

하천에서 분리한 비소 내성세균의 유전적 특성

정미경 · 이호자
경희대학교 문리과대학 생물학과

Genetic Characteristics of Arsenic Compounds-Resistant Bacteria Isolated from Stream Water

Chung, Mi Kyung and Ho-Sa Lee

Department of Biology, College of Liberal Arts and Science, Kyung Hee University,
Seoul, 130-701, Korea

ABSTRACT: Several arsenic compound-resistant bacteria were isolated from Jung-Rang stream. The isolates, D-3, D-12, and D-14 were characterized phenotypically and genetically, and identified as *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*, respectively. A plasmid of 67 kb was found in *Klebsiella oxytoca* D-12 and designated as pMH12. Transfer of this plasmid from D-12 to *E. coli* HB101 was occurred, and the resulting transconjugant strains expressed the same level of heavy metal resistance as the donor strain. The physical presence of this plasmid in transconjugant was detected with agarose gel electrophoresis. Arsenite-sensitive derivatives of isolate D-12 were obtained with Mitomycin C treatment which cured pMH12. Antibiotics and heavy metal resistances were also examined to be used as a proper marker for the isolates in gene cloning. Isolate D-12 has resistance to several heavy metal ions such as Cd^{2+} , Zn^{2+} , and Hg^{2+} . Also, all the other arsenite resistant isolates showed resistance to several heavy metal ions and antibiotics.

KEY WORDS □ *Klebsiella pneumoniae*, arsenite-resistant plasmid, conjugation, plasmid curing test, heavy metal ions and antibiotics resistance.

서 론

현대 산업사회에서는 농약이나 살충제의 광범위한 이용, 중금속 광석의 채광 및 공업적 이용, leaching 등의 산업활동에 의한 인위적 유출로 인하여 중금속이 특정 지역에 고농도로 축적되어 심각한 공해 현상을 유발하고 있다. 또한 자연계에 유입된 중금속 물질은 먹이사슬의 영양단계를 거치면서 고농도로 축적되는 biomagnification으로 인하여 인류의 건강에 심각한 위협을 가하고 있다. 그 예로 일본의 수은 중독에 의한 미나마타병이나, 카드뮴 중독에 의한 이따이 이따이 병의 피해는 이미 널리 알려진 사실이다 (Fujiki, 1992; Kobayashi, 1971).

중금속은 비중 5 이상인 약 40개의 원소로 구성되어 있고, 자연계에 미량으로 존재하며 생체내 효소활성이나 단백질, 핵산의 구조적 안정성에 기여한다. 그

러나 과다할 경우 단백질의 SH-group에 결합하여 효소작용을 억제하고 핵산의 구조를 변화시키며 인산화반응을 파괴시키는 독성을 지닌다 (Vallee and Ulmer, 1972). 미생물 세포에 있어서도 독성작용을 한다고 알려져 있으나 (McIntee *et al.*, 1986), 이런 중금속류들에 대하여 내성을 가짐으로써 생존이 가능한 세균도 많이 나타나고 있다 (Foster, 1983; Minney and Quirk, 1984; Summers and Silver, 1978). 비소는 독약, 제초제, 화학전의 발포제로 사용되는 것으로 현재 농약에 많이 사용되고 있으며, 비교적 안정된 화학구조를 지녀 환경내에 다량으로 존재하고 있다 (Chen *et al.*, 1986). 비소는 식도관을 통해 쉽게 흡수되며, 흡수가 지속되면 말초신경계에 작용하여 에너지 생성에 필수적인 cofactor 생성을 억제한다. 심한 경우에는 발암물질로 작용하여 피부암을 유발하기도 한다.

비소에 대한 내성세균의 분리는 Hedges와 Baumberg(1977)에 의해 *E. coli*가 분리되었고, Hendrick 등 (1984)은 비소와 안티몬에 대하여 다제내성인 *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *oortii*를 연구 발표하였다. *Streptomyces*의 항생제 합성시 비소 내성의 영향 등이 보고되어 있으며(Hanel *et al.*, 1989), inducible arsenical resistance operon(ars operon)을 가진 플라스미드가 arsenite내성을 위한 수송기작을 암호화한다고 알려져 있다 (Mobley *et al.*, 1984; Rosen and Borbolla, 1984).

현재 우리나라에서는 환경내에 산재하는 중금속 내성세균에 대한 구체적인 연구수행이 미비한 실정으로 고도 산업화에 따른 환경오염의 생물학적 방제 및 처리에 관한 연구가 절실하며 또한 미생물 세포의 새로운 형질의 획득과정과 그의 유지에 관한 연구도 병행하여 유익한 방향으로 이를 확대 응용할 필요도 있다 하겠다.

본 연구에서는 유전학적 응용성이 높은 그람 음성 세균들 중 주로 장내세균들을 대상으로 arsenite에 내성을 가지는 세균을 선발하였다. 선발된 arsenite 내성균의 생리생화학학적 특성 및 유전적 특성을 관찰하였고, 플라스미드 curing과 접합실험을 통해 내성 유전자의 소재를 파악하였다.

재료 및 방법

사용균주

사용된 균주와 플라스미드는 Table 1과 같다.

Arsenite 내성균주의 분리 및 동정

가내공업이 밀집된 월곡동에 위치한 월곡천 하수와 도심하천인 중량천에서 시료를 채취하여 crystal violet 4 ppm과 0.3%의 Bile salt를 첨가한 Luria-Bertani (LB) 배지에서(Davis *et al.*, 1980) 5 mM NaAsO₂(Arsenite), 100 mM Na₂HAsO₄(Arsenate)에

대해 내성을 가지는 세균을 분리하였다. 분리된 균들 중 arsenite에 대해 가장 내성이 높은 균주를 선발 하였고, 선발된 균주들은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology를 참조하여 생리생화학학적 검사를 실시하여서 동정하였다(Krieg and Holt, 1984).

플라스미드 DNA 분리

비교적 크기가 큰 플라스미드 DNA의 분리를 위해 Kado와 Liu(1981)의 방법을 사용하였다.

접합실험을 통해 얻은 transconjugant는 *in situ* lysis 방법(Eckhardt, 1978)을 약간 변형하여 플라스미드의 전이를 확인하였다. 배지에서 직접 집락을 채취하여 25% sucrose 용액이 섞인 Tris borate 완충액에 lysozyme(1 mg/ml)과 RNase(1 unit/ml)를 첨가한 용액에 부유시켰다. 세포부유액을 0.8% agarose gel의 well에 채운 뒤 즉시 그 위에 0.5% SDS와 0.5% agarose용액을 덮었다. 완전히 cell lysis가 일어나도록 약 10분간 둔 후 100 V로 3시간 동안 전기영동을 하여 UV 조명을 통해 확인하였다.

접합실험

Singh와 Klingmuller(1986)에 의해 변형된 Eppendorf-conjugation방법을 사용하였고, 수용체로는 *E. coli* HB101과 *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686을 사용하였다.

공여체와 수용체는 액체배지에서 대수기까지 배양한 후 에펜도르프 튜브에 1:1로 섞은 뒤 30초간 원심분리하여 세포들을 농축시켜서 37°C에서 정지배양하였다.

플라스미드 curing 실험

선별된 균주를 L-broth에서 진탕배양한 후 배양액을 Mitomycin C가 5, 10 µg/ml 함유된 L-broth에 접종하여 탁도가 나타날 때까지 배양한 뒤, 이를 다시

Table 1. Bacterial strains and plasmids

| Strain | Plasmid | Relevant markers | Reference or source |
|----------------------------------|---------|--|---------------------------------|
| <i>E. coli</i> | | | |
| HB101 | | F ⁻ , <i>hsd20</i> , <i>recA13</i> , <i>rpsL20(Sm^r)</i> | KCTC 2287 ^a |
| V517 | | harboring the known 8 ccc plasmids | Macrina <i>et al.</i> (1978) |
| <i>Klebsiella</i> | | | |
| <i>K. oxytoca</i> | | wild type | KCTC 1686 |
| <i>K. pneumoniae</i> | | wild type | KCTC 2208 |
| <i>K. oxytoca</i> D-12 | pMH12 | Asi ^r | This study |
| <i>K. pneumoniae</i> D-14 | | Asi ^r | This study |
| <i>K. oxytoca</i> H42 | | Asi ^r | This study |
| <i>K. oxytoca</i> G21 | | Asi ^r | This study |
| <i>Serratia liquefaciens</i> D-3 | | Asi ^r | This study |

^aKCTC: Korean collection for type cultures

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of arsenite-resistant isolates

| Test | D-3 | D-12 | D-14 |
|--------------------------------|-----|------|------|
| β -galactosidase | + | + | + |
| Arginine dihydrolase | - | - | - |
| Lysine decarboxylase | + | + | + |
| Ornithine decarboxylase | + | - | - |
| Citrate utilization | + | + | + |
| Production of H ₂ S | - | - | - |
| Urease | - | + | + |
| Tryptophane deaminase | - | - | - |
| Indole production | - | + | - |
| Voges-Proskauer | + | + | + |
| Gelatin liquefaction | + | - | - |
| Glucose | + | + | + |
| Mannitol | + | + | + |
| Inositol | + | + | + |
| Sorbitol | + | + | + |
| Rhamnose | + | + | + |
| Saccharose | + | + | + |
| Melibiose | - | + | + |
| Amygdalin | + | + | + |
| Arabinose | + | + | + |
| Cytochrome-oxidase | - | - | - |

+: positive, -: negative

Mitomycin C가 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 들어있는 L-broth에 옮겨 배양하였다. 이 배양액을 적절히 희석하여 LB 고체 배지에 도말하였고, 나타난 집락들을 arsenite가 함유된 LB 고체배지에 replica plating하여 curing여부를 확인하였다.

항생제 및 중금속 내성

항생제에 대한 분리균주들의 내성 정도를 조사하기 위하여 LB 고체배지에, tetracyclin 15 $\mu\text{g/ml}$, kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$, streptomycin 50 $\mu\text{g/ml}$, chloramphenicol 250 $\mu\text{g/ml}$ 등을 첨가하여 시험 항생물질로 사용하였다. 또한 중금속에 대한 내성도를 알아보기 위하여 Cadmium chloride 1 mM, Sodium arsenite 5 mM, Mercuric chloride 0.5 mM, Zinc sulfate 1 mM 등을 LB 고체배지에 첨가하여 사용하였다 (Timoney *et al.*, 1978).

결과 및 고찰

Arsenite 내성균주의 분리 및 동정

도심하천에서 채취한 시료에서 장내세균으로서 arsenite(Asi) 5 mM에서 생육하는 균주를 14주 분리하였고, 그 중에서 arsenite에 대해 가장 내성도가 높은 균주를 택해 D-3, D-12, D-14라 명명하고, 생리생화학 검사를 실시하여 각각 *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*로 동정하였다(Table 2).

플라스미드 DNA의 분석

선별한 각 균주의 전기영동 양상을 분석한 결과는

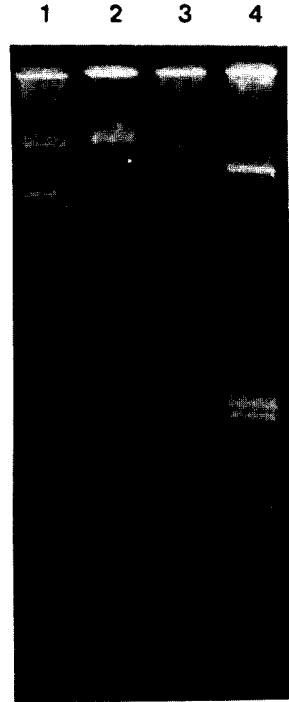


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis pattern of plasmids of the isolates.

lane 1; D-3, lane 2; D-12, lane 3; D-14, lane 4; *E. coli* V517.

다음과 같다(Fig. 1). D-3는 크기가 67, 61, 39, 20, 6 kb인 5개의 플라스미드를 가지고 있었고, D-12와 D-14는 각각 67, 55 kb의 크기를 갖는 1개의 플라스미드를 가지고 있었다. 이 중 D-12가 가진 67 kb의 플라스미드를 pMH12로 명명하였다. 보고된 바에 따르면 *E. coli*에서 분리된 Asi^r R factor인 R773과 R46은 크기가 각각 90 kb와 52 kb로서 본 실험에서 분리한 균주들과 유사한 결과를 나타내었다(Mobley and Rosen, 1982). 또한, Mobley 등 (1984)은 arsenite-resistant clinical isolates 15주에 대해 플라스미드함유 여부를 관찰하였는데, 그 중 13균주가 50 kb 이상의 플라스미드를 가지고 있었고, R773과의 colony blot hybridization 실험에서 *Klebsiella*속은 전혀 상동관계를 나타내지 않았다고 보고 하였다. 이는 *E. coli*와 *Klebsiella*속이 같은 장내세균이라 하더라도 arsenite resistance determinant는 전혀 다른 것을 보여주는 것이다.

접합실험

분리균주의 플라스미드가 전이능력을 갖는지를 알아보기 위해 세 분리균주 중 성장속도가 가장 빠른 D-12로 접합실험을 시행하였다. *E. coli* HB101을 수용체로 하여 각각 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28시간동안 mating시킨 결과 24시간에서 수용체당 transconjugant의 전이율이 9.3×10^{-6} 으로 가장 높게 나타났다

Table 3. Time course for the transfer of *AsiI* from D-12 to *E. coli* HB101

| Mating time (h) | Conjugant | Frequency of transfer (per recipient)* |
|-----------------|-------------------|--|
| 4 | 3.8×10^1 | 5.0×10^{-8} |
| 8 | 2.3×10^2 | 2.6×10^{-8} |
| 12 | 4.5×10^2 | 4.5×10^{-7} |
| 16 | 6.8×10^2 | 5.9×10^{-7} |
| 20 | 7.5×10^2 | 8.0×10^{-7} |
| 24 | 9.3×10^3 | 9.3×10^{-6} |
| 28 | 9.0×10^3 | 8.9×10^{-6} |

*Frequency of transfer is expressed as the number of *AsiI* colonies per CFU of recipient. CFU of recipient was determined after mating. Transconjugants were selected for *Sm^r* and *AsiI*.

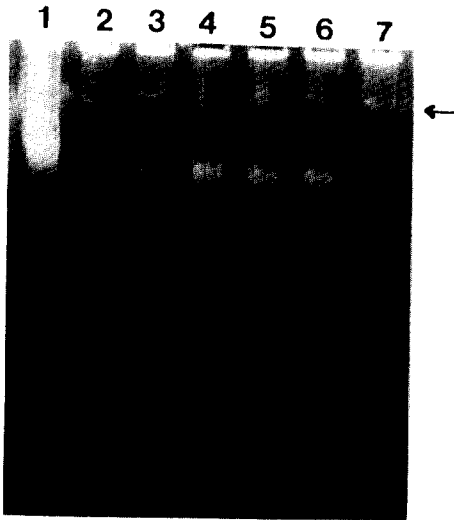


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of transconjugants from isolates D-12 to *E. coli* HB101. lane 1; *E. coli* HB101, lane 2; isolates D-12, lane 3-7: transconjugants.

(Table 3).

Transconjugant는 arsenite 5 mM에서 공여체와 마찬가지로 증식이 되었고, *in situ* lysis 방법을 이용하여 전기영동을 한 결과 모든 transconjugant는 D-12의 플라스미드와 같은 크기를 가진 한 개의 플라스미드를 함유하고 있었다(Fig. 2). 이는 D-12가 갖고있는 플라스미드가 전이능력을 갖고 있으며, arsenite 내성 유전자가 플라스미드에 존재함을 시사해주고 있다.

그리고 arsenite에 대해 감수성인 *Klebsiella oxytoca* KCTC 1686에 *E. coli*와 동일한 조건으로 접합을 시켰으나 transconjugant는 생성되지 않았다. Fig. 3에서와 같이 *K. oxytoca* KCTC 1686은 D-12의 플라스



Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of isolates D-12 and its cured strains.

lane 1; *Klebsiella oxytoca* D-12, lane 2; *Klebsiella oxytoca* KCTC1686, lane 3-4: cured strain

미드와 유사한 크기의 플라스미드를 함유하고 있었으며 이는 D-12의 플라스미드와 incompatibility를 형성하는 것으로 사료된다.

플라스미드 curing 실험

Arsenite 내성에 관여하는 유전자가 플라스미드에 존재하는지를 확실히 확인하기 위해 Mitomycin C를 사용하여 D-12의 플라스미드를 curing시켰다. Mitomycin C가 함유된 배지에서 2일간 배양 후 LB고체배지에서 분리된 420개의 집락 중에서 arsenite에 대해 감수성을 나타내는 집락을 2개 분리하였고, 이 분리된 2개의 집락을 H42, G21로 명명하였다. 이들 cured strain들은 전기영동에 의해 플라스미드의 유무를 확인한 결과 플라스미드가 없음을 확인되었다(Fig. 3). 접합과 플라스미드 curing 실험을 통해 arsenite 내성에 관여하는 유전자가 염색체에 있는 것이 아니라 플라스미드에 위치하고 있으며, arsenite내성기작은 전적으로 플라스미드에 의해 조절됨을 알 수 있었고, 이들 결과는 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*와 *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *oortii*가 arsenite에 대해 내성을 가지는

Table 4. Growth response of the isolates to antibiotics.

| Isolates | Antibiotics | | | |
|----------|-------------|----------|----------|-----------|
| | Tc 15 | Sm 50 | Km 50 | Cm 250 |
| D-3 | - | - | + | + |
| D-12 | + | - | - | - |
| D-14 | + | - | - | + |

Tc: Tetracycline, Sm: Streptomycin, Km: Kanamycin, Cm: Chloramphenicol. +: growth, -: no growth
Numbers indicate the minimum concentration in $\mu\text{g/ml}$ at which normal growth wasn't observed.

것이 플라스미드에 의한다는 보고와 일치한다(Foster, 1983; Silver *et al.*, 1981; Hendrick *et al.*, 1984).

항생제 및 중금속 내성

항생제에 대한 내성정도를 알아본 결과 세 균주 모두 streptomycin에 대해서 감수성을 나타냈다. 그 이외에 D-3는 tetracycline에 대해 감수성이었고, D-12는 chloramphenicol과 kanamycin에, D-14는 kanamycin에 감수성을 나타내었다(Table 4).

중금속에 대해서는 세 균주 모두 높은 내성을 나타내었다(Table 5). 이는 대조균으로 사용한 균주들이 중금속에 대해서 전혀 내성을 갖지 못하는 것과 대조적이었으며, 특히 D-12의 경우 Cd, As, Zn, Hg에 대해 모두 내성을 갖고 있었다. 이것은 토양과 식수 및 해안에서 분리된 중금속 내성균주들이 여러 종류의 중금속과 항생제들에 대하여 다제내성을 갖고 있다는 보고와 일치한다(Timoney *et al.*, 1978; Marques *et*

Table 5. Growth response of the isolates to heavy metals

| Isolates | Heavy metals | | | |
|-------------------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| | Cd 1.0 | As 5.0 | Zn 1.0 | Hg 0.5 |
| D-3 | + | + | + | - |
| D-12 | + | + | + | + |
| D-14 | - | + | + | - |
| <i>K. oxytoca</i> KCTC 1686 | - | - | - | - |
| <i>K. pneumoniae</i> KCTC2208 | - | - | - | - |

Cd: CdCl₂, Hg: HgCl₂, As: Na₂AsO₄, Zn: ZnSO₄. +: growth, -: no growth

*Numbers indicate the minimum concentration in mM at which normal growth wasn't observed.

al., 1979; Calomiris *et al.*, 1984). 따라서 항생물질의 남용(Kim *et al.*, 1986) 및 산업화에 따라 자연계에 방류되는 중금속들이 (Yu, 1979) 환경에서 도태압으로 작용하여 중금속과 항생물질에 대하여 다제내성인 균이 출현되는 것으로 생각된다.

본 연구에서 분리된 균주들의 항생물질과 중금속에 대한 특성은 내성유전자의 gene cloning을 의한 선 발표식으로서 뿐만 아니라 각 균주들의 내성 유전자의 위치확인, 유전자의 발현 및 조절등과 같은 유전학적인 특성을 밝히는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

적 요

Arsenite, arsenate에 대해 내성을 가지는 균들을 분리하여 D-3, D-12, D-14로 명명하였고, 생리생화학적 검사를 통해 각각 *Serratia liquefaciens*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*로 동정되었다. 내성기작에 관여하는 유전자의 위치 및 분리된 플라스미드의 전이능을 조사한 결과 내성유전자는 플라스미드에 존재하며 내성기작은 전적으로 플라스미드에 의해 조절됨을 알 수 있었고, 또한 conjugative 플라스미드임이 확인되었다. 이에 *Klebsiella oxytoca* D-12에 존재하는 67 kilobase의 conjugative 플라스미드를 pMH12로 명명하였다. Mitomycin C 처리에의해 arsenite 감수성 균주를 선발한 결과 pMH12가 없음이 확인되었다. 분리균주들의 유전적 특성을 규명하기위한 실험에 사용될 marker를 찾아내기 위하여 몇가지 항생물질과 중금속에 대한 내성을 조사하였는데, 특히 D-12의 경우 고농도의 Cd²⁺, Zn²⁺, Hg²⁺에 대해 내성을 나타내었다.

사 사

이 논문은 1988-90년도 문교부 학술연구조성비 (자유-공모과제) 지원에 의한 연구임.

참고문헌

1. Calomiris, J.J., J.L. Armstrong, and R.J. Seidler, 1984. Association of metal tolerance with multiple antibiotic resistance of bacteria isolated from drinking water. *American Society for Microbiol.* **47**. 1238-1242.
2. Chen, C.M., T.K. Misra, S. Silver, and B.P. Rosen,

1986. Nucleotide sequence of the structural genes for an anion pump. *J. Biol. Chem.* **261**. 15030-15038.
3. Davis, R.W., D. Botstein, and J.R. Roth, 1980. *Advanced bacterial genetics*. p. 140-141 and 201. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
4. Eckhardt, T., 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**, 584-588.
5. Foster, T.J., 1983. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbial. Rev.* **47**. 361-409.
6. Fujiki, M., 1972. The transitional condition of

- minamata Bay and neighbouring sea polluted by factory waste containing mercury. *Water Pollut. Res.*, **6th** Int. Conf. Paper No. 102.
7. **Hedges, R.W. and S. Baumberg**, 1973. Resistance to arsenic conferred by a plasmid transmissible between strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **115**, 459-460.
 8. **Hendrick, C.A., W.P. Haskins, and A.K. Vidaver**, 1984. Conjugative plasmid in *Corynebacterium flaccumfaciens* subsp. *oortii* that confer resistance to arsenite, arsenate, and antimony (III). *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 56-60.
 9. **Hanel, F., H. Krugel, and G. Fiedler**, 1989. Arsenical resistance of growth and phosphate control of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J. General Microbiol.* **135**, 583-591.
 10. **Kado, C.I. and S.T. Liu**, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid. *J. Bacteriol.* **145**, 1365-1373.
 11. **Kim, C.K., S.G. Lee, and Y.C. Kim**, 1986. Transfer and genetic recombination of antibiotic resistance genes occurring in water environment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 245-250.
 12. **Krieg, N.R., and J.G. Holt**, 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Williams and Wilkins. Baltimore.
 13. **Kobayashi, I.**, 1971. Relation between the Itai-Itai disease and the pollution of water by cadmium from a mine. *Adv. Water. Pollut. Res.*, **5th** Int. Conf. 1-24.
 14. **Marques, A.M., F. Congregado, and D.M. Simon-Pujol**, 1979. Antibiotic and heavy metal resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from soils. *J. Appl. Bacteriol.* **47**, 347-350.
 15. **Mcintee, J.D., J.R. Woodrow, and A.V. Quirk**, 1986. Investigation of cadmium resistance in an *Alcaligenes* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 515-520.
 16. **Minney, S.F., and A.V. Quirk**, 1984. The growth and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* at different cadmium concentrations. *Microbios.* **42**, 37-44.
 17. **Mobley, H.L., and B.P. Rosen**, 1982. Energetics of plasmid-mediated arsenate resistance in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 6119-6122.
 18. **Mobley, H.L., S. Silver, F.D. Porter, and B.P. Rosen**, 1984. Homology among arsenate resistance determinants of R factors in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 852-858.
 19. **Rosen, B.P., and M.G. Borbolla**, 1984. A plasmid-encoded arsenite pump produces arsenite resistance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **123**, 760-765.
 20. **Silver, S., K. Budd, K.M. Leahy, W.V. Shaw, D. Hammond, R.P. Novick, C.R. Willsky, M.H. Malamy, and H. Rosenberg**, 1981. Inducible plasmid-determined resistance to arsenate, arsenite, and antimony (III) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **146**, 983-996.
 21. **Singh, M., and W. Klingmüller**, 1986. Transposon mutagenesis in *Azospirillum brasilense*: Isolation of auxotrophic and *nif*⁻ mutants and molecular cloning of the metagenized *nif* DNA. *Mol. Gen. Genet.* **202**, 136-142.
 22. **Summers, A.O. and S. Silver**, 1978. Microbial transformations of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**, 637-672.
 23. **Timoney, J.F., J. Port, J. Giles, and J. Spanier**, 1978. Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York Bight. *Appl. Environ. Microbiol.* **36**, 465-472.
 24. **Vallee, B.L., and D.D. Ulmer**, 1972. Biochemical effect of mercury, cadmium and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**, 91-127.
 25. **Yu, T.S.**, 1979. Microbiological characteristics of heavy metal ion-tolerant microorganisms. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **7**, 184-190.

(Received September 25, 1990)

(Accepted January 18, 1991)