

Potensi Isolat Bakteri *Edwardsiella* dan *Corynebacterium* dari Pulau Poteran Sumenep sebagai Pelarut Fosfat

Hefdiyah dan Maya Shovitri

Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,
Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS)
Jl. Arief Rahman Hakim, Surabaya 60111 Indonesia
e-mail: maya@bio.its.ac.id

Abstrak—Salah satu potensi Pulau Poteran Sumenep adalah bidang pertanian. Beberapa desa di Kecamatan Talango tanaman hortikultura ditanam di lahan kering dan kurang subur. Salah satu penyebabnya adalah rendahnya P-tersedia padahal dilaporkan P total tanah Madura adalah sedang hingga tinggi. Penelitian ini bertujuan mengisolasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) tanah di Desa Talango dan Poteran agar diketahui keanekaragaman dan efisiensi pelarut fosfat bakteri tersebut. Isolasi bakteri dilakukan dengan metode pengenceran bertingkat dan metode sebar pada medium NA. Isolat murni diamati secara deskriptif makroskopis (bentuk, tepi, elevasi, dan warna koloni), mikroskopis (morfologi sel dan pewarnaan) dan karakter biokimia berdasarkan panduan Bergey's Manual of Determinative serta diukur efisiensi pelarut fosfat dengan medium Pikovskaya. Berdasarkan hasil isolasi dan karakterisasi didapatkan 2 isolat berbeda yang kecenderungan masuk ke dalam dua genus *Edwardsiella* dan *Corynebacterium*. Efisiensi pelarut fosfat kedua isolat bakteri tersebut berturut-turut sebesar 43.86 dan 45.63 sehingga diasumsikan bakteri-bakteri tersebut berpotensi sebagai biofertilizer.

Kata Kunci— bakteri, biofertilizer, fosfat, keanekaragaman, Pulau Poteran

I. PENDAHULUAN

KABUPATEN Sumenep sebagai Kabupaten Kepulauan, memiliki sejumlah pulau kecil, yang salah satunya adalah Pulau Poteran [1]. Pulau Poteran memiliki beberapa potensi yang dapat dikembangkan, salah satunya potensi pertanian. Di Kecamatan Talango, ada empat desa (Desa Poteran, Palasa, Gapurana dan Talango) yang masyarakatnya menanam tanaman hortikultura walaupun lahan di kecamatan tersebut dilaporkan kondisinya kering dan kurang subur [2].

Tanah-tanah di Madura mempunyai reaksi tanah netral hingga alkalis, kandungan bahan organik dan N total rendah, P total sedang hingga tinggi dan basa kalsium tinggi [3]. Reaksi tanah yang cenderung alkalis memunculkan permasalahan secara langsung yaitu kecocokan untuk tanaman dan ketersediaan unsur hara, yaitu rendahnya ketersediaan unsur mikro dan juga fosfat karena terikat oleh Ca^{2+} . Kandungan C organik, N total, P tersedia dan K di Madura tergolong rendah [4]. Kondisi ini harus menjadi perhatian utama dalam pengelolaan tanah di Madura [3].

Unsur P berperan dalam menyimpan dan mentransfer energi serta sebagai komponen protein dan asam nukleat [5].

Kekurangan P pada tanaman akan mengakibatkan berbagai hambatan metabolisme, diantaranya dalam proses sintesis protein, yang menyebabkan terjadinya akumulasi karbohidrat dan ikatan-ikatan nitrogen. Kekurangan P tanaman dapat diamati secara visual, yaitu daun-daun yang tua akan berwarna keunguan atau kemerahan karena terbentuknya pigmen antosianin. Pigmen ini terbentuk karena akumulasi gula di dalam daun sebagai akibat terhambatnya sintesis protein. Gejala lain adalah nekrosis (kematian jaringan) pada pinggir atau helai dan tangkai daun, diikuti melemahnya batang dan akar tanaman [6].

Mikroorganisme yang dapat dikembangkan dalam mengatasi ketersediaan unsur P pada tanah diantaranya adalah Bakteri Pelarut Fosfat (BPF). Bakteri telah banyak digunakan untuk meningkatkan hasil pertanian oleh beberapa negara, bahkan telah diperdagangkan dan digunakan sampai saat ini. Salah satunya di negara Cuba, beberapa pupuk hayati yang sering diproduksi adalah strain *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Azospirillum*, dan *Burkholderia* [7]. Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa bakteri *Pseudomonas* dan *Bacillus* merupakan bakteri pelarut fosfat yang memiliki kemampuan terbesar sebagai *biofertilizer* [8].

BPF membantu menyediakan hara bagi tanaman dengan melarutkan P-terjerap menjadi bentuk P-tersedia terutama pada tanah yang dipupuk dengan batuan fosfat, dengan cara mengeluarkan asam-asam organik seperti asam format, asam asetat, asam propionate, asam laktat dan asam fumarat dari dalam selnya. Asam-asam organik yang dihasilkan BPF akan bereaksi dengan ion-ion Ca^{2+} , Fe^{3+} , dan Al^{3+} yang mengikat P selama ini menjadi bentuk yang stabil (khelat) dan unsur P akan di bebaskan dan tersedia bagi tanaman [9].

Secara umum, unsur P dalam tanah terbagi menjadi 2, yaitu P-terjerap dan P-tersedia. P-terjerap dalam bentuk Ca-P [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$], Al-P ($\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dan Fe-P ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sedangkan P-tersedia dalam bentuk ion fosfat (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) [6]. Di Pulau Madura, termasuk di Desa Talango dan Poteran, memiliki kandungan P-tersedia dalam tanah yang cenderung rendah dibandingkan dengan P-terjerap [4]. Oleh karena itu, dibutuhkan BPF tanah untuk membantu mengubah P-terjerap menjadi P-tersedia. Meskipun dilaporkan memiliki kandungan P total yang sama, oleh karena itu, dilakukan isolasi, karakterisasi dan uji potensi pelarut fosfat bakteri tanah Desa Talango dan Poteran.

Penelitian ini bertujuan memperoleh data keanekaragaman bakteri pelarut fosfat di Desa Talango dan Desa Poteran, Pulau Poteran Sumenep, Madura serta menguji tingkat efisiensi pelarut fosfat isolat bakteri tersebut.

II. METODOLOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan September 2013 hingga Mei 2014 di Pulau Poteran Sumenep, Madura dan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember.

B. Pengambilan Sampel Tanah Pulau Poteran

Sampling dilakukan dengan mengambil sampel tanah Pulau Poteran Sumenep Madura. Pengambilan sampel tanah dilakukan di 2 plot berbeda yaitu di Desa Talango (S: 07°03'48.0" dan E: 113°57'02.8") dan Desa Poteran (S: 07°05'28.3" dan E: 114°03'10.6"). Kedua desa tersebut memiliki karakter tanah yang berbeda, yaitu tanah litosol di Desa Talango dan tanah mediteran merah di Desa Poteran. Sampel tanah diambil pada luasan lahan tertentu yang dibagi menjadi 5 titik berbentuk diagonal secara terpisah.

C. Isolasi Bakteri

Isolasi dilakukan dengan cara pengenceran bertingkat kemudian dilanjutkan dengan metode sebar (*spread plate*) yang dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow*. Dari pengenceran 10⁻¹ samapi 10⁻⁶ diambil 100 µl larutan sampel dengan menggunakan mikropipet dan dipindahkan ke permukaan medium *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid, Inggris) (lampiran 3) padat. Kemudian inokulum diratan dengan *Drigalski* dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam.

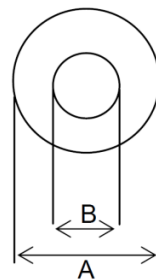
D. Karakterisasi

Isolat dimurnikan dengan metode gores 16. Karakterisasi isolat meliputi pengamatan makroskopis (karakterisasi bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni), pengamatan mikroskopis (morfologi sel dan pewarnaan) dan uji biokimia berdasarkan buku panduan *Bergey's Manual of Determinative Ninth Edition*.

E. Uji Potensi Pelarut Fosfat

Penomoran uji fosfatase dilakukan untuk melihat kemampuan hidup bakteri pelarut fosfat dengan menggunakan media selektif *Pikovskaya's Agar*. Isolat bakteri yang akan diuji kemudian diambil sedikit dan digoreskan ke dalam media tersebut lalu diinkubasi selama 10 hari pada suhu 30 ± 5°C. kemudian diukur diameter zona bening untuk menentukan efisiensi pelarut fosfat [10]. Kemampuan hidup bakteri pelarut fosfat pada media ditandai dengan terbentuknya zona bening (halo) di sekitar koloni bakteri [11].

Efisiensi pelarut dari masing-masing isolat dapat dihitung berdasarkan hubungan antara diameter koloni dengan diameter zona bening (halozon) [12].



$$\frac{\text{Diameter zona bening}}{\text{Diameter koloni}} \times 100$$

Keterangan :

- A : Diameter total (diameter koloni + diameter zona bening)
- B : Diameter koloni
- A-B : Diameter zona bening

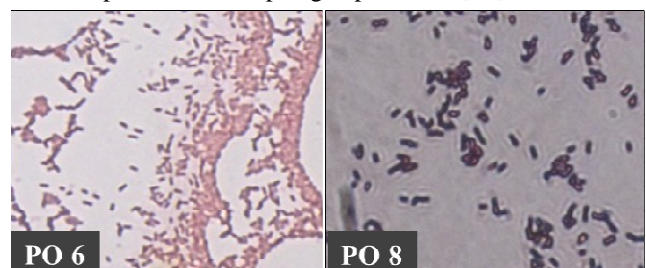
III. PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil isolasi didapatkan beberapa koloni bakteri, namun pada penelitian hanya diambil dua isolat dengan karakter koloni berbeda seperti ditunjukkan pada Tabel 1. Kedua isolat tersebut kemudian diamati karakter mikroskopis melalui pewarnaan Gram dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Gram positif ditandai dengan terbentuknya warna ungu pada sel bakteri sedangkan Gram negatif ditandai dengan warna merah muda sampai merah [13]. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat PO8 termasuk Gram positif basil. Sedangkan PO6 termasuk Gram negatif basil. Hasil ini ditunjukkan pada Gambar 1.

Tabel 1.

Karakter Makroskopis Koloni Bakteri PO6 dan PO8				
Kode	Bentuk	Tepi	Elevasi	Warna
PO6	Bulat	Rata	Menonjol	Kuning kehijauan
PO8	Tidak Beraturan	Berombak	Cekung	Putih Tulang

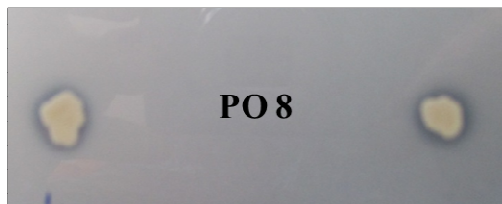
Berdasarkan hasil karakterisasi yang telah dilakukan, diketahui bahwa isolat PO6 kecenderungan masuk ke dalam genus *Edwardsiella*, sedangkan isolat PO8 kecenderungan masuk dalam genus *Corynebacterium* (Gambar 3 dan 4). Genus *Corynebacterium* memiliki karater kunci Gram positif basil, tidak membentuk Endospora, tidak tahan asam dan menghasilkan enzim katalase [14]. Genus *Corynebacterium* merupakan bakteri tanah Gram positif yang secara luas digunakan dalam industri pembuatan asam amino [15]. Genus *Corynebacterium* terdiri dari 88 spesies dan 11 subspecies. 53 diantaranya sangat jarang menyerang manusia atau menularkan pada manusia dengan kontak zoonosis [16]. Karakter kunci dari genus *Edwardsiella* adalah Gram negatif basil, tidak dapat menfermentasi laktosa, menghasilkan indol, H₂S dan enzim urease [14]. Anggota dari genus ini berasosiasi di lingkungan air tawar dan hewan-hewan yang berada di lingkungan tersebut. Oleh karena itu bakteri ini pertumbuhannya lamban pada suhu 25°C [17]. Salah satu anggota jenis ini, yaitu *E. tarda* dilaporkan bersifat patogen pada ikan [18].



Gambar 1. Pewarnaan Gram isolat PO6 (Gram + Basil) dan PO8 (Gram - Basil)

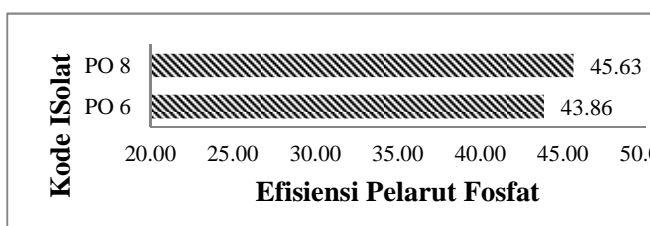
Kedua isolat ini kemudian diuji potensinya dalam melarutkan fosfat dalam medium pikovskaya [10]. Medium Pikovskaya merupakan medium selektif yang mengandung P tidak larut. P tidak larut yang digunakan dalam penelitian ini adalah trikalsium difosfat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) karena menurut penelitian sebelumnya tanah di lahan pertanian pulau Poteran Madura kecenderungan bersifat alkalis. Hal ini disebabkan masih tingginya kandungan unsur basa, terutama kalsium (Ca), karena bahan induknya yang berasal dari endapan batu kapur yang kaya akan unsur basa dan pencucian basa-basa tidak seintensif sebagaimana dengan daerah bercurah hujan tinggi, sehingga tanah masih kaya akan unsur basa tersebut [5]. Sementara pada pH basa P tidak larut cenderung berikatan dengan Ca membentuk kompleks Ca-fosfat salah satunya dalam bentuk ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) [19].

Kemampuan isolat bakteri pelarut fosfat ditandai dengan terbentuknya zona bening (*halozone*) di sekitar koloni bakteri [11]. Daerah bening di sekitar koloni isolat merupakan indikasi adanya aktivitas bakteri dalam melarutkan P terikat. Bakteri-bakteri pelarut fosfat tersebut melarutkan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ yang terdapat dalam media Pikovskaya. Luas daerah bening secara kualitatif menunjukkan tingkat kemampuan bakteri pelarut fosfat dalam melarutkan P dari fosfat tak larut mengubahnya menjadi bentuk terlarut [20].



Gambar 2. Uji Potensi Isolat PO8 pada Medium Agar Pikovskaya

Dari hasil pengukuran diameter zona bening kemudian didapatkan tingkat efisiensi pelarut fosfat masing-masing isolat. Efisiensi pelarut dari masing-masing isolat dapat dihitung berdasarkan hubungan antara diameter koloni dengan diameter zona bening (*halozon*) [12].



Gambar 3. Grafik Efisiensi Pelarut Fosfat Isolat Bakteri Genus *Edwardsiella* (PO6) dan *Corynebacterium* (PO8)

Berdasarkan hasil uji potensi terhadap kedua isolat *Edwardsiella* dan *Corynebacterium* menunjukkan hasil yang tidak berbeda nyata yaitu, 43,86 dan 45,63. Hasil ini menunjukkan bahwa kedua bakteri ini berpotensi sebagai *biofertilizer* sehingga dapat meningkatkan kesuburan tanah.

Spesies bakteri yang berbeda kemungkinan memiliki jalur metabolisme yang berbeda [21]. Mekanisme pelarutan fosfat oleh bakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu pengasaman (*acidifikasi*) dan reaksi enzimatik. Pengasaman terjadi karena adanya asam-asam organik yang dihasilkan oleh bakteri melalui metabolisme glukosa sebagai sumber karbon.

Asam organik tersebut antara lain asam sitrat, asam glutamat, asam suksinat, asam laktat, asam oksalat, asam glioksalat, asam malat, asam fumarat, asam tartrat dan asam α -ketobutirat. Asam organik tersebut akan mengkelat kation dalam bentuk kompleks yang stabil dengan Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} dan Al^{3+} [22].

Selain dengan asam organik, P dapat dilepas dari senyawa organik dalam tanah melalui tiga kelompok enzim:

1. Fosfatase nonspesifik, yang melakukan fosforilasi terhadap ikatan fosfoester bahan organik.
2. Fitase, yang secara spesifik menyebabkan P terlepas dari asam fitat.
3. Fosfonatase dan lyase C-P, enzim yang dapat melakukan pemecahan C-P pada organofosfat [7].

Fosfatase asam dan fitase merupakan yang paling sering ditemukan aktivitasnya karena substrat kedua enzim tersebut dominan di dalam tanah. Setiap enzim memiliki reaksi spesifik terhadap substrat. Salah satu contohnya adalah reaksi fosfatase dalam mengatalisis hidrolisis fosfomonoester yang dilakukan oleh bakteri genus *Corynebacterium* [23]. Fosfatase termasuk dalam enzim ekstraseluler yang disekresikan dan diaktifkan melalui membran sitoplasma [24].

Tahapan reaksi fosfatase mengatalisis hidrolisis fosfomonoester adalah sebagai berikut:

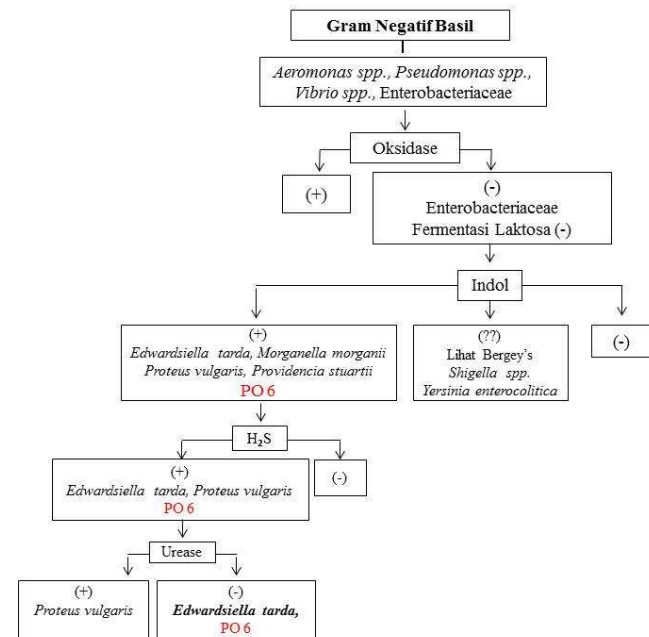
1. Ikatan non-kovalen substrat dan enzim.
2. Pelepasan grup alkohol dari ikatan kompleks dan ortofosfat membentuk ikatan kovalen dengan enzim membentuk senyawa enzim fosforil.
3. Pengikatan air oleh senyawa enzim fosforil membentuk ikatan non-kovalen.
4. Pelepasan ortofosfat dan regenerasi enzim bebas [24].

Meskipun berbagai mekanisme pelarutan fosfat telah diketahui, masih terdapat beberapa kelompok bakteri yang belum diketahui secara spesifik mekanisme yang digunakan dalam melarutkan fosfat, salah satunya *Edwardsiella*, Namun, bakteri ini telah dilaporkan dapat melarutkan fosfat [25].

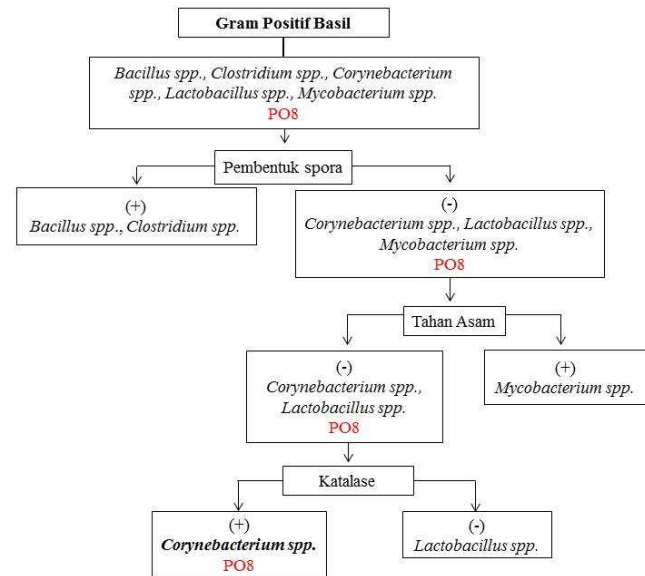
IV. KESIMPULAN

Berdasarkan hasil isolasi dan karakterisasi, dapat disimpulkan bahwa kedua isolat PO6 dan PO8 masing-masing kecenderungan masuk ke dalam genus *Edwardsiella* dan *Corynebacterium*. Kedua isolat ini memiliki kemampuan dalam melarutkan fosfat berdasarkan hasil perhitungan efisiensi pelarut fosfat sehingga dapat dijadikan sebagai *biofertilizer* untuk meningkatkan kesuburan tanah.

LAMPIRAN



Gambar 3. Bagan Alir Karakterisasi *Edwardsiella*



Gambar 4. Bagan Alir Karakterisasi *Corynebacterium*

UCAPAN TERIMA KASIH

“Penulis H mengucapkan terima kasih kepada Dr. Nurul Jadid, M. Sc. dan Dra. Nurlita Abdulgani, M. Si. atas bantuan, kritik dan saran dalam pengerjaan penelitian ini.”

DAFTAR PUSTAKA

[1] Romadhon, “Kajian Indeks Kepekaan Lingkungan Dalam Sumenep (Studi Kasus Pulau Sapudi, Poteran dan Giliyang)”, *Embryo* Vol. 5 (2008) 1-13.
 [2] Anonim. (2013), Potensi Cabai Sumenep. Pemerintah Kabupaten Sumenep, [online], <http://humaspemkabsumenep.com/2013/12/potensi-cabai-sumenep/>.

[3] S. Supriyadi, “Kandungan Bahan Organik Sebagai Dasar Pengelolaan Tanah di Lahan Kering Madura,” *Embryo* Vol. 5(2008) 176-183.
 [4] S. Supriyadi, “Kesuburan Tanah di Lahan Kering Madura,” *Embryo* Vol. 4 (2007) 124-131.
 [5] P. Marschner, *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Third Edition. USA: Elsevier Ltd (2012).
 [6] D. Elfiati, “Peranan Mikroba Pelarut Fosfat Terhadap Pertumbuhan Tanaman” *e-USU Repository*. Sumatera Utara: Jurusan Kehutanan Fakultas Pertanian Universitas Sumatera Utara (2005).
 [7] H. Rodrı́guez, R. Fraga, T. Gonzalez dan Y. Bashan, “Genetics of Phosphate Solubilization and Its Potential Applications for Improving Plant Growth-Promoting Bacteria,” in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Salamanca. Spain, Jul. 16-19, (2002), Edited by E. Vela’ zquez, and C. R. Barrueco., Netherlands: Springer.
 [8] S. Widawati, dan Suliasih. “Populasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) di Cikaniki, Gunung Botol, dan Ciptarasa, serta Kemampuannya Melarutkan P Terikat di Media Pikovskaya Padat.” *Biodiversitas* Vol. 7 (2006) 109-113.
 [9] E.M. Premono. “Jasad Renik Pelarut Fosfat, Pengaruhnya Terhadap P Tanah dan Efisiensi Pemupukan P Tanaman Tebu” *Disertasi*. Bogor: Program Pascasarjana IPB (1994).
 [10] H.A. Alikhani, N. S. Rastin, and H. Antoun, “Phosphate Solubilization Activity of Rhizobia Native to Iranian Soils. First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization,” in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Salamanca. Spain, Jul. 16-19, (2002), Edited by E. Vela’ zquez, and C. R. Barrueco., Netherlands: Springer.
 [11] S. Purwaningsih, “Isolasi, Populasi dan Karakterisasi Bakteri Pelarut Fosfat pada Tanah dari Taman Nasional Bogani Nani Wartabone, Sulawesi Utara,” *Biologi* Vol. 3 (2003) 22-31.
 [12] K. Ramachandra, V. Srinivasan, S. Hamza, dan M. Anandaraj, “Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from the Rhizosphere Soil and Its Growth Promotion on Black Pepper (*Piper nigrum* L.) Cuttings” in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Salamanca. Spain, Jul. 16-19, (2002), Edited by E. Vela’ zquez, and C. R. Barrueco., Netherlands: Springer.
 [13] Harley dan Prescott, *Laboratory Exercises in Microbiology*. Fifth Edition New York: McGraw-Hill Companies (2002).
 [14] J.G. Holt, N.R. Krieg, P. Sneath, J. T. Staley and S.T. Williams, *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. USA: Williams and Wilkins Pub (1994).
 [15] T. Hermann, “Industrial Production of Amino Acids by Coryneform Bacteria” *Journal Biotechnology* Vol. 104 (2003) 1-3.
 [16] O. Tsuzukibashi, S. Uchibori, N. Kuwahara, T. Kobayashi, K. Takada dan M. Hirasawa, “A Selective Medium for The Isolation of Corynebacterium Species in Oral Cavities” *Journal of Microbiological Methods* Vol. xxx (2014) xxx-xxx.
 [17] J.M. Janda dan S.L. Abbott, “Infections Associated With the Genus *Edwardsiella*: the Role of *Edwardsiella tarda* in Human Disease,” *Clinical Infectious Diseases* Vol. 17 (1993) 742-8.
 [18] L.C. Lima, A.A. Fernandes, A.A.P. Costa, F.O. Velasco, R.C. Leite dan J.L. Hacket, “Isolation and Characterization of *Edwardsiella tarda* from Pacu Myleus Micans” *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* Vol. 60 (2008) 275-277.
 [19] Y.P. Chen, P.D. Rekha, A.B. Arun, F.T. Shen, W.-A. Lai and C.C. Young, “Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities,” *Applied Soil Ecology* Vol. 34 (2002) 33-41.
 [20] J.E. Cunningham and C. Kuiuack, “Production of Citric and Oxalic Acid and Solubilization of Calcium Phosphate by *Penicillium bilaii*,” *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 58 (1992) 1451-1458.
 [21] S.K. Barik, C.S. Pursuhothaman dan A.N. Mohanty, “Phosphatase Activity with Reference to Bacteria and Phosphorus in Tropical Freshwater aquaculture pond systems,” *Aquaculture Research* Vol. 32 (2001) 819-832.
 [22] A.H. Goldstein dan P.U. Krishnaraj, “Phosphate solubilizing microorganisms vs. phosphate mobilizing microorganisms: What separates a phenotype from a trait?,” in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Salamanca. Spain, Jul. 16-19, (2002), Edited by E. Vela’ zquez, and C. R. Barrueco., Netherlands: Springer.

- [23] Suciati, "Mikoflora Tanah Tanaman Pisang dan Ubi Kayu pada Lahan Gambut dan Tanah Aluvial di Bengkulu," *Biodiversitas* Vol. 7 (2006) 303-306.
- [24] B.B. Jana, "Distribution Pattern and Role of Phosphate Solubilizing Bacteria in the Enhancement of Fertilizer Value of Rock Phosphate in Aquaculture Ponds: State-of-the-Art," in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Salamanca. Spain, Jul. 16-19, (2002), Edited by E. Vela´zquez, and C. R. Barrueco., Netherlands: Springer.
- [25] P. Kämpfer, "Taxonomy of phosphate solubilizing bacteria," in *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, Salamanca. Spain, Jul. 16-19, (2002), Edited by E. Vela´zquez, and C. R. Barrueco., Netherlands: Springer.