

토양미생물 *Bacillus* sp. GS2에 의한 질산이온 흡수

왕희성 · 윤영배 · 김영기*

충북대학교 농업생명환경대학 환경생명화학과

Nitrate Uptake by Soil Microorganism, *Bacillus* sp. GS2

Hee-Sung Wang, Young-Bae Yoon, and Young-Kee Kim*

Department of Environmental & Biological Chemistry, Chungbuk National University,
Cheongju, Chungbuk 361-763, Republic of Korea

Received February 15, 2011; Accepted May 18, 2011

Over-application of nitrogen fertilizer keeps increasing the salinity in the soils of greenhouse in domestic agriculture. In order to remove the excess amounts of soil nitrate, soil microorganisms which have high capacity of nitrate uptake were isolated from the upland soils and their nitrate uptake activities were measured. Strain GS2 was able to remove 50 mM nitrate within 12 h. After sequence comparison analysis of 16S rRNA gene, the strain was identified and named as *Bacillus* sp. GS2. When the growth and nitrate uptake activities were measured, maximal values were obtained at 30-40°C and 37°C, respectively; however, both were optimal at pH 6-8. In the media containing 50 mM nitrate, *Bacillus* sp. GS2 removed 43 mM nitrate which is corresponding to 86% removal. Similar amounts of nitrate removal were observed at the nitrate concentrations up to 300 mM, showing a saturation in nitrate uptake at concentrations above 50 mM. These results imply that *Bacillus* sp. GS2 can be a good candidate for the microbial remediation of accumulated environmental nitrate because of its excellent growth and nitrate uptake activity.

Key words: nitrate removal, rRNA gene, salt effect, soil salinity

서 론

질산이온은 주된 질소비료 성분으로서 식물의 성장과 분화를 위한 기본영양소[Crawford, 1995]이며, 식물체의 생산증대를 위하여 가장 많이 필요한 성분이다. 질산염류는 채소나 곡류의 생육을 위한 주요 성분이지만 토양 중 과량이 축적될 경우에는 오히려 작물의 성장을 억제하며, 이것은 염류장애라는 현상으로 잘 알려져 있다[Kang과 Hong, 2004]. 염류장애는 토양 중 염류의 농축에 의해 나타나는 현상으로 건조지역이나 간척지 등에서 주로 소금성분에 의해 나타나 작물생육에 큰 피해를 주고 있다[Karlidag 등, 2009]. 최대시비량 이하의 범위에서 질소비료는 시용량과 비례적으로 염면적을 증가시켜 생산 효율이 높아진다는 것이 밝혀져 있다[Khalghani 등, 1997]. 국내에서는 생산량 증대를 목적으로 질소질 비료의 과다 시비가 이루어지고 있으며, 이에 따른 결과로 염류장애 현상이 빈발하고 있다. 특히 시설원예농업에서는 강수의 차단으로 염류의 용탈이 억제

되기 때문에 염류장애가 심각하게 나타나고 있으며 매년 전국적으로 큰 피해를 주고 있다.

토양중 질산이온의 축적은 인축에도 피해를 주는 것으로 알려져 있다. 과다 축적된 질산이온은 식물체의 뿌리조직에서 다량 흡수되며[Chung 등, 1997], 이것은 식물체내에 질산이온의 함량을 증가시킨다[Jin 등, 2004]. 질산이온은 독성이 낮으나 장기간 섭취시 인체에 발암물질을 지속적으로 생성하여 암을 유발할 수 있고[Onyesom과 Okoh, 2006], 사람의 경우에 질산이온의 섭취는 대장암을 유발할 수 있음이 보고되었다[McKnight 등, 1999]. 또한 토양중 질산이온은 지하수의 오염을 초래하여 신생아에게는 청색증을 일으켜 건강을 위협할 수도 있다[Skipton과 Hay, 1998].

작물의 품질 및 생산성을 우수하게 유지하기 위해서는 토양이나 환경 중 집적한 과량의 질산이온 제거가 필수적이다. 오염된 토양이나 환경에서 질산이온의 제거는 다양한 생물학적, 화학적, 물리적 방법에 의해 이루어질 수 있다. 시설원예농업에서는 강수에 의한 염류의 용탈이 불가능하나, 관수에 의한 용탈을 유도하는 경우에는 지하수의 오염을 동반할 수 있다[McIsaac, 2003]. 시설을 이용한 작물재배에서 이러한 문제점을 극복하기 위하여 미생물이나 식물체를 이용한 생물학적 정화(bioremediation) 방법이 최근 성공적으로 이용되고 있다. 미생

*Corresponding author
Phone: +82-43-261-2560; Fax: +82-43-271-5921
E-mail: ykkim10@cbnu.ac.kr

물을 이용한 생물학적 정화방법은 특히 폐수처리에서 효과적임을 확인하였고[Vilchez 등, 2001; Wang 등, 2010], 시설재배지 토양 중 집적한 질산이온의 제거에도 효과가 있음을 보고하였다. 이러한 미생물들은 질산이온을 질소원이나 전자수용체 또는 환원력으로 이용함이 밝혀졌다[Steenhoudt 등, 2001].

본 연구에서는 작물의 생육환경을 개선하고 시설원에 토양에 집적한 질산이온을 제거하기 위하여 토양에 서식하는 미생물을 분리하고 이들 중 질산흡수 능력이 탁월한 토양미생물을 분리하였고, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 이들을 질산이온이 집적한 시설재배지 토양에 적용한다면 질산이온의 정화에 효과적인 방안이 될 수 있을 것이기에 분리한 미생물들의 질산이온 흡수 특성을 다양한 조건에서 조사하였다.

재료 및 방법

토양분석. 토양시료는 충북대학교 실험 농장의 밭토양으로부터 수집하였다. 토양의 화학적 특성은 한국 국립농업과학원에서 개발한 방법들을 이용하여 측정하였다. 간단하게, 토양의 pH와 전기전도도(EC) 측정은 증류수를 이용하여 토양을 5배 희석한 추출물을 사용하였으며, 각각 pH 측정기(Thermo Orion, US/EA920)와 전기전도도 측정기를 사용하였다.

토양미생물의 분리 및 배양. 토양 시료 1g을 5 mL의 증류수로 추출하여 1,200 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 상정액을 희석하여 *Pseudomonas agar F* (PAF 배지; 10 g tryptone, 10 g peptone, 1.5 g K₂HPO₄, 1.5 g MgSO₄, 10 mL glycerin/1 L 증류수) 배지에 도말하여 배양하였다. 질산이온을 흡수하는 미생물을 분리하기 위하여 배지에 50 mM KNO₃를 첨가하고, 37°C에서 12시간 배양하였다. 단일세균의 콜로니들은 색깔, 모양, 크기에 따라 선택하고 식별하였다. 분리한 미생물 균주는 다양한 농도의 질산이온을 포함하는 PAF 배지에서 37°C에 12시간동안 150 rpm의 교반상태로 배양하였다. 세포의 밀도는 분광광도계(U-2000, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 관측하였다.

GS2 균주의 동정. GS2 균주는 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석으로 동정하였다. 유전자 DNA는 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co., Madison, WI)를 사용하여 미생물 배양체에서 순수분리하였다. 유전자 증폭은 보편적인 primer인 27F와 1492R을 이용하여 이루어졌으며, PCR 산물들은 Wizard SV Gel과 PCR clean-up 시스템(Promega Co.)에 의해 정제되었고, 염기서열은 ABI PRISM 3700 DNA 분석기에서 결정되었다. 다른 균주와의 염기서열 상동성은 BLASTn (NCBI, Bethesda, MD) 프로그램을 이용하여 결정하였다. 계통수(Phylogenetic tree) 분석은 neighbor-joining 방법에 따라 만들어졌으며, 진화적 거리는 ClustalX 프로그램을 사용하여 계산하였다.

전자 현미경 사진. 분리한 균주는 인산염 완충용액으로 원심분리하여 두 번 씻은 후, 0.1 M 인산완충용액에 녹아 있는 2.5% glutaraldehyde에 실온에서 3시간동안 고정시켰다. 고정 후 시료를 세척하고 1%의 OsO₄를 함유한 인산완충용액에 30분간

후고정을 하였다. 고정한 균주는 ethanol을 30-100%까지 차례로 농도를 높인 용액으로 처리하여 탈수시킨 후, isoamyl acetate에 60분간 배양하였다. 고정한 세포는 금박한 후 주사전자현미경(Carl-Zeiss LEO-1530FE)으로 관측하였다.

질산이온 흡수측정. 질산이온 흡수는 균주를 배양하며 배지에 남아있는 질산이온의 양을 분석하여 측정하였다. 질산이온의 농도는 질산이온전극과 표준전극(double junction reference electrode)을 이용한 이온분석기(Ion Selective Analyzer, Orion 960 ISE meter)를 사용하여 측정하였다[Kang과 Hong, 2004; Kim 등, 2009]. 표준용액과 토양추출시료는 50:1 (v/v)의 비율로 이온강도조정용액(ISE)을 섞어주었다. 전극은 사용하기 전에 50 ppm의 질산이온표준용액에 2시간 동안 안정화시켰다. 분석 전에 5 ppm과 50 ppm의 질산이온표준용액을 사용하여 보정을 하였다.

결과 및 고찰

토양미생물의 분리 동정 및 질산이온 흡수 특성. 환경 중 과다 집적한 질산이온의 제거를 목적으로 밭토양에서 9가지 미생물을 콜로니의 색과 모양의 차이에 따라 분리하였다. 토양시료는 충북대학교 개신캠퍼스 실험농장의 밭토양에서 채취하였으며, 토양시료의 물리화학적 특성은 pH 6.8, 유기물함량은 0.5%, 인산함량은 79.5 mg kg⁻¹, EC 1.33 dS m⁻¹, 암모니아태와 질산태 질소의 함량은 각각 22.3과 37 mg kg⁻¹이었다. 이 균주들은 질산이온을 포함한 배지에서 증식하였고, 질산이온 흡수능력을 측정하였다(Fig. 1). 분리한 균주들 중 GS1과 GS2, GS9는 우수한 질산이온 흡수력을 보였으며, 특히 GS9는 탁월한 성장력과 질산이온 흡수력을 보였다. GS4와 GS5 균주는 중간 정도의 질산이온 흡수를 보였으나, 나머지 균주들은 매우 약한 흡수를 보였다. 시간 경과에 따른 질산이온 흡수는 각 균주의 성장과 매우 밀접한 관련을 보였다. 성장곡선에서 가장 빠르게 성장한 GS9 균주는 질산흡수에서도 가장 빠르고 높은 활성을 보였다. 전반적으로 높은 성장을 보이는 균주들의 질산이온 흡수능력도 크게 나타났다.

분리한 균주들 중 질산이온 흡수능력이 큰 균주 3가지를 선택하여 16S rRNA 유전자의 염기서열을 유전자 증폭방법을 통하여 분석하였다. 분리한 균주 중 질산이온 흡수능력이 가장 우수하였던 GS9 균주는 *Bacillus cereus*와 염기서열 상동성이 100%로 밝혀져 식중독을 유발할 수 있는 병원성 균주임을 확인하였다. 따라서, 다음으로 질산이온 흡수능이 큰 GS2 균주의 염기서열을 분석하였고 유전자은행에 등록하였다(Genebank Accession No. GQ386842). GS2 균주의 염기서열은 BLASTn 프로그램을 사용하여 분석하였고, phylogenetic tree 분석을 통하여 *Bacillus* 속에 속하는 균주임을 확인하였으나, 상동성이 98% 이상 높은 균주를 발견할 수 없어 기존에 보고된 유전자은행의 균주들과는 다른 rRNA 유전자를 가진 균주임을 확인하였다(Fig. 2). 따라서 이 균주를 *Bacillus* sp. GS2로 명명하고 질산흡수 특성을 조사하였다. 균주의 전자현미경 사진은 Fig. 2A에 보였으며, 균주의 크기는 0.7×1.5 μm로 나타났다.

***Bacillus* sp. GS2의 질산이온 흡수특성.** 질산이온 첨가에 따

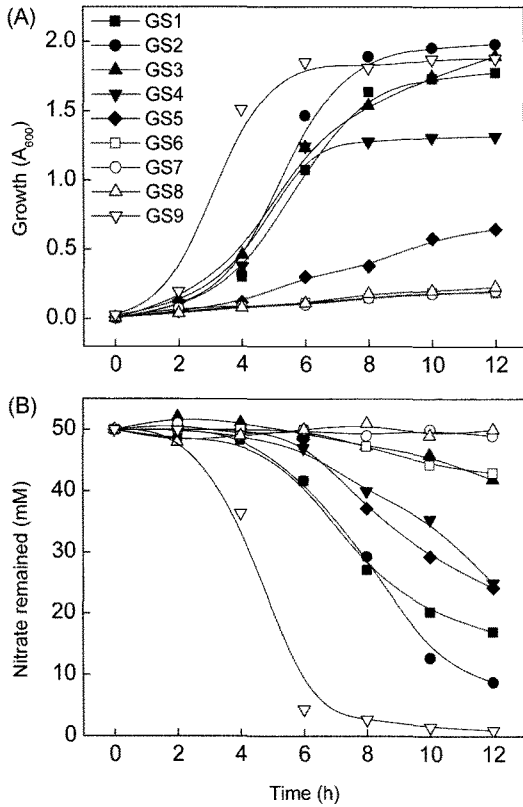


Fig. 1. Growth curves and nitrate uptakes of the isolated soil microorganisms. (A) Growth curves of the isolated microorganisms. The inoculated broths were agitated at 150 rpm and incubated for 12 h at 37°C. (B) Microbial nitrate uptakes in a broth containing 50 mM KNO₃. The amounts of nitrate remaining in the media were analyzed.

른 *Bacillus* sp. GS2 균주의 성장 촉진 여부를 확인하였다(Fig. 3). 균주는 접종 후 약 2시간부터 대수기 성장을 시작하여 6시간 동안 증식하였다. 대수기 성장은 질산이온의 존재시에 더욱 촉진되었다. 균주를 접종한 후, 8시간 지난 늦은 대수기에 대조구와 질산첨가 배지에서 흡광도를 측정하였을 때, 각각 1.65±0.05와 1.87±0.05으로 흡광도의 증가를 보였다. 이것을 생균수로 측정하였을 때, 대조구의 6.37×10⁶ cfu/mL에서 질산첨가 배지의 1.36×10⁷ cfu/mL로 균체가 약 2.13배 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 질산이온에 의한 균주의 성장촉진 효과를 나타내는 것이다.

동일한 조건에서 *Bacillus* sp. GS2 균주를 배양한 질산이온 첨가배지에서 질산이온의 잔여량을 정량분석하여 조사한 질산이온의 흡수는 배양 후 2시간 정도부터 증가하여 6-8시간에 최대 흡수를 보였고, 12시간이 경과하였을 때 약 80% 이상이 흡수되었다. 시간에 따른 균주생장과 질산이온의 감소 곡선 간에는 서로 대칭관계를 보여 질산이온 흡수와 균주의 성장 사이에 매우 밀접한 관련이 있음을 확인하였다. 그럼에도 불구하고 GS2 균주는 질산이온을 첨가하지 않은 배지에서도 우수한 성장을 보여 다른 질소원을 포함하는 배지에서 질산이온이 성장에 반드시 필요한 필수요소는 아님을 확인하였다. 질산이온은 혐기적 조건에서 전자수용체로 이용될 수 있으나[Denis 등, 1990], GS2 균주는 진탕배양을 통한 호기적 조건에서 배양되었기 때

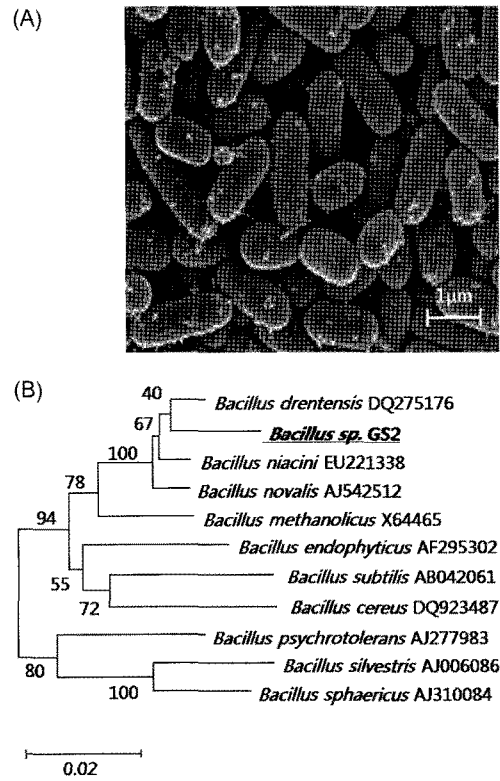


Fig. 2. Identification of *Bacillus* sp. GS2. (A) Electron micrograph of *Bacillus* sp. GS2. (B) The inferred phylogenetic relationships between GS2 and 10 validly described species.

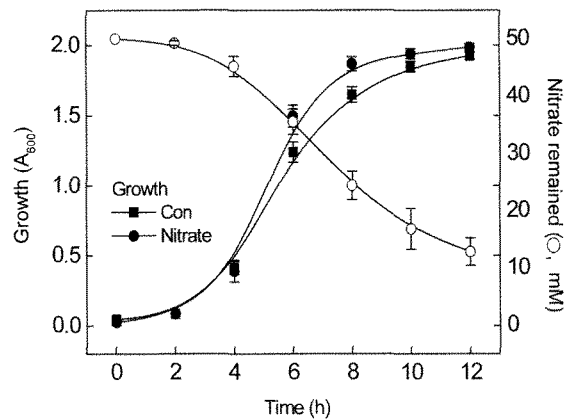


Fig. 3. Time courses of growth and nitrate uptake. Growth was measured in the absence (Con) or presence (Nitrate) of 50 mM KNO₃.

문에 배지에 가한 질산이온이 영양성분이나 생육을 위한 촉진 인자로 이용되었을 가능성이 크다.

생육조건에 따른 질산이온 흡수특성. *Bacillus* sp. GS2 균주의 생육을 위한 최적 온도와 pH, 질산이온 흡수를 위한 최적 조건을 확인하기 위하여 배양온도를 달리하며 균주의 성장과 질산이온 흡수를 측정하였다(Fig. 4). 균주를 각 온도조건에서 12시간 배양한 후, 흡광도를 측정하였을 때, 30-40°C 범위에서 최대 성장을 보였다. 25°C에서의 성장은 생균수로 측정하였을 때, 최적 성장의 약 20%를 보였다. 그러나 같은 배양조건에서 질산이온의 흡수는 37°C에서 최대치 86.9±0.8%를 보여 약

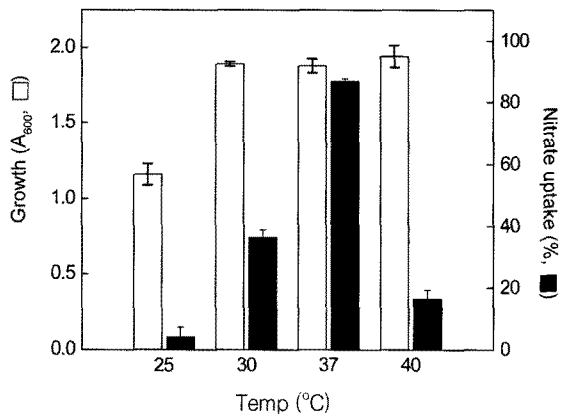


Fig. 4. Effects of temperature on the growth and nitrate uptake. Bacterial growth and nitrate uptake were measured after 12 h incubation at the indicated temperature.

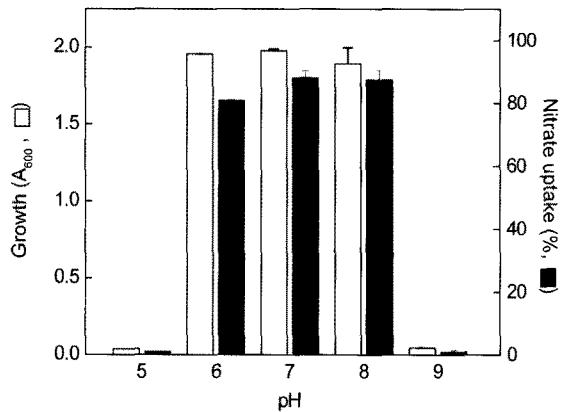


Fig. 5. Effects of pH on the growth and nitrate uptake. Bacterial growth and nitrate uptake were measured after 12 h incubation at the indicated pH.

90%의 질산이온이 흡수되었다. 30°C에서의 질산이온 흡수는 약 36.4±2.4%로 감소하여, 이 온도에서 최대 성장을 보였음에도 불구하고 질산이온 흡수력은 크지 않았다. 이것은 균주의 생육에 기여하는 질산이온의 효과가 크지는 않음을 의미하는 것이다. 25°C에서 질산이온의 흡수는 약 4.2%로 감소하였다. 40°C에서 균주의 성장은 최대치를 보였음에도 불구하고 질산이온의 흡수는 급격히 감소하여 약 16.6%의 흡수가 관측되었다. 이것은 30°C에서와 마찬가지로 질산이온 흡수가 균주 성장을 촉진하나 효과는 크지 않음을 보여준다.

Bacillus sp. GS2 균주의 최적 성장온도나 질산이온 흡수능이 30°C 이상에서 관측된 것은 이 균주가 토양중에서 서식하는 토양미생물임에도 불구하고 최적생육 온도가 높음을 나타낸다. 이러한 결과는 최적온도 이하에서 질산이온에 대한 친화력이 급격하게 감소하여 세균의 질산이온 흡수가 저하된다는 보고와 일치하며 [Reay 등, 1999], 질산이온이 균주 성장에 필수적이기 보다는 성장을 위한 영양분으로 이용됨을 의미한다.

pH 변화에 따른 균주 성장과 질산이온 흡수 특성은 pH 5-9의 범위에서 측정하였다(Fig. 5). 균주의 최적 성장온도와 질산흡수 능력은 모두 pH 6-8 범위에서 고르게 높게 나타났으며, 이 보다 높거나 낮은 pH 조건에서는 성장과 질산이온 흡수능 모

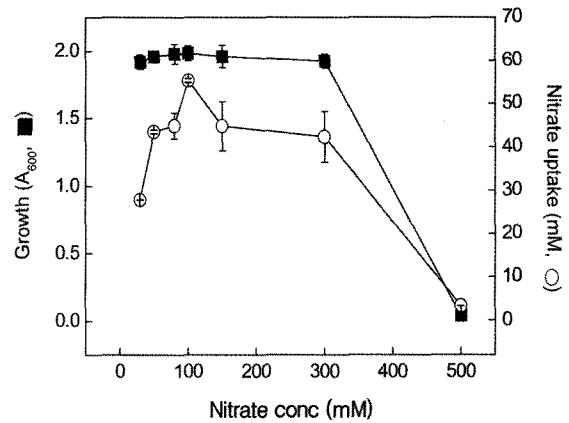


Fig. 6. Effects of nitrate concentration on the growth and nitrate uptake. *Bacillus* sp. GS2 was cultured for 12 h at 37°C in the broth containing the indicated concentration of KNO₃.

두 거의 완전히 저해되었다. 이것은 *Bacillus* sp. GS2 균주가 pH 6-8의 중성부근 생육조건에서 질산흡수균으로 이용될 수 있는 가능성을 나타낸다.

질산이온 농도에 따른 성장 및 흡수특성. 질산이온의 농도를 500 mM까지 높이며 *Bacillus* sp. GS2 균주의 성장과 질산이온 흡수능력을 측정하였다(Fig. 6). 배지의 질산이온 농도가 300 mM까지 증가하였을 때, 이 균주의 균체 성장에 따른 흡광도는 약 2.0으로 측정되었다. 이것은 높은 농도의 질산이온 존재시에도 균주의 균체 성장 활성이 매우 우수함을 나타낸다. 그러나, 500 mM에서는 성장이 완전히 저해되어 흡광도 증가를 보이지 않았다(Fig. 6, ■). 동일한 조건에서 질산이온의 흡수를 측정하였을 때, 300 mM까지는 높은 흡수율을 보여 40 mM 이상의 농도를 감소시켰으며, 이러한 흡수량은 50 mM에서 최대 300 mM의 농도범위에서 얻어졌다. 이것은 이 균주가 배지의 질산이온 농도와 무관하게 일정한 양의 질산이온을 흡수할 수 있다는 것을 보여준다(Fig. 6, ○). 이러한 결과는 *Bacillus* sp. GS2 균주에 의한 질산이온 흡수가 외부농도의 증가에도 일정한 수준으로 유지되어, 50 mM 이상의 농도에서 포화현상을 보이는 것이다. 즉, 세포막의 질산이온 수송체나 세포내 질산이온 환원효소 등의 효소활성이 질산이온 농도의 증가에 따라 포화됨을 의미하며, 이것을 밝혀내기 위해서는 분자기작에 대한 접근이 필요할 것이다.

이상의 결과를 요약하면, *Bacillus* sp. GS2는 우수한 질산이온 흡수능을 가진 토양미생물로 질산이온 존재시 생육이 촉진되며, pH 6-8의 범위에서 질산이온 흡수능이 우수한 균주이다. 이러한 특성은 포장적용실험을 통하여 확인되어야 할 것이다. 본 연구실에서 기존에 질산이온 흡수 특성을 보고한 균주 *Enterobacter amnigenus* GG0461은 그람 음성균으로서 질산이온의 흡수력은 우수하였으나 환경에서 지속적인 활력유지에 어려움이 있었다 [Kim 등, 2009]. 그러나, 생존력이 상대적으로 우수한 *Bacillus* sp. GS2 균주는 오염된 환경중 질산이온 제거에 유용할 것으로 여겨진다. 다만, 이 균주의 질산흡수를 위한 최적 온도는 30-37°C로 높으나 외부 온도의 증가에 따라 유리온실 등의 시설내 온도가 쉽게 고온에 이른다라는 점을 고려하면

토양표층에서 질산이온 제거역할에는 긍정적인 효과가 있을 것으로 판단된다. 질산이온의 과다에 의한 문제점을 근본적으로 제거하기 위해서는 질소비료의 사용량을 적정화하고, 질소고정 세균의 이용과 같은 생분비료 사용이나 *Bacillus* sp. GS2 균주와 같은 질산이온 제거능이 우수한 균주의 사용을 권장할 수 있을 것이다. 이러한 농법으로 질소비료의 사용량을 경감할 수 있음은 이미 실험적으로 확인되어 보고되었다[Eid 등, 2006; Hassen 등, 2007; Shanan과 Higazy, 2009].

초 록

국내 시설농업에서 질소비료의 과다사용은 토양에 염류집적을 유발하고 있다. 토양중 축적된 질산이온을 제거하기 위하여 질산이온 흡수능이 뛰어난 토양미생물을 발토양으로부터 분리하고, 질산이온 흡수 특성을 조사하였다. 분리한 GS2 균주는 50 mM 농도의 질산이온을 12시간 이내에 제거하였다. 이 균주는 16S rRNA 유전자의 염기서열을 분석하여 *Bacillus* sp. GS2로 분리동정하였다. 이 균주의 성장과 질산이온 흡수의 특성을 조사하였을 때, 각각 30-40°C와 37°C에서 최대치를 보였으며, 두 가지 모두 pH 6-8 범위가 최적의 조건임을 확인하였다. *Bacillus* sp. GS2 균주는 50 mM 질산이온을 포함하는 배지에서 배양하였을 때, 43 mM의 농도를 감소시켜 약 86%의 질산이온 흡수를 보였으며, 300 mM 까지의 농도범위에서 유사한 질산이온 제거 능력을 보여, 질산이온 흡수활성이 50 mM 이상에서 포화됨을 확인하였다. 이러한 결과는 *Bacillus* sp. GS2 균주의 우수한 균주성장과 질산이온 흡수능을 보여주는 것으로, 이 균주는 환경중 질산이온 제거에 유용한 균주로 이용될 수 있을 것이다.

Key words: 질산이온 제거, rRNA 유전자, 염류효과, 토양 염류

감사의 글

이 논문은 2009년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참고문헌

Chung WT, Choi KC, Youn C, Song CE, and Chun WB (1997) Effects of nitrogen fertilization on nitrate accumulation in Italian ryegrass. *J Kor Grassl Sci* **17**, 135-140.
 Crawford NM (1995) Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859-868.
 Denis KS, Dias FM, and Rowe JJ (1990) Oxygen regulation of nitrate transport by diversion of electron flow in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **265**, 18095-18097.

Eid RA, Abo-Sedera SA, and Attia M (2006) Influence of nitrogen fixing bacteria incorporation with organic, and/or inorganic nitrogen fertilizers on growth, flower yield and chemical composition of *Celosia argentea*. *World J Agric Sci* **2**, 450-458.
 Hassen AA, Xu J, and Yang J (2007) Growth conditions of associative nitrogen-fixing bacteria *Enterobacter cloace* in rice plants. *Agric J* **2**, 672-675.
 Jin SJ, Jo HJ, and Bae JJ (2004) Effect of soil salinity on nitrate accumulation of lettuce. *Kor J Soil Sci Fert* **37**, 91-96.
 Kang SS and Hong SD (2004) Estimation of optimum application rate of nitrogen fertilizer based on soil nitrate concentration for tomato cultivation in plastic film house. *Kor J Soil Sci Fert* **37**, 74-82.
 Karlidag H, Yildirim E, and Turan M (2009) Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Sci Agric* **66**, 180-187.
 Khalghani J, Khoei FR, Moghaddam M, and Mashadi HR (1997) Growth analysis of potato under different levels of nitrogen and plant density. *Agron Sci J* **7**, 58.
 Kim ST, Choi TG, Wang HS, and Kim YK (2009) Nitrate removal mediated by soil microorganism, *Enterobacter* sp. GG0461. *J Gen Appl Microbiol* **55**, 75-79.
 McIsaac G (2003) Surface water: Pollution by nitrogen fertilizers. In *Encyclopedia of Water Science* (2nd ed.), pp. 950-955, University of Illinois, Urbana, IL.
 McKnight GM, Duncan CW, Leifert C, and Golden MH (1999) Dietary nitrate in man: Friend or foe. *Br J Nutr* **81**, 349-358.
 Onyesom I and Okoh PN (2006) Quantitative analysis of nitrate and nitrite in vegetables commonly consumed in Delta State, Nigeria. *Br J Nutr* **96**, 902-905.
 Reay DS, Nedwell DB, Priddle J, and Ellis-Evans JC (1999) Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: Reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2577-2584.
 Shanan NT and Higazy AM (2009) Integrated biofertilization management and cyanobacteria application to improve growth and flower quality of *Matthiola incana*. *Res J Agr Biol Sci* **5**, 1162-1168.
 Skipton S and Hay D (1998) In *Drinking Water: Nitrate and Methemoglobinemia ("Blue baby" Syndrome) Publication G98-1369*, University of Nebraska Cooperative Extension, Lincoln, NE, USA.
 Steenhoudt O, Ping Z, Broek AV, 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.
 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.
 Wang HS, Han MW, and Kim YK (2010) Chlorate-induced inhibition of nitrate uptake mediated by *Enterobacter amnigenus* GG0461. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **53**, 164-169.