

Oligonucleotide Microarray를 이용한 유류 오염 토양 미생물 군집내 난분해성 화합물 분해 유전자의 검출

이종광 · 김 희 · 이두명 · 이석재 · 김무훈*

삼성엔지니어링(주) 기술연구소

Detection of Biodegradative Genes in Oil Contaminated Soil Microbial Community by Oligonucleotide Microarray

Jong Kwang Lee · Hee Kim · Doo Myoung Lee · Seok Jae Lee · Moo Hoon Kim*

R & D Center, Samsung Engineering Co., Ltd.

ABSTRACT

The analysis of functional population and its dynamics on the environment is essential for understanding bioremediation in environment. Here, we report a method for oligonucleotide microarray for the monitoring of aliphatic and aromatic degradative genes. This microarray contained 15 unique and group-specific probes which were based on 100 known genes involved pathways in biodegradation. Hybridization specificity tests with pure cultures, strain *Pseudomonas aeruginosa* KCTC1636 indicated that the designed probes on the arrays appeared to be specific to their corresponding target genes. It was found that the presence of 8 genes encoding alkane, naphthalene, biphenyl, pyrene (PAH ring-hydroxylating) degradation pathway could be detected in oil contaminated soil sample. Therefore, the findings of this study strongly suggest that oligonucleotide microarray is an effective diagnostic tool for evaluating biodegradation capability in oil contaminated subsurface environment.

Key words : DNA Chip, Microarray, Bioremediation, Biological monitoring

요 약 문

환경 내에서 생물학적 복원을 이해하기 위해서는 미생물 기능성 군집 및 활성을 분석하는 것은 필수적이다. 본 연구에서는 유류오염 토양의 미생물 군집을 모니터링하기 위하여 난분해성 물질의 생물학적 분해에 관여하는 100개의 알려진 대사경로 및 유전자를 기반으로 한 oligonucleotide microarray를 개발하였다. 본 연구에 사용된 microarray는 유류오염 분해 대사에 관련된 유전자를 진단하기 위한 15개의 고유한 probe를 포함하고 있다. 디자인된 probe의 hybridization specificity는 표준 균주, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC1636을 이용하여 확인 하였으며, 유류오염토양 시료의 분석결과 alkane, naphthalene, biphenyl, pyrene(PAH ring-hydroxylating) 분해에 관련된 8개의 유전자 발현을 확인 하였다. 이러한 결과는 DNA microarray가 유류오염토양환경에서 생물학적 분해유전자 진단에 효과적으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라 생물학적 복원의 가능성을 진단하기에도 적합한 기법이라는 것을 나타내고 있다.

주제어 : DNA Chip, Microarray, 생물학적 토양복원, 생물학적 모니터링

1. 서 론

토양은 공기, 물과 더불어 인간을 포함한 모든 생물의

생존 기반이며 환경의 핵심 부분을 이루어 생태계 유지의 근간을 이루고 있다. 토양이 지속적으로 유해 물질에 노출되면, 오염물질은 토양 내에 축적, 농축되어 토양을 생

*Corresponding author : moohoon123.kim@samsugn.com

원고접수일 : 2005. 7. 4 게재승인일 : 2005. 8. 10

질의 및 토의 : 2006. 4. 30 까지

존 기반으로 하는 모든 생물에게 악영향을 미치며, 지하수 확산에 의해 다른 지역의 오염도 가중시킨다.

오염된 토양을 복원하기 위한 처리 방법은 물리화학적 처리, 생물학적 방법이 있으며 각각의 방법에 따라 다시 세분화된 방법으로 나뉜다. 이러한 복원 방법들은 오염물질의 종류와 토양 오염의 특성에 따라 가장 적합한 방법이 적용되어야 하나 21세기에는 기존의 물리화학적 방법에서 벗어나 미생물을 이용한 생물학적 처리 방법에 대한 의존도가 커지고 있다. 그러나 미생물의 오염물질 처리 능력에는 한계가 있으며 또한 최적의 미생물 성장 조건에서만 최대의 제거 효율을 얻을 수 있다. 따라서 효율적인 생물학적 복원 방법을 적용하기 위해서는 미생물의 특성 파악이 매우 중요하다 할 수 있다.

일반적으로 오염토양의 생물학적 복원 가능성 진단을 위하여 사용되는 총세균수측정(CFU, Colony Forming Unit) 방법은 배양에 의존하는 방법으로 단순히 배양 가능한 미생물의 개체수만을 측정하는데 사용될 수 있으며, 실질적으로 유류오염 분해에 관련된 미생물의 개체수 및 미생물의 군집구조를 파악할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 또한 미생물에 따른 배양기간이 일정치 않고, 각각의 미생물의 유류분해능을 확인하기 위해 오랜 검사기간이 소요되고, 배양을 통해 관찰되는 세균이 총세균의 0.01~1% 이내라고 할 때 분리 및 배양에 의존한 세균 군집 분석은 극히 제한된 생태적 정보를 제공할 뿐이다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 DNA sequencing, southern 및 northern blot, PCR, 등의 분자생물학적 기법이 유류오염 토양의 생물학적 복원 진단에 적용되고 있으나 (Stapleton et al., 1998), 검사방법의 어려움과 실험의 재현성, 오랜 검사 기간 등의 이유로 적용의 어려움을 겪고 있기 때문에 현장 적용이 쉽고 정확하며, 검사소요 시간이 짧은 진단법 개발이 필요한 실정이다.

최근 들어 DNA microarray는 환경 내에서 미생물군집 연구에 광범위하게 사용되고 있다(Call et al., 2001; Loy et al., 2002; Small et al., 2001; Valinsky et al., 2002; Wu et al., 2001). 일반적으로 probe array 형태에 기초한 DNA microarray는 기능적 유전자(functional gene array, FGA), 군집 게놈(Community genome array, CGA), 계통분석학적 염기서열(Phylogenetic oligonucleotide array) 분석에 적합하기 때문에 환경연구에 광범위하게 적용할 수 있다(Rhee et al., 2004).

본 연구에서는 다양한 미생물의 석유계 탄화수소 기원 물질 분해에 관련된 7종의 주요 대사유전자(alkane hydrolase, naphthalene dioxygenase, toluene dioxygenase,

catechol-2,3-dioxygenase, biphenyl dioxygenase, xylene dioxygenase, pyrene dioxygenase)를 검출할 수 있는 probe 기반의 DNA microarray를 제작하고 이를 이용하여 오염토양 환경 내에 유류 분해 유전자를 검출하고 발현 수준(Expression Profile)을 측정함으로써 신속하고 정확하게 오염토양의 생물학적 환경복원(Bioremediation) 가능성을 진단할 수 있는 DNA microarray 기술의 적용 및 활용성을 고찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 토양 시료 채취

토양 시료 채취는 강원도 OO시에 위치한 부지로 디젤 저장탱크의 누출 사고로 오랜 기간 디젤에 오염된 토양을 토양시료 채취 장비인 Groprobe(M540)을 사용하여 채취하였다.

2.2. 유류 분해 관련 유전자 검출 probe의 설계

유류 분해 유전자 검출 및 Bioremediation 가능성 진단에 사용된 기반 DNA probe의 설계는 UM-BBD (University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database, <http://umbbd.ahc.umn.edu/>)의 오염물질 생물학적 분해 경로와 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)의 Gen-Bank database 검색을 통한 유전자 정보를 활용하였다(Rhee et al., 2004).

유류 분해능을 가지는 세균에서만 혼성화 반응이 가능하도록 석유계 탄화수소 기원 물질 분해에 관련된 7종의 주요 대사유전자(alkane hydrolase, naphthalene dioxygenase, toluene dioxygenase, catechol-2,3-dioxygenase, biphenyl dioxygenase, xylene dioxygenase, pyrene dioxygenase)를 표적으로 하여 그룹별로 세분화시킨 15종의 oligonucleotide probe를 합성하였다(Table 1). 각각의 probe는 다양한 세균으로부터 획득한 유류 분해 대사 유전자별 염기서열을 바탕으로 DNASIS MAX Program(HITACHI, MiraiBio Inc.)을 이용하여 유전자 multiple alignment 및 probe 디자인을 실시하여 제작하였다. 또한 실험의 정확성과 신뢰도를 높이기 위하여 positive control probe와 probe가 부착되지 않은 negative control을 첨가하였다. probe의 염기서열 및 특징은 Table 1에 제시하였다.

2.3. DNA Microarray의 제작

합성된 Oligomer(마크로젠)에 100% DMSO 용액을 첨가하여 최종 50 μ M로 준비한 후 UltraGAPS slides

Table 1. Biodegradation Gene probe sequences

No.	Probe	Sequence(5'-3')	Target gene
1	<i>alkB1</i>	TCTGGCTTTGGCCGGCTACTCCGATGATCGGAATCTGGGGATTTT	Alkane hydrolase
2	<i>alkB2</i>	TCGGAATCTGGCTTGCAAATGAACTGGTTGGGGGATTTTTATG	Alkane hydrolase
3	<i>todC1</i>	CTGGAACACCACTGGCGAGATAGAAGCGCTCTTGTGACGAGCATG	Toluene dioxygenase
4	<i>tmoA</i>	TGGACACCTAGCTATGTTACCGAAGAGCAGCTTTTCCCAGAGCGG	Toluene 4-monooxygenase
5	<i>tol</i>	GTCAAAGATGCGATAAAGATTGAGGCTGAACTTTACGTAGAAAA	Xylene monooxygenase
6	<i>xylE</i>	CAGTTTCTCAGTCTGTCGACCAAGGCCACGACGTGGCCTTATCC	Catechol 2,3-dioxygenase
7	<i>ndoB</i>	CACTCATGATAGAATGATTCCTGCCCCCGGCGACTATGTTACCGC	Naphthalene dioxygenase
8	<i>nahAc</i>	CCAAAAGCACCTGATTCATGGCGATGAAGAACTTTTCCAACATAC	Naphthalene 1,2-dioxygenase
9	<i>phnAc</i>	TTGAGCTGGAATGTGAGCGCATCTTCGCGCGCTGCTGGCTTTTT	Naphthalene dioxygenase
10	<i>bph</i>	GCCAAGGCTTTCACCTGCAGCTACCACGGCTGGGCTACGACATCG	Biphenyl dioxygenase
11	<i>bph1</i>	ATGCCCTACATGGACGTGATGCTCGATCGACCGAGGCGGAACC	Biphenyl dioxygenase
12	<i>bph2</i>	GACCTACCTCGGTGACGCCCGCCCTATATGGACGTCATGCTGGA	Biphenyl dioxygenase
13	<i>bph3</i>	GGCGTCTCTGTTCCGACCGGGAGAACGGCAGGATCGATCCGCAGAT	Biphenyl dioxygenase
14	<i>Bph4</i>	CTGTTGGGTACGAGACGCAAATCCCGAAGGCCGCGACTTCATG	Biphenyl dioxygenase
15	<i>nidA</i>	GGAGCGGATCTTCGGGCGCGCTGGGTGTTTCTCGGACACGAGTC	Pyrene dioxygenase (PAH ring-hydroxylating)
16	<i>PC</i>	CAGATTGAAAGCAACCTGCAACGTATTGAGCGCAAGAA	Positive control
17	<i>NC</i>		Negative control(blank)
18	<i>zmo</i>	ATCCTGCCCGATTTTGAAAATTATGAATAATACCGCGTTTTAGGGCGG	bacteria 대사 관련 유전자 (reference probe)

(Corning Inc.)에 probe를 microarrayer(Generation III spotter & Gen III spotter set, Amersham; Cat # MD0 231-302)를 이용하여 부착시켰다. DNA칩 상에는 석유계 탄화수소 기원 물질 분해에 관련된 7종의 주요 대사유전자 진단용 probe를 Fig. 2(A)에서 나타난 바와 같이 배열하였다.

유류 물질 alkane 및 toluene 등의 분해에 관련된 유전자(alkane hydroxylase, toluene dioxygenase)를 가지는 표준 균주, *Pseudomonas aeruginosa* KCTC 1636 및 오염 토양 시료의 유류분해 유전자의 발현정도를 분석하기 위하여 유류 오염 토양 및 표준 균주에서 total RNA를 분리하였다. 표준 균주는 diesel이 0.1% 첨가된 LB배지에서 37°C, 24시간 동안 배양한 후 RNeasy kit (Qiagen, USA)를 이용하여 총 RNA를 추출하였으며 유류 오염 토양시료의 총 RNA는 RNeasy kit(Qiagen, USA)를 이용하여 6 µg/µl 이상 되게 직접 추출하였다. 추출된 RNA의 정량은 UV/vis 분광광도계를 이용하여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고, OD 260/280 값으로부터 순도를 확인하였으며 probe 제작 전까지 RNase free solution에 녹아 있는 상태로 -70°C에서 보관하였다.

형광 표지된 cDNA 주형 합성은 역전사 반응을 통하여 준비하였다. 표준 균주 시료로부터 분리된 총 RNA들은 Cy3(Green)로 형광표지 하였으며, 오염 토양시료로부터 추출한 총 RNA는 실험의 재현성과 신뢰도를 높이기 위하여 동일한 시료를 Cy3(Green)와 Cy5(Red)로 각각 형광 표지하였다. 먼저, 10 µg의 총 RNA, 10 µg Random hexamer primer를 이용하여 65°C에서 10분간 반응하고 얼음에서 1분 정도 방치한 후 1 µl 25 mM dNTPs, 3 µl 0.1 M DTT, 6 µl 5×first-stand buffer, 3 µl 1 mM Cy3-dUTP 또는 Cy5-dUTP, 2 µl Superscript II reverse transcriptase (Gibo-BRL, 200 U/µl) enzyme을 첨가하여 42°C에서 2시간 동안 반응시켰다.

합성된 cDNA 주형을 정제하기 위하여 각각의 tube에 1 N NaOH 10 µl을 첨가하고 37°C에서 10분간 배양한 후 1 M Tris-HCl 25 µl을 첨가하여 Chromaspin 컬럼에 넣고 1,300×g에서 3분 동안 원심 분리하였다. Buffer가 제거된 컬럼을 새 1.5 mL 튜브에 넣고, 1,300×g에서 5분간 원심분리 한 다음 300 µl의 100% 에탄올과 10 µl의 3 M NaOAc를 첨가한 후, -70°C에 30분 동안 두었다. 12,000 rpm로 20분 동안 원심 분리하고, 에탄올을

제거한 후 70% 에탄올 1 mL를 다시 첨가하고 원심 분리한 후 에탄올을 제거하여 hybridization에 사용하였다.

DNA chip 위에 준비된 pre-hybridization buffer($4\times$ SSC, 0.5% SDS, 0.5% BSA) 15 μ l를 넣고 cover glass로 덮어 42°C 에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 $2\times$ SSC에서 2분 동안 씻어주고, $0.2\times$ SSC에서 2분간 세정하였다.

Hybridization을 위하여 정제된 cDNA 주형을 95°C 에 2분간 끓인 후 곧바로 얼음에 놓고, $15,000\times g$ 에서 8분 동안 원심 분리하였다. 준비된 15 μ l cDNA 주형을 넣고 cover glass를 덮은 후 $2\times$ SSC 600 μ l로 적신 50 ml 튜브에 넣어 42°C hybridization incubator에서 12시간 동안 hybridization 시켰다. 세척액 I($2\times$ SSC/0.2% SDS)로 58°C 에서 5분 세척하고, 세척액 II($1\times$ SSC)에서 5분간 한 후 마지막으로 세척액 III($0.5\times$ SSC)로 5분간 반응하여 세척하였다.

Microarray scanner(Genetic MicroSystems, GMS 418 Array Scanner)를 이용하여 ImaGene 3.0으로 DNA Chip을 green과 red 파장으로 스캔하여 각각의 이미지를 저장하고 유전자의 발현양상을 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. probe design

석유계 탄화수소 기원 물질 분해에 관련된 7종의 주요 대사유전자 alkane hydrolase(2 probe), naphthalene dioxygenase(3 probe), toluene dioxygenase(2 probe), catechol-2,3-dioxygenase(1 probe), biphenyl dioxygenase(5 probe), xylene dioxygenase(1 probe), pyrene dioxygenase(1 probe)를 표적으로 하여 그룹별로 세분화시킨 15종의 oligonucleotide probe를 합성하였다(Table 1). 각각의 probe는 100여종의 세균으로부터 획득한 유류 분해 대사 유전자의 염기서열을 바탕으로 유전자 multiple alignment를 실시하여 제작하였다. 기존에 Rhee et al.(2004)은 다양한 석유계 탄화수소 기원물질의 분해와 생물학적 전환 그리고 중금속 환원에 관련된 2,402의 유전자 서열로부터 1,662개의 다양한 probe를 제작하였다. 하지만 대다수의 probe(68%)는 각각의 유전자에 특이적인 probe이며 group 특이적 probe는 30% 미만이었다. 본 연구에서 디자인된 15종의 probe는 석유계 탄화수소 기원 물질 분해에 관련된 7종의 주요 대사유전자를 대상으로 group 특이적 probe를 제작하였기 때문에 환경 내에 존재하는 특정유전자의 group 특이적 진단을 용이하게 할 수 있다.

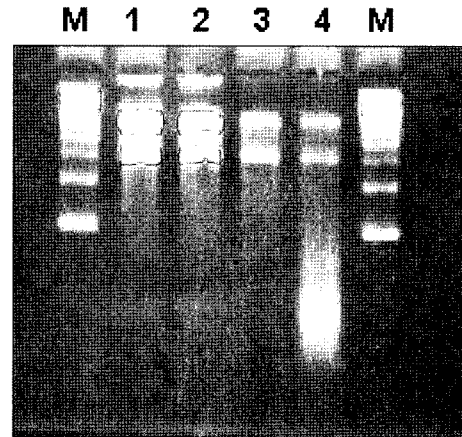


Fig. 1. Total RNA extracted from positive control bacteria and oil-contaminated soil (M: RNA Markers 0.5-9 kbp, 1, 2: *Pseudomonas aeruginosa* KCTC1636, 3,4: oil-contaminated soil).

Hybridization시 높은 해상력을 제공하기위하여 Rhee et al.(2004)이 제시한 50-mer의 probe로 제작하였으며 실험의 정확성과 신뢰도를 높이기 위하여 하나의 칩에 동일한 probe를 3개씩 spotting 하였다(Fig. 2).

3.2. Target RNA 분리

환경시료의 경우 DNA/RNA 농도가 낮고 추출 후에도 순도가 낮으므로, 충분한 labeling reaction이 가능하도록 microarray hybridization 기준에 적합한 DNA/RNA를 얻는 방법이 필요하다(조재창, 2001). Fig. 1은 추출된 RNA의 전기영동결과이다. 모든 시료에서 추가적인 DNA chip 실험 진행이 가능한 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 이상의 총 RNA 농도와 1.8 이상의 순도를 나타내었다.

3.3. Oligonucleotide microarray 분석 결과

Microarray의 검출 특이성을 확인하기위하여 유류 분해 능이 있는 단일종류의 표준균주를 사용하였다. Fig. 2(b)는 유류분해 표준 균주로부터 추출된 총 RNA를 cDNA 역전사하고, 이를 microarray와 hybridization하여 probe들과의 특이적 hybridization 반응을 스캐너로 분석한 결과이다. 분석결과 alkane hydrolase, toluene dioxygenase probe에서만 특이적으로 hybridization이 일어났으며 alkane hydrolase probe와의 반응이 높게 나타났다는 것을 확인하였다. 연구에 사용된 *Pseudomonas aeruginosa* KCTC1636 균주는 alkane hydrolase 및 toluene dioxygenase 유전자를 발현하는 표준 균주로 알려져 있는데 실험 결과 알려진 것과 동일한 유전자 발현 양상이 나타났으며, 이러한 결과는 디자인된 probe들이 상보

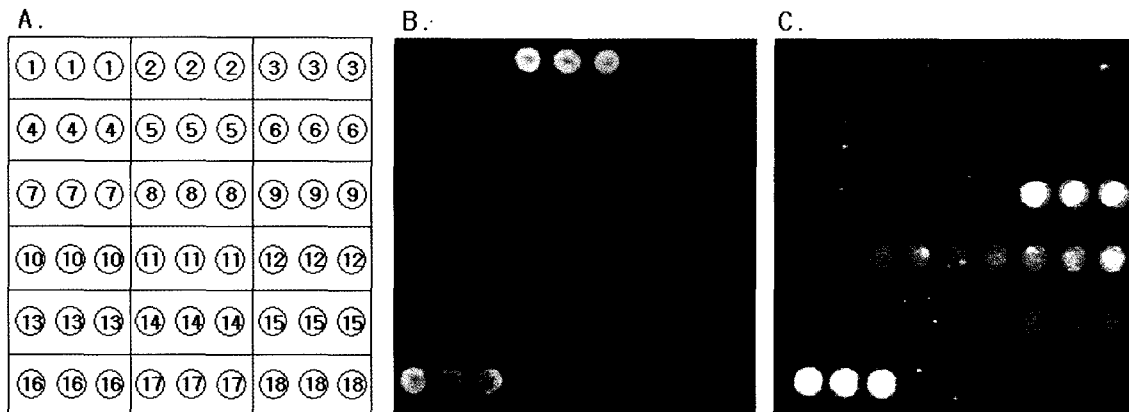


Fig. 2. (A) Schematic diagram showing the positions of the immobilized probes in glass slides. The number of schematic diagram correspond to probe number in Table 1. (B) Fluorescence image showing probe hybridized with total RNAs(cDNA) extracted from standard strain *Pseudomonas aeruginosa* KCTC1636. (C) Fluorescence image showing probe hybridized with total RNAs(cDNA) extracted from oil-contaminated soil.

적인 target gene과 특이적으로 결합한다는 것을 나타내고 있다.

Fig. 2(c)는 환경중의 유류로 오염된 토양 시료의 효소 유전자 발현을 검출하기 위한 각 probe들의 특이적 hybridization 반응의 결과를 스캐너로 분석한 그림이다. 실험의 재현성과 신뢰도를 높이기 위하여 Cy3와 Cy5로 각각 labeling한 시료를 hybridization하고 스캔한 이미지를 overlapping하여 분석하였다. 일반적으로 DNA chip 내에서 hybridization signal(fluorescence intensity)은 유전자 발현량과 밀접한 관계를 가지고 있다. 즉 fluorescence intensity가 높을수록 probe와 유전자간의 hybridization yield가 높은 것이며, 이는 특정 유전자의 발현 정도가 높다는 것을 의미한다. 시료의 분석 결과 alkane hydrolase, naphthalene dioxygenase, biphenyl dioxygenase, pyrene dioxygenase(PAH ring-hydroxylating) 관련 유전자의 발현을 확인 하였으며 toluene, xylene 분해 유전자 및 catechol-2,3-dioxygenase 유전자의 발현은 나타나지 않았다. 발현의 정도를 확인한 결과 naphthalene dioxygenase 가장 높은 fluorescence intensity를 나타내었으며, alkane hydrolase가 미약한 발현정도를 나타내었다. 이러한 분석 결과는 연구대상지역의 생물학적 복원시 toluene 및 xylene, alkane 분해에 관련된 미생물 및 효소가 포함된 미생물 처리제를 사용하는 것이 효과적이라는 것을 나타내고 있다.

따라서 분해 유전자의 발현 양상 및 발현 정도는 오염 토양의 생물학적 복원(Bioremediation)의 기초 자료로 활용이 될 뿐만 아니라 토양 환경의 monitoring에도 적용이 가능할 것으로 판단된다.

3.4. DNA microarray를 이용한 토양 환경 진단 및 생물학적 오염복원모니터링의 가능성 평가

이상과 같이, 본 연구에서는 DNA microarray를 이용하여 유류 오염 토양 환경에서 석유계 탄화수소 기원 물질 분해에 관련된 주요 대사유전자를 진단하였다. DNA microarray는 소량의 시료로부터 유전자 발현(gene expression)을 통해 오염토양의 생물학적 복원가능성을 진단할 수 있었으며 검사시간과 비용면에서도 매우 경제적 진단 방법이라 할 수 있다. 또한 본 연구에서 사용된 DNA microarray의 경우 기존의 동정용 DNA microarray가 미생물의 존재 유무만을 진단할 수 있는 것과는 달리 메신저 RNA(mRNA)를 표적으로 하기 때문에 유류분해 관여 유전자의 유무뿐만이 아니라 발현정도를 정확하게 정량적으로 측정함으로써 유류 오염 토양의 생물학적 복원가능성 진단 및 모니터링에 보다 간편하고 효과적으로 사용될 수 있다. 실제로 유류분해 관여하는 미생물의 분리 및 효소의 정성, 정량을 위해서는 매우 복잡한 과정과 많은 시간을 요하며, 특히 효소물질은 온도 및 습도와 같은 환경 조건에 대한 안정성이 낮으므로 환경시료에서의 분해효소를 모니터링 하는 것은 전통적인 방법으로는 거의 불가능하였다. 따라서 본 연구에서처럼 bioremediation에서 주요 기능을 담당하고 있는 유전자들로 DNA microarray를 제작할 경우에는 환경 기능적 유전자 분석(environmental functional gene array)로서의 기능뿐만 아니라 bioremediation을 수행하기에 앞서서 biostimulation이나 bioaugmentation 등과 같은 처리 방법의 선택에 관한 판단(조재창, 2001)에 큰 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

Rhee et al., (2004)은 그의 논문에서 DNA microarray

기술은 오염 환경 내에 미생물 군집구조와 분해유전자의 다양성을 규명하는 특이적이고 감도가 우수한 정량적 측정 방법으로서의 가능성을 가지고 있지만, 다양한 오염 환경 시료로부터 기능적 유전자 array(functional gene array, FGA)의 성능 평가에 대한 추가적인 연구가 더욱 필요하다고 언급하고 있다.

따라서 보다 정확한 환경적 분석 및 진단의 범용성 연구를 위하여 보다 많은 미생물 및 분해관련유전자의 database 확보와 함께, 현재의 전통적인 hybridization 기법을 대체할 신속한 진단 방법에 관한 연구가 선행되어야 할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

- 조재창, 2001, Environmental Genomics; Application of DNA Microarray Technology to Environmental Microbiology, 생물산업, **14**(2), 24-30.
- Call, D., Chandler, D., and Brockman, F., 2001, Fabrication of DNA microarrays using unmodified oligonucleotide probes, *BioTechniques*, **30**, 368-379.
- Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.-H., and Wagner, M., 2002, Oligonucleotide microarray for 16S rRNA-based detections of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5064-5081.
- Rhee, S.K., Liu, X., Wu, L., Chong, S.C., Wan, X., and Zhou, J., 2004, Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4303-4317.
- Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M., and Chandler, D. P., 2001, Direct detection of 16S rRNA in soil extracts by using oligonucleotide microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4708-4716.
- Stapleton R.D., Steven R, Luis J, Sung C.K., James, T.F., Igrid, R.G., and Gray, S.S., 1998, Nucleic acid analytical approaches in bioremediation: site assessment and characterization. *J. Microbiol. Methods*. **32**, 165-178.
- Valinsky, L., Vedova, G.D., Scupham, A.J., Figueroa, A., Yin, B., Hartin, R.J., Chroback, M., Crowley, D.E., Jiang, T., and Borneman, J., 2002, Analysis of bacterial community composition by oligonucleotide fingerprinting of rRNA genes, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 3243-3250.
- Wu, L.Y., Thompson, D.K., Li, G., Hurt, R.A., Tiedje, J.M., and Zhou, J., 2001, Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 5780-5790.