

생물학적 환경정화를 위한 고농도 페놀에서 생육할 수 있는 세균의 분리 및 특성

박 연 규* · 손 홍 주¹

밀양대학교 환경공학과, ¹생물공학과

Isolation and Characterization of Bacteria Able to Grow with Phenol at High Concentrations for Bioremediation

Yeon-Kyu Park* and Hong-Joo Son¹

Department of Environmental Engineering, ¹Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-702, Korea

Abstract - For the biological treatment of industrial wastewater containing high concentration of phenol, isolation and characterization of phenol-degrading bacterium were carried out. A bacterial strain P2 capable of degrading phenol was isolated from contaminated soils by enrichment culture technique and identified as the genus *Rhodococcus* by morphological, cultural, biochemical characteristics, and Biolog system. The optimal medium composition and cultural conditions for the growth and degradation of phenol by *Rhodococcus* sp. P2 were 0.1% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.2% of KH_2PO_4 , 0.25% of $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.2% of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 0.008% of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ along with initial pH 8.5 at 30°C. *Rhodococcus* sp. P2 could grow with phenol as the sole carbon source up to 1,800 ppm in batch cultures, but did not grow in medium containing above 2,000 ppm of phenol. When 800 ppm phenol was given in the optimal media, *Rhodococcus* sp. P2 completely degraded it within 24 h. Meanwhile, 1,800 ppm of phenol was degraded within 9 days. *Rhodococcus* sp. P2 could utilize toluene, *n*-hexane, xylene and benzene as sole carbon source.

Key words : phenol, biodegradation, wastewater, biological treatment

서 론

최근 급속한 화학공업의 발달로 인하여 각종 공정에서 방향족 화합물의 사용량이 증가하고 있으며, 각종 산업체에서 배출되는 폐수에도 방향족 화합물을 포함한 각종 난분해성 물질이 대량 함유되어 있어 수질오염에 커다란

영향을 미치고 있다(Chaudhrt and Chapalamadugu 1991). 방향족 화합물은 벤젠고리를 가지고 있기 때문에 자연계에서 분해가 잘 되지 않을 뿐만 아니라 생물체에 독성을 나타내기 때문에 주요 환경오염물질로 대두되고 있다(Keith and Telliard 1979; Hagblom 1992). 그중 페놀은 benzene, toluene, xylene과 함께 원유정제, 석유화학, 제약, 섬유 및 전자산업 등의 다양한 산업체에서 이용 및 배출되고 있는 물질로서, 미국 환경보호청에서는 주요 오염물질로 분류하여 그 배출량에 대해서 철저히

*Corresponding author: Yeon-Kyu Park, Tel. 055-350-5431, Fax. 055-350-5431, E-mail. ykpark@arang.miryang.ac.kr

감시하고 있다(Masque *et al.* 1987; Hinteregger *et al.* 1992). 또한 폐놀은 인체에 구토, 두통, 호흡곤란 등을 일으키며 발암과 돌연변이 유발 등의 치명적인 문제도 일으키고 있어 세계 각국은 음용수 기준에 포함시켜 그 농도를 규제하고 있다(Yang and Humphrey 1975).

현재까지 폐놀의 제거에는 화학적 산화, 용매추출, 활성탄 흡착과 같은 물리화학적 방법을 이용(Throop 1997)하고 있으나 최근에는 미생물이 갖는 빠른 대사능, 높은 환경 적응력 등을 이용한 생물학적 처리법 개발에 많은 연구가 진행되고 있다(Masque *et al.* 1987). 그러나 폐놀은 독성이 강하여 200 ppm 이하의 비교적 낮은 농도에서도 미생물의 생육을 저해(Li and Humphrey 1989)하므로 생물학적 폐수처리에는 처리농도 한계에 따르는 문제점을 극복해야 한다. 이에 따라 고농도 폐놀에서도 생육할 수 있는 미생물의 분리에 대한 연구가 많이 진행되어 왔으나 대부분의 폐놀 분해균주들은 1,000 ppm 이하의 폐놀을 분해하는 것으로 알려져 있다(Anta and Crawford 1983).

따라서 본 연구에서는 1,000 ppm 이상의 고농도 폐놀에서 생육하면서 단시간내에 폐놀을 분해할 수 있는 세균을 다양한 시료로부터 분리 및 동정한 후, 분리균주의 생육 및 폐놀분해 특성을 검토하여 고농도의 폐놀이 함유된 폐수의 생물학적 처리를 위한 기초자료를 확보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 폐놀분해세균의 분리 및 동정

폐놀을 분해하는 균주를 분리하기 위하여 경남 밀양지역에서 채집한 각종 폐수 및 오염 토양을 시료로 사용하였다. 폐수시료 각 1 ml, 토양시료 각 1 g을 폐놀 1,000 ppm이 함유된 무기염 액체배지에 접종하여 30°C, 200 rpm으로 회전진탕배양하였다. 탁도가 나타난 배양액을 적당하게 희석한 후, 폐놀 무기염 평판배지에 접종하여 폐놀분해세균을 순수분리하였다. 순수분리된 콜로니들을 다시 폐놀 무기염 액체배지에 접종하여 배양한 후, 폐놀 분해력이 우수한 균주를 선별하였다. 이때 사용한 무기염 배지의 조성은 0.15% NH₄NO₃, 0.14% KH₂PO₄, 0.18% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.025% MgSO₄ · 7H₂O, 0.0015% CaCl₂ · 2H₂O 및 0.00003% FeCl₃ · 6H₂O (pH 7.0)이었다. 폐놀은 5,000 ppm의 stock solution을 조제하여 멸균한 배지에 첨가하였다. 폐놀 분해력이 가장 우수한 P2 균주를 선정하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제 특성에 따라 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Krieg

and Holt 1984)에 준하여 동정한 결과 *Rhodococcus* 속과 가장 유사하였으며, 또한 95 종류의 탄소원 이용능 자동 분석장치인 MicroLog System 3.5 (Biolog, USA)를 이용하여 동정한 결과, 탄소원 이용능 특성이 *Rhodococcus globerulus*와 가장 유사한 것으로 나타났다(similarity = 0.961). 따라서 분리균주 P2를 *Rhodococcus* sp. P2로 명명하였다.

2. 폐놀분해 특성 검토

폐놀 500 ppm이 함유된 nutrient broth 50 ml를 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 분리균주 1 백균이를 접종한 후, 30°C에서 24시간 동안 200 rpm으로 전배양하였다. 이 전배양액 2% (v/v)를 본배양액에 접종하였으며, 다음과 같이 폐놀 분해조건을 검토하였다. 폐놀 1,000 ppm이 첨가된 무기염배지에서 배양온도, 초기 pH, 각종 질소원 및 농도 및 기타 무기염의 종류 및 농도에 따른 균체 생육도와 폐놀의 분해능을 측정하였으며, 이 결과를 바탕으로 최적화된 배지에서 폐놀농도에 따른 균체 생육도와 폐놀 분해능을 검토하였다.

3. 기질특이성 검토

탄소원으로 사용했던 폐놀대신 *n*-hexane, benzene, toluene, xylene 및 *p*-nitrophenol을 각각 600 ppm씩 첨가하여 배양한 후, 분리균주의 생육도를 조사함으로써 분리균주의 유기물 분해자로서의 특성을 살펴보았다. 이때 액체배양의 경우, *n*-hexane, benzene, toluene 및 xylene을 첨가한 플라스크는 teflon-faced butyl rubber stopper를 이용함으로써 각 물질의 휘발을 방지하였다. 그리고 평판배양의 경우, *n*-hexane, benzenze, toluene 및 xylene을 페트리 접시 뚜껑에 부착시킨 Durham tube를 이용하여 휘발상태로 공급하였다(Jeong *et al.* 1989).

4. 분석방법

분리균주의 생육도는 spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었으며, 폐놀 농도는 colorimetric assay를 변형하여 측정하였다(Folsom and Chapman 1991). 즉, 배양액을 원심분리하여 균체를 제거한 후, 상등액 1 ml를 2N NH₄OH 50 µl와 2% 4-aminoantipyren 25 µl에 첨가하여 혼합하였다. 그 후, 8% K₃Fe(CN)₆ 25 µl를 첨가하여 혼합 후, 원심분리하여 상등액의 흡광도를 500 nm에서 측정하였다. 폐놀의 정량은 폐놀표준용액을 사용하여 동일한 방법으로 실험하여 작성한 표준곡선과 비교하여 산출하였다. 이때 분리균주를 접종하지 않은 대조구를 실험구와 동일한 방법

으로 배양한 후, 페놀의 농도를 정량함으로써 휘발에 의해 제거된 페놀을 보정하였다.

결과 및 고찰

1. 페놀분해 최적배지조성

페놀 1,000 ppm이 첨가된 무기염배지에 각 질소원을 0.15%씩 첨가하여 분리균주의 생육과 분해능을 측정된 결과는 Table 1에서 보는 바와 같다. 질소원의 첨가는 페놀분해에 필수적임을 알 수 있었으며, 배양 48시간이 경과했을 때, NaNO_2 와 NaNO_3 를 제외한 모든 질소원에서 페놀이 완전히 분해되었다. 그 중 페놀 초기분해속도 (34 h)가 빠른 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 를 최적 질소원으로 선정하여 최적 농도를 조사한 결과 0.1%에서 가장 빠른 페놀분해속도를 나타내었으며, 0.4% 이상의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 는 균체생육을 저해하였다(Table 2).

페놀 1,000 ppm 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%가 첨가된 무기염

배지에 KH_2PO_4 를 각 농도별로 단계적으로 첨가하여 분리균주의 생육과 분해능을 측정된 결과, KH_2PO_4 의 첨가는 페놀분해에 필수적임을 알 수 있었으며, 배양 48시간이 경과했을 때, 0.1% 이상의 농도에서 페놀이 완전히 분해되었다. 그 중 페놀 분해속도가 가장 빠른 0.2%를 최적농도로 선정하였다(Table 3). KH_2PO_4 의 농도를 0.2%로 고정시킨 후, KH_2PO_4 의 짝염기인 K_2HPO_4 와 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 를 각 농도별로 단계적으로 첨가하여 배양한 결과, 0.25% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 에서 가장 빠른 페놀분해속도를 나타내었다(미제시).

페놀 1,000 ppm 및 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%가 첨가된 무기염 배지에 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 각 농도별로 단계적으로 첨가하여 분리균주의 생육과 분해능을 측정된 결과, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 첨가는 페놀분해에 필수적임을 알 수 있었으며, 배양 34시간이 경과했을 때, 0.04% 이상의 농도에서 페놀이 거의 100% 분해되었다. 그 중 페놀 분해속도가 가장 빠른 0.2%를 최적농도로 선정하였다(Table 4).

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 는 0.008% 첨가시, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 무첨

Table 1. The effect of nitrogen source on growth and phenol degradation of *Rhodococcus* sp. P2

Nitrogen source (0.15%)	34 hour		48 hour	
	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)
None	0.053	1000	0.071	1000
Ammonium acetate	0.998	555	1.585	0
NH_4Cl	0.524	705	1.229	0
NH_4NO_3	0.766	766	1.179	0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.651	475	1.182	0
KNO_3	0.294	879	1.175	0
NaNO_3	0.195	1000	0.762	672
NaNO_2	0.06	1000	0.074	1000
Urea	0.853	568	1.338	0
Yeast extract	1.12	543	1.771	0
Polypeptone	1.36	597	1.708	0
Beef extract	0.751	684	1.153	0

Table 2. The effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on growth and phenol degradation of *Rhodococcus* sp. P2

Concentration (%)	34 hour		48 hour	
	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)
0.05	0.108	906	1.185	0
0.1	0.918	461	1.165	0
0.15	0.631	498	1.131	0
0.2	0.154	841	1.211	0
0.3	0.169	871	1.212	322
0.4	0.058	959	0.455	630
0.5	0.057	1000	0.063	1000

Table 3. The effect of KH_2PO_4 concentration on growth and phenol degradation of *Rhodococcus* sp. P2

Concentration (%)	34 hour		48 hour	
	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)
None	0.105	995	0.195	934
0.05	0.768	449	1.011	26
0.1	0.542	599	1.214	0
0.15	0.698	474	1.375	0
0.2	0.995	265	1.405	0
0.25	0.626	542	1.425	0
0.3	0.591	538	1.405	0
0.4	0.581	527	1.411	0
0.5	0.441	498	1.295	0

Table 4. The effect of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ concentration on growth and phenol degradation of *Rhodococcus* sp. P2

Concentration (%)	34 hour		48 hour	
	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)	Growth (A_{660})	Residual phenol (ppm)
None	0.083	1000	0.091	1000
0.01	0.097	820	0.378	659
0.02	0.269	788	0.519	545
0.025	0.314	759	0.534	550
0.03	0.351	760	0.538	557
0.04	0.587	489	1.282	2
0.1	0.687	440	1.161	0
0.2	0.901	205	1.142	0
0.3	0.853	371	1.109	0
0.4	0.859	609	0.991	0

가시 균체생육 및 페놀 분해능이 가장 우수하였으나, 조사된 모든 농도(CaCl₂ · 2H₂O 및 FeCl₃ · 6H₂O 각 0~0.2%)에서 유의성있는 차이는 없었다(미제시). 또한 상기에서 확립된 배지에 NaCl를 0~3% 범위로 단계적으로 첨가하여 배양한 결과, 배양 48시간이 경과했을 때 조사된 모든 농도에서 페놀이 100% 분해되었다(미제시). 이 결과는 고농도의 염이 함유된 페놀폐수에 본 분리균주의 적용가능성을 시사한다.

2. 페놀분해 최적배양조건

상기에서 확립된 배지를 사용하여 배양온도를 25~37°C의 범위로 각각 조절하여 200 rpm, 48시간동안 회전진탕배양한 후, 페놀분해 최적온도를 조사한 결과 30°C가 선정되었다(미제시). 또한 배지의 초기 pH를 3.5~12로 각각 조절하여 30°C, 200 rpm, 48시간동안 회전진탕배양한 후, 최적 pH를 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 즉 pH 6 이하에서는 균체생육과 페놀분해가 거의 이루어지지 않았으나 pH 7~12의 범위에서는 균체생육이 양호하였으며, 페놀도 100% 분해되었다. 그 중 페놀 초기분해속도가 가장 빠른 pH 8.5를 최적 pH로 선정하였다. 알칼리성 폐수는 매우 높은 알칼리도, 미생물 생육을 저해할 수 있을 정도의 고농도 염을 함유하고 있는 특성을 가지고 있다(Baccella et al. 2000). 아직까지 호알칼리성 페놀 분해미생물의 분리 및 특성에 대한 연구는 거의 전무한 실정인데, 본 분리균주는 고농도 염이 함유된 폐수 뿐만 아니라 알칼리성 폐수에도 적용이 가능한 새로운 균주임을 알 수 있었다.

배양온도 30°C, 초기 pH 8.5의 최적배지에 페놀의 농도를 단계별로 조정하여 첨가한 후, 균체 생육도와 페놀 분해능을 측정된 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같다.

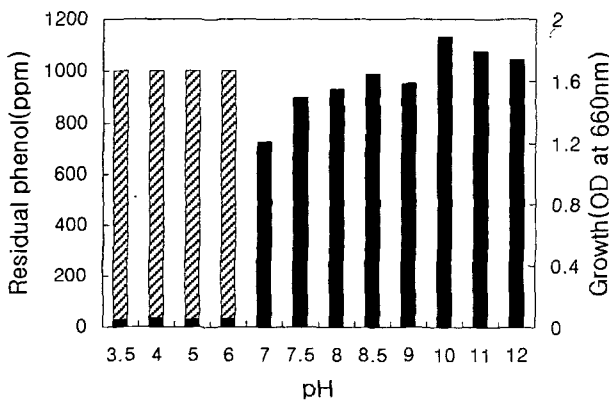


Fig. 1. The effect of initial pH on growth and phenol degradation of *Rhodococcus* sp. P2. ▨, residual phenol; ■, cell growth.

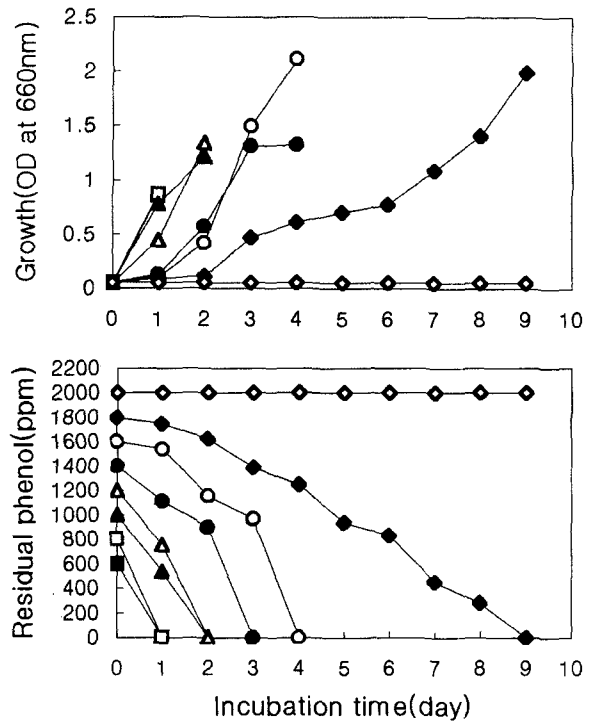


Fig. 2. Time course of phenol degradation by *Rhodococcus* sp. P2. ■, 600 ppm; □, 800 ppm; ▲, 1,000 ppm; △, 1,200 ppm; ●, 1,400 ppm; ○, 1,600 ppm; ◆, 1,800 ppm; ◇, 2,000 ppm.

600~800 ppm 범위의 페놀은 24시간내에 완전히 분해되었으며, 1,000~1,200 ppm, 1,400 ppm 및 1,600 ppm의 페놀은 각각 2, 3 및 4일만에 완전히 분해되었고, 1,800 ppm의 페놀도 2일의 유도기를 거쳐 9일만에 완전히 분해되었다. 그러나 2,000 ppm의 페놀이 첨가된 경우에는 배양 9일이 경과하여도 균체생육과 페놀분해가 전혀 이루어지지 않았다. 선행연구에서 조사된 *Rhodotorula rubra* (200 ppm) (Katayama et al. 1992), *Fusarium flocciferum* (1,000 ppm) (Anselmo and Novais 1992), *Bacillus stearothermophilus* (0.05%) (Buswell and Twomey 1975), *Acinetobacter* sp. (1,000 ppm) (Anselmo and Novais 1984), *Pseudomonas* sp. (1,000 ppm) (Masque et al. 1987)와 비교해 볼 때, 본 실험에 사용된 분리균주의 페놀 분해한계는 1,800 ppm으로 매우 높은 것으로 판단되었다. 그러나 폐수처리장의 슬러지로부터 분리된 *Pseudomonas* sp.의 생육한계농도 2,000 ppm (Park et al. 1991)에는 미치지 못하였다.

3. 기질특이성

분리균주의 *n*-hexane, benzene, toluene, xylene 및 *p*-

Table 5. Cell growth of *Rhodococcus* sp. P2 with various aromatic hydrocarbon compounds as a sole carbon and energy source

	Growth in liquid medium (OD at 660 nm*)	Growth on plate medium**
None	0.08	
<i>p</i> -Nitrophenol	0.07	
Toluene	0.219	+++
Benzene	0.111	+
Xylene	0.094	++
<i>n</i> -Hexane	0.194	+++

* The value represents the absorbance of culture broth at 3 days and 30°C. The concentration of tested compounds was 600 ppm.

** Supply in vapor phase. +++; good growth, ++; growth, +; poor growth.

nitrophenol에 대한 기질특이성을 액체배지 및 평판배지를 이용하여 검토한 결과는 Table 5에 나타내었다. *Rhodococcus* sp. P2는 *p*-nitrophenol을 제외한 대부분의 기질을 분해하여 생육할 수 있었는데, 특히 toluene, *n*-hexane에서 우수한 균체생육을 나타내었다. Benzene의 경우, 평판배양에서의 생육은 다른 기질보다 미약하였으나 액체배양에서의 생육은 다소 높았다. 따라서 본 공시균주는 기질특이성이 광범위한 균주로서 환경정화 사업에 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

폐놀은 석유화학공업 및 폐놀수지공장에서부터 배출되는 폐수에서 발견되는 광범위 환경오염물질이며, 종종 이들 산업으로부터 고농도 폐놀을 함유한 폐수가 유출된다. 고농도 폐놀을 함유한 폐수는 일반적인 활성오니법에 의하여 처리할 수 없다. 따라서 본 분리균주의 세부적인 분해 kinetics 및 고경화 물질을 확립한다면 고농도 폐놀을 함유한 알칼리성 폐수처리에 충분히 적용 가능할 것으로 판단된다.

적 요

고농도 폐놀이 함유된 산업폐수를 생물학적으로 처리하기 위한 기초실험으로 폐놀 분해균주의 분리 및 분리균주의 특성에 대하여 조사하였다. 각종 폐수 및 오염된 토양으로부터 농화배양에 의하여 폐놀 분해세균을 분리하여 동정한 결과 *Rhodococcus* 속으로 확인되었다. 균체생육과 폐놀분해를 위한 최적조건은 0.1% (NH₄)₂SO₄, 0.2% KH₂PO₄, 0.25% Na₂HPO₄ · 12H₂O, 0.2% MgSO₄ · 7H₂O, 0.008% CaCl₂ · 2H₂O, 초기 pH 8.5 및 배양온도 30°C이었다. 분리균주는 유일한 탄소원으로 1,800 ppm까지의 폐놀에서 생육할 수 있었으나 2,000 ppm 이상의 농도에서는 전혀 생육할 수 없었다. 800 ppm의 폐놀은 24 시간내에 완전히 분해되었으며, 1,800 ppm의 폐놀은

9일만에 완전히 분해되었다. 그리고 본 분리균주는 toluene, *n*-hexane, xylene 및 benzene을 유일한 탄소원으로 이용하여 생육할 수 있었다.

사 사

본 연구는 밀양대학교 교내학술연구비의 지원으로 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Anselmo, AM and JM Novais. 1984. Isolation and selection of phenol-degrading microorganisms from an industrial effluent. *Biotechnol. Lett.* 6:601-606.
- Anselmo, AM and JM Novais. 1992. Degradation of phenol by immobilized mycelium of *Fusarium flocciferum* in continuous culture. *Water Sci. Technol.* 25:161-168.
- Anta SP and DL Crawford. 1983. Degradation of phenol by *Streptomyces setonii*. *Can. J. Microbiol.* 29:142-143.
- Baccella S, G Cerichelli, M Chiarini, C Ercole, E Fantauzzi, A Lepidi, L Toro and F Veglio. 2000. Biological treatment of alkaline industrial wastewater. *Process Biochemistry* 35:595-602.
- Buswell JA and DG Twomey. 1975. Utilization of phenol and cresols by *Bacillus searothermophilus* strain PH 24. *J. Gen. Microbiol.* 87:377-379.
- Chaudhry GR and S Chapalamadugu. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. *Microbiol. Rev.* 55:59-79.
- Folsom, BR and PJ Chapman. 1991. Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of trichloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1602-1608.
- Hagblom, MM. 1992. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* 55:225-233.
- Hinteregger C, R Leitner, M Loidl, A Ferschl and F Streichsbier. 1992. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37:252-259.
- Jeong, YC, KN Kim, YJ Choi, HC Yang, JS Song and YS Seo. 1989. Biodegradation of aromatic compounds by strains of *Pseudomonas*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 17:100-108.
- Katayama HK, S Tobita and K Hirayama. 1992. Aromatic degradation in yeast *Rhodotorula rubra*. *Water Sci. Technol.* 26:773-781.
- Keith LH and WA Telliard. 1979. Priority pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 13:416-423.

- Krieg NR and JG Holt. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Li JK and AE Humphrey. 1989. Kinetic and fluorometric behavior of a phenol fermentation. *Biotechnol. Lett.* 11: 177-182.
- Masque C, M Nolla and A Brodons. 1987. Selection and adaptation of a phenol-degrading strain of *Pseudomonas*. *Biotechnol. Lett.* 9:655-600.
- Park CH, YK Kim and PS O. 1991. Microbial degradation of aromatic compounds in industrial wastewater. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19:631-636.
- Throop WM 1997. Alternative methods of phenol wastewater control. *J. Haz. Materials* 1:319-329.
- Yang, RD and AE Humphrey. 1975. Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 17:1211-1235.

(Received 24 February 2001, accepted 30 March 2001)