

수계에서 접합에 의하여 전이된 Km^r 유전자 및 Plasmid의 재배열

이성기 · 김치경*

충북대학교 자연대 미생물학과, 서울대학교 분자미생물학연구소

수계환경에서 세균의 접합에 의해 나타난 conjugant에서 plasmid의 재배열과 Km^r 유전자의 행방을 조사하기 위하여 자연계 분리균주와 유전공학적 변형균주(GMM)의 Km^r 유전자의 전이 빈도를 조사하는 동시에 3.9 kb의 Km^r 유전자를 DNA probe로 사용하여 Southern analysis를 실시하였다. Km^r 유전자의 전이빈도는 실험실 환경에서 GMM 균주가 자연계균주(DK1) 보다 100배 더 높게 나타났으나, 무심천에서는 균주에 따라 차이가 없었다. 실험실환경에서 DK1 균주를 donor로 하여 LB나 FW에서 얻은 conjugant들은 모두 같은 수의 plasmid를 가지고 있었으나 크기는 다르게 재배열되었으며, Km^r 유전자는 donor의 R plasmid인 pDK101과 비슷한 위치에서 발견되었다. GMM 균주가 donor일 때에는 180 kb의 plasmid가 새로 나타났으며, 특히 FW 수질에서 donor가 DKC600일 때는 Km^r 유전자가 염색체에 삽입되어 있었다. 무심천의 자연계 수질환경에서는 DK1이나 DKB701이 donor일 때 4개 및 8개의 plasmid가 새로 나타났으며, Km^r 유전자는 재배열된 4개의 plasmid와 염색체에서 발견되었다. DKC600이 donor일 때는 recipient의 작은 plasmid가 모두 소실되었으나, Km^r 유전자는 새로 나타난 plasmid와 염색체에서 발견되었다. 그러므로 자연환경의 수질에서는 plasmid의 재배열이 더 다양했으며, Km^r 유전자도 다양한 크기로 재배열된 plasmid에서 발견되었다.

KEY WORDS □ rearrangement of Km^r gene, Km^r plasmid, conjugal transfer, DNA hybridization

항생물질 내성유전자나 R plasmid가 자연수계에서 높은 빈도로 전이되고 있음은 이미 오래전 부터 알려져 왔다(15, 18, 20). 이는 자연 생태계에서 각종 유전자들이 세균들 사이에 교환, 전파, 순환됨으로써 재조합 및 재배열이 부단히 일어나고 있음을 의미하는 것이다. 이처럼 어떤 유전자나 plasmid가 다른 균주에 전이된 후 재구성 및 재배열되는 현상이 다양하게 일어날 수 있기 때문에(11), 최근의 분자생물학에서도 plasmid나 유전자의 재배열은 아주 흥미있는 일로 지적되고 있다(12).

Plasmid의 전이빈도와 재배열에 관한 실험적 연구는 멸균된 하폐수에서 pBR325를 가진 *E. coli*와 접합성 plasmid를 가진 균주들을 recipient와 혼합 배양했을 때 얻은 conjugant들에서 보고된 바 있었다(19). 또 다른 수계에서도 염색체의 결실에 의한 재배열 현상이 *Streptomyces glaucercens*에서 보고되었다(5). *Rhizobium*의 plasmid도 염기서열의 증폭, 결실, cointegration, plasmid의 상실 등에 의하여 다양하게 재배열되는 현상이 보고된 바 있다(7). Lee와 Kim(16, 17)도 각 수질환경에서 접합에 의해 나타난 conjugant들에서의 Km^r 유전자의 재배열을 DNA 탐침자를 이용한 DNA hybridization 방법으로 연구하였다.

미생물의 유전자들은 plasmid 또는 염색체상에

있지만, transposable element에 의하여 염색체 또는 plasmid 자체의 구조가 변화됨으로써 재배열 현상이 일어난다고 보고된 바 있다(4, 11). Collis와 Hall(8)은 integron DNA의 integrase에 의한 deletion과 insertion에 의하여 유전자의 재배열이 일어난다고 했다. 또 Gealt 등(10) 그리고 McPherson과 Gealt(19)도 하폐수 환경에서 conjugative plasmid를 가진 mobilizer 균주에 의하여 plasmid의 재배열이 다양해진다고 보고한 바 있다. 그러나 수계환경의 세균들 사이에서 전이에 의해서 일어나는 유전자의 재배열 현상과 그 과정은 거의 이해하지 못하고 있으며, 환경 요소와의 상관관계도 체계적으로 연구된 바가 없는 상태이다. 더욱이 유전공학적으로 변형된 미생물들(genetically modified microorganisms, GMMs)이 자연계에 노출될 때 이들 유전자의 전이에 의한 재배열의 문제는 환경학뿐 아니라 분자생태학적으로 지대한 관심사가 되었다(2).

그러므로 본 연구에서는 자연계로 부터 분리한 kanamycin 내성(Km^r) 균주와 그로부터 제조한 몇 가지 GMM 균주들의 Km^r 유전자에 대하여 접합에 의한 전이를 실험실 수계와 자연의 하천수계에서 비교 연구하였고, 그 결과 conjugant에서 나타나는 Km^r 유전자와 plasmid의 재배열을 연구하였다.

재료 및 방법

실험균주와 plasmid

본 실험에 사용된 균주와 plasmid는 Table 1과 같다. *E. coli* DK1과 *Providencia rettseri* MT1은 자연계 분리균주로서 그 특성은 Kim과 Lee(13)의 보고에 기술한 바와 같다. DKC600과 DKC601도 Kim과 Lee(13)의 보고에서와 같이 *E. coli* DK1으로부터 제조한 GMM균주들이고, 68 kb의 pDK101 *Km^r* plasmid를 가지고 있다. 그리고 DKB701 균주는 Fig. 1에서와 같이 제조한 재조합 plasmid인 15.1 kb의 *Km^r* plasmid인 pDKB702를 *E. coli* XL1-Blue에 형질전환한 GMM 균주이다.

접합 실험

실험실 조건에서 DK1 균주와 GMM 균주가 가지고 있는 *Km^r* 유전자의 전이를 알기위한 접합실험은 Kim과 Lee(14), 그리고 Lee와 Kim(16)의 보고에서와 같이 Luria-Bertani(LB) 액체배지와 무심천의 모층 지점에서 채수한 하천수를 0.2 μm의 membrane filter로 여과한 하천수(filtered river water, FW)에서 실시하였다. 실험균주의 밀도는 10⁴~10⁹ cell/ml이 되도록 접종하여 수온 20°C와 pH 7.0~7.7에서 18 시간 동안 접합시켰다.

하천수에서의 접합실험은 Kim과 Lee(14)의 방법에서와 같이 오염도의 차이가 있는 무심천의 두 위치(모층 지점과 홍덕 지점)를 정하여 실시하였으며, Standard methods(1)에 의거하여 수질을 분석하였다. 실험위치로부터 채수한 하천수를 0.2 μm의 membrane filter로 여과한 물(FW)을 Sambrook 등(22)의 방법에 따라 준비한 길이 30 cm 그리고 직경 10 mm인 투석관(Sigma Co.)에 무균조작으로 10~20 ml씩을 넣은 후 실험실에서 배양된 donor 및 recipient 균주를 10¹⁰~10¹² cells/ml로 접종하였다. 각 투석관을 봉한 후 각 실험위치의 20~50 cm 수심에 정치하여 5~12°C의 수온과 7.0~9.5의 pH 범위에서 전이실험을 하였다. 전이빈도는 접종한 donor에 대하여 얻어진 conjugant의 수적 비로 계산하였다.

DNA의 분리 및 전기영동

실험균주들의 plasmid DNA는 Kim과 Lee(13)의 보고에서와 같은 방법으로 분리 추출하여 0.7~1% agarose gel에서 5 V/cm 이하로 전기영동을 하였다. Plasmid DNA의 재배열에 대한 분석은 donor와 recipient의 plasmid와 함께 conjugant들의 재배열된 plasmid pattern을 전기영동한 gel상에서 비교하여 그 수와 크기의 변화를 분석하였다.

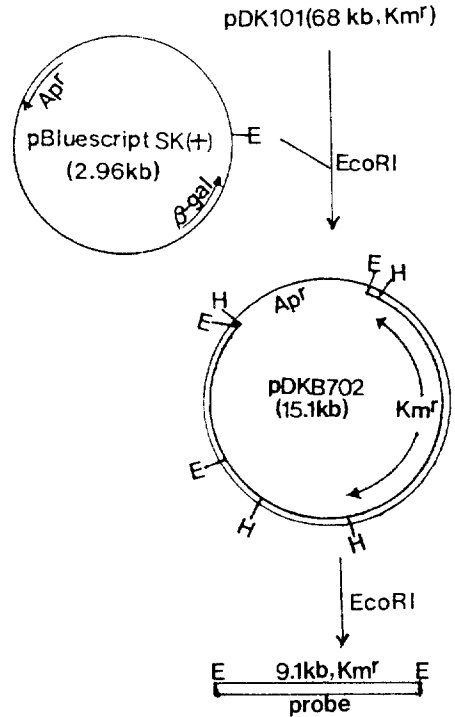


Fig. 1. Construction of DNA fragment of 9.1 kb which was used to make *Km^r* DNA probe.

Table 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Remarks and sources
Bacteria		
<i>E. coli</i> DK1	<i>Km^rAp^rTc^rCm^r</i>	Donor, natural isolate, (13)
<i>E. coli</i> DKC600	<i>Km^rAp^rTc^rCm^r</i>	Donor, GMM strain, (13)
<i>E. coli</i> DKC601	<i>Km^rAp^rTc^rCm^r</i>	Donor, GMM strain, (13)
<i>E. coli</i> DKB701	<i>Km^rAp^rCm^rSm^r</i>	Donor, GMM strain, this study
<i>Providencia rettseri</i> MT1	<i>Km^rAp^rTc^rCm^rSm^r</i>	Recipient, natural isolate, (13)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>Km^rAp^rTc^r</i>	(16)
Plasmids		
pDK101	<i>Km^rCm^r</i>	Plasmid in DK1 and DKC600, (13)
pDKB702	<i>Km^rAp^r</i>	Recombinant plasmid in DKB701, this study
pBluescript SK(+)	<i>Ap^rLacⁱ</i>	(16)

탐침자의 제조

pDX95 plasmid로 부터 Km^r 유전자를 포함하는 3.9 kb의 DNA 탐침자를 준비한 방법은 전보(16, 17)에서와 같다. 또 Fig. 1에서와 같이 제조한 pDKB702 plasmid를 *EcoRI*으로 절단한 후 Tris-acetate buffer를 사용하여 0.8% agarose gel에서 2 V/cm 이하로 전개시켰다. 310 nm의 자외선으로 *EcoRI* 절편을 확인한 후, Gene Clean II kit (Bio 101)으로 elution한 9.1 kb 절편에 multiprime DNA labeling system (RPN 1600Z, Amersham Co.)으로 biotin-7dATP (BRL, Life Technologies, Inc.)를 표식하여 Km^r DNA 탐침자로 사용하였다.

Southern hybridization

접합에 의하여 전이된 Km^r 유전자의 행방을 추적하기 위하여 각 실험에서 얻은 conjugant들로부터 plasmid들을 분리하여 전기영동한 후, Amersham Co.의 실험지침과 Lee와 Kim (16, 17)의 방법에 따라 Km^r DNA probe로 Southern hybridization을 실시하여 Km^r 유전자의 위치를 추적하였다.

결과 및 고찰

Km^r 유전자의 전이빈도

실험실 환경과 자연하천수에서 Km^r 유전자의 접합에 의한 전이빈도는 Table 2에서와 같다. 실험실 환경에서도 여과하천수(FW)에서의 전이빈도(10^{-9} ~ 10^{-7})에 비하여 LB 배지에서는 10^{-4} ~ 10^{-2} 의 훨씬 높은 전이빈도가 발견되었다. 특히 donor가 자연계 분리균주(DK1)일 때 보다 DKC600과 DKC601의 GMM 균주일 때 Km^r 유전자의 전이빈도는 100배

정도 더 높았다. 그러나 무심천 하천수에서는 Table 3과 같이 흥덕 지점은 모충 지점에 비하여 이화학적 환경요소나 생물적인 환경요소로 볼때 수질오염도가 더 높았으나, Km^r 유전자의 전이빈도는 두 지점에서 모두 약 10^{-8} 으로 나타났다. O'Morchoe 등(20)은 LB 보다 FW에서 그리고 실험실에서 보다는 담수환경에서 plasmid의 전이빈도가 낮게 나타난다고 하였으며, 이는 본 연구에서의 결과와 일치한다. Fernandez-Astorga 등(9)도 균주나 수온 등의 환경요소에 의해 전이빈도에 많은 차이가 있다고 하였으나, 본 연구에서 오염도가 상이한 무심천의 두 실험위치에서 얻은 전이빈도는 차이가 없었다.

Plasmid의 재배열 및 Km^r 유전자의 위치

LB 액체배지와 FW를 사용하여 실험실환경에서 얻은 conjugant들에서 발견되는 plasmid의 재배열은 Fig. 2-I과 같으며, 이들 plasmid의 수와 크기를 분석한 결과는 Table 4에서와 같다. DK1 균주와 MT1 균주의 접합으로 얻은 conjugant들(lanes A)은 LB에서나 FW에서 공히 6개의 plasmid가 발견되었으나 크기들은 다르게 나타났다. 특히 FW에서 얻은 conjugant에서는 donor의 4.8 kb와 4.5 kb의 plasmid가 나타나지 않았다. Donor가 DKC601 균주인 경우에 얻은 conjugant들(lanes C)에서는 88 kb의 plasmid가 새로 나타난 반면 recipient의 작은 plasmid들이 모두 소실되었다. 또 donor가 DKC600 균주인 경우에는 LB 액체배지 (lane E-LB)에서는 65 kb 이하의 plasmid들이 나타나지 않았으며, FW (lane E-FW)에서는 67 kb와 14 kb의 plasmid가 독특하게 생성되었다. LB 액체배지 보다는 FW에서 plasmid의 재배열이 커지고 있는 것은 수질조성의

Table 2. Transfer frequencies of Km^r gene by conjugation in different waters in laboratory and natural river environments.

Mating pairs (Donor×Recipient)	Transfer frequency			
	Laboratory condition ^a		Moosimcheon river ^b	
	LB broth	Filtered water	Mochung	Heungdeok
DK1×MT1	2.5×10^{-4}	1.7×10^{-9}	5.5×10^{-8}	5.6×10^{-8}
DKC600×MT1	2.4×10^{-2}	1.9×10^{-7}	8.0×10^{-8}	9.0×10^{-8}
DKC601×MT1	1.4×10^{-2}	7.3×10^{-8}	NT ^c	NT
DKB701×MT1	NT	NT	8.9×10^{-8}	9.4×10^{-8}

^aThe temperature and pH of the water were 20°C and 7.0~7.7.

^bThe temperature and pH of the water were 5~12°C and 7.0~9.5.

^cNot tested

Table 3. Physico-chemical and biological conditions of river waters.

Site of microcosm	Water temp. (°C)	Water pH	Conductivity (μmhos/cm)	Turbidity (NTU)	DO (ppm)	Total isolates (cell/ml)	Km ^r (50 μg/ml) isolates (cell/ml)
Mochung	9.0	8.4	125~150	12	0.92	2.0×10^3	5.0×10^2
Heungdeok	12.0	9.5	240~350	30	0.78	6.8×10^4	6.0×10^3

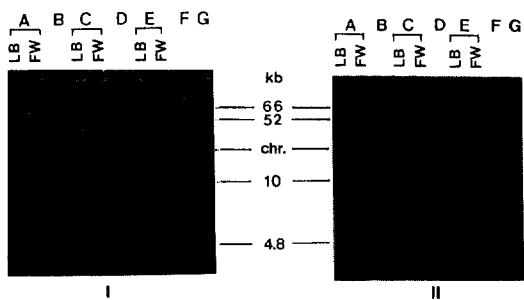


Fig. 2. Electrophoresis patterns (I) and Southern blot analysis (II) of the plasmids in the conjugants obtained by conjugation for 18 h in different waters in laboratory. Lanes: A, conjugants of DK1×MT1; B, DK1; C, conjugants of DKC601×MT1; D, DKC601; E, conjugants of DKC600×MT1; F, DKC600; G, MT1; LB, Luria-Bertani broth; FW, filtered river water. Arrows indicate pDK101 (▼) and pDT529 (◁) containing the *Km^r* genes.

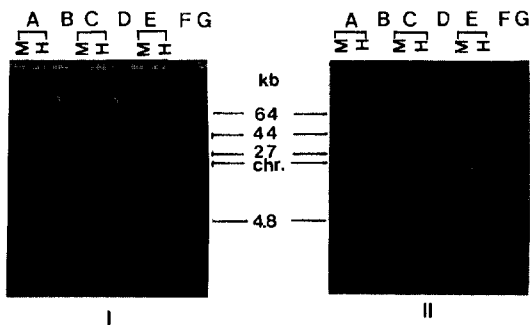


Fig. 3. Electrophoresis patterns (I) and Southern blot analysis (II) of the plasmids in the conjugants obtained by conjugation for 18 h in Moo-simcheon river waters. Lanes: A, conjugants of DK1×MT1; B, DK1; C, conjugants of DKC600×MT1; D, DKC600; E, conjugants of DKB701×MT1; F, DKB701; G, MT1; M, Mochung site; H, Heungdeok site. Arrows indicate pDK101 (▼) and pDKB702 (◁) containing the *Km^r* genes.

Table 4. Plasmid pattern rearranged in the conjugants (Fig. 2) by conjugal transfer of *Km^r* gene in different waters under laboratory conditions.

Lanes (Mating pairs)	No. & size (kb) of plasmids in the conjugants
A-LB (DK1×MT1)	6 (88, 79, 66 ^a , 62, 4.8, 4.5)
A-FW	6 (79, 72 ^a , 62, 50, 10 ^a , 1.8)
C-LB (DK601×MT1)	4 (88, 79, 62, 52 ^a)
C-FW	4 (88, 79, 62, 52 ^a)
E-LB (DKC600×MT1)	3 (72, 68 ^a , 66)
E-FW	5 (67, 62, 50, 14, 1.8), chr. ^a

^aLocation of the *Km^r* genes indicated by Southern hybridization with the DNA probe; Chr. is chromosome.

Table 5. Plasmid pattern rearranged in the conjugants (Fig. 3) by conjugal transfer of *Km^r* gene in different natural river waters.

Lanes (Mating pairs)	No. & size (kb) of plasmids in the conjugants
A-M (DK1×MT1)	4 (180 ^a , 64 ^a , 44 ^a , 27 ^a), chr. ^a
A-H	4 (180 ^a , 64 ^a , 44 ^a , 27 ^a), chr. ^a
C-M (DKC600×MT1)	4 (70, 68 ^a , 62, 44 ^a), chr. ^a
C-H	3 (70, 68 ^a , 44 ^a), chr. ^a
E-M (DKB701×MT1)	9 (80, 72, 68 ^a , 62, 44 ^a , 8.5, 7.5, 4.8, 4.5), chr. ^a
E-H	8 (68, 62, 44 ^a , 27 ^a , 8.5, 7.5, 4.8, 4.5), chr. ^a

^aLocation of the *Km^r* genes indicated by Southern hybridization with the DNA probe; Chr. is chromosome.

차이에 따른 영향으로 판단되며, recipient의 plasmid가 나타나지 않은 것은 FW 수질과 수온 및 plasmid의 incompatibility 때문인 것으로 추정된다. Brom 등(7)도 염기서열의 중복, 결실, coinegration 및 plasmid의 상실로 인한 재배열 현상이 매우 다양하게 일어난다고 보고한 바 있다.

각 conjugant의 DNA(Fig. 2-I)에 대하여 *Km^r* 유전자의 행방을 pDX95의 *Hind*III 절편(3.9 kb)을 탐침자로 하여 Southern analysis 한 결과는 Fig. 2-II와 같다. Donor가 DK1 균주일 때(lanes A) LB와 FW에서 얻은 conjugant들은 donor의 R plasmid인 pDK101과 비슷한 위치에서 hybridization이 일어났지만, donor가 DKC601 균주인 경우(lanes C)에는 수질의 종류에 관계없이 pDT529 *Km^r* plasmid가 전이되어 그대로 발견되었다. 그러나 donor가 DKC

600 균주인 경우에는 LB 액체배지(lane E-LB)에서 나타난 conjugant는 68 kb의 pDK101만이 hybridization signal을 보였으며, FW에서의 conjugant (lane E-FW)는 염색체에서 hybridization이 일어났다. 이는 conjugative transposon인 Tn5276이 *Lactococcus lactis*의 염색체에 삽입되었다는 Rauch와 De Vos(21)의 보고와도 유사하지만, donor나 FW 수질의 영향도 작용한 것으로 판단된다.

무심천 수계의 microcosm에서 DK1, DKC600, DKB701 균주를 donor로 하여 18시간 동안 혼합시켜 얻은 conjugant들의 plasmid 양상은 Fig. 3-I과 같으며, plasmid의 수와 크기를 분석한 결과는 Table 5에서와 같다. 무심천의 모충 지점(M)과 흥덕 지점

(H)에서 접합을 시켰을 때 DK1이 donor인 경우의 conjugant들(lane A-M, A-H)에서는 pDK101 plasmid(68 kb)가 소실되고, 180, 64, 44, 27 kb의 plasmid들로 재배열되었다. 그러나 DKC600이 donor인 경우의 conjugant들(lane C-M, C-H)에서는 pDK101이 전이되어 그대로 나타났으며, recipient에 있던 20 kb 이하의 plasmid들은 모두 소실되었다. DKB701이 donor인 경우의 conjugant(lane E-M)에서는 8개의 plasmid들이 새로 나타나 배열되었으며, 또 다른 conjugant(lane E-H)에서는 7개의 plasmid들이 새로 나타났었다. 이와 같이 DKB701이 donor인 경우의 conjugant들(lanes E)에서는 MT1 recipient의 62 kb plasmid만이 남고 그외는 모두 재배열되는 특성을 나타내었다. DK1이 donor일 때는 큰 plasmid들이 새로 나타난 것이나, pDKB702의 linear나 open circle 같은 형태의 plasmid(44, 27 kb)가 나타난 것은 자연 수질환경에서만 나타난 특이한 결과였다. 그리고 실험실 환경과는 대조적으로 donor가 자연계 균주(DK1)인 경우에 GMM 균주의 경우 보다 더 큰 변화가 있었으며(Fig. 3-I), 180 kb의 큰 plasmid가 새로 나타난 것은 전위에 의한 결과로 해석된다. Bringel 등(6)은 접합을 하는 동안 Tn의 DNA와 integrase가 전이되어 접합성 전위나 재배열이 일어난다고 하였으며, Gealt 등(10) 그리고 McPherson과 Gealt(19)도 하폐수 환경에서 conjugative plasmid를 가진 mobilizer 균주에 의해 재배열이 촉진된다고 하였다. 그러므로 본 연구의 무심천 실험에서 얻은 conjugant들이 보여주는 plasmid의 다양한 재배열도 donor로 사용한 자연계 분리균주 뿐 아니라 GMM 균주들의 conjugative Km^r plasmid에 의한 결과라고 할 수 있다.

무심천의 모층 지점(M)과 홍덕 지점(H)에서 접합을 실시하였을 때 나타난 conjugant에서의 Km^r 유전자의 행방은 pDKB702의 EcoRI 절편(9.1 kb)을 탐침자로 하여 추적하였으며, 그 결과는 Fig. 3-II와 같다. 자연계 분리균주인 DK1이 donor인 경우(lane A-M, A-H)에는 180, 64, 44, 27 kb의 plasmid들과 염색체에서 각각 hybridization signal이 나타났다. GMM 균주인 DKC600 균주가 donor일 때와(lane C-M, C-H), DKB701 균주가 donor인 경우(lane E-M, E-H)에도 68, 44, 27 kb 등의 plasmid와 염색체에서 hybridization이 일어났다. 이는 Collis와 Hall(8)이 genome 상의 새로운 위치로 삽입되는 유전자에 의해 결실, 중복, 재배열이 생긴다고 한 보고나, Hall 등(11)의 integron DNA의 integrase에 의하여 재배열이 촉진된다는 결과와 부합되는 것이다. 이와 같이 접합에 의하여 일어나는 Km^r 유전자의 전이 및 재배열 현상은 자연하천수에서 더욱더 다양한 변화를 나타내었다. 그러므로 전이빈도 및 plasmid간의 재배열, 유전자의 위치변환은 세포내 뿐 아니라 세포외부의 환경요인에 의해 많은 영향을 받고 있음을 알 수 있으나 보다 구체적인 기작의 규명에 관한 연구가 요

망된다.

사 사

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학연구소)의 연구과제로 수행되었으며, 과학재단의 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. American Public Health Association, 1987. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, Washington, D.C.
2. Awong, J., G. Bitton, and G.R. Chaudhry, 1990. Microcosm for assessing survival of genetically engineered microorganisms in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 977-983.
3. Bale, M.J., M.J. Day, and J.C. Fry, 1988. Novel method for studying plasmid transfer in undisturbed river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2756-2758.
4. Berg, C.M., D.E. Berg, and E.A. Groisman, 1989. Transposable elements and the genetic engineering of bacteria, p. 879. In D.E. Berg and M. M. Howe (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
5. Birch, S., A. Hausler, C. Ruttener, and R. Hutter, 1991. Chromosomal deletion and rearrangement in *Streptomyces glaucescens*. *J. Bacteriol.* **173**, 3531-3538.
6. Bringel, F., G.L. Van Alstine, and J.R. Scott, 1992. Conjugative transposition of Tn916: the transposon *int* gene is required only in the donor. *J. Bacteriol.* **174**, 4036-4041.
7. Brom, S., A.G. Santos, M.L. Girard, G. Davila, R. Palacios, and D. Romero, 1991. High-frequency rearrangement in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaeseoli* plasmids. *J. Bacteriol.* **173**, 1344-1346.
8. Collis, C.M. and R.M. Hall, 1992. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* **174**, 1574-1585.
9. Fernandez-Astorga, A., A. Muela, R. Cisterna, J. Iriberry, and I. Barcina, 1992. Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 392-398.
10. Gealt, M.A., M.D. Chai, K.B. Alpert, and J.C. Boyer, 1985. Transfer of plasmids pBR322 and pBR325 in wastewater from laboratory strains of *Escherichia coli* to bacteria indigenous to the waste disposal system. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 836-841.
11. 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.
12. Hames, B.D. and D.M. Glover, 1990. Gene

- rearrangement. Oxford University Press, Oxford.
13. **Kim, C.K. and S.G. Lee**, 1989. Transfer of R plasmids of bacterial isolates and their cloned R genes in natural wastewater environments(I)-Cloning of *Km^rCm^r* gene. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**, 447-453.
 14. **Kim, C.K. and S.G. Lee**, 1990. Conjugal transfer and fate of the genetically engineered *Km^r* gene in freshwater environments. *Kor. J. Microbiol.* **28**, 219-228.
 15. **Lee, S.G. 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.
 16. **Lee, S.G. and C.K. Kim**, 1992. Tracking of the *Km^r* gene in conjugal transfer by using DNA probe. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**, 483-490.
 17. **Lee, S.G. and C.K. Kim**, 1992. Transfer and behavior of the genetically modified R gene in water environments. *Kor. J. Microbiol.* **30**, 322-331.
 18. **Mach, P.A. and D.J. Grimes**, 1982. R-plasmid transfer in wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 1395-1403.
 19. **McPherson, P. and M.A. Gealt**, 1986. Isolation of indigenous wastewater bacterial strain capable of mobilizing plasmid pBR325. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 904-909.
 20. **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.
 21. **Rauch, P.J. and W.M. De Vos**, 1992. Characterization of the novel *nicin-sucrose* conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **174**, 1280-1287.
 22. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis**, 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

(Received June 30, 1993)

(Accepted July 20, 1993)

ABSTRACT: Rearrangement of *Km^r* Gene and Plasmid by Conjugal Transfer in Aquatic Environments

Lee, Sung-Gie and Chi-Kyung Kim* (Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, and Research Center for Molecular Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea)

The *Km^r* gene and plasmid of natural isolate and genetically modified microorganisms (GMM) rearranged by conjugation in water environments were comparatively analyzed by agarose gel electrophoresis and Southern analysis. The transfer rates of the *Km^r* gene from GMM strains were generally 100 times higher than those of natural isolate(DK1) under laboratory environments, but their transfer rate was not much different in Moosimcheon River water. The conjugants obtained in LB(Luria-Bertani broth) and FW(filtered river water) water under laboratory conditions showed same number of the plasmids, but the sizes of the plasmids were changed. The *Km^r* gene in the conjugants was found in the same position as the pDK101 *Km^r* plasmid. In case of the GMM strains as donor, the large plasmids of 180 kb appeared in conjugants obtained in LB and FW water. Especially, the *Km^r* gene in the donor of DKC600 was found to be inserted into chromosome of the conjugant obtained in FW water. However, in the conjugants obtained from DK1 and DKB 701 in Moosimcheon River water, the plasmids were rearranged by 4 and 8, respectively, and all of them showed hybridization by the *Km^r* probe. But the small plasmids of the recipient disappeared in the conjugant from DKC600 as donor, and the rearranged plasmids and chromosome in the conjugants were observed to be hybridized with the *Km^r* probe. Therefore, rearrangement of *Km^r* gene and plasmids by conjugation was found to be affected diversely by cellular characteristics as well as by environmental factors.