

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI RHİZOBİUM TÜRLERİNİN
POLİ- β -HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMLERİ
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Ayşe URUÇ

Tez Yöneticisi:
Yrd. Doç. Dr. Seher GÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu çalışma,Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından desteklenmiştir. (FÜBAP - Proje No: 1123)

ELAZIĞ, 2006

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI RHİZOBİUM TÜRLERİNİN
POLİ- β -HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMLERİ
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Ayşe URUÇ

Tez Yöneticisi:
Yrd. Doç. Dr. Seher GÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu çalışma,Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Yönetim Birimi (FÜBAP) tarafından desteklenmiştir. (FÜBAP- Proje No: 1123)

ELAZIĞ, 2006

T.C.

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI RHİZOBİUM TÜRLERİNİN
POLİ-β-HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMLERİ
ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Ayşe URUÇ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Bu tez, tarihinde aşağıda belirtilen jüri tarafından oybirliği /oyçokluğu
ile başarılı / başarısız olarak değerlendirilmiştir.

Danışman:

Üye:

Üye:

Üye:

Üye:

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

TEŐEKKÖR

Bu alıőma esnasında yardımlarını esirgemeyen bilgi ve görüşlerinden faydalandığım danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Seher GÖR'e , bölümün tüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Ahmet ŐAHİN' e, laboratuvar çalışmalarında her türlü kolaylığı sağlayan Doç. Dr. Dilek TURGUT-BALIK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe URUÇ

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLolar LİSTESİ	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOT	12
2.1. Materyal	12
2.1.1. Bakteri Kùltürleri	12
2.1.2. Besiyerleri.....	12
2.2. Metot	13
2.2.1. Suşların İzolasyonu.....	13
2.2.2. Suşların Kùltürel ve Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	13
2.2.3. Suşların Muhafaza Edilmesi	14
2.2.4. Analitik Ölçüm İçin PHB Metodu.....	14
2.2.5. PHB ye Ait Standart Grafiğın Hazırlanması	15
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	16
3.1. Suşların Kùltürel ve Biyokimyasal Özellikleri	16
3.1.1. Kùltürel Özellikler	16
3.1.2. Biyokimyasal Özellikler	16
3.2. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	17
3.3. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi	19
3.4. PHB Verimlerinin Belirlenmesi	21
4. KAYNAKLAR	24

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 3.2.1. <i>R.phaseoli</i> suşlarının hücre kuru ağırlıkları (g/l).....	15
Tablo 3.2.2. <i>R.leguminosarum</i> suşlarının hücre kuru ağırlıkları (g/l).....	15
Tablo 3.3.1. <i>R.phaseoli</i> suşlarının PHB üretimi (g/l).....	16
Tablo 3.3.2. <i>R.leguminosarum</i> suşlarının PHB üretimi (g/l).....	17
Tablo 3.4.1. <i>R.phaseoli</i> suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri.....	18
Tablo 3.4.2. <i>R. leguminosarum</i> suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri...	18

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

2.2.5.1. Krotonik Asit Formundaki Standart PHB'nin 235 nm. Dalga boyunda miktara bağlı Standart Grafiği.....	15
---	----

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI RHİZOBİUM CİNSİ BAKTERİLERİN POLİ-β-HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİMLERİ ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Ayşe URUÇ

Fırat Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
2006, Sayfa : 26

Bu araştırmada Elazığ ili merkez ve Elazığ ili ilçelerine bağlı köylerden 1996 yılında alınan toprak örneklerinden “Bitki Enfeksiyon Metodu” kullanılarak izole edilen doğal Rhizobium suşlarının Poli-β-hidroksibütirat üretimleri tespit edilmiştir. Kontrol grubu olarak Ankara Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü’nden temin edilen *Rhizobium phaseoli* CİAT 899 ve *Rhizobium leguminosarum* Le 735 suşları kullanılmıştır.

Rhizobium cinsine ait suşlar Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyerinde 28 °C de 48 saat inkübe edilmiştir.İnkübasyon sonunda kültürler santrifüjlenmiş, elde edilen biomass kurutulmuştur. Kuru ağırlıkları tespit edildikten sonra sonikasyon işlemleri ile PHB elde edilmiştir. PHB, sülfirik asit ile krotonik asite dönüştürülmüş, son maddenin miktarı 235 nm. UV spektrofotometrede ölçülmüştür.

Rhizobium phaseoli CİAT 899 suşunun kuru ağırlığı 0,2016 g/l olarak tespit edilmiştir.*R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıkları 0,0982-0,2424 g/l olarak bulunmuştur.*Rhizobium leguminosarum* Le 735 suşunun kuru ağırlığı 0,2834 g/l , *R.leguminosarum* izolatlarının kuru ağırlıkları ise 0,2544 – 0,4424 g/l olarak tespit edilmiştir.

Rhizobium phaseoli CİAT 899 suşunun kuru ağırlığa göre PHB üretim miktarı % 23,0 ve *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB üretim miktarları %17,0 - %26,0 arasında bulunmuştur. *Rhizobium leguminosarum* Le 735 suşunun kuru ağırlığına göre PHB üretim miktarı %18,9 ve *R.leguminosarum* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB üretim miktarları %8,6 - %14,6 arasında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Rhizobium phaseoli* , *Rhizobium leguminosarum*, Poli-β- hidroksibütirat (PHB)

ABSTRACT

MSc Thesis

A STUDY ON THE PRODUCTION OF POLY- β - HYDROXYBUTYRATE (PHB) BY SOME RHIZOBIUM SPECIES

Ayşe URUÇ

Firat University
Science Institute
Biology Department
2006, Page: 26

In this research, production of Poly- β - hydroxybutyrate (PHB) by Rhizobium strains which are isolated from the soil which is taken from different regions of Elazığ province and its districts in 1996 using “Plant Infection Method” was studied. *Rhizobium phaseoli* CİAT 899 and *Rhizobium leguminosarum* Le 735 strains which are taken from Ankara Soil and Fertilizer Research Institute, are used as control group.

Rhizobium strains were grown in Yeast Extract Mannitol (YEM) medium at 28 °C temperature for 48 hours. After incubation period cultures were centrifugated and biomass which are obtained were dried. After dry cell weigh had been measured, PHB were obtained by ultrasonication. PHB is converted to crotonic acid by using sulfuric acid. The amount of the last substance is measured by using UV spectrophotometer at 235 nm.

Dry cell weigh of *Rhizobium phaseoli* CİAT 899 is measured as 0,2016 g/l. The measurement of dry cell weigh of *R.phaseoli* isolates is between 0,0982 – 0,2424 g/l. Dry cell weigh of *Rhizobium leguminosarum* Le 735 is measured as 0,2834 g/l. The measurement of dry cell weigh of *R.leguminosarum* isolates is between 0,2544 – 0,4424 g/l.

Amount of PHB produced by *Rhizobium phaseoli* CİAT 899 according to dry cell weigh was 23,0 %. The amount of PHB produced by *R.phaseoli* isolates was 17,0% - 26,0%. Amount of PHB produced by *Rhizobium leguminosarum* Le735 according to dry cell weigh was 18,9%. The amount of PHB produced by *R.leguminosarum* isolates was 8,6% - 14,6%.

Key Words: *Rhizobium phaseoli* , *Rhizobium leguminosarum*, Poly- β - hydroxybutyrate (PHB)

1.GİRİŞ

İnsanların doğaya hakim olma çabaları arttıkça doğa,her geçen gün daha fazla tahrip olmuştur. Dünyamızı oluşturan atmosfer, hidrosfer ve litosferin doğal yapıları bozulmuş ve buralar yaşam ortamı olmaktan çıkmaya başlamıştır. Böylece ekosistemi oluşturan canlı ve cansız unsurlar arasındaki ilişkilerin bozulmasıyla ortaya çıkan ve insanlığın ekolojik sorunları adı verilen ekonomik ,sosyal ve çevresel sorunlar doğmuştur .

İnsanlığın yaşadığı ekolojik sorunların ve özellikle de çevre sorunlarının temel nedenlerinden birisi belki de en önemlisi, hızlı nüfus artışıdır. Dünya'nın nüfusu sanayi devrimi ile birlikte 18.yüzyılda hızlı bir artış sürecine girmiştir. 1950 yıllarına kadar % 08 iken,1950-1985 yılları arasında %1.9 a yükselmiştir. Tahminlere göre bugün 5.5 milyar civarında olan dünya nüfusuna her gün 250 bin, her yıl 93 milyon kişi katılmaktadır. Dünya nüfusunun 2025 yılında 8.2, 2050 yılında da 10.2 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir [1].

İnsan nüfusunun hızla artışı, gezegenimizde büyük miktarlarda dönüştürülemeyen atık materyal birikimine sebep olmaktadır [2].

Çevre kirliliğinde özellikle katı atıkların önemli bir yeri vardır. Katı atıklar, anorganik ve organik kökenli olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Anorganik kökenli grup içinde yer alan demir, bakır, çinko,kurşun, alüminyum,cam,seramik gibi maddelerin geri kazanımı uzun yıllardan beri gerçekleştirilmektedir. Organik kökenli gruptaki plastik atıklar ise günümüzün önemli sorunlarından [3].

Plastik malzemeler seksen yıllık bir geçmişe sahiptir. Plastikler hafif ve ekonomik olmaları, kolay işlenmeleri, elastikiyet ve nakliyyede rahatlık gibi nedenlerle gittikçe artan bir tüketim seviyesine ulaşmıştır [4,5]. Son yüzyılda polimer bilimine olan eğilim, sentetik plastiklerin gelişimini hızlandırmış ve onları doğal ürünlerle yer değiştirmeye doğru yöneltmiştir [6].

Dünyada yıllık plastik tüketimi yaklaşık yetmiş milyon ton olarak tahmin edilmektedir. Kullanılan plastiğin %20'si bir yıldan daha az ömürlü,%35'i 1-10 yıl,%45'i ise on yıldan fazla ömürlü malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır [3]. 1993 yılı verilerine göre, Türkiye'de kişi başına düşen plastik tüketim miktarı 5,5 kg civarındadır ve 2000 li yıllarda 15-20 kg.a kadar çıkması beklenmektedir [5].

Günlük yaşantımızın vazgeçilmez bir parçası olan ve yaygın olarak kullanılan petrol türevli plastikler, kullanımlarından sonra fonksiyonunu kaybetmekte, “plastik atık” olarak terk edildiklerinde yüzlerce yıl doğada parçalanamadıklarından çevre kirlenmesine neden olmaktadır [6]. Her yıl birkaç yüz bin ton plastik denizlere atılmakta ve okyanuslarda birikmektedir [4].

90'lı yıllarda 100 milyon tonun üzerinde üretilen ve 2000 yılında bu rakamın 150 milyon ton olduğu tahmin edilen sentetik polimerlerin yerine kullanılabilen başka bir malzeme türü olmadığı sürece; çevre ve insan sağlığına getireceği yükler gittikçe artacaktır [4]. Bu nedenle, plastik atıklar tarafından çevrenin kirlenmesini önlemek, önemi gittikçe artan bir görev haline gelmiştir [7].

Benzersiz özellikleri sayesinde, yeri farklı ürünlerce doldurulamayan plastiklerin, çevreye verdiği zararı önlemek amacıyla izlenen tek yol onların toplayıp, geri dönüşümünü sağlamaktır [7]. Bu nedenle, geri dönüşüm işlemleri gerektirmeyen, biyolojik yolla parçalanabilen polimerlerin (mikrobiyal termoplastik) üretimi önem kazanmıştır. Gün geçtikçe petrol kaynaklarının tükenmekte oluşu da mikrobiyal plastik üretimini arttırmaktadır [6].

Biyomateryaller, farklı organizmalar tarafından sentezlenen ve katabolize edilen doğal ürünlerdir. Biyoplastikler, biyolojik yolla parçalanabilen ve biyoyumlu biyomateryallerdir. Bunlar, farklı besin ve çevre şartları altında birçok mikroorganizma tarafından üretilmektedir. Aerobik ve anaerobik bakteriler, fotosentetik bakteriler, arkeik bakteriler ve düşük organizasyonlu ökaryotları da içine alan doksan cinsten daha fazla mikroorganizma bu polyesterleri biriktirebilme ve katabolize etme yeteneğine sahiptir [2].

Biyoplastiklerin keşfi, geçen yüzyılın ilk yarısında gerçekleşmiştir. *Azotobacter chroococcum* bakterisinde kloroform içinde çözünebilen lipit benzeri sudanofilik inklüzyonlar gözlenmiştir [8]. İlk kez Lemoigne tarafından, 1920 lerde topraktan izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinde bilinmeyen bir materyalin parçalanması sonucu rastlanılan 3-hidroksibütirik asit, poli-3-hidroksibütirat homopoliyesteri (PHB) olarak tanımlanmıştır [4,8]. 1950'li yılların sonlarında *Bacillus* cinsi bakterilerle yapılan çalışmalarda, P(3HB)'ın bu bakterilerde karbon ve enerji kaynağı olarak kullanıldığı açıklanmıştır. 1974 yılında Wallen ve Rohwedder, 3-hidroksibütirikasit (3HB) dışındaki hidroksialkanoatları (HA) tanımlamışlardır [8]. 1970'li yıllardaki ilk petrol krizinden sonra İngiltere'deki Imperial Kimya Endüstrisi (ICI), bakterilerin polimer yapılarını incelemeye başlamıştır. ICI, *Alcaligenes lotus* ve *Alcaligenes eutrophus* bakterilerini kullanarak bir PHB-PHV kopolimeri üretmiştir. Üretilen ilk ürün "Biopol" adıyla patentlenmiştir [4,9]. 1980'li yılların sonunda *Ralstonia eutropha* ve *E.coli*'nin PHA biyosentezi ile ilgili enzimlerini kodlayan genler klonlanmıştır [8].

Keşfedildiği günden bugüne üzerinde çok sayıda araştırma yapılmış olan mikrobiyal plastikler; orjinleri, monomer yapıları, monomer sayıları gibi farklı kriterler göz önüne alındığında çeşitli sınıflara ayrılmaktadırlar [2].

Biyosentetik orijinlerine göre biyoplastikler ; genel metabolitler kullanılarak mikroorganizmalar tarafından üretilen PHB ve alifatik PHA'ların dahil olduğu doğal

biyoplastikler ,mikroorganizmalar tarafından sentezlenemeyen bazı öncül maddelerin kültür ortamına eklenmesi ile üretilen aromatik monomerler içeren PHA'ları kapsayan yarı sentetik biyoplastikler ve doğal olanlarına benzeyen fakat yalnızca kimyasal yolla sentezlenen sentetik termoplastik polimerlerin bulunduğu sentetik biyoplastikler olarak üçe ayrılmaktadırlar [2].

Monomerlerinin kimyasal yapısına göre biyoplastikler kendi içerisinde; alifatik yağ asiti çeşitlerini içeren biyoplastikler (doymuş, doymamış ,düz ya da dallanmış monomerlerden oluşanlar),aromatik yağ asiti çeşitlerini içeren biyoplastikler,hem alifatik hem de aromatik yağ asiti çeşitlerini içeren biyoplastikler ve farklı bileşikleri içeren biyoplastikler (poli- γ -glutamik asit, poli- ϵ -L-lisin,poli - β -L- malik asit, poliglolikolik asit, siyanofisin gibi) olarak gruplandırılmaktadırlar [2].

Monomer büyüklüğüne göre biyoplastikler üçe ayrılmaktadırlar. Bunlar 3-5 karbonlu monomer içeren kısa zincir uzunluğuna sahip biyoplastikler, 6-14 karbonlu monomer içeren orta zincir uzunluğuna sahip biyoplastikler ve 14 karbondan daha fazla karbonlu monomer içeren uzun zincirli biyoplastiklerdir [2,10].

Poliesterdeki monomer sayısına göre; tek tip monomer içeren homopolimerik biyoplastikler ve birden fazla tip (kopolimer) monomer içeren heteropolimerik biyoplastikler olmak üzere ayrılırken, mikroorganizma tarafından poliesterler olarak; tek tip ya da karışık (birden fazla) biyoplastik şeklinde gruplandırılmaktadırlar [2].

Farklı kriterler dikkate alınarak hazırlanan bu sınıflandırmada yer alan polihidroksialkanoatlar (PHA), birçok bakteri tarafından hücre içi karbon ve enerji kaynağı olarak sentezlenen hidroksialkanoat (HA) poliesterleridir [10,11,12,13]. PHA'lar; linear, uzun ,3-hidroksi yağ asiti monomerlerinden meydana gelmektedirler. Genel formülü $(C_4H_6O_2)_n$ olarak ifade edilen polihidroksialkanoatlarda (n) sayısı otuzbeşbin gibi yüksek bir sayıya ulaşabilmektedir [4]. Molekül ağırlıkları 2×10^5 - 3×10^6 Da arasında değişiklik gösteren bu polimerler, 0.2 ± 0.5 μ m. çapındaki granüllerde biriktirilmektedirler [8,10]. *Bacillus cereus*'tan izole edilen PHB granüllerinin % 50' si merkezi bir çekirdekten oluşmaktadır. Bu çekirdek en dışta membranla tekrar çevrilmiştir. Yapılan araştırmalar sonunda her bir granülün fibriler yapıda olduğu ve 10-15 nm uzunluğunda polimerik PHB granüllerinden oluştuğu saptanmıştır [25] . Bu granüllerin sayısı ve boyutu, monomer kompozisyonu, makromoleküler yapısı, fizikokimyasal özellikleri üretici mikroorganizmaya göre değişiklik göstermektedir [2].

Polihidroksibütirat (poli[R-3-hidroksibütirat],P(3HB)), doğada en yaygın olarak bulunan ve üzerinde en çok çalışılan polihidroksialkanoattır [14,15,16]. PHB, mikroorganizmalar tarafından uygun olmayan üreme koşulları altında,büyümenin logaritmik artış evresinde granüller halinde üretilen depo materyalidir [6,17]. Uygun olmayan üreme koşulları ya bir makro element (C,H,N,O) ya da bir mikro element (P,Mg vb.) içeren besi

ortamının total olarak eksikliğinde ya da suboptimal konsantrasyonlarda meydana gelmektedir [18]. Optimal PHB üretiminin karbon kaynağının oldukça fazla; oksijen, nitrojen, fosfor vb.eksikliğinde gerçekleştiği de bildirilmektedir [19,20]. PHB granülleri tek katlı bir zar ile çevrili olup,%98 PHB ve %2 protein içermektedirler [6]. *Alcaligenes eutrophus*' taki PHB granüllerinin %40 su içerdiği tespit edilmiştir [25].

Hücre içinde sıvı, atmosferde katı halde olan PHB, organik çözücü ile hücreden özütlendiğinde kristalize olmaktadır [4]. PHB sert ve kırılgan bir materyaldir [14]. Kristalize PHB'nin kırılganlığı ise bir dezavantajdır [15]. Yüksek kristalize olma özelliğinin, sertlik ve kırılganlığının üstesinden gelmek için PHB'nin çeşitli kopolimerleri geliştirilmiştir. Örneğin;3- hidroksibütirat (3-HB) ile 3- hidroksivaleratın (3-HV) polimerize olması sonucu oluşan poli(3- hidroksibütirat-3- hidroksivalerat), 3- hidroksibütirat ile 4-hidroksibütiratın polimerizasyonuyla oluşan poli(3- hidroksibütirat- 4- hidroksibütirat) bu kopolimerlerdendir [14,20,21,22]. Bunun yanı sıra (R)-3-hidroksihekzanoat içeren P(3HB) sekanslarının da [P(3HB-co-3HHx)] esnek polimerler olduğu bildirilmektedir [14,16]. Bu şekildeki uygulamalarda PHB'nin diğer polimerlerle birleştirilmesi,uzamalara karşı kırılganlığının azalmasını,esnekliğinin artmasını sağlamaktadır [15].

Polihidroksibütiratın molekül ağırlığı, özellikle bakterinin türüne bağlı olmakla birlikte,büyüme koşulları ve hücrenin yaşam döngüsündeki yerine göre değişiklik göstermektedir [15]. Doğal suşlar tarafından üretilen P(3HB)'nin molekül ağırlığı genellikle 1×10^4 - 3×10^6 g/mol arasında değişmektedir. Ancak rekombinant bakterilerde bu değerler aşılmıştır. Özel fermentasyon şartları altında geliştirilen *Ralstonia eutropha*'nın PHA biyosentez genlerine sahip rekombinant *Ecoli*'nin 3×10^6 - 1.1×10^7 g/mol gibi çok yüksek değerde PHB ürettiği gözlenmiştir [8]. P(3HB)'in moleküler ağırlığının karbon kaynağı olarak metanol kullanıldığında *Methylobacterium extorquens* bakterisinde 0.6×10^6 Da, *Alcaligenes eutrophus* bakterisinde 1.1×10^6 Da; süksinat kullanıldığında ise *Methylobacterium extorquens* de 1.7×10^6 Da ve *Alcaligenes eutrophus* da 1.6×10^6 Da olduğu bildirilmektedir [4].

Bakteri gelişiminin eksponansiyel fazında PHB birikimi artmakta, geç eksponansiyel-erken durgun dönemde ise maksimum düzeye ulaşmaktadır. Sporlu bakterilerde PHB birikimi spor oluşumundan hemen önce olmakta ve sporulizasyonda enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır [4].

Hücre içinde sentezlenen PHB lipofilik boyalarla kolayca boyanabilmektedir. Sudan Siyahı B kullanılması, PHB açısından zengin ya da fakir olan bakteri kolonilerinin agar plakları üzerinde ayırt edilmesi için kullanılmaktadır. Bu boya ile bakteriler koyu mavi-siyah boyanmaktadır. PHB için Sudan Siyahı'ndan daha büyük bir affiniteye ve spesifiteye sahip olan

Nil Blue A kullanıldığında ise, 460 nm. dalga boyunda parlak turuncu florasan vermektedir [24].

PHB'in yumuşama sıcaklığı 157-188 °C olup, bu, polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakın bir sıcaklıktır. PHB termoplastik olduğundan preslenip şekil verilebilmektedir [4].

PHB hücrede redoks düzenleyicisidir [4,19]. Suyu ve UV ışınlarına karşı dirençli olan PHB'in, oksijene karşı impermeabl oluşu, özellikle besin paketlenmesi amacıyla kullanılmasını mümkün kılmaktadır [19,24].

Hücre içinde PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek asetil CoA ve düşük serbest CoA düzeyinin olması gerekmektedir. Bu şartların oluşumu mikroorganizmalara göre değişmekle beraber genelde nitrojen, potasyum, sülfür ve oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi sınırlandırıcı etkenlere bağlıdır [4].

PHB biyosentez genlerinin kromozomda ya da plasmid DNA'da lokalize olduğu bildirilmektedir [4]. Yapılan araştırmalara göre *Ralstonia eutropha*'da PHB sentezini gerçekleştiren genler (pha CBA) üç proteini şifrelemektedir. Bunlar PhaA (β -ketotiyolaz), PhaB (NADPH-oksidoredüktaz) ve PhaC (PHB polimeraz/sentaz)dır [2]. Bu üç enzimle gerçekleştirilen PHB sentezinde asetil CoA'nın TCA döngüsünde ve PHB metabolik yolunda ilerleyişinin büyüme şartlarına bağlı olduğu ve ortama ilave edilen NADPH'in PHB ve kopolimerlerinin üretimini arttırmada anahtar rol oynadığı bilinmektedir [21].

Genel olarak bütün polihidroksialkanoatların sentezinin anahtar enzimleri olan ve polimerizasyonu sağlayan PHA sentazların (PHA polimeraz) 54 farklı çeşidi tayin edilmiş ve klonlanmıştır. PHA sentazlar üç çeşit olarak ele alınmaktadırlar. I.sınıf PHA sentazlar *Alcaligenes eutrophus*'dan ,II.sınıf PHA sentazlar *Allochromatium virosum* ve III.sınıf PHA sentazlar *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunan enzimlerdir. *Caulobacter crescentus*'dan izole edilen 2019 nükleotid içeren ve 673 aminoasidi kodlayan PHB sentaz geni, phaC, yaklaşık 73 kDa olan moleküler ağırlığı ile bugüne kadar tanımlanan en büyük PHA sentaz enzimidir [4].

Bugüne kadar polihidroksialkanoatların sentezi ile ilgili dört farklı metabolik yol bulunduğu belirtilmektedir. *Alcaligenes eutrophus*'ta, B-ketotiyolaz enzimi iki molekül asetil-CoA'yı asetoasetil-CoA'ya dönüştürmektedir. Daha sonra NADPH bağımlı asetoasetil-CoA redüktaz enzimi, asetoasetil-CoA'yı 3-hidroksibütiril-CoA'ya çevirmektedir. Üçüncü ve son basamakta ise PHB sentaz polimerizasyon reaksiyonunu katalizlemektedir. *Pseudomonas rubium* bakterisinde bu metabolik yol B-ketotiyolaz enzimi tarafından asetoasetil-CoA'nın olduğu ikinci basamaktan sonra farklılık göstermektedir. Asetoasetil-CoA, NADPH bağımlı bir redüktaz tarafından (+)-3- hidroksibütiril-CoA'ya redüklenmekte, bu ise sonra iki enoil-CoA hidrataz ile D-(-)-3-hidroksibütiril-CoA'ya çevirmektedir. Üçüncü tip biyosentez yolu, birçok

Pseudomonas türünde gerçekleşen yoldur. *Pseudomonas oleovorans* ve diğer *Pseudomonas* türleri alkan, alkanol ya da alkanonik asitleri içeren kültür ortamında üretildikleri takdirde orta uzunlukta zincire sahip 3- hidroksialkanoik asit içeren PHA'ları biriktirmektedirler. Dördüncü tip biyosentez yolu yine birçok *Pseudomonas* türlerinde görülmektedir. Bu metabolik yol asetil-CoA'dan sentezlenen orta uzunluktaki 3HA zincirlerinin meydana getirdiği kopoliesterlerin sentezini içermektedir. Ancak bu yol henüz detaylı olarak çalışılmamıştır [10]. *Bacillus megaterium* PHB'nin ilk olarak izole edildiği ve tanımlandığı bakteri olmasına karşın, bu bakterideki biyosentez mekanizmasının henüz tam olarak karakterize edilemediği bildirilmektedir [4].

Farklı metabolik yollarla sentezlenen PHB'nin en önemli özelliklerinden biri toksik ürünler meydana getirmeksizin tamamen parçalanabiliyor olmasıdır. PHB'nin aerobik ortamdaki parçalanma ürünleri karbondioksit ve su; anaerobik ortamda parçalanma ürünü ise metandır [4]. PHB'nin yıkım hızı birkaç aydan, birkaç yıla kadar sürebilmektedir [25]. Bu yıkım esnasında bakteriler, mantarlar ve yüksek organizmalar biyolojik faktörler olarak; hidroliz ve oksidasyon kimyasal faktörler olarak; güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma ise fiziksel faktörler olarak etki etmektedirler [4].

PHB'nin depolimerizasyonu için kullanılan enzimler hücre içi veya hücre dışı enzimler olabilmektedirler. Hücre içi depolimerazların, hücre dışı depolimerazlardan farklı fonksiyonları vardır. Hücre içi depolimerazlar, hücre içinde hareketli ve kristalize olmayan doğal PHB elastomerlerini parçalamakta, dönüşüm sonrasında kristalize olan, denatüre edilmiş PHB ise hücre dışı depolimerazlar tarafından hidroliz edilmektedir [4].

Biyopolimerlerin çevre dostu fiziksel özellikleri, endüstriyel uygulamalar açısından önem taşımaktadır. PHB'nin doğaya atıldığında tamamen yok olması ve çevre kirliliği oluşturmaması nedeniyle, PHB/V tipi polimerlerden özellikle gıda ve kozmetik sanayisinde şişeleme malzemesi olarak yararlanılmaktadır. Bazı karakteristik özellikleri ise biyopolimerlere ziraat , veterinerlik, tıp gibi alanlarda kullanım imkanı sağlamaktadır [25] .

PHB ve kopolimerlerinin birçok toprak mikroorganizması tarafından parçalanabilmesi, ziraat alanında toprakta biyodegradasyon gerektiren uygulamalarda kullanılması açısından önem taşımaktadır. Özellikle alüminyum folyo gibi film şeklinde kaplamada kullanılmaktadırlar. Kullanımlar tohum kapsüllendirilmesinde ve fide taşımacılığında muhafaza ve gübre amaçlı olabilmektedir. Ayrıca pestisitlerin kontrollü salınımını sağlamak için plastik kılıf malzemesi olarak da kullanılabilirler [25] .

Veteriner hekimliğinde, kullanılan ilaçların kontrollü salınımını sağlamak için PHB kullanılmaktadır. Bu polimer özellikle sığır rumeninde çok iyi parçalanabilmektedir. Bu özelliğinden yola çıkılarak sığırlar üzerinde yapılan bir çalışmada hayvanların kurtlanması

önlemek için bir yıl süreyle antihelmitik ilaç içeren PHB kapsülleri kullanılmıştır. Hayvan dokularında toksik etki yapmadığından, vücutta absorbe edilen protez aletlerin ve cerrahi dikişlerin yapımında PHB'nin kullanılması birçok bilim adamının bu alanda çalışmalara ağırlık vermesine neden olmuştur [25].

PHB'nin uygulama alanları onun özelliklerine bağlı olarak, doğrudan kullanılmasının yanında depolimerizasyon ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomerinin kullanımı da yaygındır. Çünkü tüm yüksek organizmalarda bir ara metabolit bileşiğidir; lipid metabolizmasının ürünü olarak bulunur ve insan kanının normal bir ögesidir. Belirli dokularda özellikle de beyin ve kalp dokusu için enerji kaynağı olarak rol oynamaktadır. D(-)-3-hidroksibütirik asitin damar içi veya damar ağzından karbon sağlanması için kullanılabileceği ve daha yaygın kullanılan glikoz yerine bazı klinik avantajlara sahip olduğu bilinmektedir [25].

PHB'nin vücut içinde biyolojik parçalanması yavaştır. Çünkü insan vücudu PHB depolimeraz enzimi içermemektedir. Bu nedenle tıp alanında dikişler, protezler ve iğneler gibi cerrahi malzemelerin yapımında kullanılmaktadır. Ayrıca hastanelerde cerrahi swaplar, yara sargıları, cerrahi eldivenler içini yağlayıcı madde olarak veya ince toz formda kullanılması uygun görülmektedir [25].

Yüksek teknoloji ile PHB'nin geleceğe yönelik kullanım alanlarından biri de su geçirmez bir tüp formunda düzenlenen çok ince fibrillerden meydana gelen kan damarı veya vasküler aşı gibi kullanılabilecek olmasıdır. Bu aşının, vücut içinde gelişen yeni dokular için geçici bir yapı iskeleti olarak rol oynaması, sonuçta doğal dokuların eski haline gelmesi beklenmektedir [25].

PHB ve kopolimerleri paketleme filmleri ve tek kullanımlık malzemelerin (kadınlara mahsus hijyenik ürünler, tek kullanımlık çocuk bezleri ve mutfak malzemeleri) yapımında da kullanılmaktadırlar. Bu konudaki ilk ticari kullanıcı Almanya'da Wella Kozmetik Şirketi'dir. Şirket PHA'yı enjeksiyonla şişe şeklinde kalıplamış ve saç şampuanlarını paketlemek için kullanmıştır [4].

PHB ve çeşitli PHA'ların üretimi için kullanılan substratlar özellikle karbon kaynağı açısından bakıldığında glukoz, sükroz ve yağ asitleri ile aklanlar ve kloroalkanoik asitler gibi kimyasal bileşenlerdir. Ancak üretim konusundaki en büyük problem substratların maliyetinin yüksek olmasıdır. PHB oluşumu için kullanılan şeker substratının fiyatının, PHB üretiminin ticari başarısında sınırlayıcı faktörlerden biri olduğu ve polimer üretiminin her bir tonu için üç ton glikoz kullanılması gerektiği bildirilmektedir[4].

Polimerin kullanım sınırlarını belirleyen maliyet fiyatını düşürmek için rekombinant türler üzerinde yapılan çalışmaların yanı sıra, farklı ve ucuz karbon kaynakları kullanarak yüksek PHB verimi elde eden suşlar üzerinde araştırmalar da yapılmaktadır [4].

Düşük fiyatlı biyoplastik üretimi için melas, ksiloz, arpa ve soya atık suları ayrıca peynir altı suyunun kullanılması araştırılmaktadır [4]. Ucuz PHB üretimi için kullanılabilen melas bakteri için karbon kaynağı olmasının yanısıra ,içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü olarak da kullanılmaktadır [24].

Ticari olarak biyoplastik üretiminde İmperial Kimya Şirketi öncelikle metilotrofik bakterileri ve *Azotobacter*'leri kullanmış, ancak daha sonra PHB üretim seviyesi daha yüksek olan *Alcaligenes eutrophus* bakterisi ile devam etmiştir [4].

PHB özellikle *Alcaligenes* sp. ,*Azotobacter* sp. ,*Bacillus* sp. ,*Pseudomonas* sp. ve çeşitli toprak mikroorganizmaları tarafından sentezlenmektedir. Yapılan araştırmalar, toprak mikroorganizmalarından olan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de PHB sentezleyebildiklerini göstermektedir [4,24,25].

Rhizobium cinsi bakterilerin; gram negatif, spor oluşturmeyen, çubuk formunda, pleomorfik yapıda hücreler olduğu bilinmektedir. Genel olarak hareketli olan bu bakteriler bir ya da birden fazla flagella ihtiva etmektedirler. Karbonhidrat içeren besi ortamlarında gelişme sırasında akışkan, zamlı maddeler salgılamaktadırlar. Koloniler yuvarlak ve opaktır [25]. Hızlı gelişen *Rhizobium* ve yavaş gelişen *Bradyrhizobium* dışında günümüzde *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Photorhizobium*, *Mesorhizobium* olmak üzere dört cins daha tanımlanmıştır. Bu bakterilerin en önemli özelliklerinden biri baklagil bitkileri ile simbiyotik ilişki sonucunda azotu fiske edebilmeleridir [25].

Rhizobium, *Bradyrhizobium* ve *Azorhizobium* cinslerine ait birçok tür, serbest hücrede ve simbiyosiste PHB depolamaktadırlar. PHB'nin bu bakterilerde nitrojen fiksasyonunda enerji kaynağı olduğu düşünülmektedir [25].

Mikroorganizmaların PHB üretim yetenekleri üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu konuda yapılan bir çalışmada, *Alcaligenes eutrophus* bakterisinin fruktozun karbon kaynağı olarak kullanılması durumunda hücre kuru ağırlığının % 80'inden fazlasını PHB olarak biriktirebildiği belirtilmektedir [4].

Farklı *Azotobacter* türlerinin PHB verimi üzerinde yapılan çalışmalardan birinde, *Azotobacter 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 bildirilmektedir [4].

Bazı *Bacillus* suşlarının hücre kuru ağırlığının % 50'den fazlasının PHB olarak üretildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [4].

Chen ve arkadaşları, zenginleştirilmiş besiyerinde çoğaltılan *Bacillus* bakterilerinde hücre kuru ağırlığına göre % 5- %20 arasında PHB biriktirebildiğini bildirmektedirler [28].

Mercan ve Beyatlı 10 adet *Bacillus sphaericus* suşunun PHB üretimlerini araştırdıkları çalışmalarında PHB üretimini %5,00 - %25,88 arasında tesbit etmişlerdir. PHB üretimleri yüksek olan bazı suşları, farklı Beef Ekstrakt ve Sodyum Asetat konsantrasyonlarında geliştirdiklerinde, % 0,2 beef ekstrakt içeren besi ortamında bazı suşların PHB üretimlerinin % 32,50'ye kadar çıktığını bildirmektedirler [29].

Lebuzek ve Radecka , *Bacillus cereus* UW85 suşunu nitrojeni sınırlandırılmış şartlarda geliştirdiklerinde PHB veriminin % 9 olduğunu tespit etmişlerdir [11].

Metilotrofik organizmalardan olan bazı *Pseudomonas*'ların da PHB üretim yeteneklerinin araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. *Ps. oleovorans* , *Ps.aeruginosa*, *Ps.putida*, *Ps. fluorescens* ve *Ps. testatereni* ile yapılan çalışmalarda n-alkoller ve n-alkanoik asitler kullanılarak PHB üretimi gözlenmiştir. Karaboz ve Umay, *Ps.extorquens* bakterisini metanol içeren karbon kaynağında ürettiklerinde % 27 PHB üretimi saptadıklarını belirtmişlerdir [4].

Ateş ve Ekmekçi, substrat olarak pancar melası kullanarak, batık kültür yöntemiyle *Pseudomonas extorquens* DMS 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM) in PHB üretimlerini incelemişlerdir. Her bir bakteri için farklı şeker konsantrasyonlarının, karbon / azot oranlarının, çalkalama hızlarının ve inkübasyon sürelerinin PHB üretimine etkilerini araştırmışlardır. Optimum koşullarda PHB üretim veriminin pancar melaslı mineral ortamda *Ps. extorquens* DMS 1337'de %22,98 ve *A.chroococcum*' da %12,10 olarak bulmuşlardır. Ayrıca en iyi PHB üretiminin sakarozlu mineral ortamda gerçekleştiğini (*Ps. extorquens* DMS 1337 için %24,86 ve *A.chroococcum* (TEM) için %22,03) bildirmişlerdir [17].

Brandl ve arkadaşları, fotosentetik bakteriler olan *Rhodospirillum* ve *Rhodobacter* cinsleri üzerinde yaptıkları araştırmalarda, bu bakterilerin de n-alkanoik asitlerden polimer depo ettiğini ayrıca nitrojenin sınırlandırılması durumunda % PHB veriminin hücre kuru ağırlığının %60- %70' i kadar olabildiğini tespit etmişlerdir [30].

Sadettin ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında *Bacillus* cinsine ait *B.sphaericus*, *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.cereus*, *B. thuringiensis* ve *Bacillus* spp. bakterilerinin PHB üretim yeteneklerini incelemişlerdir. Sonuç olarak *Bacillus* cinsi bakterilerin hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretim miktarlarını *Bacillus* spp.suşlarında % 3,14 - % 31,42 , *B.subtilis* suşlarında % 10,71 - % 35,0 , *B.cereus* suşlarında % 12,24- % 22,22 , *B.sphaericus* suşlarında % 10,71 - % 57,40 ve *B.licheniformis* suşunda % 46,66 olarak saptamışlardır [6].

Yüksekdağ ve arkadaşları, *Lactobacillus* ,*Lactococcus* ve *Streptococcus* cinslerine dahil olan bazı laktik asit bakterilerinin PHB üretimlerini araştırdıkları çalışmalarında, bakteri türlerinin hücre kuru ağırlığına göre PHB verimini *Lactobacillus* türlerinde % 0,52- % 25,55 , *Lactococcus* türlerinde % 0,61 - % 14,81 ve *Streptococcus* türlerinde % 1,20 - % 13,69 olarak

tespit etmişlerdir. Streptococcus'un bir , Lactococcus'un altı suşunun PHB üretmediğini gözlemlemişlerdir [31].

Aslım ve arkadaşları, Ankara topraklarından izole ettikleri Bacillus cinsi bakterilerin PHB üretim yeteneklerini araştırmışlardır. Alınan altı farklı toprak örneğinden kırk adet bakteri izole edilmiştir. Çalışma yirmiyedi suş ile yapılmıştır. Suşların hepsinde PHB tespit edilmiştir. *B.megaterium* Y6 (% 43,13)'da en yüksek PHB verimi gözlenirken, *B.subtilis* K1(%6,53)'de hücre kuru ağırlığına göre en düşük PHB verimi gözlenmiştir [32].

Bitkilerde nodül oluşturan toprak bakterilerinden olan Rhizobium cinsi bakterilerin de PHB üretim yetenekleri araştırılmıştır.

Mercan ve arkadaşları yaptıkları araştırmada bir adet *Rhizobim japonicum*, altı adet *Rhizobium cicer*, sekiz adet Rhizobium spp. ve *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 suşunda PHB üretimini incelemişlerdir. Suşların PHB içeriklerini 0,01- 0,5 g / l ve PHB verimlerini hücre kuru ağırlığına göre % 1,36 - % 40,0 arasında bulmuşlardır. Suşlar arasında en yüksek verime sahip olan *Rhizobium* spp.2426 ile orta verimliliğe sahip olan *Rhizobium* spp. 640 suşlarını seçip, farklı karbon ve azot kaynaklarının PHB üretimine etkisini test etmişlerdir. Suşlar farklı karbon ve azot kaynağı içeren Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) sıvı besiyerinde düşük miktarda PHB üretirken, yüksek PHB üretimi L-sistein ve Glisin içeren besi ortamında elde edilmiştir. Bu besi ortamında (L-sistein ve Glisin) *Rhizobium* spp.640 suşunun % PHB verimini sırasıyla % 13,40 ve % 56,67 olarak, aynı azot kaynaklarında bu oranları *Rhizobium* spp.2426 suşunda sırasıyla % 70,0 ve % 61,43 olarak tespit etmişlerdir [27].

Mercan, yapmış olduğu doktora çalışmasında *Rhizobium meliloti*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium viciae* ve *Rhizobium* sp.türlerine ait toplam otuzbir adet suş kullanmıştır. Bakterilerin PHB üretimlerinin hücre kuru ağırlıklarına göre % 5,37- % 57,09 arasında değiştiğini tespit etmiştir. Maksimum PHB üretimi gösteren *Rhizobium viciae* F111 (% 57,09), *Rhizobium meliloti* Y11 (%39,25) ve *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab (%34,43) suşlarının farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretimlerini araştırmıştır. *Rhizobium meliloti* Y11 ve *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab suşları karbon kaynağı olarak glukoz besi ortamında maksimum PHB verimi gösterirken (sırasıyla %83,75 ve %34,31), *Rhizobium viciae* F111 suşu mannitol içeren besiyerinde yüksek oranda (%41,22) PHB üretmiştir. Suşların azot kaynaklarında (F111 dışında) PHB verimlerinin yüksek olmadığını gözlemlemiştir. Azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besi ortamında *Rhizobium meliloti* Y11 suşu maksimum %26,23 ve *Bradyrhizobium japonicum* S Irat Fab suşu %26,78 PHB üretirken, *Rhizobium viciae* F111 suşu asparajin azot kaynağında maksimum %48,13 oranında PHB üretmiştir [25].

Bu alışmada, Elazığ ili merkez ve Elazığ ili ilçelerine bağlı köylerden alınan toprak örneklerinden “Bitki İnfeksiyon Metodu” kullanılarak izole edilen doğal Rhizobium suşlarının Poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretebilme yeteneklerinin saptanması amaçlanmıştır.

2.MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

2.1.1. Bakteri Kùltürleri

Araştırmada kontrol suş olarak kullanılan *Rhizobium leguminosarum* Le 735 ve *R.phaseoli* CİAT 899 bakteri kùltürleri Ankara Toprak ve Gùbre Araştırma Enstitüsü'nden sağlanmıştır [26].

Araştırmada kullanılan *Rhizobium leguminosarum* ve *Rhizobium phaseoli* türlerine ait suşlar, Yrd.Doç.Dr.Seher Gür'den temin edilmiştir.

Bu suşlar, Elazığ İli merkez ve Elazığ İli ilçelerine bağlı köylerden 1996 yılı ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde alınan toprak örneklerinden izole edilmiştir [26].

2.1.2. Besiyerleri

Araştırmada *Rhizobium* cinsi bakterilerin Poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretim miktarlarının incelenmesinde Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) Sıvı besiyeri kullanılmıştır.

Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) Sıvı Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>g / lt</u>
Mannitol	10.0
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ .H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Trypton	2.5
Pepton	2.5
Yeast Ekstrakt	2.5

Maddeler 1 litre distile su içerisinde çözüldürölmüştür.0.01 N HCl ve 0.01 N NaOH kullanarak besiyerinin pH değeri 7'ye ayarlanarak 121 ° C de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir [27].

Katı besiyerinin hazırlanmasında (Yeast Ekstrakt Mannitol Agar) ortama %2 oranında agar ilave edilmiştir[25].

2.2. Metot

2.2.1. Suşların İzolasyonu

Araştırmada kullanılan suşların izolasyonu için Elazığ İli Merkez ve Elazığ İli ilçelerine bağlı köylerden alınan toprak örnekleri kullanılmıştır. Toprak örnekleri, mercimek ve fasulye bitkilerinin ekildiği tarlalardan 1996 yılı İlkbahar ve Sonbahar mevsimlerinde olmak üzere yılda iki kez alınmıştır.

Doğal *Rhizobium leguminosarum* populasyonunun belirlenmesinde AKM 9520 mercimek ve doğal *Rhizobium leguminosarum* populasyonunun belirlenmesinde ise Strike 308 fasulye tohumları kullanılmıştır.

Mercimek tohumları %1.2 lik agarlı su ortamında, fasulye tohumları ise steril pamuk üzerinde çimlendirilmiştir. Çimlendirilen fideler, içerisinde % 1/5 oranında sulandırılmış jensen besi solusyonu ve 1 litresinde 1ml olacak şekilde iz element çözeltisi içeren kavanozlara yerleştirilmiştir.

Araziden getirilmiş olan toprak örnekleri ile 10^{-6} ya kadar dilüsyonlar hazırlanıp, bunlardan 10 ar ml. kavanozlardaki fidelere inoküle edilmiştir.

Bitkiler dört haftalık bir gelişim periyodunun sonunda hasat edilmiştir. Sökülen bitkilerin kökleri sıvı içerisinde olduğundan herhangi bir işlem yapılmadan üzerindeki nodozitelerin sayısı, büyüklüğü, rengi ve dağılımı tespit edilmiştir.

Toprak örneklerindeki doğal populasyonun belirlenmesi amacıyla “Bitki Enfeksiyon Metodu” kullanılmıştır. Nodül oluşturan toplam bitki sayısı ile her bir toprak örneğinin 1 gramındaki *Rhizobium* sayısı EMS tablolarından faydalanılarak belirlenmiştir.

Rhizobium suşlarının izolasyonu için, toprak örnekleriyle aşılaman bitkilerin ana kökleri üzerinde bulunan pembe renkli, sağlıklı nodüller tercih edilmiştir.

Yüzey sterilizasyonu yapılan nodüller küt uçlu bir pens yardımıyla petri kutusunda ezilmiş, elde edilen *Rhizobium* süspansiyonundan YEM besiyeri ihtiva eden iki ayrı petri kutusuna sürme suretiyle aşılama yapılmıştır. 28°C de 4-5 gün süreyle inkübe edilmiştir. Bu işlem saf kültür elde edinceye kadar birkaç kere tekrarlanmıştır [26].

2.2.2. Suşların Kültürel Ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti

Rhizobium leguminosarum ve *Rhizobium phaseoli* suşlarının sabit ve değişken özelliklerini saptamak amacıyla kültürel testler (kolonilerin şekillerinin, renklerinin, büyüklüklerinin tespiti, hareket muayenesi, Kongo kırmızısı absorpsiyonu, Bromtimol mavili YEM’de asit oluşturma, ketolaktoz testi, pepton glukoz agarda üreme dururmunun tespiti) ve

biyokimyasal testler (litmuslu sütte üreme durumu, katalaz aktivitesi, metilen mavisi redüksiyonu, jelatini eritme) uygulanmıştır [26].

2.2.3. Suşların Muhafaza Edilmesi

YEM agar içeren yatık tüplere üçer paralelli olarak inoküle edilen izolatlar 28 °C de beş gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda + 4°C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Stoklar iki ayda bir yenilenmiştir [27].

2.2.4. Analitik Ölçüm için PHB Metodu

Rhizobium leguminosarum ve *Rhizobium phaseoli* suşlarının ürettiği PHB miktarı, Bonartseva ve Myshkina'nın metoduna göre belirlenmiştir [27].

YEM agarlı stok kültürden öze ile alınan inokulum içerisinde 50 ml YEM sıvı besiyeri bulunan bir erlene aktararak ön zenginleştirme yapılmıştır. Zenginleştirmenin yapıldığı erlendenden , içerisinde 100'er ml YEM sıvı besiyeri bulunan dört ayrı erlene % 4 oranında kültür aşılantısı. Erlenler 28 °C de 48 saat kalmak koşuluyla çalkalamalı etüve (Gerhardt-Laboshake) kaldırılmıştır.

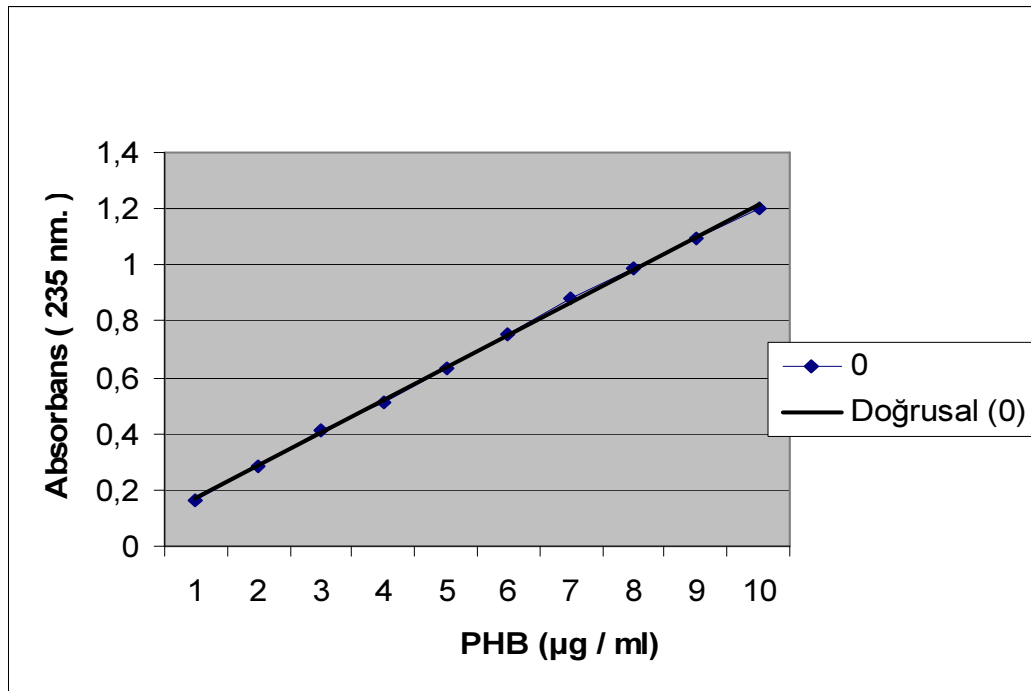
İnkübasyon sonrasında erlenlerdeki kültürler, darası alınmış olan santrifüj tüplerinin içerisine aktarılmış ve 10.000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj (Sigma 3K 18) edilmiştir. Sıvı kısım (supernatant) atıldıktan sonra tüplerde kalan pelet, 35 °C de 24 saat süreyle kurutulmuştur. Daha sonra tüpler tartılarak 100 ml'lik kültürdeki hücre kuru ağırlığı hesaplanmıştır.

Tartım işleminden sonra örnekler, 5 ml distile suyla homojenize edilmiştir. Homojenize örnekler, 2 dakika süreyle ultrasonikasyona (Bandelin UW 2070) tabi tutulmuştur. Bu tüplerdeki örneklerden 2'şer ml alınarak yeni santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 2 ml örneklerin üzerine 2 ml 2 N HCl ilave edilip, 2 saat süreyle 100 °C de su banyosuna (Clifton) alınmıştır. Su banyosundan çıkarılan örnekler, 6000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiş, sıvı kısım atıldıktan sonra geri kalan pelet üzerine 5 ml kloroform eklenip tüplerin ağzı kapatıldıktan sonra bir gece boyunca 28°C de çalkalamalı etüvde bekletilmiştir. Tüpler, ağızları açıldıktan sonra 6000 rpm'de 30 dakika santrifüj edildikten sonra kloroform kısmından 0,1 ml alınmış ve 40 °C de 15 dakika tutularak kloroform uçurulmuştur. Örneklerin üzerine 5 ml konsantre H₂SO₄ ilave edilmiş, 100 °C de su banyosunda 20 dakika bekletilmiştir. Su banyosundan alınan örnekler soğuduktan sonra 235 nm dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur.

2.2.5. PHB' ye ait Standart Grafiğın Hazırlanması

Standart grafiğın hazırlanması amacıyla Sigma-Aldrich Cheme den temin edilen saflaştırılmış ve toz haline getirilmiş standart PHB kullanılmıştır. PHB, krotonik asite dönüştürülerek spektrofotometrede absorbans taraması yapılmış ve maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun 235 nm. olduğu saptanmıştır.

Standart grafik için PHB'nin ; 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 'lik (sülfirik asit içinde) solüsyonları hazırlanmıştır. Bunlar 100 °C de 10 dakika ısıtılarak krotonik asite dönüştürülmüştür. Maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunda absorbansı ölçülerek PHB'nin $\mu\text{g} / \text{ml}$ 'ye karşılık gelen standart grafiğı elde edilmiştir [17].



Şekil 1 : Krotonik asit formundaki standart PHB'nin 235nm. dalga boyunda miktara bağlı ($\mu\text{g} / \text{ml}$) standart grafiğı

3. SONUÇ VE TARTIŞMA

3.1. Suşların Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri

3.1.1. Kültürel Özellikler

İzole edilen *Rhizobium leguminosarum* suşlarının tümü YEM besiyerinde yuvarlak, kenarları muntazam, kabarık ve krem renkli koloniler oluştururken *Rhizobium phaseoli* suşları yuvarlak, kenarları muntazam ancak daha büyük ve bir kısmı şeffaf koloniler oluşturmuşlardır. Yapılan mikroskopik incelemede her iki bakteriye ait suşların da Gram negatif olduğu görülmüştür. Suşların hepsi YEM besiyerinde mukoz oluşturmuşlardır. Araştırmada elde edilen tüm *Rhizobium leguminosarum* ve *Rhizobium phaseoli* suşlarının hareketli olduğu belirlenmiştir. *Rhizobium leguminosarum*'un dört, *Rhizobium phaseoli*'nin 5 suşu Kongo kırmızısını daha fazla absorbe ederek koyu pembe bir gelişme gösterirken her iki bakterinin diğer suşları çok az bir absorpsiyonla açık pembe koloniler oluşturmuşlardır.

Brom timol mavili YEM içeren ortamda doğal *Rhizobium leguminosarum* ve *Rhizobium phaseoli* suşlarının tümü 36 saat ve 120 saat sonra üreme göstermişler ve asit oluşturmuşlardır. Ancak her iki bakterinin birer suşu dışındaki suşlar laktozlu besiyerinde üreme göstermemişken pepton glukoz agarda tüm suşların ürediği görülmüştür [26].

3.1.2. Biyokimyasal Özellikler

Mercimek bitkisi ekili tarlalarda izole edilen *Rhizobium leguminosarum* suşlarından üç tanesi, *Rhizobium phaseoli* suşlarından iki tanesi litmuslu sütte bir aylık gelişim sonrası zon oluşturmamışlardır. Ancak her iki bakteriye ait suşların hepsi litmuslu sütte alkali reaksiyon vermiştir.

Doğal *Rhizobium leguminosarum* suşlarından sekizinde katalaz aktivitesi pozitifken *Rhizobium phaseoli* suşlarının hepsinde katalaz pozitif sonuç vermiştir. Metilen mavisi redüksiyonunun ise *Rhizobium leguminosarum*'un altı, *Rhizobium phaseoli*'nin dokuz suşunda pozitif olduğu görülmüştür.

Her iki bakteriye ait suşlar jelatin içerisindeki iki aylık inkübasyon süresi sonunda buzdolabına alındığında *Rhizobium leguminosarum*'un iki *Rhizobium phaseoli*'nin bir suşunun jelatini erittiği görülmüştür [26].

3.2. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

Bu çalışmada, Elazığ yöresi topraklarından izole edilen suşlardan bazılarının kuru ağırlıkları ve PHB üretim yetenekleri belirlenmiştir. 10 adet *Rhizobium phaseoli* ve 5 adet *Rhizobium leguminosarum* olmak üzere toplam 15 adet suş kullanılmıştır.

100'er ml'lik YEM sıvı besiyerinde 28 °C'de 48 saat inkübe edilen kültürler santrifüjlendikten sonra sıvı kısım atılmış, pelet kurutulmuştur. Daha sonra hücre kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

R.phaseoli suşlarının hücre kuru ağırlıkları , Tablo 3.2.1. ' de verilmiştir.

Tablo 3.2.1. *R.phaseoli* suşlarının hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	0,2001	0,2011	0,2035	0,2016	± 0,0017
11 F	0,1224	0,1252	0,1203	0,1226	± 0,0024
12 F	0,2441	0,2405	0,2427	0,2424	± 0,0018
22 F	0,1963	0,1997	0,1898	0,1952	± 0,0050
23 F	0,0958	0,0983	0,1007	0,0982	± 0,0024
24 F	0,2115	0,2145	0,2123	0,2127	± 0,0015
25 F	0,1834	0,1735	0,1882	0,1817	± 0,0074
27 F	0,1738	0,1734	0,1799	0,1757	± 0,0036
32 F	0,2113	0,2249	0,2179	0,2180	± 0,0068
33 F	0,1523	0,1562	0,1547	0,1544	± 0,0019

R.phaseoli CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığı 0,2016 g/l olarak bulunmuştur. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarının 0,0982-0,2424 g/l arasında değiştiği tespit edilmiştir. 23 F kodlu izolat en düşük hücre kuru ağırlığına (0,0982 g/l) sahipken, en yüksek hücre kuru ağırlığı (0,2424 g/l) ile 12 F kodlu izolat göstermiştir.

R.leguminosarum suşlarının hücre kuru ağırlıkları ,Tablo 3.2.2. ' de verilmiştir.

Tablo 3.2.2. *R.leguminosarum* suşlarının hücre kuru ağırlıkları (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.leguminosarum</i> Le 735	0,2887	0,2821	0,2795	0,2834	± 0,0047
2 M	0,2495	0,2591	0,2546	0,2544	± 0,0048
3 M	0,4115	0,4204	0,4002	0,4107	± 0,0101
5 M	0,3454	0,3547	0,3501	0,3500	± 0,0046
6 M	0,4443	0,4403	0,4427	0,4424	± 0,0020

Rhizobium leguminosarum Le 735 suşunun hücre kuru ağırlığı 0,2834 g/l olarak belirlenmiştir. *R.leguminosarum* izolatlarının hücre kuru ağırlıkları 0,2544- 0,4424 g/l arasında değişiklik göstermiştir. 2M suşu en düşük hücre kuru ağırlığına (0,2544 g/l) sahipken, en yüksek hücre kuru ağırlığının (0,4424 g/l) 6M kodlu izolata ait olduğu tespit edilmiştir.

Bahar [24], topraktan izole ettiği bakterilerin hücre kuru ağırlıklarını ve buna bağlı olarak PHB üretimlerini incelemiştir. Ayrıca temel mineral ortamı peynir altı suyu, melas ve şeftali pulbu ekleyerek bu ortamların PHB üretimine katkılarını araştırmıştır. Temel mineral ortamda hücre kuru ağırlıklarını 100 ml’de 25-450 mg arasında tespit etmiştir. Ortama %20 oranında melas ilave ettiğinde hücre kuru ağırlıklarını 160-670 mg / 100 ml. olarak belirlemiştir. % 20 lik şeftali pulbu ilavesinde ise hücre kuru ağırlıkları 280-1250 mg / 100 ml. arasında değiştiğini göstermiştir.

Toprak bakterileri ile yapılan bir başka çalışmada Sadettin ve arkadaşları [6], *Bacillus* cinsi bakterilerin hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini incelemiştir. Nutrient Broth besi ortamında en düşük hücre kuru ağırlığını 0,15 g / l , en yüksek hücre kuru ağırlığını ise 2,67 g / l olarak belirlemiştir.

Ateş ve Ekmekçi [17] *Pseudomonas extorquens* DMS 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM) ile yapmış oldukları çalışmalarında farklı şeker konsantrasyonlarının hücre kuru ağırlığını ve PHB verimini etkilediğini belirtmişlerdir. *Pseudomonas extorquens* DMS 1337’de en yüksek hücre kuru ağırlığı 22,24 mg olarak, *Azotobacter chroococcum* (TEM)’de en yüksek hücre kuru ağırlığı 67,11 mg olarak bulunmuştur.

Ankara tarlalarından alınan toprak örneklerinden izole edilen bakterilerle yapılan bir başka araştırmada Aslım ve arkadaşları [32] elde etmiş oldukları *Bacillus* cinsi bakterilerin hücre kuru ağırlıklarının 0,28-1,04 g / l arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Mercan ve arkadaşları [27] , *Rhizobium* cinsi bakterilerle yaptıkları çalışmalarında hücre kuru ağırlıklarını 0,11 – 4,35 g/l arasında bulmuşlardır. *Rhizobium* spp.2426 kodlu bakteri 0,20 g/l, *Rhizobium* spp.G49 kodlu bakteri 0,36 g/l, *Rhizobium* spp.2357 kodlu bakteri 0,58 g/l hücre kuru ağırlığına sahiptir. Çalışmamızda, hücre kuru ağırlıkları ile ilgili bulduğumuz değerler, bu çalışmadaki düşük kuru ağırlıklı suşlara benzerlik göstermektedir. Ancak tespit ettiğimiz yüksek kuru ağırlık değerleri bu çalışmaya uygunluk göstermemektedir. Çalışmamızda maksimum hücre kuru ağırlığı *R.phaseoli*’ de 0,2424 g/l, *R. leguminosarum*’ da 0,4424 g/l olarak bulunmuştur. Bu değerler Mercan ve arkadaşları’nın bulduğu 4,35 g/l değerinden düşüktür.

Mercan [25], doktora çalışmasında *Rhizobium* cinsi bakterilerle çalışmıştır. *R.phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarını 0,095 – 0,260 g/l olarak bulmuştur. Hücre kuru ağırlık değerleri *R.leguminosarum* suşlarında ise 0,155 – 0,470 g/l arasında değişiklik göstermektedir.

Çalışmamızdaki minimum ve maksimum kuru ağırlık değerleri bu çalışma ile uygunluk göstermektedir.

3.3. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi

Hücre kuru ağırlıkları tespit edildikten sonra sonikasyon işlemleri ile PHB elde edilmiştir. PHB, sülfirik asit ile krotonik asite dönüştürülmüş, son maddenin miktarı 235 nm. UV spektrofotometrede ölçülmüştür.

R.phaseoli suşlarının PHB üretimi, Tablo 3.3.1. ' de verilmiştir.

Tablo 3.3.1. *R.phaseoli* suşlarının PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2.paralel	3.paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	0,0463	0,0460	0,0467	0,0463	± 0,0003
11 F	0,0286	0,0296	0,0284	0,0288	± 0,0006
12 F	0,0408	0,0412	0,0420	0,0413	± 0,0006
22 F	0,0393	0,0406	0,0398	0,0399	± 0,0006
23 F	0,0247	0,0244	0,0253	0,0248	± 0,0004
24 F	0,0551	0,0553	0,0556	0,0553	± 0,0002
25 F	0,0445	0,0442	0,0450	0,0445	±0 ,0004
27 F	0,0349	0,0365	0,0375	0,0363	± 0,001
32 F	0,0401	0,0427	0,0409	0,0412	± 0,001
33 F	0,0306	0,0316	0,0311	0,0311	± 0,0005

R.phaseoli CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0,0463 g/l olarak bulunmuştur. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0,0248 – 0,0553 g/l olarak tespit edilmiştir.En düşük PHB üretimine (0,0248 g/l) 23 F kodlu izolatta , en yüksek PHB üretimine (0,0553 g/l) 24 F kodlu izolatta rastlanmıştır.

R.leguminosarum suşlarının PHB üretimi Tablo 3.3.2. ' de verilmiştir.

Tablo 3.3.2. *R.leguminosarum* suşlarının PHB üretimi (g/l)

Suş kodu	1. paralel	2. paralel	3. paralel	Ortalama	Standart sapma
<i>R.leguminosarum</i> Le 735	0,0531	0,0540	0,0536	0,0535	± 0,0004
2 M	0,0273	0,0279	0,0263	0,0271	± 0,0008
3 M	0,0604	0,0602	0,0599	0,0601	± 0,0002
5 M	0,0357	0,0369	0,0367	0,0364	± 0,0006
6 M	0,0566	0,0553	0,0567	0,0562	± 0,0007

Rhizobium leguminosarum Le 735 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0,0535 g/l olarak bulunmuştur. *R.leguminosarum* izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0,0271 - 0,0601 g/l olarak tespit edilmiştir. 2 M kodlu izolat en düşük PHB üretimine (0,0271 g/l) sahipken, en yüksek PHB üretiminin (0,0601 g/l) 6M kodlu izolata ait olduğu tespit edilmiştir.

Bahar [24], hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimini incelediği çalışmasında temel mineral ortamda farklı fermantasyon sürelerinde PHB miktarını en düşük 5,08 mg / 100 ml ve en yüksek 27,15 mg / 100 ml. olarak ölçmüştür. Ortama % 20 oranında melas ilave edildiğinde PHB miktarı 2,08-25,50 mg / 100ml arasında değişiklik göstermiştir. % 20 oranındaki şeftali pulbu ilavesiyle PHB miktarı biraz daha artış göstermiştir. Bu durumda en düşük miktar 10,60 mg / 100 ml, en yüksek miktar 46,09 mg / 100 ml. olarak belirlenmiştir.

Sadettin ve arkadaşları [6], *Bacillus cinsi* bakterilerin üretmiş oldukları PHB miktarını en düşük 0,03 g / l, en yüksek PHB miktarını ise 0,31 g / l olarak tespit etmişlerdir.

Aslım ve arkadaşları [32], Ankara topraklarından izole etmiş oldukları *Bacillus cinsi* bakterilerin 0,040-0,204 g / l⁻¹ arasında değişen miktarlarda PHB ürettiklerini saptamışlardır.

Mercan ve arkadaşları [27], *Rhizobium cinsi* bakterilerle yaptıkları çalışmalarında bakterilerin hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0,01-0,5 g/l arasında bulmuşlardır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz PHB üretimleri (*R.phaseoli* izolatlarında 0,0248 – 0,0553 g/l ve *R.leguminosarum* izolatlarında 0,0271 - 0,0601 g/l) bu çalışmadaki düşük PHB değerlerine uygunluk gösterse de,bulmuş oldukları maksimum değerler oldukça yüksektir.

Mercan [25], yaptığı doktora çalışmasında *R.phaseoli* suşlarında hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0,024 – 0,060g/l arasında bulmuştur. Bu değerler, çalışmamızdaki *R.phaseoli* izolatlarının PHB üretimine (0,0248 – 0,0553 g/l) uygunluk göstermektedir.Mercan, *R.leguminosarum* suşlarında PHB üretimlerini 0,024 – 0,106 g/l

arasında bulmuştur. Çalışmamızdaki. *R.leguminosarum* izolatlarının PHB üretimleri (0,0271 - 0,0601 g/l) bu değerlerle uyumludur.

3.4. PHB Verimlerinin Belirlenmesi

Suşların PHB üretimleri tespit edildikten sonra elde edilen değerler kullanılarak PHB verimleri hesaplanmıştır. *R.phaseoli* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri Tablo 3.4.1. ' de verilmiştir.

Tablo 3.4.1. *R.phaseoli* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R.phaseoli</i> CİAT 899	0,2016	0,0463	23,03
11 F	0,1226	0,0288	23,59
12 F	0,2424	0,0413	17,23
22 F	0,1952	0,0399	20,54
23 F	0,0982	0,0248	25,29
24 F	0,2127	0,0553	26,04
25 F	0,1817	0,0445	24,55
27 F	0,1757	0,0363	20,50
32 F	0,2180	0,0412	18,94
33 F	0,1544	0,0311	20,16

R.phaseoli CİAT 899 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi % 23,03 olarak tespit edilmiştir. *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri %17,23 - % 26,04 arasında bulunmuştur. 12 F kodlu izolat % 17,23 verimle en düşük değeri verirken, %26,04 ile 24 F en yüksek PHB verimine sahiptir.

R. leguminosarum suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri Tablo 3.4.2. ' de verilmiştir.

Tablo 3.4.2. *R. leguminosarum* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre % PHB verimleri

Suş kodu	Kuru ağırlık (g/l)	PHB üretimi (g/l)	% PHB
<i>R.leguminosarum</i> Le 735	0,2834	0,0535	18,91
2 M	0,2544	0,0271	10,68
3 M	0,4107	0,0601	14,65
5 M	0,3500	0,0364	8,69
6 M	0,4424	0,0562	12,71

Rhizobium leguminosarum Le 735 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi , % 18,91 olarak hesaplanmıştır. *R.leguminosarum* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri % 8,69 - % 18,91 arasında bulunmuştur. 5 M kodlu izolat % 8,69 verimle en düşük değeri verirken, %18,91 ile *Rhizobium leguminosarum* Le 735 suşunun en yüksek PHB verimine sahip olduğu bulunmuştur.

Toprak bakterileriyle yapılan bir araştırmada, temel mineral ortamda en düşük PHB verimini %3,02 ve en yüksek verimi %72,2 olarak tespit etmiştir. %20 melas ilave ettiği ortamda PHB verimini %0,33-%6,28 arasında hesaplamıştır. %20 şeftali pulbu ilavesi ile verim %0,9-%7,78 arasında değişiklik göstermiştir [24].

Bacillus cinsi bakterilerin Nutrient Broth besi ortamında üretildiği çalışmada [6], bakterilerin en düşük %4,93, en yüksek %57,40 oranında PHB verimine sahip oldukları bildirilmiştir.

Ateş ve Ekmekçi [17], farklı şeker konsantrasyonlarının PHB üretimine olan etkisini inceledikleri çalışmalarında *Pseudomonas extorquens* DMS 1337’de en yüksek PHB verimini %22,03 olarak, *Azotobacter chroococcum* (TEM)’de en yüksek PHB verimini ise %12,03 olarak bulmuşlardır.

Aslın ve arkadaşlarının [32], izole etmiş oldukları suşların PHB verimleri %6,53 - %48,13 arasında değişiklik göstermektedir.

Mercan ve arkadaşları [27], yaptıkları çalışmalarında bazı *Rhizobium* suşlarının PHB verimlerini % 1,38 - % 40,0 arasında bulmuşlardır. Aynı çalışmada karbon ve azot kaynaklarını değiştirerek % 70,0 ’ a varan PHB verimine ulaşmışlardır.

Manna ve arkadaşları, *Rhizobium* suşlarında kuru ağırlıklara göre PHB verimini %1- 38 arasında bulmuşlardır [32].

Mercan [25], çalışmasında *R.phaseoli* suşlarında PHB verimini %23,08 -28,70 arasında bulmuştur. Çalışmamızda *R.phaseoli* izolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri %17,23 - 26,04 arasında bulunmuştur. *R.phaseoli* için minimum PHB verimi bu çalışmaya göre düşük iken, ara değerler benzerlik göstermektedir. Mercan, *R.leguminosarum* suşlarında PHB verimini % 14,22- 25,85 arasında bulmuştur. Çalışmamızda, *R.leguminosarum* izolatlarında en düşük % 8,69 ,en yüksek %18,91 verim elde edilmiştir. *R.leguminosarum* için tespit ettiğimiz minimum ve maksimum değerler, bu çalışmadaki değerlerden daha düşük olarak bulunmuştur.

Mikroorganizmaların PHB üretimleri üzerine yapılan çalışmalara her geçen gün yenileri eklenmektedir. Bilim adamları sadece PHB üreten suşları belirlemekle kalmayıp, suşların hangi koşullarda daha yüksek üretim yapabileceklerini de araştırmaktadırlar. Bu çalışmada tespit ettiğimiz değerlerden faydalanılarak, farklı karbon ve azot kaynaklarında, farklı çalkama

hızlarında, farklı pH'larda ve farklı inkübasyon sürelerinde PHB üretimlerinde meydana gelecek değişiklikler araştırılabilir.

4. KAYNAKLAR

1. Yıldız, K., Sipahioğlu, Ş. ve Yılmaz, M., 2000, Çevre Bilimi. Gündüz Eğitim ve Yayıncılık. Ankara.
2. Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, R.E., 2003, Bioplastics From Microorganisms, Current Opinion in Microbiology, 6, 251 -260.
3. Boşgelmez, A., Boşgelmez, İ., Savaşçı, S., Paşlı, N. ve Kaynaş, S., 2000, Ekoloji-I .İspartalılar Eğitim Kültür Sağlık Yardımlaşma ve Dayanışma Vakfı Yayınları, 6, Ankara.
4. Yılmaz, M. ve Beyatlı, Y., 2003, Toprakta Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi; Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi, Orta On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 9, 1-33.
5. Kaya, M.A. ve Balkaya, Ç., 2001, Katı Atık Alanlarındaki Gömülü Plastik Atıkların Özdirenç Yöntemi İle Belirlenmesi, DEÜ Mühendislik Fakültesi Fen ve Mühendislik Dergisi, 3, 1, 47-58.
6. Saadettin, S., Mercan, N., Mumcu, Z.N. ve Beyatlı, Y., 2001, *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Poli- β - hidroksibütirat (PHB) Üretim Yeteneklerinin İncelenmesi, Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25, 2, 67-76.
7. Fortelny, I., Michalkova, D. and Kruliğ, Z., 2004, An Efficient Method of Material Recycling of Municipal Plastic Waste, Polymer Degradation and Stability, 85, 3, 975-979.
8. Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y., 2000, Synthesis, Structure and Properties of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters, Progress in Polymer Science, 25, 10, 1503-1555.
9. Katircioğlu, H., Asım, B., Yüksekdağ, Z.N., Mercan, N. ve Beyatlı, Y. , 2003, Production of Poly- β - hydroxybutyrate (PHB) and Differentiation of Putative *Bacillus* Mutant Strains by SDS-PAGE of Total Cell Protein, African Journal of Biotechnology, 2, 6, 147-149.
10. Khanna, S. and Srivastava, K.A., 2005, Recent Advances In Microbial Polyhydroxyalkanoates, Process Biochemistry, 40, 2, 607-619.
11. Lebuzzek, S. and Radecka, I., 2001, Biosynthesis of PHB Terpolymer By *Bacillus cereus* UW85, Journal of Applied Microbiology, 90, 353-357.
12. Rawte, T. and Mavinkurve, S., 2002, Characterization of Polyhydroxyalkanoates- Biodegradable Plastics From Marine Bacteria, Current Science, 83, 5, 562-564.
13. Law, K.H., Cheng, Y.C., Leung, Y.C., Lo, W.H., Chua, H. and Yu, H.F., 2003, Construction of Recombinant *Bacillus subtilis* Strains for Polyhydroxyalkanoates Synthesis, Biochemical Engineering Journal, 16, 203-208.

14. Kahar, P., Tsuge, T., Taguchi, K. and Doi, Y., 2003, High Yield Production of Polyhydroxyalkanoates from Soybean Oil By *Ralstonia eutropha* and Its Recombinant Strain, *Polimer Degradation and Stability*.
15. Freier, T., Kunze, C., Nischan, C., Kramer, S., Stenberg, K. and Schmitz, P.K., 2002, In Vitro and In Vivo Degradation Studies for Development of a Biodegradable Patch Based On Poly(3- hydroxybutyrate), *Biomaterials*, 23, 2649-2657.
16. Taguchi, S., Nakamura, H., Kichise, T., Tsuge, T., Yomato, I. And Doi, Y., 2003, Production of Polyhydroxyalkanoates(PHA) From Renewable Carbon Sources In Recombinant *Ralstonia eutropha* using Mutants of Original PHA Synthase, *Biochemical Engineering Journal*, 16, 107-113.
17. Ateş, M. ve Ekmekçi, S., 2001, Pancar Melası Kültüründe *Pseudomonas extorquens* DSM 1337 ve *Azotobacter chroococcum* (TEM)`dan PHB Üretimi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25, 3, 61-70.
18. Raje, P. and Srivastava, K.A., 1998, Updated Matematical Model and Fed-Batch Strategies for Poly- β - hydroxybutyrate (PHB) Production By *Alcaligenes eutrophus*, *Bioresource Technology*, 64, 185-192.
19. Dhanasekar, R., Viruthagiri, T. and Sabarathinam, P.L., 2003, Poly (3-hydroxybutyrate) Synthesis from a Mutant Strain *Azotobacter vinelandii* Utilizing Glucose In a Batch Reactor, *Biochemical Engineering Journal*, 16, 1-8.
20. Khanna, S. and Srivastava, K.A., 2005, Statistical Media Optimisation Studies For Growth and PHB Production By *Ralstonia eutropha*, *Process Biochemistry*, 40, 6, 2173-2182.
21. Jung, Y.M. and Lee, Y.H. 2000, Utilization of Oxidative Pressure For Enhanced Production Of Poly- β - hydroxybutyrate and Poly (3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate) In *Ralstonia eutropha*, *Journal Of Bioscience and Bioengineering*, 90, 3, 266-270.
22. Quinteros, R., Goodwin, S., Lenz, W.R. and Park, H.W., 1999, Extracellular Degradation Of Medium Chain Lenght Poly (β -hydroxyalkanoates) By *Comamonas* sp., *International Journal Of Biological Macromolecules*, 25, 135-143.
23. Grothe, E., Moo-Young, M. and Chisti, Y., 1999, Fermentation Obtimization For The Production Of Poly (β -hydroxybutyric acid) Microbial Thermoplastic, *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 132-141.
24. Bahar, H., 2003, Topraktan İzole Edilen Bakterilerden PHB Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
25. Mercan, N., 2002, Rhizobium Cinsi Bakterilerin Poli - β - Hidroksibütirat Üretimlerinin Belirlenmesi, Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS -PAGE) İle

- Elde Edilen Toplam Protein Profillerinin ve Plazmid DNA 'larının İncelenmesiDoktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
26. Gür, S., 1998, Elazığ Yöresi Topraklarındaki Doğal Rhizobium Populasyonunun Belirlenmesi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü.
 27. Mercan, N., Aslım, B., Yüksekdağ, Z.N. ve Beyatlı, Y., 2002, Production Of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) By Some Rhizobium Bacteria, Turk J. Biol., 26, 215-219.
 28. Chen, G.Q., König, K.H. and Lafferty, R.M., 1991, Occurence Of Poly-D(-) – 3-Hydroxyalkanoates In The Genus Bacillus, FEMS Mic. Lett., 84,174-176.
 29. Mercan, N.ve Beyatlı, Y.,2001, *Bacillus sphaericus* Suşlarının Poli- β -Hidroksibütirat (PHB) Üretimlerinin İncelenmesi, Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, 25, 2, 1-7.
 30. Brandl, H., Gross, R.A., Lenz, R.W., Llyod, R. and Fuller, R.C.,1991, The Accumulation of Poly (3-hydroxyalkanoates) in *Rhodobacter sphaeroides* , Arch.Microbiol., 155, 337-340.
 31. Yüksekdağ, Z.N., Beyatlı, Y. ve Aslım, B.,2003, Determination of Poly- β -hydroxybutyrate (PHB) Production by Some Mesophilic and Thermophilic Lactic Acid Bacteria, Turk J Biol.,27, 37-42.
 32. Aslım,B., Yüksekdağ, Z.N. ve Beyatlı, Y.,2002,Determination of PHB Growth Quantities of Certain Bacillus Species İsolated From Soil,Turkish Electronic Journal of Biotechnology,Special Issue,24-30.
 33. Manna, A.,Pal, S.P.,Paul, A.K.,2000,Synthesis and Accumulation of Poly (3-hydroxybutyric acid) by Rhizobium sp.,Arta Biologica Hungaria, 51, 1,73-82.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe URUC

Kişisel Bilgiler :

Doğum Tarihi : 15.05.1980
Doğum Yeri : Erzurum
Uyruğu : T.C.
Medeni Hali : Evli

Eğitim :

İlköğretim :

1987 – 1991 Atatürk İlköğretim Okulu (Erzurum)

Ortaöğretim :

1991 – 1994 İmam Hatip Lisesi – Orta Kısım (Erzurum)

Lise :

1994 – 1998 Turgut Özal Anadolu Lisesi (Malatya)

Lisans :

1998 – 2002 İnönü Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Malatya)

Tezsiz Yüksek Lisans :

2002 – 2004 İnönü Üniversitesi, Eğitim Bilimleri Enstitüsü (Malatya)

Yüksek Lisans :

2004 – 2006 Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Elazığ)

Tez : Elazığ Yöresi Topraklarından İzole Edilen Rhizobium Cinsi Bakterilerin
Poli-β-Hidroksibütirat (PHB) Üretim Yeteneklerinin İncelenmesi
Danışman : Seher GÜR

Çalıştığı Kurumlar :

2005 Final Dergisi Dershaneleri, Başakşehir Şubesi (İstanbul)

