

## 콜리형 세균 Plasmid의 영양단계 지표 활용에 관한 연구

趙 洪 範 · 尹 喜 周 · 崔 榮 吉  
(漢陽大學校 自然大 生物學科)

### Application of Coliform Bacterial Plasmid as a Trophic Indicator

Cho, Hong Bum, He Ju Youn, and Yong-Keel Choi  
(Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Hanyang Univ.)

#### ABSTRACT

This present study has been carried out to examine the correlation between the distribution of the coliform bacterial plasmids and the viability test against heavy metals in the upper stream of Han river(Gapyung; clean water) and the its basin (Anyang Cheon; polluted water). And the distribution of plasmids were examined to be used as trophic indicator for analysis between the clean and polluted waters.

1. A total of 110 isolates were analyzed for the presence of plasmids by means of the boiling method and agarose gel techniques. Plasmids were significantly more frequent in the strains which had been isolated from the polluted water (5.1%) than in those of which had been isolated from the clean water (14.3%). Also, there were much higher multiplicity of plasmids at the polluted water (41.0%), compared with the clean water (33.0%). By the comparison between molecular weight of bacterial plasmids in the clean water and those of polluted water, there were no significant differences of the clean water from the polluted water, to such extent as 30.0%, 28.6%, respectively, in frequency for occurrence of high molecular weight plasmids over 35.8 Mdal.
2. Each isolate was carried out the resistance test for mercury ( $10^{-5}M$ ), nickel ( $10^{-3}M$ ) and arsenic (0.1%). At the polluted site, the survival ability of the plasmid-carrying strains (Hg, 31.0%; Ni, 5.7%; As 65.7%) was higher than that of the non plasmid-carrying strains (Hg, 12.1%; Ni, 3.0%; As, 54.6%). This trend was more remarkable in the clean site (plasmid-carrying strains: 66.7%, —, 50.0%; non plasmid-carrying strains: 16.7%, —, —).

As a result it is suggested that plasmids could be used as an indicator of a certain types of water pollution. In addition, heavy metals might have influenced, some extent, to the distribution of plasmids in the environment which has been surveyed in the present study.

## 서 론

1970년 Smith의 R-factor를 가진 *E. coli*의 강물에서의 출현빈도에 대한 보고 이래로 최근 남극에서의 bacterial plasmids에 대한 연구(Himori *et al.*, 1984)에 이르기까지 생태계에서의 bacterial plasmids의 분포, 기능, 전이등에 관한 연구(Hada and Sizemore, 1981; Burton, 1982)와 아울러 model system의 적용에 따른 저항성 plamid의 양상등에 관한 연구(Smith, 1967; Chopra, 1971; Smith, 1970; Summers and Silver, 1972; Summers and Lewis, 1973; Hedges and Baumberg, 1973; Clark *et al.*, 1977; Middleditch, 1978; Meller *et al.*, 1978; Foster *et al.*, 1979)등, 자연환경에서의 bacterial plasmids의 분포와 그들의 기능등을 규명하기 위하여 환경요인과의 상호관계에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

저자들은 산업폐기물이나 가정하수, 그밖의 여러가지 인위적인 환경오염에 따른 수질환경(aquatic environment)에서의 coliform bacterial plasmids의 분포에 대한 연구와 함께 이들 분포에 미치는 중금속의 영향을 검토하고 환경오염의 지표(indicator)로서 plasmid의 활용여부를 논의하였다.

## 재료 및 방법

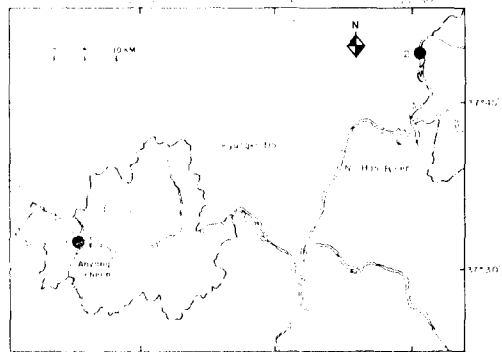
**실험대상지역** 中根과 洪(1983)의 한강유역 생태계에서의 중금속의 동향에 대한 보고와 洪과 朴(1984)의 안양천의 수질과 용존중금속의 분포에 관한 조사연구등에 기초하여 오염수역으로 안양천의 한강분류 유입지역인 양화교 부근, 청정수역으로 북한강 상류의 가평일대를 선정하였다.

**Coliform bacteria의 분리** 멸균된 cap tube로 채수한 표본을 EC배지(bacto-tryptose 20 g, bacto-lactose 5 g, bacto-bile salts No. 3 1.5 g, dipotassium phosphate 4 g, monopotassium phosphate 1.5 g, sodium chloride 5 g, bactoagar 18 g, D.W 1l)에  $10^{-1} \sim 10^{-5}$ 으로 희석하여 pour plate의 방법으로 접종하고, 37°C의 항온기에서 24시간 배양한 다음, 형성된 colony를 각각의 EC사면배지로 옮겨 보관하였다. 이들 균주를 Gram 염색하여 Gram음성인 균주만을 실험의 대상균주로 선정하였다.

**Plasmid의 추출** Holmes와 Quigley (1981)의 boiling method를 약간 수정하여 사용하였다.

EC배지에서 배양한 각각의 균주에서 single colony를 따서 LB broth배지(bacto-tryptone 10 g, bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10g, D.W 1l) 5 ml에 접종하고 37°C에서 12시간 진탕배양한 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 세포를 수회하였다.

배지는 aspiration에 의해 완전히 제거하고, 세포침전층에 8% sucrose, 0.5% triton X-100, 50 mM EDTA(pH8.0),



**Fig. 1.** The map of research area: Site 1. Yangwha Bridge(polluted water) Site 2. Gapyung (clean water).

10mM Tris HCl(pH 8.0) 등이 혼합된 용액을 350  $\mu$ l 넣고 잘 섞은 후, lysozyme (10 mg/ml in 10mM Tris HCl, pH8.0) 을 25  $\mu$ l 첨가하여 3초간 vortexing하여 혼합하였다. 이때 lysozyme은 사용하기 직전에 준비하였다.

혼합된 sample을 Eppendorf tube에 옮기고 끓는 물에 30초간 처리한 후 즉시 상온에서 Eppendorf centrifuge(VETTER GMBH 424-C)로 10,000 rpm의 속도로 10분간 원심분리하였다. 세포침전층은 toothpick으로 제거하고 상등액에 2.5 M sodium acetate 40  $\mu$ l, isopropanol 420  $\mu$ l를 첨가하여 vortexing에 의해 혼합하고  $-70^{\circ}\text{C}$  deep freezer에서 15분간 방치한 후 다시  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 Eppendorf centrifuge로 10,000 rpm의 속도로 15분간 원심분리하여 plasmid를 추출하였다. 추출한 plasmid는 사용하기 전까지  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하고 사용시에는 aspiration에 의해 isopropanol을 완전히 제거한 뒤, DNase-free RNase(Sigma)를 포함한(50  $\mu\text{g/ml}$ ) TE(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8.0) 50  $\mu$ l를 첨가하여 RNA를 제거하였다.

전기영동 Agarose gel은 길이 100 mm, 폭 64 mm의 gel casting tray에 5 mm두께가 되도록 붓고 상온에서 1시간동안 굳혀서 사용하였다. 이때 gel의 농도는 0.7%로 하였으며, well forming을 위해서는 두께 1 mm, 폭 2.6 mm로 slot가 15개인 comb을 이용하였다.

Running buffer로는 TBE(89 mM Tris base, 89 mM boric acid, 12.5 mM EDTA, pH 8.0)를 사용했으며, gel-loading buffer는 1% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10 mM EDTA pH 8.0, 50% glycerol의 조성으로 준비하였다.

준비된 agarose gel에 TBE를 채운 후, TE에 녹인 plasmid 5  $\mu$ l와 gel-loading buffer 0.5  $\mu$ l를 혼합하여 loading을 하고 20 V에서 20분간 pre-running한 후, 70 V에서 120분간 running시켰다.

Runing이 끝나면 즉시 staining soln.(ethidium bromide 0.5  $\mu\text{g/ml}$  D.W.)에 gel을 담그고 상온에서 45분간 염색한 후, UV-transilluminator위에 gel을 놓고 polaroid type 667 film으로 4.5 초간 노출시켜 촬영하였다.

Plasmid의 분자량을 결정하기 위한 size marker로는 1.4, 1.8, 2.6, 3.4, 3.7, 4.8, 35.8 Mega dalton(Mdal.)의 7가지 plasmid를 가지고 있는 *E. coli* V 517 strain(Macrina *et al.*, 1978)과 143Mdal의 plasmid를 가지고 있는 PRC 357 strain을 한양의대 생화학 교실에서 분양받아 사용하였다.

중금속 저항성 검사 Mercury, nickel, arsenic을 각각  $1 \times 10^{-5}\text{M}$ (Summer *et al.*, 1973),  $1 \times 10^{-3}\text{M}$ (Smith, 1967), 0.1%(Hedges and Bamberg, 1973)가 되도록 첨가한 EC평판 배지에 계대배양된 각 균주를 0.1 ml씩 pour plate의 방법으로 접종한 후 24시간 배양하여 colony 형성유무로 판별하였다.

자료의 통계처리 오염수역과 청정수역으로부터 분리된 coliform bacteria의 서로 다른 군집규모에서의 plasmid출현빈도를 결정하기 위해 다음과 같은식을 적용하여 비율의 차에 대한 유의성검정을 하였다.

$$(P_1 - P_2) / \sqrt{\bar{P}(1 - \bar{P}) \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

$n_1, n_2$ 는 두 지역에서 분리된 coliform bacteria의 군집규모

$P_1, P_2$ 는 각각의 군집에서 plasmid를 가지고 있는 균주들의 비율

$\bar{P}$ 는 두 지역을 합친 군집에서 plasmid를 가지고 있는 균주의 비율

결과 및 고찰

실험대상지역에서 coliform bacteria의 군집규모는 오염수역에서  $6.8 \times 10^4$  cells/ml, 청정수역에서  $4.2 \times 10^2$  cells/ml이었으며, 이들 군집에서 각각 68, 42균주를 분리하여 각 균주의 plasmids pattern을 agarose gel electrophoresis의 방법으로 분석한 결과는 Fig. 2와 같다.

Plasmid의 출현을 Fig. 2의 결과에서 나타나는 두 실험대상지역간의 plasmid 출현율은

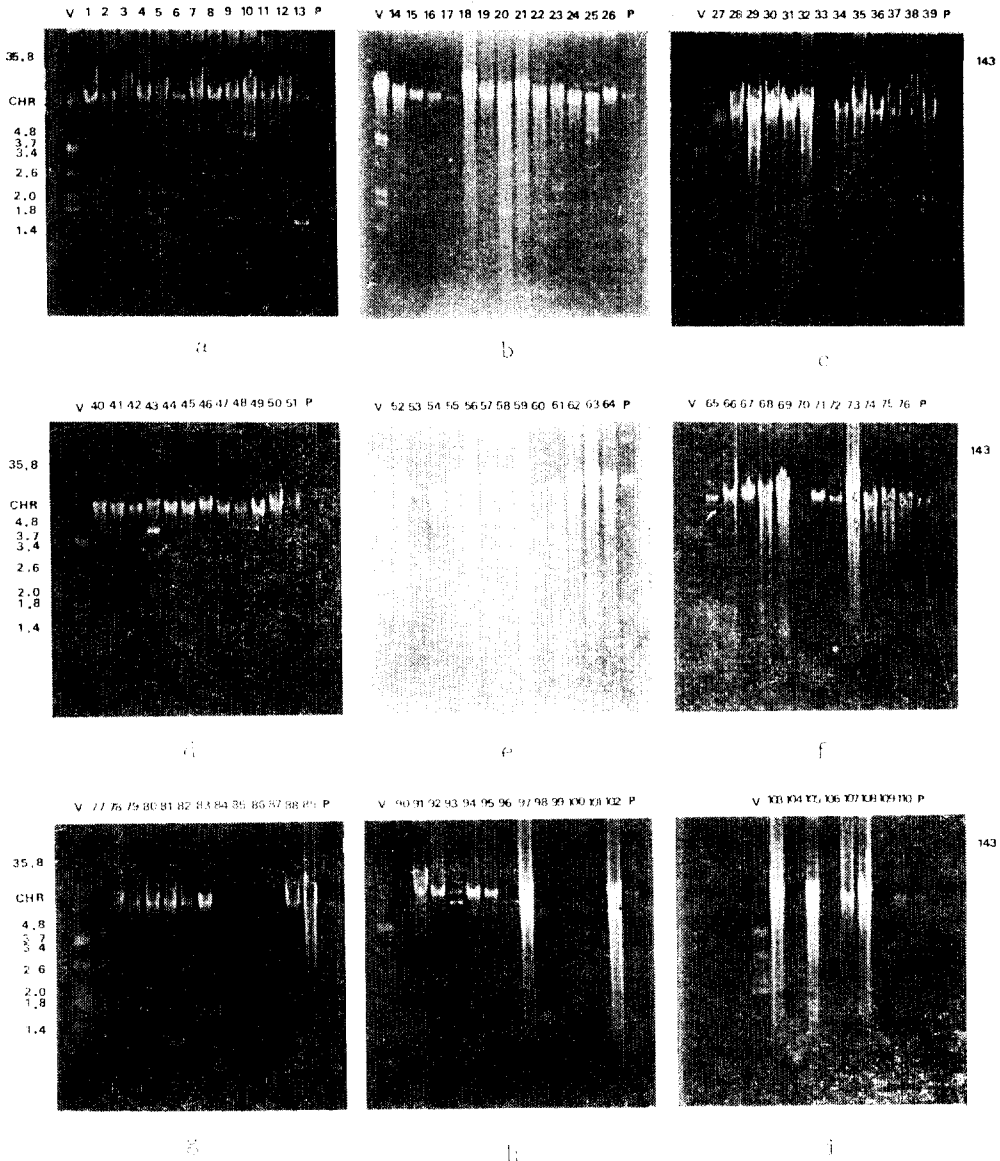


Fig. 2. Agarose gel analysis of coliform bacterial plasmid in the clean and polluted warters.

V: *E. coli* V 517 strain

P: *E. coli* PRC 357 strain

1-68: isolated from the polluted water

69-110: isolated from the clean water

**Table 1.** Frequency of plasmid-carrying strains isolated from different sampling sites

Sampling site	No. of bacteria tested	No. of strains with plasmid	% of strains with plasmid
Polluted	68	35	51.5
Clean	42	6	14.3

Table 1에서 비교하였다.

오염수역에서는 68분리균주 중 35균주, 청정수역에서는 42분리균주 중 6균주로 각각 51.5%, 14.3%를 나타내었으며, 이러한 비율의 차이에 대한 유의성 검증결과는 유의수준 1% 이하인 것으로 밝혀졌다. 청정수역 보다 오염수역에서 높은 plasmid 출현율을 보이는 현상은 Mexico Gulf만의 유류오염해역 (35.0%)과 대조해역 (23.0%)에서의 결과와 유사한 경향을 나타내고 있으며 (Hada and Sizemore, 1981), 영국 South Wales River에서의 유사한 실험 결과인 15.0%, 9.4%와도 같은 현상을 보여준다 (Burton *et al.*, 1982). 또한 남극에서의 bacterial plasmids에 관한 연구에서 보면 low-nutrient 배지와 high-nutrient 배지로부터 각각 분리된 실험균주에서의 출현율에서 저영양조건에서는 46.0%, 고영양조건에서는 25.0%의 출현율을 나타내고 있다 (Hiromi *et al.* 1984). 이렇게 인위적으로 영양조건의 차등을 두었을 때의 실험결과에서도 보여주는 바와 같이 어떤 불리한 자연환경에 처해 있는 군집에서 더 높은 plasmid 출현율을 보임을 알 수 있다.

**Plasmid의 multiplicity** 실험대상균주들이 보유하고 있는 plasmid multiplicity 정도를 두 지역에서 비교해 보면 (Table 2), 오염수역에서의 plasmid-carrying strains 중 41.0%가, 청정수역에서는 33.0%가 두개 이상의 plasmid를 가지고 있어 청정수역에서 보다 오염수역에서 더 높은 경향을 보인다. 이러한 경향은 Mexico Gulf만의 유류오염해역에서 61.4%, 대조해역에서는 29.0%로 역시 본 실험과 유사한 양상을 나타내고 있다. 이렇게 오염수역에서의 plasmid multiplicity가 높은 현상은 오염환경에 처해있는 균주들의 어떤 오염원에 대한 저항성 여부와 상당한 관계가 있는 것으로 유추된다.

**Table 2.** Plasmid multiplicity of the plasmid-carrying strains

Plasmid bands per strains	% of plasmid-carrying strains	
	Polluted site isolates	Clean site isolates
1	59	67
2	26	—
3	11	33
4	4	—

—; not detectable

**중금속에 대한 저항성** 실험대상지역에서 coliform bacterial plasmids의 분포에 미치는 영향으로 몇가지 중금속의 가능성을 검토해 본 결과는 Table 3에 나타내었다.

Table 3에서 보는 바와 같이 오염수역에서 plasmid를 가지고 있는 균주에서는 Hg, Ni, As에 대해 각각 31.0%, 5.7%, 65.7%의 저항성을 나타낸 반면 plasmid를 가지고 있지 않은 균주들에게는 각각 12.1%, 3.0%, 54.6%로 다소 낮은 경향을 보이고 있고, 청정수역에서의 결과는 더욱 두드러져 Ni을 제외하고는 Hg가 66.7%, As이 50.0%로서 plasmid를

**Table 3.** Resistance to the heavy metals between plasmid-carrying and non plasmid-carrying strains isolated from different sampling sites

Heavy metals	No. of resistant strains(%)			
	Pollued site		Clean site	
	Plasmid-carrying strains	Non plasmid-carrying strains	Plasmid-carrying strains	Non plasmid-carrying strains
Hg	11(31.0)	4(12.1)	4(66.7)	1(16.7)
Ni	2 (5.7)	4 (3.0)	—	—
As	23(65.7)	18(54.6)	3(50.0)	—

—; not detectable

가지고 있는 균주들의 저항성이 월등함을 보여준다. 하지만 이 결과만으로는 plasmid가 이들 중금속에 대한 저항성에 어느정도 기여한다고 볼수는 있겠으나 plasmid를 가지지 않은 균주들도 저항성을 가진다는 점에서 볼 때, 이들 plasmid들에 중금속에 대한 저항성 gene을 coding하고 있다는 증거로 삼기에는 미흡한 점이 많다. 따라서 앞으로 mating과 transformation등의 방법으로 이 분야에 대한 추가실험이 계속되어야 할 것이다.

**Plasmid의 분자량** 두지역에서 분리된 plasmid의 분자량을 size에 따라 비교한 결과는 다음과 같다(Table 4).

**Table 4.** Molecular weights of plasmids isolated from different sampling sites

Plasmid size(Mdal)	No. of plasmid(%)	
	Pollutes site isolates	Clean site isolates
	above 35.8	16(28.6)
10.0~35.8	16(28.6)	2(20.0)
1.4~10.0	23(41.1)	3(30.0)
below 1.4	1 (1.8)	2 (2.0)

10Mdal. 이상의 크기는 오염수역에서 57.2%이고 청정수역에서는 50.0%로 오염수역에서 출현하는 plasmid의 size가 대체로 더 크게 나타났으나, 35.8Mdal. 이상은 오염수역에서 28.6%, 청정수역에서 30.0%로 유의한 차이가 없었다. Willetts(1972)에 따르면 30Mdal. 이상의 큰 분자량을 가지는 plasmid는 conjugal transfer를 위한 gene을 가지기에 충분한 크기라 하고, Burton등 (1982)은 본 연구와 유사한 실험에서 청정수역에서 보다 오염수역에서 분자량이 큰 plasmid의 출현빈도가 높다는 점을 들어 오염수역에서 conjugal transfer의 기회가 더 많을 것이라 논의하고 있으나, 본실험의 결과로서는 plasmid의 분자량과 환경상태와의 상관관계에 대한 논의를 하기는 어려운 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 보여주는 바로, 실험대상지역으로 선택한 오염수역이 특정 환경오염물질에 의해 지배받는 환경이기 보다는 다양한 공업폐수와 가정하수의 유입으로 말미암은 환경이기 때문에 이들 환경에서 coliform bacterial plasmid의 분포가 특정 환경요인에 의해 결정되어지리라고는 보기 어렵다. 하지만 오염수역과 청정수역사이에서 plasmid의 출현율과 multiplicity가 차이를 보인다는 점은 이들 수중생태계에서 어떤 오염형태에 대한 indicator로서의 적용 가능성을 강력히 시사하는 것이라 보여진다.

## 摘 要

오염수역으로 안양천과, 청정수역으로 북한강 상류 가평 일대에서 분리된 coliform bacteria의 plasmid 분포와 이에 미치는 중금속의 영향을 검토하고 환경오염의 지표로서 plasmid의 가능성을 모색하였다.

실험대상지역에서 분리된 coliform bacterial plasmids에 대해 전기영동의 방법으로 분석한 결과, plasmid의 출현율에 있어서 오염수역(51.5%)이 청정수역(14.3%)보다 월등히 높았으며 또한 plasmid의 다양성(multiplicity)도 오염수역(41.0%)이 청정수역(33.0%)보다 높은 것으로 나타났다. plasmid의 분자량을 비교한 결과 30Mdal. 이상의 큰 분자량을 가지고 있는 비율이 청정수역에서는 30.0% 오염수역에서는 28.6%로 두 지역사이에 유의한 차이를 보이지 않았다.

중금속에 대한 저항성 검사결과, 오염수역에서는 plasmid를 가진 균주들(Hg, 31.0%; Ni, 5.7%; As, 65.7%)이 plasmid를 가지지 않은 균주들(Hg, 21.1%; Ni, 3.0%; As, 54.6%)보다 생존율이 높았으며, 청정수역에서도 또한 plasmid를 가진 균주들(Hg, 66.7%; Ni, -; As, 50%)이 plasmid를 가지지 않은 균주들(Hg, 16.7%; Ni, -; AS, -)보다 월등히 생존율이 높았다.

이상의 결과들은 plasmid가 수중생태계의 오염에 하나의 지표로서의 가능성을 시사하는 것이며, 이들 환경에서 중금속이 plasmid의 분포에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

## 引 用 文 獻

- Burton, N.F., M.J. Day and A.T. Bull. (1982). Distribution of bacterial plasmids in clean and polluted sites in a South Wales river. *App. Environ. Microbiol.*, **44** : 1026~1029.
- Chopra, I. (1971). Decrease uptake of cadmium by a resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, **63** : 265~267.
- Clark, D.L., A.A. Weiss and S. Silver. (1977). Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, **132** : 186~196.
- Foster, T.J., H. Nakahara, A.A. Weiss and S. Silver. (1979). Transposon A-generated mutations in mercuric resistance genes of plasmid R-100-1, 110pp.
- Hada, H.S. and R.K. Sizemore. (1981). Incidence of plasmids in marine *Vibrio* spp. isolated from an oil field in the northwestern gulf of Mexico. *App. Environ. Microbiol.*, **41** : 199~202.
- Hedges, R.W. and S. Baumberg. (1973). Resistance to arsenic compounds conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **115** : 459~460.
- Hiroimi K., C.W. Sullivan and S. Hiroaki. (1984). Bacterial plasmids in antarctic natural microbial assemblages. *App. Environ. Microbiol.*, **48** : 515~518.
- Holmes, D.S. and M. Quigley. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal. Biochem.*, **114** : 193.
- Macrina, F.L., D.J. Kopecko, K.R. Jones, D.J. Ayers and S.M. McCowen. (1978). A multiple plasmid containing *Escherichia coli* strain. *Plasmid*, **1** : 417~420.
- Meller, R.K., N.F.F. Jergensen, C. Chreisiensen, G. Christiansen, A.L. Bak and A. Stenderup. (1978). Characterization of plasmids from wild-type *Enterobacteriaceae*. In, *Microbiology*, D. Schlessinger (ed.), American Society for Microbiology, Washinton, D.C.P. pp. 257~261.

- Middleditch, B.S., B. Basile and S.R. Missler. (1978). Determine levels, pathways and bioaccumulation of selected discharge constituents in the marine ecosystem in the oil field/hydrocarbon modeling. In, Environmental Assessment of an Active Oil Field in the Northwestern Gulf of Mexico, vol. III, pp.635~738.
- Smith, D.H. (1967). R factors mediate resistance to mercury, nickel and cobalt. Science, 156 : 1114~1116.
- Smith, H.W. (1970). Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R factors. Nature, 228 : 1286~1288.
- Summers, A.O. and S. Silver. (1972). Mercury resistance in a plasmid-bearing strain of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 112 : 1228~1236.
- Summers, A.O. and E. Lewis. (1973). Volatilization of mercuric chloride by mercury-resistant plasmid-bearing strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus* and *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 113 : 1070~1072.
- Willets, N. (1972). The genetics of transmissible plasmids. Annu. Rev. Genet., 6 : 257~258.
- 中根周歩・洪思澳. (193). 漢江 및 그 流域에 있어서 營養鹽類와 重金屬의 動態. II, 上流에서 下流에 이르기까지 重金屬濃度の 變動. 한국육수학회지, 16 : 53~60.
- 洪思澳・朴贊晉. (1984). 安養川의 水質과 溶存重金屬의 分布에 관한 調査研究. 한국육수학회지, 17 : 33~40.

(1987年 12月 2日 接受)