

## 원형질체 융합에 의한 인산염 제거균주의 개량

윤성녀 · 조경주\* · 조홍범 · 최영길  
한양대학교 자연과학대학 생물학과 \*생물교육과

## Improvement of Bacteria for Removing of Phosphate by Spheroplast Fusion

Yoon, Sung-Nyo, Kyoung-Joo Cho,\* Hong-Bum Cho and Yong-Keel Choi  
Department of Biology, \*Biological Education, College of Natural Sciences, Hanyang University,  
Seoul 133-791, Korea

**ABSTRACT:** In order to improve the removal ability of phosphate, Spheroplast fusions were performed among auxotrophic mutants of *Aeromonas hydrophila* isolated from waste water, named A13 and A14, Aci37 auxotrophic mutant of *Acinetobacter calcoaceticus*, and auxotrophic *E. coli* HR262/pCE27 carrying *pit* gene. Eight fusants obtained from this experiment showed different biochemical characteristics. When the rate of phosphate uptake among fusants (F1-F8) was investigated in Phosphate Uptake Medium (PUM), F8 strain showed the highest rate for phosphate removal, 7 times as much as control after two hours incubation. The role of cations ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $K^+$ ) in phosphate uptake by F8 was also investigated in PUM without each salt.  $K^+$  seemed to be crucial. Being compared with phosphate uptake rate in PUM, that in PUM without  $K^+$  was reduced 1.5 times. Therefore, by applying F8 strain and  $K^+$  in practical environmental system, the increased efficiency in phosphate removal can be derived.

**KEY WORDS** □ *Aeromonas hydrophila*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli* HR262/pCE27, phosphate uptake medium (PUM), phosphate releasing medium (PRM), *pit*, *pst*.

다량의 인산염이 수계로 유입될 경우, 이 물질은 생태계의 안정화에 중요한 의미를 갖는 제한요인으로서 작용하게 되는데 그 양이 일정 수준 (0.01-0.02 ppm) 을 초과할 경우 부영양화를 초래하게 된다 (Whittaker 1975).

실제로 과량의 인산염은 변형된 생물학적 활성 슬러지 방법을 통하여 제거할 수 있다. Bio-P bacteria와 같은 poly-P를 축적하는 세균을 활성 슬러지에 처리하는 방법 (Groenestijn 등, 1988)으로 이때 사용하는 대표적인 미생물로는 *Acinetobacter* spp.로 알려졌다 (Fuhs와 Chen, 1975). 미생물이 인산염을 축적, 방출하는 기작은 아직 정확하게 밝혀지지 않았으나, 활성 슬러지내 미생물 중 bio-P bacteria는 성장에 요구되는 양 이상의 인을 섭취할 수 있는데, 이는 활성슬러지가 혐기성 상태 하에서 인을 방출하고 다시 호기성 상태로 주위 환경이 변화되었을 때 인을 과잉으로 섭취하는 특성에 의해 생물학적인 인 제거가 일어나는 것으로 알려져 있다 (Comeau 등, 1986).

미생물에서는 phosphate transfer에 2개의 주된 시

스템이 관여하는데 하나는 phosphate inorganic transport (*pit*)로써 계속적으로 발현되며 (Willsky 등, 1973), 다른 하나는 phosphate specific transport (*pst*) 시스템으로써 인산염이 제한된 상태에서 유도된다 (Tomassen과 Lugtenberg, 1981; Surin 등, 1985; Rao 등, 1986; Shinagawa 등, 1986).

또한 미생물의 인산염 섭취에는 많은 양이온들이 관여하고 있다.  $K^+$ 에 대한 연구는 Roberts와 Roberts (1950), Weiden 등 (1967) 그리고 Russell과 Rosenberg (1979)에 의해 수행되어 왔으며  $Mg^{++}$ 과  $Ca^+$ 에 대한 연구도 Miyamoto-Mills 등 (1983), Arvin과 Kristensen (1985) 그리고 Comeau 등 (1986)에 의해 계속되어 왔다.

본 연구에서는 폐수처리 과정에서 제거되지 않고 방류수에 다량 함유되어 방출되는 인산염을 생물학적 활성슬러지 방법을 통해 제거하기 위한 1차적인 방법으로 기존의 bio-P bacteria로 알려진 *Acinetobacter calcoaceticus* 외에 방류수 환경에서 인산염 제거능이 우수한 균주로 분리된 *Aeromonas hydrophila*를 이용

하여 돌연변이를 유도하고, 이들 돌연변이주와 *Pit* 유전자를 coding하고 있는 *E. coli* HR262/pCE27 균주를 서로 조합하여 세포융합을 시킴으로써 그 기능을 개량하고 이들 개량균주의 인산염 섭취에 대한 양이온들의 영향을 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주

사용된 균주는 Table 1과 같다.

### 돌연변이의 유도

균체를 Nutrient Broth(NB)배지에 접종하여 10시간 배양한 후(CD 660 $\approx$ 1.0) 세포 배양액 10 ml를 취하여 원심분리 (Hitachi, 4 $^{\circ}$ C, 10분, 3,000 $\times$ g)하였다. 이를 0.1 M phosphate 완충액 (pH 8.0)으로 세척한 후 0.9 ml를 수확하고 Ethyl-Methane-Sulfonate (EMS) 0.03 ml/과 D.W. 0.07 ml를 넣어 재 현탁하였다. 30 $^{\circ}$ C에서 15분간 배양한 후 0.2 ml를 취하여 6% sodium thiosulfate 9.8 ml를 넣어 10분간 방치하였다. 이어서 멸균증류수로 2회 세척한 다음 Gentamycin (Gm 15.625  $\mu$ g/ml)이 든 최소 배지에 현탁하여 24시간 배양하였다. 배양 후 멸균 증류수로 2-3회 세척하고 Nutrient Agar(NA) 배지에 접종하여 형성된 colony 중에서 최소배지에서 자랄 수 없는 colony를 선별하였다 (Loveless와 Howarth, 1959). 선별된 colony들은 Gerhardt등 (1981)의 방법에 따라 영양 요구특성을 결정하고 5회 이상 NA에 계대 배양한 수 최소배지에 성장할 수 없고 표현형이 변하지 않는 균

주를 안정하다고 판정하였다.

### 원형질체의 융합 및 융합체의 선별

원형질체의 융합방법은 Schaeffer등 (1976)의 방법을 따랐다. 즉 lysozyme과 EDTA로 처리되어 원형질체로 변형된 균주를 각각 1 ml/씩 섞은 후 원심분리 (4 $^{\circ}$ C, 20분, 3,000 $\times$ g)하고 침전물을 spheroplasting buffer 0.2 ml로 재현탁한 후 40% (w/v) PEG 6,000을 1.8 ml 첨가하여 3분간 처리하였다. 원형질 융합체를 선별하기 위해서는 원형질체 혼합액을  $10^{-5}$ 에서  $10^{-6}$  배로 희석하여 Rich Regeneration Medium (RRM) 평판배지에서 배양하여 재생시켰다. 융합체는 최소 평판배지에서 성장할 수 있는 colony를 replica방법을 사용하여 선별하였으며 융합율은 재생된 수에 대한 융합체수의 비율로 나타내었다 (Lee, 1986).

### 세포융합체의 관찰

#### 투과전자현미경에 의한 관찰

Lysozyme과 EDTA를 처리하여 생성시킨 각 원형질체를 PEG 6,000을 첨가하여 융합을 유도시킨 후 원형질체 혼합액을 0.5 M sucrose와 10 mM CaCl<sub>2</sub>를 포함하고 있는 0.2 M cacodylate 완충액 (pH 6.2)에 녹인 1% glutaraldehyde로 전고정하였다 (Ferber등, 1979). 원심분리한 후 침전물을 2.5% agar와 0.5 M sucrose가 들어 있는 NB 배지에 재 현탁하여 agar block을 만들었다. 0.5 M sucrose와 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% glutaraldehyde가 들어 있는 0.2 M cacodylate buffer (pH 6.2)에서 12시간 동안 재고정한 다음 0.2 M cacodylate 완충액으로 2회 세척한 후 1% OsO<sub>4</sub>로 후고정하였다. Cacodylate 완충액으로 다시 세척한 후

Table 1. Bacterial strains used for improvement of strains

Strains	Phenotype	Reference and source
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	wild type Aci37 Aci47 Aci48 Aci51	prototroph ura, cys met. val, ura, cys gua, met, leu, cys gua, leu, tyr Comeau 등, 1986 This study " " "
<i>Aeromonas hydrophila</i>	wild type A3 A5 A7 A13 A14 A20 A22	prototroph tyr phe, try leu, tyr phe, pro val, cys thr, cys leu, tyr This study " " " " " "
<i>E. coli</i> HR262/pCE27	<i>pit</i> , <i>pst</i> , pro, met, his, pur E, <i>pry</i> E, thy B, recA, srl::Tn 10/ <i>pit</i> <sup>+</sup> Amp <sup>+</sup>	Elvin 등, 1986

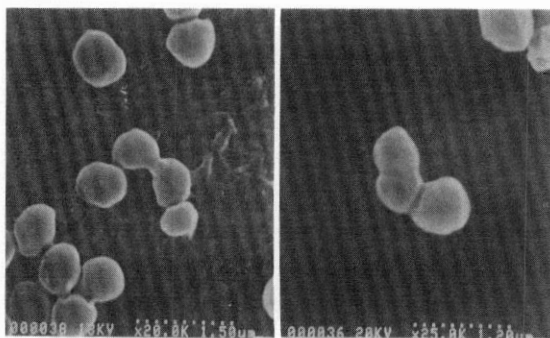


Fig. 1. Scanning electron microscopy on fusion between A13 and A14 spheroplasts after PEG 6,000 treatment. a) earlir stage of fusion (contact and cytoplasmic bridge formation), b) middle and late stage of fusion.

acetone (50, 70, 80, 90, 100%) series로 30분씩 처리하여 탈수시키고, Epon과 acetone을 1:1, 2:1, 3:1로 섞은 혼합액에 각각 넣어 30°C에서 12시간, 45°C에서 12시간, 60°C에서 48시간 동안 포매하였다. 세포내 무기인산염 축적의 관찰을 위해 Jones와 Chambers (1975)의 방법에 따라 염색하여 ultramicrotome으로 0.13  $\mu\text{m}$  두께로 잘라 투과전자 현미경 (Carl-Zeiss EM-109)으로 관찰하였다.

#### 주사전자현미경에 의한 관찰

Lysozyme과 EDTA를 처리하여 생성시킨 각 원형질체를 PEG 6,000을 처리하여 융합을 유도한 후 투과전자현미경과 같은 방법으로 전고정하였다. 전고정이 끝난 시료는 membrane filter (Millipore, 0.45  $\mu\text{m}$ )에 올려 투과전자현미경과 같은 방법으로 후 고정과 탈수를 하였다. 탈수가 끝난 각 시료는 isoamylacetate에 30분 방치한 후 액체 이산화탄소를 이용하여 critical point drier (Hitachi HCP-2)로 건조시켰다. 건조 후 각 시료는 알루미늄 막대에 올려 400 Å 두께로 gold coating 하여 Hitachi S-2500형 주사현미경으로 관찰하였다.

#### 개량균주의 인산염 제거효율의 비교

야생균주와 개량균주간의 인산염 제거효율을 비교하기 위하여 먼저 Phosphate Releasing Medium (PRM)에서 12시간 인산염을 방출시킨 후 다시 PUM에 넣어 시간별로 제거율을 측정하였다. 동시에 PUM 배지에서 각 양이온들 ( $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ )를 제거한 배지(PUM without  $\text{Mg}^{++}$ , PUM without  $\text{K}^+$ , PUM without  $\text{Ca}^{++}$ )에 넣어 무기인산 제거율을 측정함으로써 각 양이온이 무기인산 제거에 미치는 영향을 알아보았다 (Groenestijn등, 1988).

## 결 과

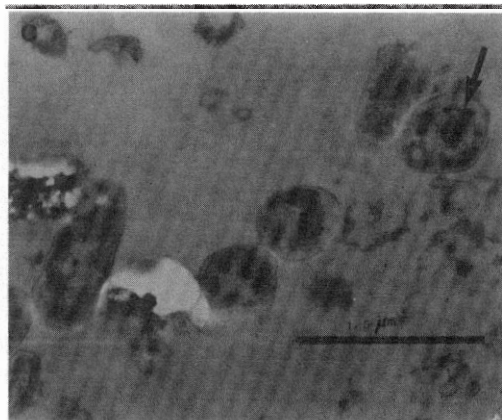


Fig. 2. Polyphosphate granules stained sections of F8  $\times 20,000$ .

#### 원형질체 융합을 이용한 균주의 개량

##### 돌연변이주의 분리

세포융합실험을 하기 위한 지표로써 영양요구성을 찾기 위해 *Aeromonas hydrophila*와 *Acinetobacter calcoaceticus*에 1차적으로 3% 되게 EMS를 처리한 결과 생긴 돌연변이를 2회 안정성 검사를 한후 2차적으로 다시 3% 되게 EMS를 처리하였다. 이렇게 double mutation을 시킨 결과 표현형이 서로 다른 4 균주의 *Acinetobacter* 돌연변이주 (Aci37, Aci47, Aci48 및 Aci51)와 7균주의 *Aeromonas* 돌연변이주 (A3, A5, A7, A13, A14, A20 및 A22)를 얻었다.

##### 세포융합체 및 세포내 무기인산의 관찰

Lysozyme과 EDTA로 처리된 원형질체와 각 돌연변이주 간의 융합체와 세포내 무기인산을 주사 전자현미경과 투과 전자현미경을 사용하여 관찰한 결과는 Fig. 1-a, b와 같다. 각 세포 두개 혹은 그 이상의 원형질체가 서로 접하여 융합이 진행되는 것을 관찰할 수 있었으며 융합과정이 진행되어 부분적으로 원형질막의 파괴가 일어나 원형질이 서로 섞이고 있는 cytoplasmic bridge를 볼 수 있었다. 또 세포내 무기인산 중합체도 하나에서 수개가 세포내에 존재함을 확인하였고, PHB와는 달리 무기인산 중합체를 싸고 있는 주변막이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 2) (Kulaev, 1979).

##### 세포융합체의 특성

A13과 A14를 융합하여 F1과, F2, A14와 *E. coli* HR262/pCE27을 융합하여 얻은 F3과 F4, Aci37과 *E. coli* HR262/pCE27을 융합하여 얻은 F5와 F6, 그리고 Aci37과 A13을 융합하여 얻은 F7과 F8의 생화학적 특성을 API 20E으로 검토한 결과는 Table 2와 같다.

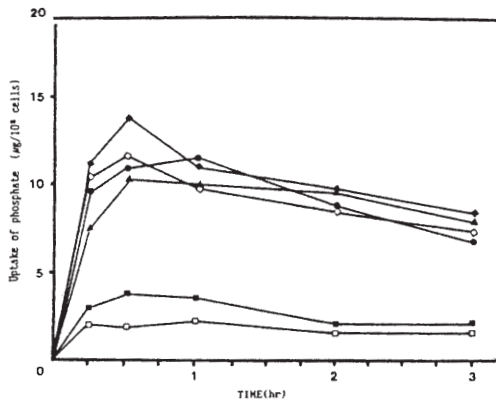
##### 융합체의 무기인산염 제거효율

각 융합체를 NB 배지에서 24시간 배양한 뒤,  $\text{N}_2$

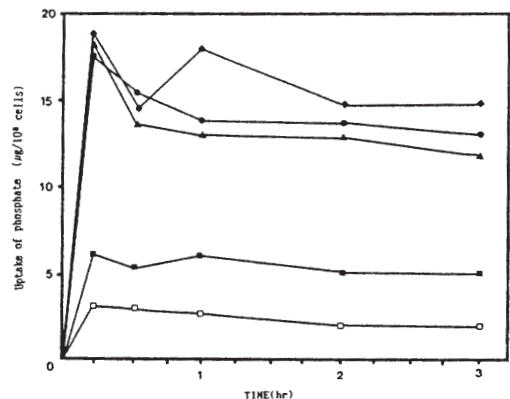


**Table 2.** Biochemical characteristics of fusants

Biochemical characteristics	Fusants							
	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
$\beta$ -galactosidase	—	—	—	—	—	—	—	—
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	—	—	—	—	—	—	—	—
Ornithine decarboxylase	—	+	—	—	—	—	—	—
Citrate utilization	+	—	+	+	—	+	—	+
H <sub>2</sub> S gas formation	—	—	—	—	—	—	—	—
Urease	—	—	—	—	—	—	—	—
Tryptophan deaminase	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole production	—	—	—	—	—	—	—	—
Acetoin production	—	—	—	+	—	—	—	+
Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+
Carbohydrate utilization								
Glucose	+	+	—	+	+	+	—	—
Mannitol	—	+	—	—	—	—	—	—
Inositol	—	—	—	—	—	—	—	—
Sorbitol	—	—	—	—	—	—	—	—
Rhamnose	—	—	—	—	—	—	—	—
Sucrose	—	—	—	—	—	—	—	—
Melibiose	—	—	—	—	—	—	—	—
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinose	—	—	—	—	—	—	—	—
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+



**Fig. 3.** Uptake of phosphate by *Aeromonas hydrophila*, *E. coli* HR262/pCE27, F1, F2, F3 and F4 in phosphate uptake medium (PUM). ( $\square$ : *Aeromonas hydrophila*,  $\blacksquare$ : *E. coli* HR262/pCE27,  $\blacktriangle$ : F1  $\blacklozenge$ : F2,  $\bullet$ : F3,  $\diamond$ : F4).



**Fig. 4.** Uptake of phosphate by *Acinetobacter calcoaceticus*, F5 F6, F7 and F8 in phosphate uptake medium (PUM). ( $\square$ : *Acinetobacter calcoaceticus*,  $\bullet$ : F5,  $\blacktriangle$ : F6,  $\blacksquare$ : F7,  $\blacklozenge$ : F8).

gas로 치환하여 혐기적 조건으로 보정한 phosphate release medium (PRM) 배지에 접종하고 12시간 배양하여 인산염을 방출시킨 다음 다시 호기적 조건의 PUM 배지에 재접종하여 시간별로 배지내 인산염 제거율을 조사한 결과 배양 2시간 후에 F8 군주가 실험

군주 중 최고의 제거율을 나타내어 *Acinetobacter calcoaceticus*에 비해 7배 가량의 증가된 제거율을 나타내었으며, 모든 융합체 (F1-F8)가 야생균주보다 월등히 높은 제거율을 나타내었다 (Fig. 3, 4). 한편 각 양이온들이 무기인산 제거효율에 미치는 영향을 조사

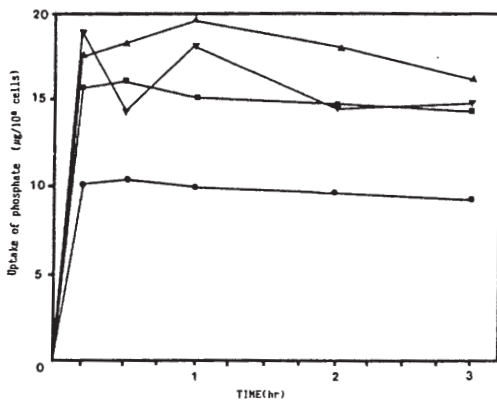


Fig. 5. Uptake of phosphate by F8.

●: PUM without K<sup>+</sup>, ▲: PUM without Ca<sup>++</sup>, ■: PUM without Mg<sup>++</sup>, ▼: PUM).

하기 위해 PRM 배지에서 12시간 배양한 F8 융합체를 각각의 양이온들이 결핍된 PUM 배지에 재현탁하여 시간별 제거율을 조사한 결과 K<sup>+</sup> 결핍 배지에서는 약 1.5배 정도 감소되었다 (Fig. 5).

## 고 찰

분리균주 *Aeromonas hydrophila*와 *Acinetobacter calcoaceticus*의 영양요구성 돌연변이주, 그리고 *pit* 유전자를 coding하고있는 *E. coli* HR262/pCE27균주를 서로 조합 (A13×A14, A14×HR262, Aci37×HR262, A13×Aci37)하여 세포융합한 결과 생화학적 특

성이 서로 다른 8개의 융합체(F1-F8)를 얻었으며 이들은 모균주들에 비해 인산염 제거율이 훨씬 높았다. 이는 2개의 phosphate transport system중 인산염의 양이 제한된 상태에서 유도되는 *pst*가 인산염의 양이 많은 경우에도 계속적으로 *pho B*를 만들어 연쇄적으로 *pho E*, *pho A*, *pho S*, *ugp A*와 *B*를 발현시킨 경우라고 생각된다. 즉, *pho R*을 항상 활성화된 상태로 만들어 *pho B*를 유도시키기 위해서 *pho R*을 조절하는 요소 (corepressor와 coinducer form)를 항상 coinducer 상태가 되게 해야 하는데 이는 *pho U*에 돌연변이가 일어난 경우 *pho R*을 조절하는 요소를 corepressor로 만들지 못하고 coinducer 상태로 남게한다 (Torriani와 Ludtke, 1985). 이 경우 *pit*와 *pst* system이 항상 발현하게 되므로 인산염 섭취율이 빨라질 뿐 아니라 인산염 섭취량도 현저히 증가하게 되는데 본 실험에서 얻은 균주도 바로 *pho U*에서 돌연변이가 생긴 것으로 사료된다.

한편 미생물에 있어서 많은 양이온들이 인산염 섭취에 관여한다고 알려져 있으나 아직 이들 기작에 대해 정확히 밝혀진 바도 없고 균주에 따른 양이온의 효과가 서로 다른것으로 알려져 있다. 본 실험에서도 양이온들이 융합체 F8의 인산염 섭취에 미치는 영향을 조사해본 결과 K<sup>+</sup>이 융합체의 인산염 제거율을 약 1.5배 정도 감소시키는 것으로 나타났다. 특히 K<sup>+</sup>이 Mg<sup>++</sup>과 Ca<sup>++</sup>에 비해 현저한 영향을 미치는 것은 무기인산중합체의 counter ion으로서 보다도 막전위차를 유지시켜 인산염을 transport (Mulder등, 1986) 시키며, 무기인산중합체의 형성에 구조적 역할 (Groenestijn 등, 1988)을 하기 때문이라고 사료된다.

## 적 요

방류수에 함유되어 있는 인산염을 미생물을 이용하여 보다 효율적으로 제거하기 위하여 이들 환경에서 인산염 제거능력이 우수한 것으로 분리된 *Aeromonas hydrophila*와 기존에 인산염 제거균주로 알려진 *Acinetobacter calcoaceticus*로부터 돌연변이를 유도하고 이들 돌연변이주들과 *E. coli* HR262/pCE27을 서로 조합하여 세포융합을 함으로써 그 기능을 개량하고자 하였다. 세포융합의 결과 생화학적 특성이 서로 다른 8개의 융합체를 얻었으며 이들중 F8 융합체가 배양 2시간만에 대조균주 *Acinetobacter calcoaceticus*보다 7배 가량의 높은 인산염 제거율을 나타내었다. 또한 융합체 F8의 인산염 제거시 미치는 양이온의 효과를 조사 하기위해 각 양이온이 제거된 배지에서 인산염 제거율을 조사한 결과 K<sup>+</sup>이 제거된 경우 제거되지 않은 배지에서보다 약 1.5배 가량 감소되었다. 따라서 융합체 F8균주를 실제 시스템에 적용하고, K<sup>+</sup>을 첨가해줄 경우 현저히 좋은 인산염 제거 효율을 얻을 수 있으리라고 생각된다.

## 알 림

본 연구는 한국과학재단의 지원을 받아 서울대학교 분자미생물학연구센터 제 6연구부 연구계획 (1990)의 일부로 수행되었다.

## 참고문헌

1. Arvin, E. and G.H. Kristensen, 1985. Exchange of

- organics, phosphate, and cations between sludge and water in biological phosphorous and nitrogen removal processes. *Water. Sci. Technol.*, **17**, 147-162.
2. Comeau, Y., K.J. Hall, R.E.W. Hancock, and W.K. Oldham, 1986. Biochemical model for enhanced biological phosphorus removal. *Water Res.*, **20**, 1511-1521.
3. Elvin, C.M., N.E. Dixon, and H. Rosenberg, 1986. Molecular cloning of the phosphate inorganic transport (*pit*) gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 477-484.

4. Frehel, C., A.M. Lheritre, C. Sanchez-Rivas, and P. Scheffer, 1979. Electron microscopic study of *Bacillus subtilis* protoplast fusion. *J. Bacteriol.* **137**, 1354-1361.
5. Fuhs, G.W. and M. Chen, 1975. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater. *Microbiol. Ecol.* **2**, 119-138.
6. Croenestijn, J.W., G.J.F.M. Vlekke, D.M.E. Anink, M.H. Deinema, and A.J.B. Zehnder, 1988. Roles of cations in accumulation and release of phosphate by *Acinetobacter* strain 210 A. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2894-2901.
7. Jones, H.E. and L.A. Chambers, 1975. Localized intracellular polyphosphate formation by *Desulfovibrio gigas*. *J. Gen. Microbiol.* **89**, 67-72.
8. Kulaev, I.S., 1979. The localization of inorganic polyphosphate within the cell volutin granules of microorganisms- The site of localization of inorganic polyphosphate. In *The biochemistry of inorganic polyphosphate*. A Wiley-Interscience Publication. pp. 47-66.
9. Lee, J.S., 1986. The formation of biparental clone and the transfer of plasmids by the spheroplast fusion in *Pseudomonas* spp. Ph.D. thesis. Korea University.
10. Loveless, A. and S. Howarth, 1959. Mutation of bacteria at high levels of survival by ethyl-methane-sulfonate. *Nature*, **184**, 1780-17822.
11. Miyamoto-Mills, J., J. Larson, D. Jenkins, and W. Owen, 1983. Design and operation of a pilot-scale biological phosphate removal plant at the central contra costa sanitary district. *Water Sci. Technol.* **15**, 153-179.
12. Mulder, M.M., M.J.T. de Mattos, P.W. Postma, and K. Van Dam, 1986. Energetic consequences of multiple K<sup>+</sup> uptake systems in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta.* **851**, 223-228.
13. Rao, N.N., E. Wang, J. Yashphe, and A. Torriani, 1986. Nucleotide pool in *pho* regulon mutants and alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**, 205-211.
14. Roberts, R.B. and I.Z. Roberts, 1950. Potassium metabolism in *E. coli* III. Interrelationship of potassium and phosphorus metabolism. *J. Cell Physiol.* **36**, 165-166.
15. Russel, L.M. and H. Rosenberg, 1979. Linked transport of phosphate, potassium ions and protons in *E. coli*. *Biochem. J.* **184**, 13-21.
16. Schaeffer, P., B. Came, and R. Hotchkiss, 1976. Fusion of bacterial protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **73**, 2151-2155.
17. Shinagawa, H., K. Makino, M. Amemura, and A. Nakata, 1986. Nucleotide sequence of the *pho R* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **192**, 549-556.
18. Surin, B.P., H. Rosenberg, and G.B. Cox, 1985. Phosphate specific transport system of *Escherichia coli*: Nucleotide sequence and gene polypeptide relationships. *J. Bacteriol.* **161**, 189-198.
19. Tommassen, J. and B. Lugtenberg, 1981. Localization of *pho E*, the structural gene for outer membrane protein in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **147**, 118-123.
20. Torriani, A. and D.N. Ludtke, 1985. The *pho* regulon of *E. coli* K12 In *Molecular biology of bacterial growth* (D. Freifeiler and E. Schaechter., eds). Jones & Bartlett, Boston, in press.
21. Weiden, P.L., W. Epstein, and S.G. Schultz 1967. Cation transport in *E. coli* VII. Potassium requirement for phosphate uptake. *J. Gen. Physiol.* **50**, 1641-1661.
22. Whittaker, R.H., 1975. *Communities and Ecosystems*. (2nd ed.) Macmillan Publishing Co.
23. Willsky, G.R., R.L. Bennett, and M.H. Malamy, 1973. Inorganic phosphate transport in *E. coli*: Involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *J. Bacteriol.* **113**, 529-539.

(Received March 18, 1991)

(Accepted April 3, 1991)