

토양 및 수계환경에서 Transformation에 의한 세균들간의 수평적 유전물질 전이

이 건 형*

(군산대학교 자연과학대학 과학기술학부 생물학전공)

(2000년 5월 1일 접수, 2000년 6월 27일 채택)

적 요 - 실험실에서 형질전환될 수 있는 세균들은 자연환경 조건에서도 형질전환 능력이 발달하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 환경 내에서 형질전환 능력이 있는 세균의 존재는 확실한 것으로 여겨진다. DNA는 무기물에 부착된 상태에서는 핵산분해효소에 의한 분해로부터 보호되는 것으로 알려져 있다. 비록 DNA가 토양 속에 분산되어져 일정 비율로 가수분해되더라도, 수 주일 후에도 낮은 비율로 감지될 수 있다. 따라서 free DNA는 자연적 형질전환을 할 수 있을 만큼 충분히 지속될 수 있다. 실험실 조건에서는 세균의 형질전환이 여러 경우 보고되었지만, 자연상태에서 형질전환과 관련된 자료는 매우 적다. 생태학적으로 GMMs로부터 재조합 DNA가 토착 미생물에 전이될 수 있는 잠재력에 대한 문제가 주요 현안이 되었는데, 이는 전이된 DNA가 방출된 세균의 생태학적인 적응력을 변화시켜 생물학적 안전성의 문제를 야기할 수 있기 때문이다. 물론, 방출된 GMMs로부터 재조합 DNA가 토착 미생물에 전이되는 율은 아주 낮은 빈도로 일어나지만, 빈도가 낮다는 것은 그리 중요하지 않다. 왜냐하면, 비록 낮은 빈도로 전이되더라도 유리한 조건을 만나게 되면 전이된 유전자는 선택될 수 있기 때문이다. 이제까지 GMMs는 실험실이나 제한된 환경에서 주로 사용되었지만 앞으로는 개방된 자연 생태계에서 이루어질 전망이다. 그러므로 GMMs가 토착세균에 미치는 영향에 대해서도 연구되어야 하고 동시에 GMMs가 생태계에 방출될 경우 그에 따른 영향평가를 반드시 수행해야 한다.

세균들간에 유전물질을 교환할 수 있다는 사실이 발견된 지 50여년이 지났다. 세균들간의 수평적인 유전물질의 전이(horizontal gene transfer: HGT)는 세 가지 기작, 즉 접합(conjugation)(Lederberg and Tatum 1946b), 형질전환(transformation)(Avery *et al.* 1944), 형질도입(transduction)(Zinder and Lederberg 1952)이 알려져 있다.

접합은 세포와 세포간의 접촉에 의한 과정으로 특수한 plasmid나 transposon이 공여체에서 수여체로 전이되는 과정이다. 이와 관련된 plasmid는 그람 음성균과 양성균에서 널리 알려져 있다. 25종 이상의 서로 다른 그람 음성 균주가 규명되었고(Couturier *et al.* 1988), 이들 plasmid들 중 몇몇은(예, IncP, W, N, C) 전이와 독립적인 복제에 있어서 광범위한 숙주 범주를 보이고(Thomas 1989), 일반적으로 대부분의 그람 음성 균주들간에 전이된다. 형질전환은 세포로부터 이탈된 DNA(free DNA)가 진정세균과 고세균에 의해서 흡수, 융화되어 안정되게 유전되는 기작이라고 정의할 수 있다. 자연적 형질전환(natural transformation)은 세균이 일정한

조건하에서 세포로부터 이탈된 DNA를 받아들일 수 있는 능력(competence)을 발달시키는 과정으로, 이러한 능력은 특수한 유전자의 조절에 의하며, 엄격하게 규제되어진 과정이다. 현재까지 40여종에 속하는 그람 음성균과 양성균, 그리고 *Methanococcus voltae*와 같은 몇몇 고세균이 자연적 형질전환 능력을 지니고 있는 것으로 알려져 있다(Lorenz and Wackernagel 1994). 이러한 세균들 중 몇몇 종은 DNA 흡수에 있어서 무차별적이어서 종간의 거리가 먼 균주들간에도 형질전환에 의한 유전물질의 전이가 가능한 것으로 알려져 있다. 형질도입은 bacteriophage에 의해 수여체와 공여체간에 유전물질이 전이되는 과정으로, 서로 연관이 먼 세균간에는 유전물질의 전이에 기여하지 않는 것으로 생각된다.

오늘날 세균들 간의 유전물질 전이에 대해서는 많은 분자생물학적인 지식이 축적되어 있지만, 자연서식지에서 어떻게 세균들간에 유전적인 연관이 있는가에 대해서는 그리 많이 알려져 있지는 않다. 군집유전학적인 연구에 의한 환경적인 증거(Smith *et al.* 1993)와 항생제 내성 유전자를 갖는 접합성 plasmid 및 transportation

(Baquero and Blazquez 1997; van Elsas 1992)이 신속히 전파되는 사실은 세균이 자연생태계에서 유전자를 교환한다는 것을 암시한다.

재조합 DNA 기술이 발달함에 따라, 세균과 같은 생물을 실험실 내에서 변형시키는 것이 가능하게 되었다. 그러한 유전자 변형미생물(Genetically Modified Microorganisms: GMMs)의 응용적인 측면의 예로 생물학적 비료로 사용되는 균주의 개발, 식물 병원성 균류의 생물학적인 제어, 난분해성 물질의 생물학적인 분해 등을 들 수 있다. GMMs의 생태계 방출은 생물학적 안전성에 관한 문제를 제기하였고, 환경에서 재조합 세균과 재조합 DNA의 운명에 관한 문제는 과학적으로, 그리고 대중들에게도 관심사가 되었다. 고의적으로 또는 우연히 방출된 세균에 의해 토착세균에게로 재조합 DNA가 전이될 수 있는 잠재적인 가능성은 특히 중요하게 인식되었는데, 이는 왜냐하면 재조합 DNA의 지속성은 숙주세균의 생존과는 무관하여 예측불허이고 장기적으로 생태학적인 효과를 줄 수 있기 때문이다. 생태계에서 세균들 간에 HGT의 잠재력을 측정하는 최초 단계로써, 실험실 연구에 근거한 실험이 토양과 수계 모델 생태계를 이용하여 수행되었다(Ashelford *et al.* 1997; Hill and Top 1998). 최근에는 여러 환경요인이 복잡하게 변화되고, 때에 따라서는 각 환경요인들 간에 상승효과를 나타내는 자연환경의 현장에서 세균들 간의 HGT를 평가하는 연구가 수행되었다.

본 글에서는 자연생태계 중 토양과 수계생태계에서 세균들 간에 일어나는 HGT와 관련된 연구들 중 형질전환에 관한 연구들과 HGT와 관련된 생물학적 안전성을 중심으로 정리하였다.

형질전환의 기작

1928년 Griffith는 *Streptococcus pneumoniae* 간에 유전자 전이가 일어나는 것에 대하여 처음으로 언급하였지만 그 기작을 이해하지는 못하였다. 1932년 Alloway가 *Pneumococci*의 추출물로 형질전환을 처음으로 증명하였고, 1944년 Avery, MacLeod, 그리고 McCarty는 세포의 DNA는 세균의 표현형을 전이하고 변화시킬 수 있다는 것을 발표하였다. 이러한 전이요소(DNA)의 규명 이후 세균들간의 접합(Lederberg and Tatum, 1946a, b)과 bacteriophage에 의한 형질전이(Lederberg *et al.* 1951; Zinder and Lederberg 1952)가 계속되어 발전되었다. 형질전환은 가장 먼저 연구된 유전물질 전이 기작으로(Griffith 1928; Avery *et al.* 1944; Katz and Marquis 1991), 자연적 형질전환과 인위적 형질전환으로 구별할

수 있다. 자연적 형질전환은 세균에게서만 일어나며, 이때 수여체 세균은 적정조건 즉, competence가 되면 능동적으로 세포외 DNA를 받아들여 그들 유전정보에 합치게 된다. 하지만 재조합 기술이 발달된 이후로 인위적 형질전환이 원핵세포와 진핵세포에서 사용되었다(Lorenz and Wackernagel 1994). 자연적 형질전환은 DNase와의 반응이 민감하다는 점에서 접합과 형질도입으로 구별된다.

환경에서 형질전환 과정은 Lorenz와 Wackernagel (1994), Mazodier와 Davies (1991)에 의해 자세히 설명되었는데 그 주요과정은 우선 공여체 세균으로부터 DNA가 방출되면 방출된 DNA는 생태계에서 지속성을 나타내야하고, 이 때 형질전환 능력을 갖는 잠재적인 수여체 세균을 만나게 되면 수여체 세균은 방출된 DNA를 세포 내로 진입시키고, 진입된 DNA는 수여체 유전자에 삽입되어 그 형질을 발현하게 된다.

토양 및 수계환경에서 형질전환

기본적으로, 자연 서식지에서 형질전환에 의한 유전자 전이에 두 가지 요인이 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 첫째, 원래부터 형질전환 능력(competence)을 나타내는 세균들을 제외하고, 자연적 형질전환을 할 수 있는 세균은 competence를 나타내야만 한다. 둘째, 세포로부터 이탈된 DNA는 형질전환 능력이 있는 세포(competent cell)에 흡수되어야 한다.

현재까지 40여종 이상의 세균들이 자연적으로 형질전환을 할 수 있는 것으로 알려져 있다(Lorenz and Wackernagel 1994). 더욱이, 수많은 세포의 DNA가 수계 생태계에 존재하고 있는 것으로 알려져 있다. 토양과 수계 퇴적토에서 세포외 효소의 농도를 결정하기는 어렵지만, Ogram 등(1987)은 정밀한 DNA 추출법을 사용하여 담수 퇴적토로부터 약 $1\mu\text{g g}^{-1}$ 의 고분자 DNA를 얻은 적이 있어 자연계에서 형질전환에 의한 유전자 전이의 가능성이 높은 것을 암시하고 있다.

1. Competence 발달에 영향을 주는 환경관련 지표

자연적 형질전환을 하는 대부분의 세균들은 대수기(exponential phase)나 정체기(stationary phase) 같은 특별한 성장기 중에 competence를 나타낸다. 영양분의 변경은 세균의 대사단계를 대수기로 이동시키거나(예, *Acinetobacter calcoaceticus*; Palmén *et al.* 1993) 대수기에서 정체기로 전환되는 동안(예, *Pseudomonas stutzeri*; Lorenz and Wackernagel 1990) 세균이 competence를 얻는데 기여한다. 실험실 내에서 얻은 결과로 미루어 볼

때 여러 세균들에 의해서 나타내는 competence의 발달은 자연환경 조건하에서도 가능한 것으로 여겨진다. 토양과 퇴적토, 물에서 서식하는 미생물인 *Azotobacter vinelandii*는 철이 제한되어있는 배지에서 competence가 발달된다(Page and von Tigerstom 1978; Page and Grant 1987). 따라서, *A. vinelandii*는 철이 제한되어 있는 토양에서 자연적으로 competence를 얻는 것 같다(Page and Grant 1987). 더욱이, *A. vinelandii*가 최적의 competence 발달에 필요한 Ca^{+2} 의 농도는 상호교환될 수 있는 범주에 있고 유리되어 있는 Ca^{+2} 는 토양과 물, 퇴적토에서 종종 발견된다(Lorenz and Wackernagel 1994). 해양미생물 *Pseudomonas*종(전에는 *Vibrio* WJT-1C라고 함)의 분석 결과 competence는 대수기 초기에 시작되어 정체가 시작될 때 최적상태에 도달하는 것으로 밝혀졌다(Frischer *et al.* 1993). 온도의 범주가 4~35°C, 염분의 범주가 12~50‰, 영양분의 농도가 1~200%인 표준 배지에서 competence 발달은 최소 효과를 나타내며, plasmid의 자연적 형질전환은 열대 및 아열대 연안과 같은 조건하에서 일어날 수 있다는 결론에 도달할 수 있다(Frischer *et al.* 1993).

자연 서식지에서 competence의 발달은 잘 알려져 있지 않다. 자연적인 조건과 근접한 상태하에서 competence를 조사하는 첫 단계로써, competence의 발달을 토양 추출물로 준비한 한천배지(Lorenz and Wackernagel 1991, 1992)와 영양분이 첨가된 멸균되지 않은 토양을 함유한 microcosm(Nielsen *et al.* 1997), 그리고 해수시료(Paul *et al.* 1991)에서 분석하였는데, 이러한 연구들은 자연계에서 competence의 발달이 가능하다는 결과를 얻었다.

Lorenz와 Wackernagel(1991, 1992)은 토양의 화학적 환경에서 *P. stutzeri*종(JM301)의 competence의 발달을 분석하였다. 네 개의 서로 다른 토양의 수용성 추출물로 만든 한천배지를 사용하여 형질전환 실험에 이용하였고, 추출물은 탄소와 질소원으로만 제한시켰다. 형질전환율에 미치는 pH와 온도의 영향은 탄소, 질소, 인을 첨가한 조성이 알려진 최소배지와 비교할 수 있었다. 흥미롭게도 질소와 인이 모두 제한된 조건하에서 형질전환율이 290 배 이상 증가하였다. 하지만 질소와 인이 모두 제한되고 탄소가 제한되었을 때는 형질전환은 감지되지 않았다. 형질전환율은 온도가 20~37°C의 범주 내에서는 중요한 영향을 미치지 않았지만, 20°C 이하에서는 형질전환율은 감소하였고 12°C까지 형질전환이 감지되었다. 더욱이, 형질전환율은 pH 7 부근에서 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 현장에서 *P. stutzeri*가 이용할 영양분이 있고 pH가 중성이거나 약알칼리 상태에 있으면

competence의 발달은 높은 가능성이 있음을 암시한다(Lorenz and Wackernagel 1992). 멸균되지 않은 점토질 토양에서 competence가 없는 상태인 *A. calcoaceticus*의 자연적 형질전환은 서로 다른 영양액과 염색체 DNA를 보충하였을 때 일어났다(Nielsen *et al.* 1997). 수계 서식지의 경우, 멸균된 해수와 멸균되지 않은 해수 시료에서 *Pseudomonas*종(전에는 *Vibrio* WJT-1C라고 함)의 plasmid 형질전환은 낮은 수준의 영양분을 첨가하였을 때 증진되었다(Paul *et al.* 1991). 고농도의 영양물질이 첨가된 시료는 첨가하지 않은 시료와 비교할 때 역효과를 나타냈다. 이것은 아마도 *Pseudomonas*종의 경우, 정체가 후기에 competence가 최대로 나타나므로 낮은 수준의 영양물질의 첨가는 휴면상태의 세포를 성장하게 하고 정체에 접어들면 competence 상태에 도달하는 것으로 사료된다. 높은 수준의 영양분을 첨가한 시료는 첨가하지 않은 시료에 비해 좀더 낮은 비율의 세포가 정체가 후기의 상태여서 결과적으로 형질전환율이 감소되는 것으로 생각된다(Paul *et al.* 1991).

2. DNA의 지속성과 유용성에 영향을 주는 환경관련 지표

자연 서식지에서 free DNA의 지속성은 핵산분해에 의한 감소와 무기물과 같은 전하를 띤 표면에 흡착되어 분해로부터 보호되는 것에 의해 영향을 받는다. 하지만 흡착된 DNA는 자연적으로 competence를 갖는 세균들에게 흡수되기 어렵게 되어 형질전환 능력이 상실될 수 있다.

1) DNA의 분해

free DNA는 토양(Romanowski *et al.* 1992; Romanowski *et al.* 1993a; Blum *et al.* 1997)이나 해수(Paul *et al.* 1987; DeFlaun and Paul 1989; Turk *et al.* 1992), 담수환경(Paul *et al.* 1989), 폐수(Phillips *et al.* 1989; Fibi *et al.* 1991) 그리고, 해양퇴적토(Maeda and Taga 1974)에서 신속한 속도로 가수분해된다는 것은 잘 알려져 있다. free DNA의 가수분해는 미생물에 의해 만들어지는 DNase가 산재되어 있으므로, 미생물들은 이러한 free DNA를 생장물질로 이용할 수 있다(Greaves and Wilson 1970; Paul *et al.* 1988). 종종 DNase 생성 미생물은 토양과 수계 세균의 90% 가량을 차지하는 것으로 알려져 있다(Maeda and Taga 1973; Maeda and Taga 1974). 서로 다른 토양에 물을 첨가할 때 세균의 군체수와 DNase의 활성간에는 긍정적인 관계를 갖는다고 Blum 등(1997)이 보고한 적이 있다. 토양에 물을 첨가하면 영양분의 이용을 증가시키고, 따라서 세균의 생장과 더불어 핵산

가수분해 효소의 분비가 촉진된다. 토양에서 원핵세포와 진핵세포의 성장을 항생제와 cycloheximide를 첨가하여 각각 억제시킨 결과 원핵세포로부터 DNase가 기원되는 것이 밝혀졌다. Cycloheximide와 물을 첨가하면 DNase의 생성이 억제되지 않는 반면 항생제와 물을 첨가시키면 DNase의 생성이 거의 완전하게 억제되었다(Blum *et al.* 1997).

토양에서 DNA의 지속성을 분석한 연구에 의하면, 토양에 유입된 DNA는 신속히 가수분해되지만 접종 후 두 달이 지나서도 감지할 수 있다고 했다(Romanowski *et al.* 1992; Romanowski *et al.* 1993a). 자연 상태의 멸균되지 않은 여러 종류의 토양에 [³H]thymidine으로 표시된 plasmid DNA를 접종시키고 나서 60일간 배양 후, trichloroacetic acid에 용해되는 방사능 물질이 27~77% (전체 방사능 물질에 대한 산 용해 물질의 비율을 계산한 값) 증가되었다(Romanowski *et al.* 1992). 일련의 연구에서 Romanowski 등(1993a)은 동일한 토양에서 장기간 배양한 후 plasmid와 관련된 DNA 서열을 감지하기 위하여 PCR을 적용시켰다. 이와 동시에 토양에서 분리한 DNA는 *E. coli*의 전기영동으로 본래 plasmid DNA의 존재를 조사하였다. 60일간 배양 후에 최초 접종한 plasmid DNA의 0.2% 미만이 PCR에 의해 감지되었다. 형질전환 분석법을 이용하여 형질전환 능력이 10,000배 이상 상실된 것이 감지되었다.

서로 상이한 수계 서식지에서 수행된 연구에 의하면, 접종된 DNA는 일반적으로 토양보다 수계 내에서 더 빨리 분해되는 것으로 알려져 있다. 하지만 서로 다른 서식지에서의 분해율은 많은 차이를 나타낸다. 인이 제한된 해수에 P³²로 표시된 plasmid pBR322 DNA를 첨가하면 0.4 μg DNA l⁻¹ hr⁻¹의 속도로 신속히 가수분해된 반면, 인이 제한되지 않은 해수에서는 DNA는 대략 0.002 μg DNA l⁻¹ hr⁻¹의 속도로 분해되었다(Turk *et al.* 1992). 또한 [³H]thymidine으로 표시된 *E. coli* 염색체 DNA를 빈영양성 해양표층수에 접종시키면 12시간 내에 거의 완전하게 분해된 반면(Paul *et al.* 1987), 해양 퇴적토에서는 DNA의 반감기가 140시간으로 계산되었다(Maeda and Taga 1974). [³H]로 표시된 파지 λ DNA를 빈영양 및 부영양성 담수에 첨가한 결과, 반감기는 각각 4.2시간과 5.5시간으로 관찰되었다(Paul *et al.* 1989). 폐수처리시설에서 채취한 시료에 첨가한 pBR322 DNA는 20분내에 완전히 개방형 환상구조와 선형구조로 변형되었다(Phillips *et al.* 1989).

2) DNA의 보호

DNA는 무기물에 흡착된 후 어느 정도 분해로부터 보

호를 받게되는데 이는 DNA가 생태계에서 지속될 수 있는 가장 중요한 요인이라고 생각된다. 대부분의 환경조건하에서 DNA 분자는 음전하를 띤다. 결과적으로, DNA는 점토 무기질과 같이 양전하를 띤 입자의 표면에 흡착하게 된다. DNA 분자는 점토와 같은 음전하를 띤 입자에도 흡착할 수 있다. 효율적인 결합은 칼슘이나 마그네슘 같은 2가 이온에 의해 만들어지는 전하 다리에 의해 이뤄진다(Lorenz and Wackernagel 1987; Lorenz and Wackernagel 1994; Paget and Simonet 1994). DNA 분자와 표면의 음전하간의 반발도 반작용하는 1가 전하의 농도 증가뿐만 아니라 낮아지는 pH 값에 의해 감소된다(Lorenz and Wackernagel 1994). 만일 반발력이 낮아지면 비이온성 반테르발스 힘은 가능할 것 같다(Lorenz and Wackernagel 1987). pH 5 이하에서 음전하를 띤 표면에 흡착은 DNA 분자를 양전하로 이끄는 DNA 염기의 양전하화에 의해 촉진된다(Greaves and Wilson 1969).

점토 무기물의 일종인 montmorillonite (Khanna and Stotzky 1992; Paget *et al.* 1992)나 모래(Aardema *et al.* 1983; Lorenz *et al.* 1988)는 DNA 흡착력이 높으며, 1g의 montmorillonite에 30 mg 상당의 DNA가 흡착되는 것으로 보고되었다(Paget *et al.* 1992). 모래는 이보다는 낮지만 그래도 DNA의 흡착력이 상당한 것으로 알려져 있다. 서로 다른 형태의 멸균된 토양에 대한 DNA의 흡착율은 1.4 mg g⁻¹로 보고되었고(Ogram *et al.* 1994), 해양 퇴적토에서는 약 3.6 μg cm⁻³ (Stewart *et al.* 1991)의 농도로 보고되었다.

여러 연구들에서 DNA가 점토무기질 (Khanna and Stotzky 1992; Paget *et al.* 1992; Gallori *et al.* 1994), 바다 모래(Aardema *et al.* 1983; Lorenz *et al.* 1988; Romanowski *et al.* 1991), 지하수 수원에서 채취한 재료(Romanowski *et al.* 1993a) 뿐만 아니라 자연 상태의 토양(Blum *et al.* 1997)에 흡착되면 핵산분해로부터 보호를 받는다는 것을 시사하였다.

물체에 흡착되면 DNA가 보호받는 것을 분석하기 위하여, Khanna와 Stotzky(1992)는 형질전환 분석법을 적용하였다. Montmorillonite와 DNA 복합체에 DNase I이 첨가된 상태에서 형질전환 능력이 있는 *Bacillus subtilis*를 혼합하여 배양시키면 형질전환은 일어나지만 DNase I이 첨가되지 않은 상태와 비교할 때 90% 이상이 억제되는 것을 알았다. 하지만 동일한 양의 free DNA를 앞의 실험보다 DNase I양이 1/4로 줄인 것과 혼합하여 배양하여도 형질전환이 거의 일어나지 않았다.

흡착된 DNA의 형질전환에 대한 유용성을 살펴보면, 여러 연구들은 자연적으로 형질전환 능력이 있는 세균들의 형질전환이 무기질의 액체 및 고체 계면에서 일어

나는 것을 암시하였다. 즉, 형질전환 능력이 있는 세균들은 무기질 표면으로부터 흡착되어진 DNA를 직접 포획하는 것으로 알려져 있다 (Lorenz *et al.* 1988; Lorenz and Wackernagel 1990; Chamier *et al.* 1993; Romanowski *et al.* 1993b). 이와는 달리, 해양 퇴적토에 DNA를 첨가하였을 경우, 형질전환이 가능한 세균에 의해 거의 이용되지 않는 것을 Stewart 등(1991)이 발표하였다.

토착세균의 형질전환

주어진 환경에서 자연적으로 형질전환 능력을 나타내는 세균의 비율은 잘 알려져 있지 않다. 여러 해양환경에서 종속영양세균에 대한 형질전환 능력을 실험한 결과 30종 중 3종이 plasmid DNA에 의해, 105종 중 15종이 염색체 DNA에 의해 각각 형질전환이 일어나는 것을 알았다. plasmid DNA에 의해 형질전환이 일어나는 종은 *Vibrio*와 *Pseudomonas*로 알려져 있고, 동정이 되지 않은 종에서도 형질전환이 일어나는 것으로 보고되고 있다. 형질전환에 대한 실험실에서의 연구 결과는 많은 수가 보고되었지만, 현장에서의 연구 결과는 단지 몇 편만이 보고되고 있다. 해양환경에서 유전자의 전이는 단지 몇 편만이 보고되어 있지만 유전자 전이가 일어난다는 증거는 여러 조사에서 나타나고 있다. 예를 들어, 해양세균에서의 plasmid의 빈도라든가, 해수에서 DNA의 농도 (DeFlaun *et al.* 1987; Paul *et al.* 1988), 자연적으로 형질전환을 나타내는 세균의 비율 등이 좋은 예이다. 더욱이, 유전자 전이에 영향을 주는 요인에 대한 정보를 제공해 주는 모델 연구가 수행된 바가 있다. 그 결과에 의하면, 해양 생태계의 세균들 간의 복잡한 상호관계에서 유전자 전이가 자연스러운 구성요인으로 작용할 수 있다는 결론을 내릴 수 있다. 담수환경의 경우, 세 곳의 서로 다른 강에서 측정된 형질전환율은 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 의 범주에서 변화하였고 온도가 증가하면 함께 증가하였다. 하지만 현장과 실험실 내에서 측정된 형질전환율간에는 상당한 차이를 보였다 (Williams *et al.* 1996).

한편, 토양환경에서도 현재까지는 형질전환에 관련된 보고는 역시 극히 드문 편이다. 토양환경에서 행한 형질전환과 관련된 생태학적 연구들 중 Lee와 Stotzky (1999)에 의한 연구에서는, *Bacillus subtilis*에서 아미노산의 합성에 관여하는 염색체 DNA의 형질전환율을 6일 동안 측정한 결과, *in vitro*의 경우, $2.8 \pm 0.20 \times 10^{-8} \sim 7.9 \pm 0.65 \times 10^{-6}$ 으로 montmorillonite의 첨가량이 증가할 수로 높아졌다. 한편 chloramphenicol 내성에 관여하는 유전자의 형질전환율은 멸균된 토양에서는 $2.4 \pm 0.60 \times 10^{-8} \sim 1.7 \pm 0.2 \times 10^{-6}$ 으로, 멸균되지 않은 자연상

태의 토양에서는 $4.3 \pm 0.12 \times 10^{-7} \sim 2.0 \pm 0.54 \times 10^{-6}$ 으로 각각 측정되어 *in vitro*에서의 결과와 마찬가지로 montmorillonite의 첨가가 증가할수록 형질전환율은 증가되었다. Gallori 등(1994)도 자연 상태의 토양에서 점토에 부착된 *B. subtilis* DNA의 형질전환에 관해 보고하였다. 염색체 DNA와 여러 형태의 plasmid DNA가 montmorillonite에 부착되어 있었으며, 선형 단량체 plasmid (linear monomeric plasmid DNA)를 제외한 다양한 DNA들은 형질전환 능력이 있는 DNA를 형질전환시킬 수 있었다. 또한 그들의 결과에 의하면, DNA의 3차 구조와 분자 크기는 점토에 달라붙는데 영향을 줄 수 있다고 시사했다. 그리고 달라붙는 DNA는 제한효소의 활동에 대해 보호받고 자연상태의 토양에서 지속될 수 있으며 토양에 첨가된 competence를 갖은 세균에 대해 형질전환을 시켰다.

유전자변형미생물의 방출에 따른 생물학적인 안전성 사례

곡식의 생산을 증진시키기 위해 유전자 변형 미생물의 재조합 DNA를 생태계에 방출시켜 생물학적 토양 증진제로 작용하는 질소고정 공생균인 *Rhizobium meliloti*를 예로 들 수 있다. 유전자 변형 미생물인 *R. meliloti*는 근권(rhizosphere), 특히 숙주 식물인 알파파가 있는 곳에서 긍정적인 반응을 나타내는 토양미생물로 영양분의 이용이 가능하고, 국지적으로 세균의 군집 밀도가 높으며, 고체 표면 등이 있는 조건에서 유전적인 상호관계가 촉진되는 것으로 알려져 있다 (van Elsas 1992; Dröge *et al.* 1998). 만일 GMMs를 대량으로 서로 다른 토양에 방출할 때에 경우에 따라서는 유전자 전이에 유리한 물리화학적 특성을 갖는 토양에 방출될 수도 있다. 숙주 식물이 없을 경우, *R. meliloti*는 상당 기간 토양에서 지속될 수 있다. 그기간 중 GMMs는 유전자 전이를 유도할 수 있는 조건을 만드는 다양한 생물학적 및 무생물학적인 요인에 노출될 수 있다. *R. meliloti*에 의한 유전자 전이 연구는 좀더 자연상태에 가까운 조건에서 실험을 하여 토양과 숙주식물인 알파파의 뿌리에서 접합에 의한 유전자 전이가 일어나는 것을 확립한 바가 있다 (Pretorius-Güth *et al.* 1990). 따라서 자연 조건에서 형질전이나 형질전환이 일어날 가능성도 얼마든지 가정할 수 있다. 재조합 DNA의 전이를 최소화시키기 위해 재조합 DNA를 원래숙주에서는 킬러세포와 결합시켜 불활성화하게 하고 수용체에 전이 될 때만 활성화하게 하는 연구가 진행되었다. 하지만 이러한 전략은 재조합 DNA가 숙주세포에서, 다른 구조유전자가 돌연변이에

의해 불활성화되는 것과 마찬가지로, 돌연변이가 일어나지 않으리라는 것을 보장할 수 없기 때문에 어렵다.

결 론

모델 시스템과 현장에서 수행된 유전자 전이 실험은 어떤 조건하에서 유전자는 전이될 준비가 되어 있는 것을 알게 되었다. 자연계에서 미생물간에는 광범위한 유전자의 흐름이 있지만, 전이 단계나 숙주에 전이된 것이 유지되는 단계에서 restriction/modification이나 mismatch repair system과 같은 자연적인 장애물이 존재하여 유전자의 교환이 자유롭거나 무제한적으로 일어나는 것을 막아 준다. 생태학적으로 GMMs로부터 재조합 DNA가 토착 미생물에 전이될 수 있는 잠재력에 대한 문제가 주요 현안이 되었는데, 이는 전이된 DNA가 방출된 세균의 생태학적인 적응력을 변화시켜 생물학적 안전성의 문제를 야기할 수 있기 때문이다. 물론, 방출된 GMMs로부터 DNA가 전이되는 것을 막을 방법은 없지만 이러한 전이가 일어나게 되면 아주 낮은 빈도로 일어나는 것이 명확하다. 하지만 재조합 DNA가 토착 미생물에 전이되는 빈도가 낮다는 것은 그리 중요하지 않다. 왜냐하면, 비록 낮은 빈도로 전이되더라도 유리한 조건을 만나게 되면 전이된 유전자는 선택될 수 있기 때문이다. 그러한 사실은 공생 유전자를 비공생 세균에게로 전이하는 *M. luti*종에서 밝혀진 바가 있다(Sullivan *et al.* 1995).

지금까지 자연생태계에서 세균간에 유전자를 교환하는 방법에 대한 연구가 상당히 이루어졌음에도 불구하고 앞으로의 연구에서 이와 관련된 자연환경에서 작용하는 선택력과 같은 많은 문제들이 해결되어야 할 과제로 남아 있다.

사 사

본 연구는 2000년도 환경부 G7연구과제 “인공습지 조성 및 갯벌에 의한 오염정화기술 개발”의 연구비 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사드린다.

참 고 문 헌

- Aardema BW, Lorenz MG & WE Krumbein (1983) Protection of sediment-adsorbed transforming DNA against enzymatic inactivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 417-420.
- Ashelford KE, JC Fry, MJ Day, KE Hill, MA Learner, JR Marchesi, CD Perkins & AJ Weightman (1997) Using microcosms to study gene transfer in aquatic habitats. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 81-93.
- Avery OT, CM MacLeod & M McCarty (1944) Studies on the chemical nature of the substance-inducing transformation of pneumococcal types. *J. Exp. Med.* **79**: 137-158.
- Baquero F & J Blazquez (1997) Evolution of antibiotic resistance. *Trends Ecol. Evol.* **12**: 482-487.
- Blum SAE, MG Lorenz & W Wackernagel (1997) Mechanism of retarded DNA degradation and prokaryotic origin of DNases in nonsterile soils. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**: 513-521.
- Chamier B, MG Lorenz & W Wackernagel (1993) Natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* by plasmid DNA adsorbed on sand and groundwater aquifer material. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1662-1667.
- Couturier M, F Bex, PL Bergquist & WK Maas (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol. Rev.* **52**: 375-395.
- DeFlaun MF, JH Paul & WH Jeffrey (1987) Distribution and molecular weight of dissolved DNA in subtropical estuarine and oceanic environments. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* **38**: 65-73.
- Dröge M, A Pühler & W Selbitschka (1998) Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. *J. Biotechnol.* **64**: 75-90.
- van Elsas JD (1992) Antibiotic resistance gene transfer in the environment: an overview. pp. 17-39. In *Genetic interactions among microorganisms in the natural environment* (Wellington EMH & JD van Elsas eds). Pergamon, Oxford.
- Fibi MR, M Brker, R Schulz, R Johannsen & G Zettlmeissl (1991) Inactivation of recombinant plasmid DNA from a human erythropoietin-producing cell mouse line grown on a large scale. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 622-630.
- Frischer ME, JM Thurmond & JH Paul (1993) Factors affecting competence in a high frequency of transformation marine *Vibrio*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 753-761.
- Gallori E, M Bazzicalupo, L Dal Canto, R Fani, P Nannipieri, C Vettori & G Stotzky (1994) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on clay in non-sterile soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 119-126.
- Greaves MP & MJ Wilson (1969) The adsorption of nucleic acids by montmorillonite. *Soil Biol. Biochem.* **1**: 317-323.
- Greaves MP & MJ Wilson (1970) The degradation of nucleic acids and montmorillonite-nucleic acids com-

- plexes by soil microorganisms. *Soil Biol. Biochem.* **2**: 257–268.
- Griffith F (1928) Significance of pneumococcal types. *J. Hyg.* **27**: 113–159.
- Haas D & B Holloway (1976) R factor variants with enhanced sex factor activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* **144**: 243–251.
- Hill KE & EM Top (1998) Gene transfer in soil systems using microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**: 319–329.
- Katz LS & JK Marquis (1991) The toxicology of genetically engineered microorganisms. pp. 51–63. In Risk analysis in Genetic Engineering (Levy MA & HS Strauss eds). McGraw-Hall. New York.
- Khanna M & G Stotzky (1992) Transformation of *Bacillus subtilis* by DNA bound on montmorillonite and effect of DNase on the transforming ability of bound DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1930–1939.
- Lederberg J & EL Tatum (1946a) Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **11**: 113–114.
- Lederberg J & EL Tatum (1946b) Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* **158**: 558.
- Lederberg J, EM Lederberg, NE Zinder & ER Lively (1951) Recombination analysis of bacterial heredity. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **16**: 413–443.
- Lee GH & G Stotzky (1999) Transformation and survival of donor, recipient, and transformants of *Bacillus subtilis* in vitro and in soil. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 1499–1508.
- Lorenz MG, BW Aardema & W Wackernagel (1988) Highly efficient genetic transformation of *Bacillus subtilis* attached to sand grains. *J. Gen. Microbiol.* **134**: 107–112.
- Lorenz MG & W Wackernagel (1987) Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 2948–2952.
- Lorenz MG & W Wackernagel (1990) Natural genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* by sand-adsorbed DNA. *Arch. Microbiol.* **154**: 380–385.
- Lorenz MG & W Wackernagel (1991) High frequency of genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in soil extracts supplemented with a carbon/energy and phosphorus source. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1246–1251.
- Lorenz MG & W Wackernagel (1992) Simulation of genetic transformation of *Pseudomonas stutzeri* in extracts of various soils by nitrogen or phosphorus limitation and influence of temperature and pH. *Microb. Release.* **1**: 173–176.
- Lorenz MG & W Wackernagel (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* **58**: 563–602.
- Maeda M & N Taga (1973) Deoxyribonuclease activity in seawater and sediment. *Mar. Biol.* **20**: 58–63.
- Maeda M & N Taga (1974) Occurrence and distribution of deoxyribonucleic acid-hydrolyzing bacteria in sea water. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **14**: 157–169.
- Mazodier P & J Davies (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **25**: 147–171.
- Nielsen KM, AM Bones & JD van Elsas (1997) Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3972–3977.
- Ogram AV, ML Mathot, JB Harsh, J Boyle & CA Pettigrew Jr (1994) Effect of DNA polymer length on its adsorption to soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 393–396.
- Ogram A, GS Saylor & T Barkay (1987) The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *J. Microbiol. Methods* **7**: 57–66.
- Page WJ & von M Tigerstom (1978) Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can. J. Microbiol.* **24**: 1590–1594.
- Page WJ & GA Grant (1987) Effect of mineral iron on the development of transformation competence in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**: 257–261.
- Paget E, LJ Simonet & P Monrozier (1992) Adsorption of DNA on clay minerals: protection against DNase I and influence on gene transfer. *FEMS Microbiol. Lett.* **97**: 31–40.
- Paget E & P Simonet (1994) On the track of natural transformation in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **15**: 109–118.
- Palmén R, B Vosman, P Buijsman, CKD Breek & KJ Hellingwerf (1993) Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 295–305.
- Paul JH, WH Jeffrey & MF DeFlaun (1987) Dynamics of extracellular DNA in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 170–179.
- Paul JH, MF DeFlaun & WH Jeffrey (1988) Mechanisms of DNA utilization by estuarine bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1682–1688.
- Paul JH, WH Jeffrey, AW David, MF DeFlaun & LH Cazares (1989) Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic environments of southwest Florida. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1823–1828.
- Paul JH, ME Frischer & JM Thurmond (1991) Gene transfer in marine water column and sediment microcosms by natural plasmid transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1509–1515.
- Phillips SJ, DS Dalgarn & SK Young (1989) Recombinant DNA in wastewater: pBR322 degradation kinetics. *J.*

- Water Pollut. Control Fed.* **61**: 1588-1595.
- Pretorius-Güth I-M, A Pühler & R Simon (1990) Conjugal transfer of megaplasmid 2 between *Rhizobium meliloti* strains in alfalfa nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2354-2359.
- Romanowski G, MG Lorenz & W Wackernagel (1991) Adsorption of plasmid DNA to mineral surfaces and protection against DNaseI. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1057-1061.
- Romanowski G, MG Lorenz, G Sayler & W Wackernagel (1992) Persistence of free plasmid DNA in soil monitored by various methods, including a transformation assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3012-3019.
- Romanowski G, MG Lorenz & W Wackernagel (1993a) Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3438-3446.
- Romanowski G, MG Lorenz & W Wackernagel (1993b) Plasmid DNA in a groundwater aquifer microcosm-adsorption, DNase resistance and natural genetic transformation of *Bacillus subtilis*. *Mol. Ecol.* **2**: 171-181.
- Smith JM, NH Smith, M O'Rourke & BG Spratt (1993) How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**: 4384-4388.
- Steffen RJ, J Gokoyr, AK Bej & RM Atlas (1988) Recovery of DNA from soils and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2908-2915.
- Stewart GS, CD Sinigalliano & KA Garko (1991) Binding of exogenous DNA to marine sediments and the effect of DNA/sediment binding on natural transformation of *Pseudomonas stutzeri* strain ZoBell in sediment columns. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 1-8.
- Sullivan JT, HN Patrick, WL Lowther, DB Scott & CW Ronson (1995) Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 8985-8989.
- Thomas CM (1989) *Promiscuous plasmids of Gram-negative bacteria*. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, London.
- Trevors JT, LS van Elsas, LS van Overbeek & ME Starodub (1990) Transport of genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 401-408.
- Turk V, A-S Rehnstam, E Lundberg & A Hagström (1992) Release of bacterial DNA by marine nanoflagellates, an intermediate step in phosphorus regeneration. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3744-3750.
- Williams HG, MJ Day, JC Fry, GJ Stewart (1996) Natural transformation in river epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2994-2998.
- Zinder ND & J Lederberg (1952) Gene exchange in *Salmonella*. *J. Bacteriol.* **64**: 679-699.

Horizontal Gene Transfer among Bacteria by Transformation in Soil and Aquatic Environments

Geon-Hyoung Lee

(Dept. of Biology, College of Natural Sciences, Kunsan National University, 573-701 Jeon-Buk, Korea)

Abstract - Laboratory studies have revealed that naturally transformable bacteria develop competence under in situ conditions. Thus, the occurrence of competent bacteria in the environment can be considered as a certainty. The persistence of free DNA in natural habitats is influenced by nucleolytic degradation and protection from degradation by adsorption to minerals. Although DNA seeded into natural environment was hydrolysed at substantial rates, but was still detectable at low levels after even several weeks. Compared to the number of laboratory based studies, only a few data have been published dealing with transformation of bacteria in the field. Recently, the potential transfer of recombinant DNA (rDNA) from deliberately or accidentally released bacteria to indigenous microbes has raised biosafety issues, since the persistence of rDNA becomes independent of the survival of its original host and leads to unpredictable, long-term ecological effects. The aim of the present review is to summarise recent literature on horizontal gene transfer (HGT) by transformation among bacteria in both soil and aquatic habitat and special emphasis is placed on recent reports which have addressed HGT among bacteria in the field. [Transformation, Horizontal gene transfer (HGT), recombinant DNA (rDNA), Genetically modified microorganisms (GMMs), Biosafety]