

## 혐기성 토착미생물의 디젤 생분해에 대한 Pb, Cu, Cr의 영향

유채원 · 임형석 · 박재우\*

한양대학교 건설환경공학과

## Effects of Pb, Cu, and Cr on Anaerobic Biodegradation of Diesel Compounds by Indigenous Bacteria

Chae-won Yoo · Hyeong-Seok Lim · Jae-woo Park\*

Department of Civil and Environmental Engineering, Hanyang University

### ABSTRACT

Anaerobic biodegradation of diesel with coexisting heavy metals (Pb) was monitored in batch mode. Two different groups of the indigenous bacteria from a site contaminated with diesel and lead were used in this research: the first group was composed of a single species and the second group was composed of several species. The effect of heavy metals on the microbial population was monitored and confirmed the biodegradation mechanism in each combined contaminant. Growth of the microorganisms in 21 days was observed Diesel > Diesel + Pb > Diesel + Cu > Diesel + Pb + Cu > Diesel + Cr > Diesel + Pb + Cr. Indigenous microorganisms showed the adaptation in the Pb contaminate. Interactive toxic effect using AMES test observed larger synergistic effect than antagonistic in Diesel + Cr and Diesel + Pb + Cr. Therefore, the main effects of diesel biodegradation in the present of heavy metals are likely to exist other factors as well as toxic of heavy metals. This is a necessary part of the future studies.

**Key words :** Biodegradation, Combined contaminant, TPH, Heavy metals

### 1. Introduction

토착미생물에 의한 유류 등의 토양 유기오염물질의 생물학적 분해 연구는 주로 단일오염물질을 대상으로 진행되어 왔다(Rocchetti et al., 2011; Naidu et al., 2012; Hara and Uchiyama, 2013; Sung et al., 2013). 특히 유기 및 무기 오염물질이 동일 부지내 동시에 존재하는 복합오염인 경우의 유기오염물질 생분해 양상은 유기오염물질이 단독으로 존재하는 상황과는 차이가 있을 수 있으며 이에 대하여서는 이를 확인하는 수준의 연구들이 주로 보고되었다(Kavamura and Esposito, 2010; Vishnevetskaya et al., 2011; Thavamani et al., 2012; Moreira et al., 2013). 따라서 실제 유류 및 중금속 등의 유기 및 무기오염물질 복합오염상황에서 유기오염물질의 체계적인 생분해 연구가 부족한 실정이며, 미생물을 이용한 생물학적 분

해를 실제 복합오염부지 정화공정에 포함시키고 이 결과를 분석 및 해석하는데 어려움이 있다.

일반적으로 중금속은 유기물질의 생분해를 저하시킨다고 알려져 있으나 그에 대한 기존 연구결과가 이와 일치하지는 않는다. 중금속인 Zn, Cd, Ni은 톨루엔 생분해에 여러 농도에서 특별히 악영향이 관찰되지 않았고(Olaniran et al., 2009), 원유와 디젤의 생분해에 저농도의 Co, Cu, Mn 등의 중금속은 오히려 생분해 효율을 높였다는 실험적 보고도 있다(Zukauskaite et al., 2008). 디젤/중금속, 디젤/미생물, 디젤/중금속/미생물을 포함한 세 가지의 조건하에 디젤 분해를 관찰한 결과 디젤/중금속/미생물의 조건에서 디젤 분해가 가장 컸고, Pb와 Zn의 경우 생분해에 미치는 악영향이 미미하다고 보고 되었다(Sprocati et al., 2011).

양질토와 점토에 대한 1,2-Dichloroethane(DCA)의 생물

\*Corresponding author : jaewoopark@hanyang.ac.kr

Received : 2015. 2. 24 Reviewed : 2015. 4. 22 Accepted : 2015. 8. 11

Discussion until : 2015. 10. 31

학적 분해에서 Pb, Hg의 두 가지 농도에 따른 영향을 관찰한 결과 유기 및 무기 복합오염 조건에서 생분해의 효율을 좌우하는 가장 큰 요소는 오염물질이나 그 농도가 아닌 미생물의 활동성과 증균속의 형태를 좌우하는 토양의 종류라고 제시하기도 하였다(Amor et al., 2001). 20 cm 깊이의 갯벌 토사와 모래 내에서 TPH((Total Petroleum Hydrocarbon) 생물학적 분해에 Cd, Cu, Pb가 미치는 영향을 15일간 연구한 결과, 토양의 종류와 상관 없이 Cd > Pb > Cu 순서로 TPH 생분해가 잘되었으며, 갯벌토사에서의 분해효율이 모래보다는 약 2배 가량 높게 나타났다. 이는 모래토사의 함수율(24.6%)과 갯벌토사의 함수율(51.3%)의 수치와 상응하는 관계로 사료된다(Almeida et al., 2013).

토착미생물을 분리하여 단일종과 두 가지 종을 섞은 혼합종에 의한 생분해능을 비교하기 위하여 Methyl Tertiary Butyl Ether(MTBE), Trichloroethylene(TCE)의 두 가지 유기오염물질과 Cd, Hg, Pb등을 혼합한 상태에서 실험한 결과, 단일종의 미생물에 비해 두 가지 종이 혼합된 혼합종에 의한 생분해 효율이 더 컸으며 미생물의 활동성에 영향을 미치는 요소는 미생물군집이라고 결론 냈다(Fernandes et al., 2009). 이처럼 복합오염상황에서의 생분해 영향 요소는 오염물질의 종류 및 농도, 토양의 종류, 토착미생물의 종류와 적응력 등 매우 다양하며 그 요소에 대한 정량적인 데이터를 통하여 유기오염물질의 분해 효율을 이해할 수 있도록 하는 연구가 필요하다.

본 연구에서는 실제 유기 및 무기 복합오염토양에서 추출한 혐기성 토착 미생물이 공존하는 증균속의 종류 및 농도에 따라 디젤의 생분해에 어떠한 영향을 주는 지 파악하고자 하였다. 현장 미생물 채취 부지의 기존 오염물질은 Pb, Zn 등의 증균속과 Benzene, Toluene, Ethylbenzene, Xylene(BTEX), Total Petroleum Hydrocarbon (TPH) 등의 유기오염물질이었다. 특히 본 연구에서는 디젤의 회분식 생분해 실험을 통하여, 기 오염된 Pb에 대한 토착미생물의 적응력을 확인하는 것과 더불어 납과 독성이 유사한 Cu를 대조군으로 비교하고, 납보다 독성이 강한 Cr의 영향을 파악해 보고자 하였다.

## 2. Method

### 2.1. 복합오염부지 토착미생물 채취 및 배양

실험에 사용된 토착미생물을 채취하기 위한 오염토양은 유기 및 무기오염물질로 복합오염된 부지인 인천 부평구 부



Fig. 1. Soil samples in this research.

Table 1. 16s rRNA Sequencing of the bacterial community in this study

Depth	Species	Similarity (%)
1-2 m	Pseudomonas	100
	Enterobacter	100
	Citrobacter	100
2-3 m	Aeromonas	100
	Comamonas	100
	Serratia	100
	Pantoea	99.9

영공원의 주차장인근 0-3 m 깊이에서 샘플링하였다(Fig. 1). 1~2 m와 2~3 m 깊이의 토양을 혐기성으로 구분하여 48시간 자연건조 시킨 후 2 mm 체거름 후 밀봉하였으며, 주기적으로 증류수를 첨가하고 암실조건 4°C 냉장고에 보관하였다.

미생물 분류를 위해 토양 1 g을 일반세균의 순수배양에 사용되는 Nutrient Broth(NB) 배지(DI water 1 L, Tryptone 5 g, Beef extract 3 g) 200 ml에 넣고 이를 원심분리(5000 rpm, 20 min, 4°C)로 하고 상등액을 버린 후 PBS buffer 용액 10 ml을 넣고 venta로 2-3분간 섞어주는 과정을 2회씩 반복하여 토착미생물을 추출하였다. 이렇게 추출한 미생물은 장기보관을 위하여 -80°C에서 동결하였다. 토착미생물의 동정을 위하여 토양 1 g을 NB 배지 200 ml에 넣고 30°C에서 24 h 동안 배양한 후 희석하여 고체 NB배지가 담긴 plate에 0.1 ml 떨어뜨리고 다시 24 h 배양하였다. 16s rRNA Sequencing은 1492R, 27F Primer를 선정하여 Align과 Blast를 분석하였다. 그 결과는 Table 1에 있다.

**Table 2.** The contaminants and their concentrations (unit: mg/L) in this research

NO.	Contaminant	Conc.	Contaminant	Conc.	Contaminant	Conc.
1	Diesel	2000				
2	Diesel	2000		32.4		
3	Diesel	2000	Cu	64.8		
4	Diesel	2000		129.6		
5	Diesel	2000		42.6		
6	Diesel	2000	Pb	85.2		
7	Diesel	2000		170.5		
8	Diesel	2000		32.4		42.6
9	Diesel	2000	Cu	64.8	Pb	85.2
10	Diesel	2000		129.6		170.5
11	Diesel	2000		1.0		
12	Diesel	2000	Cr	2.0		
13	Diesel	2000		4.0		
14	Diesel	2000		1.0		42.6
15	Diesel	2000	Cr	2.0	Pb	85.2
16	Diesel	2000		4.0		170.5

**2.2. 디젤 생분해 실험**

250 ml 갈색병의 뚜껑에 구멍 2개를 뚫고 Teflon 밸브와 Glass tube를 설치하였으며, 1 L 용량 Tedlar bag을 Glass tube에 연결하였다. 샘플은 20 cm 길이의 주사바늘을 이용하여 Teflon 밸브를 통해 주기적으로 추출하였으며 모든 실험은 Autoclave를 이용하여 살균소독을 거치고 진행하였다. 회분식 실험을 위한 준비단계에서 오염물질의 휘발과 미생물의 오염을 고려하여 먼저 중금속 표준용액(CuSO<sub>4</sub>, PbCl<sub>2</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)을 넣은 후 일반세균을 증식할 수 있는 무기배지로 알려진 BS 배지를 200 mL 넣고 Diesel 2000 mg/L 첨가하였다. 중금속의 농도는 각 중금속의 토양오염우려기준 1지역 기준의 100%, 50%, 25%로 오염된 것으로 가정하고, 각 농도에서 토양 흡착량을 뺀 수용액 농도만큼을 첨가하였다. 실험에 사용된 디젤 및 중금속 농도는 Table 2에 정리하였다. 동일한 양의 미생물을 주입하기 위하여 100°C 오븐에 유리섬유 거름종이를 1시간 동안 건조하고 중량을 측정한 뒤 미생물이 담긴 pbs 버퍼용액을 1 ml 첨가하여 배양된 미생물의 양을 정량적으로 확인한 후 동일하게 10 ml에 해당하는 토착미생물을 각 병에 주입하였다. 최종적으로 뚜껑을 닫은 상태에서 Teflon 밸브를 통해 20 cm의 주사바늘을 연결한 일회용주사기를 사용하여 질소퍼지를 5분간 시켜 주어 용존산소 및 혐기성 조건에 불필요한 기타 가스를 제거하였다.

**2.3. 분석**

디젤의 농도는 TPH 농도 측정으로 대체하였다. TPH중 aliphatic과 aromatic hydrocarbon을 구분하기 위하여 Silica gel로 전처리를 하였다. 지방족과 방향족을 분리하기 위해 실리카코팅컬럼 DB-1(0.25 μm × 30 m × 0.32 mm)을 사용하여 Gas Chromatography(GC)로 수용액 3 ml를 추출한 후 5 g/20 mL 고체추출제(Solid Phase Extraction: SPE)를 통과 시켰다. Aliphatic 용출 시에는 헥산을 통과 시켰고, Aromatic 용출 시 메틸클로라이드를 이용하여 구분하였다. GC/FID(Agilent) 60°C에서 1분, 290°C까지 8°C/min으로 증가하여 7분간 유지하였으며 최대 315°C의 온도를 설정하였다. 분석은 0, 7, 14, 21, 28일 간격으로 추출하였으며 GC추출 시 미생물 성장량을 확인하기 위한 CFU측정은 질소가스를 채운 Glove box에서 평판배양법으로 36시간 동안 진행하였다.

**2.4. 생물검정법**

Ames test는 생물학적 검정시험법으로 신뢰성, 경제성에 의해 세계적으로 가장 널리 이용되는 세균을 이용한 돌연변이 유발 실험으로서(Testa 1996, Monarca et al., 2002), Salmonella Typhimurium을 돌연변이 시킨 Histidine 요구성 균주인 TA98과 TA100을 이용하였다. 저농도로 설정한 오염물질에 노출시킨 후 Minimal Glucose Agar Plate에 36시간 배양하고 형성된 Colony 수를 측정하는 방식으로 진행하였다.

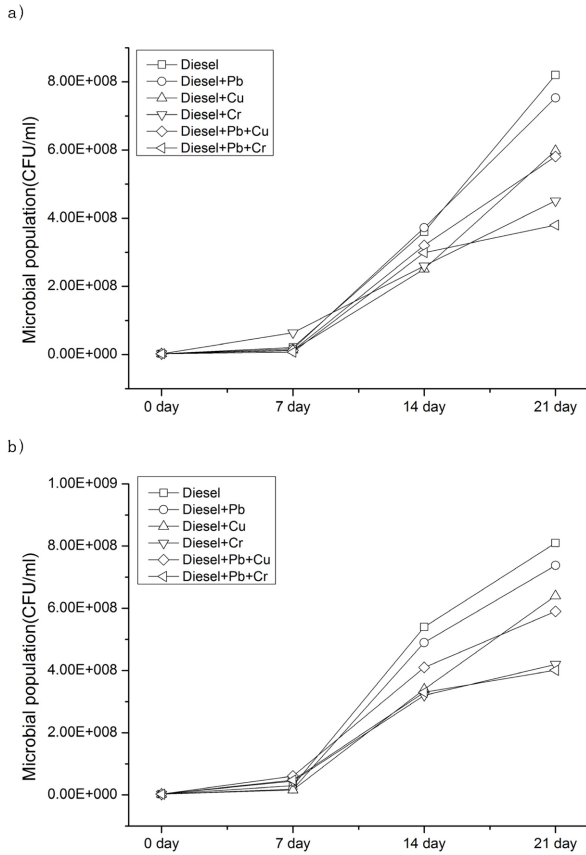


Fig. 2. Growth curve of the microorganisms in this study (a: single bacterial community (Zone 1), b: mixed bacterial community (Zone 2)).

3. Result

여섯 가지 유기 및 무기 복합오염조건(Diesel, Diesel + Pb, Diesel + Cu, Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cu, Diesel + Pb + Cr)에서의 단일 종의 미생물(Fig. 2 (a))과 혼합 종 미생물(Fig. 2 (b))의 생장을 관찰하였다. 본 연구에서는 토착미생물이 납 오염에 대해 기 적응되어 있기 때문에 납이 포함된 조건과 납과 생물학적 독성이 유사한 구리의 오염 조건에 중점을 맞추어 관찰하였다. Fig. 2에서 21일 동안 미생물의 생장은 Diesel, Diesel + Pb, Diesel + Cu, Diesel + Pb + Cu, Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr의 순서로 효율이 저하되는 것을 확인할 수 있었다. Diesel + Pb의 성장량이 Diesel + Cu보다 항상 높게 관찰되었다는 것을 통하여 납과 구리의 생물학적 독성이 유사하지만 토착미생물이 납 오염에 기 적응 되어 있고 이것이 미생물 생장에 직접적인 영향을 미치는 것을 확인하였다.

Fig. 2 (a)에서 두 가지 중금속이 포함된 Diesel + Pb + Cu의 조건이 Diesel + Cu와 비교적 유사한 생물학적 활성

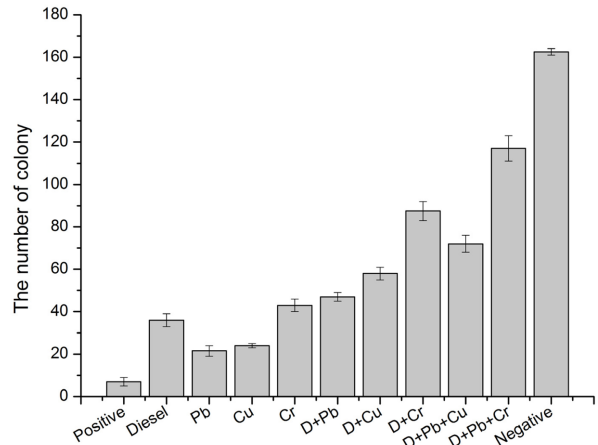


Fig. 3. Effects of combined contaminants on mutagenic potential in Ames test.

도가 나타난 점으로 미루어 보아 미생물에 의한 생물학적 작용에 있어서 오염물질의 종류의 개수가 가장 큰 영향을 미치지 않는다고 알 수 있었다. 본 실험은 국내 토양오염 분류기준에 의해 오염물질의 농도를 설정한 값이기 때문에 오염물질의 종류와 그 개수가 가장 큰 영향 요소라고 예상하였으나, 크롬이 포함된 조건(Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr)에서의 미생물 성장량이 Diesel + Pb, Diesel + Cu, Diesel + Pb + Cu에 비해 현저히 떨어지는 것과 Diesel + Pb + Cr 조건이 Diesel + Cr과 유사한 활성도가 나타났다. 따라서 본 연구결과에 따르면 단일 미생물의 경우 독성이 큰 Cr의 존재 여부가 미생물생장의 가장 큰 영향요소로 추정된다.

Fig. 2 (b)에서는 토착미생물들이 Pb에 미리 적응되었지만 Diesel + Cu의 미생물 생장이 Diesel + Pb + Cu에 비해 우수하게 나타났다. 이는 본 연구에서의 혼합미생물의 경우에는 Pb에 미리 적응되었지만 그 독성효과가 여전히 남아있어서, 미생물의 생장이 오염물질의 종류의 개수에 영향을 받은 것으로 판단된다. 또한 크롬이 포함된 조건(Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr)에서 가장 저조한 성장량이 나타난 것은 단일 미생물에서와 같이 크롬의 독성으로 인한 결과로 보인다.

Fig. 3는 생물학적 검정법으로 디젤, 납, 구리, 크롬의 혼합 조건의 독성 영향력을 확인하기 위하여 Ames test를 실시한 결과이다. 생물학적 검정법은 생물종의 민감도와 온도, 배양조건 등 실험 환경에 따라 큰 차이를 나타내기 때문에 오염물질의 오염조건에 따른 생물학적 독성을 예측하기 위하여 이용되고 있다. 혼합독성평가에서는 길항 작용에 비해 상승작용이 더 크게 나타났으며, 크롬이 포함된 Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr의 조건에서만 돌연변

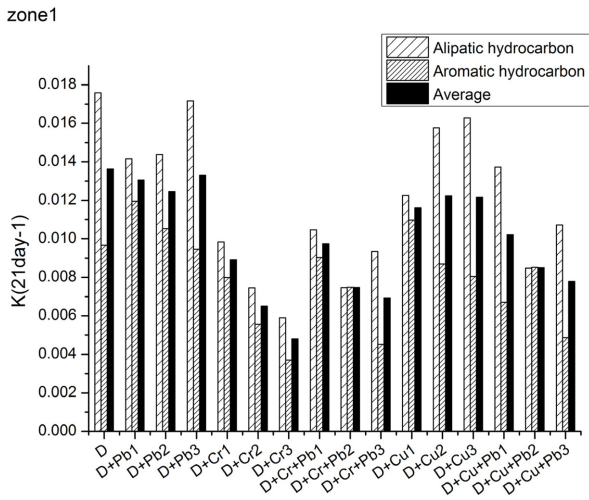


Fig. 4. Pseudo first-order rate coefficients of Diesel degradation in zone 1 at each condition (1: low concentration, 2: medium concentration, 3: high concentration).

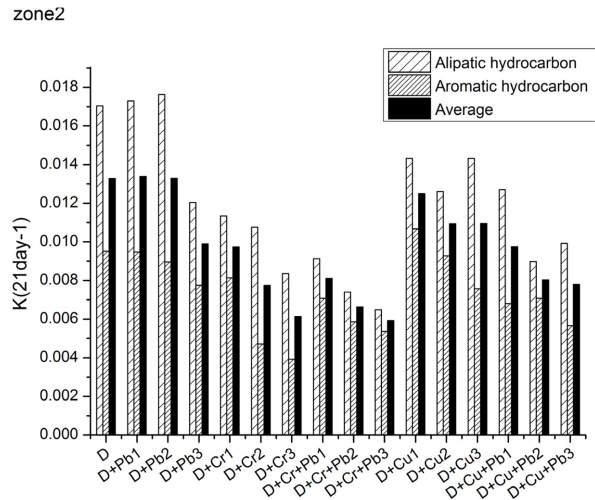


Fig. 5. Pseudo first-order rate coefficients of diesel degradation in zone 2 at each condition (1: low concentration, 2: medium concentration, 3: high concentration).

이 가능성이 월등히 높은 상승작용을 유발하는 것으로 나타났다. 반면 Diesel + Pb, Diesel + Cu, Diesel + Pb + Cu의 경우 각각 단일오염의 돌연변이 가능성을 합한 것보다 적은 길항작용이 미미하게 나타났기 때문에 유기 및 무기 오염물질이 복합적으로 오염된 경우 크롬의 독성만이 혼합독성에 가장 큰 상승작용을 보였다. 이는 Figs. 1,2에서 보여준 Cr이 포함된 경우에 미생물 생장이 다른 경우들에 비하여 낮은 결과와 일치한 결과를 보여 준다.

Figs. 4, 5에서는 지방족과 방향족 탄화수소에 대한 21일 동안의 생분해 속도를 단일 토착미생물이 검출된 zone 1과 여섯 가지 미생물종이 복합적으로 나타난 zone 2로 나누어 비교하였다. zone 1에서 지방족 탄화수소의 생분해 속도는 방향족 탄화수소에 비해 비교적 빠르게 나타났으며, 방향족 탄화수소는 오염물질의 독성과 농도에 민감하게 작용하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 오염물질의 농도가 높을수록 저감 속도가 저하되는 경향은 Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cu, Diesel + Pb + Cr에서만 관찰되었다. 또한 디젤 단일오염(Diesel)의 경우 Diesel + Pb 조건의 저, 중, 고농도와 생분해 양상이 유사하게 나타났기 때문에 토착미생물이 납에 기 적응한 결과로 사료된다.

혼합 토착미생물이 검출된 zone 2에서는 단일 미생물이 검출된 zone 1에 비해 모든 조건에서 오염물질의 농도가 생분해 속도상수에 영향을 미친 것으로 판단된다(Fig. 5). 탄화수소의 종류와 상관없이 다양한 미생물의 영향으로 농도가 높아질수록 분해 효율이 저하되는 것을 관찰할 수 있었으며, 각 토착미생물이 납의 오염에 적응되어 있었기 때문에 디젤 단일오염의 경우와 Diesel + Pb의 저, 중농도

Table 3. Ames test result (unit: number of colonies)

	Average	Sum	Toxic effect
Positive	7.0	-	-
Diesel	36.0	-	-
Pb	21.5	-	-
Cu	24.0	-	-
Cr	43.0	-	-
D + Pb	47.0	57.5	Antagonistic
D + Cu	58.0	60.0	Antagonistic
D + Cr	87.5	79.0	Synergistic
D + Pb + Cu	72.0	81.5	Antagonistic
D + Pb + Cr	117.0	100.5	Synergistic
Negative	162.5	-	

와 거의 동일한 속도로 분해된 것으로 추정하였다. 더불어 Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr과 Diesel + Cu, Diesel + Pb + Cu의 조건을 비교하여 보면, 한 가지 중금속보다 두 가지 중금속이 포함된 Diesel + Pb + Cr과 Diesel + Pb + Cu의 경우에 지방족과 방향족 탄화수소에서 고르게 저감되는 것이 관찰되었다. Fig. 2에서 중금속 종류의 갯수나 독성에 영향을 받았던 것과는 다소 차이가 나타나는 결과이다.

#### 4. Conclusion

본 연구에서는 토착미생물이 납 오염에 대해 기 적응되어 있기 때문에 Pb이 포함된 조건과 Pb과 생물학적 독성

이 유사한 Cu의 조건에 중점을 맞추어 관찰하였다. 21일 동안 미생물의 성장량은 Diesel, Diesel + Pb, Diesel + Cu, Diesel + Pb + Cu, Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr의 순서로 효율이 저하되었다. Diesel + Pb의 성장량이 Diesel + Cu보다 항상 높게 관찰되었고, 디젤 단일오염이 Diesel + Pb 조건의 농도와 상관없이 생장이 유사하게 나타났기 때문에 토착미생물이 납에 기 적응한 것으로 사료된다. 유기 및 무기 복합오염조건에 혼합독성평가는 길항작용에 비해 상승작용이 더 크게 나타났으며, 크롬이 포함된 Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr의 조건에서만 돌연변이 가능성이 월등히 높은 상승작용을 유발하는 것으로 나타났다.

디젤 생분해에 가장 큰 영향을 미치는 것은 같이 존재하는 중금속의 종류와 그 종류의 개수가 가장 큰 영향 요소라고 예상하였으나, 단일 미생물의 경우 크롬이 포함된 조건(Diesel + Cr, Diesel + Pb + Cr)의 미생물 성장량이 Diesel + Pb, Diesel + Cu, Diesel + Pb + Cu에 비해 현저히 떨어지는 것과 Diesel + Pb + Cr 조건이 Diesel + Cr과 유사한 활성도가 나타난 것을 통하여 오염물질의 독성이 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다. 혼합 미생물의 경우, 토착미생물의 납에 대한 기 적응에도 불구하고 Diesel + Cu의 미생물 성장량이 Diesel + Pb + Cu에 비해 우수하게 나타났기 때문에 미생물의 조건에 따라 오염물질의 개수에 더 큰 영향을 받는 것으로 판단된다. 또한 혼합 미생물은 속도상수에 대해 오염물질의 농도에 민감하게 작용하며, 두 가지 중금속이 포함된(Diesel + Pb + Cr, Diesel + Pb + Cu) 경우에 지방족과 방향족 탄화수소에서 고르게 저감하는 것을 확인하였다. 위의 독성결과와 디젤 생분해 실험의 결과를 종합해 볼때, 미생물에 의한 디젤 생분해에 같이 존재하는 중금속이 미치는 주 영향은 그 중금속의 독성은 물론 다른 영향 요소도 존재하는 것으로 보이며, 이는 향후 후속 연구가 더 필요한 부분이다.

## References

- Almeida, R., Mucha, A.P., Teixeira, C., Bordalo, A.A., and Almeida, C.M.R., 2013, Biodegradation of petroleum hydrocarbons in estuarine sediments: metal influence. *Biodegradat.*, **24**(1), 111-123.
- Amor, L., Kennes, C., and Veiga, M.C., 2001, Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals, *Bioresour. Technol.*, **78**(2), 181-185.
- Fernandes V.C., Albergaria J.T., Oliva-Teles, T., Delerue-Matos C., and De Marco P., 2009, Dual augmentation for aerobic bioremediation of MTBE and TCE pollution in heavy metal-contaminated soil, *Biodegradat.*, **20**(3), 375-382.
- Hara, E. and Uchiyama, H. 2013, Degradation of Petroleum Pollutant Materials by Fungi. *Fungi as Bioremediators*, Springer: 117-133.
- Kavamura, V.N. and Esposito, E., 2010, Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals, *Biotechnol. Adv.*, **28**(1), 61-69.
- Monarca, S., Feretti, D., Zerbini, I., Alberti, A., Zani, C., Resola, S., Gelatti, U., and Nardi G., 2002, Soil contamination detected using bacterial and plant mutagenicity tests and chemical analyses, *Environ. Res.*, **88**(1), 64-69.
- Moreira, I.T., Oliveira, O.M., Triguís, J.A., Queiroz, A.F., Barbosa, R.M., Anjos, J.A., Reyes, C.Y., Silva, C.S., Trindade, M.C., and Rios, M.C., 2013, Evaluation of the effects of metals on biodegradation of total petroleum hydrocarbons, *Microchem. J.*
- Naidu, R., Nandy, S., Megharaj, M., Kumar, R.P., Chadalavada, S., Chen, Z., and Bowman, M., 2012, Monitored natural attenuation of a long-term petroleum hydrocarbon contaminated sites: a case study, *Biodegradat.*, **23**(6), 881-895.
- Olaniran, A.O., Balgobind, A., and Pillay, B., 2009, Impacts of heavy metals on 1, 2-dichloroethane biodegradation in co-contaminated soil, *J. Environ. Sci.*, **21**(5), 661-666.
- Rocchetti, L., Beolchini, F., Ciani, M., and Dell'Anno, A., 2011, Improvement of bioremediation performance for the degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sediments, *Appl. Environ. Soil Sci.*, **2011**.
- Sprocati, A.R., Alisi, C., Tasso, F., Marconi, P., Sciuolo, A., Pinto, V., Chiavarini, S., Ubaldi, C., and Cremisini, C., 2011, Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil, *Process Biochem.*
- Sung, K., Kim, K.S., and Park, S., 2013, Enhancing degradation of total petroleum hydrocarbons and uptake of heavy metals in a wetland microcosm planted with phragmites communis by humic acids addition, *Int. J. Phytoremediat.*, **15**(6), 536-549.
- Testa, S.M., 1996, Considerations and Methodology in Using Natural Attenuation as a Remedial Strategy. Proc. 10th Natl. Outdoor Action. Conf., Las Vegas, Nev., Natl. Ground Water Assoc., Dublin, Ohio.
- Thavamani, P., Megharaj, M., and Naidu, R., 2012, Bioremediation of high molecular weight polyaromatic hydrocarbons co-contaminated with metals in liquid and soil slurries by metal tolerant PAHs degrading bacterial consortium, *Biodegradat.*, **23**(6), 823-835.
- Vishnivetskaya, T.A., Mosher, J.J., Palumbo, A.V., Yang, Z.K., Podar, M., Brown, S.D., Brooks, S.C., Gu, B., Southworth, G.R.,

Drake, M.M., Brandt C.C., and Elias, D.A., 2011, Mercury and other heavy metals influence bacterial community structure in contaminated Tennessee streams, *Appl. Environ. Soil Sci.*, **77**(1), 302-311.

Zukauskaitė, A., Jakubauskaitė, V., Belous, O., Ambrazaitienė, D., and Stasiskienė, Z., 2008, Impact of heavy metals on the oil products biodegradation process, *Waste Manage. Res.*, **26**(6), 500-507.