Bionatura-Jurnal Ilmu-ilmu Hayati dan Fisik
ISSN 1411 - 0903
Vol. 16, No. 1, Maret 2014: 1 - 5

PENGARUH TIMBAL TERHADAP KEPADATAN SEL DAN KADAR EKSOPOLISAKARIDA KULTUR CAIR *Azotobacter*

Hindersah, R.[1] dan Kamaluddin, N.N.[2]
[1]Laboratorium Biologi dan Bioteknologi Tanah Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran Jalan Raya Bandung-Sumedang Km. 21 Jatinangor 45363
[2]Alumni Fakultas Pertanian Universitas Padjadjaran Mahasiswa Program Doktor di Universitas Tsukuba Jepang

ABSTRAK

Kontaminasi timbal (Pb) pada tanah pertanian dapat menyebabkan masalah serius terhadap kesehatan manusia. Cara efektif dan efisien untuk mengurangi Pb dalam tanah adalah fitoremediasi, namun sering terhambat oleh rendahnya mobilisasi Pb di tanah. Penyerapan Pb oleh tanaman akumulator dapat ditingkatkan dengan bioaugmentasi mikroba resisten Pb penghasil eksopolisakarida (EPS) untuk memobilisasi logam. Penelitian ini bertujuan untuk memastikan pengaruh Pb terhadap kepadatan sel dan produksi eksopolisakarida *Azotobacter chroococcum* dan *Azotobacter* sp. LKM 6 pada media cair. Rancangan percobaan laboratorium adalah Rancangan Acak Lengkap. Masing-masing mikroba ditumbuhkan pada media cair yangdikontaminasi Pb sebesar 0,1 mM, dan 1 mM dan diinkubasi pada suhu kamar selama 96 jam. Hasil percobaan menunjukkan bahwa kepadatan sel dan kadar EPS pada kultur *A. chroococcum* tidak dipengaruhi oleh Pb tetapi Pb meningkatkan kepadatan sel *Azotobacter* sp. LKM6. Pada kultur *Azotobacter* sp. LKM6, dengan nyata 0.1 mM Pb menginduksi perbanyakan sel dan produksi EPS. Penelitian ini memperlihatkan *Azotobacter* sp. LKM6 relatif lebih resisten Pb daripada *A. chroococcum.*

Kata kunci: *Azotobacter*, timbal, eksopolisakarida, bioremediasi.

ABSTRACT

Lead (Pb) contamination in agricultural soils might pose serious human health risk. To reduce lead contamination in soils, phytoremediation is one of the most effective and efficient way, however Pb uptake is often limited by low mobilization of Pb in soil. Pb absorption by accumulator plants could be increased by bioaugmentation of microbe producing exopolysaccharide (EPS) which were resistant to Pb. Objective of this study was to verify effect of Pb on cell density and exopolysaccharide content in *Azotobacter chroococcum* and *Azotobacter* sp. LKM6 culture in liquid media. Laboratory experimental was set up in completely randomized design. Each microbe was grown on Pb contaminated media at 0.1 mM, and 1 mM and incubated at room temperature for 96 hours. Experimental results showed that Pb had no effect on cell density of *A. chroococcum* but Pb inceased that of *Azotobacter* sp. LKM6. EPS production in Azotobacter sp. LKM6 culture had been induced by the presence of Pb. This experiment suggested that *Azotobacter* sp. LKM6 was relatively more resistant to Pb than *A. chroococcum.*

Key words: *Azotobacter,* lead, exopolysaccharide, bioremediation.

PENDAHULUAN

Pencemaran agroekosistem oleh logam berat dapat membahayakan rantai makanan, keamanan pangan dan kesehatan manusia. Logam berat nonesensial Timbal (Pb) secara alami terdapat di tanah pertanian namun konsentrasinya dapat meningkat karena polusi udara serta penggunaan kotoran hewan, pupuk anorganik dan pestisida yang mengandung timbal arsenat. Untuk mencegah peningkatan kandungan Pb di lahan pertanian diperlukan suatu metode untuk menurunkan konsentrasinya. Salah satu metode bioremediasi tanah tercemar logam berat adalah fitoremediasi yang menggunakan tanaman untuk mengekstrak, mensekuestrasi dan mendetoksifikasi polutan (Lasat, 2002). Efektivitas fitoremediasi dapat ditingkatkan jika disertai bioaugmentasi dengan mikroba yang dapat menstimulasi serapan dan akumulasi logam berat pada tajuk tanaman fito-remediasi.

Salah satu komponen polimer ekstraseluler bakteri adalah eksopolisakarida (EPS) yang memiliki sifat mengikat polutan logam (Chen *et al*., 1995a; Janecka *et al*., 2002). Polimer ini larut di dalam air, diikat lemah oleh matriks tanah, dan setelah mengadsorpsi logam tidak mudah dimineralisasi sehingga berpotensi meningkatkan mobilitas logam di dalam tanah (Chen *et al.,* 1995a; Czajka*et al*., 1997). Bakteri tanah yang menghasilkan EPS antara lain *Azotobacter* (Vargas-Garcia *et al.,* 2003; Emtiazi *et al.,* 2004; Hindersah *et al.,* 2006). *Azotobacter* mampu berproliferasi dan memproduksi EPS pada kultur dengan logam berat Fe, Zn, dan Cr (Emtiazi *et al.,* 2004) dan Cd (Hindersah *et al*., 2009). Penelitian Wu *et al.,* 2009 menunjukkan bahwa *A. chroococcum* memiliki tingkat ketahanan serta dan pengikatan logam Pb dan Cd yang lebih besar dibanding bakteri *Bacillus megaterium*, sementara Hindersah *et al*., 2009 dalam penelitiannya mendapati bahwa *Azotobacter sp.* LKM6 memiliki resistensi terhadap Cd konsentrasi tinggi dan tetap mampu memproduksi EPS di bawah cekaman $CdCl_2$.

Logam berat, termasuk Pb, memiliki efek negatif terhadap produksi enzim oleh mikroba serta dapat menyebabkan berkurangnya produksi EPS, namun *Azotobacter* mampu mengembangkan sistem resistensi terhadap logam berat melalui fitokelatin yang mengkelat logam dan mensekuestrasinya di vakuola (Vatamaniuk *et al*., 2000). Saat ini belum terdapat banyak informasi mengenai kemampuan dan ketahan-an *Azotobacter* untuk memproduksi EPS pada kultur yang tercemar Pb. Di lapangan, dilaporkan bahwa resistensi *Azotobacter* terhadap logam berat Pb dan Cr termasuk tinggi diantara 17 isolat Azotobacter yang diuji oleh Narula *et al.,* 2012. Informasi resistensi ini diperlukan sebagai dasar bioremediasi tanah yang tercemar Pb oleh *Azotobacter.* Penelitian mengenai *Azotobacter* sebagai mikroba yang mampu memfiksasi N dan memproduksi

fito-hormon sudah banyak dilakukan, tetapi kemampuannya bertahan hidup dan memproduksi EPS pada media yang dicemari timbal belum banyak diteliti. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mempelajari pengaruh beberapa level Pb di dalam media tumbuh terhadap kepadatan sel dan produksi eksopolisakarida *Azotobacter chroococcum* dan *Azotobacter* sp. LKM 6.

BAHAN DAN METODE

Penelitian laboratorium ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap yang terdiri atas tiga taraf perlakuan logam Pb dan tiga ulangan. Bakteri dikulturkan di dalam media Vermani dengan N (Vermani *et al*., 1997) dengan kadar Pb di dalam terdiri atas tanpa dan dengan 0,1 dan 1 mM dalam bentuk timbal nitrat. Penelitian dibuat dua unit, untuk *Azotobacter chroococcum* dan *Azotobacter* sp. LKM6. Kedua isolat bakteri adalah koleksi Laboratorium Biologi Tanah Fakultas Pertanian Unpad. *A. chroococcum* diisolasi dari rizosfer jagung sedangkan *Azotobacter* sp.LKM6 diisolasi dari rizosfer kubis merah. Pelaksanaan penelitian kedua unit dilakukan pada waktu yang sama.

Kedua kultur bakteri dipelihara di media Ashby bebas N dan dipindahtanaman ke agar miring media yang sama 72 jam sebelum penelitian. Biakan murni cair dibuat menggunakan sodium klorida fisiologis steril. Media Vermani cair (10 g sukrosa, 1 g K_2HPO_4), 0.5 g $MgSO_4$, 0.5 g NaCl, 0.1 g $FeSO_4$), (1 g $CaCO_3$, 10 g Na_2MoO_4, 0.1 g $NaNO_3$, 1 L akuades) sebanyak 25 mL media di dalam erlenmeyer 100 mL yang mengandung Pb sesuai perlakuan diseterilisasi selama 20 menit pada suhu 121ºC menggunakan otoklaf. Sebanyak 10% biakan murni dengan kepadatan sel 10^8 CFU mL^{-1} dimasukkan kedalam media Vermani steril dengan kadar Pb sesuai perlakuan. Kultur diinkubasi pada suhu kamar (25°C-27°C) di atas shaker 115 rpm selama 96 jam. Kepadatan sel ditetapkan dengan Total Plate Count dan kadar eksopolisakarida ditetapkan dengan metoda gravimetri dihitung setiap 24 jam.

Eksopolisakarida dengan metode gravimetri setelah ekstraksi dari kultur cair dengan metode menurut Vermani (Vermani *et al*., 1997) yang telah dimodifikasi oleh Hindersah *et al*., (2006). Sel mikroba dipisahkan melalui proses sentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 20 menit pada suhu 4ºC. Aseton p.a. ditambahkan ke dalam supernatan dengan perbandingan 2:1 (v:v) dan disimpan selama satu malam pada suhu 4ºC. Ekstrak kemudian kembali disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 20 menit. Endapan EPS dipisahkan dari cairan di atasnya kemudian dipindahkan ke atas kertas saring Whatman No. 1 yang telah dipanaskan pada suhu 35ºC, dan dikeringkan pada suhu yang sama satu jam sebelum dimasukkan dalam desikator selama 20 menit. Berat EPS ditentukan dengan cara mengurangi berat kering akhir dengan berat kertas saring Whatman No. 1 yang sudah diketahui. Data dianalisis dengan analisis ragam (Uji F) pada taraf kepercayaan 5% dan jika terdapat signifikansi efek perlakuan terhadap variabel maka dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan pada taraf 5%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kepadatan Sel

Kedua isolat bakteri memberikan respons pertumbuhan yang berbeda terhadap keberadaan kontaminan Pb di dalam media cair. Pemberian 0,1 dan 1 mM $Pb(NO_3)_2$ tidak berpengaruh terhadap kepadatan sel *Azotobacter chroococcum* pada 24, 48, dan 92 jam tetapi 0,1 mM Pb meningkatkan kepadatan sel sampai dua kali lipat pada 72 jam (Tabel 1). Dengan mengabaikan uji statistik, populasi sel berpotensi menurun sampai 19% pada saat 96 jam inkubasi.

Tabel 1. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Pb terhadap Kepadatan Sel *Azotobacter chroococcum*di dalam kultur cair

Kadar Pb	Waktu (Jam)			
	24	48	72	96
	----------10^9 cfu mL^{-1}----------			
Kontrol	2,4a	2,7a	4,8c	7,1a
0,1 mM	2,1a	3,0a	4,2b	6,1a
1,0 mM	2,1a	3,5a	2,2a	5,7a

Keterangan: Nilai yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Duncan pada taraf 5%

Resistensi terhadap Pb lebih diperlihatkan oleh *Azotobacter* sp. LKM6, Pb meningkatkan kepadatan sel di dalam kultur dengan nyata kecuali pada 48 jam setelah inkubasi (Tabel 2). Meskipun demikian, pada 48 jam terlihat potensi peningkatan populasi meskipun secara statistik tidak nyata. *Azotobacter* sp. LKM6 telah beradaptasi hidup di dalam kultur yang mengandung $CdCl_2$ sampai 10 mM (Hindersah *et al*., 2009) sedangkan *A. choroococcum* belum pernah diinduksi dengan logam berat apapun.

Tabel 2. Pengaruh Berbagai Konsentrasi Pb terhadap Kepadatan Sel *Azotobacter* sp. LKM 6 di dalam kultur cair

Kadar Pb	Waktu Inkubasi (Jam)			
	24	48	72	96
	----------10^9 cfu mL^{-1}----------			
Kontrol	5,9a	15,4a	26,0a	30,9a
0,1 mM	7,7a	20,3a	29,8b	58,2b
1,0 mM	12,3b	22,7a	48,5c	65,2c

Keterangan: Nilai yang diikuti huruf yang sama tidak berbedanyata berdasarkanUji Duncan pada taraf 5%

Sejak lama telah diketahui bahwa bakteri merupakan mikroba yang relatif resisten terhadap logam berat dalam konsentrasi rendah dan memiliki mekanisme tertentu untuk mengurangi keracunan logam. Lima mekanisme resistensi logam berat yang diajukan oleh Laneva, (2009) adalah efluks ion logam, sekuestrasi ekstraseluler, sekuestrasi intraseluler, reduksi ion logam dan faktor genetik. *A. chroococcum* adalah bakteri Gram negatif kokus sedangkan *Azotobacter* sp. LKM6 bersifat Gram negatif dengan morfologi basil. Bakteri yang paling resisten terhadap logam berat adalah Gram positif, tetapi Gram negatif kokus lebih sensitif daripada Gram negatif basil. Perbedaan sensitivitas disebabkan karakteristik din-

ding sel gram negatif lebih kompleks sehingga dapat mengendalikan adsoprsi material luar sel seperti logam berat (Nasrazadani, 2011).

Resistensi bakteri Gram negatif *Cupriavidus metallidurans* CH34 (nama sebelumnya adalah Ralstonia metallidurans and Alcaligenes eutrophus)diperoleh melalui kerjasama dua jenis enzim, Zn/Cd/Pb-translocating ATPase PbrA berperan dalam translokasi Pb keluar dari sitoplasma dan logam disekuestrasi dalam garam fosfat yang dihasilkan oleh undecaprenyl pyrophosphate phosphatase PbrB (Hynninen *et al*., 2009). Resistensi terhadap Pb telah ditunjukkan oleh 14 strain *A. chroococcum* yang diisolasi dari beberapa tanah Polandia (Lenart, 2012).Terdapat kemungkinan taraf resistensi *Azotobacter* dalam memberikan efek positif terhadap pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini, kepadatan *Azotobacter* sp. LKM6 meningkat sejalan dengan peningkatan kadar timbal nitrat di dalam kultur. Strain ini lebih beradaptasi dengan Pb antara lain karena sudah pernah terpapar kadmium (Cd) secara *in vitro*. Pada konsentrasi 0,1mM, Cd meningkatkan pertumbuhan Azotobacter LKM6 terutama pada fase logaritmik akhir (Hindersah *et al.,* 2009).

Penghambatan pertumbuhan bakteri oleh keberadaan Pb tidak signifikan (Tabel 1) dan peningkatan kepadatan sel akibat paparan Pb juga tidak mencapai 1 log (Tabel 2). Penelitian ini juga belum menjelasakan *minimum inhibitory concentration* (MIC) untuk logam Pb terhadap *Azotobacter*.MIC untuk logam toksik Pb sebesar 1600 µg mL^{-1} didapatkan untuk 93% *A. chroococcum* resisten Pb yang diisolasi dari tanah rizosfer gandum (*Triticum aestivum*) yang diirigasi oleh air limbah industri selama sekitar satu dekade (Aleem *et al*., 2003).

Terdapat kemungkinan Pb juga dapat memberikan efek positif terhadap pertumbuhan bakteri. Zheng (2007) menunjukkan bahwa logam berat pada konsentrasi rendah memiliki efek stimulasi pada biomassa karbon mikroba tanah. Selain itu, menurut Wyszkowska dan Wyszkowski (2002), peningkatan jumlah mikroorganisme tertentu dalam kontaminasi logam berat pada jumlah yang relatif rendah disebabkan adanya nutrisi tersedia yang berasal dari degradasi sel-sel bakteri tidak toleran logam berat.

Kadar Eksopolisakarida

Dengan keberadaan logam toksik, spesies bakteri yang sensitif sering tidak dapat memperlihatkan resistensi dan juga tidak mati. Beberapa tipe bakteri dapat merespon cekaman terhadap logam berat melalui beberapa proses antara lain logam terperangkap di kapsul ekstraselular (Nasrazadani, 2011). Secara genetik, *Azotobacter* adalah bakteri Gram negatif yang tidak membentuk spora tetapi selalu membentuk kapsul di sekeliling selnya (Holt *et al*., 1994).

Pada penelitian ini, 0,1 Pb di dalam kultur cair tidak mengubah produksi EPS kedua strain yang diuji (Tabel 3 dan Tabel 4). Efek 1,0 Pb lebih nyata pada peningkatan kadar EPS di kultur *Azotobacter* sp. LKM6 sedangkan di kultur *A. chroococum* tidak berpengaruh.

Cekaman lingkungan mempengaruhi isolat bakteri produsen EPS. *Azotobacter chroococcum* merupakan strain yang mampu memfiksasi N_2 yang sangat baik, di bawah cekaman oksigen atau logam berat (inaktivasi nitrogenase) *A. chroococcum* memproduksi EPS untuk meminimalisir konsentrasi oksigen intraseluler agar aktivitas nitrogenase terus berjalan (Khanafari, 2007). Secara alami *Azotobacter* membentuk EPS sebagai proteksi terhadap nitrogenase (Sabra *et al.,* 2000).

Penelitian intensif menjelaskan bahwa polimer ekstraseluler bakteri adalah eksopolisakarida (EPS) yang memiliki sifat mengikat polutan logam (Chen *et al*., 1995a) yang diperkuat oleh penelitian Emtiazi *et al*., (2004) dan Hindersah *et al.,* (2009).Pembentukan polimer ekstraseluler termasuk EPS berpotensi memobilisasi logam berat tanah sehingga logam berat dapat lebih mudah diserap tanaman (Chen *et.al*., 1995b). Inokulasi *Azotobacter* dapat meningkatkan kadar logam toksis Pb di pakcoy *(Brassica chinensis)* yang ditanam di tanah dengan limbah terkontaminasi Pb (Hindersah dan Kalay, 2006).

Produksi eksopolisakarida *A. chroococcum* yang tidak terpengaruh timbal (Tabel 3) kemungkinan besar disebabkan oleh ada mekanisme lain yang dikembangkan saat terpapar Pb seperti efluks atau sequestrasi intra dan ekstraseluler. MIC Pb tidak diterapkan pada penelitian ini sehingga mungkin saja Pb yang diberikan belum cukup tinggi untuk memicu cekaman logam toksik. Namun berdasarkan data pada Tabel 3 dan Tabel 4, hanya *Azotobacter* sp. LKM 6 yang meningkatkan produksi EPS sebagai respon terhadap logam toksik Pb. Meskipun tidak nyata, produksi EPS *A. chroococcum* cenderung menurun dengan adanya Pb di media tumbuh.

Tabel 3. Pengaruh Pb terhadap Produksi Eksopolisakarida *A. chroococcum*

Kadar Pb	Waktu Inkubasi (Jam)			
	24	48	72	96
	----------g L^{-1}----------			
Kontrol	7,6a	7,0a	6,6a	9,0a
Pb 0,1mM	7,3a	6,0a	6,6a	6,3a
Pb 1,0 mM	8,3a	9,0a	7,3a	8,6a

Keterangan: Nilai yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Duncan pada taraf 5%

Tabel 4. Pengaruh Pb terhadap Produksi Eksopolisakarida *Azotobacter* sp. LKM 6

Kadar Pb	Waktu Inkubasi (Jam)			
	24	48	72	96
	----------g L^{-1}----------			
Kontrol	6,0a	5,3a	7,3a	8,7a
0,1 mM	5,0a	5,3a	8,3a	11,3a
1,0 mM	8,6b	12,0b	13,0b	26,3b

Keterangan: Nilai yang diikuti huruf yang sama tidak berbeda nyata berdasarkan Uji Duncan pada taraf 5%

Produksi eksopolisakarida bakteri juga dipengaruhi oleh fase pertumbuhannya. Menurut Chen *et al.,* (1995b), produksi maksimum EPS terjadi saat fase stasioner terjadi cekaman fisiologis. Pada penelitian ini ditunjukkan bahwa produksi EPS tertinggi terjadi pada fase deklinasi, mungkin disebabkan karena adanya akumulasi EPS selama masa inkubasi berlangsung pada kultur. Produksi EPS agaknya tidak

berkaitan dengan fase pertumbuhannya kecuali pada 1,0 mM Pb untuk *Azotobacter* sp. LKM6. Menurut Tiller and Wong (1989), fase eksponensial *Azotobacter* dicapai pada jam ke 60. Pada kultur *Azotobacter* sp. LKM6 dengan 1,0 mM Pb, peningkatan kadar EPS terjadi saat fase stasioner dan deklinasi saat terjadinya cekaman fisiologis akibat menurunnya ketersediaan nutrisi, kompetisi ruang dan mulai terbentuknya metabolit sekunder yang dapat berupa racun.

SIMPULAN

Kedua strain bakteri *Azotobacter* memperlihatkan respons pertumbuhan dan produksi eksopolisakarida (EPS) berbeda terhadap keberadaan logam toksik timbal (Pb) di kultur cair Hasil percobaan menunjukkan bahwa *Azotobacter* sp. LKM6, Gram negatif basil, relatif lebih resisten Pb daripada *A. chroococcum,* Gram negatif kokus. Meskipun secara statistik tidak nyata, Pb berpotensi menurunkan kepadatan sel di kultur *A. chroococcum* sedangkan populasi *Azotobacter* sp. LKM6 meningkat nyata pada kultur dengan konsentrasi Pb 0,1 mM maupun 1,0 mM pada 72 dan 96 jam setelah inkubasi. Produksi EPS *A. chroococcum* tidak dipengaruhi oleh Pb tetapi 0.1 mM Pb meningkatkan kepadatan sel dan kadar EPS *Azotobacter* sp. LKM6 dengan nyata. Resistensi *Azotobacter* sp. LKM6 terhadap Pb yang diperlihatkan dengan peningkatan produksi EPS akan bermanfaat untuk pengembangan strain bakteri ini untuk meningkatkan mobilisasi logam berat dalam fitoremediasi lahan terkontaminasi logam berat, khususnya Pb.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterimakasih kepada Ketua Balai Pengawasan dan Sertifikasi Benih Tanaman Pangan dan Hortikultura Dinas Pertanian Jawa Barat atas izin penggunaan instrumen di Laboratorium Hortikultura sehingga pengukuran kadar eksopolisakarida di kultur cair dapat terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

Aleem, A. J., Isar & Malik. A. 2003. Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil. Bioresour Technol. 86(1): 7-13.

Chen, J.H., Lion, L.W., Ghiorse, W.C. & Shuler, M.L. 1995a. Mobilization of adsorbed cadmium and lead in aquifer material by bacterial extracellular polymers. Water Res. 29: 421-430.

Chen, J-H., Czajka, D.R., Lion, L.W., Shuler, M.L. & Ghiorse, W.C. 1995b. Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers. Environ Health Perspect 103: 53-58

Czajka, D.R., Lion, L.W., Shuler, M.L. & Ghiorse, W.C., 1997. Evaluation of the utility of bacterial extracellular polymers for treatment of metal-contaminated soils: Polymer persistence, mobility, and the influence of lead. Water Res. 31:2827-2839

Emtiazi, G., Ethemadifar, Z. & Habibi, M.H. 2004. Production of extracellular polymer in *Azotobacter* and biosorption of metal by exopolymer. Afr. J. Biotech. 3:330-333

Hindersah, R., Arief, D.H., Soemitro, L.S. & Gunarto. 2006. Exopolysaccharide Extraction from Rhizobacteria *Azotobacter* sp. Proc. International Seminar IMTGT. Medan, 22-23 Juni 2006. Hal 50-55

Hindersah, R. & Kalay, A.M. 2006. Akumulasi timah hitam dan kadmium pada tajuk selada setelah aplikasi *Azotobacter* dan lumpur IPAL.J. Budidaya Pertanian 2:1-5

Hindersah, R.D.H., Arief, S. Soemitro & Gunarto, L. 2009. Pengaruh $CdCl_2$ terhadap produksi Eksopolisakarida dan Daya Hidup *Azotobacter*. Jurnal Natur Indonesia. 12 (1): 34-37.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Shaley, J.T. & William, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. William dan Wilkins. Baltimore.

Hynninen A., Touzé, T., Pitkänen, L., Mengin-Lecreulx, D. & Virta, M. 2009. An efflux transporter PbrA and a phosphatase PbrB cooperate in a lead-resistance mechanism in bacteria. Mol Microbiol. 74 (2): 384-94.

Janecka, J., Jenkins, M.B., Brackett, N.S., Lion, L.W. & Ghiorse, W.C. 2002. Characterization of a *Sinorhizobium* isolate and its extracellular polymer implicated in pollutant transport in soil. Appl. Environ. Microbiol. 68: 423-426

Khanafari, A. & Sepahei, A.A. 2007. Alginate Bioloymer Production by *Azotobacter chroococcum* from Whey Degradation. International Journal of Environmental Science and Technology. 4 (4): 427-432.

Laneva, O.D. 2009. Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals. Mikrobiol Z. Article in Russian, Abstract in English. 71 (6): 54-65.

Lasat, M.M. 2002. Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms.J.Environ. Qual., 31: 109-120.

Lenart, A.M. 2012. In Vitro effects of various xenobiotics on *Azotobacter chroococcum* strains isolated from soils of southern Poland. J Environ Sci Health B. 47 (1): 7-12.

Narula, N., Behl, R.K. & Kothe, E. 2011. Heavy Metal Resistance Among *Azotobacter*spp. and Their Survival in HM Contaminated Soil Using Indian Mustard. The IUP Journal of Genetics & Evolution, 4 (2): 55-62.

Nasrazadani, A., Tahmourespour, A. & Hoodaji, M. 2011. Determination of Bacteria Resistance Threshold to Lead, Zinc and Cadmium in three Industrial Waste water Samples. J. Environmental Studies, 36 (56): 25-27.

Sabra, W., Zeng, A.P., Lunsdorf, H. & Deckwer, W.D. 2000. Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4037-4044.

Taller, B.J. & Wong, T.Y. 1989. Cytokinins in *Azotobacter vinelandii* culture medium. Appl. Environ. Microbiol. 55: 266-267.

Vargas-Garcia, M.C., Lopez, M.J., Elorrieta, M.A., Suarez, F. & Moreno, J. 2003. Properties of polysaccharides produced by *Azotobacter vinelandii* cultured on 4-hydroxybenzoic acid. J. Appl. Microbiol. 94: 389-395.

Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P. & Rea, P.A. 2000. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelin synthase. J. Biol. Chem. 275: 31451-31459.

Wu, S.C., Peng, X.L. Cheung, K.S. Liu, SL, & Wong, M.H. 2009. Adsorption kinetics of Pb and Cd by two plant growth promoting rhizobacteria. Bioresour Technol. 100 (20): 4559-4563.

Vermani, M.V., Kelkar, S.M. & Kamat, M.Y. 1997. Studies in polysaccharide production and growth of *Azotobacter vinelandii* MTCC 2459, a plant rhizosphere isolate. Lett. Appl. Microbiol. 24: 379-383.

Wyszkowska, J. & Wyzskowski, M. 2001. Effect of Cadmium and Magnesium on Microbiological Activity in Soil. Poland: Polish Journal of Environmental Studies. 11 (5): 585-591.

Zeng, L.S., Liao, M. & Chen, C.L. 2007. Effect of Lead Contamination on Soil Enzymatic Activities, Microbioal Biomass, and Rice Physiological Indices in Soil-Lead-Rice (*Oryza sativa* L.) System. Ecotoxicology and Environmental Safety. 67: 67-74.