



PENENTUAN AWAL KOMUNITI BAKTERIA SEL BAHAN API MIKROB DALAM AIR SISA KUMBAHAN

S.M ZAIN¹, R. HASHIM¹, N. S. ROSLANI¹, F. SUJA¹, N. ANUAR², W.R.W. DAUD² & N.E.A
BASRI¹

¹ Jabatan Kejuruteraan Awam & Struktur,

² Jabatan Kejuruteraan Kimia & Proses,

Fakulti Kejuruteraan & Alam Bina,

Universiti Kebangsaan Malaysia

43600 Bangi, Selangor

Email:smz@vlsi.eng.ukm.my; Tel.:03-89216216; Fax:03-89216212

ABSTRAK

Mikroorganisma berperanan penting dalam membantu merawat air sisa kumbahan dengan menyingkirkan kandungan karbon dan nitrogen. Pada masa yang sama, mikroorganisma dapat menjana tenaga elektrik melalui penggunaan sel bahan api mikrob (MFC) di dalam sistem rawatan yang dijalankan. Ekologi mikrob khususnya bakteria di dalam air sisa dapat mempengaruhi kestabilan dan kecekapan penjana tenaga elektrik sel bahan api mikrob, namun sedikit maklumat sahaja diketahui tentang ekologi mikrob yang diaplikasikan ke dalam sistem MFC. Tujuan utama kajian ini adalah untuk menentukan jenis bakteria yang hadir di dalam air sisa kumbahan yang dapat membantu menghasilkan tenaga elektrik dan pada masa yang sama dapat menyingkirkan kandungan karbon dan nitrogen. Kertas kerja ini membincangkan peringkat awal pengenalpastian komuniti bakteria untuk sel bahan api mikrob. Kaedah pengesanan kumpulan bakteria yang digunakan adalah teknik *fluorescence in situ hybridization* (FISH) manakala kaedah *polymerase chain reaction* (PCR) untuk mengenalpasti bakteria tersebut. Bacteria yang didapati daripada air sisa dikultur dan dituliskan diatas nutrient agar untuk menentukan ciri-ciri morfologi koloni bakteria tersebut. Berdasarkan pencirian koloni dan pewarnaan Gram, sebanyak 21 pencilan telah diperolehi daripada 3 lokasi sampel air sisa kumbahan daripada loji rawatan enap cemar teraktif. Keputusan awal yang diperolehi menunjukkan terdapatnya 2 kumpulan bakteria yang terlibat iaitu *Bacillus sp* dan

Nitrosomonas sp dengan penghasilan maksimum tenaga elektrik yang diperolehi daripada sampel tangki edaran enap cemar teraktif adalah $9.053\text{mW}/\text{cm}^2$ dan mencatat tahap penyingkiran COD dan jumlah nitrogen Kjeldahl (TKN) masing-masing 26.8% dan 40%.

Kata Kunci : *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH); Polymerase Chain Reaction (PCR); bakteria ; sel bahan api mikrob ; air sisa kumbahan*

PENGENALAN

Matlamat utama dalam penentuan mikroorganisma dalam bidang mikrobiologi mahupun alam sekitar adalah untuk mendapatkan keputusan yang tepat dan cepat. Kaedah pengkulturan konvensional adalah mengambil masa yang lama dan terlalu selektif, terutamanya bagi bakteria yang belum dikultur dan teknik ini tidak akan dapat memberikan keputusan yang tepat bagi komuniti bakteria yang bercampur dan pelbagai (Annette et al., 2000). Sejak berdekad yang lalu, pelbagai kaedah biologi molekul telah diperkenalkan dan digunakan dalam penentuan kepelbagaian bakteria dalam air sisa antaranya adalah kaedah *fluorescence in situ hybridization (FISH)* dan *polymerase chain reaction (PCR)* (Micheal et al., 2002 ; Rudolf et al., 2001 ; Yoshiteru et al., 2000). Perkembangan kedua-dua teknik biologi molekul ini membolehkan ahli sains memperolehi penyelesaian kepada teknik konvensional tersebut.

FISH merupakan satu teknik yang sangat berkesan untuk mengesan bakteria spesifik dan menganalisis kompleks komuniti mikrob berdasarkan pada penghibridan *in situ* menggunakan prob 16S rRNA oligonukleotida sasaran yang dilabelkan dengan sebatian yang berpendafluor (Yoshiteru et al., 2000). Pengkhususan prob yang digunakan mampu untuk mengesan/menentukan mikroorganisma pada setiap aras taksonomi, iaitu dari aras paling bawah domain sehingga kepada satu resolusi untuk membezakan setiap spesis secara individu (Jose et al., 2007). Walau bagaimanapun, analisis FISH ini sangat bergantung kepada kehadiran jujukan sasaran yang banyak dalam setiap sel dan ianya tidak dapat mengesan sel yang mempunyai kandungan rRNA yang rendah (Tatsuhiko et al., 2003 ; Gulnur, 2002). Permasalahan ini membuatkan para penyelidik terus berusaha untuk meningkatkan mutu dan kualiti teknik ini dalam pengesanan mikroorganisma samada dalam bidang perubatan maupun alam sekitar. Jose et al. (2007) dan Katrin Zwirgmaier (2005) ada membincangkan beberapa pembaharuan dalam teknik FISH. Ianya merupakan kombinasi antara FISH dan kaedah lain yang mana adalah untuk meningkatkan lagi tahap kepekaan teknik FISH

dalam memberikan keputusan yang lebih tepat. Antara kombinasi yang telah dijalankan adalah seperti CARD-FISH (Annelie et al., 2002), FISH-MAR (Michael et al., 2002), PNA-FISH, dan RING-FISH (Katrin Zwirgmaier, 2005).

Selain dari FISH, teknik yang lazim digunakan untuk penentuan mikroorganisma adalah PCR. Kaedah ini memang biasa digunakan untuk mengetahui dengan lebih spesifik jenis dan nama mikroorganisma yang wujud. Ia akan menggandakan jujukan DNA sampel, ini bersesuaian jika sampel mempunyai jumlah DNA yang sangat sedikit terutama dalam bidang forensik, dan selalu digunakan dalam diagnostik perubatan untuk mengenalpasti mutasi yang menyebabkan penyakit genetik dan juga pengesanan pelbagai jenis virus seperti HIV (Jeremy et al., 2002). Banyak kajian telah dijalankan dalam menentukan komuniti mikrob dalam air sisa. Antaranya adalah mengenal pasti mikroorganisma yang terlibat dalam proses nitrifikasi dan nitrifikasi dengan tujuan untuk menyingkirkan nitrogen daripada proses rawatan air sisa. Nitrifikasi autotrofik dicapai melalui dua langkah dalam proses pengoksidaan biologi. Pada langkah pertama, ammonia dioksidakan kepada nitrat oleh bakteria pengoksidaan ammonia (AOB), yang mana lazimnya diwakili oleh jenis *Nitrosomonas*. Manakala dalam langkah kedua, nitrit dioksidakan oleh bakteria pengoksidaan nitrit (NOB) bagi menghasilkan nitrat (Gulnur, 2002). Seterusnya proses denitrifikasi akan menukarkannya kepada gas nitrogen yang mana akan dilepaskan ke atmosfera.

Pengenalpastian komuniti mikrob dibuat berdasarkan kepada penentuan tahap penghasilan tenaga elektrik oleh mikroorganisma menggunakan sel bahan api mikrob (*Microbial Fuel Cell, MFC*). Mikroorganisma akan bertindak sebagai pemangkin untuk menukarkan tenaga kimia yang tersimpan di dalam bahan organik secara terus kepada tenaga elektrik (Bruce et al., 2006). Seterusnya bakteria AOB dan NOB akan digunakan dalam MFC yang diharap dapat meningkatkan lagi tahap penyingkiran nitrogen. MFC boleh dijadikan satu pilihan yang menarik dan terbaik untuk mengurangkan kos rawatan air sisa dengan pada masa yang sama dapat menjana arus elektrik. Arus elektrik boleh dihasilkan sama ada dengan menggunakan kultur tulen atau kultur campuran, tetapi kultur campuran dilihat lebih sesuai digunakan untuk sumber yang lebih kompleks seperti air sisa (Bruce et al., 2006; Byung et al., 2007).

BAHAN DAN KAEDAH

Persampelan : Dalam kajian ini sampel telah diambil dari 3 lokasi yang berbeza dari loji rawatan air sisa kumbahan enap cemar teraktif, iaitu di bahagian tangki kumbahan mentah, tangki pengudaraan dan tangki kitaran enap cemar teraktif.

Pengkulturan dan Pemencilan mikrob : Pencairan bersiri sampel dilakukan sebelum ia dikulturkan melalui kaedah sebaran plat di atas medium agar-agar. Pembentukan koloni mikrob diperhatikan selama 2-7 hari, dimana setiap koloni yang menunjukkan morfologi yang berbeza ditandakan dan dipindahkan ke plat medium yang baru. Langkah yang sama dilakukan ke atas setiap sub-kultur sehingga kultur tulen terhasil. Seterusnya, pewarnaan Gram dijalankan terhadap pencilan-pencilan yang terhasil.

Penyediaan sampel untuk teknik FISH: Sampel untuk analisis FISH perlu ditambahkan dengan larutan 4% *paraformaldehyde* (PFA) dan disimpan pada suhu 4°C. Sampel tersebut diemparkan pada 10,000rpm selama 5 minit pada suhu 4°C untuk memisahkan bahan terampai didalam sampel partikel-partikel. Supernatan dibuang dan mendapan ditambah dengan 4% PFA. Bagi membenarkan dinding sel ditembusi oleh PFA, sampel dibiarkan semalaman pada suhu 4°C atau pada suhu bilik selama 2 jam. Sampel kemudiannya diemparkan, dan mendapan diampakan semula didalam penimbal garam fosfat (*phosphate buffer saline*, PBS). Setelah dibiarkan selama 15 minit pada suhu bilik, sampel sekali lagi diemparkan selama 5 minit. Setelah itu supernatan dibuang dan sampel sedia untuk dianalisis menggunakan teknik FISH.

Pemilihan prob untuk teknik FISH: Prob oligonukleotida 16S rRNA yang digunakan dalam kajian ini di senaraikan dalam Jadual 1. Prob oligonukleotida tersebut dilabelkan pada hujung 5' dengan pewarna pendafluor seperti berikut : *fluorescein isothiocyanate* (FITC) dan *sulphoindocyanine dyes* Cy3 and Cy5 (First Base Laboratories, Sdn Bhd, Malaysia).

Jadual 1: Senarai Prob oligonukleotida yang digunakan dalam kajian ini.

Prob	Pengkhususan	Jujukan(5'-3')	Kepekatan Formamida (%)	Kepekatan NaCl (mM)
EUB338	Semua Bakteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	20	171
NEU23a	Ahli-ahli dalam genus <i>Nitrosomonas</i> (<i>Halophilic</i> dan <i>halotolerant</i>)	CCCCTCTGCTGCACTCTA	40	25

Penghibridan in situ untuk teknik FISH: Sebanyak 5µl setiap sampel diambil dan diletakkan pada slaid kaca mikroskop, disebar rata dan dikeringkan. Sampel tersebut kemudiannya dinyahhidratkan dengan merendamkan slaid kaca ke dalam 50%, 80% dan 100% larutan etanol secara berturut-turut selama 3 minit untuk setiap larutan etanol yang berbeza. Setelah etanol tersejat, penimbal penghibridan (*hybridization buffer*) yang mengandungi 0.9M NaCl, 55% formamida, 20mM Tris-HCl pada pH 7.4 dan 0.01% *sodium dodecyl sulfate*, SDS dan 50 µg/µl larutan prob yang dipilih ditambah. Seterusnya sampel dibasuh dengan penimbal basuhan yang mengandungi 20mM Tris-HCl pada pH 7.4, 20mM NaCl dan 0.01% SDS. Penimbal basuhan tersebut disingkirkan dengan membilas slaid dengan air suling berganda. Akhir sekali, sampel diwarnakan dengan 4', 6'-*diamidino-2-phenylidole dihydrochloride* (DAPI) (0.33 µg/ml dalam H₂O) selama 5 minit dan dibilas dengan air suling berganda. Sampel seterusnya diperhatikan di bawah mikroskop Olympus BX41 epifluorescence pada pembesaran 40x dan 100x.

Polymerase chain reaction, PCR: Kaedah PCR telah dijalankan menggunakan sistem *Eppendorf Thermal Cycler PCR*. *Genomic DNA purification kit* dan *SV Gel and PCR Clean up system* (PROMEGA, Madison, WI, USA) telah digunakan dalam kajian ini. Produk PCR dipisahkan dan divisualkan melalui gel elektroforesis bersama pewarna ethidium bromida. Seterusnya Kepekatan setiap genom diukur menggunakan Biophotometer. Untuk mengetahui jujukan DNA dan jenis mikrob yang telah dipencilkan tersebut, produk PCR tersebut dihantar ke First Base Laboratories Sdn. Bhd (Malaysia) untuk analisis jujukan.

Penentuan ciri biokimia: Selain daripada teknik PCR, sampel turut dihantar ke Focus Biotech Sdn Bhd (Malaysia) untuk menentukan jenis bakteria yang wujud dalam air sisa kumbahan berdasarkan ciri biokimianya. Mikroorganisma ditentukan menggunakan *BIOLOG GEN III MICROPLATE™* (Hayward, CA, USA). Penentuannya adalah berdasarkan tindak balas dari sumber karbon dan kepekatan bahan kimia pada 96 ruangan *microplate*.

HASIL DAN PERBINCANGAN

Pemencilan bakteria : Daripada kaedah sebaran plat dan kaedah contengan, lebih kurang 21 jenis morfologi yang berbeza telah berjaya dipencilkan dimana 6 jenis untuk sampel dari tangki

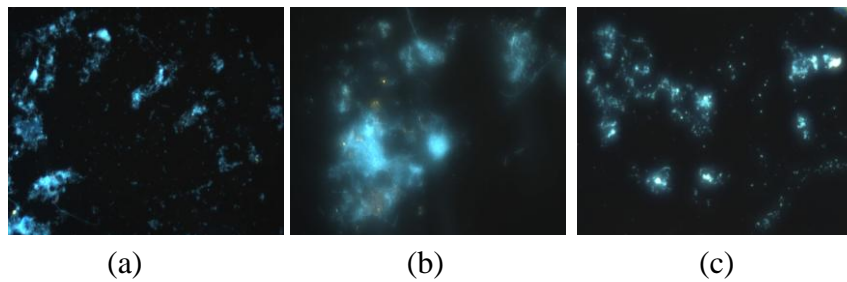
kumbahan mentah, 11 jenis dari tangki pengudaraan dan 4 jenis dari tangki kitaran kedua enap cemar teraktif. Daripada 21 jenis morfologi tersebut terdapat satu sampel yang rosak dan tidak dapat dikenalpasti bentuk dan pewarnaan Gram. Keputusan bagi pewarnaan Gram pula menunjukkan 14 adalah daripada kumpulan gram positif manakala selebihnya adalah gram negatif. Dari segi bentuk morfologi menunjukkan kumpulan bakteria ini adalah berbentuk kokus dan rod. Jadual 2 menunjukkan secara ringkas keputusan yang diperolehi. Kaedah pemencilan masih dijalankan untuk beberapa siri persampelan bagi mendapatkan gambaran sebenar komuniti bakteria ketiga-tiga lokasi persampelan tersebut.

Sampel	Gram	Bentuk morfologi	Sampel	Gram	Bentuk morfologi
Raw 3-1-1	+	kokus	Ae 5-1-2	+	kokus
Raw 4-1-1	-	rod	Ae 3-1-3	+	rod
Raw 4-2-1	+	rod	Ae 5-1-1	+	kokus
Raw 1-1-1	+	rod	Ae 6-2-1	+	rod
Raw 5-1	+	rod	Ae 3-1-1	+	rod
Raw 1-1	+	kokus	Ae 4-1-1	-	rod
Ae 3-2-1	+	kokus	Re 5-2-1	+	kokus
Ae 6-4	-	rod	Re 2-1-1	+	rod
Ae 6-1	-	rod	Re 3-2-1	-	rod
Ae 6-3-1	-	kokus	Re 3-1	+	rod

Jadual 2 : Keputusan dari pewarnaan Gram

Analisis FISH : Penentuan awal analisis FISH bagi sampel dari tangki pengudaraan menunjukkan kewujudan bakteria semua jenis bakteria dan bakteria pengoksidaan ammonia (*ammonia oxidizing bacteria*) dengan menggunakan prob NEU23a dan EUB338. Rajah 1 menunjukkan imej yang diperolehi dengan menggunakan mikroskop epifluorescent. Kehadiran bakteria jenis ini penting dalam proses untuk menyingkirkan nitrogen dalam air sisa kumbahan. Setakat ini sampel hanya diwarnakan menggunakan DAPI, oleh itu hanya imej berwarna biru diperolehi daripada pemerhatian ini. Pewarna yang biasa digunakan untuk FISH dalam mikrobiologi adalah *fluorescein-derivates* (*fluorescein-isothiocyanate* (FITC), 5-(-6) *carboxyfluorescein-N-*

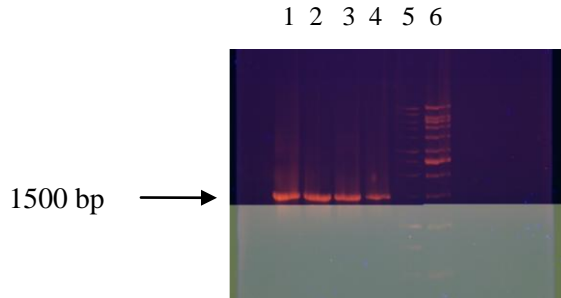
hydroxysuccinimide-ester (Fluox), *rhodamine-derivatives (tetramethyl-rhodamine-isothiocyanate (TRITC)*, dan yang terbaru *sulphoindocyanine dyes Cy3 and Cy5* (Annette et al., 2000; Rudolf et al., 2001). Untuk mendapatkan imej yang pelbagai warna, penapis yang berbeza perlu digunakan pada mikroskop epifluorescence. Penapis yang berbeza ini penting dalam membezakan warna output yang diperolehi; tetapi untuk kajian ini, hanya ada penapis bagi DAPI dan FITC. Mikroskop jenis lain yang sesuai untuk FISH adalah *confocal laser scanning microscope (CLSM)*. Mikroskop ini biasa digunakan untuk sampel yang tebal dan mempunyai latar belakang yang tinggi, seperti gumpalan enap cemar, biofilem dan bahagian-bahagian tisu (Annette et al., 2000)



Rajah 1: Hasil daripada analisis FISH a) EUB338 b)NEU23a- pembesaran 40x
c)NEU23a-pembesaran 100x

Pengenalpastian bakteria: Keputusan awal daripada sampel yang diambil dari sampel enap cemar teraktif menunjukkan kehadiran mikrob jenis *Bacillus sp* yang terdiri dari kumpulan gram positif dan berbentuk rod. Rajah 2 menunjukkan keputusan daripada gel elektroforesis yang mana menunjukkan DNA bakteria berjaya diekstrak dan berada pada jalur 1500bp. Namun percubaan seterusnya menggunakan keseluruhan sampel tidak menunjukkan keputusan yang memuaskan dimana DNA tidak berjaya diekstrak. Oleh itu dijangkakan bahawa jenis kit yang digunakan adalah tidak bersesuaian. Secara amnya, kaedah ini memerlukan ketelitian yang tinggi dalam setiap langkah atau proses. Semua proses perlu dalam keadaan yang steril supaya tidak berlaku kontaminasi terhadap sampel. Keputusan negatif yang diperolehi mungkin disebabkan oleh prob yang digunakan tidak menghibrid secara sempurna. Perkara ini telah dinyatakan oleh Gerda Harms et al. (2003) yang mana aplikasi kaedah ini untuk sampel dari alam sekitar adalah rumit disebabkan oleh kepekatan sel sasaran yang rendah dan kemungkinan kehadiran perencat PCR. Namun begitu, kesan perencatan ini pada genomik DNA pada 10 hingga 50ng/ μ l boleh diminimumkan dengan melakukan pencairan pada ekstrak DNA. Walau bagaimanapun, pencairan yang berlebihan akan

mengakibatkan jumlah DNA dan kepekatan sel sasaran rendah, meningkatkan perubahan yang tinggi dan berpotensi untuk melebihi atau kurang dari sasaran.



Rajah 2: Keputusan dari gel elektroforesis ; 1-4 adalah sampel yang telah diekstrak DNA, 5-6 adalah 1kb DNA Ladder (penunjuk)

Penentuan ciri biokimia: Kaedah ini dijalankan untuk membuat padanan dengan analisis FISH dan PCR bagi memberikan keputusan yang lebih tepat. Walaubagaimanapun pada peringkat awal penentuan hanya 3 sampel (Ae 3-1-3, Re 2-1-1 dan Re 3-1) iaitu dari tangki pengudaraan dan enap cemar teraktif yang masing-masing menunjukkan kehadiran *Kurthia Gibsonii* dan *Bacillus pseudomycoides*. Keputusan ini berdasarkan kepada persamaan dengan pengkalan data yang ada dalam sistem BIOLOG dan keputusan hanya boleh diterima jika peratusan persamaan adalah melebihi 50%. Ringkasan keputusan ditunjukkan dalam Jadual 3.

Jadual 3 : Keputusan penentuan ciri biokimia

Sampel	Penentuan BIOLOG	Peratus Persamaan(%)
Ae 3-1-3	<i>Kurthia Gibsonii</i>	94.5
Re 2-1-1	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	83.0
Re 3-1	Tiada ID	19.1

Penjanaan arus elektrik, penyingkiran COD dan jumlah nitrogen Kjeldahl (TKN): Sampel yang sama telah digunakan dalam reaktor sel bahan api mikrob untuk menentukan tahap penghasilan

tenaga elektrik dan tahap penyingkiran COD dan TKN. Zain (2009) melaporkan tentang keputusan yang diperolehi dimana sampel daripada tangki edaran enap cemar teraktif telah menunjukkan penghasilan tenaga elektrik yang tinggi iaitu $9.053\text{mW}/\text{cm}^2$ dengan mencatat tahap penyingkiran COD dan TKN masing-masing iaitu 26.8% dan 40%. Adalah dijangka komuniti-komuniti bakteria ini mempunyai peranan masing-masing dalam menghasilkan arus elektrik dan pada masa yang sama dapat menyingkirkan kandungan karbon dan nitrogen. Kajian lanjut sedang dijalankan untuk memaksimumkan tahap penghasilan tenaga elektrik dan penyingkiran pencemar karbon dan nitrogen.

KESIMPULAN

Walaupun keputusan awal tidak dapat memberikan padanan yang tepat komuniti bakteria sel bahan api mikrob bagi setiap kaedah yang digunakan iaitu FISH, PCR dan ciri biokimianya namun keputusan awal penentuan dapat memberikan gambaran tentang kewujudan 21 komuniti bakteria dan antaranya terdapat 2 kumpulan bakteria yang terlibat iaitu *Bacillus sp* dan *Nitrosomonas sp* dalam kultur bercampur sel bahan api mikrob dengan penghasilan maksimum arus elektrik yang diperolehi adalah dari tangki edaran enap cemar teraktif iaitu $9.053\text{mW}/\text{cm}^2$ dan mencatat tahap penyingkiran COD dan TKN masing-masing iaitu 26.8% dan 40%.

PENGHARGAAN

Projek ini telah mendapat pembiayaan dari Kementerian Sains, Teknologi & Inovasi MALAYSIA, MOSTI (Projek 02-01-02-SF0488) dan Kementerian Pengajian Tinggi MALAYSIA (Projek UKM-RF-02-FRGS0002-2007).

RUJUKAN

- Annelie P., Jakob P., & Rudolf A. 2002. Fluorescence In Situ Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3094-3101.
- Annette M., Ulf B.G. 2000. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 41, 85-112.
- Bruce E.L., Bert H., Rene R., Uwe S., Jurg K., Stefano F., Peter A., Willy V., Korneal R., 2006. Microbial fuel cells: Methodology and technology. *Environmental Science & Technology*, 40, 5181-5192.

- Byung, H.K., In, S. C., Geoffrey, M.G. 2007. Challenges in microbial fuel cell development and operation. Mini review, *Applied Microbial Biotechnology*, 76,485-494.
- Gerda H., Alice C. L., Hebe M. D., Igrid R. G., Victoria M. G., Shawn A. H., Kevin G.R., & Gary S.S. 2003. Real-Time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. *Environmental Science and Technology*, 37, 343-351.
- Gulnur, C. 2002. A new molecular technique for the identification of microorganisms in biological treatment plant : Fluorescent in Situ Hybridization. *Turkish Journal of Biology*, 26, 57-63.
- Jeremy W.D. & Malcolm V.S., 2002. From genes to genomes; Concepts and Application of DNA technology. Ed.1, England: John Wiley & Sons Ltd.
- Jose L.S & Thorsten K. 2007. Molecular biology techniques used in wastewater treatment : An overview. *Process Biochemistry* 42: 119-133.
- Katrin Zwirgmaier. 2005. Mini Review: Fluorescence in situ hybridization (FISH)- the next generation. *FEMS Microbiology*, 246, 151-158.
- Micheal W., & Alexander L. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment system. *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 218-227.
- Rudolf A, Bernard M. F., & Sebastian B. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridization. *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 231-236.
- Tatsuhiko, H., Satoshi, T., Akira, H., Yuhei, I. 2003. In situ PCR for visualizing distribution of functional gene 'amoA' in a biofilm regardless of activity. *Journal of biotechnology*, 105, 33-40.
- Yoshiteru, A., Miyoshi, T., Okamoto, T., Tsuneda, S., Hirata, A., Kitayama A. & Nagamune, T. 2000. Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by Fluorescence In situ hybridization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 90, 234-240.
- Zain, S.M, Hashim, R, Roslani, N. S, Suja, F, Anuar, N, Daud, W.R.W & Basri, N.E.A. 2009. Microbial fuel cells using mixed cultures of wastewater for electricity generation. *Prosiding Seminar UKM-ITB VIII 2009*.