

## 인 축적능이 우수한 세균의 분리 및 동정

신공식\* · 고정연<sup>1</sup> · 최우영<sup>1</sup>

충북대학교 원예학과 첨단원예기술개발연구센터, <sup>1</sup>충남대학교 농화학과

**Isolation and Identification of High Phosphate-accumulating Bacteria. Shin, Kong-Sik\*, Jung-Un Ko<sup>1</sup>, and Woo-Young Choi<sup>1</sup>.** Research Center for the Development of Advanced Horticultural Technology, Department of Horticulture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea, <sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea - By using autoradiography and phosphate medium, high phosphate accumulating bacteria were isolated from the soil of protected cultivation area and activated sludge. Selected strain, PO8, was gram-negative, rod/spherical (0.5 ~ 0.6 × 1.0 ~ 1.2 μm in size) and non-motile. PI4, another selected strain, was gram-negative, rod (0.4 ~ 0.5 × 1.5 ~ 1.6 μm in size) and motile. It also had flagella. According to their morphological, physiological and biochemical properties, the strains were identified as *Acinetobacter lwoffii* PO8 and *Chromobacterium lividum* PI4, respectively. *A. lwoffii* PO8 and *C. lividum* PI4 cultured in the P-1 medium containing 150 ppm phosphate were able to uptake high phosphate up to 92% and 85%, respectively after 24 hours at 30 °C during liquid culture.

**Key words :** phosphate-accumulating bacteria, autoradiography, activated sludge, *Acinetobacter lwoffii* PO8, *Chromobacterium lividum* PI4

인 성분은 호수, 만 및 기타 담수에서 질소와 더불어 부영양화(eutrophication)현상을 일으키는 주 요인으로[12, 16] 폐수처리 과정에서 인을 제거하기 위한 여러 방법이 강구되어 왔으며, 흔히 석회, 알루미늄 및 염화철 등을 이용한 화학적 침전법이 일반적으로 적용되고 있다[14, 18, 20]. 그러나 이러한 화학적 방법은 여러가지 단점, 즉 예를 들면 시설비, 유지관리비, sludge 처리비용, 유출수의 pH에 의한 제 2차 수질오염의 문제 등이 대두되고 있어서[7, 19] 단순하면서 효과적인 생물학적 방법에 대한 관심이 높다. 또한 토양내 무기염류의 집적은 농작물의 연작장해를 발생시키며, 인산염과 질산염이 문제가 되는 염류로 잘 알려져 있다. 특히 인은 다른 무기이온과는 달리 토양내에서 쉽게 불용화 되므로 과잉 공급에 의한 작물의 생리장해 등을 일으키는데[17], 그동안 크게 부각되지 않았으나, 최근 국내의 시설재배 면적이 급증하는 추세에 있고 집약적 관리방식으로 인하여 시설재배 토양에서의 인산염의 과다축적에 대한 문제점이 제기되고 있으며 아울러 그 경감대책에 대한 논의도 활발하다.

많은 미생물이 세포 내에 Poly-Pi의 형태로 과잉의 인산을 축적할 수 있다고 알려져 있는데, 특히 호기성균이며 세포내에 volutin granule을 형성하는 *Acinetobacter*속 균주가 혐기-호기 폐수처리 공정에서 인산제거에 중요한 역할을 하는 것으로 연구되어 있고[2, 11], *Pseudomonas*속[6], *Xanthomonas*속[20] 및 *Arthrobacter globiformis*[16] 등의 세

균에 있어서도 실용적인 측면에서 연구가 이루어져 있다. 이외에도 *Micrococcus*속[13], *Micrococcus*속[12], *Aeromonas*속[17], *Rhodospseudomonas*속[5], *Streptomyces*속[4] 등의 세균, *Aspergillus niger*[15], *Neurospora crassa*[3] 등의 곰팡이, 그리고 광합성 남조류[4] 등도 인을 축적한다고 보고되어 있으며, 이들 균주를 이용한 생물학적 인 제거에 대한 연구가 수행되고 있다.

따라서, 본 연구는 과잉의 인을 포함하고 있는 하수 및 연작장해 토양에서 생물학적 방법에 의해 인을 제거할 목적으로 토양 및 활성오니로부터 인 축적능이 우수한 균주를 최종 분리하여, 동정하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주의 분리 및 배양

인 축적균의 분리를 위해 충남 및 전북지역의 주요 시설재배지의 토양과 하수처리장에서 수집한 활성오니(activated sludge)를 분리원으로 하였다. 시료 1 g을 0.85% NaCl 용액 99 mL에 현탁·회석한 후 Shoda 등[16]에 의한 P-1 한천배지(glucose 2 g, NH<sub>4</sub>Cl 1 g, NaCl 2 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g, KCl 0.1 g, MgCl<sub>2</sub> 0.01 g, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g, FeCl<sub>3</sub> 0.001 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.22 g, tris(hydroxymethyl)aminomethane 10 g, agar 15 g, distilled water 1 L, pH 7.6)에 도달하고, 25 °C에서 2일간 배양하면서 형성된 집락을 3회 이상 계대하여 순수 분리하였다. 선별된 균주는 Shoda 등[16]의 방법에 따라 plate 당 10<sup>-2</sup>~10<sup>-3</sup> μCi <sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>를 함유하는 P-1 한천

\*Corresponding author

Tel. 82-421-261-3245, Fax. 82-431-275-7467

E-mail: Kongsik-s@hanmail.net

평판배지에서 1일 배양시키고 형성된 집락 위에 X-ray 필름(Fuji Co.)을 올려놓고 하루 더 배양하고, X-ray 필름을 감광시켜 진한 점을 나타낸 균주를 분리하였다. 또한 분리 균주를 P-1 액체배지에서 배양시켜 여액 중 인산의 감소율이 높은 균주를 최종 선별하였다. 균주의 배양은 250 mL 삼각플라스크에 P-1 액체배지를 50 mL씩 분주하여 121 °C에서 15분간 고압증기멸균한 후 전배양액을 0.5%(균수  $3 \sim 4 \times 10^6$ /mL)되게 접종하여 25 °C에서 진탕배양(Rotary shaker, 150 rpm with a stroke diameter of 5 cm)하였다. 전배양액은 보관중인 한천사면배지로부터 균주를 백금이로 일회 취하여 P-1 액체배지에 접종하고 24시간 진탕배양한 것을 사용하였다.

#### 균의 생육도 측정

균의 생육은 배양액을 회석하여 분광광도계(Shimadzu, UV-120-02)를 이용해 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 인산의 정량

배양액중의 인산은 ascorbic acid에 의한 몰리브덴 청법[1]에 따라 측정하였다. 배양액을 12,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상등액 1 mL와 ascorbic acid-molybdate 시약 1 mL를 25 °C에서 15분간 발색시켜 분광광도계로 880 nm에서 흡광도를 비교하였다. 표준물질로  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 를 사용하여 검량선을 작성하였으며 분석범위는 1~250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

#### 환원당의 정량

배지내의 glucose 함량은 dinitrosalicylic acid 방법[10]으로 측정하였다. 배양여액 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 넣고 5분간 끓인 다음 냉각시키고, 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다. Glucose를 표준시료로 사용하였으며 분석범위는 50~1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다.

#### 분리 균주의 동정

균주의 동정은 Bergey's Manual[9]에 준하여 동정하였다. 선별된 균주의 크기와 형태학적 특성은 Gram염색, nutrient agar에서 배양한 집락의 크기, 모양, 색깔 등을 관찰하였고, 반 유동 증충배지에 배양하여 운동성을 조사하였다. 그리고, 전자현미경 관찰은 nutrient agar 배지에서 24시간 배양한 균체를 2.5% glutaraldehyde로 고정하고, 다시 1% osmium tetroxide로 후기 고정하였으며, alcohol로 순차적으로 탈수하여 n-amylacetate로 20분간 2회 처리, 건조하고, gold coating 한 후 주사전자현미경(SEM, Hitachi-S2300)으로 검경하였다. 또한 균주의 생리학적 특성으로는 gclatin 액화력, indole 생성능, nitrate 환원력 및 catalase, oxidase, urease의 생성 유무와 아울러 혐기적 조건에서의 증식여부를 관찰하였다.

화학적 분석방법으로 세포벽의 구성 지방산을 Komagata 등[8]의 방법에 따라 수행하였다. 지방산을 14%  $\text{BF}_3$ -methanol로 methylation 한 후 gas chromatography(GC, HP6890, Hewlett Packard, USA)로 분석하였으며, 이때 GC 분석은 SP<sup>TM</sup>-2380 fused silica capillary column(30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.2  $\mu\text{m}$  film thickness, Supelco, USA)와 FID detector를 사용하여, oven 온도 180 °C, injector 온도 250 °C, detector 온도 250 °C 그리고 운반기체는 질소로 30 mL/min의 유속으로 용출시켰고, split ratio는 50:1 등의 조건으로 행하였다.

## 결과 및 고찰

#### 인 축적 세균의 분리

인 축적 세균을 분리하기 위하여 대전을 비롯한 충청지역과 전북지역의 시설재배지에서 수집한 토양과 대전시 하수처리장으로부터 수집한 활성오니를 분리원으로 하여 pH 7.6의 P-1 한천배지에 생리식염수(0.85% NaCl)로 회석한 시료용액 0.1 mL를 도말하고 30 °C에서 2일간 배양하면서 나타난 집락을 1차 선별하였다. 이들 균주를  $10^{-2} \sim 10^{-3} \mu\text{Ci}^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 를 함유한 P-1 한천배지에서 분리한 후 액체배지를 이용하여 인 축적능이 우수한 8개 균주를 2차로 선별하였다(Fig. 1, 2). Fig. 1은 토양 및 활성오니로부터 선별된 여러 균주들을  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ 를 함유하는 P-1 한천배지에서 배양 후 표지된 인( $^{32}\text{P}$ )의 흡수 정도를 X-ray 필름으로 감광시켜 비교한 결과로서, 생육과 인 축적능이 좋은 균주는 그렇지 못한 균주보다 높은 감광을 보였다. Fig. 2에서는 위의 배지

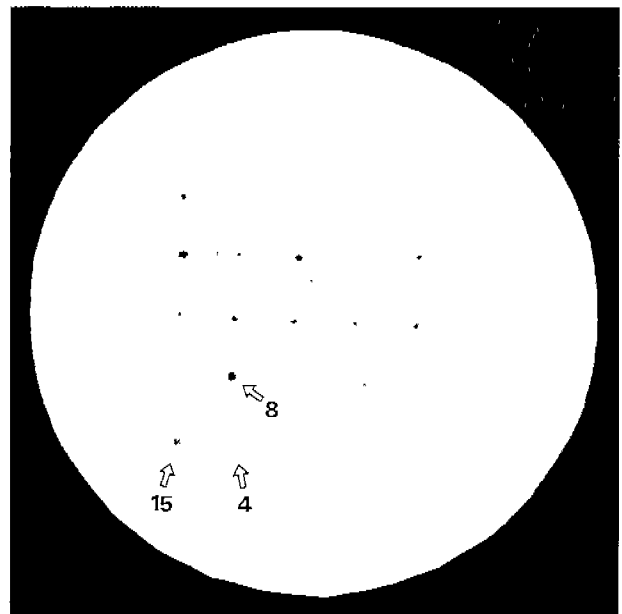
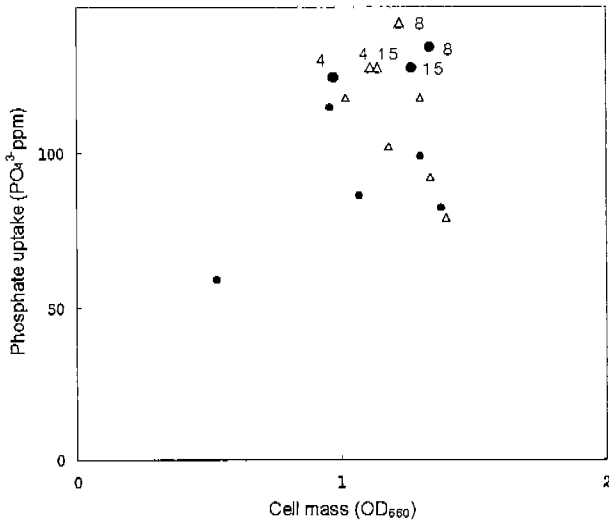


Fig. 1. Selection of phosphate-accumulating bacteria. An example of the autoradiogram using agar plate containing  $^{32}\text{PO}_4^{3-}$ .



**Fig. 2. Efficiency of phosphate uptake by the isolates.** Bacteria were grown in P-1 liquid medium with (Δ) or without (●) 0.02% yeast extract in shake flasks, and maximum values of inorganic phosphate consumed were plotted against cell mass concentration.

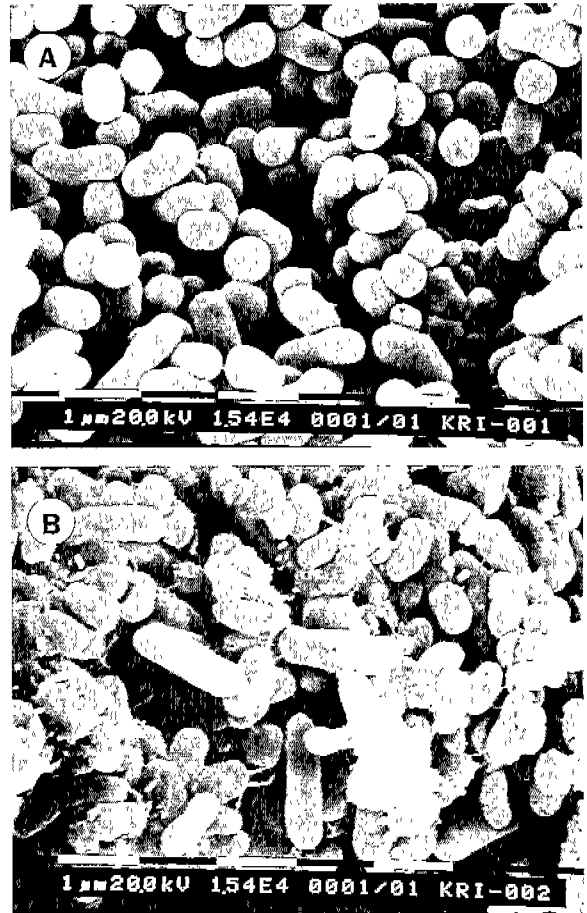
에서 선발된 8균주를 P-1 액체배지에서 배양하면서 생육과 흡수된 무기인의 정도를 조사하였다. 8균주중 배지중의 인산 감소율이 우수한 3균주 PO8, PO15 및 PI4를 선발하였다. 선발된 균주중 PO8과 PO15는 형태적 및 생리적 특징이 유사하였으므로 PO15를 제외시키고 PO8 과 PI4의 두 균주를 분리하였다.

**분리 균주의 동정**

최종 선발된 인 축적능이 우수한 균주 PO8과 PI4의 형태학적 특성과 생리 및 화학적 특성을 조사하여 결과를 Bergey's Manual[9]에 따라 분류 동정하였다.

**형태학적 특성** 모양 및 활성오니로부터 분리한 PO8와 PI4의 형태적 및 배양학적 특성을 조사하였으며 그 결과를 Fig. 3와 Table 1에 나타내었다. PO8은 그람염색의 결과 전형적인 gram 음성균이었고, 운동성이 없는 간/구균으로 크기는 0.5~0.6×1.0~1.2 μm이었다. PI4는 gram 음성의 간균이고, 크기는 0.4~0.5×1.5~1.6 μm이며 편모를 가지고 있어 운동성을 가지며, 자외선하에서 형광을 나타냈다. Nutrient agar에서 PO8은 원형의 콜로니를 형성하며 점성이 강하고 흰색이었으며, PI4의 경우는 원형의 콜로니를 가지며 점성이 약하고 묽은 반투명의 흰색을 나타내었다.

**생리 및 화학적 특성** 분리균주의 생리학적 성질을 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다. 균주 PO8은 oxidase와 urease 생성은 음성, catalase는 양성반응을 보였고, PI4은 urease 및 indole의 생성은 음성, catalase와 oxidase는 양성반응을 나타내었다. 또한 PO8은 nitrate 환원성, gelatin 액화력, phenylalanine 이용성 및 탄수화물의 산화/발효력은 음성이었으며, PI4는 gelatine 액화력, aesculin 가



**Fig. 3. Scanning electron microscopic photomicrograms of the isolates: PO8(A) and PI4(B) which grown on nutrient agar plate for 24 hours.**

**Table 1. Morphological characteristics of the isolates**

Characteristics	PO8	PI4
Colonies*		
Size(mm) in diameter	1 ~ 2	1 ~ 2
Color	White	White
Shape	Circular	Circular
Opacity	Opaque	Translucent
Elevation	Raised	Raised
Surface	Glistening	Glistening
Edge	Entire	Entire
Cells**		
Size(μm)	0.5 ~ 0.6 × 1.0 ~ 1.2	0.4 ~ 0.5 × 1.5 ~ 1.6
Shape	R/S	R
Gram staining	-	-
Motility	-	+

\*The culture was grown on nutrient agar plate (pH 6.8) for 24 hrs at 30 °C. +: Positive, -: Negative, R: Rod, S: spherical.

수분해력 및 탄소원으로 citrate 이용성에서 양성반응을 보였으며 탄수화물의 산화/발효력은 두 성질 모두 가지고

**Table 2. Physiological and culture characteristics of the isolates**

Characteristics	PO8	PI4
Growth in air	+	+
Growth anaerobically	-	+
Catalase	+	+
Oxidase	-	+
Carbohydrates [O/F/-]	-	O
Growth at 22 °C	+	ND
Growth at 42 °C	+	-
Growth on nutrient agar	+	ND
Growth on MacConkey agar	+	d
Growth on KCN	ND	-
Carbohydrates [in peptone media], acid from:		
glucose	-	+
lactose	-	-
maltose	-	ND
sucrose	ND	-
xylose	-	-
Aesculin hydrolysis	ND	+
Nitrate reduced	-	+
Citrate as carbon source	d	+
Indole	ND	-
Gelatin liquefaction	-	+
Urease	-	-
Phenylalanine	-	ND

+: Positive, -: Negative, d: 11 ~ 89% of strains are positive, F: Fermentative, O: Oxidative, ND: Not determined.

있었다. 각종 당으로부터의 산생성능 시험에서는 PO8이나 PI4 모두 음성반응을 보였으며 PI4는 glucose를 산화시키는 것으로 나타났다. 균주 PI4는 탄수화물의 산화/발효력을 나타내는 반면에 Bergey's Manual에 의하면 *Chromobacterium lividum*은 산화력만 가지는 것으로 기술하고 있다.

세포벽 구성 지방산을 methylester(FAME, fatty acid metylester)화하여 GC로 분석하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. PO8은 주로 iso-branched 와 anteiso-branched fatty acid로 구성되어 있었으며 C<sub>15</sub>~C<sub>16</sub>이 대부분을 차지하고 있었다. *Acinetobacter lwoffii* PO8과 비슷한 지방산 조성을 보이는 경우에는 *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Cellulomonas*속 등을 들수 있다. PI4의 경우는 주로 iso 2OH-branched fatty acid로 구성되어 있으며 C<sub>16</sub>이 대부분을 차지하며 *C. lividum*과 비슷한 지방산 조성을 보이는 경우에는 *Pseudomonas*속이 있다. 이상과 같은 형태, 생리 및 생화학적 특성의 전반적인 결과를 종합하여 Bergey's Manual에 따라 동정한 결과 PO8은 *A. lwoffii*로 동정되어 이를 *A. lwoffii* PO8로 명명하였고, PI4는 *C. lividum*로 동정되어 *C. lividum* PI4로 명명하였다.

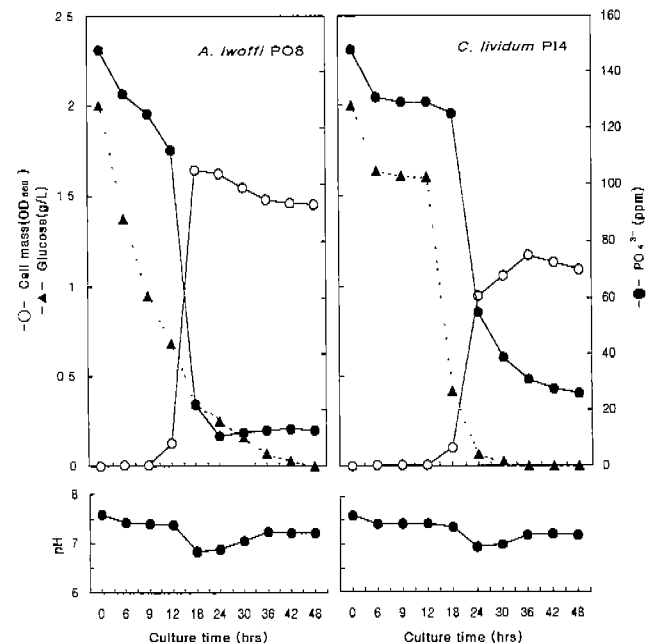
#### 액체 배양에서의 인산흡수

*A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4 균주를 인산 150 ppm

**Table 3. Profiles of cellular fatty acids from the isolates**

PO8		PI4	
Fatty acid	(%)	Fatty acid	(%)
14:0 Iso	5.72	10:0 3OH	2.94
14:0	3.38	12:0	2.69
15:0 Iso	6.34	12:0 2OH	6.21
15:0 Anteiso	60.83	12:1 3OH	3.71
15:0	1.86	14:0	0.90
16:0 Iso	10.05	16:1 w7c/15 Iso 2OH	31.89
16:0	6.65	16:0	35.54
17:0 Iso	0.40	17:0 cyclo	8.08
17:0 Anteiso	4.76	18:1 w7c/w9t/w12t, w9c/w12t/w7c, w12t/w9t/w7c	8.04

을 함유한 P-1배지에 30 °C, 48시간 진탕배양하면서 시간경과에 따른 균체의 생육, pH 변화, 당의 소비율 및 인산의 흡수율의 변화를 조사하였다(Fig. 4). 분리균 *A. lwoffii* PO8은 배양 12시간 이후부터 급속도로 생육하여 24시간 후에 정지기(stationary growth phase)에 도달하였으며 인산의 흡수율은 이와 비례적으로 증가하여 24시간 이후 92%로서 최고 수준을 나타낸 다음 배양 48시간까지 흡수한 인산의 방출을 보이지 않고 같은 양을 유지하였다. 또한 glucose의 이용은 배양초기부터 지속적으로 감소하여 36~48시간에서 완전히 소비되었다. *C. lividum* PI4의 경우는 PO8보다 생



**Fig. 4. Time courses of phosphate uptake by the strains *Acinetobacter lwoffii* PO8 and *Chromobacterium lividum* PI4.**

The organisms were grown in P-1 medium with shaking at 30 °C and the residual concentrations of glucose and phosphate were analyzed.

육속도가 다소 늦고 균체량도 낮았으며, 이와 비례적으로 인산의 흡수도 지연되어 36시간 이후에 85% 수준의 흡수율을 나타내었다. 반면에 glucose 이용은 24시간 후에 거의 소비되어 오히려 PO8 보다 빠른 소비율을 보였다. 이러한 인산 흡수에 있어 Shoda 등[16]은 인산의 배양 초기농도를 본 실험과 같은 농도에서 여러 균주를 비교 실험한 결과, *A. globiformis*이 24시간 이 후 약 87%로 최대흡수율을 보였으며, 인산 소비에 있어 중요 문제점으로 많은 세균에서 성장 중 또는 성장 중지 후 인산의 분비가 있는데, 48시간 까지 흡수농도를 유지하여 조사한 균주 중 효과적으로 인산을 소비하였다고 하며, Ohtake 등[14]은 *Acinetobacter calcoaceticus*이 배지 중 인의 초기농도를 2 mmol L<sup>-1</sup>로 하여, 20시간 경과 했을 때 1.25 mmol(P로 38 ppm에 해당)로 최대흡수율을 보였으나, 탄소원의 소비로 성장이 중단된 몇 시간 후 흡수된 인산의 분비가 관찰되었다고 하였다. 위에서 언급한 인산의 흡수를 본 균주와 비교해 볼 때 Shoda 등의 *A. globiformis*와 인 흡수, 성장, 당 소비 등의 경향이 유사하였으며, *A. globiformis*의 최대흡수율은 24시간 이후 약 87%로서 *C. lividum* PI4의 85%와 비견되는 것이었으나, *A. lwoffii* PO8의 92%가 훨씬 높은 수준이었고, 또한 Ohtake 등의 *A. calcoaceticus*는 인으로 38 ppm의 흡수율을 보였으나, 이는 *A. lwoffii* PO8의 42 ppm 보다 낮은 수준이었다.

본 실험에서 분리한 균주는 액체배양 중 인산의 축적 및 유지 정도가 다른 균주에 비해 우수하였으므로, 흡착제·미생물복합개량제의 개발이 진행될 경우, 부영양화에 따른 수질오염의 치유나 하수처리 시설에서의 인산제거 및 시설재배지의 염류집적에 의한 염해의 문제를 생물학적 방법으로 개선할 수 있을 것으로 전망된다.

## 요 약

Autoradiography 및 인 배지를 이용하여, 시설재배지 토양과 활성오니로부터 인 축적능이 우수한 미생물을 분리하였다. 분리균, PO8은 Gram 음성이고, 구간균(0.5~0.6×1.0~1.2 μm in size)의 형태를 하고 있으며, 운동성이 없었다. 또 다른 분리균, PI4는 Gram 음성이며, 간균(0.4~0.5×1.5~1.6 μm in size)의 형태를 하고, flagella를 가지고 있어 운동성이 있었다. 이러한 형태학적, 생리·생화학적 특성의 결과에 따라, 각각 *Acinetobacter lwoffii* PO8과 *Chromobacterium lividum* PI4로 동정되었다. 또한 액체배양에서 분리균주 *A. lwoffii* PO8과 *C. lividum* PI4의 인 흡수 정도는 인산을 150 ppm 함유한 P-1배지에서 30 °C, 24시간 후 각각 92%와 85%이었다.

## 감사의 말

본 연구는 농림수산부('97 농업특정연구과제)의 연구비지

원으로 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Callaway, J. O. 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, pp. 175-176. 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.
2. Groenestijn, J. W., G. J. F. M. Vlekkle, D. M. E. Anink, M. H. Deinema, and A. J. B. Zehnder. 1988. Role of cations in accumulation and release of phosphate by *Acinetobacter* strain 210A. *J. Microbiol.* **54**: 2894-2901.
3. Harold, F. M. 1963. Accumulation of inorganic polyphosphate in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* **86**: 216-221.
4. Harold, F. M. 1966. Inorganic polyphosphates in biology structure, metabolism, and function. *Bacteriol. Rev.* **30**: 772-794.
5. Hiraishi, A. and H. Kitamura. 1984. Differences in phototrophic growth on high phosphate concentrations among *Rhodospseudomonas* species. *J. Ferment. Technol.* **62**: 293-296.
6. Hiraishi, A. and Y. Morishima. 1990. Capacity for polyphosphate accumulation of predominant bacteria in activated sludge showing enhanced phosphate removal. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 368-371.
7. Kato, J., K. Yamada, A. Muramatsu, and H. Ohtake. 1993. Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3744-3749.
8. Komagata, K. and K. Suzuki. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics, pp. 161-207. *Methods in Microbiology*. Academic Press.
9. Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1974. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. The William Willkins Co., Baltimore.
10. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426-428.
11. Murphy, M. and L. H. Lotter. 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.
12. Nakamura, K., K. Masuda, and E. Mikami. 1991. Isolation of a new type of polyphosphate accumulating bacterium and its phosphate removal characteristics. *J. Ferment. Bioeng.* **71**: 258-263.
13. Nakamura, K., S. Ishikawa, and M. Kawaharasaki. 1995. Phosphate uptake and release activity in immobilized polyphosphate accumulating bacterium *Microtholus phosphovorius* strain NM-1. *J. Ferment. Bioeng.* **80**: 377-382.
14. Ohtake, H., K. Takahashi, Y. Tsuzuki, and K. Toda. 1985. Uptake and release of phosphate by a pure culture of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Wat. Res.* **19**: 1587-1594.
15. Rao, N. N., M. F. Roberts, and A. Torriani. 1985. Amount and chain length of polyphosphate in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions. *J. Bacteriol.* **162**: 242-247.
16. Shoda, M., T. Ohsumi, and S. Udaka. 1980. Screening for

- high phosphate accumulating bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 319–324.
17. Suh, S. S. 1994. Biological recycling of the insoluble phosphates accumulated in cultivated soils by the phosphate-solubilizing microorganisms. Ph D. Dissertation, Chonnam National University, Kwangju, Korea.
18. T'Seyen, J., D. Malnou, J. C. Block, and G. Faup. 1985. Polyphosphate kinase activity during phosphate uptake by bacteria. *Wat. Sci. Tech.* **17**: 43–56.
19. Winter, C. T. 1989. The role of acetate in denitrification and biological phosphate removal in modified bardenpho systems. *Wat. Sci. Tech.* **21**: 375–385.
20. Yall, I., W. H. Boughton, R. C. Knudsen, and N. A. Sinclair. 1970. Biological uptake of phosphorus by activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* **20**: 145–150.
21. Ye, Q., H. Ohtake, and K. Toda. 1988. Phosphorus removal by pure and mixed cultures of microorganisms. *J. Ferment. Technol.* **66**: 207–212.

(Received February 26, 1999)