

도시 녹화를 위한 질소고정 균 선별 및 식물 성장 평가

정순환, 이상섭*
경기대학교 생명과학과

Received: December 13, 2017 / Revised: April 16, 2018 / Accepted: May 30, 2018

Nitrogen Fixation Screening and Plant Growth Assessment for Urban Greening

Sun Hwan Jeong and Sang Seob Lee*

Department of Life Science, Graduate School, Kyonggi University, Suwon 16227, Republic of Korea

Currently, urban greening projects and research are attracting attention as a way to mitigate urban heat island phenomenon. In this study, nitrogen fixative bacteria were isolated and their effects on plant growth were confirmed. First, enrichment was performed in a nitrogen-free medium to isolate the nitrogen-fixing bacteria, and the colony showing high growth in a medium with limited nitrogen source was isolated and purified. Separated bacterial isolates were reduced by more than 90% acetylene by ARA and indirectly confirmed the activity of nitrogenase by ethylene production. *Cedecea* sp. MK7 and *Enterobacter* sp. Y8 with confirmed reproducibility were selected as nitrogen fixative bacteria. Nitrogen fixing bacteria were applied to the growth of perennial rye grass, and it was found that the dry weight increased to 34.80 mg (186.60%) compared with the control with 18.65 mg dry weight. After plant growth, microbial community analysis of soil applied by bacteria showed similarity to the control group. Therefore, in this study, it is expected that the efficiency will be increased if plant growth is promoted by using nitrogen fixing bacteria in urban greenery system.

Keywords: Nitrogen fixation, fertilizer, *Cedecea* sp., urban greening

서 론

최근 현대 사회의 도시화에 도시의 녹지가 감소하고 불투수층이 증가하고, 이에 따라 도시 열섬 현상이 발생된다. 도시 열섬현상은 시민들의 건강, 여름철 에너지 소비, 생태계 등 많은 부분에서 영향을 미치고 있다[1]. 이러한 현상을 완화시키는 방법으로 도시녹화 사업 및 연구가 대두되고 있다. 그 중에서 도시의 부족한 공간을 활용하기 위해 옥상 녹화를 이용하고 있다. 옥상 녹화를 위해 저관리 옥상녹화 식물 소재의 적합성 및 실내온도 조절 효과와 식물 소재 모델별 표면 온도변화 영향 등에 관한 연구가 진행되고 있다[2]. 옥상 녹화는 도시 열섬 현상을 완화시키는 중요한 역할을 하지만, 시스템 유지를 위한 경제적 비용이 많이 들고 건물에 대한 하중을 고려해야 한다는 제약이 따른다[2]. 그에 따라

저관리 경량형 녹화 시스템에 대한 연구의 필요성이 요구되고 있다.

저관리 경량형 도시 녹화 시스템 연구에 있어서 가장 고려해야 할 사항은 경량형 소재의 개발과 효율적인 식물 재배를 위해 필요한 영양분을 공급해 주는 것이다. 특히, 질소는 식물에게 매우 중요한 영양 성분 중 하나이다. 질소는 단백질 구성하는 성분 중 하나로서 식물에 질소가 부족한 경우 잎의 엽록체 수가 감소하여 성장이 정상적으로 일어나지 않고, 결국 열매의 수확량이 감소하게 된다. 이러한 이유로 식물의 성장과 수확량을 높이기 위해서는 질소 비료의 사용이 불가피하다[3]. 그러나 인공적인 질소 비료의 사용은 지하수나 수환경에 오염을 야기한다[4]. 질소는 지구상의 대기 중에 78%를 차지하는 풍부한 성분이다. 하지만 대부분의 생명체는 대기중의 질소를 바로 사용할 수 없다. 왜냐하면, 대기중의 질소는 안정적인 3중 결합으로 끊어지기 어려운 구조를 가지고 있기 때문이다. 따라서, 식물들은 질소 순환계에서 대기 중의 질소를 암모니아로 환원하는 질소 고정 과정으로 영양분으로 축적한다[5].

*Corresponding author

Tel: +82-31-249-9642, Fax: +82-31-245-8868

E-mail: sslee@kyonggi.ac.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

이러한 질소 고정에 관련된 미생물을 질소고정 박테리아라 부르며, 종류로는 *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter* 등이 있다. 질소는 그들이 가지고 있는 nitrogenase 라는 효소에 의해 N_2 에서 NH_3 로 환원된다[6]. 이러한 질소 고정 박테리아들의 질소고정 능력은 Acetylene Reduction Assay (ARA)에 의해 간접적으로 확인할 수 있는데, Nitrogenase는 질소에 특이적으로 작용하지 않고, 대기중 질소가 가지고 있는 삼중결합에 특이적으로 작용하여, acetylene이 ethylene으로 환원된 것을 확인함으로써 nitrogenase의 활성을 확인하는 원리를 사용한다.

질소고정 균을 이용하여 식물 성장을 촉진하는 연구는 많은 연구자들에 의해 이루어지고 있다. 선행된 연구 내용으로서, 질소고정 균을 이용하여 사탕수수, 벼, 잔디와 같은 식물의 성장을 확인한 연구 결과가 있다[7-11]. 많은 연구에서 식물의 줄기나 뿌리의 길이와 건조중량을 비교 측정함으로써 식물의 성장을 확인했다.

또한 외부인자에 따른 토양 내 균 community 분석이 활발히 연구되고 있다[12, 13]. N, P, K에 따른 토양 내 균의 군집도를 확인하고[14], 화학 비료 및 생물 유기 비료에 따른 균의 군집도나 진균의 군집도를 확인하는 실험이 이루어지고 있다[15]. 본 연구에서도 질소고정 균을 접종한 토양과 영양배지, 이미 식물성장을 촉진한다고 알려진 광합성 균을 접종한 토양에서의 군집도 변화를 확인하기 위해 miseq으로 군집 분석을 실시했다.

이에 따라 본 연구에서는 질소 고정 능력이 우수한 균주를 선별하고, 옥상녹화에서 저관리 경량형 시스템의 효율을 증대시키기 위해 실험실에서 질소고정 균의 식물 성장 촉진 효율을 확인했다. 또 균 접종 후 토양 내 균 community를 분석하여 일반 토양과 차이점을 확인했다.

재료 및 방법

Microorganism and growth conditions

질소고정 균을 얻기 위해 토양시료의 균을 분리했고 환경 미생물은행(KEMB)에서 질소고정 후보 균주를 분양받았다. 질소고정 균을 분리하기 위해 대한민국 문경의 산간 지역의 (36°38'35.0"N 127°58'42.5"E)에서 얻은 부식토와 연천 (37°58'10.9"N 127°01'41.6"E)의 콩밭에서 얻은 토양 시료를 사용했다. 각 시료를 yeast mannitol media (yeast extract 1.0 g/l, mannitol 10.0 g/l, K_2HPO_4 0.5 g/l, $MgSO_4$ 0.2 g/l, NaCl 0.1 g/l, $CaCO_3$ 0.1 g/l)에서 2일간 농화배양했다. 농화 배양된 시료는 순차 희석 기법을 이용하여 질소가 없는 배지에 도말했다. 도말된 한천배지는 28°C에서 3일간 배양했다. 이후, 질소고정 균을 얻기 위해서 질소원이 소량 함유된 배지(mannitol 5.0 g/l, malic acid 3.2 g/l, KH_2PO_4

3.0 g/l, Monosodium glutamate 0.1 g/l, $MgSO_4$ 0.1 g/l, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.005 g/l, Trace element 1 ml, Vitamin solution 1 ml)를 이용했다[12]. 순수 분리된 질소고정 균은 TSA 배지에 28°C에서 3일간 배양시켰고, glycerol stock으로 저장했고 KEMB에 기탁하여 보관하고 있다. 고효율 질소고정 균을 선별하기 위해 환경미생물은행(KEMB)에서 분양 받은 질소고정 후보 균주들은 *Rhizobium* sp. 11종, *Bacillus* sp. 7종, *Brevibacterium* sp. 12종, *Paenibacillus* sp. 3종, 기타 다른 속들 10종을 분양받아 Nutrient broth에서 배양했다.

Acetylene reduction assay (ARA)

질소원이 소량 첨가된 배지에서 높은 성장을 보인 균들은 질소고정 능력을 확인하기 위해 Acetylene reduction assay를 실시했다[13]. 분리된 균은 모두 ARA를 실시하여 nitrogenase의 활성을 간접적으로 확인했다. ARA는 serum bottle을 이용하여 실시했다. Serum bottle 안에 질소가 소량 함유된 배지 100 ml을 넣고, aluminum seal과 고무 cap을 이용해 닫힌계를 만들었다. 고무 cap을 이용해 serum bottle 안의 기상부를 99% 질소와 1% 산소로 조성하고, 순수 분리된 균을 접종했다. 2일간 28°C에서 적응시켰다. 적응된 균이 들어있는 serum bottle의 기상부를 89% 아르곤과 10% acetylene, 1% 산소로 조정한다. 0, 3, 5일에 GC-FID를 이용하여 ethylene 생성을 확인했다.

16s rRNA sequence analysis

ARA 통해 nitrogenase의 활성을 간접적으로 확인된 분리 균주들은 동정하기 위해 16s rRNA sequence를 분석했다. Kim *et al.*에 의해 기술된 universal primer를 사용하여 16S rRNA 유전자 분석을 실시했다. 염기서열은 MacroGen에서 3730XL 자동화된 DNA sequencing system (Applied Biosystems)을 사용하여 분석했다. 16S rRNA 유전자 서열은 Ezbiocloud 서버에서 BLAST 검색 분석에 의해 확인되었다[16].

Evaluation of plant growth promotion in grass treated with diazotrophic bacteria

분리된 균은 포트 실험을 통하여 식물 성장에 미치는 영향을 확인했다. 균의 준비는 분리된 질소고정 박테리아를 동일비율로 섞어 혼합 균주를 만들고 TSB (Tryptic soy broth)에 3일간 28°C에서 배양했고, 원심분리기를 이용하여 배지 성분을 제거했다. 토양을 준비된 플라스틱 포트에 150 g씩 담았다. 준비된 균을 증류수에 부유시키고, 토양에 1.0 g bacteria/kg soil의 농도로 접종했다. 식물은 perennial ryegrass를 이용했다. 포트당 seed는 3개씩 파종했다. 대조군으로 균을 접종하지 않고 같은 양의 증류수를 첨가한 포

트의 식물로 했고, positive control로 광합성 혼합 균주를 이용했다. 각 실험군은 4개의 포트를 사용했고, 식물은 20℃, 6000 lux의 빛 세기에서 배양했다. 모든 실험은 같은 조건에

서 실시했다. 토양이 건조되는 것을 방지하기 위해 증류수를 일일 15 ml씩 주었다. 50일 배양 후 줄기의 길이와 식물의 건조중량을 측정함으로써 식물 성장을 확인했다.

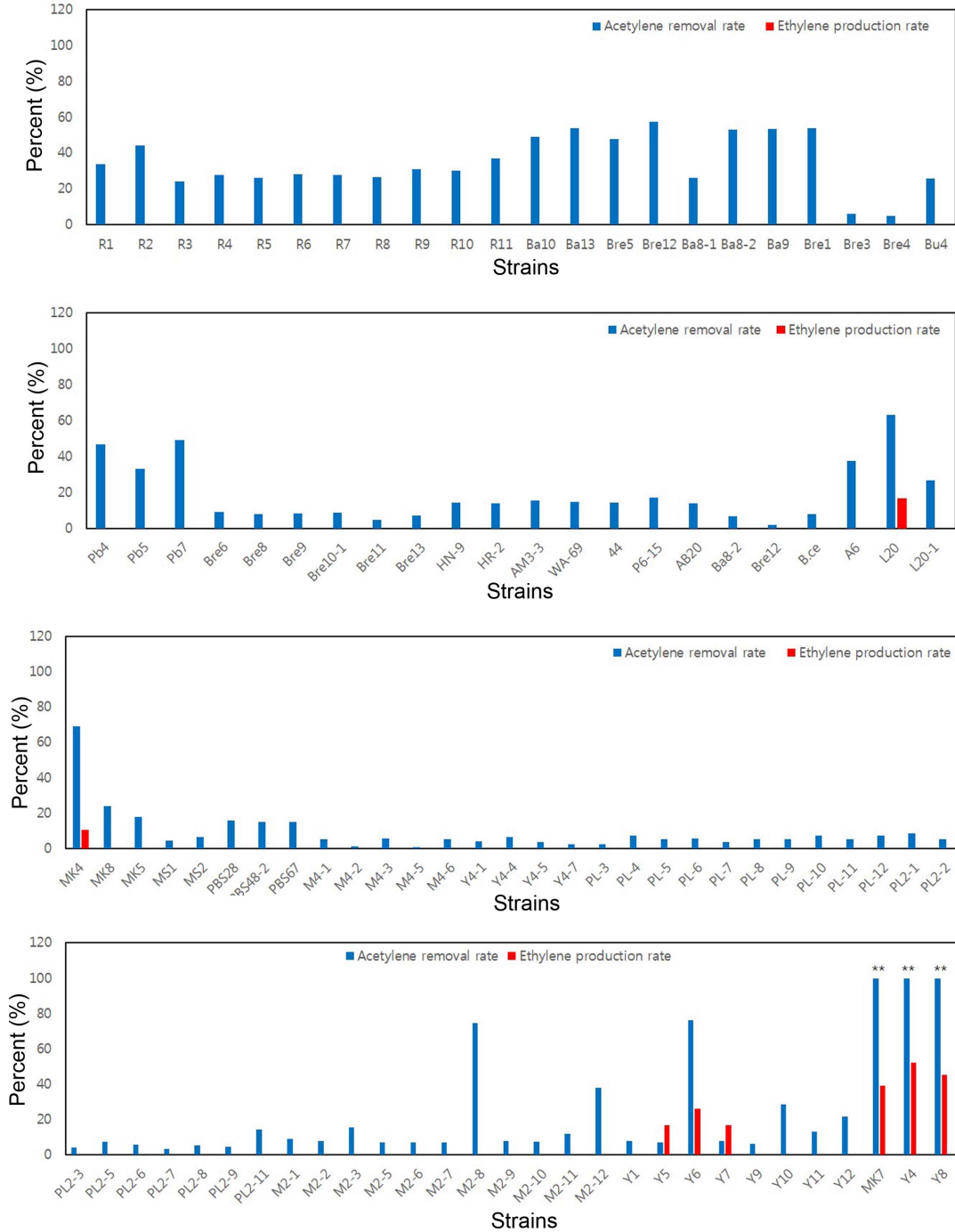


Fig. 1. The efficiency of the removed acetylene after 5 days of each strain and the ethylene efficiency were shown. The blue bars show the ratio of decrease in the initial acetylene concentration. The red bars show the ratio of the amount of ethylene produced relative to the amount of initial acetylene (** $p < 0.01$).

Table 1. Efficiency of selected high efficiency strain and confirmation reproducibility.

A. Result of screening about nitrogen fixation bacteria.

Strain	Acetylene (%)			Ethylene product (%)
	0 day	5 day	Removal rate	
Control	10.6	9.0	15.12	ND
MK7	9.3	0.0	100.00	39.3
Y8	10.6	1.7	83.78	45.2

B. Results of nitrogen fixation reproducibility.

Strain	Ethylene product (%)	
	1 st Screening	2 nd Screening
MK7	18.0	51.0
Y4	0.0	0.0
Y8	42.0	54.8

Analysis of bacteria community in soil

식물의 성장을 확인한 토양을 사용하여 토양 내 균 community를 분석했다. 토양내 미생물의 DNA는 PowerSoil® DNA Isolation Kit (카탈로그 번호 12888, MO BIO)을 이용하여 제조업체의 안내서에 따라 추출했다. 각 sequencing sample은 Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library 프로토콜에 따라 준비했다. DNA의 정량과 농도는 PicoGreen과 Nanodrop을 이용해 측정했다. 16S rRNA 유전자는 16S V3-V4 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 프라이머 서열은 다음과 같다; 16S V3-V4 프라이머(Forward Primer, 5' TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG, Reverse Primer 5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C). Input gDNA (12.5 ng)는 16S V3-V4 primer로 증폭되고 이후의 limit-cycle 증폭 단계는 multiplexing indices와 Illumina sequencing adapters를 이용해 수행했다. 최종 산물은 PicoGreen을 사용하여 표준화되고 풀링되며, 라이브러리의 크기는 LabChip GX HT DNA High Sensitivity kit (PerkinElmer, Massachusetts, USA)를 사용하여 검증했다. 그 후 MiSeq™ 플랫폼 (Illumina, San Diego, USA)을 사용하여 sequencing 했다.

결과 및 고찰

Isolation of nitrogen fixation bacteria

질소고정 능력을 가진 균을 분리하기 위해 serial dilution 된 토양 시료를 질소원이 없는 배지에서 배양했다. 그 배지에서 높은 성장을 보인 58개의 후보 균주를 분리했다. 순수

Table 2. Results of 16s rRNA sequencing.

Strain	Closest match	Similarity (%)	Seq. length (bp)
MK7	<i>Cedecea lapagei</i> GTG 346 ^T	98.21	1,470
Y8	<i>Enterobacter ludwigii</i> EN-119 ^T	99.73	1,423

분리된 균주들은 대부분 점액질로 이루어진 colony를 형성했다. 따라서 이후의 정량적 실험을 위해 각 균주는 nutrient media나 tryptic soy broth에서 성장을 확인했다. 배양된 균은 KEMB에 기탁했다. KEMB에서 분양받은 질소고정 후보 균주는 nutrient media에서 배양시켰다.

Acetylene Reduction Assay (ARA)

ARA를 통해 acetylene을 ethylene으로 환원시킨 8개의 균주(토양에서 분리된 균주 7, KEMB를 통해 분양받은 균주 1)를 확인했다(Fig. 1). 토양에서 분리된 균주 중 acetylene을 대부분 ethylene으로 환원시킨 strain MK7과 Y4, Y8에 대하여 재현성 실험을 실시했다. 재현성 실험에서 strain MK7과 Y8에서 지속적인 nitrogenase 활성을 확인했다(Table 1). 따라서 질소고정 균주로 strain MK7과 Y8을 선별하여 이후 실험을 실시했다. Strain MK7은 gas chromatography를 이용한 검출에서 초기의 기상층의 acetylene 농도는 9.3%였지만, 5일차에는 acetylene은 검출되지 않았고, ethylene은 3.9%로 검출되었다. Strain Y8은 초기의 기상부의 10.6%에서 1.7%로 감소하였으며, ethylene은 3.8%로 검출되었다. Acetylene이 약 9% 감소한 것에 비해 ethylene 생성은 약 3.8%로 낮게 검출되었다. 이는 닫힌계에서 균의 작용에 의해 용기 내부의 압력이 증가한 결과로 보인다. 하지만 acetylene은 검출되지 않았으므로 내부의 acetylene을 약 100% 환원시킨 것으로 볼 수 있다.

16s rRNA sequencing results

16s rRNA sequencing 결과를 통해 strain MK7과 Y8을 동정했고 각각 *Cedecea lapagei* GTC 346 (98.21%)과 *Enterobacter ludwigii* EN-119 (99.73%)로 동정되었다(Table 2). 각 균주는 KEMB에 질소고정 균으로 KEMB 1501-001, KEMB 1501-002로 기탁했다.

Evaluation of plant growth promotion in grass treated with diazotrophic bacteria

비료실험은 perennial rye grass를 이용하여 선별된 *Cedecea* sp. MK7과 *Enterobacter* sp. Y8을 혼합하여 실시하였다. 결과를 확인하기 위해 잎의 길이와 식물체의 건조중량을 측정했다.

잎의 길이를 확인한 결과 각 경우에서 모두 첫번째 잎의

Table 3. Perennial rye grass Leaf length measurement result. The results are listed in order of each leaf. The results were compared when the maximum growth of each leaf was maximized.

Inoculum of pot	1 st Leaf	2 nd Leaf	3 rd Leaf	4 th Leaf	5 th Leaf
Distilled water	85.4	150.4	136.6	0	0
Photosynthetic bacterial mixed inoculum	78.0	149.6	185.4	240.4	182.0
Nitrogen-fixing bacterial mixed inoculum	72.3	183.6	194.3	217.8	168.0

성장에서 차이가 없었다. 두번째 잎의 경우 증류수를 첨가한 pot와 광합성 혼합균주를 첨가한 포트에서는 별차이를 보이지 않았고, 질소고정 혼합 균주를 이용한 pot 에서 약 120% 길이 성장을 확인했다. 증류수를 이용한 pot의 경우 세번째 잎에서 성장 속도가 다른 실험군에 비해 낮은 것을 확인했고, 광합성 혼합 균주와 질소고정 혼합 균주의 경우 각각 약 136%, 142% 높은 성장률을 보인 것을 확인했다. 49일 차까지 증류수를 첨가한 pot에서는 더 이상의 잎 발생이 나타나지 않았고, 광합성 혼합 균주, 질소고정 혼합 균주에서 5번째 잎까지 발생했다. 4번째 잎과 5번째 잎의 성장을 질소고정 혼합 균주에 비해 광합성 혼합 균주에서 더 높은 성장을 보였다(Table 3).

파종 49일 후, 식물을 뽑아서 줄기의 길이와 건조 중량을 측정했다. Control에서 줄기의 길이는 18.53 cm로 측정되었다. 질소고정 균을 접종한 실험군에서는 22.06 cm로 측정되었다. 이는 control에 비해 약 123.5% 높은 성장률을 보였다. 광합성 균을 접종한 실험군에서는 21.8 cm로 측정되었다. 이는 control에 비해 약 116%의 높은 성장을 보인 것이

다. 질소고정 균을 접종한 실험군에서 가장 높은 줄기 성장률을 보인 것으로 확인되었다. 건조 중량을 측정한 결과는 control에서 식물의 건조 중량은 18.65 mg으로 측정되었다. 질소고정 균을 접종한 실험군에서는 34.80 mg으로 확인되었다. 이는 control에 비해 186.6% 증가한 결과이다. 광합성 균을 접종한 실험군에서는 25.31 mg으로 확인되었다. Control에 비해서 약 135.7%의 증가한 결과이다.

토양의 영양 상태에 따른 균의 효율을 확인하기 위해 TSB를 함께 첨가하여 실험을 실시했다. Control로 증류수를 첨가한 실험군과 TSB를 첨가한 실험군으로 두고 실험을 실시했다. 49일 후에 줄기의 길이를 측정한 결과 증류수를 첨가한 control, TSB를 첨가한 control, 질소고정 균을 접종한 실험군, 광합성 균을 접종한 실험군에서 각각 17.93 cm, 26.38 cm, 28.43 cm, 27.05 cm으로 확인되었다. 건조 중량을 측정한 결과는 각각 16.11 mg, 29.13 mg, 36.76 mg, 29.68 mg 으로 측정되었다. 각 균을 접종한 실험군에서 증류수를 첨가한 control에 비해 약 228.2%, 184.2% 증가한 것으로 확인되었다. TSB를 첨가한 control에 비해 약 126.2%, 101.9% 증

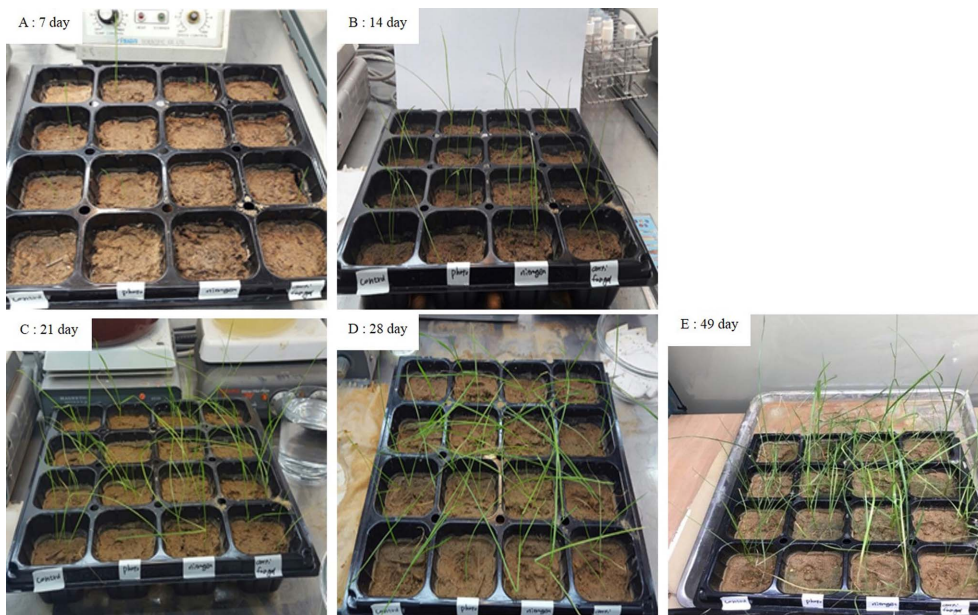


Fig. 2. Plant photos by incubation period. The first line used distilled water, the second line photosynthetic bacteria, the third line used nitrogen fixative bacteria, and the fourth line used anti-fungal microorganisms as inoculation.

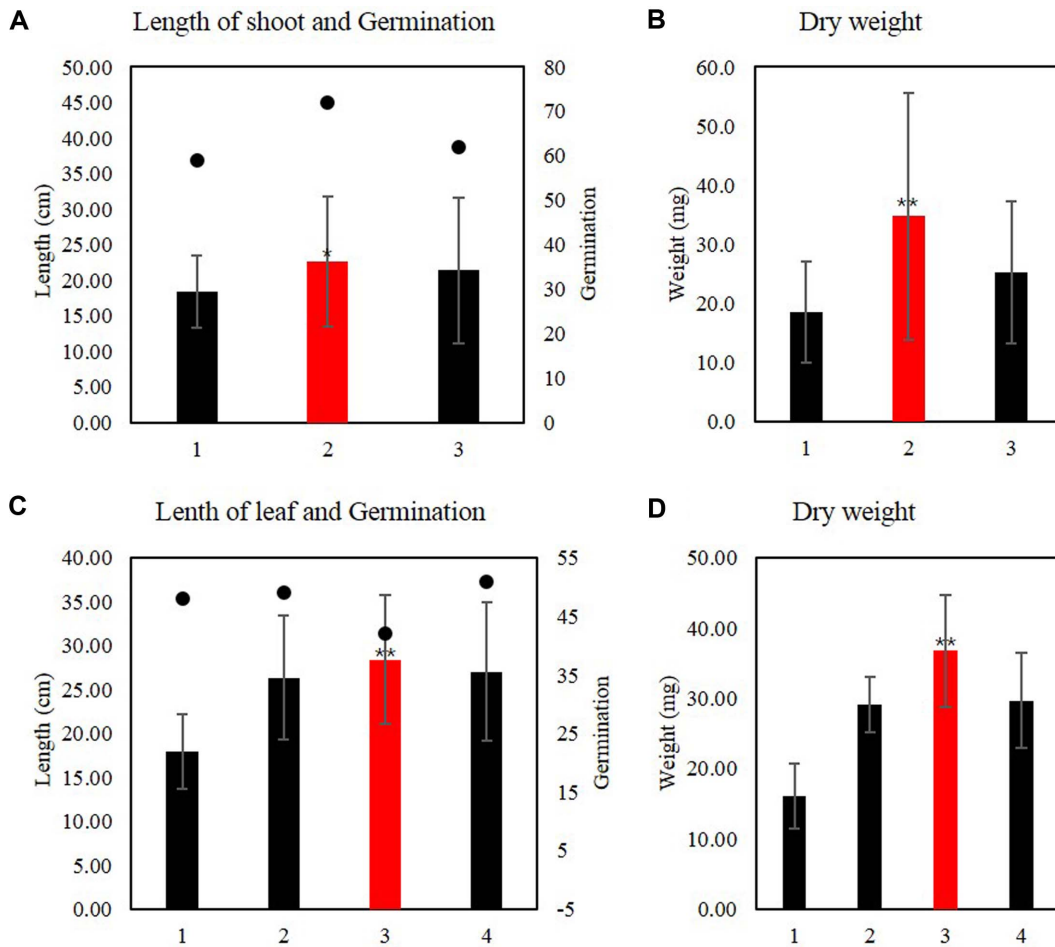


Fig. 3. The length of the stem of the grass and the dry weight of the plant were measured. The length and dry weight of the plants grown in the soil inoculated with nitrogen-fixed bacteria were shown in red. A, B; experimental group inoculated with distilled water, 1; plant grown in soil with added distilled water, 2; plants grown on soils inoculated with nitrogen fixation bacteria, 3; plants grown on soil inoculated with photosynthetic bacteria, C, D; Experimental group inoculated with TSB, 1; plant grown in soil with added distilled water, 2; plants grown in soil with sterile TSB added, 3; plants grown on soils inoculated with nitrogen fixation bacteria, 4; plants grown on soil inoculated with photosynthetic bacteria. A, C; Point is the germination, and the bar is the length of the plant (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

가한 것으로 나타났다(Fig. 3).

Analysis of bacteria community in soil

비료 실험 이후 토양을 이용한 미생물 군집 분석의 결과 대조군 토양과 증류수와 질소고정 균을 접종한 토양의 미생물 군집이 유사한 것으로 나타났다. 또 영양배지를 접종한 토양과 영양배지와 함께 광합성 균을 접종한 토양의 미생물 군집이 유사했다. 영양배지를 접종한 토양의 균 군집과 광합성 균을 접종한 토양의 균 군집도는 다른 실험군과 다른 군집도를 나타냈다(Fig. 4). 이 결과를 보면 질소고정 박테리아를 접종한 토양에서 토양 내 균 군집은 대조군과 유사했지만 식물 성장은 촉진된 것을 알 수 있다.

영양배지를 첨가한 토양의 미생물 군집도와 대조군의 군집도를 비교하면 대조군에서 1% 이상의 군집도를 가진 미생물들이 대부분 1% 이상의 군집도를 나타냈지만 군집도는 대부분 변화한 결과를 나타냈다. 영양배지와 함께 접종한 질소고정 균과 광합성 균을 접종한 토양의 균 군집도는 유사하게 나왔지만, 일부 종에서 차이를 보였다. *Silvibacterium bohemicum* (5.76%), *Tepidimonas thermarum* (9.19%)는 각각 광합성 균을 접종한 토양에서 약 1.5%, 5.8% 높은 것을 확인했다. 또 *Limisphaera ngatamarikiensis* (1.69%)의 경우는 1.5% 낮은 것을 확인했다. 질소고정 박테리아를 접종하지 않은 다른 실험군에서의 토양 내 균 군집은 많은 상당히 많은 차이를 보이고 있다(Fig. 5). 이는 여러가지 인간

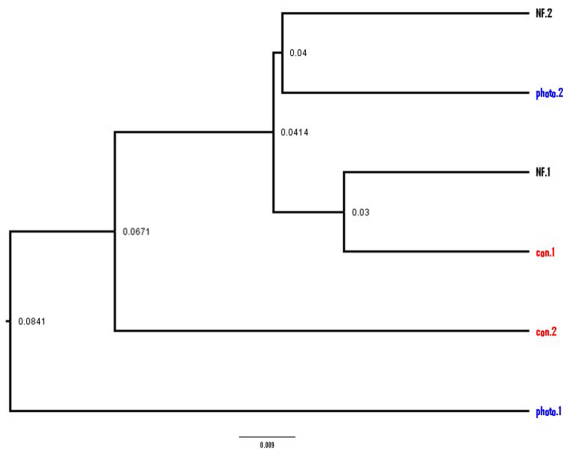


Fig. 4. UPGMA tree comparing samples. con.1; soil with added distilled water. NF.1; soil inoculated with nitrogen-fixed bacteria, photo.1; soil inoculated with photosynthetic bacteria, con.2; soil with added sterilized TSB, NF.2; soil with nitrogen fixation bacteria and sterilized TSB, 4; soil with photosynthetic bacteria and sterilized TSB.

의 처리에 따른 미생물의 직접적인 영향이나 간접적인 영향으로 인해 미생물의 군집이 변하는 것으로 볼 수 있다.

결론

도시녹화를 위해 토양에서 분리된 58개의 질소고정 후보 균주와 KEMB를 통해 분양받은 43종의 균주로 ARA를 실시하여 2종의 질소고정 균을 선별했다. 각 균의 16s rRNA sequencing 결과 *Cedecea* sp. MK7과 *Enterobacter* sp. Y8로 동정되었다. 선별된 질소고정 균을 이용하여 식물 성장 실험을 실시한 결과 균을 접종하지 않은 식물에 비해 약 186.6% 증가했다. 영양배지를 토양에 첨가해 배양한 식물에 비해 126.2% 증가한 성장률을 보였다. 또 실험에 사용된 토양을 MiSeq을 통해 균 community 분석을 실시한 결과, 균을 접종하지 않은 토양과 유사한 군집을 가진 것을 확인했다.

따라서 본 실험에서 선별된 질소고정 균들은 식물성장을 촉진하지만 균주 community에는 영향을 주기 않는 것을 확인했다. 이러한 사실은 본 연구에서 선별된 균은 식물 성장

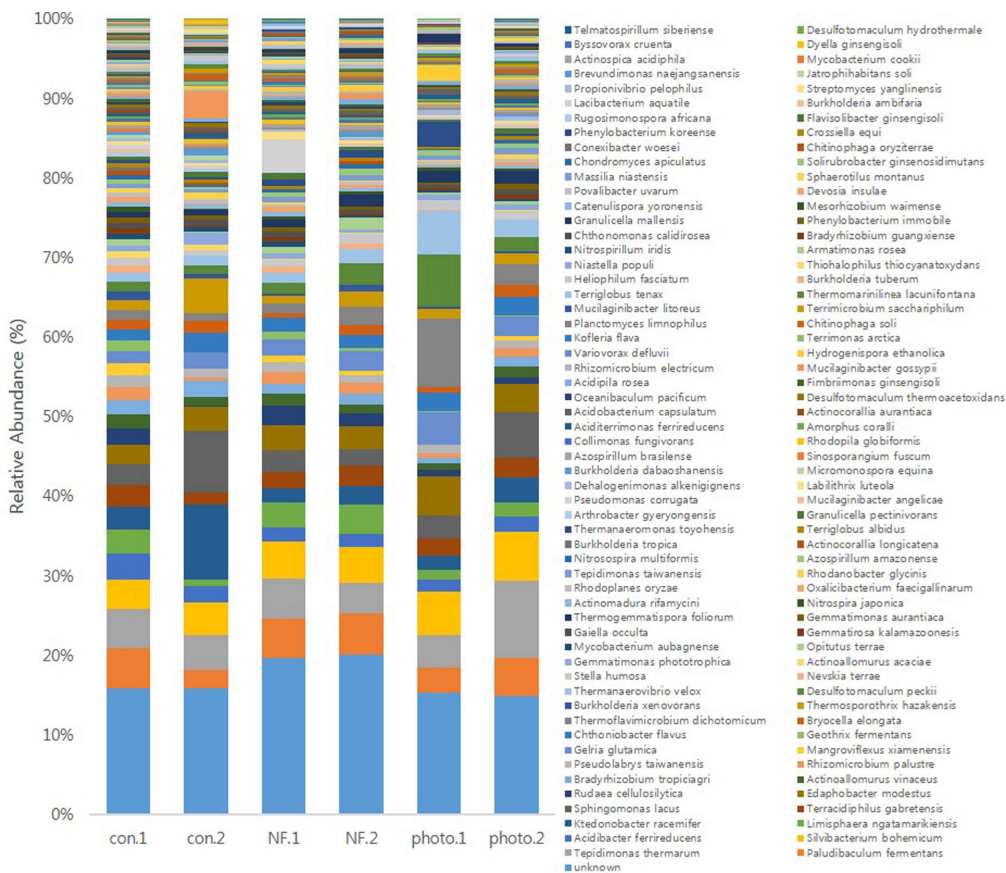


Fig. 5. Bacterial community analysis of soil samples. con.1; soil with added distilled water. NF.1; soil inoculated with nitrogen-fixed bacteria, photo.1; soil inoculated with photosynthetic bacteria, con.2; soil with added sterilized TSB, NF.2; soil with nitrogen fixation bacteria and sterilized TSB, 4; soil with photosynthetic bacteria and sterilized TSB.

을 촉진하는데 도움을 주지만 주변 환경에 영향을 미치지 않는 친환경 미생물 재제로 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구에서는 하지 않았지만 선별된 균의 다른 특징이나 유전자 분석을 통해 질소고정 의외에 식물 성장을 촉진하는 분석이 실시할 수 있을 것이라 생각된다. 또한 도시 녹화에 활용된다면 좋은 효과를 거둘 것으로 기대된다.

요 약

현재 도시의 도시열섬현상을 완화시키는 방안으로 도시 녹화사업 및 연구가 주목 받고 있다. 이 연구에서는 질소고정 균을 분리하고, 식물 성장에 미치는 영향을 확인했다. 먼저 질소고정 균을 분리하기 위해, 질소원이 없는 배지에서 enrichment를 실시했고, 질소원이 제한된 배지에서 높은 성장을 보인 colony를 분리하여 순수분리 했다. 순수 분리된 균은 ARA를 통해 acetylene이 90% 이상 감소되고, ethylene 생성을 통해 nitrogenase의 활성을 간접적으로 확인했다. 재현성이 확인된 *Cedecea* sp. MK7과 *Enterobacter* sp. Y8을 선별했다. 선별된 질소고정 균을 perennial rye grass의 성장에 적용한 결과 건조중량이 18.65 mg인 대조군에 비해 34.80 mg (186.60%)으로 증가한 것을 확인했다. 식물 성장 후, 질소고정 균이 접종된 토양의 미생물 군집 분석은 대조군과 유사했다. 따라서 본 연구에서는 도시녹화 시스템에 질소고정 균을 이용하여 식물 성장을 촉진한다면 그 효율이 증대될 것이다.

Acknowledgments

This research was supported by a grant (18SCIP-B103706-04) from Construction Technology Research Program funded by Ministry of Land, Infrastructure and Transport of Korean government and Korea National Environmental Microorganisms Bank (NFR-2017M3A9B8065734).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Kim DH, Song YI, Ryu JN, Park SM, Kang HN, Seo IK. 2015. Building on the NEXUS Based Climate Adaptation Mechanism for Integrated Environment Security. pp. 46-61.
- Kim SB, Cha EJ, Moon HS. 2010. A study on the indoor temperature reduction effect and the plants suitability of extensive green roof. *J. Nakdonggang Environ. Res. Inst.* **15**: 148-169.
- Biswas JC, Ladha JK, Dazzo FB. 2000. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **64**: 1644-1650.
- Triplett EW. 1996. Diazotrophic endophytes: progress and prospects for nitrogen fixation in monocots. *Plant Soil* **186**: 29-38.
- Shin WS, Islam R, Benson A, Joe MM, Kim KY, Gopal S, et al. 2016. Role of diazotrophic bacteria in biological nitrogen fixation and plant growth improvement. *Korean J. Soil Sci. Fert.* **49**:17-29.
- Zehr JP, McReynolds LA. 1989. Use of degenerate oligonucleotides for amplification of the nifH gene from the marine cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2522-2526.
- Setten L, Soto G, Mozzicafreddo M, Fox AR, Lisi C. 2013. Engineering *Pseudomonas protegens* Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions. *PLoS One* **8**(5):e63666. doi:10.1371/journal.pone.0063666.
- Lin L, Li ZY, Hu CJ, Zhang XC, Chang SP, Yang LT, et al. 2012. Plant growth-promoting nitrogen-fixing enterobacteria are in association with sugarcane plants growing in Guangxi, China. *Microbes Environ.* **27**: 391-398.
- Jia SH, Gururanib MA, Chuna SC. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophyticdiazotrophic bacteria from Korean rice cultivars. *Microbiol. Res.* **169**: 83-98.
- Kumari S, Singh J, Masih H. 2015. Isolation and identification of free living nitrogen fixer and Phosphobacteria from the partial flood affected area of Bihar and its effect on growth and yield of paddy (*Oryza sativa* L.). *Res. Environ. Life Sci.* **8**: 83-86.
- Shoebitz M, Claudia MR, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi LG, Cura JA. 2009. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from *Lolium perenne* rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **41**: 1768-1774.
- Katherine E, French, Tkacz A, Turnbull LA. 2016. Conversion of grassland to arable decreases microbial diversity and alters community composition. *Appl. Soil Ecol.* **110**: 43-52.
- Venter ZS, Scott SL, Strauss J, Jacobs K, Hawkins HJ. 2017. Increasing crop diversity increased soil microbial activity, nitrogen-sourcing and crop nitrogen, but not soil microbial diversity. *South African J. Plant and Soil* **34**: 371-378.
- Wang CO, Zheng MM, Song WF, Wen SL, Wang BR, Zhu CQ, et al. 2017. Impact of 25 years of inorganic fertilization on diazotrophic abundance and community structure in an acidic soil in southern China. *Soil Biol. Biochem.* **113**: 240-249.
- Wang L, Li J, Yang F, Yaoyao E, Raza WS, Huang QW, et al. 2017. Application of bioorganic fertilizer significantly increased apple yields and shaped bacterial community structure in Orchard soil. *Microbial Ecol.* **73**: 404-416.
- Tjepkema J, Evans HJ. 1975. Nitrogen fixation by free-living rhizobium in a defined liquid medium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 625-628.
- Lee KM. 1987. Studies on the effects of butachlor on nitrogen fixing in nonsulfur photosynthetic bacteria. Master's thesis Sung Kyun University.
- Cesar PC, Emilio JV, Monica NR, Carlos EE, Rubio LM. 2017. Kinetics of nif gene expression in a nitrogen-fixing bacterium. *J. Bacteriol.* **196**: 595-603.