

# 혼합배양계미생물의 군집구조해석방법과 환경개선기술에의 도입

임병란 · 안규홍

한국과학기술연구원 미래기술연구본부

인간활동에 따라서 생산·배출되는 물질을 최종적으로 받아들일 수 있는 곳은 환경중이다. 이러한 물질이 환경중에 배출되면 그곳에 서식하는 생물의 작용에 의해 분해·자원화 될 수 있을 뿐만아니라, 환경생태계중에 축적 및 이동을 반복해나가면서 물질순환에 조화되어간다. 특히, 농공지 등의 토양은 인간활동에 의해서 배출된 유기성 폐기물을 받을 수 있는 최대의 장소라고 생각되며, 그것의 역할이 크게 기대되고 있다. 특히, 최근에 각종 유기성 폐기물의 소각처리에 의한 다이옥신 발생이 문제화되고 있으며, 유기성 폐기물의 분별회수·퇴비화에 의한 토양에의 환원이 기대되어지고 있다.

이와 같이 인간활동으로부터 배출된 물질은 생태계의 작용에 의해서 변환되어, 물질순환에 도입되어가고 있는 한편, 생태계에 큰 영향을 미치고 있으며, 물질의 변환과 생태계의 변화와는 밀접하게 관계를 맺고 있다.

토양과 같은 개방계 환경에서는 다종다양한 미생물이 서식하고 있으며, 이 미생물군은 유기물의 투입 등에 의한 환경조건 변화에 따라서 그것의 군집구조 및 양이 변화한다. 미생물군은 유기물분해에 중심적인 역할을 하고 있으며, 또한, 환경부하의 변화에 대해서도 영향을 받기 쉽다고 생각된다. 그러나, 혼합미생물계에는 다종다양한 미생물이 존재하고, 상호작용뿐만아니라 환경조건에 의해서 그의 군집구조가 크게 변동함으로 미생물의 해석이 특히 곤란하다. 또한 종래의 방법으로서 직접계수법, 배양법 및 biomass법 등을 수행하여 왔지만, 직접계수법은 박테리아에 적용하기 어렵다는 결점이 있으며, 배양법은 모든 박테리아의 분리·배양이 불가능하며, 배지의 조성결정이 곤란하다는 점, 조작이 번잡하고, 시간이 걸린다는 점등의 결점이 있어, 군집구조의 해석에는 적용하기 어려우며, 새로운 approach 방법을 요구하고 있다. 이러한 가운데에서도 미생물 군체의 구성성분(세포막, 세포벽의 지질, quinone, 당, 아미노산 등)을 지표로하는 화학분류법, 항원-항체반응에 기준한 면역학적수법(형광항체법 등)과 더불어 최근, 분자생물학적수법(DNA probe법, DNA hybridization법, *in situ* hybridization, 유전자증폭-hybridization법, 16S rDNA profile 법 등)이 미생물생태계의 해석에 급속히 적용되고 있다. 현실

적으로는 기술적인 문제점도 많지만, 미생물의 분리라는 조작을 행하지않고, 원리적으로는 시료중의 미생물을 검출하는데 있어서도 감도도 높고, 직접검출, 식별도 되기 때문에, 배양이 곤란한 미생물, 공생미생물, 증식이 늦은 미생물의 해석 및 미시적환경에 있어서 미생물중의 분포해석 등에 유효할 것으로 기대되고 있다.

본 review에서는 기존에 사용해왔던 미생물의 계수 및 정량화 방법, 미생물의 군집구조해석방법으로서 최근 주목을 받고 있는 미생물의 호흡색에 필수물질인 quinone를 주목한 quinone profile법 및 유전자에 주목한 PCR(Polymerase Chain Reaction), FISH(Fluorescent In Situ Hybridization)법등에 대해서 간단히 서술하고자 한다.

## 미생물활성의 검출

### 형광활성염색법

Tetrazolium 환원법은[1, 2] tetrazolium 염을 기질로 이용하여 세균의 전자전달계의 효소활성에 의한 대사생성물인 formazan을 현미경으로 관찰하여 활성 균수를 측정하는 방법이다. 세균이 갖고있는 활성을 평가하기 위해서는 형광염색제로서 호흡활성을 평가하기 위한 CTC(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride)등의 형광성의 tetrazolium 염, esterase 활성을 평가하기 위해서는 FDA (fluorescein diacetate)계 시약이 사용되고 있다.

또한, 비형광성의 tetrazolium 염인 INT(2-(p-iodophenyl)-3-p-(nitrophenyl)-5-phenyletetrazolium chloride)를 사용함으로써, 일반 광학현미경으로 호흡활성을 갖는 미생물을 검출하는 것이 가능하다. 그러나, 미생물을 검출하는데 있어서 각 세포내에 축적된 자색색소를 검출하기 때문에 측정오차를 클 경우가 있다. 또한 수용성의 formazan를 생성하는 형광성 tetrazolium chloride인 XTT(2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxyde)를 이용함으로써 형광현미경을 사용하지않고 형광분광광도계에 의해서 세균의 호흡활성을 평가하는 것이 가능

하다[3].

### Direct viable count법

Direct viable count(DVC)법은 시료에 배지 성분과 nalidixic acid 등의 chiono계 항균제를 첨가하여 배양하는 방법으로서 증식능력을 갖는 세균은 nalidixic에 의해서 세포 분열이 저해되기 때문에 신장 또는 비대하게 된다. 이렇게 신장 및 비대된 세균수를 형광염색후, 형광현미경으로서 계측하는 방법이다[4]. 세균의 생사를 평가하기 위해서는 증식능력은 큰 지표가 되기 때문에 유용성이 크다.

## 분자생물학적방법

최근, 유전자해석의 쾌속화에 따라서 유전자배열을 특정미생물의 계측에 응용한다든지, 미생물생태계의 해석 등에 응용하는 움직임이 높아져오고 있다.

즉, 유전자 조합형 미생물(GEMs)의 환경중의 누출에 따라 biohazard의 risk평가 및 bioremediation에 있어서 분해미생물의 의도적도입에 의한 효과를 확인할 필요성으로부터, 특정미생물의 검출, 계측에 관한 요망이 높아져, 많은 관심을 모으고 있다. 초기에는 목적미생물에 colony를 형성시켜, 특이적 DNA probe를 이용한 colony hybridization을 행함으로써, 표현형에서는 다른 것과 구별이 곤란한 것을 특정한다. 최근에는 시료로부터 직접 추출한 DNA로 PCR법에 의해 표적미생물의 유전자를 증폭하고, hybridization법과의 병용함으로써 특이적이고 고감도인 검출을 행하는 *in vitro*법 및 *in situ*(원위치)로 hybridization을 행하여, 특정유전자배열을 갖는 미생물세포를 현미경적으로 검출하는 FISH 법[5, 6], 감도를 향상시키기 위해서 PCR반응을 행하는 *in situ* PCR법[7] 등, 보다 진전된 방법으로써 전개해오고 있다. *In situ*법에서는 세포계수에 의해 미생물정량을 행하지만, *in vitro*법에서는 목적유전자를 정량적으로 평가하기 위해서는 MPN-PCR법[8, 9], 경합적 PCR법[10] 등이 이용된다. 또한 DNA database에 의해 primer, probe의 폭 넓은 design 이 가능하게 되었으며, monitoring의 대상이 되는 특정미생물도 GEMs뿐만 아니라, 병원성미생물, 질산화, 탈질균, 유해화학물질 분해균 등에 확대되어, 폐수처리에 있어서 유용한 미생물(군)의 통태해석 및 bioaugmentation의 평가에 기여하고 있다.

한편, 이런 유전자형 monitoring법을 미생물의 생태계해석에의 적용은 1990년대에 들어 급속하게 주목을 받게 되었다. 특정미생물의 거동 뿐만 아니라, background가 되는 생태계 및 그의 생물상의 연이를 밝힐 수 있으며, 합리적인 폐수처리 및 bioremediation의 제어법을 확립하고자하는 움직임을 보였다. 모든 미생물이 갖고있는 공통의 유전자인 16Sr DNA 및 *gyrB*(topoisomerase subunit B) 유전자를 표적으로서 생물산업

universal primer에 의한 PCR반응을 행하여 증폭단편을 제한 효소처리 및 변성제를 이용하여 분획하고, 전기영동의 band pattern으로부터 미생물의 다양성 및 변화를 해석하는 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)법[11] 및 DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)법[12]을 이용하는 것이 일반화 되었으며, band의 염기배열을 기준으로 하여 특이적인 probe를 설계함으로써 FISH법에 의한 정량적인 해석도 유효한 것으로 알려져 있다.

그러나, 현실적으로는 얻은 결과를 어떻게 도움이 되고 있는가에 대해서 명확하게 밝히는 단계까지는 가지않았으며, 앞으로 이 연구의 진전이 기대되고 있다.

## 화학분류학적지표를 이용한 방법

### Phospholipid fatty acid(PLFA) profile method[13, 14]

인지질은 인산을 mono 또는 diester의 형을 포함한 지질을 나타낸다. 인산을 주체로 하는 극성의 윗부분과 2개의 지방산의 긴 비극성의 꼬리를 갖기 때문에, 양 친매적인 성질을 가지고 있다. 이 때문에 인지질은 생체막의 구축에 또는 생체막의 외계와의 바리아로서의 기능에 중요한 역할을 하고 있다. 인지질은 살아있는 모든 세포에 존재한다. 그러므로 PLFA profile 법은 quinone profile법에서 측정되지 않는 미생물 즉, 발효에 의해서 에너지를 획득하는 미생물까지 측정이 가능하다. 그러나, 호흡기능에 의한 분류는 할 수가 없다는 단점이 있다.

### Quinone profile method

균체 quinone[15, 16]은 호흡쇄 및 광합성전자전달물질이며, 미생물의 세포벽에 존재하고있다. 호기 및 혐기호흡 또는 광합성에 의해 에너지를 얻는 미생물에 존재하고, 메탄생성균과 같이 발효에 의해서 에너지를 획득하는 미생물에는 존재하지 않는다. 이것들의 골각형태, isoprene측쇄수 및 측쇄의 포화도 등의 차이에 따라서 특유의 산화환원전위를 나타냄에 따라, 미생물에 있어서 에너지대사의 차이에 따라서 quinone분자중도 다르게 된다. 이것으로부터, 우점 quinone 분자중은 각 미생물에 있어서 특징적인것으로 된다.

Quinone은 주로 ubiquinone(UQ), menaquinone(MK), vitamin K1(VK1) 및 plastoquinone(PQ)이 있으며, Fig. 1에 나타낸바와 같이 isoprenoid 측쇄의 길이에 따라서 각각 UQ-n, MK-n 및 PQ-n으로 표시된다. UQ은 benzoquinone형의 주된 quinone이며, MK는 naphthoquinone형의 주된 quinone이다. Ubiquinone과 menaquinone은 구조의 차이에 따라 산화환원전위도 다르며, ubiquinone은 약 +0.1V, menaquinone은 -0.07V이다. 즉, 산소 및 질산염등의 높은 전위수용체로서는 ubiquinone를 전자운반체로서 이용할수있지만, humic acid 및 유산염등의 저전위수용체로서는 menaquinone을 이용한다. 따

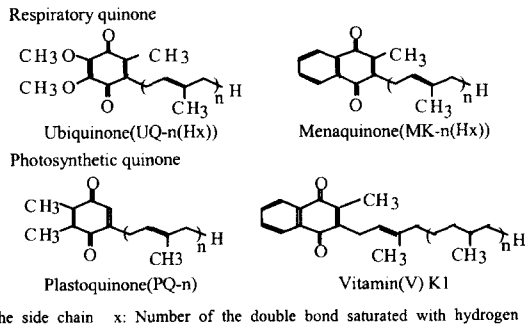


Fig. 1. Chemical structures of major respiratory quinone.

라서, 고전위수용체가 많은 호기성조건에서는 ubiquinone을 우점 quinone으로하는 미생물, 저전위 수용체가 많은 혐기상태에서는 menaquinone을 우점quinone으로하는 미생물이 많이 존재할수있다고 생각할수있다. 즉, 절대 혐기성균은 menaquinone형의 quinone계이며, ubiquinone은 보유하지않는다. 이것에 비해, 세균을 제외한 진핵생물은 ubiquinone만을 보유하며, 통기성혐기호흡에 의한 생육은 불가능하다. 또한, 양쪽의 quinone을 보유하는 통기성혐기성균에서는 호기성 조건하에서 ubiquinone을 생합성하고, 혐기성 조건하에서는 menaquinone형의 quinone계로 된다. 일반적으로 Table 1에 나타낸바와 같이 각각의 미생물에 따라 특유의 우점 quinone종을 보유하고 있으며, quinone종의 존재비 즉, quinone profile이 특징적이다. 폐수의 생물학적처리장치 및 토양과 같은 혼합 배양계의 미생물군에 있어서 quinone 분석에 의해 얻은 quinone 분자종의 양은 서식하는 미생물량을 반영하고 있으며, 각 quinone 분자종의 존재비, 즉 quinone profile은 미생물군집구조의 다양성을 나타내고 있다.

1986년 생태계연구에 있어서 quinone분석의 값을 처음으로 논증한 것은 Hedric and White[17]이며, 자연미생물군집의 산화환원상태를 평가하기 위하여 menaquinone/ubiquinone의 유용성을 나타내었다. 이 보고에 따르면 quinone profiles의 분석은 분리 및 배양을 필요로 하지않고 자연환경에의 각각 다른 미생물의 균집의 특성을 평가하기위한 도구로서 크게 기대되고 있음을 강하게 주장하였다.

Table 1. Examples of dominate quinone species of some bacteria

Bacteria	Quinone
<i>Achromobacter, Corynebacterium</i> *	UQ-8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	UQ-9
<i>Ancylobacter, Methylobacterium</i> **	UQ-10
<i>Bacillus pumilus</i> *, <i>Sporolactobacillus</i>	MK-7
<i>Brevibacterium</i> *	MK-8(H <sub>2</sub> )
<i>Mycobacterium</i> **	MK-9(H <sub>2</sub> )

\*Nitrile-degrading bacteria.

\*\*Dimethylformamide-degrading bacteria.

또한, 균체 quinone의 분석방법은 Hu[18, 19]의 그룹에 의해서 간이화 및 고감도화가 이루어졌다. 또한, quinone profile법을 이용해서 생물학적처리장치[20-25], 토양[26-30]및 하천, 호수[31-34]중의 미생물상변화에 대해서 해석하는 방법을 개발하였으며 quinone profile법에 관한 풍부한 경험과 knowhow를 축적하고 있다.

퀴논 량 및 퀴논의 조성을 화학분석, 해석하는 방법, 즉 퀴논 프로파일법을 도입하여 생물처리장치 및 토양, 하천 등에 서식하고 있는 미생물의 종류, 존재량 및 그것의 변화를 그곳에 포함되어있는 퀴논의 종류 및 량을 동정, 정량한 결과의 예를 논하고자 한다. 본 연구에서는 Quinone을 분석하기 위하여 하천 및 호수의 경우는 약 20L를 여과하여 미생물을 집균하였으며, 토양은 10~20g, 하수처리장치내 활성슬러지의 경우 MLSS 3000mg/L인 sample를 약 20mL정도 취해 원심분리(7000rpm, 10min)하여 Hu[18] 등이 개량한 quinone 분석방법을 이용하여 실험하였다.

생물처리장치 및 토양, 하천등에 서식하고 있는 미생물의 종류 및 존재량과 그것의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. 그림에 나타낸 바와 같이 sample를 채취한 장소 및 환경조건에 따라 quinone량과 종류가 서로 다른 것을 알 수 있었다. 하천 및 호수중에서는 PQ, VK1, UQ-8, MK-6과 -7 등 8종류였다. 한편, 활성슬러지 및 토양에서는 PQ와 VK1은 검출되지 않았으나, UQ 분자종의 존재비가 UQ-8>UQ-10>UQ-9의 순으로 낮아지는 현상을 보였으며, MK의 조성은 MK-6, MK-7또는 MK-8이 우점빈도가 높게 나타났다. 또한, 미생물군집구조 및 양은 하천 및 호수보다도 다양하고 미생물량이 많은 것으로 나타났다. 특히 토양에 비료를 첨가하는 방법에 따라 토양중에 서식하는 미생물의 균집구조 및 양이 크게 차이가 있음을 알 수가

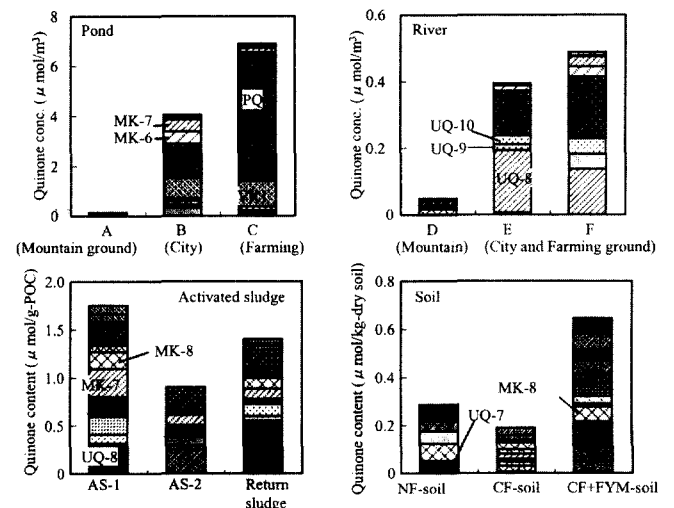


Fig. 2. Microbial community structure in various environments. (Nagoya University Farm; Unfertilized soil (NF-soil), Chemical fertilizer(CF-soil), Chemical fertilizer +40t ha<sup>-1</sup>y<sup>-1</sup> of farmyard manure(CF+FYM-soil)).

있었다.

우점 quinone 존재비와 분자종의 분포 pattern에 주목하여, quinone profile를 지표로한 미생물 혼합배양계의 다양성을 나타내는 지표, 즉 미생물다양성지표 DQ를 다음과 같이 정의하였다[35].

$$DQ = \left( \sum_{k=1}^n \sqrt{f_k} \right)^2 \dots\dots\dots (1)$$

단지,  $f_k$ 는 quinone 분자종 k의 존재비(-)로서, n은 존재비가 0.001 이상의 퀴논 분자종의 수이다.  $f_k < 1$ 임으로  $f_k^{1/2} > f_k$ 으로 되고, 또한  $f_k$ 가 작을수록  $f_k^{1/2}/f_k$ 값이 크다. 이 때문에 존재비가 작은 것 일수록 보다 하나로 모일수가 있다. DQ값은 퀴논 분자종의 수가 많을수록 크게 되며, 전부의 분자종이 평등하게 존재할 때 분자종의 수와 동등하다. 즉 DQ값이 분자종의 수와 대응하고 있는 것으로부터 DQ를 이용해서 객관적으로 다양성을 평가할 수 있다. 각각 다른 환경에 있어서 미생물군의 다양성과 우점 quinone 존재비를 비교하여 Fig. 3에 나타내었다. 하천 및 호수중의 미생물의 다양성은 4~9로 유사하였으나, 하수처리장차내 활성슬러지의 11~15 및 토양의 9~16 보다는 작았다. 우점 quinone 존재비에 대해서는 하천 및 호수에서는 0.3~0.8정도로 넓게 분포하였으나, 활성슬러지와 토양에서는 0.2이하로 낮았다. 즉, 하천 및 호수에서는 특정미생물이 우점하기 쉽고, 활성슬러지 및 토양에서는 여러 종류의 미생물이 비교적 균일하게 존재하고 있는 것으로 추측할 수 있다. 하천 및 호수보다는 토양과 활성슬러지가 미생물에 있어서 비교적 안정적이고 서식하기 좋은 환경이라고 생각된다.

본 연구에서 주목한 quinone은 미생물의 에너지대사방법에 대응하고 있으며, UQ은 호기호흡, MK은 혐기호흡, PQ 및 VK1은 광합성에 사용하는 전자전달물질이다. 이 3그룹의 quinone 존재비를 삼각 diagram에 표시하여 각각 다른 환경조건 미생물군을 비교하여 Fig. 4에 나타내었다. 호수표층수중

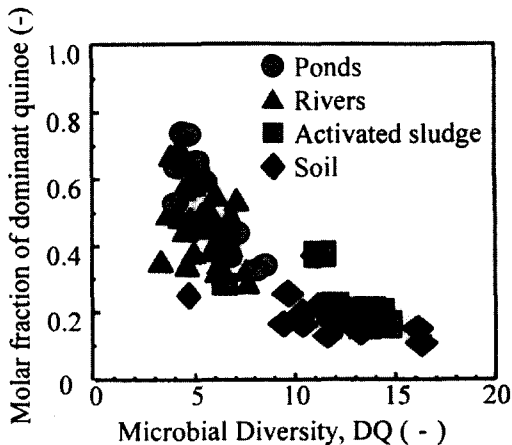


Fig. 3. Microbial diversity in different environments.

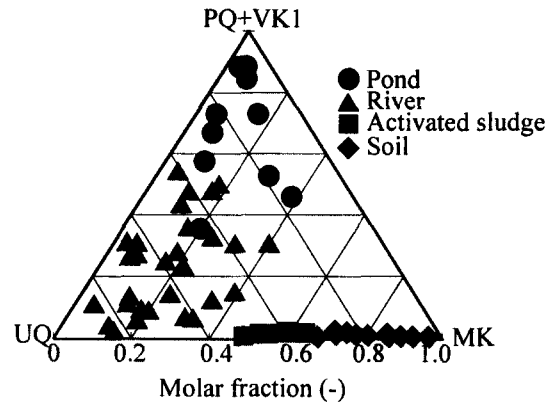


Fig. 4. Comparison of quinone composition in each environments. (UQ: Aerobic respiration, MK: Anaerobic respiration, PQ-9 + K1: Photosynthetic).

에는 (PQ+VK1)의 존재비가 가장 컸으나, 하천수중에서는 UQ의 존재비가 가장 크게 나타났다. 한편, 토양 및 활성슬러지중에서는 PQ와 VK1은 거의 검출되지 않았으며, MK의 존재비가 UQ의 존재비보다 큰 것으로 나타났다. 이상으로부터 하천수중의 미생물에는 호기호흡에 의해 에너지를 얻는 박테리아가 많고, 호수지표수중에는 광합성에 의해 에너지를 얻는 조류등이 많은 것으로 추측된다. 하천수중과 호수중의 미생물 군집이 크게 다른 것으로 나타났으며, 이것은 하천과 호수에서는 물의 체류시간이 다르기때문이라고 생각된다. 또한 활성슬러지와 토양중의 미생물은 호기호흡보다 혐기호흡에 의해 에너지를 얻는 미생물이 차지하는 비율이 큰 것으로 추측된다.

이와 같이 Quinone을 biomaker로서 이용하는 미생물군집의 해석은 세균의 분리, 배양을 필요로하지않는 장점과 더불어 분석, data해석이 쉽다는 점에서 좋은 생태학적기법이라고 생각된다. Quinone profile법에 의해 얻은 결과를 모아서, 생물학을 전공하지않은 자라도 오염에 의한 미생물생태계에 대한 영향, 오염수복의 최적화, 오염수복이 미생물군집에 미치는 영향에 대한 해석이 가능하게 될 것을 기대하며, 환경보전에 크게 공헌 될 것으로 생각된다.

### 환경개선기술에의 응용

미생물기능의 환경보전분야에의 이용을 생각할 때, 미생물이 갖고 있는 다양한 기능, 물질이 합성·분해·전환, 농축·축적, 흡착, 응집 등이 상기된다. 자르는 부분을 바꾸어 분자생물학적 시점에서 본다면, 분자인식, 물질운송, 정보전달, 물질분해·생산등으로 기능을 나눌 수 있을 것이다.

따라서 각종기능을 이용한 파괴된 환경생태계의 수복, 오염물질의 제거 등을 적절히 수행하기 위해서는 오염물질이 생태계에 미치는 영향을 해석한다든지, 목적으로 하는 제거기능을 갖은 미생물의 검색, 기능미생물의 활성을 유지하면서 오염장

소 및 오염제거장치에서의 미생물 농축기술을 개발할 필요가 있다. 또한 remediation을 실시함에 있어서 기인하는 미생물군집에의 영향을 정량적으로 신속히 해석하여, 미생물군집의 변화와 수질 또는 유기물제거성능과의 관계를 분명히 밝힘에 따라 생태계의 변화를 감시, 추적하는 것이 가능하며, 환경생태계보전 및 생물학적처리장치의 최적운전관리에 유용한 정보를 제공할 수가 있으리라고 생각된다.

### 참고문헌

1. Bhupathiraju, V. K., M. Hernandez, P. Krauter and L. Alvarez-Cohen. 1999. A new direct microscopy based method for evaluating in-situ bioremediation. *J. of Hazardous Materials*. **B67**: 299-312.
2. Bhupathiraju, V. K., M. Hernandez, D. Landfear and L. Alvarez-Cohen. 1999. Application of a tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods*. **37**: 231-243.
3. Bensaid, A., J. Thierie and M. Penninckx. 2000. The use of the tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimes. *J. Microbiol. Methods*. **40**: 255-263.
4. Kogure, K., U. Sinidu and N. Taga. 1978. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 415-420.
5. DeLong, E. F., G. S. Wlckham, N. R. Pace. 1989. Phylogenetic stains: Ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science*. **243**: 1360-1362.
6. 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.
7. Hodson, R. E., W. A. Dustman, R. P. Garg and M. A. Moran. 1995. *In Situ* PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**: 4074-4082.
8. Sykes, P. J., S. H. Neoh, M. J. Brisco, E. Hughes, J. Condon and A. A. Morley. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*, **13**: 444-449.
9. Wang, R.-F., W.-W. Cao and C. E. Cerniglia. 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1242-1247.
10. Zimmermann, K. and J. W. Manhalter. 1996 Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques*, **21**: 268-279.
11. Hiraishi, A., Y. Kamagata, K. Nakamura. 1995. Polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes from Methanogens. *J. Ferment. Bioeng.* **79**: 523-529.
12. Muyzer, G., E.C. de Waal 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.* **62**: 766-771.
13. Christopher, T. G. and M. S. Kate. 2000. Analysis of phospholipid fatty acids(PLFA) to characterize microbial communities in aquifers. *Hydrogeology J.* **8**: 126-141.
14. Fang, J. and M. J. Barcelona. 1997. Biogeochemical evidence for microbial community change in a jet fuel hydrocarbons-contaminated aquifer. *Org. Geochem.* **29**: 899-907.
15. Collins, M. D. and D. Jones. 1981. Distribution of isoprenoid quinones structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* **45**: 316-354.
16. Hiraishi, A. (1988) Respiratory quinone profiles as tools for identifying different bacterial population in activated sludge. *J. Gen. Microbiol.* **34**: 39-56.
17. Hedrick, D. B. and D. C. White. 1986. Microbial respiratory quinones in the environment. I. A sensitive liquid chromatographic method. *J. Microbiol. Methods* **5**: 243-254.
18. Hu, H.-Y., K. Fujie, and K. Urano. 1999. Development of a novel solid phase extraction method for the analysis of bacterial quinones in activated sludge with a higher reliability. *J. Biosci. Bioeng.* **87**: 378-382.
19. Hu, H.-Y., B.-R. Lim, N. Goto, and K. Fujie. 2001. Analytical precision and repeatability of respiratory quinones for quantitative study of microbial community structure in environmental samples. *J. Microbiol. Methods*. **47**: 17-24.
20. Hiraishi, A. 1991. Numerical analysis of lipoquinone patterns in monitoring bacterial community dynamics in wastewater treatment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **37**: 57-70.
21. Fujie, K., H.-Y. Hu, H. Tanaka, and K. Urano. 1994. Ecological studies of aerobic submerged biofilter on the basis of respiratory quinone profiles. *Wat. Sci. Tech.* **29**: 373-376.
22. Hu, H.-Y., K. Fujie, H. Tanaka, T. Makabe, and K. Urano. 1997. Respiratory quinone profile as a tool for refractory chemical biodegradation study. *Wat. Sci. Tech.* **35**: 103-110.
23. Lim, B.-R., H.-Y. Hu, N. Goto and K. Fujie. 2000. PVA-Coated activated carbon for aerobic biological treatment of concentrated refractory organic wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **42**: 205-210.
24. Lim, B.-R., X. Huang, H.-Y. Hu, N. Goto and K. Fujie. 2001. Effects of temperature on biodegradation characteristics of organic pollutants and microbial

- community in a solid phase aerobic bioreactor treating high strength organic wastewater. *Wat. Sci. Tech.* **43**: 131-138.
25. Lim, B.-R., H.-Y. Hu, X. Huang and K. Fujie. (Accepted) Effect of seawater on the treatment performance and microbial population in a biofilter treating coke-oven wastewater. *Process Biochemistry*
  26. Fujie, K., H.-Y. Hu, H. Tanaka, K. Urano, K. Saito, and K. Katayama. 1998. Analysis of respiratory quinone profile in soil for characterization of microbiota. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**: 393-404.
  27. Fujie, K., H.-Y. Hu, H. Tanaka, K. Urano, K. Saito, and K. Katayama. 1998. Effect of drying treatment on the respiratory quinone profile in soil. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**: 467-470.
  28. Katayama, A., H.-Y. Hu, M. Nozawa, H. Yamakawa and K. Fujie. 1998. Long-term changes in microbial community in soils subjected to different fertilizing practices revealed by quinone profile analysis. *Soil Sci. Plant Nutr.* **44**: 559-569.
  29. Katayama, A., K. Funasaka and K. Fujie. 2001. Changes in the respiratory quinone profile of a soil treated with pesticides. *Biol. Fertil. Soils.* **33**: 454-459.
  30. Hiraishi, A. H. Miyakoda, B.-R. Lim, H.-Y. Hu, K. Fujie and J. Suzuki. 2001. Toward the bioremediation of dioxin-polluted soil: structural and functional analyses of in situ microbial populations by quinone profiling and culture-dependent methods. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **57**: 248-256.
  31. Kunihiro, T., H.-Y. Hu, B.-R. Lim, N. Goto, and K. Fujie. (Accepted). Analysis of the differences in microbial community structures between suspended and sessile microorganisms in river based on quinone profile. *J. Gen. Appl. Microbiol.*
  32. Kunihiro, T., H.-Y. Hu, B.-R. Lim, N. Goto and K. Fujie. (2001. Rome/Italy) Changes of microbial community structures in river following in domestic wastewater using quinone profile. *3<sup>rd</sup> IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Processes*, Paper on CD-ROM.
  33. Naitoh, Y., T. Kunihiro, B.-R. Lim, H.-Y. Hu, N. Goto and K. Fujie. 1999. Analyses of water quality and microbial community change in ponds using quinone profile. *Proceedings of the 33rd Annual Conference of Japan Society on Water Environment.* p.220.
  34. Umeno, H., B.-R. Lim, H.-Y. Hu, N. Goto and K. Fujie. 2000. Analysis of microbial community in river using quinone profile. *Proceedings of the 34th Annual Conference of Japan Society on Water Environment.* pp.6.
  35. Hu, H.-Y., K. Fujie, H. Nakagome, K. Urano, and A. Katayama. 1999. Quantitative analyses of the change in microbial diversity in a bioreactor for wastewater treatment based on respiratory quinones. *Wat. Res.* **33**: 3263-3270.