

KARAKTERISASI PROTEASE TERMOFILIK ASAL HYDROTHERMAL VENT LAUT DALAM KEPULAUAN KAWIO SULAWESI UTARA

Luthfia Hastiani Muharram¹, I. Nyoman.P.Aryantha²,

¹Universitas Muhammadiyah Bandung,

Jl. Palasari 9A Bandung 40263, West Java, Indonesia

²Sekolah Ilmu Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung,

Jl. Ganesha 10, Bandung 40132, Indonesia

Email: hastiani.0209@gmail.com, nyoman@sith.itb.ac.id

Abstract

Among the enzymes present in the industrial field such as amylase, cellulase and protease; protease needs reach 60% in Indonesian world. Hydrothermal Region The deep sea vents of the Kawio Islands of North Sulawesi are complemented by a wealth of biodiversity including in the health of bacteria, which is very heavy as producers of various enzymes. Bacteria that live in geothermal regions are resistant to heat and are able to catalyze various reactions quickly. A study has been conducted to find the thermophilic proteases of marine Hydrothermal Vent in the Kawio archipelago of North Sulawesi. This study aims to perform thermophilic Protease characterization from Hydrothermal Vent Marine in South Kawio Islands of South Sulawesi. Microbial isolates together with the largest protease activity were grown on growth media with varying growth time and pH of the media. The microbe has a maximum growth rate constant $\mu_{max} = 0.21 \text{ hours}^{-1}$, the optimum growing temperature at 65 °C and the neutral pH growth color is between 6.6-7.5. The enzyme production was performed for 32 hours, obtained when the largest protease enzyme was 277.8 U / ml (277.8 ppm of amino acid tyrosine given every 1 ml of enzyme during reaction of 1 minute). The optimum temperature of the liquid obtained at 70°C and the optimum pH of the enzyme was obtained at pH 8.

Key word: *Hydrothermal Vent, protease, thermostable.*

1. PENDAHULUAN

Pada pertengahan tahun 2010, pakar-pakar kelautan Indonesia dan Amerika telah melakukan ekspedisi ilmiah untuk mengeksplorasi ekosistem dasar laut dalam dan lingkungan *Hydrothermal Vent* di bawah koordinasi Badan Riset Kelautan dan Perikanan (BRKP) serta Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi dari Indonesia dan *National Oceanic & Atmospheric Administration* dari Amerika Serikat. Misi ekspedisi ilmiah ini dinamakan INDEX SATAL 2010 yang tepatnya berlokasi di Sangihe Talaud Kawio-Barat Sulawesi Utara (INDEX SATAL, 2010). Sebanyak 20 titik lokasi observasi telah dieksplorasi selama 27

kali penyelaman ROV (*Remotely Operated Vehicle*) pada kedalaman 275 meter sampai 3650 meter, diketahui satu titik lokasi aktif secara *hydrothermal* pada kedalaman 1890 meter yaitu di Kawio Barat perairan dalam Indonesia dan pada titik itu ditemukan suatu gunung vulkanik aktif bawah laut (besar dan tinggi 3000 meter), sangat jelas menunjukkan fenomena ekosistem kemosintesis (Nganro, 2012).

Hasil penelitian terkini menjelaskan bahwa di dasar laut yang kedalamannya lebih dari 10.000 m, terdapat keanekaragaman dan kelimpahan makhluk hidup khususnya pada

sekitar ekosistem dasar laut di sekitar aktivitas vulkanik *Hydrothermal Vent*. Menurut artikel dalam bulletin sains dan teknologi yang diterbitkan oleh kantor parlemen Inggris, Juli 2007 bahwa terdapat potensi industri baru masa depan dari sumberdaya hayati dasar laut meliputi *bioprospecting* untuk berbagai macam industri seperti industri farmasi, industri energi terbarukan dan bioekstraksi mineral (Nganro, 2009).

Berdasarkan laporan bisnis dunia melalui Freedonia Group Inc. (2012), bahwa kebutuhan dunia akan enzim hingga 2014 diperkirakan akan meningkat sampai 4.8% dan akan mencapai tingkat penjualan 2.2 juta dolar AS. Diantara enzim-enzim yang luas digunakan dalam bidang industri seperti amilase, selulase dan protease; kebutuhan protease mencapai 60% pada pemasaran industri enzim dunia (Enshashy dkk. 2008).

Aplikasi protease sangat diperlukan dalam berbagai proses bioteknologi, terutama protease alkalin yang sangat luas penggunaannya seperti untuk industri deterjen, penyamakan kulit, pengolahan makanan, pakan, tujuan medis dan farmasi, industri kimia juga pengolahan limbah (Ventosa dkk. 1998). Kebanyakan protein-protein industri yang ditemukan bersumber dari mikroba, khususnya protease mikroba mencapai 40% dari total enzim yang dijual di seluruh dunia (Gupta dkk. 2002).

Begitu juga dengan protease yang bersifat termotabil, sangat menguntungkan dalam aplikasi industri karena pada suhu pengolahan yang lebih tinggi dapat menghasilkan laju reaksi yang lebih cepat, meningkatkan kelarutan reaktan dan mengurangi kemungkinan kontaminasi mikroba mesofilik oleh organisme (Shanmuga dkk. 2008). Pencarian potensi protease dari mikroba (bakteri proteolitik) menjadi perhatian menarik para ilmuwan karena memiliki keragaman yang luas dan berpotensi untuk dilakukan rekayasa (bioengineering).

2. METODE PENELITIAN

2.1 Kurva Pertumbuhan Mikroba

Isolat mikroba dengan aktivitas protease terbaik (Isolat H+) ditumbuhkan dalam medium cair TMM yang telah ditambahkan 2% susu skim v/v, selama 48 jam pada inkubator

bergoyang dengan suhu 60 °C dan kecepatan agitasi 150 rpm. Sampling dilakukan setiap 4 jam. Kultur hasil sampling dilakukan penghitungan total koloni (*Total Plate Count*) untuk membuat kurva baku pertumbuhan bakteri. Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan starter bakteri berjumlah 10^6 sel yang diperoleh dari kurva baku selama 48 jam dengan sampling setiap 4 jam. Setiap titik sampling dihitung jumlah sel dan kecepatan pertumbuhan bakteri serta kondisi pH selama pertumbuhan.

2.2 Produksi Enzim Kasar Protease

Inokulum untuk produksi enzim dipersiapkan dengan cara mengaktivasi kultur yang diperoleh pada pembuatan kurva baku pertumbuhan. Aktivasi dilakukan dengan menginokulasi 10% kultur ke dalam 150 ml medium cair TMM yang mengandung 2% susu skim dan diinkubasi pada 60°C 150 rpm selama 4,5 jam. Hasil kultur ini kemudian diambil sebanyak 15 ml (10% total volume produksi) dan diinokulasi ke dalam 150 ml medium cair TMM yang mengandung 2% susu skim, diinkubasi selama 32 jam dalam inkubator bergoyang dengan kecepatan agitasi 150 rpm dan suhu inkubasi 60 °C. Enzim dipanen pada usia 32 jam kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 4496 x g pada suhu 4 °C. Filtrat berupa enzim dipisahkan dari residunya di *flask* baru, disimpan pada suhu 4 °C.

2.3 Karakterisasi pH dan Suhu Enzim

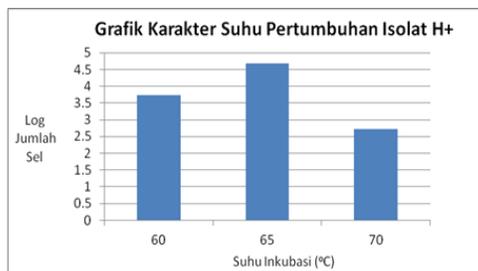
Karakterisasi enzim kasar protease pada penelitian ini meliputi karakterisasi suhu uji optimum dan pH enzim. Masing-masing karakter uji dilakukan melalui uji aktivitas protease. Variasi suhu uji dilakukan pada 60 °C, 65 °C, 70 °C dan 75 °C, sedangkan variasi pH enzim dilakukan pada pH 5, 6, 7, 8, 9 dan 10.

Uji aktivitas yang digunakan yaitu metode Kunitz (1947) dengan beberapa modifikasi. Larutan kasein 1% sebagai substrat dibuat dengan cara dilarutkan pada buffer fosfat pH 8. Sebanyak 1.5 ml kasein 1% ditambahkan dengan buffer Tris-Cl pH 7.4 kemudian dilakukan pra inkubasi pada 70 °C selama 5 menit. Pada tabung uji ditambahkan 0.2 ml enzim sedangkan pada tabung kontrol tidak. Larutan diinkubasi pada 70 °C selama 15 menit kemudian ditambahkan 3 ml TCA (*Tri Chloro*

Acetic acid) 10% untuk mengendapkan protein. Tabung kontrol ditambahkan 200 ml enzim, sedangkan tabung uji tidak. Setelah itu dikocok menggunakan vortex dan disimpan pada suhu dingin (4 °C) selama 30 menit untuk menyempurnakan pengendapan protein. Larutan kemudian disentrifugasi pada 4496 x g, 4 °C selama 15 menit. Filtrat disaring dan ditempatkan pada tabung baru kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 280 nm. Standar baku untuk uji aktivitas ini digunakan larutan asam amino tirosin yang dibuat berbagai konsentrasi yaitu 0 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm dan 500 ppm.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

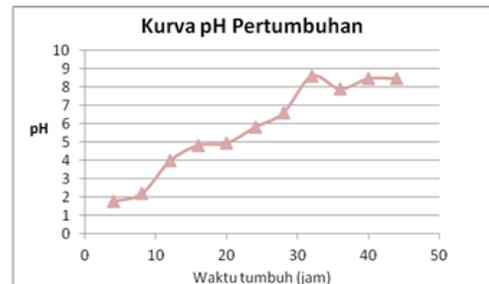
Isolat bakteri diperkirakan merupakan golongan termofilik karena isolasi dan penapisan bakteri dilakukan pada suhu tinggi di atas 45 °C yaitu pada suhu 60 °C dengan medium pertumbuhan bersifat netral. Pada Gambar 3.1 menunjukkan bahwa suhu pertumbuhan optimum isolat bakteri H⁺ adalah 65 °C.



Gambar 3.1 Karakterisasi Suhu Pertumbuhan Bakteri H⁺. Inkubasi dilakukan pada suhu 60°C, 65 °C dan 70°C. Pertumbuhan diamati melalui perubahan *Optical Density* (OD) yang diukur pada panjang gelombang 578 nm.

Selain itu, pada Gambar 4.6 dapat dilihat karakter pH pertumbuhan bakteri bersifat netral, yaitu berada pada kisaran pH 6,6 – 7,5. Dari kisaran pertumbuhan pH, bakteri ini dapat digolongkan ke dalam golongan *alkalophilic* yaitu dapat hidup pada lingkungan dengan

kisaran pH tinggi. Berdasarkan Klurwich (1986), alkalotolerant yaitu organisme yang mampu hidup pada pH lebih dari 10 namun memiliki pertumbuhan optimum pada pH mendekati netral.



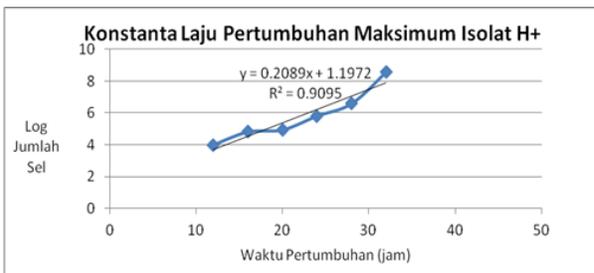
Gambar 3.2 Kondisi pH Pertumbuhan Bakteri H⁺, diukur setiap 4 jam.

Kondisi pH bakteri dapat menjelaskan habitat asal mikroorganisme. Dalam jurnal Kumar dan Takagi (1999) lingkungan dengan salinitas tinggi, merupakan sumber terbaik untuk mikroorganisme alkalofilik. Kondisi dengan salinitas tinggi sesuai dengan kondisi tempat asal sampel yang memiliki salinitas cukup tinggi yaitu 35 - 40 ppt.

Tolner dkk (1997) menjelaskan bahwa transportasi asam amino pada *Geobacillus* merupakan transport yang bergantung pada ion Na⁺. Hal ini tidak biasa untuk organisme neutrofil namun sangat umum dijumpai pada bakteri laut yang bersifat alkalophilic. Sistem transportasi ion Na⁺ ini menguntungkan bagi organisme dalam mengkonversi energi melalui siklus Na⁺ ketika dibutuhkan adaptasi fosfolipid untuk ketahanan optimal membran pada suhu tinggi. Selain itu, pH tumbuh bakteri yang bersifat netral mendekati basa ini dapat disebabkan oleh medium tumbuh yang digunakan dalam penelitian. Pada komposisi media pertumbuhan, tidak ada sumber karbon. Kehadiran susu skim pada medium dapat menggantikan sumber karbon utama sehingga banyak dilepaskan gugus amin yang bersifat basa yang merupakan hasil dari hidrolisis protein susu tersebut.

Genus *Geobacillus* ini bersifat obligat termofilik dengan kisaran suhu tumbuh 35-75 °C dan suhu tumbuh optimum pada 55-65 °C. Genus ini bersifat neutrofilik, tumbuh pada

kisaran pH 6,0 – 8,5 dengan pertumbuhan optimum pada pH 6,2 – 7,5. Bakteri ini dapat bersifat aerob, anaerob maupun *chemo-organotroph*, serta memiliki kandungan G+C pada DNA (% mol): 48,2-58 (T_m) (Whitman, 2009). Tingginya persen G+C menunjukkan DNA genus ini dapat bertahan baik pada suhu tinggi. Karakteristik sifat ini menguatkan kesimpulan bahwa isolat H+ merupakan bakteri asal laut dalam pada kawasan geothermal yaitu *Hydrothermal Vent* yang memiliki kondisi lingkungan ekstrim yaitu bersuhu panas dan menggunakan sistem rantai makanan *chemosynthesis* karena tidak adanya sinar matahari.



Gambar 3.3 Konstanta Laju Pertumbuhan Maksimum Isolat H+.
Persamaan linear menunjukkan
 $\mu_{max} = 0,21 \text{ jam}^{-1}$

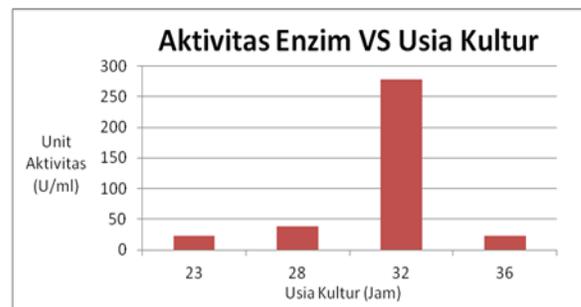
Hasil perhitungan kinetika pertumbuhan isolat bakteri ini ditunjukkan pada Gambar 4.7 diperoleh konstanta laju pertumbuhan maksimum $\mu_{max} = 0,21 \text{ jam}^{-1}$. Karakter pertumbuhan bakteri ini tergolong lambat. Kurniawan (2011) berhasil mengisolasi bakteri termofilik proteolitik dari sumber mata air Kerinci yang memiliki konstanta laju pertumbuhan $\mu = 0,58 \text{ jam}^{-1}$, sedangkan dalam Stanbury (2003) dipaparkan konstanta pertumbuhan berbagai organisme yang mewakili, untuk bakteri diwakili oleh *vibrio natriegens* dengan konstanta kecepatan maksimum $\mu_{max} = 0,42 \text{ jam}^{-1}$. Laju pertumbuhan bakteri yang lambat ini dapat disebabkan oleh kondisi tumbuh yang kurang sesuai dengan habitat asalnya seperti sumber mineral, konsentrasi garam, serta kondisi suhu, pH dan tekanan.



Gambar 3.4 Kurva pertumbuhan bakteri H+ pada inkubasi 60 °C

Pemanenan enzim dilakukan pada usia kultur 32 jam, sesuai dengan kurva pertumbuhan yang diperoleh (Gambar 4.8) bahwa bakteri mencapai kecepatan pertumbuhan maksimum pada kisaran usia 28 – 32 jam yaitu $9,9 \times 10^7$ sel/jam dengan jumlah sel terbanyak pada usia 32 jam.

Dari kurva pertumbuhan tersebut, dapat dilihat bahwa pada usia pertumbuhan 32 jam bakteri mencapai akhir fase pertumbuhan logaritmik (eksponensial). Pengujian aktivitas enzim dilakukan pada beberapa usia kultur dan diperoleh aktivitas enzim paling tinggi dihasilkan oleh kultur pada usia 32 jam yaitu sebesar 277,8 U/ml (Gambar 3.5). Pada usia 36 jam, bakteri telah memasuki fase stasioner. Pada fase ini bakteri sudah tidak memproduksi enzim. Hal ini dapat terlihat dari hasil uji aktivitas yang menurun. Pada usia 36 jam, bakteri sudah memasuki fase stasioner, yaitu fase di mana kecepatan tumbuh bakteri sama dengan kecepatan kematian bakteri.

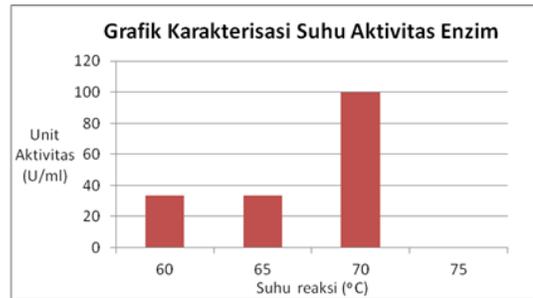


Gambar 3.5 Aktivitas enzim protease yang dihasilkan pada berbagai usia kultur

Pengukuran aktivitas protease dilakukan dengan menggunakan metode Kunitz (1947) dengan beberapa modifikasi. Satu unit aktivitas protease dapat didefinisikan sebagai banyaknya tirosin yang dilepaskan per ml ekstrak enzim pada kondisi percobaan yang dilakukan. Substrat yang digunakan pada metode ini yaitu kasein. Kasein akan diuraikan oleh protease menjadi asam amino-asam amino penyusunnya. Asam amino yang diuraikan ini kemudian diukur dengan cara spektrofotometri UV pada panjang gelombang 280 nm. Pada panjang gelombang ini, asam amino yang terukur adalah asam amino yang mengandung cincin benzene. Hal ini merupakan alasan penggunaan tirosin sebagai larutan standar, yaitu karena tirosin mengandung cincin benzene. Selain itu, hampir semua protein mengandung asam amino tirosin sehingga pengujian penguraian protein dapat dilakukan secara kuantitatif. Pengendapan protein oleh TCA dan suhu dingin pada metode ini merupakan salah satu tahapan uji untuk mendapatkan ketepatan pengukuran asam amino yang terurai.

Enzim kasar diperoleh dengan melakukan pemisahan enzim dari biomassa bakteri melalui sentrifugasi dengan kecepatan $4496 \times g$ dan pada suhu $4^\circ C$. Protease merupakan enzim ekstraseluler. Protease diproduksi di dalam tubuh mikroorganisme dan digunakan untuk kebutuhan metabolisme. Setelah digunakan, enzim protease disekresikan ke luar tubuh.

Pada Gambar 3.6 dapat dilihat bahwa enzim protease menunjukkan aktivitas yang optimum (100 U/ml) pada suhu reaksi $70^\circ C$. Pada suhu reaksi di bawah $70^\circ C$, aktivitas protease lebih rendah (Lampiran G.2). Setiap enzim memiliki suhu dan pH tertentu yang menyebabkan aktivitasnya mencapai optimum. Sedangkan pada suhu reaksi $75^\circ C$ protease tidak menunjukkan adanya aktivitas. Hal ini dimungkinkan karena terjadi denaturasi termal baik terhadap substrat maupun enzim. Berdasarkan Chopra dan Mathur (1984), varietas protease termotabil paling banyak diproduksi dari spesies *Bacillus stearothermophils*. Spesies ini kemudian digolongkan ke dalam genus *Geobacillus*.



Gambar 3.6 Karakterisasi suhu reaksi enzim. Suhu reaksi uji aktivitas divariasikan dari $60 - 75^\circ C$

Selain suhu, kondisi lain yang mempengaruhi kerja enzim yaitu pH. Aktivitas paling tinggi diperoleh pada enzim dengan pH 8 (Gambar 3.7). Enzim dengan kondisi pH asam (< 7) sama sekali tidak memberikan aktivitas. Peningkatan aktivitas enzim pada pH yang optimum dihubungkan dengan adanya perubahan ionisasi dalam gugus ionik enzim pada sisi aktifnya atau pada sisi lainnya yang secara tidak langsung mempengaruhi sisi aktif, sehingga konformasi sisi aktif menjadi efektif dalam mengikat dan mengubah substrat menjadi produk. Perubahan ionisasi ini juga dapat terjadi pada gugus enzim-substrat yang secara otomatis mempengaruhi aktivitas enzim (Webb dan Dixon, 1979 dalam. Satiawihardja dkk. 1997).



Gambar 3.7 Karakterisasi Aktivitas pH Enzim. pH enzim divariasikan 5-10

Kondisi enzim yang optimum diperoleh pada pH 8, maka dapat disimpulkan bahwa enzim ini tergolong ke dalam golongan protease alkalin. Beberapa referensi menyebutkan bahwa mayoritas protease dari *Bacillus* memiliki pH

optimum 8, diantaranya Ghorbel dkk (2003) dari *Bacillus cereus*, Nascimento dan Martin (2004) *Bacillus* sp.SMIA-2, Paten dkk (2006) dari *Bacillus* sp.Po2 dan Hawumba dkk (2001) dari *Geobacillus* dengan kisaran pH 7,5 – 8,5. Priest (1977) menjelaskan bahwa mayoritas protease *Bacillus* terdiri dari protease serin, logam dan gabungan antara protease netral dan serin. Kebanyakan protease serin yang dihasilkan oleh *Bacillus* aktif pada kondisi alkalin.

IV. KESIMPULAN

1. Isolat bakteri proteolitik (H+) memiliki suhu tumbuh optimum pada 65 °C, pH pertumbuhan pada 6,6 – 7,5 dan konstanta laju pertumbuhan maksimum $\mu_{\max} = 0,21 \text{ jam}^{-1}$
2. Enzim protease termofilik dari isolat bakteri H+ berhasil diproduksi pada usia 32 jam, suhu optimum reaksi pada 70 °C dan pH optimum enzim 8. Diperoleh unit aktivitas terbesar yaitu sebesar 277,8 U/ml.

REFERENSI

Enshasy, H., Enein, A., Helmy, S., El-Azaly, Y/ (2008): Optimization Of The Industrial Production Of Alkaline Protease By *Bacillus licheniformis* In Different Production Scales. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3): 583-593, ISSN 1991-8178

Gupta, R., Beg, O.K., dan Lorenz, P. (2002): Bacterial alkaline proteases: Molecular approach and industrial application. Mini Riview. Spinger-Verlag. *App.Microbil Biotechnol*, (59), 15-32

INDEX SATAL 2010.

(http://oceanexplorer.noaa.gov/oceanos/explorations/10index/background/plan/plan_indonesian.html) diakses pada tanggal 15 September 2010.

Kumar, C.G., dan Takagi, H. (1999): Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Research review paper.

Biotechnology Advances, Elsevier Science Inc, (17), 561 – 594.

Kunitz, M. (1947): Crystalline soybean Trypsin Inhibitor, II. General properties. *Journal of General Physiology*, 30 (4), 291-310.

Kurniawan, H.M. (2011): Isolasi dan Optimasi Ekstrinsik Bakteri Termo-proteolitik Isolat Sumber Air Panas Semurup Kabupaten Kerinci, Jambi. Pasca Sarjanan Universitas Padang

Nascimento, W.C.A. dan Martins, M.L.L.,(2004): Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Braz. J. Microbiol.*, (35), 91-95.

Nganro, N.R. 2009. Prospek Laut Dalam Sebagai Sumber Ekonomi Baru. [http://www.sith.itb.ac.id/profile/noor/PR_OSPEK LAUT DALAM SEBAGAI SUMBER EKONOMI BARU.pdf](http://www.sith.itb.ac.id/profile/noor/PR_OSPEK_LAUT_DALAM_SEBAGAI_SUMBER_EKONOMI_BARU.pdf). diakses pada tanggal 6 September 2010.

Nganro. N.S. (2012): Pertama kali di Indonesia ditunjukkan Habitat Komunitas Fauna Laut Dalam *Hydrothermal Vent* (HV) dan Non HV di Perairan Sangihe Talaud, Sulawesi Utara.

Petti, C.A.(2007): Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Medical Microbiology*, (44); 1108-1114.

Priest, F.G. (1977): Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev*, (41), 711–753

Satiawihardja, B., M. T. Suhartono., A., dan Kusdinar.(1997): Mempelajari Pengaruh Lingkungan Kimiawi Terhadap Aktifitas dan Daya Tahan Panas Protease dari *Bacillus pumilus* Y1. *Buletin Teknologi dan Industri Pangan*, . (VIII), 2.

Shanmuga, P.S., Krishnareni, J., Joseph, S., Gandhimathi., Arum, K.R., Thangavelu, M., Seghal, K., dan Natarajaseenivasan, T.G (2008): Optimization of extracellular thermotolerant alkaline

- protease produced by marine *Roseobacter* sp (MMD040). *Bioprocess Biosyst. Eng.*, (31), 427-433.
- Stanbury, P.F., Whitaker, A., Hall, S.J. (2003): *Principle of Fermentation Technology*. Second Edition. Elsevier Science Ltd.
- Sugiyono., Rosita, A.J., dan Sabe, R.A. (2010): Penapisan dan Karakterisasi Protease Bakteri Termofilik Asal Mata Air Laut Poso Sulawesi Tengah.
- Takagi, K., Nakagawa, S. Reysenbach, A.L. dan Hoek, J. (2006): Microbial ecology of mid-ocean ridges and back-arc basins, 185–214 dalam *Interpretations among Physical, Chemical, Biological, and Geological Processes in Back-Arc Spreading Systems*. D. Christie, C.R. Fisher, S.-M. Lee, dan S. Givens, eds, American Geophysical Union, Washington, DC.
- Tolner, B., Poolman, B., dan Konings, W.N. 1997. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comparative Biochem and Physiol.* Vol. 118 (3): 423-428.
- Ventosa, A., Nieto, J.J., dan Oren, A. (1998): Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, (62); 504-44.
- Whitman, W.B. (2009): *Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology*. Second edition volume three. University of Georgia Athen, USA. Springer Dordrecht Heidelberg. London USA.