

POTENSI ARCHAEA HALOFIL EKSTREM SEBAGAI PENGURAI HIDROKARBON PADA LINGKUNGAN HIPERSALIN: SEBUAH TINJAUAN SINGKAT

HYDROCARBON-DEGRADING POTENTIAL OF EXTREMELY HALOPHILIC ARCHAEA IN HYPERSALINE ENVIRONMENTS: A BRIEF REVIEW

Yosmina H. Tapilatu

UPT BKBL Ambon, JIN. Y. Syaranamual, Guru-Guru Poka-Ambon 97233
Pos-el: yosmina.tapilatu@lipi.go.id

ABSTRACT

The potential of extremely halophilic archaea degrading hydrocarbon in hypersalin environment is reviewed. The emphasis is on the last 30 years studies. The identification of extremely halophilic archaea is important as this type of prokaryote is predominant in the hypersaline environment with NaCl concentration higher than 20% (w/v). Recent studies have shown that extremely halophilic archaea especially those belong to Halobacterium, Haloarcula, and Haloferax might play an important role in hydrocarbon degradation in hypersaline environment. Other that can be found in pristine and hydrocarbon-contaminated hypersaline environment, member of these genres are also capable of using hydrocarbon as source of energy and carbon.

Keywords: *Extremely halophilic archaea, Hydrocarbon biodegradation, Hypersaline environments*

ABSTRAK

Potensi archaea halofil ekstrem sebagai pengurai hidrokarbon pada lingkungan hipersalin dengan menekankan pada perkembangan yang terjadi dalam periode 30 tahun terakhir, telah ditinjau. Pentingnya identifikasi archaea halofil ekstrem yang memiliki potensi tersebut terutama karena mikroorganisme inilah yang mendominasi lingkungan dengan kadar NaCl lebih dari 20% (w/v). Kajian terkini menunjukkan bahwa archaea halofil ekstrem terutama yang tergolong dalam marga Halobacterium, Haloarcula, dan Haloferax berpotensi memegang peranan penting dalam degradasi hidrokarbon pada lingkungan hipersalin. Selain dapat ditemukan pada lingkungan yang belum terkontaminasi hidrokarbon dan pada lokasi eksploitasi minyak bumi, anggota ketiga marga ini juga sanggup menggunakan hidrokarbon sebagai sumber energi dan karbon.

Kata kunci: Archaea halofil ekstrem, Biodegradasi hidrokarbon, Lingkungan hipersalin

PENDAHULUAN

Eksplorasi sumur-sumur minyak bumi oleh manusia menjadi semakin intensif sejak awal abad ke-20. Walaupun harganya terus meningkat, minyak bumi tetap menjadi salah satu sumber energi utama bagi manusia karena manfaatnya yang beraneka ragam dan mudah dipindahkan dari satu tempat ke tempat lainnya. Selain itu,

melalui proses kimia tertentu, minyak bumi dapat ditransformasikan menjadi berbagai produk turunan yang saat ini sudah menjadi bahan pelengkap dari kehidupan sehari-hari, seperti plastik, tekstil sintetis, pupuk, dan pestisida. Minyak bumi tergolong dalam kelompok hidrokarbon, yaitu kelompok senyawa organik yang disusun oleh karbon dan hidrogen. Gas alam, yang juga

termasuk dalam kelompok hidrokarbon, selalu ditemukan bersamaan dengan minyak bumi pada setiap sumur minyak. Gas alam ini merupakan bahan bakar yang berkualitas, dan beberapa komposannya seperti etilena juga digunakan untuk produksi polimer yang menjadi bahan dasar dari berbagai produk, seperti plastik, campuran karet, dan serat.

Tidak dapat diingkari bahwa penggunaan yang semakin intensif dari kedua sumber energi tersebut mengancam keseimbangan ekologis dari planet ini. Hal ini karena proses-proses yang berhubungan dengan ekstraksi, transportasi, dan konsumsi bahan bakar dari kelompok hidrokarbon berisiko mengakibatkan polusi di semua jenis ekosistem.

Walaupun banyak teknik penanggulangan –mekanis, kimiawi, dan biologis– sudah dikembangkan untuk mengurangi, bahkan kalau bisa menghilangkan dampak tumpahan minyak ke lingkungan, biodegradasi oleh mikroorganisme merupakan proses alamiah yang paling efektif untuk mengatasi polusi minyak bumi.^{1,2} Untuk itu, banyak penelitian intensif telah dilakukan mengenai mikroorganisme pengurai hidrokarbon (mikroorganisme hidrokarbonoklastik). Beberapa contoh dalam sepuluh tahun terakhir di antaranya adalah oleh Engelhardt *et al.*,³ Abed *et al.*,⁴ Al-Mueini *et al.*,⁵ Golyshin *et al.*,⁶ dan Aoshima *et al.*⁷ Sampai tahun 2005, tercatat sudah teridentifikasi 79 marga bakteri, 9 marga cyanobakteri, 103 marga *Fungi*, dan 14 marga mikro-eukaryota fototrof yang beberapa atau seluruh anggotanya mampu menguraikan hidrokarbon.⁸ Beberapa kajian juga dapat dijumpai mengenai jalan metabolik degradasi hidrokarbon oleh mikroorganisme yang diamati dari tingkatan fisiologis, biokimia, dan genetika,^{1,9} serta parameter-parameter lingkungan, baik fisika maupun kimia yang memengaruhi biodegradasi hidrokarbon di lingkungan.¹⁰ Di samping itu, beberapa penelitian *in situ* telah menunjukkan pentingnya peran mikroorganisme hidrokarbonoklastik tersebut dalam eliminasi hidrokarbon dari lingkungan.^{11,12,13}

Dari sekian banyak informasi mengenai mikroorganisme hidrokarbonoklastik, sebagian besar studi yang dilakukan, baik dalam kondisi *in vitro* dan/atau *in situ* hanya berkaitan dengan biotop yang memiliki kondisi fisiko-kimia standar.

Sangat sedikit penelitian yang sudah dilakukan mengenai biodegradasi pada lingkungan dengan kondisi hidup yang ekstrem.¹⁴

Kondisi hidup yang ekstrem mengacu pada kondisi di mana parameter fisiko-kimia lingkungan tersebut tidak dapat ditoleransi oleh *Homo sapiens*, tanpa memandang skala spasial.¹⁵ Tidak dapat dipungkiri bahwa keberadaan hidrokarbon, baik secara alamiah maupun akibat kegiatan antropogenik, di berbagai jenis lingkungan ekstrem, termasuk di lingkungan dengan salinitas tinggi (hipersalin). Tujuan dari ulasan singkat ini adalah untuk merangkum perkembangan yang terjadi pada periode 30 tahun terakhir dalam penelitian mengenai archaea halofil ekstrem yang berpotensi mengurai hidrokarbon pada lingkungan hipersalin.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Umum Lingkungan Hipersalin

Ekosistem hipersalin termasuk dalam berbagai jenis lingkungan ekstrem yang dapat ditemui di muka bumi. Konsentrasi NaCl terlarut dalam lingkungan ini dapat bervariasi dari 15% (w/v) hingga mendekati titik jenuh, yaitu sekitar 35% (w/v).¹⁶ Ekosistem ini sangat penting, baik secara ekonomis (produksi NaCl untuk tujuan industri dan pangan), maupun secara ekologis dan ilmiah (pemahaman mengenai mekanisme adaptasi, penemuan sistem-sistem enzimatik baru yang dapat diaplikasikan dalam bidang bioteknologi, dan sebagainya). Terbentuknya ekosistem hipersalin sendiri dapat secara alamiah (misalnya ladang garam alamiah, danau dan laguna hipersalin) atau antropik¹⁶ (ladang produksi garam dan kolam air bersalinitas tinggi yang terbentuk pada ladang kristal garam dan zona penyimpanan minyak bumi).

Lingkungan perairan hipersalin juga dapat dikelompokkan dalam *athalassohaline* dan *thalassohaline*.¹⁶ Lingkungan *athalassohaline* adalah semua lingkungan danau air asin yang terdapat di daratan, di mana air telah menggerusi bebatuan yang terbentuk dari garam atau stok garam yang disimpan. Pada lingkungan ini biasanya terdapat juga formasi karbonat sehingga komposisi ionik

air berbeda dengan air laut. Akibatnya, terdapat kombinasi antara konsentrasi garam yang tinggi dengan pH yang sangat basa (Caumette, kom. pribadi). Sebagai contoh, seperti Danau Magadi (Kenya), Danau Wadi Natrun (Mesir), dan danau gurun pasir Atacama (Chili).

Lingkungan *thalassohaline* terbagi lagi atas *thalassohaline* alamiah dan buatan. Sistem *thalassohaline* alamiah merupakan genangan air laut yang terisolasi dari lautan oleh beting, seperti Great Salt Lake di AS dan Laut Mati di Israel. Komposisi garam pada perairan ini karenanya identik dengan air laut dan didominasi oleh NaCl dan ion sulfat. Ladang produksi garam merupakan contoh *thalassohaline* buatan di mana evaporasi air laut dilakukan oleh manusia untuk memproduksi garam yang dipakai dalam dunia industri atau pangan.¹⁶ Kesemua jenis ekosistem ini merupakan tempat yang sesuai secara ekologis bagi mikroorganisme halofil ekstrem.

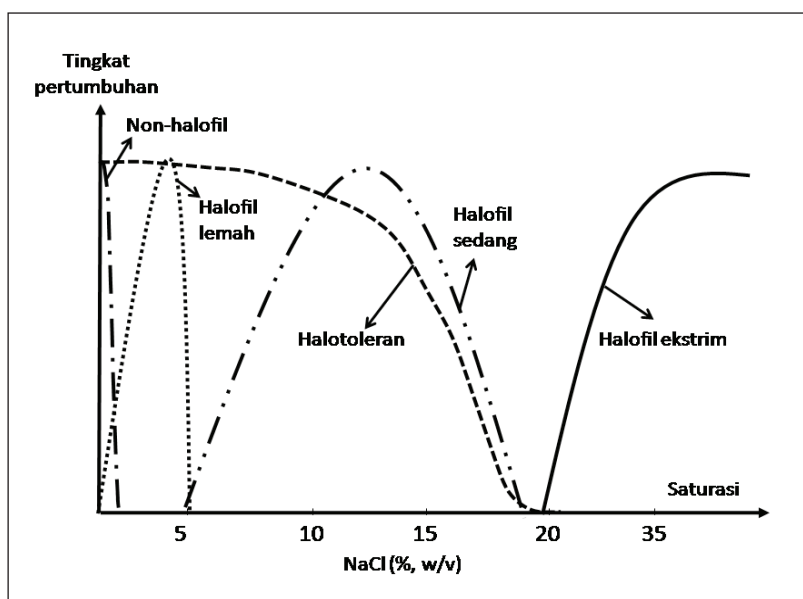
Archaea Halofil Ekstrem

Archaea merupakan satu dari tiga domain besar makhluk hidup. Domain ini diusulkan oleh Woese and Fox¹⁷ berdasarkan pohon filogenetik yang dibuat dengan menggunakan sekuens gen 16s rRNA. Hal ini disebabkan karena mikroorganisme yang tergolong dalam domain ini memiliki karakteristik yang beberapa di antaranya sama

dengan bakteri (hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop dan tidak berinti sel), dan beberapa lainnya sama dengan eukaryota (tidak ada peptidoglikan pada dinding sel dan memiliki banyak tipe RNA polymerase). Pada awalnya, archaea diduga hanya hidup pada lingkungan dengan parameter fisiko-kimia ekstrem, ternyata juga ditemukan pada lingkungan berparameter fisiko-kimia standar.

Istilah halofil (dari bahasa Yunani *allos*, garam dan *philein*, menyukai) sendiri mengacu pada jenis organisme yang membutuhkan NaCl untuk bertumbuh secara optimal. Kebutuhan ini bermacam-macam, dan halofil ekstrem menurut DasSarma and Arora¹⁸ menunjuk pada kelompok organisme yang membutuhkan kadar NaCl sebesar 20–30% (w/v) untuk hidup (Gambar 1).

Ekosistem hipersalin merupakan lingkungan yang terpapar sinar matahari secara intensif sehingga berbahaya bagi organisme yang tidak mampu beradaptasi dengan radiasi ultra-violet yang besar. Di samping itu, kadar NaCl dan suhu yang tinggi merupakan dua faktor utama yang mengurangi secara signifikan solubilitas molekul oksigen dalam air. Ketersediaan substrat organik karenanya sangat bervariasi dan akan sangat menurun ketika populasi archaea halofil menjadi padat. Kepadatan archaea halofil ekstrem pada biotop sejenis dapat mencapai 10^7



Gambar 1. Kurva pertumbuhan organisme sebagai fungsi kebutuhan akan NaCl. Digambar berdasarkan pembagian menurut DasSarma and Arora.¹⁸

sampai dengan 10^8 /mL, bahkan lebih.^{19,20} Hal ini dikarenakan ketiadaan predator dan langkanya substrat organik yang tersedia.²¹ Pada kadar garam antara 20 sampai 30% (w/v) hanya ditemukan archaea dari famili Halobacteriaceae dan bakteri dari marga *Salinibacter*.^{21,22,23} Dari sekitar 30 marga berbeda, *Halobacterium*, *Haloferax* dan *Haloarcula* merupakan tiga marga yang beberapa anggotanya berpotensi sebagai pengurai hidrokarbon.^{24,25,26,27}

Archaea yang tergolong dalam marga *Haloferax* dan *Haloarcula* dan beberapa strain *Halobacterium* mampu menggunakan berbagai jenis substrat sebagai sumber karbon dan energi.²⁸ Spesies tertentu *Haloferax* bahkan mampu hidup hanya dengan menggunakan satu substrat karbon (glusidasederhana, gliserol atau asetat).^{28,29,30} Kapasitas inilah yang membuat anggota ketiga marga tersebut berpotensi menggunakan hidrokarbon sebagai sumber karbon dan energi.

Biodegradasi Hidrokarbon pada Lingkungan Hipersalin

Informasi mengenai archaea halofil ekstrem pengurai hidrokarbon sangat penting terutama untuk menemukan strategi bioremediasi yang terbaik dalam rangka mengatasi masalah yang dihadapi dalam industri perminyakan. Masalah-masalah tersebut adalah pengelolaan limbah air buangan yang bersalinitas tinggi dan dekontaminasi zona litoral dengan tingkat evaporasi tinggi yang tercemar minyak bumi.

Pada tingkatan global, sekitar 5% dari total volume air limbah yang dibuang oleh industri kimia, farmasi, dan perminyakan memiliki kadar NaCl sama dengan atau lebih dari 35 g/L (w/v).^{31,32} Dalam industri perminyakan khususnya, buangan terbanyak berasal dari ekstraksi minyak mentah,³³ di mana untuk setiap barel minyak yang diproduksi, ada sekitar 10 barel air limbah bercampur minyak dengan kadar NaCl bervariasi antara 1 hingga 250 g/L.³⁴ Banyak sumur minyak yang sudah mendekati masa akhir eksploitasi memproduksi air buangan bersalinitas tinggi dalam jumlah besar. Pengelolaan buangan cair ini menimbulkan masalah serius, baik di lingkungan darat maupun laut dan biayanya sangat mahal.³³

Daerah litoral dengan tingkat evaporasi yang tinggi seperti daerah rawa dan hutan mangrove juga sangat rentan akan pencemaran hidrokarbon. Contoh yang banyak mendapat perhatian publik adalah pencemaran minyak mentah yang terjadi pada Teluk Persia setelah perang Teluk pada tahun 1991. Ketika masuk dalam lingkungan, limbah cair hipersalin bercampur hidrokarbon akan menghambat pertumbuhan vegetasi sehingga mengakibatkan erosi dan terkikisnya lapisan teratas tanah, namun juga mencemari jaringan air bawah tanah dengan garam dan hidrokarbon.

Jenis-Jenis Archaea Halofil Ekstrem Hidrokarbonoklastik

Kapasitas prokaryota halofil untuk mengurai minyak telah menjadi bahan kajian selama dua dasawarsa terakhir.^{5,24,25,26,27,34-40} Walau jumlah bakteri halotoleran ekstrem dan halofil sedang pengurai hidrokarbon yang berhasil diidentifikasi terus meningkat, namun sangat sedikit yang sudah diketahui mengenai archaea halofil ekstrem yang memiliki kemampuan yang sama.⁴¹

Studi pendahuluan yang dilakukan pada akhir tahun 1970-an oleh Ward and Brock⁴² menunjukkan rendahnya tingkat biodegradasi hidrokarbon pada lingkungan hipersalin. Mereka menggunakan sampel air yang berasal dari Great Salt Lake, yang diperkaya dengan substrat heksadekana sebagai sumber energi dan karbon. Hasil pengamatan yang dilakukan mengindikasikan penurunan biodegradasi heksadekana seiring dengan peningkatan salinitas. Kultur tersebut tidak dapat tumbuh pada minyak mineral atau melakukan proses mineralisasi ketika konsentrasi NaCl dalam media tumbuh melebihi 200 g/L.⁴² Hal ini diduga akibat hubungan terbalik antara salinitas dan kelarutan hidrokarbon yang menyebabkan ketersediaan substrat bagi mikroorganisme lebih rendah pada lingkungan salin apabila dibandingkan dengan lingkungan non-salin.⁴³

Beberapa penelitian yang dilakukan sejak periode tahun 90-an sampai sekarang menunjukkan bahwa biodegradasi hidrokarbon oleh archaea halofilik ekstrem pada lingkungan hipersalin sebenarnya mungkin dilakukan (Tabel 1). Selain itu, archaea halofil ekstrem yang mampu mengurai hidrokarbon ini tidak saja ditemukan pada

Tabel 1. Archaea Halofil Ekstrem Pengurai Hidrokarbon yang Berhasil Diisolasi Selama 20 Tahun Terakhir.

Isolat	Identitas berdasarkan analisis mikrobiologi	Identitas berdasarkan similaritas dengan basis data GenBank (%)	NaCl optimum untuk pertumbuhan (g/L)	Hidrokarbon yang didegradasi	Lokasi pengambilan sampel	Ref
<i>Halobacterium</i>						
HA-3	<i>Halobacterium</i> sp.	<i>Halobacterium</i> sp. (100)	235	alifatik (n-C ₈ – n-C ₂₁ '), aromatik (benzena, toluena)	Pesisir hipersalin (salt marsh) Teluk Arab	27
HA-4	<i>Halobacterium</i> sp.	<i>Halobacterium</i> sp. (99)	235	alifatik (n-C ₈ – n-C ₁₈ '), aromatik (benzena, naftalena)	Pesisir hipersalin (salt marsh) Teluk Arab	27
H-352	<i>Halobacterium</i> sp.	tidak tersedia	300	Minyak mentah	Depot minyak Bondyuzhskoe, Rusia	36
<i>Haloarcula</i>						
MSNC 2	<i>Haloarcula</i> sp.	<i>Har. argentinensis</i> (99)	225	n-C ₁₇	Kolam hipersalin Camargue, Prancis	26
EH4	<i>Halobacterium</i> sp.	<i>Haloarcula</i> sp.*	225	n-C ₁₄ ', n-C ₁₆ ', n-C ₂₀ ', n-C ₂₁ ', pristana	Lokasi produksi garam Aigues Mortes, Prancis	35
<i>Haloferax</i>						
MSNC 4	<i>Haloferax</i> sp.	<i>Hfx. volcanii</i> (98)	225	n-C ₁₇	Kolam hipersalin Camargue	26
MSNC 14	<i>Haloferax</i> sp.	<i>Hfx. alexandrinus</i> (97)	225	n-C ₁₇ ', n-C ₂₀ ', fenantrena	Kolam hipersalin Camargue	26
MSNC 16	<i>Haloferax</i> sp.	<i>Hfx. volcanii</i> (99)	225	n-C ₁₇ ', n-C ₂₀	Kolam hipersalin Camargue	26
HA-1	<i>Haloferax</i> sp.	<i>Haloferax</i> sp. (99)	> 235	alifatik (n-C ₈ – n-C ₃₄ '), aromatik (benzena, toluena, fenantrena, naftalena)	Pesisir hipersalin (salt marsh) Teluk Arab	27
HA-2	<i>Haloferax</i> sp.	<i>Haloferax</i> sp. (99)	>235	alifatik (n-C ₈ – n-C ₃₄ '), aromatik (toluena, fenantrena, naftalena)	Pesisir hipersalin (salt marsh) Teluk Arab	27
M-18	<i>Haloferax mediterranei</i>	Tidak tersedia	250	Minyak mentah	Ladang minyak Kalamkass, Rusia	38

*: analisis sekuens 16S rRNA dilakukan 20 tahun setelah isolasi dan identifikasi.²⁶

lingkungan hipersalin yang terkena kontaminasi hidrokarbon, seperti ladang minyak,^{36,38} namun juga pada lokasi-lokasi yang diketahui kurang atau bahkan tidak pernah terkontaminasi oleh minyak bumi sebelumnya, seperti kawasan pesisir²⁷ dan kolam kecil yang berada pada lokasi produksi garam.²⁶ Hal ini sekali lagi merupakan konfirmasi atas pengamatan bahwa mikroorganisme hidrokarbonoklastik pada dasarnya bersifat omnipoten, dan walaupun berada dalam jumlah yang sangat kecil, populasinya akan bertambah secara eksponensial pada saat terjadi tumpahan minyak di habitatnya.⁴⁴

Tingkat biodegradasi oleh archaea halofil ekstrem bahkan relatif mendekati tingkat biodegradasi yang dilakukan oleh mikroorganisme non-halofil atau halofil lemah dan sedang (Tabel 2).

Lebih jauh, satu hal penting yang patut dicatat dari hasil penelitian mengenai archaea halofil ekstrem adalah kemampuan beberapa isolat, terutama yang tergolong dalam marga *Haloferax*^{26,27} dan *Halobacterium*²⁷ untuk mendegradasi hidrokarbon alifatik dan aromatik. Diketahui bahwa terdapat beberapa strain bakteri non-halofil dan halofil sedang yang mampu mendegradasi hidrokarbon alifatik dan aromatik secara bersamaan,^{5,48,49} namun baru untuk pertama kalinya dideskripsikan strain archaea halofil ekstrem yang memiliki kapasitas yang serupa. Temuan ini kembali menegaskan pentingnya kajian lanjutan terhadap peranan archaea halofil

ekstrem dalam penguraian hidrokarbon pada lingkungan berkadar NaCl lebih dari 20% (w/v).

Penting untuk dicatat bahwa sampai saat ini sama sekali belum ada informasi yang tersedia mengenai metabolisme hidrokarbon oleh archaea halofil ekstrem aerobi. Untuk itu, diperlukan kajian lebih lanjut terutama untuk mendeskripsikan jalur metabolisme biodegradasi hidrokarbon oleh archaea halofil ekstrem, serta gen dan enzim yang terlibat dalam proses tersebut. Apalagi karena sekarang sekuens genom dari archaea halofil tertentu sudah tersedia, data ini dapat digunakan untuk membuat rekonstruksi metabolik pada skala genomik. Di samping itu dengan mengombinasikan data sekuens genom dengan analisis transkriptomik dan proteomik, jalur metabolik dan mekanisme regulasi gen katabolik yang terlibat akan dapat diidentifikasi.

KESIMPULAN

Banyak wilayah pesisir di mana terdapat rawa payau (*salt marsh*) dan hutan mangrove dengan tingkat evaporasi yang tinggi tercemar oleh hidrokarbon. Di samping itu, limbah cair yang berasal dari berbagai industri, terutama kilang minyak dikenal memiliki kadar NaCl melebihi 20% (w/v) dan kandungan hidrokarbon di dalamnya. Sementara itu, salinitas yang tinggi tersebut merupakan penghalang digunakannya teknik klasik bioremediasi. Identifikasi strain prokaryota pengurai hidrokarbon yang mampu beradaptasi dengan jenis lingkungan ekstrem ini karenanya

Tabel 2. Perbandingan Potensi Biodegradasi Antara Dua Archaea Halofil Ekstrem dengan Dua Bakteri Non-halofil.^{35,45,46,47}

Isolat/strain	Halofil ekstrim		Non-halofil	
	<i>Haloarcula</i> sp. EH-4	<i>Haloferax volcanii</i> MSNC 16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain WatG	<i>Alkanindiges illinoisensis</i> GTI MVAB Hex1
Jenis substrat yang didegradasi	n-C ₁₇ , n-C ₂₀ , pristana	n-C ₁₇	n-C ₄ – n-C ₃₁	n-C ₁₆
% degradasi dari total hidrokarbon (g/L)	50-70% dari 0,5 g/L	95% dari 0,5 g/L	95% dari 5 g/L	52% dari 0,2 g/L
NaCl optimum untuk pertumbuhan (g/L)	225	225	10	10
Kondisi inkubasi (hari, suhu)	30 hari, 32°C	30 hari, 40°C	28 hari, 20° C,	60 hari, 25° C
Ref	35	45	46	47

sangatlah penting, baik secara mendasar maupun aplikatif.

Kesemua kajian yang telah dilakukan selama 30 tahun terakhir, baik dengan menggunakan sampel yang berasal dari lingkungan hipersalin yang belum pernah tercemar maupun sudah terkontaminasi hidrokarbon, mengindikasikan bahwa archaea halofil ekstrem mungkin memegang peranan penting dalam proses biodegradasi hidrokarbon. Tiga marga archaea halofil ekstrem yang omnipresen yaitu Halobacterium, Haloarcula, dan Haloferax memiliki anggota yang berpotensi sebagai pengurai hidrokarbon. Tingkat degradasi hidrokarbon oleh archaea halofil ekstrem relatif identik dengan bakteri pada lingkungan yang berparameter standar. Di samping itu, temuan terkini juga mengindikasikan bahwa beberapa anggota dari marga Halobacterium dan Haloferax mampu menguraikan bukan saja alkana linear, namun juga senyawa hidrokarbon aromatik.^{26,27}

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Gono Semiadi yang telah memberikan bimbingan kepada penulis dalam penyusunan karya tulis ini.

DAFTAR PUSTAKA

- ¹Head, I.M., D.M. Jones, and W.F.M. Roling. 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nature Reviews Microbiology*, 4: 173–182.
- ²National Academy of Sciences. 1985. *Oil in the sea-inputs, fates, and effects*. Washington, DC: National Academy Press.
- ³Engelhardt, M.A., K. Daly, R.P.J. Swannell and I.M. Head. 2001. Isolation and characterization of a novel hydrocarbon degrading, Gram-positive bacterium, isolated from intertidal beach sediment, and description of *Planococcus alkanoclasticus* sp. nov. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 237–247.
- ⁴Abed, R.M.M., A. Al-Thukair, and D. de Beer. 2006. Bacterial diversity of a cyanobacterial mat degrading petroleum compounds at elevated salinities and temperatures. *FEMS Microbiology and Ecology*, 57: 290–301.
- ⁵Al-Mueini, R., et al. 2007. Hydrocarbon degradation at high salinity by a novel extremely halophilic actinomycete. *Environmental Chemistry*, 4: 5–7.

- ⁶Golyshin, P.N., et al. 2002. *Oleiphilaceae* fam. nov., to include *Oleiphilus messinensis* gen. nov., sp. nov., a novel marine bacterium that obligately utilizes hydrocarbons. *International Journal of Systematic Evolution Microbiology*, 52: 901–911.
- ⁷Aoshima, H., et al. 2006. Improvement of heavy oil degradation by *Rhodococcus erythropolis* C2. *Journal of Environmental Biotechnology*, 5: 107–109.
- ⁸Prince, R.C. 2005. The microbiology of marine oil spill bioremediation. In: B. Ollivier and M. Magot (Eds), *Petroleum Microbiology*, 317–336. Washington DC: ASM Press.
- ⁹van Hamme, J.D., A. Singh, and O.P. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 503–549.
- ¹⁰Leahy, J.G., and R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 54: 305–315.
- ¹¹Medina-Bellver, J.I., et al. 2005. Evidence for in situ crude oil biodegradation after the Prestige oil spill. *Environmental Microbiology*, 7 (6): 773–779
- ¹²Miralles, G. et al. 2007. Alkane biodegradation and dynamics of phylogenetic subgroups of sulfate-reducing bacteria in an anoxic coastal marine sediment artificially contaminated with oil. *Chemosphere*, 68: 327–334.
- ¹³Hazen, T.C. et al. 2010. Deep-Sea Oil Plume Enriches Indigenous Oil-Degrading Bacteria. *Science*, 330 (6001): 204–208. Published online 24 August 2010 [DOI:10.1126/science.1195979]
- ¹⁴Margesin, R., and F. Schinner. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 650–663.
- ¹⁵Deming, J.W. 2001. Unusual or extreme high pressure marine environments. In: C.J. Hurst et al. (Ed.). *ASM Manual of Environmental Microbiology*. 2nd ed: 478–490. Washington DC: ASM Press.
- ¹⁶Oren, A. 2006a. The Order Halobacteriales. In: M. Dworkin et al. (Eds.). *The Prokaryotes*, 3: 113–164. New York: Springer.
- ¹⁷Woese, C., and G. Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proceedings of National Academy of Science USA*, 74 (11): 5088–90.
- ¹⁸DasSarma, S., and P. Arora. 2002. Halophiles. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Vol. 8, pp. 458–466. London: Nature Publishing Group.

- ¹⁹Pedros-Alió, C. *et al.* 2000. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiology and Ecology*, 32: 143–155.
- ²⁰Oren, A. 2006b. Life in saline and hypersaline Environments. In: J. Seckbach (Ed.) *Life as we know it*: 75–87. Dordrecht: Springer Life Sciences.
- ²¹Oren, A. 2002a. Molecular ecology of extremely halophilic archaea and bacteria. *FEMS Microbiology and Ecology*, 39: 1–7.
- ²²Kamekura, M. 1998. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles*, 2: 289–295.
- ²³Anton, J. *et al.* 2008. Distribution, abundance and diversity of the extremely halophilic bacterium *Salinibacter ruber*. *Saline Systems*, 4: 15.
- ²⁴Kulichevskaya, I.S. *et al.* 1991. Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology*, 60: 596–601.
- ²⁵Zvyagintseva, I. *et al.* 1995. Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field. *Microbiology*, 64: 67–71.
- ²⁶Tapilatu, Y. *et al.* 2010a. Isolation of hydrocarbon degrading extremely halophilic archaea from an uncontaminated hypersaline pond (Camargue, France). *Extremophiles*, 14: 225–231.
- ²⁷Al-Mailem, D.M., *et al.* 2010. Biodegradation of crude oil and pure hydrocarbons by extreme halophilic archaea from hypersaline coasts of the Arabian Gulf. *Extremophiles*, 14: 321–328.
- ²⁸Grant, W.D., M. Kamekura, T.J. McGenity, and A. Ventosa. 2001. The Class III. Halobacteria. In: D. R. Boone *et al.* (Eds.). *Bergey's manual of systematic Bacteriology*, 1: 294–334. New York: Springer Verlag.
- ²⁹Torreblanca, M. *et al.* 1986. Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 8: 89–99.
- ³⁰Emerson, D., S. Chauhan, P. Oriel, and J.A. Breznak. 1994. *Haloferax* sp. D1227, a halophilic archaeon capable of growth on aromatic compounds. *Archives of Microbiology*, 161: 445–452.
- ³¹Lefebvre, O. 2005. *Application des micro-organismes halophiles au traitement des effluents industriels hypersalins*. These de Doctorat, Montpellier: Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.
- ³²Lefebvre, O., and R. Moletta. 2006. Treatment of organic pollution in industrial saline wastewater: a literature review. *Water Research*, 40: 3671–3682.
- ³³Speight, J. G. 2006. *The Chemistry and Technology of Petroleum* (4th ed.). Boca Raton-Florida: CRC Press-Taylor & Francis Group.
- ³⁴Cuadros-Orellana, S., M. Pohlschröder, and L.R. Durrant. 2006. Isolation and characterization of halophilic archaea able to grow in aromatic compounds. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 57: 151–154.
- ³⁵Bertrand, J.-C., M. Almallah, M. Acquaviva and G. Mille. 1990. Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 260–263.
- ³⁶Kulichevskaya, I.S., *et al.* 1991. Oxidation of petroleum hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology*, 60: 596–601.
- ³⁷Kuznetsov, V., T. Zaitseva, L. Vakulenko, and S. Filipova. 1992. *Streptomyces albi-axalis* sp. nov.: a new petroleum hydrocarbon degrading species of thermo- and halotolerant Streptomyces. *Microbiology*, 61: 62–67.
- ³⁸Zvyagintseva, I., *et al.* 1995. Halophilic archaeobacteria from the Kalamkass oil field. *Microbiology*, 64: 67–71.
- ³⁹Huu, N.B., *et al.* 1999. *Marinobacter aquaeolei* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a Vietnamese oil-producing well. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 367–375.
- ⁴⁰Nicholson, C.A., and B.Z. Fathepure. 2004. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 70: 1222–1225.
- ⁴¹Le Borgne, S., D. Paniagua, and R. Vazquez-Duhalt. 2008. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 15: 74–92.
- ⁴²Ward, D.M. and T.D. Brock. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. *Applied Environmental Microbiology*, 35: 353–359.
- ⁴³Whitehouse, B.G. 1984. The effects of temperature and salinity on the aqueous solubility of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Chemistry*, 14: 319–332.
- ⁴⁴Yakimov, M.M., K.N. Timmis, and P.N. Golyshin. 2007. Obligate oil-degrading bacteria. *Current Opinion in Biotechnology*, 18 (3): 257–266.
- ⁴⁵Tapilatu, Y. 2010b. *Activité hydrocarbonoclaste de procaryotes dans des milieux extremes (hyperbares et hypersalés)*. 197 p. Thèse de Doctorat, Centre d'Océanologie de Marseille. Marseille: Université de la Méditerranée.

- ⁴⁶Hasanuzzamana, M., *et al.* 2007. Degradation of long-chain n-alkanes (C36 and C40) by *Pseudomonas aeruginosa* strain WatG. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59: 40–43.
- ⁴⁷Bogan, B.W., *et al.* 2003. *Alkanindiges illinoisensis* gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic, aerobic squalane degrading bacterium isolated from oilfield soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53: 1389–1395.
- ⁴⁸Efroymson, R.A., and M. Alexander. 1991. Biodegradation by an *Arthrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Applied Environmental Microbiology*, 57: 1441–1447.
- ⁴⁹Whyte, L.G., L. Bourbonnière, and C.W. Greer. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. *Applied Environmental Microbiology*, 63: 3719–3723.

