

Petrol ve Petrol Türevlerinin Gideriminde Marmara Denizi ve Karadeniz'den İzole Edilen Bakterilerin Biyolojik İyileştirme Potansiyelinin Değerlendirilmesi

Yosun MATER, Selçuk TAŞDAN

Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Gebze, Kocaeli

ÖZ

Amaç: Kirlenici özelliklerinden dolayı canlılığı önemli ölçüde etkileyen, ham petrol ve türevlerinin doğal kaynaklardan uzaklaştırılması çok önemlidir. Bakteriler vastasıyla kirlenicilerin ortamlardan uzaklaştırılması ve/veya daha az toksik/toksik olmayan formlara dönüştürülmesi yani "biyoremediasyon" çalışmaları önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada, Marmara denizi ve Karadeniz'den izole edilmiş 698 deniz bakterisi izolatının petrol ve petrol türevlerini parçalama yeteneklerinin taranması ve bu yeteneğe sahip bakterilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu bağlamda ilk olarak, petrol parçaladığı belirlenen ve seçilen 7 izolat, daha büyük ölçeklerde ve farklı konsantrasyonlarda ham petrolle 30 gün boyunca inkübe edilmiş, petrol tabakası kalınlığı milimetrik olarak her gün ölçülmüş ve görülen fiziksel, morfolojik değişiklikler not edilmiştir. Deneme sonuçlarına göre en yüksek petrol konsantrasyonlarında bile parçalanmanın ve biyolojik canlılığın olduğu tespit edilmiştir. Deneme sıvıları gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) analizine alınmıştır. Çalışmanın son aşamasında 7 izolat ön tanımlanma için VITEK 2 Kompakt Otomatik Tanımlama Sistemi'yle test edilmiştir.

Bulgular: Deney sonuçları, tüm türlerin en yüksek petrol konsantrasyonlarında bile yaşayabildiğini ve petrolü parçaladığını göstermiştir. Petrol tabakası kalınlığındaki en fazla incelmeye sırasıyla 333 A87 ve 331 izolatları ile gerçekleşmiştir. Çalışılan deneme ortamlarının tamamında, parçalanma ürünlerinden Kuinolin (C₉H₇N) varlığı belirlenmiştir. VITEK sistemi ile 5 izolatın *Serratia plymuthica*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus sciuri* olarak ön tanımlanması yapılmıştır. Böylece denizlerimizde oluşabilecek petrol kirliliğinin biyoremediasyonunda kullanılabilecek aday bakteriler belirlenmiştir.

Sonuç: Bu çalışma Marmara ve Karadeniz'de mevcut bakterilerin biyoyiyileştirmede kullanılabilirliğini göstermesi açısından özgün ve öncü çalışmalardan birini oluşturmaktadır.

Anahtar kelimeler: Biyoremediasyon, deniz mikrobiyolojisi, ham petrol, petrol kirliliği

ABSTRACT

The Evaluation of Biological Remediation Potential of Bacteria Isolated from Marmara and Black Sea for Degradation of Crude Oil and Oil Derivatives

Objective: Decontamination of petroleum and its derivatives from natural sources is a very critical task due to highly polluting properties of the petroleum. Removal or conversion to different less toxic or non-toxic forms of oil hydrocarbons via bacteria, known as "bioremediation" has become an important research area. In this study, the aim was to determine the bacteria which have the ability of degradation of oil and oil derivatives by scanning strains of 698 marine bacteria isolated from Marmara and Black Sea.

Material and Method: Within this context, firstly, 7 selected isolates known to degrade oil were incubated for 30 days at different concentrations and larger scale in crude oil and thickness of the oil layer in millimetres and morphological changes observed were recorded on a daily basis. After 30 days of experimental period, samples were prepared for gas chromatography-mass spectrometry analysis. In the last phase of the study, seven bacterial isolates were tested by the VITEK 2 Compact Automatic Identification System for pre-identification.

Results: Based on experimental results, bacteria were able to survive and degrade the crude oil even at the highest petroleum concentrations. The highest reduction in the petroleum layer thickness was observed for 333, A87 and 331 isolates. Quinoline (C₉H₇N) was detected as the degradation product of petroleum, in all isolates. VITEK system predefined 5 isolates including *Serratia plymuthica*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Staphylococcus lentus*, and *Staphylococcus sciuri*. As a result the candidate bacteria that may be used for biological remediation of pollution of our sea arising from oil have been determined.

Conclusion: The study is one of the original and pioneering works in terms of showing that existing bacteria in Marmara and Black Sea can be used for bioremediation purposes.

Keywords: Bioremediation, marine microbiology, crude oil, oil contamination

Alındığı tarih: 09.08.2017

Kabul tarihi: 06.02.2018

Yazışma adresi: Yosun Mater, Gebze Teknik Üniversitesi, Temel Bilimler Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Çayırova Yerleşkesi 41400, Gebze / Kocaeli

e-posta: ymater@gtu.edu.tr

GİRİŞ

Türkiye, coğrafi konumu nedeniyle deniz kökenli kaynakları ve deniz yollarını tarih boyunca kullanmıştır ve kullanmaktadır. Bu nedenle, Marmara denizi ve Karadeniz gemi taşımacılığı kaynaklı pek çok kirletici etkene ve İstanbul-Kocaeli gibi büyük şehirlerin evsel ve endüstriyel atıklarına maruz kalmaktadır. Deniz trafiği nedeniyle petrol tankerlerinin olası kazalarına da şahit ve açık olan bu denizler, deniz kirliliği açısından risk altında olan bölgelerdir⁽¹⁾. Petrole bağlı çevre kirlenmesinde, petrole bulanmış bölgenin geri kazanılması uzun zaman alan yorucu ve maliyetli bir süreçtir⁽¹⁻³⁾. Son yıllarda gündeme gelen ve kullanılmaya başlayan, biyolojik iyileştirme (biyoremediasyon), bu süreci kısaltan ve daha ucuz bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada Marmara denizi ve Karadeniz'den izole edilmiş deniz bakterisi izolatlarının petrol ve petrol türevlerini parçalama yeteneklerinin taranması ve bu yeteneğe sahip bakterilerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Petrole bağlı çevre kirlenmesi, ham petrol ve ham petrolden elde edilen benzin, gazyağı, mazot gibi maddelerin oluşturduğu kirliliktir. Ham petrolün bileşimini; büyük oranda karbon ve hidrojen den meydana gelen hidrokarbonlar ile değişen ama düşük miktarlarda bulunan, yüzlerce farklı madde (kükürt, azot, oksijen, metaller) oluşturur⁽¹⁾. Biyolojik iyileştirme çalışmalarının dikkat çekici ilk örneği Alaska'da, 1989 yılında meydana gelen Exxon Valdez kazasıdır. Kaza sonrası Prince William Sound adaları ve Alaska körfezi kıyılarının %15'inin petrole kaplanması sonucu ortamdaki petrolün uzaklaştırılması için aynı ortamdan izole edilen bakteriler *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp., *Alcaligenes* sp. ve bunların karışık kültürleri kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır^(2,3). Bu başarı, biyolojik iyileştirme alanında çalışmalara ayrı bir önem kazandırmıştır.

Doğada kompleks moleküllerin parçalanması, biyolojik parçalanma (biyodegradasyon) olarak kendiliğinden devam ederken, insan eliyle yapılan değişiklikler de ortam şartlarında bu olguyu hızlandırılabilir ve biyolojik iyileştirme çalışmaları olarak karşımıza çıkmaktadır⁽⁴⁾. Biyolojik iyileştirme, kontamine olmuş toprak, sediment, su ve benzeri ortamların iyileştirilmesi veya temizlenmesi amacıyla canlı organizmaların veya enzimlerinin, söz konusu ortama aktarılması ya da çevresel koşulların ayarlanmasıyla endojen faunanın yıkım oranının artırılması gibi işlemleri kapsayan bir yöntemdir⁽¹⁻⁷⁾.

Petrol ve petrol türevlerinin biyolojik olarak parçalanması doğada kendiliğinden 5-10 yılda olurken, ortama nutrient ve/veya bakteri ilavesi ile müdahale edilerek yapılan biyolojik iyileştirme çalışmaları ile 2-5 yıl gibi daha kısa sürelerde gerçekleşebilmektedir⁽⁸⁾. Petrol kirliliğini önlemede fiziksel ve kimyasal yöntemler olmakla beraber, bu yöntemler hem yeterli giderim gerçekleştirememekte hem de çok zahmetli ve pahalı olmaktadır. Bu yöntemlerin aksine doğal bir yöntem olan biyolojik iyileştirme maliyeti az, daha pratik ve hızlı uygulanabilecek bir yöntemdir^(3,9,10).

Biyolojik iyileştirme; mikroorganizmaların kirleticileri buldukları çevreden almaları ve bu kirletici maddeleri, büyüme ve metabolik faaliyetleri için kullanmaları esasına dayanır. Bu amaçla mikrobiyal büyüme ve metabolik aktivite için en uygun şartların sağlanması gereklidir⁽¹⁰⁾. Mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ve büyümelerini optimize etmek için ilk aşamada; nem, oksijen ve sıcaklık gibi çevresel faktörler, karbon, azot ve fosfor gibi besin istekleri, oksidasyon için uygun elektron alıcısının varlığına bağlı olan koşulların düzenlenmesi gereklidir. Buna ek olarak, biyolojik iyileştirme faaliyetlerinin devam ettiği çevresel ortamdaki toksik-kirleticilerin mikta-

rı, rekabetçi mikroorganizmaların olmaması, ortamdaki bakterilerin metabolik dekompozisyon farklılıklarının bilinmesi de çok önemlidir^(10,11). Ayrıca, hidrokarbonların parçalanmasında görev alan bakterilerin tanımlanması ve bu bakterilerin özellikle “olası kirlilik uzaklaştırma çalışmalarında kullanılacak sahanın doğal izolatları” olması, iyileştirme hızı üzerinde çok önemli etkisi olan kriterlerdir⁽⁴⁾. Yapılan literatür tarama çalışmalarında *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Nocardia* ve *Pseudomonas* spp. gibi su^(4,7,9) ve toprakta^(1,4,6,7,9) yaşayan bakteri türlerinin petrol hidrokarbonlarını karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıp biyolojik parçalanmaya uğrattığı bildirilmiştir^(1,4,6,7,9,12-18).

Türkiye’de sınırlı sayıdaki deniz bakterilerine yönelik çalışmalarda bakterilerin polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) parçalanmasına etkisini irdeleyen⁽¹⁷⁾, sintine suları ile Marmara denizine gelen ve giren bakterileri inceleyen⁽¹⁹⁾ ve PAH’ların Marmara denizi bakterileri üzerindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MIK) belirlenmesi⁽⁴⁾ çalışmaları bulunmaktadır. Ayrıca Marmara denizindeki PAH ve PCB kirliliği hakkındaki^(13,20) ve özellikle Volgoneft 248⁽²¹⁾ gemisi kazasının Marmara denizine ve kıyılarına etkilerine dair yapılan çevre çalışmaları mevcuttur. Ancak kendi denizlerimizdeki temiz ortamda bulunan deniz bakterilerinin, olası bir kazada ortama yayılması olası ham petrolü ve petrol türevlerini parçalama yetenekleri hakkında bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, Marmara denizi ve Karadeniz’den izole edilen bakteri türleri, petrol ve petrol türevlerini parçalama yeteneklerinin olup olmadığının belirlenmesi amacı ile incelenmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Kullanılacak izolatların seçilmesi

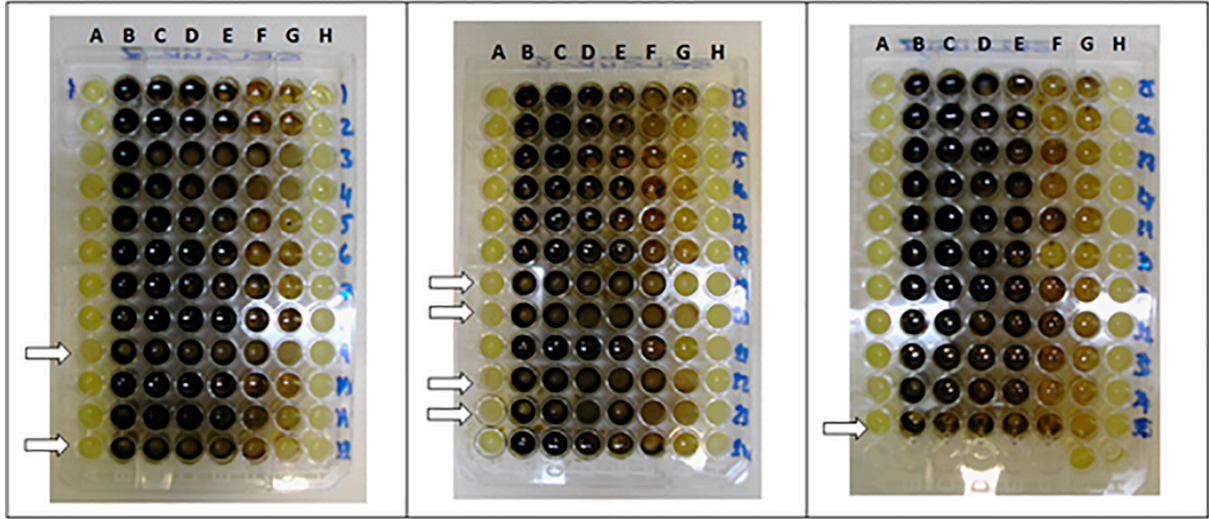
Bu çalışmada kullanılan izolatlar Gül-Şeker⁽²²⁾ doktora tezi için İstanbul Üniversitesi Deniz Bilimleri ve İşletmeciliği Enstitüsü’ne ait R/V Arar Gemisi personeli ve Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü’nün yürüttüğü proje kapsamında Marmara denizi ve Karadeniz’den, 10-100 m arasındaki değişen derinliklerde, şehir deşarjı ve kimyasal kirlilik almadığı belirlenmiş istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinden izole edilmiş 698 deniz bakterisinden seçilmiştir. Bu izolatları MacNaughton ve ark.⁽²³⁾, Peressutti ve ark.⁽²⁴⁾, Mashreghi ve Marialigeti’nin⁽²⁵⁾ çalışmalarında rapor edilen petrol ve türevlerini parçalayabilen bakterilerin genellikle Gram negatif, oksidaz negatif ve katalaz pozitif özelliklerde oldukları bilgisine dayanarak adı geçen özellikler açısından tarama yapılmış ve söz konusu özellikleri taşıyan 31 bakteri ön çalışma için seçilmiştir.

Seçilen izolatların ham petrole toleransının saptanmasında literatürle uyumlu olarak, Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIK) testi kullanılmıştır^(4,17). Buna göre, her bir plakta 12 farklı izolat, toplamda 31 izolat, her bir izolat için ham petrolün 6 farklı dilüsyonu (%0.5, %1, %5, %10, %25 ve %50 ham petrol) test edilmiştir. Her bir izolat için bakteri olan, petrol olmayan (negatif) ve petrol olan ama bakteri olmayan (pozitif) kontroller oluşturulmuştur (Şekil 1).

Farklı petrol konsantrasyonlarını içeren kuyucuklarda en fazla renk açılması gösteren izolatlar çalışmanın örnekleri olarak seçilmiştir. Seçilen 7 örnek, 81, 114, 140, 331, 333, A23 ve A87 kodları ile tanımlanan izolatlardır.

Seçilen izolatların büyük ölçekli petrol parçalama testi

Mikroplaklarda (V Taban, Greiner Bio-One,



Şekil 1. Marmara denizi ve Karadeniz izolatlarından seçilen 31 izolatın, ham petrolü parçalama kabiliyetlerinin; %0.5, %1, %5, %10, %25 ve 50 oranlarında ham petrol içeren besiyeri içerisinde, pozitif ve negatif kontroller ile mikropalakalarda irdelendiği ön deneme sonuçları, renk açılışının en fazla olduğu İzolatlardan 7'si (→) büyük ölçekli deneme için seçilmiştir.

Avusturya) %0.5, %1, %5, %10, %25 ve %50 ham petrol konsantrasyonlarında seçilen 7 izolat, büyük ölçekli çalışmada kullanılmak üzere 2 ml Triptik Soy Broth (TSB, Merck #1.04459) içinde ön kültüre ve daha sonra 10 ml TSB içinde deneme kültürüne alınarak, uygun inkübasyon sıcaklığı 30°C çoğaltılmıştır. Hazırlanan örnekler yine 30°C sıcak odada çalkalayıcı (INFORS HT Labotron, İsviçre) üzerinde 200 rpm'de çalkalanarak 24 saat büyümeye bırakılmıştır.

Büyük ölçekli çalışmada bütün örneklerin aynı yoğunlukta bakteri içermesi ve bakterilerin petrol parçalamaya aynı şartlarda başlaması için optik yoğunluk (OD600) (Bio-Rad SmartSpec 3000, ABD) eşitlenerek her biri 250 ml erlenmayerlere (ISOLAB, Almanya) içinde son hacmi 100 ml ortam ve 1'e 1.5 havalandırma oranı olacak şekilde, ham petrol ve TSB içeren ortama ekilmiştir. Büyük ölçekli denemede, seçilen her bir izolat için ön denemeden farklı ham petrol konsantrasyonları içeren (%5, %25, %50 ve %75 ham petrol içeren) deney düzenekleri kurulmuştur. Her bir dilüsyon için birer tane bakteri olan, petrol olmayan (negatif) ve petrol olan ama bakteri olmayan (pozitif) kontrol erlenmayer ortamları hazırlanmıştır (Şekil 2).

Ham petrolün %5, %25, %50 ve %75 konsantrasyonları içeren erlenmayerlerde, 30 gün boyunca, 22-25°C oda sıcaklığında kalan izolatlardan, günlük petrol katmanı kalınlığı ölçümleri yapılmıştır. Büyük ölçekli ham petrol biyolojik iyileştirme denemesinin tamamlanmasını takiben, önce deneme ortamlarında kalan ham petrol steril kabin (Nüve MN 090, Türkiye) içinde, vakum filtre sistemi (ISOLAB, Almanya) ve steril kaba filtre kağıtları yardımı ile ayrılmıştır. Sonra bakteriler deneme ortamlarından 0.45 µm por çaplı selüloz nitrat filtreler (Sartorius AG, Almanya) yardımıyla ile, steril kabin (Nüve MN 090, Türkiye) içinde, vakum filtre sistemi (ISOLAB, Almanya) ile ayrıldı. İzolatların toplandığı 0.45 µm por çaplı selüloz nitrat filtrelerden (Sartorius AG, Almanya) steril kabinde, ateş yanında ve steril öze ile alınan örnekler, Triptik Soy Agar (TSA, Merck #1.05458) içeren petri plakalarına (ISOLAB, Almanya), kesişen çizgi yöntemiyle ekilmiştir. Uygun sıcaklık şartlarında ve süresinde inkübasyonu (Binder, ABD) takiben, izolatların durumu irdelenmiştir.

Deneme erlenmayerleri içerisinde kalan sıvı, ham petrol bileşenlerinin irdelenmesi amacıyla, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi

(GC-MS) için süzme işlemi basamaklarına alınmıştır.

Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) analizleri

Örneklerin ham petrolü parçalayıp parçalamadığının kimyasal olarak belirlenmesi için deneme sonrasında elde edilen, bakteriden ve ham petrolden arındırılmış süzüntüler, Toplam Petrol Hidrokarbon (TPH) analizi için (-) kontrol olan besiyeri ve (+) kontrol olan ham petrol ile birlikte GC-MS analizlerine alınmıştır. Buzdolabında (+4°C) korunan örnekler soğuk zincir ile kromatografik analizler için Gebze Teknik Üniversitesi Çevre Mühendisliği Bölümü'nde Gaz Kromatografisi (Agilent 6890N, ABD) Kütle Spektrometresi (Agilent 5975C, EI Kütle Seçici Dedektör (MSD), ABD) cihazı kullanılarak analiz edilmişlerdir.

Örneklerin GC/MS analizi kapiler kolon (HP-5ms, 15 m, 0.25 mm, 0.25 µm) kullanılarak yapılmıştır. Fırın 40°C'de iken analize başlanmış olup 20°C/dakika ile 180°C'ye çıkarılıp 2 dakika bekletildikten sonra 10°C/dakika ile 310°C'ye çıkarıldı ve o sıcaklıkta 4 dakika bekletilerek analiz sonlandırılmıştır.

İzolatların VITEK ile ön tanımlanması


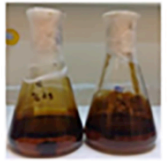

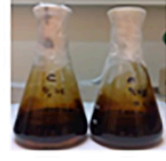

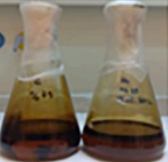
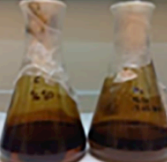
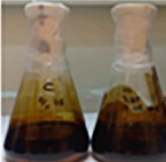

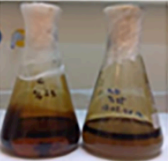
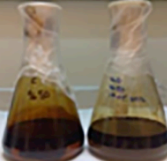

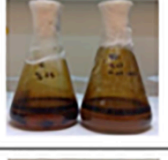


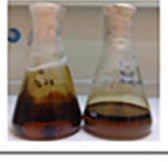
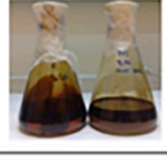
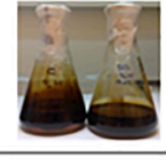








Çalışmada kullanılan ve Gram boyaması yapılan 7 örnek, Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nde bulunan VITEK 2® (VITEK 2 Compact 30, BioMérieux, Fransa) otomatik tanımlama sistemi ile türleri hakkında genel bilgi edinilmesi amacıyla test edilmiştir. VITEK 2 otomatik tanımlama sistemi bakterilerin Gram boyama özelliklerine bağlı olarak Gram negatif fermentasyon yapan ve yapmayan basil türlerini (Gram-negative fermenting and non-fermenting bacilli, GN), tanımlamak için 47 adet biyokimyasal tabanlı test uygulayan, Gram pozitif kok ve spor oluşturmeyen basilleri

belirlemek için (Gram positive cocci and non-spore-forming bacilli, GP) 43 adet biyokimyasal tabanlı test uygulayan ve son olarak Gram pozitif spor oluşturan basil formunda bakterileri belirlemek için 46 adet biyokimyasal tabanlı test uygulayan kartlara sahip bir otomatik bakteri tanımlama sistemidir. Tanımlama sonuçları, her bir teste ait (+) ve (-) sonuçların değerlendirilmesi ile yapılır. Değerlendirme sonuçlarını olası (%96-99 olasılıkla), çok iyi (%93-95), iyi (%89-92), kabul edilebilir (%85-88), zayıf ayırım ve tanımlanamadı (%0-84) olarak verir. Son yıllarda bakteri tanımlama kütüphanesi geliştirilerek hayvan ve bitki patojen bakterilerine ek olarak su, hava ve toprak bakterilerinin tür düzeyinde tanımlanmasında, diğer bir deyişle çevre mikrobiyolojisi çalışmalarında da kullanılmaya başlanan, hızlı bir mikroorganizma türleri tanımlama yöntemidir⁽²⁶⁾. Elde edilen sonuçların doğruluğu ve kontrolü açısından moleküler yöntemlerle desteklenmesi önerilir^(4,22,26).

BULGULAR

Mikroplakalarda yapılan ön denemede, inokülasyon adımını takiben %50 ham petrol %50 besiyeri içeren kuyucuklardan itibaren en fazla renk açılması görülen 7 bakteri izolatu, büyük ölçekli deneme için seçildi. Bu örnekler; 81, 114, 140, 331, 333, A23 ve A87 olarak belirlendi (Şekil 1).

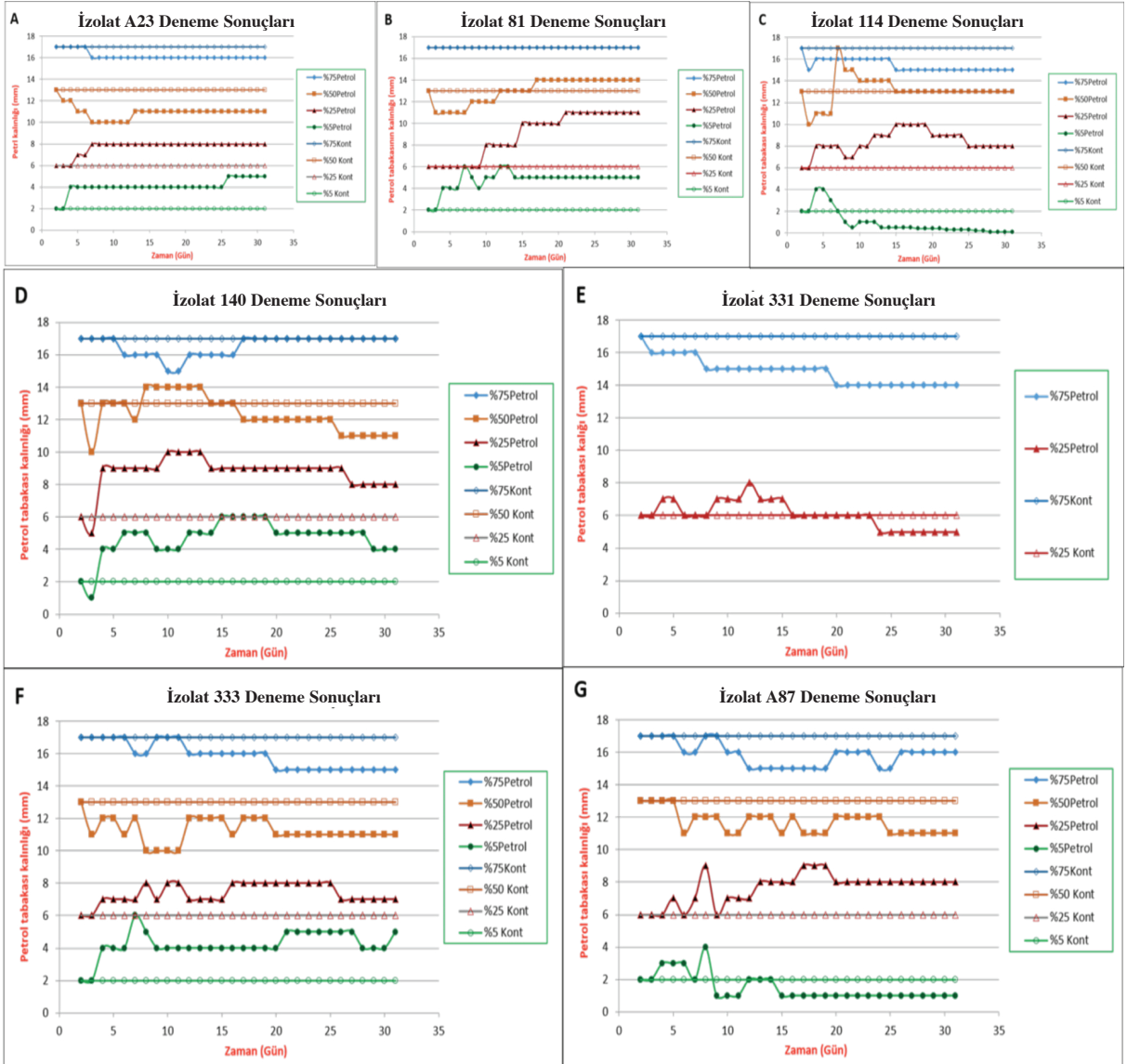
Seçilen izolatlar sonra %5, %25, %50 ve %75 petrol oranı içeren büyük ölçekli deney düzeyi içerisinde 30 gün büyütülmüş ve bu süre zarfında petrol tabakası kalınlıkları günlük ve milimetrik olarak ölçülmüştür. Besiyeriler de kontrolden farklı olarak görülen bulanıklık (Şekil 2) ve milimetrik değişen, artan ve/veya azalan petrol katmanı kalınlıkları değerlendirilmiş, elde edilen veriler Excel (Microsoft, 2010) bilgisayar programına aktarılarak incelenmiştir (Grafik 1A-G).

İzolat Kodu	%5 Ham Petrol + %95 Besiyeri	%25 Ham Petrol + %75 Besiyeri	%50 Ham Petrol + %50 Besiyeri	%75 Ham Petrol + %25 Besiyeri
İK1-81				
İK2-114				
İK2-140				
İK3-331	YOK		YOK	
İK3-333				
K-A23				
K-A87				

Şekil 2. Mikroplakalarda seçilen 7 izolatın, ham petrolü parçalama kabiliyetlerinin; %5, %25, %50 ve %75 oranlarında ham petrol içeren besiyeri içerisinde, negatif kontrol erlenleri ile 30 gün ölçüldüğü deneme sonuçları, negatif kontrol erlenmayerleri sadece ham petrol ve besiyeri içermektedir, bakteri içermemektedir.

Buna göre, izolat A23 %75 ham petrol konsantrasyonları içeren erlenmayerlerde 17 mm'lik petrol tabakası kalınlığını 16 mm'ye indirmiş 30 gün sonunda ham petrol tabakasının kalınlığını 1mm ve %50 ham petrol konsantrasyonu içeren

erlenmayerlerinde 13 mm'lik petrol tabakası kalınlığını 11 mm'ye indirmiş 30 gün sonunda ham petrol tabakasının kalınlığını 2 mm azaltmıştır. Buna karşın %25 petrol konsantrasyonun da ham petrol tabakası kalınlığı deneme sonunda



Grafik 1. Ham petrolü parçalamaya kabiliyetine sahip 7 izolatın (A-G) farklı petrol konsantrasyonları içeren erlenmayerlerde yapılan 30 günlük deneme süresinde milimetre (mm) olarak ölçülen ham petrol tabakası kalınlıkları.

6 mm'den 8 mm'ye, %5 ham petrol konsantrasyonunda petrol tabakası kalınlığı 2 mm'den 5 mm'ye artış göstermiştir (Grafik 1A). İzolat 81 ise %75 petrol konsantrasyonun da, ham petrol tabakası kalınlığı deneme boyunca aynı kalmıştır. Bu izolatın diğer konsantrasyonlarından %50 ham petrol konsantrasyonunda petrol tabakası kalınlığında 13 mm'den 14 mm'ye, %25 petrol konsantrasyonda 6 mm'den 11 mm'ye, %5 ham petrol konsantrasyonunda 2 mm'den 7 mm'ye artış ölçülmüştür (Grafik 1B). İzolat 114; %75 ham petrol konsantrasyonları içeren erlenmayer-

lerde 17 mm'lik petrol tabakası kalınlığını 15 mm'ye indirmiş, 30 gün sonunda ham petrol tabakasının kalınlığını 2 mm azaltmıştır. Aynı izolatın %5 ham petrol konsantrasyonu içeren erlenmayerinde ise 2 mm'lik petrol tabakası kalınlığını 30 gün sonunda neredeyse 0 mm'ye inmiş yani tamamen parçalanmıştır. Bununla beraber, %50 ham petrol konsantrasyonunda petrol tabakası kalınlığı önce 13 mm'den 17 mm'ye çıkmış sonra denemenin 10. günü 14 mm, 14. günü de 13 mm'ye düşmüştür. Benzer olarak aynı izolatın %25 ham petrol konsantras-

yonun da petrol tabakası kalınlığı önce 5. gün 6 mm'den 8 mm'ye, 12. gün 9 mm'ye, 15. gün 10 mm çıktığı gözlenmiş, sonra 20. gün 9 mm'ye, 25. günde 8 mm düştüğü belirlenmiştir (Grafik 1C). İzolat 140 yalnızca %50 ham petrol konsantrasyonu içeren erlenmayerdeki petrol tabakası kalınlığını 13 mm'den 11 mm'ye düşürmüş ve 30 gün sonunda 2 mm azalma göstermiştir. Buna karşın, %5 ve %25 ham petrol konsantrasyonlarında, petrol tabakası kalınlıklarında artışlar göstermiştir (Grafik 1D). İzolat 331 ham petrol miktarı yetmediği için yalnızca %75 ve %25 ham petrol konsantrasyonlarında çalışılabilmektedir. Buna göre, %75 ham petrol konsantrasyonunda, petrol tabakası kalınlığını 17 mm'den 14 mm'ye indirmiş ve 30 gün sonunda 3 mm azalma ile en fazla incelmeyi göstermiştir. %25 ham petrol konsantrasyonu içeren erlenmayerinde ise petrol tabakası kalınlığı 6 mm'den 5 mm'ye yalnızca 1 mm incelmeyi göstermiştir (Grafik 1E). İzolat 333 %75 ve %50 ham petrol konsantrasyonlarındaki petrol tabakası kalınlığını deneme sonunda 1'er mm azaltmış %5 ve %25 ham petrol konsantrasyonlarındaki petrol tabakası kalınlıklarında ise artış gözlenmiştir (Grafik 1F). İzolat A87 ise %75 ham petrol konsantrasyonundaki petrol tabakası kalınlığında 1 mm, %50 ham petrol konsantrasyonunda 2 mm ve %5 ham petrol konsantrasyonunda 1 mm azalma sergilemiştir. %25 ham petrol konsantrasyonundaki erlenmayerde ise petrol tabakası kalınlığı 6 mm'den 8 mm'ye artış göstermiştir (Grafik 1G). Farklı ham petrol konsantrasyonlarında görülen bu ham petrol tabakası kalınlık artışları, bakteri izolatlarının oluşturduğu son derece yoğun, kıvamlı mukus yapısı ile ilişkilendirilmiştir.

Seçilen 7 bakterinin, %5, %25, %50 ve %75 ham petrol konsantrasyonları içeren ortamlarda, 30 gün dışarıdan herhangi bir besiyeri ve/veya katkı maddesi eklenmeden, bulanıklık artışı ile yaşamlarına devam edebildikleri görülmüştür. Deneme sonlandırıldıktan sonra, ortamdan yön-

tem bölümünde belirtildiği şekilde ayrılan, TSA (Merck #1.05458) ekilen ve uygun sıcaklık ve inkübasyonu (Binder, ABD) büyütülen izolatların tamamının yeniden koloni oluşturduğu, mikroskopik ve görsel olarak Gram boyama, oksidaz testi, katalaz testi, hücre şekli ve koloni şekli ile (gösterilmemiş veri) belirlenmiştir. Bu sonuç, ham petrol gibi bir toksik ve kirletici^(4,10,11) maddeye rağmen, türlerin ham petrolde yaşadıklarını ve hâlâ canlı olduklarını doğrulamıştır. Bu durum seçilen bakterilerin, ham petrolü metabolize edebildiğinin bir diğer göstergesi olarak kabul edilmiştir.

Ham petrolün biyolojik iyileştirilmesine yönelik olarak çalışılan tüm izolatlara ait süzölmüş örneklerde ve bu örneklerin her konsantrasyonunda, ham petrolün alkan birimlerinin, Kuinolin [Quinoline, (C₉H₇N)] adı verilen heterosiklik, aromatik, organik azotlu birime kadar parçalandığı görülmüştür. Kuinolin aynı işlemde geçen kontrol ham petrol erlenmayerlerinde görülmemiştir. Bu sonuç, kuinolinin ham petrolün içinde bulunan bir birim değil, ancak ham petrolün bir aşamaya kadar parçalanması ile ortaya çıkan, ham petrol alkanlarından daha küçük bir parçalanma ürünü olduğunu göstermektedir. Bu, bakterilerin 30 günlük deneme süresi boyunca, bir aşamaya kadar ham petrolü parçaladığının kimyasal bir doğrulması olarak kabul edilmiştir. Tüm izolatlar içinde ham petrolü kuinoline kadar en fazla parçalayan 114 kodu ile tanımlanan bakteri örneği olmuştur.

Son olarak VITEK 2 Kompakt Mikrobiyal Tanımlama Sistemi her bir teste ait (+) ve (-) sonuçların değerlendirilmesini yapmış, izolat 140 için *Serratia plymuthica* (%86, kabul edilebilir oranda), izolat 331 için *Enterococcus faecalis* (%94, çok iyi oranda), izolat 333 için *Klebsiella pneumoniae* subsp. ozaenae (%92, iyi oranda), izolat A23 için *Staphylococcus lentus* (%97, kusursuz oranda), izolat A87 için *Staphylococcus sciuri* (%89, iyi oranda) türleri

olarak sonuçları vermiştir. Geriye kalan iki izolat, 81 ve 114 otomatik tanımlama sistemi tarafından tanımlanamamıştır.

TARTIŞMA

Petrol kirliliğini önlemede biyolojik iyileştirme öncelikli doğal bir yöntemdir. Bu nedenle hidrokarbonların parçalanmasında görev alan bakterilerin tanımlanması ve bu bakterilerin özellikle “olası kirlilik uzaklaştırma çalışmalarında kullanılacak sahanın doğal izolatları” olması, iyileştirme hızı üzerinde çok önemli etkisi olan özelliklerden biridir^(4,6,7). Bu çalışmada amacımız, Marmara denizi ve Karadeniz gibi farklı tuz oranı, mineral yapısı, derinlik ve sıcaklığa sahip olan denizlerimizden izole edilen deniz bakterilerinin petrol kirliliğinin biyolojik iyileştirmesinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi olmuştur.

Marmara denizinde, deniz bakterilerine yönelik literatür bilgisinde genellikle karşımıza çıkan bakterilerin biyolojik parçalanmada yani biyodegradasyonda veya fekal koliform varlığı ile kirlilik belirteci (indikatör) olarak kullanılmaları olmuştur. Uluslararası literatürde karşımıza çıkan ise genellikle karasal petrol alanlarında^(2,6,8,11,23-25,27-29), bölgede bulan topraklardan izole edilen bakteriler yardımıyla ve deniz^(3,8,9,11,12,14,15,25) petrol platformları veya tanker kazaları ile karşımıza çıkan biyolojik iyileştirme çalışmalarıdır.

Çalışmamız ise adı geçen literatürlerden farklı olarak deniz bakterileri, petrol alanı olmayan, şehir deşarjı ve kimyasal kirlilik almadığı belirlenmiş, derinliği 10-100 m arasındaki istasyonlardan alınan deniz suyu örneklerinden izole edilmiştir. Çalışma için bakteriler MacNaughton ve ark.⁽²³⁾, Peressutti ve ark.⁽²⁴⁾, Mashreghi ve Marialigeti'nin⁽²⁵⁾ çalışmalarında bildirilmiş olan petrol ve türevlerini parçalayabilen bakterilerin genellikle Gram negatif, oksidaz negatif ve katalaz pozitif özelliklerde oldukları bilgisi dikkate

alınarak taranmış ve 31 bakterinin bu özelliklerde olduğu belirlenmiştir. Bu özelliklere göre seçilen 31 izolat MİK testi⁽⁴⁾ ile %0.5, %1, %5, %10, %25 ve %50 ham petrol içeren ön deneme ile 7 izolata indirilmiştir (Şekil 1). Seçilen izolatlar 81 (44 m), 114 (44 m), 140 (44 m), 331 (35 m), 333 (44 m), A23 (30 m) ve A87 (40 m) 5'i Marmara denizinden, 2 tanesi Karadeniz'den olmak üzere, farklı derinliklerde 4 farklı istasyondan toplanmış örneklerdir. Seçilen bu 7 izolat %5, %25, %50 ve %75 ham petrol oranı içeren daha büyük ölçekli deney düzeneği içerisinde 30 gün büyütülmüştür. Deneme boyunca petrol tabakası kalınlıkları günlük ve milimetrik olarak ölçülmüş, sonuçlar excel programı ile grafik hâline getirilmiştir. Besiyerinde de görülen bulanıklık ve milimetrik değişen petrol katmanı kalınlığı verileri izolatların hampetrol gibi bir toksik ve kirletici^(4,6,10,11) içeren bir ortamda yaşayabildiklerini yani metabolik çalışmalarını sürdürebildiklerini göstermiştir. Bu sonuç, maddenin izolatlar üzerine etkisi ise mikroskopik olarak Gram boyama, hücre şekli ve görsel olarak oksidaz testi, katalaz testi ve koloni şekli verileri ile kontrol edilmiş ve doğrulanmıştır.

Çalışmamızda, en yoğun petrol konsantrasyonu olan %75'lik ham petrol konsantrasyonu içeren erlenmayerlerde, petrol tabakası kalınlığının en fazla incelenen (3 mm) ölçüldüğü 333 no'lu izolat başta olmak üzere, 2 mm azalma ölçülen 331 ve A87 izolatları etkili görülmektedir. Yüzde 50 konsantrasyonda ham petrol içeren erlenmayerler için izolatlar A23, 333 ve A87 petrol tabakası kalınlığının 2 mm incelme örneklerdir. %25 ham petrol konsantrasyonu içeren erlenmayerler için izolat 140 petrol tabakası kalınlığının 2 mm, izolat 331 ise 1 mm inceltmiştir. Son olarak, %5 ham petrol konsantrasyonu içeren erlenmayerlerde petrol tabakası kalınlığını izolat A87 yalnızca 1 mm inceltmiş, izolat 114 ise 2 mm kalınlığındaki tabakayı 30 günlük deneme sonunda tamamen eritmiştir. Bu veriler bize 7 izolatın hepsinin petrol biyolojik iyileştirme

yeteneklerinin farklı olduğunu göstermektedir. Bu duruma ek olarak İzolat 81'de diğer tüm izolatlardan farklı olarak %75 ham petrol konsantrasyonunda petrol tabakası kalınlığının aynı kalması dışında %50 konsantrasyonlarında ham petrol tabakası kalınlığı 1 mm arttırırken %25 ve %5 konsantrasyonlarında ham petrol tabakasını 5 mm kalınlaştırmış ve petrolü adeta eritip plastik gibi yoğunlaştırıp kalınlaştırmıştır. Bu durum, deneme sonunda, deneme ortamından ham petrolün ayrılmasında büyük kolaylık sağlamış, besiyeri ve petrol kolaylıkla ayrılmıştır. İzolatın deneme ortamından ayrılarak canlılığının, şeklinin kontrolünde de bakterinin ilk hâlindeki gibi anı mukus yapısını gösterdiği belirlenmiştir. Gözlemlerden çıkarılan sonuç, bu mukus tabakasının ham petrol ile birleştiğinde onun sıvı halini değiştirip daha kıvamlı koyu ve yoğun bir hâle getirdiği şeklinde olmuştur. Bu gözlem bakterinin kendi yapısında oluşturduğu mukus kıvamını denemeye girmiş ve girmemiş bakteri kolonilerinde karşılaştırarak göreceli olarak fark görülmemiş olmasına dayanmaktadır. Literatürlerde benzer bir duruma rastlanmamıştır. Dolayısıyla bu izolat ayrıca ve detaylı çalışma gerektirmektedir.

Çalışmamızın sonraki aşaması petrol ve bakteriden ari deneme ortamlarının ve negatif kontrol kabul edilen bakteri içermeyen petrol ve besiyeri içeren erlenmayerler içerikleri, kimyasal olarak irdelenmesi olmuştur. Bu aşamada GC-MS cihazı kullanılarak yapılan analizlerde tüm izolatlara ait süzölmüş örneklerin, her konsantrasyonunda, ham petrolün alkan birimlerinin, kuinolin (C_9H_7N) adı verilen heterosiklik, aromatik, organik bir azotlu birime kadar parçalandığı belirlenmiştir. Bu birim aynı işlemde geçen kontrol ham petrol erlenmeyenlerinde görülmemiştir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ile alınan ve kimyasal olarak ham petrol alkanlarından daha küçük olan heterosiklik aromatik organik bir azotlu birime kadar kimyasal olarak parçalandığı gösteren veriler, kullanılan tüm izo-

latların kısmen ham petrolü parçalandığının doğrulanmıştır.

Mikroorganizmaların biyolojik iyileştirme yeteneklerinde gözlenen farklılıklar nedeniyle bakterilerin olası uygulama alanlarında saf ve tek kültür olarak kullanılmaları yerine ikili, üçlü ve çoklu karışımlarının kullanılması ham petrol kirliliğinin daha hızlı biyolojik iyileştirmesine neden olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan çalışmalar arasında, Chianelli ve ark.⁽²⁾, Kasai ve ark.⁽³⁾ ve Rahman ve ark.⁽²⁷⁻²⁹⁾ çalışmalarında birden fazla bakteri türü bir arada kullanılarak oluşturulan bakteri karışımları biyolojik iyileştirme model çalışmalarında başarılı sonuçlar vermiştir.

Çalışmada kullanılan izolatlarla böyle bir uygulama yapmak ham petrolü parçalama hızlarını ve miktarlarını etkileyebilir. İzolatların arıksık kültür hâlinde ham petrolü parçalama yetenekleri ayrıca çalışılması gereken bir konudur. Son olarak, VITEK 2 Kompakt otomatik mikrobiyal tanımlama sistemi yardımıyla izolatların ön tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Buna göre izolatlardan 5'i; *Serratia plymuthica*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. ozaena, *Staphylococcus lentus* ve *Staphylococcus sciuri* olarak tanımlanmıştır. Geriye kalan 2 izolat 81 ve 114 ise tanımlanamamıştır. En ilginç verileri veren ancak ön tanımlamada tanımlanamayan bu iki izolatın ve diğer bakterilerin de tür düzeyinde kesin tanımlanması için moleküler tanımlama alınması planlanmaktadır.

Marmara ve Karadeniz iki önemli, farklı karakterde denizdir. Bu denizlerden elde edilen tüm canlı kaynaklar gibi izole edilen bakteriler de değerlendirilmesi gereken canlı kaynak potansiyelleridir. Bu elde edilen mikroorganizmalar gerek belirteç, gerek besin kaynağı ve kirlilik belirlenmesinde büyük önem gösterir. Aynı şekilde bu kaynaklar doğal ve insan eli ile karşılaşılabilecek toksik ve kirleticileri uzaklaştırma-

da, parçalamada ve yok etmede hayati önem taşımaktadır. Biyolojik iyileştirme bu anlamda denizlerle çevrili ülkemiz için hayati öneme sahiptir. Deniz trafiğinin çok yoğun olduğu deniz yollarımız daima kazalar ve buna bağlı toksik kirleticiler ile yüzleşme riski taşımaktadır. Olası toksik atıkların kendi denizlerimizden izole edilmiş bakteriler ile temizlenmesi hem bu kaynakların temiz kalması hem de maddi açıdan daha ucuza mal olacağı için büyük öneme sahiptir. Çalışma bu anlamda gelecekte denizlerimizdeki olası ham petrol kirliliğinin biyolojik yollarla gideriminde bir kaynak oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.* 1990;53(3):305-15.
2. Chianelli RR, Aczel T, Bare RE, et al. Bioremediation technology development and application to the Alaskan Spill. *International Oil Spill Conference Proceedings* 1991;1991(1):549-58. <https://doi.org/10.7901/2169-3358-1991-1-549>
3. Kasai Y, Kishira Y, Harayama S. Bacteria belonging to the genus *Cycloclasticus* play a primary role in the degradation of aromatic hydrocarbons released in a marine environment. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(11):5625-33. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.11.5625-5633.2002>
4. Altuğ G, Çardak M, Çiftçi PS, Gürün S. Petrol hidrokarbonlarının Ölüdeniz Lagünü ve Marmara Denizi'nden izole edilen bazı bakteriler üzerinde minimum inhibisyon konsantrasyonları (MIC). *Ulusal Su Günleri Kitabı*; 16-18 Mayıs 2007, Antalya, Türkiye; 2007:761-6.
5. Savaş Ü. Çok kopyalı polifosfatkinaz ve ekzopolifosfataz genlerinin potansiyel ekspresyonunun *Streptomyces coelicolor*'ın ağır metal toleransına ve fosfat depolamasına etkisi. [Yüksek Lisans], Kocaeli: Gebze Teknik Üniversitesi, 2010.
6. Sarkar P, Roy A, Pal S, Mohapatra B, Kazy SK, Maiti MK, Sar P. Enrichment and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from petroleum refinery waste as potent bioaugmentation agent for in situ bioremediation. *Bioresour Technol.* 2017;242:15-27. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.010>
7. Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol.* 2017;223:277-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
8. Korda A, Santas P, Tenente A, Santas R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1997;48(6):677-86. <https://doi.org/10.1007/s002530051115>
9. US. Congress, Office of Technology Assessment, Bioremediation for Marine Oil Spills-Background Paper. US. Government Printing Office OTA-BP-O-70. Washington DC 1991.
10. Kavamura VN, Esposito E. Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnol Adv.* 2010;28(1):61-9. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.09.002>
11. Atlas RM. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol Rev.* 1981;45(1):180-209.
12. Floodgate, GD, Atlas, RM. (Ed.) The fate of petroleum in marine environment. In: *Petroleum Microbiology*. New York: MacMillan Publishing Co. 1984:355-97.
13. Demir İ, Demirbağ Z. Polisiklik aromatik hidrokarbonların biyolojik olarak parçalanması. *Turk J Biol.* 1999;23:293-302.
14. Kasai Y, Kishira H, Sasaki T, Syutsubo K, Watanabe K, Harayama S. Predominant growth of *Alcanivorax* strains in oil-contaminated and nutrient-supplemented seawater. *Environ Microbiol.* 2002;4(3):141-7. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2002.00275.x>
15. Hara A, Syutsubo K, Harayama S. *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ Microbiol.* 2003;5(9):746-53. <https://doi.org/10.1046/j.1468-2920.2003.00468.x>
16. Kahraman H, Geckil H. Benzoik asidin *Vitreoscilla* hemoglobin geni aktarılmış *Pseudomonas aeruginosa* tarafından yıkımı. *Fırat Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi.* 2005;17(2):342-348.
17. Çiftçi PS. Marmara Denizi'nden izole edilen bakterilerin polisiklik aromatik hidrokarbonları (PAH) parçalama yeteneklerinin araştırılması [Yüksek Lisans]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi, 2008.
18. Martins dos Santos V, Sabirova J, Timmis KN. (Ed), Yakimov MM, Golyshin PN. *Alcanivorax borkumensis* in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 2010:1265-88. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77587-4_89
19. Altug G, Gurun S, Cardak M, Ciftci PS, Kalkan S. The occurrence of pathogenic bacteria in some ships' ballast water incoming from various marine regions to the Sea of Marmara, Turkey. *Mar Environ Res.* 2012;81:35-42. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.08.005>
20. Telli-Karakoc F Toluna L, Henkelmann B, Klimmb C, Okaya O, Schramm KW. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) distributions in the Bay of Marmara Sea: Izmit Bay. *Environ Pollut.* 2002;119(3):383-97. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(01\)00341-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(01)00341-4)
21. Alpar B, Unlu S. Petroleum residue following Volgoneft-248 oil spill at the Coasts of the Suburb of Florya, Marmara Sea (Turkey): A critique. *J Coast Res.* 2007;23(2):515-20. <https://doi.org/10.2112/04-0313.1>
22. Gül-Şeker M. Marmara Denizi ve Karadeniz'den izole edilen bakterilerin saflaştırılması ve tanımlanması [Doktora], Kocaeli: Gebze Teknik Üniversitesi, 2009.
23. MacNaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ, White DC. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(8):3566-74.
24. Peressutti SR, Alvarez HM, Pucci OH. Dynamics of

- hydrocarbon-degrading bacteriocenosis of an experimental oil pollution in Patagonian soil. *Int Biodeterior Biodegradation*. 2003;52(1):21-30.
[https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00102-6)
25. Mashreghi M, Marialigeti K. Characterization of bacteria degrading petroleum derivatives isolated from contaminated soil and water. *J Sci I R Iran*. 2005;16(4):317-20.
26. Balkıs N. Seasonal variations in the phytoplankton and nutrient dynamics in the neritic water of Büyükçekmece Bay, Sea of Marmara. *J Plankton Res*. 2003;25(7):703-17.
<https://doi.org/10.1093/plankt/25.7.703>
27. Rahman KSM, Thahira-Rahman J, Kourkoutas Y, Petsas I, Marchant R, Banat IM. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. *Bioresour Technol*. 2003;90(2):159-68.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00114-7](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00114-7)
28. Rahman KSM, Thahira-Rahman J, Lakshmanaperumalsamy P, Banat IM. Towards efficient crude oil degradation by a mixed bacterial consortium. *Bioresour Technol*. 2002;85(3):257-61.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00119-0](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00119-0)
29. Rahman KSM, Banat IM, Thahira J, Thayumanavan T, Lakshmanaperumalsamy P. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresour Technol*. 2002;81(1):25-32.
[https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(01\)00105-5](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(01)00105-5)