

## Enterobacter cloacae MG82에 의한 Crystal Violet의 탈색특성

정민선 · 지원대 · 김병홍<sup>1</sup> · 정영건\*

영남대학교 식품가공학과, <sup>1</sup>한국과학기술원 환경연구센터

**Decolorizing Characteristics of Crystal Violet by *Enterobacter cloacae* MG82.** Jeong, Min-Seon, Won-Dae Ji, Byeong-Hong Kim<sup>1</sup>, and Yung-Gun Chung\*. Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyongsan 713-749, Korea, <sup>1</sup>Environmental Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea - Decolorizing characteristics of crystal violet by *Enterobacter cloacae* MG82, which can decolorize rapidly triphenylmethane dyes, were investigated. The higher growth and decolorization activity was shown at big ratio of dissolved oxygen in the medium. The decolorization activity of crystal violet revealed highest at the middle of lag phase. As the concentration of crystal violet was higher, the growth of *E. cloacae* MG82 and decolorizing activity of crystal violet by this strain were worse. The maximum concentration of crystal violet at which *E. cloacae* MG82 be able to grow was 375  $\mu$ M. *E. cloacae* MG82 was not able to use the crystal violet itself as a sole carbon source. So, it was shown that growth of *E. cloacae* MG82 and decolorization activity of crystal violet by this strain needed addition of another energy sources except this dye.

**Key words:** triphenylmethane dye, crystal violet, decolorization, *Enterobacter cloacae* MG82

염색공업의 폐수는 알칼리성이 강하고 염색을 도와주는 난분해성의 조염제가 많아 종래의 폭기조, 침전조 형태의 폐수처리방법으로는 제대로 정화되지 못하고 배출되고 있는 실정이다. 염색공업의 폐수 성분 중 현재 수질환경보전법상 규제를 받는 대상은 BOD, COD 외에 부유물질, phenol 등의 오염물질과 색도, 온도까지 포함된다.

특히 색도는 수질오염의 정도를 시각적으로 극명하게 나타내는 분야로서 보다 효과적인 처리방법의 개발이 절실하게 요청되고 있다.

염료는 난분해성 물질로, Idaka 등[6]과 Kappeler 등[11], Meyer 등[12]이 아조 염료의 생분해에 관해서 보고한 바, 화학적 또는 생물학적 처리에 의한 염료의 색소 제거는 충분하지 않았다고 보고한 바 있다. 직물의 염색, 제지의 인쇄, 의학과 생물과학 분야에서 광범위하게 이용되고 있는 염료인 triphenylmethane계 염료 또한 미생물에 의한 생분해성이 극히 낮고, 폐수 처리에 의한 처리효율도 미미한 것으로 보고되었다[5]. Wald 등[17], Yatome 등[19]과 Idaka 등[7]은 triphenylmethane계 염료 중 가장 대표적인 염료인 crystal violet은 많은 미생물에 대하여 독성을 나타낸다고 하였고, Au 등[1]도 Ames assay와 cytogenic assay 등을 이용하여 이 염료의 독성에 관하여 연구한 바, 이 염료가 어류에서 발암성을 나타낸다고 보고한 바 있다.

지금까지의 triphenylmethane계 염료 분해의 연구결과

는 주로 곰팡이인 *Phanerochaete chrysosporium*의 경우, 영양소의 제한조건 하에서 lignase 또는 lignin peroxidase에 의한 이 염료의 탈색이 보고되었다[2, 3, 13]. Bumpus와 Brock[2]은 *P. chrysosporium*의 세포 배양액이 crystal violet의 경우 염료의 초기농도 12.3  $\mu$ M일 때 반응 24시간 후에 99%의 탈색을, *p*-rosaniline의 경우 염료의 초기농도 12.3  $\mu$ M일 때 반응 24시간 후에 75.7%의 탈색을 나타내었다고 하였다. 세균의 경우에는 *Nocardia corallina*, *Pseudomonas pseudomallei* 13NA, *Bacillus subtilis* 등이 알려져 있다[14, 18, 20]. *N. corallina*는 crystal violet의 경우 염료의 초기농도 2.3  $\mu$ M일 때 반응 90분만에 98.3%의 탈색을, *p*-rosaniline의 경우 염료의 초기농도 2.3  $\mu$ M일 때 70.0%의 탈색을 나타내었다[18]. *B. subtilis* IFO 13719는 triphenylmethane계 염료 중 crystal violet의 경우 초기농도 2.1  $\mu$ M일 때 8시간 후에 98%의 탈색을, *p*-rosaniline의 경우 초기농도 2.1  $\mu$ M일 때 8시간 후에 90%의 탈색을 나타내었다는 보고[20] 등이 있다.

효율적인 염색폐수처리공정의 개발에 필수적인 선행 과제로서 본 연구자들은 염색공단의 폐수로부터 triphenylmethane계 염료의 탈색성이 우수한 균주인 *Enterobacter cloacae* MG82를 분리, 동정하였는데, 이 균은 염료의 초기농도가 120  $\mu$ M일 때 95% 이상의 탈색 효율을 나타내었고 이러한 활성은 기존의 보고[14, 18, 20]보다 높은 것임을 보고한 바 있었다[8, 9]. 본 연구는 *E. cloacae* MG82의 보다 특이적인 crystal violet 탈색 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

\*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2951, Fax. 82-53-851-1891

## 재료 및 방법

### 사용 균주 및 배양

본 연구에 사용된 균은 정 등[8]이 분리한 *Enterobacter cloacae* MG82 균주이며, 균주의 접종은 0.1%(v/v)를 원칙으로 하여 660 nm에서 흡광도 1.0인 전 배양액을 접종원으로 하였다. 탈색에 있어서 glucose의 효과를 조사하기 위한 실험에서는 세포내 저장물질의 효과를 최소화하기 위하여 동일한 조성의 배지에서 최소한 3회 이상의 계대를 거쳐, 새로운 조성에 완전히 적응한 균주를 접종원으로 사용하였다.

### 사용 염료

실험에 사용한 모든 시약은 특별한 언급이 없는 한, 일급 이상의 시약을 이용하였다. 특히 표준염료로 사용한 crystal violet은 Aldrich Chemical Co.(U. S. A.)에서 구입하였다.

### 균생장 및 탈색능 측정

균생장 및 탈색능 측정을 위한 기본배지는 0.3% glucose, 0.1% yeast extract, 0.1%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.02% NaCl, 0.01%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.01%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  와 0.01%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 조성이었으며, pH는 7.0으로 조절하였다. 탈색에 있어서 glucose의 효과를 조사하기 위한 최소배지는 기본 배지에서 glucose와 yeast extract를 제외한 배지를 사용하였고 pH는 7.0으로 조절하였다.

균생장율은 균생장 기본배지에 0.1%(v/v)의 전 배양액을 접종하여 37°C에서 진탕 배양 후, 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 탈색능을 조사하기 위해서는 crystal violet를 첨가한 기본배지에 *E. cloacae* MG82의 전 배양액을 0.1% 접종하여 37°C에서 진탕 배양시킨 다음, *n*-butanol로 배양액 속의 염료를 추출하여 spectrophotometer로 crystal violet의 최대 흡광도인 588 nm에서 흡광도를 측정하였다. 탈색된 염료의 양은 사전에 측정된 염료 농도의 표준곡선에 준하여 대조구에 대한 감소량으로서 측정하였다.

### 균 성장상에 따른 탈색능

균 성장상에 따른 탈색능의 변화를 조사하기 위하여 세포의 전 배양액을 대수 증식 중기인 6시간 배양균, 안정기인 16시간 배양균, 사멸기 초기인 24시간 배양균, 사멸기 말기인 48시간 배양균으로 각각 준비한 후 각 세포 균을 660 nm에서의 흡광도의 값이 1.0이 되도록 포획하였다. 이를 생리식염수로 2회 수세한 후 10 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 7.0)에 현탁시켜 25  $\mu\text{M}$  농도의 crystal violet이 첨가된 10 mM citrate-phosphate 완충용액(pH 7.0)에서 37°C, 10분간 반응시켜 각

각의 탈색 활성을 비교하였다.

### Glucose 분석

기질로 사용한 glucose의 분석에는 PGO-enzymatic glucose kit(BC 103-E, Young-dong Pharm. Co. LTD., Korea)을 사용하였다. 시료의 glucose 함유 농도는 505 nm에서 흡광도로 측정하여 측정된 표준곡선에 준하여 계산하였다.

### Specific growth rate의 분석

균체의 배양 중 단위시간(dt)당 균체의 증가량(dx)은 다음과 같이 표현할 수 있다.

$$dx = \mu \times dt \quad (1)$$

이때,  $\mu$ 는 "specific growth rate"를 나타내는 상수 값이다.

$$\mu = 1/t \cdot \ln(x/x_0) \quad (2)$$

이때,  $x$  및  $x_0$ 는 각각 초기와 말기의 균체량을 나타낸다.

## 결과 및 고찰

### 용존산소량에 따른 균생장

배지내의 용존량이 *E. cloacae* MG82의 생장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 15 ml cap tube내의 배지량을 5 ml, 10 ml과 15 ml로 조절하여 배지에 대한 상대적인 용존 산소량을 달리하여 균주의 생장을 비교한 결과는 Fig. 1과 같았다. 균생장 배지에서 6시간 배양했을 경우, 상대적인 용존산소량이 가장 큰 5 ml 배양 시에 660 nm에서의 흡광치가 0.63으로 가장 높은 균생장을 보였으므로 용존산소의 양이 많을수록 균생장에 유리함을 알

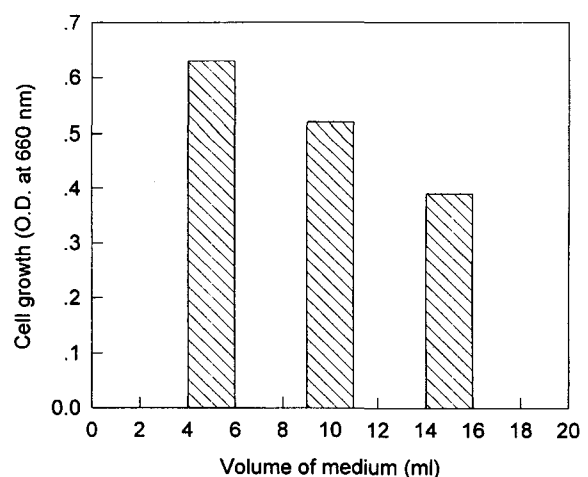


Fig. 1. Effect of air supply on the growth of *E. cloacae* MG82. Each of 15 ml closed tubes contained 5, 10, or 15 ml medium. Cells were cultured at 37°C for 6 hours in shaking incubator (100 rpm).

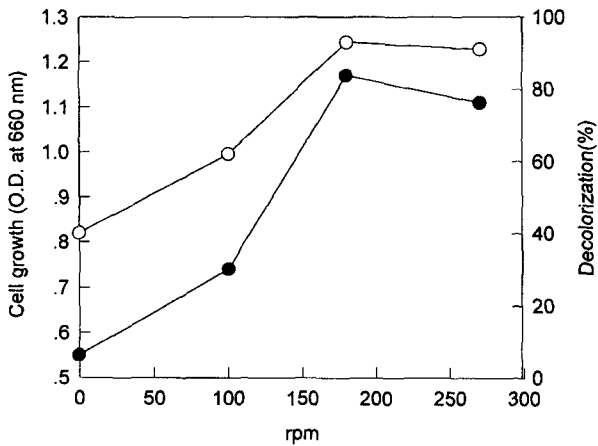


Fig. 2. Effect of agitation on the growth and decolorization of crystal violet by *E. cloacae* MG82.

Cells were cultured at 37°C for 6 hours in shaking incubator. —●—, cell growth; —○—, decolorization.

수 있었다.

정치와 교반효과에 따른 균생장과 탈색능

교반효과에 따른 *E. cloacae* MG82의 균생장과 탈색능을 비교한 결과는 Fig. 2에서와 같이 기본 배지에서 6시간 배양할 경우 정치 배양시에 최소의 성장을 보여주었고, 진탕 속도가 증가함에 따라 균생장도 점차 활발하여 180 rpm에서 진탕 배양할 경우 가장 높은 성장을 보여주었으며, 그 이상의 조건에서는 균생장이 다소 감소함을 알 수 있었다. 이러한 결과는 정치 배양의 경우보다 진탕 배양의 경우가 산소와의 접촉이 좋기 때문에 균주의 생장이 활발하게 이루어진 것으로 사료된다.

Crystal violet을 125 μM의 농도로 첨가하여 동일한 조건으로 배양하며 탈색능을 조사한 결과, 정치 배양의 경우 40%의 탈색능만을 보인 반면, 진탕 속도의 증가에 비례하여 탈색율이 증가하였으며, 180 rpm 진탕 시에는 92%의 탈색능을 나타내었으므로 정치 배양보다 진탕 배양이 이 균주의 탈색에 효과적임을 알 수 있었다. 이 결과는 용존 산소의 양이 많을수록 균생장에 유리하였던 앞의 실험결과와 일치하는 것이었고, 세포의 수가 많을수록 염료의 탈색이 효과적으로 진행됨을 의미하는 것이었다.

이러한 결과는 *Pseudomonas*속 균들을 이용한 triphenylmethane계 염료의 분해시 산소의 공급이 염료의 생분해를 촉진시켰다는 Sarnaik와 Kanekar[15]의 보고와 일치하는 것이었다. 그러나, 미생물에 의한 아조계 염료 탈색의 경우, 산소와의 접촉이 많은 진탕 배양의 경우가 정치 배양시보다 염료 탈색에 불리하게 작용하였다는 Duen 등[4]의 보고와 *P. pseudomallei* 13NA균주를 이용한 아조계 염료의 탈색시 정치 배양이 유리하였다는 석

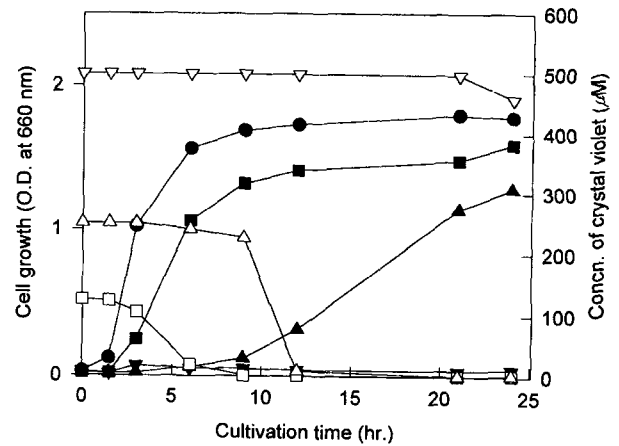


Fig. 3. Time course of decolorization of crystal violet and growth of *E. cloacae* MG82 at various dye concentration.

Cultivation was carried at 37°C in shaking incubator (180 rpm). —●—, growth without crystal violet; —■—, growth with 125 μM, crystal violet; —▲—, growth with 250 μM crystal violet; —▼—, growth with 500 μM crystal violet; —□—, residual crystal violet with 125 μM; —△—, residual crystal violet with 250 μM; —▽—, residual crystal violet with 500 μM.

등[16]의 보고 등 아조계 염료의 경우 일반적으로 용존 산소의 양이 많을수록 균주의 염료 탈색율이 낮아진다는 보고와는 상이한 것이었다. 따라서 *E. cloacae* MG82에 의한 crystal violet의 탈색 기작은 이미 보고된 아조계 염료 탈색의 기작과는 상이하게 산소에 의한 저해작용을 받지 않는 것으로 사료되었다.

염료 농도에 따른 균생장과 탈색능

Yatome 등[18]은 triphenylmethane계 염료가 독성이 매우 강하여 *N. collarina*의 경우 7 μM의 농도에서는 균의 생장이 완전히 억제되며, Gram양성균인 *B. subtilis*의 경우[20]에도 7 μM의 농도에서 균생장이 효과적으로 억제됨을 보고한 바 있었다. Idaka 등[7]도 활성 슬러지를 이용한 염색 폐수의 탈색시 염료 자체의 독성이 강하기 때문에 미생물을 이용한 염료의 생분해를 수행하기 위해서는 BOD 3,800 ppm이하의 농도에서는 폐수처리조 내의 활성 슬러지가 일정하게 유지될 수 없었고 18,000 ppm이상의 BOD 농도에서 활성 슬러지가 가장 효과적으로 일정한 농도를 유지할 수 있었다고 보고한 바 있었다.

따라서 본 실험에서도 염료 탈색 최적 조건에서 crystal violet의 초기 농도를 각기 다르게 조절하여 진탕 배양하면서 염료의 초기 농도가 *E. cloacae* MG82의 균생장과 탈색능에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었고, 이때의 균생장속도의 변화는 Fig. 4에 표시하였다.

Fig. 3에서 보는 것과 같이, 염료의 초기 농도에 따라서 탈색이 개시되는 시간이 늦어지지만 일단 탈색이 시

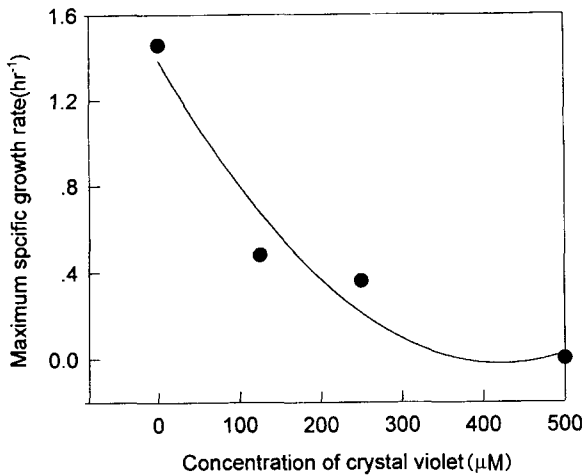


Fig. 4. Comparison of maximum specific growth rate ( $\mu_{max}$ ) of *E. cloacae* MG82 at various concentrations of crystal violet.

작되면 균생장과 비례하여 급격하게 탈색됨을 알 수 있었다. 균생장은 염료의 농도에 따라 대수증식기가 길어지며 최종 균체량도 낮아졌다.

균생장속도의 변화(Fig. 4)는 염료를 첨가하지 않은 경우의 최대 균생장속도( $\mu_{max}$ )값이 1.46 hr<sup>-1</sup>인 것에 비하여 염료 농도가 125 μM, 250 μM으로 높아짐에 따라 최대 균생장속도도 0.48 hr<sup>-1</sup>, 0.36 hr<sup>-1</sup>으로 현저하게 낮아졌다. 이 결과로부터 crystal violet이 *E. cloacae* MG82의 균생장을 억제한다는 것을 확인할 수 있었고, Table 1에서와 같이 *E. cloacae* MG82의 생장이 가능한 crystal violet의 최고 생육 가능 농도는 375 μM이었다.

이상의 실험결과로부터, triphenylmethane계 염료인 crystal violet이 균생장을 억제함을 알 수 있었으며 이러한 특성은 triphenylmethane계 염료가 항 미생물적 특성을 지니고 있어 소독용 용제로 쓰인다는 사실과도 일치하는 것이었다. 이 결과는 Yatome 등[14, 18, 20]이 *P. pseudomallei* 13NA, *B. subtilis*, *N. corallina*의 초기 생장이 crystal violet에 의하여 억제된다고 보고한 사실

Table 1. Growth inhibition of *E. cloacae* MG82 in the presence of crystal violet

Conc. of crystal violet(μM)	Growth
0	+++
75	+++
125	+++
250	++
375	+
500	-

Cells were cultivated at 37°C for 4 days in shaking incubator in the dark. +, weakly growth; ++, growth; +++, growth well; -, no growth.

과도 일치하는 것이었다.

지금까지 보고된 triphenylmethane계 염료의 탈색 세균으로는 *P. pseudomallei* 13NA[19], *P. alcaligenes*[10], *P. mendocina*[15], *P. putida* biovar B[10], *P. stutzeri* [15] 등 *Pseudomonas*속 균들을 비롯하여 *N. corallina* [18], *B. subtilis*[20]가 보고되었을 뿐으로 *E. cloacae*에 의한 triphenylmethane계 염료의 탈색은 아직 보고된 적이 없었으며, Yatome 등[18]이 보고한 *N. corallina*와 *B. subtilis*[20]가 crystal violet의 초기농도 7 μM에서 균생장 및 탈색능이 완전히 억제된다는 보고와, *P. pseudomallei* 13NA[19]가 crystal violet의 초기농도 50 μM에서 탈색능이 억제된다는 보고, Kaneker와 Sar-naik[10, 15]이 보고한 *Pseudomonas*속 균주들이 triphenylmethane계 염료인 methyl violet의 초기농도 75 μM에서 탈색능이 억제된다는 보고에 비해 본 분리균주 *E. cloacae* MG82의 탈색능 및 염료에 대한 저항성이 매우 우수함을 알 수 있었다.

균 생장상에 따른 탈색능

동일한 조건에서 동일한 균을 배양했을지라도 균의 생장상에 따라서 여러 특성이 달라지게 되므로 *E. cloacae* MG82의 생장상에 따른 염료 탈색 특성에 차이가 있는지 조사하였다.

실험결과 대수증식 중기의 상태인 6시간 배양한 세포 균의 탈색능이 97%로 가장 우수한 탈색능을 나타내었고, 안정기에서 사멸기로 갈수록 탈색능이 94%, 89%, 85%로 저하되었다. 따라서 균생장 중기의 세포에서 탈색 활성이 가장 우수하였고, 이때의 탈색 효소의 합성이 가장 왕성함을 추정할 수 있었다.

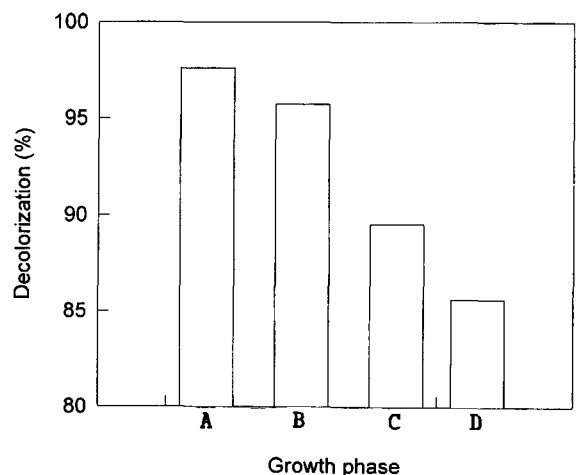


Fig. 5. Comparison of decolorization activities of *E. cloacae* MG82 at the different growth phases.

A, 6 hours old; B, 16 hours old; C, 24 hours old; D, 48 hours old.

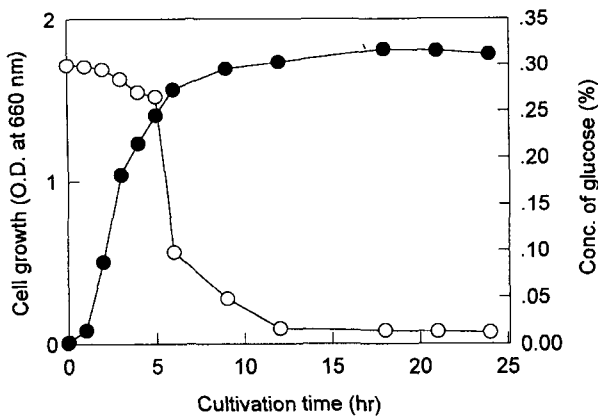


Fig. 6. Time course of cell growth and concentration of glucose of *E. cloacae* MG82 at the optimum growth conditions. Cells were cultivated at 37°C in shaking incubator (180 rpm). —●—, cell growth; —○—, glucose concentration (%).

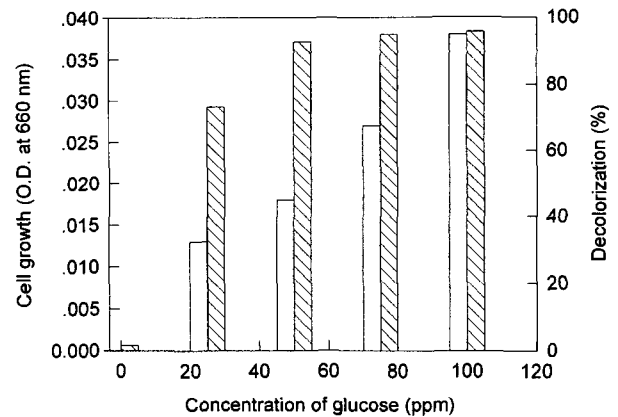


Fig. 7. Effect of glucose concentration on the decolorization activity of *E. cloacae* MG82. Cells were cultured at 37°C for 6 days with shaking incubator in the dark. □, cell growth; ▨, decolorization.

최적조건에서의 균생장과 glucose의 변화

최적 조건에서 *E. cloacae* MG82의 배양 시간에 따른 균생장과 탄소원인 glucose의 변화를 검토한 결과는 Fig. 6에서와 같이 균 배양 3시간 이후부터 대수증식기에 들어가 배양 10시간 이후에 안정기에 들어섬을 알 수 있었다.

탄소원인 glucose는 균의 생장에 따라 급속하게 감소되어 균 성장 안정기에 들어서는 배양 10시간 이후에 거의 모두 이용되어 최대 균체량에 이르고 있었다.

*E. cloacae* MG82의 탈색에 있어서 glucose의 효과

분리균 *E. cloacae* MG82가 crystal violet만을 유일한 에너지원으로 이용할 수 있는 지 없는 지를 확인하고, 만약 crystal violet을 에너지원으로 이용할 수 없다면, 탄소원인 glucose와 crystal violet 탈색능간에 어떤 대사 관계가 성립되는 지를 규명하고 염료 탈색에 미치는 glucose의 영향을 조사하고자 crystal violet을 123 μM의 농도로 첨가한 최소배지에 단일 에너지원으로 glucose만을 농도별로 첨가하여 37°C에서 180 rpm의 조건으로 6일 동안 배양 후 균생장 및 탈색능을 측정하였다. 이때 사용한 균 접종원은 세포내 저장물질의 영향을 최소화시키기 위하여 최소배지에서 최소한 3회 이상 계대한 후 사용하였고, 광선에 의한 분해를 방지하기 위하여 광선을 완전히 차단한 상태로 실험을 수행하였다. 그 결과는 Fig. 7에 나타난 것과 같이 *E. cloacae* MG82는 crystal violet을 탄소원으로 이용할 수 없음을 알 수 있었다. 즉, 탄소원인 glucose가 없을 때에는 균생장과 탈색이 일어나지 않았으나, 25 ppm 농도의 glucose만을 첨가해 주어도 균생장이 가능하였고, 이 때 73%의 탈색율을 나타내었다.

이로써 *E. cloacae* MG82는 crystal violet을 탄소원으로 이용할 수 없고, 균생장과 탈색에 탄소원을 필요로 하

며, crystal violet 탈색능과 탄소원인 glucose간에는 미생물에 의하여 생분해되어 생성된 화합물질이 미생물의 성장원으로 이용되지 못하고 미생물의 생장에 다른 에너지원이 필요하게 되는 공대사적 관계가 성립됨을 확인할 수 있었다.

실험 결과, 본 분리균주는 25 ppm의 glucose만이 있어도 73%의 탈색능을 보였으므로 실패수 처리에 응용시 더욱 우수한 탈색 효과를 기대할 수 있을 것으로 사료되었다.

요 약

Triphenylmethane계 염료 탈색균인 *E. cloacae* MG82를 이용한 crystal violet의 탈색 특성을 조사하였다. 배지내의 용존산소의 양이 많을수록 crystal violet의 탈색과 *E. cloacae* MG82의 균생장이 좋았다. 균생장 중기의 세포 군에서 crystal violet의 탈색능이 가장 활발하였고 염료의 농도가 높아짐에 따라 균생장과 탈색능이 억제되었으며, 균생장이 가능한 crystal violet의 최고 농도치는 375 μM이었다. *E. cloacae* MG82는 crystal violet을 유일한 탄소원으로 이용할 수 없었고, 균생장 및 염료의 탈색에 또 다른 에너지원을 필요로 하였다.

참고문헌

1. Au, W., M. A. Butler, S. S. Bloom, and T. S. Matney. 1979. Further study of the genetic toxicity of gentian violet. *Mutat. Res.* 66: 103-112.
2. 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.
3. Cripps, C., J. A. Bumpus, and S. D. Aust. 1990. Biode-

- gradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1114–1118.
4. Duen, G. M., K. L. Kim, and P. S. Hwei. 1991. Microbial agents for decolorization of dye waste. *Biotech.* **9**: 613–622.
  5. Duxbery, D. F. 1993. The photochemistry and photo-physics of triphenylmethane dyes in solid and liquid media. *Chem. Rev.* **93**: 381–433.
  6. Idaka, E., T. Ogawa, H. Horitsu, and M. Tomoyeda. 1978. Degradation of azo compounds by *Aeromonas hydrophila* var 24B. *J. Soc. Dye. Colour.* **94**: 91–94.
  7. Idaka, E., T. Ogawa, Y. Chidzuko, and H. Horitsu. 1985. Behavior of activated sludge with dyes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **35**: 729–734.
  8. Jeong, M. S., Y. H. Jung, W. D. Ji, J. Y. Lim, Y. C. Kim, Y. S. Kim, Y. G. Chung, and K. H. Min. 1995. Degradation of triphenylmethane dyes by thermotolerant *Enterobacter cloacae*. *The Microorganisms & Industry* **21**: 325–330.
  9. Jeong, M. S., S. J. Kwak, B. H. Kim, Y. G. Chung, S. W. Chang, and K. H. Min. 1997. Uptake of triphenylmethane and cellular localization of enzyme for its decolorization in *Enterobacter cloacae* MG82 Kor. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 37–43.
  10. Kanekar, P. and S. Sarnaik. 1991. An activated sludge process to reduce the pollution load of a dye-industry waste. *Environ. Pollut.* **70**: 27–33.
  11. Kappeler, T., U. Meyer, von A. Wattenwyl, K. Wuhlmann, and H. Zollinger. 1978. Are azo dyes biodegradable? *Text. Chem. Color* **10**: 10–15.
  12. Meyer, U., G. Overney, and von A. Wattenwyl. 1979. Ueber die biologische Abbaubarkeit von Azofarbstoffen. *Textilveredlung* **14**: 15–20.
  13. Ollikka, P., K. Alhomaki, V. M. Leppanen, T. Gloumoff, T. Rajola, and I. Suominen. 1993. Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4010–4016.
  14. Ogawa, T., C. Yatome, E. Idaka, and H. Kamiya. 1986. Biodegradation of azo acid dyes by continuous cultivation of *Pseudomonas cepacia* 13NA. *J. Soc. Dye. Colour* **102**: 12–14.
  15. Sarnaik, S. and P. Kanekar. 1995. Bioremediation of colour of methyl violet and phenol from a dye-industry waste effluent using *Pseudomonas* spp. isolated from factory soil. *J. Appl. Bacteriol.* **79**: 459–469.
  16. Suk, J. K., J. S. Kim, S. J. Lee, and J. K. Lee. 1983. Study of biodegradation of azo dyes. *Bioindustry* **8**: 93–96.
  17. Wald, W. H., M. J. Snyder, and R. L. Gutberlet. 1977. Group B beta-hemolytic streptococcal colonization acquisition, persistence and effect of umbilical cord treatment with triple dye. *Am. J. Dis. Child.* **131**: 178–180.
  18. Yatome, C., S. Yamada, T. Ogawa, and M. Matsui. 1993. Degradation of crystal violet by *Nocardia corallina*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 565–569.
  19. Yatome, C., T. Ogawa, D. Koga, and E. Idaka. 1981. Biodegradability of azo and triphenylmethane dyes by *Pseudomonas pseudoallei* 13NA. *J. Soc. Dye. Colour* **97**: 166–169.
  20. Yatome, C., T. Ogawa, and M. Matsui. 1991. Degradation of crystal violet by *Bacillus subtilis*. *J. Environ. Sci. Health* **26**: 75–87.

(Received February 27, 1998)