

## 16S rRNA 염기서열을 이용한 낮은 용존산소농도에서 발생한 벌킹슬러지의 우점종 분석

김윤중 · 박은혜 · 김규동 · 남경필 · 정태학<sup>†</sup>

서울대학교 지구환경시스템공학부

## Analysis of Dominant Microorganisms of Bulking Sludge at Low Dissolved Oxygen Concentration using 16S rRNA Sequences

Yun-Jung Kim · Eun-Hye Park · Gyu-Dong Kim · Kyoungphile Nam · Tai Hak Chung<sup>†</sup>

Civil, Urban & Geosystem Engineering, Seoul National University

(Received 18 May 2004, Accepted 31 August 2004)

**Abstract** : Maintaining dissolved oxygen (DO) at sufficiently low concentration in the aeration tank at a wastewater treatment plant (WWTP) is essential for reduction of the costs of operation and maintenance. On the other hand, the low DO level may result in adverse effect on the integrity of the activated sludge. A typical and disastrous outcome frequently experienced is the outgrowth of filamentous microorganisms, which is called as filamentous bulking. In addition to the traditional methods such as sludge settleability and microscopic observation of the culture, molecular techniques including polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by 16S rRNA sequencing were applied to identify filamentous bacteria present in bulking sludge under a condition of low DO concentration. Two morphologically distinct groups, presumably consisting of *Sphaerotilus natans*, and Eikelboom Type 1701 or Type 1851, were identified through microscopic observation. They were further confirmed by subsequent 16S rRNA sequencing. Dominant filamentous bacteria identified by the molecular techniques were consisted of three major groups. Sequences of partial 16S rRNA cloned showed that the filamentous bulking organisms were closely related to Eikelboom Type 021N and Eikelboom Type 1701, and *Sphaerotilus natans*, respectively. Molecular methods were found to possess a strong potential of direct examination of the microbial community of an activated sludge system.

**keywords** : DO, Filamentous bulking, 16S rRNA, *Sphaerotilus natans*, Eikelboom-type species

### 1. 서론

현재 운전되고 있는 활성슬러지 공정에서 최종 처리수의 고액분리는 중력식 침전에 의한 방법이 가장 광범위하게 사용되고 있으며, 슬러지의 침전성은 공정의 처리효율을 결정짓는 주요한 인자들 중 하나이다. 슬러지의 침전성이 불량해지는 문제는 다양한 현상으로 발현되며, 그 중에서 사상균의 과다 성장으로 인한 벌킹 현상은 빈번히 보고되고 있다(Donaldson, 1932; Palm *et al.*, 1980; Casey *et al.*, 1995).

사상성 벌킹은 낮은 용존산소 농도, 낮은 F/M 비, 영양 염류의 부족, 낮은 pH 등 다양한 조건들이 주요원인으로 보고되고 있다 (Jenkins *et al.*, 1993). 이러한 주요요인들을 밝혀내는 작업은 하수처리시설의 운전에서 같은 조건에 의한 벌킹현상의 재발을 방지하고자 하는 것이 주요목적이다.

사상균에 관한 기존의 연구들은 주로 현미경을 통한 형태관찰(morphological methods)과 다양한 염색법을 이용하

여 우점종을 구분하는 방법이 주를 이루었다(Jenkins *et al.*, 1993; Seviour *et al.*, 1999). 활성슬러지의 벌킹현상을 유발하는 사상균은 형태학적으로 30여종으로 알려지고 있으며 (Eikelboom, 1975), 최근 40여 가지의 새로운 형태학적 분류가 발표되었다(Eikelboom and Geurkink, 2002). 실험자의 숙련도에 따라 편차가 있으며, 다양한 종의 사상균들이 존재할 때 각각에 대해 명확하게 구분하기가 난해하다는 단점이 있음에도 불구하고 현미경 관찰은 벌킹 연구의 가장 기본적인 수단임에는 틀림없다(Davoli and Reggio, 2001).

전통적으로 미생물의 동정은 대부분 분리배양에 의존하였으나, 실제 분리배양이 가능한 박테리아는 전체 박테리아 종의 5%가 채 되지 않는다는 보고가 있으며(Amann *et al.*, 1995), 활성슬러지와 같이 매우 다양한 미생물의 군집체를 동정하기에 기존의 분리배양법은 한계를 드러내는 실정이다. 이러한 여러 문제점으로 인하여, 최근 PCR(Polymerase Chain Reaction)과 16S rRNA 염기서열 분석 등을 이용한 분자생물학적 기법을 활성슬러지를 구성하는 미생물의 군집 분석에 적용하는 연구가 활발히 진행되고 있다(Wagner and Loy, 2002).

<sup>†</sup> To whom correspondence should be addressed.  
thchung@snu.ac.kr

본 연구에서는 다양한 사상성 벌킹 유발조건 중의 하나인 낮은 용존 산소 농도에서 발생하는 벌킹 현상을 해석하기 위해 분자생물학적 기법 중 하나인 PCR과 16S rRNA 염기서열 분석을 이용하였다. 특히 벌킹 슬러지의 우점종을 동정하고, 그 결과를 전통적인 방법과 비교·분석하였다.

## 2. 연구방법

### 2.1. 벌킹 슬러지의 확보 및 성장 분석

실험에 이용된 식중 슬러지는 경기도 K 하수처리장으로 부터 채취하였으며, 기질에 대한 적응을 거친 후 8 L 용량의 반응이 있는 CSTR(Continuous Stirred Tank Reactor) 형태의 반응조에서 배양되었다. HRT는 6시간, SRT는 15일, 운전 초기의 MLSS는 2500 mg/L로 유지하였다. 유입수는 인공 하수를 사용하였으며, 주요 구성은 250 mg COD/L, 30 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N/L, 5 mg PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-P/L였다. 반응조의 전체적인 형태는 Fig. 1에 나타내었다. DO meter(YSI 58, YSI, USA)를 이용해 반응조 내의 용존산소 농도를 측정하고, A/D converter(ADAM 4011, 4520)를 이용해 프로그램(GENIE 3.0)과 연동시켰으며, 컨트롤러(ADAM 4060)를 통해 포기기를 제어하여 반응조 내의 용존산소 농도를 0.5±0.1 mg O<sub>2</sub>/L로 유지하였다.

전통적 방법의 활성슬러지 관찰은 광학현미경 관찰과 침전성 분석의 두 가지로 시행하였다. 또한 침전성의 지표로서 SVI(Sludge Volume Index)와 DSVI(Diluted Sludge Volume Index)를 측정하였다(APHA *et al.*, 1998).

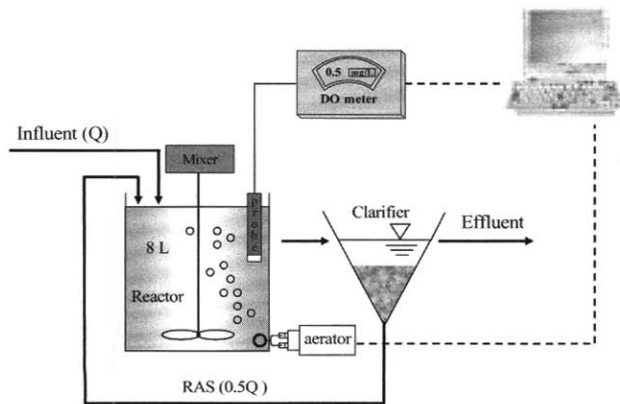


Fig. 1. Schematic diagram of bench scale CSTR under DO control.

### 2.2. 벌킹슬러지의 유전정보 분석

벌킹슬러지를 구성하는 박테리아의 유전물질을 얻기 위해 다음과 같은 순서로 실험하였다. 효소(lysozyme)를 이용

해 세포벽의 peptidoglycan 층을 제거하여 세포질을 용출시킨 뒤, RNase를 이용해 RNA를 제거하고 단백질을 침전시킨 뒤 에탄올 침전법으로 genomic DNA를 얻었다. 충분한 양의 증폭된 16S rRNA를 얻기 위해 thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700, Perkin Elmer 社, USA)를 이용하여 증폭하였다(Kang and Nam, 2002).

본 연구에서는 16S rRNA의 크기가 약 1540 base pair임을 감안하여 대부분(약 1,500 bp)의 16S rRNA clone을 회수할 수 있는 bacterial universal primer(Bioneer, Korea)를 도입하여 실험하였다. 사용된 degenerate primer의 염기서열은 Table 1과 같다.

주형 DNA의 주입량은 100 ng이며, primer는 각각 5 pmol 씩 주입하였다. PCR 튜브의 반응용량은 50 μl이며, thermal cycler의 운전조건은 95°C-1분 (denaturation) / 55°C-1분 (annealing) / 72°C-1분 (elongation) / 35 cycles, 초기 4분간 95°C에서 denaturation을 하며, 마지막 elongation time은 10분으로 설정하였다.

증폭된 PCR 산물은 아가로스 겔에서 50V의 전압으로 30분간 전기영동을 거친 뒤 DNA purification system (Cat. no. A7170, Promega, USA)을 이용하여 추출·정제하였다. 일정 순도가 확보된 16S rRNA는 플라스미드 벡터(pGEM-T Easy vector system, Promega, USA)에 접합한 뒤 competent cell(*E. coli* strain JM109)에 형질전환시켜 클로닝하였다. 얻어진 클론들은 플라스미드를 추출한 뒤 자동염기서열 분석기(ABI model 370, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다.

염기서열분석을 통해 얻어진 활성슬러지 미생물 군집의 각각의 염기서열은 NCBI BLAST program ver. 2.2.8 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)과 RDP-II server (Ribosomal Database Project II, <http://www.cme.msu.edu/RDP/>)의 database를 이용하여 서열의 상동성을 비교하여 분석하였다. 이때 상동성의 기준은 97% 이상으로 정하였으며, 가장 상동성이 높은 미생물 종을 선택하였다. 벌킹슬러지 클론의 다양한 염기서열들은 Clustal-X ver.1.83 (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>)을 이용하여 재배열하였고, 배열한 결과는 Treeview ver.1.6.6. (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>)을 이용하여 neighbor-joining method에 따라 계통도(Phylogenetic tree)로 나타내었다.

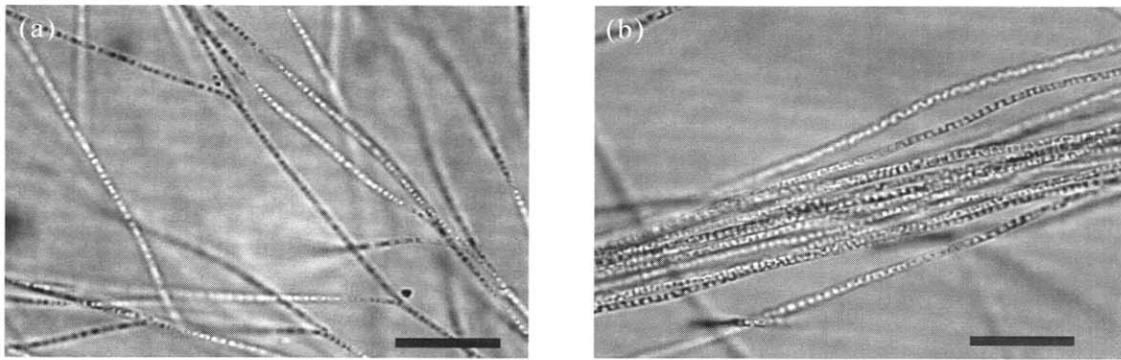
## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 전통적인 방법을 적용한 분석

기질에 적응시킨 활성슬러지를 반응조에 접종한 뒤 1 주

Table 1. Sequences of degenerate primers which are universal for bacteria domain

Primer	Sequence	T <sub>m</sub> (°C)	Reference
27f	5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'	50.53	Suzuki and Giovannoni, 1996
1522r	5'-AAG GAG GTG ATG CAN CCR CA-3'	63.64	Suzuki and Giovannoni, 1996



**Fig. 2.** Microscopic appearance of filamentous bacteria at magnification of X800, bars represent 20  $\mu\text{m}$ , Optical microphotographs were transformed by exposure adjustment to clear contrast. (a) Group A : *Sphaerotilus natans*-like microorganisms, (b) Group B : Eikelboom Type 1701 or Eikelboom Type 1851- like microorganisms.

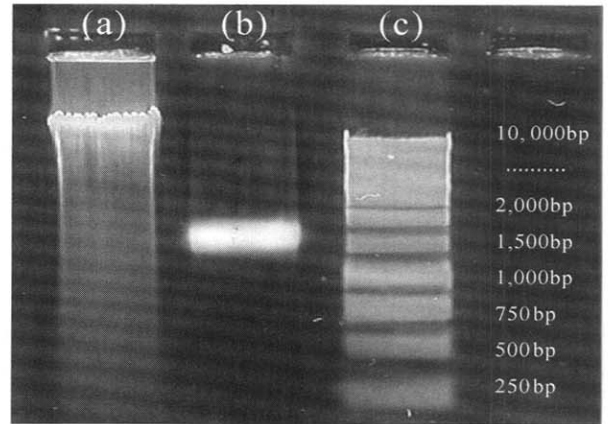
일 가량 지났을 때부터 침전성의 악화를 관찰할 수 있었고, 슬러지 시료는 별킹이 발생한 뒤 사상균의 과다 성장이 심화되었을 때 채취하여 분석하였으며, 이때의 MLSS는 1450 mg/L였다. 반응조에서 채취한 1000 mL의 슬러지를 30분간 정지한 뒤 침전된 부피는 950 mL이었으며, SVI로 환산하였을 때 약 650이었다. 별킹슬러지의 경우 희석하지 않았을 때 거의 침전하지 않으므로, 침전된 부피가 200 mL 이하가 되도록 희석한 뒤 측정된 DSVI는 493이었다. Jenkins 등 (1993)이 제시한 SVI 기준이 150임을 감안할 때 침전성이 매우 좋지 않은 성상을 보인다는 것을 알 수 있었으며, 현미경 관찰을 통해 사상성 별킹을 확인할 수 있었다.

광학현미경으로 관찰하여 사상균의 형상을 기준으로 크게 두 가지의 우점종이 존재하는 것으로 확인하였다. Fig. 2(a)는 전형적인 NALO(Nocardioform-like organisms)의 형태를 보여주며, 사상균에서 가장 일반적인 미생물 중의 하나인 *Nocardia spp.*로 추정할 수 있다. 또한 낮은 용존산소 농도에서 자주 발생하며 사상체가 분지하는 형상을 가지는 *Sphaerotilus natans*일 가능성이 있다. 그러나, 일반적으로 *Nocardia spp.*는 사상체가 짧고, 분지가 90도에 근접하며, 위분지(false branching)를 보이므로 이 사상균은 *Sphaerotilus natans*인 것으로 생각된다.

Fig. 2(b)는 막대 형태(rod shape)의 세포와 사상체 말단의 둥근 모양(round end), 뚜렷한 격벽(septum) 등의 특징을 가지며 낮은 용존산소 농도에서 자주 나타난다고 알려진 Type 1701로 추정되며, 뒤엎긴 다발로 군집체를 이루는 형태로 보아 Type 1851일 가능성을 배제할 수 없다 (Seviour and Blackall, 1999). Type 1851일 경우 쉽게 분해 가능한 용존유기물을 사용할 때 자주 나타나므로 유입수의 기질로 사용한 포도당의 영향일 수 있다고 보여진다. 보다 명확한 우점종 분석을 위해서 16S rRNA 염기서열을 이용한 분석을 실시하였다.

### 3.2. 16S rRNA clone library 분석

Fig. 3은 실험에서 얻어진 DNA를 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인한 결과이다. 왼쪽 웰(well)은 별킹슬러지에서



**Fig. 3.** Electrophoresis photograph showing (a) genomic DNA of bulking sludge, (b) PCR products of 16S rRNA, and (c) DNA size marker.

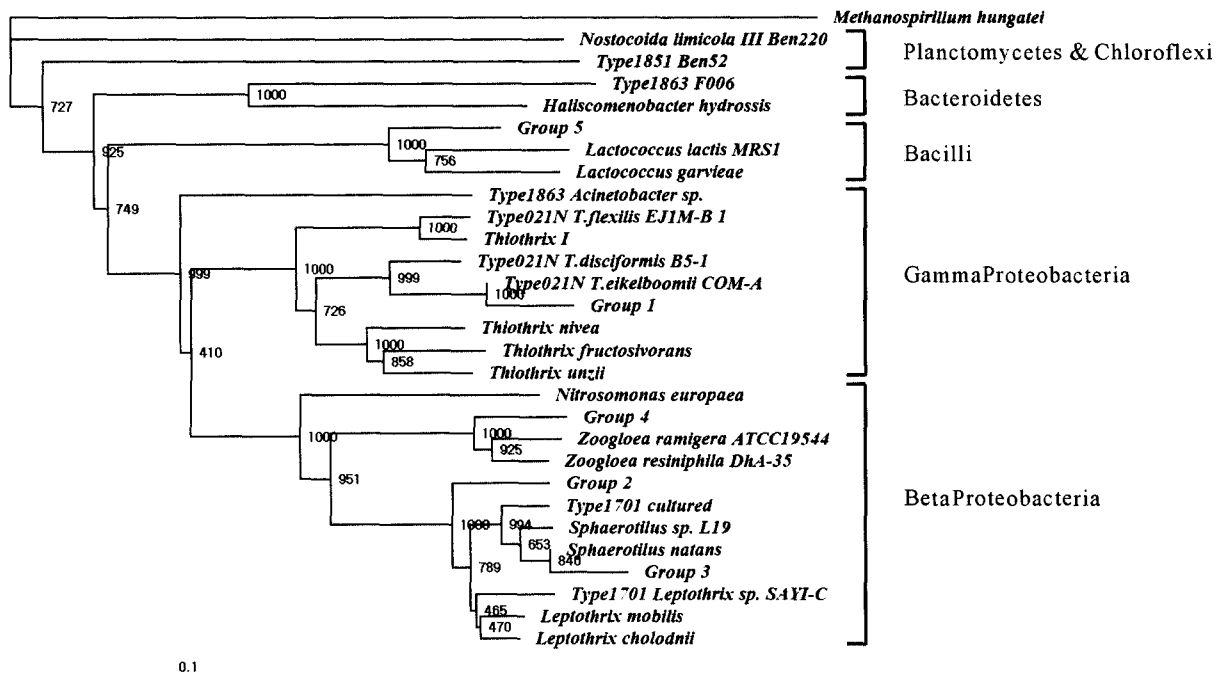
추출한 genomic DNA, 가운데는 universal primer와 PCR 증폭을 통하여 얻은 16S rDNA이며 오른쪽 웰은 전기영동한 DNA의 크기를 가늠하는 size marker(1kb DNA ladder, Promega)이다. 이것을 통해 약 1500 bp 크기의 partial 16S rDNA가 다량 복제되었음을 알 수 있다.

본 연구에서는 IPTG와 X-Gal에 의해 선별된 클론들을 모두 회수하였으며, 이는 보다 정량적인 접근을 위한 것이었다. 클로닝을 통하여 확보된 150여 개의 염기서열 중 일정 개수 (700 basepair) 이상의 염기서열이 확보된 것만 분석하였으며, NCBI BLAST 프로그램을 이용하여 가장 상동성이 높은 박테리아를 검색하여 Table 2에 정리하였다.

얻어진 클론들 중 동일한 박테리아로 보이는 클론의 개수가 2개 미만이거나 상동성이 97% 미만인 클론들은 Group 9로 제외시켰으며, 모두 20개가 여기에 포함되었다. 이 결과는 활성슬러지의 종의 다양성을 보여주는 예라고 할 수 있다. 이상의 결과로 실험에 사용된 별킹슬러지는 여덟 군(group)의 우점종으로 구분되며, 그 중 클론의 개수가 많은 상위 3개 군은 사상균으로 분류된다(John *et al.*, 1994). Group 2와 Group 3은 NCBI BLAST program에서

**Table 2.** Summary of microbial diversity of bulking sludge based on 16S rRNA by closest match of NCBI BLAST and RDP-II data base

Classification	Closest match (≥ 97%)	No. of clones (%)	Phylogenetic information
Group 1	<i>Thiothrix</i> spp.	46 (33.09)	γ subclass of Proteobacteria
Group 2	<i>Leptothrix</i> spp.	27 (19.42)	β subclass of Proteobacteria
Group 3	<i>Sphaerotilus</i> spp.	23 (16.55)	β subclass of Proteobacteria
Group 4	<i>Zoogloea</i> spp.	11 (7.91)	α subclass of Proteobacteria
Group 5	<i>Lactococcus</i> spp.	5 (3.60)	Firmicutes(phylum), Bacilli(class)
Group 6	<i>Dechloromonas</i> spp.	3 (2.16)	β subclass of Proteobacteria
Group 7	<i>Trichococcus</i> spp.	2 (1.44)	Firmicutes(phylum), Bacilli(class)
Group 8	<i>Nitrosomonas</i> spp.	2 (1.44)	β subclass of Proteobacteria
Group 9	others	20 (14.39)	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Neiseria</i> sp., <i>Trichococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., et al.
Total		139 (100.00)	



**Fig. 4.** Phylogenetic distribution of numerically dominant population in a bulking sludge sample, based on 16S rRNA sequences. The distance-matrix consensus tree was calculated using neighbor-joining method with bootstrapping. The bar represents 0.10 substitution per nucleotide.

상동성이 비슷한 값을 보이는 미생물 중 match score에서 높은 것으로 결정하여 구분하였다. Group 4-7은 플록형성 미생물들이며, *Zoogloea* spp.는 대표적인 플록형성 미생물이다. 또한 *Lactococcus* spp., *Dechloromonas* spp. 그리고, *Trichococcus* spp.는 구균 또는 간균 형태의 박테리아로써 플록 형성에 기여하는 미생물이다. Group 8의 *Nitrosomonas* spp.는 대표적인 암모니아 산화 미생물이며, 아질산성 질소의 산화에 관계하는 미생물들은 클론의 결과에서 나타나지 않았다. 이는 질산화 미생물이 활성슬러지에서 차지하는 비율이 적기 때문인 것으로 판단된다.

임의로 구분한 9개의 미생물 군 중 가장 많은 클론들이 얻어진 상위 다섯 그룹에 대해 대표적인 염기서열을 각각 지정하여 계통학적 유연관계를 추정하였다.

Clustal-X를 이용하여 재배열(multiple alignment)한 뒤 TreeView를 이용하여 계통도를 나타내었다(Page, 1996). 계통도의 통계학적 신뢰도를 평가하기 위해 bootstrapping을 실행하였으며(Felsenstein, 1985), bootstrapping 시도 횟수는 1000번이었고, 계통도의 결절(node) 부분에 신뢰도의 값(bootstrap value)을 함께 나타내었다. 벌킹슬러지로부터 얻은 클론의 신뢰도 값은 Group 3을 제외하고 모두 1000이었고, 이는 1000번 실행하여 1000번 모두 같은 자리에 위치한다는 것을 뜻한다.

Fig. 4에서 *Methanospirillum hungatei*는 Archaea domain에 속하는 미생물로써 계통도의 outgroup root로써 임의로 지정하였다. Group 4와 Group 5는 NCBI BLAST program에서 비교한 대로의 유연관계를 보인다.

Group 3의 경우 BLAST match에서 *Sphaerotilus* spp.에 포함되는 것으로 나타났으며, 계통분석 결과 *Sphaerotilus natans*와 가장 가까운 유연관계에 있는 것으로 확인되었다. 현미경 관찰의 결과를 참조하여, Group 3은 *Sphaerotilus natans*라고 말할 수 있다. Group 2는 Group 3과 가까운 유연관계에 있으나 *Sphaerotilus* spp. 그리고 *Leptothrix* spp.와 함께 비교하였을 때 뚜렷이 구분되는 다른 종 (species)으로 추정되며, 또한 현재까지 밝혀진 Eikelboom Type 1701의 두 개의 염기서열과 오히려 더 가까운 유연관계에 있는 것으로 나타났다. *Sphaerotilus* 속과 *Leptothrix* 속은 모두 베타프로테오박테리아 강(Beta Proteobacteria class)에 속하며, 이전의 분류(John *et al.*, 1994)에서는 서로 다른 속이었으나, 최근 16S rRNA 분석에 따라 *Leptothrix* 속으로 함께 분류되고 있다(Ribosomal Database Project-II, <http://rdp.cme.msu.edu>). 이것은 사상균의 형태적 측면에서 Eikelboom Type 1701가 분리배양 균집 상태에서 *Sphaerotilus natans*와 비슷한 위분지(false-branching) 형태를 보인다는 보고(Jenkins *et al.*, 1993; Jenkins *et al.*, 2003)를 뒷받침한다.

Group 1는 BLAST local-match에서 *Thiothrix Eikelboomii* strain COM-A와 가장 높은 상동성을 보였으며, 계통도에서도 가장 가까운 유연관계에 있는 것으로 나타났다. Eikelboom Type 021N은 최초의 분리 당시 형태학적인 특징이 다른 사상균과 구분되어 별개의 종으로 추정되었다(Eikelboom, 1975). 그러나, 최근의 연구에서 분리된 Eikelboom Type 021N의 염기서열은 *Thiothrix* 속에 포함되는 것으로 나타났으며, 현재까지 세 개의 그룹으로 구분되고 있다(Kanagawa *et al.*, 2000; Aruga *et al.*, 2002). 이 세 가지의 그룹은 최근 새로운 종으로서 보고되었으며, 각각 *Thiothrix disciformis*, *Thiothrix eikelboomii*, 그리고, *Thiothrix flexilis*이다. 본 연구에서 얻어진 염기서열의 Group 1은 *Thiothrix eikelboomii*와 가장 가까운 유연관계를 보이고 있으며, 다른 *Thiothrix* spp.와 함께 비교한 Fig. 4의 계통도를 참고하였을 때 Eikelboom Type 021N의 두 번째 그룹에 포함되며, *Thiothrix eikelboomii*라고 말할 수 있다.

분자생물학의 발전과 더불어 기존의 박테리아 분류가 개편되고 있으며, 이는 사상균에 대한 연구에서도 예외가 아니다. 기존의 연구에서 다른 미생물로 구분되었던 *Thiothrix* spp.와 Eikelboom Type 021N은 같은 속에 속하는 것으로 밝혀진 것과 같이(Howarth, 1999), 사상균의 연구에서 분자생물학적 접근을 시도할 때 계통학적 분류의 최근 정보는 반드시 고려되어야 할 것이다.

#### 4. 결론

본 연구는 낮은 용존산소 농도로 유지된 연속반응조에서 얻은 벌킹슬러지를 전통적인 방법과 분자생물학적 기법으로 분석하였다.

1. 상상 분석 결과 SVI는 650 ml/g, DSVI는 493 ml/g이었으며, 사상균의 형상적 특징으로 두가지의 사상균(*Spha-*

*erotilus natans*, Eikelboom Type 1701 또는 Eikelboom Type 1851)이 우점종으로 예측되었다.

2. 벌킹슬러지로부터 얻어진 염기서열들의 분석결과 사상균의 우점종은 세가지 그룹으로 구분되었으며, 각각 *Sphaerotilus natans*, Eikelboom Type 1701, 그리고, Eikelboom Type 021N와 계통학적으로 가까운 유연관계에 있는 것으로 밝혀졌다.
3. 분자생물학적 방법을 이용한 활성슬러지의 분석은 전통적인 현미경 관찰과 병행하여 우점종의 유전정보를 통한 직접적인 접근이 가능하며, 벌킹에 관한 연구를 향상시킬 수 있다.

#### 사 사

본 연구는 BK21서울대/한양대 사회기반 및 건설기술 인력양성 사업단의 지원과 한국과학재단 목적기초연구(R01-2002-000-00314-0)의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Amann R.I., Ludwig W. and Schleiferrudolf K., Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Micobiological Reviews*, **59**, pp. 143-169 (1995).
- APHA, AWWA, WEF *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed., American Public Health Association, Washington, DC, U.S.A. (1998).
- Aruga S., Kamagata Y., Khono T., Hanada S., Nakamura K., and Kanagawa T., Characterization of filamentous Eikelboom Type 021N bacteria and descriptions of *Thiothrix disciformis* sp. nov. and *Thiothrix flexilis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, pp. 1309-1316 (2002).
- Casey T.G., Ekama G.A., Wentzel M.C., Marais Gv.R., Filamentous organism bulking in nutrient removal activated sludge system. Paper 1: a historical overview of causes and control. *Water SA*, **21**, pp. 231-238 (1995).
- Davoli C. and Reggio E., Estimate of the degree of agreement to be obtained through the microscopic analysis of activated sludge. *News letter of IWA Specialist Group on Activated Sludge Population Dynamics*, **13**, pp. 26-30 (2001).
- Donaldson W., Use of activated sludge increasing. *Civil engineering*, **2**, pp. 167-169 (1932).
- Eikelboom D.H. and Geurkink B., Filamentous microorganisms observed in industrial activated sludge plants, *Water Science and Technology*, **46**, pp. 535-542 (2002).
- Eikelboom D.H., Filamentous organisms observed in activated sludge. *Water Resaearch*, **9**, pp. 365-388 (1975).
- Felsenstein J., Confidence limits of phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution*, **39**, pp. 783-791 (1985).
- Howarth R., Unz R.F., Seviour E.M., Seviour R.J., Blackall L.L., Pickup R.W., Jones J.G., Yaguchi J., Head I.M., Phy-

- logenetic relationships of filamentous sulfur bacteria (Thiothrix spp. and Eikelboom type 021N bacteria) isolated from wastewater-treatment plants and description of Thiothrix eikelboomii sp. nov., Thiothrix unzii sp. nov., Thiothrix fructosivorans sp. nov. and Thiothrix defluvii sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**, pp. 1817-1827 (1999).
- Jenkins D., Richard M.G. and Daigger G.T., *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming, 2nd ed.*, Lewis Publishers, Michigan, U.S.A. (1993).
- Jenkins D., Richard M.G. and Daigger G.T., *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming, and Other Solids Separation Problems, 3rd ed.*, Lewis Publishers, Michigan, U.S.A. (2003).
- John G. Holt, Noel R. Krieg, Peter H.A. Sneath, Stanley T. Williams, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th ed.*, Lippincott, Williams & Wilkins, U.S.A. (1994).
- Kanagawa T, Kamagata Y, Aruga S, Kohno T, Horn M, Wagner M., Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for eikelboom type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**, pp. 5043-5052 (2000).
- Kang H. and Nam K., Molecular characteristics of *Pseudomonas rhodesiae* strain KK1 in response to phenanthrene. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **12**, pp. 729-734 (2002).
- Page, R. D. M., TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, **12**, pp. 357-358 (1996).
- Palm J.C., Jenkins D., Parker D.S., Relationship between organic loading, dissolved oxygen concentration and sludge settleability in completely mixed activated sludge process. *Journal of Water Pollutant Control Federation*, **52**, pp. 2484-2506 (1980).
- Seviour R.J. and Blackall L.L., *The Microbiology of Activated Sludge*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands (1999).
- Suzuki M.T. and Giovannoni S.J., Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, pp. 625-630 (1996).
- Wagner M. and Loy A., Bacterial community composition and function in sewage treatment systems. *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, pp. 218-227 (1996).