

Characterization of Microbial Nitrate Uptake by *Bacillus* sp. PCE3

Yeong-Bae Yun · Soo-Jin Park · Min-Woo Han · Young-Kee Kim*

Bacillus sp. PCE3 균주에 의한 질산이온 흡수 특성

윤영배 · 박수진 · 한민우 · 김영기*

Received: 2 July 2013 / Accepted: 24 July 2013 / Published Online: 31 December 2013
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2013

Abstract Nitrate is one of the major nutrients in plants, and nitrate fertilizer often overused for the high yields of crops. Nitrate deposit in soil became one of the major reasons causing salt stress. Specially, salt stress is a serious problem in the soils of plastic film or glass houses. In this study, six microorganisms have been isolated from the wet soils near the disposals of livestock farms and their nitrate uptake activities were investigated. These bacteria were able to remove nitrate as high as 1,000–3,000 ppm (10–50 mM). The strain PCE3 showed the highest nitrate uptake activity and it removed more than 3,700 ppm. In order to identify these bacteria, genes of 16S rRNA were sequenced and analyzed. Phylogenetic trees were constructed with the neighbor-joining methods. Among these bacteria, strain PCE3 was identified as *Bacillus* species. When the growth and nitrate uptake activities were measured, both were maximal at 37°C and optimal pH was pH 7–9. *Bacillus* sp. PCE3 removed nitrate up to 40–60 mM (2,500–3,700 ppm) depending on the nitrate concentration in media. Therefore, *Bacillus* sp. PCE3 can be a good candidate for the microbial remediation of nitrate-deposited soils in glass and plastic film houses.

Keywords microbial remediation · nitrate uptake · salt stress · soil microorganism

서론

질소원으로 중요한 질산이온은 식물의 생육 초기부터 성장에 주된 영양소로 이용되며(Crawford, 1995), 질산이온의 흡수량과 작물의 성장량 사이에는 유의한 양의 상관관계가 있다(Walker 등, 2001). 그러나 토양중 질산염류의 과다축적은 오히려 염류장애라는 생육장애 현상을 유발하며, 특히 생육초기에 심각한 피해를 유발함이 알려져 있다(Hasegawa 등, 2000; Kang과 Hong, 2004). 질소질 비료의 사용량은 토양중 함유량에 따라 시용권장량이 제시되고 있으나, 생산 증대를 목적으로 한 다비재배법은 질소질 비료의 과다 시비로 시설을 이용한 원예작물에서 큰 피해가 나타나고 있다(Kang 등, 1996; Cha-um 등, 2010; Mori 등, 2011). 시설재배지에서 염류집적이 빈발하는 이유는 주로 강수의 차단에 의한 염류의 용탈억제와 표토의 염류집적에 따른 뿌리조직의 생육불량(Archibald 등, 2006; Eker 등, 2006) 때문으로 매년 전국적인 피해가 나타나고 있다. 특히, 연중 여러 번의 수확을 목적으로 한 다량의 비료 투입은 염류장애의 심각성을 증가시켜, 작물의 생산성 감소(De Pascale 등, 1997)는 물론, 품질의 저하가 필연적이며(Ozturk 등, 2004), 장기적으로 토양의 질을 부적합하게 변화시켜 지속적 생산을 어렵게 하고 있다.

염류가 집적된 토양이나 환경의 복원에는 화학적, 물리적 방법이 이용될 수 있으나 농작물 재배를 위한 토양은 생물학적 방법이 바람직하다. 특히, 강수의 물리적 차단으로 염류의 용탈이 불가능한 시설원예 농업에서는 시설내 관개를 함으로써 염류를 씻어내는 방법이 가능하나, 이 경우 하천이나 지하수의 염류오염이 동반될 수 있다(McIsaac, 2003). 시설재배지의 토양 개선은 염류를 제거할 수 있는 미생물이나 식물체를 이용하는 생물학적 방법(bioremediation)이 최근 성공적으로 사용되고 있다. 특히 질산이온 제거에 활력이 높은 미생물들은 질산이온을 질소원이나 전자수용체 또는 환원력으로 이용함이 알려졌다(Steenhoudt 등, 2001). 미생물을 이용한 생물학적 정화방법은 폐수처리에서 효과적임을 확인하였고(Zayed와 Winter, 1998; Drysdale 등, 1999; Wang 등, 2010), 시설재배지 토양 중 질산

Y. -B. Yun · S. -J. Park · M. -W. Han · Y. -K. Kim
Department of Environmental and Biological Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Republic of Korea

*Corresponding author (Y. -K. Kim: ykkim10@cbnu.ac.kr)

이온의 제거에도 효과가 있음을 보고하였다(Cha 등, 2003; Kim 등, 2009).

미생물을 이용한 질산염류의 제거는 다양한 오·폐수 처리에 효과적으로 사용되고 있으며, 특히, 생활하수와 축산폐수의 처리는 생물학적 방법과 화학적 방법을 혼합하여 사용하며, 미생물을 이용한 생물학적 전처리는 이후 화학적, 물리적 처리효율을 높임으로써 크게 기여하고 있다. 사전연구에서는 시설원에 토양에서 질산이온 흡수에 우수한 활성을 갖는 *Enterobacter* sp. GG0461 균주를 분리하였고, 이를 시설배지 토양에 처리하였을 때, 염류제거 효과가 있음을 확인하였다(Kim 등, 2009). 그러나, 이 균주는 그람 음성균으로 환경에 노출시 토양중 정착효율이 크지 않았다. 따라서, 본 연구에서는 질산이온 흡수능이 크고 환경에 적응력이 우수한 균종을 분리하던 중, *Bacillus* sp. PCE3 균주를 축산폐수를 접하는 토양에서 분리하였고, 이 균주의 우수성을 확인하였기에 다양한 조건에서의 균주의 질산이온 흡수 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

미생물 분리 및 배양. 축산폐수와 주변의 토양에서 액체시료를 채취하여 3,000 rpm에서 약 5분간 원심분리하여 상층액을 얻고, 이것을 *Pseudomonas* agar F (PAF 배지; Bacto-tryptone, 10 g; Bacto-peptone, 10 g; K_2HPO_4 , 1.5 g; $MgSO_4$, 1.5 g; glycerol, 10 mL; Agar, 15 g/L)에 도말하여 배양하였다. 질산이온 흡수능이 큰 미생물을 분리하기 위하여 배지에 50 mM KNO_3 를 첨가하였고, 37°C에서 12시간 이상 배양하여 성장이 우수한 균주를 분리하였다. 미생물 균주는 다양한 농도의 질산이온, 서로 다른 탄소원, pH별로 PAF 액체배지에서 37°C에 12시간동안 150 rpm의 교반상태로 배양하였다. 세균의 균수는 분광광도계(U-2000, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 흡광도를 측정하고, 이것을 균수에 따른 표준곡선과 비교하여 평가하였다.

PCE3 균주의 동정. 분리한 균주는 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석하고 염기서열비교방법을 통하여 동정하였다. 유전자 DNA는 Wizard genomic DNA purification kit (Promega Co., Madison, USA)를 이용하여 미생물 배양체에서 분리하였고, 유전자 증폭은 universal primer인 518F와 800R을 이용하여 이루어졌으며, PCR 산물들은 Wizard SV Gel과 PCR clean-up 시스템(Promega Co.)을 통해 정제하였고, 염기서열은 ABI PRISM 3700 DNA 분석기를 이용하여 결정하였다. 다른 균주와의 유전자 염기서열 상동성은 BLASTn(NCBI, Bethesda, MD) 프로그램을 이용하여 결정하였다. 계통수 분석은 neighbor-joining 방법에 따라 만들어졌으며, 진화적 거리는 ClustalW 프로그램을 사용하여 계산하였다.

질산이온 흡수측정. 미생물 균주에 의한 질산이온 흡수는 균주의 배양중 배지에 남아있는 질산이온의 양을 정량분석하여 측정하였다. 질산이온의 농도는 질산이온전극과 표준전극(double junction reference electrode)을 이용한 이온분석기(Ion Selective Analyzer, Orion 960 ISE meter)를 사용하여 측정하였다(Kang and Hong, 2004). 표준용액과 배양액 시료의 측정은 50:1 (v/v)의 비율로 이온강도조정용액(Ion Strength Adjuster)을 섞은 후에 이루어졌다. 전극은 사용하기 전에 50 ppm의 질산이온 표준용액에 2시간동안 안정화시키고, 분석 전에 5 ppm과 50 ppm의 질산이온표준용액을 사용하여 보정을 하였다.

활성측정을 위한 배지의 pH 조절. 배지의 pH 조절은 조제한 배지가 다량의 단백질 및 펩티드 성분과 인산염 등을 포함하고 있어 자체적인 완충력을 가짐으로 별도의 완충액을 첨가하지 않고 이루어졌다. 따라서 배양전 배지의 초기 pH 조절은 가능한 적은양의 산과 염기를 사용하여 이루어졌다. 즉, PAF 배지를 pH 5에서 pH 9까지 조절하기 위하여, pH 5, 6, 7은 묽은 HCl, pH 8, 9는 묽은 NaOH 용액이 사용되었다. 배지의 pH 변화는 pH 측정기(M-92, MeterLab Co., France)로 측정하였다.

결과 및 고찰

질산흡수 미생물 분리 및 특성. 양계장과 양돈장을 포함하는 축산농가의 하수 배출구 주위 환경에서 시료를 채취하여 높은 농도의 질산이온을 함유하는 선택배지에서 배양하였다. 총 6종의 미생물 균주를 콜로니의 색과 모양에 따라 분리하였고, 균주의 성장과 질산이온 흡수력을 측정하였다(Fig. 1). 균주중 PCE3 균주는 탁월한 성장력과 더불어 높은 질산이온 흡수능력을 갖고 있었다. PCE3 균주는 접종 후 약 2시간에 대수기 성장을 시작하여 약 6시간 만에 정체기에 도달하였으며, 배지에 존재하는 50 mM (3,100 ppm) 질산이온을 대부분 제거하였다. 균주의 성장기간에 따른 질산이온의 흡수는 접종 후 2시간이 지나서부터 증가하여 6시간 후 최대치를 보였다. 이 결과는 PCE3 균주의 질산이온 흡수활성이 균주의 성장과 매우 밀접한 관련이 있음을 보여(Strohm 등, 2007), 질산이온이 균주성장의 영양원이거나 전자수용체로 역할을 함을 의미한다(Steenhoudt 등, 2001). 한편, PCE2와 PCF1, PCF2 균주도 약 40%의 질산이온 흡수력을 보여 질산이온 흡수가 각 균주의 성장과 밀접한 관계가 있

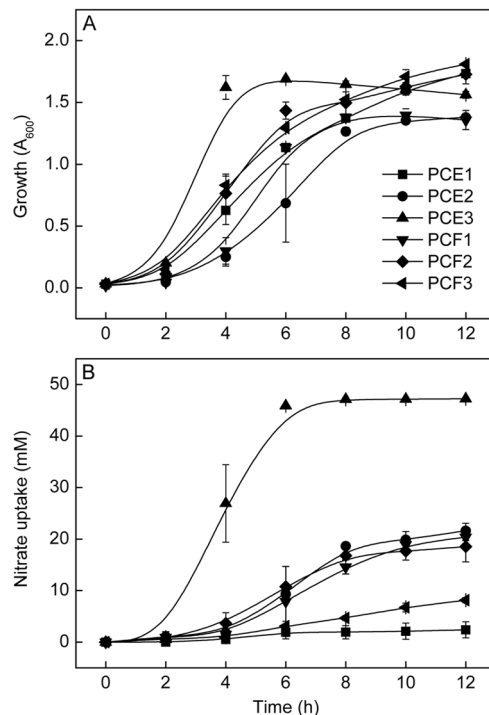


Fig. 1 Growth and nitrate uptakes by the isolated bacterial strains. (A) Bacterial growth in high nitrate medium. (B) Nitrate uptake activities.

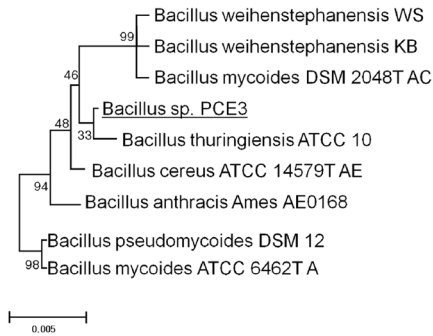


Fig. 2 Phylogenetic tree made by neighbor-joining method.

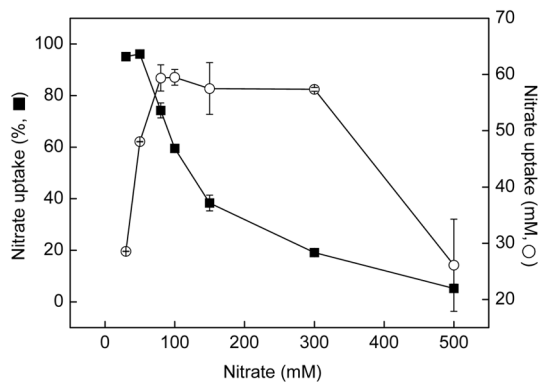


Fig. 3 Nitrate uptakes by *Bacillus* sp. PCE3 at various nitrate concentrations.

는 것으로 나타났다. 그러나, PCE1과 PCF3 균주는 고농도 질산이온 함유 선택배지에서 분리하였어도 질산이온 흡수력은 미약한 수준이었다.

질산이온 흡수능력이 탁월한 PCE3 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 유전자 증폭방법을 통하여 결정하였다. PCE3 균주의 염기서열은 BLASTn 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 유전자은행에 등록하였다(GenBank Accession No. KC544070). PCE3 균주는 phylogenetic tree 분석을 통하여 *Bacillus*에 속하는 균주임을 확인하였으나, 기존에 보고된 유전자은행의 균주들 중 유전자 서열에서 상동성이 98% 이상인 균주를 찾을 수 없어 *Bacillus* sp. PCE3로 명명하였다(Fig. 2).

질산이온 흡수특성. 질산이온의 농도를 30-500 mM까지 증가시키며 *Bacillus* sp. PCE3 균주의 성장 및 질산이온 흡수능을 측정하였다(Fig. 3). 질산이온의 첨가에 따른 균주의 성장은 대체로 일정하였으며, 높은 질산이온 농도에서도 균주의 성장은 양호하였다. 그러나, 300 mM 이상의 농도에서는 정체기에 도달하는 균주의 성장이 1-4시간 늦어졌고, 최대 흡광도도 10% 이상 감소하였다(자료미제시). 이러한 현상은 고농도의 질산이온이 균주의 성장을 억제하는 염류장애 현상으로 여겨진다. 동일한 조건에서 균주에 의한 질산이온 흡수를 측정된 결과, 첨가한 질산이온의 농도가 높아질수록 흡수율은 낮아졌다(Fig. 3, ■). 배지에 질산이온 농도증가에 따른 흡수율의 감소는 biphasic하게 나타나 150 mM까지는 흡수율이 급격히 감소하였고, 더 높은 농도에서는 완만하게 감소하였다. 질산이온 흡수량의 절대치는 300 mM 농도까지 50-60 mM로 질산이온이 일정한 수준에서 제거됨을 확인하였다(Fig. 3, ○). 이것은 *Bacillus* sp. PCE3 균주가

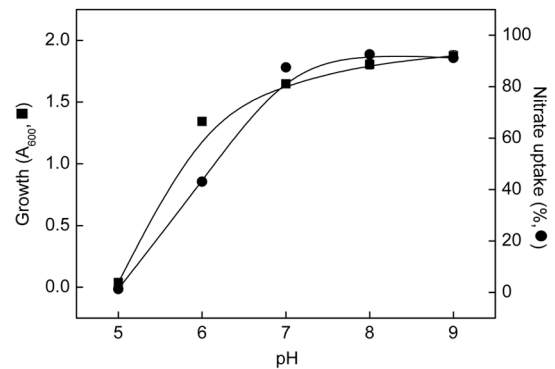


Fig. 4 Effect of pH on the growth and nitrate uptake.

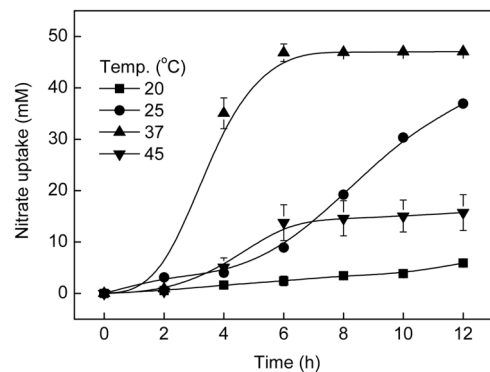


Fig. 5 Nitrate uptake of *Bacillus* sp. PCE3 at different temperature.

배지에 첨가한 질산이온의 농도에 관계없이 일정 수준의 균주 성장을 이루며, 또한 일정 양의 질산이온을 흡수할 수 있음을 보여준다. 이 결과는 균주가 성장함에 따라 배지의 질산이온 농도와 무관하게 약 60 mM 수준에서 질산이온의 제거능력을 갖고 있으며, 더 높은 농도인 100 mM 이상에서는 균주 내에 존재하는 질산이온 흡수단백질이나 환원효소가 포화되는 것으로 판단된다.

생육조건에 따른 질산이온 흡수특성. *Bacillus* sp. PCE3 균주의 성장과 질산이온 흡수를 위한 최적 조건을 확인하기 위하여 pH 5-9 범위에서 10시간 배양하였을 때, 균주의 성장과 질산이온 흡수를 측정하였다(Fig. 4). pH가 증가함에 따라 균주의 성장도 같이 증가하였으나, pH 5에서는 균주의 성장과 질산이온의 흡수를 관측할 수 없었다. pH 6에서는 약 40%의 질산이온 흡수가 측정되었다. 반면 pH 7-9 범위에서는 질산이온의 흡수가 최대에 도달하였으며, 이 범위가 질산이온 흡수를 위한 최적임을 확인하였다.

질산이온 흡수에 대한 온도의 영향을 확인하기 위하여 pH를 7.0으로 고정하고 배양온도를 달리하여 균주의 질산이온 흡수를 측정하였다(Fig. 5). 균주를 20, 25, 37, 45°C의 각 온도조건에서 배양하면서 흡광도를 측정된 결과, 20°C에서는 성장이 매우 늦었고 질산이온의 흡수도 약 10%로 거의 이루어지지 않았다. 25°C에서는 4시간 후부터 균주의 성장이 급격하게 이루어졌으며, 질산이온의 흡수는 6시간이 지난 후부터 증가하여 12시간에 약 80%의 흡수량을 보였다. 37°C에서는 균의 성장과 질산이온의 흡수 모두 우수하였다. 균주의 접종 후부터 성장이 이

루어지면서 4시간부터 일정한 흡광도로 나타났으며, 질산이온 흡수는 최대 이루어져 6시간 후부터 90% 이상의 흡수율을 보였다. 45°C에서는 균주의 성장 자체가 억제되면서 상대적으로 낮은 흡광도를 보였고, 질산이온의 흡수 또한 약 30%만이 이루어져 균주의 성장 자체가 억제됨에 따라 질산이온의 흡수도 억제되었다. 이는 *Bacillus* sp. PCE3 균주의 질산이온 흡수에 대한 최적온도가 37°C임을 나타낸다. 이 최적온도는 그래프를 성균인 *Enterobacter* 균주의 경우 25-30°C에서 얻어져 차이를 보였다(Kim 등, 2009).

이상의 결과를 요약하면, 축산농가의 하수에서 분리한 *Bacillus* sp. PCE3 균주는 배지의 질산이온 농도 300 mM까지는 정상적인 생육을 보였고, 최대 약 60 mM (3,700 ppm)까지 질산이온을 제거하는 탁월한 능력을 갖았으며, 넓은 pH 범위에서 질산이온 흡수능이 우수한 균주임을 확인하였다. 이 균주는 높은 pH에서 질산이온을 흡수하면서 동시에 H⁺을 세포 밖으로 배출하는 NO₃⁻:H⁺ antiporter 활성을 갖음을 성장중 배지의 pH 감소를 통하여 확인하였다(자료 미제시). 또한, 해당 균주의 질산이온 흡수에 대한 최적온도는 25-37°C로서, 외부 온도의 상승과 더불어 유리온실 등의 시설재배지 토양이나 혹은 축산폐수에 존재하는 질산이온 제거에 상당한 효과가 있을 것으로 판단된다. 미생물을 이용한 농법으로 화학적 질소비료의 사용량을 감소시키는 것은 이미 실험적으로 보고되었으며(Eid 등, 2006; Hassen 등, 2007; Shanan과 Higazy, 2009), 이와 더불어 농경지 및 하수에 존재하는 질산이온의 과다로 인해 발생하는 문제점을 제거하기 위해서도 화학 비료의 사용을 줄임과 동시에 *Bacillus* sp. PCE3 균주와 같은 질산이온 제거능이 우수한 균주를 사용하여 토양의 환경을 개선하여야 할 것이다. 다만, *Bacillus* sp. PCE3 균주는 (Fig. 4)에서 보였듯이 산성토양에서는 생육이 불량함으로 질산이온의 집적토양이 산성토양일 경우에는 석회 등을 개량제로 사용한 후 이 균주를 이용한 질산이온 제거가 이루어져야 할 것이다(Lee 등, 2012).

감사의 글 이 논문은 2011학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

초 록

질산이온은 식물체의 주된 영양분중의 하나이며, 다수확을 위하여 자주 과량이 사용되고 있다. 이것은 토양중 질산이온이 집적되어 염류장애의 주된 이유가 되며, 유리 및 비닐 온실의 토양에서 심각한 문제가 될 수 있다. 본 연구에서는 축산농가의 배수구 주위 젖은 토양으로 부터 6가지 미생물을 분리하였으며, 그들의 질산이온 흡수 활성을 측정하였다. 이 미생물들은 1,000-3,000 ppm (10-50 mM) 수준의 질산이온을 제거할 수 있었으며, 특히 PCE3 균주는 4,000 ppm으로 가장 높은 활성을 보였다. 이 균주들을 동정하기 위하여, 16S rRNA 유전자 서열을 결정하고 분석하였다. 이들 균주중 PCE3 균주는 *Bacillus* 속으로 확인되었다. 균주의 성장과 질산이온 흡수활성을 측정하였을 때, 37°C와 pH 7-9 범위에서 최대 값을 보였다. *Bacillus* sp. PCE3 균주는 배지의 질산이온 농도에 따라 40-60 mM (2,500-3,700 ppm)의 질산이온을 제거할 수 있었다. 그러므로, *Bacillus* sp. PCE3 균주는 질산이온이 집적한 시설원에 토양에서 질산이온 제거에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

Keywords 미생물이용 환경복원 · 염류장애 · 질산이온 흡수 · 토양미생물

References

- Archibald RD, Harper RJ, Fox JED, and Silberstein RP (2006) Tree performance and root-zone salt accumulation in three dryland Australian plantations. *Agroforest Syst* **66**, 191-204.
- Cha WS, Choi HI, Lee DB, and Cha JM (2003) Isolation and characterization of denitrification bacteria. *Kor J Biotechnol Bioeng* **18**, 461-5.
- Cha-um S, Siringam K, Juntawong N, and Kirdmanee C (2010) Water relations, pigment stabilization, photosynthetic abilities and growth improvement in salt stressed rice plants treated with exogenous potassium nitrate application. *Int J Plant Prod* **4**, 187-98.
- Crawford NM (1995) Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859-68.
- De Pascale S, Barbieri G, and Ruggiero C (1997) Effects of water salinity on plant growth and water relations in snap bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Hort* **449**, 649-55.
- Drysdale GD, Kasan HC, and Bux F (1999) Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA* **25**, 357-62.
- 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**, 450-8.
- Eker S, Comertpay G, Konuskan O, Ulger AC, Ozturk L, and Cakmak I (2006) Effect of salinity stress on dry matter production and ion accumulation in hybrid maize varieties. *Turk J Agric For* **30**, 365-73.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, and Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **52**, 463-99.
- Hassen AA, Xu J, and Yang J (2007) Growth conditions of associative nitrogen-fixing bacteria *Enterobacter cloacae* in rice plants. *Agric J* **2**, 672-5.
- Kang BG, Jeong IM, Min KB, and Kim JJ (1996) Effect of salt accumulation on the germination and growth of lettuce (*Lactuca sativa*, L.). *Kor J Soil Sci Fert* **29**, 360-4.
- 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.
- Kim ST, Choi TG, Wang HS, and Kim YK (2009) Nitrate removal mediated by soil microorganism, *Enterobacter* sp. GG0461. *J Gen Appl Microbiol* **55**, 75-9.
- Lee YH, Sonn YK, Lee ST, Heo JY, Kim MK, Kim ES et al. (2012) Effects of oyster shell lime on barley growth and soil microbe in an upland soil. *Korean J Soil Sci Fert* **45**, 610-3.
- Mclsaac G (2003) Surface water: Pollution by nitrogen fertilizers. In *Encyclopedia of Water Science*, (2nd ed). University of Illinois, USA.
- Mori M, Di Mola I, and Quaglietta CF (2011) Salt stress and transplant time in snap bean: growth and productive behaviour. *Intern J of Plant Prod* **5**, 49-64.
- Shanan NT and Higazy AM (2009) Intergrated biofertilization management and cyanobacteria application to improve growth and flower quality of *Matthiola incana*. *Res J Agr Biol Sci* **5**, 1162-8.
- 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**, 317-22.
- Strohm TO, Griffin B, Zumft WWG, and Schink B (2007) Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1420-4.
- Walker RL, Burns IG, and Moorby J (2001) Responses of plant growth rate to nitrogen supply: a comparison of relative addition and N interruption treatments. *J Exp Bot* **52**, 309-17.
- 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**, 164-9.
- Zayed G and Winter J (1998) Removal of organic pollutants and of nitrate from wastewater from the dairy industry by denitrification. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**, 469-74.