

## Yeast에 의한 휘발성 유기화합물 분해에 있어서의 기질상호관계 해석 Substrate Interactions in the Biodegradation of Volatile Organic Compounds by a Yeast Strain

장현섭<sup>1</sup> · 정미영<sup>1</sup> · 신승규<sup>2</sup> · 송지현<sup>2</sup> · 황선진<sup>1\*</sup>

Hyun Sup Jang<sup>1</sup> · MI Young Jeong<sup>1</sup> · Shoung Kyu Shin<sup>2</sup> · Ji Hyeon Song<sup>2</sup> · Sun Jin Hwang<sup>1\*</sup>

1 경희대학교 환경응용화학대학 및 환경연구센터, 2 세종대학교 토목환경공학과

(2007년 11월 22일 논문 접수 ; 12월 6일 최종수정논문 채택)

### Abstract

Biological removal capacities for volatile organic compounds (VOCs) were determined using a yeast strain, *Candida tropicalis*. In this study, VOCs including toluene, benzene, p-xylene, and styrene as single substrates or mixtures were tested in the batch culture of the yeast strain. In addition, a kinetic model was applied to evaluate substrate interactions between the VOCs. The yeast strain was able to biodegrade each VOC effectively as a growth substrate, implying it could be applied to a wide range of VOCs. When the yeast strain was subjected to VOCs in mixtures, the biodegradation rate of one substrate was either increased (stimulated) or decreased (inhibited) by the presence of the others. Both benzene and toluene were inhibited by the other VOCs, and substrate interaction parameters estimated in the model indicated that styrene was the strongest inhibitor for the benzene and toluene biodegradation. Meanwhile, the biodegradation of p-xylene and styrene was stimulated by the presence of either benzene or toluene. The biodegradation rate of p-xylene was significantly increased especially by the presence of toluene, and the styrene biodegradation was enhanced greatly by the benzene addition. The results of the substrate interaction by the yeast strain suggest that the biodegradation rates for the VOCs in mixtures should be carefully evaluated. Furthermore, the competitive inhibition coefficient could be applied as a useful index to determine the substrate interaction.

**Key words :** Yeast, VOCs, substrate interaction, competitive inhibition, stimulation

**주 제 어 :** 이스트, 휘발성 유기화합물, 기질상호작용, 경쟁적 저해, 촉진

### 1. 서론

하수관로 또는 하폐수처리장에 휘발성 유기화합물 (volatile organic compounds, VOCs)이 유입되면 다양한

운영상의 문제점이 발생하며 악취를 유발한다. 특히 화학공장 등의 산업폐수 처리시설에서 발생하는 악취 민원이 매년 증가하고 있어 하폐수에 함유된 VOCs를 효과적으로 저감하기 위한 방안의 적용이 요구되고 있다. VOCs를 제거하기

\*Corresponding author Tel : +82-31-201-2497, FAX : +82-31-203-4589, E-mail : sjhwang@knu.ac.kr (Hwang, S.J.)

위한 방법으로 활성탄 흡착이나 고도산화법이 적용될 수 있으나, 최근에는 경제적이면서도 처리효율이 양호한 생물학적 시스템에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되고 있는 추세이다. 그러나 미생물을 이용한 VOCs 저감기술에 대한 대부분의 연구가 여러 환경요인에 민감하게 반응하는 bacteria를 대상으로 하고 있어 생물반응기의 처리효율을 향상시키는데 한계가 있는 실정이다. 또한 실제 산업현장에서 배출되는 VOCs는 여러 혼합물로 구성되어 있어 생물학적으로 처리할 경우 저해(inhibition), 경쟁(competition), 촉진(stimulation)과 같은 기질간의 상호작용이 발생하게 되는데(Oh 등, 1994), 이러한 특성을 반영한 연구도 bacteria를 중심으로 이루어지고 있다. Alvarez와 Vogel(1991)은 VOCs 혼합물을 대상으로 bacteria에 의한 기질간의 상호작용을 순수균주와 혼합균주로 나누어 평가하였는데, toluene은 benzene과 p-xylene의 분해를 촉진시키며, p-xylene은 toluene과 benzene의 분해를 지연시킨다고 보고하였다 이때 p-xylene은 공대사적인 분해특성을 나타낸다고 제안하였다.

또한 bacteria에 의한 BTEX의 분해능을 평가한 결과, ethylbenzene이 두 조건 모두에서 저해작용을 일으킨다는 보고가 있었다. (Deeb 등, 1998; Yadav 등, 1993)

Acangeli와 Arvin(1997)은 toluene-oxidizing bacteria에 의한 TCE의 공대사적인 분해에 관하여 연구하여, toluene은 TCE의 분해를 촉진하지만 1 mg/L 이상의 고농도에서는 TCE의 분해를 저해한다고 보고하였다.

Bacteria에 의한 VOCs 혼합물의 분해결과를 정리해보면, 대상 미생물과 혼합기질의 종류 및 성상, 그리고 온도와 같은 반응조건에 따라 다양한 형태의 substrate interaction이 발생하므로 이들 결과들을 일반화시키는 것은 쉽지 않다.

따라서 VOCs 혼합물의 분해능이 우수한 bacteria를 분리 동정하고 분해능을 평가하는 것도 중요하지만 효모(yeast), 조류 등과 같은 미생물의 특성을 이용하는 것도 의미가 있다고 할 수 있다. 그러나 bacteria가 아닌 yeast를 이용하여 폐놀을 분해하는 연구(Jiang 등, 2005)와 같이 bacteria 이외의 미생물을 이용하여 VOCs를 분해하는 연구는 아직까지 활발하게 진행되지 못한 상황이다.

이에, 본 연구에서는 bacteria에 비해 각종 환경조건의 영향에 덜 민감한 yeast의 일종인 *C. tropicalis*를 대상균주로 하여 benzene, toluene, p-xylene, styrene의 분해특성을 단일기질 및 혼합기질의 관점에서 조사하였으며, 동력학적 모델을 이용하여 각 기질간의 저해상수를 도출함으로써 기질간의 상호작용에 관하여 평가하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1 대상 균주

대상균주는 한국중균협회에서 분양받은 *Candida tropicalis* KTCC 50075를 사용하였으며, 표준한천배지에 접종하여 계대 배양하였다.

### 2.2 VOC 분해능 평가

유일 탄소원으로 toluene을 첨가한 최소액체배지에 *C. tropicalis*를 접종하고, 30°C에서 180rpm으로 교반하며 배양하였다. 최소액체배지의 조성은 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4900 mg/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2000 mg/L; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2000 mg/L; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 340 mg/L; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 1.7 mg/L; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.4 mg/L; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.3 mg/L; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 2.4 mg/L; MnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2.4 mg/L; CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.2 mg/L; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 0.25 mg/L; yeast extract, 1 mg/L이었다. 1일이 경과된 후, 배양액을 원심분리(7,700g, 3분)한 후, 회수된 균체를 PBS로 2회 세척하였으며, 이렇게 얻어진 세균으로 VOCs (benzene, toluene, p-xylene, styrene)의 분해능을 평가하였다. 이때 균주의 농도는 분광광도계(X-ma 2000, Human Co. Korea)를 이용하여 0.2 OD<sub>600</sub>(optical density @600 nm)로 조절하였다. 이렇게 준비된 균주를 200 mL 배양병에 각각 50 ml씩 접종하고 밀봉하였다.

단일기질과 혼합기질의 분해능을 평가하기 위하여 조합 가능한 모든 조건(B, T, X, S, BT, BX, BS, TX, TS, XS)을 설정한 후, micro syringe를 사용하여 균주가 주입된 배양병에 총탄소의 농도가 0.2 mM이 되도록 주입하였다. 이렇게 제조된 시료들을 교반배양기(30°C, 180rpm)에 넣고 배양하면서 기상 VOCs의 농도를 FID가 장착된 가스크로마토그래피(M600D, Younglin Co., Korea)를 이용하여 측정하였다.

본 연구의 대상기질인 benzene, toluene, p-xylene, 그리고 styrene의 헨리상수와 기본적인 물성을 Table 1에 제시하였다. 기질로 주입된 기체상의 VOCs는 기액평형에 도달하고 액상에 존재하는 미생물에 의해 분해되는데, 본 연구에서는 편의상 기상농도의 변화를 측정하였으므로 식(1)을 이용하여 액상농도로 환산하여 생분해 특성을 비교하였다. 또한, 단일기질과 혼합기질의 분해특성을 평가하기 위해 생분해된 기질을 총탄소 기준으로도 비교하였다.

$$M = S_L V_L + S_G V_G = S_L V_L \left[ 1 + \left( \frac{H}{RT} \right) \left( \frac{V_G}{V_L} \right) \right] \quad (1)$$



**Table 1.** Chemical properties of the VOCs used in this study, Henry's law constants(H) at 30°C, liquid density and molecular weight

VOCs	H <sup>a)</sup> (atm/M)	liquid density (g/L)	m.w. (g/mol)
Benzene	5.6	0.879	78.1
Toluene	6.7	0.867	92.1
p-Xylene	6.3	0.861	106.1
Styrene	2.6	0.901	104.1

\* a) source: Rolf (1999)

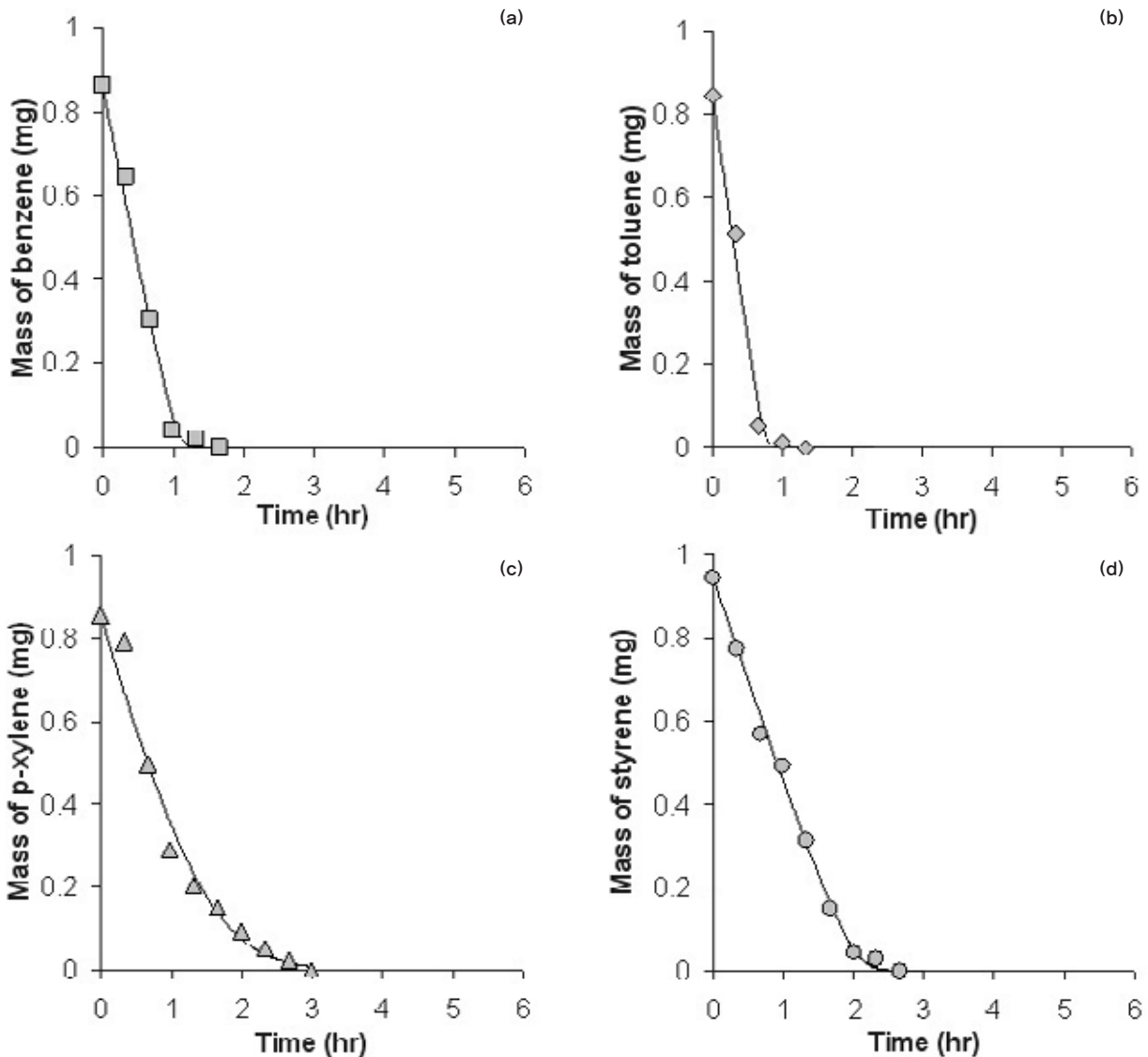
### 2.3. Model development

Toluene에 적응시킨 *C. tropicalis*의 단일 및 혼합 VOCs에 대한 분해특성을 동력학적으로 해석하기위해 본 연구에

**Table 2.** Single substrate biodegradation kinetic parameters for *C. tropicalis*

Individual substrate	$K'_s$ (mg/hr)	$K_m$ (mg/L)	$K'_s/K_m$
Benzene	17.58	0.60	29.30
Toluene	25.30	0.47	53.51
p-Xylene	16.48	4.07	4.05
Styrene	10.69	0.97	11.07

서는 Michaelis-Menten kinetics(Eq. (2))를 기본 모델로 선정하였으며, VOCs의 생분해 결과를 대상으로 기질 분해 속도(biodegradation rate)와 Michaelis 상수  $K_m$ (Half-saturation constant) 값을 Runge-Kutta 4<sup>th</sup> order method에 의한 비선형방정식으로 도출하였다.



**Fig. 2.** Degradation of individual substrates in combinations of benzene, toluene, p-xylene and styrene by *C. tropicalis*. (a) Benzene, (b) Toluene, (c) p-Xylene, (d) Styrene

이때 각 기질의 분해는 수 시간 만에 측정 한계치 이하의 농도로 분해가 완료되므로 단 시간 내의 미생물 농도의 변화는 미미하다고 판단하여 Eq.(3)과 같이 상수  $K'_s$ 를 가정 한 후 Eq.(2)에 삽입하여 계산하였다.

$$-\frac{dM}{dt} = \frac{1}{Y} \frac{\mu_m X [S] V_L}{\{K_m + [S]\}} \quad (2)$$

$$K'_s = \frac{\mu_m X}{Y} \quad (3)$$

$$-\frac{dM_1}{dt} = \frac{K'_{s1} S_1 V_L}{K_{m1} \left(1 + \frac{S_2}{I_{1,2}}\right) + S_1} \quad (4)$$

$$-\frac{dM_2}{dt} = \frac{K'_{s2} S_2 V_L}{K_{m2} \left(1 + \frac{S_1}{I_{1,2}}\right) + S_2} \quad (5)$$

또한 paired substrate의 경우 기질간의 경쟁패턴을 평가하기 위하여 아래에 제시한 Eq.(4)와 Eq.(5)를 이용하여 기질저해상수  $I$ 값을 산출하여 비교 평가하였다. 여기서,  $K_m$ ,  $K'_s$  값은 앞서 제시한 단일기질 평가실험에서 얻어진 값을 사용하였다. 기질저해상수  $I$ 의 값이 양의 값을 가지면 기질이 다른 기질의 분해에 경쟁적 저해의 영향을 미치는 것을 의미하며, 반대로  $I$ 의 값이 음의 값을 나타내면 분해를 증진시키는 것을 의미한다. 또한  $I$ 의 절대값의 크기가 작을수록 저해 및 증진의 정도가 커진다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 단일기질의 생분해

*C. tropicalis*의 benzene, toluene, xylene, styrene에 대한 분해능을 평가하기 위해 회분식 생분해 실험을 수행하였다. TDB4 순수배양액을 200ml 배양병에 0.2 OD<sub>600</sub>의 농도로 주입하고 benzene, toluene, *p*-xylene, styrene을 각각 총탄소량 기준으로 1 mM씩 동일하게 공급한 후, 시간에 따른 각 기질의 양적 변화를 관찰하였다(Fig. 2).

주입된 기질의 95% 이상 분해에 소요된 시간은 toluene이 가장 적었으며, benzene, styrene, *p*-xylene순으로 빠르게 분해되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 bacteria가 *p*-xylene과 같은 일부 VOCs 물질에 대한 분해능이 낮다고 보고된 연구결과와 비교하였을 때, yeast가 단일 VOCs 물질의 분해 잠재력이 우수하다는 것을 의미한다(Tsao et al., 1998).

Table 2에는 단일기질 분해시 Michaelis-Menten equation을 이용하여 kinetic parameter를 분석한 결과를 나타내었다.

대체로 Michaelis-Menten equation에 기초한 모델 해석이 적합함을 알 수 있으며, 각 기질의 분해결과를 바탕으로  $K'_s$ 값과  $K_m$ 값을 도출한 후  $K'_s/K_m$ 을 비교하였다.  $K'_s/K_m$ 값이 클수록 1차 반응에 상응하며 분해속도도 빠르다고 할 수 있는데, toluene의  $K'_s/K_m$ 값(53.51)이 가장 크게 나타났으며 benzene(29.30), styrene(11.07) 순으로 분해가 잘 이루어지는 것을 알 수 있다.

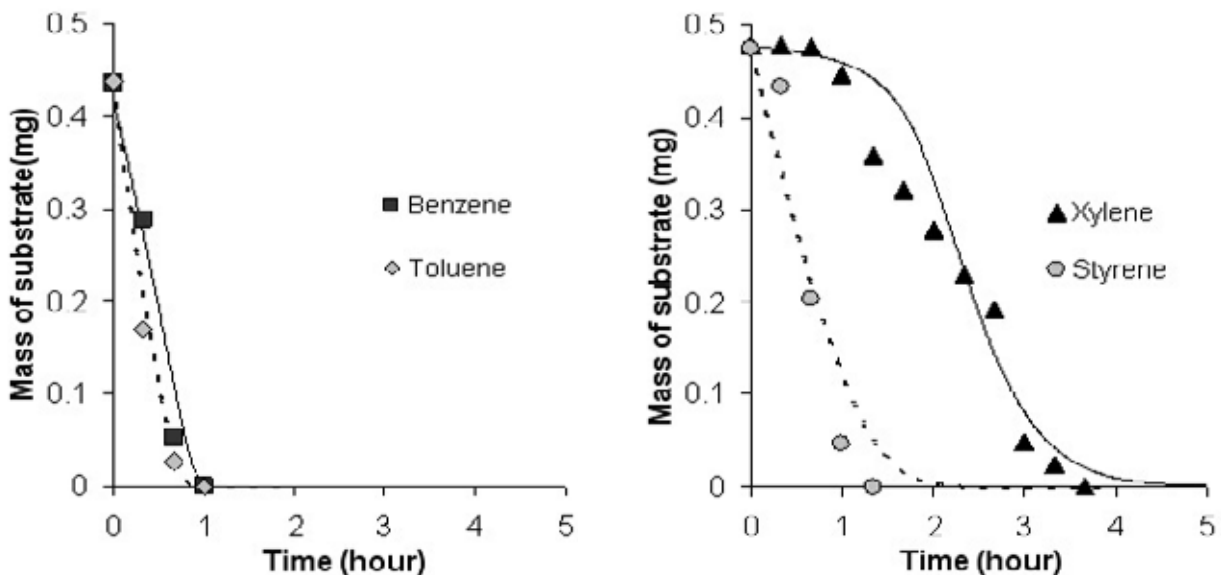


Fig. 3. The result of competitive inhibition in biodegradation of BT and XS by *C. tropicalis*.

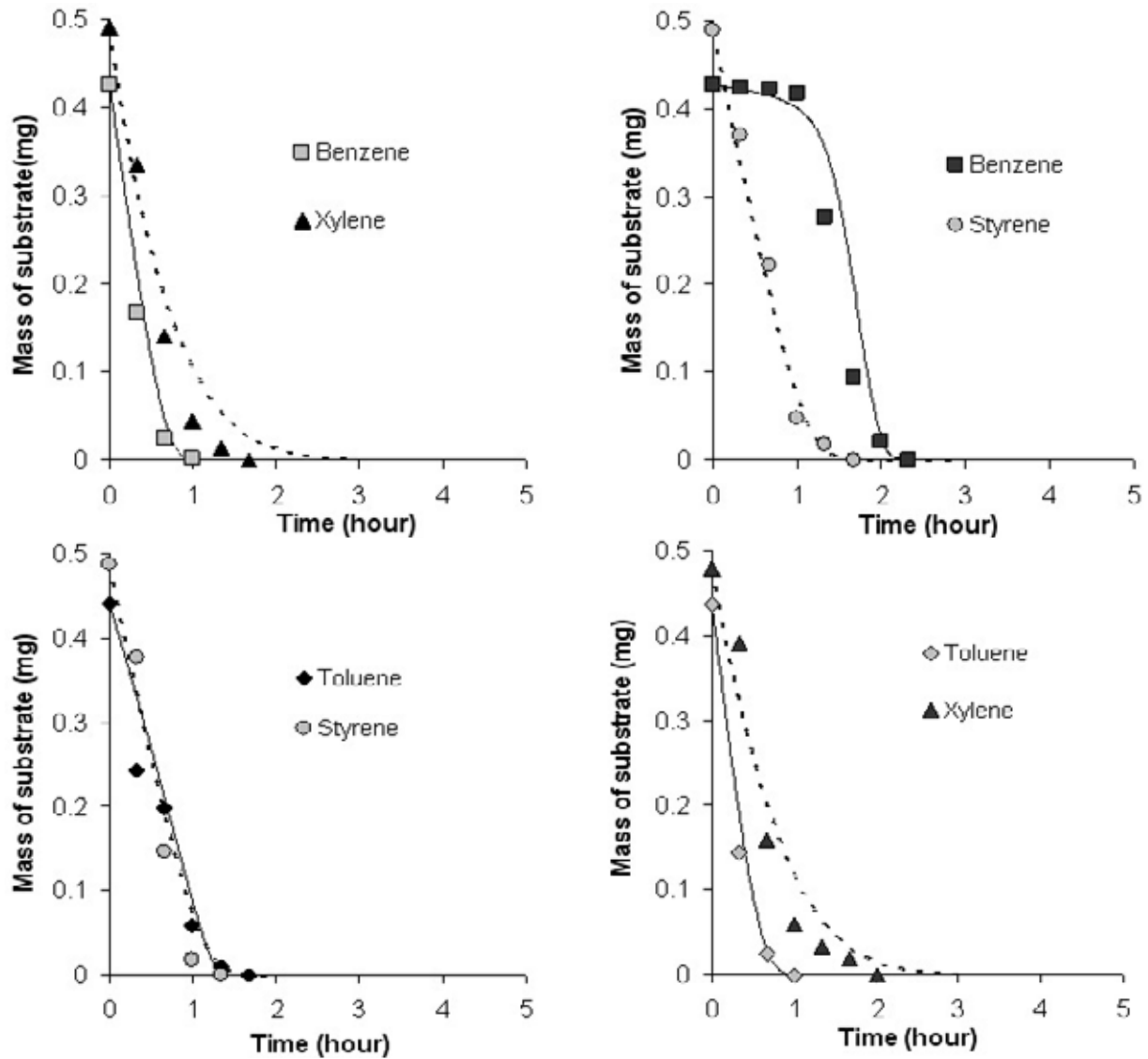


Fig. 4. The result of competitive inhibition and stimulation in biodegradation of paired substrate by *C. tropicalis*.

### 3.2 기질간의 상호작용

#### 3.2.1 경쟁적 저해

혼합 기질의 분해는 여러 형태로 나타나는데 주로 경쟁적 저해, 촉진, 공대사 등으로 나눌 수 있다.

Benzene, toluene, p-xylene, styrene을 대상으로 두 종류씩 조합하여(BT, BX, BS, TX, TS, XS) 총탄소 기준으로 동일한 양을 주입한 후 분해특성을 조사하였으며, 기질 상호간에 경쟁적 저해가 발생한 조건(BT, XS)에 대해 Fig. 3에 제시하였다. 시간에 따른 기질의 총량 변화와 모델해석 결과를 비교한 결과, 경쟁적 저해 모델은 BT, XS 등 혼합기질의 분해특성을 설명하는데 적합하였다. 각각의 기질저해 상수를 비교해보면  $I_{TB}$ 값이 0.70로서  $I_{BT}$ 값(1.45)보다 작게

나타나 toluene이 benzene에 미치는 저해의 영향이 benzene이 toluene에 미치는 영향 보다 더 큰 것을 알 수 있다.

#### 3.2.2 Stimulation

p-xylene과 styrene은 성장기질임에도 불구하고 benzene, toluene과는 달리 다른 기질과 동시에 존재할 경우, 촉진작용에 의해 분해가 증진되었다. 특히 p-xylene과 styrene은 다른 기질에 저해제로 작용하며 다른 기질은 styrene 분해에 촉진제로 작용하여 저해와 촉진이 동시에 진행되는 것이라 하겠다. 이러한 분해 특성은 앞서 제시한 경쟁적 저해 모델을 이용하여 해석할 수 있었으며, 기질저해 상수 값이 양(+)이면 저해를, 음(-)이면 촉진의 영향을 주는

Table 3. Degradation patterns for each combination by *C. tropicalis*

Substrate	Experimental condition	Interaction parameter $I_{a,b}$ (mg/L)	Substrate interaction
Benzene	B <sub>T</sub>	0.70	Competitive inhibition of B by T
	B <sub>S</sub>	0.02	Competitive inhibition of B by S
	B <sub>X</sub>	19.33	Competitive inhibition of B by p-X
Toluene	T <sub>B</sub>	1.45	Competitive inhibition of T by B
	T <sub>X</sub>	1.96	Competitive inhibition of T by p-X
	T <sub>S</sub>	0.34	Competitive inhibition of T by S
p-Xylene	X <sub>B</sub>	-5.27	p-X was stimulated by B
	X <sub>T</sub>	-10.97	p-X was stimulated by T
	X <sub>S</sub>	0.21	Competitive inhibition of p-X by S
Styrene	S <sub>B</sub>	-18.25	S was stimulated by B
	S <sub>T</sub>	-6.45	S was stimulated by T
	S <sub>X</sub>	12.34	Competitive inhibition of S by p-X

것을 의미한다. Styrene 분해에 benzene, toluene이 미치는 영향을 기질저해상수 값으로 비교하면 각각 -18.25, -6.45로서 toluene이 styrene 분해를 가장 크게 촉진하는 것으로 나타났다. p-xylene의 경우에는 benzene, toluene의 기질저해상수 값이 -5.27, -10.97로 나타나 benzene이 toluene 보다 p-xylene의 분해를 증진시키는 효과가 더 큰 것을 알 수 있다.

Table 3에는 혼합 기질의 회분식 실험 결과를 대상으로 모델해석을 통해 각각의 기질상호작용을 평가하여 나타내었다. 기질저해상수  $I$ 값은 단일기질일 경우의 동력학적 상수를 Eq(4), Eq(5)에 적용하여 도출하였으며,  $I$ 값이 양의 값(+)을 나타내는 것은 다른 기질에 의해 분해가 저해되었음을 의미하고 음의 값(-)은 다른 기질에 의해 촉진되었음을 의미한다.

또한  $I$ 값의 절대 값이 작을수록 다른 기질에 의한 저해 및 촉진의 정도가 커짐을 의미한다. Benzene과 toluene은 상호간에 경쟁적 저해의 영향을 나타내었는데, 이것은 두 물질에 대한 미생물에 의한 대사경로와 효소의 반응 기작이 유사하기 때문에 판단된다(Smith, 1990). Benzene의 경우 모든 기질(toluene, p-xylene, styrene)에 의해 저해의 영향을 받았으며, 특히 styrene에 의해 가장 큰 저해를 받았다. Toluene도 benzene과 마찬가지로 styrene에 의해 가장 큰 저해를 받았는데, 이것은 styrene의 무차원 헨리상수가 다른 기질에 비해 매우 작아 액상에 존재하는 기질이 상대적으로 많았기 때문에 미생물에 의한 분해가 우선적으로 진행되었기 때문으로 판단된다. 한편 p-xylene과 styrene은 benzene, toluene과는 달리 다른 기질에 의해 분해가 촉진되었음을 알 수 있었다. 본 연구에서는 경쟁적 저해상수를 도출하여 저해와 촉진 정도를 평가하였으며, 이러한 방법은 다른 여러 형태의 기질간의 상호작용의 평가에도 적용이 가능하리라 판단된다.

BTXS가 혼합된 경우에는 다양한 기질상호작용이 발생하므로 바이오필터와 같이 생물학적으로 VOCs를 분해하는 경우에는 이에 대한 특성을 고려하여 처리하는 것이 유리할 것으로 예상된다.

VOC에 대한 대부분의 연구가 BTEX를 초점으로 진행된 바 있어 본 연구결과와 직접적으로 비교하는 것은 어려우나, styrene과 화학적 성질이 매우 유사한 ethylbenzene이 혼합기질의 분해과정에서 확실한 저해자로서 작용한다는 Deeb 등(1998)의 연구결과는 시사하는 바가 크다. 즉, 실제 산업현장에서는 단일 VOC 보다는 여러 가지 VOCs가 혼합되어 발생하고, 그 조성도 다양하다. 따라서 바이오필터와 같은 생물처리시설에 유입되는 VOCs의 각 조성을 파악하고 예상되는 기질 저해작용을 설계 및 운전과정에서 면밀히 고려할 필요가 있다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 yeast의 일종인 *C. tropicalis*를 대상으로 하여 benzene, toluene, p-xylene, styrene에 대한 단일 및 혼합기질의 생분해 특성을 조사하였다. 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

단일기질에 대한 *C. tropicalis*의 분해능을 평가한 결과, 모든 기질을 분해할 수 있었고 성장기질로도 이용이 가능하였으며, 특히 toluene, benzene의 분해속도가 빠른 것으로 나타났다. 또한 두 종류의 VOCs 혼합물에 대해 동력학적 해석을 진행하였는데, 기질저해상수  $I$ 값을 도출하여 기질간의 상호작용을 비교하였다. 그 결과 BT(benzene, toluene mixture)와 XS(xylene, styrene mixture)는 상호 기질간에 경쟁적 저해의 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 다른 조합조건(BX, BS, TX, TS)에서는 p-xylene과 styrene이 benzene, toluene에 의해 촉진되는 특성을 나타내었다. 즉

p-xylene과 styrene은 다른 기질의 분해를 저해하는 저해제로 작용하며 자신은 다른 기질에 의해 분해가 촉진되는 분해패턴을 가진다는 사실을 알 수 있었다. 저해상수를 도출하여 단일기질과 혼합기질의 특성을 비교한 결과, 경쟁적 저해, 촉진 등의 다양한 기질 상호작용이 발생됨을 알 수 있었으며 이는 실제 처리 시스템에서 유용한 정보로 활용될 수 있을 것이다.



## 사사

본 연구는 환경부 “차세대 핵심환경기술개발사업”으로 지원받아 수행한 과제이며, 이에 감사드립니다.

- $Y$  : observed yield ( $M \cdot M^{-1}$ )  
 $\mu_m$  : maximum specific growth rate ( $h^{-1}$ ),  
 $X$  : microorganism concentration ( $M \cdot L^{-3}$ )  
 $K_m$  : half-saturation coefficient ( $M \cdot L^{-3}$ ),  
 $S_L$  : concentration of substrate in gas phase ( $M \cdot L^{-3}$ )  
 $S_G$  : concentration of substrate in liquid phase ( $M \cdot L^{-3}$ )  
 $V_L$  : volume of liquid phase ( $L^3$ )  
 $V_G$  : volume of gas phase ( $L^3$ ),  
 $I$  : inhibition coefficient  
 $M$  : mass  
 $H$  : Henry's law constant  
 $R$  : gas constant (atm/mol K),  
 $T$  : temperature (K)

## 참고문헌

1. Alvarez, P.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.* Vol. 57, pp.2981-2985
2. Deeb, R.A., Alvarez-Cohen, L. (1998) Temperature effects and substrate interaction during the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*. *Biotechnol Bioeng.* 62, pp.526-536
3. Jiang Y., Wen J.P., Li H.M. (2005) The biodegradation of phenol at high initial concentration by the yeast *Candida tropicalis*. *Biochem Eng.*, 24, pp243-247
4. Oh, Y., Shareefdeen Z., Baltzis B.C., Bartha R. (1994) Interactions between benzene, toluene, and p-xylene during their biodegradation. *Biotechnol Bioeng.*, 44, pp.533-538
5. Rogers, J.B., DuTeau, N.M., Reardon, K.F. (2000) Use of 16S-rRNA to investigate microbial population dynamics during biodegradation of toluene and phenol by a binary culture
6. Yadav, J.S., Reddy, A.C. (1993) Degradation of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene(BTEX) by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporim*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, pp756-762.
7. Smith M.A., (1990) The biodegradation of aromatic hydrocarbons in bacteria. *Biodegradation*, 1, pp191-206
8. Tsao C-W, Song H-G, Bartha R, (1998) Metabolism of benzene, toluene, xylene hydrocarbons in soil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, pp 4924-4929