

## Development of a Monitoring System for Water-borne Bacteria by a Molecular Technique, PCR-RFLP-sequence Analysis

Ji-Young Lee<sup>1</sup>, Eun-Young Jeong, Kyu-sang Lee<sup>2</sup>, Seul Ju<sup>3</sup>, Jong-Bae Kim<sup>2</sup>,  
Joon-Wun Kang<sup>3</sup> and Hyeyoung Lee<sup>1,†</sup>

<sup>1,2</sup>Department of Biomedical Laboratory Science and <sup>3</sup>Department of Environmental Engineering,  
College of Health Sciences, Yonsei University, 234 Maeji-ri, Heungup-myun, Wonju-si,  
Kangwon-do, 220-710, Korea

Since water borne infection causes acute diseases and results in spread of diseases by secondary infection, the prevention is very important. Therefore, it is necessary to have a method that is rapid and effective to monitor pathogenic bacteria in drinking water. In this study, we employed a systematic method, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis, to develop an effective monitoring system for possible bacterial contaminants in drinking water. For this purpose, PCR primers were derived from 992 bp region of the 16s rRNA gene that is highly conserved through the different species of prokaryotes. To test whether the PCR primers designed are indeed useful for detecting all the possible microbial contaminants in the water, the primers were used to amplify 16s rRNA regions of different microbial water-borne pathogens such as *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Listeria*, and *Staphylococcus*. As expected, all of tested microorganisms amplified expected size of PCR products indicating designed PCR primers for 16s rRNA indeed can be useful to amplify all different microbial water-borne pathogens in the water. Furthermore, to test whether these 16s rRNA based PCR primers can detect bacterial populations present in the water, water samples taken from diverse sources, such as river, tap, and sewage, were used for amplification. PCR products were for then subjected for cloning into a T-vector to generate a library containing 16s rRNA sequences from various bacteria. With cloned PCR products, RFLP analysis was done using PCR products digested with restriction enzyme such as *Hae* III to obtain species-specific RFLP profiles. After PCR-RFLP, the bacterial clones which showed the same RFLP profiles were regarded as the same ones, and the clones which showed distinctive RFLP profiles were subsequently subjected for sequence analysis for species identification. By this PCR-RFLP analysis, we were able to reveal diverse populations of bacteria living in water. In brief, in unsterilized natural river water, over 60 different species of bacteria were found. On the other hand, no PCR products were detected in drinking tap-water. The results from this study clearly indicate that the PCR-RFLP-sequence analysis can be a useful method for monitoring diverse, perhaps pathogenic bacteria contaminated in water in a rapid fashion.

**Key Words:** Water-borne bacteria, PCR-RFLP analysis, 16s rRNA gene

### 서 론

보건관리상 먹는 물의 가장 중요한 관건은 병원성 미생물 오염여부이다. 과거와 비교하면 수인성 전염병의 위협은 현저히 줄었으나 아직 세계 어느 나라에서도 수인성 전염병을

근절하지는 못하고 있다. 수인성 전염병이란 감염의 매개체가 물인 질병으로 오염된 물로 조제된 식품에 의해 발생하는 전염병을 일컫는다. 우리나라의 경우 콜레라, 장티푸스, 세균성이질 등이 대표적인 수인성 질병의 예로 지속적인 증가추세를 보이고 있다<sup>20,21</sup>). 수인성 감염의 원인 중 특히 미생물 오염은 2차 감염에 의한 확산의 우려가 있고 감염 후 급성 질병을 유발하기 때문에 예방이 매우 중요하다<sup>5,14</sup>). 더구나 세균성 질병이나 바이러스 등에 의해 오염된 음용수를 섭취함으로써 인체의 위해성이 더욱 증가됨에 따라서 선진국에서는 이에 대한 대책마련으로 모니터링 기법의 개발과 효과적인 소독공정 개발연구가 진행되고 있다.

\*논문 접수: 2003년 8월 8일  
수정재접수: 2003년 9월 22일

†별책 요청 저자: 이해영, 220-710 강원도 원주시 흥업면 매지리 234, 연세대학교 보건과학대학 임상병리과  
Tel: 033-760-2740, Fax: 033-760-2934  
e-mail: hyeyounglee@hotmail.com

병원성 미생물의 존재여부를 미리 안다면 이러한 수인성 질병을 미연에 방지할 수 있겠으나 병원성 미생물을 상시 측정하는 것은 검사방법의 난이성과 고비용, 장기간의 분석시간 등으로 어려운 현실이다. 우리나라에서도 간접적인 방식으로 대장균 등과 같은 지표 미생물을 사용하여 수인성 질병의 주원인인 분원성 오염여부를 상시로 진단하지만<sup>18,22)</sup> 수원에서의 분포수준이 매우 낮은 각종 수인성 세균의 존재는 현재 사용되고 있는 지표 미생물만으로는 직접 측정할 수 없다는 한계점이 존재한다.

최근 PCR 등의 분자생물학적 방법을 사용하여 다양한 종류의 미생물을 한번에 검출할 수 있는 방법 등이 개발된 바 있다.<sup>17,19)</sup> 특히 16s rRNA 부위를 이용한 PCR을 이용한 방법은 물에 존재하는 각종 microbial pathogen을 한번에 모두 증폭할 수 있을 뿐 아니라 검출에 필요한 시간을 단축시킬 수 있으며, 검사법의 민감도 및 특이도를 높일 수 있는 방법으로 여러 연구를 통해 보고된 바 있다.<sup>4,6-9)</sup>

한편, Restriction fragment length polymorphism (RFLP)은 다양한 세균의 typing에 널리 사용되고 있는 방법이다. 그런데 세균의 genomic DNA를 이용한 RFLP는 순도가 높은 많은 양의 genomic DNA를 필요로 하는 한편, 전 과정을 수행하는데 걸리는 시간이 길고 숙련된 기술이 필요함에 따라 번거로운 면이 있다. 그러나 PCR로 증폭된 산물을 제한효소로 잘라 그 RFLP profile을 분석하는 기술인 PCR-RFLP는 기존의 RFLP에 비해 훨씬 간단하고 신속하여 여러 연구에서 널리 사용되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 먹는 물에 오염될 수 있는 각종 수인성 병원균을 신속하고 정확하게 모니터링할 수 있는 분자생물학적 방법을 개발하기 위해, 각종 수인성 병원균 및 여타 세균을 증폭할 수 있는 16s rRNA based PCR primer를 이용하여 다양한 종류의 물에 존재하는 모든 세균을 검출하는 한편, PCR 산물을 대상으로 RFLP를 실시함으로써 같은 종류의 세균으로부터 증폭된 산물을 분류해 내는 데 사용하였다. 이어 각각의 서로 다른 PCR 산물은 sequence 분석함으로써, PCR-RFLP-sequence 분석법이 짧은 시간 내에 다양한 수인성 감염세균을 모니터링할 수 있는 신속하고 정확한 분자생물학적 방법인지의 여부를 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Site description and sample collection

본 연구에서는 W시에서 상수원수, 정수를 선정하여 2002년 11월 채수하였다. 원수시료는 섬강의 표층에서 채수하였고, 정수시료는 W시의 정수공정을 거친 최종수를 채수하였다. 채수용기는 다른 유기물의 오염을 막기 위해 증류수 및 메탄올로 세척하고 완전히 건조시킨 뒤, 채수하기 전 각 채수지

점의 지점수로 세척하였고, head space가 없도록 4 L를 채수하여 ice box에 담아 운반하여 4℃에서 보관하였다.

### 2. Set-up of apparatus for sterilization

미생물을 소독하기 위한 소형의 소독장치를 set-up하였다. 미생물 처리장치는 0.5 L로 Ozone, UV 각각 단독공정과 Ozone/UV 혼합공정을 실시하였다. Ozone generator (OZONIA 사, 스위스)를 이용하여 고 순도 산소로 오존을 발생시켜 기체상으로 연속적으로 반응기에 주입하였으며, 가스 유량은 flow meter를 이용하여 0.8 L/min으로 일정하게 유지하였고 주입되는 오존 농도는 5분간 4 mg/L를 처리하였고, UV 조사는 254 nm의 저압램프를 이용하여 417 mW/L 처리하였다.

### 3. Water sample process for DNA preparation

시료수의 침전물이 가라앉지 않도록 잘 혼합하여 high speed용 Nalgene centrifuge tube를 이용해 원침을 반복 실시하여 pellet을 얻었다. 원침조건은 4500 g (20,000 rpm), 30분, 실온에서 total volume 100 ml로 하였고 원침이 끝난 뒤 침전물을 1× TE buffer 100 µl에 녹인 후 PCR를 실시하기 위해 DNA는 boiling method (5분간 끓인 뒤 원침 후 상층액 이용)을 통해 분리하여 0.8% TAE agarose gel을 이용하여 DNA 농도를 확인한 후 5~10 µl의 부피를 PCR 반응에 사용하였다.

### 4. PCR amplification

PCR에 사용된 water sample은 10 µl 사용하고, sample내 inhibitor의 존재를 알아보기 위해 positive control로 *E. coli* O157:H7 ATCC 35150 균주 3 µl도 함께 사용하였다. PCR을 실시하기 위한 16s rRNA primer는 Table 1에 나타냈다<sup>23)</sup>. 전체 반응용액은 50 µl로 conventional PCR (Bioneer, Korea)제품을 사용하여 실시하였다. PCR 증폭조건은 DNA thermal cycler (Model 2700, Perkin Elmer Co.)를 이용, initial denaturation step은 94℃ 2분, 그리고 94℃ 2분, 45℃ 1분 30초, 72℃ 2분간 25 cycle을 실시하였고, 최종 DNA합성은 72℃ 10분으로 하였다. 증폭된 PCR 산물은 TBE 완충액 (45 mM Tris-borate pH 8.0, 1 mM EDTA)에서 1.0% agarose gel (Bioneer, Korea)로 전기영동한 후 ethidium bromide 용액에 염색하여 UV lamp하에서 DNA band를 확인하였다.

### 5. Cloning of 16s rRNA

GeneClean III kit (BIO 101 System)를 이용해 증폭된 PCR product를 elution하고, TOPO TA cloning kits (Invitrogen, Korea)의 plasmid vector pCR 2.1<sup>®</sup>-TOPO<sup>®</sup> plasmid vector를 이용해 ligation, One shot<sup>®</sup> chemical transformation kit의 TOP 10 competent cell를 이용해 cloning하였다. Cloned rRNA PCR 산물을 다시 PCR하기 위해 100 µl/ml ampicillin을 포함한 LB plate

에 배양한 후 수 개의 colony를 selection하였다.

### 6. Colony PCR and Enzyme digestion

위에서 실시한 direct PCR과 동일조건으로 colony PCR을 실시하여 correct-size inserts로 cloning되었는지를 확인하였다. RFLP를 실시하기 위해 사용한 DNA양은 10 µl, DNA양이 적은 것은 적당한 양으로 맞추어 전체 반응용액을 20 µl로 하여 5 U의 *Hae* III (MBI Co.) enzyme으로 37°C에서 1시간 동안 처리하였다<sup>15,16</sup>. Restricted DNAs는 2.5% TBE agarose gel에서 pattern을 확인했다.

### 7. Determination of nucleotide sequence

각각의 library에 대한 RFLP pattern을 group화하여 염기서열 분석을 위해 대표적인 clones을 선택하여 plasmid extraction kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 Plasmid DNA small-scale miniprep을 실시한 뒤 염기서열을 분석하였다.

## 결 과

1. 16s rRNA 유전자 부위 가운데, 다양한 세균의 동정에 사용될 수 있는 signature 부위를 포함하는 PCR primer를 선정, 제작하였다 (Table 1). 물 속에 존재하는 다양한 세균을 모두 증폭할 수 있도록 가능하면 모든 세균에 conserve하게

존재하는 부위를 PCR primer로 선정하였다. 이어 이 PCR primer가 수인성 병원균을 포함한 물에 존재하는 각종 세균을 모두 증폭할 수 있는지의 여부를 확인하기 위해 장내세균을 포함한 다양한 표준균주를 대상으로 (Table 2) PCR을 시행하였다. PCR 결과를 분석한 결과 예상했던 바와 같이 992 bp 크기의 산물이 증폭됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 이로써 본 실험에서 사용하게 될 16s rRNA 부위의 PCR primer가 각종 수인성 병원균을 효과적으로 증폭할 수 있으리라는 것을 알 수 있었다.

2. 16s rRNA primer를 이용하여 섬강 상류에서 채취한 강

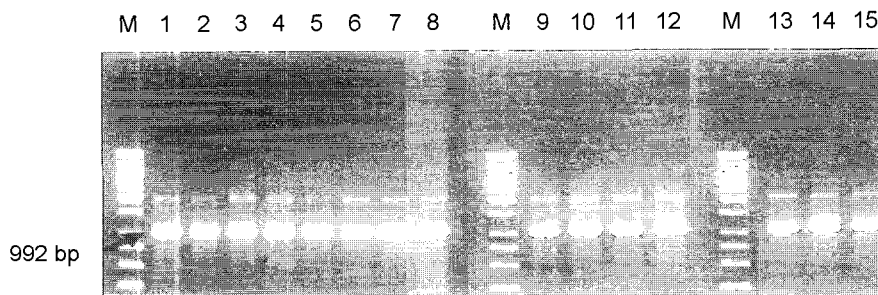
**Table 2.** Bacterial strains for PCR

Bacterial Strains	
Pathogenic <i>Escherichia</i>	EPEC (STET) U5-41, U9-41
	EPEC H311b, Su3912-41
	EHEC U4-41, H61
	EIEC Guanabara, Ewing277
<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi</i>
	<i>S. paratyphi-A</i> ATCC9150
	<i>S. typhimurium</i> ATCC14028
<i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i>
	<i>S. flexneri</i>
	<i>S. sonnei</i>
<i>Yersinia</i>	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC9610
	<i>Y. pseudotuberculosis</i> ATCC29833
<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> ATCC35657
<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i> ATCC25923
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i> ATCC15313

**Table 1.** Primer sequences to amplify 16s rRNA gene

Primer name	Sequences	mer
Forward 519f	5'-CAGCMGCCGCGGTAATWC-3'	18
Reverse 1492r	5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'	19

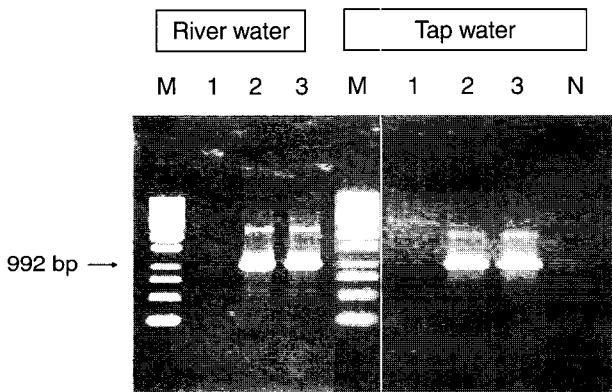
※519f: 519~536 of *E. coli* 16s rRNA numbering; Brosius *et al.*, 1978, Lane *et al.*, 1985  
 ※1492r: 1510~1492 of *E. coli* 16s rRNA numbering; Eden *et al.*, 1991



**Fig. 1.** PCR products of 16s rRNA gene of diverse bacteria. Amplified DNA run on 1% TBE gel. Lane M, DNA size marker (1 kb Ladder; MBI, Germany); Lane 1~4, *E. coli* strains (STEC, EPEC, EHEC, EIEC); Lane 5, *P. aeruginosa*; Lane 6, *S. paratyphi-A*; Lane 7, *S. typhimurium*; Lane 8, *S. typhi*; Lane 9, *S. flexneri*; Lane 10, *S. sonnei*; Lane 11, *Y. enterocolitica*; Lane 12, *K. pneumoniae*; Lane 13, *Y. pseudotuberculosis*; Lane 14, *S. aureus*; Lane 15, *L. monocytogenes*

물 및 수돗물에 존재하는 미생물을 증폭할 수 있는지의 여부를 확인하기 위해 대상물을 이용하여 PCR을 실시하였다 (Fig. 2). 그 결과 강물 시료는 PCR로 증폭된 산물이 있는 반면에 살균소독이 된 수돗물에서는 PCR 증폭이 되지 않아 16s rRNA primer가 실제로 존재하는 세균 증폭에 유용할 수 있음을 시사하였다. 여러 종류의 부유물이 존재하는 자연수나 살균작용을 거친 수돗물에 PCR 반응을 억제하는 PCR 억제제가 있어 PCR 증폭을 억제하는지의 여부를 확인하기 위해 이미 앞서 16s rRNA primer로 PCR 증폭이 이뤄지는 것으로 확인된 *E. coli* 균주의 genomic DNA를 positive control로 사용하여 함께 PCR을 실시하였다 (Fig. 2, lane 2). 대상 물에 *E. coli* 균주의 genomic DNA를 첨가하여 PCR을 시행한 결과 *E. coli* 균주의 genomic DNA만으로 PCR을 시행한 결과 (Fig. 2, lane 3)와 동일하게 나타난 것으로 보아 대상 시료로부터 얻은 DNA에는 PCR 억제제가 존재하지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

3. 이어, PCR로 증폭된 산물이 대상물 속에 존재하는 어떤 세균으로부터 유래되었는지를 동정하기 위해 증폭된 PCR 산



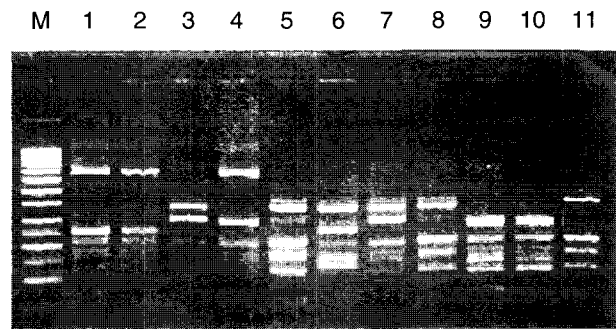
**Fig. 2.** PCR products of 16s rRNA genes of water samples. Amplified DNA run on 1% TBE gel. Lane M, DNA size marker (1 kb Ladder); Lane 1, S: Only water sample; Lane 2, S+P: Mixture of water sample with positive control; Lane 3, P: Positive control, *E. coli* O157:H7 ATCC 35150; Lane N: Negative control. Water sample: Tap water, River water

물을 PCR 산물 클로닝 벡터인 T-벡터에 클로닝하여 *E. coli* 를 형질 전환하였다. 이렇게 얻어진 *E. coli* colony를 PCR 산물이 들어 있는 clone의 library로 사용하여 각각의 clone이 유래된 세균을 동정하기 위해 PCR-RFLP를 수행하였다. PCR-RFLP를 위해 각각의 colony로부터 얻은 DNA와 16s rRNA primer를 이용한 PCR을 수행하고 제한효소인 *Hae* III로 처리하여 RFLP profile을 얻었다 (Fig. 3). PCR-RFLP profile을 분석하여 서로 같은 profile이 나오는 clone은 같은 종류의 세균 DNA를 증폭한 clone으로 간주하여 분류하였다. 그 결과 60여종의 서로 다른 PCR-profile이 나오는 것으로 확인되었다.

4. 60여가지 서로 다른 PCR-RFLP profile을 갖는 colony의 16s RNA 유전자를 sequence 분석하였다. 그 결과 *Flavobacterium* sp., *Beta proteobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Actinobacteria*, *Haliscomenobacter hylrossis*, *Thermodesulfabacteria* 의 60여 종의 다양한 수중 세균이 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Table 3).

## 결 론

먹는 물이란 먹는데 통상적으로 사용되는 자연 상태의 물



**Figure 3.** Results of RFLP with PCR products amplified with river water. PCR was done with DNAs from different colonies and amplified DNAs were subsequently digested with *Hae* III restriction enzyme and run on 2.5% TBE gel. Lane M, DNA size marker (50 bp Ladder); Lane 1-11 PCR-RFLP profiles of 11 different colonies.

**Table 3.** Variety of bacteria detected in river water before and after sterilization

River water	Number of detection	Major bacterial populations detected in river water	Similarity (%) to known sequences
강물	Flavobacterium sp. 외 60여종	<i>Flavobacterium</i> sp.	98
		<i>Beta proteobacterium</i> sp.	97
		<i>Pseudomonas</i> sp.	98
		<i>Actinobacteria</i>	99
		<i>Haliscomenobacter hylrossis</i>	98
		<i>Thermodesulfabacteria</i>	97

과, 자연 상태의 물을 먹는데 적합하도록 처리한 수돗물 등을 말한다. 산업이 발전하면서 각종 오염원에 의해 먹는 물이 오염될 가능성이 많아 졌을 뿐 아니라, 최근 들어 정수장 내에서 바이러스가 검출되었다는 보고도 있어 수질관리 및 모니터링 시스템의 필요성이 강조되고 있는 실정이다.

현재 사용되고 있는 먹는 물의 미생물오염 분석방법은 전체 미생물을 대상으로 시험하기가 현실적으로 불가능하므로 대장균 등의 지표세균을 측정하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 이와 같은 방법은 분변 등에 의한 수원의 오염도를 측정하기에는 적당하나, 다양한 세균에 의해 야기되는 수인성 병원균을 효과적으로 차단하기에는 적당하지 않다. 즉, 안전한 수원확보를 위해서는 오염미생물의 존재를 정확하고 간편하면서도 신속하게 모니터링하는 방법이 매우 중요하다고 할 수 있을 것이다. 따라서 최근에는 각 세균의 특징적인 유전자 정보를 기초로 하는 다양한 분자생물학적 동정법이 개발되고 있다.

본 연구에서 사용한 PCR-RFLP법에서는 16s rRNA 유전자를 세균동정에 이용하고자 하였다. 16s rRNA 유전자가 다양한 세균의 분류에 유용하게 이용될 수 있는 signature 유전자 부위라는 것은 이미 여러 연구를 통해 확인된 바 있다. 본 연구에서도 16s rRNA PCR primer가 다양한 세균의 16s rRNA 증폭에 유용하다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). primer로 증폭이 가능한지 확인한 세균은 모두 수인성 전염병을 일으킬 수 있는 잠재력을 가진 세균들로 향후 다양한 종류의 물을 대상으로 PCR을 수행할 경우 이들 균이 존재하는 경우 증폭할 수 있기 위해 이들 세균이 증폭되는지의 여부를 확인한 것이었다.

이러 섹장에서 채취해 온 강물 및 수돗물을 대상으로 PCR을 수행하여 본 결과, 염소소독에 의해 세균 등의 오염원 제거 처리가 된 수돗물의 경우에는 세균에 의한 16s rRNA PCR 증폭이 되지 않음을 확인할 수 있었다. 이는 16s rRNA PCR primer가 균의 DNA만을 특징적으로 증폭한다는 것을 시사한다고 생각된다. 한편 수돗물에서 PCR이 되지 않은 이유가 물에 존재하는 PCR 억제제에 의한 것인지를 알아보기 위해 대장균인 *E. coli*의 DNA를 물 시료에 넣어 PCR을 수행해 본 결과, *E. coli*의 DNA만으로 수행한 PCR 결과와 동일하게 나와 억제제가 존재하지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). 강물로 같은 실험을 수행한 경우에도 동일한 결과를 보였으며, 하수처리장에서 채취한 물을 대상으로 시행한 실험에서도 같은 결과를 얻을 수 있었다. 따라서, 향후 다양한 종류의 물을 대상으로 모니터링을 실시하는 경우에도 본 실험에서 사용한 DNA 분리방법이 적당할 것으로 생각된다.

PCR로 증폭된 산물이 물 속에 존재하는 어떤 세균으로부터 유래했는지를 알아내어 물 속에 존재하는 균을 확인하는 방법은 sequence analysis 및 RFLP, 혹은 probe에 hybridization

하는 방법 등이 있다. 이 가운데 probe hybridization방법을 제외한 나머지 방법들은 PCR한 산물이 다양한 세균에 의해 증폭된 산물이므로 각각의 DNA를 cloning하여 분석해야 하는 방법이다. Cloning된 산물을 직접 각각 sequence 분석할 수도 있을 것이나, colony 수가 많아 바로 sequence를 한다는 것은 비용과 노력이 많이 들어가므로 RFLP를 이용하여 같은 종류의 DNA를 가려내는 것이 매우 유용한 것으로 생각된다. 본 연구에서는 PCR-RFLP-sequence 분석 결과 강물에 존재하는 60여종 이상의 다양한 미생물을 동정하는데 성공하였다. 각각의 clone으로부터 얻은 PCR-RFLP profile은 향후 다양한 물을 대상으로 PCR-RFLP를 수행하면 별도의 sequence 분석 없이 각각의 균을 동정하는 데 이용될 수 있을 것이므로 귀중한 자료가 될 수 있을 것으로 사료된다. 즉, 본 연구에서는 물 시료로부터 별도의 까다로운 절차 없이 DNA를 분리하여 16s rRNA 부위를 PCR 증폭, 이 산물을 클로닝하고 RFLP 및 sequence 분석함에 따라 다양한 물에 존재하는 다양한 세균을 손쉽게 모니터링할 수 있는 기법을 개발하였다. 향후 다양한 물 시료를 대상으로 같은 방법으로 대상물에 존재하는 세균을 모니터링 하고자 한다.

## 참 고 문 헌

- 1) Amann RI, Ludwig W and Schleifer KH (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, **59**: 143-169.
- 2) Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ and Noller HF (1978): Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **75**: 4801-4805.
- 3) Eden PA, Schmidt TM, Blakemore RP and Pace NR (1991): Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA. *Int J Syst Bacteriol*, **41**: 324-325.
- 4) Embley TM and Stackebrandt E (1996): The use of 16S rRNA sequences in microbial ecology, pp. 39-62. In W. Pickup, and J. R. Saunders (ed.), "Molecular approaches in environmental microbiology", Ellis Horwood, London, United Kingdom.
- 5) Feachem RG, Bradley DJ, Garelick H and Mara DD (1983): Sanitation and disease: health aspects of excreta and wastewater management, John Wiley & Sons, "World Bank Studies in Water Supply and Sanitation 3", New York, US.
- 6) Head IM, Saunders JR and Pickup RW (1998): Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb Ecol*, **35**: 1-21.

- 7) Hidetoshi Urakawa, Kumiko Kita-Tsukamoto and Kouichi Ohwada (1999): Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology*, **145**: 3305-3315.
- 8) Holben WE, Jansson JK, Chelm BK and Tiedje JM (1988): DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community. *Appl Environ Microbiol*, **54**: 3-711.
- 9) Hugenholtz P, Goebel BM and Pace NR (1998): Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, **180**: 4765-4774.
- 10) Cho JC and Kim SJ (2000): Increase in Bacterial Community Diversity in Subsurface Aquifers Receiving Livestock Wastewater Input. *Appl Environ Microbiol*, **66**: 956-965.
- 11) Kimura M (1980): A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*, **16**: 111-120.
- 12) Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML and Pace NR (1985): Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **82**: 6955-6959.
- 13) Martinez-Murcis AJ, Acinas SG and Rodriguez-Valeria F (1995): Evaluation of prokaryotic diversity, by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiol Ecol*, **14**: 219-232.
- 14) McFeters and Gordon A (1990): 502 p. In Springer - Verlag, "Drinking water microbiology: progress and recent developments", xiv, New York.
- 15) Urakawa H, Kita-Tsukamoto K and Ohwada K (1998a): A new approach to separate the genus Photobacterium from Vibrio with RFLP patterns by HhaI digestion of PCR-amplified 16S rDNA. *Curr Microbiol*, **36**: 171-174.
- 16) Urakawa H, Kita-Tsukamoto K and Ohwada K (1997): 16S rDNA genotyping using PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism) analysis among the family Vibrionaceae. *FEMS Microbiol Lett*, **152**: 125-132.
- 17) Ward DM, Weller R and Bateson M (1990): 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured organisms in a natural community. *Nature*, **345**: 63-65.
- 18) WHO (1992): Revision of the WHO Guidelines for Drinking Water Quality.
- 19) Wintzingerode FV, Göbel UB, and Stackebrandt E (1997): Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev*, **21**: 213-229.
- 20) 보건복지부 (1999): 수인성 전염병 발생현황, <http://dis.mohw.go.kr>
- 21) 정현미, 윤재용 (1994): 미국 음용수의 미생물학적 기준에 관한 고찰, 수질보전학회 (10).
- 21) 환경부 (1995): 먹는 샘물의 기준과 규격 및 표시기준 고시.