

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PENDEGRADASI HIDROKARBON YANG BERASAL DARI TANAH TERCEMAR MINYAK BUMI

Nida Sopiah, Avi N. Oktaviani, Susi Sulistia, Fuji Suciati, Dwindrata B. Aviantara

Peneliti di Balai Teknologi Lingkungan
Badan Pengkajian Penerapan Teknologi
nidasofiah@yahoo.com

Abstark

Bioremediasi tanah tercemar minyak bumi telah diatur dalam Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup nomor 128 Tahun 2003. Salah satu faktor yang menentukan keberhasilan penerapan bioremediasi adalah ketersediaan mikroorganisme yang mampu mendegradasi cemaran minyak bumi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi konsorsium bakteri hidrokarbonklastik dari sampel tanah tercemar minyak bumi yang diperoleh dari Riau dan Bojonegoro. Dari hasil seleksi dan optimasi bakteri pada berbagai sampel tanah diperoleh empat isolate/konsorsium bakteri yang mampu mendegradasi minyak bumi, dengan kode konsorsium Ristek122-2.3; Ristek122-5; Ristek122-BN5; 122-Mix. Berdasarkan identifikasi dan uji biokimia, konsorsium bakteri terdiri dari bakteri hidrokarbonklastik yang mampu menghasilkan biosurfaktan. Produksi biosurfaktan mampu menurunkan tegangan permukaan sehingga bakteri hidrokarbonklastik mampu bekerja secara optimal.

Kata kunci : Bioremediasi,, minyak bumi, bakteri hidrokarbonklastik, biosurfaktan

Abstract

Bioremediation of soils contaminated with crude oils is promulgated by regulation of Ministry of Environment number 128 year 2003. One of factors governing the success of applying bioremediation is availability of microorganisms capable of degrading the waste. Aims of this study were isolating and identifying microbial consortia of hydrocarbonoclastic from a serial of selection and isolation steps of crude oil-contaminated soil samples obtained from Riau and Bojonegoro. Bacterial selection and optimization steps resulted in four consortia identified as Ristek 122-2.3; Ristek 122-5; Ristek 122-BN5; Ristek 122-Mix all having ability to degrade crude oils. Based on identification and biochemical test the consortia constitute of carbonoclastic bacteria and biosurfactant producing bacteria. The production of biosurfactant has reduced surface tension as such hydrocarbonoclastic bacteria capable of working optimally.

Key words : Bioremediation, crude oils, hydrocarbonoclastic bacteria, biosurfactant

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bioremediasi tanah tercemar minyak bumi telah diatur dalam Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup nomor 128 Tahun 2003 tentang tatacara dan persyaratan teknis pengolahan limbah minyak bumi dan tanah terkontaminasi oleh minyak bumi secara biologi. Bioremediasi merupakan suatu teknologi yang ramah lingkungan, yang mana bakteri memegang peranan yang sangat penting dalam proses degradasi limbah biologi ini. Tahapan proses bioremediasi tanah terkontaminasi minyak bumi mengalami dua fase. Fase pertama bakteri mampu dengan cepat mendegradasi limbah sebagai substrat sedangkan pada fase kedua dimana limbah tersebut diubah menjadi senyawa transisi berupa senyawa intermediate yang sulit didegradasi yang menjadikan kinerja bakteri tersebut mengalami penurunan. Dengan menurunnya kinerja bakteri ini dapat menyebabkan bertambah panjangnya masa bioremediasi

Hal ini menjadi tantangan, langkah apa yang harus dilakukan agar kinerja bakteri tetap terjaga. Salah satu upaya yang dilakukan adalah mengisolasi bakteri-bakteri hidrokarbonoklastik yang terlibat pada proses awal remediasi dan tahap intermediate pada proses remediasi tanah tercemar minyak bumi.

Selain itu diperlukan juga bakteri yang mampu menghasilkan biosurfaktan sehingga bakteri hidrokarbonoklastik tersebut mampu bekerja secara optimal. Dengan didapatkannya konsorsium bakteri tersebut diharapkan bioremediasi tanah terkontaminasi minyak bumi akan lebih cepat terpulihkan, sehingga dengan semakin pendeknya waktu bioremediasi maka jumlah tanah yang akan diremediasi akan lebih banyak.

1.2 Tujuan

Tujuan dari Kegiatan ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi konsorsium

bakteri hidrokarbonoklastik dan bakteri biosurfaktan yang diperoleh dari tahapan seleksi dan isolasi dari beberapa sampel tanah tercemar minyak bumi yang berasal dari Riau dan Bojonegoro.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Sampling bakteri

Sampling bakteri dilakukan dengan mengambil sejumlah sampel tanah tercemar minyak bumi yang telah mengalami proses remediasi.

Kegiatan penelitian ini dilakukan di beberapa lokasi :

- Sampling bakteri pendegradasi hidrokarbon dilakukan di tiga lokasi, yaitu di Balai Teknologi Lingkungan BPPT Serpong, Badan Operasi Bersama PT. Bumi Siak Pusako, Pertamina Hulu, Zamrud, Riau dan tanah disekitar tempat penambangan rakyat Bojonegoro.
- Seleksi dan Isolasi Bakteri Pendegradasi Hidrokarbon dilakukan di Balai Teknologi Lingkungan Badan Pengkajian dan Penerapan Teknologi (BTL – BPPT), berlokasi di Kawasan Puspiptek Serpong, Tangerang Selatan Banten.
- Uji Biokimia Isolat/ Konsorsium bakteri pendegradasi hidrokarbon hasil seleksi di Laboratorium Bakteriologi, Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.

2.2 Seleksi dan Isolasi bakteri pendegradasi cemaran hidrokarbon

Seleksi ini dilakukan untuk mendapatkan bakteri yang diharapkan mampu beradaptasi dan mendegradasi senyawa intermediate dari limbah minyak yang bertindak sebagai substrat awal. Untuk mendapatkan bakteri yang diharapkan tersebut dilakukan proses

seleksi bakteri dengan cara menimbang sebanyak 5 gram sample tanah yang berasal dari bongkaran tanah tercemar minyak bumi yang telah diolah menggunakan teknik biofile; tanah disekitar lokasi Centralized Land Treatment Site (CLTS). Kemudian diinokulasikan ke dalam 100 ml media biosurfaktan yang ditambahkan 1 mL minyak mentah, selanjutnya diinkubasikan pada shaker inkubator dalam suhu ruang selama 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh pada media biosurfaktan selanjutnya diinokulasikan pada media Nutrient Agar (NA). Inokulasi bakteri dilakukan sebanyak tiga kali untuk mendapatkan koloni dalam rentang waktu yang berbeda, yaitu 6 jam, 24 jam dan 48 jam. Koloni bakteri yang tumbuh selanjutnya dikultur pada media pengayaan, Nutrient Broth (NB), diinkubasikan pada suhu ruang pada shaker selama 24 - 48 jam.

2.3 Identifikasi morfologi Isolat bakteri

Identifikasi morfologi dilakukan dengan pewarnaan Gram. Kultur yang akan diuji digoreskan di atas kaca objek setelah dilarutkan dalam setetes akuades lalu dilewatkan di atas api. Isolat lalu ditetaskan larutan crystal violet lalu dibilas dengan alkohol 70%, lalu ditetaskan larutan iodine dan kembali dibilas dengan alkohol 70%, terakhir ditetaskan larutan safranin dan dibilas dengan menggunakan akuades steril lalu dikeringkan. Uji motilitas dilakukan dengan cara menginokulasi kultur dengan teknik stab ke dalam medium motilitas lalu diinkubasi selama 24—48 jam pada suhu ruang.(6)

Uji katalase dilakukan dengan cara meneteskan beberapa tetes H₂O₂ 3% diatas kaca objek lalu kultur diose dan diletakkan di dalam tetesan H₂O₂. Uji oksidase dilakukan dengan cara meneteskan larutan α -naftol 1% dan 0,3 ml larutan p-aminodimetilalanin-oksalat ke dalam tabung medium NB yang sudah diinokulasi, lalu dikocok selama 5 menit. Uji sitrat dilakukan dengan menginokulasikan kultur

ke dalam tabung berisi Koser Citrate Agar dan diinkubasi selama 48—72 jam. Uji Indol dilakukan dengan menginokulasi kultur ke dalam tabung berisi medium yang mengandung triptofan lalu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 30—35 0C. Tambahkan 1ml larutan reagen Kovac atau Ehrlich ke dalam tabung, lalu dikocok dan letakkan dalam keadaan tegak. Uji gelatine dilakukan dengan menginokulasi kultur ke dalam medium gelatine, lalu diinkubasi selama 24—72 jam pada suhu 300C, lalu dimasukkan lemari pendingin selama 10—15 menit. Fermentasi gula dilakukan dengan cara menginokulasikan kultur ke dalam medium cair yang mengandung gula (glukosa, laktosa, arabinosa, maltose) lalu diinkubasi pada suhu 35 0C selama 48 jam.(6)

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Seleksi, Isolasi dan identifikasi bakteri hidrokarbonoklastik merupakan salah satu dari rangkaian Kegiatan Optimasi Kinerja Bakteri Pendegeadasi Hidrokarbon pada Fase Substrat Transisi dalam Bioremediasi Tanah Terkontaminasi Minyak Bumi. Sebelum melakukan seleksi untuk memperoleh kultur yang mampu mendegradasi cemaran hidrokarbon, terlebih dahulu dilakukan sampling di berbagai lokasi yang diprediksi sebagai sumber bakteri pendegradasi hidrokarbon rantai lurus, aromatik maupun senyawa intermediate. Sampling dilakukan di lokasi lahan tercemar minyak yang berada di Bojonegoro dan Riau (Gambar 3.1).

3.1 Seleksi dan Optimasi Bakteri pendegradasi cemaran hidrokarbon

Dari berbagai isolat/konsorsium yang diperoleh dalam isolasi awal, selanjutnya dilakukan seleksi untuk menentukan konsorsium yang paling baik untuk proses degradasi minyak bumi dan senyawa intermediate yang terbentuk. Seleksi dilakukan dengan menggunakan

media yang mampu menstimulus bakteri untuk menghasilkan biosurfaktan dengan menggunakan minyak sebagai sumber karbonnya. Selanjutnya dari media kultur tersebut dilakukan isolasi menggunakan media nutrient agar.

Hasil seleksi dan optimasi bakteri yang dilakukan pada berbagai sampel tanah yang berasal dari 28 tempat yang berbeda, diperoleh 4 konsorsium bakteri yang mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon. Dengan kode konsorsium RISTEK 122-2.3; RISTEK 122-5; RISTEK-122-BN5; dan RISTEK 122-Mix yang merupakan gabungan dari ketiga konsorsium tersebut.

3.2 Identifikasi Morfologi bakteri

Pewarnaan Gram merupakan pewarnaan diferensial yang digunakan untuk melihat apakah bakteri merupakan Gram positif atau Gram negatif. Pada bakteri

setelah ditetesi larutan mordant (iodine) dan didicolorize menggunakan alkohol, kristal violet ikut terbilas. Penambahan counterstain (safranin) menyebabkan dinding sel terlihat berwarna merah. Pada hasil pemeriksaan ditemukan 2 kultur merupakan Gram negatif dan 3 kultur merupakan Gram positif. Pada uji motilitas, ditemukan 2 kultur bersifat motil, sedangkan 3 kultur yang lain bersifat non motil.

Dalam uji katalase, diketahui semua kultur dapat menghasilkan enzim katalase yang dapat digunakan untuk mengoksidasi senyawa H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂. Uji oksidase dilakukan untuk mengetahui keberadaan sitokrom oksidase. Jika terjadi perubahan warna pada medium menjadi warna biru atau keunguan maka kultur tersebut positif memiliki enzim sitokrom oksidase. Berdasarkan hasil uji, 2 kultur yang merupakan bakteri Gram negatif, positif memiliki sitokrom oksidase. Uji citrate



Gambar 3.1 Sampling bakteri pendegradasi Hidrokarbon di Badan Operasi Bersama PT. Bumi Siak Pusako, Pertamina Hulu, Zamrud, Riau

Gram positif, dinding selnya dapat menyerap kristal violet dengan baik, sehingga sel berwarna ungu. Pada bakteri Gram negatif,

dilakukan untuk mengetahui penggunaan sitrat sebagai sumber karbon. Jika medium berubah warna maka hal tersebut

menunjukkan adanya pemanfaatan sitrat oleh sel. Berdasarkan hasil uji ditemukan bahwa hanya ada satu kultur yaitu *Pseudomonas fluorescens* yang dapat memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon. Uji indol dilakukan untuk mengetahui adanya enzim yang dapat mengubah triptofan menjadi indol. Degradasi triptofan menjadi kompleks indol ditandai dengan timbulnya perubahan warna pada lapisan atas medium menjadi merah tua.

Dari hasil uji yang dilakukan tidak ditemukan adanya kultur yang dapat merombak triptofan menjadi indol. Uji pencairan gelatin dilakukan untuk mengetahui adanya enzim gelatinase pada mikroba. Jika medium gelatin yang telah diinokulasikan kultur mencair pada suhu ruang, atau tidak bias kembali membeku saat diletakkan di dalam lemari pendingin maka kultur tersebut positif memiliki enzim gelatinase yang bersifat proteolitik. Karena gelatin merupakan sejenis protein, maka enzim gelatinase dapat memecah protein yang terdapat dalam gelatin. Berdasarkan uji yang dilakukan ditemukan 2 kultur bersifat positif dan 2 kultur bersifat negatif. Fermentasi gula dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri

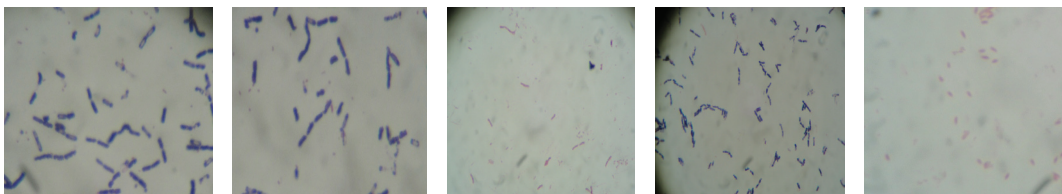
pengujian yang dilakukan diketahui bahwa 3 kultur mampu memfermentasi glukosa sedangkan 1 kultur tidak bias. Kultur bakteri Gram negatif tidak bias memfermentasi maltose, dan laktosa, sedangkan arabinosa tidak dapat difermentasi oleh kultur bakteri Gram positif. Pada pengujian lainnya seperti urease, uji VP, dan hidrolisis pati dapat dilihat pada tabel 3.2-3.4 berikut.

Uji urease dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya produksi ammonia pada medium yang mengandung urea. Keberadaan ammonia dapat diketahui dengan menggunakan pH alkali. Uji VP dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan senyawa acetyl carbinol. Jika pada medium terjadi perubahan warna menjadi kemerahan, maka bakteri dapat menghasilkan senyawa acetyl carbinol. Pada hidrolisis pati, medium yang sudah diinokulasikan kultur, ditetaskan larutan iodine untuk mengetahui pencernaan pati. Jika pada daerah sekitar koloni terdapat area bening maka bakteri positif memiliki enzim yang mampu mencerna pati.

Dari hasil identifikasi morfologi dan uji biokimia yang dilakukan di Laboratorium



Gambar 3.2. Seleksi dan Optimasi Bakteri pendegradasi cemaran hidrokarbon



Ristek 122-2.3

Ristek 122-BN5

Ristek 122-5.1

Ristek 122-5.2

Ristek 122-5.2

Gambar 3.3 Identifikasi Morfologi bakteri

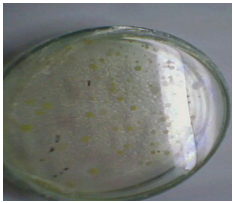

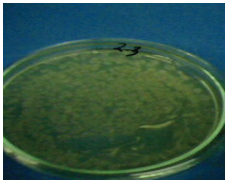
memfermentasi karbohidrat sederhana (glukosa, laktosa, maltose, arabinosa). Dari

Bakteriologi Institut Pertanian Bogor, isolat/konsorsium bakteri hasil seleksi yang

dilakukan di Balai teknologi Lingkungan, bakteri dengan kode Ristek 122-BN 5 dan 122-2.3 masing-masing merupakan isolat

berdasarkan hasil identifikasi dan uji biokimia konsorsium bakteri tersebut terdiri dari *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus insolitus*

Tabel 3.1 Konsorsium bakteri pendegradasi hidrokarbon

Kode Isolat/Konsorsium bakteri	Gambar	Koloni	Degradasi
RISTEK 122-BN5		<ul style="list-style-type: none"> • Bulat kuning • Bulat putih • Bulat putih bermata 	+++
RISTEK 122-5		<ul style="list-style-type: none"> • Bulat putih 	++
RISTEK 122-2.3		<ul style="list-style-type: none"> • Bulat putih 	+++

Tabel. 3.2 Uji Biokimia isolat bakteri Ristek 122-5.1

No.	Kode bakteri	Parameter uji dan Hasil reaksi :				
		Katalase	Oxidase	Pigment	Pertumbuhan pada 42 0C	Pertumbuhan pada Mac Conkey
2.	Ristek 122-5.1	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif
		Maltose	Mannitol	Laktose	Xylose	Salicin
		Negatif	Positif	Negatif	Positif	Negatif
		Urease	Arginine	Ornithine	Citrate	Glukose
		Dibus (bisa positif atau bisa negatif)	Positif	Negatif	Positif	positif
		Gelatin	Casein			
		Positif	Positif			

tunggal; berdasarkan hasil identifikasi dan uji biokimia kedua isolat bakteri tersebut adalah *Bacillus marinus*. Bakteri dengan kode Ristek 122-5 merupakan konsorsium bakteri yang terdiri dari 3 isolat,

dan *Pseudomonas putida*.

Pseudomonas sp merupakan bakteri hidrokarbonoklastik yang mampu mendegradasi berbagai jenis hidrokarbon.

Bacillus insolitus mampu mendegradasi

Tabel. 3.3 Uji Biokimia isolat bakteri Ristek 122-5.3

No.	Kode Isolat	Parameter uji dan Hasil reaksi :				
		Katalase	Oxidase	Pigment	Pertumbuhan pada 42 0C	Pertumbuhan pada Mac Conkey
1.	Ristek 122-5.3	Positif	Positif	Positif	Negatif	Positif
		Maltose	Mannitol	Laktose	Xylose	Salicin
		Dibus (bisa positif/ bisa negatif)	Dibus (bisa positif/ bisa negatif)	Negatif	Negatif	Negatif
		Urease	Arginine	Ornitine	Citrate	Glukose
		Dibus (bisa positif/ bisa negatif)	Positif	Negatif	Negatif	positif
		Gelatin	Casein			
		negatif	Negatif			

Tabel 3.4 Uji Biokimia isolat bakteri Ristek 122-BN 5, Ristek 122-2.3 dan Ristek 122-5.2

No.	Parameter uji	Hasil reaksi :	
		Ristek 122-BN 5, Ristek 122-2.3	Ristek 122-5.2
1.	Katalase	Positif	Positif
2.	Pertumbuhan pada media NaCl 7%	Dibus (bisa positif/ bisa negatif)	Negatif
3.	Pertumbuhan pada suhu 450C	Negatif	Negatif
4.	Citrate	Negatif	Negatif
5.	Pertumbuhan pada suhu An aerobik	Negatif	Negatif
	Fermentasi gula :	122-BN 5, Ristek 122-2.3	Ristek 122-5.2
6.	Glukosa	Positif	Negatif
7.	Arabinose	Negatif	Negatif
8.	Mannitol	Negatif	Negatif
9.	Xylose	Dibus (bisa positif/bisa negatif)	Negatif
10.	Gelatin hidrolisis	Positif	Negatif
11.	Casein hidrolisis	Dibus (bisa positif/bisa negatif)	Negatif
12.	Starch hidrolisis	Negatif	Negatif
13.	Indol	Negatif	Negatif
14.	Nitrate reduction	Dibus (bisa positif/bisa negatif)	Negatif
15.	VP test	Negatif	Negatif
16.	Urease	Negatif	Negatif
17.	Nutrien Broth pH 6,8	Negatif	Positif
18.	Nutrien Broth pH 5,7	Dibus	Negatif

senyawa fenol terhalogenasi(4).

Pseudomonas putida merupakan salah satu bakteri yang mampu mendegradasi senyawa Poli Aromatic Hidrokarbon (PAH) mampu memanfaatkan naftalen, phenantren dan BTEX sebagai substrat(10). *Pseudomonas fluorescens* selain mampu mendegradasi Poli Aromatik Hidrokarbon (naftalen) juga mampu

menghasilkan biosurfaktan viscosin dan lipopeptida. Lipopeptida biasanya terdiri dari 8 – 17 asam amino dan lipida (umumnya berupa hidroksi asam lemak) yang tersusun dari 8-9 gugus metilen(8),(10), dan

Biosurfaktan diekskresikan ke lingkungan dapat membantu melepaskan senyawa hidrokarbon dalam senyawa

organik dan meningkatkan konsentrasi senyawa hidrokarbon dalam air melalui pelarutan ataupun emulsifikasi. Dengan teremulsikannya hidrokarbon maka akan meningkatkan kinerja bakteri dalam mendegradasi hidrokarbon dan berpotensi untuk digunakan dalam upaya bioremediasi lingkungan akibat pencemaran hidrokarbon.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Dari hasil identifikasi morfologi dan biokimia diketahui bahwa isolat/konsorsium bakteri hasil kegiatan seleksi dan isolasi bakteri pendegradasi senyawa hidrokarbon ini, terdiri dari *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus insolitus* dan *Bacillus marinus*, merupakan konsorsium bakteri yang berpotensi untuk dikembangkan dan diterapkan dalam bioremediasi lahan tercemar minyak bumi.

4.2 Saran

Formulasi bakteri yang tepat merupakan salah satu faktor penting dalam bioremediasi, Faktor lain yang perlu dikaji adalah mendapatkan formulasi media serta formulasi nutrisi yang tepat yang dibutuhkan pada proses bioremediasi di lapangan.

Ucapan Terima Kasih

Kegiatan ini dapat terlaksana dengan adanya Program Insentif Riset Peningkatan Kemampuan Peneliti dan Perekrayan (PKPP) Tahun 2011 serta peran aktif rekan-rekan satu tim. Terima kasih atas dukungannya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Anonim, 2010, Faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri, [http://syariffauzi.wordpress.com/tag/faktor-faktor-yang-mempengaruhi-](http://syariffauzi.wordpress.com/tag/faktor-faktor-yang-mempengaruhi-pertumbuhan-bakteri/)

[pertumbuhan-bakteri/](http://syariffauzi.wordpress.com/tag/faktor-faktor-yang-mempengaruhi-pertumbuhan-bakteri/). online: accessed 25 Mei 2010,

2. Black, J.G., 2002, *Microbiology: principles and explorations*, 5th ed., John Wiley & Sons, xxiv + 762 hlm.
3. Budianto, H., 2008, Perbaikan lahan terkontaminasi minyak bumi secara bioremediasi, [URL: <http://www.iec.co.id/bioremediasi1.html>], online: accessed 18 October 2011
4. Wang, Chun Ching, Chi Mei Lee, Chih Hsien Kuan (2000), Removal of 2,4-dichlorophenol by Suspended and Immobilized *Bacillus Insolitus*, *Chemosphere* 41. P. 447-452, Pergamon.
5. Das, N. & P. Chandran, 2011, Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotech. Res. Int.* Vol. 2011. pp: 1-13
6. Gandjar, I., I.R.Koentjoro, W. Mangunwardoyo & L. Soebagya, 1992, *Pedoman Praktikum Mikrobiologi Dasar*, Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia, vii + 87 hlm
7. KEPMEN LH 128 Tahun 2003. Keputusan Menteri Negara Lingkungan Hidup Nomor : 128 Tahun 2003, Tentang Tata Cara Dan Persyaratan Teknis Pengolahan Limbah Minyak Bumi Dan Tanah Terkontaminasi Oleh Minyak Bumi Secara Biologis.
8. Ruzniza, 2005, Production of Biosurfactant by Locally Isolated Bacteria from Petrochemical Waste, Thesis, Faculty of Science Universiti Teknologi Malaysia
9. Susilorukmi. A, Sriwuryandari. L, & Sembiring. T., 2005, Aplikasi Mikroorganisme Untuk Bioremediasi Oil Spill Sistem Dua Tahap, *Teknologi Indonesia* 28: 29--37. LIPI PRESS.
10. Van Hamme, J.D., Ajay Singh and Owen P.W, 2003, Recent Advances in Petroleum Microbiology, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 503-549.