

Karakterisasi dan Identifikasi Bakteri Simbion Karang *Goniastrea aspera* Resisten terhadap Logam Berat Copper (Cu) dari P. Panjang, Jepara

Agus Sabdono

Jurusan Ilmu Kelautan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Universitas Diponegoro, Kampus Tembalang, Semarang, Indonesia
Telp (Fax): 024-7474698; Email: agus_sabdono@yahoo.com

Abstrak

Studi komunitas mikroba yang berasosiasi dengan karang *Goniastrea aspera* di P. Panjang, Jepara dilakukan dengan menggunakan teknik mikrobial molekuler berbasis kultur dependen. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi, menyeleksi dan mengidentifikasi bakteri simbion karang yang resisten terhadap logam Cu. Pola toleransi terhadap logam Cu ketujuhbelas isolat dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Isolat GN10 diseleksi untuk studi lebih lanjut karena memiliki karakter yang paling resisten terhadap logam Cu yang selanjutnya dikarakterisasi secara fisiologis dan molekuler. Analisis sekuen gen subunit kecil (SSU) rRNA menunjukkan bahwa isolat GN10 memiliki kekerabatan terdekat dengan *Virgibacillus marismortui* Strain 123 dengan derajat kesamaan 99%. Bakteri *V. marismortui* strain GN10 ini merupakan kandidat yang dapat digunakan sebagai indikator uji dan memiliki potensi di dalam penerapan bioteknologi dari bakteri yang resisten terhadap logam berat pada lingkungan laut yang tercemar maupun tidak tercemar.

Kata kunci: resisten, Copper, *Virgibacillus marismortui*, MIC

Abstract

The microbial community associated with coral *Goniastrea aspera* from Panjang Island, Jepara waters was investigated using culture dependent molecular microbial techniques. The objectives on this study were to isolate, select and identify bacteria associated with coral *Goniastrea aspera* which resistant to heavy metal Copper (Cu). The tolerance patterns, expressed as MICs, for 17 coral bacteria to Cu heavy metal were surveyed by using an agar diffusion method. The most copper-resistant bacterium, GN10 isolat, was selected further to examine its molecular and physiological characteristics. Small-subunit rRNA gene-based analyses indicated that this bacterium was closely related to *Virgibacillus marismortui* strain 123, with a high homology of 99%. This bacterium may serve as bioassay indicator organisms and may be potential for biotechnological applications for metal-resistant bacteria in polluted and non-polluted marine environments.

Key words: resistant, Copper, *Virgibacillus marismortui*, MIC

Pendahuluan

Di lingkungan laut, logam Pb digunakan sebagai cat pelindung kapal untuk mencegah biokorosi. Namun ketika pelaku industri maritim secara besar-besaran mengalihkan penggunaan cat pelindung berbasis logam Pb ke cat pelindung berbasis logam Cu, menyebabkan kandungan logam Cu juga meningkat di lingkungan laut tersebut (Kim et al., 1996). Kondisi tersebut lebih diperburuk lagi dengan meningkatnya limbah buangan industri dan limbah kimia pertanian yang mengandung logam ke laut, sehingga mengganggu keseimbangan ekosistem laut, khususnya ekosistem karang.

Penelitian mengenai efek logam berat terhadap terumbu karang masih sangat sedikit dilakukan. Glynn et al. (1984) melaporkan bahwa logam berat Cu mampu membunuh karang pada konsentrasi yang rendah (0,01 ppm) dalam waktu yang sangat singkat. Sabdono (2009) juga melaporkan tentang dampak logam Cu terhadap mortalitas karang *Galaxea fascicularis*. Masih sedikit upaya yang telah dilakukan untuk melestarikan sumber hayati karang. Meskipun beberapa hasil penelitian menunjukkan keberhasilan sistem transplantasi, namun rehabilitasi dan perlindungan terumbu karang membutuhkan penanganan secara ekstensif yang sangat perlu didukung oleh pendeka-

tan bioteknologi. Tampaknya bioteknologi lingkungan laut merupakan salah satu alternatif yang menjanjikan untuk dapat menjawab permasalahan tersebut, walaupun dalam penerapannya masih ditemukan beberapa kendala.

Beberapa peneliti melaporkan bahwa genus bakteri yang diisolasi dari tanah dan daerah pertambangan (*Thiobacillus*, *Leptospirillum*, *Alcaligene*, *Pseudomonas*, *Methanobacterium*) mampu mengadsorpsi logam-logam berat (Nies, 1992; Kim *et al.*, 1996; Tom-Petersen *et al.*, 2001). Namun peneliti yang tertarik untuk melakukan eksplorasi bakteri karang dan pemanfaatannya dalam kaitannya dengan resistensi terhadap logam berat Cu masih kurang.

Dalam studi ini logam Cu dipilih karena logam tersebut merupakan unsur yang esensial yang diperlukan dalam jumlah sedikit oleh organisme (Goering *et al.*, 1995). Namun, apabila unsur tersebut terdapat dalam jumlah berlebih akan bersifat toksik terhadap organisme laut. Disamping itu keberadaan Cu pada ekosistem perairan terus mendapatkan perhatian karena daya toksisitas, mobilitas dan bentuk-bentuk kompleks kimianya yang dapat memberikan efek beragam terhadap berbagai organisme perairan (Jonas, 1989). Logam Cu juga dapat mempengaruhi fungsi enzim dan protein akan kebutuhan logam tersebut, dan menyebabkan tekanan oksidatif dengan menghasilkan hidroksil radikal meskipun melalui mekanisme yang berbeda (Harwood & Gordon, 1994). Hal tersebut menjadi sangat penting artinya karena keberhasilan pemanfaatan mikroorganisme untuk bioremediasi memerlukan seleksi strain bakteri yang secara efektif mampu mendegradasi pencemar lingkungan dalam skala konsentrasi yang luas dan ditekan terutama pada penggunaan *indigenous* strain.

Bakteri diketahui terdapat sangat melimpah dan aktif di sekitar karang. Dinamika mikrobiota ini dapat berada di sejumlah lekuk/celah (*niches*) karang, pada lapisan permukaan mucus karang (Ritchie & Smith, 1995; Ritchie & Smith, 2004), di dalam jaringan karang (Banin *et al.*, 2000), dan di badan air sekeliling karang (Frias-Lopez *et al.*, 2002). Asosiasi antara bakteri dan karang ditengarai memiliki peranan yang penting untuk mempertahankan hidup karang di dalam menghadapi tekanan ekosistem, misalnya pencemaran logam berat. Oleh karena itu hasil penelitian ini sangat bermanfaat nantinya di dalam upaya melakukan konservasi keragaman hayati terumbu karang, khususnya terhadap ancaman pencemaran logam berat. Sebab

langkah awal untuk melakukan bioremediasi adalah mendapatkan bakteri yang resisten terhadap logam berat. Bakteri resisten logam atau gen yang menyandi resistensi terhadap logam dari bakteri karang ini dapat diisolasi yang sangat berguna nantinya di dalam bioremediasi ekosistem karang berbasis bioteknologi. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi, menyeleksi dan mengidentifikasi bakteri yang berasosiasi dengan karang yang memiliki resistensi terhadap logam berat Cu. Diharapkan hasil penelitian yang diperoleh dapat digunakan sebagai materi dasar aplikasi bioremediasi ekosistem karang.

Materi dan Metode

Sampling

Sampling karang dilakukan dengan menggunakan *scuba diving* pada kedalaman 2–3 meter di perairan Pulau Panjang, Jepara. Setelah koloni karang dipotong dengan tатаh dan palu, sampel kemudian dimasukkan dalam tas plastik polietilen steril (Whir-pak, Nasco, USA) dan ditempatkan dalam kontainer pendingin dan dibawa ke laboratorium. Pengukuran kondisi ekologis oseanografis di sekitar tempat sampling dan persen penutupan karang juga dilakukan (data tidak disajikan).

Isolasi dan purifikasi bakteri

Isolasi bakteri dilakukan mengerok sampel jaringan karang dengan pisau aseptik, kemudian jaringan dimasukkan ke dalam 9 ml air laut steril dan diencerkan hingga diperoleh pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} . Dari masing-masing pengeceran diambil 100 μ l dengan pipet ke dalam *half-strength* media ZoBell 2216 E yang telah disiapkan di dalam petri dish. Selanjutnya diratakan dengan menggunakan *spreader* dan diinkubasikan selama 2 x 24 jam pada suhu kamar. Isolasi dan purifikasi isolat bakteri dilakukan berdasar penampakan morfologis dengan metode goresan (*streak method*) hingga diperoleh kultur murni (Madigan *et al.*, 2000).

Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas bakteri terhadap logam berat dilakukan dengan metode difusi agar (Burnley, 2000). Metode ini dilakukan dengan menyebar kultur bakteri ke dalam petridisk yang berisi media padat ZoBell 2216E sampai merata. Kemudian *paperdisk* diletakkan pada media dan ditetesi dengan larutan logam berat Cd konsentrasi 1 mM Cu sebanyak 30 μ l dengan menggunakan pipetmikro. Media diinkubasikan pada

suhu 28 °C selama 4 x 24 jam, dan zona hambat yang muncul disekitar *paper disk* diukur menggunakan jangka sorong. Zona hambat yang diukur adalah jarak dari tepi zona hingga tepi zona lainnya. Apabila ukuran zona hambat yang terbentuk lebih dari 1 mm maka bakteri tersebut tergolong bakteri sensitif, sebaliknya bila ukuran zona hambat kurang dari 1 mm tergolong bakteri yang resisten.

Uji MIC (Minimal inhibitory concentration)

Isolat bakteri hasil seleksi uji sensitivitas selanjutnya dikembangkan lebih lanjut untuk mendapatkan isolat yang memiliki toleransi tertinggi terhadap logam Cu. Teknik pelaksanaannya sama dengan metode difusi agar, hanya ada penambahan uji perlakuan konsentrasi 1; 2,5; 5; 10; 20 dan 40 mMol logam Cu. Kriteria toleransi ditentukan berdasarkan distribusi frekuensi MIC (Jeanthon & Prieur, 1991). MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari logam yang mampu menghambat pertumbuhan setelah diinkubasikan dalam kondisi gelap pada suhu ruang selama 10 hari.

Karakterisasi bakteri seleksi

Karakterisasi bakteri karang dilakukan secara mikrobiologis meliputi karakter morfologi, fisiologi dan uji biokimiawi (*Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*) sebagai pendukung data identifikasi secara molekuler.

Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Untuk analisis PCR, genom DNA dari strain GN10 diekstraksi dari sel dengan cara mengambil sel bakteri dari *plate agar*, disuspensi dalam air steril (Sigma, Germany) dan diberi perlakuan fisik *freezing* (-70 °C) dan *thaw* (95 °C). Amplifikasi DNA-PCR total gen 16S rDNA dari strain, purifikasi hasil PCR dan analisis sekuen dilakukan menurut metode dari Radjasa *et al.* (2007). PCR dilakukan dengan mencampur MMB (*Mega Mix Blue*) sebanyak 752 µl, *forward primer* dan *reverse primer* yang masing-masing sebanyak 16 µl. Total keseluruhan volume dalam tabung PCR adalah 50 µl yang terdiri dari larutan campuran MMB dan primer-primer sebanyak 49 µl ditambah 1 µl aquabides. PCR dilakukan sebanyak 30 siklus dengan denaturasi pada suhu 94 °C selama 5 menit sebagai pemanasan awal, kemudian 30 siklus (*denaturasi* pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 54 °C selama 60 detik (1 menit), *extension* pada suhu 72 °C selama 60 detik), kemudian *extra extention* selama 2 menit,

dan terakhir pada suhu 4 °C. Primer yang digunakan untuk PCR 16S rDNA adalah primer universal 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') dan primer spesifik *Eubacteria* 1492R (5'-TACGGYTA CCTTGTTACGACTT-3') (Weisburg *et al.*, 1991).

Sekuen gen 16S rDNA hasil amplifikasi PCR

Sekuensing dilakukan menurut siklus PCR menggunakan *Big Dye Terminator v.3.1*. Formula untuk reaksi PCR sekuensing yaitu: 2 µl *big dye*, 2 µl *buffer* 10x, 4 µl templet DNA, 1 µl primer dengan konsentrasi 3,2 pmol, ddH₂O hingga volume akhir 10 µl. Hasil amplifikasi PCR gen 16S rDNA dipurifikasi dan dilakukan sekuensing dengan *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) automated DNA sequencer*. Hasil sekuen kemudian dianalisis homologinya dengan menggunakan BLAST database.

Hasil sekuen 16S rDNA dan beberapa referensi sekuen 16S rDNA juga dianalisis dengan menggunakan Clustal X. *Parsimony* digunakan untuk menghitung jarak matrik dan membangun pohon filogenetik dengan perangkat lunak PAUP (<http://www.lms.si.edu/>) (Swofford, 1998).

Hasil dan Pembahasan

Pencemaran logam berat di wilayah pantai, seperti Cu, merupakan masalah lingkungan utama di berbagai belahan bumi. Di lingkungan laut, permasalahan kontaminan logam berat terakumulasi pada sedimen yang selanjutnya merambah ke dalam ekosistem karang. Tidak diperdebatkan lagi bahwa bakteri mempunyai peranan penting dalam menentukan nasib keberadaan kontaminan ini (Ford & Ryan, 1995). Bakteri tersebut dapat memvolatilisasi atau mempresipitasi logam tersebut dan melakukan transformasi menjadi senyawa organik beracun pada derivatnya (Ford & Ryan, 1995; Ehrlich, 1997). Bakteri-bakteri tersebut juga dapat menghasilkan anionik polimer dalam logam kompleks.

Dalam uji sensitivitas ini, dari total 17 isolat yang diperoleh, 6 isolat diseleksi berdasarkan fenotip yang menunjukkan resistensi terhadap logam berat Cu (Tabel 1). Rerata besarnya diameter zona hambatan dari 11 isolat lainnya melebihi kriteria nilai ambang resistensi (≥ 1 mm) (Burnley, 2000). Beberapa teori dasar terdahulu telah menjelaskan kejadian keragaman derajat resistensi bakteri terhadap logam berat (Duxburry, 1981). Logam berat biasanya beracun terhadap mikroorganisme terutama bila dalam konsentrasi yang tinggi. Daya racun logam tersebut

dipengaruhi oleh faktor abiotik lainnya seperti pH, suhu dan bahan organik. Toleransi bakteri terhadap logam berat kemungkinan dapat digunakan sebagai indikator toksisitas yang potensial terhadap bentuk kehidupan lainnya. Karena pada umumnya bakteri gram negatif lebih toleran daripada bakteri gram positif pada situasi lingkungan yang tercemar logam berat. Trevors *et al.*, (1987) mengatakan bahwa masih terdapat kendala dalam menentukan secara pasti definisi resistensi terhadap logam berat. Duxbury (1981) mengusulkan bahwa sebaiknya definisi tentang resistensi terhadap logam berat harus dinyatakan secara lebih tegas dan akurat. Misal, resisten terhadap logam merkuri 4-10 mg/l; Cd (30 mg/l) dan Zn (110 mg/l). Sedangkan untuk logam Cu adalah sebesar 30-60 mg/l; Ni (60 mg/l) dan Co (50-100 mg/L).

Dari hasil uji sensitivitas dengan konsentrasi 1mM Cu (Tabel1), isolat GN01, GN10, GN11, GN14, GN15, GN16, diseleksi untuk studi MIC. Efek perlakuan berbagai konsentrasi Cu terhadap daya resistensi bakteri seleksi dapat dilihat pada Table 2 dan Gambar 1. Berdasar dari tabel dan gambar tersebut dapat dilihat bahwa isolat GN 10 memiliki daya resistensi tertinggi (10-20 mM Cu) yang diikuti dengan isolat GN14 (5-10 mM Cu). Dua isolat GN 11 dan GN 16 memiliki daya resistensi yang relatif sama (2,5-5 mM Cu). Kejadian yang tidak diharapkan terjadi pada isolat GN 15, dimana pada konsentrasi 1 mM Cu telah terbentuk zona hambatan.

Secara logika seharusnya tidak terjadi penghambatan pertumbuhan karena pada uji sensitivitas sebelumnya dengan konsentrasi yang sama tidak terbentuk adanya zona hambatan. Terlebih lagi pada konsentrasi yang lebih tinggi (2,5 mM Cu) juga tidak terbentuk adanya zona hambatan. Burnley (2000) menyatakan bahwa besarnya diameter zona hambatan tidak selalu bertambah besar seiring dengan meningkatnya konsentrasi perlakuan. Kesalahan faktor teknis dan kejadian internal yang tidak tampak dari dalam mikroorganisme uji kadang kala mempengaruhi hasil uji. Sehingga sebaiknya dalam menentukan bakteri seleksi dipilih dari strain yang menunjukkan zona terbesar dari setiap konsentrasi.

Hasil uji selanjutnya dengan MIC menunjukkan adanya berbagai derajat resistensi yang berbeda dari ke-6 isolat tersebut Tabel 2). Perbedaan derajat resistensi disebabkan karena mikroorganisme dapat melakukan berbagai mekanisme untuk beradaptasi

terhadap keberadaan toksisitas logam berat. Beberapa mekanisme adaptasi tersebut antara lain, *metal sorption*, mineralisasi, mengikat dan akumulasi metal, presipitasi ekstraselular, enzimatis oksidasi/reduksi dalam bentuk senyawa kurang toksik, dan *efflux* (Mergeay, 1991; Hughes & Poole, 1991; Nies, 1992; Urrutia & Beveridge, 1993; Joshi-Tope & Francis, 1995). *Isolat GN10*.

Hasil karakterisasi secara morfologi dan biokimia dari isolat GN10 dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasar tabel tersebut diketahui bahwa bakteri isolat GN10 adalah bakteri Gram (+), berbentuk batang dan menghasilkan spora dengan panjang sel kurang dari 3 µm. Isolat ini bersifat motil dan aerob serta mempunyai aktifitas katalase dan glukose, tetapi tidak aktif untuk oksidase. Isolat ini tidak mampu menghidrolisis pati dan urea, tetapi menghidrolisis Casein. Karakteristik morfologi dan biokimia yang dimiliki strain GN10 sangat mirip dengan karakteristik yang dimiliki genus *Bacillus* (Shida *et al.*, 1997; Yoon *et al.*, 2003).

Perbandingan sekuen parsial sekuen 16S rDNA dari isolat resisten logam Cu GN10 dalam studi ini dengan sekuen dari GeneBank menunjukkan bahwa isolat tersebut memiliki kekerabatan terdekat dengan genus *Virgibacillus* (99%). Pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat GN10 terletak di dalam klaster genus *Virgibacillus* (Gambar 2).

Pohon filogenetik dikonstruksi berdasarkan subunit kecil (SSU) sekuen rRNA dari organisme representatif. Konstruksi pohon filogenetik tersebut sebetulnya secara konseptual sangat sederhana (Swofford, 1996), sebab hanya melakukan *aligned* pasangan sekuen rRNA dari berbagai organisme. Kemudian derajat perbedaan pasangan tersebut dihitung dan dipertimbangkan sebagai ukuran 'jarak evolusi' diantara organism tersebut. Masalah jarak waktu tidak dipertimbangkan, yang menjadi perhatian hanyalah perubahan sekuen nukleotidanya. Berdasarakan telaah pustaka dan penjelajahan internet, sejauh ini dilaporkan bahwa bakteri *Virgibacillus marismortui* memiliki potensi sebagai penghasil protease (Chamroensaksri *et al.*, 2008) dan antijamur pada penyakit *grey mould* yang disebabkan oleh jamur *Botrytis cinerea* pada tanaman strawberry (Essghaier, *et al.*, 2009). Belum ditemukan adanya laporan fungsi/karakter fisiologis lainnya dari bakteri *V. marismortui*. Maka bakteri simbion karang *V. marismortui* strain GN10 merupakan species baru yang memiliki karakteristik resisten terhadap logam Cu. Dalam studi

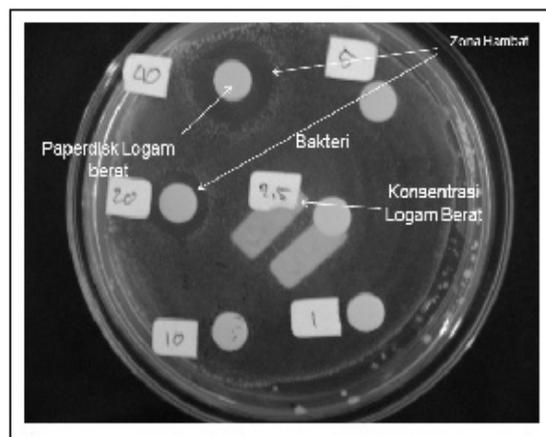
Tabel 1. Hasil uji sensitivitas bakteri karang terhadap logam Cu

Isolat bakteri	Diameter zona hambatan (mm)			
	1	2	3	Rata-rata
GN02	0	0	0	0
GN03	2.43	3.99	2.82	3.08
GN04	3.36	3.89	4.2	3.82
GN05	4.48	4.32	4.79	4.53
GN06	4.10	3.40	2.80	3.43
GN07	2.94	2.84	2.28	2.69
GN08	4.00	3.10	3.00	3.37
GN09	3.48	3.32	2.94	3.25
GN10	0	0	0	0
GN11	0	0	0	0
GN12	3.99	3.85	3.72	3.85
GN13	2.80	2.80	1.60	2.40
GN14	0	0	0	0
GN15	0	0	0	0
GN16	0	0	0	0
GN17	4.57	3.60	3.9	4.02

Tabel 2. Uji MIC bakteri seleksi pada berbagai konsentrasi logam Cu

Isolat bakteri	MIC					
	1 mM	2,5 mM	5 mM	10mM	20mM	40mM
GN 01	-	-	-	+	+	+
GN 10	-	-	-	-	+	+
GN 11	-	-	+	+	+	+
GN 14	-	-	-	+	+	+
GN 15	+	-	+	+	+	+
GN 16	-	-	+	+	+	+

Keterangan: + = terbentuk zona hambatan
 - = tidak terbentuk zona hambatan



Gambar 1. Uji sensitivitas bakteri karang terhadap logam Cu

Tabel 3. Karakterisasi mikrobiologis bakteri isolat GN10

Jenis uji mikrobiologis	Hasil
Gram	+
Bentuk	Batang
<i>Acid fast</i>	-
Spora	+
Posisi dan bentuk spora	VX
panjang cell > 3 µm	-
Motilitas	+
Aerobik	+
An Aerobik	-
Katalase	+
Oksidase	-
Glukose Acid	+
Karbohidrat (OF)	NC
Pertumbuhan dengan 10% NaCl	+
Reduksi Nitrate	+
Gas dari Glukose	-
Indol	-
ONPG	-
VP	-
Hidrolisis pati	-
Urea	-
Casein	+
L-arabinose	-
Salicin	-
Sucrose	-
Xylose	-
Celibiose	-
Galactose	-
Rafinose	-
Gelatinase	V
Tumbuh pada 50°C	-
Produksi Pigment	-
Penggunaan Nitrat	-

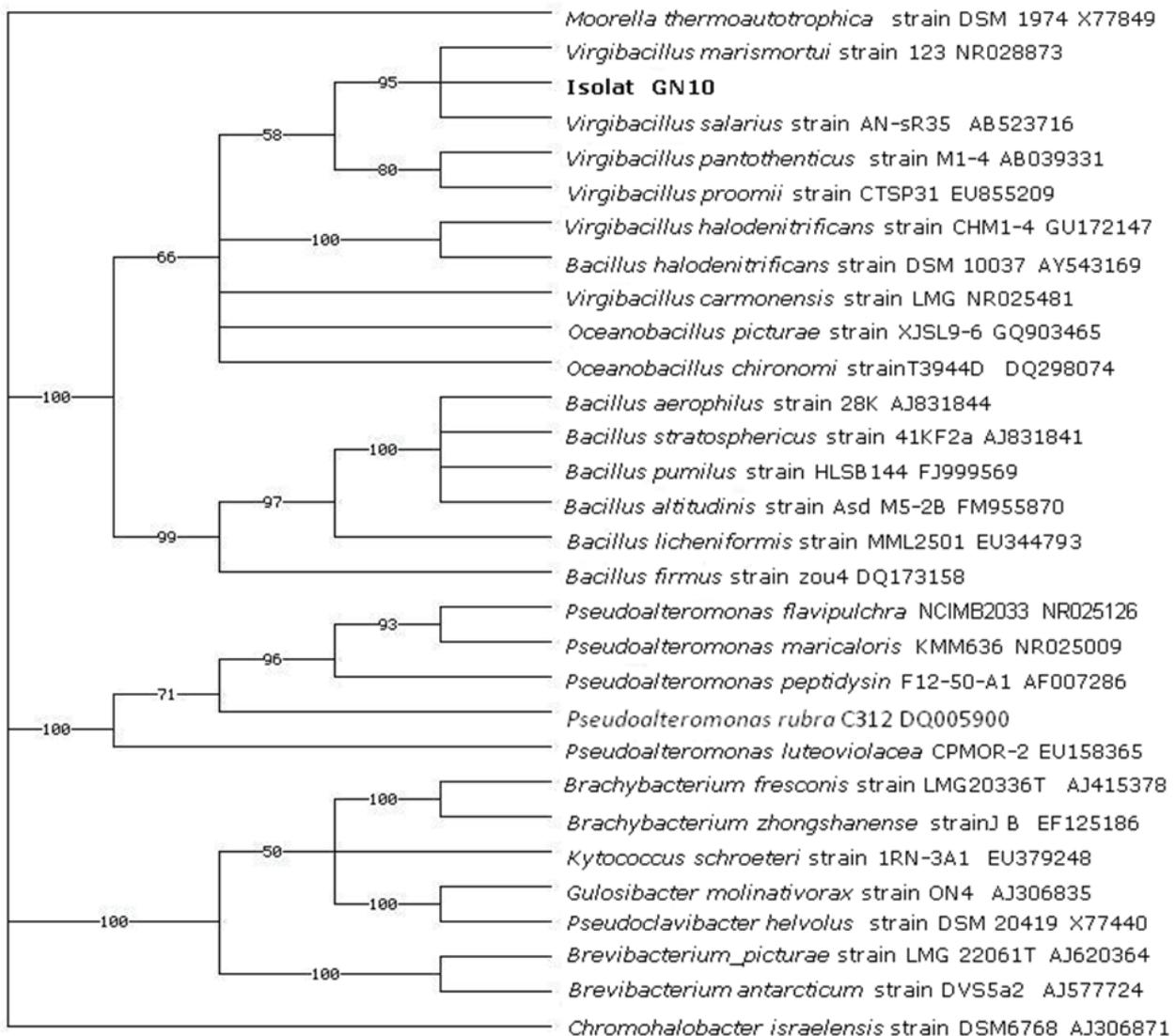
Keterangan :

- VX : Central/sub terminal - Oval
- V : Tidak diuji
- x^F : Fakultatif anaerobic
- NC : *No Change* (tidak ada perubahan)
- Tanda + : Reaksi positif
- Tanda - : Reaksi negatif

ini menunjukkan bahwa bakteri simbiosis karang ini memiliki potensi yang besar untuk dikembangkan sebagai biosensor untuk menguji toksisitas logam Cu pada ekosistem karang.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya keragaman bakteri terhadap toleransi logam Cu meskipun bakteri tersebut diisolasi dari jenis karang



Gambar 2. Pohon filogenetik bakteri simbiosis karang isolat GN10 dengan *Moorella thermoautotrophica* strain DSM 1974 sebagai outgroup.

yang sama. Bakteri karang *V. marismortui* strain GN10 memiliki potensi yang besar sebagai kandidat biosensor untuk mengakses toksisitas logam Cu pada ekosistem terumbu karang.

Ucapan Terima Kasih

Terima kasih disampaikan kepada Dirjen Dikti, Depdiknas Jakarta yang telah membiayai penelitian ini melalui Program Hibah Kompetensi Tahun Anggaran 2008, sesuai dengan Surat Perjanjian Pelaksanaan Pekerjaan Penelitian No: 013/HIKOM/DP2M/2008

Daftar Pustaka

- Banin, E., T. Israely, A. Kushmaro, Y. Loya, E. Orr & E. Rosenberg. 2000. Penetration of the Coral-Bleaching Bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(7): 3031-3036
- Burnley, L. E., 2000. Heavy Metal Resistance in the Genus *Gluconobacter*. Thesis, Master of Science in Biology, Faculty of Virginia Tech, Blacksburg, VA, USA. 81 pp.
- Chamroensaksri, N., A. Akaracharanya, W. Visessanguan & S. Tanasupawat 2008. Characterization of Halophilic Bacterium NB2-1

- from *Pla-Ra* and Its Protease Production. *J. Food Biochem.*, 32(4): 536-555.
- Duxbury, T. 1981. Toxicity of heavy metals to soil bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 11: 217-220.
- Ehrlich, H.L. 1997. Microbes and metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 687-692.
- Essghaier, B., M.L Fardeau, J.L. Cayol, M.R Hajlaoui, A. Boudabous, H. Jijakli, & N. Sadfi-Zouaoui, N. 2009. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 106(3): 833-846.
- Ford, T. & D. Ryan. 1995. Toxic metals in aquatic ecosystems: a microbiological perspective. *Environ. Health. Perspect.* 103 (1):25-28.
- Frias-Lopez J, A.L. Zerkle, G.T. Bonheyo & B.W. Foue 2002. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2214-2228
- Glynn, P.W, L.S. Howard, E. Corcoran, & A.D. Freay 1984. Occurrence and Toxicity of Herbicides in Reef Building Corals . *Mar. Poll. Bull.* 15 (10): 370-374.
- Goering, P.L., M.P. Waalkes & C.D. Klaassen 1995. Toxicology of cadmium. In: Goyer, R.A. & Cherian, M.G. (Eds.), *Toxicology of Metals. Biochemical Aspects.* Springer, Berlin, pp. 189-214.
- Harwood, V.J. & A.S. Gordon. 1994. Copper-Induced Production of Copper-Binding Supernatant Proteins by the Marine Bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (5): 1327-1332.
- Hughes, M.N. & R.K. Poole. 1991. Metal speciation and microbial growth, the hard and soft facts. *J. General Microbiol.* 137: 725-734.
- Jeanthon, C & D. Prieur, 1990. Susceptibility to Heavy Metals and Characterization of Heterotrophic Bacteria Isolated from Two Hydrothermal Vent. *Polychaete annelids, Alvinella pompejana* and *Alvinella caudate*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3308-3314.
- Jonas, R.B. 1989. Acute Copper and Cupric Ion Toxicity in an Estuarine Microbial Community. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(1):43-49.
- Joshi-Tope, G. & A.J. Francis 1995. Mechanisms of biodegradation of metal-citrate complexes by *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 177: 1989-1993.
- Kim, B.K., E.C. deMacario, J. Nolling & L. Daniels 1996. Isolation and Characterization of a Copper-Resistant Methanogen from a Copper-Mining Soil Sample. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (7): 2629-2635.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, J. Parker, & T.D. Brock. 2000. *Biology of microorganisms.* Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey 07458
- Mergeay, M. 1991. Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trend. Biotechnol.* 9: 17-24.
- Nies, D.H. 1992. Resistance to cadmium, cobalt, zinc and nickel in microbes. *Plasmid* 27: 17-28.
- Radjasa, O.K., T. Martens., H-P. Grossart., T. Brinkhoff., A. Sabdono., & M. Simon. 2007. Antagonistic activity of a marine bacterium *Pseudoalteromonas luteoviolacea* TAB4.2 associated with coral *Acropora* sp. *J. Biol. Sci.* 7(2): 239-246.
- Ritchie K.B. & G.W. Smith 1995. Preferential carbon utilization by surface bacteria communities from water mass, normal, and white-band diseased *Acropora cervicornis*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4:345-354
- Ritchie, K. B., & G. W. Smith. 2004. Microbial communities of coral surface mucopoly saccharide layers, p. 259-264. In E. Rosenberg & Y. Loya (ed.), *Coral health and disease.* Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Sabdono, A. 2009. Heavy Metal Levels and Their Potential Toxic Effect on Coral *Galaxea fascicularis* from Java Sea, Indonesia. *Res J. Environ. Sci.* 3(1): 96-102,
- Shida, O., Takagi, H., Kadowaki, K., Nakamura, L. K. & Komagata, K. 1997. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the genus *Paenibacillus* and emended description of the genus *Paenibacillus*. *Int J. Syst. Bacteriol.* 47: 289-298.
- Swofford, DL. 1998. PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods) version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. Copyright © Smithsonian Institution
- Tom-Petersen, A., C. Hosbond, & O. Nybroe. 2001. Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 59-67.
- Trevors, J. T. 1987. Copper resistance in bacteria. *Microbiol. Sci.* 4: 29-31.
- Urrutia, M.M. & T.J. Beveridge 1993. Remobilization of heavy metals retained as oxyhydroxides or

- silicates by *Bacillus subtilis* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4323-4329.
- Weisburg, W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., & Lane D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.
- Yoon, J. H., I.G. Kim, K.H. Kang, T.K. Oh & Y.H. Park. 2003. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J. Syst. Bacteriol.* 53: 1297-1303