

## *Enterobacter amnigenus* GG0461 균주의 생산을 위한 배지개발 및 질산이온 흡수

박성완 · 윤영배 · 왕희성 · 김영기\*

충북대학교 농업생명환경대학 환경생명화학과

## Development of Media for the Cultivation of *Enterobacter amnigenus* GG0461 and its Nitrate Uptake

Seong-Wan Park, Young-Bae Yoon, Hee-Sung Wang, and Young-Kee Kim\*

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

Received October 31, 2011; Accepted November 8, 2011

To remove excess nitrate from the agricultural environments, *Enterobacter amnigenus* GG0461 has been isolated as a bacterial strain having high capability of nitrate uptake activity. This strain was able to remove nitrate more than 3,000 ppm (50 mM) in the Pseudomonas agar F (PAF) medium. Therefore, it could be a candidate strain for a nitrate scavenger in the various contaminated environments, such as agricultural soils, livestock sewage, and industrial wastewater. In order to develop medium for the large-scale production of the strain GG0461, each component of PAF medium was replaced with the corresponding commercial product and the optimal conditions for bacterial growth and nitrate uptake activity were measured. Glycerol was replaced with the commercially available product and the nitrogen source was substituted with commercial tryptone, yeast extract, soybean meal, and fermented fish extract. Bacterial growth and nitrate uptake activity were maximal in the media containing 2% tryptone, followed by yeast extract, soybean meal, and fermented fish extract. The pH of the growth medium containing 2% tryptone was decreased by the bacterial nitrate uptake, suggesting that the nitrate uptake is mediated by a nitrate/proton antiporter. This result shows that the medium containing commercial tryptone was good enough for the physiological activity of the strain GG0461. Each component of PAF medium was successfully replaced with the corresponding commercial product except peptone. In conclusion, the composition of medium for the cultivation of the strain GG0461 was determined as 2% tryptone, 1% glycerol, plus required salts according to the composition of PAF medium.

**Key words:** commercial media, microbial remediation, nitrogen source, nitrate uptake

### 서 론

질산이온은 질소비료의 주된 성분으로서 식물의 성장과 분화를 위한 기본영양소[Crawford, 1995]이며, 식물체의 생산증대를 위한 가장 중요한 성분중의 하나이다. 그러나, 질산염류는 토양 중 과량이 축적할 경우에는 오히려 작물의 생육을 억제하며, 이것은 염류장애라는 현상으로 잘 알려져 있다[Hasegawa 등, 2000; Lee 등, 2001; Kang과 Hong, 2004]. 염류장애는 토양 중 염류의 축적에 의해 나타나는 현상으로 국내에서는 질소질

비료의 과다 시비로 염류장애가 빈발하고 있다. 특히 시설원에 농업에서는 시설에 의한 강수의 차단으로 염류의 용탈이 억제 되기 때문에 염류장애가 심각하게 나타나고 있으며, 매년 전국적으로 큰 피해를 주고 있다[Kang 등, 1996; 1997; Mori 등, 2011]. 시설재배에서는 연중 수확을 목적으로 과다한 양의 비료를 투입하는 다비재배법이 이루어지고 있다. 이러한 영농법은 필연적으로 표토에 염류집적을 유발하며, 염류 농도의 증가는 식물뿌리의 성장 저하[Archibald 등, 2006; Eker 등, 2006]와 작물의 생산성 감소[de Pascale 등, 1997; Mori 등, 2008]는 물론, 품질을 떨어뜨리고[Ozturk 등, 2004], 장기적으로 토양을 작물재배에 부적합하게 변화시킨다.

작물의 우수한 품질 및 생산성을 유지하기 위해서는 토양이나 환경 중 집적한 과량의 질산이온 제거가 필수적이다. 오염된 토양이나 환경에서 질산이온의 제거는 다양한 생물학적, 화

\*Corresponding author

Phone: +82-43-261-2560; Fax: +82-43-271-5921

E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.041>

학적, 물리적 방법에 의해 이루어질 수 있다. 시설원에 농업에서는 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 성공적으로 이용하고 있다. 미생물을 이용한 생물학적 정화방법은 특히 폐수처리에서 효과적임을 확인하였고 [Zayed와 Winter, 1998; Drysdale 등, 1999; Vilchez 등, 2001; Wang 등, 2010], 시설재배지 토양 중 집적한 질산이온의 제거에도 효과가 있음을 보고하였다 [Cha 등, 2003; Kim 등, 2009]. 이러한 미생물들은 질산이온을 질소원이나 전자수용체 또는 환원력으로 이용함이 밝혀졌다 [Steenhoudt 등, 2001].

*Enterobacter amnigenus* GG0461 균주는 발토양에서 분리하였고, 선행연구를 통하여 질산이온 흡수능이 탁월함을 확인하였다 [Choi 등, 2008]. 본 연구에서는 GG0461 균주의 우수한 질산이온 흡수능을 유지하며, 경제성있는 대량생산용 배지를 개발하기 위한 기초연구로 다양한 상업용 질소원과 탄소원을 사용하여 균주를 배양하였고, 질소원에 따라 질산이온 흡수능의 변화를 측정하였다. GG0461 균주의 성장과 질산이온 흡수능력은 PAF 배지에서 특히 우수하였으므로 [Kim 등, 2009], 균주 생산을 위한 상업용 배지의 개발은 PAF 배지성분을 기준으로 주로 질소원을 상업용 재료로 대체하며 균주의 성장과 우수한 질산이온 흡수능의 유지 여부를 측정하였다.

## 재료 및 방법

**재료.** Tryptone은 벤텍바이오(음성, 한국), 효모추출물(yeast extract)은 비전바이오켄(성남, 한국), 대두박(soybean meal)은 제일제당(서울, 한국)에서 각각 구입하였으며, 생선발효액(fermented fish extract)은 (주)홍살림(괴산, 한국)에서 생산하는 '생선 아미노산'이라는 제품을 이용하였다. 생선발효액은 생선부산물 78%, 발효보조제 22%로 이루어져 있는 제품이다. 대두박은 대두에서 기름을 추출하고 남은 단백질 성분을 말하며, 평균 단백질 함량은 48%이다.

**미생물의 배양조건.** *E. amnigenus* GG0461 균주는 발토양 시료에서 분리한 그람음성 균주로 *Pseudomonas agar* F (PAF 배지; 10 g tryptone, 10 g peptone, 1.5 g  $K_2HPO_4$ , 1.5 g  $MgSO_4$ , 10 mL glycerin/L 증류수)에서 좋은 성장과 높은 질산이온 흡수능을 보인다. 균주는 액체배지에서 37°C, 150 rpm의 교반상태로 배양하였다.

**질산이온 흡수측정.** 미생물 균주는 50 mM  $KNO_3$ 를 첨가한 PAF배지에서 배양하였으며, 균주의 성장은 분광광도계(U-2000, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 관측하였다. 질산이온 흡수는 균주의 배양중 배지에 남아있는 질산이온의 양을 정량분석하여 측정하였고, 제거된 질산이온의 양을 백분율로 표시하였다. 질산이온의 농도는 질산이온전극과 표준전극(double junction reference electrode)을 이용한 이온분석기(Ion Selective Analyzer, Orion 960 ISE meter, Beverly, MA)를 사용하여 측정하였다 [Kang과 Hong, 2004]. 표준용액과 토양추출시료는 50:1 (v/v)의 비율로 이온강도조정용액(ISE)을

섞어주었다. 전극은 사용하기 전에 50 ppm의 질산이온 표준용액에 2시간동안 안정화시키고, 분석 전에 5 ppm과 50 ppm의 질산이온표준용액을 사용하여 보정하였다.

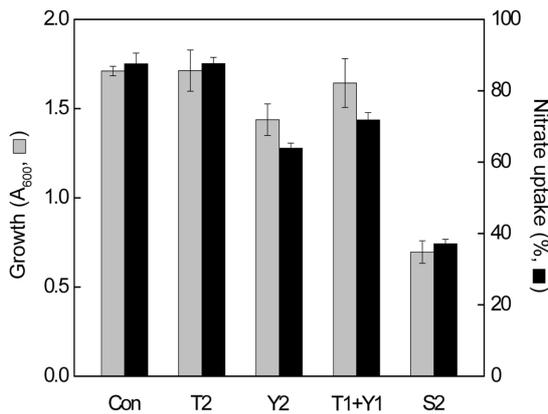
**배양중 배지의 pH 변화측정.** 조제한 배지에서 균주의 성장에 따른 배지의 pH 변화를 측정하였다. 조제한 배지는 다량의 단백질 및 펩티드 성분과 인산염 등을 함유하고 있어 자체적인 완충력을 가짐으로 별도의 완충액을 첨가하지 않았으며, 따라서 배양전 배지의 초기 pH 조정은 가능한 적은양의 산과 염기를 사용하여 이루어졌다. 즉, PAF 배지를 pH 5에서 pH 9까지 조정하기 위하여, pH 5, 6, 7은 묽은 HCl, pH 8, 9는 묽은 NaOH 용액을 사용하였다. 배지의 pH 변화는 pH 측정기(M-92, MeterLab Co., Lyon, France)로 측정하였다.

**상업용 재료를 이용한 배지제조.** GG0461 균주의 대량생산을 위한 배지개발을 위하여 다양한 상업용 재료를 조사하였다. 균주의 성장효과가 확인된 PAF 배지의 성분을 상업용 제품으로 대체하기 위하여 시중에서 판매되는 상업용 tryptone,  $MgSO_4$ ,  $K_2HPO_4$ , glycerol과 효모추출물을 구하였으며, 이들을 이용하여 배지를 만들고 GG0461 균주의 성장과 질산이온 흡수를 측정하였다.

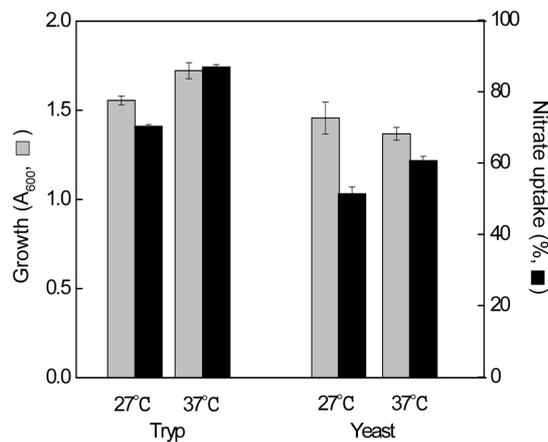
## 결과 및 고찰

**질소원에 따른 균주의 성장 및 질산이온 흡수특성.** GG0461 균주는 PAF 배지에서 성장이 우수한 것이 확인 [Choi 등, 2008] 되었으므로, 균주의 생산을 위한 배지의 개발은 PAF 배지의 성분을 기본으로 하여 각 성분을 유사한 상업용 재료로 대체하고 질산이온 흡수능을 확인하는 방법으로 이루어졌다. 탄소원으로 는 시중에서 저렴하게 구할 수 있는 식품용 glycerol을 사용하였고, 질소원으로는 상업용 tryptone을 구하였으나, peptone은 구할 수 없어 대체할 수 없었다. 이들 이외에 질소원으로 대두박과 효모추출물 등을 구할 수 있었으며, 아미노산 비료로 쓰이는 생선발효액도 질소원으로 시험에 사용하였다.

상업용 tryptone을 2% 첨가한 배지를 만들고 GG0461 균주를 접종하였을 때, 8시간 배양 후 균주의 성장은 PAF 배지에서 얻은 대조구와 같은 정도로 양호하였으며, 질산이온의 흡수능도 다른 질소원에 비하여 가장 우수하였다(Fig. 1). 질소원으로 효모추출물을 2% 가한 배지에서, 배양 후 4시간에 균주의 성장은 흡광도 1.22로 대조구인 PAF 배지에서의 흡광도 0.57에 비하여 빠르게 증가하여 초기성장은 크게 나타났으나(자료 미제시), 정제기에 도달하여 균주의 성장량은 대조구에 비하여 오히려 감소하였고, 질산이온 흡수능도 64%로 대조구의 활성에 비하여 낮게 나타났다. 효모추출물과 tryptone을 각각 1%씩 첨가한 배지에 균주를 배양하였을 때, 균주의 성장에서도 초기성장 속도가 빨라짐을 확인하였으나, 질산이온 흡수능은 PAF 배지 대조군과 tryptone을 2% 가한 배지에서의 질산이온 흡수에 비해 감소하여 약 72%로 얻어졌다. 배지에 효모추출물의 첨가시 균주의 초기 성장이 촉진된 것은 효모추출물에 포함된 다양한 성분 등에 의한 것으로 여겨지나 [Kaspro 등, 1998], 이러한 촉진효과가 성장의 초기에만 나타났고, 늦은 대수기와 정제기에는 관측되지 않았다. 한편, 대두박을 2% 첨



**Fig. 1. Effects of various nitrogen sources on the microbial growth and nitrate uptake.** Con, control; T2, 2% tryptone; Y2, 2% yeast extract; T1+Y1, 1% tryptone plus 1% yeast extract; S2, 2% soybean meal.

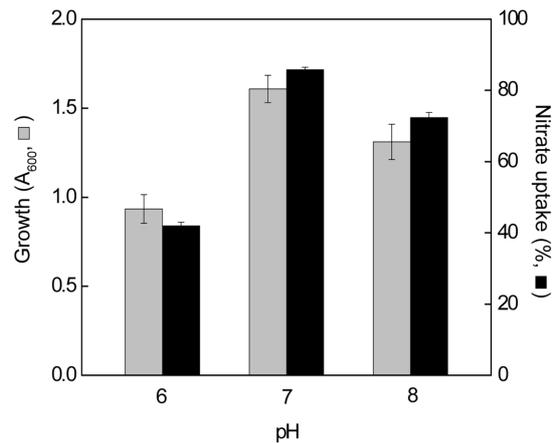


**Fig. 2. Effect of incubation temperature on the microbial growth and nitrate uptake.** Tryp, 2% tryptone; Yeast, 2% yeast extract.

가한 배지에서는 균주의 성장이 매우 낮고 질산이온 흡수활성이 40% 이하로 나타나, 대두박은 대체를 위한 질소원으로 적당하지 않음을 확인하였다.

상업용 질소원인 tryptone, 효모추출물, 대두박을 각각 2%씩 가한 배지에 GG0461 균주를 배양하고, 배양온도 27, 37, 47°C에서 균주의 성장 및 질산이온 흡수력을 비교하였다(Fig. 2). 균주의 성장은 47°C에서 매우 낮았고, 따라서 질산이온의 흡수활성도 10% 이내로 나타났다(자료 미제시). 그러나 최적온도인 37°C에서는 균주의 성장과 질산이온의 흡수활성은 모두 왕성하였으며, 특히 tryptone 2%를 첨가한 배지에서 가장 우수하여 8시간 배양후 질산이온의 흡수는 87%로 확인되었다. 효모추출물 첨가배지에서는 tryptone 첨가 배지에 비하여 균주의 성장과 질산이온 흡수능 모두 감소하여, 질산이온 흡수는 61%로 측정되었다. 대두박을 첨가한 배지에서의 균주의 질산이온 흡수는 약 30%로 매우 낮았다. 한편, 27°C에서는 모든 조건에서 균주의 성장과 질산이온 흡수능이 tryptone 첨가배지에서 우수하였으나, 37°C에서의 측정된 활성에 비하여 낮았다.

**질산이온 흡수에 따른 배지의 pH 변화.** 배지의 질소원으로 tryptone을 2% 사용하였을 때, 균주의 성장은 pH 7에서 가장



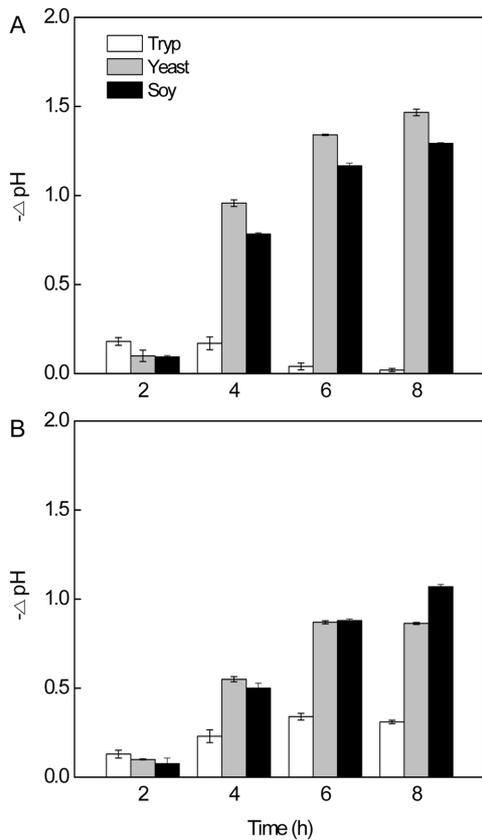
**Fig. 3. Effect of tryptone and pH on microbial growth and nitrate uptake.** Nitrogen source of PAF medium was replaced with 2% commercial tryptone.

우수하였으며, pH 7에서의 흡광도 1.61에 비하여 pH 6과 pH 8에서는 각각 0.93과 1.31로 상대적으로 낮은 성장을 보였다(Fig. 3). 같은 조건에서 질산이온 흡수활성을 측정하였을 때, pH 7과 8에서는 각각 86와 72%로 우수한 질산이온 흡수를 보였으나 pH 6에서는 흡수력이 감소함을 확인하였다. pH의 변화에 따른 균주성장 및 질산이온 흡수능의 변화는 상업용 tryptone으로 질소원을 대체하였음에도 대조실험과 비교하여 큰 감소를 보이지 않았으며, 특히 pH 7과 8에서는 이들 활성이 우수하였다.

질산이온을 첨가하지 않은 배지에서 상업용 질소원을 2%씩 가하고 균주를 배양하며 배지의 pH 변화를 측정하였다(Fig. 4A). 먼저, tryptone을 2% 첨가한 배지에서는 균주 성장에 따라 배지의 초기 pH 7이 크게 변하지 않았다. 배양 2시간 후, 배지의 pH는 0.2 감소하였으나, 배양시간 경과에 따라 배지의 pH 변화는 오히려 작아져 pH 7에 근접하였다. 반면, 효모추출물과 대두박을 2%씩 첨가한 배지에서는 pH가 크게 낮아져 8시간 배양 후 각각 5.6과 5.8로 산성화가 일어났다. 배양시간동안 pH 변화량을 동일한 조건에서 비교하였을 때, tryptone 배지에서는 균주의 성장에 따른 pH의 변화가 거의 없었으나, 효모추출물과 대두박을 첨가한 두 배지에서는 시간이 지날수록 상당한 pH 감소가 측정되었다. 이러한 결과로 tryptone을 2% 첨가한 배지에서 균주의 성장에 따른 배지의 pH 변화가 작아 균주의 성장 및 질산이온 흡수활력유지에 유리하였으나, 다른 두 질소원을 첨가한 배지에서는 성장에 따른 배지의 산성화로 활력이 좋은 균주의 생산에는 불리함을 확인하였다.

질소원과 동시에 질산이온을 50 mM 첨가한 배지에서는 균주의 성장시 배지의 산성화가 배지에 따라 다르게 나타났다(Fig. 4B). Tryptone을 2% 첨가한 배지에서 균주를 6시간 배양하였을 때, 배지의 pH는 약 0.3 감소하였다. 그러나, 효모추출물이나 대두박을 첨가한 배지에서는 질산이온 첨가로 배지의 산성화가 감소하였다. 특히, 효모추출물을 첨가한 배지에서 pH는 1.5 감소하였으나, 질산이온을 추가로 첨가한 경우에 pH는 0.9 감소하여 배지의 산성화가 작게 나타났다.

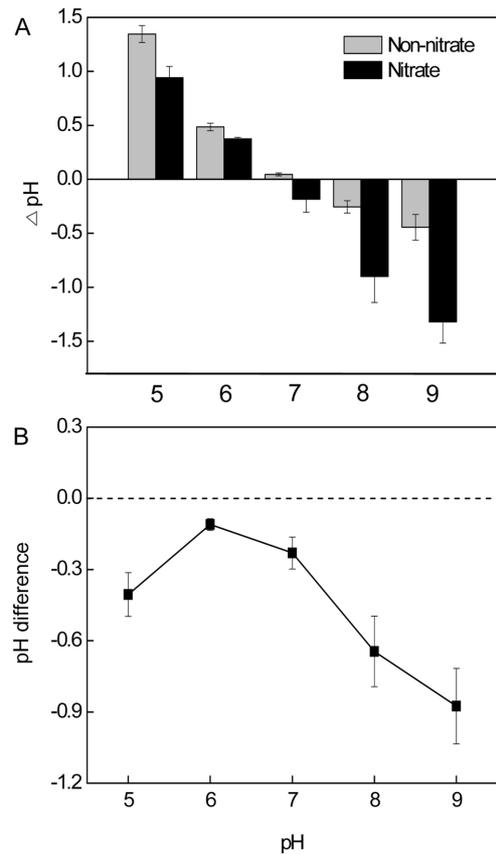
**배지의 초기 pH에 따른 배지의 pH 변화.** GG0461 균주는



**Fig. 4. pH changes during the incubation of GG0461.** Acidification upon microbial growth in the media containing various nitrogen sources was measured in the absence (A) and presence (B) of 50 mM nitrate. Tryp, 2% tryptone; Yeast, 2% yeast extract; Soy, 2% soybean meal.

염기성 조건의 PAF 배지에서 성장과 질산이온 흡수활력이 증가하였다[Choi 등, 2008]. 이러한 사실은 균주의 질산이온 흡수와 수소이온 농도가 서로 관련이 있음을 의미한다. 따라서, tryptone을 첨가한 배지에서 균주의 성장에 따른 pH 변화를 배지의 초기 pH를 변화시키며 측정하였다(Fig. 5A). 먼저 질산이온을 첨가하지 않은 조건에서, 배지의 초기 pH를 8과 9로 조정하였을 때, 8시간 배양후 배지의 pH는 약간의 감소를 보여 산성화하였으나, 배지의 초기 pH를 5와 6으로 하였을 때는 배양중 pH가 증가하여 pH 7로 수렴하였다. 한편, 배지에 질산이온 50 mM을 첨가한 염기성 조건에서, 배지의 산성화가 크게 나타났으나, 산성조건에서는 질산이온이 없는 대조구에 비하여 pH 7로의 수렴이 작게 나타났다. 즉, 질산이온을 첨가한 조건에서는 배지의 초기 pH에 관계없이 배지는 산성화되었다.

이러한 결과로부터 질산이온의 존재시에 나타나는 배지의 pH 변화 경향을 알기위하여, 각 pH 조건에서 질산이온을 첨가한 배지의 pH 변화값으로부터 질산이온을 첨가하지 않은 배지에서의 pH 변화값을 빼주었을 때의 pH 차이 값을 Fig. 5B에 나타냈다. 이 결과는 각 pH 값에서 GG0461 균주가 질산이온의 흡수에 동반하는 배지의 산성화를 나타내는 것으로, GG0461 균주는 pH 6 이상의 배지에서 초기 pH가 증가할수록 더 크게 배지를 산성화함을 나타낸다. 이것은 기존의 연구에서 GG0461 균주가 염기성 배지에서 질산흡수능이 증가한다는 결과[Choi

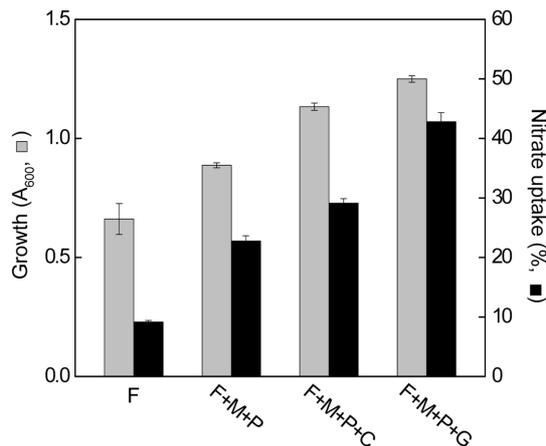


**Fig. 5. pH changes in the media at different initial pH's.** (A) pH difference before and after incubation at the indicated initial pH. (B) pH difference obtained by subtracting the pH of control media from the pH of nitrate-added media.

등, 2008]를 고려할 때, 질산이온 흡수는 배지의 산성화를 동반한다는 것으로 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter의 활성에 의존을 나타낸다. 이 antiporter의 활성에 의한 질산이온의 흡수시 배지의 산성화는 cyanobacteria에서도 보고[Incharoensakdi와 Laloknam, 2005] 되었으며, GG0461 균주도 질산이온의 흡수시 수소이온의 분비를 동반하여 배지를 산성화하며, 이러한 효과는 pH 6 이상의 배지에서 관측되어 배지가 염기성일수록 크게 나타났다.

한편, 효모추출물이나 대두박을 첨가한 pH 7의 배지에서는 tryptone을 첨가한 배지에서와 다른 결과를 보이나, 이것은 이들 성분이 아미노산과 단백질뿐만 아니라 다른 생체물질의 복합물에서 오는 효과로 여겨지며[Kaspro 등, 1998], pH 변화에 대한 단계적 실험을 수행하여야 자세한 분석이 가능할 것이다.

**생선발효액에서의 균주 생육특성.** 저렴한 가격에 판매되는 생선발효액을 질소원으로 균주의 생육효과를 조사하였다. Fig. 6은 생선발효액, 글리세롤, 옥수수 전분당(com syrup), 그리고 두 가지 염의 효과를 측정하는 것이다. 생선발효액을 2% 첨가한 배지에서 GG0461 균주를 10시간 배양후 측정된 균주의 성장은 매우 낮았다. 여기에 마그네슘과 인산의 염을 첨가하면, 균주 성장은 약 30%, 질산이온 흡수는 2배 증가하였다. 염류에 더하여 탄소원인 옥수수 전분당과 글리세롤을 첨가하였을 때, 균주 성장과 질산이온 흡수는 더욱 증가하였으며, 글리세롤 첨가시에 최대 성장과 흡수를 보였다.



**Fig. 6. Growth and nitrate uptake of GG0461 at various media.** Various media were prepared with fermented fish extract, corn syrup, glycerol, and salts. F, 2% fermented fish extract; M, 0.15% MgSO<sub>4</sub>; P, 0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; C, 1% corn syrup; G, 1% glycerol.

그러나, 생선발효액을 질소원으로 하는 조건에서 균주의 성장과 질산이온 흡수력은 tryptone을 첨가한 배지에서 얻은 생육 효과에는 크게 미치지 못하였다. 균주성장은 흡광도로 1.5에 미달하였으며 질산이온 흡수도 45% 정도로 tryptone 배지의 결과에 비하여 매우 낮게 나타났다. 다만, 배양시간을 40시간으로 4배 증가하였을 경우 tryptone 배지에서 얻은 결과와 근접하는 결과를 얻었다. 균주의 성장이 지연되는 것은 생선발효액중 포함된 여러 성분들에 기인하는 것으로 여겨지나, 현재 생선발효액의 자세한 성분분석은 이루어지지 않았다. 배양시간을 증가시키는 것은 균주 생산비용 증가와 배양 중 오염 가능성을 높이는 것으로, 생선발효액의 사용은 tryptone에 비하여 장점보다 단점이 많은 것으로 판명되었다. 이러한 결과는 아미노산 비료로 사용하는 생선발효액도 균주 생산에 저렴하게 이용할 수 있겠으나, 균주 배양에 많은 시간이 소요되어 상업용 tryptone에 비하여 균주생산 효율성은 떨어지는 것으로 나타났다.

본 연구는 GG0461 균주의 대량배양용 배지를 개발하기 위한 기초연구로 수행되었다. 배지의 개발은 균주의 성장과 질산이온 흡수에 최대 활성을 보여준 PAF 배지 성분에 준하여, 배지를 구성하는 각각의 성분을 동일한 이름으로 판매되고 있는 상업용 제품으로 대체하였다. 배지의 효과 확인은 균주 배양 중 특성변화를 최소화하기 위한 기준으로 질산이온 흡수능을 측정하였고, 배지 중 pH 변화를 관측함으로써 질산이온 흡수특성에 변함이 없음을 확인하였다. 결론적으로 GG0461 균주는 2% tryptone과 1% glycerol, 0.15% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.15% MgSO<sub>4</sub>를 첨가하여 배양하였을 때, 균주의 성장과 질산이온 흡수가 최대로 얻어졌으며, 이러한 조건에서 균주의 질산이온 흡수에 필수적인 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/H<sup>+</sup> antiporter 활성이 높게 나타남을 확인하였다.

## 초 록

농업 환경 중에 과잉으로 축적한 질산이온의 제거를 위하여, 질산이온 흡수력이 우수한 *Enterobacter amnigenus* GG0461 균주를 분리하였다. 이 균주는 *Pseudomonas agar* F (PAF) 배지

에 배양하였을 때, 3,000 ppm (50 mM) 이상의 질산이온 흡수가 가능하므로, 농업용 토양, 축산폐수, 산업폐수를 포함한 오염된 환경의 질산이온 제거를 위한 좋은 후보 균주가 될 수 있다. GG0461 균주의 대량생산을 위한 상업용 배지를 개발하기 위하여 PAF 배지 성분을 상업용 재료로 대체하고, 균주의 성장과 질산이온 흡수 활력을 측정하였다. 탄소원인 글리세롤은 상업용 제품으로 대체하였고, 질소원으로 tryptone과 효모추출물, 대두박, 생선발효액을 배양실험에 사용하였다. 균주의 성장과 질산이온 흡수활력은 2% tryptone을 첨가한 배지에서 가장 우수하였고, 효모추출물, 대두박, 생선발효액의 순으로 효과가 나타났다. Tryptone을 2% 첨가한 배지에서 균주의 질산이온 흡수는 배지의 pH를 낮추었으며, 이것은 질산이온의 흡수가 nitrate/proton antiporter의 활성으로 나타남을 의미한다. 이상의 결과에서 상업용 tryptone을 사용한 배지는 균주의 생리활성에 적합하였으며, peptone을 제외한 PAF 배지의 각 성분은 그것에 해당하는 상업용 재료로 대체할 수 있었다. 결론적으로, GG0461 균주의 배양을 위한 상업용 배지성분 조성은 2% tryptone과 1% glycerol, PAF 배지를 위한 무기이온들로 결정하였다.

**Key words:** 미생물 정화, 상업용배지, 질산흡수, 질소원

## 감사의 글

이 논문은 2010년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- 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. *Korean J Biotechnol Bioeng* **18**, 461–465.
- Choi TK, Kim ST, Han MW, and Kim YK (2008) Enhanced nitrate uptake by *Enterobacter amnigenus* GG0461 at alkaline pH. *J Korean Soc Appl Biol Chem* **51**, 1–5.
- Crawford NM (1995) Nitrate: Nutrient and signal for plant growth. *Plant Cell* **7**, 859–868.
- 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**, 649–655.
- Drysdale GD, Kasan HC, and Bux F (1999) Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA* **25**, 357–362.
- 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**, 365–373.
- 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**, 463–499.

- Incharoensakdi A and Laloknam S (2005) Nitrate uptake in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothene halophytica* is energy-dependent driven by  $\Delta\text{pH}$ . *J Biochem Mol Biol* **38**, 468–473.
- Kang BG, Jeong IM, Kim JJ, Hong SD, and Min KB (1997) Chemical characteristics of plastic film house soils in Chungbuk area. *Korean J Soil Sci Fert* **30**, 265–271.
- Kang BG, Jeong IM, Min KB, and Kim JJ (1996) Effect of salt accumulation on the germination and growth of lettuce (*Lactuca sativa*, L.) *Korean J Soil Sci Fert* **29**, 360–364.
- 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. *Korean J Soil Sci Fert* **37**, 74–82.
- Kaspro RP, Lange AJ, and Kirwan DJ (1998) Correlation of fermentation yield with yeast extract composition as characterized by near-infrared spectroscopy. *Biotechnol Prog* **14**, 318–325.
- 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.
- Lee GJ, Kang BK, Kim HJ, Park SK, and Min KB (2001) Effect of nitrogen fertilizers on soil pH, EC,  $\text{NO}_3\text{-N}$  and lettuce (*Lactuca sativa* L.) growth. *Korean J Soil Sci Fert* **34**, 122–128.
- McIsaac G (2003) Surface water: Pollution by nitrogen fertilizers. In *Encyclopedia of Water Science*, (2nd ed.), pp. 950–955, University of Illinois, Urbana, IL.
- Mori M, Amato M, Di Mola I, Caputo R, Quaglietta CF, and Di Tommaso T (2008) Productive behaviour of cherry-type tomato irrigated with saline water in relation to nitrogen fertilization. *Eur J Agr* **29**, 135–143.
- Mori M, Di Mola I, and Quaglietta CF (2011) Salt stress and transplant time in snap bean: Growth and productive behaviour. *Int J Plant Prod* **5**, 49–64.
- Ozturk A, Unlukara A, Ipek A, and Gurbuz B (2004) Effects of salt stress and water deficit on plant growth and essential oil content of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). *Pakistan J Bot* **36**, 787–792.
- 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.
- 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**, 469–474.