

## KİRLENMİŞ TOPRAKLARIN BİYOREMEDİASYON İLE ISLAHI

*Efsun DİNDAR\**

*F. Olcay TOPAÇ ŞAĞBAN\**

*Hüseyin S. BAŞKAYA\**

**Özet:** Dünyadaki nüfus artışı, kirlenmiş toprak alanlarının çoğalmasına neden olmakta ve kirlilik seviyesi gelişmişlik ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Günümüzde, özellikle gıda, sağlık ve otomotiv endüstrisinin hızlı büyümesi sonucu ortaya çıkan atıkların kontrolü büyük önem taşımaktadır. Kirleticilerin topraklarda birikmesinin sadece toprak verimliliği ve ekosistem fonksiyonları üzerinde değil aynı zamanda besin zinciri yoluyla hayvan ve insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri vardır. Toksikasyonu önlemek ve çevresel kirleticileri parçalamak için mikroorganizmaların kullanımı esasına dayanan biyoremediasyon, çevre kirliliğinin bertarafında ve önlenmesinde etkili bir biyoteknolojik yaklaşım olarak önem kazanmaktadır. Bu çalışmada kirlenmiş toprakların biyoremediasyonuna ilişkin bilgilere ve tekniklere yer verilmiştir. Biyoremediasyon doğal yollarla gerçekleşen ve maliyet açısından diğer yöntemlere göre daha ekonomik bir proses olması sebebiyle oldukça avantajlıdır. Ancak arıtım süresinin uzun olması ve yüksek kirletici konsantrasyonlarında verimli sonuçlar elde edilememesi yöntemin kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Biyoremediasyon, toprak kirliliği, ıslah teknikleri, in/ex situ.

### Bioremediation of Contaminated Soil

**Abstract:** The world's increasing population caused the increase of soil pollution and the level of pollution increased proportional to development. Nowadays the control of wastes originated from food, health and automobile industries gained special importance. Accumulation of pollutants in soil had important effects on not only soil productivity and ecosystem functions but also human and animal health via food chain. Bioremediation, comprising the use of microorganisms for destroying the pollutants and preventing toxification, is an effective biotechnological method providing elimination of environmental pollution. This study has included information and techniques about bioremediation of polluted soils. Bioremediation is a natural and economical process so it is more advantageous than the other processes. However, longer treatment periods and lower efficiencies with high pollutant concentrations limited the use of the method.

**Key Words:** Bioremediation, soil pollution, remediation techniques, in/ex situ.

## 1. GİRİŞ

Endüstriyel aktiviteler sonucunda her yıl büyük miktarda organik ve inorganik bileşik çevreye nüfuz etmektedir. Toprak kirliliği endüstriyel aktivitenin tipik bir yan etkisidir (Sabate ve diğ. 2004). Organik antropojenik bileşikler arasında yer alan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), klorlu uçucu organik bileşikler (VOC) ve alkil benzen (benzen, toluen, etil benzen ve ksilenler, BTEX) hidrokarbonlar, poliklorlubifeniller (PCB) ve trikloroetilen (TCE) toprakta sıkça karşılaşılan kirleticiler arasındadır (Reible ve Demrenova 2002). Bunun yanı sıra, petrol endüstrisinin ve pazarının genişlemesiyle; tanklardan veya dolum boşaltım esnasında tankerlerden sızma, patlama sonucu petrol saçılması ve atık petrol ürünlerinin oluşması çevre kirliliğine sebep olmaktadır (Adeniye ve Afolabi 2002). Son yıllarda, tehlikeli atık yönetiminde biyoremediasyon metodu oldukça önem kazanmıştır. Trikloroeten ve bazı poliklorlubifeniller (PCB<sub>s</sub>) gibi klorlu türleri içeren, parçalanmaya dirençli olacağı düşünülen bazı kimyasalların laboratuvar koşullarında biyolojik olarak parçalanabildiği görülmüştür (Mohn 2004).

\* Uludağ Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Çevre Mühendisliği Bölümü, 16059 Görükle, BURSA.

Tehlikeli maddeleri, zararsız veya daha az zararlı maddelere parçalamak için mikroorganizmaların kullanıldığı uzun süreli arıtım prosesleri biyoremediasyon olarak bilinmektedir (Scragg 1999; Dua 2002). Biyoremediasyon doğal olarak meydana gelen bir prosesdir; mikroorganizmaların çevresel kirlilikleri sabitleyerek ya da dönüşüme uğratarak nihai/son ürün haline getirmeleri sürecidir.

Biyoremediasyonun etkili olabilmesi için, mikroorganizmaların kirliliklere enzimatik atakta bulunarak onları zararsız ürünlere dönüştürmeleri gerekir. Bu yöntem sadece çevresel şartların mikrobiyal büyüme ve aktiviteye izin verdiği durumlarda etkili olabilir. Kirleticiyi parçalayan mikroorganizmalar, kirleticiler ile yakın ilişkide ve doğru yerde olmalıdırlar. Eğer mikroorganizma popülasyonu mevcut değilse, mikroorganizmaları kirleticilerle temas ettirmek için bazı mühendislik mekanizmaları geliştirilmelidir (Singh ve Ward 2004). Çevresel koşullar kontrol edilmelidir veya mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ve büyümelerini optimize etmek için şartlar değiştirilmelidir. Biyoremediasyon için çevrenin optimizasyonunda; sıcaklık, nutrientler (başta azot ve fosfor), elektron alıcılar (oksijen, nitrat, sülfat) ve pH gibi çevresel faktörler düzenlenmelidir (Baker ve Herson 1994).

Sağlık ve ekolojik yönden geniş alana yayılmış olan petrol ve petrol türevleri, gazolin, PAH, klorlu alifatikler (PCE), tetrakloretilen (TCE) ve klorlu aromatik hidrokarbonlar mikroorganizmalar tarafından kolayca detoksifikasyona uğratılırlar. Metaller bile biyolojik olarak parçalanamamasalar da mikroorganizmalar tarafından daha az zararlı hale dönüştürebildikleri için biyoremediasyon dahilinde değerlendirilirler (Vidali, 2001).

Biyoremediasyon teknikleri tipik olarak yakma gibi diğer geleneksel metotlardan daha ekonomiktir. ABD Çevre Koruma Kurumunun (EPA) programına göre, zararlı maddelerle kirlenmiş bölgelerde, geleneksel yöntemlere göre 10 kat daha ucuza mal olduğundan biyoremediasyon kullanımı uygun görülmüştür (Russell ve diğ., 1992). Doğal azaltma proseslerine dayalı bir yöntem olduğu için toplum tarafından diğer teknolojilere göre daha kabul edilebilir olarak göz önünde tutulmaktadır. Arıtım için atıkların taşınması veya ortadan kaldırılması esasına dayanan temel iki biyoremediasyon metodu vardır. Bunlar, yerinde (in-situ) biyoremediasyon ve alan dışında (ex-situ) biyoremediasyondur. Bununla birlikte ıslahın tamamlanması için gerekli olan zaman, kazılarak çıkarılan toprak materyalinin özel vasıtalarla taşınmasına ya da yerinde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğine bağlı olacaktır. Doğal toprak ortamında yapılmayan ıslah (Ex-situ) teknolojileri, yerinde yapılan uygulamaya göre normalde daha hızlı ve etkilidirler (Baker ve Herson 1994).

Bu çalışmada, toprak kirliliğinin giderilmesinde ekonomik bir alternatif olarak kabul edilen biyoremediasyon proseslerine ilişkin detaylara yer verilmiş ve mevcut teknolojiler avantaj ve dezavantajlarıyla irdelenmiştir.

## 2. BİYOREMEDİASYONA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Toprak çeşitliliği; toprak materyallerine, alanın topografik özelliklerine, iklimsel etkenlere, bitki örtüsüne ve topraktaki organizma durumuna bağlıdır. Başarılı bir biyoremediasyon stratejisi, toprak özelliklerindeki değişken etmenleri de kapsayacak özellikte olmalıdır. Toprak özellikleri, toprak kirleticilerinin davranışlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle kullanıma uygun bir remediasyon metodu, spesifik toprak özelliklerini ve arıtımı yapılacak alanın şartlarını göz önünde bulundurmalıdır (Cheng ve Mulla 1999).

Biyoremediasyon sistemi her koşulda aynı verimlilikte çalışmamaktadır. Tablo I'de biyoremediasyonun verimliliğini etkileyen şartlar kısaca özetlenmiştir (Balba ve diğ. 1998).

### 2.1. Toprağın Fiziksel Çevresi

Toprağın fiziksel özellikleri ve yapısı, meydana gelen kimyasal ve biyolojik aktivitelere göre değişebilir. Başarılı bir biyoremediasyon, kontamine olmuş alanın birçok faktörüne bağlıdır fakat kritik faktör toprak suyudur. Toprak suyu içeriği; toprak yapısı ve porozitesiyle kontrol edilir. Doygun topraklar genellikle oksijen bakımından yetersizdir, bu nedenle aerobik biyoremediasyon sınırlıdır. Topraktaki aerobik biyoremediasyon için yeterli miktarda oksijen ve su gereklidir (Baker 1994).

Topraktaki en önemli değişim, derinlikle beraber organik madde içeriğinin azalmasıdır. Organik madde toprakta yararlı fonksiyonlara sahiptir. Mikroorganizmalar için önemli bir nutrient kaynağıdır ve derinlikle organik madde içeriğinin azalması, mikrobiyal popülasyon yoğunluğunun azalma-

sına ve dolayısıyla toksik kimyasalların parçalanabilirliğinin de azalmasına yol açmaktadır (Mallawatanri ve diğ., 1996). Bu nedenle toprak altı tabaka yüzeysel topraktan daha düşük mikrobiyal popülasyon yoğunluğuna ve daha az mikrobiyal aktiviteye sahiptir.

**Tablo I. Biyoremediasyonu etkileyen faktörler**

Uygun kimyasal ve biyolojik faktörler	Uygun hidrojeolojik faktörler
Az sayıda organik kirlilik	Granüler boşluklu alan
Aşırı toksik olmayan kirlleticiler	Yüksek permeabilite ( $10^{-4}$ cm/s)
Mikroorganizmaların çeşitliliği	Uniform mineraloji
Oksidasyon için uygun elektron alıcı	Homojen alan
Uygun pH aralığı	Doyurulmuş tabaka
Uygun olmayan kimyasal ve biyolojik faktörler	Uygun olmayan hidrojeolojik faktörler
Birçok organik ve inorganik kirleticilerin karışımı	Kırık kayalar
Toksik kirleticiler	Düşük permeabilite
Düşük mikrobiyal popülasyon	Kompleks mineraloji
Oksidasyon için elektron alıcısı yokluğu	Heterojen alan
Uygun olmayan pH aralığı	Doyurulmamış tabaka

Toprak hidrolik iletkenliği ve permeabilitesi de biyoremediasyonun uygulanabilirliğine etki etmektedir (Thomas ve Ward, 1993). Mikrobiyal aktivitenin canlanması için nutrient ve oksijen kaynağına ihtiyaç vardır. Eğer toprak ve akifer sızdırmaz ise mikroorganizmalar büyüme ve solunum için yeterli miktarda oksijen ve nutrient temin etmekte zorlanırlar. Hidrolik iletkenlik  $10^{-4}$  cm/s'den büyük ise genellikle nutrient ve oksijenin yeterli taşınımı sağlanır. Yüksek permeabiliteye sahip topraklar ise düşük mikrobiyal popülasyondan dolayı biyoremediasyon için uygun değildirler. İnce yapılı toprak ve sedimentlerin düşük permeabiliteye sahip olması da, mikroorganizmalara güçlükle nutrient ve oksijen sağlanmasına sebep olmaktadır (Thomas ve Ward, 1993).

Toprağın fiziksel özelliklerini etkileyen diğer önemli unsurlar toprak sıcaklığı ve toprak nem dereceleridir. Bu parametreler toprak reaksiyonlarının kinetiklerini etkiler. Çünkü mikrobiyal aktivite, sıcaklığa duyarlı enzimatik ve biyokimyasal prosesleri içermektedir. Biyolojik parçalanma sıcaklığı optimum  $20^{\circ}\text{C}$  ile  $30^{\circ}\text{C}$  arasındadır. Sıcaklıklar; mevsimsel iklimsel şartlar, toprak yüzeyinin şartları, toprak nem içeriği ve derinliği tarafından kontrol edilmektedir. Yıllık hava sıcaklığı, 1-5 m derinlikteki yıllık toprak sıcaklığının göstergesidir. Nemli topraklar yüksek ısı kapasitesine sahiptir ve sıcaklıkları kuru topraklara göre daha yavaş değişmektedir. Toprak sıcaklığı, sulama ve drenaj ile yüzeydeki bitki kalıntılarıyla, yapay örtülerle veya bitki örtüsüyle kaplı olmasıyla kontrol edilebilir.

## 2.2. Toprağın Kimyasal Çevresi

Toprağın doğal özellikleri, kirleticinin konsantrasyonu ve kontaminasyonunun ölçüsü, başarılı biyoremediasyon olasılığının belirlenmesinde önemlidir (Troy, 1994). Biyolojik dönüşüme dayanıklı, yüksek konsantrasyonlarla kontamine olmuş alanlar, biyoremediasyon ile arıtıma uygun değildir. Kirleticinin durumu, diğer maddelere sorpsiyonu, taşınımı ve biyolojik parçalanması, topraktaki biyolojik aktiviteyi etkiler. Bu etkiler; toprak pH'ını, iyon değiştirme kapasitesini, nutrient, tuz, ağır metal, mineral ve organik madde içeriğini değiştirebilmektedir.

Toprağın kimyasal özelliklerini etkileyen faktörlerden biri de kil mineralleridir. Kil partikülleri etkileşim için geniş yüzeysel alana sahiptir. Kil mineralleri, kristal taneciklerden, amorf materyallerden, tuz ve metal oksitlerden oluşmaktadır. Buna ek olarak geniş reaktif yüzey alanı sağlayarak apolar kimyasalların sorpsiyonuna etki ederler. Yüzey alanlarının elektriksel yükü yükü olması sebebiyle de polar kimyasalların sorpsiyonunda önemli etkilere sahip olan iyon değişim kapasitesini etkilemektedirler. Kil mineralleri kimyasal kirliliği tutarak mikrobiyal parçalanma için kullanılamaz hale getirebilirler. Kil minerallerinin yanı sıra, toprak organik maddesi de yüksek katyon değiştirme kapasitesine sahiptir ve ağır metaller ile organik kimyasalların sorpsiyonunda önemli etkiler meydana getirmektedir (Cheng ve Mulla 1999).

Toprak, bitki ve mikroorganizmalar için bir nutrient kaynağıdır. C, N, P gibi makronutrientleri ve bütün mikronutrientleri içerir. Mikrobiyal parçalanma için makronutrient ihtiyacı, kontamine toprak örneğinden (elektrolitik respirometre yardımıyla) tahmin edilir ve biyolojik oksijen ihtiyacı (BOİ) ölçülür. Toplam BOİ mikrobiyal nutrient yükselmesi için gerekli N ve P miktarları ile artar. Genellikle BOİ, NH<sub>3</sub>-N ve ortofosfat arasındaki oran 100:10:1 olarak alınmaktadır (Jerger ve diğ., 1993).

Mikroorganizmalar beslenme için iz miktarda birkaç mikronutrient de ihtiyaç duyarlar. Birçok remediasyon alanında yeterli mikrobiyal beslenmeyi sağlamak için bu mikronutrientler belirli miktarda dışarıdan verilmektedir. Mikrobiyal beslenme üzerinde iz elementlerin etkisi biyoremediasyonda önemli olmaktadır (King ve diğ., 1992).

### 2.3. Toprağın Biyolojik Çevresi

Toprakların, diğer jeolojik materyallerden farklı olması önemli biyolojik aktivitelere sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Topraktaki yoğun biyolojik aktivite genellikle yüzey horizonunda yer alır. Bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar topraktaki biyolojik aktiviteye katkıda bulunur. Toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri biyolojik aktiviteye etki eder. Aerobik mikroorganizmaların aktivitelere olanak sağlayan toprak koşulları, iyi bir havalandırma, bol nutrient ve enerji kaynağı, yeterli nem kaynağı ve uygun sıcaklık rejimini kapsamaktadır. Toprak su ile doymuş hale geldiğinde, toprak matriksine oksijen difüzyonu sınırlanır, toprak çevresi anaerobik olur. Bu koşullar altında aerobik mikroorganizmaların aktivite sınırlanır, bununla birlikte anaerobik mikroorganizmalar büyür ve enerji için organik maddeyi kullanmaya başlarlar. Bu nedenle toprağın fiziksel yapısı, gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar, iklimsel şartlar ve organik maddenin enerji ve nutrient kaynağı olarak kullanılması biyolojik toprak koşullarını etkilemektedir (Cheng ve Mulla 1999).

## 3. BİYOREMEDİASYON TEKNİKLERİ

Biyoremediasyon; mikroorganizmaların kirleticileri bünyelerine alma kapasitesine sahip olmaları ve bunları büyüme ve metabolik faaliyetleri için kullanmaları esasına dayanmaktadır. Biyoremediasyon tasarımının asıl amacı, mikrobiyal büyüme ve aktivite için en uygun şartların sağlanmasıdır.

Alanın havalanma ve doymuşluk derecesine bağlı olarak farklı teknolojiler kullanılabilir. Biyoremediasyon iki biçimde uygulanır.

1) Atıkların döküldüğü bölgeye besin (nutrient) aktarımı yapılarak, toprağın bakteri kompozisyonuna göre, hali hazırda toprakta bulunan bakteriler etkin duruma geçirilir (Yerinde (in-situ) bertaraf teknolojileri). Bu yöntem kirleticili konsantrasyonlarının düşük olması durumunda kullanılır.

2) Toprak kazılarak yerinden alınır ve kirleticili parçalamaya yeteneğine sahip yeni bakteriler ile edilir. Çevresel koşullar kontrol edilir veya mikroorganizmaların metabolik aktivitelerini ve büyümelerini optimize etmek için koşullar değiştirilir. Biyoremediasyon için çevresel şartların optimizasyonunda; sıcaklık, inorganik nutrientler (öncelikle azot ve fosfor), elektron alıcılar (oksijen, nitrat ve sülfat) ve pH gibi faktörler uygun hale getirilir (Yerinde yapılmayan (ex-situ) bertaraf teknolojileri).

### 3.1. Yerinde (in-situ) Biyoremediasyon Teknikleri

Kirlenmiş sahaların az maliyetle temizlenmesinde, kimyasal maddeleri parçalamak için doğal mikroorganizmaların kullanıldığı üstün nitelikli bir metottur. Bu teknoloji, maliyetinin düşük olması, kirliliğin kazılmasını ve taşınmasını gerektirmeden yerinde arıtım sağlaması açısından daha caziptir (Boopathy 2000). Buna karşın yerinde (in-situ) biyoremediasyon bazı dezavantajlara sahiptir. Diğer ıslah metotlarıyla karşılaştırıldığında bu metot daha fazla zaman alabilir. Kontrol edilemeyen çevresel şartlardaki değişikliklere direkt maruz kalmaları nedeniyle mikrobiyal aktivitede mevsimsel azalmalar olabilir. Mikroorganizmalar hücre gelişimleri için daha fazla enerji ve besinlere ihtiyaç duyabilirler. Bu nedenle mevcut atık maddeye ilave besin eklenebilir (Cookson 1995). Bu koşullar uygun olmadığı zaman parçalamaya kapasiteleri azalır. Böyle durumlarda doğal olarak oluşan mikroorganizmalar tercih edilmesine rağmen genetik yollarla elde edilen mikroorganizmalar kullanılmak zorunda kalınabilir (Hoepfel ve diğ., 1991; USEPA 1995). Ayrıca, yerinde (in-situ) arıtım, toprak derinliğinin arıtımı etkilemesinden dolayı derinlikle de sınırlıdır.

Yerinde (in-situ) arıtım teknikleri ile kirleticilerin parçalanması, onları enerji kaynağı olarak kullanarak o bölgede yaşayan ve büyüyen doğal mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilir. İn-situ biyolojik parçalanma; organik kirleticilerin parçalanmasında o ortamda yaşayan bakterilerin uyarılması için dolaşım halinde olan sulu çözeltilerle toprağa oksijen ve nutrient kazandırma işlemidir (Doelman ve Breedveld 1999). Yerinde (in-situ) biyoremediasyon teknikleri genel olarak, dizel yakıt ve yoğun yağlar gibi halojen olmayan yarı uçucu organiklerin giderilmesinde kullanılır. İn-situ biyoremediasyonu kontrol altında tutmak ex-situdan daha zordur. Çünkü, deneysel kontroller yapmak genellikle kontamine olmuş toprakta mümkün değildir.

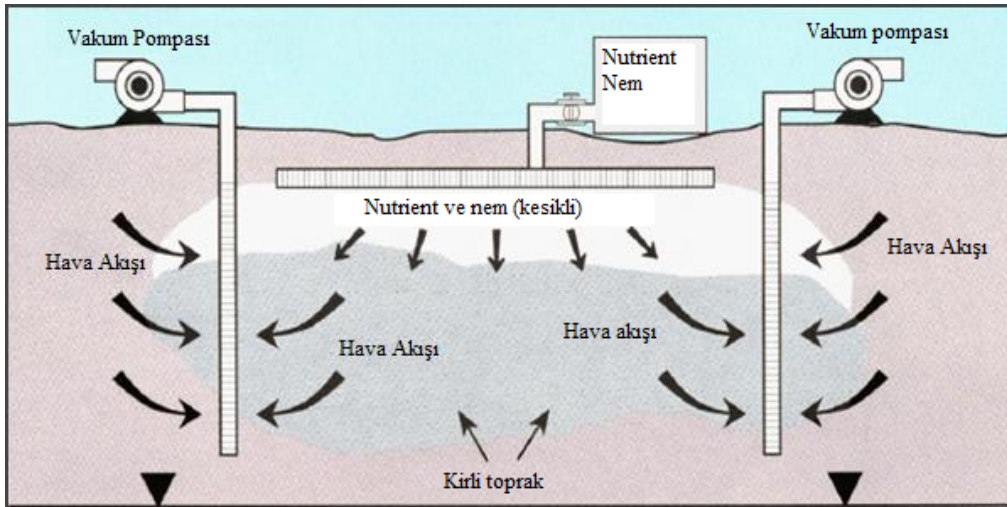
Aerobik mikroorganizmalar benzen, toluen, etil benzen, ksilen (BTEX) gibi petrol ürünlerini parçalama yeteneğine sahiptir. İzole edilmiş komunitelerin aktivitesi tarla şartlarında test edilmiştir. İzole edilmiş 4 mikroorganizma komunitesi kirlenmiş alana uygulanmıştır. İn-situ yapılan biyoremediasyon çalışması sonucunda 7 aylık sürecin sonunda benzen ve toluen için %95, etil benzen için %81 ve ksilen için %80 giderim verimi elde edilmiştir (Wolicka ve diğ., 2009). Brito ve diğ. (2009) yaptıkları çalışmada, mangrov (tropikal ekosistemde yetişen bir bitki) ekosisteminde doğal bakteriyel konsorsiyum (HBC) yardımıyla yağ ile kirlenmiş toprakların ıslahının yapılabileceğini belirlemişlerdir.

Diğer önemli kirleticilerden olan ve fosil yakıtların yakılması gibi antropojenik aktiviteler sonucu doğada biriken poliaromatik hidrokarbonlarla (PAH) kirlenmiş toprakların, fungi ve bakteriler tarafından aerobik ve anaerobik şartlar altında in situ tekniklerle ıslahının gerçekleştirilebildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Bamforth ve Singleton 2005). Bootpathy (2000) ise yaptığı çalışmada patlayıcılarla kontamine olmuş toprakların in-situ teknik ile 12 ayda ıslahının gerçekleştiğini belirtmiştir. Bu metodun uzun süre almasına rağmen düşük maliyetli olmasının avantajlı olduğunu vurgulamıştır.

Mikroorganizmalar için uygun yaşam koşullarını oluşturmak için in-situ arıtımda iki teknik kullanılır.

### 3.1.1. Bioventing (Hava enjeksiyonuyla doymamış toprakta kirletici arıtımı)

Bu metotta atmosferik hava, mikroorganizmalara gerekli oksijeni sağlamak için doymamış tabakadaki su tablası üzerindeki toprağa özel borular içinde verilir (Şekil 1). Bu yöntemde biyolojik parçalanma toprakta bulunan mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilmektedir. Zemine enjeksiyonla verilen hava veya  $O_2$ 'nin biyolojik parçalanmaya yardımcı olmasının yanı sıra, burada bulunan uçucu organik maddeleri ve  $CO_2$ 'yi hava akımıyla birlikte yüzeye taşıması gibi bir işlevi de mevcuttur. Bu sistemin özellikle petrol hidrokarbonları, klorlanmış çözücüler, bazı pestisitler, bitki koruyucuları ve diğer organik kimyasallarla kirlenmiş zeminlerin arıtımında başarıyla uygulanabildiği bilinmektedir. Bu yöntem genel olarak inorganik kirleticiler için tavsiye edilmemektedir (EPA 1994; Mihopoulos ve diğ., 2000).

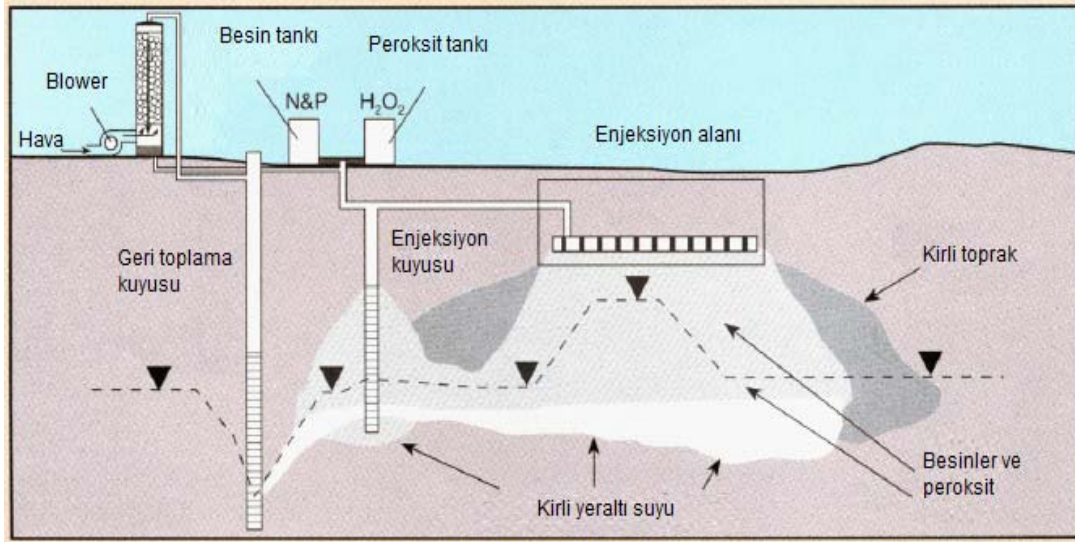


Şekil 1:  
Su tablası üzerindeki toprağın ıslahı (Bioventing) (Rittmann 1993)

### 3.1.2. Peroksit enjeksiyonu

Bu yöntemde oksijen toprağa hidrojen peroksit enjeksiyonu yoluyla sıvı bir formda verilir (Şekil 2). Kimyasal oksidasyona dayanan bu metotta, hidrojen peroksit oksidant olarak kullanılarak hidrokarbonların karbondioksit ve suya dönüştürülmesi sağlanır. Topraktaki organik ve inorganik bileşenlerin tür ve niteliklerinin değişmesi, OH• radikali tarafından başlatılan oksidatif proseslerle gerçekleşmektedir (Petigara ve diğ., 2002). Çözünmüş oksijen, organik kirleticilerin biyolojik dönüşümünde genellikle sınırlıdır. Aerobik metabolizma sırasında önemli derecede biyolojik oksijen ihtiyacı ortaya çıkmaktadır. Hidrojen peroksit eklenmesi kirlenmiş bölgede oksitleyici madde kapasitesini arttırmaktadır (Pardieck ve diğ., 1992). Gerekli hidrojen peroksit dozunun belirlenmesinde oksitleyici madde kaybolma oranı mutlaka göz önüne alınmalıdır. Toprak organik maddesi ve organik kirletici hidrojen peroksit için rekabete girmektedir. Bu nedenle toprak organik maddesi oksitleyici dozunun belirlenmesinde önemli bir etkidir. Romero ve diğ., (2009) yaptıkları çalışmada, nötral pH'da, 20°C'de hidrojen peroksit-toprak arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Yüksek organik maddeye sahip topraklarda hidrojen peroksitin bozunma oranının arttığını tespit etmişlerdir.

Bu metot, genellikle önceden kirlenmiş yer altı suyunun ve sınırlı kirliliğin olduğu alanlar için uygulanmaktadır (EPA, 1995).



Şekil 2:  
Peroksit enjeksiyonu (Rittmann 1993)

### 3.2. Yerinde Yapılmayan (ex-situ) Biyoremediasyon Metotları

Bu yöntem toprağın doğal ortamından kazılarak alınmasını gerektirir. Bunun amacı mikrobiyal parçalamayı kolaylaştırmaktır. Kirlenmiş sahadan uzakta gerçekleştirilen ex-situ biyoremediasyon metotları, yerinde yapılan (in-situ) metotlara göre daha hızlıdır. Geniş alana yayılmış kirleticiler için uygulanabilir fakat daha pahalı bir yöntemdir (Vidali 2001). Wolicka ve diğ., (2009) yaptıkları çalışmada laboratuvar şartlarında aerobik kültürler tarafından petrol türevleri olan benzen için %84, toluen için %86, etil benzen için %80 ve ksilen için %82 oranında giderim tespit etmişlerdir. Guerin (2008) yaptığı çalışmada topraktaki klorobenzenlerin biyoremediasyonunda ex-situ yöntemlerle 2-3 haftalık periyotta %90 oranında giderim sağlandığını belirtmiştir. Bunun yanı sıra, hidrokarbonların topraktan uzaklaştırılmasında ex-situ teknikler başarılı olarak kullanılmaktadır (Diplock ve ark. 2009).

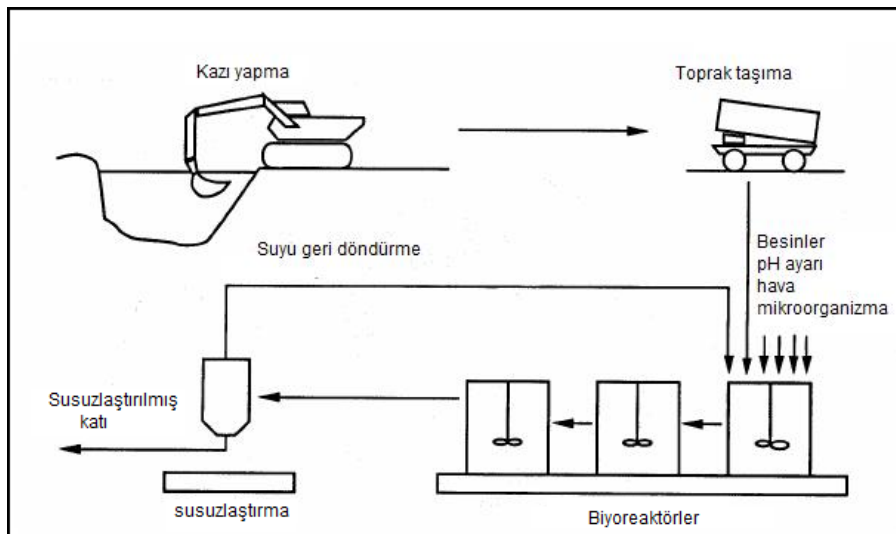
Islahın özel tanklarda ya da hazır zeminlerde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğine göre ex-situ biyoremediasyon iki teknolojiyi kapsar:

#### 3.2.1. Sulu Faz İşlemi (Biyoreaktörler)

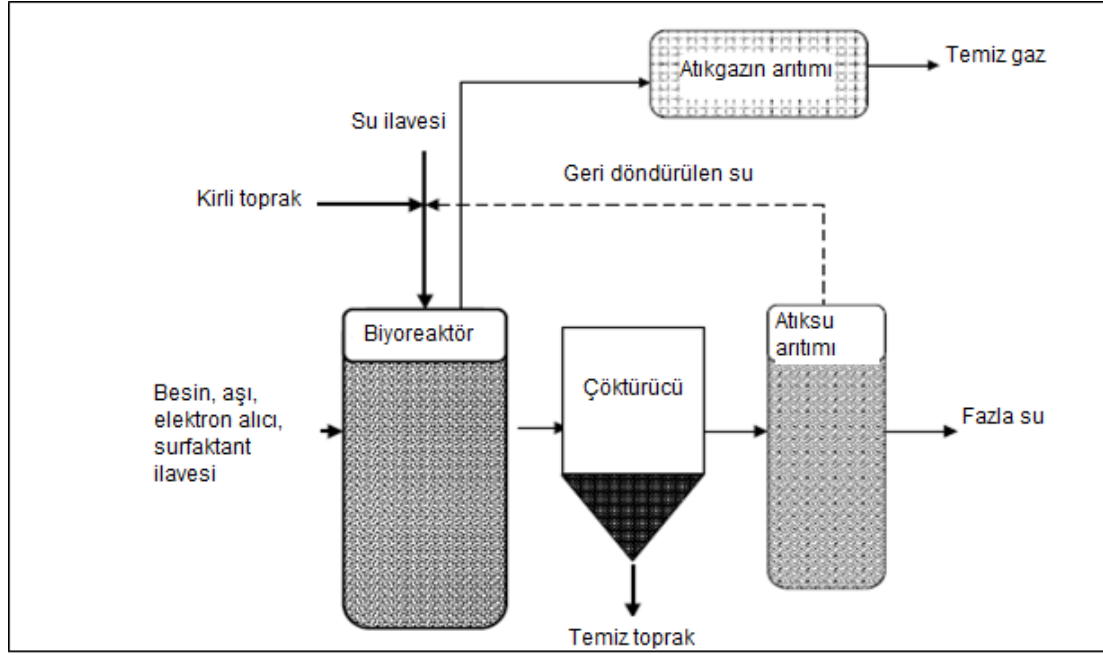
Biyoreaktörler ex-situ tekniğinin en önemli çeşididir (Şekil 3). Dayanıklı ve toksik kirleticilerle kirlenmiş toprakların biyoremediasyon ile ıslahında en iyi seçenek çevre şartlarının kontrol altında

alınabildiği biyoreaktör tekniğidir (Şekil 4) (Christodoulatos ve Koutsospyros 1998, Mohan ve diğ., 2006). Kirleticilerin giderim oranı sistemdeki aktif mikroorganizmaların parçalama kabiliyetlerine bağlıdır (Evans ve diğ., 1996, Cookson 1995). Bu reaktörler kesikli, yarı-sürekli ve sürekli olmak üzere sınıflandırılırlar. Genel olarak kesikli reaktörler tercih edilmektedir. Bunun yanı sıra elektron alıcısına bağlı olarak da aerobik (moleküler oksijen), anoksik ( nitrat ve bazı metal katyonlar), anaerobik (sülfat, metanojenik, fermentasyon) ve karışık elektron alıcıların kullanıldığı sistemler bulunmaktadır (Robles-Gonzales ve diğ., 2003; 2006). Sulu fazlı biyoremediasyon artırım uygulaması diğer artırım yöntemleriyle karşılaştırıldığında çok daha hızlı bir yöntemdir. Topraktaki kirleticiler ile temas halinde olan ve toprakta zaten doğal olarak bulunan mikroorganizmaları tutmak için bu teknolojiye kirlenmiş toprak yerinden kazılarak özel vasıtalarla alınır ve özel tanklarda su ile karıştırılır. Oksijen ve besinler daha sonra eklenir. Kirleticilerin parçalanmasında organizmaların biyoaktivitelerini devam ettirmek ve en iyi koşulları sağlamak için ısı, besin ve oksijen konsantrasyonları kontrol edilir. Bu yöntemin kütle transfer oranının ve mikroorganizma/kirletici/nutrient oranlarının artırılabilmesi, farklı elektron alıcıların kullanılabilmesi, surfaktan ve solvent kullanımı ile kirleticinin parçalanmasının artırılması, çevresel şartların optimizasyon ve kontrolünün sağlanması gibi avantajları bulunmaktadır (Nano ve diğ., 2003, Fuller ve Manning 2004, Vidali 2001). Gonzales ve diğ., (2008) yaptıkları araştırmada biyoreaktörlerin hidrokarbonlar ve bazı organoklorlu maddeler gibi toksik ve parçalanmaya dirençli maddelerle kirlenmiş toprakların ıslahında etkili bir ex-situ yöntem olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir. Piren ile kirlenmiş toprakların anoksik-aerobik-anoksik-anoksik şartlarda kesikli biyoreaktörlerde ıslahının mümkün olduğu belirtilmiştir (Mohan ve diğ., 2008). Bu çalışmada bekleme süresi 120 saat, yükleme oranı 20 kg/m<sup>3</sup>.gün, sıcaklık 28±2°C olarak seçilerek 6 farklı reaktör çeşitli substrat konsantrasyonlarında çalıştırılmıştır. Reaktörlerden bazılarında parçalanmayı biyolojik olarak güçlendirmek için evsel çamur aşılması yapılmıştır. Sonuçlar, evsel çamur ilavesi ile biyolojik güçlendirme yapılan reaktörlerde parçalanmanın çamur ilavesi yapılmayanlara oranla daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Diğer önemli bir kirletici olan PAH'ların (poliaromatik hidrokarbon) aerobik ve anaerobik işletilen biyoreaktörlerde giderilebildiği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Mohan ve diğ., 2009, Prasanna ve diğ., 2008). Metabolik fonksiyonlar (aerobik, anaerobik, anoksik), tek veya karışık mikroçevre şartları, doğal karışık mikroflora ve aşılama şartlarının biyoreaktörlerde sağlanması ve kontrolü ile PAH'ların parçalanması sağlanabilmektedir. PAH'ların toksik ve hidrofobik kirleticiler olması, toprak kompozisyonu, heterojen mikrobiyal çevre şartları biyoremediasyonu kompleks hale getirebilmektedir (Mohan ve diğ., 2008; 2009). Larsen ve diğ., (2009) yaptıkları çalışmada arıtma çamurundaki PAH'ların giderilmesinde ex-situ biyoremediasyon tekniği olan biyoreaktörlerin kullanılabilirliğini göstermişlerdir. Biyolojik parçalanmanın hızlanması için *Proteiniphilum acetatigenes* kullanılarak biyotik ve abiyotik şartlarda %80'e varan parçalanma meydana geldiğini bulmuşlardır.



Şekil 3:  
Biyoreaktörler ile toprağın ıslah yöntemi (EPA 1995)



Şekil 4:  
Tipik bir biyoreaktör diyagramı (Gonzales ve ark. 2008)

### 3.2.2. Katı Faz İşlemi

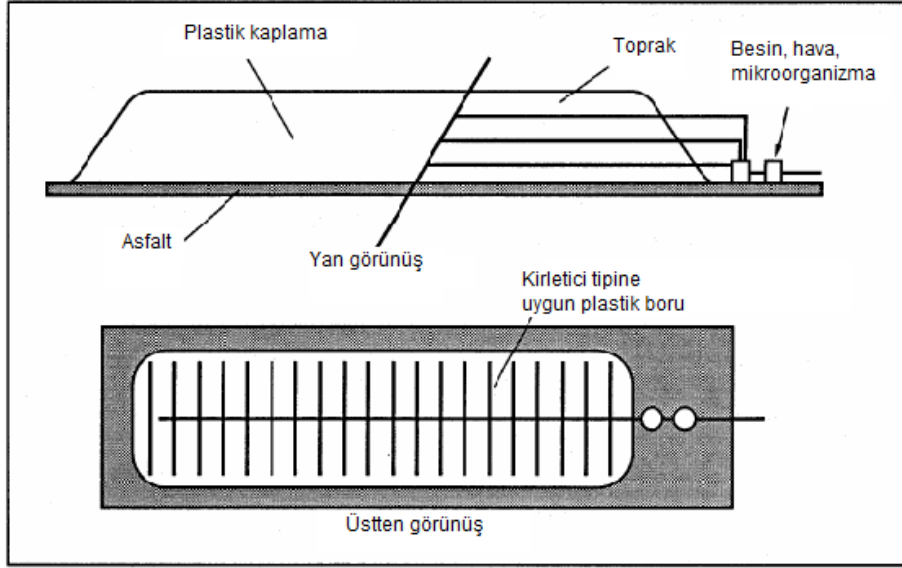
Burada kirlenmiş toprak hazır zeminler üzerinde işleme tabi tutulur (Şekil 5). Sulu zemin uygulamasına göre daha az masraflı olmasına rağmen fazla etkili değildir ve daha çok alıkonma süresine ihtiyaç vardır. Biyo-yığın oluşturma olarak da adlandırılabilen bu yöntemin kullanımıyla kazılarak yerinden alınmış topraklardaki petrol türevlerinin, PAH'ların, patlayıcıların, pestisitler gibi klorlu organik kirleticilerin konsantrasyonlarını azaltmak için kullanılabilir bilinmektedir (Janikowski ve diğ., 2002; Fuller ve Manning 2004; Gonzales ve diğ., 2003). Bu teknoloji kirlenmiş toprakların yığınlar haline getirilerek havalandırma ve/veya mineraller, besinler ve nem eklenerek toprak içerisindeki mikrobiyal aktiviteyi harekete geçirmeyi amaçlar. Bu ıslah metodunu gerçekleştirmek için iki ana teknik yaygın olarak kullanılır. Bunlar;

#### 3.2.2.1. Arazi Düzenlemesi (Land Farming)

Arazi iyileştirilmesi ya da arazi uygulaması olarak bilinen ve biyolojik parçalanma yoluyla kirletici konsantrasyonlarını azaltan toprak teknolojisidir (Clark ve Boopathy, 2007). Bu teknoloji genellikle yerinden kazılarak alınmış kirlenmiş toprakların başka bir alana yayılarak ince bir tabaka halinde serilmesini kapsar ve havalandırma ve/veya mineraller, besinler ve nem eklenmesiyle toprak içindeki aerobik mikrobiyal aktiviteyi teşvik etmeyi amaçlar (EPA, 1995). Mikrobiyal aktivitenin artması, mikrobiyal solunumun etkisiyle adsorbe olmuş kirleticilerin parçalanmasına neden olur. Toprak doğal ortamından alınarak özel olarak hazırlanmış zemine yayılır. Burada biyolojik aktiviteyi hızlandırmak ve havalanmayı kolaylaştırmak için düzenli olarak karıştırılır ve çevrilir. Mikroorganizmalar biyoparçalanma süreçlerini devam ettirmek ve hücre gelişimlerini ilerletmek için azot ve fosfor gibi inorganik besinlere gereksinim duyarlar. Bu nedenle gerekli durumlarda besin ilavesi yapılabilir. Besin ve oksijen eksikliği biyolojik parçalanmayı yavaşlatır (Widrig ve diğ., 1997). Eğer topraktaki kirlilik toprağın fazla derininde değilse (yer yüzeyi altında yaklaşık 90 cm 'den daha az ise) toprağı kazarak çıkarmaksızın mikrobiyal aktiviteyi etkili şekilde teşvik etmek mümkün olabilir. Mikroorganizma faaliyeti, toprakların karakteristikleri, kirleticilerin uçuculuğu ve iklim şartları bu teknolojinin uygulanmasında belirleyici faktörler arasındadır (Pope ve Matthews, 1993). Bu şartlar arazi uygulama dizaynında dikkate alınmalı ve düzenli olarak kontrol edilmelidir. Bunun içinde mutlaka bir kontrol planı oluşturulmalıdır (EPA, 1995).



Bu teknik yüzeyin 0,3-1 m derinliğine yayılmış hidrokarbon kirliliği için genelde tercih edilmektedir. Proses süresince, hidrokarbonlar buharlaşma veya biyolojik parçalanma proseslerinin kombinasyonu ile ortamdan uzaklaşmaktadır.



Şekil 5:  
Ex-situ katı faz proses şeması (USEPA 1993)

Arazi düzenleme tekniğinin sıcak güney iklimlerde başarıyla uygulandığı bilinmektedir (McCarthy ve diğ., 2004). Örneğin, Avustralya’da 12 aylık operasyonel bir çalışmada toplam petrolü hidrokarbon (TPH) seviyesi 4644 ppm’den 100 ppm’e kadar azaltılmıştır (Line ve diğ., 1996).

Soğuk Antartika ve Artık iklimlerde yapılan arazi düzenleme tekniklerinde ise farklı sonuçlar bulunmuştur (Aisablie ve diğ., 2004; McCarthy ve diğ., 2004). Yapılan çalışmalar soğuk iklimlerde hidrokarbonla kirlenmiş alanlarda bulunan mikroorganizmaların soğuk şartlara adapte olduğunu göstermiştir (Mohn ve Stewart, 2000).

Paudyn ve diğ., (2008) yaptıkları çalışmada, eski bir askeri üs’den dizel ile kirlenmiş toprak örnekleri olarak +3°C ortalama yaz sıcaklığında arazi denemesi kurmuşlardır. Çalışma kapsamında günlük havalandırılan, 4 günde bir havalandırılan, nutrient ilavesiyle 4 günde bir havalandırılan ve kontrol alanı olmak üzere 4 pilot arazi alanı dizayn etmişlerdir.

Elde edilen sonuçlara göre, nutrient ilavesi yapılan alanda TPH seviyesinde %90’nın üzerinde bir düşüş tespit edilmiştir. Günlük olarak havalandırılan ve 4 günde bir havalandırılan alanlarda ise giderim %80 olarak belirlenmiştir (Paudyn ve diğ., 2008). Bu veriler, Chatham (2003) ve Reynolds ve diğ., (1998) tarafından yapılan başarılı arazi düzenleme ıslah tekniği çalışma sonuçlarıyla da desteklenmektedir.

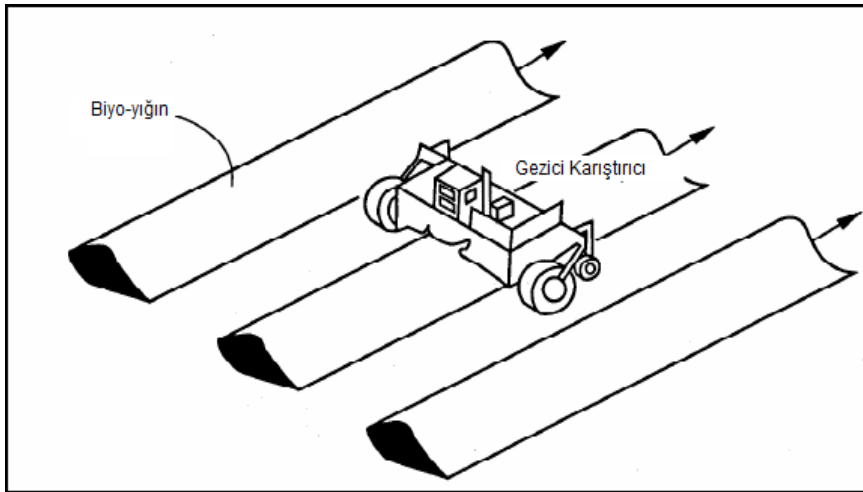
Yapılan başka bir çalışmada 1100 ton hexaklorosikloheksan (HCH) ile kirlenmiş alanın yarısı (A) anoksik/oksik, diğer yarısı da (B) oksik şartlarda arıtıma tabi tutulmuştur. A alanına 7 kez anoksik/oksik çevrim uygulanırken, B alanı düzenli olarak sürülmüştür. Arıtım 371 gün boyunca devam etmiştir. Her bir alandan 154 ve 371 gün sonra toprak örnekleri alınmıştır. 371 gün sonra, toplam HCH konsantrasyonu A alanında % 60, B alanında %75 azalma göstermiştir. Bu uygulama katı faz arazi düzenleme tekniğinin yüksek HCH konsantrasyonu içeren topraklarda uygun bir alternatif olduğunu göstermektedir (Phillips ve diğ., 2006).

Bu ıslah tekniği, kirliliğin taşınma riski ve zamanın kritik bir faktör olmadığı durumlarda başarıyla uygulanabilmektedir.

### 3.2.2.2. Toprak Biyoyığınları (Soil Biopiles)

Bu sistemde kazılarak alınan toprak birkaç metre yüksekliğinde yığınlar halinde bırakılır (Şekil 6, Şekil 7). Mikroorganizmalar ile parçalanma aktivitesini arttırmak için yığın içine hava üflenir ve gerekirse besinler eklenir. Yığınlardan yayılan gazlardan dolayı, bazı uçucu kirleticiler de kontrol edilmelidir (Von Fahnstock ve diğ., 1998). Toprak biyo-yığınları (soil biopiles), arazi düzenlemesi gibi yeraltı depolama tank alanlarında bulunan tipik petrol ürünlerinin yaklaşık tüm türevlerinin konsantrasyonlarını azaltmada etkili bir rol oynamaktadırlar (Mohn ve diğ., 2001). Gazolin gibi daha hafif (uçucu) petrol ürünleri, havalandırma yöntemleri esnasında (hava enjeksiyonu, hava ekstraksiyonu ya da yığın devirme ve harmanlama) buharlaşma yoluyla giderilmeye ve mikrobiyal solunum vasıtasıyla parçalanmaya uygun hale gelirler. Dizel yakıt, karosen gibi orta dereceli hidrokarbon ürünlerinin biyolojik parçalanması, buharlaşmaya göre daha fazla etkindir. Bununla birlikte daha yüksek moleküler ağırlıklı ürünler daha hafif ağırlıklı ürünlere göre daha uzun bir parçalanma süresine ihtiyaç duyarlar (EPA, 1995).

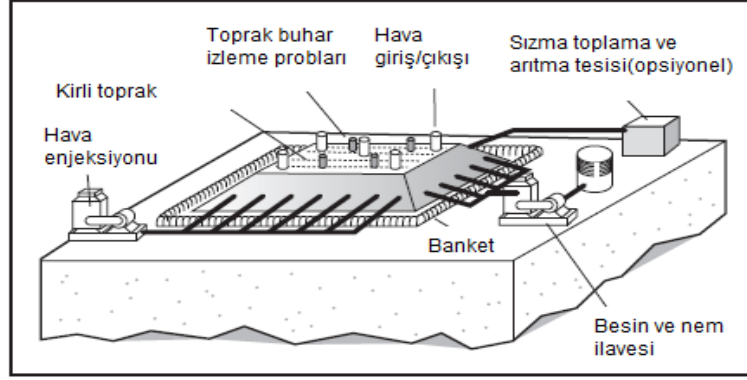
Sistemin etkinliği, toprak karakteristiğine, mevcut çevre yapısına ve iklim şartlarına bağlıdır. Toprak tekstürü, toprağın geçirgenliğini ve nem içeriğini etkiler. İnce tanecikli topraklar kaba tanecikli topraklara göre daha az geçirgendir. Daha düşük geçirgenliğe sahip toprakların havalanması zordur fakat daha yüksek geçirgenliğe sahip toprağa nazaran daha iyi nem tutma kapasitesine sahiptirler. Toprak biyo-yığınlarında aerobik bakteri faaliyetlerinin devam ettirilebilmesi ve biyolojik parçalanmanın teşvik edilmesi için belirli zamanlarda devrilmeye ya da sürülmeye ihtiyaçları vardır (Quinn ve Reinhart 1997). Topraklar, normal şartlarda farklı mikroorganizmaları ve türleri (bakteri, alg, mantar, protozoa ve aktinomisetler gibi) bünyesinde bulundurur. Biyo-yığınlar için en uygun drenaj koşullarının oluşturulduğu topraklarda bu organizmalar genellikle aerobiktirler. Bu organizmalar içinde özellikle düşük oksijen seviyelerinde biyokimyasal olarak aktif olan en kalabalık grup bakterilerdir (Von Fahnstock ve diğ., 1998).



Şekil 6:  
Toprak yığınları oluşturma tekniği (EPA 1995)

Biyoyığınlarda biyolojik parçalanmanın gerçekleşmesini etkileyen bir diğer etmen de sıcaklıktır. Mikrobiyal aktivitenin 10° C'nin altındaki sıcaklıklarda önemli derecede azaldığı bilinmektedir. Petrollü hidrokarbonların biyolojik parçalanmasında etkin olan bakterilerin mikrobiyal aktivitesi 45° C'den daha yüksek sıcaklıklarda da azalmaktadır (Leahy ve Colwell, 1990).

Yöntemin dizaynı ve gerçekleşmesi basit olup optimal koşullar altında arıtımın tamamlanma süresi 6 ay ila 2 yıl arasındadır. Ancak, yüksek kirletici derişimlerinde sistem verimli çalışmamaktadır (>50.000 ppm, total petrollü hidrokarbonlar için). Bunun yanı sıra 2500 ppm den yüksek ağır metal konsantrasyonları mikrobiyal aktiviteyi engellemektedir (EPA, 1995).



Şekil 7:  
Tipik biyo-yığın sistemi (EPA 2004b)

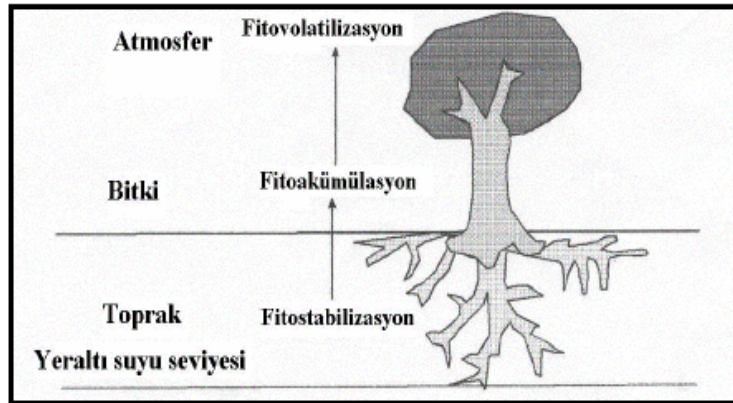
### 3.3. Fitoremediasyon (Bitkiler yardımıyla yapılan biyoremediasyon)

Son on yılda popülaritesi giderek artmakta olan fito-ıslah, toprak ıslahına ait pasif bir teknolojidir. Fitoremediasyon çevredeki kirleticilerin alınmasında yada onların zararsız hale getirilmesinde yeşil bitkilerin kullanımı olarak tanımlanır (Raskin ve diğ., 1997). Bitkiler organik kirleticileri bozabilir, parçalayabilir yada metallerde olduğu gibi bünyesine alarak stabilize edebilir (EPA, 1995). Diğer ıslah teknolojileri ile karşılaştırıldığında oldukça düşük masraflı, estetik olarak memnun edicidir (Glass, 1999). Bundan başka fitoremediasyon çevresel açıdan önemli bir sıkıntı yaratmaması sebebiyle avantajlıdır çünkü uygulanan yöntem toprak matriksini değiştirmez. Böylece başarılı bir fitoremediasyondan sonra toprak direkt olarak tarımsal amaçlar için kullanılabilir. Toksik ağır metaller ve organik kirleticilerin her ikisi de fitoremediasyonda hedef alınan kirleticilerdir. Salt ve diğ., (1998) fitoremediasyonu fitoekstraksiyon, fitodegradasyon, rizofiltrasyon, fitostabilizasyon, fitovolatilizasyon ve rizodegradasyon olarak alt gruplara ayırmışlardır (Şekil 8).

Özellikle seçilmiş, genetik olarak ayarlanmış bitkiler bu yöntemde kullanılmaktadır. Islah yöntemini tamamlama adımı olarak diğer farklı geleneksel ıslah metotlarıyla (izolasyon ve immobilizasyon teknolojileri, elektrokinetik teknolojiler, vb.) beraber kullanılabilir.

Fitoremediasyon teknolojisi, kirlenmiş toprakların temizlenmesinde biyolojik bazlı ve düşük maliyetli bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Özellikle toprağın kazılarak yerinden alınmaması önemli bir maliyet azaltıcı avantaj olarak göze çarpmaktadır. Toprak arıtımı için kullanılan fizikokimyasal teknolojilerin çoğu topraktaki biyolojik aktiviteyi tamamen yok etmekte ve toprağı bitki büyümesi için uygun olmayan bir ortama dönüştürmekteyken, fitoremediasyon toprağın biyolojik özelliklerini ve fiziksel yapısını korumaktadır (Khan ve diğ., 2000).

Bununla birlikte, köklerin derinliğine ve bitkinin kirleticiye olan toleransına bağlı olan bir metot olması dezavantaj yaratmaktadır. Diğer bir dezavantajı da, diğer metotlarla karşılaştırıldığında prosesin çok daha uzun sürmesidir.



Şekil 8:  
Fitoremediasyon prosesinde ana mekanizmalar

*Thlapsi*, *Urtica*, *Chenopodium*, *Polygonum sachalase* ve *Allyssim* gibi bazı bitkilerin kadmiyum, bakır, kuşun, nikel ve çinkoyu bünyelerinde biriktirme yetenekleri vardır ve bu nedenle, söz konusu bitkilerin yetiştirilmesi kirlenmiş toprakların arıtılmasında dolaylı bir metot olarak kabul edilmektedir (Mulligan ve ark., 2001). Örneğin, çoğu bitkiler yaklaşık 100 ppm'lik bir Zn birikiminde toksisite semptomları gösterirken, en yaygın metal hiperakümülatörü olarak bilinen *Thlapsi caeruledcens*'in 26000 ppm'in üzerinde bir birikimi sağlayabildiği literatürden bilinmektedir (Lasat, 2000).

#### 4. SONUÇ

Biyoremediasyon doğal biyolojik aktivitelerin kullanılmasıyla, kirleticilerin yıkıma uğratılmasını sağlayan bir arıtım alternatifidir. Diğer remediasyon tekniklerinde (solidifikasyon/stabilizasyon, vitrifikasyon, toprak yıkama, elektrokinetik teknolojiler, vb.) olduğu gibi kirleticiler bir fazdan diğerine dönüşmediği için daha kalıcı bir çözüm yöntemidir. Kirleticiler biyolojik aktivitelerle karbondioksit ve su gibi zararsız son ürünlere dönüştürülmektedir. Proses biyolojik aktiviteye dayalı olarak gerçekleştirildiği için ortamda yeterli mikroorganizma bulunması, biyoremediasyon boyunca oluşacak ürünlerin toksisite yaratmaması, mikroorganizmaları inhibe edici kimyasallar mevcutsa seyreltilmesi büyük önem taşır. Ayrıca mikroorganizmaların büyümesini ve aktivitesini arttıracak nutrientler, O<sub>2</sub>, diğer elektron alıcılar, uygun nem oranı, sıcaklık, karbon ve enerji kaynağı sağlanmalıdır. Kirlenmiş toprağın durumu göz önüne alınarak yerinde arıtım veya arazi dışı arıtım seçeneklerinden birine karar verilebilir. Yerinde arıtımın en büyük avantajı (özellikle yeni gelişmekte olan ülkeler için) düşük maliyetli olmasıdır. Diğer taraftan yoğun kirliliğin olduğu ve çabuk sonuç alınması gereken topraklarda ex-situ yöntemler tercih edilmelidir.

Başarılı bir toprak kirliliği kontrolü için öncelikle kirlenmiş alanların belirlenmesi, kayıt altına alınması, incelenmesi ve sınıflandırılması gerekmektedir. Toprakların iyileştirilmesinde uygulanan metotlar ve teknikler konusunda bir program oluşturulmalıdır. Toprak kirliliğinin tespiti, giderimi ve yaptırımlarına ilişkin çalışmaların artırılması büyük önem taşımaktadır. Evrensel bir problem halini alan toprak kirliliği için en iyi çözüm kuşkusuz toprak kirliliğini önleme çalışmalarıdır.

#### KAYNAKLAR

1. Adeniyi, A. A., Afolabi, J.A. (2002) Determination of total petroleum hydrocarbons and heavy metals in soils within the vicinity of facilities handling refined petroleum products in lagos metropolis. *Environmental International*, 28, 79-82.
2. Aisablie, J., Balks, J.M., Foght, J.M., Waterhouse, E.J. (2004). Hydrocarbon spills on Antarctic soil: effects and management. *Environmental Science & Technology* 38, 1265-1274.
3. Baker, K.H, Herson, D.S. (1994). *Bioremediation*. McGraw – Hill, New York
4. Balba M., Al Awadhi N., Al Daher R. (1998) Bioremediation of oil contaminated soil: Microbiological Methods to feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 32, 155-164.
5. Bamforth, S., Singleton, I. (2005) Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *J. Chem. Biotechnol.* 80:723–736.
6. Brito, E.M.S., Duran, R., Guyoneaud, R., Goñi-Urriza, M., García de Oteyza, T., Crapez, M.A.C., Aleluia, I., Wasserman, J.C.A. (2009) A case study of in situ oil contamination in a mangrove swamp (Rio De Janeiro, Brazil). *Marine Pollution Bulletin* 58, 418–423.
7. Boopathy, R. (2000) Factors limiting bioremediation technologies. *Biores. Technol.*, 74, 63–67.
8. Boopathy, R. (2000) Bioremediation of explosives contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation* 46, 29-36
9. Chatham, J.R. (2003). Landfarming on the Alaskan North slope historical development and recent applications. *10th Annual International Petroleum Environmental Conference, Houston, TX November 11–14, 2003*. [http://ipecc.utulsa.edu/Conf2003/Papers/chatham\\_35.pdf](http://ipecc.utulsa.edu/Conf2003/Papers/chatham_35.pdf).
10. Cheng, H.H., Mulla, D.J. (1999). The Soil Environment. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, USA. *Bioremediation of Contaminated Soils*

11. Christodoulatos, C., Koutsospyros, A. (1998) Bioslurry reactors. In *Biological treatment of hazardous wastes* Edited by: Lewandowsky GA, DeFilippi L.J. New York: John Wiley & Sons, Inc; 69-103.
12. Clark, B., Boopathy, R. (2007) Evaluation of bioremediation methods for the treatment of soil contaminated with explosives in Louisiana Army Ammunition Plant, Minden, Louisiana. *Journal of Hazardous Materials* 143, 643–648.
13. Cookson, J.T. (1995) Bioremediation engineering: Design and Applications. Mc Graw Hill, New York Vidali M., 2001. Bioremediation . An Overview. *Pure Application Chemistry* Vol. 73, no.7, pp. 1163-1172.
14. Diplock, E.E., Mardlin D.P., Killham K.S., Paton G.I. (2009). Predicting bioremediation of hydrocarbons: Laboratory to field scale. *Environmental Pollution* 157, 1831–1840
15. Doelman, P., Breedveld, G. (1999). In situ versus on site practices. In: D.C. Adriano, J.-M. Bollag, W.T. Frankenberger, Jr., and R.C. Sims, Eds. *Bioremediation of Contaminated Soils*, 539–558. Agronomy Monograph 372. Soil Science Society of America, Madison, WI.
16. Dua, M., Singh, A, Sethunathan, N., Johri, A.K., (2002). Biotechnology and Bioremediation: Successes and Limitations. *Appl. Microbiol.* 63:329-331.
17. EPA, 1994, Engineering Bulletin: *In-Situ Biodegradation Treatment*, EPA/540/S-94 1502.
18. EPA, (1995) Contaminants and Remedial Options at Select Metals-Contaminated Sites, EPA/540/R-95/512.
19. EPA. (2004-b). *How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites. A Guide for Corrective Action Reviewers*, EPA 510-R-04-002. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response,
20. Evans B.S., Dudley C.A., Klasson K.T. (1996) Sequential anaerobic-aerobic biodegradation of PCBs in soil slurry microcosms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57–58:885-894.
21. Fuller, M.E., Manning, J.F. (2004) Microbiological changes during bioremediation of explosives-contaminated soils in laboratory and pilot-scale bioslurry reactors. *Bioresour. Technol.* 91(2):123-133.
22. Glass, D.J., (1999). Economic potential of phytoremediation. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*. John Wiley & Sons, New York, NY. pp.15-31.
23. Guerin, T.F. (2008) Ex-situ bioremediation of chlorobenzenes in soil. *Journal of Hazardous Materials* 154, 9–20
24. Hoepfel, R.E., Hincee, R.E., Arthur, M.F. (1991) Bioventing soils contaminated with petroleum hydrocarbons. *Journal of Industrial Microbiology*, 8, 141-146
25. Janikowski, T., Velicogna, D., Punt, M., Daugulis, A. (2002) Use of a two-phase partitioning bioreactor for degrading polycyclic aromatic hydrocarbons by a *Sphingomonas* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59(2–3):368-376.
26. Jerger, D.E., Woodhill, P.M., Flathman, P.E., Exner, J. H. (1993). Solid-Phase Remediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soil: Laboratory Treatability Study Through Site Closure. P. 177-193. In: P.E. Flathmann et al. (ed.) *Bioremediation-field Experience*. Lewis publ., Boca Raton, FL.
27. Khan, A.G., Kuek, C., Chaudhry, T.M. Khoo, C.S. and Hayes, W.J. (2000) Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation, *Chemosphere*, 41, 197-207.
28. King, R.B., Long, G. M., Sheldon, J.K. (1992). *Practical Environmental Bioremediation*. Lewis Publication, Boca Raton, FL.
29. Larsen, S.B., Karakasheva, D., Angelidaki, I., Schmidta, J.E. (2009). Ex-situ bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge. *Journal of Hazardous Materials* 164, 1568–1572
30. Lasat, M.M. (2000) phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent Agronomic Issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2 (5): 1 – 25.
31. Leahy, J.G., Colwell, R.R., (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews* 54, 305– 315
32. Line, M.A., Garland, C.D., Crowley, M., (1996). Evaluation of landfarm remediation of hydrocarbon-contaminated soil at the Inveresk Railyard, Launceston, Australia. *Waste Management* 16, 567–570.
33. Mallawatantri, A.P., B.G. McConkey, D.J. Mulla. (1996). Characterization of Pesticide Sorption and Degradation in Macropore Linings and Soil Horizons of Thatuna Silt Loam. *J. Environ. Quality* 25:227-235.
34. Mc Carthy, K., Walker, L., Vigoren, L., Bartel, J. (2004). Remediation of spilled petroleum hydrocarbons by in situ landfarming at an Arctic site. *Cold Regions Science and Technology* 40, 31–39.

35. Mihopoulos, P.G., Sayles, G.D., Suidon, M.T., Shah, J., Bishop, D.D. (2000) Vapor Phase Treatment of PCE in a soil Column by Lab-Scale Anaerobic Bioventing, *Water Resource*, Vol:44, pp.3231 – 3237.
36. Mohan S.V., Shailaja S., Krishna M.R., Reddy K.B., Sarma P.N. (2006) Bioslurry phase degradation of diethyl phthalate (DEP) contaminated soil in periodic discontinuous mode operation: Influence of bioaugmentation and substrate partition. *Process Biochem.* 41(3): 644-652.
37. Mohan, S.V., Prasanna, D., Purushotam Reddy, B., Sarma, P.N., (2008). Ex-situ bioremediation of pyrene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode: influence of bioaugmentation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, doi:10.1016/j.ibiod.2008.01.006.
38. Mohan, S.V., Reddy, B.P., Sarma, P.N. (2009). Ex situ slurry phase bioremediation of chrysene contaminated soil with the function of metabolic function: Process evaluation by data enveloping analysis (DEA) and Taguchi design of experimental methodology (DOE). *Bioresource Technology* 100, 164–172.
39. Mohn, W., Stewart, G.R. (2000). Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Arctic soils. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1161–1172.
40. Mohn, W.W. (2004) Biodegradation and bioremediation of halogenated organic compounds. In: Singh A, Ward OP (eds) *Biodegradation and bioremediation*. Springer, Heidelberg, pp 125–148
41. Mohn, W.W., Radziminski, C.Z., Fortin, M.C., Reimer, K.J., (2001). On site bioremediation of hydrocarbon-contaminated Arctic tundra soils in inoculated biopiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 242–247
42. Mulligan, C.N., Yang, R.N., Gibbs, B.F., (2001), Remediation Technologies for Metal-Contaminated Soils and Ground Water: an evaluation, *Engineering Geology*, Vol:60, pp.193-207.
43. Nano, G, Borroni, A, Rota, R. (2003) Combined slurry and solid-phase bioremediation of diesel contaminated soil. *J. Hazard. Mater.*, 100 (1-3):79-94.
44. Pardieck, D.L., Bouwer, E. J., Stone, A.T. (1992) Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers: A review. *Journal of Contaminant Hydrology* Volume 9, Issue 3, 221-242.
45. Paudyn, K., Rutter, A., Rowe R.K., Poland, J.S. (2008) Remediation of hydrocarbon contaminated soils in the Canadian Arctic by landfarming. *Cold Regions Science and Technology* 53,102–114
46. Petigara, B.R., Blough N.V., Mignerey, A.C. (2002) Mechanisms of hydrogen peroxide decomposition in soils, *Environ. Sci. Technol.* 36, 39–645.
47. Phillips, T.M., Lee, H., Trevors, J. T., Seech A. G. (2006) Full-scale *in situ* bioremediation of hexachlorocyclohexane-contaminated soil. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 81, 289–298.
48. Prasanna, D., Venkata Mohan, S., Purushotam Reddy, B., Sarma, P.N., (2008). Bioremediation of anthracene contaminated soil in bio-slurry phase reactor operated in periodic discontinuous batch mode. *Journal of Hazardous Materials* 153, 244–251.
49. Pope, D.F., Matthews, J.E., (1993). *Bioremediation using the land treatment concept*. USEPA/600/R-93/164. Robert S. Kerr, Environmental Research Laboratory. US Environmental Protection Agency, Ada, OK.
50. Raskin, I., Smith, R.D., Salt, D.E., (1997). Phytoremediation of metals using plants to remove pollutants from the environment. *Curr. Opin. Birstechnol.* 8, 221 – 226.
51. Reible, D., Demnerova, K. (Eds) (2002) *Innovative approaches to the on-site Assessment and remediations of contaminated sites*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 67-113.
52. Reynolds, C.M., Brayel, A.W., Travis, M.D., Perry, L.B., Iskandar, I.K. (1998). *United States Army Corps of Engineers, Special Report*, 97–20.
53. Rittmann, B. E. (1993) Performance standards for in-situ bioremediation. *Environmen. Sci. Tech.*, Vol. 27, No. 10 1974-1979.
54. Robles-González, I., Ríos-Leal, E., Sastre-Conde, I., Ferrera-Cerrato, R., Caffarel-Méndez, S., Poggi-Valardo, H.M. (2003) Effect of supplementary organic carbon source and electron acceptors on the removal of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in slurry bioreactors. In *Proceedings 2nd International Conference on Remediation of Contaminated Sediments, Venice, September 30 2003; Venice, Italy* Edited by: Pellei M, Porta A, Hinchee E. Battelle Press, Columbus, OH; Paper G-08, ISBN. 1-57477-143-4.
55. Robles-González, I., Fava, F., Poggi-Valardo, H.M. (2008). A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microbial Cell Factories* , 7:5 doi:10.1186/1475-2859-7-5.
56. Robles-González, I., Ríos-Leal, E., Ferrera-Cerrato, R., Esparza-García, F., Rinderknecht-Seijas N., Poggi-Valardo H.M. (2006) Bioremediation of a mineral soil with high contents of clay and organic matter

- contaminated with herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid using slurry bioreactors: effect of electron acceptor and supplementation with an organic carbon source. *Process Biochem.* 41(9):1951-1960.
57. Romero, A., Santos, A., Vicente, F., Rodriguez S., Lafuente, A.L. (2009) In situ oxidation remediation technologies: Kinetic of hydrogen peroxide decomposition on soil organic matter. *Journal of Hazardous Materials* 170,627–632.
58. Sabate, J., Vinas, M., Solanas, A. M. (2004) Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54, 19-25
59. Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I. (1998) Phytoremediation, *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 49, 643–668.
60. Scragg, A. (1999). *Environmental Biotechnology*. Longman. England.
61. Singh A., Ward, O.P. (2004) Soil Biology, Volume 2, *Biodegradation And Bioremediation* Springer-Verlag Berlin Heidelberg
62. Thomas, J.M., Ward, C.H. (1993). Introduced Organisms for Subsurface Bioremediation. P. 227-244. In: R.D. Norris Et Al.(Ed) *Handbook of Bioremediation*. Lewis Publ. Baco Raton, FL.
63. Troy, M.A. (1994). Bioengineering of Soils and Groundwater. P. 173-201. In: K.H. Baker and D.S Herson (ed.). *Bioremediation*, McGraw-Hill, New York.
64. USEPA. (1993) *Bioremediation Using the Land Treatment Concept: Environmental Regulation and Technology*, EPA/600-R93/164.
65. Quinn, J.W., Reinhart, D.R., (1997). Bioremediation of diesel contaminated soil using biopiles. *Pract. Period. Hazard., Toxic, Radioact. Waste Manag.* 18–25 Jan.
66. Vidali, M., (2001). Bioremediation: an overview. *Pure Applied Chemistry* 73, 1163–1172.
67. Von Fahnestock, F.M, Wickramanagake, G.B., Kratzke, R.J., Major, W.R. (1998) *Biopile design, operation and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils*, Battelle Press, Columbus, OH.
68. Widrig, D.L., Boopathy, R., Manning, J.F. (1997). Bioremediation of TNT contaminated soil: A laboratory study. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1141–1148.
69. Wolicka, D., Suszek, A., Borkowski A., Bielecka, A. (2009) Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products *Bioresource Technology* 100, 3221–3227.