

多功能非共生固氮細菌 *Azotobacter*屬之介紹與應用

撰文/ 簡宣裕 · 張明暉 · 林素禎

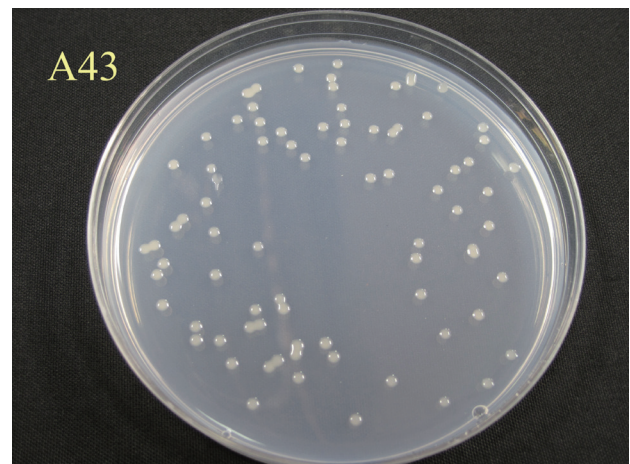
前言

臺灣每年肥料的用量已有過度施用的問題，故行政院農業委員會正大力推動合理化施肥，以減少肥料過量不當使用對土壤、空氣、水質及生態造成負面之衝擊。又化學肥料製造過程需要耗費大量能源，石油能源是珍貴與有限的，化學氮肥的價格在可見的未來，會因為能源成本的提高而大幅上漲，而連帶的影響到農業生產成本與糧食價格上漲，因此有必要開發供應作物生長所需氮素的新來源。大氣中充滿著氮氣，藉由微生物固氮酵素的作用可將氮氣 $N_2(g)$ 固定為生物性氮肥，而 *Azotobacter* (圖一) 為兼具固氮能力與分泌促進作物生長物質(圖二) 等功能之菌屬，應用於產製生物性肥料及多功能有機質肥料，可提供農民另一種氮肥的選擇，以避免對化學氮肥的過度依賴。

非共生固氮細菌 *Azotobacter* 屬之介紹

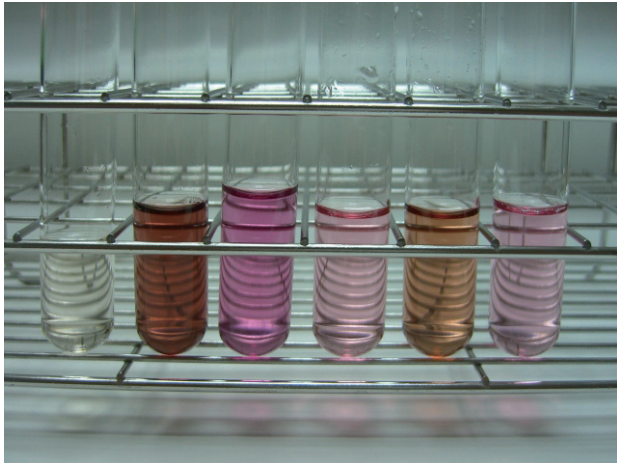
(一) *Azotobacter* 的分類

Azotobacter 屬於細菌界 (Bacteria)，變形細菌門 (Proteobacteria)， γ 變形細菌綱 (Gammaproteobacteria)，假單胞菌目 (Pseudomonadales)，短桿固氮細菌科



圖一 非共生固氮細菌 *Azotobacter* sp. 於無氮固體培養基生長情形

(Azotobacteraceae)，短桿固氮細菌屬 (*Azotobacter*)。第一個短桿固氮細菌是由荷蘭微生物學家 Martinus Beijerinck 於西元 1901 年所發現的，菌種名為色球短桿固氮細菌 (*Azotobacter chroococcum*)。至目前為止短桿固氮細菌屬至少有 11 種，分別為亞美尼亞短桿固氮細菌 (*A. armeniacus*)、AR 短桿固氮細菌 (*Azotobacter* sp. AR)、倍傑林克短桿固氮細菌 (*A. beijerinckii*)、色球短桿固氮細菌 (*A. chroococcum*)、DCU26 短桿固氮細菌 (*Azotobacter* sp. DCU26)、



圖中顏色愈深表示IAA的濃度愈高

圖二 非共生固氮細菌 *Azotobacter* spp. 產出 IAA

FA8 短桿固氮細菌 (*Azotobacter* sp. FA8)、黑色短桿固氮細菌 (*A. nigricans*)、百喜草短桿固氮細菌 (*A. paspali*)、鹽分短桿固氮細菌 (*A. salinestrus*)、熱帶短桿固氮細菌 (*A. tropicalis*) 及葡萄園短桿固氮細菌 (*A. vinelandii*)。

(二) *Azotobacter* 屬的分佈

Azotobacter 屬是游離性 (free living) 細菌，通常生長於中性至微鹼性土壤，但在寒冷氣候、作物生長季短及低 pH 值的北極與南極土壤也可以發現它的存在。*Azotobacter* 屬於淡水與海水中、植物根圈及蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 的卵囊亦可被發現。由大多數的土壤可以分離出色球固氮細菌、敏捷固氮細菌、百喜草固氮細菌及葡萄園固氮細菌。每公克土壤 *Azotobacter* 屬的族群數為 10^4 - 10^5 個，族群數會受到土壤中其他微生物的影響，例如頭孢子菌屬 (*Cephalosporium*) 會抑制 *Azotobacter* 屬的生長 (Gandora *et al.*, 1998; Sharma, 2002; Matyniuk, 2003; Tjera *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2007)。

(三) *Azotobacter* 屬的外觀形態與細胞大小

Azotobacter 屬的細胞經革蘭氏染色後呈現陰性 (Gram negative)。外觀為多變的形態，通常為卵圓

形，但是有時候為桿狀、球狀及各種形狀，於顯微鏡觀察時，可以看到分散的單一細胞、不規則串狀或不同長度鏈狀，以及含有脂肪的包含體 (inclusion body)。培養基中蛋白胨 (peptone) 成分的甘胺酸 (glycine) 通常會影響細胞的形狀，*Azotobacter* 屬細胞的大小為 $2-10 \times 1-2.5 \mu\text{m}$ (Vela, 1972; Tchan and New, 1984; Sharma, 2002)。

(四) *Azotobacter* 屬的生理特性

1. 對碳源的利用及運動方式

Azotobacter 屬是好氧性微生物，能利用簡單醣類、醇類、有機酸鹽類等有機化合物做為碳源，提供電子以進行氧化還原反應，並獲得能量。年輕的細胞利用周鞭毛 (peritrichous flagella) 運動，老細胞會轉變為沒有運動性的囊胞 (cyst) (Baillie *et al.*, 1962; Tchan and New, 1984)。

2. 囊胞的形成及特性

Azotobacter 屬培養過久之後細胞的老化及細胞在不利的環境條件下，營養細胞 (vegetative cell) 會產生一層厚黏液的莢膜 (capsule)，進而形成囊胞，此外改變培養基中養分的濃度與添加某些有機物質，譬如乙醇、正丁醇或 β - 羥基丁酸鹽，也會使營養細胞轉變為囊胞。*Azotobacter* 屬的囊胞是比營養細胞更能抵抗不利的環境因子，更特別的是抵抗紫外線的能力是營養細胞的 2 倍，囊胞也能抗乾旱、超音波及 γ 射線與太陽光的照射。囊胞能在乾土中存活 24 年，當環境有適當的酸鹼值、溫度及碳源時囊胞就會萌芽，通常形成新的營養細胞需要 4-6 小時 (Socolofsky and Wyss, 1962; Layne and Johnson, 1964; Sadoff, 1975; Tchan and New, 1984)。

3. 產生色素

當 *Azotobacter* 屬在固體培養基生長時可以產生扁平且膏狀，大小約 5-10 mm 的菌落，菌落的顏色依菌種的不同而有黑棕色、綠色及其它顏色，也可能為無色 (Jensen, 1954; Johnstone, 1955; Tchan

and New, 1984)。

4. 適合生長的酸鹼值與溫度

較適合 *Azotobacter* 屬細胞生長與固氮作用的酸鹼值為 pH 7.0-7.5，但是細胞在 pH 4.8-8.5 範圍內皆可以生長。較適合 *Azotobacter* 生長的溫度為 20-30°C，溫度超過 35°C 則不利於細胞生長 (Tchan and New, 1984; George, 2005)。

Azotobacter 屬的功能與應用

(一) *Azotobacter* 屬的功能

1. 可以固定大氣中的氮(N₂)

Azotobacter 屬能進行固氮作用，利用大氣中的氮合成細胞蛋白質。當細胞死亡後，經礦質化作用 (mineralization) 釋出有效性氮 (available nitrogen) 鉍，可供作物吸收利用，故於自然界氮循環扮演重要的角色。*Azotobacter* 屬於不含氮源培養基中每利用 1 mg 碳源 (如蔗糖)，可以固定 10-30 μg 氮 (Tchan and New, 1984; Sharma, 2002)，當土壤中的有機質含量較多時，固定於土壤中的氮量就愈多。於田間土壤情況下，*Azotobacter* 屬固定空氣中的氮，除了需利用簡單醣類或碳酸鹽化合物當作碳源進行代謝之外，土壤中還需要有豐富的鈣才能讓 *Azotobacter* 屬細胞有較好的固氮能力，而適量濃度的微量元素及鹽類可以促進此菌屬的固氮能力 (Tchan and New, 1984; Sharma, 2002)。

2. 產出有用的代謝產物

Azotobacter 屬會生成一些可以抑制鏈格菌屬 (*Alternaria*)、鐮胞菌屬 (*Fusarium*) 及長蠕孢黴菌屬 (*Helminthosporium*) 等病原菌生長的物質 (Mahdi *et al.*, 2010)。產生維生素 B、核黃素 (riboflavin)、菸鹼酸 (niacin)、吡啶乙酸、激勃素、細胞分裂素 (Martinez *et al.*, 1988; Revillas *et al.*, 2000; Ahmad *et al.*, 2008; Kamlesh *et al.*, 2004)，及拮抗微生物物質 (Verma, 2001)。此外也會產生胞外載鐵物質 (siderophore) (Suneja *et al.*, 1996; Tindale *et al.*, 2000)

與多醣體 (Emtiazia, 2004)，包含體內含有聚 β- 羥基丁酸酯 (poly β-hydroxybutyrate, PHB) (Tchan and New, 1984; Diaz-Barrera and Soto, 2010)。

(二) 於食品產業、環境復育及醫藥上之應用

Azotobacter 屬能促進土壤中重金屬如鎘、汞及鉛的移動性增加，故可以應用於土壤之生物復育 (Chen *et al.*, 1995)。一些 *Azotobacter* 屬可以降解含氯芳香族化合物的殺菌劑、殺蟲劑及殺草劑，如 2,4,6- 三氯酚等 (Li *et al.*, 1991)。*Azotobacter* 屬能產出藻酸 (Diaz-Barrera and Soto, 2010; Page *et al.*, 2001; Ahmed M. and Ahmed N, 2007; Galindo *et al.*, 2007)，可應用於醫藥上當作制酸劑 (Diaz-Barrera and Soto, 2010)。*Azotobacter* 屬細胞外的多醣體，能應用於食品產業當做冰淇淋、布丁及奶油的添加物 (Hans *et al.*, 1993)，應用於工業作為吸附金屬的生物吸附劑 (biosorbent) (Emtiazia *et al.*, 2004)，以及生物可分解塑膠 (biodegradable plastics) 的材料 (Diaz-Barrera and Soto, 2010)。

(三) *Azotobacter* 屬於農業上之應用

Azotobacter 屬能產出促進植物生長的物質、載鐵物質及拮抗有害微生物的物質，且具固定大氣中氮氣的能力，有利於農業的生產，茲將其在農業上的應用分述於下：

1. 促進作物種子萌芽、生長及產量的增加

(1) 促進作物種子萌芽與養分的吸收

Azotobacter 屬接種於水稻、玉米、小麥、高粱 (Sigh, 2006)、綠豆、鷹嘴豆 (*Cicer arietinum*)、短莢飯豆 (*Vigna catjang*) 種子 (Brown, 1975; Saharan and Nehra, 2011)，可以促進種子萌芽。作物接種 *Azotobacter* 屬可以增進根部對水分與養分的吸收速率與量 (Bretrand *et al.*, 2000; Narula *et al.*, 2000)。*Azotobacter* 屬能分泌有機酸與螯合物質 (chelating substances)，使土壤中被固定的磷化合物溶解度增加，產生有效性磷供作物吸收利用 (Illmer and

Schinner, 1995; Kumar and Narula, 1999; Deubel and Merbach, 2005)。

(2) 增加作物的產量

水稻種子接種 *Azotobacter chroococcum* 能增加 19.4-77.1% 穀粒產量 (Sigh, 2006)。小麥種子接種 *Azotobacter chroococcum* 可以增產 13% 穀粒重 (Hamid, 2008) 或 74% 穀粒產量 (Milošević, 2012)。*Azotobacter* sp. 與 *Azospirillum* sp. (固氮螺旋細菌) 一起接種於珍珠粟種子處理的穀粒產量，比種子不接種菌處理者高 13.7% (Latake *et al.*, 2009)。玉米種子接種 *Azotobacter* sp. 處理，可使產量比未接種菌處理者多 4.7-21.6% (Raouf *et al.*, 2011; Faramarzi *et al.*, 2012; Sarajoughi *et al.*, 2012)。油菜種子接種 *Azotobacter chroococcum*，於收穫時油菜植株的鮮重產量比未接種菌處理者多 20.9% (Ebrahimi *et al.*, 2007)。Paul 等人 (2011) 將 4 株 *Azotobacter* spp. 接種於棉花種子，棉花子 (seed cotton) 的產量可比未接種菌處理者多 17.5-23.8%。南非醉茄 (埃及人蔘, *Withania somnifera*) 接種 *Azotobacter chroococcum*，每公頃人蔘根部的產量比未接種菌處理者多 19.4% (Kumar *et al.*, 2009)。

2. 減少作物土生性病害的發生

Cavaglieri 等人 (2004) 將玉米種子置入 *Azotobacter armeniacus* RC2 菌液 (10^6-10^7 cell/ml) 浸潤後，取出種植於盆栽介質，可以完全抑制 *Fusarium verticillioides* 於玉米根部的生長。Deepak 與 Lal (2009) 將 *Azotobacter* sp. 菌劑以 40 kg/ha 施用於土壤，可使小茴香感染 *Fusarium oxysporum* f. sp. 的百分率降低 19.4%。Mali 與 Bodhankar (2009) 由落花生根圈分離出 *Azotobacter chroococcum* KG2、KG3 及 KG5，此 3 株菌可以有效抑制 *Fusarium oxysporum* 與 *Alternaria alternata* 生長。

3. 增加水產養殖漁獲量

A. chroococcum 接種在養殖池中可提高池塘的固氮活性、固氮量、浮游生物 (plankton) 的生質量，

及增加養殖池的漁獲量 (Garg *et al.*, 1998)。Garg 與 Bhatnagar (2002) 將乳牛糞 1,000 kg ha/year 施入養殖池，配合接種 *Azotobacter* sp.，可以顯著比未接種 *Azotobacter* sp. 處理者增加養殖池中浮游生物數量與魚的生長速率。Ali 等人 (2011) 將 *Azotobacter chroococcum* 與 *Azospirillum brasilense* 當作益生菌 (probiotics) 接種於養殖池中，可使水體中的溶氧量、生物需氧量 (biological oxygen demand)、硝酸鹽與磷酸鹽量，及尼羅魚 (*Oreochromis niloticus*) 的淨初產量 (NPP, net primary production) 及比生長速率 (specific growth rate) 顯著增加。

4. 於國內洋香瓜產區施用非共生固氮細菌 *Azotobacter* sp. 對於洋香瓜產量與品質之效益

(1) 試驗處理及田間肥料施用量

田間試驗之施肥處理有 3 種：(1) 對照處理 (試驗地農民慣行之肥料施用量)；(2) A 處理：減施 20% 化學肥料配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液；(3) B 處理：減施 20% 化學肥料配合灌澆培養基。每處理有 2 重複之試驗小區，試驗小區之畦寬度 2 公尺，洋香瓜株距 42 公分，種植 2 排，每排種植 25 株藍寶石洋香瓜苗，搭網架直立栽培洋香瓜，每植株留 1 個瓜果實。

對照處理試驗區相當於每分地施用 120 公斤台肥 43 號化學肥料與 450 公斤牛糞堆肥；A 處理試驗區相當於每分地施用 96 公斤台肥 43 號化學肥料與 450 公斤牛糞堆肥，及於每株洋香瓜根部灌澆 100 毫升稀釋 1/1,000 的 *Azotobacter* sp. 菌液；B 處理試驗區相當於每分地施用 96 公斤台肥 43 號化學肥料與 450 公斤牛糞堆肥，及於每株洋香瓜根部灌澆 100 毫升稀釋 1/1,000 的培養基。對照處理試驗區、A 處理試驗區及 B 處理試驗區，於瓜苗定植時、定植後 1 星期與 2 星期時各分別灌澆水、*Azotobacter* sp. 菌液及培養基。

(2) 施用非共生固氮細菌 *Azotobacter* sp. 對洋香瓜生長、產量與品質之效益

1. 施用 *Azotobacter* sp. 對洋香瓜生長勢之效益

於洋香瓜定植後第 4 星期與 7 星期分別進行植株高度之測定。試驗結果顯示，定植後第 4 星期時，農民慣行之肥料施用量試驗區的植株高度比減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區，與減施 20% 化學肥料並配合灌澆培養基試驗區者較高，但差異不顯著；而於定植後第 7 星期時，減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區的植株高度，分別高於農民慣行之肥料施用量試驗區與減施 20% 化學肥料並配合灌澆培養基試驗區者（表一）。於定植後第 9 星期時，洋香瓜第三葉片的相對葉綠素含量，以減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區與減施 20% 化學肥料並配合灌澆培養基試驗區，高於農民慣行之肥料施用量試驗區（表二）。

2. 施用 *Azotobacter* sp. 對洋香瓜果徑、粒重、產量及甜度之效益

洋香瓜於定植 12 星期時，進行採收，以減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區每顆瓜平均重量 1,051 公克（相當於每公頃的產量為 17,867 公斤），分別是減施 20% 化學肥料並配合灌澆培養基試驗區與農民慣行之肥料施用量試驗區的 1.03 倍與 1.15 倍。至於洋香瓜的甜度，農民慣行

之肥料施用量試驗區為 12.2 °Brix，和減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區與減施 20% 化學肥料並配合灌澆培養基試驗區的差異不顯著。減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區的洋香瓜，每顆瓜橫切面的平均直徑為 39.7 公分，大於減施 20% 化學肥料並配合灌澆培養基試驗區與農民慣行之肥料施用量試驗區（表三）。

表三 施用游離固氮菌液並配合減施化學肥料對藍寶石洋香瓜果徑、粒重、產量及甜度的影響

	瓜果鮮粒重 (公克)	果徑 (公分)	產量 (公斤/公頃)	甜度 (°Brix)
對照處理試驗區	915 ± 132	38.5 ± 1.8	15,555 ± 156	12.5 ± 1.2
A 處理試驗區	1,051 ± 174	39.7 ± 2.6	17,867 ± 160	12.2 ± 1.7
B 處理試驗區	1,024 ± 178	39.1 ± 2.5	17,408 ± 130	12.5 ± 1.6

3. 施用 *Azotobacter* sp. 對洋香瓜合理化施肥之經濟效益評估

對照試驗區每分地施用台肥 43 號化學肥料 120 公斤，而 A 處理試驗區（減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區）與 B 處理試驗區（減施 20% 化學肥料並配合灌澆培養基試驗區）每分地施用台肥 43 號化學肥料 96 公斤，此兩試驗區相當於每公頃減施 240 公斤化肥，若每包（40 公斤）台肥 43 號化學肥料價格為 445 元，則此兩試驗區的肥料支出，相當於每公頃皆可節省新臺幣 2,670 元。減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區，洋香瓜的產量相當於 17,867 公斤/公頃，農民慣行之肥料施用量試驗區的產量相當於 15,555 公斤/公頃，若藍寶石洋香瓜售價為 50 元/公斤，則減施 20% 化學肥料並配合灌澆 *Azotobacter* sp. 菌液試驗區每公頃出售瓜的收益，可比對農民慣行之肥料施用量試驗區多新臺幣 115,600 元。

本文之資料為進行一次田間試驗的結果，此

表一 藍寶石洋香瓜苗定植7星期時之植株高度
(公分)

	對照處理試驗區	A處理試驗區	B處理試驗區
	198 ± 17	201 ± 28	185 ± 12

表二 藍寶石洋香瓜苗定植9星期時第三葉片的相對葉綠素含量

	對照處理試驗區	A處理試驗區	B處理試驗區
I	48.9 ± 2.1	52.6 ± 2.6	54.5 ± 2.9
II	48.9 ± 2.1	53.4 ± 3.5	52.8 ± 2.7
平均值	48.9 ± 2.1	53.0 ± 3.1	54.0 ± 2.8

試驗顯示灌溉非共生固氮細菌 *Azotobacter* sp. 菌液對藍寶石洋香瓜的生長勢與產量有效益，但由於全國各主要洋香瓜產區耕地土壤具有差異，灌溉 *Azotobacter* sp. 菌液於藍寶石洋香瓜根部是否會有一致之效果，則需進行廣泛田間試驗加以確認。

結語

Azotobacter 菌屬能產出胞外多醣體、藻酸及胞內聚 β - 羥基丁酸酯，可以應用於食品加工、藥品及環保產業；本菌屬也能分泌促進作物生長物質、載鐵物質、拮抗微生物物質，並具固定大氣中氮的能力，能增加養殖池魚生長速率與漁獲量，防治作物

病害，增進作物的生長、品質及產量。*Azotobacter* 菌屬是環境友善的微生物，適宜施用於耕地土壤與水產養殖環境，為多功能的有益微生物，其應用範疇有很寬廣的潛力。臺灣許多耕地已長久不合理的過度施用化學肥料或有機質肥料，應透過土壤診斷分析，瞭解耕地的肥力狀態，若土壤肥力非常好，於栽培作物時，則必須認真思考減少肥料的施用量。此外，配合施用綠能肥料（微生物肥料），如非共生固氮細菌 *Azotobacter* spp.，以減少慣行肥料的施用量，亦是一種值得嘗試的選擇。

AgBIO

簡宜裕	行政院農業委員會	農業試驗所	研究員
張明暉	行政院農業委員會	農業試驗所	助理研究員
林素禎	行政院農業委員會	農業試驗所	助理研究員

參考文獻

- Ahmad, F., Ahmad, I. and Khan, M. S. (2005) *Indole acetic acid production by the indigenous isolates of Azotobacter and fluorescent Pseudomonas in the presence and absence of tryptophan*. Turkish Journal of Biology (29): 29–34.
- Ahmed, M. and Ahmed, N. (2007) *Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria*. Current Genomics 8 (3): 191–202.
- Ali Sayeda, M., Mohamed, I. A. and Wafaa, T. A. (2011) *Evaluation of Azotobacter and Azospirillum biofertilizers as a probiotics in Oreochromis niloticus aquaculture*. Journal of Fisheries and Aquatic Science 6 (5): 535–544.
- Baillie, A., Hodgkiss, W. and Norris, J. R (1962) *Flagellation of Azotobacter spp. as demonstrated by electron microscopy*. Journal of Applied Microbiology 25 (1): 116–119.
- Bretrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Toraine, B., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. C. (2000) *Stimulation of the ionic transport system in Brassica napus by a plant growth-promoting rhizobacterium (Achromobacter sp.)*. Canadian Journal of Microbiology 46:229-236.
- Brown, M.E. (1975) *Rhizosphere microorganisms opportunist bandits or benefactors*. In Soil Microbiology. N. Walker (Ed). Buterworths pp: 21-38.
- Cavaglieri, L., Passone, A. and Etcheverry, M. (2004) *Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon Fusarium verticillioides growth and fumonisin B₁ production*. Research in Microbiology 155: 74-754.
- Cavaglieri, L.R., Passone, A. and Etcheverry, M.G. (2004) *Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of Fusarium verticillioides in Zea mays L*. Biological Control 31:259-267.
- Chen, J. H., Czajka, D. R., Lion, L. W., Shuler, M. L., and Ghiorse, W. C. (1995) *Trace metal mobilization in soil by bacterial polymers*. Environmental Health Perspectives 103 (1): 53–58.
- Deepak, and Lal, G. (2009) *Integrated strategy to control wilt disease of cumin (Cuminum cyminum L.) caused by Fusarium oxysporum f. sp. cumini (Schlecht) Prasad & Patel*. Journal of Spices and Aromatic Crops 18 (1): 13-18.
- Deubel, A. and Merbach, W. (2005) *Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils*. In Soil Biology v(3): Microorganisms in soils and roles in genesis and functions pp:177-191. Ed. by F. Buscot and A. Varma. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

參考文獻

12. Diaz-Barrera, A. and Soto, E. (2010) *Biotechnological uses of Azotobacter vinelandii: Current state, limits and prospects*. African Journal of Biotechnology 33: 5240-5250.
13. Ebrahimi, S., Nejad, H. I., Rad, A. H. S., Akbari, G. A., Amiry R. and Sanavy, S. A .M. M. (2007) *Effect of Azotobacter chroococcum application on quantity and quality forage of rapeseed cultivars*. Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (18): 3126-3130.
14. Emtiazia, G., Ethemadifara, Z. and Habibib, M. H. (2004) *Production of extra-cellular polymer in Azotobacter and biosorption of metal by exopolymer*. African Journal of Biotechnology 3 (6): 330-333.
15. Faramarzi, A., Pourgorban, M. A., Ansari, M. H. and Taghizadeh, R. (2012) *The effects of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) inoculation on the yield and yield components of grain corn (Zea mays L.) in Astara, Iran*. Journal of Food, Agriculture and Environment 10(1): 299-301.
16. Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D. and Espín, G. (2007) *Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polydihydroxyalkanoate production by Azotobacter vinelandii*. Microbial Cell Factories 6 (7): 7.
17. Gandora, V., Gupta R. D., and Bhardwaj, K. K. R. (1998) *Abundance of Azotobacter in great soil groups of north-west Himalayas*. Journal of the Indian Society of Soil Science 46 (3): 379-383.
18. George, M., Garrity (2005) *Part B: The Gammaproteobacteria. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The Proteobacteria (2 ed.). New York: Springer. ISBN 0-387-95040-0.
19. Garg, S.K., Bhatnagar, A. and Narula, N. (1998) *Application of Azotobacter enhances pond productivity and fish biomass in still water ponds*. Aquaculture International 6: 219-231.
20. Garg S.K. and Bhatnagar, A. (2002) *Determination of dosage of Azotobacter and organic fertilizer for optimum nutrient release, net primary productivity and fish growth in fresh water fish ponds*. Aquaculture International 10(2): 87-107.
21. Hamid Abbaskokht. (2008) *The study of Azotobacter-chroococcum inoculation on yield and post harvest quality of wheat (Triticum aestivum)*. International meeting on soil fertility land management and agroclimatology. Turkey. pp: 885-889.
22. Hans Günter Schlegel, Zaborosch, C. and Kogut, M. (1993) *General microbiology*. Cambridge University Press. p. 380. ISBN 0-521-43980-9.
23. Illmer, P. and Schinner, F. (1995) *Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms*. Soil Biology and Biochemistry 27:257-263.
24. Jensen, H. L. (1954) *The Azotobacteriaceae*. Bacteriological Reviews 18 (4): 195-214.
25. Johnstone, D. B. (1955) *Azotobacter Fluorescence*. Journal of Bacteriology 69 (4): 481-482.
26. Kamlesh, K., Suneja, S., Goyal, S. and Narula, N. (2004) *Phytochrome production by Azotobacter - A review*. Agric. Rev. 25 (1): 70-75.
27. Kumar, V. and Narula; B. (1999) *Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by A. chroococcum mutants*. Biology and Fertility of Soils 28: 301-305.
28. Kumar, V., Behl, R. K. and Narula, N. (2001) a. *Establishment of phosphate solubilizing strains of Azotobacter chroococcum in rhizosphere and their effect on wheat under green house conditions*. Microbial Research 156:87-93.
29. Kumar, R., Bhatia, R., Kukreja, K., Behl, R. K., Dudeja, S. S. and Narula, N. (2007) *Establishment of Azotobacter on plant roots: chemotactic response, development and analysis of root exudates of cotton (Gossypium hirsutum L.) and wheat (Triticum aestivum L.)*. Journal of Basic Microbiology 47 (5): 436-439.
30. Kumar, V., Solanki, A. S. and Sharma, S. (2009) *Yield and economics of Withania somnifera influenced by dual inoculation of Azotobacter chroococcum and Pesudomonas putida*. Turk J Biol. 33: 219-233.
31. Latake, S. B., Shinde, D. B. and Bhosale, D. M. (2009) *Effect of inoculation of beneficial microorganisms on growth and yield of pearl millet*. Indian J. Agric. Res. 43(1): 61-64.
32. Layne, J. S and Johnson, E. J. (1964) *Natural factors involved in the induction of cyst formation in Azotobacter*. Journal of

參考文獻

- Bacteriology 87 (3): 684–689.
33. Li, D. Y., Eberspächer, J., Wagner, B., Kuntzer, J. and Lingens, F. (1991) *Degradation of 2,4,6-trichlorophenol by Azotobacter sp. strain GP1*. Applied and Environmental Microbiology 57 (7): 1920–1928.
 34. Mahdi, S. S., Hassan, G. I., Samoon, S. A., Rather, H. A., Showkat, A. D. and Zehra, B. (2010) *Bio-fertilizers in organic agriculture*. Journal of Phytology 2(10): 42-45.
 35. Mail, G.V. and Bodhankar, M.G. (2009) *Antifungal and phytohormone production potential of Azotobacter chroococcum isolates from groundnut (Arachis hypogea L. Rhizosphere)*. Asian J. Exp. Sci. 23(1): 293-297.
 36. Martinez-Toledo, M.V., de La Rubta, T., Moreno J. and Gonzalez Lopez, J. (1988) *Root exudates of Zea mays and production of auxins, gibberellins and cytokinins by A. chroococcum*. Plant and Soil 110:149-152.
 37. Martyniuk, S. and Martyniuk, M. (2003) *Occurrence of Azotobacter spp. in some Polish soils*. Polish Journal of Environmental Studies 12 (3): 371-374.
 38. Milosevic, N., Tintor, B., Protic, R., Cvijanoic, G. and Dimitrijevic, T. (2012) *Effect of inoculation with Azotobacter chroococcum on wheat yield and seed quality*. Romanian Biotechnological Letters 17(3).
 39. Modarres Sanavy. (2007) *Effect of Azotobacter chroococcum application on quantity and quality forage of rapeseed cultivars*. Pakistan Journal of Biological Sciences 10 (18): 3126-3130.
 40. Narula, N., Kumar, V., Behl, R. K., Deubel, A., Gransee, A. and Merbach, W. (2000) *Effect of P-solubilizing A. chroococcum on N, P, K uptake in P responsive wheat genotypes under green house conditions*. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 163:393-398.
 41. Page, W. J., Tindale, A., Chandra M. and Kwon, E. (2001) *Alginate formation in Azotobacter vinelandii UWD during stationary phase and the turnover of poly-β-hydroxybutyrate*. Microbiology 147 (Pt 2): 483–490.
 42. Paul, S., Maheshwar, S. R. and Satya, P. T. (2011) *Interactive effect with AM fungi and Azotobacter inoculated seed on germination, plant growth and yield in cotton (Gossypium hirsutum)*. Indian Journal of Agricultural Sciences 81 (11): 1041-1045.
 43. Raouf, S. S., Kazem, K. and Abdolghayoum, G. (2011) *Effect of seed priming with plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) on dry matter accumulation and yield of maize (Zea mays L.) hybrids*. International Research Journal of Biochemistry and Bioinformatics 1(3): 76-83.
 44. Revillas, J. J., Rodelas, B., Pozo, C., Martínez-Toledo M. V. and González-López, J. (2000) *Production of B-group vitamins by two Azotobacter strains with phenolic compounds as sole carbon source under diazotrophic and adiazotrophic conditions*. J. Appl. Microbiol. 89(3):486-93.
 45. Sadoff, H. L. (1975) *Encystment and germination in Azotobacter vinelandii*. Microbiological Reviews 39 (4): 516–539.
 46. Saharan, B.S and Nehra, V. (2011) *Plant growth promoting rhizobacteria : A critical review*. Life sciences and Medicine Research LSMR-21.
 47. Sarajupghi, M., Mohammad, R. A., Ghorban, N., Ali, K., Farhad, R. and Saeedi, M. (2012) *Response of yield and yield components of maize (Zea mays L.) to different biofertilizers and chemical fertilizers*. American-Eurasian J, Agric. and Environ. Sci. 12(3): 315-320.
 48. Sharma, A. K. (2002) *Biofertilizers for sustainable agriculture*. Agrobios, India pp.: 86-88.
 49. Singh, M.S. (2006) *Cereal crops response to Azotobacter - A review*. Agric. Rev. 27 (3): 229-231.
 50. Socolofsky, M. D and Wyss, O. (1962) *Resistance of the Azotobacter cyst*. Journal of Bacteriology 84: 119–124.
 51. Suneja, S., Narula, N., Anand, R. C. and Lakshminyana, K. (1996) *Relationship of Azotobacter chroococcum siderophores with nitrogen fixation*. Folia Microbiology 41:154-158.
 52. Tchan, Y. T. and New, P. B. (1984) *Key to the genera of the family Azotobacteraceae genus I. Azotobacter*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology volume 1: 220-229. Ed. by Krieg N. R. and G. H. John. William and Wilkins, Baltimore, USA.
 53. Tejera, N., Lluch, C., Martínez-Toledo, M. V. and González-López, J. (2005) *Isolation and characterization of Azotobacter and*

參考文獻

- Azospirillum* strains from the sugarcane rhizosphere. *Plant and Soil* 270 (1–2): 223–232.
54. Tindale, A. E., Mehrotra, M., Ottem, D. and Page, W. J. (2000) *Dual regulation of catechol siderophore biosynthesis in Azotobacter vinelandii by iron and oxidative stress*. *Microbiology* 146:1617-1626.
55. Vela, G. R. And Rosenthal, R. S. (1972) *Effect of peptone on Azotobacter morphology*. *Journal of Bacteriology* 111 (1): 260–266.
56. Verma, S., kumar, V., Narula N. and Merbach, W. (2001) *Studies on in vitro production of antimicrobial substances by Azotobacter chroococcum isolates/mutants*. *Journal of Plants Diseases and Protection* 108:152-165.

