

토양환경에서 항생제 내성 인자의 전이 및 생존

이건형 · 이재세

군산대학교 자연과학대학 생물학과

Transfer and Survival of Genes Resistant to Antibiotics in Soil

Lee, Geon-Hyoung and Jae-Sei Lee

Department of Biology, College of Natural Sciences,

Kunsan National University, Kunsan, Korea

ABSTRACT

The transfer of plasmid-borne genes coding for resistance to antibiotics (Ampicillin, Carbenicillin, and tetracycline) among 16 strains isolated from Mankyong River was examined. The survival of donors, recipient, and transformants in sterile and nonsterile soil (the soil was amended with 12% vol/vol with the clay mineral, montmorillonite) was also studied.

In sterile soil, the survival was prolonged in the order of donors, transformants, and recipient. The survival of donors, transformants, and recipient increased when the soil was amended with 12% montmorillonite, but not in nonsterile soil.

In nonsterile soil, donors survived longer than transformants and recipient, but the survival of transformants and recipient showed no significant differences.

The results of these studies suggest that genes can be transferred by transformation, and transferred genes can survive in soil for a considerable time.

Key words: Gene transfer, Gene survival, Transformation, Antibiotics, Soil, GMMs

서론

항생물질 내성유전자나 R plasmid가 자연수계에서 높은 빈도로 존재하고 (이 1991), 또 전이되고 있음은 이미 알려져 왔다 (Lee and Kim 1989, Mach and Grimes 1982, O'Morchoe *et al.* 1988). 이는 자연 생태계에서 세균들 사이에 각종 유전자들의 교환, 전파, 전이 등이 부단히 일어나고 있음을 의미하는 것이다. 이처럼 어떤 유전자나 플라스미드가 다른 균주에 전이된 후 재구성 및 재배열되는 현상이 다양하게 일어날 수 있기 때문에 (Hall *et al.* 1991), 최근 유전공학적인 기법으로 만들어진 미생물(GMMs: Genetically Modified Microorganisms)이 여러 분야에서 이용되고 있고 또 만들어지고 있다. 따라서 이와 같이 만들어진 GMMs가 자연생태계에 의도적으로 또는 사고로 유출되었을 때 조건과 환경에 줄 수 있는 잠재적 위해는 환경학뿐 아니라 본 이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

자생태학적으로 지대한 관심사가 되고 있다 (Curtiss 1976, Rissler 1984, Sharples 1983).

GMMs가 자연생태계에 유출되었을 때와 관련된 생태학적 관심사는 주로 미생물들의 생존과 유지 및 토착세균으로의 유전물질 전이 등으로 (Tiedje *et al.* 1989), 이에 관련된 연구로 자연계에 존재하는 미생물과 토양내의 GMMs의 전파가 물의 이동에 의한 효과 (Trevors and Oddie 1986), 토양에서의 유전물질 전이 (Stotzky and Babich 1984, Stotzky *et al.* 1990, 1991, Gauthier *et al.* 1985) 등이 있다.

본 연구는 이러한 여러 연구 중 특히 GMMs의 생태계 유출에 따른 생존상태에 주로 초점을 맞추었다. 자연생태계에서 미생물의 생존에 대한 연구(Bissonette *et al.* 1975, Lessard and Sieburth 1983, Liang *et al.* 1982, McFeters and Stuart 1972, Ohana *et al.* 1987, Scheuerman *et al.* 1988)는 많이 이루어져 있지만, GMMs나 그와 관련된 미생물들의 자연생태계에서의 생존에 관한 연구는 최근에 시도되고 있으며 주로 토양 환경(Bentjen *et al.* 1989, Devanas *et al.* 1986, Devanas and Stotzky 1986, Walter *et al.* 1987)이나 활성오니 (Dwyer *et al.* 1988), 그리고 식물의 표면(Armstrong *et al.* 1987)에서의 생존에 관련된 연구들이다.

본 실험에서는 만경강하류에서 분리 동정된 항생제 내성균주를 실험실내에서 항생제 내성이 없는 장내 세균에 항생제 내성인자를 전이시킨 다음 토양환경에서의 생존상태를 관찰하였다. 본 실험에 사용된 *Escherichia coli* 균주는 토양이나 수계환경에서 기원된 것은 아니지만 토양과 수계환경에서 상당기간 생존하는 것으로 알려져 있고 (Henschke and Schmidt 1990), 유전자조각 실험에서 가장 흔히 사용되는 균주이다 (Davies 1988).

이러한 연구는 자연생태계에 존재하는 항생제 내성세균이 토착세균에 미치는 영향과 관련된 환경영향평가시 참고 자료로 활용될 수 있으며, GMMs가 자연생태계에 유출되었을 때 이를 확인할 수 있는 감지법을 확립하고, 더 나아가서 환경영향평가나 규제에 관련된 기초자료로 제공될 수 있으리라 본다.

재료 및 방법

사용균주 및 Plasmids

본 실험에서 수용균(recipient)은 *E. coli* HB101을 사용하였고, 공여균(donor)으로는 만경강하류에서 분리 동정된 항생제 내성균주 *E. coli* N33, N78을 사용하였으며, 이들 균주로부터 공여균의 항생제 내성이 전이된 T33과 T78을 얻었다. 공여균의 특성은 Ampicillin(AM), Carbenicillin(CB) 및 Tetracycline(Te)에 내성을 가지고 있었으며, 수용균으로 사용된 *E. coli* HB101은 이들 항생제에 대한 감수성을 보였다. 이들 균주는 LB배지 (1% NaCl, 1% bacto-tryptone, 1% yeast extract)에서 37°C로 배양하였으며, 공여균 N33, N78과 재조합된 균주 T33, T78의 배양은 LB배지에 Sigma사로부터 구입한 AM(30 μ g/ml), CB(100 μ g/ml), Te(25 μ g/ml)를 각각 첨가하여 사용하였다.

토 양

뉴욕 브룩클린 식물원의 Kitchawan연구소에서 구입한 토양에 montmorillonite(Volclay, Panther Creek-Aberden, American Colloid Co.)를 각각 3, 6, 9, 12% (vol/vol) 첨가하여 본 실험에 사용하였다. 이 때 3%의 montmorillonite를 첨가한 토양은 첨가하지 않은 토양과 비교

하여 실험 결과에 거의 차이가 없었으므로 대조군으로 사용하였다. 또한 본 실험에 사용된 토양 입자의 물리화학적특징은 Babich와 Stotzky(1977)에 의해 이미 밝혀져 있다.

공여균의 분리동정

만경강 하류에서 채취한 시료를 MacConkey 배지(Difco)에 접종하여 무색과 핑크색 콜로니를 형성한 균주들을 분리하였으며, 분리된 균주들은 API kit(API systems S.A., Montalieu vercieu, France)로 동정하여 본 실험의 공여균으로 사용하였다.

항생제 내성 실험

본 실험에 사용된 항균제(Antimicrobial drug)는 Sigma사 제품으로 Gentamicin(GM), Ampicillin(AM), Tobramycin(NN), Cephalothin(CF), Amikacin(AN), Tetracycline(Te), Kanamycin(K), Carbenicilin(CB) 등 8종류이다.

플라스미드 존재확인

분리동정된 세균의 항생제내성에 관련된 플라스미드(plasmid)의 존재는 agarose gel electrophoresis를 실시하여 확인하였으며, 이때 플라스미드의 분리는 alkaline lysis법(Maniatis *et al.* 1982)을 사용하였다.

형질전환균에서 항생제 내성 plasmid의 전이확인

형질전환(transformation)은 Goodman과 McDonald(1979)의 방법을 수정하여 실시하였으며, 형질전환균(transformant)들의 plasmid DNA를 얻어 전기영동하여 비교하였다.

토양에서의 생존도 측정

멸균된 토양에서 균주의 생존도 측정은 125ml 삼각플라스크에 25ml의 멸균된 LB broth를 넣고 공여균, 수용균, 형질전환균을 각각 접종한 후 37°C에서 16시간 동안 진탕 배양하여 이들 배양액을 생리식염수(0.85% NaCl)로 희석한 후 LB 평판배지에 도말하여 측정된 각각의 균체수를 최초 균체수(initial population)로 하였다. 다음 시험관에 각각의 토양(K3M, K6M, K9M, K12M)을 1.8g씩 넣어 멸균한 후 위에서 만들어진 각 균주의 최초 균체수를 0.2ml씩 접종하여 이들을 37°C의 진탕배양기에서 15일간 배양하여 1, 2, 4, 7, 10, 15일을 기준하여 각각의 균체수를 측정하여 최초 균체수와 비교하여 생존도를 측정하였다. 이때 배지에는 균류생장억제물질인 cyclohexamide(200 μ g/ml)와 항생제인 AM(30 μ g/ml), CB(100 μ g/ml)를 첨가하였으며, 균체수는 colony-forming unit/g 단위로 측정하였다. 멸균하지 않은 토양에서 각 균주의 생존 측정도는 멸균된 토양에서의 측정 방법과 동일하게 수행하였으며, 이때 각 토양을 멸균하지 않은 것만이 다르다.

결 과

균주의 분리 및 동정

만경강 하류에서 본 실험의 형질전환 공여균(transformation donor)을 찾기 위하여 MacConkey배지로 Enterobacteriaceae계통의 균주를 분리한 후 API kit를 이용하여 16종을 분리동정

Table 1. Identification by API tests of strains isolated from Mankyong River

test\No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
H2S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+
SAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEL	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANY	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
N2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MOB	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+
McC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF/O	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF/F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Identification	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia vulneris</i>	<i>Escherichia vulneris</i>

ONPG : Ortho-Nitro-Phenyl-Galactosidase, ADH : Arginine Dihydrolase, LDC : Lysine Decarboxylase, ODC : Ornithin Decarboxylase, CIT : Simmons Citrate, H2S : Hydrogen Sulfide, URE : Urease, TDA : Tryptophan Deaminase, IND : Indole, VP : Aceitoin Production, GEL : Gelatin Hydrolysis, GLU : Glucose, MAN : Mannitol, INO : Inositol, SOR : Sorbitol, RHA : Rhamnose, SAC : Sucrose, MEL : Melbiose, ANY : Amygdaline, ARA : Arabinose, OX : Oxidase, NO2 : Nitrite Production, N2 : Nitrogen Gas Production, MOB : Motility, McC : MacConkey, OF/O : Oxidation, OF/F : Fermentation.

하였다. 분리동정된 균주의 특성은 Table 1과 같다. 분리동정된 16균주들에 대해 8종의 항생제에 대한 내성을 Disc 확산법을 이용하여 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standard)법에 따라 조사하였는데, 이들 16균주 중 AM에 15개의 균주가 내성을 나타냈으며,

Table 2. Susceptibility test of strains isolated from Mankyong River to 8 kinds of antibiotics

Species No.	Antibiotics								Identification
	GM	AM	NN	CF	AN	Te	K	CB	
1(N 7)	-	-	-	-	-	-	-	-	<i>E. vulneris</i>
2(N 17)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. coli</i>
3(N 20)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. coli</i>
4(N 21)	-	+	-	+	-	-	-	-	<i>E. vulneris</i>
5(N 30)	-	+	+	+	-	+	-	+	<i>E. coli</i>
6(N 33)	-	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. coli</i>
7(N 34)	-	+	-	+	-	+	-	+	<i>E. vulneris</i>
8(N 64)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. coli</i>
9(N 68)	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>E. vulneris</i>
10(N 77)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. coli</i>
11(N 78)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. coli</i>
12(N 79)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. vulneris</i>
13(N 80)	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>E. coli</i>
14(N 86)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. vulneris</i>
15(N 94)	-	+	-	-	-	-	-	+	<i>E. vulneris</i>
16(N101)	-	+	-	+	-	-	-	+	<i>E. vulneris</i>

* + resistant, - sensitive

Table 3. Strains of isolates resistant to antibiotics

(unit : $\mu\text{g} / \text{ml}$)

Species No.	Antibiotics											
	AM				CB				Te			
	10	20	30	40	40	50	60	70	5	10	15	20
1(N 7)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2(N 17)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3(N 20)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
4(N 21)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5(N 30)	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
6(N 33)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7(N 34)	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
8(N 64)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
9(N 68)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
10(N 77)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11(N 78)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
12(N 79)	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
13(N 80)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
14(N 86)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
15(N 94)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
16(N101)	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-

* + resistant, - sensitive

CF에 12균주가, Te에 3균주가, 그리고 CB에 14개의 균주가 내성을 가지고 있는 것으로 나타났다(Table 2). 이들 균주 중 항생제 내성농도가 비교적 높은 균주를 형질전환 공여균으로 사용하

기 위하여 각각의 항생제의 농도를 다르게 한 고체배지에 이들을 접종하였는데 그 결과는 Table 3과 같았다. 총 16균주 중 1균주(N 7)를 제외하고는 대부분의 균주가 AM과 CB, Te에 대하여 내성을 보였으며 AN, CF, NN, K, GM에 대해서는 내성이 나타나지 않았다. 이들 균주 중 3균주(N30, N33, N34)가 3종류의 항생제에 대하여 내성을 보였고, 14균주가 2종류의 항생제(AM, CB)에 대하여 항생제 내성을 보였다.

항생제 내성 균주의 플라스미드 존재 확인

실험균주의 항생제 내성에 관련된 인자는 Goodman과 McDonald (1979) 실험법을 이용하여 확인한 결과 플라스미드상에 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 따라서 항생제 내성인자가 플라스미드상에 있는 균주 중 항생제 내성이 비교적 높고 균주의 성장 상태가 비교적 양호한 N33과 N78을 본 실험의 공여균으로 사용하였다.

대장균(HB101)의 형질전환

N33 and N78에서 각각 순수분리된 플라스미드로 Goodman과 McDonald(1979)의 방법을 이용하여 *E. coli* HB101을 각각 형질전환시켰다. 이들 형질전환체의 플라스미드와 공여균의 플라스미드를 전기영동하여 비교한 결과 공여균과 형질전환균의 플라스미드는 동일한 것으로 확인되었다 (Fig. 2). 따라서 이들 형질전환균을 각각 T33과 T78로 명명하여 다음 과정의 실험에 사용하였다.

토양에서 균주의 생존도 측정

Montmorillonite의 첨가가 실험균주의 생존에 미치는 영향을 알아보기 위하여 3%, 6%, 9%, 12%의 montmorillonite가 첨가된 토양을 멸균한 후 수용균인 *E. coli* HB101과 공여균인 N33, N78, 형질전환균인 T33과 T78을 각각의 토양에 일정량씩 접종한 후 균체수의 변화를 15일간 관찰하였다. 각 균주들은 측정기간 중 균주에 따라 약 10^{-3} ~ 10^{-8} cells/g의 균체수가 감소하였다

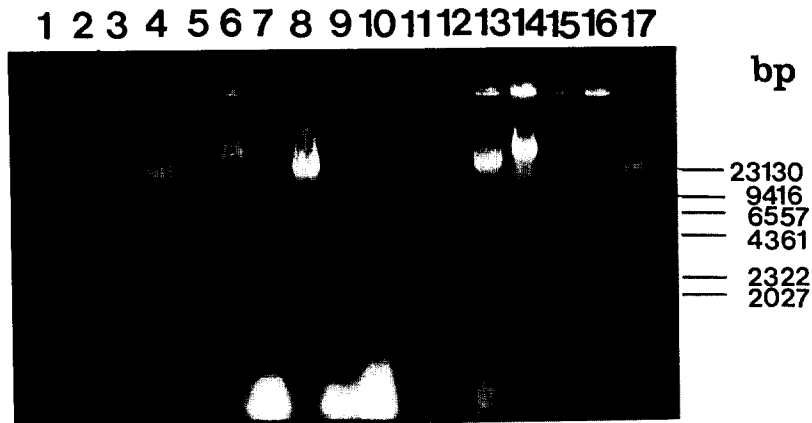


Fig. 1. The electrophoretic profile of the plasmid DNA contained in strains from Mankyong River.
lane 1, 17 : DNA size-maker λ /Hind III
lane 2-16 : plasmid of strains isolated from Mankyong River

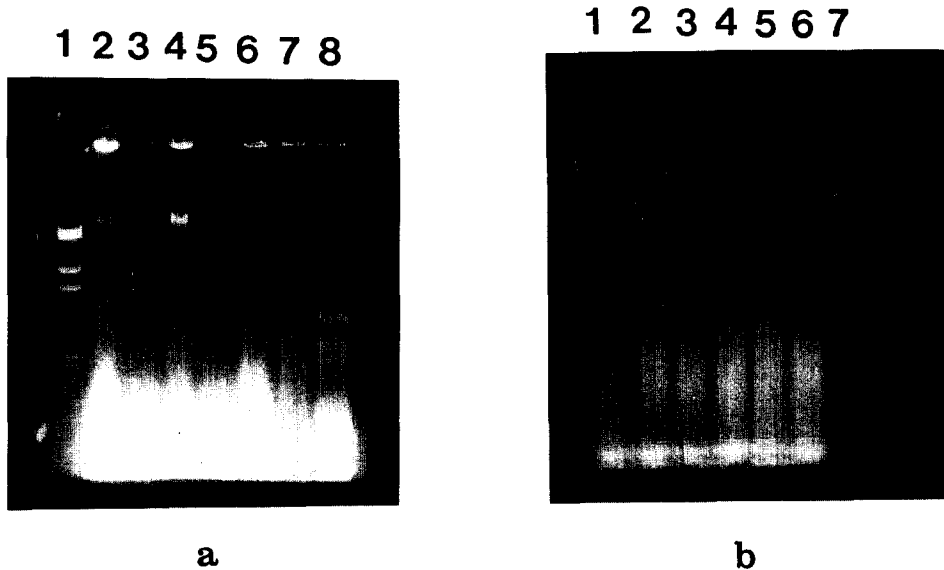


Fig. 2. The electrophoretic profile of the plasmid DNA from the transformants, T33 and T78.

(a) lane 1 : DNA size-maker λ /Hind III, lane 2-7 : plasmid of transformant (T33).

(b) lane 7 : DNA size-maker λ /Hind III, lane 1-6 : plasmid of transformant (T78).

(Fig. 3). 3%의 montmorillonite를 첨가하여 멸균한 토양의 경우 Fig. 3a에서 보는 바와 같이 자연계에서 분리된 N33이 실험실 균주인 *E. coli* HB101에 비하여 생존율이 더 높았다. 반면, N33과 같이 자연계에서 분리된 N78은 N33에 비해 생존율은 낮은 편이나 조사기간까지 생존이 유지되었다. 한편 형질전환균인 T33과 T78은 공여균보다는 생존율이 낮았으나 수용균보다는 높았다. 또한 6%, 9%, 12%의 montmorillonite를 첨가하여 멸균한 토양의 경우도 (Fig. 3b, c, d) 대체적으로 3%의 montmorillonite를 첨가한 토양과 거의 유사한 양상의 생존곡선을 보였다. 전반적으로 자연계에서 분리된 균주 N33과 N78의 생존률이 가장 높았고 형질전환균인 T33, T78, 수용균 *E. coli* HB101의 순으로 성장률이 낮아졌다. 각 균주별로 살펴보면 *E. coli* HB101의 경우 최초 접종 후 부터 2일 까지는 급격히 감소하였으며 2일부터 4일까지 다소 증가하다가 7일~10일에 거의 모두 균체수가 사멸되었다. 반면, N33과 N78, 형질전환균인 T33과 T78의 경우, *E. coli* HB101보다는 비교적 서서히 감소하여 15일 까지는 상당한 균체수가 생존하고 있음을 알 수 있다. 전반적으로 3%의 montmorillonite를 첨가하여 멸균한 토양보다 12%를 첨가하여 멸균한 토양에서 공여균과 수용균, 형질전환균 모두 더 높은 생존을 나타냈다.

한편, 멸균하지 않은 토양에 3%, 6%, 9%, 12%의 montmorillonite를 각각 첨가한 후 각 균주들의 균체수 변화를 15일간 살펴 본 결과는 Fig. 4와 같다. 멸균하지 않은 토양에서 각 균주의 생존은 측정기간동안 10^{-3} ~ 10^{-5} 정도 떨어졌다. *E. coli* HB101의 균체수는 멸균한 토양에서의 균체수 변화와는 다른 양상을 나타내어 전 측정기간 중 균체수는 지속적인 감소 경향을 보였다. 반면, N33과 N78, T33과 T78은 멸균한 토양에서 보인 균체수의 감소와 유사한 양상으로 감소하였

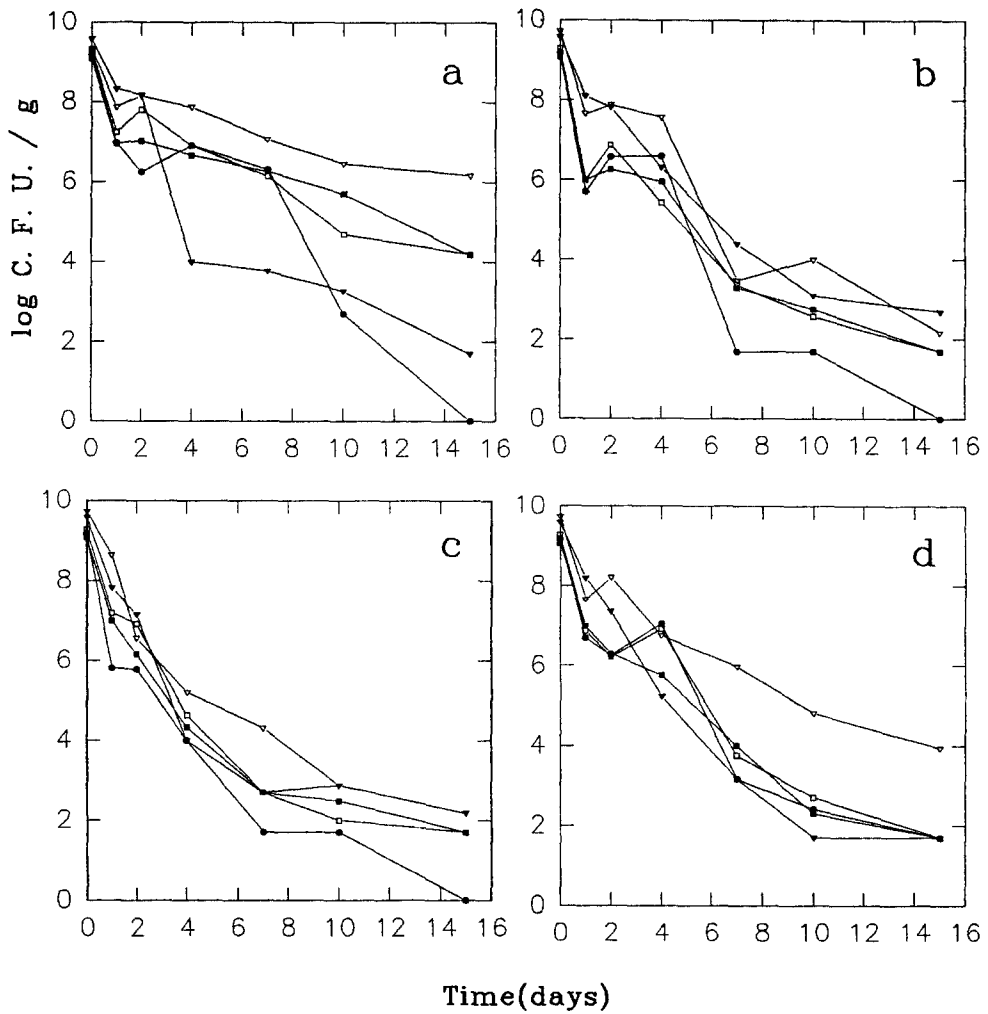


Fig. 3. Survival of donors(N33, N78), recipient(HB101), and transformants(T33, T78) in sterile soil amended with 3%(a), 6%(b), 9%(c), and 12%(d) montmorillonite, respectively. ●HB101, ▽ N33, ▼N78, □T33, ■T78.

다. 멸균하지 않은 토양에서도 멸균한 토양에서 나타난 경향과 마찬가지로 N33과 N78이 다소 높은 생존률을 보였으나, 수용균과 형질전환균의 생존률을 비교하였을 때 커다란 차이는 없었다. Montmorillonite를 첨가하였을 때의 각 균주의 생존은 멸균된 토양에서 12%의 montmorillonite가 첨가되었을 때 더 높은 생존을 보인 것과는 달리 멸균되지 않은 토양에 montmorillonite의 첨가를 증진시켜도 생존은 더이상 연장되지 않았다.

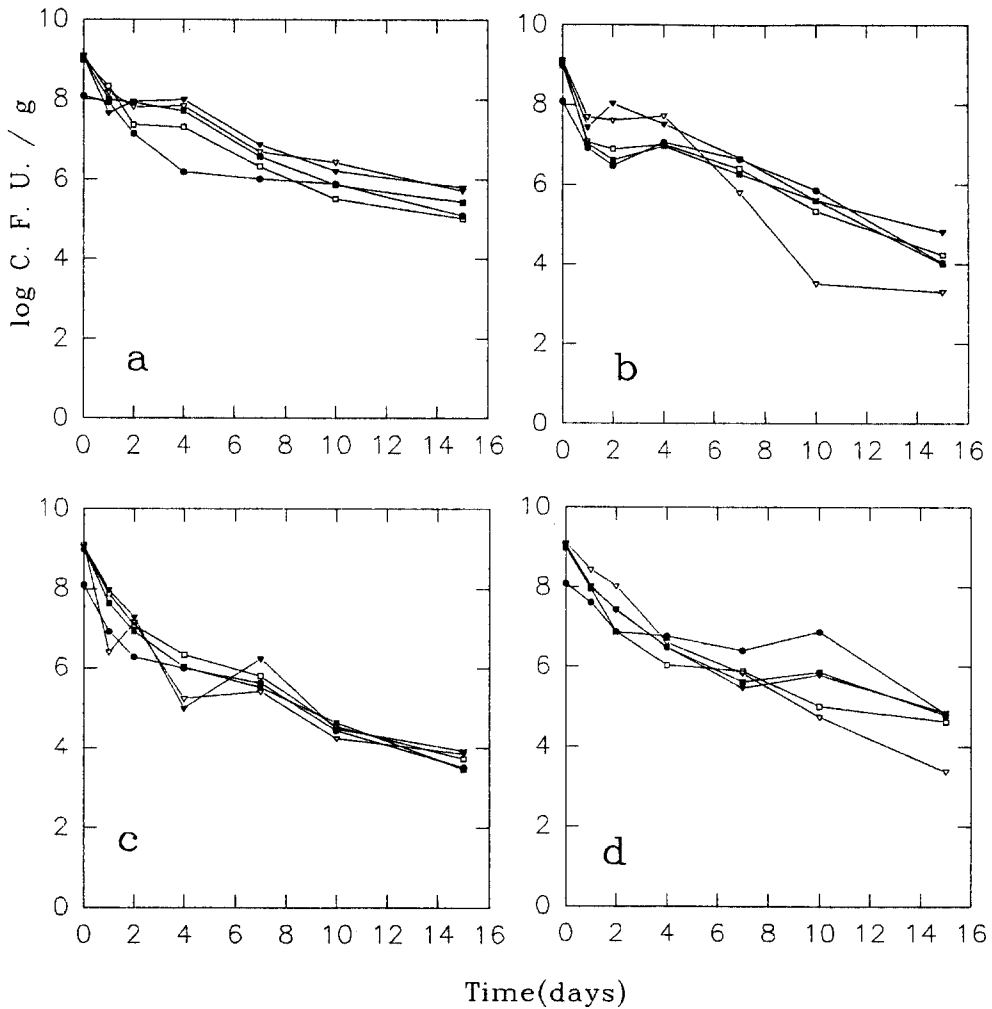


Fig. 4. Survival of donors (N33, N78), recipient (HB101), and transformants (T33, T78) in nonsterile soil amended with 3%(a), 6%(b), 9%(c), and 12%(d) montmorillonite, respectively. ●HB101, ▽N33, ▼N78, □T33, ■T78.

고 찰

본 실험에서 분리동정된 균주들의 경우 AM에 내성이 있는 균주 15종, CF에 내성이 있는 12종, Te에 내성이 있는 균주 3종, CB에 내성이 있는 균주 14종이 분리되었다. 이러한 항생제 내성양상은 이와 이(1993)의 조사에서도 100균주를 대상으로 8종의 항균제에 대한 내성을 조사한 결과 가장 높은 내성을 보인 항균제는 AM으로서 실험에 사용된 균주 중 77.3%를 차지했고, CF는 73.6%를, Te는 61.3%를 차지한 것과 일치하였다. 따라서 자연생태계에서 분리되는 많은 세균들은 AM, CF 및 Te에 상당한 내성을 나타내고 있음을 알 수 있다. 이렇게 AM, CF, Te에 대

하여 높은 내성을 보이는 것은 이러한 항생제들이 최근 치료를 목적으로 사용이 늘고 있으며 또한 내성 전달이 다른 항생제에 비해 용이하기 때문인 것으로 생각된다(이 1991). 실제 그람 음성 세균 중 AM에 73.1%, Te에 67.6%의 내성이 나타나는 것으로 보고되었다(하 등 1990). 이와 이 (1988)는 *Klebsiella*에 AM내성이 88.1%, CF 내성이 35.6%, Te 내성이 44.1%로 나타나는 것을 보고하였다. 또한 김 등(1986)은 *Pseudomonas*의 항생제 내성에서 AM과 CF에 대해 100%, Te에 대해 83.3%가 내성을 나타낸다고 보고하였다.

자연계에서 분리된 균주의 항생제 내성인자가 실험균주에 전이될 수 있다는 보고는 이미 여러 사람에게 의해 발표된 바가 있다 (Cenci *et al.* 1982, Kralikova *et al.* 1983, Shaw and Cabelli 1980, Smith 1970).

실제로 형질전환이 일어날 수 있는 확률은 10^{-7} 정도로 상당히 낮아 형질전환균을 얻는 일은 상당히 어려우므로 (Lee and Stotzky 1990) 본 실험에서는 생존을 실험을 위하여 다량의 플라스미드를 추출하여 얻은 형질전환균 T33과 T78로 공여균과 수용균 *E. coli* HB101을 토양환경에서 생존률을 조사하였다.

먼저 토양환경의 경우, 멸균된 토양에서는 montmorillonite의 첨가가 형질전환균과 공여균의 생존을 증진시켰는데 이러한 결과는 montmorillonite를 첨가시킨 토양에서 transconjugant의 생존이 모균(parental)의 생존 보다 일반적으로 높다는 Krasovsky와 Stotzky(1987)의 보고와 일치한다. 이는 일반적으로 토양에 montmorillonite를 첨가시켜 주면 토양의 pH를 일정하게 유지시켜 주고 수분포텐셜을 유지시키며 세균의 부착 면적을 늘려 주기 때문으로 알려져 있다. 하지만 Schilf와 Klingmuller(1983)가 자연환경에서 *E. coli* J5(RP4)와 Jc5466(pRD1) 및 *in vitro* mating에서 얻은 transconjugant들의 생존을 관찰한 결과 이들 플라스미드를 함유한 세균들은 시간이 지남에 따라 생존률이 낮아지는 반면, 토착세균(indigenous bacteria)은 관찰기간 동안 일정한 titer를 유지하고 있다고 보고하여 본 실험과는 다소 상이한 결과를 얻었다. 한편, 멸균하지 않은 토양에서는 토양에 존재하는 토착세균들과의 경쟁에서 불리하여 공여균, 수용균 및 형질전환균 모두 멸균한 토양에서 보다는 생존률이 높지 않았으며 생존곡선 역시 유사하게 나타난 것으로 생각된다. 또한 멸균하지 않은 토양환경에서는 montmorillonite의 첨가는 각 균주들의 생존을 연장시키는데 커다란 효과가 없는 것으로 사료된다.

본 실험의 결과 실험실에서 배양된 균주는 자연환경에서 생존율이 비교적 낮은 편이나, 자연계에서 분리된 균주와 이로부터 만들어진 형질전환균은 상당기간 생존이 유지되었음이 확인되었다. GMMs가 생태계에 유출되었을 때 생태계에 미치는 위해는 아직 보고가 되어 있지 않지만, GMMs의 이용이 증가되고 결과적으로 이러한 GMMs는 자연생태계의 안정된 미생물 군집 내에서 생존하고 군집화되고 기능을 나타낼 수 있는 가능성이 크다. 따라서 앞으로 GMMs를 생태계에 유출시킬 때에는 유출에 따른 잠재적 위해를 조사하는 환경영향평가가 이루어져야 한다고 생각된다.

적 요

만경강 하류에서 분리동정된 16균주 중 N33과 N78이 플라스미드상에 있는 항생제 내성인자를 전이함이 확인되었다.

Montmorillonite를 첨가하여 멸균한 토양과 멸균하지 않은 토양에서 수용균(*E. coli* HB101), 공여균(N33과 N78), 그리고 형질전환균(T33과 T78)의 생존상태를 관찰한 결과, 멸균한 토양

의 경우, 공여균, 형질전환균, 수용균의 순으로 생존률이 높았고, montmorillonite를 3% 첨가한 토양에서 보다 12%를 첨가한 토양에서 실험균주들의 생존률이 전반적으로 더 높았다. 반면, 멸균하지 않은 토양에서는 공여균이 다소 생존률이 높았으나 수용균과 형질전환균의 생존률은 유사하였고, montmorillonite의 첨가가 생존률에 커다란 영향을 주지 않았다. 본 실험 결과 토양환경에서 transformation에 의한 유전물질의 전이가 일어날 수 있으며, 전이된 유전자는 상당기간 토양에서 생존하고 있음을 보여 준다.

인용문헌

- 김상윤 · 이유철 · 설상용 · 조동택 · 전도기. 1986. 녹농균의 항생체 내성의 특성. 대한미생물학회지 21 : 1-15
- 이건형 · 이규춘. 1993. 만경강하류에서의 종속영양세균의 계절적 분포와 내성세균의 특성. 한국육수학회지. 26 : 73-82.
- 이규춘. 1991. 만경강하류에 분포하는 항생제 내성 세균에 관한 연구. 군산대학교 석사학위논문. pp. 35-47.
- 이훈구 · 이형환. 1988. 대장균의 *Klebsiella pneumoniae* R plasmid의 전이에 관한 연구. 대한미생물학회지 23 : 345-350
- 하경임 · 서성일 · 박종욱 · 서민호. 1990. 대장균 R-plasmid의 특성과 항균제 내성. 대한미생물학회지 25 : 19-26
- Armstrong, J.L., G.R. Knudsen and R.J. Seidler. 1987. Microcosm method to assess survival of recombinant bacteria associated with plant and herbivorous insects. Curr. Microbiol. 15 : 229-232.
- Babich, H. and G. Stotzky. 1977. Effect of cadmium on fungi and on interactions between fungi and bacteria in soil; influence of clay minerals and pH. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 1059-1066.
- Bentjen, S.A., J.K. Fredrickson, P.V. an Voris and S.W. Li. 1989. Intact soil-core microcosm for evaluating the fate and ecological impact of the release of genetically engineered microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 198-202.
- Bissonette, G.K., J.J. Jezeski, G.A. McFeters and D.G. Stuart. 1975. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. Appl. Microbiol. 29 : 186-194.
- Cenci, G., G. Morozzi, F. Scazzoccio and A. Morosi. 1982. Antibiotic and metal resistance of *Escherichia coli* isolates from different environmental sources. Zbi. Bakt. Hyg. I. Abt Orig. C. 3 : 440-449
- Curtiss, R., III. 1976. Genetic manipulation of microorganisms; Potential benefits and biohazards. Ann. Rev. Microbiol. 30 : 507-533.
- Davies, J. 1988. Genetic engineering: process and products. Trends Ecol. Evol. 3 : 7-11.
- Devanas, M.A., D. Rafeli-Eschol and G. Stotzky. 1986. Survival of plasmid-containing strain of *Escherichia coli* in soil: effect of plasmid size and nutrient on survival of hosts and maintenance of plasmids. Curr. Microbiol. 13 : 269-277.

- Devanas, M.A. and G. Stotzky. 1986. Fate in soil of a recombinant plasmid carrying a *Drosophila* gene. *Curr. Microbiol.* 13 : 279-283.
- Dwyer, D.F., F. Rojo and K.N. Timmis. 1988. Fate and behaviour in an activated sludge microcosm of genetically engineered microorganism designed to degrade substituted compounds, *In* M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner and D.E. Stewart-Tull (eds.), *The release of genetically engineered microorganisms*. Academic Press, Inc. Ltd, London, pp. 77-88.
- Goodman, H.M. and R.J. McDonald. 1979. Cloning of hormone genes from a mixture of cDNA molecules. *Meth. Enz.* 68 : 75-90.
- Gauthier, M.J., F. Cauvin and J.P. Breiottmayer. 1985. Influence of salts and temperature on the transfer of mercury resistance from a marine pseudomonad to *E. coli*. *Appl. Environ. Microbiol. Biochem.* 50 : 38-40.
- Hall, R.M., D.E. Brooks and H.W. Stokes. 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination crossover point. *Mol. Microbiol.* 5 : 1941-1959.
- Henschke, R.B. and F.R.J. Schmidt. 1990. Plasmid mobilization from genetically engineered bacteria to members of the indigenous soil microflora *in situ*. *Curr. Microbil.* 20 : 105-110.
- Kralikova, K., V. Krcmery and V. Krcmery. 1983. Incidence of gentamicin-resistant bacteria and those with R plasmids, transferable to *E. coli* K-12, in municipal waste waters. *Recomb. DNA Tech. Bullet.* 6 : 98-100.
- Krasovosky, V.N. and G. Stotzky. 1985. Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* survival in sterile and nonsterile soil. *Soil Biol. Biochem.* 19 : 631-638.
- Lee, S.K. and C.K. Kim. 1989. Transfer of R-plasmids of bacterial isolates and their cloned R genes in natural wastewater environments(II)-Comparison of transfer frequency. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17 : 454-460.
- Lee, G.H. and G. Stotzky. 1990. Transformation is a mechanism of gene transfer in soil. *Kor. Jour. Microbiol.* 28 : 210-218.
- Lessard, E.J. and J.M. Sieburth. 1983. Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and bath chambers in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 : 950-959.
- Liang, L.N., J.L. Sinclair, L.M. Mallory and M. Alexander. 1982. Fate in model ecosystems of microbial species of potential use in genetic engineering. *Appl. Environ. Microbiol.* 4 : 708-714.
- Mach, P.A. and D.J. Grimes. 1982. R-plasmid transfer in wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 1395-1403.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N. Y.
- McFeters, G.A. and D.G. Stuart. 1972. Survival of coliform bacteria in natural waters : field and laboratory studies with membrane filter chambers. *Appl. Microbiol.* 24 :

- 805-811.
- Ohana, B., J. Margalit and Z. Barak. 1987. Fate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* under simulated field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 828-831.
- O'Morchoe, S.B., O.Ogunseitan, G.S. Saylor and R.V. Miller. 1988. Conjugal transfer of R68.45 and FP5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 1923-1929.
- Rissler, J.F. 1984. Research needs for biotic environmental effects of genetically engineered microorganisms. *Recomb. DNA Tech. Bullet.* 7 : 20-30.
- Scheuerman, P.R., J.P. Schmit and M. Alexander. 1988. Factors affecting the survival and growth of bacteria introduced into lake water. *Arch. Microbiol.* 150 : 320-325.
- Schilf, W. and W. Klingmuller. 1983. Experiments with *Escherichia coli* on the dispersal of plasmids in environmental samples. *Recomb. DNA Tech. Bullet.* 6 : 101-102.
- Sharples, F.E. 1983. Spread of organisms with novel genotypes; thoughts from an ecological perspective. *Recomb. DNA Tech. Bullet.* 6 : 43-56.
- Shaw, D.R. and V.J. Cabelli. 1980. R-plasmid transfer frequencies from environmental isolates of *Escherichia coli* to laboratory and fecal strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 : 756-764.
- Smith, H.W. 1970. Incidence in river water of *Escherichia coli* containing R factors. *Nature* 228 : 1286-1288.
- Stotzky, G. and H. Babich. 1984. Fate of genetically-engineered microbes in natural environments. *Recomb. DNA Tech. Bullet.* 7 : 163-188.
- Stotzky, G., M.A. Devanas and L.R. Zeph. 1990. Methods for studying bacterial gene transfer in soil by conjugation and transduction. *Adv. Appl. Microbiol.* 35 : 57-169.
- Stotzky, G., M.A. Devanas and L.R. Zeph. 1991. Physicochemical and biological factors affect the transfer of genetic information among microorganisms in soil. *In* L. Ginzbrug (ed.), *Assessing Ecological Risks of Biotechnology*, Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA. pp. 95-122.
- Tiedje, J.M., R.K. Colwell, Y.L. Grossman, R.E. Hodson, R.E. Lenski, R.N. Mack and J. Regal. 1989. The planned introduction of genetically engineered microorganisms : ecological considerations and recommendations. *Ecology* 70 : 298-315.
- Trevors, J.T. and K.M. Oddie. 1986. R plasmid transfer in soil and water. *Can. J. Microbiol.* 32 : 610-613.
- Walter, M.V., K. Barbour, M. McDowell and R.J. Seidler. 1987. A method to evaluate survival of genetically engineered bacteria in soil extract. *Curr. Microbiol.* 15 : 193-197.
- Walter, M.V., K. Barbour, M. McDowell and R.J. Seidler. 1987. A method to evaluate survival of genetically engineered bacteria in soil extract. *Curr. Microbiol.* 15 : 193-197.