

6. BAKTERI PENAMBAT NITROGEN

R.D.M. Simanungkalit, Rasti Saraswati, Ratih Dewi Hastuti, dan Edi Husen

Summary

Nitrogen-fixing bacteria. The chapter deals with taxonomy, distribution, mechanism of nitrogen fixation, inoculant technology and utilization of inoculant. There are two groups of nitrogen-fixing bacteria, e.i free-living nitrogen-fixing bacteria and symbiotic nitrogen-fixing bacteria. Though of the latest development in the taxonomy of symbiotic nitrogen fixing bacteria in the world, very little progress made in identifying indigenous bacteria, so it is very difficult to know how rich is the diversity of rhizobia in Indonesia. Rhizobial inoculant has been produced commercially in the 1980's in order to support the national intensification program of soybean. Methods of inoculant production has followed the existing standards of production technology. Successful inoculation has been shown in some soybean growing areas. Currently, rhizobial inoculant in the form of compound biofertilizer, in which soybean-infecting rhizobia are mixed with other functional group microbes such as phosphate-solubilizing microbes and free-living nitrogen-fixing bacteria. However, production technology of compound biofertilizer has not developed yet.

Kebutuhan bakteri akan unsur N dapat dipenuhi dari sumber N yang terdapat dalam berbagai senyawa organik maupun dari N_2 udara. Beragam jenis bakteri bertanggung jawab pada penambatan N_2 secara hayati, mulai dari Sianobakter (ganggang hijau biru) dan bakteri fotosintetik pada air tergenang dan permukaan tanah sampai pada bakteri heterotrofik dalam tanah dan zona akar (Ladha and Reddy, 1995; Boddey *et al.*, 1995; Kyuma, 2004). Bakteri mampu melakukan penambatan nitrogen udara, baik melalui nonsimbiosis (*free-living nitrogen-fixing bacteria*) maupun simbiosis (*root-nodulating bacteria*).

Bakteri penambat N_2 hidup bebas (nonsimbiosis)

Berbagai jenis bakteri penambat N_2 yang hidup-bebas (non-simbiotik) di tanah sawah tercantum dalam Tabel 1.

Tabel 1. Berbagai jenis bakteri penambat N₂ yang hidup-bebas (non-simbiotik) pada tanah sawah

Bakteri	
1. Bakteri fotosintetik	
<i>Rhodospirillaceae</i>	<i>Rhodospirillum</i> , <i>Rhodopseudomonas</i> , <i>Rhodomicrobium</i>
<i>Chromatiaceae</i>	<i>Chromatium</i> , <i>Ectothiorhodospira</i> , <i>Triospirillum</i>
<i>Chlorobiaceae</i>	<i>Chlorobium</i> , <i>Chloropseudomonas</i>
2. Bakteri aerobik gram-negatif	
<i>Azotobacteriaceae</i>	<i>Azotobacter</i> , <i>Azotomonas</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Derxia</i>
<i>Pseudomonadeceae</i>	<i>Pseudomonas</i> (<i>P. azotogensis</i>)
3. Bakteri anaerobik fakultatif gram-negatif	
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i> (<i>K. pneumoniae</i>), <i>Enterobacter</i> (<i>E. cloecae</i>), <i>Escherichia</i> (<i>E. intermedia</i>), <i>Flavobacterium</i> sp.
4. Bakteri anaerobik gram-negatif	<i>Desulfovibrio</i> (<i>D. vulgaris</i> , <i>D. desulfuricans</i>)
5. Bakteri pembentuk metan	
<i>Methanobacteriaceae</i>	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanobacillus</i>
6. Bakteri pembentuk spora	
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus</i> (<i>B. polymyxa</i> , <i>B. macerans</i> , <i>B.</i> <i>circulans</i>), <i>Clostridium</i> (<i>C. pasteurianum</i> , <i>C. butyricum</i>), <i>Desulfotomaculum</i> sp.
7. Bakteri analog Actinomycetes	
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i> (<i>M. flavum</i>)
Ganggang hijau biru	
1. Alga hijau- biru pembentuk heterosista	
<i>Nostocaceae</i>	<i>Anabaena</i> , <i>Anabaenopsis</i> , <i>Aphizomenon</i> , <i>Aulosira</i> , <i>Chlorogloepsis</i> , <i>Cylindrospermum</i> , <i>Nostoc</i>
<i>Stigonemataceae</i>	<i>Hapalosiphon</i> , <i>Mustigocladus</i> , <i>Stigonema</i>
<i>Scytonemataceae</i>	<i>Microchaete</i> , <i>Scytonema</i> , <i>Tolypotrix</i>
<i>Rivulariaceae</i>	<i>Calothrix</i>
2. Alga hijau-biru yang tidak membentuk heterosista	
<i>Chloococcaceae</i>	<i>Anacystis</i> , <i>Aphanothece</i> , <i>Gloecapsa</i> , <i>Gloeothece</i> , <i>Microcystis</i>
<i>Eentophysalidaceae</i>	<i>Chlorogloea</i>
<i>Oscillatoriaceae</i>	<i>Lyngbya</i> , <i>Oscillatoria</i> , <i>Phormidium</i> , <i>Trichodesmium</i>
<i>Scytonemataceae</i>	<i>Plectonema</i>

Sumber: Kyuma (2004)

Selama ribuan tahun sawah-sawah di Asia dapat mempertahankan kesuburannya karena masih adanya ganggang hijau-biru yang dapat menambat nitrogen di sawah tersebut. Baru setelah padi varietas unggul yang sangat responsif terhadap pupuk anorganik (seperti urea) banyak digunakan petani, ganggang biru-hijau mulai menghilang dari sawah-sawah.

Ganggang hijau biru ini dapat dilihat di sawah dalam bentuk gumpalan seperti lendir di sela-sela rumpun padi (Gambar 1).



Gambar 1. Ganggang hijau-biru yang hidup di sawah
Foto: R.D.M. Simanungkalit

Penelitian untuk mengevaluasi peranan alga hijau biru pada tanah sawah di daerah Yogyakarta pernah dilakukan oleh Jutono (1973). Ia mendapatkan kelimpahan anggota-anggota dari famili Nostocaceae (7 genus dan 12 spesies) dan Oscillatoriaceae (8 genus dan 18 spesies) umumnya lebih tinggi daripada famili-famili lain. Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa pupuk N dan P mempengaruhi komposisi (penurunan jumlah alga hijau biru penambat nitrogen) dan ukuran besarnya populasi (kenaikan biomassa alga).

Ditinjau dari aspek ekologi, bakteri penambat N_2 yang mengkolonisasi tanaman gramineae (rumput-rumputan) dapat dikelompokkan menjadi tiga golongan yaitu: (a) bakteri rizosfer penambat N_2 (diazotrof) (heterotrofik dan fototrofik); (b) bakteri diazotrof endofitik fakultatif; dan (c) bakteri diazotrof endofitik obligat.

Bakteri penambat N_2 di daerah perakaran dan bagian dalam jaringan tanaman padi, yaitu *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Azotobacter*, *Azospirillum* dan *Herbaspirillum* telah terbukti mampu meningkatkan secara nyata penambatan N_2 (James dan Olivares, 1997). Bakteri penambat N_2 pada rizosfer tanaman gramineae, seperti *Azotobacter paspali* dan *Beijerinckia* spp. termasuk salah satu dari kelompok bakteri aerobik yang mengkolonisasi permukaan akar (Baldani *et al.*, 1997). *Azotobacter* merupakan bakteri penambat N_2 yang mampu menghasilkan substansi zat pemacu tumbuh giberelin, sitokinin, dan asam indolasetat, sehingga pemanfaatannya dapat memacu pertumbuhan akar (Alexander, 1977). Populasi *Azotobacter* dalam tanah dipengaruhi oleh pemupukan dan jenis tanaman.

Kelompok prokariotik fotosintetik terbesar dan menyebar secara luas yaitu Sianobakteri (Albrecht, 1998). Kemampuannya menambat N_2 mempunyai implikasi untuk mempertahankan kesuburan ekosistem pada kondisi alami lahan pertanian. Sianobakteri dan bakteri fotosintetik hidup dominan pada air mengalir di permukaan tanah. Sianobakteri yang membentuk spora dapat bertahan hidup lama pada keadaan kering sehingga populasi pada akhir musim kering menjadi melimpah. Pertumbuhan Sianobakteri dalam tanah meningkatkan pembentukan agregat sehingga mempengaruhi infiltrasi, aerasi, dan suhu tanah. Belum ada informasi mengenai eksudat N yang dihasilkan oleh Sianobakteri. Kehadiran Sianobakteri sangat tergantung pada pH dan ketersediaan P tanah. Suhu perairan yang optimum bagi pertumbuhan Sianobakteri yaitu sekitar $30-35^{\circ}C$. Pada musim hujan, kurangnya sinar dan air hujan akan membatasi pertumbuhan Sianobakteri. Sianobakteri mengasimilasi P lebih banyak daripada yang diperlukan untuk hidupnya, dan menyimpannya dalam bentuk polyphosphat yang akan digunakan pada waktu kondisi kekurangan P (Roger and Kulasooriya, 1980). Fotosintesis dapat meningkatkan pH air sawah maka selama masa pertumbuhan, kebanyakan dari N yang dilepas akan dimobilisasi kembali atau akan hilang melalui penguapan dalam bentuk NH_3 , sehingga N yang berasal dari Sianobakteri akan menjadi bentuk tersedia bagi tanaman melalui proses mineralisasi setelah ganggang mati. Besarnya sumbangan Sianobakteri terhadap kebutuhan N tanaman ditentukan oleh besarnya biomassa, masa antara dua musim tanam, laju penambatan N_2 , dan besarnya N tanah yang tersedia bagi tanaman. Potensi N yang disumbangkan oleh bakteri penambat nitrogen yang hidup-bebas tidak terlalu tinggi, karena N yang berhasil ditambat berada di luar jaringan tanaman, sehingga sebagian hilang sebelum diserap oleh tanaman (Ladha et al., 1997).

Potensi N yang disumbangkan oleh bakteri diazotrof endofitik lebih besar dari diazotrof nonendofitik, karena N yang berhasil ditambat tidak ada yang hilang. Kolonisasi bakteri diazotrof endofitik dalam jaringan tanaman dapat mengeksploitasi substrat karbon yang disuplai oleh tanaman tanpa berkompetisi dengan mikroba lain. Bakteri ini seringkali berlokasi dalam akar di bawah tanah atau berada pada jaringan yang kompak, seperti buku batang dan pembuluh xilem, sehingga bakteri ini mampu tumbuh pada lingkungan dengan tekanan O_2 yang rendah yang sangat penting bagi aktivitas enzim nitrogenase (James dan Olivares, 1997). Beberapa bakteri diazotrof endofitik selain mampu menambat N_2 juga mampu mensekresikan asam indol-3-asetat (Ladha et al., 1997). Pada umumnya bakteri diazotrof endofitik tidak menyebabkan penyakit, berproliferasi di dalam jaringan, tetapi tidak membentuk endosimbion di dalam sel tanaman yang hidup. Bakteri diazotrof endofitik biasanya hidup di dalam ruang interseluler atau pembuluh xilem akar, batang, daun, dan permukaan biji (James et al., 2000).

Bakteri diazotrof endofitik fakultatif yang merupakan simbion pada tanaman *Azolla* yaitu *Anabaena azollae*. Bakteri ini tidak pernah dijumpai, hidup bebas, tetapi selalu dijumpai sebagai endofit yang terdapat di dalam rongga atau celah daun *Azolla*. Penambatan nitrogen terjadi pada sel *heterocysts Azolla*, yaitu sel yang berasal dari sel vegetatif yang berubah bentuk menjadi sel yang berdinding tebal, yang tersebar secara teratur di sepanjang filamen.

Bakteri diazotrof endofitik obligat hanya mengkolonisasi bagian dalam akar dan bagian luar (aerial part) tanaman, dan hanya dapat diisolasi dari tanaman inang. Bakteri yang tergolong kelompok ini ialah *Herbaspirillum seropedicae*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* sp, *Burkholderia* sp. (Baldani *et al.*, 1997). Hasil penelitian menunjukkan bahwa *Herbaspirillum* yang diinokulasikan pada benih padi dalam larutan Hoagland yang mengandung ¹⁵N-label dapat meningkatkan 40% total nitrogen tanaman. Infeksi *Herbaspirillum* spp. pada biji tanaman padi terjadi melalui akar dan stomata kemudian ditranslokasikan melalui xilem ke seluruh bagian tanaman (Olivares *et al.*, 1996).

Bakteri bintil akar

Bakteri bintil akar kacang-kacangan yang biasa dikenal dengan nama kolektif rhizobia merupakan bakteri tanah yang mampu melakukan penambatan nitrogen udara melalui simbiosis dengan tanaman kacang-kacangan. Penggunaan *Rhizobium* untuk semua jenis rhizobia masih banyak digunakan pada publikasi (makalah, skripsi, thesis, dan disertasi) di Indonesia, pada hal taksonomi rhizobia sudah banyak berubah. Pada mulanya semua bakteri bintil akar termasuk *Rhizobium leguminosarum*. Bagaimana perkembangan taksonomi itu dapat dilihat pada Tabel 2.

Pemanfaatan rhizobia sebagai inokulan pupuk hayati sangat mendukung upaya peningkatan produktivitas tanaman kacang-kacangan, khususnya kedelai di Indonesia. Kesuksesan inokulasi rhizobia sangat dipengaruhi oleh kesesuaian inokulan rhizobia dengan jenis tanah yang diinokulasi dan faktor kompetisi.

Berdasarkan sequen 16S ribosomal RNA, rhizobia dikelompokkan ke dalam tiga genus, yaitu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* dan *Azorhizobium* (Young *et al.*, 1991; Willems and Collins, 1993; Yanagi and Yamasato, 1993). Selanjutnya Young dan Haukka (1996) mengelompokkan rhizobia menjadi lima genus yaitu *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* dan satu genus yang belum diidentifikasi. De Lajudie *et al.* (1998) menambahkan lagi satu spesies baru yaitu *Allorhizobium undicola*, bakteri penambat nitrogen yang menodulasi *Neptunia natans* di Senegal.

Klasifikasi terbaru rhizobia menjadi enam genus dan satu genus yang belum teridentifikasi dengan spesies-spesies masing-masing genus yang dikenal hingga saat ini seperti ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 2. Perkembangan taksonomi rhizobia

Perkembangan	Sumber
Penamaan <i>Rhizobium leguminosarum</i> untuk semua bakteri bintil akar pada legum	Frank, 1889
Enam spesies bakteri bintil akar pada legum, yaitu: <i>Rhizobium leguminosarum</i> (membentuk bintil pada <i>Lathyrus</i> , <i>Pisum</i> , <i>Vicia and Lens</i>), <i>R. trifolii</i> (membentuk bintil pada <i>Trifolium</i>), <i>R. phaseoli</i> (membentuk bintil pada <i>Phaseolus</i>), <i>R. meliloti</i> (membentuk bintil pada <i>Melilotus</i> , <i>Medicago</i> , <i>Trigonella</i>), <i>R. japonicum</i> (membentuk bintil pada kedelai), <i>R. lupin</i> (membentuk bintil pada <i>Lupinus</i>)	Fred et al., 1932
Bakteri tumbuh cepat dimasukkan pada genus <i>Rhizobium</i> dan bakteri tumbuh lambat dimasukkan pada genus <i>Bradyrhizobium</i>	Jordan, 1982
Penggunaan teknik molekuler untuk mengidentifikasi rhizobia; klasifikasi rhizobia menjadi lima genus, yaitu <i>Rhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> , <i>Mesorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> , dan satu genus belum teridentifikasi	Young and Haukka, 1996
Tambahan satu genus baru pada klasifikasi yang ada, yaitu <i>Allorhizobium</i>	De Lajudie et al., 1998

Tabel 3. Klasifikasi terbaru rhizobia

No	Genus	Spesies
1.	<i>Rhizobium</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> <i>Rhizobium tropici</i> <i>Rhizobium etli</i>
2.	<i>Sinorhizobium</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i> <i>Sinorhizobium fredii</i> <i>Sinorhizobium saheli</i> <i>Sinorhizobium teranga</i>
3.	<i>Mesorhizobium</i>	<i>Rhizobium loti</i> <i>Rhizobium huakuii</i> <i>Rhizobium ciceri</i> <i>Rhizobium tianshanense</i> <i>Rhizobium mediterraneum</i>
4.	<i>Bradyrhizobium</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Bradyrhizobium liaoningense</i>
5.	<i>Azorhizobium</i>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
6	<i>Allorhizobium</i>	<i>Allorhizobium undicola</i>
7	Belum teridentifikasi	<i>Rhizobium galegae</i>

Genus-genus rhizobia dapat dibedakan melalui bentuk dan warna koloni, banyaknya produksi polisakarida ekstraseluler, laju pertumbuhan (waktu yang diperlukan untuk terbentuknya koloni), perubahan pH karena pertumbuhan rhizobia dengan menggunakan indikator bromthimol blue (BTB) (Swift and Bignell, 2001) Perbedaan antara genus-genus ini dapat dilihat seperti di bawah ini:

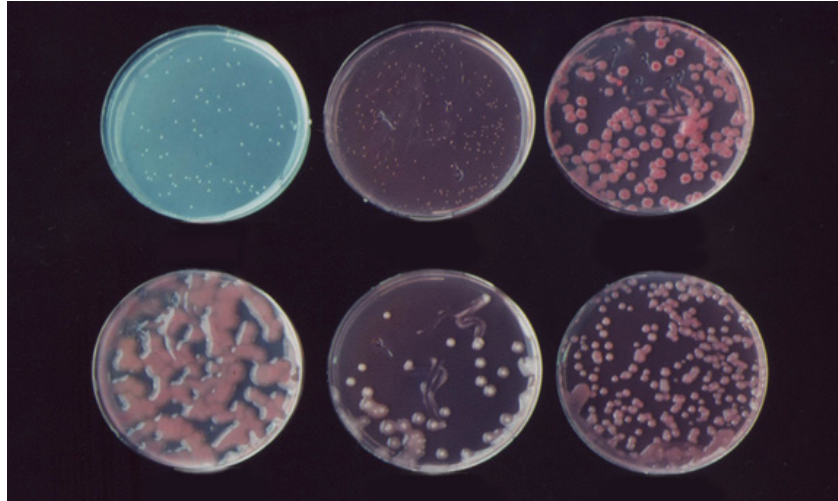
- 1). *Allorhizobium*, *Rhizobium*, dan *Sinorhizobium* memiliki bentuk koloni bulat, cembung (*convex*), diameternya 2-4 mm, produksi polisakarida ekstraseluler biasanya banyak sekali, semi-*translusen*, *raised*, bergetah (*mucilaginous*), kebanyakan bagian tengahnya berwarna kekuning-kuningan (karena perubahan pH), tergolong tumbuh cepat, kurang dari 3 hari.
- 2). *Mesorhizobium*, sama dengan *Rhizobium*, hanya laju tumbuhnya tergolong sedang (*intermediate*) 4-5 hari.
- 3). *Bradyrhizobium* memiliki bentuk koloni bulat, diameternya tidak melebihi 1 mm, produksi polisakarida ekstraseluler dari banyak sekali sampai sedikit (produksi sedikit ini umumnya pada strain yang laju tumbuhnya lebih dari 10 hari), tidak tembus cahaya (*opaque*), jarang yang tembus cahaya (*translusen*), berwarna putih, cembung, teksturnya granuler, bersifat alkalis (menaikkan pH), tergolong tumbuh lambat atau sangat lambat, laju tumbuhnya 6 hari atau lebih.
- 4). *Azorhizobium* memiliki bentuk koloni bulat, diameternya 0,5 mm, berwarna krem, produksi polisakarida ekstraseluler sangat sedikit (lebih sedikit dari *Bradyrhizobium*), reaksinya bersifat alkalis, tergolong tumbuh cepat sampai sedang dengan laju tumbuh 3-4 hari.

Gambar 2 menunjukkan berbagai bentuk koloni rhizobia pada media YMA + merah Kongo. Informasi tentang identifikasi rhizobia asli Indonesia menurut klasifikasi terbaru sangat terbatas. Waluyo (2005) meneliti 21 isolat rhizobia dari Jawa dan Sumatera dengan menggunakan teknik molekuler la mendapatkan tiga spesies rhizobia yang menodulasi kedelai, yaitu *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii*, dan *Sinorhizobium fredii*. Penelitian populasi rhizobia asli Indonesia lebih jauh dengan menggunakan teknik molekuler ini diperlukan untuk dapat mengidentifikasi spesies-spesies lain yang mungkin ada.

Bradyrhizobium

Taksonomi genus *Bradyrhizobium* sampai saat ini masih membingungkan. *Rhizobium* yang dapat menodulasi tanaman kedelai secara efektif dikenal sebagai *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), meskipun pada kenyataannya *Bradyrhizobium japonicum* bukan merupakan mikrosimbion tunggal untuk inang ini. *Strain* lain yang mampu menodulasi tanaman kedelai berupa *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall *et al.*, 1992)

dan *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu et al., 1995). Kemampuan menodulasi tanaman kedelai dari *Bradyrhizobium japonicum* ternyata lebih tinggi daripada *Bradyrhizobium elkanii*.



Gambar 2. Berbagai bentuk koloni rhizobia

Foto: R.D.M. Simanungkalit

Bradyrhizobium sebagai mikroba kemoorganotrof, pada dasarnya dapat menggunakan berbagai karbohidrat, garam-garam mineral dan asam-asam organik (Allen and Allen, 1981). Di bawah ini dibahas perbedaan antara *Bradyrhizobium* dan *Sinorhizobium*. Medium yang cocok untuk pertumbuhan *Bradyrhizobium japonicum* ialah sari kamir manitol (SKM=YEMA) agar. Pada media karbohidrat, pertumbuhan *Bradyrhizobium* biasanya disertai pembentukan lendir polisakarida ekstraseluler dalam jumlah yang cukup banyak. *Bradyrhizobium japonicum* merupakan rhizobia tumbuh lambat (5-7 hari) pada medium SKM, bereaksi basa pada medium manitol-garam mineral, memiliki koloni berbentuk bundar, berwarna putih, berelevasi cembung, cenderung bertekstur granular, berdiameter tidak lebih dari 1 mm dalam masa inkubasi 5-7 hari pada medium SKM pada suhu 28°C, dan umumnya resisten terhadap streptomisin, penisilin G, tetrasiklin, viomisin, vancomisin (Jordan, 1984). Koloni *Bradyrhizobium* yang ditumbuhkan pada medium SKM dan 0,0025% merah kongo, setelah inkubasi 7-10 hari pada suhu 28°C dibedakan menjadi tiga tipe, yaitu LM (large mucoid), LW (large watery) dan SD (small dry). Koloni tipe LM berdiameter >1 mm, berlendir, cembung, *translucens* hingga *opaque*; tipe LW berdiameter >1 mm, berair, datar, *translucens*, cenderung granular

dengan tepian tidak teratur; tipe SD berdiameter <1 mm, cembung, *translucens* hingga hampir *opag*. Kebanyakan *Bradyrhizobium* indigenous memiliki tipe LM (Fuhrmann, 1990).

Asanuma dan Saraswati (1988) menemukan strain dari *Bradyrhizobium japonicum* toleran masam asal Indonesia (pH 4,5; 5uM P; 100 uM Al) yang dapat bertahan hidup di tanah masam di daerah Lampung dengan takaran pengapuran rendah 0,5 x Al-dd (pH 5,1; Al-dd 2,6 me 100 g⁻¹; Mn 216,2 ppm). Keefektifan simbiotik strain toleran masam ini rata-rata di atas 100%. Menurut Simanungkalit *et al.* (1995b) strain dari *B. japonicum* terpilih memiliki kemampuan untuk bertahan hidup dan memperbanyak diri dalam keadaan tergenang pada rizosfir tanaman padi. Hal ini diamati pada penelitian dinamika populasi bakteri bintil akar kedelai pada tanah latosol yang ditanami dengan sistem pola tanam padi/kedelai pada lahan kering dan lahan sawah di Citayam, Jawa Barat.

Gen-gen untuk fungsi simbiotik, nodulasi dan penambatan nitrogen pada *Bradyrhizobium japonicum* berada pada kromosom (Barbour *et al.*, 1992). Selain itu, *Bradyrhizobium japonicum* juga memiliki plasmid berukuran besar yang dikenal sebagai *megaplasmid* (Masterson *et al.*, 1982). *Bradyrhizobium japonicum* memiliki satu kromosom besar dan sirkular berukuran 8.7 Mpb dengan gen-gen simbiotik yang ter-*cluster* pada daerah 380 kpb (Kundig *et al.*, 1993).

Sinorhizobium

Rhizobia tumbuh cepat dan secara *in vitro* bereaksi asam berhasil diisolasi pada tahun 1982 dari bintil akar kedelai yang dikoleksi di Republik Rakyat Cina (RRC). Strain-strain rhizobia tumbuh cepat tersebut infeksiif dan efektif terhadap varietas kedelai primitif Peking (P117852.B), *Glycine soja* Sieb. dan Zucc., namun sedikit atau tidak efektif terhadap varietas kedelai komersial yang tumbuh di USA. Berdasarkan studi perbandingan dalam hal keperluan nutrien, resistensi terhadap antibiotik, toleransi terhadap NaCl, profil plasmid, lokalisasi gen-gen untuk aktivitas nodulasi, hibridisasi DNA, dan karakter-karakter lainnya, maka diusulkan strain-strain tersebut ke dalam spesies baru *Rhizobium fredii*, dengan dua kemovar *fredii* dan *siensis* (Keyser *et al.*, 1982; Scholla and Elkan, 1984). Chen *et al.* (1988) mengadakan studi lebih lanjut sehingga dikenal dua spesies *Sinorhizobium fredii* dan *S. xinjiangensis*.

Genus *Sinorhizobium* pertama kali diusulkan karena adanya beberapa perbedaan antara *R. fredii* dengan rhizobia lain (termasuk *R. meliloti*) (Chen *et al.*, 1988). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Jarvis *et al.* (1992) antara *R. fredii* dan *R. meliloti* memiliki kemiripan, sehingga digolongkan ke dalam genus *Sinorhizobium*.

Sinorhizobium fredii merupakan rhizobia tumbuh cepat yang dapat menodulasi tanaman kedelai. Bakteri ini tumbuh 3-5 hari pada medium SKM, bereaksi asam pada medium manitol-garam mineral, dan koloninya berbentuk bundar, berelevasi cembung, agak tembus cahaya, lengket, berdiameter 2-4 mm selama masa inkubasi 3-5 hari pada medium SKM suhu 28°C, berwarna putih *opaque* seperti susu dan umumnya sensitif terhadap streptomisin, penisilin G, tetrasiklin, viomisin, vancomisin (Jordan, 1984; Somasegaran and Hoben, 1994).

Jika pada *Bradyrhizobium* gen-gen utamanya terdapat pada kromosom, maka pada *Sinorhizobium* gen-gen tersebut terdapat pada plasmid. Gen-gen penyandi nitrogenase (gen *nif*) biasanya terkait dengan gen-gen lain untuk fungsi simbiotik. Pada *Sinorhizobium* juga didapatkan replikon ekstrakromosomal berukuran besar (megaplasmid) (Burkhardt et al., 1987).

Bradyrhizobium dan *Sinorhizobium* memegang peran penting dalam penghematan penggunaan pupuk nitrogen melalui simbiosisnya dengan tanaman kedelai. Pada beberapa daerah pertanaman kedelai di Indonesia kemampuan membentuk bintil akar sangat rendah walaupun telah diinokulasi oleh inokulan rhizobia yang efektif. Ketidakmampuan rhizobia bertahan hidup dalam kondisi tercekam, seperti kondisi masam-AI atau kekeringan, dan kemampuannya bersaing dengan rhizobia pribumi yang telah beradaptasi baik dalam lingkungannya menyebabkan rhizobia tidak dapat berkembang dengan baik. Untuk mengatasi masalah tersebut telah dilakukan koleksi *Bradyrhizobium* dan *Sinorhizobium* dari beberapa daerah sentra produksi kedelai di Indonesia, identifikasi dan seleksi strain yang mempunyai kemampuan menambat N tinggi berdaya kompetisi tinggi terhadap rhizobia pribumi dan tahan hidup dalam kondisi tercekam (tahan masam-AI dan tahan kekekeringan). Strain-strain yang unggul yang diperoleh selanjutnya dimanfaatkan untuk penelitian selanjutnya, dalam hal ini untuk pengembangan pupuk mikroba multiguna untuk meningkatkan efisiensi pemupukan menunjang swasembada kedelai.

Berdasarkan klasifikasi baru, terjadi perubahan nama genus/spesies yang menodulasi kacang-kacangan (beberapa contoh ditunjukkan pada Tabel 4). Tanaman kedelai dinodulasi oleh empat spesies (*Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense*, dan *Sinorhizobium fredii*). Akar *Sesbania rostrata* dinodulasi *Sinorhizobium indiaense*, sedangkan batangnya oleh *Azorhizobium caulinodans*. *Phaseolus vulgaris* dinodulasi oleh empat spesies genus *Rhizobium*.

Pembentukan bintil merupakan ciri dari bakteri penambat N₂ simbiotik. Semua bintil dibentuk pada akar, kecuali pada *Sesbania rostrata* bintil tidak hanya terbentuk pada akar tetapi juga pada batang seperti terlihat pada Gambar 3.

Tabel 4. Genus dan spesies rhizobia berbagai legum

Legum	Genus/spesies rhizobia	Keterangan
Kedelai (<i>Glycine max</i>)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Jordan (1982)
	<i>B. elkanii</i>	Kuykendall <i>et al.</i> (1992)
	<i>B. liaoningense</i>	Xu <i>et al.</i> (1995)
	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Scholla <i>et al.</i> (1984)
Sesbania (<i>Sesbania rostrata</i>)	<i>Sinorhizobium indiaense</i> (bintil akar)	Ogasawara <i>et al.</i> (2003)
	<i>Azorhizobium caulinodans</i> (bintil batang)	Dreyfus <i>et al.</i> (1988)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Rhizobium etli</i>	Segovia <i>et al.</i> (1993)
	<i>R. gallicum</i>	Amarger <i>et al.</i> (1997)
	<i>R. giardini</i>	Amarger <i>et al.</i> (1997)
	<i>R. tropici</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991

Mekanisme penambatan nitrogen

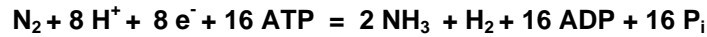
Konversi N_2 dari udara menjadi amonia dimediasi (dibantu) oleh enzim nitrogenase. Banyaknya N_2 yang dikonversi menjadi amonia sangat tergantung pada kondisi fisik, kimia, dan biologi tanah. Ketersediaan sumber energi (C-organik) di lingkungan rizosfir merupakan faktor utama yang menentukan banyaknya nitrogen yang dihasilkan (Alexander, 1977; Zuberer, 1998). Penambahan sisa-sisa tanaman (biomassa) sebagai sumber C ke dalam tanah memacu perkembangan populasi bakteri penambat N. Ini menjelaskan mengapa jumlah nitrogen yang ditambat oleh bakteri bervariasi di tiap tempat tergantung pada ketersediaan energi dan kemampuan bakteri penambat N bersaing dengan mikroba lain yang hidup dan perkembangbiakannya juga bergantung kepada sumber energi yang sama.



Gambar 3. Akar kedelai berbintil (Gambar atas) dan batang *Sesbania rostrata* berbintil (Gambar bawah)

Foto: R.D.M. Simanungkalit

Mekanisme penambatan nitrogen secara biologis dapat digambarkan melalui persamaan di bawah ini. Dua molekul amonia dihasilkan dari satu molekul gas nitrogen dengan menggunakan 16 molekul ATP dan pasokan elektron dan proton (ion hidrogen).



Reaksi ini hanya dilakukan oleh bakteri prokariot, menggunakan suatu kompleks enzim nitrogenase. Enzim ini mengandung dua molekul protein yaitu satu molekul protein besi dan satu molekul protein molibden-besi. Reaksi ini berlangsung ketika molekul N_2 terikat pada kompleks enzim nitrogenase. Protein Fe mula-mula direduksi oleh elektron yang diberikan oleh ferredoksin. Kemudian protein Fe reduksi mengikat ATP dan mereduksi protein molibden-besi, yang memberikan elektron kepada N_2 , sehingga menghasilkan $\text{NH}=\text{NH}$. Pada dua daur berikutnya proses ini (masing-masing membutuhkan elektron yang disumbangkan oleh ferredoksin) $\text{NH}=\text{NH}$ direduksi menjadi $\text{H}_2\text{N}-\text{NH}_2$, dan selanjutnya direduksi menjadi NH_3 . Tergantung pada jenis mikroba, ferredoksin reduksi yang memasok elektron untuk proses ini diperoleh melalui fotosintesis, respirasi atau fermentasi.

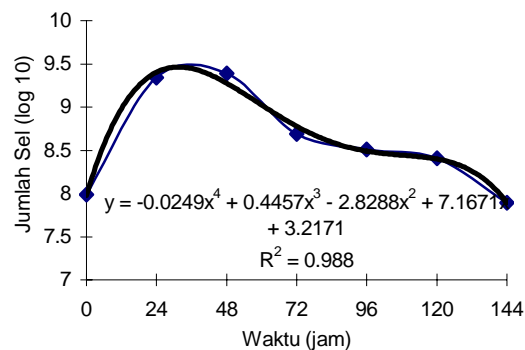
Teknologi produksi inokulan

Sistem teknik produksi yang unggul dan ekonomis dapat diperoleh dengan menggunakan strain mikroba yang efektif dengan formula bahan pembawa yang sesuai melalui proses produksi yang sederhana. Teknik produksi yang selama ini dilakukan lebih banyak bersifat skala kecil yang dibesarkan, bukan skala besar yang sebenarnya. Pengalaman di India menunjukkan bahwa di awal 1980-an, inokulan rhizobia dihasilkan dari dalam labu kocok, sehingga jumlah dan mutu hasilnya sangat buruk. Di tahun 1990-an, produksi rhizobia dilakukan dalam skala besar yang berorientasi pada pemilihan strain yang sesuai. Di Kanada (Stephens, 1996; komunikasi pribadi) pada tahun 1994 dengan fermentor ukuran 400 l. Namun, karena mutu produknya masih tetap bervariasi dan sulit menurunkan tingkat kontaminasi maka produksinya diubah dengan menggunakan fermentor yang lebih kecil (20 l). Hal penting lainnya yang perlu diperhatikan adalah mutu bahan pembawa, teknik inokulasi, dan mutu air.

Produksi pupuk mikroba multiguna (PMMG) skala besar dilakukan melalui teknologi bioproses untuk mendapatkan teknik produksi inokulan yang efisien dengan produktivitas yang tinggi (Saraswati, 2005). Pada

penggandaan skala (*scaling up*) teknologi produksi PMMG dikembangkan metode yang lebih praktis untuk menjamin kesinambungan proses, dengan kultivasi sistem *batch* melalui pembiakan tahap ganda.

Produksi inokulan dimulai dengan penyiapan biakan pemula pada agar-agar miring hingga inokulasi ke dalam media perbanyakan sari khamir manitol (SKM) cair (Somasegaran and Hoben 1994). Hasil perbanyakan ini digunakan sebagai biakan pemula untuk volume yang lebih besar di dalam fermentor, umumnya volume yang digunakan ialah 5-10% dari volume media cair dalam fermentor. Jenis fermentor yang digunakan biasanya fermentor *airlift* dengan sistem tumpah (*batch*). Fermentor *airlift* tidak menggunakan pengaduk mekanis, tetapi menggunakan penyembur udara sebagai alat pencampur. Fermentor ini lebih ekonomis dibandingkan dengan fermentor berpengaduk karena konstruksinya sederhana. Selama proses produksi, kondisi aseptik sangat diperlukan. Kontaminan biasanya mempunyai laju pertumbuhan yang cepat, berbau busuk, dan menimbulkan busa yang banyak. Media tumbuh harus mampu menyediakan sumber energi berupa C dan garam mineral, disamping aerasi menggunakan *rotary shaker*. Pertumbuhan optimum rhizobia terjadi pada selang suhu 25-30 °C dan pH 6,8-7. Penerapan bioproses dalam perbanyakan massal inokulan rhizobia telah dipelajari dalam skala laboratorium dan pabrik pilot oleh Saraswati *et al.* (1994). Gambar 4 menunjukkan kurva pertumbuhan rhizobia pada sistem tumpah. Jumlah sel tertinggi dicapai setelah 24-48 jam.



Gambar 4. Pertumbuhan rhizobia pada perbanyakan sistem tumpah (*batch*)

Bahan pembawa yang umum dipakai untuk rhizobia adalah gambut. Di negara-negara dimana gambut tidak tersedia, dapat digunakan bahan pembawa lain misalnya arang, sabut kelapa, vermikulit, dan tanah mineral. Gambut dikemas dalam kantong polietilen, lalu disterilisasi dengan sinar

gamma (5 Mrad) atau autoklaf. Berbagai uji untuk pengawasan mutu dilakukan terhadap kultur starter dan kultur massa rhizobia. Uji ini meliputi antara lain penetapan pH, pewarnaan gram, uji glukosa pepton, dan jumlah populasi.



Gambar 5. Gambaran pabrik inokulan rhizobia komersial (Pabrik Rhizo-plus)
Foto: Rasti Saraswati

Produksi komersial inokulan rhizobia dibuat dalam fermentor yang berukuran mulai dari beberapa liter sampai beberapa ribu liter. Produksi mulai dengan kultur agar miring murni yang digunakan untuk menginokulasi larutan (*broth*) SKM dalam suatu bejana. Kultur *broth* ini selanjutnya dipakai sebagai kultur starter untuk memproduksi rhizobia dalam jumlah besar di dalam sebuah fermentor logam. Kultur starter 1 l diperlukan untuk menginokulasi 100 l media di dalam fermentor (Somasegaran and Hoben, 1994).

Pemanfaatan bakteri penambat N₂ untuk efisiensi pemupukan N

Salah satu pendekatan untuk melakukan penghematan dalam pemakaian pupuk anorganik, yakni meningkatkan efisiensi penggunaan N-tersedia dalam tanah melalui penambatan N₂, baik secara langsung atau interaksi dengan bakteri penambat N₂. Pemanfaatan bakteri penambat N₂, baik yang diaplikasikan melalui tanah ataupun benih (*seed coating*) mampu meningkatkan efisiensi pemupukan N. Dalam upaya mencapai tujuan akhir strategi jangka panjang, penggunaan bakteri penambat N₂ adalah untuk meningkatkan produksi dan pendapatan usaha tani.

Bakteri penambat N₂ hidup bebas

Berbagai hasil penelitian menunjukkan bahwa inokulasi tanah atau benih dengan *Azotobacter* efektif dapat meningkatkan hasil tanaman. Di daerah-daerah empat musim (temperate regions) jumlah nitrogen yang ditambat oleh *Azotobacter* berkisar antara 10-15 kg ha⁻¹ tahun⁻¹ (Subba-Rao, 1999). Secara umum, jumlah N yang dihasilkan oleh kelompok bakteri ini adalah 10 kg N ha⁻¹ (Tenuta, 2006). Penambatan N₂ lebih besar, yakni sekitar 46 kg N ha⁻¹ (30% dari kebutuhan total N) dilaporkan oleh Malik *et al.* (1997) pada tanaman padi yang diinokulasi dengan inokulan campuran dari beberapa jenis bakteri penambat N₂ hidup bebas dan pemacu tumbuh tanaman, *Azospirillum lipoferum* N-4, *Azospirillum brasilense* Wb-3, *Azoarcus* K-1, *Pseudomonas* 96-51, dan *Zoogloea* Ky-1 (Tabel 5). Kelima jenis bakteri tersebut, selain mampu menambat N₂ dari udara (kecuali *Pseudomonas*), juga mampu memproduksi AIA, sehingga memiliki peran ganda: penyedia N dan pemacu perkembangan tanaman.

Tabel 5. Pengaruh inokulasi bakteri penambat N₂ hidup bebas* terhadap biomassa padi dan penambatan N₂ pada percobaan plot mini

Perlakuan	Jerami + padi	N-total	N ₂ ditambat dari udara	
	kg ha ⁻¹	kg ha ⁻¹	%	kg ha ⁻¹
30 kg ¹⁵ N/ha tanpa inokulasi	15.541	151	2,3	3,5
30 kg ¹⁵ N/ha diinokulasi	16.202	157	28,9	45,5
LSD _{0,05}	775	12	20,0	4,0

* Campuran inokulum *Azospirillum lipoferum* N-4, *Azospirillum brasilense* Wb-3, *Azoarcus* K-1, *Pseudomonas* 96-51, dan *Zoogloea* Ky-1

Sumber: Malik *et al.* (1997)

Penambatan N₂ pada lahan sawah seperti dipublikasikan sebelum tahun 1980, rata-rata 27 kg ha⁻¹. Menurut Ito (1977), berdasarkan studi neraca N selama >70 tahun diperoleh rata-rata pengkayaan N pada permukaan tanah 38,5 kg N ha⁻¹ tahun⁻¹ pada plot tanpa pemupukan, dan 39,6 kg N ha⁻¹ tahun⁻¹ pada plot yang dikapur. Roger dan Ladha (1992) mengemukakan bahwa kandungan N pada lahan sawah irigasi, 80-110 kg N ha⁻¹ diperoleh dari penambatan N₂, air irigasi dan presipitasi, sedangkan 10-20 kg N ha⁻¹ tertinggal di akar pada biji dan jerami.

Keberhasilan sianobakteri tergantung pada kemampuan *strain* yang diintroduksi untuk bertahan hidup, dan berkembang biak pada tanah secara cepat, sehingga sangat diperlukan strain yang cepat tumbuh sebagai bahan inokulum. Di India, Birma, Mesir, dan Cina, inokulum sianobakteri diperbanyak dalam kolam terbuka dan dangkal dengan menginokulasikan biakan pemula (starter) yang merupakan strain majemuk berupa mikroplot berukuran 5-15 cm

yang mengandung 4 kg tanah, 100 g superfosfat, dan insektisida. Bila diperlukan ditambah kapur untuk mencapai pH tanah 7,0-7,5. Dalam 1-3 minggu, pertumbuhan sianobakteri akan menutupi permukaan kolam, lalu dibiarkan kering, dan kemudian serpihannya digunakan pada pertanaman padi sawah dengan takaran 10 kg ha⁻¹ (Venkataraman, 1979). Dalam kondisi yang baik, sianobakteri dapat menambat N₂ sekitar 20-40 kg N ha⁻¹ musim tanam⁻¹ (Roger and Watanabe, 1986). Berdasarkan data yang diperoleh dari neraca N menunjukkan bahwa sianobakteri asli menyumbangkan rata-rata 30 kg N ha⁻¹ musim tanam⁻¹ dan bila diinokulasi pada rizosfir akan menghasilkan rata-rata 337 kg N ha⁻¹ (Roger and Ladha, 1992).

Pemanfaatan penambat N₂ simbiosis

Kandungan N tanah pertanian di Indonesia umumnya rendah dan pada lahan masam juga terjadi penghambatan simbiosis antara rhizobia dengan tanaman kacang-kacangan. Fenomena ini terutama berkaitan dengan pH yang rendah, keracunan Al, dan Mn, serta rendahnya kandungan Ca dan P di dalam tanah (Alva *et al.*, 1987). Namun, pada lahan agak masam yang baru pertama kali ditanami kedelai, inokulasi rhizobia seringkali memberikan respon hasil yang positif (Pasaribu dan McIntosh, 1985). Sunarlim *et al.* (1986) mengemukakan bahwa penanaman kedelai pada lahan bukaan baru, baik berupa lahan kering maupun lahan sawah memerlukan inokulasi rhizobia, demikian juga di daerah-daerah yang tingkat pembintilan dan fiksasi N-nya kurang efektif. Pada tanah Podsolik Merah Kuning (PMK) yang dikapur 2 t ha⁻¹ dan dipupuk 69 kg P₂O₅ dan 50 kg K₂O ha⁻¹ di Lampung, N yang difiksasi sebesar 63,2 kg ha⁻¹ atau 45,4% dari keseluruhan N yang dibutuhkan tanaman. Apabila brangkasan kedelai dikembalikan ke dalam tanah dan kemudian ditanami jagung, maka hasil panen jagung akan sama dengan pemberian pupuk N sebesar 45 kg ha⁻¹ (Sunarlim *et al.*, 1992).

Banyak pertanaman kedelai di Indonesia ditanam pada lahan masam. Kondisi masam merupakan salah satu faktor stres yang dapat menekan pertumbuhan dan simbiosis kebanyakan rhizobia. Akan tetapi sejumlah strain rhizobia menunjukkan ketahanan terhadap stres masam. Penggunaan strain rhizobia tahan masam telah dicoba di tanah Podsolik Merah Kuning oleh Saraswati *et al.* (1989), Brotonegoro *et al.* (1993) dan Simanungkalit *et al.* (1996). Rhizobia tahan masam dapat bertahan hidup di tanah masam Lampung dengan takaran pengapuran rendah 0,5 x Al-dd (pH 5,1; Al-dd 2,6 me 100 g⁻¹; Mn 216,2 ppm) dan keefektifan simbiotik masih di atas 100% (Saraswati *et al.*, 1989). Penggunaan galur yang tidak tahan masam (N 20C) dan tahan masam (TKG 4B) dengan pengapuran 1,5 x Al-dd menghasilkan pertumbuhan, serapan N dan hasil biji kering tertinggi dibandingkan dengan perlakuan pengapuran lainnya (Brotonegoro *et al.*, 1993). Hal ini menunjukkan

bahwa penggunaan galur rhizobia tahan masam tidak mutlak diperlukan apabila kedelai ditumbuhkan di lahan masam yang dikapur. Inokulasi galur *Bradyrhizobium* tahan masam pada lahan masam (pH 4,6) di Taman Bogo (Lampung) yang sebelumnya ditanami padi sawah terus-menerus meningkatkan hasil kedelai sampai 63% pada tanaman yang diinokulasi (Simanungkalit et al., 1996). Inokulasi dengan strain *Bradyrhizobium* tahan masam pada pemberian 50 kg N ha⁻¹ tidak memberikan pengaruh lagi terhadap hasil kedelai, karena proses penambatan N₂ menurun, yang diindikasikan dengan penurunan BK bintil (Tabel 6).

Tabel 6. Pengaruh taraf N dan strain *B. japonicum* terhadap BK bintil dan BK tajuk

Perlakuan	BK bintil ⁸	BK tajuk [*]
Strain <i>B. japonicum</i>		
	mg tanaman ⁻¹	
CB 1809	160 ab	2.990 a
USDA 110	150 b	2.824 ab
FCB 26	170 a	2.715 b
Nitrogen (kg ha⁻¹)		
0	170 a	2.621 c
25	164 a	2.761 bc
50	159 a	2.876 b
100	141 b	3.114 a
Varietas		
Willis	170 a	2.772 a
Sekayu	146 b	2.913 a

* Nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom dan setiap perlakuan tidak berbeda nyata menurut DMRT pada taraf 5%

Sumber: Simanungkalit et al. (1995a)

Pada lahan sawah di Yogyakarta dengan pola tanam padi-padi-kedelai, kombinasi pemberian pupuk N dan inokulasi rhizobia memberikan hasil tertinggi dibandingkan dengan perlakuan kontrol (Sunarlim et al., 1986). Di Indramayu inokulasi rhizobia pada kedelai hanya meningkatkan banyaknya polong isi dan bobot biji. Takaran inokulan yang tinggi (15 g kg⁻¹ benih) dapat meningkatkan banyaknya polong isi sebesar 9,4%, bobot biji tiap tanaman 9,0%, sedangkan bobot bintil akar tidak dipengaruhi oleh pupuk N. Pada percobaan rumah kaca, diperoleh hasil bahwa setiap penambahan pupuk N 10 kg ha⁻¹ mengurangi bobot bintil akar 4,86 mg tanaman⁻¹. Jadi bobot bintil akar menurun secara nyata dengan penambahan pupuk N (Sunarlim dan Achlan, 1994). Penghambatan inokulasi oleh pupuk N terutama disebabkan oleh adanya NO₃ yang berpengaruh secara lokal pada perakaran bukan disebabkan penyerapan N ke dalam tajuk yang sudah cukup. Oleh karena meskipun N tanah yang

didapat dari pupuk cukup, jika inokulan *Rhizobium* tidak efektif, kekurangan N pada tanaman merupakan suatu hal yang mungkin terjadi.

Pada percobaan inokulasi kedelai dengan tiga strain toleran masam *Bradyrhizobium japonicum* pada tanah masam dari Taman Bogo di kamar kaca menunjukkan bahwa pemupukan N yang meningkat cenderung menurunkan bobot kering (BK) bintil (Tabel 6); pada takaran 100 kg N ha⁻¹ bobot kering nodul berkurang 29 mg tanaman⁻¹ (17%), sedangkan bobot kering tajuk meningkat dengan bertambahnya takaran N. Hasil ini mengindikasikan bahwa penggunaan N yang meningkat mengurangi peranan penambatan N₂ secara hayati.

Pada percobaan lapang di Taman Bogo untuk melihat pengaruh tiga taraf pupuk N dan dua strain dari *Bradyrhizobium* tahan masam terhadap hasil dan pertumbuhan kedelai. Terdapat pengaruh interaksi strain X takaran N terhadap bobot kering (BK) brangkasan dan BK biji. Pada setiap perlakuan inokulasi, BK jerami dan BK biji memberikan respon nyata terhadap takaran N, kecuali pada takaran 50 kg N ha⁻¹ yang diinokulasi dengan FCB 152 dibandingkan dengan takaran yang sama tanpa inokulasi terjadi penurunan BK brangkasan (Tabel 7).

Strain-strain inokulan yang diberikan ke tanah/tanaman akan bersaing dengan strain-strain asli di dalam tanah untuk dapat menginfeksi akar. Proporsi bintil yang dibentuk (diokupasi) oleh strain inokulan merupakan indeks kemampuan bersaing terhadap bakteri bintil akar alami (asli). Berdasarkan hasil penelitian Simanungkalit *et al.* (1996), kemampuan bersaing ini sangat dipengaruhi oleh lokasi (site-dependent). Mereka mendapatkan adanya perbedaan okupasi bintil oleh tiga strain inokulan yang berbeda (CB 1809 dan USDA 110, yang digunakan dalam inokulan komersial di Australia, dan FCB 26, yang merupakan strain hasil isolasi dari Rawa Jitu Lampung) pada tiga lokasi tanah masam yang berbeda, masing-masing Muara Bogor (pH 5,8) Taman Bogo di Lampung (pH 4,6). Strain USDA 110 merupakan strain yang paling kurang kompetitif pada ketiga lokasi, sedangkan CB 1809 paling kompetitif di Taman Bogo, dan sama baiknya dengan di Pasar Miring. Strain FCB 26 sama kompetitifnya di Muara dan di Pasar Miring (Tabel 8). Persentase rata-rata okupasi bintil oleh strain-strain FCB 26 sebanyak 76%, strain CB 1809 sebanyak 74%, dan USDA 110 sebanyak 41%. Hasil penelitian ini juga menunjukkan tidak ada kenaikan hasil di Muara meskipun 53% dan 75% dari bintil dibentuk masing-masing oleh CB 1809 dan FCB 26. Di Taman Bogo dengan kedua strain ini masing-masing menaikkan hasil 70% dan 75%, dan pembentukan bintil masing-masing 85% dan 68% oleh kedua strain tersebut. Di Pasar Miring CB 1809 membentuk 85% dari bintil tetapi hanya menaikkan hasil 10% (Simanungkalit *et al.*, 1996). Hasil percobaan ini membantu menjelaskan respon terhadap inokulasi yang berbeda. Dilihat dari aspek

mikrobiologi inokulasi di ketiga lokasi itu berhasil, karena ketiga strain berhasil membentuk bintil, sedangkan dari aspek agronomi inokulasi hanya berhasil di dua lokasi, karena hanya di kedua lokasi ini inokulasi dapat menaikkan hasil.

Tabel 7. Pengaruh taraf N terhadap BK brangkas dan BK biji pada tanah masam di Taman Bogo

Perlakuan inokulasi	Takaran N	kg ha ⁻¹	
		BK brangkas [*]	BK biji [*]
Kontrol	0	1.920 f	1.287 f
	25	2.542 cd	1.664 cd
	50	2.917a	2.134a
FCB 152	0	2.198 e	1.542 e
	25	2.448 d	1.752 bc
	50	2.698 b	2.191a
FCB 26	0	1.990 f	1.513 e
	25	2.209 e	1.788 b
	50	2.917a	2.110a

* Nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom dan setiap perlakuan tidak berbeda nyata menurut DMRT pada taraf 5 %

Sumber: Simanungkalit *et al.* (1996)

Tabel 8. Okupasi bintil kedelai di tiga lokasi karena inokulasi dengan tiga strain

Strain	% okupasi bintil kedelai ¹⁾		
	Taman Bogo	Muara	Pasar Miring
CB 1809 ^{spe R}	85 ^a	53 ^b	85 ^a
USDA 110 ^{str R}	57 ^b	31 ^c	34 ^b
FCB 26 ^{spe R}	68 ^b	75 ^a	86 ^a

1) Nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda pada taraf 5%

Sumber: Simanungkalit *et al.* (1996)

Informasi tentang besarnya penambatan N₂ pada kacang-kacangan melalui simbiosis di Indonesia sangat sedikit. Sisworo *et al.* (1990) pada penelitian dua pola tanam (padi-kedelai-kacang panjang dan padi-jagung-kacang panjang) selama 2 tahun di Kotabumi Lampung dengan sisa tanaman dan pupuk yang dilabel dengan ¹⁵N mendapatkan 12-33% dari total N tanaman pada kacang panjang dan 33% pada kedelai berasal dari penambatan N₂ secara hayati. Penambatan N₂ pada kedelai yang ditetapkan dengan metode ureida pada percobaan lapang di Taman Bogo, Simanungkalit *et al.* (1996) mendapatkan indeks ureida relatif dan % N tajuk dipengaruhi secara nyata oleh takaran N (Tabel 9). Indeks ureida relatif ini menyatakan persentase N pada tanaman yang merupakan hasil

penambatan N_2 . Pemberian 50 kg N ha^{-1} mereduksi N hasil penambatan 10% dibandingkan dengan pemberian 25 kg N ha^{-1} . Dari hasil penelitian di atas terlihat bahwa pemberian starter 25 kg N ha^{-1} merupakan batas dimana penambatan N_2 tertinggi dicapai seperti ditunjukkan oleh indeks ureida relatif dan BK bintil, sedangkan pada pemberian yang lebih tinggi (50 kg N ha^{-1}) sudah terjadi penurunan penambatan N_2 .

Tabel 9. Pengaruh taraf N terhadap % N tajuk dan indeks ureida relatif pada tanah masam di Taman Bogo

Taraf N	% N pada tajuk	Indeks ureida relatif
kg N ha^{-1}		%
0	3,38 b	49,9a
25	3,60 b	50,2a
50	4,00a	40,4b

* Nilai rata-rata yang diikuti huruf yang sama pada setiap kolom dan setiap perlakuan tidak berbeda nyata menurut DMRT pada taraf 5%

Sumber: Simanungkalit *et al.* (1996)

Pada percobaan lain (Simanungkalit *et al.*, 1998), 23 strain *B. japonicum* hasil skrining toleran masam diuji pada tanah masam di empat lokasi: Toto Projo (pH 4,32) dan Taman Bogo (pH 4,50) di Lampung, Bumi Asih (pH 4,64) di Kalimantan Selatan, dan Bontobili (pH 5,56) di Sulawesi Selatan. Ke-23 strain berbeda penampilan dan keefektifannya menambat N_2 di keempat lokasi. Di Toto Projo hanya tiga dari 12 strain (FCB 190/1, FCB 193/3, dan FCB 63/2) yang dapat meningkatkan hasil kedelai 31-41%, sedangkan di Taman Bogo ke-23 strain tidak dapat meningkatkan hasil kedelai karena tanah di lokasi ini mengandung rhizobia alami yang sama efisiennya dengan strain yang terkandung dalam inokulan. Sepuluh dari ke-23 strain (FCB 178/1, FCB 249/3, FCB 229/3, FCB 230/3, FCB 44/2, FCB 187/3, FCB 31/1, FCB 246/3, FCB 251/3, dan 151/2) dapat meningkatkan hasil 38-74% di Bontobili. Meskipun nodulasi lebih baik ke-23 strain yang diuji di Bumi Asih tidak meningkatkan hasil, karena pertumbuhan kedelai terhambat oleh kondisi tanah yang buruk. Dari hasil percobaan di atas dapat disimpulkan bahwa toleransi potensial terhadap kondisi masam pada medium buatan di laboratorium tidak menjamin bahwa strain-strain tersebut akan menunjukkan toleransinya pada kondisi lapangan, karena kondisi agrokologis dimana kedelai tumbuh sangat beragam.

Tabel 10. Rata-rata kenaikan produksi kedelai (kg ha^{-1}) dari hasil pengujian PMMG di lahan petani di delapan lokasi pertanaman kedelai di Jawa dan Lampung pada musim kering 1995/1996-1997/1998

Lokasi	Produksi		Selisih kenaikan produksi
	Tanpa PMMG 25N-100P-100K	Dengan PMMG ON-50P-100K	
	kg ha^{-1}		
Lahan sawah, Muktihardjo, Pati (1995/1996)	1.096	1.412	316
Lahan masam, Seputih Banyak, Lampung (1995/1996)	837	1.060	223
Desa Danaraja, Kab. Banyumas (1996/1997)	1.550	1.791	241
Desa Carikan, Kab. Magetan (1996/1997)	2.930	3.100	170
Desa Ciranjang, Kab. Cianjur (1996/1997)	1.630	1.670	40
Pasuruan, Lokai I (1997/1998)	1.700	1.820	120
Pasuruan, Lokasi II (1997/1998)	1.890	1.990	100
Desa Bojen Kec. Penimbing, Kab. Pandeglang (1997/1998)	1.270	2.000	730
Selang	837-2.930	1.060-3.100	40-730
Rata-rata produksi			242,5

Dalam upaya pengembangan pupuk hayati guna peningkatan produksi dan efisiensi pemupukan menunjang keberlanjutan sistem produksi pangan (khususnya kedelai), tim peneliti pupuk hayati Badan Litbang Pertanian telah menciptakan suatu sistem teknologi produksi yang unggul dan ekonomis dengan strategi pengembangan pupuk mikroba multiguna (PMMG) yang bersifat komplementer, bermutu unggul, dan konsisten. PMMG tersebut mempergunakan formula mikroba efektif dan formula bahan pembawa yang sesuai melalui proses produksi secara teknis aseptis mutakhir, didukung dengan sistem pengawasan mutu dan distribusi yang mampu menjamin keunggulan produk sampai ke tingkat pengguna. Interaksinya positif yakni berpengaruh sangat baik pada pertumbuhan tanaman dan hasil biji kering per hektar.

Dari hasil demonstrasi plot pemberian PMMG pada tanaman kedelai di delapan lokasi pertanaman kedelai di Jawa dan Lampung pada musim kering 1995/1996-1997/1998 menunjukkan hasil yang positif (Tabel 10). Pemberian PMMG dapat menekan kebutuhan pupuk urea sampai 100% dan SP-36 sampai 50% dari takaran anjuran baku. Dari hasil demonstrasi plot di sembilan lokasi pertanaman kedelai lahan petani penggunaan PMMG dapat meningkatkan hasil kedelai dengan selang kenaikan $0,4-7,3 \text{ ku ha}^{-1}$ ($2,42 \text{ ku}$

ha⁻¹) atau 5-45%, sedangkan dari hasil uji multilokasi yang dilaksanakan oleh proyek pengembangan kedelai P2RTPTPH dan pola sekolah lapang, pola pertumbuhan, dan pola unggulan di sembilan provinsi tersebar di 30 Kabupaten pada tahun 1997/1998 menunjukkan peningkatan hasil 4,79-5,40 ku ha⁻¹ (42,09- 56,69%). Keuntungan usaha tani kedelai dengan pemanfaatan PMMG adalah peningkatan nilai pendapatan petani, yang meliputi penghematan biaya usaha tani dan peningkatan produksi kedelai.

DAFTAR PUSTAKA

- Albrecht, S.L. 1998. Eukaryotic Algae and Cyanobacteria. p. 94-131. In D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel, and D.A. Zuberer (Eds.). Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice-Hall, Inc.
- Alexander, M. 1977. Introduction to Soil Mycrobiology. 2nd Ed. John Wiley and Sons. New York. 467 p.
- Allen, O.N. and E.A. Allen. 1981. The Leguminosae. A Source Book of Characteristic, Uses and Nodulation. The University of Wisconsin Press, Wisconsin.
- Alva, A.K., D.G. Edwards, C.J. Asher, and S. Suthipradit. 1987. Effect of acid soil infertility factors on growth and nodulation of soybean. Agron. J. 79: 302-306.
- Amarger N., V. Macheret, and G. Laguerre. 1997. *Rhizobium gallicum* sp.nov., *Rhizobium giardinii* sp.nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. Int. J.Sys. Bacteriol. 47: 996-1006.
- Asanuma, S. and R. Saraswati. 1988. Expectation and potential for improved production: Use of *Rhizobium* in soybean production in Indonesia. Food Legumes - Coarse Grains Newsletter 5: 6-7, 21, 23.
- Baldani, J.I., L. Caruso Vera, L.D. Baldani, Silvia R. Goi, and J. Dobereiner. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. Soil Biol. Biochem. 29(5/6): 911-922.
- Barbour, W.M., S.H. Wang, and G. Stacey. 1992. Molecular genetics of *Bradyrhizobium* symbiosis. In Biological Nitrogen Fixation. G. Stacey, R.H. Borris, and H.J. Evans (Eds.). Chapman and Hall Inc., USA.
- Boddey, R.M., de O.C. Oliviera, S. Urquiaga, V.M. Reis, F.L. Olivares, V.L.D. Baldani, and J. Dobereiner. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. Plant Soil 174: 195-209.
- Brotonegoro, S., B. Santosa, and R.D. Hastuti. 1993. Growth responses and yields of soybean plants moculated with different strains of

- Bradyrhizobium japonicum* in acid podsolc soil amended with or without lime. In Workshop on Biological Nitrogen Fixation by Soybean in Acid Soils. Information LIPI, Bogor.
- Burkhardt, B., D. Schillik, and A. Puhler. 1987. Physical characterization of *Rhizobium meliloti* megaplasmids. Plasmid 17: 13-25.
- Chen, W.X., G.H. Yan, and J.L. Li. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Sys. Bacteriol. 38: 392-397.
- De Lajudie, P., E. Laurent-Fulele, A. Willems, U. Torck R. Coopman, M.D. Collins, K. Kersters, B. Dreyfus, and M. Gilles. 1998. *Allorhizobium undicola* sp.nov, sp.nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. Int. J. Sys. Bacteriol. 48: 1.277-1.290.
- Dreyfus, B., J.L. Garcia, and M. Gillis. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov., sp.nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Sys. Bacteriol. 38: 89-98.
- Frank, B. 1889. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft 7: 332-346.
- Fred, E.B., I.L. Baldwin, and E. McCoy. 1932. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin, Madison.
- Fuhrmann, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morphological, rhizobitoxine, and hydrogenase phenotypes. Appl. Environ. Microbiol. 56: 224-229.
- Ito, J. 1977. Behaviour and fixation of nitrogen in paddy field. Niigata Agronomy 13: 51-61 (In Japanese).
- James, E., and F.L. Olivares. 1997. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. Plant Science 17: 77-119.
- James, E.K., P. Gyaneshwara, W.L. Barraquio, N. Mathan, and J.K. Ladha. 2000. Endophytic diazotroph associated with rice. In J.K. Ladha and P.M. Reddy (Eds.). The Quest for Nitrogen Fixation in Rice. IRRI.
- Jarvis, B.D.W., H.L. Downer, and J.P.W. Young. 1992. Phylogeny of fast growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* and *Rhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. Int. J. Sys. Bacteriol. 42: 93-96.
- Jordan, D.C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. Int. J. Sys. Bacteriol. 32: 136-139.

- Jutono. 1973. Blue-green algae in rice soils of Jogjakarta, Central Java. *Soil Biol. Biochem.* 5(1): 91-95.
- Keyser, H.H., B.B. Bohlool, T.S. Hu, and D.F. Weber. 1982. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybeans. *Science* 215: 1.631-1.632.
- Kundig, C., H. Hennecke, and M. Gottfert. 1993. Correlated physical and genetic map of *Bradyrhizobium japonicum* 110 genome. *J. Bacteriol.* 175: 613-622.
- Kuykendall, L.D., B. Saxena, T.E. Devine, and S.E. Udell. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian J. Microbiol.* 38: 501-505.
- Kyuma, K. 2004. Paddy Soil Science. Kyoto University Press and Trans Pacific Press.
- Ladha, J.K. and P.M. Reddy. 1995. Extension of nitrogen fixation to rice: necessity and possibilities. *Geo Journal* 35: 363-372.
- Ladha, J.K, F.J. de Bruijn, and K.A. Malik. 1997. Introducing assessing opportunities for nitrogen fixation in rice: a frontier project. *Plant and Soil* 194: 1-10.
- Malik, K.A., R. Bilal, S. Mehnaz, G. Rasul, M.S. Mirza, and S. Ali. 1997. Association of nitrogen-fixing, plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) with kallar grass and rice. *Plant and Soil* 194: 37-44.
- Martinez-Romero, E., L. Segovia, F.M. Mercante, A.A. Franco, P. Graham, and M.A. Pardo. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L, beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 41: 417-426.
- Masterson, R.V., P.R. Russel, and A.G. Atherly. 1982. Nitrogen fixation (*nif*) genes and large plasmid of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 152: 928-931.
- Ogasawara, M., T.Suzuki, L.Muthoh, K.Annapurna, N.K.Arora, Y.Nishimura, and D.K.Maheshwari. 2003. *Sinorhizobium indiaense* sp.nov., and *Sinorhizobium abri* sp.nov. isolated from tropical legumes *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. *Symbiosis* 34: 53-68.
- Olivares, F.L., V.L.D. Baldani, V.M. Reis, J.I. Baldani, and J. Dobereiner. 1996. Occurrence of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. In roots, stems and leaves predominantly of gramineae. *Biology Fertility Soils* 21: 197-200.
- Pasaribu, D. and D.L. McIntosh. 1985. Increasing tropical soybean production with improved cropping systems as management. *In* S. Shanmugasundaram and E.W. Sulzberger (Eds.). *Soybean in Tropical*

- and Subtropical Cropping Systems. Proceedings of a Symposium Tsukuba, Japan, 26 September-1 Oktober 1983. AVRDC Taiwan.
- Roger, P.A. and S.A. Kulasooriya. 1980. Blue-green Algae and Rice. International Rice Research Institute, Los Banos.
- Roger, P.A. and I. Watanabe. 1986. Technologies for utilizing biological nitrogen fixation in wetland rice: potentialities, current usage, and limiting factors. *Fertilizer Research* 9: 39-77.
- Roger P.A. and J.K. Ladha. 1992. Biological N₂ fixation in wetland rice fields: estimation and contribution to nitrogen balance. *Plant Soil* 141: 41-55.
- Saraswati, R , Z. Nunung, and H. Inoue. 1989. Evaluation of Rhizobium acid-Al tolerant to Red Yellow Podzolic soil. hlm. 285-291. *Dalam Buletin Seminar Hasil Penelitian Tanaman Pangan Balittan Bogor*, 13-14 Pebruari 1989.
- Saraswati, R , M. Kobayashi, T. Match, and J. Sekiya. 1994. Characterization of *Rhizobium* and *Azorhizobium* a root- and stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania* species. Contribution. Central Research Institute for Food Crops, Agency for Agricultural Research and Development, Bogor, Indonesia. 82: 1-11.
- Saraswati, R. 2005. Rhizobial production sistem. pp. 40-44. *In The Future Use of Legume Nodulating Bacteria (LNB) In Indonesia. Technical and Economic Perspective*. Univ. Lampung. Bandar Lampung.
- Scholla, M.H. and Elkan G.H. 1984. *Rhizobium fredii* sp nov. a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 34: 484-486.
- Segovia, L., J.P.W. Young, and E. Martinez-Romero. 1993. Reclasification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains in a new species, *Rhizobium etli* sp.nov. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 43: 374-377.
- Simanungkalit, R.D.M., A. Indrasumunar, R.D. Hastuti E. Pratiwi, and R.J. Roughley. 1995a. Soybean response on nodulation to starter nitrogen and inoculation with *Bradyrhizobium japonicum*. *Indonesian. J. Crop Science* 10: 25-32.
- Simanungkalit, R.D.M , A. Indrasumunar, E. Pratiwi, R.D. Hastuti, and R.J.Roughley. 1995b. Population dynamics of soybean root-nodule bacteria in latosol soil used for upland and lowland rice/soybean cropping systems in West Java, Indonesia. *Soil Biol. Biochem.* 27: 625-628.
- Simanungkalit, R.D.M , A. Indrasumunar, E. Pratiwi, R.D. Hastuti, and R.J. Roughley.1996. Inoculation of soybean with selected strains of

- Bradyrhizobium japonicum* can increase yield on acid soils in Indonesia. *Soil Biol. Biochem.* 28: 257-259.
- Simanungkalit, R.D.M , T. Hutagalung, R.D. Hastuti, E. Pratiwi, and R.J. Roughley. 1998. Effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* strains selected for acid-tolerance to increase yields of soybean grown in acid soils in Indonesia. *Indonesian J. Crop Sci.* 13: 32-40.
- Sisworo, W.H., M.M. Mitrosuhardjo, H. Rasyid, and R.J.K. Myers. 1990. The relative roles of N fixation, fertilizer, crop residues and soil in supplying N in multiple cropping system in humid tropical upland system. *Plant Soil* 121: 73-82.
- Somasegaran, P. and H.J. Hoben. 1994. *Handbook for Rhizobia*. Springer-Verlag, New York.
- Subba-Rao, N.S. 1999. *Soil Microbiology (Fourth Edition of Soil Microorganisms and Plant Growth)*. Science Publishers, Inc. USA.
- Sunarlim, N., D. Pasaribu, dan W. Gunawan. 1986. Pengaruh pengolahan tanah, mulsa, inokulasi, dan pemupukan nitrogen terhadap pertumbuhan dan hasil kedelai. *Penelitian Agronomi Kacang-kacangan* 7: 18-28. Balai Penelitian Tanaman Pangan, Bogor.
- Sunarlim, N , D. Pasaribu and W. Gunawan. 1992. Effect of nitrogen and rhizobium inoculation on growth and yield of soybean in red-yellow podzolic soil. *Penelitian Pertanian* 12: 3, 116-118.
- Sunarlim, N dan M. Achlan. 1994. Kajian manfaat pupuk N dan Inokulasi Rhizobium pada kedelai yang ditanam setelah padi sawah. *Risalah Hasil Penelitian Tanaman Pangan* 3: 149-157.
- Swift, M. and D. Bignell (Eds.). 2001. *Standards Methods for Assessment of Soil Biodiversity and Land Use Practice*. International Centre for Research in Agroforestry, Southeast Asian Regional Research Programme, Bogor, Indonesia.
- Tenuta, M. 2006. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Prospect for increasing nutrient acquisition and disease control. Available: http://www.umanitoba.ca/afs/agronomists_conf/2003/pdf/tenuta_rhizo_bacteria.pdf. [Accessed 22 July 2006].
- Venkataraman, G.S. 1979. Algal inoculation on rice fields. p. 331-321. *In* International Rice Research Institute. *Nitrogen and Rice*. Los Banos, Philippines.
- Waluyo, S.H. 2005. Biological Nitrogen Fixation of Soybean in Acid Soils of Sumatra, Indonesia. PhD Thesis, Wageningen University, The Netherlands.

- Willems, A. and M.D. Collins. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 43: 305-313.
- Xu, L.M., C. Ge, Z. Cui, J. Li, and H. Fan. 1995. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. *Int. J. Sys. Bacteriol.* 45: 706-711.
- Yanagi, M. and K. Yamasato. 1993. Phylogenetic analysis of the family *Rhizobiaceae* and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiology Lett.* 107: 115-120.
- Young, J.P.W., H.L. Downer, & B.D. Eardly. 1991. Phylogeny of the phototrophic rhizobium strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* 173: 2.271-2.277.
- Young, J.P.W. and K.E. Haukka. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol.* 133: 87-94.
- Zuberer, D.A. and W.S. Silver. 1978. Biological dinitrogen fixation (Acetylene reduction) associated with Florida mangrove. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 567-575.