

최 종  
연구보고서

질산흡수 토양미생물을 이용한 시설재배지  
질산염류 제거 기술 개발

Removal of soil nitrate from greenhouse by soil  
microorganisms having nitrate-uptake activity

연 구 기 관  
충북대학교

농 립 수 산 식 품 부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “질산흡수 토양미생물을 이용한 시설재배지 질산염류 제거기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 7월 4일

주관연구기관명 : 충북대학교

총괄연구책임자 : 김 영 기

연 구 원 : 김 성 태

최 태 근

왕 희 성

윤 영 훈

김 민 희

박 성 완

이 경 자

주 영 직

# 요 약 문

## I. 제 목

질산흡수 토양미생물을 이용한 시설재배지 질산염류 제거기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

수확증대를 목적으로한 다비, 다투입재배 방법은 토양에 과다한 영양물질 유입을 일으켜 토양 중 염류집적에 따른 작물의 생육장애를 유발한다. 이러한 현상은 현재 전 국토의 토양에 광범위하게 나타나고 있으며, 특히 배수가 불충분한 비닐하우스 등 시설재배지에서는 염류용탈의 기회가 적어 염류집적의 심각성이 날로 증가하고 있다. 토양 중 과다한 염류는 작물의 생육을 저해하여 농산물의 품질저하는 물론, 생산량의 감소를 초래한다. 최근 국내 시설농업에서 염류집적에 따른 피해현황은 심각한 수준으로 알려져 있으며, 시설원에 작물에서 다양한 피해가 보고되고 있다.

국내 토양에서의 염류장애는 질소질 비료의 과다시비와 이에 따른 토양중 질산이온의 과다집적으로 나타나는 독특한 현상이다. 따라서, 시설재배지 농업에서, 양적, 질적으로 우수한 생산성을 지속적으로 유지하여 농산물의 가격경쟁력을 높이기 위해서는 토양 중 집적된 염류의 효율적 제거방법, 염류장애에 따른 작물의 생육불량 원인에 대한 생리학적, 생화학적 분석 및 이를 극복할 수 있는 재배방법의 확립 등이 선행되어 종합적이고 체계적인 염류장애 극복 방법이 확립되어야 할 것이다.

본 연구의 목적은 밭토양에서 분리한 토착 토양미생물을 분리 동정하고, 이를 염류가 집적한 시설재배지에 사용하는 환경보전적인 방법으로 토양 중 집적된 질산성분을 효율적으로 제거함으로써 시설재배지에서 생산성을 높이고 우수한 품질의 농산물을 생산하는데 있다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 주된 내용과 범위는 다음과 같다.

1. 염류장애가 심하게 나타나는 시설재배지를 포함한 다양한 밭토양으로부터 질산흡수력이 탁월한 균주들을 분리한다.

2. 분리한 균주의 생화학적 특성과 16S rRNA 유전자의 염기분석을 통하여 균주를 동정한다.
3. 균주의 최적 생육조건을 확립하고 질산이온 흡수능을 최적화 할 수 있는 배양방법을 개발한다.
4. 염류가 집적된 시설재배지에서 상추를 재배하며 균주의 생육촉진 효과를 측정한다.
5. 유용한 미생물의 대량 배양 및 값싼 생산을 위한 산업용 배지조건을 확립한다
6. 미생물 시작품을 생산하고, 제품의 경시적 변화를 조사한다.
7. 시제품의 단점을 보완하여 효율높은 제품을 생산하여 시설원예농가에 공급한다.

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 연구개발 결과

###### 가. 토양균주의 분리 및 동정

밭토양에서 20여종 이상의 미생물을 분리하였으며, 이들로부터 고농도의 질산이온을 포함한 배지에서 생육하는 균주를 8종을 분리하였다. 이들 중 질산흡수력이 우수한 균주 3종의 생화학적 대사특성과 16S rRNA 유전자를 분석하여 *Enterobacter amnigenus*와 *Bacillus arbutinivorans*임을 동정하였고, 또 한 균주는 속명만을 확인할 수 있었으며 일치하는 균주를 발견하지 못한 *Bacillus* species이었다. 이 균주들의 질산이온 흡수와 관련한 특성은 광범위한 문헌과 특허조사를 통하여 조사하였으나, 세계학계에 이들의 질산흡수와 관련한 자세한 연구 결과는 보고된 바 없었다. 따라서, 특성이 가장 우수한 *E. amnigenus* GG0461 균주의 다양한 생육특성을 연구하였고, 탁월한 질산이온 흡수력에 대한 특성도 자세히 조사하였다. 균주의 특성으로는 최적생육온도와 pH, 탄소원 등이 조사되었다. 균주는 10시간 배양으로 정체기에 도달하였으며, 균수는  $4 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 에 도달하여 실용화를 위한 증식과 균주의 활력유지는 무난한 것으로 평가되었다.

###### 나. 균주를 이용한 질산이온의 제거기술

GG0461 균주의 질산이온 흡수능력을 다양한 조건에서 측정하였다. 균주의 성장에 질산이온이 필수요인은 아니었으나, 질산이온의 농도증가에 따라 균주의 생육은 촉진되었다. 균주의 질산이온 흡수능력은 5,000 ppm (50 mM)에서 최대를 보였으며 10,000 ppm상의 농도에서는 약 60%의 흡수능력을 보였다. 균주의 생육과 질산이온 흡수능은 모두 37°C에서 최적임을 확인하였고, 다양한 토양온도를 가정한 조건에서 질산흡수 kinetics를 조사하였다. GG0461 균주

에 의한 질산이온의 흡수는 배지의 환경이 알칼리 조건에서 촉진되었으며, 질산이온 흡수에 따른 배지의 산성화를 동반하였다. 이것은 균주에 의한 질산이온 흡수기작이  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  antiporter에 의해 일어날 가능성을 보여주었다.

실제 GG0461 균주를 토양에 처리하였을 때, 토양중 질산염류 제거효과를 상추와 애기장대 이용하여 측정하였다. 먼저, 균주의 생육특성을 밝히기 위하여 균주처리후 토양중 생존하는 생균수를 측정하였다. 토양중 처리한 GG0461은 처리 5일까지 급격히 감소하나 이후에는  $10^6$  cfu  $\text{g}^{-1}$  soil의 밀도를 유지하였다. 이 조건에서 토양중 생존하는 균주에 의한 질산염의 흡수를 측정하였을 때, 균주에 의한 토양중 질산이온의 농도감소는 크게 나타나지 않았다. 이것은 토양내 영양원 부족에 의한 균주의 생육저하에 기인하는 것으로 생각된다.

그럼에도 불구하고 높은 농도의 질산이온을 처리하여 염류장애를 유발한 조건에서 상추를 재배하였을 때, GG0461 균주의 처리는 상추의 생육을 향상시키는 것으로 관측되었다. 질산이온을 100 mM부터 1.5 M 까지 포함한 용액을 주 1회 처리하였을 때, 상추와 애기장대 모두 100-200 mM 용액의 처리구에서는 생육이 오히려 촉진되었다. 이것은 질산태 질소의 첨가로 인한 양분효과로 확인되었다. 염류농도 800 mM 이상의 용액 처리구에서는 생육이 뚜렷이 나빠졌으며, 1 M 이상의 농도에서는 염류장애 현상이 크게 관측되었다. 이러한 조건에서 GG0461의 첨가는 상추의 경우 800 mM 조건에서, 애기장대의 경우 1000 mM에서 대조구와 비교하였을 때, 생육이 개선되는 것을 뚜렷이 관측할 수 있었다. 그러나 이보다 높은 질산이온 용액의 처리구에서는 생육이 크게 저해되어 균주의 효과를 평가하기 어려웠다.

#### 다. 실용화를 위한 대량배양 기술

실용화를 위한 GG0461 균주의 대량배양 방법을 확립하였다. 실험실 조건에서 균주의 배양은 PAF 배지를 이용하여 이루어졌으며, 먼저, PAF 배지 성분을 공업용 재료로 바꾸기 위한 대체실험이 수행되었다. 비료성분으로 사용하고 있는 생선발효액(fish-fermented amino acid), glycerol, corn syrup, 그리고 마그네슘과 인산의 효과를 다양한 농도에서 측정하였으며, 균의 생장은 이들 4가지 성분을 첨가하였을 때 왕성하게 이루어짐을 확인하였다. 동일한 조건에서 GG0461 균주의 질산염 흡수력을 측정하였을 경우 35시간 만에 약 5000 ppm의 질산을 흡수함을 확인하였다. 한편, 생선발효액을 대체할 수 있는 재료로 공업용 tryptone과 yeast extract, soybean meal 등의 효과를 측정하였을 때, tryptone 2%와 glycerol 1% 조건에서 최적의 균주생산이 가능함을 확인하였다.

## 2. 활용에 대한 건의

- 가. 본 연구로부터 얻어진 3가지의 유용균주 중, 처음 분리되어 연구수행의 주된 대상이된 GG0461 균주는 균주특허가 출원후 등록되어 산업화 기술로 제품화되어 이용될 예정이다.
- 나. 질산흡수능이 뛰어나며, 상추의 시설재배에서 효과를 보인 GG0461 균주는 시제품의 형태로 제작되어 효능검증과 경시변화를 조사중에 있으며, 시작품이 농가에 보급되어 절화용 국화재배지와 오이재배에서 좋은 결과를 얻었다. 그러나 완벽한 제품화를 위해서는 현장적용에 관한 좀 더 세부적인 연구가 이루어져야 할 것이다.
- 다. 본 연구결과로 분리 동정한 3종의 균주는 다양한 환경정화 사업에 이용할 수 있을 것이다. 농업분야에서 가축분뇨의 정화기술, 질산비료 성분의 하천유입에 의한 오염 방지 기술, 간이 상수도 등 음용수 중 질산제거 기술, 산업폐수로부터 질산성분 제거기술 등에 유용성이 인정되며 이러한 연구가 지원되기를 희망한다.

# SUMMARY

## I. Title

Removal of soil nitrate from greenhouse by soil microorganisms having nitrate uptake activity

## II. Objects and Significances of the Research

Excess amounts of fertilizer had been used to increase the productivity of vegetables and crops. Therefore, too much salts have been deposited in the soils of greenhouse and have been negatively influenced on the crop and vegetable cultivation, known as 'salt stress'. Salt stress has been reported national-wide. Especially, in the soils of green and glasshouses, salt accumulation causes a serious problem because of no rainfalls for leaching the soil salts. High concentration of soil salt deteriorates the growth and development of plant and, thus, its quality and productivity. Recently, there were various reports on the salt problems of vegetable culture in the greenhouse.

It is a unique phenomenon in the domestic agriculture that salt stress is due to the nitrate accumulation. Nitrogen fertilizers have been used more than those are actually necessary for crop and vegetable cultivations. In order to maintain high quality and productivity, the excess nitrate should be removed from the soils of green and glasshouse. Researches to develop the method of salt removal, physiological and biochemical analyses to elucidate the mechanism of salt stress, and the way of cultivation to overcome environmental problems, should be performed step by step.

The purpose of this research work is to isolate soil microorganisms and use them for microbial remediation of soil nitrate, in order to remove excess amounts of soil nitrate from the cultivation area.

### III. Contents and Scope of the Research

1. Isolation of soil microorganisms having high capacity of nitrate uptake from the soils of green and glasshouse.
2. Identification of soil microorganisms by the analyses of biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence.
3. Determination of optimal incubation conditions for the maximal nitrate uptake activity.
4. Conditions for the best microbial effects on the lettuce cultivation.
5. Development of commercial media for large-scale cultivation of soil bacteria.
6. Production of test microbial culture product and inspection of quality change during storage period.
7. Improve the quality of test product and make a final commercial product.

### IV. Results of the Research and Suggestions for Further Application

#### 1. Results of the Research

##### A. Isolation and identification of soil microorganisms

Twenty microorganisms were isolated from the soils of greenhouse. Eight of them were able to survive in the media containing high concentration of nitrate. Three of them showed high activities of nitrate uptake and were identified as *Enterobacter amnigenus*, *Bacillus arbutinivorans* and unidentified *Bacillus* species by analyzing biochemical characteristics and the base sequence of 16S rRNA gene. The nitrate uptake activity of *E. amnigenus* has never been reported. Therefore, various characteristics of *E. amnigenus* GG0461 were investigated and optimal conditions for the nitrate uptake activity were analyzed, such as optimal temperature, pH, and carbon source. Stationary phase of GG0461 growth was obtained after 10 h incubation and its cell density was  $4 \times 10^7$  cfu ml<sup>-1</sup>. It was concluded that GG0461 has a potential for biological removal of excess soil nitrate.



## B. Nitrate Uptake Activity of GG0461

Capability of GG0461 on the nitrate uptake has been investigated under various conditions. Nitrogen sources were helpful for the growth of GG0461, although they were not required for it. The microbial growth was stimulated by increasing the concentration of nitrate in the media. The maximal nitrate uptake was obtained at 5,000 ppm (50 mM) and the rate of uptake decreased to 60% at 10,000 ppm. The growth and nitrate uptake activity of GG0461 were maximal at 37°C. Kinetics of nitrate uptake were analyzed at various soil temperature conditions. Nitrate uptake activity was increased at alkaline conditions of culture media and it was accompanied with the acidification of media. These results imply that the major factor mediating bacterial nitrate uptake is a nitrate/proton antiporter.

Effect of GG0461 on the nitrate removal was measured during the cultivations of lettuce and *Arabidopsis*. When the bacteria of  $5 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> were treated on the soil, cell density was decreased rapidly during first 5 days and then remained constant and maintained at  $1 \times 10^6$  cfu g<sup>-1</sup> soil. Microbial nitrate uptakes were evaluated. Nitrate content in the soil was not rapidly decreased, and this is probably due to the lack of nutrients in the soils and, therefore, poor growth of GG0461.

Nevertheless, at the salt stress conditions induced by high concentrations of nitrate, the growth of lettuce was improved by the treatment of GG0461. When nitrate solutions at the concentrations from 100 mM to 1.5 M were treated once a week, the growth of lettuce was improved at the concentrations, 100–200 mM. These were due to the supplement of nitrate as a nutrient. When the concentration of nitrate solution was increased to 800 mM, the growth became deteriorated. At the concentration above 1 M, salt stress was observed seriously. Positive effects on lettuce cultivation by GG0461 treatment were observed at the treatment of 800 mM nitrate solution. Positive effects on *Arabidopsis* was also observed at 1,000 mM or higher. The growth of lettuce was severely damaged at the treatment of the solution at concentrations above 1,000 mM.

### C. Mass culture of GG0461 for commercial application

A method for large-scale cultivation of GG0461 was developed for the field application. PAF media was good enough for GG0461 in a small-scale cultivation. Therefore, each nutrient of PAF media was replaced by a commercial product. When the commercial products of fish-fermented amino acids, glycerol, and corn syrup plus two salts of magnesium and phosphate were used, GG0461 took 35 h to uptake 5,000 ppm nitrate although the growth rate of GG0461 was increased as much as that in PAF media. Therefore, fish-fermented amino acids were replaced with tryptone, yeast extract, and soybean meal. The optimal conditions for the growth and nitrate uptake by GG0461 were obtained with 2% tryptone and 1% glycerol.

# CONTENTS

SUMMARY.....	6
I. Title	
II. Objects and Significances of the Research	
III. Contents and Scope of the Research	
IV. Results of the Research and Suggestions for Further Application	
A. Isolation and identification of soil microorganisms	
B. Nitrate Uptake Activity of GG0461	
C. Mass culture of GG0461 for commercial application	
CONTENTS.....	10
Chapter 1. Outlines of research project.....	18
Section 1. Purpose of research.....	18
Section 2. Significance and scope of research.....	19
1. Significance.....	19
2. Scope.....	20
A. Isolation and identification of soil microorganisms.....	20
B. Removal of nitrate by microorganisms.....	20
C. Large-scale cultivation for commercial application.....	21
Chapter 2. Current status of domestic and foreign technology.....	22
Section 1. Domestic technology.....	22
Section 2. Foreign technology.....	23
Chapter 3. Contents of the research and results.....	26
Section 1. Outlines of research results.....	26
Section 2. Isolation and identification of soil bacteria.....	27
1. Materials and methods.....	27
2. Soil analysis and isolation of soil bacteria.....	28

3. Characteristics of soil bacteria	28
4. Identification of soil bacteria	33
A. Biochemical characterization	33
B. Gene analysis of 16S rDNA	33
5. Characteristics of GG0461 strain	37
A. Optimal temperature	37
B. Effects of carbon sources on the bacterial growth	37
C. Effects of pH changes of media	37
Section 3. Nitrate uptake by <i>Enterobacter amnigenus</i> GG0461	40
1. Materials and methods	40
2. Effects of various nutrients on the nitrate uptake	41
A. Effect of growth phase	41
B. Effect of nitrate concentration	41
C. Effect of carbon source	41
D. Effect of nitrogen source	44
3. Effects of growth conditions	48
A. Effect of growth temperature	48
B. Effect of inoculation size	48
C. Effect of pH	48
D. pH changes of medium by bacterial growth	48
4. Characteristics of nitrate uptake	54
A. Nitrate uptake and H <sup>+</sup> transport	54
B. Effect of additional nitrate addition	54
C. Effect of initial pH on the medium acidification	56
D. Effect of initial pH on the nitrate uptake	56
E. pH-dependence of growth and nitrate uptake	59
F. Nitrate uptake mechanism of GG0461	59
5. Inhibition of nitrate uptake by chlorate	62
A. Growth inhibition by chlorate	62
B. Inhibition of chlorate effect by nitrate	62
C. Effect of chlorate on T <sub>50</sub> of nitrate uptake	64
D. Effect of chlorate concentration	64
E. Inhibition of nitrate uptake by chlorate	64
Section 4. Pot and field experiment	68
1. Materials and methods	68
2. Growth experiment of lettuce	68
A. Survival of GG0461 in soil and nitrate uptake	68

B. Lettuce cultivation at high salt condition	69
C. Effect of GG0461 on salt-treated lettuce	72
D. Lettuce growth on GG0461 treatment	72
3. Growth experiment of <i>Arabidopsis</i>	72
A. Effect of salt concentration	72
B. Effect of GG0461	73
Section 5. Large-scale cultivation for commercial application	78
1. Materials and methods	78
2. Media made with commercial nutrients	78
3. Media made with fish-fermented amino acids	85
Section 6. Large-scale fermentation and experimental product production	87
1. Liscence of bacterial fertilizer	87
2. Experimental product production	87
3. Quality changes of experimental product on time	87
Section 7. Isolations of more soil bacteria	90
1. Isolation of new soil bacteria	90
2. Identification by analysis of 16S rDNA	90
3. Nitrate uptake activities	90
Chapter 4. Achievement and contribution of the research	95
Section 1. Annual achievement of research	95
Section 2. Contribution to related area	96
1. Technical aspects	96
A. Isolation of soil microorganisms	96
B. Growth analysis and maximization	96
C. Soil application and evaluation	96
D. Removal of excess nitrate environment-friendly	96
2. Economical and industrial aspects	96
A. Commercial application of useful bacterial	96
B. Application to sewage treatment	97
C. Scheduled production of agricultural product	97
Section 3. Review and recommendations for the industrial application	97
Chapter 5. Application of the results	98
Section 1. Application	98

1. Patent, Commercial product and Paper publication	98
A. Patent pending	98
B. Commercial product	98
C. Paper publication and preparation	99
a. Publication	99
b. Paper in preparation	99
c. Paper in preparation	99
Section 2. Application of the isolated bacteria	99
1. Applications to drinking water and agricultural waste water	99
2. Applications to industrial sewage treatment	99
Chapter 6. Research information collected during research progressing	100
Chapter 7. References	100

# 목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
I. 제목	
II. 연구개발의 목적 및 필요성	
III. 연구개발 내용 및 범위	
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	
SUMMARY	6
CONTENTS	10
목 차	14
제 1 장 연구개발과제의 개요	18
제 1 절 연구개발의 목적	18
제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위	19
1. 연구개발의 필요성	19
2. 연구개발의 범위	20
가. 토양균주의 분리 및 동정	20
나. 균주를 이용한 질산이온의 제거기술	20
다. 실용화를 위한 대량배양기술	21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	22
제 1 절 국외의 기술개발 수준	22
제 2 절 국내의 기술개발 현황	23
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	26
제 1 절 연구개발 결과의 개요	26

제 2 절 토양미생물의 분리 및 동정	27
1. 연구수행 방법	27
2. 토양시료의 분석 및 토양미생물의 분리	28
3. 토양미생물의 생육특성	28
4. 토양미생물의 동정	33
가. 생화학적 동정	33
나. 16S rDNA 염기서열 분석에 의한 동정	33
5. GG0461의 생육특성	37
가. 최적 생육온도	37
나. 탄소원에 따른 성장특성	37
다. 배지의 pH 변화에 따른 균주성장	37
제 3 절 <i>Enterobacter amnigenus</i> GG0461 균주의 질산흡수 특성	40
1. 연구수행 방법	40
2. 영양원에 따른 질산흡수 효과	41
가. 성장시기에 따른 질산이온 흡수	41
나. 질산염 농도에 따른 질산이온 흡수	41
다. 탄소원에 따른 질산이온 흡수	41
라. 질소원에 따른 질산이온의 흡수	44
3. 생육조건에 따른 질산흡수 효과	48
가. 생육온도에 따른 질산염 흡수효과	48
나. 접종량에 따른 질산염 흡수효과	48
다. pH에 따른 질산염 흡수효과	48
라. 균주 생육에 따른 배지의 pH 변화	48
4. 질산이온 흡수의 특성	54
가. 질산흡수와 H <sup>+</sup> 이동	54
나. 배양중 질산이온의 첨가 효과	54
다. 초기 pH에 따른 배지의 산성화	56
라. 초기 pH에 따른 질산이온 흡수	56
마. pH에 따른 균주생육과 질산이온 흡수 비교	59
바. GG0461 균주의 질산흡수 기작	59
5. Chlorate에 의한 질산흡수의 저해	62
가. Chlorate에 의한 생육저해	62
나. 질산이온에 의한 Chlorate 효과 저해	62
다. 질산흡수시간 T <sub>50</sub> 에 미치는 chlorate의 효과	64
라. Chlorate의 농도에 따른 생육저해	64
마. Chlorate의 질산이온 흡수 저해효과	64
제 4 절 Pot 및 포장에서의 질산흡수 효과	68



1. 연구수행 방법	68
2. 상추 생육실험	68
가. 토양처리 균주의 생존 및 질산이온 흡수	68
나. 고염류 토양에서 상추의 재배효과	69
다. 염류농도에 따른 상추의 생육 및 균주효과	72
라. GG0461 균주 처리에 따른 상추생육	72
3. 애기장대의 생육실험	72
가. 염류농도에 따른 애기장대의 생육평가	72
나. 질산흡수균의 처리효과	73
제 5 절 실용화를 위한 대량배양법 확립	78
1. 연구수행 방법	78
2. 산업용 재료를 이용한 배지개발	78
3. 아미노산 비료를 이용한 배지개발	85
제 6 절 실용화를 위한 대량배양 및 시작품 제작	87
1. 미생물비료 허가취득	87
2. 대량배양 실험 및 시작품 제작	87
3. 시작품의 경시적 변화	87
제 7 절 실용화를 위한 추가적인 균주의 분리 동정	90
1. 질산이온 흡수 미생물의 추가 분리	90
2. 16S rDNA 염기서열분석에 의한 동정	90
3. 질산이온 흡수력 측정	90
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	95
제 1 절 연구개발목표의 달성도	95
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도	96
1. 기술적 측면	96
가. 유용한 토양미생물의 분리 및 동정법을 확립	96
나. 토양미생물의 생육검사 및 효능 극대화를 위한 방법 확립	96
다. 분리동정한 미생물의 토양처리 및 효과검증법 확립	96
라. 친환경적 방법으로 농경지 질산 오염을 제거할 수 있는 방법 확립	96
2. 경제, 산업적 측면	96
가. 환경친화형 유용한 미생물의 산업적 이용	96
나. 폐수처리 등에 활용	97
다. 시설재배 농산물의 계획생산 가능	97

제 3 절	산업화를 위한 검토 및 개선점	97
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	98
제 1 절	결과의 활용	98
1.	특허출원, 상품화 및 논문발표	98
가.	특허출원 및 등록	98
나.	상품화	98
다.	논문발표 및 준비중 논문	99
1)	논문발표	99
2)	준비중인 논문	99
3)	준비중인 논문	99
제 2 절	미생물 균주의 활용계획	99
1.	농용폐수 및 음용수의 질산이온 제거에 이용	99
2.	산업폐수와 하천 정화에 이용	99
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	100
제 7 장	참고문헌	100

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

수확증대를 목적으로한 다비, 다투입재배 방법은 토양에 과다한 영양물질 유입으로 토양 중 염류집적을 유발하여 작물의 생육장애를 유발한다. 이러한 현상은 현재 전 국토의 토양에 광범위하게 나타나고 있으며, 특히 배수가 불충분한 비닐하우스 등 시설재배지에서는 강우가 차단되어 염류용탈의 기회가 적어지므로 염류집적의 심각성이 날로 증가하고 있다. 토양중 과다한 염류는 작물의 생육을 저해하여 농산물의 품질저하는 물론, 생산량의 감소를 초래한다. 최근 국내 시설농업에서 염류집적에 따른 피해현황은 심각한 수준으로 알려져 있으며, 시설원에 작물에서 다양한 피해가 보고되고 있다(농과원, 2004a).

국내 토양에서의 염류장애는 질소질 비료의 과다시비에 의하여 주로 나타나며 토양중 질산이온의 집적이 가장 큰 영향을 미침이 알려져 있어(Lee 2008), 외국의 염류장애가 간척지나 건조 토양에서 나타나는 NaCl 염류장애인 것과는 차이가 있다. 따라서, 그간에 선진농업국에서 수행한 염류장애에 관한 연구결과와 생육개선 방법의 국내 도입에는 어려움이 있다. 국내 농업, 특히, 연작과 다투입재배 방법이 일상화되어있는 시설재배지 농업에서, 양적, 질적으로 우수한 생산성을 지속적으로 유지하여 농산물의 가격경쟁력을 높이기 위해서는 토양 중 집적된 염류의 효율적 제거 방법, 염류장애에 따른 작물의 생육불량 원인에 대한 생리학적, 생화학적 분석 및 이를 극복할 수 있는 재배방법의 확립 등이 선행되어 종합적이고 체계적인 염류장애 극복 방법이 확립되어야 할 것이다.

본 연구의 목적은 밭토양에서 분리한 토착 토양미생물을 이용하여 환경보전적인 방법으로 토양 중 집적된 질산성분을 효율적으로 제거하여 시설재배지에서 생산성을 높이고 우수한 품질의 농산물을 생산하는데 있다. 시설재배지나 밭 토양에서 환경친화형 질산흡수 미생물을 분리한 후, 질산이온 흡수능 평가에서 우수한 균주들을 최종 선정한다. 이 균주들을 동정한 다음 균주들의 질산염 흡수능에 대한 생화학적, 생리적 특성을 밝힌 후, 질산흡수 미생물을 시용하여 토양 중 질산염류 제거방법을 확립한다. 질산흡수 미생물을 토양에 항상 생육하도록 토착화함으로써 과잉 질산염을 제거하여 염류장애를 예방하며, 질산염 제거를 위한 미생물의 최적 생육조건, 미생물의 처리방법, 균주 활력 유지방법, 균주의 질산염 흡수능 증진조건 등을 확립한다. 이들 균주들의 대량배양 조건 확립하여 미생물 시제품 제형화 기술을 확립함으로써 시설재배지 토양 중 질산염류의 친환경적 경감 방안을 마련하는 순서의 연구과정이 이루어졌다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

### 1. 연구개발의 필요성

야채류를 포함한 신선한 원예작물의 수요는 경제성장에 따른 소득의 증가로 크게 증가하여왔다. 최근 도시화와 웰빙문화의 발전에 따른 친환경 식품의 요구는 도시근교의 시설재배지를 넓혀서 2005년도에 100,915 ha로 국토의 총 경지면적의 5.5%를 차지하였으며 (MAF report, 2006), 교통과 물류의 발전으로 시설재배지는 전국적으로 확대되었고, 농가의 소득증대에 크게 기여하였다. 그러나, 시설재배의 특성상 연중 3-4회의 수확을 목적으로한 연작과 과도한 양의 비료를 투입하는 다비재배법이 보편화하면서 표토의 염류집적을 수반하였고, 이것은 오히려 생산성의 감소는 물론 생산물의 품질이 떨어지므로써 계획적인 생산이 어려워졌고 또한 소득면에서 불이익이 나타났다. 따라서, 시설재배에서 높은 생산성이나 양질의 생산물을 지속적으로 얻어내기 위해서는 작토층에 누적되는 과다염류의 제거를 위한 효율적이며 친환경적이고 비용을 최소화하는 방안이 개발되어야 할 것이다.

노지토양중 집적된 과량의 염류는 강우와 관개수에 의해 씻겨나가거나 하층으로 용탈되어 제거된다. 그러나 시설재배지에서는 관개수에 의해 용탈된 염류도 작물의 뿌리 하층에 머물게 되고, 시설내의 온도가 올라가거나 표면의 건조시에 증발산에 의해 토양수분과 함께 상승하여 표토에 집적됨으로써 작물에 더 큰 염류장애를 유발할 수 있다. 실제 Ha 등(1997)은 남부지방 시설재배 토양을 조사한 결과 토양의 평균 염류농도가 표토에서 5.84, 심토에서 2.49  $\text{dS m}^{-1}$ 로 표토가 심토보다 2배 이상 높았다고 보고하였다. 또한, 시설재배 작물별로도 염류농도는 차이를 나타내어 과채류 재배지에서 표토와 심토에 각각 5.13, 2.29  $\text{dS m}^{-1}$ 의 염류양을 보였고, 화훼류재배지에서는 각각 6.34, 2.75  $\text{dS m}^{-1}$ 를 보여 화훼류재배지에서의 염류집적이 더 심각함을 보고하였다.

국내의 연작과 다투입재배 방법이 일상화되어있는 시설재배 농업에서, 양적, 질적으로 우수한 생산성을 지속적으로 유지하여 농산물의 가격 경쟁력을 높이기 위해서는 다음의 몇 가지 기술이 시급히 확립되어야 할 것이다. 먼저, 토양내 유입되는 과잉염류의 차단을 위한 과학적 시비방법 (강&홍, 2004), 토양중 집적된 염류의 효율적 제거방법, 염류장애에 따른 작물의 생육불량 원인에 대한 생리학적, 생화학적 분석 및 이를 극복할 수 있는 재배방법의 확립 등이 선행되어 종합적이고 체계적인 염류장애 극복 방법이 확립되어야 할 것이다. 본 연구에서는 이들 토양중 과다염류의 친환경적 제거방안 개발에 초점을 맞추고 다음과 같은 범위의 연구를 수행하였다.

## 2. 연구개발의 범위

본 연구개발에서는 토양 중 질산흡수력이 탁월한 균주를 분리하고, 이들을 최적조건에서 배양하여 최대 활력을 유지하도록 만든 배양액을 염류가 집적된 시설내 토양에 가함으로써 토양의 염류를 친환경적으로 제거하는 방안을 마련하려고 한다. 이를 위하여 본 연구는 세단계로 진행되었다.

### 가. 토양균주의 분리 및 동정

충북 청주시와 청원군에서 염류농도가 다양한 밭토양을 채취하여 20여종 이상의 미생물을 분리하였으며, 이들 중 고농도의 질산이온을 포함한 배지에서 생육하는 균주를 8종을 분리하였다. 여기서 질산흡수력이 가장 우수한 균주의 생화학적 대사 특성과 16S rRNA 유전자를 분석하여 *Enterobacter amnigenus* 임을 동정하였다. 이 균주는 문헌조사를 통하여 세계학계에 질산흡수력이 보고된 바 없으며, 특허가 출원된 경우도 없음이 확인되었다. 따라서, *E. amnigenus* GG0461 균주의 다양한 특성이 연구되었고, 이 균주의 탁월한 질산이온 흡수력에 대한 특성도 자세히 조사하였다. 균주의 특성으로는 최적생육온도와 pH, 탄소원 등이 조사되었다. 균주는 10시간 배양으로 정체기에 도달하였으며, 균수는  $4 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 에 도달하여 실용화를 위한 증식과 균주의 활력유지는 무난한 것으로 평가되었다.

### 나. 균주를 이용한 질산이온의 제거기술

GG0461 균주의 질산이온 흡수능력을 다양한 조건에서 측정하였다. 균주의 성장에 질산이온이 필수적으로 필요한 요인은 아니었으나, 질산이온의 농도증가에 따라 균주의 생육이 촉진되었다. 균주의 질산이온 흡수능력은 5,000 ppm(50 mM)에서 최대를 보였으며 10,000 ppm(100 mM)이상의 농도에서는 약 60%의 흡수능력을 보여, 국제적으로 질산흡수에 탁월한 능력이 알려진 *Klebsiella* 균주와 견줄만하였다 (Pinar 등, 1997). GG0461 균주는 질산이온의 흡수에 질소원을 요구하였으며, 몇가지 질소원의 효과를 확인하였다. 균주의 생육과 질산이온 흡수능은 모두 37°C에서 최적임을 확인하였고, 다양한 토양온도를 가정한 조건에서 질산흡수 kinetics를 조사하였다. GG0461 균주에 의한 질산이온의 흡수는 배지의 환경이 알칼리 조건에서 촉진되었으며, 질산이온 흡수에 따른 배지의 산성화를 동반하였다. 이것은 이 균주에 의한 질산이온 흡수기작이  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  antiporter에 의해 일어남을 의미하는 결과로, 실용화를 위한 기초연구로 좀 더 자세한 기작이 연구되어야 할 것이다.

실제 GG0461 균주를 토양에 처리하였을 때 토양중 질산염류 제거효과를 상추와 애기장대 이용하여 측정하였다. 먼저, 균주의 생육특성을 밝히기 위하여 균주처리후 토양중 생존하는 생균수를 측정하였다. 토양중 처리한 GG0461은 처리 5일까지 급격히 감소하나 이후에는  $10^6/g$  soil의 밀도를 유지하였다. 이러한 조건에서 토양중 생존하는 균주에 의한 질산염의 흡수를 측정하였다. 균주에 의한 토양중 질산이온의 농도감소는 크게 나타나지 않았다. 이것은 토양내 영양원 부족에 의한 균주의 생육저하에 기인하는 것으로 생각된다.

그럼에도 불구하고 높은 농도의 질산이온을 처리하여 염류장애를 유발한 조건에서의 상추는 GG0461 균주의 처리로 생육의 향상이 관측되었다. 질산이온을 100 mM부터 1.5 M 까지 농도를 증가시키며 주 1회 처리하였을 때, 상추와 애기장대 모두 100-200 mM 농도에서는 생육이 촉진되었다. 이것은 질산태 질소의 첨가로 인한 양분효과로 확인되었다. 염류농도 800 mM 이상에서 생육은 뚜렷이 나빠졌으며, 1 M 이상의 농도에서는 염류장애 현상이 크게 관측되었다. 이러한 조건에서 GG0461의 첨가는 상추의 경우 800 mM 조건에서, 애기장대의 경우 1000 mM에서 대조구와 비교하였을 때, 생육이 개선되는 것으로 관측되었다. 이보다 높은 농도의 처리구에서는 상추의 생육이 크게 저해되어 균주의 효과를 평가하기 어려웠다.

#### 다. 실용화를 위한 대량배양 기술

실용화를 위한 GG0461 균주의 대량배양 방법을 확립하였다. 실험실 조건에서 균주의 배양은 PAF 배지를 이용하여 이루어졌으며, 먼저, PAF 배지 성분을 산업용 재료로 바꾸기 위한 대체실험이 수행되었다. 비료성분으로 사용하고 있는 생선발효액(fish-fermented amino acid), glycerol, corn syrup, 그리고 두 가지 염(마그네슘과 인산)의 효과를 다양한 농도에서 측정하였으며, 균의 생장은 이들 4가지 성분을 첨가하였을 때 왕성하게 이루어짐을 확인하였다. 이러한 조건에서 GG0461 균주의 질산염 흡수력을 측정하였을 때, 동일한 4가지 성분을 추가한 경우 35시간 만에 약 5000 ppm의 질산을 흡수함을 확인하였다. 한편, 생선발효액을 대체할 수 있는 재료로 공업용 tryptone과 yeast extract, soybean meal 등의 효과를 측정하였을 때, tryptone 2%와 glycerol 1% 조건에서 최적의 균주생산이 가능함을 확인하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 국외의 기술개발 수준

UN의 조사에 따르면 세계 경작지의 20%가 염류의 심각한 영향을 받는다고 알려져 있으며, 또 다른 보고에서는 피해지역이 35%에 이른다고 알려져 있다(Flowers & Yeo, 1995). 선진국에서는 염류장애의 연구가 주로 건조지역이나 간척지를 대상으로 이루어져 NaCl에 의한 생육장애를 연구하고 있다. 그간에 염류장애 연구는 기후의 변화, 토양 중 염류의 이동과 집적, 용탈기작 등은 물론, 작물의 생육저해 기작으로부터 관련 유전자 발현 및 조절까지 체계적이고 지속적으로 이루어졌다.

염류장애는 식물의 거의 대부분 생리현상과 대사과정에 영향을 주므로, 다음과 같은 중요한 의문에 대한 연구가 중점적으로 이루어졌다. 식물체가 토양 중 과다염류를 어떻게 감지하는가? 염류장애에 따른 스트레스시 방어기작의 신호는 어떻게 활성화 되는가? 장애의 경감 및 생존을 위한 과정은 어떻게 일어나는가? 이러한 연구를 통하여 식물의 염류저항성은 뿌리에서의 이온 이동 및 삼투압 조절을 통한 항상성(homeostasis)과 스트레스에 의한 조직의 파괴와 이에 따른 해독 및 수리작용의 활성화를 통하여 나타남을 확인하였다(Mansell 등, 1986). 이온의 항상성에 관한 각종 막수송 효소들의 작용은 자세히 밝혀졌으며, 원형질막 및 액포막의 H<sup>+</sup> 펌프(H-ATPase)들과 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup> 등의 2차 막수송 효소들이 염류장애에 중요한 역할을 수행함이 알려져 있다(Hasegawa 등, 2000). 염류장애에 따른 각 현상의 기작은 한 발과 냉해 스트레스 장애와 함께 여러 가지 신호전달 경로와 유전자의 관련성이 제안되었으며, 유전자들의 역할이 자세히 연구되어지고 있다. 최근, SOS(salt overly sensitive) 경로를 통한 생화학적, 분자생물학적 활성이 이온의 항상성 조절을 통하여 염류저항성에 중요한 기능을 수행함이 밝혀졌다(Hasegawa 등, 2000; Zhu, 2002)

구미에서의 질산염의 문제는 토양보다는 지하수의 오염에서 심각하게 나타나고 있다. 질산염은 우리나라와 마찬가지로 농업에서 질소비료의 과대사용과 가축분뇨에서 발생하는 경우가 많다. 질산염은 하천의 오염은 물론 건조지의 경우 지하수의 오염으로 나타나 건조지역의 국가들에서는 심각한 환경문제가 되고 있다. 폐수나 하천에서의 질산염 제거는 효소나 세포고정 수지를 이용한 방법 등 다양한 방법이 개발되었으며, 미생물 녹조류를 사용하여 동화시키는 방법 등이 적용되었다(Vilchez 등, 2001). 탈질 미생물을 이용한 질산제거는 미생물의 질산환원효소 활성을 이용하는 것으로, 이 효소는 질산을 환원하여 질소로 배출한다. 질산환원 효소는 3종류가 알려져 있는데, 미생물에 따라 또는 혐기적, 호기적 생육 조건에 따라 효소의 종류나 활성이 달라지며, 질산은 양분으로 동화 또는 질소로 유출되거나, 호흡 전

자전달계의 일부로 이용된다(Steenhoudt 등, 2001). 요약하면, 선진국에서는 질산염에 의한 작물의 염류 장애 현상이 심각하지 않아, 지하수나 하천수를 제외한 토양에서 미생물을 이용한 질산염 제거방법은 갯벌이나 습지를 제외하고는 널리 활용되지 않고 있다.

## 제 2 절 국내의 기술개발 현황

국내의 시설재배지에서는 고수익을 목표로 경제작물의 연작 및 연중재배가 이루어지고 있다. 이러한 농사법은 작물생육을 위한 토양의 화학성을 불량하게 만들어 해가 갈수록 작물의 생산성은 불안정하여 진다. 토양의 불량화는 주로 토양염류의 증가에 기인하며 시설재배지 토양의 EC는 노지상태 정상 생육지의 2.5 dS/m보다 2-3배 증가한 것이 일반적으로 관측되고 있다(농업과학기술원, 1997 & Jung 등, 2000). 토양의 염류가 생육을 저해하는 염류집적 시설재배지에서 토양의 EC 증가와 토양의 화학성분들과의 상관관계를 토양시료 282점에 대하여 조사하였을 때, 작물의 생육장애를 일으키는 3.0 dS/m 이상의 EC 값을 보이는 토양에서는 주로 염소, 질산태 질소, 황산 등 음이온과 마그네슘, 가리 등 양이온의 함량이 증가함을 확인하였다(농업과학기술원, 2004). 특히, 질산태 질소와 염소의 집적효과가 큰 것으로 분석되어 이에 대한 대책의 수립이 시급한 것으로 평가되었다.

토양의 가용성 염류중 다량인 것은  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  등이고, 비교적 소량인 것은  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$  등 이라하였는데 (Bernstein, 1975), 시설재배지 토양에서는  $\text{NO}_3^-$  및  $\text{Cl}^-$  등이 염류농도에 비례하여 많은 것으로 나타났다. (Kowalenko, 1980; Pleysier 등, 1982) 무기성분이 토양염류농도에 기여하는 정도는 정 등 (Jung 등, 1994)은  $\text{NO}_3^- \text{N} > \text{SO}_4^{2-} > \text{Na}^+ > \text{Cl}^- > \text{P}_2\text{O}_5 > \text{NH}_4 \text{N} > \text{Mg} > \text{Ca}$  순으로 기여한다고 하였고, 이 등 (Lee 등, 1987)  $\text{Cl}^- > \text{NO}_3^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{K}^+ > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$  순으로 기여한다고 하였다. 또한, 하 등 (Ha 등, 1997) 은 표토에서는  $\text{Mg}^{2+} > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{Ca}^{2+} > \text{SO}_4^{2-} > \text{K}^+$  순으로, 심토에서는  $\text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{K}^+$  순으로 기여도가 높다고 보고하였다. 이렇게 무기성분이 토양염류농도에 기여하는 정도는 연구자마다 다르게 평가되었지만, 음이온이 양이온에 비해 기여도가 높다는 것에는 연구자 모두 일치하였다. 하 등 (Ha 등, 1997)은 남부지방 시설재배 토양을 조사한 결과 토양의 평균 염류농도가 표토 5.84, 심토에서 2.49  $\text{dS m}^{-1}$ 로 표토가 심토보다 2배 이상 높았다고 보고하였다. 또한 시설재배 작물별로도 염류 농도의 차이를 나타내어 과채류재배지는 2.29(심토)-5.13  $\text{dS m}^{-1}$ (표토) 화훼류재배지는 2.75(심토)-6.34  $\text{dS m}^{-1}$ (표토)로서 화훼류재배지가 더 높음을 보고하였다. 정 등 (Jung 등, 1994)은 시설재배지 토양을 토심별로 조사한 결과 심토보다는 표토에서 더 높고, 하우스 외부토양에 비하여 내부 토양에서 질산태질소, 유효황



및 염소의 함량은 2.5-3배, 치환성 염기함량은 1.2-1.8배, EC는 2.8배 정도 높았다고 보고하였다.

이러한 물리 화학적인 원인에 의해 토양중 염류농도가 증가하게 되면, 토양중 삼투압이 높아져 작물에 대한 수분 및 양분의 흡수 저해 (Eaton 등, 1971)가 일어나고, 특정이온의 과잉에 의한 대사작용의 저해 (Ayers 등, 1984), 작물의 파종시 발아 억제 (Dunkle 등, 1983; Kang 등, 1996)등의 장애를 받게 될 뿐만 아니라, 토양중 미생물상의 변화를 가져와 작물 건전 생육에 불리하게 작용한다 (Kwon 등, 1998a; Kwon 등, 1998b). 권 등 (Kwon 등, 1998)은 염류집적 시설재배지의 토양미생물상을 조사한 결과 건전지에서는 형광성 *Pseudomonas*속 세균의 밀도가 높은 반면 염류장해지에서는 병원성 *Fusarium*속의 밀도가 높았다고 보고하였다.

이와 같이 염류집적에 의한 작물의 생육불량 및 품질 저하로 수량이 감소하게 되자 염류집적을 경감시킬 수 있는 연구가 활발하게 일어났다. 정 등 (Jung 등, 1975)은 관수량과 관수횟수에 따른 제염효과를 보였는데, 관수량이 증가할수록 1회에 전량을 관수하는 것보다 2-3회에 나누어서 관수하는 것이 제염율이 좋았으며, 또한 동일량의 관수량에 대한 제염효율은 토성에 따라 차이를 보고하였다. 김 등 (Kim 등, 1996)은 시설재배지 토양을 심토 반전함으로써 경작토양의 염류농도가 5일 동안 30 mm 관수하는 것보다도 크게 낮아지고, 심토반전이 깊을수록 수량과 생육이 좋아진다고 보고하면서 염류 장해 경감을 위한 것보다도 크게 낮아지고, 심토반전이 깊을수록 수량과 생육이 좋아진다고 보고하면서 염류 장해 경감을 위한 하나의 방안으로 심토반전을 제시하기도 하였다. 또한, 다른 방법으로 시설재배지 채소류의 질소소비량을 새롭게 설정(Lee 등, 1996)하기도 하고, 더 나아가 지금까지 사용하였던 질소시비 추천 지표성분을 질산태질소로 바꾸려는 노력과 함께 시설재배토양의 질소 비비량을 다시 결정(Kwak 등, 1997; Hong 등, 1998a; Hong 등, 1998b; Park 등, 2000; Lim 등, 2007) 방법을 도입하여 토양에 비료 투입량을 줄이면서 생산량을 증가 시킬 수 있는 연구가 수행되고 있다.

토양의 질산염 함량 증가는 작물의 생육장애를 유발함은 물론 작물의 흡수량 증가로 이어지며, 실제로 염류토양 조건에서 엽채류의 질산함량이 크게 증가함을 보였고(진 등, 2004), 이것은 질산이온의 섭취에 따른 발암이나 청색증 등 건강의 위협 가능성이 있음을 보인다(European Commission, 1997). 토양중 질산의 함량증가에 의해 작물의 질산이온 흡수도는 증가하나(정 등, 1997), 염류에 의한 스트레스 시 질산의 환원량이 오히려 감소함으로서 작물체내의 질산함량은 더욱 높아짐을 확인하였다(김, 2000). 이러한 이유에서 식용 엽채류 생산을 주로하는 시설재배지에서의 토양 중 질산함량 경감은 중요성이 높아지고 있다.

국내에서 탈질균을 이용한 토양의 질산염 제거는 일부 시도된 적이 있으나 대부분의 연구는 주로 폐수처리 과정중 질산염 제거에 집중되었다. 질산염류 제거를 목적으로 사용가능한 탈질균으로는 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Paracoccus*, *Azospillium*,

*Thiosphaera* 종이 알려져 있으나, 국내에서 분리한 탈질균들은 이미 선진국에서 보고(Gamble 등, 1997)된 것과 마찬가지로 *Pseudomonas*나 *Alcaligenes*종에 속하는 것으로 확인되고 있다(황 등, 1997). 현재, 이들 탈질균들은 주로 폐수처리에 이용되고 있으며, 토양의 개선에는 이온교환수지 등을 미생물과 함께 처리하는 방법 등이 제안되었으나, 아직 현장적용이 가능한 미생물 이용기술은 확립되지 않았다.

본 연구실에서는 선행연구를 통하여 밭 및 시설재배지 토양에서 질산흡수력을 보이는 4종의 균을 분리하였고, 이들의 몇 가지 기본 특성을 발표하였다(Cho 등, 2005). 이들의 질산흡수력은 배양조건에 따라 차이를 보이나, 가장 뛰어난 질산흡수력을 보이는 균주 GG0461은 운동성을 갖는 그램 음성균으로 형광성은 없으며, 주사형 전자현미경으로 크기가 0.5-1  $\mu\text{m}$ 인 간균으로 확인되었다. GG0461의 질산흡수력은 매우 탁월하여 액체배지에서 배양시 2,000 ppm (약 50 mM)농도의 질산이온을 10 시간 이내에 모두 흡수하였다. 분리한 균주는 약간의 차이는 있으나 PAF 액체배지에서 약 9시간이면 초기정체기에 도달하여 균주의 성장도 왕성함을 확인하였다. GG0461 균주의 질산이온 흡수는 반감기의 측정 및 분석으로 평가하였을 때, 단일인자 또는 한 가지 속도제한 단계에 좌우됨을 확인하였으며, 이것은 아마도 질산이온 수송체 단백질일 것으로 추정된다. 질산흡수가 단일 성분에 의해 좌우된다는 것은 균주의 질산흡수 기작의 연구나 흡수도 증진을 위한 방안마련이 상대적으로 쉬울 것이라는 것을 의미한다. 이러한 선행연구의 결과는 시설재배지에서 질산농도의 경감 또는 제거에 이 균주들이 크게 기여할 수 있다는 가능성을 제시한다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 결과의 개요

본 연구는 2년간의 단독과제로 수행하였으며, 실용화를 목적으로 참여기업이 공동연구를 하였다. 연구내용은 원래 제안하였던 계획에 따라 다음의 3가지 내용으로 구성되었다.

첫째, 시설재배지 토양 중 과다하게 집적된 질산염의 제거를 목적으로 밭토양에서 질산흡수 미생물을 분리하였으며, 분리한 미생물의 동정 및 생육특성 등 다양한 기본특성을 연구하였다. 결과로 질산이온의 흡수능력이 탁월한 균주를 분리하였으며, 생화학적 분석 및 유전자 분석을 통하여 *Enterobacter amnigenus* GG0461 (GenBank 등록번호 EF426859)임을 동정하였다.

둘째, GG0461 균주의 질산이온 흡수에 대한 특성을 자세히 조사하였다. 질산이온 흡수를 위한 영양요구성, 최적 pH, 온도, 질소 및 탄소원 등을 조사하였으며, 배양한 균주는 상추재배에서 염류제거 효과를 측정하기 위하여 포장실험에 이용하였다. 원래의 계획에 따라 애기장대를 이용한 염류장애의 속성평가방법 확립을 위하여 GG0461 균주의 염류제거 효과도 조사하였으나, 애기장대의 염류저항성이 커서 기대하였던 만큼의 염류효과를 얻을 수 없었다. 상추의 포장실험에서는 GG0461 균주의 효과가 상추의 모든 생육지표에서 인정되어 실용화를 위한 연구수행을 가능하게 하였다.

셋째, GG0461 균주를 실용화하기 위하여 대량배양 방법을 확립하였다. 균주배양을 위한 PAF 배지 성분은 공급원가가 저렴한 상업용 배지성분으로 완전히 대체하는 실험을 성공적으로 수행하였으며, 참여기업에서는 이를 이용한 대량배양에 성공하였다. 대량배양으로 생산한 균주는 생육이나 질산이온 흡수력에는 큰 변화없이 높은 활력을 유지하였다. 분리동정한 GG0461 균주의 높은 질산흡수능을 농업적, 산업적으로 이용하기 위하여 균주특허를 등록하였으며, 실용화를 위한 필수단계로 2008년 2월 미생물비료 허가도 취득하였다. 대량배양으로 생산한 시작품은 현재 미생물의 생균수, 활력감소 등 경시적 변화가 조사 중에 있으며, 포장실험을 위한 농가보급 및 효과검증에서도 양호한 평가를 얻어서 실용화에 문제가 없을 것으로 판단하고 있다.

본 과제는 원래 목적하였던 목표 이상으로 진행되어 토양 중 유용한 균주를 3종 추가분리하였고, 균주의 생육특성, 상추재배를 통한 포장실험 등 기반연구를 체계적으로 수행하였으며, 실용화를 위한 대량배양, 상업용 배지개발, 미생물비료 허가취득 등 필수적인 과정을 성공적으로 마쳤다. 다만, 연구기간이 짧고 실용화를 최우선으로 진행하는 과정에서 반복 및 확인 실험 등에 충분한 노력을 가하지 못하였으나, 부족한 부분은 실용화 실험을 선행하면서 제품의 개선과정에서 참여기업의 지원으로 보완할 예정이다.

## 제 2 절 토양미생물의 분리 및 동정

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 토양미생물의 분리 및 균주 보관

시설채배지 토양시료 1g을 멸균한 증류수 5 ml로 추출한 후, 1,200 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 상정액은 1,000배로 희석하고, 50  $\mu$ l를 취하여 *Pseudomonas* agar F(PAF) 평판배지 (tryptone과 peptone 각 1%,  $K_2HPO_4$  0.15%, glycerin 1%)에 도말하였다. 이때, 고농도의 질산이온을 포함하는 배지에서 생존하는 미생물을 분리하기 위하여, 50 mM  $KNO_3$ 를 PAF 고체배지에 첨가하였다. PAF 평판배지는 37°C에서 24시간동안 배양한 후, 단일세균의 콜로니들을 색, 모양, 크기에 따라 선택하고 식별하였다. 분리한 균주는 PAF 액체배지 80%, glycerol 20%를 함유한 저장배지에 냉동보관하였다.

#### 나. 균 성장 측정

토양에서 분리한 미생물 균주는 50 mM  $KNO_3$ 를 첨가한 PAF 배지에서 배양하였다. 배양은 37°C에서 이루어졌고, 세균의 밀도는 분광광도계(U-2000, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 600 nm에서 흡광도 증가로 평가하였다. 본 연구를 통하여 온도, pH, 첨가물의 농도 등을 달리하며 균주의 흡광도를 조사하여 균주성장을 측정하였다.

#### 다. 질산이온의 흡수 측정

질산이온 흡수는 배양 후 액체배지에 남아있는 질산이온의 양을 분석하여 측정하였다. 질산이온의 농도는 질산이온전극과 표준전극(double junction reference electrode)를 이용하여 이온분석기(Ion Selective Analyzer, Orion 960 ISE meter)로 측정하였다. 질산이온전극은 사용 전에 50 ppm 질산이온 표준액에서 2시간 동안 안정화시켰으며, 이온분석기는 질산이온 표준용액 5.0과 50.0 ppm 농도를 사용하여 보정하였다. 표준용액과 토양추출 시료의 질산이온 농도측정은 이온강도 조정용액을 50 : 1(v/v)로 첨가하여 이루어졌다.

#### 라. 배양중 배지의 pH 변화측정

균주의 성장에 따른 배지의 pH 변화는 PAF 배지에서 측정하였다. PAF 배지는 다량의 단백질 및 펩티드 성분과 인산염을 포함하고 있어 자체적 완충력을 가지므로 별도의 완충액을 첨가하지는 않았으며, 따라서 배지의 pH 조정은 가능한 적은양의 산과 염기를 사용하여

이루어졌다. 즉, PAF 배지를 pH 5에서 pH 9까지 조절하기 위하여, pH 5, 6, 7은 HCl, pH 8, 9는 묽은 NaOH 용액이 사용되었다. 배지의 pH 변화는 pH meter(M-92, MeterLab Co., Lyon, France)로 측정하였다.

## 2. 토양시료의 분석 및 토양미생물의 분리

충북 청주시 근교와 청원군의 시설재배지를 포함하는 약 30여 지역에서 토양을 채취하였고, 각 토양의 이화학적 특성을 분석하였으며, 토양 중 미생물을 분리하였다. Table 1은 채취한 토양의 분석결과의 일부이며, 토양의 pH는 약산성에서 중성까지, 전기전도도(EC)는 Site 2와 3의  $0.35 \text{ dS m}^{-1}$  에서 Site 6의  $11.65 \text{ dS m}^{-1}$  까지 넓은 범위를 보여줘, 같은 지역의 시설재배지 토양임에도 불구하고 염류의 함량이 다양함을 확인하였다. 이러한 큰 차이는 해당지역의 농민에 의한 비료의 사용량, 토양의 관리방법 등에 기인한 것으로 여겨진다. 전기전도도에서는 전체 15곳의 포장 중 5곳의 EC값이 5 이상으로 약 33%의 토양에서 심하게 염류장애가 유발될 수 있음을 확인하였다. 염류장애의 주된 원인이 되는 질산염의 함량은  $2.57 \text{ ppm}$ 으로 매우 낮은 토양에서  $151 \text{ ppm}$ 까지 분포하였으며, 이들 중 5곳의 토양에서는  $100 \text{ ppm}$  이상의 높은 값을 보였다. EC 값이 높은 토양의 질산태 질소 함량은 대부분 높게 측정되었으나, Site 1의 경우에는 서로 일치하지 않았다. 각 토양에서 분리한 균주들은 일련번호로 구별하였으며, 고체배지에서의 colony 모양에 따라 한 토양시료에서 2가지 이상의 균주가 분리되기도 하였다. 질산염 흡수동화 능력이 탁월한 미생물을 분리하기 위하여 토양에서 분리한 모든 균주는 질산염  $50 \text{ mM}$  ( $5,055 \text{ ppm}$ )을 포함하는 배지에 접종하여 생육가능성을 확인하였다. 높은 농도의 질산염 조건에서 colony를 형성한 균주는 4가지가 얻어졌으며, 이들 균주는 Table 1에서 밑줄로 나타내었다.

## 3. 토양미생물의 생육특성

분리한 4가지 균주들의 시간에 따른 성장곡선은 Fig. 1과 같다. 모든 균주는 질산칼륨  $50 \text{ mM}$ 을 포함하는 PAF 배지에서 약 12시간에 정체기에 도달하였으며, E5272 균주만 약간 늦은 성장을 보였다. 각 균주의 질산염 흡수능력을 측정된 결과 E0461 균주(동정후 *E. amnigenus* GG0461로 명명함)의 질산흡수 능력이 탁월하였으며, 다른 균주들은 높은 질산농도에서 생육이 가능함에도 불구하고 질산흡수 능력은 낮은 수준이었다. E0461의 질산흡수능은 PDB 배지에서는 미약하였으나, PAF 배지에서는 매우 크게 나타났다. 따라서, 두 배지 성분의 차이는 E0461 균주의 질산흡수력에 큰 영향을 줄 수 있는 성분이 존재하는 것을 의미하는 것으로 각 배지성분의 효과를 조사하였다. 두 배지를 구성하는 중요한 성분들 중 질소원으로 쓰이는 tryptone과 peptone이 E0461 균주의 질산흡수 능력을 증가시킴을 확인하였다 (Fig. 2). 질소원과 탄소원 등의 질산흡수에 미치는 효과는 제 3 절의 결과에서 보였다.

E0461 균주의 모양과 크기는 광학 및 전자현미경 사진으로 분석하였다. E0461은 평균 크기가  $1 \times 0.4 \mu\text{m}$ 인 간균임을 확인하였으며, 광학현미경에서 활발한 운동성을 확인하였음에도 불구하고 편모나 섬모 등은 확인할 수 없었다 (Fig. 3).

Table 1. Salt contents and chemical properties of green and glass house soils

Sampling site <sup>1</sup>	pH	O.M. <sup>2</sup> (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	CEC <sup>3</sup> (cmol(+)/kg)	EC <sup>4</sup> (dS/m)	NH <sub>4</sub> -N NO <sub>3</sub> -N		Microbial Strain No.
						----(mg/kg)----		
Site 1	7.3	2.6	671	15.2	5.75	4.29	2.57	E5711, E5712
Site 2	6.3	2.5	1180	19.0	0.35	6.66	106.54	–
Site 3	5.6	2.5	769	15.6	0.35	8.34	83.43	E0321, E0322
Site 4	6.5	2.7	893	14.5	2.55	5.82	49.05	E2592
Site 5	6.9	3.4	1418	25.1	6.30	7.81	94.53	E6331, <b>E6332</b>
Site 6	5.2	3.1	921	27.1	11.65	9.13	141.46	<b>E9944</b>
Site 7	6.9	2.9	1014	18.5	1.00	8.34	21.32	E1094
Site 8	7.2	1.8	233	15.5	2.45	4.03	50.81	E2491
Site 9	6.8	3.0	1283	21.4	5.25	8.22	147.07	E5251
Site 10	6.1	1.5	940	12.3	0.40	3.31	6.62	<b>E0461</b> , E0462
Site 11	6.8	3.0	1042	19.7	5.20	8.31	151.31	E5271, <b>E5272</b>
Site 12	6.2	2.5	843	11.5	1.30	6.50	47.97	E1395
Site 13	5.4	1.4	147	12.9	1.75	7.06	100.45	E1792
Site 14	4.9	3.9	857	12.9	1.40	6.94	45.11	E1495
Site 15	6.5	2.3	478	15.3	3.60	5.18	67.32	–

<sup>1</sup>Sampling site: green and glass houses of various counties in Chungbuk province.

<sup>2</sup>O.M.: organic matter.

<sup>3</sup>CEC: cation exchange capacity.

<sup>4</sup>EC: Electrical conductivity.

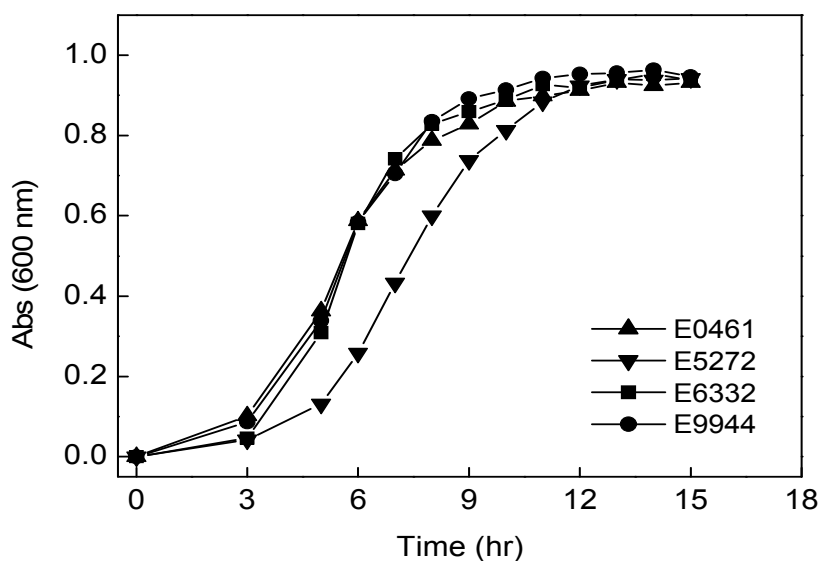


Fig. 1. Growth curves of the isolated soil microorganisms. The microorganisms were incubated in a PAF broth containing 50 mM  $\text{KNO}_3$ . The inoculated broth was agitated at 135 rpm and incubated for 15 hr at 30°C.

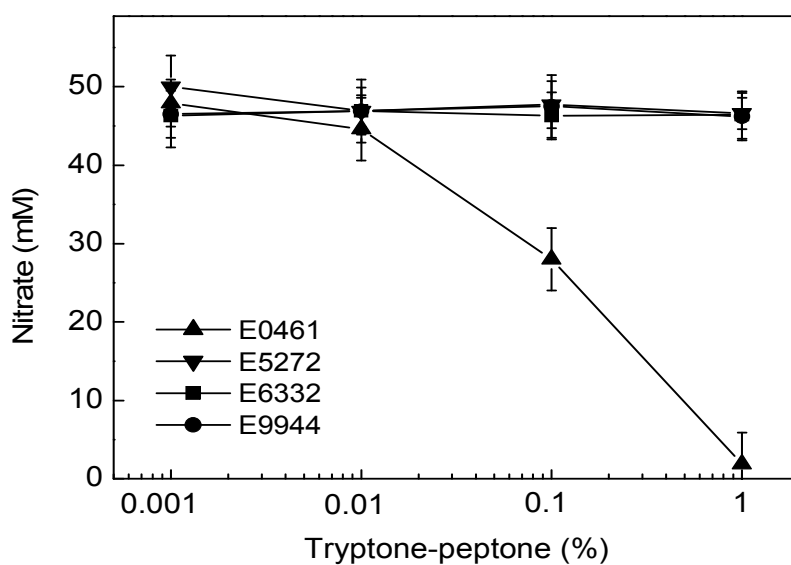


Fig. 2. Nitrate uptakes by soil microorganisms. Microbial strains were cultured in the modified PAF broth containing 50 mM  $\text{KNO}_3$ . Tryptone and peptone were added to the media with 1:1 ratio. The amount of nitrate remaining in the media was analyzed.



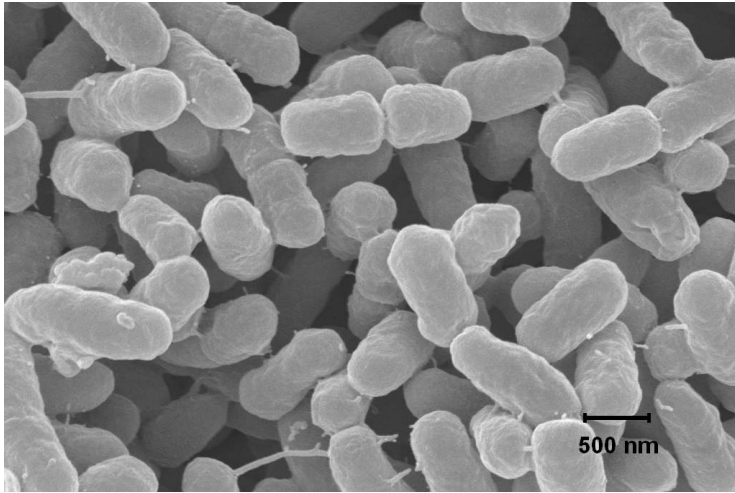


Fig. 3. Electron micrograph of E0461 (GG0461).

#### 4. 토양미생물의 동정

##### 가. 생화학적 동정

질산흡수능이 탁월한 E0461 균주의 동정을 위하여 생화학적 분석이 수행되었다. E0461 균주는 그람 음성의 운동성을 갖는 간균으로서 효소활성과 IMViC 테스트의 결과는 <Table 2>와 같다. IMViC (Indole+Methyl red+VP+Citrate)테스트에서 E0461 균주는 위의 표에서와 같이 ‘- + - +’ 결과를 보여 *E. coli*나 *E. aerogenes*와 관계가 적은 비전형적인 중간미생물의 특성을 보였다. 또한 전분이나 카제인 같은 단백질의 분해력도 보이지 않았으며, 식물의 생육에 해가 될 수 있는 황화수소의 발생도 음성을 보였다. 단, catalase 활성에서는 양성을 보였으며 호기성으로 표층토양에서 생육할 수 있었다. 또 다른 생화학적 방법으로 Api test kit (bioMerieux, Inc., France)를 이용하여 동정한 결과를 Fig. 4.에 보였다. Api 방법에 의하여 E0461 균주는 *Enterobacter*일 확률이 98.9% 였다.

##### 나. 16S rRNA 유전자 염기서열 분석에 의한 동정

E0461 균주의 16S ribosomal RNA 유전자 염기서열 분석은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 본 실험 균주의 chromosomal DNA를 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용해 분리한 후, 16S rRNA sequencing에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGTATCATGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석하였다 (Fig. 5). 염기서열 분석결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GENE BANK의 ribosomal DNA sequence와 비교하였으며, sequence의 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program(Ver. 3.1)을 이용하여 비교분석하였다.

E0461 균주의 16S rRNA 유전자를 분석한 1434개 염기서열은 Genbank NCBI에 등록하였으며(등록번호: EF426859), BLAST 분석에 따른 phylogenetic tree를 얻기위하여 Kimura의 two-parameter 모델에 따라 근연관계를 분석하였다(Fig. 6). 영양요구성이나 Api 테스트 등 생화학적 검사를 거쳐 질산흡수능이 탁월한 E0461 균주는 *Enterobacter*에 가장 가까이 속하는 것으로 동정되었고, 특히, 유사성 98% 이상으로 *Enterobacter amnigenus* 균주형임이 밝혀졌다. 따라서, 본 연구를 통하여 밭토양에서 분리한 E0461 균주는 분리된 지역인 청원군 가곡리의 명칭에 따라 *E. amnigenus* GG0461로 명명하였다.

Table 2. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain E0461

Biochemical reactions	Conventional	API 20E
Shape	short rod	
Motility	+	
KOH test	+	
Gram stain	—	
Catalase	+	
Starch hydrolysis	—	
Tributylin hydrolysis	—	
Casein hydrolysis	—	
Reaction in Litmus milk	—	
Voges–Proskauer test	—	
Methyl red test	+	
Indole production	—	—
Citrate utilization	+	+
Gelatin hydrolysis	—	—
H <sub>2</sub> S production	—	—
Arginine dihydrolase		+
Lysine decarboxylase		—
Ornithine decarboxylase		+
Urease		—
Acetoin production		—
Fermentation/oxidation of		
Glucose		+
Mannitol		+
Inositol		—
Sorbitol		+
Rhamnose		+
Sucrose		+
Melibiose		—
Amygdalin		+
Arabinose		+
Cytochrome oxidase		—
β–Galactosidase		+
Tryptophan deaminase		—

ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+



Fig. 4. Biochemical identification of E0461 by the Api 20E test.

GCCGAGGAGCTACAGCAGTCGAGCGGTACACAGGGAGCTTGCTCCTGGGTGACGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGG  
ATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTA  
GGTGGGGTAACGGCTCACCTAGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCAT-GCCGCGTGATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCATT  
AAGGTTAATAACCTTGTTGATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA  
CTGGGCGTAAAGCGCACGAGGCGGTCTGTCAAGTGGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAG  
GGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAG  
CGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTTCCCTTGAGGAGTGGCTCCCGAGCTAACCGCTTAAA  
TCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGTTAATTCGATGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCTACTCTTGACATCCAGAGAACTTACCAGAGATGGTTTGGTGCTTCGGGAACTCTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGCTGTCAGCTCGTGTGTGAAAT  
GTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGG  
GATGACGTCAGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG  
TATGTCGATGTCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACA  
CACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAAGAGTAGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTACCACTTGATCGGGGTAA

Fig. 5. Sequence analysis of 16S rRNA gene of E0461.

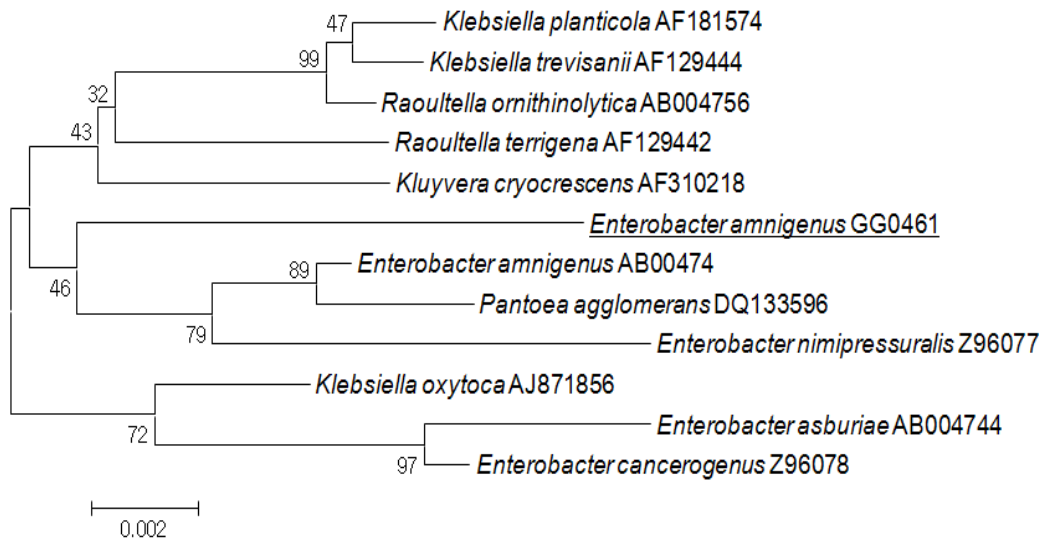


Fig. 6. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence. Comparison shows that the position of E0461 related species of the genus *Enterobacter amnigenus*. Bar, 0.002 substitutions per site.

## 5. GG0461의 생육특성

### 가. 최적 생육온도

다양한 온도에서 *E. amnigenus* GG0461 균주의 생육을 조사하였다. Fig. 7의 결과에서 GG0461 균주는 10°C에서는 생육하지 못하였고, 17°C에서는 접종후 8시간 이후에 약간의 성장을 보였으며, 37°C에서는 접종 후 8시간에 정체기에 도달하는 빠른 성장을 보여 온도가 증가할수록 생육속도는 빨라졌으나, 47°C에서는 성장이 억제되어 최적 조건의 50% 수준을 보였다. 10°C에서 균주의 성장이 억제된 상태에서 배양온도를 37°C로 증가시키면 성장이 2시간 이내에 급격히 증가하여 균주의 활력은 10°C에서도 유지되고 있음을 확인하였다(\* marked). Fig. 8은 각 온도에서의 GG0461 균주의 성장여부를 흡광도로 나타낸 것이다.

본 결과는 GG0461 균주의 생육 최적온도가 37°C 전후임을 보이는 것으로, 이 균주를 토양에 처리하였을 때 토양의 낮은 온도는 균주의 생육 및 질산염 흡수기능에 장애가 될 수도 있음을 보인다. 하지만, 대부분의 시설재배지는 작물생육기에 재배사내 온도가 상대적으로 매우 높아서 토양표층에서 GG0461 균주의 생육 및 질산이온 흡수에는 어려움이 없을 것으로 생각된다.

### 나. 탄소원에 따른 성장특성

PAF 배지에서 탄소원을 제거하고 유기산, 알콜, 당류를 가하여 GG0461 균주의 생육을 조사하였다. Glycerol을 1% 포함한 배지에서 성장이 가장 활발하여 약 120%의 생육을 보였으며, 초산과 구연산 배지에서도 높은 생육을 보였다. 전반적으로 모든 탄소원에서 균주의 성장은 양호하였으나, 에틸알콜과 메칠알콜에서는 다른 탄소원에 비하여 10-20%의 감소를 보였고, 당류에서는 대조구와 비슷한 성장을 보였다 (Fig. 9).

### 다. 배지의 pH 변화에 따른 균주성장

배지의 pH를 5에서 9까지 변화시키며 GG0461 균주의 성장을 측정하였다 (Fig. 10). 최대성장은 pH 8에서 얻어졌고, 약 6시간 만에 초기정체기에 도달하였다. 균주의 성장은 pH 9와 pH 7 순으로 조금씩 감소하였으나 시간이 지남에 따라 정체기에 이르렀다. 그러나, pH 5에서는 성장이 상당히 저해되어 시간에 따른 성장곡선은 거의 직선수준으로 천천히 증가하였고, 접종 후 8시간에 최고흡광도의 약 65%에 도달하였다. 이에 비하여 pH 6에서는 완만한 균주성장 증가를 보였다.

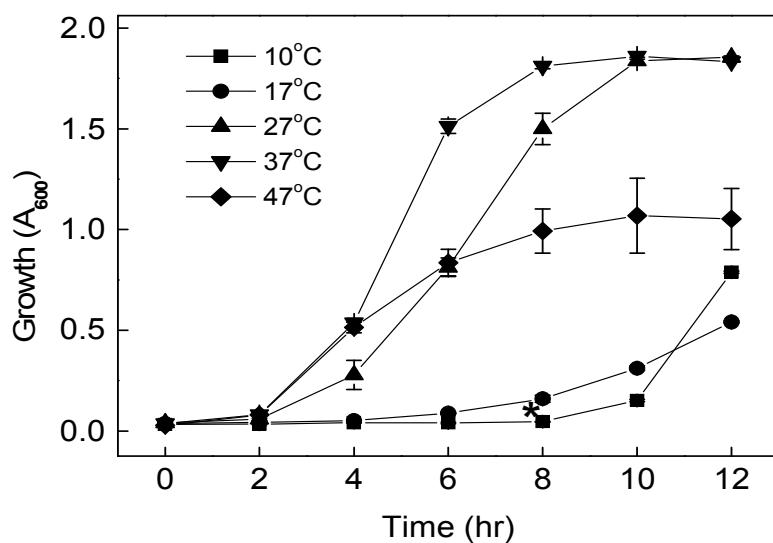


Fig. 7. Effect of temperature on the microbial growth. *E. amnigenus* GG0461 was cultured in the PAF broth at various temperatures.

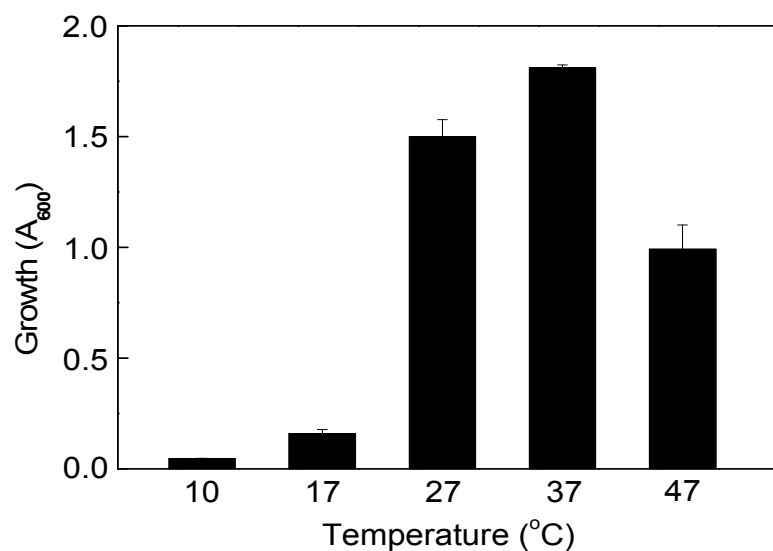


Fig. 8. Effect of temperature on the microbial growth. GG0461 was cultured in the PAF broth at various temperatures. Optimum growth was observed at 37°C and the growth was suppressed at 47°C.

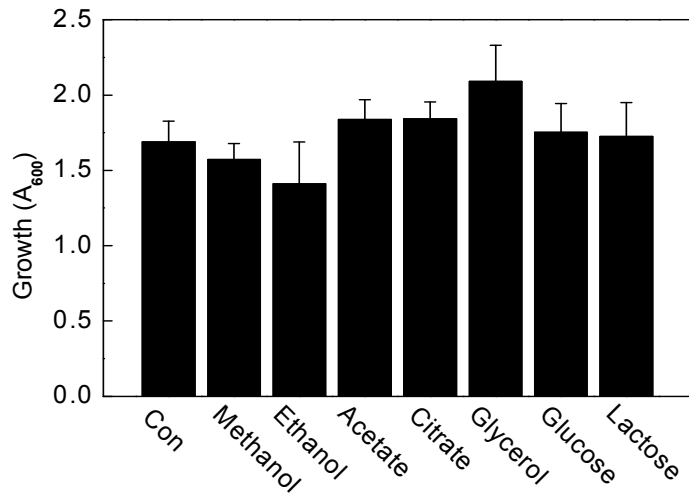


Fig. 9. Microbial growth measured with various carbon sources. The strain GG0461 was cultured in the PAF broth containing 1% carbon sources. Bacterial growth was measured in the presence of the indicated carbon sources.

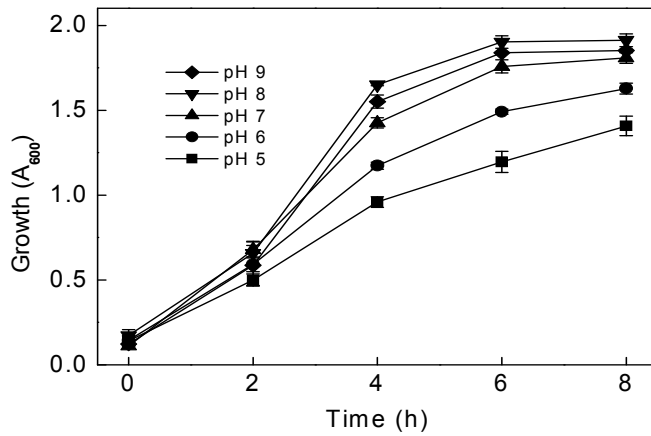


Fig. 10. pH-dependent growth of GG0461. The growth was measured at different pH.



### 제 3 절 *Enterobacter amnigenus* GG0461 균주의 질산흡수 특성

#### 1. 연구수행 방법

##### 가. 영양원에 따른 질산흡수 측정

영양원에 따른 질산이온 흡수효과를 조사하기 위하여 50 mM KNO<sub>3</sub>를 첨가한 PAF 액체배지에 선별된 질소원과 탄소원을 처리하고 37°C에서 배양하면서 2시간단위로 배지중 잔류하는 질산이온의 농도를 측정하였다. 질산이온의 잔류량은 질산이온전극과 표준전극(double junction reference electrode)를 이용하여 이온분석기(Ion Selective Analyzer, Orion 960 ISE meter)로 측정하였다.

##### 나. GG0461 균주의 생육 최적조건 측정

균주의 생육조건을 조사하기 위하여 GG0461 균주 1%를 PAF 배지에 접종하여 진탕배양기(SI-600R)에서 온도 조건을 달리하여 배양하면서 2시간마다 분광광도계(U-2001, Hitachi, jp.)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. PAF 액체배지의 pH 조정을 위하여 pH 5, 6, 7은 묽은 염산으로, pH 8, 9는 묽은 NaOH 용액으로 맞추었으며, 배지의 pH 변화를 pH meter (JENWAY, pHM6)로 측정하였다.

##### 다. GG0461 균주의 질산이온 흡수특성 측정

배지의 pH를 조정된 후, 균주를 배양하면서 2시간마다 균주의 성장과 질산이온 흡수를 측정하였다. 질산이온의 흡수도는 배지에 가해준 양으로부터 배양후 잔류량을 감해줌으로써 계산하였다.

##### 라. Chlorate의 효과 측정

PAF 액체배지에 Chlorate와 KNO<sub>3</sub>를 각각 농도별로 처리한 후에 진탕배양기 (SI-600R)을 이용하여 37°C에서 배양하면서 2시간마다 균주의 성장과 질산이온 흡수를 측정하였다.

## 2. 영양원에 따른 질산흡수 효과

### 가. 성장시기에 따른 질산이온 흡수

GG0461 균주를 염류장애가 나타나는 시설재배지에 성공적으로 사용하기 위해서는 균주의 질산흡수 특성을 이해하고 질산흡수능을 높일 수 있는 방안이 마련되어야 할 것이다. 이를 위하여 GG0461 균주의 다양한 특성과 질산흡수능 사이의 관계를 조사하였다. 먼저, 생육에 따른 질산흡수능을 측정한 결과를 Fig. 11에 보였다. 배지중 질산의 잔류량은 대수기에서 점차 감소하여 늦은 대수기와 이른 정체기에 최소가 된다. 즉, 균주에 의한 질산의 흡수는 이른 정체기에서 최대가 되며, 정체기에 도달하면 약 5000 ppm의 질산을 완전히 흡수하였다.

### 나. 질산염 농도에 따른 질산이온 흡수

균주가 최적상태로 질산을 흡수할 수 있도록  $\text{KNO}_3$  농도를 50 mM 이하로 조절하면서 각 농도별 성장곡선을 조사하였다. GG0461 균주는 질산염이 없는 조건에서 성장곡선은 직선적으로 더디게 증가하였다 (Fig. 12). 질산염을 10 mM 가했을 때, 성장은 증가하였으나 낮았고, 20 mM 이상의 질산염을 가하면 지수적인 성장곡선을 보였다. 균의 성장은 약 10시간 후에 초기정체기에 도달하였고, 고체배지에서 측정한 생균수는  $4 \times 10^7 \text{ ml}^{-1}$ 에 이르렀다. 이러한 결과는 질산염이 GG0461 균주의 필수성분은 아니어도 영양원으로 성장을 촉진함을 의미한다.

높은 질산염 농도에서 GG0461 균주의 생육능력을 측정하기 위하여 질산염의 농도를 1 M 까지 증가시키며 균주의 성장과 질산염 흡수능을 측정하였다 (Fig. 13). 흡광도로 측정한 균주의 증식은 100 mM nitrate에서 생육에 지장이 없었으며, 200 mM 까지도 양호한 생육을 보였다. 그러나, 500 mM 이상의 농도에서는 균주의 증식은 급격하게 저해되었다. 질산염의 흡수도 50과 100 mM에서 각각  $93.6 \pm 3.2$ 와  $60.8 \pm 9.4\%$ 로, 약 75 mM까지는 최대치를 보였으며 100–200 mM에서도 유효한 질산이온 흡수가 관측되었다. 질산이온 500 mM 이상의 농도에서는 생육과 흡수가 모두 저해됨을 확인하였다. 질산이온 100과 150 mM 조건에서 생육은 정상적이었으나 질산이온 흡수는 감소된 것은 GG0461 균주의 질산흡수력이 균의 증식여부와 밀접한 관계가 있음에도 고농도의 질산조건에서는 흡수가 오히려 저해됨을 의미한다.

### 다. 탄소원에 따른 질산이온 흡수

다양한 종류의 탄소원에 따른 GG0461 균주의 질산흡수능을 측정하였다. 단당류와 올리고당류, 다당류를 배지에 0.5와 1% 첨가하였을 때, 전분과 젓당, raffinose의 첨가시 50% 이상

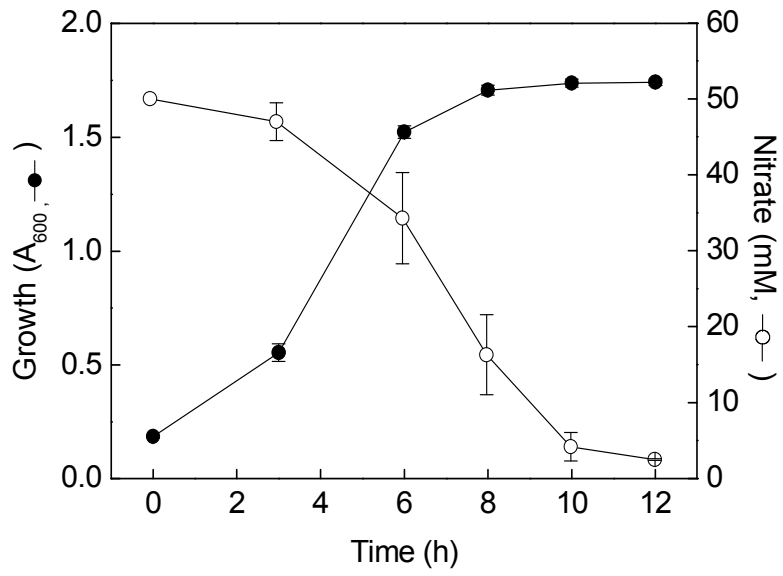


Fig. 11. Time course of growth and nitrate uptake by strain GG0461.

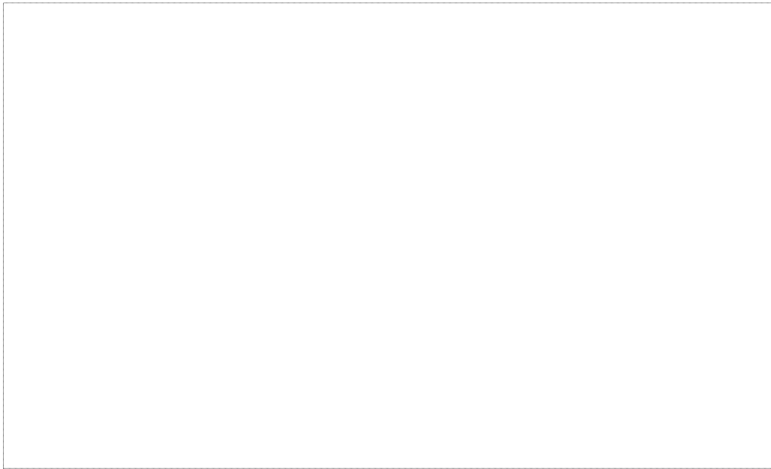


Fig. 12. Effects of nitrate concentration on the microbial growth and nitrate uptake. GG0461 was cultured for 12 h at 37°C in the PAF broth containing the indicated concentrations of KNO<sub>3</sub>. The growth is shown in the Inset.

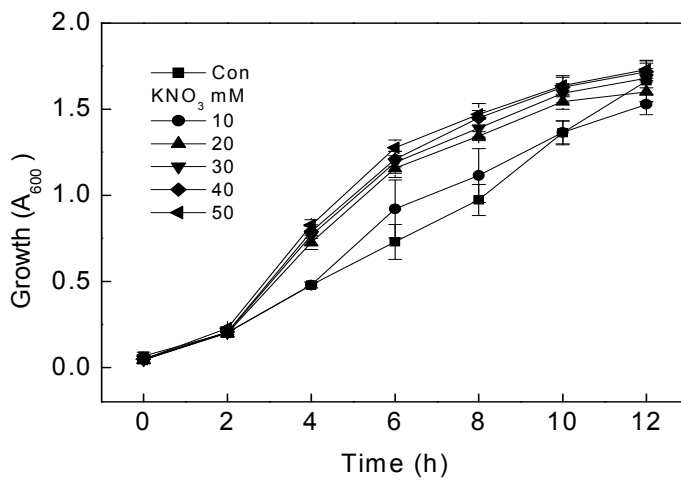


Fig. 13. Effect of nitrate concentration on the growth of GG0461. It was cultured in the PAF broth containing the indicated concentrations of KNO<sub>3</sub>.

의 질산이온 흡수력을 보였다 (Fig. 14). 전분에서는 약 70%의 흡수를 보였으나 cellulose의 첨가는 질산흡수에 큰 영향을 주지 않았다. 당알콜인 Mannitol은 약 30%의 질산이온 흡수를 보였으나, glycerol에서는 거의 모든 질산이온을 흡수하였다. 알코올과 유기산의 경우, 40-70%의 흡수를 보였으나, 포도당의 첨가시에는 40% 전후의 질산이온 흡수를 보여 낮은 수준이었다. 초산의 경우 약 70%의 흡수로 glycerol에 다음가는 효과를 보였다 (Fig. 15). 이상의 결과에서 탄소원 중에 질산흡수를 가장 크게 증가시키는 영양원은 glycerol이었으며, 5000 ppm의 질산염을 거의 대부분 흡수하게 하였다.

#### 라. 질소원에 따른 질산이온의 흡수

GG0461의 질산흡수능에 대한 질소영양원의 효과는 연구초기에 질산염의 흡수능을 각기 다른 배지에서 측정하는 과정에서 발견하였다. 질산의 흡수능은 질소원을 포함하는 PAF 배지에서는 크게 나타나나, 탄소원을 주로한 PDB 배지에서는 나타나지 않았다. Fig. 16.에서 질산염은 PAF 배지에서 약 12시간에 모두 흡수되었으나, PDB 배지의 경우는 36 시간의 배양에서도 흡수가 일어나지 않았다. 따라서, 두 배지 사이의 차이점을 질산염 흡수와 연관하여 조사하였고, 주된 질소원인 tryptone과 peptone이 질산염 흡수에 영향을 주는 것으로 확인되었다. Fig. 17은 질소원인 tryptone과 peptone의 함량에 따른 질산흡수를 보여주는 결과로, tryptone은 peptone 보다 질산흡수 촉진효과가 더 큰 것을 확인하였다.

Tryptone의 농도를 달리하면서 질산흡수율을 보면 Fig. 18에서 농도가 증가할수록 질산흡수율은 증가하나 glycerol의 함량에 좌우됨을 알 수 있다. Tryptone의 농도에 따른 질산염 흡수량에서 glycerol의 농도변화는 tryptone의 농도와 무관하여 biphasic하게 나타남을 확인하였다. Glycerol의 함량이 0.01% 이하에서는 질산염의 흡수량이 작았으나, 함량이 0.2% 이상의 glycerol의 존재시에는 질산흡수량이 30-50% 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 충분한 glycerol의 존재시 질산흡수량의 급격히 증가함을 보여주는 것으로 질산염의 흡수 또는 동화 작용을 glycerol이 촉진하는 성분임을 의미한다.

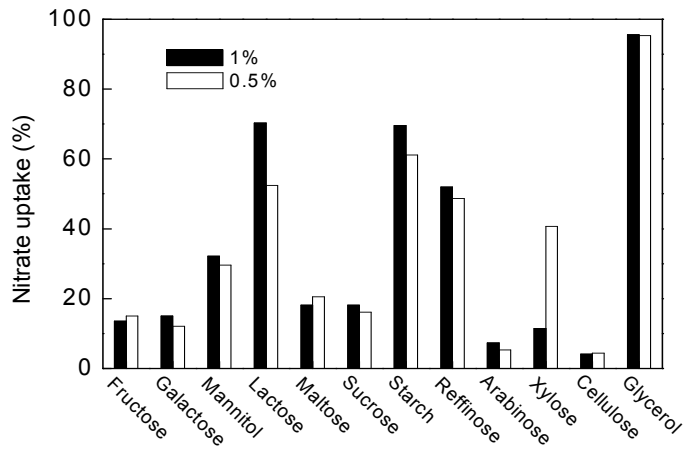


Fig. 14. Microbial nitrate uptakes measured with various carbon sources. The strain GG0461 was cultured in the PAF broth containing 0.5 and 1% carbon sources.

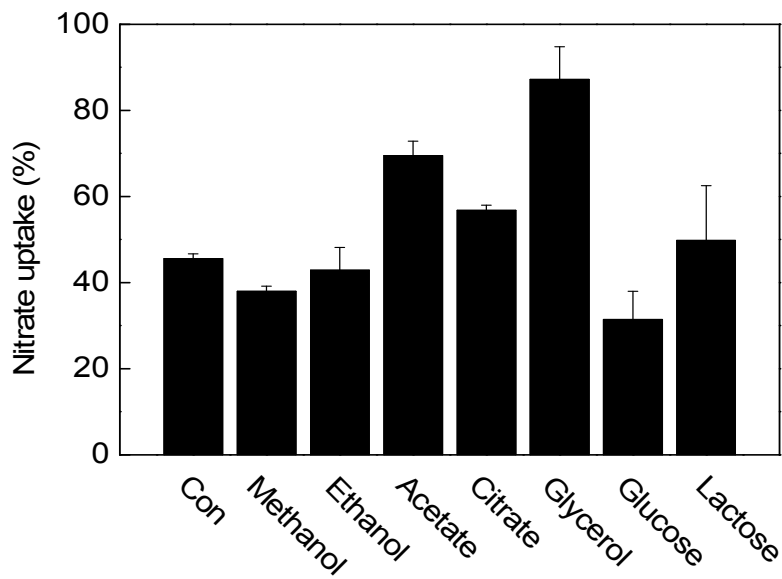


Fig. 15. Microbial nitrate uptake measured with various carbon sources.

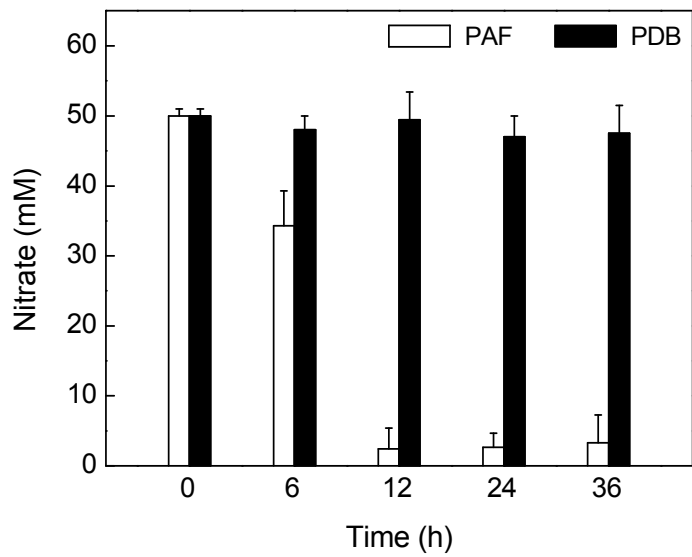


Fig. 16. Effects of culture media on the nitrate uptake of GG0461.

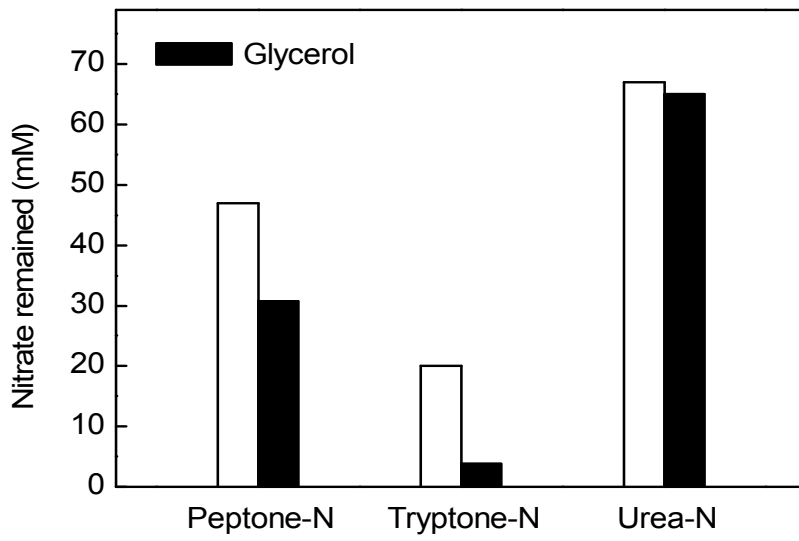


Fig. 17. Effects of nitrogen sources on the microbial nitrate uptake.

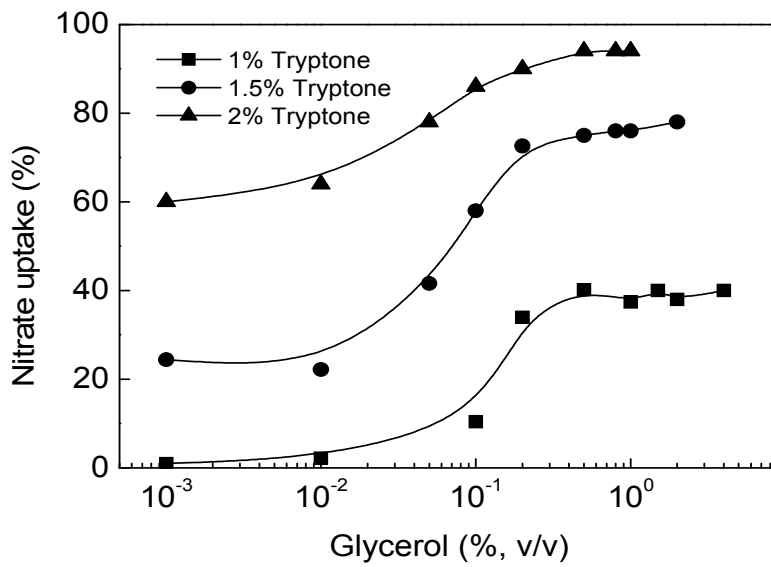


Fig. 18. Nitrate uptake at various concentration of glycerol and tryptone.



### 3. 생육조건에 따른 질산흡수 효과

#### 가. 생육온도에 따른 질산염 흡수효과

배양 온도를 달리하여 측정된 질산염 흡수량을 보면 Fig. 19에서 17°C까지는 흡수량은 증가하지 않았고, 약간의 흡수량은 아마도 균주 표면 등에 물리적 흡착량 등으로 생각된다. 37°C에서 최대의 흡수량을 보였으며, 온도가 증가할수록 흡수량은 감소하여 47°C에서 흡수량은 27°C의 흡수량과 유사하였다. 이러한 결과는 Fig. 8의 생육온도와 같은 결과로 최적생육 및 질산염 흡수 온도가 37°C임을 확인하였다. Fig. 20은 시간에 따른 질산염의 잔류량을 측정한 것이다.

#### 나. 접종량에 따른 질산염 흡수효과

액체배지에 GG0461 균주를 1에서 50% (v/v) 까지 접종하였을 때, 균주의 성장률은 접종량에 비례하였고, 접종량에 따라 4-6시간 후에 정체기에 도달하였다 (Fig. 21). 동일한 실험조건에서 질산의 배지 내 질산이온의 잔류량을 정량분석하였을 때, 접종량이 많을수록 잔류량이 빠르게 감소하여 흡수량이 많음을 보였다 (Fig. 22). 이상의 결과에서 균주의 접종량은 1% 이상이면 균주성장이나 질산이온 흡수에 충분한 것으로 측정되었으며, 토양에서의 열악한 환경을 고려할 때 5% 정도 접종시 빠른 효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

#### 다. pH에 따른 질산염 흡수효과

배지의 pH에 따른 성장량과 질산염 흡수량을 각각 Fig. 23과 Fig. 24에 보였다. GG0461 균주의 생육은 pH 7과 8에서 최대로 측정되었으며, 15시간에 정체기에 도달하였다 (Fig. 23). 그러나, pH 5에서 생육은 완전히 저해되었고, pH 6에서는 초기에 약 30%의 성장을 보이다가 정지한 상태에 머물렀다. 질산염의 흡수활성은 알칼리 조건에서 증가하였다. 배지의 pH가 증가할수록 질산염 흡수량은 증가하였으며, 중성보다도 pH 7과 8에서 최대로 나타났다 (Fig. 24). GG0461의 성장과 질산염 흡수량을 비교하여 보면 상당히 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다. 즉, 성장량이 크면 흡수량은 비례적으로 증가한다는 것이다.

#### 라. 균주 생육에 따른 배지의 pH 변화

GG0461 균주의 생육과 질산염 흡수량에 대하여 배지의 pH 변화를 측정하였다. Fig. 25에서 배지의 pH는 균주의 성장에 따라, 또는 질산염의 흡수에 따라 산성화하였다. 배지의 pH가 7이나 8일 조건에서 균주의 성장에 따라 pH는 감소하여 pH 6으로 접근하였다. 반면, pH 5나 6의 배지에서는 pH 변화가 나

타나지 않았다. 이것은 pH 7이나 8의 조건에서 질산염의 흡수와  $H^+$ 의 세포밖 유출이 연관이 있음을 의미하는 것이다. 이러한 결과는 GG0461 균주에 의한 질산이온 흡수기작을 밝힐 수 있는 단서가 되는 것으로 체계적으로 배지의 pH 변화와 질산흡수에 따른  $H^+$ 의 이동을 조사하였다.

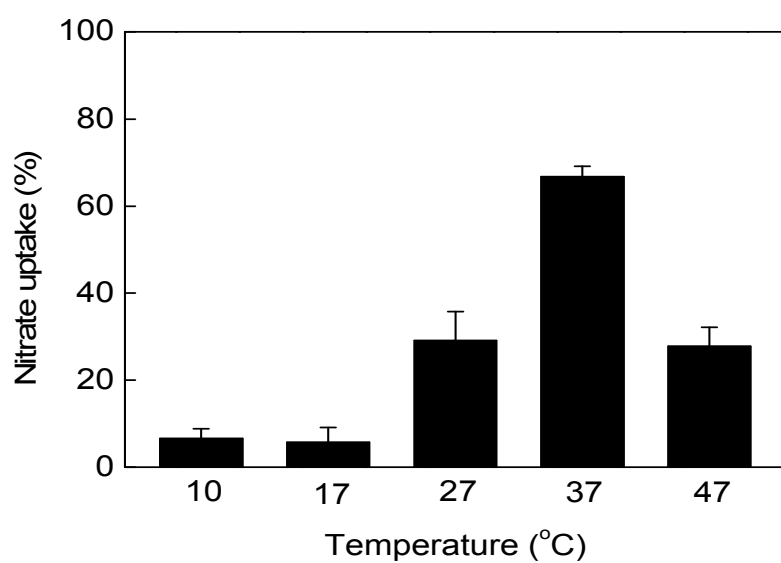


Fig. 19. Effect of temperature on the nitrate uptake. GG0461 was cultured in the PAF broth at various temperatures. The data were taken at 8 h of incubation.

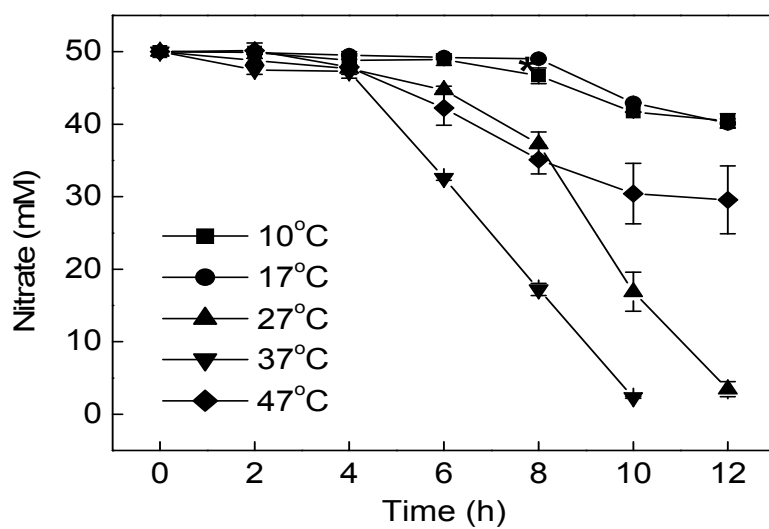


Fig. 20. Time course of nitrate uptake at various temperature.

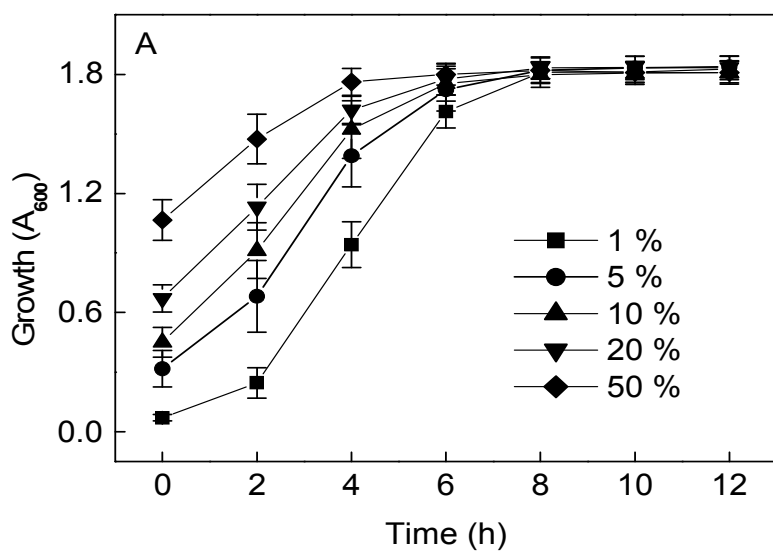


Fig. 21. Time-dependent growth at various amounts of inoculation. Growth curves obtained at 1 to 50% inoculation.

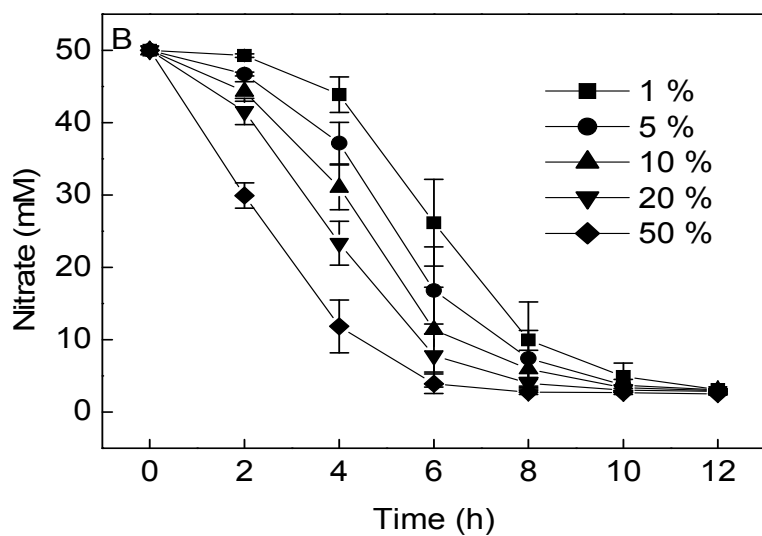


Fig. 22. Nitrate uptakes by various amounts of inoculation. The size of inoculation was from 1 to 50%.

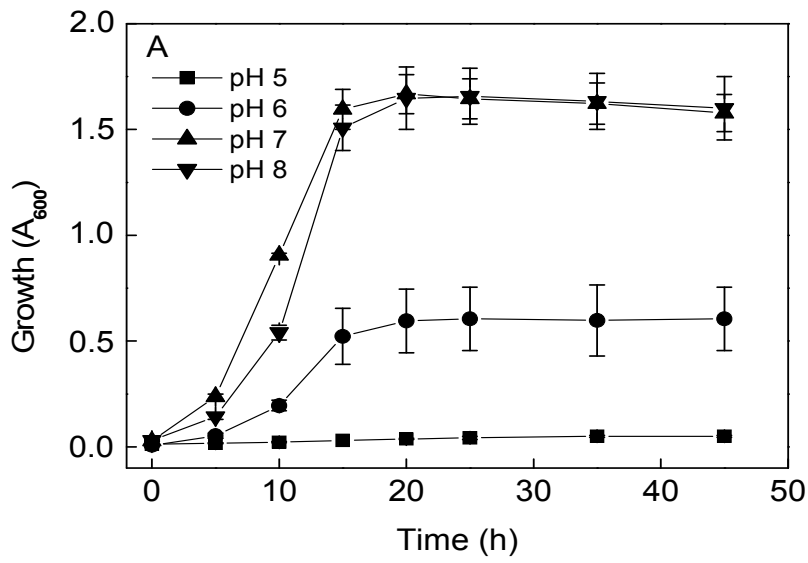


Fig. 23. pH-dependent changes in the growth of GG0461.

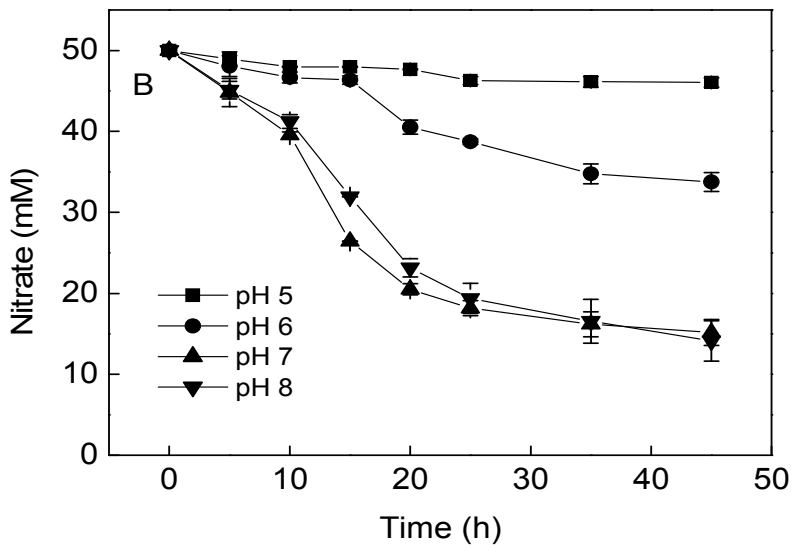


Fig. 24. Effects of pH on the nitrate uptake.

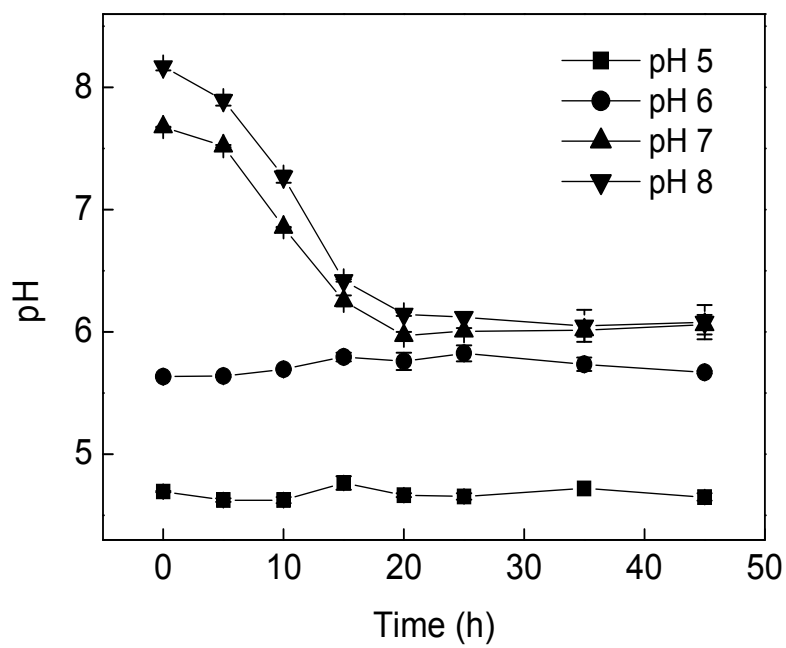


Fig. 25. Acidification of culture media by the growth of GG0461.

#### 4. 질산이온 흡수의 특성

##### 가. 질산흡수와 H<sup>+</sup> 이동

질산이온의 흡수기작을 알기 위하여 배지의 조건을 바꾸어가며 GG0461 균주를 배양하였고, 이때 배지의 pH 변화를 측정하였다. 액체 PAF 배지에 질산염을 가하지 않은 상태에서 균주를 배양하며 배지의 pH 변화를 측정하였을 때, 균주는 알칼리 조건에서 성장율이 높았다. 배지의 pH가 염기성일수록 균주의 성장이나 질산이온 흡수가 커진다는 사실은 균주의 질산이온 흡수력이 수소이온 농도와 밀접한 관련이 있음을 의미한다. 따라서, 균주가 성장함에 따른 배지의 pH 변화를 측정하였을 때, KNO<sub>3</sub>를 50 mM 첨가한 배지에서는 균주의 성장, 혹은 질산이온의 흡수에 따라 pH가 크게 변화하는 것을 관측하였다(Fig. 26A). 배지의 pH가 8과 9일 때, 배양시간에 따라 pH는 점차 감소하여 약 8시간 후에 pH 7 근처로 수렴하였다. 반면, pH 5와 6인 배지에서는 배양시간이 경과함에 따라 역시 pH 6.5-7.0 근처로 수렴하여, 배지의 초기 pH 값에 무관하게 배양 후 pH는 모두 pH 6.5-7.0으로 변화하였다.

배지에 질산이온을 첨가하지 않은 조건에서, 균주의 배양에 따른 배지의 pH 변화는 질산이온 첨가시의 경우와 다르게 나타났다(Fig. 26B). 먼저, 배지의 pH가 산성인 조건에서는 질산이온을 첨가하였을 때와 같은 변화를 보였으나, 배지가 염기성일 때는 pH의 감소가 매우 약하게 나타나 10시간 동안의 pH 변화값은 0.5 이하로 나타났다. 약산성 배지에서 pH가 중성으로 변화하는 현상은 배지의 질산이온 유무와 관계없이 나타나 질산이온 흡수와는 무관한 변화라는 것을 보이며, pH 8과 9에서 질산이온의 첨가시 배지의 pH가 급격히 저하되는 것은 질산이온의 흡수에 따른 질산이온 의존성 변화임을 보여준다. 이것은 질산이온의 흡수가 H<sup>+</sup>의 막수송과 연관이 있음을 보여주는 것이다. 질산염 흡수와 H<sup>+</sup>과의 연관성을 확인하기 위하여 질산염을 가하지 않은 알칼리 조건의 배지에 GG0461 균주를 접종하고 배양하였다.

##### 나. 배양중 질산이온의 첨가 효과.

배지중 질산이온의 유무에 따라 나타나는 생육 및 pH 변화를 확인하기 위하여, 질산이온을 첨가하지 않은 배지에 GG0461 균주를 접종하고 배양한 후, 질산이온을 추가로 첨가하여 나타나는 균주의 생육변화 및 배지의 pH 변화를 측정하였다. 배지의 pH는 질산이온의 영향이 가장 크게 나타나는 pH 8과 9로 하였고, 질산이온의 첨가는 균주의 생육이 가장 활발한 배양후 6시간에 이루어졌다.

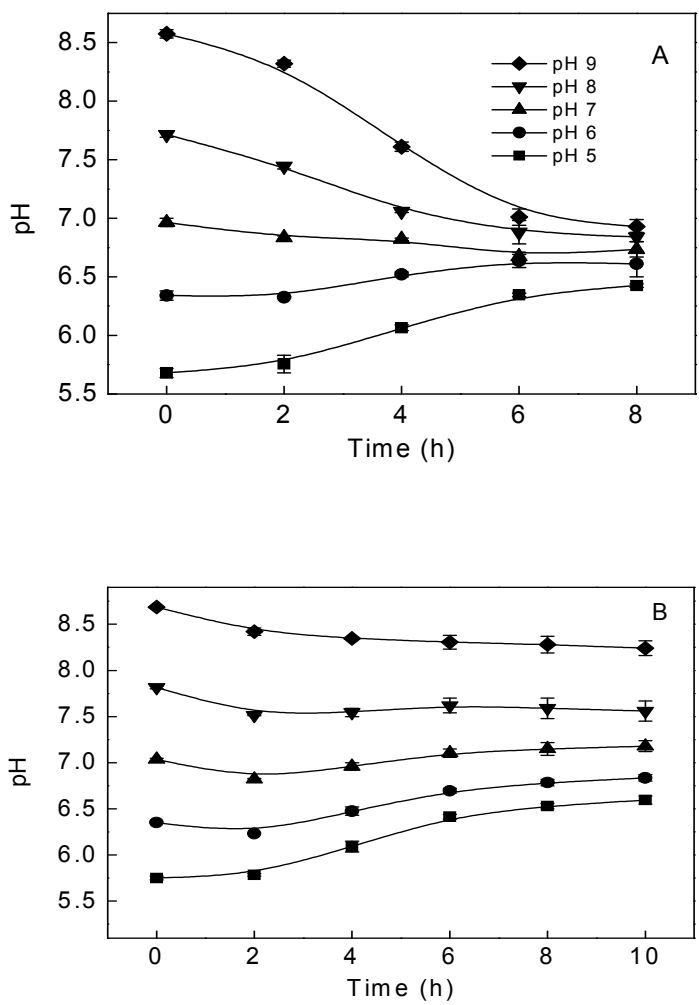


Fig. 26. Effects of nitrate addition on the pH changes of the growth medium. pH changes were obtained in the presence (A) and absence (B) of nitrate. Growth curves were obtained with 5% inoculation of GG0461.



질산이온이 없는 조건에서 균주의 성장은 완만하게 증가하였으나, 질산이온의 첨가로 성장은 크게 촉진되어 지수적으로 증가하였고, 4시간 후에는 질산이온을 포함하는 배지에서의 성장수준에 다다랐다(Fig. 27A). 이러한 질산이온의 성장촉진 효과는 pH 8과 9 모두에서 유사하게 나타났다. 마찬가지로, 질산이온을 첨가하여 배양 중 배지의 pH 변화정도를 조사하였을 때, pH 8과 9의 배지 모두 pH가 급격히 감소하여 중성부근에 수렴하였다 (Fig. 27B). 이때, 첨가한 50 mM 질산이온은 6시간 이내에 모두 흡수되었다. 이러한 결과는 질산이온을 첨가한 배지에서 GG0461 균주의 생육증가와 배지의 pH 감소 효과가 질산이온의 흡수에 따라 나타나는 것임을 의미한다. 이것은 GG0461 균주의 질산흡수가 H<sup>+</sup>의 방출과 coupling 되어 있다는 증거이다.

#### 다. 초기 pH에 따른 배지의 산성화

GG0461 균주의 생육에서 질산이온 흡수에 따른 배지의 pH 감소량을 측정하기 위하여, 질산이온의 유무에 따른 배지의 pH 변화를 측정하고 pH 변화율을 계산하였다. 배지의 pH 변화율( $\Delta$ pH)은 pH를 달리한 각각의 배지에서, 질산이온이 있는 조건에서 측정한 배지의 pH 값에서 질산이온이 없을 때 측정한 pH 값을 빼준 차이값으로 나타났다 (Fig. 28).

먼저, pH가 5와 6인 약산성 배지에서는 질산이온의 유무에 따른 pH 변화가 크지 않았다. 그러나, 초기 pH가 염기성인 배지에서는 질산이온이 있고 없음에 따라 배지의 pH 변화는 매우 큰 차이를 보였다. 즉, 염기성 배지에서 질산이온이 있을 경우, 균주 배양에 따라 pH는 크게 감소하였다. 반면, 질산이온을 첨가하지 않았을 때는 배지의 pH 변화는 크지 않았다. 따라서, 질산이온의 존재 유무에 따른 두 측정치 사이의 차이값은 초기 pH가 높을수록 크게 나타났으며, 또한 배양시간이 증가함에 따라서도 크게 나타났다. 이것은 질산이온의 존재시 균주의 증식과 질산이온의 흡수에 따라 배지의 pH가 급격히 낮아지는 것을 보여주며, 이러한 pH 감소 효과는 알칼리 조건의 배지에서 크게 나타났다.

#### 라. 초기 pH에 따른 질산이온 흡수

pH를 달리한 각각의 배지에서, 질산이온의 흡수를 시간에 따라 측정하였다 (Fig. 29). 먼저, pH가 5와 6인 약산성 배지에서는 질산농도의 감소량은 5 mM 미만으로 시간에 따른 질산이온의 흡수량은 크지 않았다. 그러나, 초기 pH가 7과 그 이상인 염기성인 배지에서는 질산이온의 흡수는 크게 증가하여, 배지의 초기 pH가 높을수록 흡수는 증가하였다. 배양시간이 6시간 경과하였을 때, pH 8과 9의 배지에서 질산이온 농도의 감소량은 25 mM 이상으로 관측되어 질산이온 흡수량의 최대치를 보였다. 이 결과는 알칼리 조건에서 질산이온의 흡수가 크게 증가함을 보여준다.

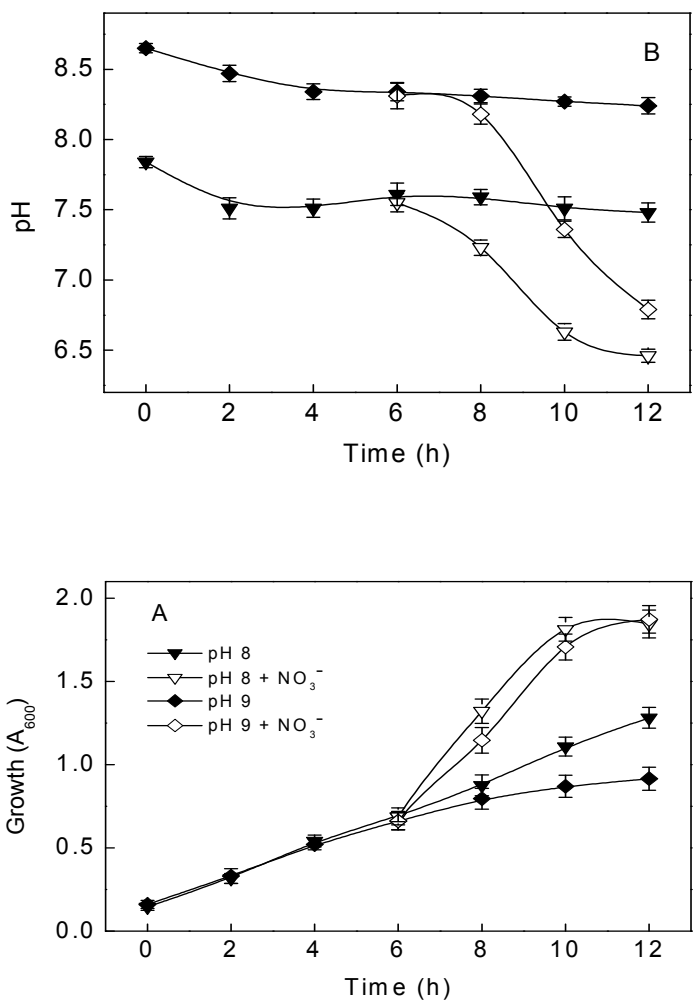


Fig. 27. Effects of nitrate addition on the bacterial growth and pH changes in the growth medium. GG0461 was cultured for 6 h to late logarithmic phase in the absence of nitrate. Nitrate (50 mM) was added at 6 h of incubation, and growth (A) and pH changes (B) were measured at pH 8 and 9.

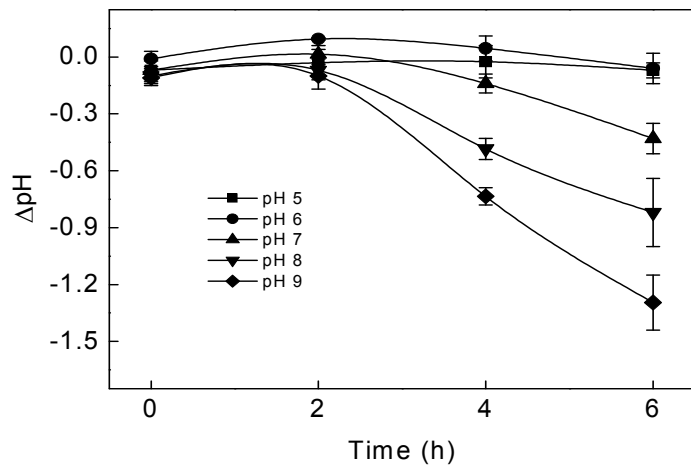


Fig. 28. Differences in pH change between the absence and presence of nitrate.  $\Delta\text{pH}$  was calculated by subtracting pH of nitrate-containing media from pH of culture in the absence of nitrate.

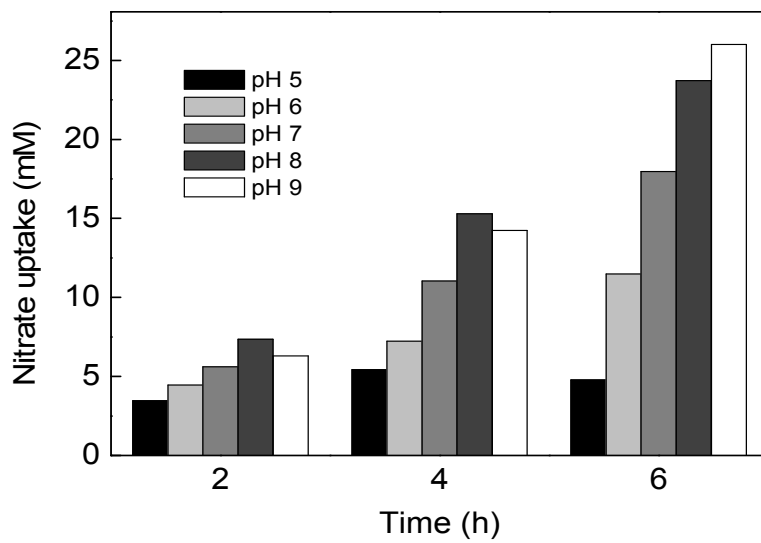


Fig. 29. Nitrate uptakes at various pH and incubation time.

마. pH에 따른 균주생육과 질산이온 흡수 비교.

배지의 pH를 변화시키며 균주의 성장곡선을 측정하여 각 pH에서 균주의 생육량을 평가하였고, 같은 조건에서 질산이온의 흡수도를 비교하였다. 배지를 pH 5에서 pH 9까지 조정 한 후, GG0461 균주를 6시간 배양하였을 때, 균주의 성장은 낮은 대수기에 도달하였으나, 배지의 pH에 따라 총 균수는 차이가 있었다. 이것을 흡광도로 나타내었을 때, pH 5-9 범위에서 성장률은 완만하게 증가하여 pH 8인 배지에서 최대의 성장을 보였다 (Fig. 30, ●). 질산이온의 흡수에서도 알칼리 조건에서 큰 값을 보였으며, pH 8과 9에서는 최대의 흡수를 보였다 (Fig. 30, □). 이러한 결과는 균주의 성장과 질산이온의 흡수사이에 상관성이 높음을 보여주는 것으로, 결과적으로 흡수된 질산이온은 전자전달이나 산화환원 과정에 이용되기 보다는 균주의 성장에 이용됨을 의미한다.

바. GG0461 균주의 질산흡수 기작

*Enterobacter amnigenus* GG0461 균주는 배지에 질산이온이 존재할 때 생육이 촉진되었으며, 특히 배지가 혐기성일 때 균주의 질산이온 흡수능력이 크게 증가하였다. 이것은 균주의 생육과 질산이온의 흡수, 배지의 pH 사이에 밀접한 관련이 있음을 보여주는 것이다. 질산이온이 없는 조건에서 균주의 생육은 혐기성에서 심하게 저해되었으나, 질산을 가하였을 때는 생육이 오히려 촉진되었다. 그러므로, 혐기성 조건의 배지에서 균주의 질산이온 흡수가 증가하고 생육이 촉진되는 것을 확인하였으며, 각 pH 조건에서 단위 균체량에 의한 질산이온 흡수량 (specific nitrate uptake rate)을 비교하였을 때에도, pH의 증가에 따라 질산이온의 흡수가 증가하는 결과를 확인하였다. 질산이온에 의한 생육촉진 효과는 질산이온이 없는 조건에서 균주의 성장곡선이 완만한 증가를 보였으나, 질산이온을 첨가하였을 때, 균주의 생육은 즉시 대수적으로 증가한다는 Fig. 27A의 결과로도 확인할 수 있었다.

세균에서의 질산이온의 흡수는 세가지 효소활성에 의해서 촉매된다고 알려져 있다. 먼저, NTR1(nitrate transporter-1)은 다양한 생물체에서 발견되며, 애기장대에서 특성이 자세히 밝혀진 효소로, 질산이온에 대한 두 가지 친화력이 있음이 알려져 있다 (Tsay 등, 1993). 두 번째로, NTR2도 세균에서 식물체까지 다양한 생물체에서 발견되며, 질산이온에 대하여 높은 친화력을 보이고, 수소이온 농도기울기에 의한 화학적에너지에 의해 질산이온 흡수가 촉진된다 (Unkles 등, 1991). 세 번째는 ATP 에너지를 이용하는 ABC 형 transporter로 cyanobacteria 등에서 발견되는 효소이다 (Sakamoto 등, 1999)

GG0461 균주의 질산이온 흡수는 혐기성 배지에서 증가하였고, 이때 배지의 pH 감소도 크

게 나타났다. 이러한 생리적 현상은 질산이온을 흡수하면서 동시에 수소이온을 배지로 방출하는 nitrate/proton antiporter의 활성으로 설명될 수 있다. GG0461 균주가 이 효소의 활성을 이용하여 질산이온을 흡수하는 것인지는 밝혀져야 하겠으나, 최근 식물체의 액포막에서 유사한 효소의 특성이 보고되어 (Angeli 등, 2006) 이와 같은 가능성은 크다고 할 수 있다. 다만, 세균에서는 이 효소가 현재까지 보고되지 않아, 미생물에서의 수소이온 이동과 관련한 질산이온 흡수 기작은 본 연구의 종료후에도 체계적으로 연구되어야 할 것이다

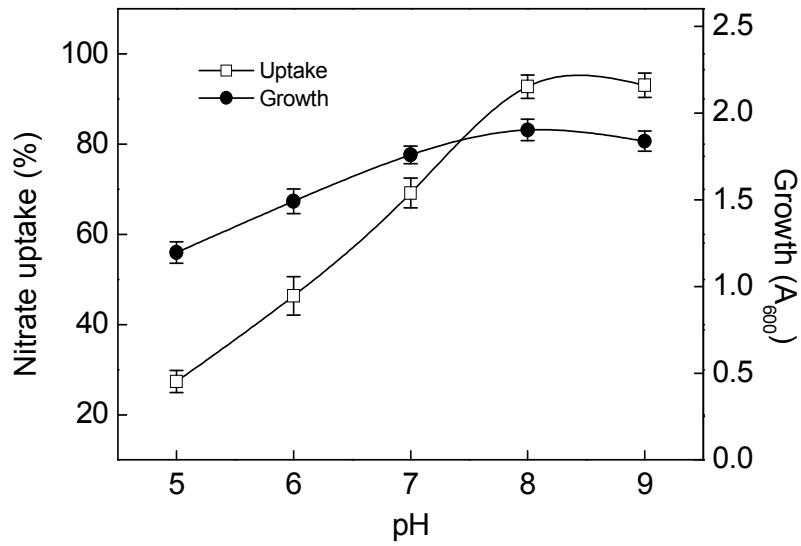


Fig. 30. The pH-dependence of growth and nitrate uptakes. Growth and uptake were measured after 8 h incubation at various pH of culture media.

## 5. Chlorate에 의한 질산흡수의 저해

### 가. Chlorate에 의한 생육저해

질산이온은 세균에서 성장을 위한 질소원, 대사에너지 생성을 위한 전자전달계, 산화환원에서 산화제로서 환원력 등 세가지로 이용된다. GG0461 균주의 질산이온 흡수에 대한 분자적 특성을 이해하기 위하여 chlorate 효과를 측정하였다. Chlorate는 nitrate와 유사한 구조로 식물체에서 nitrate reductase를 저해하는 것으로 알려져 있다 (Stauber, 1998). 따라서, 세균의 질산이온 흡수와 대사에서도 chlorate는 경쟁적 저해제로서 작용할 수 있을 것이고, 이것이 사실이라면 GG0461의 질산이온 흡수기작 연구에 좋은 분자도구로 이용할 수 있을 것이다.

GG0461은 0.1–50 mM 농도범위에서 질산이온과는 다르게 chlorate를 전혀 흡수하지 않았다. Fig. 31은 질산이온을 첨가하지 않은 조건에서 chlorate의 다양한 농도를 처리하였을 때 균주의 성장곡선을 보였다. 균주의 생장은 낮은 농도의 chlorate에 의해서 저해되었으며, 0.5 mM 이상의 농도에서는 상당한 생육의 저해가 관측되었고, 1 mM 이상의 chlorate는 균주의 성장을 심각하게 저해하였다. 세균에 따라서는 산소대신 chlorate를 전자전달계의 최종 전자수용체로 환원하는 균주가 알려져 있으나 (Logan 등, 2001), GG0461 균주의 경우는 이에 해당되지 않음이 확인되었다.

### 나. 질산이온에 의한 chlorate 효과 저해

Chlorate는 10 mM 이상의 농도에서 GG0461 균주의 생육을 심하게 저해하였으므로, 이 조건에서 추가적으로 질산이온을 첨가할 때 나타나는 효과를 조사하였다 (Fig. 32). Chlorate에 의해 저해된 GG0461 균주의 생육은 질산이온의 첨가로 확연히 극복되었다. 질산이온의 효과는 대수기에서 크게 나타났으며, 정체기에 도달하면 최대의 극복효과가 나타났다. 1–20 mM 질산이온의 첨가는 균주의 생육을 증가시켰으며, 30 mM 이상에서는 chlorate가 존재하지 않는 대조구와 같은 생육을 보였다. 이러한 결과는 chlorate에 의한 생육저해 효과가 질산이온에 의해 완전히 극복되는 질산이온과의 경쟁관계를 보인다. Chlorate에 의해 저해되었던 균주의 생육이 질산이온의 첨가에 의해 회복될 때 질산이온 흡수력의 회복 여부를 측정하였다. 균주의 생육이 10 mM chlorate에 의해 저해된 조건에서 산이온의 첨가는 그대로 질산이온의 흡수에 기여하였다. Fig. 33에서는 질산이온의 첨가농도가 증가함에 따라 배지의 남아있는 질산이온 농도를 측정한 것으로, 질산이온의 흡수는 질산이온의 농도 증가에 따라 증가하여 chlorate

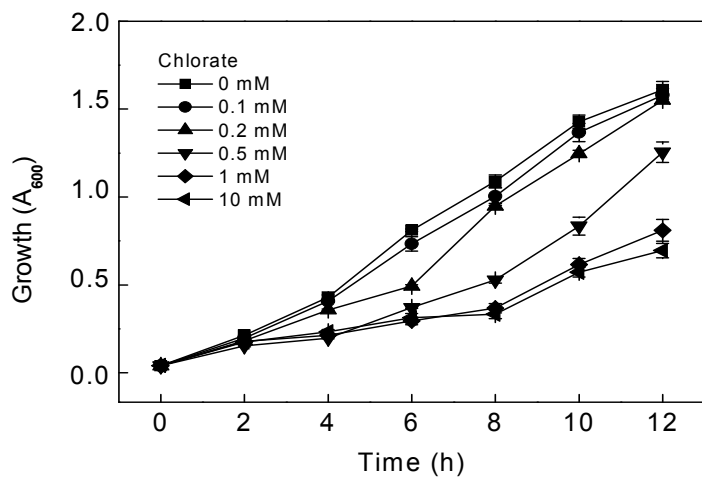


Fig 31. Effect of chlorate on the growth of GG0461.

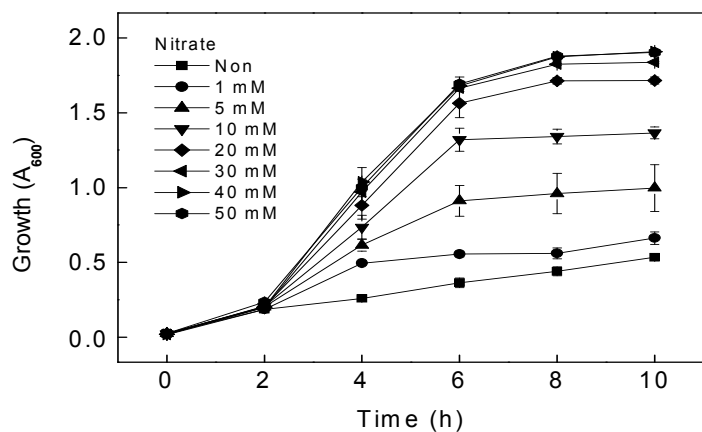


Fig. 32. The inhibitory effects of chlorate was reduced by nitrate addition. The growth curves were obtained in the presence of 10 mM chlorate and the indicated amount of nitrate.



의 저해효과가 거의 나타나지 않았다. 배지에 50 mM의 질산이온을 가했을 때, 질산이온을 완전히 흡수하는 시간은 약 10시간으로 Fig. 11에서 보여준 대조실험과 같은 경향을 보였다.

다. 질산흡수시간  $T_{50}$ 에 미치는 chlorate의 효과

Chlorate에 의한 질산이온 흡수저해 효과를 정량적으로 평가하기 위해서 10 mM chlorate가 존재하는 조건에서 50%의 질산이온이 흡수되는 시간  $T_{50}$ 을 측정하여 대조실험 결과와 비교하였다. 질산이온의 농도를 10-50 mM 범위에서 측정하였을 때,  $T_{50}$ 은 질산이온의 농도가 증가함에 따라 비례적으로 증가하였다. 이러한 조건에서 chlorate를 가하였을 때,  $T_{50}$ 은 대조실험 결과와 비교하여 평균  $22.2 \pm 9.2$ 분 커지는 것을 확인하였다 (Fig. 34). 이것은 10 mM chlorate가 질산이온의 흡수를 저해하여 질산이온 50%가 흡수되는 시간이 평균 22분 더 걸리는 것을 의미하며, 지연효과는 모든 질산이온 농도에서 유사하게 나타났다. 이 지연효과는 질산이온의 농도와 무관하게 chlorate의 농도 증가와 비례하여 증가하는 것으로 여겨진다.

라. Chlorate의 농도에 따른 생육저해

질산이온이 50 mM 존재할 때, chlorate의 농도를 50 mM 까지 증가시키며 GG0461 균주의 생육을 측정하였다. 질산이온이 존재할 때는 그렇지 않을 때인 Fig. 31의 결과와 비교하여 더 높은 농도의 chlorate 존재시에 생육저해 효과가 나타났다. Fig. 35에서 보이듯이 10 mM chlorate의 저해효과는 50 mM 질산이온에 의해 완전히 극복되었으며, chlorate의 농도가 30 mM 이상이 되어야 chlorate의 저해효과가 다시 나타났다. 이러한 결과는 chlorate의 작용이 질산이온과 상호 경쟁적임을 보이는 것이다.

마. Chlorate의 질산이온 흡수 저해효과

질산이온 흡수에서 chlorate의 저해효과는 균주의 생육저해와 마찬가지로 10 mM에서는 미약하였으나, 그 이상의 농도에서는 질산이온의 흡수를 상당히 저해하였다 (Fig. 36). 이러한 저해효과를 chlorate의 농도를 달리하며 측정하고, 10시간 배양 후 질산이온의 흡수도를 chlorate 농도별로 나타냈을 때, dose 곡선은 Fig. 37과 같다. 여기서 질산흡수를 50% 저해하는 chlorate의 농도는 18.7 mM로 측정되었다. Chlorate의 저해기작은 앞으로 밝혀져야 하겠지만, 만약 질산수송효소에 경쟁적으로 작용한다면, Fig. 36에서 40 mM chlorate가 nitrate의 효과를 완전히 저해하는 것으로 보아 효소에 대한 친화력이 비슷한 수준이나 chlorate의 그것이 nitrate보다 약간 클 것으로 평가될 수 있을 것이다.

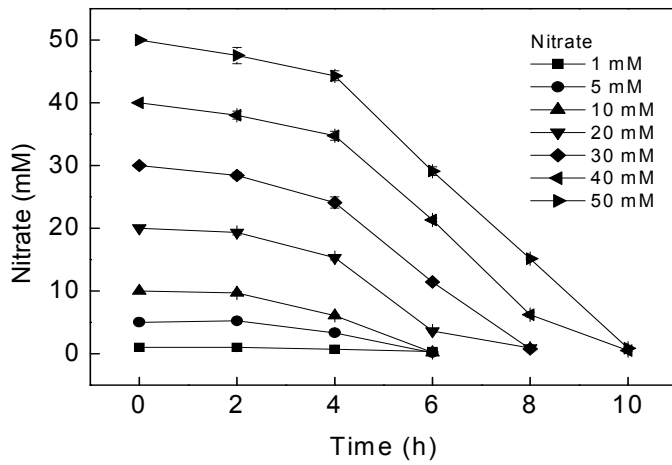


Fig. 33. Effects of chlorate on the nitrate uptake by *E. amnigenus*. Nitrate uptakes were measured at various concentrations of nitrate in the presence of 10 mM chlorate.

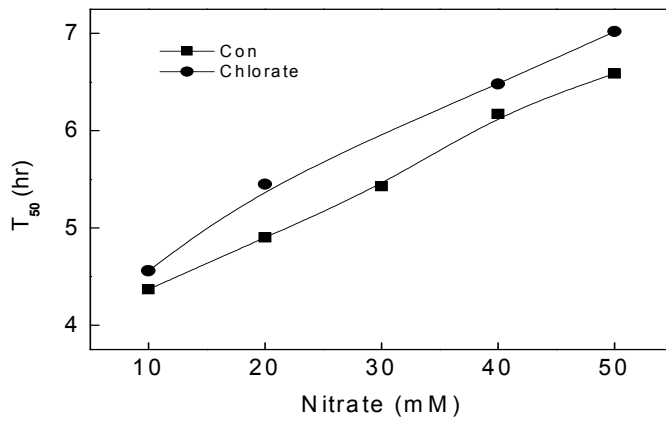


Fig. 34. Effects of chlorate on the time  $T_{50}$  taken for 50% nitrate uptake. Nitrate uptakes were measured at various concentrations of nitrate in the absence and presence of 10 mM chlorate as shown in Figure 33. Times,  $T_{50}$ , were measured and plotted against to the initial concentrations of nitrate.

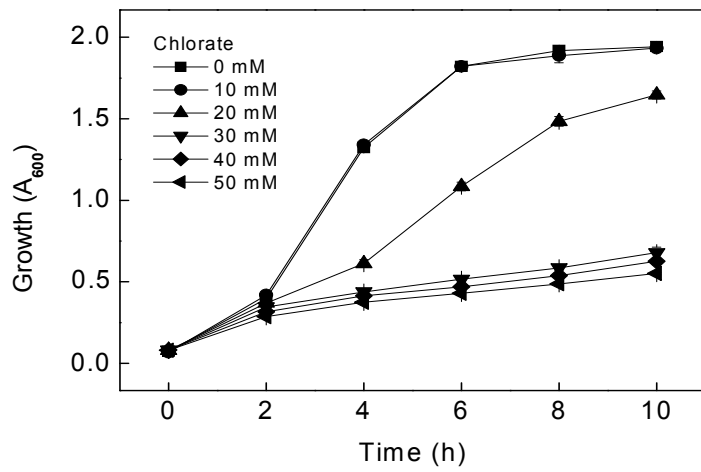


Fig. 35. Effect of chlorate on the bacterial growth. The growth was measured at 50 mM nitrate in the presence. The inhibitory effects of chlorate were obtained at the concentrations above 20 mM.

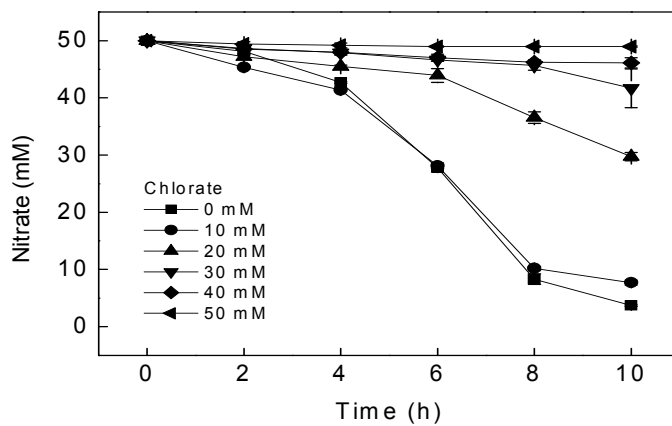


Fig. 36. Inhibitory effects of chlorate on the nitrate uptake. Nitrate uptakes were measured at various concentrations of chlorate at the presence of 50 mM nitrate.

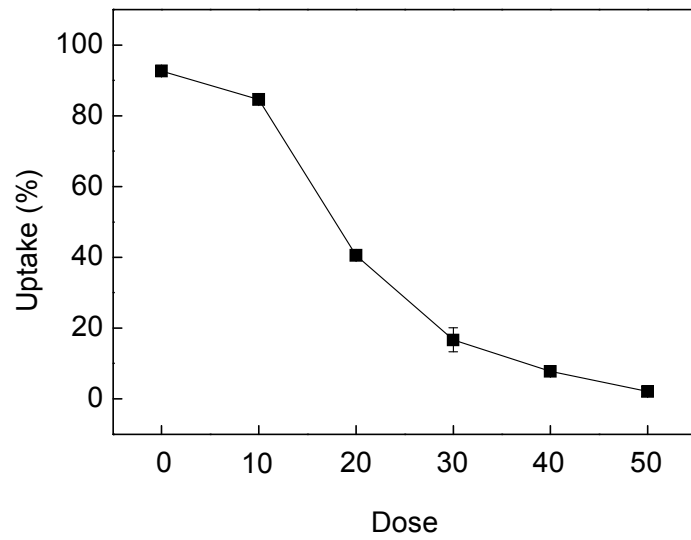


Fig. 37. Dose response curve of chlorate on the nitrate uptake. The nitrate uptake was measured after 10 h incubations as shown in Fig. 36.

## 제 4 절 Pot 및 포장에서의 질산흡수 효과

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 균주의 생존률 측정

토양중 가해진 GG0461 균주의 생존률 측정을 위해서 토양에 균주를 처리한 후 토양시료를 증류수로 현탁하고 원심분리하여 상정액을 분리하였다. 분리한 용액을 50 mM KNO<sub>3</sub>를 첨가한 PAF 평판배지에 도말하여 배양한 후, colony 수를 측정하여 균주의 생존률을 측정하였다.

#### 나. 염류처리 및 상추 생육측정

밭아한 상추는 약 15일 후에 100x80 cm<sup>2</sup> 실험용 포장에 20주씩 정식하였다. 상추와 상추 사이에 질산염의 농도를 달리한 염류액을 상추에 접하지 않도록 처리하고, GG0461 균주를 날짜별로 처리한 후 상추의 생육과 균주의 생존 수, 토양중 잔류 염류농도를 측정하였다. 상추의 생육은 생체중, 건물중, 엽수, 엽장을 측정하여 조사하였다.

염류의 처리는 200 mM 단위로 증가시키며 200에서 1000 mM 질산이온 용액을 제조하여 1 L 용액을 100x80 cm<sup>2</sup> 단위의 포장모판에 3회 처리하였다. 질산염의 처리량은 상추의 생육을 관찰하며 가감하였고, 실제 토양의 염류농도를 분석하지는 않았다.

#### 다. 애기장대의 생육 측정

Pot에 애기장대를 1주씩 심고, GG0461 균주와 질산이온을 농도별로 처리한 후, 염류장애를 유발하는 조건을 애기장대의 생육을 조사함으로써 관찰하였다.

### 2. 상추 생육실험

#### 가. 토양처리 균주의 생존 및 질산이온 흡수

*E. amnigenus* GG0461은 시설재배지 토양에서 분리한 균주로 토양중 생존력이 우수할 것으로 생각되며, 이것을 확인하기 위하여 작물을 재배하지 않는 조건의 토양에 3x10<sup>9</sup> cfu ml<sup>-1</sup>의 배양액을 토양에 가하고 약 20일간 토양 중 생존하는 생균수를 측정하였다 (Fig. 38). 토양중 처리한 GG0461은 처리 5일까지 급격히 감소하나 이후에는 10<sup>6</sup> cfu g<sup>-1</sup> soil의 밀도를 유

지하였다. 균주의 토양 중 생존력은 온도, pH, 태양광, 영양분 등 토양의 여러 가지 조건에 따라 다르겠으나 영양원이 부족한 조건에서 이 정도의 균밀도를 유지하는 것은 아주 좋은 결과라고 할 수 있다. 원래 시설재배지 토양에서 분리한 균주이기에 토양에 정착력이 우수한 것은 당연한 결과로 여겨진다. 차후 균주의 생존뿐만 아니라 증식할 수 있는 토양조건을 밝혀내야 할 것이다.

토양 중 생존하는 GG0461 균주에 의한 질산염의 흡수를 측정하였다. 균주 처리후 4일 간 급격한 질산염의 농도감소가 나타났는데, GG0461 균주를 처리한 토양에서는 작지만 염류가 대조토양에 비하여 감소하는 것으로 관측되었다 (Fig. 39). 이와 같은 소량의 염류농도 감소 효과가 상추의 생육에 어느 정도 영향을 미칠지는 정량적으로 평가할 수 없으나, Fig. 41에서 Fig. 44 까지의 결과에서 보듯이 염류처리농도 600 mM 이상의 조건에서 균주의 효과가 나타나, 균주처리로 상추의 생육이 향상되는 것을 관측하였다.

#### 나. 고염류 토양에서 상추의 재배효과

질산가리 용액을 50 에서 1,500 mM 까지 준비한 후, 상추에 염류장애를 유발할 때까지 단계적으로 처리하고, 동일한 조건에서 GG0461 균주를 처리하여 생육에 미치는 염류장애 극복효과 여부를 측정하였다. 염류농도에 따른 상추의 생육은 500 mM 이상의 염류용액 처리구에서 크게 손상되었다. 성장상을 이용한 Pot 실험에서 질산염류 50-100 mM 처리시에는 대조구와 비교하여 큰 차이를 발견할 수 없었으나, 300 mM에서 약간의 염류장애가 나타났고, 500 mM 이상의 처리에서는 심각한 피해가, 1000 mM 이상에서는 생육이 완전히 저해되었다. 따라서, 성장상내 재배실험을 통하여 확립한 염류처리 조건을 시설하우스내에서 적용하여 상추재배를 시도하였다.

본 연구실에서는 2007년 4월부터 3회에 걸쳐 포장재배 실험을 수행하였으며, 7월 중순 이후의 실험자료를 제시하였다. 상추재배를 위한 모판은 좌와 우 2개를 한조로 대조군과 균주 처리군으로 하였다. 질산염류 용액을 100에서 1000 mM 까지 제조한 후 시용하였다. 대조군에서는 균배양을 위한 액체배지를 같은 방법으로 희석하여 가하였다. 질산염의 처리량은 상추의 생육을 관찰하며 가감하였기에 토양의 염류량은 처리농도와 횟수에 비례하여 증가할 것이다.

균주의 효과는 주로 높은 농도의 처리구에서 관측되었으며, Fig. 41은 600-1,000 mM의 염류액을 처리한 대조구(Con)와 균주처리구(GG0461) 사이의 생육의 차이를 보인다.

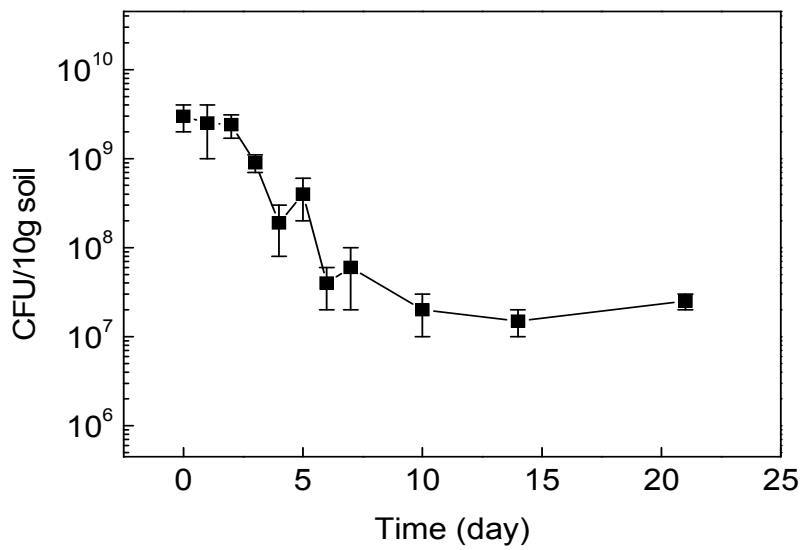


Fig. 38. Long-term survival of GG0461 in soil. GG0461 was treated to the soils and cfu was measured for 22 days.

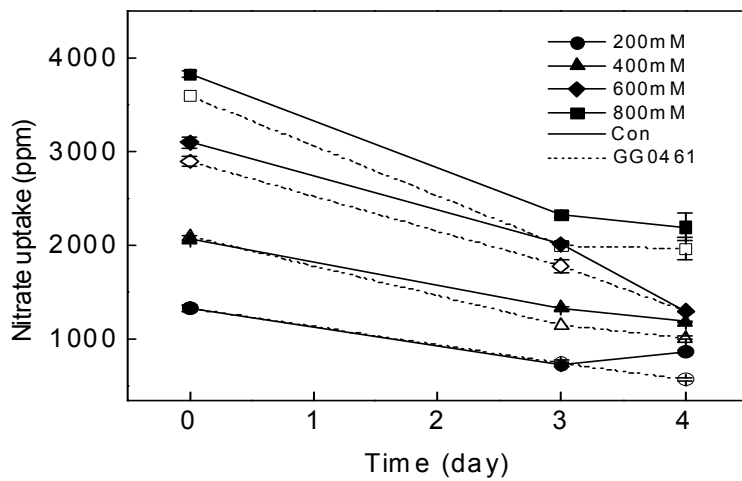


Fig. 39. Changes in the concentration of nitrate in the soil treated with GG0461. The dot line represents the nitrate concentration measured in the presence of GG0461.



Fig. 40. Effect of potassium nitrate on the growth of lettuce plant. Lettuce was treated with nitrate solutions of the indicated concentrations.



Fig. 41. Effect of soil microorganism on the growth of lettuce plant. Solutions of potassium nitrate at the concentrations of 600, 800, and 1000 mM were treated as indicated.



#### 다. 염류농도에 따른 상추의 생육 및 균주효과

상추를 시설재배지 토양에 정식한 후, Table 3과 같이 질산염과 GG0461을 처리하였다. 대조구와 염류용액 400 mM 처리구까지는 GG0461의 처리효과가 약하게 관측되었고, 600 mM 이상의 용액처리에서는 Fig. 42에서와 상추의 생육이 좋은 것으로 관측되었다.

#### 라. GG0461 균주 처리에 따른 상추생육

정식 후 질산이온 염류와 GG0461 균주를 처리하였으며 15일에 수확하여 생육특성을 분석하였다 (Fig. 43). 대조구의 상추는 염류의 처리농도가 증가함에 따라 생체중이나 건조중량, 잎의 길이, 잎의 수 등 모든 생육인자에서 비례적으로 감소하는 경향을 보였다. 반면, 균주를 처리한 조건에서는 염류농도가 증가하여도 생육수치는 크게 감소하지 않았다. 따라서 염류의 농도가 증가하여 염류장애가 크게 나타나는 조건에서 GG0461의 효과가 관측되었다

균주의 처리는 각종 생육지표와 함께, 염류처리후 생존하는 상추의 개체수에서도 증가효과를 보였다. Fig. 44에서는 400 mM 전후의 질산이온 용액 처리에 개체수가 최대가 되는 것을 알 수 있었으며, 모든 처리농도 범위에서 상추의 개체수는 증가하였다.

### 3. 애기장대의 생육실험

#### 가. 염류농도에 따른 애기장대의 생육평가

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 생육기간에 매우 짧아 각종 생리실험에 유용하게 쓰인다. 본 연구에서는 생육기간이 긴 작물대신 애기장대를 이용하여 염류장애를 평가할 수 있는 속효성방법을 확립하고, GG0461 균주를 처리하여 토양 중 염류를 효율적으로 제거하며 이에 따른 애기장대의 염류장애 극복방안을 확립하려고 하였다. 애기장대의 씨는 75% 에탄올에서 살균한 다음, 생리적 양액을 포함하는 0.7% agar 배지에서 발아시키고, 발아후 약 15일, 4엽기에 상토를 주성분으로 배합한 pot에 정식하였다. 염류의 처리는 염류 KNO<sub>3</sub>의 농도를 50, 100, 200, 300, 500 mM로 증류수에 녹인 용액을 4일마다 15 ml 토양의 표면이 적시어지도록 골고루 가하였다. 염류의 효과는 Fig. 45에서 보듯이 300 과 500 mM 이상의 농도에서 염류장애 현상이 나타나 생육 및 엽록소 농도 등이 낮은 농도의 염류처리에 비하여 떨어짐을 확인할 수 있었다. 애기장대를 이용한 염류장애의 평가에서 애기장대에 나타나는 염류장애 현상은 염류의 처리농도와 반복회수 및 주기 등에 따라 달라질 수 있으나 500 mM 전후의 염류용액을 3일마다 3% 양으로 반복처리하여 확실하게 염류장애를 일으킴을 확인하였다.

#### 나. 질산흡수균의 처리효과

*E. amnigenus* GG0461 균주를 토양에 처리하고 애기장대의 염류장애 개선효과를 조사하였다. 이 부분의 연구는 진단실험을 목적으로 수행되었다. 100 mM부터 1.5 M 까지 질산염의 농도를 달리한 용액을 처리하였을 때, 정식후 10일째되는 애기장대의 생육상태를 Fig. 46에 보였다. 염류에 의한 효과는 100-200 mM 용액처리시 애기장대의 생육은 오히려 촉진되었다. 이것은 질산태 질소의 첨가로 인한 양분효과로 확인되었다. 염류농도 800 mM 이상에서 생육은 뚜렷이 나빠졌으며, 1 M 이상의 용액처리에서는 염류장애 현상이 크게 관측되었다.

동일한 조건에서 GG0461의 첨가는 800과 1000 mM 염류용액 처리구에서 개선되는 것으로 보이나 차이는 뚜렷하게 나타나지 않았다. 애기장대의 생육은 1.5 M 염류에 의해서 완전히 저해되었다 (Fig. 47). 애기장대에서 질산염에 의한 염류장애는 오직 높은 농도의 염류처리구에서 관측되어 애기장대가 상추 등 시설원예에서 널리 이용되는 작물에 비하여 염류저항성이 상대적으로 큰 것을 확인하였다. 애기장대의 높은 염류저항성은 생육기간이 짧은 식물체를 이용하여 속효성 염류장애 평가시스템을 개발하고자 하였던 본 연구의 목적에 부합하지 않았다. 따라서, 애기장대를 이용한 질산흡수균의 염류장애 개선방안 연구항목은 큰 의의를 갖지 못함으로 연구를 지속하지 않았다.

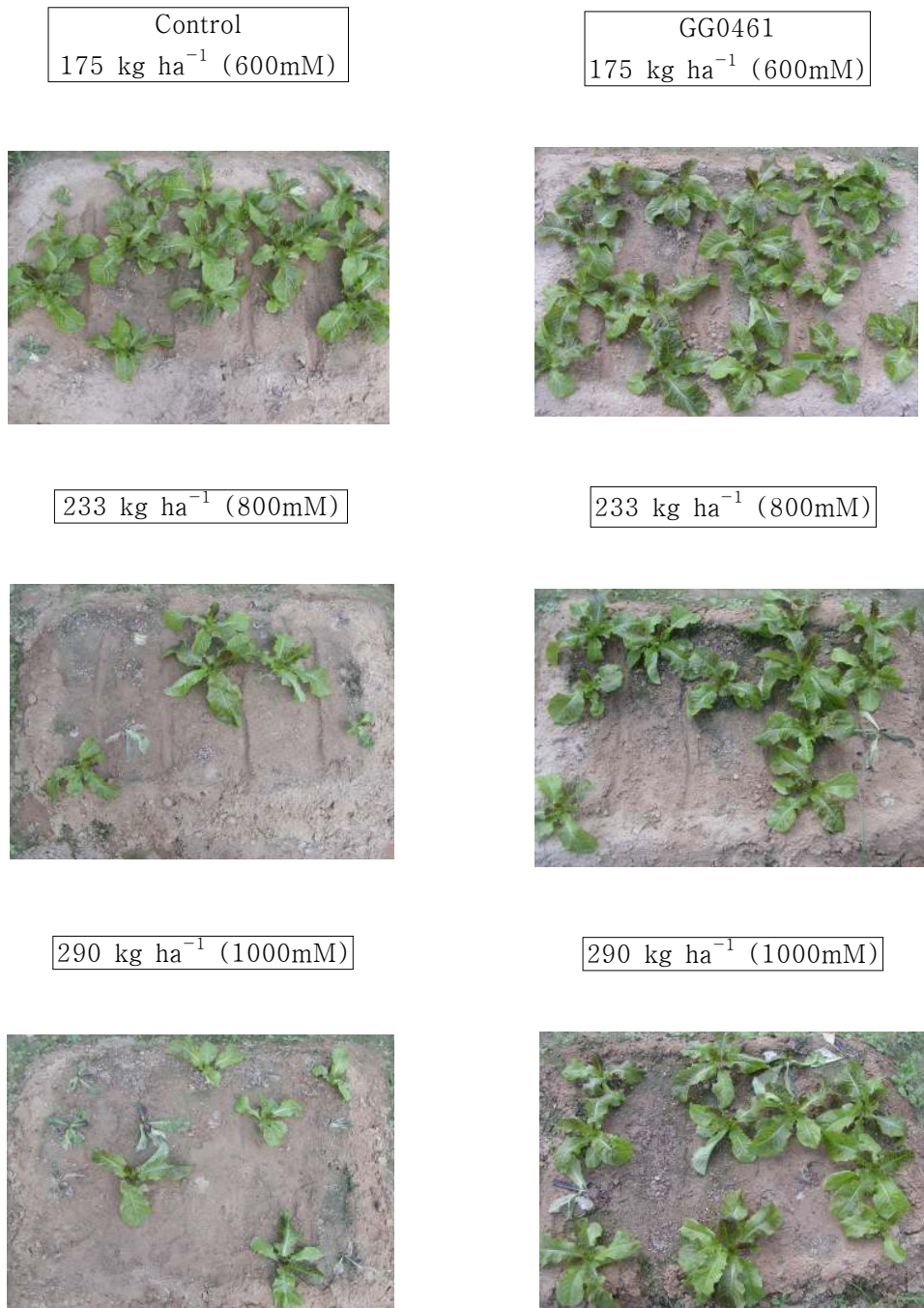


Fig. 42. Cultivation of lettuce in the presence of nitrate salt and GG0461. The concentrations of potassium nitrate solution was treated as indicated. Left: salt-treated control. Right: salt and GG0461 treatment.

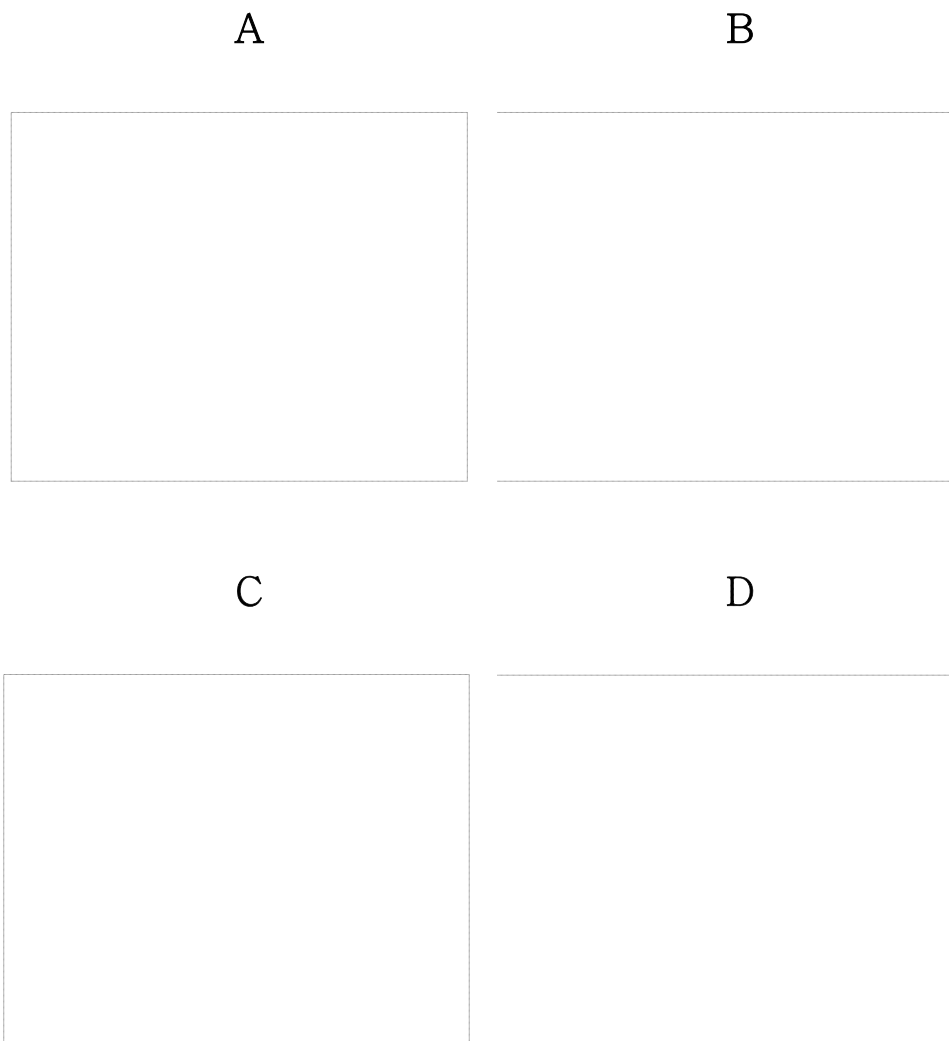


Fig. 43. Effects of GG0461 treatment on the cultivation of lettuce. Lettuce plants were cultivated for 15 days in the presence of various concentration of potassium nitrate with and without GG0461 treatments. Fresh weight (A), dry weight (B), leaf length (C), and number of leaf (D) were evaluated.

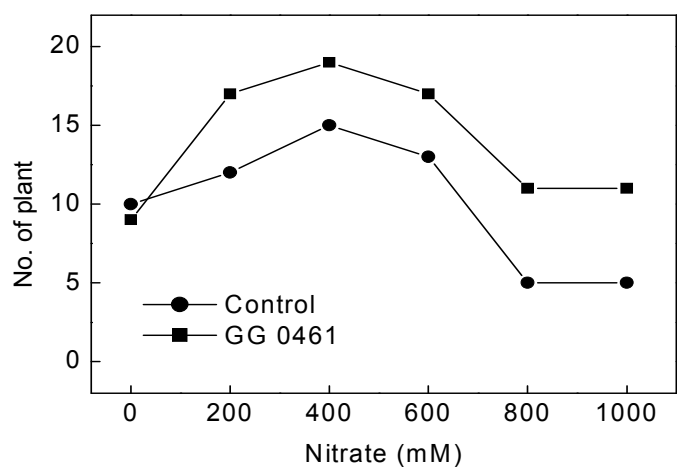


Fig. 44. Effects of GG0461 treatment on the number of plants alive by the treatment of nitrate salt. Lettuce plants were cultivated for 15 days under the treatments of potassium nitrate solutions of the indicated concentration.

Table 3. Experimental schedule for the treatments of salt and bacteria

Date	Salt treatment	GG0461 treatment	
2007. 7. 17.			sowing
July 31			transplanted
August 1		0	day 1
August 2	0		day 2
August 3	0		day 3
August 6	0		day 6
August 7		0	day 7
August 8			day 8
August 9	0		day 9
August 10			day 10
August 15			day 15



Fig. 45. Effects of potassium nitrate on the growth of *Arabidopsis thaliana*. Salt solution was sprayed to the surface of soil every 3 days. The concentration of salt solution was from 50 to 500 mM.



Fig. 46. Effects of nitrate on the growth of *Arabidopsis thaliana*. Salt solution was sprayed on the surface of soil every 3 days.



Fig. 47. Effects of GG0461 on the growth of *Arabidopsis thaliana*. The salt solutions were prepared at the indicated concentration and was sprayed on the surface of soil every 3 days.

## 제 5 절 실용화를 위한 대량배양법 확립

### 1. 연구수행 방법

#### 가. 대량 배양용 산업용배지 제조

균주의 대량배양을 위하여 PAF 배지를 대체할 수 있는 산업용 배지재료를 조사하였다. PAF 배지의 대체제로 산업용 tryptone,  $MgSO_4$ ,  $K_2HPO_4$ , glycerol과 효모추출물을 구하였으며, 이들을 이용하여 배지를 만들고 GG0461균주의 성장을 측정하였다. 질소원으로 생선발효액을 peptone과 tryptone을 대신한 배양실험을 수행하였다.

#### 2. 산업용 재료를 이용한 배지개발

GG0461 균주는 PAF 배지에서 생육이 왕성하여 대량배양을 위한 배지의 개발은 PAF 배지의 성분을 공업용 재료로 대체하는 데 주안점을 두었다. 탄소원으로는 상업용 glycerol을 이용할 수 있으며, 질소원으로는 상업용 tryptone은 구할 수 있으나 peptone은 구할 수 없었다. 이들 이외에 질소원으로 soybean meal과 효모추출물 등을 구할 수 있었으며, 아미노산 비료로 쓰이는 생선발효액도 이용하였다.

Fig. 48에서와 같이 tryptone 2%를 가하여 배지를 만들었을 때, 균주의 생육은 PAF 배지에서와 같은 정도로 양호하였으며, 질산이온의 흡수도 우수하였다. 여기에 효모추출물을 1% 가하면 성장곡선에서 초기성장 속도가 빨라짐을 확인하였다. 그러나 효모추출물은 질산이온 흡수를 촉진하는 효과는 크지 않았다.

배지의 질소원으로 tryptone을 2% 사용하였을 때, 균주의 성장은 pH 7에서 최대로 나타났으며, pH 6에서 상대적으로 낮은 성장을 보였다 (Fig. 49). 같은 조건에서 질산이온 흡수를 측정하였을 때, pH 7과 8에서는 유사한 흡수력을 보였으나 pH 6에서는 감소하였다. 산업용 tryptone을 질소원으로 대체하였음에도 균주의 성장과 질산이온 흡수력은 큰 변화를 보이지 않았으나, 최적 조건은 pH 8에서 pH 7로 이동하였다.

상업용 질소원을 각각 2% 씩 가한 배지에 GG0461 균주를 배양하고, 배양온도를 27, 37, 47°C로 증가시키며 성장 및 질산이온 흡수력을 비교하였다 (Fig. 50). 47°C에서는 생육자체가 저해되었으며, 최적온도인 37°C에서는 생육과 질산이온 흡수가 왕성하였으나 역시 tryptone 2% 배지에서 최대로 얻어졌다.

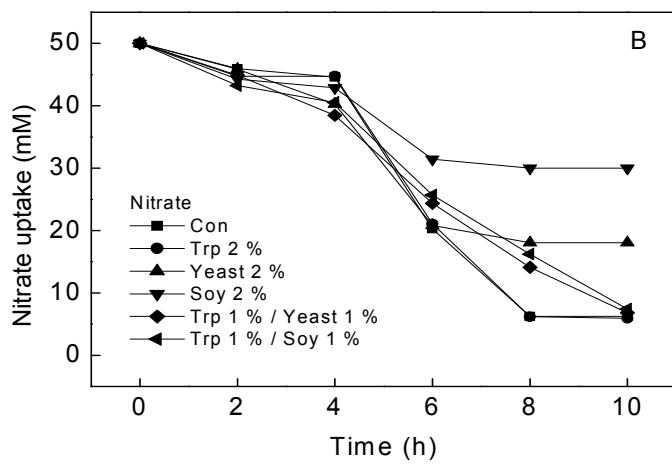
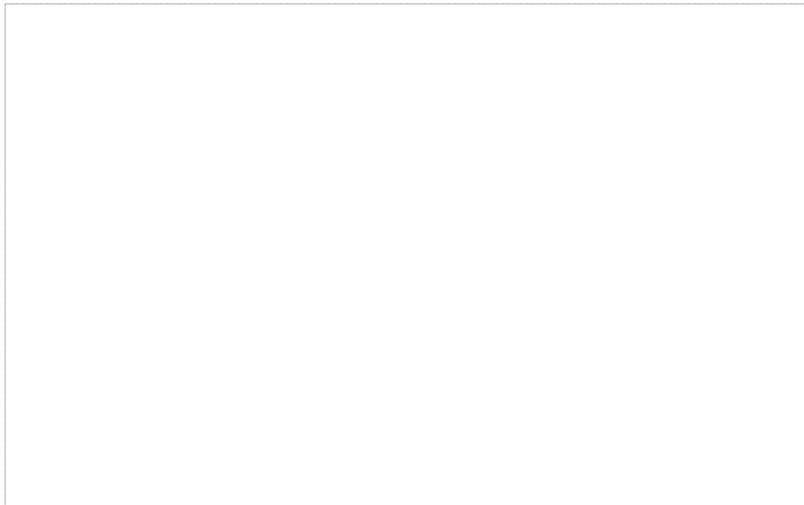


Fig. 48. Effects of various nitrogen sources on the microbial growth and nitrate uptake. (A) Growth curves were obtained in the presence or absence of nitrate under the indicated conditions. (B) Nitrate uptakes were measured in the presence of various nitrogen sources



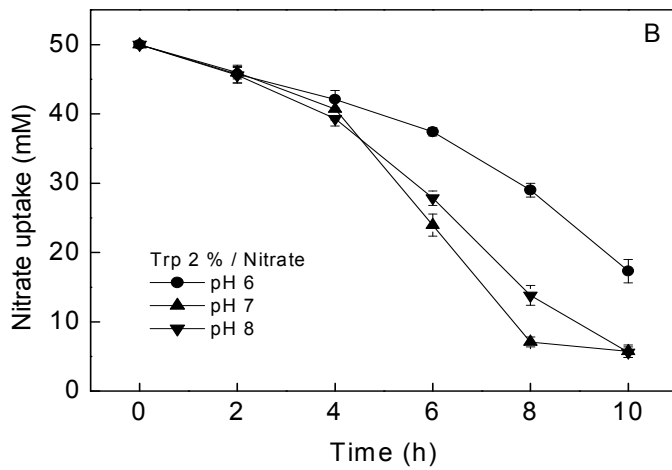
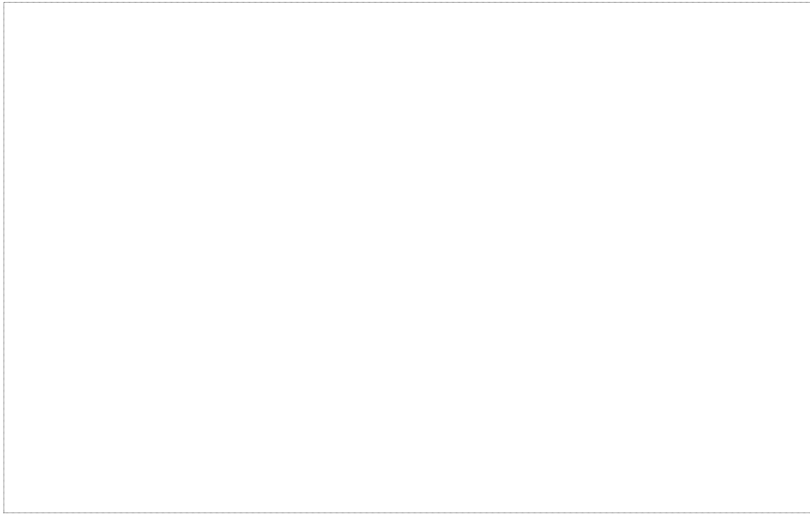


Fig. 49. Effects of tryptone and pH on microbial growth and nitrate uptake. Nitrogen source of PAF medium was replaced with 2% commercial tryptone. (A) Growth curves. (B) Nitrate uptakes.

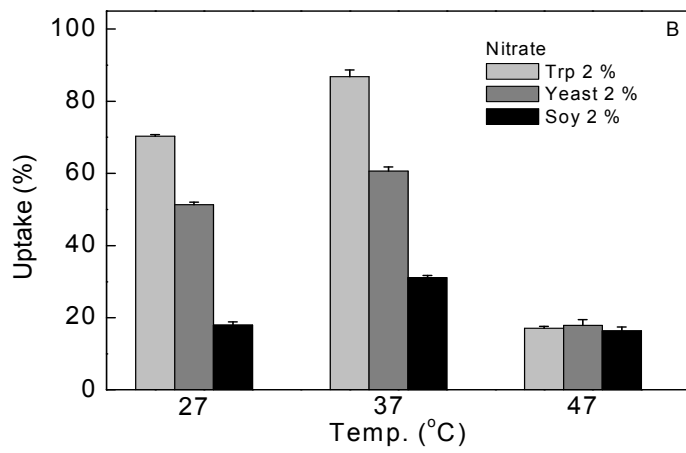
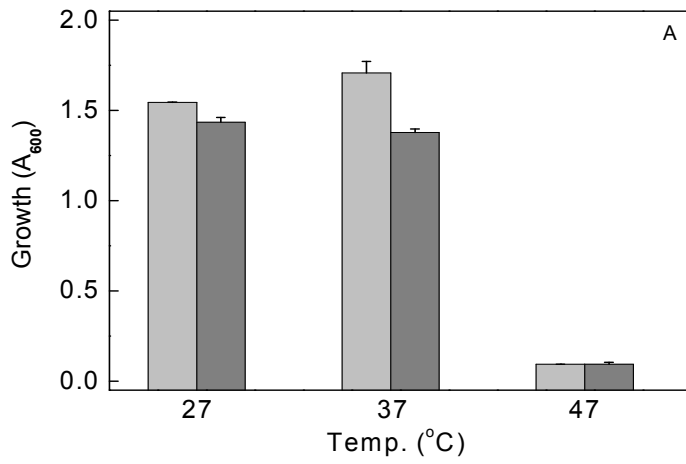


Fig. 50. Effect of nitrogen source on the microbial growth and nitrate uptake at various incubation temperatures.

상업용 질소원을 2% 씩 가한 배지에서 배양하며 배지의 산성화를 측정하였다. 먼저, tryptone 2% 배지에서는 생육에 따라 배지의 pH 변화는 pH 7 근처에서 크게 변화하지 않았다. 그러나, 효모와 대두 추출물 2%을 첨가한 배지에서는 배지의 pH가 각각 6.0과 5.5 근처로 낮아지는 것이 관찰되었다 (Fig. 51). 배양시간당 pH 변화량을 동일한 조건에서 계산하였을 때, tryptone 배지에서는 거의 변화량일 측정되지 않았으나, 다른 두 배지에서는 시간당 0.2-0.3의 pH 감소가 측정되었다. 이러한 결과는 tryptone 2% 배지에서 균주의 성장에 따라 여러 가지 요인에서 경시적 변화가 적어 균주의 활력유지에 유리함을 의미한다.

Tryptone 2% 배지에서 균주의 성장시 배지의 pH 변화가 관측되지 않았다는 사실은 Fig. 26에서 질산이온 흡수시 관측되었던 배지의 산성화 현상이 상업용 배지에서 나타나지 않을 수 있음을 의미한다. 이것은 상업용 재료 사용으로 앞에서 제안한 균주의 질산흡수 기작을 바꾸는 결과를 초래할 수 있어 자세히 조사할 필요가 있다. Tryptone 2%를 가한 배지의 초기 pH를 pH 5에서 pH 9까지 조절한 후 GG4061 균주를 배양하며 배지의 pH 변화를 측정하였다. 측정결과는 Fig. 52에서와 같이 변화의 정도는 완만하나 균주의 기본특성으로 측정되었던 결과를 재확인할 수 있었다. 이것은 상업용 tryptone을 사용하여도 균주의 질산이온 흡수기작이 변화하지 않음을 의미한다

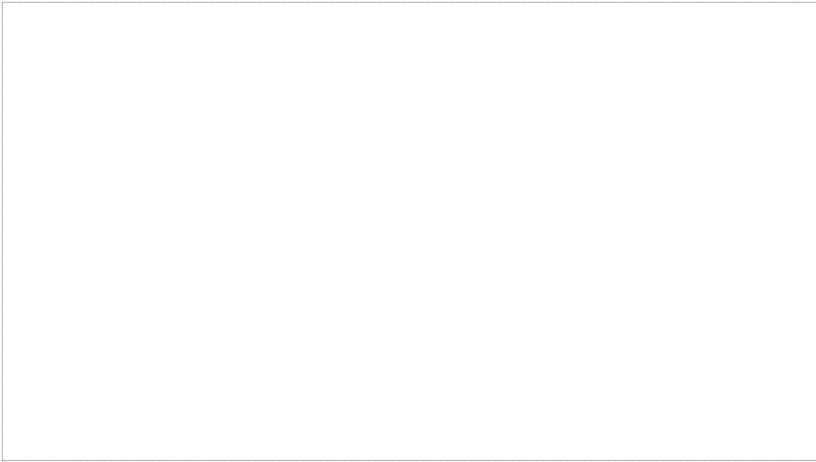
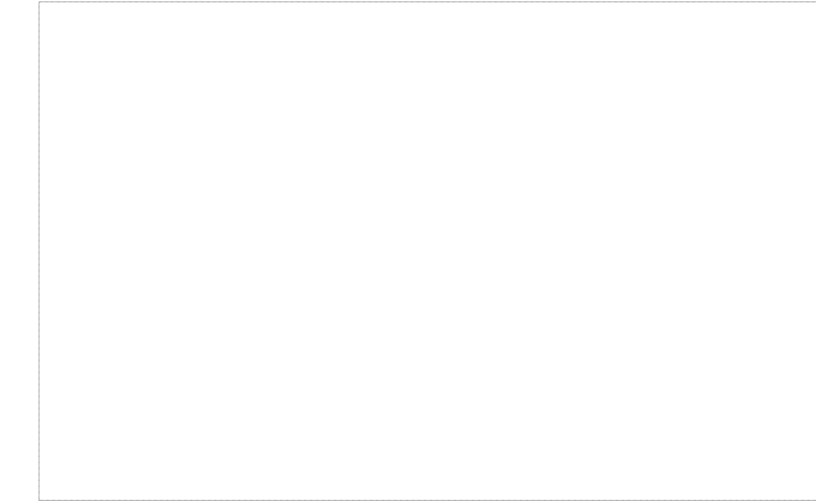


Fig. 51. pH changes during the incubation of GG0461. (A) The acidification of culture media during incubation. (B) The acidification rate of culture media at pH 7.0.

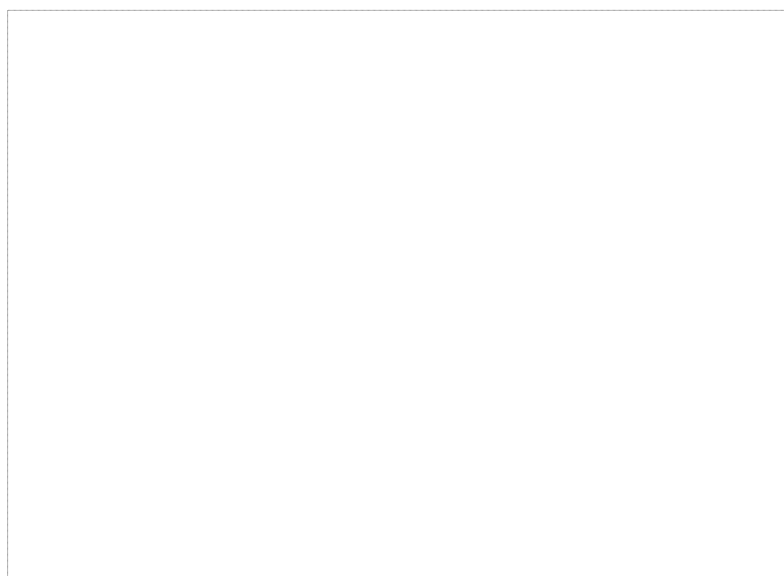


Fig. 52. Time-dependent pH changes with nitrate uptake in the presence of nitrate at different initial pHs.

## 2. 아미노산 비료를 이용한 배지개발

GG0461 균주의 산업화 대량생산을 위하여 아미노산 비료로 사용하는 생선발효액을 질소 원으로 균주의 생육효과를 조사하였다. Fig. 53은 생선발효액(fish amino acid), glycerol, corn syrup, 그리고 두 가지 염(마그네슘과 인산)의 효과를 측정한 것이다. 균의 생장은 옥수수 당 밀을 제외한 이들 4가지 성분을 첨가하였을 때, 균주의 생장이 왕성하게 이루어짐을 확인할 수 있었다. 이러한 각 조건에서 GG0461 균주의 질산염 흡수력을 측정하였을 때, 동일한 4가지 성분을 추가한 경우 35시간만에 약 5000 ppm의 질산을 흡수함을 확인하였다 (Fig. 54). 특히, 생선발효액과 glycerol의 혼합처리에서도 높은 효과를 보여줬다.

이러한 결과는 아미노산 비료인 생선발효액도 이용이 가능함을 보여주나, 질산이온 흡수에 많은 시간이 소요되어 상업용 tryptone에 비교하여 효율성은 떨어지는 결과이다. 따라서, GG0461 균주의 배양을 위한 상업용 배지성분 조성은 2% tryptone과 1% glycerol, 필요한 무기이온으로 결정하였다.

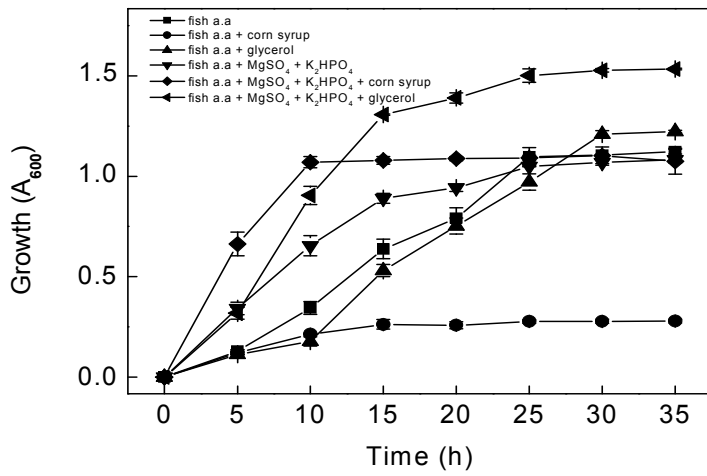


Fig. 53. Growth of *E. amnigenus* at various conditions. In order to develop artificial media for the soil cultivation of *E. amnigenus*, various compositions of carbon and nitrogen sources were tested.

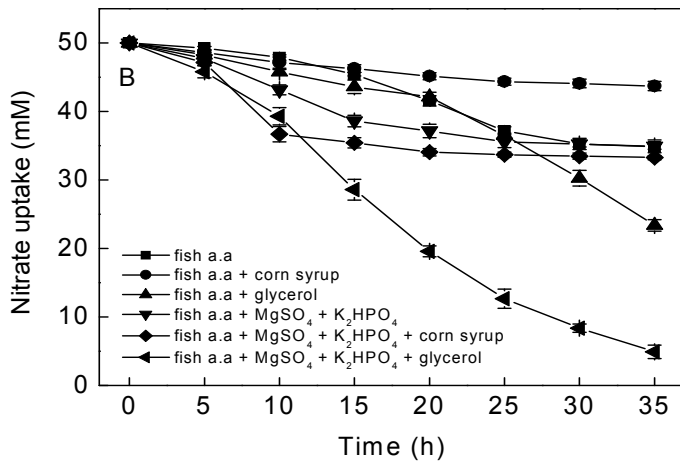


Fig. 54. Nitrate uptake of *E. amnigenus*. Nitrate uptake was measured at the conditions of various nutrients, shown in Fig. 15.

## 제 6 절 실용화를 위한 대량배양 및 시작품 제작

### 1. 미생물비료 허가취득

본 연구과제의 참여기업인 (주)흙살림에서는 *Enterobacter amnigenus* GG0461 균주를 이용한 실용화에 산업적 장점이 충분하다고 판단하였으며, 따라서 실용화를 위하여 GG0461 균주의 미생물비료 허가를 취득하였다. 아래 첨부한 사본은 충청북도에서 2008년 3월 25일자로 취득한 허가서(등록번호, 12-나-12-25호)로 제품중 GG0461의 유효균수는 유통과정중 생균수의 감소를 충분히 고려하여  $1 \times 10^4$  cfu ml<sup>-1</sup>로 하였다.

### 2. 대량배양 실험 및 시작품 제작

대량배양은 (주)흙살림의 오창공장에서 이루어졌으며, 250 L 배양탱크에 상업용 재료를 이용한 배지에서 배양되었다. 대량배양을 위한 배지는 <제 5 절>에서 연구결과를 바탕으로 제조되었으며, 비료생산 등록증에 제시된 대로 트립톤, 효모추출물, 인산, 황산마그네슘 및 글리세롤 등을 주성분으로 하였으며, 배양은 37°C에서 18시간 교반하여 이루어졌다.

### 3. 시작품의 경시적 변화

GG0461 균주의 종균배양은 5 L jar에서 이루어졌으며, 2008년 1월 10일 14시간 배양으로 생산되었고, 초기의 생균수는  $4.7 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> 이었다. 추후 배양시간은 2시간 줄여 12시간으로 조정되었다.

주배양과정은 250 L 배양탱크에서 이루어졌으며, 2008년 1월 11일에 18시간 배양으로  $2.8 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup>의 배양액이 생산되었다. 배양액으로부터 생산된 시제품은 80일이 경과한 4월 2일에 생균수는 10°C의 저온보관시  $2.8 \times 10^8$  cfu ml<sup>-1</sup> 을 유지하고 있었으며, 18°C 상온보관시  $2.1 \times 10^4$  cfu ml<sup>-1</sup>의 생균수를 유지함이 관측되었다. 따라서 저온유통시 제품의 유효기한은 상당히 오랜 기간 가능하나, 상온유통의 경우는 약 3개월 정도로 관측되었다. 물론 상온유통의 경우에도 글리세롤 등의 첨가물을 가함으로써 유통기간 연장이 가능할 것으로 생각되며 이에대한 연구가 이루어질 예정이다.



등록번호 제12-나-12-25호

### 비료생산업등록증


상호 또는 법인명 : (주)휴살림  
주 소 : 충북 괴산군 문정면 영원리 528번지  
상 명(대표자) : 이태근 주민등록번호 : 590805-4444444  
제조장 소재지 : 충북 괴산군 문정면 영원리 528번지  
비료의 종류 : 토양미생물제제

---

제조관리법 제11조제1항 및 품질시험규칙 제7조제1항의 규정에  
위하여 위와 같이 비료생산업을 등록하였음을 증명합니다.

2008년 3월 25일

충청북도지



### 비료의 종류 및 명칭별 등록사항

연월일	비료의 종류 및 명칭	보증성분량 (%)	유해성분량 (%)	기타규격	원료 투입비율
2008. 3. 25.	토양미생물제제	Enterobacter amnigenus : 1.0×10 <sup>8</sup> cfu/gal	사실	-	<sup>5)</sup> 미생물중균체량1.0 프림톤 1.5 요보수출물 0.5 이탄산가리 0.15 황산이그대용 0.15 금리제물 1.0 합 95.7

Fig. 55. License for the microbial fertilizer production using *Enterobacter amnigenus* GG0461 obtained from the Government of Chungbuk Province.



Fig. 56. Large scale production of microbial fertilizer. Bottom-right: Commercial product of GG0461 culture.

## 제 7 절 실용화를 위한 추가적인 균주의 분리 동정

### 1. 질산이온 흡수 미생물의 추가 분리

GG0461 균주는 산업화를 위하여 많은 장점을 갖추고 있다. 그럼에도 불구하고 제품의 효율이나 안정성을 높이기 위하여 혼합균주 배양 및 제품화의 장점을 고려하여 GG0461과 특성이 상이한 균주의 분리 및 동정을 하였다. 새로운 그리고 생육특성이 다른 균주를 GG0461과 함께 혼합하여 제품화한다면 유통이나 토양조건에 따라 어느 한 균주의 단점이 나타나더라도 다른 균주가 단점을 보완할 수 있다는 가능성으로 제품의 질을 보증하기 위하여 본 연구내용이 수행되었다.

새로운 질산이온 흡수 미생물을 분리하기 위하여, 충청북도 청주시 인근의 토양을 채취하였으며, 3종의 토양미생물을 분리할 수 있었다. 분리한 균주와 토양분석 자료를 Table 4에 제시하였다.

### 2. 16S rDNA 염기서열분석에 의한 동정

분리한 3가지 균주의 PCR을 이용한 염기서열 분석이 이루어졌으며 Fig. 57에 제시하였다. 유전자 분석자료로부터 two-parameter 모델에 따라 근연관계가 분석되어 phylogenetic tree가 얻어졌다 (Fig. 58). 세 균주는 모두 *Bacillus* 속으로 밝혀졌으며, GS1 균주는 *Bacillus arbutinivorans*로 GS2 균주는 *Bacillus*에 속하나 염기서열이 98% 이상 일치하는 균주가 없었고, GS4는 *Bacillus cereus*로 식중독을 유발할 수 있는 균으로 밝혀졌다.

### 3. 질산이온 흡수력 측정

분리한 세 균주의 질산이온 흡수력을 측정하였다 (Fig. 59). 세 균주 중 GS1은 질산이온 흡수력이 상대적으로 떨어졌으며, GS4의 경우는 흡수력은 높으나 식중독을 유발할 수 있는 균이었고, GS2 만이 높은 질산이온 흡수력을 갖춘 사용가능한 토양세균으로 판명되었다. GS2 균주와 GG0461 균주는 각각 그람 양성균과 음성 균주로서 본 연구에서 목적하는 서로 다른 특성이 만족되어 혼합배양시 또는 배양후 혼합시 여러 가지 장점을 얻을 수 있을 것으로 판단된다. 상업용 제품의 제작과 실용화에 이들 두 균주를 이용한 제품화 실험이 수행될 예정이다.

Table 4. Isolated microorganisms and physicochemical properties of the soil

Microbial Strain No.	pH	O.M. <sup>2</sup> (%)	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )	CEC <sup>3</sup> (cmol(+)/kg)	EC <sup>4</sup> (dS/m)	NH <sub>4</sub> -N NO <sub>3</sub> -N	
						---(mg/kg)---	
GS 1							
GS 2	6.18	0.5	79.5	4.3	1.33	22.33	37
GS 4							

<sup>1</sup>O.M.: organic matter.

<sup>2</sup>CEC: cation exchange capacity.

<sup>3</sup>EC: Electrical conductivity.

**GS1 [ *Bacillus arbutinivorans.* ]**

TNGNNCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAANCACCTTCGGTGGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTT  
GGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAAATTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTTCCTCNCATGAGGNAAGCTGAAAGTCCGGTT  
TCGGCTGACACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
TCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCG  
CGTGAGCGATGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGA  
AAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCCCTT  
TAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATCCACGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAA  
AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCAC  
TCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACGCG  
AAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTGACACTCCTAGAGATAGGACGTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC  
AGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGACTTAAGTGACTGCCG  
GTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAAAGGGCTG  
CAAGACCGGAGGTTTAGCCAATCCCATAAAACCAATTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCCGGAATCGTAGTAATCG  
CGATCAGCATGCCCGGTGAATAACGTTCCGGGCTTGTA

**GS2 [ *Bacillus sp.* ]**

TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAGACTCTTCGGAGTCTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTTGGGCAA  
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACACCGGAAACCGGTGCTAATACCGGATAATCCTTTTCCTCTCATGAGGAAAAGCTGAAAGTCCGGTTTCGGCT  
GACACTTACAGATGGGCCCGCGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTTCGGCC  
ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG  
CGATGAAGGCCTTCGGGTGCTAAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCCAGAAAGCCA  
CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTCCCTTAAGTC  
TGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGCGGAATCCACGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATT  
AGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCT  
GGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGCAACCGGAAGAAC  
CTTACCAGTCTTGACATCCTTGACACTCCTAGAGATAGGACTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT  
GTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTTGCCAGCATTTCATTGGGCACTCTAAAGTGACTGCCGGTGACN  
AACCGAAAGGAGGTGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACCAAAGGCTGCAAGAC  
CGGAGGTTTAAACCAATCCATAAAAACCAATTCAGTTCGGATTGCAAGCTGCAACTCGCTGCATGAAGCCCGGATCGCTAGTAATCGCGGATCA  
GCATGCGGGTGGAAACATTTCCGGGCTTGTA

**GS4 [ *Bacillus cereus.* ]**

TCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAA  
CACGTGGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAACATTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGG  
CGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCGCGTCGCAATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG  
GGTGTATCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAA  
CGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTA  
ACCAGAAAGCCACGGCTAACCTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTG  
GTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCAT  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGGAAAGCGTGGGGA  
GCAAACAGGATTAAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCGCCCTTATGTCGAAAGTAAACGCATT  
AAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGTGGAGCATGTGGTTAATTGAAAGC  
AACCGAAGAACCTTACCAGTCTTGACATCCTGAAAACCTTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGT  
CGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGATCTTAGTTGCCATCATTAAGTGGGCACTCTAAGTGAC  
TGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGACGGTACAAAG  
AGCTGCAAGACCGGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAACCGTTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGAAGCTGGAATCGTAGT  
AATCGGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCGGGT

Fig. 57. 16S rDNA base sequences of the isolated soil microorganisms.

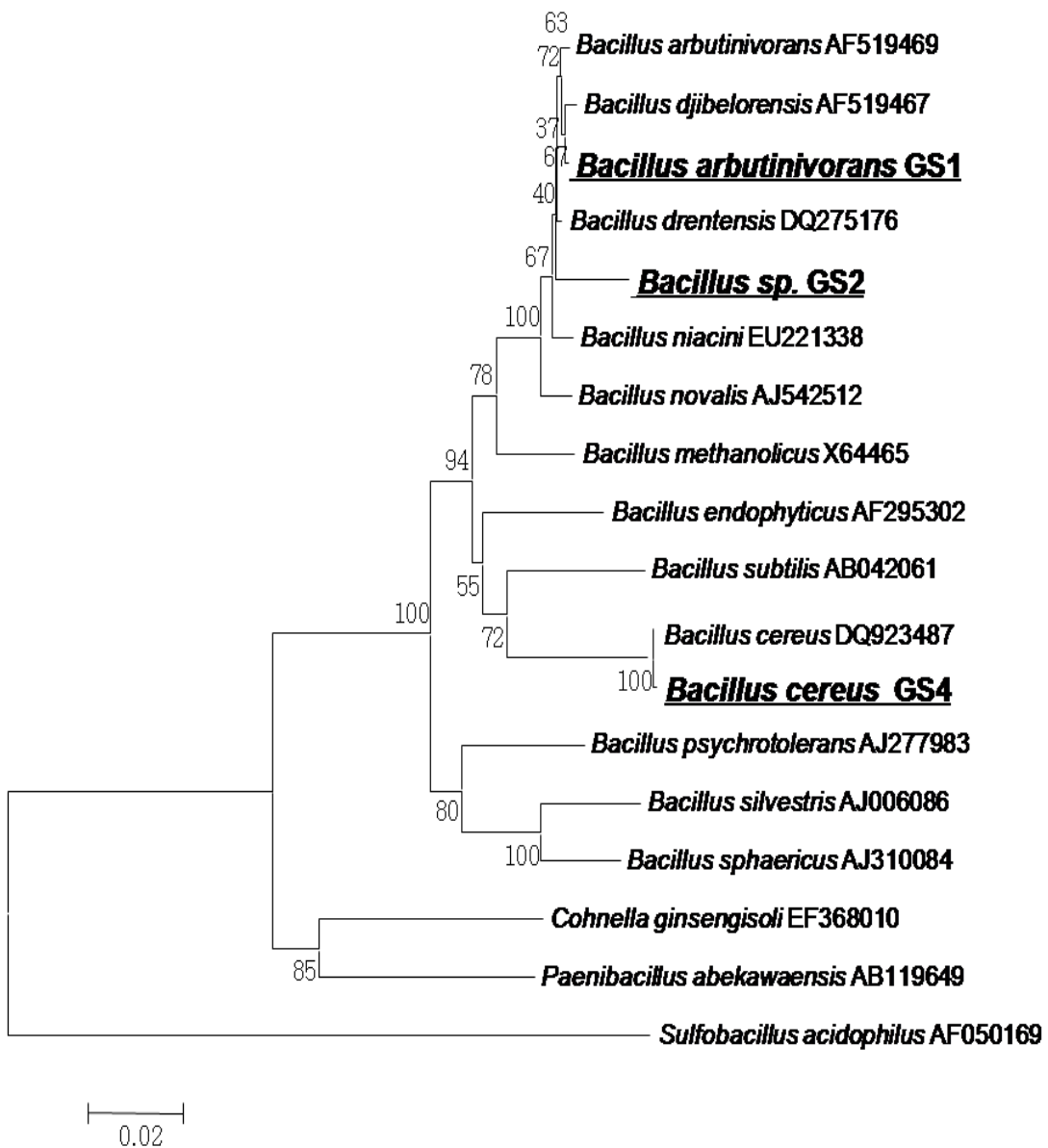


Fig. 58. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequence. Comparison shows that the position of three species (underlined). Bar, 0.02 substitutions per site.

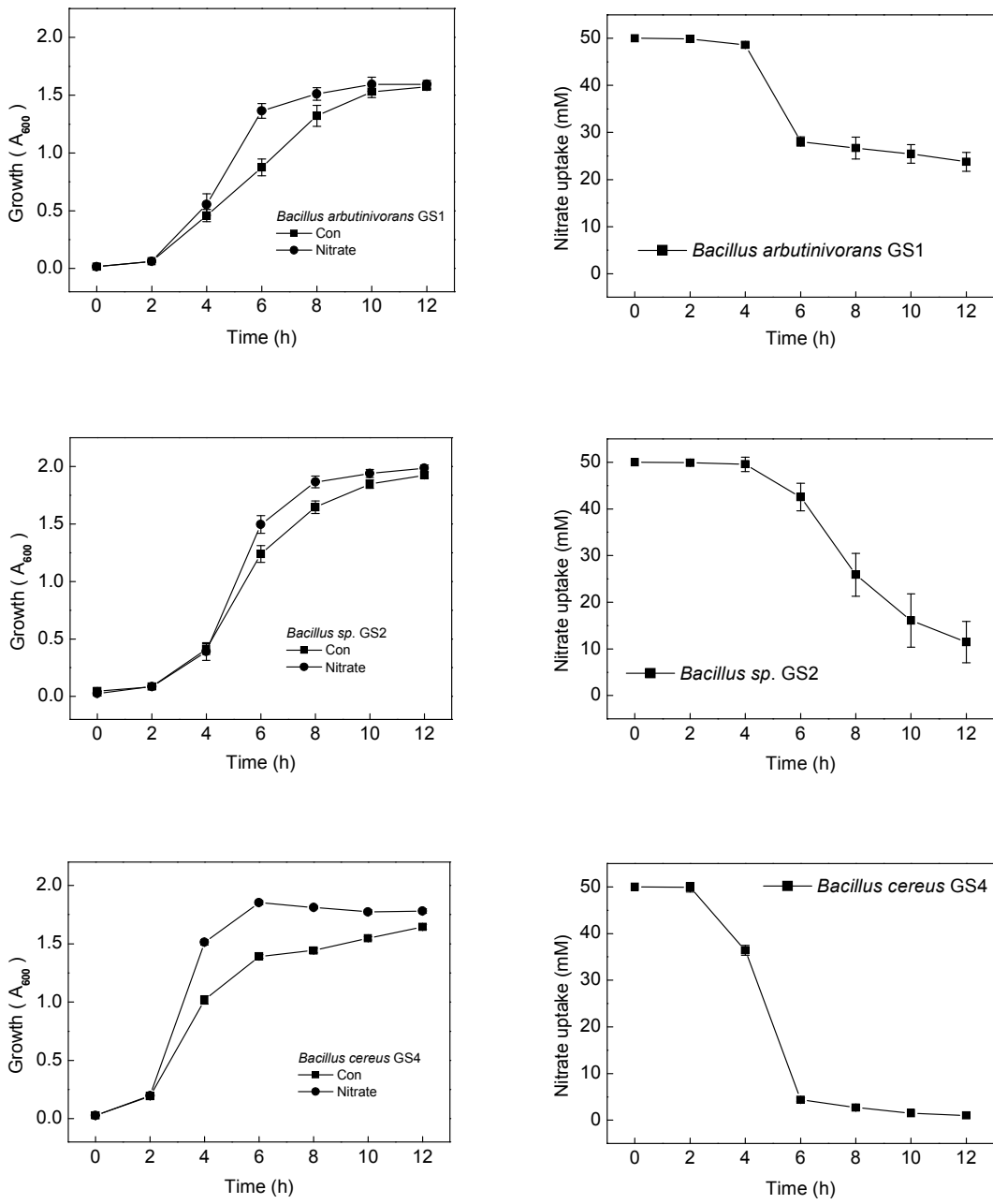


Fig. 59. Time course of growths and nitrate uptakes by three strains.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구개발목표의 달성도

구분	연도	세부연구개발 목표	가중치	달성도
1차년도	2006. 4. -2007. 3.	미생물 동정, 생육특성, 대량배양, 질산 흡수능 평가 등	30 %	100%
		pot 실험에서 염류장애 평가시스템 개발	30 %	70%
		질산염 처리시 질산흡수균의 질산 제거능력 평가	40 %	100%
2차년도	2007. 4. -2008. 4.	질산흡수균의 시용으로 염류장애 개선효과 증진	50 %	100%
		시제품 제형화 기술개발 및 Pot에서 효과 검증	30 %	100%
		토양중 균주의 토착화 및 지속적 활력유지 방안	20 %	90%
최종평가	2006- 2007	미생물의 동정, 생육특성구명	40 %	100%
		염류장애 경감, 극복 효율향상	40 %	100%
		미생물의 토착에 의한 지속성	20 %	90%



## 제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

### 1. 기술적 측면

가. 유용한 토양미생물의 분리 및 동정법을 확립.

*Enterobacter amnigenus* GG0461, *Bacillus arbutinivorans*로 GS2, *Bacillus* 속의 새로운 균주 등 질산흡수능을 갖춘 유용균주 3종을 성공적으로 분리 동정하였다. 토양시료의 채취 및 분석, 다양한 미생물 중 특정 활성을 갖는 균주의 분리, 활성검증법 등 체계적 방법을 확립하였다.

나. 토양미생물의 생육검사 및 효능 극대화를 위한 방법 확립

분리한 미생물의 최적 생육조건을 온도, pH, 영양원 등에서 조사하였으며, 배양과정 중 질산흡수능을 극대화하기 위한 조건 등을 확립하였다.

다. 분리동정한 미생물의 토양처리 및 효과검증법 확립

GG0461 균주를 상추 시설재배지에 처리하여 상추의 염류장애 극복 효과를 평가하였고, 유용한 결과를 확인하였다. 연구기간이 짧아 반복실험과 효과극대화를 위한 조건 확립 등은 수행할 수 없었지만, 적용방법 등을 설정하였다.

라. 친환경적 방법으로 농경지 질산오염을 제거할 수 있는 방법 확립

농경지의 과도한 질소비료 사용은 지하수 및 하천수의 질산오염을 유발하였고, 특히 지하수 오염에 따른 식수원 오염은 인축의 건강에 심각한 영향을 미치고 있다. 본 연구를 통하여 분리한 유용미생물은 자연 식수의 질산오염 경감에 기여할 수 있을 것이다.

### 2. 경제, 산업적 측면

가. 환경친화형 유용한 미생물의 산업적 이용

토양에서 분리한 균주를 환경친화형 미생물로 산업화할 수 있는 방안을 마련함으로써 염류제거용 화학약품 등 사용방법 보다 환경보전 효과가 크고 차후 그린라운드 대처 효과가 있다.

#### 나. 폐수처리 등에 활용

산업폐수의 질산오염은 수질오염 등으로 청색증 유발 등 인체에 해로움이 잘 알려져 있다. 본 연구에서 분리한 유용미생물은 폐수 중 질산이온 제거 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### 다. 시설재배 농산물의 계획생산 가능

시설재배지에서 시기에 맞춘 계획적인 농산물의 생산은 가격경쟁력을 높여 소득을 증대할 수 있다. 화훼농가 등 시설재배지에서 과잉염류에 의한 염류장애 등을 피하며 질소비료를 사용할 수 있다면 농산물의 생산계획조절이 가능하여 농산물의 가격경쟁력을 높일 수 있다.

### 제 3 절 산업화를 위한 검토 및 개선점

본 과제는 세부과제의 구성이 없이 2년간의 단독과제로 수행되었기 때문에 연구진이 최선을 다하여 노력하여 많은 성과를 얻었음에도 불구하고 아직도 결과에서 부족하고 부실한 부분이 여러 곳이 있다. 이러한 부족한 부분을 정리하여 향후 계속연구 계획수립에 도움이 되고자 한다.

본 연구과제를 통하여 얻어진 GG0461 균주는 참여기업인 (주)흙살림에 의해서 시작품으로 약 200 L가 2회에 걸쳐 배양되어 전국의 회원농가 무료로 보내져 시용되었다. 처리효과는 아직 수집중에 있으나 몇몇의 농가에서 좋은 결과를 얻어 실용화 가능성을 높이고 있다. 특히 절화용 원예농가에서는 양액 재배용 베드의 염류제거에 균주의 효과가 탁월하여 베드 수명을 연장할 수 있어서 시설비 절감을 통한 생산원가 감소가 기대된다는 반응이 있었으며, 오이를 재배하는 원예농가에서는 염류장애가 뚜렷이 감소함을 보고하였다. 이러한 몇가지 결과는 GG0461 균주의 염류제거 효과가 실제 농가에서도 가능함을 보인다.

그럼에도 불구하고 균주의 안전한 실용화를 위한 고려할 점을 적어보면,

- 1) 포장 적용실험의 부족 : GG0461 균주가 토양에서 유래하였고, 토양중에서 생존하는 것으로 확인되었으나, 토양에서의 생육실태가 좀 더 자세히 연구되어야 할 것이다. 특히, 토양 수분, 온도, pH, 토성, 유기물 등의 인자에 따른 생육특성이 밝혀져야 할 것이다.
- 2) 염류집적 시설재배지에서의 염류경감 효과 : 실제 염류장애가 나타나는 시설재배지에서 균주의 처리효과를 조사하여야 할 것이다. 균주의 처리가 염류경감에 기여하는 정도, 토성의 개량에

기여도, 작물의 생육증진 기여도, 균주의 토착화 및 밀도유지에 따른 지속적 효과 등 포장에서의 다양한 특성조사가 이루어져야 할 것이다.

- 3) 토양미생물의 짧은 생육사이클에 기인하는 질산염류의 재집적 가능성 : 이 내용은 본 과제 of 심사 및 결과발표 과정에서 여러 전문가에 의해서 지속적으로 지적되어 온 문제이다. 이것은 질산이온이 균주에 의해 흡수 제거된 후, 해당 균주의 사멸과 이에 따른 질산이온의 재공급과 연이은 토양의 염류 재집적 및 염류장애의 재발생을 우려하는 내용인 것이다. 균주에 의한 질산이온의 흡수 및 동화는 아미노산 등의 유기물 합성으로 나타나 해당 균주가 사멸하더라도 생물체에 의한 신속한 소비가 이루어져 질산이온으로의 토양에 재공급되는 양은 작을 것으로 본 연구진은 생각하지만, 이러한 염류는 미생물의 생태학적 장기간 연구로 답을 얻을 수 있을 것이다.
- 4) 균주 대량생산의 경제성 : PAF 배지를 모방하여 산업용 재료를 사용한 대량배양용 배지를 개발하였으나 농가에 저렴한 공급을 위해서는 아직도 배지의 가격을 낮출 필요가 있다. 이 문제의 핵심은 균주가 잘 성장할 수 있는 값싼 질소원을 구하는 데 있다. 대량배양용 배지에 사용하는 공업용 tryptone을 대체할 수 있는 질소원을 구하는 데 노력을 쏟아야 할 것이다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 결과의 활용

#### 1. 특허등록, 상품화 및 논문발표

##### 가. 특허등록

본 연구에서 분리한 GG0461 균주는 균주특허 등록을 완료하였다.

출원일자: 2006년 12월

등록일자: 2008년 2월

출원인 : 김영기, 이태근(참여기업 대표이사)

출원번호: 2006-0118739

등록번호: 10-0806926

특허명: 토양으로부터 분리한 엔테로박터 암니지너스 GG0461

##### 나. 상품화

GG0461 균주를 이용한 미생물비료 허가를 취득한 상태이며, 현재 시작품을 제

조하여 약 3개월간의 경시변화를 조사하였고, 6개월간의 경시변화를 조사한 후, 충북대 실험포와 (주)흙살림 실험포에서 효능증진을 위한 보완실험을 수행한 다음, 개선점을 보완하여 농가에 시범보급할 예정이다.

다. 논문발표 및 준비중 논문

1) 논문발표

제 목 : 혐기성 pH에서 *Enterobacter amnigenus* GG0461의 질산이온 흡수증가

저 자 : 최태근, 김성태, 한민우, 김영기

학술지: 한국응용생명화학회지 51권 1-5 (2008. 3.)

2) 준비중인 논문

제 목 : Nitrate uptake mediated by soil microorganism, *Enterobacter amnigenus* GG0461

학술지 : 논문작성은 완료하였고 국제학술지(SCI)에 투고 예정임

3) 준비중인 논문

제 목 : Chlorate에 의한 *Enterobacter amnigenus* GG0461의 질산흡수 저해효과

학술지 : 논문작성 중이며, 응용생명화학회지에 투고 예정임.

## 제 2 절 미생물 균주의 활용계획

### 1. 농용폐수 및 음용수의 질산이온 제거에 이용

본 연구를 위하여 분리한 유용균주 4종중 하나는 *Bacillus cereus*로 식중독을 유발할 수 있는 세균으로 판명되었으나, 이 균주를 제외한 3종은 산업적 이용에 문제가 없는 것으로 확인되었다. 따라서, 3종의 균주는 생육특성이 밝혀지는 대로 간이 상수원이거나 우물 등 지하수에 처리하여 청색증 등의 원인이 되는 질산이온의 제거에 이용하려고 한다. 또한 가축분뇨와 같이 질산이온이 과다하게 함유된 농용폐수의 정화용으로도 이용이 가능할 것으로 생각된다. 참여기업 (주)흙살림에서는 돼지의 가축분뇨에 GG0461 균주를 이용하여 암모니아의 발생을 현저히 감소시킬 수 있음을 보였다 (본 연구과제의 내용이 아니므로 자료를 제시하지 않았음). 만약, 가축분뇨에 처리시 GG0461 균주의 특성을 체계적으로 밝힌다면 좋은 결과를 기대할 수 있을 것이다.

### 2. 산업폐수와 하천 정화에 이용

공장 등 산업폐수에 질산이온의 정화는 비용이 많이 소요되는 고가의 처리방법으로 본 연구과정에 분리한 질산흡수균을 사용할 수 있도록 방버을 연구할 예정이다. 또한 자연하천의 질산이온 함량도 본 균주를 사용하여 감소시킬 수 있을 것이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음.

## 제 7 장 참고문헌

농업과학기술원. (1997) 토양의 적정미생물상. 연구보고서.

농업과학기술원. (2004a) 작물의 생리장애 발생원인과 대책. 연구보고서.

농업과학기술원. (2004b) 환경농업보고서(지도과제: 시설재배지 토양의 염농도 증가요인과 양분관리기술).

Ayers, A. D. and H. E. Hayward. (1984) A method for measuring the effects of soil salinity on seed germination with observations on several crop plant. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **48**, 224-226.

Cho, K. H., Lee, G. J., Ahn, H. J. and Kim, Y. K. (2005) Nitrate uptakes by microorganism isolated from the soils of greenhouse. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**, 11-15.

Chung, W. T., Choi, K. C., Youn, C., Song, C. E. and Chun, W. B. (1997) Effects of nitrogen fertilization on nitrate accumulation in Italian rygrass. *J. Korean Grassl. Sci.* **17**, 135-140.

De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomone, S., Gambale, F. and Varvier-Brygoo, H. (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 877-878.

- Dunkle, E. C. and F. G. Merkle. (1983) The conductivity of soil extracts in reaction to germination and growth of certain plants. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* **8**, 185–158
- Eaton, F. M., Olmstea, W. R. and Taylor, O. C. (1971) Salt injury to plants with special reference to cations versus anions and ion activities. *Plant and Soil* **34**, 533–547.
- European Commission. (1997) Council regulation 194/97 of 31 January 1997. *Official J. Eur. Commu.* **L31**, 48–50.
- Flowers, T. J. and Yeo, A. R. (1995) Breeding for salinity resistance in crop plants: where next? *Aust. J. Plant Physiol.* **22**, 875–884.
- Gamble, R. N., Betlach, M. R. and Tiedje, J. M. (1997) Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 926–939.
- Ha, H. S., Lee, Y. B., Sohn, B. K. and U. G. Kang. (1997) Characteristics of soil electrical conductivity in ;oastic film house located in southern part of korea. *J. Korean Soc. soil Sci. Fert.* **30**(4):345–350.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K. and Bohnert, H. J. (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 463–499.
- Hong, S. D. (1998) Fertilizer recommendation based on soil testing for tomato in plastic film house. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **31**, 350–358.
- Hong, S. D., Kang, B. G. and Kim, J. J. (1998) Optimum fertilization based on soil testing for chinese cabbage cultivation in plastic film houses. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **31**, 16–24.

- Hwang, S. H., Lee, Y. H. and Cho, M. H. (1999) Isolation and characteristics of denitrifying *Pseudomonas* CW4. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 616–620.
- Jin, S. J., Jo, H. J. and Jeong, J. B. (2004) Effect of soil salinity on nitrate accumulation of lettuce. *J. Korean Soc. soil Sci. Fert.* **37**, 91–96.
- Jung, G. B., Ryu, I. S. and Kim, B. Y. (1994) Soil texture, electrical conductivity and chemical components of soils under the plastic film house cultivation in northern central areas of Korea. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **27**, 33–40.
- Jung, Y. S., Cho, S. H., Yang, J. E., Kim, J. J. and Lim, H. S. (2000) Available phosphorus and electrical conductivity of the saturated extracts of soils from the plastic film houses. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **33**, 1–7.
- Jung, Y. S. and Yoo, S. H. (1975) Effect of watering on eluviation of soluble salts in the vinyl house soils. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **8**, 53–60.
- Kang, B. G., I. M. Jeong, K. B. Min, and J. J. Kim. (1996) Effect of salt accumulation on the germination and growth of lettuce (*Lactuca sativa*, L.). *Korean J. Soil Sci. Fert.* **29**, 360–364.
- Kang, S. S. and Hong, S. D. (2004) Estimation of optimum application rate of nitrogen fertilizer based on soil nitrate concentration for tomato cultivation in plastic film house. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **37**, 74–82.
- Kim, J. G., Lee, C. H., Lee, H. S., Jo, J. G. and Lee, Y. H. (1996) Subsoil inverting depth and fertilizer needs in salt accumulated soils of plastic film house. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **38**, 370–375.
- Kim, T.-H. (2000) Nitrate metabolism affected by osmotic stress and nitrate supply level

in relation to osmoregulation. *J. Kor. Grassl. Sci.* **20**, 77–84.

Kwak, H. K., Song, Y. S. and Hong, C. W. (1997) Nitrogen recommendation based on soil nitrate test for chinese cabbage grown in plastic film house. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **30**, 84–88.

Kwon, J. S., Suh, J. S., Weon, H. Y. and Shin, J. S. (1998) Evaluation of soil microflora in salt accumulated soils of plastic film house. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **31**, 204–210.

Kwon, J. S., Suh, J. S. and Weon, H. Y. (1998) Effects of salt-induced stress on the fluctuation and rizosphere colonization of soil microorganims. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **31**, 291–300.

Lim, T. J., Hong, S. D., Kim, S. H. and Park, J. M. (2007) Recommendation of nitrogen fertilization for cucumber from relationship between soil nitrate nitrogen and yield. *Kor. J. Environ. Agric.* **260**, 223–227.

Logan, B. E., Zhang, H., Mulvaney, P., Milner, M. G., Head, I. M. and Unz, R. F. (2001) Kinetics of perchlorate- and chlorate-respiring bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2499–2506.

Lee, C. S., Park, Y. H., Lee, J. Y. and Lee, S. K. (1996) Studies on recommendation of N fertilizer rates for vegetable crops in vinyl house soil. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **38**, 402–409.

Lee, G. J. (2008) Nitrate accumulation in soils and groundwater and fertilizer management for lettuce in plastic film houses. Ph.D. Thesis, Chungbuk National University, Chunbuk, Cheongju.

Lee, S. E., Park, J. K., Yoon, J. H. and Kim, M. S. (1987) Studies on the chemical



properties of soils under the vinyl-house cultivation. *Res. Rept. RDA* **29**, 166–171.

Ministry of Agriculture and Forestry (2006) Statistics of Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Goachon, Korea.

Park, H. T. and Hong, S. D. (2000) Optimum level of nitrogen fertilizer based on content of nitrate nitrogen for growing chinese cabbage in green house. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **33**, 84–392.

Pinar, G., Duque, E., Haidour, A., Oliva, J. –M., Sanchez–Barbero, L., Calvo, V. and Ramos, J. L. (1997) Removal of high concentrations of nitrate from industrial wastewaters by bacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2071–2073.

Richard, Y. R. (1989) Operating experiences of full-scale biological and ion-exchange denitrification plants in France. *Water Environ. J.* **3**, 154–167.

Sakamoto, T., Inoue–Sakamoto, K. and Bryant, D. A. (1999) A novel nitrate–nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* **181**, 7363–7372.

Stauber, J. L. (1998) Toxicity of chlorate to marine microalgae. *Aquatic Toxicol.* **41**, 213–227.

Steenhoudt, O., Ping, Z., Broek, A. V. and Vanderleyden, J. (2001) A spontaneous chlorate-resistant mutant of *Azospirillum brasilense* Sp245 displays defects in nitrate reduction and plant root colonization. *Biol. Fertil. Soils* **33**, 317–322.

Tsay, T. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A. and Crawford, N. M. (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705–713.

Unkles, S. E., Hawker, K. L., Grieve, C., Campbell, E. I., Montague, P. and Kinghorn, J. R. (1991) *crnA* encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 204–208.

Vilchez, C., Garbayo, I., Markvicheva, E., Galvan, F. and Leon, R. (2001) Studies on the suitability of alginate–entrapped *Chlamydomonas reinhardtii* cells for sustaining nitrate consumption process. *Bioresour. Technol.* **78**, 55–61.

Zhu, J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 247–273.