

(7) *amoA* mRNA の転写量に基づいた *in-situ* におけるアンモニア酸化活性の評価

Evaluation of the *in-situ* activity of ammonia-oxidizing population
in biofilm by quantification of *amoA* mRNA

押木守*、荒木信夫*、山口隆司**、山崎慎一***、原田秀樹****

Mamoru OSHIKI, Nobuo ARAKI, Takashi YAMAGUCHI, Shinichi YAMAZAKI,
Hideki HARADA

ABSTRACT; The relationship between ammonia-oxidizing activities and *amoA* mRNA (encoding ammonia monooxygenase) levels was investigated by batch experiments with nitrifying biofilms taken from a lab-scale bioreactor. RT-PCR technology was applied to determine copy numbers of *amoA* mRNA in total RNA extracted from the sludge sample. Ammonia oxidation rates and transcription levels of *amoA* mRNA were monitored throughout the experiment that ammonia was fed as the concentration rose abruptly up to 20 or 100 mg-N/L whenever ammonia was consumed completely. A large ammonia turnover rate occurred immediately after every ammonia shock load, although the *amoA* mRNA level was still low. The turnover rate gradually reduced with decreasing ammonia concentration, while the *amoA* mRNA level increased until several hours after every ammonia shock load. The tendency of the *amoA* mRNA transcription changed a decrease as ammonia concentration dropped as low as K_m value of *Nitrosomonas*. The induction of *amoA* mRNA was detected under the presence of low ammonia less than 5 mg-N/L. However the *amoA* mRNA level was not correlated with the ammonia turnover rate in the range from 5 to 100 mg-N/L. It was indicated that the *amoA* mRNA level in the nitrifying sludge was not directly connected to the *in-situ* activity of ammonia-oxidizing bacteria.

KEYWORDS; ammonia-oxidizing bacteria, ammonia monooxygenase, mRNA, RT-PCR, *amoA*

1 はじめに

下排水からの生物学的窒素除去反応の律速段階である硝化反応を効率的に進めるためには、反応を担っているアンモニア酸化細菌の「種類」、「数」、「活性」などの基礎的情報を把握する必要がある。16S rRNA をパイオマーカとした分子生物学的手法の進展により、複合微生物系である活性汚泥内に存在するアンモニア酸化細菌の菌種や菌数を評価することが可能となった^{1,2,3,4)}。

一方、近年、RT-PCR 法が比較的簡便に使えるようになったことから機能遺伝子の mRNA 解析の進展が著しい。アンモニア酸化反応は 3 つのサブユニットから構成されるアンモニア酸化酵素(ammonia monooxygenase、以後 *amo* と略す)の触媒作用により進行している。このアンモニア酸化酵素に対応する遺伝子として *amoA,B,C* があり、この遺伝子群がアンモニア酸化細菌の細胞内でひとつのオペロンとして発現していることが知られている⁵⁾。アンモニア酸化細菌はこのオペロンを複数有し⁶⁾、それぞれのオペロンで

* 長岡工業高等専門学校 環境都市工学科(Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology)

** 呉工業高等専門学校 環境都市工学科(Dept. of Civil Engineering, Kure National College of Technology)

*** 高知工業高等専門学校 建設システム工学科(Dept. of Civil Engineering, Kouchi National College of Technology)

**** 長岡技術科学大学 環境システム工学系(Dept. of Environ. Systems Engineering, Nagaoka University of Technology)

役割が異なっていることも報告されている^{7b)}。

硝化脱窒プロセスを代表する嫌気好気法や間欠曝気法ではアンモニア酸化細菌に対して、基質であるアンモニアと溶存酸素のストレスを与えることになる。それらの環境因子によって *amoA* 遺伝子の mRNA が転写を調整されていることがこれまでに報告されている^{9,10,11,12)}。また、複合微生物系内において *amoA* mRNA を転写している菌種が環境変化に伴い変化することも知られている¹³⁾。このため、プロセス内でのアンモニア酸化細菌の *in-situ* 活性を把握することは最適運転条件を検討する上で必要不可欠である。従来行われてきたアンモニアを用いた比活性バッチ試験では *in-situ* 活性を評価することはできなかった。また、細胞内におけるエネルギー物質である ATP プールを用いた *in-situ* 活性の評価¹⁴⁾では、活性汚泥のような複合微生物系の中で一部の微生物群が持つ ATP に注目して評価することはできなかった。一方、mRNA は汚泥をサンプリングした後に瞬時に固定ができ、PCR 技術を用いることにより目的とする機能遺伝子の mRNA の逆転写 cDNA を特異的に検出することができることから *in-situ* 活性を評価しうるものと推測される。さらに、バクテリアの mRNA の世代時間は数分とされており、短い時間スケールにおける微生物の活性変化を追跡することも可能と考えられる。Stein らは、*amoA* mRNA、アンモニア酸化酵素量とアンモニア酸化能には密接な関係があると報告している¹⁵⁾。

本研究は、スポンジ担体に付着した硝化汚泥にアンモニアをパルス的に供給し、アンモニア酸化速度と *amoA* mRNA 転写量の変遷を追跡することにより、*amoA* mRNA は短い時間スケールにおいてアンモニア酸化細菌の *in-situ* 活性を評価しうるものであるか否かを検証するものである。

2 実験方法

2.1 アンモニア酸化細菌の馴養

アンモニア酸化細菌の馴養は容積 3.2L に 1cm 辺のスポンジキューブ担体を投入したラボスケールリアクターを用い、20℃、暗所の恒温室内で実施した。リアクターはアンモニア容積負荷 625g-N/m³/daym になるように人工無機排水を連続流入した。Table1 に人工無機排水の組成を示す。

2.2 バッチ試験

3 ヶ月にわたる運転によってリアクターのアンモニア酸化率が向上した後に Table1 の人工無機排水の組成から NH₄Cl を除いた無機排水を3日または7日間連続流入させ、汚泥内の *amoA* mRNA を消失させた。その後、300 個ほどのスポンジ担体を取り出し、バッチ試験に供した。バッチ試験は開始時のアンモニア濃度が 22mg-N/L の低濃度系と 100mg-N/L の高濃度系の2系列を行った。

低濃度系では7日間のアンモニア飢餓後に基質を与え、経時的にアンモニア濃度を追跡し、スポンジ担体から汚泥を採取した。アンモニア濃度が低下後、22mg-N/L の新しい培地に交換し、これを3回繰り返した。高濃度系ではバッチ試験時のアンモニア酸化速度を低濃度系と同じレベルにするためにスポンジ担体数を多くして実施した。3日間のアンモニア飢餓後に基質を与え、低濃度系と同じ測定を行った。

バッチ試験時のアンモニア酸化速度はサンプリング間のアンモニア減少量から評価した。アンモニア濃度の測定には HACH 法(PROGRAM No:380)を用いた。

Table 1. Composition of synthetic wastewater to develop nitrifying biofilms

	(g/100L)
NaCl	1.01
KCl	0.47
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.47
NaHCO ₃	93.72
NaHPO ₄ · 12H ₂ O	2.31
Fe-EDTA	1mL
NH ₄ Cl	44.94
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.67

2.3 RNA 抽出

バッチ試験で採取した汚泥サンプルは pH5.1buffer (50mM sodium acetate, 10mM EDTA-2Na)にて基質洗浄を行った後、直ちに RNA later (Ambion)へ浸透させ RNA の分解を防止した。その後、チューブへ0.2mm 径ガラスビーズを 0.5g 加え、ISOGEN (Nippon Gene)浸透下でビーズビーディング(5000rpm, 2min)を行った。60℃で 10min 保温後に再び同条件でビーズビーディングを行った。クロロホルムを 200μL 加え混合した後、遠心分離(10000rpm, 20min, 4℃)を行った。上澄みを回収し、エタノール沈澱後、ペレットの乾燥を行い、100μL の TE(1M Tris-HCl, 0.5M EDTA)へ溶解させた。サンプル中に混入している DNA は測定に悪影響を及ぼすため、抽出後に DNase 処理(1×DNase I buffer, 50U DNase I (Takara), 13.6U Ribonuclease inhibitor, 37℃, 40min)を行った。その後、酸性フェノール、クロロホルムを用いてサンプルの精製を行った。再びエタノール沈澱、ペレットの乾燥、TE への溶解を行い、抽出したサンプルの RNA 濃度を Gene quant pro (Amersham Pharmacia Biotech)を用いて計測を行った。

2.4 RT-PCR

逆転写反応では Random Primer を用い、Total RNA を cDNA へ逆転写した。その際の反応液の組成は (5.0mM MgCl₂, 1×RNA PCR buffer, 0.25mM dNTPs, 2.5pM Random 9 mers, 0.34U Ribonuclease Inhibitor, 0.25U AMV Reverse transcriptase(Takara), (9.83μL-X μL) RNase free ddH₂O, X μL RNA template, Total 20μL) で行った。逆転写反応時に投入する RNA template 量は核酸重量で 40~120ng とした。逆転写反応は Takara Thermal Cycler MP を用い、30℃(10min)、55℃(30min)、99℃(5min)、5℃(5min)で行った。

2.5 Real time PCR

逆転写した cDNA サンプル中の *amoA* 遺伝子数(*amoA* cDNA)を Smart Cycler を用いた Real time PCR により測定した。Real time PCR の蛍光取得法として SYBR Green I を用いたインターカレーター法を採用した。定量時の外部標準遺伝子としては *N.europaea* (IFO14298)の DNA を Nakamura⁴⁾らの方法により抽出し、*amoA* 遺伝子を増幅、精製した後の PCR 産物を適宜希釈し、検量線として用いた。増幅する際に用いたプライマーは amo1F、2R³⁾である。定量した遺伝子数の単位として内部標準遺伝子や rRNA を用いる方法が提案されており^{16,17)}、今回は逆転写に供した Total RNA 1ng に対する *amoA* cDNA の copy 数として表した。

Real time PCR 時の酵素には R-PCR Version Takara Ex TaqTMを用い、その際の PCR 反応液の組成は付属の説明書に従った。PCR プライマーには amo1F、2R を使用した。PCR 反応はまず 95℃(2min)の熱変性を行い、その後 95℃(10sec)、59℃(15sec)、72℃(15sec)の増幅反応を 40cycle 行った。SYBR Green I の蛍光取得は 85℃(6sec)に設定した。PCR 反応後に融解曲線を確認して非特異的増幅が起こっていないことを確認した。

3. 実験結果

3.1 低濃度バッチ試験

Fig.1 に低濃度系バッチ試験におけるアンモニア濃度の変化を示す。基質添加後から 15min、45min、2hr、4hr、6hr、9hr 経過した時点でサンプルを採取した。アンモニア濃度は、基質投入時に約 22mg-N/L であったものが約 9 時間後に 3mg-N/L ほどにまで低下した。10 時間後、20 時間後に新しい培地に入れ替えた。新しい培地にした 0-10 時間、10-20 時間、20-30 時間をそれぞれ Phase1~Phase3 とする。各 Phase とともに初期段階ではアンモニア酸化速度が大きいが、濃度が低下するにつれて酸化速度は減少している。バッチ試験期間の pH は 8.0-8.5 であった。本来であれば実験期間中のアンモニア酸化細菌の増殖や菌相の変化について確認する必要がある。しかし、アンモニア酸化細菌の増殖速度は極めて小さく、さらに

菌相変化も比較的遅いため^{18,19)}、本試験のような 30 時間程度では菌の増殖と菌相の変化は小さいものと判断した。本実験に供した汚泥の FISH 観察では *Nitrosomoans* 属に特異的な Nmn657 プローブ²⁰⁾で検出される細胞が極めて高頻度に存在しており、アンモニア酸化細菌としては *Nitrosomonas* 属細菌が優先していた。

バッチ試験で採取した汚泥サンプルから RNA を抽出し、*amoA* mRNA を定量した結果を Fig.2 に示す。7 日間の飢餓条件を設定した結果、実験開始時には *amoA* mRNA は完全に消失していた。

amoA mRNA は抽出した Total RNA 1ng あたり $10^3 \sim 10^5$ コピーで推移した。*amoA* mRNA は、Phase の初期から上昇しはじめ、アンモニア濃度の低下した Phase の終わりに低下する傾向を示した。各 Phase で *amoA* mRNA が最大値を示した経過時間は 6 時間、4 時間、15 分であり、Phase を追うごとにその最大値に達するまでの時間が短縮した。これはバッチ試験前に飢餓期間を設けたため、アンモニア酸化細菌の細胞内で mRNA を転写するために必要となるポリメラーゼやヌクレオチドなどの材料が枯渇していたものと推測される。

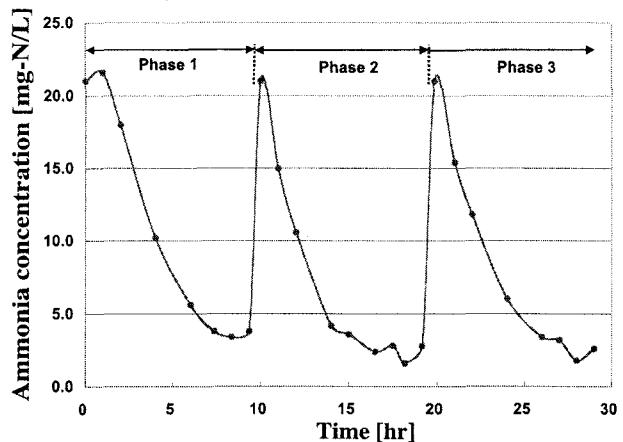


Fig.1 Changes of ammonia concentration during the batch experiment by low ammonia stimulation

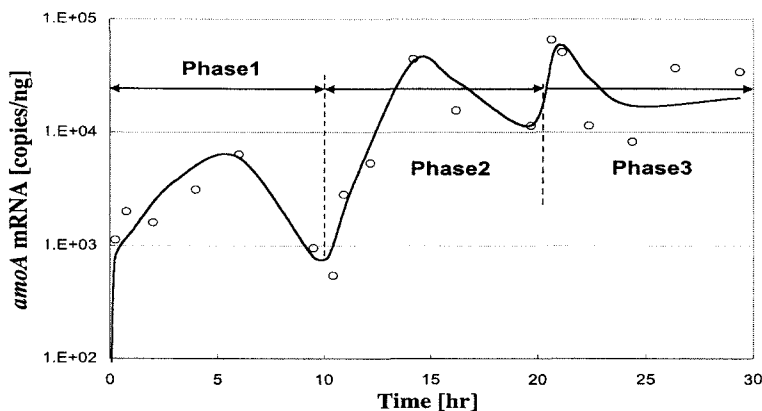


Fig.2 Changes of *amoA* mRNA copy number in total RNA during the batch experiment by low ammonia stimulation

サンプル採取時のアンモニア減少量から算出したアンモニア酸化速度と *amoA* mRNA の転写量の関係を Fig.3 に示す。時間経過による変遷は図中の矢印で示した。低濃度系バッチ試験では両者に明確な傾向は認められなかった。ただし、各 Phase の後半においてアンモニア酸化速度が低下したときは *amoA* mRNA の転写量が低下している。また、Phase2 開始直後における *amoA* mRNA の転写量は 1×10^3 copies/ng と低レベルであったにも関わらず、高いアンモニア酸化速度を示した。これは Phase1 の段階で合成された *amo* 酵素が、細胞内で分解されずに残存していたものと考えられる。すなわち、*amoA* mRNA が 3 時間ほどで完全に分解される²¹⁾のに対して、*amoA* mRNA から翻訳された *amo* 酵素は飢餓条件下に移行しても 24 時間は安定¹⁵⁾であることが原因であると考えられる。

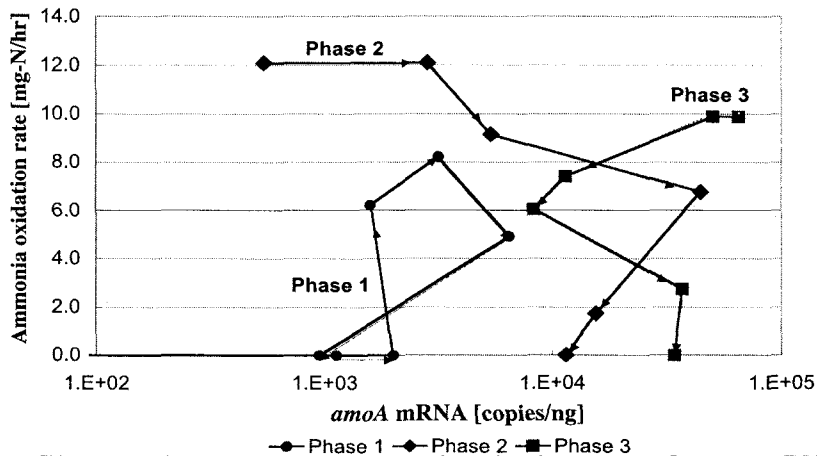


Fig.3 Relationship between ammonia oxidation rate and *amoA* mRNA copy number in the low ammonia shock load experiment

3.2 高濃度系バッチ試験

筆者らは *amoA* mRNA の転写量が、培地の 40mg-N/L のアンモニア濃度に対し 40mg-N/L の亜硝酸の蓄積によって抑制されることを報告した¹²⁾。高濃度系バッチ試験では初期アンモニア濃度を 100mg-N/L に設定するため、アンモニア酸化反応に伴い生成する亜硝酸が *amoA* mRNA の転写へ影響を及ぼす可能性がある。そこで、予備試験を行い、1 時間で減少する培地のアンモニア濃度が約 20mg-N/L であることを確認した。バッチ試験ではこの亜硝酸蓄積による *amoA* mRNA の転写抑制を排除するために、約 1 時間間隔で培地中のアンモニア濃度を追跡し、培地濃度が約 20mg-N/L 低下するごとに、低下した培地濃度に等しいように濃度調整した新しい培地に交換した。アンモニア濃度が最終的に十分に低下した 2 時間後に 100mg-N/L の培地に交換し、それを一つの Phase として計 4 回実施した。それぞれを Phase1'~4' とする。

高濃度系バッチ試験は 3 日間の飢餓運転後のスポンジ担体を採取して行った。高濃度系バッチ試験におけるアンモニア濃度の変化を Fig.4 に示す。グラフ中の黒点が定期的に計測した培地のアンモニア濃度である。中抜き点は亜硝酸蓄積を回避するための培地交換を行った直後の培地のアンモニア濃度である。各 Phase においてアンモニア濃度は十分に低下し、アンモニア酸化速度は Phase を追う度に増大した。

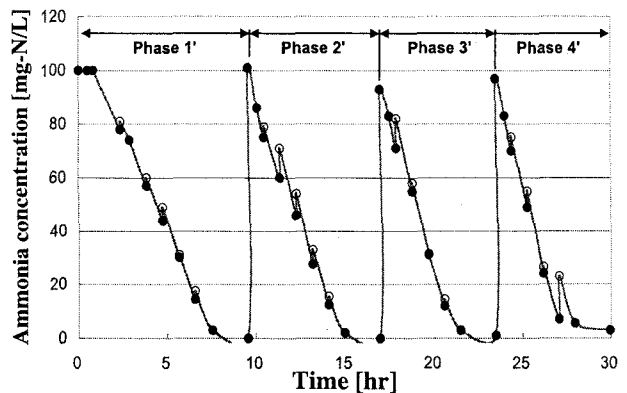


Fig.4 Changes of ammonia concentration during the batch experiment by high ammonia stimulation

各 Phase において汚泥から回収した Total RNA 1ng 中の *amoA* mRNA のコピー数の経時変化を Fig.5 に示す。*amoA* mRNA は低濃度系と同様に $10^3 \sim 10^5$ copies/ng で推移した。アンモニア濃度の高い Phase の初期から徐々にコピー数は上昇し、その Phase の最大値を示した。その後、アンモニア濃度が低下し、アンモニア酸化速度が小さくなると *amoA* mRNA のコピー数は急激に減少した。また、低濃度系と同様に、Phase を追う度に *amoA* mRNA の転写量の最大値を示すまでの経過時間が短くなっている。Sayavedra-Soto ら⁹⁾は、純粋菌株を用いた実験において 8 時間のアンモニアの飢餓で *amoA* mRNA プ

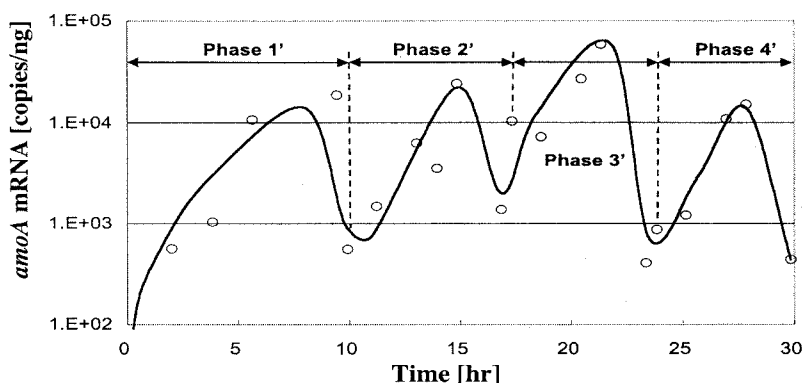


Fig.5 . Changes of *amoA* mRNA copy number in total RNA during the batch experiment by high ammonia stimulation

ールが完全に無くなり、アンモニアの供給後 3 時間で *amoA* mRNA の転写が開始し、*amo* 酵素活性が追従すると報告している。本実験においてもアンモニア供給と *amoA* mRNA の転写が最大になる時間には 3~8 時間程度のタイムラグが観察された。

Fig.6 に高濃度系バッチ試験におけるアンモニア酸化速度と *amoA* mRNA コピー数の関係を示す。飢餓期直後の Phase1'を除いて Phase2'~4'は同じ挙動を示した。すなわち、Phase 初期のアンモニア濃度の高い条件では大きなアンモニア酸化速度を示すが、*amoA* mRNA の転写量は小さい。アンモニア濃度が減少するにつれてアンモニア酸化速度も低下するが、逆に *amoA* mRNA は増大する。アンモニア濃度が *Nitrosomonas europaea* の有する Michaelis-Menten 定数(K_m 値: 14mg-N/L²²)よりも低下し、アンモニア酸化速度が小さくなると *amoA* mRNA コピー数も低レベルに戻る。このことから本実験のような短い時間で変化している *in-situ* でのアンモニア酸化速度と *amoA* mRNA の転写量は必ずしも連動していないことが判明した。これは前述したが、アンモニア酸化酵素と *amoA* mRNA の世代時間が大きく異なることが原因と考えられる。

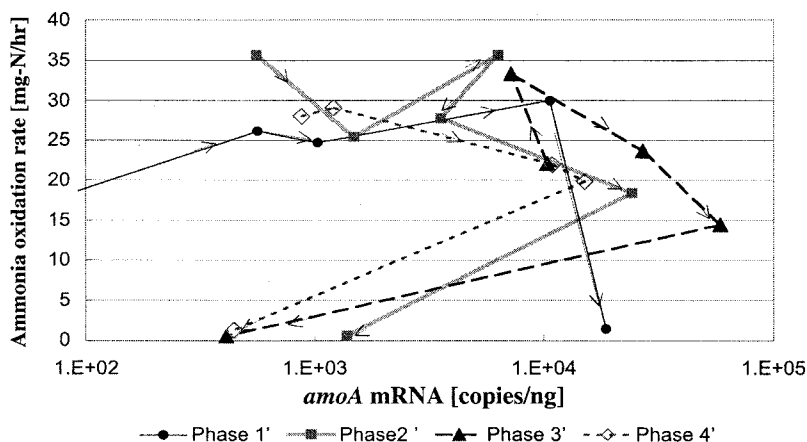


Fig.6 Relationship between ammonia oxidation rate and *amoA* mRNA copy number in the high ammonia shock load experiment

低濃度系および高濃度系バッチ試験における培地のアンモニア濃度と *amoA* mRNA の転写量の関係を **Fig.7** に示す。*amoA* mRNA は、5mg-N/L 以下のアンモニア濃度条件下において、 $10^2 \sim 10^5$ レベルの広範囲で存在し、この範囲内においてアンモニア濃度と *amoA* mRNA の転写量の間に明確な関係は見られなかった。また、アンモニア濃度が 5mg-N/L 以上の条件下でもアンモニア濃度と *amoA* mRNA の間に明ら

かな傾向は確認されない。これは、本実験のようなパルスのな基質供給を行うと、アンモニア濃度が短時間で変化することから、アンモニアによる転写誘導に対して *amoA* mRNA の生成が追従しないためだと考えられる。

RT-PCR 法を用いることによりアンモニア酸化細菌の *amoA* mRNA を複合微生物系から特異的に定量でき、さらに *in-situ* における *amoA* mRNA の転写量を評価することができた。しかし、*amoA* mRNA 定量のもう一つの特長である短時間スケールでの活性変化を追跡することはできなかった。これは、*amoA* mRNA の転写や分解に要する時間に対して、*amo* 酵素の世代時間が長いことが原因と考えられる。さらに、*amoA* mRNA の転写が比較的低いアンモニア濃度条件下 (5mg-N/L 以下) でも確認されるのに対し、*amo* 酵素の基質親和定数がその値よりも大きいことが影響しているものと推察される。

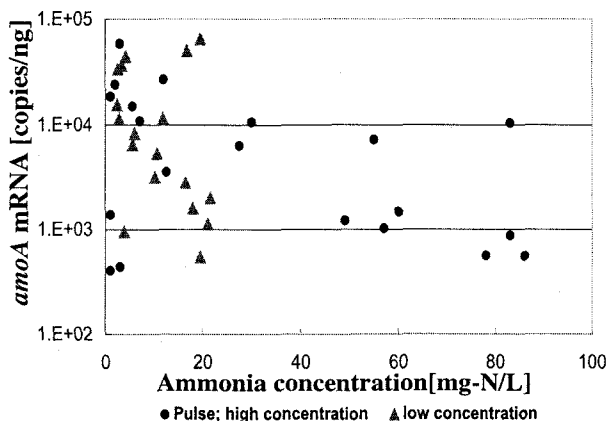


Fig.7 Relationship between *amoA* mRNA number and ammonia concentration

4 まとめ

本研究で得られた知見をまとめると以下の通りである。

- 1) *amoA* mRNA の *in-situ* 転写量を RT-PCR と Real time PCR 法を用いることで活性汚泥内から特異的に定量することができた。今回行った低濃度系、高濃度系バッチ試験において *amoA* mRNA の転写量は共に $10^3 \sim 10^5$ copies/ng-totalRNA のレベルで推移した。
- 2) 培地にアンモニアを供給するとアンモニア酸化速度は最大を示し、アンモニア濃度の減少とともにアンモニア酸化速度は低下する。一方、*amoA* mRNA はアンモニア供給後から上昇しはじめ、数時間で最大値に達した。培地のアンモニア濃度が *Nitrosomonas* 属の K_m 値を下回ると *amoA* mRNA の転写は急激に抑制された。
- 3) アンモニアを消費した後一定濃度の培地を再供給することを繰り返すことで、アンモニア酸化速度は次第に上昇し、*amoA* mRNA の転写応答も早くなる傾向を示した。
- 4) *amoA* mRNA は 5mg-N/L 以下の低アンモニア条件でも転写量が大きく変化し、アンモニア濃度が 5～100mg-N/L ではアンモニア濃度と *amoA* mRNA 転写量に相関関係が認められなかった。

謝辞：本研究は NEDO(新エネルギー産業技術総合開発機構)の産業技術研究事業費助成金の助成 (課題番号 01B63001d、研究代表者：山口隆司) を受けたことを付記し、関係各位に深謝いたします。

参考文献

- 1) Harms, G., A.C. Layton, H.M. Dionisi, I.R. Gregory, V.M. Garrett, S.A. Hawkins, K.G. Robinson and G.S. Saylor. 2003. Real-time PCR Quantification of Nitrifying Bacteria in a Municipal Wastewater Treatment Plant. *Environ. Sci. Technol.* **37**: 343-351.
- 1) Hermansson, A. and P. Lindgren. 2001. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 972-976.
- 2) Rothauwe, J.-H., H.-P. Witzel, and W. Liesack. 1997. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional

- Marker: Molecular Fine-Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4704-4712.
- 3) 中村明靖, 荒木信夫, 山口隆司, 山崎慎一, 大橋晶良, 原田秀樹. 2002. Real-time PCR 法と Competitive PCR 法を用いた *Nitrosomonas* 属の 16SrDNA 及び *amoA* 遺伝子の定量. 環境工学研究論文集. **37**:365-375.
 - 4) Sayavedra-Soto, L.A., N.G.Hommes, J.J.Alzerreca, D.J.Arpa, J.M.Norton and M.G.Klotz. 1998. Transcription of the *amoC*, *amoA*, *amoB* genes in *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. NpAV. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**:81-88.
 - 5) Hommes, N.G., L.A.Sayavedra-Soto and D.J.Arpa. 2001. Transcript Analysis of Multiple Copies of *amo* (Encoding Ammonia Monooxygenase) and *hao* (Encoding Hydroxylamine Oxidoreductase) in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **183**:1096-1100.
 - 6) Hommes, N.G., L.A.Sayavedra-Soto and D.J.Arpa. 1998. Mutagenesis and Expression of *amo*, Which Codes for Ammonia Monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **180**:3353-3359.
 - 7) Stein, L.Y., L.A.Sayavedra-Soto, N.G.Hommes and D.J.Arpa. 2000. Differential regulation of *amoA* and *amoB* gene copies in *Nitrosomonas europaea*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**:163-168.
 - 8) Sayavedra-Soto, L.A., N.G.Hommes, S.A.Russell and D.J.Arpa. 1996. Induction of ammonia monooxygenase and hydroxylamine oxidoreductase mRNA by ammonium in *Nitrosomonas europaea*. *Mol. Microbiol.* **20**:541-548.
 - 9) Aoi, Y., Y.Shiramasa, S.Tuneda, A.Hirata, A.Kitayama and T. Nagamune. 2002. Real-time monitoring of ammonia-oxidizing activity in a nitrifying biofilm by *amoA* mRNA analysis. *Wat. Sci. Technol.* **46**:439-472.
 - 10) 蛭江美考, 松村正利, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平. 2003. 窒素濃度および温度がアンモニア酸化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響. 第 37 回日本水環境学会年会講演集. P428.
 - 11) 井口晃徳, 塚本雄介, 中村明靖, 荒木信夫, 山口隆司, 大橋晶良, 原田秀樹. 2002. RT-PCR 法で評価した硝化汚泥中の *amoA* 遺伝子の発現量と比活性の関係. 第 36 回日本水環境学会年会講演集. P297.
 - 12) 三浦英智, 蛭江美考, 常田聡, 平田彰, 稲森悠平. 2003. 流入負荷変動に対するアンモニア酸化細菌の活性発現のモニタリング解析. 第 37 回水環境学会年会講演集. P429.
 - 13) Chu, C.P., D.J.Lee, B.-V.Chang, C.S.Liao. 2001. Using ATP Bioluminescence Technique for Monitoring Microbial Activity in Sludge. *Biotechnol. Bioeng.* **75**: 469-474.
 - 14) Stein, L.Y. and D.J. Arpa. 1998. Ammonium Limitation Results in the Loss of Ammonia-Oxidizing Activity in *Nitrosomonas europaea*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1514-1521.
 - 15) Bustin, S.A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-193.
 - 16) Bustin, S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**:23-39.
 - 17) Purkhold, U., A.Pommerening-Roser, S.Juretschko, M.C.Schmid, H.-P.Koops and M.Wagner. 2000. Phylogeny of All Recognized Species of Ammonia Oxidizers Based on Comparative 16S rRNA and *amoA* Sequence Analysis: Implications for Molecular Diversity Surveys. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5368-5382.
 - 18) Prinic, A., I.Mahne, F.Megusar, E.A.Paul and J.M.Tiedje. 1998. Effects of pH and oxygen and Ammonium Concentrations on the community Structure of Nitrifying Bacteria from Wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:3584-3590.
 - 19) Araki, N., A.Ohashi, I.Machdar and H.Harada. 1999. Behaviors of nitrifiers in a novel biofilm reactor employing hanging sponge-cubes as attachment site. *Wat. Sci. Technol.* **39**(7), 23-31.
 - 20) Hyman, M.R. and D.J.Arpa. 1995. Effects of Ammonia on the De Novo Synthesis of Polypeptides in cells of *Nitrosomonas* Denied Ammonia as an Energy Source. *J. Bacteriol.* **177**: 4974-4979.
 - 21) Belser, L.W. and E.L. Schmidt. 1980. Growth and Oxidation Kinetics of Three Genera of Ammonia Oxidizing Nitrifiers. *FEMS Microbiol. Lett.* **7**: 213-216.