

지하수 미생물군집의 분자생태학적 분석

조장천 · 김상종*

서울대학교 분자미생물학연구센터, *서울대학교 생명과학부

지난 수십년 동안 급속한 산업화의 영향에 따라 지표수가 오염되면서 전 세계적으로 지하수 이용량이 급속히 증가하고 있다. 유럽연합국가들의 지하수 이용률은 약 75%이며, 미국에서는 약 50%의 지하수 이용률을 보이고 있다. 특히 미국 농촌 지역의 지하수 이용률은 약 90%에 달하고 있는 등 지하수의 수요는 매우 큰 상태이다. 반면, 우리나라의 지하수 이용률은 아직 5% 미만에 그치고 있지만, 급속히 오염되고 있는 지표수의 사정에 따라 지하수 이용률이 점차 증가하는 추세이다[1]. 지하수 이용량의 급격한 증가와 부적절한 관리에 따라 지하수 수위는 점차 하락하고 있으며 각종 화학물질과 병원성 미생물로 인한 오염은 지하수의 수질을 크게 위협하고 있는 실정이다. 대수층(Aquifer)이 일단 오염되면 다시 복구되는 것은 매우 어려우며 복구하는 데에는 상당한 비용과 노력이 따르게 된다. 설사 오염원에 대한 처리가 이루어졌다고 하더라도 대수층의 꾸준한 이동에 따라서 수년동안 오염의 효과가 장기적으로 존재하게 된다. 이처럼 지하수의 중요성에도 불구하고, 지하수에 대한 연구는 지하수의 흐름과 부존량에 대한 연구를 중심으로 이루어져 왔고 미생물학의 관점에서의 지하수에 대한 연구는 극히 저조한 상태에 놓여 있다.

대수층(aquifer)과 지하토양 및 암석에 존재하는 미생물에 대한 연구가 수행되기 전까지는 세균이 지하수층에 존재하지 않는 것으로 인식되어져 왔으나 최근 10년 동안의 연구결과는 세균, 바이러스 및 원생동물이 지하 깊은 곳에서까지 다양한 종류로 존재하며[10, 19, 40, 59], 이들이 활성을 지니고 있는 것을 밝히고 있어[25, 62, 67, 68] 현재 더욱 많은 연구가 진행 중에 있다. 그러나 지하수층에 존재하는 미생물에 대한 연구는 주로 오염토양 및 지하수의 생물학적인 복원(bioremediation)의 관점에서 오염물질의 이동과 제거의 측면에서 수행되었기 이[75] 지하수의 미생물학적인 안전성 판단과 생태계의 구조와 기능을 이해하기 위한 미생물군집의 분석은 비교적 연구가 덜 진행된 상태이며, 국내의 경우에는 지하수 미생물군집에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다.

지하수의 미생물학적인 안전성을 판정하기 위하여는 병원성 세균 및 지표세균의 존재확인[21], 오염원으로부터 유출 및 지하수층으로의 유입경로와 이동경로[61], 미생물군집의 분포 및 구조[22], 미생물군집의 이동에 미치는 여러 물리화학·지

질학적인 요인[69], 미생물 군집의 생존기간 및 생존의 방식, 그리고 이들 군집의 병원성의 여부 등에 대한 광범위한 연구가 필요하다. 이 중에서 무엇보다도 중요한 것은 우선적으로 지하수층에 존재하고 있는 미생물 군집구조의 파악이다. 기본적으로 미생물 생태학은 생태계에 어떤 종류의 미생물이 존재하고 있는가?(What is it?), 생태계에 얼마나 많은 미생물이 있는가?(How many are there?), 그리고 그들은 살아 있는가?(Are they active?)에 대한 답을 구하는 학문이며 이들 질문을 해결하기 위한 군집구조의 분석은 미생물 생태학의 출발점이자 목표점이다.

이러한 점에서 본 고에서는 최근 급속도로 발달한 분자생태학적 기법을 바탕으로 분석된 지하수 군집구조에 대해 고찰하고자 한다. 이를 위하여 우선, 지하수 미생물군집에 대한 전통적인 분석으로부터 확인된 지하수 미생물 군집구조를 살펴볼 것이며, 지하수 미생물군집구조 분석을 위한 분자생태학적 방법론, 분자생태학적 기법을 도입하여 얻어진 미생물의 군집구조 및 국내의 지하수 미생물군집에 대한 연구결과를 순차적으로 고찰하고자 한다.

지하수 미생물군집에 대한 전통적인 분석

매우 오랫동안 지하수생태계에 대한 생태학적 연구는 다른 생태계에 대한 연구에 비해 매우 저조하게 진행되었다. 그 이유는 지하의 토양과 지하수를 오염 없이 채취하는 것은 매우 어려운 일이었고 많은 시간과 노력, 비용이 필요했기 때문이었다. 따라서, 지하수생태계에 대한 전통적인 개념은 표층생태계와의 비교를 통해 형성될 수밖에 없었다(Table 1). 가장 기본적인 지하수의 특징은 태양광선이 들지 않은 어두운 장소라는 것이다. 따라서 표층에서와는 달리 광합성으로 표현되는 일차생산이 존재하지 않는 생태계이다. 그러므로 기본적인 먹이사슬구조 역시 표층의 autotrophy와는 달리 heterotrophy 혹은 allotrophy를 보인다. 또한, 종의 풍부도(richness)나 균일도(evenness)가 매우 낮은 생태계이다. 이러한 기본적인 관점은 1980년대 후반에 들어서 집중적으로 시작된 지하수 미생물군집에 대한 연구의 결과 더욱 풍부해지게 되었다. 특히, 이러한 집중적인 연구는 지하수의 미생물군집은 지극히 단순하고 숫

Table 1. Physical and biological organization of the groundwater environment in contrast to surface waters.

	Underground system	Surface system
Environment	Constant darkness Habitats: restricted variety Physical inertia, predictability	Light(alternative day/night) Habitats: high diversity Frequent variations, low predictability
Organisms	Morphological, physiological, and behavioral specialization to underground environment	No adaptation to underground environment (except ecological one for ubiquitous species)
Communities	A selection dominant, Richness, diversity, and density: low and variable Population concentration in interstitial habitat near contact points with surface one	r or k selection dominant Richness, diversity, and density: generally high and variable Different spatial distribution
Functional characteristics	Heterotrophy and allotrophy With or without rigorous resource filtration by habitat Short and simple food webs System with lower productivity	Autotrophy Optional resource filtration High diversity of diets and very complex food webs System with higher productivity

자도 얼마 되지 않는다는 기존의 생각을 뒤집어 옳으며 지하수 생태계에도 다양한 미생물 군집이 존재하고 그들의 활성도 높다는 사실을 새롭게 밝혀 내었다.

지하 깊은 곳의 미생물의 생태에 대해서 알려지기 시작한 것은 최근 10여년간의 연구의 결과이다[18, 40, 41, 42, 45]. 1970년에 들어서서는 얕은 지하수층(shallow aquifer)의 오염이 보고되기 시작하였으며 1980년대에는 깊은 지하수층(deep subsurface aquifer)의 오염에 대한 관심이 고조되기 시작하였다. 깊은 지하환경에 적응하면서 생존하고 있는 미생물에 대한 연구는 지하환경의 생물학적 정화(Bioremediation)에 대한 연구가 시작하면서 본격적으로 연구가 시작되었다[72]. 특히 미국 에너지성(USDOE, U.S. Department of Energy)에서 주관한 Hanford site에서는 지하수 미생물생태학, 지질학, 수문학, 지질화학 등 새로운 분야에 대한 연구가 집중적으로 이루어졌으며[10, 39, 41, 42], 이들의 연구결과, 지하층에는 지표생태계와는 독특한 미생물군집이 존재하며 이들 군집 역시 지표와 마찬가지로 매우 다양하다는 사실이 밝혀졌다[8, 42].

이러한 지하수 미생물군집에 대한 연구는 심층 토양층[8, 15, 25], 심층 대수층[9, 46], 고퇴적층[18], 현무암 대수층[31] 등을 대상으로 주로 미생물의 존재유무와 미생물의 종류에 대한 접근으로부터 시작되었다. 지하수층에서 미생물의 존재는 다양한 생화학 물질의 측정, 총세균수의 측정, 생균수의 측정 등으로 확인될 수 있었으며[39, 46, 70], 미생물의 활성도는 방사성 동위원소로 표지된 기질의 이용도로 측정될 수 있었다[7, 49, 54]. 이 이외에도 지하에서 분리된 미생물의 형태학적 특징과 생리적인 특징을 바탕으로 하는 미생물의 동정은 지하수층의 미생물 군집구조에 대한 이해를 한층 더 심화시켰으며, 이러한 연구결과에 따라 대수층이나 심층의 지하토양 및 암반에 존재하는 미생물군집은 측정시료, 측정장소, 그리고 측정

생물산업

깊이에 따라 매우 다양함이 확인되었다[8].

Pedersen과 Ekendahl[67]은 Sweden의 지하 860m의 심층 화강암 대수층에 존재하는 세균군집의 분포와 측정을 종합적으로 수행하였다. 총세균수는 평균 2.6×10^5 cells/ml 이었으며 종속영양세균수는 7.7×10^3 cells/ml이었다. 또한, 이들은 분리된 균주들의 대부분은 다양한 탄소원을 이용할 수 있는 그램 음성세균이라고 밝혔다. 대부분의 지하층의 총세균수(total bacterial numbers)는 $10^5 \sim 10^7$ cells/ml, $10^6 \sim 10^8$ cells/g-dw이며 총생균수(total direct viable counts)는 총세균수의 0.5%에서 80%까지 이른다. 하지만, Hazen[43] 등은 지하토양 및 이들과 인접하고 있는 지하수에서 미생물 군집을 비교한 결과, 이들의 군집이 서로 다름을 확인하였고, 지하층에 대한 연구는 지하토양과 지하수를 종합적으로 고찰할 때 완성될 수 있다고 제안하였다. 또한, 일반적으로 지하층에는 그램음성세균보다는 그램양성세균이 보다 많은 비율로 존재한다. Balkwill 등[8]은 많은 양의 recharge가 이루어지고 있는 지하수층의 세균군집을 분석한 결과, 75%의 분리주가 그램양성세균임을 밝혔으며 이들은 대부분 *Arthrobacter*와 *Bacillus* 속에 속한다고 하였다.

지하수에서 분리된 세균을 대상으로 한 주요한 연구결과 중의 하나는 지하수세균이 빈영양환경에 잘 적응되어 있다는 것이다. 지하수 생태계는 기본적으로 탄소원 및 에너지원, 그리고 여러 영양물질이 고갈되어 있는 생태계이므로 지하수의 세균들은 생존에 적합한 환경으로 신속하게 이동할 수 있는 능력, 낮은 endogenous respiration, PHB와 같은 에너지 저장원들을 생산할 수 있는 능력을 지녀 생존능력을 스스로 키운다고 보고되었다[13].

이러한 연구들은 주로 콜로니 특징, 그램양성/음성, 다양한 탄소원을 이용할 수 있는 능력의 존재여부 등 Bergey's

manual에 따른 표현형의 측면에서 미생물 군집의 특징을 조사한 연구이다[40, 50]. 하지만 심층의 지하층에서 배양가능한 세균의 수는 총세균수의 1%에 지나지 않으므로[17, 44], 이러한 연구가 지하수 세균군집을 전체적으로 반영하고 있다고 할 수 없다. 지하수에는 많은 미생물들이 dormant stage 또는 살아 있지만 배양이 불가능한상태(VBNC, viable but non-culturable state)로 존재하고 있기 때문에 배양에 의존하는 기존의 연구방법은 당연히 한계를 가질 수밖에 없다. 이러한 한계를 극복하기 위하여 최근에는 배양에 의존하지 않는 군집구조의 분석이 지하수를 대상으로 집중적으로 연구되고 있다.

분자생태학적 군집구조 분석방법

1965년에 Zuckerkandl and Pauling[79]이 미생물 계통분석에 핵산을 사용하는 것에 대한 타당성을 제기한 이래로 순수 배양에서 나타나는 문제점을 극복하기 위한 많은 노력들이 있었으며 그 결과 분자미생물생태학이라고 하는 커다란 흐름이 형성되게 되었다. 특히 Woese 그룹[78]과 Pace 그룹[64, 65]은 16S ribosomal RNA를 미생물 계통학과 분자미생물생태학에의 적용을 시도하였으며 이러한 분석방법은 현대 분자생태학의 주요한 연구분야가 되고 있다.

미생물의 군집구조를 분석할 수 있는 다양한 분자들 중에서 rRNA 유전자는 세균들을 종이나 아종까지 분리할 수 있는 정보를 담고 있는 영역이고, 모든 생물체에 존재하며, 이들 중 변이가 심한 variable region은 종과 속간의 분화에 따른 다양성이 큰 부분이므로 미생물의 분류 및 진화의 측면에서 많은 연구가 되어 왔다. rRNA 유전자중 5S rRNA 유전자는 크기가 120 bp밖에 되지 않아 실험이 용이하다는 장점을 지니고 있어서 rRNA 분자들 중에서 가장 먼저 세균군집의 다양성을 측정하는 영역에 적용되었다[73, 74]. 하지만, 분석대상 염기서열이 매우 작기 때문에 전체의 군집구조를 분석하는데 필요한 정보량이 적어서 5S rRNA 접근방법은 다양성이 매우 낮은 시료에만 적용될 수 있는 단점을 지니고 있다[65]. 환경시료에 대한 PCR 적용방법이 확립되고, cloning과 sequencing 방법이 간편해 지면서 5S rRNA 접근방법은 16S rRNA를 기반으로 하는 접근방법으로 점차 대체된다. 16S rRNA 유전자는 크기가 약 1.6 kb이므로 5S rRNA 유전자보다 정보량이 훨씬 많으며 16S rRNA에 대한 집중적인 연구결과로 축적된 database의 양이 상당하다. 또한, 16S rRNA 유전자의 일부는 진화의 속도가 매우 느려 염기서열이 잘 보존되어 있어서 다양한 분류군들에 대한 상호비교를 가능하게 해주며, 특히 3'과 5' 말단에 보존된 염기서열은 거의 모든 세균군집에 공통적으로 존재하므로 PCR을 통한 군집구조의 분석을 가능하게 해준다. 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용한 미생물 군집구조의 분석에는 여러가지 방법이 있으며, Figure 1은 분자미생물생

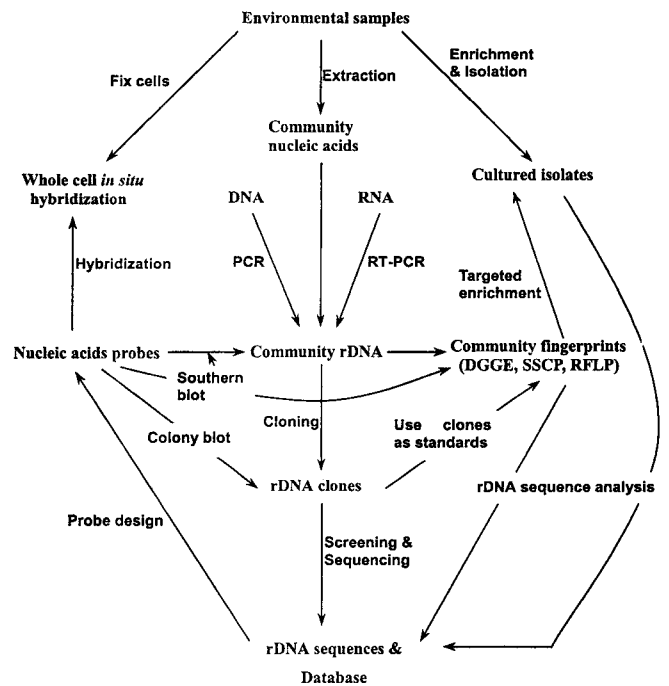


Fig. 1. Various approaches using nucleic acids in molecular microbial ecology.

태학에 사용되는 16S rRNA 접근방법을 정리하고 있다. 16S rRNA 염기서열을 통한 접근 방법에는 크게 *in situ* hybridization, PCR을 통한 미생물 군집의 fingerprinting, 그리고 PCR-cloning-sequencing 방법이 있다.

형광물질로 표지된 probe를 이용하는 *in situ* hybridization 방법은 1980년대 후반에 개발되었으며[34], 최근에는 다양한 생태계에서 다양한 분류군에 대한 분석에 사용되고 있다[5, 6]. 이 방법은 고정된 세포내의 rRNA에 형광물질로 표지된 probe를 hybridization시켜 형광을 띠는 미생물을 형광현미경으로 직접 관찰하는 방법이다. PCR방법의 문제점이라고 할 수 있는 '정량의 불가능성'이 이 방법에는 적용되지 않으며 특정 분류군에 대한 군집의 크기를 결정할 때에는 매우 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 염기서열은 알고 있지만 그들의 형태를 모르는 분류군이 있다고 할 때 직접 이들을 눈으로 관찰할 수 있는 장점을 지닌다. 그러나 이 방법을 전체 생태계의 군집구조에 적용하기 위하여는 수많은 분류군에 대하여 수많은 probe를 제작해야 하고 제작된 probe에 해당하는 수만큼 현미경을 관찰해야 하므로 다양한 개체군이 존재하는 자연생태계의 군집구조를 분석하는 데에는 한계가 있다.

PCR을 바탕으로 하는 미생물 군집구조의 분석에는 두가지 일반적인 방법이 있다. 그 하나는 community fingerprinting이며 다른 하나는 증폭된 16S rRNA 유전자를 cloning을 하고 각 clone의 염기서열을 분석하는 것이다. 이러한 접근을 위하여는 우선 시료에 존재하는 핵산을 추출해야 하며 추출된 핵산을 universal primer를 사용하여 증폭해야 한다. PCR 이후에

16S rRNA 유전자는 적절한 전기영동과정을 거쳐 fingerprinting되거나 vector를 이용, cloning되어 그 염기서열이 분석된다. 하지만, 분자미생물생태학에 적용되는 PCR 방법의 유용성에도 불구하고 16S rRNA 유전자의 증폭은 핵산추출시의 선택적인 추출, PCR 반응시 특정 미생물의 선택적 증폭, *rrn* operon의 heterogeneity, chimera의 형성 등 군집구조를 왜곡할 수 있는 문제점들이 존재한다[44, 76]. 따라서, 이러한 문제점을 줄이기 위해서는 핵산추출의 방법을 달리한 시료를 섞어서 PCR을 수행하고, 또한 PCR 조건도 다르게 하여 각각 증폭된 산물을 함께 섞어서 분석해야 한다. 하지만, 이러한 어려움에도 불구하고 PCR을 바탕으로 하는 군집구조의 분석은 많은 양의 시료를 비교적 정확하고 신속하게 분석할 수 있다는 장점을 지니고 있기 때문에 군집구조의 분석에 널리 이용되고 있다.

군집 fingerprinting 방법에는 denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)[53, 63], temperature gradient gel electrophoresis(TGGE)[36, 37], single-strand-conformation polymorphism(SSCP)[55, 71], restriction fragment length polymorphism(RFLP)[60], terminal restriction fragment length polymorphism(T-RFLP)[30] 등이 있다. 미생물군집의 다양성을 가장 간단하게 측정할 수 있는 방법에는 RFLP 방법의 일종인 ARDRA(amplified ribosomal DNA restriction analysis)[60]가 있는데, 이는 환경시료에서 직접 증폭된 16S rRNA 유전자의 제한효소패턴으로부터 군집의 다양성을 추정하는 것이다. 그러나 ARDRA 방법은 polyacrylamide gel이나 agarose gel에 나타난 각각의 band가 어느 분류군으로부터 기인한 것인지를 알 수 없다는 치명적인 단점을 가지고 있다.

DGGE, TGGE, SSCP 방법은 크기는 같지만 염기서열이 다른 핵산을 전기영동에 의해 분리할 수 있는 원리를 생태학에 적용한 방법이다. 이 방법은 polyacrylamide gel에 나타난 각각의 band가 특정 분류군으로부터 유래된 것이므로 특정 band를 다시 sequencing을 하게 되면 그 band가 어떠한 분류군으로부터 유래된 것인지를 알 수 있어 군집다양성의 신속한 측정과 함께 군집에 존재하는 미생물의 종류를 알 수 있다는 장점을 지니고 있다. 하지만 군집 다양성이 큰 시료에서 전개되어 나타난 특정한 band가 특정 분류군으로부터 유래되었음을 가정하는 것은 한계가 있다. 또한, gel에 나타난 band 수는 대개 16S rRNA 유전자를 cloning하여 얻어진 분류군의 숫자보다 훨씬 작아서 군집의 다양성이 과소평가될 수 있는 위험성을 지니고 있다.

마지막으로 cloning-sequencing 방법은 증폭된 16S rRNA 유전자의 3' overhang을 채워서 blunt-end ligation을 하거나, 또는 증폭된 핵산을 직접 cloning할 수 있는 vector를 이용하여 cloning한 다음 염기서열을 분석하는 방법이다. 염기서열이 분석되면 GenBank[4]나 RDP[16]와 같은 공공의 database에 존재하는 16S rRNA 염기서열과 비교하여 군집의 다양성 및

군집구조를 파악한다. 16S rRNA 유전자의 cloning-sequencing 방법은 군집의 구조를 빠른 시간에 파악할 수 없다는 단점이 있지만, 환경시료에 존재하고 있는 희박한 분류군을 검출할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 특정한 생태계에 서식하는 미생물들에 대한 정보가 없는 상태에서 미생물군집의 구조를 분석하는 데에 매우 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 독특한 염기서열을 지니는 미지의 미생물의 경우에는 그들의 계통학적 위치로부터 생리적 특징을 추정하는 데에도 이용될 수 있고, 결정된 염기서열은 다른 분자생태학적 분석에 기초적인 자료로서 매우 유용하게 쓰일 수 있다. 이러한 cloning-sequencing 방법은 미생물의 다양성에 대한 우리의 기존의 관점을 획기적으로 변화시켰다. Cloning-sequencing 방법에 의해 Bacteria domain에서는 *Acidobacterium*, *Holophaga*, *Verrucomicrobium*, 그리고 Archaea domain에서는 *Crenarchaeota*, *Koryarchaeota*와 같은 새로운 분류그룹이 밝혀졌다 [12, 33, 38, 57, 58, 77]. 그 결과 최근의 Bacteria domain에는 1987년에 Carl Woese[78]가 제안했던 12개의 division보다 무려 3배 이상 증가한 약 40개 정도의 division이 존재하고 있음이 밝혀졌고[47], 앞으로도 더욱 늘어날 전망이다.

지하수 미생물군집의 분자생태학적 분석

지하수 세균군집에 대한 최초의 분자생태학적 접근은 지하수층에서 배양을 통해 분리된 세균의 분자생물학적인 분석이었다. Jimenez[48]는 Savanna River의 세계의 site에서 분리된 세균의 total DNA hybridization과 G+C 비율을 구하여 군집구조를 분석하였다. 우선 분리된 세균의 형태학적, 표현형적 특징으로부터 이들 세균을 동정하였으며, 각 세균의 G+C 함량을 구하였다. 그들은 같은 표현형을 보이는 세균일지라도 DNA homology와 G+C 함량이 서로 다르다는 사실을 발견하였으며, 표현형으로 측정된 군집의 다양성이 분자생물학적인 방법으로 측정된 군집의 다양성보다 낮게 측정된다는 결론을 내렸다. 이들이 분리한 지하수 세균의 평균적인 G+C 함량은 20-77%였으며, 전체 분리세균의 60%는 *Pseudomonas* spp.와 유사한 G+C 함량을 가지고 있고 12%는 *Acinetobacter* spp.와 유사한 G+C 함량을 가지고 있다는 사실로부터 이들 *Pseudomonas*, *Acinetobacter*와 유사한 세균군집이 지하환경에 오랫동안 적응되어 있다는 결론을 유도하였다.

한편, 지하수 미생물군집에 대한 본격적인 접근은 16S rRNA 유전자의 염기서열의 분석을 통해 이루어 졌는데, 크게 두가지 접근 방법으로 연구가 진행되었다. 그 하나는 지하수에서 분리된 균주로부터 16S rRNA 유전자의 제한효소패턴(RFLP, restriction fragment length polymorphism)의 분석 및 sequencing을 통하여 기존의 database와 비교하는 연구이며 다른 하나는 지하수로부터 직접 DNA를 추출하여 16S rRNA 유전

자를 증폭한 다음, 이들로부터 clone library를 만들어서 개개 clone의 sequencing을 통해 군집의 다양성을 분석하는 연구였다.

지하수에서 배양을 통하여 분리된 세균의 형태학적 분석과 분자생태학적인 분석은 Balkwill 등[11]에 의해 종합적으로 검토되었다. 이들은 USDOE가 주관한 지하미생물탐색 프로젝트에 의하여 수집된 균주를 이용하였다. 이들 균주들은 Subsurface Microbial Culture Collection(SMCC)이라는 기관에 기탁이 되어 있는데 SMCC는 약 10,000여종의 세균을 포함하고 있다. 이들은 지질학적으로 구분된 서로 다른 세계의 연구지점에서 모은 균주를 대상으로 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 계통학적 분석을 시도하였다. 이들 분리균주들의 대부분은 6개의 주요한 계통학적 그룹인 high G+C gram positives, low G+C gram positives, alpha-, beta-, gamma Proteobacteria, Bacteroides-Cytophaga-Flexibacter 그룹에 속하였다. 또한 대부분의 그램양성 세균은 *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, 대부분의 그램 음성 세균은 *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Variovorax*, 그리고 분리된 혐기성 세균의 대부분은 sulfate-reducing bacteria와 methanogen임을 밝혀 냈다. 이들은 또한 분리된 균주들에 대한 RFLP 양상을 분석하여 같은 종 내에서도 strain 사이에 유전적 다양성이 존재함을 제시하였으며, 일부 종들은 기존의 보고와는 전혀 다른 새로운 종임을 밝혀 내어, 지하수 군집은 아직까지 밝혀지지 않은 미생물의 다양성을 연구하기에 매우 적합한 생태계라는 것을 제안하였다.

그러나 이와 같은 방법은 미생물을 배양하여 얻은 결과이므로 전체 미생물 군집의 구조를 반영한다고 볼 수 없어서 지하 토양과 지하수로부터 직접 DNA 또는 RNA를 추출하여 16S rRNA 유전자의 염기서열 및 fingerprinting 양상을 분석하는 연구들이 시도되었다. 이러한 방법에 따라 오염되지 않은 지하 토양[22], 심층 점토질 토양[14], paleosol[23], 심층 화강암 대수층[51, 52], natural nuclear reactor[32], 자유면 대수층[20], 석유화합물에 의해 오염된 지하수[35], 쓰레기 매립장의 지하수[56], 축산폐수로 오염된 지하수[2, 28] 등에서 연구가 진행되었다. 이들의 연구결과는 대부분 배양에 의해 분리된 미생물의 다양성이 시료로부터 직접 추출한 핵산을 기초로 하여 제작된 clone library에서의 다양성보다 떨어진다는 것이었다. 하지만, Chandler 등[22]은 배양에 의해서 분리된 호기성 세균의 16S rRNA 유전자와 지하수시료로부터 직접 증폭한 16S rRNA 유전자의 염기서열을 비교·분석하였는데, 오히려 시료로부터 직접 증폭되어 형성된 clone library에 많은 수의 순수 배양된 세균의 16S rRNA 유전자가 포함되지 않는 사실을 밝히고, 지하수 미생물 군집의 분석을 위하여는 결국 배양을 기초로 하는 군집구조와 배양으로부터 독립적인 군집구조의 분석을 동시에 수행해야 한다고 제안하였다.

전반적으로 지하수 미생물군집의 분자생태학적인 연구결과

로부터 지하수에는 지금까지 알려져 있지 않은 새로운 미생물 그룹이 존재한다는 사실이 밝혀졌다. Kotelnikova and Pedersen[51, 52]은 수소와 메탄을 다량으로 함유하고 있는 화강암류의 지하수에서 chemolithotroph을 분리함과 동시에 추출한 DNA를 cloning하여 이들의 염기서열을 분석하여 새로운 종임을 밝혔다. 또한 이들은 *Archaea* domain에서는 acetotrophic methanogens이 지하 112m까지 우점함을 확인함과 동시에 autotrophic methanogens은 446m까지 우점함을 보여 *Archaea* 그룹이 장소에 따라서 독특한 niche를 차지하고 있음을 확인하였다.

국내 지하수 미생물군집구조에 대한 연구

전술했듯이 국내 지하수에서 미생물군집의 구조 및 다양성에 대한 접근이 시도된 예는 거의 없으며 최근에서야 축산폐수로 오염된 지하수에서 미생물 군집의 다양성에 대하여 보고가 되었다[2, 3, 28]. 국내 지하수 미생물에 대한 연구가 저조한 이유는 지하수를 연구할만한 연구용 관정이 거의 존재하지 않기 때문에 시료를 구하기가 힘들고, 지하수의 이용률이 높지 않기 때문에 관심이 적었기 때문이다. 1990년대 중반 들어서 증가되는 먹는샘물의 수요에 맞추어 주로 음용수로서의 지하수의 안전성에 대한 연구가 진행되었으나, 군집구조에 대한 생태학적 분석은 거의 이루어지지 않았다.

먹는샘물로 이용되는 지하수에서 세균에 대한 분석은 주로 지하수의 미생물학적 안전성에 대한 연구를 중심으로 진행되었다[2]. 조와 김[2]은 세균군집의 분포에 따른 지하수의 세균학적인 안전성을 평가하기 위하여 음용을 목적으로 개발된 4곳의 관정에서 심층피압대수층(deep confined aquifer)의 지하수를 채수하여 물리화학적 환경요인, 세균의 분포와 활성, 지표세균의 분포 및 중속영양세균의 종조성을 조사하였다. 이 연구에서는 지하수 시료로부터 배양하여 분리된 균주의 형태적 특징과 표현형의 특징으로부터 세균을 동정하고, 특히 분변성 오염의 지표가 되는 지표세균에 대한 분석을 실시하였다. 연구결과, 먹는샘물로 이용되는 지하수에 주로 존재하는 세균속은 *Acinetobacter*, *Eikenella*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Micrococcus* 속이라는 것이 밝혀졌으며, 지하수에 일반적으로 존재하지 않는 Enterobacteriaceae 그룹과 *Staphylococcus* 속과 *Enterococcus* 속이 조사관정에서 검출됨에 따라 이들 세균이 지하수 분변성 오염 판정의 지표세균으로 사용할 수 있음이 확인되었다.

국내 지하수 미생물군집에 대한 분자생태학적 접근은 축산이 이루어지는 농촌지역의 지하수에서 오염된 지하수와 오염되지 않은 지하수를 대상으로 하여 이루어졌다. Cho 등[29]은 대규모 축산이 이루어지는 강원도 원주에 위치한 축산폐수 및 축산폐기물 투기장 주위에 연구관정을 설치하여, 축산지역 하

부의 오염된 관정과 상부의 대조군 관정에서 지표세균 및 병원성세균의 분포를 조사하여 지하수의 축산폐수에 의한 오염이 심각함을 확인하였으며, 이들의 농도는 우기에 강우량이 증가함에 따라 더욱 증가되어 강우 시에 축산폐수가 강우의 이동에 따라 지표로부터 토양간극을 통해 유입됨을 확인하였다. 또한, 이 지역에서 Cho & Kim[28]은 축산지역 상부에 위치한 오염되지 않은 지하수, 하부에 위치한 오염된 지하수, 그리고 축산폐수에서 시료를 채취, 16S rDNA의 염기서열을 분석하여 미생물 군집의 다양성을 조사하였다.

이 연구 site의 시료에서는 *Bacteria*와 *Archaea*의 16S rRNA 유전자가 증폭되었으며 증폭된 산물은 cloning되어 염기서열이 분석되었다. clone library의 다양성 지수를 조사한 결과 축산지역 하부의 오염된 지하수와 축산폐수에서는 다양성 지수가 매우 높은 반면, 오염되지 않은 축산지역 상부의 지하수에서는 다양성 지수가 낮음이 확인되었으며, 이로부터 축산폐수가 지하수 관정 내로 유입됨에 따라 지하수 내 미생물 군집의 다양성이 증가함을 확인할 수 있었다. 한편, 이 연구에서는 축산폐수가 지하수로 유입됨에 따라 어떠한 미생물 개체군이 전체군집구조의 변화에 영향을 미치는지를 파악하기 위

하여 염기서열을 분석하여 계통학적 연구를 수행하였는데, 축산지역 상부의 오염되지 않은 지하수에서는 beta *Proteobacteria*가 가장 우점하였으며 새롭게 제안된 그룹인 WJG-1도 상당량 차지하였다. 축산폐수에서는 *Bacteroides-Cytophaga-Flexibacter* (B-C-F) 그룹과 low G+C gram positives 그룹이 우점하였으며 축산폐수로 오염된 축산지역 상부 지하수에서도 이들 그룹이 우점하였다. 이러한 결과로부터 축산폐수로 오염된 지하수에서 미생물군집의 다양성 증가에 크게 영향을 미치는 세균군집은 B-C-F 그룹과 low G+C gram positives 그룹임을 확인하였고, 특히 이들 그룹 중 가축의 rumen으로부터 유래된 염기서열은 지하수의 분변성 오염을 확인할 수 있는 중요한 분자 지표염기서열임을 확인할 수 있었다. 한편, 이 연구지역에서는 아직까지 밝혀진 세균 그룹과는 계통학적으로 독특하게 분리되는 여러가지의 염기서열을 확인하였는데, 이들을 WJG-1과 WJG-2라는 새로운 그룹으로 명명하고 이러한 염기서열들이 지하수 미생물 군집의 novelty를 나타내줄 수가 있다고 제안되었다(Figure 2). 또한, 이 연구지역에서는 *Salmonella*와 *Staphylococcus*가 MPN-PCR방법을 통해 존재가 확인되고 계수되어 국내지하수의 축산폐수로 인한 병원성세균의 오염이 심각함을 확인하였으며, *Salmonella typhi*가 지하수에서 VBNC 상태로 들어간다는 사실을 *gfp* 유전자로 표시된 *S. typhi*의 생존을 조사하여 확인하기도 하였다[26,27].

결론

시료의 채취가 까다롭다는 단점 때문에 지하수 생태학은 장기간 외면 받아 왔지만, 지하수의 오염에 따라서 이제는 보존되어야 할 가치가 있는 중요한 생태계로서 지하수는 새롭게 인식되고 있다. 앞에서 살펴본 바와 같이 지하수, 지하토양, 지하암석에는 다양한 종류의 미생물들이 서식하고 있음이 밝혀졌으며, 다른 생태계에서는 볼 수 없는 새로운 종들이 최근 발달한 분자생태학적 연구방법에 따라 지속적으로 보고되고 있다. 이러한 결과는 지하 미생물이 우리 지구에 서식하는 미생물의 다양성에 대한 더욱 많은 정보를 제공할 수 있다는 점을 암시한다. 국내 지하수에서도 새롭고 독특한 계통학적 특징을 지니는 세균그룹이 분자생태학적 방법을 적용하여 발견되기도 하였다.

전체적으로 지하수생태학은 아직까지도 초기단계라 할 수 있다. 현재까지의 연구는 지하에 서식하는 미생물의 수, 종류, 활성에 대한 연구에 집중되어 있고 지하수군집만이 가지는 독특한 생리적, 생태적 특징에 대해서는 아직도 밝혀진 바가 거의 없다. 지하수의 빈영양환경에 적응하는 미생물의 생리적 특징에 대해서는 다소 연구가 되었지만, 새롭게 등장하고 있는 분류군에 대한 생리적 정보는 매우 빈약하다. 특히, 지하수를 포함하고 있는 암석 및 토양의 지질학적인 특징, 철이나 황의

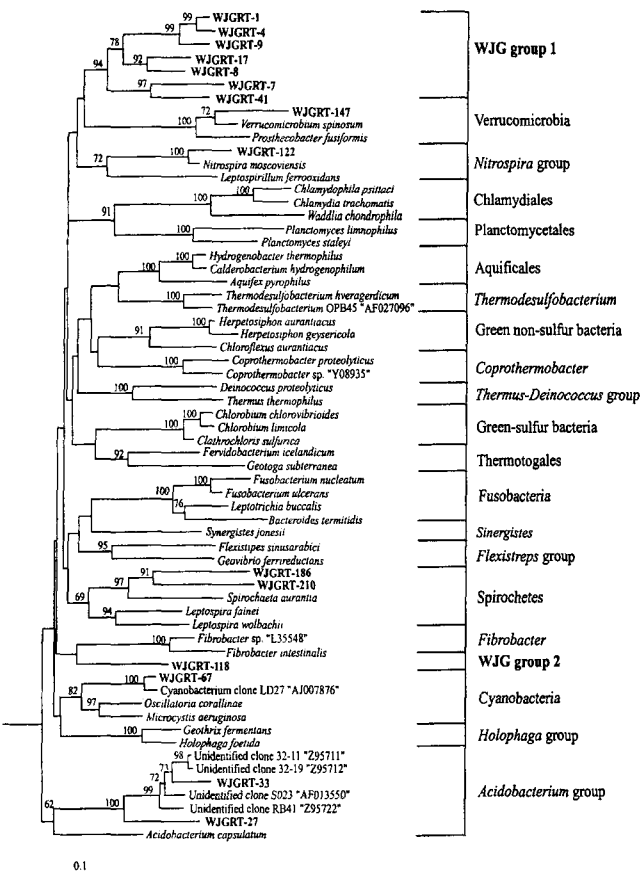


Fig. 2. Phylogenetic tree showing the phylogenetic relationships among Wonju groundwater and livestock wastewater clones within the domain *Bacteria*.

종류와 양, 산화환원전위 등에 따라서 서식하고 있는 미생물들의 종이 매우 다르므로 이들 개체군이 지하수 내에서 어떠한 생리적 특징을 가지는지 살피는 것은 향후 연구의 주된 과제가 될 전망이다.

생물종 다양성과 유전적 다양성은 생물자원의 확보라는 차원에서 매우 중요하게 대두되고 있으며 이 점에서 지하수는 매우 중요한 가치가 있는 생물자원의 보고이다. 지하수는 아직까지 밝혀지지 않는 미생물 군집의 저장고이므로 분자생태학적 연구방법에 따라 새롭게 분류된 미생물 분류군에 대하여는 집중적으로 연구가 되어야 한다. 염기서열로만 확인되었던 새로운 분류군에 대해서는 적절한 probe를 제작하여 형광현미경으로 형태를 확인해야 하며, 이들의 순수분리 및 배양을 통해 그들의 생리적인 특징과 진화적인 특징을 아울러 확인해야 한다. 이와 같은 연구는 미생물 군집의 다양성에 대한 정보뿐만 아니라 새롭게 밝혀진 미생물들을 산업적으로 이용할 가능성에 대한 정보도 제공해 줄 것이다.

참고문헌

- 정용, 구자건, 이자경. 1993. 지하수 환경기준 및 지하수 오염 판정 기준설정에 대한 연구. 한국환경과학협회의회.
- 조장천. 2000. 지하수 환경에서 미생물 군집구조와 병원성 세균 생존에 대한 분자생태학적 연구. 서울대학교 박사학위 논문.
- 조장천, 김상중. 1999. 심층피압지하수에서 세균군집의 분석에 의한 분변성 오염 평가. 한국미생물학회지 **35**:47-52.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**:143-169.
- Amann, R., J. Snaird, M. Wagner, W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1996. In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community. *J. Bacteriol.* **178**:3496-3500.
- Badia, D., and J. M. Alcaniz. 1993. Basal and specific microbial respiration in semiarid agricultural soils: Organic amendment and irrigation management effects. *Geomicrobiol. J.* **11**:261-274.
- Balkwill, D. L. 1989. Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiol. J.* **7**:33-52.
- Balkwill, D. L. and W. C. Ghiorse. 1985. Characterization of subsurface bacteria associated with two shallow aquifers in Oklahoma. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:58-588.
- Balkwill, D. L., J. K. Fredrickson., and J. M. Thomas. 1989. Vertical and horizontal variations in the physiological diversity of the aerobic chemoheterotrophic bacterial microflora in deep southeast costal plain subsurface sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:1058-1065.
- Balkwill, D. L., R. H. Reeves, G. R. Drake, J. Y. Reeves, F. H. Crocker, M. B. King, and D. R. Boone. 1997. Phylogenetic characterization of bacteria in the subsurface microbial culture collection. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:201-216.
- Barns, S. M., S. L. Takala, and C. R. Kuske. 1999. Wide distribution and diversity of members of the bacterial kingdom *Acidobacterium* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:1731-1737.
- Bengtsson, G. 1989. Growth and metabolic flexibility in groundwater bacteria. *Microb. Ecol.* **18**:235-248.
- Boivin-Jahns, V., R. Ruimy, A. Bianchi, S. Daumas, and R. Christen. 1996. Bacterial diversity in a deep-subsurface clat environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3405-3412.
- Bone, T. L., and D. L. Balkwill. 1988. Morphological and cultural comparison of microorganisms in subsurface soil and subsurface sediments at a pristine study site in Oklahoma. *Microb. Ecol.* **16**:85-97.
- Bonnie L. M., J. R. Cole, C. T. Parker, J. G. M. Garrity, N. Larsen, B. Li, T. G. Lilburn, M. J. McCaughey, G. J. Olsen, R. Overbeek, S. Pramanik, T. M. Schmidt, J. M. Tiedje, and C. R. Woese. 1999. A new version of the RDP(Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res.* **27**:171-173.
- Brockman, F. J., and C. J. Murray. 1997. Subsurface microbiological heterogeneity: current knowledge, descriptive approaches, and applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:231-247.
- Brockman F. J, T. L. Kieft, J. K. Fredrickson, B. N. Bjornstad, S. W. Li, W. Spangenburg, and P. E. Long. 1992. Microbiology of vadose zone paleosols in south-central Washington state. *Microb. Ecol.* **23**:279-301.
- Brown. D. A., D. C. Kamineni, J. A. Sawicki, and T. J. Beveridge. 1994. Minerals associated with biofilms occurring on exposed rock in a granite underground research laboratory. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:3182-3191.
- Byers, H. K., E. Stackebrandt, C. Hayward, and L. L. Blackall. 1998. Molecular investigation of a microbial mat associated with the Great Artesian Basin. *FEMS Microbiol. Ecol.* **25**:391-403.
- Capuano, R. M., M. A. Siringan, R. Z. Jan, and P. Jurtschuk. 1995. Enhanced activity of oligotrophic endogeneous bacteria in clay-rich sediments by nutrients

- injection. *Geomicrobiology J.* **13**:165-179.
22. Chandler, D. P., S. Li, C. M. Spadoni, G. R. Drake, D. L. Balkwill, J. K. Fredrickson, and F. J. Brockman. 1997. A molecular comparison of culturable aerobic heterotrophic bacteria and 16S rDNA clones derived from a deep subsurface sediment. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**:131-144.
 23. Chandler, D. P., F. J. Brockman, T. J. Bailey, and J. K. Fredrickson. 1998. Phylogenetic diversity of *Archaea* and *Bacteria* in a deep subsurface paleosol. *Microb. Ecol.* **36**:37-50.
 24. Chapelle, F. H. and D. R. Lovely. 1990. Rates of microbial metabolism in deep coastal plain aquifers. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:1865-1874.
 25. Chapelle, F. H., J. L. Zeliber, D. J. Grimes, and L. L. Knobel. 1987. Bacteria in deep coastal plain sediments of Maryland: A possible source of CO₂ to groundwater. *Water Resour. Res.* **23**:1625-1632.
 26. Cho, J.-C., and S.-J. Kim. 1999. Green fluorescent protein-based direct viable count to verify a viable but non-culturable state of *Salmonella typhi* in environmental samples. *J. Microbiol. Methods* **36**:227-235.
 27. Cho, J.-C., and S.-J. Kim. 1999. Viable but nonculturable state of a GFP-tagged environmental isolate of *Salmonella typhi* in groundwater and pond water. *FEMS Microbiol. Lett.* **170**:257-264.
 28. Cho, J.-C., and S.-J. Kim. 2000. Increase in bacterial community diversity in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:956-965.
 29. Cho, J.-C., H. B. Cho, and S.-J. Kim. 2000. Heavy contamination of a subsurface aquifer and a stream by livestock wastewater in a stock farming area, Wonju, Korea. *Environ. Pollut.* **109**:137-146.
 30. Clement, B. G., L. E. Kehl, K. L. DeBord, and C. L. Kitts. 1998. Terminal restriction fragment patterns (TRFPs), a rapid, PCR-based method for the comparison of complex bacterial communities. *J. Microbiol. Meth.* **31**:135-142.
 31. Colwell, F. S. 1989. Microbiological comparison of surface soil and unsaturated subsurface soil from a semiarid high desert. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**:2420-2423.
 32. Crozier, R. H., P.-M. Agapow, and K. Pedersen. 1999. Towards complete biodiversity assessment: an evaluation of the subterranean bacterial communities in the Oklo region of the sole surviving natural nuclear reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* **28**:325-334.
 33. DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:5685-5689.
 34. DeLong, E. F., G. S. Wickham, and N. R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single microbial cells. *Science* **243**:1360-1363.
 35. Dojka, M. A., P. Hugenholz, S. K. Haack, and N. R. Pace. 1998. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3869-3877.
 36. Eichner, C. A., R. W. Erb, K. N. Timmis, and I. Wagner-Dobler. 1999. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:102-109.
 37. Felske, A., A. D. L. Akkermans, and W. M. DeVos. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4581-4587.
 38. Felske, A., A. Wolterink, R. V. Lis, and A. D. L. Akkermans. 1998. Phylogeny of the main bacterial 16S rRNA sequences in Drentse A grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:871-879.
 39. Fredrickson, J. K., T. R. Garland, R. J. Hicks, J. M. Thomas, S. W. Li, and K. M. McFadden. 1989. Lithotrophic and heterotrophic bacteria in deep subsurface sediments and their relation to sediment properties. *Geomicrobiol. J.* **7**:53-66.
 40. Fredrickson, J. K., F. J. Brockman, B. N. Bjornstad, P. E. Long, S. W. Li, J. P. McKinley, J. V. Wright, J. L. Conca, T. L. Kieft, and D. L. Balkwill. 1993. Microbiological characteristics of pristine and contaminated deep vadose sediments from an arid region. *Geomicrobiol. J.* **11**:95-107.
 41. Haldeman, D. L., and P. S. Amy. 1993. Diversity within a colony morphotype: implications for ecological research. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:933-935.
 42. Haldeman, D. L., B. J. Pitonzo, S. P. Story, and P. S. Amy. 1994. Comparison of the microbiota recovered from surface and deep subsurface rock, water, and soil along an elevational gradient. *Geomicrobiol. J.* **12**:99-111.
 43. Hazen, T. C., L. Jimenez, G. L. de Victoria, and C. B. Fliermans. 1991. Comparison of bacteria from deep subsurface sediment and adjacent groundwater. *Microb. Ecol.* **22**:293-304.
 44. Head, I. M., J. R. Saunders, and R. W. Pickup. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* **35**:1-21.
 45. Hicks R. J., and J. K. Fredrickson. 1989. Aerobic metabolic potential of microbial populations indigenous to deep subsurface environments. *Geomicrobiol. J.* **7**:67-78.
 46. Hirsch, P., and E. Rades-Rohkohl. 1988. Some special problems in the determination of viable counts of

- groundwater microorganisms. *Microb. Ecol.* **16**:99-113.
47. Hugenholtz, P., B. M. Goebel, and N. R. Pace. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* **180**: 4765-4774.
48. Jimenez, L. 1990. Molecular analysis of deep-subsurface bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2108-2113.
49. Kazumi, J., and D. G. Capone. 1994. Heterotrophic microbial activity in shallow aquifer sediments of Long Island, New York. *Microb. Ecol.* **28**:19-37.
50. Kieft T. L., P. S. Amy, F. J. Brockman, J. K. Fredrickson, B. N. Bjornstad, and L. L. Rosacker. 1993. Microbial abundance and activities in relation to water potential in the vadose zones of arid and semiarid sites. *Microb. Ecol.* **26**:59-78.
51. Kotelnikova, S., and K. Pedersen. 1997. Evidence for methanogenic Archaea and homoacetogenic Bacteria in deep granitic rock aquifers. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:327-339.
52. Kotelnikova, S., and K. Pedersen. 1998. Distribution and activity of methanogens and homoacetogens in deep granitic aquifers at Aspo Hard Rock Laboratory, Sweden. *FEMS Microbiol. Ecol.* **26**:121-134.
53. Kowalchuk, G. A., J. R. Stephen, W. D. Boer, J. I. Prosser, T. M. Embley, and J. W. Woldendorp. 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class *Proteobacteria* in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1489-1497
54. Lauritzen, S., and S. Bottrell. 1994. Microbiological activity in thermoglial karst springs, South Spitsbergen. *Geomicrobiol. J.* **12**:161-173.
55. Lee, D.-H., Y.-G., Zo, and S.-J. Kim. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:3112-3120.
56. Lloyd-Jones, G., and P. C. K. Lau. 1998. A molecular view of microbial diversity in a dynamic landfill in Quebec. *FEMS Microbiol. Lett.* **162**:219-226.
57. Ludwig, W., S. H. Bauer, M. Bauer, I. Held, G. Kirchhof, R. Schulze, I. Huber, S. Spring, A. Hartmann, and K. H. Schleifer. 1997. Detection and in situ identification of representatives of a widely distributed new bacterial phylum. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**:181-190.
58. MacGregor, B. J., D. P. Moser, E. W. Alm, K. H. Nealson, and D. A. Stahl. 1997. Crenarchaeota in Lake Michigan sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1178-1181.
59. Marmonier, P., P. Vervier, J. Gibert, and M.J. Dole-Olivier. 1994. Biodiversity in groundwaters. *TREE* **11**:392-295.
60. Martinez-Murcia, A. J., S. G. Acinas, and F. Rodriguez-Valeria. 1995. Evaluation of prokaryotic diversity by restrictase digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* **14**:219-232.
61. Matthes, G. and A. Pekdeger. 1981. Concepts of a survival and transport model of pathogenic bacteria and virus in groundwater. *The science of the total Environments* **21**:149-159.
62. Murphy, E. M., J. A. Schramke, J. K. Fredrickson, H. W. Bledsoe, A. J. Francis, D. S. Sklarew, and J. C. Linehan. 1992. The influence of microbial activity and sedimentary organic carbon on the isotope geochemistry of the Middendorf aquifer. *Water Resour. Res.* **28**:723-740.
63. Muyzer, G., E. C. DeWaal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:695-700.
64. Olsen G. J., D. J. Lane, S. J. Giovannoni, and N. R. Pace. 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu. Rev. Microbiol.* **40**:337-365.
65. Pace, N. R. 1996. New perspectives on the natural microbial world: molecular microbial ecology. *ASM News* **62**:463-470.
66. Pace N. R., D. A. Stahl, D. J. Lane, and G. J. Olsen. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. *Adv. Microb. Ecol.* **9**:1-55.
67. Pedersen, K. and S. Ekendahl. 1990. Distribution and activity of bacteria in deep granitic groundwaters of Southeastern Sweden. *Microb. Ecol.* **20**, 37-52.
68. Pederson, K. and S. Ekendahl. 1992. Assimilation of CO₂ and introduced organic compounds by bacterial communities in groundwater from Southeastern Sweden deep crystalline bedrock. *Microb. Ecol.* **23**:1-14.
69. Russel, C. E., R. Jacobson., D. L. Haldeman., and P. S. Amy. 1994. Heterogeneity of deep subsurface microorganisms and correlations to hydrogeological and geochemical parameters. *Geomicrobiology J.* **12**:37-51.
70. Rusterholtz, K. J., and L. M. Mallory. 1994. Density, activity, and diversity of bacteria indigenous to a karstic aquifer. *Microb. Ecol.* **28**:79-99.
71. Schwieger, F., and C. C. Tebbe. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:4870-4876.
72. Semprini L., and P. L. McCarty. 1991. Comparison between model simulations and field results for in-situ bioremediation of chlorinated aliphatics: Part 1. Biostimulation of methanotrophic bacteria. *Ground Water*

- 29:365-374.
73. Stahl, D. A., D. J. Lane, G. J. Olsen, and N. R. Pace. 1984. Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* **224**:409-411.
74. Stahl D. A., D. J. Lane, G. J. Olsen, and N. R. Pace. 1985. Characterization of a Yellowstone hot spring microbial community by 5S ribosomal RNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1379-1384.
75. Thomas, J. M., and C. H. Ward. 1992. Subsurface microbial ecology and bioremediation. *J. Hazard. Materials* **32**:172-179.
76. Wintzingerode, F. V., U. B. G bel, and E. Stackebrandt. 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:213-229.
77. Wise, M. G., J. V. McArthur, and L. J. Shimkets. 1997. Bacterial diversity of a Carolina bay as determined by 16S rRNA gene analysis: confirmation of novel taxa. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1505-1514.
78. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**:227-271.
79. Zuckerkandl, E., and L. Pauling. 1965. Molecules as documents of evolutionary history. *J. Theoret. Biol.* **8**:357-366.