



## 逢甲大學學生報告 ePaper

報告題名：底泥微生物燃料電池陽極菌相之探討-  
變性梯度膠體電泳(DGGE)之菌相分析

作者：陳盈蓉

系級：環境工程與科學學系四年級乙班

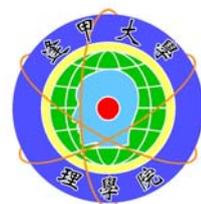
學號：D9688184

開課老師：胡苔莉 教授

課程名稱：畢業論文

開課系所：環境工程與科學學系

開課學年： 98 學年度 第二 學期



## 摘要

微生物燃料電池是利用微生物在陽極分解基質以產生電流，電流的產生受許多因素影響，其中微生物的組成與生物量亦會影響其產電效率，因此本研究分析底泥微生物燃料電池之陽極菌相，以了解其電力和菌種間之相互關係。

移除陽極上生物膜，再以市售之 DNA 萃取套件(Ultra Clean™ soil DNA kit, MO BIO)直接萃取電極上之 DNA，該法較以超音波振盪法可得較高濃度 DNA (19.4 ng/μl)以及較好的純度( $A_{260}/A_{280}$  : 1.52)。萃取所得之 DNA 以稀釋法將樣品中會抑制聚合酶連鎖反應(PCR)之物質稀釋後，再經巢式 PCR (11f-1492r 和 341fgc-534r)進行 PCR 放大，以獲得較高濃度之 PCR 產物。該 PCR 產物在變性劑濃度 30-80%下可完全分離。利用變性梯度膠體電泳(DGGE)分析兩種不同醋酸基質添加方式之電池菌相，DGGE 圖譜顯示直接與管柱添加基質之電池皆有優勢菌存在，其中以管柱添加基質之底泥微生物燃料電池之優勢菌(6 條亮帶)較多，比較底泥微生物燃料電池之陽極菌相與電力，發現以管柱添加基質之電池菌相豐富度較高，共有 25 條亮帶，同時該電池之電力亦較高。菌相中也具有與產電菌 *Shewanella putrefaciens* 對應之亮帶且亮帶強度亦較強，顯示管柱添加基質之方式有助於產電細菌

之增長。

**關鍵字：**生物膜、菌相、底泥微生物燃料電池、變性梯度膠體電泳。



## 目 錄

摘要	1
目錄	2
圖目錄	5
表目錄	6
第一章 前言	7
第二章 文獻回顧	8
2-1 微生物燃料電池(Microbial Fuel Cell)	8
2-2 微生物燃料電池的共生現象	9
2-3 分子生物技術在菌相分析的重要性與應用	10
2-4 16S rRNA 在微生物多樣性研究的應用	11
2-5 變性梯度膠體電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)	12
2-5-1 DGGE 原理	12
2-5-2 DGGE 在微生物菌相分析的應用	13
第三章 材料與方法	14
3-1 實驗流程	14
3-2 底泥微生物燃料電池設置	15

3-3 樣品來源	16
3-4 DNA 的萃取	16
3-4-1 底泥 DNA 的萃取	16
3-4-2 電極 DNA 的萃取	18
3-4-3 DNA 濃度測定	18
3-5 聚合酶連鎖反應(Polymerase Chain Reaction)	19
3-5-1 瓊脂膠體電泳(agarose gel electrophoresis)	19
3-6 變性梯度膠體電泳(DGGE)	21
3-6-1 引子的設計	21
3-6-2 PCR for DGGE	21
3-6-3 DGGE 步驟	23
3-6-4 SYBR green I 螢光染色步驟	24
第四章 結果與討論	28
4-1 電極上 DNA 萃取方式的比較	28
4-2 PCR 放大	30
4-2-1 DNA 之稀釋	31
4-2-2 巢式 PCR	34
4-3 DGGE 分析	36
4-3-1 變性梯度範圍	36

4-3-2 底泥微生物燃料電池(SMFC)菌相與電力之比較	37
第五章 結論與建議	41
5-1 結論	41
5-2 建議	41
第六章 參考文獻	42



## 圖目錄

圖 3-1	實驗流程	14
圖 3-2	底泥微生物燃料電池之示意圖	15
圖 4-1	底泥及陽極萃取 DNA 在 0.8%洋菜膠分離 2 h 之結果	30
圖 4-2	稀釋作用對 DNA 樣品以 PCR 放大之影響	33
圖 4-3	DNA 稀釋樣品直接以 PCR 放大和巢式 PCR 放大之比較	35
圖 4-4	DGGE 膠體變性劑濃度之分析	36
圖 4-5	(a)底泥微生物燃料電池(SMFC)陽極生物群以 DGGE 分 析圖譜(b)膠片亮帶位置繪製圖	39

## 表 目 錄

表 3-1	土壤 DNA 萃取套劑藥劑成分	17
表 3-2	膠體濃度和 DNA 長度之關係	20
表 3-3	10%丙烯醯胺變性溶液	26
表 4-1	電極 DNA 萃取效率比較	29
表 4-2	DNA 樣品之特性	32
表 4-3	基質添加方式對底泥微生物燃料電池之產電效率影響	40



## 第一章 前言

自從工業革命之後人類對能源的需求量大增，有限的石化能源一直被使用，在 1973 年第一次石油危機後，科學家不斷的尋找新的替代能源，例如風能、太陽能及生物燃料等，而微生物燃料電池正是其中一項。微生物燃料電池是利用產電細菌於陽極釋放電子，再經由外電路將電子送至陰極形成電流(Min and Logan, 2004)。產電細菌只需要足夠的有機物當做基質，就能一面分解有機物，一面釋放出電子，產生電力，因此細菌在微生物燃料電池中扮演著相當重要的角色。微生物燃料電池研究中多以單槽或雙槽型式探討，但是微生物電池裝置中最適合自然環境者為底泥微生物燃料電池(sediment microbial fuel cell, SMFC)，微生物燃料電池中細菌的相互關係可能會影響其產電效率，故針對陽極上生物菌群進行菌相分析。本研究利用分子生物技術，如變性梯度膠體電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)探討底泥微生物燃料電池(sediment microbial fuel cell, SMFC)之菌相，以了解產電菌和電力的關係。

## 第二章 文獻回顧

### 2-1 微生物燃料電池(microbial fuel cell, MFC)

微生物燃料電池是利用微生物的代謝作用將有機物轉化成電能的裝置。典型微生物燃料電池有兩個槽體，陽極槽和陰極槽，中間以質子交換膜(PEM)作為區隔。陽極為一個厭氧槽體，以微生物作為催化劑，分解基質產生電子與質子(Bond and Lovely, 2003；Min and Logan, 2004)，電子透過外電路傳遞到陰極形成電流，質子則經由質子交換膜進入陰極，兩者在陰極槽內結合成水(Kim et al., 2003)；微生物燃料電池分為雙槽和單槽式，而單槽型式中底泥微生物燃料電池是屬於最適合自然環境的一種，底泥微生物燃料電池的概念為：將陽極置於厭氧底泥中，陰極置於含有溶氧的水面上，以外電路連接，中間不需質子交換膜即可操作，故所需成本較低(賴，2009)。微生物可利用底泥中的有機物來產生電力，不需額外添加基質即可驅動簡單的電子設備，進行偏遠地區水域之溫度及大氣中溼度、溫度及壓力變化的監測。

## 2-2 微生物燃料電池的共生現象

共生現象在自然界中普遍存在，例如動物體內的寄生細菌分解動物腸胃無法消化的物質，同時也獲取自生生長所需的能量。共生現象主要分為三種，互利共生、片利共生以及寄生。Ren et al. (2007)利用細菌 *Clostridium cellulolyticum* 分解纖維素，其產物被另一種細菌 *Geobacter sulfurreducens* 用於厭氧呼吸(anaerobic respiration)，產生電子和電流。纖維素是一種富含有機物的物質，但很難被直接利用，需進行預處理和水解，少數微生物或特殊生物酶可以水解纖維素。*Clostridium* 是一種專性厭氧細菌，因有降解纖維素的特殊能力而受到重視。相關研究證實 *C. cellulolyticum* 可以分解纖維素，但無法產生電流，*G. sulfurreducens* 無法分解纖維素生長，因而無法產生電流。但將 *C. cellulolyticum* 和 *G. sulfurreducens* 混合生長時，微生物燃料電池產生了電流，且纖維素的分解效率比單獨 *C. cellulolyticum* 生長時提高了 18%。此研究證實兩種細菌在產電過程中的共生關係，而實驗結果也進一步證實發酵過程和厭氧呼吸的結合可能比單一菌種的活動更加有利於能量產生。Richter et al. (2007) 研究 *Geobacter sulfurreducens* 和 *Pelobacter carbinolicus* 兩者關係，前者是已知的產電菌，後者則生長在底泥微生物燃料電池的陽極上，根據文獻，能夠還原  $\text{Fe}^{3+}$  的細菌都能利用陽極當電子接受者，但實驗結果證實 *P. carbinolicus* 不具備此能

力。用乙醇當微生物燃料電池的基質時，雖然*P. carbinolicus*可代謝乙醇，但卻無法產生電流，而*G. sulfurreducens*無法代謝乙醇，但可產生電流，兩者經過混合生長後，乙醇會被*P. carbinolicus*轉化成氫氣和醋酸，*G. sulfurreducens* 就可以利用這些產物產電，因此在微生物燃料電池中細菌的相互關係相當值得探討。

### 2-3 分子生物技術在菌相分析的重要性與應用

研究微生物多樣性的傳統方法是以微生物菌種培養為主，再針對可分離培養的菌株做定性和定量研究，目前有90-99%的細菌無法被培養和分離出來，這些細菌大多需要特別的生長環境，此外，因許多菌種間有著複雜的共生關係及生存條件，無法使用實驗室現有方式進行培養或分離培養，所以需要分子生物技術的協助。由於分子生物學的進步，利用分子生物技術來分析環境中的微生物已成為一種趨勢。例如：以萃取土壤中微生物核酸來分析土壤中的微生物菌相以及微生物生態的探討。分子生物技術，是藉由比較DNA序列來判斷微生物在親緣上的相關性，利用的方法有螢光原位雜交法(Fluorescent in situ hybridization, FISH)、限制片段長度多型性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)、墨點法(slot-blotting hybridization)等。目前較常以分析16S rRNA 序列作為分類依據(Heuer et al., 1997; Ludwig et al., 1998)。

## 2-4 16S rRNA 序列在微生物多樣性研究的應用

傳統菌種分類方法，通常是依照其外觀、生理生化特性來做區分，但仍無法精確判斷出菌種(陳，2008)。近年分子生物技術進步，在建立微生物親緣關係和菌種鑑定佔有重要地位。目前較常使用核糖體核糖核酸(Ribosomal RNA, rRNA)作為鑑定依據。核糖體核糖核酸由大次單元和小次單元組成，大次單元中包含了34種蛋白質及兩種核糖體核糖核酸：5S rRNA及23S rRNA，小次單元則由21種蛋白質及16S rRNA組成。目前在微生物演化分類上最常被研究的片段是16S rRNA。16S rRNA是細菌內特有的基因，此段基因在序列上是由高度變異區域和高度保留區域所組成，16S rRNA長度為1542 bp，其中包含10個變異區域(variable region)和11個保留區域(constant region)(Brosius et al., 1978)。16S rRNA還具有下列特點：普遍存在於原核生物中、在演化過程中基因序列穩定，不易變異、演化速率慢、其長度適中，能提供足夠的基因訊息，來作為鑑定以及分類依據(鮑，2007)。經過許多研究，已建立起16S rRNA完備的基因資料庫，可透過資料庫進行序列分析比對，只要將某片段的16S rRNA序列透過NCBI基因資料庫進行比對，即可對菌種加以鑑定和分類。

## 2-5 變性梯度膠體電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)

### 2-5-1 DGGE原理

DGGE是Fischer及Lerman於1979年開始發展並應用，Muyzer et al. (1993)首次將DGGE應用在生物膜的菌種族群分析上。DGGE為檢測片段DNA內單一鹼基改變之電泳法，利用尿素(urea)及甲醯胺(formamide)兩種變性物質濃度的變化，在電泳膠體上建立濃度梯度，分離不同序列的基因片段。由於變性物質的作用，DNA序列會產生部分變性，DNA為雙股結構，兩股鹼基間是藉由氫鍵結合，A-T是雙鍵，G-C是參鍵，變性物質可使DNA氫鍵打斷，由於不同菌種間其序列雙鍵和參鍵的位置、數量不同，變性程度也不相同，變性程度會影響DNA在膠體中移動速度，DNA序列變性的程度與melting point (Tm)有關，一般而言，含有較高G-C鹼基對比例的序列有較高的Tm值，低Tm值的DNA序列會在低濃度的變性物質作用下產生變性，而高Tm值的DNA序列則必須在高濃度的變性物質作用下才會產生變性，利用此原理便可使相同長度但不同序列的PCR產物在電泳過程中由於變性程度不同而造成移動速度不同，進而達到分離混合菌種的目的(Muyzer et al., 1993)。在膠體製備完成時，加入經過定量和固定體積的DNA樣品，即可進行變性膠體電泳。電泳方法分為兩種類型：(1)電泳方向和變性梯度垂直。(2)電泳方向和變性梯度平行。分析菌相

使用的方法為電泳方向與變性梯度平行，因為微生物菌相包含許多菌種，使用平行膠能清楚呈現菌相，並容易觀察菌相的變化。

## 2-5-2 DGGE在微生物菌相分析的應用

目前較多使用來研究菌相的方法是PCR-DGGE (Miletto et al., 2007; Lyautey et al., 2005)，DGGE圖譜上不同band分別代表不同菌種 (Muyzer et al., 1993)，band的亮度和DNA濃度有正比關係，band的粗細可代表菌種含量的多寡，具有半定量和半定性的作用，因此DGGE可作為評估微生物菌相組成的方法。目前，DGGE技術亦趨成熟，在微生物領域上的應用，大致上涵蓋四大類：1.分析微生物族群組成的多樣性(Nubel et al., 1999)；2.族群組成之動態研究(Watanabe et al., 1998)；3.協助分離環境中不易培養的菌種；4.微生物群落中優勢菌種之相關性(Palys et al., 1997)。此外，進行過DGGE電泳後，可將膠體上的16S rRNA切下後進行定序，然後和網路上的基因資料庫進行比對，鑑定出可能菌種。以此技術分析環境中的微生物種類，不僅克服目前傳統菌種培養技術裡無法培養環境中大部分微生物，更縮短了研究時間，因此被廣泛的使用在分析環境微生物菌相及生態的研究上。

### 第三章 材料與方法

#### 3-1 實驗流程

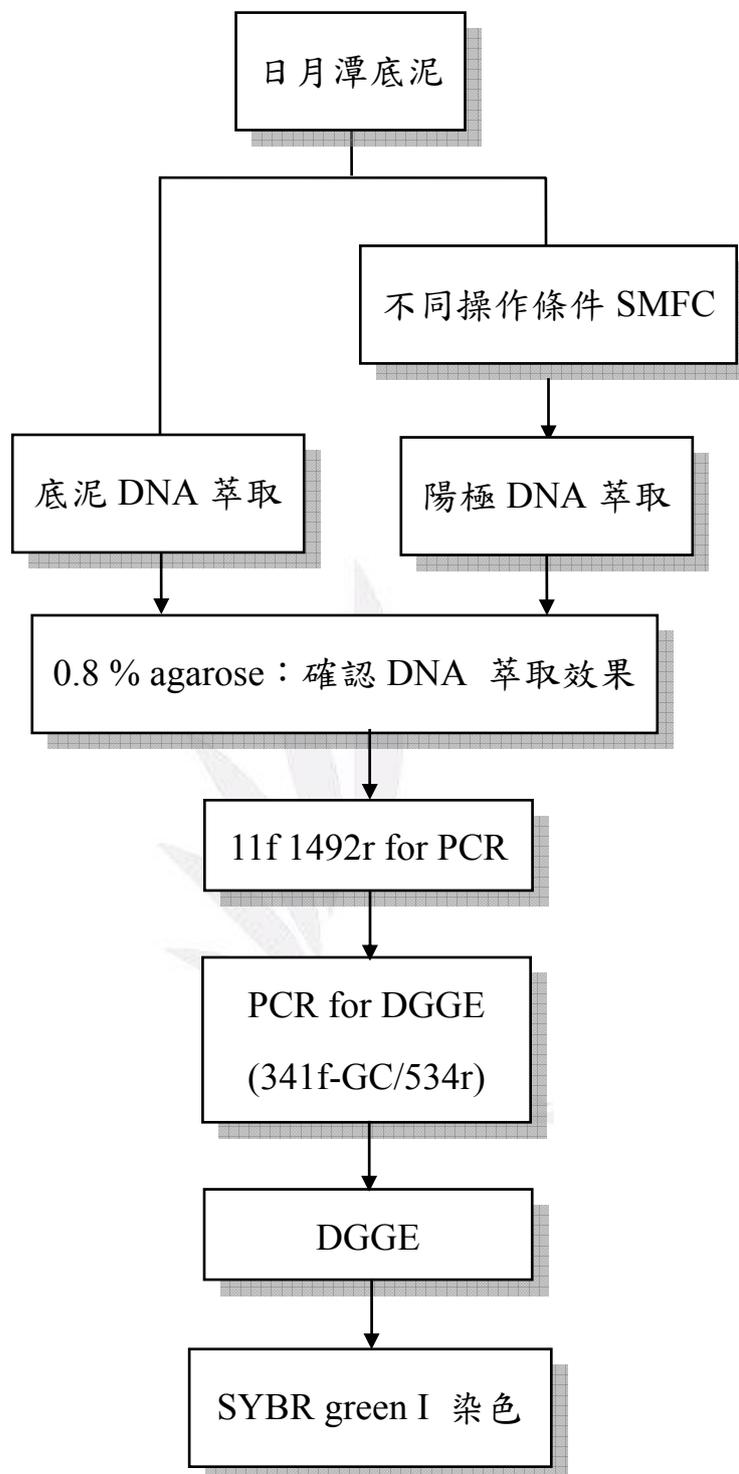


圖 3-1 實驗流程

### 3-2 底泥微生物燃料電池設置

使用 500 ml 血清瓶，取日月潭水社碼頭底泥，作為底泥微生物燃料電池之基質，電池陰極液則取自採樣底泥上方之水樣。陽極(1.5×5.0×0.5)放置於血清瓶底部，上方添加約 300 ml 底泥，接著於底泥上添加水樣至約 550 ml 的位置，陰極平鋪於水面，最後使用電阻連接兩電極形成通路，電池架設完成後，因基質添加方式不同，圖 3-2 分別為在底泥部分插入玻璃管柱使用管柱添加，及基質直接添加兩種(侯，2010)。

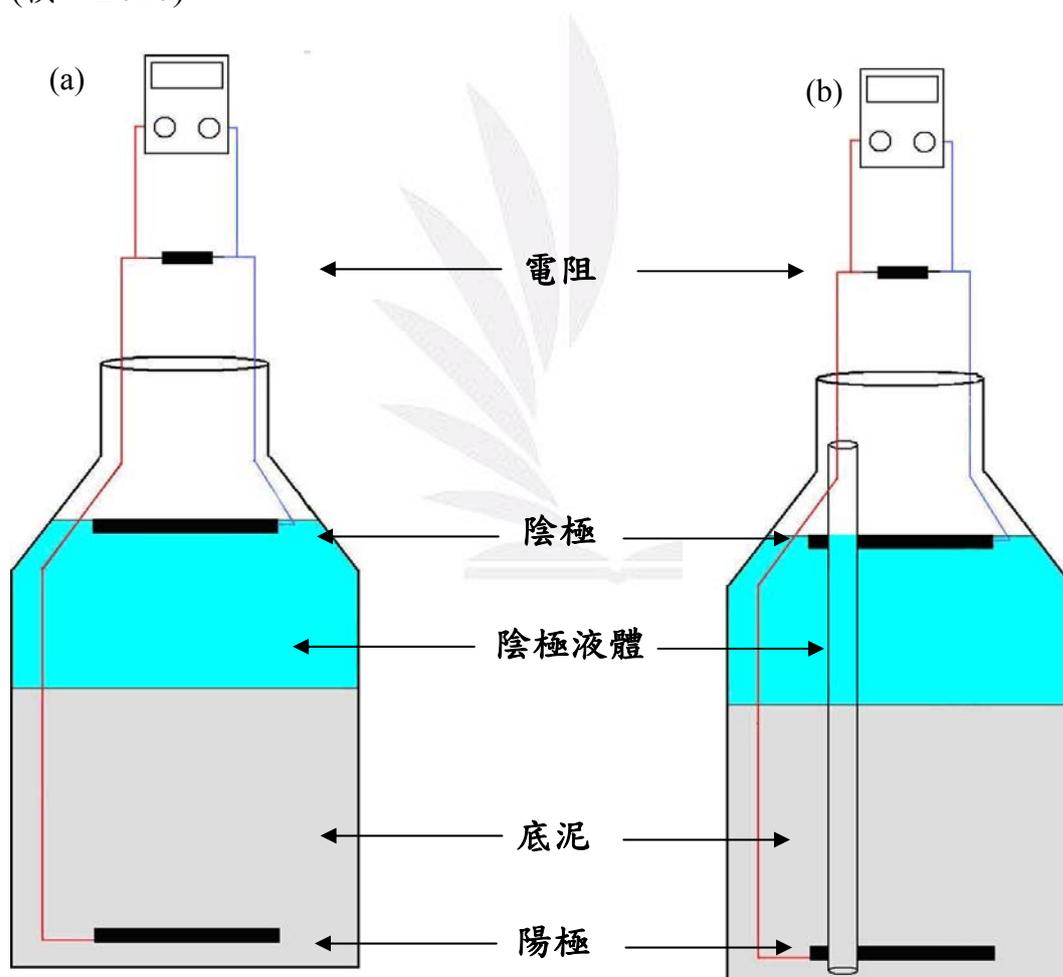


圖 3-2 底泥微生物燃料電池(SMFC)之示意圖。  
(a)為直接添加基質之 SMFC，(b)為管柱添加基質之 SMFC。

### 3-3 樣品來源

DNA 萃取來源分為兩部份，分別為日月潭底泥和操作時間 463 天直接添加基質 SMFC、管柱添加基質之 SMFC 及未添加基質之陽極電極作為 DNA 萃取樣本，其中底泥微生物燃料電池之添加基質為 2 mM 醋酸。

### 3-4 DNA 的萃取

#### 3-4-1 底泥 DNA 的萃取

使用(Ultra Clean™ soil DNA kit, MO BIO)土壤 DNA 萃取套件組，藥品成分及作用列於表 3-1。操作步驟如下：

1. 取 0.25-1.0 g 的土樣到 Bead Solution tube，若樣品水分含量較高，可將樣品放至 tube 離心後，移除離心液，重覆數次，盡可能移除水分。
2. 將樣品放入 Bead Solution tube 中，混合均勻，加入 60  $\mu$ l solution S1 及 200  $\mu$ l solution IRS。
3. 使用 vortex 最大速度均勻震盪 10 min，tube 需水平放置，10000 rpm 離心 30 sec，取上清液到新的離心管中。
4. 加入 200  $\mu$ l solution S2，vortex 均勻震盪 5 sec。
5. 放置 4  $^{\circ}$ C 下靜置 5 min，10000 rpm 離心 1 min，取上清液到新離心管中。

6. 加入 1.2 ml solution S3 並均勻混合 5 sec，取上清液置入 spin filter，10000 rpm 離心 1 min，重覆數次，直到上清液取完。
7. 加入 300  $\mu$ l solution S4，10000 rpm 離心 30 sec，再以 10000 rpm 離心 1 min 一次，將 spin filter 移至新的離心管中。
8. 加入 50  $\mu$ l solution S5，離心 30 sec，丟棄 spin filter，即得到 DNA。DNA 需置於  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

表 3-1 土壤 DNA 萃取套劑藥劑成分  
(Ultra Clean™ soil DNA kit, MO BIO)

藥劑	成分	功能
IRS	抑制溶液	去除脂肪酸和細胞膜上脂質的有機物
S1	SDS	去除腐植酸，避免抑制 PCR (土壤含有高濃度有機物，其中腐植酸含量最多)
S2	蛋白質沉澱劑	移除蛋白質污染，蛋白質污染會影響 DNA 的純度
S3	高濃度鹽類	使 DNA 緊縮
S4	乙醇	進一步清洗濾膜上的鹽類、腐植酸和汙染物
S5	DNA 緩衝液	完整溶出 DNA

### 3-4-2 電極 DNA 的萃取

方法一、超音波振盪法(Kite et al., 2004; Sarro et al., 2005)

從底泥微生物燃料電池系統中取出陽極，將電極(1.5×5.0×0.5)以滅菌剪刀剪碎，取 1g 置入含 10 ml PBS (1×)之離心管中，超音波振盪 15 min (ED, LEO-1502, 40kHz)後，收集經振盪之上清液置於離心管中，液體以 9000 rpm 離心 10 min，重複振盪數次。收集所得之沉澱物以土壤 DNA 萃取套件組(Ultra Clean™ soil DNA kit, MO BIO)萃取陽極 DNA。

方法二、直接萃取法

從底泥微生物系統中取出陽極，取 1g 電極(1.5×5.0×0.5)以滅菌剪刀剪碎後，取 1 g 電極樣品以土壤 DNA 萃取套件組(Ultra Clean™ soil DNA kit, MO BIO)萃取陽極 DNA。

### 3-4-3 DNA 濃度測定

取萃取之 DNA 樣品 2  $\mu$ l，以超微量樣本分光光度計(ND-1000, Nanodrop)分別偵測波長 280 nm、260 nm 及 230 nm 吸光值，分析樣品 DNA 的純度及濃度。 $A_{260}/A_{280}$  比值表示樣品中 DNA 含量對蛋白質含量的比例，數值大於 1.7 表示蛋白質含量較少或 DNA 純度較高。而  $A_{260}/A_{230}$  則表示樣品中 DNA 含量對腐植酸含量的比例，數值大於

1.2 則表示腐植酸含量較少(Yeates et al., 1998)。

### 3-5 聚合酶連鎖反應(PCR)

本實驗使用熱循環機(iCycler iQ, Bio-Rad)，進行PCR放大反應，使用引子為11f (5'-GTT TGA TCC TGGCTC AG-3')和1492r (5'-TAC CTT GTT ACG ACT T-3')為針對eubacteria之16S rRNA所設計之引子。

PCR條件：

Primer各0.4  $\mu\text{M}$ 、iQ<sup>TM</sup> Supermix 25  $\mu\text{l}$  (包含dNTP、iTaq DNA polymerase、6 mM MgCl<sub>2</sub>和stabilizers)、DNA template 5  $\mu\text{l}$ 、再以無菌水定量到50  $\mu\text{l}$ ，熱循環機的條件一開始升溫至95°C維持五分鐘，使雙股DNA模板變性成單股，接著進行30個循環升降溫反應：95°C使DNA變性90秒、52°C引子黏合2分鐘、72°C延長DNA序列3分鐘，最後以72°C合成DNA序列6分鐘結束。

#### 3-5-1 瓊脂膠體電泳(agarose gel electrophoresis)

瓊脂膠體電泳的原理是因為 DNA 含有磷酸根，在中性及鹼性的環境下帶負電，通電後 DNA 會往正極移動。此步驟主要是為了確定 PCR 產物位置及濃度，本研究萃取之 DNA 經 11f-1492r 進行 PCR 放大之片段大小為 1.481 kb，依片段大小不同，在膠體濃度的選擇上也有所不同。由表 3-2 可判斷出 PCR 產物在進行瓊脂膠體電泳時，較

適合之膠體濃度分別為 1.5% (Sambrook et al., 2001)，若 DNA 片段較短，則膠體濃度可以提高以增加電泳解析度。取 agarose 粉末，加入 1× TBE buffer，使用微波爐加熱，取出搖晃均勻，重覆沸騰至液體呈現透明狀，待冷卻後 (約 50°C) 加入 EtBr 搖勻，將膠體倒入電泳膠台，待凝固後放置於裝滿 1× TBE buffer 的水平式電泳槽中，把 DNA 與 loading dye 均勻混合 (loading : DNA , 3 : 7) 後 loading 到 well，控制電流於 400 mA，設定電壓與時間後進行電泳，結束後將 agarose gel 以照相系統設備 (活體冷光螢光數位系統, Kodak ) 觀察亮帶 (Sambrook et al., 2001)。

表 3-2 膠體濃度和 DNA 長度之關係 (Sambrook et al., 2001)

Agarose concentration in gel (% ,W/V)	Range of separation of linear DNA molecules (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2.0	0.1-2

### **3-6 變性梯度膠體電泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)**

#### **3-6-1 引子的設計**

進行 DGGE 實驗前，須先進行 PCR 反應，此目的是為了增加 DNA 的濃度。選用不同的引子進行不同區域 16S rRNA 放大，來鑑定不同菌種，例如：放大 16S rRNA 的 V8 和 V6 區域來鑑定土壤中的真細菌和古細菌(Snaider et al., 1999；Chang et al., 2000)，或利用 V2 與 V3 區域來鑑定乳酸菌(Satokari et al., 2001)。一開始將這項技術用來研究微生物菌相所使用的引子，是針對 16S rRNA 的 V3 區域(Muyzer et al., 1993)，根據文獻，目前較多研究使用此區域來進行土壤及底泥之菌相分析，341fGC-534r 引子是針對細菌的 16S rRNA 中 V3 區域進行放大，V3 變異區是真細菌分類研究中較為深入的區域，此片段在同一物種內具有高度保留性，在不同物種間具有足以區別物種差異的遺傳訊息，故本研究選擇針對真細菌的 V3 區域的引子進行 PCR 放大。

#### **3-6-2 PCR for DGGE**

本實驗樣品進行DGGE實驗前，皆使用巢式PCR (nested PCR)進行PCR放大反應來提高PCR產物濃度(Dar et al., 2005)，巢式PCR是使用兩組不同引子進行PCR放大反應，第一組引子對(11f-1942r)放大之片段較長，而第二組引子對(341fgc-534r)放大片段介於第一組引子對片

段間(柯, 2005)。在實驗中使用選用引子為341f-GC (5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3')及534r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') (Muyzer et al., 1993), 將細菌16S rRNA 基因中第341至第534(V3區域)DNA序列片段進行複製(Muyzer et al., 1993)。在引子341f前端加40 bp的GC clamp, 目的是為了提高DNA序列的T<sub>m</sub>值, DNA的變性程度和T<sub>m</sub>值有關, 外加GC clamp可避免DNA序列在變性梯度膠體裡完全變性形成單股(Muyzer et al., 1993)。

PCR for DGGE條件：

Primer各0.4 μM、iQ<sup>TM</sup> Supermix 25 μl (包含dNTP、iTaq DNA polymerase、6 mM MgCl<sub>2</sub>和stabilizers)、DNA template 5 μl、再以無菌水定量到50 μl, 熱循環機的條件一開始升溫至95°C維持五分鐘, 使雙股DNA模板變性成單股, 接著進行35個循環升降溫反應: 95°C使DNA變性1分鐘、55°C引子黏合1分鐘、72°C延長DNA序列2分鐘, 最後以72°C合成DNA序列5分鐘結束。

### 3-6-2 DGGE步驟

#### 1. 垂直變性梯度膠體(perpendicular denaturing gradient gel)

##### 製膠

垂直膠體是利用Bio-Rad的DCode™ Universal Mutation Detection System系統進行;另外,使用Bio-Rad的” Model 475 Gradient Former”為製膠設備。首先依表3-2配置出0%及90%之膠體,各別取16 ml 0%和90%膠體於針筒中,注入16 cm×16 cm的玻璃製膠台,插入單齒齒膜,採垂直式注膠。

##### 電泳條件

開啟電泳系統 (Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, DCode™)之加熱裝置,使槽體的緩衝溶液 (1× TAE buffer) 預熱至60°C。把凝好的膠體組放入電泳槽內,PCR產物與loading dye混合後 (loading : DNA , 40 : 160),將樣品注入膠孔中,設定溫度60°C,電壓80V下,進行電泳6 h。

#### 2. 水平變性梯度膠體(parallel denaturing gradient gel)

##### 製膠

DGGE是利用Bio-Rad的DCode™ Universal Mutation Detection System系統進行;另外,使用Bio-Rad的” Model 475 Gradient Former”

為製膠設備。變性梯度膠體為10% polyacrylamide的凝膠 (base pair separation :100-300 bp)。由垂直膠結果選擇最好之變性劑梯度30-80 % (urea/formamide)。依表3-2配置30%、80%之膠體溶液，分別取16 ml 30%及80%溶液置於針筒中，將膠體溶液注入16 cm×16 cm的玻璃製膠台，由上往下灌膠混合，隨後插上齒模，靜置待膠體凝固，即可製成10% polyacrylamide的膠體。

### 電泳條件

開啟電泳系統 (Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, DCode™)之加熱裝置，使水槽中的緩衝溶液 (1× TAE buffer) 預熱至60°C，確保DNA在電泳過程中達穩定溫度之梯度變性效應。將凝固的變性梯度膠體組放入電泳槽內，將PCR產物與loading dye混合後 (loading : DNA , 5 : 20)，注入膠孔中，設定溫度60°C，電壓80V下，進行電泳12 h。

### 3-6-3 SYBR green I 螢光染色步驟

DNA染劑靈敏度大小為：SYBR green I > Silver staining > EtBr (柯，2005)，因此本實驗選用SYBR green I作為染劑(Bano and Hollibaugh, 2002；Seghers et al., 2004)。首先將變性梯度膠體於電泳槽中取出，置於盤中，以ddH<sub>2</sub>O清洗數次，隨後即進行SYBR green I

染色：將膠體放入200 ml 二次水中，再加入20  $\mu$ l SYBR green I ，以100 rpm 避光搖晃(Orbital shaker OS701, KS ) 1小時。染色完畢利用螢光偵測系統，進行激發與影像拍攝(活體冷光螢光數位系統, Kodak )。



表3-3 10%丙烯醯胺變性溶液(10% acrylamide denaturing solution) base pair :100-300 bp

	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
<b>Acrylanide/Bis (ml)</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>TAE (ml)</b>	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
<b>Formamide (ml)</b>	0.8	1.6	2.4	3.2	4	4.8	5.6	6.4	7.2
<b>Urea (g)</b>	0.84	1.68	2.52	3.36	4.20	5.04	5.88	6.72	7.56
<b>ddH<sub>2</sub>O (ml)加至</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20
<b>10%APS (μl)</b>	200	200	200	200	200	200	200	200	200
<b>TEMED (μl)</b>	20	20	20	20	20	20	20	20	20

## 第四章 結果與討論

### 4-1 電極上 DNA 萃取方式的比較

進行分子生物技術分析時，DNA 萃取效率好壞對後續分析影響很大，一般萃取生物膜是利用超音波振盪(Kite et al., 2004; Sarro et al., 2005)使生物膜剝落，由於電極為碳氈纖維構成，底泥固體及菌體會附著於電極表面及纖維內部，造成 DNA 萃取不易，因此本研究使用土壤 DNA 萃取套件組(Ultra Clean™ soil DNA kit, MO BIO)以超音波振盪(Kite et al., 2004; Sarro et al., 2005)和直接萃取法兩種 DNA 萃取方式，並比較其 DNA 萃取效率。

萃取結果如表 4-1 所示，其中  $A_{260}$  代表蛋白質的吸光度， $A_{280}$  則為核酸的吸光度，當兩者之比值大於 1.7 表示蛋白質污染較少或 DNA 純度較高(Steffan et al., 1988)。由表 4-1 可得知超音波振盪的  $A_{260}/A_{280}$  比值與 DNA 濃度分別為 1.25 及 8.5 ng/ $\mu$ l；直接萃取的  $A_{260}/A_{280}$  比值與 DNA 濃度分別為 1.52 及 19.4 ng/ $\mu$ l，直接萃取的  $A_{260}/A_{280}$  比值較接近 1.7，表示其萃取效率較好，可以得到較高 DNA 濃度。直接萃取效率優於超音波振盪法，推測其原因可能為陽極電極埋設於底泥中，電極表面會形成生物膜，電極纖維內部附著底泥，其整體型態似顆粒狀，故使用直接萃取法進行萃取，可與電極上的生物膜及纖維內部充分撞擊摩擦，進而得到較好的萃取效率及 DNA 濃度；而超音波振盪

可能較適合用於平整面樣品上之生物膜萃取。直接萃取法雖可得到較好的萃取效率，但  $A_{260}/A_{280}$  仍無法達到 1.7 以上，其原因為萃取樣品為混菌系統且底泥有許多未知物干擾，故萃取效率無法達到標準值。

表 4-1 電極 DNA 萃取效率比較

	$A_{260}/A_{280}$ *	DNA 濃度 (ng/ $\mu$ l)
振盪離心法	1.25	8.5
直接萃取法	1.52	19.4

\* $A_{260}/A_{280}$  :比值 > 1.7 表示 DNA 純度較高，或蛋白質汙染較少。

\*\*皆取 1g 電極樣本進行 DNA 萃取。

將直接萃取後底泥及電極 DNA 樣品經瓊脂膠體(agarose)電泳初步確認 DNA 萃取之效果及產量，因底泥及電極 DNA 分子量較大(大於 10 kb)，故使用 0.8% 洋菜膠進行電泳來確認萃取 DNA (Sambrook et al., 2001)，由圖 4-1 可得知 Ln 1 和 Ln 2 在 agarose gel 上亮帶並不明顯，表示其 DNA 濃度較低，故須先進行 PCR 放大反應，才能獲得足夠濃度的產物以進行陽極菌相分析。

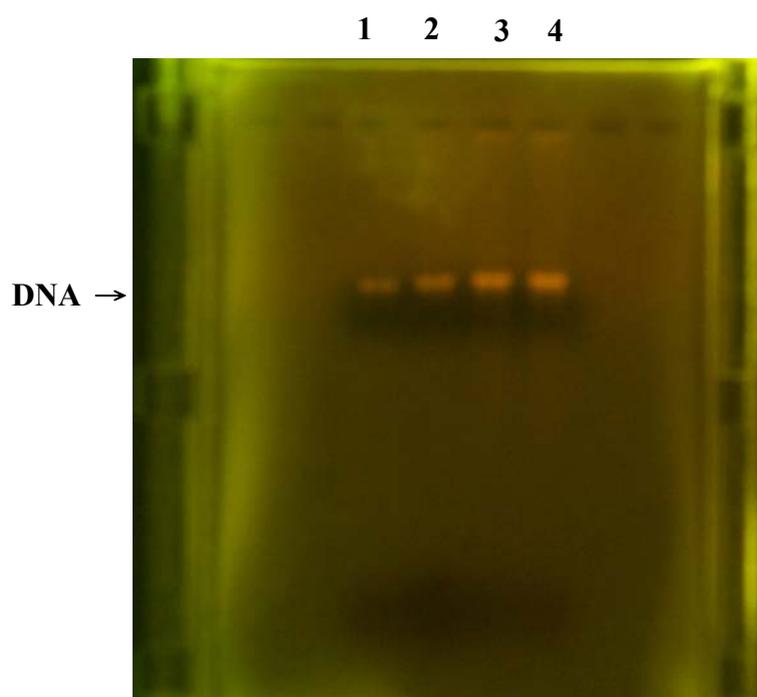


圖 4-1 底泥及陽極萃取 DNA 在 0.8%洋菜膠分離 2h 之結果。Ln 1 底泥 DNA，Ln 2 未添加基質之陽極 DNA，Ln 3 直接添加基質之陽極 DNA，Ln 4 管柱添加基質之陽極 DNA。

#### 4-2 PCR 放大

由圖 4-1 結果顯示，所萃取之底泥及陽極電極 DNA 濃度較低，故必須先進行 PCR 放大提高 DNA 之濃度，影響 PCR 產物濃度的因素很多，例如：Tm 值、Mg<sup>2+</sup>濃度、Taq 效率等，或藉由增加 Taq polymerase 的含量、改變 DNA template、primer 的比例、改變 PCR 黏合溫度或降低 DNA 中抑制物的含量等方式來改善 PCR 反應，也可利用 PCR 純化套件組或巢式 PCR (nested PCR)來提高產物濃度(Dar et al., 2005)。

#### 4-2-1 DNA 之稀釋

本研究之 DNA 樣品來源有日月潭底泥及經操作過 463 天之各種 SMFC 陽極電極，由於 SMFC 陽極電極埋設於底泥中，底泥裡成分複雜，陽極電極進行 DNA 萃取時，有些有機物會抑制 PCR 反應，其中又以腐植酸影響最大，因腐植酸具有和 DNA 相似的分子大小及電荷特性，故萃取過程中腐植酸容易與 DNA 一併被萃取，而影響 DNA 萃取效率，進而干擾後續 PCR 放大反應。腐植酸含量的高低可由  $A_{260}/A_{230}$  比值判斷， $A_{260}/A_{230}$  比值越高表示腐植酸干擾較少，一般認為比值應在 1.2 以上可避免腐植酸的影響(Steffan et al., 1988; Yeates et al., 1998)。研究發現，無論 DNA 濃度多高，只要有 1  $\mu$ l 未稀釋的腐植酸物質存在，都足以抑制 PCR 反應進行(Tsai and Olson, 1992)。由表 4-2 可得知本研究底泥及電極樣品 DNA 的  $A_{260}/A_{230}$  比值約在 0.5-0.8 之間，故需要經前處理才能進行實驗；而  $A_{260}/A_{280}$  比值約在 1.4-1.5 左右，和文獻中所說的  $>1.7$  比較仍是偏低，推測原因為土壤樣品為混菌系統，且土壤中含有許多未知物質，容易影響到 DNA 萃取，導致數值無法達到標準值；DNA 濃度方面，可看出底泥的 DNA 濃度偏低，只有 12.6 ng/ $\mu$ l，而經操作過之電極樣品濃度約在 40-60 ng/ $\mu$ l 之間。因為 *Shewanella putrefaciens* 為文獻中指出之產電菌(Lovley, 2006)，而 *Pseudomonas pseudomallei* 在土壤及水池環境中常

被發現(Smith et al., 1995), 故選擇此兩株菌為對照菌。兩菌株之 DNA 萃取效率方面,  $A_{260}/A_{280}$  比值可達 1.7 以上, 表示其萃取效率好, 因該菌株為純菌培養故  $A_{260}/A_{230}$  比值也達 1.2 左右。

表 4-2 DNA 樣品之特性

樣品	$A_{260}/A_{280}$ *	$A_{260}/A_{230}$ **	DNA 濃度 (ng/ $\mu$ l)
底泥	1.41	0.58	12.6
未添加基質	1.51	0.76	45.2
直接添加基質	1.44	0.75	39.8
以管柱添加基質	1.49	0.80	65.4
<i>Shewanella putrefaciens</i>	1.98	1.35	75.3
<i>Pseudomonas pseudomallei</i>	2.10	1.17	88.7

\* $A_{260}/A_{280}$ : 比值 > 1.7 表示 DNA 純度較高, 或蛋白質汙染較少。

\*\* $A_{260}/A_{230}$ : 比值 > 1.2 表示 DNA 受腐植酸干擾較小。

由圖 4-2 所示, 未經稀釋的 DNA 樣品以 PCR 反應後, 無法得到產物(Ln 2-5), 膠體上無亮帶出現, 推測其原因可能是未經稀釋之 DNA 中含有抑制 PCR 反應之物質。文獻指出可利用純化(Sambrook and Russell, 2001)去除抑制 PCR 反應的物質, 亦有研究指出可使用稀釋法來降低抑制物的干擾(申, 2004), 因此本研究選用稀釋法將 DNA 樣

品進行稀釋，同時達到降低抑制物的濃度。由圖 4-2 可看出，將 DNA 樣品稀釋 100 倍後(Ln 6-9)，再進行 PCR 反應，膠體上有明顯亮帶出現，因此在處理底泥及電極 DNA 樣品時須先稀釋，再進行 PCR 放大反應，才能獲得所需 PCR 產物。

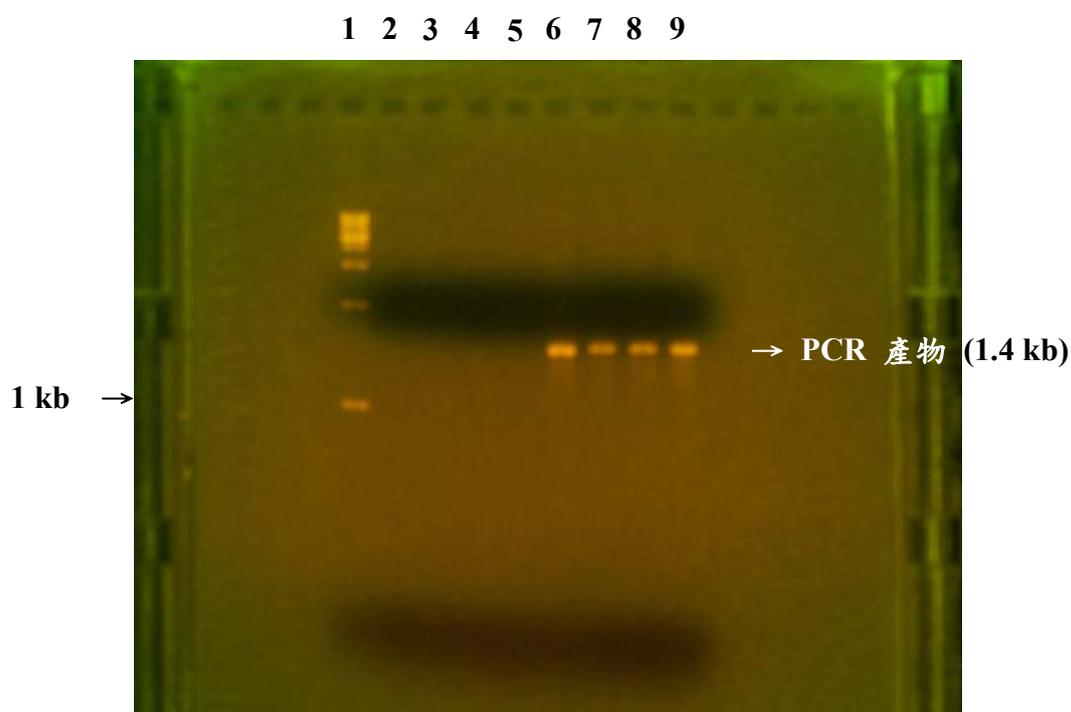


圖 4-2 稀釋作用對 DNA 樣品以 PCR 放大之影響。Ln 1:1kb Marker，Ln 2-5 為萃取 DNA 直接進行 PCR 反應，其樣品分別為底泥、未添加基質之電極樣品，操作 463 天管柱添加之陽極樣品、操作 463 天直接添加之陽極樣品；Ln 6-9 為萃取之 DNA 稀釋後(100×)進行 PCR 反應，樣品之次序如 Ln 2-5，以 1.5%洋菜膠在 120V 下，進行電泳 2 h 之電泳。

#### 4-2-2 巢式 PCR

巢式 PCR 其目的是為了增加 PCR 產物濃度，其優點可提高 PCR 產物的敏感度，本研究使用 PCR 和巢式 PCR 對樣品進行放大反應。直接 PCR 是利用 341fGC-534r 進行放大反應。巢式 PCR 是以 11f-1492r 之 universal bacteria 引子進行第一次 PCR 放大反應，再以 341fGC-534r (Muyzer et al., 1993) 進行 PCR 放大，最終產物片段皆為 198 bp。圖 4-3 是比較 DNA 樣品以 PCR 和巢式 PCR 放大效果，Ln 2-5 為一般 PCR 放大可看出亮帶較淡，Ln 6-9 為巢式 PCR 之結果，可顯示出亮帶較清晰，因此選擇以巢式 PCR 來提高 PCR 產物濃度，以利進行後續 DGGE 實驗。圖 4-2 中直接 PCR 有亮帶出現(Ln 6-9)，但圖 4-3 卻沒有亮帶出現(Ln 2-5)，因兩張圖中樣品所使用之引子長度不同(1481 bp 和 198 bp)，故圖 4-3Ln 2-5 雖然也是用直接 PCR 處理樣品，因所夾取樣品 DNA 片段較短導致亮帶較不明顯。其中因巢式 PCR 是進行兩次 PCR 放大，實驗過程加入反應試劑時容易出現交互污染，要避免 PCR 產物污染後續實驗，最好是將執行電泳的空間與萃取樣品、配製試劑的空間區隔開來。

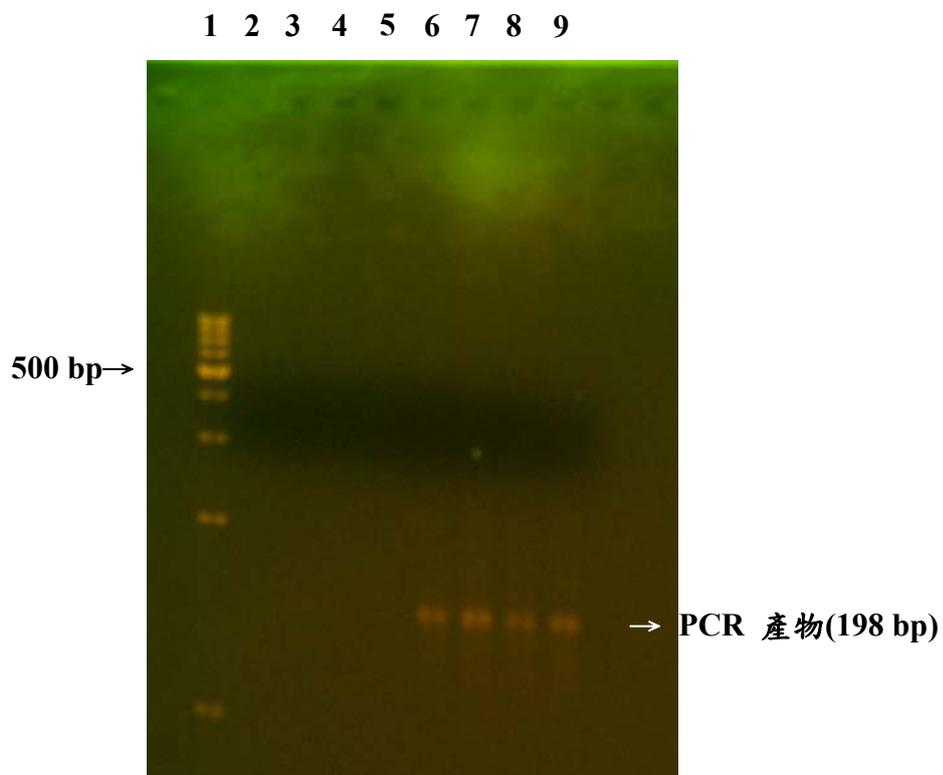


圖 4-3 DNA 稀釋樣品直接以 PCR 放大和巢式 PCR 放大之比較。Ln 1:100 bp Marker，Ln 2-5 為直接使用 341fGC-534r 進行 PCR 放大產物，Ln 6-9 經巢式 PCR 後所得的產物，其中 Ln 2-3、6-7 為底泥樣品，Ln 4-5、8-9 為電極樣品，以 2% 洋菜膠在 120V 下，進行電泳 2 h 之電泳。

### 4-3 DGGE 分析

#### 4-3-1 變性梯度範圍

變性梯度膠體電泳(DGGE)一般常選用變性劑濃度範圍為 40-60% 或 40-80% (Helms, 1990)，然而各樣品均有其各自之濃度範圍。圖 4-4 為 DGGE 膠體變性劑濃度之分析，底泥及電極樣品經 11f-1492r 及 341fGC-534r 進行巢式 PCR 放大反應後，尿素(urea)及甲醯胺(formamide)所組成的變性劑在變性濃度 0-90 %下，膠體濃度 10% polyacrylamide，以垂直變性梯度膠體進行測試，電泳條件為 80 V，6 h，由圖 4-4 可判斷出 SMFC 樣品中 DNA 在變性劑濃度 35-75%可被分離，為確保樣品能完全分離，故選擇 30-80%為變性劑範圍。

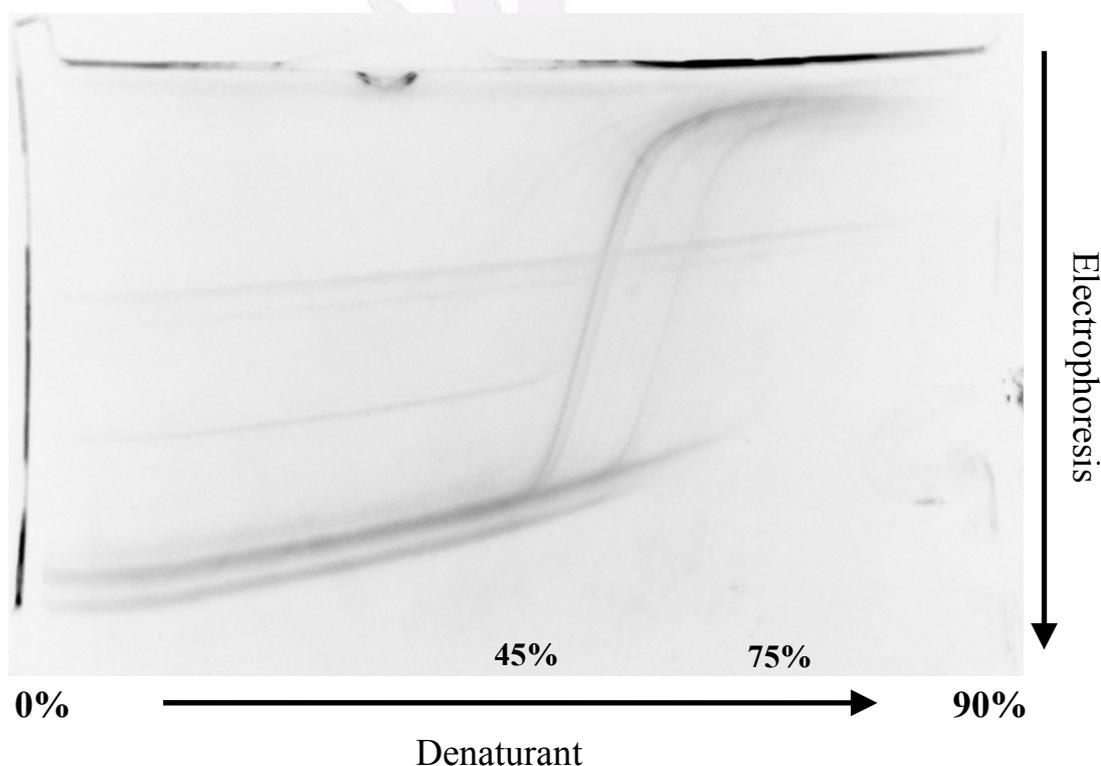


圖 4-4 DGGE 膠體變性劑濃度之分析。膠體濃度 10% 聚丙烯醯胺 (polyacrylamide)，變性劑濃度 0-90%，電壓 80V，電泳時間 6 h。

#### 4-3-2 底泥微生物燃料電池(SMFC)菌相與電力之比較

DGGE 著重於分析環境中菌相組成，由圖譜中不同樣品之條帶分布作為判斷依據，條帶位置相同，可以判斷屬於相同菌群，而亮帶強弱及位置出現頻率可判斷樣本中優勢(predominant) 及普遍存在(common)菌種(Muyzer and Smalla, 1998)。

圖 4-5 (a) 為底泥微生物燃料電池(SMFC)陽極生物群以 DGGE 分析之結果，將圖中經常出現之亮帶及相同位置比較下亮帶強度較強者，定義為普遍存在及優勢菌，分別以 # 和 \* 表示(圖 4-5 b)，圖中普遍存在菌群(#)共有 12 條，有五條為四個樣品中皆有出現之亮帶(#1、4、8、9、10)；其中三條亮帶為底泥中沒有出現，但經操作後出現之亮帶(#2、3、12)，推測其原因為底泥中原本即有此菌，但因菌量較低不足以在圖譜上產生亮帶，經培養後菌量增多，可在 DGGE 圖譜上顯示亮帶。原始底泥並無明顯優勢菌種(\*)，直接添加基質培養 463 天之陽極電極樣品有 4 條亮帶強度較強(\*1-4)，而管柱添加基質培養 285 天之陽極電極樣品則有 6 條(\*1-3、5-7)，未添加基質樣品只有 1 條(\*8)。比較基質添加方式不同之 SMFC 電極樣品和原始日月潭底泥的菌相，顯示經操作後，陽極樣品有優勢菌種出現，其中又以管柱添加樣品優勢種最多。DGGE 圖譜上亮帶數目表示菌種種類多寡，原始底泥可測得 15 條亮帶，管柱添加基質電極樣品為 25 條亮帶，

而直接添加基質與未添加基質之電極樣品亮帶皆為 18 條，由亮帶數目可發現菌相在原始底泥中數目(15 條)最少，管柱添加基質之樣品亮帶(25 條)最多，顯示經基質添加可使 SMFC 陽極生物菌群增加，並可獲得最多優勢菌種。

DGGE 圖譜中 Ln 1 為 *Shewanella putrefaciens*，該菌為文獻中指出之產電細菌(Lovley, 2006)，在原始底泥中有與 *Shewanella putrefaciens* 相同位置之條帶，即表示底泥中原本即含有產電細菌，經操作後產電菌數量增多(亮帶明顯)，其中又以管柱添加基質後(Ln 7、8)亮帶最為明顯且樣品上優勢菌種數目最多(6 條)，顯示出管柱添加基質方式較適合產電細菌利用基質。Ln 2 為 *Pseudomonas pseudomallei*，此菌在土壤及水池環境中常被發現(Smith et al., 1995)，故選擇此菌為對照菌株，該菌為純菌，在 DGGE 圖譜中應只會呈現一條亮帶，但 Ln 2 上卻有四條明顯亮帶，推測其原因可能是進行 PCR 放大反應時，此株純菌之 cycle 太高(35 cycle)，導致 PCR 產物濃度過高出現非專一性產物，因此在後續實驗中需進行切膠定序以確定是否為非專一性產物。利用 DGGE 分析 SMFC 陽極樣品之菌相組成，可將膠片上普遍存在及亮帶較強之優勢菌切下並進行定序，其定序結果再與 NCBI 資料庫進行序列比對，鑑定出可能菌種。

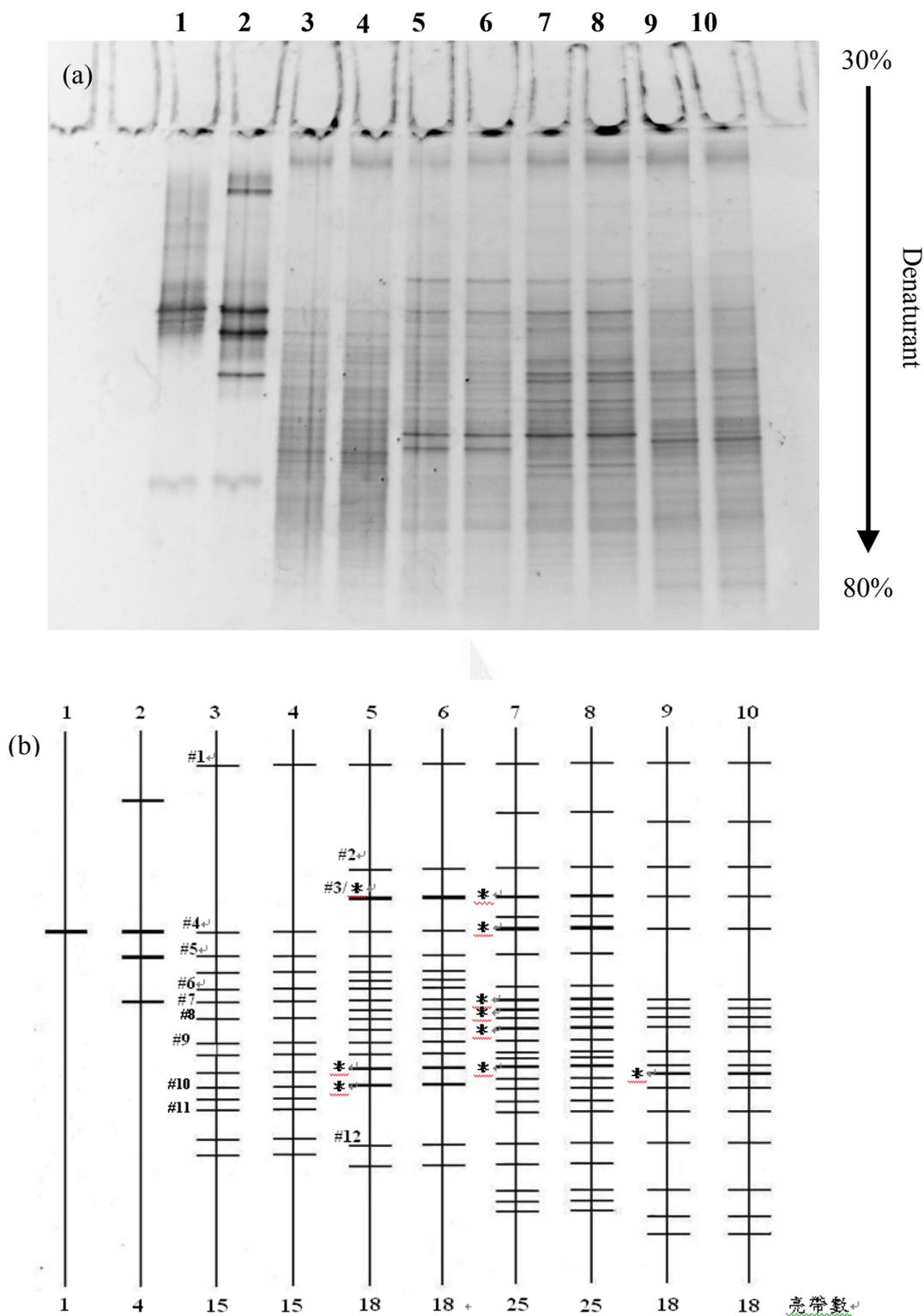


圖 4-5 (a) 底泥微生物燃料電池(SMFC)陽極生物群以 DGGE 分析圖譜，產物大小為 193 bp。Ln 1 為 *Shewanella putrefaciens*，Ln 2 為 *Pseudomonas pseudomallei*，Ln 3-4 為底泥，Ln 5-6 為直接添加基質方式操作 463 天之陽極樣品，Ln 7-8 為管柱添加基質(285 天)之陽極樣品，Ln 9-10 為未添加基質之 SMFC 陽極對照組。(b) 膠片亮帶位置繪製圖，# 代表普遍存在菌群，\* 代表優勢菌群。



由表 4-3，基質以管柱添加之 SMFC 其可產生之最高功率密度為 3.1 mW/m<sup>2</sup>，優於基質以直接添加之 SMFC (最高功率密度為 2.3 mW/m<sup>2</sup>)，兩種不同添加方式的電池電力皆高於未添加基質之 SMFC (0.1 mW/m<sup>2</sup>)電力，可看出電力大小依序為管柱添加基質(3.1 mW/m<sup>2</sup>) > 直接添加基質(2.3 mW/m<sup>2</sup>) > 未添加基質(0.1 mW/m<sup>2</sup>)。由 DGGE 圖譜中發現，管柱添加基質之 SMFC 陽極電極菌相最豐富，產電量亦最高。

表 4-3 基質添加方式對底泥微生物燃料電池之產電效率影響(侯，2010)

底泥微生物電池	最高電壓(mV)	功率密度(mW/m <sup>2</sup> )
未添加基質(463 天)	36	0.1
直接添加基質(463 天)	160	2.3
管柱添加基質(285 天)	184.5	3.1

## 第五章 結論與建議

### 5-1 結論

1. 因為直接萃取法可與碳氈為材質之陽極電極纖維內部充分撞擊摩擦，故使用直接萃取法萃取之 DNA 濃度較高。
2. 利用稀釋法可將萃取出 DNA 樣品中抑制 PCR 反應的物質降低，達到預期之放大效果。
3. 底泥微生物燃料電池之菌群以 V3 區域為目標引子，在變性劑濃度為 30-80% 間可完全分離，並由 DGGE 圖譜中發現，以管柱添加基質方式之菌相最豐富，共有 25 條亮帶，且具有產電菌 *Shewanella putrefaciens* 之相對應亮帶，顯示管柱添加基質之方式有助於產電細菌增長。

### 5-2 建議

進行巢式 PCR 時，雖然可順利提高樣品之產物濃度，但容易出現交互污染的情形，因此在添加反應藥劑時須特別注意。

## 第六章 參考文獻

- 胡苔莉，林正鏘，侯欣妤，2010，基質添加方式對底泥微生物燃料電池電力的影響，第十三屆海峽兩岸環境保護學術研討會。
- 賴建甫，2009，底泥微生物燃料電池之建置及探討，逢甲大學環境工程與科學系碩士論文。
- 鮑韋涵，2007，烏山頂泥火山之細菌多樣性分析與研究，中山大學生物科學系碩士論文。
- 陳嘉凌，2008，烏山頂泥火山對微生物燃料電池的效能分析與菌種探討，中正大學應用地球物理與環境科學所碩士論文。
- 柯君微，2005，以分子生物技術分析模擬配水系統生物膜菌群之組成，逢甲大學環境工程與科學系碩士論文。
- 申忠哲，2004，處理煉焦廢水知活性汙泥槽中硫氰酸分解菌的族群結構之研究，成功大學生物學研究所碩士論文。
- Brosius, J., Palmer, M., Kennedy, P. and Noller, H., 1978. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75: 4801.
- Bano, N. and Hollibaugh, J., 2002. Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 505-518.
- Bond, D. and Lovley, D., 2003. Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes. *Applied and Environmental*

- Microbiology, **69**:1548-1555.
- Dar, S., Kuenen, J. and Muyzer, G., 2005. Nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis approach to determine the diversity of sulfate-reducing bacteria in complex microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**: 2325-2330.
- Helms C., 1990, Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), Donis-Keller laboratory manual.
- Heuer, H., Krsek, M., Baker, P., Smalla, K. and Wellington, E., 1997. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**: 3233–3241.
- Kim, B., Chang, I., Cheol Gil, G., Park, H. and Kim, H., 2003. Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell. *Biotechnology Letters*, **25**: 541-545.
- Kite, P., Eastwood, K., Sugden, S. and Percival, L., 2004. Use of in vivo-generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. *Journal of Clinical Microbiology*, **42**: 3073-3076.
- Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaier, J., Bachleitner, M. and Schleifer, K., 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis*, **19**: 554-568.
- Lyautey, E., Lacoste, B., Ten-Hage, L., Rols, J. and Garabetian, F., 2005. Analysis of bacterial diversity in river biofilms using 16 S rDNA PCR-DGGE: methodological settings and fingerprints interpretation.

- Water Research, **39**: 380-388.
- Lovley, D., 2006. Bug juice: harvesting electricity with microorganisms. Nature Reviews Microbiology, 4.
- Muyzer, G., De Waal, E. and Uitterlinden, A., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Applied and Environmental Microbiology, **59**: 695-700.
- Muyzer, G. and Smalla, K., 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie van Leeuwenhoek, **73**: 127-141.
- Min, B. and Logan, B., 2004. Continuous electricity generation from domestic wastewater and organic substrates in a flat plate microbial fuel cell. Environmental Science and Technology, **38**: 5809-5814.
- Miletto, M., Bodelier, P. and Laanbroek, H., 2007. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. Journal of Microbiological Methods, **70**: 103-111.
- Nubel, U., Garcia-Pichel, F., Kuhl, M. and Muyzer, G., 1999. Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. Applied and Environmental Microbiology, **65**: 422-430.
- Palys, T., Nakamura, L. and Cohan, F., 1997. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world: the role of DNA sequence data. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **47**: 1145-1156.

- Ren, Z., Ward, T. and Regan, J., 2007. Electricity production from cellulose in a microbial fuel cell using a defined binary culture. *Environ. Sci. Technol*, **41**: 4781-4786.
- Richter, H., Lanthier, M., Nevin, K. and Lovley, D., 2007. Lack of electricity production by *Pelobacter carbinolicus* indicates that the capacity for Fe (III) oxide reduction does not necessarily confer electron transfer ability to fuel cell anodes. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**: 5347-5353.
- Steffan, R., Goksoyr, J., Bej, A. and Atlas, R., 1988. Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **54**: 2908-2915.
- Smith, M., Wuthiekanun, V., Walsh, A. and White, N., 1995. Quantitative recovery of *Burkholderia pseudomallei* from soil in Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **89**: 488-490.
- Sambrook, J. and Russell, D., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL press.
- Snaidr, J., Fuchs, B., Wallner, G., Wagner, M., Schleifer, K. and Amann, R. 2001. Phylogeny and in situ identification of a morphologically conspicuous bacterium, *Candidatus Magnospira bakii*, present at very low frequency in activated sludge. *Environmental microbiology*, **1**: 125-135.
- Seghers, D., Wittebolle, L., Top, E., Verstraete, W. and Siciliano, S., 2004. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 1475-1482.
- Sarro, M., Garcia, A. and Moreno, D., 2005. Biofilm formation in spent

- nuclear fuel pools and bioremediation of radioactive water. *International Microbiology*, **8**: 223-230.
- Tsai, Y. and Olson, B., 1992. Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**: 754-757.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H. and Harayama, S., 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 4396-4402.
- Yeates, C., Gillings, M., Davison, A., Altavilla, N. and Veal, D., 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biological Procedures Online*, **1**: 40-47.

