

활성슬러지내의 전기화학적활성 박테리아 분포 특성

손형식¹, 손희종², 김미아¹, 이상준^{1*}

Distribution of Electrochemically Active Bacteria in Activated Sludge Characteristics

Hyeng-Sik Son¹, Hee-Jong Son², Mia Kim¹, and Sang-Joon Lee^{1*}

접수: 2011년 6월 1일 / 게재승인: 2011년 10월 25일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Microbial fuel cell (MFC) was enriched using sludge in wastewater treatment. The microbial community of activated sludge and enriched MFC were analyzed by FISH (fluorescent *in situ* hybridization) and 16S rDNA sequencing. *Bacteroidetes* group were pre-dominant in activated sludge by FISH. α group, γ group and *Acinetobacter* group were dominant and they were similar to distribution. The average value of 10 peak of MFC is 0.44C. When MFC was enriched by sludge, γ -*Proteobacteria*, *Plantomycetes* group increased 70% and 60%, respectively. In results of 16S rDNA sequencing, *Sphingomonas* sp. was comprised in α *proteobacteria* and *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp. were comprised in γ *proteobacteria* and *Chryseobacterium* sp. was comprised in *Flavobacteria* were isolated from sludge.

Keywords: Microbial Fuel Cell, Sludge, Microbial Community, FISH, 16S rDNA

1. 서론

미생물 연료전지 (Microbial fuel cell, MFC)는 전기활성 미생

물을 촉매로 이용하여 하·폐수에 포함된 유기물의 화학적 에너지를 전기에너지로 전환할 수 있는 장치이다 [1]. 금속염을 전자수용체로 사용하는 혐기성 미생물인 금속염 환원세균 (metal reducing bacteria)이 매개체 없이 전자전달이 가능하다는 것 [2-4]이 알려진 이후 이에 관한 연구가 많이 진행되어왔다. 이런 매개체 없이 전자전달이 가능한 미생물을 전기화학적 활성미생물 (electrochemically active bacteria, EAB)이라고 한다 [5-6]. 현재 알려진 대표적인 EAB들로는 철 환원 미생물 (Fe(III)-reducing bacteria, FRB)인 *Clostridium butyricum* [5], *Enterococcus gallinarum* [6], *Rhodospirillum rubrum* [7], *Geobacter* [8-10], *Shewanella* [11-12] 및 Sulfate-reducing bacterium인 *Desulfotomaculum reducens* [13] 등이 많이 알려져 있으며, MFC내의 미생물 군집에 대해서 배양적인 방법과 비배양적인 방법으로 현재 여러 연구 그룹에서 진행 중이다. 본 연구에서는 여러 가지 probe를 이용하여 실제 배양으로 확인할 수 없는 미생물들을 비배양적인 방법인 fluorescent *in situ* hybridization (FISH)를 이용하여 활성슬러지 중에 서식하는 EAB들을 MFC에서 농화배양 후의 미생물 군집의 계통학적 분석이 미생물 다양성 관찰을 위해 수행되었다. 또한, 이를 배양적 방법인 16S rRNA sequencing을 이용하여 종 동정을 함으로써 EAB 중별 MFC에서의 전류 생산 능을 파악하기 보다는 MFC에 적합한 미생물 종을 파악하여 MFC 성능을 향상시키기 위한 것이 그 목적이다.

¹부산대학교 미생물학과

¹Department of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Tel: +82-51-510-2268, Fax: +82-51-514-1778
e-mail: sangjoon@pusan.ac.kr

²부산광역시 상수도사업본부 수질연구소

²Water Quality Research Institute, Waterworks Headquarter, Busan 621-813, Korea

2. 재료 및 방법

2.1. 하수처리장 슬러지 sample 채취와 인공폐수 생성

2009년 6월에 부산 S 하수처리장의 활성슬러지를 채취하여

MFC의 접종원으로 사용하였으며, MFC의 작동을 위해 인공 폐수를 사용하였다. 인공폐수는 15 mg/L KH_2PO_4 , 30 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3.75 mg/L CaCl_2 , 0.25 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5.0 mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 105 mg/L NaHCO_3 의 basal solution과 trace mineral solution (10 mL/L)으로 구성되며, 여기에 glucose와 glutamic acid의 양을 조절하여 BOD 농도를 220 ± 20 mg/L 및 pH를 7.0 ± 0.2 로 조절하였다 [14].

2.2. MFC 시스템 구성 및 농화배양

MFC 시스템의 구성은 MFC, 저항기 (resistor, Korbi Co. Ltd, Anyang, Korea), multimeter (Model 2700, Keithley Co. Cleveland, Ohio, USA), 데이터 수집기 및 인공폐수를 공급하는 펌프로 구성하였고, MFC는 음극, 양극 및 양이온 교환 막으로 구성되며, 전극은 graphite felts (GF series, Electrosynthesis, Lancaster, NY, USA)를 사용하였고, 양이온 교환 막은 Nafion 424 (30×70 mm; Dupont, Wilmington, DE, USA)를 사용하였다. 전기신호는 120초에 한번씩 multimeter와 DMM monitoring program (Korbi, Seoul, Korea)을 이용하여 PC에서 측정·저장하였다.

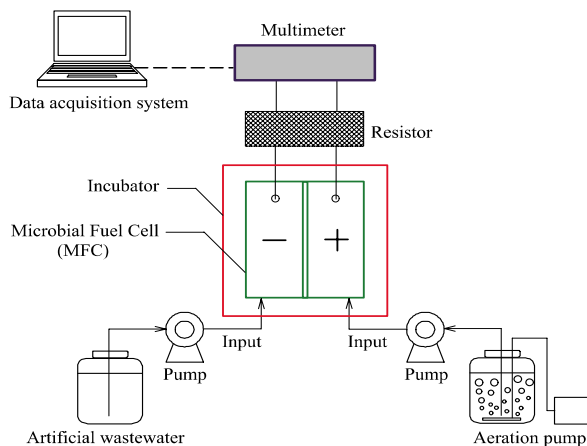


Fig. 1. The schematic diagram of MFC system.

하수처리장에서 채취된 활성슬러지를 MFC의 음극부에 각각 주입한 후 약 24시간 동안 open circuit 상태로 발생하는 전기량을 모니터링 하였으며, 24시간 후 저항기를 이용하여 200 Ω 의 저항을 음극과 양극에 연결한 후 음극에는 BOD 220 mg/L (pH 6.8~7.2)의 인공폐수 [15]를 1 mL/min의 유속으로 매 시간당 20분 동안 간헐적으로 주입하였고, 양극부에는 1 mL/min의 유속으로 공기로 포화된 증류수를 주입하여 음극과 양극의 전압차를 일정하게 유지하면서 실험기간 동안 농화 배양하였다. 각각의 MFC에서 발생하는 전류는 multimeter에 수집되어 PC에 자동적으로 전송된다. 농화배양은 35°C의 항온배양기 (HB-103S, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 실시하였다.

2.3. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 관찰 [16-17]

농화배양 전·후의 미생물 군집을 관찰하기 위해 농화배양

전의 채취된 활성슬러지와 농화배양 후의 MFC 음극부의 전극을 1 g 취하여 멸균된 pH 7의 phosphate buffered saline 용액 (PBS) 9 mL에 투입하였다. 각각의 시료가 함유되어 있는 PBS 용액에서 1 mL를 분취하여 3 mL의 4% paraformaldehyde/PBS solution으로 4°C에서 16시간 고정하였다. 고정된 시료를 4°C, 12,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상등 액을 제거를 PBS로 세척하였고, 그 작업을 3회 반복하였다. 전처리를 거친 고정된 시료 각 1 mL 씩을 polycarbonate membrane (diameter, 47 mm; pore size, 0.20 mm; type GTTP 4700; Millipore, Eschborn, Germany)으로 여과하여 50%, 80%, 100%의 에탄올에 순차적으로 각 3분씩 처리한 후 공기 중에서 건조시켰다. Table 1에는 FISH 관찰을 위해 13개의 probe 들을 사용하였으며, 총 10개의 그룹들이 측정된다. 각각의 probe를 균체가 부착된 polycarbonate membrane에 떨어 뜨린 후 46°C에서 90분 동안 혼성화시켰다. 그 후 48°C에서 미리 예열된 washing buffer에서 15분 동안 세척시킨 후 건조시켜 confocal laser scanning microscopy (LSM 510, ZEISS, Germany)를 통해 확인하였다.

Table 1. Characteristics of oligonucleotide probes used in this study

Probe	Probe sequence (5'-3')	Specificity	Ref.
ALF1b	CGTTCGYTCTGAGCCAG	α subclass of <i>Proteobacteria</i>	16)
BET42a	GCCTTCCCACTTCGTTT	β subclass of <i>Proteobacteria</i>	16)
GAM42a	GCCTTCCACATCGTTT	γ subclass of <i>Proteobacteria</i>	16)
CF319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	<i>Bacteroidetes</i>	16)
CF319b	TGGTCCGTATCTCAGTAC	<i>Bacteroidetes</i>	16)
Aca23a	ATCCTCTCCCATACTCTA	<i>Acintobacter</i> spp.	18)
PLA46	GACTTGCATGCCTAATCC	<i>Planctomycetes</i>	19)
HoAc1402	CTTTCGTGATGTGACGGG	<i>Acidobacter</i>	20)
Cyan785	CTACTGGGGTATCTAATCC	<i>Cyanobacteria</i>	17)
DSV698	GTTCTCCAGATATCTACGG	<i>Desulfovibrio</i> spp.	21)
LGC354a	TGGAAGATCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	22)
LGC354b	CGGAAGATCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	22)
LGC354c	CCGAAGATCCCTACTGC	<i>Firmicutes</i>	22)

2.4. 16S rRNA sequencing

MFC의 농화배양 후 전극에 부착되어 있는 EAB들의 동정을 위해 전극에 부착된 미생물들을 LB agar plate에 배양한 후 colony PCR로 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 universal primer set (27F, 1492R, Solgent, Korea)를 이용하여 PCR 분석기 (PCR Thermal cycler, Takara, Japan)를 사용하여 분석하였다.

2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

MFC의 농화배양 후 전극을 전처리 하고 백금으로 코팅을 한 후 [5], S3500N (Hitachi, Japan)을 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 활성슬러지의 미생물 군집분석

FISH법을 이용하여 채취한 활성슬러지의 미생물 군집을 분석한

결과를 Fig. 2에 나타내었다. *Bacteroidetes*가 5.5×10^9 cells/g로 가장 우점을 보였고, α proteobacteria, β proteobacteria, γ proteobacteria, *Acintobacter*와 *Firmicutes*가 각각 3.5×10^9 cells/g, 2.4×10^9 cells/g, 3.8×10^9 cells/g, 3.9×10^9 cells/g, 3.1×10^9 cells/g 정도로 많이 분포하였으며, *Desulfovibrio*도 1.5×10^9 cells/g 정도의 생체량을 나타내었으며, *Plantomycetes*와 *Acidobacteria*은 5.0×10^8 cells/g, 2×10^8 cells/g 정도로 낮은 분포를 나타내었으며, *Cyanobacteria*는 1×10^8 cells/g로 가장 낮은 분포를 보였다. 이전 활성슬러지의 분포 특성 [23-24]을 보면, 경우 처리법에 따라 미생물의 분포의 차이는 있지만, 전체적으로 Proteobacteria가 가장 많은 분포를 보이고, *Bacteroidetes*도 많은 분포를 보였다. 본 연구결과와 비교해서 유사한 결과를 보였다. 약간의 분포 차이를 보인 것은 슬러지의 수온, 지역, 조성이 다르게 작용하여 나타난 것으로 사료된다.

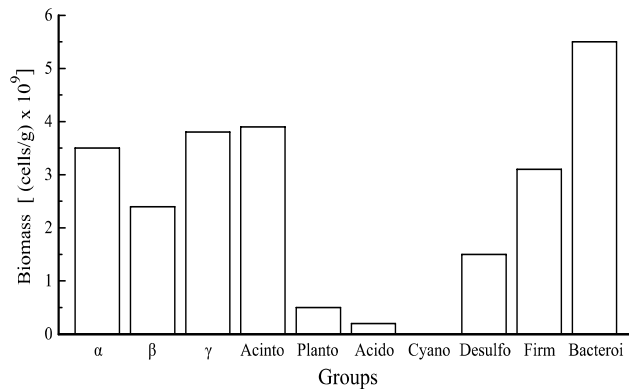


Fig. 2. Bacterial community structure in activated sludge by FISH analysis. (α : α proteobacteria, β : β proteobacteria, γ : γ proteobacteria, Acinto: *Acintobacter* spp., Planto: *Plantomycetes*, Acido: *Acidobacteria*, Cyano: *Cyanobacteria*, Desulfo: *Desulfovibrio* spp., Firm: *Firmicutes*, Bacteroi: *Bacteroidetes*)

3.2. MFC 농화배양 및 운전

활성슬러지를 MFC에 주입한 후에 open circuit 상태에서 나타난 최대전압 (V)은 약 0.3 V로 나타나, 활성슬러지 내 EAB들의 존재를 확인할 수 있었고, 활성슬러지를 MFC에 주입하고 36시간 후부터 음극과 양극 사이에 200 Ω 의 저항을 걸어주고, 배지공급을 하며 농화배양을 시작하였다. 이후의 실험기간 동안 농화배양이 진행될수록 전류의 생산량이 점진적으로 증가하는 것을 current profile을 통해 볼 수 있다. 농화배양 시작 10일경부터 각각의 MFC에서 생산되는 전류 값이 0.07~0.25 mA로 안정된 패턴을 나타내었다. 집중한 각각의 MFC에서 생산된 최대 전류 값은 각각 0.25 mA로 타나났다. 집중한 MFC가 안정적인 전류생산 단계에 접어들 이후 (농화배양 시작 17일경)에 생산된 전류 값 peak 10개를 선택하여 분석한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 최대 생산 전류 값은 0.24 mA이었고, 단위 시간 당 전류 생산 능을 나타내는 지표인 coulombic yield (CY)는 0.44 C로 나타났고, 편차가 거의 없어 전극에 부착된 EAB들이 정상상태에 도달한 것을 확인할 수 있었다.

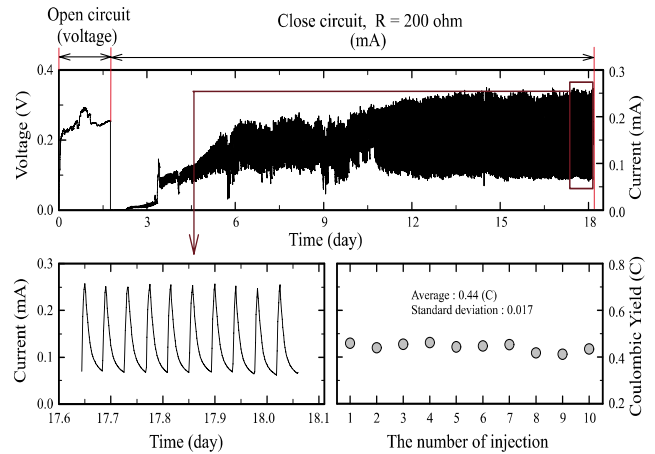


Fig. 3. The signal trends from the microbial fuel cells inoculated activated sludge during the enrichment procedure.

3.3. MFC 내의 미생물 군집분포

EAB들이 정상상태에 도달한 운전시작 19일경에 전극을 분리하여 SEM을 이용하여 전극표면에 부착된 EAB들을 관찰한 것을 Fig. 4에 나타내었으며, Fig. 4 (a)는 농화배양 전의 전극 표면을 SEM으로 관찰한 것으로 농화배양 전에는 매끈하고 깨끗한 전극의 모습이 관찰되었다. 농화배양 후에는 전극의 표면에 EAB들이 biofilm을 형성하고 있는 것을 Fig. 4 (b)에서 확인할 수 있었다.

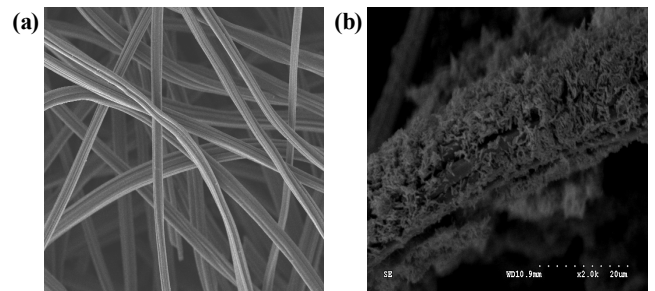


Fig. 4. SEM images of the electrodes before (a) and after enrichment (b) using activated sludge.

활성슬러지로 MFC에 농화배양한 후의 미생물 군집분포 변화를 Fig. 5에 나타내었다. 슬러지에서 가장 많은 분포를 나타낸 (Fig. 2), *Bacteroidetes* 그룹은 전체적인 양은 3.1×10^9 cells/g 정도로 적은 편은 아니지만, 변화폭을 보면 생체량이 44%정도로 줄어들었다. α proteobacteria은 농화배양 전후의 생체량이 큰 변화가 없었으며, β proteobacteria는 약 10%정도 감소를 보였으며, γ proteobacteria는 70%정도 증가를 보여, 6.5×10^9 cells/g로 가장 많은 생체량을 보였다. *Acintobacteria*는 77% 감소를 보였으며, *Plantomycetes*는 약 60% 증가를 하였지만, 실제 생체량은 8×10^8 cells/g로 낮았다. *Acidobacteria*는 1×10^8 cells/g로 약 50% 감소를 보였고, *Cyanobacteria*는 농화배양 전후의 생체량이 1×10^7 cells/g로 변화가 없었다. *Desulfovibrio*는 6×10^8 cells/g로 60% 정도 감소를 보였고, *Firmicutes*는 3.7×10^9 cells/g로 약 12% 정도의 생체량의 증가를 보였다. 실제 미생물의 분포가 슬러

지의 상태에 따라 많은 변화를 보이기도 하지만, 기질에 따라서도 미생물의 군집이 다르게 분포한다 [25-26]. Glucose를 기질로 사용한 이전의 미생물 분포는 [27] *Proteobacteria*가 가장 많은 분포를 나타낸 것과 비교해서 본 논문에서는 glucose, glutamic acid를 기질로 사용하여 실험하였으며, 미생물 생체량이 γ proteobacteria > α proteobacteria > Firmicutes > Bacteroidetes의 순으로 나타나므로, glucose만을 사용한 결과와 일정부분 유사한 결과를 나타내었다. 농화배양 전과 비교하여 농화배양 후에 생체량이 감소한 그룹들은 전기활성미생물과 관련이 적은 그룹들일 가능성이 높은 것으로 판단된다.

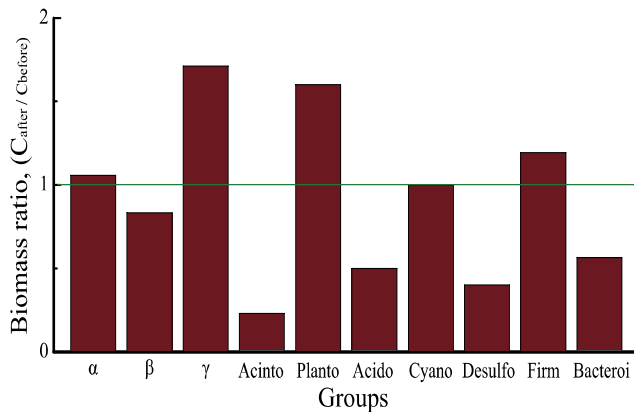


Fig. 5. Comparison of bacterial community structure before and after enriched culture in activated sludge by FISH analysis. (α : α proteobacteria, β : β proteobacteria, γ : γ proteobacteria, Acinto: *Acintobacter* spp., Planto: *Plantomycetes*, Acido: *Acidobacteria*, Cyano: *Cyanobacteria*, Desulfro: *Desulfovibrio* spp., Firm: *Firmicutes*, Bacterioi: *Bacteroidetes*)

3.4. MFC의 미생물 동정

농화 배양된 MFC에 부착된 EAB들을 배양한 후 단일 종을 16S rDNA sequencing을 이용하여 동정한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 활성슬러지에서 9개의 종이 동정되었다. α proteobacteria에 속하는 *Sphingomonas* sp. (AC7), γ proteobacteria에 속하는 *Enterobacter* sp. (AC1, AC2), *Klebsiella* sp. (AC3), *Acinetobacter* sp. (AC4)와 *Bacillus* sp. (AC6), Flavobacteria에 속하는 *Chryseobacterium* sp. (AC8, AC9)이 동정되었다. 비배양적 분석법인 FISH 결과와 배양하여 단일 종을 얻은 후의 sequencing 결과를 비교해보면 γ proteobacteria가 FISH 결과가 1.7배 정도 증가한 것과 sequencing에 의해 동정된 *Enterobacter* sp. (AC1, AC2), *Klebsiella* sp. (AC3), *Acinetobacter* sp. (AC4)와 *Bacillus* sp. (AC6)을 비교하면 유사한 결과를 볼 수 있다. 비배양적인 방법과 배양적 방법을 직접 비교하는 것은 어느 정도만 유추가 가능할 뿐이다. 실제 α proteobacteria (*Sphingomonas* sp.)가 동정이 되었지만 실제 생체량은 약 10% 내외로 증가만을 보였으며, Bacteroidetes에 속하는 Flavobacteria 속인 *Chryseobacterium* sp.도 동정이 되었지만, 실제 생체량은 44% 정도 감소를 보였다. 미생물 분포는 어느 정도 파악이 가능하지만, 미생물의 개체수를 파악하는데 한계가 있다.

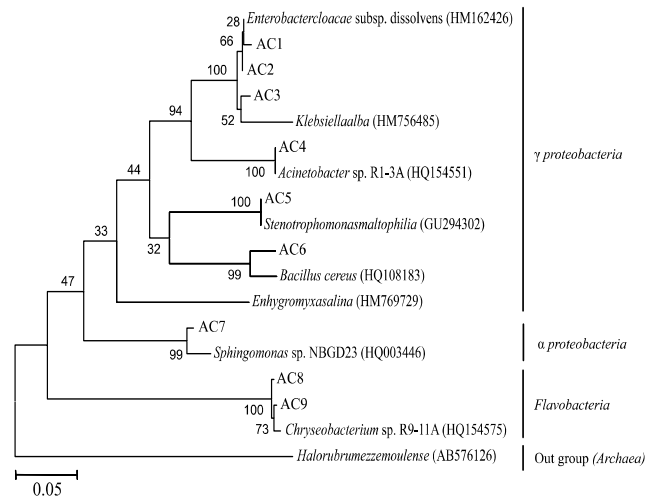


Fig. 6. Neighbor-joining trees showing phylogenetic relationships of 16S rDNA sequences clones from MFC with activated sludge to closely related sequences from GenBank. The scale bars on the bottom indicate the distances between sequences.

4. 결론

S 하수처리장에서 채집한 활성슬러지를 이용하여 MFC 농화배양 전·후의 전기 활성 박테리아 분포 특성을 FISH와 농화배양 후 단일 종을 분리하여 16S rDNA를 이용하여 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- ① 활성슬러지의 미생물 군집을 FISH 분석을 통하여 조사한 결과, Bacteroidetes가 가장 높은 분포비율을 보였으며, α proteobacteria, *Acintobacter*와 *Acintobacter*가 유사한 분포 특성을 나타냈었다.
- ② 활성슬러지를 집중한 MFC 농화배양 이후의 coulombic yield는 0.44 C로 나타났으며, 농화배양 완료 후의 미생물 군집분포는 γ proteobacteria와 *Plantomycetes*가 농화배양 전보다 각각 70%, 60% 정도 생체량의 증가를 보였으며, 실제 생체량은 γ proteobacteria, α proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes의 순으로 각각 6.5×10^9 cells/g, 3.7×10^9 cells/g, 3.7×10^9 cells/g, 3.1×10^9 cells/g로 나타났다.
- ③ 순수 분리한 단일 종을 16S rDNA sequencing을 이용한 미생물 동정 결과, α proteobacteria에 속하는 *Sphingomonas* sp. (AC7), γ proteobacteria에 속하는 *Enterobacter* sp. (AC1, AC2), *Klebsiella* sp. (AC3), *Acinetobacter* sp. (AC4)와 *Bacillus* sp. (AC6), Flavobacteria에 속하는 *Chryseobacterium* sp. (AC8, AC9)이 동정되었다.

References

1. Park, D. H. and J. D. Zeikus (2000) Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1292-1297.
2. Kim, H. J., H. S. Park, M. S. Hyun, I. S. Chang, M. Kim, and B.

- H. Kim (2002) A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*. *Enzyme. Microb. Technol.* 30: 145-152.
3. Liu, H., R. Ramnarayanan, and B. E. Logan (2004) Production of electricity during wastewater treatment using a single chamber microbial fuel cell. *Environ. Sci. Technol.* 38: 2281-2285.
 4. Kim, T. S. and B. H. Kim (1998) Modulation of *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically supplied reducing equivalent. *Biotechnol. Lett.* 10: 123-128.
 5. Park, H. S., B. H. Kim, H. S. Kim, H. J. Kim, G. T. Kim, M. Kim, I. S. Chang, Y. K. Park, and H. I. Chang (2001) A novel electrochemically active and Fe (III) reducing bacterium phylogenetically related to *Clostridium butyricum* isolated from a bacterial fuel cell. *Anaerobe.* 7: 297-306.
 6. Kim, G. T., M. S. Hyun, I. S. Chang, H. J. Kim, H. S. Park, B. H. Kim, S. M. Kim, and J. W. T. Wimpenny (2005) Dissimilatory Fe (III) reduction by electrochemically active lactic acid bacterium phylogenetically related to *Enterococcus gallinarum* isolated from submerged soil. *J. Appl. Microbiol.* 99: 978-987.
 7. Chaudhuri, S. K. and D. R. Lovley (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells. *Nat. Biotechnol.* 21: 1229-1232.
 8. Lovley, D. R., S. J. Giovannoni, D. C. White, J. E. Champine, E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby, and S. Goodwin (1993) *Geobacter metallireducens* gen. nov. sp. nov., a microorganism capable of coupling the complete oxidation of organic compounds to the reduction of iron, and other metals. *Arch. Microbiol.* 159: 336-344.
 9. Caccavo, F., J. D. Coates, R. A. Rossello-Mora, W. Ludwig, K. H. Schleifer, D. R. Lovley, and M. J. McInerney (1996) *Geovibrio ferrireducens*, a phylogenetically distinct dissimilatory Fe (III)-reducing bacterium. *Arch. Microbiol.* 165: 370-376.
 10. Bond, D. R., D. E. Holmes, L. M. Tender, and D. R. Lovley (2002) Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments. *Science.* 295: 483-485.
 11. Lovley, D. R., E. J. P. Phillips, and D. J. Lonergan (1989) Hydrogen and formate oxidation coupled to dissimilatory reduction of iron or manganese by *Alteromonas putrefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 700-706.
 12. Lovley, D. R., F. Caccavo, and E. J. P. Phillips (1992) Acetate oxidation by dissimilatory Fe (III) reducers. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3205-3206.
 13. Tebo, B. M. and A. Y. Obraztsova (1998) Sulfate-reducing bacterium grows with Cr (VI), U (VI), Mn (IV), and Fe (III) as electron acceptors. *FEMS Microbiol. Lett.* 162: 193-198.
 14. Kim, B. H., H. S. Park, H. J. Kim, G. T. Kim, I. S. Chang, J. Lee, and N. T. Phung (2004) Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel cell type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 672-681.
 15. Nübel, U., F. Garcia-Pichel, and G. Muyzer (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3327-3332.
 16. Wagner, M., R. Amann, H. Lemmer, and K. Schleifer (1993) Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1520-1525.
 17. Glöckner, F. O., B. M. Fuchs, and R. Amann (1999) Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3721-3726.
 18. Wagner, M., R. Erhart, W. Manz, R. Amann, H. Lemmer, D. Wedi, and K. H. Schleifer (1994) Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus acinetobacter and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 792-800.
 19. Neef, A., R. Amann, H. Schlesner, and K. Schleifer (1998) Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiol.* 144: 3257-3266.
 20. Juretschko, S., A. Loy, A. Lehner, and M. Wagner (2002) The Microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA Approach. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 84-99.
 21. Manz, W., M. Eisenbrecher, T. R. Neu, and U. Szewzyk (1998) Abundance and spatial organization of gram-negative sulfate-reducing bacteria in activated sludge investigated by *in situ* probing with specific 16S rRNA targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 43-61.
 22. Meier, H., R. Amann, W. Ludwig, and K. H. Schleifer (1999) Specific oligonucleotide probes for *in situ* detection of a major group of gram-positive bacteria with Low DNA G+C content. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 186-196.
 23. Eschenhagen, M., M. Schuppler, and I. Röske (2003) Molecular characterization of the microbial community structure in two activated sludge systems for the advanced treatment of domestic effluents. *Water Res.* 37: 3224-3232.
 24. Adav, S. S., D. J. Lee, and J. Y. Lai (2009) Biological nitrification-denitrification with alternating oxic and anoxic operations using aerobic granules. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 1181-1189.
 25. Lee, J., N. T. Phung, I. S. Chang, B. H. Kim, and H. C. Sung (2003) Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 185-191.
 26. Kim, B. H., H. S. Park, H. J. Kim, G. T. Kim, I. S. Chang, J. Lee, and N. T. Phung (2004) Enrichment of microbial community generating electricity using a fuel-cell-type electrochemical cell. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63: 672-681.
 27. Aelterman, P., K. Rabaey, T. H. Pham, N. Boon, and W. Verstraete (2006) Continuous electricity generation at high voltages and currents using stacked microbial fuel cells. *Environ. Sci. Technol.* 40: 3388-3394.