

## 강물에서 분리한 *Pseudomonas rhodesiae*의 아닐린 분해

김현주 · 김진철\* · 김흥태 · 최경자 · 최도일<sup>1)</sup> · 김흥기<sup>2)</sup> · 조광연

한국화학연구소 스크리닝연구부, <sup>1)</sup>생명공학연구소 식물세포공학실, <sup>2)</sup>충남대학교 농생물학과,  
(2000년 9월 8일 접수, 2001년 4월 25일 수리)

### Biodegradation of Aniline by *Pseudomonas Rhodesiae* Isolated from River Water

Hyun Ju Kim, Jin Cheol Kim\*, Heung Tae Kim, Gyung Ja Choi, Doil Choi<sup>1)</sup>, Hong Gi Kim<sup>2)</sup>, and Kwang Yun Cho (Screening Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-606, <sup>1)</sup>Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejon 305-600, <sup>2)</sup>Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Taejon 705-764, Korea)

**ABSTRACT** : Two Bacterial strains 1-C and 51-C capable of utilizing aniline as a sole source of carbon and energy were isolated from river waters. Both strains were identified as *Pseudomonas rhodesiae* based on their physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence. The strains were able to grow on the mineral salt media containing aniline at concentrations up to 6,000  $\mu\text{g/mL}$ . *Pseudomonas rhodesiae* 51-C completely degraded aniline in a mineral salt medium containing 300  $\mu\text{g/mL}$  of aniline as a sole carbon and energy source within 16 hours. The optimum pH and temperature for its growth and aniline degradation were 7.0 and 30°C~35°C, respectively. This is the first report of aniline degradation by *P. rhodesiae* strains.

**Key words** : aniline, biodegradation, *Pseudomonas rhodesiae*

## 서론

아닐린은 다방면에서 중요한 산업적 재료로 이용되면서 환경에 다량 노출되어 아닐린과 그들의 유도체가 토양, 하천 및 지하수를 오염시키고 있다. 생물에 대한 이들 물질들의 독성 및 발암성이 보고된<sup>1)</sup> 이후에 많은 연구자들이 폐수, 하천, 지하수 및 토양에서 아닐린계 물질들의 분해 메카니즘 연구를 하고 있다. 아닐린의 제거 방식에는 휘발, 광산화, 자연적 산화 및 화학적 결합과 같은 다양한 이화학적 과정도 있으나, 가장 중요한 것은 미생물에 의한 생물학적 분해(biodegradation)이다. 일반적으로 생물학적 분해란 생물에 의해 유기물질이 완전히 산화되어 무기 화합물로 변화하는 광물화(mineralization)와 본래의 유기물질보다 더 복잡한 산물이 생성되는 것 등 모든 유형의 변화를 지칭하는데, 더욱 복잡한 물질로 변형(transformation)된 화합물은 다른 미생물에 의해 분해되거나 또는 메틸화, 아세틸화, 알킬화된 화합물을 형성하여 때때로 환경에 부정적인 영향을 미치기도 한다.

최근까지 알려진 아닐린 및 그의 유도체를 분해하는 균주들은 대부분 *Alicycigenes* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhodococcus* spp. 등에 속하며 이들 균주는 분해물질에 따라 아닐린 및 클로로아닐린 유도체를 분해하는 그룹<sup>2,6)</sup>과 아닐린 및 메틸아닐린 유도체를 분해하는 두 그룹으로 나눌 수 있다<sup>7,8)</sup>. *Pseudomonas* 속 균주들 중 아

닐린을 분해하는 것으로 알려진 균주들에는 *P. multivorans*<sup>2)</sup>, *P. acidovorans*<sup>9)</sup>, *P. testosteroni*<sup>7)</sup>, *P. putida*<sup>9)</sup>, *P. diminuta*<sup>10)</sup>, *P. cepacia*<sup>11)</sup> 등이 보고되어 있다. *P. acidovorans*는 *Comamonas acidovorans*로 명명되어<sup>12)</sup> 오다가, *Delftia acidovorans*로 최근에 재명명되었다<sup>13)</sup>. 또한 본 저자들은 *Stenotrophomonas maltophilia*를 아닐린 분해 균주로서 처음으로 보고한 바 있는데<sup>14)</sup>, 이 균주의 경우 과거에는 *P. maltophilia* 또는 *Xanthomonas maltophilia*로 불리워 지기도 하였다<sup>3)</sup>.

본 연구에서는 아닐린 분해 균주들을 분리하여 그 특성을 연구하여 온 바 지금까지 아닐린 분해 균주로 보고되지 않은 두 개의 *P. rhodesiae* 균주를 강물에서 분리하였다. 본 논문에서는 아닐린 분해균으로서 *P. rhodesiae* 균주의 분리 및 동정 그리고 아닐린 분해 특성에 대한 내용을 보고한다.

## 재료 및 방법

### 분해미생물의 분리 및 보관

아닐린 분해 균주의 분리를 위하여 전국의 강(낙동강, 소양강, 한강, 금강, 대전 갑천, 백마강)에서 채취한 물 시료 10 mL을 아닐린이 300  $\mu\text{g/mL}$  수준으로 처리된 40 mL의 mineral salt 배지 (0.22 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.085 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.45 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 0.23

g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.37 g  $CaSO_4$  및 0.0025 g  $FeCl_3$ , 1L 증류수)에 넣고 pH를 7.0으로 조절한 후 30°C, 200 rpm으로 진탕배양하였다. 7일간 배양 후 소량을 취하여 4°C에서 10,000 rpm으로 20 분간 원심분리한 다음 상층액을 자외선 흡광계(UV-2401PC Spectrophotometer; Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정하여 아닐린의 분해여부를 조사하고 550 nm에서는 균의 증식을 조사하였다. 초기의 아닐린 농도와 비교하여 감소된 것이 확인된 배양액 0.1 mL을 취하여 아닐린이 300  $\mu g/mL$ 이 포함된 PTYG 평판배지(0.25 g peptone, 0.25 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g glucose, 0.03 g  $MgSO_4$  및 0.003 g  $CaCl_2$  Agar 15 g, 1 L 증류수)에 도말하고 자라는 균주를 순수 분리하였다. 분리한 균주들을 다시 아닐린이 최소영양원으로 포함되어 있는 mineral salt 배지에 배양하면서 아닐린 분해 여부를 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)분석으로 확인하였다. 이러한 일련의 과정을 통하여 두 개의 세균(1-C와 51-C)을 순수 분리하였고, 분리한 균주들은 1.5%의 한천과 300  $\mu g/mL$  수준의 아닐린을 첨가하여 만든 사면 아닐린 mineral salt 배지에 배양 후 4°C에서 보관하였다. 또한 두 균주의 장기 보관을 위하여 20% glycerol에 접종하여 -70°C에 보관하였다.

#### 분해 미생물의 동정

순수 분리한 두 개의 세균들의 동정을 위하여 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology의 표준방법에 따라 몇 가지 생리·생화학적 특성 및 Micro Station System(Biolog, Inc., Hayward, Calif., USA)을 이용한 95가지 탄소원의 이용에 대한 특성을 조사하였다<sup>14)</sup>. 또한 분리한 균주들의 정확한 동정을 위하여 16S rRNA gene은 Polymerase Chain Reaction(PCR)으로 증폭시킨 후<sup>15)</sup> DNA를 순수분리한 다음 DNA sequencer(Perkin-Elmer ABI, Foster City, Calif., USA)로 염기서열을 해독하였다. 이때 동정의 key가 되는 1,485 bp를 포함하는 부분을 sequencing하기 위해 forward primer와 reverse primer로 각각 8f (20-mer, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')<sup>16)</sup>와 1492r(19-mer, 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>17)</sup>를 사용하였다.

#### 아닐린 분해 특성 조사

두 균주의 아닐린 분해 최대 농도를 결정하기 위해 PTYG 배지에서 종 배양한 균체를 4°C에서 10,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한 후 0.015 M phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척한 다음, 최소배지인 mineral salt 배지로 현탁하여 550 nm에서 균체의 혼탁도(OD)가 0.3(약  $2.0 \times 10^8$  cells/mL)이 되도록 희석하였다. 농도별(250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000  $\mu g/mL$ )로 아닐린이 포함된 mineral salt 배지 3 mL이 든 시험관에 약  $2.0 \times 10^8$  cell/mL 수준으로 균을 접종하고 7일간 200 rpm에서 진탕배양 한 후 HPLC를 사용하여 분해능을 조사하였다. 그 결과 두 균주 중에서 51-C 균

주가 다소 분해능이 높고 또한 두 균주 모두 *P. rhodesiae*로 동정되어 이후의 실험은 51-C 균주를 이용하여 실시하였다.

*P. rhodesiae* 51-C 균주의 아닐린 분해능을 확인하기 위해 300  $\mu g/mL$ 수준으로 아닐린이 포함된 200 mL의 mineral salt배지에 든 500 mL의 삼각 플라스크에 약  $2.0 \times 10^8$  cell/mL 수준으로 균을 접종한 다음, 30°C에서 200 rpm으로 진탕배양하였다. 매 8시간 간격으로 수확한 시료를 원심분리하여 상층액을 자외선 분광계를 이용하여 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 분해능을 조사하였고<sup>14)</sup>, 균의 생육은 550 nm에서의 흡광도로 측정하였다.

또한 아닐린 분해를 위한 pH와 온도의 영향을 알아보기 위해서 아닐린을 300  $\mu g/mL$  수준으로 처리한 3 mL의 mineral salt 배지에 51-C 균주를 약  $2.0 \times 10^8$  cells/mL 수준으로 접종하고, 20 시간동안 200 rpm에서 진탕배양하였다. 이때 배지의 pH는 5.0~9.0의 범위에서, 배양 온도는 5~40°C의 범위에서 각각 배양하였으며, 각 배양구에서의 아닐린의 분해능은 HPLC를 이용하여 조사하였다.

#### 분석 방법

아닐린의 정량적 분석을 위하여 수확한 시료를 10,000 rpm에서 20분간 4°C에서 원심분리한 후 상층액을 HPLC(Waters; Millipore Co., Milford, Mass., USA)를 이용하여 분석하였다. Column은  $\mu$  Bondapak  $C_{18}$ (3.9 x 300 mm; Millipore Co.)을 사용하였고 photodiode array detector(Waters Model 996; Millipore Co.)를 이용하여 280 nm에서 분석하였다. 그리고 이동상은 acetonitrile : water(60 : 40, v/v)였으며, 유속은 1 mL/min였다<sup>14)</sup>.

## 결과 및 고찰

#### 아닐린 분해미생물의 분리 및 동정

낙동강, 소양강, 한강, 금강, 대전 갑천, 백마강 등 전국의 강에서 채취한 물 시료로부터 아닐린을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 증식이 가능한 두 개의 *Pseudomonas* 균주를 분리하였다. 두 개의 균주는 모두 그람 음성균으로 간상형이며 단일 편모를 가지고 있었다. Oxidase와 catalase reaction에 양성 반응을 보였고, 성장온도 범위는 4°C에서 36°C사이이며 성장 적온은 30°C였다. Biolog(Biolog Inc.)실험을 수행한 결과 두 균주 모두 탄소원으로 methylpyruvate, formic acid, L-histidine, L-phenylalanine, L-proline, L-pyrogutamic acid, L-arabinose, glucose, inositol, mannitol, acetate, propionate, N-valerate, N-caproate, heptanoate, succinate, fumarate, glutate, DL-lactate, malonate, fumarate 등을 이용하였으나, poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid 등은 이용하지 못하였다<sup>18)</sup>. 16S rDNA sequencing을 실시한 결과 두 개의 균주(1-C와 51-C)는 *P. rhodesiae* 16S rRNA gene(AF064459)과 similarity가 99% 일치하여 *P. rhodesiae*로 동정되었다.

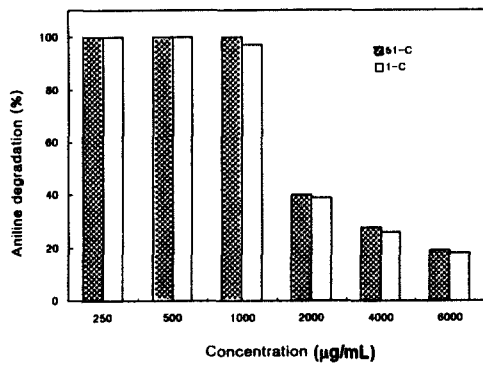


Fig. 1. Degradation of aniline at different concentrations by *Pseudomonas rhodesiae* strains 1-C and 51-C isolated from river waters.

*P. rhodesiae*는 형광 *Pseudomonads*에 속하며 주로 자연광천수 (natural mineral water)에서 분리되는 종으로서 Elomari 등<sup>18,19)</sup>에 의해 처음으로 명명되었다. 1995년에 Elomari 등<sup>20)</sup>은 형광 *Pseudomonads* 균주들에서 3가지의 새로운 cluster (I b, II a, V)를 발견하였는데, 그들 중 I b cluster와 II a cluster가 자연광천수에서 서식하는 균주에서 주로 존재함을 알게 되었고, 그 다음 해에 그들은 DNA-DNA hybridization에 의해 I b cluster와 II a cluster 균주들을 각각 새로운 종으로서 *P. veronii* sp. nov.와 *P. rhodesiae* sp. nov.로 명명하였다<sup>19)</sup>. 본 실험에서 분리된 균주들은 강물에서 분리되었고 아닐린 분해에 대한 보고는 전무하며 본 연구에서 처음으로 보고하는 바이다.

아닐린 분해미생물의 최대 분해 농도 조사

분리한 두 개의 아닐린 분해미생물들을 아닐린이 유일한 탄소원으로 포함된 mineral salt 배지에 배양한 후, 서로 다른 아닐린의 농도에서 그 분해능을 비교하였다. 그 결과 두 개의 균주 모두 250 µg/mL, 500 µg/mL 및 1,000 µg/mL에서 97% 이상의 높은 분해능을 보여 주었으며 2,000 µg/mL에서는 39% 이상의 분해능을 보였다(그림 1). 두 균주 간 아닐린 농도에 따른 분해능의 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았으나 두 균주 중 아닐린 분해능이 다소 높은 51-C 균주를 아닐린 분해에 대한 특성 연구에 이용하였다. 한편 균주를 접종하지 않은 대조구에서는 7일 동안 아닐린의 양에 변화가 전혀 없었다.

*P. rhodesiae* 51-C 균주에 의한 아닐린 분해 특성

아닐린을 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 *P. rhodesiae* 51-C 균주를 아닐린을 포함하고 있는 mineral salt 배지에 배양하면서 8시간 간격으로 분해 양상을 조사한 결과, 아닐린은 배양시간이 지남에 따라 급속하게 줄어들고 16시간이 되면서 완전히 분해되었다(그림 2). 균의 생육은 아닐린이 감소함에 따라 증가하였

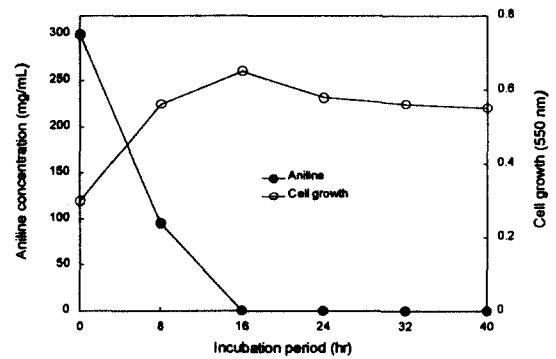


Fig. 2. Time course of cell growth and aniline degradation by *Pseudomonas rhodesiae* strain 51-C in a mineral salt medium containing 300 µg/mL of aniline as a sole carbon and energy source.

는데 최대 흡광도가 0.65 이상일 때 100%의 아닐린 감소를 보여 주었다. 본 균주는 모두 16시간 이내에 아닐린을 효과적으로 제거하였으며 대사 산물은 관찰되지 않아 아닐린을 탄소원 및 에너지원으로 완전히 이용하는 것을 알 수 있었다. 균주를 처리하지 않은 대조구에서는 아닐린의 양에 변화가 없었으며, 또한 균처리구에서 0시간의 아닐린 농도가 대조구에서의 아닐린 농도와 일치하여 균에 의한 단순한 흡수나 흡착은 거의 없는 것으로 나타났다. 한편 *P. rhodesiae* 51-C 균주에 의해 아닐린이 분해되면서 배지가 노란색을 띠었는데 이러한 결과는 *S. maltophilia* A-2 균주와<sup>16)</sup> 마찬가지로 *P. rhodesiae* 51-C 균주도 meta-cleavage pathway에 의해 아닐린을 분해하는 것으로 사료된다.

한편 *P. rhodesiae* 51-C 균주의 아닐린 분해에 대한 pH의 영향을 조사한 결과, pH 5.0과 pH 9.0 사이에서는 넓은 pH범위에서 아닐린의 분해가 일어났으나 pH 5.0과 pH 9.0에서는 각각 21%와 35%의 낮은 분해율을 보여 주었다. pH 6.0~8.0에서는 60%이상의 분해율을 보였고 pH 7.0에서 100%의 분해율을 보여 가장 양호한 조건으로 결정되었다. 또한 *P. rhodesiae* 51-C 균주의 아닐린 분해 및 세균의 생육에 대한 온도의 영향을 조사한 결과 전반적으로 20°C와 35°C사이에서 55%이상의 아닐린의 분해와 균주의 생육이 진행되었고, 30°C와 35°C에서 100%로 최대의 생장과 분해가 일어났다. 그러나 15°C와 40°C에서는 각각 28.4%와 7.5%로 분해율이 매우 낮았다. 특히 40°C에서는 최초 접종 농도인 OD 0.3 보다 낮은 OD 0.24로 cell death와 cell lysis가 일어났다(그림 3). Coroler 등<sup>18)</sup>에 의하면 *P. rhodesiae*의 생장 온도의 특성은 4°C에서는 생육이 가능하나 41°C에서는 생장하지 못한다고 보고하였는데 본 실험의 결과와 일치함을 보여 주고 있다.

이상의 연구 내용을 종합하면 강물 시료로부터 분리한 두 개의 아닐린 분해균주들은 *P. rhodesiae*로 동정되었다. 그 중에서도 지금까지 전혀 보고되지 않았던 *P. rhodesiae* 1-C와 51-C 균주를

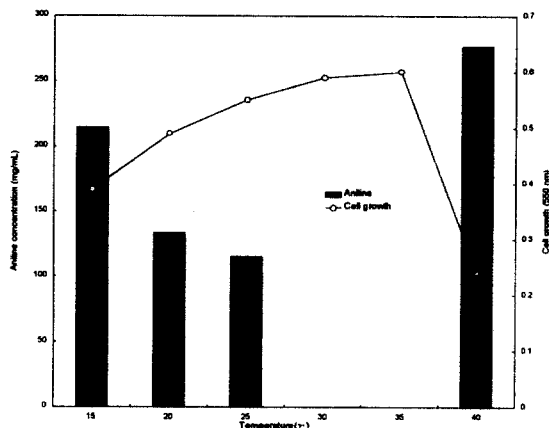


Fig. 3. Effect of temperature on aniline degradation and cell growth of *Pseudomonas rhodesiae* strain 51-C in mineral salt medium containing 300  $\mu\text{g/mL}$  of aniline as a sole carbon and energy source for 20 hours.

선발하여 최대 분해 농도를 조사한 결과 이들은 매우 높은 농도에서도 아닐린의 분해가 가능하였으며 매우 짧은 시간 내에 효과적으로 아닐린을 제거하였다. 환경내에는 다양한 오염원들이 복잡한 형태로 존재하고 있으므로 앞으로는 메틸아닐린과 클로로아닐린 등의 아닐린 유도체들을 포함하여 다른 주요 환경오염물질들에 대한 분해 여부도 조사할 예정이다.

## 요 약

아닐린을 유일 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 두 개의 균주를 강물에서 분리하였다. 두 개의 세균 균주들은 생리·생화학적 특성과 16S rRNA 유전자 염기서열을 통하여 모두 *Pseudomonas rhodesiae*로 동정되었다. 이 균주들은 유일 탄소원으로 아닐린이 6,000  $\mu\text{g/mL}$  수준으로 포함되어 있는 최소배지에서 생육이 가능하였으며 두 균주간의 아닐린 분해능에는 뚜렷한 차이가 없었다. *P. rhodesiae* 51-C 균주는 아닐린이 300  $\mu\text{g/mL}$  수준으로 처리된 최소배지에서 16시간 이내에 아닐린을 완전히 분해하였고 아닐린 분해에 대한 최적의 pH는 7.0이었으며, 적온은 30°C와 35°C 사이였다. *P. rhodesiae*에 의한 아닐린의 분해는 처음으로 보고하는 바이다.

## 참 고 문 헌

- Lyons, C. D., Katz, S. E. and Bartha, R. (1985) Persistence and mutagenic potential of herbicide-derived aniline residues in pond water, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 696-703.
- Rever, H., Helm, V. and Karanth, N. G. K. (1979) Comparative studies on the metabolism of aniline and chloroaniline by *Pseudomonas multivorans* strain An 1, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 7, 181-189.
- Debette, J. and Blondeau, R. (1980) Presence de *Pseudomonas maltophilia* dans la rhizosphere de quelques plantes cultivees, *Can. J. Microbiol.* 26, 460-463.
- Kaminski, U., Janke, D., Prauser, H. and Fritsche, W. (1983) Degradation of aniline and monochloroanilines by *Rhodococcus* sp. An 117 and a pseudomonad: a comparative study, *Z. Allg. Microbiol.* 23, 235-246.
- Janke, D., Baskunov, B. P., Nevedova, M. Y., Ztakun, A. M. and Golovleva, L. A. (1984) Incorporation of  $^{18}\text{O}_2$  during cometabolic degradation of 3-chloroaniline by *Rhodococcus* sp. An 117, *Z. Allg. Microbiol.* 24, 253-259.
- Loidl, M., Hinteregger, C., Ditzelmuller, G., Ferschl, A. and Strichsbier, F. (1990) Degradation of aniline and mono chlorinated anilines by soil-born *Pseudomonas acidovorans* strains, *Arch. Microbiol.* 155, 56-61.
- Raabe, T., Appel, M. and Lingens, F. (1984) Degradation of  $p$ -toluidine by *Pseudomonas testosteroni*, *FEMS Microbiol. Lett.* 25, 61-64.
- Fuchs, K., Schreiner, A. and Lingens, F. (1991) Degradation of 2-methylaniline and chlorinated isomers of 2-methylaniline by *Rhodococcus rhodochrous* strain CTM, *J. Gen. Microbiol.* 137, 2033- 2039.
- You, I. S. and Bartha, R. (1982) Metabolism of 3,4-dichloroaniline by *Pseudomonas putida*, *J. Agric. Food Chem.* 30, 274-277.
- Surovtseva, E. G., Ivoilov, V. S., Karasevich, Y. N. and Vacieva, G. K. (1985) Chlorinated anilines as a source of carbon, nitrogen, and energy for *Pseudomonas diminuta*, *Microbiol.* 54, 756-760.
- Stockinger, J., Hinteregger, C., Loidl, M., Ferschl, A. and Strichsbier, F. (1992) Mineralization of 3-chloroaniline via ortho-cleavage pathway by *Pseudomonas cepacia* strain CMA1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 421-428.
- Tamaoka, J., Ha, D. M. and Komagata, K. (1987) Reclassification of *Pseudomonas acidovorans* den dooren de Jong 1926 and *Pseudomonas testosteroni* Marcus and Talalay 1956 as *Comamonas acidovorans* comb. nov. and *Comamonas testosteroni* comb. nov., with an emended description of the genus *Comamonas*, *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 52-59.

13. Wen, A., Fegan, M., Hayward, C., Chakraborty, S. and Sly, L. I. (1999) Phylogenetic relationship among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 567-576.
14. Kim, H.-J., Kim, J.-C., Kim, H. T., Choi, G. J., Choi, D., Kim, H. G., and Cho, K. Y. (2000) Isolation and characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* strains capable of degrading aniline, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28, 202-208
15. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY, USA.
16. Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. and Botter, E. C. (1989) Isolation and direct complete determination of entire genes, *Nucleic acids Res.* 17, 7843-7853.
17. Bintrim, S. B., Donohue, T. J., Handelsman, J., Roberts, G. P. and Goodman, R. M. (1997) Molecular physiology of Archaea from soil, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 277-282.
18. Coroler, L., Elomari, M., Hoste, B., Gillis, M., Izard, D., and Leclerc, H. (1996) *Pseudomonas rhodesiae* sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters, *System. Appl. Microbiol.* 19, 600-607.
19. Elomari, M., Coroler, L., Hoste, B., Gillis, M., Izard, D. and Leclerc, H. (1996) DNA relatedness among strains of *Pseudomonas* isolates from natural mineral waters and proposal of *Pseudomonas veronii* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 1138-1144.
20. Elromari, M., Coroler, L., Izard, D. and Leclerc, H. (1995) A numerical taxonomic study of fluorescent *Pseudomonas* strains isolated from natural mineral waters, *J. Appl. Bacteriol.* 78, 71-81.