

Pengecaman Awal Komuniti Bakteria Sel Bahan Api Mikro dalam Air Sisa Kumbahan

(Preliminary Identification of the Microbial Fuel Cell
Bacteria Communities in Sewage)

S.M. ZAIN*, R. HASHIM, N.S. ROSLANI, N. ANUAR, F. SUJA, W.R.W. DAUD & N.E.A. BASRI

ABSTRAK

Kajian ini bertujuan 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. Kaedah pengesanan kumpulan bakteria yang digunakan adalah teknik penghibridan in situ berpendarfluor (FISH) manakala kaedah tindak balas berantai polimerase (PCR) untuk mengenalpasti bakteria tersebut. Penentuan ciri biokimia menggunakan BIOLOG GEN III MICROPLATE™ turut digunakan. Bakteria yang didapati daripada air sisa dikultur dan dituliskan di atas agar zat makanan untuk menentukan ciri-ciri morfologi koloni bakteria tersebut. Berdasarkan pencirian koloni dan pewarnaan Gram, sebanyak 21 pencilan telah diperolehi daripada tiga lokasi sampel air sisa kumbahan daripada loji rawatan enap cemar teraktif (enam koloni air sisa mentah; sebelas koloni tangki pengudaraan; empat koloni tangki kitaran enap cemar teraktif). Penentuan awal daripada ketiga-tiga kaedah yang dijalankan tidak dapat memberikan padanan yang tepat dengan hanya mencatatkan kehadiran bakteria pengoksida ammonia (FISH) dan Kurthia Gibsoni (BIOLOG) di dalam sampel tangki pengudaraan; bakteria Bacillus sp (PCR) dan Bacillus Pseudomycooides (BIOLOG) di dalam sampel kitaran enap cemar teraktif. Ketumpatan kuasa maksimum yang diperolehi daripada sampel kitaran enap cemar teraktif adalah 9.053 mW/cm² dengan tahap penyingkiran COD dan jumlah nitrogen adalah (TKN) masing-masing 26.8% dan 40%.

Kata Kunci: Air sisa kumbahan; bakteria; penghibridan in situ berpendarfluor (FISH); tindak balas berantai polimerase (PCR); sel bahan api mikro

ABSTRACT

This study aimed to determine the types of bacteria exist in wastewater that contribute to generate electricity and simultaneously remove carbon and nitrogen. The method used was Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) to detect the bacteria group while Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to confirm the observation made using FISH. A biochemical identification using BIOLOG GEN III MICROPLATE™ also was used. The samples were cultured on nutrient agar plate to identify the morphology of the bacteria. The result showed that 21 isolates from three different locations at the activated sludge treatment plant with six, eleven and four strains for raw sewage, aeration tank and returned activated sludge samples, respectively. Preliminary identification does not give a good match but only showed the existence of ammonia-oxidizing bacteria (FISH) and Kurtia Gibsoni (BIOLOG) from aeration tank; Bacillus sp (PCR) and Bacillus Pseudomycooides (BIOLOG) from returned activated sludge. The maximum power density generated using returned activated sludge was 9.053 mW/cm², with 26.8% COD removal and 40% TKN removal

Keywords: Bacteria; Fluorescence In Situ Hybridization(FISH); microbial fuel cell; polymerasa chain reaction(PCR); sewage

PENGENALAN

Matlamat utama dalam penentuan mikroorganisma dalam bidang mikrobiologi mahupun alam sekitar adalah untuk mendapatkan keputusan yang tepat dan cepat. Kaedah pengkulturan konvensional 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 (Moter & Gobel 2002). Sejak berdekad yang lalu, pelbagai kaedah biologi molekul telah diperkenalkan dan digunakan dalam penentuan

kepelbagaian bakteria dalam air sisa antaranya adalah kaedah penghibridan in situ berpendarfluor (FISH) dan tindak balas berantai polimerase (PCR) (Micheal et al. 2002; Rudolf et al. 2001; Yoshiteru et al. 2000). Perkembangan kedua-dua teknik biologi molekul ini membolehkan ahli sains memperoleh penyelesaian kepada teknik konvensional tersebut.

FISH merupakan satu teknik yang sangat berkesan untuk mengesan bakteria spesifik dan menganalisis komuniti kompleks 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 spesies 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 sama ada dalam bidang perubatan mahupun alam sekitar. Jose et al. (2007) dan Zwirgmaier (2005) ada membincangkan beberapa pembaharuan dalam teknik FISH. Ianya merupakan kombinasi antara FISH dan kaedah lain untuk meningkatkan lagi tahap kepekaan teknik FISH dalam memberikan keputusan yang lebih tepat. Antara kombinasi yang telah dijalankan adalah seperti CARD-FISH (Pernthaler et al. 2002), FISH-MAR (Michael & Alexander 2002), PNA-FISH, dan RING-FISH (Zwirgmaier 2005).

Selain daripada 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 & Malcolm 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 di loji rawatan air sisa kumbuhan enap cemar teraktif, iaitu di bahagian tangki kumbuhan mentah, tangki pengudaraan dan tangki kitaran enap cemar teraktif.

PENGKULTURAN DAN PEMENCILAN MIKROB

Pencairan bersiri sampel dilakukan sebelum ia dikulturkan melalui kaedah sebaran piring di atas zat makanan. Pembentukan koloni mikrob diperhatikan selama 2-7 hari, dengan setiap koloni yang menunjukkan morfologi yang berbeza ditandakan dan dipindahkan ke piring agar 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 paraformaldehid (PFA), 4% dan disimpan pada suhu 4°C. Sampel tersebut diemparkan pada 10,000 rpm selama 5 min pada suhu 4°C untuk memisahkan bahan terampai di dalam sampel partikel-partikel. Supernatan dibuang dan enapan ditambah dengan PFA 4%. 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 enapan diampai semula di dalam penimbal garam fosfat (PBS). Setelah dibiarkan selama 15 min pada suhu bilik, sampel sekali lagi diemparkan selama 5 min. 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 disenaraikan dalam Jadual 1. Prob oligonukleotida tersebut dilabelkan pada hujung 5' dengan pewarna pendafluor seperti berikut : fluoesin isotiosianat (FITC) dan pewarna sulfoindosianin Cy3 and Cy5 (First Base Laboratories, Sdn Bhd, Malaysia).

PENGHIBRIDAN *IN SITU* UNTUK TEKNIK FISH

Sebanyak 5µL setiap sampel diambil dan diletakkan pada slaid kaca mikroskop, disebar rata dan dikeringkan.

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> (Halofil dan halotoleran)	CCCCTCTGCTGCACTCTA	40	25

Sampel tersebut kemudiannya dinyahhidratkan dengan merendamkan slaid kaca ke dalam 50%, 80% dan 100% larutan etanol secara berturut-turut selama 3 min untuk setiap larutan etanol yang berbeza. Setelah etanol tersejat, penimbal penghibridan yang mengandungi 0.9 M NaCl, formamida 55%, 20 mM Tris-HCl pada pH 7.4 dan natrium dodesil sulfat, SDS 0.01% dan 50 µg/µL larutan prob yang dipilih ditambah. Seterusnya sampel dibasuh dengan penimbal basuhan yang mengandungi 20 mM Tris-HCl pada pH 7.4, 20 mM 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-fenilidol dihidrokloride (DAPI) (0.33 µg/mL dalam H₂O) selama 5 min dan dibilas dengan air suling berganda. Sampel seterusnya diperhatikan di bawah mikroskop Olympus BX41 epifluorescence pada pembesaran 40x dan 100x.

TINDAK BALAS BERANTAI POLIMERASE, PCR

Kaedah PCR telah dijalankan menggunakan alat *Eppendorf Thermal Cycler*. DNA genom bakteria dituliskan menggunakan *Genomic DNA purification kit* dan pemencilan DNA yang diautofilem melalui PCR dipisahkan daripada gel menggunakan *SV Gel* dan *PCR Clean up system* (PROMEGA, Madison, WI, USA). Produk PCR dipisahkan secara elektroforesis. 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 dijujuk dan analisis jujukan dilakukan menggunakan perisian BLAST.

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 penggunaan bahan kimia.

KONFIGURASI REAKTOR SEL BAHAN API MIKROB

Reaktor diperbuat daripada bahan akrilik. Dua kebuk 1L dibina dan disambungkan dengan membran Nafion™ (Alfa Aesar, USA). Membran Nafion™ melalui proses pra-rawatan sebelum boleh digunakan iaitu dengan dididihkan di dalam larutan tertentu mengikut urutan iaitu

3% H₂O₂, air ternyahion, 0.5 M H₂SO₄ dan air ternyahion dengan setiap proses mengambil masa selama 1 jam. Setiap kebuk dibekalkan elektrod kertas karbon (2.5 cm x 5 cm) dan pada hari kelima kertas karbon akan ditambah pada kebuk katod. Kemudian, wayar kuprum digunakan untuk menggabungkan elektrod-elektrod tersebut sebelum dijalinan dengan pengelogg data. Data voltan dan arus direkod setiap 2 jam oleh pengelogg data. Kebuk katod diisi dengan larutan penimbal fosfat (50 mM, pH 7.5) dan kebuk anod diisi dengan sampel air sisa berisipadu setiap satunya adalah 700 mL. Semua operasi dijalankan dalam keadaan mod kelompok selama 10 hari.

KAEDAH ANALISIS

Setiap sampel influen dan effluen ditentukan nilai keperluan oksigen kimia (COD) dan jumlah kjedahl nitrogen (TKN) menggunakan kaedah piawai, APHA 1998. Data voltan dikira secara berterusan dengan menyambungkan reaktor dengan pengelogg data (PRODIGIT 3315D) serta komputer. Kuasa (P) dikira dengan formula $P=IV$ dan ketumpatan kuasa maksimum dibahagikan dengan luas permukaan anod.

HASIL DAN PERBINCANGAN

PEMENCILAN BAKTERIA

Daripada kaedah sebaran piring dan kaedah contengan, lebih kurang 21 jenis morfologi yang berbeza telah berjaya dipencilkan dimana enam jenis untuk sampel dari tangki kumbahan mentah, sebelas jenis dari tangki pengudaraan dan empat jenis dari tangki kitaran 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. Daripada 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.

ANALISIS FISH

Penentuan awal analisis FISH bagi sampel dari tangki pengudaraan (sampel Ae 6-2-1 dan Ae 3-1-3) menunjukkan

keujudan bakteria semua bakteria dan bakteria pengoksida ammonia (*ammonia oxidizing bacteria*) dengan menggunakan prob NEU23a (Ae 6-2-1) dan EUB338 (Ae 3-1-3). Rajah 1 menunjukkan imej yang diperolehi dengan menggunakan mikroskop epifluoresen. 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. Untuk mendapatkan imej yang pelbagai warna, penapis yang berbeza perlu digunakan pada mikroskop epifluoresens. Penapis yang berbeza ini penting dalam membezakan warna output yang diperolehi; tetapi untuk kajian ini, hanya menggunakan 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, biofilm dan bahagian-bahagian tisu (Moter & Gobel 2000).

PENGENALPASTIAN BAKTERIA

Keputusan awal daripada sampel yang diambil dari sampel enap cemar teraktif (Re 2-1-1) menunjukkan kehadiran mikrob jenis *Bacillus* sp yang terdiri daripada kumpulan gram positif dan berbentuk rod. Rajah 2 menunjukkan keputusan daripada gel elektroforesis yang mana menunjukkan DNA bakteria berjaya diekstrak dan berada pada jalur 1500 bp.

PENENTUAN CIRI BOKIMIA

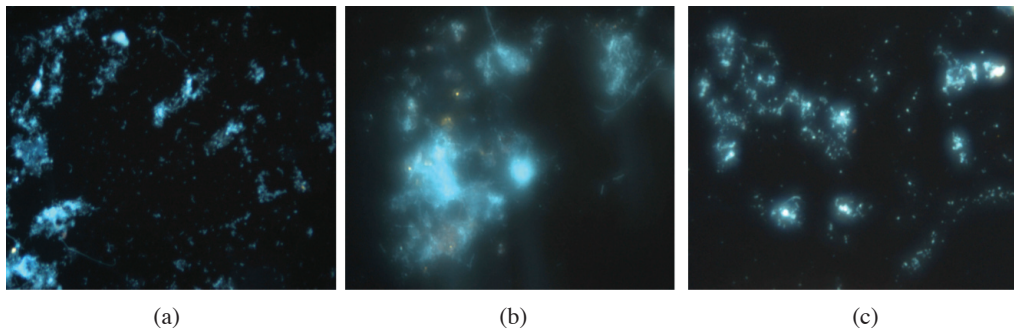
Kaedah ini dijalankan untuk membuat padanan dengan analisis FISH dan PCR bagi memberikan keputusan yang lebih tepat. Walau bagaimanapun pada peringkat awal penentuan hanya 3 sampel (Ae 3-1-3, Re 2-1-1 dan Re 3-1) iaitu dari tangki pengudaraan dan enap cemar teraktif yang masing-masing menunjukkan kehadiran *Kurthia gibsonii* dan *Bacillus pseudomycooides*. 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.

PENJANAAN ARUS ELEKTRIK, PENYINGKIRAN COD DAN JUMLAH NITROGEN KJEHDAHL(TKN)

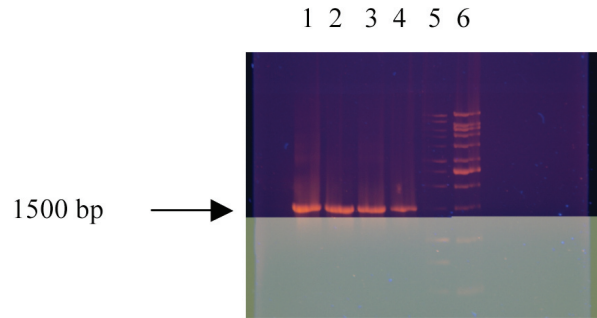
Sampel yang sama telah digunakan dalam reaktor sel bahan api mikrob untuk menentukan tahap penghasilan tenaga elektrik dan tahap penyingkiran COD dan TKN. Rajah 3 menunjukkan profil ketumpatan kuasa yang diperolehi untuk ketiga-tiga sampel yang digunakan dalam sel bahan api mikrob. Tangki edaran enap cemar teraktif telah menunjukkan penghasilan tenaga elektrik yang tinggi iaitu 9.053 mW/cm² dengan mencatat tahap penyingkiran COD dan TKN masing-masing iaitu 26.8% dan 40% (Jadual 4). Adalah dijangka komuniti-komuniti bakteria ini mempunyai peranan masing-masing dalam menghasilkan arus elektrik dan pada masa yang sama

JADUAL 2. Keputusan daripada pewarnaan Gram

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



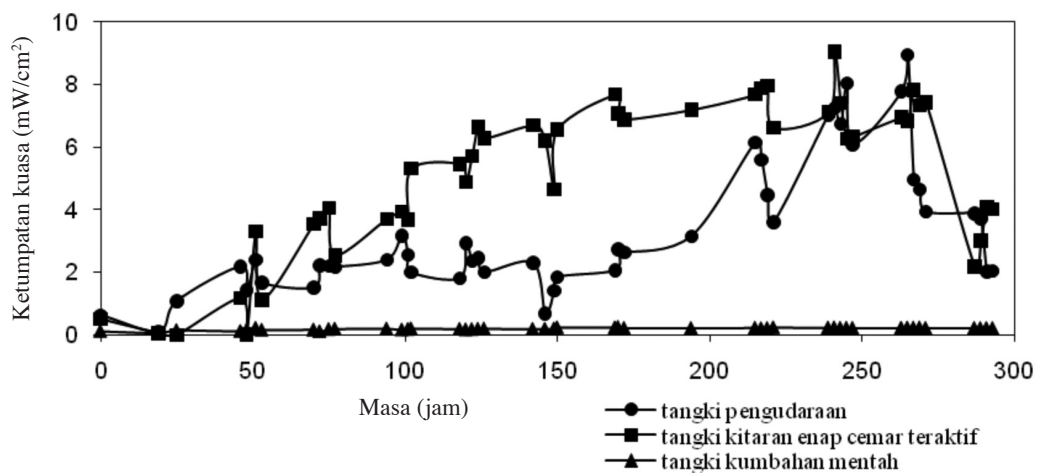
RAJAH 1. Hasil daripada analisis FISH yang dicerap di bawah mikroskop epifluoresens a) EUB338-pembesaran 100×10 b) NEU23a- pembesaran 40×10 dan c) NEU23a-pembesaran 100×10



RAJAH 2. Keputusan daripada gel elektroforesis; 1-4 adalah sampel yang telah diekstrak DNA, 5-6 adalah 1kb DNA Ladder (penunjuk)

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 pseudomycooides</i>	83.0
Re 3-1	Tiada ID	19.1



RAJAH 3. Profil ketumpatan kuasa yang dicatatkan untuk ketiga-tiga sampel

JADUAL 4. Kecekapan penyingkiran COD dan TKN

Sampel	pH	% penyingkiran COD	% Penyingkiran TKN
Tangki pengudaraan	7.08-7.13	45.8	37.5
Enap cemar teraktif	6.12-6.44	26.8	40.0
Kumbahan mentah	7.1-7.3	50.0	54.5

dapat menyingkirkan kandungan karbon dan nitrogen. Walau bagaimanapun, kajian lanjut sedang dijalankan untuk mengenalpasti komuniti bakteria yang berperanan menghasilkan tenaga elektrik yang tinggi.

KESIMPULAN

Walaupun keputusan awal tidak dapat memberikan padanan komuniti bakteria sel bahan api mikroba bagi setiap kaedah yang digunakan iaitu FISH, PCR dan ciri

biokimianya namun keputusan awal penentuan dapat memberikan gambaran tentang kewujudan 21 komuniti bakteria dalam kultur bercampur sel bahan api mikro (enam koloni air sisa mentah; sebelas koloni tangki pengudaraan; empat koloni tangki kitaran enap cemar teraktif) dengan penghasilan maksimum arus elektrik yang diperolehi adalah dari tangki kitaran enap cemar teraktif iaitu 9.053 mW/cm^2 dengan 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

- 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.
- 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.
- Micheal, W. & Alexander, L. 2002. Bacterial community composition and function in sewage treatment system. *Current Opinion in Biotechnology* 13: 218-227.
- Moter, A. & Gobel, U.B. 2000. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* 41: 85-112.
- Pernthaler, A. Pernthaler, J. & Amann, R. 2002. Fluorescence *In Situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 3094-3101.
- 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.
- Zwirgmaier, K. 2005. Mini Review: Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)-the next generation. *FEMS Microbiology* 246: 151-158.
- S.M. Zain*, R. Hashim, N.S. Roslani, F. Suja & N.E.A. Basri
Department of Civil & Structural Engineering
Faculty of Engineering & Built Environment
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor D.E.
Malaysia
- N. Anuar & W.R.W. Daud
Department of Chemical Process & Engineering
Faculty of Engineering & Built Environment
Universiti Kebangsaan Malaysia
43600 Bangi, Selangor D.E.
Malaysia

*Pengarang untuk surat-menyurat; email: smz@eng.ukm.my

Diserahkan: 16 Jun 2010

Diterima: 11 Januari 2011