

ZASTOSOWANIE TECHNIKI REAL-TIME PCR W DIAGNOSTYCE PATOGENÓW W PROCESIE OCZYSZCZANIA ŚCIEKÓW*

Małgorzata Kacprzak, Krzysztof Fijałkowski, Agnieszka Rorat

Instytut Inżynierii Środowiska, Wydział Inżynierii i Ochrony Środowiska, Politechnika Częstochowska
ul. Brzeźnicka 60A, 42-200 Częstochowa
e-mail: AgnieszkaRorat@gmail.com

Streszczenie. Najważniejsze w walce z chorobotwórczymi patogenami jest ich szybkie, skuteczne i dokładne diagnozowanie. Tradycyjne metody, wymagające wielogodzinnych hodowli, są stopniowo wypierane przez narzędzia biologii molekularnej i biochemii, takie techniki jak: PCR, elektroforeza, hybrydyzacja czy znakowanie mikroorganizmów przy pomocy zielonego białka fluorescencyjnego (ang. GFP). Celem badań było określenie, czy metoda real-time PCR może zastąpić tradycyjną metodę posiewów powierzchniowych dla próbek ścieków i osadów ściekowych oraz w jakich okolicznościach jej stosowanie jest wskazane. Określono nie tylko obecność tradycyjnych organizmów wskaźnikowych, takich jak *Salmonella typhimurium* czy *Clostridium perfringens*, ale także oznaczono patogeny „wylaniające się” (*Escherichia coli* 0157:H7), oraz tzw. patogeny „nowe” (*Yersinia enterocolitica* i *Legionella pneumophila*). Jako fluorochromu użyto DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit. Stwierdzono, że procesy oczyszczania ścieków w znacznym stopniu wpływają na redukcję liczebności wymienionych mikroorganizmów, choć ich nie eliminują, a ścieki i osady ściekowe opuszczające oczyszczalnie mogą nadal pozostawać ich istotnym rezerwuarem. Metoda real-time PCR okazała się wysoce czułą metodą określenia liczebności mikroorganizmów ze ścieków i osadów ściekowych, choć izolacja DNA nie tylko z żywych komórek mikroorganizmów może dać znacznie zawyżone (fałszywie pozytywne) wyniki.

Słowa kluczowe: real-time PCR, oczyszczanie ścieków, osad ściekowy, patogeny

WSTĘP

Tradycyjne metody oznaczania drobnoustrojów mają wiele wad. Przede wszystkim tylko 1% gatunków bakterii zawartych w glebie można w łatwy sposób hodować (Malik i in. 2008). Hodowla drobnoustrojów jest limitowana odpowiednim składem pożywki

*Badania finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant nr N N523 612739). Sprzęt do analiz molekularnych zakupiono w ramach projektu: Wyposażenie Centralnego Laboratorium Środowiskowego WKP_1/1.4.3/2/2005/61/180/365/2006/U.

i zapewnieniem niemal identycznych z naturalnymi warunków. Ponadto, niektóre mikroorganizmy mogą rosnać na podłożach szybciej, maskując przy tym inne, słabsze drobnoustroje. Powoduje to powstanie zaburzonego obrazu mikrośrodowiska (Gilbride i in. 2006). Diagnostyka drobnoustrojów oparta na metodach wymagających hodowli, czy obserwacji mikroskopowych, pozwoliła na sklasyfikowanie wielu organizmów. Pomimo tego wciąż pozostaje bardzo dużo niezidentyfikowanych gatunków i powstają nowe szczepy gatunków już istniejących. Dokładne poznanie metabolizmu drobnoustrojów jest sprawą kluczową dla ich zastosowania w bioremediacji skażonych terenów czy ścieków. Dlatego też poszczególne metody mogą posłużyć nie tylko stwierdzeniu, czy i w jakich ilościach dany mikroorganizm znajduje się w badanej próbce, ale też w jaki sposób oddziałuje na konkretny ekosystem (Schneegurt i in. 1998). Ogromną zaletą metod diagnostycznych, omijających konieczność hodowli mikrobiologicznej, jest możliwość izolowania DNA i ekstrahowania produktów metabolizmu organizmów bezpośrednio z próbek środowiskowych, co zapewnia analizę w naturalnych warunkach (Francy i in. 2009).

Osady ściekowe, wprowadzane do gleby w celu poprawienia jej właściwości fizykochemicznych, mogą być szczególnie niebezpieczne dla ekosystemu ze względu na dużą zawartość groźnych grzybów i bakterii (Bień 2007). Mikroorganizmy te są jednym z powodów, dla których z wielką ostrożnością podchodzi się do zagospodarowania osadów w rolnictwie, czy też w celu rekultywacji gleb (Kacprzak, Stańczyk-Mazanek 2003). Chorobotwórcze patogeny mogą być bardzo szybko wykrywane przy pomocy odpowiednich testów molekularnych nie tylko w wodzie, glebie, pożywieniu, powietrzu, ale też w próbkach pochodzących z oczyszczalni ścieków. W wielu przypadkach wczesna detekcja równa się szybkiej odpowiedzi, a ta decydować może o życiu i zdrowiu wielu istot (Frostedgard i in. 1993).

Spśród technik bazujących na obecności kwasów nukleinowych w komórkach drobnoustrojów, na szczególną uwagę zasługuje metoda PCR. Dzięki jej zastosowaniu produkowane są miliony kopii pożądanego genu, charakterystycznego dla danego organizmu, z dużą dokładnością, w krótkim czasie. Wiele zespołów badawczych podkreśla zalety tej metody w diagnostyce między innymi bakterii *Clostridium perfringens* w przewodzie pokarmowym kurcząt (Wise i Siragusa 2005), *Yersinia enterocolitica* w pożywieniu (Lambertz i in., 2008), ale też różnorodnej mikroflory w ściekach czy osadach ściekowych (Lee i in. 2006, Varma i in. 2009). Skuteczność przeprowadzanej reakcji zależy w dużej mierze od zastosowanej metody izolacji materiału genetycznego z komórek bakterii. Konieczne jest uzyskanie odpowiedniej czystości i ilości DNA, co w przypadku próbek środowiskowych stanowi trudność. Wintzingerode i in. stwierdzili, że niewystarczająca liza komórek może skutkować preferencyjną ekstrakcją DNA z bakterii gram ujemnych, podczas gdy przesadnie „ostre” traktowanie komórek może być powodem utraty DNA (Wintzingerode i in. 1997). Ogromnym problemem w przypadku próbek środowiskowych są wszelkie inhibitory, takie jak kwasy huminowe, materia organiczna, czy fragmenty gliny. Substancje te mogą izolować się razem z kwasami nukleinowymi hamując reakcję PCR (Kirk i in. 2004).

Celem pracy było określenie skuteczności metody real-time PCR jako narzędzia umożliwiającego diagnostykę mikrobiologiczną w próbkach ścieków i osadów ściekowych. Podjęto próbę określenia zmian liczebności pięciu gatunków drobnoustrojów: *Salmonella typhimurium*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157:H7, *Yersinia enterocolitica* i *Legionella pneumophila* w poszczególnych etapach oczyszczania ścieków.

MATERIAŁ I METODY

Czyste kultury bakterii

Czyste kultury pięciu bakterii, to jest *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* str. LT2, *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Escherichia coli* O157:H7 str. EDL933, *Yersinia enterocolitica* subsp. *enterocolitica* 8081 i *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* str. *Philadelphia* 1 poddano hodowli powierzchniowej na podłożu stałym z wykorzystaniem selektywnych pożywek (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Po określonym czasie inkubacji szalki przepłukano wodą destylowaną i przeniesiono po 1 ml zawiesiny do probówek. Całość zwirowano (12000 rpm, 4°C, 1 min) z uzyskanego peletu komórek bakteryjnych wyizolowano genomowe DNA przy pomocy zestawu QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Duesseldorf, Germany), zgodnie z zaleceniami producenta. DNA przechowywano w temperaturze -80°C.

Izolacja DNA genomowego bakterii z próbek środowiskowych

Próbki przeznaczone do badań pobrano z komunalnej oczyszczalni ścieków o przepustowości ~ 22 000 m³·d⁻¹. Pobrano ścieki dopływające, ścieki z komór napowietrzania, ścieki z osadnika wtórnego i oczyszczone oraz osady: z komór napowietrzania, osad z komór fermentacyjnych, osad z osadnika wtórnego oraz osad po prasie.

DNA genomowe wyizolowano zestawem MO BIO UltraClean DNA extraction kit (MO Bio Laboratories Inc., Carlsbad, USA) według protokołu dla zmaksymalizowania ilości otrzymanego DNA. Czystość wyekstrahowanego w ten sposób DNA potwierdzono przy pomocy pomiaru spektrofotometrycznego (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany), przy czym stosunek A260/280 mieścił się w przedziale 1.7-2.0.

Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze -80°C (Innova range U101, New Brunswick Scientific co., Inc., New Jersey, USA).

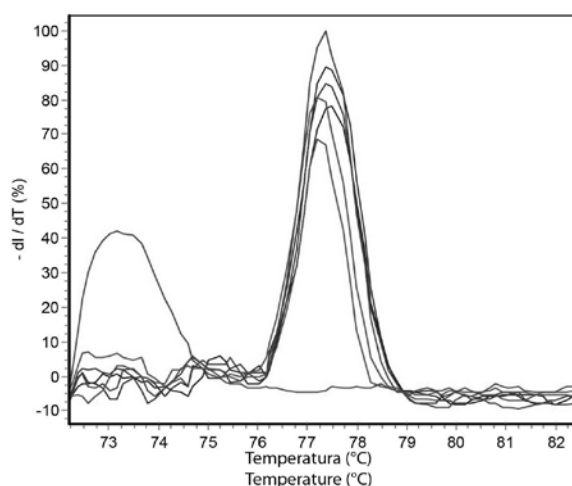
Reakcja real-time PCR

Sekwencje starterów do reakcji real-time PCR zaczerpnięto z literatury (tab. 1). Mieszanka reakcyjna zawierała 25 µl 2x DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes Oy, Vantaa, Finland), 5 µl badanego DNA (1-100ng), po 1 µl starterów odpowiednich dla konkretnej bakterii (Genomed S.A., Warszawa, Polska) oraz 18 µl wody czystej pod względem mikrobiologicznym. Zastosowano następujące warunki temperaturowe dla przeprowadzonych reakcji: 95°C przez 15 minut wstępnej denaturacji oraz 40 cykli złożo-

nych z trzech następujących po sobie etapów: denaturacja w 94°C przez 10 sekund, przyłączenie starterów przez 35 sekund z wykorzystaniem gradientu temperatur specyficznego dla każdej pary starterów, wydłużanie łańcucha DNA w 72°C przez 30 sekund. W celu weryfikacji wyników przeprowadzono również dodatkowy etap wyznaczania krzywej topnienia powstałych fragmentów DNA (rys. 1): 95°C przez 10 sekund, 65°C przez 10 sekund, stopniowe zwiększanie temperatury od 65°C do 95°C przez 20 minut, 95°C przez 10 sekund. Dla każdej pary starterów sporządzono kontrolę negatywną, dzięki której wykluczono możliwość tworzenia się dimerów primer-primer.

Tabela 1. Sekwencje DNA wykorzystane jako startery do reakcji real-time PCR
Table 1. DNA sequences used for real-time PCR primers

Bakteria Bacteria	Starter Primer	Sekwencja – Sequence	Gen Gene	Źródło litera- turowe Reference
<i>S. typhimurium</i>	Forward	GGTCTGCTGTACTCCACCTTCAG	bipA	Calvo i in. 2008
	Reverse	TTGGAGATCAGTACGCCGTCT		
<i>Y. enterocolitica</i>	Forward	ATGATAACTGGGGAGTAATAGGTTTCG	ail	Lambertz i in. 2008
	Reverse	CCCAGTAATCCATAAAGGCTAACATAT		
<i>C. perfringens</i>	Forward	GCATGAGTCATAGTTGGGATGATT	plc	Shannon i in. 2007
	Reverse	CCTGCTGTTCTTTTGGAGAGTTAG		
<i>L. pneumophila</i>	Forward	ACCGATGCCACATCATTAGCT	mip	Shannon i in. 2007
	Reverse	CCAAATCGGCACCAATGC		
<i>E. coli O157:H7</i>	Forward	TCGAGCGGACCATGATCA	tir	Shannon i in. 2007
	Reverse	GCGGCGTCTGAGATAACA		



Rys. 1. Krzywa topnienia dla *Yersinia enterocolitica*

Fig. 1. Melting curve for *Yersinia enterocolitica*

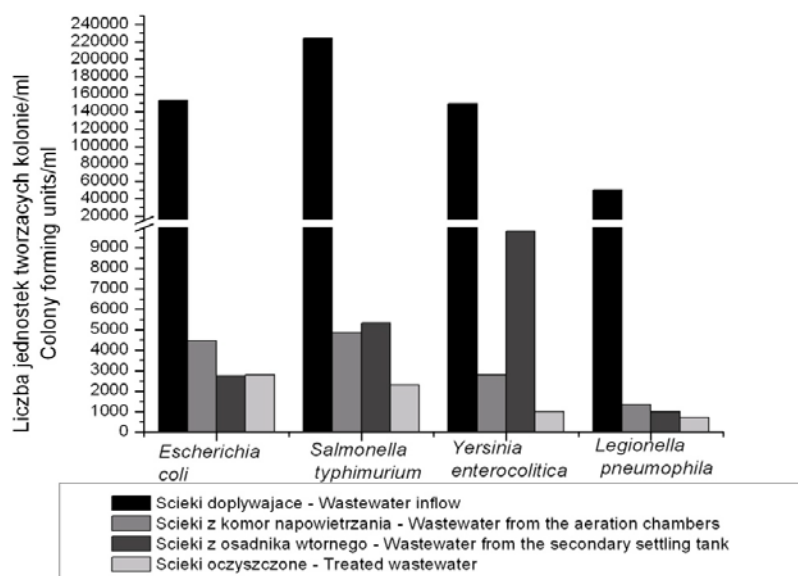
Posiewy powierzchniowe na podłożu stałym

Pobrano 1 ml lub 1g każdej próbki. Odmierzoną ilość zawieszono w 9 ml buforu PBS (Calbiochem, EMD Biosciences Inc. La Jolla , CA, USA) i dokładnie wymieszano. Sporządzono kolejne rozcieńczenia: 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000.

Na wcześniej przygotowane podłoża (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) posiewano 0,1 ml odpowiednio rozcieńczonej próbki. Wszystkie analizy wykonywane były w dwóch powtórzeniach. Po określonym dla każdej pożywki czasie odczytano ilość jednostek tworzących kolonie dla każdej próbki.

WYNIKI I DYSKUSJA

Zgodnie z oczekiwaniami autorów, stwierdzono obecność wszystkich badanych mikroorganizmów w ściekach dopływających, obserwując znaczną redukcję kontaminacji w kolejnych etapach ich oczyszczania (rys. 2).

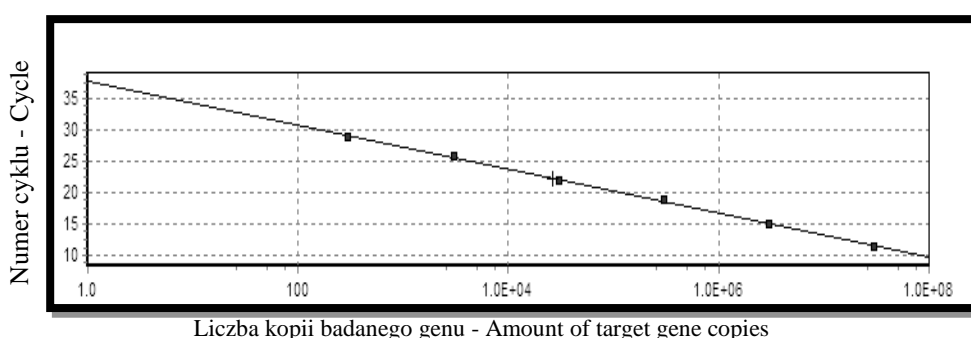


Rys. 2. Zawartość jednostek tworzących kolonie poszczególnych drobnoustrojów w próbkach pochodzących z kolejnych etapów oczyszczania ścieków na podstawie metody płytkowej

Fig. 2. The amount of colony forming units of microorganisms in samples from successive stages of wastewater treatment – Petri dish method

Kolejne rozcieńczenia DNA wyizolowanego z czystych kultur bakterii posłużyły jako wzorzec do wykreślenia krzywej standardowej w reakcji real-time PCR. Przykładowa

krzywa określająca zależność między numerem cyklu reakcji, w którym uzyskano określoną ilość kopii materiału genetycznego (ang. *cycle threshold*), a logarytmem stężenia materiału genetycznego w badanej próbce, została przedstawiona na rysunku 3. Wykreślenie powyższej zależności umożliwiło odczyt ilości kopii badanego DNA dla każdej próbki, a więc określenie liczby komórek bakteryjnych. Czulość metody ograniczona jest przez rozcieńczenie DNA wzorcowego, czyli istnieje możliwość wykrycia od 30 do 3000000 kopii genu. Uzyskane wyniki porównano z wynikami posiewów powierzchniowych.



Rys. 3. Krzywa standardowa dla mikroorganizmu *Salmonella typhimurium*

Fig. 3. Standard curve for *Salmonella typhimurium*

W przypadku każdego z badanych drobnoustrojów stwierdzono większą liczbę komórek bakteryjnych metodą real-time PCR (tab. 2 i 3). Fakt ten tłumaczy się możliwością izolacji DNA również z martwych komórek bakteryjnych, co uważane jest za główną wadę tej metody w aspekcie diagnostycznym (Kacprzak i Fijałkowski 2009). Podobny wniosek wysunuli Morio i in. (2008) porównując metodę płytkową z real-time PCR w oznaczaniu bakterii *Legionella pneumophila* oraz Lee i in. (2006) przeprowadzając podobne porównanie dla kilku patogenów występujących w oczyszczalniach ścieków. Soejima i in. (2008) zaproponowali rozwiązanie, jakim jest wstępne traktowanie próbek monoazydkiem etydyny, co jest również przedmiotem badań autorów publikacji. Zadaniem tej substancji jest penetracja do martwych komórek i związanie się z ich materiałem genetycznym, co uniemożliwia izolację DNA. Podobne rozwiązanie zaproponowali Nocker i in. (2007), sugerując zastosowanie w tym celu monoazydki propydyny. Późniejsze prace innych zespołów potwierdzają możliwość izolacji DNA wyłącznie z komórek żywych, jednak konieczne są dalsze badania nad możliwością zastosowania wyżej wymienionych substancji w przypadku próbek pochodzących z oczyszczalni ścieków (Varma i in. 2009).

Skuteczność metody real-time PCR w diagnostyce mikrobiologicznej w produktach spożywczych stwierdzono wielokrotnie (Lambertz i in. 2008, Omiccioli i in. 2009). Jej

zastosowanie w diagnostyce groźnych bakterii udowodnili Volkmann i in. (2004), badając pięć wybranych oczyszczalni ścieków pod kątem obecności genów odpowiedzialnych za odporność mikroorganizmów na konkretne antybiotyki.

Tabela 2. Porównanie metody płytkowej i real-time PCR dla *Salmonella typhimurium*

Table 2. Comparison of Petri dish method and Real-time PCR for *Salmonella typhimurium*

Miejsce poboru próbki Sampling location	J.t.k.·ml ⁻¹ Cfu·ml ⁻¹	Liczba kopii genu·ml ⁻¹ Target gene copy·ml ⁻¹
Osad z komór napowietrzania Sewage sludge from the aeration chamber	139 545	1 413 594
Osad z komór fermentacyjnych Sludge from the fermentation chamber	3 500	456 024
Osad wtórny Secondary sludge	127 273	378 909
Osad po prasie sewage sludge after the press	89 000	2 113 142

Tabela 3. Porównanie metody płytkowej i real-time PCR dla *Legionella pneumophila*

Table 3. Comparison of Petri dish method and Real-time PCR for *Legionella pneumophila*

Miejsce poboru próbki Sampling location	J.t.k.·ml ⁻¹ Cfu·ml ⁻¹	Liczba kopii genu·ml ⁻¹ Target gene copy·ml ⁻¹
Osad z komór napowietrzania Sewage sludge from the aeration chamber	52273	6220000
Osad z komór fermentacyjnych Sludge from the fermentation chamber	20500	14355300
Osad wtórny Secondary sludge	2600	518160
Osad po prasie sewage sludge after the press	18095	9500000

WNIOSKI

1. Wysoko czuła metoda real-time PCR stanowi obiecujące narzędzie biologii molekularnej, dzięki któremu możliwa jest szybka i dokładna diagnostyka mikrobiologiczna.
2. Próbki środowiskowe, a w szczególności te pochodzące z oczyszczalni ścieków, mogą zawierać inhibitory reakcji PCR, wobec czego konieczne jest szczególne trakto-

wanie materiału podczas izolacji DNA, a w niektórych przypadkach doczyszczanie otrzymanego już kwasu dezoksyrybonukleinowego.

3. Stosunkowo wysoki koszt reakcji real-time PCR rekompensowany jest poprzez możliwość uzyskania diagnozy w bardzo krótkim czasie.

4. Konieczne są kolejne badania nad zastosowaniem monoazydku etydyny jako substancji umożliwiającej izolację DNA tylko z żywych komórek bakteryjnych.

PIŚMIENNICTWO

- Bień J.B., 2007. Osady Ściekowe. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Politechniki Częstochowskiej, Częstochowa.
- Calvo L., Martínez-Planells A., Pardos-Bosch J., Garcia-Gi L.J., 2008. A new real-time PCR assay for the specific detection of salmonella spp. Targeting the bipA Gene. Food Anal. Methods 1, 236-242.
- Francy, D.S., Bushon, R.N., Brady, A.M.G., Bertke, E.E., Kephart, C.M., Likirdopulos, C.A., Mailot, B.E., Schaefer, F.W., III, and Lindquist, H.D.A. 2009, Performance of traditional and molecular methods for detecting biological agents in drinking water: U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report, 2009-5097, 17 p.
- Frostegard A., Tunlid A., Baath E., 1993. Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals. App. Env. Microbiol., 11(59), 3605-3617.
- Gilbride K.A., Lee D.Y., Beaudette L.A., 2006. Molecular techniques in wastewater: Understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. J. Microbiol. Methods, 66(1), 1-20.
- Kacprzak M., Fijałkowski K., 2009. Wstępne badania dotyczące stosowania metody real-time PCR do wykrywania *Salmonella typhimurium* w ściekach. Monografie Wydziału Inżynierii Mechanicznej i Robotyki, AGH im. Stanisława Staszica w Krakowie, 38, 105-112.
- Kacprzak M., Stańczyk-Mazanek E., 2003. Changes in the structure of fungal communities of soil treated with sewage sludge. Biol. Fertil. Soils, 38, 89-95.
- Kirk J.L., Beaudette L.A., Hart M., Moutoglis P., Klironomos J.N., Lee H., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. J. Microbiol. Methods, 58, 169-88
- Lambertz S.T., Nilsson C., Hallanvuo S., Lindblad M., 2008. Real-Time PCR method for detection of pathogenic yersinia enterocolitica in food. Appl. Environ. Microbiol., 74(19), 6060-6067.
- Lee D.-Y., Shannon K., Beaudette L.A., 2006. Detection of bacterial pathogens in municipal wastewater using an oligonucleotide microarray and real-time quantitative PCR. J. Microbiol. Methods, 65, 453-467.
- Malik S., Beer M., Megharaj M., Naidu R., 2008. The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. Environ. Int., 34(2), 265-76.
- Morio F., Corvec S., Caroff N., Le Gallou F., Drugeon H., Reynaud A., 2008. Real-time PCR assay for the detection and quantification of Legionella pneumophila in environmental water samples: Utility for daily practice. Int. J. Hyg. Environ.-Health, 211, 403-411.
- Nocker A., Fernandez P., Burr M.D., Camper A.K., 2007. Use of propidium monoazide for live/dead distinction in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol., 73(16), 5111-5117.
- Omiccioli E., Amagliani G., Brandi G., Magnani M., 2009. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. Food Microbiology, 26, 615-622.
- Schneegurt M.A., Kulpa Ch.F. Jr., 1998. The application of molecular techniques in environmental biotechnology for monitoring microbial systems. Appl. Biochem., 27, 73-79.

- Shannon K., Lee D.-Y., Trevors J.T., Beaudette L.A., 2007. Detection of bacterial pathogens during wastewater treatment using real-time PCR. *Science of the Total Environment*, 282, 121-129.
- Soejima T., Iida K., Qin T., Taniai H., Seki M., Yoshida S., 2008. Method to detect only live bacteria during PCR amplification, *J. Clin. Microbiol.*, 46, 2305-2313.
- Varma M., Field R., Stinson M., Rukovets B., Wymer L., Haugland R., 2009, Quantitative real-time PCR analysis of total and propidium. *Water Research*, 43 (19), 4790-4801
- Volkman H., Schwartz T., Bischoff P., Kirchen S., Obst U., 2004. Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods*, 56, 277-286.
- Wintzingerode F.V., Gobel U.B., Stackebrandt E., 1997. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21, 213-29.
- Wise M.G., Siragusa G.R., 2005. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(7), 3911-3916.

APPLICATION OF REAL-TIME PCR METHOD IN THE DIAGNOSIS OF PATHOGENS IN SEWAGE TREATMENT PROCESS

Małgorzata Kacprzak, Krzysztof Fijałkowski, Agnieszka Rorat

Institute of Environmental Engineering, Faculty of Environmental Protection and Engineering,
Częstochowa University of Technology
ul. Brzeźnicka 60A, 42-200 Częstochowa
e-mail: AgnieszkaRorat@gmail.com

Abstract. The most important thing when dealing with pathogens is quick, effective and accurate diagnosis. Traditional methods require many hours of culturing and are gradually being replaced by molecular biology and biochemistry tools, involving techniques like PCR, electrophoresis, hybridisation or green fluorescent protein (GFP) marking. The aim of this study was to determine whether real-time PCR may replace the traditional method of surface cultures of environmental samples and when it should be used. The analysed samples came from various stages of wastewater treatment processes. The amount of indicator organisms' cells like *Salmonella typhimurium* or *Clostridium perfringens* was determined. The method was also tested for "emerging" organisms such as *Escherichia coli* O157:H7 and for "new" bacteria like *Yersinia enterocolitica* or *Legionella pneumophila*. The DyNAmo HS SYBR Green qPCR Kit was used as a fluorochrome. It was noted, that wastewater treatment processes significantly influenced reduction of quantity of studied microorganisms, however do not eliminate them, hence wastewater and sewage sludge may still be an important reservoir of pathogens. The real-time PCR is highly sensitive method, although isolation of DNA not only from alive cells of microorganisms, could result in high false positive results.

Keywords: real-time PCR, wastewater treatment, sewage sludge, pathogens