

β-시클로덱스트린(β-Cyclodextrin)의 결합 특성과 벤젠의 생물학적 분해에의 적용에 대한 연구

최종규 · 손현석 · 조경덕[†]
서울대학교 보건대학원 환경보건학과

A Study on the Binding Characteristics of β-Cyclodextrin with Benzene and Its Application on the Bioremediation

Jong Kyu Choi · Hyun Seok Son · Kyung Duk Zoh[†]

Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health,
Seoul National University

(Received September 17, 2002; Accepted November 27, 2002)

ABSTRACT

Recently, surfactants were frequently used in order to desorb the hydrophobic organic compounds (HOCs) from soil and to enhance the bioavailability. Among them, β-cyclodextrin (β-CD) is one of those. This study was performed to investigate the binding characteristics between benzene and β-CD and to examine the bioavailability of benzene. First, we investigated binding characteristics between benzene and β-CD in water and water/soil system. Then, we examined the effect of β-CD on the biodegradation of benzene in water and water/soil system. Experimental results on the binding characteristics showed that β-CD resulted in an efficient complex formation with benzene. As β-CD concentration increased, the benzene concentration complexed with β-CD rapidly increased to 30~40% initial benzene added, and reached the equilibrium. We also investigated the effect of β-CD on the desorption of benzene from soil in the water/soil system. As β-CD concentration increased, benzene concentration desorbed into water increased up to 90%. However, in its application to biodegradation of benzene in water and water/soil system, the biodegradation rate of benzene did not improved in the presence of β-CD compared with in the absence of β-CD. This result indicated that β-CD was more preferentially used as a carbon source than benzene. Therefore, for remediation of benzene contaminated soils, β-CD can be used as a surfactant to desorb benzene from soil, and then ex-situ chemical treatment can be applied for the remediation.

Keywords : β-cyclodextrin, Surfactant, Bioremediation, Biodegradation, Benzene

I. 서 론

토양과 대수층에 오염된 비극성 유기화합물(hydrophobic organic compounds, 이하 HOCs)은 흡착력으로 인해 토양과 같은 media로부터 이동성이 제한되어 있다. HOCs의 이러한 특성으로 인하여 오염물질의 처리에 어려움에 직면하고 있다. HOCs는 소수성(hydrophobic)의 특성을 지니고 있어 토양과 대수층의

점토 층이나 부식토에 흡착되어 Non-aqueous phase liquid(NAPL)의 형태로 존재하여 aqueous phase로 이동이 상당히 느리며, 이로 인해 미생물에 의한 생물학적 처리에 있어 제한 인자가 되기도 한다.^{1,3)} 이러한 특성을 가진 석유화합물(BTEXs), PAHs, TNT와 같은 HOCs들의 생물학적 분해에 대한 연구는 생물복원공정(bioremediation)에서 주요한 연구분야이다.^{1,3,4)} 이들 HOCs는 생물학적 처리시 미생물에 의해 분해되는데 1) 지방친화성 특성으로 물에 대한 용해도가 낮고 미생물에 대한 접근성이 낮은 편이며, 2) 일부 오염물질은 고농도에서 미생물에 대해 독성을 나타내 처리의 제한점이 있다. 이러한 HOCs를 지하수나 토양에서 추출(extraction)하고 미생물의 접근성을 향상시키며 독성을

[†]Corresponding author : Department of Environmental Health, Graduate School of Public Health, Seoul National University
Tel: 02-740-8891, Fax: 02-745-9104
E-mail : Zohkd@snu.ac.kr

낮추기 위해서는 HOCs의 물리 화학적 특성을 변화시켜야 가능하다.

최근에는 이러한 HOCs들의 토양으로부터 물로서의 이동성을 향상시킴으로써 bioavailability를 향상시키는 연구가 진행되고 있다.⁶⁾ 이러한 방법에는 surfactants(이하 계면활성제), cosolvents, organic colloids 등을 이용한 방법이 제시되고 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 현재 널리 연구되고 있는 계면활성제는 sodium dodecyl sulfate(음이온), Tween 80(비이온) 등이 있다. 이 계면활성제들은 토양으로부터 HOCs를 제거하는데 효과적이지만, 계면활성제 자체가 토양에 흡착되어 손실되는 제한점이 있다. 이러한 제한점을 극복하기 위해 토양에 흡착손실이 적고, 독성이 낮은 시클로덱스트린(Cyclodextrins, 이하 CDs)을 이용하는 방법이 제시되었다. CDs는 1891년 Viller에 의해 발견된 물질로 전분 등이 *Bacillus macerans*의 아밀라제의 작용에 의해 생성된 물질이다. 또한 식품, 섬유, 종이제조 등의 산업에서 많이 제조되고 있다. 일반적인 구조는 α -1,4-linked glucopyranose subunits로 구성된 oligosaccharides의 ring 구조를 이루고 있고, 형태는 α -, β -, γ -CDs(각각 6,7,8개의 glycuranose subunit으로 구성)가 있다. 이들은 양동이 형태를 하고 있으며 hydroxyl groups이 cone 가장 자리에 위치하고 물 속에서 soluble한 특성을 지니는 반면에 내부에 cone은 소수성의 특성을 지닌다. 이러한 CDs는 한 개 혹은 둘 이상의 벤젠 고리와 결합하여 결합체(inclusion complexes)를 형성하거나 noble gases, 아프라핀, 알코올류, 카르복실산, 방향족염류, 벤젠화합물 또는 그 염과 complex를 형성한다.¹⁰⁾ CDs는 또한 다핵성 방향족 탄화수소와 결합성이 있어 환경적으로는 유기인계농약, PAHs,¹¹⁾ 폭발성물질인 TNT¹²⁾ 등과의 결합성을 가지고 있다고 보도되고 있다.¹⁰⁾ CDs는 일반적으로 α -CD에 비해 결합대상이 광범위하고, γ -CD에 비해 구조적 안정성이 높은 β -CD가 많이 이용되고 있다.¹⁰⁾ 현재 β -CD를 이용한 p-toluic acid의 생물학적 분해, 토양에 오염된 폭발성 물질의 회수에 관한 연구 및 다양한 소수성유기물의 처리에 대한 연구를 통하여 이용 가능성이 높다는 것을 보여주었다.³⁾

본 연구는 유류오염지역에서 채취한 토양을 이용하여 회분식 반응기에서 β -CD를 주입한 후, 물과 토양에서 나타나는 기초적인 결합반응을 관찰하였다. 또한 β -CD의 주입 후 물과 토양 중에서 벤젠의 물리화학적 특성 변화에 의한 농도 분포를 관찰하였다. 둘째로, β -CD의 첨가를 통한 미생물에 의한 벤젠의 생물학적 분해경향을 관찰하여 벤젠으로 오염된 토양의 복원 가능성을 살펴보고자 한다.

II. 연구방법

1. 실험재료

1) 시료

시료는 Aldrich사에서 구입한 99.9% 벤젠을 사용하였고, 용매는 deionized water와 J.T. Baker사의 아세토니트릴(CH₃CN)을 이용하였다. β -CD는 99.8%의 β -CD(Sigma Aldrich)를 이용하였다. 미생물 배양에 이용되는 basal mineral medium과 stock salt solution은 직접 제조하였다. basal mineral medium은 (NH₄)₂SO₄ 8 g/L, KH₂PO₄ 5 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.1 g/L를 함유한 용액이고, stock salt solution의 성분은 Table 1에 나타나 있다.

2) Soil and culture microorganisms

실험에 이용된 토양과 미생물 culture는 강원도 대관령지역의 A 주유소 주변에 유류로 오염된 토양을 채취한 후, incubator에서 보관을 하였다. 실험을 위해 채취한 토양 200 g을 1 l 용기에 넣고 pH 7의 basal mineral medium 22 ml와 stock salt solution 1 ml를 1 l의 증류수에 녹이고, 탄소와 에너지원으로 벤젠 10 ppm을 용기에 주입하고 3주일 동안 배양시켰다. 이때 3일 간격으로 basal mineral medium과 stock salt solution, 벤젠 10 ppm을 계속 주입하였다.

2. 실험방법

1) 벤젠과 β -CD의 결합특성

벤젠과 β -CD의 결합 특성에 대해 알아보기 위하여 먼저 β -CD의 농도를 10 mM로 일정하게 하면서 벤젠의 농도를 1에서 100 ppm을 변화시킨 용액을 만들었다. 그리고 이 용액이 생물학적 분해반응이 일어나, 결합반응에 영향을 미치는 것을 배제하기 위하여 증류수를 autoclave(Advantec Autoclave SVM-30H, Advantec사)시킨 다음, 용액의 멸균을 위하여 NaN₃를 2 g/l의 농

Table 1. The composition of stock salt solution in 1 l³⁾

Stock salts	Added(g)
MgO	10.8
CaCO ₃	2.0
FeSO ₄ ·7H ₂ O	4.5
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4
MnSO ₄ ·4H ₂ O	1.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.3
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0.3
H ₃ BO ₃	0.1
HCl(35%, v/v)	52 ml

도로 주입하였다. 그리고 이 용액을 shaking incubator로 30±0.1°C에서 24시간 동안 교반한 다음, 기상(air phase)시료를 채취하여 GC-Mass(HP 6890)를 이용하여 측정하였다. 대조군 실험은 β-CD를 주입하지 않고, 위의 실험과 동일하게 실시하였다. 벤젠의 분석은 기상의 샘플을 gas-tight syringe로 100 μl를 취하여 EPA Method 502124)에 의해 GC-Mass를 이용하여 분석하였다. 컬럼은 Hewlett Packard사의 HP-5 Trace Analysis column(5% PHME Siloxane, 30 m×0.2 mm×0.25 μm film thickness)을 사용하였고, 온도 program은 injector, oven, detector 각각 230°C, 40°C, 250°C이었다.

β-CD 농도를 변수로 하는 실험에서 115 ml의 serum bottle에 60 ml 증류수를 넣고 β-CD의 농도를 각각 1 mM, 5 mM 그리고 10 mM에서 농도를 변화시켜 주입하였고, 벤젠의 초기 농도는 모두 50 ppm으로 일정하게 하였다. 미생물의 작용을 배제하기 위한 방법과 벤젠의 분석방법은 상기절차와 동일하였다.

β-CD주입에 의해 토양 중에 흡착되어 있는 벤젠과 반응을 통하여 수중으로 탈착시키는 실험에서는 시료인 토양과 물을 위의 절차에 따라 autoclave한 다음 serum bottle에 토양 10 g을 넣고 벤젠의 농도를 50 ppm이 되도록 일정하게 유지하였다. 여기에 β-CD의 농도를 각각 0~10 mM로 변화시켰다. 여기에서도 역시 미생물의 작용을 배제하기 위해 autoclave 이후에 NaN₃를 2 g/l의 농도로 주입하였다. 그리고 휘발에 의한 손실을 줄이기 위해 serum bottle을 완전히 물로 채워 headspace를 없앴다. 이 용액을 24시간 동안 교반한 다음, 시료중 물을 채취하여 HPLC(Dionex사)로 분석하였다. 물 속의 벤젠 농도의 분석은 시료를 1 ml syringe로 취하여 Millex HVDF syringe filter(pore size 0.45 μm, Millipore사)로 여과하였다. 그리고 아세트니트릴과 시료를 2:1의 비율로 혼합하여 vial에 담고 HPLC를 이용하여 측정하였다. 자외선 검출기는 multiwavelength detector로 210 nm의 파장에서 측정하였다. 이때 사용된 컬럼은 Supelco사의 RP C-18 silica column(25 cm×4.6 mm initial diameter, 5 μm particles)을 사용하였고, 이동상은 아세트니트릴과 물(66:34, v/v%)을 사용하였으며, 유량은 1 ml/min.이었다.

2) β-CD가 미생물에 의한 벤젠 분해에 미치는 영향

토양과 수중에서 미생물에 의한 벤젠의 분해에 β-CD의 첨가가 미치는 영향에 대한 실험은 serum bottle에 토양 10 g/l을 넣고 autoclave시킨 후, β-CD를 각각 0, 5, 10 mM씩 주입하였다. 그리고 basal mineral medium 22 ml, stock salt solution 0.11 ml와 완충용액인 K₂HPO₄ 3 g/l, 그리고 전자 수용체인 KNO₃

10 ppm을 각각 넣었다. 여기에 배양된 미생물 culture 용액 2 ml와 벤젠 50 ppm을 각각 주입하였다. 이후 shaking incubator(140 rpm, 30°C)에서 교반시키면서 20 일 동안 주기적으로 물 시료를 채취하여 수중의 벤젠 농도를 HPLC를 이용하여 분석하였다. 대조군은 β-CD를 주입하지 않고 증류수, serum bottle, culture, 토양 등을 모두 autoclave시킨 후 NaN₃ 2 g/l를 넣고 위와 동일한 조건과 방법으로 실험하였다. 실험이 끝난 후 시료의 수분을 모두 제거하고 남아있는 토양을 methylene chloride로 추출하여 GC-FID(HP5973, Hewlett Packard 사)를 이용하여 토양 중에 남아있는 벤젠의 농도를 측정하였다. 사용된 조건은 GC-Mass의 경우와 동일하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 벤젠과 β-CD의 결합특성

수중에서 벤젠의 농도를 1에서 100 ppm까지 변화시키면서 10 mM의 β-CD와 결합 특성을 기상에서 농도 변화로 관찰한 결과가 Fig. 1에 나타나 있다.

β-CD를 벤젠에 주입한 결과 벤젠은 β-CD의 결합하여 휘발성이 증가함으로써 기상에 벤젠 농도가 상당히 증가함을 알 수 있었다. 그림에서 보는 바와 같이 평형에서 벤젠은 56 ppm 주입시 약 45%의 벤젠이 10 mM의 β-CD와 결합하여 complex를 형성하였고, 1~100 ppm까지 전체적으로 비슷한 경향이었다. 반면 β-CD를 주입하지 않은 실험에서는 기상에서 농도의 변화가 거의 없었다. 이 결과는 Yoshihiro Saito의 연구 결과와 비슷한 경향을 나타낸다.¹³⁾

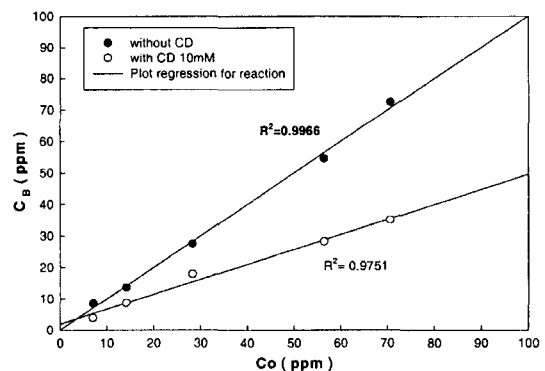


Fig. 1. Binding characteristics between β-CD and benzene complex in water system (C_B: equilibrium benzene concentration in air phase, C₀: initial benzene concentration added).

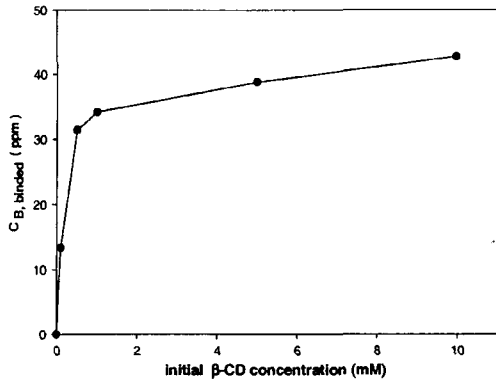


Fig. 2. Effect of changing β -CD concentration on the binding characteristics between benzene and β -CD (initial benzene concentration added = 50 ppm, $C_{B, binded}$: benzene concentration binded with β -CD).

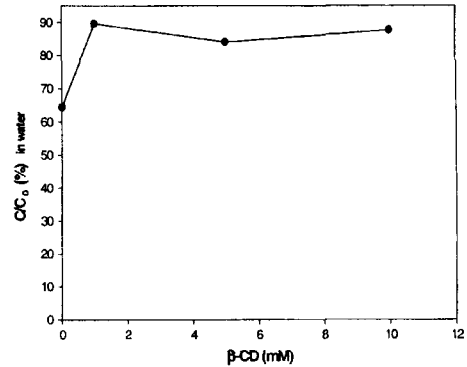


Fig. 4. Effect of β -CD on benzene the efficiency of desorption from soil to water (C/C_0 : equilibrium benzene concentration in water/initial benzene concentration added).

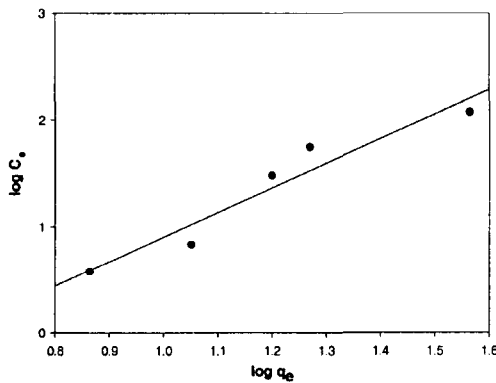


Fig. 3. Freundlich isotherm for benzene and β -CD complex.

2. β -CD의 농도 변화에 따른 벤젠과 결합경향

다음으로 50 ppm의 벤젠의 농도에 β -CD의 농도를 0, 0.5, 1, 5, 10 mM 농도로 변화시켜 β -CD와 벤젠과의 결합을 관찰하여 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 β -CD가 1 mM까지는 β -CD의 농도 변화에 의해 결합된 벤젠의 비율이 처음 넣어준 농도인 50 ppm의 약 30~40%까지 급격히 증가하다가 5 mM 이상 주입 시에는 증가 경향이 완만해짐을 볼 수 있었다. 즉 β -CD가 1 mM 이상 주입 시에는 거의 반응이 포화 상태에 도달함을 알 수 있다. 그리고 결합 반응식을 분석한 결과 Freundlich isotherm을 따르고 있었고($R^2 = 0.927$), K_f 와 n 값은 각각 0.0427과 0.435이었다.

이 반응은 수중에서 β -CD와 벤젠 간의 complex형성이 매우 잘 되고 있음을 보여주고 있다. 일반적으로 β -CD와 HOCs 간의 complex의 형성은 주로 guest 물질의 특성과 크기에 영향을 받는다.¹⁰⁾ β -CD complex는

비극성이며, 크기가 β -CD보다 작은 물질과 결합이 용이하다. 하지만 complex형성 경향은 물리적 특성뿐만 아니라, 화학적 특성에 따라 달라질 수 있다.¹⁰⁾ 벤젠이 구조적 특성상 물리적인 크기가 작고, 화학적으로 비극성의 특성을 가지고 있어 β -CD와 결합체 형성 정도가 높아졌다고 여겨진다.

3. β -CD에 의해 토양 중의 흡착된 벤젠의 물속에서의 탈착경향

다음으로 β -CD를 주입함으로써 토양 중에 흡착되어 있는 벤젠을 물 속으로 탈착시키는 경향에 대해 실험하였다. 토양과 물이 동시에 존재하는 조건에서 β -CD의 농도 변화에 따른 벤젠의 탈착(desorption)에 대한 실험결과가 Fig. 4에 나타나 있다.

실험에서 물 속의 β -CD와 결합하고 있는 벤젠과 결합하지 않은 벤젠의 총량을 알아보기 위해 물 속의 벤젠 농도는 시료와 아세트니트릴과 1:2의 비율로 혼합하였다. 그 이유는 아세트니트릴에 의해서 β -CD에 흡착된 벤젠도 물로 탈착하게 하므로 이 절차를 거쳐 HPLC분석을 하였다.

분석의 결과 β -CD를 첨가하지 않은 경우에는 평형에서 약 40% 정도의 벤젠만이 토양에서 탈착됨을 알 수 있었다. 다음으로 1 mM 이상의 β -CD 주입시 약 90% 정도가 토양에서 탈착되어 물 속에 존재함을 알 수 있다.

4. 수중 β -CD의 첨가에 따른 미생물에 의한 벤젠의 분해경향

다음으로 β -CD를 각각 0, 5, 10 mM로 주입한 후

벤젠의 수중에서의 생물학적 분해 경향에 대해 실험한 결과를 Fig. 5에 나타냈다. 그림에서 보는 바와 같이 반응 초기에는 모든 조건에서 벤젠의 생물학적 분해가 원활히 진행되었다. 그러나 1일 이후부터 β-CD를 주입하지 않은 조건에서 99.8%의 높은 생물학적 분해율을 보였다. 이 결과는 5 mM과 10 mM의 β-CD주입시 벤젠의 분해율인 87.7%, 83.2%보다 높은 것이다. 실험결과 β-CD의 주입으로 생물학적 분해율이 감소함을 볼 수 있었다. 이러한 현상이 나타난 원인은 β-CD가 벤젠보다 미생물이 이용하기에 손쉬운 탄소원으로서 역할을 함을 알 수 있다.

5. 토양과 수중 β-CD의 첨가에 따른 미생물에 의한 벤젠의 분해경향

위의 연구결과를 토대로 물과 토양이 동시에 포함된 시스템에서 미생물의 벤젠분해에 β-CD가 미치는 영향을 살펴보았다. 이 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 그림에

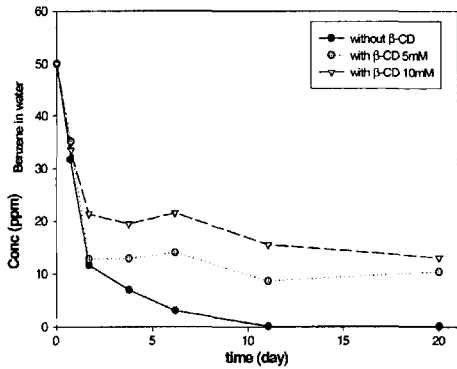


Fig. 5. Effect of β-CD on the biodegradation of benzene in water system.

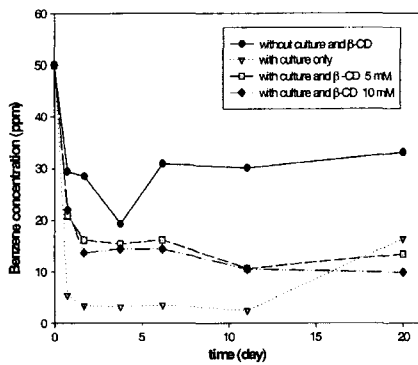


Fig. 6. Effect of β-CD on the biodegradation of benzene in water/soil system.

서 보듯이 먼저 미생물을 NaN₃ 멸균하고, β-CD도 첨가하지 않은 경우에는 평형에서 약 30 ppm의 벤젠이 물속에서 발견되었다. 이는 앞에서 발견한 바와 같은 결과로 40%의 벤젠이 토양에 흡착되어 존재함을 의미한다.

다음으로 β-CD를 주입하지 않고 NaN₃로 미생물을 멸균하지 않은 상태에서 미생물에 의한 벤젠의 제거율을 살펴본 결과, 반응 초기에는 물속에서의 벤젠의 농도가 급격히 감소됨을 볼 수 있었다. 이는 벤젠의 토양에서의 흡착과 생물학적인 분해의 이중반응으로 여겨진다. 그리하여 평형이 된 후 수중에는 약 10%정도의 벤젠만이 존재함을 알 수 있었다. 다음으로 β-CD를 5 mM과 10 mM을 주입한 상태에서 culture에 의한 벤젠의 수중에서의 분해율을 살펴본 결과 초기에는 역시 토양에 흡착으로 인하여 수중에서 벤젠의 농도가 급격히 감소하다가 시간이 지나면서 미생물에 의하여 분해가 진행이 되어 감소하여 약 10에서 15%정도의 벤젠만이 남아 있게 되었다. 그리고 수중에 남아있는 벤젠의 양은 넣어준 β-CD의 양에 좌우되지 않았다. 이 결과를 종합하여 보면 각 조건에서 반응초기에는 약 40% 정도의 벤젠이 먼저 토양에 흡착되고 나머지 수중에 존재하는 벤젠이 미생물에 의해 분해되는데 분해되는 경향은 β-CD를 주입한 경우에는 오히려 수중의 벤젠의 농도가 높음을 알 수 있다. 따라서 미생물의 분해가 β-CD가 없는 상태에서 더 효과적임을 알 수 있다.

IV. 결 론

벤젠을 대상으로 하여 계면활성제의 하나인 β-CD를 적용하여 물과 토양에서의 기초적인 결합특성을 구명하고, β-CD의 첨가에 따른 물 또는 물과 토양에서 미생물에 의한 생물학적 분해에 대한 결과는 다음과 같다.

1. 물과 토양에서 β-CD과 벤젠의 결합특성을 관찰한 결과 물에서는 50 ppm 벤젠의 농도 중 약 45%정도의 벤젠이 10 mM의 β-CD와 결합하였다.
2. β-CD의 농도를 0, 0.5, 1, 5, 10 mM 변화시켜 물에서 벤젠의 농도변화를 관찰한 결과, β-CD가 1 mM까지는 β-CD에 흡착되는 벤젠의 비율은 30~40%까지 급격히 증가하다가 평형에 도달하였다. 이처럼 β-CD는 저 농도에서도 벤젠과 결합반응이 활발하였으며, 벤젠과 β-CD간의 complex경향은 Freundlich isotherm에 잘 부합하였다.
3. 수중에서 β-CD의 첨가에 따른 미생물에 의한 벤젠의 분해경향은 β-CD를 첨가한 경우의 분해율이 β-

CD를 주입하지 않은 실험조건에서의 분해율보다 약간 낮았다. 또한 토양과 물이 공존하는 시스템에서 벤젠의 분해에 있어 토양 중에 흡착된 벤젠과 같은 소수성 유기물을 생물학적으로 처리시 β -CD의 첨가 역시 벤젠의 분해를 감소시켰다.

위의 실험을 통하여 지하수나 토양에 오염된 벤젠과 같은 소수성 유기물질의 추출에는 β -CD가 매우 효율적인 매체임을 확인하였으나, 생물학적 분해에는 별로 효과적이지 못함을 알 수 있었다. 이는 벤젠 이외에 계면활성제로 사용한 β -CD가 직접 미생물의 탄소원으로 사용됨으로써 나타나는 현상으로 여겨진다. 따라서 먼저 토양에 존재하는 벤젠의 bioavailability를 β -CD를 이용하여 높이고 이를 *ex situ* 처리방법을 통하여 물리학적이나 화학적인 처리방법을 적용하는 것이 효과적이라 판단된다.

참고문헌

- Galli, E. : Evolution of new degradative pathways in microorganism of environmental interest, biotechnology for soil remediation : scientific bases and practical applications. R. Serra. C.I.P.A. S.r.l., Milan, Italy, 67-80, 1998.
- De Jonge, H. Freijer, J. I. and Verstraten, J. M. : Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environmental Science & Technology*, **31**, 81-98, 1997.
- Bender, M. L. and Komiyama, M. : Cyclodextrin chemistry. Springer-Verlag, 2-9, 1978.
- Bouwer, E. J. : Biotreatment of PAH contaminant soils/sediments. Annals of the New York Academy of Sciences, **829**, 103-117, 1997.
- Bresseau, M. L. : The impact of physical, chemical and biological factors on biodegradation implications for in situ bioremediation in biotechnology for soil remediation. scientific bases and practical applications, R. Serra. C.I.P.A. S.r.l., Milan, Italy, 81-98, 1998.
- Mark, L., B. Wang, and X. Hu, Q. : Enhanced transport of low-polarity organic compounds through soil by cyclodextrins. *Environmental Science & Technology*, **28**, 952-956, 1994.
- Bresseau, M. L., Miller, R. M. and Zhang, Y. : Biosurfactant and cosolvent-enhanced remediation of contaminated media. *ACS Symposium Series*, **594**, 82-94, 1995.
- Bai, G., Brusseau, M. L. and Miller, R. M. : Biosurfactant enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. *Journal of Contaminant Hydrology*, **25**, 157-170, 1997.
- Barkay, T., Navon-Venezia, S., Ron, E. Z. and Rosenberg, E. : Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the biomulsifier alasan. *Applied & Environmental Microbiology*, **63**(4), 401-409, 1997.
- Szejtli, J. : Cyclodextrin technology. Kluter Academic Publishes, 1st Ed., 1-66, 1988.
- Holliger, C. and Gaspard, S. : Contaminated environments in the subsurface and bioremediation: organic contaminants. *FEMS Microbiology Reviews*, **20**(3-4), 517-523, 1997.
- Guerin, T. F. : Bioremediation of phenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in creosotes contaminated soil using *ex situ* land treatment. *Journal of Hazardous Materials*, **65**(3), 305-315, 1999.
- Bauchop, T. : The Growth of microorganism in relation to their energy supply. *Journal of Gene and Microbiology*, **23**, 457-460, 1960.
- US EPA. : Volatile organic compounds in soils and other solid matrices using equilibrium headspace analysis. SW-846 EPA method 5021, revision 0, december 1996.
- Yoshihiro, S. and Kazunobu, Y. : Determination of stability constants of benzene and alkylbenzenes with α -cyclodextrins by static head-space gas chromatography. *Bulletin of Chemistry and Pharmacology*, **45**, 1711-1713, 1997.
- Brain, J., Jonna, R., Stoke, D. and Kevin, C. : Non-exhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAHs bioability. *Environmental Science and Technology*, **34**, 3174-3179, 2000.
- Tamara, W. Sheremata. and Hawari, J. : Cyclodextrins for desorption and solubilization of 2,4,6-trinitrotoluene and its metabolite from soil. *Environmental Science & Technology*, **34**, 3462-3468, 2000.
- Wang, X. and Mark, L. B. : Solubilization of some low-polarity organic compounds by hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *Environmental Science & Technology*, **27**, 2821-2825, 1993.
- Bardi, L., Mattei, A., Steffan, S. and Marzona, M. : Hydrocarbon degradation by soil microbial population β -cyclodextrin as surfactant to enhanced bioavailability. *Enzyme and Microbial Technology*, **27**, 709-713, 2000.
- Nazaroff, W., W. Alvarez-Cohen, L. : Environmental engineering science, 1st Ed., John Wiley & Sons, Inc., Chapter 3, 76-158, 2001.