

음용 지하수중에 분포하는 저영양세균의 계통학적 해석

김인기 · 橋本知義¹ · 황경숙*

목원대학교 생명과학부 미생물학과, ¹九州沖繩農業研究センター

다양한 농도의 영양배지(nutrient broth, NB; diluted nutrient broth, DNB)를 이용하여 음용 지하수중의 세균수를 계수한 결과, 통상농도의 NB배지에 비해 저영양배지인 DNB배지에서 2~50 배 이상 높은 계수치를 나타내었다. 이와 같은 결과로부터 지하수중에는 NB배지에서는 증식이 현저히 저해되고 DNB배지에서만 증식이 가능한 저영양세균(oligotrophic bacteria)이 다수 분포하고 있음이 판단되어 DNB배지로부터 184 균주의 저영양세균을 분리하였다. 본 연구에서는 시판 음용수(CW, CJ)와 광천수(DPG, CJG1)에서 분리된 저영양세균 102 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 계통분류학적 특성을 검토한 결과 세 개의 주요한 계통군: Proteobacteria α -subdivision (49 균주), β -subdivision (50 균주), γ -subdivision (3 균주)으로 분류되었다. Proteobacteria α -subdivision에는 *Afipia*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Phenylobacterium*, *Rhizobium*, *Sphingomonas*가 포함되었으며, β -subdivision에는 *Acidovorax*, *Azonexus*, *Ferribacterium*, *Janthinobacterium*, *Leptothrix*, *Polaromonas*, *Variovorax*가 포함되었고, γ -subdivision에는 *Rhodanobacter* 등 다양한 계통군이 확인되었다.

Key words □ oligotrophic bacteria, phylogenetic analysis, potable groundwater, proteobacteria α -, β -, γ -subdivision.

음용 지하수의 수질기준은 「먹는물 수질기준 및 검사등에 관한 규칙」 제2조 1항에 규정되어 있다(2). 이 규정은 샘플 또는 먹는샘물 이외의 지하수(먹는물)의 수질기준으로 일반세균·대장균군, 무기·유기물질 및 심미적 영향물질 등 45 개 항목을 제시하고 있다. 수질오염으로 인한 병원성 미생물의 증식은 수인성 질병을 일으키므로 음용수의 적합성 여부를 판단하기 위해 분변성 장내세균 검사가 매우 중요한 의미를 갖는 것은 사실이지만, 대장균군과 같은 분변성 오염의 지표미생물이 검출되지 않는다고 하여 깨끗한 물이라고 단정할 수는 없다(10). 끊임없이 변화하는 생태계 특성상 제한된 인자에만 의존하는 수질평가 결과는 정확하지 못한 경우가 많기 때문이다.

수질오염은 그 속에 서식하는 생물체의 서식환경이 변화하는 것을 의미한다. 따라서 지하수 속에 존재하는 미생물의 분포 및 종 다양성을 폭넓게 조사하여 수질오염을 판단하는 것이야말로 물리화학적 분석에 의한 평가보다 훨씬 근본적인 방법이라고 할 수 있다. 일반적으로 지하수로부터 유래한 음용수는 매우 낮은 유기물 농도로 구성되어진 저영양 환경이다(13). 특히, 지하수의 음용 가능성과 관련한 생물학적 검사에 있어서 “저영양미생물”의 존재와 분포를 조사하는 것이 특히 중요하다. 왜냐하면, 지하수 오염 여부에 관하여 보다 정밀한 결론을 얻기 위해서는, 유기물질과 무기물질로 구성되는 다양한 영양환경 속에서 생존하는 저영양세균에 대하여 조사하는 편이 더욱 효과적일 것이기 때문이다.

저영양세균(oligotrophic bacteria)이란 영양분이 극히 적은 환경에서 자랄 수 있는 세균을 말한다(14,15,20). 저영양 환경이라는 개념 자체가 매우 폭넓고 다양하기 때문에 저영양세균에 대한 일의적인 정의는 극히 어렵다(11). 또한 이들 저영양세균은 분리하기가 매우 어렵고, 배양이 잘 되지 않거나 배양도중에 소멸되어 버리는 경우가 많기 때문에 분류학적 및 생리적 특성이 충분히 해명되어 있지 못한 실정이다(15,20). 게다가, 분명히 환경시료 중에 생존해 있음에도 불구하고 배양이 불가능한(viable but non-culturable, VBNC) 미생물의 실태에 관하여도 다수 보고되고 있다(3,4,10). 이상의 사실들을 종합적으로 고려할 때, 지하수의 오염도 측정을 위한 미생물학적 검사, 특히 저영양미생물에 관한 조사를 할 필요가 있다는 사실은 더 이상 강조할 필요조차 없다고 생각된다.

지하수 수질관리를 위한 종합적 검사기준에 미생물학적 검사 항목을 보완하기 위해서는, 그동안 배제되어 왔던 지하수에 존재하는 저영양세균을 분리하고 그 분류학적 및 생리적 특성을 분석함으로써 인체에 대한 유·무해를 밝혀내야 한다고 생각한다. 본 연구에서는 음용 지하수중 저영양세균의 분포상황을 조사하고, 분리된 저영양세균의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 계통학적 위치를 밝히고자 한다.

재료 및 방법

저영양세균의 분리

지하수 시료는 시판되는 음용수(CW, CJ), 충남 대평리와 충청도의 광천수(DPG, CJG1), 대전 근교지역의 지하수(TJ), 충남 논

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-829-7593, Fax: 042-829-7590
E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr

산 축산농가 인근지역의 지하수(NPG1)를 채수하였다(1). 저영양 세균의 분리를 위해서는 육즙영양배지(NB)와 육즙영양배지를 10^{-2} 로 희석한(DNB) 배지를 사용하였다(1). 세균수 측정에 사용한 DNB 한천배지로부터 분리한 각 균주들을 순수 분리한 후, 반고체 배지에 첨자배양하여 보존하였다. 통상농도의 NB 배지에서 증식가능한 「NB세균」과 NB 배지에서는 증식하지 않고 DNB 배지에서만 증식가능한 「DNB세균」으로 분리하였다(4). 한편, 10^{-4} 배로 희석한 영양배지는 증식능이 미비하여 탁도로서 증식능 판별이 불가능 하였으므로 평판법에 의거하여 재확인 하였다. 즉, 순수 분리된 각 균주들을 10 ml의 DNB 액체 배지에 전배양한 후 시료를 1 ml당 10^2 ~ 10^3 cell 정도가 되도록 조정하여 접종 3주일 후 colony를 계수한 결과 10^6 cell/ml 이상의 colony가 나타나는 것을 증식한 것으로 판정하였다(20).

DNA의 추출 및 정제

Chromosomal DNA의 분리는 Benzyl chloride 방법을 변형하여 수행하였다(7). 각 균주는 50 ml의 DNB에 접종하여 25°C에서 120 rpm으로 1주일 동안 진탕 배양한 후 원심분리기를 이용하여 균체를 침전하였다. 침전된 균체에 500 μ l의 TE buffer (100 mM Tris-HCl, 40 mM EDTA, pH 8.0)를 첨가하여 잘 현탁시킨 후 100 μ l의 10% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)와 300 μ l의 benzyl chloride (Katayama chemicals, Japan)를 첨가하여 50°C에서 30분간 배양하였다. 배양 균체에 60 μ l의 3 M sodium acetate (pH 5.2)를 첨가한 후 각반하여 얼음 위에서 정치하였다. 그 후 4°C, 17,000×g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새로운 tube로 옮기고 동량의 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 혼합액을 첨가하고 10분간 교반한 다음 4°C, 17,000×g에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 tube로 옮기고 위와 같은 방법으로 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1) 혼합액을 2회 처리하였다. 최종적으로 얻은 상층액에 동량의 2-propanol을 첨가한 후 30분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 4°C에서 17,000×g으로 15분간 원심분리하고 70% ethanol과 100% ethanol로 각각 세척한 다음 진공건조시켰다. 최종적으로 멸균 D.W. 50 μ l를 가하여 DNA를 얻었다.

16S rDNA의 PCR 증폭

16S rDNA를 증폭하기 위해서 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 27F (5'-AGAGTTT-GATCTGGCTCAG-3') primer와 1525R (5'-AAGGAGGTG-ATCAGCCGCA-3') primer를 이용하였다(9,12). 추출된 DNA 1 μ l (50~100 ng)에 27 Forward primer, 1 μ l; 1525 Reverse primer, 1 μ l; ReadyMix Taq (Sigma, St. Louis, USA), 25 μ l와 H₂O (Sigma) 22 μ l를 0.2 ml PCR 반응 tube에 넣고 잘 섞어준 후 다음 조건에 따라 PCR 반응을 실시하였다. 94°C, 5분간 반응한 다음 94°C, denaturation 1분, 55°C, annealing 1분, 72°C, extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 10분간 final extension을 실시하였다. Thermal cycler는 Perkin Elmer (GeneAmp PCR system 9700; Applied Biosystems, Foster City,

USA)를 이용하였다. 16S rDNA를 확인하기 위해서 PCR 반응물은 0.7% agaose gel, 0.5X TBE buffer (45 mM Tris-borate, 10 mM EDTA)에서 100V, 25 mA로 30분간 전기 영동한 후 ethidium bromide (EB)에 15분간 염색하여 UV하에서 확인하고, Qiagen PCR purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 정제하였다. 정제된 16S rDNA는 분광광도계를 이용하여 농도를 확인하였다.

16S rDNA sequencing reaction

정제한 16S rDNA를 주형으로 ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 염기서열을 결정하였다. Sequencing PCR은 BigDye 8 μ l, 3.2 μ M 27F (5'-AGAGTTTGTATCCT-GGCTCAG-3') primer 1 μ l, 16S rDNA sample 1 μ l (90 ng)에 H₂O 10 μ l를 0.2 ml PCR 반응 tube에 넣고 잘 섞어준 후 96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4분으로 25회 반복하였다. 이 PCR product에 100% ethanol 50 μ l와 3 M sodium acetate (pH 5.2) 2 μ l를 첨가한 후 17,000×g에서 10분간 침전시켰다. 70% ethanol로 세정하여 건조시킨 후 formamide/EDTA 5:1 (v/v) 혼합액 4 μ l를 첨가하여 90°C에서 2분동안 denaturation 한 다음 sequencing gel에 loading하였다.

16S rDNA 염기서열 분석

ABI PRISM 373 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)를 사용하여 결정된 16S rDNA partial 염기서열의 homology는 DDBJ/EMBL/GenBank database의 Blast program을 이용하여 분석하였다. 각 염기서열의 alignment는 Clustal W (Version 1.7) program package를 이용하여 정렬하였고(19), 근린 결합법에 의거(17) 지하수내 저영양세균의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

결 과

음용 지하수중 DNB세균의 분포

DNB 평판배지로부터 분리한 균주들에 대해 통상농도의 NB 배지에서의 증식능을 조사한 결과 총 373 분리균주 중 156 균주는 NB 배지에서 증식이 가능한 NB 세균이었으며, 217 균주는 NB 배지에서는 증식하지 않고 DNB 배지에서만 증식이 가능한 DNB세균이었다. 시중에서 유통되고 있는 음용수 CW, CJ로부터 분리된 세균은 68%와 64%가 DNB 세균이었으며, 지하수 DPG, CJG1 시료에서는 50%와 98%의 분포율을 나타내었다. 한편, 도시근교 지역 지하수 TJ 시료중의 DNB 세균은 23%, 축산농가 인근 지역의 지하수 NPG1 시료에서는 46%로 비교적 낮은 분포율을 나타내었다(Table 1).

음용 지하수 중의 세균이 증식할 수 있는 영양분 농도의 범위

DNB 세균의 높은 분포율을 나타낸 CW, CJ, DPG 및 CJG1 시료와 NB 세균의 높은 분포율을 나타낸 TJ와 NPG1 시료로부

터 분리된 세균을 대상으로 NB 배지를 10⁻¹~10⁻⁴ 배의 다양한 농도로 희석한 배지를 사용하여 이들 지하수세균이 증식할 수 있는 영양분 농도의 범위를 결정한 결과 4 개의 type으로 나눌 수 있었다. 통상 농도의 NB 배지에서 증식하는 NB 세균중 10⁻⁴ 배로 희석한 배지에서는 증식하지 못하지만 10⁻³ 배로 희석한 배지에서 증식하는 세균군을 Type I, 10⁻⁴ 배로 희석한 배지에서도 증식 가능한 세균군을 Type II로 하였다. NB 배지에서는 증식하지 않는 DNB 세균중 10⁻¹~10⁻³ 배 NB 희석 배지에서 증식하는 세균군을 Type III, 10⁻⁴ 배 NB 희석배지에서 증식하는 세균군을 Type IV로 하였다(16). 본 연구에서는 NB 배지에서는 증식하지 않고 DNB 배지에서만 증식 가능한 Type III와 Type IV의 균주를 저영양세균(oligotrophic bacteria)으로 정하였다. Table 1은 각 시료중 저영양세균의 분포율을 나타낸 결과이다. 음용 지하수 시료 CW, CJ, DPG와 CJG1에서 분리한 균주중의 저영양세균의 비율은 약 70%이었으며, 도시 근교 지역으로부터의 시료 TJ와 축산농가 인근 지역으로부터의 시료 NPG1에는 약 35%로 매우 낮게 존재하는 것으로 나타났다(Table 2).

음용 지하수중 저영양세균의 계통학적 특성

시판되는 음용수(CW, CJ)와 대평리, 초정리의 지하수(DPG, CJG1) 시료에서 분리한 저영양성 세균 102 균주에 대해 16S rDNA 염기서열을 결정한 결과 3 개의 주요한 계통군 Proteobacteria α-subdivision (49 균주), β-subdivision (50 균주)과 γ-subdivision (3 균주)으로 분류되었다.

시판되는 음용수(CW, CJ)로부터 분리한 저영양세균 45 균주들

Table 1. Number of NB and DNB organisms collected from 6 groundwater samples

Sample	Source	Total isolates (T)	NB organisms (X)	DNB organisms (Y)	Y/T (%)
CW	bottled water	56	18	38	68
CJ	bottled water	56	20	36	64
DPG	mineral water	50	25	25	50
CJG1	mineral water	50	1	49	98
TJ	edible water	56	43	13	23
NPG1	edible water (stock farm)	50	27	23	46
Total		318	134	184	

은 크게 5 개의 cluster로 나눌 수 있었다(Fig. 1). Cluster I-IV에 속하는 균주들은 Proteobacteria α-subdivision에 속하였다. Cluster I에 속하는 균주들은 *Bradyrhizobium*, *Agromonas*, *Nitrobacter*와 *Afipia* 속에 속하였으며(5), cluster II는 *Rhizobiaceae*과에 속하였고, cluster III은 *Caulobacter* group, cluster IV의 균주는 *Sphingomonadaceae*에 속하였다. Cluster V는 Proteobacteria β-subdivision에 속하는 *Comamonadaceae*에 속하였다. 시판 음용수 CW 시료중의 저영양세균의 계통학적 특성은 Proteobacteria α-subdivision이 19 균주로 가장 높은 비율로 나타났으며 특히 *Phenylbacterium*에 속하는 균주가 13 균주로서 균주 *Phenylbacterium immobile*과 95%의 유사도를 나타내었다. 시판 음용수 CJ 시료에서는 17 균주가 Proteobacteria α-subdivision에 속하였으며 우점종은 *Blastobacter denitrificans* (9

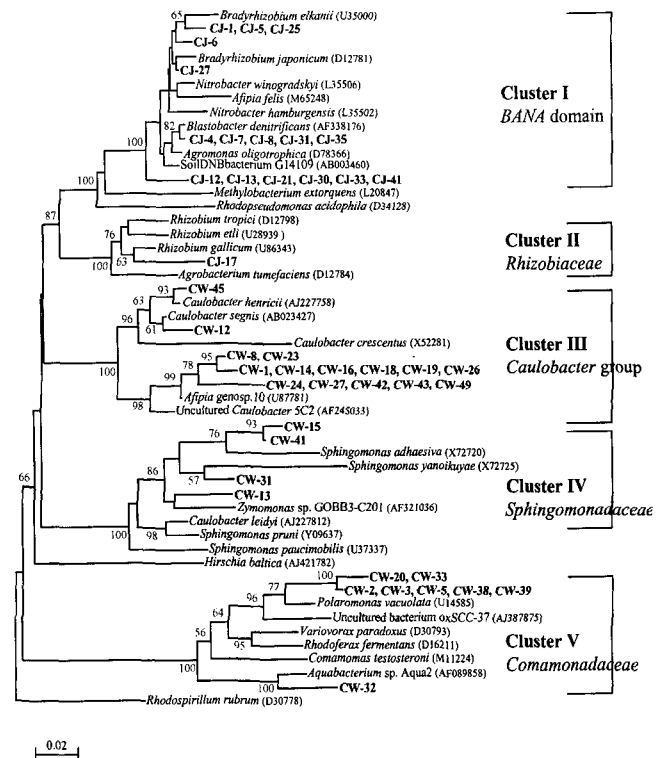


Fig. 1. Phylogenetic tree showing the affiliations of bacteria isolated from bottled water (CW, CJ). The scale bar represents substitutions per nucleotide position. Number at nodes indicate bootstrap values out of 1000 bootstrap resampling.

Table 2. Classification of isolated strains based on growth pattern of the bacteria in different concentration of nutrient broth

Type	Dilution of nutrient broth					No. of isolate						
	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	1	CW	CJ	DPG	CJG1	TJ	NPG1	Total
I	- ^a	+	+	+	+	15	12	16	1	29	26	99
II	+	+	+	+	+	0	6	9	0	10	0	25
III	-	+	+	+	-	31	15	17	25	10	23	121
IV	+	+	+	+	-	4	17	8	24	1	0	54

^aGrowth test, +; growth was observed, -; growth was not observed

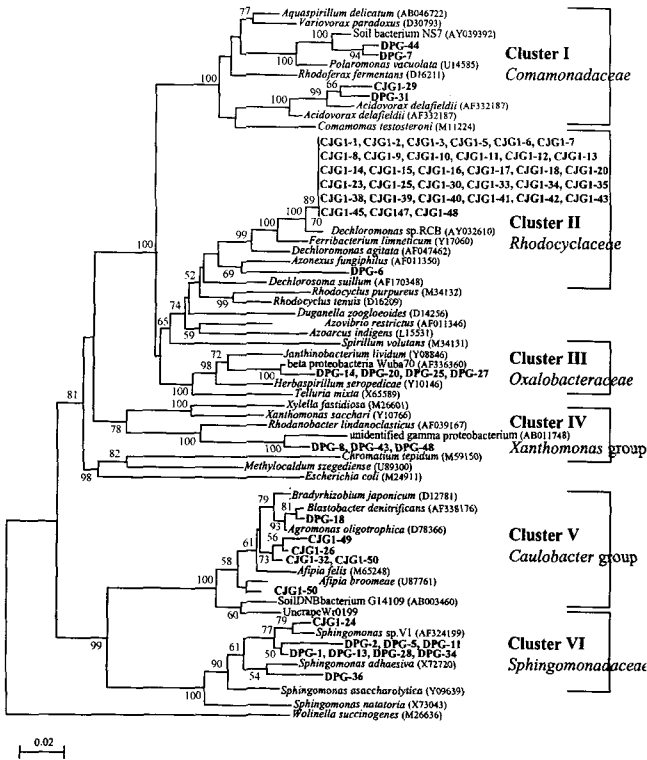


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the affiliations of bacteria isolated from potable groundwater (DPG, CJG1). The scale bar represents substitutions per nucleotide position. Number at nodes indicate bootstrap values out of 1000 bootstrap resampling.

균주)와 *Bradyrhizobium japonicum* (7 균주)으로 이들 균주와는 99%의 유사도를 나타내었다.

대평리와 초정리의 광천수(DPG, CJG1)에서 분리한 58 균주들은 크게 6개의 cluster로 나눌 수 있었다(Fig. 2). Cluster I-III에 속하는 균주들은 Proteobacteria β-subdivision에 속하였다. Cluster I은 Comamonadaceae에 속하였으며, 가장 높은 분포율을 나타낸 cluster II에 속하는 균주들은 Rhodocyclaceae에, cluster III은 Oxalobacteriaceae에 속하였다. Cluster IV에 속하는 균주들은 Proteobacteria γ-subdivision인 Xanthomonas group에 속하는 것으로 나타났다. Cluster V와 VI은 Proteobacteria α-subdivision인 Caulobacter group과 Sphingomonadaceae에 속하는 것으로 나타났다. DPG 시료에서는 Proteobacteria α-subdivision과 β-subdivision이 8 균주씩 같은 비율로 나타났으며 각각 *Sphingomonas*와 *Janthinobacterium*이 우점하였다. CJG1 시료에서는 Proteobacteria β-subdivision이 총 39 균주중 34 균주로 우점하였으며 *Ferribacterium limneticum*과 99%의 유사도를 나타내었다.

고찰

다양한 농도의 영양배지를 이용하여 희석평판법에 의해 음용 지하수층의 세균수를 측정된 결과 통상농도의 육즙영양배지(NB)에서보다 저영양배지인 DNB 배지에서 높은 계수치를 나타내었

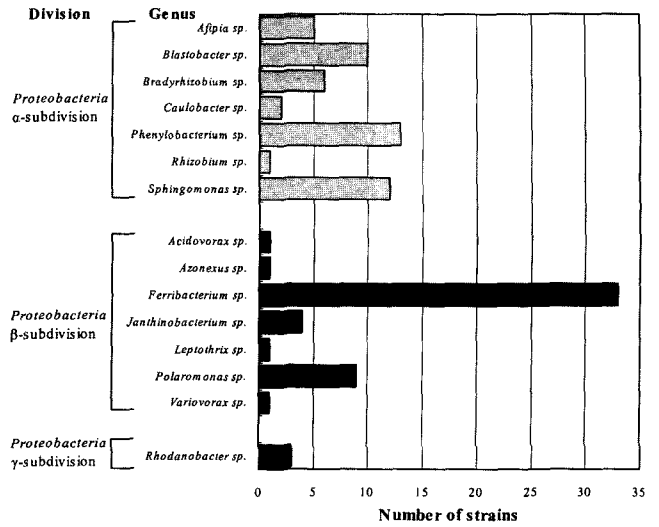


Fig. 3. Numbers of bacteria from each phylogenetic group and comparison of phylogeny with oligotrophic isolates.

다(1). 이상의 결과로부터 지하수와 같이 빈영양 환경 내에는 통상농도의 NB 배지에서는 증식할 수 없고 저영양 배지에서만 증식 가능한 세균이 다수 분포해 있음이라고 판단되어, 분리균주의 NB 배지에서 증식능을 확인한 결과 통상농도의 NB에서 증식하지 않고 DNB 배지에서만 증식이 가능한 세균이 다수 검출되었다. Kuznetsov 등(11)과 Poindexter (16)는 1~15 mg/l 이하의 유기탄소원을 함유하는 배지에서 증식 가능한 세균을 저영양세균(oligotrophic bacteria)으로 분류하였으며, Ishida와 Kadota (8)는 배지 1리터당 1 mg이하의 유기탄소원을 함유하는 배지에서 증식 가능한 세균을 저영양세균이라고 하였다. 본 실험에서 사용한 NB 배지의 경우, 배지중의 유기 탄소 함유량은 7550 mg C/l로 10⁻⁴배로 희석한 배지에는 약 1 mg의 유기 탄소원이 포함되어 있다고 할 수 있다. 따라서, 상기의 기준을 고려해 본다면 10⁻⁴배로 희석한 배지에서 증식한 세균군은 모두 저영양세균이라고 할 수 있다(20). 이들 저영양세균은 분리하기가 매우 어렵고, 배양이 잘 되지 않거나 배양도중에 소멸되어버리는 경우가 많기 때문에 분류학적 및 생리·생화학적 특성이 충분히 해명되어 있지 못한 실정이다(15,20). 저영양 환경에서의 미생물 생리학적 특성에 관해서는 기존에 알려진 *Pseudomonas*나 *E. coli*와 같은 고영양세균이 기아상태 하에서 나타내는 생리학적 특성에 관해 일부 밝혀진 상태이다(14).

음용 지하수 시료(CW, CJ, DPG, CJG1)로부터 분리한 세균 중에는 저영양세균의 분포율이 높게 나타난데 반해 도시 근교지역과 축산농가 인근지역과 같이 오염된 지역의 지하수 시료(TJ, NPG1) 중에는 낮은 분포율을 나타내어, 향후 저영양세균의 정량적 측정을 통해 수질오염을 예측 판단하는 기초자료로 활용될 수 있으리라 기대한다.

음용 지하수로부터 분리한 저영양세균 102 균주의 16S rDNA 염기서열을 결정된 결과 Proteobacteria α-subdivision에 속하는 *Afipia*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Caulobacter*, *Phenyllobac-*

terium, Rhizobium, Sphingomonas, Proteobacteria β -subdivision에 속하는 Acidovorax, Azonexus, Variovorax와 Proteobacteria γ subdivision에 속하는 Rhodanobacter 등 다양한 계통군이 존재함이 확인되었다(Fig. 3). 지금까지 지하수로부터 분리·보고된 세균은 주로 Pseudomonas, Kingella, Acinetobacter 속과 그람양성 세균으로는 Micrococcus, Aerococcus, Enterococcus, Bacillus, Streptococcus 속 등이 대부분이었다(16).

이상 계통분류학적으로 조사된 저영양세균이 세균학적으로 인체에 안전하다고는 규정할 수 없으므로 저영양세균의 생리·생화학 특성에 관한 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 판단된다. 또한 본 연구에서 밝힌 음용 지하수 중의 저영양세균에 대한 정보를 데이터베이스화함으로써 지하수 수질관리를 위한 미생물학적 기준을 새로이 정립할 수 있으리라 기대한다.

참고문헌

- 김인기, 染谷孝, 황경숙. 2002. 형광현미경을 이용한 음용 지하수내 배양불능 세균의 관찰 및 정량적 평가. 한국미생물학회지 38, 180-185.
- 먹는물 수질기준 및 검사등에 관한 규칙(환경부령 제65호, 1999. 2. 11) 제2조 별표 1.
- Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.B. Roszak, S.A. Huq and L.M. Palmer. 1985. Viable but non-culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio. Technol.* 3, 817-820.
- Colwell, R.R. and S.A. Huq. 1994. Vibrios in the environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*, p. 117-133. In I.K. Wachsmuth, P.A. Blake, and O. Osvik(ed.), *Vibrio cholerae* and cholerae: molecular to global perspectives. American Society for microbiology, Washington, D.C.
- Hattori, T. 1976. Plate count of bacteria in soil on diluted nutrient broth as a culture medium. *Rep. Inst. Agric. Res. Tohoku Univ.* 27, 23-30.
- Hattori, T. 1996. Advance in soil microbial ecology and biodiversity. In: Proceedings of the eighth international congress for culture collections (Samson, R.A., Stalper, J.A., Mei, D., Stouthamer, A.H., Eds.), pp. 118-122.
- Heng Zhu, Feng Qu, and Li-Huang Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21(22), 5279-5280.
- Ishida, Y. and H. Kadota. 1979. A new method for enumeration of oligotrophic bacteria in lake water. *Arch. Hydrobiol.* 12, 77-85.
- Johnson, J.L. 1994. Similarity analysis of rRNAs, In gerhardt, P., R.G.E. Murray, W.A. Wood, N.R. Kirig (Eds), Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, DC. pp.683-700.
- Kogure, K. 1997. 病原細菌 Viable but Nonculturable (VBNC) State. *Microbes and Environments.* 12, 135-145.
- Kuznetsov, S.I., G.A. Dubinnina, and N.A. Lapteva. 1979. Biology of oligotrophic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 33, 377-387.
- Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, In Stackebrandt, E., M Goodfellow (Eds.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics, John Wiley and Sons, Chichester. pp.115-175.
- Leclerc, H.A. Moreau 2002. Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 207-222.
- Morita, R.Y. 1985. Starvation and miniaturization of heterotrophs, with special emphasis on maintenance of the starved viable state. In: fletcher M, Floodgate GD(eds) Bacteria in their natural environment. Academic Press, New York, pp. 111-131.
- Ohta, H. and T. Hattori. 1983. Oligotrophic bacteria on organic debris and plant roots in paddy field soil. *Soil Biol. Biochem.* 15, 1-8.
- Poindexter, J.S. 1981. Oligotrophy. Fast and famine existence. In M. Alexander(ed) Advances in microbiol ecology. Plenum Press, New York. Vol. 5, 63-89.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Szewzyk, U., R. Szewzyk, W. Manz, and K.H. Schleifer. 2000. Microbiological safety of drinking water. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 81-127.
- Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W; improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Whang, K and T. Hattori. 1988. Oligotrophic bacteria in rendzina a forest soil. *Antonie van Leewenhoek.* 54, 19-37.

(Received November 1, 2002/Accepted December 4, 2002)

ABSTRACT: Phylogenetic Analysis of Oligotrophic Bacteria Found in Potable Groundwater

In-Gi Kim, Tomoyoshi Hashimoto¹, and Kyung-Sook Whang* (Department of Microbiology, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea, ¹Department of Agro-Environmental Research, National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Kumamoto, 861-1192, Japan)

In order to investigate the ecological aspect of bacteria on groundwater, water samples were collected from various regions. Total of 318 strains were isolated from diluted nutrient broth (DNB) agar medium, and investigated their growth pattern on nutrient broth (NB) medium. As a result, all the isolated strains were divided into two groups, NB and DNB organisms. Growth of DNB organisms were suppressed in full strength NB medium but not in DNB medium, which were called oligotrophic bacteria in this study. Proportion of DNB organisms occurred in the frequency of 50-98% in potable groundwaters (CW, CJ, DPG, CJG1), however, it was 23, 46% in polluted site (TJ, NPG1). One hundred and two strains were identified as oligotrophic bacteria and their phylogenetic characteristics were determined by using 16S rDNA sequencing. Based on the phylogenetic analysis, they were found to fall into three major phylogenetic groups: belonging to the *Proteobacteria* α - (49 strains), β - (50 strains), γ (3 strains) subdivisions. The phylogenetic analysis suggested that microbial diversity of potable groundwater is more complex than that obtained in the past investigation.