

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI ORGANİK KÜKÜRTLÜ BİLEŞİKLERİN
MİKROBİYAL DESÜLFÜRİZASYONUNUN ARTTIRILMASI

MURAT ÖZTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2022

**T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI ORGANİK KÜKÜRTLÜ
BİLEŞİKLERİN MİKROBİYAL
DESÜLFÜRİZASYONUNUN
ARTTIRILMASI**

**MURAT ÖZTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**DANIŞMANI
PROF. DR. MELTEM YEŞİLÇİMEN AKBAŞ
II. DANIŞMANI
DR. TANER ŞAR**

GEBZE

2022

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

INCREASING MICROBIAL DESULFURIZATION
OF DIFFERENT ORGANIC SULFUR
COMPOUNDS

MURAT ÖZTÜRK
A THESIS SUBMITTED FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
MELTEM YESILCIMEN AKBAS
II. THESIS SUPERVISOR
DR. TANER SAR

GEBZE
2022



YÜKSEK LİSANS JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/04/2022 tarih ve 2022/21 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 11/05/2022 tarihinde tez savunma sınavı yapılan MURAT ÖZTÜRK'ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI)

: Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ÜYE

: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Selim ŞILBIR

ÜYE

: Doç. Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

Prof. Dr. Ümit DEMİR

Gebze Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Fosil yakıtların yanması ile oluşan kükürt dioksit (SO_2) gazının atmosfere salınması, çevre kirliliğine ve asit yağmurlarına sebep olmaktadır. Günümüzde, kükürt içeren fosil yakıtların kükürten arındırılması için önemli çalışmalar yapılmaktadır. Kükürdün hidrosülfürizasyon yöntemleri ile yakıttan uzaklaştırılması çok yüksek maliyete ve enerji kaybına neden olur. Alternatif olarak, mikrobiyal desülfürizasyon ise çok daha az maliyetli ve düşük enerji gerektiren bir süreçtir. Bu çalışmada *Paenibacillus* 32O-W ve 32O-Y suşlarının aljinat jel boncuklara immobilizasyonu ve manyetik Fe_3O_4 nanopartikülleri kaplanması ile organik kükürtlü bileşiklerden dibenzotiyofen (DBT) ve DBT sülfon (DBTS)'dan kükürt gideriminin artırılmasına çalışılmıştır. Bunun için aljinat boncuklara immobilize edilen ve Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri ile kaplanan 32O-W ve 32O-Y suşları, 96 saat boyunca çeşitli DBT veya DBTS konsantrasyonlarında (0.1-2 mM) inkübe edilmiştir. DBT veya DBTS'nin 4S yolu biyotransformasyonu yoluyla 2-hidroksibifenil (2-HBP)'in üretimi tespit edilmiştir. DBT veya DBTS'in desülfürizasyonundan oluşan en yüksek 2-HBP üretim miktarları, 0.1 ve 0.5 mM konsantrasyonlarında görülmüştür. Serbest suşlar ile karşılaştırıldığında, en fazla 2-HBP üretimleri immobilize suşlar ile DBT desülfürizasyonu için %54 ve DBTS desülfürizasyonu için %90 oranlarında artmıştır. Nanopartikül kaplı suşlarla ise, en fazla 2-HBP üretimlerinin DBT desülfürizasyonunda %44 ve DBTS desülfürizasyonunda %66 oranlarında daha fazla olduğu görülmüştür. Böylece aljinat jel immobilizasyonu ve Fe_3O_4 nanopartikülleri ile kaplama yöntemlerinin etkili bir biyodesülfürizasyonda kullanım potansiyellerinin olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Fosil yakıt, Desülfürizasyon, İmmobilizasyon, *Paenibacillus*, Nanopartikül.

SUMMARY

Combustion of fossil fuels generates the release of sulfur dioxide (SO₂) into the atmosphere causing pollution and acid rain. Today, important studies are carried out to desulfurize fossil fuels containing sulfur. Removal of sulfur from fuel by hydrodesulfurization methods causes very high cost and energy loss. Alternatively, microbial desulfurization results in a low energy cost and minimal production of unwanted byproducts. In this work, the improvement of DBT and DBTS desulfurization by *Paenibacillus* 32O-W and 32O-Y strains were investigated through immobilization and nanoparticle coating of cells as novel techniques. For this, strains 32O-W and 32O-Y immobilized in alginate gel beads or coated with magnetic Fe₃O₄ nanoparticles were incubated at various concentrations (0.1-2 mM) of dibenzothiophene (DBT) or DBT sulfone (DBTS) for 96 hours. Productions of 2-hydroxybiphenyl (2-HBP) from 4S pathway biotransformation of DBT or DBTS were measured. The highest amounts of 2-HBP productions from desulfurizations of DBT or DBTS were obtained at 0.1 and 0.5 mM concentrations. Compared with free cultures, the maximum productions of 2-HBP increased by 54% for DBT and 90% for DBTS desulfurization with immobilized strains. The enhancements of maximum 2-HBP productions by nanoparticle coating of cells were determined as 44% for DBT and 66% for DBTS desulfurization. It was shown nanoparticle coating and immobilization of cells could have potential use for an efficient biodesulfurization.

Keywords: Fossil fuel, Desulfurization, Immobilization, *Paenibacillus*, Nanoparticle.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca çalışmalarına her türlü desteği sağlayan, tecrübeleri ve bilgisi ile bana yol gösteren, ihtiyacım olan her anda bana doğru yolu gösteren ve bilimsel bir bakış açısı kazanmamı sağlayan değerli tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans çalışmalarımda bana öncülük eden, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her sorunumda sabır ve hoşgörü ile bana yardımcı olan, her ihtiyacım olduğunda iletişime geçebildiğim eş danışmanım Sn. Dr. Taner ŞAR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Gerek yüksek lisans eğitimin gerek özel hayatım boyunca sürekli yanımda olan, her zaman desteğini hissettiren, her ihtiyaç duyduğumda tereddütsüz yardımına koşan, hayatımın her anında yanımda olan ve olacak olan sevgili eşim ve yoldaşım Naciye ÖZTÜRK'e bütün kalbimle teşekkür ederim.

Hayatımın her anında bana maddi ve manevi desteklerini sunan, her zaman ve her koşulda arkamda olan ve olacağını bildiğim çok sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda bilgisi ve tecrübeleri ile daima bana yardımcı olan ve ayrıca dostluğunu esirgemeyen Gamze ŞEKER'e ve onun nezdinde bütün laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tez çalışması TÜBİTAK destekli olarak 118Y416 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Katkısı	2
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Fosil Yakıtların Yanması ile Oluşan Kirlilik	4
2.2. Fosil Yakıtlarda Kükürt Fraksiyonları	4
2.3. Mevzuat Düzenlemeleri	5
2.4. Desülfürizasyon	5
2.4.1. Hidrodesülfürizasyon (HDS)	6
2.4.2. Derin Kükürt Giderme İşlemleri	6
2.5. HDS'ye Alternatif: Biyodesülfürizasyon	7
2.6. BDS için Kullanılan Model Kükürtlü Bileşikler	8
2.7. BDS Tarihine Genel Bakış	8
2.8. Halka Yıkıcı Yollar	9
2.8.1. Anaerobik Kükürt Giderme Yolları	10
2.8.2. Aerobik Kükürt Giderme Yolları	10
2.9. Biyodesülfürizasyonun Arttırılması için Kullanılan Biyoteknolojik Yöntemler	12
2.9.1. İmmobilizasyon	12
2.9.2. Nanopartiküller ile Kaplama	13
3. MATERYAL ve METOT	14
3.1. Bakteri Suşları	14
3.2. Kimyasallar, Büyüme Ortamı ve Kültür Koşulları	14
3.3. Ön Kültürlerin Hazırlanması	14
3.4. DBT ve DBTS'nin İmmobilize Edilmiş Suşlar Tarafından Desülfürizasyonu	15

3.5. DBT ve DBTS'nin Nanopartikül Kaplı Suşlar Tarafından Desülfürizasyonu	15
3.6. 2-HBP Miktarının Belirlenmesi	16
3.7. HPLC Analizi	17
3.8. Suşların Kükürtlü Bileşikleri Dönüştürme Etkinlikleri	18
4. SONUÇLAR	19
4.1. Suşların İmmobilizasyonu ve Nanopartiküller ile Kaplanması	19
4.2. DBT Desülfürizasyonu	24
4.3. DBTS Desülfürizasyonu	28
5. TARTIŞMA	34
 KAYNAKLAR	 38
ÖZGEÇMİŞ	46
EKLER	47

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler ve</u>	<u>Açıklamalar</u>
<u>Kısaltmalar</u>	
%	: Yüzde
/	: Bölme
=	: Eşittir
>	: Büyüktür
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
2,3 DBPS	: 2,3-dihidroksibifenil 20-sülfınat
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
API	: Amerika Petrol Enstitüsü
ark.	: Arkadaşları
BDS	: Biyodesülfürizasyon
BT	: Benzotiyofen
BTH	: Benzotiyofen
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CDM	: Kimyasal olarak tanımlı besiyeri
CO ₂	: Karbondioksit
DBT	: Dibenzotiyofen
DBTO	: Dibenzotiyofen sülfoksit
DBTO ₂	: Dibenzotiyofen S,S-dioksite
DBTS	: Dibenzotiyofen sülfon
dk	: Dakika
EPA	: Environmental Protection Agency
Fe ₃ O ₄	: Demir oksit

FeS ₂	: Demir pirit
g	: Gram
g	: g-force
H ₂ S	: Hidrojen sülfür
2-HBP	: 2-hidroksibifenil
HCl	: Hidroklorik asit
HDS	: Hidrodesülfürizasyon
HFBTH	: 3-hidroksi 2-formil benzotiyofen
HPEaL	: 2-[2-hidroksietil] fenol
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
KH ₂ PO ₄	: Potasyum hidrojen fosfat
L	: Litre
M	: Molar
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Militre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
N	: Azot
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum hidrojen fosfat
NaCl	: Sodyum klorür
NH ₄ Cl	: Amonyum klorür
nm	: Nanometre
NO _x	: Nitrojen oksitler
OD	: Optik yoğunluk
PM	: Partiküler madde
ppm	: Parts per million
Prof.	: Profesör
psi	: Pounds per square
rpm	: Revolutions per minute

S	:	Kükürt
SEM	:	Taramalı elektron mikroskobu
SO ₂	:	Sülfür dioksit
SRB	:	Sülfat redükte edici bakteri
TH	:	Tiyofen
US	:	United States
UV	:	Ultraviyole
v	:	Hacim
w	:	Ağırlık

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No:</u>	<u>Sayfa</u>
2.1: DBT ve türevlerinin mikrobiyal kükürt gideriminde kullanılan 4S yolağı.	11
3.1: Nanopartiküller (10 µg/mL) ile kaplanan bakteri suşlarının CDM besiyerinden bir mıknatıs yardımı ile toplanması.	16
3.2: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart 2-HBP değerlerine göre Gibbs deneyi sonrası ölçülen OD _{610nm} absorbans değerleri ile çizilen kalibrasyon eğrisi.	17
3.3: Farklı organik kükürt bileşiklerinin (DBT ve DBTS) ve bu kükürt bileşiklerinin desülfürizasyonları ile açığa çıkan 2-HBP oluşumunun HPLC analizleri ile belirlenmesi.	18
4.1: Oluşturulan küresel aljinat boncuklarının inkübasyon öncesi görüntüleri.	20
4.2: Aljinat boncuklara immobilize Paenibacillus 32O-Y suşunun 0.5 mM DBTS içeren CDM besiyerinde 96 saatlik inkübasyonu sonrası görüntüleri.	21
4.3: Aljinat boncuk kesitlerinin elektron mikroskobu ile hücrelerin görüntülenmesi.	22
4.4: Fe ₃ O ₄ manyetik nanopartiküller ile kaplanan 32O-Y hücrelerinin görüntüleri.	23
4.5: 0.5 mM DBTS içeren CDM besiyerinde 96 saat 250 rpm hızında inkübe edilen hücreler ve boş CDM besiyeri	24
4.6: 32O-Y ve 32O-Yvbg suşlarının farklı konsantrasyonlarda DBT içeren CDM besiyerinde 40°C sıcaklıkta 250 rpm çalkalama hızında 24-72 saatlik inkübasyonları sonunda oluşan 2-HBP miktarlarının Gibbs deneyi ile 610 nm’de 96 kuyulu mikrotiplalarda belirlenmesi.	25
4.7: Aljinat ile immobilize edilmiş 32O-Y suşunun farklı DBT konsantrasyonlarında ve 96 saatlik inkübasyonları sonrası miktarları.	26
4.8: Fe ₃ O ₄ nanopartikülleri ile kaplanmış 32O-Y suşunun farklı DBT konsantrasyonlarında ve 96 saatlik inkübasyonları sonrası miktarları.	27

4.9:	Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen 32O-W ve 32O-Y suşları için aljinat immobilizasyonunun büyüme üzerindeki etkileri.	30
4.10:	Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen 32O-W ve 32O-Y suşları için Fe ₃ O ₄ nanopartiküller ile kaplamanın büyüme üzerindeki etkileri.	30
4.11:	Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen immobilize edilmiş 32O-W ve 32O-Y suşları tarafından 2-HBP üretimi.	31
4.12:	Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen Fe ₃ O ₄ nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşları tarafından 2-HBP üretimi.	31
4.13:	Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen immobilize edilmiş 32O-W ve 32O-Y suşları ile ortamda kalan DBTS konsantrasyonu (mM).	32
4.14:	Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen Fe ₃ O ₄ nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşları ile ortamda kalan DBTS konsantrasyonu (mM).	32

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa</u>
3.1: Suşların DBT ve DBTS'yi 2-HBP'ye dönüştürme etkinlik denklemi.	18
4.1: İmmobilize edilmiş veya nanopartikül kaplanmış 32O-Y suşu tarafından 0.1 ve 0.5 mM başlangıç DBT'de üretilen maksimum 2-HBP'nin (%) serbest hücreler ile karşılaştırılması.	28
4.2: İmmobilize edilmiş veya nanopartiküller ile kaplanmış 32O-Y suşu ile 0.1 ve 0.5 mM DBT konsantrasyonlarının 24-96 saatlik inkübasyonları sonunda 2-HBP'e dönüşüm oranları (%).	28
4.3: Aljinat ile immobilize edilmiş ve nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşları ile 0.1 ve 0.5 mM DBTS konsantrasyonlarının 24-96 saatlik inkübasyonları sonunda 2-HBP'e dönüşüm oranları (%).	29
4.4: İmmobilize edilmiş veya nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşları tarafından 0.1 ve 0.5 mM başlangıç DBTS konsantrasyonlarında üretilen maksimum 2-HBP miktarlarının serbest hücreler ile elde edilenlere göre artış oranları (%)	33

1.GİRİŞ

Günümüz dünyasının en temel enerji kaynaklarının başında fosil yakıtlar ve türevleri gelmektedir. Bu yakıtlar içerisinde çok sayıda yoğunlaştırılmış tiyofenik bileşikler bulunur (Czogalla and Boberg, 1983). Bu bileşiklerin en önemlileri tiyofen (TH), benzotiyofen (BTH) ve dibenzotiyofen (DBT) gibi yapılarında kükürt içeren bileşiklerdir.

Kükürt içeren fosil yakıtların yanması, hava ve su kirleticileri olan kükürt oksitlerin doğaya salınmasına yol açar. Bu durum asit yağmurlarına ve dolayısı ile yoğun su ve toprak kirliliğine sebep olur. Bu nedenle, dünya çapında düzenleyici kurumlar tarafından yakıtlardaki kükürt limitlerine ilişkin katı düzenlemeler uygulanmaktadır. ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), benzin ve dizeldeki kükürt miktarını sırasıyla 30 ppm (US EPA 2012a) ve 15 ppm (US EPA 2012b) ile sınırlamaktadır. Avrupa Birliği, dizel için sınırı 10 ppm olarak belirlemiştir (Schmitz et al., 2004). Bu nedenle, petrol türevli yakıtlar kullanılmadan önce hem inorganik hem de organik kükürt fosil yakıtlardan uzaklaştırılmalıdır.

Fosil yakıtlardan kükürdün uzaklaştırılması için en yaygın kullanılan teknoloji hidrodesülfürizasyondur (HDS). HDS, kükürdün uzaklaştırılmasında güçlü bir etkinlik gösterse de bu işlem hem yüksek enerji harcayan termofilik hem de yüksek basınç gerektiren bir işlemdir. Ayrıca HDS işlemleri, tiyofen ve türevleri gibi heterosiklik organosülfür bileşiklerin kükürttan arındırılmasında sınırlı etkinliğe sahiptir (Song, 2003). Hidrokarbon fraksiyonlarından kükürdü seçici olarak uzaklaştıran, mikroorganizmalar tarafından gerçekleştirilen, biyokatalitik bir işlem olan biyodesülfürizasyon (BDS), düşük basınç ve sıcaklıkta gerçekleşmesi ve çevre dostu olması sebebi ile HDS'ye potansiyel bir alternatif olarak araştırılmaktadır (Chen et al., 2008; Kilbane, 2006; Shavandi et al., 2009).

Şimdiye kadar, DBT, BTH veya bunların alkillenmiş türevlerini metabolize edebilen bazı mikrobiyal türlerin varlığı bildirilmiştir (Bahrami et al., 2001; Czogalla and Boberg, 1983; Furuya et al., 2003; Li et al., 2003). Mikrobiyal kükürt gideriminin iki farklı yol ile yapıldığı bilinmektedir. İlki *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (ATCC 53968) suşunda tanımlanmış ve dibenzotiyofen (DBT)'in inorganik sülfid ve 2-hidroksibifenil (2-HBP) çevrildiği yoldur (Kayser et al., 1993). İkinci

bir yol ise benzo(tiy)ofenin (BTH)'in 2-[2-hidroksietil] fenole (HPEaL) desülfüre edildiği yoldur (Gilbert et al., 1998).

Yakın geçmişte izole edilen iki *Paenibacillus* suşu (32O-Y ve 32O-W) DBT'de kükürt gideriminde kullanılmıştır (Wang et al., 2015). 32O-Y suşunun 4S yolu ile DBT'nin desülfürizasyonunu etkili bir şekilde yapabildiği gözlenmiştir. 32O-W suşu DBT'den kükürdü uzaklaştırmamış ancak 4S yolunun ara bileşiği olan DBT sülfonu (DBTS) kullanmasına olanak sağlayan kısmi bir 4S kükürt giderme yolağını kodladığı belirlenmiştir (Wang et al., 2015). Bu da iki suş arasında simbiyotik bir ilişki ortaya çıkmasını sağlamıştır. Böylece 32O-Y ve 32O-W suşları birlikte kullanıldığında DBT'yi daha etkin bir şekilde desülfüre edebilmişlerdir (Sar vd., 2021).

Bu tez çalışmasında farklı kükürtlü bileşiklerin *Paenibacillus* 32O-Y ve 32O-W suşlarının immobilizasyonu ve nanopartiküllerle kaplanması ile biyodesülfürizasyon etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir.

1.1. Tezin Amacı, İçeriği ve Katkısı

Günümüz temel enerji kaynağı olan fosil yakıtlar yüksek oranda kükürtlü heterosiklik organik bileşikler içermektedir. Bu kükürtlü bileşiklerin yanması sonucu meydana gelen kükürt oksitler çevreye çok ağır hasarlar vermektedir. Bu nedenle fosil yakıtlar kullanılmadan önce içerdikleri kükürdün bu bileşiklerden uzaklaştırılması gerekmektedir (Fatahi and Sadeghi, 2017).

Fosil yakıtlardan kükürdün uzaklaştırılması için hali hazırda kullanılan birçok yöntem mevcuttur. Fakat bu yöntemler yüksek basınç ve sıcaklık gerektiren süreçler içermektedir. Bu durum yüksek maliyete ve enerji kaybına neden olmaktadır (Song, 2003). Son dönemlerde fosil yakıtlardan mikrobiyal kükürt giderimi HDS süreçlerine alternatif olarak çalışılmakta ve yoğun ilgi görmektedir.

Mikrobiyal kükürt giderimi ile ilgili birçok çalışma hali hazırda mevcuttur ve umut verici birçok gelişme bulunmaktadır (Butler et al., 2016; Chen et al., 2008; Fatahi and Sadeghi, 2017; Gilbert et al., 1998; Sar vd., 2021; Wang et al., 2015). Yapılan bu tez çalışmasında yenilikçi biyoteknolojik yaklaşımlar ile *Paenibacillus* spp. suşlarının kükürt gideriminin artırılması ve böylece yüksek maliyetli kükürt giderme süreçlerine bir alternatif oluşturulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda bu tez

alışmasında *Paenibacillus* spp. 32O-W ve 32O-Y suşları, fosil yakıtlarda bulunan organik kükürt bileşiklerinden DBT ve DBT sülfon biyodesülfürizasyonu için kullanılarak bu suşların, farklı konsantrasyonlarda bu kükürtlü bileşikleri içeren ortamlarda aljinat boncuklara immobilizasyonu ve bakteri hücrelerinin Fe₃O₄ nanopartiküllerle kaplanması ile desülfürizasyonlarının arttırılmasına çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fosil Yakıtların Yanması ile Oluşan Kirlilik

Fosil yakıtların yanması sonucu nitrojen oksitler (NO_x) ve sülfür dioksit (SO_2) içeren sera gazı atmosferde su, oksijen ve diğer maddelerle tepkimeye girerek sülfirik asit ve nitrik asit çözeltileri oluşturmaktadır. Bu çözeltiler yoğunlaşarak asit yağmurlarını oluşturmaktadır. Asit yağmurları binaları eritmekte, ormanlara göllere ve tarım alanlarına önemli zararlar vermektedir (Ghasemali Mohebbi and Ball, 2008). Ayrıca sera gazının içinde partiküler madde (PM) oluşmaktadır. Fosil yakıtlarda bulunan kükürt PM'nin ana nedenidir. ABD Çevre Koruma Ajansı'na (US EPA) göre dizel yakıttaki kükürtün yaklaşık %2'si doğrudan PM emisyonlarına dönüştürülür. PM'nin ayrıca kanserojen etkiye sahip olduğu ortaya konmuştur (Stanislaus et al., 2010). Bununla beraber, yüksek oranda kükürdioksit gazı önemli sağlık sorunlarına da sebep olmaktadır (Oldfield et al., 1998).

2.2. Fosil Yakıtlarda Kükürt Fraksiyonları

Ham fosil yakıtlarda kükürt çözünür organik formda bulunmaktadır. Bu organik bileşikler temel olarak 3 grupta sınıflandırılabilir (Gilbert et al., 1998):

- Alifatik ve aromatik tiyoller ve bunların oksidasyon ürünleri (disülfidler).
- Alifatik, aromatik ve karışık tiyoeterler
- Tiyofen halkasına dayalı heterosiklikler (tiyofenin kendisi, benzotiyofen (BT), dibenzotiyofen (DBT) ve bunların alkilli türevleri).

Petrolde en çok bulunan kükürt formu genellikle tiyofenik formdur. Tiyofenik kükürt genellikle ham petrol ve türetilmiş fraksiyonlardaki sülfürün %50-%95'ini oluşturur ve alkillenmiş DBT'ler, tipik olarak ham petrolde ve dizel üretmek için kullanılan fraksiyonlarda bulunan en yaygın organosülfür bileşikleridir (Kilbane and Le Borgne, 2004).

2.3. Mevzuat Düzenlemeleri

Ham petrolün kalitesi günden güne değişmektedir; Amerika Petrol Enstitüsü (API)' ye göre petrolün ağırlığı azalmakta ve kükürt içeriği artmaktadır (Mohebbi and Ball, 2016). Kükürt ham petrolerin daha yüksek moleküler ağırlıklı bileşenleri ile ilişkilidir ve sonuç olarak ağır ham petroler hafif ham petrolerden daha fazla kükürt içermektedir (Kilbane and Le Borgne, 2004). Ham petroldeki kükürdün yüksek olması rafine edilmiş petrol ürünlerinin de içerdiği kükürdün yüksek olmasına sebep olmaktadır.

ABD çevre koruma ajansı (US EPA) dizel yakıttaki kükürt oranını 3500ppm'den 500'ppme indirmiştir (Song, 2003). Ayrıca, US EPA karayolu ve karayolu dışı dizel yakıtlarda bulunan kükürt konsantrasyonunun 2010-2014 yılları arasında 15 ppm'i geçmemesini şart koşmuştur (Web 1, 2022). Ayrıca Avrupa Birliği 2009 yılından itibaren dizel yakıttaki kükürt içeriğinin 10 ppm'in altında olmasını yasalaştırmıştır (Mohebbi and Ball, 2016).

2.4. Desülfürizasyon

Kükürt fosil türevli yakıtlarda en çok bulunan üçüncü heteroatomdur ve bileşimin %0.05- %10'u oluşturur (Blumberg and Walsh, 2003). Petrol türevli yakıt ve ham yağlarda sülfat, sülfid, tiyosülfid ile birlikte 200'den fazla organik kükürtlü bileşik tanımlanmıştır (Ma, 2010). Kükürt içeren heterosiklik yapılar en güçlü çevre kirleticileri arasında yer alır. Bu sebeple fosil yakıtlar yakılmadan önce kükürt içeren bileşiklerdeki kükürdün uzaklaştırılması gerekir. Yakıtlardaki kükürt seviyeleri üç şekilde azaltılabilir (Stanislaus et al., 2010).

- Kükürt dioksit (SO_2) ve sülfat partikül maddesinin doğrudan azaltılması.
- Emisyon kontrol sistemlerinin özellikle katalizörlerin daha da geliştirilmesi.
- Dizel sülfat partikül maddesi filtreleri, NO_x emiciler ve seçici katalizör indirgeme sistemleri gibi yeni emisyon kontrol teknolojilerinin kullanımı.

Rafinerilerde fosil yakıtlardaki organik kükürtlü bileşiklerdeki kükürdün uzaklaştırılması için uzun yıllardır HDS sistemi kullanılmaktadır. (Breyse et al.,

2003). Ancak yeni yasal düzenlemeler ile yakıtlardaki kükürt içeriğinin 15 ppm'in altına düşmesi ile bu yöntem oldukça maliyetli olmaya başlamıştır. Sonuç olarak, seçici adsorpsiyon, iyonik bir sıvı ile ekstraksiyon, oksidatif kükürt giderme ve BDS dahil olmak üzere çeşitli alternatif yaklaşımlar kullanılmaya başlanmıştır (Ghasemali Mohebbi and Ball, 2016).

2.4.1. Hidrodesülfürizasyon (HDS)

Bir rafineride yapılan hidrodesülfürizasyon, doymamış hidrokarbonları doyuran ve S, O, N ve metalleri farklı fosil yakıtlardan uzaklaştıran hidrojenasyon işlemlerini ifade eder. Hidro arıtmanın temel amacı hava kirliliği emisyonlarını azaltmak, katalizörlerin bozulmasını önlemek ve yakıt kalitesini arttırmaktır. HDS ayrıca malzemenin özelliğini geliştirerek daha kolay kırılmasını sağlar (Mohebbi and Ball, 2016). HDS, uygun katalizör varlığında ham petrol fraksiyonlarını hidrojen ile tepkimeye sokarak organik kükürdü hidrojen sülfür gazına çeviren katalitik bir işlemdir. Bu gaz daha sonra yakıttan kolayca ayrılır. Dizel yakıtlardan kükürt giderimi ise hem içerdiği kükürt oranının fazla olması hem de hammaddedeki kükürdün çıkarılmasının zorluğu nedeni ile daha güçtür. HDS işlemi 200-450 °C çalışır ve gerekli kükürt giderme seviyesine bağlı olarak inorganik bir katalizör varlığında 150-200 psi basınç kullanır (Gupta et al., 2005). HDS işleminde yüksek basınç ve sıcaklık kullanılması nedeni ile maliyet artmaktadır. HDS işlemi, tiyoller, sülfürler, disülfidler gibi nispeten basit kükürtlü bileşiklere karşı etkili olsa da DBT, BT ve poliaromatik kükürt bileşikleri gibi karmaşık aromatik kükürt içeren bileşiklere karşı etkisizdir (Ma, 2010). Bu sebeple araştırmalar aromatik kükürtlü bileşiklerin desülfürizasyonuna odaklanmıştır.

2.4.2. Derin Kükürt Giderme İşlemleri

Derin (ultra-derin) kükürt giderimi dizel yakıtlar için kükürt içeriğinin 15 ppm'in altına indirilmesini ifade eder (Song, 2003). Bir yakıtın derin kükürt giderimini, içerdiği kükürtlü bileşik ve bu bileşiklerin ısı ve basınca dayanıklılığı belirler (Pawelec et al., 2011). HDS işleminde kükürtlü bileşiklerdeki kükürdün uzaklaştırılması şu sırayı izler: TH> BT> DBT (Babich and Moulijn, 2003).

Normalden daha fazla (ultra-derin) kükürt giderme işlemi çeşitli sorunları ortaya çıkarmıştır. HDS işlemi ile kükürt gidermenin sonucu olarak yakıt yapısında değişiklikler meydana gelmektedir (Stanislaus et al., 2010). Bu değişiklikler yakıtın yanması ile oluşturacağı kalori değerini düşürmektedir. Ayrıca derin HDS işleminde enerji yoğunudur, büyük sera gazı emisyonlarına neden olur. Sistemin kurulumu ile çalıştırılması da maliyetlidir. Bu göstergelerin ışığında kolay ve düşük maliyetli çalışma koşulları altında daha etkili kükürt giderimi yapabilecek mekanizmalar geliştirilmeye çalışılmıştır (Ito and van Veen, 2006). Bu kapsamda, BDS, oksidatif kükürt giderme (Wu and Ondruschka, 2010), adsorpsiyon ile kükürt giderme, çözücüler ve iyonik sıvılar kullanılarak kükürt giderme gibi (Kulkarni and Afonso, 2010) yöntemler incelemiştir.

2.5. HDS'ye Alternatif: Biyodesülfürizasyon

Çeşitli yakıtların kükürten arındırılması için HDS işlemlerine alternatif işlemler hala araştırılmaya devam edilmektedir. BDS bu araştırılma konuları içerisinde en umut verici olandır. BDS çok düşük maliyetle yüksek verim sunarak HDS'ye karşı güçlü bir alternatif oluşturmaktadır. BDS sayesinde işletme ve tesis maliyetleri yüksek oranda azaltılabilir (Worrell and Galitsky, 2004).

BT, DBT ve bunların alkillenmiş formlarından kükürdün uzaklaştırılması zor bir işlemdir. HDS ile aromatik organik kükürtlü bileşiklerden kükürdün uzaklaştırılması tam verimle gerçekleşmez. Fakat uluslararası standartlara göre kükürdün yakıttaki miktarı 15 ppm'in altında olması gerekmektedir (Song, 2003). BDS, HDS'nin aksine halkasal bileşiklerdeki kükürdü giderebilmektedir. Bu da BDS'nin daha az maliyetli ve daha yüksek verimli bir kükürt giderme işlemi olmasındaki umutları arttırmaktadır.

Doğada bakteriler gerekli metabolitleri üretebilmek için kükürdü az miktarda kullanabilirler. Hem tarım arazilerinde hem de işlenmemiş toprakta kükürt büyük ölçüde sülfonatlar ve sülfat esterleri olarak organik bağlı kükürt biçimindedir ve biyolojik olarak kullanılabilir inorganik sülfat kadar kullanılabilir durumda değildir (Singh and Schwan, 2011). Kükürt içeren organik bileşikleri içerdikleri kükürdü ya da karbon iskeletini kullanmak için metabolize eden bakteriler doğada yaygındır

(Borgne, 2010). Kükürt dönüştürebilen bakteriler doğada çok farklı ortamlarda ve farklı şartlar altında gelişebilmektedir.

2.6. BDS için Kullanılan Model Kükürtlü Bileşikler

Genel ham petrol türevli yakıt fraksiyonlarının ortak bir model bileşiği olmamasına rağmen ABD Batı Teksas bölümünden çıkarılan petrolün kükürtlü bileşiklerinin %70'ini DBT ve türevlerinin oluşturduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bazı orta doğu ülkelerinden çıkarılan petrolündeki kükürtlü bileşiklerin %40'ını DBT ve türevleri oluşturmaktadır (Monticello, 1985). Özetle DBT, BTH, TH ve türevlerinin model bileşik olarak seçilmesinin temel sebebi, ham petrolü oluşturan tiyofenik bileşiklerin çok büyük kısmını oluşturmalarıdır.

2.7. BDS Tarihine Genel Bakış

Fosil yakıtlardan kükürdün çıkarılması için mikroorganizmaların kullanılması kavramı *Acidianus*, *Sulpholobus* ve *Thiobacillus* gibi asidofilik sülfid oksitleyicilerin kömürden demir piritin (FeS_2) çıkarılması için kullanılabileceği keşfini takiben ortaya atılmıştır ve 50 yıldan daha eskiye dayanmaktadır (Olson et al., 1993). Çok sayıda patent bu organizmaların kömürde doğrudan kullanımından bahsetmektedir (Barvinchak, 1980, Apel et al., 1984).

Dikkatleri üzerine ilk çeken *Pseudomonas* suşlarının DBT'yi parçalayabilme özellikleri olmuştur. *Pseudomonas* cinsinin aromatik dioksijenaz yolunu kullanarak benzen, ksilen, tolüen gibi basit aromatikleri (Cruden et al., 1992) ve dibenzofuran gibi bazı karmaşık aromatik bileşikleri verimli bir şekilde mineralize ettiği gözlenmiştir (Bunz and Cook, 1993). Böylece benzen mineralleştirici *Beijerinckia* ve *Pseudomonas* suşları, DBT'yi karakteristik olarak 3-hidroksi 2-formil benzotiyofene (HFBTH) indirgediği saptanmıştır. Bu “Kodama” yolu olarak tanımlanmıştır. Bu yolda kükürt içeren HFBTH fazla bozulmamaktadır (Laborde and Gibson, 1977). *Pseudomonas* suşlarının bazı türleri BTH'yi kısmen aromatik tiyollerin bir karışımına indirgemektedir. Fakat kükürt ortamdan uzaklaştırılamadığı için bu organizma yakıttan kükürt giderimi için uygun değildir (Eaton and Nitterauer, 1994).

Brevibacterium sp. DO suşu daha ilginç sonuçlar ortaya koymuştur (Klein et al., 1994). Bu organizmanın DBT'yi tamamen mineralize ettiği görülmüştür. DBT'in *Brevibacterium* DO suşu tarafından mineralizasyonu şu şekilde gerçekleşir: Dibenzotiyofenin (DBT) dibenzotiyofen S,S-dioksit (DBTO₂) oksidasyonunu takiben, tiyofen halkasının açılması açısall bir dioksijenazın etkisiyle tetiklenmektedir. Bu reaksiyonun ürünü 2,3-dihidroksibifenil 20-sülfinattır (2,3 DBPS). İkinci bir dioksijenaz saldırısında, katekol halkası açılır ve ürün, bir desülfünasyon aşamasını içeren, tanımlanmış bir sırayla benzoata indirgenmektedir. Sonuçta benzoat, CO₂ ve suya mineralize edilir (Afferden et al., 1993).

İlk olarak *Rhodococcus erythropolis* IGTS8'de tanımlanan mezofilik enzim yolu DBT'i 2-hidroksibifenil'e (2-HBP) metabolize etmekte ve kükürdü sülfid olarak serbest bırakmaktadır. DBT'nin kalorik değerini koruyan bu yol "4S" yolu olarak adlandırılmıştır (Kilbane, 2006). Mezofilik 4S yolu bir dizi bakteride belirlenmiş (Bhatia and Sharma, 2010; Mohebbi et al., 2007; Ohshiro et al., 1994, 1996; Omori et al., 1992; Yu et al., 2006) ve ilgili "dzsABC" operonu karakterize edilmiştir (Denome et al., 1994; Kilbane and Robbins, 2007). 4S yolunun termofilik versiyonları da keşfedilmiştir (Ishii et al., 2000; Kayser et al., 2002; Kirimura et al., 2001; Konishi et al., 1997; Li et al., 2003) ve bu 4S yollarında yer alan enzimleri kodlayan "tdsABC" (Ishii et al., 2000) ve "bdsABC" (Kirimura et al., 2001) gibi operonlar da karakterize edilmiştir. tdsABC kodlu enzimlerin yaklaşık 60 °C ye kadar aktif olduğu gözlenmiştir (Konishi et al., 1997).

2.8. Halka Yıkıcı Yollar

Şimdiye kadar DBT ve türevlerinin metabolizması için 2 halka yıkıcı yol tanımlanmıştır. Kodama yolu olarak bilinen DBT ve türevlerinin bozunmasındaki en yaygın bu yol naftalininkine benzerdir (Kodama et al., 1973). DBT'nin bu yol üzerinden *Pseudomonas* (Hou et al., 2005; Kodama, 1977), *Beijerinia* (Laborde and Gibson, 1977) ve *Rhizobium* (Frassinetti et al., 1998) dahil olmak çeşitli bakteriler tarafından kullanılabileceği rapor edilmiştir.

DBT'nin mineralizasyonu ile sonuçlanan bir başka halka yıkıcı yol, Van Afferden ve diğerleri (1990) tarafından tarif edilen yoldur (Afferden, 1989). Afferden et al. (1989) tarafından bu yol izine sahip olan ve büyüme için DBT'yi

karbon, kükürt ve enerjinin tek kaynağı olarak kullanabilen *Brevibacterium sp.* DO suşu izole edilmiştir. DBT mineralizasyonu sırasında 3 metabolit tanımlanmıştır; bunlar DBTO (DBT sülfoksit), DBTO₂ (DBT sülfon) ve benzoat olarak belirlenmiştir. Bu yol kükürt atomunun stokiyometrik olarak sülfitin salınmasıyla DBT'nin tam mineralizasyonu ile tamamlanır, bu daha sonra abiyotik olarak sülfata oksitlenir (Afferden, 1989; Afferden et al., 1993). Başka bir çalışmada, *Xanthobacter polyaromaticivorans* 127W suşunun DBT de dahil olmak üzere çok çeşitli halkasal aromatik bileşikler parçalayabilen bir suş olduğu bildirilmiştir (Hirano et al., 2004).

2.8.1. Anaerobik Kükürt Giderme Yolları

Sülfat redükte edici bakterilerin (SRB) fosil yakıtları kükürtten arındırdığı rapor edilmiştir (Kim et al., 1995; Lizama et al., 1995). *Desulfovibrio desulfuricans* M6 anaerobik olarak DBT'yi H₂S ve bifenile indirgeyebilmektedir (Kim et al., 1995). *Desulfomicrobium escambium* ve *Desulfovibrio longreachii*'nin, bifenilin son ürün olmadığı bir yolu izleyerek DBT'yi kükürtten arındırdığı rapor edilmiştir (García, 2010). Anaerobik koşullar altında termofilik karma bir kültür tarafından DBT'nin metabolize edildiği bildirilmiştir. (Bahrami et al., 2001). Petrolün anaerobik koşullar altında kükürtten arındırılması, havalandırmayla ilgili maliyetleri önlemekte ve kükürtün gaz olarak serbest bırakılması avantajına sahip olmaktadır. Bununla birlikte, düşük reaksiyon hızı, güvenlik ve maliyet endişeleri nedeniyle anaerobik BDS şu anda yeterince geliştirilememiştir (Gupta et al., 2005).

2.8.2. Aerobik Kükürt Giderme Yolları

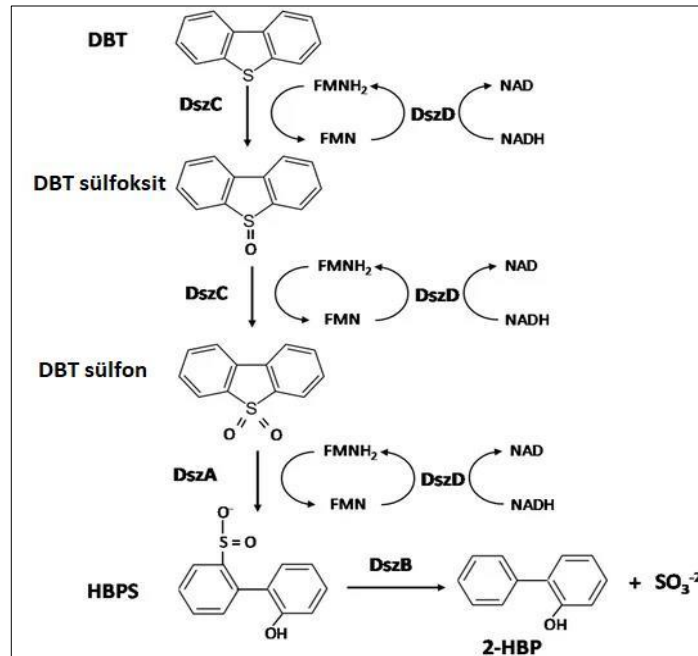
4S yolu DBT'nin kükürtten arındırıldığı ve substratın karbon iskeletinin bozulmadan salındığı kükürde özgü bir yoldur (Şekil 2.1) (Prasoulas et al., 2021). Petrol ürünlerinin kalorik değerinde neredeyse hiç azalma olamamaktadır. 4S yolu enerji açısından yüksek enerjili bir yoldur çünkü karbon iskeleti enerjinin geri kazanımı için mineralize edilmemektedir. Yol üç aşamaya ayrılmaktadır et al., 1998);

- Kükürt parçasının oksidasyonu ile bölünme için tiyofen halkasının aktivasyonu
- Aromatik bir sülfonat verecek şekilde tiyofen halkasının bölünmesi

- Sülfonat gurubunun çıkarılması.

Bu yolun kullanılması, üretim alanlarında ve rafinerilerde petrolün kükürtten arındırılması için önerilmektedir.

DBT'yi 4S yolunun ara ürünlerine çevirebilen veya bu yolu kısmen kullanabilen bakteriler rapor edilmiştir (Marzona et al., 1997). Bazı termofilik *Mycobacterium* suşlarında genişletilmiş bir 4S yolu da rapor edilmiştir. Bu yolda 4S yolunun son ürünü olan 2-HBP, 2-metoksibifenil (2-MBP) ve metoksiler tespit edilmiştir (Chen et al., 2009; Li et al., 2003; Xu et al., 2006). Son zamanlarda, izole edilen iki termofilik *Paenibacillus* suşu (32O-Y ve 32O-W) DBT'nin kükürt giderme çalışmalarında ve 4S yolunun bir ara ürünü olan dibenzotiyofen sülfonun (DBTS) çalışmalarında kullanılmıştır (Sar et al., 2021; Wang et al., 2015). 32O-Y suşu, 4S yolu aracılığıyla DBT'yi kükürtten arındırabildiği ve 32O-W, DBTS'yi metabolize etmesine izin veren kısmi bir 4S kükürt giderme yolunu kodladığı rapor edilmiştir. 32O-Y suşu 32O-W suşu ile birlikte kültürlendiğinde DBT metabolizmasını arttırdığı ve iki suşun DBT'yi sinerjik bir şekilde metabolize ettiği görülmüştür (Sar et al., 2021).



Şekil 2.1: DBT ve türevlerinin mikrobiyal kükürt gideriminde kullanılan 4S yolağı.

2.9. Biyodesülfürizasyonun Arttırılması için Kullanılan Biyoteknolojik Yöntemler

2.9.1. İmmobilizasyon

Tüm hücre (Caro et al., 2007; Tao et al., 2006) veya enzimler kullanılarak BDS üzerinde daha önce birçok çalışma yapılmıştır. Enzim kullanımının pahalı enzim ekstraksiyonu ve enzimin sürekli kofaktörlere ihtiyaç duyması gibi dezavantajları vardır (Sheldon, 2007). Bu nedenle çoğu durumda BDS'de enzimler yerine tüm hücreler kullanılır. Bununla birlikte, tüm hücrelerin kullanımı da sınırlıdır. Örneğin, BDS'de serbest hücrelerin kullanılması, yağın hücrelerle karışımına yol açar ve hücrelerin ayrılmasının santrifüj gerektirdiği, yüksek maliyetli bir hücre süspansiyonu oluşur. Ayrıca ürünlerin hücre kontaminasyonu olasılığı vardır (Guo et al., 2006). İmmobilizasyonun serbest hücre kullanımına göre, stabilitenin artması, hücrelerin kolay ayrılması, ürünün hücre kontaminasyonunun en aza indirilmesi veya ortadan kaldırılması ve hücrelerin sürekli olarak kullanılmasını sağlayan kolay geri kazanılması ve yeniden kullanılması gibi bazı avantajları bulunmaktadır (Sheldon, 2007).

Yukarıda bahsedilen sorunları çözebilen hücre immobilizasyonu, son zamanlarda geniş çapta çalışılmakta ve uygulanmaktadır ve BDS araştırmalarının odak noktası haline gelmektedir. Naito et al., (2001) uygun bir jel materyali olarak ENT-4000'i seçmişler ve kükürttten arındırılmış yağın geri kazanılmasını ve yeniden etkinleştirme ile uzun süreler boyunca biyokatalizörün tekrar tekrar kullanılmasını kolaylaştıran iki fazlı bir BDS sistemi (immobilize edilmiş hücreler ve yağ) oluşturmayı başarmışlardır (Peng and Wen, 2010). Shan et al. (2005) DBT kükürt giderici bakteri *Pseudomonas delafieldii* R-8'i immobilize etmek için manyetik polivinil alkolü kullanmış ve manyetik olarak immobilize edilmiş hücreler, DBT'yi verimli bir şekilde kükürttten arındırmak için kullanılabileceğini göstermişlerdir (G. bin Shan et al., 2005). Manyetik olmayan immobilize edilmiş hücrelerle karşılaştırıldığında, manyetik immobilize hücrelerin boncukları daha yüksek kükürt giderme reaksiyon aktivitesi gösterilmiştir (G.-B. Shan et al., 2003). Hou et al. (2005) tarafından sodyum aljinat boncuklarında tutulan immobilize edilmiş *Pseudomonas stutzeri* UP-1 hücreleri, model yakıtta ve sulu sistemde DBT'yi verimli

bir şekilde kükürtten arındırmak için kullanmışlardır. Sonuçlar, sodyum aljinatın uygun bir immobilizasyon malzemesi olduğunu ve immobilize edilmiş hücrelerin stabilitesi ve yaşam süresinin (yeniden etkinleştirme ile 600 saate ulaşan) immobilize edilmemiş hücrelerden çok daha iyi olduğunu göstermiştir (Hou et al., 2005).

2.9.2. Nanopartiküller ile Kaplama

Manyetik nanopartiküller, geniş yüzey/hacim oranları, süperparamanyetik özellikleri ve düşük toksisiteleri nedeniyle biyoteknoloji ve biyotıp alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Harici bir manyetik alan uygulanarak, manyetik nanopartiküllere bağlı malzemeler reaksiyon karışımından ayrılabilir (Berry and Curtis, 2003).

Son zamanlarda, manyetik bakteri hücre ayrımı, petrol türevli yakıtların mikrobiyal kükürtten arındırılması gibi endüstriyel uygulamalarla ilgilenmektedir. Bunun için bakteri hücreleri öncelikle manyetik nanopartiküller ile kaplanmaktadır; kükürt giderme reaksiyonu gerçekleştirildikten sonra, harici manyetik alan uygulanarak reaksiyon çözeltisinden izole edilmektedir (Safarik and Safarikova, 1999).

Biyoteknolojide manyetik ayırma teknolojisinin kullanılması, biyolojik sistemlere uygulanan geleneksel yöntemlerden daha uygun maliyetli, orta, basit ve daha hızlı bir ayırma yaklaşımı sağlamaktadır (Kvam and Haukanes, 1993). Bir biyodesülfürizasyon işleminde mikrobiyal biyokütleyi manyetik olarak ayırabilmek için hücrelerin manyetik nanopartikül kaplanması gerekir. Ardından, kaplanmış hücreler, harici bir manyetik alan uygulanarak yakıt/su bifazik sisteminden ayrılabilir (G. bin Shan et al., 2005). Daha önceki çalışmalarda, Ansari ve diğerleri, *R. erythropolis* IGTS8'in 40-50 nm boyut aralığında glisin ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküller ile kaplanmasını değerlendirmişlerdir. Bu bakteri hücrelerinin yüzeyinde manyetik nanopartiküllerin immobilizasyonunun kükürt giderme aktivitelerini arttırdığını göstermişlerdir (Ansari et al., 2009).

3. MATERİYAL ve METOT

3.1. Bakteri Suşları

Bu tez çalışmasında Prof. B. C. Stark (Illinois Teknoloji Enstitüsü, Şikago, IL, ABD) tarafından hediye edilen *Paenibacillus* 32O-Y ve 32O-W (Wang et al. 2015) suşları kullanıldı.

3.2. Kimyasallar, Büyüme Ortamı ve Kültür Koşulları

Bakteriyel suşlar kimyasal olarak tanımlanmış bir ortam (CDM) içerisinde büyütüldü (Wang et al., 2015). CDM'in hazırlanması için, fosfat tamponu (Na_2HPO_4 (86.6 g/L) ve KH_2PO_4 (52 g/L), 1 M), NH_4Cl (1 M), MgCl_2 (1 M), CaCl_2 (0.3 M), glikoz (1 M), ve maya özütü (50 g/L) çözeltileri hazırlandı ve bir otoklavda 121 °C 20 dk'da ayrı ayrı steril edildi. İmmobilize edilmiş suşlar, aljinat boncuklarının çözünmesini engellemek için fosfat tamponu yerine 8.6 g/L Na_2HPO_4 eklendi. İz element ve vitamin karışımı çözeltileri de ayrı ayrı hazırlandı ve 0.22 µm membran filtre kullanılarak sterilize edildi. Tüm çözeltiler daha önce tanımlandığı gibi (Wang et al., 2015) karıştırıldı ve steril distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Dibenzotiyofen (DBT, 98 %, Sigma-Aldrich, Almanya) ve dibenzotiyofen sülfon (DBTS, 97 %, Sigma-Aldrich, Almanya) kükürt bileşikler, etanol (99 %, v/v) içinde 40 mM stok çözeltiler halinde hazırlandı ve son konsantrasyonlar 0.1, 0.5, 1 ve 2 mM olacak şekilde CDM'e ilave edildi.

3.3. Ön Kültürlerin Hazırlanması

Bakteriyel suşların ön kültürleri için, her bir suştan bir veya iki koloninin çeşitli konsantrasyonlarda DBT veya DBTS içeren 20 ml (immobilize hücreler için) veya 100 ml (nanopartikül kaplı hücreler için) CDM içeren 100 ml'lik erlenlere inokülasyonu ile hazırlandı. Bu kültürler 40 °C 250 rpm'de gece boyu büyütüldü.

3.4. DBT ve DBTS'nin İmmobilize Edilmiş Suşlar Tarafından Desülfürizasyonu

Sodyum aljinat, daha önce tanımlandığı gibi %6 (w/v) aljinat çözeltisi oluşturacak şekilde distile su ile karıştırıldı (Sar vd., 2017). Bütün ön kültürlerin OD_{600nm} değerleri NaCl (%0.9 w/v) ile 0.6'ya ayarlandı, ardından 4000 g'de 15 dakika süre ile 4 °C'de santrifüjlendi. Peletler 20 ml NaCl (%0.9) çözeltisi ve 20 ml %6'lık sodyum aljinat çözeltisi (%3'lük bir son aljinat konsantrasyonu olacak şekilde (Sar vd., 2017a; Sar vd., 2017b) içinde tekrar çözüldü ve nazıkçe vortekslendi. Daha sonra 250 ml steril 1 M CaCl₂ çözeltisinin içine bir şırınga (3P 21G 0.80 x 38 mm) kullanılarak damlatıldı ve oda sıcaklığında 30 dk boyunca sürekli olarak karıştırıldı. Bu karışımın yaklaşık 1 ml'si, bir beher içerisinde NaCl (%0.9) solüsyonu ile durulanan 40 aljinat boncuğu yapmak için kullanıldı. Boncukların ortalama çapı 3 mm'ydı. Boncuklar üretilir üretilmez kullanıldı. Boncukların morfolojisi hem ışık mikroskobu (Zeiss, Oberkochen, Almanya) hem de taramalı elektron mikroskobu (SEM, Phillips XL30 SFEG, Burladingen, Almanya) kullanılarak belirlendi.

Her immobilize hücre kültürü 0.03'lük bir son OD_{600nm} değeri (serbest hücreler ile yapılan önceki çalışmalar ile aynı (Sar vd., 2021)) verecek şekilde 100 ml'lik bir erlen içindeki 20 ml CDM ortamına 40 boncuğun (daha önce belirtilen şekilde (Sar vd., 2021) hazırlandı) eklenmesi ile hazırlandı. Bu kültürler 40 °C 250 rpm'de 96 saat boyunca inkübe edildi.

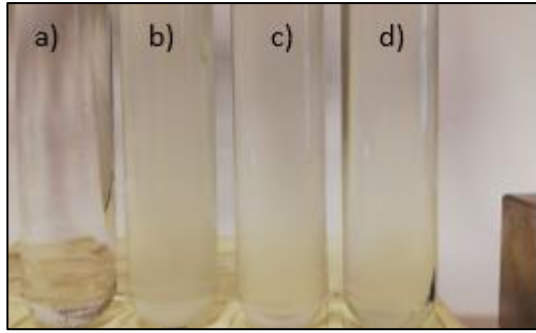
3.5. DBT ve DBTS'nin Nanopartikül Kaplı Suşlar Tarafından Desülfürizasyonu

Manyetik Fe₃O₄ nanopartiküller (20-40 nm; Nanografi Co., Ankara, Türkiye) suşların kaplanması için kullanıldı. Bakteri suşlarının Fe₃O₄ nanopartikülleri ile kaplanması için 0.1 mM DBT veya DBTS içeren CDM içinde büyüyen ön kültürler hazırlandı ve OD_{600nm} değerleri 0.03'e ayarlandı.

Su içinde 100 µg/ml Fe₃O₄ nanopartikül içeren stok süspansiyonun 10 ml'si hücre süspansiyonunun 100 ml'si ile karıştırıldı ve 9 µg/ml'lik nihai bir nanopartikül konsantrasyonu elde edildi. Bu karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında bırakıldı. Manyetik nanopartikül kaplı bakteriler bir mıknatıs (50 mm x 50 mm x 25 mm) kullanılarak bu süspansiyondan toplandı ve daha sonra belirli DBT veya DBTS

konsantasyonlarına karşılık gelen 100 ml taze CDM içinde kültürlendi. İnkübasyon 40 °C 250 rpm’de 96 saat süre ile gerçekleştirildi (Şekil 3.1). Nanopartikül kaplı hücreler daha önce yukarıda immobilize hücreler için tarif edildiği gibi SEM ile görüntülendi.

İmmobilize ve nanopartikül kaplı kültürlerin OD_{600nm} değerleri, ilgili ortamın besi ortamına karşı kültürün OD_{600nm}’si ölçülerek belirlendi. Ölçülen OD’ler gerektiğinde taze ortam ile seyreltilerek 0.6’nın altında tutuldu ve gerçek OD değerleri seyreltme faktörleri kullanılarak hesaplandı.

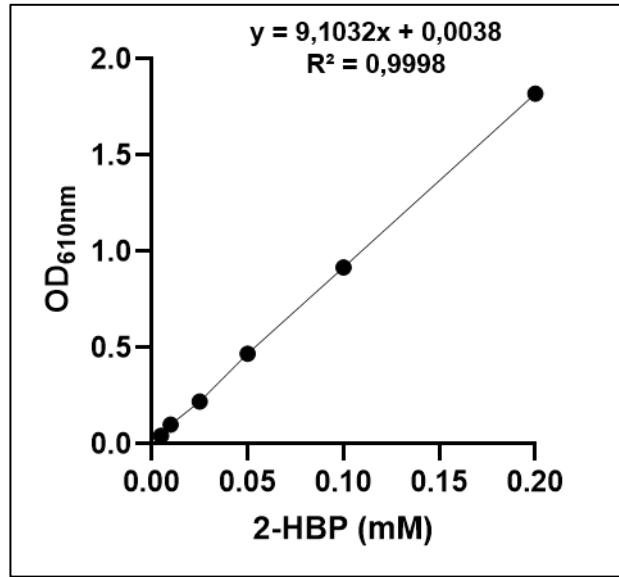


Şekil 3.1: Nanopartiküller (10 µg/mL) ile kaplanan bakteri suşlarının CDM besiyerinden bir mıknatıs ile toplanması a) nanopartikül içeren CDM besiyeri b) nanopartikül ile kaplanan hücre kültürü, c) nanopartikül içermeyen hücre kültürü ve d) nanopartiküller ile kaplı hücrelerin bir mıknatıs yardımı ile tüp kenarında toplanması.

3.6. 2-HBP Miktarının Belirlenmesi

2-HBP miktarı daha önce tarif edildiği gibi Gibbs deneyi kullanılarak belirlendi (Oldfield et al., 1997). Suşlar yukarıda tarif edildiği gibi büyütüldü ve kültür örnekleri 3000 g 4 °C koşullarında 10 dakika süre ile santrifüjlendi. Süpernatantlar yeni bir tüpe aktarıldı ve Na₂CO₃ (10 %, w/v) ile pH değerleri 8.0’a ayarlandı. Her süpernatantın 150 µl’si, 96 kuyucuklu mikrotitre plakasının bir kuyucuğuna yüklendi. Gibbs deneyi, 30 dk içinde mavi bir ürün üretmek için 2-HBP’nin hidroksil grubuyla bir reaksiyon veren Gibbs reaktifinin (2, 6-dicloroquinone-4-chloroimide) eklenmesiyle gerçekleştirildi. Kuyucuklarda mavi renk oluşumu 610 nm’de (BMG Labtech Fluostar Omega ELISA, Ortenberg, Almanya) spektrofotometrik olarak ölçüldü. Standart çözeltiler 2-HBP’nin (%99, Acros Organics, ABD) bilinen

konsantrasyonları kullanılarak hazırlandı ve kalibrasyon grafiği her süpernatant içerisindeki 2-HBP miktarının belirlenmesi için çizildi (Şekil 3.2).

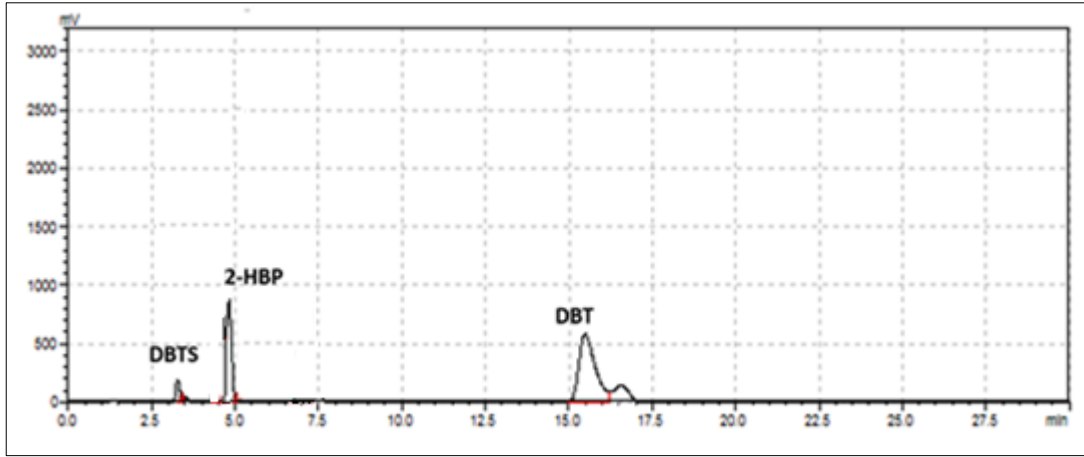


Şekil 3.2: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standart 2-HBP değerlerine göre Gibbs deneyi sonrası ölçülen OD_{610nm} absorbans değerleri ile çizilen kalibrasyon eğrisi.

3.7. HPLC Analizi

DBT ve DBTS konsantrasyonları HPLC analizi ile belirlendi. Kültür örnekleri 3000 g 4 °C koşullarında 10 dakika süre ile santrifüjlendi ve süpernatantlar yeni tüplere aktarıldı. DBT, HPLC analizinden önce süpernatantlardan ekstrakte edildi. Bunun için, her süpernatantın 5 ml'sinin pH değeri 6 mM HCl eklenerek 2.0'a ayarlandı ve 4 ml etil asetat (99.8 %, Sigma-Aldrich, Almanya) eklendi. Karışım, oda sıcaklığında 5 dk tutuldu. Üst faz 0.22 µm membran filtre ile filtre edildi ve HPLC analizi için kullanıldı (Ismail vd., 2016).

HPLC analizi bir Shimadzu 10A HPLC sistemi (Shimadzu, Colombia, MD, ABD) ile gerçekleştirildi. Ölçümler bir UV dedektör ve C18 kolon (5 µm, 4.6 x 250 mm, GL Sciences Inc., Shinjuku, Tokyo, Japonya) kullanılarak elde edildi. Enjeksiyon hacmi 20 µl idi ve mobil faz (asetonitril:su, 60:40) 1 ml/dk akış oranı ile pompalandı. Kükürt bileşiklerinin tespiti için UV 254 nm dalga boyu kullanıldı. DBT ve DBTS'nin konsantrasyonları iki bileşik için hazırlanan standart grafikler kullanılarak pik alanlarına göre belirlendi.



Şekil 3.3: Farklı organik kükürt bileşiklerinin (DBT ve DBTS) ve bu kükürt bileşiklerinin desülfürizasyonları ile açığa çıkan 2-HBP oluşumunun HPLC analizleri ile belirlenmesi.

3.8. Suşların Kükürtlü Bileşikleri Dönüştürme Etkinlikleri

Suşların DBT ve DBTS'ü 2-HBP'e dönüştürme etkinlikleri (CE) aşağıda ifade edilen denklem ile belirlendi:

$$CE (\%) = (H / D) \times 100 \quad 3.1$$

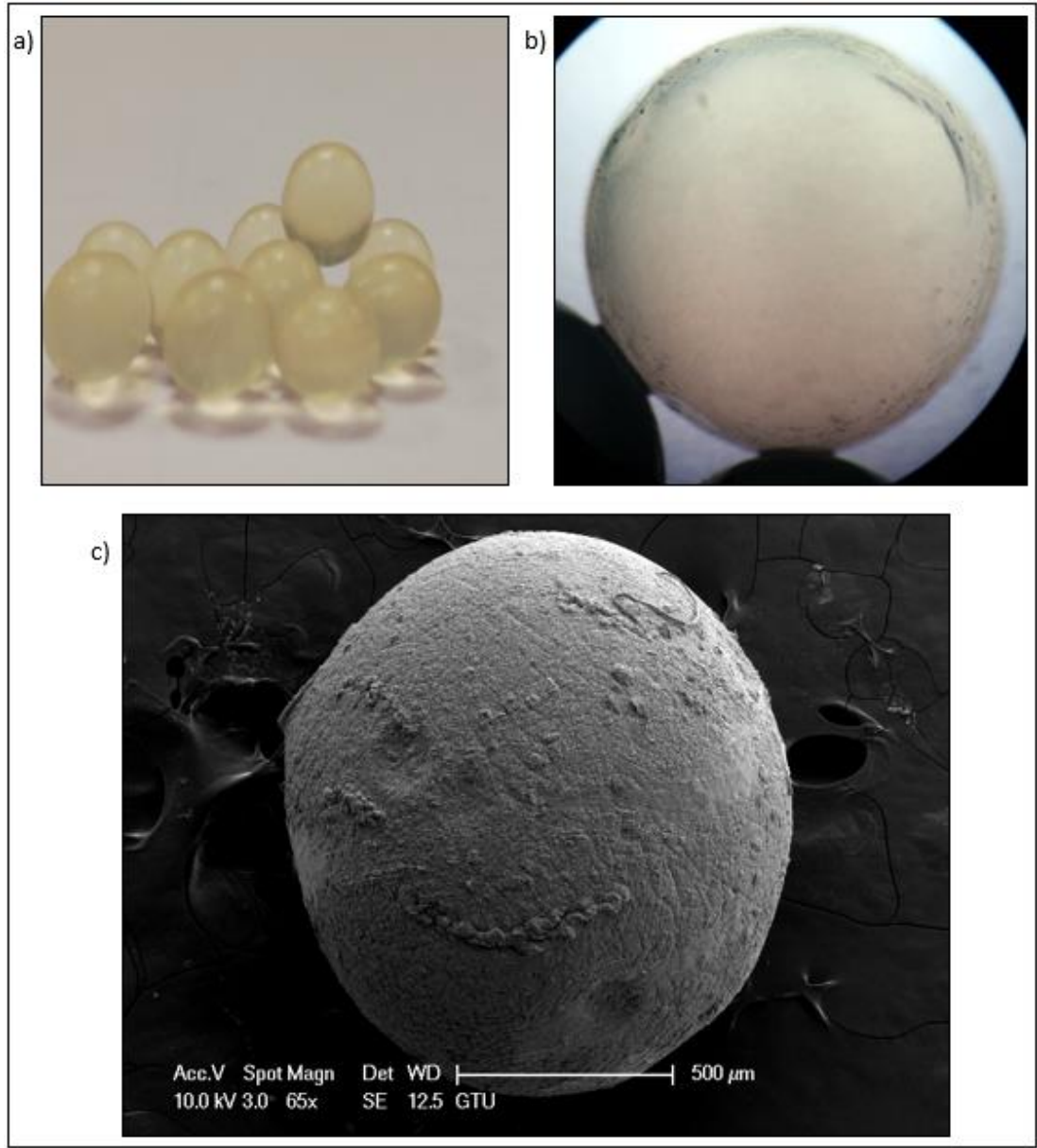
H, 24, 48, 72 ve 96 saatlik inkübasyondan sonra 2-HBP (mM) konsantrasyonları ve D, başlangıç DBT ve DBTS konsantrasyonlarıdır (mM).

4. SONUÇLAR

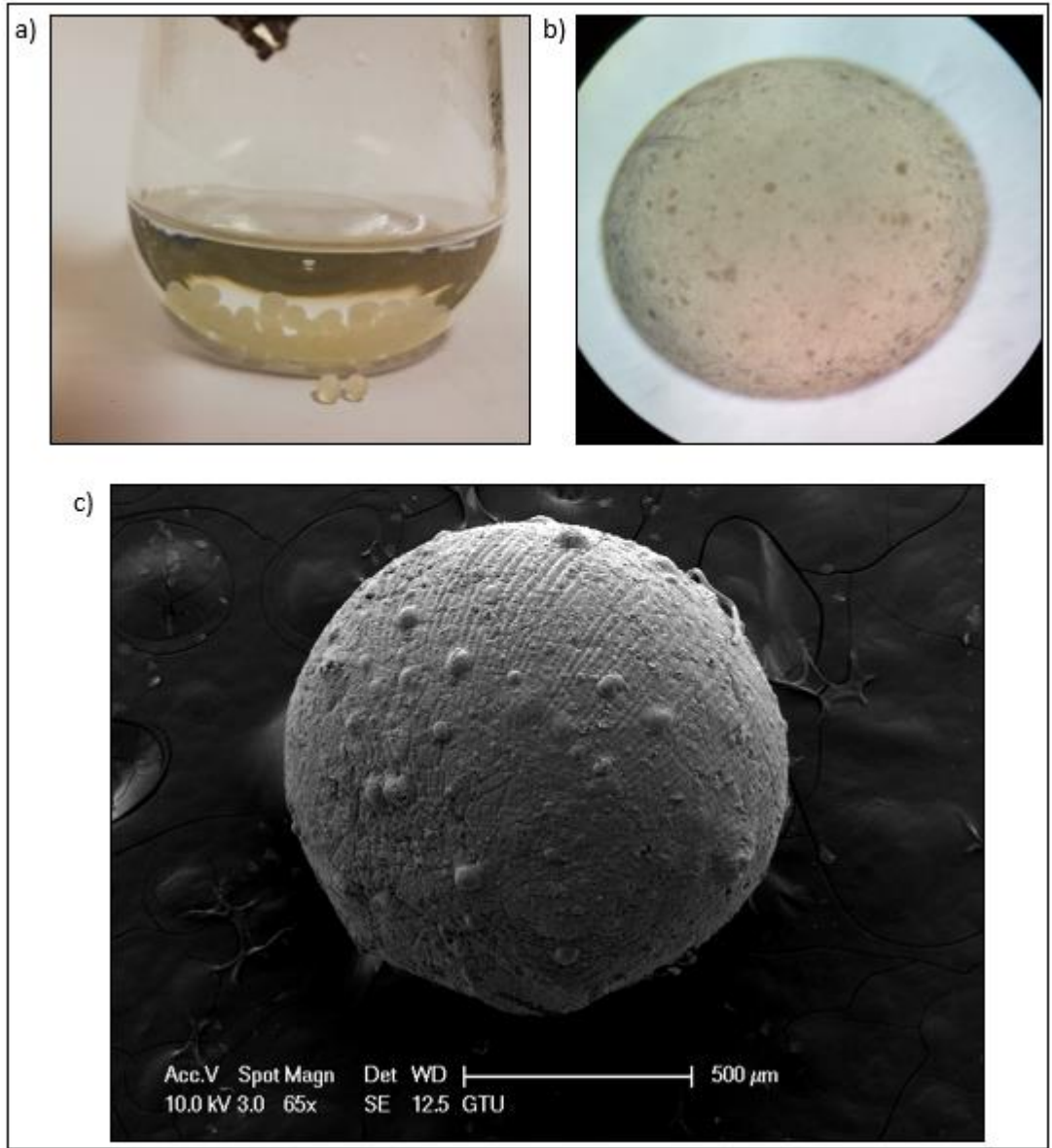
Bu tez çalışmasında, *Paenibacillus* 32O-Y ve 32O-W (Sar vd., 2021) suşları kullanılarak DBT ve DBTS desülfürizasyonunun hücrelerin immobilizasyonu veya Fe₃O₄ nanopartikülleri ile kaplanması yoluyla arttırılması daha önceden serbest hücreler ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılarak araştırıldı.

4.1. Suşların İmmobilizasyonu ve Nanopartiküller ile Kaplanması

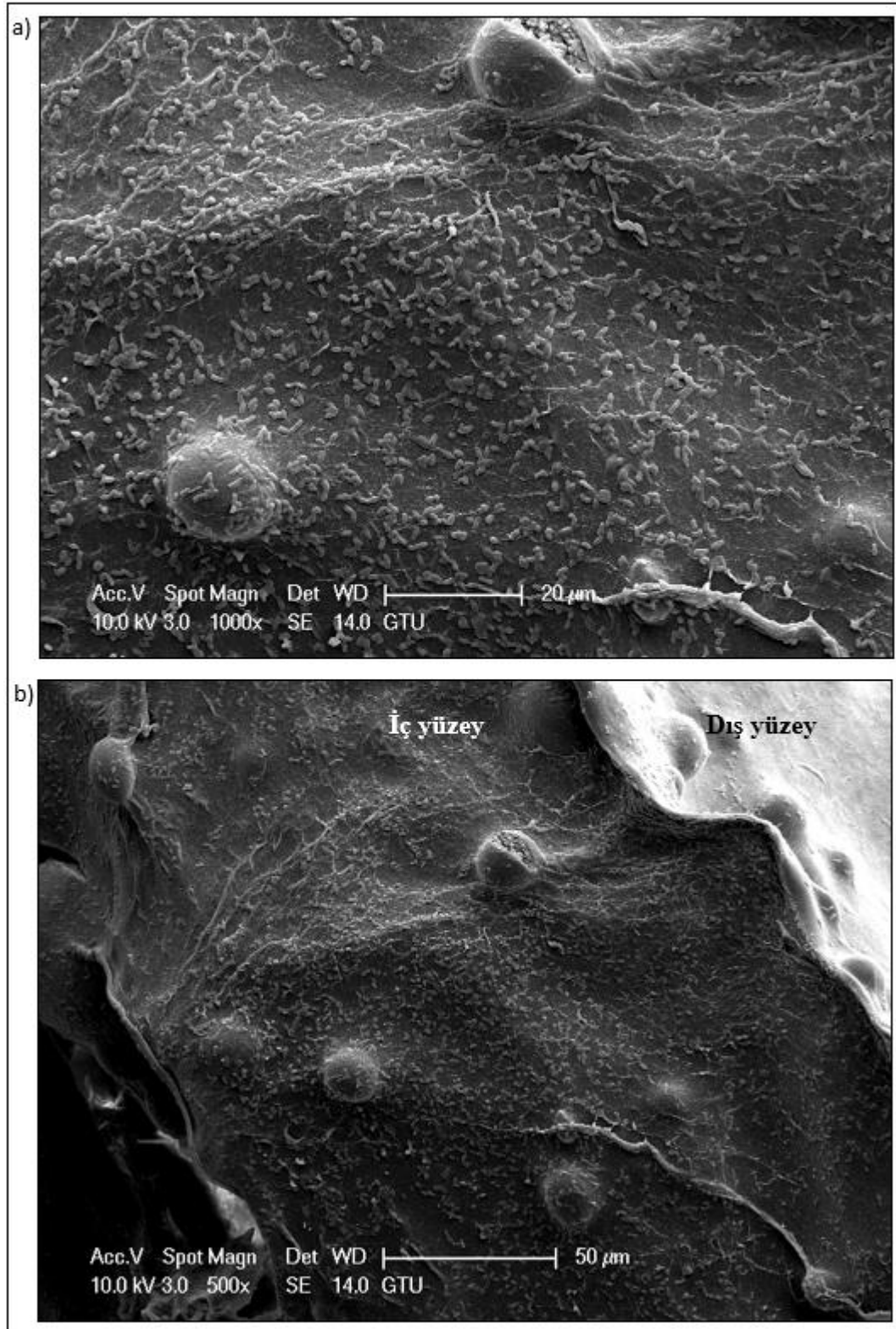
Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve ışık mikroskobu görüntülerinde de görüldüğü gibi, %3'lük bir aljinat konsantrasyonu ile küresel ve sert boncuklar elde edildi (Şekil 4.1). Farklı büyüme ortamlarında 96 saatlik inkübasyon sonrasında da küresel ve sert boncuklar yapılarını korumaya devam etti (Şekil 4.2). Ayrıca Şekil 4.3'te gösterildiği üzere aljinat boncuklar bakteri suşlarının gelişimine herhangi bir inhibe edici etki göstermedi. Böylece %3 aljinatın, verimli desülfürizasyon için kütle transferini destekleyecek şekilde hücreleri immobilize etmek için uygun bir konsantrasyon olduğu görüldü (Klein et al., 1983; Derikvand and Etemadifar, 2014).



Şekil 4.1: Oluşturulan küresel aljinat boncuklarının inkübasyon öncesi a) yakın çekim, b) ışık mikroskobu ve c) SEM görüntüleri.

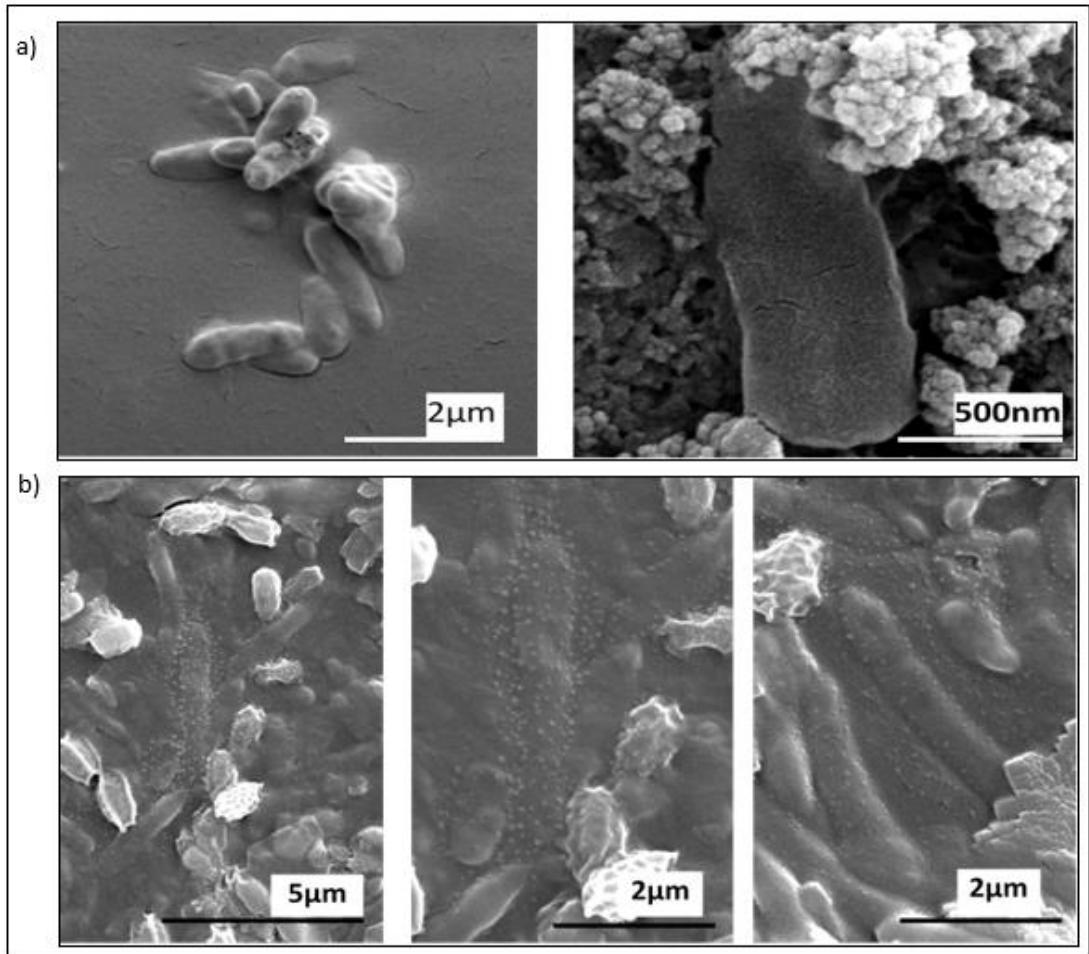


Şekil 4.2: Aljinat ile immobilize edilmiş *Paenibacillus* 32O-Y suşunun 0.5 mM DBTS içeren CDM besiyerinde 96 saatlik inkübasyonu sonrası a) besiyeri ortamındaki, b) ışık mikroskobu ve c) SEM görüntüleri.

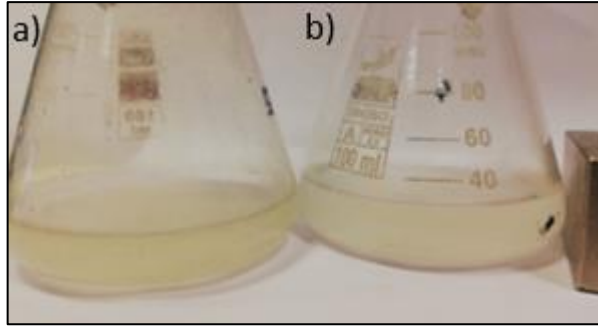


Şekil 4.3: Aljinat boncuk kesitlerinin elektron mikroskobu ile hücrelerin a) iç yüzey ve b) iç ve dış yüzeylerde görüntülenmesi.

Nanopartikül ilişkili hücreler için Fe_3O_4 nanopartikülün (0.01 g) adsorbe edilen kütlesinin, hücre biyokütlesine (0.06 g) oranı, başlangıçtan 96 saatlik inkübasyon sonuna kadar sabit kalmıştır (Şekil 4.4). Nanopartikül kaplı hücrelerin bir mıknatıs kullanarak etkin bir şekilde toplanabilmesi, onların tekrar kullanılabilceğini göstermiştir (Şekil 4.5). Ön deneyler, nanopartiküller ile kaplamanın kültürlerin $\text{OD}_{600\text{nm}}$ ölçümlerine önemli bir katkı sağlamadığını ve kendi başlarına besiyerindeki DBT veya DBTS konsantrasyonlarını etkilemediğini gösterdi. Buna ek olarak, aljinat boncuklar, örnekler alınmadan önce erlenlerin alt kısmında toplandığı için OD ölçümlerini etkilemedi.



Şekil 4.4: Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller ile kaplanan 32O-Y hücrelerinin a) inkübasyon öncesi ve b) 0.5 mM DBTS içeren CDM besiyerinde 96 saatlik inkübasyon sonrası görüntüleri.



Şekil 4.5: 0.5 mM DBTS içeren CDM besiyerinde 96 saat 250 rpm hızında inkübe edilen a) Serbest 32O-Y suşu kültürü ve b) Nanopartiküllerle kaplanmış 32O-Y suşu kültürü ve bir mıknatıs ile nanopartiküllerle kaplı hücrelerin toplanması.

4.2. DBT Desülfürizasyonu

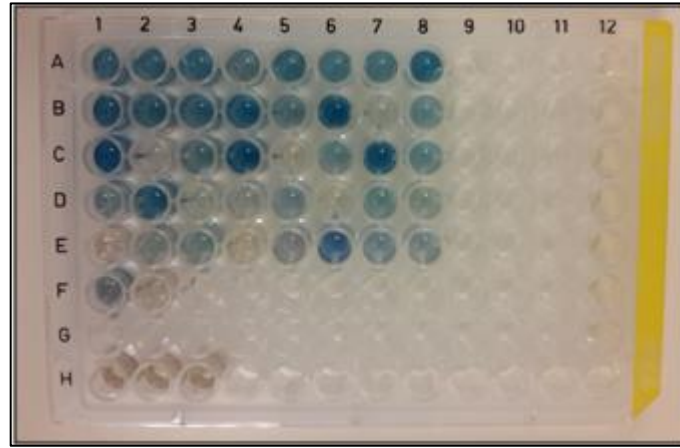
Kullanılan dört farklı DBT konsantrasyonunun hepsi için ulaşılan en yüksek OD_{600nm} değerleri incelendiğinde, immobilize 32O-Y suşunun hücre büyümesinin, serbest hücrelerden daha (yaklaşık %40 kadar) düşük olduğu (Sar vd., 2021) ve serbest hücrelerde olduğu gibi, dört DBT konsantrasyonunda da maksimum OD_{600nm} değerine 72. saatte ulaşıldığı belirlendi (Şekil 4.7.a; Şekil 4.8.a).

Nanopartiküller ile kaplı 32O-Y suşu ile elde edilen en yüksek OD_{600nm} değerleri serbest hücreler ile benzer (Sar vd., 2021) ve immobilize hücrelerden yaklaşık %25 daha fazla olarak tespit edildi. Ayrıca nanopartiküller ile kaplanan suşların OD_{600nm} değerleri 48 saatte maksimuma ulaşması ve daha sonra hızlıca azalması bakımından serbest ve immobilize hücrelerden farklı bir büyüme profili izlemiş olduğu görüldü (Şekil 4.7.a; Şekil 4.8.a).

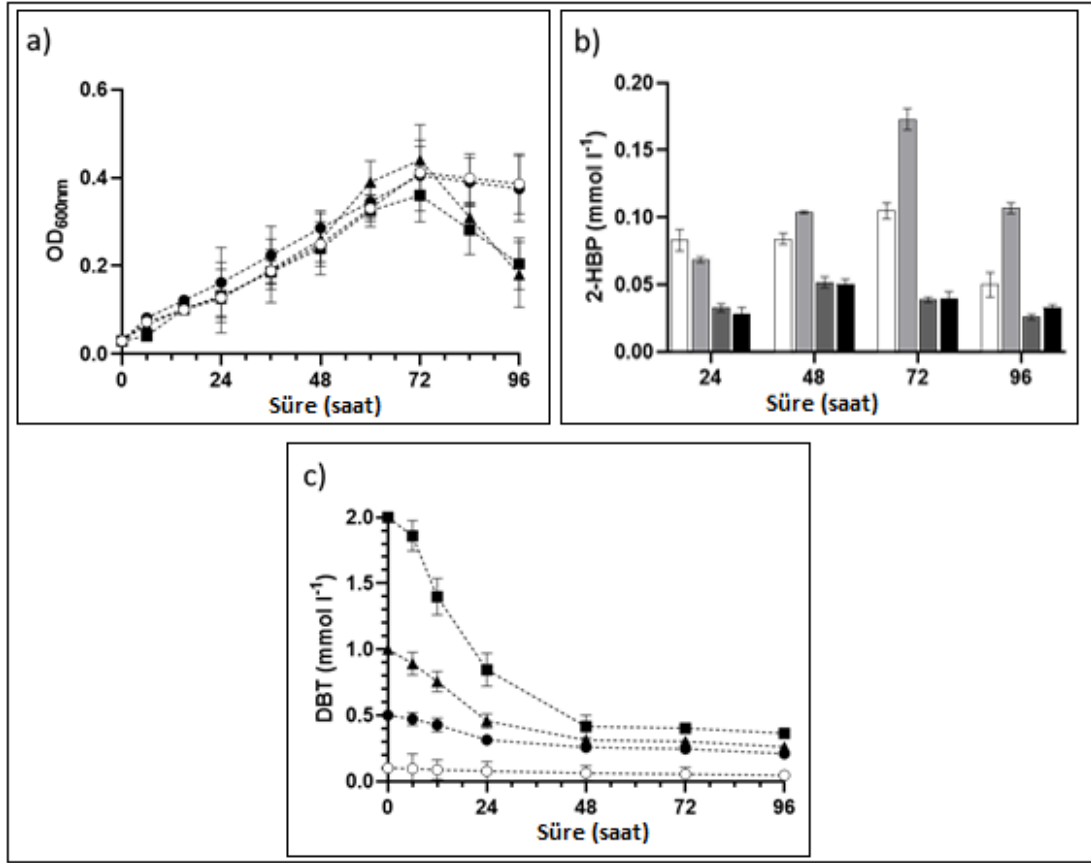
0.1 mM ve 0.5 mM başlangıç DBT konsantrasyonlarının her ikisi için de en yüksek 2-HBP üretim değerlerinin serbest hücreler ile karşılaştırıldığında hem immobilize hücreler (0.1 mM'da %29; 0.5 mM'da %54) hem de nanopartikül kaplı hücreler (0.1 mM'da %38; 0.5 mM'da %44) için arttırıldığı belirlendi (Sar vd., 2021) (Şekil 4.7.b; Şekil 4.8.b; Tablo 4.1). Serbest hücrelerde olduğu gibi, 2-HBP'nin en yüksek miktarı 0.5 mM DBT konsantrasyonunda (yaklaşık %30 dönüşüm oranı ile) üretildi ve DBT'nin 2-HBP'ye (aslında %100) en yüksek dönüşüm oranı 0.1 mM DBT konsantrasyonu için gerçekleşti (Şekil 4.7.b; Şekil 4.8.b; Tablo 4.2).

İmmobilize hücreler için 0.1 mM ve 0.5 mM başlangıç DBT konsantrasyonlarının ikisinde de DBT miktarındaki azalış ve 2-HBP'nin artışı arasında stokiometrik bir ilişki görüldü. Ancak 1 mM ve 2 mM DBT'nin tüketilmesi

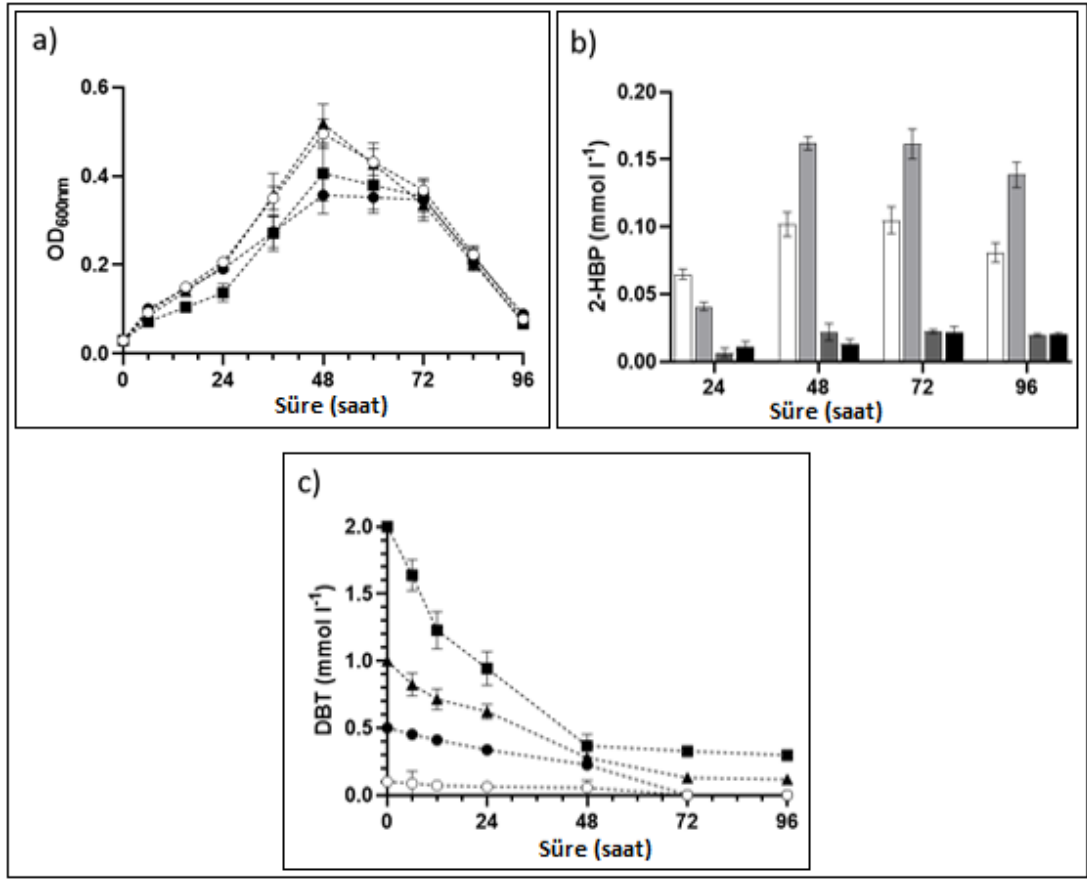
ve üretilen 2-HBP miktarları arasında bu ilişki görülmedi. Benzer durum, nanopartiküller ile kaplı hücreler için görülmesine rağmen 0.5 mM başlangıç DBT konsantrasyonunda DBT'nin tüketimi ve 2-HBP oluşumu arasında bir stokiyometri belirlenmedi (Şekil 4.7.c; Şekil 4.8.c). 2-HBP miktarının belirlenmesinde kullanılan yöntemdeki renk değişimleri örnek bir görsel ile Şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6: İmmobilize ve nanopartiküller ile kaplanmış 32O-Y suşunun farklı konsantrasyonlarda DBT içeren CDM besiyerinde 40°C sıcaklıkta 250 rpm çalkalama hızında 24-72 saatlik inkübasyonları sonunda oluşan 2-HBP miktarlarının Gibss deneyi ile 610 nm'de 96 kuyulu mikrolakalarda belirlenmesi.



Şekil 4.7: Aljinat ile immobilize edilmiş 32O-Y suşunun farklı DBT konsantrasyonlarında ve 96 saatlik inkübasyonları sonrası a) OD_{600nm} değerleri, b) 2-HBP dönüşüm miktarları ve c) besiyerinde kalan DBT miktarları. Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. (-○-) 0.1 mM, (-●-) 0.5 mM, (-▲-) 1 mM, (-■-) 2 mM. (□) 0.1 mM; (■) 0.5 mM; (■) 1 mM; (■) 2 mM.



Şekil 4.8: Fe₃O₄ nanopartikülleri ile kaplanmış 32O-Y suşunun farklı DBT konsantrasyonlarında ve 96 saatlik inkübasyonları sonrası a) OD_{600nm} değerleri, b) 2-HBP dönüşüm miktarları ve c) besiyerinde kalan DBT miktarları. Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. (-○-) 0.1 mM, (-●-) 0.5 mM, (-▲-) 1 mM, (-■-) 2 mM. (□) 0.1 mM; (■) 0.5 mM; (■) 1 mM; (■) 2 mM.

Tablo 4.1: İmmobilize edilmiş veya nanopartikül ile kaplanmış 32O-Y suşu tarafından 0.1 ve 0.5 mM başlangıç DBT’de üretilen maksimum 2-HBP'nin (%) serbest hücreler ile karşılaştırılması.

Suş	Konsantrasyon (mM)	Maksimum 2-HBP artış oranları (%)	
		İmmobilizasyon	Nanopartiküller ile kaplama
32O-Y	0.1	29	38
	0.5	54	44

Tablo 4.2: İmmobilize edilmiş veya nanopartiküller ile kaplanmış 32O-Y suşu ile 0.1 ve 0.5 mM DBT konsantrasyonlarının 24-96 saatlik inkübasyonları sonunda 2-HBP’e dönüşüm oranları (%). Değerler, üç bağımsız deneyin ortalamalarıdır (parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir).

Suşlar	DBT (mM)	2-HBP dönüşüm oranları (%)							
		İmmobilizasyon				Nanopartiküller ile kaplama			
		Süre (saat)				Süre (saat)			
		24	48	72	96	24	48	72	96
32O-Y	0.1	83	84	105	50	65	102	105	81
		(1.7)	(1.4)	(1.2)	(0.9)	(1.4)	(2.3)	(2.9)	(2.1)
	0.5	13	21	34	21	8	32	32	28
		(1.1)	(0.8)	(1.1)	(1.3)	(0.9)	(0.8)	(1.6)	(1.8)

4.3. DBTS Desülfürizasyonu

32O-Y ve 32O-W suşlarının ikisinde de farklı konsantrasyonlarda DBTS içeren ortamlarda immobilize edilmiş ve nanopartiküller ile kaplanmış hücreler için DBT içeren besiyerindeki gözlenen değerlere benzer değerler tespit edildi (Şekil 4.9; Şekil 4.10). Hem immobilize edilen hem de nanopartiküller ile kaplı her iki suş için belirlenen maksimum OD_{600nm} değerlerinin, serbest suşlar ile elde edilenlerden 2-3 kat daha düşük olduğu görüldü (Sar vd., 2021) (Şekil 4.9; Şekil 4.10).

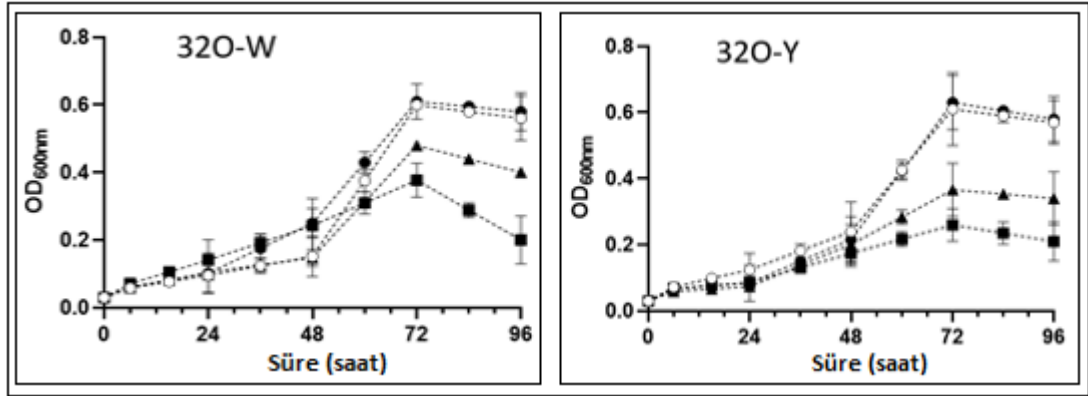
Farklı konsantrasyonlarda DBT içeren besiyerinde görüldüğü gibi, 0.1 mM başlangıç DBTS konsantrasyonunda da 2-HBP’e %100 dönüşüm verimliliği elde edildi. Bu verimin 0.5 mM konsantrasyonunda oldukça azaldığı ve daha sonra 1 ve 2 mM DBTS konsantrasyonlarında neredeyse sıfıra düştüğü görüldü. Benzer durum daha önceki çalışmada serbest hücrelerle ve bu çalışmada da DBT varlığında görüldü (Şekil 4.11; Şekil 4.12; Tablo 4.3). 0.1 mM ve 0.5 mM DBTS konsantrasyonlarında, serbest suşlar ile elde edilenlerden immobilize edilen 32O-W suşu ile 0.1 mM

konsantrasyonunda %90 ve 32O-Y suşu ile 0.1 mM ve 0.5 mM konsantrasyonlarında %35 ve %20 daha fazla 2-HBP oluşumları belirlendi (Tablo 4.4). Serbest suşlar ile karşılaştırıldığında, nanopartiküller ile kaplı 32O-W suşu ile 0.1 ve 0.5 mM başlangıç DBTS konsantrasyonlarında, en fazla 2-HBP oluşumlarının sırasıyla, %66 ve %65 ve 32O-Y suşu ile %15 ve %42 daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.11; Şekil 4.12; Tablo 4.4).

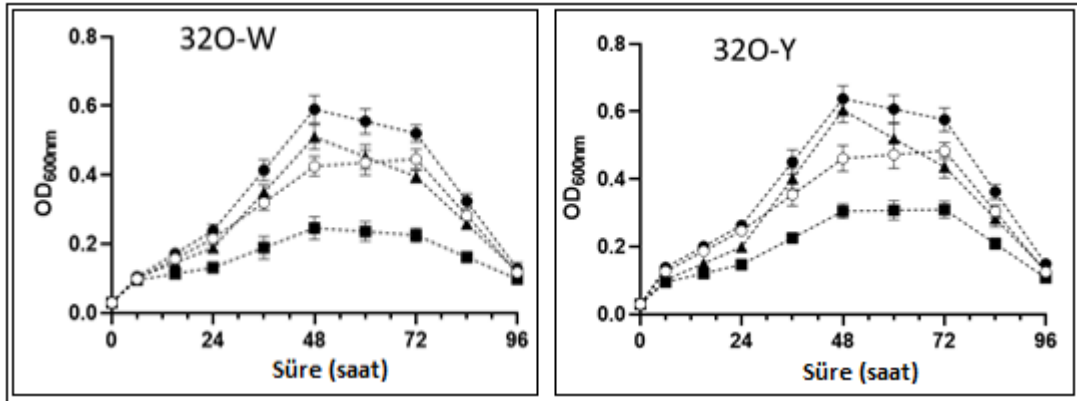
DBTS tüketiminin serbest hücrelerinkine ve bu çalışmada DBT tüketimine benzer olduğu görüldü (Sar et al., 2021). 0.1 mM DBTS konsantrasyonu haricinde, DBTS'un giderimi ile 2-HBP'nin oluşumu arasında stokiometrik bir ilişki görülmedi (Şekil 4.11; Şekil 4.12; Şekil 4.13; Şekil 4.14).

Tablo 4.3: Aljinat ile immobilize edilmiş ve nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşları ile 0.1 ve 0.5 mM DBTS konsantrasyonlarının 24-96 saatlik inkübasyonlar sonunda 2-HBP'e dönüşüm oranları (%). Değerler en az üç bağımsız tekrar deneylerinin ortalamalarıdır (parantez içindeki değerler standart sapmaları göstermektedir).

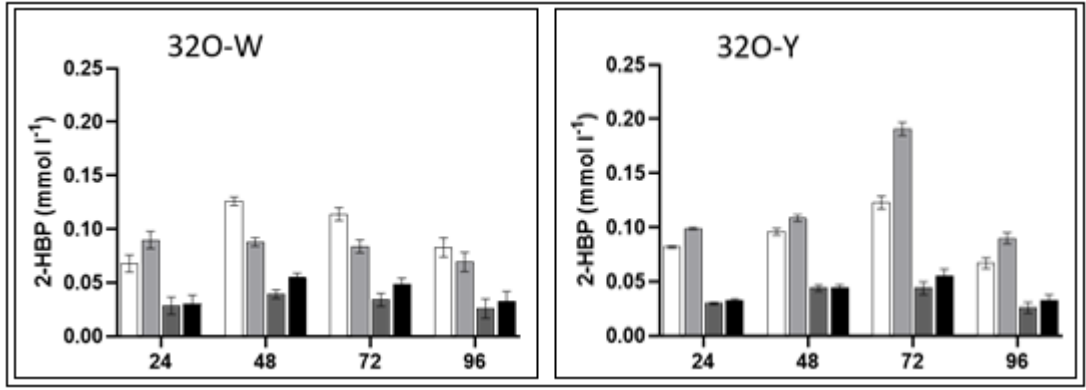
2-HBP dönüşüm oranları (%)									
		İmmobilizasyon				Nanopartiküller ile kaplama			
Suşlar	DBT (mM)	Süre (saat)				Süre (saat)			
		24	48	72	96	24	48	72	96
32O-W	0.1	68	126	114	83	110	109	108	93
		(1.2)	(1.5)	(1.4)	(0.9)	(2.5)	(2.0)	(1.4)	(1.2)
	0.5	18	18	17	14	20	46	36	15
		(0.6)	(0.8)	(1.1)	(0.7)	(1.3)	(2.4)	(1.1)	(1.2)
320-Y	0.1	82	96	123	67	91	105	96	76
		(1.6)	(0.5)	(1.1)	(1.2)	(2.2)	(2.4)	(1.5)	(1.1)
	0.5	20	22	38	18	12	33	45	37
		(1.1)	(1.2)	(0.8)	(0.8)	(2.4)	(1.41)	(1.0)	(0.4)



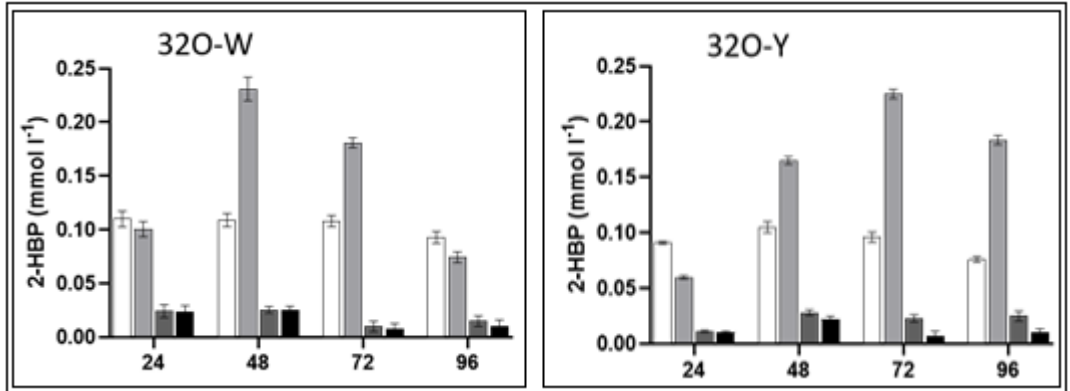
Şekil 4.9: Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonları varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen immobilize edilmiş 32O-W ve 32O-Y suşlarının, OD_{600nm} değerleri. Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. (-○-) 0.1 mM, (-●-) 0.5 mM, (-▲-) 1 mM, (-■-) 2 mM.



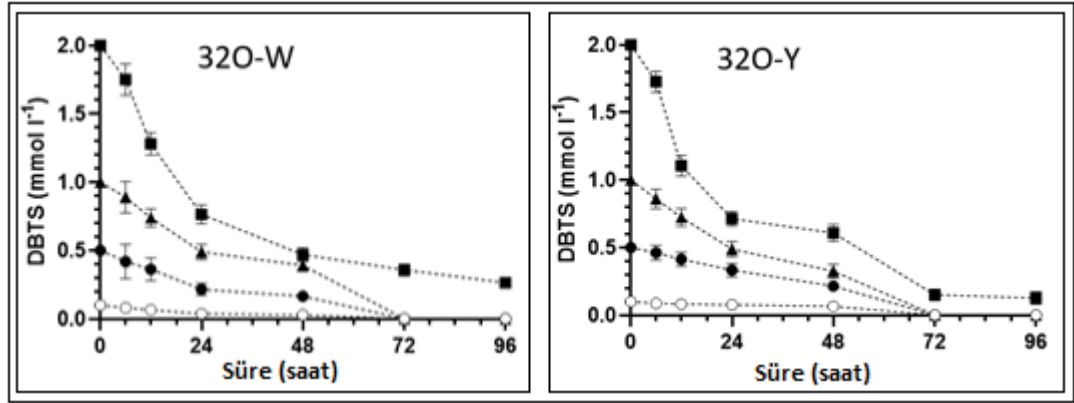
Şekil 4.10: Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen Fe₃O₄ nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşlarının OD_{600nm} değerleri. Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. (-○-) 0.1 mM, (-●-) 0.5 mM, (-▲-) 1 mM, (-■-) 2 mM.



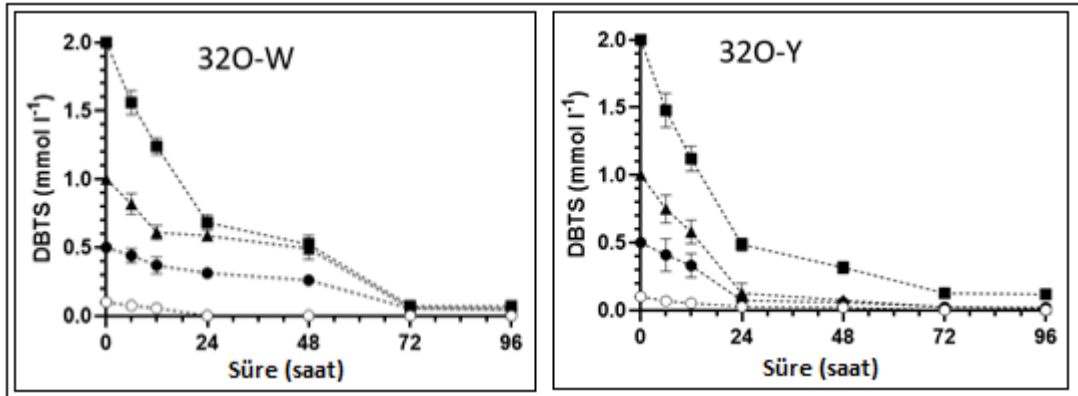
Şekil 4.11: Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen immobilize edilmiş 32O-W ve 32O-Y suşları tarafından 2-HBP üretimi. Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. () 0.1 mM; () 0.5 mM; () 1 mM; () 2 mM.



Şekil 4.12: Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen Fe₃O₄ nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşları tarafından 2-HBP üretimi. Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. () 0.1 mM; () 0.5 mM; () 1 mM; () 2 mM.



Şekil 4.13: Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen immobilize edilmiş 320-W ve 320-Y suşları ile ortamda kalan DBTS konsantrasyonu (mM). Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. (-○-) 0.1 mM, (-●-) 0.5 mM, (-▲-) 1 mM, (-■-) 2 mM.



Şekil 4.14: Çeşitli başlangıç DBTS konsantrasyonlarının varlığında 40 °C ve 250 rpm'de 96 saat süreyle inkübe edilen Fe₃O₄ nanopartiküller ile kaplanmış 320-W ve 320-Y suşları ile ortamda kalan DBTS konsantrasyonu (mM). Değerler, üç ayrı deneyin ortalamalarıdır. Hata çubukları, her ortalama için ayrı ayrı belirlenen örnek standart sapmalarını gösterir. (-○-) 0.1 mM, (-●-) 0.5 mM, (-▲-) 1 mM, (-■-) 2 mM.

Tablo 4.4: İmmobilize edilmiş veya nanopartiküller ile kaplanmış 32O-W ve 32O-Y suşları tarafından 0.1 ve 0.5 mM başlangıç DBTS konsantrasyonlarında üretilen maksimum 2-HBP miktarlarının serbest hücreler ile elde edilenlere göre artış oranları (%).

Maksimum 2-HBP artış oranları (%)			
Suş	Konsantrasyon (mM)	İmmobilizasyon	Nanopartiküller ile kaplama
32O-W	0.1	90	66
	0.5	0	65
32O-Y	0.1	35	15
	0.5	20	42

5. TARTIŞMA

Günümüzde yaygın enerji kaynağı olan fosil yakıtların yanması sonrası salınan kükürt dioksit, asit yağmurlarına ve geri döndürülmesi zor çevre kirliliğine neden olmaktadır. Fosil yakıtların yeni uygulamalar ile kükürtten arındırılarak kullanılması sonucunda elde edilecek enerji çevreyle dost ve ekonomik olacaktır. Bu nedenle bu çalışmada kükürt gideriminin iyileştirilmesi için yeni uygulamaların kullanım potansiyelleri araştırılmıştır.

Fosil yakıtlarda yoğun bir şekilde bulunan DBT gibi organik kükürtlü bileşiklerin kimyasal yolla giderimi zordur. Alternatif olarak bu bileşiklerin yeni uygulamalar ile biyodesülfürizasyonunun iyileştirilmesi endüstriyel ölçekte uygulanabilirliği için önemlidir. Bu amaçla, bakteri suşlarının immobilizasyonu (Ghorbani vd., 2011; Partovinia ve Rasekh, 2018) veya nanopartiküllerle kaplanması gibi biyoteknolojik uygulamalar (Ansari vd., 2009; Bardania vd., 2013) endüstriyel ölçekte etkin bir biyodesülfürizasyon için büyük ölçüde önem kazanmıştır. Bu uygulamalar ile biyodesülfürizasyon işlemlerinde daha etkin aktivite sağlanması, bakterilerin tekrarlı kullanımı ve son üründen kolaylıkla ayrılabilmelerini mümkün kılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, *Paenibacillus* spp. 32O-W ve 32O-Y suşları, fosil yakıtlarda yaygın bulunan organik kükürt bileşiklerinden DBT ve DBT sülfon (DBTS)'un biyodesülfürizasyonu için kullanılmıştır. Bu çalışmada, ilk kez, farklı konsantrasyonlarda (0.1, 0.5, 1 ve 2 mM) farklı organik kükürt bileşiklerini (DBT ve DBTS) içeren ortamlarda, suşların, aljinat boncuklara immobilizasyonu ve Fe₃O₄ nanopartiküllerle kaplanması ile desülfürizasyonları arttırılmaya çalışılmıştır. Bu kapsamda, bakteri suşlarının organik kükürt bileşikleri içeren ortamlarda, farklı inkübasyon sürelerinde, üreme özellikleri ve DBT ve DBTS'un 4S yolu ile desülfürizasyonundan oluşan 2-HBP'in miktarları ölçülmüş ve suşların desülfürizasyon etkinlikleri belirlenmiştir.

İmmobilize edilmiş hücrelerin serbest hücrelere kıyasla belirgin büyüme dezavantajı (OD_{600nm} ile ölçüldüğü gibi), DBT içeren ortamda büyüme sırasında canlılığın azalması (Derikvand and Etemadifar, 2014), boncuk yüzeylerinin yakınındaki bakterilerin büyümesini sınırlayan kütle transferi veya hücrelerin aljinat boncukların dışına yapışması olabilir.

Bu tez çalışmasında immobilizasyon için %3 aljinat konsantrasyonu kullanılmıştır. Boncuk stabilitesinin arttırılması (daha yüksek aljinat yüzdeleri için daha fazla) kütle transferini (bu daha düşük konsantrasyonlu aljinat ile yapılan boncuklar için daha fazla) azaltabilir ve dolayısıyla boncukların yeniden kullanımını etkileyebilir (Derikvand and Etemadifar, 2014; Srinivasulu et al., 2003).

Nanopartikül kaplı hücrelerin serbest hücrelere kıyasla OD_{600nm} değerlerinin 48 saatlik inkübasyon sonrası azalması, nanopartikül kaplamanın membran geçirgenliğini artırması veya kütle transfer sorunlarına ve/veya agregasyona yol açmasıyla ilişkili olabilir (Ansari et al., 2009; Karimi et al., 2017). Her iki bakteri kültürü için, büyüme ile kükürtlü bileşiklerin başlangıç konsantrasyonları arasındaki ters ilişki, daha yüksek konsantrasyonlarda bir toksisite etkisini gösterebilir. Aynı eğilimler, serbest hücrelerle yapılan önceki çalışmada da görülmüştür (Sar vd., 2021).

Bu çalışmada kullanılan farklı DBT/DBTS konsantrasyonları, DBT (6 μ M (Pearlman et al., 1984)) veya DBTS'un (36 μ M (Beškoski et al., 2007)) çözünürlüğünden çok daha yüksektir. Buna rağmen 0.1 mM başlangıç DBT veya DBTS ortamlarında kükürtlü bileşiklerin 2-HBP'ye %100 dönüşümü engellenememiştir. Biriken 2-HBP miktarına kıyasla 0.5 mM ve üzerindeki başlangıç konsantrasyonlarında DBT veya DBTS'nin azalması süspansiyon halindeki bu bileşiklerin yavaş çökmesinden kaynaklanabilir.

Yüksek inkübasyon sürelerinde düşük 2-HBP dönüşüm verimi 2-HBP'nin metabolize olabileceğini göstermektedir. Benzer durum çözünmeyen DBT ve DBTS'un çözünür fraksiyonlarının 4S yolu ile tükenerek, inkübasyon süresince çözünmeye devam edebildiğinde görülebilir (Davoodi-Dehaghani et al., 2010; Mohamed et al., 2015). Ayrıca tespit edilmeyen 2-HBP muhtemelen DBT ve DBTS'un 4S yol izinde son ürün olan 2-HBP'ye dönüşümü yerine ara metabolitlere dönüşmesinden, yani kısmi metabolizmadan dolayı olabilir. İmmobilize edilmiş bakteriler tarafından DBT'nin giderimi diğer çalışmalarda da belirlenmiştir (Gunam et al., 2021; Guobin et al., 2005; Peng and Wen, 2010). Bu çalışmalarda, bu tez çalışmasında kullanılan benzer başlangıç DBT konsantrasyonları kullanılmış ve mikrobiyal inkübasyonları sırasında DBT miktarında önemli düşüşlerin olduğu görülmüştür (Baldi et al., 2003; Buzanello et al., 2014).

0.1 ve 0.5 mM başlangıç DBT ve DBTS konsantrasyonları için, immobilize edilmiş veya nanopartikül kaplı 32O-Y ve 32O-W suşları ile belirlenen maksimum 2-HBP oluşumu, serbest hücrelere göre %15-90 oranında daha fazladır (Sar et al., 2021). Elde edilen bu artışlar, manyetik Fe₃O₄ kaplı *Rhodococcus erythropolis* IGST8 suşunun serbest hücrelere kıyasla 0.5 mM başlangıç DBT konsantrasyonunda yaklaşık %15 daha fazla kükürt giderme kapasitesine sahip olduğu önceki bir çalışmadan daha fazladır (Karimi et al., 2017). Diğer ilgili çalışmalarda, bakterilerin Fe₃O₄ nanopartikülleri ile kaplanması, biyodesülfürizasyon faaliyetleri üzerinde net bir etki göstermemesine rağmen hücrelerin stabil olması nedeniyle kükürt giderimi için en az beş kez yeniden kullanılabilirliği gösterilmiştir (Rahpeyman et al., 2017; G. bin Shan et al., 2005).

DBT ve DBTS'un 2-HBP'ye dönüştürülmesinde aljinat ile immobilize edilmiş suşların aktif büyüme yeteneği göstermesi ve serbest hücrelere göre daha fazla kükürt giderimi sağlaması, boncukların çeşitli çevresel koşullardan etkilenmediğini veya serbest hücrelere göre daha az etkilendiğini göstermektedir. Benzer şekilde, polivinil alkol (PVA) içerisine immobilize edilmiş *Sphingomonas subarctica* T7b suşu, çeşitli başlangıç pH ve yüksek sıcaklıklar gibi çeşitli çevresel koşullar altında yüksek DBT giderimini sağlamıştır. Ayrıca hücrelerin kükürt giderme aktivitesi kaybı olmaksızın sekiz kez tekrarlı olarak kullanılabilirliği gösterilmiştir (Gunam et al., 2013). Nanopartikül kaplı hücreler için ise kükürt giderimi aktivitesindeki artış, substratın hücre içine ve hücre dışına aktarılmasını kolaylaştıran hücre zarının geçirgenliğindeki bir artıştan kaynaklanabilir (Ansari et al., 2009; Karimi et al., 2017; Rahpeyman et al., 2017). Adsorplanan nanopartiküller ayrıca 2-HBP'in hücrelerden büyüme ortamına salınımını artırabilir (Karimi et al., 2017; Rahpeyman et al., 2017).

Bu tez çalışmasında elde edilen etkin kükürt giderimi endüstriyel ölçekte kullanılabilir bir süreç için ön araştırma niteliğindedir. Endüstriyel ölçekte, 4S yolunu kullanarak biyodesülfürizasyonun etkin olarak sürdürülebilmesi için birkaç farklı stratejinin aynı anda kullanılması gerekebilir. Immobilize edilmiş ve nanopartikül kaplı hücreler, bir kükürt giderimi işleminden sonra üreme ortamından ayrılabilir ve daha sonra tekrarlı kullanılarak kükürt giderimi için avantajlı olarak kullanılabilir. Bunun için, örneğin *Vitreoscilla* Hemoglobini'nin kullanılması (Sar vd., 2021), bir sinerji sergileyen farklı suşların ko-kültürlerinin kullanılması (Sar vd.,

2021; Wang et al., 2015), veya DBT ve DBTS'un çözünürlüğünü arttırmak için büyüme ortamına sürfaktanların dahil edilmesi gibi çeşitli kükürt giderme yöntemleri uygulanabilir (Bardania et al., 2013; Derikvand and Etemadifar, 2014; Feng et al., 2006; Karimi et al., 2017; G. bin Shan et al., 2005; Kilbane, 2006). Ayrıca, DBT ve DBTS'un aljinat boncuklara veya nanopartikül kaplı hücrelere yapıştığı tespit edilebilirse, bunların yağ veya su fazlarından kolay ayrılmaları, organik kükürt bileşiklerinin uzaklaştırılması için 4S yoluna da faydalı olabilir. Aljinat immobilizasyonu ve nanopartikül ile kaplama kombinasyonunun bu kükürtlü bileşiklerin bakteri hücrelerine yapışmasını arttırdığı ve sitoplazmaya transferine izin verdiği de önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Derikvand and Etemadifar, 2014).

Elde edilen sonuçlar, *Paenibacillus* suşlarının DBT ve DBTS'un kükürt giderimlerinde etkin olduğunu göstermiştir. Yapılabilecek sonraki çalışmalarda, fosil yakıtlardaki diğer kükürt bileşiklerinin iyileştirilmesi (örneğin dibenzotiyofen türevleri) için bu stratejiler kullanılabilir. Ayrıca, laboratuvar ortamında gerçekleştirilen bu kükürt giderim teknolojileri endüstriyel ölçekte de uygulanmalıdır.

KAYNAKLAR

- Afferden M. V., (1989), "Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp.", DO, 1990, 324–328.
- Afferden M. V., Tappe D., Beyer M., Trüper, H. G., Klein, J., (1993), "Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds", Fuel, 72(12), 1635–1643.
- Ansari F., Grigoriev P., Libor S., Tothill I. E., Ramsden J. J., (2009), "DBT degradation enhancement by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 with magnetic Fe₃O₄ nanoparticles", Biotechnology and Bioengineering, 102(5), 1505–1512.
- Apel W. A., Macmillan C. B., Pfister R. M., Wilkinson R. F., Bacteriol J., Dugan P. R., Filippi J. A., Mcilhinney A. E., Mining C., (1984), United States Patent (19). 11(19), 123–137.
- Babich I. V., Moulijn J. A., (2003), "Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: A review", Fuel, 82(6), 607–631.
- Bahrami A., Shojaosadati S. A., Mohebbali G., (2001), "Biodegradation of dibenzothiophene by thermophilic bacteria", Biotechnology Letters, 23(11), 899–901.
- Baldi F., Pepi M., Fava F., (2003), "Growth of *Rhodospiridium toruloides* strain DBVPG 6662 on dibenzothiophene crystals and orimulsion", Applied and Environmental Microbiology, 69(8), 4689–4696.
- Bardania H., Raheb J., Mohammad-Beigi H., Rasekh B., Arpanaei A., (2013), "Desulfurization activity and reusability of magnetite nanoparticle-coated *Rhodococcus erythropolis* FMF and *R. erythropolis* IGTS8 bacterial cells", Biotechnology and Applied Biochemistry, 60(3), 323–329.
- Barvinchak G., (1980), United States Patent (19). 19.
- Berry, C. C., Curtis, A. S. G. (2003), "Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine", In J. Phys. D: Appl. Phys (Vol. 36).
- Beškoski V. P., Matić V. F., Milić J., Godevac D., Mandić B., Vrvic M. M., (2007), "Oxidation of dibenzothiophene as a model substrate for the removal of organic sulphur from fossil fuels by iron(III) ions generated from pyrite by *Acidithiobacillus ferrooxidans*", Journal of the Serbian Chemical Society, 72(6), 533–537.
- Bhatia S., Sharma D. K., (2010), "Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3", Biochemical Engineering Journal, 50(3), 104–109.

- Blumberg K. O., Walsh M. P., (2003), “Low-Sulfur Gasoline and Diesel: The Key to Lower Vehicle Emissions”, The International Council on Clean Transportation, May, 66.
- Borgne S. Le., (2010), “Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology”, Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology.
- Breyse M., Djega-Mariadassou G., Pessayre S., Geantet C., Vrinat M., Pérot G., Lemaire M., (2003), “Deep desulfurization: Reactions, catalysts and technological challenges”, *Catalysis Today*, 84(3–4), 129–138.
- Bunz P. V., Cook A. M., (1993), “Dibenzofuran 4,4a-dioxygenase from *Sphingomonas* sp. strain RW1: Angular dioxygenation by a three-component enzyme system”, *Journal of Bacteriology*, 175(20), 6467–6475.
- Butler R. R., Wang J., Stark B. C., Pombert J. F., (2016), “Complete genome sequences of two interactive moderate thermophiles, *Paenibacillus naphthalenovorans* 32O-Y and *Paenibacillus* sp. 32O-W”, *Genome Announcements*, 4(1).
- Buzanello E. B., Rezende R. P., Sousa F. M. O., de Lima Silva Marques E., Loguercio L. L., (2014), “A novel *Bacillus pumilus*-related strain from tropical landfarm soil is capable of rapid dibenzothiophene degradation and biodesulfurization”, *BMC Microbiology*, 14(1).
- Caro A., Boltes K., Letón P., García-Calvo E., (2007), “Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria”, *Biochemical Engineering Journal*, 35(2), 191–197.
- Chen H., Cai Y. B., Zhang W. J., Li W., (2009), “Methoxylation pathway in biodesulfurization of model organosulfur compounds with *Mycobacterium* sp.”, *Bioresource Technology*, 100(6), 2085–2087.
- Chen H., Zhang W. J., Chen J. M., Cai Y. B., Li W., (2008), “Desulfurization of various organic sulfur compounds and the mixture of DBT + 4,6-DMDBT by *Mycobacterium* sp. ZD-19”, *Bioresource Technology*, 99(9), 3630–3634.
- Cruden D. L., Wolfram J. H., Rogers R. D., Gibson D. T., (1992), “Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium”, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2723–2729.
- Czogalla C.-D., Boberg F., (1983), “Sulfur compounds in fossil fuels I”, *Sulfur Reports*, 3(4), 121–161.
- Davoodi-Dehaghani F., Vosoughi M., Ziaee A. A., (2010), “Biodesulfurization of dibenzothiophene by a newly isolated *Rhodococcus erythropolis* strain”, *Bioresource Technology*, 101(3), 1102–1105.
- Denome S. A., Oldfield C., Nash L. J., Young K. D., (1994), “Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. strain IGTS8”, *Journal of Bacteriology*, 176(21), 6707–6716.

- Derikvand P., Etemadifar Z., (2014), "Improvement of biodesulfurization rate of alginate immobilized *Rhodococcus erythropolis* R1", *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(3).
- Eaton R. W., Nitterauer J. D., (1994), "Biotransformation of benzothiophene by isopropylbenzene-degrading bacteria", *Journal of Bacteriology*, 176(13), 3992–4002.
- Fatahi A., Sadeghi S., (2017), "Biodesulphurization of gasoline by *Rhodococcus erythropolis* supported on polyvinyl alcohol", *Letters in Applied Microbiology*, 64(5), 370–378.
- Feng J., Zeng Y., Ma C., Cai X., Zhang Q., Tong M., Yu B., Xu P., (2006), "The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization", *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7390–7393.
- Frassinetti S., Setti L., Corti A., Farrinelli P., Montevecchi P., Vallini G., (1998), "Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*", *Canadian Journal of Microbiology*, 44(3), 289–297.
- Furuya T., Ishii Y., Noda K. Kino K., Kirimura K., (2003), "Thermophilic biodesulfurization of hydrodesulfurized light gas oils by *Mycobacterium phlei* WU-F1", *FEMS Microbiology Letters*, 221(1), 137–142.
- Gilbert S. C., Morton J., Buchanan S., Oldfield C., McRoberts A., (1998), "Isolation of a unique benzothiophene-desulphurizing bacterium, *Gordona* sp. strain 213E (NCIMB 40816), and characterization of the desulphurization pathway", *Microbiology*, 144(9), 2545–2553.
- Gunam I. B. W., Sitepu A., Antara N. S., Triani I. G. A. L., Arnata I. W., Setiyo Y., (2021), "Bacterial desulfurization of dibenzothiophene by *Pseudomonas* sp. strain kwn5 immobilized in alginate beads", *Jurnal Teknologi*, 83(2), 107–115.
- Gunam I. B. W., Yamamura K., Nengah Sujaya I., Antara N. S., Aryanta W. R., Tanaka M., Tomita F., Sone T., Asano K., (2013), "Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives using resting and immobilized cells of *Sphingomonas subarctica* T7b", *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(4), 473–482.
- Guo X. L., Deng G., Xu J., Wang M. X., (2006), "Immobilization of *Rhodococcus* sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide", *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), 1–5.
- Guobin S., Jianmin X., Chen G., Huizhou L., Jiayong C., (2005), "Biodesulfurization using *Pseudomonas delafieldii* in magnetic polyvinyl alcohol beads", *Letters in Applied Microbiology*, 40(1), 30–36.
- Gupta N., Roychoudhury P. K., Deb J. K., (2005), "Biotechnology of desulfurization of diesel: Prospects and challenges", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66(4), 356–366.

- Hirano S. I., Kitauchi F., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S., (2004), "Isolation and characterization of *Xanthobacter polyaromaticivorans* sp. nov. 127W that degrades polycyclic and heterocyclic aromatic compounds under extremely low oxygen conditions", *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68(3), 557–564.
- Hou Y., Kong Y., Yang J., Zhang J., Shi D., Xin W., (2005), "Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas stutzeri* UP-1", *Fuel*, 84(14–15), 1975–1979.
- Ishii Y., Konishi J., Okada H., Hirasawa K., Onaka T., Suzuki M., (2000), "Operon structure and functional analysis of the genes encoding thermophilic desulfurizing enzymes of *Paenibacillus* sp. A11-2", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(1), 81–88.
- Ismail W., El-Sayed W. S., Abdul Raheem A. S., Mohamed M. E., el Noyal A. M., (2016), "Biocatalytic desulfurization capabilities of a mixed culture during non-destructive utilization of recalcitrant organosulfur compounds", *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR).
- Ito E., Van Veen J. A. R., (2006), "On novel processes for removing sulphur from refinery streams", *Catalysis Today*, 116(4), 446–460.
- Karimi E., Jeffryes C., Yazdian F., Akhavan Sepahi A., Hatamian A., Rasekh B., Rashedi H., Omid M., Ebrahim-Habibi M. B., Ashrafi S. J., (2017), "DBT desulfurization by decorating *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 using magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in a bioreactor", *Engineering in Life Sciences*, 17(5), 528–535.
- Kayser K. J., Bielaga-Jones B. A., Jackowski K., Odusan O., Kilbane J. J., (1993), "Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8", *Journal of General Microbiology*, 139(12), 3123–3129.
- Kayser K. J., Cleveland L., Park H. S., Kwak J. H., Kolhatkar A., Kilbane J. J., (2002), "Isolation and characterization of a moderate thermophile, *Mycobacterium phlei* GTIS10, capable of dibenzothiophene desulfurization", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 737–745.
- Kilbane J. J., (2006), "Microbial biocatalyst developments to upgrade fossil fuels", *Current Opinion in Biotechnology*, 17(3), 305–314.
- Kilbane J. J., Le Borgne S., (2004), "Petroleum biorefining: The selective removal of sulfur, nitrogen, and metals", *Studies in Surface Science and Catalysis*, 151, 29–65.
- Kilbane J. J., Robbins J., (2007), "Characterization of the *dszABC* genes of *Gordonia amicalis* F.5.25.8 and identification of conserved protein and DNA sequences", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(4), 843–851.
- Kim B. H., Kim H. Y., Kim T. S., Park D. H., (1995), "Selectivity of desulfurization activity of *Desulfovibrio desulfuricans* M6 on different petroleum products", *Fuel Processing Technology*, 43(1), 87–94.

- Kirimura K., Furuya T., Nishii Y., Ishii Y., Kino K., Usami S., (2001), "Biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivatives through the selective cleavage of carbon-sulfur bonds by a moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU-S2B", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(3), 262–266.
- Klein J., Stock J., Vorlop K.-D., (1983), "Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts", *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* (Vol. 18).
- Klein J., Van Afferden M., Pfeifer F., Schacht S., (1994), "Microbial desulfurization of coal and oil", *Fuel Processing Technology*, 40(2–3), 297–310.
- Kodama K., (1973), "Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway", *Agr. Bio. Chem.* 37(1), 45-50, 1973.
- Kodama K., (1977), "Co-metabolism of dibenzothiophene by *Pseudomonas jianii*", *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(7), 1305–1306.
- Konishi J. I. N., Ishii Y., Onaka T., Okumura K., Suzuki M., (1997), "Thermophilic Carbon-Sulfur-Bond-Targeted Biodesulfurization", *Applied and Environmental Microbiology*, 63(8), 3164–3169.
- Kulkarni P. S., Afonso C. A. M., (2010), "Deep desulfurization of diesel fuel using ionic liquids: Current status and future challenges", *Green Chemistry*, 12(7), 1139–1149.
- Kvam C., Haukanes I., (1993), "Application of Magnetic Beads in Bioassays", *Nature Publishing Group*, Vol (11).
- Laborde A. L., Gibson D. T., (1977), "Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* species", *Applied and Environmental Microbiology*, 34(6), 783–790.
- Li F. L., Xu P., Ma C. Q., Luo L. L., Wang X. S., (2003), "Deep desulfurization of hydrodesulfurization-treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B", *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 301–307.
- Lizama H. M., Wilkins L. D. A., Scott T. C., (1995), "Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria", *Biotechnology Letters*, 17(1), 113–116.
- Ma T., (2010), "The desulfurization pathway in *Rhodococcus*", *Microbiology Monographs* 16, 207–230.
- Marzona M., Pessione E., Di Martino S., Giunta C., (1997), "Benzothiophene and dibenzothiophene as the sole sulfur source in *Acinetobacter*: Growth kinetics and oxidation products", *Fuel Processing Technology*, 52(1–3), 199–205.
- Mohamed M. E. S., Al-Yacoub Z. H., Vedakumar J. V., (2015), "Biocatalytic desulfurization of thiophenic compounds and crude oil by newly isolated bacteria", *Frontiers in Microbiology*, Vol (6),
- Mohebbi G., Ball A. S., (2008), "Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels", *Microbiology*, 154(8), 2169–2183.

- Moheballi G., Ball A. S., (2016), "Biodesulfurization of diesel fuels - Past, present and future perspectives", *International Biodeterioration and Biodegradation*, 110, 163–180.
- Moheballi G., Ball A. S., Rasekh B., Kaytash A., (2007), "Biodesulfurization potential of a newly isolated bacterium, *Gordonia alkanivorans* RIPI90A", *Enzyme and Microbial Technology*, 40(4), 578–584.
- Monticello D. J., (1985), "Microbial desulfurization of fossil fuels", *Ann. Rev. Microbiol.* 1985. 39:371-89.
- Naito M., Kawamoto T., Fujino K., Kobayashi M., Maruhashi K., Tanaka A., (2001), "Long-term repeated biodesulfurization by immobilized *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 cells", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), 374–378.
- Ohshiro T., Hine Y., Izumi Y., (1994), "Enzymatic desulfurization of dibenzothiophene by a cell-free system of *Rhodococcus erythropolis* D-1", *FEMS Microbiology Letters*, 118(3), 341–344.
- Ohshiro T., Hirata T., Izumi Y., (1996), "Desulfurization of dibenzothiophene derivatives by whole cells of *Rhodococcus erythropolis* H-2", *FEMS Microbiology Letters*, 142(1), 65–70.
- Oldfield C., Pogrebinsky O., Simmonds J., Olson E., Kulpa C. F., (1997), "Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968)", *Microbiology*, (Vol. 143).
- Oldfield C., Wood N. T., Gilbert S. C., Murray F. D., Faure F. R., (1998), "Desulphurisation of benzothiophene and dibenzothiophene by actinomycete organisms belonging to the genus *Rhodococcus* and related taxa", *Antonie van Leeuwenhoek*, (Vol. 74, pp. 119–132).
- Olson E. S., Stanley D. C., Gallagher J. R., (1993), "Characterization of intermediates in the microbial desulfurization of dibenzothiophene", *Energy and Fuels*, 7(1), 159–164.
- Omori T., Monna L., Saiki Y., Kodama T., (1992), "Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1", *Applied and Environmental Microbiology*, 58(3), 911–915.
- Pawelec B., Navarro R. M., Campos-Martin J. M., Fierro J. L. G., (2011), "Towards near zero-sulfur liquid fuels: A perspective review", *Catalysis Science and Technology*, 1(1), 23–42.
- Pearlman R. S., Yalkowsky S. H., Banerjee S., (1984), "Water solubilities of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds", *J. Phys. Chem. Ref. Data*, Vol (13), No (12).
- Peng Y., Wen J., (2010), "Modeling of dbt biodesulfurization by resting cells of *Gordonia* sp. WQ-01A immobilized in alginate gel beads in an oil-water-immobilization system", *Chem. Biochem. Eng. Q.* 24 (1), 85-94.

- Prasoulas G., Dimos K., Glekas P., Kalantzi S., Sarris S., Templis C., Vavitsas K., Hatzinikolaou D. G., Papayannakos N., Kekos D., Mamma D., (2021), "Biodesulfurization of dibenzothiophene and its alkylated derivatives in a two-phase bubble column bioreactor by resting cells of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8", *Processes*, 9(11).
- Rahpeyman S., Mohammad M., Raheb J., (2017), "Biodesulfurization of dibenzothiophene by two bacterial strains in cooperation with Fe₃O₄, ZnO and CuO nanoparticles", *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 09(02).
- Safarik I., Safarikova M., (1999), "Use of magnetic techniques for the isolation of cells", *Journal of Chromatography B*, (Vol. 722).
- Sar T., Chen Y., Bai Y., Liu B., Agarwal P., Stark B. C., Yesilcimen Akbas M., (2021), "Combining co-culturing of *Paenibacillus* strains and *Vitreoscilla* hemoglobin expression as a strategy to improve biodesulfurization", *Letters in Applied Microbiology*, 72(4), 484–494.
- Sar T., Seker G., Erman A. G., Stark B. C., Yesilcimen Akbas, M., (2017), "Repeated batch fermentation of immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin for long-term use", *Bioengineered*, 8(5), 651–660.
- Sar T., Stark B. C., Yesilcimen Akbas M., (2017), "Effective ethanol production from whey powder through immobilized *E. coli* expressing *Vitreoscilla* hemoglobin", *Bioengineered*, 8(2), 171–181.
- Schmitz C., Datsevitch L., Jess A., (2004), "Deep desulfurization of diesel oil: Kinetic studies and process-improvement by the use of a two-phase reactor with pre-saturator", *Chemical Engineering Science*, 59(14), 2821–2829.
- Shan G. bin, Xing J. M., Zhang H. Y., Liu H. Z., (2005), "Biodesulfurization of dibenzothiophene by microbial cells coated with magnetite nanoparticles", *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), 4497–4502.
- Shan G.-B., Xing J.-M., Luo M.-F., Liu H.-Z., Chen J.-Y., (2003), "Immobilization of *Pseudomonas delafieldii* with magnetic polyvinyl alcohol beads and its application in biodesulfurization", *Biotechnology Letters*, (Vol. 25).
- Shavandi M., Sadeghizadeh M., Zomorodipour A., Khajeh K., (2009), "Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RIPI90A", *Bioresource Technology*, 100(1), 475–479.
- Sheldon R. A., (2007), "Enzyme immobilization: The quest for optimum performance", *Advanced Synthesis and Catalysis*, 349(8–9), 1289–1307.
- Singh S. P., Schwan A. L., (2011), "Sulfur metabolism in plants and related biotechnologies", *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition (Second Edi, Vol. 4). Elsevier B.V.
- Song C., (2003), "An overview of new approaches to deep desulfurization for ultra-clean gasoline, diesel fuel and jet fuel", *Catalysis Today*, 86(1–4), 211–263.

Srinivasulu B., Adinarayana K., Ellaiah P., (2003), "Investigations on neomycin production with immobilized cells of *Streptomyces marinus* Nuv-5 in calcium alginate matrix", AAPS PharmSciTech (Vol. 4, Issue 4).

Stanislaus A., Marafi A., Rana M. S., (2010), "Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production", Catalysis Today, 153(1–2), 1–68.

Tao FeiTao F., Yu B., Xu P., Ma C. Q., (2006), "Biodesulfurization in biphasic systems containing organic solvents", Applied and Environmental Microbiology, 72(7), 4604–4609.

Wang J., Davaadelger B., Salazar J. K., Butler R. R., Pombert J. F., Kilbane J. J., Stark B. C., (2015), "Isolation and characterization of an interactive culture of two *Paenibacillus* species with moderately thermophilic desulfurization ability", Biotechnology Letters, 37(11), 2201–2211.

Web 1, (2022), www.epa.gov/otaq/standards/fuels, (Erişim Tarihi: 06/01/2022).

Worrell E., Galitsky C., (2004), "Profile of the petroleum refining industry in California, California industries of the future program", Berkeley: Lawrence Berkeley National Laboratory, LBNL-55450.

Wu Z., Ondruschka B., (2010), "Ultrasound-assisted oxidative desulfurization of liquid fuels and its industrial application", Ultrasonics Sonochemistry, 17(6), 1027–1032.

Xu P., Yu B., Li F. L., Cai X. F., Ma C. Q., (2006), "Microbial degradation of sulfur, nitrogen and oxygen heterocycles", Trends in Microbiology, 14(9), 398–405.

Yu B., Ma C., Zhou W., Wang Y., Cai X., Tao F., Zhang Q., Tong M., Qu J., Xu P., (2006), "Microbial desulfurization of gasoline by free whole-cells of *Rhodococcus erythropolis* XP", FEMS Microbiology Letters, 258(2), 284–289.

ÖZGEÇMİŞ

Murat ÖZTÜRK, orta öğretimini Şehit Osman Altinkuyu Anadolu Lisesi'nde 2011 yılında tamamladı. 2012 yılında girdiği Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde 2017 yılında mezun oldu. 2019 yılında Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ danışmanlığında yüksek lisans eğitimine başladı.

EKLER

Ozturk M., (2020). “Kükürtlü Bileşiklerin Gideriminde Biyoteknolojik Yöntemlerin Uygulanması”, (Sözlü sunum). International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (BioTechBioChem 2020), 16-18 Aralık 2020

Ozturk M., Sar T., Yesilcimen-Akbas M. (2021). “Tiyofenik Kükürtlü Bileşiklerin Etkin Desülfürizasyonu”, (Poster sunumu), Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Araştırmalar Sempozyumu ve Tanıtım Günleri 2021, 10-11 Haziran 2021