

# Ticari Dizel Yağının Çevresel Mikroorganizmalar ile Bozunması Üzerindeki Etkinliğinin Belirlenmesi

## Determination of the Efficacy of Commercial Diesel Oil on Degradation by Environmental Microorganisms

Cansu Vural<sup>®</sup>

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye

**Atf/Cite as:** Vural C. Ticari dizel yağının çevresel mikroorganizmalar ile bozunması üzerindeki etkinliğinin belirlenmesi. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2023;53(4):278-286.

### Öz

**Amaç:** Dizel yağı; motorlu araçlarda kullanılan, birçok çevre sorununu oluşturan çevre kirleticileri olarak kabul edilebilir. Mikrobiyal konsorsiyum, petrol hidrokarbonlarının bozunmasında önemli bir rol oynayabilir. Spesifik hidrokarbonlar üzerindeki yeni mikrobiyal ayrıştırıcıların taranması, çevre için çeşitli tehlikeleri olan hidrokarbonların uzaklaştırılması için yeni bakış açıları sağlar. Bu çalışmada, mikrobiyal konsorsiyumun dizel yağının bozunması üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlandı.

**Yöntem:** Aktif mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulması için petrokimya endüstrisinden ham petrol örnekleri toplandı. Geniş tarama yapabilmek için kültür ortamlarında n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı kullanıldı. Daha sonra, bozunma deneyi %0,5 ve %0,25 dizel yağı eklendi ve çeşitli karbon kaynaklarıyla zenginleştirilen ortamlardan 50 ml ilave edilerek gerçekleştirildi. Erlenler, 21 gün boyunca 200 rpm'de döner çalkalayıcıda 30°C'de inkübe edildi. Analitik analizler; Gaz Kromatografisi ve gravimetrik analiz ile yapıldı. Seçilen izolatların gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz ve KOH testleri, lipaz ve proteaz aktiviteleri tarandı. Başarılı izolatları belirlemek için genomik DNA izolasyonları ve moleküler analizler yapıldı.

**Bulgular:** CT1 konsorsiyumu başarılı parçalayıcı aktivite göstermiştir. GC ve gravimetrik analizleri sonucunda CT1 konsorsiyumu dizel yağının 21 günde %93 oranında bozundurmuştur. Bu konsorsiyumun üyeleri *Citrobacter sp.*, *Pseudomonas japonica* ve *Bacillus sp.* olarak belirlenmiştir.

**Sonuç:** Bu çalışma ile CT1 konsorsiyumundaki bakteriler ile dizel yağının neredeyse tamamını bozundurmuştur. Bu şekilde izole edilen bakteriler; kirlenmiş toprakların çevre dostu bir şekilde iyileştirilmesi için umut verici bir çözüm olarak hizmet edebilirler. Dizel yağı biyoparçalanması, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak ve çevresel etkileri azaltmak için önemli bir adım olabilir. Bu nedenle, bu alanda yapılan ilerici çalışmalar, sürdürülebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Biyoteknolojik yöntemler kullanarak mikroorganizmaların dizel yağı parçalama yeteneklerini artırılabilir.

**Anahtar kelimeler:** Biyobozunma, Dizel yağı, Mikrobiyal Konsorsiyum

### ABSTRACT

**Objective:** Diesel oil can be considered as an environmental pollutant used in motor vehicles, causing environmental problems. The microbial consortium can play an important role in the degradation of petroleum hydrocarbons. The screening of new microbial decomposers on specific hydrocarbons provides new perspectives for the removal of hydrocarbons with various hazards to the environment. This study aimed to determine the effects of microbial consortium on the degradation of diesel oil.

**Methods:** Crude oil samples were collected from the petrochemical industry to establish the active microbial consortium. In order to perform wide screening, n-tridecane, n-tridecane, n-hexadecane, sunflower oil, and olive oil were used in the culture media. Then, the degradation test was carried out by adding 0.5% and 0.25% of diesel oil and adding 50 ml of media enriched with various carbon sources. The bottles were incubated at 30°C on a rotary shaker at 200 rpm for 21 days. Gas Chromatography and gravimetric analysis did analytical analyzes. Gram reactions of selected isolates were screened in catalase, oxidase, KOH tests, lipase and protease activities. Genomic DNA isolations and molecular biological analyzes were performed to identify successful isolates.

**Results:** The CT1 consortium showed successful disintegrating activity. As a result of GC and gravimetric analysis, the CT1 consortium degraded 93% of diesel oil in 21 days. Members of this consortium are *Citrobacter sp.*, *Pseudomonas japonica*, and *Bacillus sp.* have been determined.

**Conclusion:** CT1 consortium degraded 93% of the diesel oil. Diesel oil biodegradation could be an important step towards reducing dependence on fossil fuels and reducing environmental impacts.

**Keywords:** Biodegradation, Diesel oil, Microbial Consortium

**Alındığı tarih / Received:**  
14.06.2023 / 14.June.2023

**Kabul tarihi / Accepted:**  
11.11.2023 / 11.November.2023

**Yayın tarihi / Publication date:**  
08.12.2023 / 08.December.2023

### ORCID Kayıtları

C. Vural 0000-0001-7500-6691

✉ caansudogan@gmail.com

## GİRİŞ

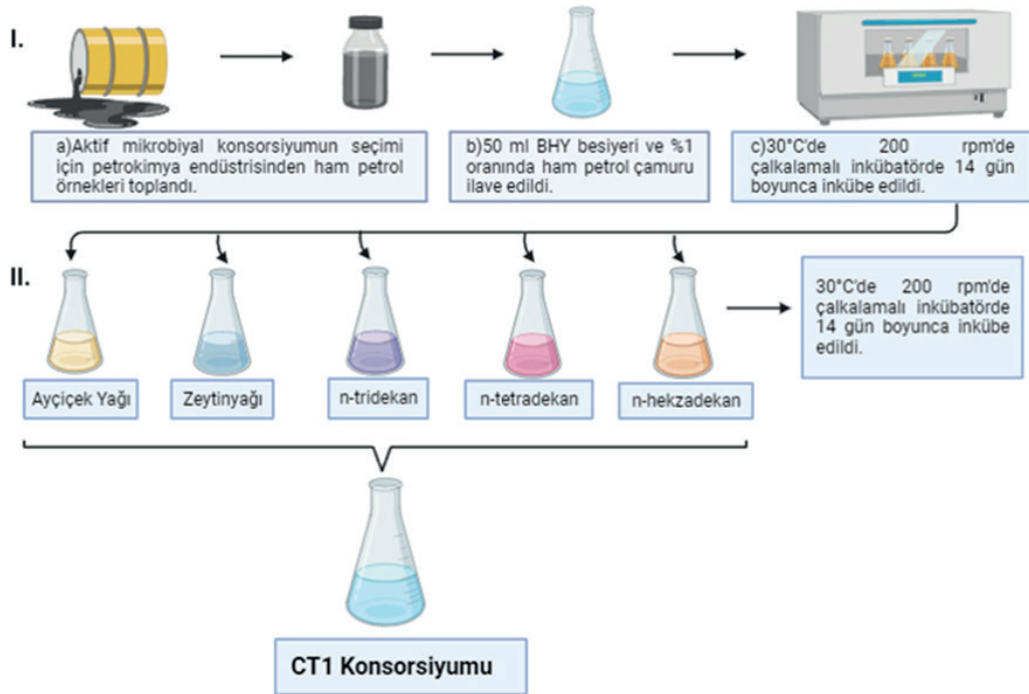
Son yıllarda petrol kaynaklarının sık kullanılmasıyla birlikte birçok çevre sorunu yaşanmaktadır. Dizel yağları veya madeni yağlar, otomobillerde ve hafif ticari araç motorlarında günlük olarak kullanılan ham petrolden elde edilir ve motorları korozyona bağlı problemlere karşı korurlar. Ancak; petrol kaynaklarının sıklıkla kullanımıyla birçok çevresel problem yaşanmaktadır. Özellikle petrol taşımacılığıyla meydana gelen petrol sızıntısı kazaları ve iyi arıtılmamış yağlı atık suların deşarji gibi çevresel problemler meydana gelmektedir. Bu çevre sorunlarını ortadan kaldırmak için fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler uygulanabilmektedir. Bu yöntemlerden biyolojik yöntemler, fiziksel ve kimyasal yöntemlerden farklı olarak ekolojik dengeyi bozmadan uygulanabilen, çevre dostu ve düşük maliyetli bir uzaklaştırma işlemidir<sup>(1-3)</sup>. Bu nedenle, mikrobiyal konsorsiyum petrol hidrokarbonlarının parçalanmasında önemli bir rol oynayabilir. Petrol hidrokarbonları bakteriler, mantarlar, mayalar ve mikroalgler tarafından parçalanabilir. Bununla birlikte, biyolojik bozunmada bakterilerin önemli bir üstünlüğü vardır. Bakteriler, çok düşük moleküler ağırlıklı alkanlar, polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH), C9 ila C23 arasında değişen alifatik hidrokarbonlar ve çeşitli aromatik bileşiklerden oluşan dizel yağını bozabilir<sup>(4,5)</sup>. Örneğin, *Acinetobacter* sp. tek karbon kaynağı olarak n-alkanları (C10 - C40) kullanır<sup>(3)</sup>. Benzer şekilde, *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Thalassolituus*, *Cycloclasticus* ve *Oleispira* gibi zorunlu hidrokarbonoklastik bakteriler olarak adlandırılan bazı mikrobiyal cinsler, çeşitli alkan parçalanma süreçlerinde önemli bir rol oynar. Bu mikroorganizmalar tipik olarak petrol ile kirlenmeden önce tespit edilemeyen seviyelerde bulunurlarken, petrol kirliliğinden sonra bölgede baskın hale geçmektedirler<sup>(1,6-8)</sup>. Bu nedenle, bu mikroorganizmalar çevredeki petrol hidrokarbonlarının bozulması, dönüşümü ve kaderi için gereklidir.

Biyolojik bozunma önceliği genellikle n-alkanlardan dallı alkanlara, düşük moleküler ağırlıklı n-alkil aromatlara, monoaromatlara, siklik alkanlara ve polinükleer aromatlara doğrudur<sup>(4)</sup>. Petrolün

tüm bu bileşenlerini tek bir mikrobiyal türle parçalamak zor olduğundan, mikrobiyal konsorsiyum uygulamalarının gerekliliği iyi bilinmektedir. Mikrobiyal bir konsorsiyum, birçok farklı bakteri grubunun metabolik işlevi de dahil olmak üzere, biyobozunma daha geniş bir enzim aktivitesi aralığına sahiptir<sup>(9)</sup>. Spesifik hidrokarbonlar üzerinde yeni mikrobiyal ayrıştırıcıların taranması, çevre için çeşitli tehlikeleri olan hidrokarbonların uzaklaştırılması için yeni bakış açıları sağlar. Bu amaçla çalışmada, çevresel mikroorganizmaların ticari dizel yağını (15W40) bozundurma üzerindeki etkileri araştırıldı. Aktif mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulması için petrokimya endüstrisinden ham petrol örnekleri toplandı. Geniş tarama yapabilmek için farklı karbon kaynakları (n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı) enerji kaynağı olarak kullanılarak kültür ortamlarında inkübe edildi. Analitik analizler için; gravimetrik analizi ve gaz kromatografisi yapıldı. Toplam miktardan kalan dizel yağını belirlemek için dizel yağı bileşimi analizleri yapıldı. Seçilen konsorsiyumdan üç farklı mikrobiyal izolat konsorsiyum üyesi olarak üretildi. Bu izolatlara çeşitli mikrobiyolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak bu üyelerin saflıkları ve farklılıkları tespit edildi. Ayrıca moleküler biyolojik analizler ile bu izolatların hangi türler ile yakın benzerlik gösterdiği belirlendi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Mikrobiyal Konsorsiyumun Oluşturulması: Tüm degradasyon çalışmaları, bazal ortam olarak Bushnel Haas (BHY; Sigma Aldrich) ortamı (%0.025 maya özütü eklenmiş) ile gerçekleştirildi. Aktif mikrobiyal kültürler elde etmek için iki adım izlendi. İlk adım olarak, petrokimya endüstrisinin ham petrol çamuru, toplam petrol hidrokarbonlarını kullanabilen mikroorganizmaların seçimi için bir rezervuar olarak kullanıldı. Bu amaçla; %1 oranında ham petrol çamuru ilave edilerek 30°C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde 14 gün boyunca inkübe edildi (Şekil 1). İnkübasyon süresi boyunca 48 saatte bir erlenlerdeki bulanıklık ve cam iç yüzeyinde oluşan biyofilm yapıları takip edilerek mikrobiyal üreme durumları gözlemlendi. İnkübasyon sonunda ikinci adım olarak; dizel yağı içeriğinde bulunan orta



Şekil 1. Mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulma şeması

zincirli alifatik hidrokarbonlardan olan n-tridekan (C13), n-tetradekan (C14), n-hekzadekan (C16) ile, yine benzer molekül yapılarına sahip evsel kullanım yağlarından ticari ayçiçek yağı ve zeytinyağı spesifik hidrokarbon kaynakları olarak kullanıldı. Bahsedilen her bir hidrokarbon kaynağından %1 oranında olacak şekilde 50 ml BHY ortamı içeren erlenlere eklendi. Daha sonra, birinci basamakta oluşan mikrobiyal üremelerin gözlemlendiği erlenlerden %5 olacak şekilde alınarak içerisinde spesifik hidrokarbon bulunan her bir erlen üzerine ilave edilerek 30°C'de 200 rpm çalkalamalı inkübatörde 14 gün boyunca inkübe edildi. Mikrobiyal konsorsiyumun oluşturulması için, 14 günlük inkübasyon sonunda her bir erlen iyice çalkalanarak içerisinde üreyen mikroorganizmalar homojen hale getirildikten sonra, mikrobiyal karışım içeren bu erlen dizel yağının bozunması çalışmasında kullanıldı.

**Dizel Yağının Biyolojik Bozunma Testi:** Dizel yağının biyolojik bozunması amacıyla, ticari olarak madeni yağ olarak nitelendirilen 15W40 motorin yağı kullanıldı. Bir önceki aşamadan elde edilen homojen haldeki mikrobiyal karışımdan %5 olacak şekilde alınarak 5ml steril nutrient broth (NB) içeren

tüpe aktararak 30°C'de 24–48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra üreme olan tüpten bir ml alınarak 1.5 ml steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 6000 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası hücrelerin yıkanması için, süpernatant atılarak elde edilen hücre pelleti üzerine bir ml steril %0.89 NaCl ilaveli fosfat tamponlu tuz (PBS) eklenerek kısa bir vorteks ile homojen hale getirildikten sonra aynı şekilde santrifüjlendi. Daha sonra hücre yoğunluğu densitometre cihazı (Den-1B; Grant Instruments) ile  $545 \pm 15$  nm dalga boyunda 0.5 McFarland (MF)-Birim'e ( $\sim 1.5 \times 10^8$  hücre/ml) ayarlandı<sup>(10)</sup>. MF'ye göre ayarlanmış hücrelerin %5'i, dizel yağının (15W40) %0.5'i ve %0.25'i ve 50 ml BH sıvı ortamı (%0.05 maya ekstraktı ile takviye edilmiş) içeren sterilize edilmiş şişeye ayrı ayrı aktarıldı. Daha sonra, 30°C'de 200 rpm'de döner bir çalkalayıcıda 21 gün boyunca bozunma için inkübasyonuna izin verildi. Emülsifikasyon ve bulanıklık olarak bozunma gözlemi inkübasyon sırasında günlük olarak yapıldı.

Bozunma oranını belirlemek için gravimetrik analiz yöntemi kullanıldı. Bu amaçla; kalan yağlar diklorometan ile 1:1 oranında çözündürüldü. Karışım beş dakika vortekslelendikten sonra organik faz toplandı.

Sulu faz iki kez çözdürüldü. Çözücü, evaporatör kullanılarak uçuruldu. Bozunmuş hidrokarbon yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı<sup>(11)</sup>:

$$YBO (\%) = \frac{(\text{Kontrol kültüründe KYA} - \text{Numunede KYA}) \times 100}{\text{Kontrol kültüründe KYA}}$$

Bu formülde, YBO = Yağ Bozunma Oranı ve KYA = Kalan Yağın Ağırlığı temsil etmektedir.

Gaz Kromatografisi ile Dizel Yağ Diyagramının Standart Eğrisinin Oluşturulması: Standart eğri oluşturmak için Gaz Kromatografisi (GC) kullanıldı. Dizel yağı çözümlerinin diklorometan (DCM) içinde seri dilüsyonları (0.1 µg/ml'den 0.01 µg/ml'ye) hazırlandı ve GC'de analiz edildi. GC cihazı (Agilent 7820A, Santa Clara, CA, ABD), alev iyonlaşma detektörü HP-5 kapiler kolonu (30 m x 0,320 mm; film kalınlığı 0,25 mm; Agilent, ABD) ile donatıldı. Enjektör ve detektör sıcaklığı sırasıyla 230°C ve 300°C idi. Taşıyıcı gaz, helyum (1 mL/dak); hava akışı, 300 mL/dak; hidrojen akışı ise; 30 mL/dak.'idi. Analiz yöntemi şu şekilde yapılandırıldı; başlangıç sıcaklığı bir dakika süreyle 70°C idi, sıcaklık kademeli olarak 10°C/dk artırıldı. 300°C'ye kadar ve tutma süresi 35 dakikaydı<sup>(11)</sup>. GC'de dikkate alınan toplam alan sonuçları standart eğri diyagramı olarak değerlendirildi ( $r^2=0,9955$ ). Bir µl numune hacmi HP-5 kolonuna enjekte edildi ve yukarıda bahsedilen GC yöntemi ile analiz edildi.

Dizel Yağının Bozunmasının Tayini: Dizel yağı, sıvı-sıvı (1:1 v/v) DCM'de özümlendi. 21 gün sonra eşit hacimde DCM, mikrobiyal popülasyon ve mazot içeren BHY ortamına eklendi. DCM-BHY, beş dakika boyunca maksimum hızda vorteks yoluyla hemen karıştırıldı. Bu prosedür BHY ortamı için iki kez tekrarlandı<sup>(12)</sup>. Daha sonra, bozunmuş kalan dizel yağının belirlenmesi için dizel yağı bileşiminin GC analizi yapıldı.

Mikrobiyal Kültürlerin İzolasyonu: İnkübasyon süresinden sonra, CT1 konsorsiyumunu içeren mikroorganizmalar saflaştırıldı. Bu amaçla; Nutrient Agar (NA) petriplerde çizgi ekim yöntemi kullanılarak izole edildi<sup>(12)</sup>.

**Tablo 1. Mikrobiyal yapı belirlemede kullanılan primer setleri**

Primer	Nükleotid Dizisi
11F	5'-GTTTGATCCTGGCTCAG-3'
1492R	5'-TACGGCTACCTGTGACTT-3'

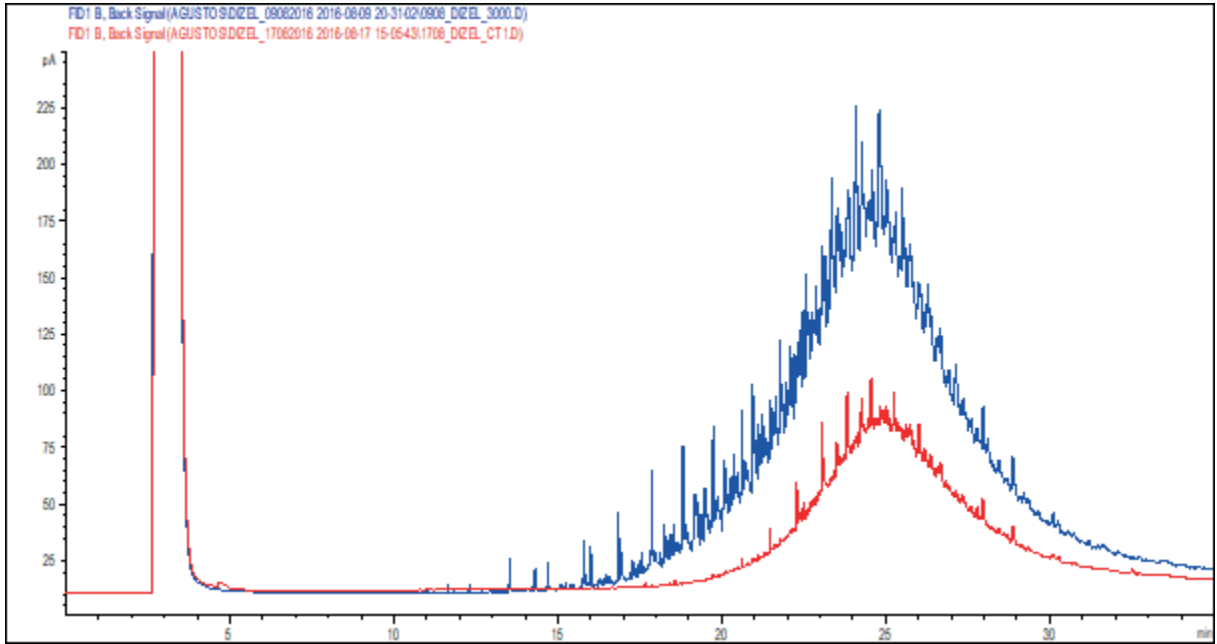
Biyokimyasal ve Enzimatik Tayin: Saflaştırılan izolatlar, biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonlar açısından ayrıntılı olarak analiz edildi. Bunun için mikrobiyal hücreler gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz ve KOH tahlillerinde değerlendirildi<sup>(13)</sup>. Lipaz ve proteaz aktiviteleri tarandı<sup>(14)</sup>.

Konsorsiyum Üyelerinin Belirlenmesi İçin Moleküler Analizler: Tüm mikrobiyal izolatlar için ZR Fungal/Bakteri DNA MiniPrepTM (Zymo Research, ABD) ile DNA izolasyonları yapıldı. DNA konsantrasyonları ve saflıkları UV-Vis spektrofotometre (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, ABD) ile analiz edildi. 16S rRNA kodlayan gen bölgesi, 11F-1492R primer setleri kullanılarak amplifiye edildi (Tablo 1). Bu işlem için gerçekleştirilen PCR protokolü, başlangıç denatürasyon için 95°C 'de beş dk. bir döngü; amplifikasyon için 40 döngü boyunca denatürasyon 95°C'de 20 sn., 50°C'de 40 sn. ve 72°C'de 80 sn. olarak belirlendi<sup>(12)</sup>. Çoğaltılan PCR ürünleri agaroz jel (%2 w/v) elektroforezinde çalıştırıldı ve biyogörüntüleme sistemi (Biospectrum UVP, Birleşik Krallık) altında görüntüledi. Daha sonra PCR ürünleri sekanslandı.

## BULGULAR

CT1 konsorsiyumunda gözlenen erlenler arasında en iyi parçalanmanın %0,5 oranında dizel yağı içeren olduğu tespit edildi. Bu örnekte biyolojik bozunma oranının belirlenmesi amacıyla yapılan gravimetrik analize göre evaporatör sonrasında kalan yağın ağırlığı 0,1027 gr ve kontrolde ise; 0,1861 gr olarak ölçüldü. Bu sonuçlara göre hidrokarbonun biyolojik bozunma yüzde hesaplama formülüne %93 olarak elde edildi.

Şekil 2'de de GC analizi sonucunda elde edilen kromatogramlar verilmektedir. Mavi renkte gösterilen kromatogram yalnızca %0,5 oranında



Şekil 2. Dizel yağının CT1 konsorsiyumunda bozunmasının GC analizi ile tayini

15W40 dizel yağını içeren kontrol örneğine aittir. Kırmızı kromotogram ise; CT1 konsorsiyumunun bulunduğu erlende kalan dizel yağı miktarını temsil etmektedir. GC sonuçları, dizel yağının ana bileşenleri olan çok çeşitli alkanları parçalayabildiğini de gösterdi.

CT1 konsorsiyumunda bulunan mikroorganizmaların belirlenmesi amacıyla saflaştırılarak CT1-1, CT1-2 ve CT1-3 izolatları elde edildi. Saflaştırılan izolatlar, biyokimyasal ve enzimatik reaksiyonlarının belirlenmesi açısından ayrıntılı olarak analiz edildi. Bu amaçla; mikrobiyal hücreler gram reaksiyonları, katalaz, oksidaz ve KOH tahlillerinde değerlendirildi. Lipaz ve proteaz aktiviteleri tarandı (Tablo 2).

Tablo 2’de CT1 izolatlarına ait biyokimyasal testlerin ve enzimatik reaksiyonların sonuçları verilmektedir. Bunun sonucunda; CT1-1 ve CT1-2 izolatlarının gram negatif, CT1-3 izolatının ise gram pozitif bakteri olduğu tespit edildi. KOH testi; CT1-1 ve CT1-2 izolatlarında pozitif, CT1-3 izolatında negatifti. Tüm izolatlarda katalaz aktivitesi tayin edilirken; oksidaz enziminin aktivitesi yalnızca CT1-2 izolatında belirlendi. Lipaz ve proteaz aktiviteleri sadece CT1-3 izolatında tespit edildi.

Tüm mikrobiyal izolatların tanılanması amacıyla yapılan moleküler analizler sonucunda dizel yağının bozunmasını gerçekleştiren mikrobiyal yapı belirlendi. Buna göre; CT1-1 izolatının %99 oranında

Tablo 2. Biyokimyasal testler ve enzimatik reaksiyonların sonuçları

İzolatlar	Gram reaksiyonları	KOH testi	Katalaz	Oksidaz	Lipaz aktivitesi	Proteaz aktivitesi
CT1-1	-	+	+	-	-	-
CT1-2	-	+	+	+	-	-
CT1-3	+	-	+	-	+	+

**Tablo 3. NCBI veri tabanında BLAST edilen dizilerden dominant türler ve % benzerlikleri**

İzolat Adı	Organizma Adı	Genbank % Benzerlik Oranı
CT1-1	<i>Citrobacter</i> sp.	%99
CT1-2	<i>Pseudomonas japonica</i>	%100
CT1-3	<i>Bacillus</i> sp.	%100

*Citrobacter* sp., CT1-2 izolatının %100 oranında *Pseudomonas japonica* ve CT1-3 izolatının %100 oranında *Bacillus* sp. olduğu bulundu (Tablo 3).

## TARTIŞMA

Dizel yağı gibi petrol türevleriyle kirlenmiş olan ortamların biyolojik olarak giderilmesi çevre dostu ve uygun maliyetlidir. Bu çalışmada; ham petrol ile kirlenmiş topraklardan toplanan örnekler aktif biyobozunmayı gerçekleştirecek olan mikrobiyal konsorsiyumun seçimi için n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı kullanıldı. Bu zenginleştirme sonrasında oluşturulan konsorsiyumlardan CT1 bakteriyal konsorsiyumu ile 15W40 dizel yağını 21 günde %93 oranında bozundurmıştır. Nikhil et al.<sup>(15)</sup> petrolle kirlenmiş topraktan izole edilen *Micrococcus* sp. ve *Pseudomonas* sp. tarafından dizel motor yağının biyolojik bozunma oranını incelemişlerdir. 25 günlük inkübasyon süresinden sonra *Pseudomonas* sp. dizel yağının %67.57'sini ve *Micrococcus* sp. ise %52.95 oranında gidermişlerdir. Ancak *Micrococcus* sp. ve *Pseudomonas* sp. karışımı birlikte denendiğinde 25 gün sonra dizel motor yağının %89.98'ini bozmak için büyük bir potansiyele sahip olduğunu tespit etmişlerdir<sup>(15)</sup>. Petrol hidrokarbonları ile kirlenmiş topraklarda emülsifiye edici ve dizel bozundurucu bakteri popülasyonlarının değerlendirildiği başka bir çalışmada *Serratia marcescens* C11S1, *S. marcescens* C7S3A, *Citrobacter freundii* CCC4DS3, *Raoultella ornithinolytica* C5S3, *Stenotrophomonas maltophilia* CCC10S1 ve *Stenotrophomonas pavanii* C5S3FN suşlarını içeren bir konsorsiyum da %97 oranında dizel bozunması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir<sup>(16)</sup>. Demeter ve ark.<sup>(17)</sup> birçok çalışmanın tek izolatlar yerine mikrobiyal konsorsiyumları tercih ettiğini,

çünkü mikrobiyal konsorsiyumların metabolik aktiviteyi uyararak saf kültürlerle göre daha yüksek bir bozunma oranına neden olabileceğini belirtmişlerdir.

Ham petrolün bozunma verimliliği sadece mikrobiyal faktöre bağlı değildir. Aynı zamanda hem çevresel faktörlere hem de ham petrolün miktarına da bağlıdır<sup>(12)</sup>. Bu çalışmada dizel yağının gideriminde en verimli olan CT1(%0,5) konsorsiyumundan üç bakteri izolatının bozunmada etkili olduğu görülmüştür. Hidrokarbon konsantrasyonundaki azalma, CT1-1, CT1-2 ve CT1-3 izolatlarının ham petrolü etkili bir şekilde parçaladığını göstermektedir. Yüksek konsantrasyonda dizel yağının (%0,5) varlığında hidrokarbon parçalayıcı suşların etkinliği, ham petrolün toksik etkisine karşı yüksek tolerans gösterdiklerinin göstergesidir. Bu çalışmada da olduğu gibi; mikroorganizmaların daha yüksek konsantrasyonlarda dizel yağının parçalayabilmesi, çevresel açıdan önemlidir. Çünkü bu yetenek, petrol ürünlerinin sızıntıları veya kirlilik olayları sonucunda ortaya çıkan çevresel kirliliği azaltmada etkili bir yöntem sunabilir. Bu yetenek; çevresel kirliliği azaltma, ekonomik fayda ve biyoremediasyon gibi bazı nedenlerden dolayı oldukça önemlidir<sup>(1,2)</sup>. Özellikle bu çalışmada da işlev görecektir olan mikrobiyal konsorsiyumun seçimi için petrokimya endüstrisinden ham petrol örnekleri toplanmıştır. Geniş tarama yapabilmek için; kültür ortamlarında tek karbon ve enerji kaynağı olarak n-tridekan, n-tetradekan, n-hekzadekan, ayçiçek yağı ve zeytinyağı kullanılmıştır. Bunun sonucunda da dizel yağının parçalanmasında kullanılan konsorsiyum hidrokarbon bozunmasında daha etkili ve dirençli olmuştur. Literatürde bazı çalışmalar, bakteri topluluğunun hidrokarbona önceden maruz kalmasının, daha sonra yağ eklenmesine hızla yanıt verebilecek popülasyonların seçilmesine yol açtığını bildirmiştir<sup>(18,19)</sup>.

CT1 konsorsiyumundaki dizel yağının bozunmasını gerçekleştiren izolatlar; *Citrobacter* sp., *P. japonica* ve *Bacillus* sp.'dir. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, vb. bakteriler, hidrokarbonla kirlenmiş toprakların biyolojik gideriminde oldukça etkili oldukları iyi bilinmektedir<sup>(20)</sup>. Özellikle,

*Bacillus* sp. gibi gram pozitif bakteriler, çoğunlukla petrol ürünlerinden oluşan daha dirençli PAH'ların biyobozunması için de kullanılabilirler. Örneğin; Ekvador'da ham petrolle kirlenmiş bölgelerden izole edilen *Bacillus thuringiensis* B3 ve *Bacillus cereus* B6 suşları 30 günde sırasıyla %84 oranında dizeldeki PAH'ları gidermişlerdir ve ham petrol ile kirlenmiş topraklardan toplam petrol hidrokarbonlarını %94 oranında uzaklaştırmışlardır<sup>(21)</sup>. Kullanılmış motor yağı ile kirlenmiş topraktan izole edilen *Ochrobactrum anthropi* HM-1 ve *Citrobacter freundii* HM-2'nin gama radyasyonu ile ışınlanmış bakteriyel karışımın bozunma etkinliği %95 olurken; ışınlanmamışta ise %79 olduğu görülmüştür<sup>(22)</sup>. Yine, literatürde bazı bakteri türlerinin 20'den fazla karbon atomuna sahip uzun zincirli alkan moleküllerini asimile edebildiği belirtilmiştir<sup>(23-25)</sup>. Alkanların biyolojik olarak ayrışmasına katkıda bulunan enzimler arasında Sitokrom P450 enzimleri, integral membran di-demir alkan hidroksilazlar (örneğin AlkB), çözünür di-demir metan monooksijenazlar ve membrana bağlı bakır içeren metan monooksijenazlar bulunmaktadır<sup>(1,26)</sup>. Alkan hidroksilaz (AH) enzimleri, alkanları genellikle alkollere dönüştürmek için hidroksilasyon reaksiyonlarını katalizleyerek alkanların enzimatik olarak parçalanmasını gerçekleştirirler<sup>(27)</sup>. Bu enzim ailesinin iki önemli üyesi, integral membran alkan 1-monooksijenaz (AlkB) ve sitokrom P450 CYP153 enzimleri, kısa ve orta uzun zincirli alkanların ayrışmasında görev alırlar ve hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerde bulunabilirler<sup>(28,29)</sup>. Bu açıdan, çeşitli *Acinetobacter* suşlarının farklı alkan moleküllerini parçalayabildiği bilinmektedir<sup>(30,31)</sup>. Örneğin; *Acinetobacter oleivorans* DR1 suşunun genomunda iki *alkB*, *almA* ve *ladA* kopyasına sahip olduğu tespit edilmiştir<sup>(32)</sup>. *Acinetobacter* sp. M1, hem *AlkB* ile ilişkili iki hidroksilazı hem de uzun zincirli alkanları oksitleyen bir dioksijenazı içerir<sup>(33)</sup>. *P. aeruginosa* PAO1 ve RR1 suşlarının C12-C16 alkanları oksitleyen membrana entegre non-heme diiron monooksijenazları kodlayan iki alkan hidroksilaz genine (*AlkB1* ve *AlkB2*) sahip olduğu bulunmuştur<sup>(27,33)</sup>.

Sonuç olarak; doğada bazı mikroorganizmalar çeşitli metabolik işlevlere sahiptir. Birçoğu da ortamlardan

belirli kirlenmeleri uzaklaştırabilirler. Özellikle belirli bir mikrobiyal konsorsiyumlar kullanarak çeşitli hidrokarbonların giderimi mümkündür. Mikrobiyal konsorsiyumlar bu hidrokarbonları uzaklaştırmak için bir dizi metabolik yola sahip olduklarından sinerjik olarak işbirliği yapabilirler. Bu sebeple, yerel mikroorganizmaları hızlandırdığı veya geliştirdiği için kirlenmeleri kontamine alanlardan uzaklaştırmanın etkili bir yoldur<sup>(34)</sup>. Ayrıca, saf mikrobiyal kültürlerle kıyasla mikrobiyal konsorsiyumlar daha etkili bir biyolojik iyileştirme/yağ bozunma potansiyeline sahiptirler<sup>(35)</sup>. Bu çalışma ile CT1 konsorsiyumundaki bakteriler ile dizel yağının neredeyse tamamını bozundurmıştır. Bu şekilde izole ve karakterize edilen bakteriler; kirlenmiş toprakların çevre dostu bir şekilde iyileştirilmesi için umut verici bir çözüm olarak hizmet edebilirler. Dizel yağı biyoparçalanması, fosil yakıtlara olan bağımlılığı azaltmak ve çevresel etkileri azaltmak için önemli bir adım olabilir. Bu nedenle, bu alanda yapılan ilerici çalışmalar, sürdürülebilir enerji kaynaklarının geliştirilmesine katkı sağlayabilir. Biyoteknolojik yöntemler kullanarak mikroorganizmaların dizel yağı parçalama yeteneklerini artırılabilir. Örneğin, gen mühendisliği veya enzim mühendisliği gibi yöntemlerle mikroorganizmaların performansını optimize edilebilir. Bu tür çalışmalar, çevre koruma ve sürdürülebilirlik açısından önemli katkılar sunabilirler.

**Teşekkür:** Laboratuvar altyapısının kullanımına olanak sağladığı için Prof. Dr. Güven Özdemir'e teşekkür ederim.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Finansman:** Bu araştırma için herhangi bir dış finansman alınmadığı bildirilmiştir.

**Acknowledgment:** I would like to thank Prof. Dr. Güven Özdemir for allowing the use of the laboratory infrastructure.

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

**Funding:** Declared as "This research received no external funding".

## KAYNAKLAR

1. Das N, Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotechnol Res Int*. 2011;2011:941810. <https://doi.org/10.4061/2011/941810>
2. Xue J, Yu Y, Bai Y, Wang L, Wu Y. Marine oil-degrading microorganisms and biodegradation process of petroleum hydrocarbon in marine environments: a review. *Curr Microbiol*. 2015;71(2):220-8. <https://doi.org/10.1007/s00284-015-0825-7>
3. Bachmann RT, Johnson AC, Edyvean RGJ. Biotechnology in the petroleum industry: An overview. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2014;86(Part C):225-37. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.09.011>
4. Onur G, Yılmaz F, Içgen B. Diesel oil degradation potential of a bacterium inhabiting petroleum hydrocarbon contaminated surface waters and characterization of its emulsification ability. *J Surfact Deterg*. 2015;18:707-17. <https://doi.org/10.1007/s11743-015-1697-3>
5. Dixit H, Madan L, Umema M, et al. Screening and identification of diesel oil degrading bacterial isolates from petroleum contaminated soil of Barmer. *J Pharm Chem Biol Sci*. 2018;6(1):34-40.
6. Varjani SJ. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresour Technol*. 2017;223:277-86. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
7. Rojo F, editor. *Aerobic utilization of hydrocarbons, oils, and lipids*. Cham: Springer International Publishing; 2019.
8. Xu X, Liu W, Tian S, et al. Petroleum hydrocarbon-degrading bacteria for the remediation of oil pollution under aerobic conditions: a perspective analysis. *Front Microbiol*. 2018;9:2885. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02885>
9. De Souza Pereira Silva D, de Lima Cavalcanti D, de Melo EJV, et al. Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2015;97:85-9. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.09.021>
10. Vural C, Diallo MM, Ozdemir G. Assessment of *Comamonas testosteroni* strain PT9 as a rapid phthalic acid degrader for industrial wastewaters. *J Basic Microbiol*. 2022;62(3-4):508-17. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100258>
11. Diallo MM, Vural C, Şahar U, Ozdemir G. Kurstakin molecules facilitate diesel oil assimilation by *Acinetobacter haemolyticus* strain 2SA through overexpression of alkane hydroxylase genes. *Environ Technol*. 2021;42(13):2031-45. <https://doi.org/10.1080/09593330.2019.1689301>
12. Diallo MM, Vural C, Cay H, Ozdemir G. Enhanced biodegradation of crude oil in soil by a developed bacterial consortium and indigenous plant growth promoting bacteria. *J Appl Microbiol*. 2021;130(4):1192-207. <https://doi.org/10.1111/jam.14848>
13. Shoaib M, Muzammil I, Hammad M, Bhutta ZA, Yaseen I. A mini-review on commonly used biochemical tests for identification of bacteria. *Int J Res Publ*. 2020;54(1). <https://doi.org/10.47119/IJRP100541620201224>
14. Uzunbayır-Akel N, Tekintaş Y, Yılmaz FF, et al. Klinik *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının virülans özellikleri ve epidemiyolojik ilişkisi. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2019;76(4):395-404. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.68235>
15. Nikhil T, Deepa V, Rohan G, Satish B. Isolation, characterization and identification of diesel engine oil degrading bacteria from garage soil and comparison of their bioremediation potential. *Int Res J Environment Sci*. 2013;2(2):48-52.
16. Morales-Guzmán G, Ferrera-Cerrato R, Rivera-Cruz MDC, et al. Diesel degradation by emulsifying bacteria isolated from soils polluted with weathered petroleum hydrocarbons. *Appl Soil Ecol*. 2017;121:127-34. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.10.003>
17. Demeter MA, Lemire JA, Mercer SM, Turner RJ. Screening selectively harnessed environmental microbial communities for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in moving bed biofilm reactors. *Bioresour Technol*. 2017;228:116-24. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.086>
18. Dörr De Quadros P, Cerqueira VS, Cazarolli JC, et al. Oily sludge stimulates microbial activity and changes microbial structure in a landfarming soil. *Int Biodeterior Biodegrad*. 2016;115:90-101. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.018>
19. Koolivand A, Godini K, Saeedi R, Abtahi H, Ghamari F. Oily sludge biodegradation using a new two-phase composting method: kinetics studies and effect of aeration rate and mode. *Process Biochem*. 2019;79:127-34. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.003>
20. Yadav AK, Manna S, Pandiyan K, et al. Isolation and characterization of biosurfactant producing *Bacillus* sp. from diesel fuel-contaminated site. *Microbiology*. 2016;85:56-62. <https://doi.org/10.1134/S0026261716010161>
21. Raju MN, Leo R, Herminia SS, Morán REB, Venkateswarlu K, Laura S. Biodegradation of diesel, crude oil and spent lubricating oil by soil isolates of *Bacillus* spp. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017;98(5):698-705. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2039-0>



22. Ibrahim HMM. Biodegradation of used engine oil by novel strains of *Ochrobactrum anthropi* HM-1 and *Citrobacter freundii* HM-2 isolated from oil-contaminated soil. 3 Biotech. 2016;6(2):226. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0540-5>
23. Van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. Oil Gas Sci Technol. 2003;58(4):427-40. <https://doi.org/10.2516/ogst:2003026>
24. Boonmak C, Takahashi Y, Morikawa M. Cloning and expression of three *ladA*-type alkane monooxygenase genes from an extremely thermophilic alkane-degrading bacterium *Geobacillus thermoleovorans* B23. Extremophiles. 2014;18(3):515-23. <https://doi.org/10.1007/s00792-014-0636-y>
25. Feng L, Wang W, Cheng J, et al. Genome and proteome of long-chain alkane degrading *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 isolated from a deep-subsurface oil reservoir. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(13):5602-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609650104>
26. Rosenberg M, Rosenberg E. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane. J Bacteriol. 1981;148(1):51-7. <https://doi.org/10.1128/jb.148.1.51-57.1981>
27. Rojo F. Enzymes for aerobic degradation of alkanes. In: Timmis KN, editor. Handb Hydrocarb Lipid Microbiol. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010:781-97.
28. Ji Y, Mao G, Wang Y, Bartlam M. Structural insights into diversity and n-alkane biodegradation mechanisms of alkane hydroxylases. Front Microbiol. 2013;4:58. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00058>
29. Maier T, Förster H-H, Asperger O, Hahn U. Molecular characterization of the 56-kDa CYP153 from *Acinetobacter* sp. EB104. Biochem Biophys Res Commun. 2001;286(3):652-8. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5449>
30. Throne-Holst M, Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, Zotchev SB. Identification of novel genes involved in long-chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* sp. strain DSM 17874. Appl Environ Microbiol. 2007;73(10):3327-32. <https://doi.org/10.1128/AEM.00064-07>
31. Jung J, Baek J-H, Park W. Complete genome sequence of the diesel-degrading *Acinetobacter* sp. strain DR1. J Bacteriol. 2010;192(18):4794-5. <https://doi.org/10.1128/JB.00722-10>
32. Kang Y-S, Jung J, Jeon CO, Park W. *Acinetobacter oleivorans* sp. nov. is capable of adhering to and growing on diesel-oil. J Microbiol. 2011;49(1):29-34. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0315-y>
33. Park C, Shin B, Jung J, Lee Y, Park W. Metabolic and stress responses of *Acinetobacter oleivorans* DR 1 during long-chain alkane degradation. Microb Biotechnol. 2017;10(6):1809-23. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12852>
34. Vural C. A brief perspective on hydrocarbon degradation: Microbial factors and role of bacteria-hydrocarbon interactions in bioremediation. Interdiscip Basic Sci Res Approaches. Lithuania: SRA Academic Publishing; 2022:41-62.
35. Canul-Chan M, Sánchez-González M, González-Burgos A, Zepeda A, Rojas-Herrera R. Population structures shift during the biodegradation of crude and fuel oil by an indigenous consortium. Int J Environ Sci Technol. 2018;15:1-16. <https://doi.org/10.1007/s13762-017-1362-7>