

EKSPLOKASI DAN SKRINING BAKTERI PELARUT FOSFAT DARI KAWASAN TAMAN NASIONAL LORE LINDU

Salapu Pagiu¹⁾

¹⁾ Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Tadulako, Jl. Soekarno – Hatta Km 9 Palu 94118, Sulawesi Tengah Telp/Fax: 0451 – 429738.

ABSTRACT

Exploration of phosphate solubilizing bacteria (PSB) was carried out to know the population density and diversity of PSB in any rhizospore of vegetation in the area of Lore-Lindu National Park. The Rhizospore sampling used method of 'Polar Institut-Bromophenol Blue (NBRI-BPB), Pikovskaya media and Tadulako-2 media. The result showed that 52 isolates of bacteria had been differentiated from 25 rhizospore sample with population density range between 19.0 and 192.5 ($\times 10^4$ cfu g^{-1}), yellow and white of colony colors, and colony diameter between 1.5 mm and 3.5 mm. Screening these bacteria in NBRI-BPB media found 25 isolates classified as phosphate solubilizing bacteria based on clear zone showed in media. The diameter of clear zone range between 3.0 mm and 4.5 mm. Continuing tested of these 25 PSB isolates showed that seven isolates clustered as superior PSB based on their ability to solve tricalcium phosphate in liquid Pikovskaya media with phosphate concentration range between 671.5 and 895.7 ($mg L^{-1}$ media). These isolates also showed better viability with population density range between 87.5 and 142.0 ($\times 10^6$ cfu g^{-1}) after 80 days inoculated in Tadulako-2 media. These seven isolates were SED-01, WUA-07, KAD-08, WAN-03, WAT-03, TAL-02, and ROM-05.

Key Words : Exploration, NBRI-BPB, phosphate solubilizing bacteria, polar sampling plans, tadulako-2 media.

PENDAHULUAN

Bakteri pelarut fosfat (BPF) adalah salah satu mikroorganisme potensial yang banyak mendapat perhatian baik dalam penelitian maupun praktek pertanian (Pradhan and Sukla, 2005; Loganathan and Nair, 2004; Mayhew, 2003). Bakteri tersebut hidup bebas dalam tanah di berbagai rizosfir tumbuhan dan mempunyai kemampuan yang baik dalam melarutkan fosfat tidak/sukar larut (Chen *et al.*, 2006; Nowak, 2003; Narsian and Pate, 200; Illmer *et al.*, 1995). Akan tetapi, beberapa jenis bakteri penambat nitrogen, yang hidup bersimbiosis dengan tumbuhan, juga mempunyai kemampuan melarutkan fosfat (Igual *et al.*, 2001; Seshadri *et al.*, 2000). Padat populasi BPF di dalam tanah selalu berada di bawah padat populasi optimal dan penyebarannya juga tidak homogen. Kepadatan populasi BPF lebih tinggi pada daerah rizosfir dibandingkan

daerah nonrizosfir dan tiap-tiap rizosfir mempunyai kepadatan populasi yang berbeda (Peix *et al.*, 2004). Setiap isolat mempunyai kemampuan yang berbeda-beda dalam melarutkan P (Ponmurugan and Gopy, 2006; Rivas *et al.*, 2004; Seshadri *et al.*, 2000; Whitelaw *et al.*, 1999), karena itu, eksplorasi perlu dilakukan untuk mengetahui kepadatan populasi dan penyebarannya serta mendapatkan isolat-isolat yang unggul melarutkan P.

Pengembangan dan pemanfaatan mikroorganisme indigen dapat memberikan hasil lebih baik daripada mikroorganisme introduksi. Pemanfaatan mikroorganisme indigen unggul di suatu kawasan juga sejalan dengan sistem pertanian berkelanjutan yang menganjurkan penggunaan sumberdaya alam lokal. Kendala yang dihadapi dalam pemanfaatan mikroorganisme indigen adalah keterbatasan data yang mengungkapkan potensi, keragaman, dan penyebarannya dalam suatu kawasan. Karena itu, penelitian ini merupakan

penelitian tahap awal yang ditujukan untuk data tentang kemampuan bakteri indigen melarutkan fosfat, kepadatan populasi, keragaman dan penyebarannya dalam kawasan Taman Nasional Lore Lindu.

Penyingkapan keanekaragaman organisme tanah dalam kawasan TNLL dipandang sangat penting untuk beberapa tujuan antara lain (1) membuat dataBase keanekaragaman organisme tanah dalam ekosistem alamiah, (2) terdapat peta keanekaragaman dan kepadatan populasi BPF dalam kawasan TNLL, data tersebut dapat dijadikan pembanding untuk mengevaluasi perubahan komposisi dan keanekaragaman bakteri pada areal pertanian di sekitar TNLL, (3) peta keanekaragaman bakteri membantu peneliti dalam penjarangan mikroorganisme menguntungkan yang potensi dikembangkan sebagai pupuk hayati (biofertilizer), pengendali patogen tanah (biokontrol), pengurai bahan organik atau limbah (biodekomposer), dan mikroorganisme yang dapat meningkatkan viabilitas bibit tanaman untuk tujuan rehabilitasi lahan dan hutan, dan (4) kawasan Taman Nasional Lore-Lindu dapat merupakan kawasan konservasi *insitu* dan bank isolat secara alamiah beragam mikroorganisme tanah seperti BPF.

BAHAN DAN METODE

Eksplorasi Bakteri Pelarut Fosfat.

Eksplorasi dilakukan di kawasan Taman Nasional Lore-Lindu dengan mengambil contoh tanah rizosfir dari 25 jenis vegetasi hutan. Waktu pengambilan contoh tanah dilakukan dalam akhir musim hujan dari 6-30 April 2009. Pada setiap titik pengambilan sampel, data koordinat lintang dan bujur serta ketinggian lokasi dari permukaan laut (dpl) dicatat dengan menggunakan perangkat 'global positioning system' (GPS) tipe 'Garmin'.

Polar sampling plans adalah metode yang digunakan mengambil sampel komposit tanah rizosfir di 8 sub-titik sampel pada posisi 8 arah mata angin yang membentuk lingkaran seperti pada Gambar 1 (Alef and

Nannipieri, 1995). Empat sub-titik membentuk lingkaran dalam dengan radius 2 m pada posisi Utara-Timur-Selatan-Barat dan empat sub-titik lainnya membentuk lingkaran luar dengan radius 3 m pada posisi Timurlaut-Tenggara-Baratdaya-Baratlaut. Sampel komposit yang diambil, 400 g, dimasukkan kedalam plastik kemasan, diberi label, dimasukkan ke dalam *coolbox*, dan dibawa ke Laboratorium untuk isolasi.

Gambar 1: Titik-titik pengambilan sampel Model BGBD Titik 1, 2, 3, 4 berjarak 2 m dari titik pusat **0**, Titik 5, 6, 7, 8 berjarak 3 m dari titik pusat **0**.

Isolasi Bakteri Pelarut Fosfat. Isolasi bakteri indigen dari contoh tanah yang sudah dikumpulkan dilakukan dengan menggunakan metode pengenceran sampai seri 10^{-4} . Setiap sampel pada pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} masing-masing dibiakkan dalam 2 cawan petri sebagai duplo. Koloni bakteri dalam cawan kemudian diamati pada hari kedua. Setiap koloni dipisahkan berdasarkan indikator warna, diameter zona bening, dan diameter koloni.

Isolasi bakteri dilakukan dengan menimbang 1 g contoh tanah halus dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl fisiologis steril dan dikocok dengan mesin pengocok vortex; larutan tersebut merupakan pengenceran 10^{-1} . Kemudian dilakukan seri pengenceran sampai 10^{-4} . Dari seri pengenceran 10^{-3} dan 10^{-4} diambil 1 ml dan ditumbuhkan dalam cawan petri steril yang berisi media NBRI-BPB, diinkubasi dalam inkubator selama 2 hari pada suhu 28°C . Setiap sampel ditumbuhkan dalam 2 cawan petri sebagai ulangan. Koloni bakteri dalam cawan kemudian diamati pada hari kedua dan populasi dihitung berdasarkan warna, diameter zona bening, dan diameter koloni. Setiap koloni yang berbeda warna dan diameter dipisahkan dan ditanam kembali pada cawan petri dengan media Pikovskaya padat. Proses isolasi ini dulang hingga diperoleh koloni murni. Setiap biakan murni disimpan pada media agar untuk digunakan pada percobaan berikutnya.

Tabel 1. Data Geografis, pH Tanah, dan Populasi Bakteri Pelarut Fosfat

No.	Lokasi Sampling	Koordinat Lintang/Bujur	Altitud (mdpl)	pH H ₂ O	KCl	Populasi BPF (10 ⁴ cfu g ⁻¹)
1.	Sedoa	01 ⁰ 21'08"/120 ⁰ 18'40"	1.116	4,9	3,4	151,0
2.	Sedoa	01 ⁰ 21'40"/120 ⁰ 18'30"	1.135	5,1	4,4	96,5
3.	Sedoa	01 ⁰ 22'20"/120 ⁰ 18'50"	1.129	4,9	3,5	123,5
4.	Wuasa	01 ⁰ 23'30"/120 ⁰ 18'31"	1.127	5,2	3,7	120,5
5.	Wuasa	01 ⁰ 24'10"/120 ⁰ 18'02"	1.123	5,5	4,0	192,5
6.	Wuasa	01 ⁰ 24'40"/120 ⁰ 18'09"	1.112	5,4	4,0	174,5
7.	Wuasa	01 ⁰ 25'06"/120 ⁰ 17'21"	1.121	5,4	3,0	87,0
8.	Kadua	01 ⁰ 25'50"/120 ⁰ 16'52"	1.133	4,5	3,7	175,0
9.	Kadua	01 ⁰ 26'24"/120 ⁰ 17'46"	1.133	4,0	3,1	153,0
10.	Kadua	01 ⁰ 26'48"/120 ⁰ 18'03"	1.139	6,9	5,7	94,5
11.	Kadua	01 ⁰ 27'32"/120 ⁰ 18'09"	1.134	5,4	4,2	121,0
12.	Wanga	01 ⁰ 28'13"/120 ⁰ 18'22"	1.149	5,1	3,6	95,0
13.	Wanga	01 ⁰ 28'51"/120 ⁰ 18'11"	1.124	6,8	5,1	82,5
14.	Wanga	01 ⁰ 29'11"/120 ⁰ 18'34"	1.116	5,0	3,9	104,5
15.	Wanga	01 ⁰ 29'54"/120 ⁰ 18'12"	1.154	6,0	5,1	91,5
16.	Watutau	01 ⁰ 31'41"/120 ⁰ 19'05"	1.116	5,1	3,9	58,5
17.	Watutau	01 ⁰ 32'29"/120 ⁰ 19'15"	1.124	4,1	3,4	129,0
18.	Watutau	01 ⁰ 33'27"/120 ⁰ 19'33"	1.109	4,4	2,8	173,0
19.	Talabosa	01 ⁰ 34'38"/120 ⁰ 19'10"	1.135	5,3	4,2	108,5
20.	Talabosa	01 ⁰ 35'22"/120 ⁰ 19'15"	1.131	5,3	4,4	19,0
21.	Talabosa	01 ⁰ 35'42"/120 ⁰ 18'02"	1.130	5,4	4,1	184,0
22.	Talabosa	01 ⁰ 36'08"/120 ⁰ 17'43"	1.171	4,1	2,8	127,5
23.	Rompo	01 ⁰ 36'55"/120 ⁰ 17'48"	1.135	4,8	2,8	123,0
24.	Rompo	01 ⁰ 37'18"/120 ⁰ 18'21"	1.135	4,2	3,0	28,5
25.	Rompo	01 ⁰ 37'31"/120 ⁰ 18'42"	1.112	4,1	3,8	115,0

Skrining Isolat Bakteri Pelarut Fosfat.

Skrining isolat BPF dilakukan pada media pikovskaya cair (MPC), dan uji viabilitas dalam Media Tadulako-2. Kemampuan isolat BPF melarutkan P dalam MPC ditentukan dengan mengukur konsentrasi P yang terlarut dalam media menggunakan metode vanadat-molibdat (Pierzynski, 2000). Uji viabilitas dalam media Tadulako-2 dilakukan untuk menentukan rentang waktu penurunan populasi dari 10⁹ ke 10⁵ cfu g⁻¹ media.

Pengamatan P terlarut dalam MPC dilakukan dengan menginokulasikan setiap isolat ke dalam erlenmeyer yang berisi 50 ml MPC steril dan dikocok dengan mesin pengocok selama 4 hari. Setelah 4 hari dikocok maka dilakukan pengamatan dengan mengukur variabel respons (1) populasi bakteri, (2) pH media, dan (3) P terlarut dalam media. Data variabel respons kemudian dianalisis secara serempak menggunakan paket statistik MINITAB

15.1.1 model analisis gugus (cluster analysis). Model analisis ini mengelompokkan isolat-isolat yang memiliki kesamaan variabel respons berdasarkan koefisien korelasi. Kelompok (gugus) isolat yang memiliki nilai populasi dan P terlarut tertinggi merupakan kelompok yang digunakan pada uji berikutnya.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Lokasi pengambilan sampel tanah dicatat berdasarkan nama desa yang menjadi jalur masuk ke dalam areal TNLL untuk mengambil sampel tanah. Desa Sedoa, Wuasa, dan Kadua di Kecamatan Lore Utara, Desa Wanga dan Watutau di Kecamatan Lore Piore, dan Desa Talabosa dan Rompo di Kecamatan Lore Tengah. Ketinggian tempat dan koordinat titik sampel tertera pada Tabel 1. Lokasi sampling berada pada ketinggian di atas 1.100 m dpl

dan koordinat 01⁰20'00'' LS - 01⁰40'00'' LS dan 120⁰15'00'' BT – 120⁰20'00'' BT. Rentang yang lebar tersebut memperbesar probabilitas mendapatkan isolat BPF indigen yang unggul melarutkan fosfat.

Skrining Isolat Bakteri Pelarut Fosfat. Berdasarkan sandar statistika cawan (Hadioetomo, 1985) maka skrining isolat hanya dilakukan terhadap 23 sampel yang populasi isolatnya lebih besar dari 30x10⁴ cfu g⁻¹ tanah. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa dari 23 sampel yang diamati berhasil dibedakan 52 isolat berdasarkan warna, diameter koloni, dan diameter zona bening (Tabel 2). Dari 52 isolat tersebut ada 25

isolat yang zona beningnya nyata dan selebihnya tidak menampakkan zona bening nyata. Oleh karena itu, hanya 25 isolat yang dipilih sebagai bakteri pelarut fosfat.

Uji lanjut terhadap 25 isolat terseleksi menunjukkan bahwa semua isolat mampu melarutkan fosfat dalam media Pikovskaya cair (Tabel 3). Berdasarkan analisis gugus (cluster analysis) maka ditetapkan tujuh isolat sebagai isolat unggul pelarut fosfat yaitu isolat SED-02, WUA-07, KAD-08, WAN-03, WAT-03, TAL-02, dan ROM-05. Ketujuh isolat tersebut mampu melarutkan fosfat dalam media Psikovskaya cair antara 671,5 – 895,7 (mg L⁻¹ media) dengan pH antara 4,6 – 5,1.

Tabel 2 . Profil Isolat Bakteri Indigen dalam Media NBRI-BPB

No.	Nama Isolat	Warna Koloni	Koloni (mm)	Zona Bening (mm)	No.	Nama Isolat	Warna Koloni	Koloni (mm)	Zona Bening (mm)
1.	SED-01	Kuning	2,0	tt	27.	WAN-01	Kuning	2,0	Tt
2.	SED-02	Putih	2,5	3,5	28.	WAN-02	Putih	2,5	Tt
3.	SED-03	Kuning	2,0	3,5	29.	WAN-03	Putih	2,5	3,5
4.	SED-04	Putih	2,0	tt	30.	WAN-04	Kuning	2,5	3,0
5.	SED-05	Kuning	3,0	4,5	31.	WAN-05	Putih	2,0	Tt
6.	SED-06	Kuning	2,5	tt	32.	WAN-06	Putih	2,5	3,0
7.	SED-07	Putih	2,0	tt	33.	WAT-01	Kuning	2,0	3,5
8.	SED-08	Kuning	2,5	3,5	34.	WAT-02	Putih	1,5	Tt
9.	WUA-01	Putih	2,0	tt	35.	WAT-03	Kuning	2,5	3,0
10.	WUA-02	Kuning	2,0	3,5	36.	WAT-04	Putih	1,5	Tt
11.	WUA-03	Putih	2,0	tt	37.	WAT-05	Kuning	2,0	3,0
12.	WUA-04	Kuning	2,5	3,5	38.	WAT-06	Kuning	1,5	Tt
13.	WUA-05	Putih	1,5	tt	39.	TAL-01	Putih	2,5	Tt
14.	WUA-06	Putih	2,0	tt	40.	TAL-02	Kuning	2,5	3,5
15.	WUA-07	Kuning	2,5	3,0	41.	TAL-03	Putih	3,0	4,0
16.	WUA-08	Kuning	1,5	tt	42.	TAL-04	Kuning	2,5	3,0
17.	WUA-09	Putih	2,0	3,0	43.	TAL-05	Putih	2,0	Tt
18.	KAD-01	Putih	2,5	tt	44.	TAL-06	Kuning	2,0	Tt
19.	KAD-02	Kuning	1,5	tt	45.	TAL-07	Putih	3,5	4,5
20.	KAD-03	Putih	2,0	3,0	46.	ROM-01	Kuning	2,5	3,0
21.	KAD-04	Kuning	2,5	3,5	47.	ROM-02	Putih	2,5	Tt
22.	KAD-05	Putih	2,5	tt	48.	ROM-03	Kuning	2,0	Tt
23.	KAD-06	Kuning	2,0	tt	49.	ROM-04	Putih	3,5	4,0
24.	KAD-07	Putih	3,0	4,5	50.	ROM-05	Putih	2,5	3,5
25.	KAD-08	Putih	3,5	4,0	51.	ROM-06	Putih	1,5	Tt
26.	KAD-09	Putih	1,5	tt	52.	ROM-07	Putih	2,0	Tt

Tabel 3. Profil Bakteri Pelarut Fosfat dalam Media Pikovskaya Cair

No.	Isolat BPF	Warna Koloni	Diameter Koloni (mm)	Diameter Zona Bening (mm)	pH Media (H ₂ O)	Populasi (10 ⁷ cfu ml ⁻¹)	P-terlarut (mg L ⁻¹)
1.	SED-02	Putih	2,5	3,5	4,7	165,5	768,4
2.	SED-03	Kuning	2,0	3,5	5,6	98,5	461,1
3.	SED-05	Kuning	3,0	4,5	5,2	112,0	730,2
4.	SED-08	Kuning	2,5	3,5	5,1	104,0	678,4
5.	WUA-02	Kuning	2,0	3,5	5,7	56,5	396,6
6.	WUA-04	Kuning	2,5	3,5	5,5	79,5	401,8
7.	WUA-07	Kuning	2,5	3,0	4,6	203,5	812,6
8.	WUA-09	Putih	2,0	3,0	5,7	63,0	385,4
9.	KAD-03	Putih	2,0	3,0	5,7	91,5	307,8
10.	KAD-04	Kuning	2,5	3,5	5,5	77,0	403,3
11.	KAD-07	Putih	3,0	4,5	4,9	121,0	797,3
12.	KAD-08	Putih	3,5	4,0	4,7	192,0	873,9
13.	WAN-03	Putih	2,5	3,5	5,1	148,5	671,5
14.	WAN-04	Kuning	2,5	3,0	5,4	69,5	352,8
15.	WAN-06	Putih	2,5	3,0	5,6	67,5	423,7
16.	WAT-01	Kuning	2,0	3,5	4,8	124,0	741,2
17.	WAT-03	Kuning	2,5	3,0	4,6	241,5	895,7
18.	WAT-05	Kuning	2,0	3,0	5,6	76,0	564,3
19.	TAL-02	Kuning	2,5	3,5	5,0	188,5	698,9
20.	TAL-03	Putih	3,0	4,0	5,7	95,0	442,5
21.	TAL-04	Kuning	2,5	3,0	4,8	112,0	678,2
22.	TAL-07	Putih	3,5	4,5	5,6	72,5	365,4
23.	ROM-01	Kuning	2,5	3,0	5,6	82,5	435,2
24.	ROM-04	Putih	3,5	4,0	5,5	93,5	577,4
25.	ROM-05	Putih	2,5	3,5	4,9	211,0	767,3

Tabel 4. Viabilitas Bakteri Pelarut Fosfat dalam Media Tadulako-2

Nama Isolat	10 ⁹	Populasi Isolat			10 ⁵
		Cfu g ⁻¹			
		Hari Sesudah Inokulasi			
		0	40	80	
SED-02	80,5	169,0	134,5	120,5	
WUA-07	67,0	185,5	114,0	92,5	
KAD-08	79,0	203,5	127,5	104,0	
WAN-03	65,5	206,0	102,5	87,5	
WAT-03	74,0	162,0	98,5	124,5	
TAL-02	60,5	158,5	87,5	72,5	
ROM-05	83,5	196,5	142,0	135,5	

Ketujuh isolat yang terseleksi dari uji pada media Psikovskaya cair juga menunjukkan viabilitas yang baik dalam media Tadulako-2. Rata-rata populasi ketujuh isolat tersebut setelah 80 hari diinokulasikan dalam media Tadulako-2 berkisar antara 87,5 – 142,0 (x10⁶ cfu g⁻¹ media) (Tabel 4).

KESIMPULAN

Metode polar sampling plans cukup representatif mengamati kepadatan populasi dan keragaman isolat bakteri di berbagai rizosfir vegetasi hutan.

Pada media NBRI-BPB padat populasi bakteri dari 23 sampel rizosfir

berkisar antara 19,0 – 192,5 ($\times 10^4$ cfu g^{-1} tanah), 2 sampel yang tidak memenuhi kriteria statistik cawan dengan kepadatan populasi $< 30 \times 10^4$ cfu g^{-1} tanah. Dari 23 sampel yang memenuhi kriteria statistik cawan dibedakan 52 isolat bakteri dan 25 isolat diantaranya ditetapkan sebagai bakteri pelarut fosfat berdasarkan zona bening yang tampak dalam media.

Skrining pada Media Psikovskaya cair menunjukkan bahwa isolat-isolat SED-02, WUA-07, KAD-08, WAN-03, WAT-

03, TAL-02, dan ROM-05 adalah isolat-isolat unggul dari yang lainnya dengan kemampuan melarutkan fosfat ($mg L^{-1}$ media) berturut-turut sebesar 768.4, 812.6, 873.9, 671.5, 895.7, 698.9, dan 767.3.

Viabilitas isolat-isolat SED-02, WUA-07, KAD-08, WAN-03, WAT-03, TAL-02, dan ROM-05 juga sangat baik dengan populasi berturut-turut 134.5, 114.0, 127.5, 102.5, 98.5, 87.5, dan 142.0 ($\times 10^6$ cfu g^{-1} media) setelah 80 hari diinokulasi dalam media Tadulako-2.

DAFTAR PUSTAKA

- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. 2006. *Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities*. *App. Soil Ecol.* 34:33-41.
- Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek*. Penerbit Gramedia, Jakarta.
- Igual, J.M., A. Valverde, E. Cervantes, and E. Velazquez, 2001. *Phosphate-Solubilizing Bacteria as Inoculants for Agriculture: use of Update Molecular Technique in Their Study*. *J. Agronomie* 21:561-568.
- Illmer P, Schinner F, Babato A. 1995. *Solubilization of Hardly Soluble Aip04 with p Solubilizing Microorganisms*. *Soil Biol. Biochem.* 27:265:-270.
- Loganathan P, Nair S. 2004. *Swaminathia Salitolerans gen.nov.,sp.nov., a Salt-Tolerant, Nitrogen-Fixing and Phosphate-Solubilizing Bacterium from Wild Rice (Porteresia coartata Tateoka)*. *Soil Ecol. Microbiol.* 54:1185-1190.
- Mayhew L. 2003. *Bioavailability of Rock Phosphates from a Geomicrobiological Perspective (Review)*. *Midwestern Bio-Ag. Blue Mounds Wisconsin*. pp 20.
- Narsian V, Patel HH. 2000. *Aspergillus aculeatus* as Rock Phosphates Solubilizer. *Soil Biol. Biochem.* 32:559-565.
- Nowak B. 2003. *Environmental Chemistry of Phosphonates (Review)*. *Water Research, Pergamon*: pp 14.
- Peix A, Rivas R, Santa-Regina I, Matos PF, Martinez-Molina E, Rodrigues-Barrueco C, Valasques E. 2004. *Pseudomonas lutea sp. nov., a Novel Phosphate-Solubilizing Bacterium Isolated from the Rhizosphere of Grasses*. *J. Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:847-850.
- Pierzynski GR. 2000. *Methods of Phosphorus Analysis for Soils, Sediments, Residuals, and Waters*. Southern Cooperative Series Bulletin No. 396. [http://www.soil.ncsu.edu/sera17/publications/sera17-2/pm_cover.htm (July 20th 2007)]
- Ponmurugan P, Gopi C. 2006. *In Vitro Production of Growth Regulator and Phosphatase Activity by Phosphate Solubilizing Bacteria*. *African Journal of Biotechnology* 5:348-350.
- Pradhan N, Sukla LB. 2005. *Solubilization of Inorganic Phosphates by Fungi Isolated from Agriculture Soil*. *African Journal of Biotechnology* 5:850-854.
- Rivas R, Foujillo ME, Zanchez M, Matos PF, Martinez-Molina E, Velazquez E. 2004. *Microbacterium ulmi sp.nov., a Xylanolytic, Phosphate-Solubilizing Bacterium Isolated from Sawdust of Ulmus vigma*.
- Seshadri S, Muthukumarasamy R, Lakshminarasimhan C, Iganacimuthu S. 2000. *Solubilization of Inorganic Phosphates by Azospirillum halopraeferans*. *Current Science* 79:565-567.
- Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. 1999. *Phosphates Solubilization in Solution Culture by the Soil Fungus Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem* 31:655-665.