

AKTIVITAS REDUKSI NITRAT *PSEUDOMONAS STUTZERI* (ASLT2) PADA SUMBER KARBON DAN KONDISI INKUBASI YANG BERBEDA

Tri Widiyanto*, Iman Rusmana**, & Lena Novita**

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh berbagai jenis sumber karbon terhadap aktivitas reduksi nitrat, serta kemampuan kecepatan aktivitas reduksi maksimumnya. Sumber karbon yang digunakan adalah: asam asetat, asam suksinat, gliserol, glukosa, dan karbonat. Pengujian aktivitas reduksi nitrat dilakukan pada kondisi aerob dan anaerob. Kinetika reduksi nitrat, dilakukan pada medium cair denitrifikasi dengan glukosa sebagai sumber karbon. Pengukuran aktivitas reduksi nitrat dilakukan setiap 4 jam. *Pseudomonas stutzeri* (ASLT2) dapat mereduksi nitrat pada kondisi aerob maupun anaerob serta sumber karbon yang berbeda. Aktivitas reduksi nitrat yang tinggi terjadi pada kondisi aerob dengan sumber karbon dari asetat yaitu sebesar 82,28%. Sedangkan pada kondisi anaerob aktivitas reduksi yang tertinggi terjadi dengan asam suksinat sebagai sumber karbon, yaitu sebesar 47,98%. Persentase gas yang terbentuk paling tinggi pada inkubasi anaerobik, yaitu sebesar 97,73%, pada sumber karbon glukosa. Pada inkubasi aerobik persentase terbentuknya gas nitrogen sebesar 53.06% pada sumber karbon asam suksinat. Laju reduksi nitrat maksimum (V_{max}) isolat ASLT2 sebesar $0.0633\mu\text{M}/\text{jam}$ dengan K_M sebesar $0.3409\mu\text{M}$.

Kata kunci : *Pseudomonas stutzeri* (ASLT2), reduksi nitrat, sumber karbon, aerobik, dan anaerobik.

ABSTRACT

The aim of this research is to find out the influence of carbon sources on nitrate reduction activities as well as its maximum reduction rate in *Pseudomonas stutzeri* (ASLT2). The sources of carbon were acetic acid, succinic acid, gliserol, glucose and carbonate. The experiment was conducted in aerobic and anaerobic condition. The study of kinetic maximum reduction rate of nitrate was conducted by growing the bacteria in glucose as the carbon source. The nitrate reduction was measured every 4 hours. *P. stutzeri* (ASLT2) was able to reduce nitrate in both aerobic and anaerobic condition as well as at variety of carbon sources. The highest nitrate reduction rate was observed in the culture with acetic acid as the carbon source, ie 82.28% under aerobic condition. Under anaerobic condition, the best nitrate reduction was in the succinic acid based media, ie 47.98%. The highest percentage of gases production was under anaerobic incubation that was 97.73% in the culture based on glucose as the source of carbon. Under aerobic incubation with succinate acid as the carbon source there was produced 53.06% nitrogen gasses. The maximum nitrate reduction rate was $0.0633\mu\text{M}/\text{hour}$ with K_m $0.3409\mu\text{M}$.

Key word : *Pseudomonas stutzeri* (ASLT2), nitrate reduction, carbon sources, aerobic, anaerobic

* Staf Peneliti Puslit Limnologi-LIPI

** Departemen Biologi F-MIPA Biologi-IPB

PENDAHULUAN

Salah satu sumber senyawa “toksik” dalam sistem perairan budidaya udang adalah nitrat. Senyawa tersebut banyak dihasilkan dari sisa pakan tambahan (pellet). Tingginya kandungan senyawa nitrat dalam sistem tambak udang akan merangsang pertumbuhan fitoplankton secara cepat. Kondisi tersebut mempengaruhi tingkat kecerahan air tambak dan fluktuasi oksigen. Mekanisme pengeluaran senyawa nitrat dari sistem tambak secara aman hanya dapat dilakukan oleh kelompok bakteri denitrifikasi. Kelompok bakteri tersebut akan memanfaatkan nitrat sebagai salah satu penerima elektron dalam aktivitas metabolismenya. Senyawa nitrat direduksi menjadi nitrit, nitrit oksida, nitrous oksida, dan gas nitrogen.

Setiap tahapan reaksi dikatalisis oleh enzim yang berbeda. Reduksi nitrat menjadi nitrit dikatalisis oleh enzim nitrat reduktase. Enzim ini terdiri dari dua macam, yaitu nitrat reduktase yang terikat membran (Nar) dan nitrat reduktase yang berada pada periplasmik (Nap). Aktivitas enzim Nap terjadi pada kondisi aerob dan anaerob, sedangkan aktivitas enzim Nar diduga hanya terjadi pada kondisi anaerob (Richardson, 2000). Hal ini disebabkan adanya penghambatan sistem transfer nitrat ke dalam sel oleh oksigen (Moreno-Vivian, 1991; Zumft, 1997). Bakteri pereduksi nitrat merupakan mikroorganisme heterotrof yang memerlukan sumber karbon organik seperti asam asetat, asam propionat, asam benzoat, gliserol, metanol dan glukosa untuk pertumbuhannya (Teixera & Oliveira, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk menelaah pengaruh berbagai jenis sumber karbon terhadap aktivitas reduksi nitrat dari isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri* ASLT2, serta kemampuan kecepatan aktivitas reduksi maksimumnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan dari bulan Februari sampai dengan Juni 2006 di Laboratorium Mikrobiota, Pusat Penelitian Limnologi LIPI, Cibinong - Bogor. Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri pengoksidasi amonium asal tambak udang *Pseudomonas stutzeri* ASLT2 koleksi Laboratorium Mikrobiota, Pusat Penelitian Limnologi – LIPI, Cibinong - Bogor. Sumber karbon yang digunakan meliputi: asam asetat, asam suksinat, gliserol, glukosa, dan karbonat.

Pemurnian isolat dilakukan dengan menumbuhkan isolat bakteri pada medium agar nitrifikasi melalui metode kuadran dan diinkubasi pada suhu ruang (28-31)°C selama tujuh hari. Koloni murni yang diperoleh ditumbuhkan kembali pada medium agar nitrifikasi dan denitrifikasi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 3-4 hari.

Pengujian aktivitas reduksi nitrat dilakukan pada kondisi aerob dan anaerob. Inokulum untuk pengujian disiapkan dengan ditumbuhkannya isolat bakteri pada medium cair denitrifikasi sebanyak 50 ml, kemudian diinkubasi di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 80 rpm dan suhu ruang (28-31)°C selama 3 hari. Sebanyak 1 ml kultur isolat ditumbuhkan pada 50 ml medium denitrifikasi dengan sumber karbon dari asam asetat, asam suksinat, gliserol, glukosa, dan karbonat dengan konsentrasi nitrat $\pm 5000 \mu\text{M}$. Kemudian diinkubasi selama tujuh hari di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 80 rpm dan suhu ruang (28-31)°C. Masing-masing perlakuan sumber karbon diulang tiga kali dan kontrol masing-masing perlakuan dibuat tanpa diinokulasi kultur bakteri. Pengujian aktivitas reduksi nitrat pada kondisi anaerob dilakukan dengan menggunakan medium denitrifikasi anaerob dan tanpa aerasi.

Pengukuran pertumbuhan sel dan pengukuran aktivitas reduksi nitrat dilakukan pada hari ke-0, 2, 3, 5, dan 7. Pengukuran pertumbuhan sel dilakukan melalui analisis OD pada panjang gelombang 550 nm. Pengukuran aktivitas reduksi nitrat dilakukan melalui analisis kadar nitrat, nitrit, dan amonium (Greenberg, *et al.*, 1992).

Jumlah nitrat yang direduksi dari medium dihitung berdasarkan selisih kadar nitrat awal dengan kadar nitrat yang direduksi. Laju pertumbuhan spesifik (μ_{sel}) bakteri dalam masing-masing medium perlakuan sumber C dan laju oksidasi amonium (μ_{NH_3}) ditentukan berdasarkan hasil pengukuran tersebut (White, 2000).

Inokulum untuk pengujian kinetika reduksi nitrat disiapkan dengan menumbuhkan isolat pada 50 ml medium cair denitrifikasi dengan glukosa sebagai sumber karbon, kemudian diinkubasi di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 80 rpm dan suhu ruang (28-31) $^{\circ}$ C selama tiga hari. Kultur bakteri dibuat pelet dengan sentrifugasi pada kecepatan 5000 rpm selama 15 menit. Pelet dipisahkan dan diresuspensi dengan medium denitrifikasi tanpa nitrat. Sebanyak 2 ml kultur bakteri diinokulasikan ke dalam 50 ml medium denitrifikasi dan glukosa sebagai sumber karbon dengan konsentrasi nitrat 0, 500, 1000, 1500, dan 2000 μ M. Kemudian diinkubasi selama 20 jam di atas inkubator berpenggoyang pada kecepatan 80 rpm dan suhu ruang (28-31) $^{\circ}$ C. Masing-masing perlakuan diulang tiga kali. Kontrol masing-masing perlakuan dibuat tanpa diinokulasi kultur bakteri.

Pengukuran pertumbuhan sel dan pengukuran aktivitas reduksi nitrat dilakukan setiap 4 jam. Analisis kinetika

reduksi nitrat digunakan persamaan kinetika Michaelis-Menten (White, 2000).

HASIL DAN PEMBAHASAN

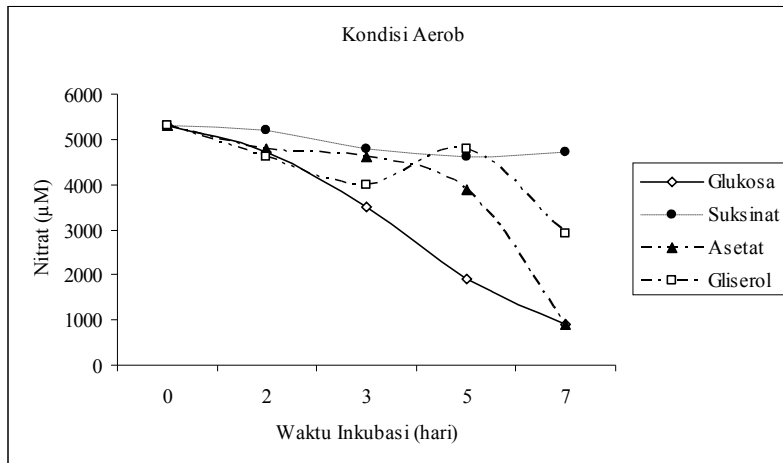
Pemurnian dan Peremajaan Isolat

Isolat murni ASLT2 diperoleh dari kultur yang ditumbuhkan pada medium nitrifikasi setelah 7-10 hari inkubasi dengan bentuk koloni bulat, berwarna putih dengan ukuran \pm 1 mm. Isolat ASLT2 diisolasi pada medium nitrifikasi autotrof (Widiyanto, 2005). ASLT2 dapat tumbuh pada medium agar nitrifikasi dan denitrifikasi setelah 2-3 hari inkubasi.

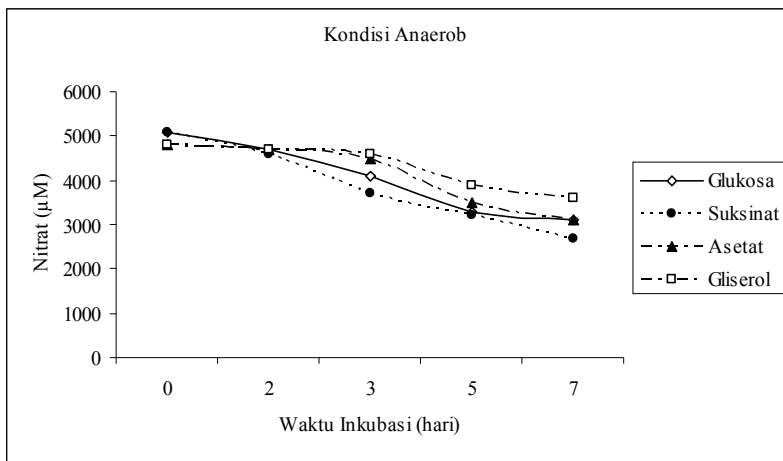
Aktivitas Reduksi Nitrat

P. stutzeri ASLT2 dapat mereduksi nitrat pada kondisi aerob maupun anaerob. Kemampuan isolat dalam mereduksi nitrat ditunjukkan oleh penurunan konsentrasi senyawa nitrat dalam medium pertumbuhan (Gambar 1). Perubahan konsentrasi senyawa nitrat tidak terjadi pada medium kontrol. Penurunan senyawa nitrat diduga disebabkan penggunaan nitrat sebagai akseptor elektron alternatif pengganti oksigen dalam rantai respirasi. Peningkatan kadar nitrat yang direduksi sejalan dengan peningkatan biomassa sel dalam medium pertumbuhan (Gambar 2).

Perbedaan aktivitas reduksi nitrat pada masing-masing perlakuan diduga berhubungan dengan jalur metabolisme sumber C yang merupakan senyawa organik yang sangat diperlukan bagi bakteri pereduksi nitrat (Kelso, *et al.*, 1999), baik pada kondisi aerob maupun anaerob. Richardson (2000) mengemukakan bahwa denitrifikasi merupakan proses reduksi nitrat yang berhubungan langsung dengan proses transfer elektron, dimana senyawa organik berperan sebagai donor elektron dan nitrat sebagai akseptor elektron terakhir.



(a)



(b)

Gambar 1. Profil Penurunan Senyawa Nitrat oleh Isolat ASLT2 pada Kondisi Aerob (A) dan Anaerob (B) dengan Sumber karbon yang Berbeda

Perbedaan kadar nitrat yang direduksi pada masing-masing perlakuan diduga dipengaruhi oleh banyaknya elektron yang dapat diperoleh dari oksidasi senyawa karbon yang tersedia dalam medium. Elektron yang diperoleh dari oksidasi senyawa karbon tersimpan pada molekul NADH dan FADH₂ yang akan berperan sebagai donor elektron antara pada rantai respirasi (Madigan, *et al.*, 2000; White, 2000). Bakteri denitrifikasi dapat memanfaatkan nitrat, nitrit, nitrik oksida, atau nitrous oksida sebagai akseptor elektron terakhir pengganti oksigen dalam rantai respirasi.

Pemberian sumber karbon yang

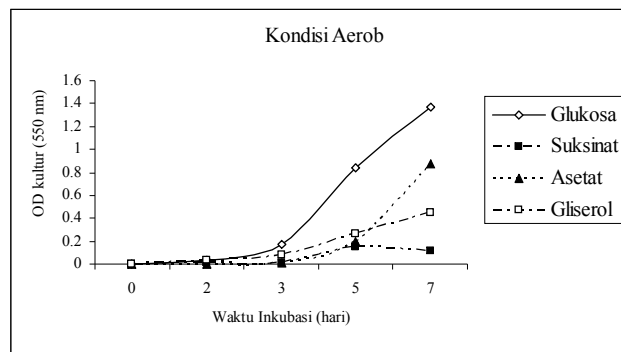
berbeda pada medium memberikan pengaruh yang berbeda terhadap aktivitas dan laju reduksi nitrat (Tabel 1). Isolat ASLT2 memiliki aktivitas reduksi nitrat dan pertumbuhan sel yang lebih tinggi pada medium dengan glukosa dibandingkan gliserol dan asetat sebagai sumber karbon, baik pada kondisi aerob maupun anaerob. Aktivitas reduksi nitrat paling tinggi pada kondisi aerob terjadi pada media dengan sumber karbon glukosa dan paling rendah dengan suksinat. Aktivitas reduksi nitrat dan pertumbuhan isolat paling tinggi pada kondisi anaerob terjadi dengan suksinat sebagai sumber karbon (Gambar 2).

Pertumbuhan isolat ASLT2 dan aktivitas reduksi nitrat pada kondisi aerob yang sangat rendah dengan suksinat sebagai sumber karbon (Gambar 2a) diduga berhubungan dengan kesulitan untuk mendapatkan elektron dari oksidasi senyawa tersebut. Asam-asam organik termasuk suksinat pada kondisi anaerob akan diubah menjadi piruvat dan dioksidasi lebih lanjut setelah diubah menjadi Asetil-CoA (Madigan, *et al.*, 2000). Aktivitas metabolisme tersebut dihasilkan molekul

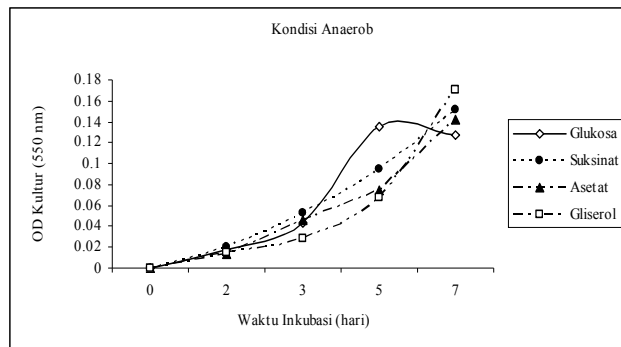
NADH yang diduga oleh isolat ASLT2 direoksidasi melalui rantai respirasi dengan memanfaatkan nitrat, nitrit, nitrik oksida atau nitrous oksida sebagai akseptor elektron. Firth & Edwards (2000) melaporkan bahwa *P. stutzeri* dapat tumbuh dan mereduksi nitrat dengan maksimal pada medium mikroaerofil yang mengandung nitrat yang ditambah suksinat dibandingkan dengan penambahan glukosa, gliserol, dan piruvat.

Tabel 1. Kemampuan isolat ASLT2 dalam mereduksi nitrat dan menghasilkan senyawa nitrit dan gas pada kondisi aerob dengan sumber karbon yang berbeda.

Sumber C dalam Medium	Nitrat Awal (μM)	Nitrat yang direduksi		Nitrit yang terbentuk		Gas yang terbentuk	
		μM	%	μM	%	μM	%
Asetat	5256,67	4325,08	82,28	527,97	12,21	3797,11	87,79
Suksinat	5282,13	651,13	12,33	0	0	651,13	100
Glukosa	5271,22	4304,79	81,67	1763,34	40,96	2541,43	59,04
Gliserol	5285,77	2331,69	44,11	52,90	2,27	2278,79	97,73



(a)



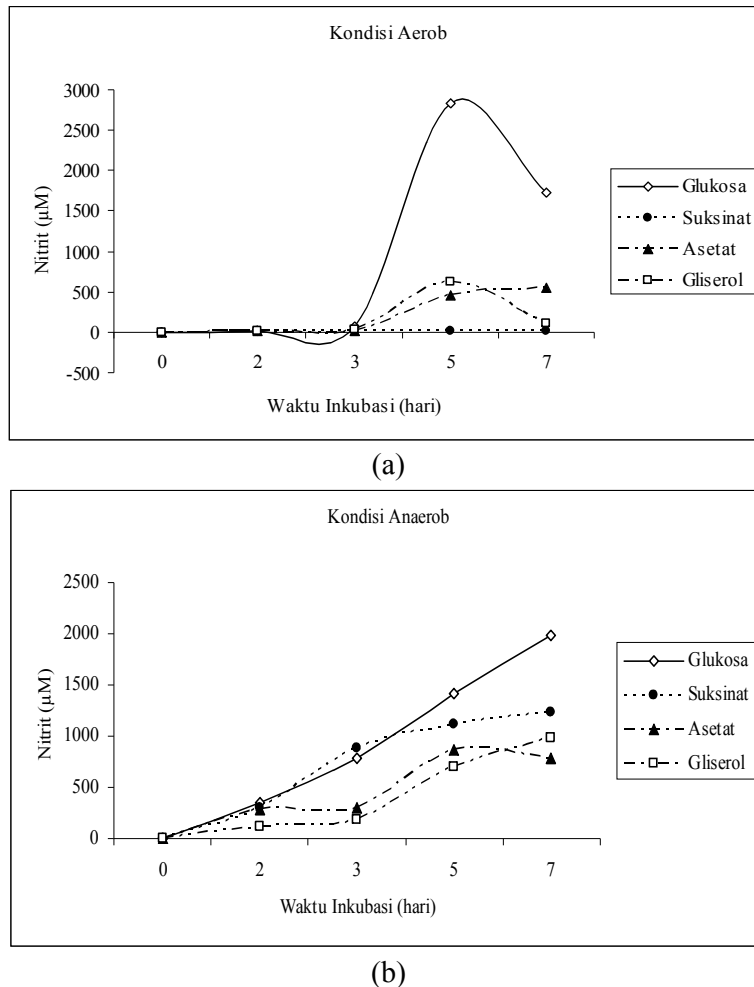
(b)

Gambar 2. Pertumbuhan Isolat ASLT2 pada Kondisi Aerob (A) dan Anaerob (B) dengan Sumber karbon yang berbeda

Senyawa nitrit yang dihasilkan selama aktivitas reduksi nitrat dapat dilihat pada Gambar 3. Senyawa nitrit yang terakumulasi dalam medium pada kondisi pertumbuhan anaerob relatif lebih tinggi dibandingkan kondisi aerob. Penurunan senyawa nitrit dalam medium diduga disebabkan penggunaan nitrit oleh isolat ASLT2 sebagai akseptor elektron alternatif pengganti oksigen dalam rantai respirasi.

Oksidasi molekul glukosa pada sistem metabolisme aerob akan berlangsung melalui lintasan glikolisis yang dilanjutkan dengan oksidasi piruvat menjadi CO_2 melalui siklus TCA. Gliserol akan masuk ke dalam lintasan glikolisis melalui pembentu-

kan Gliseraldehida-3-fosfat sedangkan asetat akan masuk ke dalam siklus TCA setelah diubah menjadi Asetil-CoA (Prescott, *et al.*, 2000). Oksidasi satu molekul glukosa melalui lintasan glikolisis dan siklus TCA akan menghasilkan ATP, NADH, dan FADH_2 yang lebih banyak dibandingkan dari hasil oksidasi satu molekul asetat, suksinat, dan gliserol. Perolehan energi yang lebih banyak akan mendukung untuk pertumbuhan sel sedangkan perolehan molekul NADH dan FADH_2 yang lebih banyak sebagai donor elektron yang akan masuk ke rantai respirasi memungkinkan aktivitas reduksi nitrat yang lebih tinggi.



Gambar 3. Profil Akumulasi Senyawa Nitrit dalam Medium Selama Proses Reduksi Nitrat oleh Isolat ASLT2 pada Kondisi Aerob (A) dan Anaerob (B)

P. stutzeri merupakan bakteri non fermentatif (Madigan, *et al.*, 2000). Dengan demikian, pada kondisi anaerob molekul NADH dan FADH₂ yang diperoleh dari oksidasi sumber karbon direoksidasi melalui rantai respirasi. Dalam hal ini, isolat ASLT2 diduga menggunakan nitrat, nitrit, nitrik oksida, atau nitrous oksida sebagai akseptor elektron terakhir untuk memperoleh energi.

Bakteri heterotrof memperoleh energi dari serangkaian proses oksidasi senyawa karbon organik. Hasil oksidasi senyawa karbon yang lebih tereduksi pada kondisi aerob sangat memungkinkan terjadinya kelebihan energi pereduksi. Oleh karena itu, untuk menjaga keseimbangan energi pereduksi diperlukan lintasan untuk mengalirkan elektron-elektron hasil oksidasi tersebut tetapi dengan tujuan bukan untuk konservasi energi yaitu melalui reduksi nitrat oleh enzim Nap.

Peranan enzim Nap dalam mengontrol keseimbangan energi pereduksi selama metabolisme oksidatif senyawa karbon telah banyak dilaporkan. Sears, *et al.* dalam Ellington, *et al.* (2002) menunjukkan bahwa jenis sumber karbon mempengaruhi aktivitas enzim Nap. Pada kondisi aerob, aktivitas enzim Nap *Paracoccus denitrificans* Pd22 lebih rendah dengan sumber karbon yang lebih teroksidasi (malat dan suksinat) dibandingkan dengan sumber karbon yang lebih tereduksi (kaproat dan butirat). Selain itu, Ellington, *et al.* (2002) melaporkan bahwa ekspresi *nap* dan aktivitas enzim Nap pada *Paracoccus pantotrophus* lebih tinggi pada kondisi pertumbuhan aerob dengan sumber karbon yang lebih tereduksi dibandingkan sumber karbon yang lebih teroksidasi (suksinat < asetat < butirat).

Reduksi nitrit menjadi nitrik oksida dikatalisis oleh enzim nitrit reduktase (Nir). Nitrik oksida diubah menjadi gas nitrous oksida dengan melibatkan enzim nitrik oksidoreduktase (Nor), sedangkan nitrous oksida diubah menjadi gas nitrogen dengan melibatkan enzim nitrous oksidoreduktase

(Nos) (Zumft, 1999; Richardson, 2000). Akumulasi senyawa nitrit pada kultur bakteri pereduksi nitrat menurut Blaszczyk (1993) dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain adanya penghambatan nitrit reduktase oleh nitrat karena nitrat lebih kompetitif sebagai akseptor elektron dibandingkan nitrit, ketidakseimbangan reaksi reduksi nitrat atau nitrit oleh masing-masing reduktase, dan induksi nitrit reduktase yang lebih lambat daripada nitrat reduktase.

Isolat ASLT2 dapat mereduksi senyawa nitrat menjadi nitrit dan gas baik pada kondisi aerob maupun anaerob (Tabel 2) dengan sumber karbon asetat, glukosa, dan gliserol. Sedangkan dengan suksinat sebagai sumber karbon pada kondisi aerob tidak menghasilkan senyawa nitrit (Tabel 2).

P. stutzeri merupakan bakteri denitrifikasi yang mampu mereduksi nitrat dengan menghasilkan gas dinitrogen (Korner & Zumft, 1989; Zumft, 1997; Rius, *et al.*, 2001). Denitrifikasi merupakan proses reduksi senyawa nitrat menjadi nitrit, nitrit menjadi nitrik oksida, nitrik oksida menjadi gas nitrous oksida hingga pada akhirnya dihasilkan gas dinitrogen (Richardson, 2000). Richardson (2000) mengemukakan bahwa proses reduksi nitrat oleh enzim Nar berhubungan dengan konservasi energi yaitu sebagai akseptor elektron terakhir dalam rantai respirasi pada kondisi anaerob, sedangkan aktivitas enzim Nap cenderung untuk mengontrol keseimbangan energi pereduksi.

Laju reduksi senyawa nitrat pada masing-masing perlakuan sumber karbon dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan analisis kinetika diperoleh nilai laju kecepatan reduksi nitrat maksimum (V_{max}) oleh isolat ASLT2 sebesar 0,0633 $\mu\text{M}/\text{jam}$ dengan K_M sebesar 0,3409 μM . Isolat ASLT2 mempunyai kecepatan reduksi yang lebih besar dari isolat bakteri *Alcaligenes* sp (KDTM 10), dan dengan nilai K_m yang lebih tinggi (Hermawan, 2005). Oleh karena itu, ASLT2 mempunyai kompleks enzim substrat

Tabel 2. Kemampuan Isolat ASLT2 dalam Mereduksi Nitrat dan Menghasilkan Senyawa Nitrit dan Gas pada Kondisi Anaerob dengan Sumber karbon yang Berbeda

Sumber C dalam Medium	Nitrat Awal (μM)	Nitrat yang direduksi		Nitrit yang terbentuk		Gas yang terbentuk	
		μM	%	μM	%	μM	%
Asetat	4805,97	1728,2	35,96	811,3	46,95	916,91	53,06
Suksinat	5105,54	2449,7	47,98	1250,7	51,06	1199,01	48,94
Glukosa	5116,24	2082,1	40,70	1944,7	93,40	137,44	6,60
Gliserol	4805,97	1160,8	24,15	1004,5	86,54	156,27	13,46

Tabel 3 Laju Reduksi Nitrat (μ_{N03}) dan Laju Pertumbuhan Spesifik (μ_{sel}) Isolat ASLT2 dengan Sumber Karbon yang Berbeda pada Kondisi Aerob dan Anaerob

Sumber C dalam medium	Aerob				Anaerob			
	μ_{N03} ($\mu\text{M}/\text{hari}$)	R-sq (μ_{N03})	μ_{sel} (sel/hari)	R-sq (μ_{sel})	μ_{N03} ($\mu\text{M}/\text{hari}$)	R-sq (μ_{N03})	μ_{sel} (sel/hari)	R-sq (μ_{sel})
Asetat	0,4571	0,979	0,977	0,951	0,3944	0,903	0,4220	0,892
Suksinat	0,0527	0,535	0,564	0,662	0,3657	0,737	0,4629	0,897
Glukosa	0,5111	0,905	1,088	0,944	0,4392	0,902	0,6892	0,982
Gliserol	0,3059	0,736	0,659	0,988	0,4364	0,845	0,3888	0,959

yang masih lebih rendah dari isolat *Alcaligenes* sp (KDTM 10). Jika nilai K_m tinggi maka enzim yang dihasilkan mempunyai afinitas rendah terhadap substrat.

KESIMPULAN SARAN

Kesimpulan

Sumber C dapat mempengaruhi aktivitas reduksi nitrat. *P. stutzeri* ASLT2. Isolat ASLT2 dapat mereduksi nitrat pada medium dengan asetat, suksinat, glukosa dan gliserol sebagai sumber karbon (C), baik pada kondisi aerob maupun anaerob. Aktivitas reduksi nitrat yang paling tinggi pada kondisi aerob terjadi dengan glukosa sebagai sumber karbon sedangkan pada kondisi anaerob aktivitas paling tinggi terjadi dengan suksinat sebagai sumber karbon.

Saran

Diperlukan pengujian lebih lanjut dari isolat ASLT2 melalui deteksi gen-gen yang terlibat dalam proses reduksi nitrat

untuk memperkuat hasil analisis bahwa *P. stutzeri* ASLT2 memiliki kemampuan dalam melakukan proses tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Blaszczyk M. 1993. Effect of medium composition on the denitrification of nitrate by *Paracoccus denitrificans*. Appl Environ Microbiol 59: 3951-3953.
- Ellington MJK, Bakhoo KK, Sawers G, Richardson DJ, Ferguson SJ, 2002. Hierarchy of carbon sources selection in *Paracoccus pantothrophus*: strict correlation between reduction state of the carbon substrate and aerobic expression of the *nap* operon. J. Bacteriol. 184:4767-4774.
- Firth JR, Edward C, 2000. Analysis of denitrification by *Pseudomonas stutzeri* under nutrient limited condition using membrane inlet mass

- spectrometry. J of Appl Microbiol. 88: 853-859.
- Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD. Editor. 1992. *Standart Metods for Examination of Water and Wastewater*. 18th Edition. Publication Office American Public Health Association: Washington DC.
- Kelso BHL, Smith RV, Laughlin RJ, 1999. Effect of carbon substrates on nitrite accumulation in freshwater sediment. *Appl Enviro Microbiol*. 65: 61-66.
- Korner H, Zumft WG. 1989. Expression of denitrification enzymes in response to the dissolved oxygen level and respiratory substrate in continuous culture of *Pseudomonas stutzeri*. *Appl Environ Microbiol* 55: 1670-1676.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2000. *Biology of Microorganism*. 9th edition. Prentice Hall.: New Jersey.
- Moreno-Vivian C, Cabello P, Martinez-Lucue M, Blasco R, Castillo F. 1991. Procarvotic nitrate reduction: Molecular properties and fungtional distinction among bacterial nitrate reductase. *J. of Bacteriol*. 181: 6573-6584.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2000. *Microbiology*. 5th Edition. The McGraw-Hill Companie: USA.
- Richardson DJ. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology*. 146: 551-571.
- Rius N, Fuste MC, GuaspmC, Lalucat J, Loren JG, 2001. Clonal population structur of *Pseudomonas stutzeri*, a species with exceptional diversity. *J. of Bacteriol* 183: 736-744.
- Teixeira P, Oliveira R. 2002. Metabolism of *Alcaligenes denitrificans* in bio film vs planktonic cells. *J Of Appl. Microbiol* 92: 256-260.
- White D. 2000. *The Physiology and Biochemistry of Procaryotes*. 2nd Edition. Oxford University Press: USA.
- Widiyanto T. 2005. Seleksi Bakteri Nitrifikasi dan Denitrifikasi untuk Bioremediasi di Tambak Udang. Laporan Tekhnis Hasil penelitian Puslit Limnologi LIPI. Cibinong Bogor.
- Zumft WG. 1997. Cell biology and molecular basic of denitrification. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 533-616.