

주요 오염물질로 오염된 지하수에서 미생물의 무배양식 군집분석방법과 미생물상에 대한 조사방법 연구

김재수*

이화여자대학교 환경학과

Culture-Independent Methods of Microbial Community Structure Analysis and Microbial Diversity in Contaminated Groundwater with Major Pollutants

Jaisoo Kim*

Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University

ABSTRACT

This review inquired the recently applied molecular biological and biochemical methods analyzing the microbial community structure of groundwater and, as a result, summarized the functional or taxonomic groups of active microorganisms with major contaminants in groundwater. The development of gene amplification through PCR has been possible to figure out microbial population and identification. Active microbial community structures have been analyzed using a variety of fingerprinting techniques such as DGGE, SSCP, RISA, and microarray and fatty acid analyses such as PLFA and FAME, and the activity of a specific strain has been examined using FISH. Also, this review included the dominant microflora in groundwater contaminated with fuel components such as *n*-alkanes, BTEX, MTBE, and ethanol and chlorinated compounds such as TCE, PCE, PCB, CE, carbon tetrachloride, and chlorobenzene.

Key words : Culture-independent method, Microbial community structure, Groundwater, Pollutant, Fingerprinting technique

요약문

최근에 적용된 지하수 미생물의 군집구조를 밝히는 분자생물학적 및 생화학적 방법들에 대해서 알아보았고 그 결과로서 지하수의 주요 오염물질에 따른 활성화 된 미생물군집들이 무엇인지를 밝힌 연구논문들을 종합하여 정리하였다. PCR에 의한 유전자 증폭기술의 발달로 배양 없이 미생물 종류와 개체군을 파악할 수 있게 되었고 각종 fingerprinting 방법(DGGE, SSCP, RISA, microarray)과 지방산분석법(PLFA/FAME)을 이용하여 활성화 된 미생물군집구조를 분석하였으며 FISH 등의 방법으로 특정균의 활성도를 알아본 사례들을 조사하였다. 대표적인 지하수오염물질인 유류성분(*n*-alkanes, BTEX, MTBE, ethanol)과 염소계 용매(TCE, PCE, PCB, CE, carbon tetrachloride, chlorobenzene) 등으로 오염되었을 때 우점하는 지하수 미생물상에 대해 보고 된 내용을 포함하였다.

주제어 : 무배양식, 미생물 군집구조, 지하수, 오염물질, 유전자 지문감식기술

1. 서론

미생물 군집의 다양성은 배양과 분리라는 전통적인 방

법에 의해 오랫동안 조사되어 왔고, 이러한 방법은 너무 선택적이라서 미생물 군집의 크기를 파악할 수 없었다. 배양된 미생물의 비율은 약 0.1%이며 총미생물수의 약

*Corresponding author : jkimtama@ewha.ac.kr

원고접수일 : 2006. 4. 13 게재승인일 : 2006. 6. 12

질의 및 토의 : 2006. 8. 31 까지

Table 1. Terminal electron accepting processes for toluene oxidation

Microbial	process	Degradation reactions for toluene (C ₇ H ₈)*
↓ Decreasing Energy Yield	Aerobic degradation	$C_7H_8 + 9O_2 \Rightarrow 7CO_2 + 4H_2O$
	Denitrification	$5C_7H_8 + 36NO_3^- + H^+ \Rightarrow 35HCO_3^- + 3H_2O + 18N_2$
	Manganese (IV) reduction	$C_7H_8 + 18MnO_2 + 29H^+ \Rightarrow 7HCO_3^- + 18Mn^{2+} + 15H_2O$
	Fe (III) reduction	$C_7H_8 + 36FeOOH + 65H^+ \Rightarrow 7HCO_3^- + 36Fe^{2+} + 51H_2O$
	Sulphate reduction	$2C_7H_8 + 9SO_4^{2-} + 6H_2O \Rightarrow 14HCO_3^- + 5H_2S + 4HS^-$
	Methanogenesis	$2C_7H_8 + 10H_2O \Rightarrow 5CO_2 + 9CH_4$

* : Electron acceptors are shown in bold.

10% 정도로 추정된다(Aman et al., 1995). 그러므로 전통적인 방법에 의해 얻은 자료들은 미생물군집의 실제적인 구성요소를 대변하지 못한다. 최근에 분자생물학의 발달로 세균의 분리와 배양이 더 이상 필요하지 않게 되었고 그 전까지의 전통적인 방법으로 인해 발생된 오류를 줄일 수 있게 되었다. 최근의 분자생물학적 방법들은 1) 지하수서식 균세포의 용해, 2) 유전자의 추출, 3) 특정 부분 또는 전부의 염기서열 분석의 과정을 거친다.

지하수에는 다양한 미생물이 살고 있으나 물리화학적 특성이나 오염물질의 종류에 따라 우점하는 미생물종이 다양하게 나타난다. 특히 같은 오염물질이라도 전자수용체의 이용가능성에 의해 크게 좌우하는데 여러 개가 동시에 존재하는 경우 대개 에너지발생효율에 따라 우점종이 결정된다(Table 1). 이러한 미생물상의 변화는 무배양적 기법을 통해 실제로 밝혀서 오염물질별로 그리고 환경적 요인별로 활성화된 미생물의 군집구조의 분석이 가능하여 여러 가지 기본적인 정보를 얻을 수 있고 더 나아가 실제 오염현장의 이해를 통한 생물학적 정화에도 기여할 것이다.

본 연구의 목표는 다양한 지하수환경에 서식하는 미생물의 생태적 분석을 위한 최근의 분자생물학적 또는 생화학적인 기법들을 소개하며 각 기법들의 장단점을 제시하고 오염물질별 주요 서식 미생물들을 소개함으로써 이 분야에 관심 있는 연구자들에게 도움을 주는 것이다.

2. 본 론

2.1. 환경시료에 일반적으로 많이 쓰이는 무배양적 (culture-independent) 방법

그 동안 토양 미생물과 마찬가지로 지하수에 서식하는 미생물 중 극히 일부인 매우 적은 비율만이 전통적인 배

양방법에 의해 특성이 파악이 되어왔지만(Aman et al., 1995) 분자생물학적 기법이나 지방산분석법 등의 발달로 배양여부를 떠나서 실제 자연상태거나 현장에서의 배양이 까다로운 미생물을 포함한 미생물 군집의 구조분석이 가능하게 되었다.

환경시료로부터 직접 DNA를 추출하여 미생물 군집구조를 분석할 수 있는 분자생물학적 기법에는 크게 두 가지 유형으로 나뉜다. 첫 번째는 부분 DNA 염기서열분석으로 PCR에 의한 어느 특정 부분의 유전자 염기서열을 증폭하여 조사하는 방법이고, 두 번째는 전체 DNA 염기서열 분석방법으로 추출된 DNA의 전체 유전정보를 이용하여 분석하는 분자생물학적 방식이다(Ranjard et al., 2000).

부분 염기서열 분석방법에는 PCR을 통한 부분 염기서열의 cloning 후에 RFLP(restriction fragment length polymorphism)와 염기서열 분석을 연계하는 분석방법으로서 미생물종들의 수와 이들 종들의 상대적 군집크기 등을 파악하는데 유용한 방법이고, 또 하나는 유전자 fingerprint 방법으로 미생물 군집의 유전적 구조의 전체그림을 나타낸다. 후자는 증폭된 염기서열의 다양성을 분석하기 위한 두 가지 전기영동의 기본 원리가 적용되는데 하나는 염기서열의 크기에 의해 두 번째는 염기서열의 차이에 의해 분석된다. 염기서열의 크기로 분석하는 방법들은 ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis), T-RFLP (terminal RFLP), RISA(ribosomal intergenic spacer analysis) 그리고 RAPD(random amplified polymorphic DNA)가 있고 염기서열의 차이에 의한 분석방법에는 DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)와 TGGE(temperature gradient gel electrophoresis) 그리고 SSCP(single-strand conformation polymorphism)가 있다.

ARDRA는 제한효소를 사용하여 PCR에서 증폭된 16S

rDNA를 절단한 후 agarose나 polyacrylamide gel 상에서 잘라진 절편들의 분리를 통해 여러 환경조건하에서 미생물 군집구조의 변화를 분석할 수 있다(Ranjard et al., 2000). T-RFLP는 ARDRA의 변형된 유형으로 fluorochrome-labelled primer를 사용하여 16S rDNA의 말단절편을 분석하는 방법으로 한 개의 말단제한효소로 군집 내의 많은 미생물종들의 윤곽을 확인하는데 유용하다(Marsh, 2000). RISA는 16S rDNA와 IGS(intergenic spacer) 사이의 spacer의 길이 차이를 분석함으로써 서로 다른 종임을 구별할 수 있고 계속해서 band의 염기서열까지 분석하면 군집 내 특별한 개체군의 분류학적 동정도 가능하다(Ranjard et al., 2000). RAPD는 short random primer (약 10 bp)들을 사용하여 genomic DNA의 여러 곳으로부터 여러 가지 길이의 PCR 산물들을 합성해 유사하게 복잡한 게놈들 간의 차이를 구별할 수 있다(Hadrys et al., 1992). DGGE와 TGGE는 일정 primer set을 사용하여 PCR을 통해 증폭된 절편들을 분리하는 것으로써 크기는 같지만 염기서열이 다르므로 중간에 다른 band 위치를 보여준다. DGGE는 urea나 formamide와 같은 화학물질의 농도구배로 분리되지만, TGGE는 온도구배에 의해 절편이 분리되는 것이 다르다(Hadrys et al., 1992; Felske and Akkermans, 1998; Muyzer et al., 1993). SSCP는 PCR 증폭 후 변성과정을 거친 단일가닥 DNA 절편을 nondenaturing polyacrylamide gel에 전기영동 시키면 염기서열에 따라 분리된다. 원리는 다른 염기서열을 가진 PCR 절편의 가닥들이 다른 모양으로 접혀 이동률이 달라지기 때문이며 각 band는 autoradiograph를 통해 확인한다(Sunnucks and Wilson, 2000).

전체 DNA 염기서열방법에는 DNA 추출과 정제 과정을 포함한 한 시료의 DNA를 다른 시료의 것과 cross-hybridization을 통해 군집간의 유사성을 알아보는 방법(Lee and Furhman, 1990)과 원핵생물은 DNA의 G+C 양이 다르다는 점을 이용한 %G+C 분석법이 가장 일반적으로 사용된다(Ranjard et al., 2000).

그 외에 DNA와 RNA에 직접 형광물질을 가진 probe를 붙여 특정 미생물 집단을 검출하는 FISH(fluorescence in situ hybridization) 방법과, 수백 개 또는 수천 개의 유전자를 slide glass상에 고정시켜, 알고자하는 환경에서 추출한 DNA를 증폭시켜 형광물질을 붙인 후, 유전자의 발현변화를 보는 microarray 방법이 있다.

유전자 이외의 생화학적 분자구조의 분석을 통해 미생물군집구조를 비교한 방법이 지방산분석법이다. 이 방법은 지금까지 토양, 침전물, 물에서 추출된 인지질지방산

(phospholipid fatty acid, PLFA)이나 지방산 메틸에스터(fatty acid methyl esters, FAME)를 분석하여 미생물군집구조와 다양한 환경에서의 차이점 등을 평가하는데 사용되어졌다(White et al., 1998; Bossio and Scow, 1998; von Keitz et al., 1999; Peacock et al., 2004; Cavigelli et al., 1995; Ibekwe and Fennedy, 1988; Glucksman et al., 2000).

Table 2는 각종 배양 및 무배양적 방법들(분자생물학적 및 기타 분석방법)의 장단점을 비교하여 나타내었다.

2.1.1. 지하수 미생물상 분석에 적용된 분자생물학적 기법
유전자를 이용한 분자생물학적 기법은 생분해과정에 관여하는 특별 미생물의 개체군을 파악하는데 강력한 도구로 사용되어진다(Purohit et al., 2003; Eysers et al., 2004). 예를 들자면 16S rDNA이나 reductase gene의 분석과 같은 방법을 이용하여 석유로 오염된 대수층에서 황 환원세균의 개체군을 파악하거나(Kleikemper et al., 2002), PCE나 TCE로부터 ethene까지 완전한 생물학적 분해가 이루어졌는지를 알기 위한 *Dehalococcoides*의 개체군을 파악하는데 매우 유용하다(Smidt and de Vos, 2004). 또한 감도가 높고 16S rRNA나 functional gene sequences의 복제수를 셀 수 있는 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR) 방법으로 MTBE 분해 세균 PM1(Smith et al., 2005)이나 TCE 분해 세균인 *Methylocystis*(Kikuchi et al., 2002) 등의 개체수를 세는 데 사용되어 왔다.

DNA fingerprinting 방법과 clone library construction 방법은 자연저감(natural attenuation)과 향상된 생물정화기술(enhanced bioremediation)의 적용과정 동안의 미생물군집반응을 나타낸다. Amplified rDNA 분석방법과 DGGE 방법은 대수층의 지구화학적 특징이나 우점하는 전자수용체의 특성 등에 따른 미생물 군집의 유형을 나타내는데 사용된다(Haack et al., 2004). 또한 DGGE 분석은 염기서열 분석과 병행하여 미생물 군집의 계통발생적 다양성을 측정하는데 사용된다. 예로써 BTEX로 오염된 지하수(Cavalca et al., 2004), BTEX와 MTBE로 오염된 지하수(Feris et al., 2004) 또는 매립지 침출수로 오염된 지하수(Röling et al., 2001) 등의 군집구조의 차이점을 파악할 수 있다. SSCP 분석방법은 chlorinated benzene으로 오염된 지하수의 생물활성법(biostimulation)과 미생물첨가법(bioaugmentation)의 효과를 비교하기 위해 사용되었고(Wenderoth et al., 2003), PCR-DNA clone library와 병행하여 BTEX로 오염된 토양에서 촉매 유전자의 다양

Table 2. Advantages and disadvantages of methods to study microbial diversity

Method	Advantage	Disadvantage
Plate count	<ul style="list-style-type: none"> - fast in process - inexpensive 	<ul style="list-style-type: none"> - not detectable for unculturable microorganisms
Sole carbon utilization	<ul style="list-style-type: none"> - fast in process - relatively inexpensive - differentiable between microbial communities 	<ul style="list-style-type: none"> - not detectable for organisms not capable of using available carbon sources
PLFA/FAME	<ul style="list-style-type: none"> - culture free - direct extraction from samples 	<ul style="list-style-type: none"> - Influence by external factors
G + C content	<ul style="list-style-type: none"> - detectable for even rare members in a community - to provide community structure and relative abundance 	<ul style="list-style-type: none"> - requirement of large DNA quantities - low level of taxon resolution
Nucleic acid reassociation and hybridization	<ul style="list-style-type: none"> - able to examine total DNA - able to study <i>in situ</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - lack of sensitivity - requirement of sequences with high copy number
PCR/RFLP/sequencing	<ul style="list-style-type: none"> - to allow a fine identification of uncultured bacteria - informative for diversity, richness and evenness 	<ul style="list-style-type: none"> - time-consuming and cumbersome - very expensive equipment (sequencer) - bias due to PCR work
DNA microarray	<ul style="list-style-type: none"> - fast analysis of thousands of genes - comprehensive - flexible to any gene 	<ul style="list-style-type: none"> - expensive to perform - unknown significance of RNA - uncertain quality control
DGGE & TGGE	<ul style="list-style-type: none"> - analysis of a large number of samples - to provide community structure and relative abundance - informative for the structure of active bacterial populations through RT-PCR - possible for taxonomic identification - easy to perform - less time-consuming 	<ul style="list-style-type: none"> - sensitive by sample handling - possible more than one stable form of ssDNA - detectable for only most abundant species - not able to separate amplicons harboring different sequences - formation of chimaeric sequences - differential PCR - not efficient separation beyond 500 base pairs - to migrate at the same position with two different sequences
ARDRA	<ul style="list-style-type: none"> - able to detect structural changes in microbial community - convenience (no more development) - easy to perform - less time-consuming 	<ul style="list-style-type: none"> - choice of suitable restriction enzymes - not always possible to make good resolution for high molecular fragments - formation of chimaeric sequences - differential PCR
T-RFLP	<ul style="list-style-type: none"> - able to detect only the terminal fragments - easy to perform - less time-consuming 	<ul style="list-style-type: none"> - formation of chimaeric sequences - differential PCR
RISA	<ul style="list-style-type: none"> - to provide a finer taxonomic identification - easy to perform - less time-consuming 	<ul style="list-style-type: none"> - not enough information on IGS sequence databank - not always possible to make good resolution for high molecular fragments - formation of chimaeric sequences - differential PCR
RAPD	<ul style="list-style-type: none"> - rapid and sensitive for revealing differences between similar complex genomes - easy to perform - less time-consuming 	<ul style="list-style-type: none"> - lack of reproducibility - not able to provide phylogenetic information - formation of chimaeric sequences - differential PCR

성을 파악하는데 사용되었다(Junca and Pieper, 2004). FISH는 주로 동일한 균을 동정하는데 사용하며 DGGE와

결합하여 자연저감이 진행되는 지하수에서 황환원세균의 우점도와 다양성을 나타내는데 사용되었고(Kleikemper et

Table 3. Anaerobic bacteria existing in various environments including groundwaters

Phylogenetic Group		Species	
Methanogens	Euryarchaeotes	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ¹⁾	
		<i>Methanobrevibacter arboriphilicus</i> ¹⁾	
		<i>Methanococcus voltae</i> ¹⁾	
		<i>Methanococcus termolithotrophicus</i> ¹⁾	
		<i>Methanosarcina barkeri</i> ¹⁾	
Sulfate-reducers	Euryarchaeotes	<i>Archaeoglobus</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulfoarculus</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulfobacter</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulfobacterium</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulfobotulus</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulfobulbus</i> sp. ^{3,4)}	
		<i>Desulfocapsa</i> sp. ³⁾	
		<i>Desulfococcus</i> sp. ^{3,4)}	
		<i>Desulfomicrobium</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulfomonile</i> sp. ⁴⁾	
	δ -Proteobacteria	<i>Desulfonema</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulforhopalus</i> sp. ³⁾	
		<i>Desulfosarcina</i> sp. ^{3,4)}	
		<i>Desulfotomaculum</i> sp. ⁴⁾	
		<i>Desulfovibrio</i> sp. ⁴⁾	
Thermodesulfobacteria	<i>Thermodesulfobacterium</i> sp. ⁴⁾		
Crenarchaeota	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> ⁶⁾		
Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. ⁵⁾		
	<i>Clostridium</i> sp. ⁶⁾		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ⁵⁾		
	β -Proteobacteria	<i>Rhodferax ferrireducens</i> ⁷⁾	
		<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> ⁶⁾	
		<i>Thiobacillus thiooxidans</i> ⁶⁾	
	Fe(III)-reducers	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ⁵⁾
			<i>Acinetobacter johnsonii</i> ⁵⁾
			<i>Pseudomonas fluorescens</i> ⁵⁾
			<i>Pseudomonas</i> sp. ^{5,6)}
<i>Shewanella putrefaciens</i> ^{5,6)}			
δ -Proteobacteria		<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> ⁵⁾	
		<i>Desulfovibrio</i> sp. ⁶⁾	
		<i>Desulfovibrio vulgaris</i> ⁶⁾	
		<i>Geobacter metallireducans</i> ^{6,7)}	
		<i>Geobacter</i> sp. ^{2,6)}	
Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp. ⁵⁾		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ⁵⁾		
	γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ⁵⁾	
		<i>Acinetobacter johnsonii</i> ⁵⁾	
		<i>Pseudomonas fluorescens</i> ⁵⁾	
		<i>Pseudomonas</i> sp. ^{5,6)}	
		<i>Shewanella putrefaciens</i> ^{5,6)}	
	δ -Proteobacteria	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> ^{5,6)}	
		<i>Geobacter metallireducans</i> ^{5,6)}	
		<i>Geobacter</i> sp. ²⁾	
Actinobacteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> ⁸⁾		
	<i>Corynebacterium efficiens</i> ⁸⁾		
	<i>Corynebacterium glutamicum</i> ⁸⁾		
	<i>Mycobacterium bovis</i> ⁷⁾		
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> ⁸⁾		
	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> ⁸⁾		
	<i>Streptomyces coelicolor</i> ⁸⁾		

Table 3. continued

	Crenarchaeotes	<i>Aeropyrum pernix</i> ⁸⁾ <i>Pyrogaculum aerophilum</i> ⁸⁾
	Euryarchaeotes	<i>Haloarcula marismortui</i> ⁸⁾
	Firmicutes	<i>Bacillus anthracis</i> ⁸⁾ <i>Bacillus cereus</i> ⁸⁾ <i>Bacillus licheniformis</i> ⁸⁾ <i>Bacillus stearothermophilus</i> ⁸⁾ <i>Bacillus subtilis</i> ⁸⁾ <i>Geobacillus stearothermophilus</i> ⁸⁾ <i>Lactobacillus plantarum</i> ⁸⁾ <i>Selenomonas ruminantium</i> ⁸⁾ <i>Staphylococcus aureus</i> ⁸⁾ <i>Staphylococcus carnosus</i> ⁸⁾ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ⁸⁾
	α -Proteobacteria	<i>Azospirillum brasilense</i> ⁸⁾ <i>Bradyrhizobium japonicum</i> ⁸⁾ <i>Brucella suis</i> ⁸⁾ <i>Brucella melitensis</i> ⁸⁾ <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> ⁸⁾ <i>Paracoccus denitrificans</i> ⁸⁾ <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ⁸⁾ <i>Sinorhizobium meliloti</i> ⁸⁾
Nitrate-reducers	β -Proteobacteria	<i>Azoarcus</i> sp. ²⁾ <i>Bordetella bronchiseptica</i> ⁸⁾ <i>Bordetella parapertussis</i> ⁸⁾ <i>Burkholderia cepacia</i> ⁸⁾ <i>Burkholderia fungorum</i> ⁸⁾ <i>Burkholderia pseudomalleri</i> ⁸⁾ <i>Chromobacterium violaceum</i> ⁸⁾ <i>Ralstonia metallisurans</i> ⁸⁾ <i>Ralstonia solanacearum</i> ⁸⁾ <i>Wautersia eutropha</i> ⁸⁾
	γ -Proteobacteria	<i>Actinobacillus actinocydetemcomitans</i> ⁸⁾ <i>Escherichia coli</i> ⁸⁾ <i>Haemophilus ducreyi</i> ⁸⁾ <i>Haemophilus influenzae</i> ⁸⁾ <i>Halomonas halodenitrificans</i> ⁸⁾ <i>Pasteurella multocida</i> ⁸⁾ <i>Photobacterium profundum</i> ⁸⁾ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁸⁾ <i>Pseudomonas fluorescens</i> ⁸⁾ <i>Psychrobacter</i> sp. ⁸⁾ <i>Salmonella enterica</i> ⁸⁾ <i>Salmonella typhi</i> ⁸⁾ <i>Salmonella typhimurium</i> ⁸⁾ <i>Shewanella oneidensis</i> ⁸⁾ <i>Shigella flexneri</i> ⁸⁾
	δ -Proteobacteria	<i>Geobacter metallireducans</i> ⁸⁾
	ϵ -Proteobacteria	<i>Campylobacter jejuni</i> ⁸⁾ <i>Helicobacter hepaticus</i> ⁸⁾ <i>Sulfurospirillum barnesii</i> ⁸⁾ <i>Wolinella succinogenes</i> ⁸⁾
	Thermus	<i>Thermus thermophilus</i> ⁸⁾

References: ¹⁾Klein and Schnorr, 1984; ²⁾Roling et al., 2000; ³⁾Knittel et al., 2003; ⁴⁾Widdel and Hansen, 1991; ⁵⁾Nealson and Saffarini, 1994; ⁶⁾Lovely, 1993; ⁷⁾Eriksson et al., 2005; ⁸⁾Philippot, 2005.

al., 2002; Zang et al., 2005), SSCP나 RISA 등과도 접목하여 사용되었다(Wenderoth et al., 2003; Zang et al., 2005). ITS(internal transcribed spacer) DNA fingerprinting은 오염물질의 오염체(plume)를 따라서 미생물 군집구조의 변화를 비교하기 위해(Feris et al., 2004) 그리고 RISA 역시 지하수처리 반응기의 생물막에서 미생물 군집 분석에 적용되었다(Zang et al., 2005). 마지막으로 microarray방법은 많이 사용되지는 않았지만, PAH와 BTEX로 오염된 지하수의 미생물 군집의 특성을 파악하는데 쓰였다(Rhee et al., 2004).

2.1.2. 지하수 미생물상 분석에 적용된 생화학적 기법

PLFA 분석방법은 석유로 오염된 지하수에서 미생물 군집구조의 변화를 검증하는데 사용되었으며(Fang and Barcelona, 1998; MacNaughton et al., 1999), 활성있는 미생물의 존재를 파악하는 데도 사용되었다(Rooney-Varga et al., 1999). 그리고 몇몇 연구들은 분자생물학적 기법과 접목하여 미생물 군집의 특성을 밝히는데 사용되었다(von Keitz et al., 1999; MacNaughton et al., 1999; Stephen et al., 1999; Pombo et al., 2002). 특히 최근에는 미생물 군집구조와 연계하여 미생물의 활성도를 파악하기 위해 방사성동위원소를 많이 사용한다(Pombo et al., 2002; Boschker et al., 2001; Boschker et al., 1998; Radajewski et al., 2000; Manefield et al., 2002; Pombo et al., 2005). FAME 분석방법은 지하수의 전체 미생물군집의 특성을 조사하기 위해(Glucksman et al., 2000), pentachlorophenol(PCP) 분해균들을 찾기 위해(Schmidt et al., 1999), 그리고 *Aeromonas* sp.에 속하는 다양한 균주를 밝히기 위해(Huys et al., 1995) 사용되었다. 이와 같이 지방산 분석방법도 RNA나 DNA와 마찬가지로 표지된 biomarker 분자의 분석을 통해 활성화된 미생물의 정체를 밝히는데 유용하다(Pombo et al., 2002; Pombo et al., 2005). PLFA와 RNA는 세포분열 없이도 생합성될 수 있어 전환율(turnover rate)이 빠르다(Manefield et al., 2002).

2.2. 오염된 지하수에 서식하는 미생물의 군집 특성

미생물의 활성은 서로 다른 미생물 군집 간의 복잡한 상호작용과 전자수용체, 탄소원, 에너지원과 영양성분의 이용 가능성 및 특성 그리고 환경의 물리화학적 특성에 의해 고려된다(Madigan et al., 2000; Anderson and Lovely, 1997). 전형적인 미생물 군집에 관한 연구는 미생물 군집구조나 물질대사적 기능 중 하나에 초점을 맞춰왔

다. 그러나 군집구조와 기능의 연계는 실제 자연에서 미생물 군집의 역학관계를 이해하는데 매우 중요하다(Boschker et al., 2001; Boschker et al., 1998; Pelz et al., 1999). 오염된 지하수에 서식하는 주요 미생물들은 메탄생성균(methanogens), 황환원균(SO_4^{2-} -reducers), 철환원균(Fe(III)-reducers), 망간환원균(Mn(IV)-reducers) 그리고 질산환원균(nitrate-reducers) 등이 오염체를 따라 일반적으로 널리 분포하지만 오염체 밖에서도 흔히 발견할 수 있다(Christensen et al., 2001). Table 3은 오염된 지하수 및 여러 환경에 존재하는 혐기성 세균들의 계통발생학적 분류에 따라 정리를 한 것이다.

2.2.1. 유류오염 지하수

지하수의 유류 오염물질의 분해는 대수층의 특성에 의해 다양하게 나타난다(Warren et al., 2004). 유류의 대부분을 차지하는 탄화수소화합물은 혐기적으로 자연저감에 의해 잘 분해되는데 철 환원조건이나 methane 생성조건 등에서 발생한다(Bekins et al., 2001; Cozzarelli et al., 2001). BTEX(benzene, toluene, ethyl benzene, xylene), 디젤, 석유도 혐기적 자연저감에 의한 제거가 보고되었고(Essaid et al., 2003; Hunkeler et al., 2002) *n*-alkanes의 경우 황산화와 메탄생성조건에서 혐기적으로 분해가 되었다(Townsend et al., 2003). 이와 같이 유류로 오염된 지하수에서 혐기성 그람음성 철산화균이나 황산화균(Kleikemper et al., 2002; Langworthy et al., 1998; Piffner et al., 1997; Shi et al., 1999), β -proteobacteria와 γ -proteobacteria(Feris et al., 2004; MacNaughton et al., 1999; Shi et al., 1999) 그리고 Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes 군(Feris et al., 2004; Shi et al., 1999)에 속하는 종들이 일반적으로 우점 하였고 특별히 BTEX를 잘 분해하는 지하수에서 식균들은 *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Azoarcus*, *Mycobacterium*, *Bradyrhizobium* 속에 속하는 균들이었다(Cavalca et al., 2004). 한편 benzene은 황산화균에 의해 잘 분해가 안 되지만 탈질세균에 의해 분해가 잘 된다(Spence et al., 2005).

연료산화제로 사용되는 MTBE(methyl tert-butyl ether)는 가솔린 구성물질 중에서 가장 극성이 강하여 물에 매우 잘 녹고 독성이 강하기 때문에(Hubbard et al., 1994) 일반적으로 BTEX에 비해 토착 지하수미생물에 의해 잘 분해가 안 되어 MTBE 오염체가 BTEX 오염체보다 더 멀리 퍼져나간다(Wilson et al., 2002). 그러나 최근 MTBE 분해 세균인 *Methylobium petroleophilum* PM1의 발견으로 미생물 첨가법에 의해(Smith et al., 2005) 또는 현존

하는 미생물에 의해(Wilson et al., 2002) MTBE 정화가 이루어지고 있다. 하지만 전자수용체로 산소나 질산이 있는 조건에서 주로 분해가 되고 혐기적 분해가 일어나더라도 제한적이며 광물화까지는 안 간다(Spence et al., 2005; Yeh and Novak, 1994; Suffita and Mormile, 1993; Mormile et al., 1994). 또한 MTBE는 어떤 조건 하에서도 BTEX나 ethanol의 분해에 영향을 주지 않았고(Ruiz-Aguilar et al., 2002; Da Silva and Alvarez, 2002) 미생물 군집구조에 있어서 오염되지 않은 지하수와 유사하다(Feris et al., 2004). 하지만 고농도의 MTBE는 BTEX의 생분해를 저해한다(Salanitro and Wisniewski, 1996). 한편 BTEX의 존재는 MTBE의 분해를 저해하고(Church et al., 1999; Koenigsberg et al., 1999; Deeb et al., 2001) 미생물 군집구조도 바꾸지만(Feris et al., 2004), 경우에 따라서는 중요한 영향을 주지 않는다(Sedran et al., 2002).

최근에는 연료산화제로서 MTBE대신 연소 시 공기오염을 완화시켜주는 ethanol의 사용이 급증하고 있다(Powers et al., 2001). 최근의 연구들은 ethanol이 지하수에서 토착 미생물에 의해 우선적으로 분해되기 때문에 산소 및 영양분의 고갈을 동반하여 BTEX의 생분해를 저해한다고 보고한다(Da Silva and Alvarez, 2002; Corseuil et al., 1998; Hunt et al., 1997).

2.2.2. 염소계 용매오염 지하수

PCE(tetrachloroethene)와 TCE(trichloroethene)는 지하수에 많이 오염된 대표적인 염소계 오염물질이다. 대부분의 지하수에서 이들 물질들은 혐기적 분해를 통해 여전히 독성이 있는 DCE(dichloroethene)나 발암물질인 VC(vinyl chloride)의 축적을 야기한다(Aulenta et al., 2004). 이러한 문제점을 해결하기 위해 생물활성법과 미생물 첨가법을 병행하여 비독성인 ethene까지 분해시키는 경우가 많다. 미생물성장 촉진을 위해서 lactate와 기타 영양분(Major et al., 2002; Lendvay et al., 2003) 또는 계면활성제인 Tween 80(Ramsburg et al., 2004)이 사용되었고 주입된 미생물로서는 *Dehalococcoides*를 포함한 메탄생성(혼합)균(Major et al., 2002; Duba et al., 1996) 또는 *Dehalococcoides/Desulfuronmonas* 혼합균(Lendvay et al., 2003)이 사용되었다. 현재까지 발견된 종으로서 PCE에서 ethene까지 환원적 분해를 할 수 있는 것은 *Dehalococcoidesethnogenes*가 유일하다(Aulenta et al., 2004). PCE/TCE를 포함한 염소계 용매로 오염된 지하수에는 철산화균, 황산화균, 아세톤생성균, 탈질균들이 서식하고 16s rRNA 유전

자 서열분석에 의해 이들은 δ -proteobacteria, low-G+C 그람음성균에 속하였고 *Desulfitobacterium*, *Dehalobacter*, *Geobacter*, *Pelobacter*, *Desulfurmonas* 등으로 밝혀졌다(Davis et al., 2002). 그리고 PCB(polychlorinated biphenyl)와 CE(chlorinated ethene)는 *Dehalococcoides* spp.와 유사한 균주에 의해 탈염소화가 진행되었으며(Miller et al., 2005) *Clostridium*은 PCB의 환원적 탈염소화의 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(LaMontagne et al., 1998). 사염화탄소(carbon tetrachloride)와 nitrate로 오염된 지하수에서는 탈질균인 *Pseudomonas stutzeri* 이 효율적이었고(Dybas et al., 2002), chlorobenzene으로 오염된 지하수는 *Pseudomonas putida*의 추가에 의해 효과적으로 처리되었으며(Wenderoth et al., 2003), 사염화탄소는 탈질 세균인 *Pseudomonas* sp.(Dybas et al., 1998)에 의해 분해가 촉진되었다. 대부분의 경우 혐기조건에서만 처리하기보다 호기조건을 병행을 통해 처리할 때 염소계 화합물의 제거가 더욱 효과적이었다(Beeman and Bleckmann, 2002; Devlin et al., 2004).

3. 결 론

이러한 무배양식 미생물 군집구조를 밝히는 기술의 발달로 난배양성 미생물의 종류와 특성을 파악할 수 있게 되었고, 오염 지하수에서의 미생물상의 변화를 관찰하는데 사용되어 왔다. 특정 오염물질을 분해하는 균의 유전자를 분석하여 개체균의 변화를 보았으며 DNA fingerprinting 방법을 이용하여 여러 정화 과정에서 발생하는 미생물 군집의 변화와 지하수의 물리화학적 환경에 따른 미생물 군집의 다양성과 오염물질에 의한 군집구조의 차이 등을 알아보았다. 그리고 16 rDNA와 같은 유전자의 특정부위의 염기서열을 추가로 분석하여 미생물 동정도 가능하였으며, FISH와 같은 기법을 접목해 동일종의 활성도의 변화를 관찰하였다. 위의 방법들을 이용하여, 유류로 오염된 지하수에서는 혐기성 그람음성 철산화균이나 황산화균, β -proteobacteria와 γ -proteobacteria 그리고 Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes 군에 속하는 종들이 일반적으로 우점하였는데 이들 대부분은 혐기적인 지하수환경에서 유용한 전자수용체로 주로 철이나 황을 이용하고 유류를 분해하여 탄소원으로 사용할 수 있는 균들이다. 염소계 화합물로 오염된 지하수에서는 철산화균, 황산화균, 아세톤생성균, 탈질균, δ -proteobacteria, low-G+C 그람음성균에 속하는 균들이 우점 하였음을 보고하였는데 이들은 환원성 탈염소 반응을 일으키거나 촉진을 돕는 균들이 대부분이다.

사 사

본 연구는 공공기술연구회 정책 과제인 “지하수 환경 특성화를 위한 미생물, 미소생물의 생리학적 적용과 오염 물질 거동 특성 연구”의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고 문헌

- Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.-H., 1995, Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiol. Rev.*, **59**, 143-169.
- Anderson, R.T. and Lovley, D.R., 1997, Ecology and biogeochemistry of in situ groundwater bioremediation, *Adv. Microb. Ecol.*, **15**, 289-350.
- Aulenta, F., Rossetti, S., Majone, M., and Tandoi, V., 2004, Detection and quantitative estimation of *Dehalococcoides* spp. in a dechlorinating bioreactor by a combination of fluorescent in situ hybridization (FISH) and kinetic analysis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 206-212.
- Beeman, R.E. and Bleckmann, C.A., 2002, Sequential anaerobic-aerobic treatment of an aquifer contaminated by halogenated organics: field results, *J. Contam. Hydrol.*, **57**, 147-159.
- Bekins, B.A., Cozzarelli, I.M., Godsy, E.M., Warren, E., Essaid, H.I., and Tuccillo, M.E., 2001, Progression of natural attenuation processes at a crude oil spill site: II. Controls on spatial distribution of microbial populations, *J. Contam. Hydrol.*, **53**, 387-406.
- Boschker, H.T.S., de Graaf, W., Koster, M., Meyer-Reil, L.-A., and Cappenberg, T.E., 2001, Bacterial populations and processes involved in acetate and propionate consumption in anoxic brackish sediment, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **35**, 97-103.
- Boschker, H.T.S., Nold, S.C., Wellsbury, P., Bos, D., de Graaf, W., Pel, R., Parkes, R.J., and Cappenberg, T.E., 1998, Direct linking of microbial populations to specific biogeochemical processes by ¹³C-labeling of biomarkers, *Nature*, **392**, 801-805.
- Bossio, D.A. and Scow, K.M., 1998, Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: Phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns, *Microb. Ecol.*, **35**, 265-278.
- Cavalca, L., Della Amico, E., and Andreoni, V., 2004, Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**, 576-587.
- Cavigelli, M.A., Robertson, G.P., and Klug, M.J., 1995, Fatty acid methyl ester (FAME) profiles as measures of soil microbial community structure, *Plant Soil*, **170**, 99-113.
- Christensen, T.H., Kjeldsen, P., Bjerg, P.L., Jensen, D.L., Christensen, J.B., Baun, A., Albrechtsen, H.-J., and Heron, G., 2001, Biochemistry of landfill leachate plumes, *Appl. Geochem.*, **16**, 695-718.
- Church, C.D., Tratnyek, P.J., Pankow, J.F., Landmeyer, J.E., Baehr, A.L., Thomas, M.A., and Schirmer, M., 1999, Effects of environmental conditions on MTBE degradation in model column aquifers, *Proceedings of the Technical Meeting of the USGS Toxic Substances Hydrology Program, Vol. 3*, Charleston, SC, p. 93-101.
- Corseuil, H.X., Hunt, C.S., Ferreira dos Santos, R.C., and Alvarez, P.J.J., 1998, The influence of the gasoline oxygenate ethanol on aerobic and anaerobic BTX biodegradation, *Water Res.*, **33**, 2065-2072.
- Cozzarelli, I.M., Bekins, B.A., Baedecker, M.J., Aiken, G.R., Eganhouse, R.P., and Tuccillo, M.E., 2001, Progression of natural attenuation processes at a crude-oil spill site: I. Geochemical evolution of the plume, *J. Contam. Hydrol.*, **53**, 369-385.
- Da Silva, M.L.B. and Alvarez, P.J.J., 2002, Effects of ethanol versus MTBE on benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene natural attenuation in aquifer columns, *J. Environ. Eng.*, **128**(9), 862-867.
- Deeb, R.A., Hu, H.-Y., Hanson, J.S., Scow, K.M., and Alvarez-Cohen, L., 2001, Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 312-317.
- Devlin, J.F., Katic, D., and Barker, J.F., 2004, In situ sequenced bioremediation of mixed contaminants in groundwater, *J. Contam. Hydrol.*, **69**, 233-261.
- Duba, A.G., Jackson, K.J., Jovanovich, M.C., Knapp, R.B., and Taylor, R.T., 1996, TCE remediation using in situ, resting-state bioaugmentation, *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1982-1989.
- Dybas, M.J., Hyndman, D.W., Heine, R., Tiedje, J., Linning, K., Wiggert, D., Voice, T., Zhao, X., Dybas, L., and Criddle, C.S., 2002, Development, operation, and long-term performance of a full-scale biocurtain utilizing bioaugmentation, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 3635-3644.
- Dybas, M.J., Barcelona, M., Bezborodnikov, S., Davies, S., Forney, L., Heuer, H., Kawka, O., Mayotte, T., Sepulveda-Torres, L., Smalla, K., Sneathen, M., Tiedje, J., Voice, T., Wiggert, D.C., Witt, D.C., and Criddle, C.S., 1998, Pilot-scale evaluation of bioaugmentation for in-situ remediation of carbon tetrachloride-contaminated aquifer, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 3598-3611.
- Eriksson, S., Ankner, T., Abrahamsson, K., and Hallbeck, L., 2005, Propylphenols are metabolites in the anaerobic biodegradation of propylbenzene under iron-reducing conditions, *Bioremediation*, **16**, 253-263.
- Essaid, H.I., Cozzarelli, I.M., Eganhouse, R.P., Herkelrath, W.N., Bekins, B.A., and Delin, G.N., 2003, Inverse modeling of

- BTEX dissolution and biodegradation at the Bemidji, MN crude-oil spill site, *J. Contam. Hydrol.*, **67**, 269-299.
- Eyers, L., George, I., Schuler, L., Stenuit, B., Agathos, S.N., and Fantroussi, S.E., 2004, Environmental genomics: exploring the unmined richness of microbes to degrade xenobiotics, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **66**, 123-130.
- Fang, J., and Barcelona, M.J., 1998, Biogeochemical evidence for microbial community change in a jet fuel hydrocarbon contaminated aquifer, *Org. Geochem.*, **29**, 899-907.
- Felske A. and Akkermans A.D.L., 1998, Spatial homogeneity of abundant bacterial 16S rRNA molecules in Grassland soils, *Microb. Ecol.*, **36**, 31-36.
- Feris, K.P., Hristova, K., Grebreyesus, B., Mackay, D., and Scow, K.M., 2004, A shallow BTEX and MTBE contaminated aquifer supports a diverse microbial community, *Microb. Ecol.*, **48**, 589-600.
- Glucksman, A.M., Skipper, H.D., Brigmon, R.L., and Domingo, J.W., 2000, Use of the MIDI-FAME technique to characterize groundwater communities, *J. Appl. Microbiol.*, **88**(4), 711-719.
- Haack, S.K., Fogarty, L.R., West, T.G., Alm, E.W., McGuire, J.T., Long, D.T., Hyndman, D.W., and Forney, L.J., 2004, Spatial and temporal changes in microbial community structure associated with recharge-influenced chemical gradients in a contaminated aquifer, *Environ. Microbiol.*, **6**, 438-448.
- Hadrys, H., Balick, M., and Schierwater, B., 1992, Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology, *Mol. Ecol.*, **1**, 55-63.
- Hubbard, C.E., Barker, J.F., O'Hannesin, S.F., Vandegriendt, M., and Gillham, R., 1994, Transport and fate of dissolved methanol, ethyltertiary-butyl-ether, and monoaromatic hydrocarbons in a shallow sand aquifer, American Petroleum Institute, Health & Environmental Sciences Department, Washington, DC, p. 226.
- Hunt, C.S., dos Santos Ferreira, R., Corseuil, H.X., and Alvarez, P.J.J., 1997, Effect of ethanol on aerobic BTX degradation, *In Situ and On-site Bioremediation*, Leeson A.L., and Alleman, B.C., (eds.), Battelle, Columbus, OH, p. 49-54.
- Hunkeler, D., Hohener, P., and Zeyer, J., 2002, Engineered and subsequent intrinsic in situ bioremediation of a diesel fuel contaminated aquifer, *J. Contam. Hydrol.* **59**, 231-245.
- Huys, G., Kersters, I., Vancanneyt, M., Coopman, R., Janssen, P., and Kersters, K., 1995, Diversity of *Aeromonas* sp. in Flemish drinking water production plants as determined by gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acid methyl esters (FAMES), *J. Appl. Bacteriol.*, **78**(4), 445-455.
- Ibekwe, A.M. and Fennedy, A.C., 1988, Phospholipid fatty acid profiles and carbon utilization patterns for analysis of microbial community structure under field and greenhouse conditions, *FEMS Microbiol. Ecol.*, **26**, 151-163.
- Junca, H. and Pieper, D.H., 2004, Functional gene diversity analysis in BTEX contaminated soils by means of PCR-SSCP DNA fingerprinting: comparative diversity assessment against bacterial isolates and PCR-DNA clone libraries, *Environ. Microbiol.*, **6**, 95-110.
- Kikuchi, T., Iwasaki, K., Nishihara, H., Takamura, Y., and Yagi, O., 2002, Quantitative and rapid detection of the trichloroethylene-degrading bacterium *Methylocystis* sp. M in groundwater by real-time PCR, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 731-736.
- Kleikemper, J., Schroth, M.H., Sigler, W.V., Schmucki, M., Bernasconi, S.M., and Zeyer, J., 2002, Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 1516-1523.
- Klein, A., and Schnorr, M., 1984, Genome complexity of methanogenic bacteria, *J. Bacteriol.*, **158**(2), 628-631.
- Knittel, K., Boetius, A., Eilers, A.L.H., Lochte, K., and Linke, O.P.P., 2003, Activity, distribution, and diversity of sulfate reducers and other bacteria in sediments above gas hydrate (Cascadia Margin, Oregon), *Geomicrobiol. J.*, **20**, 269-294.
- Koenigsberg, S., Sandefur, C., Mahaffey, W., Deshusses, M., and Fortin, N., 1999, Peroxygen mediated bioremediation of MTBE, *In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon and Other Organic Compounds, Vol. 3*, Alleman, B.C., and Leeson, A., (eds.), Battelle Press, Columbus, OH, p. 3-18.
- LaMontagne, M.G., Davenport, G.J., Hou, L.-H., and Dutta, S.K., 1998, Identification and analysis of PCB dechlorinating anaerobic enrichments by amplification: accuracy of community structure based on restriction analysis and partial sequencing of 16S rRNA genes, *J. Appl. Microbiol.*, **84**, 1156-1162.
- Langworthy, D.E., Stapleton, R.D., Sayler, G.S., and Findlay, R.H., 1998, Genotypic and phenotypic responses of a riverine microbial community to polycyclic aromatic hydrocarbon contamination, *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3422-3428.
- Lee, S. and Furhman, J.A., 1990, DNA hybridization to compare species composition of natural bacterioplankton assemblages, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 739-746.
- Lendvay, J.M., Löffler, F.E., Dollhopf, M., Aiello, M.R., Daniels, G., Fathepure, B.Z., Gebhard, M., Heine, R., Helton, R., and Shi, J., et al., 2003, Bioreactive barriers: a comparison of bioaugmentation and biostimulation for chlorinated solvent remediation, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1422-1431.
- Lovely, D.R., 1993, Dissimilatory metal reduction, *Ann. Rev. Microbiol.*, **47**, 263-290.
- MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.-J., and White, D.C., 1999, Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill,

- Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3566-3574.
- MacNaughton, S.J., Stephen, J.R., Venosa, A.D., Davis, G.A., Chang, Y.J., and White, D.C., 1999, Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3566-3574.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J., Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ (2000).
- Major, D.W., McMaster, M.L., Cox, E.E., Edwards, E.A., Dworzatzek, S.M., Hendrickson, E.R., Starr, M.G., Payne, J.A., and Buonamici, L.W. 2002, Field demonstration of successful bioaugmentation to achieve dechlorination of tetrachloroethene to ethene, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 5106-5116.
- Manefield, M., Whiteley, A.S., Griffiths, R.I., and Bailey, M.J., 2002, RNA stable isotope probing, a novel means of linking microbial community function to Phylogeny, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**, 5367-5373.
- Marsh, T.L., 1999, Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products, *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 323-327.
- Miller, G.S., Milliken, C.E., and Sowers, K.S., 2005, Reductive dechlorination of tetrachloroethene to *trans*-dichloroethene and *cis*-dichloroethene by PCB-dechlorinating bacterium DF-1, *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 2631-2635.
- Mormile, M.R., Liu, S., and Suflita, J.M., 1994, Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenate: Extrapolation of information to multiple sites and redox conditions, *Environ. Sci. Technol.*, **28**, 1727-1732.
- Muyzer, G., De Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G., 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.* **59**, 695-700.
- Nealson, K.H. and Saffarini, D., 1994, Iron and manganese in anaerobic respiration: environmental significance, physiology, and regulation, *Ann. Rev. Microbiol.*, **48**, 311-343.
- Peacock, A.D., Chang, Y.J., Istok, J.D., Krumholz, L., Geyer, R., Kinsall, B., Watson, D., Sublette, K.L., and White, D.C., 2004, Utilization of microbial biofilms as monitors of bioremediation, *Microb. Ecol.*, **47**, 284-292.
- Pelz, O., Tesar, M., Wittich, R.-M., Moore, E.R.B., Timmis, K.N., and Abraham, W.-R., 1999, Towards elucidation of microbial community metabolic pathways: unraveling the network of carbon sharing in a pollutant-degrading bacterial consortium by immunocapture and isotopic ratio mass spectrometry, *Environ. Microbiol.*, **1**, 167-174.
- Pfiffner, S., Palumbo, A., Gibson, T., Ringelberg, D., and McCarthy, J., 1997, Relating ground water and sediment chemistry to microbial characterization at a BTEX-contaminated site, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **63**, 775-788.
- Philippot, L., 2005, Tracking nitrate reducers and denitrifiers in the environment, *Biochem. Soc. Trans.*, **33**(1), 200-204.
- Powers, S.E., Rice D., Doohar, B., and Alvarez, P.J.J., 2001, Will ethanol-blended gasoline affect groundwater quality? Using ethanol instead of MTBE as a gasoline oxygenate could be less harmful to the environment, *Environ. Sci. Technol.*, **35**, 24A-30A.
- Purohit, H.J., Raje, D.V., Kapley, A., Padmanabhan, P., and Singh, R.N., 2003, Genomics tools in environmental impact assessment, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 356A-363A.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., and Murrell, J.C., 2000, Stable-isotope probing as a tool in microbial ecology, *Nature*, **403**, 646-649.
- Ramsburg, C.A., Abriola, L.M., Pennell, K.D., Löffler, F.E., Gamache, M., Amos, B.K., and Petrovskis, E.A., 2004, Stimulated microbial reductive dechlorination following surfactant treatment at the Bachman road site, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 5902-5914.
- Ranjard, L., Poly, F., and Nazaret, S., 2000, Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment, *Res. Microbiol.*, **151**, 167-177.
- Rhee, S.K., Liu, X.D., Wu, L.Y., Chong, S.C., Wan, X.F., and Zhou, J.Z., 2004, Detection of genes involved in biodegradation and biotransformation in microbial communities by using 50-mer oligonucleotide microarrays, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4303-4317.
- Rling, W.F.M., Van Breukelen, B.M., Braster, M., and Van Verseveld, H.W., 2000, Linking microbial community structure to pollution: Biolog-substrate utilization in and near a landfill leachate plume, *Water Sci. Technol.*, **41**, 47-53.
- Roling, W.F.M., van Breukelen, B.M., Braster, M., Lin, B., and van Verseveld, H.W., 2001, Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer, *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 4619-4629.
- Rooney-Varga, J.N., Anderson, R.T., Fraga, J.L., Ringelberg, D.B., and Lovley, D.R., 1999, Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 3056-3063.
- Ruiz-Aguilar, G.M.L., Fernandez-Sanchez, J.M., Kane, S.R., Kim, D., and Alvarez, P.J., 2002, Effect of ethanol and methyl-tert-butyl ether on monoaromatic hydrocarbon biodegradation: response variability for different aquifer materials under various electron-accepting conditions, *Environ. Toxicol. Chem.*, **21**, 2631-2639.
- Salanitro, J.P., and Wisniewski, H.L., 1996, Observations on the Biodegradation and Bioremediation Potential of Methyl *t*-Butyl

- Ether, *Proceedings of the 17th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry*, Washington, DC..
- Schmidt, L.M., Delfino, J.J., Preston, J.F. 3rd, and St Laurent, G. 3rd, 1999, Biodegradation of low aqueous concentration pentachlorophenol (PCP) contaminated groundwater, *Chemosphere*, **38**(12), 2897-912.
- Sedran, M.A., Pruden, A., Wilson, G.J., Suidan, M.T., and Venosa, A.D., 2002, Effect of BTEX on degradation of MTBE and TBA by mixed bacterial consortium, *J. Environ. Eng.*, **128**(9), 830-835.
- Shi, Y., Zwolinski, M.D., Schreiber, M.E., Bahr, J.M., Sewell, G.W., and Hickey, W.J., 1999, Molecular analysis of microbial community structures in pristine and contaminated aquifers: field and laboratory microcosm experiments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 2143-2150.
- Smidt, H., and de Vos, W.M., 2004, Anaerobic microbial dehalogenation, *Annu. Rev. Microbiol.*, **58**, 43-73.
- Smith, A.E., Hristova, K., Wood, I., Mackay, D.M., Lory, E., Lorenzana, D., and Scow, K.M., 2005, Comparison of biostimulation versus bioaugmentation with bacterial strain PM1 for treatment of groundwater contaminated with methyl tertiary butyl ether (MTBE), *Environ. Health Perspect.*, **113**, 1-9.
- Spence, M.J., Bottrell, S.H., Thornton, S.F., Richnow, H.H., and Spence, K.H., 2005, Hydrochemical and isotopic effects associated with petroleum fuel biodegradation pathways in a chalk aquifer, *J. Contam. Hydrol.*, **79**, 67-88.
- Stephen, J.R., Chang, Y.-J., Gan, Y.D., Peacock, A., Pffiffer, S.M., Barcelona, M.J., White, D.C., and MacNaughton, S.J., 1999, Microbial characterization of a JP-4 fuel-contaminated site using a combined lipid biomarker/polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)-based approach, *Environ. Microbiol.*, **1**, 231-241.
- Suflita, J.M., and Mormile, M.R., 1993, The anaerobic biodegradation of known and potential gasoline oxygenates in the terrestrial subsurface, *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 976-978.
- Sunnucks, P. and Wilson, A.C.C., Zenger, L.B.K., French, J., and Taylor, A.C., 2000, SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology, *Mol. Ecol.*, **9**, 1699-1710.
- Townsend, G.T., Prince, R.C., and Suflita, J.M., 2003, Anaerobic oxidation of crude oil hydrocarbons by the resident microorganisms of a contaminated anoxic aquifer, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 5213-5218.
- Von Keitz, V., Schramm, A., Altendorf, K., and Lipski, A., 1999, Characterization of microbial communities of biofilters by phospholipid fatty acid analysis and rRNA targeted oligonucleotide probes, *Syst. Appl. Microbiol.*, **22**, 626-634.
- Warren, E.B.B., Godsy, E., and Smith, V., 2004, Inhibition of acetoclastic methanogenesis in crude oil- and creosote-contaminated groundwater, *Bioremediation J.*, **8**, 1-11.
- Wenderoth, D.F., Rosenbrock, P., Abraham, W.-R., Pieper, D.H., and Hofle, M.G., 2003, Bacterial community dynamics during biostimulation and bioaugmentation experiments aiming at chlorobenzene degradation in groundwater, *Microb. Ecol.*, **46**, 161-176.
- White, D.C., Flemming, C.A., Leung, K.T., and MacNaughton, S.J., 1998, In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms, *J. Microbiol. Methods*, **32**, 93-105.
- Widdel, F., and Hansen, T.A., 1991, The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria, *The Prokaryotes, 2nd edition, vol. 1*, Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H. (eds.), Springer-Verlag, New York. p. 583-624.
- Wilson, R.D., MacKay, D.M., and Scow, K.M., 2002, In situ MTBE biodegradation supported by diffusive oxygen release, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 190-199.
- Yeh, C.K. and Novak, J.T., 1994, Anaerobic biodegradation of gasoline oxygenates in soils, *Water Environ Res.*, **66**, 744-752.
- Zang, H., Logan, B.E., Regan, J.M., Achenbach, L.A., and Bruns, M.A., 2005, Molecular assessment of inoculated and indigenous bacteria in biofilms from a pilot-scale perchlorate-reducing bioreactor, *Microb. Ecol.*, **49**, 388-398.