

BTEX 분해미생물의 순수분리와 혼합 배양에 따른 기질 분해율 및 미생물 성장률 변화에 관한 연구

정경미^{*,**} · 이상협^{*,†} · 이한웅^{*} · 홍석원^{*,***} · 김영오^{****} · 최용수^{*} · 유명진^{**}

^{*}한국과학기술연구원 환경공정연구부 수질환경 및 복원연구센터

^{**}서울시립대학교 도시과학대학 환경공학부

^{***}서울대학교 지구환경시스템공학부

^{****}삼창기업(주) 부설연구소

A Study on Isolation of BTEX Degrading Microorganism and Variation of BTEX Removal Efficiency and Microorganism Growth Rate According to Co-Culture

Kyung-mi Chung^{*,**} · Sang-hyup Lee^{*,†} · Han-woong Lee^{*} · Seok-won Hong^{*,***}

Young-o Kim^{****} · Yong-su Choi^{*} · Myong-jin Yu^{**}

^{*}Water Environment and Remediation Research Center, Environment & Process Technology Division, Korea Institute of Science and Technology

^{**}Faculty of Environmental Engineering, The University of Seoul

^{***}School of Global, Urban & Geosystem Engineering, Seoul National University

^{****}R&D Center, Samchang Co., Ltd.

(Received 25 February 2005, Accepted 11 April 2005)

Abstract

The isolated microorganisms, *Pseudomonas stutzeri*, *Raoultella planticola* (*Klebsiella*), *Serratia fonticola* from petroleum contaminated soil were enriched on benzene, toluene, ethylbenzene, *o*-xylene as carbon and energy sources, respectively. And the degradation characteristics of BTEX was observed in the mixed BTEX substrates. We found that the BTEX in mixed substrates were degraded more than 50% by three isolated microorganisms. Among three isolated microorganisms, the highest degradation rate was observed in *Pseudomonas stutzeri*, but the degradation rate was different according to microorganisms. In order to increase the degradation efficiency, we applied the co-culture of isolated three microorganisms. The mixture rate of *pseudomonas stutzeri* : *Raoultella planticola* (*Klebsiella*) : *Serratia fonticola* was follows ; 1:2:1, 1:1:2, and 2:1:1, respectively. In two co-culture of 1:2:1 and 1:1:2, degradation rate was lower than isolated microorganisms. However, degradation rate became higher than isolated microorganisms and the degradation rate of benzene, toluene, and ethylene was more than 95% in co-culture of 2:1:1. The degradation rate increased through the co-culture of isolated microorganisms, however, the growth rate decreased. This was resulted from the *substrate competition* between microorganisms. The co-culture of microorganisms is a effective method to increase the degradation efficiency of BTEX and the co-culture mixing rate is a important factor for determination of degradation efficiency.

keywords : Co-culture, Mixed substrate, benzene, toluene, ethylbenzene, *o*-, *m*-, *p*-xylene (BTEX), Co-culture mixing rate

1. 서론

Petroleum의 80% 이상을 차지하고 있는 BTEX(benzene, toluene, ethylbenzene, *o*-, *m*-, *p*-xylene)는 산업화로 인한 화학 공업의 발달과 함께 다양한 형태로 이용되고 있으며 사용량도 증가하고 있다. 이로 인해 전 세계적으로 유류저장탱크의 부식과 손상으로 인한 누출로 토양 및 지하수의 오염문제가 대두되고 있으며 이에 따른 연구가 활발히 진행되고 있는 실정이다. 미국의 경우 160 만개 이상의 지하유류저장 시설이 있으며 이들 중 약 20%가 누출되는 것으

로 알려져 있다(Shim et al., 2002). 우리나라의 경우도 산업화가 가속화됨에 따라 지하유류탱크에 의한 지하수, 토양 오염이 우려되고 있는 실정이다. BTEX는 잠재적 발암물질로 분류되고 있으며 미국 환경청(EPA)에서는 우선적으로 처리되어야 할 주요 오염물질로 분류되어 있다(이 등, 1998). 지하 환경에서 유류탄화수소인 BTEX는 대수층에서 NAPLs(Non- Aqueous Phase Liquids) 상태로 존재하여 지하토양에 흡착되는 성질이 있지만 휘발성도 비교적 높아 물리, 화학적 처리와 생물학적 분해가 비교적 가능하다(라 등, 2000; Juck et al., 2000). 반면 물질 특성상 휘발이 크긴 하지만 다른 탄화수소에 비해 용해도가 높기 때문에 자연계로 유출되었을 때에는 쉽게 토양과 수계를 오염시킬

[†] To whom correspondence should be addressed.
yisanghyup@kist.re.kr

수 있다(Smith, 1990). 유류탄화수소의 In-Situ 처리방식 중 물리화학적 방법을 이용한 호기성 생분해가 효과적이지만, 전형적으로 탄화수소로 오염된 지하수는 미생물의 호흡으로 인하여 용존 산소는 매우 낮고, 지하수내 산소의 주입 또한 산소의 낮은 용해도 특성으로 인해 경제적이 못하다. BTEX는 호기성 및 혐기성, 무산소 조건에서 생물학적으로 어렵지 않게 분해 될 수 있다(Pedro et al., 1991). 그러나 오염지역의 특성에 따라서 BTEX의 분해 특성, 분해 경로 및 분해정도 등이 달라질 수 있다. 더구나 유류오염 지역은 유류성분이 복합적으로 존재함으로 생물학적 공정에 의한 처리 시, 이들 물질들의 상호 분해 특성은 중요하다(Rainer et al., 2004) 최근 연구에서 산소의 부제로 생분해가 제한될 경우 NO_3^- , Fe^+ , SO_4^{2-} , CO_2 같은 전자수용체가 미생물에 의해 이용되고 있음이 알려져 있다(오 등, 2003). 특히, 질산염은 토양에 널리 존재하며 산소 다음으로 우수한 전자수용체로써 탈질산화 공정을 통한 유기화합물의 혐기성 생분해 에너지를 공급한다(Rainer et al., 2004). 그러나 이들은 환경적으로 볼 때 부영양화를 유발하는 문제점도 있다. BTEX를 수계와 토양에서 제거하기 위한 방법인 bioremediation은 여러 연구자들에 의해 오랜 기간 동안 연구되고 있으며(Prenafata-Boldu et al., 2002), 유류에 의한 오염된 환경에서 생존하는 미생물의 분포에 대한 연구도 활발히 진행되어 왔다(Shinoda et al., 2004). 그러나 지금까지의 연구는 단일 미생물에 대하여 단일 탄소원으로 benzene, toluene, ethylbenzene과 *o*-xylene을 첨가한 후 이들 물질의 대사과정, 분해정도 그리고 미생물의 분포 변화 연구에 집중되어 왔다(Zwolinski et al., 1999). 따라서 본 연구에서는 전자 수용체로 NO_3^- -N을 이용하고, BTEX 4 가지 물질이 혼합되어 있는 무산소 조건 시스템을 대상으로 미생물 분포, 분해 효율 등을 관찰함과 동시에 분해 효율 향상을 위한 한 가지 방법으로 분리 미생물의 혼합 배양을 통한 BTEX 분해 효율 향상을 도모하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 시료채취

BTEX 분해 미생물을 분리하기 위해 사용한 시료는 경기도 S공단으로부터 S호로 유입되는 하천의 저질을 사용하였으며, 저질내 성분 분석 결과 Table 1과 같이 TCE, BTEX 그리고 PCBs가 주요 물질로 검출되었다.

2.2. 배양조건

토양 시료채취 후 토양과 methylene chloride를 1 : 1의 비율로 혼합한 후 120 rpm에서 12시간 동안 현탁 한 후 상정액을 취하여 methylene chloride로 희석하였다. 미생물

Table 2. Modified M9 medium

Materials	Dosage(g/L)
Na_2HPO_4	6
KH_2PO_4	3
NaCl	0.5
NH_4Cl	1
MgSO_4	0.5
CaCl_2	0.015
KNO_3	0.5
bacto agar	20

배양 및 배양조건은 미생물이 포함된 토양시료를 0.9% NaCl이 첨가된 phosphate buffer에 첨가한 후 희석하였으며, 준비된 배지(토양시료 + bacto agar)에 도달하여 30°C 조건의 배양기에서 5일 동안 배양한 후 배지에 형성된 균락수를 측정하였고, BTEX를 탄소원으로 하고 NO_3^- -N를 electron acceptor로 사용하는 탈질 미생물을 순수 분리하여 modified M9배지(Table 2)에서 미생물의 증식여부를 확인하였다. 이때 modified M9 배지에 단일 탄소원으로 사용한 BTEX 농도는 각각 50 mg/L이었으며, 탈질반응을 알아보기 위한 NO_3^- -N의 혼합 농도는 85 mg/L이었다. 또한, 일정 시간 마다 미생물들의 OD_{600} (optical density)를 측정하여 혼합 미생물의 성장을 관찰하여 이들이 일정한 세포 성장을 보이는지 알아보았다.

2.3. 실험 방법

2.3.1. DNA 추출 및 PCR 방법

Modified M9배지에서 선별된 미생물은 NB(Nutrient broth, Difco Co.)배지에서 하루 동안 배양한 후 Microbial DNA isolation kit(Mo Bio Laboratories Inc., Solana Beach, Calif)를 사용하여 미생물의 genomic DNA를 추출하였고, Table 3에 나타난 바와 같이 추출한 genomic DNA를 주형으로 중합연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위해 사용한 primer (TAKARA, Japan)는 5'-GATTTGGATCCTGG CTCAG-3' (27F), 5'-AAGGAGGGATCCAGCC-3' (1492R)이었다. 첫

Table 3. PCR reaction materials

Materials	Dosage
6 mM MgCl_2	3 μL
5 mM deoxynucleoside triphosphate	2 μL
20 pmol primer 27F	1 μL
20 pmol primer 1492R	1 μL
DNA template	1 μL
Ex taq (Takara)	0.5 μL
Autoclaved water (D.W)	6.5 μL

Table 1. Analyzed compounds of sediment

	TCE	Benzene	Toluene	Ethylbenzene	Xylene	PCBs
sediment(mg/kg)	1.1		22.4	23.6	34.4	≤ 0.1
supernatant(mg/L)	0.07	≤ 0.01	1.34	0.74	1.04	≤ 0.01

번째 반응은 94°C에서 4분, 다음 각 단계에서는 94°C 1분, 57°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초 동안 16S rDNA를 증폭하는 반응을 30번 반복하였고, 마지막으로 72°C에서 10분 동안 16S rDNA를 증폭한 후 4°C에서 chilling하였다. PCR 증폭산물은 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, Cat. No. 28106)를 사용하여 정제하였으며, 16S rDNA 염기서열을 분석하기 위하여 정제한 PCR 산물을 주형으로 다시 DNA Sequencing Kit(ABI prism, Part No. 4303152)를 사용하였고, 27F와 1492R을 염기서열 primer로 사용하여 얻은 PCR 산물을 MegaBACE 1000(Amersham Biosciences, USA)염기서열 분석기계를 사용하여 분석하였다.

2.3.2. BTEX 분석

BTEX 분해 효율 및 성장률 측정을 위한 실험을 위하여 앞에서 분리한 미생물을 Serum bottle에 주입하고 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 닫았다. 혼합 미생물에 의한 채취한 시료로부터 BTEX의 측정은 15,000 rpm에서 원심 분리한 후 상정액을 30 m × 0.32 mm × 2.25 μm, 5% phenylmethylsiloxane capillary column이 장착된 GC 분석기(LSC 2000; Tekmar)를 사용하여, Standard Methods(APHA, 1998)에 의해 실험하였다. 초기 농도를 200 mg/L를 주입했음에도 불구하고 분해율 계산 시, 초기 농도가 모두 60 mg/L 이하의 농도가 측정되었다. 이는 BTEX 휘발 특성으로 인해 수중에 200 mg/L를 주입해도 serum bottle의 head space 중으로 휘발되기 때문에 판단된다. 본 실험에서는 이와 같은 BTEX 강한 휘발특성을 고려하여 200 mg/L를 주입 후, 정확한 제거율 계산을 위한 농도는 BTEX 혼합액의 주입 직후의 액상에서의 농도와 배양 후, 액상에서의 농도를 측정하여 계산하였다. 본 논문에서 분리된 미생물의 탈질반응과 BTEX 분해 효율을 관찰하기 위하여 비교 시료로 control 시료를 제조하여 사용하였다. Control 시료에는 미생물을 주입하지 않고 BTEX와 NO₃-N만을 주입한 상태에서 동일한 방법으로 실험을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물 동종 분리

미생물들의 동정은 16S rDNA 염기서열 분석결과를 BLAST search(<http://www.ncbi.nih.gov>)를 사용하여 수행하였으며(Fig. 1), 미생물의 Phylogenetic tree는 phydit soft-

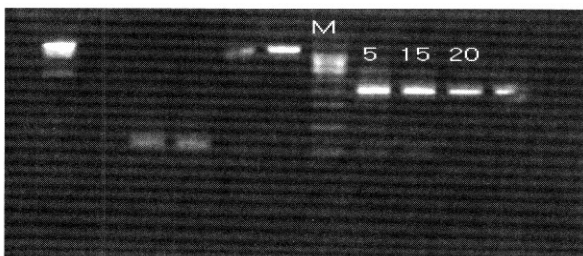


Fig. 1. 16s rDNA of isolated microorganisms.

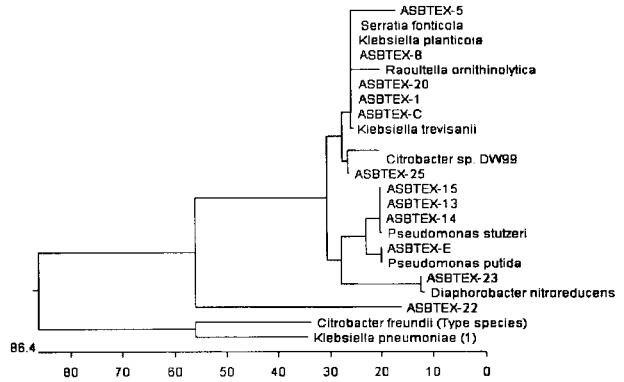


Fig. 2. Phylogenetic tree of isolated microorganisms.

ware를 사용하여 작성하였다(Fig. 2). 이로써 분리한 미생물이 어떤 종에 속하는지 알아낼 수 있었으며, 유사한 성질의 미생물 그룹화가 가능하였다.

BTEX에 의해 오염된 공업단지 하천저질로부터 탈질반응과 BTEX를 동시에 분해하는 40개의 미생물을 순수분리 및 그룹화하였으며, 이 가운데 BTEX 분해 및 탈질반응이 동시에 효율적으로 발생하는 미생물(ASBTEX-DB2, ASBTEX-DB5, ASBTEX-DB9, ASBTEX-DB13, ASBTEX-DB14, ASBTEX-DB15)을 분리하였다. ASBTEX-DB는 이하 ASBTEX로 칭한다. Fig. 2의 Phylogenetic tree에는 표기되어 있지 않으나 ASBTEX-DB20도 분리하였다. 분리된 미생물 중 가운데 본 실험에서는 ASBTEX-DB5, ASBTEX-DB15 그리고 ASBTEX-DB20의 3종의 미생물을 사용하여 실험을 수행하였다.

분리된 3종 미생물의 Phylogenetic tree 분석 결과, 유전자 상동 관계가 97% 이상인 종은 ASBTEX-5는 *Serratia fonticola*, ASBTEX-15는 *Pseudomonas stutzeri*, ASBTEX-20은 *Raoultella planticola*(*Klebsiella*)임을 알 수 있었다. *Klebsiella*는 Fig. 2의 Phylogenetic tree에는 표기되어 있지 않으나 *Raoultella planticola*와 같은 종으로 알려져 있어 (<http://www.ncbi.nih.gov>) *Serratia fonticola*, *Klebsiella*, *Pseudomonas stutzeri* 3종의 미생물을 BTEX 분해 실험을 적용하여 실험을 수행하였다.

3.2. 분리 미생물의 BTEX 분해

3.2.1. 단독 미생물에 의한 BTEX 분해 효율

Serum bottle에서 40시간 배양하여 순수 분리한 미생물은 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 총 BTEX 200mg/L 중 평균 78%의 제거율을 보였으며, 이때 NO₃-N 제거율은 Fig. 4에 나타낸 바와 같이 평균 75%로 나타났다. *Pseudomonas stutzeri*. strain ASBTEX-15는 BTEX 분해율 및 탈질율이 약 86% 수준을 보이는 높은 활성도를 가진 미생물로서, 분리한 미생물들 중 제거 효율이 가장 높았다.

3.2.2. 혼합 미생물에 의한 BTEX 분해 효율

BTEX 분해 효율 향상을 위한 방법으로 동종 분리된 3종의 미생물 혼합 배양을 적용해 보았다. 혼합 비율은 모두 부피 기준으로 결정하였으면 동일한 OD₆₀₀값의 조건에서

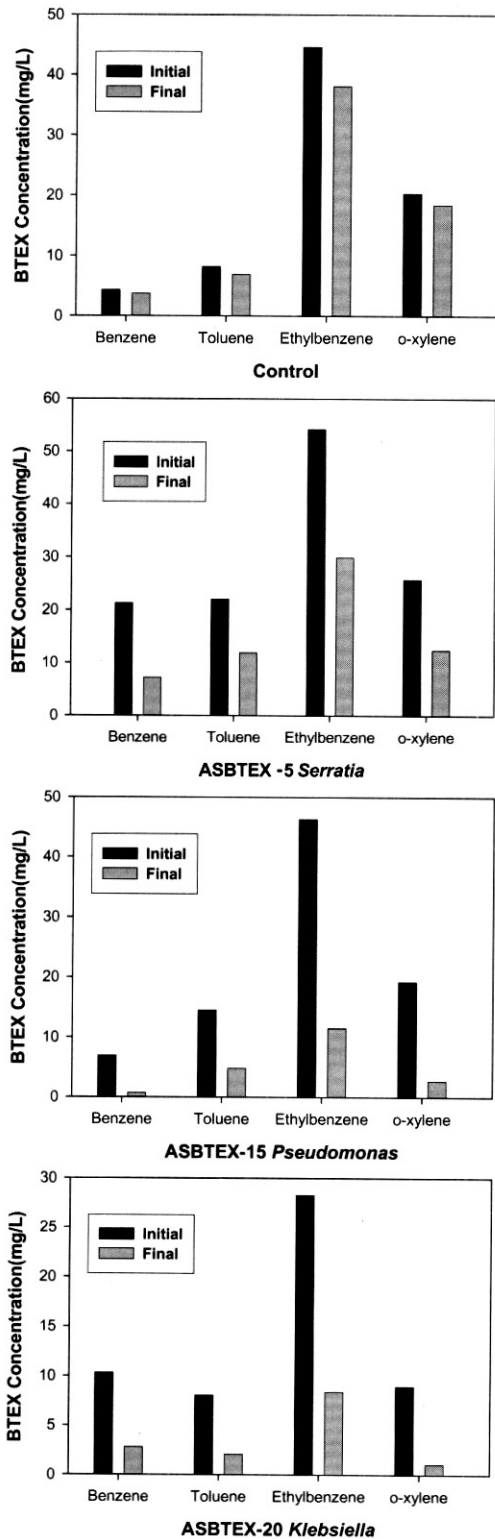


Fig. 3. Biodegradation of BTEX by the isolated microorganisms.

주입하였다. 혼합 비율 선정을 위하여 우선적으로 분리한 40개의 미생물 가운데 *Pseudomonas* 종이 약 50%를 차지하고 있었으며, *Pseudomonas stutzeri*. strain ASBTEx-15는 *Raoultella planticola*(*Klebsiella*). strain ASBTEx-20와 함께 BTEX 분해율도 높았으므로, 이를 통하여 혼합 배양 조건 선정 시, serum bottle에 *Pseudomonas stutzeri*. strain ASB-

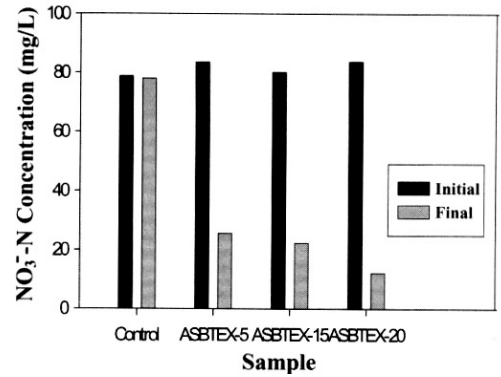


Fig. 4. Denitrification for each BTEX using the isolated microorganisms.

TEX-15, *Raoultella planticola*(*Klebsiella*). strain ASBTEx-20, *Serratia fonticola*. strain ASBTEx-5를 2:1:1을 기본 혼합 비율로 선정하여 배양을 행하였다. 비교 실험 위하여 1:2:1과 1:1:2의 2가지의 혼합 비율을 선정하여 실험을 수행하였다. 배양시간은 40시간으로 결정하였다. 그 결과, Fig. 5에 나타난 바와 같이 2:1:1 혼합 배양의 경우, Benzene, Toluene 그리고 Ethylbenzene의 경우 92%의 분해 효율로 단일 미생물 조건과 다른 혼합 배양 조건에 비하여 높은 분해 효율을 관찰할 수 있었다. 그러나 o-Xylene의 경우는 64%의 분해 효율로 다른 혼합 배양에 비해서는 높은 값이 관찰되었으나 단일 미생물에 비해서는 낮은 결과가 관찰되었다. 또한 NO₃-N의 분해율도 다른 혼합 배양 조건에 비하여 높은 효율이 관찰되었다(Fig. 6). 이로부터 2:1:1 혼합 배양의 경우가 다른 배양 조건보다 Benzene, Toluene 그리고 Ethylbenzene의 분해율이 향상되는 것을 관찰할 수 있었다. Table 4에 단일 배양 조건과 혼합 배양 조건에서의 BTEX 초기 농도와 반응 후, 농도를 및 질산성 질소 농도를 비교, 정리하여 나타내었다.

3.3. 미생물 세포 성장률과 BTEX 분해 관계

본 실험에서 분리된 3종의 미생물들의 성장률 관찰을 위하여 OD₆₀₀를 측정하였다(George Nakhla, 2003). 각 미생물의 특성에 따라 0.014~0.060정도로 고르게 분포 하였으며 시간에 따른 미생물 성장 곡선은 다음과 같다(Fig. 7). 사용된 모든 미생물은 고체 배지 상에서 빠르게 반응 하는 것들을 분리 하였으므로 이들의 액상 반응 역시 빠른 성장률이 관찰되었다. 앞서 단일 미생물의 BTEX 분해 실험에서 *Pseudomonas stutzeri*. strain ASBTEx-15가 가장 높은 분해율이 관찰된 것처럼 세포 성장률 결과에서도 *Pseudomonas stutzeri*. strain ASBTEx-15가 가장 높은 성장률이 관찰되었다. 즉 성장률이 빠른 종일수록 BTEX 분해율도 빠르다는 것을 알 수 있었다. 그러나 co-culture의 경우 단일 미생물보다 낮은 세포 성장률의 결과가 관찰되었다. 즉 BTEX 분해율에 있어서는 co-culture가 높은 값이 관찰되었으나 세포 성장률의 경우에는 단일 미생물 경우가 높은 값이 관찰되었다. 이로부터 미생물의 혼합 배양으로 인해 혼합된 미생물들 사이의 기질 경쟁 작용이 있을 것으로 사료된다.

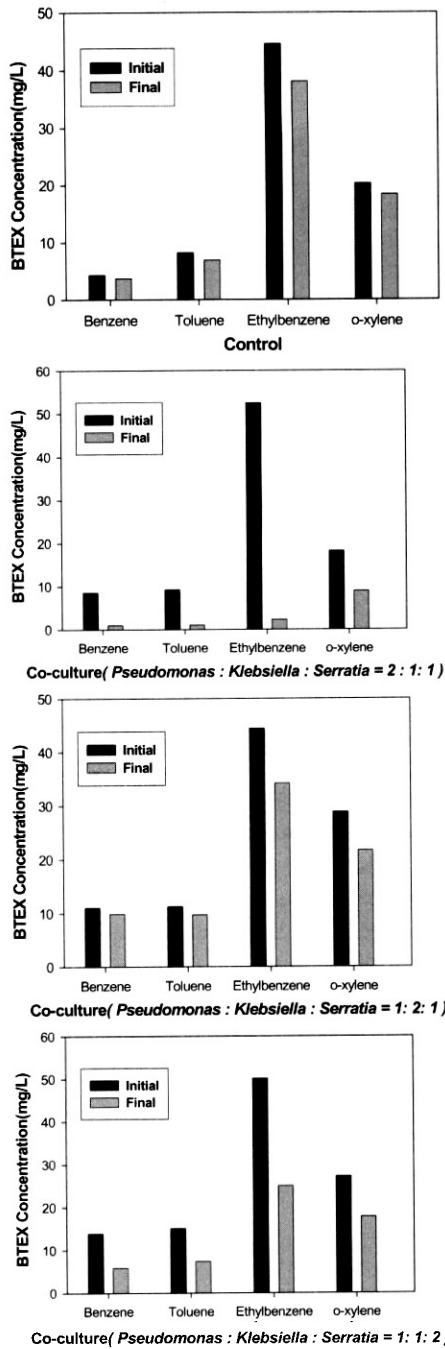


Fig. 5. Biodegradation of BTEX by the co-culture.

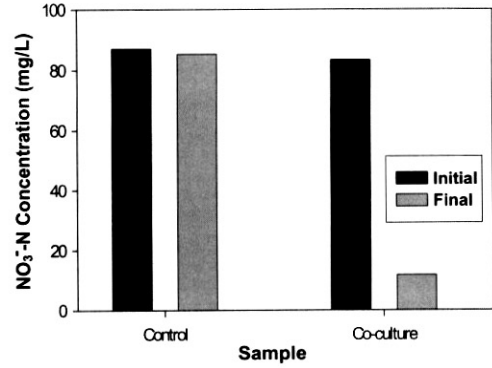


Fig. 6. Denitrification by the mixed culture (*Pseudomonas* : *Klebsiella* : *Serratia* = 2:1:1) using denitrifying bacteria.

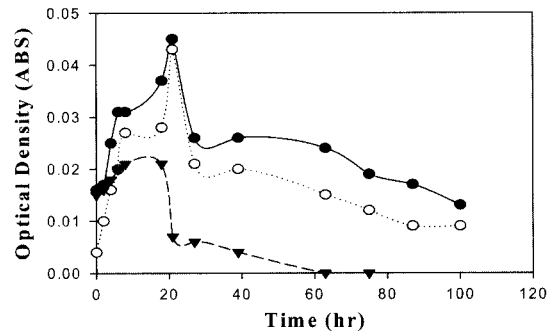


Fig. 7. Growth of isolated microorganisms.
 ● ASBTEX-5 (*Serratia fonticola*),
 ○ ASBTEX-15 (*Pseudomonas stutzeri*)
 ▼ ASBTEX-20 (*Klebsiella*)

4. 결론 및 고찰

BTEX에 오염된 하천 저질에 생존하는 BTEX 분해 미생물의 분포를 조사하여 탈질반응에 의한 질산성 질소의 제거 및 BTEX를 동시에 분해하는 *Pseudomonas stutzeri*. strain ASBTEX-15, *Raoultellaplanticola*(*Klebsiella*). strain ASBTEX-20, *Serratia fonticola*. strain ASBTEX-5 3종의 미생물을 분리 동정한 결과, BTEX 혼합 기질에 대해 *Pseudomonas stutzeri*. strain ASBTEX-15가 다른 2종에 비하여 높은 분해 효율을 나타내었다. 또한 BTEX 분해 효율 향상을 위한 방안으로 미생물 혼합 배양을 통한 분해 효율

Table 4. Concentration of BTEX and NO_3^- -N in batch test (mg/L)

Microorganism	Benzene		Toluene		Ethylbenzene		o-xylene		NO_3^- -N	
	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final	Initial	Final
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	6.9	0.70	14.51	4.8	46.29	11.5	19.25	2.7	80.1	22.3
<i>Klebsiella</i>	10.32	2.8	8.06	2.07	28.3	8.41	8.95	1.07	83.75	12.15
<i>Serratia fonticola</i>	21.26	7.2	22.0	11.9	54.2	29.9	25.74	12.4	83.55	25.5
Co-culture (P:K:S=1:2:1)	11.05	9.87	11.28	9.73	44.38	34.18	28.90	21.68	82.67	20.5
Co-culture (P:K:S=1:1:2)	13.86	5.89	15.07	7.37	50.14	24.99	27.22	17.77	84.52	11.26
Co-culture (P:K:S=2:1:1)	8.53	0.96	9.21	0.98	52.46	2.3	18.18	8.92	83.35	2.33

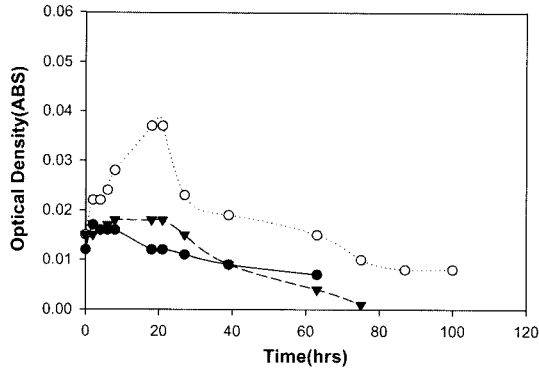


Fig. 8. Growth of co-culture.

- Co-culture(*Pseudomonas*:*Klebsiella*:*Serratia*=2:1:1)
- ▼ Co-culture(*Pseudomonas*:*Klebsiella*:*Serratia*=1:2:1)
- Co-culture(*Pseudomonas*:*Klebsiella*:*Serratia*=1:1:2)

변화는 단일 미생물에 의한 제거보다 각각 분리된 미생물을 혼합 배양시킴으로써 BTEX 분해율 및 탈질율을 향상시킬 수 있었다.

그리고 혼합 비율 변화에 따른 분해율 관찰을 위하여 3가지 혼합 비율 실험을 수행한 결과, *Pseudomonas*:*Raoultellaplanticola*(*Klebsiella*):*Serratia* = 2:1:1의 조건에서 가장 높은 분해 효율을 관찰할 수 있었다. 이는 주어진 환경조건에서 BTEX의 분해율 및 탈질율을 상승시키기 위해서는 단일 미생물보다는 동종 분리된 미생물의 혼합 배양이 효과적인 방법임을 알 수 있었고 혼합 배양에 있어서는 미생물의 혼합 비율이 중요 인자임을 알 수 있었다. 또한, 단일 배양 조건과 혼합 배양 조건에서 OD₆₀₀값을 측정하였을 때, 단일 및 혼합 배양 조건 모두 성장률은 BTEX 분해율과 비례하여 높은 분해율의 단일 미생물 및 혼합 배양 비율 조건에서 가장 높은 미생물 성장률이 관찰되었다. 그러나 혼합 배양을 함으로써 BTEX 분해율은 *Pseudomonas*:*Raoultellaplanticola*(*Klebsiella*):*Serratia* = 2:1:1의 조건에서 단일 배양 조건에 비하여 향상되었지만 성장률은 감소되는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 혼합 미생물 배양 조건에서 미생물 간에 기질 경쟁에 의해 발생된 원인으로 판단되었다.

참고문헌

라현주, 장순웅, 이시진, 토양미생물을 이용한 Benzene, Toluene, Ethylbenzene 그리고 Xylene isomers(BTEX)의 분해시 기질반응, *대한환경공학회지*, **22**(2), pp. 375-383 (2000).

오인석, 이시진, 장순웅, A Laboratory Study on Petroleum hydrocarbons Biodegradation under Aerobic and Denitrifying Conditions, *대한환경공학회 추계학술연구발표회 논문집* (2003).

이승우, 이준명, 장덕진, *Pseudomonas putida* F1과 *Burkholderia cepacia* G4에 의한 BTEX, trichloroethylene의 분해, *한국생물공학회지*, **13**(5), pp. 561-568 (1998).

Shim, H. J., Shin, E. B. and Yang, S. T., A Continuous Fibrous-bed Bioreactor for BTEX Biodegradation by a Co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*, *Advances in Environmental Research*, **7**, pp. 203-216 (2002).

APHA, AWWA, WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th Edition, APHA, Washington D.C., USA (1998).

George, Biokinetic Modeling of in Situ Bioremediation of BTX Compounds-impact of Process Variables and Scaleup Implications, *water research*, **37**, pp. 1296-1307 (2003).

Juck, D.T., Charles, L. G. and Whyte, C. W., Polyphasic Microbial Community Analysis of Petroleum Hydrocarbon-contaminated Soils from two Northern Canadian Communities, *FEMS microbiology ecology*, **33**, pp. 241-249, (2000).

Pedro, J. J. A. and Timothy, M., Substrate Interaction of BTEX during Microbial Degradation by Pure Cultures and Mixed Culture Aquifer Slurries, *American Society for Microbiology*, **57**(10), pp. 2981-2985 (1991).

Prenafeta-Boldu, F. X., Vervoort, J. J., Grotenhuis, T. C. and Van Groenestijn, J. W., Substrate Interaction during the Biodegradation of BTEX Hydrocarbons by the Fungus *Cladophialophora* sp. Strain T1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(6), pp. 2660-2665 (2002).

Rainer, U. M., Rolf, J. W. and Wolfgang, S., Inhibition of Anaerobic Microbial o-xylene Degradation by Toluene in Sulfidogenic Sediment Columns and Pure Cultures, *FEMS Microbiology Ecology*, **47**, pp. 381-386 (2004).

Shinoda, Y., Sakai, Y., Uenishi, H., Uchihashi, Y., Hiraishi, A., Yukawa, H., Yurimoto, H. and Nobuo K., Aerobic and Anaerobic Toluene Degradation by a Newly Isolated Denitrifying Bacterium, *Thauera* sp. Strain DNT-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, pp. 1385-1392 (2004).

Smith, R. K., The Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons by Bacteria, *Biodegradation.*, **1**(4), pp. 191-206 (1990).

Zwolinski, M. D. Y. S. H., Schreiber, M. E., Bahr, J. M., Sewell, G. W. and Hickey, W. J., Molecular Analysis of Microbial Community Structures in Pristine and Contaminated Aquifers Field and Laboratory Microcosm Experiments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**(5), pp. 2143-2150 (1999).