Korean J. Ecol. 16(1):51~61, 1993

담수계내 염료 분해 세균의 특성

金道謙 · 趙洪範 · 李豪容* · 崔榮吉

한양대학교 생물학과 · 상지대학교 생물학과*

Characterization of the Dye-degrading Bacteria in Aquatic Habitat

Kim, Do-Gyeom, Hong-Bum Cho, Ho-Yong Lee*, and Yong-Keel Choi

Department of Biology, Hanyang University and *Department of Biology, Sangji University**

ABSTRACT

Crystal violet, a typical triphenylmethane dye(N, N, N′, N′, N″, N″-hexa methylpararosaniline), extensively used in textile dye, industry and research, has been suggested to cause tumor growth in bottom-feeding fishes. For the isolation of crystal violet degrading bacteria, wastewaters were sampled from plants′ wastewater treatment facility, textile wastewater treatment plant and etc.. The most efficient strain in crystal violet degrading bacteria was identified as *Klebsiella oxytoca*. Added sole carbon source in PAS minimal media was 10 mg /l crystal violet, which incubated at 30℃, the degrading efficiency was maximum 12.3%. When fructose, glucose, sucrose and yeast-extract were added 0.01% in PAS media respectively, the degrading efficiency were all 96 % within 24 hours.

서 론

환경 오염원으로 작용하는 난분해성 염료는 천연 염료가 아닌 인공 합성염료들로서 이들은 aniline을 원료로 한 염기성 및 산성염료, naphthalene 계의 직접 및 산성 합성염료, anthraquinone을 모체로 한 vat 및 분산염료 그리고 azo염료 등 그 수가 매우 많으며(Anliker, 1979; Zollinger, 1987), 현대 사회에서 난분해성 염료의 사용은 방직과 염료 산업 뿐 아니라 식품 첨가물, 인쇄, 칼라 사진, 원유 가공품의 첨가제, 화장품, 피혁 산업 등 그 범위가 점차 확대되고 있다(Youngless *et al.*, 1985).

Triphenylmethane 계열 염료인 crystal violet(N, N, N′, N′, N″, N″-hexamethyl-pararosaniline)은 머리 염색제, 볼펜잉크, 타자기 리본, biological stain, pH indicator, 의학 및 수의학 부분과 직물 염료로 사용되어 왔다(Kingsland *et al.*, 1976; Shanin *et al.*, 1978).

본 연구는 교육부의 1992년도 기초과학연구소 학술연구조성비의 지원에 의해 수행되었음.

Triphenylmethane 계열 염료를 포함한 상품화된 염료는 중화학 공업, 제지 공업 폐수와 마찬가지로 미생물에 독성이 되거나 생물학적 분해가 어려운 물질이 섞여 있어 생물학적 공법을 이용하여 처리할 때 처리 효율이 좋지 않은 경우가 많고, 항생제 제조 및 각종 화학공업 폐수에서와 같이 독성 물질이 다량 함유되어 생물학적 처리가 전혀 시도되지 못하는 경우도 있다. 따라서, 이러한 폐수에는 물리화학적 처리가 이용되는데, 이 경우 화학 약품에 의한 응집, 침전처리시 많은 양의 폐슬러지가 발생하며 독성으로 인해 슬러지의 최종처리시 많은 비용이 들 뿐 아니라 부적절한 매립시 토양과 지하수를 오염시키는 결과를 발생시키기도 한다(Roy *et al.*, 1978). Triphenylmethane 계열 염료는 부적절한 화학폐기물 처리로 인해 토양과 강바닥에서 발견되기도 하며(Nelson *et al.*, 1980), 이들 중 일부 triphenylmethane계열 염료는 발암원으로 작용하며(U. S. Environmental Protection Agency Genetox Program, 1986), 특히 crystal violet은 잠재적 염색체이상 야기물질(clastogen)로 작용하는 것으로 알려져 있다(Au *et al.*, 1979).

Crystal violet 분해에 대한 초기 연구에 의하면 triphenylmethane 계열 염료가 미생물과 폐기물 처리시설에 의한 분해에 내성이 있는 것으로 나타나고 있으며 대다수의 미생물에 유독 물질로 작용하기 때문에 crystal violet을 분해하지 못할 것이라는 보고도 있다(Yatome *et al.*, 1991). Michaels *et al.*(1985, 1986)은 여러 환경에서 채집한 시료에서 crystal violet의 탈색능이 있는 6~28%의 세균 군락을 분리해 냈다. 그러나 다른 직물염료의 분해능에 비해 느리며, 측정 불가한 수준까지 분해되는 triphenylmethane 계열 염료는 없는 것으로 알려졌다.

본 연구에서는 물의 사용량이 많아 방류량이 많고, 폐수 중의 수중 미생물에 의하여 잘 분해되지 않으며, 생물학적 처리에 많은 문제점을 안고 있는 섬유공장 폐수 및 염색공장 폐수가 하천을 착색함으로써 미관을 나쁘게 할 뿐만 아니라, 광투과성을 저하시켜 생산성을 감소시킴과 아울러 생태계의 평형을 깨뜨리는 원인(Judkins *et al.*, 1978)이 되는 염료 중 crystal violet을 분해하는 균주를 수계로 부터 분리하여 그 특성을 규명하고 분해 효율을 증대할 수 있는 조건을 설정하여 난분해성 물질의 처리에 대한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

배지 및 시약

완전배지로는 LB배지를 사용하였으며, 항생제의 처리는 Sambrook *et al.*(1989)의 방법을 따랐다. 탄소원으로 사용된 crystal violet은 Hartman-Leddon사의 제품을 증류수에 녹여 1,000 mg/l으로 만들었고, 포도당, 과당, 자당은 Sigma 제품을, yeast-extract는 Difco사의 제품을 증류수에 녹여 18%(W/V)로 만들어 습윤멸균하여 사용하였다. 그외의 시약은 모두 ACS grade를 이용하였다. Crystal violet 분해균주의 분리 및 보관은 PAS배지(Bedard *et al.*, 1986)에 탄소원으로 crystal violet 및 포도당의 최종 농도가 각각 10 mg/l, 0.001~1.8%가 되도록 첨가하여 사용하였고, 모든 배지는 pH 7.0으로 보정하여 사용하였다.

시료의 채취 및 보관

Crystal violet 분해 균주의 분리를 위한 시료는 안산 하수 종말처리장의 산업폐수 유입수 및 염색공동폐수 처리장의 폭기조와 반송슬러지에서 채취하여 4℃에 냉장 보관하여 사용하였다.

Crystal violet 분해 균주의 분리 및 동정

폐수 시료 1ml를 탄소원으로 crystal violet 및 포도당의 최종 농도가 각각 10mg/l, 0.001%가 되도록 첨가한 PAS배지 50ml에 접종하고 1주일~수 주일 간격으로 crystal violet와 포도당의 농도를 높혀가며 농화 배양하여 분해균주를 분리하였다. 분리균주에 대한 동정은 그람 염색과 광학 현미경을 통한 형태적 특성 및 API Kit(Apparelis et Procédés d'Identification, France) 20E를 이용한 생화학적 특성 시험 결과를 API 20E의 분류 일람표에 따라 확인하였다.

분리균의 생장 및 분해능의 측정

분리균주의 crystal violet 분해 최적온도를 측정하기 위해 PAS 액체배지에 포도당 0.01%, crystal violet을 10mg/l가 되도록 첨가하고, 초기 접종 세포수는 8.5×10^5 cell/ml 정도로 하여, 20, 25, 30 및 37℃에서 24시간 배양한 후 crystal violet의 잔존량을 측정하였다. 생장률은 분해 최적온도와 동일한 조건에서 포도당을 0, 0.01, 및 0.05%가 되도록 첨가하여 30℃에서 150 rpm으로 진탕배양하여 일정 시간 간격으로 배양액을 취하여 680nm에서 흡광도를 측정(Shimadzu, UV-150-02)하여 알아보았다. 또한 분해율은 12,000×g으로 2분간 원심분리(Vetter GMBH, 424-C)한 상층액을 crystal violet의 최대 흡광 파장인 590nm와 가시광선 영역인 400~700nm(scan speed 750nm/min)에서 흡광도를 측정(Beckman, DU-40)하여 흡광도의 감소를 보고 측정하였다. 그리고 분해효율의 환산은 Yatome *et al.*(1991)의 방법을 따랐다.

분해산물 생성 여부의 확인

접종 후 시간별로 채취한 상등액에서 crystal violet을 동일 부피의 n-butanol로 추출하고 일정량의 Na_2SO_4로 탈수시킨 butanol 추출액의 흡광도를 200~400nm(scan speed 750nm/min)에서 측정하였으며, 최대 흡광파장의 이동으로 분해산물의 생성을 확인하였다(Yatome *et al.*, 1981).

TLC에 의한 분해산물의 확인

TLC plate는 Sigma사의 제품(T-6270, F_{254}, 20×20cm)을 사용하였으며, 전개 용매로는 propanol : H_2O : glacial acetic acid를 90:9:1(V/V/V)로 혼합하여 4시간 동안 전개하였다(Bumpus *et al.*, 1988).

항생제 내성에 대한 특성

Streptomycin, ampicillin, kanamycin, tetracycline, chloramphenicol, carbenicillin을 LB 액체배지에 각각 ml당 1, 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100, 200, 400 및 800μg으로 첨가하였다. 준비된 각 배지에 분리균주를 접종하고, 30℃에서 24~72시간 배양한 후 680nm에서 흡광도를 측정(Shimadzu, UV-150-02)하여 균의 성장 여부를 보고 각 항생제에 대한 내성을 조사하였다.

2차 탄소원으로 과당, 자당, yeast-extract 첨가시 분해효율의 변화

탄소원으로 포도당 대신에 과당, 자당, yeast-extact를 각각 0.01%, 0.05%의 농도로, crystal violet을 10mg/l의 농도로 첨가하고 진탕배양하여 일정 시간 간격으로 배양액을 취하여 680 nm에서 흡광도를 측정(Shimadzu, UV-150-02)하였으며 상층액을 취한 후 crystal violet의 최

대 흡광파장인 590nm에서 흡광도를 측정(Beckman, DU-40)하여 흡광도의 감소로 분해 정도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Crystal violet 분해 균주의 분리 및 동정

Crystal violet에 대한 분해능을 가진 균주를 분리하기 위하여 탄소원으로 과당을 0.001~1.8 %로, crystal violet은 10~40mg/l의 농도로 첨가하여 수 주일간 진탕배양한 후 PAS 평판 배지에 희석, 도말하여 생장한 균주들 중 탈색환(Halo zone)이 상대적으로 큰 균락을 형태에 따라 6개를 선택하였으며 이들은 동일 조건의 PAS 액체배지에 접종하고 4시간 간격으로 균의 성장 및 crystal violet의 분해능을 측정하여, 성장 및 분해능이 우수한 균주를 선택하여 HYCV 06으로 명명하였다(Fig. 1).

분리균주 HYCV 06에 대한 광학 현미경하의 형태적 특성과 그람 염색 및 생화학적 특성 시험의 결과는 Table 1과 같고, 이들 결과를 API 20E profile list에 의해 확인한 결과 *Klebsiella oxytoca*로 동정되었다.

분리 균주의 생장곡선 및 분해능

PAS 액체배지에 포도당은 0.05%, crystal violet은 10mg/l가 되도록 첨가하여 온도별로 crystal violet의 분해 양상을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 접종 12 시간후 20, 25, 30 및 37 ℃에서 분해되지 않고 남아있는 crystal violet의 양이 각각 93.4, 56.73, 25.36 및 31.57%이었고 24시간 후에는 각각 48.18, 18.81, 2.70 및 1.88 %이었다. 그리고 6, 12시간에서는 분해효율이 37 ℃에 비해 30 ℃에서 6% 이상 높았으나 18, 24시간에서는 37 ℃에서 0.8%이상으로, 유의한 차를 보이지 않았다. 위의 결과로 crystal violet 분해에 필요로 하는 최적 온도 구간을 30 ℃로 설정하

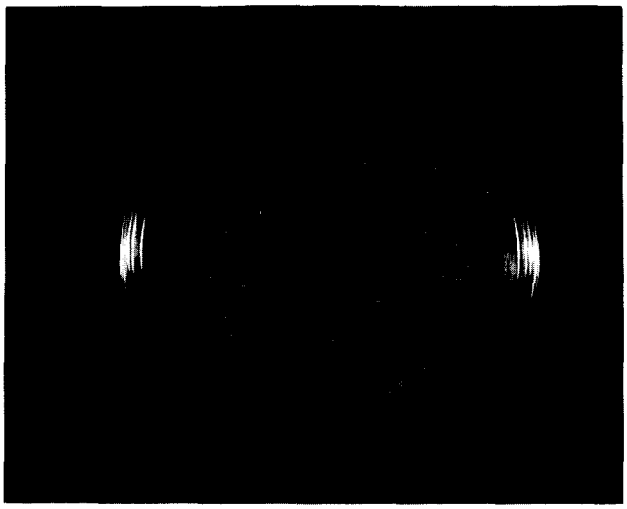

Fig. 1. Degradation of crystal violet on the PAS agar plate by the *K. oxytoca* as indicated by the clear zone surrounding the colonies. The initial concentration of crystal violet and glucose were 10 mg/l and 0.05%, respectively.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolate, *K. oxytoca*.

Test items	Characteristics	Test items	Characteristics
Cell arrangement	Single	Indole production	+
Shape	Rod	Voges-Proskaur test	−
Colony form	Circular	Gelatin hydrosis	−
Cell pigment	Creamy	β-galactosidase	+
Motility	−	Carbohydrate utilization	
Gram stain	−	Glucose	+
Indole formation	+	Mannitol	+
Glucose acidification	+	Inositol	+
Arginine dihydrolase	−	Sorbitol	+
Lysine decarboxylase	−	Rhamnose	+
Ornithine decarboxylase	−	Sucrose	+
Citrate utilization	+	Melibiose	+
H_2S production	−	Amygdalin	+
Urease test	+	Arabinose	+
Tryptophan deaminase	−	Oxidase	−

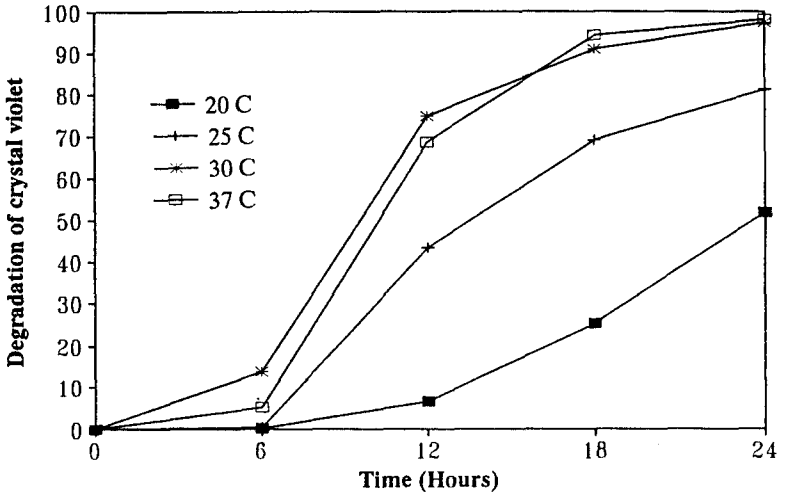

Fig. 2. Degradation of crystal violet by *K. oxytoca* according to different temperatures.

였으며 이후의 실험은 30℃에서 수행하였다.

탄소원으로 포도당의 최종농도가 0, 0.01, 및 0.05%가 되도록 첨가한 PAS 액체배지에 crystal violet의 최종농도가 10mg/l가 되도록 첨가하고 분리균주를 접종하여 균의 생장을 측정하였을 때 포도당의 농도가 증가할수록 생장이 왕성하게 나타났음을 알 수 있었다(Fig. 3). 그러나, 생장곡선상에서 배지의 영양원중 포도당 등을 먼저 이용하고 crystal violet을 나중에 이용하는 diauxie 양상은 나타나지 않았는 바, 이는 crystal violet이 본 분리균주의 탄소원으로 이용되지는 않는 것임을 시사하는 것이며, 또한 LB 완전배지에서도 crystal violet 40mg/l 이상의 농도에서는 생장하지 못하는 것으로 관찰되었는데(data not shown), 이는 crystal violet와 같

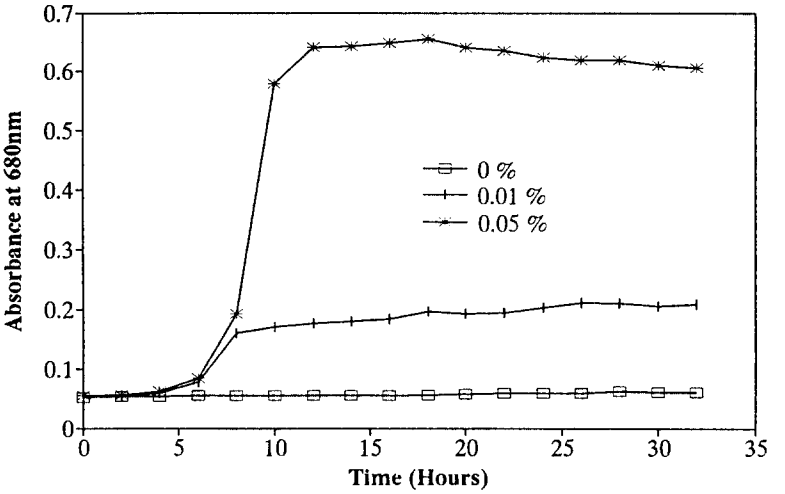

Fig. 3. Time courses of cell growth in liquid broth PAS medium of *K. oxytoca* after incubation 0 to 32 hours. Initial concentration of crystal violet was 10mg/l. Glucose was added to the medium 0 to 0.05%.

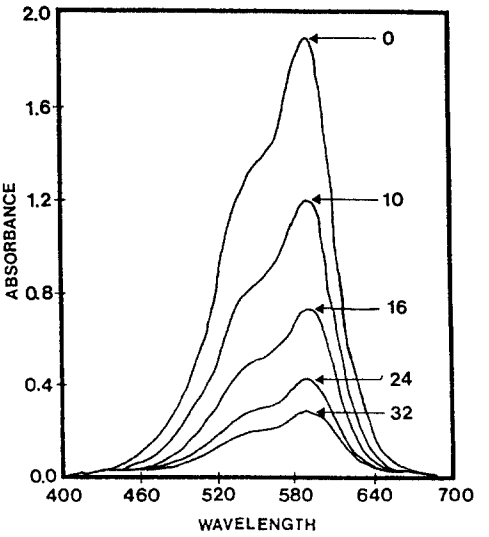

Fig. 4. Spectra of crystal violet in extracellular fluid obtained from a liquid broth PAS medium of *K. oxytoca* after 0 to 32 hours incubation. Initial concentration of crystal violet and glucose were 10mg/l and 0.01%, respectively.

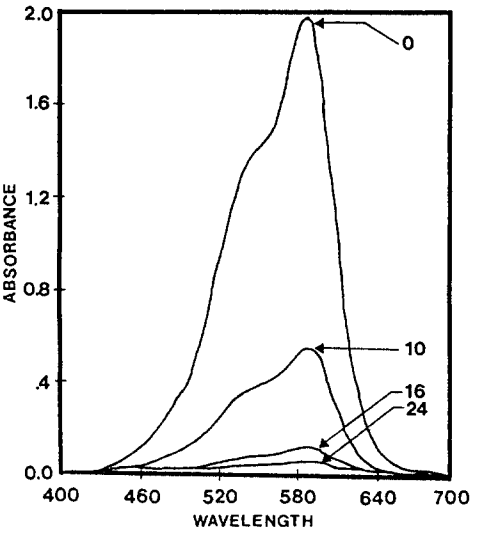

Fig. 5. Spectra of crystal violet in extracellular fluid obtained from a liquid broth PAS medium of *K. oxytoca* after 0 to 24 hours incubation. Initial concentration of crystal violet and glucose were 10mg/l and 0.05%, respectively.

은 합성 염료에는 미생물 분해에 내성이 있는 치환기(azo, nitro, sulfo group 등)가 효소의 활성을 억제하여 일정 농도 이상에서는 미생물 생육에 영향을 미치기 때문으로 해석된다(Pagga *et*

al., 1986; Zimmerman *et al.*, 1982).

본 실험에서 분리된 *K. oxytoca*에 의한 crystal violet의 분해 양상은 crystal violet의 최대 흡광파장대인 590 nm에서 나타나는 peak의 감소로 확인하였으며(Fig. 4, 5), 포도당을 첨가하지 않은 배지에서는 총 crystal violet의 양에서 약 7% 정도 밖에 분해하지 못하였으나(data not shown), 포도당이 0.05% 첨가된 배지에서는 약 24시간 만에 crystal violet을 98% 이상 분해하는 것으로 나타났고, 또한 포도당의 농도가 증가할수록 crystal violet의 분해속도가 증가함을 알 수 있었다. 이는 동일 조건의 Kwasniewska(1985)의 실험에서 *Rhodotorula rubra*와 *R.* sp.를 이용하여 10 mg/l의 crystal violet를 완전 분해하는데 약 4일의 시간이 소요되었음과 비교하면 그 분해능이 상대적으로 우수하였으며, 향후 실제 폐수에의 적용 가능성을 시사하였다.

분해산물 생성 여부의 확인

배양액중 crystal violet 만을 n-butanol로 추출하였을 때, Yatome *et al.*(1981)의 보고에 의하면 crystal violet의 흡광 peak는 307 nm와 252 nm에서 나타나고 분해가 진행될수록 252 nm의 peak는 감소하며 동시에 307 nm의 peak는 265 nm로 이동하는 hypochromic shift 현상이 일어나며, 이때 265 nm에서의 흡광 peak의 증가를 중간 대사산물로서 4,4-bis(dimethylamino) benzophenone(Michler's ketone)이 생성되는 것으로 보고하였다(Yatome, 1991). 본 실험에서는 307 nm와 252 nm 외에도 210 nm의 peak가 관찰되었고, crystal violet의 분해가 진행될수록 이들 peak가 모두 감소하는 양상을 나타내어(Fig. 6) Yatome *et al.* 이 보고한 중간 대사산물로 추정할 만한 유의한 peak로의 hypochromic shift 현상은 볼 수 없었던 까닭에 TLC에 의한 분해산물의 확인을 시도하였다. Crystal violet은 hexa-, penta-, tetra- 및 trimethyl- pararosaniline의 혼합물로 구성되어 있는데, 본 TLC 실험에서도 배양 후 0, 6, 12, 18, 24, 30 및 32 시간 시료의 전 구간에서 이들로 추정되는 R_f값이 각각 0.298, 0.374, 0.450, 0.557인 네개의 band가 나타났으며, 배양시간이 증가할수록 band가 희미해짐으로써 이들 물질이 감소되는 것으로 나타났을 뿐 분해산물로 추정되는 유의한 다른 band는 확인할 수 없었다(Fig. 7).

Crystal violet의 분해경로에 관한 연구는 Yatome *et al.*(1981, 1991)의 보고 이외에 *Phanerochaete chrysosporium*를 이용한 분해 연구에서 lignin peroxidase와 glucose oxidase가 N-demethylation에 관여한다는(Bumpus, 1989; Bumpus *et al.*, 1988) 정도의 국소적인 연구가 있을 뿐 전체적인 분해경로에 관한 확실한 정보가 없는 실정에서, 본 결과를 단정적으로 해석할 수는 없으나 분리균주 *K. oxytoca*에 의한 crystal violet의 분해는 단계적으로 일어나는 것이 아니라 효소의 복합적인 관여에 의해 분해 중간산물의 생성을 거치지 않고 최종 분해산물로 진행되는 것으로 추정되어진다.

분리균주의 항생제에 대한 내성

분리 균주의 ampicillin, tetracycline, streptomycin, chloramphenicol, kanamycin, carbenicillin 5가지 종류의 항생제에 대한 내성검사를 한 결과 carbenicillin, ampicillin에 저항성이 있는 것으로 나타났으며, tetracycline, streptomycin, chloramphenicol, kanamycin에 대해 민감한 것으로 나타났다(Table 2). 이러한 결과는 향후 crystal violet의 분해특성 등에 관한 연구에 본 분리균주의 genetic marker로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

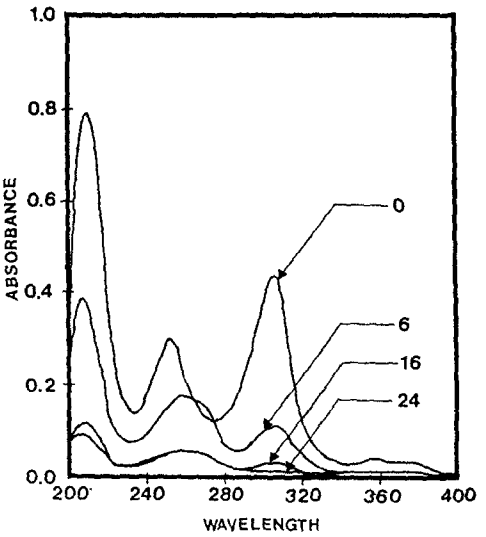

Fig. 6. UV spectra of crystal violet in n-butanol extract obtained from a liquid broth PAS medium of *K. oxytoca* after 0 to 24 hours incubation. Initial concentration of crystal violet and glucose were 10 mg/l and 0.05%, respectively.

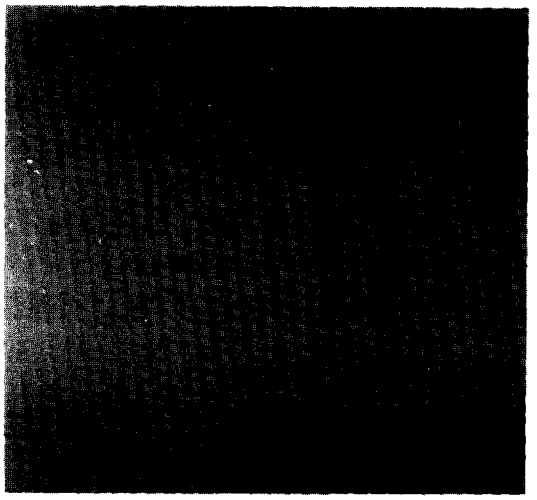

Fig. 7. Thin layer chromatogram of extracellular fluid in liquid broth PAS medium of *K. oxytoca* after 0 to 32 hours incubation(C-I). A and B were standard solution of crystal violet and methyl violet 2B, respectively. The solvent system was propanol-H_2O-glacial acetic acid(90:9:1)

Table 2. Antibiotic resistance of the isolate, *K. oxytoca*.

Strains	Response to antibiotics						MIC of antibiotics(μg/ml)					
	Ap	Tc	Sm	Cm	Km	Cb	Ap	Tc	Sm	Cm	Km	Cb
Klebsiella oxytoca HYCV 06	R	S	S	S	S	R	800<	1	20	5	50	800<

2차 탄소원으로 과당, 자당, yeast-extract 첨가시 분해효율의 변화

탄소원으로 0.01% 과당을 첨가한 배양(Fig. 8)에서는 20시간 이후의 구간에서 배양액에 잔존하는 crystal violet이 6% 미만으로 가장 많이 분해되었고, 0.05% 구간(Fig. 9)에서는 18 시간 이후의 모든 그룹에서 crystal violet의 잔존량이 10% 미만이었다.

이상의 결과에서 분리균주 *K. oxytoca*는 crystal violet의 분해를 위해 2차 탄소원의 첨가를 요구하였으나 실제 염색폐수에는 염료 조제나 호료(polyvinyl alcohol, starch 등) 등의 다량한 영양원이 존재하므로 본 실험에서 분리한 균주를 인공폐수에서 단독 또는 혼합 배양하여 적응시킨 후 활성슬러지를 조제하여 염색폐수의 정화에 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

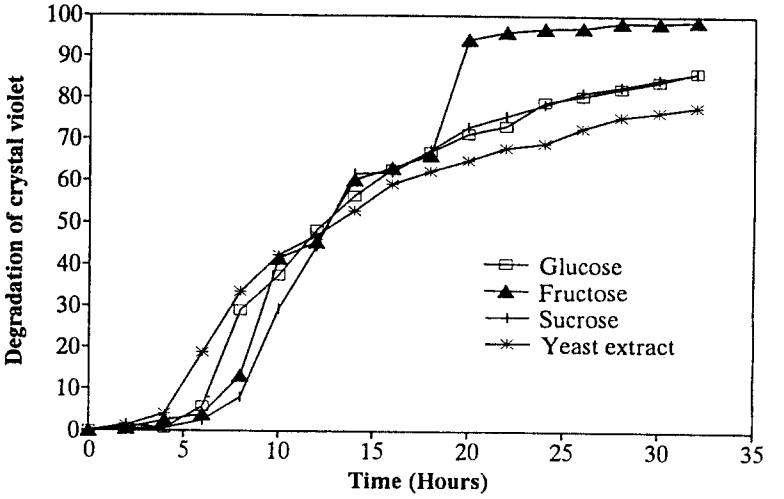

Fig. 8. Degradation of crystal violet in extracellular fluid obtained from a liquid broth PAS medium of *K. oxytoca* after 0 to 32 hours incubation. Initial concentration of crystal violet and secondary carbon sources were 10 mg /l and 0.01%, respectively.

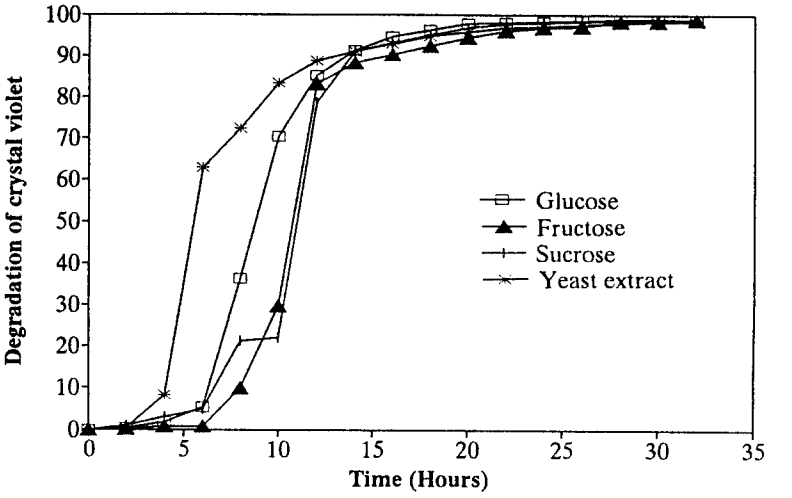

Fig. 9. Degradation of crystal violet in extracellular fluid obtained from a liquid broth PAS medium of *K. oxytoca* after 0 to 32 hours incubation. Initial concentration of crystal violet and secondary carbon sources were 10 mg /l and 0.05%, respectively.

적 요

직물 염료 및 산업과 연구 분야에서 널리 사용되고 있는 triphenylmethane 계열 염료는 저생섭식 어류 등에 발암원으로 작용하고 있는 것으로 알려져 왔다. 이 계열 염료 중 crystal violet

(C.I. Basic violet 3)을 분해하는 세균을 분리하기 위하여 공단 하수 종말처리장과 염색 폐수 처리장 등에서 시료를 채취하였다. 분해능을 나타낸 균주 중 분해 효율이 가장 높은 균주는 *Klebsiella oxytoca*로 동정되었다. PAS 최소배지에 단일 탄소원으로 crystal violet을 10 μg/ml의 농도로 처리하여 배양하였을 때 최고 12.3%의 분해효율을 보였으며, 과당, 포도당, 자당, yeast extract를 각각 0.01%농도로 첨가 배양하였을 때 모두 96% 이상의 분해 효율을 나타내었다.

인용문헌

Anliker, R. 1979. Ecotoxicology of dyestuffs – A joint effort by industry. Ecotoxicol. Environ. Saf. 3:59-74.

Au, W., M.A. Butler., S.E. Bloom, and T.S. Matmey. 1979. Further study of the genetic toxicology of gentian violet. Mutat. Res. 66:103-112.

Bedard, D.L., R. Unterman, L.H. Bopp, M.J. Brennan, M.L. Haberl, and C. Johnson. 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. Appl. Environ. Microbiol. 51:761-768.

Bumpus, J.A., and B.J. Brock. 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 54:1143-1150.

Bumpus, J.A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 55:154-158.

Judkins Jr., J.F., and J.S. Hornsby. 1978. Color removal from textile dye using magnesium carbonate. J. Water Pollut. Conrol Fed. 50:2446-2456.

Kingsland, G.V., and J. Anderson. 1976. A study of the feasibility of the use of gentian violet as a fungistat for poultry feed. Poult. Sci. 55:852-857.

Kwasniewska, K. 1985. Biodegradation of crystal violet(hexamethyl-p-rosaniline chloride) by oxidative red yeasts. Bull. Enviorn. Contam. Toxicol. 34:323-330.

Michaels, G.B., and D.L. Lewis. 1985. Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. Environ. Toxicol. Chem. 4:45-50.

Michaels, G.B., and D.L. Lewis. 1986. Microbial transformation rates of azo and triphenylmethane dyes. Environ. Toxicol. Chem. 5:161-166.

Nelson, C.R., and R.A. Hites. 1980. Aromatic amines in and near buffalo river. Environ. Sci. Technol. 14:1147-1149.

Pagga, U., and D. Brown. 1986. The degradation of dyestuffs. Part Ⅱ. Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. Chemosphere 15:479-491.

Roy, C., and B. Volesky. 1978. Activated carbon adsorption process for purification of textile wastewater. Text. Chem. Color. 10:26-33.

Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Spring Harbor. p. A.6.

Shanin, M.M., and R.C. Von Borstel. 1978. Comparisons of mutation induction in rever-

sion systems of *Saccharomyces cerevisiae* and *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. 53:1-10.

Yatome, C., T. Ogawa, D. Koga, and E. Idaka. 1981. Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. J. Soc. Dyers Colour. 97:166-169.

Yatome, C., T. Ogawa, and M. Matsui. 1991. Degradation of crystal violet by *Bacillus subtilis*. J. Environ. Sci. Health, Part A. 26:75-87.

Youngless, T., J.T. Swanssinger, D.A. Danner, and M. Greco. 1985. Mass spectral characterization of petroleum dyes, tracers and addictives. Anal. Chem. 57:1894-1902.

Zimmerman, T., H.G. Kulla, and T. Lesinger. 1982. Properties of purified orange azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. Eur. J. Biochem. 129:197-203.

Zollinger, H. 1987. Color chemistry-synthesis, properties and applications of organic dyes and pigments, p. 92-102. VCH Publishers, New York.

(1993년 1월 7일 접수)