

Klebsiella gr. 47을 이용한 생물학적 폐수처리에서 BTX 분해 특성

염 승 호 · 최 석 순*

서울대학교 화학공학과 · 용인공업전문대학 제지공학과
(1998년 1월 22일 접수)

Degradation of BTX by *Klebsiella gr. 47* in the Biological Wastewater Treatment

Sung-Ho Yeom and Suk-Soon Choi*

Dept. of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul, 151-742, Korea
*Dept. of Paper Technology, Yongin Technical College, Yongin, 449-040, Korea
(Manuscript received 22 January 1998)

A microorganism, *Klebsiella gr. 47*, capable of degrading BTX(benzene, toluene and xylene) was isolated from oil-contaminated soil and its characteristics of BTX degradation were investigated. When benzene and toluene were fed to *Klebsiella gr. 47* simultaneously, they showed competitive inhibition. The degradation rate of xylene was enhanced as much as 3 times when xylene was fed with benzene or toluene. Degradation rate of benzene and toluene was also enhanced by cocultured with *Alcaligenes xylosoxidans*. When benzene-adapted microorganism was used, each BTX compound was degraded efficiently within 5 hours.

Key words : *Klebsiella*, BTX, degradation, competitive inhibition, adaptation

1. 서 론

BTX(benzene, toluene, xylene)는 정유공장, 석유회학공장, 정밀화학공장 등에서 대량으로 생산되거나 사용되고 있는데 부주의 또는 여러 가지 원인에 의하여 자연계로 배출된다(Chang *et al.*, 1993). 이들은 발암물질 또는 잠재적 발암물질로 알려져 있으며 미국 환경청(EPA)으로부터 중요 오염물(priority pollutant)로 분류되어 있다. BTX는 휘발성이 크지만 다른 탄화수소에 비해 용해도가 상대적으로 크기 때문에 자연계로 유출되었을 때에는 쉽게 토양과 지하수를 오염시킬 수 있어 생태계 파괴는 물론이고 인체에 치명적인 해를 미칠 수 있다(Oh *et al.*, 1994). 그러므로 BTX를 효과적으로 처리하기 위한 연구가 오랫동안 진행되어 왔으며 최근 2차 오염이 없고 경제적인 생물학적인 처리 연구가 활발히 진행되고 있다(Gibson *et al.*, 1968; Satsangee and Ghosh, 1990). 유기 염소화합물과 같은 난분해성 물질의 처리와 마찬가지로 BTX를 생물학적으로 처리하기 위해서는 다양한 환경 인자(environmental factors)의 영향이 충분히 규명되어야 한다. 대표적인 환경인자로는 BTX 농도, 미생물 농도, 저해 물질의 존재 유무, 온도, pH, 기질간의 상호영향(substrate interaction), 미생물간의 경쟁 및 조합(microbial competition and consortium), 미생물의 적응(microbial adaptation) 등이 있다(Arvin *et al.*, 1989; Chang *et al.*, 1993;

Oh *et al.*, 1994; Yeom *et al.*, 1997a). 기질간의 상호영향을 연구하는 이유는, 실제 자연계에서는 단일 오염원에 의한 환경오염이 거의 없기 때문이다. 특히 BTX는 원유 속에 함께 포함되어 있을 뿐만 아니라 각종 화학공정에서 생산되고 유출되는 경우가 대부분이기 때문에 기질 상호간의 영향을 연구하는 것이 매우 필요하게 되었다. 기질 상호간의 영향에는 하나의 기질이 다른 기질의 분해를 촉진하는 경우와 하나의 기질은 미생물 성장을 뒷받침해 주는 1차 기질(primary substrate)로 작용하면서 2차 기질(secondary substrate)의 생변환(biotransformation)을 가능케 해주는 cometabolism이 있다. 이러한 예는 기질이 혼합되어 목적 물질의 분해에 도움을 주는 경우이다. 한편 어떤 기질이 존재할 때 다른 기질의 분해가 방해되는 경우도 있는데 이러한 메커니즘에는 diauxy, catabolic repression, competitive inhibition 등이 있다. *Pseudomonas* strain을 이용한 실험에서 benzene과 toluene은 competitive inhibition 관계라는 보고가 있었으며(Oh *et al.*, 1994), Yeom과 Yoo(1997b) 또한 *Alcaligenes xylosoxidans*를 이용한 실험에서 benzene과 toluene이 competitive inhibition관계라고 보고하였다. 그리고 *Pseudomonas cepacia* G4는 phenol이 존재할 때 trichloroethylene을 cometabolism에 의해 제거한다는 보고가 있었다(Hecht *et al.*, 1995).

Table 1. The composition of preculture media

Component	Concentration (g/L)
Glucose	10.0
Yeast extract	5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.0
KH ₂ PO ₄	5.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0

Table 2. The composition of main culture media

Component	Concentration (g/L)
K ₂ HPO ₄	5.0
KH ₂ PO ₄	4.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0
trace element	200 μl

미생물 적응의 영향 또한 많이 연구되어 왔는데 이것은 미생물이 어떤 환경을 거쳐 왔느냐 하는 것이 오염원의 분해에 큰 영향을 미치기 때문이다. 생물학적 phenol 처리에서, phenol의 분해 속도는 phenol에 적용된 시간에 의존한다고 보고가 있었으며 (Satsangee and Ghosh, 1990) anthrathen, naphthalene, phenantheren 또는 benzene에 미리 적응시킨 미생물은 naphthalene의 분해를 촉진시켰다는 보고도 있었다 (Bauer and Capone, 1988). 또한 *Alcaligenes xylosoxidans*를 benzene에 적응시켰을 때 benzene 뿐만 아니라 toluene과 m-xylene의 분해 속도가 획기적으로 증가하였으며 분해 가능한 phenol 농도가 증가한다고 보고가 있었는데 (Yeom et al., 1997a) 이들은 미생물 적응을 최소적인 관점에서 설명하였다. 즉, 미생물이 적용될수록 benzene ring 개환과 직접적인 관계가 있는 catechol 1,2-dioxygenase의 activity가 높아지며 이것이 benzene 등의 방향족 화합물의 분해를 촉진한다는 것이다. 또 다른 연구자들은 미생물 적응 메커니즘을 세포막의 조성 변화로 설명하였는데 (Hiepler and Bont, 1994) 그들은 *Pseudomonas putida* S12를 이용한 실험에서 toluene에 적응시킨 미생물이 ethanol에 더 잘 견디는 이유는 미생물 적응을 통하여 세포막 성분이 cis 형태의 지방산에서 trans 형태로 바뀌기 때문이라고 하였다.

생물학적 처리에 있어서 미생물 경쟁 및 조합 (microbial competition and consortium)의 영향 또한 많이 연구되고 있다 (Duetz et al., 1994). 황성오니 공정과 같이 자연적으로 발생하는 미생물을 이용할 경우, 수많은 종류의 미생물이 유기물을 분해함으로써 이 때 미생물간의 상호 경쟁이 일어나게 되며 또한 미생물간의 협동을 하게 된다. 그러나 이렇게 복잡한 시스템에서는 정성 및 정량적인 분석이 어려워 실제 처리 공정에 이 현상을 응용하기가 어렵다. 그러나 자연계에서 선별한 오염원 분해능이 우수한 미생물을 이용하여 유기물을 분해할 경우, 정량적 분석이 가능할 뿐만 아니라 이를 토대로 효율적인 유기물 분해를 도모할 수 있다. 즉, 미생물 경쟁을 이용하여 분해 속도를 증가시키거나 미

생물 협동을 이용하여 가용 기질의 범위를 확대할 수도 있다.

이와 같이 환경인자를 고찰하는 목적은 예상되는 오염원을 최적의 상태에서 분해할 수 있는 환경적인 조건을 인위적으로 조성해 주기 위한 기초 데이터를 얻기 위함이다. 이러한 연구가 완료되면 이를 토대로 오염원을 효과적으로 처리할 수 있는 bioreactor를 개발할 수 있다. 본 연구에서는 토양에서 분리한 *Klebsiella gr. 47* 균주를 이용하여 BTX 각각의 분해 특성과, 기질 경쟁, 미생물 협동, 미생물 적응에 관한 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 미생물 및 배지

본 연구에 사용된 미생물은 원유에 오염된 땅에서 선별한 *Klebsiella gr. 47*과 *Alcaligenes xylosoxidans*인데 이들은 공통적으로 benzene, toluene, m-xylene을 분해할 수 있으며 *Klebsiella gr. 47*은 p-xylene 또한 분해할 수 있었다. 본 실험에서 사용될 미생물을 대량 배양하기 위하여 Table 1과 같은 조성의 배지 200 ml를 500 ml 플라스크에 넣고 진탕배양기에서 30 °C, 150 rpm의 조건으로 20시간 동안 미생물을 배양한 다음 원심분리기로 분리하여 사용하였다. 분리된 미생물을 Table 2와 같은 조성의 본배양 배지 20 ml를 포함한 120 ml 병에 0.2 mg를 넣고 진탕배양기에서 30 °C, 150 rpm의 조건으로 배양하면서 시간에 따라 미생물 농도와 BTX 농도를 측정하였다. 이 병에는 실리콘 고무 septum과 알루미늄 crimp cap이 달려 있어서 BTX가 유출되는 것을 방지해 준다. 본 배지에 첨가된 trace element는 16.2 g/L FeCl₃·6H₂O, 10.2 g/L CaCl₂·2H₂O, 0.22 g/L CoCl₂·6H₂O, 0.15 g/L CuSO₄·5H₂O, 0.13 g/L CrCl₃·6H₂O, 0.09 g/L NiCl₂·6H₂O, 40.0 g/L citric acid으로 구성되어 있다.

2.2 분석 방법

BTX의 농도는 head space analysis를 통하여 행하였는데, 병에서 gas-tight syringe를 이용하여 500 μl의 기체를 취하여 GC(HP-5890 II)로 분석하였다. 여기서 미생물 없이 BTX만을 포함한 병 두 개를 대조군으로 사용하였다. 분석에는 HP-1 칼럼이 사용되었으며 GC 조건은 injection port 150 °C, oven을 100 °C, detection port를 250 °C로 조절하였다. 미생물의 농도는 spectrophotometer (UVIKON, Kontron Instrument)를 이용하여 660 nm에서 측정하였다.

2.3 미생물의 적응 방법

미생물 적응 실험을 수행하기 위해 120 ml 병에 20 ml의 본배양 배지를 넣은 뒤 여기에 5 mg의 benzene과 0.2 mg의 미생물을 투입하여 benzene이 90 % 분해되었을 때 이를 회수하여 미생물 적응 효과를 알아보기 위한 실험에 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 BTX 분해 특성

Table 3. BTX degrading microorganisms isolated from oil-contaminated soils

microorganism	benzene	toluene	o-xylene	m-xylene	p-xylene
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	+++	++	-	+	-
<i>Klebsiella gr. 47</i>	++	++	-	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i>	++	++	-	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	++	++	-	-	-
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	+	++	+	-	-
<i>Rahnella aquatilis</i>	++	++	-	-	-

+++ : fast degradation
 ++ : degradation
 + : slow degradation
 - : not degradation

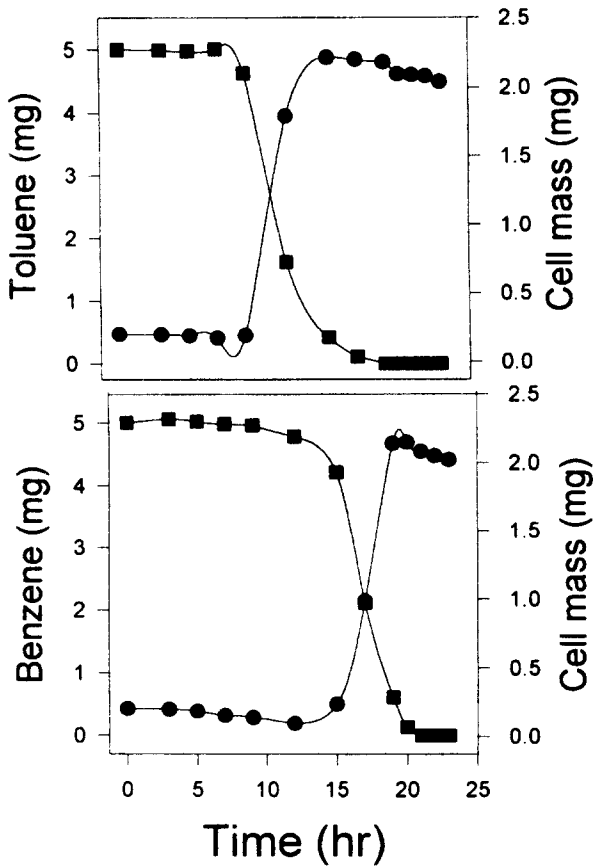


Fig. 1. Time courses of benzene and toluene degradation by *Klebsiella gr. 47*.
 ● : cell mass, ■ : benzene or toluene

지금까지 BTX를 동시에 분해하는 박테리아에 관한 보고는 거의 없는 실정이며, *Pseudomonas putida*에 유전자 조합 기술을 이용하여 benzene, toluene, p-xylene을 동시 분해하고자 하는 연구가 있었으나(Lee et al., 1995) 재조합 미생물의 안전성에 대한 논란이 있고 재조합 유전자가 안정적으로 다음 세대로 계속 이어질지에 대한 기술적인 의문이 있어 아직까지 사용에 제한이 있다. 곰팡이의 일종인 *Phanerochaete chrysosporium*이 BTX를 모두 분해하였다고 보고가 있었는데

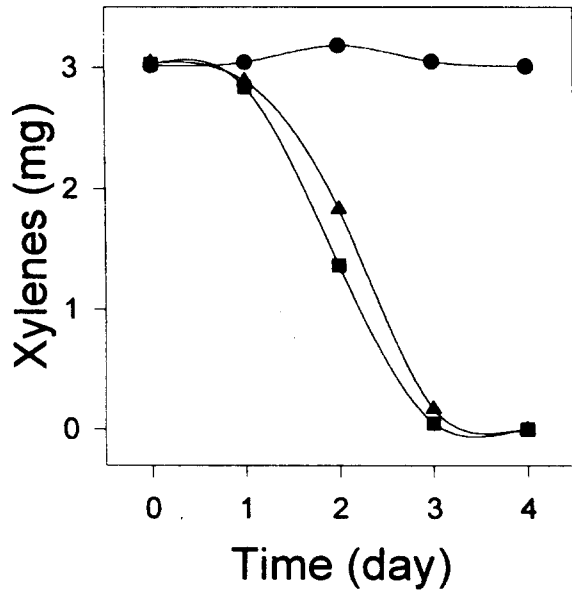


Fig. 2. Time courses of xylene degradation by *Klebsiella gr. 47*.
 ● : o-xylene, ■ : m-xylene, ▲ : p-xylene

(Yadav와 Reddy, 1993)분해 시간이 7일 이상 걸렸으며, 일반적으로 곰팡이는 제거가 어렵고 폐수처리에 적합하지 않는 것으로 알려져 있으므로 BTX를 동시에 분해할 수 있는 박테리아를 찾고 이를 실제 폐수 처리 공정에 응용하는 것이 필요하다고 하였다 (Tchobanoglous, 1979).

본 연구에서는 원유에 오염된 땅에서 enrichment technique을 이용하여 Table 3과 같은 여섯 종의 BTX 분해능이 있는 미생물을 선별하였다. 이 중 *Alcaligenes xylosoxidans*는 benzene, toluene 분해능이 가장 뛰어났으나 세 가지 xylene isomer 중 m-xylene만을 분해하였고 *Klebsiella gr. 47* 균주는 benzene, toluene 외에도 m-xylene, p-xylene을 분해할 수 있는 능력을 가지고 있었다. 그리하여 분해 기질 범위가 넓은 *Klebsiella gr. 47*을 중심으로 BTX 분해 특성을 살펴 보았다.

*Klebsiella gr. 47*의 BTX 분해능을 보다 구체적으로 분석하기 위하여 시간에 따른 BTX와 cell mass의 변화

Table 4. The characteristics of BTX degradation by *Klebsiella gr. 47*

	Benzene	Toluene
Maximum specific growth rate(1/hr)	0.72	0.76
Cell yield (mg-cell/mg-substrate)	0.38	0.40
Maximum specific substrate consumption rate ^a	1.72	1.20

a : mg-substrate/mg-cell/hr

Table 5. The characteristics of BTX degradation by *Alcaligenes xylosoxidans* [Yeom et al., 1997a]

	Benzene	Toluene
Maximum specific growth rate(1/hr)	0.58	0.52
Cell yield (mg-cell/mg-substrate)	0.33	0.24
Maximum specific substrate consumption rate ^a	1.87	1.32

a : mg-substrate/mg-cell/hr

를 살펴보았다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 5.0 mg의 benzene 또는 toluene이 투입되었을 때 *Klebsiella gr. 47*은 각각 15시간, 9시간의 비교적 긴 적응기간을 거친 후에 benzene, toluene을 분해하기 시작하였다. 분해가 일어나기 전까지는 cell mass가 다소간 감소하였지만 일단 분해가 시작되면 급격히 증가하였다. 이 때 benzene, toluene에 대한 최대 비성장 속도 (maximum specific growth rate), 수율(cell yield), 최대 기질 소모 속도(maximum specific substrate consumption rate)는 Table 4에, 비교를 위한 *Alcaligenes xylosoxidans*의 benzene, toluene 분해특성은 Table 5에 나타 내었다. *Klebsiella gr. 47*의 benzene과 toluene 적응시간이, *Alcaligenes xylosoxidans*의 7시간 (benzene), 4시간(toluene)에 비하여 길었지만 적응 후의 분해 능력에서는 차이가 거의 없었다. 한편 xylene의 분해는 Fig. 2에서 보였듯이, o-xylene은 분해되지 않았고 m-xylene과 p-xylene은 하루의 적응 시간을 거친 후에 분해되기 시작하여 3일이 지났을 때 완전히 분해되었다. 다음으로 BTX의 농도를 높여 가며 분해 양상을 관찰하였고 이를 Fig. 3에 보였다. 그림에서 보듯이 투입된 toluene 양이 3 mg에서 10 mg으로 늘어났을 때 적응시간이 7시간에서 13시간으로 늘어났지만 분해속도는 0.21 mg/hr에서 0.67 mg/hr로 증가하였고 같은 실험 조건에서 benzene의 적응시간은 13시간에서 17시간, 분해 속도는 0.23 mg/hr에서 0.59 mg/hr로 증가하였다. Xylene의 경우, 처음량의 2배인 6 mg을 투입하였을 때 적응시간이 24시간 더 길어졌는데 이것은 xylene의 *Klebsiella gr. 47*에 대한 독성이 benzene, toluene 보다 크기 때문으로 생각된다.

3.2 기질의 상호 영향

단일 오염원에 의한 오염은 실제로 드물기 때문에 두 가지 이상의 오염물질이 동시에 유출되었을 때의 분해 과정을 파악하는 것이 실제 폐수처리 공정에서 필요하다. 본 연구에서는 우선 benzene, toluene 두 기질을 동시에 투입하였을 때의 분해 과정을 살펴보았으며 또한 benzene과 xylene, toluene과 xylene이 함께 투입되었

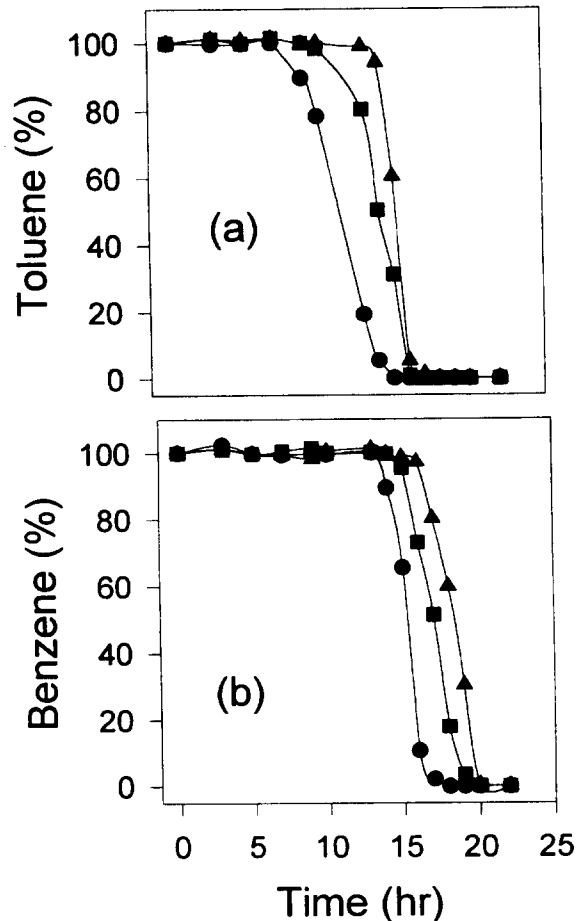


Fig. 3. The effect of BTX concentration on the degradation rate of BTX.

- (a) ● : 3 mg toluene, ■ : 6 mg toluene, ▲ : 10 mg toluene
- (b) ● : 3 mg benzene, ■ : 6 mg benzene, ▲ : 10 mg benzene

을 때 분해되는 과정을 관찰하였다. Fig. 4에 나타내었

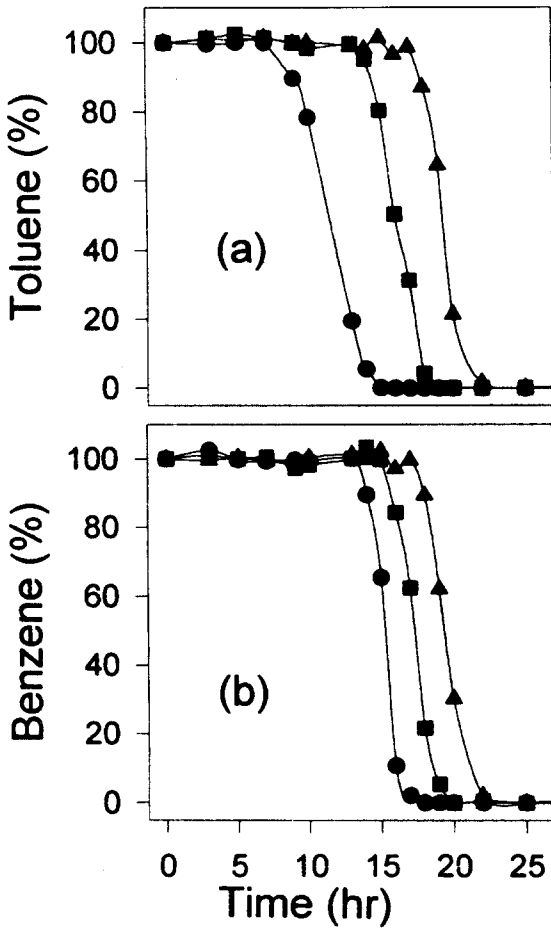


Fig. 4. The interaction effect between benzene and toluene.

(a) ●: 3 mg toluene, ■: 3 mg toluene + 3 mg benzene, ▲: 3 mg toluene + 6 mg benzene

(b) ●: 3 mg benzene, ■: 3 mg benzene + 3 mg toluene, ▲: 3 mg benzene + 6 mg toluene

듯이 일정량의 benzene에 투입되는 toluene 양을 증가시켰을 때와 그와 반대로 일정량의 toluene에 투입되는 benzene의 양을 증가시켰을 때 각각 benzene, toluene의 분해 속도가 늦어지는 것을 알 수 있는데 이것은 benzene과 toluene이 competitive inhibition을 보임을 의미한다(Chang et al., 1993; Yeom and Yoo, 1997b). 그리고 benzene과 xylene, toluene과 xylene을 함께 투입하였을 때의 분해 과정을 관찰하였다. Fig. 5와 Fig. 6에서 보듯이 benzene 또는 toluene의 분해가 일어남과 동시에 xylene의 분해가 시작됨으로써 xylene 분해시간이 3일에서 24시간 이내로 줄어들어 결국 분해 속도가 3배 증가하였다. 즉 benzene과 toluene이 xylene의 분해를 촉진시킨 것이다. 또한 분해되지 않던 o-xylene이 제거되기 시작하였다. 이러한 현상은 cometabolism으로 설명할 수 있다. cometabolism이란 효소

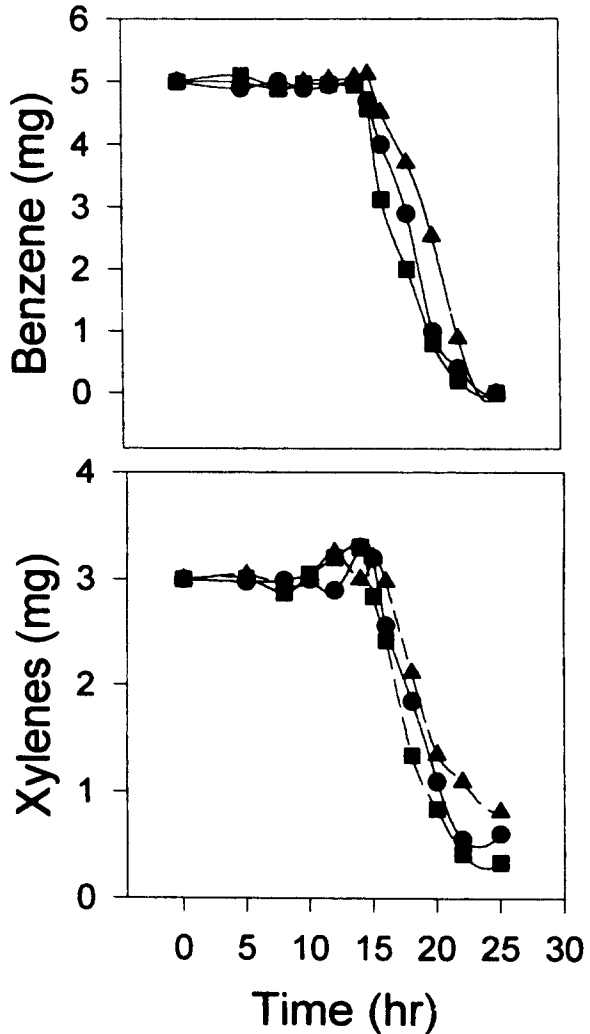


Fig. 5. The interaction effect between benzene and xylenes.

●: benzene + o-xylene, ■: benzene + m-xylene, ▲: benzene + p-xylene

의 broad specificity로 인하여 야기되는 것으로 어느 한 기질에 의하여 유도된 효소가 다른 기질을 생전환시키는 것을 말한다. 즉, benzene, toluene의 분해에서 유도된 효소가 xylene의 제거를 촉진했다는 것이다.

3.3 미생물 협동의 영향

Klebsiella gr. 47 균주의 benzene, toluene 분해능은 *Alcaligenes xylosoxidans*보다 떨어지지만 xylene의 분해 능력은 우수하다. 그러므로 이 두 미생물 각각의 장점을 이용할 수 있다면 보다 효율적으로 BTX를 처리할 수 있을 것으로 생각되었다. 이 두 미생물의 협동 가능성을 살펴보기 위하여 *Klebsiella gr. 47*과 *Alcaligenes xylosoxidans*을 0.1 mg 씩 혼합하여 benzene, toluene, xylene 각각의 분해 양상을 살펴보았다. Fig. 7에서 보듯이 *Alcaligenes xylosoxidans*의 효과로 인하

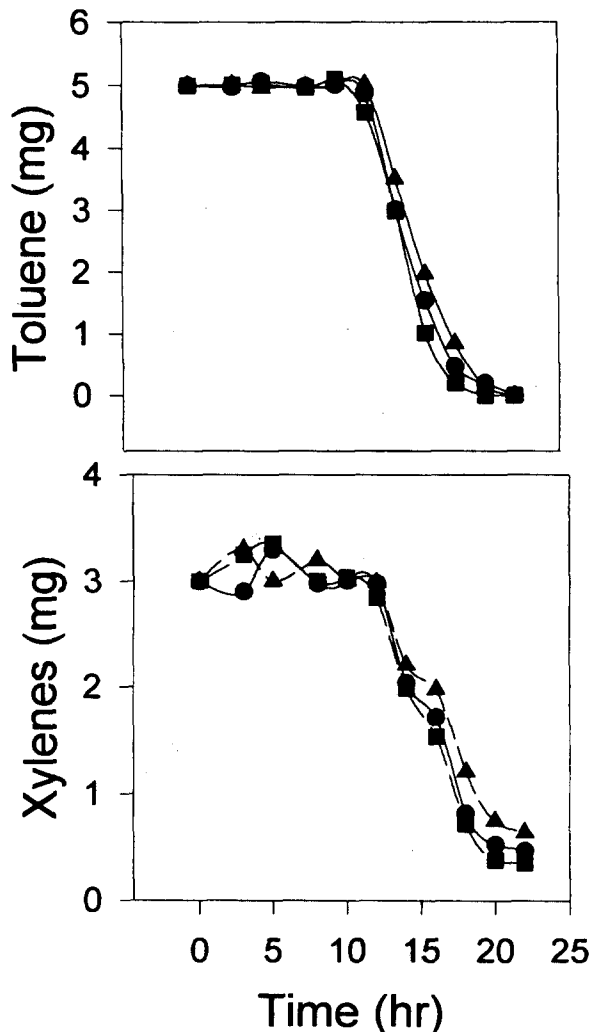


Fig. 6. The interaction effect between toluene and xylenes.

●: toluene + o-xylene, ■: toluene + m-xylene, ▲: toluene + p-xylene

여 *Klebsiella gr. 47*만을 투입했을 때보다 적응시간이 benzene의 경우는 5시간 toluene의 경우는 3시간이 단축되었으며, p-xylene도 분해되었다. 물론 미생물 종별로 개체수 변화 등을 살펴보아야 정확한 분석이 가능하겠지만 현상적인 결과로부터 두 미생물이 협동하여 BTX를 분해하였다는 것을 알 수 있었다.

3.4 미생물 적응의 영향

*Alcaligenes xylosoxidans*를 이용한 실험에서 미생물 적응이 benzene, toluene의 분해 속도와 xylene의 제거 속도를 획기적으로 개선했다는 보고를 하였다(Yeom et al., 1997a). 이를 바탕으로 benzene에 적응한 *Alcaligenes xylosoxidans*와 *Klebsiella gr. 47*을 이용하여 benzene, toluene, o-xylene, m-xylene, p-xylene의 분해를 시도하여 보았다. 여기서 BTX 각 한 성분만을

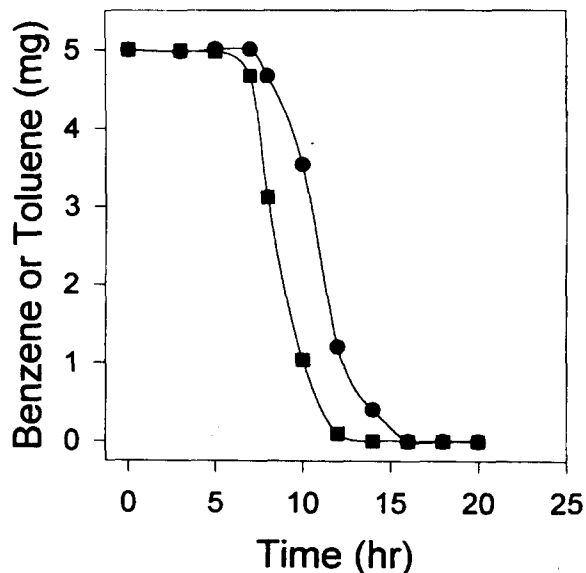


Fig. 7. The degradation of BTX using coculture of *Klebsiella gr. 47* and *Alcaligenes xylosoxidans Y234*.

●: benzene, ■: toluene

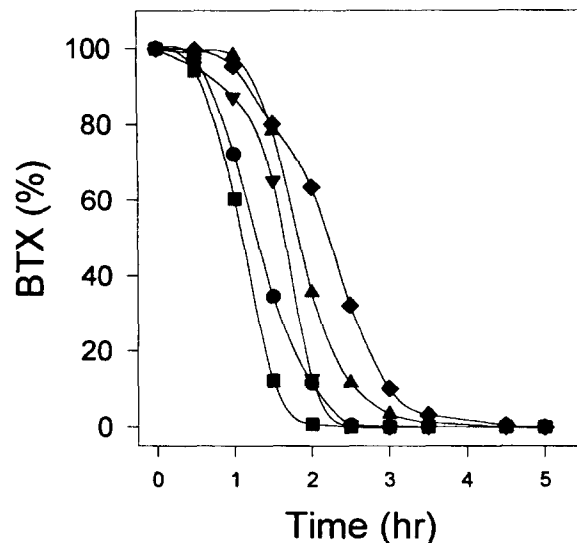


Fig. 8. The effect of microbial adaptation on the degradation of BTX.

●: benzene, ■: toluene, ▲: o-xylene, ▼: m-xylene, ◆: p-xylene

포함한 배지에 benzene에 적응된 미생물 0.2 mg을 투입하여 시간에 따른 BTX 분해 실험을 수행하였다. Fig. 8에 나타난 것과 같이 benzene에 적응된 미생물이 각각 5 mg의 benzene과 toluene 그리고 각각 1 mg의 세 가지 xylene isomer을 5시간만에 완전히 분해하였다. 이 현상은 Yeom et al.(1997a)의 실험 결과로써 설명할 수 있다. 즉 benzene에 적응된 미생물은 BTX를 분

해할 수 있는 효소를 충분히 유도하였으므로 BTX가 투입 후 빠른 속도로 분해한 것이었다.

본 연구에서는 *Klebsiella gr. 47*를 이용하여 실험실 수준에서 BTX를 효율적으로 처리할 수 있는 방법을 제시하였다. 이러한 실험 결과는 BTX를 함유한 폐수를 처리하기 위한 bioreactor의 개발과 운전에 유용한 데이터로 사용될 수 있을 것이다. 그러나 *o*-xylene은 Yeom *et al.*,(1997a)의 실험 결과로서 유추해 보면, 분해된 것이 아니라 다른 물질로 전환되었을 가능성이 높으므로 판단된다. 따라서 *o*-xylene을 포함한 BTX를 완벽하게 처리할 수 있는 방법이 강구되어야 할 것이다.

4. 결 론

본 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1) 원유에 오염된 땅에서 선별한 *Klebsiella gr. 47*은 benzene, toluene, *m*-xylene, *p*-xylene을 분해할 수 있었다.

2) BTX 각각의 농도가 높아질수록 분해가 되기까지의 적응시간은 길어졌지만 일단 적응이 된 후에는 분해 속도가 빨라졌다. 투입되는 benzene, toluene 양을 3 mg에서 10 mg으로 늘렸을 때 분해 속도는 약 3 배 증가하였다.

3) Benzene과 toluene이 동시 존재하였을 때는 competitive inhibition을 보였으며 xylene이 benzene 또는 toluene과 함께 있을 때는 분해 속도가 3배 증가하여 분해 되는 시간이 3일에서 24시간 이내로 줄어 들었다.

4) *Klebsiella gr. 47*을 benzene과 toluene의 분해능이 우수한 *Alcaligenes xylosoxidans*와 함께 배양함으로써 미생물 적응시간을 benzene의 경우는 5시간, toluene의 경우는 3시간 줄일 수 있었다.

5) Benzene에 적응된 미생물이 각각 5 mg의 benzene과 toluene 그리고 각각 1 mg의 세 가지 xylene isomer을 5시간만에 완전히 분해하였다. 이것은 적응시키지 않은 미생물을 이용하였을 때보다 분해 속도가 benzene과 toluene의 경우는 4배, xylene isomer의 경우는 5배가 증가한 것이다.

참 고 문 헌

Alvarez, P. J. J. and Vogel, T. M., 1991, Substrate Interactions of Benzene, Toluene, and *para*-Xylene during Microbial Degradation by Pure Cultures and Mixed Culture Aquifer Slurries, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2981-2985.

Arvin, E., Jensen, B. K. and Gundersen, A. T., 1989, Substrate interaction during aerobic biodegradation of benzene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 3221-3225.

Bauer, J. E. and Capone, D. G., 1988, Effects of Co-Occurring Aromatic Hydrocarbons on Degradation of Individual Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediment Slurries.

Appl. Environ. Microbiol., 54: 1649-1655.

Chang, M. K., Thomas, C. V. and Craig, S. C., 1993, Kinetics of Competitive Inhibition and Cometabolism in the Biodegradation of Benzene, Toluene, and *p*-xylene by Two *Pseudomonas* Isolates, *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 1057-1065.

Duetz, W. A., DE Jong, C., Williams P. A. and VAN An del, J. G., 1994, Competition in Chemostat Culture between *Pseudomonas* Strains That Use Different Pathways for the Degradation of Toluene, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 2858-2863.

Gibson, D. T., Koch, J. R. and Kallio, R. E., 1968, Oxidative Degradation of Aromatic Hydrocarbons by Microorganisms. I. Enzymatic Formation of Catechol from Benzene. *Biochem.*, 7, 2653-2662.

Hecht, V., Brebbermann, D., Bremer, P and Deckwer, W. D., 1995, Cometabolic Degradation of Trichloroethylene in a Bubble Column Bioreactor, *Biotechnol. Bioeng.*, 47, 461-469.

Heipteper, H. J. and DE Bont, J. A. M., 1994, Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to Ethanol and Toluene at the Level of Fatty Acid Composition of Membranes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 4440-4444.

Lee, J. Y., Jung, K. H., Choi, S. H. and Kim, H. S., 1995, Combination of the *tod* and *tol* Pathways in Redesigning a Metabolic Route of *Pseudomonas putida* for the Mineralization of a Benzene, Toluene, and *p*-Xylene Mixture", *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2211-2217.

Oh, Y. S., Shareefdeen, Z., Basil, C. B. and Richard B., 1994, Interactions Between Benzene, Toluene, and *p*-xylene (BTX) During Their Biodegradation, *Biotechnol. Bioeng.*, 44, 533-538.

Satsangee, R. and Ghosh, P., 1990, Anaerobic degradation of phenol using an acclimated mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 34, 127-130.

Tchobanoglous, G., 1979, *Wastewater Engineering*, McGRAW-Hill., 520pp.

Yadav, J. S. and Reddy, C. A., 1993, Degradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX) by the Lignin-Degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 756-762.

Yeom, S. H., Yoo, Y. J. and Lee, J. W., 1997a, The importance of microbial adaptation in the degradation of BTX, *Global Environmental*

Biotechnology, Wise, D. L.(Ed.), Elsevier Science B. V. pp 683.
Yeom, S. H. and Yoo, Y. J, 1997b, Substrate In-

teraction Analysis in the Degradation of Benzene and Toluene by *Alcaligenes xylosoxiants* Y234, Environ. Eng. Res., 2, 245-250.