

Acinetobacter lwoffii PO8에 의한 인산흡수 및 축적

신공식* · 윤민호¹ · 고정연¹ · 최우영¹

충북대학교 원예학과 첨단원예기술개발연구센터, ¹충남대학교 농화학과

초 록 : 토양 및 수계에 집적, 유입되어 있는 과다한 인산의 제거에 이용 가능한 미생물 자원을 확보하기 위하여 활성오니에서 분리된 *Acinetobacter lwoffii* PO8의 배양조건 및 외부환경조건에 따른 인산흡수 양상을 조사하였다. 배양액 내 초기 pH가 7.5~8.5 범위에서 균생육과 인산흡수율이 가장 높았으며, 탄소원으로 glycerol 및 arabinose를 첨가하였을 경우 각각 약 93 및 91%의 높은 인산 흡수율을 보였다. 질소원 형태에 따른 인산흡수양상은 아미노태 보다 암모늄염이 효과적이었으며, 특히, NH_4NO_3 와 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 각각 95와 96%의 인산흡수율을 나타냈다. 금속이온 중에서 Co^{2+} 첨가 시 균생육이 제해되었으나, 이외의 다른 금속이온은 균의 성장 및 인산흡수에 큰영향을 미치지 않았다. 아미노산 중 arginine, methionine 및 lysine 등은 아미노산을 첨가하지 않은 경우보다 10~20% 더 높은 인산흡수율을 나타냈었으며, 이때 배양기간 중 glucose의 공급으로 배지 중 잔존 인산이 완전히 제거되었다. 또한 ^{32}P 를 사용하여 균의 인산 분포를 조사한 결과로 세포내 흡수된 인산은 대부분 세포의 원형질 내에 polyphosphate의 형태로 분포되어 있었다. (2000년 4월 17일 접수, 2000년 6월 5일 수리)

서 론

호수, 만(bays) 및 기타 담수에서 부영양화(eutrophication)는 인과 질소 등의 무기영양염류가 급증됨으로써 조류가 폭발적으로 증식하는 현상이며, 이에 따라 급증한 남조류의 독소에 의하여 어패류가 폐사하고, 수자원의 질적 저하로 식수원은 물론 공업, 농업 용수원으로도 부적합하게 되어 상수나 용수처리에 많은 비용을 발생시킨다.¹⁾ 그러므로 하·폐수처리 과정에서 유입된 과다한 인의 제거 문제는 수자원 이용 및 수질오염의 관점에서 중요한 부분이다. 하·폐수처리 과정에서 기존에는 대부분 칼슘이온과 반응, 침전시켜 제거하는 등의 화학적 처리방법(정석법)이 적용되어 왔으나, 이러한 처리방법은 유지관리의 비용 및 2차적인 수질오염의 문제가 대두되어 왔다.^{2,3)} 그런데 최근 기존의 시설 전단부에 수중 교반기를 갖는 탱크의 설치 정도로 종래의 화학적 방법과 병용할 수 있는 미생물 이용의 생물학적 탈인법에 관심과 연구가 진행되어지고 있다.⁴⁾ 이러한 생물학적 방법은 수처리계에서 소비 에너지를 줄일 수 있으며, 사용되는 화학제를 경감시킬 수 있고, 미생물을 재 이용할 수 있다. 또한 토양계에서는 인산에 의한 염류집적 현상이 심화되고 있는데 이는 최근 국내의 시설재배 면적이 급증에 따라 집약적인 관리방식에 의해 연작지 등의 산성 토양에서 철 및 알루미늄 이온, 알카리성 토양에서는 칼슘이온이 인과 쉽게 결합하여 불용화 되는 것으로 이로 인해 식물이 이용할 수 있는 유리인산의 양이 점차 고갈되고 있다.⁵⁾

자연계에 존재하는 박테리아 중에는 자신이 필요로 하는 인보다 더 많은 인을 polyphosphate의 형태로 축적하는 미생물들이 존재한다.⁶⁾ 이들 미생물의 무기인 축적기작을 보면 먼저 세포외에서 인산분해효소(acid phosphatase, alkaline phosphatase)

에 의해 유리인을 생성하고, 유리된 무기인을 세포 내로 수송하여 인산중합효소(polyphosphate kinase)의 작용으로 인산중합체를 형성한다.^{6,7)} 미생물에 의한 인 제거의 문제는 미생물이 인을 어느 정도로 축적할 수 있는가에 달려있는데, 이러한 중합인산축적 미생물에 대해서 많은 연구가 진행되고 있으며, 대표적인 인산축적 미생물에는 *Acinetobacter* sp.,⁸⁾ *Pseudomonas* sp.,⁹⁾ *Aeromonas* sp.,¹⁰⁾ *Arthrobacter* sp.,³⁾ *Micrococcus* sp.,²⁾ 및 *Rhodospseudomonas* sp.¹¹⁾ 등이 있으며 이외에 많은 미생물이 알려져 있다.

급속한 경제 성장과 더불어 주요 오염원인 생활하수와 공장 폐수가 급증하고, 축산물의 수요 증가에 의한 축산 폐수의 증가, 늘어나는 화학비료 및 농약의 사용 등은 토양내 염류 집적과 수계로의 유입은 인 부하에 큰 비율을 차지하여 수질오염의 문제를 더욱 심화시키고 있다. 이에 따라 우수한 인 축적능을 갖는 미생물의 선발 및 미생물축적체의 개발이 이루어진다면 인산제거 및 이용에 더욱 효과적일 것이라 생각된다.

따라서 본 연구는 과잉의 인을 포함하는 하수로부터 인 제거 및 연작지의 불용성 인산의 이용 등의 측면에서 인축적능이 우수한 균주를 개발하기 위한 기초연구로 활성오니로부터 분리·동정된 *Acinetobacter lwoffii* PO8을 이용하여, 여러 배양조건에 따른 인산흡수 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

공시균주 및 배지

공시균주는 Shin 등¹²⁾이 활성오니(activated sludge)로부터 분리·동정한 *Acinetobacter lwoffii* PO8을 사용하였다. 공시배지는 Shoda 등³⁾이 사용한 P-1 액체배지(glucose 0.2%, NH_4Cl 0.1%, NaCl 0.2%, Na_2SO_4 0.1%, KCl 0.01%, MgCl_2 0.001%, CaCl_2 0.001%, FeCl_3 0.0001%, Na_2HPO_4 0.022%, tris(hydroxymethyl)aminomethane 1%, pH 7.6)를 기본배지로

찾는말 : 인산 제거, 인산흡수, *Acinetobacter lwoffii*, poly-Pi
*연락처 : Tel : 82-41-261-3245; Fax : 82-41-275-7467
E-mail : kongsik-s@hanmail.net

사용하였다. 배양은 P-1 액체배지에 전배양액을 0.5%(균수 3~4 × 10⁶/ml)되게 접종하여 30°C에서 150 rpm으로 진탕배양하였으며, 전배양액은 보관중인 한천사면배지로부터 균주를 백금이로 1회 취하여 P-1 액체배지에 접종하고 24시간 진탕배양한 것을 사용하였다.

생육도 측정

균의 생육은 배양액을 2배 희석하여 분광광도계(Shimadzu UV-120-02, Japan)를 이용하여 660 nm에서 흡광도로 측정하였다.

인산 정량

배양액중의 인산은 폴리브덴 청법¹³⁾에 따라 측정하였다. 배양액을 16,000×g에서 15분간 원심분리한 후, 상등액을 ascorbic acid-molybdate 시약과 발색시켜 분광광도계 880 nm에서 흡광도를 측정하였다.

환원당 정량

배지내의 glucose 함량은 Dinitrosalicylic acid 방법¹⁴⁾에 따라 배양여액을 DNS 시약으로 발색하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

배양조건에 따른 인산흡수량상

초기 pH : 공시균의 성장 및 인산 흡수에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 배양액내 초기 pH를 5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9로 조정하여 30°C에서 36시간 진탕 배양하여 배양액 중의 잔존 인산량을 측정하였다.

탄소원 : glucose를 포함하는 P-1 배지를 대조구로 하여 탄소원으로 glucose 대신에 fructose, galactose, sucrose, maltose, lactose, xylose, arabinose, sorbitol, mannitol, glycerol을 0.2% 되도록 첨가한 후 배양하여 배양 여액 중의 잔존 인산량을 측정하였다.

질소원의 영향 : NH₄Cl을 포함한 P-1 배지를 대조구로 하여 각각 0.1%의 NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, (NH₂)₂CO, NaNO₃, KNO₃, NaNO₂를 첨가한 후 상기 배양조건으로 배양하였으며, 배양기간 동안 시료를 취하여 배양액의 잔존 인산량을 측정하였다.

금속이온 및 아미노산의 영향 : 금속이온은 P-1 배지를 대조구로 하고 여기에 CoCl₂·6H₂O, ZnCl₂, CuCl₂·2H₂O, BaCl₂·2H₂O, LiCl, NiCl₂·6H₂O, MnCl₂·4H₂O, NH₂MoO₄·2H₂O, Al₂(SO₄)₃·16~18H₂O 등의 금속이온을 0.1~10 mg/l 농도로 첨가하여 36시간 배양하였고, 아미노산의 첨가 효과를 조사하기 위해 배지의 PO₄³⁻의 초기농도를 200 mg/l로 조정하고, glucose가 95% 이상 소비되는 배양 36시간 후에 여과살균 한 Phe, Asp, Glu, Arg, Met, Tyr, Ala, Lys, Cys 등을 100 mg/l의 농도로 무균적으로 첨가한 다음, 이를 같은 조건으로 계속 진탕 배양하면서 배양액 중의 인산량을 측정하여 인산흡수 양상을 조사하였다.

인산 흡수 및 분비 : 배양 24시간 후 탄소원으로 0.2% glucose와 30, 60 mg/l의 sodium acetate를 각각 첨가하고, 배양

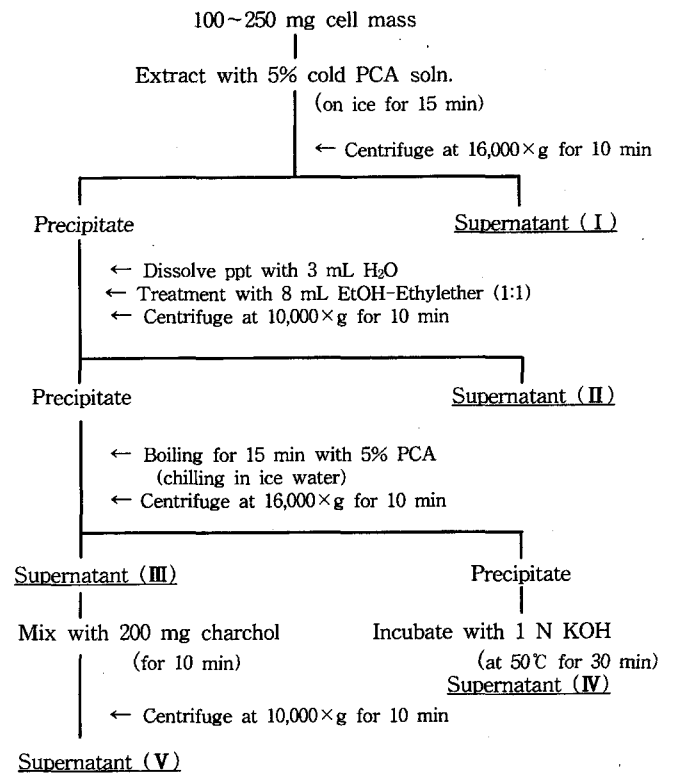


Fig. 1. Schematic diagram for analysis of intracellular PO₄³⁻.

하면서 배양 여액 중의 잔존 인산량을 측정하여 균에 의한 배지내 인산의 흡수와 분비 여부를 검토하였다.

Volutin 염색에 의한 세포내 인산축적의 검경

세포내에 polyphosphate가 축적되는 양상을 관찰하기 위해 배양초기인 6시간과 24시간 배양 후의 균체를 증류수로 세척하고 적정균수가 되도록 희석하여 Laybourn 방법¹⁵⁾에 따라 Albert's stain 변형시약으로 Toluidine blue를 사용하여 염색한 다음 광학현미경(Olympus BX50)으로 인산축적 시 세포내부에 나타나는 짙은 남색이나 보라빛의 정도를 검경하였다.

세포내 인산 분포

세포내에 축적된 인산의 분포를 조사하기 위해 Shoda 등³⁾의 방법에 따라 인산을 ³²P로써 10⁻⁴ mCi/ml 함유하는 P-1 액체배지에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 균체를 회수하고, 균체 250 mg(wet weight)에 냉각시킨 5% perchloric acid(PCA)용액 15 ml을 가하였다. 이후 4°C에서 15분 동안 추출하고 원심분리하여 상등액에 포함된 유리상태의 무기인산, nucleotide, 저분자의 polyphosphate를 제거한 다음 Fig. 1의 절차로 분획하였다. 각 분획물을 Whatman 3 MM Chr. 지에 3, 5 μl씩 점적하고, 건조한 다음 X-ray 필름(Fuji Co.)에 감광시켜 확인하였다.

결과 및 고찰

배양조건에 따른 인산흡수 양상

초기 pH : *Acinetobacter lwoffii* PO8의 배양조건에 따른 인산

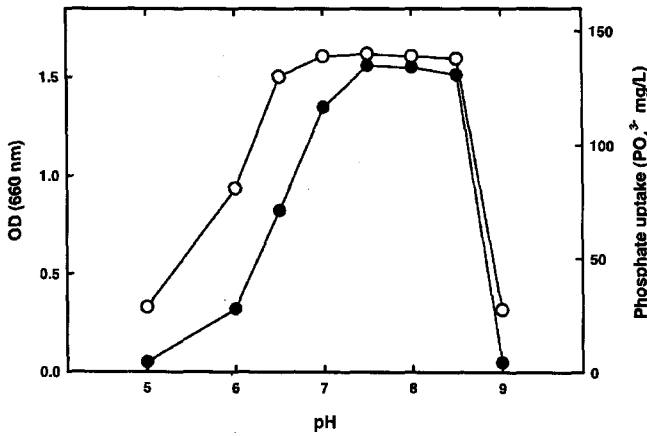


Fig. 2. Effect of initial pH on cell growth and phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8. ●, OD (660 nm); ○, phosphate uptake.

흡수 양상을 조사하기 위하여 인산의 초기농도를 PO_4^{3-} 로서 150 mg/l로 조정된 P-1 기본배지에 공시균주를 접종하고 30°C에서 진탕배양하여 잔존 인산량을 조사하였다. 먼저 배양액 중 초기 pH를 5에서 9까지 조정하여 균생장 및 인산흡수 양상을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 균체의 생장도는 초기 pH 7.5~8.5 범위에서 가장 높았으며, 인산흡수도 이 범위에서 가장 높은 것으로 나타내 균의 생장이 왕성함에 따라 인산의 흡수도 좋은 것으로 나타났다.

탄소원 : Glucose를 대조구로하여 여러종류의 탄소원을 각각 0.2%되게 첨가하고 36시간 배양한 다음 균체의 생육 및 인산흡수를 조사한 결과는 Table 1과 같이 탄소원으로 glycerol, arabinose, sucrose를 첨가했을 때 약 90~93%의 인산흡수율을 보였고, 균체 생육도도 좋았으나, 대조구인 큰 차이를 보이지 않았다. Ohsumi 등¹⁴⁾도 *Arthrobacter globiformis*의 인산흡수에서 150 mg/l의 PO_4^{3-} 를 포함한 배지에서 glucose의 소비에 따라 인산을 120 mg/l 흡수하였으며, arabinose, xylose, sucrose, maltose, glycerol 등의 경우에는 100 mg/l를 흡수하였으나, lactose, sorbitol, mannitol 등은 대사에 이용되지 않았다고 보고하였다. 이는 *A. lwoffii* PO8과 같은 경향을 보였으며, 탄소원

Table 1. Effect of carbon sources on cell growth and phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8

Carbon source	Growth (OD _{660nm})	PO ₄ ³⁻ Uptake (%)*
Control	1.39	93
Fructose	1.21	82
Galactose	0.34	22
Sucrose	1.5	90
Maltose	0.12	31
Lactose	0.01	12
Xylose	1.68	89
Arabinose	1.26	91
Sorbitol	1.55	88
Mannitol	1.63	81
Glycerol	1.64	93

*Uptake content = $\frac{\text{initial phosphate} - \text{residual phosphate}}{\text{initial phosphate}} \times 100$.

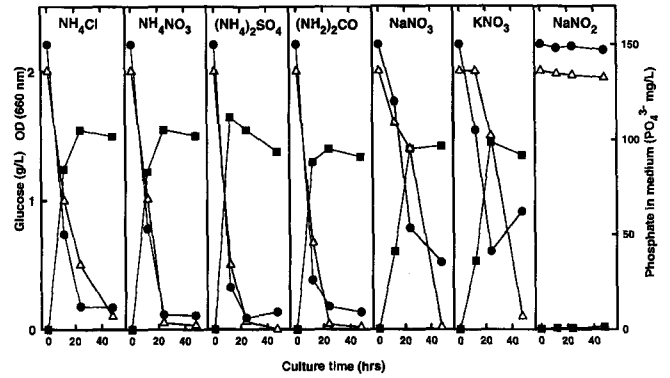


Fig. 3. Effect of nitrogen sources on cell growth and phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8. Each 0.1% nitrogen source was added to the basal medium as a substitute of NH_4Cl . △, Glucose; ■, OD (660 nm); ●, phosphate in medium.

glucose가 인산흡수에 가장 효과적인 것으로 생각된다.

질소원의 영향 : 배지에 무기질소원을 첨가하였을 때 인산흡수에 미치는 효율을 조사하기 위해 각 질소원을 0.1%씩 첨가하여 배양기간별 변화를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_2)_2CO$ 등과 같이 질소원으로 암모늄염의 이용성이 좋았으며, 특히 NH_4NO_3 , $(NH_4)_2SO_4$ 가 각각 약 95, 96%로 대조구인 NH_4Cl 의 93% 보다 높은 인산흡수를 보였다. 그러나 $NaNO_3$, KNO_3 는 균의 생장, glucose 소비 및 인산흡수율에서 비록 암모늄염에 비해 낮았으나, 상당한 인산흡수율을 나타냈다. Ohsumi 등¹⁶⁾도 또한 아미노대는 암모늄염보다 낮은 이용성을 보였으며, 암모늄염이 인산흡수의 질소원으로 효과적이라고 보고한 바 있다.

금속이온 및 아미노산의 첨가효과 : 기본배지에 함유된 금속이온 이외의 각종 금속이온을 0.1~10 mg/l의 농도로 첨가하고 인산흡수 양상을 조사한 결과는 Table 2와 같다. Co^{2+} 는 전혀 이용되지 않았으며 Ni^{2+} 는 10 mg/l 농도에서 이용되지 못했다. 그러나 이외의 첨가된 대부분의 금속이온에서 대조구와 균의 성장 및 인산의 흡수에서 큰 차이를 보이지 않았다. 위의 결과로 보아 본 균주의 이용 시 금속이온에 의해 인산흡수에 저해 작용을 받지 않을 것으로 보여진다.

P-1 기본배지의 탄소원이 고갈되어 영양 결핍상태에 있을 때 아미노산의 첨가가 인산흡수 효율에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. Arginine, methionine, lysine을 첨가하였을 경우에 첨가하지 않은 대조구에 비하여 인산흡수율이 10~20% 향상되었고, 특히 arginine이 대조구 142 mg/l보다 178 mg/l로서 가장 높은 흡수율을 보였다. Ohsumi 등¹⁶⁾은 각종 아미노산 중에서 특히 phenylalanine을 50~100 mg/l로 첨가하였을 때 균의 성장과 인산의 흡수에 높은 영향을 보였으며, 또한 Met, Lys, Ala, Gln 등 대부분의 아미노산이 효과적이었다고 보고하였는데, 본 실험에 사용한 공시균주는 phenylalanine의 경우 대조구와 큰 차이를 보이지 않았으나 Met, Lys, Tyr 첨가에 의해 인산흡수효율이 증가되었다.

인산흡수 및 분비 : 미생물은 탄소원을 세포내로 흡수하기 위해 ATP의 에너지를 이용하게 되며 이때 전환된 ADP는 다시 ATP를 생성하기 위해 세포내의 일부 인산중합체를 분해시

Table 2. Influence of metal ions on cell growth and phosphate uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8

Metal source	0.1 mg/l		0.25 mg/l		1 mg/l		10 mg/l	
	Growth (OD _{660nm})	PO ₄ ³⁻ uptake (%)*	Growth (OD _{660nm})	PO ₄ ³⁻ uptake (%)	Growth (OD _{660nm})	PO ₄ ³⁻ uptake (%)	Growth (OD _{660nm})	PO ₄ ³⁻ uptake (%)
Control	1.47	93.0	-	-	-	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-
ZnCl ₂	1.40	92.5	1.42	92.5	1.47	93.0	-	-
CuCl ₂ ·2H ₂ O	1.48	93.0	1.36	93.4	1.18	91.0	0.12	35.7
BaCl ₂ ·2H ₂ O	1.67	92.7	1.39	91.4	1.42	92.0	1.45	92.7
LiCl	1.59	93.0	1.44	94.0	1.33	93.7	1.28	92.6
NiCl ₂ ·6H ₂ O	1.50	93.0	1.31	93.3	0.90	90.0	-	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1.63	92.2	1.60	90.2	1.42	94.2	1.36	92.7
NH ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.62	92.8	1.52	93.0	1.34	93.4	1.40	92.5
Al ₂ (SO ₄) ₃ ·16H ₂ O	1.51	92.9	1.24	93.6	1.49	92.0	1.72	90.2

- : Not growth and not phosphate uptake.

*Uptake content = $\frac{\text{initial phosphate} - \text{residual phosphate}}{\text{initial phosphate}} \times 100$.

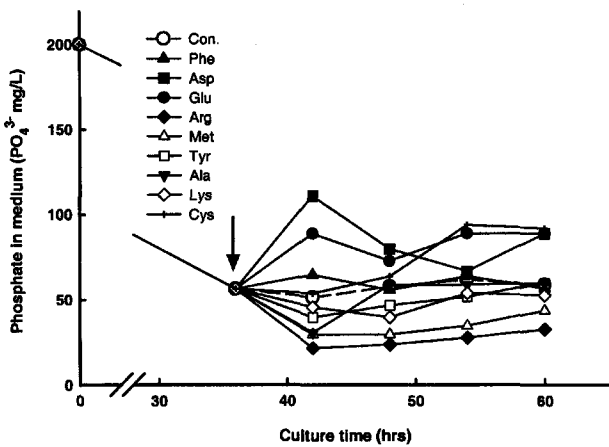


Fig. 4. Effect of subsequent addition of amino acid on phosphate uptake during cultivation by *Acinetobacter lwoffii* PO8. Arrow: addition of amino acids (100 mg/l).

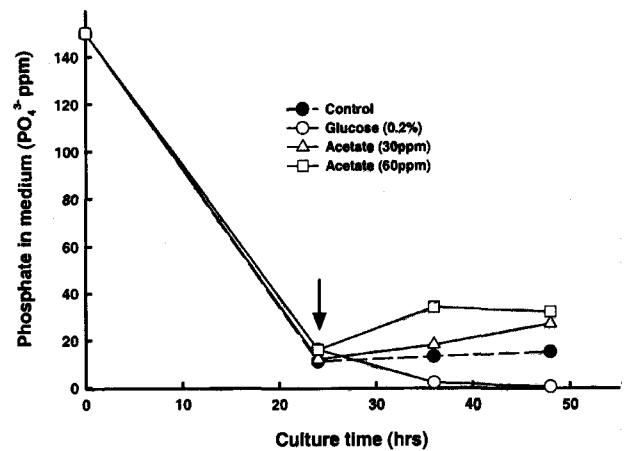


Fig. 5. Effect of subsequent addition of glucose and acetate on phosphate uptake and release during cultivation by *Acinetobacter lwoffii* PO8. Arrow: addition of glucose and acetate.

킨다. 이들 과정에서 분해된 인산이 세포 밖으로 방출되며,¹⁷⁾ 대부분의 미생물은 흡수와 분비를 지속적으로 행하는데 인산축적능이 높은 미생물의 경우 분비의 정도가 낮은 것으로 알려져 있다.^{2,3)} 이러한 흡수와 분비에 미치는 영향을 조사하기 위해 균의 생육이 정지기에 도달하여 인산을 축적하고 있는 상태에서 탄소원으로 glucose와 acetate를 첨가하고 배양하면서 인산의 흡수와 분비의 정도를 파악하기 위하여 배양 여액 중의 잔존 인산량을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 60 ppm의 acetate를 첨가했을 때는 이후 바로 흡수한 인산을 분비하였고, 30 ppm은 인산분비율의 정도가 시간이 경과하면서 조금씩 늘어났으나, glucose의 경우 첨가하고 배양 24시간이 경과하였을 때 인산의 분비는 관찰되지 않았으며, 잔존 인산을 더욱 흡수하여 배지내의 인산을 100% 제거하였다. Murphy⁸⁾ 및 Comeau 등¹⁷⁾은 호기적 조건에서 acetate 및 succinate의 첨가로 인산의 방출이 관찰되었으며, 이는 기질을 세포내로 흡수하기 위해 많은 에너지를 필요로 하기 때문이라고 보고하였으며, Potgieter¹⁸⁾은 propionate와 glucose의 첨가가 인산의 방출을 유도하였다고 보고하였다. 또한 Nakamura²⁾는 혐기적 조건에서 여러 기질 중

에서 glucose가 가장 높은 인산의 방출을 유도했다고 하였다. 그러나 본 균주는 이와는 다르게 acetate에서는 다소의 방출은 보였으나 glucose의 첨가에서 인산의 방출은 관찰되지 않고 잔존의 인산을 흡수하는 결과를 보였다. 이는 *A. lwoffii* PO8의 경우 균주의 특성으로 기질의 이용에 따라 차이를 보였는데, 탄소원으로 glucose의 공급은 균의 생육을 좋게 하여 인산 흡수율을 증가시켰을 것으로 생각된다.

Volutin 염색에 의한 세포내 인산축적 검정

액체 배양 중 세포내로 polyphosphate가 축적되어 vultine 구조체를 형성하게 된다. 이러한 인산의 흡수양상을 관찰하기 위해 6시간 배양 균체와 24시간 후의 균체를 toluidine blue 시약으로 염색하여 광학현미경으로 인산의 축적 정도를 확인하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 흡수전의 경우 밝은 녹색의 세포내부에 남보라 빛의 입자가 관찰되었고, 반면에 24시간 후의 균체는 세포내부 전체가 짙은 남보라 색으로 염색되어 인산 축적 정도의 차이를 보였다. 이로 보아 *A. lwoffii* PO8은 배양 24시간 이후 높은 인산의 흡수가 이루어지고 있는 것을 확인할

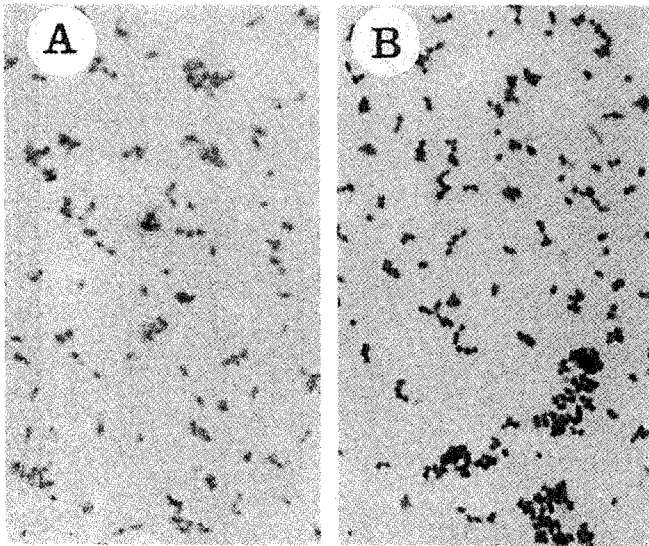


Fig. 6. Microscopic pictures (×400) of *Acinetobacter lwoffii* PO8 stained for the volutine granules. (A) Before uptake of phosphate, (B) after uptake of phosphate

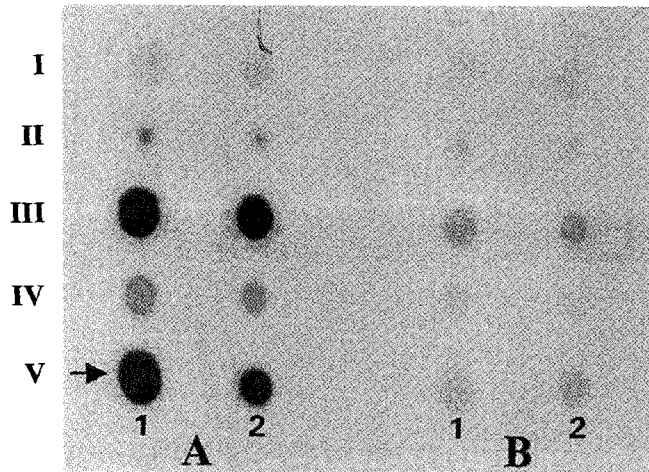


Fig. 7. Autoradiogram of intracellular location of polyphosphate in *Acinetobacter lwoffii* PO8(A) and *chromobacterium lividum* PI4(B). Fraction I: Free Pi, nucleotide, and low molecular poly-Pi, II: Lipid, III: Nucleic acid and high molecular polyphosphate, IV: Protein, V: High molecular polyphosphate 5 μl(1) and 3 μl(2) of sample was spot.

수 있었다. 본 실험과 같이 Nakamura 등²⁾도 인산 축적균으로 분리한 *Micrococcus* sp. NM-1의 volutine granule 염색에서 인산축적 정도에 따라 명확한 차이가 관찰되었다.

세포내 인산의 분포

세포내의 DNA, RNA등의 핵산이나 인지질에 결합되어 있는 인산을 제외한 원형질내에 축적되어 있는 Poly-Pi의 정도를 확인하기 위해 방사성 동위원소인 ³²P를 함유하는 P-1액체배지에서 24시간 배양한 균체를 회수하여 Shoda 등³⁾의 방법으로 세포분획을 실시하였다. 이로 얻어진 I, II, III, IV, V 분획을 Whatman 3MM Chr. 여지에 점적하여 X-ray 필름에 감광시켰으며, 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 여기서 분획 I은 유리인산, nucleotide 및 저분자의 polyphosphate, 분획 II는 인지질,

분획 III는 고분자의 polyphosphate 및 핵산, 분획 IV는 단백질 추출물이며, 분획 V는 활성탄을 이용하여 분획 III중의 핵산을 제거하고 순수한 고분자의 polyphosphate만을 얻은 것이다. 분획 I, II, IV에서 보다 특히 분획 V에서 감광도가 현저한 차이를 나타낸 autoradiogram을 확인할 수 있었다. 또한 *A. lwoffii* PO8(Fig. 7A)과 함께 인산축적 세균으로 분리·동정된 *Chromobacterium lividum* PI4(Fig. 7B)와 다소 차이를 보여 균주에 따른 세포내 인산의 축적 정도를 비교할 수 있었다. Shoda 등³⁾은 *Arthrobacter gloviformis*의 대수기에 핵산과 인산 중합체가 57%이었으며 정지기에는 75-82%를 차지했다고 보고했다. Auling 등¹⁹⁾은 활성오니로부터 분리한 *Acinetobacter* sp.의 transmission electron microscopy(TEM)을 통해 각 균의 세포내에 granule 상태로 많은 중합인산을 축적하고 있는 것을 관찰하였고, Murphy 등⁸⁾은 *Acinetobacter*에서 같은 방법으로 유도기 초기와 정지기 초기의 세포내 관찰에서 유도기 초기의 경우 세포내에 유리인 및 작은 인산 덩어리의 상태로 이루어져 있었으나, 정지기 초기에는 이들이 결합하여 큰 granule 상태로 존재한다고 보고하였다. 또한 Florentz 등²⁰⁾은 활성오니에서 채취한 균주의 호기조건과 혐기조건의 TEM 관찰에서 전 조건은 세포내에 거대한 인산중합체를 축적하고 있었으며, 후 조건은 이들 인산중합체가 모두 방출되어 있음을 보고하였다. 이들 결과로부터 본 실험에서는 세포내의 전자현미경 관찰은 없었지만 방사성 동위원소 ³²P의 세포내 이동 이후 분획을 통해 인지질이나 DNA와 RNA등의 핵산에 이용된 인산 이외에 원형질내에 다량의 인산중합체를 축적하고 있음을 세포분획을 통해 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Kwak, N. T. and Ahn, T. Y. (1997) Progress of eutrophication and its countermeasure. *Kor. J. Microbiol.* **33**, 72-77.
2. Nakamura, K., Masuda, K. and Mikami, E. (1991) Isolation of a new type of polyphosphate accumulating bacterium and its phosphate removal characteristics. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 258-263.
3. Shoda, M., Ohsumi, T. and Udaka, S. (1980) Screening for high phosphate accumulating bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 319-324.
4. Mino, T., Kawakami, T. and Matsuo, T. (1984) Location of phosphorus in activated sludge and function of intracellular polyphosphates in biological phosphorus removal process. *Wat. Sci. Tech.* **17**, 93-106
5. Kang, S. C. and Choi, M. C. (1999) Solid culture of phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. PS-113. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 1-7.
6. Harold, F. M. (1966) Inorganic polyphosphates in biology structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.* **30**, 772-794.
7. Michael, J. L., Perry, F. C. and Robert, G. W. (1995) Effect of substrate and cell surface hydrophobicity on phosphate utilization in bacteria. *Appl. Environmen. Microbiol.* **61**, 913-919.
8. Murphy, M. and Lotter, L. H. (1986) The effect of acetate and

- succinate on polyphosphate formation and degradation in activated sludge, with particular reference to *Acinetobacter calcoaceticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 512-517.
9. Hiraishi, A. and Morishima, Y. (1990) Capacity for polyphosphate accumulation of predominant bacteria in activated sludge showing enhanced phosphate removal. *J. Ferment. Bioeng.* **69**, 368-371.
 10. Lotter L. H. and Murphy, M. (1985) The identification of heterotrophic bacteria in an activated sludge plant, with particular reference to polyphosphate accumulation. *Water S. A.* **11**, 179-184.
 11. Hiraishi, A. and Kitamura, H. (1984) Differences in phototrophic growth on high phosphate concentrations among *Rhodospseudomonas* species. *J. Ferment. Technol.* **62**, 293-296.
 12. Shin, K. S. J., Ko, U. and Choi, W. Y. (1999) Isolation and identification of high phosphate-accumulating bacteria. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**, 286-291.
 13. Callaway, J. O. (1995) In 'Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater,' 19th ed., pp. 175-176, American Public Health Association, Washington, D.C.
 14. Miller, G. L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428.
 15. Laybourn, R. L. (1924) A modification of Albert's stain for the *Diphtheria bacillus*. *J. Am. Med. Assoc.* **83**, 121
 16. Ohsumi, T., Shoda, M. and Udaka, S. (1980) Influence of cultural conditions on phosphate accumulation of *Arthrobacter globiformis* PAB-6. *Agric. Biol. Chem.* **44**, 325-331.
 17. Comeau, Y., Hall, K. J., Hancock, R. E. W. and Oldham, W. K. (1986) Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Wat. Res.* **20**, 1511-1521.
 18. Potgieter, D. J. J. and Evans, B. W. (1983) Biochemical changes associated with luxury phosphate uptake in a modified phoredox activated sludge system. *Wat. Sci. Technol.* **15**, 105-115.
 19. Auling, G., Pilz, F., Busse, H. J., Karrasch, S., Streichan, M. and Schon, G. (1991) Analysis of the polyphosphate-accumulating microflora in phosphorus-eliminating, anaerobic-aerobic activated sludge systems by using diaminopropane as a biomarker for rapid estimation of *Acinetobacter* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 3585-3595.
 20. Florentz, M., Granger, P. and Hartemann, P. (1984) Use of ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopy and electron microscopy to study phosphorus metabolism of microorganisms from wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **16**, 519-525.

Phosphate Uptake by *Acinetobacter lwoffii* PO8 and Accumulation.

Kong-Sik Shin*, Min-Ho Yoon¹, Jung-Youn Ko¹ and Woo-Young Choi¹(*Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea;* ¹*Department of Agricultural Chemistry, Chungnam National University, Taejeon, 305-764, Korea*)

Abstract : To remove phosphate accumulated in the soil and water, *Acinetobacter lwoffii* PO8 possessing a high ability to accumulate phosphate was isolated from a active sludge. Bacterium was cultured in the liquid medium containing 150 µg/mL of phosphate at 30°C in different culture conditions to examine intracellular phosphate uptake. The initial pH in the range of 7.5~8.5 was effective on the growth and phosphate uptake of the strain. Glycerol and arabinose used as a carbon sources showed 93 and 91% the phosphate uptake, respectively. Among the nitrogen sources, ammonium salt such as NH₄NO₃ and (NH₄)₂SO₄ was effectively utilized on the phosphate uptake compared with amino compounds. The rate of the phosphate uptake of NH₄NO₃ and (NH₄)₂SO₄, was 95 and 96%, respectively. The growth and phosphate uptake ability in the strain were significantly promoted when metal ions were added in the medium; Co²⁺, however, was not utilized by the strain. The capacity of phosphate uptake was enhanced to 10~20% when arginine, methionine, or lysine was added. Using ³²P to examine the uptake pattern of intracellular phosphate, experiment result showed that polyphosphate was largely found in the fraction of intracellular inorganic phosphate of *Acinetobacter lwoffii* PO8.

Key words : phosphate remove, phosphate uptake, *Acinetobacter lwoffii* PO8, polyphosphate

*Corresponding author