

# EKSKRESI AMONIUM PADA BAKTERI PENAMBAT NITROGEN DAN PENGARUHNYA TERHADAP PERTUMBUHAN TANAMAN

**Hartono**

Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Negeri Makassar  
Gunung Sari Baru, Jl. A.P.Pettarani Makassar 90222  
e-mail: hartono@unm.ac.id

**Abstract: Ammonium Excretion in Nitrogen Fixing Bacteria and Its Effects on The Plant Growth.** Nitrogen fixing bacteria have been utilized as biofertilizers and their effects on the increase of growth in plants have been proven. The obstacle in the application of free living diazotroph as biofertilizers is the fact that only a little amount of nitrogen is released to the environment which implies on minimum supply of fixed nitrogen for the plants. This phenomenon is due to the fixed nitrogen is used by the bacteria itself and it is eventually released to the environment only after the bacteria die and undergo decomposition. A different regulation of nitrogen fixation has been found as a unique characteristic of some strains of bacteria. In these bacteria, ammonium which is formed inside the cell as the result of nitrogenase activities, is not accumulated in the cells, but is excreted out through a simple diffusion. Such ability to excrete ammonium in nitrogen fixing bacteria might be found not only in some wild type strains but also in induced mutant strains. Ammonium excretion might occur due to inhibitory mechanism to enzyme activity in ammonium assimilation. Thus, ammonium will passively diffuse out of the cell membrane. Inoculation of plants with mutant bacteria in our laboratory experiment shows that there is a significant improvement of the plant growth. However, such is result is not reached yet when we did the same procedure in the field.

**Abstrak: Ekskresi Amonium pada Bakteri Penambat Nitrogen dan Pengaruhnya terhadap Pertumbuhan Tanaman.** Bakteri penambat nitrogen telah lama dimanfaatkan sebagai pupuk hayati dan terbukti berperan dalam meningkatkan pertumbuhan tanaman. Kendala yang dihadapi dalam penerapan bakteri penambat nitrogen khususnya yang tidak bersimbiosis (*free living diazotroph*) sebagai pupuk hayati adalah masih rendahnya jumlah senyawa nitrogen yang dilepaskan ke lingkungan sehingga kontribusinya dalam menyediakan senyawa nitrogen terfiksasi bagi pertumbuhan tanaman juga rendah. Hal ini disebabkan karena senyawa nitrogen yang difiksasi digunakan oleh sel bakteri itu sendiri dan baru dilepaskan ke lingkungan pada tahap lanjut pertumbuhan tanaman setelah sel bakteri mengalami kematian dan dekomposisi. Suatu mekanisme regulasi penambatan nitrogen yang berbeda ditemukan pada beberapa strain bakteri penambat nitrogen dimana amonium yang terbentuk di dalam sel sebagai hasil dari aktivitas nitrogenase tidak terakumulasi di dalam sel karena diekskresikan keluar melalui suatu mekanisme difusi sederhana. Fenomena ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen dapat berlangsung pada strain *wild type* atau dapat diinduksi melalui mutasi. Ekskresi amonium bisa berlangsung karena terjadi penghambatan sintesis atau aktivitas enzim yang terlibat di dalam asimilasi amonium yang menyebabkan amonium tidak bisa diasimilasi lanjut dan terakumulasi di dalam sel. Hal ini menyebabkan amonium berdifusi secara pasif keluar melalui membran sel. Inokulasi tanaman dengan bakteri mutan pengekskresi amonium pada skala laboratorium menunjukkan pengaruh yang signifikan pada pertumbuhan tanaman tetapi tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan ketika diujikan pada skala lapangan.

**Kata kunci:** bakteri penambat nitrogen, ekskresi amonium, pertumbuhan tanaman.

## A. PENDAHULUAN

Bakteri penambat nitrogen ( $N_2$ ) adalah bakteri yang dapat mengkonversi molekul  $N_2$  bebas di atmosfer menjadi amonium melalui reduksi elektron dan protonasi gas  $N_2$  dengan menggunakan enzim nitrogenase (Zahran, 1999). Setelah sel bakteri mati dan lisis, senyawa nitrogen organik dalam sel seperti protein dan asam nukleat akan dilepaskan ke lingkungan dan selanjutnya

dapat dimanfaatkan oleh organisme lain seperti tanaman setelah melalui proses mineralisasi. Fenomena ini telah banyak dimanfaatkan dengan menggunakan bakteri penambat nitrogen sebagai agensia penyedia nitrogen bagi tanaman yang dikenal sebagai pupuk hayati (*biofertilizer*).

Pemanfaatan bakteri penambat nitrogen sebagai pupuk hayati diharapkan dapat mengurangi penggunaan pupuk nitrogen sintetis yang harganya mahal dan menyebabkan dampak negatif bagi lingkungan (Gordon & Jacobson, 1983). Kendala yang dihadapi dalam penerapan bakteri penambat nitrogen khususnya yang tidak bersimbiosis (*free living diazotroph*) sebagai pupuk hayati adalah rendahnya jumlah senyawa nitrogen yang dilepaskan ke lingkungan (Rao *et al.*, 1998; Dobbelaere *et al.*, 2003) sehingga kontribusinya dalam menyediakan senyawa nitrogen terfiksasi bagi pertumbuhan tanaman juga rendah. Hal ini disebabkan karena senyawa nitrogen yang difiksasi digunakan oleh sel bakteri itu sendiri untuk mensintesis berbagai senyawa nitrogen organik dalam sel dan baru dilepaskan ke lingkungan pada tahap lanjut pertumbuhan tanaman setelah sel bakteri mengalami kematian dan dekomposisi (Martinez, 1984; Thomas *et al.*, 1990; Boussiba, 1991; Bali *et al.*, 1992). Selain itu, akumulasi amonium sebagai hasil penambatan nitrogen di dalam sel akan mengakibatkan penghambatan terhadap sintesis dan aktivitas enzim nitrogenase sehingga proses penambatan nitrogen akan berhenti (Gordon and Moore *et al.*, 1981; Roberts and Ludden, 1992; Zhang *et al.*, 1996; Colnaghi *et al.*, 1997).

Suatu mekanisme regulasi penambatan nitrogen yang berbeda ditemukan pada beberapa strain bakteri penambat nitrogen dimana amonium yang terbentuk di dalam sel sebagai hasil dari aktivitas nitrogenase tidak terakumulasi di dalam sel karena diekskresikan keluar melalui suatu mekanisme difusi sederhana (Kleiner, 1982; Castorph and Kleiner, 1984; Brewin *et al.*, 1999; Day *et al.*, 2001). Fenomena ini memberikan konsekuensi penting dalam pemanfaatan bakteri penambat nitrogen sebagai pupuk hayati dimana amonium yang diekskresikan keluar sel oleh sel bakteri dapat langsung dimanfaatkan oleh tanaman dan organisme lain tanpa harus menunggu sel mati dan lisis (Colnaghi *et al.*, 1997).

Sampai saat ini belum banyak kajian ilmiah yang memberikan penggambaran jelas tentang fenomena ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen baik pada strain *wild type*

maupun mutan yang disarikan dari berbagai jurnal penelitian dan bagaimana potensinya dalam mempengaruhi pertumbuhan tanaman. Tulisan ini bertujuan untuk memberikan ulasan tentang fenomena ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen baik pada strain *wild type* maupun mutan dan potensinya dalam mempengaruhi pertumbuhan tanaman.

## B. METODE

Metode yang digunakan dalam penulisan artikel ilmiah ini adalah metode kajian pustaka (*library research*) yang dilakukan dengan menelusuri berbagai literatur yang relevan dengan masalah yang dikaji yaitu fenomena ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen dan dampaknya terhadap pertumbuhan tanaman kemudian disusun dalam bentuk kajian ilmiah. Data dan informasi yang disajikan dalam tulisan ini bersumber dari berbagai literatur seperti jurnal hasil penelitian, buku dan artikel ilmiah yang relevan dengan objek yang dikaji. Data dan informasi yang terkumpul diseleksi sehingga diperoleh data dan informasi ilmiah yang dibutuhkan dan selanjutnya disusun dalam dua sub pokok bahasan, yaitu ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen dan pengaruh aplikasi bakteri pengekskresi amonium terhadap pertumbuhan tanaman.

## C. HASIL DAN PEMBAHASAN

Zelitch *et al.*, (1951) adalah peneliti yang pertamakali berhasil membuktikan bahwa amonium merupakan senyawa antara yang dihasilkan melalui proses penambatan nitrogen pada bakteri *Clostridium pasteurianum*. Hasil yang sama juga dilaporkan oleh Burma and Burris (1956) pada bakteri bakteri *Azotobacter vinelandii*. Kedua penelitian ini berhasil mendeteksi adanya senyawa nitrogen yang diekskresikan oleh bakteri penambat nitrogen yang diteliti ke dalam medium pertumbuhan. Beberapa penelitian selanjutnya menunjukkan bahwa bakteri *A. vinelandii* yang ditumbuhkan secara batch culture dengan kondisi sulfat yang terbatas mengekskresikan amonium dalam jumlah yang signifikan ke dalam medium pertumbuhannya (Kleiner and Kleinschmidt, 1976). Narula *et al.* (1981) melaporkan berhasil mengisolasi dua strain *A. chroococcum* yang dapat mengekskresikan 45 µg/ml amonium ketika ditumbuhkan pada medium Jensen dengan sistem fermentasi selama 18 hari. Penambahan Mn<sup>++</sup>

(10-7M) pada medium pertumbuhan bakteri *A. chroococcum* meningkatkan ekskresi amonium sampai 99 µg/ml (Narula and Gupta, 1986). Penelitian pada bakteri *Azospirillum brasilense* menunjukkan bahwa penumbuhan bakteri ini pada medium yang ditambah dengan ekstrak yeast menunjukkan ekskresi amonium yang cukup tinggi (Narula and Kleiner, 1995).

Ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen dapat diinduksi dengan cara mutasi pada gen yang terlibat di dalam sintesis enzim nitrogenase. Mutasi pada gen *nifL* yang terlibat di dalam regulasi sintesis enzim nitrogenase pada bakteri *A. vinelandii* berhasil menginduksi bakteri ini mengekskresikan amonium ke dalam medium pertumbuhan sebanyak 10 mM (Bali *et al.*, 1992) dan 35 mM (Brewin *et al.*, 1999). Mutasi spontan dengan pemberian methylammonium pada *A. vinelandii* menyebabkan sintesis enzim nitrogenase berlangsung secara terus menerus dan mengekskresikan 0,5 mM senyawa nitrogen ke dalam medium pertumbuhan jika dibandingkan dengan strain *wild type*. Target mutasi ini belum diketahui tetapi diduga terjadi penghambatan pada aktivitas enzim Glutamine synthetase (GS). Salah satu dampak dari mutasi ini menyebabkan pertumbuhan bakteri mutan *A. vinelandii* menjadi terhambat (Gordon and Jacobson, 1983).

Ekskresi amonium juga dapat diinduksi melalui mutasi pada aras genetik atau penghambatan aktivitas enzim yang terlibat di dalam asimilasi amonium seperti enzim GS, Glutamine oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) dan Glutamate dehydrogenase (GDH). Mutasi pada aras genetik dapat dilakukan dengan pemberian senyawa kimia seperti Ethylmetane sulfonate (EMS) dan Ethylenediamine (EDA). Mutan *Anabaena sp* yang resisten terhadap EDA diketahui dapat mengekskresikan amonium sebanyak 1,5 mM, (Polukhina *et al.*, 1982) sedangkan mutan *Rhodobacter capsulatus* yang resisten terhadap EMS dapat mengekskresikan amonium sebanyak 15 mM ke dalam medium pertumbuhan (Wall and Gets, 1979).

Pemberian senyawa kimia penghambat aktivitas enzim GS seperti L-methionin-D,L-sulfoximine (MSX) pada bakteri *Anabaena variabilis* ATCC 29413, berhasil menginduksi ekskresi amonium lebih dari 1 mM ke dalam medium pertumbuhan (Spiller *et al.*, 1986). Perlakuan yang sama berhasil menginduksi ekskresi amonium pada beberapa spesies bakteri penambat nitrogen seperti, *Anabaena cylindrica*

(Steward and Rowell, 1975), *Anabaena sp.* 33047 (Ramos *et al.*, 1984), *Noctoc muscorum* (Singh *et al.*, 1983), *Anabaena strain 2B* (Newton and Cavins, 1985), *Anabaena azollae* (Zimmerman and Boussiba, 1987), dan *Anabaena siamensis* (Thomas *et al.*, 1990).

Terdapat kelemahan pada bakteri mutan pengekskresi amonium yang dihasilkan melalui mutasi dan pemberian senyawa kimia. Modifikasi secara genetik dan fisiologis melalui pemberian senyawa kimia seperti MSX menyebabkan bakteri mutan kehilangan kemampuan mensintesis glutamin sehingga harus diberikan ke dalam medium untuk pertumbuhan (Spiller *et al.*, 1986; Weninger and Van Veen, 1991).

Induksi ekskresi amonium melalui mutasi dan penghambatan aktivitas enzim yang terlibat di dalam sintesis dan asimilasi amonium juga berhasil menjelaskan mekanisme ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen. Ekspresi nitrogenase yang tinggi (Bali *et al.*, 1992; Brewin *et al.*, 1999) dan penghambatan sintesis dan aktivitas enzim yang terlibat di dalam asimilasi amonium seperti enzim GS dan GOGAT (Shanmugam and Valentine, 1975; Spiller *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1990) menyebabkan amonium tidak bisa diasimilasi lanjut dan terakumulasi di dalam sel. Akumulasi amonium di dalam sel menyebabkan konsentrasinya lebih tinggi di dalam sel jika dibandingkan dengan konsentrasi diluar sel. Hal ini menyebabkan amonia berdifusi secara pasif keluar melalui membran sel (Kleiner, 1982; Castorph and Kleiner, 1984; Brewin *et al.*, 1999). Kleiner (1982) mengemukakan suatu teori cyclic retention yang menjelaskan bahwa pada bakteri penambat nitrogen terdapat suatu mekanisme dimana NH<sub>3</sub> akan berdifusi secara pasif keluar sel yang diikuti oleh transpor aktif NH<sub>4</sub> masuk ke dalam sel.

Pada bakteri penambat nitrogen strain *wild type*, ekskresi amonium disebabkan karena aktivitas yang rendah dari enzim yang terlibat dalam asimilasi amonium seperti enzim GS (Zimmerman and Boussiba, 1987). Hal ini menyebabkan amonia terakumulasi di dalam sel tanpa menginaktivasi enzim nitrogenase (Orr and Haselkorn, 1982). Narula dan Kleiner (1995) melaporkan bahwa penurunan ekskresi amonium pada bakteri *Azospirillum brasilense* terjadi seiring dengan peningkatan aktivitas enzim GS dan GDH. Hasil penelitian pada bakteri bakteri *Clostridium pasterurianum* strain W5 yang ditumbuhkan secara anaerob dan *Anabaena*

*siamensis* yang ditumbuhkan secara aerob dengan sistem *continuous culture* menunjukkan bahwa ekskresi amonium terjadi pada tahap awal pertumbuhan bakteri (awal fase logaritmik) (Zelithc *et al.*, 1952; Thomas *et al.*, 1990). Sementara penelitian lain yang dilakukan pada bakteri *A. Chrococum*, *A. vinelandii*, dan *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan bahwa ekskresi amonium tertinggi terjadi pada saat pertumbuhan bakteri memasuki akhir fase eksponensial menjelang masuk fase stationer ketika pertumbuhan bakteri mulai berhenti (Shanmugam and Valentine, 1975; Kleiner and Kleinschmidt, 1976; Narula *et al.*, 1981; Bali *et al.*, 1992).

Penelitian yang lain juga menunjukkan bahwa ekskresi amonium dengan konsentrasi tinggi berlangsung pada kultur bakteri yang ditumbuhkan pada konsentrasi oksigen yang rendah (Hartman *et al.*, 1988; Kuhla *et al.*, 1991; Weniger and Van Veen, 1991; Bali *et al.*, 1992). Hal ini disebabkan karena konsentrasi oksigen yang tinggi akan menghambat aktivitas dari enzim nitrogenase.

Penelitian yang dilakukan oleh Hartono *et al* (2009) pada bakteri penambat nitrogen *wild type* yang diisolasi dari tanah mineral masam berhasil menemukan empat isolat yang memiliki kemampuan mengekskresikan amonium dengan konsentrasi yang tinggi yaitu isolat GMA1, GMA3, GMA6 dan GMA9 dengan konsentrasi amonium yang diekskresikan masing-masing 1107,7  $\mu\text{M}$ , 688,7  $\mu\text{M}$ , 454,1  $\mu\text{M}$  dan 391,5  $\mu\text{M}$ . Karakterisasi secara molekular melalui analisis gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat GMA1 memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *Stenotrophomonas sp.* strain MFC-C, isolat GMA3 memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *Brevibacillus formosus* strain DSM 9885T, isolat GMA6 dan GMA9 memiliki hubungan kekerabatan yang dekat dengan *Azotobacter vinelandii* strain ISSDS-428.

Iwata *et al* (2010) dan Iwata *et al* (2012) melaporkan bahwa bakteri penambat nitrogen strain *wild type* yang ditumbuhkan pada medium burk's yang mengandung sumber karbon sukrosa dengan konsentrasi yang bervariasi dapat menginduksi *A. beijerinckii* mengekskresikan amonium sebesar 0,192 mM sedangkan *A. vinelandii* dapat mengekskresikan amonium dengan konsentrasi 0,63 mM. Penelitian ini juga melaporkan bahwa perbedaan sumber karbon dapat berpengaruh pada kemampuan sel bakteri dalam mengekskresikan amonium.

Inokulasi tanamam dengan bakteri mutan pengekskresi amonium pada skala laboratorium menunjukkan pengaruh yang signifikan pada pertumbuhan tanaman. Spiller *et al.* (1986) berhasil mendapatkan mutan *Cyanobacterium Anabaena variabilis* strain SA-1 yang dapat mengekskresikan amonium sekitar 1 mM. Inokulasi tanaman padi (*Oryza sativa*) dengan mutan *Anabaena variabilis* strain SA-1 pada medium bebas nitrogen menunjukkan peningkatan berat kering biomassa padi sembilan kali lebih tinggi dibandingkan dengan tanaman kontrol yang tidak diinokulasi. Inokulasi strain SA-0 (*wild type*) menunjukkan peningkatan berat kering biomassa tanaman padi empat kali dibandingkan dengan tanaman kontrol yang tidak diinokulasi (Latorre *et al.*, 1986).

Penelitian dengan menggunakan bakteri yang sama yang dilakukan pada tanaman gandum kultivar Yecora rojo. Tanaman gandum yang diinokulasi dengan strain SA-1 menunjukkan peningkatan berat kering biomassa dua kali lipat jika dibandingkan dengan tanaman kontrol atau tanaman yang diinokulasi dengan strain SA-0 (Spiller and Gunasekaran, 1990). Kandungan nitrogen total pada tanaman gandum yang diinokulasi dengan strain SA-1 menunjukkan peningkatan enam kali jika dibandingkan dengan tanaman gandum yang diinokulasi dengan strain SA-0 dan sebelas kali lebih tinggi jika dibandingkan dengan tanaman gandum yang tidak diinokulasi dengan bakteri (kontrol negatif).

Penelitian yang dilakukan dengan bakteri yang berbeda untuk mengetahui kemampuan mutan pengekskresi amonium *Azospirillum brasilense* C3 dalam meningkatkan suplai nitrogen pada tanaman gandum (*Triticum aestivum*). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa berat kering dan kandungan nitrogen total tanaman gandum yang diinokulasi dengan mutan *Azospirillum brasilense* strain Wa5 meningkat secara signifikan jika dibandingkan dengan tanaman gandum yang diinokulasi dengan *Azospirillum brasilense* strain *wild type* dan tanaman kontrol yang tidak diinokulasi dengan bakteri (Weniger and Van Veen, 1991).

Aplikasi bakteri mutan pengekskresi amonium dalam menunjang pertumbuhan tanaman menunjukkan hasil yang signifikan pada skala laboratorium akan tetapi bakteri mutan ini tidak bisa bertahan hidup ketika diujikan ke lapangan. Hal ini disebabkan karena bakteri mutan sudah mengalami modifikasi secara genetik dan fisiologis sehingga membutuhkan

perlakuan khusus seperti pemberian glutamin untuk bisa bertahan hidup. Selain itu bakteri pengekskresi amonium yang dihasilkan melalui mutasi dapat menyebabkan penurunan kemampuan bakteri mutan dalam beradaptasi dan

berkompetisi dengan mikroorganisme lain yang hidup alamiah di tanah (Spiller *et al.*, 1986; Thomas *et al.*, 1990; Colnaghi *et al.*, 1997).

#### D. KESIMPULAN

Fenomena Ekskresi amonium pada bakteri penambat nitrogen dapat berlangsung pada strain *wild type* atau dapat diinduksi melalui mutasi. Ekskresi amonium bisa berlangsung karena terjadi penghambatan sintesis atau aktivitas enzim yang terlibat di dalam asimilasi amonium yang menyebabkan amonium tidak bisa diasimilasi lanjut dan terakumulasi di dalam sel.

Hal ini menyebabkan amonium berdifusi secara pasif keluar melalui membran sel. Inokulasi tanamam dengan bakteri mutan pengekskresi amonium pada skala laboratorium menunjukkan pengaruh yang signifikan pada pertumbuhan tanaman tetapi tidak menunjukkan pengaruh yang signifikan ketika diujikan pada skala lapangan.

#### E. DAFTAR PUSTAKA

- Bali, A., G. Blanco, S. Hill, and C. Kennedy. 1992. Excretion of ammonium by a *nifL* mutant of *Azotobacter vinelandii* fixing nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:1711-1718.
- Burma, D.P., and R. H. Burris. 1956. Kinetics of ammonia utilization by *Azotobacter vinelandii*. *The Journal of biological chemistry.* 287-285.
- Boussiba, S. 1991. Nitrogen fixing Cyanobacteria potential uses. *Plant and Soil.* 137: 177-180.
- Brewin, B., P. Woodley, and M. Drummond. 1999. The Basis of Ammonium Release in *nifL* Mutants of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology.* 181: 7356-7362.
- Castorph, H., and D. Kleiner. 1984. Some properties of *Klebsiella pneumoniae* ammonium transport negative mutant (Amt). *Arch. Microbiol.* 139: 245-247.
- Colnaghi, R., A. Green, H. Luhong, P. Rudnick, and C. Kennedy. 1997. *Strategies for increased ammonium production in free-living or plant associated nitrogen fixing bacteria.* *Plant Soil.* 194:145-154.
- Day, D. A., P. S. Poole, S. D. Tyermanc, and L. Rosendahl. 2001. Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen fixing legume nodules. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58: 61-71.
- Dobbelaere, S., J. Vanderleyden, and Y. Okon. 2003. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Critical Reviews in Plant Sciences.* 22(2): 107-149.
- Gordon, J. K., and M. R. Jacobson. 1983. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutant strains with potential as bacterial fertilizer. *Can. J. Microbiol.* 29: 973-978.
- Gordon, J. K., and R. A. Moore. 1981. Ammonium and methylammonium transport by the nitrogen-fixing bacterium *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 148:435-442.
- Hartmann, A., H. Fu., and R. H. Burris. 1988. Influence of amino acids on nitrogen fixation ability and growth of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 87-93.
- Hartono, J. Widada, S. kabirun. 2009. 16s rRNA Sequence Analysis and Amonium Excretion Ability Of Nitrogen Fixing Bacteria Isolatd From Mineral Acid Soil. *Indonesian Journal of Biotechnology.* Vol. 14, No. 22.
- Iwata, K., Azlan, A., Yamakawa, H. & Omori, T. (2010). Ammonia accumulation in culture broth by the novel nitrogen-fixing bacterium, *Lisobactersp.* E4. *Journal of Bioscience*
- Iwata, K., S. S. Yu., A. Azlan., T. Omori. 2012. *Ammonia Accumulation of Novel Nitrogen-Fixing Bacteria. Biotechnology - Molecular Studies and Novel Applications for Improved Quality of Human Life.* Published by InTech Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia.
- Kleiner, D. 1982. Ammonium (methylammonium) transport by *Klebsiella pneumoniae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 688: 702- 708.
- Kleiner, D., and J. A. Kleinschmidt. 1976. Selective inactivation of nitrogenase in *Azotobacter vinelandii* batch cultures. *J. Bacteriol.* 128:117-122.
- Kuhla, J., C. Dingier., and J. Oelze. 1991. Production of extracellular nitrogen containing components by *Azotobacter vinelandii* fixing dinitrogen in oxygen-controlled continuous culture. *Arch. Microbiol.* 141: 297-302.
- Latorre, C., J. H. Lee, H. Spiller, and K. T. Shanmugam. 1986. Ammonium ion excreting cyanobacterial mutant as a source of nitrogen for growth of rice: a feasibility study. *Biotech. Letts.* 8: 507-512.
- Martinez, M. R. 1984. Algae: *biofertilizer* for rice. *Philipp. Counc. Agric. Res. Resources Dev. (PCARRD) Monit.* 12:9-12.
- Narula, N., and D. Kleiner. 1995. Relationship of Ammonia Excretion, Dinitrogen Fixation and Ammonia Assimilatory Enzymes to Encystation in a Continuous Culture of *Azospirillum brasilense*. *Folia Microbiol.* 40 (3): 333-336.
- Narula, N., and K. G. Gupta. 1986. Ammonia excretion by *Azotobacter chroococcum* in liquid culture and soil in the presence of manganese and clay minerals. *Plant and Soil.* 93: 205-209.
- Narula N., K. Lakshminarayana, and P. Tauro. 1981. Ammonia excretion by *Azotobacter chroococcum*. *Bio-tech. Bioeng.* 23: 467-470.
- Newton, J. W., and J. F. Cavins. 1985. Liberation of ammo-

- nia during nitrogen fixation by a facultatively heterotrophic cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta.* 809: 44–50.
- Orr, J., and R. Haselkorn. 1982. Regulation of glutamine synthetase activity and synthesis in free living and symbiotic *Anabaena* spp. *J. Bacteriol.* 152: 626–635.
- Polukhina, L. E., Sakhurieva, G. N., and Shestakov, S. V., 1982. Ethylenediamine-resistant *Anabaena variabilis* mutants with derepressed nitrogen-fixing system. *Microbiology.* 51: 90–95.
- Ramos, J. L., M. G. Guerrero, and M. Losada. 1984. Sustained photoproduction of ammonia from dinitrogen and water by the nitrogen fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. strain ATCC 33047. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 114–118.
- Rao, V. R., B. Ramakrishnan, T. K. Adhya, P. K. Kanungo, and D. N. Nayak, 1998. Current status and future prospects of associative nitrogen fixation in rice. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 621–633.
- Roberts, G. P., and P. W. Ludden. 1992. *Control of nitrogen fixation in photosynthetic bacteria.* In Biological Nitrogen Fixation. Eds. G Stacey, R H Burris and H J Evans. pp 135–165. Chapman and Hall, New York.
- Singh, H. N., R. K. Singh, and R. Sharma, 1983. An L-methionine-D,L-sulfoximine resistant mutant of the cyanobacterium *Nostoc muscorum* showing inhibitor resistant g-glutamyl-transferase, defective glutamine synthetase and producing extracellular ammonia during N<sub>2</sub> fixation. *FEBS. Lett.* 153: 10–14.
- Shanmugam, K. T., and R. C. Valentine. 1975. Microbial production of ammonium ion from nitrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 136–139.
- Spiller, H., Latore, C., Hassan, M. E., and Shanmugam, K.T., 1986. Isolation and characterization of nitrogenase-derepressed mutant strains of Cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *J. Bacteriol.* 165: 412–419.
- Spiller, H., and M. Gunasekaran. 1990. Ammonium-excreting mutant strain of the cyanobacterium *Anabaena variabilis* supports growth of wheat. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 33: 477–480.
- Stewart, W. D. P., and P. Rowell. 1975. Effects of L-methionine-D,L-sulfoximine on the assimilation of newly fixed NH<sub>3</sub>, acetylene reduction and heterocyst production in *Anabaena cylindrica*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 846–856.
- Thomas, S. P., A. Zaritsky, and S. Boussiba, 1990. Ammonium excretion by an L-methionine-DL-sulfoximine resistant mutant of the rice field *Cyanobacterium Anabaena siamensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3499–3504.
- Wall, J. D., and Gest. H. 1979. Derepression of nitrogenase activity in glutamine auxotrophs of *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 137: 1459–1463.
- Weninger, C. C., and J. A. Van Veen. 1991. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Excreting *Azospirillum brasilense* mutants enhance the nitrogen supply of Wheat host. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3006–3012.
- Zahran, H. H. 1999. Rhizobium legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol and Mol. Biol. Rev.* 63: 968–989.
- Zelitch, I., E. D. Rosenblum, R. H. Burris, and P. W. Wilson. 1951. Isolation of the key intermediate in biological nitrogen fixation by *Clostridium*. *J. Bact.* 62: 747–298.
- Zimmerman, W. J., and S. Boussiba. 1987. Ammonia assimilation and excretion in an asymbiotic strain of *Anabaena azollae* from *Azolla filiculoides* Lam. *J. Plant Physiol.* 127: 443–450.
- Zhang, Y. P., R. H. Burris, P. Ludden., and G. Roberts. 1996. Presence of a second mechanism for the post-translational regulation of nitrogenase activity in *Azospirillum brasilense* in response to ammonium. *J. Bacteriol.* 178: 2948–2953.