

ÇEŞİTLİ SU KAYNAKLARINDAN İZOLE EDİLEN OKSİJENİK VE HALOFİL FOTOSENTETİK MİKROORGANİZMALARIN 2,4-D'Yİ FARKLI KONSANTRASYONLARDA KULLANIMI

Hale KÖKSOY^{1*}, Gönül DÖNMEZ²

¹Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD., 42075, KONYA

²Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji AD., 06560, ANKARA

hkoksoy76@selcuk.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada çeşitli su kaynaklarından, oksijenik ve halofil fotosentetik mikroorganizmalar izole edilmiştir. İzolatlar farklı konsantrasyonlarda 2,4-D herbisiti içeren besi yerlerinde geliştirilmiştir. İzole edilen 20 oksijenik fotosentetik mikroorganizma (*Synechocystis* sp., *Chlorella* sp. *Scenedesmus* sp.) morfolojik özelliklerine göre teşhis edilmiştir. Beş izolatın *Synechocystis* sp., 5 izolatın *Chlorella* sp., 2 izolatın *Scenedesmus* sp. ve 8 halofil izolatın *Dunaliella* sp. cinsleri olduğu saptanmıştır. İzolatlar sürekli ışık altında ve 30 gün boyunca süren inkübasyondan sonra 100-400 ppm 2,4-D herbisiti içeren BG11 besi yerine ekilmiştir. *Synechocystis* sp., *Chlorella* sp. izolatları 100-200 ppm ve *Scenedesmus* sp. izolatı 100 ppm içeren 2,4-D herbisit konsantrasyonunda gelişim göstermiştir. Bu konsantrasyonlarda gelişen izolatlar 300-400 ppm 2,4-D içeren besi yerine ekildiği halde gelişme görülmemiştir. Halofil *Dunaliella* sp. türleri ise 2,4-D herbisitini içeren BG 11 besi yerinde (% 15 NaCl) gelişmemiştir. Sonuç olarak, Türkiye'de biyolojik yollarla, herbisit parçalayan farklı mikroorganizmaların denenmesi açısından, 2,4-D herbisit direncini ölçen bu çalışma, bir ön çalışma düzeyindedir.

Anahtar Kelimeler: *Synechocystis* sp., *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Dunaliella* sp. ve 2,4-D herbisiti.

**ISOLATED FROM VARIOUS WATER RESOURCES
PHOTOSYNTHETIC OXYGENIC AND HALOPHIL
MICROORGANISMS 2,4-D OF THE USING OF
DIFFERENT CONCENTRATIONS**

ABSTRACT

In this study, oxygenic and halophilic photosynthetic microorganisms from different samples were isolated. Isolates were grown in the media containing different concentrations of 2,4-D herbicide. Twenty different oxygenic photosynthetic microorganisms (Synechocystis sp., Chlorella sp. Scenedesmus sp.) were identified by their morphological characteristics. Five isolates cyanobacterium Synechocystis sp., five isolates of Chlorella sp., 2 isolates, Scenedesmus sp. and 8 halophilic isolates Dunaliella sp. types, respectively. Isolates which lasted for 30 days under continuous light after incubation of BG 11 medium containing 100-400 ppm of 2,4-D herbicide were planted. Isolates Synechocystis sp., Chlorella sp. strains 100-200 ppm and Synechocystis sp. strains isolate that contains the 2,4-D herbicide at a concentration of 100 ppm have developed. The concentrations of 300-400 ppm isolates evolving medium containing 2,4-D even though planted to replace development was observed. Halophilic Dunaliella sp. BG 11 medium containing 2,4-D herbicide in the place types (with %15 NaCl) could not be developed. As a result, Turkey biological means, a different herbicide-degrading microorganisms, for testing, measuring the resistance of 2,4-D herbicide in this study, the level of a pilot study.

Key Words: *Synechocystis sp., Chlorella sp., Scenedesmus sp., Dunaliella sp. ve 2,4-D herbicide.*

1.GİRİŞ

Sucul sistemlerdeki herbisit kirliliği, son yıllarda ilgi çeken temel konular arasında yer almaktadır. Yabani otların temizlenmesi, tarımsal alanlardan uzaklaştırılması ve bu yoldan herbisit'in sucul sistemlere

girmesiyle beraber sucul çevre kirlenmektedir [1]. Sucul sistemlerde yaşayan organizmalarla yapılmış birçok çalışmada, bu kirliliğin onların üzerinde çok sayıda zararlı etkileri belirlenmiştir [2,3]. Herbisitler, özellikle bahçelerdeki yabancı otların uzaklaştırılmasında büyük ölçüde etkin olarak kullanılmaktadır. Satın alma maliyetleri çok yüksek değildir. Birçok canlı üzerinde toksik etkiye sahiptirler [4]. Topraktaki mikroorganizmalar 2,4-Diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) herbisitini birçok sentetik bileşikten daha hızlı parçalarlar. Örneğin, *Arthrobacter* suşlarıyla ilk kez 2,4-D'nin hangi ürünlere kadar parçalandığını gösterilmiştir [5]. Başka bir çalışmada izole edilen *Arthrobacter* suşlarındaki 2,4-D'nin parçalama aşamaları üzerine çalışmalar yapmıştır [6]. Yapılan çalışmada *Arthrobacter*'lerin 2,4-D'yi, öncelikle 2,4-Diklorofenol'e dönüştürdüğü saptanmıştır. Dönüşen diğer ara sekansların 3,4-Diklorokatekol, 2,4-Dikloromukonik asit, süksinat ve sonuncusu 2-kloro-4-karboksümetilen olduğu belirlenmiştir. Dikloromukonik asitin dönüşümü "ortho fission" (fenolik halkalarının açılması) adı verilen bir mekanizma ile gerçekleşir. Don ve Pemberton, 2,4-D'nin parçalanma yollarını ayrıntılı bir şekilde incelemiş, enzimleri izole etmiş ve genetik şifreye göre olan parçalanmayı göstermişlerdir [7]. Fenoksiasetatlarla ilgili çalışmalarda genellikle 2,4-D'yi ve MCPA'yı (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid) parçalayan bakteri suşları izole edilmiş, daha az sayıdaki bakteri türünün ise 2,4,5-T'yi parçaladığı belirtilmiştir. Örneğin yapılan bir çalışmada, izole edilen *Brevibacterium sp.*'nin 2,4,5-T'yi (2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid) okside ederek 3,5-Diklorokatekol'e döndürmüştür [8]. Bazı tatlı su alglerinin düşük konsantrasyondaki fenol ve kateşolü karbondioksit kadar parçaladığını göstermiştir. Buradaki parçalanma, radyoaktif işaretlenmiş ¹⁴CO₂'nin ölçümünden saptanmıştır. Ayrıca, naftalinin 1-naftole dönüştürülmesi mikroalg ve siyanobakterilerle olmaktadır [9]. Siyanobakterilerden *Microcystis aeruginosa* ile yapılan bir çalışmada bu bakterinin CuSO₄, DCMU (Analytical Grade Diuron), Karmex (Commercial Grade Diuron), Fernoxone vs. gibi pestisitleri ve 2,4-D'yi kullanabilme koşulları denenmiştir. Siyanobakterinin farklı pestisit ve 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarında yaşamını sürdürdüğü görülmüştür. *Microcystis aeruginosa* 1-2000 µg/ml 2,4-D'li ortamda gelişimine devam etmiştir [10].

En fazla kullanılan herbisitlerden biri olan 2,4-D'yi yüksek kapasitede parçalayan fotosentetik mikroorganizmaları bulmak amacıyla planlanan bu araştırmada, aerob fotosentetik bakteriler çeşitli su kaynaklarından izole ve identifiye edilerek, bu mikroorganizmaların 2,4-D'yi kullanımı belirlenmiştir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Oksijenik fotosentetik bakterilerin izolasyonu için, Ankara Çayı ve Abant Gölü aktif çamurundan alınan örnekler kullanılmıştır. Tuz Gölü'nden alınmış olan su ve toprak örnekleri halofil fotosentetik mikroorganizmaların izolasyonunda kullanılmıştır.

2.2. Fotosentetik Oksijenik Mikroorganizmaların İzolasyonu

Fotosentetik oksijenik mikroorganizmaların izolasyonu için alınan örnekler, erlende BG11 sıvı besi yerine seyreltmeler yapılarak ekilmiştir. Seyreltme işlemi steril serum fizyolojik (SF) ile yapılmıştır. (BG11 sıvı besi yeri 1000 ml erlende hazırlanarak, 121 °C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir) [11, 12]. Sonra BG11 sıvı besi yerinden, inverted mikroskopta pipet yardımı ile izole edilen mikroorganizmalar agarlı BG11 besi yeri içeren petri plaklarına ekilmiştir. Ekim yapılmış olan petri plakları sürekli ışık altında ve oda sıcaklığında 15 gün boyunca inkübe edilmiştir. Besi yeri ile ilgili temel bilgiler aşağıda sunulmaktadır.

***BG 11 MEDİUM (gr/l)**

NaNO ₃	1.5 gr
K ₂ HPO ₄	0.03 gr
MgSO ₄ xH ₂ O	0.075 gr
CaCl ₂	0.027 gr
Sitrik asit	0.006 gr
Ferrik amonyum sitrat	0.006 gr
Na ₂ CO ₃	0.02 gr
EDTA Disodyum Mg tuzu	0.001 gr
Toprak Extract	4 ml
A ₅ (İz Element)	1000 µl
Distile Su	1000 ml
pH	8-8.5

*121 °C'de 15' otoklavda sterilize edilir.

* Katı besi yeri elde etmek için 3 gr agar tartılıp eklenir.

***A5 (İZ ELEMENT) ÇÖZELTİSİ**

H ₂ BO ₃	2.86 mg
MgCl ₂ x2H ₂ O	1.8 mg
ZnSO ₄ x7H ₂ O	0.22 mg
Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	0.4 mg
CuSO ₄ x5H ₂ O	0.08 mg
Co(NO ₃) ₂ x6H ₂ O	0.05 mg

*Membran filtre ile sterilize edilir.

***TOPRAK ÖZÜTÜ**

5 Çay Kaşığı Bahçe Toprağı

1 g CaCO₃

100 ml Distile Su

*100 °C'de 15' kaynatılıp filtre ile sterilize edilir.

Petrilerin inkübasyonu sonucu gelişen ve yeşil renkte olan her koloni incelenerek, farklı şekil ve renk gösterenler işaretlenmiştir. Bu koloniler tekrar alınıp agarlı BG 11 besiyeri bulunan petrilere ekilerek saflaştırılmıştır. Böylece BG 11 besi yerinde gelişebilen 12 oksijenik izolat elde edilmiştir. Bu izolatlardan 8 tanesi Ankara Çayı'ndan, 4 tanesi de Abant Gölü'nden izole edilmiştir. Çizelge 1.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1. Ankara Çayı ve Abant Gölü'nden izole edilmiş olan fotosentetik oksijenik mikroorganizmalar

Ankara Çayı	AÇ1	AÇ2	AÇ3	AÇ4	AÇ5	AÇ6	AÇ7	AÇ8
Abant Gölü	AB1	AB2	AB3	AB4				

2.3. Halofil Fotosentetik Mikroorganizmaların İzolasyonu

Halofil fotosentetik mikroorganizmaların izolasyonu için, tuz gölünden alınan örnekler yüksek tuzlu (%15 NaCl) BG 11 sıvı besi yerine seyreltmeler yapılarak ekilmiştir. Seyreltme işlemi steril serum fizyolojik (SF) ile yapılmıştır [11, 12]. Sonra BG11 sıvı besi yerinden, inverted mikroskopta pipet yardımı ile izole edilen mikroorganizmalar agarlı BG11 besi yeri içeren petri plaklarına ekilmiştir. Ekim yapılan petrilere sürekli ışık altında ve oda sıcaklığında 15 gün boyunca inkübe edilmiştir. Petrilerin inkübasyonu sonucunda oluşan yeşil renkli koloniler incelenerek farklı şekil ve renk gösterenler tekrar yüksek tuzlu agarlı BG 11 besi yerine ekilerek saflaştırılmıştır. Böylece BG 11 besi yerinde gelişebilen 8 halofil izolat elde edilmiştir. Çizelge 1.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Tuz Gölü'nden izole edilmiş olan halofil fotosentetik mikroorganizmalar

Tuz Gölü	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
----------	----	----	----	----	----	----	----	----

2.4. Fotosentetik Oksijenik Mikroorganizmaların İdentifikasyonu

İzole edilen 12 koloni morfolojik özelliklerine göre mikroskopta teşhis edilmiştir [11]. Mikroskobik incelemelerde Ankara Çayı'ndan izole edilen 8 koloninin 5 tanesinin (AÇ1, AÇ2, AÇ3, AÇ4, AÇ5) tek hücreli, yuvarlak

veya küresel şekilli, kılıfsız; 3 tanesinin (AÇ6, AÇ7, AÇ8) ise kamçısız, yuvarlak şekilli ve at nalı şeklinde kloroplast içerdikleri gözlenmiştir. Abant Gölü'nden izole edilen 4 koloni'nin 2 tanesi (AB1, AB2) kamçısız, yuvarlak biçimli ve at nalı şeklinde kloroplastlı; diğer 2 tanesinin de (AB3, AB4) 4-12 kolonili, mekik şeklinde bir kılıfla çevrili ve yuvarlak kloroplastlı yeşil mikroalg oldukları gözlenmiştir.

Bulunan verilere göre Ankara Çayı'ndan izole edilen 5 tane oksijenik fotosentetik mikroorganizmanın *Synechocystis sp.* ve 3 tane mikroalgin *Chlorella sp.* olduğu teşhis edilmiştir [11, 13, 14]. Abant Gölü'nden izole edilen mikroalglerden 2 koloninin (AB1, AB2) *Chlorella sp.* ve diğer 2 koloninin (AB3, AB4) *Scenedesmus sp.* olduğu teşhis edilmiştir [11]. Şekil 1' de kültür koleksiyonu görülmektedir.



Şekil 1. Siyanobakteri Kültür Koleksiyonu

2.5. Halofil Fotosentetik Mikroorganizmaların İdentifikasyonu

İzole edilen 8 koloni morfolojik özelliklerine göre mikroskopta teşhis edilmiştir. Mikroskobik incelemelerde bu kolonilerin tek hücreli, asimetrik oval şekilli, iki kamçılı ve kılıfsız yeşil algler oldukları

gözlenmiştir. Alglerin kadeh şeklindeki kloroplastlarının merkezinde kırmızı-turuncu renkte β -karoten görülmüştür. Bulunan verilere göre 8 izolatın *Dunaliella sp.* türünün özelliklerini gösterdiği tespit edilmiştir [15].

2.6.Fotosentetik Oksijenik Mikroorganizmaların 2,4-D Herbisitini Kullanımı

İzole edilen 5 oksijenik siyonobakter ve 7 ökaryotik mikroalg, konuyla ilgili literatür kaynakları örnek alınarak, 100-200-300-400 ppm arasında değişen düzeylerde 2,4-D içeren, petrillerdeki BG 11 besiyerine ekilmiştir[16-19]. Bu denemeler izolasyonda kullanılan pH 8-8.5'da gerçekleştirilmiştir. Denemeler sürekli ışık altında ve 30 gün boyunca, her izolat için üç kez tekrarlanmıştır.

2.7.Halofil Fotosentetik Mikroorganizmaların 2,4-D Herbisitini Kullanımı

İzole edilen sekiz *Dunaliella sp.* suşu, konuyla ilgili literatür kaynakları örnek alınarak, 100-200-300-400 ppm 2,4-D içeren petrillerdeki yüksek tuzlu BG 11 besiyerine ekilmiştir (pH 8-8,5) [16-19]. Sürekli ışık altında ve 30 gün boyunca devam etmiştir. Denemeler her izolat için üç kez tekrarlanmıştır.

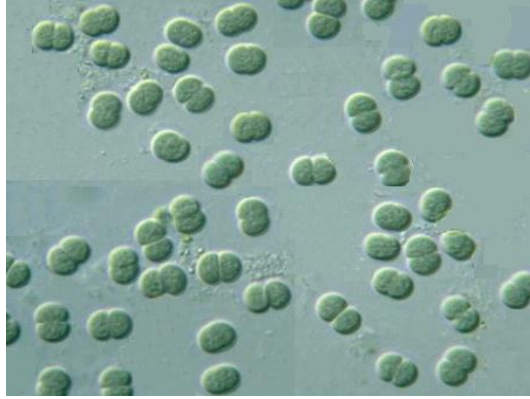
3. BULGULAR

3.1. Fotosentetik Oksijenik Mikroorganizmalar Tarafından 2,4-D Herbisiti'nin Kullanımının Gelişime Etkisi

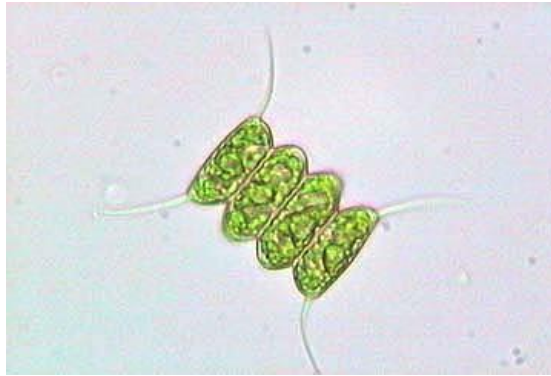
Sürekli ışık altında ve 30 gün boyunca devam eden inkübasyondan sonra Ankara Çayı'ndan izole edilen AÇ kodlu *Synechocystis sp.* suşlarının (AÇ2,AÇ4veAÇ5), AÇ7 kodlu *Chlorella sp*'nin ve Abant Gölü'nden izole edilen AB3 kodlu *Scenedesmus sp*'nin 100 ppm 2,4-D'li ortamda geliştiği görülmüştür. Ankara Çayı'ndan izole edilen AÇ2, AÇ4

ve AÇ5 kodlu *Synechocystis sp.* suşları 200 ppm 2,4-D'li ortamda da gelişmiştir.

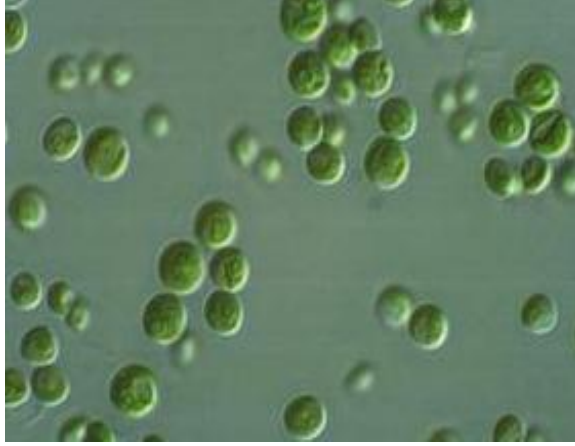
100 ppm'de gelişen *Scenedesmus sp.* ve *Chlorella sp.*(AB3 ve AÇ7), 200 ve 300 ppm; 200 ppm'de gelişebilen 3 *Synechocystis sp.* suşu (AÇ2,AÇ4 ve AÇ5) 300 ve 400 ppm 2,4-D'li BG 11 besi yerine ekilmiş ve 30 gün boyunca inkübe edilmiştir ve yükseltelen konsantrasyon düzeylerinde gelişme görülmemiştir. Tüm sonuçlar ve şekiller, çizelge 1.3 ve şekil 2,3,4'de verilmiştir.



Şekil 2. *Synechocystis sp.*



Şekil 3. *Scenedesmus sp.*



Şekil 4. *Chlorella sp.*

3.2.Halofil Fotosentetik Mikroorganizmalarda 2,4-D Herbisiti'nin Kullanımının Gelişime Etkisi

Sürekli ışık altında ve 30 gün boyunca devam eden inkübasyondan sonra her dört konsantrasyon düzeyinde de (100-200-300 ve 400 ppm) gelişme görülmemiştir. Sonuçlar, çizelge 1.3 ve şekil 5'de verilmiştir. Şekil 1 Hp m525 6x dijital fotoğraf makinesi, Şekil 2,3,4 ve 5 de ki fotoğraflar ise çalışmalar sırasında Müller mtx-2000 mikroskopta çekilmiştir



Şekil 5. *Dunaliella sp.*

Çizelge 1.3. Fotosentetik mikroorganizmalarda 2,4-D'nin kullanımının gelişime etkisi

	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm
<i>Scenedesmus sp.</i>	AB3	AB3	AB3	gelişme yok
<i>Synechosystis sp.</i>	AÇ (2,4,5)	AÇ (2,4,5)	gelişme yok	gelişme yok
<i>Chlorella sp.</i>	AÇ7	AÇ7	AÇ7	gelişme yok
<i>Dunaliella sp.</i>	gelişme yok	gelişme yok	gelişme yok	gelişme yok

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Fenoksiasetat ve türevlerinin parçalanmasıyla ilgili literatürlerde oksijenik fotosentetik bakteriler, mikroalgler ve alkalofilik bakterilerle çalışılmıştır. Alkalofilik bakterilerden, herbisit fabrikasından örnek alınarak izole edilen *Rhodospirillum rubrum*'un 2,4-D'yi parçaladığını ve yapılan PCR çalışmasıyla bu bakterinin genlerinin *tfd-A* gen sekansıyla homoloji gösterdiği saptanmıştır [20]. Alkalofilik bakterilerle yapılan bir başka çalışmada *Comomonas acidovarans* P4a suşunun 2,4-D ve MCPA'yı parçalayabilme koşullarını incelenmiştir [16]. Yapılan deneylerde (pH 5,5-10) en iyi gelişme düzeyinin pH 8,5'da ve 0,4 g/l olduğunu saptamışlardır. pH değeri 12'ye çıkarıldığında 2,4-D'nin parçalanma kapasitesinin 0,4 g/l'den 1,6 g/l'ye kadar yükseldiği saptanmıştır. Klecner ve Kosaric'in alglerle yaptıkları bir çalışmada, çevresel kirliliğe neden olan fenolik bileşiklerin, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus obliquus* ve *Spirulina maxima* türleri tarafından parçalandığı anlatılmıştır [17]. *Spirulina maxima* pH 9-9,2 olan sodyum bikarbonatlı ortamda, diğer iki tür ise pH 7-7.2 olan agarlı ortamda fenollerini parçalamıştır. Bu çalışmada Fotosentetik Oksijenik Bakteriler en fazla 0,3 g/l içeren 2,4-D ortamında gelişebilmiştir. Siyanobakterilerden, *Microcystis aeruginosa*, ışık altında yapılan 10 günlük çalışmada, 2,4-D'nin 1000 ve 1500 ppm dozları karşısında canlılığını sürdürmüştür [19]. *Phaeodactylum tricornutum* ve *Dunaliella tertiolecta* isimli iki fitoplankton üzerine 2,4-D herbisitinin toksik etkisinin araştırıldığı çalışmada LC50 değerleri belirlenmiştir. Buna göre *Phaeodactylum tricornutum*'un 2,4-D'ye karşı LC50 değeri 362±9 ppm, *Dunaliella tertiolecta*'nın 2,4-D'ye karşı LC50 değeri 185±11 ppm olarak belirlenmiştir [19].

Literatür taramalarında halofil fotosentetik mikroorganizmaların 2,4-D'yi parçalamasıyla ilgili bilgiye az rastlanmaktadır. Tuz Gölü'nden alınan örneklerden uzun süreli denemelerle izole ettiğimiz *Dunaliella sp*'nin 100-400 ppm aralığındaki 2,4-D'yi tolere etmediği saptanmıştır. Aerobik fotosentetik mikroorganizmalar izole edilerek yapılmış olan bu çalışmaların sonucunda, bunların hepsine 2,4-D'nin toksik etki ettiği bulunmuştur. Bu mikroorganizmaların bazıları 100-300 ppm (AÇ 2,4,5 ve 7, AB 3) 2,4-D konsantrasyonlarında gelişebilmişlerdir.

5. KAYNAKLAR

- [1]. Ying, G.G. and B. Williams, "Laboratory study on the interaction between herbicides and sediments in water systems". Environ. Pollut., 107: 399-405, 2000.
- [2]. Fairchild, J.F., D.S. Ruessler, P.S. Haverland and A.R. Carlson, "Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides". Arch. Environ. Contam. Toxicol., 32: 353-357, 1997.
- [3]. Waldhoff, D., B. Furch and W.J. Junk, "Fluorescence parameters, chlorophyll concentration, and anatomical features as indicators for flood adaptation of an abundant tree species in central Amazonia: *Symmeria paniculata*". Environ. exp. Bot., 48: 225-235, 2002.
- [4]. Sklyarov, V.G., P.N. Taran and B.K. Kerzhner, "Decomposition of 2,4-dichloroohenoxyacetic acid by ozone in aqueous solutions". Khim.Technol. Vody., 8:81-83, 1986.
- [5]. Loos, M.A., Roberts, R.N. and Alexander, M., "Phenols as intermediates in the decomposition of phenoxyacetates by an *Artrobacter Species*". Canadian Journal of Microbial., 13: 691, 1967.
- [6]. Tiedje, J.M. and Alexander, M., "Enzymatic cleavage of the ether bond of 2,4-D". J. Agric. Food. Chem., 17: 1080, 1969.
- [7]. Don, R.H. and Pemberton, J.M., "Genetic and physical map of the 2,4-diclorophenoxyacetic acid-degradive plasmid *pJP4*". J. Bacteriol., 161: 466, 1985.
- [8]. Horvath, R.S., "Microbial cometabolizm of 2,4,5-T". Bull. Environ. Microbiol., 54: 2203, 1988.

- [9]. Ellis, B.E., "Degradation of phenolic compounds by fresh-water algae". Plant Sci. Lett., 8: 213-216, 1977.
- [10]. Swain, N., Rath, B. and Alhikary, S.P., "Growth response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to herbicides and pesticides". J. Basic Microbiol., 34:197-204, 1994.
- [11]. Geitler, L., "Cyanophyceae". Heft. In pascher. die süßwasser flora mitteleuropas Gustav Fisher Pub., Jena, Germany, 12, 1925.
- [12]. Krieg, N.R., "Enrichment and isolation . In Manual of Methods for general bacteriology". Ed. P. Gerhardt et al., American Society for Microbiology, Washington, 112-142, 1981.
- [13]. Rippka, R., "Isolation and purification of cyanobacteria". Methods Enzimol., 167: 3-27, 1987.
- [14]. Lund, J.W.G., Kipling, C. and Le Cren, E.D., "The inverted microscope method of estimating algal numbers and the statistical basis of estimations by counting". Hydrobiologia., 11: 143-170, 1958.
- [15]. Borowitzka, M.A. and Borowitzka L.J., "Micro-algal biotechnology". Cambridge University Press., Cambridge, 2: 28-40, 1988.
- [16]. Hoffmann D., Müller R. H., Kiesel B. and Babel W., "Isolation and characterization of an alkaliphilic bacterium capable of growing on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid". Acta Biotechnol., 16: 121-131, 1996 .
- [17]. Klecner, V., Kosaric, N., "Degradation of phenols by algae". Environ. Technol., 13: 493-501, 1992.
- [18]. Loser, C., Seidel, H., Hoffmann, A. Zehnsdorf., " Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil" Appl. Microbiol. Biotechnol., 51:105-111, 1999.
- [19]. King, E.O., Ward, W.K. and Raney, D.E., " Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein", J.Lab.Clin.Med., 44:301-307, 1954.
- [20]. Ehrig, A., Muller, R.H. and Babel, W., "Isolation of phenoxy herbicide-degrading *Rhodospirillum rubrum* Species from contaminated building material". Acta Biotechnol., 17(4): 351-356, 1997.