

# Marga *Candida*, Khamir Tanah Pelarut Posfat yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Papua

## *Candida* sp. yeast solubilizing phosphate isolated from soil in Wamena Biological Garden, Papua

ATIT KANTI<sup>♥</sup>

Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Bogor 16002.

Diterima: 16 Januari 2006. Disetujui: 6 Maret 2006.

### ABSTRACT

Twenty isolates of yeast were isolated from soil of Wamena Biological Garden. Out of 20 isolates tested, 3 isolates were able to increase solubility of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , as indicated by formation of clearing zone surrounding growing colonies. Nutrient of media, which was mainly contained of glucose (20%), were metabolically converted into of either biomass or and metabolic product that may have cause a change of pH profile, and biomass during cell cultivation. Conversely, pH of media decreased during cell cultivation, and that may have cause acceleration of  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dissolution, which have resulted in an increased of ortho-fosfat in the bulk solution during cell growth. The three isolates having ability of accelerating  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dissolution belonging to genera of *Candida*. The three isolates have ability to solubilize about 5-6 mg/L-P, with phosphomonoesterase activity of about 0.10-0.65 unit. Ecological incentive of Fosfat solubilizing yeasts in soil ecosystem are enormous, among other is provision of available P for plant growth and for other soil microorganism.

© 2006 Jurusan Biologi FMIPA UNS Surakarta

**Key words:** yeast, *Candida*, yeast solubilizing phosphate, Wamena Biological Garden.

### PENDAHULUAN

Isolasi dan identifikasi khamir terus menerus dilakukan oleh Kelompok Taksonomi, Bidang Mikrobiologi Pusat Penelitian Biologi LIPI, Bogor sehingga berhasil menambah koleksi isolat-isolat mikroba dari berbagai ekosistem di Indonesia. Salah satu area kajian penelitian diversitas khamir adalah Kebun Biologi Wamena (KBW). KBW merupakan salah satu kawasan ekosistem yang dilindungi karena memiliki kekayaan biodiversitas yang tinggi. Pada areal ini dilakukan kegiatan penelitian biodiversitas berlanjut, salah satunya adalah eksplorasi dan inventarisasi mikroba dataran tinggi. Isolasi khamir tanah merupakan rangkaian dari kegiatan tersebut, dan ditujukan untuk mengetahui kekayaan jenis mikroba tanah yang berpotensi untuk meningkatkan kesuburan tanah atau sumber genetika untuk penelitian bidang ilmu lain. Khamir dikenal memiliki rentang ekologi cukup luas dan mampu hidup pada daerah ekstrem (Spencer, 1997), dan biasanya banyak ditemukan pada lingkungan yang memiliki bahan organik tinggi (Kurtzman dan Fell, 1998).

Telah banyak dilakukan penelitian tentang metabolisme mikroba tanah, terutama bakteri dan jamur yang mampu menginduksi proses biotransformasi senyawa fosfat di dalam tanah. Mikroba tanah menghasilkan kompleks enzim fosfatase yang berperan dalam membantu mineralisasi fosfat (Tabatai 1982; Adams dan Pate, 1992). Fosfatase

tanah digolongkan ke dalam dua kelompok utama berdasarkan pH optimum reaksi mineralisasi fosfat, yaitu kelompok fosfatase asam yang optimum mengkatalisis mineralisasi organik fosfat di bawah pH netral, dan fosfatase alkalin yang bekerja optimum di atas pH netral. Beberapa marga jamur seperti *Aspergillus* (Vassilev *et al.*, 1996), dan bakteri seperti *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, dan *Rhizobium* (Yanai *et al.*, 1995) dilaporkan mampu memacu mineralisasi fosfat di dalam tanah (Abd-Alla, 1994; Vassilev *et al.*, 1996; Toro *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1998). Beberapa jenis khamir mempunyai aktivitas fosfatase dan ligninase seperti *Trichosporon pullulans* (Slavikova *et al.*, 2002).

Penelitian ini bertujuan untuk menginventarisasi dan mengidentifikasi khamir tanah KBW yang berperan dalam siklus fosfat diharapkan dapat menambah informasi mengenai peran ekologi khamir tanah.

### BAHAN DAN METODE

#### *Isolasi khamir pelarut fosfat*

Untuk mendapatkan khamir pelarut fosfat dilakukan dua tahapan isolasi, yaitu pengkayaan kultur khamir dengan menggunakan media cair YNB 20% glukosa, dan media pikovskaya padat selektif untuk pertumbuhan khamir pelarut fosfat. Media pikovskaya terdiri dari  $5 \times 10^{-1}$  g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 1 g glukosa,  $2 \times 10^{-2}$  g NaCl,  $2 \times 10^{-2}$  g KCl,  $1 \times 10^{-2}$  g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $2,5 \times 10^{-4}$  g  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $2,5 \times 10^{-4}$  g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ,  $5 \times 10^{-2}$  g ekstrak ragi, ditambah 100 mL air destilata. Media YNB 20% glukosa terdiri dari 1,7 g YNB ditambah 5 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , dalam 1 L akuades, dan ditambah dengan glukosa, sehingga didapatkan 20% kadar glukosa di dalam

♥ Alamat korespondensi:  
Jl.Ir. H.Juanda 18 Bogor 16002  
Tel. +62-251-324006. Fax.: +62-251-325854  
e-mail: atitkanti@yahoo.com

media. Sebanyak 1 g sampel tanah ditimbang dan dimasukkan ke dalam 5 mL media cair YNB 20% glukosa yang telah disterilisasi. Larutan tersebut dikocok selama 3 hari dengan menggunakan *shaker* (160 rpm). Setelah 3 hari, dari larutan tersebut diambil 0,1 mL dan ditanam pada media pikovskaya, diinkubasi selama 24 jam atau lebih, selanjutnya khamir diamati morfologinya.

#### Seleksi Isolat khamir

Isolat khamir dimurnikan dengan metode cawan gores pada media pikovskaya. Khamir yang dapat melarutkan fosfat adalah isolat yang menghasilkan zona bening disekeliling koloni yang tumbuh setelah 3 hari inkubasi. Perbandingan luas zona bening dengan luas koloni dijadikan kriteria untuk pemilihan isolat yang akan diuji aktivitas enzim fosfomonoesterase (PMEase).

#### Pengukuran pH dan rapat optis (OD)

Sebanyak 20 mL sampel diukur nilai pH-nya. Sebanyak 500  $\mu$ L sampel diencerkan dengan 7 mL akuades, dan diukur nilai OD dengan spektrofotometer (Thermo Spectronic Type Genesys 20) pada panjang gelombang 600 nm. Sisa sampel disentrifugasi selama 30 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan yang dihasilkan diambil untuk pengukuran lebih lanjut.

#### Pengukuran konsentrasi glukosa

Sampel diambil 1 mL dan ditambahkan 1 mL DNS setelah itu dipanaskan di atas pemanas air selama 7 menit kemudian diukur nilai OD pada panjang gelombang 540 nm. Nilai OD sampel dikonversi menjadi konsentrasi glukosa berdasarkan persamaan larutan glukosa standar.

#### Pengukuran fosfat terlarut

Sampel diambil 3 mL dan ditambahkan 500  $\mu$ L reagen campuran, setelah itu didiamkan selama 15-30 menit. Konsentrasi fosfat diukur dengan panjang gelombang 880 nm. Nilai OD dikonversi menjadi konsentrasi fosfat terlarut berdasarkan persamaan larutan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  standar. Larutan campuran terdiri dari 10 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N ditambahkan dengan 1 mL larutan potassium antimonil tartrat, kemudian ditambahkan dengan 3 mL larutan ammonium molibdat dan 6 mL larutan asam askorbat.

#### Aktivitas enzim fosfomonoesterase (PMEase)

Sebanyak 1 mL supernatan sampel dan kontrol ( $\text{CaCl}_2$  0,5 M) ditambah 1 mL *p*-nitrofenil fosfat 115 mM + 4 mL bufer asetat) pH 6,5, kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 38°C. Setelah ditambah 1 mL  $\text{CaCl}_2$  0,5 M dan 4 mL NaOH 0,5 M lalu dikocok dengan vortex selama 1 menit. Sampel dan kontrol diukur nilai OD pada panjang gelombang 400 nm. Nilai OD sampel dan kontrol dikonversi menjadi aktivitas enzim fosfomonoesterase berdasarkan persamaan larutan *p*-nitrofenil standar (Tabatabai, dan Bremner, 1969; Darrah dan Harris, 1986).

#### Isolat khamir dan media pemeliharaan

Dua puluh isolat yang diisolasi dari tanah Kebun Biologi Wamena, Propinsi Papua dan 4 isolat acuan : *Saccharomyces cerevisiae* LIPI MC 415, *Debaromyces hansenii*<sup>T</sup> (type strain) JCM 5912, *Rhodotorula minuta*<sup>T</sup> TUA 0960 Y, *Candida catenulata*<sup>T</sup> JCM 1604 digunakan pada penelitian ini. Untuk pemeliharaan, isolat ditumbuhkan pada media padat YME dan disimpan pada suhu 4°C (Kirshop dan Doyle, 1991).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

*Candida* merupakan marga dominan khamir tanah dari Kebun Biologi Wamena yang dapat diisolasi dengan kadar glukosa yang tinggi (20%). Pemberian kadar glukosa yang tinggi ini pada media merupakan cara khas yang digunakan untuk memberikan kesempatan khamir yang diisolasi dari tanah tumbuh lebih baik daripada khamir lain yang kemungkinan hadir akibat kontaminasi (Yarrow, 1998). Lima puluh isolat khamir berhasil diisolasi dari 9 jenis tanah di KBW. Berdasarkan bentuk morfologi dan koloni yang tumbuh selanjutnya 20 jenis isolat dipilih kemudian ditumbuhkan pada media pikovskaya untuk mengetahui kemampuan isolat khamir dalam melarutkan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Hanya tiga isolat yang membentuk zona bening cukup besar (Tabel 1) yaitu di atas 2,1 (perbandingan antara luas zona bening dengan luas koloni khamir), setelah dikultivasi selama 3 hari.

**Tabel 1.** Seleksi isolat khamir tanah yang mampu melarutkan kalsium fosfat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Marga	Pembentukan zona bening
<i>Candida</i>	+
<i>Candida</i>	+
<i>Candida</i>	+
<i>Rhodotorula</i>	-
<i>Rhodotorula</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Debaryomyces</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Cryptococcus</i>	-
<i>Cryptococcus</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Rhodotorula</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Candida</i>	-
<i>Candida</i>	-

*Candida* merupakan khamir tanah yang umum ditemukan pada tanah dengan kandungan bahan organik tinggi. Marga *Candida* merupakan khamir yang mempunyai diversitas fisiologi cukup tinggi dan mempunyai jenis cukup tinggi (Prasad *et al.*, 2005). Marga *Candida* juga banyak dimanfaatkan untuk pembuatan pakan ternak. Kemampuan marga ini melarutkan fosfat menambah informasi mengenai diversitas fisiologi marga ini.

#### Perubahan keasaman media

Perubahan keasaman media merupakan salah satu indikator aktivitas metabolisme sel. Penurunan pH medium terjadi sangat cepat pada awal kultivasi kemudian perlahan menurun pada akhir masa inkubasi. Penurunan pH merupakan salah satu penyebab pelarutan kalsium fosfat menjadi orthofosfat. Produksi asam organik seperti sitrat, propionat, laktat hasil metabolisme glukosa diyakini merupakan salah satu pendorong mineralisasi kalsium fosfat untuk menghasilkan fosfat (Tarafdar dan Claassen, 1988; Tarafdar *et al.*, 1988; Tarafdar dan Marschner, 1994).

#### Konsumsi glukosa

Glukosa merupakan sumber karbon utama yang dapat digunakan oleh khamir, dan jenis senyawa karbon yang

dapat digunakan oleh khamir merupakan penciri suatu marga (Kurtzman dan Fell, 1998; Barnett dan Pankhurst, 2000). Glukosa dapat digunakan dengan mudah oleh ketiga isolat yang diuji, absorpsi terjadi sangat cepat pada awal kultivasi dan sedikit menurun setelah hari ke-5. *Candida* merupakan khamir yang dapat menggunakan variasi karbon cukup luas. Marga ini mempunyai rentang distribusi ekologi yang cukup luas (Spencer, 1997).

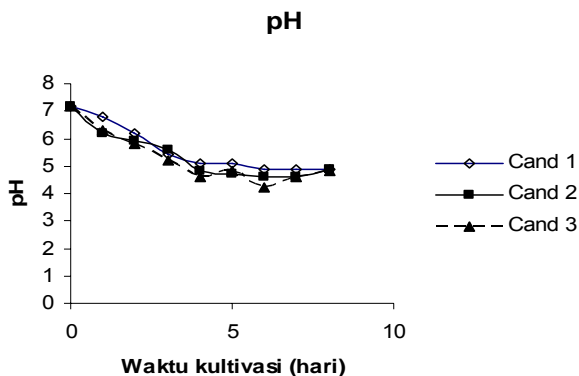
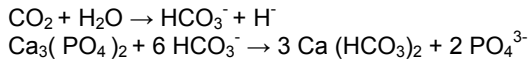
**Pertumbuhan biomassa**

Konsumsi glukosa yang sangat cepat terjadi pada awal kultivasi diikuti dengan pertumbuhan sel yang juga cukup tinggi (Gambar 3). Ketiga isolat memperlihatkan pola pertumbuhan yang serupa. Marga *Candida* mampu tumbuh cepat dan dapat memanfaatkan glukosa secara optimum. Hal itu mengindikasikan bahwa penggunaan glukosa yang tinggi untuk isolasi khamir mengakibatkan kemungkinan mendapatkan marga *Candida* cukup besar. Untuk mendapatkan jenis khamir yang lain mungkin perlu dilakukan variasi sumber karbon untuk media isolasi. Beberapa peneliti menyarankan penggunaan sumber karbon alternatif seperti misalnya asam propionat atau senyawa karbohidrat yang lain untuk mendapatkan jenis-jenis yang lebih heterogen (Lachance, 1993).

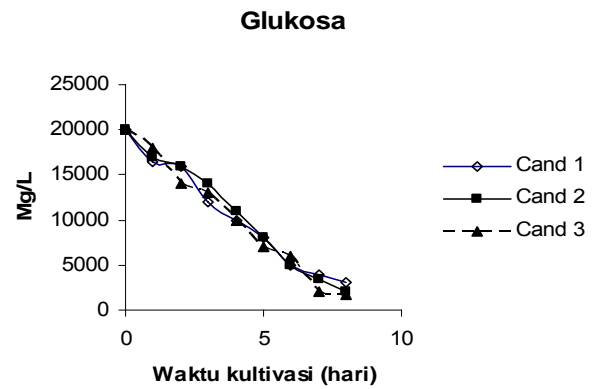
**Fosfat terlarut**

Kemampuan untuk melarutkan kalsium fosfat merupakan karakter fisiologi khamir yang paling dicari untuk menentukan peran ekologi di dalam ekosistem tanah. Marga *Candida* yang diuji mampu melarutkan fosfat lebih dari 5 mg/L (Gambar 4). Hal tersebut membuktikan bahwa ketiga isolat merupakan mikroba tanah yang berperan dalam hal mineralisasi fosfat. Selain *Candida* beberapa jenis khamir seperti *Pichia*, dan *Rhodotorula* juga mampu melarutkan fosfat (Kanti, 2005). Kemampuan *Candida* melarutkan fosfat mungkin disebabkan oleh kemampuannya melakukan fermentasi glukosa menjadi beberapa asam organik seperti asam laktat, asam sitrat, dan glukonat (Huang *et al.*, 2003). Akibat pembentukan asam organik tersebut terjadi penurunan pH medium dan penurunan pH ini mengakibatkan kestabilan kelarutan  $Ca_3(PO_4)_2$ , berubah di dalam air yaitu lebih kepada pembentukan orthofosfat. Ada reaksi lain yang bertanggung jawab dalam pembentukan orthofosfat akibat pelepasan  $CO_2$  hasil respirasi khamir.

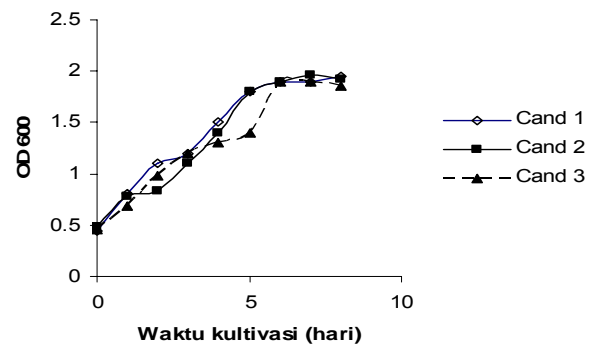
Menurut Tate (1984) proses yang terjadi sebagai berikut:



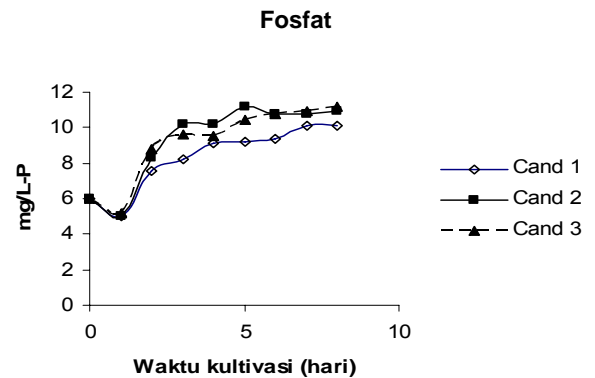
Gambar 1. Profil pH selama kultivasi.



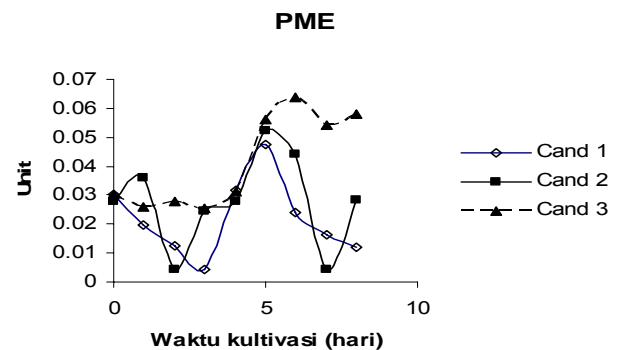
Gambar 2. Konsumsi glukosa selama kultivasi.



Gambar 3. Profil pertumbuhan *Candida*.



Gambar 4. Profil ortofosfat selama waktu kultivasi.



Gambar 5. Aktivitas enzim phosphomonoesterase selama kultivasi.

### Aktivitas PMEase

PMEase merupakan enzim yang berperan dalam proses pelepasan ikatan ester fosfat pada fosfat organik (Boero dan Thien, 1979; Appiah dan Thomas, 1982; Asmar *et al.*, 1995). PMEase juga diproduksi oleh *Candida* seperti ditunjukkan oleh Gambar 5. Produksi PMEase terjadi pada pH yang agak asam dan ini mengindikasikan bahwa PMEase yang dihasilkan oleh *Candida* merupakan PMEase asam. Kebanyakan mikroba tanah menghasilkan PME asam (Torriani, 1960; Hebrien dan Neal, 1990). Kemampuan ketiga isolat menghasilkan enzim PMEase serta menurunkan pH membuktikan bahwa *Candida* merupakan marga khamir yang memegang peran penting dalam siklus unsur hara P di dalam tanah. Selain mikroba tanah, tanaman seperti gandum, jagung dan pinus juga menghasilkan enzim fosfatase dan senyawa organik yang berperan dalam proses mineralisasi P (O'Connell dan Grove, 1985; Dinkelaker dan Marschner, 1992; Awad *et al.*, 1994; Asmar *et al.*, 1995; Zoysa *et al.*, 1997; Jones, 1998), sehingga siklus fosfat di dalam tanah melibatkan proses biokimia yang sangat kompleks.

### KESIMPULAN

Augmentasi 20% glukosa efektif untuk mengisolasi khamir tanah Kebun Biologi Wamena. Khamir tanah yang diisolasi didominasi oleh Marga *Candida*. Marga ini mampu menggunakan glukosa dengan cepat dan mempunyai kemampuan melarutkan fosfat organik dan anorganik. Dengan kemampuan tersebut marga ini mempunyai peran yang cukup penting dalam pelarutan fosfat tanah.

### DAFTAR PUSTAKA

- Abd-Alla, M.H., 1994. Posfatase and the utilisation of organic phosphorus by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viceae*. *Letters in Applied Microbiology* 18: 294-296.
- Adams, M.A., and J.S. Pate, 1992. Availability of organic and inorganic forms of phosphorus to lupins. *Plant and Soil* 145:107-113.
- Appiah, M.R. dan R.L. Thomas, 1982. Inositol fosfat and organic phosphorus contents and posfatase activity of some Canadian and Ghanaian soils. *Canadian Journal of Soil Science* 62: 31-38.
- Asmar, F., T.S., Gahoonia, and N.E., Nielsen. 1995. Barley genotypes differ in activity of soluble extracellular posfatase and depletion of organic phosphorus in the rhizosphere soil. *Plant and Soil* 172: 117-122.
- Awad, F., V., Romheld, and H., Marschner, 1994. Effects of root exudates on mobilisation in the rhizosphere and uptake of iron by wheat plants. *Plant and Soil* 165: 213-218.
- Barnett, J.A. and R.J. Pankhurst. 2000. *A New Key to the Yeast*. New York: American Elsevier Publishing Company, Inc.
- Boero, G., Thien, S., 1979. Posfatase activity and phosphorus availability in the rhizosphere of corn roots. In: Harley, J.L., and R.S. Russell, Jr. (eds.). *The Soil Root Interface*. London: Academic Press.
- Darra, P.R., and P.J. Harris, 1986. A fluorimetric method for measuring the activity of soil enzymes. *Plant and Soil* 92: 81-88.
- Dinkelaker, B., and H. Marschner. 1992. In vivo demonstration of acid posfatase activity in the rhizosphere of soil grown plants. *Plant and Soil* 144: 199-205.
- Hebrien, S.A., and J.L. Neal. 1990. Soil pH and posfatase activity. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 21: 439-456.
- Huang Q, Z. Zhao, and W. Chen. 2003. Effects of several low-molecular weight organic acids and fosfat on the adsorption of acid posfatase by soil colloids and minerals *Chemosphere* 52: 571-579
- Jones, D.L., 1998. Organic acids in the rhizosphere—a critical review. *Plant and Soil* 205: 25-44.
- Kanti, A. 2005. *Pichia membranifaciens* dan *Rhodotorula minuta* khamir pelarut fosfat yang diisolasi dari Tanah Taman Nasional Gunung Halimun. *Gakuryoku* 11 (2): 156-161.
- Kirshop, B.E. and A. Doyle. 1991. *Maintenance of Microorganism and Cultured Cells. A Manual of Laboratory Methods*. New York: Academic Press, Ltd.
- Kurtzman C.P. and J.W. Fell. 1998. *The Yeast A Taxonomic Study*. New York: Elsevier.
- Lachance, M.A. 1993. *Metschnikowia agaveae* sp.no., a heterothallic haploid yeast from blue agave. *Canadian Journal of Microbiology* 39: 562-566.
- O'Connell, A.M., and T.S. Grove, 1985. Acid posfatase activity in Karri (*Eucalyptus diversicolor* F. Muell.) in relation to soil fosfat and nitrogen supply. *Journal of Experimental Botany* 36: 1359-1372.
- Prasad G.S., S. Mayilraj, N. Sood, V. Singh, K. Biswas, and B. Lal. 2005. *Candida digboiensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species from an acidic tar sludge-contaminated oilfield. *International Journal of Systematics and Evolution Microbiology* 55: 967-972.
- Rao, M.R., A. Niang, F. Kwesiga, B. Duguma, S. Franzel, B. Jama, and R. Buresh. 1998. Soil fertility replenishment in sub-Saharan Africa: new techniques and the spread of their use on farms. *Agroforestry Today* 10: 3-8.
- Sláviková E., B. Košíková, and M. Mikulášová. 2002. Biotransformation of waste lignin products by the soil-inhabiting yeast *Trichosporon pullulans*. *Canadian Journal of Microbiology/Review Canadian Microbiology* 48(3): 200-203.
- Spencer, J.F.T. 1997. *Yeast in Natural and Artificial Habitats*. Berlin: Springer-Verlag.
- Tabatabai, M.A., 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L., E.M. Miller, and D.R. Keeney. (eds.), *Methods of Soil Analysis; Part II. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd edition. Madison Wisconsin: ASA and SSSA.
- Tabatabai, M.A., and J.M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl fosfat for assay of soil posfatase activity. *Soil Biology and Biochemistry* 1: 301-307.
- Tarafdar, J.C., and N. Claassen, 1988. Organic phosphorus compounds as aphosphorus source for higher plants through the activity of posfatase produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 5: 308-312.
- Tarafdar, J.C., Marschner, H., 1994. Posfatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. *Soil Biology and Biochemistry* 26: 387-395.
- Tarafdar, J.C., A.V. Rao, and K. Bala. 1988. Production of posfatase by fungi isolated from desert soils. *Folia Microbiologica* 33: 453-457.
- Tate, K.R., 1984. The biological transformations of P in soil. *Plant and Soil* 76: 245-256.
- Toro, M., R. Azcón, and J.M. Barea. 1997. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil fosfatsolubilizing rhizobacteria to improve rock fosfat bioavailability(32P) and nutrient cycling. *Applied Environmental Microbiology* 63: 4408-4412.
- Torriani, A., 1960. Influence of inorganic fosfat in the formation of posfatases by *Echerichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* 38: 460-479.
- Vassilev, N., I. Franco, M. Vassileva, and R. Azcón. 1996. Improved plant growth with rock fosfat solubilized by *Aspergillus niger* grown on sugar beet waste. *Bioresource Technology* 55: 237-241.
- Yanai, R.D., T.J. Fahey, and S.L. Miller. 1995. Efficiency of nutrient acquisition by fine roots and mycorrhizae. In: Smith, W.K. and T.M. Hinckley (eds.). *Resource Physiology of Conifers: Acquisition, Allocation and Utilization*. London: Academic Press.
- Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of Yeast. In Kurtzman, C.P. and J.W. Fell. *The Yeast, a Taxonomic Study*. 4th edition. Amsterdam: Elsevier.
- Zoysa, A.K.N., P. Loganathan, and M.J. Hedley, 1997. A technique for studying rhizosphere processes in tree crops: soil phosphorus depletion around camellia roots. *Plant and Soil* 190: 253-265.