

염기성 pH에서 *Enterobacter amnigenus* GG0461의 질산이온 흡수증가

최태근 · 김성태 · 한민우 · 김영기*

충북대학교 농업생명환경대학 농화학과

Enhanced Nitrate Uptake by *Enterobacter amnigenus* GG0461 at Alkaline pH

Tae-Keun Choi, Sung-Tae Kim, Min-Woo Han and Young-Kee Kim*

Department of Agricultural Chemistry, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

Received February 4, 2008; Accepted February 18, 2008

Salt accumulation in soils of greenhouse due to the massive application of nitrogen fertilizers causes salt stress on the various crops, a serious problem in domestic agriculture. Since the majority of the salinity is nitrate, the excess nitrate should be removed; therefore, a bacterial strain having high capacity of nitrate uptake and identified as *Enterobacter amnigenus* GG0461 was isolated from the soils of greenhouse. Optimum conditions for the bacterial growth and nitrate uptake were investigated. GG0461 was able to grow without nitrate; however, nitrate facilitated the growth. The rate of nitrate uptake increased at alkaline pH and both growth and nitrate uptake were maximal at pH 8-9. When the initial pH of culture medium was increased to pH 8 or 9, it was decreased to neutral upon bacterial growth and nitrate uptake. These results imply that the major factor mediating bacterial nitrate uptake is a nitrate/proton antiporter. The fact was supported by the effect of nitrate addition in the absence of nitrate, since the addition of nitrate greatly increased the nitrate uptake and rapidly decreased pH of media.

Key words: *Enterobacter*, Nitrate uptake, pH effect, Salinity, Soil bacteria

서 론

시설재배지에서 고수익을 목적으로 한 작물의 연중재배는 작물생육을 위한 토양의 질을 떨어뜨려 생산성을 저하시킨다. 시설재배지에서 토양의 생산성 감소를 유발하는 주요 요인 중 하나는 생산량 증대를 위한 다비재배와 이에 따르는 토양염류의 증가로서, 시설재배지 토양의 전기전도도(EC)는 노지상태에 비하여 2배 이상 증가한다는 것이 알려져 있다.¹⁾ 작물의 생육을 저해하는 수준의 염류가 집적된 시설재배지에서 토양의 화학성분들을 분석하였을 때, 주로 염소, 질산태 질소, 황산이온 등 음이온과 마그네슘, 가리 등 양이온의 함량이 증가하였음을 확인하였다.²⁾ 이들 중 특히 질산태 질소의 집적이 생육저해에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 분석되어,³⁾ 이에 대한 대책의 수립이 시급한 것으로 평가되었다.

염류가 집적된 시설재배지에서 질산염은 작물에 의하여 다량 흡수되며, 특히, 엽채류의 질산이온 함량이 크게 증가하는 것이 알려져 있다.⁴⁾ 토양중 과도한 질산염은 작물의 생육장애를 유

발함은 물론, 작물을 통한 섭취시 인체에 암을 유발할 수 있고,⁵⁾ 청색증의 원인이 되기도 하여 인체의 건강에 위협이 될 수 있다.⁶⁾ 토양중 질산이온 함량의 증가가 작물의 질산이온 흡수를 증가시키며 일찍부터 확인되었으며,⁷⁾ 염류에 의한 스트레스시에도 작물체내의 질산환원효소 활성이 저해되어 질산이온 함량은 더욱 높아짐을 확인하였다.⁸⁾ 이러한 이유로 시설재배지에서 토양 중 질산이온의 함량을 경감시키는 것은 매우 중요한 과제이다.

국내에서 탈질균을 이용한 토양의 질산염 제거는 일부 시도된 적이 있으나, 많은 연구가 주로 폐수나 하천에서 질산염 제거에 집중되었다.⁹⁾ 질산염류 제거를 목적으로 사용가능한 탈질균으로는 *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Hypomicrobium*, *Moraxella*, *Paracoccus*, *Azospillum*, *Thiosphaera* 종이 알려져 있으며, 질산환원효소 활성과 함께 질산이온 제거기작 등이 연구되었다.^{10,11)} 국내에서 분리한 탈질균들은 이미 선진국에서 보고된 것과 마찬가지로 *Pseudomonas*나 *Alcaligenes*종에 속하는 것으로 확인되었다.¹³⁾ 토양의 개선에 탈질균들과 이온교환수지 등을 함께 처리하는 방법¹⁴⁾ 등이 제안되었으나, 현장 적용이 가능한 미생물 이용기술은 확립되지 않았다.

본 연구실에서는 시설재배지 토양에서 질산이온 흡수력을 보이는 4종의 균을 분리하였고, 이들의 몇 가지 기본 특성을 발

*Corresponding author
Phone: +82-43-261-2560; Fax: +82-43-271-5921
E-mail: ykkim10@chungbuk.ac.kr

표하였다.¹⁵⁾ 이들의 질산이온 흡수력은 배양조건에 따라 차이를 보이나, 가장 뛰어난 질산이온 흡수력을 보이는 균주는 유전자 분석을 통하여 *Enterobacter amnigenus*임을 확인하였다. *E. amnigenus* GG0461 균주는 운동성을 갖는 그램 음성균으로 형광성이 없으며, $0.5 \times 1 \mu\text{m}$ 크기의 간균으로 확인되었다. 본 논문에서는 GG0461 균주의 질산이온 흡수특성을 조사하기 위하여 수소이온 이동과 질산이온 흡수의 상호 연관성을 조사하던 중, 알칼리 조건에서 질산이온 흡수가 탁월하게 증가함을 확인하였다.

재료 및 방법

토양 미생물의 분리 및 균주 보관. 시설재배지 토양시료 1g을 멸균한 증류수 5mL로 추출한 후, 1,200 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 상정액은 1,000배로 희석하고, 50 μL 를 취하여 Pseudomonas agar F(PAF) 평판배지(tryptone과 peptone 각 1%, K_2HPO_4 와 MgSO_4 각 0.15%, glycerin 1%)에 도말하였다. 이때, 고농도의 질산이온을 포함하는 배지에서 생존하는 미생물을 분리하기 위하여, 50 mM KNO_3 를 PAF 고체배지에 첨가하였다. PAF 평판배지는 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 단일세균의 콜로니들을 색, 모양, 크기에 따라 선택하고 식별하였다. 분리한 균주는 PAF 액체배지 80%와 glycerol 20%를 함유한 저장배지 1.5 mL에 현탁하여 -80°C에서 사용할 때까지 보관하였다.

균 성장 측정. 토양에서 분리한 미생물 균주는 50 mM KNO_3 를 첨가한 PAF 배지에서 배양하였다. 배양은 37°C에서 이루어졌고, 세균의 밀도는 분광광도계(U-2000, Hitachi, Tokyo)를 이용하여 600 nm에서 흡광도 증가로 평가하였다.

질산이온의 흡수 측정. 질산이온 흡수는 배양 후 액체배지에 남아있는 질산이온의 양을 분석하여 측정하였다. 질산이온의 농도는 질산이온전극과 표준전극(double junction reference electrode)을 이용하여 이온분석기(Ion Selective Analyzer, Orion 960 ISE meter)로 측정하였다.³⁾ 질산이온전극은 사용 전에 50 ppm 질산이온 표준액에서 2시간 동안 안정화시켰으며, 이온분석기는 질산이온 표준용액 5.0과 50.0 ppm 농도를 사용하여 보정하였다. 표준용액과 토양추출 시료의 질산이온 농도측정은 이온강도 조정용액을 50:1(v/v)로 첨가하여 이루어졌다.

배양중 배지의 pH 변화 측정. GG0461 균주의 질산이온 흡수에 따른 배지의 pH 변화는 PAF 배지에서 측정하였다. PAF 배지는 다량의 단백질 및 펩티드 성분과 인산염을 포함하고 있어 자체적으로 완충력을 가짐으로 별도의 완충액을 첨가하지는 않았으며, 따라서 배지의 pH 조정은 가능한 적은 양의 산과 염기를 사용하여 이루어졌다. 즉, PAF 배지를 pH 5에서 pH 9까지 조절하기 위하여, pH 5, 6, 7은 묽은 염산으로, pH 8, 9는 묽은 NaOH 용액으로 조절하였다. 배지의 pH 변화는 pH meter(M-92, MeterLab Co., Lyon, France)로 측정하였다.

결과 및 고찰

E. amnigenus GG0461 균주의 질산이온 흡수력은 매우 탁월

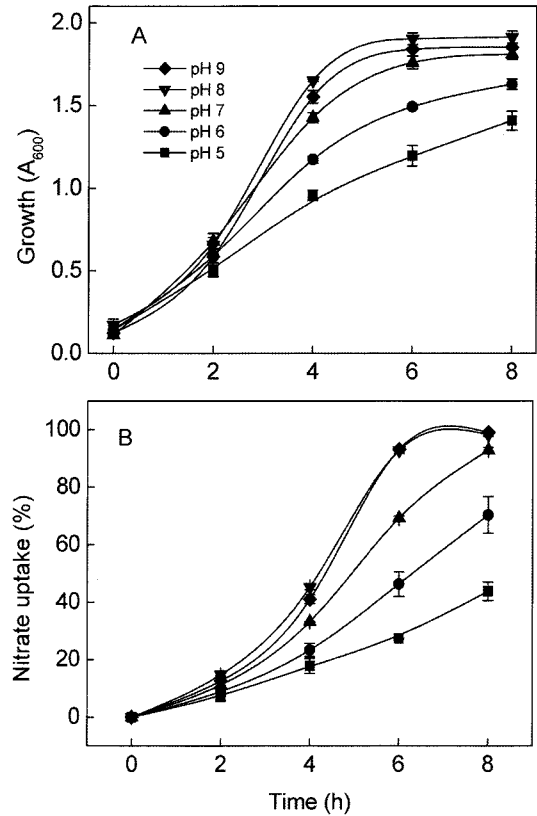


Fig. 1. pH-dependent growth and nitrate uptake. Growth (A) and nitrate uptakes (B) were measured at different pH in the presence of nitrate.

하여 액체배지에서 배양시 3,000 ppm(약 50 mM) 농도의 질산이온을 10시간 이내에 모두 흡수하였다. 분리한 균주는 접종량에 따라 차이는 있으나 PAF 액체배지에서 1% 접종시 약 8시간이면 초기정체기에 도달하여 균주의 성장도 왕성함을 확인하였다. GG0461 균주의 질산이온 흡수는 반감기의 측정 및 분석으로 평가하였을 때, 단일인자 또는 한 가지 속도제한 단계에 좌우됨을 확인하였다.¹⁴⁾ 질산이온 흡수에 관여하는 주된 인자는 아마도 세포막에 위치한 질산수송체 효소일 것으로 추정하며, 질산이온 흡수기작을 밝히기 위하여 배지의 pH를 변화시키며 질산이온 흡수능을 측정하였다.

균 성장과 질산이온 흡수. GG0461 균주를 PAF 배지에 배양하였을 때, 균주의 성장은 질산이온을 첨가한 상태에서 지수적으로 증가하였으나, 질산이온이 없는 조건에서는 배양시간에 따라 비례적으로 증가하였다.¹⁴⁾ 배지의 pH 변화에 따른 균주의 성장과 질산이온 흡수능을 효율적으로 측정하기 위하여, GG0461 균주를 5%가 되도록 접종하고 pH를 변화시키며 배양한 결과는 Fig. 1A와 같다. 배지의 pH가 증가할수록 균주의 성장은 빨라졌으며, 총균수도 증가하여 600 nm에서 흡광도는 pH 8에서 최대치를 보였고, 균수는 6.2×10^8 cfu mL⁻¹에 이르렀다.

이러한 경향은 질산이온의 흡수활성에서도 유사하게 나타났다. 배지의 pH가 증가할수록 질산이온의 흡수는 증가하였으며, 배양시간이 경과함에 따라 흡수율은 증가하였다. 특히, pH 8과 9에서는 약 6시간에 50 mM의 질산이온 성분을 모두 흡수하였다(Fig. 1B).

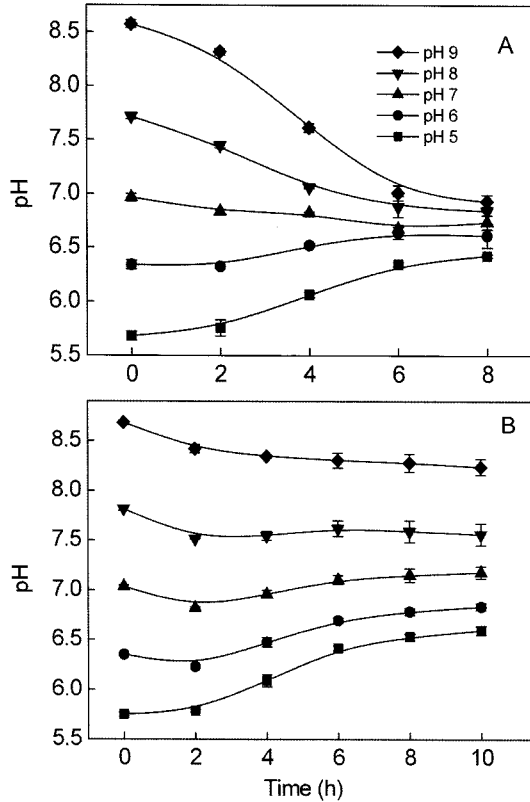


Fig. 2. pH changes of growth media upon bacterial cultivation. GG0461 was cultured in the presence (A) and absence (B) of nitrate.

균주성장에 따른 pH 변화. 배지의 pH가 염기성일수록 균주의 성장이나 질산이온 흡수가 커진다는 사실은 균주의 생육이 수소이온 농도와 밀접한 관련이 있음을 의미한다. 따라서, 균주가 성장함에 따른 배지의 pH 변화를 측정하였을 때, KNO₃를 50 mM 첨가한 배지에서는 균주의 성장, 혹은 질산이온의 흡수에 따라 pH가 크게 변화하는 것을 관측하였다(Fig. 2A). 배지의 pH가 8과 9일 때, 배양시간에 따라 pH는 점차 감소하여 약 8시간 후에 pH 7 근처로 수렴하였다. 반면, pH 5와 6인 배지에서는 배양시간이 경과함에 따라 역시 pH 6.5-7.0 근처로 수렴하여, 배지의 초기 pH 값에 무관하게 배양 후 pH는 모두 pH 6.5-7.0으로 변화하였다.

배지에 질산이온을 첨가하지 않은 조건에서, 균주의 배양에 따른 배지의 pH 변화는 질산이온 첨가시의 경우와 다르게 나타났다(Fig. 2B). 먼저, 배지의 pH가 산성인 조건에서는 질산이온을 첨가하였을 때와 같은 변화를 보였으나, 배지가 염기성일 때는 pH의 감소가 매우 약하게 나타나 10시간 동안의 pH 변화값은 0.5 이하로 나타났다. 약산성 배지에서 pH가 중성으로 변화하는 현상은 배지의 질산이온 유무와 관계없이 나타나 질산이온 흡수와는 무관한 변화라는 것을 보이며, pH 8과 9에서 질산이온의 첨가시 배지의 pH가 급격히 저하되는 것은 질산이온의 흡수에 따른 질산이온 의존성 변화임을 보여준다.

배양중 질산이온의 첨가 효과. 배지중 질산이온의 유무에 따라 나타나는 생육 및 pH 변화를 확인하기 위하여, 질산이온을 첨가하지 않은 배지에 GG0461 균주를 접종하고 배양한 후, 질

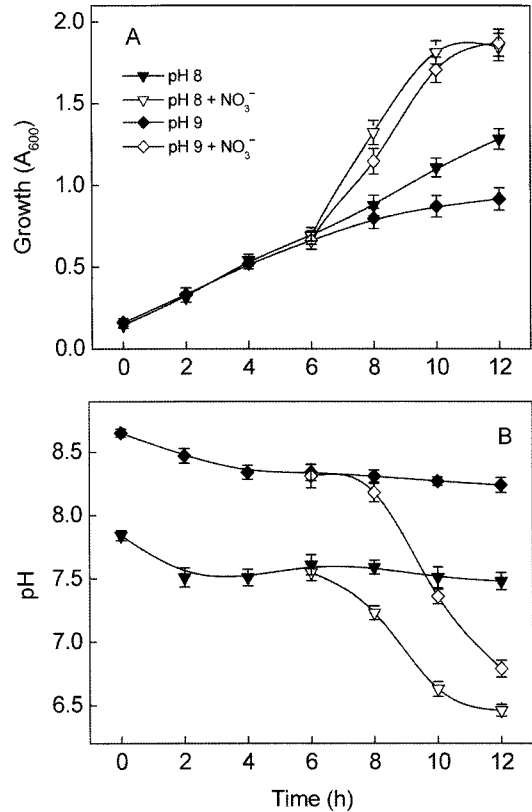


Fig. 3. Effects of nitrate addition on the bacterial growth and pH changes in the culture media. GG0461 was cultured for 6 h to late logarithmic phase in the absence of nitrate. Nitrate (50 mM) was added at 6 h of incubation, and growth (A) and pH changes (B) were measured at pH 8 and 9.

산이온을 추가로 첨가하여 나타나는 균주의 생육변화 및 배지의 pH 변화를 측정하였다. 배지의 pH는 질산이온의 영향이 가장 크게 나타나는 pH 8과 9로 하였고, 질산이온의 첨가는 균주의 생육이 가장 활발한 배양후 6시간에 이루어졌다.

질산이온이 없는 조건에서 균주의 성장은 완만하게 증가하였으나, 질산이온의 첨가로 성장은 크게 촉진되어 지수적으로 증가하였고, 4시간 후에는 질산이온을 포함하는 배지에서의 성장 수준에 다다랐다(Fig. 3A). 이러한 질산이온의 성장촉진 효과는 pH 8과 9 모두에서 유사하게 나타났다. 마찬가지로, 질산이온을 첨가하여 배양중 배지의 pH 변화정도를 조사하였을 때, pH 8과 9의 배지 모두 pH가 급격히 감소하여 중성부근에 수렴하였다(Fig. 3B). 이때, 첨가한 50 mM 질산이온은 6시간 이내에 모두 흡수되었다(자료미제시). 이러한 결과는 질산이온을 첨가한 배지에서 GG0461 균주의 생육증가와 배지의 pH 감소 효과가 질산이온의 흡수에 따라 나타나는 것임을 의미한다.

질산이온 첨가에 의한 pH 변화율. GG0461 균주의 생육에서 질산이온 흡수에 따른 배지의 pH 감소량을 측정하기 위하여, 질산이온의 유무에 따른 배지의 pH 변화를 측정하고 pH 변화율을 계산하였다. 배지의 pH 변화율(Δ pH)은 pH를 달리한 각각의 배지에서, 질산이온이 있는 조건에서 측정된 배지의 pH 값에서 질산이온이 없을 때 측정된 pH 값을 빼준 차이값으로 나타났다(Fig. 4).

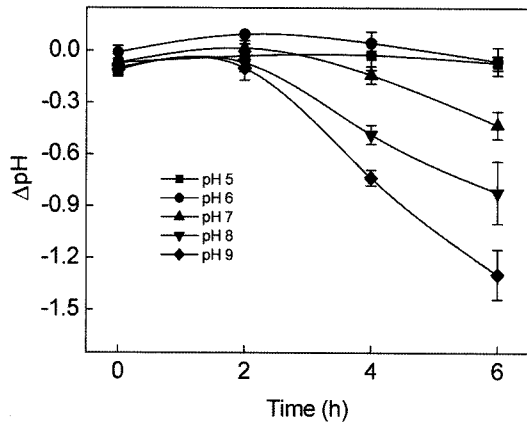


Fig. 4. The pH differences measured in the absence and presence of nitrate. ΔpH was calculated by subtracting pH of nitrate-containing media from the pH measured in the absence of nitrate. The data were obtained from the average values of 3-5 experiments.

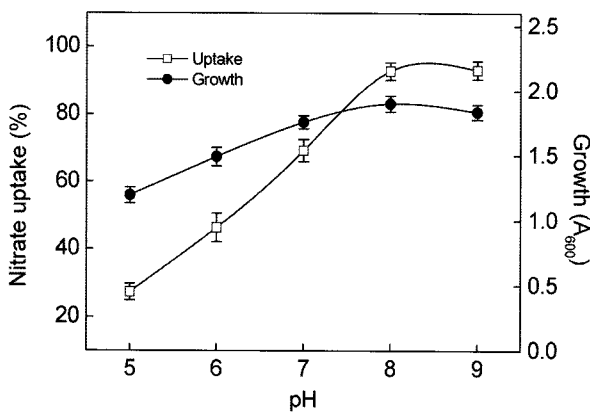


Fig. 5. The pH-dependence of growth and nitrate uptakes. Growth and uptake were measured after 8 h incubation at various pH of culture media.

먼저, pH가 5와 6인 약산성 배지에서는 질산이온의 유무에 따른 pH 변화가 크지 않았다. 그러나, 초기 pH가 염기성인 배지에서는 질산이온이 있고 없음에 따라 배지의 pH 변화는 매우 큰 차이를 보였다. 즉, 염기성 배지에서 질산이온이 있을 경우, 균주 배양에 따라 pH는 크게 감소하였다. 반면, 질산이온을 첨가하지 않았을 때는 배지의 pH 변화는 크지 않았다. 따라서, 질산이온의 존재 유무에 따른 두 측정치 사이의 차이값은 초기 pH가 높을수록 크게 나타났으며, 또한 배양시간이 증가함에 따라서도 크게 나타났다. 이것은 질산이온의 존재시 균주의 증식과 질산이온의 흡수에 따라 배지의 pH가 급격히 낮아지는 것을 보여주며, 이러한 pH 감소 효과는 알칼리 조건의 배지에서 크게 나타났다.

pH에 따른 균주생육과 질산이온 흡수 비교. 배지의 pH를 변화시키며 균주의 성장곡선을 측정하여 각 pH에서 균주의 생육량을 평가하였고, 같은 조건에서 질산이온의 흡수도를 비교하였다. 배지를 pH 5에서 pH 9까지 조정할 후, GG0461 균주를 6시간 배양하였을 때, 균주는 낮은 대수기에 도달하였으나, 배지의 pH에 따라 총 균수는 차이가 있었다. 이것을 흡광도로 나타내었을 때, pH 5-9 범위에서 성장률은 완만하게 증가하는 것

으로 나타났다(Fig. 5, ●). 그러나, 질산이온의 흡수도는 알칼리 조건에서 크게 증가하였으며, pH 8과 9에서는 최대의 흡수를 보였다(Fig. 5, □).

Enterobacter amnigenus GG0461 균주는 배지에 질산이온이 존재할 때 생육이 촉진되었으며, 특히 배지가 염기성일 때 균주의 질산이온 흡수 능력이 증가하였다. 이것은 균주의 생육과 질산이온의 흡수, 배지의 pH 사이에 밀접한 관련이 있음을 보여주는 것이다. 질산이온이 없는 조건에서 균주의 생육은 염기성에서 심하게 저해되었으나(자료 미제시), 질산을 가하였을 때는 생육이 오히려 촉진되었다. 이러한 결과는 염기성 조건의 배지에서 균주의 질산이온 흡수가 증가하고 생육이 촉진되는 것을 의미하며, 각 pH 조건에서 단위 균체량에 의한 질산이온 흡수량(specific nitrate uptake rate)을 비교하였을 때, pH의 증가에 따라 질산이온의 흡수가 증가하는 결과로도 확인되었다(자료 미제시). 질산이온에 의한 생육촉진 효과는 질산이온이 없는 조건에서 균주의 성장곡선이 완만한 증가를 보였으나, 질산이온을 첨가하였을 때, 균주의 생육은 즉시 대수적으로 증가한다는 Fig. 3A의 결과로도 확인할 수 있었다.

세균에서의 질산이온의 흡수는 세가지 효소활성에 의해서 촉매된다고 알려져 있다. 먼저, NTR1(nitrate transporter-1)은 다양한 생물체에서 발견되며, 애기장대에서 특성이 자세히 밝혀진 효소로, 질산이온에 대한 두 가지 친화력이 있음이 알려져 있다.¹⁶⁾ 두 번째로, NTR2도 세균에서 식물체까지 다양한 생물체에서 발견되며, 질산이온에 대하여 높은 친화력을 보이고, 수소이온 농도기울기에 의한 화학적에너지에 의해 질산이온 흡수가 촉진된다.¹⁷⁾ 세 번째는 ATP 에너지를 이용하는 ABC 형 transporter로 cyanobacteria 등에서 발견되는 효소이다.¹⁸⁾

GG0461 균주의 질산이온 흡수는 염기성 배지에서 증가하였고, 이때 배지의 pH 감소도 크게 나타났다. 이러한 생리적 현상은 질산이온을 흡수하면서 동시에 수소이온을 배지로 방출하는 nitrate/proton antiporter의 활성으로 설명될 수 있다. GG0461 균주가 이 효소의 활성을 이용하여 질산이온을 흡수하는 것인지는 밝혀져야 하겠지만, 최근 식물체의 액포막에서 유사한 효소의 특성이 보고되어,¹⁹⁾ 이와 같은 가능성은 크다고 할 수 있다. 다만, 세균에서는 이 효소가 현재까지 보고되지 않아, 미생물에서의 수소이온 이동과 관련한 질산이온 흡수 기작이 체계적으로 연구되어야 할 것이다.

초 록

질소비료의 과량 시용에 따른 시설원예지 토양 중 염류집적은 다양한 작물에 염류장애를 유발하여 국내농업에 심각한 문제가 되고 있다. 염류의 주성분은 질산염으로 필요이상의 질산이온을 제거하기 위하여 질산이온 흡수능력이 크며, *Enterobacter amnigenus* GG0461로 동정된 토양세균을 시설원에 토양에서 분리하였다. 이 균주의 최적 생육 및 질산이온 흡수능력을 조사하였을 때, GG0461 균주는 질산이온이 없는 조건에서 생육이 가능하나, 질산이온이 존재할 때 생육이 크게 촉진되었다. 또한, 염기성 조건에서 질산이온 흡수율이 증가하였으며, 성장과 질산이온 흡수 모두 pH 8-9에서 최대로 나타났다. 배지의 초기

pH를 8과 9로 조정하였을 때, 균주에 의하여 질산이온이 흡수됨에 따라 배지의 pH는 중성으로 감소하였다. 이러한 결과는 질산이온 흡수를 위한 주된 인자가 nitrate/proton antiporter임을 의미한다. 이것은 질산이온이 없는 조건에서 질산이온의 첨가 효과인 질산이온 흡수의 급격한 증가와 빠른 배지의 pH 감소 사실로도 확인되었다.

Key words: *Enterobacter*, 질산이온 흡수, pH 효과, 염류, 토양미생물.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업(자유응모과제)의 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Jung, Y. S., Cho, S. H., Yang, J. E., Kim, J. J. and Lim, H. S. (2000) Available phosphorus and electrical conductivity of the saturated extracts of soils from the plastic film houses. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **33**, 1-7.
- RDA Report. (2004) Report of Environmental Agriculture; Factors affect on the increase in salinity of greenhouse soils.
- Kang, S. S and Hong, S. D. (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.
- Jin, S. J., Jo, H. J. and Bae, J. J. (2004) Effect of soil salinity on nitrate accumulation of lettuce. *Kor. J. Soil Sci. Fert.* **37**, 91-96.
- Onyesom, I. and Okoh, P. N. (2006) Quantitative analysis of nitrate and nitrite in vegetables commonly consumed in Delta State, Nigeria. *Br. J. Nutr.* **96**, 902-905.
- European Commission. (1997) Council regulation 194/97 of 31 January 1997. *Official J. Eur. Commu.* **L31**, 48-50.
- Chung, W. T., Choi, K. C., Youn, C., Song, C. E. and Chun, W. B. (1997) Effects of nitrogen fertilization on nitrate accumulation in Italian ryegrass. *J. Kor. Grassl. Sci.* **17**, 135-140.
- Kim, T.-H. (2000) Nitrate metabolism affected by osmotic stress and nitrate supply level in relation to osmoregulation. *J. Kor. Grassl. Sci.* **20**, 77-84.
- 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.
- Steenhoudt, O., Ping, Z., Broek, A. V. 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.
- Zhu, J. K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 247-273.
- Gamble, R. N., Betlach, M. R. and Tiedje, J. M. (1997) Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**, 926-939.
- Hwang, S. H., Lee, Y. H. and Cho, M. H. (1999) Isolation and characteristics of denitrifying *Pseudomonas* CW4. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 616-620.
- Richard, Y. R. (1989) Operating experiences of full-scale biological and ion-exchange denitrification plants in France. *Water Environ. J.* **3**, 154-167.
- Cho, K. H., Lee, G. J., Ahn, H. J. and Kim, Y. K. (2005) Nitrate uptakes by microorganism isolated from the soils of greenhouse. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**, 11-15.
- Tsay, T. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A. and Crawford, N. M. (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 arabidopsis encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* **72**, 705-713.
- Unkles, S. E., Hawker, K. L., Grieve, C., Campbell, E. I., Montague, P. and Kinghorn, J. R. (1991) crnA encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 204-208.
- Sakamoto, T., Inoue-Sakamoto, K. and Bryant, D. A. (1999) A novel nitrate-nitrite permease in the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *J. Bacteriol.* **181**, 7363-7372.
- De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomone, S., Gambale, F. and Varvier-Brygoo, H. (2006) The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 877-878.