

Karakterisasi mikroba perakaran (PGPR) agen penting pendukung pupuk organik hayati

Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) supporting organic biofertilizer

TIRTA KUMALA DEWI^{1*}, ELA SEKAR ARUM², HARTATI IMAMUDDIN¹, SARJIYA ANTONIUS¹

¹Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi LIPI, Jl. Raya Jakarta-Bogor KM 46 Cibinong, Bogor 16911, Jawa Barat. Tel.: +62-21-87907636, Fax.: +62-21-87907612, *e-mail: tirta.kdewi@gmail.com

²Program Studi Biologi, FMIPA, Universitas Padjadjaran, Bandung, Jawa Barat.

Manuskrip diterima: 5 Desember 2014. Revisi disetujui: 13 Januari 2015.

Abstrak. Dewi TK, Arum ES, Imamuddin H, Antonius S. 2015. Karakterisasi mikroba perakaran (PGPR) agen penting pendukung pupuk organik hayati. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2): 289-295.* Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) merupakan mikroba tanah yang terdapat pada akar tanaman yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman dan perlindungan terhadap patogen tertentu. PGPR mampu menghasilkan hormon tumbuhan auxin, giberellin dan sitokinin, sebagai pelarut fosfat dan fiksasi nitrogen yang berperan sebagai pendukung Pupuk Organik Hayati Beyonic StarTmik. Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi mikroba perakaran agen penting pendukung Pupuk Organik Hayati Beyonic seri StarTmik. Sampel tanah yang di gunakan berasal dari Lampung dan Ngawi. Mikroba hasil isolasi di tumbuhkan pada media Pikovskaya, skim milk agar (protease) dan TSB (*Tryptic Soy Broth*). Bakteri yang mampu menghasilkan IAA (*Indole-3-Acetic-Acid*) secara kualitatif akan berwarna merah muda ketika ditumbuhkan pada media TSB dengan precursor *L-Tryptophan* dan ditetesi dengan reagen *Salkowski* dan di inkubasi dalam ruang gelap selama 1 jam. Analisis IAA secara kuantitatif dilakukan dengan dua metode yaitu spektrofotometri dan HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Hasil isolasi menunjukkan bahwa beberapa isolat mampu menghasilkan enzim protease dan sebagai pelarut fosfat serta satu isolat yaitu isolat IC mampu menghasilkan IAA tertinggi dengan konsentrasi 158,651 ppm dengan konsentasi *L-tryptophan* 200 ppm.

Kata kunci: PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, pupuk organik hayati, Indole-3-acetic acid

Abstract. Dewi TK, Arum ES, Imamuddin H, Antonius S. 2015. *Characterization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) supporting organic biofertilizer.* *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon 1 (2): 289-295.* Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) is a group of bacteria that is actively colonizing plant roots, increasing plant growth and providing protection against certain pathogens. PGPR produces plant hormones (auxin, gibberellin, and cytokinin), promotes phosphate solubilization and performs nitrogen fixation which is very important for Beyonic StarTmik organic biofertilizer. The aims of this research are to characterize PGPR potentially producing IAA (Indole-3-Acetic Acid), protease enzyme and phosphate solubilising agents that support Beyonic StarTmik organic biofertilizer. Isolated bacteria were cultured in Pikovskaya, skim milk agar (protease) and TSB (Tryptic Soy Broth) medium. The Indole 3 -Acetic Acid production was analyzed by Spectrophotometry and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). Seven isolates were able to produce protease enzyme, and one isolate was able to produce high amount of IAA (158.651 ppm) with 200 pp L-Tryptophan.

Keywords: PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*, organic biofertilizer, indole-3-acetic acid

PENDAHULUAN

Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) merupakan mikroba tanah yang terdapat pada akar tanaman yang dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman dan perlindungan terhadap patogen tertentu (Van Loon 2007). PGPR mampu menghasilkan hormon tumbuhan seperti auxin, giberellin dan sitokinin, sebagai pelarut fosfat dan fiksasi nitrogen (Spaepen et al. 2009; Vessey 2003). Zat pengatur tumbuh (ZPT) merupakan senyawa yang sangat vital guna mengawali, menginisiasi terjadinya pertumbuhan tanaman, berperan penting dari pertumbuhan perakaran

sampai pembentukan buah. Menariknya bahwa ZPT juga bisa dihasilkan oleh mikroba perakaran (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*/PGPR) yang jauh lebih baik manfaatnya dibanding ZPT yang disintesis melalui reaksi kimia biasa. Untuk itu PGPR penghasil hormon tumbuh berperan vital dalam pembuatan pupuk organik hayati (POH) seri StarTmik, Beyonic-LIPI. Pupuk hayati majemuk mengandung lebih dari satu jenis/strain mikroba, diantaranya adalah bakteri penambat N dan bakteri pelarut P yang juga mampu menghasilkan hormon pertumbuhan serta bakteri yang berperan sebagai agen biokontrol (Kloepper 1993).

Protease merupakan salah satu kelompok enzim yang di manfaatkan dalam bidang industri. Protease mengkatalisis reaksi hidrolisis dengan memotong ikatan peptida dalam protein (Akhtaruzzaman et al. 2012). Protease yang berasal dari mikroba lebih banyak di gunakan di bandingkan enzim yang berasal dari tanaman maupun hewan (Mukesh Kumar et al. 2012). Beberapa contoh mikroba yang menghasilkan protease antara lain *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Clostridium*, *Bacillus* dan *Pseudomonas* (Kumar et al. 2005). Protease yang berasal dari mikroorganisme memiliki beberapa peran penting dalam bidang industri (misalnya detergen, makanan, kulit, dan tekstil) dan bioremediasi lingkungan. Protease memiliki kemampuan untuk mengurai atau menghilangkan protein kompleks pada lingkungan yang tercemar (Gitishree and Prasad 2010; Vishwanatha et al. 2010)

IAA (*Indole-3-Acetic-Acid*) merupakan hormon tumbuh yang memegang peranan penting untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Mikroba yang mampu menghasilkan IAA dapat meningkatkan pertumbuhan dan perpanjangan akar sehingga permukaan akar menjadi lebih luas dan akhirnya tanaman mampu menyerap nutrisi dari dalam tanah lebih banyak (Bolero et al. 2007). *L-Tryptophan* merupakan asam amino yang berfungsi sebagai precursor dalam biosintesis auxin (IAA) pada tanaman dan mikroba (Patil et al. 2011). Fosfor (P) merupakan makronutrien yang berfungsi untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Beberapa mikroba mampu mengubah P yang tidak terlarut dalam tanah menjadi bentuk yang terlarut sehingga dapat di gunakan secara langsung oleh tanaman (Pradhan dan Sukla 2005). Penggunaan mikroba pelarut fosfat sebagai inokulan dapat meningkatkan penyerapan P oleh tanaman (Saharan dan Nehra 2011). Mikroba pelarut fosfat banyak digunakan sebagai biofertilizer (Kudashev 1956; Krasilnikov 1957). Aktivitas pelarutan P oleh mikroba ditentukan berdasarkan kemampuan mikroba untuk melepaskan metabolit seperti asam organik yang memiliki gugus karboksil dan hidroksil sebagai agen pengkhelet kation yang berikatan menjadi

fosfat dan kemudian diubah menjadi bentuk yang terlarut (Sagoe et al. 1998).

Penelitian ini bertujuan untuk mengkarakterisasi mikroba yang mempunyai kemampuan menghasilkan hormon tumbuh IAA (*Indole-3-Acetic-Acid*), pelarut fosfat, pengurai protein (protease) sebagai pendukung pupuk organik hayati Beyonic-LIPI seri StarTmik.

BAHAN DAN METODE

Sampel tanah

Sampel tanah yang di gunakan berasal dari tanah area perkebunan nanas PT Great Giant Pineapple, Lampung dan tanah persawahan dari kabupaten Ngawi. Tanah di simpan dalam *poly bag* dan selanjutnya di lakukan isolasi.

Isolasi bakteri pengurai protein, penghasil IAA, dan pelarut fosfat.

Isolasi bakteri penghasil IAA, pengurai protein dan pelarut fosfat di lakukan terhadap tanah yang berasal dari Lampung dan Kabupaten Ngawi. Isolasi dilakukan dengan pengenceran berseri menggunakan metode *plate count*. Pengamatan di lakukan terhadap isolat yang mampu membentuk zona bening pada media Pikosvkaya dan Protease. Pada media TSB pengamatan dilakukan terhadap isolat yang mampu tumbuh dan menghasilkan warna merah muda setelah ditetesi reagen *Salkowski*.

Analisis IAA secara kualitatif

Bakteri yang mampu menghasilkan IAA di uji secara kualitatif dengan metode kolorimetri menggunakan reagen *Salkowski* (Gordon dan Weber 1951). Pembuatan reagen *Salkowski* menurut Gordon dan Weber 1951 yaitu dengan mengambil 1 mL 0.5 M FeCl_3 di tambah 50 mL HClO_4 50% [v/v], selanjutnya disimpan dalam botol yang tidak tembus cahaya atau ditutup dengan aluminium foil. (FeCl_3 0.5M = 1.35 g / 10 mL) (HClO_4 50% = 25 mL HClO_4 + 25 mL aquades).



Gambar 1. Lokasi pengambilan sampel tanah (A) Lampung dan (B) Ngawi

Analisis IAA secara kuantitatif

Analisis dengan metode spektrofotometri menurut Gravel et al. (2007) menggunakan 100 mL media *Tryptic Soy Broth* (TSB) 50 % (*half-strength*). Media yang telah steril tersebut ditambahkan precursor *L-Tryptophan* 200 ppm. Satu mL supernatan dari sampel hasil dari *sentrifuge* selama 10 menit pada 8.000 rpm, kemudian ditambahkan 2 mL larutan reagen *Salkowski*, diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit dan selanjutnya absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 530 nm. Konsentrasi IAA dari sampel di hitung berdasarkan kurva standar dengan standar IAA murni (Gravel et al. 2007). Analisis IAA dengan metode HPLC dilakukan dengan cara mengambil 5 mL sampel di *sentrifuge* pada 10.000 rpm selama 15 menit. Supernatan di ambil kemudian di atur pH nya menjadi 2,8. Selanjutnya di lakukan ekstraksi menggunakan etil asetat dengan perbandingan volume 1: 1 sebanyak 3 kali. Hasil ekstraksi yang di diperoleh kemudian dievaporasi dan di analisis dengan HPLC (Mehnaz dan Lazarovits 2006). Fase gerak yang di gunakan adalah metanol: asam asetat: akuabides (30:1:70 v/v/v). Standar yang di gunakan adalah larutan IAA murni yang di ukur pada keadaan dan kondisi yang sama.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Hasil isolasi yang di lakukan terdapat 8 isolat dari Lampung yaitu IA, IB, IC, ID, IE, IF, IG, IH. Dari isolat-isolat tersebut terdapat 4 isolat yang mampu membentuk zona bening pada media *skim milk agar* yaitu isolat IC, IF, IG dan IH yang berasal dari tanah perkebunan Lampung serta 3 isolat yaitu 4.4, 5.5, 6.3 yang berasal dari tanah persawahan Ngawi.

Uji aktivitas enzim protease dilakukan dengan menggunakan media *skim milk agar*. Media tersebut

umum digunakan dalam uji penapisan aktivitas protease (Deepthi et al. 2012).

Tabel 1. Diameter zona bening yang dihasilkan oleh masing-masing isolat

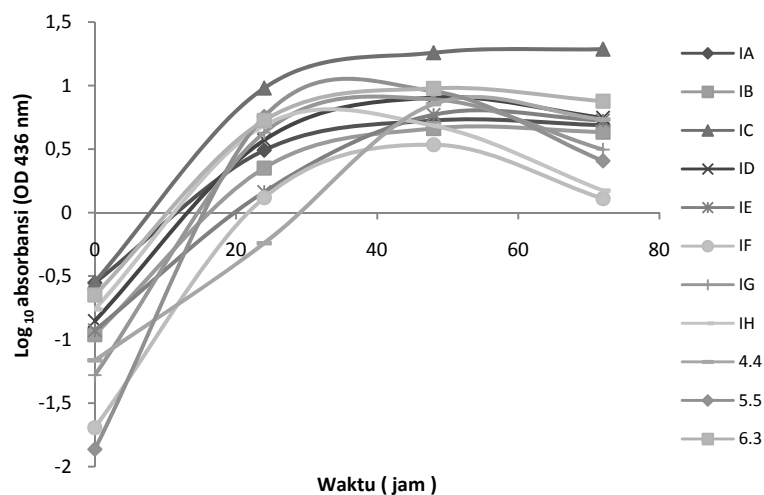
Isolat	Diameter zona bening (cm)	
	Hari ke 2	Hari ke 5
IC	1,1	2,4
IF	1,7	3,5
IG	1,0	3,0
IH	1,8	3,5
4.4	1,3	2,2
5.5	1,2	3,1
6.3	0,9	1,1

Isolate-isolat hasil dari isolasi juga memiliki kemampuan sebagai pelarut fosfat. Hal ini dapat di lihat dari adanya zona bening yang terbentuk pada media *Pikovskaya*.

Pengamatan terhadap isolat yang mampu menghasilkan IAA, di lakukan dengan menumbuhkan isolat-isolat tersebut dalam media TSB dan selanjutnya di lakukan analisis secara kualitatif dan kuantitatif. Gambar 4 menunjukkan hasil pengukuran pertumbuhan masing-masing isolat pada media TSB yang berasal dari tanah Lampung dan Ngawi selama 72 jam. Nilai OD paling tinggi di tunjukkan oleh isolat IC dari Lampung dan isolate 5.5 dari Ngawi.

Bakteri yang mampu menghasilkan IAA akan menghasilkan warna merah muda ketika di tetesi dengan reagen *Salkowski*.

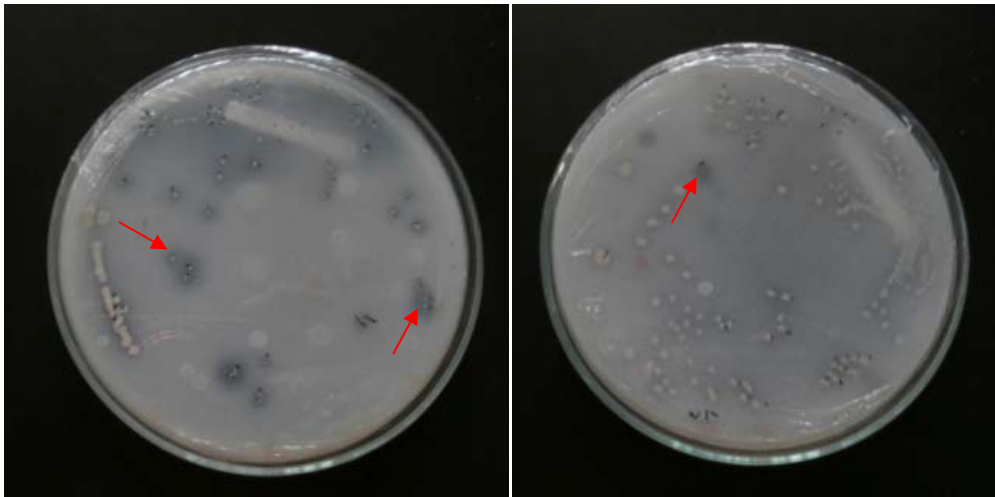
Analisis IAA secara kuantitatif dengan HPLC menunjukkan bahwa isolat yang memiliki kemampuan dalam menghasilkan IAA memiliki puncak kromatogram yang sama dengan puncak kromatogram pada standar IAA.



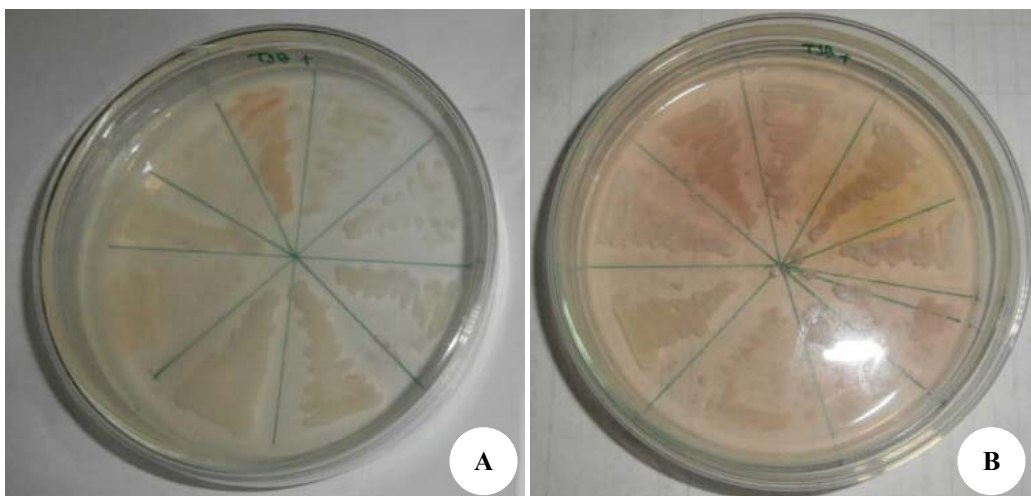
Gambar 4. Kurva pertumbuhan beberapa isolat pada media TSB



Gambar 2. Zona bening yang di hasilkan oleh beberapa isolate pada media *skim milk agar*.



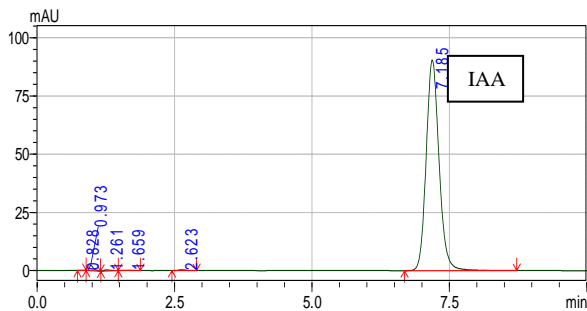
Gambar 3. Zona bening yang di hasilkan oleh beberapa isolat pada media *Pikovskaya*.



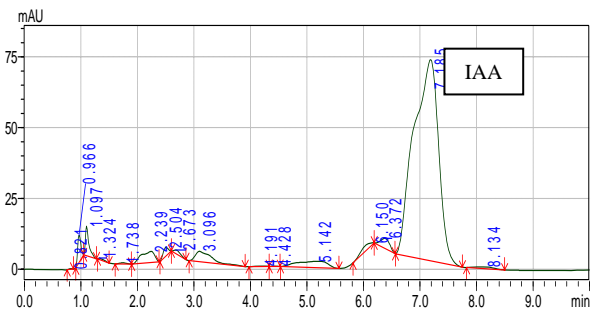
Gambar 5. Bakteri yang mampu menghasilkan IAA berwarna merah muda setelah di tetesi *Salkowski* (A) sebelum di tetesi *Salkowski*, (B) setelah di tetesi *Salkowski*



Gambar 6. Sampel untuk analisis dengan spektrofotometer (A) sebelum ditetesi reagen *Salkowski* (B) sesudah ditetesi reagen *Salkowski*



Gambar 7. Standar IAA



Gambar 8. Isolat yang mampu menghasilkan IAA

Tabel 2. Hasil analisis IAA pada beberapa isolate

Sampel	0 jam	24 jam	48 jam	72 jam
IA	0,359	0,288	0,583	1,454
IB	0,258	1,376	5,339	7,485
IC	0,275	29,919	56,956	158,651
ID	0,217	4,597	4,356	5,437
IE	0,180	0,627	3,705	5,081
IF	0,532	0,963	16,529	11,610
IG	0,244	0,176	1,156	3,780
IH	0,258	2,281	3,329	4,858
4.4	0,220	8,708	8,163	8,386
5.5	0,217	42,685	48,137	27,434
6.3	0,176	2,176	6,376	9,322

Pembahasan

Hasil isolasi menunjukkan beberapa isolat mampu menghasilkan enzim protease. Hal ini di tunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar koloni pada media *skim milk agar* (Gambar 2). Media tersebut mengandung protein berupa kasein. Zona bening yang terbentuk menunjukkan bahwa koloni bakteri mampu menghidrolisis kasein (Ramalaksmi et al. 2012).

Isolat yang di hasilkan juga mempunyai kemampuan sebagai pelarut fosfat (Gambar 3). Aktivitas pelarutan fosfat oleh bakteri melalui beberapa mekanisme antara lain produksi (i) asam organik seperti glukonat, oksalat, suksinat, dll, (Vazquez et al. 2000), (ii) polisakarida (Goenadi et al. 2000), dan (iii) enzim fosfatase (Rodriguez et al. 2000). Bakteri pelarut fosfat juga mampu manghasilkan matabolit sekunder yang lain yaitu hormon tumbuh IAA dan siderofor. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa bakteri pelarut fosfat mampu menghasilkan IAA (Patten dan Glick 2002; Shahab et al. 2009) dan siderofor (Koo dan Cho 2009) membuat bakteri pelarut fosfat cocok untuk pupuk organik (Gupta 2012). Beberapa jenis bakteri memiliki kemampuan sebagai pelarut fosfat baik organik maupun anorganik sehingga menjadi bentuk yang bisa di dimanfaatkan oleh tanaman.

Hasil analisis IAA pada beberapa isolat menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut mampu menghasilkan hormon tumbuh IAA yang sangat penting untuk tanaman. Analisis dilakukan pada waktu inkubasi 24, 48 dan 72 jam. Hormon tumbuh IAA merupakan salah satu produk metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri. Kadar hormon IAA yang dihasilkan oleh bakteri melimpah pada saat fase stasioner. Hal ini dapat di lihat pada isolat IC dan 5.5 yang mampu menghasilkan IAA tertinggi pada fase stasioner.

Produksi IAA akan meningkat pada saat kondisi pertumbuhan menurun, ketersediaan karbon yang terbatas dan dalam kondisi lingkungan pH asam. Kondisi tersebut terjadi pada saat bakteri memasuki fase stasioner. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Patil et al. (2011) yang menyatakan bahwa bakteri mulai menghasilkan IAA pada fase awal pertumbuhan dan mencapai hasil maksimum pada awal fase stasioner. Isolat IC mampu menghasilkan IAA sebesar 158, 651 ppm pada jam ke-72 dan isolate 5.5 menghasilkan IAA sebesar 48,137 ppm pada jam ke-48 (Gambar 4). Hormon tumbuh IAA yang dihasilkan oleh PGPR berfungsi sebagai sinyal molekuler yang penting dalam regulasi perkembangan tanaman, memacu perkembangan perakaran tanaman inang, meningkatkan ketahanan tanaman terhadap patogen dan memacu pertumbuhan tanaman (Shaharoon et al. 2006; Ashrafuzzaman et al. 2009; Joshi dan Bath 2011). Analisis IAA dalam penelitian ini menggunakan asam amino *L-Tryptophan* sebesar 200 ppm yang merupakan prekursor utama yang berperan penting dalam biosintesis IAA. Secara kualitatif bakteri ditumbuhkan pada TSB dengan precursor *L-Tryptophan* kemudian ditetesi dengan reagen *Salkowski* dan di inkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Bakteri yang mampu menghasilkan IAA akan berwarna merah muda (Gambar 5).

Bakteri yang mampu menghasilkan IAA secara kualitatif akan berwarna merah muda karena adanya interaksi antara IAA dengan Fe membentuk senyawa kompleks $[Fe_2(OH)_2(IA)_4]$, IA merupakan *indole-3-acetate*. Interaksi tersebut terjadi pada suasana asam (Kovacs 2009). Menurut Kovacs (2009) reaksi yang terbentuk ada dua macam yaitu reaksi kompleks dan reaksi redoks. Warna merah muda yang semakin pekat menunjukkan kandungan IAA yang dihasilkan oleh bakteri semakin tinggi.

Analisis IAA secara kuantitatif menggunakan metode spektrofotometri. Konsentrasi IAA pada analisis dengan metode spektrofotometri berdasarkan nilai absorbansi yang di serap oleh spektrofotometer UV-Visible. Berdasarkan hukum Lambert-Beer nilai absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi sampel. Panjang gelombang yang digunakan adalah 530 nm berada pada daerah tampak. Panjang gelombang ini dipilih berdasarkan warna yang dihasilkan oleh interaksi antara reagen *Salkowski* dan IAA (Glickmann dan Dessaux 1995) yang menghasilkan warna merah muda (Gambar 6).

Analisis IAA menggunakan HPLC menunjukkan bahwa terdapat puncak kromatogram dengan waktu retensi 7,185 menit, puncak kromatogram tersebut merupakan puncak kromatogram dari IAA. Waktu retensi puncak kromatogram tersebut di bandingkan dengan waktu retensi IAA standar. Konsentrasi IAA yang dihasilkan pada penelitian ini lebih tinggi di bandingkan penelitian yang dilakukan oleh Patil et al. (2011). Pada penelitian ini di hasilkan IAA sebesar 158,651 ppm dengan konsentrasi *L-Tryptophan* 200 ppm sedangkan penelitian Patil et al. (2011) menghasilkan IAA 26,28 ppm dengan konsentrasi *L-Tryptophan* 1200 ppm.

Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa isolat-isolat yang di peroleh dari hasil isolasi tanah Lampung dan Ngawi menunjukkan aktivitas sebagai

pengurai pengurai protein (protease), pelarut fosfat dan penghasil hormon tumbuh IAA. Aktivitas tersebut memegang peranan penting sebagai pendukung Pupuk Organik Hayati Beyonic starTmik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada team laboran dan teknisi (Astri Anggraeni, Ari Rosmalina, Entis Sutisna, Nani Mulyani) laboratorium pupuk organik hayati-LIPI. Penelitian ini dapat terlaksana berkat pendanaan dari Program Prioritas Nasional Pengembangan Pupuk Organik Hayati Mikroba Indonesia Tahun 2009-2014.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhtaruzzaman M, Mozumder NHM, Jamal R, Rahman A, Rahman T. 2012. Isolation and characterization protease enzyme from leguminous seeds. *Agric Sci Res J* 2 (8): 434-440
- Ashrafuzzaman M, Hossen FA, Ismail MR, Hoque MA, Islam MZ, Shahidullah SM, Meon S. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afr J Biotechnol* 8(7): 1247--1252.
- Bolero L, Perrig D, Masciarelli O, Penna C, Cassan F, Luna V. 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 874-880
- Deepthi MK, MS Sudhakar MN, Devamma. 2012. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. from Coringa mangrove soils for Enzyme Production and Antimicrobial Activity. *Int J Pharm Chem Biol Sci* 2(1): 110--116.
- Gitishree D, Prasad MP. 2010. Isolation, purification and mass production of protease enzyme from *Bacillus subtilis*. *Int Res J Microbiol* 1 (2): 026-031.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds reduced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* 61 (2): 793
- Goenadi DH, Sisweto I, Sugiarto Y. 2000. Bioactivation of poorly soluble phosphate rocks with a phosphorus-solubilizing fungus. *Soil Sci Soc Am J* 64: 927-932
- Gordon SA, Weber RP, 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiol* 26:192-195
- Gravel V, Antoun H, Tweddel RJ. 2007. Effect of indole-acetic acid (IAA) on the development of symptoms caused by *Pythium ultimum* on tomato plants. *Eur J Plant Pathol* 119: 457-462
- Gupta M, Kiran S, Gulati A, Singh B, Tewari R. 2012. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aoin-a biosynthesis of aloe barbadensis miller. *Microbiol Res* 167: 358-363
- Joshi P, Bath AB. 2011. Diversity and function of plant growth-promoting rhizobacteria associated with wheat rhizosphere in North Himalaya Region. *Int J Environ Sci* 1(6): 1135-1143.
- Koo SY, Cho KS. 2009. Isolation and characterization of a plant growth rhizobacterium serratia sp. SY5. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1431-1438.
- Kovacs K. 2009. Applications of Mossbauer Spectroscopy in Plant Physiology [Ph.D. Dissertation]. ELTE Chemistry Doctoral School, ELTE Institute of Chemistry, Budapest.
- Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R. 2005. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: Purification and characterization. *Process Biochem*. 40:1701-1705
- Mehnaz S, Lazarovits G. 2007. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microb Ecol* 51: 326-335
- Mukesh Kumar DJ, Pramavathi V, Govindarajan N, Balakumaran MD, Kalaichelvan PT. 2012. Production and purification of alkaline protease from *Bacillus* sp. MPTK 712 isolated from dairy sludge. *Global Veterinaria* 8 (5): 433-439

- Patil NB, Gajbhiye M, Ahiwale SS, Gunjal AB, Kapadnis BP. 2011. Optimization of indole 3-acetic acid (IAA) production by *Acetobacter diazotrophicus* L1 isolated from sugarcane. *J Environ Sci* 2 (1): 307-314.
- Ramalaksmi N, Narendra D, Ramalaksmi M, Roja S, Archana BKN, Maanasa G. 2012. Isolation and characterization of protease producing bacterial from soil and estimation of protease by spectrophotometer. *The Experimen* 1 (1): 1-7
- Rodriguez H, Rossolini GM, Gonzalez T, Li J, Glick BR. 2000. Isolation of a gene from *Burkholderia cepacia* IS-16 encoding a protein that facilitates phosphatase activity. *Curr Microbiol* 40: 362-366
- Sagoe CI, Ando T, Kouno K, Nagaoka T. 1998. Relative importance of protons and solution calcium concentration on phosphate rock dissolution by organic acids. *Soil Sci Plant Nutr* 44: 617-625
- Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA, Khalid A. 2006. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-diaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biol Biochem* 38: 2971--2975.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv Botl Res* 51: 283-320
- Van Loon LC. 2007. Plant responses to plant growth-promoting-rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119:243-254
- Vazquez P, Holguin G, Puente M, Elopez Cortes A, Bashan Y.. 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi arid coastal lagoon. *Biol Fert Soils* 30: 460-468
- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586
- Vishwanatha T, Spoorthi NJain, Reena V, Divyashree BC, Siddalingeshwara KG, Karthic J, Sudipta KM. 2010. Screening of substrates for protease production from *Bacillus licheniformis*. *Int J Eng Sci Technol* 2 (11): 6550-6554.