

## 유전자 조작기법으로 변형시킨 Km<sup>r</sup> 유전자의 담수 환경에서의 전이 및 행방

김치경 · 이성기

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

## Conjugal Transfer and Fate of the Genetically Engineered Km<sup>r</sup> Gene in Freshwater Environments

Kim, Chi-Kyung and Sung-Gie Lee

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Chungbuk National University,  
Cheongju 360-763, Korea

**ABSTRACT:** A kanamycin resistance(Km<sup>r</sup>) gene was studied for its transfer in natural freshwater environments by using the natural bacterial isolate(NI) of DK1 and the DKC601 strain, Km<sup>r</sup> plasmid of which was genetically engineered from the NI strain. The transfer frequency of the Km<sup>r</sup> gene and rearrangement of the Km<sup>r</sup> plasmid were compared between the genetically engineered microorganism(GEM) and the NI parental strain by conjugation with the same recipient strain. The transfer frequency of the Km<sup>r</sup> gene was about  $9.1 \times 10^{-12}$ ~ $1.8 \times 10^{-11}$  in both the GEM and NI strains at 5 to 10°C, but the frequency of the NI was about 10 times higher than that of the GEM at 20 to 30°C. The Km<sup>r</sup> plasmid in the transconjugants obtained by conjugation of the NI with the MT1 strain as a recipient showed a lot of rearrangement, but the Km<sup>r</sup> plasmid transferred from the GEM was stable without alteration of its size. When the MT2 strain was used as a recipient, however, such a rearrangement of the Km<sup>r</sup> plasmid was observed in the transconjugants obtained from the GEM as well as the NI strain. In those transconjugants obtained from different mating pairs and water environments, the plasmid were appeared to decrease in their number as the period of conjugation time was prolonged, but only the Km<sup>r</sup> plasmid transferred from the GEM kept having its size of 52 kb. Therefore, the Km<sup>r</sup> gene was transferred at the same rate from the GEM and NI strains in natural freshwater environment, but the gene of the GEM strain was more stable than the NI during conjugation and the Km<sup>r</sup> plasmid was rearranged by changing the recipient strain for conjugation in any water environments.

**KEY WORDS** □ Genetically engineered bacteria, Km<sup>r</sup> gene, Conjugal transfer, Fate, Freshwater

수계나 토양 등의 자연환경에서 일어나는 유전자의 전이는 미생물들 사이에 유전 정보를 전달시킨다는 관점에서 유전생태학적으로 중요한 의미가 있다. 세균들 사이에서 일어나는 유전자의 전이는 conjugation, transformation, transduction 등의 방법에 의하여 이루어진다는 것이 널리 알려져 있으나, 특히 하폐수와 같은 수계생태계에서의 항생물질 내성유전자의 전이는 conjugation에 의한 연구가 많이 보고되었다. Mach와 Grimes(1982)는 하폐수에서 ampicillin(Ap), chloramphenicol(Cm), streptomycin(Sm), tetracycline(Tc) 등의 R-plasmid가  $4.9 \sim 7.5 \times 10^{-5}$ 의

빈도로 전이되었다고 보고한 바 있고, Mancini 등(1987)은 conjugative R gene의 전이와 nonconjugative plasmid의 mobilization이 하폐수의 조성, 미생물의 밀도, 유속 등에 의하여 영향을 받는다고 보고하였다. 그리고 Bale 등(1988)은 하천수의 환경에서 수은내성 plasmid가  $2.5 \times 10^{-6} \sim 2.2 \times 10^{-1}$ 으로 전이되었다고 보고한 바 있다. 최근에는 담수 및 해수에서 extracellular DNA의 검출방법이 개발됨으로써(Paul과 David, 1989), 수계환경에 존재하는 plasmid 뿐만 아니라 free DNA에 의한 유전 정보의 전이와 그들의 행방과 기능에 대한 연구가 집중되고 있다(Paul 등,

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

Strains and plasmids	Relevant characteristics	Remarks
<b>Bacteria</b>		
DK1 ( <i>E. coli</i> )	Km <sup>r</sup> Ap <sup>s</sup> Tc <sup>s</sup> Cm <sup>r</sup>	Natural isolate, donor
DKC601 ( <i>E. coli</i> ) <sup>a</sup>	Km <sup>r</sup> Ap <sup>s</sup> Tc <sup>s</sup> Cm <sup>r</sup>	Genetically engineered strain, donor
MT1 ( <i>Prov. rettseri</i> )	Km <sup>s</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Natural isolate, recipient
MT2 ( <i>E. coli</i> )	Km <sup>s</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Natural isolate, recipient
C600 ( <i>E. coli</i> )	Km <sup>s</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>s</sup> Cm <sup>s</sup>	ATCC 23724, competent host
DKC600 ( <i>E. coli</i> ) <sup>b</sup>	Km <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> Tc <sup>s</sup> Cm <sup>r</sup>	Transconjugant
<b>Plasmids</b>		
pDK101	Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Plasmid in DK1
pDT529 <sup>c</sup>	Km <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup>	Recombinant plasmid in DKC601
pKT230	Km <sup>r</sup> Cm <sup>s</sup> Sm <sup>r</sup>	Vector

<sup>a</sup>Made by transformation of the recombinant plasmid of pDT529 into *E. coli* C600.

<sup>b</sup>Made by conjugation of DK1 with *E. coli* C600 for isolation of PDK101.

<sup>c</sup>Made by ligation of *EcoRI* fragments of pDK101 and the vector of pKT230.

Km, kanamycin; Ap, ampicillin; Tc, tetracycline; Cm, chloramphenicol; Sm, streptomycin.

1989).

근래에는 유전공학적인 기법이 대부분의 생명과학 실험실에서 보편화되었고, 유전자조작 기술로 제조된 미생물들(genetically engineered microorganisms; GEMs)이 여러 가지 원인으로 인하여 자연계에 유출되는 사례가 많아져 (Awong 등, 1990; McPherson과 Gealt, 1986) 그 미생물 뿐 아니라 그들이 가지고 있는 유전자의 전이 동태에 대한 관심이 커지게 되었다. 또 GEM 균주들이 자연계로 방출되었을 때 인위적으로 변형시킨 genetic element들이 얼마나 안정성을 유지하고, 어떻게 토착 미생물들에 영향을 주며 소진되는지에 관한 연구는 매우 중요한 것이다 (Scanferlato 등, 1989). 그러나 이와 같은 문제에 대해서는 주로 GEM들의 자연계 도입 및 회수와 그 생존성에 관한 연구가 주로 이루어졌으며 (Trevors와 Van Elsas, 1989; Van Elsas 등, 1989), 유전자의 상호작용이나 probe를 이용하는 유전자 분석 등에 관한 연구는 별로 많지 않다 (Walia 등, 1990; Paul 등, 1989; Van Elsas 등, 1988; 1990).

Gealt 등(1985)과 McPherson과 Gealt(1986)는 *E. coli*의 pBR322와 pBR325가 coinubation에 의하여 전이된 뒤 recombinational rearrangement가 일어나 plasmid profile이 크게 변화되었다고 했다. 그리고 자연환경에서 Tn5와 plasmid가 제조된 *E. coli* GEM을 토양환경에서 *Rhizobium*에 conjugation시켰을 때 그 전이 빈도가  $1.8 \times 10^{-4}$ 까지 높아졌다고 Richaume 등(1989)은 보고하였다. Trevors 등(1990)은  $\delta$ -tox gene을 삽입시킨 Tn5를 *Pseudomonas*에 도입한

GEM 균주를 soil microcosm에 접종시켜 10일간 배양했을 때, 토양속의 물의 양과 유속에 따라 transport되는 정도가 달라졌으나, 유전자 조작으로 변형시킨 유전자는 매우 안정된 상태로 검출되었다고 보고하였다. 본 연구실에서도 20~30°C의 자연 수계 환경에서 conjugation에 의한 GEM 유전자의 전이에 대하여 연구한 바 있다 (Lee와 Kim, 1989).

그러므로 본 연구에서는 자연계로부터 분리한 natural isolate(NI)의 kanamycin(Km)에 대한 내성 plasmid를 유전공학 기법으로 변형시킨 genetically engineered microorganism(GEM)을 제조한 후 그들의 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이 실험을 저온의 자연 수계 환경에서 conjugation 방법으로 시행함으로써, GEM과 NI 균주로부터 Km<sup>r</sup> 유전자가 전이되는 빈도를 비교 연구하였고, conjugation 과정을 통하여 Km<sup>r</sup> plasmid의 rearrangement를 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 실험균주 및 Plasmids

본 연구에서는 Standard Methods(1989)의 세균 분리 방법에 따라 청주시 무심천의 하천수로부터 분리한 균주(NI)인 DK1, MT1, MT2 균주들(Lee와 Kim, 1989)과 함께, DK1으로부터 Silhavy 등(1984)과 Kawamura 등(1983)의 방법에 따라 Km<sup>r</sup> 유전자를 유전공학 기법으로 변형시킨 균주(GEM)인 DKC601을 conjugation 실험에 사용하였다. 이들의 항생물질 내성은 Kim 등(1986)이 기술한 방법에 따라 측정하

**Table 2.** Conditions of the natural river water during conjugation

Conjugation time(h)	Water temp. (°C)	Water depth(cm)	pH	Conductivity (μmhos/cm)	Turbidity (NTU)
0	10-10.5	20-25	8.2	270-300	20
6	7.5-8	20-25	8.3	270-300	18
12	5	20-25	8.0	270-300	16
18	10	20-25	8.4	270-300	21
24	10	20-25	8.2	270-300	22

였으며, 그 특성은 Table 1에서와 같다.

#### Km<sup>r</sup>유전자를 변형시킨 GEM의 제조

자연계로부터 분리한 DK1 균주(Km<sup>r</sup>Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>)를 Kim과 Lee(1989a)가 기술한 방법에 따라 *E. coli* C 600(Km<sup>r</sup>Ap<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>)에 *in vivo* cloning시킨 후 Km (100 μg/ml), Cm(10 μg/ml) 그리고 Ap(20 μg/ml)를 첨가한 Luria-Bertani(LB) agar plate에서 DKC600을 선발하였다. DKC600에서는 pDK101 plasmid(Km<sup>r</sup>-Cm<sup>r</sup>)을, 그리고 *Pseudomonas putida* KT2440에서는 pKT230 vector plasmid(Km<sup>r</sup>Sm<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>)를 Sambrook 등(1989)과 Perbal(1989) 등의 방법에 따라 순수분리하여 *Eco*RI(Promega Co., Madison, WI)으로 digestion하였다. *Eco*RI으로 digestion한 이들 plasmid의 절편을 Promega Manual(Promega Co., Madison, WI)과 Silhavy 등(1984)의 방법에 따라 T4 DNA ligase로 처리한 후 *E. coli* C600 competent cell에 transformation하였다. 그리고 50~100 μg/ml의 Km과 10 μg/ml의 Cm 등이 포함된 LB agar plate에서 cloned cell을 선발함으로써 Km<sup>r</sup> plasmid인 pDT529를 포함하는 GEM인 DKC601 균주를 제조하였다.

#### 하천수의 환경조건

Km<sup>r</sup> 유전자의 전이를 자연의 수계환경에서 실험하기 위하여, 청주시 무심천의 하천수에 대한 환경조건을 Standard Methods(1989)에 따라 분석하였다. Conjugation을 하는 동안 일정시간에 따라 수계의 온도를 측정하였고, pH는 portable pH meter(Orion SA520, Boston, MA)로, conductivity는 S-C-T meter (Yellow Springs Inst. Co., Model 33, Yellow Springs, OH)로, 그리고 turbidity는 turbidimeter(model 83 91-35, Cole Parmer Co.)로 측정하였으며, 그 하천수의 환경조건은 Table 2에서와 같다.

#### Conjugation에 의한 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이

자연의 수계환경에서 유전자조작 기법으로 변형시킨 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이실험은 Lee와 Kim(1989)의 방법에 따라 시행하였고, 그 결과를 실험실 환경에서의 전이 빈도와 비교 분석하였다. 각각의 실험에서는 GEM인 DKC601과 NI인 DK1를 donor로 하고 NI인 MT1과 MT2를 recipient로 mating pair를 조

합하여 수온이 상이한 계절에 따라 무심천 하천수에서 24시간 동안 conjugation시켰다. 멸균한 무심천의 하천수를 cellulose dialysis sac(Sigma Co., St. Louis, MO) 속에 각각 10 ml씩을 넣고 LB broth에서 overnight 배양한 각 실험균주를  $8.2 \times 10^{11} \sim 4.4 \times 10^{12}$ /ml로 접종하여 봉한 후 무심천의 하천수에 정치하여 conjugation 실험을 하였다. 일정시간에 따라 시료가 든 dialysis sac을 회수하여 ice box에 담아 30분 이내에 실험실로 옮겨와 transconjugant를 선발하였다. Transconjugant는 50 μg/ml씩의 Km, Ap, Tc 등의 항생물질(Sigma Co.)이 들어있는 LB agar plate에서 counterselection 방법으로 선발하였다. 그리고 transconjugants의 전이 빈도는 Kim과 Lee(1989)의 방법에 의하여 계산하였다. 그리고 멸균한 하천수와 LB broth를 매질로 사용한 실험실 환경에서의 conjugation은 균주의 접종량이나 pH 등의 조건을 무심천에서와 동일하게 조절하여 비교 실험하였다.

#### Plasmid의 분리 및 전기영동

Donor 및 recipient로 사용한 균주들과 함께 conjugation에 의하여 얻은 각각의 transconjugants에 대하여 Km<sup>r</sup> 유전자를 확인하기 위하여, Silhavy 등(1984)과 Sambrook 등(1989)의 방법을 응용하여 plasmid DNA를 순수분리하여 전기영동하였다. 각각의 transconjugant 들은 Km, Ap, Tc를 각각 50 μg/ml씩을 첨가한 5 ml 또는 500 ml의 LB broth에서 20 시간 정도 배양한 후 microcentrifuge(Eppendorf 5414) 또는 high speed centrifuge(Hitachi)로 원심 분리하였다. 회수된 균체들은 100 μl~10 ml의 glucose-EDTA용액(50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0)에 현탁하고, 이어 0.2 N NaOH, 1% SDS 용액을 200 μl~20 ml씩 더하여 혼합한 후 5 M potassium acetate를 150 μl~10 ml를 가하여 부드럽게 vortex하고 5분간 냉장시켰다. 그 후 4°C에서 원심분리하여 상층액을 새 시험관에 옮겨 ethanol 또는 isopropanol을 첨가하여 DNA를 농축시킨 후 TE buffer 또는 멸균한 증류수에 용해시켰다. Plasmid DNA를 더 순수하게 분리하기 위해서는 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 EtBr-CsCl을 사용

하여 초고속 원심분리법을 병행하였으며 순수분리된 DNA는 4°C에 보관하였다. 전기영동은 0.6~1.2%의 agarose gel(Sigma, type II)과 TBE buffer에서 5 v/cm 이하로 전개시켰다.

## 결과 및 고찰

### 시험균주 및 Km<sup>r</sup> plasmid의 특성

본 실험에서 donor로 사용한 균주 중 NI인 DK1은 Table 1에서와 같이 *E. coli*로서 1,500 µg/ml의 Km과 12.5 µg/ml의 Cm에 각각 내성을 가지고 있었지만 Ap와 Tc에는 내성이 전혀 없었다. DK1으로부터 제조한 GEM인 DKC601은 1,600 µg/ml의 Km과 10 µg/ml의 Cm에 각각 내성을 나타냈고, Ap와 Tc에는 DK1과 같이 내성이 없었다.

그리고 recipient로 사용한 NI 균주인 MT1과 MT2는 각각 *Prov. rettseri*와 *E. coli*로써, 2,500 µg/ml의 Ap와 185 µg/ml의 Tc 그리고 60 µg/ml의 Cm에는 각각 내성을 나타내었고 Km에는 내성이 없었다. Km<sup>r</sup> 유전자를 가지고 있는 pDK101은 NI인 DK1에서는 약 70 kb의 크기였으며 1,500 µg/ml의 Km과 12.5 µg/ml의 Cm에 각각 내성을 나타내었다. 유전자조작 기법으로 제조한 GEM이 가지고 있는 pDT529는 약 52 kb로써, vector plasmid인 pKT230이 가지고 있던 Sm에 대한 내성은 없어졌고 1,600 µg/ml의 Km과 10 µg/ml의 Cm에 각각 내성을 나타내었다.

이 균주들이 가지고 있는 plasmid들을 전기영동 방법으로 확인한 결과는 Fig. 1에서와 같다. Lane A는 NI 균주인 DK1으로서 약 70 kb 정도의 pDK101 plasmid(Km<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>)을 가지고 있었으며, DK1 균주를 plasmid가 없는 *E. coli* C600(lane D)에 conjugation시켜 얻은 DKC600(lane B)에서는 pDK101이 그대로 전이되어 나타났다. 이와 같이 *in vivo* cloning으로 얻은 DKC600에서 pDK101을 순수분리하고 pKT230과 함께 *Eco*RI로 digestion하여 재조합시킨 후, *E. coli* C600에 transformation함으로써 얻은 GEM 균주인 DKC601(lane C)은 11.9 kb의 pKT230이 아닌 52 kb의 recombinant plasmid인 pDT529(Km<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>)를 포함하고 있는 것을 확인하였다.

### Km<sup>r</sup> 유전자의 전이

Natural isolate 뿐만 아니라 GEM 균주를 donor로 이용하여 conjugation에 의한 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이 빈도를 Table 2에서와 같은 5~10°C의 자연 수계환경에서 실험하였으며, 그 결과를 20°C와 30°C에서의 전이빈도와 비교 분석하였다. 수온이 5~10°C의 자연수계환경에서 DKC601의 pDT529와 DK1의 pDK101에 의한 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이 빈도를 24시간 동안 비교 실험한 결과는 Table 3에서와 같다. Recipient로 MT1을 사용했을 경우에는 GEM의 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이

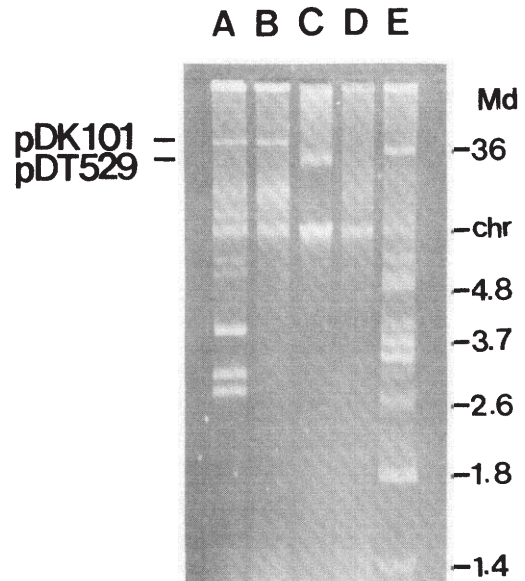


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmids in the natural bacterial isolate and the genetically engineered strain.

Lanes: A, DK1; B, DKC600; C, DKC601; D, *E. coli* C600; E, *E. coli* V517.

빈도가 NI에 비하여 다소 낮았지만, 두 경우 모두 6 시간부터 약  $9.1 \times 10^{-12}$ ~ $1.8 \times 10^{-11}$ 의 전이 빈도를 나타냈다. 그러나 recipient가 MT2인 경우에는 GEM이나 NI에서 모두 전이 빈도가  $1.0 \sim 4.5 \times 10^{-12}$  정도였고, NI에서는 18시간 이후에 전이가 일어났으나 GEM에서는 6시간부터 transconjugant가 나타났다.

이에 비하여 멸균한 하천수(Table 4)나 LB broth (Table 5)를 사용하여 실험실 환경에서 recipient를 MT1으로 하여 실험했을 때에는 GEM과 NI의 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이가 모두 6시간 이후부터 일어났다. 멸균 하천수에서의 전이 빈도가 자연의 하천수에서보다 더 높았고, 또 LB broth에서의 전이 빈도는 멸균 하천수에서보다 더욱 높게 나타났다. Mach와 Grimes (1982)는 하폐수에서 Ap<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup>Sm<sup>r</sup> plasmid가  $4.9 \sim 7.5 \times 10^{-5}$ 의 빈도로 전이된다고 했으며, Kim 등(1986)도 하폐수에서 Ap<sup>r</sup>Cm<sup>r</sup>Tc<sup>r</sup> plasmid의 전이 빈도가  $1.0 \times 10^{-9} \sim 1.2 \times 10^{-7}$  정도였다고 보고한 바 있다. 또 Gowland와 Slater(1984)나 Schilf와 Klingmüller(1983)는 멸균한 pond water를 dialysis sac에 넣어 연못에서 실험하였을 때 plasmid가 매우 낮은 빈도로 전이되었다고 보고하였다. 이와 같은 plasmid의 전이 빈도는 실험균주 뿐 아니라 수계환경에 따라 다르게 나타났다. 그러나 실험실 환경에서는 GEM의 전이



**Table 3.** Conjugal transfer of *Km<sup>r</sup>* gene of genetically engineered strain and its parental bacterial isolate in the natural river water at 5~10°C

Mating pairs		Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for(h):			
Donor	Recipient		6	12	18	24
DKC601 <sup>a</sup>	MT1	$4.4 \times 10^{12}/1.4 \times 10^{12}$	$4.5 \times 10^{-12}$	$6.8 \times 10^{-12}$	$1.8 \times 10^{-11}$	$2.1 \times 10^{-12}$
DK1 <sup>b</sup>	MT1	$2.2 \times 10^{12}/1.4 \times 10^{12}$	$3.2 \times 10^{-11}$	— <sup>c</sup>	$9.1 \times 10^{-12}$	$1.8 \times 10^{-11}$
DKC601	MT2	$4.4 \times 10^{12}/8.2 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{-12}$	$2.3 \times 10^{-12}$	$2.3 \times 10^{-12}$	$1.5 \times 10^{-12}$
DK1	MT2	$2.2 \times 10^{12}/8.2 \times 10^{11}$	—	—	$4.5 \times 10^{-12}$	$1.7 \times 10^{-12}$

<sup>a</sup>Genetically engineered strain from DK1.<sup>b</sup>Bacterial strain isolated from the natural environment.<sup>c</sup>No transconjugant was detected.**Table 4.** Conjugal transfer of *Km<sup>r</sup>* gene of genetically engineered strain and its parental bacterial isolate in the auto-claved river water under laboratory conditions at 9~10°C.

Mating pairs		Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for(h):			
Donor	Recipient		6	12	18	24
DKC601 <sup>a</sup>	MT1	$4.4 \times 10^{12}/1.4 \times 10^{12}$	$9.1 \times 10^{-12}$	$1.5 \times 10^{-10}$	$5.2 \times 10^{-11}$	$1.8 \times 10^{-10}$
DK1 <sup>b</sup>	MT1	$2.2 \times 10^{12}/1.4 \times 10^{12}$	— <sup>c</sup>	$5.5 \times 10^{-11}$	$6.4 \times 10^{-11}$	$5.0 \times 10^{-11}$
DKC601	MT2	$4.4 \times 10^{12}/8.2 \times 10^{11}$	—	—	$1.3 \times 10^{-12}$	$1.8 \times 10^{-12}$
DK1	MT2	$2.2 \times 10^{12}/8.2 \times 10^{11}$	—	—	$1.0 \times 10^{-12}$	$1.2 \times 10^{-12}$

<sup>a,b,c</sup> same as in Table 3**Table 5.** Conjugal transfer of *Km<sup>r</sup>* gene of genetically engineered strain and its parental bacterial isolate in the Luria-Bertani broth under laboratory conditions at 9~10°C

Mating pairs		Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation for(h):			
Donor	Recipient		6	12	18	24
DKC601 <sup>a</sup>	MT1	$1.4 \times 10^{11}/7.4 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^{-9}$	$1.7 \times 10^{-9}$	$1.5 \times 10^{-8}$	$7.0 \times 10^{-9}$
DK1 <sup>b</sup>	MT1	$1.2 \times 10^{12}/7.4 \times 10^{11}$	$8.3 \times 10^{-11}$	$1.3 \times 10^{-10}$	$1.2 \times 10^{-9}$	$6.6 \times 10^{-10}$
DKC601	MT2	$1.4 \times 10^{11}/2.6 \times 10^{11}$	— <sup>c</sup>	—	$7.1 \times 10^{-11}$	$6.4 \times 10^{-10}$
DK1	MT2	$1.2 \times 10^{12}/2.6 \times 10^{11}$	—	—	$1.1 \times 10^{-12}$	$1.4 \times 10^{-12}$

<sup>a,b,c</sup> same as in Table 3

빈도가 자연의 수계환경에서와는 달리  $9.1 \times 10^{-12} \sim 1.5 \times 10^{-8}$  정도로 NI보다 약 10배 높게 나타났다.

그러나 MT2를 recipient로 했을 경우에는(Table 4와 5), GEM이나 NI 모두 18시간 후에 *Km<sup>r</sup>* 유전자의 전이가 일어났으며 그 전이 빈도는 수계환경에 따라 큰 차이가 없었다. 이는 *Km<sup>r</sup>* 유전자의 전이가 donor 보다는 recipient로 사용한 균주의 종류에 따라 크게 차이가 있었으며, 수계환경이나 donor 세포의 종류에 의해서는 전이 빈도가 크게 달라지지 않았다. 그리고 Bale 등(1988)은 하천수에서 자연계로부터 분리한

균주의 수온내성 plasmid가 donor와 recipient의 비에 의하여  $2.5 \times 10^{-6} \sim 2.2 \times 10^{-1}$ 까지 그 전이 빈도가 달라졌으며 12~19°C의 수온의 차이는 영향이 없었다고 했다. 그러나 본 연구에서는 donor나 recipient cell의 수가 실험에 따라  $1.4 \times 10^{11} \sim 4.4 \times 10^{12}/\text{ml}$  정도로 차이가 있더라도 *Km<sup>r</sup>* 유전자의 전이 빈도에는 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.

GEM과 NI의 *Km<sup>r</sup>* 유전자의 전이에 수온의 영향을 비교 연구한 결과는 Table 6에서와 같다. GEM 뿐 아니라 NI의 *Km<sup>r</sup>* 유전자에 대하여 5~10°C에서 18

**Table 6.** Conjugal transfer of *Km<sup>r</sup>* gene of genetically engineered strain and its parental bacterial isolate by conjugation for 18 h in the natural river waters of different temperature

Mating pairs		Inocula of donor/recipient (cells/ml)	Transfer frequency by conjugation at( °C):		
Donor	Recipient		5-10	18-20 <sup>a</sup>	28-30 <sup>a</sup>
DKC601 <sup>b</sup>	MT1	$4.4 \times 10^{12}/1.4 \times 10^{12}$	$1.8 \times 10^{-11}$	$2.0 \times 10^{-11}$	$4.2 \times 10^{-11}$
DK1 <sup>c</sup>	MT1	$2.2 \times 10^{12}/1.4 \times 10^{12}$	$9.1 \times 10^{-12}$	$4.0 \times 10^{-10}$	$2.3 \times 10^{-10}$
DKC601	MT2	$4.4 \times 10^{12}/8.2 \times 10^{11}$	$2.3 \times 10^{-12}$	$1.3 \times 10^{-12}$	$2.6 \times 10^{-12}$
DK1	MT2	$2.2 \times 10^{12}/8.2 \times 10^{11}$	$4.5 \times 10^{-12}$	$1.1 \times 10^{-11}$	$2.8 \times 10^{-11}$

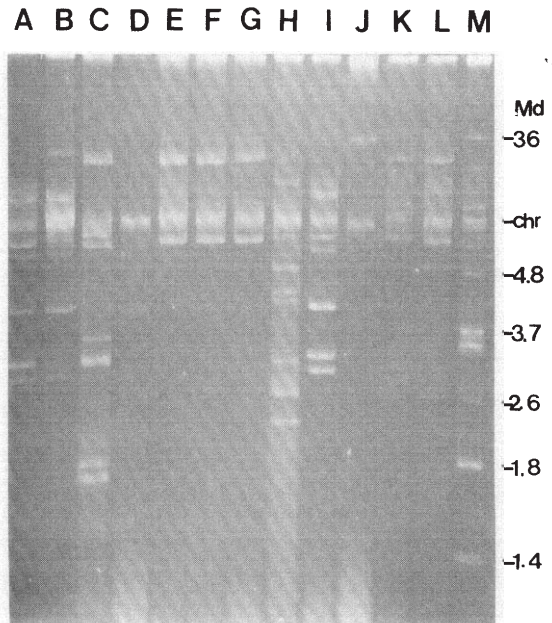
<sup>a</sup>The inocula of donor and recipient for conjugation at 18-20 °C and 28-30 °C were  $2.6 \times 10^{10}/1.0 \times 10^9$  for DKC601 × MT1,  $4.8 \times 10^9/1.0 \times 10^9$  for DK1 × MT1,  $8.6 \times 10^{11}/4.5 \times 10^{10}$  for DKC601 × MT2, and  $4.6 \times 10^{11}/4.5 \times 10^{10}$  for DK1 × MT2, respectively.

<sup>b</sup>Genetically engineered strain from DK1.

<sup>c</sup>Bacterial strain isolated from the natural environment.

시간 동안 conjugation하여 얻은 전이 빈도는 20°C와 30°C에서의 결과와 비교했을 때, 온도가 증가함에 따라 NI에서의 전이 빈도는 증가하였으나 GEM에서의 전이 빈도는 큰 차이가 없었다. 이와 같은 경향은 recipient 균주가 달라도 큰 차이는 없었다. 그러나 5~10°C에서는 GEM과 NI 사이에 전이 빈도의 차이가 별로 없지만 20°C와 30°C에서는 NI의 전이 빈도가 GEM보다 약 10배 높았다. 그러나 Richaume 등(1989)은 Tn5와 pRK2073 plasmid로 제조한 *Km<sup>r</sup>Sm<sup>r</sup>*-GEM을 donor로 하여 28°C의 토양환경에서 conjugation했을 때  $1.8 \times 10^{-4}$ 의 전이 빈도를 얻었으며, Ruffi와 Crawford(1988)도 *Streptomyces* GEM을 30°C의 멸균한 토양환경에서 conjugation했을 때 70%까지의 전이 빈도를 얻었다고 했다. 이는 본 실험의 결과에 비하여 매우 높은 전이 빈도이지만 실험균주나 토양 환경에서 오는 차이라고 해석된다.

Donor 및 recipient와 수계환경을 다르게 하여 얻은 transconjugant들의 plasmid pattern을 비교 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. Donor가 NI일 때와 GEM일 때에 얻은 transconjugant들의 plasmid pattern 사이에는 흥미있는 차이가 발견되었다. Recipient가 똑같이 MT1인데도 불구하고 donor가 NI인 DK1의 경우 (lane A, B, C)에는 *Km<sup>r</sup>* 유전자가 존재하는 70 kb의 pDK101이 나타나지 않았으며 recipient인 MT1이 가지고 있던 plasmid들은 재조합이 일어나 plasmid의 크기가 달라진 경우가 많았다. 그러나 donor를 GEM인 DKC601으로 한 경우의 transconjugant (lane E, F, G)들은 *Km<sup>r</sup>* 유전자를 가지고 있던 52 kb의 pDT529 뿐만 아니라 recipient인 MT1의 plasmid들을 대부분 그대로 가지고 있었다. Natural isolate인 DK1과 MT1 균주에서 얻은 transconjugant들이 나타내는 이러한 plasmid의 rearrangement 현상은 자연의 수계환경에서나 실험실의 수계환경에서 거의 비슷한

**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of plasmids in the natural bacterial isolates, genetically engineered strain, and their transconjugants.

Lanes; A, transconjugant of DK1 × MT1 in LB broth; B, transconjugant of DK1 × MT1 in autoclaved river water; C, transconjugant of DK1 × MT1 in natural river water; D, transconjugant of DK1 × MT2 in natural river water; E, transconjugant of DKC601 × MT1 in LB broth; F, transconjugant of DKC601 × MT1 in autoclaved river water; G, transconjugant of DKC601 × MT1 in natural river water; H, transconjugant of DKC601 × MT2 in natural river water; I, DK1; J, DKC601; K, MT1; L, MT2; M, *E. coli* V517.

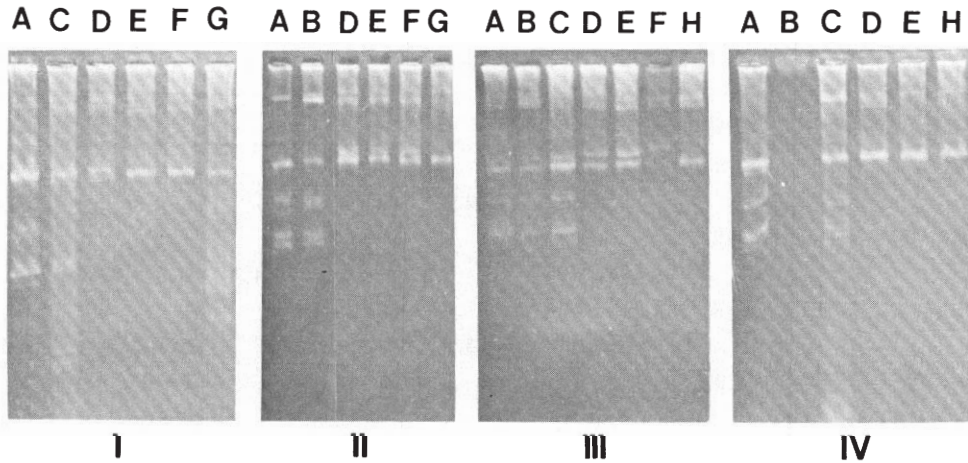


Fig. 3. Agarose gel electrophoresis patterns of plasmids rearranged in the transconjugants obtained during conjugation for 6 h(I), 12 h(II), 18 h(III), and 24 h(IV).

Lanes: A, transconjugant of DK1  $\times$  MT1 in LB broth; B, transconjugant of DK1  $\times$  MT1 in autoclaved river water; C, transconjugant of DK1  $\times$  MT1 in natural river water; D, transconjugant of DKC601  $\times$  MT1 in LB broth; E, transconjugant of DKC601  $\times$  MT1 in autoclaved river water; F, transconjugant of DKC601  $\times$  MT1 in natural river water; G, transconjugant of DKC601  $\times$  MT2 in natural river water; H, transconjugant of DKC601  $\times$  MT2 in LB broth.

경향을 보여주었다. O'Morchoe 등(1988)의 보고에서도 *Pseudomonas*를 하천수에서 conjugation하였을 때 conjugative plasmid에 deletion 또는 genetic rearrangement가 나타났으며, Gealt 등(1985)과 McPherson과 Gealt(1986)도 plasmid의 rearrangement를 보고한 바 있다. Ruffi와 Crawford(1988)는 *Streptomyces* GEM 균주를 실험실과 토양환경에서 conjugation시켰을 때 pIJ101, pIJ303, pIJ702뿐 아니라 non-conjugative plasmid도 전이되었는데, 특히 pIJ702는 전이과정에서 rearrangement가 없었다고 보고하였다.

그러나 recipient가 MT2일 때에는 donor가 NI이거나 GEM인 경우에 따라 transconjugant들의 plasmid pattern은 recipient를 MT1으로 했을 때에 비하여 크게 달라졌다. NI인 DK1과 MT2에서 얻은 transconjugant(lane D)에서는 DK1이 가지고 있던 70 kb의 pDK101 뿐 아니라 작은 크기의 plasmid들도 대부분 나타나지 않은 것이 recipient가 MT1이었던 transconjugants(lane A, B, C)에 비하여 달랐다. GEM인 DKC601과 NI인 MT2의 conjugation에서 얻은 transconjugant(lane H)의 경우에는 DKC601이나 MT2에서도 없었던 작은 크기의 plasmid가 여러 개 나타났다. 이와 같은 plasmid의 rearrangement는 recipient가 MT1이었던 transconjugant(lane E, F, G)에서는 전혀 없었던 현상이다. 이러한 결과로 볼 때  $Km^r$  유전자는 NI에서나 GEM에서 전이되는 빈도는 recipient 균주의 종류에 따라 큰 차이가 없으나,

그 결과로 얻어진 transconjugant들에서 나타나는 plasmid의 rearrangement pattern은 recipient의 종류에 따라 차이가 많았다. 이와 같은 현상은 수계환경에 의해서 보다 donor나 recipient 균주의 종류에 따라 달라진다는 것을 알 수 있다. Conjugation 과정에서 나타나는 이와 같은 plasmid의 rearrangement는 Gealt 등(1985)과 Buchanan-Wollaston 등(1987)의 보고에서도 지적한 바와 같이 자연계에서 유전자의 전이가 일어날 때 흔히 나타나는 현상이지만 그 기작에 관해서는 아직 완전히 이해하지 못하고 있다. 그러므로 본 연구에서는 natural isolate인 DK1이 가지고 있는  $Km^r$  plasmid인 pDK101에 비하여 GEM 균주인 DKC601이 가지고 있는 pDT529 plasmid는 pDK101로부터 유전자조작 기법으로 변형시킨 것으로써,  $Km^r$  유전자 이외의 많은 부분을 제거시켰고 pKT230을 vector로 사용하여 제조한 plasmid라는 점에서 볼 때, GEM이 가지고 있는  $Km^r$  유전자는 NI의  $Km^r$  유전자에 비하여 그 전이 특성도 변화되었다고 판단된다.

#### 전이에 의한 $Km^r$ 유전자의 행방

수계환경에서 conjugation에 의하여 얻어진  $Km^r$  transconjugant들의 plasmid pattern은 donor로 사용한 GEM과 NI 균주에 따라 차이가 많았다. 이들 transconjugant들이 가지고 있는 plasmid의 행방과 동태를 이해하기 위하여, conjugation의 시간을 다르게 하여 얻은 여러 가지 transconjugant들의 plasmid

**Table 7.** Analysis of the plasmids rearranged in the *Km<sup>r</sup>* transconjugants during the period of conjugation

Lane	Mating pairs		Water for conjugation	No. and size of plasmids in the transconjugants during conjugation for (h):			
	Donor	Recipient		6	12	18	24
A	DK1	MT1	LB-L <sup>a</sup>	6 (51,30,6.2,6.0,4.8,4.5) <sup>d</sup>	4 (51,6.0,4.8,4.5)	2 (6.0,4.8)	2 (6.0,4.8)
B	DK1	MT1	AR-L <sup>b</sup>	— <sup>e</sup>	5 (51,50,6.0,4.8,4.5)	4 (51,50,6.0,4.8)	0
C	DK1	MT1	AR-N <sup>c</sup>	6 (51,50,5.5,5.0,3.8,3.5)	—	3 (25,6.0,4.8)	3 (51,6.0,4.8)
D	DKC601	MT1	LB-L	3 (52,50,25)	3 (52,50,25)	2 (52,25)	2 (52,45)
E	DKC601	MT1	AR-L	3 (52,50,45)	3 (52,50,25)	3 (52,50,25)	1 (52)
F	DKC601	MT1	AR-N	2 (52,50)	3 (52,50,25)	3 (52,50,25)	—
G	DKC601	MT2	AR-N	6 (52,7.1,6.8,4.7,4.3,4.1)	1 (52)	—	—
H	DKC601	MT2	LB-L	—	—	2 (52,50)	1 (52)

<sup>a</sup>Luria-Bertani broth experimented under laboratory condition.<sup>b</sup>Autoclaved river water experimented under laboratory condition.<sup>c</sup>Autoclaved river water experimented in natural environment of river water.<sup>d</sup>Numbers in parenthesis mean the estimated size of the plasmids in kilobase.<sup>e</sup>Not determined.

pattern을 전기영동 사진으로 비교 분석하였다. 그 결과는 Fig. 3에서와 같이 transconjugant들이 가지고 있는 plasmid의 수는 conjugation의 시간이 길어짐에 따라 대체로 감소하였다. 즉 donor가 NI인 DK1의 경우에는 초기에 6개의 plasmid가 발견되었으나 24 시간 후에는 2~3개로 감소하였으며, donor가 GEM인 DKC601의 경우에는 2~3개 었던 것이 1~2개로 줄어 들었다.

그리고 각 transconjugant들이 가지고 있는 재조합된 plasmid의 수와 크기를 상이한 mating pair와 수계환경에 따라 분석한 결과는 Table 7과 같다. Natural isolate인 DK1을 donor로 했을 때에는 DK1이 가지고 있던 *Km<sup>r</sup>* plasmid인 70 kb의 pDK101이 어느 transconjugant에서도 발견되지 않았으나, GEM 균주인 DKC601을 donor로 했을 때에는 *Km<sup>r</sup>* plasmid인 52 kb의 pDT529는 recipient 균주가 다르더라도 모든 transconjugant에서 그대로 발견되었다. 이는 NI인 DK1이 가지고 있던 *Km<sup>r</sup>* plasmid는 O'Morchoe 등 (1988)의 보고에서와 같이 conjugation 과정에서 rearrangement가 많이 일어났으나, 유전자조작 기법으로 제조한 pDT529 plasmid는 conjugation 과정에서 매우

안정된 상태로 전이되어 transconjugant에 그대로 존재한다는 결과로써, Trevors 등(1990)의 보고에서와 같이 GEM 유전자의 안정성과 연관하여 이해할 수 있다.

그러나 conjugation 과정에서 *Km<sup>r</sup>* 유전자를 포함하는 plasmid의 행방은 수계환경에 따라서는 큰 차이를 발견할 수 없었지만(lane A, B, C 또는 D, E, F), 동일한 수계환경에서 GEM 균주인 DKC601을 donor로 하더라도 recipient가 MT1(lane F)이 아닌 MT2로 했을 경우(lane G)에서는, 52 kb의 plasmid와 함께 크기가 작은 plasmid들이 conjugation 초기에 여러 개 나타났지만 12시간 후부터는 52 kb의 plasmid 이외에는 모두 없어지는 경향을 발견할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Van Der Lelie 등(1990)이 지적한 바와 같이 전이되는 plasmid에 대한 chromosomal DNA의 영향이나 Pre(plasmid recombination enzyme)의 작용으로 설명할 수 있겠으며, 또 Fitzgerald와 Gasson(1988)이 보고한 바와 같이 전이가 일어난 후 plasmid의 segregation에 의한 homologous recombination 등의 현상으로 해석할 수 있다.



## 적 요

자연계로부터 분리한 DK1 균주(NI)가 가지고 있는 Km<sup>r</sup> plasmid를 유전자조작 기법으로 변형시킨 DKC601 균주(GEM)를 이용하여 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이를 무심천의 자연 수계환경에서 실험하였다. Km<sup>r</sup> 유전자의 전이 빈도는 NI 균주의 결과와 비교 연구하는 동시에, 전이과정에서 일어나는 plasmid rearrangement를 비교 분석하였다. GEM과 NI의 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이 빈도는 5~10℃의 하천수에서는  $9.1 \times 10^{-12} \sim 1.8 \times 10^{-11}$ 로 비슷하였으나 20~30℃에서는 NI 균주가 GEM 균주보다 조금 높았다. 그리고 멸균하천수나 LB broth를 이용한 실험실 환경에서의 Km<sup>r</sup> 유전자의 전이 빈도는 하천수에서보다 다소 높게 나타났다. NI 균주가 가지고 있던 70 kb인 Km<sup>r</sup> plasmid는 MT1 균주를 recipient로 했을 때 얻은 transconjugant에서는 수계환경에 관계없이 rearrangement가 많이 일어났으나, GEM 균주에서 얻은 transconjugant에서는 52 kb인 Km<sup>r</sup> plasmid가 안정된 상태로 발견되었다. 그러나 MT2 균주를 recipient로 했을 때에는 NI 뿐만 아니라 GEM 균주로부터 전이된 Km<sup>r</sup> plasmid가 모두 rearrangement를 나타냈다. Transconjugant들이 가지고 있는 plasmid의 수는 conjugation의 시간이 길어짐에 따라 사용한 실험균주나 수계환경에 관계없이 감소되었으며, 특히 GEM의 52 kb인 Km<sup>r</sup> 유전자의 크기는 24시간 후에도 그대로 유지되었다. 이와 같은 결과로 볼 때, Km<sup>r</sup> 유전자는 GEM에서나 NI로부터 전이되는 빈도는 recipient 균주에 관계없이 비슷하였으나, conjugation 과정 중 GEM의 Km<sup>r</sup> 유전자는 NI의 Km<sup>r</sup> 유전자보다 더욱 안정된 상태로 전이되었으며 이 Km<sup>r</sup> plasmid의 rearrangement는 수계환경에 관계없이 recipient 균주에 따라 다양하게 나타났다.

## 사 사

본 연구는 1990년도 대우학술재단 Post Graduate 장학연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. APHA-AWWA-WPCF, 1989. Standard methods for the examination of water and wastewater, 17th ed., American Public Health Association 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. Buchanan-Wollaston, V., J.E. Passiatore, and F. Cannon, 1987. The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. *Nature* **328**, 172-175.
5. Fitzgerald, G.F. and M.J. Gasson, 1988. *In vivo* gene transfer systems and transposons. *Biochimie* **70**, 489-502.
6. Gealt, M.A., M.D. Chai, K.B. Alpert, and J.C. Boyer, 1985. Transfer of plasmid 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.
7. Gowland, P.C. and J.H. Slater, 1984. Transfer and stability of drug resistance plasmids in *Escherichia coli* K12. *Microb. Ecol.*, **10**, 1-13.
8. Kawamura, M., M. Takagi and K. Yano, 1983. Cloning of a LEU gene and an ARS site of *Candida maltosa*. *Gene* **24**, 157-162.
9. Kim, C.K. and S.G. Lee, 1989. Conjugal transfer of antibiotics resistance genes in water environments. *Genet. Eng. Res.* **3**, 23-31.
10. Kim, C.K. and S.G. Lee, 1989a. Transfer of R plasmids of bacterial isolates and their cloned R genes in natural wastewater environments (I)-Cloning of Km<sup>r</sup> Cm<sup>r</sup> gene. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 447-453.
11. Kim, C.K., S.G. Lee, and Y.C. Kim, 1986. Transfer and genetic recombination of antibiotic resistance gene occurring in water environment. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 245-250.
12. 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.
13. Mach, P.A. and D.J. Grimes, 1982. R-plasmid transfer in a wastewater treatment plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1395-1403.
14. Mancini, P., S. Fertels, D. Nave, and M.A. Gealt, 1987. Mobilization of plasmid pH3V106 from *Escherichia coli* HB101 in a laboratory-scale waste treatment facility. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 665-671.
15. McPherson, P. and M.A. Gealt, 1986. Isolation of indigenous wastewater bacterial strain capable of mobilizing plasmid pBR325. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 904-909.
16. O'Morchoe, S.B., O. Ogunseitan, G.S. Sayler, and R.V. Miller, 1988. Conjugal transfer of R68.45 and PF5 between *Pseudomonas aeruginosa* strains in a freshwater environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1923-1929.
17. Paul, J.H. and A.W. David, 1989. Production of extracellular nucleic acids by genetically altered bacteria in aquatic environment microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1865-1869.
18. Paul, J.H., W.H. Jeffrey, A.W. David, M.F. Deflaun, and L.H. Cazares, 1989. Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic freshwater environment of southwest Florida. *Appl.*

- Environ. Microbiol.* **55**, 1823-1828.
19. **Perbal, B.**, 1989. A practical guide to molecular cloning. John Wiley & Sons, Inc., New York.
  20. **Rafii, F. and D.L. Crawford**, 1988. Transfer of conjugative plasmids and mobilization of a nonconjugative plasmid between *Streptomyces* strains on agar and in soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1334-1340.
  21. **Richaume, A., J.C. Angle, and M.J. Sadowsky**, 1989. Influence of soil variables on *in situ* plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1730-1734.
  22. **Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis**, 1989. Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  23. **Scanferlato, V.S., D.R. Orvos, J. Cairns, Jr., and G.H. Lacy**, 1989. Genetically engineered *Erwinia carotovora* in aquatic microcosms: Survival and effects on functional groups of indigenous bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1477-1482.
  24. **Schilf, W. and W. Klingmüller**, 1983. Experiments with *Escherichia coli* on the dispersal of plasmids in the environment. *Recombinant DNA Technol. Bull.* **6**, 101-102.
  25. **Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist**, 1984. Experiment with gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
  26. **Trevors, J.T. and J.D. Van Elsas**, 1989. A review of selected methods in environmental microbial genetics. *Can. J. Microbiol.* **35**, 895-902.
  27. **Trevors, J.T., J.D. Van Elsas, L.S. Van Overbeek, and M.E. Starodub**, 1990. Transport of a genetically engineered *Pseudomonas fluorescens* strain through a soil microcosm. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 401-408.
  28. **Van Der Lelie, D., H.A.B. Wosten, S. Bron, L. Oskam and G. Venema**, 1990. Conjugal mobilization of streptococcal plasmid pMV158 between strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *J. Bacteriol.* **172**, 47-52.
  29. **Van Elsas, J.D., J.T. Trevors, L.S. Van Overbeek, and M.E. Starodub**, 1989. Survival of *Pseudomonas fluorescens* containing plasmids RP4 or pRK2501 and plasmid stability after introduction into two soils of different texture. *Can. J. Microbiol.* **35**, 951-959.
  30. **Van Elsas, J.D., J.T. Trevors, and M.E. Starodub**, 1988. Bacterial conjugation between pseudomonads in the rhizosphere of wheat. *FEMS Microbiol. Ecol.* **53**, 299-306.
  31. **Van Elsas, J.D., J.T. Trevors, M.E. Starodub, and L.S. Van Overbeek**, 1990. Transfer of plasmid RP4 between pseudomonads after introduction into soil; influence of spatial and temporal aspects of inoculation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**, 1-12.
  32. **Walia, S., A. Khan, and N. Rosenthal**, 1990. Construction and applications of DNA probes for detection of polychlorinated biphenyl-degrading genotypes in toxic organic contaminated soil environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 254-259.

(Received July 26, 1990)

(Accepted August 30, 1990)