

Isolasi dan Identifikasi Bakteri Selulolitik dengan Aktivitas Tinggi dalam Saluran Pencernaan Keong Emas (*Pomacea canaliculata*)

(Isolation and Identification of High Cellulolytic Activity of Bacteria from Golden Snail's (*Pomacea canaliculata*) gut)

M. Anam Al-Arif*, Win Darmanto**, Ni Nyoman Tri Puspaningsih**, Suwarno*

ABSTRACT

Cellulase can degrade cellulose to become glucose. A large number of cellulolytic microbes are available in the animal's gut. The aim of this research was to isolate and identify the cellulolytic bacteria with high activity from Golden snail's gut. Some golden snails were surface sterilized by 70% ethanol and then washed in sterile distilled water. The entire guts were removed from the abdomen and disrupted then 1 gram of gut debris was suspended in 10 ml sterile distilled water. After serial dilution, aliquots were transferred into CMC-solid media and incubated at 35° C for 24 hours. The growing cultures were cultivated on NA-solid media. Bacteria from single colonies were repeatedly grown on CMC-solid medium and covering the Petri dishes with Congo red dye. The colonies that had high degradation ability then tested to endoglucanase activity and identified with biochemical and 16S-rRNA tested. The result of this research is there were two high cellulolytic bacteria isolates: Burkholderia pseudomallei and Klebsiella sp.

Key words: Golden snail, identification, cellulolytic bacteria, cellulase

PENDAHULUAN

Selulosa merupakan rangkaian glukosa dengan jumlah 1000 sampai lebih dari satu juta unit sehingga merupakan sumber energi yang sangat potensial (Wang, 2004), namun glukosa pada selulosa terhubung dengan ikatan β -1,4-glikosida sehingga sulit didegradasi. Enzim selulase merupakan enzim kompleks terdiri dari endoglukanase, eksoglukanase dan selobiase yang mampu mendegradasi selulosa (Murashima et al., 2002).

Secara umum enzim selulase hanya diproduksi oleh mikroba, baik bakteri, protozoa maupun jamur. Keberadaan protozoa atau bakteri simbiotik dalam saluran pencernaan memungkinkan hewan invertebrata maupun herbivora untuk mencerna selulosa. Saluran pencernaan rayap *Zootermopsis angusticollis* mengandung bakteri Gram-positif kelompok Actinomycetes ordo Actinomycetales yang meliputi genus Cellulomonas/Orskovia, Microbacterium dan Kocuria, serta bakteri Gram-positif dari ordo Bacillales yang meliputi genus Bacillus, Brevibacillus dan Paenibacillus. Terdapat juga genus Afipia, Agrobacterium/Rhizobium,

Brucella/Ochrobactrum, Pseudomonas dan Sphingomonas/ Zymomonas dari Proteobacteria dan Spirosoma dari "Flexibacteriaceae" yang merupakan bakteri Gram-negatif (Wenzel et al., 2002). Pada saluran pencernaan rayap *Mastotermes darwiniensis* dapat ditemukan bakteri *Promicromonospora citrea*, *Promicromonospora sukumoe* dan genus *Cellulosimicrobium* (Bakalidou et al., 2002). *Clostridium cellulovorans* bisa memproduksi enzim selulase kompleks (Murashima et al., 2002).

Keong *Pulmonata* mampu mencerna tumbuhan karena dalam saluran pencernaan terdapat mikroba pencerna serat (Reavell, 1980; Charrier and Brune, 2003; Ghesquire, 2003). Saluran pencernaan keong *Helix pomatia* dan *Cornu aspersum* mengandung bakteri yang dapat dikelompokkan dalam dua taksa, yaitu Gamma Proteobacteria misalnya: *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Obesumbacterium*, dan *Raultella*; serta Firmicute yang meliputi: *Enterococcus*, *Lactococcus* dan *Clostridium* (Charrier et al., 2006).

* Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga

** Fakultas Sain dan Teknologi Universitas Airlangga

Keong emas (*Pomacea canaliculata*) merupakan salah satu hama pertanian yang mempunyai kemampuan tinggi dalam merusak tanaman pertanian. Hal ini menunjukkan bahwa keong emas juga mampu mencerna hijauan dan kemungkinan juga menghasilkan enzim pencernaan serat. **Castro-Vazquez et al.**, (2002) menyebutkan bahwa pada glandula usus tengah keong emas terdapat korpuskel C dan K yang mampu memproduksi enzim pencernaan. **Al-Arif dkk.** (2004) menemukan bahwa isi saluran pencernaan keong emas mempunyai aktivitas selulase yang lebih tinggi dibandingkan dengan isi saluran pencernaan rayap (*Macrotermes sp.*), sedangkan **Setyono dkk.** (2005) juga menemukan 2 jenis protozoa simbiotik dalam pencernaan keong emas yang serupa dengan protozoa dalam saluran pencernaan rayap. Penelitian mengenai keberadaan bakteri simbiotik dalam saluran pencernaan keong emas sejauh ini masih belum pernah dilakukan, oleh sebab itu tujuan penelitian ini untuk menganalisis keberadaan bakteri selulolitik dalam saluran cerna keong emas serta diidentifikasi.

MATERI DAN METODE

Beberapa ekor keong emas masing-masing disterilisasi pada bagian luar cangkang dengan ethanol 70%, dicuci dengan PBS steril, diambil bagian isi usus dan lambung dengan cara dibuka menggunakan gunting steril, ditimbang sebanyak 10 gram kemudian ditambah dengan 90 ml aquadest steril dan dihomogenisasi (**Li et al.**, 2003). Dibuat beberapa kali pengenceran dari 10^{-1} sampai 10^{-5} , kemudian masing-masing pengenceran ditanam pada media selektif dengan sistem *spread* (**Wenzel et al.**, 2002).

Dibuat lima buah media selektif mengandung CMC. Larutan media selektif disterilisasi kemudian dituang ke dalam cawan Petri, setelah media dingin selanjutnya larutan isi usus dan lambung keong emas masing-masing diambil sebanyak 1 ml dan dituang di atas media CMC agar dan diratakan dengan *spreader*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C .

Koloni bakteri yang tumbuh kemudian dimurnikan dengan menanam kembali beberapa kali pada media Nutrien Agar dalam cawan Petri dengan cara *streak* dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C sampai didapatkan seluruh biakan tersebut benar-benar murni.

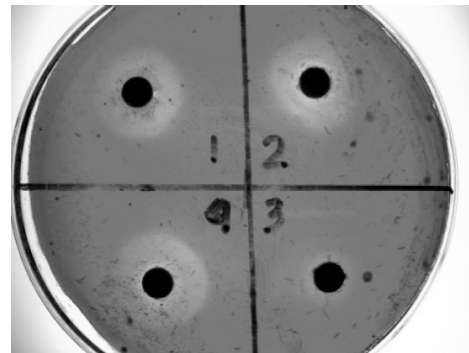
Isolat-isolat bakteri yang sudah murni, selanjutnya ditumbuhkan pada media CMC yang terdiri dari $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g/100 ml, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/100 ml, NaCl 0,23 g/100 ml, Yeast extract 0,2 g/100 ml, CMC 1 g/100 ml serta Agar 2,5 g/100 ml. Sebanyak 1 ose koloni

bakteri ditanam dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 35°C , diwarnai dengan Congo red 0,1% dan diinkubasikan selama 30 menit kemudian dibilas dengan larutan NaCl 1% (**Ji et al.**, 2003). Dilakukan pengamatan adanya halo (daerah bening) di sekitar koloni dan diukur diameternya.

Beberapa isolat bakteri yang dapat menghasilkan daerah halo dengan diameter lebar dipilih sebagai isolat unggulan. Masing-masing koloni selanjutnya diidentifikasi dengan uji morfologis dan biokimiawi (**Barrow and Feltham**, 1993), serta diuji aktivitas endoglukanasanya. Isolat bakteri dengan aktivitas endoglukanase paling tinggi selanjutnya diidentifikasi dengan 16S-rRNA menggunakan Primer umum F: 5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3' dan R: 5'-GGTTACGTTGTTACGACTT-3'.

HASIL DAN DISKUSI

Larutan isi usus dan lambung keong emas yang ditanam pada media selektif CMC, didapatkan beberapa isolat yang tumbuh. Isolat-isolat bakteri yang sudah murni selanjutnya ditumbuhkan kembali pada media CMC-agar dan didapatkan empat isolat yang mampu membentuk daerah bening yang lebar (*Gambar 1*).



Gambar 1. Beberapa isolat yang membentuk daerah halo.

Empat isolat tersebut selanjutnya diidentifikasi secara morfologis dan biokimiawi. Hasil uji biokimiawi keempat isolat tersebut tercantum pada *Tabel 1*.

Hasil uji biokimiawi kemudian dicocokkan dengan program Microbact™ serta Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (**Brenner et al.**, 2005). Hasil identifikasi tercantum pada *Tabel 2*.

Keempat isolat kemudian ditumbuhkan pada media cair pertumbuhan dengan waktu inkubasi 24 jam. Setelah masa inkubasi selesai, selanjutnya dilakukan ekstraksi enzim masing-masing isolat. Aktivitas enzim selulase yang dihasilkan oleh keempat isolat bakteri pencernaan

Tabel 1. Hasil uji biokimiawi beberapa isolat bakteri selulolitik

Sifat	Isolat C-1	Isolat C-2	Isolat C-3	Isolat C-4
Gram	-	-	-	-
Oxidase	+	+	+	+
Motility	+	+	+	-
Nitrate	+	+	+	-
Adonitol	+	-	-	-
Arabinose	+	-	+	-
Arginine	-	-	+	-
Citrate	+	+	+	-
Gelatine	-	-	-	-
Glucose	+	-	+	-
H ₂ S	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
Inositol	+	-	+	-
Lactose	+	-	+	-
Lysine	+	+	+	-
Malonate	+	+	-	+
Mannitol	+	-	+	-
ONPG	+	-	+	+
Ornithine	-	-	+	-
Raffinose	+	-	+	-
Rhamnose	+	-	-	-
Salicin	+	-	+	-
Sorbitol	+	-	+	-
Sucrose	+	-	+	-
TDA	+	-	-	-
Urease	+	-	+	+
VP	+	-	+	-
Xylose	+	-	+	-

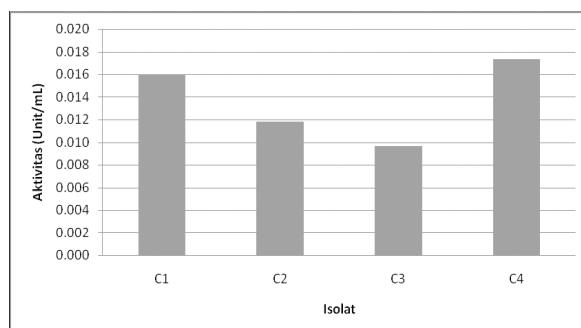
Tabel 2. Hasil Identifikasi Empat Isolat Bakteri Selulolitik Asal Pencernaan Keong Emas

Isolat	Nama Isolat	Probabilitas (%)
C-1	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	99.99
C-2	<i>Buttiauxella</i> sp.	86
C-3	<i>Kluyvera</i> sp.	86
C-4	<i>Actinobacillus</i> sp.	99.97

keong emas menunjukkan bahwa aktivitas endoglukanase paling tinggi berasal dari isolat bakteri C4 dengan aktivitas sebesar 17×10^{-3} Unit/mL, kemudian diikuti berturut-turut oleh isolat C1, C2 dan C3 seperti disajikan pada *Tabel 3* dan *Gambar 2*.

Tabel 3. Aktivitas Enzim Selulase Produksi Bakteri dari Pencernaan Keong Emas pada Medium Cair

Isolat	Aktivitas enzim selulase ($\times 10^{-3}$ Unit/mL)
C-1	16.02
C-2	11.80
C-3	9.65
C-4	17.32



Gambar 2. Grafik aktivitas enzim selulase beberapa isolat bakteri dari pencernaan keong emas.

Berdasarkan data tersebut diketahui bahwa aktivitas enzim endoglukanase tertinggi berasal dari isolat bakteri C-4, oleh sebab itu isolat bakteri tersebut dipilih sebagai bakteri terpilih untuk penelitian lebih lanjut. Isolat bakteri C-4 diidentifikasi lebih lanjut menggunakan 16S-rRNA. Hasil sekuensing menunjukkan susunan nukleotida sebagai berikut:

```

TTNTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGC
TCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTT
GAGTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGG
TCGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCC
TCAAGGGCACAACCTCCAAATCGACATCGTTTA
CGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTG
CTCCCCACGCTTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTT
TGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCC
TCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGG
AATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCC
AGTTTCGAATGCAGTCCCAGGTTGAGCCCGGG
GATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGT
GCGCTTTACGCCAGTAATTCGGATTAACGCTTG
CACCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGA
GTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAA
TCGACAAGGTTATTAACCTTATCGCCTTCCTCCC

```

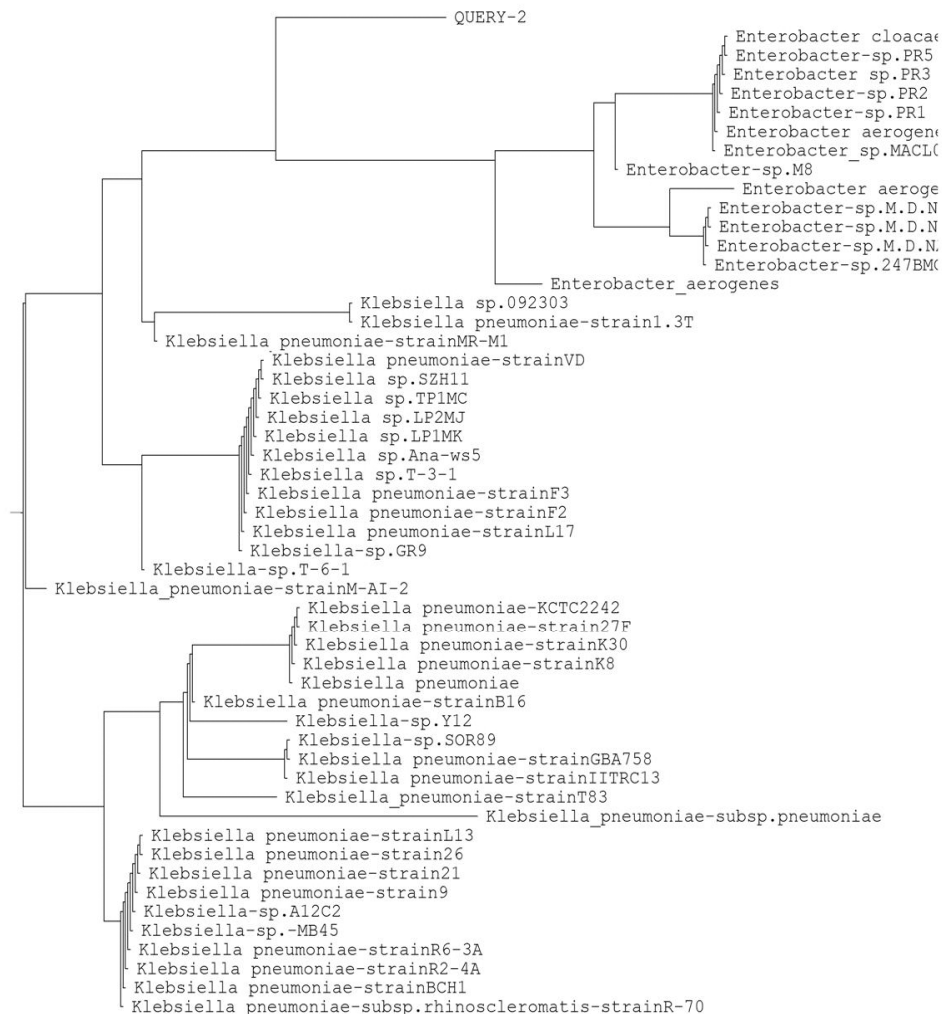
CGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCT
 TCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCG
 CCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCG
 TAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG
 GCTGGTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGT
 CGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCT
 AATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGC
 CCGAAGGTCCCCCACTTTGGTCTTGCGACATTAT
 GCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCC

CTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTCACC
 CGTCCGCGCACTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCTC
 TGTGCTACCG

Susunan nukleotida isolat C-4 yang diperoleh selanjutnya diidentifikasi menggunakan program BLAST dalam www.ncbi.com dan didapatkan 52 isolat yang mempunyai kemiripan susunan nukleotida dengan tingkat kemiripan 98 sampai lebih dari 99%. Hasil identifikasi lanjut

Alignment: Multi-way DNA alignment.
 Parameters: Scoring matrix: Linear (Mismatch 2, OpenGap 4, ExtGap 1)

Number of sequences to align: 53



Gambar 3. Pohon filogenetik isolat bakteri C-4 menggunakan program Clone Manager.

menunjukkan bahwa isolat C-4 yang semula diidentifikasi sebagai *Actinobacillus* sp. ternyata lebih mengarah pada *Klebsiella* sp. seperti tercantum pada Gambar 3.

Berdasarkan uji aktivitas endoglukanase, diketahui terdapat dua isolat bakteri selulolitik yang mempunyai aktivitas selulolitik tinggi yaitu *Klebsiella* sp. dan *Burkholderia pseudomallei*. Genus *Burkholderia* meliputi lebih dari 30 spesies bakteri dengan ekologi yang berbeda-beda (Coenye and Vandamme, 2003), misalnya pada lingkungan tanah dan air (Zhang et al., 2000; Bramer et al., 2001; Goris et al., 2004; Yang et al., 2006), manusia dan hewan (Coenye and Vandamme, 2003) serta sebagai bakteri simbiotik, misalnya pada pembuluh tanaman (Van Oevelen et al., 2002, 2004).

Umumnya spesies-spesies *Burkholderia* bersifat patogen terhadap tanaman serta sebagai bakteri tanah kecuali *B. mallei* dan *B. pseudomallei* yang bersifat patogen terhadap manusia dan hewan (Coenye and Vandamme, 2003), namun beberapa strain *Burkholderia* juga diketahui sebagai bakteri yang menguntungkan karena dapat mengontrol penyakit pada tanaman dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri dan jamur patogen terhadap tanaman (Aoki et al., 1993), meningkatkan produksi tanaman (Tran-Van, 2000) serta mengikat nitrogen (Gillis et al., 1995).

Smith et al., (1997) menemukan bakteri yang hidup di alam yang secara morfologis, biokimiawi dan serologis sangat mirip dengan *Burkholderia pseudomallei* namun tidak virulen. Brook et al., (1997) menyebutkan bahwa *B. pseudomallei* merupakan organisme saprofit yang dapat diisolasi dari alam misalnya air, tanah lembab serta batang padi. Brett et al., (1998) menyebutkan bahwa bakteri yang menyerupai *B. pseudomallei* tersebut selanjutnya disebut sebagai *B. thailandensis*, sedangkan Yabuuchi et al., (2000) menyebutkan bahwa salah satu *B. thailandensis* yang diisolasi dari permukaan tanah di pinggir jalan di Thailand selanjutnya diklasifikasikan sebagai *B. ubonensis*.

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri gram negatif dari subdivisi gamma dari kelas *Proteobacteria* dan secara genetis mempunyai kedekatan yang tinggi dengan genus lain dari *Enterobacteriaceae*, antara lain *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, dan *Yersinia* (Brenner et al., 2005). *Klebsiella pneumoniae* juga menjadi penyebab bakterimia serta infeksi yang tahan terhadap antibiotika (Ko et al., 2002; Paterson et al., 2004).

Beberapa bakteri endofit pengikat nitrogen berhasil diisolasi dari tanaman padi lahan basah, misalnya *Azospirillum* sp. (Baldani and Doebereiner, 1980), *Klebsiella* sp. dan *Enterobacter* sp. (Fujie et al., 1987).

Tanaman padi di Filipina menunjukkan keberadaan bakteri endofit dalam jaringan tanaman dengan spektrum yang luas. Bakteri endofit tersebut umumnya bervariasi tergantung umur tanaman, dengan populasi yang meningkat seiring dengan peningkatan umur tanaman (Barraquio et al., 1997; Stoltzfus et al., 1997; Watanabe et al., 1979).

Anand et al. (2010) menemukan sebelas isolat bakteri dari saluran cerna ulat sutra (*Bombyx mori*), meliputi bakteri Gram positif *Bacillus circulans* dan Gram negatif *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas* sp. dan *Erwinia* sp. Tiga dari isolat tersebut, yaitu *Pseudomonas vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, mempunyai aktivitas selulolitik dan xilanolitik, *Pseudomonas fluorescens* dan *Erwinia* sp. mempunyai aktivitas pektinolitik dan *Klebsiella pneumoniae* juga dapat mendegradasi pati. *Aeromonas* sp. mampu menggunakan CMC dan xilan. *Serratia liquefaciens* mampu menggunakan tiga polisakarida yaitu CMC, xilan dan pektin, *Bacillus circulans* mampu menggunakan empat polisakarida dengan tingkat efisiensi yang berbeda. Saluran cerna ulat sutra mempunyai pH basa dan seluruh isolat bakteri yang ditemukan tumbuh dan mendegradasi polisakarida dalam suasana pH basa.

Keong secara kontinyu mengkonsumsi bakteri dari tanah serta lingkungan, serta setiap saat dapat terkontaminasi dengan bakteri dalam konsentrasi yang tinggi, bahkan kemungkinan juga bakteri patogen melalui pakan yang dikonsumsi (Kowalczyk-Pecka and Puchalski, 2008). Saluran pencernaan merupakan penghubung antara lingkungan dengan fisiologi hewan, sehingga kemungkinan secara permanen mengandung mikroba yang berasal dari lingkungan. Bakteri tersebut kemungkinan bersifat patogen ataupun menguntungkan (Watkins and Simkiss, 1990). Keong emas mengkonsumsi sejumlah besar tanaman air dan alga serta tanaman padi yang banyak mengandung selulosa, oleh sebab itu mikroba yang ada dalam saluran pencernaan berperan dalam pencernaan pakan keong. Isolat bakteri yang berhasil diisolasi dari keong emas (*Pomacea canaliculata*), tersebut bukanlah bakteri patogen karena normal berada pada lingkungan, baik di air, tumbuhan maupun pencernaan hewan. Bakteri tersebut juga berasal dari keong emas yang sedang dalam kondisi sehat serta mampu menghasilkan enzim pencernaan serat, hal ini terbukti dari isolasi yang dilakukan menggunakan media CMC sehingga bakteri yang berhasil tumbuh merupakan bakteri selulolitik.

SIMPULAN

Simpulan yang dapat dirumuskan dari hasil penelitian ini adalah: dalam pencernaan keong emas dapat diisolasi 2 (dua) isolat bakteri selulolitik dengan aktivitas tinggi yaitu *Burkholderia pseudomallei* dan *Klebsiella* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Arif MA, H. Setyono dan Tri-Nurhajati**, 2004. Isolasi dan Karakterisasi Enzim Selulase dari Keong Emas dan Rayap sebagai Bahan Pendegradasi Selulosa. FKH Unair, Surabaya.
- Anand AAP, Vennison SJ, Sankar SG, Prabhu DIG, Vasan PT, Raghuraman T, Geoffrey CJ and Vendan SE**, 2010. Isolation and characterization of bacteria from the gut of *Bombyx mori* that degrade cellulose, xylan, pectin and starch and their impact on digestion. *J. Insect Sci*: Vol. 10. Article 107: 1–20.
- Aoki M, K. Uehara, K. Tsuji, K. Ono, and M. Iijima**, 1993. Large-scale culture and preservation methods of *Pseudomonas cepacia* B5 for biological control against wilt disease. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57: 668–669.
- Bakalidou A, P. Kampfer, M. Berchtold, T. Kuhnigk, M. Wenzel and H. Konig**, 2002. *Cellulosimicrobium variabile* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the hindgut of the termite *Mastotermes darwiniensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1185–1192.
- Baldani VLD and Doebereiner J**, 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol Biochem* 12: 433–439.
- Barraquio WL, Revilla L and Ladha JK**, 1997. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant Soil* 194: 15–24.
- Barrow GI and RKA. Feltham**, 2003. Cowan and Steel's Manual for The Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Cambridge University Press. Cambridge – New York.
- Bramer CO, P. Vandamme, LF. da Silva, JGC. Gomez and A. Steinbuchel**, 2001. *Burkholderia sacchari* sp. nov., a polyhydroxyalkanoate-accumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 1709–1713.
- Brenner DJ, NR. Krieg and JT. Staley**, 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 2nd ed. Vol.2. The *Proteobacteria*. Part B. *Gammaproteobacteria*. Springer. Michigan State University. USA.
- Brett PJ, D. De-Shazer, and DE. Woods**, 1998. *Burkholderia thailandensis* sp. nov., a *Burkholderia pseudomallei*-like species. *Int J Syst Bacteriol* 48: 317–320.
- Brook MD, B. Currie, and PM. Desmarchelier**, 1997. Isolation and identification of *Burkholderia pseudomallei* from soil using selective culture techniques and the polymerase chain reaction. *J Appl Microbiol* 82: 589–596.
- Castro-Vazquez A, EA. Albrecht, IA. Vega, E. Koch, and C. Gamarra-Luques**, 2002. Pigmented corpuscles in the midgut gland of *Pomacea canaliculata* and other neotropical apple-snails (Prosobranchia, Ampullariidae): A possible symbiotic association. *Biocell.* 26(1): 101–109.
- Charrier M and A. Brune**, 2003. The gut microenvironment of helix snails (Gastropoda: Pulmonata) in-situ profiles of pH, oxygen and hydrogen determined by microsensors. *Can. J. Zool.* 81: 928–935.
- Charrier M, G. Fonty, B. Gaillard-Martinie, K. Ainouche, and G. Andant**, 2006. Isolation and characterization of cultivable fermentative bacteria from the intestine of two edible snails, *Helix pomatia* and *Cornu aspersum* (Gastropoda: Pulmonata). *Biological Research*, 39: 669–681.
- Coenye T and P. Vandamme**, 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ Microbiol* 5: 719–729.
- Fujie T, Huang YD, Higashitani A, Nishimura Y, Iyama S, Yoneyama YYH and Dixon RA**, 1987. Effect of inoculation with *Klebsiella oxytoca* and *Enterobacter cloacae* on dinitrogen fixation by rice-bacteria associations. *Plant Soil* 103: 221–226.
- Ghesquire S**, 2003. Introduced species summary project applesnail (*Pomacea canaliculata*). www.applesnail.net
- Gillis M, V. Tran-Van, R. Bardin, M. Goor, P. Hebbat, A. Willems, P. Segers, K. Kersters, T. Heulin, and MP. Fernandez**, 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia Ôietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 274–289.
- Goris J, P. de Vos, J. Caballero-Mellado, J. Park, E. Falsen, JF. Quensen, JM. Tiedje, and P. Vandamme**, 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T

- and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 54: 1677–1681.
- Ji W, D. Ming, L. Yan-Hong, C. Qing-Xi, X. Gen-Jun, and Z. Fu-Kun**, 2003. Isolation of a multi-functional endogenous cellulase gene from mollusc, *Ampullaria crosseana*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica. 35(10): 941–946.
- Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, McCormack JG, and Yu VL**, 2002. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. Emerg. Infect. Dis. 8: 160–166.
- Kowalczyk-Pecka D and Puchalski A**, 2008. Potential interaction between the *Cepaea nemoralis* wild snail and *Citrobacter* spp. Bacteria. Medycyna Wet. 64(6): 786–790.
- Li L, J. Frohlich, P. Pfeiffer and H. Konig**, 2003. Termite gut symbiotic archaezoa are becoming living metabolic fossils. Eukaryotic Cell, 2(5): 1091–1098.
- Murashima K, A. Kosugi and RH. Doy**, 2002. Synergistic effects on crystalline cellulose degradation between cellulosomal cellulases from *Clostridium cellulovorans*. J. Bacteriol. 184(18): 5088–5095.
- Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, Mohapatra S, Casellas JM, Goossens H, Mulazimoglu L, Trenholme G, Klugman KP, Bonomo RA, Rice LB, Wagener MM, McCormack JG, and Yu VL**, 2004. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial Infections. Ann. Intern. Med. 140: 26–32.
- Reavell A**, 1980. A study of the diets of some British freshwater gastropods. J. Conch. 30: 253–271.
- Setyono H, Al-Arif MA, dan A. Sunarso**, 2005. Identifikasi Protozoa Simbiotik pada Saluran Pencernaan Keong Emas (*Pomacea Canaliculata*). FKH – Unair.
- Smith MD, BJ. Angus, V. Wuthiekanun, and NJ. White**, 1997. Arabinose assimilation defines a nonvirulent biotype of *Burkholderia pseudomallei*. Infect. Immun. 65: 4319–4321.
- Stoltzfus JR, So R, Malarvithi PP, Ladha JK, and de Bruijn FJ**, 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. Plant Soil 194: 25–36.
- Tran-Van V, O. Berge, S. Ngo-Ke, J. Balandreau, and T. Heulin**, 2000. Reproducible beneficial effects of rice inoculation with a strain of *Burkholderia Ōietnamiensis* on early and late yield components in low fertility sulphate acid soils of Vietnam. Plant Soil 218: 273–284.
- Van Oevelen S, R. de Wachter, P. Vandamme, E. Robbrecht, and E. Prinsen**, 2002. Identification of the bacterial endosymbionts in leaf galls of Psychotria (Rubiaceae, Angiosperms) and proposal of ‘Candidatus *Burkholderia kirkii*’ sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 52: 2023–2027.
- Van Oevelen S, R. de Wachter, P. Vandamme, E. Robbrecht, and E. Prinsen**, 2004. ‘Candidatus *Burkholderia calva*’ and ‘Candidatus *Burkholderia nigropunctata*’ as leaf gall endosymbionts of African Psychotria. Int J Syst Evol Microbiol 54: 2237–2239.
- Wang NS**, 2004. Cellulose Degradation. Biochemical Engineering Laboratory (ENCH 485), University of Maryland.
- Watanabe I, Barraquio WL, de Guzman MR, and Cabrera DA**, 1979. Nitrogen-fixing (acetylene reduction activity) and population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice. Appl Environ Microbiol 39: 813–819.
- Watkins B and Simkiss K**, 1990. Interactions between soil bacteria and the molluscan alimentary tract. J. Molluscan Stud, 56: 267–274.
- Wenzel M, I. Schonig, M. Berchtold, P. Kampf and H. Konig**, 2002. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. Journal of Applied Microbiology 92: 32–40.
- Yabuuchi E, Y. Kawamura, T. Ezaki, M. Ikeda, S. Dejsirilert, and N. Fujiwara**, 2000. *Burkholderia uboniae* sp. nov., L-arabinose-assimilating but different from *Burkholderia thailandensis* and *Burkholderia vietnamiensis*. Microbiol Immunol 44: 307–317.
- Yang HC, WT. Im, KK. Kim, DS. An, and ST. Lee**, 2006. *Burkholderia terrae* sp. nov., isolated from a forest soil. Int J Syst Evol Microbiol 56: 453–457.
- Zhang H, S. Hanada, T. Shigematsu, K. Shibuya, Y. Kamagata, T. Kanagawa, and R. Kurane**, 2000. *Burkholderia kururiensis* sp. nov., a trichloroethylene (TCE)-degrading bacterium isolated from an aquifer polluted with TCE. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 743–749.