

***Rhizobium* CİNSİ BAKTERİLERİN POLİ- $\beta$ -HİDROKSİBÜTİRAT  
ÜRETİMLERİNİN BELİRLENMESİ, SODYUM DODESİL SÜLFAT  
POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE) İLE ELDE  
EDİLEN TOPLAM PROTEİN PROFİLLERİNİN VE PLAZMİD  
DNA'LARININ İNCELENMESİ**

**Nazime MERCAN**

**123552**

**DOKTORA TEZİ**

**(BİYOLOJİ ANABİLİM DALI)**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Haziran 2002**

**ANKARA**

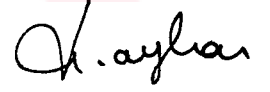
Nazime MERCAN tarafından hazırlanan *Rhizobium* CİNSİ BAKTERİLERİN POLİ- $\beta$ -HİDROKSİBÜTİRAT ÜRETİMLERİNİN BELİRLENMESİ, SODYUM DODESİL SÜLFAT POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE) İLE ELDE EDİLEN TOPLAM PROTEİN PROFİLLERİNİN VE PLAZMİD DNA'LARININ İNCELENMESİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.



Prof. Dr. YAVUZ BEYATLI  
Tez Yöneticisi

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

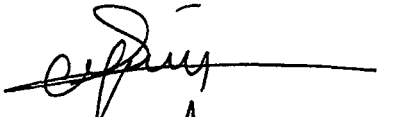
Başkan : Prof. Dr. Kamuran Ayhan



Üye : Prof. Dr. Yavuz Beyatlı



Üye : Prof. Dr. Mübeccel Ergun



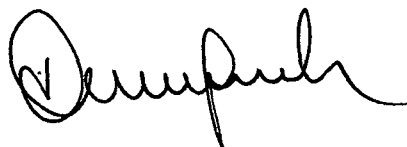
Üye : Prof. Dr. Gönül Dönmez



Üye : Doç. Dr. Belma Aslım



Bu tez, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygundur.



## İÇİNDEKİLER

|                                                                                        | Sayfa |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| ÖZET.....                                                                              | i     |
| ABSTRACT .....                                                                         | iv    |
| TEŞEKKÜR .....                                                                         | vii   |
| ÇİZELGELERİN LİSTESİ .....                                                             | viii  |
| ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....                                                               | xii   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                           | xvi   |
| 1. GİRİŞ.....                                                                          | 1     |
| 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....                                                            | 4     |
| 2.1. Prokaryotik Hücre İnklüzyonları ve Poli-β-Hidroksibütiratın (PHB) tarihçesi ..... | 4     |
| 2.2. PHB'nin Özellikleri.....                                                          | 6     |
| 2.3. PHB'nin Biyosentezi.....                                                          | 8     |
| 2.4. Bakterilerde PHB Üretimi.....                                                     | 9     |
| 2.4.1. <i>Alcaligenes eutrophus</i> ve <i>A. latus</i> .....                           | 9     |
| 2.4.2. <i>Azotobacter vinelandii</i> ve <i>Pseudomonas</i> cinsi bakteriler .....      | 10    |
| 2.4.3. <i>Bacillus</i> cinsi bakteriler .....                                          | 11    |
| 2.4.4. Diğer bakterilerde PHB .....                                                    | 12    |
| 2.4.5. Rekombinant <i>E. coli</i> .....                                                | 13    |
| 2.4.6. Transgenik bitki (= <i>Arabidopsis thaliana</i> ).....                          | 14    |
| 2.4.7. PHB'nin biyolojik parçalanabilirliği ve yenilenebilme özelliği .....            | 15    |
| 2.5. PHB'nin Kullanım Alanları.....                                                    | 16    |
| 2.5.1. Ziraatte kullanım alanları.....                                                 | 16    |
| 2.5.2. Veterinerlikte kullanım alanları.....                                           | 17    |
| 2.5.3. Tıpta kullanım alanları.....                                                    | 17    |
| 2.5.4. Özel uygulamalarda kullanılması.....                                            | 19    |
| 2.6. <i>Rhizobium</i> Bakterilerinin Genel Özellikleri.....                            | 19    |
| 2.6.1. <i>Rhizobium</i> -baklagil ilişkisi.....                                        | 22    |

|           |                                                                               |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.2.    | Azot fiksasyonunda ve <i>Rhizobium</i> bakterilerinde PHB.....                | 23 |
| 2.7.      | PHB Üretimi Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları .....                        | 26 |
| 2.8.      | Melasın PHB Üretiminde Kullanılması.....                                      | 27 |
| 2.9.      | <i>Rhizobium</i> Bakterilerinde Plazmid DNA.....                              | 29 |
| 2.10.     | Bakteriyosin ve/veya Bakteriyosin Benzeri Maddeler .....                      | 32 |
| 2.11.     | Protein Profillerinin Bakteri Sistematğinde Kullanımı.....                    | 34 |
| 3.        | MATERYAL ve METOT .....                                                       | 37 |
| 3.1.      | Materyal .....                                                                | 37 |
| 3.1.1.    | Materyal örnekleri .....                                                      | 37 |
| 3.1.2.    | Araştırmada kullanılan besiyerleri .....                                      | 38 |
| 3.1.3.    | Araştırmada kullanılan test bakterileri.....                                  | 40 |
| 3.2.      | Metot.....                                                                    | 41 |
| 3.2.1.    | Bakterilerin izolasyonu .....                                                 | 41 |
| 3.2.2.    | İzole edilen suşların muhafazası.....                                         | 42 |
| 3.2.3.    | Bakterilerin farklı karbon kaynaklarında üreme durumlarının belirlenmesi..... | 41 |
| 3.2.4.    | Nitrat redüksiyonu .....                                                      | 42 |
| 3.2.5.    | Genel inhibisyon aktivitesinin tespiti .....                                  | 43 |
| 3.2.6.    | PHB granüllerinin Nile Blue A ile boyanması.....                              | 44 |
| 3.2.7.    | PHB üretiminin tespiti .....                                                  | 44 |
| 3.2.8.    | Sonikasyon süresinin tespiti.....                                             | 46 |
| 3.2.9.    | Farklı karbon ve azot kaynaklarının PHB üretimine etkisi.....                 | 46 |
| 3.2.10.   | Mutasyon denemeleri.....                                                      | 47 |
| 3.2.10.1  | UV ışını ile mutasyon çalışması. ....                                         | 47 |
| 3.2.10.2. | Akriflavin uygulaması .....                                                   | 48 |
| 3.2.10.3. | N-metil-3-nitrosoguanidin uygulaması.....                                     | 48 |
| 3.2.10.4. | 5-Bromourasil uygulaması.....                                                 | 49 |
| 3.2.11.   | <i>Rhizobium</i> bakterilerin melas besi ortamında PHB üretimleri.....        | 50 |
| 3.2.12.   | Plazmid DNA izolasyonu .....                                                  | 51 |
| 3.2.13.   | Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE).....         | 54 |
| 3.2.13.1. | Toplam hücre protein ekstraksiyonu .....                                      | 54 |
| 3.2.13.2. | Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı.....                              | 55 |

|                                                                                       |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.13.3. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun yarı kantitatif tayini .....         | 58  |
| 3.2.14.1. Protein elektroforezin yapılışı ve jellerin boyanması. ....                 | 58  |
| 3.2.14.2. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması.....                     | 58  |
| 4. DENEYSEL BULGULAR .....                                                            | 59  |
| 4.1. <i>Rhizobium</i> Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyonları .....                | 59  |
| 4.2. <i>Rhizobium</i> Suşlarının Bazı Test Bakterileri Üzerine İnhibisyon Etkisi..... | 60  |
| 4.3. PHB Granüllerinin Nile Blue A ile Boyanması .....                                | 65  |
| 4.4. <i>Rhizobium</i> Bakterilerinde PHB Üretimi .....                                | 65  |
| 4.5. Farklı Karbon Kaynaklarının PHB Üretimine Etkisi .....                           | 71  |
| 4.6. Farklı Azot Kaynaklarının PHB Üretimine Etkisi.....                              | 89  |
| 4.7. Kombine Besiyerinde PHB Üretimi .....                                            | 103 |
| 4.8. Farklı Sodyum Klorür Miktarlarının PHB Üretimine Etkisi. ....                    | 111 |
| 4.9. Mutasyon Uygulamaları.....                                                       | 114 |
| 4.10. Melas Ortamında PHB Üretimi.....                                                | 123 |
| 4.11. <i>Rhizobium</i> Suşlarında Plazmid DNA .....                                   | 130 |
| 4.12. <i>Rhizobium</i> Suşlarının Toplam Protein Profillerine Göre Ayrımı.....        | 132 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                            | 135 |
| 6. ÖNERİLER.....                                                                      | 162 |
| KAYNAKLAR. ....                                                                       | 163 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                                         | 175 |

***Rhizobium* CİNSİ BAKTERİLERİN POLİ- $\beta$ -HİDROKSİBÜTİRAT  
ÜRETİMLERİNİN BELİRLENMESİ, SODYUM DODESİL SÜLFAT  
POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ (SDS-PAGE) İLE ELDE  
EDİLEN TOPLAM PROTEİN PROFİLLERİNİN VE PLAZMİD  
DNA'LARININ İNCELENMESİ**  
(Doktora Tezi)

Nazime MERCAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2002

**ÖZET**

Araştırmada *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium viciae* ve *Rhizobium* sp. türlerine ait toplam 31 adet suş kullanılmıştır. Bakterilerin karbon kaynaklarını kullanma yetenekleri belirlenmiş ve suşların monosakkarit olarak glukoz, dekstroz ve mannitolu kullandıkları gözlenirken, trehaloz, ksiloz, rafinoz, maltoz, galaktoz, sukroz, laktoz ve pirüvik asit-sodyum tuzunu kullanma yeteneklerinde farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir. Genel olarak *Rhizobium* suşların asidik ortamda üremedikleri gözlenirken, suşlardan yalnız *R. viciae* F69, F111, *R. phaseoli* Fa28, Fa41, *R. cicer* N1, N2, N4, N6'nın pH 4,5'te üredikleri ve bu suşların asite tolerant oldukları tespit edilmiştir. Bakterilerin toplam hücre proteinlerinin SDS-PAGE analizi yapılmış, proteinlerin moleküler ağırlıkları 11-215 kD arasında olduğu bulunmuştur. SDS-PAGE analizi, aynı türe ait suşların protein profillerinin birbirine benzer olduğunu, diğer türlerden farklı olduğunu göstermiştir.

*Rhizobium* bakterilerin PHB üretimleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş, hücredeki polimer içeriğinin kalitatif tayininde ise Nile Blue A kullanılmıştır.

Bakteri kolonilerin PHB miktarına bağı olarak 254 nm UV ışığı altında rengin pembeden turuncuya doğru değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Bakterilerin PHB üretimleri hücre kuru ağırlığına göre %5,37-57,09 arasında değiştiği bulunmuştur. Maksimum PHB üretimi gösteren *R. viciae* F111 (%57,09), *R. meliloti* Y11 (%39,25) ve *B. japonicum* S Irat Fab (%34,43) suşlarının farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretimleri araştırılmıştır. *R. meliloti* Y11 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşları karbon kaynağı olarak glukoz besi ortamında maksimum PHB verimi gösterirken (sırasıyla, %83,75 ve %34,31), *R. viciae* F111 suşu mannitol içeren besiyerinde yüksek oranda (%41,22) PHB üretmiştir. Suşların azot kaynaklarında (F111 dışında) PHB verimlerinin yüksek olmadığı bulunmuştur. Azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besi ortamında *R. meliloti* Y11 suşu maksimum %26,23 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşu %26,78 PHB üretirken, *R. viciae* F111 suşu asparajın azot kaynağında maksimum %48,13 oranında PHB üretmiştir. Ayrıca kültür ortamının asitliği arttıkça PHB içeriğinde azalma olduğu bulunmuştur.

Yüksek PHB üreten suşlar arasından *R. meliloti* Y11 suşu seçilerek mutasyonun PHB üretimine etkisi incelenmiştir. Fiziksel mutajen olarak farklı sürelerde 254 nm dalga boyunda UV ışını, kimyasal mutajen olarak da farklı konsantrasyonlarda akriflavin, 5-bromourasil ve nitrosoguanidin uygulanmıştır. Muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun PHB üretimleri tespit edilmiş ve bir yıl arayla suşların PHB sentez yetenekleri incelenmiştir. Muhtemel mutant suşlar ilk ölçümlerde atasal suşa kıyasla daha düşük oranlarda PHB üretirken, bazı suşların bir yıl sonraki ölçümlerde PHB üretimlerinde yükselme olduğu tespit edilmiştir.

Araştırmada, farklı melas konsantrasyonlarında *R. meliloti* Y11, *B. japonicum* S Irat Fab ve *R. viciae* F111 suşları üretilmiş ve bu besi ortamlarında suşların PHB üretimleri incelenmiştir. *R. meliloti* Y11 suşu melasın %0,5 konsantrasyonunda maksimum %56,31 oranında PHB üretirken, *R. viciae* F111 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşlarında PHB üretimin düşük olduğu

belirlenmiştir. *R. viciae* F111 suşunda kültür ortamındaki viskozitenin artışına bağlı olarak PHB veriminde bir azalma olduğu gözlenmiştir.

*Rhizobium* bakterilerin bazı test bakterileri üzerinde genel inhibisyon etkileri agar difüzyon metodu ile incelenmiştir. Kullanılan test bakterileri üzerinde *Rhizobium* bakterilerin inhibisyon etkilerinin olmadığı bulunmuştur.

*Rhizobium* suşlarının plazmid DNA profilleri çıkarılarak, bunların moleküler ağırlıkları tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre yalnız 13 adet suşun plazmid içerdiği, diğer suşlarda plazmidin bulunmadığı gözlenmiştir. Bakterilerde plazmidlerin moleküler ağırlıkları 13,5-16,74 kb arasında bulunmuştur.

Bilim Kodu : 401.02.00

Anahtar Kelimeler : *Rhizobium*, izolasyon, karbon kaynaklarını kullanım yeteneği, biyoplastik (PHB) üretimi, farklı karbon ve azot kaynakları, şeker pancarı melası, antimikrobiyal aktivite, protein profili, plazmid DNA

Sayfa adedi : 175

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

**DETERMINATION OF PRODUCTION OF POLY- $\beta$ -  
HYDROXYBUTYRATE (PHB) OF SOME *Rhizobium* BACTERIA,  
DISCRIMINATION OF STRAINS BY TOTAL CELL PROTEIN PROFILES  
OBTAINED BY SODIUM DODECYL SULPHATE POLYACRYLAMIDE  
GEL ELECTROPHORESIS (PAGE) AND ISOLATION OF PLASMID DNA  
(Ph.D.Thesis)**

Nazime MERCAN

GAZİ UNIVERSITY  
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

June 2002

**ABSTRACT**

In the research, a total of 31 of *Rhizobium* strains (*R. meliloti*, *R. japonicum*, *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *R. viciae*, *Rhizobium* sp.) were used. Determination of carbon source utilization showed that these strains could use glucose, dextrose and mannitol as monosaccharides while they showed differences in the utilization of trehalose, xylose, raffinose, maltose, galactose, sucrose, lactose and pyruvic acid-sodium salt. Generally, *Rhizobium* strains did not grow at low pH, but *R. viciae* F69, F111, *R. phaseoli* Fa28 and Fa41, *R. cicer* N1, N2, N4, N6 strains were able to grow at pH 4,5 and these strains were characterized to be acid tolerant. Total cell protein profiles of bacteria were analysed using SDS-PAGE and molecular weights of proteins were found between 11-215 kD. Based on the protein profiles, it was possible to distinguish all of the strains. According to the SDS-PAGE analysis, it has been found strains belonging to the same species showed similarities in their protein patterns and differences from other species.

PHB production by *Rhizobium* bacteria was determined by a spectrophotometric method. A qualitative method using Nile Blue A reagent

was used for the detection of PHB in the cells. The color of the colonies under 254 nm-ultraviolet light at 254 nm ranged from pink to orange depending on the amount of PHB in the cells. It was found that the PHB contents of the strains the cell dry weight were between 5,37-57,09%. The effects of different carbon and nitrogen sources on the production of PHB by some of the strains were examined. For this purpose the strains *R. viciae* F111 (57,09%), *R. meliloti* Y11 (39,25%) and *B. japonicum* S Irat Fab (34,43%) which had been shown to have the highest PHB production were used. The maximum yield of PHB for *R. meliloti* Y11 and *B. japonicum* S Irat Fab strains were 83,75% and 34,31% of the cell dry weight respectively when they were grown in glucose medium as the carbon source. *R. viciae* F111 produced a high level of PHB (41,22%) in the mannitol medium. The percentage yield of PHB by the strains (except F111) was not found high in the media containing nitrogen sources. While the highest PHB accumulation was obtained with the strain *R. meliloti* Y11 (26,23%) and *B. japonicum* S Irat Fab (26,78%) grown in the medium containing protease peptone, *R. viciae* F111 was produced 48,13% of PHB in medium containing asparagine. The PHB concentration of the cells decreased with decreasing pH of the cultures.

Among the strains showing the highest production of PHB *R. meliloti* Y11 was selected for mutation studies. Acriflavine, 5-bromourasil, nitrosoguanidine as chemical mutations and UV irradiation at 254 nm as physical mutation were applied on the selected strain. The PHB production by parent and mutant strains were determined periodically and continued one year interval. Compared with the parent strains the percentage were determined in the first period of measurement. The amount of PHB in some mutant strains increased in the second period measurement. In addition, the effects of physical and chemical mutations on the production of PHB by the strains were different.

Ability of strains in the production of PHB by *R. meliloti* Y11, *B. japonicum* S Irat Fab and *R. viciae* F111 grown in different concentration of beet molasses were studied. While *R. meliloti* Y11 strain produced maximum of PHB as

56,31% in medium containing 0,5% beet molasses, *R. viciae* F111 and *B. japonicum* S Irat Fab strains in beet molasses medium showed production of PHB at lower percentage. A lower yield of PHB for *R. viciae* F111 was observed with increasing viscosity of the medium.

The agar diffusion method was used to study the general inhibitory effect of *Rhizobium* strains on some test bacteria. None of the strains were shown to have any inhibitory affect on test bacteria.

Plasmid DNA profiles of *Rhizobium* strains and their molecular weight were determined. According to the results, only 13 strains carried plasmid, while the did not carry. Molecular weights of plasmids ranged between 13,5-16,74 kb.

Science Code : 401.02.00

Key Words : *Rhizobium*, isolation, utizilation of carbon sources, bioplastic (PHB), different carbon and nitrogen sources, beet molasses, antimicrobial activity, protein profile, plasmid DNA

Page number : 175

Advisor : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

## TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgilerinden yararlandığım danışman hocam sayın Prof. Dr. Yavuz BEYATLI'ya, yine kıymetli tecrübelerinden faydalandığım sayın Prof.Dr. Gönül DÖNMEZ ve Doç.Dr. Belma ASLIM'a, ayrıca Ziraat Yüksek Mühendisi Dr. Kemal KARUÇ'a, laboratuvarında çalışan tüm arkadaşlarıma, maddi ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, yazım sırasında oluşan tüm sıkıntılarımla paylaşan çok değerli aileme teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmayı proje olarak destekleyen Gazi Üniversitesi Araştırma Fonuna teşekkür ederim.



## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

| Çizelge       | Sayfa                                                                                                                                                           |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Çizelge 3.1.  | <i>Rhizobium</i> suşları ve temin edildikleri kaynaklar.....37                                                                                                  |
| Çizelge 3.2.  | İndikatör bakteri suşların temin edildiği kaynaklar ve inkübasyon dereceleri.....40                                                                             |
| Çizelge 3.3.  | Şeker pancarı melasının ortalama bileşimleri .....50                                                                                                            |
| Çizelge 4.1.  | <i>Rhizobium</i> suşlarının karbon kaynaklarında üreme durumları.....61                                                                                         |
| Çizelge 4.2.  | <i>Rhizobium</i> bakterilerin YEM besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB üretimi ve yüzde verimi.....67                                                        |
| Çizelge 4.3.  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....74              |
| Çizelge 4.4.  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.75                         |
| Çizelge 4.5.  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.76                         |
| Çizelge 4.6.  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.77                         |
| Çizelge 4.7.  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Sodyum Asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....78             |
| Çizelge 4.8.  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....79      |
| Çizelge 4.9.  | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....80 |
| Çizelge 4.10. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....81       |

|               |                                                                                                                                                                              |    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4.11. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....                      | 82 |
| Çizelge 4.12. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Sodyum Asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....               | 83 |
| Çizelge 4.13. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....        | 84 |
| Çizelge 4.14. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....                              | 85 |
| Çizelge 4.15. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.....                                     | 86 |
| Çizelge 4.16. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.....                                     | 87 |
| Çizelge 4.17. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.....                                     | 88 |
| Çizelge 4.18. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak Proteaz pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....                             | 91 |
| Çizelge 4.19. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.....                                      | 92 |
| Çizelge 4.20. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi. | 93 |
| Çizelge 4.21. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.                                       | 94 |
| Çizelge 4.22. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak DL-triptofan içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.                                    | 95 |
| Çizelge 4.23. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Proteaz pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi .....                | 96 |

|               |                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 4.24. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi. ....          | 97  |
| Çizelge 4.25. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi ....                                                 | 98  |
| Çizelge 4.26. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak Proteaz pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.                                                              | 99  |
| Çizelge 4.27. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.....                                                                  | 100 |
| Çizelge 4.28. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi                              | 101 |
| Çizelge 4.29. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.....                                                               | 102 |
| Çizelge 4.30. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in Glukoz+Proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi                                                                 | 105 |
| Çizelge 4.31. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın Glukoz+Proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi ....                                               | 106 |
| Çizelge 4.32. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.                                                                    | 107 |
| Çizelge 4.33. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi.                                                                   | 108 |
| Çizelge 4.34. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi ....                                                  | 109 |
| Çizelge 4.35. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in Glukoz+Proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi                                                                  | 110 |
| Çizelge 4.36. | <i>R. meliloti</i> Y11, <i>B. japonicum</i> S Irat Fab ve <i>R. viciae</i> F111'in farklı sodyum klorür miktarları içeren YEM sıvı besiyerinde hücre kuru ağırlıkları, PHB miktarı ve yüzde verimi..... | 112 |
| Çizelge 4.37. | UV ışını uygulaması ile elde edilen muhtemel mutant suşlar ve atasal suşun I. ve II. PHB ölçümü .....                                                                                                   | 116 |

|               |                                                                                                                                                                    |     |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 4.38. | Akriflavin mutagen uygulaması ile elde edilen muhtemel mutant suşlar ve atasal suşun II. PHB ölçüm sonuçları.....                                                  | 117 |
| Çizelge 4.39. | 5-Bromourasil mutagen uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm sonuçları.....                                         | 118 |
| Çizelge 4.40. | Nitrosoguanidin mutagen uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm sonuçları.....                                       | 121 |
| Çizelge 4.41. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in farklı melas konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu.....                                                                            | 125 |
| Çizelge 4.42. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın farklı melas konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu .....                                                              | 126 |
| Çizelge 4.43. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in farklı melas konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu.....                                                                             | 127 |
| Çizelge 4.44. | <i>R. meliloti</i> Y11, <i>B. japonicum</i> S Irat Fab ve <i>R. viciae</i> F111'in melas ortamında hücre kuru ağırlıkları, PHB üretimleri ve yüzde verimleri ..... | 128 |
| Çizelge 4.45. | <i>Rhizobium</i> bakterilerin plazmid sayı ve moleküler ağırlıkları .....                                                                                          | 130 |

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

| Şekil                                                                                                                                                             | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 4.1a. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın koloni morfolojisi .....                                                                                | 63    |
| Şekil 4.1b. <i>Rhizobium</i> spp. Ba378'in koloni morfolojisi.....                                                                                                | 63    |
| Şekil 4.1c. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in koloni morfolojisi.....                                                                                              | 64    |
| Şekil 4.1d. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in mikroskopik görünümü .....                                                                                           | 64    |
| Şekil 4.2. <i>Rhizobium</i> bakterilerin YEM sıvı besi yerinde hücre kuru ağırlıkları ve PHB üretim histogramı.....                                               | 69    |
| Şekil 4.3. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....          | 74    |
| Şekil 4.4. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                 | 75    |
| Şekil 4.5. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                 | 76    |
| Şekil 4.6. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                 | 77    |
| Şekil 4.7. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Sodyum Asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....         | 78    |
| Şekil 4.8. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....  | 79    |
| Şekil 4.9. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.. | 80    |
| Şekil 4.10. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....  | 81    |
| Şekil 4.11. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....  | 82    |
| Şekil 4.12. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Sodyum Asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı | 83    |

|                                                                                                                                                                                                         |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.13. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....                          | 84  |
| Şekil 4.14. <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....                                                | 85  |
| Şekil 4.15. <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                       | 86  |
| Şekil 4.16. <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                       | 87  |
| Şekil 4.17. <i>Rhizobium viciae</i> F111'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                       | 88  |
| Şekil 4.18. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak Proteaz pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                | 91  |
| Şekil 4.19. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                        | 92  |
| Şekil 4.20. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....               | 93  |
| Şekil 4.21. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                     | 94  |
| Şekil 4.22. <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in azot kaynağı olarak DL-triptofan içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                  | 95  |
| Şekil 4.23. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Proteaz pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı                                        | 96  |
| Şekil 4.24. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı ..... | 97  |
| Şekil 4.25. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....                                       | 98  |
| Şekil 4.26. <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak Proteaz pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                 | 99  |
| Şekil 4.27. <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....                                                        | 100 |

|             |                                                                                                                                                                                               |     |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.28. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                     | 101 |
| Şekil 4.29. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                        | 102 |
| Şekil 4.30. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in Glukoz+Proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                     | 105 |
| Şekil 4.31. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın Glukoz+Proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....                                       | 106 |
| Şekil 4.32. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                         | 107 |
| Şekil 4.33. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi. ....                                                    | 108 |
| Şekil 4.34. | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab'ın Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı .....                                          | 109 |
| Şekil 4.35. | <i>Rhizobium viciae</i> F111'in Glukoz+Proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı.....                                                      | 110 |
| Şekil 4.36. | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11, <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab ve <i>Rhizobium viciae</i> F111'in farklı NaCl miktarı içeren YEM sıvı besiyerinde PHB yüzde verim histogramı ..... | 113 |
| Şekil 4.37. | UV ışını uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm histogramı .....                                                                               | 116 |
| Şekil 4.38. | Akriflavin uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm histogramı .....                                                                             | 117 |
| Şekil 4.39. | 5-Bromourasil uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm histogramı .....                                                                          | 118 |
| Şekil 4.40. | Nitrosoguanidin uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm histogramı .....                                                                        | 119 |
| Şekil 4.41. | Farklı melas konsantrasyonlarında <i>Rhizobium meliloti</i> Y11 suşunun hücre gelişim eğrisi.....                                                                                             | 125 |
| Şekil 4.42. | Farklı melas konsantrasyonlarında <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab suşunun hücre gelişim eğrisi.....                                                                                | 126 |

|                                                                                                                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4.43. Farklı melas konsantrasyonlarında <i>Rhizobium viciae</i> F111 suşunun hücre gelişim eğrisi.....                                                      | 127 |
| Şekil 4.44. <i>R. meliloti</i> Y11, <i>B. japonicum</i> S Irat Fab ve <i>R. viciae</i> F111'in melas ortamında PHB yüzde verim histogramı.....                    | 129 |
| Şekil 4.45. <i>R. phaseoli</i> Fa26, Fa27, Fa28, Fa41, <i>R. meliloti</i> Y22, Y520 ile <i>R. leguminosarum</i> M6 suşların plazmid DNA profilleri.....           | 131 |
| Şekil 4.46. <i>R. viciae</i> F111, <i>R. meliloti</i> Y11, Y2, Y1 ve <i>R. cicer</i> N3 suşların plazmid DNA profilleri.....                                      | 131 |
| Şekil 4.47. <i>R. cicer</i> suşların SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri ...                                                                       | 133 |
| Şekil 4.48. <i>B. japonicum</i> , <i>R. phaseoli</i> , <i>R. viciae</i> ve <i>Rhizobium</i> spp. suşların SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri..... | 133 |
| Şekil 4.49. <i>R. leguminosarum</i> ve <i>Rhizobium meliloti</i> suşların SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri .....                                | 134 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

| <b>Simgeler</b>    | <b>Açıklama</b>                 |
|--------------------|---------------------------------|
| <b>et. al.</b>     | Ve arkadaşları                  |
| <b>°C</b>          | Santigrat derece                |
| <b>cm</b>          | Santimetre                      |
| <b>dak</b>         | Dakika                          |
| <b>g</b>           | Gram                            |
| <b>l</b>           | Litre                           |
| <b>ml</b>          | Mililitre                       |
| <b>mg</b>          | Miligram                        |
| <b>mm</b>          | Milimetre                       |
| <b>µg</b>          | Mikrogram                       |
| <b>µl</b>          | Mikrolitre                      |
| <b>nm</b>          | Nanometre                       |
| <b>UV</b>          | Ultraviyole                     |
| <b>vd</b>          | Ve diğerleri                    |
| <b>vs</b>          | Ve saire                        |
| <b>%</b>           | Yüzde                           |
| <b>Kısaltmalar</b> |                                 |
| <b>PHB</b>         | Poli-β-hidroksibütirat          |
| <b>PHA</b>         | Polihidroksialkanat             |
| <b>PAGE</b>        | Poliakrilamid Jel Elektroforezi |

**SDS**

Sodyum Dodesil Sülfat

**APS**

Amonyum Persülfat

**ME**

Merkaptoetanol

**TEMED**

Tetra Etil Metilen Diamin



## 1. GİRİŞ

Son yıllarda çevre koruma bilincinin arttırılmasına yönelik çalışmalarda önemle üzerinde durulan konulardan birisinin de plastik ambalaj malzemeleri olduğu görülmektedir. Yerine kullanılabilecek başka bir malzeme cinsi bulunmadığı sürece, getirilmeye çalışılan her türlü yasaklama ve kısıtlamanın ambalaj malzemesi olarak plastiklerin kullanılmasını engellemeyeceği açıktır.

Atıkların büyük bir bölümünü plastik materyaller oluşturmaktadır. Atık plastikler genellikle diğer evsel atıklarla birlikte çöp boşaltma sahalarına atılmakta veya çöp çukurlarına dökülmektedir. Atık boşaltma sahalarının ve çukurlarının giderek dolması, yakma gibi alternatif yöntemlerin giderek artan maliyetleri, çeşitli teknik sorunlar, enerji kaynaklarını koruma ve atıkları çevresel açıdan kabul edilebilir şekilde azaltma isteğiyle birleşince atık plastiklerin yeniden kullanımı konusu gündeme gelmiştir (Savaşçı vd., 1998). Fakat atık plastiklerin tekrar kullanıma hazırlanması için toplama, ayıklama, hammadde haline getirme aşamaları maliyeti oldukça arttırmaktadır. Gerçekten de gittikçe artan ve bilinmeyen çevresel sonuçlar, biyolojik olarak parçalanabilen plastiklere ilginin her geçen gün büyümesine neden olmuştur (Dave et al., 1996). Bu sorunların çözümüne yönelik polimer bilminde yapılan çalışmalar arasında biyopolimerler (mikrobiyal termoplastikler) önemli bir yer tutmaktadır.

Biyolojik olarak parçalanabilen poli- $\beta$ -hidroksibütirik asit (PHB)'in özellikleri yıllardan beri bilinmesine ve alınan patentlerin 1962'de J.N. Baptist tarafından Amerika'da orijinal olarak dosyalanmasına rağmen 1982'de Imperial Chemistry Industries Plastic (ICI plc.) tarafından bu polimerin Biopol ticari adıyla pazarlanmasına kadar, polihidroksialkanatların (PHA) ve PHB'nin endüstriyel üretimi üzerinde yeterince durulmamıştır (Anderson and Dawes, 1990).

Biopol, *Alcaligenes* cinsine ait bakteriler kullanılarak endüstriyel olarak üretilmiş ilk biyodönüştürülebilir plastiktir. Bu materyal, doğal ve sentetik polimerlerin tüm avantajlarını taşımaktadır. Güçlü kristal yapıda olup polimer ya da monomer

birimlerine bağı olan, elastik kauçuklara benzeyen çeşitli özelliklere sahiptir (Holmes, 1985).

1920'li yıllarda, bazı bilim adamlarının, bakteri hücresinde yedek enerji kaynağı olarak PHA sınıfının bir üyesi olan PHB'nin biriktirildiğini saptamaları, o zamanlar henüz farkına varılmayan günümüzde yoğun ilgi odağı olan yeni bir plastik malzeme sınıfının keşfinin başlangıcı olmuştur. Karbon, azot, fosfor, potasyum gibi elementlerin herhangi birinin kısıtlanması ile bakteri bu gerilimli ortamda canlılığını devam ettirebilmek için ilerde kullanmak amacıyla enerji deposu olarak bu polimeri biriktirmektedir (Lee, 1996).

Birçok mikroorganizma tarafından doğal olarak sentezlenen PHB'nin, yüksek miktarlarda üretilen ve çoğunlukla ambalaj malzemesi olarak kullanılan polipropilenin özelliklerine benzerlik göstermesi, bu termoplastiğin Avrupa, Amerika ve Japonya'da endüstriyel çapta üretimine hız kazandırmıştır. Doğaya terk edildiği zaman petrol kökenli plastiklerin uzun yıllar bozulmadan kalması yaban hayat için toksik etki yapmaktadır. Sonuç olarak tüm dünyada geleneksel polimerlerin kullanımının azaltılması amaçlanmış, buna yönelik çalışmalara başlanmıştır (Braunegg et al., 1998).

Özellikle son yıllarda dünya nüfusunun hızla arttığı ve buna paralel olarak da yaşam şartlarına göre plastik kullanımlarında artış görüldüğü bir dönemde, petrolden elde edilen plastiğin bir takım ekolojik problemler yarattığı göz önüne alınırsa, çok çeşitli mikroorganizmalarca sentezlenen PHB'nin çevre sorununun çözülmesinde önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Biyolojik plastikler, çevre korunmasına karşı petrolden elde edilen plastiklere alternatif olarak kabul edilseler de, geniş bir uygulama alanına sahip petrol kökenli geleneksel plastiklerle karşılaştırıldığında maliyetinin daha fazla olduğu bilinmektedir (Lee, 1996). Bu nedenle biyolojik polimerlerle ilgili araştırmalar, farklı mikroorganizmalardaki PHB üretimi, farklı çevrelerden PHB üreten yeni mikroorganizmaların izolasyonu, PHB ürettiği bilinen mikroorganizmaların

özelliklerinin iyileştirilip üretiminin arttırılmasına ya da çeşitli ve ekonomik karbon kaynaklarında gelişebilen mikroorganizmaların seçimine yöneliktir.

Bu çalışmada, doğada yaygın olarak bulunan baklagillerin köklerinde nodül oluşturarak havadaki azotu fikse eden ve bu özelliğinden dolayı doğal azot gübresi olarak kullanılan *Rhizobium* cinsine ait bakterilerin PHB üretim yetenekleri incelenmiştir. Bakterilerin farklı azot ve karbon kaynaklarında süreye bağlı olarak PHB üretimleri araştırılmış, en uygun besi ortamında en iyi PHB üreten suşun seçimi hedeflenmiştir. Ayrıca suşların, atık madde olan Melas'taki PHB miktarları incelenerek ekonomik yönden polimer üretimi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan bakterilerin plazmid DNA sayıları ve moleküler ağırlıkları belirlenmiş, SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profillerine göre suşların ayrımı hedeflenmiştir.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Prokaryotik Hücre İnküzyonları ve Poli-β-Hidroksibütirat (PHB)'ın Tarihçesi

Hücre inküzyonu formunda olan ökaryotik depo materyalleri, genelde lipidler veya polisakkaritlerdir. Mayalar, filamentli funguslar gibi ökaryotik hücreler ve hayvansal hücreler, büyüme koşulları düzensiz olduğunda, nişasta veya glikojen (amilopektin) gibi çözünmeyen polisakkaritler ya da intrasellüler yağ kürecikleri biriktirirler. Bunlar basit boyama yöntemleri uygulanarak kolaylıkla tanımlanabilirler. Örneğin lipidler Sudan Black ile mavi-siyah boyanır. Glikojen, İodin ile kahverengi veya pembeye boyanır ve mikroskopta kolaylıkla görülebilir (Lafferty et al., 1988).

Prokaryotik hücrelerde, hücre içi inküzyonların bir çeşidi olan depo materyallerinin oluşturulması, ökaryotik hücrelerden oldukça farklıdır. Hücre içi depo materyalleri, diğer besinler olmadığı zaman organizma tarafından bir karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Prokaryotik hücre inküzyonlarının büyük bir kısmı genel olarak membranla çevrili olanlar ve membranla çevrili olmayanlar diye iki gruba ayrılmıştır (Lafferty et al., 1988).

Birçok prokaryot ve ökaryot mikroorganizma karbon içeren hücre içi depo materyallerini sentezleyecek enzimatik kapasiteye sahiptir. Bu depo materyalleri, dengesiz büyüme koşulları gibi özel koşullar altında organizmalar tarafından sentezlenen maddeler olarak bilinirler.

Mikroskobun, mikrobiyoloji alanında kullanılmaya başlamasından bu yana, birçok kez küçük "yağ damlaları"nın bazı bakteri hücrelerinde düzenli bir şekilde gözlendiği belirtilmiştir. *Rhizobium* hücreleri içindeki böyle granüllerin nodüllerden izole edilen bakteroidlerde de bulunduğu gözlenilmiş ve bunlar "ışığı kıran damlacıklar" olarak belirtilmiştir. Birçok mikrobiyolog, bakterilerdeki lipofilik granülleri çok önceden tanımlamış olmasına rağmen, bu partiküllerin yapısı ilk kez Lemoigne tarafından 1923 yılında ortaya konmuştur. Araştırmacı, *Bacillus subtilis* kültürleri distile suda

otolize olduğu zaman, bilinmeyen bir asit oluşunu ile pH'nın azaldığını gözlemiştir. Bu bilinmeyen asidin, şeker hastalarında görülen ürindeki  $\beta$ -hidroksibütirik asite benzer olduğu sonradan bulunmuştur. Araştırmacılar, *Bacillus megaterium*'un otolizi esnasında  $\beta$ -hidroksibütirik asit monomerleri oluştuğunu ve bu monomerlerin kaynağının poli- $\beta$ -hidroksibütirik asit olduğunu kesin olarak ortaya koymuşlardır (Lemoigne, 1923; Anderson and Dawes, 1990; Lee, 1996).

PHB'nin mikrobiyal sentezi uzun yıllar araştırma konusu olmamıştır. Lafferty et al. (1988)'in bildirdiğine göre, gram negatif bakterilerde PHB sentezini ilk kez gösteren Forsythe ve grubu olmuştur. Buna ilaveten araştırmacılar PHB sentez yeteneğinin varlığının ya da yokluğunun, bir taksonomik kriter olarak kullanılabileceğini de rapor etmişlerdir. Aynı yıllarda bakteriyal biomasstan PHB'nin kantitatif belirlenmesi için ilk pratik metodlardan biri geliştirilmiştir. Hücreleri, PHB'nin dışında tüm hücresel bileşiklerin çözünebildiği standart şartlarda alkali hipoklorit solusyonu ile muamele etmişlerdir. Bu şekilde elde edilen PHB granüllerinin yoğunluğu, hücre içindeki PHB miktarıyla bağlantılı olarak belirlenmiştir. Bu metod geliştirilmeden önce Lemoigne, PHB'yi kuru bakteri kütesinden kloroform ile ayırmış ve gravimetrik olarak belirlemiştir (Lafferty et al., 1988).

Birçok bakteri cinsinin PHB sentezleme yeteneğine sahip olduğu görölmüştür ve farklı cinslerde sentezlenen PHB'nin infrared absorpsiyonu ile X-ışını differaksiyonu gibi fiziksel özellikleri birbirine benzemektedir. Böylece bir depo materyali olan PHB'yi sentezleme yeteneğinin prokaryotik mikroorganizmalarda çok yaygın olduğu bulunmuştur (Braunegg et al., 1998).

Hücreiçi depo granülü olarak sentezlenen ve biriktirilen PHB, mikroorganizma için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Buna ilaveten lokal oksijen konsantrasyonlarının düzenlenmesinde, sporulasyon için enerji sağlanması ve redükleyici ekivalentler için elektron havuzu olarak da rol oynar (Anderson and Dawes, 1990; Madison and Huisman, 1999).

## 2.2. PHB'nin Özellikleri

Bakteri hücrelerinde PHB granülleri faz-kontrast veya elektron mikroskop kullanıldığında kolayca gözlemlenebilir. Granüller, 100-800 nm çapında olup genellikle küresel şekildedirler. 2-4 nm kalınlığında ünit olmayan bir membranla çevrilidir. İzole edilen PHB granülleri yaklaşık %98 PHB ve %2 protein içermektedir. *Bacillus cereus*'tan izole edilen PHB granüllerinin %50'si merkezi bir çekirdekten oluşmaktadır. Bu çekirdek en dışta bir membranla tekrar çevrilmiştir. Yapılan araştırmalar sonunda her bir granülün fibriler yapıda olduğu ve 10-15 nm uzunluğunda polimerik PHB granüllerinden oluştuğu saptanmıştır (Anderson and Dawes, 1990). Araştırmacılar bu fibrillerin eş zamanlı sentez ve suda çözünmeyen bir polimer yapısında, kristalizasyonun bir sonucu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca araştırmacılar, bakteri hücrelerinden hiç bozulmamış doğal PHB granülleri elde etmedeki zorluklar nedeniyle, PHB sentezinin fiziksel mekanizması konusunda halen bazı belirsizlikler olduğunu açıklamışlardır. Ancak, hücre içindeki PHB'nin yüksek bir kristallenme yüzdesiyle (%80) fibriler bir yapıya sahip olduğu kesin olarak bilinmektedir (Abe et al., 2000).

PHB, sağ el kuralına uygun iki katlı kıvrılmış bir heliks olup, her bir iplik 0,596 nm'de bir tekrarlanmaktadır. Optik olarak aktif olan PHB, D(-) konfigürasyonundadır. Konfigürasyonu ve kaynama noktalarının hemen hemen birbirine yakınlığı nedeniyle polipropilen ve PHB, yapısal olarak benzerlik göstermektedirler. Biyouygunluk ve biyodönüşüm gibi önemli özelliklere sahip olmaları, aynı derecelerde kristalleşmelerine rağmen bunların kimyasal özellikleri tamamen farklıdır. Fiziksel olarak PHB, propilenden daha sert ve kırılmandır. Fakat UV ışığına karşı daha dirençlidir (Holmes, 1985).

PHB, D(-)-3-hidroksibütirik asitin makromoleküler bir polimeridir. İzolasyon yöntemi, kullanılan bakteriyel suş, substratın tipi, inkübasyon süresi ve oksijenin kısmi basıncı polimerin kimyasal yapısında değişikliklere neden olmaktadır (Anderson and Dawes, 1990; Madison and Huisman, 1999).

Barham et al. (1984), çözelti halindeki PHB'yi çöktürerek tek lamelli kristaller elde etmişler, lameller arasındaki kalınlık ile 25-125 °C arasındaki kristalleşme sıcaklığının birbiriyle ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmacılar eritmeyle kristalizasyonda PHB'yi kimyasal olarak saf ve küresel şekilde elde edip, bunları kristalizasyon sıcaklığına göre ayırmışlardır. Bu yüzden PHB'nin preparasyon yöntemi onun hem morfolojisi hem de fiziksel özelliklerini belirlemektedir.

PHB'nin fiziksel özellikleri, kullanılan bakteri suşundan elde edilen polimerin moleküler ağırlığına bağlıdır. Ayrıca PHB'nin mikrobiyal kütleden ekstraksiyonu sırasında moleküler ağırlığında bir azalma olmaktadır (Lafferty et al., 1988).

Işık-yayılma ölçümlerine göre PHB granüllerinin moleküler ağırlıkları  $5 \times 10^9$  civarındadır ve her bir granül minimum 1000 polimer zincirinden oluşmaktadır. *Alcaligenes eutrophus*'taki PHB granüllerinin %40 su içerdiği tespit edilmiştir. Hücredeki granül sayısı da incelenmiş, granül sayısının polimer birikiminin başladığı erken gelişme safhalarında sabit olduğu belirlenmiştir (Anderson and Dawes, 1990).

PHB, kopolimerleri kadar iyi bir şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve polietilen gibi diğer sentetik polimerlerle heteropolimerler yapımında kullanılabilir. Sentetik polimerlere kıyasla PHA'nın fiziksel özellikleri PHV/PHB moleküler oranının değiştirilmesiyle düzenlenebilir. PHB kopolimerleri diğer kopolimerlerden çok daha kullanışlıdır (Witholt and Kessler, 1999).

Fonksiyonel PHA'ların, primer sekansındaki diğer metabolitler veya çeşitli fonksiyonel monomerlerle bağlantılı olarak biyosentetik prosedürlerle hazırlanabildiği açıklanmıştır. *A. eutrophus*'un, polietilen glikol ve polisakkarit içeren ortamdaki fermentasyonu ile -OH uçlu blok polimer içeren PHA sentezlenmiştir (Hiki et al., 2000). Besi ortamında yapılan değişikliklerle kopolimerin monomer kompozisyonunun ve moleküler ağırlığının kontrol edilebildiğini ispatlamışlardır. Araştırmacılar, sentezledikleri kopolimer bloğun termoplastik olarak kullanımda yüksek bir potansiyele sahip olduğunu da açıklamışlardır.

Madden et al. (2000), *Ralstonia eutropha*'yı glukoz, propiyonik asit ve 4-hidroksibütirik asit veya bütürolakton karbon kaynaklarında geliştirdiklerinde bakterinin poli-3-hidroksibütirat-co-3-hidroksivalerat-co-4-hidroksibütirat terpolimerlerini sentezlediğini saptamışlardır. Monomerlerin farklı kısımlarını içeren terpolimerlerin termal ve mekanik özelliklerini karakterize etmişlerdir. Terpolimerlerin, kaynama sıcaklığının oldukça düşük olduğunu ve monomerlerin mekanik yönden daha üstün özellikte olduğunu savunmuşlardır.

### 2.3. PHB'nin Biyosentezi

Prokaryotik hücrelerde PHB'nin intrasellüler sentezi için ilk bileşik Asetil CoA'dır. Genel olarak PHB, 3-Ketotiolaz, asetoasetil-CoA redüktaz ve PHB sintaz tarafından katalize edilen üç reaksiyon basamağı ile Asetil CoA'dan sentezlenmektedir (Anderson et al., 1990). Asetil CoA'nın hücrelerarası konsantrasyonunu arttırıcı şartlar, PHB'nin sentezi üzerinde pozitif etki yapmaktadır (Lee, 1996). PHB'nin hücre içi sentezi üzerine çeşitli ara yolların etkisi *B. megaterium*'da incelenmiştir. Birçok mikroorganizmanın PHB sentezinde ara bileşik olarak asetatı içerdiği bildirilmiştir. <sup>14</sup>C-β-hidroksibütiril-CoA kullanmak suretiyle bu bileşiğin *Rhodospirillum rubrum* ve *B. megaterium*'da PHB sentezinde önemli bir ara ürün olduğu gösterilmiştir (Anderson and Dawes, 1990; Lee, 1996). Steinbüchel and Schlegel (1991), PHB sentezinde anahtar reaksiyonun, iki molekül Asetil CoA'nın Asetoasetil CoA'ya dönüştüğü reaksiyonun olduğunu doğrulamışlardır.

*A. eutrophus* H16'da PHB'nin sentezindeki başlıca reaksiyonun, iki molekül CoA'nın Asetoasetil CoA'ya dönüşümünü içerdiği belirlenmiştir. Bu reaksiyon, β-ketotiolaz ile katalize olmaktadır. Asetil CoA, reaksiyonun asetoasetil CoA redüktaz tarafından katalize edilmesiyle β-hidroksibütiril-CoA'ya dönüşmektedir. Bu molekül de PHB polimeraz enzimi ile PHB'ye polimerize olmaktadır. Polimeraz enzimi sadece PHB'nin sentezinde rol oynamamakta, aynı zaman da PHB'nin hücrelerde tekrar kullanılmasında da görev yapmaktadır (Lee, 1996).

## 2.4. Bakterilerde PHB Üretimi

Polihidroksialkanatlar, hidroksialkanatların poliestерleridir. Bu poliestерlerin en iyi bilineni üzerinde en çok çalışılmasından dolayı PHB'dir. Birçok bakteri PHB ve diğer kopolimerleri, fazla karbon kaynağı altında azot, fosfor, magnezyum veya oksijenin sınırlandırıldığı dengesiz gelişme şartlarında sentezler ve intrasellüler olarak depo eder. Günümüzde PHB depo eden 300'den fazla gram (-) ve gram (+) bakteri tespit edilmiştir. Bu nedenle polimerin etkili üretimi için teşvik edilebilecek kültür stratejilerinin geliştirilmesi önemlidir. *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*'nin mutant suşları ve diğer birçok bakterinin PHB'yi depoladığı bilinmektedir. Polimerin endüstriyel üretimi, uygun mikroorganizmanın seçimi, seçilen bakterinin gelişim oranı, polimer sentezi, depolamadaki maksimum oran ve pahalı olmayan karbon kaynaklarının seçimi gibi birçok faktöre bağlıdır. PHA'ların üyesi olan üzerinde en sıklıkla durulan P(3HB), P(3HB-co-3HV) ve P(3-hidroksikekzanat-co-3-hidroksioktanat kopolimerleri bakterilerde yüksek verimlilikte üretilmeye başlanmıştır (Lee, 1996).

### 2.4.1. *Alcaligenes eutrophus* ve *A. latus*

*Alcaligenes eutrophus*, endüstriyel PHB üretiminde en fazla kullanılan bakteri olup, hücre içinde yüksek miktarda PHB depoladığı (hücre kuru ağırlığının % 80'i) tespit edilmiştir. İngiltere'de (Imperial Chemical Industries), *A. eutrophus*'un endüstriyel biyoplastik üretiminde kullanıldığı bildirilmiştir (Holmes, 1985).

*A. eutrophus*'dan elde edilen biyoplastik maddenin sert ve eriyebilen bir özelliğe sahip olduğu, plastiğin soğuk içecek şişelerinde kullanılmasının uygun olabileceği bildirilmiştir. Bakteri, glukoz ve organik asit içeren ortamlarda geliştirildiğinde PHB üretirken, ortama %2-20 oranında hidroksivaleerat ilave edildiğinde, P(3HB)-co-P(3HV) kopolimerini sentezlemiştir (Beyatlı, 1996).

*A. eutrophus* suşunun PHB biyosentez geninin *E. coli*'ye klonlandığı ve alıcı bakteride gen ekspresyonunun gerçekleştiği bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir

(Slater et al., 1992; Liu et al., 1998; Madison and Huisman, 1999; Lee, 1996). Bakteri tarafından üretilen termobiyoplastığın, toprakta fungus ve bakteriler tarafından bir kaç haftada parçalanabileceği bildirilmiştir (Anderson and Dawes, 1990).

Avustralya'da Biyoteknoloji Araştırma Ünitesi'nde parçalanabilen biyoplastik üretimi ile ilgili teknik yöntemler geliştirilmiştir. Üretimde, *Alcaligenes latus*'un mutant tipleri kullanılmıştır. Adı geçen bakterinin normal koşullarda üretildiğinde hücre içi PHB depoladığı bildirilirken, bakteri pancar şekeri besi ortamında üretildiğinde, PHB miktarının hücre kuru ağırlığının %80'den fazla olduğu ve PHB ekstraksiyonundan sonra uygulanan çöktirmede PHB'nin saflığının %99'dan fazla olduğu açıklanmıştır (Beyatlı, 1996).

*A. latus* bakterisinin kopolimer (R)-3-hidroksibütirat ve 4-hidroksibütirat üretimleri de incelenmiştir. Bakteri %1 sakkaroz ve %0.02 gammabütrolakton besi ortamında 30°C'de 2 gün üretilmiştir. Sakkarozun 3HB'ye dönüştüğünü ve bu maddenin bakteri kuru ağırlığının %58'i kadar olduğunu ve (4HB) kopolimerin gammabütrolaktondan meydana geldiğini, bu madde ile toplam polimerin %60'a yükseldiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar, bakteri yalnız gamma bütrolakton substratlarda üretildiğinde, bakterinin üremediği ve polimerin oluşmadığını bildirirken, iki maddeyi içeren besi ortamına fruktoz şekeri ilave edildiğinde, bakteri üremesini sitümüle ettiği tespit edilmiştir (Hiramitsu et al., 1993).

#### **2.4.2. *Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas* cinsi bakteriler**

*A. vinelandii* UWD mutant suşunun, eksponansiyel gelişme fazında hücre kuru ağırlığının %75'i PHB'dir (Page and Knosp, 1989). Şeker pancarı melasında, yüksek miktarda PHB depo edildiği de gösterilmiştir. Ayrıca farklı kompleks nitrogen kaynakları ilavesinin PHB sentezine etkisi incelenmiş, %0,2 balık pepton ilavesiyle bakterideki PHB konsantrasyonun 7,5 g/l'ye ulaştığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, hücrelerin bu besi ortamında kolay kırılabilir olduklarını, 45°C'de 10 dak 1 N

amonyaklı suda muamele ederek, polimerlerin saflaştırılabildiğini de rapor etmişlerdir (Page, 1992c; Page and Cornish, 1993).

Brandl et al. (1988), *Pseudomonas oleovorans*'ı, n-alkanoik asitlerin karbon kaynağı olarak kullanıldığı homojen bir aquatik sistemde geliştirmişlerdir. Bu ortamda 24 saatten sonra bakteri hücre ürününün 1,5 g/l'yi geçtiği ve hücre kuru ağırlığının %49'unun polimer olduğunu rapor etmişlerdir. *P. oleovorans* alkan hidrolaz enzim kompleksini kodlayan OCT plazmidi ile yağ asitlerini oksitlemekte,  $\beta$ -oksidasyon yolu ile katabolize ederek polimeri oluşturmaktadır.

Metilotrofik bir bakteri olan *Pseudomonas extorquens*'in PHB üretim yeteneği değişik karbon kaynakları içeren substratlarda araştırılmıştır. Bakterinin en yüksek PHB üretimi %0,5 metanol içeren substratta, hücre kuru ağırlığında %27 olarak saptanmıştır (Karaboz ve Umay, 1994).

#### 2.4.3. *Bacillus* cinsi bakteriler

Doğal PHB granülleri, ilk kez *Bacillus megaterium* ve *Azotobacter beijerinckii*'nin DNaz ile muamele edilen hücrelerden, gliserol yüzeyinden toplanarak izole edilmiştir (Anderson and Dawes, 1990).

Benoit et al. (1990), *B. thuringiensis* HD-1 suşunda, sporulasyon ile PHB üretimi arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. HD1 suşunun, glukoz-tripton mineral tuz karışımında geliştirildiğinde laktat, pirüvat, asetat, aseton ve PHB ürettiği bulunmuştur. Bakterinin, asetatı 2-3 bütandiol siklusuna okside ettiği, daha sonra PHB üretimi için kullanıldığı belirlenmiştir. Hücrede biriktirilen PHB'nin, sporulasyon sırasında enerji kaynağı olarak tüketildiği de saptanmıştır.

Aktif çamur biyokütlesinde de biyolojik polimerin varlığı kanıtlanmıştır (Dave et al., 1996). Araştırmacılar, teşhis ettikleri 12 bakteriyal suştan, *Bacillus* cinsine ait 10 bakterinin PHB ürettiğini bulmuşlardır. Suşlar arasında en yüksek PHB üretimini *Bacillus* sp. IPCB-403 göstermiş, optimum kültür şartlarında bakterinin %70'inin

PHB olduğu tespit edilmiştir. Aslın vd. (1998), topraktan izole ettikleri farklı *Bacillus* türlerinde PHB miktarlarının suş ve türlere göre farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, suşların hücre kuru ağırlıklarına göre %6,53-48,13'ünün PHB olduğunu rapor etmişlerdir. Bir diğer çalışmada ise, *B. sphaericus* suşlarının yüzde PHB verimleri %5-25,88 arasında tespit edilmiştir. Suşların, Beef ekstrakt ve Sodyum asetatın farklı konsantrasyonlarındaki PHB üretimleri incelenmiş ve %0,2 Beef ekstrakt konsantrasyonunda *B. sphaericus* ATCC 7055'in maksimum PHB verimine (%32,50) ulaştığı tespit edilmiştir (Mercan ve Beyatlı, 2001).

#### 2.4.4. Diğer bakterilerde PHB

Bir araştırmada, iki adet *Acinetobacter* sp. suşunun PHB üretimleri incelenmiştir. Ra3117 suşunun amonyak ve fosfat içermeyen sentetik besi ortamında PHB üretmediği, RA 3757 suşunun fosfat, amonyum veya sülfat içeren farklı substratlarda ürettiği PHB miktarının sırasıyla 2,0; 7,8 ve %11,5 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada,  $\beta$ -ketotiolaz ve asetoasetil-CoA redüktaz enzimlerinin yalnız RA 3757 hücre ekstraktında serbest olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Her iki suşun PHB ürettiği veya üretmediği durumlarda,  $\beta$ -ketotiolaz enzimi sentezlenirken asetoasetil-CoA'ya sadece PHB üreten bakteride rastlanıldığı açıklanmıştır. RA3757 suşu amonyum içermeyen ve karbon kaynağı olarak asetat, bütirat, karbon ve etanol içeren besi ortamında üretildiğinde benzer miktarda PHB ürettiği ve bu suşun valerat içermeyen substratta %5,6 poli- $\beta$ -hidroksivalerat ve %0,9 oranında PHB ürettiği saptanmıştır (Beyatlı, 1996; Madison and Huisman, 1999).

*Azospirillum brasilense* cd suşu, amonyum-malt tuzlarını içeren besi ortamında kesikli ve sürekli kemostat fermenterlerde üretilmiştir. Kemostat fermenterlerde oksijenin sınırlanmasında, kesikli fermenterlerde ise C/N oranı yüksek tutulduğunda hücrelerin eksponansiyel fazda yüksek miktarda PHB biriktirdiği bildirilmiştir. Aynı çalışmada, bakterinin ölüm döneminde nitrogenaz aktivitesi incelenmiş, enzim aktivitesinin yüksek olduğu, hidroksibütirat dehidrogenaz aktivitesinin az olduğu açıklanmıştır (Tal and Okon, 1985).

İki adet metanotrof tip II bakterinin PHB üretimi incelenmiş, *Methanobacterium organophilum* bakteride PHB'nin bulunduğu ve besi ortamlarına metanol ilave edildiğinde, bakterilerin PHB üretebildiği rapor edilmiştir (Madison and Huisman, 1999).

Brandl et al. (1991), fototrofik ve non-sülfür bir bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides*'in PHB üretim potansiyelini araştırmışlardır. Azotun sınırlandırıldığı ortamda hücre kuru ağırlığının %60-70'inin PHA olduğunu bildirirken, bu polimerin %98 mol 3HB ve %2 mol 3HV monomerinden oluştuğunu tespit etmişlerdir.

#### 2.4.5. Rekombinant *E. coli*

Maksimum polimer üretimi için rekombinant organizmaların oluşturulması, PHA biyosentez genlerin transferi ile mümkün olmaktadır. Rekombinant sistemlerde polimerlerin yüksek konsantrasyonlarda üretimi, hiç kuşkusuz konukçu-plazmid sistemlerin ve üretim stratejilerinin gelişimine de bağlıdır. Buna ilaveten, etkili bir üretim için, yüksek kopya sayılı stabil plazmidlere gereksinim duyulduğu gibi, test edilen farklı suşlar arasında uygun bir *E. coli* suşunun da seçiminin önemli olduğu bildirilmiştir (Lee, 1996; Madison and Huisman, 1999).

*A. eutrophus* (= *Ralstonia eutropha*), önemli bir PHB üreticisi olmasına rağmen, bakterinin besi ortamında yavaş gelişmesi, kolay lize olması ve genetik yönden tam olarak karakterize edilememesi gibi problemler, PHB'nin ticari gelişimini engellemektedir (Madison and Huisman, 1999).

PHB'nin üretimindeki bu tür engeller, rekombinant sistemlerle aşılmaya çalışılmaktadır. Bu tür çalışmalar için PHB'yi doğal olarak sentezleyemeyen *E. coli* suşları kullanılmaktadır (Lee, 1996).

*E. coli*'de ilk kez *phb* genleri eksprese olmasına rağmen, bir çok araştırmacı PHB dışında PHB-co-PHV gibi diğer kopolimerleri de sentezlediklerini açıklamışlardır (Anderson and Dawes, 1990).

Rekombinant *E. coli*'de depo edilen PHB, fermentasyon sonunda hücre kuru ağırlığının %80-90'nını oluşturmaktadır. 10 farklı *E. coli* suşu ile yapılan bir çalışmada %2 glukoz-LB besi ortamında W, K-12 ve EC3132 suşları %15-33 arasında PHB depolarken, B suşunun hücre kuru ağırlığının %76'sının PHB olduğu bildirilmiştir. Tipik olarak klonlanan XL1-Blue, JM109 ve HB101 suşları ise hücre kuru ağırlıklarına göre %75-85 arasında PHB biriktirmişlerdir. Yüksek kopya sayılı plazmidlerle stabilize edilen XL1-Blue suşunun, %2 glukoz-LB besi ortamında saatte 2,1 g/l üretim ile %81 oranında PHB ürettiği açıklanmıştır (Madison and Huisman, 1999).

#### 2.4.6. Transgenik bitki (= *Arabidopsis thaliana*)

*Arabidopsis thaliana*, bir tahıl bitkisi olmamasına rağmen transgenik polimer çalışmaları için seçilen ilk bitkidir ve günümüzde transgenik bitkilerdeki ekspresyon çalışmaları için model organizmadır (Madison and Huisman, 1999).

Bitkide, PHB sentez izyoluna ait 3-ketoasil-CoA tiolaz enzimi bulunmaktadır. Bu sitoplazmik enzim, izoprenoidlerin öncüsü olan mevalonatı sentezlemektedir. Tiolaz enzim aktivitesinin varlığı nedeniyle, *Ralstonia eutropha*'nın phbB ve phbC genleri bitkiye transfer edilmiştir. Sitoplazma, vakuol ve nukleusta 0,2-0,5 µm çapında PHB granüllerinin depolandığı görülmüştür. Bitki taze ağırlığının 100 µg/g'nın PHB olduğu açıklanmıştır. Mevalonat izyolundan substratın ani azalışının, bitkinin zayıf gelişmesine neden olduğunu, bu problemin giderilmesi ve polimer birikiminin arttırılabilmesi için doku spesifitesi ile gen ekspresyonunun düzenlenmesi gerektiği rapor edilmiştir (Lee, 1996).

Araştırmacılar asetil-CoA'ya doğru karbon akışının yoğun olduğu bitki plastidlerinin, PHB üretimi için çok daha uygun olduğunu savunmuşlardır (Lee, 1996; Madison and Huisman, 1999). Plastidlerdeki maksimum PHB miktarı 10 mg/g, yüzde verim hücre kuru ağırlığa göre %14'tür. Plastidlerden izole edilen PHB'nin

moleküler ağırlığı 500 000 Da olarak hesaplanmıştır (Lee, 1996; Madison and Huisman, 1999).

*Saccharomyces cerevisiae*, böcek ve buğdayda da PHB üretimi ile ilgili çalışmalara başlanmıştır. Ancak bu organizmalarda PHB miktarının henüz çok az olduğu bildirilmiştir (Madison and Huisman, 1999).

Bitkilere aktarılacak PHB geninin gelişimi sağlanabildiği takdirde PHB üretiminin ekonomik olabileceği düşünülmüştür. Belki de gelecekte çiftçiler tarlalarında plastik yetiştireceklerdir. Market raflarında “plastik patates” etiketlerine bile rastlamak mümkün olabilir (Lee, 1996).

#### **2.4.7. PHB’nin biyolojik parçalanabilirliği ve yenilenebilme özelliği**

PHB’nin temel özelliklerinden birisi, topraktaki birçok mikroorganizma tarafından parçalanabilmesidir. PHB, hücre dışı enzimlerle depolimerize edildiğinde oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asit ve dimer yapı birçok organizma için kullanılabilir substratlardır. Biyolojik parçalanma oranı, polimerin yüzey özelliklerine bağlıdır (Laffert et al., 1988).

Polimer degradasyonunda bakteri, fungus ve yüksek yapılı organizmalar biyolojik faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir. PHB, salgılanan hidrolazlar ve depolimerazlar ile yıkılırlar. Bu enzimlerin aktiviteleri, polimerin fiziksel özelliklerine ve çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (Madison and Huisman, 1999).

Biyopolimer, mikroorganizmalar tarafından su ve karbondioksit kadar parçalanabilmektedir. Parçalanma nitrojen oksidi oluşmadığından çevre korunmasında önemlidir. Parçalanmış biyoplastik, bitkilerin gelişimini olumlu yönde etkilemektedir (Lee, 1996). PHB’nin yıkım hızı birkaç aydan (anaerobik), birkaç yıla (denizsuyu) kadar olabilmektedir. PHB’nin fermentatif üretimi, şeker ve yağ asitleri

gibi tarımsal ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır (Madison and Huisman, 1999).

## 2.5. PHB'nin Kullanım Alanları

Endüstriyel üretilen termobiyoplastiklerin sertlik durumlarının, polietilene oranla dört misli daha fazla olduğu (20 kg/m) tespit edilmiştir. Üretilen biyoplastik maddelerin, çeşitli paketleme materyalleri olarak değerlendirilebileceği gösterilmiştir. En çok bilinen ve en yaygın kullanılan PHA tipi olan PHB'nin fiziksel özellikleri petrol kökenli polipropilen ile karşılaştırıldığında PHB'nin daha kristal bir yapıda olması, özgül ağırlığının daha yüksek oluşu, UV'ye dirençliliği gibi bazı özellikleri nedeni ile PHB üretiminin iyi bir seçenek olduğu bildirilmiştir (Barham et al., 1984; Bluhm et al., 1998; Beyatlı, 1996).

PHB'nin doğaya atıldığında tamamen yok olması ve çevre kirliliği oluşturmaması nedeniyle, PHB/V tipi polimerlerden veya bunların başka polimerlerle karışımından özellikle gıda ve kozmetik sanayiinde şişeleme malzemesi olarak yararlanılmaya başlanmıştır. PHA'lar çevre dostu fiziksel özelliklere sahip oluşlarından dolayı, endüstriyel uygulamalar açısından çekici olmalarının yanısıra, özel karakteristik özellikleri sayesinde biyomedikal alanda kullanımı çok fazladır (Lee, 1996; Page, 1995).

### 2.5.1. Ziraatte kullanım alanları

PHB ve kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında tamamen CO<sub>2</sub> ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir. Parçalanma için geçen süre kalınlık ve yüzey özelliklerine bağlı olarak düzenlenebilir (Lee, 1996).

PHB ve PHA, özellikle toprakta biyodegradasyon gerektiren uygulamalara çok uygundur. Çoğunlukla bunlar bir alüminyum folyo gibi film şeklinde kaplamada kullanılmaktadır. Tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında muhafaza ve

gübre ya da pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak kullanılabilir (Holmes, 1985).

### **2.5.2. Veterinerlikte kullanım alanları**

Veterinerlik hekimliğinde ilaçların salınımı için biyolojik parçalanabilen bir matriks olarak PHB'nin birçok kullanım alanı vardır.

Polimer özellikle sığırların rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir. Bu konuda çok tipik bir örnek olarak bir yıl boyunca hayvanların kurtlanması önlemek için antihelmitik ilaç içeren PHB'nin büyük kapsülleri yapılmıştır (Holmes, 1985).

### **2.5.3. Tıpta kullanım alanları**

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte, biyolojik uygunluğundan dolayı son zamanlarda tıp ve eczacılıkta sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Hayvan dokularında toksik etki yapmadığından, vücutta absorbe edilen protez aletlerin ve cerrahi dikişlerin yapımında PHB'nin kullanılması birçok bilim adamının, bu alanda çalışmalara ağırlık vermesine neden olmuştur. PHB ve kopolimerleri, hayvan dokularına implante edildiğinde onların biyolojik olarak parçalanabildiği görülmüş ve PHA'ların kullanımına olan ilgi artmıştır. Neticede veterinerlikte ve insanların ilaçla tedavisinde teropatik bileşiklerin kontrollü olarak salınması için PHA'lar kullanılmıştır (Lafferty et al., 1988).

Polimerin uygulama alanları onun özelliklerine bağlı olarak, doğrudan kullanılmasının yanında depolimerizasyon ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da yaygındır. Özellikle PHB'nin parçalanma ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit bu alanda çok önemlidir. Çünkü bu tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşiktir; lipid metabolizmasının ürünü olarak bulunur ve insan kanının normal bir ögesidir (Holmes, 1985).

Belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için bir enerji kaynağı olarak rol oynar. Bu durum ilk olarak Krebs tarafından bulunmuştur ve daha sonra bunun beyin gelişiminde rol alan aminoasitlerin öncüsü olarak fizyolojik bir role sahip olduğu saptanmıştır. Ayrıca D(-)-3-hidroksibütirik asitin diyabetiklerin kan serumunda anormal konsantrasyonlarda var olan keton yapılarından biri olarak rol oynadığına dair birçok bilgiler de vardır. Middlesex hastanesindeki çalışmalar, D(-)-3-hidroksibütirik asitin damar içi veya ağızdan karbon sağlanması için kullanılabileceğini ve daha yaygın olarak kullanılan glukoz yerine bazı klinik avantajlara sahip olduğunu göstermiştir. PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. Çünkü insan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB, cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır (Holmes, 1985).

PHB'nin hastanelerde cerrahi swaplar, yara sargıları, cerrahi eldivenler için de bir yağlayıcı madde olarak veya ince toz formunda kullanılması uygun görülmüştür. Ameliyat sonrası hastalarda unutulmuş pamuk swaplar, ABD'de ve diğer ülkelerde birçok hukuk davalarının başında geldiği düşünülürse bu avantaj oldukça önemlidir (Holmes, 1985).

Yüksek teknoloji ile PHB'nin geleceğe yönelik kullanım alanlarından biri de uygun ölçülerde su geçirmez bir tüp formunda düzenlenen çok ince fibrillerden meydana gelen kan damarı veya bir vasküler aşı gibi kullanılmasıdır. Bu aşı, vücut içinde gelişen yeni dokular için geçici bir yapı iskelesi olarak rol alabilir ve sonuçta doğal dokular tarafından tamamen eski haline getirilebilir. Bu, vücudun doğrudan tepkisini alan sentetik arterlerdeki blokaj ve pıhtı oluşum problemini tamamen yok edecektir (Holmes, 1985).

PHB'nin bir diğer önemli özelliği de onun piezoelektrik polimer olmasıdır. PHB ve kopolimerleri poliviniliden florit polimeri gibi kesikli piezoelektrisite göstermektedir. Poliviniliden florit polimeri filmleri, kemiği elektriksel stimülasyon ile kuvvetlendirmekte ve kemiği onarmaktadır. Dolayısıyla, bir kemik kırığını sabitleyen levhalar benzer mekanik özelliklere sahip takviyeli bir PHB karışımından

yapılırsa, stimüle edilen kemik büyür ve gelişir. Böyle bir kemik kırığındaki plaka biyolojik olarak parçalanabilir ve vücut tarafından resorbe edilebilir. Bu süre içinde de kemik kaynar ve plakayı uzaklaştırmak için ikinci bir ameliyata gerek kalmaz (Holmes, 1985).

#### 2.5.4. Özel uygulamalarda kullanılması

PHB, oldukça aktiftir ve polimeri oluşturan her bir hidroksibütirat ve hidroksivalerat monomer ünitesi kiral bir karbon atomuna sahip olup, bunların herbiri D(-) konfigürasyonundadır. PHB solusyonları ve PHB'den yapılan filmler, kendi içinden geçen polarize ışığın konumunu çevirecektir. Bu optik izomerler bulundukları ortamda kiral merkezleriyle diğerlerinden daha kuvvetli bağlanma özelliğine sahip olduğundan kromatografide kullanılabilir. Polimerlerin hidrolizi ile elde edilen birçok ilaç, sadece bir kiral formda aktiftir ve bu materyal böyle bileşiklerin organik sentezinde bir çimento bloku olarak kullanılabilir. Tokyo Üniversitesinden Prof. Mori, HB monomerinden, Hindistan mısırındaki haşaratın bir seks hormonu, bir balarısı hormonu, long-horned-beetle bir böceğin koruyucu substratı ve güzel koku olarak S-citronellol gibi 6 kimyasal maddenin sentezini rapor etmiştir (Holmes, 1985).

PHB ve kopolimerleri paketlenme filmleri ve tek kullanımlık malzemelerin yapımında da kullanılmaktadır. Bu materyallerin özellikleri polietilen, polipropilen gibi bazı ticari plastiklere benzediğinden termoplastik materyallerdir. PHB filmleri, polipropilen filmleri kadar güçlüdür, fakat PET (polyethylene terephthalate) kadar dayanıklı değildir. Cam takviyeli PHB kalıpları ise naylona olan benzerliğine göre daha sert ve dayanıklıdır (Holmes, 1985).

#### 2.6. *Rhizobium* Bakterilerinin Genel Özellikleri

Gram negatif, spor oluşturmeyen, çubuk formunda olup, pleomorfik yapıda hücrelerdir. Hücreler zaman zaman yaşlı sıvı kültürlerde, yıldız veya rozet şeklinde kümeler halinde bulunur. Genel olarak hareketlidirler, bir polar veya subpolar

flagellum ya da 2-6 peritrik flagella ihtiva ederler. Bu bakteriler, kemoorganotroflardır, birçok karbohidratı kullanabilirler. Karbohidrat içeren besi ortamlarında gelişme sırasında akışkan, zamlı maddeler salgırlar. Salgılanan bu maddelerin oranı suşlar arasında farklılık göstermektedir. Baklagillerin kök nodül hücreleri içerisinde, simbiyotik olarak azotu fikse edebilen bakteroidler halinde bulunurlar (Prescott et al., 1993). Koloniler yuvarlak ve opak, beyaz, konveks yapıdadır. *Lotononis bainesii*'den izole edilen bazı suşların kolonileri intrasellüler pigmentasyon nedeniyle kırmızıdır. Bazı suşlar optimum gelişme için biotin, tiamin, pantotenik asit gibi vitaminlere ihtiyaç duyarlar. Nikel, krom, kobalt, molibden gibi mikroelementler de gelişmeyi teşvik eder. Bazı *Rhizobium* ve *Agrobacterium* suşları, DNA baz kompozisyonu yönünden yakın bir ilişki gösterir (Jordan, 1984).

Birçok izolatin optimum gelişme sıcaklığı 12°C veya 44°C olabilir. Bunlar baklagil bitkileri ile simbiyotik ilişki sonucunda azotu fikse edebilirler. Bu familya temel olarak hızlı ve yavaş gelişen suşları içermesiyle iki grupta toplanır. Hızlı gelişen cins *Rhizobium* ve yavaş gelişen cins *Bradyrhizobium*'dur. Günümüzde *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Photrhizobium* ve *Mesorhizobium* olmak üzere 4 cins daha tanımlanmıştır (URL-1, URL-2).

Bakterilerin sınıflandırılması, suşların baklagil bitkilerinde nodül oluşturma özelliğine dayanılarak yapılmaktadır. *Rhizobium* suşları, bir grup baklagil bitkisini enfekte ederek nodül meydana getirebilirler. Diğer baklagil bitkilerini enfekte edemezler. Aynı bakteri tarafından enfekte edilen bitkiler kros-inokülasyon grupları teşkil ederler. *Rhizobium* bakterilerinin tür ayrımında esas, aynı kros-inokülasyon grubunda nodul yapabilme yeteneğidir. Bu özelliği gösteren bakteri suşları aynı tür içine girerler.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, kros-inokülasyon gruplarına dayanarak yapılan sınıflandırmanın yeterli olmadığını göstermektedir. Bazı *Rhizobium* suşları, gruplar arasında da kros-inokülasyon yapmaktadır (Spaink, 2001).

Agglutinasyon, jel difüzyon, presipitin ve flöresan antikor gibi birçok serolojik reaksiyonlar, suşa spesiflik göstermektedir. Yüzey antijenleri, suşun tanınmasında kullanışlı olmasına rağmen, türlerin teşhisinde yeterli değildir. Bazı taksonomik araştırmalar, bakterilerin serolojik reaksiyonlarıyla ilişkilidir (Jordan, 1984).

Kök nodül bakterilerinin sınıflandırılması, moleküler seviyedeki analizlerle yapılabilmektedir. *R. phaseoli* ve *R. trifolii*'nin *R. leguminosarum*'dan , ayrı bir tür olarak da *R. meliloti*'den ayrımı, numerik taksonomik analiz, DNA/DNA homolojisi, hücresel proteinlerin 2-yönlü poliakrilamid jel elektroforezi, ekstrasellüler yapının kompozisyonu ve infekte etme özelliği taşıyan plazmidlerin analizi ile yapılmıştır. *Bradyrhizobium* suşlarının taksonomik ilişkisi, heterojenliğinden dolayı tam olarak anlaşılamamıştır. Bu cinse ait teşhisler ise, DNA baz oranları, numerik taksonomi, nükleik asit hibridizasyonu, serolojisi, ekstrasellüler yapının kompozisyonu, karbohidrat metabolizması, bakteriyofaj, antibiyotiğe hassaslık ve bakteroid inklüzyonların tipine bağlı olarak yapılabilmektedir (Jordan, 1984).

Sıcaklıktaki değişiklerin karbon metabolizması için mikroorganizmalarda alternatif bir yol kullanımını stimüle ettiği bilinmektedir. Farklı organizmalardaki herbir izyolun, beklenen sonucu vermesi üzerinde belirsizlikler de vardır. Embden-Meyerohoff-Parnas (EMB) ve Entner-Doudoroff (ED) izyollarının *Rhizobium*'larda bulunmadığı veya küçük bir rol oynadığı rapor edilmiştir. Diğer taraftan *R. trifolii*'de ED izyolunu Pentoz fosfat izyolu izlemektedir. Bu bakteride EMB izyolu bulunamamıştır. Bu sonuçlar, *Rhizobium*'lardaki karbon metabolizmasının çeşitliliğinin bir göstergesidir (Sardesai and Babu, 2001).

Atmosferdeki azottan, bitkiler doğrudan yararlanamazlar. Bitkiler azotu amonyak olarak alırlar ve aminoasitlerine dönüştürürler. Atmosferdeki azotu fikse edebilen mikroorganizmaların bir kısmı yüksek bitkilerle simbiyoz yaşamakta, bir kısmı ise yaşamlarını serbest sürdürmektedir. Simbiyoz yaşayanlar azotu çeşitli reaksiyonlar sonucu bitkiler üzerinde organik bileşiklere dönüştürürken serbest yaşayanlar bu işi toprakta yaparlar (Öner, 1992). Atmosfer ve topraktaki azot döngüsünün merkezinde amonyak bulunur. Amonyak, toprakta bulunan bitki ve hayvanların ölmesi sonucu

proteinlerin, aminoasitlerin parçalanmasıyla oluşur. İyi havalandırılmış toprakta amonyak, *Nitrosomonas*'lar ve *Nitrobacter*'ler aracılığıyla  $\text{NO}_2$  ve  $\text{NO}_3$ 'lere okside olurlar. Gerek amonyak gerekse  $\text{NO}_3$ 'lar bitkiler tarafından azot kaynağı olarak kullanılırlar (Tortora et al., 1998).

Nodüller ile moleküler azotun fiksasyonu arasındaki ilişki ilk kez 1886-1888 yıllarında ortaya konmuştur. Bakteroidlerle dolu hücrelerin yer aldığı doku kırmızı renkli olup, leghemoglobin moleküllerini içerirler. Azot fiksasyonu sadece leghemoglobin içeren dokularda olanaklıdır (Schlegel, 1976). Serbest yaşayan *Rhizobium*'larda nitrogenaz enzimi bulunmamaktadır. Agarlı besiyerinde *Rhizobium* suşlarından çok azında nitrogenaz varlığı gösterilebilmiştir (Bonartseva et al., 1994).

Toprakta azot kaynağı olarak nitratlar bulunuyorsa, nitratlar kökler aracılığıyla alınır ve bitkide amonyağa dönüştürülür. Nitrat amonifikasyonu denilen bu dönüşümü, bitki yapraklarında bulunan nitrat redüktaz enzimi yapar.

#### 2.6.1. *Rhizobium*-baklagil ilişkisi

*Rhizobium*'lar kimyasal gradiente doğru hareket etme yeteneğindedirler. Rhizosfer bölgesinde, koloni oluşumunu yöneten aminoasit, karboksilik asit ve fenolik bileşikler gibi pekçok kimyasal çekici maddeler belirlenmiştir. *R. meliloti*'de, hareketlilik ve kemotaksisin nodül oluşumu için temel oluşturmadığı ancak rekabet için önemli olduğu bilinmektedir. Bakterinin mutant suşlarının CHO veya aminoasitlere karşı olan yönelme özelliklerini kaybetmelerine rağmen yonca köklerine lokalize bölgelere tutunabilme özelliğine sahip oldukları, aynı zaman da bağımsız bir kemotaktik bir yolun varlığı da saptanmıştır. Bu ikinci yolun luteolin adı verilen bir flavonoid tarafından kullanılabileceği ve bu maddenin sadece *R. meliloti*'de nodülasyon genlerinin (nod) indüklenmesine neden olmadığı, aynı zaman da kimyasal çekiciliğe sahip bir madde olduğu da ortaya konmuştur. *R. leguminosarum* suşları için nod genlerini indükleyen flavonoidlere karşı kemotaksis olayının var olduğu da ileri sürülmüştür. Bu durumda bütün bilinen nod genlerini

taşıyan simbiyotik plazmid, kemotaksis için yararlı ancak temel değildir (Ayhan, 1994).

*Rhizobium*'lar baklagillerin rizosfere salgıladıkları flavonoidleri nod genlerinin indüklenmesiyle cevap verirler. Nod gen proteinlerinin düzenli hareketi sonucu lipo-oligosakkaritler üretilir. Bu nod metabolitleri, bakteriden gelen sinyalleri bitkiye tanıtır ve kıvrımlı kök kılcallarının oluşması görünür hale gelir. Bakteriler, kök korteksine, enfeksiyon iplikçisi yoluyla girerler. Bu arada bitki hücreleri nod faktörlerine cevap olarak bölünmeye başlarlar ve nodül denilen organ meydana gelir. Bazı yonca (*Medicago sativa*) gibi bitkilerde *Rhizobium* olmaksızın nodül benzeri yapıların oluştuğu da bilinmektedir. Nod genlerinin yanısıra efektif simbiyozun oluşumunda pek çok bakteriyel genler de rol oynamaktadır (Akçelik vd., 1997).

#### 2.6.2. Azot fiksasyonunda ve *Rhizobium* bakterilerinde PHB

*Rhizobium* türlerinde PHA ve diğer poliestерlerin oluşumu, polimerlerin üretimi, nedenleriyle birlikte çok detaylı olarak çalışılmamıştır. Fakat bu grup bakterilerde, hücre metabolizması ve poliestер oluşumu arasında karşılıklı etkileşime de güzel bir ortam hazırlanmaktadır (Madison and Huisman, 1999).

*Rhizobium*, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* cinslerine ait birçok tür, serbest hücrede ve simbiyosiste PHB depolamaktadır (Karr et al., 1983). PHB'nin, *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsi bakterilerle baklagil bitkileri arasındaki simbiyotik nitrojen fiksasyonunda, enerji kaynağı olduğu düşünülmektedir (McDermott et al., 1989; Karr et al., 1984). *R. meliloti* ve diğer türlerde ise sadece serbest hücre devresinde veya nodül gelişiminin ilk aşamasında PHB depolanmaktadır. Bu türlerde nitrojeni fikse eden bakteroidlerde PHB depolanmamaktadır. Simbiyotik ilişkide bu bileşiklerin fizyolojik rolü tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, bakteroidlerde depo edilen PHB'nin karanlık evrede azot fiksasyonunu teşvik ettiği ve azot fiksasyonunun ön uzama evresini desteklediği açıklanmıştır. Çünkü bakteroidler, düşük oksijen konsantrasyonunda PHB'yi kullanmaktadırlar (Cevallos et al., 1996).

Bakteroid hücrelerin azot fiksasyonu için gereksinim duyduğu enerji, kök nodüllerine transfer edilen karbon bileşiklerin, prensip olarak, organik asitlerin fotosentetik metabolizması ile sağlanmaktadır. Bakteroid biokütlenin %50'sinden fazlası PHB'dir. *B. japonicum*'da PHB sentez yolunun *Azotobacter beijerinckii*'dekine çok benzer olduğu ve bakteroidlerde polimer birikiminin mikroaerofilik şartların etkisiyle başladığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda nitrogenaz aktivitesindeki artış ile de yakından ilişkili olduğu bulunmuştur (Anderson and Dawes, 1990).

Oksijen sınırlamasının PHB üretimi üzerine etkisi detaylı olarak araştırılmamış olmasına rağmen, hücrede depo edilen PHB'nin regülatör bir rolü olduğu ve enerji azalması halinde metabolizma faaliyetleri ile nitrogenaz aktivitesi için eşit oranda paylaşıldığı düşünülmektedir (McDermott et al., 1989).

Emden-Meyerhof ve Etner-Doudorff izyollarındaki enzim aktivitesi, bazı *Rhizobium*'larda ölçülmüş olmasına rağmen, bu enzim aktivitesinin nitrojen fiksasyonuna bağlı olup olmadığı tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Karr et al., 1984). Araştırmacılar, bazı bilim adamlarının, bakteroidlerde radyoaktif işaretli substratlar kullanmak suretiyle sitrik asit siklusunun varlığını gösterdiklerini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, yaptıkları çalışmada *B. japonicum* bakteroidlerinde sitrik asit ve PHB siklusundaki enzimlerin aktivitesini incelemişlerdir. Nitrogenaz enzim aktivitesindeki artışa paralel olarak fumarazın spesifik aktivitesinin, hidroksibütirat dehidrogenaz,  $\beta$ -ketotiolaz ve pirüvat dehidrogenaz kompleksinin arttığını, asetoasetat süksinil-CoA transferaz ve izositrat dehidrogenazın azaldığını tespit etmişlerdir. Malat dehidrogenaz aktivitesi sabit kalmıştır. Araştırma sonunda nitrogenaz aktivitesi ve PHB depo edilmesi arasındaki ilişkinin daha detaylı olarak çalışılıp açıklığa kavuşturulması gerektiği sonucuna varılmıştır (Karr et al., 1984).

*Rhizobium* türleri ile bunların konukçu bitkileri arasındaki simbiyosis, bakteroidlerdeki bakteriyal nitrogenazların aktivitesi doğrultusunda atmosferik azotun fikse edildiği sistemle sağlanmaktadır (Stowers, 1985). P(3HB)'nin, nodüldeki bakteroidlerin fizyolojisinde bir rolü olduğu bilim adamları tarafından

kabul edilmektedir. Diğer taraftan bakteroidin metabolik aktivitesinin ancak başarılı bir simbiyoz düzeneğinin oluşturulmasıyla çözülebileceği ileri sürülmüştür (Madison and Huisman, 1999).

Povolo et al. (1994), P(3HB) üretme yönünden defektli *R. meliloti*'nin 4 adet transpozon mutantlarını elde etmişler ve bu mutant suşların simbiyosisteki etkilerini araştırmışlardır. P(3HB)-negatif mutantların yoncada nodul oluşturma yönünden atasal suşa benzediğini bildirmişlerdir. Buna ilaveten araştırmacılar, nitrogenaz enzim aktivitesinin, PHB-negatif mutantlarda değişiklik göstermediğini de tespit etmişler ve *R. meliloti* ile yonca arasındaki simbiyosisin, P(3HB) sentez yollarındaki değişikliklerden etkilenmediği kanısına varmışlardır.

Oksotrofik *R. etli* CE3 suşunun, biotin ve tiamin vitaminlerinin yokluğunda PHB 'yi yüksek miktarda depoladığı bildirilmiştir (Madison and Huisman, 1999). Araştırmacılara göre, oksotroflarda TCA siklusu aerobik serbest hücrelerde optimal olarak fonksiyon gösterememektir. Ancak karbon metabolizmasındaki artış, TCA siklusunun rolünün P(3HB) oluşumu olarak ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Cevallos et al. (1996), *R. etli* phaC mutantını elde etmişlerdir. Atasal suşun aksine mutant suşun oluşturduğu nodüllerin daha yüksek ve uzun süre nitrogenaz aktivitesi gösterdiğini bulmuşlardır. Araştırmacılar, *R. etli* ile bezelye arasındaki simbiyosiste PHB ilişkisini açıklayamamışlar, fakat PHB'nin bakterinin canlılığını devam ettirmede bir rol oynadığına inanmışlardır.

PHA biyosentezi, PHA oluşumundan spesifik olarak sorumlu birkaç enzimin aktivitesiyle gerçekleşir. Buna ilaveten diğer aktiviteler de, hücrelerde biriktirilen PHB miktarını etkilemektedir. Polimerin metabolizmasının moleküler fizyolojisinin detaylı olarak anlaşılabilmesi, başarılı transgenik PHA üreticilerinin geliştirilmesine bağlıdır. Bakteri hücrelerinin, PHA sentezini nasıl düzenleyebildiği çözümlendiği takdirde çok daha etkili PHA proseslerin geliştirilebilmesi mümkün olabilecektir (Lee, 1996; Madison and Huisman, 1999).

## 2.7. PHB Üretimi Üzerine Yapılan Mutasyon Çalışmaları

Proteinler ve nükleik asitler, UV ışığına karşı özel affinite gösterirler ve UV ışığını kolayca absorbe edebilirler. Nükleik asitlerin 300 nm dalga boyunun altındaki UV ışığını absorbe etme yetenekleri daha fazladır. UV ışığı, DNA iplikçiklerinin timinleri arasında bağların kurulmasına, timin dimerlerinin oluşmasına etki ederler ve bakteri sentez mekanizmasını bozarak, bakterilerin ölümüne sebep olurlar. UV ışığının dozu arttırılırsa, sitozin dimerleri de oluşmaya başlar ve ölümler artabilir. Eğer bakteri, UV ışığı uygulamasından hemen sonra görülebilen ışığa tutulursa (300-400 nm dalga boyu) tamir mekanizması devreye girer, dimerler ortadan kaldırılarak bozukluk tamir edilir ve UV ışınının letal etkisi azaltılabilir. Mutasyon çalışmalarında arzulanan mutantlar, ölüm oranı %90-99'un üzerinde olduğunda elde edilebilir (Ashm, 1994).

Akridin boyaları (proflavine, acriflavine, acridin orange) bakterilerde yüksek etkili mutajenlerdir. Bu mutajenler genelde iki yönlü transversiyon ya da transisyonlara yol açarak, mutasyonlara neden olurlar. Bu mutasyonlar bazen kendiliğinden bazen de akridinin etkisi ile normale dönerler (Ashm, 1994).

Birçok bakteri gibi *Rhizobium* türlerinin de PHB depo ettikleri ve hücre kuru ağırlıklarının %55'ten fazlasının PHB olduğu bilinmektedir (Tombolini and Nuti, 1989).

PHA'ı depolayamayan mutantların mevcut olması, polimerin enzimolojisi ve fizyolojisinin anlaşılması için önem taşımaktadır (Madison and Huisman, 1999). PHB biriktiremeyen *Rhizobium* suşları ile yapılan denemeler, simbiyotik azot fiksasyonunda polimerin rolünü açıklamaya yardımcı olacaktır (Lee, 1996).

*A. eutrophus*'un PHA<sup>-</sup> mutantları ilk kez Schlegel ve grubunca, 1-nitroso-3-nitro-1-methylguanidine mutageni ile elde edildiğini bildiren Povolo et al., 1994 yılında Tn5 transpozon mutagenезisi ile *R. meliloti*'nin PHB<sup>-</sup> mutantlarını elde etmişlerdir.

Yaklaşık 1000 koloni üzerinde gaz-kromatografik inceleme sonunda elde edilen 4 mutantın atasal suşa benzerlikleri kontrol edilmiş, mutasyonun genetik manipulasyonların bir sonucu olarak, genomda ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. Mutantların mega plazmid sayı ve büyüklüklerinin atasal suşa benzediğini saptamışlardır.  $\beta$ -ketotiolaz, PHB sintaz ve asetoasetil-CoA redüktaz enzim aktivitelerine bakılmış ve tüm mutantlarda sadece PHB sintaz enziminin inaktif olduğu bulunmuştur. Elektron mikroskop çalışması ile PHB granüllerine rastlanmadığı desteklenmiştir. PHB<sup>-</sup> mutantların yoncada nodül oluşturabildikleri ve simbiyotik azot fiksasyonunun etkilenmediği de görülmüştür. Araştırmacılar, PHB içeriğinde azalma olan *Rhizobium* hücrelerinin, enerji gereksinimlerini alternatif bir depo materyalini kullanarak karşıladıkları hipotezini ileri sürmüşlerdir. Diğer taraftan, Lodwig et al. (2001), bazı *Rhizobium* mutantlarında azot fiksasyon yeteneklerinde artış olmasına rağmen, PHB ve glikojeni sentezleyemediklerini ve PHB-simbiyoz ilişkisinin hala aydınlatılamadığını da bildirmişlerdir.

## 2.8. Melasın PHB Üretiminde Kullanılması

Melas, şeker üretiminin teknik ve ekonomik şartlar altında şuruplardan en fazla kristal şeker alındıktan sonra geriye kalan ana şuruptur. Şeker teknolojisinde işlenen pancara göre yaklaşık %4-5 oranında melas elde edilir. Melasın bileşimi bitki türüne, mevsim ve toprak şartlarına, hasata, şeker rafinasyon işlemlerine ve melas depolama koşullarına bağlı olarak değişmektedir.

Melasta bulunan şeker sakkarozdur. İndirgen şeker olarak kamış melasında %12-35 oranında glukoz ve fruktoz vardır. Trisakkarit olan rafinoz, pancar melasında %2 konsantrasyona kadar bulunabilir. Melasta bulunan şeker dışındaki organik maddelerin başlıcaları; azotlu maddeler, organik asitler, nişasta ve pentozanlar gibi kompleks karbohidratlardır. Ayrıca mumsu maddeler, steroller ve pigmentler de az miktarda bulunur. Melasta bulunan azotlu maddeler aminoasitler, amidler ve diğer basit azotlu maddelerdir. Şeker pancarı melasında baskın halde bulunan azotlu maddeler betain ve glutamik asittir ve bu bileşikler melasın karakteristik koku ve

lezzetinin büyük bir kısmını oluşturlar. Melasta bulunan azotun ancak %40-60 kadarı mikroorganizmalar tarafından kullanılır, bu nedenle amonyum tuzları, sıvı amonyak veya üre ortama katılarak azot zenginleştirilmesi yapılır (Katırcıoğlu ve Aksöz, 1996; Göksungur, 1998).

Asetik asit, bütirik asit formik asit ve propiyonik asit, melasta bulunan organik asitlerdir. Melasta %4-11 arasında inorganik bileşikler vardır. Bunlar potasyum, sodyum, demir, sülfat, magnezyum, kalsiyum, klorür ve fosfatlardır. Pancar melasında genellikle potasyum oranı yüksektir. Melasta biyotin, pantotenik asit, inositol, tiyamin, riboflavin, nikotinik asit, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler vardır (Burrows, 1970).

Melasın endüstriyel fermentasyonlarda ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajları vardır ancak kompleks bir substrat olduğu için bazı toksik maddeler ve mineral maddeler de içerir. Bu maddelerin yüksek konsantrasyonları da inhibitör etki yapar (Burrows, 1970).

Bilimsel literatürde melastan PHA/PHB üretimine ait çalışma sayısı oldukça azdır.

Ticari bir ürün olan melas, glukozdan daha ucuzdur ve maya fermentasyonunda karbon kaynağı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Melas besi ortamında *A. eutrophus*, *Azotobacter vinelandii* ve rekombinant *E. coli*'nin PHA üretimi de son yıllarda çalışılmaya başlanmıştır (Page, 1992a, b; Beaulieu et al., 1995; Liu et al., 1998).

Şeker pancarı melası, *Azotobacter vinelandii* UWD suşunda PHA üretimi için besi ortamı olarak kullanılmış ve rafine edilmemiş şeker kaynaklarının en iyisi olduğu açıklanmıştır (Page, 1989; Page, 1992a, b). Bakteride, %10 melas konsantrasyonunda polimer üretimi gerçekleşmezken, ortama ekstra nutrientlerin ilavesi UWD suşunun gelişimine uyarıcı etki yapmış ve hücrede PHA biriktiği görülmüştür. Bakteri %2 sukroz içeren %5 melasta 1 g/l PHA sentezlemiştir. Kültür ortamında ilk 10 saatte polimer üretimi oldukça azken, 35 saat ve sonrasında PHA miktarında artış olduğu açıklanmıştır. Melasa öncü olarak valerat ilave edildiğinde  $\beta$ -

hidroksivaleat içeren kopolimerlerin üretildiği de tespit edilmiştir. Sonuç olarak PHA/PHB üretimi üzerine saf olmayan şeker kaynaklarının arttırıcı bir etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Page, 1992a).

*A. eutrophus* DSM 545 suşu, %3 glukoz, çok sayıda amonyum substratları ve şeker pancarı melasında pH=7.0'de geliştirilmiş ve bakterideki PHB içeriği gaz kromatografisi ile belirlenmiştir. En iyi hücre gelişimi ve PHB üretimi amonyum sülfatlı ortamda elde edilmiştir. Gelişme faktörü olarak melasa amonyum sülfat ilave edildiğinde %0,3 melas konsantrasyonunda optimal PHB (%17-26) depolandığı bildirilmiştir (Beaulieu et al., 1995).

Liu et al. (1998), rekombinant *E. coli*'nin tek karbon kaynağı olarak melastaki PHB üretim yeteneğini araştırmışlardır. Araştırmacılar, yüksek melas konsantrasyonlarında PHB üretiminin arttığını açıklamışlardır. 35 saat sonra bakteri kuru ağırlığının %80'inin PHB olduğunu rapor etmişlerdir. Glukoz yerine melas kullanımının daha ucuz ve ekonomik olacağı sonucuna varmışlardır.

## 2.9. *Rhizobium* Bakterilerinde Plazmid DNA

Plazmidler, konukçu hücrede otonom olarak replike olabilen, çift zincirli, halkasal DNA molekülleridir. Bunlar bir iki ile birkaç yüz kilo baz (kb) uzunluğundadırlar. Replikasyonun başlaması ve kontrolü gibi plazmid fonksiyonları için temel olan genler içerirler. Bazıları hücre bölünmesi veya konjugal transfer sırasında eşit bölünme gibi stabil olan özellikleri kontrol eden genleri taşırlar. Birçok plazmid ise sadece kendilerine değil, konukçularına da yarar sağlayacak genlere (ilaçlara dirençlilik, organik bileşiklerin degradasyonu, virulens faktörleri, toksin üreten genler gibi) sahiptir. Bu tip genler, sıklıkla transpozonlar içerisinde yer alırlar (Couturier et al., 1988).

Bazı durumlarda plazmidler ve kromozomlar arasında biyokimyasal yönden bir iş birliği gelişebildiği gibi bu işbirliği ters veya olumsuz yönde de gelişebilmektedir. Aynı fonksiyona sahip plazmidlerin moleküler ağırlıkları değişik bakterilerde farklı

ölçülerde olabilmektedir. *E. coli*'de laktoz fermantasyonu 58,5 Md'luk plazmid tarafından yönetilmesine karşın, *K. pneumoniae*'de 163 Md'luk plazmid aynı fonksiyonu yapmaktadır. *R. leguminosarum*'da bulunan 100 Md'luk plazmid, hidrogenaz aktivitesini spesifik etmesine karşın *A. eutrophus*'ta 300 Md'luk plazmid aynı aktiviteyi iki enzimle yapmaktadır (Arda,2000).

Büyük plazmidler içermesinden dolayı, *Rhizobium* genetiği bilim adamlarının ilgi duyduğu bir alandır (Long, 1989).

Baklagil bitkisinde kök kılcallarının oluşumu, enfeksiyon borucuğunun meydana gelmesi ve spesifik nodül oluşumunun genetik determinantları Sym plazmidi adı verilen büyük doğal plazmid tarafından kodlanmaktadır. Çoğu hızlı gelişen *Rhizobium* suşlarında yüksek moleküler ağırlıkta Sym plazmidinin var olduğu ve bu plazmidlerin azot fiksasyonu için gerekli olan fix genleri, nitrogenaz genleri (nif) ve nodül oluşumu için nodül genlerini (nod) içerdiği saptanmıştır. *Bradyrhizobium* suşlarında ise bu genlerin plazmidde değil, kromozomda yer aldığı belirtilmiştir (Akçelik vd., 1997; Geniaux and Amarger, 1993; Ayhan, 1994).

*R. meliloti*'deki bir plazmid, *R. leguminosarum* bv. *viciae*'ye transformasyon yolu ile aktarılmış ve *R. leguminosarum* bv. *viciae*'nin normal konukçusu olan fiğ bitkisini enfekte etme ve nodül oluşturma yeteneğini kaybettiği deneysel olarak gösterilmiştir. Bu suшта meydana gelen simbiyotik özelliklerdeki değişikliğe *R. meliloti*'de var olan nod H ve nod Q genlerinin neden olduğu rapor edilmiştir (Akçelik vd., 1997).

*R. leguminosarum* Sym plazmidlerinin self-transmissible (kendi kendine geçebilen) plazmidler olduğu ve *R. meliloti*'ye konjugasyon yoluyla transfer edilebildiği açıklanmıştır (Miksch and Lentzsch, 1988). Araştırmacılar, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*'deki Sym pRtr5a plazmidi, *R. meliloti*'ye transfer ederek, verici suştaki nod ve nif/fix genlerinin *R. meliloti*'de eksprese olduğunu, bu bakteride yüksek seviyede nitrojen fikse edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca verici suş ile inokule edilen legüm bitkisi ürününe göre *R. meliloti* suşu ile inokule edilen ürünün, çok daha fazla olduğu saptanmıştır (Miksch and Lentzsch, 1990).

*Rhizobium phaseoli* CFN299 suşunda 185, 225 ve 410 kb büyüklüğünde toplam üç plazmid tespit edilmiştir. 410 kb büyüklüğündeki plazmidin nodülasyon ve nitrojen fiksasyonundan sorumlu tüm genleri taşıdığı bildirilmiştir (Martinez et al., 1987).

*Rhizobium* ve *Azorhizobium*'da da büyük plazmidlerde simbiyosis için primer gen bölgeleri bulunmaktadır. Simbiyotik genlerin düzenlenişinin her türde farklılık gösterdiği ve bu genlerin plazmidlerde bulunduğu gibi kromozomda da yer aldığı açıklanmıştır (Long, 1989).

Akçelik vd. (1997), *Bradyrhizobium* suşlarında nodulasyon yeteneğinin plazmidlerle olan ilişkisini araştırmışlardır. Bu özelliğin, bu suşlarda kromozomal DNA kökenli olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, antibiyotik direnç markerlerinin oluşturulmasından sonra yürütülen türler arası konjugasyon denemelerinde, 72,6 kb büyüklükteki plazmidin konjugal aktarım yeteneğinde olduğu ancak transkonjugatlarda stabil olmadığını belirtmişlerdir.

Akçelik vd. (1997)'nın bildirdiğine göre Percuoca ve grubu, topraktan izole edilen *R. leguminosarum* bv. *viciae* suşlarının plazmid içeriklerini belirlemişlerdir ve simbiyotik özelliklerini saptamışlardır. Plazmid bant sayısı ile büyüklüklerinin suştan suşa değişiklik gösterdiği, bir suşta sadece bir adet 135-140 kb büyüklükte Sym plazmidinin varlığını tespit etmişlerdir. Sym plazmidinin büyük olmasının, simbiyotik effektivlik ile bir ilişkisi olmadığını da vurgulamışlardır.

*Rhizobium trifolii*'nin 32 kd'luk simbiyotik plazmidinin, konukçu-spesifik nodülasyon ve nitrojen fiksasyonu için gerekli olan tüm genlere sahip olduğu bildirilmiştir (Long, 1989).

Charles et al. (1997), *R. meliloti*'de PHB degradasyon izyoluna etki eden kromozomal ve megaplazmid bölgesini belirlemişlerdir. Karbon kaynağı olarak asetoasetat veya 3-hidroksibütiratı kullanabilen *R. meliloti* suşundaki megaplazmid üzerinde yapılan delesyonla mutant suşlar elde edilmiştir. Mutantların, asetatı kullanma yeteneğine sahipken, 3-hidroksibütiratı kullanma yeteneklerini

kaybettikleri görülmüştür. Bu mutantlar sayesinde asetoasetat ve/veya 3-hidroksibütiratı kullanımdan sorumlu gen bölgelerinin belirlendiği rapor edilmiştir.

## 2.10. Bakteriyosin ve/veya Bakteriyosin Benzeri Maddeler

Bakteriyosinler, protein veya protein kompleksleri olup, *E. coli* ve *Pseudomonas* gibi gram negatif bakterilerin yanı sıra birçok gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenebilen, dar spektrumlu ve letal etkileri olan; düşük molekül ağırlığına sahip potansiyel antimikrobiyal maddelerdir (Arda, 2000).

Bakterilerde bakteriyosin şekillenmesi için, özel bakteriyosin genlerinin bulunması gerekir. Bunlar bakteriyosin sentezini spesifiye eden özel genler olup, bir kısmı kromozomal olmasına karşın, bir kısmı da ekstra kromozomal karakter taşımaktadır. Birçok bakteride böyle genler bulunmasına karşın genellikle baskı altında tutulurlar ve bakteriyosin oluşturmazlar (Arda, 2000).

Bakteriyosinler birçok tarzda, hedef bakteriyi etkileyerek lize ve inhibe ederler. Bunlar, hücre duvarı ve membranında kanallar oluşturarak iyonların giriş-çıkışını ve permeabilitesini arttırmırlar. Hücreden dışarı çıkan iyonlar, aynı zaman da enzimlerin kofaktörleri olduğundan enzim aktivitelerini inhibe ederler. Dolayısıyla hücre zarında bulunan enzimlerin etkinliğinin değişmesi ile permeabilitesi artan hücre membranının bakteriyosin geçişi hızlanır ve hücre içine giren bakteriyosinler, DNaz ve RNaz olarak etkinlik göstererek, hücredeki DNA ve RNA'nın fonksiyonunu engellerler (Arda, 2000).

Tümü olmasa da birçok *Rhizobium* türü rhizobiocin olarak adlandırılan düşük moleküler ağırlıklı bakteriyosin sentezlerler. Rhizobiocinlerin genel olarak inhibisyon zon çapları, 20 mm'den büyüktür. Düşük moleküler ağırlığında olup, agar yüzeyinde hızlı difüze oldukları için bunlara "small bakteriyosin molekül" denmektedir Farklı suşlara ait rhizobiocinler, birçok suşun gelişimini tümüyle inhibe etmeleri ve kross-resistant özellikte olmalarından dolayı, benzer olmasalar da birbirleriyle yakın ilişkilidirler. Bu molekülleri kodlayan genler, hızlı gelişen

*Rhizobium* türlerinin tümünde mevcuttur. Small bakteriyosinler proteolitik enzimlere, pektinaz ve lizozime karşı dirençlidirler ve bakterisidal etkileri, hücre bölünmesini inhibe etme şeklindedir (van Brussel et al., 1985).

Joseph et al. (1983), *Rhizobium* türleri tarafından sentezlenen bakteriyosinlerin, faj benzeri moleküller olarak karakterize edildiğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, *R. trifolii* IARI suşundan geniş spektrumlu bir antimikrobiyal madde, Rel1 suşundan ise bakteriyosin benzeri bir madde saflaştırmışlardır. Saflaştırdıkları iki maddenin, gram (+) ve gram(-) birçok patojen bakteri üzerine inhibisyonik etkisini test etmişlerdir. IARI suşunun 2-14 mm, Rel1'in ise 2-6 mm inhibisyon zon çapına sahip olduğunu gözlemişlerdir. Antimikrobiyal maddenin 75-80°C ısıya, tripsin, lizozim, DNaz I ve RNaz A'ya dayanıklı olduğunu belirlemişlerdir. Diğer taraftan, *R. trifolii* Rel 1'in sentezlediği maddenin, tripsin ve 75-80°C'ye hassas; lizozim, RNaz A ve DNaz I'e dayanıklı olduğunu açıklamışlardır.

*R. leguminosarum*'dan saflaştırılan small bakteriyosin molekülün, N-(3R-hidroksi-7-cis-tetradecanoil)-L-homoserin lakton olduğu teşhis edilmiştir. Bu molekülde, her iki asimetrik karbon atomu da bulunmaktadır. Bakteriyosinin, yapısal olarak; *Vibrio fischeri*, *P. aeuroginosa*, *Erwinia carotovora* ve *Agrobacterium tumefaciens* gibi bakterilerdeki ko-transkripsiyon faktörlerine yakın olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar, bu tarz ko-transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenen mekanizmanın, *R. leguminosarum*'da hala tam olarak açıklanamadığını da bildirmişlerdir (Schripsema et al., 1996). Bu molekülün sentezinden sorumlu genlerin, kromozomda yer aldığı da rapor edilmiştir (Lithgow et al., 2000).

Wilson et al. (1998), 1993 yılında bitki nodüllerinden izole ettikleri *R. leguminosarum* bv. *viciae*'ye ait 20 suşu fenotipik, RAPD PCR ve plazmid profillerine göre gruplandırmışlar ve izolatların tek bir suş olduğunu belirlemişlerdir. 1994 ve 1995 yıllarında izole edilen toplam 153 suştan sadece 20 suş karakterize edilmiştir. Teşhis edilen suşların bakteriyosin özellikleri incelenmiş, 1993'te izole ettikleri suşun orta moleküler ağırlıklı bakteriyosin sentezlediğini, test bakterileri

üzerine %68 oranında etki gösterdiğini bulmuşlardır. 1994 ve 1995 yıllarına ait izolatların %62'sinin, bu bakteriyosinden etkilenmediği de rapor edilmiştir.

### 2.11. Protein Profillerinin Bakteri Sistematğinde Kullanımı

İzole edilen bir çok suşun birbiriyle karıştırılması, suşlar arasında ayrımı geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Sınıflandırmaya yönelik ilk çalışmalar genelde morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyon temel alınarak yapılmıştır. Ancak özellikle fenotipik özellikler suşların ayrımı için yeterli olmadığından değişik metodlar geliştirilmiştir (Bağcı vd., 1991).

Mikrobiyal sistematiğe protein jel elektroforezi, özellikle aynı türler veya alt türlere ait suşların hücresel proteinlerin karşılaştırılması ve ayrımı için hassas bir teknik olarak yıllardır kullanılmaktadır (Bruce and Jordens, 1991; Çökmüş and Yousten, 1994; Kampfer, 1995; Nick et al., 1999).

Elektroforetik metodlar, bir çok örneğe kolaylıkla adapte edilebildiğinden, farklı moleküllerin elektroforetik profilleri populasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. *Rhizobium*'ların lipopolisakkarit (LPS) ve proteinlerinin yapısında görülen geniş çeşitlilik, bunların elektroforetik davranışlarına yansımakta, izolatlar arasında farklılığın belirlenmesinde bir kriter olarak kullanımı mümkün olmaktadır. Bunun yanı sıra *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium*'un tarla izolatlarının identifikasyonu için plazmid profilleri de kullanılmaktadır (Hitchcock and Brown, 1983; Kamicker and Brill, 1986; Dreyfus et al., 1988; Kishore et al., 1996; Santamaria et al., 1997).

*Rhizobium* suşları, doğal azot gübresi olarak yılda bir kez tarım topraklarına verilir. Wisconsin soya çiftliklerinden toplanan 543 *B. japonicum* izolatının tek yönlü SDS-PAGE ile ayrımı yapılmış, elektroforetik ayrımın serotiplendirme ile yapılan ayırmadan daha iyi olduğu açıklanmıştır. Tüm hücre proteinlerinin elektroforetik analizi sonunda suşlardan 23'ünün doğal, 6'sının inokulant suş olduğu belirlenmiştir. İzolatlardan 61A76 suşunun en etkin suş olduğu ve %21 oranında nodül oluşturduğu

saptanmıştır. Bu predominant suşların bilhassa soya kültürü, toprak tipi ve tarla lokasyonu ile ilişkili olmadığı da rapor edilmiştir (Kamicker and Brill, 1986).

Dreyfus et al. (1988), *Sesbania rostrata* kök nodüllerinden izole ettikleri 20 adet kök ve gövde nodül bakteri suşlarının 221 fenotipik özelliğinin numerik analizini yapmışlardır. Bu suşları *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsine ait kontrol suşlarla ve sadece köklerde nodül oluşturan 9 suşla karşılaştırmışlardır. Ayrıca bu suşların tüm hücre proteinleri, DNA-DNA ve DNA-rRNA hibridizasyonları karşılaştırılmıştır. Sadece kök nodülasyonu yapan suşların *Rhizobium* cinsine ait olduğunu belirlemişlerdir. Kök ve gövde nodülasyonu yapan suşların ise, *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium*'dan oldukça farklı olduğunu saptamışlardır. Suşların *Xanthobacter*'e yakın olduğunu fakat genotipik ve fenotipik yönden farklılık gösterdiğini rapor etmişlerdir. Yeni bir cins olan *Azorhizobium*'a ait *Azorhizobium caulinodans* ORS 571 tip suşunu önermişlerdir.

Diğer taraftan, *Sesbania* türlerinde kök ve gövde nodülü oluşturan *Rhizobium* izolatlarının, toplam çözünür protein ve membran lipopolisakkarit profillerinin SDS-PAGE ile analizi suşların identifikasyonunda kullanılmıştır. İzolatların elektroforetik özellikleri referans suşlarla karşılaştırılmıştır. Protein ve LPS profilleri ile suşların birbirinden, hatta referans suşlardan ayrımının sağlanabildiği rapor edilmiştir (Kishore et al., 1996).

Brezilya'nın Atlantik Çölleri ve Amazon bölgesindeki tropik legüm bitkilerinin nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium*'un toplam 800 suşu arasındaki akrabalıklar ve taksonomik pozisyonlar determine edilmiştir. Araştırmacılar SDS-PAGE ile toplam 171 suş seçmişler, bunların da 23 adet elektroforetik küme oluşturduğunu belirtmişlerdir. İzolatların çoğu *Bradyrhizobium japonicum* tip suşunu da içine alan büyük bir kümede toplanmıştır. Birkaç izolatın ise *R. fredii*, *R. galegae* ve *R. loti* türleri ile aynı olduğu bulunmuştur. Fakat birçok suşun takson olarak tanımlanamadığı da bildirilmiştir (Moreira et al., 1993).

Gatti et al. (1997), laktik asit bakterilerinin farklı türlerine ait toplam 119 suştan saflaştırdıkları hücre duvar proteinlerinin SDS-PAGE parmak izini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon ve elektroforetik seperasyonun, termofilik laktobasil tür ve suşların karakterizasyonu için hızlı ve uygun bir metot olduğu sonucuna varılmıştır. Yaklaşık 50 kDa olan bir proteinin, tüm *Lact. helveticus* suşlarında karakteristik olduğu, 20 ve 30 kDa civarında olan iki duvar proteinin de *Lact. delbrueckii* suşlarına özgü olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan araştırmacılar, *Lact. lactis* ve *Lact. bulgaricus* alt türleri arasında ayrımın elektroforetik teknikle mümkün olmadığını da bildirmişlerdir. *Lact. helveticus* ve *Lact. delbrueckii*'nin ise hücre duvar proteinlerine göre ayrımının sağlanabildiği rapor edilmiştir.

Bu bakteri grubu ile yapılan bir diğer çalışmada, şaraplardan izole edilen 32 laktik asit bakterisinin SDS-PAGE ile elde edilen tüm hücre protein profillerine göre ayrımı incelenmiş ve bu suşların *Leuconostoc oenos* veya *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*'nin üyesi oldukları açıklanmıştır (Patarata et al., 1994).

Elektroforezle desteklenen bir başka çalışmada ise *B. sphaericus* suşlarının gruplandırılmasında bakteriyosin aktivitelerinin de kullanılabileceği bildirilmiştir (Çökmüş and Yousten, 1993). DNA homoloji gruplarındaki suşlar arasında bakteriyosin profillerinde çeşitlilik gözlenmiştir. H5a5b'ye ait suşların benzer bakteriyosin aktivitesi gösterdiği ve poliakrilamid jeldeki bakteriyosin bandının benzer olduğu tespit edilmiştir. *B. sphaericus* suşlarının Native-PAGE ve SDS-PAGE ile elde edilen filtrat protein profillerine göre ayrımı yapılmıştır. Yapılan çalışmada suşların birbirlerinden ayrımında, tamamen sporlanmış kültürlerdeki filtrat proteinlerin vejetatif evreye göre daha uygun olduğu rapor edilmiştir. Suşların ayrımında Native-PAGE'in kullanılabileceği buna karşılık SDS-PAGE'in kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır (Mercan, 1996).

### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Materyal örnekleri

Araştırmada *Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsine ait toplam 31 adet bakteri kullanılmış olup, bunların 22 adeti Ankara-Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü'nden, 1 adeti Prof.Dr. Kamuran Ayhan'dan temin edilmiştir. 8 adeti ise Mercimek ve Nohut kök nodüllerinden izole edilmiştir. Bu bakterilerin temin edildiği kaynaklar ile bakteri kodları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Rhizobium* suşları ve temin edildikleri kaynaklar

| No | Bakteri                                    | Temin Edildiği Kaynak                 |
|----|--------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y1               | Yonca izolatu-TGAE                    |
| 2  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y2               | Yonca izolatu-TGAE                    |
| 3  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y4               | Yonca izolatu-TGAE                    |
| 4  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y11              | Yonca izolatu-TGAE                    |
| 5  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y22              | Yonca izolatu-TGAE                    |
| 6  | <i>Rhizobium meliloti</i> Y520             | Yonca izolatu-TGAE                    |
| 7  | <i>Rhizobium</i> sp. Ba378                 | Bakla izolatu-TGAE                    |
| 8  | <i>Rhizobium viciae</i> F69                | Fig izolatu-TGAE                      |
| 9  | <i>Rhizobium viciae</i> F111               | Fig izolatu-TGAE                      |
| 10 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S543       | Soya izolatu-TGAE                     |
| 11 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SFr        | Soya izolatu-TGAE                     |
| 12 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S Irat Fab | Soya izolatu-TGAE                     |
| 13 | <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110   | A.Ü.Z.F.                              |
| 14 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> M6          | Mercimek izolatu-TGAE                 |
| 15 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> M23         | Mercimek izolatu-<br>Şereflikoçhisar* |
| 16 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> M24         | Mercimek izolatu-İbrahimbeyli*        |

Çizelge 3.1'in devamı. *Rhizobium* suşları ve temin edildikleri kaynaklar

| No | Bakteri                            | Temin Edildiği Kaynak |
|----|------------------------------------|-----------------------|
| 17 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> M28 | Mercimek izolatu-TGAE |
| 18 | <i>Rhizobium leguminosarum</i> M43 | Mercimek izolatu-TGAE |
| 19 | <i>Rhizobium cicer</i> N1          | Nohut izolatu-Kazan*  |
| 20 | <i>Rhizobium cicer</i> N2          | Nohut izolatu-Kazan*  |
| 21 | <i>Rhizobium cicer</i> N3          | Nohut izolatu-Kazan*  |
| 22 | <i>Rhizobium cicer</i> N4          | Nohut izolatu-Kazan*  |
| 23 | <i>Rhizobium cicer</i> N5          | Nohut izolatu-Kazan*  |
| 24 | <i>Rhizobium cicer</i> N6          | Nohut izolatu-Kazan*  |
| 25 | <i>Rhizobium cicer</i> N63         | Nohut izolatu-TGAE    |
| 26 | <i>Rhizobium cicer</i> N522        | Nohut izolatu-TGAE    |
| 27 | <i>Rhizobium cicer</i> 16C         | Nohut izolatu-TGAE    |
| 28 | <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa26     | Fasulye izolatu-TGAE  |
| 29 | <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa27     | Fasulye izolatu-TGAE  |
| 30 | <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa28     | Fasulye izolatu-TGAE  |
| 31 | <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa41     | Fasulye izolatu-TGAE  |

T.G.A.E: Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü-Ankara, Ziraat Yüksek Mühendisi Dr. Kemal Karuç'tan temin edilmiştir.

A.Ü.Z.F: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği, Prof. Dr. Kamuran Ayhan'dan temin edilmiştir.

\*Ankara ilçelerinden 1998 yılında tarafımda izole edilmiştir.

### 3.1.2. Araştırmada kullanılan besiyerleri

*Rhizobium* bakterilerinin izolasyon, karbon kaynaklarında üreme durumlarının belirlenmesi, inhibisyon etkilerinin ve Poli- $\beta$ -hidroksibütirat (PHB) üretim miktarlarının incelenmesinde Yeast Extract Mannitol (YEM) Sıvı besiyeri kullanılmıştır (Vincent, 1970).

### Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) Sıvı Besiyeri

| <u>Maddeler</u>                      | <u>g/l</u> |
|--------------------------------------|------------|
| Mannitol                             | 10,0       |
| Pepton                               | 2,5        |
| Trypton                              | 2,5        |
| Yeast Ekstrakt                       | 2,5        |
| NaCl                                 | 0,1        |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 0,2        |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>      | 0,5        |

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri  $7,0 \pm 0,2$ 'ye 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanmasında ortama %2 oranında agar ilave edilmiştir.

Araştırmada *Rhizobium* suşlarının genel inhibisyon etkileri bazı test bakterileri üzerinde uygulanmıştır. Test bakterilerin aktifleştirilmesinde Nutrient Sıvı besiyeri kullanılmıştır (Cruikshank, 1972).

### Nutrient Sıvı Besiyeri

| <u>Maddeler</u>  | <u>g/l</u> |
|------------------|------------|
| Lab-Lemco Powder | 1,0        |
| Yeast Ekstrakt   | 2,0        |
| Pepton           | 5,0        |
| NaCl             | 5,0        |

Maddeler 1 litre distile suya ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri  $6,8 \pm 0,2$ 'ye 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri 121°C'de 15 dakika otoklavda

sterilize edilmiştir. Katı besiyerinin hazırlanmasında, ortama %2 oranında agar ilave edilmiştir.

### 3.1.3. Araştırmada kullanılan test bakterileri

Araştırmalarda test bakterileri olarak *Bacillus sphaericus* ATCC 14577, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* NRLL-B 4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Escherichia coli* NRRL, B-704 kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besi ortamında 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bakterilerin temin edildikleri kaynak ve inkübasyon dereceleri Çizelge 3.2’de verilmiştir. Bu bakteriler Nutrient Agar besi ortamında muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.2. İndikatör bakteri suşların temin edildiği kaynaklar, inkübasyon dereceleri

| Bakteri Suşları                 | Temin Edildiği Kaynak | Inkübasyon Derecesi |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
| <i>E. coli</i> NRLL B-704       | R.S.S.K.K.            | 37°C                |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923     | H.Ü. Tıp Fak.         | 37°C                |
| <i>B. sphaericus</i> ATCC 14577 | A.Ü.F.F.              | 30°C                |
| <i>B. subtilis</i> ATCC 6633    | A.Ü.F.F.              | 37°C                |
| <i>M. luteus</i> NRLL-B 4375    | R.S.S.K.K.            | 30°C                |

R.S.S.K.K. : Refik Saydam Merkez Hıfızısıha Enstitüsü

H.Ü. : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

A.Ü.F.F. : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Prof. Dr. Cumhuriyet Çökmüş’ten temin edilmiştir.

### 3.2. Metod

#### 3.2.1. Bakterilerin izolasyonu

Ankara- Kazan, Şereflikoçhisar ve İbrahimbeyli tarlalarından toplanan nohut ve mercimek köklerindeki nodüller, içerisinde silika jel bulunan deney tüplerinde ağzı sıkıca kapatılarak muhafazaya alınmış bir şekilde laboratuvara getirilmiştir. Nodüller, deterjanlı suda yıkanarak çamurlarından arındırılmış ve 2 kez steril distile sudan geçirilmiştir. %99'luk alkol'de 20 sn tutulan nodüller 3 dakika konsantre çamaşır suyunda bekletilerek 3 kez steril distile sudan geçirilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılan nodüller, steril bir şekilde YEM Agar bulunan petrilerin bir kenarında patlatılarak nodül içindeki sıvının dışarı çıkması sağlanmıştır. Öze ile tek koloni ekimi yapılarak, 30°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır (Date and Halliday, 1987). İnkübasyon sonunda YEM Agar yüzeyinde gelişen koloniler morfolojik ve mikroskopik yönden incelenmiş, YEM sıvı besiyerine inoküle edilerek hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,4-0,5 (OD) olacak şekilde aktive edilmiştir.

#### 3.2.2. İzole edilen suşların muhafazası

YEM Agar içeren yatık tüplere paralelli olarak inoküle edilen izolatlar ve farklı kaynaklardan temin edilen bakteriler 30°C'de 5 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda +4°C'de buzdolabında muhafazaya alınmış ve stoklar iki ayda bir yenilenmiştir (Date and Halliday, 1987).

#### 3.2.3. Bakterilerin farklı karbon kaynaklarında üreme durumlarının belirlenmesi

Çalışmada kullanılan tüm bakteriler ile nodüllerden izole edilen *Rhizobium cicer* ve *R. leguminosarum* türüne ait izolatların farklı karbon kaynaklarında üreme durumlarının belirlenmesi için çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Öncelikli olarak izolatların koloni morfolojilerine bakılarak

mikroskopik incelemesi gerçekleştirilmiştir. Bakterilerin gram (+), gram (-) özellikleri, katalaz reaksiyonları, nitrat redüksiyonları, 30°C ve 40°C sıcaklık derecelerinde ve farklı pH'lardaki (3,5; 4,0; 4,5; 5,0, 8,0, 9,0 ve 9,5) gelişmeleri de incelenmiştir.

Bakterilerin mannitol, trehaloz, ksiloz, rafinoz, maltoz, galaktoz, sukroz, glukoz, laktoz, dekstroz şekerleri ile pirüvatı kullanımları test edilmiştir. Karbon kaynaklarını kullanma yeteneklerinin belirlenmesi için YEM Broth sıvı besiyerinden karbon kaynağı olan mannitol çıkartılmış ve 0,004 g bromocresol purple indikatörü ilave edilerek stok besiyeri hazırlanmıştır. Hangi karbon kaynağının testi yapılacaksa o şekerden %1 oranında stok çözeltisi hazırlanmış, 0,2 µm'lik filtre kağıdı kullanılarak sterilize edilmiştir. Besiyerine stok karbon kaynağı çözeltilerinden %1 oranında ilave edilmiştir. Besi ortamı %4 oranında aktif kültürler ile inoküle edilerek 30±1°C'de çalkalamalı etüvde 3-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon bitiminde karbon kaynağını kullanan suşlar, besiyerinin rengini sarıya dönüştürmesiyle anlaşılmıştır (Jordan, 1984; Buchanon and Gibbons, 1974).

#### 3.2.4. Nitrat redüksiyonu

Nitrat redüksiyonu testinde YEM sıvı besiyerine 1 g/l Potasyum nitrat ilave edilmiştir. Besi ortamı 15 dakika 121°C'de sterilize edilerek, aktif kültürlerden ortama %4 oranında ekim yapılmıştır.

#### A-AYIRACI

- Alfa Naftilamin      0,5 g
- %30 Asetik asit      100 ml

### **B-AYIRACI**

- Sülfanilik Asit            0,8 g
- %30 Asetik Asit        100 ml

İnkübasyon bitiminde kültürler üzerine 1 ml A ve 1 ml B ayıracı ilave edilmiştir. 30 sn içinde kırmızı renk oluşması, pozitif bir reaksiyon olarak değerlendirilmiştir. Ortamda renk oluşmasının gözlenmediği durumlarda tüplere çinko tozu ilave edilmiştir. Ortam kırmızı-pembe bir renge dönüştüğünde ortamda nitrat varlığı kanıtlanmıştır ve sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. Eğer kırmızı renk oluşumu gözlenmişse bu da nitratin nitrite daha ileriki aşamalarda redükte olduğunu göstermiştir (Arda, 1997; Bilgehan, 1995).

#### **3.2.5. Genel inhibisyon aktivitesinin tespiti**

*Rhizobium* suşları Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) ve Tripton Yeast Ekstrakt (TY) besiyerlerinde iki kez aktifleştirilerek,  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,4-0,5 OD olacak şekilde inkübe edilmiştir. Aktif kültürler 5000 devir/dakikada 30 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant 0,2 µm'lik filtre kağıdı kullanılarak sterilize edilmiştir.

Araştırmada test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli* NRLL-B 704, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* NRLL-B 4375, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve *Bacillus sphaericus* ATCC 14577 suşları kullanılmıştır. Bu bakteriler Nutrient sıvı besiyerinde uygun sıcaklıkta 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

*Rhizobium* bakterilerinin, test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon etkiyi gözlemek amacıyla, aktif test bakteri kültürlerinden 0,1 ml steril plaklara aktarılmıştır. Petrilere, sterilize edilmiş ve  $50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmuş Nutrient Agar'dan 20 ml ilave edilip homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Petri kapları bir süre oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmış, besiyerinin üzerinde 1 cm çapında

steril şartlarda kuyular açılmıştır. Kuyuların tabanı ince bir steril agar tabakası ile kaplanarak, 2 saat süre ile plaklar buzdolabında bekletilmiştir. Süre sonunda plakların kuyularına, steril *Rhizobium* filtratlarından 100 µl ilave edilmiş, test bakterilerinin optimum sıcaklıklarına göre  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  ve  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyuların çevresinde inhibisyon zonların oluşumu kontrol edilmiştir (Reinheimer et al., 1990).

### 3.2.6. PHB granüllerinin Nile Blue A ile boyanması

PHB sentezleyen ve sentezlemeyen bakterilerin ayrımı için Nile Blue A boyası kullanılmıştır. Bunun için; 0,01 g/ml Nile Blue A stok çözeltisinden %1 olacak şekilde YEM Agar besiyerine ilave edilmiş ve besiyerinin pH değeri  $7,0\pm0,2$ 'ye 0,01 N NaOH ve 0,01 N HCl ile ayarlanarak  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk. sterilize edilmiştir. Agarın yüzeyine önceden aktifleştirilmiş olan *Rhizobium* bakterileri tek koloni ekimi yapılarak,  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloniler UV ışığı altında incelenmiştir. PHB oluşturan bakterilerin kolonileri Nile Blue A ile boyanarak turuncu renk oluşturduğu gözlenmiştir (Ostle and Holt, 1982; Pierce and Schroth, 1994).

### 3.2.7. PHB üretiminin tespiti

*Rhizobium* bakterilerin oluşturduğu PHB miktarı Bonartseva and Myshkina (1985)'nin metoduna göre belirlenmiştir.

1. Bakteriler YEM sıvı besiyerinde 100 devir/dakika çalkalamalı etüvde  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,4-0,5 (OD) olacak şekilde aktifleştirilmiştir.
2. Aktifleştirilen kültürler 100 ml'lik YEM sıvı besiyerine %4 oranında inoküle edilerek,  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyon sonunda hücre kültürü 6000 devir/dakikada 30 dk. santrifüj edilmiştir.

4. Süpernatant elimine edilip, pelet 40°C'de kurutulmuştur. Bu aşamada hücre kuru ağırlığı tespit edilmiştir.
5. Pelet 5 ml steril distile su ile homojenize edilmiş, 2 dk. 50 MHz'lik ultrasonikasyon (Vibra-Cell, Sonics&Materials Inc. Danbury, CT USA) cihazı ile hücre duvarları parçalanmıştır.
6. 1:1 oranında, kültür ve 2 N HCl karışımı 100°C'de 2 saat tutulmuştur. Süre sonunda karışım 6000 devir/dakikada 20 dk. santrifüj edilmiş ve pelet elde edilmiştir.
7. Pelet üzerine 5 ml saf kloroform ilave edilerek ağızları iyice kapatılmış, bir gece 28°C'de çalkalamalı etüvde bekletilmiştir (Bu aşamada PHB kloroform içinde çözünmüştür).
8. Örnekler 6000 devir/dakikada 20 dk. santrifüj edilerek PHB granülleri çöktürülmüştür.
9. Kloroform kısmından 0,1 ml alınıp, 40°C'de 15 dk. süreyle bekletilerek kloroform uçurulmuştur. Örneklerin üzerine 5 ml saf H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> konulmuş, 100°C'de su banyosunda 20 dk. bekletilmiştir. Bu aşamada PHB krotonik asite dönüştürülmüştür.
10. Örneklerin optik yoğunluk değeri (O.D) 235 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülerek tespit edilmiştir. Örneğin PHB miktarı, standart PHB değeri ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir.

#### **Standardın Hazırlanışı:**

5,0-100 µg/ml<sup>-1</sup> olacak şekilde değişen miktarlarda *Alcaligenes* sp.'den saflaştırılan Sigma marka Poli-β-Hidroksibütirat kullanılarak PHB standartları hazırlanmıştır. 1 µg/ml'ye tekabül eden O.D değeri açıklanan metoda göre saptanmıştır.

#### **İstatistiksel Analiz:**

Bakterilerin PHB üretimi ile hücre kuru ağırlığı arasındaki korelasyon Sperman'ın testine göre aşağıdaki denkleme göre belirlenmiştir (Conver, 1971).

$$\rho=1-\frac{6-\sum(x_i-y_i)^2}{n(n^2-1)}$$

Hesaplanan  $\rho$  değeri çizelge değeri ile kıyaslanmıştır.  $\rho$  değerinin çizelge değerinden yüksek olduğu durumlarda PHB üretimi ile hücre kuru ağırlığı arasındaki ilişkinin önemli olduğu belirlenmiştir.

### 3.2.8. Sonikasyon süresinin tespiti

Çalışmada kullanılan *Rhizobium* bakterilerinden bir suş seçilerek 5 adet 5 ml'lik YEM sıvı besiyeri içeren tüplere inoküle edilerek 2 kez aktifleştirilmiştir. Kültürler  $30\pm1^\circ\text{C}$ 'de hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,4-0,5 olacak şekilde inkübe edilmiştir. Örnekler 30 sn, 45 sn, 1 dk., 2 dk., 3 dk. ve 4 dk. süre ile sonikasyona tabii tutulmuşlardır. Süre sonunda örneklerin  $10^{-1}$ 'den  $10^{-7}$ 'ye kadar dilusyonları yapılmıştır. Örneklerden 0,1 ml YEM Agar besi ortamına inoküle edilerek  $30\pm1^\circ\text{C}$ 'de 72 saat inkübe edilmiştir. Süre bitiminde üreyen kolonilerin sayısı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılarak hücre sayısındaki azalma dikkate alınmış ve en iyi sürenin 2 dk. olduğu bulunmuştur. Ayrıca her örneğin sonikasyon sonrası preperatları mikroskopta incelenerek, hücre yapısındaki değişiklikler de incelenmiştir.

### 3.2.9. Farklı karbon ve azot kaynaklarının PHB üretimine etkisi

YEM sıvı besiyeri içeriğinde bulunan mannitol çıkarılarak yerine ayrı ayrı olarak %1 oranında Glukoz, Sukroz, Laktoz, Pirüvat ve Sodyum Asetat konulmuştur. Azot kaynağı denemelerinde ise YEM besi ortamında bulunan pepton ve tripton çıkarılarak yerine ayrı ayrı  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Glisin, Proteaz Pepton, DL-Triptofan ve Asparajin (sırasıyla 0,66; 0,75; 1,0; 1,0 ve 0,66 g/l oranlarında) konulmuştur. Kullanılan karbon ve azot kaynakları 0,22'lik filtre kğıdı ile sterilize edilerek besiyerine ilave edilmiştir (Bonartseva et al.,1994). Hazırlanan karbon ve azot kaynaklarını içeren besi ortamları,  $37^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyonda bekletilerek steril durumları kontrol edilmiş ve daha sonra denemelerde kullanılmıştır.

### 3.2.10. Mutasyon denemeleri

Yüksek PHB verimine sahip *Rhizobium meliloti* Y11'in üzerinde fiziksel mutasyon olarak ultraviyole ışını, kimyasal mutagen olarak da akriflavin, 5-bromourasil ve nitrosoguanidin uygulanmıştır. Tüm mutasyon uygulamaları kültürlerin  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,4-0,5 olduğunda çalışılmıştır.

#### 3.2.10.1. UV ışını ile mutasyon çalışması

5 ml'lik steril YEM sıvı besiyeri içeren tüplere aktif *Rhizobium meliloti* Y11 suşu %4 oranında aşılınmış,  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonu hücre kültürü 5000 rpm'de 30 dk. santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Peletler steril serum fizyolojik su ile iki kez yıkanmış ve tekrar hücreler serum fizyolojik su içinde süspansiyon edilmiştir. UV ışını uygulanmayacak kontrol grubu tüpü ayrılmış, diğer örnekler homojen bir şekilde karıştırılarak steril petrilere aktarılmıştır. Örnek içeren her bir petriye 254 nm dalga boyunda (Model UVG-54, Mineralight Lamp, Shortwave UV-254 nm; 0,12 A, 220 V, 50 Hz) 13 cm yüksekliğinden 45 sn, 1 dk. ve 2 dk. sürelerde UV ışını uygulanmıştır. UV ışını uygulanacak örnek ve kontrol grubunun hücre yoğunluğunun 600 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerde 0,4-0,5 olmasına dikkat edilmiştir. Mutasyon uygulanan ve uygulanmayan hücre süspansiyonları  $10^{-1}$ - $10^{-7}$  arasında dilüsyonları yapıp, YEM Agar besiyerine 0,1 ml aşılansak drigalski spatülü ile kültürlerin besi ortamının yüzeyinde yayılması sağlanmıştır. Petriler  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin kolonileri sayılarak hem kontrolün hem de UV ışını uygulanmış örneklerin canlı bakteri sayıları tespit edilmiştir. Suşların ölüm oranları aşağıdaki formüle göre belirlenmiştir (Pellzor et al., 1956; Aslım, 1994).

$$\% \text{ ölüm oranı} = 100 - \frac{\text{Mutasyon sonundaki canlı mikroorganizma sayısı}}{\text{Kontroldeki canlı bakteri sayısı}} \times 100$$

% ölüm oranı %96.67 - %99.90 olan petrilere muhtemel mutant suşlar seçilerek, suşların PHB üretimleri tespit edilmiştir. Seçilen bu suşlar YEM Agar besi ortamında muhafazaya alınarak +4°C’de saklanmıştır.

### 3.2.10.2. Akriflavin uygulaması

100 ml distile suda 0,1 g akriflavin çözülerek stok akriflavin çözeltisi hazırlanmıştır. Çözeltinin sterilizasyonu mikrofiltrasyon yöntemi ile sağlanmış, ışık geçirilmeyen şişelerde + 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Stok çözeltiden YEM sıvı besiyerine 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml ve 50 µg/ml olacak şekilde tüplere ilave edilmiş, bir adet tüp de akriflavin içermeyen kontrol tüpü olarak kullanılmıştır. Tüpler %4 oranında aktif kültürler ile aşılansın, 30±1°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin steril fizyolojik suda  $10^{-1}$  -  $10^{-7}$  arasında dilüsyonları yapılmıştır. Her bir dilüsyondan YEM Agar besiyerine 0,1 ml aşılansın, örnekler drigalski spatülü ile homojen bir şekilde besi ortamının yüzeyinde yayılmıştır (Mc Kay et al., 1970). Plaklar 30±1°C’de 72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda % ölüm oranları 3.2.10.1’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

### 3.2.10.3. N-metil-3-nitrosoguanidin uygulaması

100 ml distile suda 0,1 g N-metil-3-nitrosoguanidin çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin sterilizasyonu mikrofiltrasyon yöntemi ile sağlanmış, ışık geçirilmeyen şişelerde +4°C’de muhafaza edilmiştir. N-metil-3-nitrosoguanidin mutasyon uygulaması 3.2.10.2’de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

#### 3.2.10.4. 5-Bromourasil uygulaması

100 ml distile suda 0,1 g 5-Bromourasil çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin sterilizasyonu mikrofiltrasyon yöntemi ile sağlanmış, ışık geçirmeyen şişelerde + 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Stok çözeltiden YEM sıvı besiyerine 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml ve 90 µg/ml olacak şekilde tüplere ilave edilmiş, bir adet tüp de 5-bromourasil içermeyen kontrol tüpü olarak kullanılmıştır. Tüpler %4 oranında aktif kültürler ile aşıl原因arak 30±1°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda örneklerin steril fizyolojik suda  $10^{-1}$  -  $10^{-7}$  arasında dilüsyonları yapılarak, her bir dilüsyondan YEM Agar besiyerine 0,1 ml aşılanıp, örnekler drigalski spatülü ile homojen bir şekilde besi ortamı yüzeyinde yayılmıştır (Mc Kay et al. 1970). Plaklar 30±1°C’de 72 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda % ölüm oranları 3.2.10.1’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır.

### 3.2.11. *Rhizobium* bakterilerin melas besi ortamında PHB üretimleri

Araştırmamızda kullanılan şeker pancarı melası, Ankara Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Şeker pancarı melasının bileşimi Çizelge 3.3'te verilmiştir (Burrows, 1970). Melasın PHB üretimi üzerine etkisinin incelenmesinde en yüksek PHB verimi gösteren *Rhizobium meliloti* Y11, *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab ve *Rhizobium viciae* F111 suşları kullanılmıştır. Suşlar %0,5; %1, %1,5 ve %2 melas konsantrasyonunda geliştirilmiş ve gelişim eğrileri çıkarılmıştır. Suşların en iyi gelişme gösterdikleri melas konsantrasyonlarında PHB üretimleri incelenmiştir.

Çizelge 3.3. Şeker pancarı melasının ortalama bileşimleri (Burrows, 1970)

| Bileşen                | Pancar Melası       |
|------------------------|---------------------|
| Kuru Madde             | %78-85              |
| Toplam Şeker           | %48-58              |
| Sakkaroz               | %51                 |
| Glukoz                 | -                   |
| Fruktoz                | -                   |
| Rafinoz                | %>1                 |
| Toplam azot            | %0,-2,8             |
| $\alpha$ -Amino azot   | %0,36               |
| Fosfor, $P_2O_5$       | %0,02-0,07          |
| Kalsiyum, CaO          | %0,15-0,7           |
| Magnezyum, MgO         | %0,01-0,1           |
| Potasyum, $K_2O$       | %2,2-5,0            |
| Çinko, Zn              | 30-50 $\mu g/g$     |
| Toplam Karbon, C       | %28-34              |
| Toplam inorganik madde | %4-11               |
| Kükürt, $SO_3$         | %0,3-0,4            |
| Biyotin                | 0,01-0,13 $\mu g/g$ |
| Kalsiyum pantotenat    | 40-100 $\mu g/g$    |

Çizelge 3.3'ün devamı. Şeker pancarı melasının ortalama bileşimleri (Burrows, 1970)

| Bileşen     | Pancar Melası  |
|-------------|----------------|
| İnositol    | 5000-8000 µg/g |
| Tiamin      | 1-4 µg/g       |
| Pridoksin   | 2,3-5,6 µg/g   |
| Riboflavin  | 0-0,75 µg/g    |
| Nikotinamid | 37-51 µg/g     |
| Folik asit  | 0,21 µg/g      |

### 3.2.12. Plazmid DNA izolasyonu

*Rhizobium* suşlarının plazmid DNA profilleri Shivaji (2001)'e göre çıkarılmıştır. TY besi ortamında aktifleştirilen *Rhizobium* suşları 50 ml'lik TY sıvı besiyerine %4 oranında aşılınmış,  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de 100 devir/dakikada 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 1,5 ml hücre kültürü, 13 000 devir/dakikada 15 dk. santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Peletlerin üzerine 4 mg/ml lizozim içeren soğuk Çözelti I'den 100 µl ilave edilip, 1-2 sn vortekste çalkalanmıştır. Karbohidratların lizozim enzim aktivitesini engellemesini önlemek amacıyla, üzerine 500 µl STE çözeltisinden ilave edilip, 13 000 devir/dakikada 10 dk. santrifüj edilmiştir. Pelet üzerine tekrar soğuk Çözelti I ve Lizozim'den 100 µl ve taze hazırlanmış Çözelti II'den 200 µl ilave edilmiştir. Ependorf tüpleri elle karıştırılarak buzda 15 dk. bekletilmiştir. Örnekler 150 µl Çözelti III ilave edilerek, tüp 10 sn hafifçe aşağı yukarı çevrilerek karıştırılmış,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13 000 devir/dakikada 5 dk. santrifüj edildikten sonra, süpernatant yeni bir steril ependorf tüpüne aktarılmıştır. Üzerine eşit hacimde Fenol:Kloroform ilave edilmiş, 1-2 sn çalkalanarak  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13 000 devir/dakikada 5 dk. santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım yeni ependorf tüpüne aktararak, üzerine 1000 µl %96'lık etanol ilave edilmiştir. Tüpler oda sıcaklığında 2 dk. bekletildikten sonra,  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13 000 devir/dakikada 5 dk. santrifüj edilerek alkol

uzaklaştırılmıştır. Üzerine  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş %70'lik etanolden 1000  $\mu\text{l}$  ilave edilmiş ve  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13 000 devir/dakikada 5 dk. santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırılarak peletler  $37^{\circ}\text{C}$ 'de kurutulmuştur. Peletlerin üzerine 30  $\mu\text{l}$  TE+RNaz (0,1 mg/ml) ilave edilerek,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafazaya alınmıştır. Örnekler Loading Buffer içine alınmıştır. Seyreltilmiş 10XTEA tamponu ile hazırlanan %0,7'lik agaroz, 1  $\mu\text{l}$  etidyum bromid ile boyandıktan sonra elektroforez tankına dökülmüş ve donduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. Tank, seyreltilmiş 10XTEA tamponu ile doldurularak kuyulara 10  $\mu\text{l}$  örnekler yüklenmiştir. Örnekler 40 V'ta 3-3,5 saat süre ile koşturulmuştur.

Suşların plazmid DNA'ların moleküler ağırlıkları Sambrook et al. (1989)'in bildirdiği yöntemle göre hesaplanmıştır.

#### **Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Besi Ortamı ve Çözeltiler:**

*Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsi bakterilerin plazmid DNA izolasyonunda Tripton Yeast Ekstrakt (TY) sıvı besiyeri ortamı kullanılmıştır (Beringer, 1974; Plazinski et al., 1985).

#### **TRİPTON YEAST EKSTRAKT (TY) SIVI BESİYERİ**

| <b><u>Maddeler</u></b>                    | <b><u>g/l</u></b> |
|-------------------------------------------|-------------------|
| Tripton                                   | 5,0               |
| Yeast Ekstrakt                            | 3,0               |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 1,3               |

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiyerinin pH değeri  $7,0 \pm 0,2$ 'ye 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiyeri  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 15 dk. otoklavda sterilize edilmiştir.

**CÖZELTİ I**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Glukoz            | 50 mM |
| Tris-HCl (pH=8,0) | 25 mM |
| EDTA (pH=8,0)     | 10 mM |

**LİZOZİM CÖZELTİSİ:**

1 ml Çözelti I içerisine 4 mg lizozim ilave edilerek hazırlanmıştır.

**CÖZELTİ II:**

|      |                                                      |
|------|------------------------------------------------------|
| NaOH | 0,2 N (10 N NaOH'den seyreltilerek taze hazırlanır.) |
| SDS  | %1                                                   |

**CÖZELTİ III:**

|                     |         |
|---------------------|---------|
| Potasyum Asetat 5 M | 600 ml  |
| Glasial asetik asit | 11,5 ml |
| Distile su          | 28,5 ml |

**STE CÖZELTİSİ:**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| Sodyum klorür     | 0,1 M |
| Tris-HCl (pH=8,0) | 10 mM |
| EDTA (pH=8,0)     | 1 mM  |

**10XTAE TAMPONU:**

|               |                                          |
|---------------|------------------------------------------|
| Tris          | 4,84                                     |
| Sodyum asetat | 2,72                                     |
| EDTA          | 0,74                                     |
| Distile su    | 1000 ml                                  |
| pH            | 8,1 (Glasial asetik asit ile ayarlanır.) |

**TE TAMPONU (RNaz Çözeltisini Hazırlamak İçin):**

|      |        |
|------|--------|
| Tris | 0,12 g |
| EDTA | 0,03 g |

|            |        |
|------------|--------|
| Distile su | 100 ml |
| pH         | 8,0    |

### **RNaz CÖZELTİSİ:**

Hazırlanan TE tamponundan 1 ml alınarak 0,1 mg RNaz ilave edilmiştir. Çözelti -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

### **ETİDYUM BROMİD:**

1 ml distile suya 10 mg etidyum bromid ilave edilerek hazırlanmıştır.

### **LOADİNG BUFFER (BOYAMA TAMPONU):**

|                 |        |
|-----------------|--------|
| Bromofenol Blue | 0,25 g |
| Sukroz          | 40 g   |
| Distile su      | 100 ml |

### **3.2.13. Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)**

#### **3.2.13.1. Toplam hücre protein ekstraksiyonu**

Protein ekstraksiyonu Tan et al. (1997)’ın metoduna göre yapılmıştır. Bakteriler, TY besi ortamında  $30\pm1^{\circ}\text{C}$ ’de 72 saat 100 devir/dakikada inkübe edilmiştir. Hücre kültürü 6000xg’de 30 dk. santrifüj edilerek pelet elde edilmiştir. Peletler steril 10 mM Tris-HCl (pH=7,6) ile bir kez yıkanmıştır. 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH=7,6) tamponunda homojenize edilen hücreler, 50 MHz ultrasonikasyon ile buz içerisinde 30 sn sonike edilmiştir. Örnekler 6000xg’de 3 dk. santrifüj edilerek hücre artıkları ile eksopolisakkarit (EPS) kısmı çöktürülmüş ve elektroforez işlemine kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ ’de muhafaza edilmiştir. Elektroforezden önce örnek tamponu ile muamele edilerek 5 dk. kaynatılmıştır.

### 3.2.13.2. Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı

Elektroforez işlemi Laemmli (1970)'ye göre yapılmıştır.

#### **SDS-PAGE İÇİN KULLANILAN STOK ÇÖZELTİLER**

##### **AKRİLAMİD + N, N' – METİLEN BİS AKRİLAMİD STOĞU (%30'luk)**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| Akrilamid (Sigma)     | 28,8 g |
| Bis akrilamid (Sigma) | 1,2 g  |

Maddeler 75 ml distile su içerisinde çözülerek, 100 ml'ye tamamlanır. Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülerek, renkli cam şişelerde +4°C'de en fazla 1 ay muhafaza edilir.

##### **AYIRMA JEL TAMPONU (1,5 M Tris-HCl, pH: 8,6)**

|                     |          |
|---------------------|----------|
| Trizma base (Sigma) | 18,165 g |
| SDS (Sigma)         | 0,4 g    |

Maddeler, 75 ml distile suda çözüldükten sonra 6 N HCl ile pH=8,6'ya ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandıktan sonra 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve +4°C'de saklanır.

##### **YIĞMA JEL TAMPONU (0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8)**

|             |        |
|-------------|--------|
| Trizma base | 6,05 g |
| SDS         | 0,4 g  |

Maddeler 75 ml distile suda çözüldükten sonra 6 N HCl ile pH=6,8'e ayarlanır. Son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandıktan sonra 121°C'de 15 dk. sterilize edilir ve +4°C'de saklanır.

**KOŞTURMA TAMPONU**

|             |      |
|-------------|------|
| Trizma base | 1,21 |
| Glisin      | 5,76 |
| SDS         | 1,0  |

Maddeler 1000 ml distile suda çözülür.

**ÖRNEK TAMPONU (2X)**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| 1 M Tris-HCl, pH=7,6 | 2 ml   |
| Gliserol             | 3 ml   |
| SDS                  | 0,5 g  |
| 2-β ME               | 2,0 ml |
| Bromofenol blue      | 4 mg   |

Karışımın hacmi 10 ml'ye tamamlanır. 6 N HCl ile pH=6,8'e ayarlanır. Çözelti renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

**BOYAMA ÇÖZELTİSİ**

|                               |          |
|-------------------------------|----------|
| Coomassie Brilliant Blue R250 | 1,5 g    |
| Glasiyal Asetik Asit          | 70,0 ml  |
| Metanol                       | 50,0 ml  |
| Distile su                    | 880,0 ml |

Boya çözüldükten sonra Whatman No:1 filtre kağıdından süzülür ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanır.

**BOYA GİDERİCİ ÇÖZELTİ**

70 ml Glasiyal asetik asit, 50 ml Metanol ve 880 ml Distile su karıştırılarak hazırlanan çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanır.

### **MOLEKÜLER AĞIRLIK STANDARDI**

Proteinlerin moleküler ağırlıklarını hesaplamak için protein standardı olarak Sigma MW SDS 200 kiti kullanıldı. Markerda bulunan proteinler ve moleküler ağırlıkları sırasıyla,

|           |                       |
|-----------|-----------------------|
| 29 000 D  | Karbonik anhidraz     |
| 45 000 D  | Yumurta albumini      |
| 66 000 D  | Sığır serum albumini  |
| 97 400 D  | Fosforilaz b          |
| 116 000 D | $\beta$ -Galaktosidaz |
| 205 000 D | Miyozin               |

### **AYIRMA JELİN HAZIRLANIŞI**

|                                   |               |
|-----------------------------------|---------------|
| Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk) | 5,78 ml       |
| Distile su                        | 7,13 ml       |
| 1,5 M Tris-HCl pH=8,6             | 4,33 ml       |
| % 10'luk APS                      | 86,70 $\mu$ l |
| TEMED                             | 8,16 $\mu$ l  |

Maddeler 1 mm aralığa sahip iki cam arasına dökülür, üst kısım doymuş butanol veya saf su ile kaplanarak hava ile teması önlenir ve polimerize olması için beklenir.

### **YIĞMA JELİN HAZIRLANIŞI**

|                                   |               |
|-----------------------------------|---------------|
| Akrilamid/Bis Akrilamid (%30'luk) | 0,82 ml       |
| Distile su                        | 2,93 ml       |
| 0,5 M Tris-HCl pH=6,8             | 1,25 ml       |
| % 10'luk APS                      | 30,00 $\mu$ l |
| TEMED                             | 5,00 $\mu$ l  |

Bu karışım, polimerize olan ayırma jel üzerinde distile su uzaklaştırıldıktan ve tarak yerleştirildikten sonra dökülür. Jel polimerize olduktan sonra tarak çıkarılır,

kuyular koşturma tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenir ve hazne koşturma tamponu ile doldurulur.

### **3.2.13.3. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun yarı kantitatif tayini**

Örneklerdeki protein miktarını belirlemek için spot test kullanılmıştır (Esen, 1978). Şerit halinde kesilen Whatman No: 1 kağıdına hazırlanan protein ekstraktlarından 2,5 µl emdirilir. Kurutulduktan sonra 10 dk. boyama solusyonunda bekletilir. Daha sonra su ile yıkanır. Boyanma derecesine göre örneklerin eşit miktarda yüklenmesi sağlanır.

### **3.2.14.1. Protein elektoroforezin yapılışı ve jellerin boyanması**

Proteinler 30 mA'de yaklaşık 150 V'ta ortalama 7 saat koşturulur. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, Coomassie Brilliant Blue R-250 içinde 24 saat bekletilerek boyanır. Daha sonra boya giderici solusyonda bırakılarak jellerin zemininde bulunan boyanın uzaklaştırılması sağlanır. Son olarak %7'lik Asetik asit içerisinde saklanan jeller, ışıklı beyaz tabla üzerinde karanlık odada fotoğrafları çekilir.

### **3.2.14.2. Proteinlerin moleküler ağırlıklarının hesaplanması**

Ayrırma jelde proteinin koştuğı mesafenin izleme boyasının bulunduğu mesafeye oranı bize Rf değerini verir. Molekül ağırlıklarını bildiğimiz standart proteinlerin her birinin Rf değeri bulunur. Yarı logaritmik kağıtta Rf değeri apsise, proteinlerin moleköl ağırlıkları da ordinata konarak bir doğru çizilir. Daha sonra moleköl ağırlığı hesaplanacak proteinin moleköl ağırlığı da hesaplanır.

#### 4. DENEYSEL BULGULAR

##### 4. 1. *Rhizobium* Suşlarının İzolasyon ve İdentifikasyonları

Çalışmada 6 adet *R. meliloti*, 9 adet *R. cicer*, 4 adet *B. japonicum*, 4 adet *R. phaseoli*, 5 adet *R. leguminosarum*, 2 adet *R. viciae* ve 1 adet de *Rhizobium* spp. olmak üzere toplam 31 adet suş kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Suşların 28'i Ziraat Yüksek Mühendisi Dr. Kemal Karuç (Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü)'tan, referans suş olan *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 ise Prof. Dr. Kamuran Ayhan'dan temin edilmiştir. Ankara-Kazan'a bağlı köylerden 6 adet *R. cicer* (Nohut) ve İbrahimbeyli ve Şereflikoçhisar'dan 2 adet *R. leguminosarum* (Mercimek) olmak üzere toplam 8 adet *Rhizobium* bakterisi izole edilmiştir. Nohut ve mercimek nodüllerinden bakterilerin izolasyonu 3.2.1'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Yavaş gelişen *Bradyrhizobium* cinsine ait *B. japonicum* S Irat Fab ve *Rhizobium* spp. Ba378 ile hızlı gelişen *Rhizobium* cinsine ait olan *R. meliloti* Y11'in YEMA besiyerindeki üreme durumları ve koloni morfolojileri sırasıyla Şekil 4.1a, 1b ve 1c'de verilmiştir.

Bakterilerin karbon kaynaklarındaki üreme durumları 3.2.3'te anlatıldığı gibi yapılmış olup, test sonuçları da Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Test sonuçlarına bakıldığında, tüm suşların glukoz, dekstroz ve mannitolü kullandıkları gözlenirken, trehaloz, ksiloz, rafinoz, maltoz, galaktoz, sukroz, laktoz ve pirüvatı kullanma yeteneklerinde farklılık gösterdikleri tespit edilmiştir. İzolatlardan *R. cicer* N1, N2, N4, *R. leguminosarum* M23 ve M24 suşlarının maltozu, *R. cicer* N3 ve N4'ün sukrozu, N6 suşunun laktozu, M24, N3, N4 ve N5 suşlarının da pirüvatı kullanmadıkları tespit edilmiştir. Toprak Gübre Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen diğer suşların da denemelerde kullanılan karbon kaynaklarını kullanma yönünden farklılık gösterdikleri görülmüştür. *Rhizobium* sp. Ba378 suşu pH=9,0'da ve laktoz ortamında ürememiştir. *R. phaseoli* Fa26 ve Fa28 maltozda gelişmezken, Fa27 ve Fa41'in bu ortamda ürediği gözlenmiştir. Ayrıca Fa28 ve Fa41'in

pH=4,5'da gelişme gösterdikleri tespit edilmiştir. *R. leguminosarum* M28 suşu tüm şekerleri kullanırken, M6 suşu laktoz ortamında, M43 suşu da pirüvatta ürememiştir. *B. japonicum* S Irat Fab suşu trehaloz ve sukroz ortamında, S543 pH=9,0 ve pH=9,5'ta, galaktoz ve sukroz ortamlarında gelişme göstermemiştir. *R. cicer* 16C, N63 ve N522 suşları laktozu kullanmazken, *R. meliloti* suşlarının (Y1 hariç) tümünün pH=9,5 olan besiyerinde üredikleri saptanmıştır. Suşların pH=3,5; pH=4,0 ve 40°C'de gelişme göstermedikleri de tespit edilmiştir. Suşların en iyi gelişme gösterdikleri optimum sıcaklık 30°C ve pH ise 8,0 olarak belirlenirken, *R. viciae* F111, F69, *R. phaseoli* Fa28, Fa41, *R. cicer* N1, N2, N4 ve N6 nolu suşların pH=4,5 gibi asidik bir ortamda üremeleri dikkati çekmiştir.

*R. leguminosarum* M43, *R. meliloti* Y520, *R. cicer* N522, N3 ve N5 suşlarının katalaz pozitif oldukları tespit edilmiştir.

Denemeler sırasında *R. meliloti* Y11 suşu mikroskopik olarak da incelenmiştir (Şekil 4.1d).

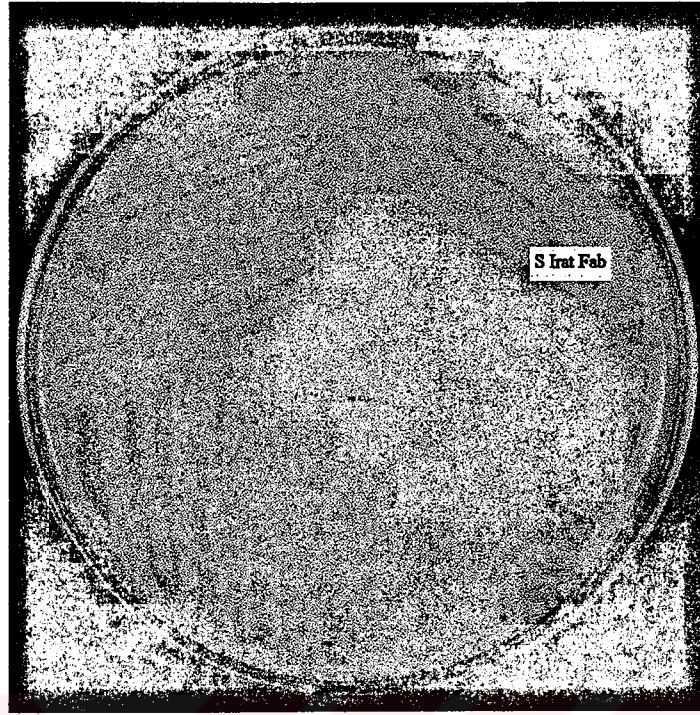
#### 4. 2. *Rhizobium* Suşlarının Bazı Test Bakterileri Üzerine İnhibisyon Etkisi

*Rhizobium* suşlarının ve *R. meliloti* Y11'e ait muhtemel mutant suşların test mikroorganizmaları üzerine genel inhibisyon etkisinin varlığı araştırılmıştır. Suşların hiçbirinin test bakterileri üzerine antimikrobiyal aktivite göstermedikleri tespit edilmiştir.

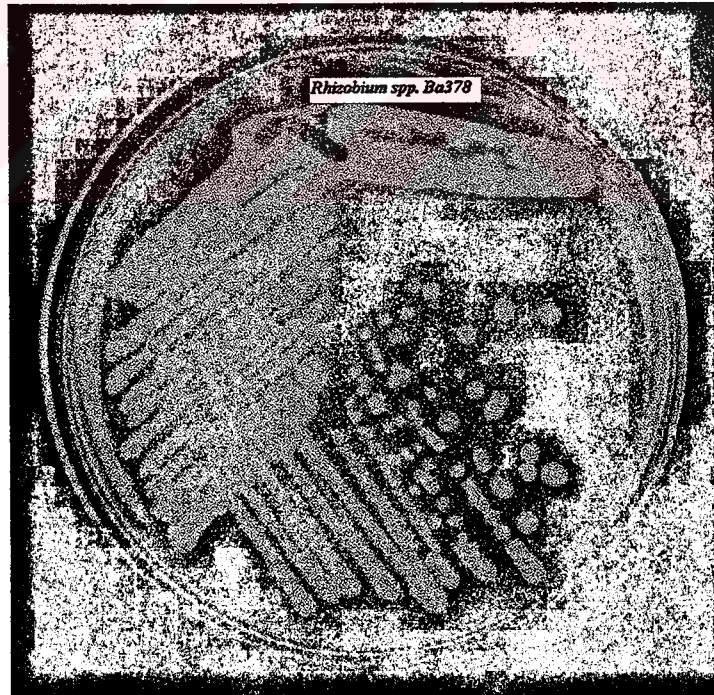
Çizelge 4.1. *Rhizobium* suşlarının karbon kaynaklarında üreme durumları

[illegible]

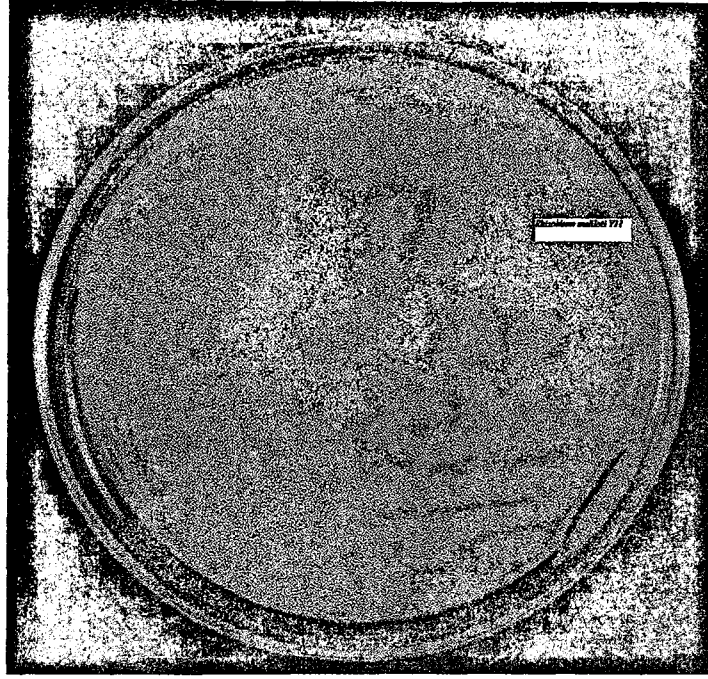




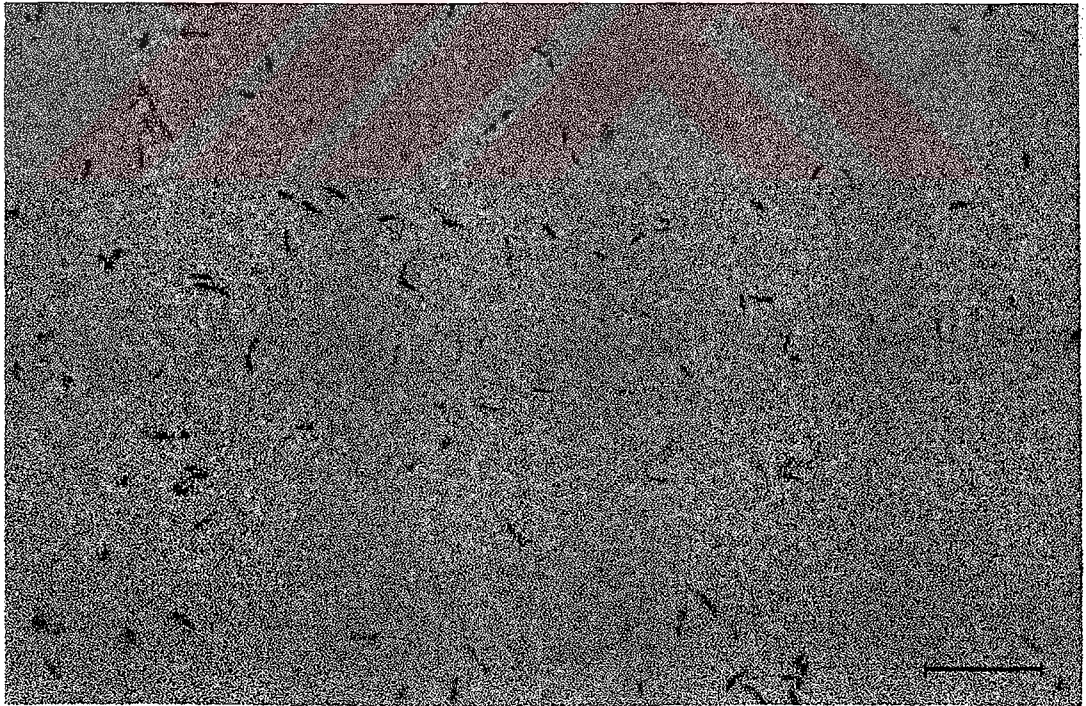
Şekil 4.1a. *B. japonicum* S Irat Fab'ın koloni morfolojisi



Şekil 4.1b. *Rhizobium* spp. Ba378'in koloni morfolojisi



Şekil 4.1c. *Rhizobium meliloti* Y11'in koloni morfolojisi



Şekil 4.1d. *Rhizobium meliloti* Y11'in mikroskopik görünümü (bar: 10 µm)

#### 4. 3. PHB Granüllerinin Nile Blue A ile Boyanması

PHB sentezleyen *Rhizobium* bakteri kolonilerinin Nile Blue A ile boyanma tekniği 3.2.8'de belirtildiği gibi yapılmıştır. %1 Nile Blue A içeren YEMA yüzeyine tek koloni ekim tekniği ile ekilen bakteriler, 30°C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Gelişen bakteri kolonileri inkübasyon sonunda 254 nm UV ışığı altında incelendiklerinde, içerdikleri polimer miktarına göre, rengin pembeden parlak turuncuya doğru değişiklik gösterdiği gözlenmiştir. Hücrede sentezlenen PHB miktarları en az olan, *R. cicer* N63 (0,007 g/l) ve *R. viciae* F69 (0,008 g/l) nolu suşların çok zayıf boyandıkları tespit edilirken, PHB miktarları ve yüzde verimleri suşlar içinde en yüksek olarak belirlenen *R. viciae* F111, *R. meliloti* Y11, Y22, *B. japonicum* S Irat Fab, *R. leguminosarum* M43, *R. cicer* N2, N4, N6 ve 16C'nin diğer suşlara oranla daha parlak turuncu renkte boyandıkları gözlenmiştir. Bu bakterilerin PHB içerikleri 0,101-0,365 g/l ve yüzde verimleri ise %5,76-57,09 arasında olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.2). Diğer suşların ise polimer içeriklerine göre farklı derecelerde boyandıkları gözlenmiştir.

#### 4. 4. *Rhizobium* Bakterilerinde PHB Üretimi

*Rhizobium* suşlarının PHB üretimleri ve yüzde verimleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. PHB üretiminin tespiti 3.2.9'da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Denemelerde kullanılan suşların hücre kuru ağırlıklarına göre PHB miktarları 0,007-0,365 g/l, yüzde verimleri de %5,37-57,09 arasında bulunmuştur. İzole edilen *R. cicer* N1, N2, N3, N4, N5, N6 ve *R. leguminosarum* M23 ile M24 suşlarının PHB yüzdelerinin genel olarak diğer suşlara oranla düşük olduğu bulunmuştur. Bu suşların hücre kuru ağırlıklarına göre PHB miktarları 0,064-0,104 g/l, yüzde verimleri ise %5,71-15,32 arasında bulunmuştur.

En yüksek PHB üretim miktarı ve yüzde verimi *R. viciae* F111 (0,157 g/l; %57,09), *R. meliloti* Y11 (0,365 g/l; %39,25) ve *B. japonicum* S Irat Fab (0,105 g/l; %34,43) suşlarında belirlenmiştir. PHB ürettiği bilinen ve kontrol suş olarak kullanılan *B.*

*japonicum* USDA 110 suşunda PHB miktarı 0,070 g/l ve yüzde verimi %27,67 olduğu tespit edilmiştir.

*Rhizobium* bakterilerinin PHB üretim miktarları ortalama 0,079 g/l ve yüzde verimleri %13,37 olarak hesaplanmıştır.

Suşların hücre kuru ağırlıkları, PHB miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 4.2’de, hücre kuru ağırlığı ile PHB arasındaki ilişkiyi gösteren histogram Şekil 4.2’de verilmiştir.



Çizelge 4.2. *Rhizobium* bakterilerin YEM besisi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB üretimi ve yüzde verimi

| Bakteri Kodu                              | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB <sup>a</sup> (g/l) | Verim <sup>b</sup> (%PHB) |
|-------------------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| <i>Rhizobium meliloti</i> Y1              | 0,950 ± 0,250             | 0,071 ± 0,005          | 7,47                      |
| <i>Rhizobium meliloti</i> Y2              | 0,320 ± 0,060             | 0,068 ± 0,022          | 21,25                     |
| <i>Rhizobium meliloti</i> Y4              | 0,870 ± 0,200             | 0,068 ± 0,003          | 7,82                      |
| <i>Rhizobium meliloti</i> Y11             | 0,930 ± 0,030             | 0,365 ± 0,020          | 39,25                     |
| <i>Rhizobium meliloti</i> Y22             | 0,765 ± 0,075             | 0,137 ± 0,014          | 17,91                     |
| <i>Rhizobium meliloti</i> Y520            | 0,770 ± 0,150             | 0,069 ± 0,007          | 8,96                      |
| <i>Rhizobium</i> sp. Ba378                | 0,185 ± 0,005             | 0,027 ± 0,002          | 14,59                     |
| <i>Rhizobium viciae</i> F69               | 0,130 ± 0,070             | 0,008 ± 0,000          | 6,15                      |
| <i>Rhizobium viciae</i> F111              | 0,275 ± 0,005             | 0,157 ± 0,012          | 57,09                     |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> S543      | 0,225 ± 0,035             | 0,051 ± 0,001          | 22,67                     |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SFr       | 0,540 ± 0,045             | 0,029 ± 0,002          | 5,37                      |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> SIrat Fab | 0,305 ± 0,005             | 0,105 ± 0,019          | 34,43                     |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110  | 0,253 ± 0,008             | 0,070 ± 0,023          | 27,67                     |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> M6         | 0,155 ± 0,005             | 0,024 ± 0,001          | 15,48                     |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> M23        | 0,450 ± 0,110             | 0,064 ± 0,001          | 14,22                     |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> M24        | 0,470 ± 0,140             | 0,072 ± 0,033          | 15,32                     |

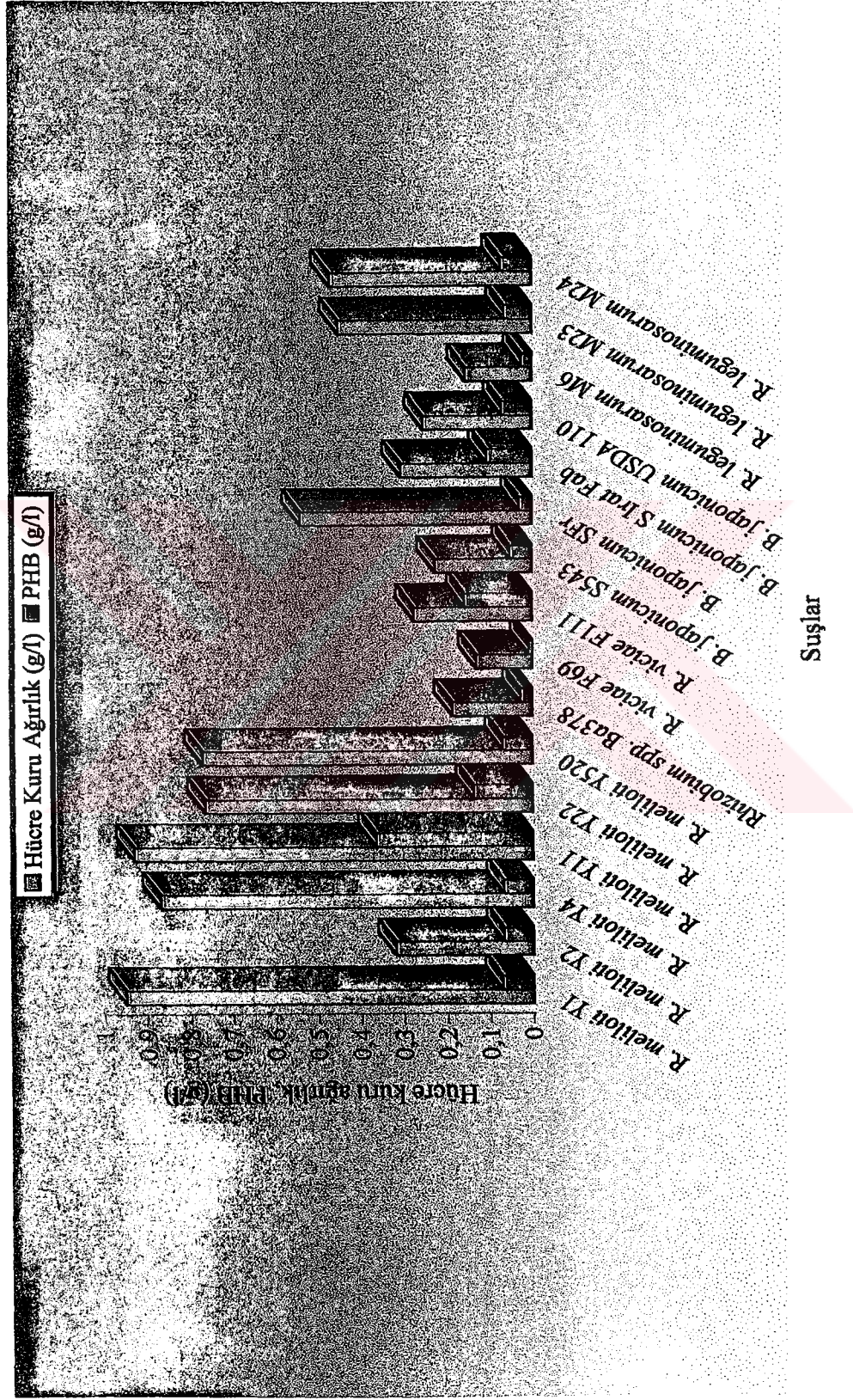
Çizelge 4.2'nin devamı. *Rhizobium* bakterilerin YEM besisi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB üretimi ve yüzde verimi

| Bakteri Kodu                       | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB <sup>a</sup> (g/l) | Verim <sup>b</sup> (%PHB) |
|------------------------------------|---------------------------|------------------------|---------------------------|
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> M28 | 0,270 ± 0,000             | 0,054 ± 0,008          | 20,00                     |
| <i>Rhizobium leguminosarum</i> M43 | 0,410 ± 0,060             | 0,106 ± 0,009          | 25,85                     |
| <i>Rhizobium cicer</i> N1          | 1,250 ± 0,000             | 0,094 ± 0,001          | 7,52                      |
| <i>Rhizobium cicer</i> N2          | 1,085 ± 0,105             | 0,101 ± 0,003          | 9,31                      |
| <i>Rhizobium cicer</i> N3          | 1,700 ± 0,050             | 0,097 ± 0,002          | 5,71                      |
| <i>Rhizobium cicer</i> N4          | 1,805 ± 0,588             | 0,104 ± 0,009          | 5,76                      |
| <i>Rhizobium cicer</i> N5          | 1,240 ± 0,050             | 0,071 ± 0,005          | 5,73                      |
| <i>Rhizobium cicer</i> N6          | 1,005 ± 0,015             | 0,103 ± 0,014          | 10,25                     |
| <i>Rhizobium cicer</i> N63         | 0,100 ± 0,020             | 0,007 ± 0,001          | 7,00                      |
| <i>Rhizobium cicer</i> N522        | 0,390 ± 0,023             | 0,040 ± 0,014          | 10,26                     |
| <i>Rhizobium cicer</i> 16C         | 0,850 ± 0,050             | 0,142 ± 0,045          | 16,71                     |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa26     | 0,260 ± 0,050             | 0,060 ± 0,017          | 23,08                     |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa27     | 0,115 ± 0,035             | 0,033 ± 0,004          | 28,70                     |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa28     | 0,095 ± 0,015             | 0,024 ± 0,001          | 25,26                     |
| <i>Rhizobium phaseoli</i> Fa41     | 0,145 ± 0,035             | 0,038 ± 0,012          | 26,21                     |
| Ortalama*                          | 0,591                     | 0,079                  | 13,37                     |

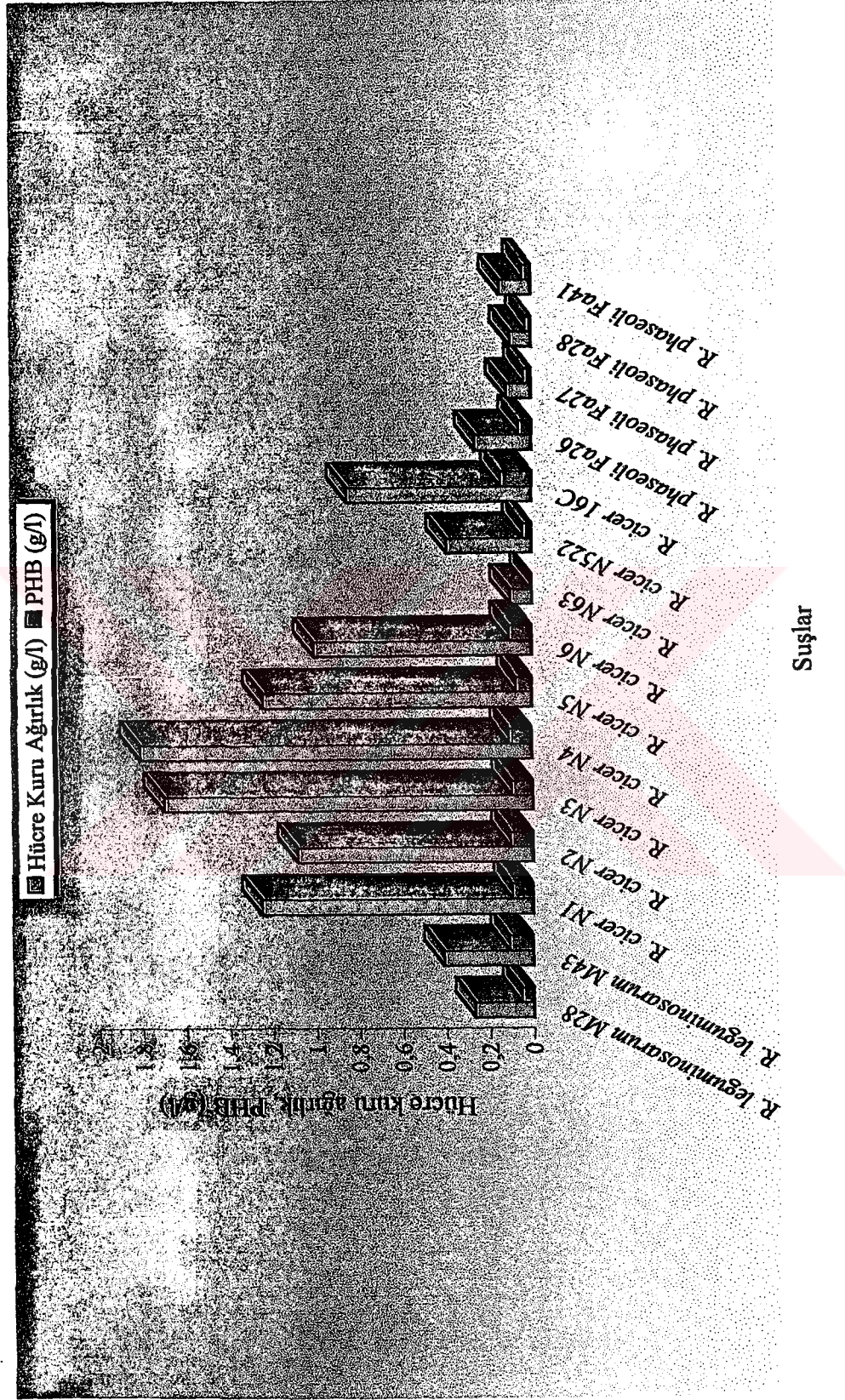
<sup>a</sup>Hücre kuru ağırlığında determine edilmiştir.

<sup>b</sup>Hücre kuru ağırlığına göre belirlenmiştir.

\*:PHB üreten suşların ortalaması



Şekil 4.2. *Rhizobium* bakterilerinin YEM sıvı besiyerinde hücre kuru ağırlıkları ve PHB üretim histogramı



Şekil 4.2'nin devamı. *Rhizobium* bakterilerinin YEM sıvı besiyerinde hücre kuru ağırlıkları ve PHB üretim histogramı

#### 4. 5. Farklı Karbon Kaynaklarının PHB Üretimine Etkisi

Farklı karbon kaynakları olarak Laktoz, Glukoz, Sodyum asetat, Sukroz ve Pirüvik asit-Na tuzu kullanılmıştır. Ayrıca YEM besiyerinin içeriğinde yer alan mannitol karbon kaynağında suşların PHB verimi belirlenmiş ve diğer karbon kaynaklarındaki polimer verimleri ile mukayese edilmiştir. Karbon kaynakları, bölüm 3.2.9'da anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Karbon kaynaklarının PHB üretimine etkisinin araştırılması için en yüksek verime sahip olan *R. meliloti* Y11 (%39,25), *B. japonicum* S Irat Fab (%34,43) ve *R. viciae* F111 (%57,09) suşları seçilmiştir.

*R. meliloti* Y11 suşunun tüm karbon kaynaklarında PHB ürettiği tespit edilirken, *B. japonicum* S Irat Fab'ın sukrozu kullanmaması, *R. viciae* F111'in de sodyum asetat ve pirüvik asit-Na tuzu içeren ortamda zayıf gelişmesi nedeniyle, bu suşların PHB üretimleri tespit edilememiştir.

Suşların PHB üretimleri 24-144 saat zaman aralığında çalışılmış, bu sürelerde PHB'nin tespit edildiği ortamın son kültür pH'sı da belirlenmiştir.

Farklı karbon kaynaklarında *R. meliloti* Y11'in PHB üretim yüzdesi, mannitol ortamında %11,61-33,37 (Çizelge 4.3, Şekil 4.3); laktozda %1,96-17,55 (Çizelge 4.4, Şekil 4.4); glukozda %8,82-83,75 (Çizelge 4.5, Şekil 4.5); sukrozda %6,54-27,44 (Çizelge 4.6, Şekil 4.6); sodyum asetatda %2,91-10,53 (Çizelge 4.7, Şekil 4.7) ve pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında %2-26,45 (Çizelge 4.8, Şekil 4.8) arasında tespit edilmiştir.

Diğer taraftan tüm karbon kaynakları ve inkübasyon süreleri dikkate alındığında, bakterinin maksimum PHB üretim miktarı ve yüzdesi, glukoz içeren besi ortamında elde edilmiştir. Karbon kaynağı olarak glukoz içeren besiyerinde geliştirilen bakteride en yüksek PHB miktarı inkübasyon süresinin 72. saatinde elde edilirken (0,275 g/l), ilk 24 saatte bakterinin, maksimum %83,75 PHB ürettiği belirlenmiştir

(Çizelge 4.5, Şekil 4.5). Diğer karbon kaynaklarında ise PHB üretiminin düşük olduğu bulunmuştur.

Yapılan çalışmada zamana bağlı olarak, hücrede biriktirilen PHB miktarında ve yüzde veriminde bir azalma gözlenmiştir. Genel olarak, ilk 72. saate kadar inkübe edilen bakterinin, PHB'yi sentezleyip hücrede biriktirdiği ve 96. saat inkübasyondan sonra PHB'yi kullandığı gözlenmiştir. Bu durum sadece sukroz içeren besiyerinde farklılık göstermiştir. Sukroz içeren ortamda, *R. meliloti* Y11 suşundaki PHB miktarının 144 saat inkübasyon ile aynı seviyelerde devam etmesi, hücre gelişimi olmasına rağmen PHB içeriğinde belirgin derecede bir azalma veya yükselme olmaması dikkat çekmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.6).

YEM besi ortamında %34,43 oranında doğal PHB verimine sahip olan *B. japonicum* S Irat Fab'm (Bkz. Çizelge 4.2), mannitol içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığına göre %13,06-30,24'ünün PHB olduğu tespit edilirken (Çizelge 4.9, Şekil 4.9), PHB verimin laktozda %5,27-15,79 (Çizelge 4.10, Şekil 4.10); glukozda %2,23-34,31 (Çizelge 4.11, Şekil 4.11); sodyum asetatda %1,10-20,95 (Çizelge 4.12, Şekil 4.12) ve pirüvik asit-Na tuzu içerikli besi ortamında %3,81-22,09 (Çizelge 4.13, Şekil 4.13) arasında değiştiği saptanmıştır.

Bakterinin, karbon kaynağı olarak mannitol ve glukozun dışında laktoz, sodyum asetat ve pirüvik asit-Na tuzu ortamlarında geliştirildiğinde, hücrede depo edilen PHB miktarın ve verimin düşük olduğu gözlenmiştir.

*B. japonicum* S Irat Fab suşunun maksimum PHB üretimi *R. meliloti* Y11 suşu gibi glukoz içeren ortamda gerçekleşmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.11). Bakterinin PHB içeriği ile yüzde verimi, bakterinin inkübasyon süresine bağlı olarak artmıştır. Maksimum PHB üretimi bakterinin 144. saat inkübasyonunda gerçekleşmiştir (%34,31). Bakterinin, mannitol içeren besi ortamına kıyasla daha yüksek miktarda PHB ürettiği belirlenmiştir. Maksimum PHB veriminin elde edildiği ortamın son kültür pH'sı da 8,24 olarak ölçülmüştür.

Bakteri laktoz, sodyum asetat ve pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında dikkate değer PHB üretimi gerçekleştirmezken, en iyi PHB üretimi glukoz ve mannitol içeren besi ortamlarında gerçekleşmiştir. Ancak bakterinin mannitolde ilk 48 saatte depoladığı PHB'yi ilerleyen inkübasyon sürelerinde kullandığı (Bkz. Çizelge 4.9, Şekil 4.9), glukozda ise inkübasyon süresince polimeri sentezlemeye devam ettiği de tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.11, Şekil 4.11).

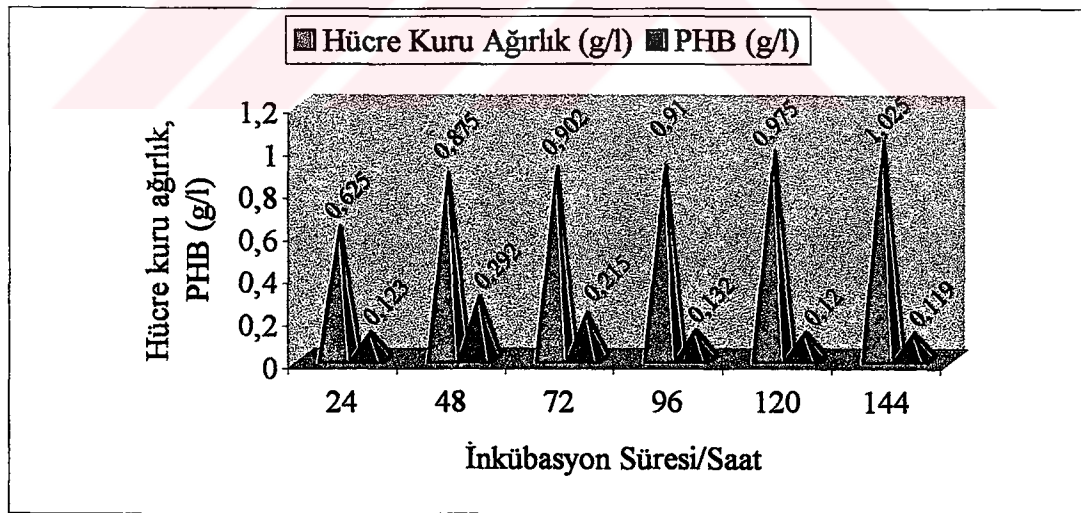
Yüksek (%57,09) PHB verimine sahip *R. viciae* F111 suşunun (Bkz. Çizelge 4.2) mannitol, laktoz, glukoz ve sukroz karbon kaynaklarındaki PHB üretimleri tespit edilmiştir. Tüm karbon kaynaklarında (mannitol dışında) bakterinin PHB üretiminin düşük olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan, bakteri şeker kaynaklarında üretildiğinde diğer suşlara kıyasla kültür ortamındaki viskozitesinin arttığı, dolayısıyla ortama salgılanan EPS miktarının yüksek olduğu gözlenmiştir.

*R. viciae* F111 suşun PHB verimi mannitolde %13,38-41,22 (Çizelge 4.14, Şekil 4.14); laktozda %13,93-24,29 (Çizelge 4.15, Şekil 4.15); glukozda %4,45-12,63 (Çizelge 4.16, Şekil 4.16) ve sukrozda %3,09-26,18 (Çizelge 4.17, Şekil 4.17) olarak bulunmuştur. Bakterinin maksimum PHB üretimi, mannitol içeren besi ortamında tespit edilmiştir. Bu karbon kaynağında bakterinin PHB verimi, 48. saat inkübasyonda maksimum %41,22 olarak bulunmuştur. PHB veriminin tespit edildiği son kültür pH'sı da 7,53 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.14, Şekil 4.14). İnkübasyon süresi ilerledikçe, mannitol ve sukroz içeren besi ortamlarında hücrede depolanan PHB miktarı azalırken, laktoz ve glukoz besi ortamlarında PHB miktarında bir artış gözlenmiştir. Ayrıca karbon kaynağı olarak mannitol içeren besi ortamında, bakteri hücrelerinde depo edilen PHB miktarının ilk 24. ve 72. saat inkübasyonlarda sabit olduğu da gözlenmiştir (Çizelge 4.14, Şekil 4.14).

*R. meliloti* Y11 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşlarında en yüksek PHB verimi glukoz ortamında elde edilirken, *R. viciae* F111 suşunun bu karbon kaynağındaki PHB veriminin düşük olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu karbon kaynağını içeren kültür ortamındaki viskozitenin, diğer karbon kaynaklarına kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

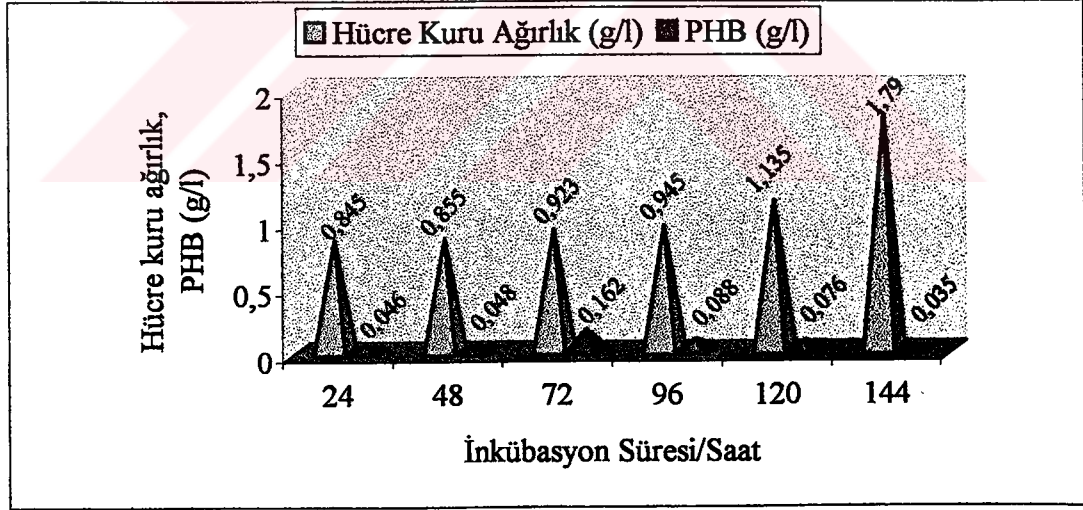
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | %PHB (Verim) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,625 ± 0,005             | 0,123 ± 0,003 | 19,68        | 0,80                     | 7,50             |
| 48 Saat           | 0,875 ± 0,075             | 0,292 ± 0,039 | 33,37        | 1,03                     | 8,01             |
| 72 Saat           | 0,902 ± 0,009             | 0,215 ± 0,010 | 23,84        | 1,58                     | 8,15             |
| 96 Saat           | 0,910 ± 0,000             | 0,132 ± 0,003 | 14,51        | 1,89                     | 8,21             |
| 120 Saat          | 0,975 ± 0,105             | 0,120 ± 0,001 | 12,31        | 2,00                     | 8,33             |
| 144 Saat          | 1,025 ± 0,025             | 0,119 ± 0,002 | 11,61        | 2,55                     | 8,34             |



Şekil 4.3. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.4. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

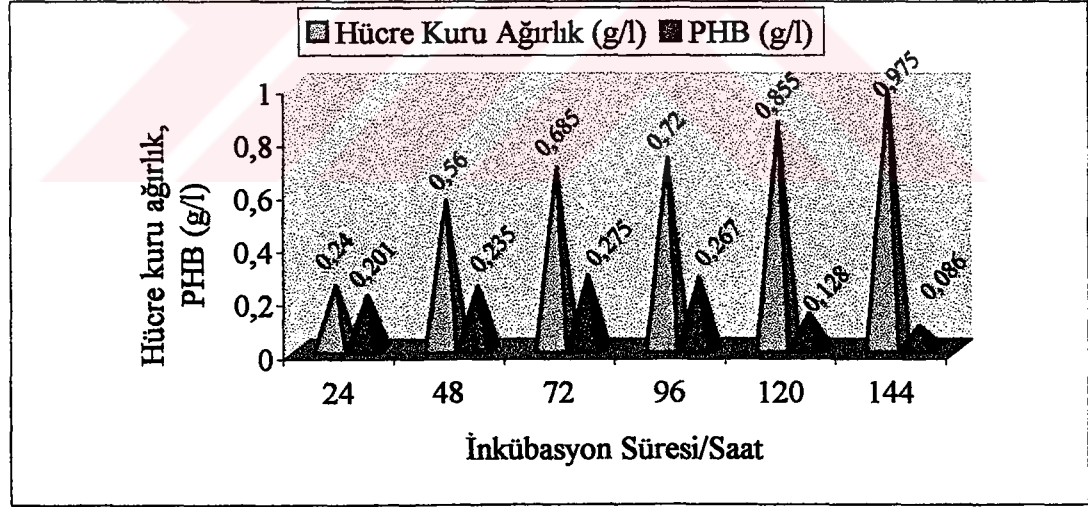
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,845 ± 0,185             | 0,046 ± 0,007 | 5,44         | 0,88                     | 7,72             |
| 48 Saat           | 0,855 ± 0,125             | 0,048 ± 0,001 | 5,61         | 1,10                     | 7,84             |
| 72 Saat           | 0,923 ± 0,023             | 0,162 ± 0,017 | 17,55        | 1,55                     | 8,01             |
| 96 Saat           | 0,945 ± 0,005             | 0,088 ± 0,040 | 9,31         | 2,10                     | 8,36             |
| 120 Saat          | 1,135 ± 0,115             | 0,076 ± 0,030 | 6,70         | 2,18                     | 8,80             |
| 144 Saat          | 1,790 ± 0,180             | 0,035 ± 0,009 | 1,96         | 2,37                     | 8,84             |



Şekil 4.4. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.5. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

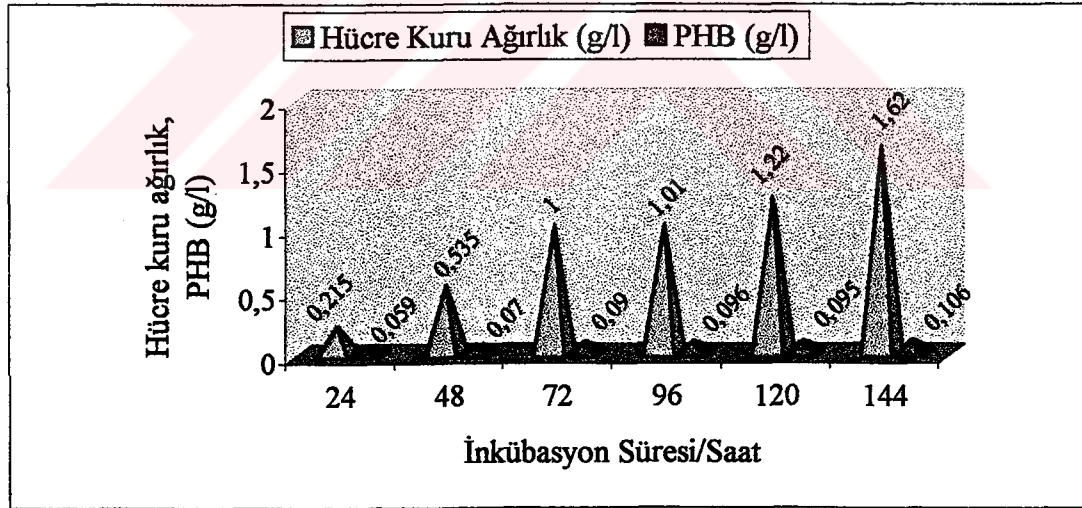
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,240 ± 0,000             | 0,201 ± 0,013 | 83,75        | 0,40                     | 7,01             |
| 48 Saat           | 0,560 ± 0,150             | 0,235 ± 0,029 | 41,96        | 0,70                     | 7,34             |
| 72 Saat           | 0,685 ± 0,045             | 0,275 ± 0,077 | 40,15        | 1,50                     | 7,85             |
| 96 Saat           | 0,720 ± 0,060             | 0,267 ± 0,077 | 37,08        | 1,57                     | 8,10             |
| 120 Saat          | 0,855 ± 0,020             | 0,128 ± 0,073 | 14,97        | 1,70                     | 8,26             |
| 144 Saat          | 0,975 ± 0,095             | 0,086 ± 0,080 | 8,82         | 1,82                     | 8,56             |



Şekil 4.5. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.6. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

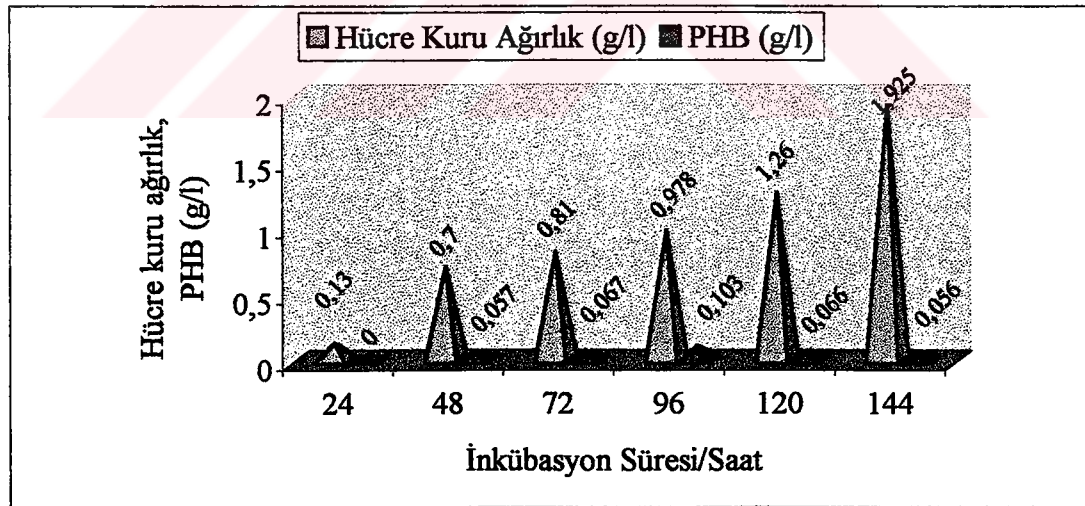
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,215 ± 0,015             | 0,059 ± 0,018 | 27,44        | 0,42                     | 7,43             |
| 48 Saat           | 0,535 ± 0,005             | 0,070 ± 0,006 | 13,08        | 1,08                     | 7,92             |
| 72 Saat           | 1,000 ± 0020              | 0,090 ± 0,006 | 9,00         | 1,87                     | 9,08             |
| 96 Saat           | 1,010 ± 0,045             | 0,096 ± 0,015 | 9,50         | 2,08                     | 9,10             |
| 120 Saat          | 1,220 ± 0,060             | 0,095 ± 0,020 | 7,79         | 2,37                     | 9,04             |
| 144 Saat          | 1,620 ± 0,340             | 0,106 ± 0,010 | 6,54         | 2,72                     | 9,06             |



Şekil 4.6. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.7. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Sodyum asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

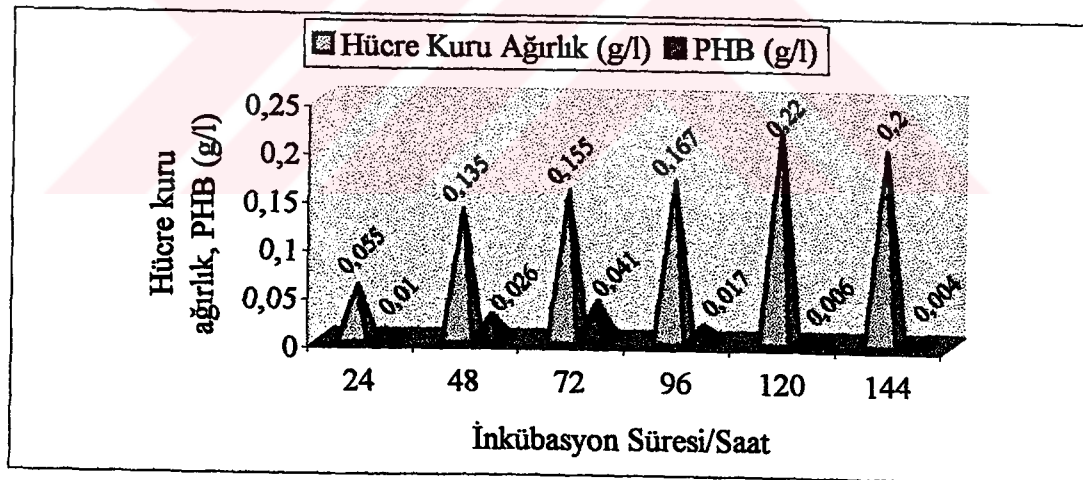
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,130 ± 0,050             | —             | —            | 0,30                     | 7,04             |
| 48 Saat           | 0,700 ± 0,000             | 0,057 ± 0,000 | 8,14         | 1,20                     | 7,40             |
| 72 Saat           | 0,810 ± 0,042             | 0,067 ± 0,001 | 8,27         | 1,50                     | 8,22             |
| 96 Saat           | 0,978 ± 0,001             | 0,103 ± 0,005 | 10,53        | 1,63                     | 8,58             |
| 120 Saat          | 1,260 ± 0,050             | 0,066 ± 0,034 | 5,24         | 2,20                     | 9,16             |
| 144 Saat          | 1,925 ± 0,125             | 0,056 ± 0,008 | 2,91         | 2,30                     | 9,20             |



Şekil 4.7. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Sodyum asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.8. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

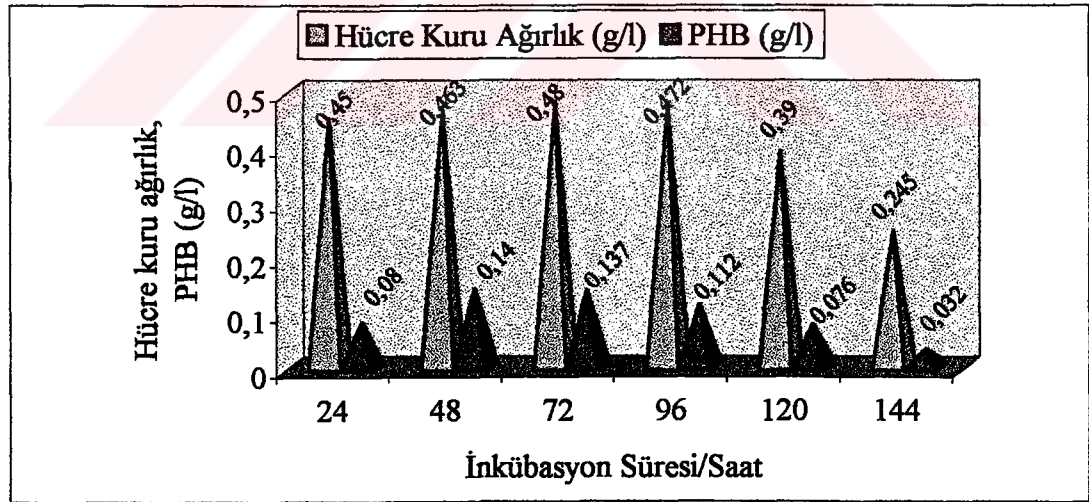
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,055 ± 0,015             | 0,010 ± 0,001 | 18,18        | 0,32                     | 7,11             |
| 48 Saat           | 0,135 ± 0,015             | 0,026 ± 0,002 | 19,26        | 0,37                     | 7,24             |
| 72 Saat           | 0,155 ± 0,035             | 0,041 ± 0,019 | 26,45        | 0,41                     | 7,86             |
| 96 Saat           | 0,167 ± 0,010             | 0,017 ± 0,007 | 10,18        | 0,64                     | 7,91             |
| 120 Saat          | 0,220 ± 0,020             | 0,006 ± 0,003 | 2,73         | 0,77                     | 8,26             |
| 144 Saat          | 0,200 ± 0,020             | 0,004 ± 0,001 | 2,0          | 0,45                     | 8,00             |



Şekil 4.8. *Rhizobium meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.9. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besisi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

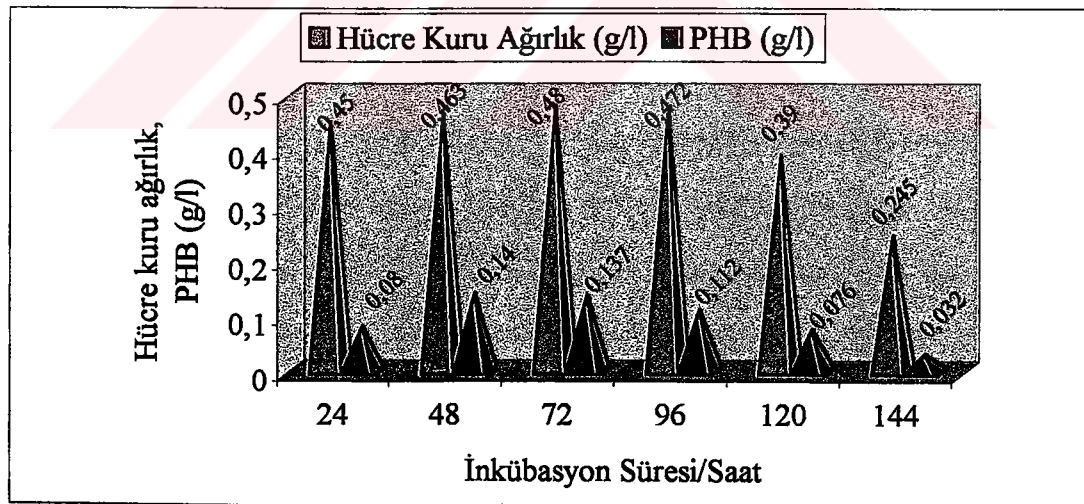
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,450 ± 0,060             | 0,080 ± 0,002 | 17,78        | 0,40                     | 7,03             |
| 48 Saat           | 0,463 ± 0,024             | 0,140 ± 0,005 | 30,24        | 0,58                     | 7,35             |
| 72 Saat           | 0,480 ± 0,030             | 0,137 ± 0,027 | 28,54        | 0,68                     | 8,03             |
| 96 Saat           | 0,472 ± 0,000             | 0,112 ± 0,003 | 23,73        | 0,92                     | 8,50             |
| 120 Saat          | 0,390 ± 0,020             | 0,076 ± 0,011 | 19,49        | 1,33                     | 8,26             |
| 144 Saat          | 0,245 ± 0,005             | 0,032 ± 0,019 | 13,06        | 0,44                     | 7,75             |



Şekil 4.9. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Mannitol içeren YEM besisi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.9. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Mannitol içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

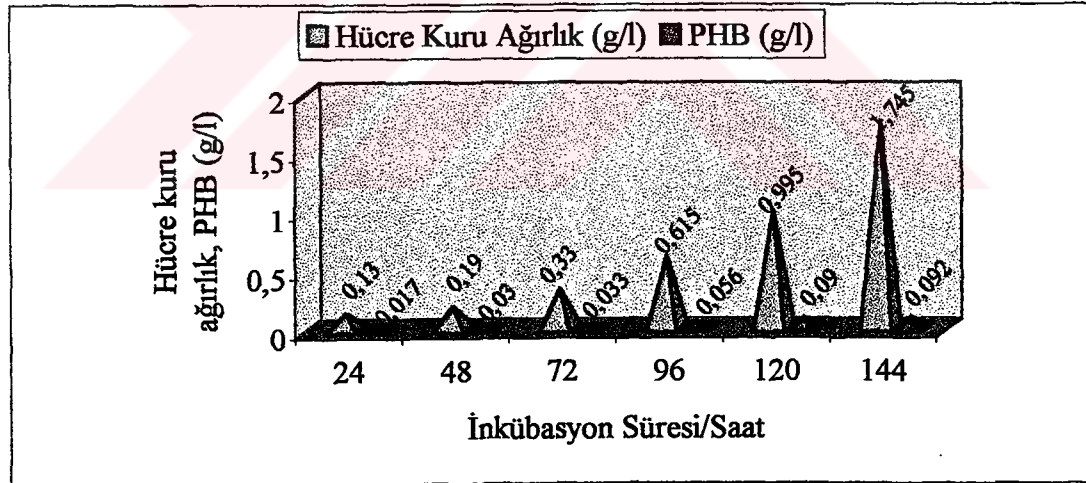
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,450 ± 0,060             | 0,080 ± 0,002 | 17,78        | 0,40                     | 7,03             |
| 48 Saat           | 0,463 ± 0,024             | 0,140 ± 0,005 | 30,24        | 0,58                     | 7,35             |
| 72 Saat           | 0,480 ± 0,030             | 0,137 ± 0,027 | 28,54        | 0,68                     | 8,03             |
| 96 Saat           | 0,472 ± 0,000             | 0,112 ± 0,003 | 23,73        | 0,92                     | 8,50             |
| 120 Saat          | 0,390 ± 0,020             | 0,076 ± 0,011 | 19,49        | 1,33                     | 8,26             |
| 144 Saat          | 0,245 ± 0,005             | 0,032 ± 0,019 | 13,06        | 0,44                     | 7,75             |



Şekil 4.9. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Mannitol içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.10. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

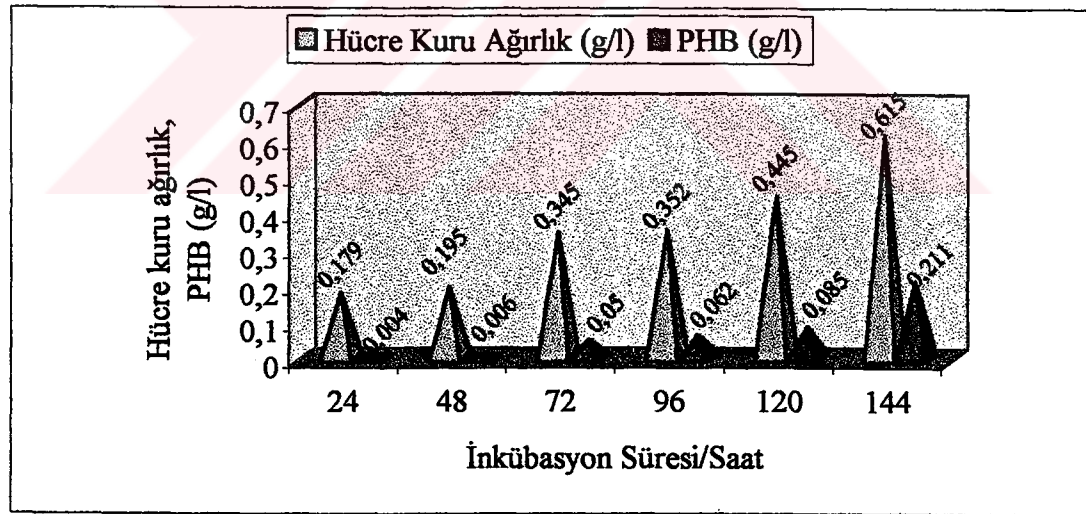
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,130 ± 0,020             | 0,017 ± 0,002 | 13,08        | 0,20                     | 7,11             |
| 48 Saat           | 0,190 ± 0,010             | 0,030 ± 0,008 | 15,79        | 0,37                     | 7,05             |
| 72 Saat           | 0,330 ± 0,010             | 0,033 ± 0,017 | 10,00        | 0,60                     | 7,42             |
| 96 Saat           | 0,615 ± 0,105             | 0,056 ± 0,021 | 9,11         | 1,02                     | 7,78             |
| 120 Saat          | 0,995 ± 0,055             | 0,090 ± 0,030 | 9,05         | 2,90                     | 8,38             |
| 144 Saat          | 1,745 ± 0,015             | 0,092 ± 0,008 | 5,27         | 3,78                     | 8,60             |



Şekil 4.10. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.11. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

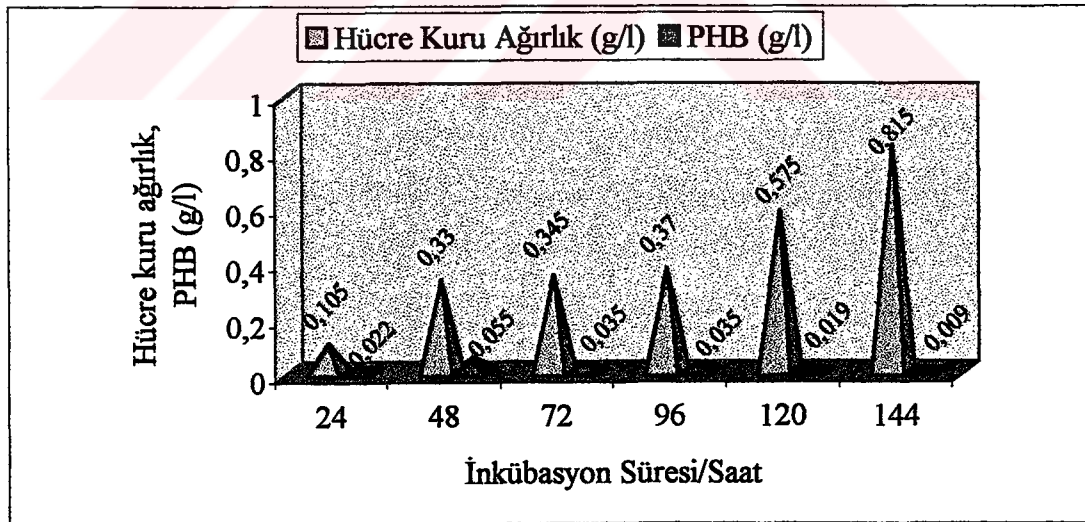
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,179 ± 0,001             | 0,004 ± 0,001 | 2,23         | 0,40                     | 7,13             |
| 48 Saat           | 0,195 ± 0,015             | 0,006 ± 0,002 | 3,08         | 0,53                     | 7,60             |
| 72 Saat           | 0,345 ± 0,015             | 0,050 ± 0,021 | 14,49        | 0,60                     | 7,78             |
| 96 Saat           | 0,352 ± 0,008             | 0,062 ± 0,003 | 17,61        | 0,88                     | 7,77             |
| 120 Saat          | 0,445 ± 0,045             | 0,085 ± 0,022 | 19,10        | 0,92                     | 8,24             |
| 144 Saat          | 0,615 ± 0,009             | 0,211 ± 0,006 | 34,31        | 0,90                     | 8,24             |



Şekil 4.11. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.12. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Sodyum Asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

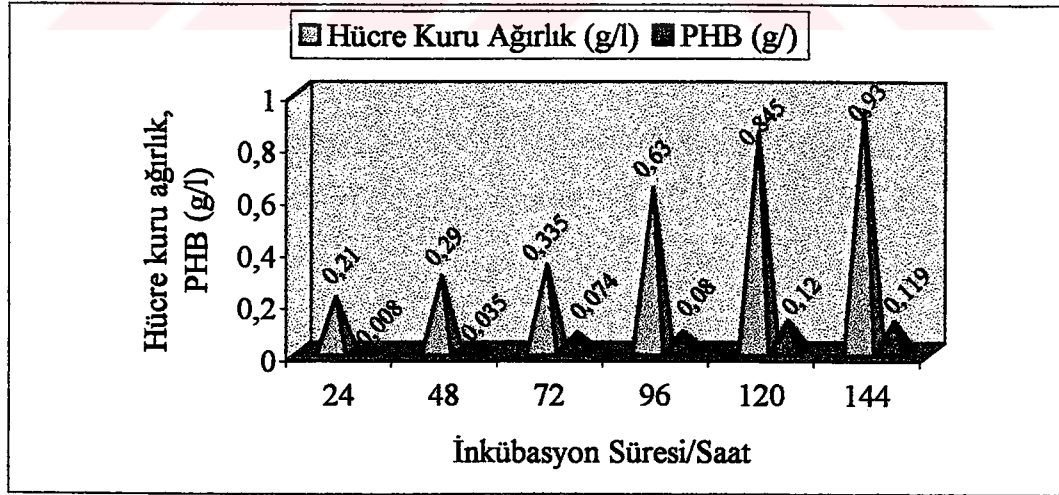
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,105 ± 0,035             | 0,022 ± 0,012 | 20,95        | 0,50                     | 7,05             |
| 48 Saat           | 0,330 ± 0,070             | 0,055 ± 0,014 | 16,67        | 0,63                     | 7,31             |
| 72 Saat           | 0,345 ± 0,115             | 0,035 ± 0,003 | 10,14        | 0,74                     | 7,36             |
| 96 Saat           | 0,370 ± 0,190             | 0,035 ± 0,018 | 9,46         | 0,78                     | 7,62             |
| 120 Saat          | 0,575 ± 0,005             | 0,019 ± 0,004 | 3,30         | 1,05                     | 8,04             |
| 144 Saat          | 0,815 ± 0,075             | 0,009 ± 0,001 | 1,10         | 1,25                     | 8,24             |



Şekil 4.12. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Sodyum Asetat içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.13. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

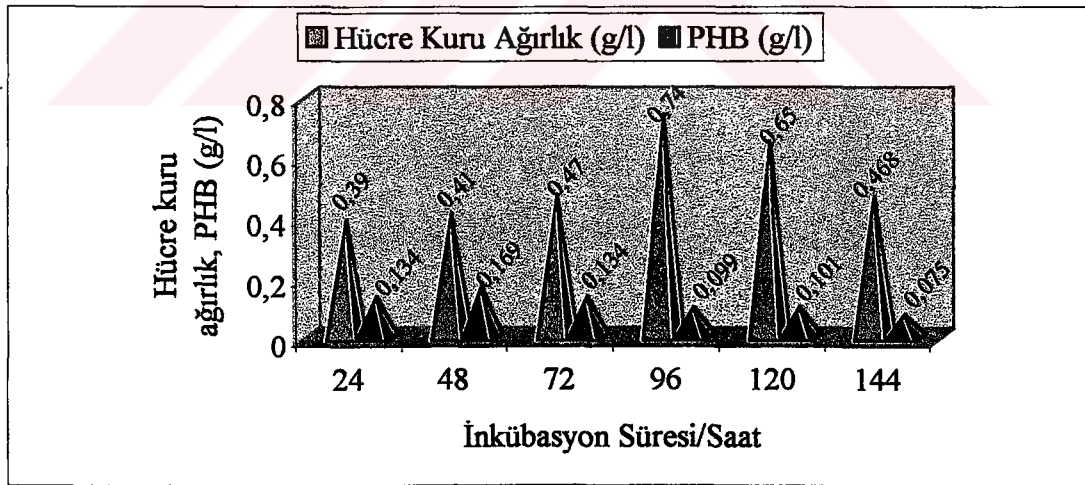
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,210 ± 0,012             | 0,008 ± 0,001 | 3,81         | 0,34                     | 6,95             |
| 48 Saat           | 0,290 ± 0,140             | 0,035 ± 0,009 | 12,07        | 0,59                     | 7,16             |
| 72 Saat           | 0,335 ± 0,195             | 0,074 ± 0,005 | 22,09        | 1,00                     | 7,42             |
| 96 Saat           | 0,630 ± 0,020             | 0,080 ± 0,000 | 12,70        | 1,70                     | 7,28             |
| 120 Saat          | 0,845 ± 0,005             | 0,120 ± 0,007 | 14,20        | 2,00                     | 7,65             |
| 144 Saat          | 0,930 ± 0,070             | 0,119 ± 0,008 | 12,80        | 2,60                     | 7,90             |



Şekil 4.13. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın karbon kaynağı olarak Pirüvik asit-Na tuzu içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.14. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

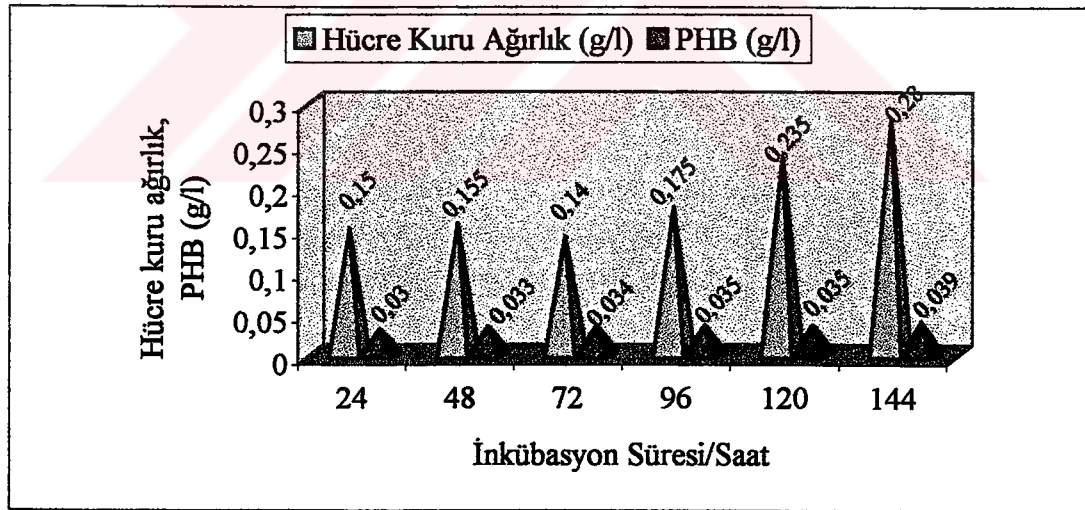
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,390 ± 0,002             | 0,134 ± 0,005 | 34,36        | 0,63                     | 7,21             |
| 48 Saat           | 0,410 ± 0,020             | 0,169 ± 0,003 | 41,22        | 0,78                     | 7,53             |
| 72 Saat           | 0,470 ± 0,010             | 0,134 ± 0,002 | 28,51        | 1,05                     | 7,84             |
| 96 Saat           | 0,740 ± 0,140             | 0,099 ± 0,007 | 13,38        | 1,50                     | 7,92             |
| 120 Saat          | 0,650 ± 0,010             | 0,101 ± 0,004 | 15,54        | 1,20                     | 7,98             |
| 144 Saat          | 0,468 ± 0,027             | 0,075 ± 0,005 | 16,03        | 1,02                     | 7,95             |



Şekil 4.14. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Mannitol içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.15. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

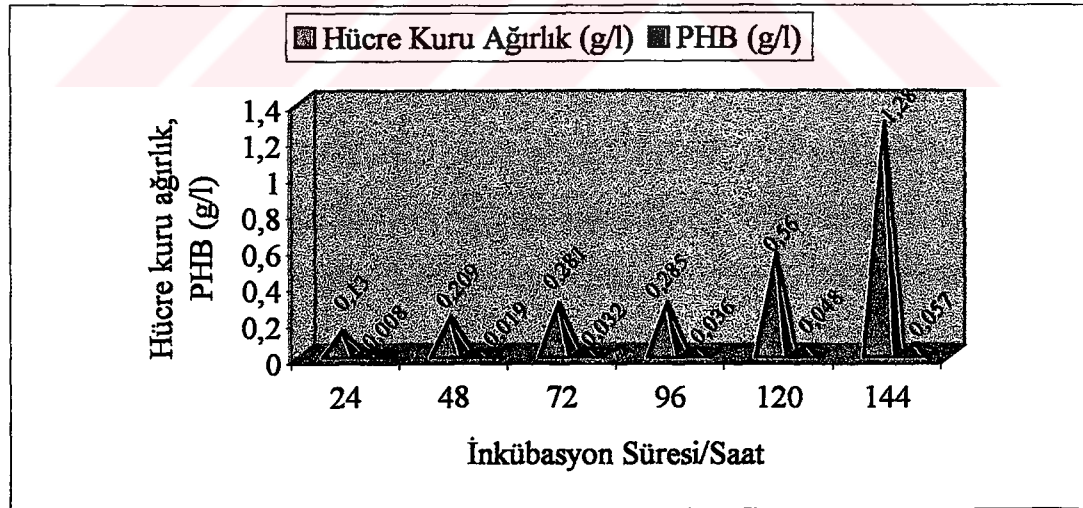
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,150 ± 0,010             | 0,030 ± 0,012 | 20,0         | 0,25                     | 7,00             |
| 48 Saat           | 0,155 ± 0,015             | 0,033 ± 0,011 | 21,29        | 0,29                     | 7,02             |
| 72 Saat           | 0,140 ± 0,020             | 0,034 ± 0,014 | 24,29        | 0,30                     | 7,06             |
| 96 Saat           | 0,175 ± 0,025             | 0,035 ± 0,004 | 20,0         | 0,38                     | 7,15             |
| 120 Saat          | 0,235 ± 0,135             | 0,035 ± 0,010 | 14,89        | 0,37                     | 7,26             |
| 144 Saat          | 0,280 ± 0,020             | 0,039 ± 0,014 | 13,93        | 0,33                     | 7,40             |



Şekil 4.15. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Laktoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.16. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

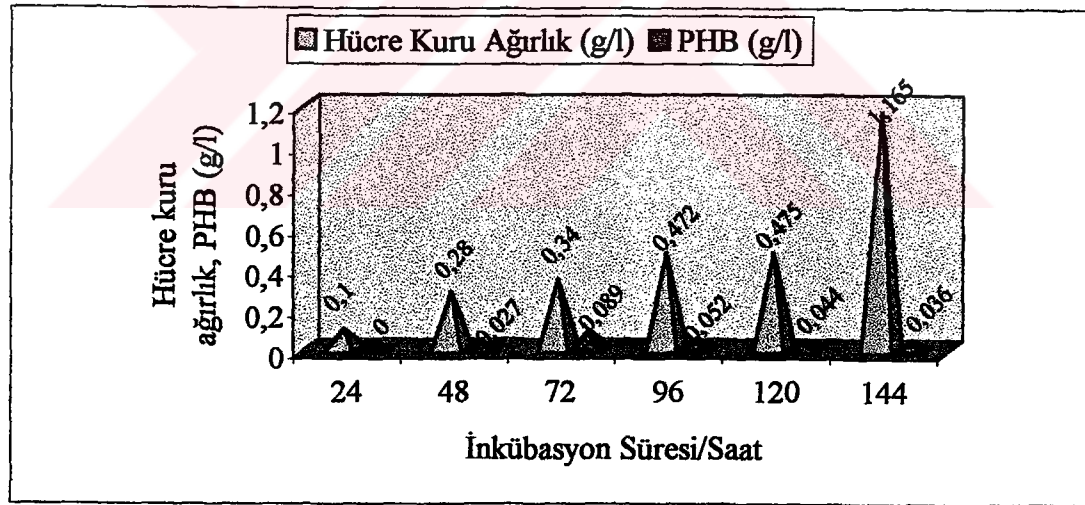
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,130 ± 0,000             | 0,008 ± 0,000 | 6,15         | 0,20                     | 6,68             |
| 48 Saat           | 0,209 ± 0,008             | 0,019 ± 0,001 | 9,09         | 0,45                     | 6,72             |
| 72 Saat           | 0,281 ± 0,001             | 0,032 ± 0,002 | 11,39        | 0,52                     | 7,25             |
| 96 Saat           | 0,285 ± 0,017             | 0,036 ± 0,002 | 12,63        | 1,00                     | 7,50             |
| 120 Saat          | 0,560 ± 0,080             | 0,048 ± 0,004 | 8,57         | 1,40                     | 7,52             |
| 144 Saat          | 1,280 ± 0,140             | 0,057 ± 0,018 | 4,45         | 2,00                     | 7,62             |



Şekil 4.16. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Glukoz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.17. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,100 ± 0,000             | –             | –            | 0,30                     | 6,93             |
| 48 Saat           | 0,280 ± 0,007             | 0,027 ± 0,003 | 9,64         | 0,45                     | 7,10             |
| 72 Saat           | 0,340 ± 0,080             | 0,089 ± 0,020 | 26,18        | 0,60                     | 7,19             |
| 96 Saat           | 0,472 ± 0,013             | 0,052 ± 0,009 | 11,02        | 1,15                     | 7,40             |
| 120 Saat          | 0,475 ± 0,200             | 0,044 ± 0,013 | 9,26         | 1,30                     | 7,47             |
| 144 Saat          | 1,165 ± 0,455             | 0,036 ± 0,008 | 3,09         | 2,80                     | 7,48             |



Şekil 4.17. *Rhizobium viciae* F111'in karbon kaynağı olarak Sukroz içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

#### 4. 6. Farklı Azot Kaynaklarının PHB Üretimine Etkisi

Azot kaynakları olarak proteaz pepton, glisin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , asparajin ve DL-triptofan kullanılmıştır. Azot kaynakları 3.2.9’da anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

*B. japonicum* S Irat Fab suşunun DL-triptofan ve glisin azot kaynaklarının ilave edildiği besi ortamında zayıf gelişmesi, *R. viciae* F111 suşunun da glisin azot kaynaklı ortamda gelişmemesi nedeniyle her iki suşun bu azot kaynaklarında PHB üretimleri determine edilememiştir. Genel olarak suşların azot kaynaklarındaki PHB üretimlerinin düşük olduğu saptanmıştır.

*R. meliloti* Y11 suşu azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besiyerinde geliştirildiğinde, PHB üretimi yüzdesi %7,40-26,23 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.18, Şekil 4.18). Bu verimin, glisinde %6,96-22,29 (Çizelge 4.19, Şekil 4.19) ve asparajinde %9,14-18,04 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.21, Şekil 4.21).

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  azot kaynaklı besi ortamında PHB verimi %5,24-19,41 olarak tespit edilirken (Çizelge 4.20, Şekil 4.20), DL-triptofanda PHB veriminde bir artış olduğu gözlenmiştir (%6,14-21,18) (Çizelge 4.22, Şekil 4.22).

Sonuç olarak, *R. meliloti* Y11 suşunda en yüksek PHB verimine proteaz pepton içerikli besi ortamında ulaşılmıştır (Çizelge 4.18, Şekil 4.18). Bu azot kaynağında bakteri, maksimum PHB üretimini 96. saat inkübasyonda gerçekleştirmiştir (%26,23). Maksimum PHB verimin elde edildiği ortamın son kültür pH’sı da 6,89 olarak ölçülmüştür. Bakterinin genel olarak bu azot kaynağında diğer azot kaynaklarına kıyasla daha yüksek miktarlarda PHB sentezlediği gözlenmiştir.

*B. japonicum* S Irat Fab suşunun proteaz pepton,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ve asparajin içerikli azot kaynaklarındaki PHB üretimleri Çizelge 4.23, 4.24 ve 4.25’te verilmiştir.

Bakterinin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  azot kaynağında 72 saat inkübasyon süresince PHB üretmediği gözlenmiştir. İlerleyen inkübasyon süresinde bakterinin hücre kuru ağırlığına göre %7,67-8,47'sinin PHB olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.24, Şekil 4.24).

Azot kaynağı olarak asparajın içeren besi ortamında bakterinin %1,0-9,88 arasında PHB ürettiği tespit edilirken, proteaz peptonda PHB verimin %7,62-26,78 arasında arttığı bulunmuştur.

Bakteri maksimum PHB üretimini, proteaz pepton kaynaklı besiyerinde gerçekleştirmiş olup, en yüksek PHB verimine (%26,78) inkübasyon süresinin 144. saatinde ulaşmıştır (Çizelge 4.23).

*R. viciae* F111 suşunun proteaz pepton, glisin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ve asparajın azot kaynaklarında PHB üretimleri incelenmiştir.

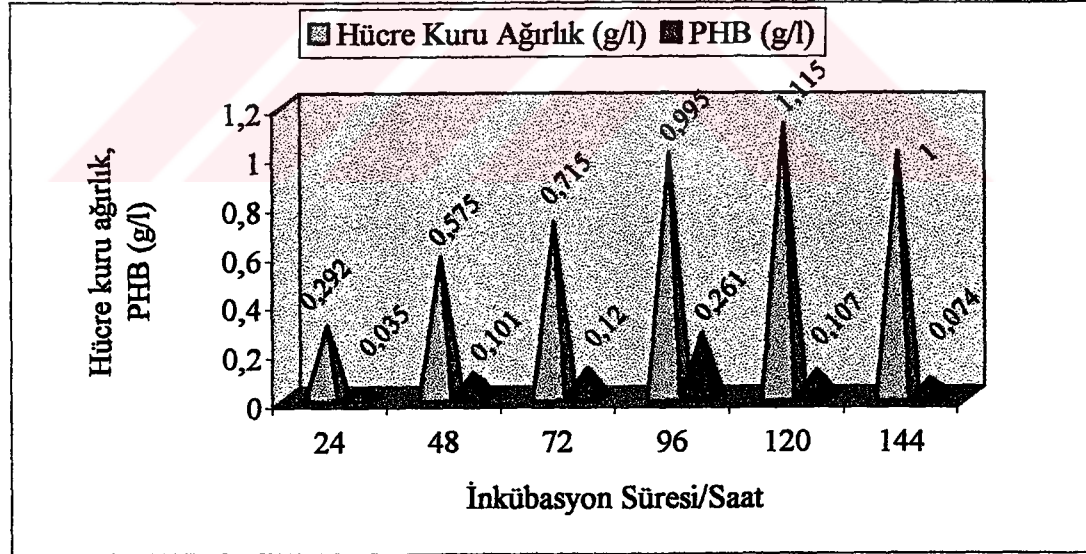
F111 suşunun bu azot kaynaklarındaki PHB verimlerinin diğer iki suşa kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

Proteaz pepton içeren besi ortamında bakterinin hücre kuru ağırlığının %8,14-21,09'u PHB (Çizelge 4.26, Şekil 4.26) olarak tespit edilirken, bu verimin glisinde %20,24-29,54 (Çizelge 4.27, Şekil 4.27);  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ta %18,43-35,43 (Çizelge 4.28, Şekil 4.28) ve asparajinde %24,14-48,13'e (Çizelge 4.29, Şekil 4.29) arttığı gözlenmiştir.

Bakteri proteaz pepton ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ta 72. saat inkübasyonda maksimum oranda PHB sentezlerken (sırasıyla, %21,09; %35,43), glisinde ilk 24 saatte (%29,54), asparajın içeren azot kaynağında ise 96. saatte (%48,13) yüksek oranda PHB üretmiştir. Bakteri yüksek PHB üretimini azot kaynağı olarak asparajın içeren ortamda gerçekleştirmiştir.

Çizelge 4.18. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak Proteaz Pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

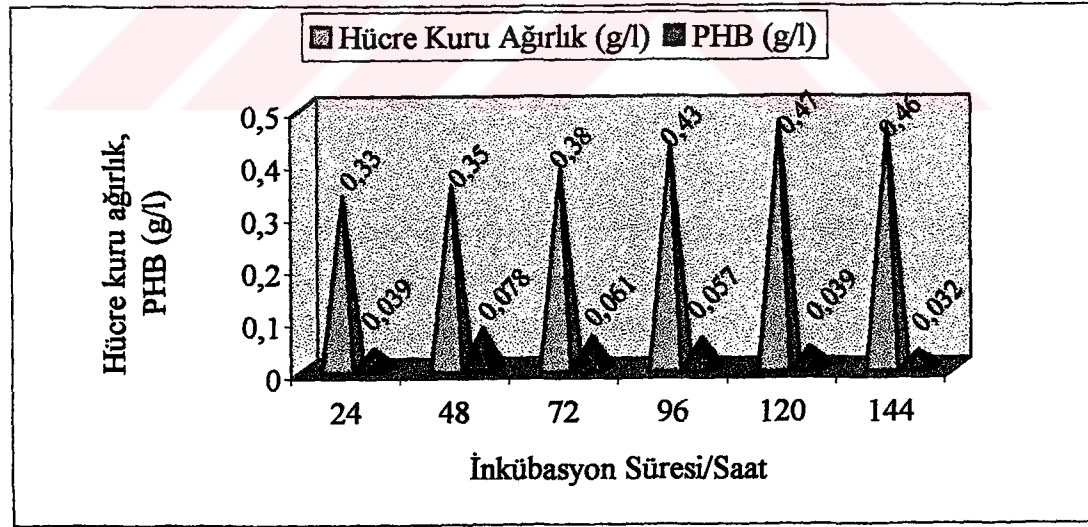
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,292 ± 0,004             | 0,035 ± 0,001 | 11,99        | 0,40                     | 7,32             |
| 48 Saat           | 0,575 ± 0,035             | 0,101 ± 0,050 | 17,57        | 1,06                     | 7,88             |
| 72 Saat           | 0,715 ± 0,015             | 0,120 ± 0,015 | 16,78        | 1,40                     | 7,89             |
| 96 Saat           | 0,995 ± 0,165             | 0,261 ± 0,030 | 26,23        | 2,18                     | 6,89             |
| 120 Saat          | 1,115 ± 0,195             | 0,107 ± 0,001 | 9,60         | 2,09                     | 6,66             |
| 144 Saat          | 1,000 ± 0,030             | 0,074 ± 0,005 | 7,40         | 1,38                     | 6,55             |



Şekil 4.18. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak Proteaz Pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.19. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

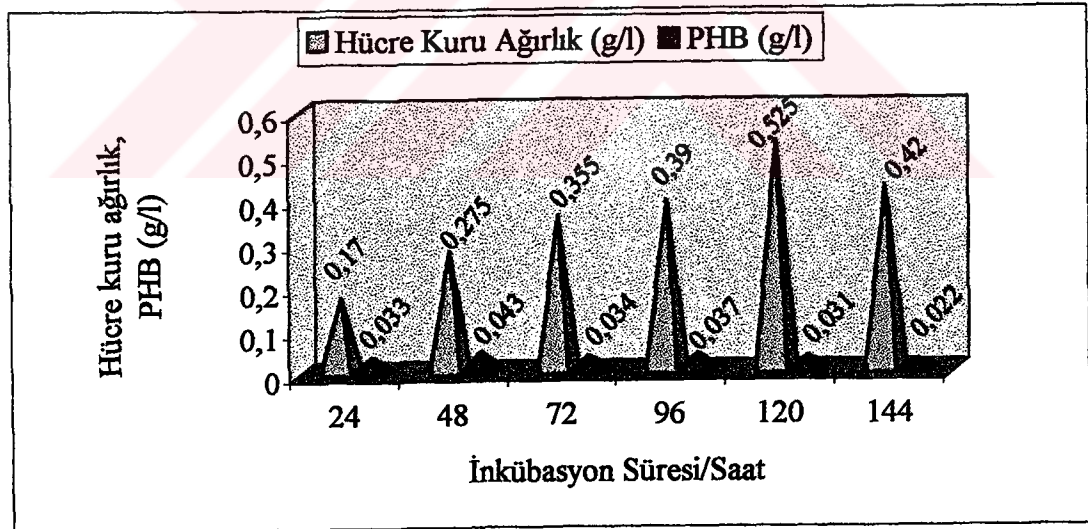
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,330 ± 0,030             | 0,039 ± 0,008 | 11,82        | 0,60                     | 7,21             |
| 48 Saat           | 0,350 ± 0,000             | 0,078 ± 0,000 | 22,29        | 0,73                     | 7,46             |
| 72 Saat           | 0,380 ± 0,000             | 0,061 ± 0,004 | 16,05        | 0,80                     | 7,66             |
| 96 Saat           | 0,430 ± 0,040             | 0,057 ± 0,009 | 13,26        | 0,98                     | 8,03             |
| 120 Saat          | 0,470 ± 0,010             | 0,039 ± 0,004 | 8,30         | 1,10                     | 8,34             |
| 144 Saat          | 0,460 ± 0,020             | 0,032 ± 0,001 | 6,96         | 0,93                     | 7,80             |



Şekil 4.19. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.20. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

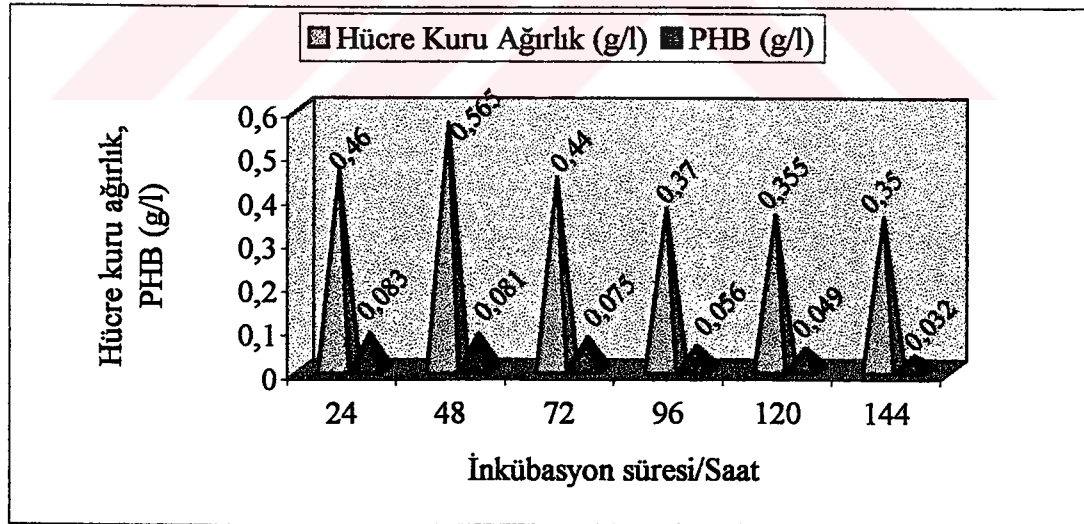
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,170 ± 0,030             | 0,033 ± 0,001 | 19,41        | 0,34                     | 7,49             |
| 48 Saat           | 0,275 ± 0,025             | 0,043 ± 0,009 | 15,64        | 0,47                     | 7,75             |
| 72 Saat           | 0,355 ± 0,005             | 0,034 ± 0,009 | 9,58         | 0,65                     | 8,75             |
| 96 Saat           | 0,390 ± 0,010             | 0,037 ± 0,009 | 9,49         | 0,76                     | 8,30             |
| 120 Saat          | 0,525 ± 0,003             | 0,031 ± 0,014 | 5,90         | 0,98                     | 8,32             |
| 144 Saat          | 0,420 ± 0,070             | 0,022 ± 0,003 | 5,24         | 0,93                     | 8,00             |



Şekil 4.20. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.21. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

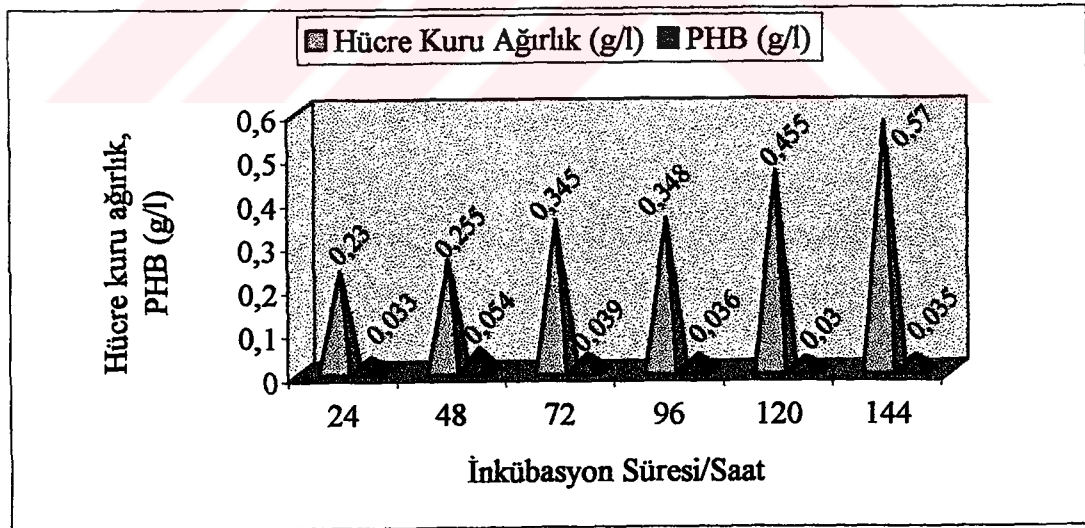
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,460 ± 0,020             | 0,083 ± 0,002 | 18,04        | 1,15                     | 7,67             |
| 48 Saat           | 0,565 ± 0,045             | 0,081 ± 0,001 | 14,34        | 1,28                     | 7,92             |
| 72 Saat           | 0,440 ± 0,020             | 0,075 ± 0,001 | 17,05        | 1,37                     | 7,85             |
| 96 Saat           | 0,370 ± 0,020             | 0,056 ± 0,003 | 15,14        | 0,80                     | 8,05             |
| 120 Saat          | 0,355 ± 0,002             | 0,049 ± 0,009 | 13,80        | 0,75                     | 7,92             |
| 144 Saat          | 0,350 ± 0,008             | 0,032 ± 0,001 | 9,14         | 0,74                     | 7,90             |



Şekil 4.21. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.22. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak DL-Triptofan içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

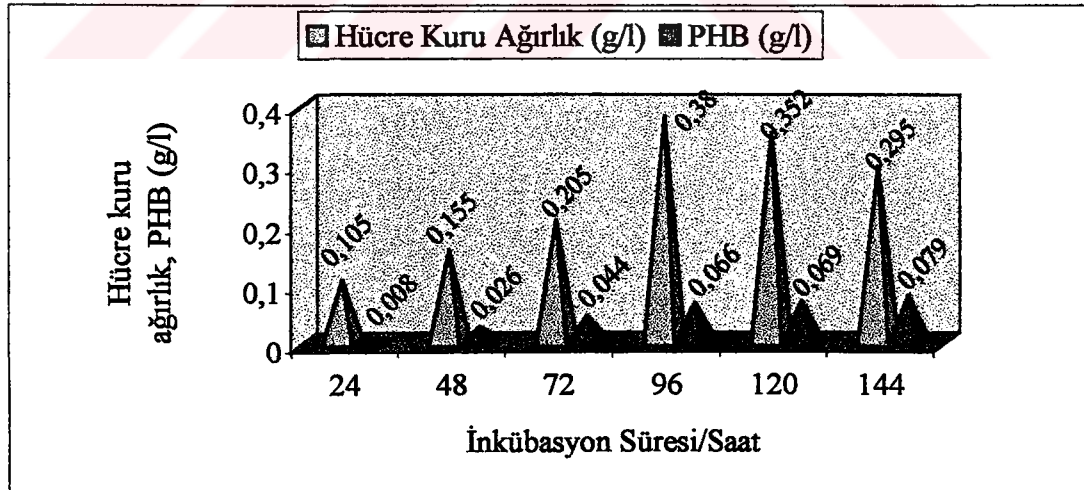
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH' ısı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|--------------------|
| 24 Saat           | 0,230 ± 0,030             | 0,033 ± 0,007 | 14,35        | 0,50                     | 8,00               |
| 48 Saat           | 0,255 ± 0,003             | 0,054 ± 0,005 | 21,18        | 0,63                     | 8,06               |
| 72 Saat           | 0,345 ± 0,035             | 0,039 ± 0,005 | 11,30        | 1,10                     | 8,50               |
| 96 Saat           | 0,348 ± 0,005             | 0,036 ± 0,001 | 10,34        | 1,50                     | 8,61               |
| 120 Saat          | 0,455 ± 0,005             | 0,030 ± 0,000 | 6,59         | 1,25                     | 8,40               |
| 144 Saat          | 0,570 ± 0,040             | 0,035 ± 0,013 | 6,14         | 1,13                     | 8,85               |



Şekil 4.22. *Rhizobium meliloti* Y11'in azot kaynağı olarak DL-Triptofan içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.23. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Proteaz Pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

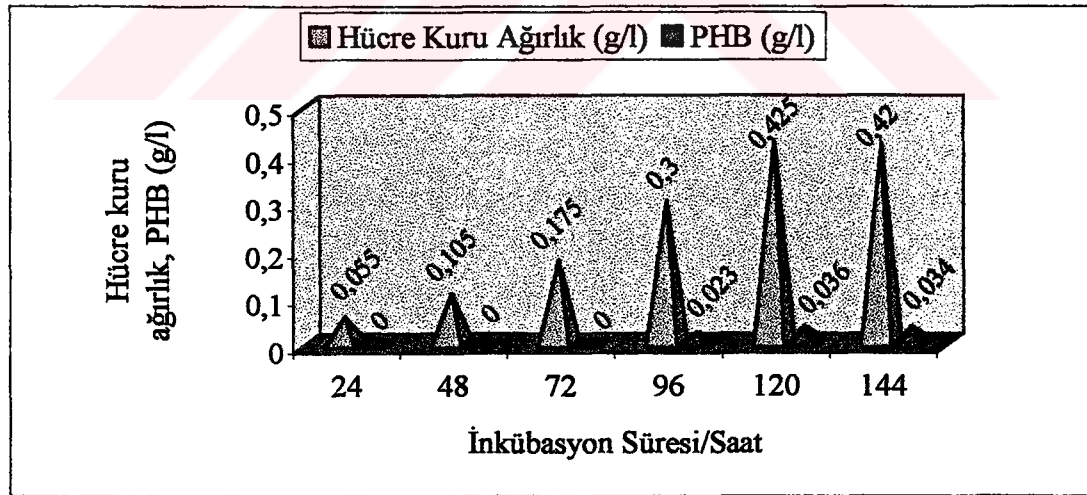
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,105 ± 0,015             | 0,008 ± 0,002 | 7,62         | 0,20                     | 7,51             |
| 48 Saat           | 0,155 ± 0,005             | 0,026 ± 0,002 | 16,77        | 0,31                     | 7,88             |
| 72 Saat           | 0,205 ± 0,035             | 0,044 ± 0,006 | 21,46        | 0,35                     | 7,81             |
| 96 Saat           | 0,380 ± 0,006             | 0,066 ± 0,002 | 17,37        | 0,74                     | 7,95             |
| 120 Saat          | 0,352 ± 0,007             | 0,069 ± 0,001 | 19,60        | 0,68                     | 7,98             |
| 144 Saat          | 0,295 ± 0,025             | 0,079 ± 0,018 | 26,78        | 0,65                     | 8,28             |



Şekil 4.23. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Proteaz Pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.24. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

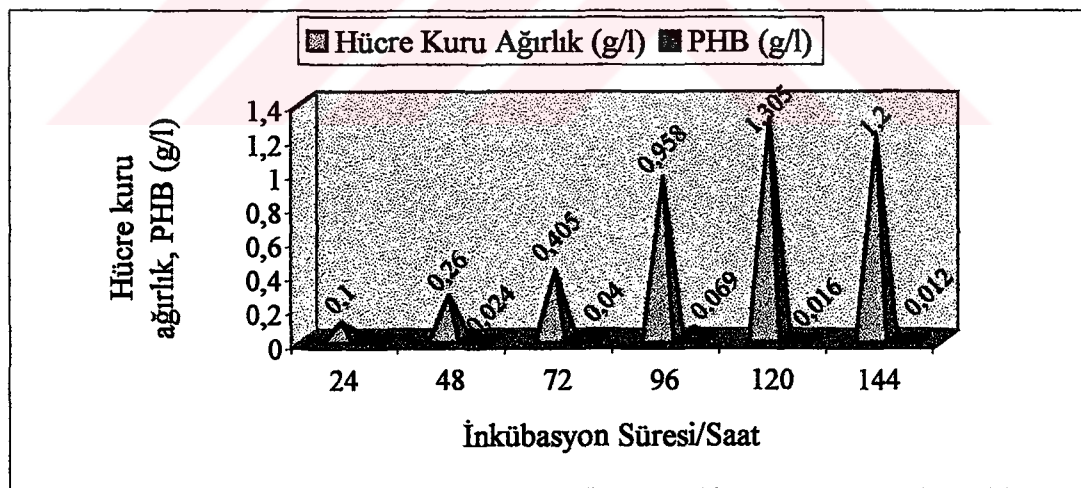
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,055 ± 0,005             | -             | -            | 0,13                     | 7,06             |
| 48 Saat           | 0,105 ± 0,005             | -             | -            | 0,20                     | 7,30             |
| 72 Saat           | 0,175 ± 0,025             | -             | -            | 0,23                     | 8,23             |
| 96 Saat           | 0,300 ± 0,050             | 0,023 ± 0,014 | 7,67         | 0,65                     | 8,83             |
| 120 Saat          | 0,425 ± 0,055             | 0,036 ± 0,005 | 8,47         | 0,87                     | 8,45             |
| 144 Saat          | 0,420 ± 0,050             | 0,034 ± 0,000 | 8,10         | 0,93                     | 8,00             |



Şekil 4.24. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.25. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

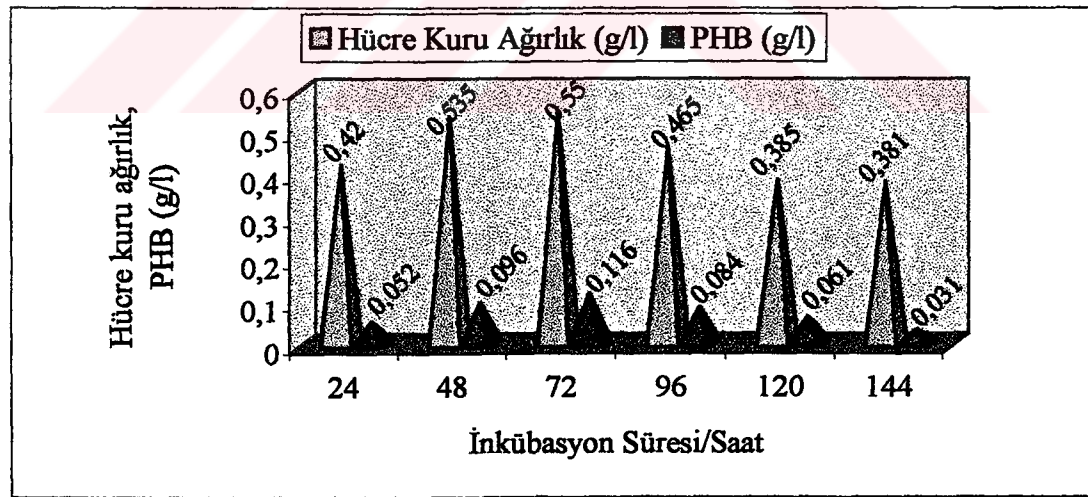
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,100 ± 0,000             | -             | -            | 0,40                     | 6,90             |
| 48 Saat           | 0,260 ± 0,060             | 0,024 ± 0,000 | 9,23         | 0,63                     | 7,35             |
| 72 Saat           | 0,405 ± 0,025             | 0,040 ± 0,005 | 9,88         | 0,50                     | 7,62             |
| 96 Saat           | 0,958 ± 0,012             | 0,069 ± 0,003 | 7,20         | 0,98                     | 7,65             |
| 120 Saat          | 1,305 ± 0,025             | 0,016 ± 0,001 | 1,23         | 2,25                     | 7,37             |
| 144 Saat          | 1,200 ± 0,050             | 0,012 ± 0,001 | 1,0          | 2,00                     | 7,31             |



Şekil 4.25. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.26. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak Proteaz Pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

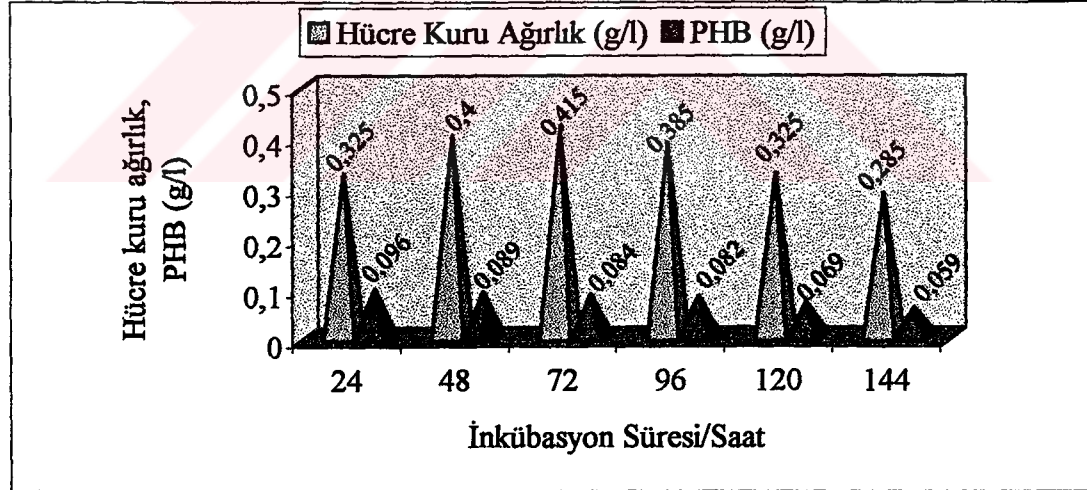
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,420 ± 0,040             | 0,052 ± 0,000 | 12,38        | 0,70                     | 6,71             |
| 48 Saat           | 0,535 ± 0,085             | 0,096 ± 0,001 | 17,94        | 1,00                     | 6,74             |
| 72 Saat           | 0,550 ± 0,040             | 0,116 ± 0,001 | 21,09        | 1,05                     | 6,91             |
| 96 Saat           | 0,465 ± 0,013             | 0,084 ± 0,015 | 18,06        | 0,96                     | 6,91             |
| 120 Saat          | 0,385 ± 0,025             | 0,061 ± 0,005 | 15,84        | 0,95                     | 6,92             |
| 144 Saat          | 0,381 ± 0,001             | 0,031 ± 0,001 | 8,14         | 0,63                     | 6,82             |



Şekil 4.26. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak Proteaz Pepton içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.27. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

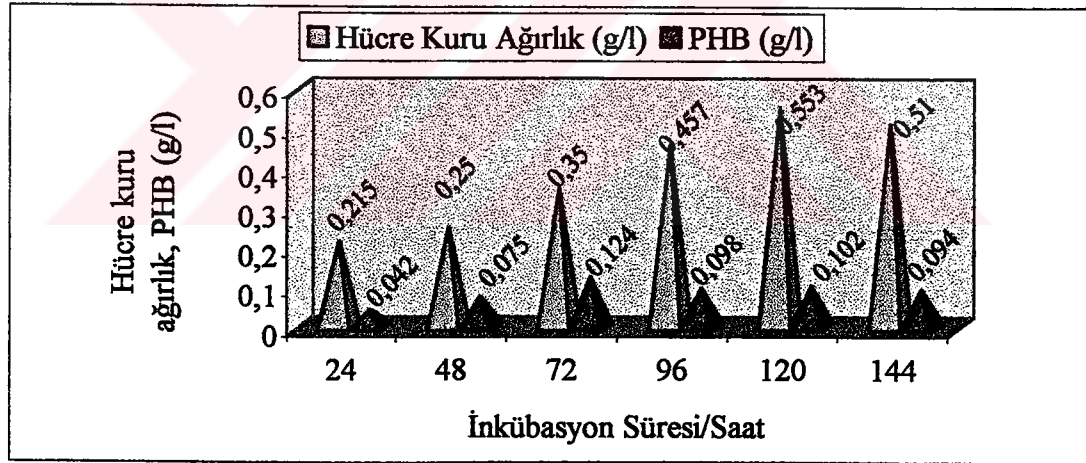
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,325 ± 0,015             | 0,096 ± 0,013 | 29,54        | 0,78                     | 7,76             |
| 48 Saat           | 0,400 ± 0,000             | 0,089 ± 0,007 | 22,25        | 1,13                     | 8,12             |
| 72 Saat           | 0,415 ± 0,025             | 0,084 ± 0,013 | 20,24        | 1,28                     | 8,30             |
| 96 Saat           | 0,385 ± 0,035             | 0,082 ± 0,020 | 21,30        | 1,05                     | 8,49             |
| 120 Saat          | 0,325 ± 0,005             | 0,069 ± 0,006 | 21,23        | 0,95                     | 8,60             |
| 144 Saat          | 0,285 ± 0,085             | 0,059 ± 0,003 | 20,70        | 0,78                     | 7,20             |



Şekil 4.27. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak Glisin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.28. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

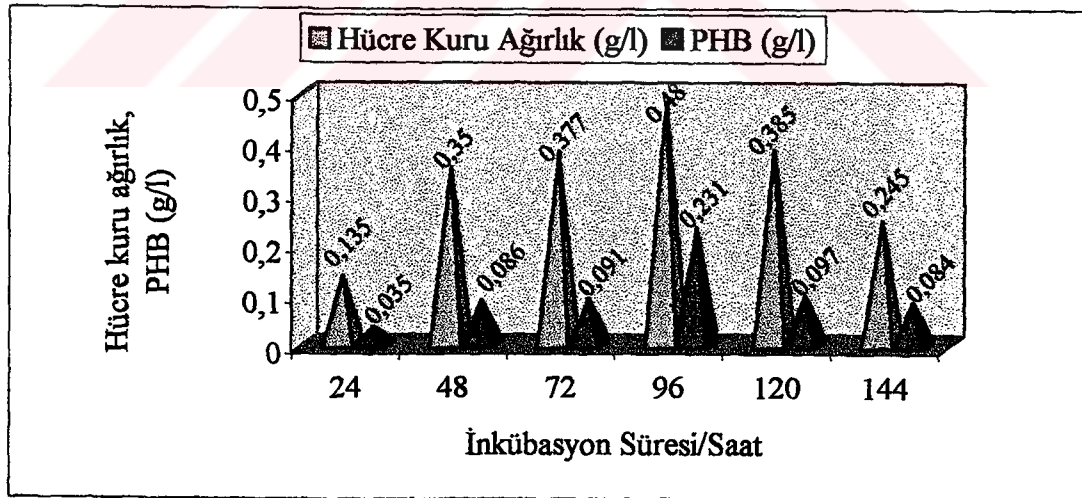
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,215 ± 0,035             | 0,042 ± 0,006 | 19,53        | 0,50                     | 6,53             |
| 48 Saat           | 0,250 ± 0,030             | 0,075 ± 0,012 | 30,00        | 0,60                     | 6,57             |
| 72 Saat           | 0,350 ± 0,000             | 0,124 ± 0,000 | 35,43        | 0,78                     | 6,60             |
| 96 Saat           | 0,457 ± 0,007             | 0,098 ± 0,009 | 21,44        | 0,93                     | 6,79             |
| 120 Saat          | 0,553 ± 0,001             | 0,102 ± 0,010 | 18,44        | 1,30                     | 6,81             |
| 144 Saat          | 0,510 ± 0,040             | 0,094 ± 0,004 | 18,43        | 1,00                     | 6,42             |



Şekil 4.28. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

Çizelge 4.29. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,135 ± 0,015             | 0,035 ± 0,004 | 25,93        | 0,68                     | 6,75             |
| 48 Saat           | 0,350 ± 0,120             | 0,086 ± 0,020 | 24,57        | 1,25                     | 7,32             |
| 72 Saat           | 0,377 ± 0,003             | 0,091 ± 0,002 | 24,14        | 1,30                     | 7,52             |
| 96 Saat           | 0,480 ± 0,170             | 0,231 ± 0,001 | 48,13        | 1,48                     | 7,65             |
| 120 Saat          | 0,385 ± 0,115             | 0,097 ± 0,013 | 25,19        | 1,50                     | 7,67             |
| 144 Saat          | 0,245 ± 0,015             | 0,084 ± 0,001 | 34,29        | 0,90                     | 8,31             |



Şekil 4.29. *Rhizobium viciae* F111'in azot kaynağı olarak Asparajin içeren besi ortamında hücre kuru ağırlığı ile PHB üretim histogramı

#### 4. 7. Kombine Besiyerinde PHB Üretimi

*R. meliloti* Y11, *B. japonicum* S Irat Fab ve *R. viciae* F111 suşlarının maksimum PHB ürettikleri karbon ve azot kaynakları seçilip, bunlardan oluşan farklı kombine besi ortamları hazırlanmıştır.

Bu amaçla YEM besiyerindeki karbon kaynağı olan mannitol, azot kaynakları olan tripton ve pepton çıkarılmış, yerine her suşun maksimum PHB verimine sahip olduğu karbon ve azot kaynağı ilave edilerek kombine besi ortamı oluşturulmuştur. Her bakterinin kendine ait bu kompleks besi ortamındaki PHB üretim yeteneği araştırılmıştır.

Karbon kaynağı olarak glukoz ve azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren kombine besi ortamında *R. meliloti* Y11 suşun farklı sürelerde PHB verimi %4,45-38,64 arasında değiştiği bulunmuştur. Bakteride maksimum (%38,64) PHB üretimi, 48. saat inkübasyonda tespit edilmiştir. Kombine besi ortamında hücrede depo edilen PHB içeriğinin ve yüzde verimin 48 saat inkübasyondan sonra azaldığı da gözlenmiştir (Çizelge 4.30, Şekil 4.30).

*B. japonicum* S Irat Fab suşun da *R. meliloti* Y11 suşu gibi glukoz ve proteaz pepton kaynaklı besi ortamlarında yüksek PHB ürettiği bulunmuştur. Bakterinin, karbon kaynağı olarak glukoz içeren besi ortamında %34,31 ve azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besiyerinde %26,78 oranında PHB ürettiği tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.11, Şekil 4.11 ve Çizelge 4.23, Şekil 4.23). Bakteri, glukoz ve proteaz peptondan oluşturulan kombine besi ortamında geliştirildiğinde, PHB verimin %2,5-48,24 arasında olduğu bulunmuştur. Maksimum %48,24 PHB verimi, bakterinin 120. saat inkübasyonundan elde edilmiştir (Çizelge 4.31, Şekil 4.31).

*R. viciae* F111 suşunda en yüksek PHB verimi, karbon kaynağı olarak mannitol (%41,22) ve azot kaynağı olarak asparajin (%48,13) içeren besi ortamlarında bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.14, Şekil 4.14 ve Çizelge 4.29, Şekil 4.29). Mannitol ve asparajinden oluşturulan kombine besiyerinde geliştirilen bakterinin PHB üretimi az

bulunmuştur. Bakteri 96. saat inkübasyonda maksimum %38,79 oranında PHB üretmiştir (Çizelge 4.32, Şekil 4.32).

Ayrıca denemelerde, *R. meliloti* Y11 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşlarının Mannitol+Asparajin, *R. viciae* F111 suşunun da Glukoz+Proteaz pepton içeren besi ortamlarındaki PHB üretimleri de araştırılmıştır.

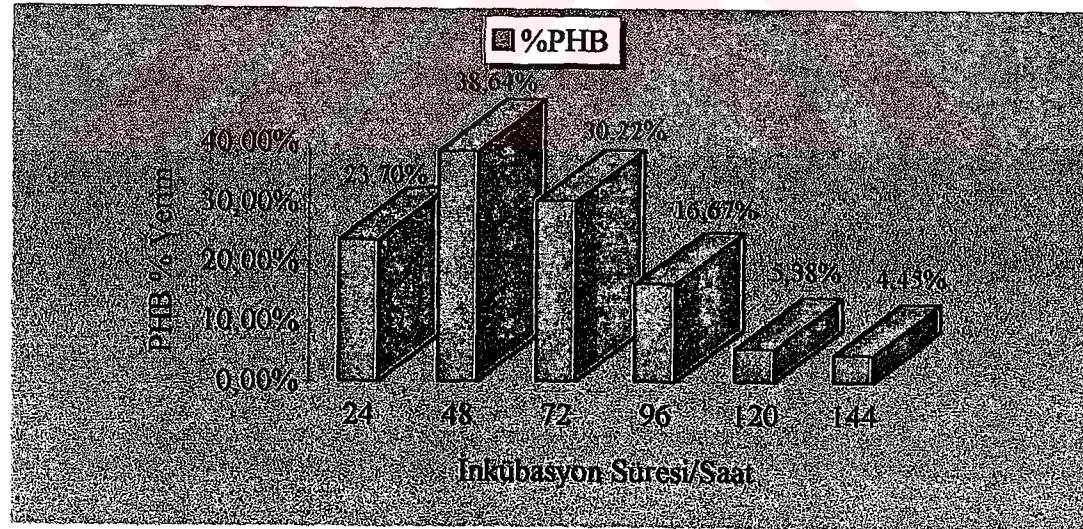
Mannitol+Asparajin ortamında geliştirilen *R. meliloti* Y11 suşunun PHB üretimi ve histogramı Çizelge 4.33 ve Şekil 4.33'te verilmiştir. Bu besi ortamında bakterinin farklı sürelerde PHB üretimi %20,17-41,25 arasında bulunmuştur. Bakteri maksimum (%41,25) PHB üretimini 72. saat inkübasyonda gerçekleştirmiştir. Bakteri, bu besi ortamında Glukoz+Proteaz pepton besiyerine kıyasla daha yüksek miktarda PHB üretmiştir. Glukoz+Proteaz pepton besiyerinde en yüksek PHB verimi %38,64 olarak tespit edilirken (Bkz. Çizelge 4.30, Şekil 4.30), Mannitol+Asparajin'de PHB verimin %41,25'e yükseldiği bulunmuştur (Çizelge 4.33, Şekil 4.33).

*B. japonicum* S Irat Fab suşun Mannitol+Asparajin kombine besi ortamındaki PHB üretimi ve histogramı Çizelge 4.34 ve Şekil 4.34'de verilmiştir. Bakteri bu ortamda, %1,14-13,37 arasında PHB üretmiştir. Bakterinin PHB üretimi Glukoz+Proteaz pepton besi ortamıyla karşılaştırıldığında daha düşük olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.31, Şekil 4.31). Glukoz+proteaz pepton içerikli besi ortamında bakterinin hücre kuru ağırlığının %48,24'ü PHB olarak tespit edilirken, Mannitol+Asparajin besiyerinde maksimum PHB verimin %13,37 olduğu gözlenmiştir.

*R. meliloti* F111 suşun, glukoz ve proteaz peptondan oluşan besi ortamındaki PHB üretimi ve yüzde verimi Çizelge 4.35'te verilmiştir. Bakteri bu besiyerinde %14,29-25,81 arasında PHB üretmiştir. F111 suşu maksimum (%25,81) PHB verimini 120. saat inkübasyonda gerçekleştirmiştir. Bakteri bu besiyerinde Mannitol+Asparajin içeren besiyerine kıyasla daha az PHB üretmiştir.

Çizelge 4.30. *Rhizobium meliloti* Y11'in Glukoz+Proteaz Pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

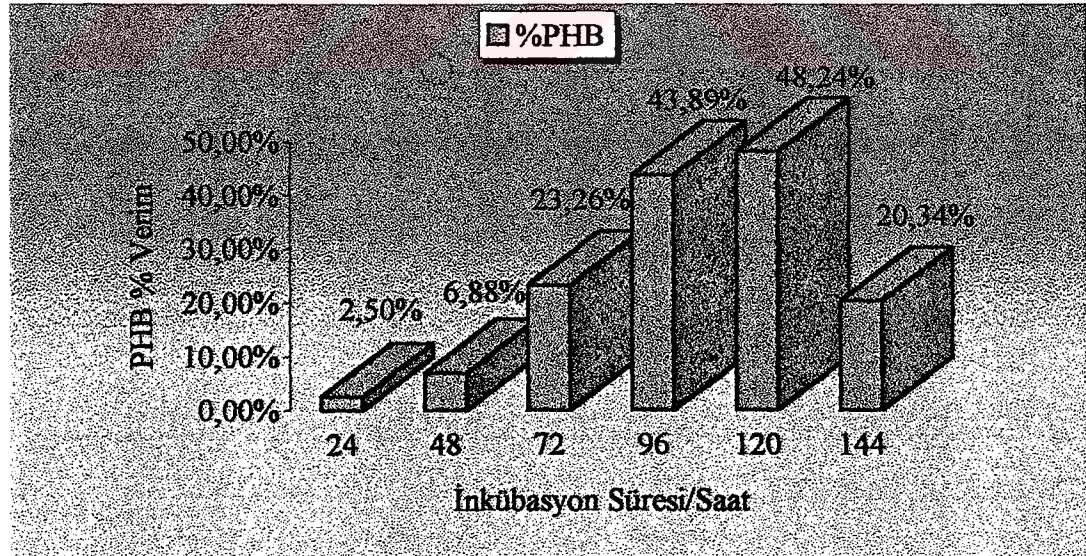
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,135 ± 0,015             | 0,032 ± 0,014 | 23,70        | 0,30                     | 6,88             |
| 48 Saat           | 0,220 ± 0,000             | 0,085 ± 0,002 | 38,64        | 0,48                     | 7,20             |
| 72 Saat           | 0,225 ± 0,005             | 0,068 ± 0,001 | 30,22        | 0,53                     | 7,24             |
| 96 Saat           | 0,240 ± 0,010             | 0,040 ± 0,020 | 16,67        | 0,58                     | 7,19             |
| 120 Saat          | 0,390 ± 0,080             | 0,021 ± 0,003 | 5,38         | 0,73                     | 7,14             |
| 144 Saat          | 0,382 ± 0,005             | 0,017 ± 0,001 | 4,45         | 0,69                     | 7,21             |



Şekil 4.30. *Rhizobium meliloti* Y11'in Glukoz+Proteaz Pepton içerikli kombine besi ortamında farklı sürelerde PHB üretim histogramı

Çizelge 4.31. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın Glukoz+Proteaz Pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

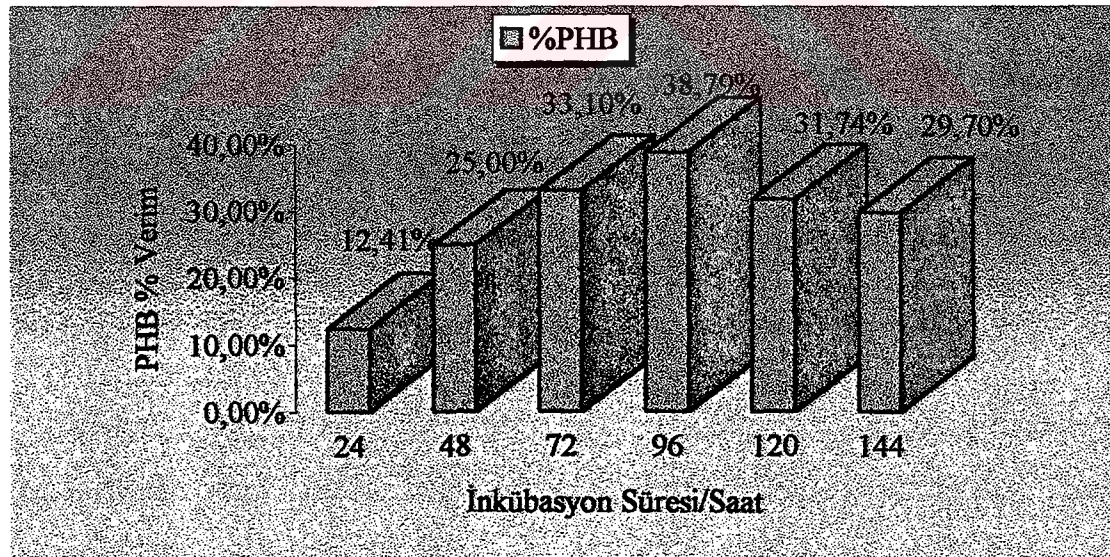
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,120 ± 0,002             | 0,003 ± 0,001 | 2,50         | 0,23                     | 6,97             |
| 48 Saat           | 0,160 ± 0,010             | 0,011 ± 0,001 | 6,88         | 0,33                     | 7,04             |
| 72 Saat           | 0,215 ± 0,035             | 0,050 ± 0,000 | 23,26        | 0,67                     | 7,19             |
| 96 Saat           | 0,360 ± 0,080             | 0,158 ± 0,006 | 43,89        | 0,83                     | 7,37             |
| 120 Saat          | 0,340 ± 0,050             | 0,164 ± 0,003 | 48,24        | 0,78                     | 7,49             |
| 144 Saat          | 0,295 ± 0,025             | 0,060 ± 0,001 | 20,34        | 0,70                     | 7,25             |



Şekil 4.31. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın Glukoz+Proteaz Pepton içerikli kombine besi ortamında farklı sürelerde PHB üretim histogramı

Çizelge 4.32. *Rhizobium viciae* F111'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

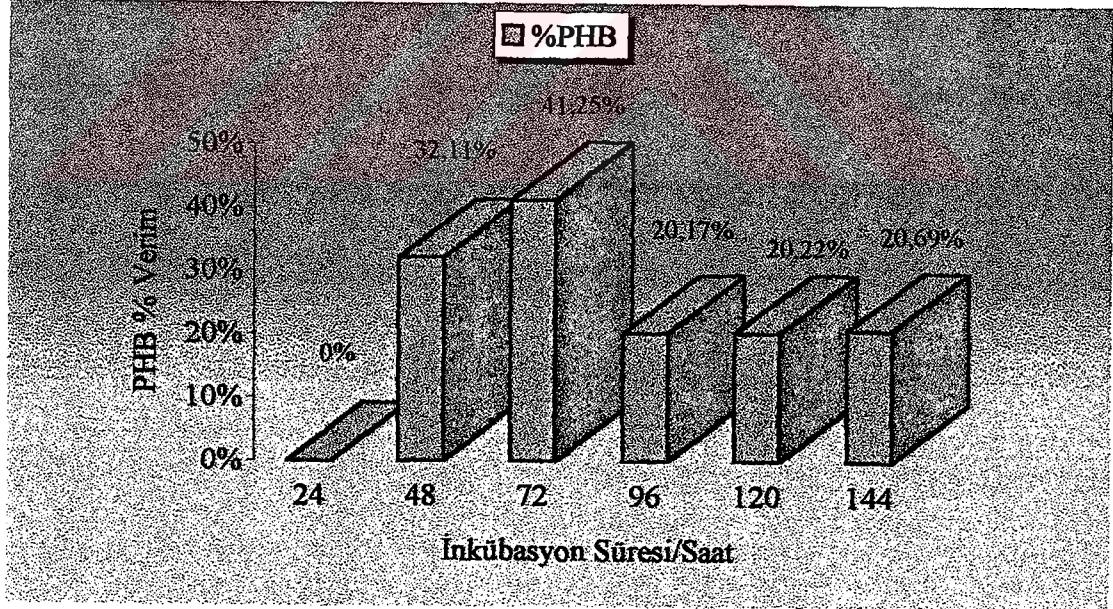
| Inkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,145 ± 0,005             | 0,018 ± 0,001 | 12,41        | 0,38                     | 6,79             |
| 48 Saat           | 0,260 ± 0,020             | 0,065 ± 0,002 | 25,00        | 0,55                     | 7,03             |
| 72 Saat           | 0,290 ± 0,010             | 0,096 ± 0,004 | 33,10        | 0,73                     | 7,17             |
| 96 Saat           | 0,330 ± 0,020             | 0,128 ± 0,004 | 38,79        | 0,90                     | 7,44             |
| 120 Saat          | 0,230 ± 0,020             | 0,073 ± 0,001 | 31,74        | 0,88                     | 8,05             |
| 144 Saat          | 0,165 ± 0,015             | 0,049 ± 0,003 | 29,70        | 0,48                     | 8,11             |



Şekil 4.32. *Rhizobium viciae* F111'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında farklı sürelerde PHB üretim histogramı

Çizelge 4.33. *Rhizobium meliloti* Y11'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

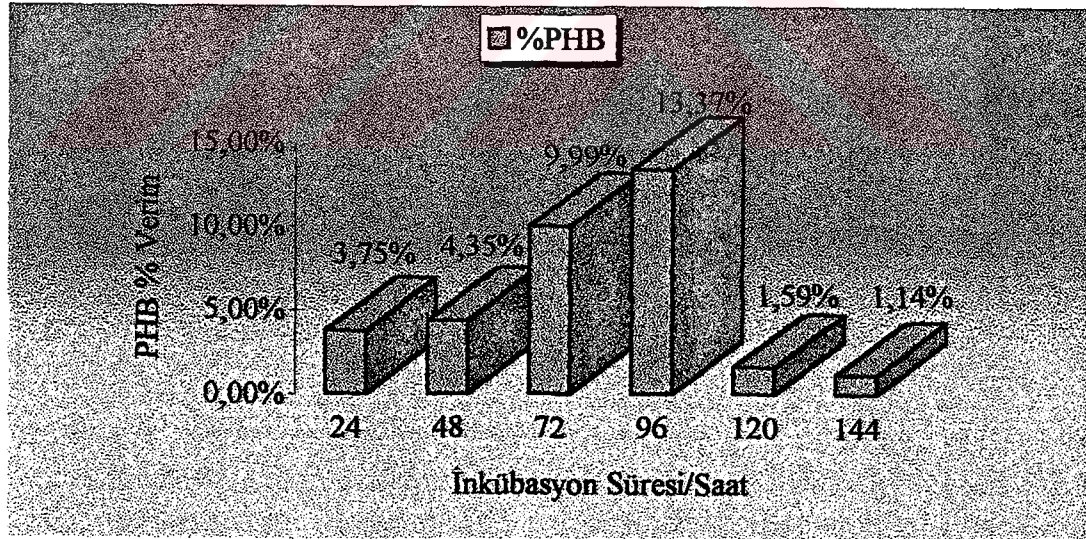
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,095 ± 0,005             | -             | -            | 0,35                     | 6,55             |
| 48 Saat           | 0,380 ± 0,050             | 0,122 ± 0,019 | 32,11        | 0,98                     | 7,54             |
| 72 Saat           | 0,497 ± 0,003             | 0,205 ± 0,015 | 41,25        | 1,30                     | 8,52             |
| 96 Saat           | 0,481 ± 0,002             | 0,097 ± 0,003 | 20,17        | 0,90                     | 8,36             |
| 120 Saat          | 0,465 ± 0,095             | 0,094 ± 0,042 | 20,22        | 0,48                     | 8,20             |
| 144 Saat          | 0,290 ± 0,000             | 0,060 ± 0,017 | 20,69        | 0,40                     | 8,21             |



Şekil 4.33. *Rhizobium meliloti* Y11'in Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre farklı sürelerde PHB üretim histogramı

Çizelge 4.34. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

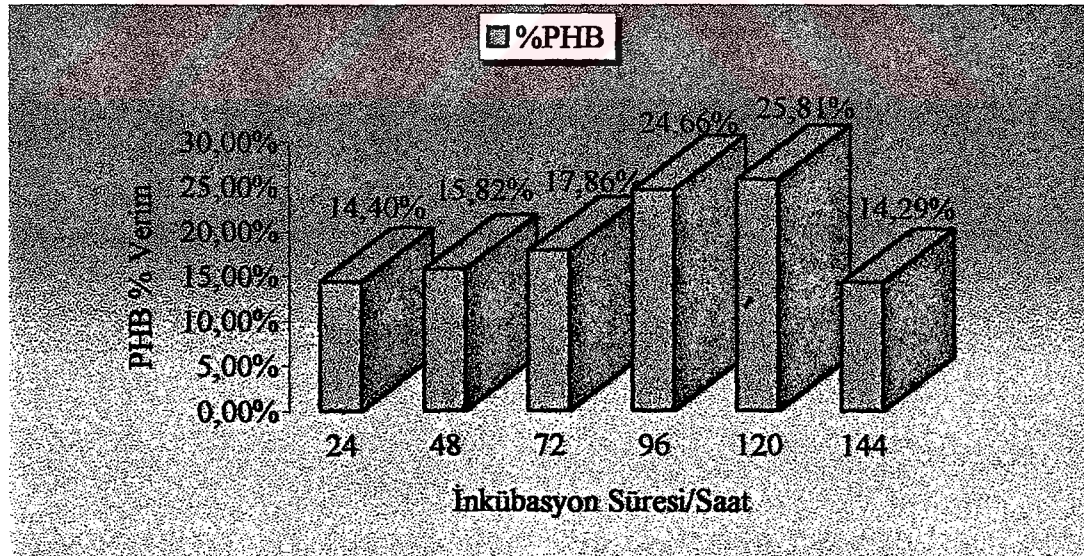
| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,160 ± 0,040             | 0,006 ± 0,004 | 3,75         | 0,25                     | 7,35             |
| 48 Saat           | 0,735 ± 0,055             | 0,032 ± 0,002 | 4,35         | 1,05                     | 7,46             |
| 72 Saat           | 0,821 ± 0,009             | 0,082 ± 0,005 | 9,99         | 1,30                     | 7,58             |
| 96 Saat           | 0,965 ± 0,035             | 0,129 ± 0,024 | 13,37        | 1,38                     | 7,43             |
| 120 Saat          | 1,135 ± 0,045             | 0,018 ± 0,001 | 1,59         | 2,10                     | 7,10             |
| 144 Saat          | 0,967 ± 0,078             | 0,011 ± 0,002 | 1,14         | 1,60                     | 7,10             |



Şekil 4.34. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın Mannitol+Asparajin içerikli kombine besi ortamında farklı sürelerde PHB üretim histogramı

Çizelge 4.35. *Rhizobium viciae* F111'in Glukoz+Proteaz Pepton içerikli kombine besi ortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

| İnkübasyon süresi | Hücre Kuru Ağırlığı (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|-------------------|---------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| 24 Saat           | 0,125 ± 0,015             | 0,018 ± 0,013 | 14,40        | 0,35                     | 6,82             |
| 48 Saat           | 0,335 ± 0,025             | 0,053 ± 0,025 | 15,82        | 0,69                     | 7,05             |
| 72 Saat           | 0,571 ± 0,009             | 0,102 ± 0,001 | 17,86        | 1,50                     | 7,59             |
| 96 Saat           | 0,365 ± 0,005             | 0,090 ± 0,022 | 24,66        | 0,98                     | 7,42             |
| 120 Saat          | 0,310 ± 0,030             | 0,080 ± 0,014 | 25,81        | 0,79                     | 7,29             |
| 144 Saat          | 0,259 ± 0,010             | 0,037 ± 0,001 | 14,29        | 0,62                     | 7,12             |



Şekil 4. 35. *Rhizobium viciae* F111'in Glukoz+Proteaz Pepton içerikli kombine besi ortamında farklı sürelerde PHB üretim histogramı

#### 4. 8. Farklı Sodyum Klorür Miktarlarının PHB Üretimine Etkisi

Farklı NaCl miktarının *R. meliloti* Y11, *B. japonicum* S Irat Fab ve *R. viciae* F111 suşlarının PHB üretimine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla YEM besiyerine 0,2; 0,25; 0,5; 1,0 ve 2,0 g/l NaCl ilave edilmiştir. Bakterilerin PHB üretimleri metotta anlatıldığı gibi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.36 ve Şekil 4. 36'da verilmiştir.

*R. meliloti* Y11 suşu 0,2 g/l NaCl'de maksimum (%10,94), 2 g/l NaCl'de ise minimum (%6,44) oranda PHB üretmiştir. Bakterideki PHB veriminin sodyum klorür miktarındaki artışa bağlı olarak azalma gösterdiği belirlenmiştir.

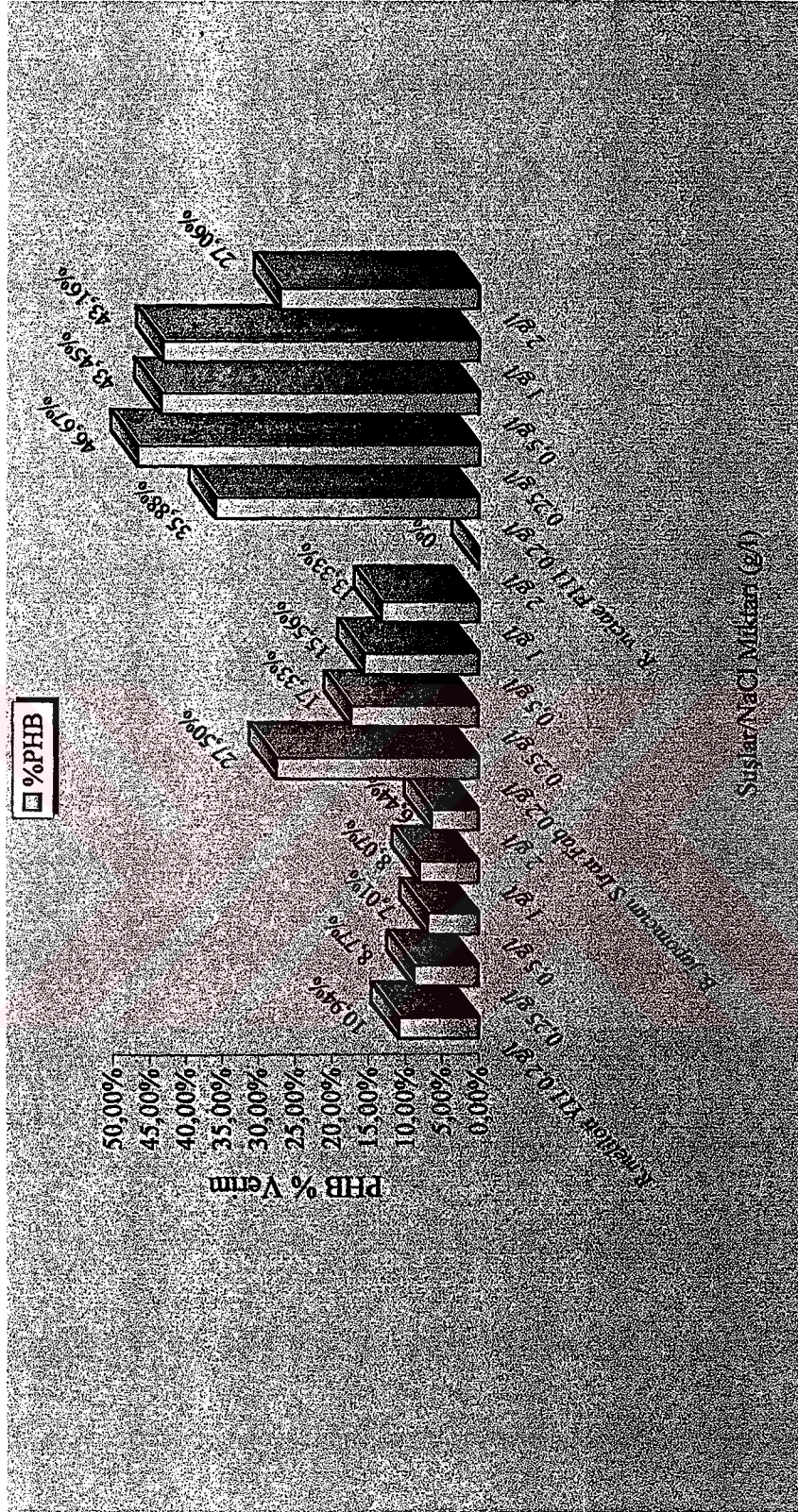
*B. japonicum* S Irat Fab suşunda 0,2 g/l sodyum klorür ortamında en yüksek (%27,5) PHB verimine ulaşılırken; 2,0 g/l NaCl'de bakterinin PHB üretmediği gözlenmiştir. Bakteri 0,25 g/l NaCl'de %17,33 PHB verimi gösterirken, 0,5 ve 1,0 g/l NaCl'de PHB verimi sırasıyla %15,56 ve %13,33 olarak tespit edilmiştir.

*R. viciae* F111 suşu, farklı NaCl konsantrasyonlarında en iyi PHB üreten suş olmuştur. Bakteri, NaCl'ün 0,2 g/l miktarında %35,88; 0,25 g/l'de %46,67; 0,5 g/l'de %43,45 ve 1 g/l'de %43,16 oranında PHB üretmiştir. Minimum PHB üretimi, 2 g/l sodyum klorür içeren ortamda %27,06 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.36. *R. meliloti* Y11, *B. japonicum* S Irat Fab ve *R. viciae* F111'in farklı sodyum klorür miktarları içeren YEM sıvı besiyerinde hücre kuru ağırlıkları, PHB miktarları ve yüzde verimleri

| Suşlar                         | NaCl Miktarı (g/l) | Hücre Kuru Ağırlık (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) |
|--------------------------------|--------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| <i>R. meliloti</i> Y11         | 0,2                | 0,960 ± 0,060            | 0,105 ± 0,002 | 10,94        |
|                                | 0,25               | 1,095 ± 0,285            | 0,096 ± 0,007 | 8,77         |
|                                | 0,5                | 0,985 ± 0,065            | 0,069 ± 0,011 | 7,01         |
|                                | 1                  | 0,855 ± 0,005            | 0,069 ± 0,006 | 8,07         |
|                                | 2                  | 0,870 ± 0,060            | 0,056 ± 0,001 | 6,44         |
|                                | Kontrol            | 0,930 ± 0,030            | 0,365 ± 0,020 | 39,25        |
| <i>B. japonicum</i> S Irat Fab | 0,2                | 0,080 ± 0,000            | 0,022 ± 0,012 | 27,5         |
|                                | 0,25               | 0,075 ± 0,015            | 0,013 ± 0,001 | 17,33        |
|                                | 0,5                | 0,045 ± 0,005            | 0,007 ± 0,003 | 15,56        |
|                                | 1                  | 0,045 ± 0,005            | 0,006 ± 0,001 | 13,33        |
|                                | 2                  | 0,040 ± 0,001            | -             | -            |
|                                | Kontrol            | 0,305 ± 0,005            | 0,105 ± 0,019 | 34,43        |
| <i>R. viciae</i> F111          | 0,2                | 0,170 ± 0,030            | 0,061 ± 0,009 | 35,88        |
|                                | 0,25               | 0,225 ± 0,035            | 0,105 ± 0,009 | 46,67        |
|                                | 0,5                | 0,145 ± 0,015            | 0,063 ± 0,019 | 43,45        |
|                                | 1                  | 0,095 ± 0,015            | 0,041 ± 0,018 | 43,16        |
|                                | 2                  | 0,085 ± 0,005            | 0,023 ± 0,001 | 27,06        |
|                                | Kontrol            | 0,275 ± 0,005            | 0,157 ± 0,012 | 57,09        |

- ; PHB yok.



Şekil 4.36. *Rhizobium meliloti* Y11, *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab ve *Rhizobium viciae* F111 suslarının farklı NaCl miktarları içeren YEM besiyerinde PHB yüzde verim histogramı

#### 4. 9. Mutasyon Uygulamaları

Mutasyon uygulamasının bakterilerin PHB üretimine etkisinin araştırılması amacıyla, yüksek PHB üreten suşlardan *R. meliloti* Y11 suşu seçilmiştir.

UV ışını uygulamasında Y11 suşuna ait muhtemel mutant suşlar, %96,67 oranında ölüm gösteren UV ışını uygulanan 1 dak. süreden izole edilmiştir. 2 dak. UV ışını uygulamasında, ölüm oranı %100 olarak tespit edilmiştir.

Kimyasal mutagen uygulamasında nitrosoguanidin, 5-bromourasil ve akriflavin kullanılmıştır.

Nitrosoguanidin mutagen uygulamasında, muhtemel mutantların seçiminde %99,27 ve üstünde ölüm oranı gösteren konsantrasyonlar kullanılmıştır. Muhtemel mutant suşlar, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml ve 70 µg/ml nitrosoguanidin konsantrasyonlarından seçilmiştir.

5-Bromourasil mutagen uygulamasında muhtemel mutantların seçimi, %98,42 ölüm oranı gösteren 60 µg/ml ve 70 µg/ml konsantrasyonlardan yapılmıştır.

Akriflavin mutagen uygulamasında ise muhtemel mutant suşların seçimi %99,90 oranında ölüm gösteren 20 µg/ml ve 40 µg/ml konsantrasyonlardan yapılmıştır. 50 µg/ml akriflavin konsantrasyonunda %100 oranında ölüm gerçekleşmiştir.

*R. meliloti* Y11 nolu suşun, kimyasal mutagenler arasında 5-Bromourasil mutagenine karşı daha dirençli olduğu gözlenmiştir.

UV ışınlanmasından 11 adet muhtemel mutant suş izole edilmiştir. Bu suşların 8'i çalışmalar sırasında kaybedilmiştir. Suşların PHB üretimleri metotta anlatıldığı gibi belirlenmiştir. I. ölçümde suşların PHB üretimleri %16-23,39 arasında tespit edilirken, bir yıl sonra yapılan II. PHB ölçümlerinde bu verimin %7,78-74,04

arasında artış gösterdiği bulunmuştur. Sa7 suşun bir yıl sonra hücrede %74,04 oranında PHB depoladığı ve atasal suştan daha yüksek PHB ürettiği gözlenmiştir (Çizelge 4.37, Şekil 4.37).

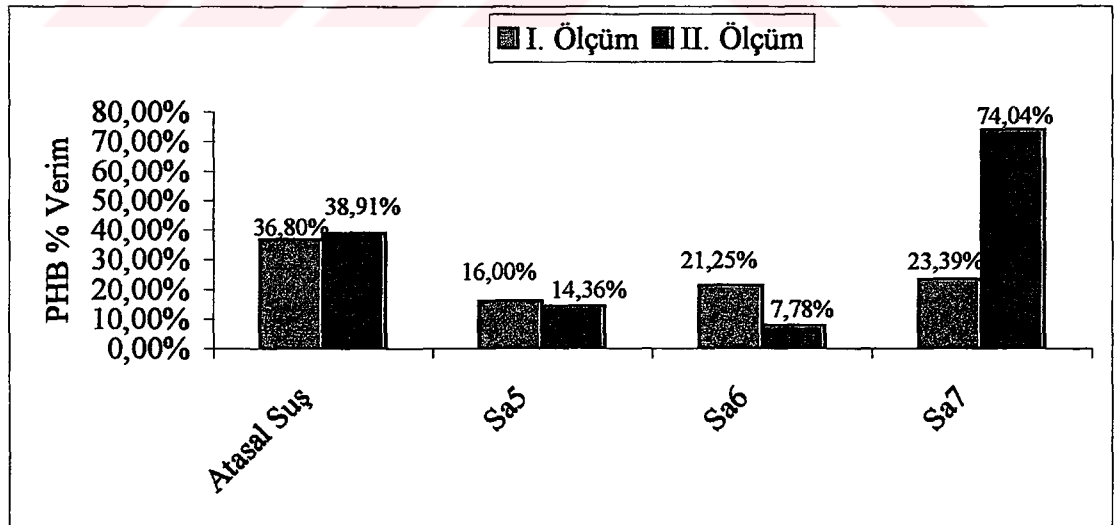
Akriflavin mutagen uygulamasından izole edilen üç adet muhtemel mutantların I. ölçümlerde PHB üretmedikleri, II. ölçümde ise bu suşların atasal suşa benzer miktarlarda PHB ürettikleri belirlenmiştir. Muhtemel mutant suşların PHB verimleri %22,67-39,64 arasında bulunmuştur (Çizelge 4.38, Şekil 4.38).

5-Bromourasil mutagen uygulamasından toplam 11 adet muhtemel mutant suş izole edilmiştir. Suşların I. ölçümdeki PHB verimi %2,96-23,91 iken, II. ölçümde bu verim %6,13-64,52 olarak tespit edilmiştir. Bir yıl sonra suşların PHB üretimlerinde bir artış olduğu gözlenmiştir. Bro5 suşunun atasal suşa göre daha yüksek PHB üretmesi (%64,52) dikkat çekmiştir (Çizelge 4.39, Şekil 4.39).

Nitrosoguanidin uygulamasından toplam 10 adet suş izole edilmiştir. Seçilen muhtemel mutant suşlar ilk PHB ölçümlerinde, atasal suşa kıyasla daha az PHB üretmiştir. Suşların PHB verimleri %0,62-7,5 arasında bulunmuştur. II. PHB ölçümünde, suşların PHB üretiminde artış gözlenmiştir. H8, H9 ve H10 nolu muhtemel mutant suşların PHB üretimleri, sırasıyla %45,58; %49,68 ve %57,25 oranında olduğu tespit edilmiştir. Suşların PHB verimleri atasal suşa kıyasla daha yüksek bulunmuştur (Çizelge 4.40, Şekil 4.40).

Çizelge 4.37. UV ışını uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm sonuçları

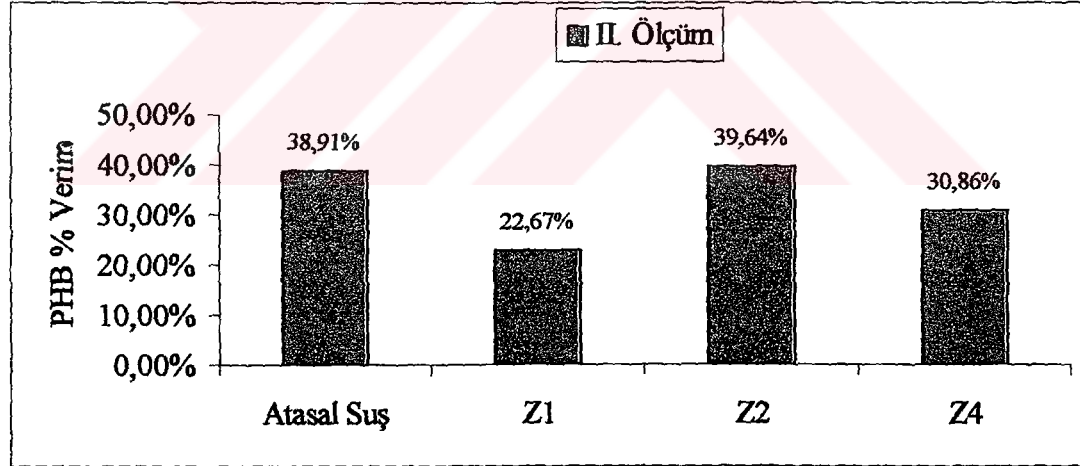
|           | Suşlar           | Hücre Kuru Ağırlık (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) |
|-----------|------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| I. ÖLÇÜM  | Atasal Suş (Y11) | 0,663 ± 0,047            | 0,244 ± 0,014 | 36,80        |
|           | Sa5              | 0,175 ± 0,015            | 0,028 ± 0,005 | 16,00        |
|           | Sa6              | 0,240 ± 0,020            | 0,051 ± 0,001 | 21,25        |
|           | Sa7              | 0,560 ± 0,160            | 0,131 ± 0,013 | 23,39        |
|           |                  |                          |               |              |
| II. ÖLÇÜM | Atasal Suş (Y11) | 0,239 ± 0,019            | 0,093 ± 0,018 | 38,91        |
|           | Sa5              | 0,195 ± 0,025            | 0,028 ± 0,011 | 14,36        |
|           | Sa6              | 0,360 ± 0,040            | 0,028 ± 0,014 | 7,78         |
|           | Sa7              | 0,235 ± 0,115            | 0,174 ± 0,008 | 74,04        |
|           |                  |                          |               |              |



Şekil 4.37. UV ışını uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ve atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm histogramı

Çizelge 4.38. Akriflavin mutagen uygulaması ile elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun II. PHB ölçüm sonuçları

|          | Suşlar           | Hücre Kuru Ağırlık (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) |
|----------|------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| II.ÖLÇÜM | Atasal Suş (Y11) | 0,239 ± 0,019            | 0,093 ± 0,018 | 38,91        |
|          | Z1 (20 µg/ml)    | 0,300 ± 0,010            | 0,068 ± 0,015 | 22,67        |
|          | Z2 (20 µg/ml)    | 0,275 ± 0,075            | 0,109 ± 0,000 | 39,64        |
|          | Z4 (40 µg/ml)    | 0,350 ± 0,040            | 0,108 ± 0,027 | 30,86        |



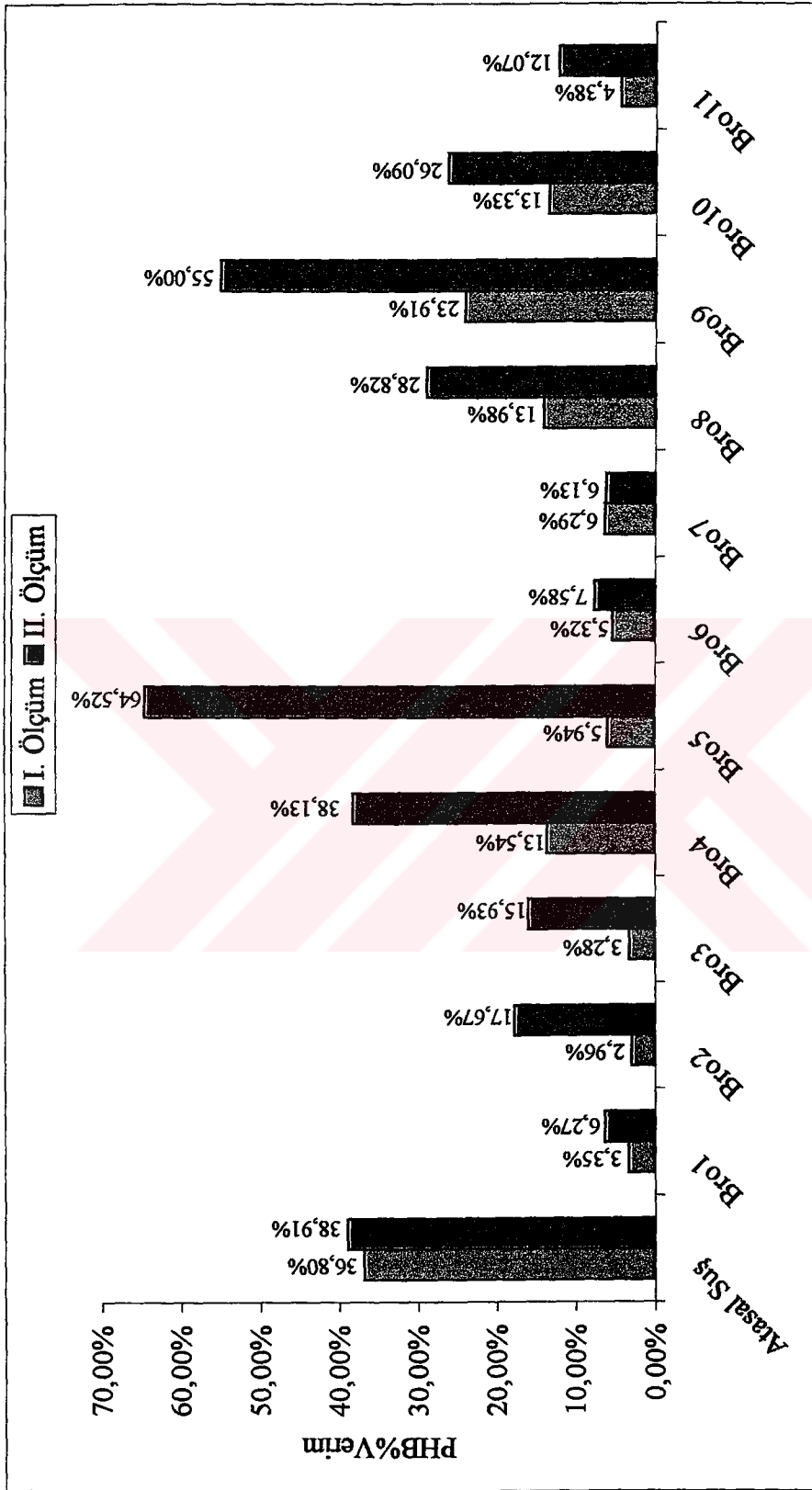
Şekil 4.38. Akriflavin mutagen uygulaması ile elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun II. PHB ölçüm histogramı

Çizelge 4.39. 5-Bromourasil mutagen uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm sonuçları

| I. ÖLÇÜM | Suşlar           | Hücre Kuru Ağırlık (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) |
|----------|------------------|--------------------------|---------------|--------------|
|          | Atasal Suş (Y11) | 0,663 ± 0,047            | 0,244 ± 0,014 | 36,80        |
|          | Bro1 (60 µg/ml)  | 0,955 ± 0,045            | 0,032 ± 0,001 | 3,35         |
|          | Bro2 (60 µg/ml)  | 0,270 ± 0,050            | 0,008 ± 0,005 | 2,96         |
|          | Bro3 (60 µg/ml)  | 0,335 ± 0,045            | 0,011 ± 0,007 | 3,28         |
|          | Bro4 (60 µg/ml)  | 0,325 ± 0,015            | 0,044 ± 0,001 | 13,54        |
|          | Bro5 (60 µg/ml)  | 0,320 ± 0,020            | 0,019 ± 0,003 | 5,94         |
|          | Bro6 (70 µg/ml)  | 0,545 ± 0,055            | 0,029 ± 0,014 | 5,32         |
|          | Bro7 (70 µg/ml)  | 1,225 ± 0,095            | 0,077 ± 0,012 | 6,29         |
|          | Bro8 (70 µg/ml)  | 0,565 ± 0,065            | 0,079 ± 0,005 | 13,98        |
|          | Bro9 (70 µg/ml)  | 0,435 ± 0,005            | 0,104 ± 0,001 | 23,91        |
|          | Bro10 (70 µg/ml) | 0,480 ± 0,000            | 0,064 ± 0,001 | 13,33        |
|          | Bro11 (70 µg/ml) | 1,665 ± 0,215            | 0,073 ± 0,025 | 4,38         |

Çizelge 4.39'un devamı. 5-Bromourasil mutagen uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm sonuçları

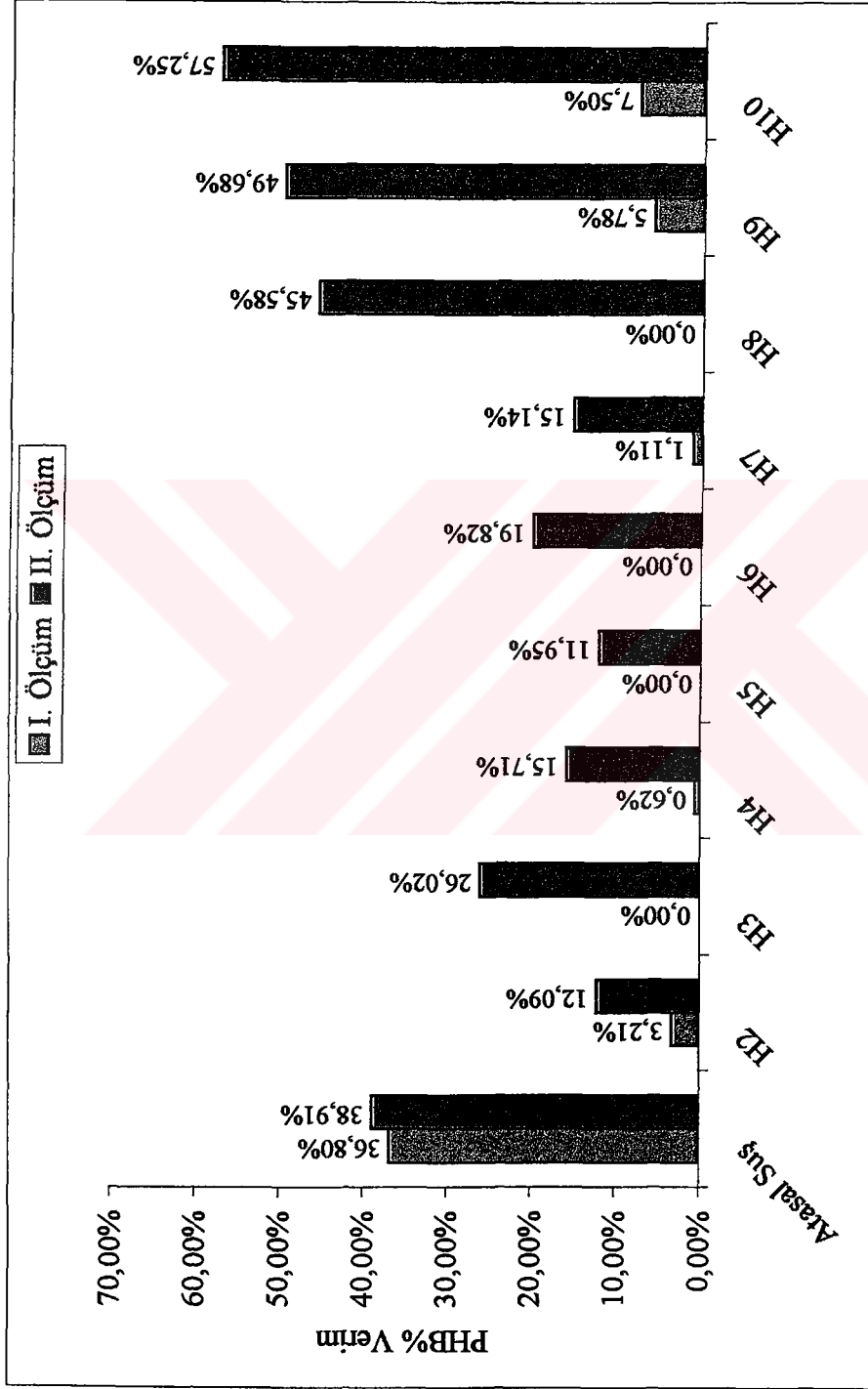
| II. ÖLÇÜM | Suşlar           | Hücre Kuru Ağırlık (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) |
|-----------|------------------|--------------------------|---------------|--------------|
|           | Atasal Suş (Y11) | 0,239 ± 0,019            | 0,093 ± 0,018 | 38,91        |
|           | Bro1 (60 µg/ml)  | 1,995 ± 0,375            | 0,125 ± 0,020 | 6,27         |
|           | Bro2 (60 µg/ml)  | 0,430 ± 0,010            | 0,076 ± 0,008 | 17,67        |
|           | Bro3 (60 µg/ml)  | 0,590 ± 0,030            | 0,094 ± 0,018 | 15,93        |
|           | Bro4 (60 µg/ml)  | 0,160 ± 0,050            | 0,061 ± 0,026 | 38,13        |
|           | Bro5 (60 µg/ml)  | 0,155 ± 0,025            | 0,100 ± 0,031 | 64,52        |
|           | Bro6 (70 µg/ml)  | 0,805 ± 0,045            | 0,061 ± 0,001 | 7,58         |
|           | Bro7 (70 µg/ml)  | 1,110 ± 0,010            | 0,068 ± 0,017 | 6,13         |
|           | Bro8 (70 µg/ml)  | 0,340 ± 0,000            | 0,098 ± 0,025 | 28,82        |
|           | Bro9 (70 µg/ml)  | 0,100 ± 0,020            | 0,055 ± 0,004 | 55,0         |
|           | Bro10 (70 µg/ml) | 0,115 ± 0,005            | 0,030 ± 0,002 | 26,09        |
|           | Bro11 (70 µg/ml) | 0,290 ± 0,030            | 0,035 ± 0,003 | 12,07        |



Şekil 4.39. 5-Bromourasil mutagen uygulaması ile elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm histogramı

Çizelge 4.40. Nitrosoguanidin mutagen uygulamasıyla elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasal suşun I. ve II. PHB ölçüm sonuçları

|           | Mutant Suşlar    | Hücre Kuru Ağırlık (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) |
|-----------|------------------|--------------------------|---------------|--------------|
| I. ÖLÇÜM  | Atasal Suş (Y11) | 0,663 ± 0,047            | 0,244 ± 0,014 | 36,80        |
|           | H2 (30 µg/ml)    | 0,280 ± 0,050            | 0,009 ± 0,006 | 3,21         |
|           | H4 (30 µg/ml)    | 0,975 ± 0,155            | 0,006 ± 0,002 | 0,62         |
|           | H7 (40 µg/ml)    | 3,435 ± 0,215            | 0,038 ± 0,012 | 1,11         |
|           | H9 (40 µg/ml)    | 0,225 ± 0,025            | 0,013 ± 0,001 | 5,78         |
|           | H10 (40 µg/ml)   | 0,200 ± 0,030            | 0,015 ± 0,005 | 7,50         |
| II. ÖLÇÜM | Atasal Suş (Y11) | 0,239 ± 0,019            | 0,093 ± 0,018 | 38,91        |
|           | H2 (30 µg/ml)    | 0,670 ± 0,016            | 0,081 ± 0,003 | 12,09        |
|           | H3 (30 µg/ml)    | 0,415 ± 0,005            | 0,108 ± 0,001 | 26,02        |
|           | H4 (30 µg/ml)    | 0,420 ± 0,190            | 0,066 ± 0,043 | 15,71        |
|           | H5 (30 µg/ml)    | 0,435 ± 0,015            | 0,052 ± 0,020 | 11,95        |
|           | H6 (40 µg/ml)    | 0,555 ± 0,035            | 0,110 ± 0,005 | 19,82        |
|           | H7 (40 µg/ml)    | 0,370 ± 0,150            | 0,056 ± 0,003 | 15,14        |
|           | H8 (40 µg/ml)    | 0,215 ± 0,005            | 0,098 ± 0,006 | 45,58        |
|           | H9 (40 µg/ml)    | 0,310 ± 0,040            | 0,154 ± 0,015 | 49,68        |
|           | H10 (40 µg/ml)   | 0,255 ± 0,005            | 0,146 ± 0,028 | 57,25        |



Şekil 4.40. Nitrosoguanidin mutagen uygulaması ile elde edilen muhtemel mutant suşlar ile atasıl suşun I. ve II. PHB ölçüm histogramı

#### 4.10. Melas Ortamında PHB Üretimi

Araştırmamızda kullanılan şeker pancarı melası Ankara Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Şeker pancarı melasın bileşimi Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Suşların %0,5; %1; %1,5 ve %2 melas konsantrasyonunda gelişim eğrileri çıkarılmıştır. Gelişmenin en iyi olduğu melas konsantrasyonlarında PHB üretimi tespit edilmiştir.

*R. meliloti* Y11 suşunun melasın farklı konsantrasyonlarındaki hücre yoğunluğu Çizelge 4.41 ve Şekil 4.41'de görülmektedir. Bakteri %0,5 melas konsantrasyonunda daha iyi gelişme göstermiştir (ortalama hücre yoğunluğu, 600 nm OD=1,2). Bakterinin bu konsantrasyonda PHB üretimi incelendiğinde, bakterinin ilk 24 saat inkübasyonunda PHB üretmediği gözlenmiştir. Bakterinin diğer inkübasyon sürelerinde %20,35-56,31 arasında PHB ürettiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.44, Şekil 4.44). Y11 suşun, PHB'yi inkübasyonun 48. saatinden itibaren hücrede depoladığı, 96. saat ve sonrasındaki inkübasyonda da kullandığı tespit edilmiştir. Bakteri en yüksek (%56,31) PHB üretimini 72. saat inkübasyonda gerçekleştirmiştir.

*B. japonicum* S Irat Fab suşun farklı melas konsantrasyonlarındaki hücre yoğunluğu Çizelge 4.42 ve Şekil 4.42'de görülmektedir. Bakteri, %1,5 melas konsantrasyonunda daha yüksek gelişim göstermiştir (ortalama hücre yoğunluğu, 600 nm OD=1,07). Bakterinin farklı sürelerde bu konsantrasyondaki PHB verimi %0,87-29,19 arasında bulunmuştur. Bakterinin, 48. saat inkübasyonda maksimum %29,19 oranında PHB ürettiği tespit edilmiştir. İnkübasyon süresinin artması ile bakterideki PHB üretim miktarının azaldığı saptanmıştır.

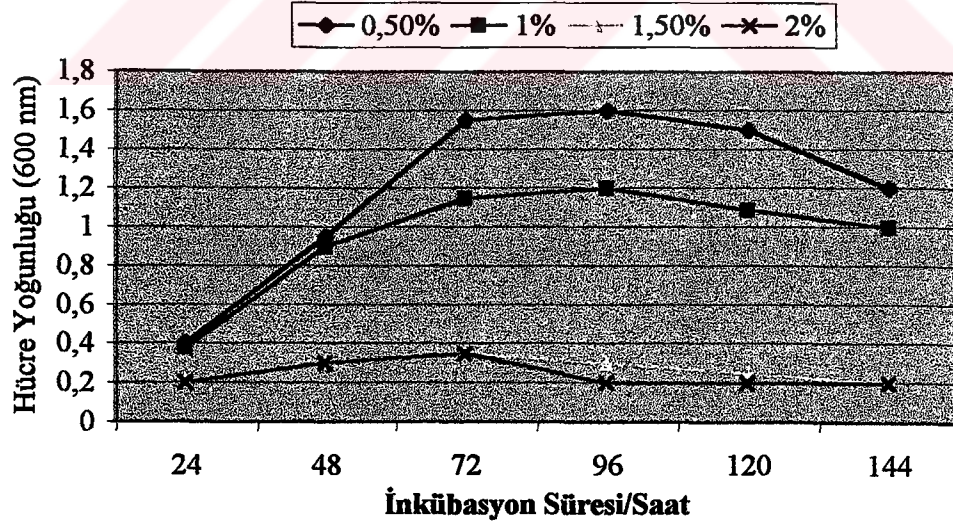
*R. viciae* F111 suşunun farklı melas konsantrasyonlarındaki hücre yoğunluğu Çizelge 4.43 ve Şekil 4.43'te verilmiştir. Suşun, %1 melas konsantrasyondaki hücre gelişiminin %0,5 ve %1,5 melas konsantrasyonlara kıyasla daha iyi olduğu belirlenmiştir. Bakteri, %2 melas konsantrasyonunda hücre gelişimi göstermemiştir. Hücre gelişimin en iyi olduğu %1 melas konsantrasyonunda, kültür ortamının

viskozitesi artmış ve ortam tamamen jelleşmiştir (ortalama hücre yoğunluğu, 600 nm OD=1,0). Ortam viskozitesinin artması hücrelerin santrifüjle çökmesini engellemiş, dolayısıyla bu konsantrasyonda PHB üretimi determine edilememiştir. Viskozitenin daha az olduğu %1,5 melas konsantrasyonunda PHB üretimi belirlenmiştir (ortalama hücre yoğunluğu, 600 nm OD=0,58). Bakteri bu konsantrasyonda ilk 24 saat inkübasyonda iyi gelişim göstermezken, ilerleyen inkübasyon sürelerinde az miktarda PHB sentezlediği gözlenmiştir. F111 suş bu konsantrasyonda maksimum (%23,33) oranında PHB üretmiştir (Çizelge 4.44, Şekil 4.44).



Çizelge 4.41. *Rhizobium meliloti* Y11'in farklı melas konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu

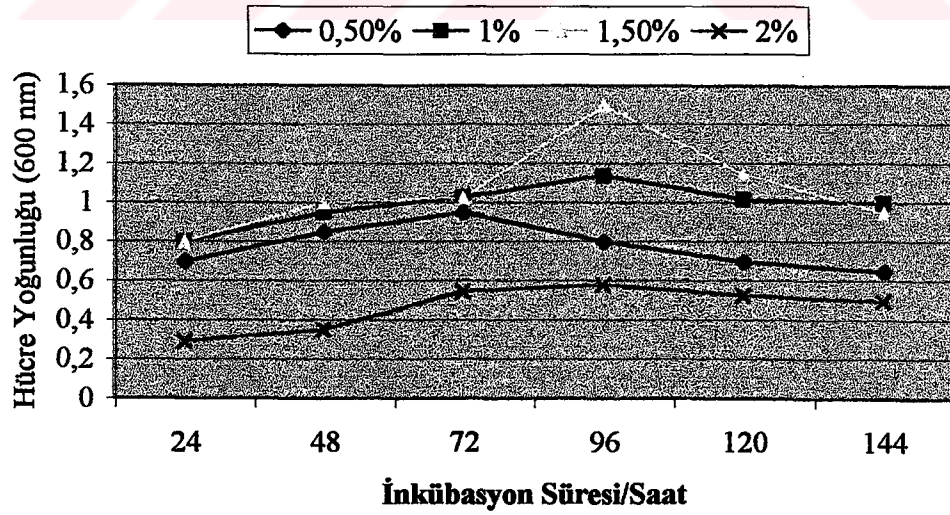
| İnkübasyon Süresi            | Farklı Melas Konsantrasyonları |      |      |      |
|------------------------------|--------------------------------|------|------|------|
|                              | %0,5                           | %1   | %1,5 | %2   |
| 24 Saat                      | 0,40                           | 0,38 | 0,21 | 0,20 |
| 48 Saat                      | 0,95                           | 0,90 | 0,30 | 0,30 |
| 72 Saat                      | 1,55                           | 1,15 | 0,35 | 0,35 |
| 96 Saat                      | 1,60                           | 1,20 | 0,30 | 0,20 |
| 120 Saat                     | 1,50                           | 1,09 | 0,25 | 0,20 |
| 144 Saat                     | 1,20                           | 1,00 | 0,20 | 0,20 |
| Ortalama Değer ( $\bar{x}$ ) | 1,20                           | 0,95 | 0,27 | 0,24 |



Şekil 4.41. Farklı melas konsantrasyonlarında *Rhizobium meliloti* Y11 suşun hücre gelişim eğrisi

Çizelge 4.42. *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab'ın farklı melas konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu

| İnkübasyon Süresi  | Farklı Melas Konsantrasyonları |      |      |      |
|--------------------|--------------------------------|------|------|------|
|                    | %0,5                           | %1   | %1,5 | %2   |
| 24 Saat            | 0,70                           | 0,80 | 0,80 | 0,29 |
| 48 Saat            | 0,85                           | 0,95 | 1,00 | 0,35 |
| 72 Saat            | 0,95                           | 1,03 | 1,03 | 0,55 |
| 96 Saat            | 0,80                           | 1,14 | 1,50 | 0,58 |
| 120 Saat           | 0,70                           | 1,02 | 1,15 | 0,53 |
| 144 Saat           | 0,65                           | 1,00 | 0,95 | 0,50 |
| Ortalama Değer (x) | 0,78                           | 0,99 | 1,07 | 0,47 |

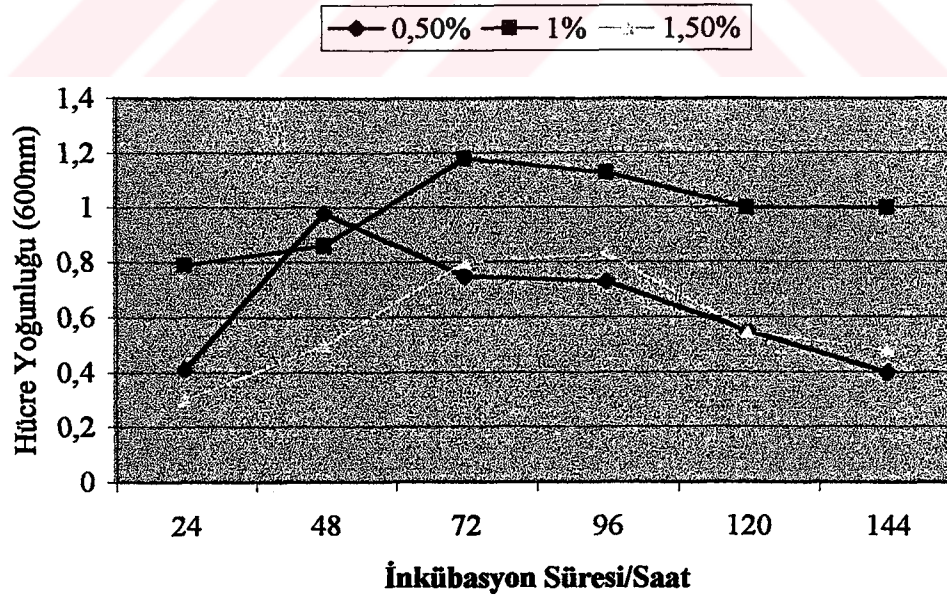


Şekil 4.42. Farklı melas konsantrasyonlarında *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab suşu hücre gelişim eğrisi

Çizelge 4.43. *Rhizobium viciae* F111'in farklı melas konsantrasyonlarında hücre yoğunluğu

| İnkübasyon Süresi  | Farklı Melas Konsantrasyonları |      |      |    |
|--------------------|--------------------------------|------|------|----|
|                    | %0,5                           | %1   | %1,5 | %2 |
| 24 Saat            | 0,41                           | 0,79 | 0,30 | -  |
| 48 Saat            | 0,98                           | 0,86 | 0,50 | -  |
| 72 Saat            | 0,75                           | 1,18 | 0,80 | -  |
| 96 Saat            | 0,73                           | 1,13 | 0,83 | -  |
| 120 Saat           | 0,55                           | 1,00 | 0,55 | -  |
| 144 Saat           | 0,40                           | 1,00 | 0,48 | -  |
| Ortalama Değer (x) | 0,64                           | 1,00 | 0,58 | -  |

-; Hücre gelişimi gözlenmedi

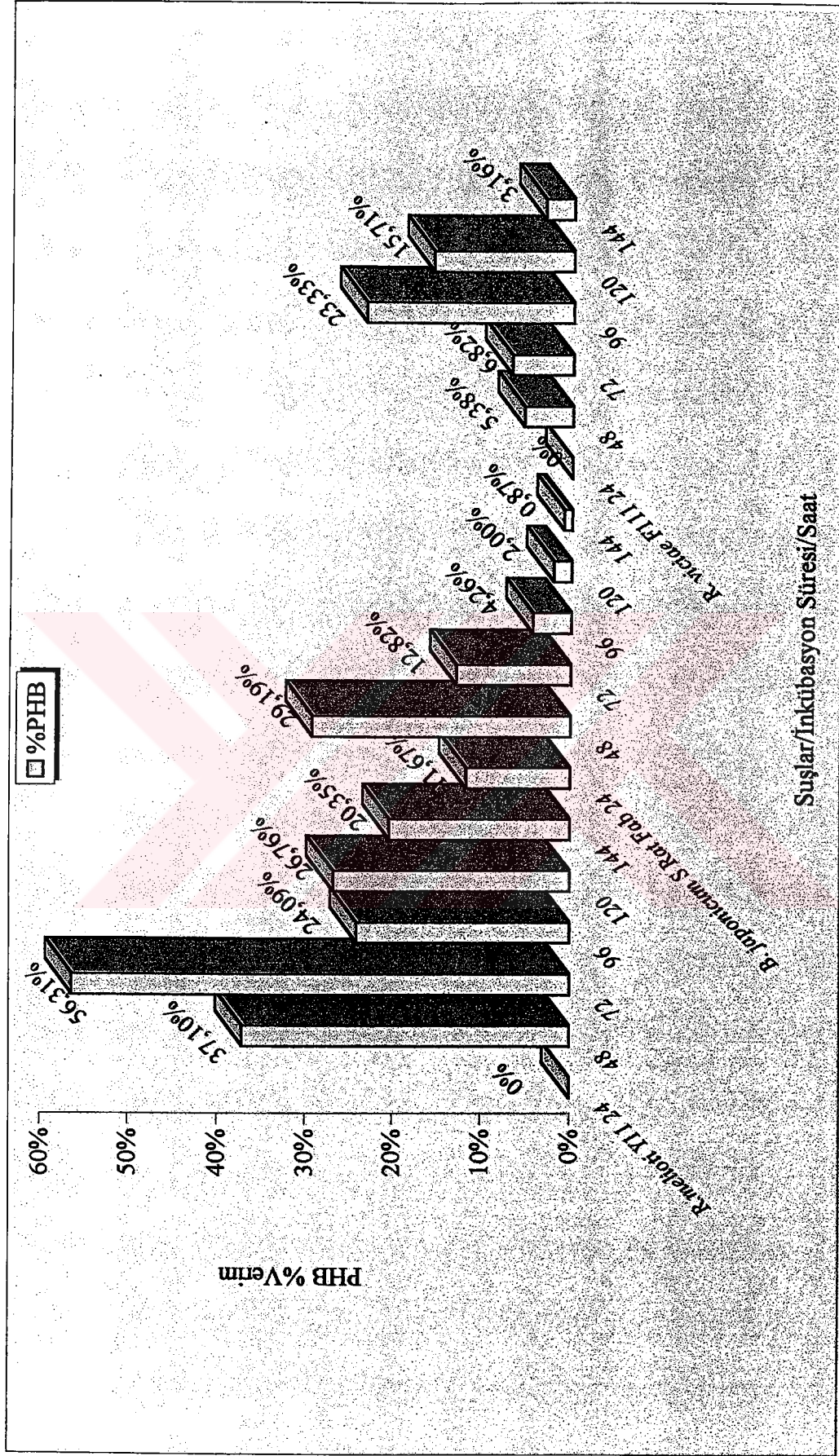


Şekil 4.43. Farklı melas konsantrasyonlarında *Rhizobium viciae* F111 suşunun hücre gelişim eğrisi

Çizelge 4.44. *R. melloti* Y11, *B. japonicum* S Irat Fab ve *R. viciae* F111'in melas ortamında hücre kuru ağırlıkları, PHB üretimleri ve yüzde verimleri

| Suşlar                         | İnkuvasyon Süresi | Hücre Kuru Ağırlık (g/l) | PHB (g/l)     | Verim (%PHB) | Hücre Yoğunluğu (600 nm) | Son Kültür pH'sı |
|--------------------------------|-------------------|--------------------------|---------------|--------------|--------------------------|------------------|
| <i>R. melloti</i> Y11          | 24 Saat           | 0,080 ± 0,000            | -             | -            | 0,35                     | 6,74             |
|                                | 48 Saat           | 0,310 ± 0,020            | 0,115 ± 0,014 | 37,10        | 0,98                     | 6,87             |
|                                | 72 Saat           | 0,325 ± 0,025            | 0,183 ± 0,010 | 56,31        | 1,20                     | 6,77             |
|                                | 96 Saat           | 0,498 ± 0,025            | 0,120 ± 0,030 | 24,09        | 1,92                     | 7,41             |
|                                | 120 Saat          | 0,355 ± 0,005            | 0,095 ± 0,026 | 26,76        | 1,23                     | 7,08             |
| (% 0,5 Melas)                  | 144 Saat          | 0,344 ± 0,003            | 0,070 ± 0,009 | 20,35        | 1,10                     | 6,91             |
|                                | 24 Saat           | 0,120 ± 0,010            | 0,014 ± 0,007 | 11,67        | 0,63                     | 6,78             |
|                                | 48 Saat           | 0,370 ± 0,010            | 0,108 ± 0,008 | 29,19        | 0,91                     | 7,01             |
|                                | 72 Saat           | 0,585 ± 0,003            | 0,075 ± 0,001 | 12,82        | 1,30                     | 7,80             |
|                                | 96 Saat           | 0,470 ± 0,010            | 0,020 ± 0,006 | 4,26         | 1,08                     | 8,12             |
| <i>B. japonicum</i> S Irat Fab | 120 Saat          | 0,400 ± 0,000            | 0,008 ± 0,000 | 2,0          | 1,15                     | 8,25             |
|                                | 144 Saat          | 0,230 ± 0,070            | 0,002 ± 0,000 | 0,87         | 0,60                     | 8,00             |
|                                | 24 Saat           | -                        | -             | -            | 0,05                     | 7,00             |
|                                | 48 Saat           | 0,130 ± 0,030            | 0,007 ± 0,001 | 5,38         | 0,31                     | 7,05             |
|                                | 72 Saat           | 0,220 ± 0,020            | 0,015 ± 0,006 | 6,82         | 0,53                     | 8,15             |
| <i>R. viciae</i> F111          | 96 Saat           | 0,270 ± 0,010            | 0,063 ± 0,010 | 23,33        | 0,88                     | 8,37             |
|                                | 120 Saat          | 0,210 ± 0,030            | 0,033 ± 0,000 | 15,71        | 0,83                     | 8,22             |
|                                | 144 Saat          | 0,190 ± 0,010            | 0,006 ± 0,003 | 3,16         | 0,60                     | 7,18             |
|                                | 24 Saat           | -                        | -             | -            | 0,05                     | 7,00             |
|                                | 48 Saat           | 0,130 ± 0,030            | 0,007 ± 0,001 | 5,38         | 0,31                     | 7,05             |
|                                | 72 Saat           | 0,220 ± 0,020            | 0,015 ± 0,006 | 6,82         | 0,53                     | 8,15             |
|                                | 96 Saat           | 0,270 ± 0,010            | 0,063 ± 0,010 | 23,33        | 0,88                     | 8,37             |
|                                | 120 Saat          | 0,210 ± 0,030            | 0,033 ± 0,000 | 15,71        | 0,83                     | 8,22             |
|                                | 144 Saat          | 0,190 ± 0,010            | 0,006 ± 0,003 | 3,16         | 0,60                     | 7,18             |

-; Hücre gelişimi çok zayıf  
Kontrol besi ortamında *R. melloti* Y11 %39,25; *B. japonicum* S Irat Fab %34,43 ve *R. viciae* F111 %57,09 ortamında PHB üretmiştir.



Şekil 4.44. *R. meliloti* Y11, *B. japonicum* S Rat Fab ve *R. viciae* F111'in melas ortamında PHB verim histogramı

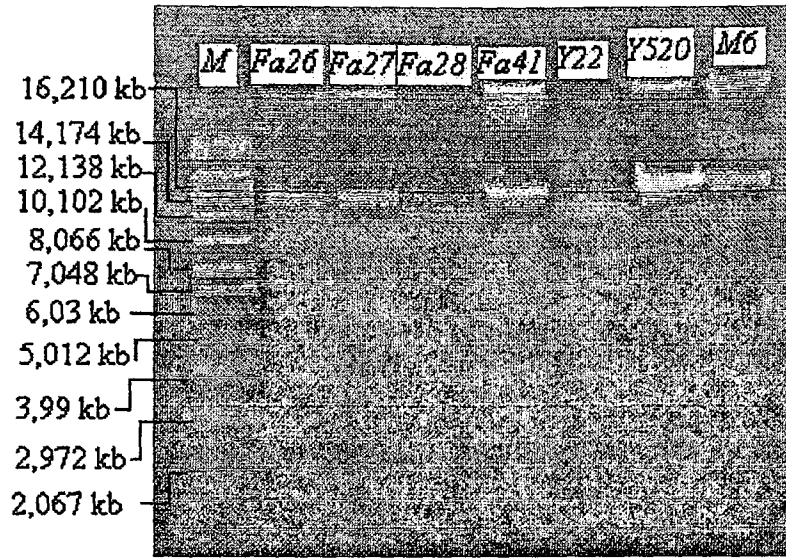
#### 4. 11. *Rhizobium* Suşlarında Plazmid DNA

13 adet *Rhizobium* suşunun plazmid DNA sayı ve moleküler ağırlıkları Çizelge 4.45'te verilmiştir. Bu suşlarda birer adet plazmid DNA'ya rastlanmıştır. Plazmidlerin moleküler ağırlıkları 13,5-16,75 kb arasında hesaplanmıştır.

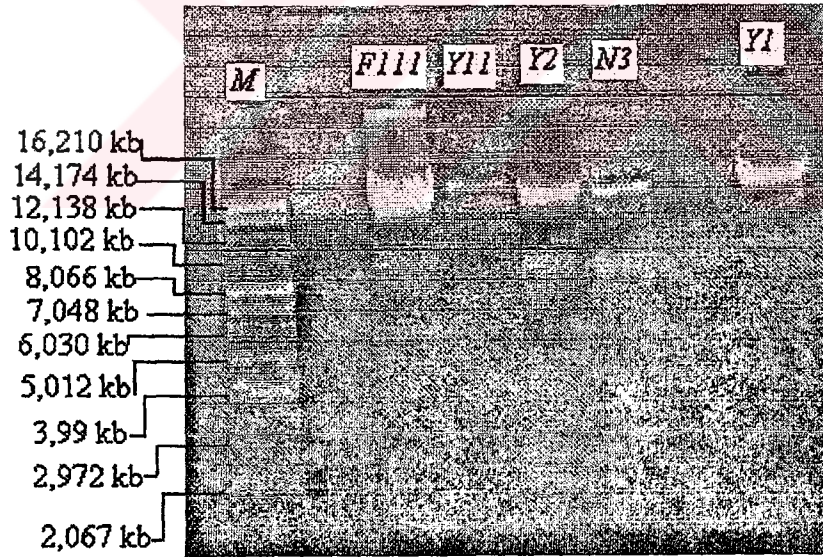
Çizelge 4.45. *Rhizobium* bakterilerin plazmid DNA sayı ve moleküler ağırlıkları

| Suş                        | Plazmid DNA Sayısı | Moleküler Ağırlık (kb) |
|----------------------------|--------------------|------------------------|
| <i>R. viciae</i> F69       | 1                  | 14,42                  |
| <i>R. viciae</i> F111      | 1                  | 16,75                  |
| <i>R. meliloti</i> Y1      | 1                  | 16,74                  |
| <i>R. meliloti</i> Y2      | 1                  | 16,07                  |
| <i>R. meliloti</i> Y11     | 1                  | 16,25                  |
| <i>R. meliloti</i> Y22     | 1                  | 14,14                  |
| <i>R. meliloti</i> Y520    | 1                  | 16,04                  |
| <i>R. leguminosarum</i> M6 | 1                  | 15,14                  |
| <i>R. phaseoli</i> Fa26    | 1                  | 14,25                  |
| <i>R. phaseoli</i> Fa27    | 1                  | 14,28                  |
| <i>R. phaseoli</i> Fa28    | 1                  | 13,50                  |
| <i>R. phaseoli</i> Fa41    | 1                  | 15,50                  |
| <i>R. cicer</i> N3         | 1                  | 15,30                  |

Bazı *Rhizobium* suşlarının jel elektroforez görünümüleri Şekil 4.45 ve Şekil 4.46'da gösterilmiştir.



Şekil 4.45. *R. phaseoli* Fa26, Fa27, Fa28, Fa41, *R. meliloti* Y22, Y520 ile *R. leguminosarum* M6 suşların plazmid DNA profilleri



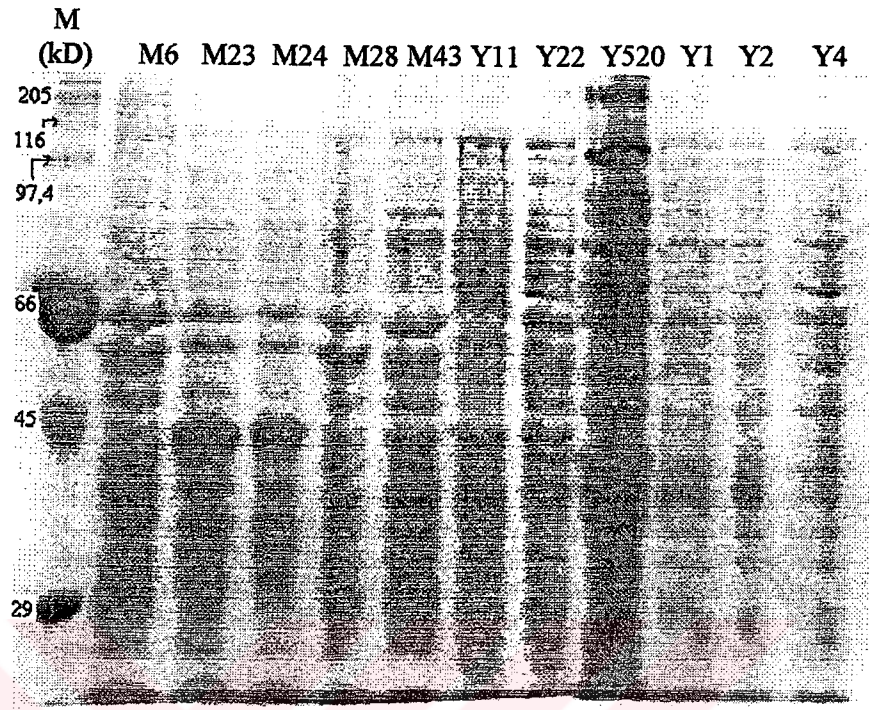
Şekil 4.46. *R. viciae* F111, *R. meliloti* Y11, Y2, Y1 ve *R. cicer* N3 suşların plazmid DNA profilleri

#### 4.12. Toplam Hücre Protein Profilleri

*Rhizobium* bakterilerin toplam hücre protein profilleri 3.2.15'te anlatıldığı gibi tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan bakteriler *R. phaseoli*, *R. cicer*, *R. leguminosarum*, *B. japonicum*, *R. meliloti*, *R. viciae* ve *Rhizobium* spp. olmak üzere 6 tür altında toplanıp, protein profilleri %10'luk SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. Toplam protein profilleri Şekil 4.47, 4.48 ve 4.49'da verilmiştir.

Bakterilerdeki proteinlerin moleküler ağırlıklarının yaklaşık olarak 11-215 kD arasında olduğu tespit edilmiştir. Suşların genel olarak elektroforetik görünimleri birbirine benzerlik gösterirken, bazı bantlar yönünden bakteriler arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Aynı türe ait suşlar benzer protein profili gösterirken, elektroforetik yönden türler arasında farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bazı türlerin, özellikle *R. phaseoli*'nin heterojen bir elektroforetik yapıya sahip olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.49. *Rhizobium leguminosarum* ve *R. meliloti* suşların SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Rhizobium* ve *Bradyrhizobium* cinsine ait suşların çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve karbohidrat kaynaklarında üreme durumları belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.1). Ayrıca bu suşların sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi ile toplam hücre protein profilleri karşılaştırılarak suşlar arasındaki benzerlik ve farklılıklar incelenmiştir.

Araştırmada kullanılan suşların tümünün monosakkaritlerden glukoz, dekstrozu ve mannitolü kullanırken, diğer karbon kaynaklarını kullanma yeteneklerinde farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Fulchieri et al. (2000), *Lotus globosus* kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium loti* suşlarının glukoz, galaktoz, gliserol, mannitol, sukroz ve rafinozu kullanma yeteneklerini incelemişlerdir. Suşlardan NZP 2309 ve Ayac'ın sukroz ve rafinozu kullanamadıklarını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar her iki suşun da yavaş gelişen *Rhizobium* suşu olduğunu açıklamışlardır. Suşların tümünün monosakkaritlerden glukoz ve galaktozda iyi geliştiğini belirtmişlerdir.

Çalışmada suşların çoğu asidik ortamda ( $pH \leq 4,5$ ) gelişmezken; *R. viciae* F111, F69, *R. phaseoli* Fa28, Fa41, *R. cicer* N1, N2, N4 ve N6 nolu suşların belirtilen pH'da üredikleri gözlenmiştir. Chen et al. (1993), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* ANU 1173'ün  $pH=4,4$  gibi düşük pH'da gelişme yeteneğinde olan asite tolerant bir izolat olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca laboratuvar ortamında identifiye edilen ve asitliğe toleranslı olan suşların asidik topraklara dayanıklı olduğunu açıklamışlardır. Benzer olarak asit toleranslı olan *Bradyrhizobium* sp., *Rhizobium phaseoli* ve *Rhizobium meliloti*'nin suşlarının da nodülasyonu ve asidik çevrelerde konukçu bitkilerin gelişimini arttırdığını bildirmişlerdir. Del Papa et al. (1999), asitli topraklarda yetişen yoncalardan izole ettikleri 15 adet izolatın  $pH=5,0$ 'te gelişebildiğini ve bu izolatların nitrojen fiksasyon oranı düşük olan yoncalarda nodül oluşturabilme yeteneğinde olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca asidik şartlarda yüksek oranda simbiyotik performans gösteren bu tür suşların önemini vurgulamışlardır. Çalışmamızda da düşük pH'da gelişme yeteneğinde olan

bazı suşların, asidik topraklarda doğal azot gübre üreticisi olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

*Rhizobium* bakterilerinin taksonomisinde bakteri-bitki kross inokulasyonu temel alınmasına rağmen, günümüzde bunun yerini seroloji, metabolik komponentler, numerik taksonomi ve çeşitli moleküler teknikler almıştır. Bir çok araştırmacı, nodül bakterilerin teşhisinin moleküler seviyedeki metotlarla yapıldığını belirtmiştir (Jordan, 1984; Yang and Lin, 1998; URL3; Mendonça et al., 1999; Münchbach et al., 1999; Nick et al., 1999). Proteinlerin aminoasit dizilişleri, serolojik özellikleri ve protein profilleri sistematikte önemli bir yer tutmaktadır. Günümüzde poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE), değişik mikroorganizmaların protein profillerine göre karakterizasyonu ve sınıflandırılmasında, sıklıkla kullanılan bir metottur. Birçok araştırmacı, toplam hücre proteinlerin, toplam çözünür protein, sitoplazmik membran proteini, hücre duvarı ve yüzey proteinlerinin hatta lipopolisakkaritlerin elektroforetik görünümünün, bakteri taksonomisinde ve identifikasyonunda çok sayıda suşun kısa sürede ayrımı için oldukça güçlü bir yöntem olduğunu bildirmiştir (Gatti et al., 1997; 2001; Hitchcock and Brown, 1983; Flint et al., 1997; Kishore et al., 1996; Moreira et al., 1993; Zahran, 1992).

Çalışmada, *Rhizobium* suşlarının identifikasyonunda klasik biyokimyasal ve fizyolojik testler ile birlikte suşların elektroforetik görünümleri incelenerek, bu suşların birbirleriyle olan benzerlik ve farklılıkları karşılaştırılmıştır.

*R. cicer* suşların SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri Şekil 4.47'de görülmektedir. Suşların elektroforetik yönden birbirine benzer profil verdikleri, ancak bazı bantlar yönünden de birbirlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. Kazan'dan izole edilen *R. cicer* suşlarından N5 ve N6 nolu suşların tümüyle benzer elektroforetik görünüme sahip olması dikkat çekerken, *R. cicer* N2 ve N4 suşların da birbirlerine benzer oldukları gözlenmiştir. Ancak *R. cicer* N2, moleküler ağırlığı yaklaşık olarak 210 kD civarında olan 1 nolu protein bandı ile 35 kD büyüklüğünde olan 2 nolu protein bantları yönünden *R. cicer* N4 suşundan ayrılmıştır. Ayrıca 75 kD civarında olan 3 nolu protein bandının tüm *R. cicer* suşlarında (N1 suş dışında) ortak

olması nedeniyle bu protein bandının türe özgü olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, izolatlardan *R. cicer* N1 nolu suşun elektroforetik görünümünün diğer suşlardan farklı olması da dikkati çekmiştir.

*B. japonicum* USDA 110, S543, SFr ve S Irat Fab, *R. phaseoli* Fa26, Fa27, Fa28 ve Fa41, *R. viciae* F69 ve F111 ile *Rhizobium* sp. Ba378 suşların SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri Şekil 4.48’de verilmiştir. *Bradyrhizobium* cinsine ait suşların referans suş olan *B. japonicum* USDA 110 ile ortak bantlar içerdikleri tespit edilmiştir. Özellikle *B. japonicum* S Irat Fab’ın USDA 110 ile aynı elektroforetik görünüme sahip olması dikkati çekmiştir. Ancak S Irat Fab suşu 36 kD civarında olan 4 nolu protein bandı içermemesi ile USDA 110’dan ayrılmıştır. *B. japonicum* SFr suşunun da *Bradyrhizobium* cinsinden farklı bir protein profili içerdiği gözlenmiş, bu suşun farklı olabileceği düşünülmüştür.

*R. phaseoli* suşları ortak bantlar içermelerine rağmen, elektroforetik yönden heterojen bir yapı göstermişlerdir (Şekil 4.48). Yapılan bir araştırmada, *Sesbania* türlerinde kök ve gövde nodülü oluşturan *Rhizobium* izolatlarının, toplam çözünür protein ve lipopolisakkarit (LPS) profillerinin SDS-PAGE analizi yapılmış, izolatların birbirinden ve referans suşlardan farklı profil gösterdikleri rapor edilmiştir (Kishore et al., 1996). Diğer taraftan, *R. phaseoli* Fa26 suşun, *B. japonicum* S Irat Fab suşuna benzer protein profili gösterdiği dikkati çekmiştir. Ancak *B. japonicum* S Irat Fab suşunda yer alan ve moleküler ağırlığı yaklaşık 42 kD olan 5 ile işaretli protein bandıyla bu suştan ayrılmıştır. Ayrıca tüm *R. phaseoli* suşlarında ortak olan 6 nolu protein bandının (85 kD) türe özgü bir bant olabileceği düşünülmüştür. *R. viciae* türüne ait olan F69 ve F111 nolu suşların içerdikleri farklı bantlar ile birbirlerinden ayrıldıkları anlaşılmıştır. Moleküler ağırlığı yaklaşık 32 kD olan F111 suşunda yer alan 7 nolu protein bandı ile bu iki suş birbirinden ayrılmıştır. *Rhizobium* sp. Ba378’in elektroforetik görünümünün diğer suşlara benzer olduğu, ancak ortak bantlar dışında belirgin derecede benzerlik göstermediği de tespit edilmiştir.

*R. leguminosarum* ve *R. meliloti*’ye ait suşların SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri incelendiğinde (Şekil 4.49), aynı türe ait olan suşların birbirine

benzer protein profili içerdikleri tespit edilmiştir. İzolatlardan *R. leguminosarum* M23 ve M24 nolu suşların aynı protein profiline sahip olması nedeniyle bu iki suşun tek bir suş olabileceği düşünülmüştür. Toprak Gübre Araştırma Enstitüsünden temin edilen diğer *R. leguminosarum* suşlarıyla ortak bantlar içermesi de aynı türe ait suşlar olduğunu göstermiştir. Protein profili yönünden birbirlerine benzer olduğu belirlenen *R. meliloti* suşlarının, bazı protein bantları ile birbirlerinden ayrıldıkları gözlenmiştir.

Zahran (1992), tuzlu topraklardan izole ettiği 30 adet kök nodül bakterilerin protein profilinin referans suşlara göre farklılık gösterdiğini ve proteinlerin moleküler ağırlığının 10,000-90,000 Dalton arasında olduğunu tespit etmiştir. Yang and Lin (1998), Tayvan topraklarından izole ettikleri çok sayıda *Rhizobium* suşunun LPS ve hücresel proteinlerinin SDS-PAGE analizini yapmışlardır. Aynı türe ait olan suşların LPS ve protein profili yönünden benzer olduğunu, farklı türlerin elektroforetik görünümünün farklı olduğunu bildirmişlerdir. Kiredjian et al. (1986) de izole ettikleri *Alcaligenes*'e ait 7 suşun elektroforetik yönden birbirine benzer pattern verdiği, ancak suşlardan *A. piechaudii* suşunun elektrogram analizi ile diğer suşlardan ayrıldığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda suşlar arasında benzer elektroforetik görünüm olmasına rağmen, türler arasında farklılıkların bulunduğu tespit edilmiştir. Aynı türe ait suşlar birbirine benzer elektroforetik bir yapı göstermelerine rağmen, türlerin birbirinden ayrıldıkları gözlenmiştir.

İntrasellüler depo materyali olarak PHA/PHB'ler çok geniş bakteri grubunca sentezlenmektedir. Termoplastiğin keşfi ve biyoplastiklerin biyodönüşüm kalitesinin anlaşılmasından bu yana, endüstriyel açıdan bu tür polimerlerin üretimine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu ürünler günümüzde paketlenmede, tıpta kullanıldığı gibi PHB'nin kopolimerlerinden biri olan poli-3-hidroksibütirat-co-3-hidroksivaleratın market alanında kullanılabileceği de önerilmiştir (Lee, 1996). Biyopolimerler, ticari olarak yüksek kullanım potansiyeline sahip ürünlerdir. Petrokimyasal plastiklerin yerini almasının başlıca sebebi, bunların ekolojik avantajının yanı sıra ekonomik farklılığından kaynaklanmaktadır.

Bakteri hücrelerinde Sudan Black veya Sudan III gibi lipofilik boyalarla PHA/PHB'nin kalitatif olarak aranması çok yaygın kullanılan bir metottur. Nile Blue A, Nile Red, Fosfin 3R, 3-4 benzipren gibi luminescent boyalar da günümüzde bu amaç için kullanılmaktadır (Anderson and Dawes, 1990; Ostle and Holt, 1982; Pierce and Schroth, 1994; Bonartseva, 1985; James et al., 1999).

Geleneksel olarak mikrobiyologlar, bakteri hücrelerindeki PHB granüllerinin varlığını, Sudan Black B ile boyayarak araştırmışlardır. Ancak Ostle and Holt (1982), PHB granüllerinin boyanmasında Nile Blue A'yı önermişlerdir. Araştırmacılar, Nile Blue A'nın Sudan Black'a göre PHB granüllerini daha yüksek bir affinite ile boyadığını bildirmişlerdir. *Bacillus megaterium* KM ve *Azotobacter chroococcum* hücrelerini bu iki boya ile boyayarak 362 nm ve 460 nm dalga boylarında incelemişlerdir. Nile Blue A'nın Sudan Black'a kıyasla çok daha fazla sayıda PHB granülünü boyadığını ve Sudan Black ile karşılaştırıldığında, dekolizasyon sırasında hücrelerden kolaylıkla ayrılmadığını da bildirmişlerdir. Aynı çalışmada araştırmacılar, glikojen ve polifosfat gibi diğer inklüzyon bodylerin bu boya ile boyanmadığını da rapor etmişlerdir.

Pierce and Schroth (1994), PHB sentezleyen *Pseudomonas* cinsi suşların da Nile Blue A içeren ortamda kalitatif olarak belirlenebileceğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar fluorescent ve nonfluorescent *Pseudomonas* bakterilerini %1 Nile Blue A içeren ortamda geliştirmişlerdir. UV ışığı altında incelediklerinde PHB pozitif *Pseudomonas*'ların turuncu renkte gözlemlendiğini, hücrede depo edilen polimer miktarına bağlı olarak rengin pembeden turuncuya doğru değişiklik gösterdiğini de rapor etmişlerdir.

Nodül bakterilerinin hücredeki PHB içeriğinin fluorometrik yünden belirlenmesinde, lipofilik bir boya olan Fosfin 3R'nin kullanılabileceği açıklanmıştır (Bonartseva and Myshkina, 1985; Bonartseva, 1985). Araştırmacılar kaba yonca (lucerne) ve fasülye nodüllerinden izole edilen aktif *Rhizobium* suşların PHB içeriklerine göre kalitatif seçiminde bu metodun kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Az miktarda PHB üreten aktif suşların kolonilerinin fluorescence göstermediği, düşük aktiviteye sahip

suşların ise UV ışığı altında polimer granüllerinin hücredeki PHB miktarına bağlı olarak açık yeşil bir fluorescence sahip olduklarını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, bu metodun seri analizlerde, çok sayıda bakteri arasından, PHB sentezleyen suşların ayırımında kolaylıkla kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Çalışmamızda tüm *Rhizobium* suşları %1 Nile Blue A içeren YEM Agar besi ortamında geliştirilmiş, inkübasyon sonunda koloniler 254 nm UV ışığı altında incelenmiştir. Tüm *Rhizobium* bakterileri UV ışığında turuncu renkte gözlenmiş, bakterilerdeki polimer miktarına bağlı olarak, rengin pembeden turuncuya doğru değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu boya ile boyanan bakteri hücrelerinden yalnız *R. viciae* F69 ve *R. cicer* N63 suşların çok zayıf boyandıkları gözlenmiştir. Bakterilerdeki PHB içeriğinin diğer suşlara oranla az olduğu belirlenmiştir (sırasıyla; %6,15 ve %7,0). *R. viciae* F111, *R. meliloti* Y11, Y22, *B. japonicum* S Irat Fab, *R. leguminosarum* M43, *R. cicer* N2, N4, N6 ve 16 C suşları UV ışığında parlak turuncu renkte gözlenmiştir. Bu suşlar, bakteriler arasında maksimum miktarda PHB sentezleyen suşlar olup, polimer içerikleri 0,101-0,365 g/l, yüzde verimleri de %5,76-57,09 arasında değişmektedir. Diğer suşların hücrede sentezlenen ve depolanan PHB miktarlarına bağlı olarak, UV ışığında pembeden turuncuya farklı derecelerde boyandığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Yapılan literatür taramalarında, nodül bakterilerin PHB içeriklerinin kalitatif tespitinde bu boyanın kullanıldığına dair herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır. Bu çalışma ile hücre içinde depo edilen PHB miktarlarına göre *Rhizobium* bakterilerinin kalitatif seçiminde Fosfin 3R dışında Nile Blue A'nın da kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

PHA/PHB, en az 75 farklı cinse ait bakteriler tarafından sentezlenen intrasellüler granüller olup, bunların varlığı bakterilerin taksonomik karakterizasyonunda kullanılmaktadır (Mergaert et al., 1993). Bakterilerdeki polimerin önemi, hücrede karbon ve enerji depoları sınırlandığında ortaya çıkmaktadır. Düşük moleküler ağırlıklı PHB'lerin de hücre zarı taşımacılığında ve DNA transformasyonunda fizyolojik rolleri olduğu tahmin edilmekte olup, günümüze kadar belirlenen rolleri

dışında çok daha farklı işlevlerinin olabileceği de sanılmaktadır (Witholt and Kessler, 1999).

Bakterilerde PHB'nin başlıca fonksiyonu muhtemelen enerji deposudur. *Rhizobium vigna*, *B. japonicum*, *R. phaseoli* ve *R. meliloti*'de nitrogenaz ve hidrogenaz enzim aktivitesinin PHB içeriği ile ilişkisi araştırılmıştır. Nitratların varlığında anaerobik gelişim sırasında, PHB içeriği ile nitrogenaz aktivitesi arasında ters bir ilişki tespit edilirken, hidrogenaz aktivitesi ile direkt bir korelasyon bulunmuştur. Ayrıca, PHB'nin azot fiksasyonu sırasında harcadığı, metabolizmada moleküler hidrojenin ikincil olarak kullanılması sonucu enerji artışı olduğu ve bu enerjinin de PHB'de depolandığı rapor edilmiştir (Bonartseva et al., 1989).

Diğer bir çok toprak bakterisi gibi *Rhizobium* türlerinin de bir depo materyali olarak bu polimeri sentezledikleri ve hücrede depoladıkları bilinmektedir (Anderson and Dawes, 1990; Bonartseva, 1985; Bonartseva et al., 1994; Tavernier et al., 1997). Genel olarak *Rhizobium*'ların hücre kuru ağırlıklarının %30-55'inin PHB olduğu da gösterilmiştir (Tombolini and Nuti, 1989).

*Rhizobium* suşlarının PHB üretimleri YEM besi ortamında araştırılmış ve hücredeki PHB içeriklerinin ortalama olarak 0,079 g/l olduğu bulunmuştur. Bu da hücre kuru ağırlığının %13,37'sini oluşturmuştur.

Suşıardaki polimer miktarı 0,007-0,365 g/l, yüzde verim de %5,37-57,09 arasında bulunmuştur. Maksimum PHB verimi *R. viciae* F111 (%57,09)'de belirlenirken, minimum üretim *B. japonicum* SFr (%5,37) suşundan elde edilmiştir. Hücredeki maksimum PHB miktarı *R. meliloti* Y11 nolu suşta 0,365 g/l olarak tespit edilmiştir. Referans suş *B. japonicum* USDA 110'da PHB miktarı 0,070 g/l olup, bu da bakterinin hücre kuru ağırlığının %27,67'sini oluşturmuştur (Bkz. Çizelge 4.2, Şekil 4.2).

Kazan ve Şereflikoçhisar'dan temin edilen nohut ve mercimek nodüllerinden izole edilen izolatların PHB verimlerinin genel olarak diğer suşlara oranla düşük olduğu

bulunmuştur. Suşların PHB miktarları 0,064-0,104 g/l olarak hesaplanırken, bakterilerin hücre kuru ağırlıklarının %5,71-15,32'sinin PHB olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.2, Şekil 4.2). *B. japonicum*, *R. vigna*, *R. phaseoli* ve *R. meliloti* ile yapılan bir çalışmada, bakterilerin anaerobik şartlarda ve  $\text{NO}_3^-$  içermeyen ortamda maksimum %11-21 oranında PHB sentezledikleri belirlenmiştir (Bonartseva et al., 1989). *B. megaterium* B-124'ün optimum kültür şartlarında hücre kuru ağırlığının %20'sinin PHB olduğu bildirilmiştir. Besi ortamına sukroz ve  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ilave edildiğinde, bakterinin üç gün içinde PHB dışında 7,6 g/l trimer sentezlediği ve bu trimerin PHB'nin intrasellüler degradasyonunun bir ürünü olduğu açıklanmıştır (Kato et al., 1992).

Bilimsel çalışmalar, PHB üretimi ve bakterilerdeki verimin artırılmasının fermentasyon şartlarının geliştirilmesiyle doğrudan ilişkili olduğunu göstermiştir. Birçok araştırmacı tarafında seçilen mikroorganizmaların biyosentetik kapasitesinin araştırılmasının gerekli olduğu bildirilmektedir.

PHB üreten mikroorganizmalarda polimer veriminin artırılması, PHB üreten yeni mikroorganizmaların seçilmesi ya da PHB ürettiği bilinen mikroorganizmaların özelliklerinin iyileştirilmesi ile sağlanmaktadır. Bu amaçla, daha ucuz materyaller veya optimum şartlar kullanılarak, bakterilerde polimerin metabolik düzenlenmeleri araştırılmaktadır. Mitomo et al. (1987), PHB'nin bakteri hücrelerinde normal olarak düşük oranlarda bulunduğunu (%1-30), ancak bu oranın karbon varlığında, azotun sınırlandırıldığı fermentasyon şartlarında hücre kuru ağırlığına göre %70'lere kadar yükseltilebildiğini açıklamışlardır.

Üretim maliyetinin azaltılması amacıyla, hedef mikroorganizmaya yönelik en uygun karbon ve azot kaynaklarının belirlenmesi gerekmektedir. Günümüzde birçok karbon kaynaklarından PHB'ların sentezlendiği çok çeşitli bakteri grubunda gösterilmiştir (Haywood et al., 1989). Örneğin, endüstriyel polimer üretiminde kullanılan ve %95 PHB verimine sahip *Alcaligenes eutrophus*'un, tek karbon kaynağı olarak bütirik asit veya pentanoik asit içeren kültür solusyonlarında 3HB ve 3HV kopoliesterlerini sentezlediği açıklanmıştır (Doi et al., 1988).

Çalışmamızda, suşlar arasında en yüksek doğal PHB verimin elde edildiği *R. viciae* F111 (%57,09), *R. meliloti* Y11 (%39,25) ve *B. japonicum* S Irat Fab (%34,43) suşlarında, farklı karbon ve azot kaynaklarının PHB üretimine etkisi araştırılmıştır. Farklı karbon kaynakları olarak laktoz, glukoz, sukroz, sodyum asetat ve pirüvik asit-Na tuzu; azot kaynakları olarak da proteaz pepton, glisin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , asparajin ve DL-triptofan kullanılmıştır. Bakteriler, YEM besi ortamında bulunan mannitol (kontrol) ve diğer karbon kaynaklarında 144 saat inkübe edilerek, farklı sürelerde PHB içerikleri incelenmiştir.

*R. meliloti* Y11'in tüm karbon ve azot kaynaklarında PHB içeriği tespit edilmiştir. Ancak *R. meliloti* Y11'in aksine, *B. japonicum* S Irat Fab'ın sukrozu kullanmaması, DL-triptofan ile glisin azot kaynaklarında da hücre gelişiminin zayıf olması nedeniyle bu substratları içeren ortamlarda PHB determinasyonu yapılamamıştır. *R. viciae* F111'in de karbon kaynağı olarak sodyum asetat ile pirüvik asit-Na tuzunda az geliştiği ve azot kaynağı olarak da glisinde üremediği için polimer içeriği belirlenememiştir.

*R. meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak laktoz, sukroz, sodyum asetat ve pirüvik asit-Na tuzu içeren ortamlarda PHB üretiminin glukoz ve mannitol içeren ortamlara kıyasla düşük olduğu gözlenmiştir. Bakterinin farklı inkübasyon süresince PHB üretim yüzdesi laktozda %1,96-17,55 (Bkz. Çizelge 4.4, Şekil 4.4), sukrozda %6,54-27,44 (Bkz. Çizelge 4.6, Şekil 4.6), sodyum asetat %2,91-10,53 (Bkz. Çizelge 4.7, Şekil 4.7) ve pirüvik asitte %2-26,45 (Bkz. Çizelge 4.8, Şekil 4.8) arasında tespit edilmiştir. Bakteri, karbon kaynağı olarak mannitol (kontrol) içeren besi ortamında maksimum (%33,37) PHB verimine 48 saat inkübasyonda varmıştır. Inkübasyonun 72. saatinden itibaren hücredeki PHB içeriğinde azalma olmasına rağmen hücre gelişiminin devam etmesi nedeniyle bakterinin PHB'yi kullandığı düşünülmüştür (Bkz. Çizelge 4.3, Şekil 4.3). Bakteri en yüksek PHB üretimini, glukoz içeren besi ortamında göstermiştir. Bakterinin bu karbon kaynağında 24 saat inkübasyonda maksimum %83,75 oranında PHB üretmiştir. İlerleyen inkübasyon sürelerinde bakterinin PHB üretimi azalmıştır (Bkz. Çizelge 4.5, Şekil 4.5).

*B. japonicum* S Irat Fab'ın mannitol ve glukoz dışında, denenen tüm karbon kaynaklarında hücrede depo edilen PHB miktarı ve yüzde veriminin düşük olduğu tespit edilmiştir. Bakteri maksimum PHB üretimi glukozda, minimum üretimi ise laktoz ve sodyum asetatta gerçekleştirmiştir. Bakterinin, laktoz içeren besi ortamında %5,27-15,79 (Bkz. Çizelge 4.10, Şekil 4.10), sodyum asetat içeren besi ortamında %1,10-20,95 (Bkz. Çizelge 4.12, Şekil 4.12) ve pirüvik asitte ise %3,81-22,09 (Bkz. Çizelge 4.13, Şekil 4.13) arasında PHB ürettiği tespit edilmiştir. Bonartseva et al. (1989) da *R. vigna*, *R. japonicum*, *R. phaseoli* ve *R. meliloti*'nin organik asit olarak kullanılan asetatta PHB içeriğinin az olduğunu açıklamışlardır.

*B. japonicum* S Irat Fab, maksimum (%34,31) PHB üretimini glukoz içeren besiyerinde 144. saat inkübasyonda gerçekleştirmiştir (Bkz. Çizelge 4.11, Şekil 4.11). Buna ilaveten, glukoz varlığında hücre gelişiminin ve PHB sentezinin inkübasyon süresince devam ettiği de gözlenmiştir. Bakteri karbon kaynağı olarak mannitol içeren besi ortamında inkübasyonun 48. saatinde maksimum %30,24 oranında PHB verimi gösterirken, verimin glukoz varlığında %34,31'e yükseldiği bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.9, Şekil 4.9 ve Çizelge 4.11, Şekil 4.11).

Tavernier et al. (1997), *R. meliloti*'nin iki suşunda fruktoz ve glukoz karbon kaynağındaki PHB verimlerini karşılaştırmışlar, suşlardan birinin glukozlu ortamda inkübasyonun 144. saatinde %70,3 oranında PHB verimine ulaştığını rapor etmişlerdir. *Azotobacter vinelandii* ile yapılan bir diğer çalışmada ise glukoz varlığında bakterideki hücre yoğunluğunun 4. saatte maksimuma vardığı ve PHB artışının inkübasyon süresince devam ettiği açıklanmıştır (Page, 1989). Manna et al. (1999), 55 adet *Streptomyces* izolatu ile yaptıkları çalışmada, izolatların 72 saat inkübasyonda %1,93-7,82 arasında PHB depoladığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada bir izolatın, 24 saat inkübasyondan sonra PHB depolamaya başladığını, PHB üretiminin ve hücre gelişiminin glukoz konsantrasyonunun artışı ile maksimum seviyeye ulaştığını açıklamışlardır. Dave et al. (1996), PHB'nin sentezinde azot ve fosfor kaynağı sınırlandırılıp, karbon kaynağı zenginleştirildiğinde ve özellikle karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında PHB üretiminin 13 kat arttığını

belirtmişlerdir. Araştırmacılar, petrokimyasal atık suya glukoz ilavesiyle, bakterideki PHB veriminin %52'ye yükseldiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, *R. meliloti* Y11 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşunda maksimum PHB üretim ve yüzde verimi glukoz içeren besiyerinde tespit edilmiş, elde edilen sonuçlar araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermiştir.

Doğal PHB üretimi yüksek olan diğer bir suş *R. viciae* F111'in mannitol dışında laktoz, glukoz ve sukroz varlığında PHB veriminin düşük olduğu saptanmıştır. Ayrıca, bakterinin laktoz ortamında hücre gelişiminin zayıf olduğu da gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.15, Şekil 4.15). Farklı sürelerde bakteride depolanan PHB verimi, laktozda %13,93-24,29 (Bkz. Çizelge 4.15, Şekil 4.15), glukozda %4,45-12,63 (Bkz. Çizelge 4.16, Şekil 4.16) ve sukrozda %3,09-26,18 (Bkz. Çizelge 4.17, Şekil 4.17) arasında değiştiği bulunmuştur. *R. viciae* F111'in, maksimum (%41,22) PHB üretimi mannitol içeren besi ortamında inkübasyonun 48. saatinde elde edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.14, Şekil 4.14). Yushkova et al.'a göre, *R. lupini*'de de maksimum PHB verimi mannitol ve glutamatta elde edilmiştir (Bonartseva et al., 1994).

*Rhizobium meliloti* Y11 ve *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab suşlarının aksine, glukoz varlığında *R. viciae* F111'in hücre gelişiminin iyi olmasına rağmen, PHB içeriğinin ve veriminin düşük olduğu gözlenmiştir. Ayrıca *Rhizobium* bakterilerinin doğal bir özelliği olan eksopolisakkarit (EPS) üretiminin, *R. viciae* F111 nolu suşta diğer karbon kaynaklarına kıyasla glukoz varlığında artış gösterdiği ve buna bağlı olarak ortam viskozitesinin arttığı gözlenmiştir. Kültür ortamının viskozitesindeki artışın, oksijen transferini azalttığı ve buna bağlı olarak PHB veriminde azalma olduğu düşünülmüştür. Page (1992a) de yaptığı bir çalışmada, melas ve sukroz karışımından oluşan kültür ortamında *A. vinelandii* UWD suşun besi ortamı viskozitesini arttırdığını ve bunun da ortamdaki oksijen transferini azalttığını bildirmiştir. Hücre gelişiminin iyi olmasına rağmen, bakteride PHA'nın sentezlenmemesinin ortam viskozitesi ile ilişkili olduğunu açıklamıştır. Ayrıca Tavernier et al. (1997), *R. meliloti*'ye ait iki suşta da bu durumu tespit etmişler ve bakterilerin ortama salgıladıkları EPS miktarının artışının oksijeni sınırlandırdığını,

dolayısıyla PHB sentezinin olumsuz yönde etkilendiğini açıklamışlardır. Araştırmacılara ait bulguların çalışma sonuçlarımızı doğrular nitelikte olduğu anlaşılmıştır.

Yapılan araştırmalarda, polihidroksialkanatlara 100 farklı monomerin bağlanabildiği bildirilmiştir. Ancak bu durum karbon varlığında azot, fosfor ve sülfür gibi besinler kısıtlandığında ortaya çıkmaktadır. Bu gibi olumsuz şartlarda hücreler yaşayamamakta, fakat karbon kaynaklı poliesterleri depolamaktadırlar (Witholt and Kessler, 1999). Araştırmacılar, genelde azotun sınırlandırıldığı şartların, PHB üretimine olumlu etkisinin olduğunu bildirirlerken (Anderson and Dawes, 1990; Ramsay et al., 1990, 1992; Lee, 1996, Madison and Huisman, 1999), bu genel kanının aksine Manna et al. (1999), *Streptomyces* izolatlarında nitrojenin sınırlandırıldığı şartların, hücre gelişimine ve PHB üretimine inhibitör etki yaptığını, ortama amonyum sülfat ilavesinin ise PHB sentezini ve hücre gelişimini maksimum seviyeye yükselttiğini açıklamışlardır. *A. vinelandii* UWD ve *A. chroococcum* suşlarında da kompleks nitrojen kaynaklarının PHB'ye etkisinin varlığı kanıtlanmıştır (Page, 1992c; Page and Cornish, 1993; Pal et al., 1998). *Azotobacter beijerinckii* DSM 1041 suşu ile yapılan bir çalışmada ise, maksimum PHB miktarı, kazein peptone (24 g/l) ve ürede (20 g/l) elde edilirken, hücrede depolanan polimer miktarının yeast extract ve casaminasitte 11-14 g/l arasında değiştiği bildirilmiştir (Bormann et al., 1998). Ayrıca azotun ve karbon kaynaklarının *R. meliloti* suşlarında biomass ve polimer oluşumu üzerine olan etkisinin varlığına dikkat çekilmiş, azotun yoksun olduğu ortamda hücre gelişiminin sınırlandırıldığı ve PHB üretiminin düşük olduğu da belirtilmiştir (Tavernier et al., 1997).

Çalışmamızda, azot kaynakları olarak proteaz pepton, glisin,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , asparajin ve DL-triptofanın PHB üretimine etkisi araştırılmıştır. Araştırmada kullanılan azot kaynaklarının PHB sentezi üzerine olumlu yönde etkili olduğu belirlenememiştir. Genel olarak, farklı azot kaynaklarında üretilen *R. meliloti* Y11 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşların PHB üretimleri az bulunurken, *R. viciae* F111'deki PHB verimin bu iki suşa kıyasla daha iyi olduğu gözlenmiştir.

*R. meliloti* Y11 nolu suş farklı inkübasyon sürelerinde, azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besiyerinde geliştirildiğinde, PHB üretim yüzdesi %7,40-26,23 olarak hesaplanmıştır (Bkz. Çizelge 4.18, Şekil 4.18). Bu verimin, glisinde %6,96-22,29 (Bkz. Çizelge 4.19, Şekil 4.19),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ta %5,24-19,41 (Bkz. Çizelge 4.20, Şekil 4.20), asparajinde %9,14-18,04 (Bkz. Çizelge 4.21, Şekil 4.21) ve DL-triptofanda %6,14-21,18 (Bkz. Çizelge 4.22, Şekil 4.22) arasında değiştiği tespit edilmiştir.

*B. japonicum* S Irat Fab suşun farklı sürelerde azot kaynaklarında inkübe edildiğinde PHB verimi; proteaz peptonda %7,62-26,78 (Bkz. Çizelge 4.23, Şekil 4.23),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ta %7,67-8,47 (Bkz. Çizelge 4.24, Şekil 4.24), asparajinde %1-9,88 (Bkz. Çizelge 4.25, Şekil 4.25) arasında olduğu bulunmuştur.

*R. viciae* F111 suşun PHB verimi farklı sürelerde geliştirildiğinde; proteaz peptonda %8,14-21,09 (Bkz. Çizelge 4.26, Şekil 4.26), glisinde %20,24-29,54 (Bkz. Çizelge 4.27, Şekil 4.27),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ta %18,43-35,43 (Bkz. Çizelge 4.28, Şekil 4.28) ve asparajinde %24,14-48,13 (Bkz. Çizelge 4.29, Şekil 4.29) olarak tespit edilmiştir.

*R. meliloti* Y11 suşu maksimum PHB miktarına (0,261 g/l) ve yüzde verimine (%26,23) azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besi ortamında 96. saat inkübasyonda ulaşmıştır (Bkz. Çizelge 4.18, Şekil 4.18). *B. japonicum* S Irat Fab suşu aynı azot kaynağında maksimum (%26,78) PHB verimini inkübasyonun 144. saatinde gerçekleştirmiştir (Bkz. Çizelge 4.23, Şekil 4.23). *R. viciae* F111'in ise proteaz pepton azot kaynağında PHB veriminin düşük olduğu gözlenirken, *B. japonicum* S Irat Fab suşuna kıyasla hücre gelişiminin ve hücrede depolanan PHB miktarının daha yüksek olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.26, Şekil 4.26). *R. viciae* F111 suşun 72. saat inkübasyonda hücredeki PHB miktarı 0,116 g/l olup, *B. japonicum* S Irat Fab suşun 144. saat inkübasyonda dahi bu miktara (0,079 g/l) ulaşamadığı gözlenmiştir. Ancak hücre kuru ağırlığına göre *R. viciae* F111'in yüzde PHB veriminin (%21,09), *B. japonicum* S Irat Fab (%26,78) ve *R. meliloti* Y11 (%26,23) suşlarına kıyasla az olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.26, Şekil 4.26). Page (1992c), farklı azot kaynaklarının ilave edildiği glukoz ortamında *A. vinelandii* UWD suşunun 24 saatlik kültürünün proteaz peptonda %71 oranında PHB

depoladığını tespit ederken, bacto pepton ve beef ekstraktta verimi %68 olarak belirlemiştir. Maksimum PHB verimini ise balık peptonda (%74) elde etmiştir.

Diğer taraftan *R. viciae* F111 suşunda DL-triptofanda hücre gelişiminin zayıf olması nedeniyle PHB içeriği determine edilemezken, kullanılan tüm azot kaynaklarındaki PHB içeriğinin diğer iki suşa kıyasla yüksek olması da dikkat çekmektedir. Bakteri en yüksek polimer üretimini asparajin ve  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  içeren besi ortamında gerçekleştirmiştir. Bakteri  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'lı ortamda maksimum PHB miktarını (0,124 g/l) 72. saat inkübasyonda gerçekleştirmiştir. Bu sürede bakterinin hücre kuru ağırlığına göre %35,43'ünün PHB olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.28, Şekil 4.28). F111 suşu, maksimum (%48,13) PHB verimini azot kaynağı olarak asparajin içeren besi ortamında 96. saat inkübasyonda göstermiştir (Bkz. Çizelge 4.29, Şekil 4.29).

Çalışmada, en yüksek PHB üretim ve verimin elde edildiği karbon ve azot kaynaklarından farklı kombinasyonlar oluşturulup, suşların polimer üretimleri de incelenmiştir.

*R. meliloti* Y11'in karbon kaynağı olarak glukoz ve azot kaynağı olarak proteaz peptondan oluşan kombine besiyerinde farklı sürelerde PHB verimi %4,45-38,64 (Bkz. Çizelge 4.30, Şekil 4.30) arasında değiştiği bulunurken, mannitol ve asparajin kombine besiyerinde bakterinin PHB içeriğinin %20,17-41,25'e yükseldiği gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.33, Şekil 4.33). Bu besiyerinde bakteri, maksimum hücre gelişimini 72. saat inkübasyonda gerçekleştirmiştir. Hücrede sentezlenen PHB verimi %41,25 olarak saptanmıştır (Bkz. Çizelge 4.33, Şekil 4.33).

*R. meliloti* Y11'in aksine, *B. japonicum* S Irat Fab'ın mannitol ve asparajin kombine besiyerinde PHB miktarı düşük bulunurken, hücre gelişiminin daha iyi olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.34, Şekil 4.34). Bakteri bu kombine besiyerinde 96. saat inkübasyonda, maksimum %13,37 oranında PHB üretmiştir. Bakteri, glukoz ve proteaz pepton kombine besiyerinde 120. saat inkübasyonunda %48,24 oranında PHB üretmiştir (Bkz. Çizelge 4.31, Şekil 4.31).

*R. meliloti* Y11 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşların glukoz ve proteaz pepton kombine besiyerinde maksimum PHB verimleri sırasıyla %38,64 ve %48,24 olarak belirlenirken (Bkz. Çizelge 4.30, Şekil 4.30 ve Çizelge 4.31, Şekil 4.31), aynı kombine besiyerinde *R. viciae* F111'in PHB veriminin düşük olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.35, Şekil 4.35). Bu suş, 120. saat inkübasyonunda maksimum %25,81 oranında PHB üretmiştir. Bakterinin bu kültür ortamında, besiyeri viskozitesini arttırdığı gözlenmiş ve bakterinin PHB üretiminin az olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.35, Şekil 4.35). Bakteride, mannitol ve asparajinden oluşan kombine besiyerindeki PHB miktarı ve yüzde verimin daha yüksek olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.32, Şekil 4.32). *R. viciae* F111 suşu bu kombine besiyerinde 96. saat inkübasyonunda maksimum %38,79 oranında PHB üretmiştir. Bakteri tarafından sentezlenen ve depolanan PHB miktarı 96 saat inkübasyondan sonra azalmış ve bakterinin bu polimeri kullandığı düşünülmüştür (Bkz. Çizelge 4.32, Şekil 4.32).

Bonartseva et al. (1994), glukoz ve nitrat ile oluşturulan kombine besiyerinde *R. trifolii*'nin az aktif suşunun aktif suşa kıyasla PHB içeriğinin daha yüksek olduğunu belirtirken, *R. meliloti*'nin az aktif suşunun ise sukroz ve glisin kombine besiyerinde maksimum PHB içeriğinin %59'dan fazla olduğunu açıklamışlardır. Araştırmacılar, en yüksek PHB verimini (%65'ten fazla) *R. phaseoli*'nin az aktif suşunda sukroz ve nitrat kombinasyonundan oluşturulan besi ortamında gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, yüksek PHB verimin elde edilmesi amacıyla oluşturulan kombine besi ortamlarında PHB veriminin, arzu edilen düzeyde artmadığı belirlenmiştir.

Ancak *B. japonicum* S Irat Fab suşun, glukoz ve proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında diğer suş ve kombinasyonlara kıyasla daha yüksek PHB verimine sahip olduğu saptanmıştır (%48,24). Elde edilen sonuçlardan, farklı türlerin farklı besi ortamında oluşturdukları PHB miktarları farklı bulunmuştur. Nitekim bazı araştırmacılar da, hücrede sentezlenen ve depolanan PHB içeriğinin farklı olmasının, kültürün tipinden, suşların genetik özelliklerinden ve bunların farklılığından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (Bonartseva et al., 1994; Tavernier et al., 1997).

Çalışmada kültürlerin pH'sı ölçülmüş, PHB içeriği ile son kültür pH'sı arasında ilişki araştırılmıştır. Tüm kültür şartları dikkate alındığında, her üç suşta da, kültür pH'sı arttıkça PHB verimin de arttığı gözlenmiştir. Maksimum PHB verimin elde edildiği inkübasyon sürelerinde, son kültür pH'larının yüksek olduğu dikkat çekmiştir. Tavernier et al. (1997), *R. meliloti*'nin iki suşu ile yaptıkları çalışmada ortamın asitliği arttıkça, kültürlerde PHB içeriğinin azaldığını tespit etmişlerdir. M5N1 suşu, fruktoz ortamında %84,5 PHB verimine vardığında son kültür pH'sı 6,8 iken, verim %50,8'e azaldığında kültür pH'ı 5,5 olarak ölçülmüştür. Aynı suş, glukoz karbon kaynağında pH 4,8'de %40,8 oranında PHB verimi gösterirken, pH 6,9'da verimin %44,1'e yükseldiği bildirilmiştir. Su47 nolu suş, glukoz ortamında maksimum (%70,3) PHB üretimini pH 7,1'de gösterirken, pH 5,5'ta bu verimin %51'e azaldığını rapor etmişlerdir.

Çalışmamızda, *R. meliloti* Y11 suşu glukoz ve proteaz pepton içerikli kombine besi ortamında maksimum %38,64 PHB verimine ulaştığında son kültür pH'nın 7,2 olduğu, PHB verimi %5,38'e azaldığında pH'nın 7,14'e düştüğü gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.30, Şekil 4.30). Aynı suş, mannitol+asparajin kombine besi ortamında pH 8,52'de %41,25 oranında PHB verimi gösterirken, pH 6,55'te PHB depolamadığı gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.33, Şekil 4.33). Chung et al. (1997), %2 propiyonik asit içeren besi ortamında *A. eutrophus*'un pH 6,5'ta PHB sentezlemediğini, pH 7,5'ta %37,9 oranında PHB ürettiğini ve pH 7'de PHB verimin %30'a azaldığını açıklamışlardır. Araştırmacılar pH'daki düşmeye bağlı olarak PHB depolanma oranının azaldığını rapor etmişlerdir.

*B. japonicum* S Irat Fab suşu, glukoz ve proteaz pepton içeren kombine besiyerinde pH 6,97'de %2,50 oranında PHB verimi üretirken, son kültür pH'nın 7,49 olduğu inkübasyonun 120. saatinde bu verim %48,24'e yükselmiştir. Ayrıca bu pH'da bakterinin maksimum PHB içeriğine vardığı da gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.31, Şekil 4.31). Aynı suş, mannitol ve asparajin içeren kombine besi ortamında, maksimum (%13,37) PHB verimi pH 7,43'te gösterirken; pH 7,10'da bu verimin %1,59'a azaldığı tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.34, Şekil 4.34). Benzer durum *R. viciae* F111 suşunda da gözlenmiştir. Bakteri mannitol ve asparajin içerikli kültür

ortamında minimum (%12,41) PHB verimini pH 6,79'da gösterirken, maksimum PHB verimi (%38,79) pH 7,44'te elde edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.32, Şekil 4.32). Bakteri glukoz ve proteaz pepton içeren kombine besi ortamında pH 6,82'de %14,40 PHB verimi gösterirken, son kültür pH'sı 7,29'a yükseldiğinde üretilen PHB miktarı %25,81'e yükselmiştir (Bkz. Çizelge 4.35, Şekil 4.35). Brandl et al. (1991), *Rhodobacter sphaeroides*'in karbon kaynağı olarak malat, asetat, asetat malat, pirüvat malat, glukoz malat, krotonat içeren ve azotun sınırlandırıldığı besi ortamlarında maksimum (%65) PHB verimine 122 mM asetat içeren besiyerinde bakterinin durgun fazında ulaştığını ve son kültür pH'sının 10,33 olduğunu açıklamışlardır. *B. circulans*'a ait beş farklı suşla yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Nam and Ryu, 1985). Suşlardaki PHB içeriğini 2,9-18 µg/mg arasında belirleyen araştırmacılar, maksimum PHB miktarını SM-3 ve SM-4 suşlarında elde etmişlerdir. Suşları 120 saat inkübe eden araştırmacılar, süre sonunda SM-3 suşun pH 7,51'de 18 µg/mg PHB ürettiğini, bu miktarın SM-4 suşunda 15 µg/mg olup, son kültür pH'sının da 7,23 olduğunu açıklamışlardır. Minimum (2,9 µg/mg) PHB sentezleyen NRLL B-3313 suşunun son kültür pH'sının 6,87 olduğunu bildirmişlerdir.

Denemelerimizde, tüm inkübasyon şartlarında PHB'nin tespit edildiği ortamın son kültür pH'ları suşlarda farklılık göstermiştir. Ancak genel olarak incelendiğinde, PHB'nin tespit edildiği son kültür pH'sına göre yorumlanacak olursa; ortam pH'sı yükseldikçe PHB yüzde verimin de arttığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür bilgileri ile benzerlik göstermiştir.

Birçok araştırmacı, PHB'nin mikroorganizmalar için gerekli olan mineral maddelerin tükendiği, diğer çevresel ve stres şartların baskın olduğu durgun fazda depolandığını bildirmişlerdir (Anderson and Dawes, 1990, Lee, 1996, Madison and Huisman, 1999). Ancak *Rhizobium etli*'de, PHB'nin yalnız durgun fazda değil, aynı zaman da eksponensiyal gelişme devresinde de sentezlendiği açıklanmıştır (Encarnacion et al., 1995). Üstelik PHB'nin hücre içinde sürekli olarak sentezlendiği ve parçalandığını bildiren araştırmacılar, PHB'nin sentez ve parçalanmasını kontrol eden çok hassas

bir mekanizmanın varlığını bildirmişlerdir. *Legionella pneumophila* serogrup 1'e ait iki suşta da PHB granülleri Nile Red ile boyanarak, hücrede depo edilen PHB'nin ölüm fazında kullanıldığı açıklanmıştır (James et al., 1999).

Mc Cool et al. (1996), hücre gelişimi ile PHB depolanması arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla aralıklı olarak *Bacillus megaterium*'un polimer içeriğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, depo edilen PHA oranının orta ekspanensiyal fazda (0,5 OD) arttığını ve geç ekspanensiyal fazda ise (1,0-1,5 OD) bu oranın maksimum seviyeye ulaştığını açıklamışlardır. Durgun fazdan itibaren (2,0-2,2 OD) polimer içeriğinin azaldığını belirlemişlerdir (Mc Cool et al., 1996). Çalışmamızda da hücre gelişimi ile PHB depolanması arasındaki ilişkinin belirlenmesinde kültürlerin 600 nm (OD)'de hücre yoğunlukları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermiştir. Kullanılan kültürlerde PHB'nin, bakteri gelişme devresinin ekspanensiyel ve durgun fazında sentezlendiği ve depo edildiği gözlenmiştir. Diğer taraftan hücre kuru ağırlığındaki artış ile hücrelerin PHB içeriği arasındaki ilişkinin orantılı olmadığı tespit edilmiştir. Manna et al. da 1999 yılında yaptıkları çalışmada, *Streptomyces* izolatlarında intrasellüler PHB'deki dereceli artışın hücre gelişimi ile paralel olduğunu veya çok az paralellik gösterdiğini açıklamışlardır. *B. megaterium*'da ise ekspanensiyal fazdaki hücrelerin %PHA içeriğindeki artışın hem minimal hem de zenginleştirilmiş besi ortamında %34 oranında olduğu belirlenirken, hücre biyomassındaki artışın %26,3 olduğu bulunmuştur. Araştırmacılar, ekspanensiyal ve durgun fazdaki gelişme sırasında %PHA'daki artış veya azalmanın toplam hücre kuru ağırlığındaki artış veya azalmadan daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, PHA inklüzyonlarının ekspanensiyal gelişim fazında hücre biyomassından daha hızlı depolandığını da rapor etmişlerdir (Mc Cool et al., 1996).

Çalışmamızda Sperman'ın korelasyon testine göre suşların hücre kuru ağırlığı ile PHB üretimi arasında bir ilişki olup olmadığı test edilmiş ve  $p=0,6923$  bulunmuştur. Bu değer tablo değeri ile kıyaslandığında,  $p=0,6923>0,3059$  olduğu için hücre kuru ağırlığı ile PHB arasındaki ilişkinin önemli olduğu görülmüştür. Ancak

çalışmamızda Sperman'ın korelasyon testine göre kültürlerin PHB içeriği ile hücre kuru ağırlığında ilişkinin doğrusal olmasına rağmen, diğer araştırmacıların bulgularına benzer şekilde, hücre kuru ağırlığı ile PHB depolanması arasında önemli paralellik tespit edilememiştir. Bu durum belirgin şekilde *R. meliloti* Y11 suşunda, glukoz ortamında gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.5, Şekil 4.5). Karbon kaynağı olarak glukoz içeren besi ortamında hücre yoğunluğunun 0,4 OD olduğu ilk 24 saat inkübasyonda, PHB depolanması belirlenmiştir. Hücre kuru ağırlığı ve PHB sentezindeki artış, 72 saat inkübasyon süresince devam etmiştir. Bu artışlar birbiriyle orantılı olmadığı için bakterinin PHB veriminin, inkübasyonun 48. ve 72. saatlerinde ilk 24. saate kıyasla düşük olduğu bulunmuştur. Bakterinin maksimum PHB verimi (%83,75) 24 saat inkübasyonunda tespit edilmiştir. Bakteri hücre gelişiminin erken ekspanzional fazında (0,4 OD) olduğu bulunmuştur. Bu fazda hücre kuru ağırlığı 0,240 g/l ve PHB miktarı 0,201 g/l iken, 72. saat inkübasyonda geç ekspanzional/erken durgun fazda (1,0-1,5 OD) hücre kuru ağırlığı 0,685 g/l ve PHB miktarı 0,275 g/l'ye yükselmiş, ancak hücre kuru ağırlığına göre PHB yüzde verimi %40,15'e azalmıştır.

Yine aynı şekilde S Irat Fab suşunun, mannitol karbon kaynağı içeren besi ortamında 48 saatlik inkübasyon süresince hücre kuru ağırlığı yaklaşık %3 oranında artış gösterirken, bu artış PHB oranında %75 olarak belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.9, Şekil 4.9). Bu suş, laktozlu ortamda geliştirildiğinde, aynı sürelerde hücre kuru ağırlığı %46 oranında artarken, PHB içeriği %76 oranında artmıştır (Bkz. Çizelge 4.10, Şekil 4.10).

*R. viciae* F111 suşu, mannitol karbon kaynağında geliştirildiğinde, 24 saat inkübasyonda hücre kuru ağırlığı 0,390 g/l iken, inkübasyonun 48. saatinde hücre kütlesi %5 oranında artmıştır. Bu sürelerdeki PHB miktarındaki artış ise yaklaşık %26 olmuştur (Bkz. Çizelge 4.14, Şekil 4.14). Karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında, inkübasyonun 120. saatinde bakterinin hücre kuru ağırlığındaki artış 4 kat iken, PHB içeriğindeki artışın 6 kat olduğu bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.16, Şekil 4.16). Tanaka et al. 1993'te *A. eutrophus*'ta depo edilen PHB miktarının da hücre gelişim oranından daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, gelişim

ve PHB depolanması üzerine besinlerin farklı etkileri olduğunu ve bu şartların detaylı olarak incelenmesi gerektiğini de vurgulamışlardır.

Çalışmada PHB sentez metabolizması üzerine sodyum klorürün etkisi de incelenmiş, sonuçlar Çizelge 4.36 ve Şekil 4.36'da verilmiştir. Çizelgede de görüldüğü gibi sodyum klorürdeki artışın PHB üretimi üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Suşlar arasında maksimum PHB üretimin elde edildiği *R. viciae* F111'in 0,25 g/l sodyum klorür içeren YEM besiyerindeki PHB verimi %46,67 olarak tespit edilmiştir. Ancak kontrol grubu olan ve 0,1 g/l sodyum klorür içeren YEM besi ortamındaki PHB verimi %57,09 PHB olarak bulunmuştur. Sodyum klorür miktarındaki artışa bağlı olarak PHB veriminin azaldığı gözlenmiştir. Bulgularımızın aksine Natarajan et al. (1995), *Rhizobium* DDSS 69'da sodyum klorürdeki artışın PHB içeriğinin artmasına neden olduğunu açıklamışlardır.

Mutasyonların genler üzerine yaptığı olumlu veya olumsuz etkileri, bilimsel çalışmaların bir diğer araştırma alanını oluşturmaktadır. *A. vinelandii* UWD suşu mutant bir bakteri olup, bakterinin 24 saat inkübasyonda polimer içeriği, fermentasyon şartlarına bağlı olarak %65-75 oranında değişirken, bu suşun atasalı olan UW suşu aynı şartlarda %22-25 oranında PHB depolayabilmektedir (Page and Knosp, 1989). Kültürlerin farklı karbon ve azot kaynaklarıyla oluşturulan kombine besi ortamlarında PHB üretimleri farklı bulunmuştur. Suşlar arasında maksimum (%83,75) PHB üretimi *R. meliloti* Y11 suşunda karbon kaynağı olarak glukoz içeren besiyerinden elde edilmiştir. Denenen karbon ve azot kaynaklarında *R. viciae* F111 suşunun PHB içeriği yüksek olduğu ancak kültür ortamındaki viskozitenin artışına neden olması bu bakteri ile çalışmayı zorlaştırmıştır. *B. japonicum* S Irat Fab suşunda da arzu edilen PHB verimi elde edilememiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, mutasyonun *Rhizobium*'lardaki etkisini incelemek amacıyla *R. meliloti* Y11 suşu seçilmiş, suş üzerinde farklı sürelerde UV ışını ve değişik konsantrasyonlarda akriflavin, 5-bromourasil ve nitrosoguanidin mutageni uygulanmıştır. Denemelerde muhtemel mutant izolatlar, yüzde ölüm üzerinden, tesadüfi olarak seçilmiştir. *Rhizobium etli* ile yapılan bir mutasyon çalışmasında %1 fruktoz ve %0,025 NH<sub>4</sub>Cl içeren besiyerinden 5 ile 7 gün sonra gelişen koloniler arasından opak görünümlü

koloniler seçilmiştir (Cevallos et al., 1996). Lach et al. (1990), N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin içeren besiyerinden *B. megaterium*'a ait toplam 1000 koloniden atasal suşa göre farklı morfolojik özellik gösteren ve filamentli gelişen bakterileri mutant bakteri olarak izole etmişlerdir.

UV mutasyonu sonunda yapılan ilk ölçümde, muhtemel mutant suşların PHB içerikleri ve yüzde verimlerin atasal suşa kıyasla düşük olduğu belirlenirken, bir yıl sonraki ikinci PHB ölçümünde Sa7 suşundaki polimer miktarının yaklaşık olarak %33 oranında arttığı gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.37, Şekil 4.37). Hücrede depolanan PHB miktarı 0,174 g/l olup, bu da hücre kuru ağırlığının %74,04'ünü oluşturmuştur. Sa7 muhtemel mutant suşun PHB içeriğinin atasal suşa oranla yaklaşık iki kat arttığı gözlenmiştir. Sa6 muhtemel mutantın ikinci ölçüm sonunda PHB içeriğinde %45 oranında bir azalma olduğu saptanmıştır.

Fiziksel ve kimyasal mutasyon sonunda elde edilen muhtemel mutant suşlar arasında akriflavin muhtemel mutantların ilk ölçümde PHB sentezlemedikleri tespit edilirken, bir yıl sonra yapılan II. ölçümde suşların %22,67-39,64 arasında değişen miktarlarda PHB sentezledikleri belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.38, Şekil 4.38). Akriflavin muhtemel mutantlarından Z1 ve Z4 suşlarının PHB verimleri atasal suşa kıyasla az bulunmuştur. Z2 muhtemel mutant suşun PHB veriminin (%39,64), atasal suştan (%38,91) yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda, kimyasal mutagenlerden 5-bromourasil ve nitrosoguanidin muhtemel mutantların PHB verimleri atasal suşa karşılaştırıldığında, ilk ölçümde düşük olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.39, Şekil 4.39 ve Çizelge 4.40, Şekil 4.40). 5-Bromourasil muhtemel mutantların PHB verimleri %2,96-23,91 arasında tespit edilirken, nitrosoguanidin muhtemel mutantların PHB verimleri %0,62-7,5 olarak bulunmuştur. Lach et al. (1990), *B. megaterium*'un N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidin mutantının atasal suşa göre daha az PHB depoladığını açıklamışlardır. Muhtemel mutant suşun 28 saatlik inkübasyon sonunda 26 µg/ml PHB depoladığını ve bunun da hücre kuru ağırlığın %16'sını oluşturduğunu rapor

etmişlerdir. Araştırmacılar, atasal suşun 6 saat inkübasyonda %18 oranında PHB sentezlediğini, mutant suşun depoladığı PHB'nin 28 saat sonrasında dahi bu miktara varmadığını açıklamışlardır. Çalışmamızda bir yıl sonra yapılan II. ölçümde muhtemel mutant suşların polimer verimlerinde artış olduğu gözlenmiştir. 5-Bromourasil muhtemel mutantlarından Bro5 ve Bro9 (sırasıyla %64,52 ve %55) ile nitrosoguanidin muhtemel mutantlarından H8, H9 ve H10 nolu izolatların (sırasıyla %45,58; %49,68 ve %57,25) atasal suşa (%38,91) kıyasla daha yüksek PHB verimi göstermişlerdir. Ayrıca, nitrosoguanidin mutasyonu sonrasında yapılan ilk ölçümde PHB sentezlemeyen suşların (H1 nolu suş dışında), II. ölçümlerde PHB sentezledikleri de gözlenmiştir. Bu suşlardan H3 ve H5 nolu suşlar, atasal suşa kıyasla daha az PHB sentezlerken, H8 ve H10 nolu izolatların PHB verimleri atasal suştan daha yüksek olduğu bulunmuştur. Huisman et al. (1992), *Pseudomonas oleovorans* mutantının %20 n-oktan destekli mikroelementlerin bulunduğu besi ortamında %41 oranında PHA sentezlediğini, atasal suşun aynı şartlarda %45 PHA ürettiğini tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada *P. putida* atasal suşunda verimin %48 olduğu açıklanırken, bu türe ait iki mutantın PHA verimlerinin %25 ile %38'e azaldığını açıklamışlardır. *A. eutrophus*'un PHA sentezleyemeyen 1-nitroso-3-nitro-1-methylguanidine mutantının aksine, *A. eutrophus* H16'nı glukozu kullanabilen bir başka mutantının, amonyağın sınırlandırıldığı kültür ortamında 50. saat inkübasyonda hücrede %76 oranında PHB depoladığı açıklanmıştır (Kim et al., 1994).

Çalışmamızda, bazı muhtemel mutant suşların ilk ölçümde PHB sentezleyemedikleri, II. PHB ölçümünde bazı izolatların atasal suşa kıyasla daha fazla PHB sentezlediği gözlenmiştir. Çalışmada ayrıca, fiziksel ve kimyasal mutagenlerin PHB üretimi üzerinde etkileri farklı bulunmuştur.

PHA/PHB'nin üretim maliyeti; suşun geliştirilmesinin yanısıra, uygun fermentasyon şartlarının ve ayırma yöntemlerinin belirlenmesi veya ucuz karbon kaynaklarının kullanımı ile düzenlenir. PHB'nin üretiminde toplam üretim maliyetinin %40'ının ham materyal olduğunu bildiren Kim (2000), PHB'nin ekonomik yönden daha fazla

üretilebilmesi amacıyla ucuz karbon kaynaklarının kullanımına gereksinim duyulduğunu belirtmiştir.

Nişasta, peynir altı suyu, şeker pancarı melası, şeker kamışı melası, buğday melası vb. atık maddeler PHB'nin ucuz ve kolay yünden üretilebilmesi için önerilmektedir. Şeker pancarı melasın PHB üretiminde kullanımı, bazı çalışmalarla gösterilmiştir (Page, 1989, 1992a, 1992b; Beaulieu et al., 1995; Kim, 2000).

Kim (2000), nişasta besi ortamında *Azotobacter chroococcum* ve peynir altı suyunda rekombinant *E. coli*'den PHB üretimini araştırmıştır. Oksijenin sınırlandırıldığı nişasta ortamında, *A. chroococcum*'un %46 oranında PHB ürettiği belirlenmiştir. Oksijenin sınırlandırılmadığı ortamda ise bakteri biomassında artış gözlenirken, PHB veriminin %20'ye düştüğü bulunmuştur. Aynı çalışmada peynir altı suyunda geliştirilen rekombinant *E. coli*'nin, sınırlı oksijen ortamında %80 oranında PHB ürettiği, oksijenin sınırlandırılmadığı fermentasyon şartlarında verimin %57'ye düştüğü açıklanmıştır. Araştırmacı, oksijen sınırlandırılmasının PHB miktarında artışa neden olduğunu ve endüstriyel atık maddelerin polimer üretiminde önemli derecede potansiyel olabileceğini rapor etmiştir.

Çalışmamızda kullanılan şeker pancarı melası Ankara Şeker Enstitüsü'nden temin edilmiş, melasın kimyasal bileşimi Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Suşların %0,5; %1; %1,5 ve %2 melas konsantrasyonlarda hücre gelişim eğrileri çıkarılmış ve hücre gelişiminin en iyi olduğu melas konsantrasyonunda PHB üretimi tespit edilmiştir (Bkz. Çizelge 4.41, Şekil 4.41). Şekil 4.41'de görüldüğü gibi *R. meliloti* Y11 suşu %0,5 melas konsantrasyonunda en iyi hücre gelişimi gösterirken, melasın %1,5 ve %2 konsantrasyonlarında hücre gelişiminin zayıf olduğu bulunmuştur. *B. japonicum* S Irat Fab suşu en iyi hücre gelişimini %1,5 melas konsantrasyonunda gösterirken (Bkz. Çizelge 4.42, Şekil 4.42), *R. viciae* F111 suşun %1 melas konsantrasyonundaki hücre gelişimi %0,5 ve %1,5 konsantrasyona kıyasla daha iyi olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.43, Şekil 4.43). Ancak bu konsantrasyonda bakterinin kültür ortamındaki viskozitesinin arttığı ve ortamın

tamamen jelleştiği gözlenmiştir. Dolayısıyla %1 melas konsantrasyonunda PHB tespit edilememiştir. Diğer taraftan %2 melas konsantrasyonunda da F111 suşun hücre gelişiminin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. Burrows (1970), endüstriyel fermentasyonlarda melasın ucuz ve kolay temin edilebilir olması gibi avantajlarının yanısıra, kompleks bir substrat olduğundan bazı toksik elementler ile mineral maddeler içerdiğini ve bu maddelerin yüksek konsantrasyonlarının da mikroorganizma gelişimi üzerinde inhibitör etki yaptığını açıklamıştır.

Melasın %0,5 konsantrasyonunda geliştirilen *R. meliloti* Y11, inkübasyonun ilk 24. saatinde PHB sentezlemezken, ilerleyen inkübasyon sürelerinde hücrede polimer depolandığı gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.44, Şekil 4.44). Bakteri 48. saat inkübasyonda %37,10 oranında PHB depolarken, maksimum (%56,31) PHB üretimini inkübasyonun 72. saatinde gerçekleştirmiştir. Bakteri kontrol (YEM) besi ortamında daha az (%39,25) oranda PHB üretmiştir. Hücrede sentezlenen ve depo edilen polimer miktarının ilerleyen inkübasyon süresince azaldığı gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.44, Şekil 4.44).

n-Alkanat destekli %5 melas konsantrasyonunda geliştirilen *A. vinelandii* UWD suşunda P(HB-co-HV) oluşumunu araştıran Page (1992a) de, bakterinin ilk 10 saat inkübasyonunda polimer sentezlemediğini, polimer sentezin 12 saatten sonra gerçekleştiğini bildirmiştir. Bakteri, propiyonat destekli melas besiyerinde %61 oranında PHA sentezlerken, bütiratın ilave edildiği melas ortamında bu oranın %66'ya yükseldiği açıklanmıştır. Bakteri kontrol olarak yalnız melas besi ortamında geliştirildiğinde polimer verimin %63 olduğu belirtilmiştir.

Melasın %1,5 konsantrasyonunda geliştirilen *R. viciae* F111 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşlarının PHB üretimlerinin Y11 suşa kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.44, Şekil 4.44). F111 suşu, Y11 nolu suş gibi inkübasyonun ilk 24 saatinde PHB sentezlemezken, *B. japonicum* S Irat Fab suşun ise bu iki suştan farklı olarak inkübasyonun ilk 24 saatinde polimer ürettiği gözlenmiştir. Melasın %1,5 konsantrasyonunda her iki suşun da PHB miktarlarının tüm inkübasyon sürelerinde oldukça az olduğu bulunmuştur. *R. viciae* F111 suşu maksimum (%23,33) PHB

üretimini 96. saat inkübasyonda gerçekleştirirken, *B. japonicum* S Irat Fab suşu ise maksimum %29,19 oranında PHB üretimini inkübasyonun 48 saatinde gerçekleştirmiştir. Maksimum PHB üretim ve sentezin devam ettiği inkübasyon süreleri dikkate alınıp, *R. meliloti* Y11 ile kıyaslandığında, her iki suşun da 48 saat inkübasyonda *R. meliloti* Y11'den daha az PHB ürettiği gözlenmiştir. Ayrıca *R. viciae* F111 suşun %1 melas konsantrasyonunda kültür ortamındaki viskozitesinin, diğer konsantrasyonlara kıyasla daha fazla olması nedeni ile PHB'nin belirlenmesini engellemiştir. Benzer sonuç bakterinin %1,5 melas konsantrasyonunda geliştirilmesi ile de gözlenmiştir. Page (1992a) de yaptığı bir çalışmada buna benzer bir sonuca dikkat çekmiştir. Araştırmacı, %5 melas ve %2,5 sukroz karışımından oluşan besiyerinde *A. vinelandii* UWD suşu geliştirildiğinde, 24 saat inkübe edilen kültür ortamındaki viskozitenin arttığını ve buna bağlı olarak ortamdaki oksijen transferini azalttığını belirtmiştir. Inkübasyonun ilk 10 saatinde hücre gelişiminin iyi olmasına rağmen, hücrede PHA oluşmadığını bildirirken, bu sonucun ortamın viskozitesi ile ilişkili olabileceğini açıklamıştır.

Melasın PHB üretimine olan etkisinin incelenmesine yönelik yapılan bir diğer araştırmada, *A. eutrophus* DSM 545 suşu %0,3 melas konsantrasyonunda geliştirilmiş ve bakterinin optimal %17-26 arasında PHB depoladığı bildirilmiştir (Beaulieu et al., 1995).

Page (1992b), şeker pancarı melasının %5 ve %2 konsantrasyonlarında *A. vinelandii* UWD suşun PHB içeriğini karşılaştırmıştır. Bakteri %5 melasta hücre kuru ağırlığına göre %24 oranında PHB verimi gösterirken, bu verimin %2 melas konsantrasyonunda %51'e yükseldiğini bildirmiştir. Düşük PHB verimi elde edilen %5 melas konsantrasyonuna 15 mM amonyum asetat ilavesi ile polimer verimin %70'e yükseldiğini bildirmiştir. Araştırmacının başka bir çalışmasında, melas besi ortamına glukoz ve amonyum asetat ilavesiyle bakterinin optimal PHB verimine vardığını ve hücre gelişiminin stimüle edildiğini de rapor etmiştir (Page, 1989).

Yapılan literatür araştırmalarımızda, *Rhizobium*'larla atık maddelerden PHB üretimi ile ilgili herhangi bir bilimsel çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışma sonunda elde

edilen bulgular, endüstriyel bir atık madde olan ve biyoteknoloji alanında yaygın olarak kullanılan melasın, *Rhizobium* bakterileri ile PHB üretimine uygunluk gösterdiği ve konu ile ilgili daha detaylı araştırmanın yapılması gerektiğini göstermiştir. Elde edilen sonuçlardan, polimer veriminin *Rhizobium* bakterilerin türüne ve melas konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonraki yapılacak denemelerde polimer üretiminde en uygun suş ile fermentasyon şartının belirlenmesi, hatta melasın şeker, elementler veya vitaminlerle zenginleştirilmesi ile PHB verimin artırılması amaçlanmıştır.

*Rhizobium* suşlarındaki plazmidler, özellikle hızlı gelişen bir çok *Rhizobium* bakterisinde bulunan tek ve büyük plazmidler olup, nodülasyon ve nitrojenazdan sorumlu genleri taşımaktadırlar. Bu grup bakteriler, genellikle tek plazmid içermelerine rağmen, tarladan bir baklagil nodülünden izole edilen *Rhizobium* suşlarında, plazmid sayılarının 2 ile 4-5 hatta 10 olabileceği açıklanmıştır. Azot fiksasyonundan sorumlu olan megaplazmidlerin dışındaki diğer plazmidlerin fonksiyonları henüz aydınlatılamamış, bu plazmidler “cryptic” plazmidler olarak adlandırılmıştır (Weaver et al., 1990).

Laguerre et al. (1992) bezelye, kırmızı yonca, mercimek ve Fransa fasülyesinin kök nodüllerinden izole ettikleri 113 adet *Rhizobium* izolatının tümünde, moleküler büyüklükleri 180-190 kb arasında değişen plazmid DNA'nın varlığını bildirmişlerdir. Ayrıca suşların genomik dağılımı sonunda, izolatların %40'nın aynı kromozomal tipe ait olduğunu belirlemişlerdir. Zahran (1992), *Vicia faba*, *Trifolium alexandrium* ve *Lupinus termis*'ten izole ettiği 30 adet kök nodül bakterisinden 21'inde, sayıları 1-3 arasında değişen plazmid DNA tespit etmiş ve bunların moleküler ağırlıklarının 273-40 Md arasında değiştiğini bildirmiştir.

Bir başka çalışmada ise *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas* suşlarının tümünde megaplazmid varlığı tespit edilmiş, bu plazmidlerin moleküler ağırlıklarının  $3 \times 10^8$ - $5 \times 10^8$  arasında değiştiği bildirilmiştir. Araştırmacılar, hızlı gelişen toprak mikroorganizmalarında  $5 \times 10^8$ 'den daha büyük megaplazmidlerin izolasyonu için hassas bir metot önermişlerdir (Plazinski et al., 1985).

Martinez et al. (1987), *Rhizobium phaseoli* CFN 299 suşunda 185, 225 ve 410 kb büyüklüğünde üç plazmid belirlerken, Weaver et al. (1990), *R. phaseoli*'ye ait üç suşta 250, 225 ve 210 Md büyüklüğünde birer adet plazmid DNA izole etmişlerdir. Araştırmacılar, moleküler ağırlığı 166 ve 248 Md olan iki plazmid içeren *R. phaseoli* DB1 suşunu standart suş olarak kullandıklarını açıklamışlardır. Rhizobial suşlardaki megaplazmidlerin Sym plazmidi olduğu ve bunların azot fiksasyonu için gerekli olan genleri taşıdıkları açıklanmıştır (Geniaux and Amarger, 1993).

Çalışmamızda, 31 adet *Rhizobium* bakterisinin 13'ünde birer adet plazmid DNA bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.45). Diğer suşlarda plazmid DNA'ya rastlanılmamıştır. Plazmidlerin moleküler ağırlıkları 13,5-16,75 kb arasında hesaplanmıştır. Referans suş *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 nolu suşta plazmid DNA belirlenememiştir. Akçelik vd. de (1997), USDA 110 suşunun plazmid DNA içermediğini rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, izole ettikleri *B. japonicum* suşlarından birinde, alkali lizis yöntemiyle 22 kb büyüklüğünde bir plazmidin varlığını belirlemişlerdir.

Plazinski et al. (1985) tarafından farklı Rhizobial türlerinde aynı büyüklükte plazmid bantların varlığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, *Rhizobium* sp., *R. trifolii* (ANU suşları), *R. meliloti* ve *R. japonicum* (USDA suşları) bakterilerinde,  $450 \times 10^6$  büyüklüğündeki plazmidin ortak olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar *R. meliloti*'de  $5 \times 10^8$ 'den daha büyük megaplazmidlerin elektroforetik prosedürlerle belirlenmesinin çok kolay olmadığını ve bu tip plazmidlerin etkilenebilir özelliğinden kaynaklandığını bildirmişlerdir (Plazinski et al., 1985). Çalışmamızda da *R. meliloti* Y520 ve *R. viciae* F111 suşlarında ikinci birer plazmidin varlığı gözlenmiş, ancak bu plazmidlerin izolasyonunda başarı sağlanamamıştır.

Araştırmamızda kullanılan bakterilerin PHB üretme yetenekleri ile plazmid içerikleri arasındaki ilişkinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bakterilerin tümünün PHB sentezlemelerine rağmen, bazı suşların plazmid DNA içermedikleri gözlenmiştir. En yüksek PHB içeriği ve yüzde verimi gösteren F111 ve Y11 nolu suşların plazmid taşıdığı belirlenirken, S Irat Fab'ın PHB verimi yüksek olmasına rağmen plazmid

DNA içermediği gözlenmiştir (Bkz. Çizelge 4.2 ve 4.45). Plazmid DNA içermeyen referans USDA 110 suşun PHB sentezlediği bulunmuştur.

Aslım vd. (1998), PHB üretiminde plazmid DNA'nın yanısıra kromozomal DNA'nın da etkili olabileceğini açıklamışlardır. *R. meliloti*'de de PHB degradasyon iz yoluna etki eden kromozomal ve megaplazmid bölgesi teşhis edilmiştir (Charles et al., 1997).

Çalışmamızda, bazı suşların plazmid içermemeleri, söz konusu suşlarda PHB sentezinden sorumlu olan genlerin plazmidten bağımsız olduğunu, dolayısıyla PHB sentez yeteneğine ait genetik materyalin aynı zaman da kromozomal DNA üzerinde de olabileceğini düşündürmüştür.

## 6. ÖNERİLER

Her geçen gün artan plastik tüketimi, özellikle yüksek miktarlarda geri dönüşümlü plastik üretiminin gerekli olduğunu ortaya koymuştur. Bu gereksinim petroplastığe olan talebi de azaltacaktır. Nitekim, petrol fiyatlarının hızlı artışı ve dünyadaki petrol rezervlerinin gittikçe tükenmesi, plastik üretimi için yeni kaynaklar bulunmasının oldukça akıllıca olacağını göstermektedir. Böylece 21. yy ve sonrasında tükenebilecek kaynakların yerine bir yenisi konabilecektir. Hiç kuşkusuz bakterilerden üretilecek PHB'ler, petrokimyasal plastiklere kıyasla daha ucuz ve ekonomik olacaktır. Çalışmalarımız sonunda elde edilen bilgiler doğrultusunda, glukoz içeren besiyerinde maksimum %83,75 oranında PHB sentezlediği tespit edilen *R. meliloti* Y11 suşu, şeker pancarı melasında da yüksek (%56,31) PHB verimi göstermiştir. Bakterideki PHB verimi glukoz içeren besi ortamında daha avantajlı gibi görünse de; endüstriyel olarak PHB üretimi düşünüldüğünde şeker pancarı melası, glukozu göre ucuz bir materyal olduğu için melas ortamında polimer üretmek daha ekonomik olacaktır. Dolayısıyla bakterinin PHB sentez şartlarının optimizasyonu ile endüstriyel bir polimer üreticisi olarak geliştirilebileceği düşünülmüştür.

## KAYNAKLAR

- Abe, H., Kikkawa, Y., Iwata, T., Aoki, H., Akehata, T. and Doi, Y., 2000, Microscopic visualization on crystalline morphologies of thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymer, **Polymer**, 41, 867-874.
- Akçelik, M., Karuç, K., Ayhan, K. and Gürgün, V., 1997, *Bradyrhizobium japonicum* suşlarının nodülasyon yeteneğine ait genetik determinantların belirlenmesi, **Tr. J. of Biology**, 21, 237-247.
- Anderson, A.J. and Dawes, E.A., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, **Microbiol. Reviews**, 54, 4, 450-472.
- Anderson, A.J., Haywood, G.W. and Dawes, E.A., 1990, Biosynthesis and composition of bacterial poly(hydroxyalkanoates), **Int. J. Biol. Macromol.**, 12, 102-105.
- Arda, M., 1997, Temel Mikrobiyoloji, Kükem Derneği, **Bilimsel Yayınlar**, No. 2., 490 s.
- Arda, M., 2000, Temel Mikrobiyoloji, **Medisan Yayınları**, İkinci baskı, seri no.2 548s.
- Aslım, B., 1994, *Lactobacillus bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* bakterilerinin metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine bazı fiziksel ve kimyasal mutagenlerin etkisi, **Doktora Tezi**, 151s., Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Aslım, B., Sağlam, N. ve Beyatlı, B., 1998, Toprakta izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) üretim miktarının belirlenmesi, **III. Ulusal Biyoteknoloji Sempozyumu-Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği**, 67-74.
- Ayhan, K., 1994, *Rhizobium* bakterilerindeki nodülasyon genlerinin fonksiyonları ve regülasyonu, **KÜKEM Dergisi**, 17, 2, 43-48.
- Barham, P.J., Keller, A., Otun, E.L. and Holmes, P.A., 1984, Crystallization and morphology of a bacterial thermoplastic: poly-3-hydroxybutyrate, **Journals of Materials Science**, 19, 2781-2794.
- Bağcı, H., Shareef, S.R. ve Özdamar, K., 1991, *Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması, **Doğa Tr J of Biology** 5, 70-81.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S. and Goulet, J., 1995, Influence of ammonium salts and cane molasses on growth of *Alcaligenes eutrophus* and production of polyhydroxybutyrate, **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 1, 165-169.

- Benoit, T.G., Wilson, G.R. and Baugh, C.L., 1990, Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1, **Lett. Appl. Microbiol.**, 10, 15-18.
- Beringer J.E., 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*, **Journal of General Microbiology**, 84, 188-198.
- Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal termoplastik üretimi, **Kükem Dergisi**, Cilt, 19, Sayı 2, 23-32.
- Bilgehan, H., 1995, Klinik mikrobiyolojik tanı, Fakülteler Kitabevi, **Barış Yayınları**, 529-532, İzmir.
- Bluhm, T.L., Hamer, G.K. and Sundararajan, P.R., 1998. Isodiomorphism in poly( $\beta$ -hydroxybutyrate-co- $\beta$ -hydroxyvalerate) copolyesters, **Polymer Prepr.**, 29, 603.
- Bonartseva G.A., 1985, Testing for activity of nodule bacteria in terms of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation following vital staining of the colonies with phosphine 3R, **Microbiology**, 54:3, 371-374.
- Bonartseva G.A. and Myshkina, V.L., 1985, Fluorescence intensity of strains of nodule bacteria (*Rhizobium meliloti* and *Rhizobium phaseoli*) differing in activity, grown in the presence of the lipophilic vital stain phosphine 3R, **Microbiology**, 54, 4, 535-541.
- Bonartseva, G.A., Myshkina, V.L. and Zagreba, E.D., 1989, Relationship between poly- $\beta$ -hydroxybutyrate content and nitrogenase and hydrogenase activity in some strains of *Rhizobium*, **Translated from Mikrobiologiya**, 58:6, 920-922.
- Bonartseva, G.A., Myshkina, V.L. and Zagreba, E.D., 1994, Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate content in cells of various *Rhizobium* species during growth with different carbon and nitrogen sources, **Microbiology**, 63, 1, 45-48.
- Bormann, E.J., Leibner, M. and Beer, B., 1998, Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 38, 117-121.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W. and Fuller, R.C., 1988, *Pseudomonas oleovorans* as an source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters, **Applied and Environmental Microbiology**, 54, 8, 1977-1982.
- Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Lloyd, R. and Fuller, R.C., 1991, The accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides*, **Arch. Microbiol.**, 155, 337-340.
- Braunegg, G., Lefebvre, G. and Genser, K.F., 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects, **Journal of Biotechnology**, 65, 127-161.

- Bruce, K.D. and Jordens, J.Z., 1991, Characterization of noncapsulate *Haemophilus influenzae* by whole-cell polypeptide profiles, restriction endonuclease analysis, and RNA gene restriction patterns. **J. Clin. Microbiol.**, 29:2, 291-296.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E., 1974, *Bergey's Manual of determinative bacteriology*, 8th edition, **The Williams and Wilkins Company**, 1246p, Baltimore.
- Burrows, S., 1970, Baker's yeast, 365-369, The yeast, Rose, A.H. and Harrison J.S. (Eds), **Academic Press**, London and New York.
- Cevallos, M. A., Encarnacion, S., Leija, A., Mora, Y. and Mora, J., 1996, Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, **Journal of Bacteriology**, 178, 6, 1646-1654.
- Charles, T.C., Cai, G. and Aneja, P., 1997, Megaplasmid and chromosomal loci for the phb degradation pathway in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, **Genetics**, 146, 1211-1220.
- Chen, H., Gartner, E. and Rolfe, B. G., 1993, Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, **Applied and Environmental Microbiology**, 59:4, 1058-1064.
- Chung, Y.J., Cha, H.J., Yeo, J.S. and Yoo, Y.J., 1997, Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric) acid using propionic acid by pH regulation, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 83, 5, 495-497.
- Cruikshank, R., 1972, *Medical microbiology*, 11<sup>th</sup> . ed., **Livingstone**, London.
- Conver, W.J., 1971, *Practical nonparametric statistics*, **John Weleyard and Sonc. Inc**, New York USA.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L. and Maas, W.K., 1988, Identification and classification of bacterial plasmids, **Microbiological Reviews**, 52, 3, 375-395.
- Çökmüş, C. and Yousten, A.A., 1993, Bacteriocin production by *Bacillus sphaericus*, **J. Invertebr. Pathol.**, 61, 323-325.
- Çökmüş, C. and Yousten, A.A., 1994, Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE. **J Invertebr Pathol** 64, 267-268.
- Date, R.A. and J. Halliday, 1987, Collection, isolation, cultivation and maintenance of *rhizobia*, p.1-27, In:G.H. Elkan (ed.), **Symbiotic nitrogen fixation technology**, Morcel Dekker, Inc. New York.
- Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J.D., 1996, Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp., IPCB-403, **Indian Journal of Experimantal Biology**, 34, 216-219.

- Del Papa, M.F., Balague, L.J., Sowinski, S.C., Wegener, C., Segundo, E., Abarca, F.M., Toro, N., Niehaus, K., Pühler, A., Aguilar, M., Martinez-Drets, G. And Lagares, A., 1999, Isolation and characterization of alfalfa-nodulating Rhizobia present in asidic soils of central Argentina and Uruguay, **Applied and Environmental Microbiology**, 65, 4, 1420-1427.
- Doi, Y., Tamaki, A., Kunioka, M. and Soga, K., 1988, Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate by *Alcaligenes eutrophus* from butyric and pentanoic acids, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 28:330-334.
- Dreyfus, B., Garcia, J.L. and Gillis, M., 1988, Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*, **International Journal of Systematic Bacteriology**, 38, 1, 89-98.
- Encarnacion, S., Dunn, M., Willms, K. and Mora, J., 1995, Fermentative and Aerobic Metabolism in *Rhizobium etli*, **Journal of Bacteriology**, 177, 11, 3058-3066.
- Esen, A., 1978, A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein, **Analytical Biochemistry**, 89, 264-273.
- Flint, S.H., Brooks, J.D. and Bremer, P.J., 1997, The influence of cell surface properties of thermophilic streptococci on attachment to stainless steel, **Journal of Applied Microbiology**, 83, 508-517.
- Fulchieri, M.M., Estrella, M.J. and Iglesias, A.A., 2000, Characterization of *Rhizobium loti* strains native from the Salado River Basin, Studies on symbiotic potential, <http://www.psu.missouri.edu/lnl/v30/Fulchieri.htm>, p1-4.
- Gatti, M., Fornasari, M.E. and Neviani, E., 1997, Cell-wall protein profiles of dairy thermophilic lactobacilli, **Letters in Applied Microbiology**, 25, 345-348.
- Gatti, M., Fornasari, M.E. and Neviani, E., 2001, Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* by SDS-PAGE of cell-walls proteins, **Letters in Applied Microbiology**, 32, 352-356.
- Geniaux, E. and Amarger, N., 1993, Diversity and stability of plasmid transfer in isolated from single field population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, **FEMS Microbiology Ecology**, 102, 251-260.
- Göksungur, Y., 1998, Melastan laktik asit üretiminde farklı üretim tekniklerinin kullanılabilirliği ve ortam şartlarının optimizasyonu, Ege Üniv. Fen Bil. Enst. Gıda Müh. A.B.D., **Doktora Tezi**, İzmir, 19-63.

- Haywood, G. W., Anderson, A.J. and Dawes, E.A., 1989, A survey of the accumulation of novel polyhydroxyalkanoates by bacteria, **Biotechnology Letters**, 11, 7, 471-476.
- Hiki, S., Miyamoto, M. and Kimura, Y., 2000, Synthesis and characterization of hydroxy-terminated [RS]-Poly-(3-hydroxybutyrate) and its utilization to black copolymerization with L-lactide to obtain a biodegradable thermo-plastic elastomer, **Polymer**, 41:7369-7379.
- Hiramitsu, M., Koyaman, N. and Doi, Y., 1993, Production of poly-(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by *Alcaligenes latus*, **Biotechnology Letters**, 15:461-466.
- Hitchcock, P.J. and Brown, T.M., 1983, Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels, **Journal of Bacteriology**, 154: 1, 269-277.
- Holmes, P.A., 1985, Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastic, **Phys. Technol.**, 16, 32-36.
- Huisman, G.W., Wonink, E., de Koning, G., Preusting, H. and Witholt, B., 1992, Synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 38:1-5.
- James, B.W., Mauchline, W.S., Dennis, P.J., Keevil, C.W. and Wait, R., 1999, Poly-3-hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an energy source for survival in low-nutrient environments, **Applied and Environmental Microbiology**, 65:2, 822-827.
- Jordan, D. C., 1984, Bergey's of Manual of Systematic Bacteriology, Noel R. Krieger and John G. Holt (ed), **The Williams and Wilkins Company**, Baltimore, London, Vol.1, p. 234-244.
- Joseph, M.V., Desai, J.D. and Desai, A.J., 1983, Production of antimicrobial and bacteriocin-like substances by *Rhizobium trifolii*, **Applied and Environmental Microbiology**, 45:2, 532-535.
- Kamicker, B.J. and Brill, W.J., 1986, Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms, **Applied and Environmental Microbiology**, 51:3, 487-492.
- Kämpfer, P. 1995, An efficient method for preparation of extracts from gram-positive bacteria for comparison of cellular protein patterns, **Journal of Microbiological Methods**, 21, 55-60.
- Karaboz, İ. ve Umay, B., 1994, *Pseudomonas extorquens*'den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi, **Ulusal Biyoloji Kongresi**, Edirne, 14-18.
- Karr, D.B., Waters, J.K. and Emerich, D.W., 1983, Analysis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Rhizobium japonicum* bacteroids by ion-exclusion high-pressure liquid

- chromatography and UV detection, **Applied and Environmental Microbiology**, 46, 6, 1339-1344.
- Karr, D.B., Waters, J.K., Suzuki, F. and Emerich, D.W., 1984, Enzymes of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and citric acid cycles of *Rhizobium japonicum* bacteroids, **Plant Physiol.**, 75, 1158-1162.
- Katırcıoğlu, H. ve Aksöz, N., 1996, Tek hücre proteini eldesi ve bunun Drosophila gelişimine etkisi, **Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi**, 16:2, 37-44.
- Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. and Sakazawa, C., 1992, Production of 3-hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 73:3, 246-247.
- Kim, B.S., Lee, S.C., Lee, S.Y., Chang, H.N., Chang, Y.K. and Woo, S.I., 1994, Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control, **Biotechnology and Bioengineering**, 43, 892-898.
- Kim, B.S., 2000, Production of poly(-3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, **Enzyme and Microbial Technology**, 27:774-777.
- Kiredjian, M., Holmes, B., Kersters, K., Guilvout, I. and De Ley, J., 1986, *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment, **International Journal of Systematic Bacteriology**, 36,2, 282-287.
- Kishore, L., Natarajan, K. and Babu, C.R., 1996, Total Soluble protein and membrane lipopolysaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* Isolates, **Microbios**, 86, 143-156.
- Lach, D.A., Sharma, V.K. and Vary, P.S., 1990, Isolation and characterization of a unique division mutant of *Bacillus megaterium*, **Journal of General Microbiology**, 136, 545-553.
- Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature (London)**, 227, 680-685.
- Lafferty, R.M., Korsatko, B. and Korsatko, W., 1988, Microbial production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid, **Biotechnology**, edited by H. J. Rehm and G. Reed. Volume 6b, Special Microbial Processes.
- Laguerre, G., Geniaux, E., Mazurier, S.I., Rodriguez, C.R. and Amarger, N., 1992, Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes, **Canadian Journal of Microbiology**, 39:412-419.

- Lee, S.Y., 1996, Bacterial polyhydroxyalkanoates, **Biotechnology and Bioengineering**, 49, 1-14.
- Lithgow, J.K., Wilkinson, A., Hardman, A., Rodelas, B., Wisniewski, D.F., Williams, P. and Downie, J.A., 2000, The regulatory locus *cin* RI in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci, **Molecular Microbiology**, 37, 1, 81-97 (Abstract).
- Liu, F., Li, W., Ridgway, D. and Gu, T., 1998, Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate or molasses by recombinant *Escherichia coli*, **Biotechnology Letters**, 20, 4, 345-348.
- Long, S.R., 1989, *Rhizobium* Genetics, **Annu. Rev. Genet.**, 23, 483-506.
- Lodwig, E.M., Allaway, D., Wheeler, T., Downie, A.J. and Poole, P.S., 2001, Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and glycogen metabolism in *Rhizobium leguminosarum*, <http://www.ams.rdg.ac.uk/microbiology/phb%20and%20glycogen%20metabolism>, 1p.
- Madden, L.A., Anderson, A.J., Asrar, J., Berger, P. and Garrett, P., 2000, Production and characterization of poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures, **Polymer**, 3499-3505.
- Madison, L.L. and Huisman G.W., 1999, Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): From DNA to plastic, **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 63, 21-53.
- Manna, A., Banerjee, R. and Paul, A., 1999, Accumulation of poly(3-hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*, **Current Microbiology**, 39, 153-158.
- Martinez, E., Palacios, R. and Sanchez, F., 1987, Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids, **Journal of Bacteriology**, 169, 6, 2828-2834.
- Mc Cool, G.J., Fernandez, T., Li, N. and Cannon, M.C., 1996, Polyhydroxyalkanoate inclusion-body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, **FEMS Microbiology Letters**, 138, 41-48.
- Mc Dermott, T.R., Griffith, S.M., Vance, C.P. and Graham, P.H., 1989, Carbon metabolism in *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids, **FEMS Microbiology Reviews**, 63, 321-340.
- Mc Kay, L., Miller A., Sondine, W.E. and Elliker, P.R., 1970, Mechanisms of lactose utilization by lactic acid *Streptococci*: enzymatic and genetic analysis, **Journal of Bacteriology**, 102, 3, 804-809.

- Mendonça, E.H.M., Mazzafera, P., Schiavinato, M.A., 1999, Purification of leghemoglobin from nodules of *Crotalaria* infected with *Rhizobium*, **Phytochemistry**, 50, 313-316.
- Mercan, N. 1996, *Bacillus sphaericus* suşlarının PAGE ile elde edilen Hücre dışı protein profillerine göre ayrımı, **Yüksek Lisans Tezi**, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Mercan, N. ve Beyatlı, Y., 2001, *Bacillus sphaericus* suşlarının Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate üretimlerinin incelenmesi, **Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi**, 25: 2, 1-7.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A. and Swing, J., 1993, Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils, **Applied and Environmental Microbiology**, 59:10, 3233-3238.
- Miksch, G. and Lentzsch, P., 1988, Transfer of *Rhizobium leguminosarum* SYM plasmids to *R. meliloti* and stability of resident and transferred plasmids, **J. Basic Microbiol.**, 28, 445-455.
- Miksch, G. and Lentzsch, P., 1990, Expression and stability of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Sym plasmid in *R. meliloti* and *Agrobacterium tumefaciens* and its effect on clover-bacterium symbiosis, **Journal Basic of Microbiology**, 30, 3, 181-187.
- Mitomo, H., Barham, J. and Keller, A., 1987, Crystallization and morphology of Poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) and its copolymer, **Polymer Journal**, 19:11, 1241-1253.
- Moreira, F.M.S., Gillis, M., Pot, B., Kersters, K. and France, A.A., 1993, Characterization of Rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins, **System. Appl. Microbiol.**, 16, 135-146.
- Münchbach, M., Nocker, A. and Narberhaus, F., 1999, Multiple small heat shock proteins in Rhizobia, **Journal of Bacteriology**, 181, 1, 83-90.
- Nam, D.H. and Ryu, D.D.Y., 1985, Relationship between butirosin and sporulation in *Bacillus circulans*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 27, 5, 798-801.
- Natarajan, K., Kishore, L. and Babu, C.R., 1995, Sodium chloride stress results in increased poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Rhizobium* sp. DDSS 69, **Microbios**, 331, 95-107 (Abstract).
- Nick, G., de Lajudie, P., Eardly, B.D., Suomalainen, S., Paulin, L., Zhang, X., Gillis, M. and Lindström, K., 1999, *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostense* sp. nov., isolated from Leguminous trees in Sudan and Kenya, **Int. Syst. Bacteriol.**, 49, 1359-1368.

- Ostle, A.G., and Holt, J.G., 1982, Nile Blue A as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, **Applied and Environmental Microbiology**, 44, 1, 238-241.
- Öner, M., 1992, Genel Mikrobiyoloji (Ders Kitabı) II. Baskı, E.Ü. Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:94, s380.
- Pal, S., Manna, A. and Paul, A.K., 1998, Nutritional and cultural conditions for production of poly(3-hydroxybutyric acid) by *Azotobacter chroococcum*, **Folia Microbiology**, 43: 177-181.
- Page, W.J., 1989, Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, **Appl. Microbiol. Biotech.**, 31, 329-333.
- Page, W.J., and Knosp, O., 1989, Hyperproduction of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, **Applied and Environmental Microbiology**, 55,1334-1339.
- Page, W.J., 1992a, Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, **FEMS Microbiology Reviews**, 103, 149-158.
- Page, W.J., 1992b, Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD, **Biotechnology Letters**, 14:5, 385-390.
- Page, W.J., 1992c, Production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 38, 117-121.
- Page, W.J., and Cornish, A., 1993, Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate, **Applied and Environmental Microbiology**, 59, 4236-4244.
- Page, W.J., 1995, Bacterial polyhydroxyalkanoates, natural biodegradable plastics with a great future, **Can. J. Microbiol.**, 141 (Suppl.1), 1-3.
- Patarata, L., Pimentel, M.S., Pot, B., Kersters, K. and Faia, A.M., 1994, Identification of lactic acid bacteria isolated from Portuguese wines and musts by SDS-PAGE. **J. Appl. Bacteriol.**, 76, 288-293.
- Pellzor, M., J., Hasen, A.P. and Konetzka, A.W., 1956, "Quantitative Bacterial Physiology Experiments", **Burgess Publishing, Co.**, USA.
- Pierce, L. and Schroth, M.N., 1994, Detection of *Pseudomonas* colonies that accumulate poly- $\beta$ -hydroxybutyrate on Nile Blue A medium, **Plant Disease**, 78, 7, 683-685.

- Plazinski, J., Cen, Y.H. and Rolfe, B.G., 1985, General method for the identification of plasmid species in fast-growing soil microorganisms, **Applied and Environmental Microbiology**, 48, 4, 1001-1003.
- Povolo, S., Tombolini, R., Morea, A., Anderson, A.J., Casella, S. and Nuti, M.P., 1994, Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium meliloti* unable to synthesize poly- $\beta$ -hydroxybutyrate, **Can. J. Microbiol.**, 40, 823-829.
- Prescott, L., Harley, J.P. and Klein, D.A., 1993, Microbiology, second edition, WCB, Wm. C. Brown Publishers.
- Ramsay, B.A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P. and Ramsay, J.A., 1990, Production of poly( $\beta$ -hydroxybutyric-Co- $\beta$ -hydroxyvaleric) acids, **Applied and Environmental Microbiology**, 56:7, 2093-2098.
- Ramsay, B.A., Saracovan, I., Ramsay, J.A. and Marchessault, R.H., 1992, Effect of nitrogen limitation on long-side-chain poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*, **Applied and Environmental Microbiology**, 58, 2, 744-746.
- Reinheimer, J.A. , Demkow, M.R. and Condioti, M.C., 1990, Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures, **The Aust. J. Dairy Technol.**, May. 5-9.
- Sambrook, J., Fritseh, E.F. and Maniatis, T., 1989, Factors affecting the rate of DNA migration in agarose gels, **Molecular Cloning**, 643-645.
- Santamaria, M., Corzo, J., Barrios, M.L. and Navarro, A.M.G., 1997, Characterisation and differentiation of indigenous *Rhizobia* isolated from Canarian shrub legumes of agricultural and ecological interest. **Plant and Soil**, 143-152.
- Sardesai, N. and Babu, C.R., 2001, Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism is affected by changes in respiratory enzymatic activities due to cold stress in two psychrotrophic strains of *Rhizobium*, **Current Microbiology**, 42, 53-58.
- Savaşçı, Ö.T., Uyanık, N. ve Akovalı, G., 1998, Plastikler ve plastik teknolojisi, **Çantay Kitabevi**, 505 s.
- Schlegel, H.G., 1976, Allgemeine mikrobiologie, **Georg Thieme Verlag Stuttgart**, p480.
- Schripsema, J., De Rudder, K.E.E., Van Vliet, T.B., Lankhorst, P.P., De Vroom, E., Kijne, J.W., van Brussel, A.A.N., 1996, Bacteriocin small of *Rhizobium leguminosarum* belongs to the class of n-acyl-l-homoserine lactone molecules, known as autoinducers and as quorum sensing co-transcription factors, **Journal Bacteriology**, 178, 2, 366-371 (Abstract).
- Shivaji, S., 2001, Plasmids in antarctic bacteria: detection, isolation and characterisation, p.1-22, [http://www.icair.iac.org.nz/subfolder/science/biotas/manual/methods\\_shiv.html](http://www.icair.iac.org.nz/subfolder/science/biotas/manual/methods_shiv.html).

- Slater, S., Gallaher, T. and Dennis, D., 1992, Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) in a recombinant *Escherichia coli* strain, **Applied and Environmental Microbiology**, 58, 4, 1089-1094.
- Spaink, H.P., 2001, The molecular basis of the host specificity of *Rhizobium* bacteria. <http://rulbim.leidenuniv.nl/~spaink/ANTOVANA1.html>.
- Steinbüchel, A. and Schlegel, G., 1991, Physiology and molecular genetics of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, **Mol. Microbiol.**, 5, 3, 535-542.
- Stowers, M.D. 1985, Carbon metabolism in species, **Ann.Rev.Microbiol.**, 39, 89-108.
- Tal, S. and Okon, Y., 1985, Production of the reserve material poly- $\beta$ -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd., **Can. J. Microbiol.**, 31, 608-613.
- Tan, Z.Y., Xu X.D., Wang, E.T., Gao, T.L., Romero, E.M. and Chen, W.X., 1997, Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related *Rhizobia*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 47, 3, 874-879.
- Tanaka, K., Katamune, K. and Ishizaki, A., 1993, Fermentative production of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid from xylose by a two-stage culture method employing *Lactococcus lactis* IO-1 and *Alcaligenes eutrophus*. **Biotechnology Letters**, 15:12, 1217-1222.
- Tavernier, P., Portais, J.C., Saucedo, J.E.N., Courtois, J., Courtois, B. and Barbotin, J.N., 1997, Exopolysaccharide and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains, **Applied and Environmental Microbiology**, 63:1, 21-26.
- Tombolini, R. and Nuti, M.R., 1989, Poly( $\beta$ -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species, **FEMS Microbiology Letters**, 60:299-304.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L., 1998, Microbiology, an introduction, 6th Edition, **An Imprint of Addison Wesley Longman, Inc.**, p832.
- Tsakalidou, E., Manolopoulou, E., Kabaraki, E., Zoidou, E., Pot, B., Kersters, K. and Kalantzopoulos, G., 1994, Lactic acid bacteria, **Taxonomy and Enzyme Screening**, 444-457.
- URL1: <http://www.sciencenet.com.au/rhizobrareae.htm>.
- URL2: A quick *Rhizobium* Primer, <http://sciborg.uwaterloo.ca/~tcharles/rhizbium.html>
- URL3: Determination of wild rhizobia by numerical taxonomy, <http://www.mtntorum.org/resources/library/blas97e.htm>, 2001, 1-18.

- van Brussel, A.A.N., Zaat, S.A.J., Wijffelman, C.A., Pees, E. and Lugtenberg, B.J.J., 1985, Bacteriocin small of fast-growing *Rhizobia* is chloroform soluble and is not required for effective nodulation, **Journal of Bacteriology**, 162, 3, 1079-1082.
- Vincent, J.M. 1970, A manual for the practical study of the root-nodule-bacteria, IBP Handbook 15, **Blackwell Scientific Publishers**, England.
- Weaver, R.W., Wei, G.R. and Berryhill, D.L., 1990, Stability of plasmids in *Rhizobium phaseoli* during culture, **Soil. Biol. Biochem.**, 22, 4, 465-469.
- Wilson, R.A., Handley, B.A. and Beringer, J.E., 1998, Bacteriocin production and resistance in a field population of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, **Soil Biology and Biochemistry**, 30, 3, 413-417.
- Witholt, B. and Kessler, B., 1999, Perspectives of medium chain length poly-hydroxyalkanoates, a versatile set of bacterial bioplastics, **Current Opinion in Biotechnology**, 10, 279-285.
- Yang, F.L. and Lin, L.P., 1998, Characteristics from *Rhizobium fredii* cystostructure, lipopolysaccharides and cell proteins analysis from *Rhizobium fredii*, **Bot. Bull. Acad. Sin.**, 39:261-267.
- Zahran, H.H., 1992, Characterization of root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles, **J. Basic Microbiol.**, 32, 4, 279-287.

## ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı 1970 yılında Çine’de doğdu. İlkokulu İzmir, Ortaokulu Kızıltepe ve Lise’yi Ankara’da okudu. 1992 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun oldu. 1996 yılında aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Mikrobiyoloji’de Yüksek Lisansını tamamladı. 1994 yılında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 1997 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nde doktora programına kaydoldu.

İngilizce biliyor.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ