

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* CİNSİ BAKTERİLERİN
BAZI METABOLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, PLAZMİD
DNA VE PROTEİN PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

133461

Miraç YILMAZ

DOKTORA TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2003

ANKARA

133461

**Y.Ö. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Miraç Yılmaz tarafından hazırlanan TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* CİNSİ BAKTERİLERİN BAZI METABOLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, PLAZMİD DNA VE PROTEİN PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

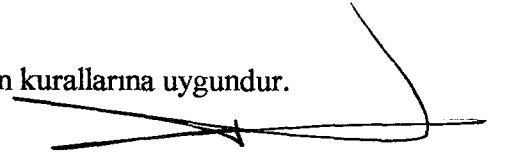


Prof. Dr. YAVUZ BEYATLI
Tez Yöneticisi

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

Başkan : Prof. Dr. Maluk Soran 
Üye : Prof. Dr. Yavuz Beyatlı 
Üye : Doc. Dr. Belma Asım 
Üye : Doc. Dr. Selma Atas 
Üye : Prof. Dr. Gönül Dönmez 

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



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	viii
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	4
2.1. <i>Bacillus</i> Cinsi Hakkında Genel Bilgiler.....	4
2.1.1. <i>Bacillus</i> 'ların önemi.....	4
2.1.2. <i>Bacillus</i> 'ların morfolojisi.....	5
2.1.3. <i>Bacillus</i> 'larda spor oluşumu.....	6
2.1.4. <i>Bacillus</i> 'ların habitatı.....	6
2.1.5. <i>Bacillus</i> 'ların metabolizması.....	7
2.1.6. <i>Bacillus</i> 'ların genetik yapısı.....	8
2.2. <i>Bacillus</i> Cinsi ve Poli- β -hidroksibütirat (PHB) Üretimi.....	9
2.2.1. Poli- β -hidroksialkanat (PHA) ve poli- β -hidroksibütirat'ın (PHB) tarihçesi.....	9
2.2.2. PHB'in genel özellikleri.....	10
2.2.3. PHB oluşum şartları ve tayini	11
2.2.4. PHB sentezi.....	12
2.2.5. PHB'in biyolojik parçalanabilirliği.....	13
2.2.5.1. PHB'ı parçalayan mikroorganizmalar.....	16
2.2.6. PHB'in yenilenebilme özelliği.....	17
2.2.7. PHB'in kullanım alanları.....	18
2.2.8. PHB üretiminde kullanılan substratlar.....	21
2.2.9. PHB'in ucuz üretimi	22
2.2.9.1. Melas	23
2.2.10. PHB üreten mikroorganizmalar.....	23
2.2.10.1. <i>Alcaligenes</i> , <i>Azotobacter</i> ve <i>Pseudomonas</i> cinslerinde PHB üretimi.....	24
2.2.10.2. Diğer bakterilerde PHB üretimi.....	26
2.2.10.3. <i>Bacillus</i> cinsinde PHB üretimi.....	28
2.2.10.4. <i>Bacillus</i> 'ların farklı büyüme koşullarında ve melasda PHB üretimleri.....	31
2.2.11. Genetik uygulamalarla biyoplastik eldesi.....	32
2.3. <i>Bacillus</i> Cinsi ve Antimikrobiyal Aktivite.....	34
2.3.1. Antimikrobiyal maddelerin önemi ve antimikrobiyal madde üreten mikroorganizmalar	34
2.3.2. <i>Bacillus</i> 'ların antimikrobiyal aktivitesi	36
2.3.2.1. <i>Bacillus</i> 'ların antibakteriyal aktivitesi	38
2.3.2.2. <i>Bacillus</i> 'ların antifungal aktivitesi	40
2.3.2.3. <i>Bacillus</i> 'ların antiviral aktivitesi	41
2.3.2.4. <i>Bacillus</i> 'ların antiamöbositik aktivitesi	42

	Sayfa
2.3.2.5. <i>Bacillus</i> 'ların bakteriyosin aktivitesi	42
2.3.3. <i>Bacillus</i> 'ların oluşturduğu tedavide önemli antibiyotikler	43
2.4. <i>Bacillus</i> Cinsinde Proteolitik Aktivite	44
2.5. <i>Bacillus</i> Cinsinde Plazmid DNA	46
2.6. <i>Bacillus</i> Cinsinde Toplam Hücre Protein Profili	48
 3. MATERYAL VE METOT	 51
3.1. Materyal	51
3.1.1. Materyal örnekleri	51
3.1.2. Araştırmada kullanılan besiortamları	53
3.1.3. Araştırmada kullanılan test bakterileri	54
3.2. Metot	55
3.2.1. Toprak pH'sının ölçülmesi	55
3.2.2. Bakterilerin izolasyonu	56
3.2.3. Bakterilerin muhafazası	56
3.2.4. Bakterilerin tanımlanması	56
3.2.4.1. Karbonhidrat testleri	57
3.2.4.2. Nitrat indirgenmesi	57
3.2.4.3. Eskulin hidrolizi	58
3.2.4.4. Nişasta hidrolizi	58
3.2.4.5. Katalaz testi	59
3.2.4.6. Glukozdan gaz oluşumu	59
3.2.4.7. Sporların incelenmesi	59
3.2.5. Sodyum dodesil poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)	59
3.2.5.1. Toplam hücre protein ekstraksiyonu	59
3.2.5.2. Poliakrilamid jel elektroforezinin yapısı	60
3.2.5.3. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun yarı kantitatif tayini	63
3.2.5.4. Elektoroforesin yapısı ve jellerin boyanması	64
3.2.5.5. Moleküler ağırlıkların hesaplanması	64
3.2.6. PHB üretiminin tespiti	64
3.2.7. Sonikasyon süresinin tespiti	66
3.2.8. Farklı karbon, azot ve fosfat kaynaklarının PHB üretimine etkisinin incelenmesi	66
3.2.9. Azotsuz ortamın PHB üretimine etkisinin incelenmesi	67
3.2.10. Oksijeni sınırlı ortamın PHB üretimine etkisinin incelenmesi	68
3.2.11. Melas besiortamının PHB üretimine etkisinin incelenmesi	68
3.2.12. Genel inhibisyon aktivitesinin tespiti	68
3.2.13. <i>Bacillus</i> suşlarının birbirlerine karşı inhibisyon aktivitesinin tespiti	69
3.2.14. Proteolitik aktivitenin tespit edilmesi	69
3.2.15. Plazmid DNA izolasyonu	69
 4. DENEYSEL BULGULAR	 73
4.1. <i>Bacillus</i> 'ların İzolasyonu	73
4.2. <i>Bacillus</i> 'ların Tanımlanmaları ve Dağılımları	74
4.3. <i>Bacillus</i> Suşlarının Toplam Hücre Protein Profilleri	83
4.4. <i>Bacillus</i> 'larda PHB Üretimi	86

4.4.1. Farklı şartlar ve besiortamlarının PHB verimine etkileri	89
4.4.1.1. Farklı karbon kaynaklarının PHB verimine etkisi	89
4.4.1.2. Farklı fosfat kaynaklarının PHB verimine etkisi	89
4.4.1.3. Farklı azot kaynaklarının PHB verimine etkisi	92
4.4.1.4. Azotsuz ortamın PHB verimine etkisi	92
4.4.1.5. Oksijeni sınırlı ortamın PHB verimine etkisi	95
4.4.2. Melaslı ortamda PHB üretimi	97
4.4.2.1. %1 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi	97
4.4.2.2. %2 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi	99
4.4.2.3. %3 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi	101
4.4.2.4. %4 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi	103
4.4.2.5. %5 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi	105
4.5. <i>Bacillus</i> Suşlarının Bazı Patojen ve Kontaminant Bakteriler Üzerine İnhibisyon Etkisi	108
4.6. <i>Bacillus</i> Suşlarının Birbirlerine Karşı İnhibisyon Etkileri.....	113
4.7. <i>Bacillus</i> Suşlarının Proteolitik Aktiviteleri.....	122
4.8. <i>Bacillus</i> Suşlarında Plazmid DNA Profilleri.....	126
 5. SONUÇ VE TARTIŞMA	128
 6. ÖNERİLER	160
 KAYNAKLAR	161
 EKLER	184
 ÖZGEÇMİŞ	195

**TOPRAKTAN İZOLE EDİLEN *BACİLLUS* CİNSİ BAKTERİLERİN BAZI
METABOLİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ, PLAZMİD DNA VE
PROTEİN PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

(Doktora Tezi)

Miraç YILMAZ

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mart 2003

ÖZET

Araştırmada, *Bacillus brevis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Bacillus coagulans* türlerine ait toplam 32 adet suş kullanılmıştır. Suşların 29 adedi topraktan izole edilmiştir. İzole edilen bu suşlar, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlere tabi tutularak tanımlanmışlardır. Bakterilerin toplam hücre protein profillerinin sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile analizi yapılmış ve bunların molekül ağırlıkları 19-160 kD arasında bulunmuştur. SDS-PAGE analizi, aynı türe ait suşların protein profillerinin birbirine benzer ve diğer türlerden farklı olduğunu göstermiştir.

Bacillus'ların poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimleri spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve PHB üretimlerinin hücre kuru ağırlığına göre %1,06-%41,67 arasında değiştiği bulunmuştur. En yüksek PHB üretimi gösteren *Bacillus brevis* M6 (%41,67) suşunun farklı karbon, fosfat ve azot kaynakları ile azot ve oksijen sınırlaması gibi şartlar altında PHB üretimi araştırılmıştır. Suşun en yüksek PHB verimlerine, karbon kaynağı olarak sitrat içeren besi ortamında (%51,85) ve azot kaynağı olarak sodyum nitrat içeren besi ortamında (%60,00) ulaştığı; fosfatlı besi ortamındaki en yüksek PHB'ın ise %6,50 olduğu tespit

edilmiştir. Azotsuz ve oksijeni sınırlandırılmış besiortamlarındaki PHB üretiminin sırası ile %25,45 ve %7,53 olduğu bulunmuştur.

Çalışmada, şeker pancarı melası kullanılarak PHB'nin ekonomik eldesi araştırılmış ve farklı melas konsantrasyonlarının PHB üretimine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, glukoz ve sükroz şeker çeşitlerini kullanabilen ve ikinci derecede en yüksek PHB üreten *Bacillus cereus* M5 suşu seçilerek, %1-%5 melas konsantrasyonlarındaki PHB üretimi incelenmiştir. Bakterinin en yüksek PHB üretimi olan %73,84 değerine, %1 melas konsantrasyonunda ulaştığı tespit edilmiştir. Melas konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak bakterinin PHB veriminde azalma olduğu gözlenmiştir.

Araştırmada, *Bacillus* cinsi bakterilerin bazı patojen ve kontaminant test bakterileri üzerindeki genel inhibisyon etkileri agar difüzyon metodu ile incelenmiştir. *B. brevis* M6'nın, test bakterilerinden olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 üzerinde; *B. cereus* M15'in, *Pseudomonas fluorescens* RSKK 240, *Micrococcus flavus* ve *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 üzerinde; *B. cereus* M10'un, *Bacillus megaterium* RSKK 578, *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 ve *Bacillus cereus* F2 üzerinde; *B. brevis* M4 ve *B. cereus* M5'in ise *Bacillus cereus* F2 üzerinde genel inhibisyon etkilerinin olduğu gözlenmiştir.

Bacillus türleri suşlarının birbirlerine karşı olan inhibisyon etkilerinin incelenmesinde de yine agar difüzyon metodu kullanılmış ve bazı izolatların birbirlerine karşı inhibisyonlarının olduğu bulunmuştur.

Çalışmada, *Bacillus* cinsi bakterilerin Skim Milk Agar (SMA) besiortamında proteolitik aktiviteleri incelenmiş ve *B. sphaericus* M3 ile *B. sphaericus* ATCC 14577 suşları dışındaki tüm suşlarda proteolitik aktivite gözlenmiştir. Bu suşlarda tespit edilen proteolitik aktivite 1,4-8,1 mm zon çapı arasındadır ve zonların ortalaması 4,17 mm olarak hesaplanmıştır. En yüksek proteolitik aktivite zon çapı 8,1 mm ile *B. circulans* M32 suşunda bulunmuştur.

***Bacillus* suşlarının plazmid DNA incelenmesinde, yalnız 6 adet suşun plazmid DNA içerdği ve bu plazmidlerin moleküler ağırlıklarının 3,9-31,7 kb arasında olduğu tespit edilmiştir.**

Bilim Kodu : 216

Anahtar Kelimeler : *Bacillus*, izolasyon, protein profili, biyoplastik (PHB) üretimi, antimikrobiyal aktivite, proteolitik aktivite, plazmid DNA.

Sayfa Adedi : 195

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI

**STUDYING OF SOME METABOLIC ACTIVITIES, PLASMID DNA
AND PROTEIN PROFILES OF *BACILLUS* BACTERIA ISOLATED
FROM THE SOIL**

(Ph. D. Thesis)

Miraç YILMAZ

**GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY**

March 2003

ABSTRACT

In the study, a total of thirty two strains belonging to *Bacillus brevis*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* were analysed. Twenty nine of them were isolated from the soil. These strains isolated were physiologically and biochemically tested and described. Total cell protein profiles of bacteria were analysed by sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). The molecular weights of proteins were found ranging between 19 and 160 kD. SDS-PAGE analysis showed that those strains belong to the same category had similar protein profiles and that they were different from the others.

Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) productions of *Bacillus* bacteria were determined by spectrophotometric method and it was found that PHB productions ranged from 1,06-41,67% depending on the of dry cell weight. *Bacillus brevis* M6 strain which has the highest PHB production (41,67%) was analysed in terms of its PHB production under certain conditions such as carbon, phosphate, nitrogen resources and oxygen limitations. It was found that the PHB production increased in the medium with citrat as carbon resource (51,85%) and in the medium with sodium nitrate as nitrogen resource (60,00%).

However maximum PHB production was in the medium with phosphate (6,50%). PHB production in the medium without nitrogen and limited oxygen medium were 25,45% and 7,53% respectively.

Economical production of PHB was investigated by using sugar beet molasses and the effects of different concentration molasses on PHB production were investigated. For this reason, *Bacillus cereus* M5 strain were selected and cultivated in 1%-5% molasses concentration. It was found that strain was produced higher PHB (73,84%) in 1% molasses concentration. It was also observed that PHB productivity decreased with to the increaseing molasses concentration.

The general inhibition of *Bacillus* isolates on the pathogen and contaminant test bacteria were investigated by using the agar diffusion method. As a result of this study, the following data were found: *B. brevis* M6 showed inhibition effect on *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and on *Bacillus thuringiensis* RSKK 380; *B. cereus* M15 on *Pseudomonas fluorescens* RSKK 240, on *Micrococcus flavus* and on *Bacillus thuringiensis* RSKK 380; *B. cereus* M10 on *Bacillus megaterium* RSKK 578, on *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 and on *Bacillus cereus* F2; *B. brevis* M4 and *B. cereus* M5 on *Bacillus cereus* F2.

Also, the inhibition effect of isolates between each others were carried by using agar diffusion method and the inhibition effect some isolates were found.

Proteolytic activities of *Bacillus* isolates were tested in Skim Milk Agar (SMA). It was concluded that all strains had proteolytic activities except for *B. sphaericus* M3 and *B. sphaericus* ATCC 14577. Proteolytic activities of the isolates was found between 1,4-8,1 mm zone diameter. The overage of proteolytic activity was found to be 4,17 mm. The highest zone diameter of proteolysis 8,1 mm was found in *B. circulans* M32 strain.

Plasmid DNA profiles of *Bacillus* strains were determined and their molecular weights were found. Results indicated that only six strains were carried plasmid DNA and their molecular weights were ranged from 3,9 to 3,1 kb.

Science code : 216

Key Words : *Bacillus*, isolation, protein profile, bioplastic (PHB) production, antimicrobial activity, proteolytic activity, plasmid DNA.

Page Number : 195

Advisor : Prof. Dr. Yavuz BEYATLI



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren, bilgilerinden yararlandığım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Yavuz Beyatlı'ya, yine değerli tecrübelerinden faydalandığım Sayın Prof. Dr. Haluk Soran ve Doç Dr. Belma Aslım'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında destek ve yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Zehra Nur Yüksekdağ ve laboratuvarında çalışan diğer dostlarıma; ayrıca bu çalışmanın çeşitli aşamalarında dostluk ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Nazime Mercan'a şükranlarımı sunarım.

Görev yaptığım Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi'nde, doktora öğrenimim boyunca bana destek olan değerli hocalarım ve arkadaşlarıma içtenlikle teşekkür ederim. Bunlara ek olarak, maddi ve manevi destekleri ve ilgileriyle her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkür ederim.

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. <i>Bacillus</i> suşlarının temin ve izole edildikleri kaynaklar.....	51
Çizelge 3.2. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak ve inkübasyon dereceleri	55
Çizelge 4.1. <i>Bacillus</i> 'ların izole edildiği yer, toprağın pH değeri ve seyreltme faktörleri	73
Çizelge 4.2. <i>Bacillus</i> izolatları ve izole edildikleri yerler	74
Çizelge 4.3. <i>Bacillus</i> izolatlarının tanımlama testleri	76
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan <i>Bacillus</i> suşlarının numara ve kodları.....	79
Çizelge 4.5. <i>Bacillus</i> 'ların NB besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB üretimi ve yüzde verimleri	86
Çizelge 4.6. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın karbon kaynağı olarak sodyum asetat ve sitrat içeren besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	90
Çizelge 4.7. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın fosfat kaynağı olarak potasyum fosfat ve potasyum-2-fosfat içeren besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	91
Çizelge 4. 8. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın azot kaynağı olarak D-L-triptofan, amonyum sülfat ve sodyum nitrat içeren besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	93
Çizelge 4.9. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın NB bazal besiortamı ve azotsuz ortam şartları altında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	94
Çizelge 4.10. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın oksijenin sınırlandığı ortamda, hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	96
Çizelge 4.11. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %1 Melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	98
Çizelge 4.12. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %2 Melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	100
Çizelge 4.13. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %3 Melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	102

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.14. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %4 Melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	104
Çizelge 4.15. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %5 Melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi	106
Çizelge 4.16. <i>Bacillus</i> suşlarının bazı patojen ve kontaminant bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitesi	109
Çizelge 4.17. <i>Bacillus</i> suşlarının birbirlerine karşı antagonistik etkileri	115
Çizelge 4.18. <i>Bacillus</i> suşlarının proteolitik aktiviteleri	122
Çizelge 4.19. Bazı <i>Bacillus</i> suşlarında tespit edilen plazmid DNA sayı ve moleküler ağırlıkları	126

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı	10
Şekil 2.2. PHB Sentezi	13
Şekil 2.3. PHB'nin parçalanması ve sentezi	14
Şekil 2.4. PHB'nin karbon döngüsü	18
Şekil 4.1. <i>Bacillus</i> izolatlarının yüzde dağılımları	81
Şekil 4.2. <i>Bacillus cereus</i> M10'un mikroskopik görünümü	82
Şekil 4.3. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın Nutrient Agar besiortamındaki koloni morfolojisi	82
Şekil 4.4. <i>B. licheniformis</i> (M19, M20, M27, M30) ve <i>B. megaterium</i> (M14, M21, M22, M26, M28) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri	84
Şekil 4.5. <i>B. subtilis</i> (M17, M24, M29, M33, ATCC 6633) ve <i>B. brevis</i> (M2, M4, M6) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri.....	84
Şekil 4.6. <i>B. cereus</i> (<i>B. cereus</i> , M5, M10, M15) ve <i>B. coagulans</i> (M8, M25, M35) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri	85
Şekil 4.7. <i>B. sphaericus</i> (M3, ATCC 14577) ve <i>B. circulans</i> (M16, M18, M23, M31, M32, M34) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri	85
Şekil 4.8. <i>Bacillus</i> 'ların NB besiortamındaki PHB yüzde verim histogramı	88
Şekil 4.9. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın karbon kaynağı olarak sodyum asetat ve sitrat içeren besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB yüzde verim histogramı....	90
Şekil 4.10. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın fosfat kaynağı olarak potasyum fosfat ve potasyum-2-fosfat içeren besiortamında PHB yüzde verim histogramı...91	
Şekil 4.11. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın azot kaynağı olarak D-L-triptofan, amonyum sülfat ve sodyum nitrat içeren besiortamında PHB yüzde verim histogramı.....	93
Şekil 4.12. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın farklı azot şartları altında PHB yüzde verim histogramı	94

Şekil	Sayfa
Şekil 4.13. <i>Bacillus brevis</i> M6'nın oksijenli ve oksijeni sınırlı şartlar altında PHB yüzde verim histogramı	96
Şekil 4.14. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %1 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı	98
Şekil 4.15. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %2 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı	100
Şekil 4.16. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %3 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı	102
Şekil 4.17. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %4 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı	104
Şekil 4.18. <i>B. cereus</i> M5 suşunun %5 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı	106
Şekil 4.19. <i>B. cereus</i> M5'in %1-%5 melas konsantrasyonlarında farklı sürelerde PHB yüzde verim histogramı	107
Şekil 4.20. <i>B. cereus</i> M10 suşunun <i>B. megaterium</i> RSKK 578 üzerine olan antagonistik etkisi	111
Şekil 4.21. <i>B. cereus</i> M10 suşunun <i>B. thuringiensis</i> RSKK 380 üzerine olan antagonistik etkisi	111
Şekil 4.22. <i>B. cereus</i> M15 suşunun <i>B. thuringiensis</i> RSKK 380 üzerine olan antagonistik etkisi	112
Şekil 4.23. <i>Bacillus</i> suşlarının <i>B. sphaericus</i> M3 üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram	117
Şekil 4.24. <i>B. brevis</i> M6 ve <i>B. cereus</i> M5 suşlarının <i>B.sphaericus</i> M3 üzerine olan inhibisyon etkilerinin görüntüsü	118
Şekil 4.25. <i>B. licheniformis</i> M27 ve <i>B. megaterium</i> M28 suşlarının <i>B. sphaericus</i> M3 üzerine olan etkilerinin görüntüsü	118
Şekil 4.26. <i>Bacillus</i> suşlarının <i>B. sphaericus</i> ATCC 14577 üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram	119
Şekil 4.27. <i>B. brevis</i> M4 ve <i>B. cereus</i> M5 suşlarının <i>B.sphaericus</i> ATCC 14577 üzerine olan inhibisyon etkilerinin görüntüsü	120

Şekil	Sayfa
Şekil 4.28. <i>B. coagulans</i> M25 ve <i>B. megaterium</i> M26 suşlarının <i>B.sphaericus</i> ATCC 14577 üzerine olan etkilerinin görüntüsü	120
Şekil 4.29. <i>Bacillus</i> suşlarının <i>B. cereus</i> üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram	121
Şekil 4.30. <i>Bacillus</i> suşlarının <i>B. coagulans</i> M8 üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram	121
Şekil 4.31. <i>Bacillus</i> suşlarının SMA besiortamı üzerinde proteolitik aktivite histogramı	124
Şekil 4.32. <i>B. circulans</i> M31 ve M32 suşlarının SMA besiortamı üzerinde proteolitik aktivite görüntüsü	125
Şekil 4.33. <i>B. coagulans</i> M25 suşunun plazmid DNA profili	127

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklama
bp	baz çifti
et al.	ve arkadaşları
°C	Santigrat derece
cm	Santimetre
dk.	Dakika
g	Gram
kD	Kilodalton
l	Litre
Md	Megadalton
ml	Mililitre
mg	Miligram
M	Molar
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
nm	Nanometre
vb.	ve benzeri
vd.	ve diğerleri
vs.	ve saire
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
APS	Amonyum Persülfat
CoA	Koenzim A
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EM	Elektron Mikroskobu
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopi
ICI	Imperial Kimya Şirketi
NA	Nutrient Agar
NADH	Redükte Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NB	Nutrient Broth
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ME	Merkaptoetanol
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PHB	Poli- β -hidroksibütirat
P(HB-HV)	Poli(hidroksibütirat-co-hidroksivalerat)
PHA	Polihidroksialkanat
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SMA	Skim Milk Agar
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Günlük hayatımızın bir parçası olan plastik ürünler, kanıtlanmış pek çok dezavantajlarına rağmen; kolay şekil alma, esneklik, nakliyyede rahatlık ve ucuzluk gibi nedenlerden dolayı tercih edilen malzemeler olmuşlardır. Ancak, plastiğin “kullanılıp-atılabilme” özelliği, en önemli sorunlardan biri haline gelmiştir (Page 1992b). Her yıl birkaç yüzbin ton plastik denizlere atılır ve bunlar okyanuslarda birikir (URL:1). Dünyada biriken yıllık plastik miktarı ise 25 milyon ton kadardır (Lee, 1996). Bu nedenle, son yıllarda plastikler, ekolojik problemlerin kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadırlar (URL:1).

90’lı yıllardaki plastik üretiminin 100 milyon tonun üzerinde olduğu ve 2000 yılında üretiminin 150 milyon ton olduğu düşünülürse, sentetik polimerlerin, yerine kullanılabilecek diğerk bir malzeme türü olmadığı sürece, çevre ve insan sağlığına getireceği yükler gittikçe artacaktır (Dave et al., 1996, Aslım vd., 1998).

Petrolde elde edilen sentetik polimerler, plastik atık olarak doğaya terkedildiklerinde, toprakta uzun süre parçalanamadığından çevre kirliliğine ve toksik madde birikimine neden olmaktadır. Bu nedenle, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin, özellikle poli-Beta-hidroksibütirat’ın (PHB) üretimi önem kazanmış ve petrol kökenli polimerlerin yerini almalarına yönelik çalışmalar artmıştır (Page 1992b, Beyatlı, 1996).

Günümüzde, PHB gibi biyoparçalanabilir, biyouyumlu ve doğayla dost plastiklerin bakterilerde sentezi ve polimer kimyasındaki uygulamaları ile ilgili elde edilen olumlu sonuçlarla biyoplastiklere olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Braunegg et al., 1998, Poirier, 2002)

Araştırmacılar, biyoplastik üretiminde bakteriyel biyoplastiklerin, gelecek uygulamalar için kullanılabileceğini bildirmektedirler (Dave et al., 1996; Labuzek and Radecka, 2001). Avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB üretimi gerçekleştirmek amacıyla uygun suşların tespiti araştırmalarında, *Bacillus* cinsi bakteriler de yer almaktadır (Wu et al., 2001).

Doğal ortamı toprak olan ve endospor oluşturan *Bacillus* cinsi bakteriler; genom ya da proteom gibi temel gelişim konularındaki, moleküler detayların araştırılması için kullanılmaktadırlar. Ayrıca, bazı üyelerinin ürettiği enzimler, antibiyotikler ve toksinler gibi biyoteknoloji endüstrisine ekonomik katkı sağlayacak metabolik aktiviteleri nedeniyle de bakteriyologların ilgi odağı olmuşlardır (Cash, 1998).

Bacillus cinsi bakteriler, izolasyonunun kolaylığı, üretiminde kompleks besi ortamına gerek duymaması ve kısa sürede gelişimi gibi nedenlerden dolayı araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır ve bu cinsin çeşitli antimikrobiyal madde üretim potansiyeli de yüksektir (Eltem ve Uçar, 1998; Rosovitz et al., 1998).

Antibiyotiklerin, dünyadaki yaygın kullanımı, bulaşıcı hastalıkların tedavisindeki en önemli sorun olan, antibiyotiklere dirençli mikroorganizma enfeksiyonlarını ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle, sürekli olarak, değişik antibiyotikler üreten, yeni gen kaynaklarına gereksinim duyulmaktadır. Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip, güçlü antibiyotik üreten yeni mikroorganizma tiplerinin araştırılması önem kazanmıştır (Demain, 1999).

Özellikle son yıllarda, uluslararası ilaç endüstrisinin araştırma-geliştirme çalışma programlarında yeni keşfedilen ve patenti alınan ilaç sayısında ciddi bir azalmanın olduğu bildirilmektedir (Pollack, 2002; Tamer, 2002). Bu nedenle, birçok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol yeteneği, ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır. Bazı *Bacillus* türleri bacitracin, polymyxin ve subtilin gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler. Bunların yanı sıra siklik lipoproteinlerden olan iturin ve zwittermicin gibi antibiyotikler ise birçok fungusun neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır (Rosovitz et al., 1998).

Mikrobiyal proteolitik enzimler, endüstriyel amaçlar açısından oldukça ilgi çekicidirler (Ibanez et al., 1992). *Bacillus* cinsi bakteriler de proteolitik enzim aktiviteleri nedeniyle, ticari üretim için seçilen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır (Perez et al., 1992) ve bir kaç ticari mikrobiyal enzimin kaynağıdır (Johnvesly et al., 2002).

Endüstriyel enzimlerin en önemli grubunu oluşturan proteazların, toplam dünya enzim üretiminde %65'lik bir yeri vardır. Proteazlar, deterjan, besin, eczacılık, deri

işlenmesi ve organik sentez gibi çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılırlar (Johnvesly and Naik, 2001; Singh et al., 2001).

Genelde, *Bacillus* cinsi bakterilerin yüksek miktarda hücre dışı proteaz ürettikleri bildirilmektedir (Kunitate et al., 1989). Termofilik ve alkalifilik basiller tarafından üretilen alkalın proteazların, yüksek sıcaklık, pH, kimyasal parçalayıcı ajanlar ve kurak çevrelere dayanabilecekleri bildirilmiştir (Johnvesly and Naik, 2001).

B. subtilis, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus* ve *B. thuringiensis* gibi türler tarafından üretilen subtilisinin deterjan endüstrisinde (Kunitate et al., 1989; Yin et al., 1991), *B. licheniformis*'in ürettiği keratinazın ise özellikle kuş ve tavuk tüylerinin parçalanmasında önem taşıdığı bildirilmektedir (Rozs et al., 2001).

Bu çalışmada, *Bacillus* cinsine ait bakteriler topraktan izole edilerek, tanımlamaları yapılmış ve suşların sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile elde edilen toplam protein profillerine göre ayrımı hedeflenmiştir. İzole edilen bakterilerin, PHB üretim yetenekleri araştırılmıştır. PHB verimi yüksek olan izolatların, farklı azot, karbon ve fosfat kaynaklarında ve atık madde olan melasda, ekonomik PHB üretimleri amaçlanmıştır. Ayrıca izolatların, farklı patojen mikroorganizmalar ve birbirlerine karşı olan antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Araştırmada, suşların proteolitik aktiviteleri ile plazmid DNA sayı ve moleküler ağırlıklarının da tespit edilmesi hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. *Bacillus* Cinsi Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. *Bacillus*'ların önemi

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler dünyasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır (Rosovitz et al., 1998; Wipat and Harwood, 1999). Ayrıca, sporlanma kabiliyetleri ve metabolizmal faaliyetlerinin çeşitliliğinin, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağladığı da belirtilmektedir (Wipat and Harwood, 1999).

Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus*'lar, ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler. *Bacillus*'ların ürettiği endüstriyel enzimlerden olan subtilisin, selulaz ve amilazlar deterjan endüstrisinde; nötral proteazlar süt endüstrisinde; farklı amilaz ve pullulanazlar besin ve meyve suyu endüstrisinde; kullanılmaktadır (Rosovitz et al., 1998).

Bazı *Bacillus* türleri ise, proteolitik, sakkarolitik ve lipolitik enzimleri nedeniyle besin endüstrisinde önem taşımaktadır. *B. stearothermophilus*, *B. coagulans*, *B. licheniformis*, *B. macerans* ve *B. subtilis* gibi türler, peynir vb. ürünlerin oluşmasına yardım etmektedirler (Rosovitz et al., 1998).

Birçok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi de ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır. Bazı *Bacillus* türleri bacitracin (*B. licheniformis*), polymyxin (*B. polymyxa*), gramicidin (*B. brevis*), tyrocidine (*B. brevis*), subtilin (*B. subtilis*) ve bacilycin (*B. subtilis*) gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler. Bunların yanı sıra siklik lipoproteinlerden olan iturin (*B. subtilis*) birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır. Zwittermicin (*B. cereus*) ve antibiotik B (*B. cereus*) tarafından üretilen antibiyotiklerin mantarların neden olduğu bazı bitki hastalıklarında etkili olduğu bilinmektedir (Rosovitz et al., 1998).

Bacillus 'ların bir başka özelliği de, çeşitli böceklerle karşı etkin bakteriyel kontrol ajanı olmalarıdır. *B. thuringiensis*, *B. larvae* ve *B. popilliae* Lepidoptera larvalarına patojenik etki gösterirler (Priest, 1993; Rosovitz et al., 1998).

Antraks etkeni olan *Bacillus anthracis* ve besin zehirlenmelerine neden olan *Bacillus cereus* hariç, patojen değildirler (Rosovitz et al., 1998).

2.1.2. *Bacillus* 'ların morfolojisi

Bacillaceae ailesine ait olan *Bacillus* cinsi, çubuk şekilli, endospor oluşturan, aerob veya fakültatif anaerob bakterilerden oluşur. Vejetatif hücreler, tek başına veya zincir şeklinde bulunabilir. Yuvarlak veya köşeli şekilde biten hücrelerin büyüklükleri 0,5x1,2 µm'den 2,5x10 µm'ye değişmektedir. Hücreler, Gram-pozitif boyanır, ancak bazıları kültürün yaşına bağlı olarak gram negatif reaksiyon verebilir. (Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998).

Durgun fazda, besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak endospor oluşturur. Bazı vejetatif hücreler, protein kristalleri veya poli-β-hidroksibütirat gibi metabolik maddeler depolarlar (Rosovitz et al., 1998).

Bacillus hücreleri, sitoplazmik membran üzerinde genelde hücre duvarı bulundurur. Hücre duvarı, bir veya birkaç aniyonik polimer ve birkaç kat peptidoglikan ile sarılmıştır (Priest, 1993; Rosovitz et al., 1998).

Bazı *Bacillus* türleri, dış yüzeyinde polisakkarit veya polipeptid yapıda kapsül oluştururlar. *B. anthracis*'de poli D-glutamik asitten oluşan kapsülü görülmekte ve bu virulens faktor taşımaktadır (Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998).

Bacillus üyelerinin çoğu peritirik flagella taşırlar ve bununla hareket ederler. Flagellar antijenler *B. cereus*, *B. thuringiensis*, ve *B. sphaericus* gibi türlerin tanımlanması için kullanılmakla birlikte, flagella oluşumu taksonomide kullanılan temel kriterlerden biri değildir (Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998).

Bacillus türlerinin koloni karakteristikleri, çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Besiyeri çeşidi, koloninin yaşı gibi özelliklere göre, yarı şeffaf, opak,

düzgün ya da pürüzlü kenarlı koloniler görülebilir. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya doğru olabilir. Çoğu *Bacillus* türü pigment oluşturmaz, ancak, bazı türler farklı besiyerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah vb. pigmentler üretebilir (Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998).

2.1.3. *Bacillus*'larda spor oluşumu

Bacillus türlerinin en önemli özelliklerinden biri endospor oluşturuyor olmalarıdır. Her hücrede, ısı gibi çevresel şartlara dayanıklı, dipikolinik asit içeren bir adet endospor oluşabilir. Spor formları, ısı değişimleri, çeşitli kimyasallar ve besin maddelerinin yetersizliği gibi zorlu yaşam koşullarına dayanıklı formlardır. *Bacillus* sporları, ısıya, vejetatif hücrelerden 10^5 kez, UV ışımaya 7-50 kez daha dayanıklıdır. Sporu çevreleyen membranlar, korteks ve spor paltosu gibi yapılar nedeniyle çeşitli kimyasal ajanlara karşı direnç de geliştirilmiştir (Rosovitz et al., 1998).

Sporilizasyon, bakteri üremesinin duraksama fazında gerçekleşir ve birçok metabolik faaliyetin gerçekleşmesi ile ilgilidir. *Bacillus*'ların izolasyonunda, sporların ısıya dirençli olması özelliğinden faydalanılır. Sporum şekli, pozisyonu ve büyüklüğü taksonomide kullanılan önemli kriterlerdendir (Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998).

2.1.4. *Bacillus*'ların habitatu

Bacillus'lar, sporları nedeniyle biyosferde birçok farklı çevreden izole edilebilirler (Priest, 1993; Rosovitz et al., 1998). Cinsin asıl habitatu, çok çeşitli topraklardır (Ishib and Ohba, 1993; Young et al., 1995; Nicholson and Law, 1999). Toprak mikroflorasında yeralan *Bacillus*'lar, besin maddeleri açısından zengin topraklarda bulunabildikleri gibi, besince fakir topraklardan da izole edilebilirler. Örneğin; *B. subtilis*, *B. licheniformis* ve *B. cereus* kompleks besin maddelerine ihtiyaç duymazken, *B. polymyxa* ve *B. azotofixans* gibi gelişmek için bitki rizosferine ihtiyaç duyan türler de bulunur (Massie et al., 1985; Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998).

Endospor yapan *Bacillus* türleri toprak, bitki rizosferi, gıda, su ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinden izole edilebilirler. Bunun yanı sıra, Mosquito, Lepidoptera,

Diptera ve Coleoptera böceklerinin larvalarından da izole edilmişlerdir (Burke et al, 1983, Chilcott and Wigley, 1993; Young et al., 1995; Rosovitz et al., 1998)

Birçok mikroorganizma çeşidi gibi *Bacillus*'lar için de önemli bir habitat olan topraktaki farklı ortam şartları, mikroorganizma çeşidinin de artmasına yol açar. Genel olarak iyi havalanmış, nemli ve yüksek organik materyal içeren toprakları seçen mikroorganizmalar, toprağın ilk 10 cm'lik üst kısmında yüksek sayıda bulunurlar. Toprakta populasyon yoğunluğunun büyük bir kısmını bakteriler (10^6 - 10^9 bakteri/l gr toprak) oluşturur. Mantarlar, biyokütle oluşumunda önemlidirler (URL:2).

Mikroorganizmalar, organik maddelerin parçalanması ve C, N, P, Fe gibi maddelerin döngülerinde yer aldıklarından toprak oluşumu ve şekillenmesi için önemli canlılardır. Ayrıca biyolojik kökenli polimerler olan selüloz, hemiselüloz, kitin ve lignin polimerlerini parçalayarak, mineralize ederler. Gerçekleştirdikleri parçalama olaylarından başka, oksidasyonlara da sebep olduklarından sentez faaliyetlerine de katılırlar. Toprakta bulunan mikrobiyal gruplar virüsler, bakteriler, siyanobakteriler, algler, protozoonlar ve mantarlardır. Bakterilerin büyük bir kısmının içinde yer aldığı, toprağın lithosfer tabakası, *Bacillus*'ların da esas yaşam alanlarından biridir (URL:2).

Bacillus türleri toprakta geniş bir yayılıma sahip oldukları gibi deniz ve tatlı sularla, buraların sedimentlerinde de bulunabilirler. Bazı *Bacillus*'lar ise ekstrem şartlarda büyüyebilme kapasitesindedirler ve üre içeren, uç pH değeri olan, asitli veya yüksek ısıli ortamlardan izole edilebilirler (Rosovitz et al.,1998).

Bacillus türlerinin çeşitli besinlerde bulundukları ve besin maddelerinin dönüşümü ve bozulmalarında rol oynadıkları da bilinmektedir. Örneğin; *B. cereus* pastörize süt ve süt ürünlerine kontaminant olan önemli bir türdür (Giffel et al., 1997). *B. cereus* ve *B. subtilis* gibi türlerin ise un, çukolata, kakao, baharat, salça ve sucuk, salam gibi et ürünlerinden de izole edildikleri bildirilmiştir (Giffel et al., 1996; Kalaylı, 2001).

2.1.5. *Bacillus*'ların metabolizması

Aerobik ya da fakültatif anaerobik olan *Bacillus*'lar genelde Embden-Meyerhof izyolunu kullanırlar. Bunun yanı sıra heterolaktik (fosfoketolaz) izyolunu kullananları (*B. subtilis*) da vardır (Mignone and Avignone-Rossa, 1996; URL:1).

Terminal elektron alıcıları genelde oksijendir, ancak bazı türlerin elektron alıcısı NO_3 da olabilir, denitrifikasyon yapan türleri de (*B. azotoformans*, *B. licheniformis*) vardır. Bazı türler (*B. polymyxa*, *B. macerans*) ise azotu fikse ederler. $\text{O}_2\text{-CO}_2\text{-H}_2$ veya $\text{O}_2\text{-CO}$ ortamlarında ototrofik yaşayan türlere (*B. schlegelii*) de rastlanabilir (Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998).

Aerobik ortamlarda karbon kaynağı olarak organik asitleri (asetik asit, süksinik asit, laktik asit veya pürüvik asit) kullanarak heterotrofik olarak yaşayabilirler. Kemoorganotrofiklerdir. Sadece bir tür fakültatif kemolitotroftur. Bazı türler aromatik veya hidroksiaromatik bileşenleri metabolize edebilirler ve bu nedenle benzin gibi maddelerin bioremediasyonunda kullanılabilirler.

Genelde prototrof oldukları halde, oksotrof türlere de rastlanır. *Bacillus*'lar çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra, geniş fizyolojik yetenekleri ile de, psikrofilikden termofiliğe; asidofilikden alkalifiliğe; halotoleranttan halofiliğe geniş bir yelpazeye sahiptir ve bu nedenle endüstriyel uygulamalarda kullanıma potansiyelleri yüksektir (Sneath, 1986; Rosovitz et al., 1998; URL:1; URL:3).

Bazı *Bacillus* türlerinin (deoksi)nükleozidleri veya (deoksi)ribozları karbon ve enerji kaynağı olarak kullandığı da bildirilmektedir (Sgarrella et al., 1997).

2.1.6. *Bacillus*'ların genetik yapısı

Bacillus genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılan *B. subtilis* türü oldukça iyi tanımlanmış olup, genom büyüklüğünün 4,2 Mbp olduğu ve 4100 protein kodlama geni içerdiği bildirilmiştir (Wipat and Harwood, 1999).

Genel ve özel transdüksiyon, plazmid DNA aktarımı, plazmid ve bakteriyofaj vektörleri ile ilgili moleküler genetik araştırmalarda *B. subtilis* türünün yanı sıra, *B. brevis*, *B. cereus* *B. coagulans* gibi türler de kullanılmaktadır (Sneath, 1986).

Bacillus cinsi içindeki DNA baz kompozisyonunun dağılımı, cinsin genetik dağılımı açısından ilginç sonuçlar vermektedir. Doğal bir cinsde, en fazla %10-15 aralığında olması gereken %mol G+C oranı *Bacillus* cinsi içinde %32-69 arasında değişmektedir. Bu oranın aynı türdeki değişik suşlarda %40-50 arasında olabildiği

bildirilmektedir. Bu bilgiler belki de cinsin yeni cinslere bölünebileceğini göstermektedir (Sneath, 1986; Priest, 1993; Rosovitz et al., 1998).

2.2. *Bacillus* Cinsi ve Poli- β -hidroksibütirat (PHB) Üretimi

2.2.1. Poli- β -hidroksialkanat (PHA) ve poli- β -hidroksibütirat'ın (PHB) tarihçesi

Bakteriyel plastik veya biyoplastik de denilen ve petrokimyasal plastiklerin neden olduğu çevresel kirliliğe alternatif olan poli- β -hidroksialkanatlar (PHA), geleneksel plastik potansiyeline sahip, mikrobiyal olarak üretilen polimerlerdir (Anderson and Dawes, 1990; Page, 1992a). PHA'ların bakterilerde, insandaki yağ veya bitkilerdeki nişasta gibi rol oynadığı bildirilmektedir (Pool, 1989; URL:1).

Bir çok çeşidi bulunan PHA'lar, linear, uzun, 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden oluşan, bakterilerden elde edilebilen, aktif mikrobiyal polyesterlerdir (Anderson and Dawes, 1990; Madison and Huisman, 1999). Bunlar içinde yer alan poli-Beta-hidroksibütirat (PHB), PHA'ların en yaygın ve geniş kapsamlı olarak çalışılan tipidir (Madison and Huisman, 1999; URL:4).

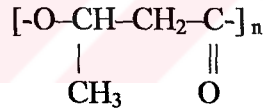
PHB polimerinin bakterilerden ilk izolasyonu ve karakterizasyonu 1920'li yıllarda, Lemoigne (1927) tarafından Pastör Enstitüsünde yapılmıştır (Holmes, 1985; Anderson and Dawes, 1990; Braunegg et al., 1998). Lemoigne, topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu 3-hidroksi bütirik aside rastlamış ve bunu depo maddesi olan, poli-3-hidroksibütirat homopolyesteri olarak tanımlamıştır. Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* bakterilerinde PHB sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır (Braunegg et al., 1998).

Biyoparçalanabilir, termoplastik bir materyal olduğu anlaşılan PHB'nin, petrol türevli plastiklerin yerini almak amacıyla ticari olarak üretimi çalışmaları, 1960'lı yıllarda başlamış, ancak ilk endüstriyel üretimi 1980'li yıllarda gerçekleşmiştir (Holmes 1985, Anderson and Dawes, 1990, Madison and Huisman, 1999). Bu yıllarda İngiltere'de Imperial Kimya Şirketi (ICI) birçok bakteriyel türü, potansiyel PHB

üretimi açısından incelemiş ve endüstriyel üretimde, hücre kuru ağırlığının % 90'ı üzerinde PHB biriktiren *Alcaligenes eutrophus* bakterisini kullanmaya başlamıştır (Madison and Huisman, 1999). Daha sonraki yıllarda PHB ile ilgili çalışmalar *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium* vb. bakterilerle devam etmiştir. Bu çalışmalarda, PHB'nin fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metodları, metabolizması, hücre içi ve hücre dışı parçalanması gibi çok yönlü özellikleri incelenmiştir (Braunegg et al., 1998).

2.2.2. PHB'nin genel özellikleri

Hücre içi depo granülü şeklinde sentezlenen ve biriktirilen PHB, yapısında kısa zincirli β -hidroksi yağ asitleri içeren, prokaryotların membranla çevrili hücre içi depo maddesi olup, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşan uzun bir polimerdir (Molitoris et al., 1996; Poirier, 2002; URL:1). Yan zincirinde bir metil grubu bulunan, optikçe aktif D(-)-3-hidroksi bütirik asidin makromoleküler bir polimeri olan PHB'nin genel formülü $(C_4H_6O_2)_n$ şeklindedir (Şekil 2.1). (n) sayısı 35 000 gibi yüksek bir sayıya ulaşabilir (McCool et al., 1996; Madison and Huisman, 1999).



Şekil 2.1. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı

PHB, mikroorganizma için karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılır. Ayrıca, oksijen konsantrasyonlarının düzenlenmesinde, sporulasyon için enerji sağlanmasında ve redükleyici ektüvalentler için elektron havuzu olarak da görev alır. Hücrede bir redoks düzenleyicisidir (Valentin et al., 1994; Madison and Huisman, 1999; URL:5).

Bakteriyel hücrelerde PHB granülleri, faz kontrast veya elektron mikroskobu ile gözlenebilir. Genellikle küre şeklindedir. Her granülün çapı 100-800 nm arasındadır ve 2-4 nm kalınlığında bir membranla çevrilidir. Granüllerin % 98'i PHB, % 2'si ise protein içermektedir (Dunlop and Rombards, 1973; Lafferty et al., 1988).

PHB'lar, polipropilen gibi petrol türevli yaygın plastiklere benzer materyal özellikler gösterirler (Madison and Huisman, 1999). Bir termoplastik olan PHB'nin sertliği,

polietilene kıyasla dört misli daha fazladır. Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden ekstrakte edildiğinde kristalize olur (Lafferty et al., 1988; Dave et al., 1996; Madison and Huisman, 1999). Katı ama kırılğan bir materyal olan PHB'nin erime sıcaklığı 157-188°C arasındadır. PHB termoplastik olduğundan preslenip şekil verilebilir (Lafferty et al., 1988; Dave et al., 1996, Madison and Huisman, 1999).

UV ışınlarına dirençli olan PHB'nin, asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf dirence sahip olduğu; polimerin su ve hava geçirmez oluşunun hidrolitik parçalanmaya direnç sağladığından kullanım olanaklarının genişlediği bildirilmiştir (Poirier, 2002).

Polimerin molekül ağırlığı, özellikle bakterinin türüne bağlı olmakla birlikte, büyüme koşulları ve hücrenin yaşam döngüsündeki yerine göre de değişebilir (Dunlop and Rombards, 1973; Taidi et al., 1994). PHB molekülünün ağırlığının 60 000–2 000 000 Da arasında değiştiği bildirilmektedir (Braunegg et al., 1998).

PHB biyosentez genlerinin, kromozomda veya plasmid DNA'da lokalize olduğu bildirilmektedir (Steinbüchel ve Schlegel, 1991).

2.2.3. PHB oluşum şartları ve tayini

Araştırmacılar, PHB'nin birçok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme koşullarında oluşturulduğunu (Lafferty et al., 1988; Jan et al., 1996) ve PHB birikiminin genellikle, fazlaca karbon kaynağı varlığında, ancak büyüme için gerekli azot kaynağı, oksijen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe vb.) gibi besleyici maddelerin eksikliğinde gerçekleştiğini bildirmektedirler (Valentin et al., 1994; Jan et al., 1996; McCool et al., 1996). Ancak *Rhizobium etli* (Encarnacion et al., 1995) ve *Azotobacter vinelandii* UWD suşu (Page and Knosp, 1989) gibi bazı bakterilerde eksponansiyel gelişme devresinde de biriktirildiğini rapor etmişlerdir.

Yapılan araştırmalarda, büyüme ve PHB biriktirimi arasında yakın bir ilgi tespit edilmiştir. Buna göre, büyümenin eksponansiyel fazında PHB birikimi artmakta, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise maksimum düzeye ulaşmaktadır (McCool et al., 1996). Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de, PHB miktarının

yüksek oranda arttığı bilinmektedir (Lee, 1996). Sporlu bakterilerde PHB birikiminin spor oluşumundan hemen önce olduğu ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı belirtilmektedir (Nickerson et al., 1981; Benoit et al., 1990).

Yapılan bir çalışmada, *Rhizobium* bakterilerinde, kültür ortamının asitleşmesine bağlı olarak hücre ölümünün arttığı ve PHB içeriğinin buna bağlı olarak düştüğü bildirilmiştir (Tavernier et al., 1997).

PHB'nin belirlenmesinde UV spektrofotometreden yararlanılır. PHB, hücreden elde edildiğinde sülfürik asitle krotonik aside dönüştürülerek, 235 nm dalga boyundaki absorbanı ölçülür (Bonartseva and Myshkina, 1985). PHB'nin hücrede tespiti ve konsantrasyonunun belirlenmesinde ¹H NMR ve Gaz Kromatografisi analizi ve FTIR Spektroskopi yöntemi de kullanılabilir (Jan et al., 1996; Misra et al., 2000; Yan et al., 2000). Canlı bakteri hücresinde PHB depo granüllerinin tespitinde kullanılan metodlardan biri de lipofilik boyalarla boyamadır. Bu amaçla Nil Blue A, Sudan Black B ve Sudan III gibi bazı florosan boyalar kullanılabilir (Bonartseva, 1985; Pierce and Schroth, 1994).

2.2.4. PHB sentezi

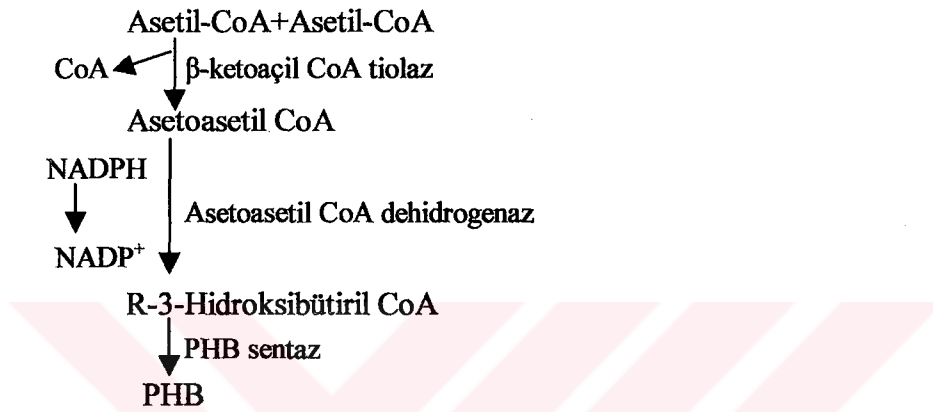
Polimerin biyosentezi, monomerlerin oluşumu ve birleştirilmesi gibi, iki enzimatik aşama gerektirir. Üretim seviyesi, zincir uzunluğu ve oluşan kopolimerlerin kompozisyonu, bu enzimlerin performansına bağlıdır (Taguchi et al., 2001).

Hücrede PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek Asetil-CoA ve düşük koenzim A düzeyinin olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu, mikroorganizmalara göre değişmekle beraber genelde azot, potasyum, sülfür veya oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır (Braunegg et al., 1998).

Prokaryot hücrelerde PHB'nin hücre içi sentezi için başlangıç bileşiği, Asetil CoA'dır. Substrat ve Asetil CoA'nın hücre içi konsantrasyonunun artışıyla oluşan koşullar, PHB sentezinde pozitif bir etkiye sahiptir. Bu aynı zamanda PHB sentezini oldukça

basitleştirmektedir. Çünkü, enzimatik olarak katalizlenen reaksiyon, düzenleyici mekanizmanın idaresi altındadır (Lafferty et al., 1988).

En kapsamlı karakterize edilen polimer olan PHB'nin biyosentezi, üç değişik enzim tarafından katalize edilen, üç enzim reaksiyonundan oluşmaktadır (Şekil 2.2.) (Madison and Huisman, 1999).



Şekil 2.2. PHB Sentezi (Lee'den, 1996)

PHB granülleri ile sentaz enzimi polimerizasyonu arasındaki ilişki yıllardır bilinmektedir. Sınırlı karbonlu ortamda gelişme sırasında, sentaz enzimi çözünmüş formda oluşmaktadır. Ayrıca, azotun ortamda azlığında da PHB sentaz meydana gelmektedir. Çözünmüş sentazın bu şartlar altında hızla tükenmesi PHB granülleri ile ilişkilidir (Anderson and Dawes, 1990).

2.2.5. PHB'nin biyolojik parçalanabilirliği

PHB'nin en önemli özelliklerinden biri, toprak ve insan vücudu gibi yerlerde, toksik ürünler meydana getirmeksizin tamamen parçalanabiliyor olmasıdır. PHB'nin aerobik ortamdaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su; anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise metandır (Page, 1992b; Braunegg et al., 1998; Lee, 1996).

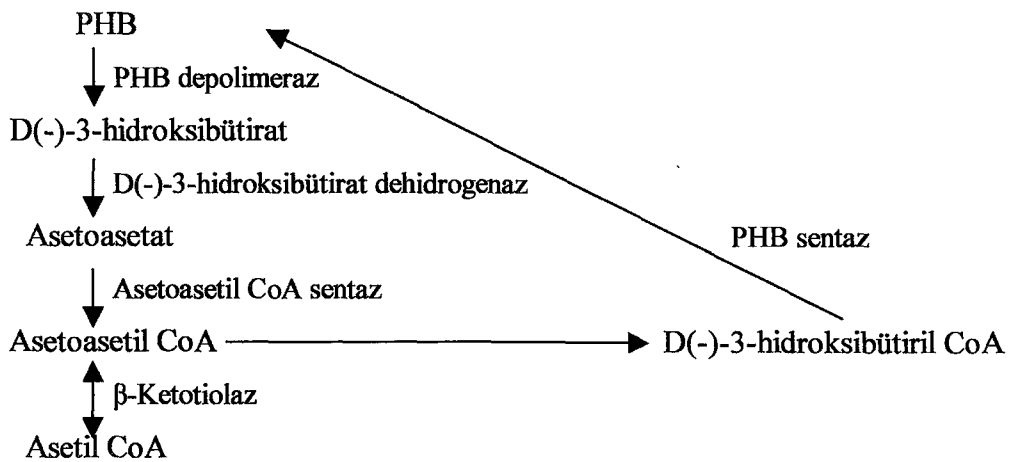
PHB'nin parçalanma süresi bir kaç aydan (anaerobik), bir kaç yıla (denizsu) kadar, katkı maddesi ile ayarlanabilir. Parçalanmada azot oksidi oluşmaması, çevre korunması açısından önemlidir. Parçalanmış biyoplastik, bitkilerin gelişmesini olumlu yönde etkilemektedir (Chen et al., 1991; Dave et al., 1996; Madison and Huisman, 1999).

Polimerin parçalanmasında, bakteri, mantar ve yüksek organizmalar biyolojik faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon kimyasal faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedir (Madison and Huisman, 1999). PHB ve kopolimerleri bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar tarafından belirli çevre şartlarında, kısa bir periyot içerisinde tamamen CO_2 ve enerjiye dönüştürülerek parçalanabilmektedir (Lafferty et al., 1988).

Tamamen parçalanma için gereken zaman ve biyoparçalanma oranının, kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal populasyon gibi etkenlere bağlı olarak değiştiği bildirilmiştir (Lafferty et al., 1988; Lee, 1996).

Mergaert ve arkadaşları (1993), PHB'nin toprakta ve steril tampon çözeltide parçalanmasını araştırdıkları çalışmada, her iki ortamda da molekül ağırlığının düştüğünü, ancak kütle miktarındaki azalmanın sadece toprakta gözlemlendiğini ve bunun toprak çeşidine bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Buna göre, kütle azalmasındaki en yüksek düzeye killi toprakta ulaşılmıştır. Bazı araştırmacılar da, topraktaki P(HB-HV) biyoparçalanabilirlik yüzdesinin toprağın çeşidi ve içerdiği su miktarına bağlı olarak değiştiğini göstermişlerdir (Yakabe et al., 1992).

Lafferty ve arkadaşları (1988), PHB'nin bakteriler tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi için depolimerize olması gerektiğini ve depolimerizasyon sonucu oluşan monomerik 3-hidroksibütirik asitin, birçok organizma tarafından kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3. PHB'nin parçalanması ve sentezi (Lee'den, 1996)

PHB'nin depolimerizasyonu için kullanılan enzimler hücre içi veya hücre dışı enzimler olabilir. PHB'ı parçalayan hücre içi enzimler *Bacillus megaterium* ve *Alcaligenes eutrophus*'da saptanmıştır (Lafferty et al., 1988).

Hücre içi depolimerazların, hücre dışı depolimerazlardan farklı fonksiyonları vardır. Hücre içi depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan, doğal PHB elastomerlerini parçalarlar. Dönüşüm sonrasında kristalize olan, denature edilmiş PHB ise hücre dışı depolimerazlar tarafından hidrolize edilir (Lee, 1996). Bununla beraber, hücre dışı PHA depolimerazlarla hücre içi depolimerazlar arasındaki yapısal farklılık nedeniyle, bozulmamış PHA granüllerinin hücre dışı PHA depolimerazlarla direkt olarak parçalanamadığı bildirilmektedir. PHA sentaz ve PHA depolimeraz aktivitelerinin, granüllerin membran protein tabakası ile ilişkili olduğu ve membranı parçalayıcı veya tahrip edici metodlar olan PHB ekstraksiyon metodlarının, sentaz aktivitesinin kaybına ve depolimerizasyona hassasiyetin artmasına yol açtığı bildirilmektedir (Braunegg et al., 1998).

PHB'nin hücre içi parçalanması, PHA depolimeraz enziminin PHB'ı hidrolize etmesi ile başlar. R-3-hidroksibütirat dehidrogenaz ve asetoasetil-CoA sentaz, R-3-hidroksi bütirat monomer ve dimerlerinin oluşumuna neden olur (Braunegg et al., 1998). *A. eutrophus*'da PHB'nin in vivo depolimerizasyonu sonucu oluşan 3-hidroksi bütirik asit monomerlerinin, hücredeki düşük -R(-)-3-hidroksi bütirik asit dehidrogenaz ve yüksek PHA depolimeraz aktivitesi ile oluşturulduğu bildirilmiştir (Lee, 1996). Ancak, Gribel'in (1968) *B. megaterium*'la yaptığı çalışmada PHA sentaz ve PHA depolimeraz enzimlerinin granüle bağlı olmayıp, çözünmüş halde olduğu bildirilmiştir. Burada, granül dışı membranının bir proteini, depolimeraz aktivitesini engeller. Buna göre, çözücü ile granül yapısının tahrip olması üzerine polimer hidrolizindeki artış açıklanabilir (Braunegg et al., 1998).

PHB'nin, hücre dışı parçalanması depolimeraz tarafından katalizlenir. Bu enzimlerin aktiviteleri polimerin kompozisyonuna, amorf veya kristalin olmasına, örneğin bölümlerine ve en önemlisi çevresel koşullara bağlı olarak değişebilmektedir (Madison and Huisman, 1999). *A. faecalis*'de PHB depolimeraz enziminin etkisinin kristal yapının kalınlaşması ile azaldığı bildirilmiştir (Abe et al., 2000).

Abe ve Doi (2002), (R)-3-hidroksialkanoik asitlerle kopolyester oluşturan (R)-3-hidroksibütirik asitlerin enzimatik parçalanması üzerine yaptıkları çalışmada, *A. faecalis* T1 PHB depolimeraz enzimi varlığında, kopolyesterin erozyon oranının hem kristaliniteye hem de tabaka kalınlığına bağlı olduğunu ve enzimatik parçalanmanın monomer birimlerin karbon sayısındaki artışla arttığını bildirmişlerdir.

Hidroliz reaksiyonunun ürünü iz halindeki D(-)-3-hidroksibütirat monomeriyle esasen bir dimerdir. Dimer ve monomerler hücrelerce içeriye alınır. Hücre içinde bir hücre içi Beta-hidroksibütirat dimer hidrolaz tarafından dimer katalizlenir ve daha sonra oluşan monomer ara metabolik yol izlerine dahil edilir (Lafferty et al., 1988). Örneğin, *A. faecalis* ve *Ps. lemoignei*'den elde edilen hücre dışı PHB depolimeraz enzimi, PHB'dan 3-Hidroksibütirik asit dimer ve trimer yapılarını serbestleştirmiştir. *Bacillus megaterium*'da da PHB'ın parçalanması sonucu 3-Hidroksibütirik asit trimer yapılarının hücrede biriktirildiği bulunmuştur (Kato et al., 1992).

Charles ve arkadaşları (1997), *Rhizobium meliloti*'de PHB'ın parçalanma izyolunu etkileyen genlerin kromozom ve mega plazmidde yerleştiğini tespit etmişlerdir.

2.2.5.1. PHB'ı parçalayan mikroorganizmalar

PHB'ın parçalanmasında, topraktaki birçok mikroorganizma görev alır (Lafferty et al., 1988). Aerobik ve anaerobik PHB parçalayan bakteriler dışında funguslar da, bu yıkıma katılmaktadır. Bunlar toprak, kompostlar, aerobik ortamlar, anaerobik bataklıklar, göl-deniz suları ve hava gibi çeşitli ekosistemlerden izole edildiklerinden PHB'ın bu ortamlarda parçalanabildiği bildirilmiştir (Budwill et al., 1996; Molitoris et al., 1996). Topraklarda yer alan parçalayıcı organizmaların bazı Gram-negatif mikroorganizmalar, Gram-pozitif basiller, streptomycetler ve küf mantarları olduğu bildirilmiştir (Mergaert et al., 1993).

PHB depolimeraz enzimi salgılayan bakteri ve mantarlar, PHA'ları suda çözünebilen oligomer ve monomerlere hidrolize ederler (Abe et al., 2000). Molitoris ve arkadaşları (1996), bir çalışmalarında, *Comomonas* sp., *Pseudomonas lemoignei* ve *P. fluorescens* tarafından polihidroksialkonatların yüzey tabakasının bakteriyel olarak parçalandığını bildirmişlerdir. Bakteriyel hidroliz sırasında polimerdeki

morfolojik değişikliklerin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile araştırıldığı çalışmada, parçalanmış örnekler bakıldığında hidrolizin yüzeyden başladığı gösterilmiştir.

Denitrifikasyon yapan bazı bakteriler, PHB'ı anaerobik olarak parçalayabilmektedirler. Khan ve Hiraishi (2001), aktif çamurdan izole ettikleri yeni bir denitrifikant kemoorganotrof bakterinin PHB ve kopolimeri P(HB-HV)'ı aerobik ve anaerobik şartlarda parçalayabildiğini bildirmişlerdir. Denitrifikasyon bakterilerinin PHB ve P(HB-HV)'ı parçalamaları onları elektron vericisi olarak kullanmaları ile mümkün olmaktadır.

Stieb ve Schink (1984), denizin anoksik kısmından izole ettikleri, zorunlu anaerobik, Gram-negatif bir bakteri olan *Ilyobacter polytropus*'un 3-hidroksibütiratı, bütirata fermente ettiğini tespit etmişlerdir.

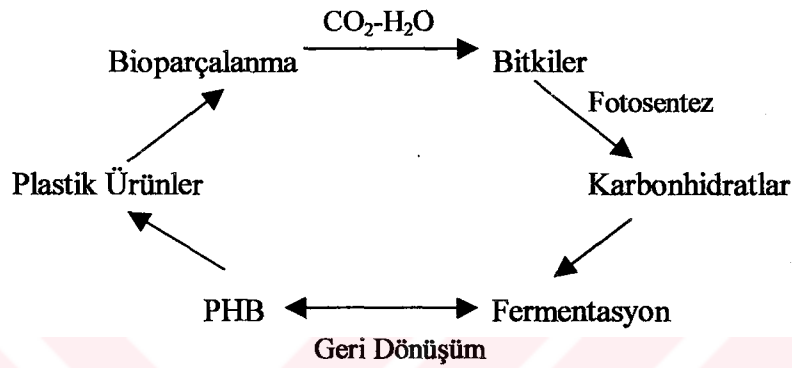
Çevreyle dost, biyoparçalanabilir plastiklerin kullanım ve tüketimlerinin artması doğal çevredeki birikim ve biyoparçalanabilir potansiyellerinin iyice bilinmesi gereğini ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla, polimerleri parçalayıcı mikroorganizmalar ve mekanizmalar üzerinde yapılan çalışmalar da her geçen gün artmaktadır. Bu çalışmalardan birinde, Sei ve arkadaşları (2001), PHB parçalayan mikroorganizmaların hızlı ve duyarlı bir şekilde tespitine yarayan, bir PCR primer seti ve gen probu dizayn etmişler ve bunun çalışmalarında kullandıkları 57 adet PHB parçalayan mikroorganizmadan 47'si üzerinde olumlu sonuç verdiğini bildirmişlerdir.

2.2.6. PHB'ın yenilenebilirlik özelliği

PHB'ın biyolojik yapısı ve biyolojik yıkıma uğraması kadar önemli olan, onun yenilenebilir kaynaklara dayalı üretilmesi gerçeğidir. Bir çok mikroorganizma, doğal bir materyal olan bu polimeri parçalama yeteneğindedirler ve polimer geri dönüştürülebilir bir biyoparçalanma gösterir (Madison and Huisman, 1999).

PHB'ın fermentatif üretimi, karbonhidrat ve yağ asitleri gibi tarımsal ürünlerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesine bağlıdır. Bu, tarımsal kaynaklı

karbondioksit ve sudan meydana gelmektedir ve bunların biyoparçalanabilir PHB'a çevriminden sonra, yıkım ürünleri yine karbondioksit ve sudur (Lee, 1996). Biyoplastiklerin yeniden oluşum devresi, sentez-parçalanma-sentez olarak gösterilmiştir (Şekil 2.4.). Bu devre tabiatta gerçekleşebileceğinden, çevre korunması açısından da önemlidir (Dave et al., 1996).



Şekil 2.4. PHB'nin karbon döngüsü (Lee'den, 1996)

2.2.7. PHB'nin kullanım alanları

PHB'nin, biyolojik parçalanabilirliği, biyolojik uyum yeteneği ve toksik olmayışı sayesinde endüstriyel uygulamalarda kolayca kullanılabileceği bildirilmektedir (Steinbüchel, 1991; Weber, 2000). Kolay şekil alma ve parçalanabilme özellikleri nedeniyle PHB, daha çok paketleme malzemesi olarak kullanılmaktadır (Madison and Huisman, 1999). Ancak, biyoyum yeteneklerinin de olması, implantasyon maddesi olarak kullanımını da her geçen gün arttırmaktadır (Lootz et al., 2001).

Özellikle PHB ve kopolymer poli-β-hidroksibütirat-co-polihidroksivalerat P(HB-HV), gıda ve kozmetik alanındaki paketleme maddeleri, tarım, kişisel temizlik araçları ve biyomedikal ürünler gibi alanlarda çok geniş potansiyel uygulamalara açıktır. Hidroksiasit uzun yan zincirli PHB'lar basınca duyarlı yapışkanlar olarak kullanılmaktadır. PHB, kağıt örtüler ve krem öncülleri gibi ajanların yapımını da sağlayabilirler (Madison and Huisman, 1999; Weber, 2000; Lootz et al., 2001).

Biyoyumlu olan PHB monomerleri insan vücudunda bulunan doğal metabolit olması nedeniyle, polimer vücutta sadece çok hafif bir immünolojik cevap oluşmasına neden olur. Bu özelliğinden dolayı PHB insanlarda ilaçların kontrollü

salınımı için test edilmiştir. Böyle çalışmalarda ilaç, PHB'dan yapılmış bir hap içine sıkıştırılmış ve ağız yoluyla hastalara verilmiştir. PHB'ın vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. İnsan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermez. Bu özelliğinden dolayı da PHB cerrahi dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmıştır (Holmes, 1985).

Yapılan çalışmalar, tekstil sanayinde, PHB'dan yararlanılabileceğini göstermiştir. *Alcaligenes eutrophus*'dan izole edilen genlerin pamuk bitkisine (*Gossypium hirsutum* L.Cv DP50) aktarılması sonucu, transgenik pamuğun lif lümenleri içinde PHB üretimi sağlanmıştır. PHB granülleri sayesinde yüksek ısı kapasitesi ve düşük termal geçirgenliğe sahip olan transgenik liflerin tekstil sanayi uygulamalarında avantaj sağladığı bildirilmiştir (Chowdhury and John, 1998).

Biyobozunur plastiklerin paketlenme, gıda, tıp, eczacılık ve tarımdaki kullanım alanları aşağıda sıralanmıştır (Lee, 1996);

- Paket filmleri, poşetler, torbalar, gıda korunmasında kullanılmak üzere tepsiler ve çeşitli kaplar,
- Şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamaları,
- İlaç, tablet, insektisit, herbisit ve gübrenin uzun sürede, belli hızda salıverilmesi için biyoparçalanır taşıyıcılar,
- Bir defa kullanılan traş bıçağı, çatal, bıçak, tabak gibi mutfak kapları ve bebek bezleri,
- Cerrahi pens, eldiven, önlük ve maske,
- Kemik değiştirilmesi ve cerrahi plakalar,
- Pansuman sargısı,
- Kan damarı değiştirilmesi,
- Bitki sulama boruları, bitki yapraklarının kaplanması,
- Kemik büyütülmesi ve tedavisi,
- Kiral bileşenler üretimi için başlatıcı materyaller,
- Taze balık, peynir, et ve et ürünleri, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve

oksijene karşı koruma veya parlaklık sağlama, aroma kaybını önleme amacıyla kullanım,

- Bazı kimyasal maddelerin eldesi.

PHB, özellikle toprakta biyoparçalanma gerektiren uygulamalar için çok uygundur. Örneğin, ekin sulaması için PHA'lardan yapılacak oluklar kullanılabilir. Bu durumda hasat mevsiminin sonunda bunların tarladan toplanması gerekmeyecektir. Ayrıca bunlar tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak için, gübre yada pestisitlerin kontrollü salınımı için plastik kılıflar olarak kullanılabilir. Kış mevsiminde buğdayı topraktaki bir zararlıdan korumak gerektiğinde, uygun bir insektisit PHB granülü içine alınabilir ve sonbaharda buğdayla birlikte toprağa ekilir. Topraktaki bakteriler PHB granülünde kolonize olmaya başlayacak ve PHB yaklaşık bir haftalık inkübasyon periyodundan sonra insektisidi serbest bırakmaya başlayacaktır. Bu süre kimyasalların olmadığı bir çevrede tohumların çimlenmesi için yeterlidir (Holmes, 1985).

PHB ve kopolimerleri çeşitli ürünlerin yapısında önemli bir potansiyele sahip olmakla birlikte, son zamanlardaki en ilginç uygulamalar biyolojik uygunluğu ve maliyetinden dolayı tıp ve eczacılık alanlarındadır. Veterinerlikte ve insanların ilaçla tedavisinde teropatik bileşiklerin kontrollü olarak salıverilmesi için PHA'lar kullanılmıştır (Lafferty et al., 1988, URL:6). D-(-)-3-hidroksibütirik asitin insan kanının normal bir ögesi olduğu ve tüm yüksek organizmalarda lipit metabolizmasının ürünü olarak bulunduğu saptanmıştır. Veteriner hekimliğinde ilaçların salınımı için biyolojik parçalanabilen bir matriks olarak PHB'nin birçok kullanım alanı vardır. Polimer özellikle sığırların rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir (Holmes, 1985).

Enantiomerik saf bileşiklerden olan D-(-)-3-hidroksibütirik asitin, asimetric sentez işlemi ile saf maddelerin eldesinde kullanıldığı bildirilmektedir (Holmes, 1985).

Biyolojik olarak parçalanabilirliğinden dolayı tek kullanımlık ürünlerin üretimi için PHA'lara yönelinmiştir. PHB, kopolimerleri gibi preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve diğer sentetik polimerlerle heteropolimer yapımında kullanılabilir (Lafferty et al., 1988).

Polipropilene fiziksel özellikleri yüzünden çok benzeyen PHB, polipropilenden yapılan yıkanabilir kaplar, kırıştırılabilen paketler ve ipler gibi pek çok ürünün yapımında da kullanılabilir (Holmes, 1985).

2.2.8. PHB üretiminde kullanılan substratlar

PHB ve çeşitli PHA'ların üretimi için kullanılan substratlar özellikle karbon kaynağı açısından bakıldığında, glukoz, sükröz ve yağ asitleri ile alkanlar ve kloroalkanoik asitler gibi kimyasal bileşenlerdir (Kato et al.,1992; Tanaka et al., 1993; Jan et al., 1996). Ayrıca, bütirik ve pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit, L-Laktat gibi karbon kaynakları kullanımı da denenmiştir (Valentin et al., 1981; Doi et al., 1988; Tanaka et al., 1993).

PHB ve kopolimerlerin kompozisyonu, kullanılan karbon kaynağına bağlı olarak değişebildiği (Bloembergen, 1986), ancak bu dağılımın tesadüfi olabileceği de bildirilmiştir (Doi et al., 1986) .

Doi ve arkadaşları (1988), karbon kaynağı olarak pentatonik asit kullanıldığında *Alcaligenes eutrophus*'da % 90 oranında PHB üretimi saptamışlardır. *Alcaligenes eutrophus*'da Tanaka ve arkadaşları (1993), L-Laktatlı besiyerinde % 55 oranında PHB birikimi tespit etmişlerdir.

A.eutrophus'un polietilen glikol veya polisakkaritlerden kopolimerler ürettiği ve bu kopolimer kompozisyonu ve moleküler ağırlığının yapılan müdahalelerle kontrol edilebileceği bildirilmiştir (Hiki et al., 2000). Yine aynı bakterinin glukoz, propiyonik asit veya 4-hidroksi bütirik asit ya da bütirolakton kullanıldığında P(3HB-co-3HV-co-4HB) ürettiği bildirilmiştir (Madden et al., 2000).

Amonyum klorür (Kato et al.,1992), amonyum asetat, balık peptonu (Page and Cornish, 1993) amonyum sülfat (Braunegg et al., 1998) vb. azot içeren kaynaklardan da PHB verimini arttırıcı çalışmalarda yararlanılmaktadır.

Durner ve arkadaşları (2000), *Pseudomonas oleovorans* ile yaptıkları çalışmada, oktonat ve amonyum içeren besiyerini farklı C/N oranlarında hazırlamışlar ve C/N

oranı arttığında PHA birikiminin yükseldiğini ve bunun azotun sınırlanmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Azotobacter vinelandii UWD suşu, glukoz ve balık peptonu içeren besi ortamında geliştirildiğinde %80 oranında PHB ürettiği gösterilmiştir (Page, 1995). *Rhizobium meliloti*'nin fruktozlu ortamda üretildiğinde yüksek miktarda PHB depo ettiği bildirilmiştir (Jan et al., 1996).

2.2.9. PHB'ın ucuz üretimi

PHB oluşumu için kullanılan karbonhidrat substratı fiyatının, PHB üretiminin ticari başarısında sınırlayıcı faktörlerden biridir ve polimer üretiminin her bir tonu için, 3 ton glukoz kullanılması gerektiği bildirilmektedir (Page, 1992a). Kullanılan glukozun, maliyeti yükseltmesi sonucunda üretilen PHB'ın kg fiyatı 15-30 US Dolar arasında değişmektedir (Witholt and Kessler, 1999).

Polimerin kullanım sınırlarını belirleyecek olan maliyet fiyatını düşürmek amacıyla rekombinant türler üzerinde çalışılmasının yanısıra, farklı ve ucuz karbon kaynakları kullanarak yüksek PHB üreten suşların tespiti üzerinde de çalışılmaktadır (Witholt and Kessler, 1999).

Ekonomik biyoplastik üretimi için melas, (Page, 1992a; Page, 1992b; Wu et al., 2001; Gouda et al., 2001) ksiloz, arpa ve soya atık suları (Law et al., 2001) ve peynir altı suyunun (Ahn et al., 2000) kullanılması araştırılmaktadır. Özellikle melas, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanı sıra, içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır (Beaulieu et al., 1995).

PHB'ın pratik uygulamalarında üretim fiyatlarının indirgenmesi için daha ekonomik kültür ortamları araştırılırken substrat maliyetinin düşürülmesinin yanısıra karbondioksitin dönüştürülüp ucuz yoldan PHB üretilmesi için, siyanobakteriler ile de çalışmalar yürütülmektedir (Tanaka et al., 1993; Miyake et al., 1997; Asada et al., 1999; Klinke et al., 1999).

Ucuz karbon kaynakları ve hatta peyniraltı suyu gibi atıklardan PHB üretimi yapılarak verimin arttırılması amaçlanmaktadır. Ahn ve arkadaşları (2000),

rekombinant *E. coli* kullanarak peynir altı suyundan yüksek PHB verimi alındığını bildirmişlerdir. Kim (2000) ise çalışmasında, yine rekombinant *E. coli*'yi peynir altı suyunda geliştirmiş ve %20 oranında PHB verimi; *Azotobacter chroococcum*'u ise nişasta içeren besi ortamında geliştirerek, oksijeni sınırlandırılmış şartlar altında %46 oranında PHB verimi elde etmiştir.

2.2.9.1. Melas

Şeker endüstrisinin yan ürünü olan melas, kristalize şekerin eldesinden sonra şeker imali ve rafinesinin son ürünü olarak da tanımlanabilir. Dünyadaki melas üretiminin % 75'i şeker kamışından (*Saccharum officinarum*), geri kalanının en büyük kısmı ise şeker pancarından (*Beta vulgaris*) elde edilmektedir. Dünyadaki melas üretimi 1990'lı yılların sonunda 46 milyon ton olduğu bildirilmektedir (URL:7).

Dünya melas üretiminin yaklaşık üçte biri şeker üretiminden gelmektedir. 100 ton şeker kamışının işlenmesi sonucu 3-4 ton; 100 ton şeker pancarının işlenmesinden ise 4-6 ton melas elde edilmektedir.

Melasın esas içeriği, glukoz ve fruktoz monosakkaritlerinin biraraya gelmesiyle oluşan sükroz disakkaritidir. Burrows (1970), şeker pancarı melasının yoğun miktarda sükrozun yanı sıra, rafinoz şekeri de bulundurduğunu, bunların yanı sıra birçok mineral ve vitamin içerdiğini de bildirmiştir.

Page (1992a), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun şeker pancarı melasında yüksek PHB verimine sahip olduğunu saptamıştır. Ayrıca *Bacillus* cinsi bakterilerin de melasda hızlı bir şekilde geliştiği ve PHB ürettiği bildirilmektedir (Wu et al., 2001).

2.2.10. PHB üreten mikroorganizmalar

Prokaryotik mikroorganizmaların geniş bir kısmı tarafından sentez edilebilen PHB, toprak, deniz ve tatlısu, bunların sedimentleri gibi farklı çevresel örneklerden izole edilen, çok sayıda heterotrofik ve ototrofik aerobik, fotosentetik anaerobik bakteriler, *Actinomycetes*'ler, siyanobakteriler, anaerobik, yağ asidi okside eden bakteriler, Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından depolanabilmektedir (Findlay and White, 1983; Labuzek ve Radecka, 2001). PHB, özellikle *Alcaligenes* sp.,

Azotobacter sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. ve çeşitli toprak mikroorganizmaları gibi mikroorganizmalar tarafından oluşturulur (Lafferty et al., 1988; Jan et al., 1996).

Ticari olarak biyoplastik üretiminde Imperial Kimya Şirketi öncelikle metilotrofik bakteriler ve *Azotobacter*'leri kullanmış, ancak daha sonra PHB üretim seviyesi daha yüksek olan *Alcaligenes eutrophus* bakterisi ile devam etmiştir.

2.2.10.1. *Alcaligenes*, *Azotobacter* ve *Pseudomonas* cinslerinde PHB üretimi

Yapılan çalışmalarda, *Alcaligenes eutrophus* bakterisinin, fruktozu karbon kaynağı olarak kullanarak hücre kuru ağırlığının %80'inden fazlasını PHB olarak biriktirebildiği (Madison and Huisman, 1999) ve *Alcaligenes eutrophus*'un glukozu kullanabilen mutantlarının da PHB üretiminde kullanılabileceği bildirilmektedir. *Alcaligenes latus* gibi bu cinse ait diğer türler de birçok karbon kaynağını kullanarak yüksek PHB verimi sağlarlar. Ortamdaki C/N oranının artışının polimer sentezini kolaylaştırması nedeniyle, *Alcaligenes* türlerinde PHB üretiminin kinetiğinde büyüme fazını takiben, azot kaynağının sınırlı hale getirilmesinin oldukça belirgin bir depo fazı oluşturduğu rapor edilmiştir (Lafferty et al., 1988).

Beaulieu ve arkadaşları (1995), *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 suşunda %3 glukoz ve farklı amonyum kaynakları ile şeker kamışı melasında PHB verimini araştırdıkları çalışmalarında, en iyi büyüme ve PHB üretiminin amonyum sülfat içeren besiyerinde olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada, bakteri tarafından metabolize edilemeyen melas, karbon kaynağı olarak değil sadece büyüme aktivatörü olarak kullanılmıştır. Optimal büyüme ve PHB üretiminin %0,3 melas oranında sağlandığı rapor edilmiştir. Çalışmada ulaşılan en yüksek PHB verimi ise %26 olarak tespit edilmiştir.

Tanaka ve arkadaşları (1993) ise, geliştirdikleri iki aşamalı fermentasyon metodunda, *A. eutrophus*'un *Lactococcus lactis*'in ksilozdan üretmiş olduğu L-Laktat içeren besiyerinde geliştirildiğinde % 55 oranında PHB biriktirdiğini tespit etmişlerdir.

A. eutrophus NCIMB 11599 suşunun PHB üretimi, amonyumu sınırlı şartlarda incelenmiş ve kültür en yüksek hücre yoğunluğundayken sınırlanan amonyumun PHB veriminde %76'lık bir artışa sebep olduğunu bildirmişlerdir (Kim et al., 1994).

Borman ve arkadaşları (1998), *Azotobacter beijerinckii* bakterisinin kasein pepton, maya özütü, kasamino asit ve üre gibi organik azot kaynaklarının glukoz veya süktroz gibi karbon kaynaklarıyla kombine edildiğinde, azot sınırlamasına gerek kalmadan %50'den fazla PHB üretebileceğini bildirmişlerdir. PHB'nin büyüme ilişkili şartlardan etkilendiğini ve özellikle kazein pepton içeren besiyerinde büyümenin durgun fazında en yüksek PHB üretim değerine ulaştığını bildirmişlerdir. Çalışmada, oksijeni sınırlanmış şartlarda PHB üretiminin arttığı da vurgulanmıştır.

A. vinelandii UWD suşunun glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz gibi rafine karbon kaynakları ile şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, mısır şurubu, malt ekstraktı gibi kompleks karbon kaynaklarında yüksek PHB verimi elde edildiği bildirilmiştir (Page, 1989; Page 1992a).

Page ve Knosp (1989), *A. vinelandii* UWD suşunun, glukoz ve yanısıra amonyum asetat veya N₂ içeren besi ortamında 24 saatlik kültür sonucunda, hücre kuru ağırlığına oranla sırasıyla %65 ve %75 PHB verimine ulaştığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, PHB üretiminin oksijen sınırlanmasına bağlı olmadığını, glukozun PHB'a dönüşümünün oksijeni sınırlı kültürlerde arttığını gözlemişlerdir.

Nişasta gibi ucuz substratlardan PHB üretiminin araştırıldığı bir çalışmada *Azotobacter chroococcum* kullanılmış ve farklı oksijen konsantrasyonları altındaki PHB verimleri araştırılmıştır. Oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığı ve PHB veriminin %20'den %46'ya ulaştığı bildirilmiştir (Kim, 2000).

Hoffmann ve arkadaşları (2000), *Pseudomonas* bakterilerinin glukonat veya asetat gibi karbon kaynaklarında üretildiğinde, orta zincir uzunluğunda 3-hidroksi yağ asitlerinden (C6-C14) PHA biriktirme yeteneğinde olduğunu belirtmişlerdir.

Ps. aeruginosa, *Ps. putida* ve *Ps. fluorescens* gibi diğer florosan *Pseudomonas* suşlarının da karbon kaynakları varlığında ve sınırlayıcı şartlar altında PHB üretmedikleri, ancak yağ asitlerinde geliştirilirse, orta zincir uzunluğunda (C6-C12) PHA üretebildikleri gözlenmiştir. Araştırmacılar, polimer oluşturma yeteneğinin plasmid DNA'dan kaynaklanmadığını, özel bir enzim sisteminin PHA üretiminde etkin olduğunu belirtmişlerdir (Huisman et al., 1989).

Metilotrofik organizmalardan olan bazı *Pseudomas*'ların da PHB üretimi araştırılmış ve bakterilerde yüksek PHB verimi gözlenmiştir. *Ps. oleovorans*, *Ps. aeruginosa*, *Ps. putida*, *Ps. fluorescens* ve *Ps. testotereni*, n-alkoller ve n-alkanoik asitler kullanılarak PHB üretimi gözlenmiştir (Holmes, 1985; Anderson and Dawes, 1990). Karaboz ve Umay (1994), *Ps. extorquens* bakterisini metanol içeren karbon kaynağında ürettiklerinde % 27 oranında PHB üretimi saptamışlardır.

Fakültatif metilotrof *Pseudomonas* sp.135 suşu üzerinde yapılan bir çalışmada methanol varlığında NH_4^+ 'ün sınırlı tutulduğu ortamda %55, Mg^{+2} eksikliğinde %42,5 ve PO_4^{3-} eksikliğinde ise %34,5 oranında PHB verimi sağlandığı tespit edilmiştir (Daniel et al., 1992).

Xi ve arkadaşları (2000), *Ps. stutzeri* 1317 suşunu glukoz, glukonat, yağ asidi ve alkol içeren ortamda geliştirmişler ve PHA yapısının ortamdaki yağ asidi ve alkollere bağlı olarak değiştiğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, glukoz içeren besiyerinde 20. saatte başlayan azot eksikliğinin hem hücre sayısı hem de polimer miktarında artmaya neden olduğunu ve %50 oranında PHB verimine ulaştığını bildirmişlerdir.

Ateş ve Ekmekçi (2001), *Ps. extorquens* DMS 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'in pancar melası içeren besi ortamındaki PHB üretimini inceledikleri araştırmalarında, *Ps. extorquens* DSM 1337'nin %22,98 ve *A. chroococcum* (TEM)'in %12,10 oranında PHB üretim verimine ulaştığını bildirmişlerdir.

2.2.10.2. Diğer bakterilerde PHB üretimi

Biyolojik olarak parçalanabilen plastik olan PHA'nın fotosentetik üretimi için, güneş ışığı yardımıyla, sera etkisi yaratan gaz olan karbondioksitin kullanımı çevresel olarak kabul edilebilir olduğundan, bu amaç için siyanobakterilerin seçiminin uygun olduğu belirtilmiştir. Karbondioksitten PHA biriktiren üç grup mikroorganizma vardır ki bunlar, hidrojen okside eden kemoototrofik bakteriler, genetik mühendisliği ile yükseltilmiş bitkiler ve siyanobakterilerdir. Siyanobakteriler oksijenik fotosentez ile PHA depo ederler. Asada ve arkadaşları (1999), termofilik izolat *Synechococcus* MA19 suşu ile yaptıkları çalışmada, fotoototrofik şartlarda ve azot azlığında PHB

biriktirdiğini ve PHB granüllerinin tilakoid membranla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

PHB üretimleri araştırılan toprak bakterilerinin, %1 glukoz içeren besiyerinde geliştirildiğinde, varolan PHB üretimlerini on misli arttırdıkları gözlenmiştir (Hanzlikova et al., 1985). Gómcz ve arkadaşları (1996), toprak Gram-negatif bakterilerinin şeker kamışı türevli şekerler olan sükroz, fruktoz ve glukoz ile propiyonik asitten PHB üretimini incelemişler ve bakterilerin %50-80 arasında PHB ürettiğini bildirmişlerdir.

Bitkide nodül oluşturan toprak bakterilerinden olan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de hücre içi PHB depo etme yeteneği birçok araştırmaya konu olmuştur. Bonartseva ve arkadaşlarının (1989) yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, PHB içeriği, nitrogenaz enzimi aktivitesi ile ters, hidrogenaz enzimi aktivitesi ile doğru orantılıdır. Yine, *R. leguminosarum*, *R. trifoli*, *R. galega*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* gibi farklı türlerle yapılan çalışmalarda da, PHB üretimlerinin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğu bildirilmiştir. Sükroz içeren besiyerinde, farklı azot kaynakları kullanılarak yapılan çalışmada, en yüksek PHB veriminin KNO₃'lı besiyerinde %65 ile *R. phaseoli*'den elde edildiği bildirilmiştir (Bonartseva et al., 1994; Beyath, 1996).

Tal ve Okon (1985), *Azospirillum brasiliense* Cd suşunun, eksponansiyel fazın son aşamasında, yüksek C/N oranında, oksijen sınırlandırıldığında %5 olan PHB veriminin, %40'a ulaştığını bildirmişlerdir.

Brandl ve arkadaşları (1991), fotosentetik bakterilerden olan *Rhodospirillum* ve *Rhodobacter* cinsleri üzerinde yaptıkları araştırmalarda bunların da n-alkanoik asitlerden polimer depo ettiğini, ayrıca azotin sınırlandırılması durumunda %PHB veriminin hücre kuru ağırlığının %60-%70'i kadar olabildiğini bildirmişlerdir.

Lillo ve Rodriguez-Valera (1990) ise, yüksek tuz konsantrasyonlarında yaşayan halofilik bakterilerden olan *Halobacter mediterranei*'nin, karbon kaynağı olarak glukoz ve nişasta kullanıldığında, fosfatı sınırlandırılmış şartlar altında %60 oranında PHB ürettiğini bildirmişlerdir.

Manna ve arkadaşları (1999), topraktan izole ettikleri 55 adet toprak *Streptomyces* üzerinde yaptıkları çalışmada, *Streptomyces griseorubiginosus* olarak tanımlanan izolatın, %2 glukoz varlığında, durgun fazda, bakterinin hücre kuru ağırlığının %9,5'u kadar PHB ürettiğini tespit etmişlerdir.

Semenov ve arkadaşları (1989), *Polyprosthecate* bakterisi ile yaptıkları çalışmalarında, *Labrys* cinsinde yer alan bakterilerin %26, *Prothecomicrobium* cinsindeki bakterilerin ise %23 oranında PHB ürettiğini bildirmişlerdir.

Uğur ve arkadaşları (2002), 27 adet *Streptomyces* izolatının %80'inin PHB'ı %0,3-7,6 oranında sentezlediğini tespit etmişlerdir.

Ayrıca, bazı mezofilik ve termofilik laktik asit bakterilerinin PHB üretiminin %0,52-25,55 oranları arasında olduğu tespit edilmiştir (Yüksekdağ et al., 2003).

2.2.10.3. *Bacillus* cinsinde PHB üretimi

Çeşitli araştırmacılar, biyoplastik üretiminde *Bacillus* biyopolimerlerinin potansiyel gelecek uygulamalar için kullanılabileceğini bildirmektedirler (Dave et al., 1996; Labuzek and Radecka, 2001). Lemoigne (1927), 1920'li yıllarda, topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu 3-hidroksi bütirik aside rastlamış ve bunu rezerv maddesi olan, poli-3-hidroksibütirat homopolysteri olarak tanımlamıştır (Braunegg et al., 1998). Sonraki 30 yılda PHB polimerine olan ilgi giderek artmış ve 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içinde PHB sentezi ve parçalanmasını sağlayan hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır (Braunegg et al., 1998).

Macrae ve Wilkinson (1958), *B. megaterium*'un özellikle glukozun azote olan oranının yüksek olması durumunda PHB'ın, hızlı bir şekilde sentezlendiğini ve ortamda karbon ve enerji kaynağı azaldığında hızla parçalandığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, PHB'ın, sentez aşamasında asetat ve Koenzim A kompleksi varlığına bağlı olduğunu da bildirmişlerdir (Braunegg et al., 1998).

Daha sonraları yapılan araştırmalarda, *Bacillus*'ların melas gibi ucuz substratlarda hızlı bir şekilde geliştiği; yüksek sıcaklık ve yüksek osmotik basınca dayanıklı

oldukları ancak, hücre duvarı yapılarının kalın oluşu nedeniyle PHB ekstraksiyonunun kolay olmadığı bildirilmiştir. Yine de avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB üretimini gerçekleştirmek amacıyla uygun suşların tespiti araştırmaları devam etmektedir (Wu et al., 2001).

Bacillus türlerinde PHB sporulasyon için hücre içi enerji rezervi olarak işlev görmektedir. Örneğin, *B. cereus*'da spor oluşumundan hemen önce PHB birikiminin maksimum oranda olduğu ve bakterinin sporulasyon döneminde PHB'nin kullanıldığı bildirilmektedir (Nickerson et al., 1981). Benoit ve arkadaşları (1990), *B. thuringiensis* üzerinde yaptıkları çalışmada, durgun fazdaki sporulasyon sırasında PHB'nin tüketilmeye başladığını ve PHB'nin spor şekillenmesi sırasında enerji kaynağı olarak kullanıldığını bildirmişlerdir.

Kato ve arkadaşları (1992) yaptıkları çalışmada, *B. megaterium*'da 3-Hidroksibütirik asit trimer yapılarının geç eksponansiyel fazda biriktirildiğini, durgunlaşma ve ölüm fazında ise parçalanma sonucunda en yüksek düzeye ulaştıklarını bildirmişlerdir.

B. megaterium 11561 suşunda gelişimin lag fazında PHA yıkımı, eksponansiyel fazda ise sentezin arttığı, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise PHA birikiminin maksimum düzeye ulaştığı ve bu oranın durgun fazın devamı boyunca gittikçe azaldığı bildirilmiştir (McCool et al., 1996). Araştırmalarda, *Bacillus* suşlarının PHB'ı hücre kuru ağırlıklarının %50'sinden fazla biriktirebildiği bildirilmektedir (Chen et al., 1991, Dave et al., 1996, Beyath ve Aslım, 1999).

Bacillus'larda genelde 0,2-0,5 µm çapında olan in klüzyon cisimciklerinin dış membranının 2 nm olduğu ve cisimciklerin %97'sinin PHA, %1,87'sinin protein ve %0,46'sının ise lipid içerdiği gösterilmiştir (McCool et al., 1996). Dunlop ve Robards (1973) ise, *B. cereus* ile yaptıkları çalışma sonucunda 240-720 nm büyüklüğünde olan PHB granüllerinin iç kısımda 140-270 nm çapında bir çekirdek ve onu saran bir kılıf ve en üst kısımda ise bir zarla çevrili olduğunu belirtmişlerdir.

Chen ve arkadaşları (1991), zenginleştirilmiş besiyerinde geliştirilen *Bacillus* bakterilerinde hücre kuru ağırlığına göre %5-20 arasında PHB biriktirildiği ve oluşan PHB'nin hem 4 hem 8 karbonlu, geniş zincirli, kompleks karışımlı polimerler

olduğunu ve oluşan PHA'ların kompozisyonunun suşa ve karbon kaynağına göre değiştiğini bildirmektedirler.

Aslım ve Beyatlı 'nın çalışmasında (1998) ise, topraktan izole edilen farklı *Bacillus* türlerine ait PHB üretim miktarları belirlenmiş ve izole edilen tüm suşların PHB ürettiği, verimlilik yüzdesi en yüksek suşun ise %48,13 ile *B. megaterium* olduğu bildirilmiştir. Kato ve arkadaşları (1992) da kendi izole ettikleri *B. megaterium* B-124 suşunun hücre kuru ağırlığının %20'sinin PHB olduğunu bildirmişlerdir.

Dave ve arkadaşları (1996), atık suda yaptıkları incelemelerde, aktif çamurda PHB varlığı tespit edilmiş ve bu çamurdan izole edilen 12 adet bakteriyel suşun 10 adedinin *Bacillus* olduğunu bildirmişlerdir. Bu suşlardan özellikle birinin %70 oranında PHB ürettiğini bildirmişlerdir.

Bacillus 'ların amilaz ve proteinaz enzimlerinin varlığı nedeniyle gıda atık sularından faydalanabileceğini bildiren Law ve arkadaşları (2001), aktif çamurdan izole ettikleri *Bacillus* suşlarını arpa ve soya atık suyunda geliştirerek PHB verimlerini araştırmışlar ve suşlardan HF-1'in atıklardan %19,22 HF-2'nin ise %10,18 oranında PHB ürettiğini gözlemişlerdir. Araştırmacılar, düşük maliyetli PHB üretimi için ucuz karbon kaynaklarının kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Mercan ve Beyatlı (2001), 10 adet *B. sphaericus* suşunun PHB üretimlerini tespit ettikleri çalışmalarında, PHB üretiminin %5,00-%25,88 arasında bulmuşlardır. Ancak özellikle üretimi en yüksek olan bazı suşların, %0,2 beef ekstrakt içeren besi ortamında yüzde verimlerinin %32,50'ye kadar yükseldiğini açıklamışlardır. Sadettin de (2000), PHB üretimlerini araştırdığı bazı *Bacillus* türlerinde, en yüksek PHB üretiminin %49,91 ile *B. sphaericus* suşunda olduğunu tespit etmiştir.

Wu ve arkadaşları (2001) ise, melasla kontamine olmuş topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp. Jma5 suşunun 250 g/l melas içeren besiyerinde ürettiği en yüksek PHB miktarının %35 olduğunu bildirmişlerdir.

Labuzek ve Radecka (2001), *B. cereus* UW85 suşunu azoti sınırlandırılmış şartlarda PHB verimini %9 olarak tespit etmişlerdir.

2.2.10.4. *Bacillus*'ların farklı büyüme koşullarında ve melasda PHB üretimleri

PHB üretimi, bakteriler için uygun üreme ortamı sağlandığında artmaktadır. Araştırmalarda, PHB seviyesinin, besiyeri içeriği ve kullanılan substratlar gibi bazı faktörler tarafından sınırlandırılabilceği bildirilmektedir (Chen et al., 1991; Beyatlı, 1996).

Chen ve arkadaşları (1991), *Bacillus* türleri ile yaptıkları araştırmalarında, karbon ve azotun sınırlandırıldığı fermentasyon şartlarında PHB veriminin arttığını ve kültür ortamına propiyonat veya valerat ilave edildiğinde PHB ve PHV sentezinin gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Dave ve arkadaşları (1996), karbon kaynağı olarak glukoz içeren ve içermeyen besiyerinde geliştirilen *Bacillus* bakterilerindeki PHB üretimini glukoz içermeyen besiyerinde 1,56 - 2,64 µg/ml olarak tespit ederken, %1 glukoz içeren besiyerinde PHB üretiminin 20 misli arttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, petrokimyasal aktif çamurdan izole ettikleri *Bacillus* suşlarını, azot ve fosforu sınırlı tutarak, litrede 20 gr glukoz ilave edilen aktif çamura inoküle ettiklerinde, çamur içeriğindeki PHB'nin 13 kat arttığını bulmuşlardır.

Farklı azot kaynağı olarak proteaz pepton kullanıldığında, *B. subtilis* K1 suşunda %78,69 ve *B. megaterium* Y6 suşunda %77 oranında PHB verimi saptanmıştır. Aynı suşların, karbon kaynağı olarak glukoz kullanılan besiyerinde PHB verimi %19,51 ve %19,49 olarak tespit edilmiştir (Beyatlı ve Aslım, 1999).

Mercan ve Beyatlı (2001), bazı *B. sphaericus* suşlarının PHB üretimlerini tespit ettikleri çalışmalarında, yüksek PHB üreten (%20-25) suşları NB besi ortamı içeriği sabit tutularak, farklı beef ekstrakt ve sodyum asetat konsantrasyonlarının (%0,2; %0,5; %1) PHB üretimine olan etkisini incelemişlerdir. Sonuçta elde edilen verilere göre araştırmacılar, sodyum asetat içeren ortamda suşların PHB verimlerinin düşük olmasına rağmen, %0,2 beef ekstrakt içeren besi ortamında en iyi PHB veriminin gözlemlendiğini belirtmişlerdir.

Wu ve arkadaşları (2001), melaslı besiyerindeki oksijen şartlarını değiştirerek yaptıkları çalışmada, oksijen miktarındaki azalmanın sporulasyona neden olduğunu ve PHB üretiminin düştüğünü; azot ve fosfor oranının karbona göre düşük olduğu besiyerlerinde ise PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. Jma5 suşunun, PHB verimini %25-35 olarak tespit etmişlerdir.

Gouda ve arkadaşları (2001), şeker kamışı melası ve mısır suyunu karbon ve azot kaynağı olarak kullanarak *B. megaterium*'da PHB üretimini incelemişler ve en yüksek PHB miktarının melas ve glukoz içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hücre gelişiminin en iyi olduğu melas yüzdesinin %3 olmasına rağmen, en yüksek PHB verimi olan %46,2'lik oranın %2 melas içeren besiyerinden elde edildiğini bildirmişlerdir.

2.2.11. Genetik uygulamalarla biyoplastik eldesi

1920'li yıllardan bu yana hakkında birçok bilgi edinilmiş olmasına rağmen, ticari PHB üretiminin hala çok yüksek maliyete neden olması, sentetik polimerlerin yerini alabilecek kapasiteye sahip olan bu biyoplastiğin en önemli dezavantajıdır. Son yıllarda, moleküler biyolojideki gelişmelere paralel olarak, daha fazla ve ucuz PHB üreten bakteriyel suşların geliştirilmesi çalışmaları hız kazanmıştır (Ahn et al., 2000). PHB'nin rekombinantlardan yüksek oranda üretimi, vektör veya promotor aktivitesindeki zenginleşmeye bağlı olarak artmaktadır (Taguchi et al., 2001). Bu amaçla *Alcaligenes eutrophus* ve *Alcaligenes latus* bakterilerinin PHB biyosentez genlerinin başarıyla aktarıldığı rekombinant *Escherichia coli* suşları kullanılmaktadır (Ahn et al., 2000). Nitekim, 1987 yılında *A. eutrophus* genleri, *E. coli* bakterisine başarıyla klonlanmış ve normalde PHB üretmeyen bakterinin, modifiye edildikten sonra PHB ürettiği gösterilmiştir (Pool, 1989).

PHB biyosentetik genlerinin (phbA, phbB ve phbC) *Alcaligenes eutrophus*'da kromozom ve megaplasmid pHG1'de yerleştiği bildirilmiştir (Steinbüchel and Schlegel, 1990). Gelişen Hibridizasyon teknikleri ve heterolog tamamlayıcılar, bu ve diğer bakterilerin PHB biyosentez genlerinin izolasyonunu ve klonlanmasını mümkün kılmaktadırlar (Steinbüchel, 1991).

E. coli'nin çok düşük moleköl ağırlığa sahip ve granül halde olmayan PHB biriktirdiği bildirilmiştir (Sim et al., 1997). Rekombinant *E. coli*'nin PHB üretiminde kullanılma nedenleri arasında, bunların hızlı üremesi, polimerin yüksek miktarda biriktirilebilmesi; ucuz karbon kaynağı kullanabilmesi, üretilen PHB'nin kolay saflaştırılabilmesi ve sentezlenen polimerin depolimerize eden enzimlerin eksikliği gibi önemli bazı avantajları vardır. Rekombinant *E.coli* bakterilerinden %80-90 oranında PHB verimi elde etmek mümkün olduğu bildirilmektedir (Lee, 1996).

Lee ve arkadaşları (1994), *E.coli*'de PHB üretimi için, *A. eutrophus* PHB sentez genleri taşıyan plazmidler kullanmışlar ve plazmid stabilitesinin yüksek olduğunu belirttikleri çalışmalarında, PHB veriminin %80,1'e ulaştığını bildirmişlerdir.

Peynir altı suyu gibi ucuz substratlardan PHB üretiminin, bir rekombinant *E. coli* suşu kullanılarak araştırıldığı bir çalışmada, farklı oksijen konsantrasyonları altındaki PHB verimleri araştırılmıştır. Oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığı tespit edilen çalışmada, yüzde PHB verimi %80'e varmıştır. Araştırmacılar, rekombinant *E. coli*'de PHB biyosentez ve oksijen sınırlandırılma sürelerinin PHB verimi için önemli olduğunu belirtmişlerdir (Kim, 2000).

Klinke ve arkadaşları (1999) da, şeker veya melas gibi ucuz karbonhidrat kaynaklarından, rekombinant *E. coli* yardımıyla PHA üretimi için alternatif stratejiler yapılabileceğini ve *E. coli*'nin kısa sürede üreme, PHA'nın kolayca saflaştırılabilmesi, polimeri parçalayıcı enzim sisteminin yokluğu nedeniyle dikkat çektiğini açıklamışlardır. Araştırmacılar, beta-oksidasyon döngüsünü işletemeyen bir *E.coli* suşuna, glukonattan PHA sentezleyemeyen *Pseudomonas* bakterisinden orta zincir uzunluğunda PHA polimeraz enzimini kodlayan geni aktararak, onun glukonattan orta zincir uzunluğunda PHA üretmesini sağlamışlardır. Rekombinant *E. coli*'deki PHA verimi %2,3 olarak tespit etmişlerdir.

Qi ve Rehm (2001), bilinen en büyük PHB sentaz genine sahip olduğunu bildirdikleri, glukoz varlığında %18 PHB üreten, *Caulobacter crescentus* bakterisini genetik uygulamaya tabii tutmuşlardır. Bakterideki PHB sentaz enzim genini, phaC, kodlayan bölgeyi mutant *A. eutrophus* PHB(-)4 ve rekombinant *E. coli* JM109'a

aktarmışlardır. Sonuçta bakterilerde % PHB verimi sırasıyla %62 ve %6 olarak tespit edilmiş, özellikle *A. eutrophus* PHB(-)4'den alınan verim dikkate değer bulunmuştur.

Ahn ve arkadaşlarının (2000), *Alcaligenes latus* PHA biyosentez genlerini kopyaladıkları *E. coli* CGSC 4401 suşunun, peynir altı suyundan ürettiği PHB miktarını tespit etikleri çalışmalarında, yüzde PHB veriminin yaklaşık %60 civarında olduğunu tespit etmişlerdir.

PHB sentaz enzimi genlerinin prokaryot mikroorganizmalara aktarılmasının yanı sıra ökaryot mikroorganizmalara da aktarılması çalışmaları yapılmaktadır. Örneğin; *A. eutrophus* bakterisinden alınan PHB sentaz enzimi genleri bir maya plazmidine aktarılmış ve *Saccharomyces cerevisiae*'da bu enzimlerin aktif hale geçmesi sağlanmıştır. Araştırmada, üremenin durgun fazında, hücre kuru ağırlığının %0,5'i kadar PHB üretimi elde edildiği bildirilmiştir.

Hori ve arkadaşları (2002), *Bacillus megaterium*'un kendini yıkan bir suşu üzerinde yaptıkları çalışmalarla elde ettikleri transformantın PHB üretimini incelemişler ve ortamda glukoz tükenince hücrelerin kendiliğinden parçalanıp, PHB'nin serbestleştiğini tespit etmişlerdir.

Bitkiler birer PHB üreticisi olmamalarına karşın, PHB genlerinin taşıyıcısı olabildiklerinden, PHB üretebildikleri (URL:5) ve bu nedenle, transgenik bitkilerin çok miktarda ve ucuz PHB üretimi için potansiyel organizmalar olduğu bildirilmiştir (Klinke et al., 1999; Poirier, 2002; URL:5). Yapılan çalışmalarda bunlardan, kuru ağırlıklarının %20-40 arasında PHB elde edildiği bildirilmiştir (Klinke et al., 1999).

2.3. *Bacillus* Cinsi ve Antimikrobiyal Aktivite

2.3.1. Antimikrobiyal maddelerin önemi ve antimikrobiyal madde üreten mikroorganizmalar

Antimikrobiyal maddeler, çok az yoğunlukta dahi mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli, ikincil metabolitlerdir. Bunlar, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici "bakteriostatik" veya "fungustatik" olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan "bakterisit" ve "fungisit" gibi maddeler de

olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünler olan antimikrobiyaller, seçici toksisiteye sahip olduklarından, çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zararlı olup, makroorganizmaya zarar vermezler (Schlegel, 1992; Demain, 1999).

Günümüzde tedavi amacıyla kullanılan antimikrobiyal maddelerin, antibiyotik adı altında tıp hizmetine sunulduğu yenidir. Alexander Fleming'in 1929'da, *Stafilococ*ların üremesini engellediğini tespit ettiği *Penicillium notatum*, bu faaliyetini milyonlarca yıldan beri sürdürmekte idi. Ancak, olayın endüstriyel uygulamaları ve dolayısı ile antibiyotiklerin tedavide kullanılışı, 1940'lardan sonra başlamış ve hızla gelişmiştir. 1950'lerde streptomisin, kloramfenikol ve tetrasiklinlerin izolasyonlarını, bu ve benzeri antibiyotiklerin klinik kullanımındaki artış takip etmiştir. Gerçekten de, yeni antibiyotiklerin keşfi ve yarı sentetik antibiyotik üretimi, tıbbi tedavi olanaklarını önemli oranda zenginleştirmiştir (Sarışeker, 1983; Schlegel, 1992; URL:8).

50 yıldan fazla zamandır, bakteri ve fungus enfeksiyonlarına karşı kullanılmakta olan antibiyotikler, bunların yanı sıra enzim inhibitörleri ve antitümör, bağışıklık baskılayıcı, antiparazitik ajanlar olarak da kullanılmaktadır (Demain, 1999). Bilinen 12 000 adet antimikrobiyalın %55'i, filamentli bakteriler olan *Actinomyces*'lerin *Streptomyces* cinsinden, %11'i diğer *Actinomyces*'lerden, %12'si filamentli olmayan bakterilerden ve %22'si funguslardan elde edilmektedir (Demain,1999).

1990'larda mikroorganizmalardan yılda 200-300 yeni biyoaktif ürün elde edilirken, 1997'de bu rakamın 500 olduğu bildirilmektedir (Demain, 1999). Buna rağmen, sürekli olarak yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi amaçlanmakta ve *Streptomyces*, *Bacillus* ve *Penicillium* gibi cinslere ait türler antimikrobiyal madde üretme yetenekleri bakımından incelenmektedirler. Günümüzde, genetik mühendisliği ile yeni antimikrobiyallerin üretilmesinin mümkün olabileceği düşünülse de, şu anda bunun için kullanılan başlıca yol "eleme" yöntemidir (Eltem ve Uçar, 1998).

Son yıllarda, uluslararası ilaç endüstrisinin araştırma-geliştirme çalışmaları her yıl arttığı halde, yeni keşfedilen ve patenti alınan ilaç sayısında ciddi bir düşüş olduğu

bildirilmektedir (Pollack, 2002; Tamer, 2002). Üstelik, son on yılda, antibakteriyel ve antifungal ilaçlara karşı, dirençli mikroorganizmalar izole edilmiş ve bunlarla tek yönlü etkili antibiyotiklerin mücadelesinin çok zor olduğu sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, sürekli olarak, değişik antibiyotikler üreten, yeni gen kaynaklarına gereksinim duyulmaktadır ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip, güçlü antibiyotik üreten yeni mikroorganizma tiplerinin araştırılması önem kazanmıştır (Eltem ve Uçar, 1998; Demain, 1999).

2.3.2. *Bacillus*'ların antimikrobiyal aktivitesi

Etkin ve ekonomik antibiyotiklerin gelişimi için yapılan araştırmalar, *Bacillus* genusu türlerinin birkaç antibiyotiği ürettiğini göstermektedir (Perez et al., 1992). Bitki hastalıklarının kontrolünde kullanılan kimyasal insektisit ve pestisitlerin yarattığı çevre kirliliği ve patojen dirençliliği, patojene özgü doğal bakteriyel antagonist ajanlarla biyolojik kontrol sağlamanın önemini ortaya çıkarmıştır. *Bacillus* bakterileri bu açıdan ciddi potansiyele sahiptirler ve bitki hastalıklarını baskılayan bir çok antibiyotikler üretirler (Stabb et al, 1994; Milner et al, 1996). Bunun yanı sıra, balık üretim merkezlerindeki ciddi ticari kayıplara karşı da, *Bacillus*'ların oluşturduğu antibiyotiklerden yararlanılabileceği belirtilmektedir (Sugita et al, 1998).

Araştırmacılar, 1980'li yıllarla birlikte, ekstrem çevrelerde gelişen mikroorganizmalara ilgi göstermeye başlamışlardır. Özellikle alkalofilik mikroorganizmalarla ilgili araştırmalar, son 20 yıldır geniş ilgi alanı oluşturmuştur. Bunlar arasında yer alan alkalofilik *Bacillus* türleri, antibiyotik üretme kapasitesi yönünden incelenen organizmalar arasındadır (Perez et al., 1993; Eltem ve Uçar, 1998).

Antibiyotik üreten *Bacillus* türleri arasında *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus* gibi türler yer almaktadır (Morikawa et al., 1992; Perez et al., 1993; Drablos et al., 1999; Duitman et al., 1999).

Son yıllarda *Bacillus*'ların, antibiyotikleri nedeniyle probiyotik türler arasında yer aldığı da bildirilmektedir. Gültekin (2000) ve Vural (2000), *Bacillus* cinsinin bazı türlerinin probiyotik olarak kullanıldığını belirtmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, probiyotik *B. subtilis* 3 suşunun *Enterobacteriaceae* ailesinin bazı türlerine karşı

antagonistik etkiler gösterdiği gözlenmiştir. Özellikle, *B. subtilis* 3'den elde edilen ve amicoumacin A ve nonamicoumacin adı verilen antibiyotiklerin kronik gastrit ve ülser hastalığına sebep olan *Helicobacter pylori* üzerine aktif olması, oldukça önemli bir sonuç olarak değerlendirilmektedir (Pinchuk et al, 2001).

Yapılan çalışmalarda, *Bacillus* türlerinin farklı mekanizmalarla sentez edilen, birkaç hücre dışı peptid antibiyotiği ürettiği ve bu antibiyotiklerin de daha çok Gram-pozitif bakterilere etkili olduğu; buna karşılık Gram-negatiflere etkili olan geniş spektrumlu ve antifungal antibiyotik üretiminin az olduğu belirtilmektedir (Morikawa et al., 1992; Perez et al., 1993; Eltem ve Uçar, 1998).

Bacillus türleri, antibakteriyel ajan olarak kullanılmalarının yanı sıra, antifungal (Milner et al, 1995), antiviral (Steller et al, 1999) anti-amöbositik (Galvez et al, 1994) ve anti-Mycoplasma (Peypoux et al, 1999) ajanı olarak da kullanılabilen, geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler.

Bacillus'ların antagonistik etki ile bazı besin avantajları sağladıkları, ancak, sporulasyon veya çimlenme ile ilgili hormon veya sinyal moleküllerinin de antimikrobiyal aktiviteye neden olduğu düşünülmektedir (URL:8).

Mikroorganizmalarda sporulasyon ve ikincil metabolit üretimi arasındaki ilişki biyokimyasal ve genetik yollarla araştırılmaktadır. Basillerde, spor oluşumun polipeptid antibiyotik üretimi ile doğrudan veya dolaylı olarak ilgisi tespit edilmiştir. Sporulasyon sırasında serin proteazları oluşumunun antibiyotik üretimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Araştırmalar, peptid antibiyotikler üreten *Bacillus* suşlarında, sporulasyonda meydana gelen fizyolojik değişikliklerin, antibiyotik üretimini düzenlediğini göstermektedir (Nam and Ryu, 1985). Moleküler genetik çalışmalar da, *Bacillus*'ların bazı peptid antibiyotiği biyosentez genlerinin, endospor oluşumunu aktive eden operonda yer aldığını göstermektedir (Marahiel, 1992).

Bacillus'ların, geç logaritmik faz veya erken sabit fazda antibiyotik üretme kapasitesinde olduğu ve sporulasyon olayı başladığında, antimikrobiyal üretimine de başladıkları bilinmektedir (Galvez et al, 1994; Milner et al, 1995; URL:8).

Yapılan çalışmalarda bazı *Bacillus* suşlarının antibiyotik aktivitesinin pH ve besiyerindeki besin maddelerine bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir (Leifert et al., 1995). Araştırmalarda, antimikrobiyal aktivite ve üretilen maddelerin profillerinin, kültür şartlarına göre de değişebileceği bildirilmiştir. Örneğin, bacitracin üreten *B. licheniformis*'in glukoz yerine laktik asitte geliştirildiğinde, bakterinin bacitracin yerine licheniformis antibiyotikini sentezleyebildiği belirtilmiştir (Tunç, 1995).

Bacillus'lar, genellikle peptid yapılı antimikrobiyaller (Marahiel, 1992; Galvez et al, 1993b) üretmekle birlikte, bunların yanı sıra biyosurfaktant (Desai and Banat, 1997), polyene (Patel et al., 1995), aminoglikozid (Ota et al,2000) ve fosfolipid yapıda (Tamehiro et al, 2002) antimikrobiyaller de üretirler.

Bacillus türlerinin oluşturduğu antimikrobiyallerin yapıları farklı olduğu gibi etki mekanizmaları da birbirinden farklı olabilir. Hücre duvarı sentezini bozan ya da hücre membranına zarar veren etkileri olan antimikrobiyallerin yanı sıra protein sentezini engelleyen (Patel et al, 1995) antimikrobiyaller de sentezlenmektedir. Antimikrobiyal maddelerin sentezlenebilmesinde 30 veya daha fazla enzimatik reaksiyona gerek duyulur (URL:8).

2.3.2.1. *Bacillus*'ların antibakteriyal aktivitesi

Bacillus suşları tarafından üretilen antimikrobiyallerin çoğu Gram-pozitif bakteri ve funguslara karşı aktiftir. Bununla beraber Gram-negatif bakterilere karşı duyarlı bir kaç peptid antimikrobiyal de üretebilirler (Perez et al., 1992). *Bacillus* suşlarının antibakteriyel aktivite gösterdiği Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasında *Yersinia enterocolitica*, ve *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* (Chatterjee et al., 1992; Perez et al.,1993; Aslım vd., 2002) *E.coli* (Perez et al., 1992; Aslım vd., 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (Perez et al., 1992) ve *Micrococcus luteus* (Perez et al.,1993) gibi patojen bakterilerin olduğu bildirilmiştir.

Birçok bitki hastalığında biyolojik kontrol aracı olarak kullanılabilen *Bacillus*'lardan, balık üretim merkezlerindeki ciddi ticari kayıplara karşı da, yararlanılabileceğinin belirtildiği bir araştırmada, *Bacillus* NM 12 suşunun *Vibrio vulnificus* bakterisine karşı aktif olduğu rapor edilmiştir (Sugita et al, 1998).

Bacillus'lar, oluşturdıkları bu antagonistik etkileri, ürettikleri bir çok ikincil metabolitleri aracılığıyla sağlamaktadırlar. Wilson ve arkadaşları (1987), *B. subtilis* ATCC 39320'den aerobik ve anaerobik organizmalara karşı antibakteriyel etkide bulunabilen, difficidin ve oxydifficidin antibiyotiklerini izole ettiklerini bildirmişlerdir. (Zweerink and Edison,1987). Zweerink ve Edison (1987) ise, bu antibiyotiklerin *E. coli*'de protein sentezi inhibitörü olarak görev aldığını rapor etmişlerdir. *Bacillus* suşlarından elde edilen yeni bir peptid antimikrobiyal olan mersacidinin ise, metisilin dirençli *Staphylococ*'lar başta olmak üzere bazı Gram-pozitif bakterilere karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Chatterjee et al, 1992).

B. subtilis ATCC 21332'in ürettiği ve en güçlü biyosurfaktanlardan biri olduğu bilinen surfactin'in, yüzey tansiyonunu düşürdüğü bildirilmektedir (Desai and Banat, 1997). Antitumoral, antiviral ve anti-Mycoplasma ajanı olarak kullanılabileceği belirtilen (Peypoux et al., 1999) Surfactin'e ek olarak, *B. licheniformis*'in oluşturduğu lichenysin A, BL-86 ve *B. brevis* ve *B. polymyxa* tarafından oluşturulan biyosurfaktanlar olan, gramicidinler ile polymixinler'in de dikkate değer yüzey aktif özellikleri olan moleküller olduğu rapor edilmiştir (Desai and Banat, 1997).

Bacillus aurantinus tarafından üretilen, aurantin A ve B'nin, yeni bir polyketid antibiyotik kompleksi olup, özellikle anaerob, Gram-pozitif bakterilere karşı etki gösterdikleri bildirilmektedir (Nakagawa et al., 1988).

B. circulans J2154'den elde edilen lipopeptid yapıdaki circulocinlerin Gram-pozitif bakterilere ve piperacillin dirençli streptokoklar ile vancomycin dirençli enterokoklara karşı etkin olduğu tespit edilmiştir (He et al., 2001).

Bacillus cereus UW 85'in ürettiği ve biyolojik kontrol aracı olan zwittermicin A'nın, özellikle Gram-negatif bakterilerden *Agrobacterium*, *Pseudomonas* ve *Erwinia* bakterilerine karşı etkin olduğu bilinmektedir (Silo-Suh et al., 1994).

Bacillus polymyxa KT-8 suşunun kültür sıvısından izole edilen fusaricidin A, B, C ve D'nin, *Staphylococcus aureus* FDA 209 ve *Micrococcus luteus* IFO 3333 gibi Gram-pozitif bakterilere karşı aktif olduğu (Laland and Zimmer, 1984; Hughes and Poole, 1989); *Bacillus subtilis* tarafından üretilen bacillomycin L'nin ise Gram-negatiflere

karşı etkin olduğu bildirilmiştir (Schreiber et al., 1988; Kajimura and Kaneda, 1996). Polymixin, gatavalin, jolipeptin gibi peptid antibiyotik üreticisi olan *B. polymyxa*'nın, mikrobiyal fitopatojenleri engelleyen, gavaserin ve saltavalin adlı iki yeni peptid antibiyotiği de ürettiği bildirilmiştir (Pichard et al, 1995).

Yapılan bir çalışmada, *B. licheniformis* A12 ve M-4 suşlarından izole edilen amoebicinin (A12-A, A12-B, m4-A, m4-B ve m4-C), *Bacillus megaterium*, *Corynebacterium glutamicum* ve *Sarcina* gibi bakterilere karşı aktif olduğu bildirilmektedir (Galvez et al, 1993b).

2.3.2.2. *Bacillus*'ların antifungal aktivitesi

Bacillus subtilis ATCC 6633 suşu, antifungal peptid antibiyotik potansiyeli içeren, Mycosubtilin üreticisi olarak teşhis edilmiştir. (Duitman et al., 1999) Bunun yanı sıra *B. subtilis*'in özellikle bitki hastalıklarına neden olan *Fusarium oxysporum*'un büyümesini engelleyici surfactin ve iturin A gibi antimikrobiyaller ürettiği bilinmektedir (Hiraoka et al, 1992; Stabb et al, 1994; Ohno et al., 1996) Leifert ve arkadaşları (1995), *B. subtilis* CL27 ve *B. pumilus* CL45 suşlarının *Botrytis cinerea*'ya karşı antifungal etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Tamehiro ve arkadaşları (2002), *B. subtilis* 168 tarafından üretilen yeni bir fosfolipid antimikrobiyal olan bacilyosocin'in, özellikle bazı funguslara karşı aktif olduğu *B. subtilis* FR-2 tarafından üretilen yeni iturin-grup antifungal olan bacillopeptinlerin ise, *Fusarium oxysporum*'un neden olduğu kök çürüklüğü hastalığına karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Kajimura et al, 1995).

Bunların yanı sıra, *B. subtilis* tarafından sentez edilen lipopeptid yapıdaki plipastatin A ve B'nin (Volpon et al., 2000), peptid antibiyotik potansiyeli içeren Mycosubtilin'in (Duitman et al., 1999), ve bacillopeptin A, B, C'nin (Kajimura and Kaneda, 1996) antifungal antibiyotikler olduğu rapor edilmektedir.

Tarım kültürü ile ilgili olarak yapılan çalışmalar sonucunda, *Bacillus cereus* UW 85 bakterisinin, tütün, salatalık ve yerfıstığı gibi bitkilerde fungusların neden olduğu hastalıkları baskıladığı (He et al., 1994) ve kanosamine adı verilen bir antibiyotiğin

bitki patojenik oomycetler ve funguslar üzerine etki ettiği açıklanmıştır (Milner et al, 1996). Yine *B. cereus* UW85'in ürettiği zwittermicin A ve antibiotic B'nin *Phytophthora medicaginis* fungusunun neden olduğu hastalığı baskıladığı bildirilmektedir (Silo-suh et al, 1994; Stabb et al, 1994; Milner et al, 1995).

Shibazaki ve arkadaşları (1996) ise, YI-03709B kodlu bir *Bacillus* suşundan izole ettikleri ve YM-47522 olarak niteledikleri yeni bir antimikrobiyalin *Rhodotorula acuta*, *Pichia angusta*, *Candida albicans* ve *Cryptococcus neoformans* gibi funguslara karşı aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Bacillus polymyxa KT-8 suşundan elde edilen fusaricidin A, B, C ve D'nin *Fusarium oxysporum* mantarının neden olduğu kök çürüklüğü hastalığına karşı etkili olduğu; özellikle fusaricidin B'nin *Candida albicans* TFO 1594 ve *Saccharomyces cerevisiae* HUT 7099 mayalarına karşı aktivitesinin bulunduğu da yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kajimura and Kaneda, 1997). Bapat ve Shah (2000), *B. brevis*'in bezelye gibi bitkilerde solmaya sebep olan, *Fusarium oxysporum* f. sp. *udum* etkenli, fusarial hastalıklara karşı etkin biyokontrol ajanı olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmalarda, *B. licheniformis* A12'nin sporlu kültüründen saflaştırılan hidrofilik peptid antibiyotik olan A12-C'nin, *Microsporium canis*, *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, *Sporothrix schenckii* ve *Trichophyton mentagrophytes* gibi funguslara (Galvez et al., 1993a); *B. licheniformis* M-4 tarafından üretilen hidrofilik peptid antibiyotik olan fungicin M4'ün ise yine *M. canis*, *Mucor mucedo*, *Mucor plumbeus*, gibi funguslara karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Lebbadi et al., 1994b). Bir çalışmada, *B. licheniformis* A12 ve M-4 suşlarının ürettiği amoebicinin (A12-A, A12-B, m4-A, m4-B ve m4-C), *S. heterogenicus* ve *Cryptococcus neoformans* gibi mayalar ve *A. niger*, *Microsporium canis*, *Mucor plumbeus*, *Trycophyton mentagrophytes* gibi mantarlara karşı da aktif olduğu bildirilmektedir (Galvez et al, 1993b).

2.3.2.3. *Bacillus*'ların antiviral aktivitesi

B. subtilis tarafından üretilen bir lipopeptid ve biosurfaktan olan surfactin'in farklı virüsler üzerinde (SFV, HSV-1, SHV-1, VSV, SIV, FCV EMCV gibi) geniş antiviral aktivitesinin olduğu bildirilmektedir. Virüs lipid membranı ve kapsidi üzerinde yıkıcı

etkileri bulunan surfactinin, biyoteknolojik ve farmakolojik ürünlerin virüsten korunmasında kullanılabileceği belirtilmektedir. Surfactin'in yanısıra cyclosporin A ve gramicidinlerin de antiviral etkileri açıklanmıştır (Vollenbroich et al, 1997).

2.3.2.4. *Bacillus*'ların antiamöbositik aktivitesi

B. licheniformis A12 ve M-4 suşlarından izole edilen amoebicinin (A12-A, A12-B, m4-A, m4-B ve m4-C), insan patojeni olan *Naegleria fowleri* amibinin hücre membranının yapısını bozarak antiamöbik etki oluşturduğu bildirilmektedir (Galvez et al, 1993a; Galvez et al, 1994; Lebbadi et al, 1994a).

2.3.2.5. *Bacillus*'ların bakteriyosin aktivitesi

Bakteriyosinler, *E.coli* ve *Pseudomonas* gibi Gram-negatif bakterilerin yanısıra, laktik asit bakterileri, *Staphilococ*'lar ve *Bacillus*'lar gibi Gram-pozitif bakteriler tarafından da sentezlenebilen; dar spektrumlu ve letal etkileri olan, düşük molekül ağırlığına sahip proteinlerdir. Bakteriyosin oluşturan suşlar, kendi oluşturdıkları bakteriyosinlere karşı dirençlidirler. Ancak, aynı türden olan diğer suşlar bunların bakteriyosinlerinden etkilenir. Etkileri dar spektrumlu olmakla beraber, bir çok Gram-pozitif ve negatif bakteri ve funguslara karşı etkinlik gösterirler (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 (Arda, 2000). Gram-pozitif bakteriler tarafından oluşturulan bakteriyosinlerin bir çoğunun plazmid DNA genlerinde kodlandığını belirtilmektedir (Jack et al., 1995).

Antimikrobiyal peptidler olan bakteriyosinler ile ilgili çalışmalar, genellikle laktik asit bakterilerinde ve *E. coli*' de yoğunlaşmış olmasına rağmen, son yıllarda *Bacillus* bakteriyosinleri de dikkat çekmektedir (Zheng and Slavik, 1999).

Botrycidin, alirin (Zheng and Slavik, 1999), sublancin 168 (Paik et al, 1998) ve subtilin üreten *Bacillus subtilis* (Cherif et al, 2001); tohycin (Paik et al, 1997) ve thuricin üreten *B. thuringiensis*; megacin üreten *B. megaterium*; thermocovarin üreten *B. thermoleovorans* (Cherif et al, 2001); cerein üreten *B. cereus* (Naclerio et

al, 1993); coagulin üreten *B. coagulans* (Le Marrec et al, 2000), polyfermenticin üreten *B. polyfermenticus* (Lee et al, 2001) ve farklı bakteriyosinler üreten *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis* (Le Marrec et al, 2000) gibi *Bacillus* türleri vardır.

Paik ve arkadaşları (1997), *B. thuringiensis* subs. *tochigiensis* HD868 suşundan saflaştırdıkları tochicin bakteriyosininin 20 tipik *B. thuringiensis* suşu ve bir *B. cereus* suşuna karşı aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Büyüme ve bakteriyosin üretimi arasındaki ilişkiyi araştıran bilimadamları, tochicin aktivitesinin logaritmik fazın ortalarında başlayıp, erken durgun fazda en yüksek seviyeye ulaştığını, fakat durgun fazda azaldığını bildirmişlerdir.

Naclerio ve arkadaşları (1993), *B. cereus* suşundan durgun faz döneminde elde ettikleri cerein bakteriyosininin, diğer *B. cereus* suşlarına karşı aktivite gösterdiğini ve 9 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu bildirmişlerdir. Oscariz ve arkadaşları (1999), yine bir *B. cereus* suşundan elde ettikleri cerein 7 bakteriyosininin, diğer *B. cereus* suşlarına olduğu kadar *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Streptococcus bovis* gibi bir çok Gram-pozitif bakteriye karşı da aktif olduğunu bildirmişlerdir.

B. subtilis'den elde edilen bacillocin 22'nin, *B. cereus*'un yanı sıra *Listeria monocytogenes* bakterisine de etki gösterdiği ve gıda patojeni olan bu iki türe karşı aktivitesi tespit edilen bacillocin 22'nin gıdalarda antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Zheng and Slavik, 1999).

2.3.3. *Bacillus*'ların oluşturduğu tedavide önemli antibiyotikler

Bacillus cinsi bakterilerin oluşturduğu, polypeptid antibiyotikler, yapılan araştırmaların sonuçları itibariyle gittikçe önem kazanmaktadırlar. *Bacillus*'ların ürettiği, tıbbi tedavide kullanılan polypeptid antibiyotikler arasında, basitrasin, gramisidin S, polimiksinler ve tyrotrisinidin sayılmaktadır (Drablos et al., 1999; Morikawa et al., 1992; Perez et al., 1992; Perez et al., 1993).

2.4. *Bacillus* Cinsinde Proteolitik Aktivite

Endüstrinin hemen her alanında kullanılan enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni, mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktivitelerinin bitkisel ve hayvansal kaynaklara göre çok yüksek olması, daha stabil ve daha ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Eren, 1996). Modern endüstrideki enzim uygulamaları, teknik ve ekonomik yönden çok önemli faydalar ve başarılar sağlamaktadır. Bu nedenle, mikrobiyal enzimlerin üretimi ve uygulanması dikkat çekmektedir (Yin et al., 1991). Azot döngüsünde, önemli rolü olan proteolizis olayını gerçekleştiren toprak proteazları, daha çok toprak mikroorganizmaları tarafından salgılanır (Watanabe and Hayano, 1993).

Endüstriyel enzimlerin en önemli grubunu oluşturan proteazların, toplam dünya enzim üretimindeki payı %65'dir. Proteazlar, deterjan, besin, eczacılık, deri işlenmesi, ipek ve röntgen filmlerinden gümüş geri kazanımı, et yumuşatılması, organik sentez, protein geri kazanımı veya sıvılaştırma gibi çeşitli endüstriyel uygulamalar için kullanılır (Johnvesly ve Naik, 2001; Singh et al., 2001). Alkali proteazlar, bakteri, küf, ve maya gibi çok geniş bir grup tarafından üretilirler.

Alkalifilik ve nötrofilik *Bacillus* türlerinden ısıya dayanıklı alkalin proteaz üretimi gerçekleştirildiği belirtilmektedir. Bazı *Bacillus* türlerinden endüstriyel çapta enzim üretilmektedir (Perez et al., 1992; Johnvesly et al., 2002). *Bacillus*'lar, hücre dışı proteazların özgün üreticileridirler. Enzim, kan, kir ve süt gibi protein içerikli lekelerin giderilmesinde ve deterjanlara ilave edilir (Singh et al., 2001).

Genelde, *Bacillus*'lar, yüksek miktarda hücre dışı proteaz üretirler (Kunitate et al., 1989). *B. subtilis* (Aderibigbe and Odunfa, 1988; Kunitate et al., 1989; Kudrya and Simonenko, 1994), *B. licheniformis* (Kunitate et al., 1989; Aderibigbe et al., 1990), *B. thermoruber* (Manachini et al., 1988), *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* (Kunitate et al., 1989) ve *B. megaterium* (Moravcova ve Vachova, 1993) gibi *Bacillus* bakterilerinin, yüksek proteaz enzimi aktivitesine sahip oldukları, ilgili çalışmalarla gösterilmiştir. Bunlardan, subtilizinlerin de dahil olduğu alkali proteazlar iyi karakterize edilmiştir (Kunitate et al., 1989).

Bacillus'lar, proteazlar, beta-glukanazlar, alfa-amilazlar, nükleazlar (Yin et al., 1991), karbohidrazlar, pektinazlar ve lipazlar (Aderibigbe and Odunfa, 1990) gibi çeşitli enzimler salgılar. Özellikle proteaz üretimleri yüksek olan bazı *Bacillus*'ların, hücre dışı ve hücre içi proteaz enzimi ürettikleri gösterilmiştir (Kim et al., 1996). Hücre içi proteaz enzimleri ve aktivitesi daha çok *B. thuringiensis* türünde çalışılmıştır (Kunitate et al., 1989). Hücre dışı hidrolitik enzimlerin üreticileri olan *Bacillus* türleri, subtilisin proteinazlarının üretimi ile çamaşır deterjanları ve diğer ticari uygulamalarda kullanılırlar. Subtilisinlerin ticari önemi nedeniyle, bu enzimlerin yapı-fonksiyon çalışmaları ve protein mühendisliği teknikleri ile geliştirilmeleri üzerinde durulmaktadır (Yin et al., 1991). Subtilisin, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus* ve *B. thuringiensis* tarafından üretilmektedir. Benzer özellikleri olan bu subtilisinlerin molekül ağırlıkları 25 000-30 000 ve optimal pH'ları 9-11'dir ve yüksek sıcaklıklarda Ca^{+2} varlığında korunabilmektedir (Kunitate et al., 1989).

Yin ve arkadaşları (1991), endüstriyel enzimlerin kaynaklarından biri olan *B. subtilis*'de, hücre dışı proteaz aktivitesinin gelişmenin durgun fazında ve besiyerinde azot kaynağı tamamen tükendiğinde arttığını bildirmişlerdir. Kembhavi ve arkadaşları (1993) ise, sıcak sudan izole ettikleri *B. subtilis* bakterisinin, pH 5-11 aralığında proteaz salgıladığını ve en yüksek proteaz üretiminin, nişasta ve bakteriyolojik pepton kullanıldığında gerçekleştiğini rapor etmişlerdir.

Bazı *Bacillus* türlerinin pH 7-11 aralığında gelişebildiği ve bunların alkali, hücre dışı proteazlar ürettiği bildirilmiştir (Singh et al., 2001). Termofilik ve alkalifilik basillerin ürettiği alkalın proteazların, yüksek sıcaklık, pH, kimyasal parçalayıcı ajanlar ve kuraklığa dayanabilecekleri bildirilmiştir (Johnvesly ve Naik, 2001).

Diğer mikroorganizmalar tarafından sentezlenen enzimlerle parçalanamayan keratin, *B. licheniformis*'in sentezlediği bir proteaz olan Keratinaz sayesinde parçalanabilir. Keratinolitik *Bacillus* suşları sadece özgün keratinazlar değil, aynı zamanda tripsin-kimotripsin ve subtilisin benzeri proteazlar da üretirler. Keratinaz enzimi üretimi özellikle kuş ve tavuk tüylerinin parçalanmasında önem taşımaktadır (Rozs et al.,

2001). Kim ve arkadaşları (1996), bir *Bacillus* üyesinden elde ettikleri fibrinolitik proteaz enziminin, trombolitik ajan olarak tıpta kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

B. stearothermophilus'dan elde edilen proteazların, atık aktif çamur parçalanmasında ekonomik kimyasal faydalar sağladığı bildirilmektedir. Atık aktif çamur parçalanmasında, asıl enzimatik reaksiyonlardan birinin proteolizis olduğunu belirten araştırmacılar, termofilik bakteriler tarafından üretilen ısıya dayanıklı proteazların, termofilik aerobik parçalanma olayında atık aktif çamurun ayrıştırılmasında mutlaka bulunması gerektiğini açıklamışlardır (Kim et al., 2002). Johnvesly ve Naik (2001), termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp. JB-99 suşunun ürettiği alkali proteazın deterjan yapımında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Proteinaz üreten *Bacillus* türlerinin karakterizasyonunun ve saflaştırılmasının yanı sıra, bu enzimlerin *E. coli* gibi konaklarda üretilmesi ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır (Peek et al., 1993).

2.5. *Bacillus* Cinsinde Plazmid DNA

Bakteriyel plazmidler, kromozomal olmayan DNA'nın genellikle kovalent-kapalı-sirkular (ccc) molekülleridirler ve kendi kendilerine çoğalabilme yeteneğine sahiptirler. Antibiyotik direnci, virulens özellik veya çeşitli metabolik aktiviteler gibi fenotipik özelliklere dair genler taşırlar. Bazı plazmidler ise, fenotipte gözlenmeyen özelliklere dair genler içerirler, bunlara "kriptik plazmidler" denir. Kendi kendine transfer olabilen veya konjugatif plazmidler, içerdikleri "tra"genleri sayesinde, diğer tür veya bakteriyel suşlara, çıkardıkları kopyaları transfer edebilme yeteneğindedirler. Diğer bazı plazmidler ise, kendi transferleri için yetenekli olmasalar da, bazı bakteriyel hücrelerde sunulan konjugatif plazmidlerin tra fonksiyonlarından yararlanırlar (Woodford and Johnson, 1998).

1-200 kb büyüklüğünde olabilen mikrobiyal plazmid DNA'ların hücredeki sayısı 1-700 kopya arasında değişebilir. Fonksiyonları tam olarak bilinmeyen plazmidlerin hücre canlılığı için esansiyel olmadığı, konakçıları için özel ve avantajlı şartlar sağladıkları bilinmektedir (URL:9). Plazmidlerin kodladığı özellikler arasında, bakteriyosin üretimi, toksik bileşenlerin parçalanması, ökaryotlar ile simbiyoz (azot

fiksasyonu) antibiyotik üretimi, antibiyotik dirençliliği, enterotoksin üretimi, hemolizin üretimi, tutunma ve kolonileşme faktörleri (pili), serum direnç proteinleri ile katabolik ve anabolik izyolları gibi özellikler vardır (Arda, 2000; URL:10).

Diğer bakterilere transformasyon, transduksiyon ve konjugasyon gibi olaylarla aktarılabilen Plazmid DNA'lar, in vitro rekombinasyon olaylarında kullanılan klonlama vektörleridirler (URL:10).

Mikroorganizmalarda, plazmid DNA'ların varlığı ile oluşan biyoçeşitliliğin nedeni henüz tam olarak anlaşılamamış olmasına rağmen, plazmidler hücre içi yaşamın çeşitliliğinin tanımlanmasındaki önemli faktörlerdendir (Zawadzki et al., 1996).

Bacillus plazmidleri, *Bacillus subtilis*, *B. pumilus*, (Tanaka et al., 1977; Voskuil and Chambliss, 1993) *B. cereus* (Ombui et al., 1996), *B. thuringiensis* (Zakharian et al, 1979; Andrup et al., 1993) *B. sphaericus* (McDonald and Burke, 1984), *B. licheniformis* (Parini et al.,1991), *B. megaterium* (Kunnimalaiyaan et al., 2001), *B. brevis* (Dobritsa et al.,1978), *B. larvae* (Bodorova-Urgosikova et al., 1992), *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* (Yoshimura et al., 1983) ve *B. anthracis* (Mikesell et al., 1983) gibi birçok *Bacillus* türünde araştırılmıştır. Özellikle bazı *Bacillus* suşlarının antibiyotiklere direnç özelliği taşıyan plazmidler bulundurması, rekombinant DNA çalışmalarında vektör olarak kullanılabilmelerine ve bir çok çalışma için aranan türler olmalarına neden olmuştur (Tanaka et al., 1977; Yoshimura et al., 1983).

Yapılan çalışmalarda, genelde *Bacillus* cinsi bakterilerin içerdği plazmidlerin kriptik plazmidler olduğu belirtilmiş olmasına rağmen (Tanaka and Koshikawa, 1977; Yoshimura et al., 1983), *B. thuringiensis*'in bir plazmidinin insektisidal kristal proteinin üretimiyle ilişkili olduğu (Jaoua et al., 1996), *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* türlerinin tetrasiklin antibiyotiğine, *B. sphaericus*'un kloramfenikol antibiyotiğine (McDonald and Burke, 1984) ve yine *B. subtilis*'in eritromisine (Yoshimura et al., 1983) dirençli olma özelliklerini taşıdığını gösterilmiştir. Ayrıca, *B. megaterium*'un ürettiği megacin A gibi (Rostas et al., 1980), bazı bakteriyosinlerin (Tanaka et al., 1977) ve *B. amyloliquefaciens*'in alfa

amilaz enziminin üretiminde (Hillier et al., 1997) olduğu gibi bazı farklı metabolik aktivitelerin de plazmid DNA ile kontrol edildiği bildirilmektedir.

Yoshimura ve arkadaşları (1983), 111 adet *Bacillus* suşunun yalnız 13 adedinde plazmid DNA bulunduğunu gözlemişlerdir. Araştırmacılar, antibiyotiğe dirençli olduğu tespit edilen 41 suşdan yalnız 5 adedinde plazmid DNA bulunduğunu ve bunların dirençliliğinin de plazmid DNA'dan kaynaklanmadığı tespit etmişlerdir. Plazmid DNA'ların moleküler ağırlıklarının 2,8-45,2 Md arasında değiştiği gösterilmiştir. *Bacillus*'larda 23 kb'dan büyük veya 37 Md ağırlığında kromozomal DNA'lara rastlandığı da bildirilmiştir (Himeno et al., 1985; Jaoua et al., 1996).

Biyoteknolojik uygulamalar ve temel araştırmalar için önemli bir model olan *B. subtilis* ve diğer basillerde, plazmid kararsızlığı önemli bir problemdir. Hücredeki plazmid popülasyonunun tamamının kaybına yol açan bölünmeye bağlı kararsızlık ve yapısal yeni düzenlenmeyi taşıyan plazmid popülasyonunda kayıplarla oluşan yapısal kararsızlık olmak üzere iki grup belirlenmiştir (Cordes et al., 1996).

2.6. *Bacillus* Cinsinde Toplam Hücre Protein Profili

Farklı bakterilerin genom nükleik asit sekanslarının tayini, küresel düzeyde gen ifadesinin araştırılması için bir fırsattır. Dolayısıyla, genoma ait tüm proteinler olarak tanımlanan proteomun analizi, genom çalışmalarını tamamlar. Bir organizma tarafından sunulan proteinlerin tümünün tanımlanmasına yönelik amaçlar, protein sentezi seviyesinde gen ifadesinin analizinin ortaya konmasına yol açar. Ökaryotik hücrelerle bakterilerin ilişkileri ve bakteriyel stres cevapları gibi konuların anlaşılmasını sağlayacak olan bakteriyel proteomunun karakterizasyonu, protein analiz yöntemleri yardımıyla gerçekleştirilebilir (Cash, 1998).

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

Toplam hücre proteininin, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile çalışılması sayesinde, protein yapısındaki farklar belirlenerek, türler içi veya türler arası benzerlik ve farklılıkların ortaya konması mümkündür. Mikrobiyal sistematiplerde, özellikle aynı türler veya alttürler ait suşların hücresel proteinlerinin karşılaştırılması ve ayrımı için, duyarlı bir teknik olarak protein jel elektroforezi yıllardır kullanılmaktadır (Çökmüş and Yousten, 1994; Kämpfer, 1995; Matar et al., 1996). SDS-PAGE jellerinden elde edilen verilerin karşılaştırılması, araştırmaların ilerlemesine yardımcı olmuştur (Cash, 1998). Genelde Gram-negatif bakterilerde kullanılan protein jel elektroforezinin, Gram-pozitif bakterilerden proteinlerin eldesi için geliştirilmesi araştırmaları devam etmektedir. Çünkü hücre duvarında çok tabakalı peptidoglikan yapı içeren ve bu nedenle daha zor parçalanan Gram-pozitif bakterilerle çalışırken, daha fazla biyokütleye gerek duyulur. Bu dezavantajın ortadan gidermek için Gram-pozitif bakteriler, mutanolizin ile muamele edilmiştir (Kämpfer, 1995).

SDS-PAGE ile toplam hücre protein profili çıkarılmasının, bakterilerin sistematiği ve karakterizasyonunda kullanılabileceğini belirten bir çok araştırmacı (Çökmüş and Yousten, 1994; Matar et al., 1996), farklı molekül ağırlığındaki proteinlerin tayini ve karşılaştırılması ile hem suşların akrabalıklarını (Matar et al., 1996; Swiecicka, 2001) hem de belli özellikleri denetleyen proteinlerin tespitinin yapılmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir (Çökmüş et al., 2000; Jobin et al., 2002).

47 adet *B. circulans* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profili ile, API testlerinden alınan biyokimyasal karakteristikleri karşılaştıran Swiecicka (2001), iki ana gruba ayrılan suşların protein profillerinin %78 oranında birbirine benzediğini ve ikinci gruptaki bakterilerin daha yüksek biyokimyasal aktivite gösterme gibi ortak özellikleri olduğunu bildirmiştir.

Matar ve arkadaşları (1996), toplam hücre protein profili ile, hastalık etkeni olan *B. cereus* türünün alt tiplendirmesini yaptıkları çalışmalarında, 58 adet *B. cereus* izolatının bir biyotip varlığında, 3 antibiyogram ve 22 toplam hücre protein profiline ulaştıklarını bildirmişlerdir. SDS-PAGE ile elde edilen verilerinde %38 oranında bir benzerliğe sahip olan *B. cereus* izolatlarının heterojen bir yapı gösterdikleri

belirtmiştir. Predominant özellik gösteren 13 adet *B. cereus* izolatının, *B. cereus* ATCC 14579 suşu ile polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılan alt tiplendirmesi ile de yaklaşık %89 benzerlik gösterdiğini bildiren araştırmacılar, toplam hücre protein profili sonuçlarının *Bacillus* cinsi içindeki tiplendirmelere izin verdiğini ve pilot epidemiyolojik çalışmalarda, PCR'ın yanısıra toplam hücre protein profillerinin yardımıyla da tiplendirmelerin yapılabileceğini bildirmişlerdir.

Çökmüş ve arkadaşları (2000) çalışmalarında, UV ile muamele edilmiş toksik *B. sphaericus* suşlarının, larvisidal aktivitesini araştırmışlardır. SDS-PAGE analizi yaparak, bazı maddelerin gösterdiği koruyucu etkiyi, moleküler ağırlıklarının bildikleri toksik protein bantlarının varlığını taramak suretiyle tespit etmişlerdir.

13 sivrisinek patojeni ve 6 patojen olmayan *B. sphaericus* suşunun toplam protein profilini karşılaştırarak, patojenik suşların farklı yapıya sahip olduğunu ifade eden Çökmüş ve Yousten (1994), poliakrilamid jel elektroforeziyle (PAGE) elde edilen toplam protein profillerinin mikrobiyal türlerin farklılaşması ve karakterizasyonunda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. *B. sphaericus* suşlarının gruplandırılmasında bakteriyosin aktivitelerinin de kullanılabileceğinin bildirildiği bir başka çalışmada ise, DNA homoloji gruplarındaki suşlar arasında bakteriyosin profillerinde çeşitlilik gözlenmiştir. Buna göre, H5a5b'ye ait suşların benzer bakteriyosin aktivitesi gösterdiği ve poliakrilamid jeldeki bakteriyosin bandının benzer olduğu tespit edilmiştir (Çökmüş and Yousten, 1993).

Mercan (1996), Native-PAGE ve SDS-PAGE ile elde edilen filtrat protein profillerine göre, *B. sphaericus* suşlarının ayırımı yapmıştır. Çalışmada, suşların birbirinden ayırımında, tamamen sporlanmış kültürlerdeki filtrat proteinlerin, vejetatif evreye göre daha uygun olduğu ve bu amaçla Native-PAGE'in kullanılabileceği, buna karşılık SDS-PAGE'in kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Materyal örnekleri

Araştırmada, Ankara'nın çeşitli bölgelerindeki, (Beytepe, Keçiören, Sincan, Eryaman, ODTÜ, Ostim, Yıldız ve Ahlatlıbel) çayırılık alanlardan, 15-20 gr kadar toprak alınmış ve +4 C'de muhafaza edilmiştir. Çalışmada, 29'u bu topraklardan ve 3'ü kültür koleksiyonlarından temin edilen referans suşlar olmak üzere, toplam 32 adet *Bacillus* suşu kullanılmıştır. Bu bakterilerin temin ve izole edildiği kaynak ve kodları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *Bacillus* suşlarının temin ve izole edildikleri kaynaklar

No	Bakteri ve Kodu	Temin ve İzole Edildiği Kaynak
1	<i>Bacillus brevis</i> M2	Beytepe Toprağı İzolatı
2	<i>Bacillus brevis</i> M4	Beytepe Toprağı İzolatı
3	<i>Bacillus brevis</i> M6	Keçiören Toprağı İzolatı
4	<i>Bacillus sphaericus</i> M3	Beytepe Toprağı İzolatı
5	<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 14577	A.Ü.F.F.*
6	<i>Bacillus cereus</i> M5	Beytepe Toprağı İzolatı
7	<i>Bacillus cereus</i> M10	Sincan Toprağı İzolatı
8	<i>Bacillus cereus</i> M15	Eryaman Toprağı İzolatı
9	<i>Bacillus cereus</i>	RSSK**
10	<i>Bacillus megaterium</i> M14	Eryaman Toprağı İzolatı
11	<i>Bacillus megaterium</i> M21	Ostim Toprağı İzolatı
12	<i>Bacillus megaterium</i> M22	Ostim Toprağı İzolatı
13	<i>Bacillus megaterium</i> M26	Yıldız Toprağı İzolatı

Çizelge 3.1'in devamı. *Bacillus* suşlarının temin ve izole edildikleri kaynaklar

No	Bakteri ve Kodu	Temin ve İzole Edildiği Kaynak
14	<i>Bacillus megaterium</i> M28	Yıldız Toprağı İzolatı
15	<i>Bacillus circulans</i> M16	ODTÜ Toprağı İzolatı
16	<i>Bacillus circulans</i> M18	ODTÜ Toprağı İzolatı
17	<i>Bacillus circulans</i> M23	Ostim Toprağı İzolatı
18	<i>Bacillus circulans</i> M31	Ahlatlıbel Toprağı İzolatı
19	<i>Bacillus circulans</i> M32	Ahlatlıbel Toprağı İzolatı
20	<i>Bacillus circulans</i> M34	Ahlatlıbel Toprağı İzolatı
21	<i>Bacillus subtilis</i> M17	ODTÜ Toprağı İzolatı
22	<i>Bacillus subtilis</i> M24	Ostim Toprağı İzolatı
23	<i>Bacillus subtilis</i> M29	Yıldız Toprağı İzolatı
24	<i>Bacillus subtilis</i> M33	Ahlatlıbel Toprağı İzolatı
25	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	A.Ü.F.F.*
26	<i>Bacillus licheniformis</i> M19	Ostim Toprağı İzolatı
27	<i>Bacillus licheniformis</i> M20	Ostim Toprağı İzolatı
28	<i>Bacillus licheniformis</i> M27	Yıldız Toprağı İzolatı
29	<i>Bacillus licheniformis</i> M30	Yıldız Toprağı İzolatı
30	<i>Bacillus coagulans</i> M8	Keçiören Toprağı İzolatı
31	<i>Bacillus coagulans</i> M25	Yıldız Toprağı İzolatı
32	<i>Bacillus coagulans</i> M35	Ahlatlıbel Toprağı İzolatı

*A.Ü.F.F.: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Cumhuri Çökmüş'ten temin edilmiştir

** RSKK: Refik Saydam Hıfızısıhha Merkez Başkanlığı, Dr. Fügen Durlu Özkaya'dan temin edilmiştir.

3.1.2. Araştırmada kullanılan besiortamları

Topraktan izole edilen *Bacillus*'ların izolasyon, identifikasyon, antimikrobiyal aktivite, Poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretim miktarlarının incelenmesi ve Plazmid DNA izolasyonu çalışmalarında Nutrient Sıvı (NB) ve Nutrient Agar (NA) besiortamı kullanılmıştır (Cruikshank et al., 1972). Protein profillerinin incelenmesi çalışmasında ise Luria-Bertani (LB) besiortamı kullanılmıştır (Donovan, 1997). Proteolitik aktivite çalışmaları, Skim Milk Agar'dan (SMA) yararlanılarak gerçekleştirilmiştir (Arslan, 1993, Kembhavi et al., 1993).

Nutrient Sıvı (NB) Besiortamı

Maddeler	g/l
Lab-lemco Powder	1,0
Yeast extract	2,0
Pepton	5,0
NaCl	5,0

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiortamının pH değeri $6,8 \pm 0,2$ 'ye 0,01 N HCl ve 0,01 N NaOH ile ayarlanmıştır. Besiortamı 121°C'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Katı besiortamının hazırlanmasında ortama %2 oranında agar ilave edilmiştir.

Araştırmada kullanılan *Bacillus*'ların antimikrobiyal aktiviteleri bazı test bakterileri üzerinde uygulanmıştır. Test bakterilerin aktifleştirilmesinde Nutrient Sıvı besiortamı kullanılmıştır (Cruikshank et al., 1972).

Luria-Bertani (LB) Besiortamı

Bacto LB Broth'dan 25 g alınıp, 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiortamının pH değeri $7,0 \pm 0,2$ 'dir. Besiortamı 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Bacto LB Broth (DIFCO) içeriği aşağıda verilmiştir.

Maddeler	g/l
Bacto Tryptone	10 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
Sodium Chloride	5 g/l

Skim Milk Agar (SMA) Besiortamı

Maddeler	g/l
Skim Milk (DIFCO)	100 g/l
Agar	20 g/l

Maddeler 1 litre distile su içerisine ilave edilmiştir. Besiortamının pH değeri $6,3 \pm 0,2$ 'dir. Besiortamı 121°C 'de 15 dakika otoklavda sterilize edilmiştir.

3.1.3. Araştırmada kullanılan test bakterileri

Araştırmada test bakterileri olarak *Bacillus megaterium* RSKK 578, *Bacillus thuringiensis* RSKK 380, *Bacillus subtilis* F1, *Bacillus cereus* F2, *Micrococcus luteus* NRLL-B 4375, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Pseudomonas fluorescens* RSKK 240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 ve *Escherichia coli* NRRL B-704 kullanılmıştır.

Test bakterileri Nutrient sıvı besiortamında 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Bakterilerin temin edildiği kaynak ve inkübasyon dereceleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Bu bakteriler Nutrient Agar besiortamında muhafaza edilmişlerdir.

Çizelge 3.2. Test bakterilerinin temin edildiği kaynak ve inkübasyon dereceleri

Bakteri Suşları	Temin Edildiği Kaynak	İnkübasyon Derecesi
<i>Bacillus megaterium</i> RSKK 578	R.S.K.K.	37° C
<i>Bacillus thuringiensis</i> RSKK 380	R.S.K.K.	37°C
<i>Bacillus subtilis</i> F1	E.Ü.	37° C
<i>Bacillus cereus</i> F2	E.Ü.	37° C
<i>Micrococcus luteus</i> NRRL-B 4375	R.S.K.K.	30°C
<i>Micrococcus flavus</i>	R.S.K.K.	30° C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	H.Ü.	37°C
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 1501	O.D.T.Ü.	37° C
<i>Pseudomonas fluorescens</i> RSKK 240	R.S.K.K.	37° C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 29212	H.Ü.	37° C
<i>Escherichia coli</i> NRRL B-704	R.S.K.K.	37°C

R.S.K.K. : Refik Saydam Hıfızısıhha Merkez Başkanlığı

H.Ü. : Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

E.Ü. :Ege Üniversitesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

O.D.T.Ü. : Ortadoğu Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümünden temin edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Toprak pH'sının ölçülmesi

Toprak pH'sı, toprak:su oranı 1:2,5 olarak ayarlanan toprak çözeltisinde, cam elektrodlu pH metre kullanılarak yapılmıştır (Hossain et al., 1997).

3.2.2. Bakterilerin izolasyonu

Ankara iline ait farklı semtlerden (Beytepe, Keçiören, Sincan, Eryaman, ODTÜ, Ostim, Yıldız, Ahlatlıbel) alınan toprak örneklerinin 1 gr'ı, 10 ml (1:5, w/v) steril serum fizyolojik çözeltisi ilave edilmiş ve kuvvetlice çalkalanmıştır. Örnekler, 60°C'deki su banyosunda 60 dakika tutularak, vejetatif bakteri formları öldürülerek, ortamda bu bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlanmıştır. Örneklerden 10^{-1} - 10^{-7} şeklinde seri dilüsyonlar hazırlanarak, 10^{-3} dilüsyondan itibaren NA plakları üzerine 0,1 ml ekimler yapılmış ve 30°C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Chilcott and Wigley, 1993; Hossain et al., 1997). İnkübasyon sonunda, kolonilerden tesadüfi seçimler yapılmış ve mikroskop altında incelenmiştir. *Bacillus* görünümündeki bakteriler, NB besi ortamına inoküle edilerek hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,3-0,5 (OD) olacak şekilde aktifleştirilmiştir.

3.2.3. Bakterilerin muhafazası

Nutrient Agar içeren yatık tüplere paralelli olarak inoküle edilen izolatlar, 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda +4°C'de buzdolabında muhafazaya alınan stoklar iki ayda bir yenilenmiştir.

3.2.4. Bakterilerin tanımlanması

Toprakten izole edilen izolatların identifikasyonunda çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testlerden yararlanılmıştır. Öncelikli olarak izolatların morfolojileri, spor oluşturma durumları, gram boyamaya karşı reaksiyonlarına bakılarak mikroskopik incelemeleri gerçekleştirilmiş ve katalaz reaksiyonu sonuçlarına göre *Bacillus* cinsine ait oldukları saptanmıştır.

Bacillus cinsine ait izolatların tür tespitleri, farklı sıcaklık derecelerinde gelişme (5°C, 30°C, 40°C, 65°C); farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme (%2, % 5, %10) ve farklı pH derecelerinde gelişmelerine (pH 5,7, pH 6,8') bakılarak; ayrıca esculin hidrolizi; nişasta hidrolizi; nitrat redüksiyonu; glukozdan gaz oluşumu; çeşitli karbonhidratlardan asit oluşturmaları (glukoz, mannitol, laktoz, galaktoz, süktroz, rafinoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, maltoz gibi) ve spor boyama gibi bir dizi

fizyolojik, biyokimyasal testler ve mikroskopik gözlemler yardımı ile yapılmıştır.

3.2.4.1. Karbonhidrat testleri

Bakterilerin glukoz, mannitol, laktoz, galaktoz, sükroz, rafinoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, maltoz şekerlerini kullanarak asit oluşturmaları incelenmiştir. Şeker testleri için Nutrient sıvı besiortamına 0,004 g brom krezol moru indikatörü ilave edilerek stok besiortamı hazırlanmıştır. Hangi şekerin testi yapılacaksa o şekerden % 1 oranında şeker çözeltisi hazırlanmış, 0,2 µm'lik filtre kağıdı kullanılarak sterilize edilmiştir. Stok besiortamına şekerlerden %1 oranında ilave edilmiştir. Besiortamı % 2 oranında aktif kültürler ile inoküle edilmiş, 30±1°C'de çalkalamalı etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde şekerini kullanarak asit oluşturan süşlar, besiortamı renginin sarıya dönüşmesiyle anlaşılmıştır (Buchanon and Gibbons, 1974; Temiz 1994).

3.2.4.2. Nitrat indirgenmesi

Nitrat redüksiyonu testinde Nutrient sıvı besiortamına 1 g/l Potasyum nitrat ilave edilmiş, pH 7,0 olacak şekilde ayarlanmıştır. Besiortamı 15 dakika 121°C'de sterilize edilerek, aktif kültürlerden ortama %2 oranında inoküle edilmiştir.

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 (Zn) ilave edilmiştir. Çinko tozu ilavesiyle ortam kırmızı-pembe bir renge dönüştüğünde ortamda nitrat varlığı kanıtlanmıştır ve sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. Eğer kırmızı renk oluşumu gözlenmişse bu da nitratın nitrite daha ileriki aşamalarda indirgenliğini göstermiştir (Arda, 2000; Bilgehan, 1995).

A-AYIRACI

0,5 g alfa naftilamin, 100 ml %30'luk asetik asitte çözülerek hazırlanmıştır.

B-AYIRACI

0,8 g sülfanilik asit, 100 ml %30'luk asetik asitde çözülerek hazırlanmıştır.

3.2.4.3. Eskulin hidrolizi

Eskulin hidrolizi için besiortamı hazırlanırken, öncelikle peptonlu su hazırlanmış ve bunun içine diğer maddeler konmuştur. Aktif *Bacillus* suşları %2 oranında ortama inoküle edilmiş ve kültür 30°C' de 1-7 gün bekletilmiştir. Süre sonunda besiortamında kömür renginin oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir (Arda, 2000).

Peptonlu Su

Maddeler	g/l
Pepton	10 g
NaCl	5 g
Saf su	1000 ml

Eskulin Besiortamı

Maddeler	g/l
Eskulin	1 g
Ferrik sitrat	0,5 g
Peptonlu su	1000 ml

3.2.4.4. Nişasta hidrolizi

Nişasta hidrolizi testi için Nutrient Agar besiortamına %1 oranında nişasta ilave edilmiştir. 121°C'de 10 dakika steril edilen besiortamına, aktif kültürlerden çizgi ekim yapılmıştır. 30°C'de, 24 saatlik inkübasyon sonunda, kolonilerin üzerine lugol damlatılarak, etraflarında renksiz bölgelerin oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir (Arda, 2000).

3.2.4.5. Katalaz testi

Katalaz enziminin ortamdaki hidrojen peroksidi su ve oksijene ayrıştırdığı bilindiğinden, bakteriler 5 ml'lik steril Nutrient sıvı besiortamına %2 oranında inoküle edilmiş ve 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kültürlerin üzerine %3 oranında H₂O₂ ilave edilip, gaz oluşumu kontrol edilmiştir (Arda, 2000).

3.2.4.6. Glukozdan gaz oluşumu

Bu test için hazırlanan Nutrient sıvı besiortamı, Durham tüpü koyulan test tüplerine 5 ml olarak dağıtılmış ve 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiortamı, aktif kültürlerin %2 oranındaki inokülasyonundan sonra 30°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve Durham tüplerinde gaz (H₂ ve CO₂) oluşup oluşmadığı kontrol edilmiştir (Temiz, 1994).

3.2.4.7. Sporların incelenmesi

Bakteri, spor yapılarının incelenebilmesi için özel bir besiortamında geliştirilmiştir. Nutrient Agar besiortamına 0,05 g MnSO₄·H₂O ilave edilerek hazırlanan besiortamına çizgi ekim yapılarak, 30°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, malaşit yeşili ve safranin ile spor boyamaya tabi tutulan bakterilerin spor konumları tespit edilmiştir (Sneath, 1986; Temiz, 1994).

3.2.5. Sodyum dodesil poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)

3.2.5.1. Toplam hücre protein ekstraksiyonu

Protein ekstraksiyonu Tan ve arkadaşlarının (1997) metoduna göre yapılmıştır. Aktifleştirilmiş bakteriler, Luria-Bertani (LB) besiortamında 30±1°C'da 48 saat 100 rpm'de inkübe edilmiştir. Hücre kültürü 6000xg'de 30 dk. santrifüj edilerek pellet elde edilmiştir. Pelletler steril 10 mM Tris-HCl (pH=7,6) ile bir kez yıkanmıştır. 1 ml 10 mM Tris-HCl (pH=7,6) tamponunda homojen hale getirilen hücreler, 50 MHz ultrasonikasyon ile buz içerisinde 5 dk. sonikasyona tabi tutulmuş ve elektroforez

işlemine kadar -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Elektroforezden önce örnek tamponu ile muamele edilerek 5 dk. kaynatılmıştır.

3.2.5.2. Poliakrilamid jel elektroforezinin yapılışı

Elektroforez işlemi Laemmli'ye (1970) göre yapılmıştır.

SDS-PAGE İçin Kullanılan Stok Çözeltiler

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

Akrilamid (Merck) 28,8 g

Bis akrilamid (Merck) 1,2 g

Maddeler 75 ml distile su içerisinde çözülerek, 100 ml'ye tamamlanmıştır. Whatman No: 1 filtre kağıdından süzülerek, renkli cam şişelerde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de en fazla 1 ay muhafaza edilmiştir.

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

Trizma base 18,165 g

SDS 0,4 g

Maddeler, 75 ml distile suda çözüldükten sonra 6 N HCl ile pH=8,6'ya ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandıktan sonra 121°C 'de 15 dk. sterilize edilmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

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 ayarlanmıştır. Son hacim 100 ml'ye saf su ile tamamlandıktan sonra 121°C 'de 15 dk. sterilize edilmiş ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

KOŞTURMA TAMPONU

Trizma-Base (Sigma)	1,21
Glisin (Sigma)	5,76
SDS (Sigma)	1,0

Maddeler 1000 ml distile suda **çözölmüştür.**

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 tamamlanmış ve 6 N HCl ile pH=6,8'e ayarlanmıştır.
Çözelti renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

BOYAMA ÇÖZELTİSİ

Coosentaz Brillant Blue R250	1,5 g
Glasiyal Asetik Asit	70,0 ml
Metanol	50,0 ml
Distile su	880,0 ml

Boya **çözöldükten sonra** Whatman No:1 filtre kağıdından süzölmüş ve renkli cam şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.

BOYA GİDERİCİ ÇÖZELTİ

Glasiyel Asetik Asit	70,0 ml
Metanol	50,0 ml
Distile su	880,0 ml

Çözelti oda sıcaklığında renkli cam şişede saklanmıştır.

MOLEKÜLER AĞIRLIK STANDARDI

Proteinlerin moleküler ağırlıklarının tespiti için protein standardı olarak BİO-RAD SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range kiti kullanılmıştır. Markerda bulunan proteinler ve moleküler ağırlıkları sırasıyla,

6 500 D	Aprotitin
14 400 D	Lizozim
21 500 D	Soya fasulyesi tripsin inhibitörü
31 000 D	Karbonik anhidraz
45 000 D	Yumurta albumini
66 200 D	Sığır serum albumini
97 400 D	Fosforilaz b
116 300 D	β -Galaktosidaz
200 000 D	Miyozin

Ayrırma Jelinin Hazırlanışı

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 (Sigma)	86,70 µl
TEMED (Sigma)	8,16 µl

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

Yığma Jelin Hazırlanışı

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 (Sigma)	30,00 µl
TEMED (Sigma)	5,00 µl

Bu karışım, polimerize olan ayırma jelin üzerindeki distile su uzaklaştırıldıktan ve tarak yerleştirildikten sonra yığma jel üzerine dökülmüştür. Polimerizasyonu takiben tarak çıkarılmış, çukurluklar koşturma tamponu ile yıkandıktan sonra tanka sabitlenmiş ve hazne koşturma tamponu ile doldurulmuştur.

3.2.5.3. Örneklerdeki protein konsantrasyonunun yarı kantitatif tayini

Örneklerdeki protein miktarını belirlemek için spot test kullanılmıştır (Esen, 1978). Şerit halinde kesilen Whatman No: 1 süzgeç kağıdına, hazırlanan protein ekstraktlarından 2,5 µl emdirilmiştir. Kurutulduktan sonra 10 dk. boyama solusyonunda bekletilmiş ve su ile yıkanmıştır. Boyanma derecesine göre örneklerin eşit miktarda yüklenmesi sağlanmıştır.

3.2.5.4. Elektoroforezin yapılışı ve jellerin boyanması

Proteinler 30 mA'de yaklaşık 150 V'ta ortalama 7 saat koşturulmuştur. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jeller, Coosentaz Brilliant Blue R-250 içinde 24 saat bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra boya giderici solusyonda bırakılarak jellerin zemininde bulunan boyanın çıkması sağlanmıştır. Son olarak %7'lik Asetik asit içerisinde korunan jellerin, ışıklı beyaz tabla üzerinde karanlık odada fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.5.5. Moleküler ağırlıkların hesaplanması

Ayrırma jelinde proteinin koştuğu mesafenin izleme boyasının bulunduğu mesafeye oranı Rf değerini verir. Molekül ağırlıklarını belli olan standart proteinlerin her birinin Rf değeri bulunmuştur. Yarı logaritmik kağıtta Rf değeri apside, proteinlerin molekül ağırlıkları da ordinata konarak bir doğru çizilmiş ve proteinin molekül ağırlığı hesaplanmıştır.

3.2.6. PHB üretiminin tespiti

Bacillus suşlarının oluşturduğu PHB miktarı Bonartseva and Myshkina'nın (1985) metoduna göre belirlenmiştir.

1. Bakteriler, Nutrient sıvı besi ortamında 100 rpm çalkalamalı etüvde $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,4-0,5 (OD) olacak şekilde aktifleştirilmiştir.
2. Aktifleştirilen kültürler 100 ml'lik Nutrient sıvı besi ortamına %2 oranında inoküle edilerek, $30 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır.
3. Inkübasyon sonunda hücre kültürü 6000 rpm'de 30 dk santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonunda oluşan sıvı kısım elemine edilerek, pellet 40°C 'de 1 gece bırakılarak kurutulmuştur. Bu aşamada hücre kuru ağırlığı tespit edilmiştir.
5. Pellet 5 ml steril saf su ile homojenize edilmiş ve 5 dk 50 MHz'lik Ultrasonikasyon (Vibra-Cell, Sonics&Materials Inc. Danbury, CT USA marka) cihazı ile bakterilerin hücre duvarları parçalanmıştır.

6. 1:1 oranında, kültür ve 2 N HCl karışımı 100°C'lik su banyosunda 2 saat tutulmuştur. Süre sonunda karışım 6000 rpm'de 20 dak santrifüj edilmiş ve pellet elde edilmiştir.
7. Pellet 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 rpm'de 20 dk. santrifüj edilerek PHB granülleri çöktürülmüştür.
9. Kloroform kısmından 0,1 ml alınıp, 40°C'de 15 dk. tutularak kloroform uçurulmuştur. Örneklerin üzerine 5 ml saf H₂SO₄ konulmuş, 100°C'de su banyosunda 20 dk. bekletilmiştir. Bu aşamada PHB krotonik asite dönüştürülmüştür.
10. Örneklerin OD değeri 235 nm dalga boyunda UV Spektrofotometrede ölçülerek tespit edilmiştir. Örneğin PHB miktarı, standart PHB değeri ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir.

Standartın Hazırlanışı:

1.0-2500 µg/ml 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.

İstatistik Analiz:

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

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

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

3.2.7. Sonikasyon süresinin tespiti

Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşlarından biri seçilerek, 5 adet 5 ml'lik Nutrient sıvı besiortamı içeren tüplere inoküle edilmiş ve 2 kez aktifleştirilmiştir. Kültürler 30 ± 1 °C'de hücre yoğunluğu 600 nm'de 0,4-0,5 (OD) olacak şekilde inkübe edilmiştir. Örnekler 30 sn, 45 sn, 1 dk., 2 dk., 3 dk. 4 dk. ve 5 dk. süre ile sonikasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda örneklerin 10^{-1} 'den 10^{-7} 'ye kadar dilusyonları yapılmıştır. Örneklerden 0,1 ml alınıp, Nutrient Agar besiortamına inoküle edilerek, 30 ± 1 °C'de 72 saat inkübe edilmiştir. Süre bitiminde üreyen kolonilerin sayısı tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırılarak hücre sayısındaki azalma dikkate alınmış ve en uygun sürenin 5 dk. olduğu bulunmuştur. Ayrıca, her örneğin sonikasyon sonrası preparatları mikroskopta incelenerek, hücre yapısındaki değişiklikler de incelenmiştir.

3.2.8. Farklı karbon, azot ve fosfat kaynaklarının PHB üretimine etkisinin incelenmesi

Farklı karbon, azot ve fosfat kaynaklarının PHB üretimi üzerine etkisinin incelenmesinde en yüksek PHB verimi gösteren izolatlardan biri olan *Bacillus brevis* M6 kullanılmıştır. Nutrient sıvı besiortamı içeriğine karbon kaynağı olarak, ayrı ayrı %1 oranında sitrat ve %0,2 oranında sodyum asetat ilave edilmiştir. Azot kaynağı denemelerinde ise Nutrient sıvı besiortamında bulunan pepton çıkarılarak, yerine ayrı ayrı %1 oranlarında amonyum sülfat $[(NH_4)_2SO_4]$, DL-Triptofan ve sodyum nitrat $[NaNO_3]$ ilave edilmiştir. Fosfat kaynağı denemelerinde ise besiortamına ayrı ayrı %1 oranında potasyum-2-fosfat $[K_2HPO_4]$ ve potasyum fosfat $[KH_2PO_4]$ konulmuştur. Kullanılan karbon ve azot kaynakları 0,2 μ m'lik filtre kağıdı ile sterilize edilerek besiortamına ilave edilmiştir (Sneath, 1986; Bonartseva et al.,1994).

3.2.9. Azotsuz ortamın PHB üretimine etkisinin incelenmesi

Azot içermeyen besiortamında PHB üretimi denemelerinde, litrede 1ml olacak şekilde iz element solüsyonu içeren bir besiortamı hazırlanmıştır (Chen et al., 1991).

Azotsuz Besiortamı

Maddeler	g/l
Glukoz	20 g
K ₂ HPO ₄	4,65 g
KH ₂ PO ₄	0,9 g
NaCl	3 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,5 g
İz Elementleri Solüsyonu	1 ml
Saf su	1000 ml

İz Elementleri Solüsyonu

Maddeler	g/l
ZnSO ₄	0,01 g
MnCl ₂	0,003 g
H ₃ BO ₃	0,03 g
CuSO ₄	0,007 g
NaMoO ₄	0,032 g
Saf su	100 ml

3.2.10. Oksijeni sınırlı ortamın PHB üretimine etkisinin incelenmesi

Oksijeni sınırlı koşullarda PHB üretimi miktarının incelenmesi için Nutrient sıvı besiortamı hazırlanmıştır ve aktif kültürler ile aşıl原因an besiortamları, anaerobik jar içerisinde, kit kullanılmaksızın 30°C’de 48 saat inkübe edilmişlerdir (Chen et al., 1991; Arda, 2000).

3.2.11. Melas besiortamının PHB üretimine etkisinin incelenmesi

Araştırmamızda kullanılan şeker pancarı melası, Ankara Şeker Enstitüsü’nden temin edilmiştir. Melasın PHB üretimi üzerine etkisinin incelenmesinde en yüksek PHB verimi gösteren izolatlardan biri olan *Bacillus cereus* M5 kullanılmıştır. İzolat, %1, %2, %3, %4, %5 melas konsantrasyonunda geliştirilmiş ve PHB üretimi incelenmiştir.

3.2.12. Genel inhibisyon aktivitesinin tespiti

Bacillus suşları Nutrient sıvı besiortamında iki kez aktifleştirilerek, 30±1°C’de hücre yoğunluğu 600 nm’de 0,4-0,5 OD olacak şekilde inkübe edilmiştir. Aktif kültürler 5000 dev./dk.’da 30 dakika santrifüj edilmiş, kültürün üstte kalan sıvı kısmı 0,2 µm’lik filtre kağıdı kullanılarak sterilize edilmiştir.

Araştırmada test bakterileri olarak *Bacillus megaterium* RSKK 578, *Bacillus thuringiensis* RSKK 380, *Bacillus subtilis* F1, *Bacillus cereus* F2, *Micrococcus luteus* NRLL-B 4375, *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Pseudomonas fluorescens* RSKK 240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212 ve *Escherichia coli* NRRL B-704 kullanılmıştır. Bu bakteriler Nutrient sıvı besiortamında uygun sıcaklıkta 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir (Çizelge 3.2).

Bacillus bakterilerinin, test bakterileri üzerinde oluşturduğu inhibisyon etkisini gözlemek amacıyla, aktif test bakteri kültürlerinden 50 µl steril petrilere aktarılmıştır. Petrilere, sterilize edilmiş ve 50 °C’ye kadar soğutulmuş Nutrient Agar’dan 20 ml ilave edilip homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Petri kapları bir süre oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış, besiortamının 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 *Bacillus* filtratlarından 100 µl ilave edilmiş, test bakterilerinin optimum sıcaklıklarına göre 37±1°C ve 30±1°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyuların çevresinde inhibisyon zonlarının oluşumu kontrol edilmiştir (Reinheimer et al., 1990).

3.2.13. *Bacillus* suşlarının birbirlerine karşı inhibisyon aktivitesinin tespiti

Bacillus suşlarının birbirlerine karşı inhibisyon etkilerinin incelenmesi, bölüm 3. 2. 12'de anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.2.14. Proteolitik aktivitenin tespit edilmesi

Bakterilerin, proteolitik aktivitelerinin incelenmesinde, Skim Milk Agar (SMA) besiyortamı kullanılmıştır. Aktif kültürler, SMA plakları üzerine 5 µl ekilerek, 30°C'de 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda, bakterilerin SMA besiyortamı üzerinde oluşturdıkları şeffaf zonlar ölçülmüştür (Arslan, 1993; Kembhavi et al., 1993; Bilgehan, 1995). Besiyortamı içeriği Bölüm 3.1.2.'de belirtildiği gibidir.

3.2.15. Plazmid DNA izolasyonu

Bacillus suşlarının plazmid DNA profilleri, Voskuil ve Chambliss'in (1993) uyguladığı metot modifiye edilerek çalışılmıştır. Buna göre, aktif *Bacillus* suşları 5 ml'lik Nutrient Broth (NB) besiyortamına %4 oranında aşılansmış, 30±1°C'de 100 rpm'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücre kültürü, 10 000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Pelletlerin üzerine 5 mg/ml lizozim içeren soğuk SET çözeltisinden 200 µl ilave edilip, 1-2 sn vortekslenmiştir. Eppendorf tüpleri 37 C'de 10 dk. bekletilmiştir. Süre sonunda tüplere taze NaOH sodyum dodesil sülfat solüsyonundan 350 µl ilave edilerek, 10 sn hafifçe aşağı yukarı çevrilerek süspansiyonun yıkanması sağlanmıştır. Süspansiyona 350 µl soğuk 3 M K⁺ - 5 M Asetat solüsyonu eklenmiş ve 10 sn. çalkalanmıştır. Süspansiyon, 13 000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildikten sonra, sıvı fazın 750 µl'si yeni bir steril eppendorf

tüpüne aktarılmıştır. Tüpe, 650 µl soğuk fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ilave edilerek 1 dk. vortekslenmiştir. Oluşan karışım, 13 000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş, sıvı fazın 620 µl'si yeni bir ependorf tüpüne aktarılmış ve üzerine 620 µl soğuk kloroform:izoamil alkol (24:1) ilavesi ile 30 sn vortekslenmiştir. Karışım 5 dk. santrifüjlenmiş ve sıvı fazın 550 µl'si yeni bir ependorf tüpüne aktarılmıştır. Plazmid DNA, eşit hacimde soğuk (-20°C) İzopropanol ile muamele edilmiş, bir kaç kez el ile karıştırılmış ve 13 000 rpm'de 5 dk. santrifüjlenmiştir. İzopropanol uzaklaştırılmış ve pellet 1 ml %70'lik etanolle yıkanarak, 2 dk. santrifüjlenmiştir. Ethanol uzaklaştırılmış ve pellet kurutulmuştur. Kurutulan pelletlerin üzerine 50 µl TE+RNaz (0.1 mg/ml) ilave edilerek, plazmid DNAlar -20°C'de muhafazaya alınmıştır.

Plazmid DNA'ların koşturulmasında, örnekler Boyama Tamponu ile boyanmıştır. Seyreltilmiş 10XTEA tamponu ile hazırlanan %0,7'lik agaroz elektroforez tankına ilave edilmiş ve donduktan sonra taraklar çıkarılmıştır. Tank, seyreltilmiş 10XTEA tamponu ile doldurularak kuyulara 10 µl örnekler yüklenmiştir. Örnekler 40 V'ta 3-3,5 saat süre ile koşturulmuştur. Jel, 1 saat etidyum bromür solüsyonu içinde boyandıktan sonra, UV ışığında Plazmid DNA'lar incelenmiştir.

Suşların plazmid DNA'ların moleküler ağırlıkları Sambrook ve arkadaşlarının (1989) bildirdiği yöntemle göre hesaplanmıştır.

Plazmid DNA İzolasyonunda Kullanılan Besiortamı ve Çözeltiler:

Bacillus 'ların plazmid DNA izolasyonunda Nutrient Broth (NB) besiortamı kullanılmıştır. Besiortamı içeriği Bölüm 3.1.2.'de belirtildiği gibidir.

SET SOLUSYONU:

Sükroz	%25
Tris-HCl (pH=8,0)	50 mM
EDTA (pH=8,0)	50 mM

LİZOZİM ÇÖZELTİSİ:

1 ml SET solusyonuna 5 mg lizozim ilave edilerek hazırlanmıştır.

NaOH SOLUSYONU:

NaOH 0,2 N (10 N NaOH'den seyreltilerek taze hazırlanır)

SDS %1

3 M K⁺-5 M ASETAT SOLUSYONU:

Potasyum Asetat 5 M 600 ml

Glasial asetik asit 11,5 ml

Distile su 28,5 ml

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 ÇÖZELTİSİ:

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

ETİDYUM BROMÜR:

Etidyum bromür stok çözeltisi, 10 mg/1 ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

LOADİNG BUFFER (BOYAMA TAMPONU):

Bromofenol Blue	0,25 g
-----------------	--------

Sukroz	40 g
--------	------

Distile su	100 ml
------------	--------

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1. *Bacillus*'ların İzolasyonu

Çalışmada, 29 adedi topraktan izole edilen, toplam 32 adet *Bacillus* suşu kullanılmıştır (Çizelge 3.1). İzole edilenlerin yanısıra kullanılan üç adet suşun 2 adedi, Prof. Dr. Cumhur Çökmüş'ten (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), 1 adedi ise Dr. Fügen Durlu Özkaya'dan (Refik Saydam Hıfızısıhha Merkez Başkanlığı) temin edilmiştir.

İzolasyon kaynağı olarak seçilen çeşitli topraklardan *Bacillus* izolasyonu, Bölüm 3.2.2.'de anlatıldığı gibi yapılmış ve izolatlar Nutrient Agar (NA) besiyortamında muhafazaya alınmıştır. İzolatların elde edildikleri topraklar ve bunların pH değerleri ile yapılan seyreltmeler Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Ankara sınırları içinde yer alan, Beytepe'den 4 adet, Keçiören'den 2 adet, Sincan'dan 1 adet, Eryaman'dan 2 adet, ODTÜ kampüsünden 3 adet, Ostim'den 6 adet, Yıldız'dan 6 adet ve Ahlatlıbel'den 5 adet olmak üzere toplam 29 adet *Bacillus* izolatı seçilerek kodlanmıştır. İzolatlar ve elde edildikleri toprakların yer aldığı liste Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. *Bacillus*'ların izole edildiği yer, toprağın pH değeri ve seyreltme faktörleri

Toprak	pH	Seyreltme Faktörü				
		10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Beytepe Toprağı	8,18	4	-	-	-	-
Keçiören Toprağı	8,37	2	-	-	-	-
Sincan Toprağı	7,84	1	-	-	-	-
Eryaman Toprağı	7,96	1	-	1	-	-
ODTÜ Toprağı	8,28	-	-	-	1	2
Ostim Toprağı	7,96	-	-	3	3	-
Yıldız Toprağı	8,52	-	-	2	2	2
Ahlatlıbel Toprağı	8,33	-	-	1	4	-

Çizelge 4.2. *Bacillus* izolatları ve izole edildikleri yerler

Topraklar	İzolatlar
Beytepe	M2, M3, M4, M5
Keçiören	M6, M8
Sincan	M10
Eryaman	M14, M15
ODTÜ	M16, M17, M18
Ostim	M19, M20, M21, M22, M23, M24
Yıldız	M25, M26, M27, M28, M29, M30
Ahlatlıbel	M31, M32, M33, M34, M35

4.2. *Bacillus*'ların Tanımlanmaları ve Dağılımları

Topraktan izole edilen *Bacillus*'ların tanımlanmaları, Bölüm 3.2.4'de belirtilen bir dizi fizyolojik, biyokimyasal testler ve mikroskopik gözlemler yardımı ile yapılmıştır. Tanımlama testleri ve sonuçları Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Yapılan testler, farklı sıcaklık derecelerinde (5°C, 30°C, 40°C ve 65°C) gelişme; farklı NaCl konsantrasyonlarında (%2 NaCl, % 5 NaCl ve %10 NaCl) üreme; pH 5,7 ve pH 6,8'de gelişme; katalaz reaksiyonu; esculin ve nişasta hidrolizi; nitrat redüksiyonu; glukozdan gaz oluşumu; karbonhidratlardan asit oluşumu (glukoz, mannitol, laktoz, galaktoz, sükroz, rafinoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz, maltoz) ve spor boyama gibi testlerdir.

Test sonuçlarından, hiçbir suşun 5° ve 65°C da üremediği ve tüm suşların 30 ve 40°C de geliştiği gözlenmiştir.

%10 NaCl konsantrasyonunda yalnız M30 suşunda iyi üreme gözlenmiş, M19, M21, M22 ve M26 suşlarında ise zayıf üreme belirlenmiştir. %5 NaCl konsantrasyonunda M2, M3, M4, M8, M25 ve M35 suşları dışında üreme olmuştur. Tüm suşlar, %2 NaCl'de üremişlerdir.

pH 5,7'de tüm suşlarda üreme gözlenirken, M22 suşunun zayıf ürettiği tespit edilmiştir. pH 6,8'de ise, M15 suşu dışında tüm suşlarda üreme gözlenmiştir.

Aktif kültür üzerine % 3'lük H₂O₂ damlatılarak yapılan katalaz reaksiyonunda ise, tüm suşlarda katalaz enzimi reaksiyonu farklı olarak tespit edilmiştir.

Eskulin hidrolizi, M2, M3, M4, M6 ve M22 suşları dışında gözlenmiştir.

Nişasta hidrolizi, M2, M5, M8, M10, M15, M16, M17, M18, M22, M24, M26, M27, M28, M34, M35 suşlarında gerçekleştirilmiş; diğer suşlarda hidroliz gözlenmemiştir.

Nitratın nitrite indirgenmesi M3 ve M8 suşlarında tespit edilememiştir. M22 suşunda zayıf olmakla birlikte, diğer tüm suşlarda nitratın nitrite indirgendiği gözlenmiştir.

Suşların hiçbirinin glukozdan gaz üretmediği tespit edilmiştir.

Glukoz, mannitol, laktoz, galaktoz, sükroz, rafinoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz ve maltoz kullanılarak yapılan karbonhidrat testlerinde, suşların çoğunluğunun karbonhidratlardan asit oluşturduğu gözlenmiştir. Ancak, suşlar arasında karbonhidratlardan asit oluşturulmasında farklılıklar bulunmuştur. M2, M3, M4, M6, M10 suşları glukozdan; M2, M3, M4, M5, M6, M10, M15 suşları mannitolden; M2, M3, M4, M6, M10 suşları sükrozdan; M2, M3, M4, M5, M6, M8, M10, M14, M15 suşları laktoz, galaktoz, rafinoz, ksiloz, arabinoz, fruktoz ve maltozdan; M17, M26, M27 ve M33 suşları laktoz ; M26 ve M27 suşları galaktoz; M18 ve M21 suşları rafinoz; M21, M26, M28 ve M35 suşları ksiloz; M27 suşu fruktoz; M25 suşu ise maltozdan asit oluşturmamıştır. Diğer suşların, bu şekerlerden asit oluşturduğu gözlenmiştir.

Suşların spor konumlarının incelenmesinde, M3 suşunda terminal veya subterminal sferik spora rastlanırken, M14 ve M15 suşlarında merkezi veya subterminal oval konumlu; diğer tüm suşlarda ise merkezi oval konumlu sporların varlığı gözlenmiştir.

Tanımlama testlerinin değerlendirilmesi sonucunda, 29 izolatdan 1 adedi *Bacillus sphaericus*, 3 adedi *Bacillus brevis*, 3 adedi *Bacillus cereus*, 3 adedi *Bacillus coagulans*, 5 adedi *Bacillus megaterium*, 6 adedi *Bacillus circulans*, 4 adedi *Bacillus subtilis* ve 4 adedi de *Bacillus licheniformis* olarak tanımlanmıştır (Çizelge 4.3).

Çalışmada kullanılan suşların listesi Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. *Bacillus* izolatlarının tanımlama testleri

TANIMLAMA SONUÇLARI		<i>B. brevis</i>	<i>B. sphaericus</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. circulans</i>
Spor Konumu		M.	T. S.	M.	M.	M.	M.	M.	M. S.	M. S.	M.
Maltozdan Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Fruktozdan Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Arabinozdan Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Ksilitozdan Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Rafinozdan Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sükrozdan Asit Oluşumu		-	-	-	+	-	+	-	+	+	+
Galaktozdan Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Laktozdan Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Mannitolden Asit Oluşumu		-	-	-	-	-	Z	-	+	-	+
Glukozdan Asit Oluşumu		-	-	-	+	-	+	-	+	Z	+
Glukozdan Gaz Oluşumu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Nitrat Redüksiyonu		+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Nişasta Hidrolizi		+	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Esküfin Hidrolizi		-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Katalaz Reaksiyonu		+	++	+	+++	+	+	++	+++	++	+++
pH 6,8'de Gelişme		+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
pH 5,7'de Gelişme		Z	Z	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl'de Gelişme		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
%5 NaCl'de Gelişme		-	-	-	+	Z	-	+	+	+	+
%2 NaCl'de Gelişme		Z	Z	Z	+	+	+	+	+	+	+
65°C'de Gelişme		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40°C'de Gelişme		+	+	Z	+	+	+	+	+	+	+
30°C'de Gelişme		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5°C'de Gelişme		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İZOLATLAR		M2	M3	M4	M5	M6	M8	M10	M14	M15	M16
SUŞ NO		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Z: Zayıf üreme, + : Pozitif Reaksiyon, - : Negatif Reaksiyon, M.:Merkezi, T.: Terminal, S.:Subterminal

Çizelge 4.3'ün devamı. *Bacillus* izolatlarının tanımlama testleri

TANIMLAMA SONUÇLARI	<i>B. subtilis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. megaterium</i>
Spor Konumu	M.	M.	M.	M.	M.	M.	M.	M.	M.	M.
Maltozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Fruktozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksilitozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Rafinozdan Asit Oluşumu	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Sükrozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Laktozdan Asit Oluşumu	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mannitolden Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukozdan Gaz Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrat Redüksiyonu	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	+
Nişasta Hidrolizi	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
Eskulin Hidrolizi	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Katalaz Reaksiyonu	+	++	++	+	+	++	++	+	++	++
pH 6,8'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5,7'de Gelişme	+	+	+	+	+	Z	+	+	+	+
%10 NaCl'de Gelişme	-	-	Z	-	Z	Z	-	-	-	Z
%5 NaCl'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
%2 NaCl'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65°C'de Gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40°C'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5°C'de Gelişme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
İZOLATLAR	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26
SUŞ NO	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20

Z: Zayıf üreme, +: Pozitif Reaksiyon, -: Negatif Reaksiyon; M:Merkezi; T.: Terminal; S.:Subterminal

Çizelge 4.3'un devamı. *Bacillus* izolatlarının tanımlama testleri

TANIMLAMA SONUÇLARI	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. circulans</i>	<i>B. coagulans</i>
Spor Konumu	M.	M.	M.	M.	M.	M.	M.	M.	M.
Maltozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Früktozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ksilozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sükrozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Laktozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitolden Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukozdan Asit Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukozdan Gaz Oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nitrat Redüksiyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin Hidrolizi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Katalaz Reaksiyonu	++	++	++	++	++	++	++	++	++
pH 6,8'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
pH 5,7'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%10 NaCl'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%5 NaCl'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%2 NaCl'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
65°C'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5°C'de Gelişme	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İZOLATLAR	M27	M28	M29	M30	M31	M32	M33	M34	M35
SUŞ NO	21	22	23	24	25	26	27	28	29

Z: Zayıf üreme, +: Pozitif Reaksiyon, -: Negatif Reaksiyon, M.:Merkezi, T.: Terminal, S.:Subterminal

Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşlarının numara ve kodları

No	Suşlar ve Kodları
1	<i>Bacillus brevis</i> M2
2	<i>Bacillus brevis</i> M4
3	<i>Bacillus brevis</i> M6
4	<i>Bacillus sphaericus</i> M3
5	<i>Bacillus sphaericus</i> ATCC 14577*
6	<i>Bacillus cereus</i> M5
7	<i>Bacillus cereus</i> M10
8	<i>Bacillus cereus</i> M15
9	<i>Bacillus cereus</i> **
10	<i>Bacillus coagulans</i> M8
11	<i>Bacillus coagulans</i> M25
12	<i>Bacillus coagulans</i> M35
13	<i>Bacillus megaterium</i> M14
14	<i>Bacillus megaterium</i> M21
15	<i>Bacillus megaterium</i> M22
16	<i>Bacillus megaterium</i> M26
17	<i>Bacillus megaterium</i> M28
18	<i>Bacillus circulans</i> M16
19	<i>Bacillus circulans</i> M18
20	<i>Bacillus circulans</i> M23
21	<i>Bacillus circulans</i> M31

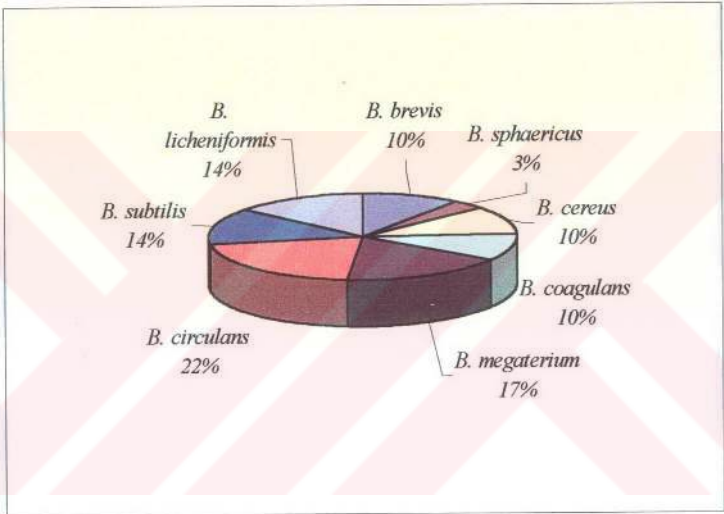
Çizelge 4.4'ün devamı. Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşlarının numara ve kodları

No	Suşlar ve Kodları
22	<i>Bacillus circulans</i> M32
23	<i>Bacillus circulans</i> M34
24	<i>Bacillus subtilis</i> M17
25	<i>Bacillus subtilis</i> M24
26	<i>Bacillus subtilis</i> M29
27	<i>Bacillus subtilis</i> M33
28	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633*
29	<i>Bacillus licheniformis</i> M19
30	<i>Bacillus licheniformis</i> M20
31	<i>Bacillus licheniformis</i> M27
32	<i>Bacillus licheniformis</i> M30

*A.Ü.F.F.: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Prof. Dr. Cumhuri Çökmüş'ten temin edilmiştir

** RSKK: Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Başkanlığı, Dr. Fügen Durlu Özkaya'dan temin edilmiştir.

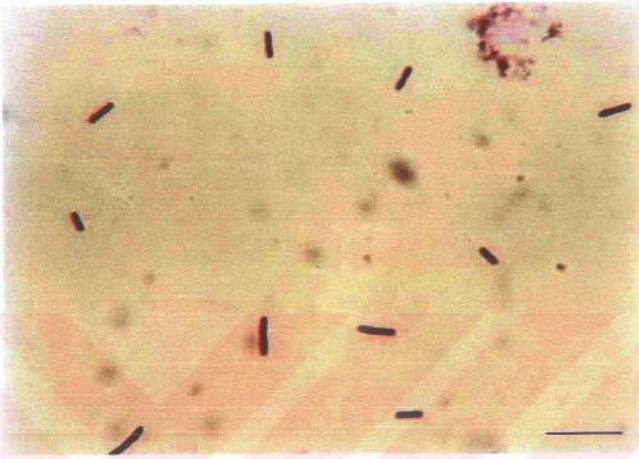
Ankara'nın çeşitli yerlerinden alınan toprak örneklerinden izole edilen toplam 29 adet izolatın yüzde dağılımları Şekil 4.1'de verilmiştir. Buna göre; izolatların %14'ü *B. subtilis*, %14'ü *B. licheniformis*, %3'ü *B. sphaericus*, %10'u *B. brevis*, %10'u *B. cereus*, %10'u *B. coagulans*, %17'si *B. megaterium*, %22'si *B. circulans* olarak dağılım göstermiştir.



Şekil 4.1. *Bacillus* izolatlarının yüzde dağılımları

Denemeler sırasında *B. cereus* M10 suşu mikroskopik olarak da incelenmiştir (Şekil 4.2).

Tanımlamaları yapılan izolatlar arasında yer alan *Bacillus brevis* M6'nın Nutrient Agar besi ortamındaki üreme durumu ve koloni morfolojisi Şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.2. *Bacillus cereus* M10'un mikroskopik görünümü (bar 5 μm)



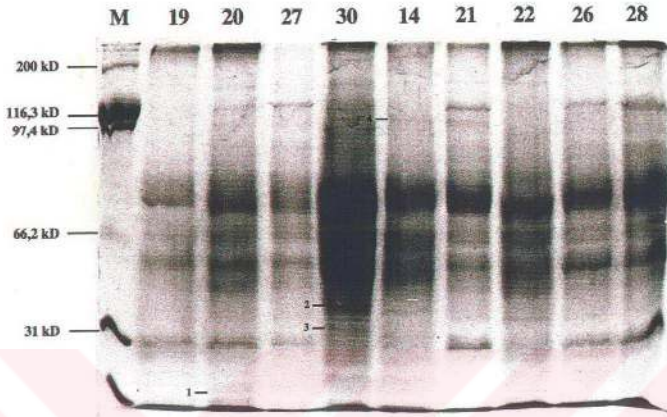
Şekil 4.3. *Bacillus brevis* M6'nin Nutrient Agar besiyortamındaki koloni morfolojisi

4.3. *Bacillus* Suşlarının Toplam Hücre Protein Profilleri

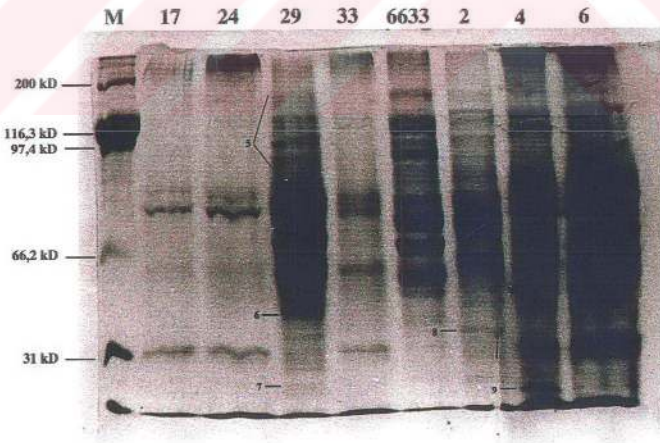
*Bacillus*ların toplam hücre protein profilleri 3.2.5.1'de anlatıldığı gibi tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan suşlar, *B. brevis*, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* olmak üzere 8 tür altında toplanıp, protein profilleri %10'luk SDS-PAGE'de analiz edilmiştir. Suşların toplam protein profilleri Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7'de verilmiştir.

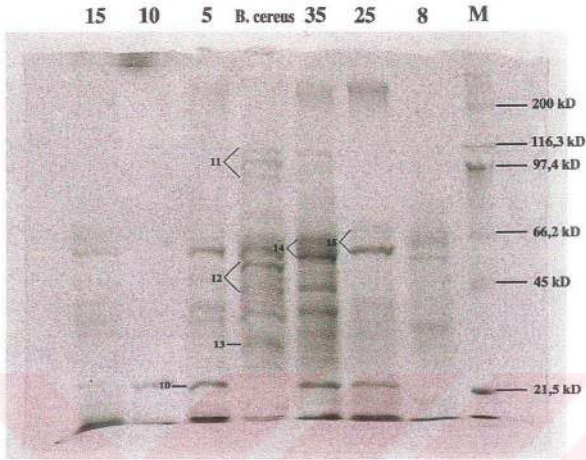
Bakterilerdeki proteinlerin moleküler ağırlıklarının yaklaşık olarak 19-160 kD arasında olduğu tespit edilmiştir. Suşların genel olarak elektroforetik görünimleri birbirine benzerlik gösterirken, bazı bantlar yönünden bakteriler arasında farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Bazı türlerin, özellikle *B. subtilis*, *B. cereus* ve *B. circulans*'ın heterojen bir elektroforetik yapıya sahip olduğu bulunmuştur.



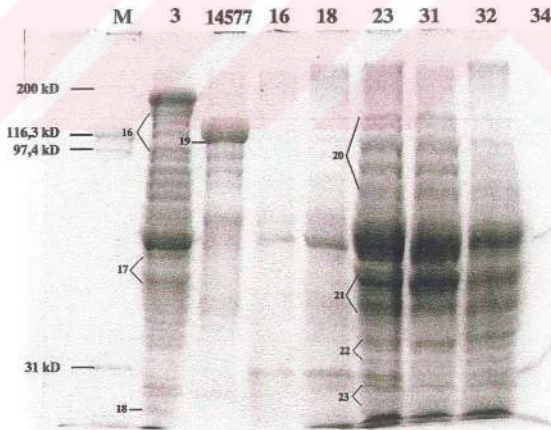
Şekil 4.4. *B. licheniformis* (M19, M20, M27, M30) ve *B. megaterium* (M14, M21, M22, M26, M28) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri



Şekil 4.5. *B. subtilis* (M17, M24, M29, M33, ATCC 6633) ve *B. brevis* (M2, M4, M6) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri



Şekil 4.6. *B. cereus* (*B. cereus*, M5, M10, M15) ve *B. coagulans* (M8, M25, M35) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri



Şekil 4.7. *B. sphaericus* (M3, ATCC 14577) ve *B. circulans* (M16, M18, M23, M31, M32, M34) suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri

4.4. *Bacillus*'larda PHB Üretimi

Bacillus suşlarının Nutrient Broth (NB) bazal besiortamındaki PHB üretimleri ve yüzde verimleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. PHB üretiminin tespiti 3.2.6'da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Denemelerde kullanılan suşların hücre kuru ağırlıklarına göre PHB miktarları 0,004-0,160 g/l, yüzde verimleri de %1,06-41,67 arasında bulunmuştur. En yüksek PHB üretim miktarı ve yüzde verimi *Bacillus brevis* M6 (0,025 g/l; %41,67) ve *Bacillus cereus* M5 (0,095 g/l; %27,53) suşlarında bulunmuştur.

Bacillus'ların PHB üretim miktarları ortalama 0,051g/l ve yüzde verimleri %11,50 olarak hesaplanmıştır.

Suşların hücre kuru ağırlıkları (g/l), PHB (g/l) miktarları ve yüzde verimleri Çizelge 4.5'de, yüzde verimleri histogramı Şekil 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. *Bacillus*'ların NB besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB üretimi ve yüzde verimleri

<i>Bacillus</i> Suşları	Hücre Kuru Ağırlığı (g/l)	PHB ^a (g/l)	Verim ^b (%PHB)
<i>B. brevis</i> M2	0,035±0,005	0,005±0,002	14,28
<i>B. brevis</i> M4	0,295±0,055	0,059±0,002	20,00
<i>B. brevis</i> M6	0,060±0,010	0,025±0,005	41,67*
<i>B. sphaericus</i> M3	0,305±0,015	0,040±0,005	13,11
<i>B. sphaericus</i> ATCC 14577	0,690±0,140	0,044±0,003	6,37
<i>B. cereus</i> M5	0,345±0,115	0,095±0,030	27,53*
<i>B. cereus</i> M10	1,535±1,005	0,059±0,010	3,84
<i>B. cereus</i> M15	0,580±0,050	0,097±0,031	16,72
<i>B. cereus</i>	0,945±0,265	0,160±0,090	16,93
<i>B. coagulans</i> M8	0,190±0,010	0,046±0,010	24,21
<i>B. coagulans</i> M25	0,370±0,020	0,032±0,004	8,90
<i>B. coagulans</i> M35	0,445±0,065	0,064±0,001	14,5

Çizelge 4.5'in devamı. *Bacillus* 'ların NB besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB üretimi ve yüzde verimleri

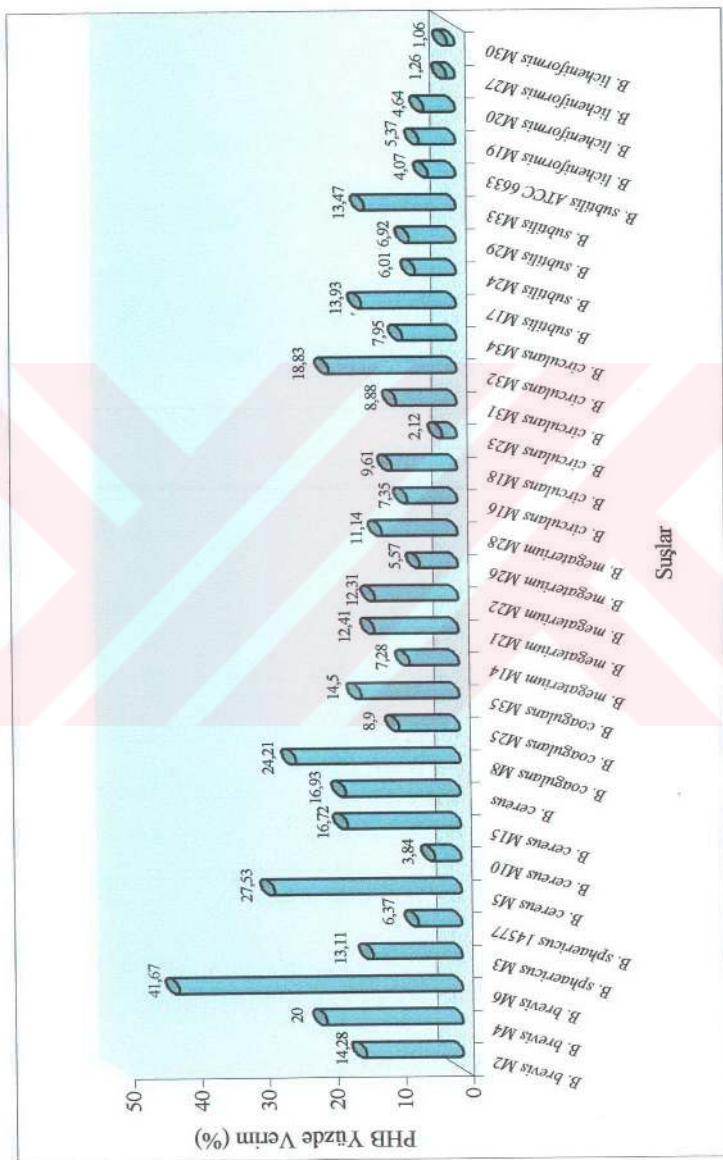
<i>Bacillus</i> Suşları	Hücre Kuru Ağırlığı (g/l)	PHB ^a (g/l)	Verim ^b (%PHB)
<i>B. megaterium</i> M14	1,195±0,205	0,087±0,006	7,28
<i>B. megaterium</i> M21	0,630±0,000	0,078±0,001	12,41
<i>B. megaterium</i> M22	0,430±0,020	0,052±0,004	12,31
<i>B. megaterium</i> M26	0,655±0,265	0,036±0,005	5,57
<i>B. megaterium</i> M28	0,425±0,035	0,047±0,019	11,14
<i>B. circulans</i> M16	0,460±0,030	0,033±0,013	7,35
<i>B. circulans</i> M18	0,375±0,025	0,036±0,015	9,61
<i>B. circulans</i> M23	1,000±0,640	0,021±0,000	2,12
<i>B. circulans</i> M31	0,435±0,015	0,038±0,015	8,88
<i>B. circulans</i> M32	0,450±0,020	0,084±0,021	18,83
<i>B. circulans</i> M34	0,535±0,015	0,042±0,001	7,95
<i>B. subtilis</i> M17	0,480±0,050	0,066±0,026	13,93
<i>B. subtilis</i> M24	0,845±0,475	0,050±0,008	6,01
<i>B. subtilis</i> M29	0,470±0,070	0,032±0,003	6,92
<i>B. subtilis</i> M33	0,535±0,035	0,072±0,026	13,47
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	0,415±0,015	0,016±0,006	4,07
<i>B. licheniformis</i> M19	1,010±0,320	0,054±0,006	5,37
<i>B. licheniformis</i> M20	1,310±0,540	0,060±0,025	4,64
<i>B. licheniformis</i> M27	0,410±0,040	0,005±0,000	1,26
<i>B. licheniformis</i> M30	0,445±0,055	0,004±0,000	1,06
Ortalama ^x	0,572	0,051	11,50

^a Hücre kuru ağırlığında tayin edilmiştir.

^b Hücre kuru ağırlığına göre belirlenmiştir.

*Yüksek PHB üreten suşlar

^x PHB üreten suşların ortalamaları



Şekil 4.8. *Bacillus* 'ların NB besi ortamındaki PHB yüzde verim histogramı

4.4.1. Farklı şartlar ve besiortamlarının PHB verimine etkileri

Farklı şartlar ve besiortamlarının PHB verimine etkilerinin incelenmesinde, suşlar arasında en yüksek verimi (%41,67) gösteren *B. brevis* M6 suşu kullanılmıştır.

4.4.1.1. Farklı karbon kaynaklarının PHB verimine etkisi

Farklı karbon kaynakları olarak sodyum asetat ve sitrat kullanılmıştır. Karbon kaynakları, bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

B. brevis M6 suşu, sodyum asetat besiortamında % 2,39 PHB ürettiğini, sitrathlı ortamda ise daha yüksek %51, 85 PHB üretmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.9).

4.4.1.2. Farklı fosfat kaynaklarının PHB verimine etkisi

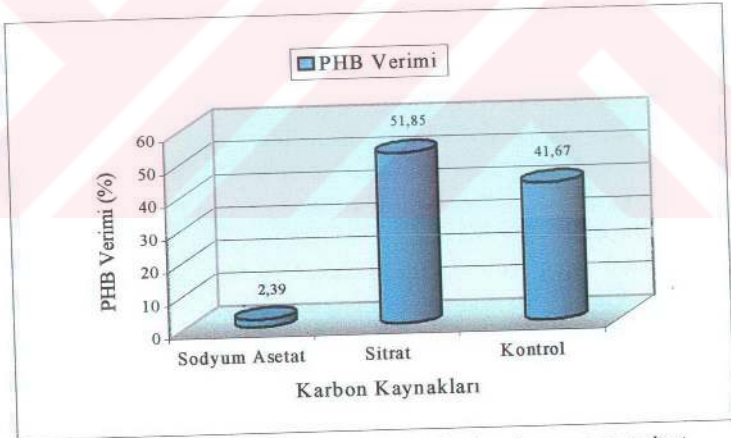
Farklı fosfat kaynakları olarak potasyum fosfat [KH_2PO_4] ve potasyum-2-fosfat [K_2HPO_4] kullanılmıştır. Fosfat kaynakları, bölüm 3.2.8'de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Fosfat kaynaklarının PHB üretimine etkisinin araştırılması için en yüksek verime sahip olan *B. brevis* M6 suşu (%41,67) seçilmiştir.

B. brevis M6 suşunun her iki fosfat kaynağında da PHB ürettiği ancak, üretim miktarlarının düşük olduğu bulunmuştur. Bazal besiortamına, fosfat kaynağı olarak KH_2PO_4 ilave edildiğinde, % 1,52 PHB ürettiği ve K_2HPO_4 'lı ortamda ise % 6,5 PHB üretim yüzdesi tespit edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.10).

Çizelge 4.6. *Bacillus brevis* M6'nın karbon kaynağı olarak sodyum asetat ve sitrat içeren besiyortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

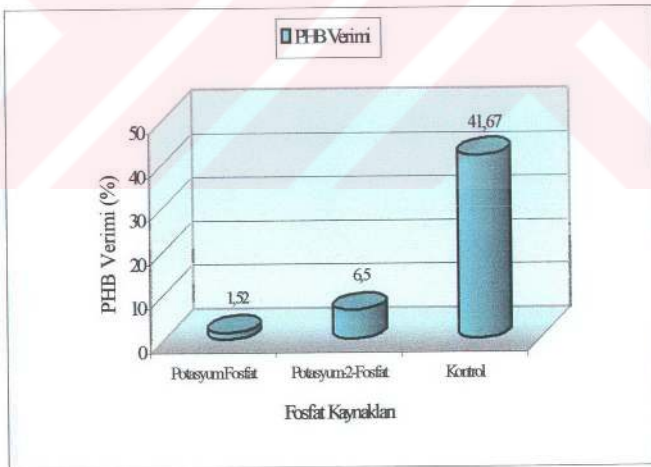
Karbon Kaynakları	Hücre Kuru Ağırlık (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
Sodyum Asetat	1,880±0,390	0,045±0,009	2,39
Sitrat	0,135±0,015	0,070±0,017	51,85
Kontrol	0,060±0,010	0,025±0,005	41,67



Şekil 4.9 *Bacillus brevis* M6'nın karbon kaynağı olarak sodyum asetat ve sitrat içeren besiyortamında PHB yüzde verim histogramı

Çizelge 4.7. *Bacillus brevis* M6'nın fosfat kaynağı olarak potasyum fosfat ve potasyum-2-fosfat içeren besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

Fosfat Kaynakları	Hücre Kuru Ağırlık (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
Potasyum fosfat	2,530±0,610	0,038±0,015	1,52
Potasyum-2-fosfat	0,830±0,140	0,054±0,007	6,50
Kontrol	0,060±0,010	0,025±0,005	41,67



Şekil 4.10. *Bacillus brevis* M6'nın fosfat kaynağı olarak potasyum fosfat ve potasyum-2-fosfat içeren besiortamında PHB yüzde verim histogramı

4.4.1.3. Farklı azot kaynaklarının PHB verimine etkisi

Farklı azot kaynakları olarak D-L-triptofan, amonyum sülfat $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ ve sodyum nitrat $[\text{NaNO}_3]$ kullanılmıştır. Azot kaynakları, bölüm 3.2.8’de anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

Azot kaynaklarının PHB üretimine etkisinin araştırılması için en yüksek verime sahip olan *B. brevis* M6 suşu (%41,67) seçilmiştir.

B. brevis M6 suşunun tüm azot kaynaklarında farklı miktarda PHB ürettiği gözlenmiştir. Besiortamına azot kaynağı olarak D-L- triptofan ilave edildiğinde %2,93, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ içeren ortamda %19,13 ve NaNO_3 ’lı ortamda %60 oranında PHB üretmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.11).

Tüm azot kaynakları dikkate alındığında *B. brevis* M6 suşunun, en yüksek PHB üretim miktarı ve yüzdesinin NaNO_3 içeren besiortamında elde edildiği ve PHB üretim yüzdesinin %60 olduğu görülmektedir. Bakteri bu azot kaynağında diğer azot kaynaklarına kıyasla daha yüksek düzeyde PHB sentezlediği görülmüştür.

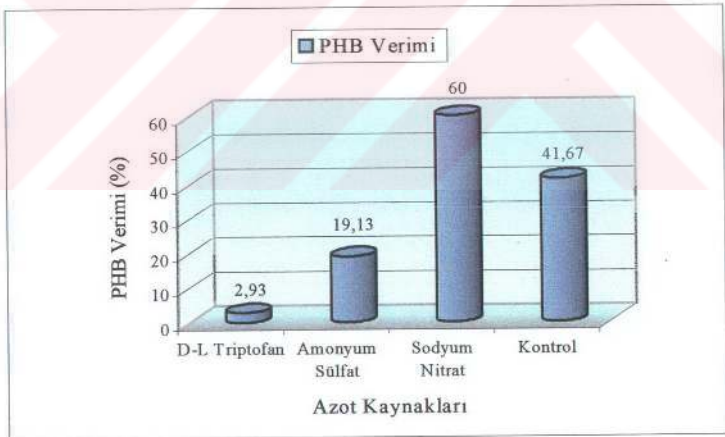
4.4.1.4. Azotsuz ortamın PHB verimine etkisi

Çalışmada kullanılan azotsuz ortam şartları, bölüm 3.2.9’da anlatıldığı gibi hazırlanmıştır.

B. brevis M6 suşu, azotsuz ortamda geliştirildiğinde %25,45 PHB üretim yüzdesine ulaşmıştır. Bakteri, bazal besiortamında %41,67 oranında PHB üretmiştir (Çizelge 4.9, Şekil 4.12). Azotsuz ortamın, bakterinin PHB sentezleme oranını düşürdüğü görülmüştür.

Çizelge 4. 8. *Bacillus brevis* M6'nın azot kaynağı olarak D-L-triptofan, amonyum sülfat ve sodyum nitrat içeren besiortamında hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

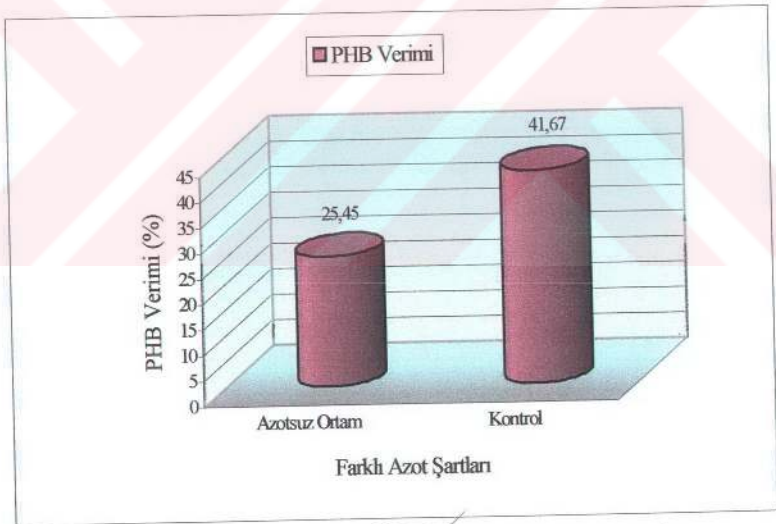
Azot Kaynakları	Hücre Kuru Ağırlık (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
D-L Triptofan	1,825±0,075	0,053±0,009	2,93
Amonyum sülfat	0,115±0,015	0,022±0,013	19,13
Sodyum nitrat	0,065±0,005	0,039±0,011	60,00
Kontrol	0,060±0,010	0,025±0,005	41,67



Şekil 4.11. *Bacillus brevis* M6'nın azot kaynağı olarak D-L-triptofan, amonyum ve sodyum nitrat içeren besiortamında PHB yüzde verim histogramı

Çizelge 4.9. *Bacillus brevis* M6'nın NB besi ortamı ve azotsuz ortamlarda hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

Farklı Şartlar	Hücre Kuru Ağırlık (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
Azotsuz Ortam	0,330±0,000	0,084±0,014	25,45
Azotlu Ortam (Kontrol)	0,060±0,010	0,025±0,005	41,67



Şekil 4.12. *Bacillus brevis* M6'nın farklı azot şartları altında PHB yüzde verim histogramı

4.4.1.5. Oksijeni sınırlı ortamın PHB verimine etkisi

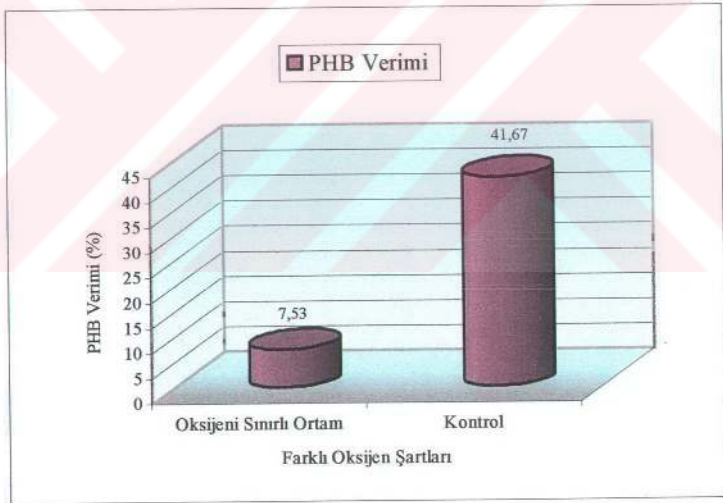
Çalışmada, oksijeni sınırlı ortam şartlarının PHB üretimi üzerindeki etkisi, bölüm 3.2.10'da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

Oksijeni sınırlı ortamın, PHB üretimine etkisinin araştırılması için en yüksek PHB verimine sahip olan *B. brevis* M6 suşu (%41,67) seçilmiştir.

Bakteri, NB bazal besiortamında oksijenin sınırlandığı ortamda geliştirildiğinde %7,53 PHB üretmiştir. Bakterinin oksijenli şatlar altındaki PHB üretim yüzdesi %41,67'dir (Çizelge 4.10, Şekil 4.13). Oksijeni sınırlı ortamın, bakterinin PHB sentezleme oranını düşürdüğü tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. *Bacillus brevis* M6'nın oksijenin sınırlandığı ortamda, hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

Farklı Şartlar	Hücre Kuru Ağırlık (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
Oksijeni Sınırlı Ortam	0,790±0,320	0,059±0,007	7,53
Oksijenli Ortam (Kontrol)	0,060±0,010	0,025±0,005	41,67



Şekil 4.13. *Bacillus brevis* M6'nın oksijenli ve oksijeni sınırlı şartlar altında yüzde PHB verim histogramı

4.4.2. Melaslı ortamda PHB üretimi

Araştırmada kullanılan şeker pancarı melası, Ankara Şeker Enstitüsünden temin edilmiştir.

İkinci derecede yüksek miktarda (%27,53) PHB üreten *Bacillus cereus* M5 melas besiyortamında geliştirilmiştir. Bakteri, melasta bulunan glukoz ve süktroz şekerlerini kullanabilmektedir.

Su, %1, %2, %3, %4 ve %5 melas konsantrasyonunda geliştirilmiş ve süreye bağlı olarak PHB üretimleri tespit edilmiştir. Bakterinin, farklı konsantrasyonlardaki melasda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde, hücre yoğunluğu, son kültür pH'sı, hücre kuru ağırlığı, PHB (g/l) ve yüzdesi incelenmiştir.

4.4.2.1. %1 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi

B. cereus M5 bakterinin %1 melas konsantrasyonunda hücre yoğunluğunun 24 ve 48. saatlerde arttığı, 72 ve 96. saatlerde ise gittikçe azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.11.).

Hücre kuru ağırlığı yine 24 ve 48. saatlerde giderek artarken, 72 ve 96. saatlerde daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11).

PHB (g/l) üretiminin, hücre yoğunluğu ve hücre kuru ağırlığının düşmeye başladığı 72. saatte en yüksek PHB (g/l) değeri olan 0,096'ya vardığı, 96. saatte ise PHB (g/l) üretiminde 0,021 varan bir düşüş gözlenmiştir (Çizelge 4.11).

Su, %1 melas konsantrasyonunda PHB yüzde veriminin olduğu en yüksek değer %73,84'dür. Bu değere 72. saatte varmıştır. 96. saatte ise PHB yüzde veriminde %15,35'e varan azalma saptanmıştır (Çizelge 4.11 ve Şekil 4.14).

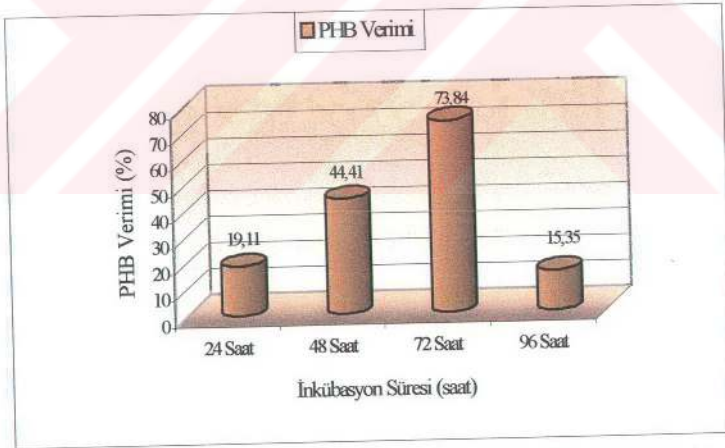
Farklı sürelerdeki pH değeri Çizelge 4.11'de verilmiş olup, en yüksek PHB yüzde veriminin olduğu 72. saatteki pH 5, 86 olarak tespit edilmiştir. Bu değer farklı sürelerde yapılan ölçmeler arasında en asidik olan değerdir.

Çizelge 4.11. *B. cereus* M5 suşunun %1 melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

%1 Melas					
İnkübasyon Süresi	Hücre Yoğunluğu	pH	Hücre Kuru Ağırlığı (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
24 Saat	0,55±0,15	6,85±0,11	0,170±0,00	0,032±0,006	19,11
48 Saat	0,60±0,10	7,05±0,05	0,215±0,00	0,095±0,019	44,41
72 Saat	0,40±0,10	5,86±0,19	0,130±0,02	0,096±0,012	73,84*
96 Saat	0,35±0,05	6,20±0,04	0,140±0,01	0,021±0,013	15,35

* Yüksek PHB yüzde verimidir.

Kontrol NB besi ortamında *B. cereus* M5 %27,53 oranında PHB üretmiştir



Şekil 4.14. *B. cereus* M5 suşunun %1 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı

4.4.2.2. %2 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi

B. cereus M5'in, %2 melas konsantrasyonunda hücre yoğunluğu 24. saatte en yüksek değere varmıştır. Bu sürede 0,70 olan hücre yoğunluğunun, ilerleyen sürelerde azaldığı gözlenmiştir (Çizelge 4.12).

Bakterinin hücre kuru ağırlığı da, en yüksek 0,240 g/l değerine 24. saatte ulaşmış olup, 48. saatte hücre kuru ağırlığının en düşük 0,150 g/l olduğu tespit edilmiştir. Bakterinin PHB (g/l) üretimi ise, en yüksek 0,116 değerine yine 24. saatte yükselmiş, 48 ve 72. saatlerde ise daha az oranlarda PHB üretmiştir.

Bakterinin, hücre yoğunluğu, hücre kuru ağırlığı ve PHB(g/l) üretiminin en yüksek olduğu 24. saat inkübasyonda daha az oranda (%48,33) PHB ürettiği tespit edilmiştir. Bakteri, yüksek PHB yüzde verimine 48. saatte (%52,00) ulaşıldığı bulunmuştur. 72. saatte PHB yüzde veriminde düşüş (%51,08) olmuştur (Çizelge 4.12, Şekil 4.15).

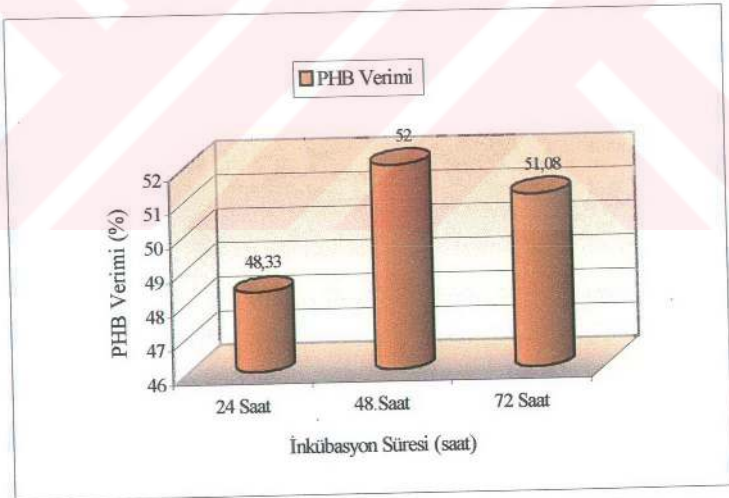
Farklı sürelerdeki pH değeri Çizelge 4.12'de verilmiş olup, en yüksek PHB yüzde veriminin olduğu 48. saatte pH değeri 6,36 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.12. *B. cereus* M5 suşunun %2 melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

%2 Melas					
İnkübasyon Süresi	Hücre Yoğunluğu	pH	Hücre Kuru Ağırlığı (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
24 Saat	0,70±0,10	7,50±0,18	0,240±0,02	0,116±0,028	48,33
48 Saat	0,40±0,00	6,36±0,05	0,150±0,02	0,078±0,096	52,00*
72 Saat	0,50±0,10	6,01±0,05	0,185±0,02	0,094±0,017	51,08

* Yüksek PHB yüzde verimidir.

Kontrol NB besiyortamında *B. cereus* M5 %27,53 oranında PHB üretmiştir.



Şekil 4.15. *B. cereus* M5 suşunun %2 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı

4.4.2.3. %3 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi

B. cereus M5, %3 melas konsantrasyonunda 24. saatte en yüksek hücre yoğunluğuna 0,90 değerinde ulaşan bakterinin, 48 ve 72. saatlerdeki hücre yoğunluğunun giderek azaldığı tespit edilmiştir. Bakterinin hücre kuru ağırlığının 24. saatte 0,430 g/l ile en yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sürede bakteri, en yüksek PHB miktarını (0,165 g/l) üretmiştir. Bu sürede bakterinin PHB yüzde veriminin de %38,48 ile en yüksek düzeyde olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.13, Şekil 4.16).

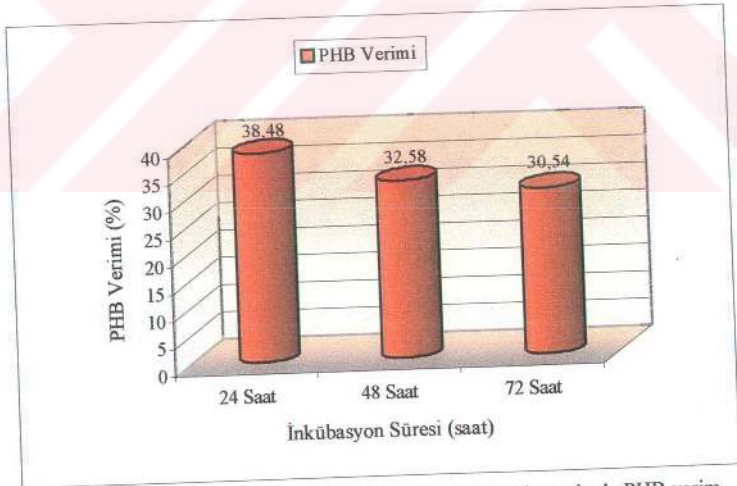
En yüksek yüzde PHB değerinin olduğu 24. saatteki son kültür pH'sının 7,13 değerinde olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.13. *B. cereus* M5 suşunun %3 melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

%3 Melas					
İnkübasyon Süresi	Hücre Yoğunluğu	PH	Hücre Kuru Ağırlığı (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
24 Saat	0,90±0,00	7,13±0,11	0,430±0,02	0,165±0,045	38,48*
48 Saat	0,85±0,05	6,76±0,07	0,290±0,020	0,094±0,028	32,58
72 Saat	0,65±0,25	6,33±0,03	0,275±0,02	0,084±0,020	30,54

* Yüksek PHB yüzde verimidir.

Kontrol NB besiyortamında *B. cereus* M5 %27,53 oranında PHB üretmiştir.



Şekil 4.16. *B. cereus* M5 suşunun %3 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı

4.4.2.4. %4 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi

B. cereus M5 suşunun, %4 melas konsantrasyonundaki hücre yoğunluğunun, ilk 48 saatte düşme eğiliminde olmasına rağmen, 72. saatte arttığı ve 1,30 değeri ile hücre yoğunluğunun en yüksek değere ulaştığı tespit edilmiştir.

Hücre yoğunluğunda 48. saate kadar yaşanan düşüşe paralel olarak hücre kuru ağırlığında da azalma gözlenmiş, ancak 72. saatteki yoğunluk artışı, hücre kuru ağırlığının da 0,440 g/l olan en yüksek düzeyine varmasına neden olmuştur. Bu değerler Çizelge 4.14'de verilmiştir.

Bakterinin PHB (g/l) miktarı ise, en yüksek olduğu 0,105 g/l değerine 24. saatte yükselmiş, 48 ve 72. saatlerde PHB miktarlarının daha az oranlarda olduğu bulunmuştur.

PHB yüzde veriminin ise, %25,11 ile 24. saatte en yüksek düzeyde bulunduğu, 48 ve 72. saatlerde yapılan ölçümlerde, PHB'nin hücrede giderek azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4. 14 ve Şekil 4.17).

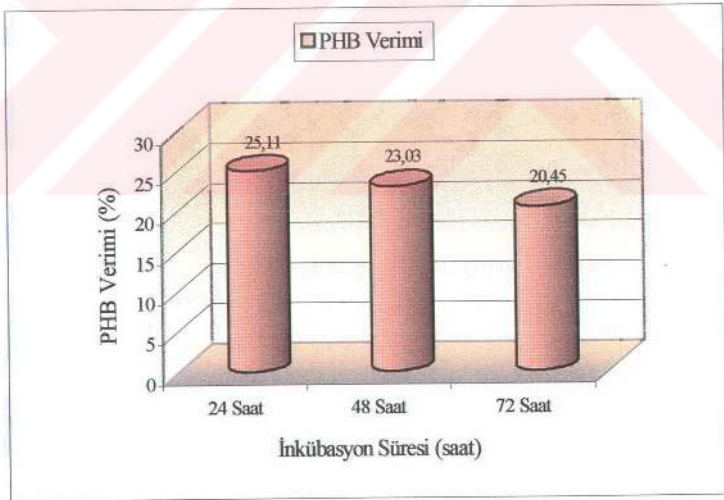
En yüksek yüzde PHB değerinin olduğu 24. saatteki son kültür pH'sının 7,44 değerinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.14).

Çizelge 4.14. *B. cereus* M5 suşunun %4 melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

%4 Melas					
İnkübasyon Süresi	Hücre Yoğunluğu	pH	Hücre Kuru Ağırlığı (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
24 Saat	1,00±0,00	7,44±0,03	0,420±0,09	0,105±0,005	25,11*
48 Saat	0,80±0,00	6,83±0,06	0,395±0,03	0,091±0,027	23,03
72 Saat	1,30±0,20	6,92±0,03	0,440±0,01	0,090±0,000	20,45

* Yüksek PHB yüzde verimidir.

Kontrol NB besi ortamında *B. cereus* M5 %27,53 oranında PHB üretmiştir.



Şekil 4.17. *B. cereus* M5 suşunun %4 melas ortamında farklı sürelerde PHB verim histogramı

4.4.2.5. %5 Melas konsantrasyonunda PHB üretimi

B. cereus M5 bakterinin bu besiortamında en yüksek hücre yoğunluğuna 72. saatte vardığı ve bu değer aynı zamanda farklı melas konsantrasyonları arasındaki en yüksek (1,45) değer olduğu tespit edilmiştir. Bu süreçte bakterinin hücre kuru ağırlığının da, en yüksek olduğu (0,380 g/l) bulunmuştur.

Bakterinin, PHB (g/l) üretimi ise, en yüksek olduğu 0,133 (%35,46) değerine 24. saatte yükselmiş, 48 ve 72. saatlerde ise giderek azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.15).

En yüksek yüzde PHB değerinin (%35,46) olduğu, 24. saatteki son kültür pH'sının 7,17 değerinde olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.18).

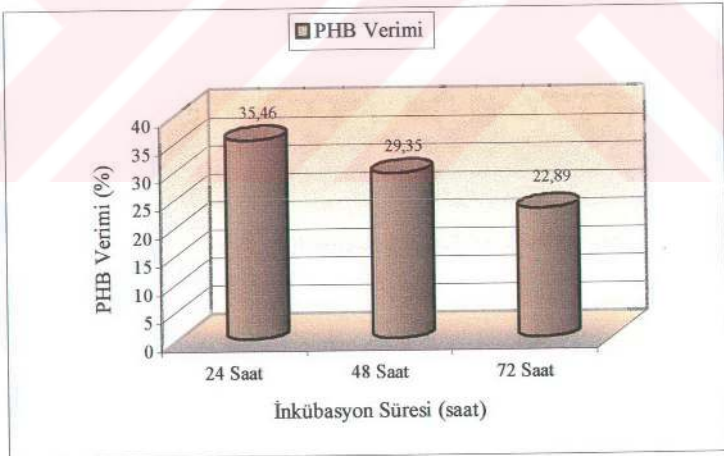
Bakterinin farklı (%1-%5) melas ortamında süreye bağlı ürettiği %PHB miktarları topluca Şekil 4. 19'de verilmiştir.

Çizelge 4.15. *B. cereus* M5 suşunun %5 melas konsantrasyonunda farklı sürelerde hücre kuru ağırlığı, PHB miktarı ve yüzde verimi

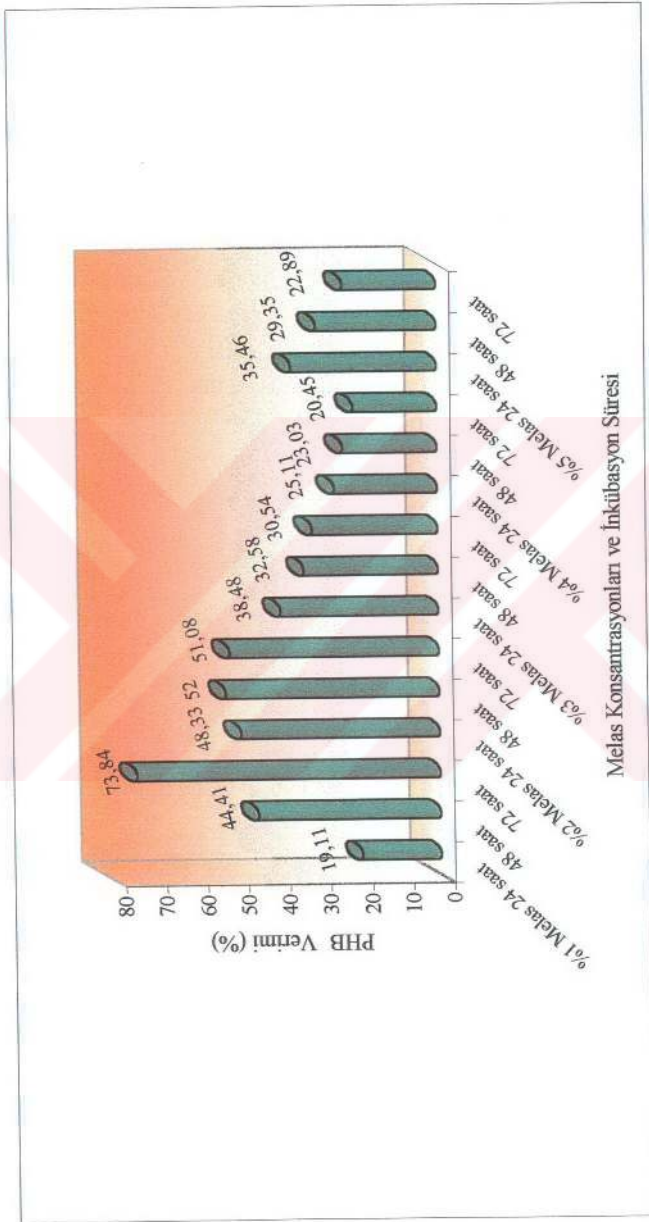
%5 Melas					
İnkübasyon Süresi	Hücre Yoğunluğu	pH	Hücre Kuru Ağırlığı (g/l)	PHB (g/l)	Verim (%PHB)
24 Saat	1,10±0,10	7,17±0,07	0,375±0,02	0,133±0,023	35,46*
48 Saat	1,10±0,10	6,59±0,38	0,310±0,020	0,091±0,006	29,35
72 Saat	1,45±0,55	6,88±0,38	0,380±0,16	0,087±0,002	22,89

* Yüksek PHB yüzde verimidir.

Kontrol NB besi ortamında *B. cereus* M5 %27,53 oranında PHB üretmiştir.



Şekil 4.18. *B. cereus* M5 suşunun %5 melas konsantrasyonunda farklı sürelerde PHB verim histogramı



Şekil 4.19. *Bacillus cereus* M5'in %1-%5 melas konsantrasyonlarında farklı sürelerde PHB yüzde verim histogramı

4.5. *Bacillus* Suşlarının Bazı Patojen ve Kontaminant Bakteriler Üzerine İnhibisyon Etkisi

Bacillus suşlarının genel inhibisyon aktivitesinin tespiti bölüm 3.2.12’de verildiği gibi yapılmıştır. *Bacillus* suşlarının, test bakterileri olarak seçilen, *Micrococcus luteus* NRRL-B 4375, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Pseudomonas fluorescens* RSKK 240, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, *Escherichia coli* NRRL B-704, *Bacillus megaterium* RSKK 578, *Bacillus thuringiensis* RSKK 380, *Bacillus subtilis* F1, ve *Bacillus cereus* F2 üzerinde gösterdikleri genel inhibisyon etkileri Çizelge 4.16’da verilmiştir.

Bacillus suşlarının, *Escherichia coli* NRRL B-704, *Yersinia enterocolitica* ATCC 1501, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 29212, *Micrococcus luteus* NRRL-B 4375, *Bacillus subtilis* F1 ve *Bacillus cereus* F2 üzerine antimikrobiyal aktivite göstermediği gözlenmiştir.

Suşlardan *B. brevis* M4, *B. cereus* F2 üzerine, 3,1 mm ve *B. cereus* M5 suşu aynı test bakterisi üzerinde 2,4 mm inhibisyon zon çapı göstermiştir.

Suşlardan *B. brevis* M6, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ve *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 suşları üzerinde inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu suşun test bakterileri üzerine gösterdiği inhibisyon zon çapları sırasıyla, 16,0 mm ve 10,8 mm olarak bulunmuştur.

Suşlardan *B. cereus* M10 suşu, *Bacillus megaterium* RSKK 578, *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 ve *Bacillus cereus* F2 üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu suşun test bakterileri üzerine gösterdiği inhibisyon zon çapları sırasıyla, 5,6; 8,8 ve 3,1 mm olarak bulunmuştur. Bu suşun *Bacillus megaterium* RSKK 578 üzerine olan inhibisyon etkisi Şekil 4.20’de ve *Bacillus thuringiensis* RSKK 380’e olan antagonistik etki Şekil 4.21’de gösterilmiştir.

Suşlardan *B. cereus* M15, *Pseudomonas fluorescens* RSKK 240, *Micrococcus flavus* ve *B. thuringiensis* üzerine inhibisyon etkisi göstermiştir. Bu suşun test bakterileri üzerine gösterdiği inhibisyon zon çapları sırasıyla, 10,5; 6,4 ve 6,7 mm olarak bulunmuştur. Bu suşun *Bacillus thuringiensis* RSKK 380’e olan inhibisyon etkisi Şekil 4.22’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.16'nın devamı. *Bacillus* suşlarının bazı patojen ve kontaminant bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivitesi (inhibisyon zon çapı mm)

BACİLLUS SUŞLARI	TEST BAKTERİLERİ											
	<i>B. cereus</i> F2	<i>B. subtilis</i> F1	<i>B. thuringiensis</i> RSKK 380	<i>B. megaterium</i> RSKK 578	<i>M. luteus</i> NRRL B-4375	<i>M. flavus</i>	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 29212	<i>P. fluorescens</i> RSKK 240	<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 1501	<i>E. coli</i> NRLL B-704	<i>St. aureus</i> ATCC 25923	
<i>B. circulans</i> M16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. circulans</i> M18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. circulans</i> M23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. circulans</i> M31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. circulans</i> M32	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. circulans</i> M34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> M17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> M24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> M29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> M33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> M19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> M20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> M27	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> M30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

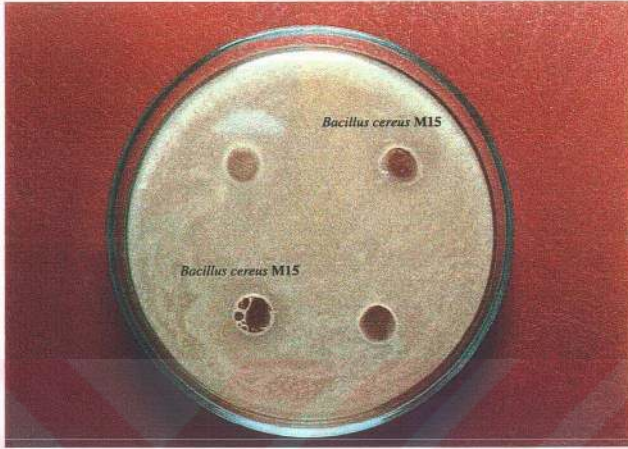
(-) İnhibisyon yoktur.



Şekil 4.20. *B. cereus* M10 suşunun *B. megaterium* RSKK 578 üzerine olan antagonistik etkisi



Şekil 4.21. *B. cereus* M10 suşunun *B. thuringiensis* RSKK 380 üzerine olan antagonistik etkisi



Şekil 4.22. *B. cereus* M15 suşunun *B. thuringiensis* RSKK 380 üzerine olan antagonistik etkisi

4.6. *Bacillus* Suşlarının Birbirlerine Karşı İnhibisyon Etkileri

Bacillus suşlarının birbirlerine karşı olan inhibisyon etkilerinin tespiti bölüm 3.2.12'de verildiği gibi yapılmıştır. Çalışmada kullanılan bazı suşların, hiç bir suş üzerine inhibisyon etkisine rastlanmazken, bazı suşların aynı türden olan diğer suşlar veya cinsin diğer türlerine karşı antagonistik etkilerinin olduğu saptanmıştır.

Çalışılan suşlardan *B. brevis* M2, *B. sphaericus* M3, *B. sphaericus* ATCC 14577, *B. cereus*, *B. coagulans* M8, *B. circulans* M23, *B. circulans* M31, *B. circulans* M32, *B. subtilis* M29, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. licheniformis* M30 suşlarının diğer *Bacillus* suşlarına karşı inhibisyon etki göstermediği gözlenmiştir.

B. sphaericus M3'e antagonistik etki gösteren suşların sırası ile, *B. brevis* M4, *B. brevis* M6, *B. cereus* M5, *B. cereus* M10, *B. cereus* M15, *B. coagulans* M25, *B. coagulans* M35, *B. megaterium* M14, *B. megaterium* M21, *B. megaterium* M22, *B. megaterium* M26, *B. megaterium* M28, *B. circulans* M16, *B. circulans* M18, *B. circulans* M34, *B. subtilis* M17, *B. subtilis* M24, *B. subtilis* M33 ve *B. licheniformis* M27 olduğu tespit edilmiştir. Bu suşlar, test bakterisi *B. sphaericus* M3 üzerinde sırasıyla, 21,6; 19,8; 17,9; 18,2; 19,3; 6,2; 6,2; 5,3; 4,8; 4,4; 5,2; 8,6; 11,8; 15,1; 5,8; 12,8; 5,4; 6,0 ve 6,4 mm inhibisyon zon çapı oluşturdıkları gözlenmiştir. Bu değerler, Çizelge 4.17 ve Şekil 4.23'te gösterilmiştir.

B. brevis M6 ve *B. cereus* M5'in, test bakterisi *B. sphaericus* M3 üzerine olan etkisi Şekil 4.24'de, *B. licheniformis* M27 ve *B. megaterium* M28'in aynı test bakterisi üzerinde etkisi ise Şekil 4.25'de gösterilmiştir.

B. sphaericus ATCC 14577'ye antagonistik etki gösteren suşların *B. brevis* M4, *B. brevis* M6, *B. cereus* M5, *B. cereus* M10, *B. coagulans* M25, *B. coagulans* M35, *B. megaterium* M21, *B. megaterium* M22, *B. megaterium* M26, *B. megaterium* M28, *B. circulans* M18, *B. circulans* M34, *B. subtilis* M17, *B. subtilis* M24, *B. subtilis* M33, *B. licheniformis* M19 ve *B. licheniformis* M20 olduğu tespit edilmiştir. Bu suşlar, test bakterisi *B. sphaericus* ATCC 14577 üzerinde sırasıyla, 11,7; 10,4; 10,4; 14,8; 7,8; 5,4; 4,8; 3,6; 4,0; 8,8; 8,2; 8,0; 3,4; 3,6; 5,2; 3,5 ve 3,0 mm inhibisyon zon çapları oluşturdıkları gözlenmiştir. Bu değerler, Çizelge 4.17 ve Şekil 4.26'te gösterilmiştir.

B. brevis M4, *B. cereus* M5'in, *B. sphaericus* ATCC 14577 üzerinc olan antagonistik etkisi Şekil 4.27'de, *B. coagulans* M25 ve *B. megaterium* M26'nın aynı test bakterisi üzerinde etkisi ise Şekil 4.28'de gösterilmiştir.

B. cereus üzerinde inhibisyon etkisi gösteren suşlar, *B. brevis* M4, *B. brevis* M6, *B. cereus* M10, *B. cereus* M15 suşlarıdır. Bu suşların test bakterisi üzerinde sırasıyla, 1,9; 2,7; 3,5 ve 3,0 mm inhibisyon zon çapları oluşturdıkları gözlenmiştir. Bu değerler, Çizelge 4.17 ve Şekil 4.29'da gösterilmiştir.

B. coagulans üzerinde inhibisyon etkisi gösteren suşlar, *B. brevis* M4, *B. cereus* M5, *B. cereus* M10 suşlarıdır. Bu suşların test bakterisi üzerinde sırasıyla, 6,9; 3,9 ve 5,4 mm inhibisyon zon çapları oluşturdıkları gözlenmiştir. Bu değerler, Çizelge 4.17 ve Şekil 4.30'da gösterilmiştir.

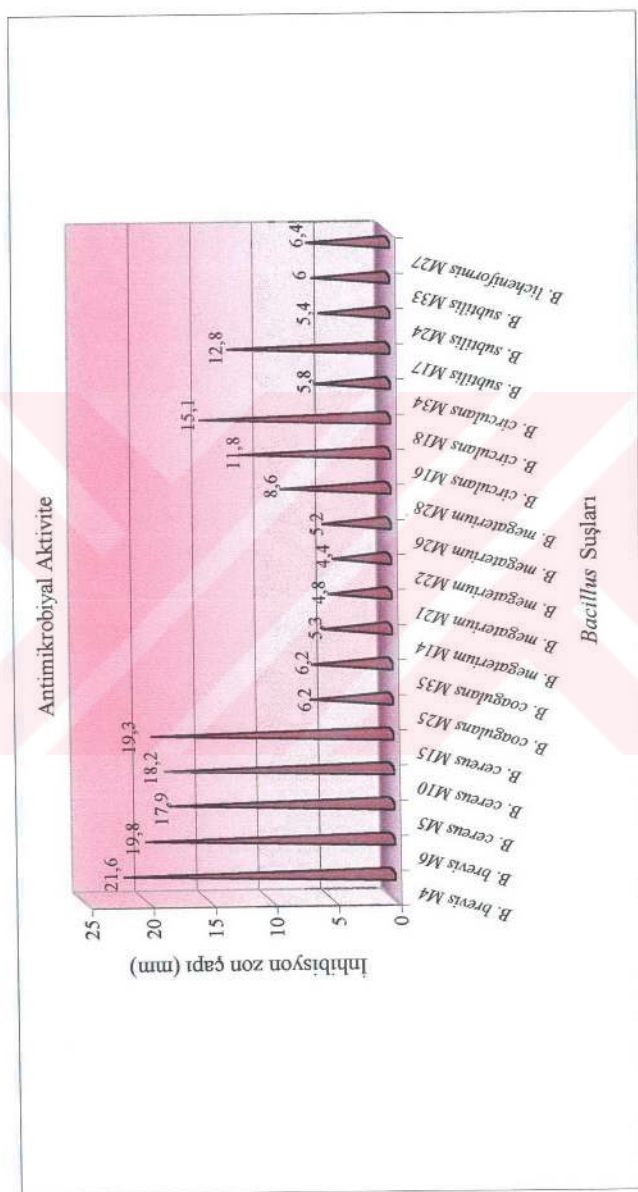
Çizelge 4.17. *Bacillus* suşlarının birbirlerine karşı antagonistik etkileri
(inhibisyon zon çapı mm)

<i>BACİLLUS</i> SUŞLARI	TEST BAKTERİLERİ			
	<i>B.sphaericus</i> M3	<i>B.sphaericus</i> ATCC 14577	<i>B.cereus</i>	<i>B.coagulans</i> M8
<i>B.brevis</i> M2	-	-	-	-
<i>B.brevis</i> M4	21,6±0,2	11,7±0,5	1,9±0,3	6,9±0,9
<i>B.brevis</i> M6	19,8±0,8	10,4±0,2	2,7±0,1	-
<i>B.sphaericus</i> M3	-	-	-	-
<i>B.sphaericus</i> ATCC 14577	-	-	-	-
<i>B.cereus</i> M5	17,9±1,3	10,4±0,4	-	3,9±0,7
<i>B.cereus</i> M10	18,2±1,2	14,8±2,2	3,5±0,5	5,4±0,2
<i>B.cereus</i> M15	19,3±2,3	-	3±0,4	-
<i>B.cereus</i>	-	-	-	-
<i>B.coagulans</i> M8	-	-	-	-
<i>B.coagulans</i> M25	6,2±0,2	7,8±1,0	-	-
<i>B.coagulans</i> M35	6,2±1,0	5,4±0,2	-	-
<i>B.megaterium</i> M14	5,3±0,1	-	-	-
<i>B.megaterium</i> M21	4,8±0,2	4,8±0,4	-	-
<i>B.megaterium</i> M22	4,4±0,8	3,6±00,0	-	-
<i>B.megaterium</i> M26	5,2±0,6	4,0±0,6	-	-
<i>B.megaterium</i> M28	8,6±0,2	8,8±0,2	-	-
<i>B.circulans</i> M16	11,8±0,2	-	-	-
<i>B.circulans</i> M18	15,1±0,1	8,2±1,6	-	-
<i>B.circulans</i> M23	-	-	-	-
<i>B.circulans</i> M31	-	-	-	-
<i>B.circulans</i> M32	-	-	-	-
<i>B.circulans</i> M34	5,8±1,0	8,0±0,0	-	-

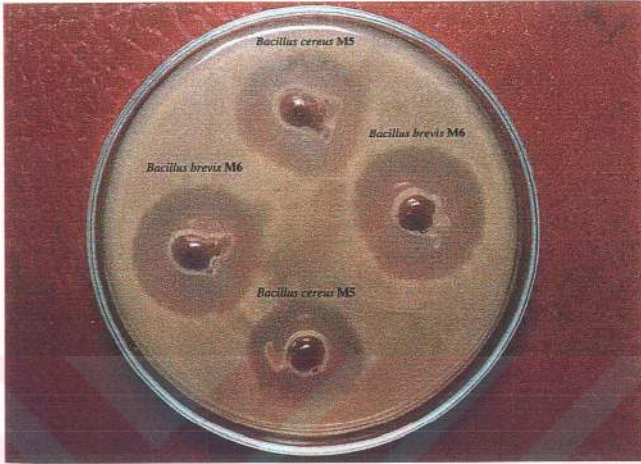
Çizelge 4.17'nin devamı. *Bacillus* suşlarının birbirlerine karşı antagonistik etkileri (inhibisyon zon çapı mm)

BACİLLUS SUŞLARI	TEST BAKTERİLERİ			
	<i>B.sphaericus</i> M3	<i>B.sphaericus</i> ATCC 14577	<i>B.cereus</i>	<i>B.coagulans</i> M8
<i>B.subtilis</i> M17	12,8±0,2	3,4±0,6	-	-
<i>B.subtilis</i> M24	5,4±0,2	3,6±0,2	-	-
<i>B.subtilis</i> M29	-	-	-	-
<i>B.subtilis</i> M33	6,0±1,0	5,2±0,2	-	-
<i>B.subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-	-
<i>B.licheniformis</i> M19	-	3,5±0,1	-	-
<i>B.licheniformis</i> M20	-	3,0±0,4	-	-
<i>B.licheniformis</i> M27	6,4±0,4	-	-	-
<i>B.licheniformis</i> M30	-	-	-	-

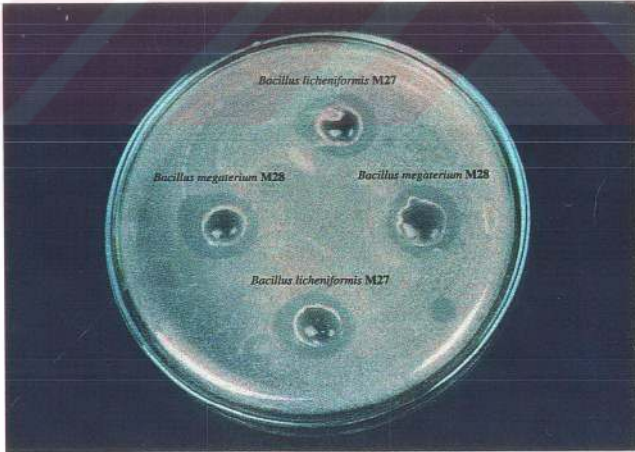
(-) İnhibisyon yoktur.



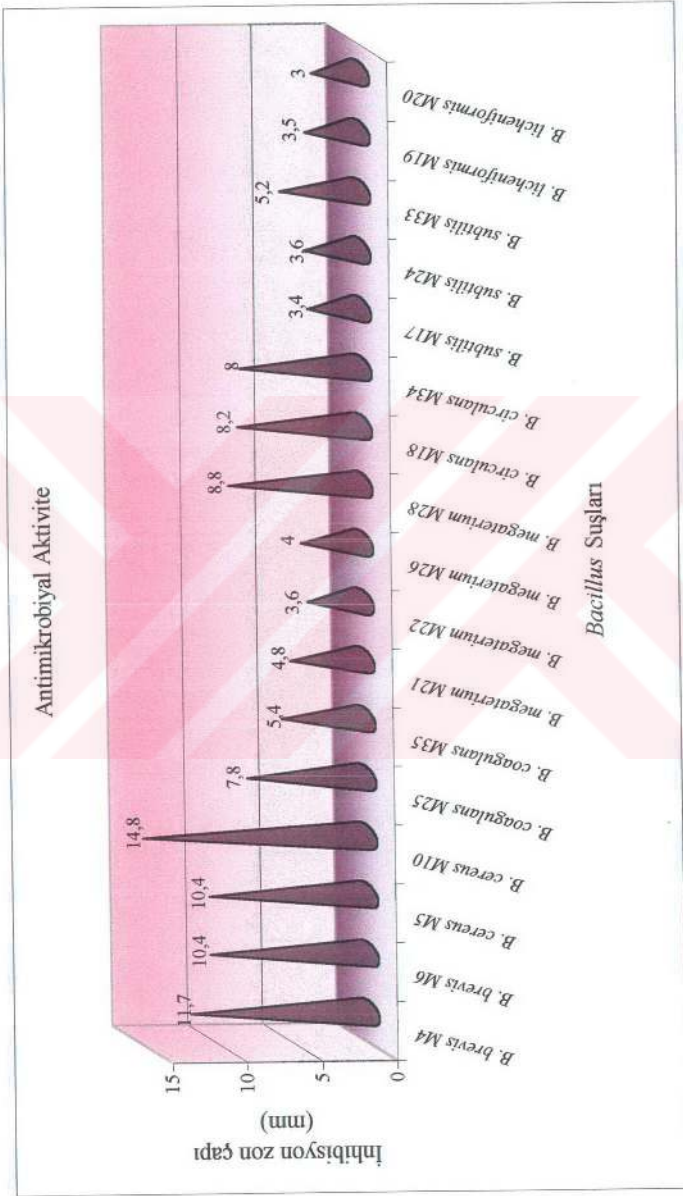
Şekil 4.23. *Bacillus* suşlarının *B. sphaericus* M3 üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram



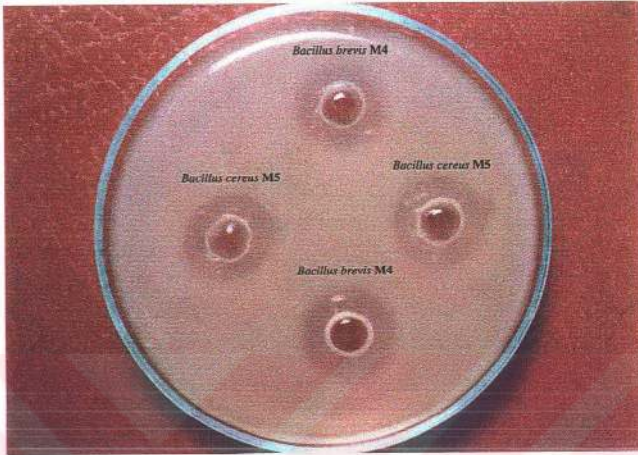
Şekil 4.24. *B. brevis* M6 ve *B. cereus* M5 suşlarının *B. sphaericus* M3 üzerine olan inhibisyon etkilerinin görüntüsü



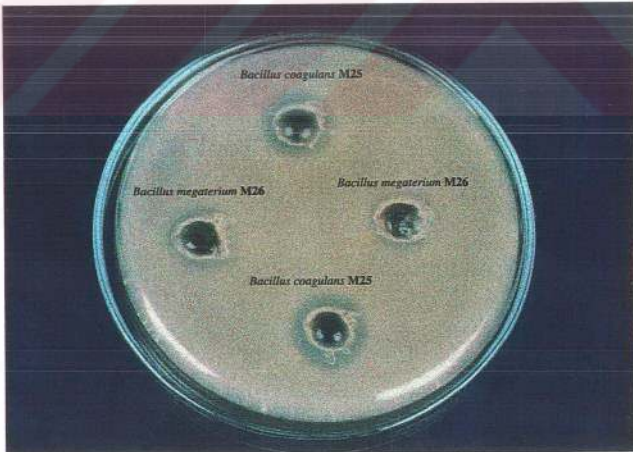
Şekil 4.25. *B. licheniformis* M27 ve *B. megaterium* M28 suşlarının *B. sphaericus* M3 üzerine olan etkilerinin görüntüsü



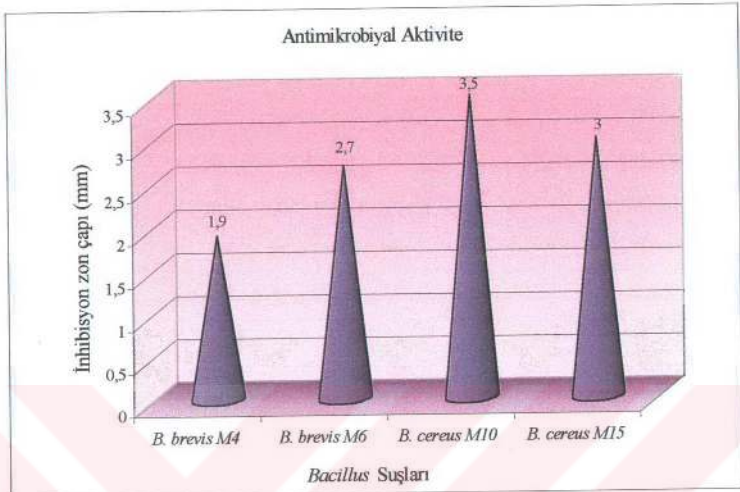
Şekil 4.26. *Bacillus* suşlarının *B. sphaericus* ATCC 14577 üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram



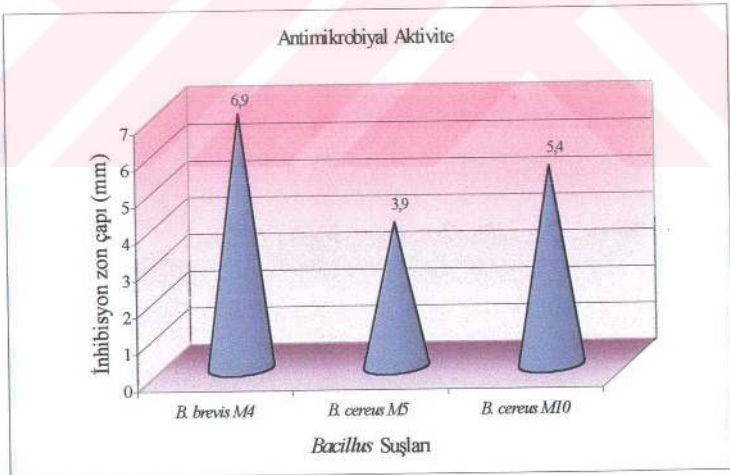
Şekil 4.27. *B. brevis* M4 ve *B. cereus* M5 suşlarının *B.sphaericus* ATCC 14577 üzerine olan inhibisyon etkilerinin görüntüsü



Şekil 4.28. *B. coagulans* M25 ve *B. megaterium* M26 suşlarının *B.sphaericus* ATCC 14577 üzerine olan etkilerinin görüntüsü



Şekil 4.29. *Bacillus* suşlarının *B. cereus* üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram



Şekil 4.30. *Bacillus* suşlarının *B. coagulans* M8 üzerine inhibisyon zon çaplarını gösterir histogram

4.7. *Bacillus* Suşlarının Proteolitik Aktiviteleri

Çalışmada kullanılan 32 adet *Bacillus* suşunun Skim Milk Agar (SMA) besiortamında proteolitik aktiviteleri, 3.2.14'de verildiği gibi tespit edilerek, incelenmiştir. Suşların proteolitik aktiviteleri Çizelge 4.18 ve Şekil 4.31'de verilmiştir. *B. sphaericus* M3 ve *B. sphaericus* ATCC 14577 suşları dışında, tüm suşlarda proteolitik aktivite gözlenmiştir. Bu suşlarda, proteolitik aktivite, 1,4-8,1 mm zon çapı arasında bulunmuş ve ortalama olarak 4,17 mm hesaplanmıştır. En yüksek proteolitik aktivite zon çapı, 8,1 mm ile *B. circulans* M32'de bulunmuştur. *B. circulans* M31 ve *B. circulans* M32 suşlarının SMA besiortamında proteolitik aktivite zonları Şekil 4.32'de görülmektedir.

Çizelge 4.18. *Bacillus* suşlarının proteolitik aktiviteleri

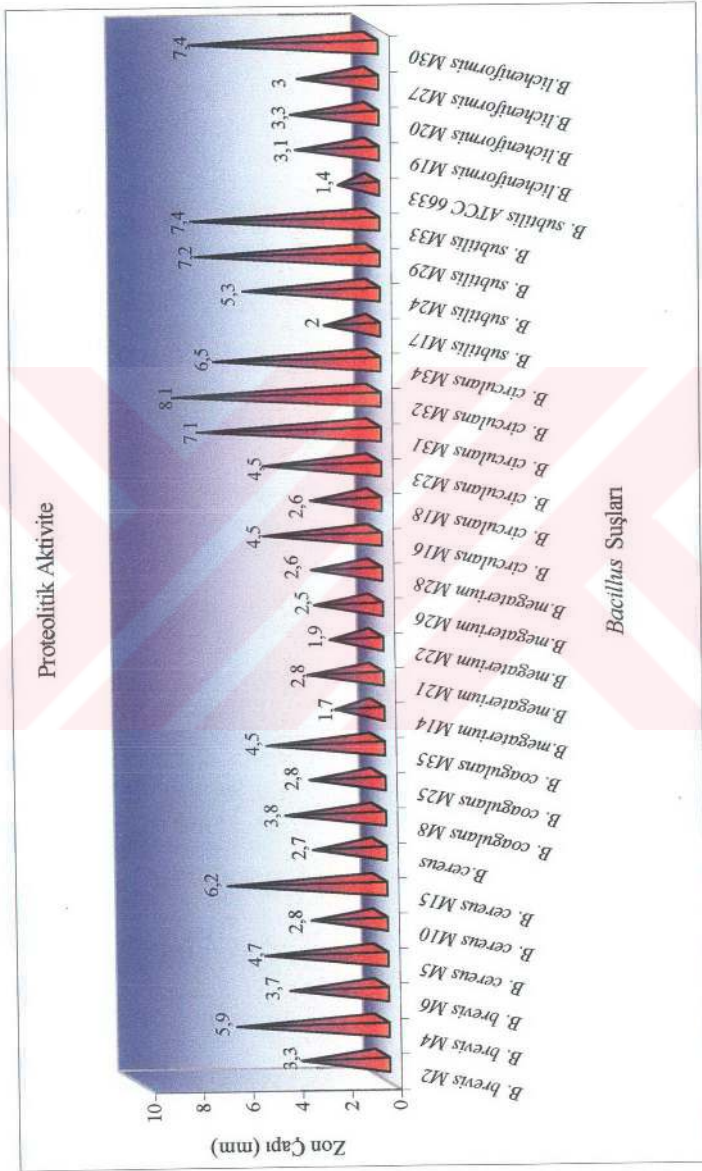
<i>Bacillus</i> Suşları	Proteolitik Aktivite (zon çapı, mm)
<i>B. brevis</i> M2	3,3±0,7
<i>B. brevis</i> M4	5,9±0,1
<i>B. brevis</i> M6	3,7±0,3
<i>B. sphaericus</i> M3	-
<i>B.sphaericus</i> ATCC 14577	-
<i>B. cereus</i> M5	4,7±0,5
<i>B. cereus</i> M10	2,8±0,2
<i>B. cereus</i> M15	6,2±0,4
<i>B.cereus</i>	2,7±0,3
<i>B. coagulans</i> M8	3,8±0,6
<i>B. coagulans</i> M25	2,8±0,2
<i>B. coagulans</i> M35	4,5±0,5
<i>B.megaterium</i> M14	1,7±0,1

Çizelge 4.18'in devamı. *Bacillus* suşlarının proteolitik aktiviteleri

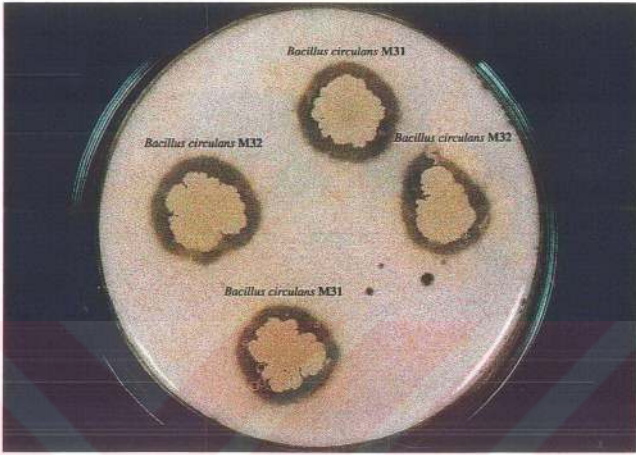
<i>Bacillus</i> Suşları	Proteolitik Aktivite (zon çapı, mm)
<i>B. megaterium</i> M21	2,8±0,0
<i>B. megaterium</i> M22	1,9±0,1
<i>B. megaterium</i> M26	2,5±0,3
<i>B. megaterium</i> M28	2,6±0,2
<i>B. circulans</i> M16	4,5±0,1
<i>B. circulans</i> M18	2,6±0,6
<i>B. circulans</i> M23	4,5±0,3
<i>B. circulans</i> M31	7,1±1,1
<i>B. circulans</i> M32	8,1±0,3*
<i>B. circulans</i> M34	6,5±0,7
<i>B. subtilis</i> M17	2,0±0,2
<i>B. subtilis</i> M24	5,3±0,1
<i>B. subtilis</i> M29	7,2±0,4
<i>B. subtilis</i> M33	7,4±1,2
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1,4±0,2
<i>B. licheniformis</i> M19	3,1±0,3
<i>B. licheniformis</i> M20	3,3±0,3
<i>B. licheniformis</i> M27	3,0±0,4
<i>B. licheniformis</i> M30	7,4±0,2
Ortalama	4,17**

* En yüksek proteolitik aktivite zon çapıdır.

**Ortalama proteolitik aktivite zon çapıdır.



Şekil 4.31. *Bacillus* suşlarının SMA besiyortamı üzerinde proteolitik aktivite histogramı



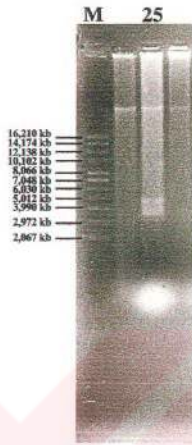
Şekil 4.32. *B. circulans* M31 ve M32 suşlarının SMA besiyortamı üzerinde proteolitik aktivite görüntüsü

4.8. *Bacillus* Suşlarında Plazmid DNA Profilleri

Çalışmada kullanılan 32 adet *Bacillus* suşunun plazmid DNA profilleri, 3.2.15'de verildiği gibi tespit edilerek, incelenmiştir. Suşlarda tespit edilen plazmid DNA sayı ve moleküler ağırlıkları Çizelge 4.19'da verilmiştir. Kullanılan 32 *Bacillus* suşunun yalnız 6 adedinde plazmid DNA tespit edilmiş, diğer suşlarda ise plazmid DNA'ya rastlanmamıştır. *B. brevis* M2, *B. brevis* M6, *B. sphaericus* M3, *B. sphaericus* ATCC 14577, *B. cereus* M5 ve *B. coagulans* M25 suşlarında plazmid DNA'nın varlığı gözlenmiştir. Bu suşlardaki plazmid DNA sayıları 1-2 arasında bulunmuş, bunların moleküler ağırlıkları 3,9-31,7 kb arasında hesaplanmıştır. *Bacillus coagulans* M25 suşunun jel elektroforez görünümü Şekil 4.33'de verilmiştir.

Çizelge 4.19. Bazı *Bacillus* suşlarında tespit edilen plazmid DNA sayı ve moleküler ağırlıkları

<i>Bacillus</i> Suşları	Plazmid DNA Sayısı	Plazmid DNA Moleküler Ağırlığı (kb)
<i>B. brevis</i> M2	1	31,2
<i>B. brevis</i> M6	1	20,4
<i>B. sphaericus</i> M3	1	31,7
<i>B. sphaericus</i> ATCC 14577	2	31,3 ve 27,6
<i>B. cereus</i> M5	1	24,1
<i>B. coagulans</i> M25	2	4,7 ve 3,9



Şekil 4.33. *B. coagulans* M25 suşunun plazmid DNA profili

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Çalışmada kullanılan *Bacillus* suşlarının 29 adedi, Ankara'nın farklı yerlerinden alınan toprağın ısıtılması ve seyreltilmesi sonucunda izole edilmiştir (Çizelge 4.1 ve 4.2) Bu suşların tanımlanması, çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal testler yardımıyla yapılmıştır (Çizelge 4.3, Çizelge 4.4). Suşların, sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile toplam hücre protein profilleri çıkarılmış ve bunlar karşılaştırılarak, aralarındaki benzerlik ve farklılıklar incelenmiştir (Şekil. 4.4 - 4.7).

Bacillus cinsi bakterilerinin karbonhidratlardan asit oluşturulması gibi biyokimyasal özellikler açısından çeşitlilik gösterebileceği ve bu gibi özelliklere bakılarak cins içinde bazı türlerin gruplanabileceği bildirilmiştir (Priest, 1993). Ancak, yapılan çalışmalarda aynı türün suşları arasında da farklılıklar olabileceği gösterilmiştir (Asatani and Kurahashi, 1977; Giffel et al., 1997). Çalışmamızda, suşların şeker testlerinden elde edilen sonuçların da genel olarak bu gruplamalara uyacak şekilde görünüm sergilediği, ancak bazı suşların farklı sonuçlar da verebildiği gözlenmiştir.

Bacillus cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında, aerobik, Gram-pozitif, çubuk ve endospor oluşturmaları önemli yer tutmasına rağmen, türlerin ayrımının güç olduğu ve yanlış tanımlamalar yapılabileceği bildirilmektedir. Yüksek derecedeki heterojenitenin standart testler ile tanımlamayı zorlaştırdığı ifade edilmektedir (Priest, 1993; Rosovitz et al., 1998). Cinsin sahip olduğu geniş fenotipik çeşitliliğin aynı zamanda geniş bir filogenetik dağılıma neden olduğu ve gelişmiş moleküler tekniklerle elde edilen moleküler kriterlerin organizmaların gruplandırılmasında esas yeri teşkil ettiği belirtilmiştir (Rosovitz, et al., 1998).

İzole edilen bir çok suşun birbiriyle karıştırılması, suşlar arasında ayırım geliştirmek ve suşların teşhisinin doğruluğunu ispatlamak zorunluluğunu gündeme getirmiştir. Ancak, sınıflandırma için geliştirilen morfolojik ve biyokimyasal testler ve fenotipik özellikler suşların ayrımı için yeterli olmadığından değişik metotlar geliştirilmiştir (Bağcı vd., 1991).

Toplam hücre proteininin, SDS-PAGE ile çalışılması sayesinde, protein yapısındaki farklar belirlenerek, türler içi veya türler arası benzerlik ve farklılıkların ortaya konmasının mümkün olduğunu bildiren bir çok araştırmacı, mikroorganizmaların sınıflandırılmasında, özellikle aynı türler veya alt türlere ait suşların hücresel proteinlerinin karşılaştırılması ve ayrımı için duyarlı bir teknik olan protein jel elektroforezinin kullanılabileceği belirtilmiştir (Çökmüş and Yousten, 1994; Kämpfer, 1995; Kishore et al., 1996; Matar et al., 1996; Cash, 1998).

SDS-PAGE ile toplam hücre protein profili çıkarılması sayesinde, farklı molekül ağırlığındaki proteinlerin tayini ve karşılaştırılması ile hem suşların akrabalıklarını (Matar et al., 1996; Swiecicka, 2001) hem de belirli özellikleri denetleyen proteinlerin (Çökmüş et al., 2000; Jobin et al., 2002) tespiti yapılabilmektedir.

Jobin ve arkadaşları (2002), *B. cereus* TZ415 izolatının farklı pH'larda ve farklı büyüme evrelerinde oluşan aside dayanıklılık cevaplarını hücrelerin toplam hücre protein profillerine göre incelemişlerdir. Araştırmacılar, geç durgun fazda aside tolerans düzeyinin en yüksek seviyeye ulaştığını ve bunun toplam hücre proteini profilinde değişiklikler ile belirlendiğini bildirmişlerdir.

Çökmüş ve arkadaşları (2000), SDS-PAGE analizi yaparak, UV ile muamele edilmiş toksik madde üreten *B. sphaericus* suşlarındaki larvisidal aktiviteyi koruyan bazı maddelerin etkilerini, moleküler ağırlıkları bilinen toksik protein bantlarının varlığını aramak suretiyle tespit etmişlerdir.

Çalışmada, *Bacillus* suşlarının tanımlanmasında klasik biyokimyasal ve fizyolojik testlerle birlikte suşların elektroforetik görünüşleri de incelenerek, bu suşların birbirleriyle benzerlik ve farklılıkları karşılaştırılmıştır.

B. licheniformis ve *B. megaterium* suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri Şekil 4.4'de görülmektedir. *B. licheniformis* suşlarının elektroforetik yönden birbirine benzerlik gösterdikleri, ancak bazı bantlar yönünden de birbirlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. *B. licheniformis* M19 ve M27 suşlarının tümüyle benzer elektroforetik görünüme sahip olması dikkat çekerken, *B. licheniformis* M20 ve M30 suşlarının da birbirlerine benzer oldukları gözlenmiştir.

Ancak *B. licheniformis* M30 suşu , moleküler ağırlığı yaklaşık 40 kD olan 2 nolu protein bandı ile 35 kD ağırlığında olan 3 nolu protein bantları yönünden *B. licheniformis* M20 suşundan ayrılmıştır. Ayrıca, bu iki suş içerdikleri 1 nolu, 23 kD ağırlığındaki protein bandı ile de *B. licheniformis* M19 ve M27 suşlarından ayrılmışlardır. Ancak, tüm *B. licheniformis* suşlarında gözlenen yaklaşık 140 kD ağırlığındaki bandın ortak bant olması nedeniyle, bu protein bandının türe özgü olabileceği düşünülmüştür.

B. megaterium 'a ait M14, M21, M22, M26, M28 suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam protein profilleri incelendiğinde (Şekil 4.4), aynı türe ait olan suşların protein bantları yönünden benzer elektroforetik görünümüne sahip oldukları tespit edilmiştir. İzolatlardan M14 ve M21 suşlarının aynı protein profiline sahip olması dikkat çekmiştir. Bu suşlar yalnız, yaklaşık 114 kD ağırlığındaki 4 nolu protein bandı yönünden diğer suşlardan ayrılmışlardır.

B. subtilis M17, M24, M 29, M33, ATCC 6633 suşları ile *B. brevis* M2, M4, M6 suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri Şekil 4.5'de verilmiştir. *B. subtilis* suşları ortak bantlar içermelerine rağmen, elektroforetik yönden heterojen bir yapı göstermişlerdir. *B. subtilis* M29 ve referans suş olan *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarının birbirlerine benzer protein profiline sahip oldukları dikkat çekmiştir. Ancak M29 suşunun yaklaşık 40 kD ağırlığındaki 6 nolu protein bandı ile, ATCC 6633'den ayrıldığı gözlenmiştir. *B. subtilis* türüne ait olan diğer suşların referans suş olan *B. subtilis* ATCC 6633 ile ortak bantlar içerdikleri, ancak özellikle M17, M24 ve M33 suşlarının 5 numara ile gösterilen ve sırasıyla 150, 130, 125, 110 ve 96 kD ağırlığındaki protein bantları ile 7 numaralı 26 kD ağırlığındaki protein bandı nedeniyle, elektroforetik yönden farklı bir protein profiline sahip oldukları anlaşılmıştır. Bu suşların farklı olduğu düşünülmüştür.

B. brevis M2, M4, M6 suşlarının protein profillerinin birbirine benzerlik gösterdiği, ancak bazı bantlar yönünden ayrıldıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.5). M2 suşunda tespit edilen yaklaşık 36 kD ağırlığındaki 8 ile işaretlenmiş protein bandı M4 ve M6'da görülmezken; M4 ve M6 suşlarında gözlenen 24,5 kD ağırlığındaki 9 nolu bandın da M2 suşunda bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda, *B. brevis* M4 ve

M6'nın birbiriyle benzer, M2'nin ise bunlardan farklı bir suş olabileceği düşünülmüştür.

B. cereus M5, M10, M15 ve referans suş olan *B. cereus* suşları ile *B. coagulans* M8, M25, M35 suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri Şekil 4.6'da verilmiştir. *B. cereus* M5, M10, M15 ve referans *B. cereus* suşlarının ortak bantlar içeriyor olmalarına rağmen, elektroforetik yönden heterojen bir yapı gösterdikleri gözlenmiştir. Suşların protein profilleri incelendiğinde, ortak protein bantları içerdikleri, ancak M5, M10 ve M15 suşlarının referans suş olan *B. cereus* suşunda bulunan bazı bantlar yönünden birbirlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. M5, M10 ve M15 suşlarında bulunan 10 numaralı 23 kD ağırlığındaki protein bandının *B. cereus* suşunda bulunmadığı gözlenmiştir. Buna karşılık *B. cereus* suşunda bulunan 11 numaralı 108 ve 97 kD ağırlığındaki bantlar ile 13 nolu 28 kD ağırlığındaki bantların da *B. cereus* M5, M10 ve M15 suşlarında bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle M5, M10 ve M15 suşlarının farklı olduğu düşünülmüştür. Bunun yanı sıra, referans *B. cereus* suşuna benzerlik gösteren M5 ve M15 suşlarının protein profillerinin benzer olduğu, M10 suşunun ise 12 numaralı 50 ve 42 kD ağırlığındaki bantlar yönünden bu suşlardan farklı olduğundan, ayrı bir suş olduğu düşünülmüştür.

B. coagulans M8, M25, M35 suşlarının protein profillerinin birbirine benzerlik gösterdiği, ancak bazı bantlar yönünden ayrıldıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.6). M35 ve M8 suşlarında gözlenen 60 ve 52 kD ağırlığındaki 14 numaralı bantların M25 suşunda bulunmadığı, buna karşılık M25 suşunda tespit edilen yaklaşık 66 kD ve 56 kD ağırlığındaki 15 nolu protein bantlarının da M8 ve M35 suşlarında bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu durumda, birbiriyle aynı protein profili gösteren *B. coagulans* M8 ve M35'in aynı, M25'in ise farklı bir suş olabileceği düşünülmüştür.

Matar ve arkadaşları (1996), toplam hücre protein profili ile, hastalık etmeni olan *B. cereus* türünün alt tiplendirmesi çalışmalarında, 58 adet *B. cereus* izolatının toplam hücre proteininin heterojen bir yapı gösterdiğini ve %38 oranında bir benzerliğe sahip olduklarını belirtmişlerdir.

B. sphaericus M3 ve referans suş olan *B. sphaericus* ATCC 14577 suşları ile *B. circulans* M16, M18, M23, M31, M32 ve M34 suşlarının SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profilleri Şekil 4.7’de verilmiştir. *B. sphaericus* M3 ve *B. sphaericus* ATCC 14577 suşlarının toplam protein profilleri incelendiğinde, bu suşların protein bantları yönünden benzer elektroforetik görünüme sahip oldukları tespit edilmiştir. Ancak M3 izolatında varolan 16 numaralı sırasıyla 130, 125, 116 ve 102 kD ağırlığındaki protein bantları, 17 numaralı 58 ve 49 kD ağırlığındaki protein bantları ve 18 numaralı 23 kD ağırlığındaki protein bantlarının, ATCC 14577 suşunda bulunmadığı görülmüştür. Bunun yanı sıra M3 suşunun, *B. sphaericus* ATCC 14577 suşunda bulunan yaklaşık 110 kD ağırlığındaki 19 nolu protein bandı içermemesi de dikkat çekmiştir. M3 suşunun farklı bir suş olabileceği düşünülmüştür. Çökmüş ve Yousten (1994), 13 adet sivrisinek patojeni ve 6 adet patojen olmayan *B. sphaericus* suşunun toplam protein profilini karşılaştırarak, patojen suşların farklı protein yapısına sahip olduğunu ifade etmişlerdir.

B. circulans M16, M18, M23, M31, M32 ve M34 suşlarının, ortak bantlar içeriyor olmalarına rağmen, elektroforetik yönden heterojen bir yapı gösterdikleri gözlenmiştir (Şekil 4.7). Suşların toplam hücre protein profilleri incelendiğinde M23, M31 ve M32 suşlarının benzer elektroforetik yapıya sahip oldukları gözlenmiştir. *B. circulans* M16, M18 ve M34 suşlarının ise, bu suşlarla ortak protein bantları içermelerine rağmen, bazı bantlar yönünden farklılık gösterdikleri gözlenmiştir. M23, M31 ve M32 suşlarında bulunan 20 numaralı 120, 105, 93, 84 kD ağırlığındaki bantlar, 21 numaralı 49 ve 41 kD ağırlığındaki bantlar ve 22 numaralı 35 ve 32 kD ağırlığındaki bantların M16, M18 ve M34 suşlarında bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu suşların M23, M31 ve M32’den farklı suşlar olduğu düşünülmüştür. Bunun yanı sıra, M18, M23, M31 ve M32 suşlarında gözlenen 23 numaralı 27 ve 25 kD ağırlığındaki bantların M16 ve M34 suşlarında bulunmadığı ve M18 suşunun ayrı bir suş olup, M16 ve M34 suşlarının ise ayrı suşlar olabileceği düşünülmüştür. 47 adet *B. circulans* suşunun SDS-PAGE ile elde edilen toplam hücre protein profili ile, API testlerinden alınan biyokimyasal karakteristikleri karşılaştıran Swiecicka (2001), suşların protein profillerinin %78 oranında birbirine benzediğini bildirmiştir.

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

Son yıllarda, petrolden elde edilen sentetik polimerlerin yerine, biyolojik olarak parçalanabilen polimerlerin üretimi önem kazanmış ve petrol kökenli polimerlerin yerini almalarına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır (Page, 1992b; Beyatlı, 1996). PHB ve kopolimerleri, paketlenme, gıda, tıp ve tarım gibi alanlarda çok geniş uygulama potansiyeli göstermektedir (Lee, 1996). PHB monomerlerinin biyoyumlu olması ve insan vücudunda doğal olarak bulunması sebebiyle de, çevre sağlığının yanı sıra insan sağlığı açısından da önemli avantajlara sahiptir (Holmes, 1985). Son yıllarda, biyoparçalanabilir ve biyoyumlu bir materyal olan PHB'nin nitelikli ve ucuz eldesi ile ilgili yapılan çalışmalarla, bu biyoplastiğe olan ticari ilgi de artmaktadır (Dave, 1996; Braunegg, 1998).

PHA'ların varlığı ile ilgili yapılan ilk çalışmalarda, topraktan izole edilen *Bacillus megaterium*'da, otoliz sırasında β -hidroksibütirik asit monomerleri salgılandığı ve bunların kaynağının poli- β -hidroksibütirik asit olduğu ortaya konmuştur (Braunegg, 1998).

Bacillus 'ların da dahil olduğu 75 farklı cins bakteri tarafından sentezlenebilen, hücre içi depo granülü olan PHB'nin (Mergaert, 1993), bazı bakterilerin sınıflandırılmasında da kullanılabileceği bildirilmektedir (Huisman, 1989).

PHB sentezlediği bilinen *Bacillus* türleri arasında *B. cereus* (Dunlop and Robards, 1973; Chen et al., 1991; Labuzek and Radecka, 2001), *B. circulans* (Chen et al., 1991; Nam and Ryu, 1985), *B. megaterium* (Findlay and White, 1983; Chen et al., 1991, Kato, et al., 1992; McCool et al., 1996; Aslım vd. 1998; Law et al., 2001; Gouda et al., 2001), *B. sphaericus* (Chen et al., 1991; Aslım vd. 1998; Mercan ve Beyatlı, 2001), *B. subtilis* (Chen et al., 1991; Aslım vd. 1998), *B. thuringiensis* (Nickerson et al., 1981; Benoit et al., 1990; Chen et al., 1991; Mignone and Avignone-Rossa, 1996; Aslım vd. 1998), *B. mycoides*, *B. licheniformis*, *B. macerans*,

B. amyloliquefaciens, *B. laterosporus* (Chen et al, 1991), ve tür ayırımına gidilmemiş geniş bir *Bacillus* spp. suşu dağılımı (Dave, 1996; Wu et al., 2001) yer almaktadır.

Çalışmamızda, *B. brevis*, *B. sphaericus*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. megaterium*, *B. circulans*, *B. subtilis* ve *B. licheniformis* oldukları teşhis edilen *Bacillus* cinsine ait 8 farklı türün PHB sentezlediği tespit edilmiştir.

Araştırmamızda PHB üretimleri NB besi ortamında araştırılan *Bacillus* suşlarının, hücredeki PHB içeriklerinin ortalama olarak 0,051 g/l olduğu, bunun da hücre kuru ağırlığının %11,50'sini oluşturduğu bulunmuştur. Suşların hücre kuru ağırlıklarına göre PHB miktarlarının 0,004-0,160g/l, ve PHB yüzde verimlerinin de %1,06-%41,67 arasında olduğu tespit edilmiştir. %41,67 ile en yüksek PHB verimine sahip suş olan *B. brevis* M6 suşunu, %27, 53 ile *B. cereus* M5 suşu izlemiştir. % 1,06 ile en düşük PHB verimine sahip olan suşun ise *B. licheniformis* M30 suşu olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda test bakterileri olarak kullanılan *B. sphaericus* ATCC 14577, *B. cereus* ve *B. subtilis* ATCC 6633 suşlarının sırasıyla %6,37; %16,93 ve %4,07 ile değişik oranlarda daha az PHB ürettikleri bulunmuştur (Çizelge 4.5, Şekil 4.8).

Yapılan araştırmalarda, *Bacillus* cinsine ait tür ve suşların farklı oranlarda PHB üretim kapasitesinde oldukları bildirilmiştir. Farklı *Bacillus* türleri üzerinde yapılan çalışmalarda hücre kuru ağırlığına göre, Lach ve arkadaşları (1990) %16 PHB yüzde verimi tespit ederlerken, Chen ve arkadaşları (1991) %5-20, Kato ve arkadaşları (1992) %20, Dave ve arkadaşları (1996) %3-70, Aslın ve arkadaşları (1998) %6-48, Beyatlı ve Aslın (1999) %1-78; Wu ve arkadaşları (2001) %25-35, Labuzek ve Radecka (2001) %1-25, Mercan ve Beyatlı (2001) %5-25, Law ve arkadaşları (2001) ise %10-19, PHB verimine rastlamışlardır. Çalışmamızda, bazı *Bacillus* suşlarının PHB üretim miktarları, bu değerlerin büyük kısmından daha yüksek bulunmuştur.

Alcaligenes eutrophus'un hücre kuru ağırlığının %80'inden fazlasını PHB olarak biriktirebildiği, Madison ve Huisman (1999) tarafından bildirilmiştir. Başka bir çalışmada da, *A. latus*'un %40 oranında PHB ürettiği tespit edilmiştir (Ramsay et al., 1990). Değişik bakteri grupları ile yapılan çalışmalarda, *Azotobacter beijerinckii*

bakterisinin %50'den fazla (Borman et al., 1998), *Caulobacter crescentus* bakterisinin, %18 (Qi and Rehm, 2001), *Pseudomonas extorquens* bakterisinin ise % 27 (Karaboz ve Umay, 1994) PHB ürettiği tespit edilmiştir.

Araştırmacılar, PHB seviyesinin, besiyeri içeriği ve kullanılan substratlar gibi bazı faktörler tarafından denetlendiğini ve PHB üretiminin, bakteriler için uygun üreme ortamı sağlandığında arttığını belirtmektedirler (Chen et al., 1991; Beyatlı, 1996). Bu nedenle, PHB ile ilgili olarak çalışmaların çoğunu, yeni organizmaların üretim yeteneğinin ortaya çıkarılması olduğu kadar, onlardan en fazla polimer üretimini sağlayacak olan substratların araştırılması da oluşturmaktadır. Biyoteknolojik yöntemler ile, kullanılan substratların dağılımının genişletilmesi ve PHB üretimi iyileştirilmeye çalışılmaktadır. Maliyeti düşüren bu uygulamalar, biyoparçalanabilir plastik materyallerin kullanımını da arttırabilir (Braunegg, 1998).

Çalışmamızda, bu amaçla, suşlar arasında en yüksek doğal PHB veriminin elde edildiği *B. brevis* M6 (%41,67) suşunda farklı karbon, fosfor ve azot kaynaklarının PHB üretimine etkisi araştırılmıştır. Farklı karbon kaynakları olarak, *Bacillus*'ların kullandığı bilinen, sodyum asetat ve sitrat; fosfat kaynakları olarak potasyumfosfat ve potasyum-2-fosfat; azot kaynakları olarak da D-L-triptofan, amonyum sülfat ve sodyum nitrat kullanılmıştır. Bu ortamlarda *B. brevis* M6 suşunun PHB üretimi saptanmıştır.

Karbon kaynağı olarak sodyum asetat içeren ortamda PHB üretiminin, sitrat içeren ortamdan çok daha düşük olduğu bulunmuştur. Bakterinin sodyum asetat içeren ortamda PHB üretimi %2,39 iken, sitrat içeren ortamdaki PHB üretimi %51,85 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.9).

Braunegg ve arkadaşlarının (1998) bildirdiğine göre, Macrae ve Wilkinson (1958) çalışmalarında, *B. cereus* ve *B. megaterium*'daki PHB üretimini, ortamdaki asetat ve asetil CoA varlığına bağlamışlardır. Dawes ve Senior (1973) ise, hücrede PHB biriktirme şartlarının yüksek NADH, yüksek asetil-CoA ve düşük serbest CoA oranları ile ilgili olduğunu bildirmişlerdir (Dawes, 1988).

Araştırmalar, hem TCA döngüsü hem de PHB sentezinde kullanılabilen Asetil CoA bileşiğinin, dengeli büyüme şartlarında, asetil-CoA açiltransferaz enziminin inhibe olması nedeniyle doğrudan TCA döngüsünde yer aldığını ve PHB sentezine katılmadığını göstermektedir. Oysa sınırlandırılmış, yani dengesiz şartlarda NADH oksidaz aktivitesinin azalmasına bağlı olarak NADH miktarının artması ve sitrat sintaz enziminin inhibe olması ile, Asetil CoA'nın PHB biyosentezinde kullanılmasına neden olduğu bildirilmektedir (Page and Knosp, 1989).

Page ve Knosp (1989), NADH oksidaz mutantlı *A. vinelandii* UWD suşunun, glukoz ve yanısıra amonyum asetat içeren besi ortamında, hücre kuru ağırlığına oranla %65 PHB verimine ulaştığını bildirmektedirler.

PHB granülleri ile sintaz enzimi polimerizasyonu arasındaki ilişki yıllardır bilinmektedir. Sınırlı karbonlu ortamda gelişme sırasında, sintaz enzimi çözünmüş formda oluşmaktadır. Azot azlığında ise PHB sintaz oluşmaktadır. Çözünmüş sintazın bu şartlar altında hızla tükenmesi PHB granülleri ile ilişkilidir (Anderson and Dawes, 1990).

Chen ve arkadaşları (1991) ise, *Bacillus* türleri ile yaptıkları çalışmalarında, sodyum asetatı karbon kaynağı olarak kullandıkları azotsuz besiyerindeki PHB veriminin, glukoz içeren azotsuz besiyerindeki verimlere oranla, tüm suşlarda artış gösterdiğini ve *B. megaterium* DSM 90 suşunda %47,2'lik verime ulaşıldığını bildirmişlerdir.

Benoit ve arkadaşları (1990), *B. thuringiensis*'in gelişimi sırasındaki glukoz kullanımını araştırdıkları çalışmalarında, glukozun asetata ve daha sonra da asetoina dönüştüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar, asetat oluşmaya başladıktan sonra kültürde PHB'nin sentezlendiğini ve PHB oranının asetat tüketimi boyunca arttığını izlemişlerdir. Ancak, asetatın aynı zamanda asetoin oluşumu için de kullanıldığını bildirmişlerdir. Ayrıca, ortamda asetoinin indirgenmesi ile oluşan 2-3-bütandiol oluşumuna da rastlanmıştır. Araştırmacılar, asetatın yalnız PHB üretiminde kullanılmadığını, asetoin oluşumu veya PHB sentezinde gerekli NADH₂'lerin kullanıldığı indirgenme reaksiyonlarında da tüketildiğini açıklamışlardır.

Çalışmamızda, asetatin fazla miktarda asetil-CoA oluşumuna neden olabileceği ve bu bileşiğin PHB sentezinde kullanılmayıp solunum ve enerji kazanımı gibi diğer metabolizmal faaliyetlerde kullanılabilmesi nedeniyle, elde edilen PHB veriminin düşük olduğu düşünülmüştür. Asetat kullanımında tespit edilen hücre kuru ağırlığının oldukça yüksek olması da, bu görüşü desteklemektedir.

Farklı karbon kaynaklarının kullanımı ile yapılan çalışmalarda, bazı *B. sphaericus* suşlarında, farklı beef ekstrakt ve sodyum asetat konsantrasyonlarının (%0,2; %0,5; %1) PHB üretimine olan etkisi incelenmiştir. Suşların sodyum asetat içeren ortamdaki PHB üretimlerinin, kontrol grubuna göre düşük olduğu beef ekstrakt besiyortamında ise kontrol grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak çalışmada, beef ekstrakt miktarının artması ile yüzde PHB veriminin azaldığı belirlenmiştir (Mercan ve Beyatlı, 2001).

Dave ve arkadaşları (1996), aktif çamurda karbon kaynağı olarak asetat kullanımında, farklı asetat oranlarının PHB düzeyine etkisini denemişler ve asetatin ortamdaki oranı arttıkça PHB oranının azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, en yüksek PHB birikiminin, %0,1 asetat varlığında, %26 olarak gerçekleştiğini tespit etmişlerdir.

Page ve Knosp (1989), asetat ve glukozu azot kaynakları ile beraber kullandıkları çalışmalarında, *Azotobacter vinelandii* UWD suşunda glukoz ve amonyum sülfat bulunan ortamda, asetat ve amonyum sülfat bulunan ortamdan çok daha fazla miktarda PHB sentezlendiğini tespit etmişlerdir.

Hoffmann ve arkadaşları (2000) ise, çeşitli *Pseudomonas* bakterilerinin asetat gibi basit karbon kaynaklarında üretildiğinde, orta zincir uzunluğunda, 3-hidroksi yağ asitlerinden şekillenen (C6-C14) PHA biriktirme yeteneğinde olduğunu belirtmişlerdir.

PHB biyosentezinin başında iki asetil-CoA molekülü birleşerek asetoasetil-CoA'yı oluşturduğu bilinmektedir. Ancak, asetil-CoA'nın TCA döngüsünde de kullanılıyor olması, bu molekül için rekabet edilmesine neden olmaktadır. Bununla beraber, ortamdaki serbest CoA molekülüne bağlı olarak, fazla miktardaki CoA'nın asetil-

CoA'yı TCA döngüsüne dahil etmesi, PHB üretiminin düşük olmasına yol açabileceği bildirilmektedir (Doi et al., 1988).

Çalışmamızda, sitrat kullanımının PHB üretimini %41,67'den %51,85'e yükseltmesi, ortama fazla miktarda katılan sitrat nedeniyle asetil-CoA bileşiğinin önemli oranda PHB yapımında kullanılabilmesine neden olduğunu düşündürmektedir.

Braunegg ve arkadaşlarının (1998) bildirdiğine göre, Nakamura ve arkadaşları (1992) *A. eutrophus* ile yaptıkları çalışmalarında, sitratın yanısıra kullandıkları 4-hidroksi bütirik asit ve amonyum sülfatın saf PHB sentezine izin verdiğini ve %70 mol olan oranın %100 mol miktarına yükseldiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar, hücre kuru ağırlığının %2'sini teşkil eden PHB miktarının, ortamdan amonyum sülfat çıkarıldığında %21'e yükseldiğini de belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, *B. brevis* M6 suşunun her iki fosfat kaynağında da PHB ürettiği ancak, üretim miktarlarının düşük olduğu bulunmuştur. Bazal besiyerine, fosfat kaynağı olarak potasyum fosfat ilave edildiğinde, % 1,52 PHB üretim yüzdesi ve potasyum-2-fosfat ilave edildiğinde ise % 6,5 PHB üretim yüzdesi tespit edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 4.10). *B. brevis* M6 suşunun, fosfat kaynakları arasında en yüksek PHB üretim miktarı ve yüzdesine potasyum-2-fosfat içeren besiyerinde olduğu gözlenmiştir. Genel olarak fosfat kaynaklarındaki PHB üretimlerinin düşük olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.7, Şekil 4.10).

Daniel ve arkadaşları (1992), *Pseudomonas* 135 suşunda, ortamda fosfat eksikliği durumunda, %34,5 PHB üretimine ulaşıldığını bildirmişlerdir. Ancak fosforun canlılık olaylarında aldığı önemli rol nedeniyle, çok düşük seviyelerde kullanımının aynı etkiye neden olmayacağını da belirtmişlerdir. Dave ve arkadaşları (1996) ise, aktif çamurda fosfor oranı yükseldikçe, gelişmenin arttığını fakat PHB birikiminde azalma olduğunu kaydetmişlerdir.

Araştırmalarda, farklı çevresel şartların, bazı organizmalarda benzer etkilere yol açabileceği ve bakterilerde PHB'nin yüksek miktarda sentezinin oksijen, azot ve fosfor gibi maddelerin sınırlandırılması ile artabileceği bildirilmektedir (Lillo and Rodriguez-Valera, 1990; Dave et al., 1996; Brandl et al., 1991; Daniel et al., 1992).

Lillo ve Rodriguez-Valera (1990), halobakterlerle yaptıkları çalışmalarında, fosfat sınırlamasının PHB birikiminin yüksek oranlara çıkmasını sağladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, potasyum fosfat kullandıkları besi ortamında geliştirilen *Haloferax mediterranei* bakterisinin, hücre kuru ağırlığının %60'ı oranında PHB ürettiğini tespit etmişlerdir. %0,00375 gibi düşük fosfat konsantrasyonunda bakterinin daha iyi PHB üretimi sağlandığını, ancak bu oranın altına inildiğinde PHB üretiminin azaldığını da belirtmişlerdir.

Farklı azot kaynakları kullanılarak bölüm 3.2.8'de belirtildiği gibi hazırlanan ortamlarda geliştirilen *B. brevis* M6 suşunun D-L- triptofan ortamda, % 2,93 PHB üretim yüzdesi, amonyum sülfat ortamda %19,13 PHB üretim yüzdesi ve sodyum nitrat ortamda ise %60 oranında PHB üretmiştir (Çizelge 4.8, Şekil 4.11). Bu suşun tüm azot kaynaklarında farklı miktarda PHB ürettiği gözlenmiştir. En yüksek PHB üretim miktarı ve yüzdesinin sodyum nitrat içeren besi ortamında elde edildiği ve PHB üretim yüzdesinin %60 olduğu ve bu azot kaynağında diğer azot kaynaklarına kıyasla çok daha yüksek düzeyde PHB sentezlediği bulunmuştur.

Doi ve arkadaşları (1988), *A. eutrophus*'da ortama fazla miktarda azot ilave edildiğinde, asetil CoA'yı ya TCA döngüsüne veya aminoasit oluşumuna yönelteceğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, serbest CoA molekülleri birikiminin asetil-CoA'nın asetoasetil-CoA'ya dönüşümünü engellediğini, oysa karbon kaynağı olarak bütirik asit kullanıldığında serbest CoA moleküllerinin bütirik asidin dönüşümü sırasında asetil-CoA'nın ve dolayısıyla PHB'nin oluşmasını desteklediğini tespit etmişlerdir. Araştırmada, karbon kaynağının çeşidine göre azot miktarının artması veya azalmasının PHB üretimini farklı etkileyeceği bildirilmiştir.

Kato ve arkadaşları (1992), *B. megaterium*'un özellikle süktroz ve amonyum klorür içeren besiyerinde PHB verimini arttırdığını ve hücre kuru ağırlığının %24'ü kadar PHB ürettiğini bildirmişlerdir. Lillo ve Rodriguez-Valera (1990), azot kaynağı olarak amonyum klorür ve maya özütünün, halobakterler üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, bu maddelerin oranları düşürüldüğünde PHB miktarının azaldığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmalarında azot sınırlamasının PHB sentezini azalttığını açıklamışlardır.

Farklı azot kaynağı olarak proteaz pepton kullanılan bir başka çalışmada ise, *B. subtilis* K1 suşunda % 78,69 ve *B. megaterium* Y6 suşunda % 77 oranında PHB verimi saptanmıştır (Beyatlı ve Aslım, 1999).

Bonartseva ve arkadaşları (1994), *Rhizobium* suşlarında ortamda süktroz ve nitrat bulunmasının PHB verimini %65 oranına yükselttiğini belirtmişlerdir. Buna rağmen, Daniel ve arkadaşları (1992), *Pseudomonas* 135 suşunun amonyumu sınırlı ortamda hücre kuru ağırlığının %55'i kadar PHB depo ettiğini tespit etmişlerdir.

Brandl ve arkadaşları (1991) ise, fototrofik bir bakteri olan *Rhodobacter sphaeroides* bakterisinin, azotu sınırlı şartlar altında hücre kuru ağırlığının %70'i kadar polimer üretimi yapabileceğini bildirmişlerdir.

Beaulieu ve arkadaşları (1995), azot kaynağı olarak amonyum kullanılmasının, hücre kütlelerinin yoğunluğunu arttırması nedeniyle, PHB biriktirilmesi sırasında, ihtiyaç duyulan, önemli bir etken olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar, ortamdaki amonyum iyonu konsantrasyonunun düşürülmesinin, PHB miktarında artışa yol açmadığını, fakat çeşitli amonyum tuzlarının PHB veriminde farklı ve yüksek sonuçlara neden olduğunu tespit etmişlerdir. Özellikle en yüksek PHB verimine neden olan amonyum sülfatın, amonyum iyonlarının yarattığı karşılıklı iyon geçişleri ile etkide bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Araştırmalar, bakterileri azotu PHB üretiminde kullanmaları açısından iki gruba ayırmaktadır. Buna göre, birinci grup bakterilerin, polimer sentezleyebilmeleri için ortamda mutlaka N, P ve Mg gibi maddelerin bulunması gerektiği gösterilmiştir. *Alcaligenes latus*, *Azotobacter vinelandii*'nin mutant suşu, *Pseudomonas resinovorans* ve rekombinant *E.coli* gibi bakterilerin yer aldığı ikinci gruptakilerin ise, polimer sentezi için bu tip sınırlamalara ihtiyaç duymadıkları bildirilmektedir (Ramsay et al., 1992; Borman et al., 1998).

Borman ve arkadaşlarının (1998) *Azotobacter beijerinckii* ile yaptıkları çalışmalarda, PHB birikiminin azot sınırlaması olmaksızın gerçekleştiğini bildirmektedirler. Ancak araştırmacılar azot kaynağının çeşidine göre PHB sentez miktarının

değişebileceğini ve kazein pepton ile üre gibi azot kaynakları kullanımının PHB verimini %50 oranına yükselttiğini bildirmişlerdir.

Chen ve arkadaşları (1991), *Bacillus* türlerinin glukoz ve pepton içeren zengin besiyerindeki PHB üretimi ile azotsuz besiyerinde geliştirilen bakterilerin PHB üretimini karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar, azotsuz besiyerinde PHB veriminin, zengin besiyerinden daha fazla olduğunu ve karbon varlığında azotun sınırlandırılmasının PHB verimini arttırdığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *B. brevis* M6 suşunun, azotsuz ortamda %25,45 PHB üretim yüzdesine ulaşılmıştır (Çizelge 4.9, Şekil 4.12). Ancak, bakteri kontrol besiyerinde, azotlu ortamda PHB üretim yüzdesi %41,67 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.9, Şekil 4.12). Azotsuz ortamın, bakterinin PHB sentezleme oranını düşürdüğü gözlenmiştir.

Labuzek ve Radecka'da (2001), %25 PHB verimi aldıkları *B. cereus* UW85 suşunu azotu sınırlandırılmış şartlarda geliştirmişler ve PHB homopolimerinin verimini %9'a azaldığını tespit etmişlerdir.

Bertrand ve arkadaşları (1990), *Pseudomonas pseudoflava*'nın arabinoz ve ksiloz fermentasyonunda, ortamdaki azot miktarındaki azalma sırasında gittikçe yükselen PHB miktarının, amonyum iyonları tamamen tükendikten sonra hızla düştüğünü bildirmişlerdir.

Borman ve arkadaşları (1998), *Azotobacter beijerinckii* bakterisinin kazein pepton, maya özütü, kasamino asit ve üre gibi organik azot kaynaklarının glukoz veya sükroz gibi karbon kaynaklarıyla kombine edildiğinde, azot sınırlamasına gerek kalmadan %50'den fazla PHB üretebileceğini bildirmişlerdir.

Dave ve arkadaşları (1996) ise, *Aeromonas*, *Bacillus* ve *Pseudomonas* gibi bakteriler bulunduran aktif çamurda, azot ve fosforu sınırlandırılmış glukoz içeren ortamda *Bacillus* cinsinin %5'den %80 gibi bir yoğunluğa ulaştığını ve PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir.

Bazı çalışmalarda da, *Ps. resinovorans* ve *Ps. stutzeri* gibi suşlarda azot sınırlamasının PHA brikimi ile sonuçlandığını ve %50 oranında verime ulaşıldığını bildirilmiştir (Ramsay et al., 1992; Xi et al., 2000).

Araştırmamızda, oksijeni sınırlı ortamda geliştirilen *B. brevis* M6 suşunun, %7,53 PHB üretim yüzdesine vardığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.10, Şekil 4.13). Bakteri oksijenli şatlar altında bazal besiyerinde geliştirildiğinde PHB üretim yüzdesi %41,67 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.10, Şekil 4.13). Oksijeni sınırlı ortamın, bakterinin PHB sentezleme oranını düşürdüğü anlaşılmıştır

Dawes'in (1988), oksijen sınırlamasının NADH/NAD oranını artıracağını ve bunun da PHB oranını yükselteceğini belirtmiş olmasına rağmen, *Bacillus* bakterileri ile çalışan Wu ve arkadaşları (2001), düşük oksijen oranının *Bacillus*'larda sporlanmaya neden olduğunu ve PHB içeriğinde azalma meydana getirdiğini; azot ve fosforun oranının karbona göre az olduğu besiyerlerinde ise PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir. *Bacillus* sp. Jma5 suşunun, PHB verimini %25-35 olarak tespit etmişlerdir.

Lillo ve Rodriguez-Valera (1990) ise *Haloferax mediterranei* ile yaptıkları ve litredeki oksijen konsantrasyonunu 0,4'den 0,02'ye düşürdükleri çalışmalarında, oksijen sınırlamasının PHB verimini düşürdüğünü ve oksijenin 0,4 oranında bulunması sırasında 0,208 g olan PHB miktarının, oksijen oranı 0,02'ye düşürüldüğünde 0,048 g'a azaldığını bildirmişlerdir. Buna karşın, Beaulieu ve arkadaşları (1995), *A. eutrophus*'da, ortamdaki oksijen miktarının ani yükselişinin, hücre yoğunluğunu arttırmasına bağlı olarak, PHB üretimini de arttırdığını bildirmişlerdir.

Page ve Knosp (1989), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunda, polimer üretiminin oksijen sınırlamasına bağlı olmadığını, fakat glukozun PHB'a dönüşümünü arttırdığını bildirmektedirler.

Kim (2000) ise, oksijeni sınırlı şartlarda, *Azotobacter chroococcum*'un PHB miktarını arttırdığını ve oksijenli şartlarda %20 olan verimin, oksijeni sınırlı şartlar altında %46'ya vardığını bildirmişlerdir. Tal ve Okon (1985), aynı etkinin *Azospirillum*

brasile CD suşunda da gözlemlendiğini ve oksijen sınırlamasının PHB verimini arttırdığını tespit etmişlerdir. Borman ve arkadaşları (1998) da, *Azotobacter beijerinckii* bakterisinin oksijeni sınırlandırılmış şartlarda PHB üretiminin arttığını vurgulamışlardır.

Biyoplastik üretimi maliyetinin düşürülmesi, üzerinde durulan önemli konulardan biridir. Maliyet fiyatının düşürülmesi için rekombinant türler üzerinde çalışmalar yapılmasının yanısıra, ucuz karbon kaynakları kullanarak da yüksek PHB verimi elde edilmesi için araştırmalar yapılmaktadır (Witholt and Kessler, 1999; Kim, 2000; Law, 2001). PHB verimi yüksek olan suşlardan düşük maliyetli PHB elde edilmesinde farklı karbon kaynakları kullanılması önerilmektedir. Araştırmalarda, ucuz karbon kaynakları olarak nişasta, peynir altı suyu, şeker pancarı melası, şeker kamışı melası, mısır, arpa ve soya atık suları gibi atık maddelerin kullanıldığı bildirilmektedir (Page, 1989; Page, 1992a; Page, 1992b; Bealieu, et al., 1995; Ahn et al., 2000; Kim, 2000; Gouda et al., 2001; Law et al., 2001; Wu et al., 2001). Bu araştırmalarda, ucuz karbon kaynağı olarak en çok kullanılan atık madde olarak melas dikkati çekmektedir (Page, 1989; Page, 1992a; Page, 1992b; Bealieu, et al., 1995; Wu et al., 2001). Şeker pancarı melasının PHB üretiminde kullanımı da kimi çalışmalarda gösterilmiştir (Page, 1989; Page, 1992a; Page 1992b).

Page (1992a), *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun şeker pancarı melası gibi kompleks karbon kaynaklarında da yüksek PHB verimine sahip olduğunu saptamıştır. İyi bir polimer üreticisi olan *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun şeker pancar melasında üretildiğinde, glukozun üçte biri maliyet tutarında olduğu bildirilmiştir (Page, 1992b).

Mercan (2002) ise, çalışmasında ucuz karbon kaynağı olarak şeker pancarı melasının kullanılabileceğini, *Rhizobium meliloti* Y11 suşunun %0,5'lik melas konsantrasyonunda %56, 31 oranında PHB ürettiğini bildirmiştir.

Çalışmamızda, ikinci derecede en yüksek PHB üreten *Bacillus cereus* M5, glukoz ve sükröz şekerlerini kullanabildiğinden melasda PHB üretimi için seçilen suş olmuştur.

Suşun %1, %2, %3, %4 ve %5 melas konsantrasyonunda ve süreye bağlı PHB üretimleri tespit edilmiştir (Şekil 4.19). *Bacillus cereus* M5 suşu, farklı konsantrasyonlardaki melasda 24, 48, 72 ve 96. saatlerde inkübe edilerek, hücre yoğunluğu, son kültür pH'sı, hücre kuru ağırlığı, PHB (g/l) ve yüzde PHB verimi tespit edilmiştir.

Bakteri, en yüksek hücre yoğunluğuna 1,45 OD ile, %5 melas konsantrasyonunda ulaşmıştır (Çizelge 4.15 ve Şekil 4.18). Melasın, bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanısıra, içerdiği vitamin ve mineraller ile büyüme faktörü olarak da etkili olduğu belirtilmektedir (Page, 1992b; Beaulieu, et al., 1995).

Beaulieu ve arkadaşları (1995), *Alcaligenes eutrophus* DSM 545 suşunun şeker kamışı melasında PHB verimini araştırdıkları çalışmalarında, melasın karbon kaynağı olarak değil sadece büyüme aktivatörü olarak kullanıldığını ve optimal büyüme ve PHB üretiminin %0,3 melas oranında sağlandığını rapor etmişlerdir. Çalışmada varılan en yüksek PHB veriminin %26 seviyesinde olduğu bildirilmiştir.

Page (1989), şeker pancarı melası gibi tanımlı olmayan karbon kaynaklarında da PHB üretimi olduğunu bildirdiği bir çalışmada, *Azotobacter vinelandii* UWD suşunda melasın büyümeyi uyararak daha yüksek PHB depolanmasına neden olduğunu, ancak PHB veriminin ortama asetat ilavesinden sonra %70'e vardığı belirtmektedir. Buna karşın 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 mikroorganizma gelişimi üzerinde engelleyici etki yaptığını açıklamıştır.

Çalışmamızda, melasdan elde edilen en yüksek PHB yüzde verimine, en iyi hücre gelişiminin olduğu %5'lik melas oranında değil de %1 melas konsantrasyonunda elde edildiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.14).

Gouda ve arkadaşları (2001), karbon kaynağı olarak şeker kamışı melasında, *B. megaterium*'un PHB üretimini inceledikleri çalışmalarında, hücre gelişiminin en iyi

olduğu melas yüzdesinin %3 olmasına rağmen, en yüksek PHB verimi olan %46,2'lik oranın %2 melas içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Melasın %1 konsantrasyonunda geliştirilen *B. cereus* M5 suşunun, 24 ve 48. saat inkübasyonda PHB yüzde verimi artmış, 72. saatte en yüksek değerine varırken 96. saatten itibaren azalma göstermiştir (Çizelge 4.11, Şekil 4.14). Bakteri, 24 ve 48. saat inkübasyonda sırasıyla %19,11 ve %44,41 oranında PHB depolarken, maksimum PHB üretimini (%73,84) inkübasyonun 72. saatinde gerçekleştirmiştir. Bu suşun kontrol besiyerinde ürettiği PHB miktarı (%27,53) daha azdır.

Bakteri, %2 melas konsantrasyonunda en yüksek PHB verimi (%52,00) inkübasyonun 48. saatinde gerçekleştirmiştir. Bu suş, %3, %4 ve %5 melas konsantrasyonlarında en yüksek PHB verimine (sırasıyla %38,48, %25,11, %35, 46) inkübasyonun 24. saatinde ulaşmıştır (Çizelge 4.12–4.15, Şekil 4.15–4.18). Genel olarak, melas konsantrasyonu arttıkça yüzde PHB veriminde azalma olduğu tespit edilmiştir.

Page (1992a), düşük melas konsantrasyonlarında iyi PHB verimi elde edildiğini bildirdiği bir çalışmada, *Azotobacter vinelandii* UWD suşunun PHB üretimini, %5 ve %2 şeker pancarı melası konsantrasyonlarında incelemiştir. Bakterinin %5 melasda hücre kuru ağırlığına oranla %24 oranında PHB verimi gösterirken, bu verimin %2 melas konsantrasyonunda %51'e yükseldiğini bildirmiştir. Araştırmacı, düşük PHB verimi elde edilen %5 melas konsantrasyonuna 15 mM amonyum asetat ilavesi ve iyi bir havalandırma ile polimer veriminin %70'e yükseldiğini bildirmiştir.

Gouda ve arkadaşları (2001), *B. megaterium*'un %2 ve %3 şeker kamışı melasında PHB üretimini inceledikleri çalışmalarında, en yüksek PHB veriminin %2 melas içeren besiyerinde elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu bilgiler, çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçları da desteklemektedir.

Page (1989), melas gibi tanımlı olmayan karbon kaynaklarının PHB verimini arttırdığını, ancak, melasın kompleks yapısı nedeniyle PHB sentezinin uyarılmasında kullanılan şartları bozabileceğini ve düşük melas oranlarında daha iyi sonuçlar alınabileceğini bildirmiştir (Page, 1989; Page, 1992a).

Wu ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada, melasla kontamine olmuş topraktan izole edilen *Bacillus* sp. Jma5 suşunun 250 g/l melas içeren besiyerinde üretildiğinde hücrede PHB miktarının %35 olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar düşük oksijen oranının *Bacillus*'larda sporulasyona ve buna bağlı olarak PHB veriminin düşmesine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Mercan (2002) ise, *Rhizobium* cinsi bakterilerin şeker pancarı melasındaki PHB üretimini araştırdığı çalışmasında, farklı türlerde ulaşılan en yüksek yüzde PHB veriminin, inkübasyon süresinin artması ile azaldığını bildirmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen bulgular, *Bacillus* cinsi bakterilerden yüksek PHB verimi eldesinde, şeker endüstrisi atık maddesi olan melasın, ucuz karbon kaynağı olarak kullanılabileceğini ve konu ile ilgili daha ayrıntılı araştırmalar yapılması gerektiğini göstermiştir. Yapılan literatür çalışmalarında *Bacillus* cinsi bakterilerin melasdan PHB üretimi ile ilgili bazı çalışmalara rastlanmıştır. Ancak elde edilen veriler ışığında bu alandaki çalışmaların artacağı açıktır.

Çalışmamızda Spearman'ın korelasyon testine göre suşların hücre kuru ağırlığı ile PHB üretimi arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmış ve $p=0,3973$ bulunmuştur. Bu değer tablo değeri ile kıyaslandığında $p=0,3973>0,3059$ olduğundan hücre kuru ağırlığı ile PHB arasındaki ilişkinin önemli olduğu anlaşılmıştır. Ancak çalışmamızda Spearman'ın korelasyon testine göre kültürlerin PHB içeriği ile hücre kuru ağırlığında ilişkinin doğrusal olması, diğer araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermiş ve hücre kuru ağırlığı ile PHB depolanması arasında önemli paralellik tespit edilememiştir. Bu durum özellikle *Bacillus cereus* M5 suşunda %1 melas besiyerinde gözlenmiştir (Çizelge 4.11). *B. cereus* M5 suşunun %1 melas besiyerinde hücre yoğunluğunun 0,55 OD olduğu ilk 24 saat inkübasyonda, PHB depolanması tespit edilmiştir. PHB sentezindeki artışın, 72 saat inkübasyon süresince devam ettiği, ancak bu artışların hücre kuru ağırlığı ile orantılı olmadığı bulunmuştur. 24. saatteki hücre kuru ağırlığı 0,170 g/l iken, inkübasyonun 48. saatinde hücre kütlesi 0,215 g/l olmuştur. Hücre yoğunluğunun 0,4 olduğu ve hücre kuru ağırlığının da azaldığı 72. saatte ise PHB miktarı artmaya devam etmiştir. Bakteri hücre gelişiminin eksponansiyel fazında (0,6 OD), hücre kuru ağırlığı 0,215

g/l iken, %44,41 PHB verimine ulaşmış olmasına rağmen, hücre yoğunluğunun 0,4 OD ve hücre kuru ağırlığının 0,130 g/l'ye düştüğü dönemde ise PHB verimi %73,84'e yükselmiştir (Çizelge 4.11). Tanaka ve arkadaşları da (1993), *A. eutrophus*'da depo edilen PHB miktarının hücre gelişim oranından daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, gelişim ve besinlerin PHB üzerine etkileri olduğunu ve bu şartların detaylı olarak incelenmesinin gerektiğini vurgulamışlardır.

Yapılan bir çalışmada *Streptomyces* suşlarındaki PHB miktarındaki artışın, kimi suşlarda hücre gelişimi ile paralel olup, kimi suşlarda ise çok az paralellik gösterdiği rapor edilmiştir (Manna et al., 1999). Benzer şekilde Borman ve arkadaşları (1998), *Azotobacter beijerinckii* ile yaptıkları çalışmada, hücre kuru ağırlığının artması sırasında PHB üretiminin düşük kaldığını bildirmişlerdir. *B. megaterium*'da ise, PHA'nın toplam hücre ağırlığından daha hızlı artma oranına sahip olduğu ve %PHA'daki artışın eksponansiyel ve durgun fazdaki hücrelerin toplam kuru ağırlığındaki artıştan daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (McCool et al., 1996).

Bazı çalışmalarda da, hücre kuru ağırlığı ile PHB üretimi arasında bir ilişki olup olmadığı aranmıştır. Mercan ve Beyatlı (2001), Spearman'ın korelasyon testine göre *Rhizobium* bakterilerinde suşların hücre kuru ağırlığı ile PHB arasındaki ilişkinin önemli olmadığını bildirmişlerdir. Mercan (2002) ise, *Rhizobium* bakterilerinin PHB içeriği ile hücre kuru ağırlığı arasındaki ilişkinin doğrusal olmasına rağmen, hücre kuru ağırlığı ile PHB depolanması arasında önemli bir paralellik tespit edememiştir.

PHB'nın ilk tespit edildiği bakteri cinsi olmalarına rağmen *Bacillus*'ların PHB biyosentez mekanizmalarının henüz tam olarak aydınlatılamadığı (Madison and Huisman, 1999), ancak avantajlı özelliklerinden yararlanmak ve endüstriyel PHB üretimini gerçekleştirmek için kullanıldıkları belirtilmektedir (Wu et al., 2001).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlardan, polimer veriminin *Bacillus* bakterilerinin türüne, besiyortamının çeşidine ve şartlarına ve melas konsantrasyonuna göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Daha sonraki yapılacak çalışmalarda, polimer üretiminde en uygun suş ile fermentasyon şartlarının belirlenmesi, melasın içeriğinin

vitamin, şeker ve elementlerle zenginleştirilerek PHB veriminin artırılması amaçlanmıştır.

Tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin sağladığı faydalar, sayı ve niteliklerinin artırılması için geniş ve ayrıntılı araştırmaların yapılmasına neden olmaktadır. Özellikle bakteriyel ve fungal kökenli hastalıkların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin, antimikrobiyal aktiviteleri tespit edilen bakterilerden elde edilmeleri ile ilgili olarak yürütülen bir çok araştırma vardır. Son yıllarda antibiyotiklere dirençli mikroorganizma sayısının arttığı düşünülürse, değişik antibiyotikler üreten yeni gen kaynaklarına duyulan gereksinim ve geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip, etkili antibiyotikler üreten mikroorganizma tiplerinin araştırılmasının ne denli önemli olduğu anlaşılabilecektir (Eltem ve Uçar, 1998; Demain, 1999).

Yapılan araştırmalar, *Bacillus* cinsi bakterilerin de özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı etkin olmakla birlikte, bazı Gram-negatiflere karşı da antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ve birkaç tür antibiyotiği ürettiğini göstermektedir (Morikawa et al., 1992; Perez et al., 1992; Perez et al., 1993; Eltem ve Uçar, 1998).

Soya fasulyesinden izole edilen *B. subtilis* bakterilerinin antimikrobiyal aktivitesinin çalışıldığı bir araştırmada, bu suşun ürettiği antimikrobiyal maddenin *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *E. coli* ATCC 27662, *E. coli* 0157:H7 ATCC 437888, *Listeria monocytogenes* F 7244, *Yersinia enterocolitica* ATCC 27729, *B. cereus* ATCC 27729, *B. subtilis* ATCC 6633 ve *B. subtilis* ATCC 6051 suşlarına karşı geniş inhibitör aktivite gösterdiği, agar difüzyon tekniği ile tespit edilmiştir (Zheng and Slavik, 1999).

Çalışmamızda kullanılan suşlardan *B. brevis* M4, *B. cereus* M5 ve *B. cereus* M10 suşları test bakterisi olan *B. cereus* F2 üzerinde aktivite gösterirken, *B. brevis* M6 suşu da *Staphylococcus aureus* üzerine inhibisyon etki göstermiştir (Çizelge 4.16).

B. brevis M6, *B. cereus* M10 (Şekil 4.21) ve *B. cereus* M15 (Şekil 4.22) suşları *Bacillus thuringiensis* RSKK 380 üzerine *B. cereus* M10 suş ise *Bacillus megaterium* RSKK 578 üzerine (Şekil 4.20) inhibisyon etki göstermişlerdir (Çizelge 4.16).

Suşlarımızdan; *B. cereus* M15 suşunun ise *Micrococcus flavus* ve *Pseudomonas fluorescens* gibi bakteriler üzerine antagonistik etkide bulunduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.16).

Binnet (1998), araştırmasında süttten izole ettiği *Bacillus* suşlarının *S. lactis*, *S. fecalis*, *E. coli* K12, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa* ve *L. monocytogenes* gibi bakteriler üzerinde antagonistik etkisini çalışmıştır. Araştırıcı, *Bacillus* 'ların yalnızca *L. monocytogenes* üzerine inhibitör etkisinin varlığını tespit etmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız *Bacillus* suşlarının da, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *P. aeruginosa* üzerine antimikrobiyal aktivitelerinin olmadığı gözlenmiştir (Çizelge 4.16). Elde edilen sonuçlar, Binnet (1998), tarafından elde edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir.

Perez ve arkadaşları (1993), topraktan izole ettikleri 375 adet *Bacillus* cinsi bakterinin %25'inin *M. luteus*'a karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğunu tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada araştırıcılar, *B. circulans* MIR 13 suşunun denenen *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Aspergillus niger*'e karşı etkili olmadığı; oysa *B. polymyxa* MIR 23'ün bu bakterilere karşı etkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırmada *B. subtilis* ATCC 6633'ün sadece bir *St. aureus* suşuna etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız *B. subtilis* ATCC 6633'ün ise *St. aureus* ATCC 25923 üzerine inhibisyon etkisine rastlanmamış, ancak *B. brevis* M6'nın bu suşa etki ettiği gözlenmiştir (Çizelge 4.16).

Yine Perez ve arkadaşlarının (1992) bir başka çalışmasında ise, *B. subtilis* MIR 15 suşunun *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *M. luteus* üzerine antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda, *B. subtilis* suşlarının, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *M. luteus* ve *St. aureus* test bakterileri üzerinde antimikrobiyal etkilerine rastlanmamıştır. *B. circulans* suşlarımızın antimikrobiyal aktivitelerinin olmayışı, Perez ve arkadaşlarının (1993) sonuçları ile benzerlik göstermiştir.

B. circulans J2154'den elde edilen lipopeptid antibakteriyeller olan circulocinlerin Gram-pozitif bakterilere ve piperacillin dirençli *Streptococ* 'lar ile vancomycin dirençli *Enterococ* 'lara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (He et al., 2001).

Bacillus circulans tarafından biyosentezi gerçekleştirilen butirosin'in üretiminin sporulasyon olayı ile yakından ilgili olup, özellikle PHB ve dipikolinik asit oluşumu ile gerçekleştiği bildirilmektedir (Nam and Ryu, 1985).

Bacillus cereus UW 85'in ürettiği ve biyolojik kontrol aracı olarak kullanılabilen zwittermicin A'nın, özellikle Gram-negatif bakterilerden *Agrobacterium*, *Pseudomonas* ve *Erwinia* bakterilerine karşı etkin olduğu bilinmektedir (Silo-Suh et al., 1994).

Topraktan izole edilen *B. cereus* Bc7 suşunun antimikrobiyal aktivite çalışmalarında, bu suşun ürettiği bakteriosin benzeri maddenin Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu Gram negatif bakteriler üzerinde etkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Oscariz et al., 1999). Çalışmamızda, suşlar arasında yer alan *B. cereus* M15 suşu, hem Gram-pozitif hem de Gram negatif bazı bakteriler üzerine inhibitör etki göstermiştir.

Wilson ve arkadaşları (1987), *B. subtilis* ATCC 39320'den aerobik ve anaerobik organizmalara karşı antibakteriyel etkide bulunabilen, diffididin ve oxydiffididin antibiyotiklerini izole ettiklerini bildirmişler; Zweerink ve Edison (1987) ise, bu antibiyotiklerin *E. coli*'de protein sentezi inhibitörü olarak fonksiyon gösterdiğini rapor etmişlerdir. Zimmerman ve arkadaşları (1987), çalışmalarında *B. subtilis* ATCC 39320 ve ATCC 39374 suşlarının yeni iki adet antibiyotik ürettiklerini bildirmişlerdir. Üretilen diffididin antibiyotiğinin *Proteus* sp., metsiline direçli *St. aureus* ve *Serratia*'ya karşı etkin olurken; cefaxitin *St. aureus*, *Proteus* sp., *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* ve *S. marcescens* üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir.

Bacillus suşlarından elde edilen yeni bir peptid antimikrobiyal olan mersacidinin ise, methicillin dirençli *Staphylococ*'lar başta olmak üzere bazı Gram-pozitif bakterilere karşı aktif olduğu bildirilmiştir (Chatterjee et al, 1992).

Antibiyotik üreten yeni gen kaynaklarının taranmasında ekstrem çevrelerden *Bacillus* suşlarının izolasyonu bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Eltem ve Uçar'ın Denizli Acıgöl' de yaptıkları araştırmada (1998), izole edilen 5 adet alkalotolerant ve 18 adet

fakültatif alkalofilik özelliğe sahip 23 adet *Bacillus* suşu, antibiyotik üretimi yönünden elemeye tabi tutularak, antimikrobiyal aktiviteleri saptanmıştır. Bu suşlar fakültatif ve alkalotolerant oldukları için, hem alkali hem de nötral pH da gelişme gösterebildiklerinden biyoteknoloji ve genetik mühendisliği alanlarında oldukça değerli yeni gen kaynakları olma potansiyelinde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada bacitracin antibiyotiği standart antibiyotik madde olarak kullanılmış, bu madde ile izole edilen *Bacillus*'ların ürettiği tanımsız olan maddenin karşılaştırılması yapılmıştır. TEM-FA-18 suşunun 8,5 mm'lik zon çapı ile *E.coli* üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda ise, *Bacillus* izolatlarının *E.coli* üzerine antimikrobiyal aktivitesi gözlenmemiştir. Aynı araştırmada 23 adet *Bacillus* suşundan 9 adedinin *B. subtilis* üzerinde aktif olduğu tespit edilmiş ve TEM-FA-7 suşunun bu test bakterisi üzerinde 11 mm zon çapı gösterdiği; 12 *Bacillus* suşunun ise *M. luteus* üzerine etkin olduğu ve TEM-FA-22 suşunun aynı test bakterisine karşı 21 mm'lik inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda ise *B. subtilis* ve *M. luteus* üzerinde etkili olan herhangi *Bacillus* izolatı tespit edilmemiştir. Eltem ve Uçar'ın araştırmasında (1998), *St. aureus* üzerine de etkili olan 12 adet *Bacillus* suşu arasında TEM-FA-19 suşunun 23 mm'lik zon çapı ile en yüksek inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda, *B. brevis* M6 suşunun yalnız *St. aureus* üzerine 16 mm'lik zon çapı ile inhibisyon etkisi gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.16).

Aslın ve arkadaşları (2002), topraktan izole edilen *Bacillus* suşlarının antibakteriyel aktivitesini araştırdıkları çalışmalarında, 40 adet *Bacillus* suşundan *B. thuringiensis*, *B. subtilis* ve *B. megaterium* türlerine ait olan 4 adedinin *E. coli* ve *Y. enterocolitica* üzerinde aktif olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda suşlarımızın bu test bakterilerine karşı antimikrobiyal aktivitesi gözlenmemiştir. Aynı çalışmada, *St. aureus* üzerine inhibisyon etkisi bulunan 7 adet suş tespit edilmiş, bu test bakterisi üzerinde en yüksek inhibisyonu *B. megaterium* Y6 suşunda 7,9 mm'lik zon çapı ile bildirilmiştir. Buna karşılık, çalışmamızda, *B. brevis* M6'nın *St. aureus*'a karşı 16 mm'lik zon çapı ile antagonistik etki tespit edilmiştir. Aslın ve arkadaşlarının çalışmasında (2002) da ayrıca, *M. flavus*' a etkili olduğu bildirilen 14 adet suşdan özellikle *B. thuringiensis* D1 suşunun bu test bakterisi üzerinde 9,6 mm inhibisyon

zon çapı gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda da, *B. cereus* M15 suşunun *M. flavus* 6,4 mm inhibisyon zon çapı oluşturduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.16).

Bacillus subtilis ve *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen Basitrasinin birçok Gram pozitif ve bazı gram negatif bakteriye karşı da antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmektedir (Drablos 1999).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlardan *Bacillus* izolatlarının özellikle daha çok Gram pozitif test bakterileri üzerinde inhibitör etkileri gözlenmiştir. Ancak, *B. cereus* M15 suşunun hem Gram pozitif ve hem de Gram negatif bazı bakteriler üzerine inhibitör etki gösterdiği tespit edilmiştir. Farklı bir antibakteriyel dağılım gösteren izolatlarımızın potansiyel faydalarının araştırılması ve tespit edilen antimikrobiyallerin kimyasal karakterizasyonunun ilerideki araştırmaların amaçları arasında yer alacağı düşünülmektedir.

Bugüne değin yapılan birçok araştırmada *Bacillus* cinsi bakterilerin aynı cins ve türdeki diğer suşlar üzerindeki etkileri üzerinde durulmuştur. Çalışmamızda kullandığımız suşların da özellikle birbirlerine karşı olan inhibisyon etkileri agar difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır.

Son yıllarda dikkat çeken, *Bacillus* türleri tarafından üretilen antimikrobiyal peptidler olan bakteriyosinlerin özellikle Gram pozitif bakterilere karşı aktif olduğu Gram-negatiflere etkili olmadığı bildirilmektedir (Oscariz et al, 1999, Zheng and Slavik, 1999).

Le Marrec ve arkadaşları (2000), *B. coagulans* I₄ suşundan, genelde laktik asit bakterileri dışındaki bakterilerde pek rastlanmayan pediocin benzeri coagulin bakteriyosinini elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda *Bacillus* izolatlarının birbirlerine karşı inhibisyon etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.17, Şekil 4. 23-30). Aynı türün suşlarına karşı ve hem de farklı türlere etki gösterebilen *B. cereus* M10 (Şekil 4.29-30) ve *B. cereus* M 15 (Şekil 4.30) suşları tespit edilmiştir (Çizelge 4.17).

Yapılan bazı çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmıştır. Favret ve Yousten (1989), *B. thuringiensis* HD-2 suşundan elde ettikleri thuricinin, diğer *B. thuringiensis* suşları ile bazı Gram-pozitif türlere karşı aktif olduğunu tespit etmişlerdir.

Yine bir başka araştırmada da, *B. thuringiensis* subs. *tochigiensis* HD868 suşundan saflaştırılan tochicin bakteriyosininin 20 adet *B. thuringiensis* suşları ile bir *B. cereus* suşuna karşı aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Paik et al., 1997).

Naclerio ve arkadaşları (1993) ise, *B. cereus* suşundan durgun faz döneminde elde ettikleri cerein bakteriyosininin, diğer *B. cereus* suşlarına karşı aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, inhibisyon etkilerini diğer türlere karşı gösteren suşların, *B. brevis* M4 (Şekil 4. 27), *B. brevis* M6 (Şekil 4. 24), *B. cereus* M5 (Şekil 4. 24, 4.27, 4.30), *B. cereus* M10, *B. cereus* M15, *B. coagulans* M25 (Şekil 4. 28), *B. coagulans* M35, *B. megaterium* M15, *B. megaterium* M21, *B. megaterium* M22, *B. megaterium* M26 (Şekil 4. 28), *B. megaterium* M28 (Şekil 4. 25) *B. circulans* M16, *B. circulans* M18, *B. circulans* M34, *B. subtilis* M17, *B. subtilis* M24, *B. subtilis* M29, *B. subtilis* M33, *B. licheniformis* M19, *B. licheniformis* M20 ve *B. licheniformis* M27 (Şekil 4. 25) olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.17, Şekil 4.23-4.26, Şekil 4.29-30). Bu suşların, özellikle *B. sphaericus* suşları üzerinde inhibisyon etki göstermesi dikkat çekicidir.

Bacillus hücrelerinin yapıları ile ilgili araştırmalar sitoplazmik membran üzerinde genelde hücre duvarı bulunduran *Bacillus*'ların hücre duvarının, bir veya birkaç anyonik polimer ve birkaç kat peptidoglikan ile sarıldığını ortaya koymuştur. Hücre duvarındaki peptidoglikan murein yapı, kısa peptidlerle çapraz bağlanmış glikan zincirlerden oluşmuştur. *Bacillus* peptidoglikan yapısındaki bu çapraz bağlanmaların direkt meso-diaminopimelik asit (m-Dpm) ile olduğu bilinmektedir. Ancak yapılan incelemelerde *B. sphaericus* grubunda yer alan bakterilerde bu duruma rastlanılmamıştır. *B. sphaericus* grubu bakteriler, peptidoglikan yapılarında L-Lizin veya Ornitin bulundurmaları ile farklılık göstermektedirler (Priest, 1993; Rosovitz et

al., 1998). Bu yapısal farklılığın inhibisyon etkiye neden olabileceği düşünülmektedir.

Bazı *Bacillus* izolatlarının, *B. sphaericus*'un yanısıra *B.cereus* *B. coagulans* gibi diğer bazı suşlar üzerinde de inhibisyon etkileri olduğu gözlenmiştir. *B. brevis* M4, *B. brevis* M6, *B. cereus* M10, *B. cereus* M15 suşları *B. sphaericus*'un yanısıra *B.cereus* üzerine ve yine *B. brevis* M4, *B. cereus* M5 ve *B. cereus* M10 suşlarının *B. coagulans* üzerine, inhibisyon etki gösterdiği gözlenmiştir (Çizelge 4.17).

Oscariz ve arkadaşları (1999), *B. cereus* suşundan elde ettikleri cerein 7 bakteriyosininin, diğer *B. cereus* suşlarına olduğu kadar *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Lactococcus lactis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ve *Streptococcus bovis* gibi bir çok Gram-pozitif bakteriye karşı da aktif olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan bir çalışmada, *B. subtilis* tarafından oluşturulan bacillocin 22 adı verilen bir bakteriyosinin, *B. cereus*'un yanısıra *Listeria monocytogenes* bakterisine de etki gösterdiği tespit edilmiştir. Gıda patojeni olan bu iki türe karşı aktivitesi tespit edilen bacillocin 22'nin gıdalarda antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu bildirilmektedir (Zheng and Slavik, 1999).

Araştırmalarda, özellikle *B. coagulans* ve *B. cereus* türlerinin cins ve tür içi inhibisyon etkilerine rastlandığını göstermektedir (Naclerio et al., 1993; Oscariz et al., 1999; Le Marrec et al., 2000). Bu veriler, sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

Bakteriler içinde, *Bacillus* cinsi, modern biyoteknolojide, enzim uygulamalarında kullanılan organizmalar arasında baskın bir yer almaktadır (Yin et al., 1991; Perez et al., 1992). *Bacillus*'lar, hücre dışı proteazların özgün üreticileridirler. Bunlar kan, kir ve süt gibi protein içerikli lekelerde, deterjanlara katkıda bulunurlar (Singh et al., 2001).

Genelde, *Bacillus* cinsi bakteriler, yüksek miktarda hücre dışı proteaz üretirler (Kunitate et al., 1989). *B. subtilis* (Aderibigbe and Odunfa, 1988; Kunitate et al., 1989; Kudrya and Simonenko, 1994), *B. licheniformis* (Kunitate et al., 1989; Aderibigbe et al., 1990), *B. thermoruber* (Manachini et al., 1988), *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* (Kunitate et al., 1989) ve *B. megaterium* gibi bazı *Bacillus* cinsi üyelerinin, yüksek miktarda hücre dışı alkali proteaz ürettiği ve pH 7-11 aralığında üreyebildiği bildirilmiştir (Moravcova and Vachova, 1993; Singh et al., 2001). Kim ve arkadaşları (1996), bir *Bacillus* üyesinden elde ettikleri fibrinolitik proteaz enziminin, trombolitik ajan olarak tıpta kullanılabileceğini bildirmişlerdir. *B. stearothermophilus*'dan elde edilen proteazların, atık aktif çamur parçalanmasında ekonomik kimyasal faydalar sağladığı bildirilmektedir. (Kim et al., 2002).

Çalışmalarda, subtilisin proteinazlarını üreten *Bacillus* türlerinin, çamaşır deterjanları ve diğer ticari uygulamalarda kullanıldığı bildirilmiştir (Yin et al., 1991). Subtilisinin *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. pumilus* ve *B. thuringiensis* tarafından üretilmektedir (Kunitate et al., 1989). Termofilik ve alkalifilik basiller tarafından üretilen alkalın proteazlar, yüksek sıcaklık, pH, kimyasal parçalayıcı ajanlar ve susuz çevrelere dayanabilecekleri belirtilmektedir (Johnvesley ve Naik, 2001).

Çalışmamızda, *B. sphaericus* suşları dışında, *Bacillus* cinsine ait olan diğer yedi türdeki (*B. brevis*, *B. cereus*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. megaterium*) tüm suşlarda proteolitik aktiviteye rastlanmıştır (Çizelge 4. 18, Şekil 4.31). Bu suşlarda, proteolitik aktivite, 1,4-8,1 mm zon çapı arasında bulunmuş ve ortalama olarak 4,17 mm hesaplanmıştır. En yüksek proteolitik aktivite 8,1 mm zon çapı ile *B. circulans* M32'de tespit edilmiştir (Şekil 4. 32).

Literatür bilgilere dayanılarak, çalışılan 8 *Bacillus* türünün tümünde proteaz aktivitesinin olabileceği, *B. coagulans*, *B. circulans* ve *B. sphaericus* türlerin bazı suşlarında bu aktivitenin olmadığı bildirilmiştir (Sneath, 1986). Araştırmamızda da özellikle *B. sphaericus* suşlarının proteolitik aktiviteden yoksun olduğu görülmüştür.

Araştırmalarda, *B. licheniformis*'in sentezlediği özgün bir proteaz olan Keratinaz ürettiği, (Rozs et al., 2001) ve *B. subtilis* ve *B. megaterium*'un proteolitik aktivitesinin olduğu bildirilmektedir (Moravcova and Vachova, 1993).

Kembhavi ve arkadaşları (1993), sıcak sudan izole ettikleri *B. subtilis*'den pH 5-11 aralığında proteaz salgıladığını rapor etmişlerdir.

Johnvesly ve Naik (2001), alkali proteaz üreten termofilik ve alkalifilik *Bacillus* sp. JB-99 suşunun deterjan yapımında kaynak enzim olarak kullanılabileceğini; Müderrizade ve arkadaşları (2001) ise, topraktan izole ettikleri *Bacillus* sp.'den pH optimum 11,5'da iken, alkaline proteaz saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.

Yapılan araştırmalarda, tür tanımı yapılmamış bir çok *Bacillus* suşunun yanı sıra, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. cereus* türlerin proteaz enzimi ürettikleri ve proteolitik aktivitelerinden faydalandığı üzerinde durulmuştur (Kunitate et al., 1989; Kembhavi et al., 1993; Moravcova and Vachova, 1993; Johnvesly and Naik, 2001; Müderrizade vd. 2001; Rozs et al., 2001).

Plazmid DNA birçok *Bacillus* türünde araştırılmıştır. Özellikle bazı *Bacillus* suşlarının antibiyotiklere direnç özelliği taşıyan plazmidler bulundurması, rekombinant DNA çalışmalarında vektör olarak kullanılabilmeleri şansını artırarak, bir çok çalışma için aranan türler olmalarına neden olmuştur (Tanaka et al., 1977; Yoshimura et al., 1983).

Yapılan çalışmalarda, genelde *Bacillus* cinsinin içerdiği plazmidlerin kriptik plazmidler olduğu belirtilmiş olmasına rağmen (Tanaka and Koshikawa, 1977; Yoshimura et al., 1983), *B. thuringiensis*'in bir plazmidinin insektisidal kristal proteinin üretimiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Faust et al., 1983; Clark, et al., 1985; Himeno et al., 1985; Jaoua et al., 1996). Bazı türlerin ise plazmid DNA kaynaklı antibiyotik direnç geni taşıdıkları ve bu türler arasında yer alan *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. sphaericus*, *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* türlerinin tetrasiklin antibiyotiklerine, *B. sphaericus*'un kloramfenikol antibiyotiklerine (McDonald and Burke, 1984), ve yine *B. subtilis*'in eritromisine (Yoshimura et al., 1983) dirençli olma özelliklerini taşıdıkları tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra, *B. megaterium*'un ürettiği

megacin A gibi (Rostas et al., 1980) bazı bakteriyosinlerin (Tanaka et al., 1977) ve *B. amyloliquefaciens*'in alfa amilaz enziminin üretiminde (Hillier et al., 1997) olduğu gibi bazı farklı metabolik aktivitelerin de plazmid DNA ile kontrol edildiği bildirilmektedir.

Yoshimura ve arkadaşları (1983), 111 adet *Bacillus* suşunu inceledikleri çalışmalarında, yalnız 13 adet suşda bulunan plazmid DNA'ların moleküler büyüklüklerinin 2,8-45,2 Md arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, çalışmada 41 adet antibiyotik dirençli suşun 5'inde plazmid DNA tespit edilmiştir.

Clark ve arkadaşları (1985), *B. thuringiensis* var. *israelensis* suşunda, hücre içi kristal protein üretimi ile ilgili olduğunu bildirdikleri 108 kb ağırlığında bir plazmid DNA izole ettiklerini rapor etmişlerdir.

Jaoua ve arkadaşları (1996) ise, *Bacillus*'larda hücre içi kristal proteinini kodlayan genlerin 30 Md'dan büyük olduğunu bildirmişlerdir. Himeno ve arkadaşları'da (1985), *B. thuringiensis* var. *israelensis*'de delta-endotoksin proteini ile ilişkili 72 Md ağırlığında bir plazmid ve 4-4,4 Md ağırlığında küçük plazmidlerin bulunabileceğini belirtmişlerdir.

Tanaka ve Koshikawa (1977), *Bacillus subtilis*'de 3,6 ve 4 Md ağırlığında küçük plazmidler ile 34 ve 46 Md ağırlığında büyük plazmidler izole ettiklerini bildirmişlerdir.

Yine Tanaka ve arkadaşlarının (1977) bir başka çalışmasında ise 19 adet *B. subtilis* suşunun ikisinde 5,4 Md, diğer iki suşunda ise 4,9 ve 5,3 Md ağırlığında iki plazmid tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, plazmid taşıyan bu suşların fenotiplerinde antibiyotik direnç veya bakteriyosin üretimine rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Ombui ve arkadaşları (1996), süttten izole etikleri 72 adet *B. cereus* izolatının antibiyotik direnç ve plazmid profillerini araştırdıkları çalışmalarında, izolatların %71,7'sinde plazmid DNA'ya rastlamışlardır. 1-5 sayıları arasında plazmid tespit ettikleri izolatlardaki plazmidlerin 0,1-60 Md büyüklüklerinde olabildiğini, ancak önemli oranda plazmidin 4,8 ve daha düşük ağırlıklı plazmidler olduklarını; büyük

plazmidlerin özellikle 35,8; 58 ve 60 Md ağırlığında olduğunu rapor etmişlerdir. Araştırmacılar, tüm suşların ampicillin antibiyotikğine dirençli olduğunu ancak bunun plasmid DNA ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, 32 adet *Bacillus* suşunun 6 adedinde plazmid DNA tespit edilmiş, diğer suşlarda plazmid DNA'ya rastlanmamıştır (Çizelge 4.19, Şekil 4.33). Plazmid DNA bulunduran suşlar *B. brevis* M2, *B. brevis* M6, *B. sphaericus* M3, *B. sphaericus* ATCC 14577, *B. cereus* M5 ve *B. coagulans* M25 suşlarıdır (Şekil 4.33). Bu suşlardaki plazmid DNA sayıları 1-2 arasında bulunmuştur. Plazmidlerin moleküler ağırlıkları 3,9-31,7 kb arasında hesaplanmıştır. *B. brevis* türüne ait M2 ve M6 suşlarında sırasıyla 31,2-31,7 kb ağırlıkta, *B. cereus* M5'te ise 24,1 kb ağırlığında birer plazmid tespit edilmiştir. *B. sphaericus* suşlarında ise 1-2 plazmid bulunduğu ve *B. sphaericus* M3 suşunda 31,7 kb, *B. sphaericus* ATCC 14577 suşunda ise 31,3 ve 27,6 kb olan 2 plazmid DNA gözlenmiştir. Yine iki plazmid içeren *B. coagulans* M25 suşunda ise 4,7 ve 3,9 kb ağırlığında plazmidler belirlenmiştir.

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 yüzde verimi *B. brevis* M6 ve *B. cereus* M5 suşlarında tespit edilmiş, bu suşlarda plazmid DNA varlığı gözlenmiştir.

Steinbüchel ve Schlegel (1990), PHB biyosentetik genlerinin (phbA, phbB ve phbC) *Alcaligenes eutrophus*'da kromozom ve megaplasmid pHG1'de kodlandığını bildirmişlerdir. Aslın ve arkadaşları (1998) da, PHB üretiminde plazmid DNA'nın yanı sıra kromozomal DNA'nın da etkili olabileceğini açıklamışlardır. *Pseudomonas* suşları ile çalışan Huisman ve arkadaşları (1989), polimer oluşturma yeteneğinin plasmid DNA'dan kaynaklanmadığını, bildirmişlerdir. Charles ve arkadaşları (1997) ise, *R. meliloti*'de PHB degradasyon izyoluna etki eden kromozomal ve megaplasmid bölgelerini tespit etmişlerdir.

Çalışmamızda PHB üretimi gerçekleştiren bazı suşların plazmid içermemeleri, bu suşlarda PHB sentezinden sorumlu olan genlerin plazmidten bağımsız olduğunu ve

PHB üretimi ile ilgili genlerin aynı zamanda kromozomal DNA üzerinde de varolabileceğini düşündürmüştür.

Araştırmamız sırasında, kullandığımız bakterilerin antimikrobiyal aktivite gösterme yetenekleri ile plazmid DNA içermeleri arasında bir ilişki olup olmadığı da tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda antimikrobiyal aktiviteye sahip olan suşların bir kısmı plazmid DNA içerirken, büyük kısmının plazmid DNA içermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.16 ve Çizelge 4.17). Bunun yanısıra plazmid DNA içeren bazı suşların da antimikrobiyal aktivitesinin olmadığı belirlenmiştir. Bakteriyosin sentezini spesifiye eden özel genlerin, bir kısmının kromozomal olmasına karşın, bir kısmının da ekstra kromozomal karakter taşımakta olduğu (Arda, 2000) ve özellikle Gram-pozitif bakteriler tarafından oluşturulan bakteriyosinlerin bir çoğunun plazmid DNA genlerinde kodlandığı belirtilmektedir (Jack et al., 1995).

Tanaka ve arkadaşları (1977), plazmid DNA içeren *B. subtilis* suşları ile yaptıkları çalışmalarında, bu suşların fenotiplerinde bakteriyosin üretimine rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Favret ve Yousten (1989), bazı Gram-pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivite gösteren *B. thuringiensis* serovar. *thuringiensis* HD-2 suşunun, 150 Md ağırlığındaki plazmid DNA ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar, *B. thuringiensis* tarafından oluşturulan Thuricin, *B. megaterium* tarafından sentezlenen megacin (Favret and Yousten, 1989), ve *B. coagulans* tarafından oluşturulan coagulin (Le Marrec et al, 2000) bakteriyosinlerinin plazmid DNA ilişkili olduklarını açıklamışlardır.

6. ÖNERİLER

Dünyada artan plastik tüketimi, petrol fiyatlarının artışı ve kaynakların tükenme tehlikesi gibi nedenler, petrol kökenli plastiğe alternatif aranmasına neden olmaktadır. Gelecekte, PHB gibi biyoparçalanabilir ve ucuz bakteriyel biyoplastikler, petrokimyasal plastiklerin yerine geçebilirler. Çalışmamız sonucunda elde edilen bilgiler doğrultusunda *B. brevis* M6 suşunun sodyum nitrat içeren besiyerinde % 60,00 oranında PHB verimine, *B. cereus* M5 suşunun ise şeker pancarı melasında %73,84 oranında PHB verimine ulaştığı tespit edilmiştir. Özellikle ucuz karbon kaynağı olan şeker pancarı melasındaki PHB verimi dikkate değerdir ve endüstriyel PHB üretiminde maliyet fiyatını düşürecektir. Dolayısıyla bakterinin PHB sentez şartlarını düzenleyerek biyoplastik üreticisi olarak kullanılabileceği düşünülmüştür.

Son yıllarda, geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip ve etkili antibiyotikler üreten mikroorganizma tiplerinin araştırılması oldukça önem kazanmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlara göre, izolatlarımız özellikle Gram pozitif test bakterileri üzerinde inhibitör etki göstermişlerdir. Ancak, *B. cereus* M15 suşunun Gram pozitif bakterilerin yanı sıra, Gram negatif test bakteri üzerine de antimikrobiyal etki gösterdiği tespit edilmiştir.

Ayrıca, *Bacillus* suşlarının birbirlerine karşı da inhibisyon etkileri olduğu gözlenmiştir. Hem tür içi hem de türlerarası inhibisyon etkileri olan izolatlarımızın antimikrobiyal maddelerinin kimyasal karakterizasyonun, değişik antibiyotiklerin üretimi için önemli olduğu düşünülmektedir.

Ticari enzim uygulamalarında kullanılan *Bacillus* cinsinin, çalışma sonucunda elde edilen bilgilere göre farklı bir dağılım gösteren proteolitik aktivitesinin de, enzimlerin saflaştırılması ve özelliklerinin belirlenmesi durumunda endüstriyel kullanım için potansiyel olabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

- Abe, H., Kikkawa, Y., Iwata, T., Aoki, H., Akehata, T., Doi, Y., 2000, Microscopic visualization on crystalline morphologies of thin films for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymer, **Polymer**, 41, 867-874.
- Abe, H., Doi, Y., 2002, Side-chain effect of second monomer units on crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability for random copolyesters of (R)-3-hydroxybutyric acid with (R)-3-hydroxyalkanoic acids, **Biomacromolecules**, 3, 1, 133-138.
- Aderibigbe, E. Y. and Odunfa, S. A., 1988, Purification and characterization of extracellular proteinases excreted by a strains of *Bacillus subtilis* BS2, isolated from fermented African locust bean, iru, **Journal of Applied Bacteriology**, 65, 361-369.
- Aderibigbe, E. Y. and Odunfa, S. A., 1990, Growth and extracellular enzyme production by strains of *Bacillus* species isolated from fermenting African locust bean, iru, **Journal of Applied Bacteriology**, 69, 662-671.
- Aderibigbe, E. Y., Schink, B. and Odunfa, S. A., 1990, Extracellular proteinases of *Bacillus* spp. isolated from fermented African locust bean, iru, **Food Microbiology**, 7, 281-293.
- Ahn, W. S., Park, S. J., Lee, S. Y., 2000, Production of poly(3-hydroxybutyrate) by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli* with a highly concentrated whey solution, **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 8, 3624-3627.
- Akiyama, M., Doi, Y., 1993, Production of poly(3-hydroxyalkanoates) from α , ω -alkanedioic acids and hydroxylated fatty acids by *Alcaligenes* sp., **Biotechnology Letters**, 15, 2, 163-168.
- Anderson, A., Dawes, E., 1990, Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, **Microbiological Reviews**, 54, 4, 450-472.
- Andrup, L., Damgaard, J. and Wassermann, K., 1993, Mobilization of small plasmids in *Bacillus* subs. *israelensis* is accompanied by specific aggregation, **Journal of Bacteriology**, 175, 220, 6530-6536.
- Arda, M., 2000, Temel Mikrobiyoloji, **Medisan Yayınları**, Ankara.
- Arslan A., 1993, Keban baraj gölü aynalı sazanlarının (*Cyprinus carpio* L.) mikrobiyolojik ve kimyasal kaliteleri, **Doğa-Tr. Journal of Veterinary and Animal Sciences**, 17, 251-259.

- Asada, Y., Miyake, M., Miyake, J., Kurane, R. and Tokiwa, Y., 1999, Photosynthetic accumulation of poly(hydroxybutyrate) by cyanobacteria – the metabolism and potential for CO₂ recycling, **International Journal of Biologicals Macromolecule**, 25, 37-42.
- Asatani, M. and Kurahashi, K., 1977, Carbohydrate metabolism in *Bacillus brevis* ATCC 9999, **Journal of Biochemistry**, 81, 4, 813-822.
- Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y., 1998, Topraktan izole edilen Bazı *Bacillus* Türlerinin Poly- β - hydroxybutyrate (PHB) üretim miktarlarının belirlenmesi, **Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği Sempozyumu'98**, Anadolu Üni. ve Biyoteknoloji Derneği, 23-24 Ekim 1998 Eskişehir.
- Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y., 2002, Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil, **Turkish Journal of Biology**, 26, 41-48.
- Ateş, M., Ekmekçi, S., 2001, Pancar melası kültüründe *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)'dan PHB üretimi, **Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi**, 25, 3, 61-70.
- Bağcı, H., Shareef, S.R. ve Özdamar, K., 1991, *Bacillus thuringiensis* varyetelerinin sınıflandırılmasında sayısal taksonominin uygulanması, **Doğa Tr. J. of Biology**, 5, 70-81.
- Bapat S. and Shah A. K., 2000, Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*, **Canadian Journal of Microbiology**, 46, 125-132.
- Beaulieu, M., Beaulieu, Y., Melinard, J., Pandian, S., 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.
- Bendicho, S., Marti, G., Hernandez, T., Martin, O., 2002, Determination of proteolytic activity in different milk systems, **Food Chemistry**, in Press.
- Benoit, T. G., Wilson, G. R. and Baugh, C. L., 1990, Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Letters in Applied Microbiology**, 10: 15-18.
- Beyatlı, Y., 1996, Mikrobiyal Termoplastik Üretimi, **KÜKEM Dergisi**, 19, 2, 23-32.
- Beyatlı, Y., Aslım, B., Mumcu, Z. N., 1999, Doğada Parçalanabilen Termobiyoplastiklerin Üretimi. **Devlet Planlama Teşkilatı Projesi (DPT :97K121150)**, s.21-37, Ankara.
- Bilgehan, H., 1995, Klinik Mikrobiyolojik Tanı, **Barış Yayınları** Fakülteler Kitabevi, İzmir.

- Binnet, D. H., 1998, Çiğ Sütten İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin *Listeria monocytogenes* ve Diğer Bakteriler Üzerine Tuz ve Glukoz Konsantrasyonlarında İnhibitör Etkileri ile *Bacillus* Türlerinin Betalaktamaz Enzim Aktivitesi ve Betalaktamaz İnhibitörü Olan Antibiyotiklere Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması, **Yüksek Lisans Tezi**, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Bloembergen, S., Holden, D., Hamer, G., Bluhm, T., Marchessault, R., 1986, Studies of Composition and Crystallinity of Bacterial Poly(β -hydroxybutyrate-co- β -hydroxyvalerate), **Macromolecules**, 19, 2865-2871.
- Bodorova-Urgosikova, J., Benada, O., Tich, P., 1992, Large-scale isolation and partial characterization of plasmid DNA from *B. larvae*, **Folia Microbiologica**, 37, 2, 82-86.
- Bonartseva, G. A., 1985, Testing for activity of nodule bacteria in terms of poly- β -hydroxybutyrate accumulation following vital staining of the colonies with phosphine 3R, **Microbiology**, 54, 3, 371-374.
- Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., 1985, Fluorescence intensity of strains of nodule Bacteria (*Rhizobium melliloti*, *R. phaseoli*) differing in activity, Grown in the Presence Lipophilic vital stain phosphine 3R, **Microbiol.**, 54, 4, 535-541.
- Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., Zagreba, E. D., 1989, Relationship between poly- β -hydroxybutyrate content and nitrogenase and hydrogenase activity in some strains of *Rhizobium*, **Mikrobiologiya**, 58, 6, 920-922.
- Bonartseva, G., A., Myskina, V. L., Zagreba, E. D., 1994, Poly- β -hydroxybutyrate content in cells of various *Rhizobium* species during growth with different carbon and nitrogen sources, **Microbiol.**, 63, 1, 45-48.
- Bormann, E. J., Leissner, M., Beer, B., 1998, Growth-associated production of poly(hydroxybutyric acid) by *Azotobacter beijerinckii* from organic nitrogen substrates, **Appl. Microbiol, Biotechnol.**, 49, 84-88.
- 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., genser, K. L., 1998, Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects, **Journal of Biotechnology**, 65, 127-161.
- Buchanon, R. E. and Gibbons, N.E., 1974, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **Williams and Wilkins**, 1246 p, Baltimore.

- Budwill, K., Fedorak, P. M., Page, W. J., 1996, Anaerobic microbial degradation of poly(3-hydroxyalkanoates) with various terminal electron acceptors, **Journal of Environmental Polymer, Degradation**, 4, 2, 91-102.
- Burke, W., F., McDonald, K., O., Davidson, E., 1983, W., Effect of UV light on spore viability and Mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593, **Applied and Environmental Microbiology**, Oct., 954-956.
- Burrows, S., 1970, Baker's Yeast, The Yeast, edited by A. H. Rose, J. S. Harrison, **Academic Press**, London and New York, 365-369.
- Cash, P., 1998, Characterisation of bacterial proteomes by two-dimensional electrophoresis, **Analytica Chimica Acta**, 372, 121-145
- Charles, T. C., Cai, G., Aneja, P., 1997, Megaplasmid and chromosomal Loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*, **Genetics**, 146, 1211-1220.
- Chatterjee, S., Chatterjee, D. K., Jani, R. H., Blumberg, J., Ganguli, B. N., Klesel, N., Limbert, M., Seibert, G., 1992, Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity, **The Journal of Antibiotics**, 45, 6, 839-845.
- Chen, G. Q., König, K. H. and Lafferty, R. M., 1991, Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*. **FEMS Mic. Lett.**, 84:174-176.
- Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Salama, K., Hassen, A., Jaoua, S. and Boudabous, A., 2001, Thuricin 7: a novel bacteriosin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil, **Letters in Applied Microbiology**, 32, 243-247.
- Chilcott, C. N. and Wigley, P. J., 1993, Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand, **Journal of Invertebrate Pathology**, 61, 244-247.
- Clark, B. D., Boyle, T. M., Chu, C. and Dean, D. H., 1985, Restriction endonuclease mapping of three plasmids from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, **Gene**, 129, 169-171.
- Chowdhury, B. and John, M., 1998, Thermal evaluation of transgenic cotton containing polyhydroxybutyrate, **Thermochimica Acta**, 313, 43-53.
- Conover, W. J., 1971, Practical Nonparametric Statistics, **John Wiley and Sons Inc.**, New York.
- Cordes, C., Meima, R., Twiest, B., Kazemier, B., Venema, G., Dijk, J. M., Bron, S., 1996, The expression of a plasmid-specified exported protein causes structural plasmid instability in *Bacillus subtilis*, **Journal of Bacteriology**, 178, 17, 5235-5242.

- Cosmina, P., Rodrigez, F., Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., Sinderen, D., 1993, Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*, **Molecular Microbiol.**, 8,5,821-831.
- Cruikshank, R., 1972, **Medical Microbiology**, 11. Ed.,Livingstone, London.
- Çökmüş, C., Sayar, H., Saçılık, S. C., Osmanağaoğlu, Ö., Berber, I., 2000, Effects of UV-light on *Bacillus sphaericus* and its protection by chemicals, **Journal of Basic, Microbiology**, 40, 4, 215-221.
- Çökmüş, C. and Yousten, A. A., 1994, Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by SDS-PAGE, **Journal of Invertebrate Pathology**, 64, 267-268
- Daniel, M., Choi, J. H., Kim, J. H., Lebeault, J. M., 1992, Effect of nutrient deficiency on accumulation and relative molecular weight of poly- β -hydroxybutyric acid by methylotrophic bacterium, *Pseudomonas* 135, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 37, 702-706.
- Dave, H., Ramakrishna, C. and Desai, J. D., 1996, Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus* sp. IPCB-403. **Ind. Jour. Exp. Bio.**, 34: 216-219.
- Dawes, E. A., 1988, Polyhydroxybutyrate: Intriguing biopolymer, **Bioscience Reports**, 8, 6, 537-547.
- Demain, A. L., 1999, Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 52, 455-463.
- Desai, J. D. and Banat, I. M., 1997, Microbial production of surfactants and their commercial potential, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61,1, 47-64.
- Dobritsa, A. P., Dobritsa, S. V., Tanyashin, V. I., 1978, Isolation and characterization of plasmid from the *Bacillus brevis* var. G.-B. cells, **Molecular & General Genetics**, 164, 2, 195-204.
- Doi, Y., Kunioka, M., Nakamura, Y., Soga, K., 1986, Nuclear magnetic resonance studies on poly (Beta- hydroxybutyrate) and a copolester of beta-hydroxyvalerate isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16, **Macromolecules**, 19, 2860-2864.
- 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 pentatonic acids, **Appl. Microbiol.Biotechnol.**, 28, 330,334.
- Donovan, W.P., Tan, Y., Slaney, A. C., 1997, Cloning of the *nprA* gene for neutral protease A of *Bacillus thuringiensis* and effect of in vivo deletion of *nprA* on insectisidal crystal protein, **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 6, 2311-2317.

- Drablos, F., Nicholson, D., Ronning, M., 1999, EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1431, 433-442.
- Duitman, E. H., Hamoen, L., Rembold, M., Venema, G., 1999, The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an aminotransferase, and a fatty acid synthase, **Genetics**, 96, 23, 13294-13299.
- Dunlop, W. F., Robards, A. W., 1973, Ultrastructural Study of Poly- β -hydroxybutyrate granules from *Bacillus cereus*, **J. of Bacteriol.** 114, 3, 1271-1280.
- Durner, R., Witholt, B., Egli, T., 2000, Accumulation of poly(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas oleovorans* during growth with octanoate in continuous culture at different dilution rates, **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 8, 3408-3414.
- Eltem, R., Uçar, F., 1998, Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl'den izole edilmiş 23 *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması, **KÜKEM Dergisi**, 21, 1, s. 57-64.
- Encarnacion, S., Dunn, M., Willms, K. And Mora, J., 1995, Fermentative and aerobik metabolism in *Rhizobium etli*, **Journal of Bacteriology**, 177, 11, 3058-3066.
- Eren, Ö., 1996, *Bacillus* sp. Suşlarında Antibiyotik, Selulaz ve Amilaz Üretiminden Sorumlu Genlerin Protoplast Transformasyon Tekniği ile Gram (+) Bakterilere Transferi ve Ekspresyon Düzeyinin Araştırılması, **Yüksek Lisans Tezi**, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Esen, A., 1978, A simple method for quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein, **Analytical Biochemistry**, 89, 264-273.
- Favret M. E. and Yousten, A.A., 1989, Thuricin: the bacteriocin by a *Bacillus thuringiensis*, **Journal of Invertebrate Pathology**, 53, 206-216.
- Faust, R. M., Abe, K., Held, G. A., Iizuka, T., Bulla, L. A., Meyers, C. L., 1983, Evidence for plasmid-associated crystal toxin production in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, **Plasmid**, 9, 1, 98-103.
- Findlay, R. H. and White, D. C., 1983, Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 45, 1, 71-78.
- Galvez, A., Valdivia, E., Gonzalez-Segura, A., Lebbadi, M., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., 1993a, Purification, characterization and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amonebicins produced by *Bacillus licheniformis* A-12, **Applied and Environmental Microbiology**, 59, 5, 1480-1486.

- Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Lebbadi, M., Valdivia, E., 1993b, Isolation and physico-chemical characterization of an antifungal and antibacterial peptide produced by *Bacillus licheniformis* A-12, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 39, 438-442.
- Galvez, A., Maqueda, M., Cordovilla, P., Martinez-Bueno, M., Lebbadi, M., Valdivia, E., 1994, Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amonebicins produced by *Bacillus licheniformis* D-13, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 38, 6, 1314-1319.
- Giffel, M. C., Beumer, R.R., Leijendekkers, S., Rombouts, F. M., 1996, Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands, **Food Microbiology**, 13, 1, 53-58.
- Giffel, M. C., Beumer, R.R., Granum, P. E., Rombouts, F. M., 1997, Isolation and characterisation of *Bacillus cereus* from pasteurised milk in household refrigerators in the Netherlands, **International Journal of Food Microbiology**, 34, 307-318.
- Gomez, J. G. C., Rodrigues, M. F. A., Alli, R. C. P., Torres, B. B., Bueno Netto, C. L., Oliveira, M. S., da Silva, L. F., 1996, Evaluation of soil gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates and propionic acid, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45, 785-791.
- Gouda, M. K., Swellam A. E., Omar, S. H., 2001, Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources, **Microbiological Research**, 156, 3, 201-207.
- Gültekin, M., 2000, Probiyotikler ve etki mekanizmaları, **XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi**, 8-13 Ekim, Antalya.
- Hanzlikova, A., Jandera, A., Kunc, F., 1985, Poly-3-hydroxybutyrate production and changes of bacterial community in the soil, **Folia Microbiol.**, 30, 58-65.
- He, H., Silo-suh, L. A., Handelsman, J., Clardy, J., 1994, Zwittermicin A, an antifungal and plant protection from *Bacillus cereus*, **Tetrahedron Letters**, 35, 16, 2499-2502.
- He, H., Shen, B., Korshalla, J., Carter, G., T., 2001, Circulosins, new bacterial lipopeptides from *Bacillus circulans*, J2124, **Tetrahedron**, 57, 1189-1195.
- Hillier, P., Wase, D. A. J., Emery, A. N. and Solomons, G. L., 1997, Instability of α -amylase production and morphological variation in continuous culture of *Bacillus amyloliquefaciens* is associated with plasmid loss, **Process Biochemie**, 32, 1, 51-59.
- Hiki, S., Miyamoto, M., Kimura, Y., 2000, Synthesis and characterization of hydroxy-terminated [RS]-poly-(3-hydroxybutyrate) and its utilization to

block copolymerization with L-lactide to obtain a biodegradable thermoplastic elastomer, **Polymer**, 41, 7369-7379.

- Himeno, M., Ikeda, M., Sen, K., Koyama, N., Komano, T., Yamamoto, H. and Nakayama, I., 1985, Plasmids and insecticidal activity of delta-endotoxin crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, **Agric. Biol. Chem.**, 49, 3, 573-580.
- Hiraoka, H., Asaka, O., Ano, T. and Shoda, M., 1992, Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin a and surfactin, **J. Gen. Appl. Microbiol.**, 38, 635-640.
- Hoffmann, N., Steinbüchel, A., Rehm, B. H. A., 2000, Homologous functional expression of cryptic phaG from *Pseudomonas oleovorans* establishes the transacylase-mediated polyhydroxyalkanoate biosynthetic pathway, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 54, 665-670.
- Hori, K., Kaneko, M., Tanji, Y., Xing, XH., Unno, H., 2002, Construction of self-disruptive *Bacillus megaterium* in response to substrate exhaustion for polyhydroxybutyrate production, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 59(2-3), 211-216.
- Holmes, P. A., 1985, Applications of PHB – A Microbially produced Biodegradable Thermoplastic, **Phys. Technol.**, 16, 32-36.
- Hossain, M. A., Ahmed, S., Hoque, Sirajul, 1997, Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh, **Journal of Invertebrate Pathology**, 70, 221-225.
- Hughes, M. N., Poole, R. K., 1989, Manganese transport in Bacteria, Ions and Microorganisms, **Metals and Micro-organisms**, Chapman and Hall, London.
- Huisman, G. W., Leeuw, O., Eggink, G., Witholt, B., 1989, Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates, is a common feature of fluorescent *Pseudomonads*, **Applied and Environmental Microbiology**, 55, 8, 1949-1954.
- Huisman, G. W., Wonink, E., Koning, G., Preusting, H., Witholt, B., 1992, Synthesis of poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 38, 1-5.
- Ibanez, A. M., Altuna, B., Diaz De Villegas, M. E., 1992, Effect of different nitrogen and carbon sources on the proteolytic activity, **Acta Biotechnology** 12, 187-190.
- Ishib, T., Ohba, M., 1993, Characterization of Mosquito specific *Bacillus thuringiensis* strains coisolated from a soil population, **System. Appl. Microbiol.** 16, 494-499.

- Jack, W. R., Tagg, J. R. and Ray, B., 1995, Bacteriocins of gram-positive bacteria, **Microbiological Reviews**, 59, 2, 171-200.
- Jan, S., Roblot, C., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N. and Seguin, J. P., 1996, ¹H NMR spectroscopic determinatin of poly 3-hydroxybutyrate extracted from microbial biomass, **Enzyme and Microbial Technol.**, 18, 195-201.
- Jaoua, S., Zouari, N., Tounsi, S., Ellouz, R., 1996, Study of the –endotoxins produced by three recently isolated strains of *Bacillus thuringiensis*, **FEMS Microbiology Letters**, 145, 349-354.
- Jobin, M. P., Clavel, T., Carlin, F., Schmitt, P., 2002, Acid tolerance response is low-pH and late-stationary growht phase inducible in *Bacillus cereus* TZ415, **International Journal of Food Microbiology**, 2495, in Press.
- Johnvesly, B., Naik, G.R., 2001, Pigeon pea waste as anovel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chmically defined medium, **Process Biochemistry**, 37, 139-144.
- Johnvesly, B., Manjunath, B.R., Naik, G.R., 2002, Pigeon pea waste as anovel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99, **Bioresource Technology**, 82, 61-64.
- Kajimura, Y., Sugiyama, M., Kaneda, M., 1995, Bacillopeptins, new cyclic lipopeptide antibiotics from *Bacillus subtilis* FR-2, **Journal of Antibiotics**, 48, 10,1095-1103.
- Kajimura, Y. and Kaneda, M., 1996, Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 : Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity, **J. Antibiotics**, 49,2, 129-135.
- Kajimura, Y. and Kaneda, M., 1997, Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 : Isolation, structure elucidation and biological activity, **J. Antibiotics**, 50, 3, 220-228.
- Kalaylı, E., 2001, Süt ve Fermente Ürünlerden İzole Edilen *Bacillus* Bakterilerinin Antimikrobiyal Aktivite, PHB Üretim ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi, **Yüksek Lisans Tezi**, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- 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, 55-66.
- Karaboz, İ., Umay, F. B., 1994, *Pseudomonas extorquens* den PHB üretiminde farklı karbon kaynaklarının etkisi, **XII. Ulusal Biyoloji Kongresi**, 6-8 Temmuz 1994 Edirne, 14-17.

- Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. and Sakazawa, C., 1992, Production of 3-Hydroxybutyric Acid Trimer by *Bacillus megaterium* B-124. **Jour. Ferment. And Bioeng.**, 73, 3: 246-247.
- Kembhavi, A.A., Kulkarni, A., Pant, A., 1993, Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No.64, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 38, 83-92.
- Khan, S. T., Hiraishi, A., 2001, Isolation and characterization of a new poly(3-hydroxybutyrate)-degrading, denitrifying bacterium from activated sludge, **FEMS Microbiology Letters**, 205, 253-257.
- Kishore, L., Natarajan, K. and Babu, C. R., 1996, Total soluble protein and membrane lipopolisaccharide profiles in differentiating *Rhizobium* isolates, **Microbios**, 86, 143-156.
- Kunnimalaiyaan. M, Stevenson, D. M., Zhou, Y., Vary, P. S., 2001, Analysis of the replicon region and identification of an rRNA operon on pBM400 of *Bacillus megaterium* QM B1551, **Molecular Microbiology**, 39, 4, 1010-1021.
- Kim, S. B, 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, W., Choi, K., Kim, Y., Park, H, Choi, J., Lee, Y., Oh, H., Kwon, I., Lee, S., 1996, Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 Screened from Chungkoo-Jang, **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 7, 2482-2488.
- Kim, B. S., 2000, , Production of poly(3-hydroxybutyrate) from inexpensive substrates, **Enzyme and Microbial Technology**, 27, 774-777.
- Kim, Y., Bae, J., Oh, B., Lee, W. H., Choi, J., 2002, Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process, **Bioresource Technology**, 82, 157-164.
- Klinke, S., Ren, Q., Witholt, B., Kessler, B., 1999, Production of medium-chain-length poly(3-hydroxyalkanoates) from Gluconate by recombinant *Escherichia coli*, **Applied and Environmental Microbiology**, 65, 2, 540-548.
- Kudrya, V. A. and Simonenko, I. A., 1994, Alkaline serine proteinase and lectin isolation from the culture fluid of *Bacillus subtilis*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 41, 505-509.

- Kunitate, A., Okamoto, M., Ohmori, I., 1989, Purification and characterization of a thermostable serine protease from *Bacillus thuringiensis*, **Agric. Biol. Chem.**, 53, 3251-3256.
- Labuzek S., and Radecka, I., 2001, Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85, **Journal of Applied Microbiology**, 90, 353-357.
- Lach, D. A., Sharma, V. K., and Vary, P. S., 1990, Isolation and characterization of a unique division mutant of *Bacillus megaterium*, **J. Gen. Microbiol.**, 136, 545-553.
- Laemli, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, 227, 680-685.
- Lafferty, R. M., Korsatko, B., Korsatko, W., 1988, Microbial production of poly- β -hydroxybutyric acid, *Biotechnology*, edited by H. J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, **VCH Verlagsgesellschaft**, Weinheim.
- Laland, S. G., Zimmer, T., 1984, Synthesis of peptid antibiotics by the thiotemplate mechanism, **Biologically Active Principles of Natural Products**, edited by W. Voelter and D. G. Daves, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W., Yu, P. H., 2001, Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 91-93, 515-524.
- Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B. and Urdaci, M. C., 2000, Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin by *Bacillus coagulans* I⁴, **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 12, 5213-5220.
- Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N., Chang, Y. K., 1994, Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly(3-hydroxybutyric acid) by recombinant *Escherichia coli*, **Journal of Biotechnology**, 32, 203-211.
- Lee, S. Y., 1996, Bacterial Polyhydroxyalkanoates, **Biotechnology and Bioengineering**, 49, 1-14.
- Lee, S. Y., Lee, Y., Wang, F., 1999, Chiral compounds from Bacterial polyesters: Sugar to plastics to fine chemicals, **Biotechnology and Bioengineering**, 65, 3, 363-368.
- Lee, K. H., Jun, K. D., Kim, W.S. and Paik, H. D., 2001, Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*, **Letters in Applied Microbiology**, 32, 146-151.

- Lebbadi, M., Galvez, A., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M., 1994a, Purification of amoebolytic substances from *Bacillus licheniformis* M-4, **Arch. Microbiol.**, 162, 98-102.
- Lebbadi, M., Galvez, A., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Valdivia, E., 1994b, Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4, **Journal of Applied Microbiology**, 77, 1, 49-53.
- Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H. A. S., Harbour A., 1995, Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45, **Journal of Applied Microbiology** 78, 2, 97-108.
- Lillo, J. G., Valera, F. R., 1990, Effects of culture conditions on poly(β -hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*, **Applied and Environmental Microbiology**, 56, 8, 2517-2521.
- Lootz, D., Behrend, D., Kramer, S., Freier, T., Haubold, A., Benkiesser, G., Schmitz, K. P., Becher, B., 2001, Laser cutting: influence on morphological and physicochemical properties of polyhydroxybutyrate, **Biomaterials**, 22, 2447-2452.
- Madden, L. A., Anderson, A. J., Asrar, J., Berger, P., Garrett, P., 2000, Production and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Ralstonia eutropha* in fed-batch cultures, **Polymer**, 41, 3499-3505.
- Madison, L. L., Huisman, G. W., 1999, Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic, **Mic. Mol. Bio. Reviews**, 63, 21-53.
- Manachini, P. L., Fortina, M. G., Parini, C., 1988, Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* – a new species of *Bacillus*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 28, 409-413.
- Manchak, J., Page, W. J., 1994, Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD, **Microbiology**, 140, 953-963.
- Manna, A., Banerjee, R., Paul, A. K., 1999, Accumulation of poly(3-Hydroxybutyric acid) by some soil *Streptomyces*, **Current Microbiology**, 39, 153-158.
- Marahiel, M. A., 1992, Molekular biologie und regulationmechanismen der antibiotika produktion in *Bacillus*, **Naturwissenschaften**, 79, 202-212.
- Massie, J., Roberts, G., White, P. J., 1985, Selective isolation of *Bacillus sphaericus* from soil by use of acetate as the only major source of carbon, **Applied and Environmental Microbiology**, June, 1478-1481.

- Matar, G. M., Slieman, T. A., Nabbut, N. H., 1996, Subtyping of *Bacillus cereus* by total cell protein patterns and arbitrary primer polymerase chain reaction, **European Journal of Epidemiology**, 12, 3, 309-314.
- McCool, G. J. and Cannon, M. C., 1999, Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*, **J. Bacteriol.**, 181 (2), 585-592.
- McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., Cannon, M. C., 1996, Polyhydroxyalkanoate inclusion body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, **FEMS Microbiol. Lett.**, 138, 41-48.
- McDonald, K. O. and Burke, W. F., 1984, Plasmid transformation of *Bacillus sphaericus* 1593, **Journal of General Microbiology**, 130, 203-208.
- Mercan, N., 1996, *Bacillus sphaericus* Suşlarının PAGE ile Elde Edilen Hücre Dışı Protein Profillerine Göre Ayırımı, **Yüksek Lisans Tezi**, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Mercan, N., Beyath, Y., 2001, *Bacillus sphaericus* suşlarının poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimlerinin incelenmesi, **Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi**, 25, 2, 1-7.
- Mercan, N., 2002, *Rhizobium* Cinsi Bakterilerin Poli- β -Hidroksibütirat Üretimlerinin Belirlenmesi, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-Page) ile Elde Edilen Toplam Protein Profillerinin ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi, **Doktora Tezi**, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Mergaert, J., Webb, A., Anderson, C., Wouters, A., Swings, 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.
- Mignone, C. F. and Avignone-Rossa, C., 1996, analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 46, 78-84.
- Mikesell, P., Ivins, B.E., Ristoph, J. D., Dreier, T. M., 1983, Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis*, **Infection and Immunity**, 39, 1, 371-376.
- Milner, J. L., Raffel, S.J., Lethbridge, B. J., Handelsman, J., 1995, Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 43, 4, 685-691.
- Milner, J.L., silo-suh, L., Lee, L. C., He, H., Clardy, J. and Handelsman, J., 1996, Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85, **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 8, 3061-3065.

- Misra, A. K., Thakur, M. S., Srinivas, P., Karanth, N. G., 2000, Screening of poly- β -hydroxybutyrate-producing microorganism using Fourier transform infrared spectroscopy, **Biotechnology Letters**, 22, 1217-1219.
- Miyake, M., Kataoka, K., Shirai, M., Asada, Y., 1997, Control of Poly- β -hydroxybutyrate Synthase mediated by acetyl phosphate in *Cyanobacteria*, **J. of Bacteriol.**, 179, 16, 5009-5013.
- Molitoris, H. P., Moss, S. t., de Koning, G. J. M., 1996, Scanning electron microscopy of polyhydroxyalkanoate degradation by bacteria, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 46, 570-579.
- Moravcova, J. and Vachova, L., 1993, Dependence of intracellular proteolytic enzymes in growing and sporulating cells of *Bacillus megaterium* on Ca^{+2} concentration, **Folia Microbiol.**, 38, 201-204.
- Morikawa, M., Ito, M., Imanaka, T., 1992, Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus A-1*, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, *psf-1*, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 74, 5, 255-261.
- Müderrizade, A., Ensari, N. Y., Aguloğlu, S., Otludil, B., 2001, Purification and characteristics of alkaline proteinase from alkalophylic *Bacillus* sp., **Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya**, 37, 6, 674-677.
- Naclerio, G., Ricca, E., Sacco, M. and De Felice, M., 1993, Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*, **Applied and Environmental Microbiology**, 59, 12, 4313-4316.
- Nakagawa, A., Konda, Y., Hatano, A., Omura, S., 1988, Structure and biosynthesis of novel antibiotics, Aurantinins A, and B by *Bacillus aurantinus*, **J. Org. Chem.**, 53, 2660-2661.
- Nam, D. H. and Ryu, D. D. Y., 1985, Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *Bacillus circulans*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 27, 5, 798-801.
- Nicholson, W. L., Law, J. F., 1999, Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural Sonoran desert soil populations of *Bacillus* spp. With reference to *B. subtilis* strain 168, **Journal of Microbiological Methods**, 35, 13-21.
- Nickerson, K. W., Zarnick W. J. and Kramer, V. C., 1981, Poly-B-Hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, **FEMS Microbiology Letters**, 12: 327-331.
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M., 1996, Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22, **Process Biochemistry**, 31, 8, 801-806.

- Ombui, J. N., Mathenge, J. M., Kimotho, A. M., Macharia, J. K. and Nduhiu, G., 1996, Frequency of antimicrobial resistance and plasmid profiles of *Bacillus cereus* strains isolated from milk, **East African Medical Journal**, 73, 6, 380-384.
- Oscariz, J. C., Lasa, I., Pisabarro, A., G., 1999, Detection and characterization of cerein 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity, **FEMS Microbiology Letters**, 178, 337-341.
- Ota, Y., Tamegai, H., Kudo, F., Kuriki, H., Koike-Tageshita, A., eguchi, T., Kakinuma, K., 2000, Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*, **Journal of Antibiotics**, 53, 10, 1158-1167.
- Page, W. J., 1989, Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 31, 329-333.
- Page, W. J. and Knosp, O., 1989, Hyperproduction of Poly- β -hydroxybutyrate during exponential growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, **Appl. Environ. Microbiol.** 55, 6, 1334-1339.
- Page, W. J., 1992a, Suitability of commercial beet molasses fractions as substrates for polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii* UWD, **Biotechnol. Lett.**, 14, 5, 385-390.
- Page, W. J., 1992b, Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture, **FEMS Microbiology Reviews**, 103, 149-158.
- Page, W. J. and Cornish, A., 1993, Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly- β -hydroxybutyrate, **Appl. Environ. Microbiol.** 5, 12, 4236-4244.
- Page, W. J. and Manchak, J., 1995, The role of β -oxidation of short-chain alkanoates in polyhydroxyalkanoate copolymer synthesis in *Azotobacter vinelandii* UWD, **Can. J. Microbiol.** 41, 6, 106-114.
- Page, W. J., Sherburne, R., D'Elia, L., Graham, L. L., 1995, Poly(β -hydroxybutyrate) extrusion from pleomorphic cells of *Azotobacter vinelandii* UWD, **Can. J. Microbiol.**, 41, 22-31.
- Paik, S., H., Bae, S. S., Park, S. H., Pan, J. G., 1997, Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*, **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 19, 4, 294-298.

- Paik, S., H., Chakicherla, A., Hansen, J. N., 1998, Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168, **The Journal of Biological Chemistry**, 273, 36, 23134-23142.
- Parini, C., Fortina, M. G. , Manachini, P. L., De Rossi, E., Riccardi, G., 1991, Detection and characterization of naturally occurring plasmids in *Bacillus licheniformis*, **FEMS Microbiology Letters**, &5, 3, 329-334.
- Patel, P. S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P., Mayerl, F., 1995, *Bacillaene*, a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity, **Journal of Antibiotics**, 48, 9, 997-1003.
- Peek, K., Veitch, D. P., Prescott, M., Daniel, R. M., Maciver, B., and Bergquist, P., 1993, Some characteristics of a Proteinase from a thermophilic *Bacillus* sp. expressed in *Escherichia coli*: comparison with the native enzyme and its processing in *E. coli* and in vitro, **Applied and Environmental Microbiology**, 59, 4, 1168-1175.
- Perez, C., Suarez, C., Castro, G. R., 1992, Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15, **Journal of Biotechnology**, 26, 331-336.
- Perez, C., Suarez, C., Castro, G. R., 1993, Antimicrobial Activity Determined in Strains of *Bacillus circulans* Cluster, **Folia Microbiol.** 38, 1, 25-28.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M., Wallach, J., 1999, Recent trends in the biochemistry of surfactin, **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51, 5, 553-563.
- Phlippis, R., Ena, A., Guastini, M., Sili, C., Vincenzini, M., 1992, Factors affecting poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *cyanobacteria* and in purple non-sulfur bacteria, **FEMS Microbiology Reviews**, 103, 187-194.
- Pichard, B., Larue, J., Thouvenot, D., 1995, Gavaserin and saltavalin, new peptide antibiotics produced by *Bacillus polymyxa*, **FEMS Microbiology Letters**, 133, 215-218.
- Pierce, L. and Schroth, M. N., 1994, Detection of *Pseudomonas* colonies that accumulate poly- β -hydroxybutyrate on Nile blue medium, **Plant Disease**, 78, 7, 683-685.
- Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Megraud, F. and Urdaci, M., 2001, In vitro Anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 45, 11, 3156-3161.

- Poirier, Y., 2002, Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, **Progress in Lipid Research**, 41, 2, 131-155.
- Pollack, A., 2002, Drug research yields a decreasing return, **The New York Times**, April 20.
- Pool, R., 1989, In search of the plastic potato, **Science**, 245, 1187-1189.
- Priest F. G., 1993, *Bacillus*, **Biotechnology, Biological Fundamentals**, by H. Sahm, Wiley-Vch Verlag GmbH, Volume 1, Weinheim.
- Qi, Q., Rehm, B. H., 2001, Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase, **Microbiology**, 147, 12, 3353-3358.
- Ramsay, B. A., Lomaliza, K., Chavarie, C., Dube, B., Bataille, P., Ramsay, J. A., 1990, Production of poly-(β -hydroxybutyric-co- β -hydroxyvaleric) acids, **Applied and Environmental Microbiology**, 56, 7, 2093-2098.
- Ramsay, B. A., Sarcovan, I., Ramsay, J. A., Marchessault, R. H., 1992, Effect of nitrogen limitation on long side-chain poly- β -hydroxyalkanoate synthesis by *Pseudomonas resinovorans*, **Appl. Environ. Microbiol.**, 58, 2, 744-746.
- Rehm, B. H. A., Antonio, R. V., Spiekermann, P., Amara, A. A., Steinbüchel, A., 2002, Molecular characterization of the poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase from *Ralstonia eutropha*: in vitro evolution, site-specific mutagenesis and development of a PHB synthase protein model, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1594, 178-190.
- Reinheimer, J. A., Demkov, M. R. And Condioti, M. C., 1990, Inhibition of coliform bacteria by lactic cultures, **The Aust. J. Dairy Technol.**, May, 5-9.
- Rosovitz, M., J., Voskuil, M., I., Chambliss, G., H., 1998, *Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, by edited L. Collier, A. Balows and M. Sussman, **Oxford University Press**, Ninth Edition, Volume 2, New York.
- Rostas, K., Dobritsa, S. V., Dobritsa, A. P., Konez, C., Alföldi, L., 1980, Magacinogenic plasmid from *Bacillus megaterium* 216, **Molecular & General Genetics**, 180, 2, 323-329.
- Rozs, M. Manczinger, L., Vagvölgyi, Cs., Kevei, F., 2001, Secretion of a trypsin-like thiol protease by a new keratinolytic strain of *Bacillus licheniformis*, **FEMS Microbiology Letters**, 205, 221-224.
- Sadettin, S., 2000, Bazı *Bacillus* cinsi bakterilerinin PHB üretim yeteneklerinin incelenmesi. **Yüksek Lisans Tezi**, Ankara Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- Sambrook, J., Fritseh, E. F and Maniatis, T., 1989, Factors affecting the rate of DNA migration in agarose gels, **Molecular Cloning**, 643-645.
- Sarıseker, N., 1983, Fermentasyon Yolu ile Antibiyotik Üretimi, Endüstriyel Mikrobiyoloji, editör E. T. Çetin, **İstanbul Üniversitesi Vakfı**, 280-304.
- Schlegel, H., 1992, Produktion Sekundärer Metabolite, **Allgemeine Mikrobiologie, Georg-Thieme Verlag** s. 362-371,.
- Schöber, U., Thiel, C., Jendrossek, D., 2000, Poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase of *Pseudomonas lemoignei*, **Applied and Environmental Microbiology**, 66, 4, 1385-1392.
- Schreiber, L. R., Gregory, G.F., Krause, C. R., Ichida, J. M., 1998, Production, partial purification, and antimicrobial activity of a novel antibiotic produced by a *Bacillus subtilis* isolate from *Ulmus americana*, **Can. J. Bot.**, 66, 2338-2346.
- Sei, K., Nakao, M., Mori, K., Ike, M., Kohno, T., Fujita, M., 2001, Design of PCR primers and a gene probe for extensive detection of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB)-degrading bacteria possessing fibronectin type III linker type-PHB depolymerases, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 55, 801-806.
- Semenov, A. M., Hanzlikova, A., Jandera, A., 1989, Quantitative estimation of poly-3-hydroxybutyric acid in some oligotrophic *polyprosthecae* bacteria, **Folia Microbiol.**, 34, 267-270.
- Shibazaki, M., Sugawara, T., nagai, K., Shimizu, Yamaguchi, H. and Suzuki, K., 1996, YM-47522, A novel antifungal antibiotic produced by *Bacillus* sp. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties, **The Journal of Antibiotics**, 49, 4, 340-344.
- Silo-Suh, L. A., Lethbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J., Handelsman, J., 1994, Biological Activities of two fungistatic Antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85, **Appl. Environ. Microbiol.** 60, 6, 2023-2030.
- Sim, S. J., snell, K. D., Hogan, S. a., stubbe, J., Rha, C., Sinskey, A. J., 1997, PHA synthase activity controls the molecular weight and polydispersity of polyhydroxybutyrate in vivo, **Nature Biotechnology**, 15, 63-67.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, R. C., 2001, Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1, **Process Biochemistry**, 36, 781-785.
- Sgarrella, F., Poddie, F. P. A., Meloni, A. M., Sciola, L., Pippia, P., Tozzi, M. G., 1997, Channelling of deoxyribose moiety of exogenous DNA into carbohydrate metabolism: role of deoxyriboaldolase, **Comp. Biochem. Physiol.** 117 B, 2, 253-257.

- Sneath, P. H. A., 1986, Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, edited by P. H. A Sneath, , N. S., Mair, M. E., Sharpe, J. G Holt, **Williams and Wilkins**, Volume 2, 1104-1139, Baltimore.
- Stabb, E. V., Jacobson, Lynn, M. and Handelsman, J., 1994, Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils, **Applied and Environmental Microbiology**, 60, 122, 4404-4412.
- Stieb, M. and Schink, B., 1984, A new 3-hydroxybutyrate fermenting anaerobe, *Ilyobacter polytropus*, ge. Nov. sp. nov., possessing various fermentation pathways, **Arch. Microbiol.**, 140, 139-146.
- Stohl, E. A., Milner, J. L., Handelsman, J., 1999, Zwittermycin A biosynthetic cluster, **Gene**, 237, 403-411.
- Steinbüchel, A., 1991, Recent advances in the knowledge of the metabolism of bacterial polyhydroxyalkanoic acids and potential impacts on the production of biodegradable thermoplastics, **Acta Biotechnol.**, 11, 5, 419-427.
- Steinbüchel, A., Schlegel, H. G., 1991, Physiology and molecular genetics of poly (β -hydroxy-alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*, **Molecular Microbiology**, 5, 3, 535-542.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein, T., Conrad, B., Hofemeisterr, J., Jaques, P., Thonart, P. and Vater, J., 1999, Structural and functional organization of the fengycin synthase multianzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3, **Chemistry & Biology**, 6,1, 31-41.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi, Y., 1998, Production of the antibacterial substance by *Bacillus* sp. strain Nm 12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish, **Aquaculture**, 165, 269-280.
- Swiecicka, I., 2001, Protein profile and biochemical properties of *Bacillus circulans* isolated from intestines of small free-living animals in Poland, **Folia Microbiologica**, 46, 2, 165-171.
- Taguchi, S., Maehara, A., Takase, K., Nakahara, M., Nakmura, H., Doi, Y., 2001, Analysis of mutational effects of a polyhydroxybutyrate (PHB) polymerase on bacterial PHB accumulation using an in vivo assay system, **FEMS Microbiology Letters**, 198, 65-71.
- Taidi, B., Anderson, A., Dawes, E. A., Byrom, D., 1994, Effect of carbon source and cocentration on the moecular mass of poly(3-hydroxybutyrate) produced by *Methylobacterium extorquens* and *Alcaligenes eutrophus*, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 40, 786-790.

- Tal S. and Okon, Y., 1985, Production of the reserve material poly- β -hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense* Cd, **Can. J. Microbiol.**, 31, 608-613.
- Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. and Ochi, K., 2002, Bacilysoicin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 168, 46, 2, 315-320.
- Tamer, M., 2002, İlaç devleri yeni ilaç keşfedemiyor, **Milliyet**, Nisan 23.
- 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, T., Kuroda, M. and Sakaguchi, K., 1977, Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*, **Journal of Bacteriology**, 129, 3, 1487-1494.
- Tanaka, T., Koshikawa, T., 1977, Isolation and characterization of four plasmids from *Bacillus subtilis*, **Journal of Bacteriology**, 131, 3, 699-701.
- Tanaka, K., Katamune, K., 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., Barbotin, J. N., 1997, Exopolysaccharide and poly- β -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains, **Applied and Environmental Microbiology**, 63, 1, 21-26.
- Temiz, A., 1994, Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, **Hatiboğlu Yayınevi**, Ankara.
- Tunç, K., 1995, Biyoteknoloji, **Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi**, Ankara, s. 80-86.
- Uğur, A., Şahin, N., Beyatlı, Y., 2002, Accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in *Streptomyces* species during growth with different nitrogen sources, **Turk. J. Biol.**, 26, 171-174.
- URL 1: [http:// www. bact.wisc. edu/ScienceEd/BacterialPlastics.html](http://www.bact.wisc.edu/ScienceEd/BacterialPlastics.html)
- URL 2: [http:// www.cidt.scar.utoronto.ca/BGYC55/C55-2001-L7-web.html](http://www.cidt.scar.utoronto.ca/BGYC55/C55-2001-L7-web.html)
- URL 3: <http://www.fao.org/ WAICENT/ FAOINFO/ AGRICULT/AGP/ AGPC/ gp/SILA GE/HTML/Paper2.html>

URL 4: [http:// www. clt.astate.edu/dgilmore/Research%20students/phas.html](http://www.clt.astate.edu/dgilmore/Research%20students/phas.html)

URL 5: [http:// www. bio.umass.edu/biochem/cannon/htmlfiles/research.html](http://www.bio.umass.edu/biochem/cannon/htmlfiles/research.html)

URL 6: [http:// www. snf.ch/de/com/prr/prr_arh_00feb21.asp](http://www.snf.ch/de/com/prr/prr_arh_00feb21.asp)

URL 7: [http:// www. rhball.ie/bulletins/molasses_html](http://www.rhball.ie/bulletins/molasses_html)

URL 8: [http:// www. textbookofbacteriology.net/antimicrobial.html](http://www.textbookofbacteriology.net/antimicrobial.html)

URL 9: [http:// www. bact.wisc.edu/microtextbook/Bacteria/Structure/DNA.html](http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/Bacteria/Structure/DNA.html)

URL 10: [http:// www. bact.wisc.edu/microtextbook/BactGenetics/conjugation1.html](http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/BactGenetics/conjugation1.html)

Xi, J., Wu, Q., Yan, y., Zhang, Z., Yu, P. H. F., Cheung, M. Zhang, R., Chen, G., 2000, Hyperproduction of polyester consisting of medium-chain-length hydroxyalkanoate monomers by strain *Pseudomonas stutzeri* 1317, **Antonie van Leeuwenhoek**, 78, 43-49.

Valentin, H. E., Lee, E. Y., Choi, C. Y., Steinbüchel, A., 1994, Identifications of 4-hydroxyhexanoic acid as a new constituent of biosynthetic polyhydroxyalkanoic acids from bacteria, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 40, 710-716.

Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R. M. and Pault, G., 1997, Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*, **Biologicals**, 25, 289-297.

Volpon, L., Besson, F., Lancelin, J. 2000, NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A₂, **FEBS Letters**, 485, 76-80.

Voskuil, M. I., Chambliss, G. H., 1993, Rapid isolation and sequencing of purified plasmid DNA from *Bacillus subtilis*, **Applied and Environmental Microbiology**, 59, 4, 1138-1142.

Vural, T., 2000, Probiyotiklerin gelişimi, **XXIX. Türk Mikrobiyoloji Kongresi**, 8-13 Ekim, Antalya.

Wallen, L. L. and Rohwedder, K. W., 1974, Poly- β -hydroxyalkanoate from activated sludge, **Environmental Science & Technology**, 8, 6, 576-579.

Watanabe, K. and Hayano, K., 1993, Distribution and identification of proteolytic *Bacillus* spp. In paddy field soil under rice cultivation, **Can. J. Microbiol.**, 39, 674-680.

Weber, C. J., 2000, Biobased Packaging Materials for the food Industry, **The EU Directorate 12**, Frederiksberg.

- Wipat, A., Harwood, C. R., 1999, The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium, **FEMS Microbiology Ecology**, 28, 1-9.
- Witholt, B., Kessler, B., 1999, Perspectives of medium chain length poly(hydroxyalkanoates), a versatile set of bacterial bioplastics, **Current Opinion in Biotechnology**, 10, 279-285.
- Woodford, N., and Johnson, A. P., 1998, Plasmid Analysis, **Molecular Bacteriology**, Humana Press, New Jersey.
- Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K., Chen, G., 2001, Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus* sp. Jma5 cultivated in molasses media, **Antonie van Leeuwenhoek**, 80, 111-118.
- Yakabe, Y., Nohara, K., Hara, T., Fujino, Y., 1992, Factors affecting the biodegradability of biodegradable polyester in soil, **Chemosphere**, 25, 12, 1879-1888.
- Yakimov, M. M., Timmis, K. N., Wray V., Fredrickson, H. L., 1995, Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50, **Applied and Environmental Microbiology**, 61, 5, 1706-1713.
- Yan, Y., Wu, Q., Zhang, R., 2000, Dynamic accumulation and degradation of poly(3-hydroxyalkanoate)s in living cells of *Azotobacter vinelandii* UWD characterized by ¹³C NMR, **FEMS Microbiology Letters**, 193, 269-273.
- Yin, X. S., Li, Y. X. and Stark, J. R., 1991, Amylase, β -glucanase and protease activities from a mutant of *Bacillus subtilis*, **Starch/Stärke**, 43, 10, 403-409.
- Yoshimura, K., Yamamoto, O., Seki, T., Oshima, Y., 1983, Distribution of heterogenous and homologous plasmids in *Bacillus* spp., **Applied and Environmental Microbiology**, 46, 6, 1268-1275.
- Young, C., S., Lethbridge, G., Shaw, L., J., Burns, R., G., 1995, Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in nonplanted and rhizosphere soil, **Soil Biol. Biochem**, 27, 8, 1017-1026.
- Yüksekdağ, Z. N., Beyath, Y., Asım, B., 2003, Determination of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) production by some mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria, **Turk. J. Biol.**, 27, 37-42.
- Zakharian, R. A., Israelian, I. A., Agabalian, A. S., Tatevosian, P. E., Akopian, S. M., 1979, *Bacillus thuringiensis* plasmid DNA, **Mikrobiologia**, 48, 2, 226-229.

- Zawadzki, P., Riley, M. A. and Cohan, F. M., 1996, Homology among nearly all plasmids infecting three *Bacillus* species, **Journal of Bacteriology**, 178, 1, 191-198.
- Zheng, G. and Slavik, M. F., 1999, Isolation, partial purification and characterization of a Bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain, **Letters in App. Microbiol.**, 28, 363-367.
- Zimmerman S. B., Schwartz, C. D., Monaghan, R. L., Pelak, B. A., Weissberger, B., Gilfillan, E. C., Mochales, S., Hernandez, S., Currie, S. A., Tejera, E. and Stapley, E. O., 1987, Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*, **The Journal of Antibiotics**, Vol.XL, No.2.
- Zweerink, M. M. and Edison, A., 1987, Difficidin and Oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*, **J. Antibiotics**, XL, 12, 1682-1691.
- 



EKLER

Bacterial Plastics

Favorite Articles

Enrique Becerra

List of Articles

July 20, 1998

Dr. Tim Paustian

Recent Articles

Home

Undergraduate Program

Graduate Program

Bacteriology News

Questions

It would be very difficult to try to imagine our lives without plastics. From automobiles to medicine, plastics are utilized in almost every manufacturing industry in the world. About seventy-five billion pounds of plastic are produced by the plastics industry a year. Fifty million tons of plastic are produced per year in the United States alone (Atlas, 1993). Plastics are very advantageous because as synthetic polymers, their structure can be chemically manipulated to have a wide range of strengths and shapes. Plastics also have a high chemical resistance and are quite durable. Plastics are truly significant in our industrial society.

As we all know, not everything is perfect and the same can be said of plastics. The disposal of plastics points out their major weaknesses. Being a xenobiotic, "man-made" compound, plastics are recalcitrant, or resistant, to microbial degradation because bacteria have not been exposed to them through the course of evolution. The high molecular weights of plastics, ranging from several thousand to 150,000, which provide durability also make them resistant to biodegradation (Atlas, 1993). Incinerating plastics has been one option in dealing with non-degradable plastics, but this can be expensive and dangerous. Harmful chemicals like hydrochloric acid and hydrogen cyanide are released during incineration. Recycling has also been an idea, but it also presents disadvantages. First, it is difficult sorting the wide variety of plastics. Second, recycling changes the plastic's material so much, the application range of the recycled plastic is further limited (Fiechter, 1990). One of the safest and least expensive ways to deal with the disposal of non-degradable plastics is to use landfills. Forty percent of the 75 billion pounds of plastics produced a year is discarded into landfills (Fiechter, 1990). However, landfills are rapidly reaching their maximum capacity while the amount of plastic thrown away is rising. Non-degradable plastics also present another ecological problem. Several hundred thousand tons of plastic are discarded into marine environments every year and accumulate in certain oceanic regions. Approximately one million marine animals are killed every year either by choking on plastics they mistook as food or becoming entangled in non-degradable plastic debris (Fiechter, 1990).

In recent years, there has been increasing legislative efforts to increase the ban on the disposal of non-degradable plastics. These legislative efforts have pressured the plastics industry to look for more "environmentally friendly" plastics. The substitution of biodegradable plastics for non-degradable plastics has been one response to the problem. There have been three main types of biodegradable plastics introduced: photodegradable, starch-linked, and "bacterial" plastics.

Photodegradable plastics are advantageous because extensive (several weeks to months) ultraviolet radiation can disintegrate their polymeric structure rendering them open to further bacterial degradation (Atlas, 1993). The problem with photodegradable plastics is that many landfills lack sunlight so their structure remains unaltered and non-degradable. Starch-linked plastics, often utilized in plastic shopping bags, incorporate starch to hold together short fragments of polyethylene. The idea behind starch-linked plastics is that once discarded into landfills, bacteria in the soil will attack the starch and release polymer fragments that can be further degraded by other bacteria (Atlas, 1993). Bacteria do indeed

BGY C55 S - Microbes in the Environment

CTURE # 7

MICROORGANISMS IN THEIR NATURAL HABITATS

osphere (or Biosphere) - constitutes "totality of living organisms on Earth and the abiotic surroundings they inhabit"

- vided into:
- i) atmo-ecosphere (air = aerial habitats)
 - ii) litho-ecosphere (soil = terrestrial habitats)
 - iii) hydro-ecosphere (water (freshwater and marine) = aquatic habitats)

7.1. ATMO-ECOSPHERE

er to Chapter 9 (p. 333-340) in Atlas and Bartha (1998)

Description of Atmo-ecosphere

- nosphere consists of:
- 79 % N_2
 - 21 % O_2
 - 0.033% CO_2
 - other gases (e.g. Ar, CH_4) in trace amounts
 - water vapour in trace amounts

isions of the atmo-ecosphere - based on temperature minima / maxima (see **Figure 29.1**)

- (i) **troposphere** - division closest to earth's surface (up to about 10 km altitude)
 - temperature, pressure and O_2 levels decrease with increasing altitude
 - separated from stratosphere by tropopause
- (ii) **stratosphere** - division of atmosphere between 10 and 40 to 50 km altitude

Silage fermentation processes and their manipulation

Sjouke J. W. H. Oude Elferink^{1*}, Frank Driehuis¹, Jan C. Gottschal², and Sierk F. de Boelstra²

¹Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), P.O. Box 65, NL-8200 AB, Lelystad, THE NETHERLANDS.

²Groningen State University, Dept. Microbiology, P.O. Box 14, NL-9700 AA, Haren, THE NETHERLANDS.

Corresponding author: Tel: +31-320-238238; Fax: +31-320-237320. E-mail: s.j.w.h.oudeelferink@id.dlo.nl

Introduction.

Forage crops such as maize, grasses, legumes, wheat and lucerne can be preserved by ensiling. In many countries ensiled forages are highly valued as animal feed. In European countries such as The Netherlands, Germany and Denmark more than 90% of the forages locally produced are stored as silage. Even in countries with generally good weather conditions for hay making such as France and Italy approx. 50% of the forages are ensiled (Wilkinson *et al.* 1996). It is essential to have a good microbial fermentation process to produce high quality silage. A good fermentation process is not only dependent on the type and quality of the forage crop, but also on the harvesting and ensiling technique. In this paper the current knowledge on general silage microbiology is reviewed with the aim to aid with the choice of the best ensiling strategy to produce high quality silage.

The ensiling process.

Ensilage is a forage preservation method based on a spontaneous lactic acid fermentation under anaerobic conditions. The epiphytic lactic acid bacteria ferment the water-soluble carbohydrates (WSC) in the crop to lactic acid, and to a lesser extent to acetic acid. Due to the production of these acids the pH of the ensiled material decreases and spoilage microorganisms are inhibited. Once the fresh material has been chopped and covered to exclude air, the ensiling process can be divided into 4 stages (Weinberg and Muck 1966; Merry *et al.* 1997),

Phase 1, aerobic phase. This phase normally only takes a few hours in which the atmospheric oxygen present between the plant particles is reduced, due to the respiration of the plant material and aerobic and facultative aerobic microorganisms such as yeasts and enterobacteria. Furthermore, plant enzymes such as amylases and carbohydrases are active during this phase, provided the pH is still within the normal range of fresh forage juice (pH 6.5-6.0).

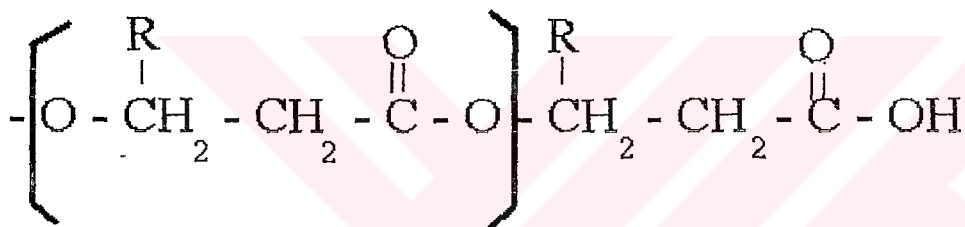
Phase 2, fermentation phase. This phase starts when the silage becomes anaerobic, and it continues for several days to several weeks, depending on the properties of the ensiled forage crop and the ensiling conditions. If the fermentation proceeds successfully lactic acid bacteria develop, and become the dominant population during this phase. Due to the production of lactic and other acids the pH decreases to 3.8-5.0.

PHAs: Chemistry, History, and Biology

Chemistry of the PHAs

Of all the biodegradable plastics being studied, those that have generated the most interest are the poly(3-hydroxyalkanoates) (PHAs) which are made by bacteria. Like all plastics, PHAs are polymers, large molecules made up of many small subunits (monomers) which have been joined together. In the case of PHAs, the monomers are 3-hydroxyalkanoates. An alkanoate is simply a fatty acid which is a linear molecule containing just carbon and hydrogen (an alkane) with a carboxyl group at one end (making an alkanoate). Furthermore, these monomers have a hydroxyl group (OH) at the 3rd carbon (what used to be called the beta position), making these beta or 3-hydroxyalkanoates. The hydroxyl group of one monomer is attached to the carboxyl group of another by an ester bond; these plastics are thus polyesters.

As is shown in figure 1, the polyester linkage creates a molecule which has 3-carbon segments separated by oxygen atoms. The remainder of the monomer becomes a sidechain off the main backbone of the polymer. Most of the PHAs encountered in nature are poly(beta-hydroxybutyrate) (PHB), in which the monomer unit is hydroxybutyric acid and the side chain is a methyl group. Other monomer units occur in nature, and many others can be produced in the laboratory by feeding unusual carbon sources to bacteria. Most PHAs, even what we call PHB, are actually copolymers, and contain some amount of another type of monomer unit.



Poly (3-hydroxyalkanoate) (PHA)

R = CH₃, Poly(3 hydroxybutyrate)

R = CH₂-CH₃, Poly(3-hydroxyvalerate)

Fig. 1

The composition of the PHA has a direct effect on the physical properties of the plastic, in part due to reasons that will be discussed below. PHB, with its short methyl sidechain, is a very crystalline and very brittle polymer. Industrially, it is difficult to use because the temperature at which it melts is very close to the temperature at which it begins to decompose. Its high degree of crystallinity causes it to crack easily. As a result, the PHA used commercially is PHBV, a copolymer of hydroxybutyrate and hydroxyvalerate (4 carbons long). PHBV is a random copolymer, meaning that the monomer units do not occur in the chain in any particular order. PHBV can still crystallize, but it produces a much more supple plastic and melts at a lower temperature, making processing easier. PHB and PHBV have properties similar to polypropylene, and bottles made from these polyesters feel just like "normal" plastic. The flexibility increases with sidechain length throughout the PHA family, largely because of a loss of crystallinity. Polymers composed mostly of hydroxyoctanoate, an 8- carbon monomer, are elastic. Longer sidechain polymers are so soft that they are gummy or glue-like. This remains one of the potential values of PHAs,

HOMEPAGE

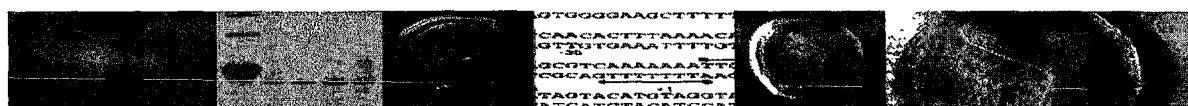
Research



PHA inclusion-body biogenesis in *Bacillus megaterium*

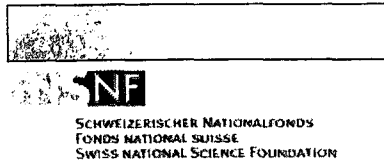
Polyhydroxyalkanoate (PHA) is a class of polyesters that accumulate in inclusion-bodies in most bacteria examined. PHA inclusion bodies are a storage mechanism for carbon, reducing equivalents (NADPH) and proteins. They have also been described as a redox regulator in the cell. They form a significant component of cell metabolism but are not vital for cell growth under laboratory conditions. PHA has commercial potential for use as biodegradable plastic, hence its chemical composition and materials properties have been extensively studied. Our research concentrates on understanding at the molecular level how PHA inclusion-bodies grow and proliferate using *Bacillus megaterium* as a model system.

From a biotechnology perspective we are interested in plants as alternatives to bacterial production systems for PHA. The main obstacle to the use of PHA derived biodegradable plastics is the high cost of production compared with plastics derived from fossil fuels. Plants have the potential to reduce the cost of production and to provide novel and interesting PHA polymers. Plants do not naturally synthesize PHA but the concept has been proven that plants carrying bacterial PHA genes can produce PHA. However, the metabolic engineering required for a plant to produce PHA of the desired chemical structure and in commercially significant quantities awaits further research and development. We are addressing some relevant questions in this area.



Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*

The body plan of a plant is developed during embryogenesis. From the zygote to the mature embryo, several vital developmental events occur. We are interested in identifying the molecules responsible for the developmental events and in understanding their functions. Cell differentiation occurs when a cell divides to produce two different daughter cells. This occurs at many locations and times during embryogenesis, starting with the first unequal division of the zygote to produce a small upper cell and a larger lower cell. We make and study enhancer-trap and gene-trap embryo mutants for the purpose of identifying genes with developmental functions in the embryo. We study the profiles of expression of these genes and seek to identify the transcription factors that regulate their expression. Transcription factors play critical roles in developmental processes. Knowing the identity and expression



HOME AKTUELLES KONTAKT FAQ SITEMAP

SUCHEN

SNF-PRESSAT: GEDRUCKT UND DIGITAL: PRESSEKONTAKT UND WEITERE ANGABEN
FORSCHUNGSBEREICH: BIOGENE KREISLAUFWIRTSCHAFT: KOMMUNIKATION LINEA

KOMMUNIKATION

Medienmitteilungen 2003

Medienmitteilungen 2002
Medienmitteilungen 2001
Medienmitteilungen 2000
Medienmitteilungen 1999
Medienmitteilungen 1998

Bild des Monats

Forschungsmagazin Horizonte

Portraits: Forschende unter 30

Forschung Live

Informationsbroschüren

Medienmitteilungen

Bern, 21. Februar 2000

Forscher optimieren Zuchtbedingungen für Plastik bildende Bakterien

Bioplastik nach Mass

Wenn Bakterien in einer Nährlösung baden, die ihnen Kohlenstoff liefert, speichern sie diesen oft in Form plastischer Verbindungen, sogenannter Polyhydroxyalkanoate (PHA) wie konventioneller Plastik. Wasser abstossend und - je nach Zusammensetzung - elastisch, haben aber den Vorteil, biologisch abbaubar zu sein.

Voraussetzung, dass die Bakterien die Kohlenstoffverbindungen zur Vermehrung brauchen, ist der Mangel an einem wichtigen Nährstoff. Beispiel Stickstoff. Damit Bakterien jedoch eine brauchbare Menge an Kohlenstoff anhäufen, muss ihre Nährlösung zu Beginn eine recht grosse Menge an Kohlenstoff, zum Beispiel in Form von langkettigen Fettsäuren, wiedergeben. Diese Kohlenstoffverbindungen bekommen den Bakterien nicht; ihre Hüllen werden von aggressiven Fettsäuren aufgelöst, und die Kohlenstofflösung schäufelt



Bioplastik vorher und nachher: Im Innern der Bakterien (25 Vergrösserung) als kleine Vorratskügelchen und in unverarbeiteter Form als Klumpen.

Das Wachstumsverhalten der Plastik bildenden Bakterien haben Forscher von der Eidgenössischen Anstalt für Wasserversorgung, Abwasserreinigung und Gewässerschutz (EAWAG) und dem Institut für Biotechnologie der ETH Zürich mit ihren Mitarbeiterinnen genau analysiert. Sie haben den optimalen Wachstumszustand gefunden, der optimale Zuchtbedingungen darstellt, in dem nicht nur der Stickstoff, sondern auch der Kohlenstoff ist. In dieser Phase bilden die Bakterien nicht nur die grösstmögliche Menge an Bioplastik; sie sind auch nicht wählerisch, wenn ihnen verschiedene Kohlenstoffverbindungen verfüttert werden. Sie nehmen die Kohlenstoffverbindungen entsprechend auf und lagern sie ein. So können sie auf unterschiedlichen und standardisierten Zusammensetzungen hängen. Dieses Prinzip der mehrfachen Nährstofflimitierung lässt sich wahrscheinlich nicht nur zur Produktion von Bioplastik nutzen, sondern auch für viele anderen biotechnologischen Prozessen anwenden, in denen Mikroorganismen Produkte, wie z.B. Antibiotika, hergestellt werden.

Damit sowohl Kohlenstoff wie auch Stickstoff über eine längere Zeit in derselben - tiefen - Konzentration vorhanden sind, verwenden die Forscher einen Bioreaktor, dem kontinuierlich Nährlösung und separat Kohlenstoff und Stickstoffquellen zugeführt werden. Die überschüssigen Bakterien werden dann zur Gewinnung von Bioplastik genutzt.



Home | About Us | Product Range | Quality Control & Safety | Technical Bulletins | Grass Growth | Website Links

Technical Bulletins

Molasses in Livestock Feeds

Introduction

Molasses is a by-product of the sugar industry, defined as the end product of sugar manufacture or refining from which no more sugar may be economically crystallised by conventional means. About 75% of the world's molasses comes from sugar cane (*Saccharum officinarum*) and the majority of the remainder comes from sugar beet (*Beta vulgaris*). Other sources of molasses include citrus, corn and sorghum. Sugar cane is grown in tropical climates (Asia, South America), whereas sugar beet has its origin in the temperate climates (Europe and North America). The most important constituent of molasses is sugar, being predominantly sucrose with some glucose and fructose.

Cane Extraction

Sugar is extracted by crushing sugar cane stems to extract juice. Lime (Calcium Hydroxide) is added to the juice, which is then heated and filtered in order to remove impurities. The juice is then evaporated, to concentrate the sugar and several crystallisation processes follow to extract as much sugars as possible. Centrifugal machines then separate the sugar and syrup. The residual syrup is often called blackstrap cane molasses.

Beet Extraction

Sugar Beets are washed and sliced before undergoing a diffusion process to extract the juice. Once the juice is extracted it is processed in the same way as cane sugar.

In general, world molasses production is approximately one third that of the sugar production. For every 100 tonnes of sugar cane processed, 3 to 4 tonnes of molasses is produced and for every hundred tonnes of sugar beet 4 to 6 tonnes of molasses is produced. The quantity of molasses produced is influenced by the market price of sugar. The higher the sugar price the more sugar extraction's the molasses is put through to get as much sugar out as possible.

[back to contents](#)



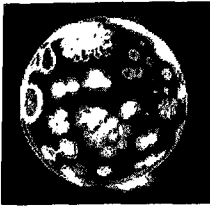
[Introduction](#) | [World Molasses Production](#) | [EU Molasses Production](#) | [Consumption of Molasses](#)
[Molasses Composition](#) | [Dietary Use of Molasses](#) | [Ruminants](#) | [Non Ruminants](#) | [Conclusions](#)
[Main References](#) | [About the Author](#)

[Home](#) | [About Us](#) | [Product Range](#) | [Quality Control & Safety](#)
[Technical Bulletins](#) | [Grass Growth](#) | [Website Links](#)

R & H Hall, 151 Thomas St., Dublin 8, Ireland.
 Tel: +353 1 612 1234, Fax: +353 1 612 1213 Email: info@rhhall.ie

R & H Hall is a member of





Todar's Online Textbook of Bacteriology

Antimicrobial Agents Used in Treatment of Infectious Disease

© 2002 Kenneth Todar University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology

Introduction

Most microbiologists distinguish two groups of antimicrobial agents used in the treatment of infectious disease: **antibiotics**, which are natural substances produced by certain groups of microorganisms, and **chemotherapeutic agents**, which are chemically synthesized. A hybrid substance is a **semisynthetic antibiotic**, wherein a molecular version produced by the microbe is subsequently modified by the chemist to achieve desired properties. Furthermore, some antimicrobial compounds, originally discovered as products of microorganisms, can be synthesized entirely by chemical means. They might be referred to as **synthetic antibiotics** to distinguish them from the chemotherapeutic agents.

The modern era of antimicrobial chemotherapy began in 1929 with Fleming's discovery of the powerful bactericidal substance penicillin, and Domagk's discovery in 1935 of synthetic chemicals (sulfonamides) with broad antimicrobial activity.

In the early 1940's, spurred partially by the need for antibacterial agents in WW II, penicillin was isolated, purified and injected into experimental animals, where it was found to not only cure infections but also to possess incredibly low toxicity for the animals. This fact ushered into being the age of antibiotic chemotherapy and an intense search for similar antimicrobial agents of low toxicity to animals that might prove useful in the treatment of infectious disease. The rapid isolation of streptomycin, chloramphenicol and tetracycline soon followed, and by the 1950's, these and several other antibiotics were in clinical usage.

The most important property of an antimicrobial agent, from a host point of view, is its **selective toxicity**, i.e., that the agent acts in some way that inhibits or kills bacterial pathogens but has little or no toxic effect on the host. This implies that the biochemical processes in the bacteria are in some way different from those in the animal cells, and that the advantage of this difference can be taken in chemotherapy.

Characteristics of Antibiotics

Antibiotics are low-molecular weight substances that are produced as secondary metabolites by certain groups of microorganisms, especially *Streptomyces*, *Bacillus*, and a few molds (*Penicillium* and *Cephalosporium*) that are inhabitants of soils (Table 1). Antibiotics may have a **cidal (killing) effect** or a **static (inhibitory) effect** on a range of microbes. The range of bacteria or other microorganisms that is affected by a certain antibiotic is expressed as its **spectrum of action**. Antibiotics effective against procaryotes which kill or inhibit a wide range of Gram-positive and Gram-negative bacteria are said to be **broad spectrum**. If effective mainly against

[[Previous]] [[Next]]

Search | Site Maps and Contents

Introduction
Cytoplasm
Nucleic Acids

Chapters->

Proteins
Viruses
Spores
Cellulose
Membranes
Membrane
Functions
Cell Wall
More Cell Wall
Flagella
Surface Structures

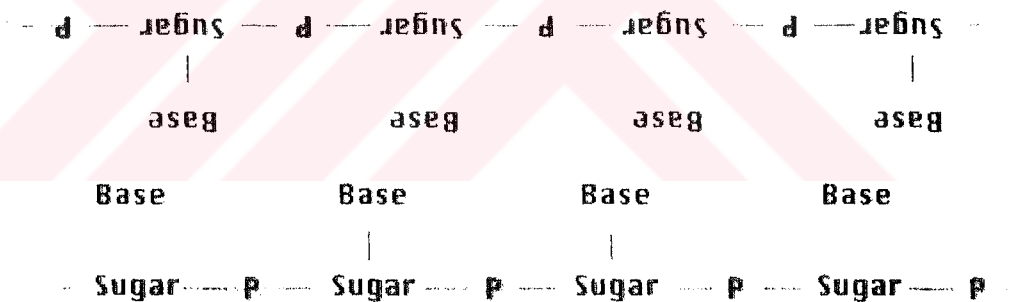
©2001 University of Wisconsin-Madison

Bacterial cells lack a membrane defined nucleus. However a discrete region in the bacterial cytoplasm seems to contain the genetic material and this **nucleoid** region can often be distinguished on EMs of cells. Most cells have only one main chromosome although a few species do have 2 or more. For the rest of this section we will focus on the majority of bacteria; assuming one chromosome per cell.

The Bacterial Chromosome

The bacterial chromosome consists of a single, circle of deoxyribonucleic acid. To learn more about basic nucleic acid structure follow the link.

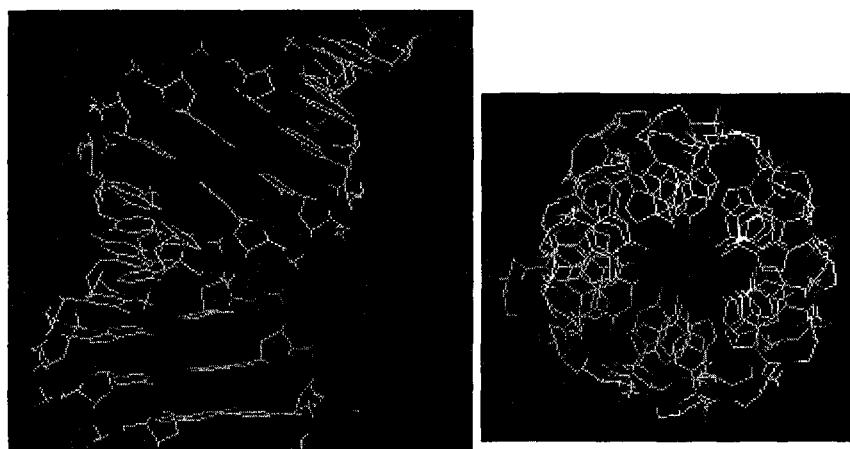
DNA is double stranded- two strands line up antiparallel to each other and the bases are linked together with hydrogen bonds.



A schematic of the bonding of one DNA strand to another

Due to the nature of these bonds the strands form a left handed double helix

Wire frame model of DNA



[\[Previous\]](#) | [\[Next\]](#)
[Search](#) | [Send us your comments](#)

[Table of Contents](#)
[Why Do Genetics](#)
[Genetic Terms](#)
[More Terms](#)
[Basic Molecular](#)
[Biology](#)
[More Basic](#)
[Concepts](#)
[Screens](#)
[Selections](#)
[Mutation](#)
[Frequency](#)
[Chemical](#)
[Mutagenesis](#)
[Frameshift](#)
[Mutation](#)
[DNA Repair](#)
[Mutation](#)
[Summary](#)
[Detecting Mutants](#)
[Complex](#)
[Mutation](#)
[Insertion](#)
[Sequences](#)
[Compound](#)
[Transposons](#)
[Complex](#)
[Transposons](#)
[Models of](#)
[Transposition](#)
[Transposition](#)
[Summary](#)
[Mutagenesis *in*](#)
vitro
[Effects of](#)
[Mutations](#)
[Complementation](#)
[Plasmids and](#)
[Conjugation](#)
[F Factor](#)
[Transformation](#)
[Transduction](#)
[Generalized](#)

[Chapters->](#)


Plasmids and conjugation

©2000 written by Gary Roberts, edited by Timothy Paustian, University of Wisconsin-Madison

VI. GENE TRANSFER SYSTEMS

The following sections on plasmids and conjugation, transformation, and transduction will provide some background information on how and why the systems work, but the main emphasis will be on their use in gene transfer and amplification.

VI A. PLASMIDS AND CONJUGATION

(This section treats movement of DNA without cell-cell contact. Please realize that Plasmids and conjugation mixes rather different things: conjugation can certainly occur without plasmids, and many plasmids cannot be moved by conjugation.)

A plasmid is defined as a replicon, or replicating piece of DNA, that is stably inherited in an extrachromosomal state. In older literature, the term episome was used for plasmids capable of integration into the chromosome, but this term has largely gone into disuse. It typically exists as a covalently closed circular piece of double stranded DNA that has the capability of replicating autonomously and it is this property that leads to its isolation and physical recognition. The closed covalent nature of their structure allows them to be separated from chromosomal DNA by either gel electrophoresis or cesium chloride buoyant density gradients.

There are two features held in common by all plasmids:

1. They all have **replication** functions. In the simplest case, this consists of one or more origins of replication with the *trans*-acting proteins necessary for replication either being encoded by the plasmid itself or "borrowed" from the normal host replication machinery. The broad host range of some plasmids is at least in part explained by their multiple replication systems that allow them to function in a variety of dissimilar hosts. (Question for the reader:

ÖZGEÇMİŞ

Araştırmacı, 1973 yılında Düzce’de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Düzce’de tamamladı. 1989 yılında girdiği Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Bölümü’nden 1994 yılında mezun oldu. 1995-1998 yılları arasında ilkokul ve lise öğretmenliği yaptı. 1998 yılında Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans öğrenimini tamamladı. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eğitim Fakültesi Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanlar Bölümü Biyoloji Eğitimi Ana Bilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 1999 yılında Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora programına kaydoldu.

