

Bazı Çevresel İzolatların Yağ/Su Ara Yüzü Etkileşimlerinin İncelenmesi Üzerine Bir Ön Çalışma

A Preliminary Study on the Investigation of Oil/Water Interface Interactions of Some Environmental Isolates

Tuğçe Yağmur Orhan[®], Caner Vural[®]

Pamukkale Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Denizli, Türkiye

Atf/Cite as: Orhan TY, Vural C. Bazı çevresel izolatların yağ/su ara yüzü etkileşimlerinin incelenmesi üzerine bir ön çalışma. Turk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derg. 2023;53(2):107-117.

ÖZ

Amaç: Bu çalışmada, çeşitli çevresel örneklerden n-dekan yüzeyine en iyi şekilde adsorbe olan bakterilerin izolasyonu, biyodegradasyon yetenekleri ile çeşitli fizyolojik özelliklerinin belirlenmesi ve yağ/su ara yüzü ile bakteriyel etkileşimlerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmanın amacına uygun olarak çevresel örneklerden bakteri izolasyonları yapılmıştır. İzolatlar koloni ve hücre morfolojileri ile Gram reaksiyonları bakımından incelenmiştir. İzolatların yağ/su ara yüzü etkileşimleri ve yağa tutunma durumları hidrokarbona bakteriyel adezyon (HBA) testi ile belirlenmiştir. Ayrıca, izolatların n-dekan giderim yetenekleri kantitatif olarak yağ parçalama oranı (YPO) analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Bulgular: n-dekan içeren besiyeri kullanılarak n-dekan parçalanması ve yağ/su ara yüzü etkileşimleri ile ilgili yapılan çalışmalardan 12 bakteriyel izolat elde edilmiştir. İzolatların agar petri üzerinde farklı koloni morfolojileri sergiledikleri gözlemlenmiştir. Hücre boyama sonucu, izolatların çoğunluğunun çubuk morfolojide olduğu ve Gram reaksiyonlarının değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Yağ/su ara yüzüne adsorpsiyon analizlerinde, izolatların çoğunun değişen oranlarda (%3-25) yağ/su ara yüzüne tutunduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, bazı izolatların ise hidrofobik özellik sergilemediği saptanmıştır. Çalışmadan elde edilen izolatların %48-97 oranında n-dekan giderimi yapabildikleri tespit edilmiştir.

Sonuç: Ön çalışma niteliğinde yapılan yağ/su ara yüzü çalışmalarından elde edilen mevcut verilere göre, bakteriyel hidrofobisite/adsorpsiyon ile biyofilm oluşumu arasında doğrudan bir ilişki kurulamasa da, hidrofobik özellikteki bakterilerin yağ/su ara yüzünde iyi derecede biyofilm yapısı oluşturduğu söylenebilir. Ayrıca, n-dekana iyi adsorbe olan izolatların aynı zamanda yüksek bir n-dekan giderim yeteneğine sahip oldukları gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Hidrokarbon giderimi, yağ/su arayüzü, biyofilm, hidrofobisite

ABSTRACT

Objective: This study aimed to isolate bacteria capable of adsorbing to the n-decane surface from various environmental samples, determine their biodegradation abilities, and study the bacterial interactions with the oil/water interface.

Methods: In accordance with the purpose of the study, bacterial isolations were made from environmental samples. The isolates were examined for colony and cell morphologies and Gram reactions. The oil/water interface interactions of the isolates and their adhesion to the oil were determined by the bacterial adhesion to hydrocarbon (BATH) test. In addition, the n-decane removal ability of the isolates was quantitatively determined by oil degradation rate analysis.

Results: Twelve bacterial isolates were obtained from the studies related to n-decane degradation and interactions of oil/water interface using n-decane-containing media. The isolates exhibited different colony morphologies on the agar media. It was determined that the isolates were mostly in rod shape and Gram reactions were variable. In the adsorption analysis to the oil/water interface, most of the isolates adhered to the oil/water interface at varying rates (3-25%). It was determined that some isolates did not exhibit hydrophobic properties. n-decane removal rates of the isolates were 48-97%.

Conclusion: According to the results of this study, although a direct relationship cannot be established between bacterial hydrophobicity/adhesion and biofilm formation, it can be commented that hydrophobic bacteria form a good biofilm structure at the oil/water interface. It was observed that isolates that adsorb well to n-decane also had a high n-decane removal ability.

Keywords: Hydrocarbon removal, oil/water interface, biofilm, hydrophobicity

Alındığı tarih / Received:
23.12.2022 / 23.December.2022

Kabul tarihi / Accepted:
10.03.2023 / 10.March.2023

Yayın tarihi / Publication date:
01.06.2023 / 01.June.2023

ORCID Kayıtları

T. Y. Orhan 0000-0003-4588-4754
C. Vural 0000-0003-1400-6377

✉ canerv@pau.edu.tr

GİRİŞ

Petrol ürünleri, ağırlıklı olarak ham petrolden elde edilir ve dünyada en yaygın kullanılan birincil enerji kaynaklarından birisidir⁽¹⁾. Ham petrol ve türevlerinin rafineri faaliyetleri sırasında toprağa dökülmesi, tanker ve gemilerle taşınması sırasında kazara salınması, depolanması, yanlış kullanılması ve tahrip edilmesi sonucu çevresel kirlilik ortaya çıkmaktadır⁽²⁾. Bu tarz çevresel kirliliklerin giderilmesinde kullanılan fiziksel ve kimyasal yöntemler oldukça karmaşık ve pahalı olabilmektedir. Bu nedenle, fiziksel ve kimyasal yöntemler petrol türevi kirleticilerin çevresel sistemlerden tamamen bertaraf edilmesinde etkili bir şekilde kullanılamaz. Ancak, bu tarz kimyasallar, biyolojik yollarla ucuz ve etkili bir şekilde giderilebilmektedir. Çünkü mikroorganizmalar hidrokarbon hücrel metabolizmalarında enerji elde etmede kullanabildiklerinden dolayı, hidrokarbon kirleticileri için güçlü ayrıştırıcılar olarak iş görebilmektedir⁽³⁾. Genellikle petrol hidrokarbonlarının çeşitli bakteriler, filamentöz funguslar, mayalar ve mikroalgler tarafından parçalanabildiği, ancak bakterilerin biyoremediyasyon çalışmalarında daha yoğun olarak kullanıldığı bilinmektedir^(4,5).

Kirleticilerin biyolojik giderimi açısından değerlendirildiğinde biyoremediyasyon kavramı ortaya çıkmaktadır. Biyoremediyasyon, çevreden kirleticileri uzaklaştırmak için mikroorganizmaların kullanıldığı⁽⁶⁾, petrol giderimi ve kazanımında faydalı olabilecek çevre dostu bir yöntem olarak tercih edilebilir^(7,8).

Bakteriler katı-sıvı, sıvı-sıvı ve sıvı-hava ara yüzeylerde biyofilm olarak bilinen mikrobiyal topluluklar oluştururlar. Biyofilmler, mikroorganizmaların kendi ürettikleri hücre dışı polimerik maddeler olan ekzopolisakaritler (EPS) içerisindeki mikrobiyal topluluklar olarak tanımlanabilir. Biyofilmler birçok bakteri türünün çoğalması, canlılıklarının korunması ve çevreye dağılması için önemli role sahiptir⁽⁹⁾. Sıvı/sıvı (yağ/su) ara yüzeylerde adsorpsiyon ve biyofilm oluşumu, katı ara yüzeylerdekinden daha farklı süreçler içermektedir^(10,11). Sıvı-sıvı ara yüzeylerde yapışmayı sağlayan fiziksel etkileşimler

mikroorganizmaların organizasyonunu, bir araya gelerek toplanmasını, çoğalmasını ve biyofilmin nihai yapısını etkilemektedir. Bunun yanında, EPS'nin absorbe edebilme, sabitleyebilme ve parçalayabilme gibi özelliklere sahiptir. Bu sayede, EPS çevresel kirleticilerin biyoremediyasyonunda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir⁽¹²⁾. *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Paenibacillus*, *Alcaligenes*, *Sporosarcina*, *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Cycloclastic* ve *Alcanivorax* gibi birçok bakteri cinsine ait türlerin biyofilm oluşturdukları ve çeşitli kirli ortamlarda kirleticileri parçaladıkları ya da mineralize edebildikleri bildirilmiştir⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Petrol ve türevleri gibi hidrofobik karakterdeki sıvı organik kirleticiler sulu yüzeylerde kümelenmektedir. Bu nedenle, bu maddelerin sulu sistemlerde oluşturduğu çevresel kirliliklerin bakteriler aracılığıyla giderilmesi için bakterilerin yağ/su ara yüzü etkileşimlerinin anlaşılması önem taşımaktadır. Bu çalışmada, hidrokarbonlarca kirlenmiş çeşitli çevresel örneklerden on karbonlu alifatik bir hidrokarbon olan *n*-dekanın en iyi şekilde biyotransformasyonunu sağlayan bakterilerin izolasyonu, bu bakterilerin *n*-dekan/su ara yüzü etkileşimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Besiyerleri: *n*-dekan ortalama bir karbon zincir uzunluğuna sahip, suda çözünmeyen ve düşük yoğunluğundan dolayı su yüzeyinde faz oluşturan, oda sıcaklığında buharlaşmayan özelliktedir. Ayrıca, *n*-dekan bakteriyel biyofilmlerin gözlemlenebildiği bir emülsiyon ara yüz oluşturduğu ve yağ/su ara yüzü oluşturmak için çalışmalarda tercih edilebilen^(16,17) bir hidrokarbon olduğundan dolayı, bu çalışmada yağ/su ara yüzü oluşturmak için *n*-dekan (%>99 saflık, TCI, Japonya) kullanılmıştır. Çalışmada *n*-dekan besiyerlerine eklenmeden önce 0.45 µm por çapına sahip filtreden geçirilerek steril edilmiştir. *n*-dekan bulunan ortamlarda üreyebilen bakterilerin izolasyonu için Bushnell Haas (BH) sıvı besiyeri (HiMedia, Hindistan) kullanılmıştır. Bakterilerin izolasyonu, saflaştırılması ve çoğaltılması için Nutrient Broth (NB) ve Nutrient Agar (NA) besiyerleri (Biokar Diagnostics, Fransa)

kullanılmıştır. Besiyerinden *n*-dekan ekstraksiyonu için Hekzan (Merck, Amerika Birleşik Devletleri) ve Sikloheksan (Isolab, Almanya) kullanılmıştır.

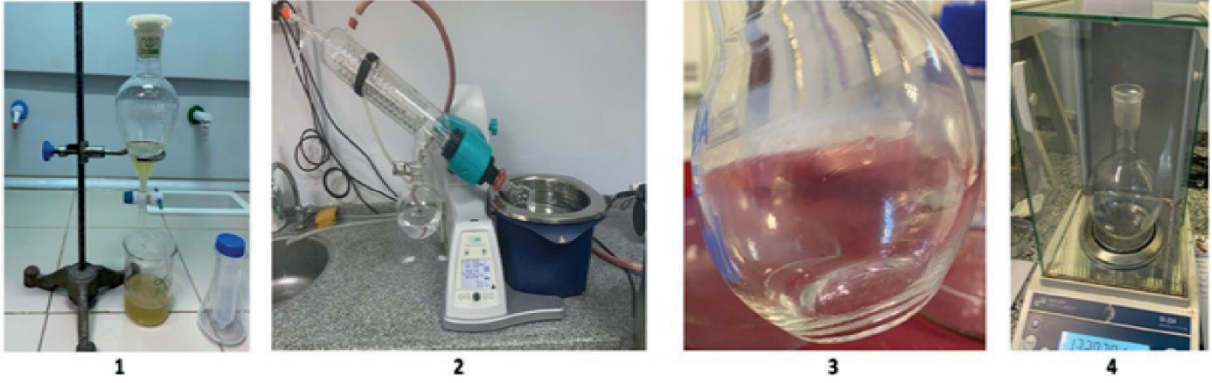
Bakterilerin Çoğaltılması ve İzolasyonu: Çalışmada yağ/su ara yüzünde biyofilm oluşturma ve sıvı hidrokarbon parçalama yeteneği olan bakterilerin izolasyonu amacıyla göl suyu, evsel atık su, petrokimya endüstrisi atık suyu olmak üzere çeşitli çevresel kaynaklardan örneklemeler yapılmıştır. Steril koşullarda laboratuvara getirilen örnekler Li ve ark.⁽¹⁸⁾ tarafından tarif edilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Her bir örnekten %5 (v/v) *n*-dekan içeren steril BH sıvı besiyeri ortamlarına %5 (v/v) olacak şekilde inokülasyon yapılarak durağan koşulda 30°C'de 14 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ortamlar her 48 saatte bir kontrol edilerek mikrobiyal büyümeler takip edilmiştir. İnkübasyon sonrasında, BH sıvı besiyerinde çoğalan bakterilerin saflaştırılması için her bir örneği içeren BH sıvı besiyeri ortamlarından %0.85'lik NaCl içeren Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) kullanılarak bir seri seyreltmeler yapılmıştır. Seyreltme tüplerinden 0.1'er mL alınarak tek karbon kaynağı olarak %1 (v/v) *n*-dekan içeren BH agar besiyeri yüzeylerine yayma plaka yöntemiyle ekimler yapılarak 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında BH agar yüzeyinde tek düşen kolonilerden NA besiyerine çizgi ekim yöntemiyle ekimler yapılarak bakteri kolonileri saflaştırılmıştır.

İzolatların Yağ/Su Ara yüzü ile Etkileşimlerinin Belirlenmesi: Saflaştırılan bakteriyel izolatların yağ/su ara yüzünde biyofilm oluşturma davranışlarının incelenmesi ve *n*-dekanı parçalama yeteneklerinin belirlenmesi için BH sıvı besiyeri ve NB besiyeri kullanılmıştır. BH besiyeri hidrokarbon parçalayabilen heterotrof bakterilerin izolasyonu için tercih edilen bir besiyeridir. BH besiyerine sadece parçalanması istenen hidrokarbonlar eklenerek bakteriyel degradasyon ve izolasyon çalışmaları yapılabilir. NB besiyeri ise heterotrof bakterilerin büyümesi için zengin ek besin maddeleri içeren genel bir besiyeridir. Çalışmada, sadece tek karbon kaynağı olarak *n*-dekan varlığında ve zengin organik karbonlu bileşiklere ek olarak *n*-dekan varlığında izolatların davranışlarının gözlenmesi amacıyla bu iki besiyeri kullanılmıştır. Li ve ark.⁽¹⁸⁾ tarafından kullanılan yöntem çalışmamıza uyarlanarak uygulanmıştır. Öncelikle, her bir izolata

ait taze kültürlerinden %0.85'lik NaCl içeren FTS ile 1 McFarland (3.0x10⁸ kob/mL) olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Daha sonra, her bir bakteri izolatına ait hücre süspansiyonlarından 100'er µL alınarak %5 (v/v) *n*-dekan içeren BH sıvı besiyeri ve %5 (v/v) *n*-dekan içeren NB besiyerine pasajlandıktan sonra durağan koşulda 30°C'de 14 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Bakterilerin besiyerlerindeki üreme durumları her 24 saatte bir kontrol edilerek yağ/su ara yüzüne en hızlı tutunma, biyofilm oluşturma ve *n*-dekan emülsifiye etme özelliklerinden en az birine sahip 12 izolat seçilmiştir.

Bakteriyel Hidrofobisite ve Hidrokarbona Bakteriyel Adsorpsiyon Testi: Bakteri izolatlarının hidrofobisite ve yağ/su ara yüzüne tutunma özellikleri, hidrokarbona bakteriyel adsorpsiyon (HBA) testi ile belirlenmiştir. HBA testi genellikle bakterilerin hidrofobik özelliğinin bir ölçüsü olarak tanımlanmakla birlikte, çalkalama sonucunda mikroorganizmaların bilinen bir konsantrasyondaki polar olmayan faz yüzeyine yapışma yeteneğini ölçen bir test olarak bilinmektedir⁽¹⁹⁾. HBA testinde yağ/su iki fazlı sıvı sistemlerin belirli bir süre kuvvetli bir şekilde karıştırılması sonucu bakterilerin yağ fazı içerisine absorbe olma durumuna göre, alttaki sulu fazda kalan bakteri miktarının spektrofotometrik ölçümü yapılır. Bu sayede, ne kadar bakterinin su fazında kaldığı tespit edilir. Çalışmada Rosenberg⁽²⁰⁾ tarafından geliştirilen HBA testinde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Bakteri izolatları NB besiyerine pasajlanarak 30°C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında izolatların hücre süspansiyonları Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) çözeltisi ile 0.2 OD (2 McFarland) olacak şekilde spektrofotometre vasıtasıyla 600 nm dalgaboyunda ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteri süspansiyonları *n*-dekan ile 1:3 (nonpolar (v): polar (v)) oranında karıştırıldıktan sonra vorteks cihazı ile 2 dakika boyunca tam hızda karıştırılmıştır. Oluşan emülsiyonların ayrılması için oda sıcaklığında 15 dakika beklendikten sonra, her bir örneğin alttaki sulu fazı yine spektrofotometre vasıtasıyla 600 nm'de ölçülmüştür. Bakterileri yağ fazına yapışması, karıştırma öncesi ve sonrası optik yoğunluk arasındaki oran aşağıdaki formüle göre hesaplanarak ölçülmüştür.

$$\text{HBA (\%)} = 100 \times [1 - (\text{OD}_{600} \text{ karıştırma sonrası} / \text{OD}_{600} \text{ karıştırma öncesi})]$$



Şekil 1. Hidrokarbon ekstraksiyon aşamaları: 1- Ayırma hunisi ile fazın ayrılması, 2- Döner buharlaştırıcı, 3- Evaporasyon sonrası organik fazın kazanımı, 4- Tartım işlemi.

İzolatların *n*-dekan Parçalama Kapasitelerinin Belirlenmesi: Bakteriyel izolatlar tarafından gerçekleştirilen *n*-dekan parçalama oranları gravimetrik analiz yöntemi⁽²¹⁾ ile belirlenmiştir. Bu analiz için, izolatlar öncelikle NB ortamına pasajlanarak 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. Taze kültürden PBS çözeltisi ile 1 McFarland (3.0×10^8 kob/mL) olacak şekilde bakteri hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan her bir bakteri süspansiyonundan 200 µL alınarak %5 *n*-dekan (v/v) içeren 20 mL NB besi ortamına inoküle edilerek 30°C'de 150 rpm'de 7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ayrıca, bakteri inoküle edilmemiş bir adet aynı besiyeri ortamı ise kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, ortamdaki yağ ekstraksiyonu yapılabilmesi için öncelikle tüm örnekler 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantlar alınarak her bir süpernatant üzerine eşit hacimde hekzan/sikloheksan (2:1) ilave edilerek iyice karıştırılmıştır. Elde edilen karışımlar 5 dakika çalkalandıktan sonra, ayırma hunisi kullanılarak her bir örnek için organik faz toplanmıştır. Bu ekstraksiyon işlemi iki kez tekrarlanmıştır (Şekil 1). Ekstraksiyonla elde edilen organik faz darası alınmış bir evaporatör balonuna aktararak, bir döner buharlaştırıcı vasıtasıyla organik fazda bulunan çözgen (hekzan/sikloheksan) karışımı buharlaştırılmıştır. Evaporasyon sonrasında balonda kalan organik madde tartımları yapılarak bakteriler tarafından parçalanmış olan hidrokarbon yüzdesi hesaplanmıştır. Kalan hidrokarbon yüzdesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$YPO = (KBYA - ÖKYA) \times 100 / KBYA$$

YPO: Yağ parçalanma oranı; KBYA: Kontrol besiyerindeki yağın ağırlığı; ÖKYA: Örnekte kalan yağın ağırlığı.

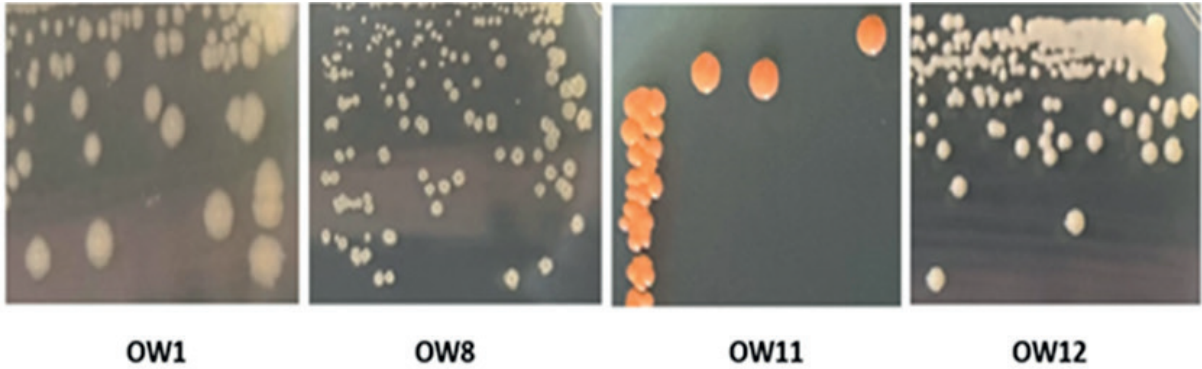
BULGULAR

Çevresel kaynaklardan yapılan bakteriyel izolasyon işlemleri ile yağ/su ara yüzüne en hızlı tutunma, biyofilm oluşturma ve *n*-dekan emülsifiye etme özelliklerine göre 12 bakteriyel izolat seçilmiştir. Bakteri izolatlarının NA besiyerinde genellikle krem ve beyaz renkli koloniler oluşturdukları gözlemlenmiştir. Sadece OW11 kodlu izolatta turuncu renkli pigmentasyon olduğu görülmüştür (Şekil 2). İzolatların Gram boyama özelliklerinin ve ışık mikroskobu altında hücre morfolojilerinin değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 3). İzolatların ön tanılamaları için NA besiyeri üzerindeki koloni şekli, koloni rengi gibi özellikler ile Gram reaksiyonları, mikroskop morfolojileri, referans hidrokarbon (*n*-dekan) içeren BH ve NB besiyerlerinde üreme durumları, izolatlara verilen bakteri kodları ile birlikte Tablo 1'de verilmiştir.

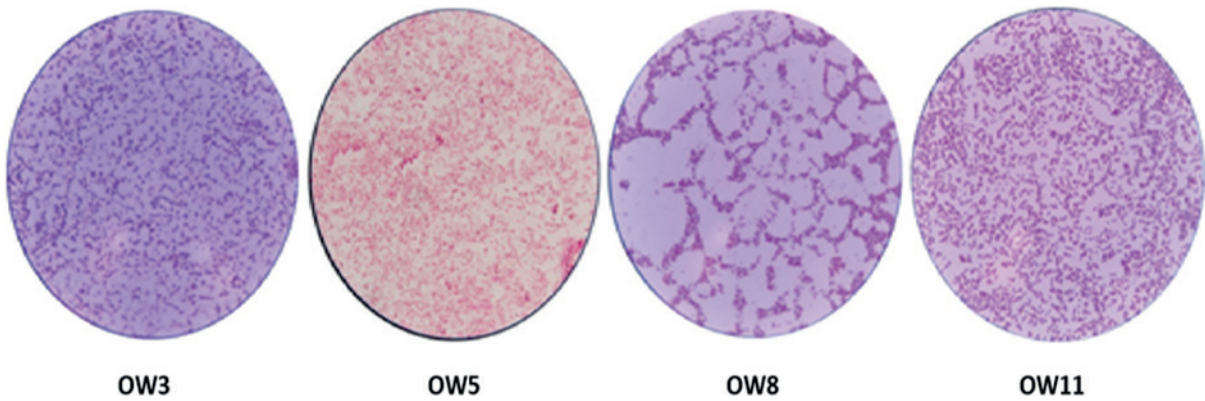
Bakteri izolatlarının %5 (v/v) *n*-dekan içeren NB ve BH besiyerlerinde 1-5 gün arasında üredikleri gözlemlenmiştir. OW1, OW2, OW4, OW5 ve OW7 kodlu izolatlarda 24 saat sonrasında üremeler gözlenirken; OW11 kodlu izolat 2. günde, OW12 kodlu izolat ise 3. günde üremiştir. Ayrıca, OW3, OW6, OW8, OW9 ve OW10 kodlu izolatlarda üremenin 5. günde gerçekleştiği görülmüştür. NB ve BH besiyerinde inkübasyon sonrasında OW5, OW6 ve OW11 kodlu

Tablo 1. Bakteri izolatlarının genel özellikleri

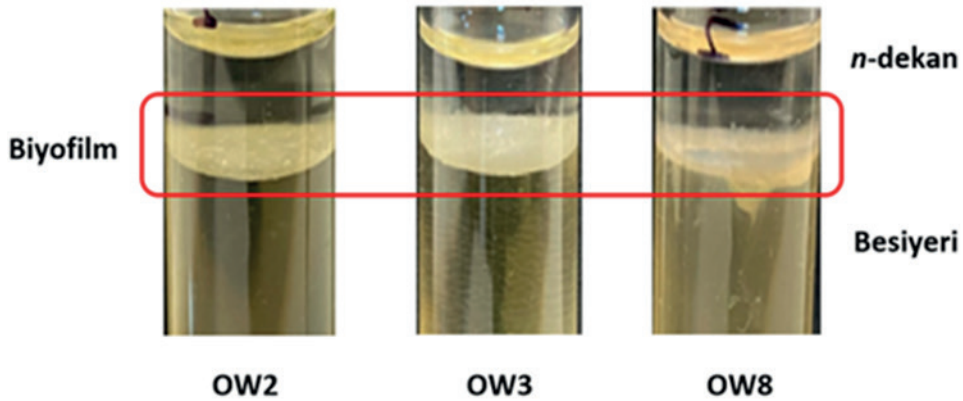
Bakteri Kodları	Genel bakteriyel karakteristikler				
	NA besiyerindeki koloni morfolojisi	Gram özelliği	Mikroskopik morfoloji	%5 <i>n</i> -dekan içeren NB'da üreme (30°C)	%5 <i>n</i> -dekan içeren BH'de üreme (30°C)
OW1	Krem	Gram negatif	Kokobasil	1 gün	1 gün
OW2	Krem-mukoid	Gram negatif	Kokobasil	1 gün	1 gün
OW3	Koyu krem	Gram pozitif	Kok	5 gün	5 gün
OW4	Beyaz	Gram negatif	Çomak	1 gün	1 gün
OW5	Şeffaf	Gram negatif	Çomak	1 gün	1 gün
OW6	Şeffaf	Gram pozitif	Çomak	5 gün	5 gün
OW7	Beyaz/küçük	Gram pozitif	Kokobasil	1 gün	1 gün
OW8	Krem/orta	Gram pozitif	Çomak	5 gün	5 gün
OW9	Krem/orta	Gram pozitif	Çomak	5 gün	5 gün
OW10	Krem/küçük	Gram negatif	Çomak	5 gün	5 gün
OW11	Turuncu	Gram pozitif	Çomak	2 gün	2 gün
OW12	Beyaz/mukoid	Gram negatif	Çomak	3 gün	3 gün



Şekil 2. İzolatlardan bazılarının NA besiyerindeki koloni görünüşleri



Şekil 3. İzolatlardan bazılarının Gram özellikleri ve mikroskop morfolojileri

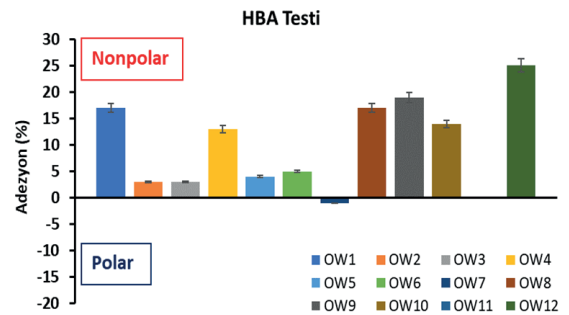


Şekil 4. Bakteri izolatlarının *n*-dekan/su ara yüzünde oluşturdukları biyofilm örnekleri

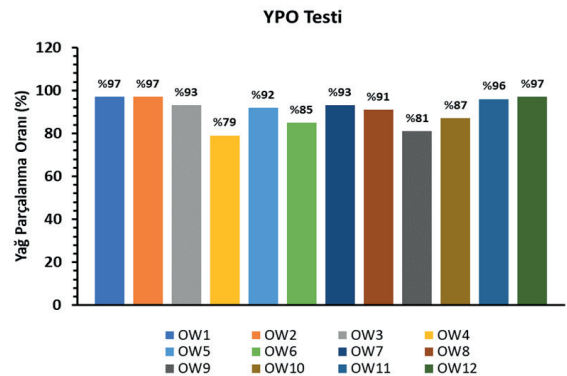
izolatlar dışında diğer izolatların çoğunun *n*-dekan/su ara yüzünde biyofilm tabakası oluşturdukları ancak bu tabakaların yapısının (kalınlık, tekstür, stabilite vb.) değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. NB besiyerinde yağ/su ara yüzüne tutunan ve biyofilm oluşumu iyi olan izolatlardan bazıları Şekil 4'te gösterilmiştir.

HBA testi sonuçlarına göre polar olmayan faza (*n*-dekan)%13,%14,%17,%17,%19 ve %25 oranlarıyla en fazla tutunan izolatların sırasıyla OW4, OW10, OW1, OW8, OW9 ve OW12 olduğu belirlenmiştir. Polar olmayan faza en az tutunan izolatlar ise, %3, %3, %4 ve %5 ile sırasıyla OW2, OW3, OW5 ve OW6 olarak belirlenmiştir. Bunun yanında, OW11 izolatının polar fazdaki bakteri yoğunluğunda herhangi bir değişiklik olmazken, OW7 izolatının polar yüzeye eğilimi olduğu gözlenmiştir (Şekil 5). OW7 ve OW11 hariç diğer bakteri izolatlarının hidrofobik karakterde olduğu görülmüştür.

Hidrokarbon giderim testinden elde edilen bulgulara göre, izolatların çoğunun yüksek hidrokarbon giderimine sahip olduğu görülmektedir. OW1, OW2, ve OW12 kodlu izolatların %97 ile, OW11 izolatının ise %96 ile en yüksek *n*-dekan giderim oranına sahip oldukları gözlenmiştir. Ayrıca en düşük *n*-dekan giderimi yapan izolatların ise sırasıyla %79 ve %81 giderim oranıyla OW4 ve OW9 oldukları saptanmıştır (Şekil 6).



Şekil 5. HBA (%) testi sonuçları



Şekil 6. İzolatlara ait hidrokarbon (*n*-dekan) giderim testi sonuçları

TARTIŞMA

Bu çalışmada, farklı çevresel örneklerden izole edilen bakterilerin *n*-dekan/su ara yüzüne en iyi şekilde tutunma, *n*-dekan parçalama ve yağ/su ara yüzü etkileşimleri incelenmiştir. Bu doğrultuda yapılan izolasyon çalışmaları sonucu çalışmaya 12 izolat dahil edilmiştir. İzolatların koloni morfolojileri, mikroskopik morfolojileri, Gram özellikleri ve *n*-dekan içeren ortamda üreme durumları incelenmiştir. İzolatların 30°C sıcaklıkta üremelerinin 1 ila 5 gün arasında olduğu ve yağ/su ara yüzüne tutunmalarının ise 2 ila 5 gün arasında gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Yapılan bazı çalışmalarda, biyofilm oluşumu ve hidrokarbon giderimi için inkübasyon sıcaklığının çoğunlukla 30-37°C olarak seçildiği, inkübasyon süresinin ise 48 saat ile 21 gün arasında değiştiği görülmüştür^(22,23). Basumatary ve ark.⁽²⁴⁾ hidrokarbonlarca kirletilmiş topraktan elde ettikleri izolatların 37°C'de 7 günde 135 rpm'de ürediklerini bildirmiştir. Hossain ve ark.⁽¹⁾ ise petrolle kirletilmiş topraktan elde ettikleri izolatların üremesi için optimum koşulların 37°C'de 180 rpm'de 48 saat olduğunu bildirmiştir. Onur⁽²⁵⁾ ve Aydın⁽²⁶⁾ petrolle kirletilmiş nehir suyundan aldıkları örneklerden elde ettikleri izolatları 30°C'de sırasıyla yedi gün⁽²⁵⁾ ve üç hafta⁽²⁶⁾ inkübasyona bıraktıklarını bildirmişlerdir. Li ve ark.⁽¹⁸⁾ ise petrolle kirletilmiş deniz kenarındaki topraktan elde ettikleri izolatların 30°C'de beş günde ürediğini bildirmiştir. Laothamteep ve ark.'nın⁽²⁷⁾ yaptıkları bir çalışmada, poliaromatik hidrokarbon (PAH) parçalanması için kullandıkları *Bacillus subtilis*'i 30°C'de beş gün boyunca inkübe etmiş ve 30°C sıcaklıkta PAH (Poliaromatik Hidrokarbon) parçalanmasının yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarda da görüldüğü gibi örnekleme yapılan alan veya mikroorganizma değiştikçe inkübasyon koşulları da değişmektedir. Ayrıca yüksek sıcaklıkta sudaki oksijen çözünürlüğü azaldığı için aerobik mikrobiyal bozunma sınırlandırılırken, düşük sıcaklıkta ise hidrokarbon degradasyonu gerçekleşmeyebilir⁽²⁸⁾. Bu çalışmada ise, kullanılan bakteriyel izolatlar farklı çevresel kaynaklardan elde edildikleri için çalışma sıcaklığı 30°C olarak tercih edilmiştir.

Çalışmada bakterilerin çoğunun farklı yapılarda (tekstür, kalınlık vb.) biyofilm tabakası oluşturdukları gözlemlenmiştir (Şekil 4). Ayrıca NB besiyerinde biyofilm oluşumunun BH besiyerine göre daha önce gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu durumun NB besiyerindeki besin içeriklerinin daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Biyofilm, bakterilerin stres koşulları altında oluşturdukları mikrobiyal topluluklardır. Biyofilm oluşumunu yüzey yapısı⁽²⁹⁾, ortamdaki klor ve besin (karbon) miktarı⁽³⁰⁾ vb. faktörlerden etkilenebilmektedir. Chandy ve Angles⁽³⁰⁾, düşük seviyede organik karbon içeren klorlu içme sularında biyofilm oluşumunun gözlemlenmediği ve organik karbonun uzaklaştırılmasının klorun daha uzun süre ortamda kalmasına yol açtığından dolayı biyofilm oluşumunu engellediğini tespit etmişlerdir. Literatürde, bakterilerin yağ/su ara yüzünde tutundukları ve biyofilm oluşturdukları çalışmalar mevcuttur^(16,31). Bu doğrultuda petrol-su ara yüzünde oluşan mikrobiyal biyofilmin dağılmış petrol damlacıklarının stabilizasyonu ve suya dökülen petrolün giderilmesinde çevresel yönden iyi ve sürdürülebilir bir yöntem olduğu belirtilmiştir⁽³²⁾. Ayrıca Mishra ve ark.⁽³³⁾ derleme olarak hazırladıkları çalışmalarında biyofilmlerde quorum sensing ve kemotaksi genlerinin kontrol edilmesiyle organik kirleticilerin ve ağır metallerin biyoremediyasyon kinetiğinin geliştirilebileceğini belirtmişlerdir. Mangwani ve ark.⁽¹⁴⁾, hidrokarbonca kirletilmiş deniz ortamından izole ettikleri polisiklik aromatik hidrokarbon (fenantren ve piren) parçalayıcı bakterilerin her iki aromatik hidrokarbona büyüydiklerini ve izolatların %75'nin biyofilm oluşturduğu tespit etmişlerdir. Ayrıca bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğinin organik kirleticilerin biyoremediyasyon etkinliğini artırdığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde, iyi biyofilm oluşturan *Bacillus*, *Halomonas* gibi cinslerin petrol degradasyonunda kullanılabileceği bildirilmiştir⁽³⁴⁾. Lahiri ve ark.⁽¹²⁾, biyofilmin çeşitli fizikokimyasal parametrelerinin PAH gideriminin etkinliğini düzenlediğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise, OW5, OW6 ve OW11 kodlu izolatların biyofilm oluşturmadıkları tespit edilmekle birlikte, bu izolatların sırasıyla %92, %85 ve %96 oranında *n*-dekan parçalayabildikleri gözlemlenmiştir (Şekil 6).

Bu sonuçlara göre, bakterilerin sulu sistemlerde yağ parçalaması için her zaman ara yüzde biyofilm oluşturmadıkları; aynı şartlar altında yağ/su ara yüzünde biyofilm oluşturmanın bakteriden bakteriye farklılık gösterebildiği söylenebilir.

HBA testi sonuçlarına göre izolatlardan 10 tanesinin %3-25 oranında yağ/su ara yüzüne tutundukları gözlemlenmiştir. OW7 ve OW11 izolatlarının ise yağ/su ara yüzüne tutunmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda OW7 ve OW11 dışında kalan tüm izolatların hidrofobik özellikte olduğu tespit edilmiştir. Koolivand ve ark.⁽³⁵⁾, petrol hidrokarbonlarınca zenginleştirilmiş çamurdan izole ettikleri *Sphingomonas olei* ve *Acinetobacter radioresistens* bakterilerinin karıştırılmasıyla oluşturulan kompostun petrol giderimi özellikleri araştırmışlardır. Bu amaçla petrol giderimi, emülsifikasyon indeksi, HBA testi vb. testleri gerçekleştirmişlerdir. Her iki bakterinin karışımı ile oluşturulan kompostun HBA değerini %15.25 olarak tespit etmişlerdir. Bulgularımız genellikle literatür ile uyumlu olmasına rağmen daha yüksek HBA değerine sahip çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Poddar ve ark.⁽³⁶⁾ araç tamir istasyonları, garajlardan ve benzin depolarında zenginleştirme kültür ile izole ettikleri bakterilerden konsorsiyum oluşturmuşlar ve hidrokarbon giderimi, HBA testi vb. testleri gerçekleştirmişlerdir. İzolatların HBA testi sonuçlarına göre en yüksek %72.9 ile *Pantoea sp.*, en düşük %49.2 ile *Klebsiella sp.* olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda da görüldüğü gibi bakteriyel adhezyon değerlerinin bakteriye, ürettiği bileşenlere (EPS, biyosüfaktan vb.) göre değiştiği söylenebilir. Wang ve ark.⁽³¹⁾ yaptıkları bir çalışmada, EPS'nin moleküler bileşimindeki proteinlerin bakteriyel adhezyonu etkileyen bir faktör olduğu bildirilmiştir. Subbiahdoss ve Reimhult⁽¹⁶⁾, bakterilerin hidrofobik özellikleri ile *n*-dekan/su ara yüzünde biyofilm oluşturma durumlarını ilişkilendirmiştir. Bakterilerin hidrokarbona tutunma durumlarının biyofilm oluşumuna etkisi olsa da, ürettikleri biyosüfaktanların biyofilm yapılarına etki ettiğini bildirmişlerdir. Rodrigues ve ark.⁽³⁷⁾, hidrofobik karbon kaynağı varlığında bakterilerin hidrofobik özellikler kazandığını ve bu nedenle bakterilerin hidrofobik kirleticilerle (örneğin ham petrol) kirlenmiş ortamlarda kullanılabileceğini bildirmiştir.

Çalışmada elde edilen çevresel izolatların hidrokarbon (*n*-dekan) giderimi yetenekleri incelendiğinde, bakteri izolatlarının *n*-dekanı %79 ila %97 arasında değişen oranlarda parçalayabildikleri görülmüştür. Literatürde farklı kaynaklardan elde edilen mikroorganizmalarla değişen oranlarda hidrokarbon parçalanabildiği bildirilmiştir. Örneğin, Basumatary ve ark.⁽²⁴⁾, *Bacillus vallismortis* DU12 ve *B. vallismortis* DU14 suşları ile yaptıkları bir çalışmada, *in vitro* koşullarda motor yağının bu suşlar tarafından %26.34 ve %53.85 oranında parçalanabildiğini tespit etmişlerdir. Ansari ve ark.⁽³⁸⁾, Basra Körfezi'ndeki mercanlardan izole ettikleri *Cobetia*, *Shewanwlla*, *Alcanivorax* ve *Cellulosimicrobium* cinslerine ait suşların yüksek ham petrol giderimine sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Çalışmada IAUK3568, IAUK3568, IAUK3502, IAUK3531 ve IAUK3552 suşlarının ham petrolü sırasıyla %93.5; %88.13; %87.24; %85.17 ve %77.3 oranlarında parçaladıklarını belirlemişlerdir. Bulgularımız literatürdeki çalışmalarla genel olarak uyumludur. Ayrıca hidrokarbon gideriminin zaman, mikroorganizma türü vb. faktörlerden etkilendiğini rapor eden araştırmalar da bulunmaktadır. Titah ve ark.⁽²³⁾, *Bacillus subtilis* ve *Pseudomonas putida* ile yaptıkları bir çalışmada, bu bakterilerin zaman geçtikçe toplam petrol hidrokarbon (TPH) giderimini maksimuma ulaştırdıklarını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada ise, *Pseudomonas aeruginosa*'nın iki suşunun (PP3 ve PP4) yüksek moleküler ağırlıklı hidrokarbonları (>C40) parçalama yetenekleri incelenmiştir. PP3 ve PP4 suşları için ham petrol giderimi sırasıyla %50 ve %86, alkan gideriminin sırasıyla %46 ve %47, PAH gideriminin sırasıyla %22 ve %48 olarak tespit edilmiştir. PP4 suşunun PP3 suşuna göre daha etkili olduğu ve biyodegradasyon süresince tüm hidrokarbonların bakteriler tarafından biyosüfaktan üretimi için karbon kaynağı olarak kullanıldığı ve ayrıca yüksek molekülü hidrokarbonların biyosüfaktan üretimi için daha fazla kullanıldığı bildirilmiştir⁽³⁹⁾. Eze ve ark.⁽⁴⁰⁾ dizel ile kirlenmiş topraklardan rizoremediyasyon için *Medicago sativa* ve *Paraburkholderia tropica* bakterilerini izole etmişlerdir. *M. sativa* ve *P. tropica* türleri birlikte bitki toprağına aşılandığında %96 oranında C10-C25 *n*-alkan giderimini yaptığı ve ayrıca bitki biyokütlesinde %99'luk bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada izole edilen bakterilerin farklı koloni ve mikroskop morfolojisine sahip, yağ/su ara yüzüne tutunma, biyofilm oluşturma ve hidrokarbon degradasyonu gibi yeteneklerinin değişkenlik gösterdiği görülmektedir. Bakterilerin hidrokarbon giderme ve biyofilm oluşturma özellikleri arasında doğrudan bir ilişki olmamasına rağmen *n*-dekana yüksek oranda tutunan izolatların hidrokarbon parçalama yeteneklerinin de yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca, bazı izolatların hidrokarbona tutunmadan parçalama yapabildikleri saptanmıştır. Petrol sızıntıları, insanlar ve hayvanlar için birçok sağlık, çevresel ve ekonomik sorunu da beraberinde getirir⁽¹⁵⁾. Bu tür çevresel problemlerin aşılabilmesi için geleneksel yöntemler yerine, sürdürülebilir teknolojik yöntemlerin tercih edilmesi zaman, maliyet ve verilen zararın en aza indirilmesi açısından önem taşımaktadır. Biyoremediyasyon çalışmaları geniş ölçeklerde uygulanabilirliği açısından umut vadeden çalışmalardır. Bu açıdan değerlendirildiğinde, mikroorganizmaların kirletici yüzeyler ile etkileşimlerinin incelenmesi oldukça önem arz etmektedir. Özellikle, mikroorganizmaların yağ/su ara yüzüne adezyon mekanizmalarının belirlenmesi, petrol ve türevi gibi suda çözünmeyen ve su yüzeyinde faz oluşturan hidrokarbonlar ile kirlenmiş suların kirleticilerden temizlenmesi için yeni ve etkili biyoremediyasyon stratejilerinin geliştirilebilmesi açısından önemlidir. Yapılan bu çalışma bir ön araştırma niteliği taşımaktadır. Bu nedenle, bu çalışmadan elde edilen bulgular hidrokarbonlarca kirlenmiş çevresel kaynaklardan izole edilen bu bakterilerin yağ/su ara yüzü etkileşimleri ve hidrokarbon giderimi özellikleri hakkında bir ön bilgi sağlamaktadır. Bakterilerin tür bazında tanımlanması sonraki araştırmaların konusu olabilir. Bu doğrultuda bu alanda yapılacak olan biyoremediyasyon çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

Finansman: Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 2022FEBE014 Nolu Yüksek Lisans Tez Projesi olarak desteklenmiştir.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Funding: This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordinatorship as BAP Project No. 2022FEBE014.

KAYNAKLAR

1. Hossain MF, Akter MA, Sohan MR, Sultana DN, Reza MA, Hoque KMF. Bioremediation potential of hydrocarbon degrading bacteria: isolation, characterization, and assessment. *Saudi J Biol Sci.* 2022;29(1):211-6. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.069>
2. Keta MN, Bello IM, Bazata YA, et al. Biodegradation of crude oil contaminated soils using fungal species. *Int J Sci Res Biol Sci.* 2021;8(4):35-41.
3. Abbasian F, Lockington R, Mallavarapu M, Naidu R. A comprehensive review of aliphatic hydrocarbon biodegradation by bacteria. *Appl Biochem Biotechnol.* 2015;176(3):670-99. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1603-5>
4. Wang HP. The study on oil pollution environmental treatment based on micro-biological degradation. *Adv Mater Res.* 2012;490-495:1743-7. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.490-495.1743>
5. Liu QY, Zhang YB, Zhao DF, Zhao CC. Bioremediation condition optimization of hydrocarbon in soil using response surface methodology by microbial consortium KL9-1. *Adv Mater Res.* 2012;518-523:2073-8. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.518-523.2073>
6. Alharbi NK, Alzaban MI, Albarakaty FM, et al. Transcriptome profiling reveals differential gene expression of laccase genes in *Aspergillus terreus* KC462061 during biodegradation of crude oil. *Biology (Basel).* 2022;11(4):564. <https://doi.org/10.3390/biology11040564>
7. Ambaye TG, Chebbi A, Formicola F, et al. Remediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons and its reuse for agriculture: Recent progress, challenges, and perspectives. *Chemosphere.* 2022;293:133572. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133572>
8. Liang K, Gao R, Wang C, Wang W, Yan W. Chemotaxis toward crude oil by an oil-degrading 6-1B strain. *Pol J Microbiol.* 2021;70(1):69-78. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-006>
9. Donlan R. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881-90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>

10. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016;14(9):563-75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
11. Macedo AJ, Kuhlicke U, Neu TR, Timmis KN, Abraham WR. Three stages of a biofilm community developing at the liquid-liquid interface between polychlorinated biphenyls and water. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(11):7301-9. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.7301-7309.2005>
12. Lahiri D, Nag M, Dey A, et al. Biofilm mediated degradation of petroleum products. *Geomicrobiol J*. 2022;39(3-5):389-98. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1968979>
13. Kostka JE, Prakash O, Overholt WA, et al. Hydrocarbon-degrading bacteria and the bacterial community response in gulf of mexico beach sands impacted by the deepwater horizon oil spill. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(22):7962-74. <https://doi.org/10.1128/AEM.05402-11>
14. Mangwani N, Kumari S, Das S. Taxonomy and characterization of biofilm forming polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria from marine environments. *Polycycl Aromat Compd*. 2021;41(6):1249-62. <https://doi.org/10.1080/10406638.2019.1666890>
15. Rahmati F, Asgari LB, Shadfar N, van Bodegom PM, van Hullebusch ED. A review on biotechnological approaches applied for marine hydrocarbon spills remediation. *Microorganisms*. 2022;10(7):1289. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071289>
16. Subbiahdoss G, Reimhult E. Biofilm formation at oil-water interfaces is not a simple function of bacterial hydrophobicity. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2020;194:111163. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111163>
17. Subbiahdoss G, Osmen S, Reimhult E. Cellulosic biofilm formation of *Komagataeibacter* in kombucha at oil-water interfaces. *Biofilm*. 2022;26(4):100071. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2022.100071>
18. Li C, Zhou ZX, Jia XQ, Chen Y, Liu J, Wen JP. Biodegradation of crude oil by a newly isolated strain *Rhodococcus* sp. JZX-01. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;171(7):1715-25. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0451-4>
19. Rosenberg M. Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: water interface. *Crit Rev Microbiol*. 1991;18(2):159-73. <https://doi.org/10.3109/10408419109113512>
20. Rosenberg M. Microbial adhesion to hydrocarbons: twenty-five years of doing MATH. *FEMS Microbiol Lett*. 2006;262(2):129-34. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00291.x>
21. Diallo MM, Vural C, Cay H, Ozdemir G. Enhanced biodegradation of crude oil in soil by a developed bacterial consortium and indigenous plant growth promoting bacteria. *J Appl Microbiol*. 2021;130(4):1192-207. <https://doi.org/10.1111/jam.14848>
22. Ehmedan SS, Ibrahim MK, Azzam AM, Hamedo HA, Saeed AM. Acceleration the bacterial biodegradation of crude oil pollution using Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles. *Environ Nanotechnol Monit Manag*. 2021;16:100613. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100613>
23. Titah HS, Pratikno H, Purwanti IF, Wardhani WK. Biodegradation of crude oil spill using *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas putida* in sequencing method. *J Ecol Eng*. 2021;22(11):157-67. <https://doi.org/10.12911/22998993/142913>
24. Basumatary M, Das S, Gogoi M, Das I, Charingia D, Borah D. Evaluation of pilot scale in-vitro and ex-situ hydrocarbon bioremediation potential of two novel indigenous strains of *Bacillus vallismortis*. *Bioremediat J*. 2020;24(2-3):190-203. <https://doi.org/10.1080/10889868.2020.1799928>
25. Onur G. Screening of biosurfactant producing and diesel oil degrading bacteria from petroleum hydrocarbon contaminated surface waters [master's thesis]. Ankara: Middle East Technical University, 2015.
26. Aydın DC. Indigenous hydrocarbon degraders further evaluated for their kerosene degradation and biosurfactant production potentials [master's thesis]. Ankara: Middle East Technical University, 2018.
27. Laothamteep N, Kawano H, Vejarano F, et al. Effects of environmental factors and coexisting substrates on PAH degradation and transcriptomic responses of the defined bacterial consortium OPK. *Environ Poll*. 2021;277:116769. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116769>
28. Sharma N, Lavania M, Lal B. Microbes and their secondary metabolites: Agents in bioremediation of hydrocarbon contaminated site. *Arch Pet Environ Biotechnol*. 2019;4:151. <https://doi.org/10.29011/2574-7614.100051>
29. Lee SW, Phillips KS, Gu H, Kazemzadeh-Narbat M, Ren D. How microbes read the map: Effects of implant topography on bacterial adhesion and biofilm formation. *Biomaterials*. 2021;268:120595. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120595>
30. Chandy JP, Angles ML. Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact on disinfectant decay. *Water Res*. 2001;35(11):2677-82. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(00\)00572-8](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(00)00572-8)

31. Wang J, Liu Q, Dong D, Hu H, Wu B, Ren H. In-situ monitoring of the unstable bacterial adhesion process during wastewater biofilm formation: A comprehensive study. *Environ Int.* 2020;140:105722. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105722>
32. Omarova M, Swientoniewski LT, Mkam Tsengam IK, et al. Biofilm formation by hydrocarbon-degrading marine bacteria and its effects on oil dispersion. *ACS Sustainable Chem Eng.* 2019;7(17):14490-9. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b01923>
33. Mishra S, Huang Y, Li J, et al. Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. *Chemosphere.* 2022;294:133609. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133609>
34. Elumalai P, Parthipan P, AlSalhi MS, et al. Characterization of crude oil degrading bacterial communities and their impact on biofilm formation. *Environ Poll.* 2021;286:117556. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117556>
35. Koolivand A, Abtahi H, Parhamfar M, Didehdar M, Saeedi R, Fahimirad S. Biodegradation of high concentrations of petroleum compounds by using indigenous bacteria isolated from petroleum hydrocarbons-rich sludge: Effective scale-up from liquid medium to composting process. *J Environ Manage.* 2019;248:109228. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.06.129>
36. Poddar K, Sarkar D, Sarkar A. Construction of potential bacterial consortia for efficient hydrocarbon degradation. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2019;144:104770. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104770>
37. Rodrigues EM, Cesar DE, Santos OR, de Paula ST, Tótola MR. Hydrocarbonoclastic bacterial species growing on hexadecane: Implications for bioaugmentation in marine ecosystems. *Environ Poll.* 2020;267:115579. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115579>
38. Ansari N, Rokhbakhsh-Zamin F, Hassanshahian M, Hesni MA. Biodegradation of crude oil using symbiont crude-oil degrading bacteria isolated from corals collected at the Persian Gulf. *J Chem Technol Biotechnol.* 2021;96(7):1882-92. <https://doi.org/10.1002/jctb.6707>
39. Muthukumar B, Parthipan P, AlSalhi MS, et al. Characterization of bacterial community in oil-contaminated soil and its biodegradation efficiency of high molecular weight (>C40) hydrocarbon. *Chemosphere.* 2022;289:133168. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.133168>
40. Eze MO, Thiel V, Hose GC, George SC, Daniel R. Bacteria-plant interactions synergistically enhance biodegradation of diesel fuel hydrocarbons. *Commun Earth Environ.* 2022;3:192. <https://doi.org/10.1038/s43247-022-00526-2>