

Isolate Of Bacteriua Cellulase Enzyme Production In The Rumen Of Aceh Cattle Base On Analysis Homology 16S rRNA

Indah Melzana¹, Safika², Darmawi^{3*}, Erina³, Fakhrurrazi³, Al Azhar⁴

¹Program Studi Pendidikan Dokter Hewan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

²Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan IPB University, Bogor

³Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

⁴Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh

*Corresponding author: darmawi@unsyiah.ac.id

ABSTRACT

The rumen of cattle is well known one of a bacterium cellulolytic production that have ability to degrade cellulose for produce cellulase enzymes. The aims of the present study is to determine the type of bacteria produced cellulase enzymes in the rumen of cattle aceh. The diversity of cellulolytic bacteria is determined by analysis of 16S rRNA genes. Isolation of cellulolytic bacteria, total DNA isolation, agarose gel electrophoresis, amplification of the 16S rRNA gene, determining the DNA sequence, DNA sequence homology and alignment of DNA sequences. Isolation of bacterium cellulolytic, isolating total DNA, gel electrophoresis agarosa, amplified of gen 16S rRNA, determination the DNA barcode, homology DNA barcode, and alignment of DNA sequences. The sample of rumen liquid was taken from RPH, then maked isolation of total DNA to get pure DNA from bacterium whos result and amplification DNA of bacterium cellulolytic separated by electrophoresis gel agarosa. Gene of bacterium cellulolytic was isolated based Polymerase Chain Reaction method. Alignment is done by using BlastN program, then use CLustalW program. It can be concluded that the species of bacteria (FKH_USK_6) in rumen has a closeness with Coronabacter sakazakii bacteria strain PNP8 of 97% according to the size of the DNA sequence and the same position on an existing gene in GenBank.

Keywords: cellulolytic bacteria, cellulase, aceh cattle, rumen, PCR

PENDAHULUAN

Terdapat beberapa jenis sapi lokal, diantaranya sapi jawa, sapi bali, sapi madura dan sapi aceh. Sapi lokal mempunyai keunggulan dalam efisiensi penggunaan pakan, mampu beradaptasi terhadap lingkungan Indonesia seperti panas, lembab, pakan mutu rendah, ektoparasit dan endoparasit. Walaupun laju pertumbuhannya tidak sebesar sapi persilangan, sapi lokal mampu menunjukkan produktivitas dan efisiensi ekonomi maksimal pada kondisi terbatas (Susilawati dkk., 2004; Romjali dkk., 2007).

Sapi aceh, yang terbentuk dari hasil persilangan antara sapi lokal (*Bos sondaicus*) dengan sapi turunan zebu dari India (*Bos indicus*), merupakan salah satu

plasma nutfah sapi lokal di Indonesia (Basri, 2006). Sapi aceh dibudidayakan secara turun temurun oleh masyarakat sebagai penghasil daging. Keunggulan dari sapi aceh ini selain memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap penyakit, juga mempunyai keunggulan dalam adaptasi pakan yang berkualitas rendah dan banyak mengandung serat kasar yang tinggi (BPTU-HPT Indrapuri, 2014).

Pakan yang mengandung serat kasar seperti selulosa, amilum, dan xilan sebagai pakan basal bagi ruminansia, difermentasi di rumen oleh mikroba seperti bakteri, archaea, protozoa dan jamur menjadi bentuk yang lebih sederhana. Bakteri merupakan biomassa mikroba yang terbesar di dalam rumen. Populasi bakteri di dalam rumen ternak ruminansia terdapat sekitar 10^{10} - 10^{12} bakteri pada tiap gram isi rumen

(Ogimoto,1981). Jumlah bakteri di rumen bervariasi tergantung pakan yang dikonsumsi, waktu pengambilan sampel setelah pemberian pakan, spesies hewan, musim dan ketersediaan hijauan pakan (Hernawati dkk., 2010; Marganingtyas, 2011).

Bakteri yang mendegradasi selulosa disebut bakteri selulolitik, dengan menghasilkan enzim selulase. Bakteri ini merupakan salah satu mikroba yang paling banyak ditemukan di rumen sapi terutama sapi-sapi yang pakannya mengandung serat kasar tinggi seperti sapi aceh. Jumlah mikroba selulolitik di dalam isi rumen sapi berkisar $8,1 \times 10^4$ sel/gram isi rumen (Hernawati dkk., 2010). Jumlah bakteri selulolitik ini tergantung pada kondisi lingkungan dan pakan yang diberikan.

Pada umumnya bakteri aerobik selulolitik termasuk dalam kelompok *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* dan *Proteobacteria* (Ulrich dkk., 2008). Bakteri selulolitik yang berhasil diidentifikasi pada rumen sapi antara lain *Bacteriodes succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Butyrivibrio fibrisolvent*, *Bacteroides succinogenes*, *Clostridium lockheadii* dan *Cillobacterium cellulosolvens*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, *Cytophaga*, *Cellvibrio*, dan *Pseudomonas* (Dilly dkk., 2001; Lynd dkk., 2002; Ulrich dkk., 2008; Pattanachomsri dkk., 2011).

Identifikasi bakteri selulolitik dapat dilakukan melalui pendekatan genetika molekuler dengan menggunakan penanda DNA yang selanjutnya dilakukan amplifikasi gen. (Ammor dkk., 2005; Safika dkk., 2013). Di antara berbagai metode yang digunakan, RNA ribosomal paling banyak digunakan sebagai penanda molekuler. Pada prokaryota terdapat tiga jenis RNA ribosomal, yaitu 5S, 16S, dan 23S rRNA. Di antara ketiganya, 16S rRNA yang paling sering digunakan. Molekul 5S rRNA

memiliki urutan basa terlalu pendek, sehingga tidak ideal dari segi analisis statistika, sementara molekul 23S rRNA memiliki struktur sekunder dan tersier yang cukup panjang sehingga menyulitkan analisis. Sehingga analisis gen penyandi 16S rRNA telah menjadi prosedur baku dalam identifikasi bakteri (Ammor dkk., 2005).

PCR merupakan suatu metode amplifikasi DNA secara *in vitro* yang mampu mengamplifikasi segmen tertentu dari keseluruhan genom bakteri. Metode amplifikasi *in vitro* dianggap memiliki sensitifitas yang lebih tinggi. Diantara beberapa metode, PCR-sequensing merupakan metode identifikasi prokaryota yang paling banyak digunakan.

Dari latar belakang tersebut, maka perlu dilakukan penelitian tentang identifikasi bakteri penghasil enzim selulase pada rumen sapi aceh berdasarkan analisis homologi gen 16S rRNA.

MATERIAL DAN METODE

Isolasi Bakteri Selulolitik

Isolasi bakteri dilakukan dengan cara mengambil cairan rumen dan retikulum sapi aceh yang dipotong di Rumah Pemotongan Hewan (RPH) Banda Aceh sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml NaCl fisiologis kemudian dihomogenkan. Larutan tersebut diambil 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri steril, lalu ditambahkan sebanyak 20 ml media BHM agar yang merupakan media selektif bakteri selulolitik dengan metode tuang dan di aduk sampai larutan tercampur secara merata. Selanjutnya diinkubasi selama 72-96 jam. Koloni yang tumbuh ditambahkan congo red 0,3% selama 20 menit, kemudian dicuci dengan larutan NaCl 1 M. Pada isolat yang menandakan aktivitas enzim selulase terlihat zona bening di sekitar koloni. Setiap koloni murni yang mempunyai zona bening di ambil dan di kulturkan ke media cair dan

diinkubasi kembali selama 72-96 jam. Hasil inkubasi disentrifus 7000 g dan dibuang supernatannya, selanjutnya pelet sel dilakukan isolasi DNA.

Isolasi DNA total

DNA total diisolasi menggunakan *isolation DNA kit*. Kemudian, DNA total dan hasil amplifikasi DNA bakteri selulolitik dipisahkan dengan cara elektroforesis pada gel agarosa 1% dalam buffer TBE 1X.

Amplifikasi gen 16S rRNA

Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan metode PCR. Salah satu primer (BacF) yang digunakan komplemen dengan daerah lestari pada domain bakteri dan primer lain (UniB) didasarkan pada daerah lestari universal pada gen 16S rRNA *E.coli* (Aminin dkk., 2007).

Penentuan urutan DNA

Penentuan urutan DNA (sekuensing) dilakukan melalui jasa komersial di MacroGen Inc., Korea. Proses penentuannya adalah menggunakan metode Dye Terminator (3'-dye labelled dideoxynucleotide triphosphate).

Homologi Urutan DNA

Analisis homologi urutan DNA dapat diketahui di NCBI melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Penjajaran dilakukan dengan menggunakan program BLASTNkemudian, file disimpan dalam bentuk FASTA (Altschul dkk., 1997).

Untuk mendapatkan ukuran dan posisi yang sama dengan sampel DNA digunakan *clustal W* pada MEGA 5.1 (Tamura dkk., 2011).

Analisis Data

Data yang diperoleh berdasarkan hasil isolasi DNA, PCR dan urutan nukleotida akan dianalisis secara deskriptif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi Bakteri Selulolitik

Hasil koloni bakteri yang tumbuh pada media BHM-CMC agar dapat dilihat pada Gambar 1. Berdasarkan dari pengamatan yang dilakukan, koloni bakteri berwarna putih dengan bentuk bulat, pinggirannya tidak rata serta terlihat koloni bakteri yang tumbuh berada didalam media. Hasil aktivitas enzim selulose yang ditambahkan dengan *congo red* 0,3% selama 20 menit dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil isolasi bakteri selulolitik dari cairan rumen didapatkan koloni yang mempunyai diameter zona bening terluas yaitu koloni FKH_USK_8 (Gambar 2) dengan luas diameter zona bening 25 mm (Tabel 1). Indeks zona bening merupakan rasio antara diameter zona bening dengan diameter koloni (Nugraha. R, 2014). Hal ini menunjukkan bahwa koloni FKH_USK_8 aktivitas enzim selulase yang paling tinggi dalam mendegradasikan selulosa. Selulosa yang terhidrolisis pada medium agar jika digenangi oleh *Congo red* akan menghasilkan zona bening karena adanya reaksi antara *Congo red* dan ikatan β -1,4-glikosidik yang terkandung dalam polimer selulosa. Selulosa sendiri terhidrolisis karena aktivitas enzim selulolitik yang dihasilkan oleh bakteri (Steensma, 2001).

Tabel 1. Morfologi dan Zona bening masing-masing koloni bakteri

Koloni	Posisi Koloni	Pinggiran	Diameter Zona bening	Diameter Koloni
FKH_USK_5	Di dalam agar	Halus	10 mm	1,6 mm
FKH_USK_6	Di dalam agar	Halus	15 mm	1,4 mm
FKH_USK_7	Di dalam agar	Halus	20 mm	2 mm
FKH_USK_8	Di dalam agar	Halus	25 mm	2,5 mm

Isolasi DN A total

Metode isolasi DNA yang tepat merupakan tahap yang penting dalam analisis molekuler di bidang mikrobiologi. Ekstraksi DNA dapat dilakukan dengan berbagai metode, baik konvensional maupun menggunakan *kit*. Seiring perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi, ekstraksi DNA dapat dilakukan menggunakan *kit* dari berbagai merek (Fitriya, dkk. 2015). Hasil elektroforegram DNA yang telah di isolasi. Terlihat fragmen pita yang utuh pada tiap sumur agarosa (Gambar 3).

Dari gambar 3, menunjukan jalur migrasi DNA yaitu terlihat adanya pita yang terbentuk bahwa terdapat fragmen yang utuh. Pada saat memvisualisasikan dengan UV *Transiluminator*, bentuk DNA yang diperoleh memiliki tingkat kemurnian yang baik pada sampel tersebut dengan ditandai munculnya bentuk pita tunggal atau pita DNA yang tidak berekor. Ini menunjukan isolasi DNA berhasil dilakukan.

Langkah awal yang sangat menentukan dalam keberhasilan penelitian molekuler yang berbasis pada DNA adalah kualitas DNA yang diperoleh dari tahapan isolasi. Kemurnian dan kualitas DNA yang diperoleh dari tahap ini akan sangat menentukan dalam penelitian-penelitian biologi molekuler. Tiga langkah utama dalam isolasi DNA adalah perusakan dinding sel atau lisis, pemisahan DNA dari bahan padat seperti lipid dan protein, serta pemurnian DNA (Surzycki, 2000).

Amplifikasi gen 16S rRNA

Proses amplifikasi dilakukan dengan menggunakan metode PCR. Salah satu primer (BacF) yang digunakan komplemen dengan daerah lestari pada domain bakteri dan primer lain (UniB) didasarkan pada daerah lestari universal pada gen 16S rRNA *E.coli* (Aminin *et al.*, 2007). Proses penempelan primer pada utas DNA yang sudah terbuka memerlukan suhu optimum,

karena suhu yang terlalu tinggi dapat menyebabkan amplifikasi tidak terjadi atau sebaliknya suhu yang terlalu rendah menyebabkan primer menempel pada sisi lain genom yang bukan sisi homolognya. Akibatnya dapat teramplifikasi banyak daerah tidak spesifik dalam genom tersebut. Suhu penempelan (*annealing*) ini ditentukan berdasarkan primer yang digunakan yang dipengaruhi oleh panjang dan komposisi primer (Suryanto, 2003). Desain primer yang diperlukan untuk PCR adalah sepasang primer yang dikenal dengan forward primer dan reverse primer. Primer yang diperoleh merupakan rangkaian basa nukleotida yang unik dan diusahakan memiliki ukuran pendek untuk meminimalkan biaya.

Hasil elektroforegram amplifikasi gen 16S rRNA. 1. Marker DNA 1 kb, 2-8. Hasil amplikon dengan panjang ± 1500 bp. Dari hasil elektroforesis diketahui terdapat pita yang terseparasi dan sejajar dengan marka 1500 bp (Gambar 4). Hal ini menandakan bahwa fragmen gen yang teramplifikasi memiliki ukuran ± 1500 bp. Menurut Janda dan Abbott (2007), sekuen 16S rRNA memiliki tiga kelebihan yaitu ada pada semua bakteri, fungsinya tidak pernah berubah, dan gennya cukup besar mencapai ukuran 1500 bp, sehingga dapat disimpulkan bahwa proses amplifikasi fragmen gen 16S rRNA bakteri berhasil dilakukan secara utuh.

Penentuan urutan DNA

Hasil sekuensing bakteri selulolitik FKH_USK_6 dapat dilihat pada Gambar 5. Sekuensing dilakukan untuk menentukan urutan nukleotida pada fragmen DNA yang terdeteksi dari hasil visualisasi DNA yang teramplifikasi dalam proses PCR menggunakan mesin sekuensing DNA otomatis. Hasil sekuensing DNA, kemudian di analisis urutan nukleotidanya yang baik ditandai dengan menggunakan *software* DNA Start di program Editseq. Hasil

analisis sekuens gen FKH_USK_6 dengan menggunakan aplikasi editseq, jumlah DNA nukleotida yang dianalisis sebanyak 922 pb. Hasil analisis dapat dilihat pada Gambar 6.

Homologi Urutan DNA

Kemiripan urutan DNA isolat FKH_USK_6 dengan urutan DNA yang sudah dideposit di GenBank, dapat diketahui melalui penjajaran urutan DNA sampel dengan data nukleotida di NCBI melalui situs <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Penjajaran dilakukan dengan menggunakan program BLASTN (Altschul dkk., 1997). Selanjutnya, sekitar 100 urutan DNA yang mempunyai kemiripan tertinggi dengan cuplikan didownload melalui situs yang sama. File disimpan dalam bentuk FASTA (teks) untuk mempermudah penyuntingan.

Gambar 7. Hasil BLASTN dari sekuens gen FKH_USK_6

Hasil BLASTN (*Basic Local Alignment Search Tool*) dari sekuens gen FKH_USK_6 (Gambar 7) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Diketahui bahwa bakteriselulolitik FKH_USK_6 memiliki persamaan sekuens sebesar 97% dari yang ada pada GenBank, seperti *Salmonella enterica*, *Eschericia coli*, *Shigella sonnei*, *Cronobacter sakazakii*, dll. Menurut Janda dan Abbott (2007) jika homologi mempunyai persentase mendekati 100% atau diatas 97% dapat dikonfirmasi sebagai suatu spesies tetapi sebaliknya jika homologinya lebih kecil dari 97% kemungkinan isolat tersebut adalah spesies baru atau spesies belum dapat dikonfirmasi. Oleh karena itu, pada hasil BLASTN terhadap isolat bakteri selulolitik ini kemungkinan adalah spesies baru.

Penjajaran urutan DNA

Data yang diambil dari Gen Bank memiliki ukuran yang berbeda-beda, untuk

mendapatkan analisa yang benar, digunakan urutan DNA dengan ukuran dan posisi yang sama pada gen. Untuk mengetahui posisi tersebut dilakukan penjajaran menggunakan program ClustalW di Mega 5 (Tamura dkk., 2011). Selanjutnya, daerah di luar posisi tersebut dihilangkan. Data yang sudah sama ukuran dan posisinya dikelompokkan ke dalam satu file. Gambar hasil analisis bakteri selulolitik FKH_USK_6 dapat dilihat pada Gambar 7.

Dari data hasil penjajaran bakteri selulolitik gen FKH_USK_6 dengan program Mega 5, diketahui bahwa isolat FKH_USK_6 memiliki kedekatan dengan bakteri *Cronobacter sakazakii* strain PNP8 sebesar 97%. Hal ini menunjukkan bahwa kemungkinan isolat FKH_USK_6 merupakan yang baru, walaupun masih dalam Genus *Cronobacter*.

Bakteri ini termasuk dalam golongan *Enterobacteriaceae*, memiliki Gram negatif, berbentuk rod (kapsul), tidak memproduksi spora. Dikelompokkan dalam genus *Cronobacter* karena tahan terhadap medium selektif vancomycin. Bakteri ini berkembangbiak pada suhu optimum 44°C pada medium selektif *lauryl sulphate* yang telah diberivancomycin (Rapid Microbiology, 2008a; Ghassem dkk, 2008; Iversen dkk, 2007; Skovgaard, 2007).

C. sakazakii merupakan bakteri Gram positif, berbentuk batang, bergerak dengan flagel, anaerob fakultatif, termasuk dalam keluarga *Enterobacteriaceae*. *C. sakazakii* memiliki dua bentuk morfologi koloni yang berbeda (Iversen dan Forsythe, 2003; Gurtu dkk, 2005). Terdiri dari jenis koloni yang kering berlendir, struktur elastis ketat dan yang lain adalah tipe struktur koloni datar dan halus (Gurtu dkk, 2005).

KESIMPULAN

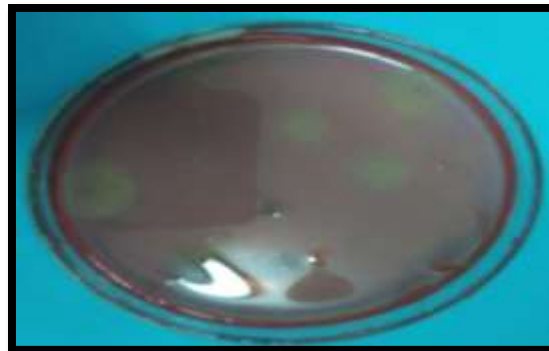
Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa isolat gen FKH_USK_6

bakteri penghasil enzim selulase pada rumen sapi aceh memiliki kedekatan dengan bakteri *Coronabacter sakazakii* strain PNP8 sebesar 97%, yang kemungkinan spesies baru dari *Coronabacter*. Dan isolat gen FKH_USK_4 jenis bakteri penghasil enzim

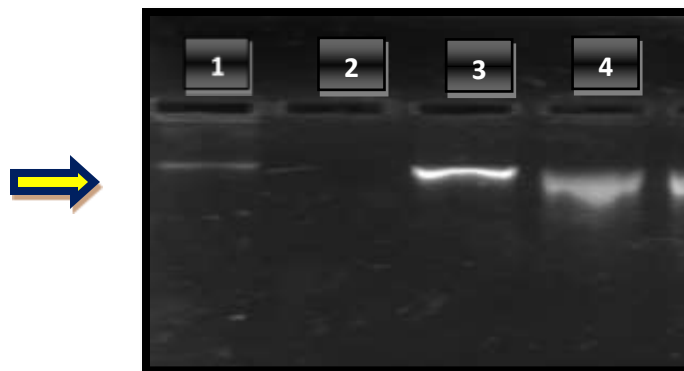
selulase pada Retikulum sapi aceh memiliki kedekatan dengan bakteri *Enterobacter sp.* TSSAS2-21 16s sebesar 87% sesuai dengan urutan DNA dan ukuran posisi yang sama pada gen yang ada di Gen Bank berdasarkan analisis Gen 16S rRNA.



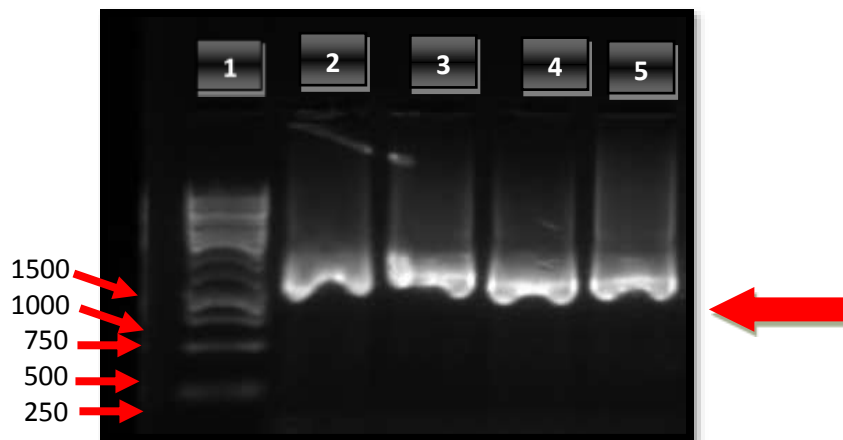
Gambar 1. Koloni bakteri yang tumbuh pada media BHM-CMC agar



Gambar 2. Zona bening yang terlihat di sekitar koloni



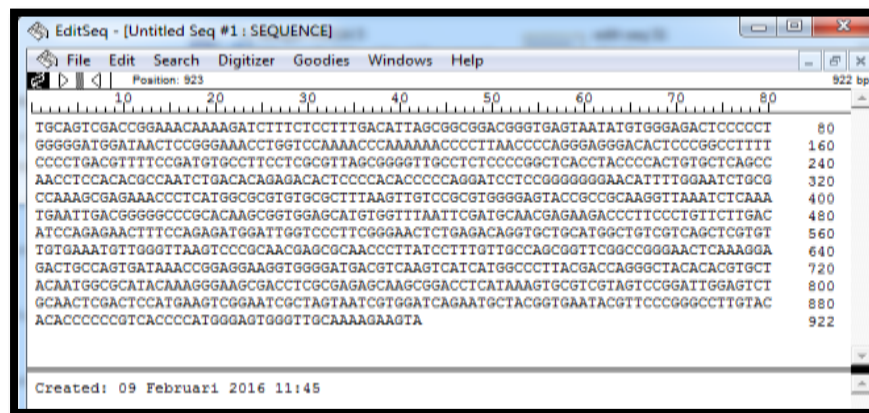
Gambar 3. Hasil elektroforegram DNA yang telah di isolasi. Terlihat fragmen pita yang utuh pada tiap sumur agarosa



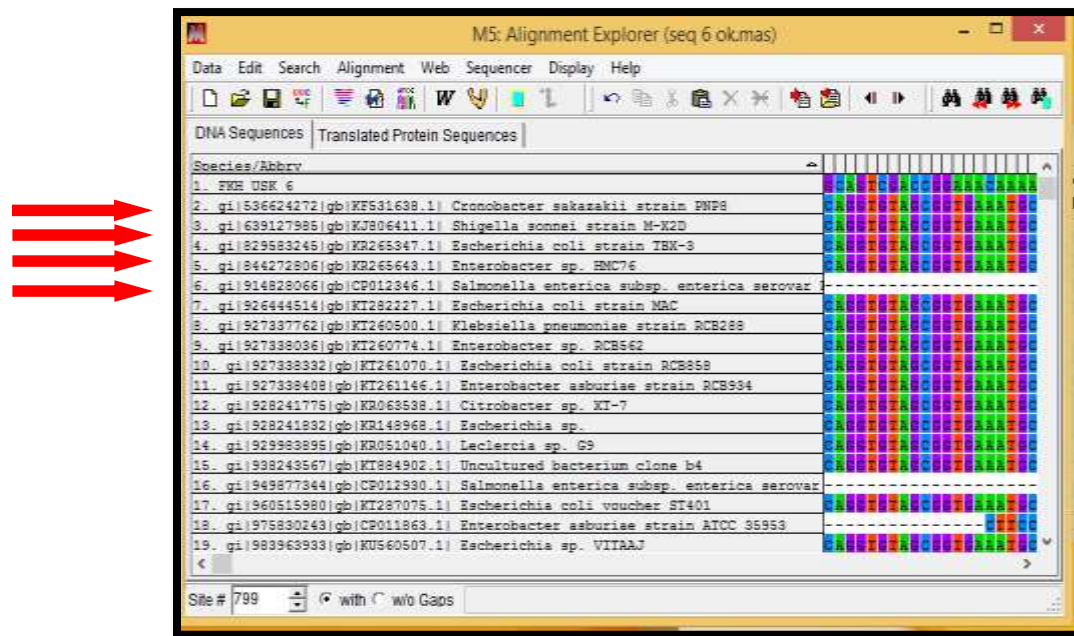
Gambar 4. Hasil elektroforegram amplifikasi gen 16S rRNA.



Gambar 5. Elektroforegram sekuens Gen 16S rRNA dari bakteri selulolitik pada sapi aceh menggunakan primer BacF



Gambar 6. Hasil analisis sekuens gen FKH_USK_6 dengan menggunakan aplikasi editseq, jumlah DNA nukleotida yang dianalisis sebanyak 922 p



- tradisional dry sausages. **J. Food Microbial.** 22: 373-382.
- BPTU-HPT, 2014. Keunggulan sapi Aceh. **bptu-hptindrapuri.com/keunggulan-sapiaceh**. (diakses tanggal 20 Oktober 2015)
- Dilly, O., S. Bartsch, P. Rosenbrock., F. Buscot., and J.C. Munch. 2001. Shifts in physiological capabilities of the microbiota during the decomposition of leaf litter in a black alder (*Alnus glutinosa* (Gaertn) L) forest. **Soil Biol Biochem.** 33:921–930.
- Handoyo, D. dan A. Rudenta. 2000. Prinsip umum pelaksanaan polymerase chain reaction (PCR). **Jurnal Universitas Surabaya Unitas.** Vol. 9(1).
- Hernawati, T., Lamid., M. Hermadi., dan H.A. Warsito. 2010. Bakteri Selulolitik untuk Meningkatkan Kualitas Pakan Komplit Berbasis Limbah Pertanian. **Veterinaria Medika.** Vol 3(3).
- Himedia. 2015. Bushnell Haas Agar. **Swastik Disha Business Park, Via Vadhani Ind.** Est., LBS Marg, Mumbai. 400086, India.
- Lynd, L.R., P.J. Weimer., W.H. Van and Zyl, I.S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiol Mol Biol Rev** 66:506–577
- Marganintyas, D.D. 2011. Potensi Selulolitik Indigenous Mangrove terhadap Komposisi Limba Ternak Udang. **Skripsi.** Sarjana Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya.
- Ogimoto, K. and Imai, S. 1981. Atlas of Rumen Microbiology. **Japan Scientific Societies Press.** Tokyo, Japan.
- Pattanachomsri, U., P. Kanokratana., L. Eurwilaichitr., Y. Igarashi., and V. Champreda. 2011. Culture-independent phylogenetic analysis of themicrobial community in industrial sugarcane bagasse feedstock piles. **Biosci Biotechnol Biochem** 75: 232–239.
- Romjali, E., Mariyono, W., dan D. B. Hartati. 2007. Rakitan Teknologi Pembibitan Sapi Potong Lokal Penelitian Sapi Potong, Grati– Pasuruan. **Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Jawa Timur.** <http://jatim.litbang.deptan.go.id>.
- Susilawati, T., Subagio., Kuswati, I., Budiarto, A., dan Ciptadi, G. 2002. Identifikasi Fenotipe dan Genotipe Sapi Lokal Jawa Timur. **Laporan Penelitian.** Fakultas Peternakan. Malang. Universitas Brawijaya
- Safika, Fida, M., A. Pingkan, and Akhmaloka. 2013. Succession culture independent bacterial during manure composting process. **J. Pure and Appl. Microbiol.** 7(13): 269-276. Microbiol. Volume 7 No. Special Edition Nov. 13 Page No. 269-276
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. **Could Spring Harbour Laboratory Press, USA.**
- Steensma, D.P. 2001. Congo red out of Africa: *archives of pathology and laboratory medicine* 125: 250-252.
- Singh, S., Vijayanand, S. Moholkar, and A. Goyal. 2013. Isolation, Identification, and Characterization of a Cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* Strain SS35 from *Rhinoceros* Dung. **Hindawi Publishing Corporation. ISRN Microbiology. Volume 2013,** Article ID 728134, 7 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/728134>
- Surzycki, S. 2000. **Basic Techniques in Molecular Biology.** Springer-Verlag, Berlin. New York.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA 5.10: Molecular evolutionary genetics analysis using likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony. **Methods Mol Biol Evol.** 28(10): 2731-2739.
- Ulrich, A., G. Klimke, and S. Wirth. 2008. Diversity and activity of cellulose decomposing bacteria, isolated from a sandy and a loamy soil after longterm manure application. **Microb Ecol.** 55: 512–522.