

Real-time PCR 기술의 생물학적 폐수처리에서의 응용

엄호섭 · 이선미 · 상병인[†] · 정운철

한국과학기술연구원 유해물질연구센터

Application of Real-time PCR Techniques for the Biological Wastewater Treatment

Ho-Seop Eom · Sun-Mi Lee · Byoung-In Sang[†] · Yun-Chul Chung

Hazardous Substances Research Center, Korea Institute of Science and Technology

(Received 15 November 2005, Accepted 8 February 2006)

Abstract

About 99% of microorganisms in the environment are unculturable. However, advances in molecular biology techniques allow for the analysis of living microorganisms in the environment without any cultivation. With the advent of new technologies and the optimization of previous methods, various approaches to studying the analysis of living microorganisms in the environment are expanding the field of microbiology and molecular biology. In particular, real-time PCR provides methods for detecting and quantifying microorganisms in the environment. Through the use of the methods, researchers can study the influence of environmental factors such as nutrients, oxygen status, pH, pollutants, agro-chemicals, moisture and temperature on the performances of environmental processes and some of the mechanisms involved in the responses of cells to their environment. This review will also address information gaps in the analysis of the microorganisms using real-time PCR in the environmental process and possible future research to develop an understanding of microbial activities in the environment.

keywords : Biological wastewater treatment, Real-time PCR

1. 서론

인간과 여러 미생물의 계승 프로젝트의 성공적인 수행은 생명공학 외에 여러 공학분야에 있어서 이전에는 고려하지 못했던 미시적 세계로의 깊은 통찰력을 주고 있다. 계승 프로젝트를 포함한 유전체 연구의 획기적인 진보는 유전학 보다는 분자생물학에 의해 이루어졌으며(John et al., 2003), 1985년 Kary Mullis에 의해 소개된 중합 효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)이 중합효소의 발견으로 급속히 대중화되면서 유전자를 이용한 대용량 분석 기술(gene-based high-throughput technology)도 병행 발달되어 왔다. PCR의 장점은 연구자가 원하는 유전자의 특이적인 염기서열을 손쉽게 얻을 수 있다는 것과 반복되는 유전자 합성과정을 통해 적은 양의 유전자 시료로부터 상당히 많은 양의 동일한 염기서열을 증폭해 낼 수 있다는 것이다. 그러나, 환경분야에서 생물학적 모니터링 및 독성물질의 dose effect를 측정하기 위해서는 기존 PCR 기반의 방법들은 한계가 있는데, 가장 큰 제약은 기존 PCR의 결과가 말단 반응의 산물(end-point detection)로부터 얻어지기 때문이다. 즉, 긴 반응시간 소요, 낮은 감응도, 증폭 길이에 의존한 분리, 비선형적 증폭량, PCR후 겔 확인과정 등이 약점으로

작용한다. 이러한 단점들은 EtBr(ethidium bromide) 염색을 이용한 아가로오스겔의 낮은 해상도와 결합되어 다양한 환경분야로의 응용에도 한계로 작용할 수 있다. 한편, RFLP(restriction fragment length polymorphism), DGGE(denatured gradient gel electrophoresis), FISH(fluorescence in situ hybridization), T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism), DNA 칩(DNA chip) 등 환경생물 모니터링이나 독성 평가를 수행할 수 있는 대용량 분석 방법 등이 개발되어 왔으며, 특히 DNA 칩은 한번에 수많은 유전자에 대한 특이적 마커를 집적할 수 있어 최근 환경미생물 모니터링분야에서 각광을 받고 있다. 그러나, DNA 칩 역시 PCR 기반의 선행단계가 요구되고 재현성 여부가 여전히 문제로 지적되고 있다. 따라서 이를 보완하기 위해 최근엔 PCR 반응 초기의 사이클 수에 따른 증폭산물의 양을 형광물질을 이용하여 정확히 예측할 수 있고 PCR 후 겔 확인과정이 필요없는 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)이 관심을 끌면서 관련 응용 연구가 급속히 늘고 있다.

Real-time PCR은 정량적인 검출을 가능하게 하는 형광물질을 리포터(Connell et al., 1993; Livak et al., 1995)로 사용하는 방법으로써 사이클이 증가함에 따라 반응산물로부터 나오는 형광신호가 비례적으로 증가하도록 설계되었다(Higuchi et al., 1992, 1993). 이러한 형광신호는 PCR 반응 곡선의 초기 지수 단계(exponential phase)에서 정확히 비례

[†] To whom correspondence should be addressed.
biosang@kist.re.kr

증가하므로 초기 표적시료의 양과 증폭된 PCR 산물의 양이 주어진 사이클에 대해 정량적인 관계를 갖게 되는 것은 물론, PCR 후 겔 확인 과정이 필요 없기 때문에 전체적인 실험 시간이 단축된다. 또한 PCR 산물의 양을 감지할 수 있는 해상도($\sim 10^7$ fold)가 훨씬 넓고 동시에 감도와 특이성이 좋아서 표적시료의 초기 농도차가 적어 증폭 산물의 차이가 적은 경우에도 이를 능히 검출할 수 있다. 더욱이, 양을 사전에 알고 있는 경쟁시료(competitor)를 이용한 경쟁적 qPCR(Wang et al., 1989; Becker-André et al., 1989; Gilliland et al., 1990)에서와 같이, 표적시료와 경쟁시료의 비(1:10~10:1, low dynamic range)를 적절히 맞추어주는 과정과 반응 후 이를 정확히 정량하기 위한 PCR 이후 과정 등이 필요없으며 Ct 값(threshold cycle)을 자동으로 계산해 주므로 아주 정확한 정량분석이 가능하다. 이와 같이, 기존 PCR의 한계를 극복하고 우수한 성능을 지닌 real-time PCR은 최근 환경공학의 핵심요소로 발전하고 있는 환경생물공학의 핵심기술로서 다양하게 응용될 수 있다. 환경생물공학의 대표적인 기술은 생물정화(bioremediation), 식물정화(phytoremediation), 생물예방(bioprevention), 생물진단(bio-monitoring)의 4가지로 구분되며, 이는 총 12가지의 세부 기술로 나누어진다(기초기술연구회, 2003). 하지만, 각 기술들의 주된 원리는 환경 미생물이므로, 이를 분류하고 탐지하며 관련 독성물질을 진단하여 위해 정도를 평가하는 생물진단 연구가 생물/식물 정화기술과 예방 기술과 병행되어 연구되어야 한다. 따라서, 본 총설에서는 real-time PCR을 응용한 환경생물공학기술 중 생물학적 폐수 처리에 응용될 수 있는 분야를 정리하였다.

2. 생물학적 폐수 처리 기술로의 응용

2.1. 벌킹 현상의 제거

활성 슬러지법을 적용한 폐수처리시 벌킹 또는 거품이 발생하는데, 이것은 침강과 농축을 불량하게 하여 고형물을 분리하는데 종종 장애를 초래한다. 발생된 거품이나 벌킹 현상을 해소하는 것은 쉽지 않으며 폐수 처리 공정의 전체적인 성능을 감소시킨다. 거품이 생기는 주 원인은 그람 양성체에 속하는 사상균(대표적으로 *Microthrix parvicella*) 때문이다(Wagner et al., 2002). 이를 해결하기 위해서 보통 응집제나 침강제(polyaluminium chloride, PAC)를 첨가하지만(Roel et al., 2002), 비용이 많이 소요되기 때문에 다른 방법들이 고안되어 왔다. 침강제는 사상균의 탄소 및 에너지 원료인 지방산이나 인산염을 침전시킴으로서 사상균의 성장을 억제하는 것이지만(Aguilar et al., 2002), 사상균 자체를 통제할 수 있다면 고가의 침강제 사용을 감소시킬 수 있고 폐수처리장 운전 조건을 획기적으로 개선시킬 수 있을 것이다. 특히 운전 조건을 개선시키기 위해서는 폐수의 성상과 폐수 처리 공장의 운전 조건에 따라 벌킹 현상을 일으키는 사상균의 우점종을 결정하는 것이 중요하다. Kaetzke 등(2005)은 real-time PCR을 이용하여 활성 슬러지에서 사상균인 *Microthrix parvicella*를 정량하는 연구를 수

행하였다. 독일 폐수처리공장에서 32개의 활성슬러지 시료 중 18개의 시료에서 *M. parvicella* 16S rDNA의 양이 전체 박테리아 16S rDNA 양에 대해 3% 미만일 때 거품이 일지 않았고 나머지 14개의 시료에 대해서 *M. parvicella* 16S rDNA의 상대적인 양이 0~18%일 때 거품이 발생하였으며 이 중 7 시료에서는 *M. parvicella*이 발견되지 않았다(Kaetzke et al., 2005). 이는 벌킹 현상의 주요 원인인 사상균이 폐수처리공장과 운영 조건에 따라 다르며, 벌킹 또는 거품 현상을 최소화하는 운영 조건을 개발하기 위해서는 폐수 처리 현장의 주요 사상균 동정이 병행되어야 할 필요가 있다는 것을 말해준다(de los Reyes et al., 1998; Guan et al., 2003; Oerther et al., 2001). 이와 같이, 폐수처리공정에 real-time PCR을 응용한 균집 분석법은 일반적으로 rRNA 레벨이 낮아서 FISH 등의 방법으로 정량하기 어려운 경우에도 정량 분석에 아주 유리한 기술이라 할 수 있다(Oerther et al., 2001; Bradford et al., 1998). 또한, real-time PCR에 의해 동정된 사상균을 호기성 또는 혐기성 선택조를 이용해 통제한다면 보다 효과적으로 거품 또는 벌킹 현상을 제어할 수 있을 것이다(Lebek et al., 2002; Lee et al., 2004).

2.2. 생물학적 질소 제거

생활하수 및 폐수처리 공정에서 질소를 제거하는 것은 매우 중요한 단계이다. 질산화와 탈질화에 관여하는 많은 미생물들은 광범위한 환경, 즉 토양(Killham, 1986), 해양(Ward, 1986), 청정 호수(Hall, 1986), 폐수(Painter, 1986), 그리고 양식장(Kawai et al., 1971)에 존재한다. 질산화와 탈질화 박테리아의 균집도를 분석하기 위해서는 질산화 및 탈질화에 관여하는 효소를 코딩하는 유전자를 기반으로 하는 real-time PCR 기술이 적용되어야 한다.

2.2.1. 질산화 박테리아

질산화 과정은 두 가지 다른 독립영양미생물(autotrophic bacteria)에 의해 두 단계로 진행된다. 첫 번째 과정은 암모니아염(NH_4^+)이 아질산염(NO_2^-)으로 산화되는 단계로 ammonia-oxidizing bacteria(AOB)에 의해 이루어진다(Purkhold et al., 2000). 두 번째 과정에서는 주로 nitrite-oxidizing bacteria(NO₂)가 관여하여 아질산염(NO_2^-)을 질산염(NO_3^-)으로 산화시킨다(Kirstein et al., 1993). 다양한 종속영양세균과 곰팡이가 질산화 과정을 수행할 수 있지만 독립영양세균에 비해 그 수는 무시할 수 있을 정도이다(Verstraete et al., 1973; Watson et al., 1981; Wolfe et al., 1990). 질산화 및 탈질화 과정에서 속도제한단계는 질산화 과정에서 암모니아가 아질산염으로 산화되는 단계이며, 이때 생긴 아질산염은 NOB에 의해 즉시 질산염으로 산화된다. 따라서, AOB는 전체 질산화 과정에 있어서 중요한 조절자(regulator)라 할 수 있다. Harms 등(2003)은 폐수 처리장의 미생물 내에 존재하는 AOB와 NOB를 real-time PCR 기술을 이용해 동시에 정량할 수 있음을 보고하였다. 이 연구에서 AOB를 정량하기 위한 분자 마커로 16S rDNA

(Hermansson et al., 2001)와 *Nitrosomonas. oligotropha*-like *amoA*(ammonia monooxygenase) 유전자로 선정하고 *amoA*

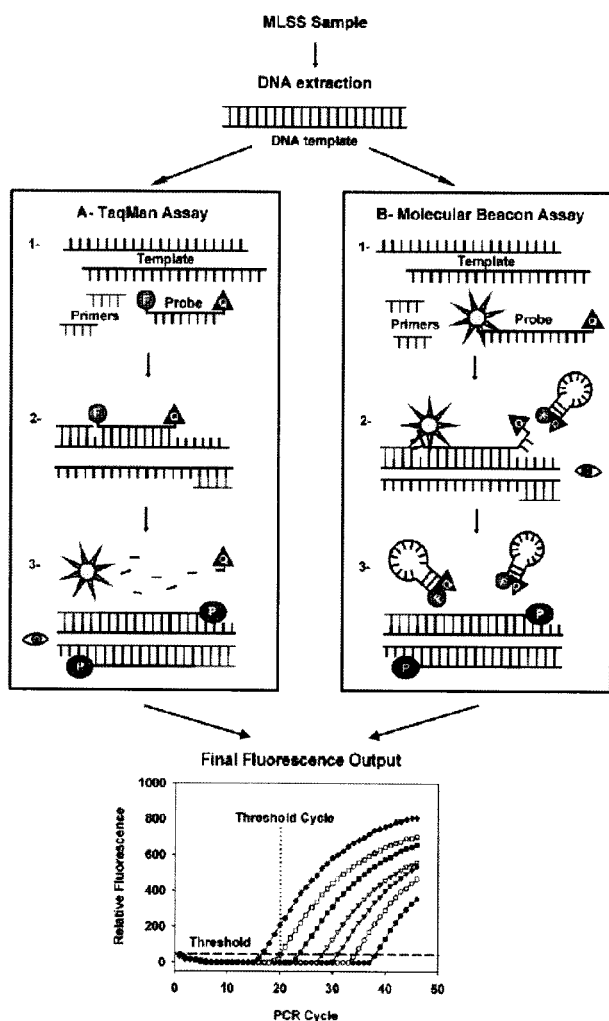


Fig. 1. Schematic representation of the quantification of specific targets from mixed-liquor suspended solids (MLSS). After DNA extraction, the DNA template is used in real-time PCR assays. (A) TaqMan probe assay. A TaqMan probe is a linear oligonucleotide probe complementary to the target sequence, with a fluorescent dye(circle, F) attached to the 5' end and a quencher (triangle, Q) to the 3'end. The proximity of these two dyes quenches the signal. Steps: (1) Denaturation of the DNA at 95°C separates the template. (2) Annealing of primers (usually 18-22 nucleotides) and probe to target DNA at temperatures of 50°C to 60°C. (3) Extension and synthesis of the DNA strand results in the 5' exonuclease activity by *Taq* DNA polymerase (oval, P) separating the fluorescent dye from the quencher resulting in an increase in fluorescence at the end of step 3 (eye). Steps 1-3 are repeated 45 to 50 times. In each cycle, additional reporter dye molecules are cleaved, resulting in an increase in fluorescence intensity proportional to the amount of amplicon produced. (B) molecular beacon assay. A Molecular beacon probe has a stem and loop structure. The loop section of the probe is complementary to the target and the stem results from the annealing of artificially designed arm sequences. A fluorescent dye (circle, F) and a quencher (triangle, Q) are attached to the arm sequences. Step: (1) Denaturation at 95°C results in the separation of the template DNA and separation of the stem in the molecular beacon probe, separation the quencher from the dye allowing fluorescence. (2) Annealing at 60°C allows the probe to hybridize to the template resulting in fluorescence. Alternatively, if the probe does not hybridize with the template the stem-and-loop structure is reformed and fluorescence is quenched. The relative fluorescence is measured at the beginning of this step (eye) and is proportional to the number of target sequences. (3) Extension and synthesis of DNA at 72°C results in dissociation of the probe from the target and fluorescence is quenched. Steps 1-3 are repeated 45-50 times. The final output for both assays shows relative fluorescence as a function of cycle number. Amplification curves for template concentrations between 10^7 and 10 copies per PCR reaction are shown (left to right). The threshold is calculated as 10 times the standard deviation of the background fluorescence (dashed line). The point where the fluorescence signal crosses the threshold is threshold cycle (C_T) (dotted line) and is lower when more copies of the template are present at the beginning of the reaction(Harms et al., 2003).

에 대한 프라이머와 프로브를 설계하였으며, NOB(*Nitrospira sp.*)의 16S rDNA(Dionisi et al., 2002)에 대해서는 TaqMan과 molecular beacon 프로브를 사용하여 각각 비교하였다(Fig. 1). 결과적으로 AOB를 정량하는데 있어서 16S rDNA로부터 제작된 마커가 계통학적으로 유사한 다른 균주(*Ralstonia eutropha*)에 대해 허위 양성(false-positive) 결과를 유도할 수 있기 때문에, 변별력이 뛰어난 *amoA* 유전자가 16S rDNA 보다 더 특이적인 마커로써 작용한다. 하지만, 활성 슬러지내에는 수많은 AOB 미생물들이 존재하기 때문에, cPCR(Hermansson et al., 2001)보다 50배나 더 뛰어난 검출 효율을 보이는 real-time PCR에서는 *amoA* 유전자 유래의 특이적인 마커가 오히려 허위 양성 결과를 초래할 수 있어서 프로브를 설계하는데 이를 고려하는 세심한 주의가 요구된다. 반면에, 1년 동안 위에 언급한 두 마커로 예측한 미생물 농도와 MLVSS값들의 피어슨 관계를 평가했을 때 높은 상관관계(0.901)를 보여주어 두 가지 마커를 동시에 사용하면 AOB의 정량 검출에 상호보완적인 결과를 얻을 수 있다.

더불어, *amoA*를 이용한 정량화 방법을 환경 조건의 변화에 따른 *Nitrosomonas oligotropha*의 생리적 반응을 측정하기 위해 mRNA 기반의 역전사 효소 real-time PCR (reverse transcriptase real-time PCR)이 제안되었다. 이 연구는 Aoi 등(2004)에 의해 수행되었는데, 질산화 미생물군을 함유한 슬러지를 이용한 회분식 반응기에서 암모니아의 공급 유무에 따른 암모니아 산화 활성을 *amoA* mRNA의 모니터링(Fig. 2)을 통해 비교하고 또 연속반응기에서 저해제로 사용된 NaCl의 농도에 따른 암모니아 산화 활성의 변화를 *amoA* mRNA의 모니터링(Fig. 3)을 통해 비교하였다(Aoi et al., 2004).

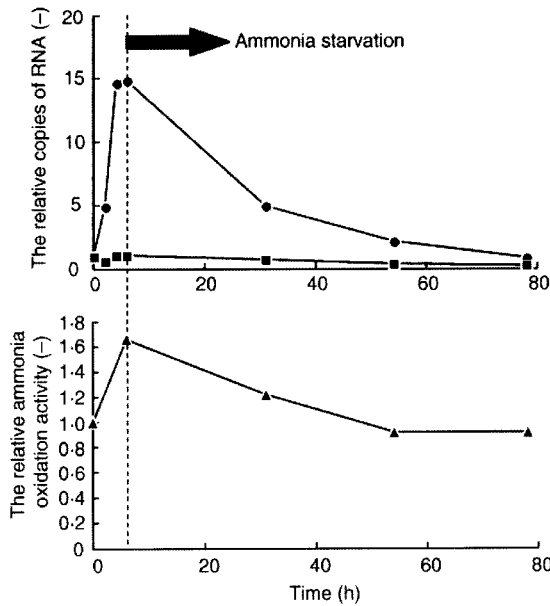


Fig. 2. Profiles of *amoA* mRNA and rRNA levels in batch-mode incubation. Relative copies of *amoA* mRNA (●) and rRNA (■) (C_n/C_0) and relative ammonia oxidation activity (▲) based on a value of 1.0 at 0 h are shown. Nitrifying bacteria were incubated in an ammonia-rich culture medium from 0 to 6 h. Then, the solution was changed to ammonia-free pure water at 6 h (Aoi et al., 2004).

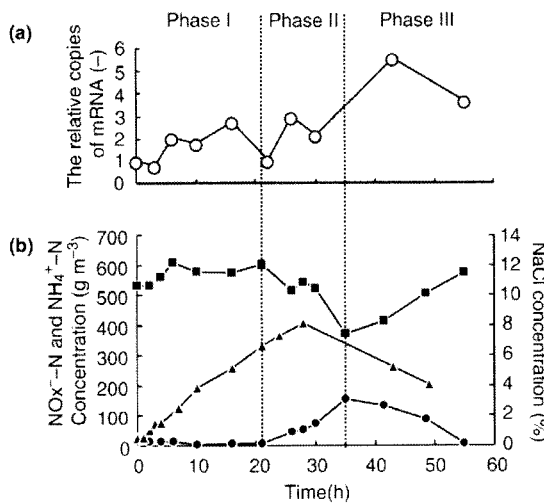
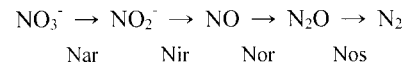


Fig. 3. Profiles of *amoA* mRNA level and ammonia oxidation activity in the continuously fed nitrification reactor in response to the change in ammonia oxidation activity caused by the addition of salt to the reactor. (a) Relative amount of copies of *amoA* mRNA (C_n/C_0) based on a value of 1.0 at 0 h. (b) Concentrations of $\text{NH}_4^+\text{-N}$ (●), $\text{NO}_x^-\text{-N}$ (■) and NaCl (▲) (Aoi et al., 2004).

2.2.2. 탈질화 박테리아

탈질화는 미생물이 질소산화물(NO_3^-)을 에너지 생산을 위해 대체 전자 수용체로서 사용하는 반응으로 N_2O 를 방출하여 지구온난화와 오존층 파괴의 원인이 된다(Lashof et

al., 1995; Bange, 2000). 한편, 탈질 반응은 고정된 질소를 대기로 돌려보내는 주요한 생물학적 반응으로 관련 박테리아는 토양이나 퇴적물과 수중환경에 존재하고 있으며, 토양과 폐수 처리시 수용성 질소산화물을 제거하는 데에 중요한 역할을 한다. 탈질화 과정은 4가지 반응을 거쳐 질산염이 질소가스로 환원되며 여기에 4가지의 metalloenzyme - 질산환원효소(nitrate reductase), 아질산환원효소(nitrite reductase), 일산화질소환원효소(nitric oxide reductase), 아산화질소환원효소(nitrous oxide reductase)-이 관여한다. 이러한 효소들은 혐기성 조건에서 연속적으로 유발된다.



탈질화과정에서 핵심단계는 아질산염이 일산화질소 - 대부분의 생물체가 더 이상 이용할 수 없는 질소 형태 - 로 환원되는 단계이므로 이에 관여하는 아질산환원효소가 상기한 4가지 효소 중 핵심효소라 할 수 있다. 이 효소는 단백질의 구조와 보조 금속이온의 관점에서 상이한 두 가지 효소 - copper nitrite reductase와 cytochrome cd1-nitrite reductase로 존재하며 각각의 효소를 코딩하는 유전자를 *nirK*와 *nirS* 유전자라 부른다(Zumft et al., 1997). 이 유전자들은 탈질화 박테리아를 동정하는 분자 마커로서 일부 연구 보고되어 왔다(Yoshie et al., 2004; Liu et al., 2003; Avrahami et al., 2003; Braker et al., 2001). 그러나 정량 분석은 여전히 MPN(most probable number) 방법에 의해 수행되는 경우가 빈번하나, 이 기술은 탈질화 미생물을 정량하는데 있어서 까다롭고 많은 시간이 필요하다. 이에 반해 *nirK*나 *nirS*와 같은 기능 유전자를 이용한 정량적 근접 분석에 관한 연구는 상대적으로 적은 편이다. Verónica 등 (2001)은 토양(Gamble et al., 1977)과 해양시료(Ward et al., 1993)에서 일반적으로 발견되는 *Pseudomonas stutzeri*의 탈질화 효소(cytochrome cd1-nitrite reductase)를 코딩하는 *nirS* 유전자를 정량하는 데 real-time PCR을 이용하였다. 양성 대조군으로 21가지 *P. stutzeri* 균주들을 토양과 지하수 및 해양침전물로부터 분리하거나 미생물 분양기관을 통하여 확보하였고 음성 대조군으로 다른 8가지 균주들과 4가지의 다른 *nirS* 클론을 사용하였다. 양성대조군 21가지 중에 3가지 균주 즉, *P. stutzeri* DSM 6084, DSM 6082, DSM 50238만이 검출이 안되었는데 그 이유는 *nirS* 염기 서열분석에서 음성대조군 중의 하나인 *Pseudomonas aeruginosa*와 80% 이상의 유사도를 보였기 때문이며, 사용된 프라이머와 프로브가 상보적인 영역에서 각각 5-9 개 또는 4-5 개의 불일치를 보였기 때문이다. 특히 음성 대조군으로서 주형(template) 또는 증합효소 없이 PCR을 수행하였을 때, 반응 사이클이 증가할수록 형광강도가 threshold (0.1)에 근접하게 증가하였는데 이는 프로브의 분해에 의한 것으로 추정하였다(Fig. 4). 또한 검출의 민감도는 다른 연구(Haugland et al., 1999; Kimura et al., 1999)에서 보고된 것처럼 *nirS* 유전자가 1 copy일 때도 가능하였으나, 정확한

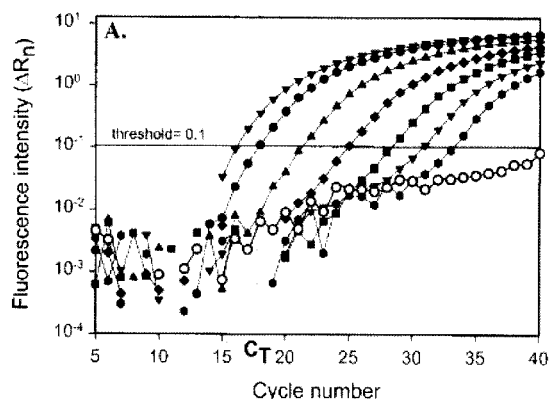


Fig. 4. Generation of standard curve. (A) Increase of fluorescence intensity with cycle number for serially diluted *P. stutzeri* DNA. Symbols, from left to right: ▼, 17.8 ng; ●, 5.9 ng; ▲, 0.59 ng; ◆, 59 pg; ■, 5.9 pg; ▽, 0.59 pg; ●, 59 fg; ○, no-template control. C_T , cycle at which the fluorescence intensity crosses an arbitrary threshold value (Verónica et al., 2001).

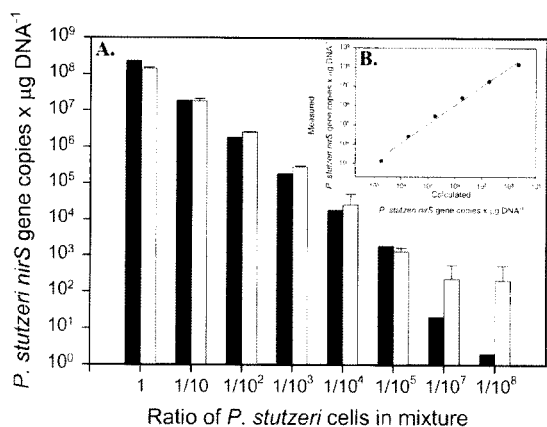


Fig. 5. Quantification of *nirS* DNA in artificial mixtures of *P. stutzeri* KC, *P. aeruginosa*, and *E. coli* cells. (A) Comparison between *P. stutzeri nirS* gene copies per μg of DNA measured values by real-time PCR (gray bars) and calculated values based on cell counts (black bars). (B) Correlation between calculated and measured values (slope = 0.98, $r^2 = 0.992$). Error bars represent 95% confidence intervals ($n = 3$) for both panels (Verónica et al., 2001).

정량적 검출이 가능하기 위해서는 *nirS* 유전자의 copy number가 적어도 100 copies 이상이 되어야 함을 보여주었고, *P. stutzeri*와 *E. coli*의 혼합비가 100%에서 0.001%에 이르기까지 real-time PCR에 의한 특이적인 정량적 검출이 가능하였다(Fig. 5). 그러나, *P. stutzeri*는 호수 침전물과 토양 시료에서 높게 나타났으나 해양 침전물에서는 낮게 관찰되었으며, 이를 통하여 *P. stutzeri*의 *nirS*가 해양 탈질 박테리아 중에서 우점종이 아닐 수 있음을 보여주었다 (Verónica et al., 2001).

Henry(2004)와 Philippot(2002)은 여섯 가지 다른 토양에서 탈질화 박테리아 군집을 real-time PCR을 이용하여 정

량하기 위해 검출원리로서 탈질화 효소 (copper nitrite reductase)를 코딩하는 *nirK* 유전자를 사용하였다. *nirK* 유전자를 검출하는 프라이머는 환경시료에도 적용하기 위하여 여러 환경 라이브러리에서 클로닝한 *nirK* 염기서열로부터 제작하였으며 배양가능한 균주에 대해서도 특이적이었음을 확인하였다. 정량적인 측면에서 *nirS* 유전자를 이용했던 연구(Verónica et al., 2001) 및 다른 보고와 같이 전반적으로 비슷한 감도(10^2 copy)를 나타내었으며 특히, 물이나 탄소를 첨가한 토양 시료에서 *nirK* 유전자의 증폭수를 비교한 결과, 탄소를 첨가한 토양에서 물을 첨가한 토양보다 4배 증가된 *nirK* 유전자의 증폭수가 관찰되었다. 이는 그만큼 탈질화 박테리아의 개체수 밀도가 증가했기 때문이라고 할 수 있다. 또한 증폭산물의 염기서열의 계통발생 분석을 통하여 56개의 클로닝 시료를 비교한 결과, 대부분의 클러스터에 속하는 주요 *nirK* 서열은 주로 α -proteobacteria에 속하였고, 일부 염기서열이 β -proteobacteria의 *Nitrosomonas* 속(genus)에 속하였다. 하지만, 토양에서 얻은 클론의 염기서열은 이미 알려진 배양 가능한 탈질 박테리아를 포함하지는 않았다(Henry et al., 2004). 이와 같이, real-time PCR을 이용한 탈질화 박테리아의 정량적 검출은 주로 기능성 유전자에 의존하였으며, 16S rDNA의 operon copy number로부터 세포 수(cell number)를 유추하는 것과 같이 *nirK*나 *nirS* 유전자의 copy number를 바로 세포수로 연관시킬 수 있는 장점을 지니고 있다(Philippot, 2002).

2.3. 혐기공정을 이용한 폐수 처리

혐기공정은 일반적인 호기공정보다 처리 효율이 높고 폐수 처리 후 발생하는 슬러지가 적으며 넓은 부지를 필요로 하지 않는 저비용, 고효율 처리방법일 뿐 아니라, 폐수 처리 과정에서 메탄이나 수소와 같은 유용한 바이오 가스를 생산할 수 있는 방법이다. 이러한 혐기공정은 주로 acidogen과 methanogen의 두 미생물 군에 의해 이루어지며, 특히 메탄화(methanogenesis)가 전체 혐기공정에서 처리율을 결정하는 단계(rate-limiting step)로서, 메탄화의 최적화가 전체 혐기공정의 효율을 증대시킬 수 있는 중요한 요인이 된다(Rittmann et al., 2001; Speece, 1996; Yang et al., 2003). 그러나 메탄생성균(methanogen)은 성장속도가 매우 낮으며 절대 혐기성 미생물로, 배양에 기초한 기존 방법으로는 연구하기 어렵기 때문에(Raskin et al., 1994) 분자생물학적 분석을 통한 메탄화에 대한 연구를 통하여 혐기공정을 최적화하는 것이 요구된다.

혐기공정을 이용하여 산업폐수를 처리하는 과정에서 메탄생성균은 열역학적으로 유리한 일부 기질만을 이용하여 메탄가스를 생성한다. 이렇게 생성되는 메탄은 약 70%가 aceticlastic methanogens에 의한 것이며, 나머지 30%가 hydrogenotrophic methanogens에 의한 것이다(Speece, 1999). 따라서 아세트산을 기질로 이용하는 aceticlastic methanogens이 폐수처리에 있어서 중요한 역할을 하게 된다(Speece, 1999).

이에 유 등(Yu et al., 2005)은 real-time PCR을 이용하

여 여러가지 혐기공정에서 존재하는 acetoclastic methanogens의 16S rDNA를 다양한 분류수준에서 정량하고 개체군 역학(population dynamics)에 대한 연구를 수행하였다. 이 연구에서 메탄생성에서 중요한 역할을 하는 메탄생성균인 methanosarcinal 뿐 아니라 그 하위 단계의 methanosarcinaceae와 methanosaetaceae에 대해 특이적인 프라이머와 프로브 세트를 제작하고(Table. 1) *M. acetivorans*, *M. barkeri*, *M. mazei*, *M. concilii*, *M. thermoacetophila*와 같이 순수배양 한 5종의 메탄생성균을 이용하여 표준곡선을 얻었다. 이때 종의 차이에 따른 PCR 증폭효율은 의미있는 차이를 나타내지 않았으며 각각의 프라이머와 프로브 세트로 메탄생성균을 정량함에 있어서 유의성이 높은 결과를 얻을 수 있었지만 methanosaetaceae의 정량과정에서 methanosarcinaceae에 속하는 *M. thermophila*가 methanosaetaceae의 비표적종(non-target organism)으로 검출되었다. 메탄생성균을 정량한 결과, 아세트산의 농도가 높은 경우 methanosarcinaceae가 methanosarcinal의 대부분을 차지하는 반면, 농도가 낮은 경우에는 methanosaetaceae의 개체수가 꾸준히 증가하는 것을 정량적으로 확인하였다. 또한, 연속 실험 중 메탄 생성량의 큰 감소가 유입수의 체류시간과 메탄생성균의 최대 성장물의 차이로 인한 메탄생성균의 워시아웃(washout) 때문이라는 것을 real-time PCR을 이용한 정량결과로부터 확인하였다. Sawayama 등(2004)은 fluidized bed를 이용한 혐기성 소화에 있어서 암모니아가 메탄생성균 군집에 미치는 영향에 대한 연구를 수행함에 있어서 real-time PCR을 이용하였다. 이들은 암모니아의 농도가 3000 mg/L 이상이 될 경우, 반응기 내 메탄생성균의 밀도가 낮아져 메탄화가 저해되고 바이오 가스의 생성이 줄어든다는 것을 확인 하였으며, 메탄생성균을 탄소펄트에 고정화 했을 경우 메탄생성균을 포함한 전체 미생물에 대한 메탄생성균의 비율이 25%에서 48%로 증가했다는 것을 정량적으로 확인하였다(Sawayama et al., 2004). Shigematsu 등(2003)은 FISH, 계통도 분석, real-time PCR을 이용한 정량법을 이용하여 희석비율이 아세트산을 분해하는 중온성 메탄생성균의 군집 변화에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 이 연구에서 FISH를 이용하여 희석율이 높은 조건에서는 acetoclastic methanogens에 의해, 희석율이 낮은 조건에서는 hydrogenotrophic methanogens에 의해 아세트산의 분해가 주로 이루어진다는 것을 확인 하고, real-time PCR을 이용하여 정량화하여, 아세트산의 농도에 따라 아세트산의 분해경로가 달라진다는 것을 확인하였다. Yang 등(2004)은 고정상과 유동상 반응기의 메탄화 및 메탄생성균의 군집변화에 대한 연구에 real-time PCR을 적용하였다. 그들은 이 연구에서 고정화 시스템에서의 부착미생물의 군집을 비교하기 위하여 SEM(scanning electron microscopy)과 real-time PCR을 이용하였으며, 베드(bed) 물질의 공극 크기와 베딩(bedding) 방법에 따른 메탄생성균의 특성을 확인하였다. 그 결과 고정화 메탄생성균의 비율과 밀도가 fluidized bed reactor보다 fixed-bed에서 더 높다는 것을 확인하고, real-time PCR 분석이 효율적인 형태의 베드 반응기를 결

정하는 수단이 될 수 있다고 보고하였다. 또한 클론 라이브러리를 통한 반응기 내 우점종의 변화를 real-time PCR을 이용하여 정량적으로 평가하여, 고정화 전 반응기 내 우점종이 methanomicrobiales였는데 반해, 고정화 후에는 methanobacterium과 methanosarcina로 우점종이 바뀌었다는 것을 확인하였다. 이와 같이 혐기공정에서 메탄생성균의 군집분석에 관한 몇몇의 연구가 보고되고 있지만, 메탄생성균의 게놈 크기나 16S rDNA의 카피수(copy number)에 대한 정보가 제한되어 있기 때문에 정량적인 연구결과는 아직 소수에 불과하다. 그러나 혐기공정의 특성상 분자생물학적 접근을 통한 미생물 군집 분석이 요구된다는 것을 감안할 때, real-time PCR을 이용한 혐기공정 내 미생물 분석은 혐기공정의 효율적인 운영을 위한 좋은 수단이 될 수 있다.

3. 결론

21세기에는 환경분야의 한 패러다임으로 자리잡은 환경생물공학의 중요성이 더욱 부각될 것이다. 인류가 환경오염 물질을 처리하는 데 사용한 미생물이 전체 미생물의 1% 미만이라는 사실에서 확인할 수 있듯이, 나머지 99%의 미생물에 대한 활용 가능성은 분자생물학적 기술의 발전과 함께 급격히 증가하고 있는 것이 사실이다. 특히 검출 범위가 광범위한 고감도의 real-time PCR과 같이 특정 환경에서 존재하나 배양하기 어려운 미생물들의 군집 구조를 정량적으로 이해하고 분석할 수 있는 기술의 발전은 분자생태학적 군집에 의한 환경오염물질의 생분해를 극대화시킬 수 있다. 이와 함께 생물정화와 예방 및 생물진단에 사용되어온 FISH, DGGE, T-RFLP 및 DNA Chip과 연계해 보다 향상된 high-throughput platform의 real-time PCR을 구현한다면 강력한 유전체 기반의 도구가 될 것이다. 하지만, real-time PCR은 주어진 환경에 대한 대상 미생물의 transcriptome 수준만을 진단할 수 있다. 그러나 유전자수준의 전사가 반드시 단백질수준의 발현을 직접적으로 반영해 준다고 볼 수 없기 때문에 proteomics 기술과의 접목 및 상호 연계된 전략이 요구된다.

한편, 정량적인 PCR - 특히 real-time PCR - 에 대한 국제적인 관심이 증가하면서 작년 3월에 처음으로 1st International qPCR Symposium 및 Application Workshop이 독일에서 열렸다. 이 심포지움은 real-time PCR을 clinical diagnostics, microbiology 및 virology, nutrigenomics, food hygiene 및 GMO 분야에 응용한 세션들과 기술적 영역인 normalization 및 standardization, transcriptomics 및 expression profiling, quality assessment, detection methods 등의 세션으로 이루어졌다. 비록 real-time PCR의 환경생물공학 응용에 관련된 발표는 식품분야 특히 유전자 개량 식품 외에는 없었지만, 단백질을 정량하기 위해 정량적인 PCR을 응용한 연구와 정량적인 PCR과 MALDI-TOF mass spectrometry를 연계하여 massarray시스템으로의 접근 등 환경공학분야에서 접목할 만한 많은 연구들이 소개되었다. 두번째 international qPCR symposium & application workshop

Table 1. Primers and probes used in the study of biological treatment of wastewater

Assay	Target	Primer and probe	Sequence	Reference	
Gram-positive filamentous bacteria (bulking and forming problem)	<i>Microthrix parvicella</i>	S-S-M.par-0828-S-21	5'-GGTGTGGGGAGAACTCAACTC-3'	(Kaetzke et al., 2005)	
		S-S-M.par-1018-A-17	5'-GACCCGAAGGACACCG-3'		
Total bacteria	Bacterial 16S rDNA	1055f 1392r 16STaq1115	5'-ATGGCT GTCAGCT-3' 5'-ACGGGCGGTGTGTA-3' 5'-(6-FAM)-CAACGAGCGCAACCC-(TAMRA))-3'	(Harms et al., 2003)	
Ammoniaoxidizing bacteria	<i>N. oligotropha</i> like <i>amoA</i>	amoNo550D2f	5'-TCAGTAGCYGACTACACMGG-3'	(Harms et al., 2003)	
		amoNo754r	5'-CTTTAACATAGTAGAAAGCGG-3'		
		amoNoTaq729	5'-(6-FAM)-CAAAGTACCACCATACGCGA-(TAMRA)-3'		
	AOB	CTO 189fA/B CTO 189fC RT1r TMP1	5'-GGAGRAAAGCAGGGGATCG-3' 5'-GGAGGAAAGTAGGGGATCG-3' 5'-CGTCTCTCAGACCARCTACTG-3' 5'-(6-FAM)-ACTAGCTAATCAGRCATCRGCC GCTC-(TAMRA)-3'	(Harms et al., 2003)	
Nitrite oxidizing bacteria	Nitrospira 16S rDNA	NSR1113f	5'-CCTGCTTTCAGTTGCTACCG-3'	(Harms et al., 2003)	
		NSR1264r	5'-GTTTCAGCGCTTGTACCG -3'		
		NSR1143Taq	5'-(6-FAM)-GCACTCTGAAAGGACTGCCCA GG-(TAMRA)-3'		
		NSR1143Beac	5'-(6-FAM)-CTGCACCAGCACTCTGAAAGG ACTGCCAGGGGGTGCAGC(DABCYL)-3'		
Denitrifying bacteria (nitrite reductase gene)	<i>nirS</i>	Forward primer	5'-ACAAGGAGCACAACCTGGAAGGT-3'	(Verónica et al., 2001)	
		Reverse primer	5'-CGCGTCGGCCAGA-3'		
		Probe	5'-(6-FAM)GCAACCTGTTCTCGTCAAGACCCA-(TAMRA)-3'		
	<i>nitK</i>	Heme 832F	5'-TACCACCCGAGCCGCGGT-3'	(Liu et al., 2003)	
		Heme 1606R	5'-AGKCGTTGAACTTKCCGGTCCG-3'		
		Copper 583F Copper 909R	5'-TCATGGTGTGCCGCGKACGG-3' 5'-GAACTTGCCGGTGPCCAGAC-3'		(Liu et al., 2003)
Denitrifying bacteria (nitrous oxidise reductase)	<i>nosZ</i>	Nos661F	5'-CGGCTGGGGGCTGACCAA-3'	(David et al., 1998)	
		Nos2230R	5'-TTCCATGTGCAGCGCATGG-3'		
		Nos661F	5'-CGGCTGGGGGCTGACCAA-3'		
		Nos1527R	5'-CTGRCTGTCGADGAACAG-3'		
		Nos1527F	5'-CGCTGTTCHTCGACAGYCA-3'		
		Nos1773R	5'ATRTCATCARCTGBTCGTT-3'		
Aceticlastic Methanogens (Anaerobic digestion)	Methanosacinals	MSL812F	5'-GTAAACGATRYTCGCTAGGT-3'	(Yu et al., 2005)	
		MSL1159R	5'-GGTCCCACAGWGTTACC-3'		
		MSL860F	5'-(6-FAM)-AGGGAAGCCGTGAAGCGARCC -(TAMRA)-3'		
	Methanosacinaceae	Msc380F	5'-GAAACCGYGATAAGGGGA-3'		
		Msc828R	5'-TAGCGARCATCGTTTACG-3'		
		Msc492F	5'-(6-FAM)-TTAGCAAGGGCCGGGCAA-(TAMRA)-3'		
	Methanosactaceae	Mst702F	5'-TAATCCTYGARGGACCACCA-3'		
		Mst862R	5'-CCTACGGCACCRACMAC-3'		
		Mst753F	5'-(6-FAM)-ACGGCAAGGGACGAAAGCTAG G-(TAMRA)-3'		
	Aceticlastic Methanogens (Anaerobic digestion)	<i>Methanosaeta</i> sp.	S-F-Msaet-0387-S-a-21	5' - GATAAGGGRAYCTCGAGTGCY-3'	(Sawayama et al., 2004)
			S-F-Msaet-0573-A-a-17	5'-GGCCGRCTACAGACCCT-3'	
			S-F-Msaet-0540-A-a-31	5'-AGACCCAATAAHARCGGTTACCACTCG RGCC-3'	
<i>Methanosaeta</i>		MS1	5'-CCGGCCGATAAGTCTCTTGA-3'		
		SAE835R	5'-GACAACGGTTCGACCCGTGGCC-3'		
		SAE761TAQ	5'-ACCAGAACGGACCTGACGCAAGG-3'		
<i>Methanosarcina</i>		MB1	5'-CGGTTTGGTCAGTCTCCGG-3'	(Shigematsu et al., 2003)	
		SAR853R	5'-AGACACGGTTCGCGCCATGCCT-3'		
		SAR761TAQ	5' - ACCAGAACGGGTTTCGACGGTGAGG-3'		
<i>Methanoculleus</i>		AR934F	5' - AGGAATTGGCGGGGAGCAC-3'		
		MG1200	5' - CCGGATAATTCGGGGCATGCTG-3'		
		MCU1023TAQ	5'-GAATGATTGCCGGGCTGAAGACTC-3'		

은 9월에 독일에서 열릴 예정이다.

이와 같이, 정량적인 real-time PCR은 이미 많은 분야에서 응용하고 있으며, functional genomics와 더불어 functional proteomics로의 관심이 집중되는 시점에서 유전자 수준과 단백질 수준의 상호관계를 연구하기 위한, 정량성과 감도가 아주 우수한 기술이다. 따라서, 환경생물공학 분야에 이러한 real-time PCR을 중심으로 한 high-throughput platform으로 접근이 더욱 활발히 진행된다면 오염된 환경을 보다 효과적이고 빠르게 진단하고 통제하며 예방할 수 있을 것이다.

사 사

본 논문은 환경부 차세대 핵심환경기술개발사업의 연구비 지원 (04-0010026)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- 기초기술연구회, *생명공학 TRM 및 전략분야 연구* (2003).
- Aguilar, M. I., Sa'ez, J., Llore'ns, M., Soler, A. and Ortuno, J. F., Nutrient Removal and Sludge Production in the Coagulation-Flocculation Process, *Water Research*, **36**, pp. 2910-2919 (2002).
- Aoi, Y., Masaki, Y., Tsuneda, S. and Hirata, A., Quantitative Analysis of amoA mRNA Expression as a New Biomarker of Ammonia Oxidation Activities in a Complex Microbial Community, *Letters in Applied Microbiology*, **39**, pp. 477-482 (2004).
- Avrahami, S., Conrad, R. and Braker, G., Effect of Soil Ammonium Concentration on N₂O Release and on the Community Structure of Ammonia Oxidizers and Denitrifiers, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, pp. 5685-5692 (2003).
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schloter, M. and Munch, J. C., Enumeration of Total Bacteria and Bacteria with Genes for Proteolytic Activity in Pure Cultures and in Environmental Samples by Quantitative PCR Mediated Amplification, *J. Microbiol. Methods*, **49**, pp. 235-245 (2002).
- Bange, H. W., Global change. It's not a gas, *Nature*, **16**, pp. 301-302 (2000).
- Becker-André, M. and Hahlbrock, K., Absolute mRNA Quantification Using the Polymerase Chain Reaction, A Novel Approach by a PCR Aided Transcript Titration Assay PATTY, *Nucleic Acids Research*, **17**, pp. 9437-9446 (1989).
- Bradford, D., Christensson, C., Jakab, N. and Blackall, L. L., *Microthrix parvicella* and to Determine its Abundance in Activated Sludge, Molecular Biological Methods to Detect, *Water Science and Technology*, **37**, pp. 37-45 (1998).
- Braker, G., Ayala-del-Rio, H. L., Devol, A. H., Fesefeldt, A. and Tiedje, J. M., Community Structure of Denitrifiers, Bacteria, and Archaea along Redox Gradients in Pacific Northwest Marine Sediments by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Amplified Nitrite Reductase (nirS) and 16S rRNA Genes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, pp. 1893-1901 (2001).
- Connell, C. R. and Bloch, W., Allelic Discrimination by Nick-translation PCR with Fluorogenic Probes., *Nucleic Acids Research*, **21**(16), pp. 3761-3766 (1993).
- David, J. S. and Lee, J. K., Nitrous Oxide Reductase (nosZ) Gene-specific PCR Primers for Detection of Denitrifiers and three nosZ Genes from Marine Sediments, *FEMS Microbiology Letters*, **162**, pp. 61-68 (1998).
- de los Reyes, M. F., de los Reyes, F. L. III, Hernandez, M. and Raskin, Quantification of Gordona Amarae Strains in Foaming Activated Sludge and Anaerobic Digester Systems with Oligonucleotide Hybridization Probes, *L. Applied and Environmental Microbiology*, **64**, pp. 2503-2512 (1998).
- Dionisi, H. M., Layton, A. C., Harms, G., Gregory, I. R., Robinson, K. G. and Sayler, G. S., Quantification of Nitrosomonas Oligotropha-like Ammonia-oxidizing Bacteria and Nitrospira spp. from Full-scale Wastewater Treatment Plants by Competitive PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(1), pp. 245-253 (2002).
- Gamble, T. N., Betlach, M. R. and Tiedje, J. M., Numerically Dominant Denitrifying Bacteria From World Soils, *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, pp. 926-939 (1977).
- Gilliand, G., Perrin, S., Blanchard, K. and Bunn, F., Analysis of Cytokine mRNA and DNA: Detection and Quantitation by Competitive Polymerase Chain Reaction, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **87**, pp. 2725-2729 (1990).
- Guan, Y., Kurisu, F., Satoh, H. and Mino, T., A Quantitative Method for Measuring the Mass Concentration of the Filamentous Bacterium Type 021N in Activated Sludge using Fluorescence In Situ Hybridization, *Letters in Applied Microbiology*, **37**, pp. 100-104 (2003).
- Hall, G., *Nitrification in Lakes*. In J. I. Prosser (ed.), Nitrification. IRL Press, Oxford, pp. 127-156 (1986).
- Harms, G., Layton, A. C., Dionisi, H. M., Gregory, I. R., Garrett, V. M., Hawkins, S. A., Robinson, K. G. and Sayler, G. S., Real-Time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant, *Environ. Sci. Technol.*, **37**(2), pp. 343-351 (2003).
- Haugland, R. A., Vesper, S. J. and Wymer, L. J., Quantitative Measurement of Stachybotrys Chartarum Conidia using Real time Detection of PCR Products with the TaqMan™ Fluorogenic Probe System, *Mol. Cell. Probes*, **13**, pp. 329-340 (1999).
- Henrya, S., Baudoinb, E., Lopez-Gutierrez, J. C., Martin-Laurenta, F., Braumanb, A. and Philippot, L., Quantification of Denitrifying Bacteria in Soils by nirK Gene Targeted Real-time PCR, *Journal of Microbiological Methods*, **59**, pp. 327-335 (2004).
- Hermansson, A. and Lindgren, P. E., Quantification of Ammonia-oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-time PCR, *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(2), pp. 972-976 (2001).
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R., Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences, *Biotechnology(NY)*, **10**(4), pp. 413-417 (1992).
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R., Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA

- Amplification Reactions, *Biotechnology(NY)*, **11**(9), pp. 1026-1030 (1993).
- John, S. and Georgina, F., *The Common Thread*, Black Swan press, 2nd edition, chapter 2. (2003)
- Kaetzke, A., Jentsch, D. and Eschrich, K., Quantification of *Microthrix Parvicella* in Activated Sludge Bacterial Communities by Real-time PCR, *Letters in Applied Microbiology*, **40**(3) pp. 207-211 (2005).
- Kawai, A., Sugiyama, M., Shiozaki, R. and Sugahara, I., Microbiological Studies on the Nitrogen Cycle in Aquatic Environments, *Mem. Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.*, **32**, pp. 7-15 (1971).
- Killham, K., *Heterotrophic Nitrification*, In J. I. Prosser (ed.), Nitrification. IRL Press, Oxford, pp. 117-126 (1986).
- Kimura, H., Morita, M., Yabuta, Y., Kuzushima, K., Kato, K., Kojima, S., Matsuyama, T. and Morishima, T., Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus Load by using a Real-time PCR Assay, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, pp. 132-136 (1999).
- Kirstein, K. and Bock, E., Close Genetic Relationship between *Nitrobacter Hamburgensis* Nitrobacter Hamburgensis Nitrite Oxidoreductase and *Escherichia Coli* *Escherichia Coli* Nitrate Reductases, *Arch. Microbiol.*, **160**, pp. 447-453 (1993).
- Kolb, S., Knief, C., Stubner, S. and Conrad, R., Quantitative Detection of Metanotrophs in Soil by Novel pmoA Targeted Real-time PCR Assays, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, pp. 2423-2429 (2003).
- Lashof, D. A. and Lashof, D. R., Relative Contributions of Greenhouse Gas Emissions to Global Warming, *Nature*, **3**, pp. 529-531 (1995).
- Lebek, M. and Rosenwinkel, K. H., Control of the Growth of *Microthrix parvicella* by using an Aerobic Selector - Results of Pilot and Full Scale Plant Operation, *Water Science and Technology*, **46**, pp. 491-494 (2002).
- Lee, Y. and Oleszkiewicz, J. A., Bench-scale Assessment of the Effectiveness of an Anaerobic Selector in Controlling Filamentous Bulking, *Environmental Technology*, **25**, pp. 751-755 (2004).
- Liu, X., Tiquia, S. M., Holguin, G., Wu, L., Nold, S. C., Devol, A. H., Luo, K., Palumbo, A. V., Tiedje, J. M. and Zhou, J., Molecular Diversity of Denitrifying Genes in Continental Marine Sediments within the Oxygen-deficient Zone off the Pacific Coast of Mexico, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, pp. 3549-3560 (2003).
- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W. and Deetz, K., Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization, *PCR Methods*, **4**(6), pp. 357-362 (1995).
- Lopez-Gutierrez, J. C., Henry, S., Hallet, S., Martin-Laurent, F., Catroux, G. and Philippot, L., Quantification of a Novel Group of Nitrate-reducing Bacteria in the Environment by Real-time PCR, *J. Microbiol. Methods*, **57**, pp. 399-407 (2004).
- Oerther, D. B., de los Reyes, F. L. III, de los Reyes, M. F. and Raskin, L., Quantifying Filamentous Microorganisms in Activated Sludge before, during, and after an Incident of Foaming by Oligonucleotide Probe Hybridizations and Antibody Staining, *Water Research*, **35**, pp. 3325-3336 (2001).
- Painter, H. A., *Nitrification in the Treatment of Sewage and Waste-water*, In J. I. Prosser (ed.), Nitrification. IRL Press, Oxford, pp. 185-211 (1986).
- Philippot, L., Denitrifying Genes in Bacterial and Archeal Genomes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1577**, pp. 355-376 (2002).
- Piatak, M., Luk, K. C., Williams, B. and Lifson, J. D., Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction for Accurate Quantitation of HIV DNA and RNA Species, *BioTechniques*, **14**, pp. 70-80 (1993).
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M. C., Koops, H. P. and Wagner, M., Phylogeny of all Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and amoA Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys., *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, pp. 5368-5382 (2000).
- Raskin, L., Poulsen, L. K., Noguera, D. R., Rittmann, B. E. and Stahl, D. A., Quantification of Methanogenic Groups in Anaerobic Biological Reactors by Oligonucleotide Probe Hybridization, *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, pp. 1241-1248 (1994).
- Rittmann, B. E., McCarty, P. L., *Environmental biotechnology : Principles and applications*, Mew York, NY : McGraw-Hill, New York, pp. 470-496 (2001).
- Roels, T., Dauwe, F., Van Damme, S., De Wilde, K. and Roelandt, F., The Influences of PAX-14 on Activated Sludge Systems and in Particular on *Microthrix Parvicella* Roels, *Water Science and Technology*, **46**, pp. 487-490 (2002).
- Sawayama, S., Tada, C., Tshukahara, K. and Yagishita, T., Effect of ammonium addition on methanogenic community in a fluidized bed anaerobic digestion, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **97**(1), pp. 64-70 (2004).
- Shigematsu, T., Tang, Y., Kawaguchi, H., Ninomiya, K., Kinjima, J., Kobayashi, T., Morimura, S. and Kida, K., Effect of Dilution Rate on Structure of a Mesophilic Acetate-Degrading Methanogenic Community during Continuous Cultivation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94**(6), pp. 547-558 (2003).
- Speece, R. E., *Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters*, Nashville, TN : Archae Press (1996).
- Speece, R. E., Ammonia Inhibition in High-solids Biogasification : an Overview and Practical Solutions, *Environ. Technol.*, **20**, pp. 355-365 (1999).
- Stubner, S., Enumeration of 16S rDNA of *Desulfotomaculum* Lineage 1 in Rice Field Soil by Real-time PCR with SyberGreen Detection, *J. Microbiol. Methods*, **50**, pp. 155-164 (2002).
- Verónica, G., Stepheb, C. N., Jizhong, Z. and James, M. T., *Pseudomonas Sutzeri* Nitrite Reductase Gene Abundance in Environmental Samples Measured by Real-Time PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, pp. 760-768 (2001).
- Verstraete, W. and Alexander, M., Heterotrophic Nitrification in Samples of Natural Ecosystems, *Envir. Sci. Technol.*, **7**(1), pp. 39-43 (1973).
- Wagner, M. and Loy, A., Bacterial Community Composition and Function in Sewage Treatment Systems Wagner,

- Current Opinion in Biotechnology*, **13**, pp. 218-227 (2002).
- Wang, A. M., Doyle, M. V. and Mark, D. F., Quantitation of mRNA by the Polymerase Chain Reaction, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, pp. 9717-9721 (1989).
- Ward, B. B., *Nitrification in Marine Environments*, In, J. I. Prosser (ed.), Nitrification. IRL Press, Oxford, pp. 157-184 (1986).
- Ward, B. B. and Cockcroft, A. R., Immunofluorescence Detection of the Denitrifying Strain *Pseudomonas stutzeri*(ATCC 14405) in Seawater and Intertidal Sediment Environments, *Microb. Ecol.*, **25**, pp. 233-246 (1993).
- Watson, S. W., Valos, F. W. and Waterbury, J. B., *The Family Nitrobacteraceae*, In *the Prokaryotes*, Edited by M.P. Starr et al. Berlin: Springer-Verlag (1981).
- Wolfe, R. L., Nancy, I. L., George, I. and Edward, G. M., Ammonia-oxidizing Bacteria in a Chloraminated Distribution System: Seasonal Occurrence, Distribution, and Disinfection Resistance, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**(2), pp. 451-462 (1990).
- Yang, K., Yu, Y. and Hwang, S., Selective Optimization in Thermophilic Acidogenesis of Cheese-whey Wastewater to Acetic and Butyric Acids : Partial Acidification and Methanation, *Water Res.*, **37**(10), pp. 277-286 (2003).
- Yang, Y., Tada, C., Tsukahara, K. and Sawayama, S., Methanogenic Community and Performance of Fixed- and Fluidized-bed Reactors with Reticular Polyurethane Foam with Different Pore Size, *Materials Science and Engineering*, **24**, pp. 803-813 (2004).
- Yoshie, S., Noda, T., Tsuneda, S., Hirata, A. and Inamori, Y., Salinity Decreases Nitrite Reductase Diversity in Denitrifying Bacteria of Wastewater Treatment Systems, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, pp. 3152-3157 (2004).
- Yu, Y., Kim, J. and Hwang, S., Use of Real-time PCR for Group-specific Quantification of Aceticlastic Methanogens in Anaerobic Processes : Population Dynamics and Community Structures, *Biotechnology and bioengineering*, accepted, (2005).
- Zumft, W. G., Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, pp. 533-536 (1997).