⁾의 방법에 따라 무심천에서 시행하였다. 滅菌된 하천수를 투석관에 넣고 하천수에 1 시간 동안 정치한 후 *in vitro* 실험에서와 같은 양의 시험균주를 멸균된 주사기로 투석관에 접종하였다. 그리고 일정시간별로 시료를 채취하여 *in vitro* 실험에서와 같은 要領으로 R-plasmid의 傳移를 측정하였다.

형질전환에 의한 R-플라스미드의 傳移는 Maniatis 등⁽¹⁰⁾, Hanahan⁽¹¹⁾, Glick 등⁽¹²⁾의 방법에 따라 *E. coli* HB 101를 수용체균주로 하여 실험실 환경에서 형질전환을 실시하였다. 형질전환체의 選別시 항생제의 농도는 Ap를 20~50 µg/ml, Cm를 30~50 µg/ml, Tc를 15~20 µg/ml로 하였다.

그리고 플라스미드의 傳移率は 試料採取시의 공여체균주 또는 수용체균주 세포수에 대한 접합체나 형질전환체 수의 百分率로 계산하였다.

R- plasmid DNA分離 및 制限酵素 處理

Maniatis 등⁽¹⁰⁾과 Silhavy 등⁽¹³⁾의 phenol추출 방법과 Kado 등⁽¹⁴⁾의 alkaline sodium dodecyl sulfate 방법을 병용하여 covalently closed circular (CCC) 형의 DNA를 分離하였으며 large R-플라스미드의 분리는 Hansen 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 純粹分離하였다. 순수분리된 DNA의 제한효소 처리는 1 µg 정도의 DNA를 1.5 ml Eppendorf 튜브속에서 제한효소 완충액 50 µl에 현탁시킨후 *EcoRI*, *BamHI*, *PstI*등을 각각 1 unit씩 혼합한 후 37°C에서 1~3시간 동안 반응시켰다.

電氣泳動

순수분리된 R-플라스미드와 제한효소로 처리한 플라스미드 DNA의 試料는 Kado 등⁽¹⁴⁾, Hansen 등⁽¹⁵⁾, Meyers 등⁽¹⁶⁾의 方法에 따라 電氣泳動을 하였다. 0.7~1% agarose gel을 사용하여 Tris-borate緩衝液에서 1~12 v/cm로 전기영동시킨 후 0.5 µg/ml의 ethidium bromide 용액으로 DNA를 염색하여 관찰하였다.

結果 및 考察

試驗菌株에 대한 耐性檢定

시험균주에 대한 내성검정은 Gonzalez 등⁽⁹⁾과 Mach 등⁽⁶⁾이 사용한 항생제의 濃度を 참고하여 각 균주의 耐性을 결정하였으며 季節別로 분리한 Gram 음성 세균의 抗生物質에 대한 耐性頻度는 Table 1과 같다. 봄과 여름에는 1600 개체의 분리균중 多劑耐性比 (MAR)가 90%인데 비하여 가을과 겨울에는 1300 개체의 분리균중 다제내성비가 65~70%로 나타났었다.

그리고 선발된 시험균주에 대하여 각 항생물질의 MIC를 測定한 결과는 Table 2와 같다. 1-24 균주는 Ap, Su에 抵抗性을 나타내고 Cm, Km, Sm, Tc에는 感受性을 보였으며, 3-29 균주는 Ap, Cm, Su,

Table 1. The ratio of antibiotic sensitive and resistant bacteria among Gram negative isolates.

Season	Ratio(%) of antibiotic sensitive and resistant bacteria			
	Sensitive	SAR*	MAR**(Double+Triple+Quadruple+Quintuple)	
Spring	1.97	8.97	89.40 (17.10+23.00+41.00+8.30)	
Summer	0.85	8.50	90.25 (34.10+25.00+22.20+8.95)	
Autumn	12.30	23.20	64.50 (22.70+25.10+10.30+6.40)	
Winter	6.50	23.60	69.90 (42.30+21.50+6.10+0.00)	

*SAR, Single antibiotic resistance

**MAR, Multiple antibiotic resistance

Table 2. Minimal inhibitory concentration(MIC) of antibiotics for the isolates.

Isolates	Sources	MIC ($\mu\text{g/ml}$)					
		Ap	Cm	Km	Sm	Su	Tc
1-24	Moosimcheon	128	< 2	< 8	< 4	300	< 2
3-29	Moosimcheon	32	128	< 8	< 8	300	128
T-44	Moosimcheon	200	65	<15	250	1500	200
KE-1	Industrial wastewater	<10	<10	400	25	300	<10

Tc에 抵抗性을 나타내었으나 Km, Sm에는 感受性을 보였다. T-44 균주는 Km에 感受性을 나타내고 다른 抗生物質에는 강한 저항성을 나타내었으며, KE-1은 특히 Km에 강한 저항성을 나타내고 Ap, Cm, Tc에는 감수성을 나타내었다. 위의 4 菌株는 플라스미드의 존재를 확인하였으며, 항생제에 강한 耐性을 나타내는 균주로 밝혀져 본 실험에 사용하였다.

R- plasmid 存在確認

Ap, Cm, Tc 등의 抗生物質에 耐性을 나타내는 菌株에 대하여 그 耐性遺傳子가 플라스미드에 存在하는지를 確認하기 위하여 플라스미드 제거검사를 한 결과는 Table 3과 같다. 20~40 $\mu\text{g/ml}$ 의 acridine orange를 사용한 실험에서 1-24 (Ap^rSu^r) 균주는 285 콜로니중 Ap에 대한 내성이 消失된 것이 235 콜로니가 나타나 그 효율이 82%였다. 3-29 ($\text{Ap}^r\text{Cm}^r\text{Tc}^r\text{Su}^r$) 균주는 300 콜로니를 검사한 결과 60 콜로니에서 Ap, Cm, Tc에 대한 내성이 소실되어 그 효율이 20%로 나타났다. 제거의 效率이 높게 나타난 1-24 균주를 電氣泳動하였을때 Fig. 1에서와 같이 정상균주의 lane a에 비하여 제거된 세포의 lane b와 c에서 Ap^r 플라스미드가 消失되었음을 보아 이들 항생제 내성유전자가 플라스미드에 存在한다는 것을 確認할 수 있었다.

接合과 形質轉換에 의한 抗生物質耐性 플라스미드의 轉移와 再組合

시험균주로 사용한 1-24, 3-29, T-44, KE-1의 균주를 실험실의 환경과 無心川의 자연환경에서 서

Table 3. Curing efficiency of the isolates containing R-plasmids.

Isolates	Phenotypes	No. of colony tested	No. of colony cured	Curing efficiency(%)
1-24	Ap^rSu^r	285	235	82
3-29	$\text{Ap}^r\text{Cm}^r\text{Su}^r\text{Tc}^r$	300	60	20

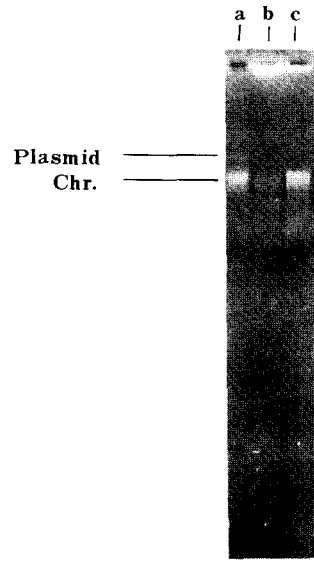


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmids from the isolate 1-24 wild strain and its cured cells.

(a), 1-24 wild strain containing an Ap^r -plasmid; (b) and (c), cured cells of 1-24 lost their Ap^r -plasmid. Chr, chromosomal DNA.

로 接合시킴으로서 나타난 플라스미드의 轉移率은 Table 4와 같다. 35 $^{\circ}\text{C}$ 의 실험실환경에서 3-29 ($\text{Ap}^r\text{Cm}^r\text{Tc}^r\text{Su}^r$) 균주를 공여체균주로 하고 1-24 (Ap^rSu^r) 균주를 수용체균주로 하여 接合시킨 결과 5×10^9 cell/ml의 공여체균주에서 플라스미드가 전이된 接합체는 5.1×10^2 cell/ml로 나타나 接合에 의한 轉移率은 1.0×10^{-7} 이었다. 30~35 $^{\circ}\text{C}$ broth의 실험실환경에서 공여체균주로 T-44 ($\text{Ap}^r\text{Cm}^r\text{Km}^r\text{Sm}^r - \text{Tc}^r\text{Su}^r$)와 수용체균주로 KE-1 ($\text{Ap}^r\text{Cm}^r\text{Km}^r\text{Sm}^r - \text{Tc}^r\text{Su}^r$)를 서로 接合시킨 결과 試料採取시의 공여체균주는 4×10^{10} cell/ml 이었고 Km^rAp^r 接합체는 4.4×10^4 cell/ml, Km^rCm^r 接합체는 4.6×10^3 cell/ml

Table 4. Conjugation frequency of the isolates tested in Mueller-Hinton broth and river water environment.

Conjugation (Donor \times Recipient)	Antibiotic marker	Conjugation frequency (Conjugant/Donor)	
		Mueller-Hinton broth(30-35 $^{\circ}\text{C}$)	River water (14-17 $^{\circ}\text{C}$)
3-29 \times 1-24	Cm^r	1.0×10^{-7}	NE*
T-44 \times KE-1	Ap^r	1.1×10^{-6}	1.2×10^{-7}
T-44 \times KE-1	Cm^r	1.2×10^{-7}	1.0×10^{-9}
T-44 \times KE-1	Tc^r	1.1×10^{-7}	1.0×10^{-9}

*NE, not experimented

Table 5. Transformation frequency of the isolates.

Source of R-plasmid DNA	Antibiotic marker	Transformation frequency (Transformant/Recipient)
1-24	Ap ^r	2.3 × 10 ⁻⁶
3-29	Ap ^r	6.7 × 10 ⁻⁶
T-44	Ap ^r , Cm ^r , Tc ^r	1.7 × 10 ⁻⁶

ml, Km^rTc^r 접합체는 4.3 × 10³ cell/ml로 나타나 그 傳移率은 각각 1.1 × 10⁻⁶, 1.2 × 10⁻⁷, 1.1 × 10⁻⁷ 이었다. 위와 같은 실험을 14~17°C의 무심천의 자연환경에서 시행한 결과 시료채취시의 공여체균주가 2 × 10¹⁰ cell/ml, Km^rAp^r 접합체는 2.4 × 10³ cell/ml, Km^rCm^r 접합체는 2 × 10¹ cell/ml, Km^rTc^r 접합체는 2 × 10¹ cell/ml로 나타나 그 傳移率은 각각 1.2 × 10⁻⁷, 1.0 × 10⁻⁹, 1.0 × 10⁻⁹ 이었다. 하천수의 자연환경에서 플라스미드의 傳移를 接合方法으로 실험한 보고가 별로 없어 본 실험의 접합에 의한 전이율(1.2 × 10⁻⁷ ~ 1.0 × 10⁻⁹)을 직접 비교할 수는 없으나 Mach 등⁽⁶⁾이 廢下水 처리장의 水質環境에서 接合실험을 했던 결과(4.9 × 10⁻⁵ ~ 7.5 × 10⁻⁵) 보다는 낮고, Talbot 등⁽¹⁷⁾이 상자속에서 흙으로 덮은 무우 植物의 자연환경과 톱밥이 혼합된 2차증류수

환경에서 接合실험을 하였던 결과(1 × 10⁻⁶ ~ 6 × 10⁻⁸)와는 유사하였다.

3-29, 1-24, T-44 균주의 R 플라스미드 DNA 를 순수분리하여 *E. coli* HB 101 (Sm^rSu^r)에 形質轉換을 실험실환경에서 실시한 결과는 Table 5와 같다. 1-24 균주의 Ap^r 플라스미드는 1 × 10⁸ cell/ml의 수용체균주중 2.3 × 10² cell/ml을 형질전환시켜 2.3 × 10⁻⁶의 전이율을 나타냈으며, 3-29와 T-44의 균주에서는 1.2 × 10⁹ cell/ml의 수용체균주로 부터 각각 Ap^r 형질전환체가 8 × 10³ cell/ml, Ap^rCm^rTc^r 형질전환체가 2 × 10³ cell/ml로 나타나 그 전이율은 6.7 × 10⁻⁶, 1.7 × 10⁻⁶이었다. 또한 Ap^rCm^rTc^r 플라스미드가 *E. coli* HB 101에 傳移되어 發現되었던 사실은 電氣泳動의 결과(Fig.2)에서도 명백히 증명되었다. 이것은 R 플라스미드가 自然의 水質環境에서도 형질전환에 의하여 傳移될 수 있음을 암시해 주는 것이다. T-44 균주의 Ap^r, Cm^r, Tc^r 플라스미드와 3-29 균주의 Cm^r 플라스미드가 실험실환경에서 接合에 의하여 전이되는 율이 1.1 × 10⁻⁶ ~ 1.2 × 10⁻⁷으로 나타났었고, 形質轉換에 의한 전이율이 1.7 × 10⁻⁶ ~ 6.7 × 10⁻⁶으로 나타난 것으로 보아 형질전환에 의한 傳移率은 接合에 의한 전이율과 큰 차이가 없을 것으로 추정된다.

制限酵素에 의한 R 플라스미드 DNA의 分析

抗生物質 耐性 플라스미드의 分子生物學的인 특성을 규명하기 위하여 接합과 形質轉換에서 전이가 일어난 T-44 균주의 Ap^rCm^rTc^r 플라스미드를 分離하여 制限효소로 처리한 후 전기영동을 한 결과는 Fig.3과 같으며, *EcoRI*과 *BamHI*으로 처리한 λ DNA 단편을 표준으로 하여 각 절편의 크기를 분석한 결과는 Table 6과 같다.

分子的 크기가 9.01 kb이고 CCC 형태의 Ap^rCm^r-

Table 6. Fragment size (Kb) of the Ap^rCm^rTc^r-plasmid DNA obtained after endonuclease digestion.

Restriction endonuclease	Fragment size (Kb)									
<i>EcoRI</i>	9.01									
<i>BamHI</i>	9.01									
<i>PstI</i>	5.5		2.83							
<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>	4.6	4.41								
<i>EcoRI</i> + <i>PstI</i>			3.5	2.83	2.0					0.68
<i>BamHI</i> + <i>PstI</i>	5.5					1.92	0.91	0.58		
<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i> + <i>PstI</i>			3.5	2.0	1.92	0.91	0.58			
Designation of fragment	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J

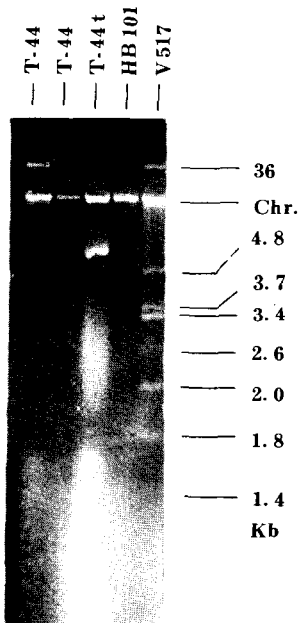


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic analysis of plasmids from the selected donor(T-44), transformant(T-44 t), recipient(*E. coli* HB 101), and reference strain(*E. coli* V517).

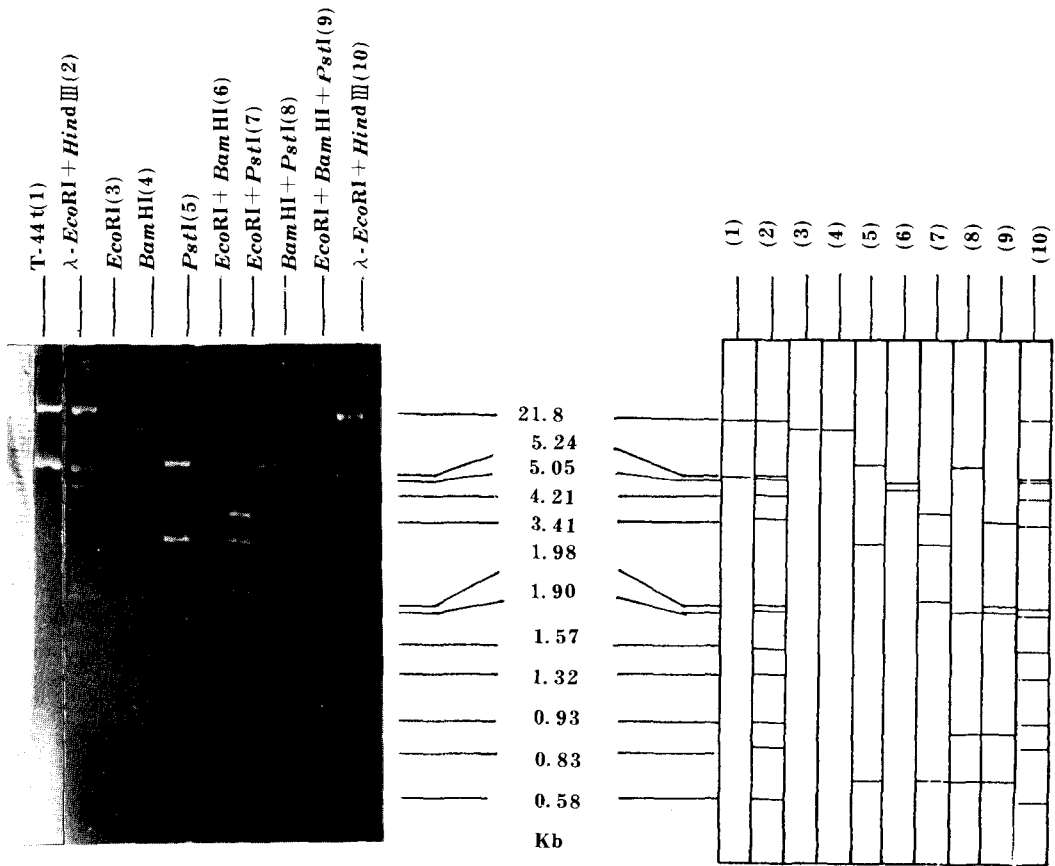


Fig. 3. Restriction endonuclease analysis of plasmid($Ap^rCm^rTc^r$) of the isolate T-44.

Tc^r 플라스미드 DNA를 *EcoRI*이나 *BamHI*으로 처리하였을때 각각 1 개씩의 절편(A)이 나타났다. *PstI*으로 처리하였을때는 5.5 kb(B)와 2.83 kb(F) 그리고 0.68 kb(J) 크기의 절편이 나타났으며, *BamHI*과 *EcoRI*으로 처리한 경우에는 4.6 kb(C)와 4.41 kb(D)의 절편이 나타났다. *PstI*과 *EcoRI*으로 처리한 경우는 *PstI*에 의하여 나타난 2.83 kb(F)와 0.68 kb(J)는 그대로 있고 5.5 kb(B) 절편이 3.5 kb(E)와 2 kb(G)로 절단되었다. *PstI*과 *BamHI*으로 처리한 경우는 *PstI*에 의해 만들어진 5.5 kb(B)와 0.68 kb(J)는 그대로 있고 2.83 kb(F)의 절편이 1.92 kb(H)와 0.91 kb(I)로 절단되었다. 또 *PstI*, *BamHI*, *EcoRI*으로 처리하였을 때는 *PstI*에 의하여 나타난 0.68 kb(J) 절편은 그대로 있고 5.5 kb(B)와 2.83 kb(F) 절편이 각각 3.5 kb(E)와 2 kb(G) 및 1.92 kb(H)와 0.91 kb(I)로 절단되었다. 그러므로 $Ap^rCm^rTc^r$ 플라스미드는 *EcoRI*과 *BamHI*의 절단 부위가 각각 1 개씩 존재하고 *PstI*의 절단 부위는 3 개가 있음을 확인할 수 있었다.

이러한 결과를 종합하여 Fig. 4 와 같이 제한효소

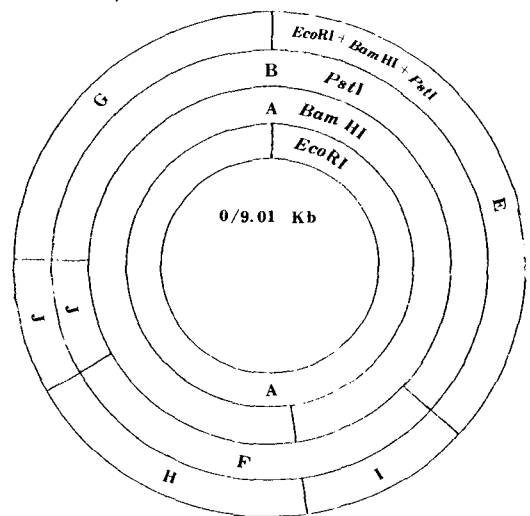


Fig. 4. Restriction map of $Ap^rCm^rTc^r$ -plasmid of T-44 isolate showing the relative size of each fragment after endonuclease digestion.

지도를 작성하였다. 그러나 이 플라스미드에 Ap, Cm, Tc 등의 遺傳子가 어떤순서로 배열되어 있는지 또 制限酵素로 절단하였을때 이들 유전자가 어느 절편에 存在하는지는 더 많은 研究가 진행되어야 알 수 있을 것이다.

摘 要

淸州市 無心川의 河川水에서 抗生物質에 耐性을 나타내는 Gram 음성 세균을 분리하여 水質環境에서 일어나는 R 플라스미드의 傳移를 研究하였다. 분리된 균주사이에서 接合에 의한 R 플라스미드의 전이는 실험실 환경에서 $1.1 \times 10^{-6} \sim 1.2 \times 10^{-7}$, 河川의 水質環境에서 $1.2 \times 10^{-7} \sim 1.0 \times 10^{-9}$ 으로 나타나, 自然의 水質環境에서도 R 플라스미드의 傳移가 일어남을 확인하였다. 또 T-44 균주의 Ap^rCm^rTc^r 플라스미드는 형질전환에 의하여 *E. coli* HB 101 에 1.7×10^{-6} 의 비율로 전이되었다. 분자의 크기가 약 9.01 kb로 측정된 Ap^rCm^rTc^r 플라스미드 DNA 를 制限酵素로 처리한 결과 이 플라스미드에는 *Eco*RI 과 *Bam*HI 의 절단부위가 각각 하나씩 존재하고 *Pst*I 의 절단부위는 3 개가 있었다.

참고문헌

1. Koch, A.L.: *Microbiol. Rev.*, **45**, 355-378 (1981).
2. Ogawara, H.: *Microbiol. Rev.*, **45**, 591-619 (1981).
3. Bell, J.B., W.R. Macrae and G.E. Elliott: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 486-491 (1980).
4. Shaw, D.R. and V.J. Cabelli: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 756-764 (1980).
5. Singleton, P. and A.E. Anson: *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 789-791. (1981).
6. Mach, P.A. and D.J. Grims: *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1395-1403 (1982).
7. American Public Health Association: Standard methods for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, Inc., Washington, D.C., 15th. 747-928 (1981).
8. DIFCO: Difco Manual, Difco Laboratories, Detroit Michigan, 10th. 8-44 (1984).
9. Gonzalez, C.F. and B.S. Kunka: *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 81-89 (1983).
10. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1st, 86-97, 363-373 (1984).
11. Hanahan, D.: *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580 (1983).
12. Glick, B.R., H.E. Brooks and J.J. Pasternak: *J. Bacteriol.*, **162**, 276-279 (1985).
13. Silhavy, T.T., M.L. Berman and L.W. Enquist: Experiment with gene fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1st, 137-151 (1984).
14. Kado, C.I. and S.T. Liu: *J. Bacteriol.*, **145**, 1365-1373 (1981).
15. Hansen, J.B. and R.H. Olsen: *J. Bacteriol.*, **135**, 227-238 (1978).
16. Meyers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell and S. Falkow: *J. Bacteriol.*, **127**, 1519-1537 (1976).
17. Talbot, H.W., D.K. Yamamoto, M.W. Smith and R.J. Seidler: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 97-104 (1980).