

Analisis Kemampuan Akumulasi Polyfosfat pada Tiap Fase Pertumbuhan Isolat Bakteri Toleran Uranium

Heni Mutmainnah¹, Muhammad Rijal²

^{1,2}Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Ilmu Tarbiyah dan Keguruan

Institut Agama Islam Negeri Ambon

¹Email: henimutmainnah@gmail.com

Abstrak: Polyfosfat merupakan biopolimer rantai lurus yang terdiri dari puluhan hingga ratusan residu fosfat yang dihubungkan oleh ikatan *phosphoanhydride* energi tinggi, polyfosfat berperan penting dalam proses bioremediasi limbah uranium terutama dalam proses presipitasi logam uranium pada sel bakteri. Beberapa bakteri diketahui memiliki potensi untuk berinteraksi dengan uranium melalui transformasi redoks dan biopresipitasi dengan melepaskan fosfat anorganik untuk mengikat uranium dilingkungannya. Fosfat anorganik dihasilkan dari degradasi polifosfat yang terakumulasi didalam sel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri toleran uranium dalam mengakumulasi polifosfat selama fase pertumbuhannya. Pengukuran dilakukan pada 5 fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase logaritmik, awal fase stasioner, fase stasioner, dan akhir stasioner. Analisis akumulasi polifosfat secara kuantitatif dilakukan dengan menggunakan metode Olsen & Dean. Hasil uji diketahui bahwa isolat bakteri toleran uranium mampu mengakumulasi polyfosfat paling optimal pada fase stasioner terutama pada jam ke 48 dan akumulasi polyP terendah ditemukan pada fase awal stasioner pada jam ke 24.

Kata Kunci: Polyfosfat, Bakteri, Kurva Pertumbuhan

Abstract: Polyphosphate is a straight chain biopolymer consisting of tens to hundreds of phosphate residues that are linked by high energy phosphoanhydride bonds, polyphosphate plays an important role in the bioremediation process of uranium waste, especially in the process of uranium metal precipitation in bacterial cells. Some bacteria are known to have the potential to interact with uranium through redox transformation and bioprecipitation by releasing inorganic phosphate to bind uranium in the environment. Inorganic phosphate results from degradation of polyphosphates that accumulate in cells. This study aims to determine the ability of uranium-tolerant bacteria to accumulate polyphosphates during their growth phase. Measurements were made in 5 growth phases, namely the lag phase, the logarithmic phase, the beginning of the stationary phase, the stationary phase, and the stationary end. Quantitative analysis of polyphosphate accumulations was carried out using the Olsen & Dean method. The test results are known that the uranium-tolerant bacterial isolat is able to accumulate the most

optimal polyphosphate in the stationary phase, especially at the 48th hour and the lowest polyP accumulation is found in the initial stationary phase at the 24th hour.

Keywords: Polyphosphate, Bacteria, Growth Curve

Poly P merupakan salah satu biopolimer alami yang distribusinya paling luas. Polimer ini telah terdeteksi di banyak bakteri, jamur, ragi, tumbuhan dan hewan. PolyP terdiri dari rantai lurus yang terdiri dari puluhan hingga ratusan residu fosfat yang dihubungkan oleh ikatan *phosphoanhydride* energi tinggi (Kulaev *et al.*, 2004). Diketahui beberapa fungsi biologis polyP antara lain sebagai reservoir fosfat dan energi, terlibat dalam regulasi aktifitas gen, sebagai agen yang mentranspor DNA ke dalam sel pada fenomena transformasi bakteri, bahan pembentuk kapsul pada bakteri, komponen pembentuk biofilm, pengkelat kation *divalent*, buffer terhadap alkali, terlibat dalam motilitas bakteri patogen, penghambat degradasi RNA, dan temuan yang paling terbaru adalah promoter degradasi protein ribosomal bebas dalam hubungannya dengan protease Lon (Scroder & Muller, 1999; Hirota *et al.*, 2010; Tumpibonsak *et al.*, 2010). Selain itu, PolyP memegang peranan penting pada adaptasi fisiologis sel bakteri terhadap lingkungannya selama pertumbuhan dan perkembangan, dan sebagai respon terhadap stres lingkungan seperti syok osmotik dan kekurangan nutrisi (Mullan *et al.*, 2002).

Kadar intraselular Pi pada umumnya tergantung pada tingkat konsumsi Pi dari lingkungannya (Kulaev *et al.*, 2004). Pada *Aerobacter aerogenes*, akumulasi inorganik polifosfat merupakan fungsi dari medium pertumbuhan. Pada medium dengan konsentrasi fosfat yang rendah, polifosfat banyak diakumulasi. Sedangkan pada medium dengan konsentrasi fosfat yang tinggi, akumulasi polifosfat diinduksi oleh kelaparan sulfur (Harold & Sylvan, 1963). Selain itu, akumulasi polyP juga dipengaruhi oleh keadaan energi dari sel sehubungan dengan aktivitas yang terkait pada ATPase membran dan aktivitas berbagai enzim penting yang terlibat dalam fosforilasi dan defosforilasi seperti kinase dan fosfatase (Kulaev *et al.*, 2004). Penyerapan Pi dari medium dipengaruhi oleh pH lingkungan, pada *Burkholderia cepacia* maksimal menyerap fosfat dan mengakumulasi fosfat dalam bentuk polyP pada pH 5,5; tingkatannya mencapai 220% dan 330%, lebih tinggi dari pada pertumbuhan sel di pH 7,5. Tingkat maksimal intraselular polifosfat pada *B. cepacia* diperoleh pada awal fase stasioner (Mullan, 2002). Meningkatnya transportasi fosfat di nilai-nilai pH asam terjadi sebagai akibat dari serapan preferensial H_2PO_4 (spesies fosfat dominan pada nilai PH < 7,0) di atas HPO_4 atau terjadinya reduksi kekuatan motif proton melintasi membran Plasma pada pH 5 - 6. Penyerapan fosfat pada *Yarrowia lipolytica* didorong oleh ion H^+ / fosfat *co-transporter* dengan gradien H^+ melintasi membran plasma diregulasi oleh H^+ ATPase yang terikat membran. Selanjutnya fosfat bebas yang berlebihan di intraselular disimpan sebagai polyP (Van veen *et al.*, 1994; Zvyagilskaya *et al.*, 2000).

Sidat *et al.* (1999) menemukan bahwa bakteri pengakumulasi PO_4 tertinggi adalah bakteri gram negatif yang terdiri dari *Pseudomonas* spp. yang merupakan organisme utama sebanyak 58% dari total gram negatif yang diisolasi dari lumpur aktif, *Moraxella* spp 14%, *Acinetobacter* sp. 7%, *Aeromonas* spp., *Alcaligenes* spp. dan *Enterobacter* spp. masing-masing sebanyak 7% dari total populasi gram negatif. Berdasarkan hasil sekuensing gen 16S rRNA oleh Jeon *et al* (2003) diketahui bahwa *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., dan *Pseudomonas* spp. merupakan bakteri dominan penghilang fosfat, meskipun termasuk dalam populasi minor, *Acinetobacter* spp. dapat mengakumulasi lebih banyak fosfat daripada yang dibutuhkan untuk sintesis sel, sehingga bakteri ini biasa disebut *luxury phosphate uptake* (Sidat *et al.*, 1999).

Beberapa penelitian sebelumnya juga telah menunjukkan bahwa hilang dan lepasnya fosfat dalam lumpur aktif merupakan hasil dari dominasi genus tunggal bakteri *Acinetobacter* spp. dan lebih spesifik yaitu merupakan spesies tunggal, *Acinetobacter calcoaceticus* (Sidat *et al.*, 1999). Selain berpotensi mengakumulasi polifosfat, bakteri ini juga mampu hidup pada kondisi ekstrim seperti yang dilaporkan oleh Nishimura *et al.* (1981) yang berhasil mengisolasi *Acinetobacter* dari kapas tampon yang telah disterilisasi dengan sinar gamma. Hasil karakterisasi menunjukkan bahwa secara fenotipik, genotipik dan enzimatis terdapat perbedaan dengan spesies *Acinetobacter* lainnya. Kemampuan *Acinetobacter* hidup pada lingkungan yang terpapar radiasi dan sifatnya sebagai akumulator polyP, menjadikan genus ini sangat potensial sebagai agen presipitasi limbah radioaktif uranium.

Acinetobacter calcoaceticus dan *Aeromonas hydrophila* diketahui sebagai akumulator PO_4 yang paling tinggi. Kedua isolat ini mampu mengakumulasi sebanyak 1.84×10^{-10} dan 1.65×10^{-10} mg $\text{PO}_4 \cdot \text{sel}^{-1}$ secara berurutan. *Acinetobacter* secara alami terdapat pada lumpur aktif yang berperan dalam mengabsorpsi orthofosfat dan mengakumulasi dalam bentuk polifosfat, tetapi merupakan minoritas karena tingkat pertumbuhannya yang rendah. *Acinetobacter* spp. jumlahnya sangat sedikit akan tetapi kapasitasnya dalam mengakumulasi polifosfat intraselular paling tinggi diantara mikrobia yang telah diisolasi (Sidat *et al.*, 1999).

METODE PENELITIAN

1. Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri A671 toleran uranium pada konsentrasi 0,4 mM yang bersifat fakultatif anaerob. Sampel penelitian diisolasi dari limbah yang mengandung uranium dari pusat Sains dan Teknologi Akselerator (PSTA) BATAN Yogyakarta.

2. Uji Akumulasi Polifosfat

a. Pembuatan kurva standar PO_4

Larutan standar fosfat dibuat dengan cara 0,4393 gram KH_2PO_4 dilarutkan kedalam air destilat sampai volume 1 L, larutan ini mengandung PO_4 dengan konsentrasi

100 µg/L. Kurva standar P dibuat dengan konsentrasi P- terlarut 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 70, 80 dan 90 µg/L. Sebanyak 1 ml larutan yang mengandung PO₄ konsentrasi 100 µg/L diambil kemudian ditambahkan dengan *ekstrak solution* 4 mL lalu digojok selama 1 menit, dari suspensi tersebut diambil 2 mL kemudian ditambahkan akuades 5 ml dan ammonium molibdat 2 mL lalu dihomogenkan selama 1 menit. Selanjutnya ditambahkan 1 mL SnCl kemudian dihomogenkan dan diinkubasi selama 10 menit. *Optical Density* (OD) larutan ditera dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 660 nm (Olsen & Dean, 1965). Deret standar P dibuat dari hasil pengenceran PO₄ konsentrasi 100 µg/L. Nilai yang diperoleh kemudian dibuat sebagai dasar persamaan regresi linier kurva standar fosfat.

b. Analisis Akumulasi Polifosfat

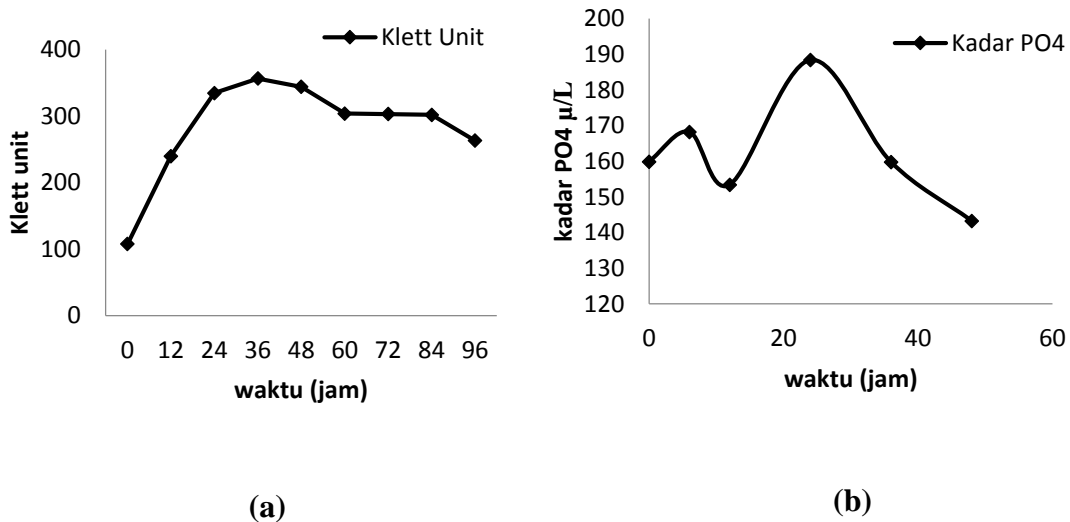
Analisis akumulasi polifosfat diawali dengan *pre-culture* isolat A671 pada medium P-limit dengan sumber karbon hanya natrium asetat dan sumber fosfat terbatas. Isolat diinkubasi dengan cara digojok pada suhu 25 °C selama *overnight* (Groenestijn *et al.*, 1988). Dengan kondisi seperti ini maka gen *ppk* yang berperan dalam sintesis polyphosphate akan menjadi aktif (Gavigan *et al.*, 1999; Kuroda & Ohtake, 2000). Selanjutnya, sel yang telah di *pre-culture* disentrifus dan dicuci dua kali menggunakan buffer Tris hydrochloride dan pellet disuspensikan ke dalam medium P-uptake untuk pengambilan fosfat. Isolat ditumbuhkan dengan digojok 160 rpm pada suhu 25 °C. Asetat pada medium ini digunakan sebagai sumber energi untuk proses penyerapan fosfat, sedangkan streptomisin ditambahkan untuk mencegah pertumbuhan sel (Groenestijn *et al.*, 1988). Pengukuran dilakukan pada 5 fase pertumbuhan yaitu fase lag, fase logaritmik, awal fase stasioner, fase stasioner, dan akhir stasioner.

Analisis akumulasi polifosfat secara kuantitatif menggunakan metode Olsen & Dean (1965). Supernatant diambil 1 mL kemudian ditambah 4 mL *extract solution* lalu digojok selama 1 menit. Suspensi supernatan dan *extract solution* diambil 2 ml kemudian ditambahkan 5 ml akuades dan 2 ml ammonium molibdat lalu digojok. Terakhir ditambahkan 1 ml reagen SnCl₂ yang telah dilarutkan dalam 1N HCl. Sampel yang telah diberi reagen dihomogenkan dan diinkubasi selama 1-10 menit lalu diukur nilai absorbansinya pada panjang gelombang 660 nm menggunakan spektrofotometer *visible*. Kadar fosfat (PO₄) diketahui dengan menggunakan persamaan pada kurva standar PO₄. Analisis secara kualitatif akumulasi polifosfat dilakukan dengan menggunakan pengecatan Neisser yang dapat mewarnai granula-granula polyP didalam sel (Hoppert, 2003).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasi analisis mikroba toleran uranium dalam mengakumulasi polifosfat selama fase pertumbuhannya diukur dengan menganalisis sisa fosfat yang terlarut dalam medium cair yang telah diinokulasikan isolat A671 dan diinkubasi selama 48 jam. Sisa fosfat yang

terlarut dalam medium merupakan jumlah fosfat yang belum diserap ke dalam sel. Hasil analisis jumlah fosfat terlarut dalam medium terlihat pada gambar berikut.



Gambar 1. Hasil analisis akumulasi polifosfat berdasarkan kurva pertumbuhan isolat A671 pada medium *P-uptake* (a) dengan mengamati kadar fosfat yang terlarut dalam medium *P-uptake* (b) yang diukur dari beberapa titik pada fase pertumbuhan isolat A671. Kadar P diukur menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 660 nm.

Berdasarkan hasil pengukuran kadar fosfat yang terlarut dalam medium diketahui bahwa jumlah fosfat yang tersisa di medium paling sedikit pada jam ke-48. Hal ini menunjukkan bahwa penyerapan fosfat terbanyak terjadi pada fase stasioner di jam ke-48. Jumlah fosfat yang diserap oleh sel pada fase pertumbuhan didapatkan dengan cara mengurangi kadar fosfat pada medium kontrol yang berjumlah 303,09 µg/L, dengan kadar fosfat terlarut setelah dilakukan inokulasi. Data hasil analisis penyerapan fosfat ditunjukkan pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Penyerapan fosfat oleh isolat A671

Jam	Fase Pertumbuhan	P-dalam medium (µg/L)	P-uptake (µg/L)
0	Adaptasi	159,92	143,17
6	Ekspansional	168,24	134,85
12	Ekspansional	153,43	149,66
24	Awal stasioner	188,39	114,70
36	Stasioner	159,81	143,28
48	Stasioner	143,32	159,77

Berdasarkan hasil analisis diketahui bahwa kadar fosfat yang diserap oleh sel paling banyak pada fase stasioner yaitu pada jam ke-48 sebanyak 159,77 µg/L. Polifosfat disintesis optimal pada fase stasioner berhubungan dengan peran molekul ini dalam fase tersebut. PolyP berperan penting pada regulasi sel dalam merespon fase stasioner (Tzeng & Kornberg, 1998). Selain itu pada *E. coli*, polyp dibutuhkan untuk menginduksi rpoS, gen sigma faktor RNA polimerase yang meregulasi lebih dari 50 gen yang merespon stres (Shiba *et al.*, 1997; Sword, 1997). Rao *et al.* (1998) menambahkan bahwa pada *E. coli*

yang telah dimutasi gen *ppk* akan gagal beradaptasi pada fase stasioner terhadap tekanan dan *stringencies* sehingga tidak dapat bertahan hidup.

Pada uji akumulasi polifosfat, isolat bakteri sebelumnya ditumbuhkan pada medium TGY yang berisi nutrisi yang kompleks sehingga sel dapat tumbuh optimal. Hal ini bertujuan untuk mendapatkan biomassa sel yang akan digunakan dalam pengujian akumulasi polyP. Kultur isolat kemudian dipindahkan pada medium *limit* fosfat dengan tujuan untuk melepaskan fosfat keluar sel yang telah diakumulasi sebelumnya. Groenestijn *et al.* (1988) menjelaskan bahwa tidak ditemukan adanya granula-granula polifosfat setelah sel *Acinetobacter* ditumbuhkan dalam medium *limit* fosfat hingga fase stasioner. Isolat bakteri yang sudah tidak memiliki granula polifosfat dalam selnya kemudian dipindahkan di medium *P-uptake* untuk melihat kemampuannya dalam menyerap fosfat dari medium. Terdapat beberapa sistem transpor fosfat inorganik (Pi) yang berperan dalam menyerap Pi dari lingkungannya. Ketika Pi tersedia berlebih dilingkungannya, Pi akan diserap oleh sistem transpor inorganik Pi (*Pit*) yang diekspresikan secara konstitutif. Sedangkan pada kondisi kelaparan fosfat, fosfat akan diserap oleh sistem transpor spesifik Pi (*Pst*). Fosfat yang telah diserap selanjutnya disimpan dalam bentuk polyP (Kulaev *et al.*, 2004; Hirota *et al.*, 2010).

Polifosfat didalam sel terdapat dalam 3 fraksi yaitu polyP rantai pendek yang terdapat pada permukaan sel (periplasmik), polifosfat rantai panjang yang terlarut dalam sitoplasma dan polyP rantai panjang yang terdapat dalam bentuk granular-granular (volutin) (Clark *et al.*, 1986). Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya dijelaskan bahwa pada saat mikrobia tumbuh cepat, maka hanya sedikit cadangan polifosfat terakumulasi dalam sel, sedangkan apabila pertumbuhan terganggu (terhenti) karena nutrisinya tidak seimbang (tidak sesuai) maka sejumlah besar cadangan polifosfat tetap terakumulasi (Wilkinson & Duguid, 1960; Harold & Sylvan, 1963). Hasil yang didapatkan ini berkesesuaian dengan penelitian yang dilakukan sebelumnya bahwa terdapat hubungan antagonistik antara pertumbuhan sel dan akumulasi polifosfat. Menurut Harold & Sylvan (1963) terdapat hubungan *reciprocal* antara metabolisme polifosfat dan metabolisme asam nukleat, sehingga saat sel tumbuh dan dimulai sintesis asam nukleat, maka polifosfat dalam sel akan didegradasi dan ditransfer untuk sintesis asam nukleat dan ketika pertumbuhan terganggu atau terhenti sehingga sintesis asam nukleat juga terhenti maka tidak ada degradasi polifosfat untuk sintesis asam nukleat sehingga cadangan polifosfat tetap terakumulasi dalam jumlah besar. Identifikasi akumulasi polyP tertinggi berdasarkan fase pertumbuhan isolat berperan penting dalam tujuan aplikasi bakteri untuk meremediasi limbah logam yang memanfaatkan polifosfat pada proses penyerapan logam dari lingkungan. Berdasarkan hasil ini dapat diketahui bahwa isolat A671 paling optimal mengakumulasi polyP pada fase stasioner terutama pada jam ke 48.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil ini dapat diketahui bahwa isolat A671 paling optimal mengakumulasi polyP pada fase stasioner terutama pada jam ke 48 dan akumulasi polyp terendah ditemukan pada fase awal stasioner pada jam ke 24.

SARAN

Perlu dilakukan uji akumulasi polyp dengan menggunakan beberapa sel bakteri toleran uranium lainnya sebagai pembanding untuk mengetahui korelasi antara kemampuan mengakumulasi poliP terhadap kemampuan presipitasi uranium.

DAFTAR PUSTAKA

- Clark, J.E., Beegen, H. and Wood, H.J. (1986). Isolation of intact chains of polyphosphate from *Propionibacterium shermanii* grown on glucose or lactate. *J. Bacteriol* 168: 1212 - 1219.
- Gavigan, J., L.M.Marshall dan A.D.W.Dobson. (1999). Regulation of Polyphosphate Kinase Gene Expression in *Acinetobacter baumannii* 252. *Microbiology* 145: 2931-2937.
- Groenestijn, J.V., Vlekke, G.J.F.M., Anink, D.M.E., Deinema, M.H. and Zehnder, A.J.B. (1988). Role of Cations in Accumulation and Release of Phosphate by *Acinetobacter* Strain 210A. *App. and Env.Microbiol.*54 (12): 2894-2901.
- Harold, F.M. and Sylvan, S. (1963). Accumulation of Inorganic Polyphosphate in *Aerobacter aerogenes*.II. Environmental Control and The Role of Sulfur Compounds. *J. Bacterial.* 86: 222-231.
- Hirota, R., Kuroda, A., Kato, J., and Ohtake, H. (2010). Bacterial Phosphate Metabolism and Its Application to Phosphorus Recovery and Industrial Bioprocesses. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 109: 423-432.
- Hoppert, M. (2003). *Microscopic Techniques in Biotechnology.* Wiley- VcH Verlag, GmnH & Co, KGaA, Weinheim, Germany.
- Jeon, C.O., D.S.Lee, J.M. Park. (2002). Microbial communities in activated sludge performing enhanced biological Phosphorus removal in a sequencing batch reactor. *Water Research.* 37: 2195-2205.
- Kulaev, I.S., Vagabov, V.M. and Kulakovskaya, T.V. (2004). *The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates*;2ed. John Wiley & Sons,Ltd. England.
- Kuroda, A., and Ohtake, H. (2000). Molecular Analysis Of Polyphosphate Accumulation In Bacteria. *Biochemistry (Moscow)* 65 (3) : 304-308.
- Mullan, A., J.P.Quinn, and J.W.McGrath. (2002). Enhanced Phosphate Uptake and Polyphosphate accumulation in *Burkholderia cepacia* grown under Low-pH conditions. *Microbial Ecology.*44: 69-77.

- Muthmainna, H. (2018). KARAKTERISASI FENOTIPIK ISOLAT BAKTERI TOLERAN URANIUM. *Biosel (Biology Science and Education): Jurnal Penelitian Sains dan Pendidikan*, 7(1), 23-28.
- Nishimura, Y., Kairiyama, E., Shimadzu, M., and Iizuka, H. (1981). Characterization of a Radiation-Resistant Acinetobacter. *Zeitschrift fur Allgemeine mikrobiologie*. 21:125-130.
- Olsen, S.R. and Dean, L.A. (1965). *Phosphorus Methods of Soil Analysis Part 2*. American Society of Agronomy, Inc. USA.
- Rao, N.N., Liu, S. and Kornberg, A. (1998). Inorganic Polyphosphate in Escherichia coli: The phosphate Regulon and The Stringent Response. *J. Bacteriol.* 180(8): 2186
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N., and Kornberg, A. (1997). *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 94: 11210-11215.
- Sidat, M., F.Bux, and H.C.Kasan. (1999). Polyphosphate accumulation by bacteria isolatd from activated sludge. *Water SA*. 25 no. 2
- Swords. W.E., Cannon, B.M. and Benjamin, W.H. (1997). Avirulence f LT2 Strains of Salmonella typhimurium Results from a Defective rpoS Gene. *Infection and Immunity*. 65(6): 2451-2453.
- Tunpiboonsak, S., Mongkolrob, R., Kitudomsub, K., Thanwatanaying, P., Kiettipirodom, Tungboontina, Y., and Tungpradabkul, S. (2010). Role of a Bulkholderia pseudomallei Polyphosphate Kinase In an Oxidative Stress Response, Motilities, and Biofilm Formation. *The Journal of microbiology*.48: pp.63-70
- Tzeng, C.M. and Kornberg, A. (1998). Polyphosphate Kinase is Highly Conserved In many Bacterial Pathogens. *Mol.Microbiol.* 29: 381-382.
- Vanveen, H.W., Abee, T., Kortstee, G.J.J., Konings, W.N., and Zehnder, A.J.B. (1994). Substrate Specificity of Two Phosphate Transport System of Acinetobacter johnsonii 210A in Relation to Phosphate Speciation in Its Aquatic Environment. *The Journal of Biological Chemistry*. 269(23): pp 16212-16216.
- Wilkinson, J.F., and Duguid, J.P. (1960). The Influences Of Cultural Conditions On Bacterial Cytology. *Intern.Rev.Cytol.* 9 : 1-76.
- Zvyagilskaya, R., Allard, P. and Persson, B.L. (2000). Two systems for Phosphate Uptake in Yarrowia lipolytica Cells Grown at Acidic Conditions. *IUBMB Life*. 49: 143-147