

STUDI DEGRADASI DIBENZOTHIOPHENE OLEH *Sphingomonas paucimobilis* BAKTERI INDIGENOUS MUARA BARU-TELUK JAKARTA

Nunik Sulistinah¹ dan Rini Riffiani²

^{1,2} Bidang Mikrobiologi, Pusat Penelitian Biologi-LIPI
CSC, Jl. Raya Jakarta-Bogor Km 46, Cibinong 16911
Email: listin_ar@yahoo.com

Abstrak

Dibenzothiophen (DBT) adalah salah satu senyawa Hidrokarbon Aromatik Polisiklik yang dikenal beracun di lingkungan. Sebagian besar PAH bersifat karsinogenik dan persisten di lingkungan. Teknik Biostimulation digunakan untuk mengisolasi bakteri indigen dari Muara Baru yang mampu mendegradasi DBT. Tujuan utama dari penelitian ini untuk mengisolasi dan meneliti bakteri laut yang dipilih untuk mendegradasi senyawa DBT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteri isolat M4 (*Sphingomonas paucimobilis*) dapat tumbuh optimal pada 30 °C dengan 1,6 X 10⁹ sel / ml dan waktu penggandaan (td) adalah 6 jam. Pertumbuhan *Sphingomonas paucimobilis* pada konsentrasi 2% NaCl adalah 2,6 X 10⁹ dengan Waktu penggandaan 11 jam. Proses biodegradasi DBT menunjukkan bahwa Km dan Vmaks untuk KNO₃ adalah 0,0307 jam⁻¹ dan 12,27 mg lt⁻¹ h⁻¹. KNO₃ dan NH₄NO₃ adalah sumber yang cocok dari nitrogen untuk mempercepat kecepatan biodegradasi *Sphingomonas paucimobilis*. Efisiensi degradasi mereka adalah 62,5% dan 57,6%.

kata kunci: dibenzothiophen-merendahkan bakteri laut, minyak mentah *Sphingomonas paucimobilis*, Muara Baru-Teluk Jakarta

Abstract

Dibenzothiophene (DBT) is one of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon compound which are known toxic in the environment. Most of PAHs are carcinogenic and persistent in the environment. Biostimulation technique used for isolating the indigenous bacteria from Muara Baru which are capable of degrading DBT. The main purpose of this study are isolated and investigated the selected marine bacteria to degrade DBT compound. The results showed that bacteria isolate M4 (Sphingomonas paucimobilis) be able to grow optimum at 30 °C with 1,6 X 10⁹ cell/ml and the doubling time (td) is 6 h. Growth of Sphingomonas paucimobilis at 2% concentration of NaCl with 2,6 X 10⁹ and the doubling time 11 h. The biodegradation of DBT showed that Km and Vmax for KNO₃ are 0,0307 h⁻¹ and 12,27 mg lt⁻¹ h⁻¹. KNO₃ and NH₄NO₃ are suitable source of a nitrogen to accelerate biodegradation speed of Sphingomonas paucimobilis. The efficiency of their degradation are 62,5% and 57,6%.

key words: *Dibenzothiophene-degrading marine bacteria, crude oil Sphingomonas paucimobilis, Muara Baru-Teluk Jakarta*

1. PENDAHULUAN

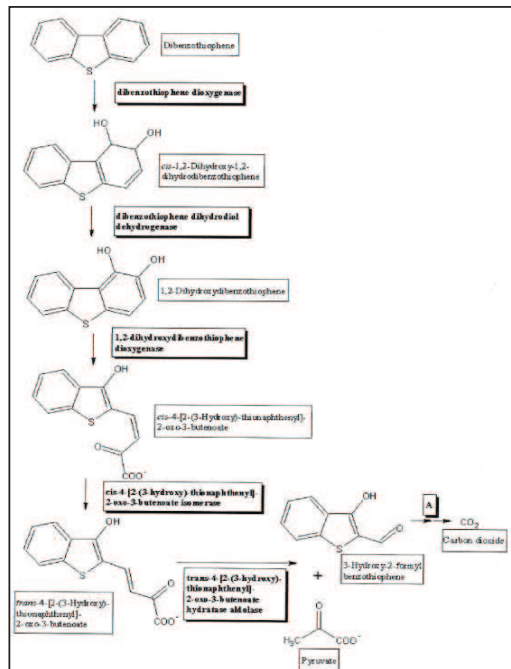
1.1. Latar Belakang

Polisiklik aromatik hidrokarbon (PAHs) merupakan polutan yang tersebar luas di lingkungan⁽¹⁾. Beberapa senyawa PAHs misalnya benzene, toluene, naphtalene, dibenzothiophene, dan benzophyrene, tergolong toksik, bahkan beberapa diantaranya diketahui bersifat karsinogenik dan teratogenik^(2,3,4). Dilaporkan bahwa introduksi senyawa PAHs ke lingkungan melalui proses pirolitik meliputi aktivitas manusia, seperti misalnya pembakaran batubara, petroleum, kebakaran hutan⁽⁵⁾. Polusi senyawa hidrokarbon banyak terjadi di lingkungan laut seperti misalnya, polusi laut akibat tumpahan minyak mentah dari kegiatan eksplorasi minyak bumi, kecelakaan tanker pengangkut minyak yang akhir-akhir ini juga sering terjadi di perairan Indonesia. Hal ini sangat berpengaruh terhadap kehidupan biota laut dan berpotensi sebagai pencemar^(2,6,7).

Beberapa strain bakteri laut, seperti misalnya *Bacillus*, *Thalassolituus oleivorans*, *Oleiphilus messinensis*, *Pseudomonas* sp., *Mycobacterium* sp. dilaporkan mampu mendegradasi senyawa hidrokarbon^(8,9,10,11). *Sphingomonas* strain 2MPLL yang diisolasi dari sedimen laut yang tercemar PAHs dilaporkan mampu mendegradasi beberapa senyawa aromatik hidrokarbon, seperti phenanthrene dan dibenzothiophene⁽¹²⁾. Dilaporkan juga oleh Harayama et al., 1999⁽¹³⁾ bahwa genus *Marinobacter*, dan khususnya *Alcanivorax* mempunyai peran yang penting pada tahap awal biodegradasi *crude oil* di lingkungan laut.

Degradasi senyawa hidrokarbon oleh mikroba mendapat perhatian sangat besar karena mikroba pendegradasi tersebut dapat diaplikasikan sebagai agent bioremediasi untuk lingkungan yang terkontaminasi senyawa PAHs⁽¹⁴⁾.

Degradasi senyawa Dibenzothiophene menurut⁽¹⁵⁾ digambarkan sebagai berikut :



Gambar 1. Degradasi Dibenzothiophene (DBT)

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengisolasi, menapis mikroba *indigenous* dari Muara Baru, Teluk Jakarta yang mempunyai potensi sebagai pendegradasi senyawa PAHs, khususnya Dibenzothiophene (DBT).

2. METODOLOGI

2.1. Isolasi dan Purifikasi Mikroba Pendegradasi PAH

Isolasi mikroba pendegradasi hidrokarbon dilakukan dengan menginokulasikan 190 ml sampel air laut ke dalam Erlenmeyer volume 500 ml yang berisi 10 ml medium SWP dan 1 ml minyak mentah Arabian. Selanjutnya kultur diinkubasi di atas mesin pengocok (*shaker*) pada suhu ruang (30°C) selama ± 60 hari. Secara periodik (0, 3, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 hari) supernatan dari kultur yang teraklimasi tersebut disampling untuk diisolasi mikroba pendegradasi PAHs yang diujikan.

Sebanyak 1,0 ml kultur diinokulasikan ke dalam 9,0 ml larutan NaCl 0,85%, demikian seterusnya dilakukan serial pengenceran bertingkat hingga 10^{-4} . Selanjutnya 100 μ l dari pengenceran tersebut diinokulasikan ke dalam medium ONR7a agar, kemudian disublimasi dengan senyawa PAHs yang diujikan (DBT) dan diinkubasi pada suhu ruang $\pm 28^{\circ}$ C selama $\pm 1-2$ minggu. Koloni yang tumbuh dan membentuk *clearing zone* atau terjadinya perubahan warna media mengindikasikan isolat tersebut berpotensi sebagai pendegradasi PAHs. Luasnya *clearing zone* yang terbentuk pada umumnya berkaitan dengan kemampuan mikroba dalam mendegradasi senyawa hidrokarbon. Isolat yang memberikan reaksi positif kemudian diisolasi dan dimurnikan untuk pengujian selanjutnya.

2.2. Media Isolasi dan kultivasi

Media yang digunakan untuk isolasi adalah media SWP dan ONR7a. Adapun komposisi media SWP adalah sebagai berikut NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , Ferri citrat, Yeast extract. Sedangkan komposisi ONR7a adalah sebagai berikut : NaCl 22,79 g, Na_2SO_4 , 3,99 g, KCl 0,72 g, NaBr 83 mg, NaHCO_3 31 mg, H_3BO_3 27 mg, NaF 2.6 g, NH_4Cl 0,27 g, Na_2HPO_4 83 mg, TAPSO 1,3 g, MgC_{12} 11,18 g, CaC_{12} 1,46 g, SrC_{12} 24 mg, FeC_{12} 2 mg, pH diatur 7,0. Media kultivasi digunakan Marine Agar dengan komposisi : Marine Broth 33,7 g dalam 1000 ml aquadest, pH diatur $7,2 \pm 0,2$ ^{16, 17}).

2.3. Uji Konfirmasi

Uji konfirmasi dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa isolat bakteri yang terisolasi benar-benar potensial sebagai pendegradasi DBT.

2.4. Pengujian Pertumbuhan Mikroba Pada Berbagai Suhu dan Salinitas

Pengujian dilakukan dengan menumbuh-kan isolat ke dalam media cair

ASW (*Artificial Sea Water*) dan diinkubasi di atas shaker selama 16 jam pada kisaran suhu $20-30^{\circ}$ C dan kisaran salinitas 0-5, 10, dan 20% NaCl.

2.5. Identifikasi Mikroba

Identifikasi dilakukan secara morfologi dan berdasarkan 16S rDNA dilakukan di Laboratorium Bioremediasi NCBD, NITE, Jepang.

2.6. Uji Biodegradasi DBT

Uji biodegradasi DBT oleh *Sphingomonas paucimobilis* ditentukan dengan menggunakan TOC (Total Organic Carbon) dengan cara sebagai berikut : 1 ml sampel dimasukkan dalam tabung kemudian disentrifugasi pada kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit. Selanjutnya 0,5 ml supernatan diambil dan dimasukkan dalam tabung reaksi. Sebelum diinjeksikan sampel terlebih dahulu diencerkan dan pengukuran dengan TOC dilakukan.

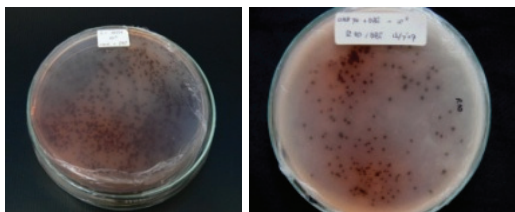
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Isolasi Mikroba Pendegradasi PAH dan Uji Konfirmasi

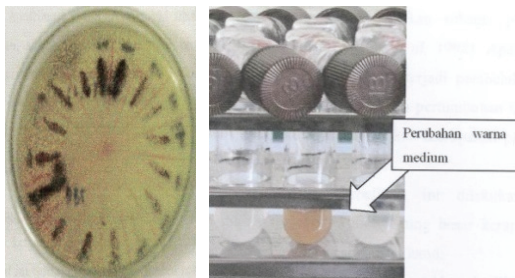
Dari isolasi dan penapisan diperoleh 16 isolat mikroba yang diduga potensial sebagai pendegradasi senyawa Dibenzo(1,2-b)thiophene) (Gambar 2). Untuk membuktikan bahwa isolat-isolat tersebut mempunyai kemampuan sebagai pendegradasi senyawa PAHs maka dilakukan uji konfirmasi terhadap keseluruhan isolat hasil penapisan. Uji konfirmasi yang dilakukan terhadap 16 isolat tersebut menunjukkan, bahwa hanya 8 isolat yang benar-benar berpotensi sebagai pendegradasi senyawa Dibenzo(1,2-b)thiophene (Tabel 1). Hal ini terbukti dengan terbentuknya zona bening disekeliling isolat dan warna merah. Dari 8 isolat tersebut dipilih satu isolat yaitu isolat bakteri M4 yang dipelajari kemampuannya dalam mendegradasi Dibenzo(1,2-b)thiophene (DBT). mengindikasikan isolat tersebut berpotensi

sebagai pendegradasi DBT

Pemilihan tersebut didasarkan atas besarnya luasan zona bening (*clearing zone*) yang dihasilkan oleh isolat bakteri M4 tersebut dan diasumsikan isolat bakteri tersebut mempunyai kemampuan paling baik mendegradasi DBT dibandingkan isolat-isolat lainnya (Tabel 1).



Gambar 2. Isolasi dan Seleksi mikroba laut pendegradasi DBT pada media ONR7a agar (teknik sublimasi).



Gambar 3. Uji konfirmasi pada media padat dan cair ONR7a.

Hasil identifikasi berdasarkan 16sDNA menunjukkan bahwa isolat bakteri M4 tersebut adalah *Sphingomonas paucimobilis*. Koloni *Sphingomonas paucimobilis* secara mikroskopis ditunjukkan dalam Gambar 5.

3.2. Karakteristik Fisiologis Isolat Bakteri M4 (*Sphingomonas paucimobilis*)

Karakterisasi fisiologis dilakukan meliputi pengujian pertumbuhan isolat pada berbagai suhu dan salinitas. Pertumbuhan *Sphingomonas paucimobilis* pada berbagai suhu dan salinitas ditampilkan dalam Gambar 4A dan 4B. Hasil pengujian menunjukkan, bahwa isolat bakteri M4 mampu tumbuh

pada suhu hingga 40°C dengan pertumbuhan optimum dicapai pada suhu 30°C, dengan demikian isolat bakteri tersebut termasuk dalam kelompok mikroba mesofilik.

Fase lag yang dicapai pada suhu 20°C relatif cukup panjang yaitu 24 jam bila dibandingkan pada suhu 25°C dan 35°C (15 jam). Sedangkan pada suhu 30°C fase lag dicapai selama 11 jam, dan 8 jam pada suhu 40°C. Nampak bahwa semakin tinggi temperatur fase lag semakin pendek.

Fase log pada suhu 20°C terjadi pada jam ke 24 dengan nilai pertumbuhan awal sebesar $0,1 \times 10^9$ sel/ml. Selama 9 jam mengalami pembelahan diri sebanyak $0,56 \times 10^9$ sel/ml. (Tabel 1).

Fase log pada suhu 25°C dicapai pada jam ke 15 dan waktu yang dibutuhkan untuk membelah diri (td) adalah 8 jam, serta jumlah massa tertinggi yang diperoleh adalah sebesar $1,3 \times 10^9$ sel/ml. Waktu pembelahan (td) tercepat dicapai pada suhu 30°C selama 6 jam dengan massa sel sebesar $21,3 \times 10^9$ sel/ml. Pada suhu 35°C Fase log dicapai pada jam ke 22 dengan massa sel $1,6 \times 10^9$ sel/ml dan waktu pembelahan (td) selama 7 jam, sedangkan fase log pada suhu 40°C yaitu pada jam ke 8 dan waktu yang dibutuhkan untuk membelah diri (td) adalah sebesar 8 jam dengan massa sel yang dihasilkan sebesar $0,8 \times 10^9$ (Tabel 2).

Hasil pengujian pertumbuhan pada berbagai salinitas ditampilkan pada tabel 3. tabel tersebut menunjukkan, bahwa isolat bakteri M4 mampu tumbuh pada kisaran salinitas 2%-10%, pertumbuhan optimum dicapai pada salinitas 2%, fase lag pada salinitas tersebut dicapai selama 11 jam dengan jumlah massa sel sebesar $2,6 \times 10^9$ sel/ml. Isolat tersebut tidak mampu tumbuh pada salinitas 10 dan 20%. Berdasarkan hasil pengujian tersebut maka isolat bakteri M4 dapat dikelompokkan kedalam bakteri kosmopolit.

Fase lag isolat bakteri M4 pada salinitas 1% dicapai selama 20 jam, sedangkan fase log dicapai selama 12 jam dengan massa sel $1,747 \times 10^9$ sel/ml. Fase

lag pada salinitas 5% dicapai pada jam ke 41, sementara fase log dicapai selama 23 jam dengan massa sel sebesar $1,34 \times 10^9$ sel/ml. Pada salinitas 10% pertumbuhan isolat bakteri sangat lambat, sedangkan pada salinitas 20% isolat tidak mampu tumbuh (Tabel3).

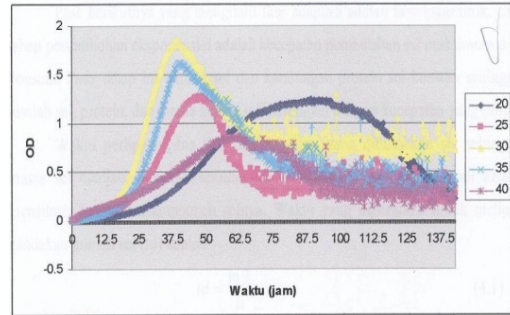
Tabel 1. Delapan isolat bakteri laut yang di isolasi dari Muara Baru yang menunjukkan uji konfirmasi positif

No.	Kode Isolat	Kemampuan isolat dalam mendegradasi DBT (uji sublimasi)
1	M3	+++
2	M4	+++++
3	M6	++
4	M7	++
5	M10	+++
6	M11	++
7	M15	+++
8	M16	++

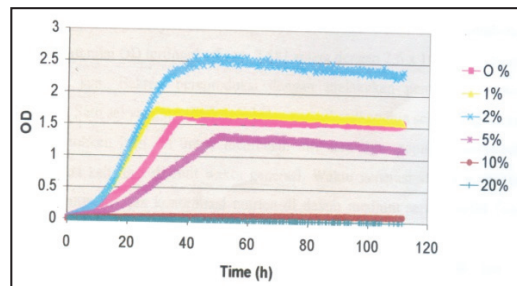
Keterangan : ++ : tumbuh, +++ : tumbuh baik, ++++ : tumbuh sangat baik

Tabel 2. Penentuan μ dan td pada berbagai Suhu

No	Suhu (°C)	Laju pertumbuhan μ (jam ⁻¹)	td (jam)
1	20	0,0721	10
2	25	0,0832	8
3	30	0,1130	6
4	35	0,0972	7
5	40	0,0402	17



Gambar 4 A. Kurva pertumbuhan *Sphingomonas paucimobilis* pada berbagai suhu (oC)



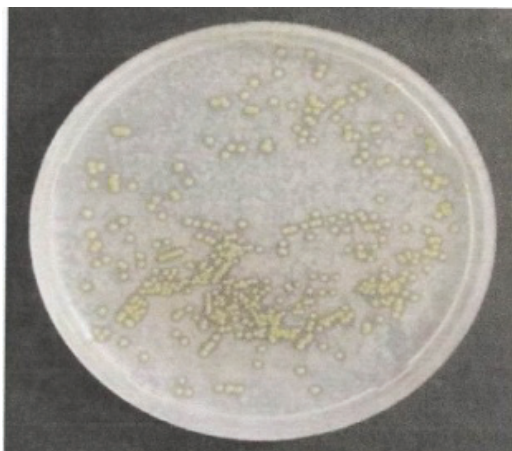
Gambar 4B. Kurva pertumbuhan *phingomonas Paucimobilis* pada berbagai salinitas (%)

Tabel 3. Penentuan μ dan td pada berbagai salinitas

No	Salinitas (%)	Laju pertumbuhan μ (jam ⁻¹)	td (jam)
1	0	0,0532	13
2	1	0,0567	12
3	2	0,0603	11
4	5	0,0297	23
5	10	0,0177	39
6	20	0	0

3.3. Identifikasi Mikroba

Identifikasi mikroba dilakukan secara molekuler berdasarkan analisis penjarangan urutan nukleotida partial gen pengkode 16S-rDNA menggunakan program BLAST. Primer yang digunakan adalah 9F dan 1510R. Hasil Blast menunjukkan bahwa isolat bakteri M4 adalah *Sphingomonas paucimobilis*.



Gambar 5. *Sphingomonas paucimobilis*

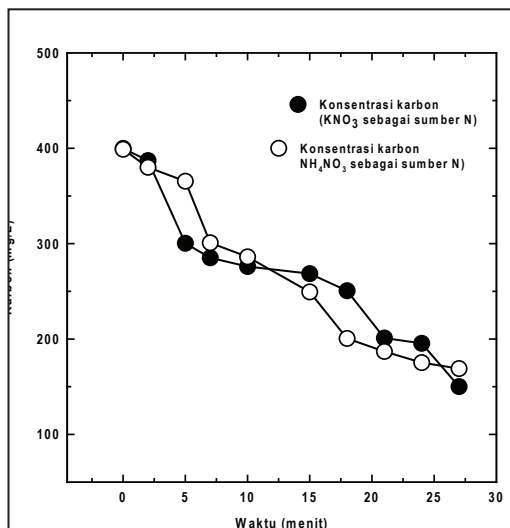
3.4. Biodegradasi DB oleh *Sphingomonas paucimobilis* (bakteri M4)

Penentuan degradasi DBT dilakukan berdasarkan analisa penurunan karbon organik dengan menggunakan TOC analyzer.

Untuk mengetahui efisiensi degradasi senyawa DBT oleh *Sphingomonas paucimobilis* digunakan variasi sumber nitrogen yaitu KNO_3 dan NH_4NO_3 . Kecepatan biodegradasi DBT ditentukan berdasarkan pengukuran konsentrasi karbon pada berbagai interval waktu dengan menggunakan TOC analyzer. Hasil penentuan konsentrasi karbon ditampilkan dalam Gambar 6. Pada Gambar 6 tersebut ditunjukkan bahwa penurunan konsentrasi karbon mengindikasikan bahwa isolat bakteri tersebut mampu menggunakan senyawa DBT sebagai sumber karbon untuk substrat pertumbuhannya.

Kemampuan *Sphingomonas paucimobilis* dalam mendegradasi senyawa DBT dalam eksperimen ini selaras dengan laporan Nadalig et al., 2002⁽¹⁸⁾ bahwa *Sphingomonas strain* 2MPII yang diisolasi dari sedimen laut yang tercemar senyawa PAHs mampu mendegradasi senyawa DBT dan phenanthrene. *Sphingomonas strain* 2MPII juga mampu menggunakan senyawa 2-methylphenanthrene, dan 9 methylphenanthrene. Dilaporkan juga bahwa *Sphingomonas paucimobilis* strain TZS7 yang diisolasi dari "crude oil" mampu mendegradasi senyawa dibenzothiophene, naphthalene dan beberapa senyawa aromatik hidrokarbon¹⁹⁾.

Dari hasil penentuan konsentrasi karbon tersebut di atas dapat ditentukan bahwa prosentase degradasi DBT dengan menggunakan KNO_3 sebagai sumber nitrogen adalah sebesar 62,5 %, sedangkan prosentase degradasi DBT dengan NH_4NO_3 sumber nitrogen dalam waktu yang sama (27 hari) adalah 57%. Dengan demikian penggunaan KNO_3 dan NH_4NO_3 mempercepat degradasi DBT oleh *Sphingomonas paucimobilis*.



Gambar 6. Penurunan karbon pada proses biodegradasi DBT oleh *Sphingomonas paucimobilis*.

4. KESIMPULAN

Isolat bakteri laut M4 teridentifikasi sebagai *Sphingomonas paucimobilis* merupakan bakteri indigenous Muara Baru, Teluk Jakarta, mampu tumbuh pada kisaran temperatur 20-40° C. Pertumbuhan optimum dicapai pada suhu 30° C dengan jumlah massa sebesar $1,6 \times 10^9$ sel/ml dan waktu penggandaan (td) 6 jam. Isolat tersebut juga mampu tumbuh pada salinitas yang relatif cukup tinggi yaitu hingga 5%, pertumbuhan optimum dicapai pada salinitas 2% dengan jumlah massa sebesar $2,6 \times 10^9$ sel/ml dan waktu penggandaan (td) 11 jam. K_m dan V_{maks} dari degradasi bakteri M4 dengan KNO_3 adalah $0,0307 \text{ h}^{-1}$ and $12,27 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Efisiensi degradasi DBT oleh *Sphingomonas paucimobilis* dengan sumber karbon KNO_3 mencapai 62,5% dan 57,6% dengan sumber karbon NH_4NO_3 , KNO_3 and NH_4NO_3 merupakan sumber nitrogen yang baik untuk mempercepat laju degradasi DBT oleh *Sphingomonas paucimobilis*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Dr. I Made Sudiana yang telah banyak terlibat dan memberikan bimbingan dalam kegiatan penelitian ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Dra. Sulistiani, M.Kes. yang membantu mengidentifikasi secara molekuler di NCBD, NITE, Jepang. Ucapan terima kasih disampaikan juga kepada Project NITE II yang telah memberikan bantuan bahan, peralatan sehingga menunjang penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Blumer, M. 1976. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Scientific American*, 234 : 34-45.
- Khan, K., Naeem, M., Arshed, MJ., & Asif, M. 2006. Extraction and Characterization of Oil Degrading Bacteria. *Journal of Applied Sciences* 6(10) : 2302-2306.
- Kramer PGN, V.D Heijden CA. 1990. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) : Carcinogenicity data and Risk Extrapolations. In: *Environmental topic*, Ed Rose J, Gordon and Breach Science Publishers. New York, pp 47-57.
- Holt, J., S. Hothem, H. Howarton, R. Larson, and R. Sanford. 2005. 9,10-Phenanthrenequinone photoautocatalyzes its formation from Phenanthrene, and inhibits biodegradation of Naphtalene. *J. Environ. Qual*, 34 : 462-468.
- Neff, JM. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbon the aquatic environment, sources, fates and biological effect. *Applied Science*. London.
- Yu, OH., L. Ke, Y.S. Wong, and NFY. Tom. 2005.. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by a bacterial consortium enriched from mangrove. *Environment International*, Vol. 31 (2) : 149-154.
- Peruguni, M., P. Visciano, A. Giammarino, M. Manera, W.D.Nardo, and M. Amorena. 2007. Polycyclic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea Italy. *Chemosphere*, 66 (10) : 1904-1910.
- Guerin WF & GE Jones. 1988. Mineralization of phenanthrene by a Mycobacterium sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54 : 937-944
- Shuttleworth & CE Cerniglia. 1996. Bacterial degradation of low concentrations of phenanthrene and inhibition by naphthalene. *Micob. Ecol.* 31 : 305-317.
- Golyshin, PN., Chernikova, TN., Abraham WR., Lunsdorf H., Timmis, KN. & Yakimov, MM. 2002. *Oleiphilaceae* fam. Nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology*, 52 : 901-911.
11. Liu, C. & Shao, Z. 2005. *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55 : 1181-1186
 12. Gilewicz, M., Ni'matuzahroh, Nadalig, T, Budzinski, H., Doumeneq P., Michotey, V., and Bertrand, J.C. 1997. Isolation and characterization of a marine bacterium capable of utilizing 2-methylphenanthrene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48 : 528-533.
 13. Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y. & Shutsubo, K. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal Molecular Microbiology Biotechnology*, 1 : 63-70
 14. Johnsen, AR., Bendixen, K & Karlson U. 2002. Detection of Microbial Growth on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Microtiter Plates by Using the respiration Indicator WST-1. *Applied and Environmental Microbiology* : 2683-2689
 15. OZ, G & D. Jun. 2006. Dibenzothiophene degradation pathway. http://umbbd.msi.umn.edu/dbt2_map.html
 16. Alley, JF. & Brown LR. 2000. Use of Sublimation To Prepare Solid Microbial Media with Water-Insoluble Substrates. *Applied and Environmental Microbiology* 66(1) : 439-442
 17. Harayama, S., Y. Kasai, A. Hara. 2004. Microbial communities in oil-contaminated seawater. *Current opinion in Biotechnology*, 15 : 204-215.
 18. Nadalig, T., N. Raymond, Ni'matuzahroh, M. Gilewicz, H. Budzinski, and J.C. Bertrand . 2002. Degradation of phenanthrene, methylphenanthrene and dibenzothiophenes *Sphingomonas* strain 2 MPLL . *Applied Microbiol. Biotechnol.* 59 : 79-85.
 19. Lu, J., T. Nakajima-Kambe, T. Shigeno, A. Ohbo, N. Nohura, and T. Nakahara. 1999. Biodegradation of dibenzothiophene and 4,6-dimethylbenzothiophene by *Sphingomonas paucimobilis* Tzs-7. *Journal of Bioscience & Bioengineering*, 88 (3) : 293-299.