



유·무기성 악취저감을 위한 최적의 미생물 포괄고정담체 제조법에 관한 연구 Development of Optimal Bio-encapsulated Media for Organic/Inorganic Odor Reduction

김선진¹ · 김태형¹ · 이윤희¹ · 장현섭² · 송지현³ · 황선진^{1*}

Sun-jin Kim¹ · Tae-Hyeong Kim¹ · Yunhee Lee¹ · Hyun-sup Jang² · Ji-Hyeon Song³ · Sun-jin Hwang^{1*}

1 경희대학교 공과대학 환경학 및 환경공학과 · 환경연구센터, 2 성균관대학교 무배출형환경기술센터, 3 세종대학교 건설환경공학과
(2011년 12월 7일 접수; 2012년 2월 3일 수정; 2012년 2월 6일 채택)

Abstract

A bio-encapsulated media was developed to apply on reducing odors produced from organic waste treatment process. The microorganism, *Candida tropicalis*, was encapsulated in sponge media consisted of polyurethane material. Sodium alginate as a natural polymer which does not affect to hydrophilic microbes and PEGDA (poly ethylene glycol diacrylate) as a artificial polymer were used for the encapsulated media. The media was evaluated with TMEDA (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, 0.02~0.1%) as a catalyst at different temperature 25 and 35°C. The best performance was achieved with 0.02% of TMEDA at 25°C. The microbes' activity in the media was examined by Live/Dead cell method.

Key Words : Biofilter, encapsulation media, *Candida tropicalis*

주제어 : 바이오필터, 포괄고정담체, *Candida tropicalis*

I. 서 론

인구증가와 도시화로 인한 유기성 폐기물의 발생량이 급증함에 따라 여러 환경문제가 발생되고 있으며, 처리과정에서 발생하는 대기 환경오염물질인 악취 가스는 또 다른 환경 문제로 인식되고 있다. 환경부는 악취로 인한 환경문제의 적극적인 대처를 위해 2005년 2월 10일부터 악취방지법을 시행하였고, 다양한 악취 발생시설에서는 적용타당성이 높은 악취 저감기술에 대한 연구를 진행하고 있다(Lee *et al.*, 2009).

악취 제거기술중 생물학적 처리방법인 바이오필터는 물리적 충격에 강한 매개 물질인 담체에 미생물을 부착시켜 오염물질을 처리하는 방식으로 처리 효율이 뛰어나고, 경제적인 측면에서도 유리하다(Kim *et al.*, 2005; Dorado *et al.*, 2008). 특히, 하폐수 처리장과 제지공장 등 다양한 산업현장에서 배출되는 휘발성 유기화합물(VOCs)은 저농도로 발생되어 물리화학적 방법 보다 생물학적 방법이 더욱 적합하다(Swanson and Loehr, 1997). 그러나 바이오필터를 적용할 경우 오염물질이 처리되는 과정

* Corresponding author Tel:+ 82-31-201-2497, Fax:+ 82-31-203-4589, E-mail : sjhwang@khu.ac.kr

에서 담체에 부착된 미생물의 과다성장으로 반응조 내 공극을 막아(clogging) 오염물질의 흐름을 방해하거나, 담체에 부착된 미생물이 탈리되어 운전효율이 급격히 감소되는 단점이 있다. 이외에도 미생물의 개체 수 및 활성 유지의 어려움, 미생물의 분해작용으로 인한 담체의 수명단축 등으로 인해 악취 제거 효율이 안정적이지 못하며, 운전조건에 따라 악취제거 효율에 영향을 크게 받는다(Jang *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2000).

최근 이러한 문제점을 보완하고 악취제거 효율을 극대화시키기 위해 고정화 담체에 대한 연구가 진행되고 있다(Jung, 2009; Song, 2006). 담체에 미생물을 고정시키는 방법은 담체표면에 미생물을 자연 부착시키는 생물막법과 인공적으로 미생물을 담체 내에 고정시키는 포괄고정화법으로 분류된다. 미생물 포괄고정 담체는 미생물을 담체 내부에 고정시킴으로써 충분한 SRT를 유지할 수 있을 뿐만 아니라, 유입부하나 온도, pH 변화 등에 대해 미생물의 활성을 유지시킬 수 있다는 장점이 있다(Han *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2004). 그러므로 미생물의 대량 확보와 안정적 운전이 가능한 포괄고정화법이 효과적인 담체제조법으로 제안되고 있다(Sumino, 1992; Leenen, 1996). 현재까지 연구된 포괄고정화 담체는 물리적 강도가 떨어지고, 내구성이 약하다는 단점과 고정화시 사용되는 시약이 미생물에 독성으로 작용되는 약점이 있다. 또한 담체의 대량제조시 고가의 생산비용으로 경제성이 떨어진다. 따라서 담체의 강도와 내구성이 강하고 미생물에 독성영향을 주지 않는 경제적인 포괄고정화 담체의 개발이 요구되어지고 있다.

본 연구에서는 담체제조를 위해 친수성으로 미생물에 영향을 미치지 않을 것으로 예상되는 천연 고분자물질과 인공 고분자물질을 결합한 복합 고분자물질을 이용하였다. 이때 촉매제로써 TMEDA (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)의 적정농도와 담체 제조시 설정 온도에 따른 경화속도를 평가

하였으며, 각각의 조건에 따른 미생물 활성도를 Live/Dead cell method에 의거하여 평가하였다. 이로부터 경제적이고 현실적용이 가능한 담체제조법을 제안하고자 하였다.

II. 재료 및 실험방법

2.1. 균주배양

휘발성 유기화합물에 분해능이 높은 효모(yeast)인 *Candida tropicalis*를 대상균주로 하였으며, 한국 생물자원센터(Korea Biological Resource Center, BRC)에서 분양받아 YM medium(Yeast extract 3.0 g, Malt extract 3.0 g, Peptone 5.0 g, Dextrose 10.0 g, Agar 20.0 g, Distilled water 1.0 L)에서 1차 배양하였다. 배양된 *C. tropicalis* 균주를 유일 탄소원으로 톨루엔을 첨가한 액체배지에 접종하고, 30°C에서 180 rpm으로 교반하며 배양하였다. 배양된 *C. tropicalis*의 모습을 Fig. 1에 나타내었고, 액체배지의 조성을 Table 1에 나타내었다.

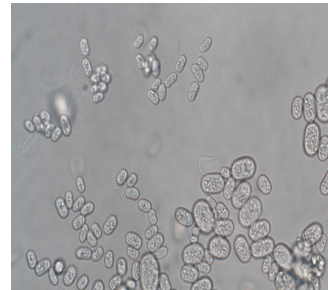


Fig. 1. Yeast cells observed by microscopy ($\times 600$)

Table 1. Composition of nutrient solution for yeast (Katsutoshi *et al.*, 2001)

Components	Concentration (mg/L)
Na ₂ HPO ₄	4,900
KH ₂ PO ₄	2,000
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,000
MgCl ₂ · 6H ₂ O	340
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.7
FeSO ₄ · 7H ₂ O	2.4
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.3
CoCl ₂ · 6H ₂ O	2.4
MnSO ₄ · 7H ₂ O	2.4
CuCl ₂ · 2H ₂ O	0.2
Na ₂ MoO ₄	0.25
Yeast extract	1.0

2.2. 포괄고정화 담체제조

포괄고정화 담체의 제조방법을 Fig. 2에 나타내었다. 이때 인공고분자물질로 PEGDA (poly ethylene glycol diacrylate)와 천연고분자물질로 조류에서 추출된 sodium alginate를 사용하였고, 개시제로 potassium persulfate, 촉매제로 TMEDA (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)를 사용하였다. 담체는 polyurethane 재질의 스펀지(12×12×12, Biocube, K사)를 사용하여 미생물을 포괄고정 하였다.

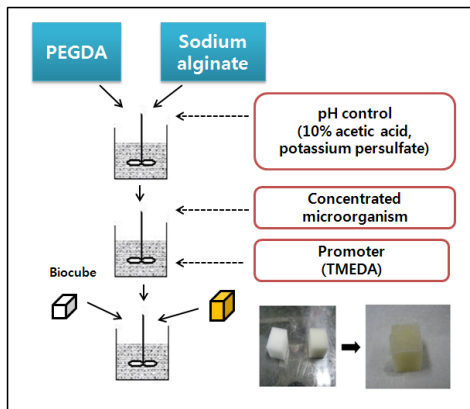


Fig. 2. Schematic of developing the bio-encapsulated media

2.2.1 포괄고정화 담체의 성상 파악

스펀지 담체에 미생물을 고정할 때 스펀지 담체에 가해진 압축횟수가 담체의 밀도변화에 미치는 영향을 평가를 진행하였다. 미생물이 포함된 담지액에 스펀지 담체를 투입한 후, 일정한 압력을 가하였다. 이후 25℃에서 10분간 경화시킨 후 스펀지 담체의 무게를 측정하여 담체의 밀도를 측정하였다.

2.2.2 TMEDA와 온도에 따른 포괄고정화 담체 제조

TMEDA 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1%(v/v), 온도 25, 35℃ 조건에서 포괄고정화 담체를 각각 제조하여 TMEDA 농도와 온도 조건이 고정화 담체의 경화속도에 미치는 영향을 평가하였다.

이때 고정화 담체 제조방법은 다음과 같다. 100 mL 비이커에 PEG diacrylate(mw 400) 10 mL,

sodium alginate 1 g을 혼합한 후, potassium persulfate 1 g, 증류수 40 mL를 넣어 혼합하였다. 10% acetic acid를 이용하여 pH 7로 조절한 후, TMEDA를 농도별로 주입하였다. 이후 1.5 OD(optical density)의 *C. tropicalis* 50 mL를 넣고 혼합한 후, 부피가 1.8 cm³인 스펀지 담체에 흡수시켜 주어진 온도에서 경화하였다.

2.3. 미생물 활성여부 실험

각 조건에서 제조된 담체에 포괄고정된 *C. tropicalis*의 활성도를 알아보기 위하여 batch test를 실시하였다. 제조된 담체 약 10 cm³를 250 mL 삼각플라스크에 투입하고 100 mL의 배지를 주입하였다. 이후 35℃, 125 rpm으로 조정된 항은 shaking incubator에서 18 시간 동안 배양하였다. 활성도는 glucose 소비율과 OD값으로 평가하였다. OD는 UV photometer를 이용하여 600 nm에서 측정하였고, glucose는 DNS법으로 측정하였다. 이때 사용된 배지조성은 각각 glucose 2.5 g/L, yeast extract 1.25 g/L, pepton-G 1.25 g/L이었다.

2.4. Live/Dead cell 분석

TMEDA의 농도가 담체에 고정된 *C. tropicalis*의 활성에 미치는 영향을 파악하기 위하여 Live/Dead cell 분석을 실시하였다. 분석은 LIVE/DEAD Yeast Viability Kit(Invitrogen Co.)를 사용하여 다음과 같이 진행하였다. 먼저 0.2 μm로 거른 증류수와 2% glucose를 1 : 1로 제조한 용액과 10 mM Na-HEPES(pH 7.2)를 1 : 1로 혼합하여 1 mL를 취하였다. 여기에 미생물을 50 μL 주입한 후 20 μM의 FUN 1과 25 μM 농도의 Calcofluor White M2R 염색시약을 주입하였다. 염색된 시료는 30℃에서 빛을 차단하고, 30분 동안 반응시킨 후 공초점 현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)으로 세포 사멸여부를 판단하였다. 이때 사멸세포는 녹색으로 형광되고, 활성이 있는 세포는 붉은색으로 형광된다.

III. 결과 및 고찰

3.1. 포괄고정화 담체의 밀도 측정

스폰지 담체의 압축횟수에 따른 담체의 무게와 밀도변화를 Fig. 3에 나타내었다. 초기 스폰지 담체의 무게는 약 0.2 g, 밀도는 0.1 g/mL이었다. 1회 압축시 담체 무게는 약 2 g, 밀도는 1.2 g/mL로 나타났고, 3회 압축시 담체 무게는 약 3 g, 밀도는 1.8 g/mL까지 증가하였다. 3회 압축이후, 고정화 담체 무게는 약 3 g, 밀도는 약 1.7 g/mL 정도로 유지되었다.

포괄고정화 담체는 폴리에틸렌글리콜(poly ethylene glycol) 성분이 중합되어 형성된 분자사이에 가교결합이 형성되어 있는 3차원 망목구조로 이루어져 있으며, 비중은 1.2~3이 적합하다(Lee, 2004). 밀도가 1.05 미만이면 바이오필터 운전시 공기의 유속에 의해 바이오필터에 충전된 담체의 부피 팽창률이 증가하게 된다. 이로 인해 담체 충전률이 제한될 수 있다. 반대로 밀도가 3.0을 초과하게 되면 공기의 유입이 어려워지고 바이오필터에 살수되는 물의 양이 증가하여 비경제적인 운영을 초래한다(Lee, 2008).

그러므로 본 연구에서 제조된 미생물 포괄고정화 담체는 평균 밀도가 1.7 g/mL로 살수량이나 송풍량의 제한없이 장기간 바이오필터 운전이 가능할 것으로 판단된다.

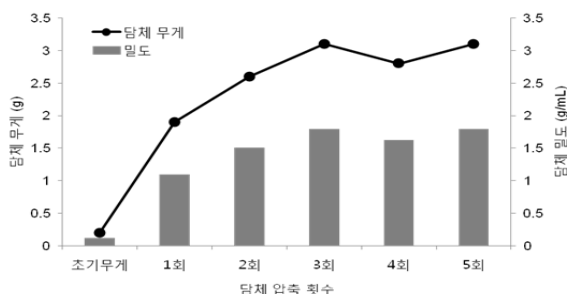


Fig. 3. Density and mass change of the media depending on the compressing frequency

3.2. 포괄고정화 담체제조

고정화 담체제조시 사용되는 TMEDA는 경화속도를 촉진시켜 주는 반면, 미생물의 활성화에 독성으로

작용할 수 있다(Jung, 2009). 또한 담체 내부에 형성된 겔은 가역적으로 팽윤과 수축을 하는 열 민감성 고분자로 온도가 중합속도에 영향을 미친다(Han, 2002). 이에 TMEDA 농도와 온도에 따른 담체의 경화속도 및 미생물 활성도를 평가하여 고정화 담체 제조법을 최적화하고자 하였다. 본 연구에서는 미생물의 활성범위인 온도조건을 고려하여 25℃와 35℃에서 각각 실험하였다. 이는 온도가 15℃이하로 낮아질 경우, 미생물의 활성화에 저해를 주어 최적 포괄고정화 담체의 제조 조건과 관계없이 미생물 성장에 영향을 미칠 수 있기 때문이다(Gao, 1988).

TMEDA 농도와 온도 변화에 따른 포괄고정화 담체 경화시간을 Fig. 4에 나타내었다. 경화시간은 담체내부에 겔이 형성되어 액체에 담겼을 때 담지액이 새어 나오지 않는 시간을 기준으로 평가하였다. TMEDA 0.02%, 25℃에서 제조된 포괄고정화 담체는 경화시간이 11분으로 중합속도가 가장 길었으며, TMEDA 0.1%, 35℃에서 제조된 포괄고정화 담체의 경화시간은 1분 30초로 중합속도가 가장 짧게 나타났다. 포괄고정화 담체의 경화시간은 2~12분으로 나타났으며, TMEDA 농도와 온도가 높을수록 경화시간이 단축되었다. 자유라디칼에 의한 중합반응은 단량체의 라디칼의 공격으로 분자사슬 끝에 각 단량체 분자가 부가되는 연속반응으로써 개시반응, 전파반응, 연쇄이동반응, 종결반응을 통해 진행된다. 이때 중합속도는 촉매의 농도와 중합반응의 속도상수, 온도와 비례관계에 있다(주, 2001; 정, 1988). 따라서 촉매제인 TMEDA 농도와 온도가 높을수록 중합속도가 짧아진 것으로 판단된다.

담체의 경화시간은 담체내부의 미생물에 산소공급 및 물질전달에 영향을 미친다. 경화시간이 빠를수록 호기성 미생물의 생존에 필요한 적절한 산소공급 및 물질전달이 어려워 미생물의 안정적인 성장이 어려울 수 있다(Jung, 2009). 본 연구에서는 TMEDA 농도가 높을수록 경화시간이 단축되는 것으로 나타나, 미생물의 활성화저해와 경제성을 고려하여 고농도의 TMEDA 주입은 적당하지 않은 것으로

판단된다. 또한 35℃에서 담체를 제조할 경우 경화 시간이 단축될 뿐만 아니라 대량 생산시 가온장치 및 수분공급이 추가적으로 필요하기 때문에 비경제적이다. 그러므로 포괄고정화담체에 저농도의 TMEDA를 주입하여 상온(25℃)에서 제조하는 것이 타당할 것으로 판단된다.

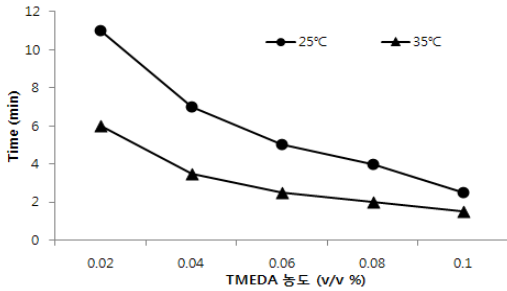


Fig. 4. Gelation time of the bio-encapsulated media at different concentration of TMEDA and temperature.

3.3. 미생물 활성여부 실험

TMEDA 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1 %, 온도 25℃, 35℃ 조건에서 *C. tropicalis*를 고정화시킨 담체를 이용하여 batch test를 수행하였다(Fig. 5). 초기 glucose를 2.5 g/L로 주입하여 18 시간 동안 배양 하였을 때, 25℃에서 제조된 고정화 담체를 적용한 경우 99%의 glucose가 소비되었고, 35℃에서 제조된 고정화 담체를 적용한 경우 약 90%의 glucose가 소비되었다. 25℃에서 제조된 고정화 담체는 약 2 OD를 나타낸 반면, 35℃에서 제조된 담체는 약 1.6 OD를 나타내었다. 25℃에서 제조된 담체가 35℃에서 제조된 담체에 비해 glucose는 약 10% 이상, OD는 약 0.5 OD 정도 높게 나타났다. 이것은 담체 내부에 겔이 형성될 때 온도와 TMEDA의 상호작용으로 담체의 강도가 높아져 담체 내부에 적절한 산소공급 및 물질전달이 잘 이루어지지 않았기 때문인 것으로 판단된다. 그러므로 25℃에서 제조된 담체가 *C. tropicalis*의 성장에 더 적합할 것으로 판단된다. 반면 TMEDA 농도에 따른 glucose 소비율과 OD값은 큰 차이를 나타나지 않았다. 그러므

로 본 연구에서 적용한 TMEDA 농도 0.02~0.1 %는 반응속도에는 영향을 끼치나 *C. tropicalis*의 활성에는 영향을 끼치지 않는 것으로 판단된다.

포괄고정화 담체에 고정된 미생물 활성과 담체로의 물질전달은 유·무기성 약취제거에 큰 영향을 미친다. 본 연구에서 최적화한 고정화 담체의 성능을 파악하기 위해 파일럿 스케일의 이단 바이오필터를 운전한 결과, 휘발성 유기화합물질과 황화수소에 대해 99% 이상의 높은 제거효율을 나타내었다(김, 2011). 그러므로 본 연구에서 최적화한 포괄고정화 담체를 적용하여 하폐수처리장, 축산폐수 등에서 발생하는 휘발성 유기화합물질과 황화수소 등의 복합 약취를 높은 제거 효율로 제거할 수 있을 것이라 판단된다.

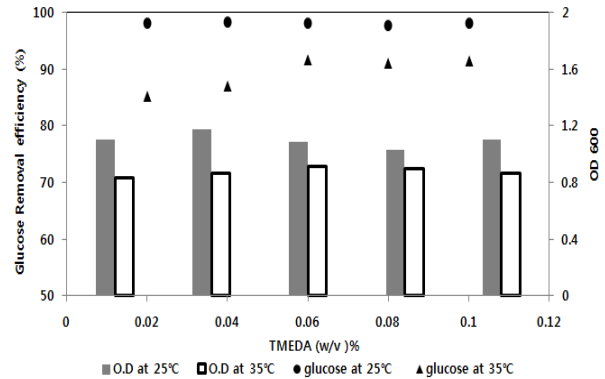
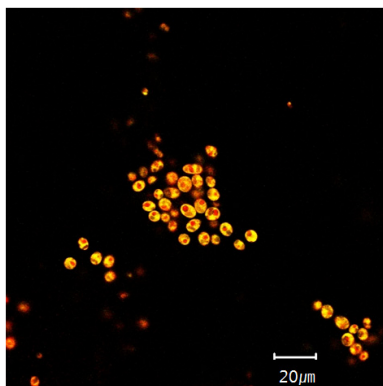


Fig. 5. Concentration of residual glucose and optical density after 18 h operation.

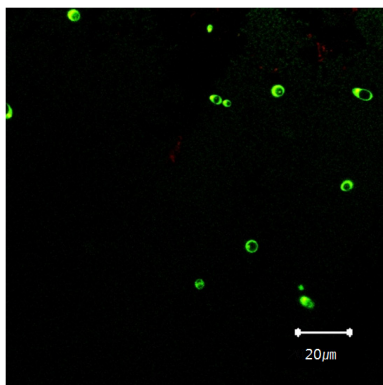
3.4. Live/Dead cell 분석결과

각 조건에서 제조된 담체 내부에 존재하는 미생물의 활성을 Live/Dead cell kit법을 적용하여 분석하였다. Fig. 6의 (a)는 TMEDA 농도 0.1%, 온도 25℃에서 제조된 담체의 내부를 공초점 현미경으로 관찰한 결과이다. *C. tropicalis* 내부의 핵이 red-orange색으로 형광되어 100% 활성이 있는 것으로 나타났다. *C. tropicalis*가 사멸하여 dead cell로 형광된 예시를 Fig. 6의 (b)에 나타내었으며, 본 연구에서는 관찰되지 않았다. 따라서 위의 조건에서

제조된 담체는 내부에 고정된 미생물의 생존 및 활성도가 높으며, 담체제조 과정에 문제가 없음을 알 수 있다.



(a)



(b)

Fig. 6. (a) Live/Dead cell image of bio-encapsuled media with TMEDA 100 μ l/100ml at 25 $^{\circ}$ C and (b) example of the dead cell image at the same condition

IV. 결론

본 연구에서는 TMEDA 농도 0.02~0.1 %와 온도 25 $^{\circ}$ C, 35 $^{\circ}$ C에서 *C. tropicalis*를 스폰지 담체에 포괄 고정화시켜 경화시간에 따른 활성도를 평가하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

1. 온도는 35 $^{\circ}$ C에서 제조된 담체가 경화시간은 빠르나 *C. tropicalis*의 활성은 25 $^{\circ}$ C에서 제조된 담체가 좋은 것으로 나타났다. 또한, 현장에서 가온에 의한 운전비용 증대와 수분증발에 따른 미생물 활성유지를 고려하여 담체제조를 위한 적정 온도는

25 $^{\circ}$ C로 도출되었다.

2. 담체제조시 촉매제로 적용된 TMEDA는 *C. tropicalis*에 독성을 미치지 않았으나, 농도가 높아 질수록 경화시간이 단축되어 대량제조시 경우 적용성이 떨어진다. 그러므로 담체 제조시 미생물에 독성이 없으며 경화시간에 따른 제조의 용이성과 비용을 고려할 때, 적정 TMEDA의 주입농도는 0.02 %로 판단된다.

사 사

본 연구는 환경부의 “차세대핵심환경기술개발사업 (Eco-technopia 21 project)”의 지원을 받아 수행한 과제입니다.

참고문헌

- 권혁구, 정준오, 추덕성, 이장훈 (2009) 유기성 폐기물의 발생 약취 제거를 위한 *Delftia* sp.의 성장조건 최적화, 한국환경보건학회지, 35(5), pp.393-401
- 김선진, 김태형, 이윤희, 장현섭, 송지현, 황선진 (2011) 미생물 포괄고정화 담체를 적용한 파일럿 스케일 바이오필터에서의 복합약취 제거, 상하수도학회지, 25(5), pp.741-750
- 송지현, 함은이 (2006) 미생물 고정화 복합고분자 담체를 이용한 가스상 암모니아 제거, 한국폐기물자원순환학회지, 23(4), pp.337-343
- 정미영, 황선진 (2009) 암모니아 가스 제거를 위한 포괄고정화 담체 개발, 물환경학회지, 25(2), pp.306-310
- 정영태, 김영태, 정한모, 이동호 (1988) 개량 Ziegler-Natta 촉매를 사용한 프로필렌의 Slurry 중합; I. 온도의 영향, Polymer Society of Korea, 12(3), pp.229-233
- 주영배, 이내우, 최재욱, 강돈오, 설수덕 (2001) 메틸메타크릴레이트의 환경친화적인 광중합 및 열분해특성, 한국산업안전학회지, 16(3), pp.68-75
- 한덕규, 배우근, 조영진, 원호식, 이용후 (2005) 고정화담체를 이용한 염색폐수의 난분해성 유기물질 처리, 대한환경공학학회지, 27(9), pp.917-922.
- 한영아, 손성욱, 지병척 (2002) 서로 다른 가교제를 이용하여 제조한 온도 및 pH 민감성 하이드로겔의 특성, 한국섬유공학학회지, 39(5), pp.544-552
- Dorado, A.D., Baquerizo, G., Maestre, J.P., Gamisans, X.,

- Gabriel D., Lafuente, J. (2008) Modeling of a bacterial and fungal biofilter applied to toluene abatement Kinetic parameters estimation and model validation, *Chemical Engineering Journal*, 140, pp.52-61
- Gao, G., Fleet, G.H. (1988) The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*, *J. of Applied Microbiology*, 65(5), pp.405-409
- Jang, J.H., Hirai, M., Shoda, M. (2004) Styrene degradation by *Pseudomonas* sp. SR-5 in biofilters with organic and inorganic packing materials, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, pp. 349-355
- Kim, D.K., Cai, Z.i, Sorial, G.A. (2005) Impact of interchanging VOCs on the performance of trickle bed air biofilter, *Chemical Engineering Journal*, 113 pp. 153-160
- Lee, E.H., Ryu, H.W., Cho, K.S. (2009) Removal of benzene and toluene in polyurethane biofilter immobilized with *Rhodococcus* sp. EH831 under transient loading, *Bioresource Technology*, 100, pp. 5656-5663.
- Leenen, E.J.T.M., Santos, V.A.P.D. (1996) Characteristics of and selection criteria for support materials for cell immobilization in wastewater treatment, *Water Research*, 30(12), pp.2985-2996.
- Lee, W.K., Chung, J.W., Bae, W.K., Park, S.J., Kim, Y.K., Lee, Y.W., Park, D.W. (2004), Operational factor for nitrite accumulation from a mixed culture by cell immobilization, *J. Ind. Eng. Chem.*, 10(6), pp.959-966
- Lee, Y.W., Lee, J.K. Min, Y.K., Hamaguchi, H.O., Chung, J.W. (2008) Development of an automatic phase-contrast microscopic system capable of determining the microbial density and distribution inside an immobilized carrier, *Analytical sciences*, 24, pp.547-550
- Oh, Y.S., Choi, S.C. (2000) Selection of suitable packing material for biofiltration of toluene, m- and p-xylene vapors, *J. Microbiol.*, 38, pp. 31-35
- Sumino, T., Nakamura, H. (1992) Immobilization of nitrifying bacteria in porous pellets of urethane gel for removal of ammonium nitrogen from wastewater, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, pp.556-560.