

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YABANI BAKLAGİL BİTKİLERİNDEN İZOLE EDİLEN
***Rhizobium* spp. TÜRLERİNİN SİDEROFOR ÜRETİMİ**
VE MELAS BESİORTAMINDA POLY- β -
HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİM VERİMİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hülya AVŞAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KIRŞEHİR 2017

T.C.
AHI EVRAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YABANI BAKLAGİL BİTKİLERİNDEN İZOLE EDİLEN
***Rhizobium* spp. TÜRLERİNİN SİDEROFOR ÜRETİMİ**
VE MELAS BESİORTAMINDA POLY- β -
HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİM VERİMİNİN
ARAŞTIRILMASI

Hülya AVŞAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

KIRŞEHİR 2017

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Yrd. Doç. Dr. Aysel KEKİLLİOĞLU

Üye

Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

Üye

Doç. Dr. Makbule ERDOĞDU

Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

04/08/2017

Prof. Dr. Levent KULA

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Hülya AVŞAR

**YABANI BAKLAGİL BİTKİLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Rhizobium spp. TÜRLERİNİN SİDEROFOR ÜRETİMİ
VE MELAS BESİORTAMINDA POLY-β-
HİDROKSİBÜTİRAT (PHB) ÜRETİM VERİMİNİN
ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Hülya AVŞAR

Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

AĞUSTOS 2017

ÖZET

Bu çalışmada Kırşehir il merkezi ve ilçelerinde (Kaman, Mucur, Akpınar, Akçakent, Çiçekdağı, Boztepe) bulunan yabancı baklagil bitkilerinden daha önce izole edilmiş olan toplam 56 adet *Rhizobium* spp. izolatu kullanılmıştır. Bu amaçla izolatlara morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak Poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretme yetenekleri Nile Blue A boyası ile belirlenmiş olup 43 adet izolatın PHB üretebildiği tespit edilmiştir. Bu 43 izolattan 5 adeti seçilmiş ve *R. leguminosarum* IFO 14778 kontrol suşu ile birlikte melasın %0.5, %1 ve %1.5 konsantrasyonlarında 96 saatlik inkübasyon sonunda spektrofotometrik yöntem ile PHB üretim verimleri incelenmiştir.

Kullanılan *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi %0.5'lik melas konsantrasyonunda %24.23 olarak tespit edilmiştir. *Rhizobium* spp. izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri farklı melas konsantrasyonlarında %7.30- %72.58 arasında bulunmuştur. Farklı melas konsantrasyonlarında hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi HR 38-1a kodlu izolatta, %1'lik melas konsantrasyonunda %72.58 olarak tespit

edilmiştir. Genel olarak izolatların hepsinde (%1'lik melas konsantrasyonunda HR 41-1 izolatı dışında) kontrol suşundan daha yüksek oranda verim elde edilmiştir.

Ayrıca *Rhizobium* spp. izolatlarının siderofor üretme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla Chrome Azurol Sulphate (CAS) Agar kullanılmış ve toplam 56 adet izolattan 50 adetinin siderofor üretebildiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada; yabancı baklagil bitkilerinden elde edilen izolatların daha yüksek PHB verimine sahip olduğu tespit edilmiş olup bunların ileride biyoplastik eldesinde kullanılabileceği bu bağlamda da ekosistemin dengesinin düzenlenmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Yabancı Baklagil, *Rhizobium*, PHB Üretimi, Melas, Siderofor

Sayfa Adedi: 100

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

**INVESTIGATION OF SIDEROPHORES PRODUCTION AND POLY- β -
HYDROXYBUTYRATE (PHB) PRODUCTION YIELDS OF *Rhizobium* spp.
TYPES ISOLATED FROM WILD LEGUMES IN MOLASSES MEDIUM**

(Master of Science Thesis)

Hülya AVŞAR

Ahi Evran University, Enstitute of Science

AUGUST 2017

ABSTRACT

In this study, total 56 pieces of *Rhizobium* spp. isolations which were previously isolated from wild leguminous plant existing in the central and the districts of Kırşehir province (Kaman, Mucur, Akpınar, Akçakent, Çiçekdağı, Boztepe). For this purpose, morphological physiological and biochemical tests to isolate the PHB-producing capabilities Nile Blue A is designated with 43 pieces of isolates has been found to produce PHB. 5 of these 43 isolates were selected and their PHB producing yields with *R. leguminosarum* IFO 14778 control strain together with 0.5, 1 and 1.5 percent concentrations of molasses at the end of the 96 hour incubation period in spectrophotometric method were studied.

R. leguminosarum IFO 14778 strain used cell dry weight 0.5 percent of the highest yield PHB according to molasses concentration has been identified as 24.23 percent. PHB yields of *Rhizobium* spp. isolates according to the cell dry weight was found between 7.30 percent and 72.58 percent in different molasses concentration. According to cell dry weights in different maximum PHB yields was identified, at HR 38-1a isolate, as 72.58 percent in 1 percent molasses concentration. In general in all isolates (exceptfor HR 41-1 isolate in 1 percent molasses concentration) a higher rate yield has been obtained than control strain.

In addition, in order to identify the siderophore producing abilities of *Rhizobium* spp. isolates Chrome Azurol Sulphate (CAS) Agar was used and it was determined that 50 of 56 isolates in total can produce siderophore.

As a result of this study, isolates obtained from wild legume plant were found to have higher PHB yields and these can be used in bioplastic in the future, and in these context it is believed to contribute to the regulation of the ecosystem balance.

Key Words: Wild Leguminous, *Rhizobium*, PHB Production, Molasses, Siderophore

Number of Pages: 100

Thesis Advisor: Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmam boyunca her konuda bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice ÖĞÜTCÜ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimime başlamam için beni yönlendiren, her zaman bilgi ve görüşlerinden faydalandığım, tezimde de yardımını esirgemeyen, maddi ve manevi destek olan ablam Emine ILGAZ'a teşekkür ederim.

Labaratuvar olanakları konusunda yardımcı olan Doç. Dr. Aslıhan GÜNEL'e ve Uzman Dr. Murat ÇINARLI'ya; laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü kolaylığı sağlayan Yrd. Doç. Dr. Tayfun KAYA'ya, Arş. Gör. Esin KIRAY'a, Öğr. Gör. Yasemin ERBEY'e, arkadaşlarım Muhammed Yunus Emre KARAMAN'a ve Deniz ŞANLI'ya teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen annem Ayşe AVŞAR'a, babam Ömer AVŞAR'a, kardeşlerim Nazife AVŞAR'a, Nihal TÜRK'e, Leyla AVŞAR'a ve Mustafa AVŞAR'a sonsuz minnet ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma Ahi Evran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri FEF.B2.16.004 kapsamında desteklenmiştir.

Hülya AVŞAR

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
RESİMLER DİZİNİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Rhizobium</i> Türlerinin Genel Özellikleri.....	5
1.2. Biyoplastiklerin Genel Özellikleri	6
1.3. PHB (Poli-β-hidroksibütirat)'nin Keşfi ve Tarihi Gelişimi	10
1.4. PHB'nin Genel Özellikleri.....	11
1.5. PHB'nin Biyosentezi.....	14
1.6. PHB'nin Biyolojik Parçalanabilirliği ve Yenilenebilme Özelliği.....	15
1.7. PHB'nin Kullanıldığı Alanlar	18
1.7.1. Veterinerlikte Kullanıldığı Alanlar	18
1.7.2. Ziraatta Kullanıldığı Alanlar	18
1.7.3. Tıpta Kullanıldığı Alanlar	19
1.7.4. Kimyasalların Eldesinde Kullanılması.....	20
1.7.5. Özel Uygulamalarda Kullanımı	21
1.8. PHB Üretiminde Kullanılan Substratlar.....	22
1.9. PHB Üretiminde Melasın Kullanılması	23
1.10. Sideroforların Genel Özellikleri	25
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	28
2.1. PHB ile İlgili Yapılan Çalışmalar	28
2.2. Siderofor ile İlgili Yapılan Çalışmalar	35
3. MATERYAL VE METOD.....	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. Kullanılan Bakteri Kültürleri	39
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri	41

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	41
3.2. Metod	42
3.2.1. İzolatların Kültürel ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti.....	42
3.2.1.1. Gram Boyama	42
3.2.1.2. Hareketlilik Testi.....	43
3.2.1.3. Katalaz Testi.....	43
3.2.1.4. Oksidaz Testi.....	44
3.2.1.5. Brom Thymol Mavili YMA'da Gelişim	44
3.2.1.6. Kongo Kırmızılı YMA'da Gelişim	44
3.2.2. İzolatların Muhafaza Edilmesi	45
3.2.3. PHB Granüllerinin Nile Blue A ile Boyanması	45
3.2.4. Analitik Ölçüm için PHB Metodu.....	45
3.2.5. PHB'ye ait Standart Grafiğin Hazırlanması.....	46
3.2.6. İzolatlarda Siderofor Varlığının Tespiti	48
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	50
4.1. İzolatların Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri	50
4.2. PHB Granüllerinin Nile Blue A ile Boyanması	55
4.3. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi	57
4.4. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi	61
4.5. PHB Verimlerinin Belirlenmesi	65
4.6. İzolatlarda Siderofor Varlığının Tespiti.....	71
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	77
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ.....	100

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1.1. Çeşitli Kriterlere Göre Mikrobiyal Biyoplastiklerin Sınıflandırılması (Türkoğlu, 2009)	9
Tablo 1.2. PHB ve Polipropilen (PP)'in Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması (Tamdoğan, 2009)	13
Tablo 3.1. <i>Rhizobium</i> spp. İzolatlarının Toplandığı Bitkiler	40
Tablo 4.1. İzolatların Gram Boyama, Morfoloji, Koloni Rengi ve Mukoz Oluşturma Özellikleri	51
Tablo 4.2. İzolatların Gram Boyama, Morfoloji, Koloni Rengi ve Mukoz Oluşturma Özellikleri (Devamı)	52
Tablo 4.3. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları	53
Tablo 4.4. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları (Devamı).....	54
Tablo 4.5. İzolatların PHB Üretebilme Yetenekleri.....	55
Tablo 4.6. İzolatların %0.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıkları (g/l)	57
Tablo 4.7. İzolatların %1 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıkları (g/l)..	58
Tablo 4.8. İzolatların %1.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıkları (g/l)	59
Tablo 4.9. İzolatların %0.5 Melas Konsantrasyonunda PHB Üretimi (g/l)	61
Tablo 4.10. İzolatların %1 Melas Konsantrasyonunda PHB Üretimi (g/l)	62
Tablo 4.11. İzolatların %1.5 Melas Konsantrasyonunda PHB Üretimi (g/l)	63
Tablo 4.12. İzolatların %0.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıklarına Göre % PHB Verimleri	65

Tablo 4.13. İzolatların % 1 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıklarına Göre % PHB Verimleri	67
Tablo 4.14. İzolatların % 1.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıklarına Göre % PHB Verimleri	68
Tablo 4.15. İzolatların Siderofor Üretme Potansiyelleri ve Zon Çapları	74
Tablo 4.16. İzolatların Siderofor Üretme Potansiyelleri ve Zon Çapları (Devamı)...	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı (Tamdoğan, 2008)	12
Şekil 1.2. PHB sentezi (Tamdoğan, 2008).....	15
Şekil 1.3. PHB'nin parçalanması ve sentezi (Ediz ve Beyatlı, 2005).....	17
Şekil 3.1. Krotonik asit formundaki standart PHB'nin 235 nm. dalga boyunda miktara bağlı standart grafiği	47
Şekil 4.1. İzolatların %0.5 melas konsantrasyonunda % PHB verimleri.....	66
Şekil 4.2. İzolatların %1 melas konsantrasyonunda % PHB verimleri.....	67
Şekil 4.3. İzolatların %1.5 melas konsantrasyonunda % PHB verimleri.....	68

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. İzolatların YMA'da üreme fotoğrafları a. HR 36-2 b. HR 37 c. HR 38-1a d. HR 41-1 e. HR 51	50
Resim 4.2. İzolatların Nile Blue A'lı YMA'daki fotoğrafları a. HR 36-2 (+) b. HR 37 (+) c. HR 38-1a (+) d. HR 41-1 (+) e. HR 51 (+) f. HR 4 (-)	56
Resim 4.3. İzolatların CAS Agar'da oluşturdukları zonlar.....	72
Resim 4.4. İzolatların CAS Agar'da oluşturdukları zonlar (Devamı).....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kisaltmalar	Açıklama
PHA	Polihidroksialkanoatlar
PHB	Poli-β-Hidroksibütirat
YEM	Yeast Ekstrakt Mannitol
YMA	Yeast Mannitol Agar
YMB	Yeast Mannitol Broth
CAS	Chrome Azurol Sulphate
UV	Ultraviyole
cm	Santimetre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
g	Gram
mg	Miligram
L	Litre
ml	Mililitre
pH	Asitlik-Bazlık Birimi
N	Normalite
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
dk	Dakika
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
ark.	Arkadaşları

1. GİRİŞ

İnsanoğlunun ihtiyaçlarını karşılama potansiyeline sahip olan dünyanın dengesi her geçen gün giderek bozulmaktadır. Zaman içerisinde insanlar, refah seviyesini artırmak amacıyla doğaya hakim olmaya başlamış, teknolojiyi de kullanarak yaşamını sürdürdüğü çevre ile devamlı bir mücadele içinde olmuş ve ortam koşullarını istediği gibi değiştirip yapay bir çevre meydana getirmiştir (Türk, 1998; Kıvanç ve Yücel, 1998; Özey, 2001; Şama, 2003; Baysak, 2008).

Dünyamızı oluşturan atmosfer, hidrosfer ve litosferin doğal yapılarının değişmesi sonucu buralar yaşam ortamı olmaktan çıkmaya başlamış, ekosistemi meydana getiren canlı ve cansız varlıklar arasındaki ilişkilerin de bozulmasıyla birlikte ekonomik, sosyal ve çevresel problemler olarak bilinen ekolojik sorunlar ortaya çıkmıştır (Uruç, 2006).

İnsanların yaşadığı ekolojik sorunların, özellikle de çevre sorunlarının önemli nedenlerinden birisi nüfusun hızlı artmasıdır. Sanayi devrimi ile birlikte Dünya'nın nüfusu 18. yüzyılda hızlı bir artış sürecine girmiş ve nüfus artış hızı 1950 yıllarına kadar %0.8 iken, 1950-1985 yılları arasında %1.9'a çıkmıştır. Dünya nüfusunun 2025'te 8.2, 2050'de ise 10.2 milyara yükseleceği öngörülmektedir. (Yıldız ve ark., 2000; Uruç, 2006).

İnsan nüfusunun hızlı artışı ile birlikte tüketim de artmış bunun sonucu olarakta çok fazla miktarda dönüştürülemeyen atık materyal birikimi de kaçınılmaz olmuştur (Luengo ve ark., 2003; Uruç, 2006). Bu atıkların büyük bir bölümünü ise plastik materyaller oluşturmaktadır (Mercan, 2002).

Plastiklerin; uygulama kolaylıkları, ekonomik olmaları ve özelliklerinin sürekli geliştirilmesiyle kullanım alanları ve miktarları her geçen gün artmaktadır. Otomobil sektörü, elektrikli ev aletleri, mutfak eşyası, park ve bahçe alanları, tarım ürünleri, plastiğe dayalı inşaat malzemesi, kozmetik, temizlik malzemesi, tekstil, gıda malzemesi ambalajı, konfeksiyon ambalajı ve sağlık alanında yani günlük yaşantımızın her alanında plastik kullanılmaktadır (Ediz ve Beyatlı, 2005; Baysak, 2008). Ancak plastiklerin kullanılıp atılması çevre kirliliğinde önemli bir sorun teşkil etmektedir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Baysak, 2008).

Atık plastikler çoğunlukla diğer evsel atıklar ile beraber çöp çukurlarına atılmakta ya da çöp boşaltma alanlarına bırakılmaktadır. Çöp boşaltma alanlarının ve çukurlarının her geçen gün dolması, yakma gibi alternatif uygulamaların yüksek maliyetleri, değişik teknik sorunlar, atıkları azaltma ve enerji kaynaklarını koruma isteği, atık plastiklerin tekrar kullanımı konusunu gündeme getirmiştir (Savaşçı ve ark., 1998; Mercan, 2002). Ancak atık plastiklerin yeniden kullanıma hazırlanması amacıyla; toplama, ayıklama, hammadde haline dönüştürme aşamaları maliyeti oldukça yükseltmektedir (Dave ve ark., 1996; Mercan, 2002).

Plastik atıkların ekosistemde uzun yıllar parçalanamaması, doğadaki canlıların yaşamını tehdit etmesi, yok etme uygulamalarından biri olan yakarak uzaklaştırmanın soluduğumuz havaya zararlı gazların salınımı ile insan sağlığını bozucu etkenler içermesi tüm bu olumsuz özelliklere çözüm önerisi olarak biyoplastik üretimini karşımıza çıkarmaktadır. Biyoplastik doğada tamamen parçalanabilme özelliğindedir. Ayrıca petrol yerine yenilenebilir enerji kaynakları ile üretildikleri ve sentetik plastiklerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini taşıdıkları için plastik sektöründe çok önemli bir yere de sahiptirler. Tüm bunlara ilaveten petrol rezervlerinin dünyada gittikçe azalması, üretim maliyetlerinin artması ve doğaya büyük zararlar vermesinden dolayı plastik sektöründe petrol türevi olan sentetik plastik hammaddelerin yerine biyoplastik hammaddelerin kullanılması büyük önem taşımaktadır (Tekin, 2008).

Petrol türevi plastiklerin doğada uzun yıllar parçalanamaması sonucu oluşan çevre kirliliğinin önlenmesi için yapılan çalışmalarda; bakterilerin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere, stres şartlarında depoladıkları lipit granüllerinin plastik özellikte olması ve bu plastik materyalin doğada mikroorganizmalar tarafından tekrar parçalanabilmesi gibi nedenlerden dolayı bunlar kullanılarak plastik madde üreten bir sektörün gelişmesini sağlamıştır. Bu bağlamda da biyolojik olarak parçalanma özelliğinde olan polimerlerin (mikrobiyal termoplastik) üretimi oldukça önemli hale gelmiştir (Baysak, 2008; Türkoğlu, 2009).

Polihidroksialkanoatlar (PHA) %100 biyoparçalanır polimerlerdir. Bu polimerler farklı mikroorganizmalar tarafından, azot ve fosfor gibi temel besinlerin sınırlı, karbon kaynağının ise fazla olduğu durumda enerji depo maddesi olarak sentezlenen

çeşitli hidroksialkanoatlardır. PHA polipropilen gibi değişik termoplastiklere benzer özellikler taşıdıkları için polipropilenin yerine de kullanılabilir. PHA denizlerde, göllerde, toprakta ve atık sularda bulunan mikroorganizmalar tarafından aerobik koşullarda karbondioksit ve suya kadar; anaerobik şartlarda ise metana kadar tamamen ayrışabilmektedir (Khanna ve Srivastava 2005a; Dinigüzel, 2007).

PHA; biyoparçalanabilirlik ve biyouyumluluk göstermesinden dolayı son yıllarda oldukça önemli hale gelmiş olup üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bunlardan biri olan poli- β -hidroksibütirat (PHB) ise en iyi bilinen ve yaygın olan PHA'dır (Ediz, 2004; Türkoğlu, 2009).

PHB'nin en önemli özelliklerinden birisi de; toprak ve insan vücudu gibi farklı ortamlarda herhangi bir toksik ürün oluşturmadan tamamen biyoparçalanabilir olmasıdır. Bu özelliğinden yola çıkılarak tek kullanımlık eşyaların üretiminde önemli bir avantaj sağlayacağı düşünülmektedir. Doğada yoğun olarak bulunan bakterilerin çoğunluğu ise depo materyali olarak PHB üretme özelliğindedir (Hajikhani, 2003; Baysak, 2008).

Çok fazla sayıda bakterinin doğal yollarla sentezlediği PHB'nin, yüksek miktarda üretilen ve genellikle ambalaj malzemesi olarak kullanılan polipropilene benzerlik göstermesi, bu termoplastığın Amerika, Avrupa ve Japonya'da endüstriyel yollarla üretiminin hızlandırılmasını sağlamıştır (Braunegg ve ark., 1998; Türkoğlu, 2009). PHB genellikle; *Alcaligenes* spp., *Azotobacter* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Rhizobium* spp. gibi çok sayıda toprak bakterisi tarafından üretilmektedir. Baklagil bitkileriyle birlikte simbiyotik azot fiksasyonu yapan *Rhizobium* cinsi bakterilerin de hücre içi PHB depo etme yeteneğinin olduğu birçok araştırmayla belirlenmiştir (Bonartseva ve ark., 1994; Jan ve ark., 1996; Tavernier ve ark., 1997; Mercan, 2002; Uruç, 2006; Baysak, 2008; Türkoğlu, 2009; Küçük ve ark, 2016). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise çok sayıda *Rhizobium* cinsine ait türün PHB'yi hem serbest yaşamda hem de simbiyotik ilişkide üretebildikleri tespit edilmiştir (Türkoğlu, 2009).

PHA ve PHB'nin üretimi için kullanılan substratlar; özellikle karbon kaynağı olarak glukoz, sükröz, yağ asitleri ile alkanlar ve kloroalkanoik asitlerdir (Tanaka ve ark., 1993; Jan ve ark., 1996; Türkoğlu, 2009).

Düşük maliyetle biyoplastik üretmek amacıyla; melas (Page, 1992b; Wu ve ark., 2001; Türkoğlu, 2009) ksiloz, arpa ve soya atık suları ile peynir altı suyunun (Ahn ve ark., 2000; Türkoğlu, 2009) kullanılması ile ilgili çalışmalar son yıllarda yoğunlaşmıştır. Bu materyallerden biri olan melas; bakteriler için karbon kaynağı olmasının yanısıra içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü olarak da kullanılmaktadır (Beaulieu ve ark., 1995; Lee, 1996; Türkoğlu, 2009).

PHB lipofilik boyalarla kolayca tespit edilebilmektedir. Sudan Siyahı B, az veya çok miktarda PHB üreten bakteri kolonilerinin agar plaklarında ayırt edilmesi için kullanılmakta olup bakteriler koyu mavi-siyah boyanmaktadır. PHB için Sudan Siyahı B' den daha fazla affiniteye ve spesifikliğe sahip olan Nile Blue A kullanıldığında ise, 460 nm. dalga boyunda bakterilerin kolonileri parlak turuncu florasan oluşturduğu bildirilmektedir (Bahar, 2003; Uruç, 2006).

Bakteriler birçok biyolojik süreçte kullanmak ve hücrel yaşamın sürdürülmesi için demire gereksinim duymaktadırlar. Bu bağlamda çok sayıda bakteri demir ihtiyacını karşılayabilmek için siderofor adı verilen molekülleri sentezlemekte ve salgılamaktadır. Birçok mikroorganizma için siderofoların sentezi, yapısı, özellikleri ve kullanım alanları, çok sayıda çalışmayla ortaya konulmuş olup bakteri, actinomycetes, mantar ve alglerin çeşitli siderofor türlerini ürettiği belirtilmiştir (Winkelman, 2002; Güney, 2014).

Bu çalışmada Kırşehir yöresindeki yabani baklagil bitkilerinden daha önce izole edilmiş *Rhizobium* spp. izolatlarının, atık bir madde olan melasın farklı konsantrasyonlarında spektrofotometrik metot yardımıyla Poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretim verimlerinin ve buna ilaveten *Rhizobium* spp. türlerinin siderofor üretimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.1. *Rhizobium* Türlerinin Genel Özellikleri

Rhizobium türleri baklagil bitkilerinin köklerinde simbiyotik bir ilişki kuran ve toprakta azot fikse eden bakterilerdir. Baklagil türlerinin tohumu sert kabuklu olup otsu veya odunsu bitkilerden oluşmaktadır. Bu türler ise; bezelye, yer fıstığı, fasulye, yonca, üçgül, akasya, acı bakla, soya fasulyesi gibi bitkilerden oluşmaktadır. Baklagil bitkisi ve *Rhizobium* türleri arasında simbiyotik bir ilişki vardır. Bu yaşam tarzında hem mikroorganizma hem de bitki yarar görmektedir. Bitkinin kök hücreleri bakterinin besin ve karbonhidrat ihtiyacını karşılarken bakteri de bitki için gerekli olan azotu, amonyak formunda bitkiye kazandırmaktadır (Öğütücü, 2000; Kantar ve ark., 2003; Yıldız, 2007).

Rhizobium türleri baklagil bitkilerini enfekte edebilme yeteneklerine göre sınıflandırılmaktadırlar. *Rhizobium* türleri bir grup baklagil bitkisini enfekte edip nodül oluştururken diğer baklagil bitkilerini enfekte edemezler. Türlerin bu seçici özelliği esas alınarak, *Rhizobium* cinsi 6 türde gruplandırılmaktadır. Aynı bakteri tarafından enfekte olan bitki türleri, çapraz aşılama gruplarını oluşturmaktadırlar. Türleri ayırt etmede aynı çapraz aşılama grubunda nodül oluşturabilme yeteneği dikkate alınmaktadır (Vincent, 1970; Öğütücü ve ark., 2009; Çetin-Karaca, 2010).

Rhizobium türleri Eubacteriales takımının Rhizobiaceae familyasının *Rhizobium* cinsinde yer almaktadırlar. Hücreler kısa çubuk şeklinde, 0.5-0.9 µ eninde ve 1.2-3.0 µ uzunluğundadır. *Rhizobium* türleri; gram negatif, endospor oluşturmayan, heterotrofik bakteriler olup en iyi üremeyi maya ve malt ekstraktında göstermektedirler. Karbon kaynağı olarak özellikle Mannitol'e ve üreme için amino asitlere ihtiyaç duyarlar (Gür, 1987; Matur, 2009; Adıgüzel ve ark., 2010).

Ayrıca koloniler; yuvarlak, konveks ve musilajlı olup, genellikle 2–4 mm çapındadır. Azot kaynağı olarak; amonyum tuzları, nitrat, nitrit ve aminoasitlerin birçoğunu kullanabilirken, peptonlu besiyerinde gelişmeleri zayıf olup kazeini hidrolize etmezler. Bazı türlere ise biotin ya da suda çözünür vitaminlerin gerekli olduğu bildirilmektedir (Jordan, 1984; Çetin-Karaca, 2010). Şeffaf kolonilerin çok yapışkan ve yumuşak, mat kolonilerin ise hafif yapışkan ve sert bir yapıya sahip olduğu bildirilmiştir. Optimum üreme sıcaklıkları 26-30°C arasında olup koloniler

yaşlandıkça koyu bir renge sahip olmaktadır (Beck ve ark., 1993; Holt ve ark., 1994; Öğütçü, 2000; Atıcı ve ark., 2005; Çetin-Karaca, 2010).

Rhizobium türleri aerobik bakteriler olup, gelişimlerini 3-10 günlük periyotta tamamlamaktadırlar. Yavaş üreyenler 3-5 günde gelişirler ve ortalama generasyon süreleri 6-10 saat; hızlı üreyenler ise 2-3 günde gelişirler ve generasyon süreleri 2-4 saattir (Grimm ve ark., 1994; Kızıloğlu, 1995; Öğütçü, 2000; Matur, 2009).

Rhizobium bakterilerinin teşhisinde hücre ve koloni morfolojilerinin yanısıra; onlara ait spesifik besiyeri olan Yeast Mannitol Agar (YMA) da kullanılmakta olup karbon kaynağı olarak Mannitol, organik azot kaynağı olarak da yeast ekstrakt kullanılmaktadır (Öğütçü ve ark., 2008; Çetin-Karaca, 2010).

Rhizobium türleri taze hazırlanmış Brom-Timol Mavili YMA besiyerine ekildiğinde besiyerinin yeşil rengini, ya maviye (yavaş üreyerek alkali reaksiyon oluşturanlar) veya sarıya (hızlı üreyerek asit reaksiyon oluşturanlar) dönüştürürler. Kongo Kırmızılı YMA besiyerinde karanlıkta inkübe edildiklerinde boyayı absorbe etmezler ve beyaz opak görünümünde nadiren pembemsi koloniler oluştururlar. Işıktaki inkübe edildiklerinde ise boyayı absorbe ederek kırmızı renkli koloniler oluştururlar (Uçar ve Öner, 1988; Kızıloğlu, 1992; Beck ve ark., 1993; Öğütçü, 2000; Öğütçü ve ark., 2010).

1.2. Biyoplastiklerin Genel Özellikleri

Biyolojik kökenli polimerlerden ya da yenilenebilir karbon kaynaklarından elde edilen plastikler olarak bilinen biyoplastikler; hayvan, bitki, mantar, alg veya bakteriler gibi çeşitli organizmalarca üretilen biyolojik materyallerdir (Luengo ve ark., 2003; Rajendran ve ark., 2012; Reddy ve ark., 2012; Özdemir ve Erkmen, 2013). Biyomateryaller; biyoteknolojik metodlarla çeşitli organizmalar tarafından sentezlenen, konvensiyonel sentetik ürünlere kıyasla çok sayıda canlı tarafından kolay asimile edilebilen doğal ürünlerdir ve biyo-uyumlu oldukları için de organizmalarda toksik etki yapmazlar (Vroman ve Tighzert, 2009; Özdemir ve Erkmen, 2013). Bu özelliklerinden dolayı biyoplastikler, farklı besin ve çevrede geliştirilen geniş bir yelpazede yer alan mikroorganizmalar tarafından üretilen

biyomateryallerin özel bir formu olarak da bilinmektedir (Luengo ve ark., 2003; Özdemir ve Erkmen, 2013).

Mikrobiyal kökenli plastikler; orijinleri, monomer yapıları, monomer sayıları gibi farklı özellikleri esas alınarak çeşitli gruplara ayrılmaktadırlar (Luengo ve ark., 2003; Türkoğlu, 2009) (Tablo 1.1.).

Biyosentetik orijinlerine göre biyoplastikler üç grupta incelenmektedir;

- **İlk grup;** mikroorganizmalar tarafından sentezlenemeyen bazı öncül maddelerin kültür ortamına ilave edilmesiyle üretilen yarı sentetik biyoplastiklerdir. Bu grupta dolgu maddesi olarak nişasta kullanılmakta ve çapraz bağlarla nişasta-plastik oluşturulmaktadır. Toprak mikroorganizmaları nişastayı kolayca parçalayabildiği için polimer matrikside kolayca ayrıştırabilmektedir. Bu nedenle parçalanma sırasında önemli bir azalma olmakta ancak bazı plastikler kısmen parçalanabilmektedir. Bu bağlamda nişastanın parçalanmasından sonra oluşan plastikler dayanıklı oldukları için çevrede çok uzun bir süre kalmaktadır (Uruç, 2006; Türkoğlu, 2009).
- **İkinci grup;** doğal olanlara benzeyen ancak sadece kimyasal olarak sentezlenen sentetik biyoplastiklerdir. Bu gruptakiler enzimatik veya mikrobiyal etkiye duyarlıdırlar. Ancak plastiklerin bütün özelliklerini taşımadıkları için ticari açıdan plastiklerin yerini alabilecek özellikte değildirler (Khanna ve Srivastava, 2005b; Türkoğlu, 2009).
- **Üçüncü grup;** mikroorganizmalar tarafından genel metabolitler kullanılarak üretilen doğal biyoplastiklerdir (Khanna ve Srivastava, 2005b; Türkoğlu, 2009).

Monomerlerin kimyasal yapısına göre biyoplastikler;

- Alifatik yağ asiti içeren biyoplastikler,
- Aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler,
- Hem alifatik hem de aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler,
- Değişik bileşikler içeren biyoplastikler (Luengo ve ark., 2003; Türkoğlu, 2009).

Monomer büyüklüğüne göre biyoplastikler;

- Kısa zincir uzunluğuna sahip biyoplastikler,
- Orta zincir uzunluğuna sahip biyoplastikler,
- Uzun zincirli biyoplastikler (Khanna ve Srivastava, 2005a, 2005b; Türkoğlu, 2009).

Polyesterdeki monomer sayısına göre;

- homopolimerik biyoplastikler,
- heteropolimerik biyoplastikler (Luengo ve ark., 2003; Türkoğlu, 2009).

Tablo 1.1. Çeşitli Kriterlere Göre Mikrobiyal Biyoplastiklerin Sınıflandırılması (Türkoğlu, 2009).

SINIF	ALT SINIF
Biyosentetik Köken	<i>Doğal biyoplastikler:</i> Mikroorganizmalar tarafından genel metabolitlerden üretilirler (örneğin; PHB'lar ve alifatik PHA'lar)
	<i>Yarı sentetik biyoplastikler:</i> Mikroorganizmalar tarafından sentezlenemeyen bazı öncül maddelerin besiyerine eklenmesi gerekli olanlar (örneğin; aromatik monomerler içeren PHA'lar)
	<i>Sentetik biyoplastikler:</i> Sadece kimyasal sentezlerle elde edilebilen doğal olanlara benzeyen polyesterler (örneğin; sentetik termoplastik polimerler)
Monomerlerin kimyasal yapısı	<i>Alifatik yağ asiti içeren biyoplastikler:</i> Doymuş veya doymamış (çift ya da üç bağ içeren) monomerler; düz veya dallanmış monomerler
	<i>Aromatik yağ asiti içeren biyoplastikler</i>
	<i>Hem alifatik hem de aromatik yağ asitlerini içeren biyoplastikler</i>
	<i>Değişik bileşikler içeren biyoplastikler</i> (örneğin; poli- γ -glutamik asit, poli- β -L-malik asit, poliglukolik asit)
Monomer Büyüklüğü	<i>Kısa zincirli biyoplastikler</i> (örneğin; 3-5 karbon atomu içeren PHA'lar)
	<i>Orta zincir uzunluğundaki biyoplastikler</i> (örneğin; 6-14 karbon atomu içeren PHA'lar)
	<i>Uzun zincirli biyoplastikler</i> (örneğin; 14 karbon atomundan fazla karbon atomu içeren PHA'lar)
Polyesterdeki monomer içeriği	<i>Homopolimerik biyoplastik:</i> Biyoplastikte tek bir monomer içeren
	<i>Heteropolimerik biyoplastik (kopolimer):</i> Biyoplastikte birden fazla monomer içeren

1.3. PHB (Poli-β-hidroksibütirat)'nin Keşfi ve Tarihi Gelişimi

Mikrobiyoloji alanında mikroskobun kullanılmaya başlamasından sonra, küçük "yağ damlacıkları"nın bazı bakteri hücrelerinde görüldüğü tespit edilmiştir. *Rhizobium* bakterileri içindeki bu granüllerin nodüllerden izole edilen bakteroidlerde de bulunduğu görülerek bunların "ışığı kıran damlacıklar" olduğu bildirilmiştir. Çoğu mikrobiyolog, bakterilerdeki lipofilik granülleri daha önceleri tanımlamışlar ancak bu partiküllerin yapısını ilk kez Lemoigne 1923 yılında ortaya koymuştur (Lee, 1996; Türkoğlu, 2009). Bu araştırmacı çalışmasında, *Bacillus subtilis* kültürlerini distile su içerisinde otoliz ettiğinde, bilinmeyen bir asit oluşumu ile pH'nin azaldığını tespit etmiş ve bu asidin, şeker hastalarında bulunan ürindeki β-hidroksibütirik asite benzediği ise sonradan tespit edilmiştir (Anderson ve Dawes, 1990; Türkoğlu, 2009).

İlerleyen yıllarda PHB polimeriyle ilgili çalışmalar giderek artmıştır. 1958 yılında Macrae ve Wilkinson, *Bacillus* spp.'de PHB sentezini ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartlar ve mekanizmasıyla ilgili araştırmalar yapmışlardır (Mercan ve Beyatlı, 2004; Türkoğlu, 2009). Araştırmalar sonunda, *Bacillus megaterium*'un otolizi esnasında β-hidroksibütirik asit monomerleri oluştuğunu ve bunların kaynağının ise poli-β-hidroksibütirik asit olduğunu kesin olarak tespit etmişlerdir (Anderson ve Dawes, 1990; Lee, 1996; Türkoğlu, 2009).

PHB polimerinin ticari üretim çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamış olmakla birlikte endüstriyel boyutta üretimi 1970'li yıllarda gerçekleştirilmiştir (Holmes, 1985; Anderson ve Dawes, 1990; Madison ve Huisman, 1999; Dinigüzel, 2007). 1982 yılında Imperial Kimya Endüstrisi (ICI Ltd.) polimeri *Alcaligenes* cinsine ait bakterileri kullanarak endüstriyel olarak üretilen BIOPOL® adıyla patentini almıştır (Holmes, 1985; Anderson ve Dawes, 1990; Dinigüzel, 2007). PHB'nin ilk ticari üreticisi ise Almanya'daki Wella kozmetik şirketi olup PHB'ı şampuan şişelerinin imalatında kullanmıştır (Lafferty ve ark., 1988; Dinigüzel, 2007).

Biopol, güçlü kristal yapıda olup polimer ya da monomer birimlerine bağlı olan, elastik kauçuklara benzeyen çeşitli özellikleri taşımaktadır. Aynı zamanda doğal ve sentetik polimerlerin tüm avantajlarına da sahiptir (Özdemir, 2012).

1988 yılında *Alcaligenes eutrophus* bakterisi kullanılarak 3- ve 4-hidroksibütiratın yeni kopolimerleri bulunmuş ve Page 1995 yılında PHA'ların hem aerobik hemde anaerobik ortamda biyoparçalanabilir olduklarını bildirmiştir. Daha sonra ise 1996 yılında Lee, bakterilerde PHA'nın 80 farklı formunu tespit etmiş ve en yaygın formunun PHB ve PHV olduğunu belirtmiştir (Aydoğmuş, 2011).

Sonraki yıllara geldiğimizde PHB ile yapılan araştırmalar; *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Bacillus* cinsleriyle devam etmiş, fiziksel ve kimyasal özellikleri, moleküler ağırlığı, ekstraksiyon metodları, metabolizması, iç ve dış parçalanması gibi özellikleri belirlenmeye çalışılmıştır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Baysak, 2008).

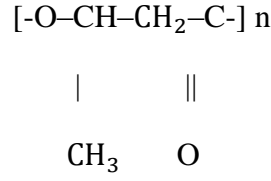
Günümüzde en önemli PHA/PHB üretici firmaları; Metabolix/ADM (USA), PHB Industrial (Brazil), Biomer (Germany), and Tianan (China), Meredian, LLC in Bainbridge, Georgia, and Newlight Technologies, LLC, formerly The G2 Chemical Company, in Costa Mesa, California olarak sıralanabilir (Bordes ve ark., 2009; McKirahan, 2013; Al, 2015).

1.4. PHB'nin Genel Özellikleri

Kısa zincirli β -hidroksi yağ asitlerine sahip olan PHB, depo granülü olarak sentezlenip biriktirilmekte ve membranla çevrili, tekrarlanan hidrofobik birimlerden oluşmaktadır (Findlay ve White, 1983; Aydoğmuş, 2011).

Biyoplastikler çok sayıda mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme şartlarında sentezlenmektedir. PHB'nin büyüme için gerekli olan oksijen, nitrojen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe vb.) gibi besleyici maddelerin sınırlı ancak karbon kaynağının yüksek olduğunda biriktirildiği tespit edilmiştir (Jafari Baranı, 2014).

PHB'nin genel formülü $(C_4H_6O_2)_n$ olarak gösterilme (Şekil 1.1) ve (n) 35.000 kadar yüksek bir sayı olabilmektedir. Polimer uzunluğunca karbonil oksijen ile metil grupları yer almaktadır (Nickerson ve ark., 1981; McCool ve ark., 1996; Madison ve Huisman, 1999; Tamdoğan, 2008).



Şekil 1.1. D(-)-3-hidroksi bütirik asit polimerinin kimyasal yapısı (Tamdoğan, 2008).

PHB'nin moleküler ağırlığının 60.000-2.000.000 Da arasında olduğu belirtilmekte olup bakterinin türüne, büyüme koşullarına, hücrenin yaşam döngüsüne göre farklılık göstermektedir (Dunlop ve Robards, 1973; Taidi ve ark., 1994; Braunegg ve ark., 1998; Dinigüzel, 2007). Organik çözücülerle hücreden özütlendiklerinde kristalleşen polimerler hücre içinde sıvı, dışında katı formdadırlar (Lafferty ve ark., 1988; Dave ve ark., 1996; Madison ve Huisman, 1999; Dinigüzel, 2007).

Bakteri türlerinde bulunan PHB granülleri faz-kontrast yada elektron mikroskop ile görülebilmektedir. Granüller ise çoğunlukla küresel olup 100- 800 nm çapındadır ve 2-4 nm kalınlığında ünit olmayan bir zarla çevrilmiştir. Hücrelerden izole edilen granüllerin genellikle %98 PHB ve %2 protein ihtiva ettiği belirtilmektedir. *Bacillus cereus*'tan izole edilen granüllerin %50'sinin merkezi çekirdekten meydana geldiği ve çekirdeğin en dışta bir zarla tekrar çevrili olduğu bildirilmektedir. Her bir granül fibriler yapıda olup 10-15 nm uzunluğunda polimerik PHB granüllerinden oluştuğu incelemeler sonucunda tespit edilmiştir (Anderson ve Dawes, 1990; Mercan, 2002). Bu fibrillerin eş zamanlı sentez ve suda çözünmeyen bir polimer yapısında, kristalizasyonun bir sonucu olarak oluştuğu açıklanmıştır. Tüm bu bilgilere ilaveten bakterilerden doğal yollarla PHB granüllerinin eldesinde zorluklar yaşandığı için PHB sentezinin fiziksel mekanizması hakkında halen bazı belirsizlikler olduğu ileri sürülmüş fakat PHB'nin yüksek bir kristallenme yüzdesiyle (%80) fibriler bir yapıya sahip olduğu kesin olarak ortaya konmuştur (Abe ve ark., 2000; Mercan, 2002).

PHB molekülü; petrol kökenli polipropilene benzer fiziksel özellikler taşıyan optikçe aktif D(-)-3-hidroksibütirik asitin bir polimeridir ve yan zincirinde bir metil grubu bulundurmaktadır (Nickerson ve ark., 1981; Türkoğlu, 2009). PHB, oldukça kristal yapıda ve D(-) konfigürasyonundaki asimetric karbon atomundan dolayı

%100 stereospesifiktir. Katı - kırılğan PHB kopolimerlerinin erime sıcaklığı 157-188 °C arasında olup bu sıcaklık polimerin termal olarak ayrıştığı sıcaklığa yakın özellik gösterir (Lafferty ve ark., 1988; Madison ve Huisman, 1999; Türkoğlu, 2009).

PHB, sağ el kuralına uygun iki kat halinde kıvrılmış heliks yapıdadır ve her iplik 0.596 nm'de bir tekrarlanmaktadır. Konfigürasyonu ve kaynama noktaları birbirine yakın olduğu için polipropilen ve PHB, yapısal olarak da benzer özellik taşımaktadır. Biyodönüşüm ve biyouygunluk gibi önemli özelliklere sahip olup aynı derecelerde kristalleşmelerine rağmen kimyasal özellikleri farklılık gösterir. Fiziksel olarak UV ışığına daha dirençli olan PHB, propilenden daha sert ve kırılğandır (Holmes, 1985; Mercan, 2002).

Tablo 1.2. PHB ve Polipropilen (PP)'in Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması (Tamdoğan, 2009).

Fiziksel Özellikler	PHB	PP
Kristalin kaynama noktası (°C)	175	176
Camsı geçiş sıcaklığı (°C)	15	-10
Yoğunluk (g/cm ³)	1.250	0.905
Kırılma uzaması	6	400
UV'ye dayanıklılık	Dayanıklı	Dayanaksız
Organik çözücüye dayanıklılık	Dayanıklı	Dayanaksız

Büyüme ve PHB birikimi arasında sıkı bir ilişkinin olduğu çalışmalar sonucu saptanmıştır. Bakteri gelişiminin logaritmik üreme safhasında PHB birikiminin yükseldiği, geç logaritmik üreme-erken duraklamada ise maksimum olduğu gözlemlenmiştir (McCool ve ark., 1996; Dinigüzel, 2007). Büyüme sırasında bölünmeyen hücrelerde de PHB'nin yüksek miktarda çoğaldığı bildirilmektedir (Lee, 1996; Dinigüzel, 2007). Ayrıca spor ihtiva eden bakterilerin PHB birikiminin spor oluşumundan önce olduğu ve biriken PHB'nin sporulasyonda enerji kaynağı olarak kullanıldığı yapılan çalışmalar sonunda ortaya konulmuştur (Nickerson ve ark., 1981; Benoit ve ark., 1990; Dinigüzel, 2007).

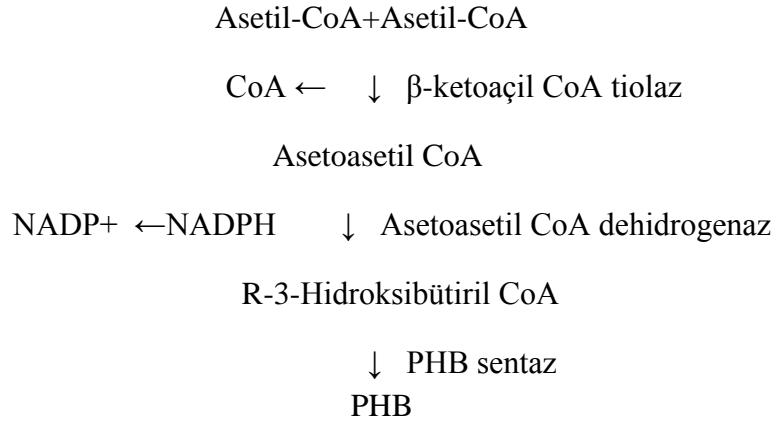
Bakteri hücrelerinde PHB birikiminin artması; yüksek asetil-CoA, yüksek NAD(P)H ve düşük serbest CoA olmasına bağlıdır. Bunlar, mikroorganizmalar arasında farklılık göstermekle birlikte genellikle potasyum, nitrojen, sülfür yada oksijenin sınırlandırılması gibi büyümeyi kısıtlayıcı faktörlere de ihtiyaç vardır (Braunegg ve ark ., 1998; Yüce, 2014).

1.5. PHB'nin Biyosentezi

Moleküler genetik çalışmaların ışığında 1987'den günümüze kadar PHB'nin biyokimyası, metabolizması ve fizyolojisinin aydınlatılmasıyla ilgili pek çok veri elde edilmiştir. PHA'lar arasında en ayrıntılı şekilde PHB karakterize edilmiş olup intraselüler sentezinde meydana gelen ara ürünler ve basamaklar *B. megaterium*'da incelenmiştir. Glukoz substratı ile başlayan ve son ürün PHB arasındaki ara basamaklarda pirüvat, asetat, asetoasetat ve β -hidroksibütirat olduğu ortaya konmuştur (Ali, 2002; Türkoğlu, 2009).

PHB biyosentezinde rol alan genlerinin kromozomda veya plazmid DNA'da bulunduğu belirtilmektedir (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Uruç, 2006). *Ralstonia eutropha*'da PHB sentezinde rol alan genlerin (pha CBA) üç proteini şifrelediği bildirilmektedir. Bu proteinler; PhaA (β -ketotiaz), PhaB (NADPH-oksidoredüktaz) ve PhaC (PHB polimeraz/sentaz) olarak ifade edilmiştir (Luengo ve ark., 2003; Uruç, 2006). Bunlarla gerçekleştirilen PHB sentezinde asetil CoA'nın TCA döngüsünde ve PHB metabolik yolunda ilerleyişinin büyüme koşullarına bağlı olduğu ortama eklenen NADPH'nin PHB ve kopolimerlerinin üretimini arttırmada görevli olduğu belirtilmektedir (Jung ve Lee, 2000; Uruç, 2006).

PHB'nin biyosentezi, üç değişik enzim tarafından katalizlenen reaksiyondan meydana gelmektedir. Birinci reaksiyon; iki Asetil-CoA molekülünün, β -ketoaçil CoA tiolaz tarafından Asetoasetil CoA'ya dönüştürülmesiyle oluşmaktadır. İkinci reaksiyon ise; Asetoasetil CoA'nın NADPH bağlı bir Asetoasetil CoA dehidrogenaz tarafından, R-3 Hidroksibütiril CoA'ya indirgenmesi reaksiyonudur. Üçüncü reaksiyon; R-3 Hidroksibütiril CoA monomerlerinin PHB sentaz tarafından, PHB'a polimerize olması aşamasıdır (Madison ve Huisman, 1999; Tamdoğan, 2008).



Şekil 1.2. PHB sentezi (Tamdoğan, 2008).

Çok sayıda mikroorganizmanın ara bileşik olarak PHB sentezinde asetatı bulundurduğu belirtilmektedir. *Rhodospirillum rubrum* ve *B. megaterium*'da PHB sentezinde ¹⁴ C-β-hidroksibütiril-CoA kullanıldığında asetatın önemli bir ara ürün olduğu bildirilmiştir (Anderson ve Dawes, 1990; Lee, 1996; Mercan, 2002).

1.6. PHB'nin Biyolojik Parçalanabilirliği ve Yenilenebilme Özelliği

PHB'nin en önemli özelliklerinden birisi de herhangi bir toksik ürün oluşturmadan ekosistemde tamamen parçalanmasıdır. Yine PHB'nin anaerobik şartlarda parçalanma ürünü metan, aerobik şartlardaki parçalanma ürünleri ise karbondioksit ve su olmaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Uruç, 2006). Doğada PHB'nin tam olarak parçalanması birkaç aydan, bir kaç yıla kadar devam eden bir süreçtir (Mercan, 2002; Uruç, 2006). Parçalanma sırasında biyolojik etkenler olarak bakteriler, mantarlar ve yüksek organizmalar; kimyasal etkenler olarak hidroliz ve oksidasyon; fiziksel etkenler olarak ise güneş ışığı, ıslanma ve mekanik aşınma görev almaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Uruç, 2006).

PHB, biyolojik olarak parçalanabilmesinden dolayı bir kez kullanılıp atılan yani tek kullanımlık eşyaların üretiminde önemli bir avantaja sahiptir. Bakteriler, funguslar ve algler gibi mikroorganizmalar PHB ve onun kopolimerlerini belirli şartlar altında tamamen karbondioksit ve enerjiye çevirerek parçalayabilmektedir (Lafferty ve ark., 1998; Tamdoğan, 2008). Bu parçalanma esnasında gerekli süre ve

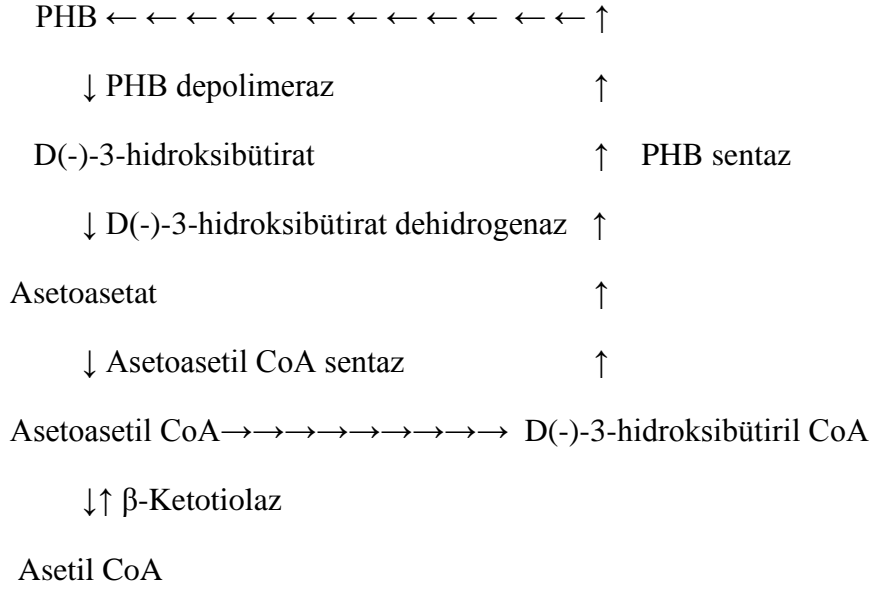
biyoparçalanma oranının; kalınlık, yüzey özellikleri, ısı ve çevredeki mikrobiyal nüfus gibi faktörlere göre değişebildiği belirtilmektedir (Lee, 1996; Lafferty ve ark., 1998; Tamdoğan, 2008).

Toprakta çok fazla ve çeşitte bulunan PHB'yi aerobik ya da anaerobik yolla parçalayan bakterilerin yanısıra funguslar da bu ayrıştırmada görev almaktadır. Bu organizmalar; toprak, kompostlar, aerobik ortamlar, anaerobik bataklıklar, göl-deniz suları ve hava gibi farklı ekosistemlerde yer aldıkları yine kolaylıkla izole edilebildikleri için biyoplastiklerin de bu ortamlarda ayrışabildiği saptanmıştır. Topraktaki bu ayrıştırma işleminde görev yapan gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler, streptomisetler ve küf mantarları gibi organizmaların olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmektedir (Jafari Barani, 2014).

1963 yılında; *Streptomyces*, *Pseudomonas* ve *Bacillus* cinslerine ait ilk PHB parçalayan mikroorganizmaları Chowdhury yaptığı çalışmada bulmuştur (Tokiwa ve Calabia, 2004; Türkoğlu, 2009). Sonraki yıllarda ise topraktan *Acidovorax facilis*, *Aspergillus fumigatus* ve *Pseudomonas lemoignei*; aktiflenmiş çamurdan *Alcaligenes faecalis* ve *P. fluorescens*; deniz suyundan *Comamonas testosteroni*; göl suyundan *P. stutzeri* ve anaerobik çamurdan *Hyobacter delafieldii* gibi çok sayıda bakteri ve fungusun izole edildiği bildirilmiştir (Ali, 2002; Türkoğlu, 2009).

Bakteriler tarafından karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilmesi için PHB depolimerize halde olmalıdır. Yine depolimerizasyon sonrasında meydana gelen 3-hidroksibütirik asiti çok sayıda organizmanın kullanabileceği belirtilmektedir (Şekil 1.3.) (Ediz ve Beyatlı, 2005).

PHB'nin depolimerizasyonunda görev yapan enzimler hücre içi veya hücre dışı olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Hücre içi enzimler *B. megaterium* ve *A. eutrophus*'da tespit edilmiştir (Lafferty ve ark., 1988; Yılmaz ve Beyatlı, 2003). PHB'in hücre içi parçalanması, PHA depolimeraz enziminin PHB'ı hidrolize etmesi ile başlarken (Braunegg ve ark., 1998; Tamdoğan, 2008) hücre dışı parçalanmasını depolimeraz katalize etmektedir. Enzimlerin aktiviteleri polimerin kompozisyonuna, amorf veya kristalin yapıda olmasına, kullanılan örneğin bölümlerine ve çevresel şartlara göre farklılık gösterebilmektedir (Madison ve Huisman, 1999; Tamdoğan, 2008).



Şekil 1.3. PHB'nin parçalanması ve sentezi (Ediz ve Beyatlı, 2005).

PHB'nin önemli bir özelliği de üretim kaynaklarının yenilenebilmesidir. PHB'nin fermentasyon ile sentezinde, şeker ve yağ asiti gibi tarım ürünleri karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmakta olup bu tarım ürünleri PHB'ye dönüştükten sonra da parçalanma ürünleri CO_2 ve H_2O 'dur. Bu bağlamda PHB'ler giderek azalan fosil yakıtlara alternatif olarak karşımıza çıkan yenilenebilir bileşiklerdir (Madison ve Huisman, 1999; Özdemir, 2012).

Biyoplastiklerin yeniden oluşum süreci, sentez-parçalanma-sentez olarak ifade edilmiştir. Doğada bu süreç kendiliğinden gerçekleştiği için çevre korunmasında dolayısıyla ekositemin dengesinin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Dave ve ark., 1996; Özdemir, 2012).

1.7. PHB'nin Kullanıldığı Alanlar

Endüstriyel olarak üretilen termobiyoplastiklerin sertlik durumlarının, polietilene oranla dört kat daha fazla olduğu (20 kg/m) saptanmıştır. PHB ve petrol kökenli polipropilenin fiziksel özellikleri kıyaslandığında; PHB'nin kristal ve özgül ağırlığının daha fazla olması, UV ışınlarına dirençlilik gibi özellikleri ile üretiminin önemli bir alternatif olduğu belirtilmektedir (Barham ve ark., 1984; Beyatlı, 1996; Bluhm ve ark., 1998; Mercan ve Beyatlı, 2004). PHB, doğaya bırakıldığında tamamen parçalandığı ve çevre kirliliğine neden olmadığı için PHB/V tipi polimerlerden ya da bunların başka polimerlerle karışımları kullanılmaya çalışılmıştır (Page, 1995; Lee, 1996; Mercan ve Beyatlı, 2004).

Geleneksel yöntemlerle üretilen plastiklerin yıllık büyüme oranı %5 iken biyoplastik üretiminin büyüme oranı %30 olup daha yüksektir. Araştırmalara göre üretim miktarı 2020'de 3.45 milyon tona ulaşabilecektir ve yıllık ortalama büyüme oranı 2013'den 2020 yılına kadar %6 olarak öngörülmektedir. Üretim ve tüketim miktarları kıyaslandığında ise üretimin talebi karşılamada yetersiz kaldığı saptanmıştır (Özdemir ve Erkmen, 2013; Dut, 2015).

1.7.1. Veterinerlikte Kullanıldığı Alanlar

Veterinerlik alanında, ilaçların kontrollü salınımını yapmak amacıyla PHB'den yararlanılmaktadır. PHB genellikle sığır rumeninde çok iyi parçalandığı için sığırlarda yapılan bir araştırmada, hayvanların kurtlanmasını önlemek amacıyla bir yıl süreyle antihelmitik ilaç içeren PHB kapsüllerinin kullanımı incelenmiştir. Hayvan dokularında toksik etkiye neden olmadığından, vücutta absorbe edilen protez aletlerin ve cerrahi dikişlerin yapımında PHB'nin kullanılması ile ilgili çok sayıda bilim insanı yoğun olarak çalışmaktadır (Mercan, 2002; Uruç, 2006).

1.7.2. Ziraatta Kullanıldığı Alanlar

Toprakta biyoparçalanmanın gerekli olduğu uygulamalarda PHB'nin oldukça uygun bir yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Bu özelliğinden dolayı; film şeklinde kaplamada alüminyum folyo gibi kullanılmasının yanı sıra tohum kapsüllendirilmesinde, fide taşımacılığında örnekleri korumak amacıyla, gübre veya

pestisitlerin kontrollü salınımlarında plastik kılıflar şeklinde kullanıldığı bildirilmektedir (Holmes, 1985; Türkoğlu, 2009).

Yine tarımsal uygulamalarda tohumların zararlılardan korunması amacıyla kullanıldığı da bilinmektedir. Bu amaçla kışın, buğdayın topraktaki zararlılardan korunması istendiğinde, uygun insektisit PHB granülünün içine alınarak sonbaharda buğdayla beraber toprağa ekilebilir. Topraktaki bakteriler PHB granülünde kolonize olur ve PHB bir hafta süren inkübasyon sonucunda insektisidi serbest bırakmaya başlar. Bitki büyümesi ve mikrobiyal büyüme insektisidin salınımlarıyla birlikte geç sonbahara kadar devam eder. Yaklaşan kışla birlikte toprağın sıcaklığı düşer, mikrobiyal büyüme oranı azalır ve daha az insektisit serbest bırakılmış olur. Böylelikle aktif kimyasallar kullanılmadan toprakta zararlıların aktivitesi tüm kış boyunca azalır. Daha sonra ilkbahar ve toprak zararlıları tekrar geldiğinde toprak sıcaklığının yükselmesi PHB kökenli pelletlerin daha fazla mikrobiyal parçalanmasını hızlı bir şekilde artırır. Sonuçta diğer zararlılar için de insektisit etkili olur ve bu ise “biyolojik geribesleme” mekanizması olarak da bilinmektedir (Holmes, 1985; Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

1.7.3. Tıpta Kullanıldığı Alanlar

Son yıllarda PHB sağlık alanında çok sayıda malzemenin üretilmesinde yoğun olarak kullanılmaktadır. PHB'den; kardiyovasküler dokularda atardamar büyütmede rejenerasyon malzemesi olarak, atriyal septal hasarların düzeltilmesinde, damar naklinde, kardiyovasküler stent ve kalp kapakçığı üretiminde yararlanılmaktadır. Yine PHA'lar implant ve tablet yapımında, mikropartikül taşınımında, sinirlerin onarımında, ilaç öncülü olarak, hayvan ve insan besin katkı maddesi olarak, medikal sektörde ise ortopedi alanında lokal kemik oluşumunun uyarılması amacıyla, ürolojide üreter onarımında, yaraların sargısında ve yumuşak doku onarımında kullanılmaktadır. Ayrıca diş hekimliğinde doku rejenerasyonunda kullanıldığı da bildirilmiştir (Williams ve ark., 1996; Ensari, 2012).

PHB'nin doğrudan kullanılması ile birlikte depolimerizasyon ürünü olan D(-)-3-hidroksibütirik asit monomeri de kullanılmaktadır. Bu tüm yüksek yapılı organizmalarda bir ara metabolit bileşiği olmasının yanısıra insan kanının normal bir

ögesi ve lipit metabolizmasının da ürünüdür (Holmes, 1985; Tamdoğan, 2008). Özellikle beyin ve kalp dokusu için de enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda diyabetiklerin kan serumunda anormal konsantrasyonlarda var olan keton yapılarından biri olarak da rol oynadığı da bildirilmiştir (Tamdoğan, 2008).

İleri teknolojiler kullanarak tıpta yeni ürünler elde edilmesi geleceğe yönelik uygulamalar arasındadır. Bunlardan birisi ise; PHB'nin uygun ölçülerde su geçirmez bir tüp formunda düzenlenen çok ince fibrillerden oluşan kan damarı ya da bir vasküler aşı şeklinde kullanılmasıdır. Üretilen bu aşı, vücut içinde gelişen yeni dokular için geçici bir yapı iskelesi olarak görev alabilir ve doğal dokular tarafından tamamen eski haline dönüştürülebilir. Böylelikle vücudun doğrudan tepkisini alan sentetik arterlerdeki blokaj ve pıhtı oluşum sorununda ortadan kalkacağı bildirilmektedir (Holmes, 1985; Mercan ve Beyatlı, 2004).

PHB ve kopolimerlerinin bir diğer önemli özelliği ise; polinükleotitler, polisakkaritler polipeptitler ve proteinler gibi piezoelektrik polimer olmaları ve poliviniliden florit polimeri gibi kesikli piezoelektrite göstermeleridir. Poliviniliden florit polimeri filmlerinin kemiği elektriksel stimülasyon aracılığı ile kuvvetlendirdiği ve kemiğin tamir edildiği bildirilmiştir. Buradan yola çıkılarak bir kemik kırığını sabitleyen levhalar PHB karışımından yapılır ise, uyarıtıyı alan kemik büyürek gelişir. Daha sonra kemik kırığındaki plaka biyolojik yolla parçalanabilmekte ve bulunduğu yerde vücut tarafından yavaşça emilimi sağlanmaktadır. Tüm bu süreç sonunda kemik kaynamakta plakayı uzaklaştırmak amacıyla başka bir işlem yapmaya ihtiyaç duyulmamaktadır (Holmes, 1985; Aydoğmuş, 2011).

1.7.4. Kimyasalların Eldesinde Kullanılması

PHB'lardan çeşitli kimyasalların elde edilmesinde de yararlanılmaktadır. Antibiyotikler, aromatikler, vitaminler ve feromonlar gibi kimyasalların üretiminde kiral yapı blokları olarak, kiral bir merkezi ve iki fonksiyonel grubu (-OH, -COOH) bulunan (R)-(-)-hidroksi asitler kullanılmaktadır (Lee ve ark., 1994; Dinigüzel, 2007).

Yine organik kimya alanında asimetrik sentez yöntemi büyük önem arz etmektedir. Enantiomerik saf bileşiklerden olan D-(-)-3 -hidroksibütirik asit de bu gruba ait olduğu için saf maddelerin yüksek miktarlarda elde edilmesinde PHB'nin kullanılması oldukça önemlidir. D-(-)-3 konfigürasyonuna sahip olan optik izomerler, buldukları ortamda kiral merkezleriyle daha kuvvetli bağlandıkları için kromatografi çalışmalarında kullanılabilir. Yine bunların yağ/su emülsiyonları amacıyla emülsifikasyon ajanı olarak kullanımı da uygundur (Holmes, 1985; Tamdoğan, 2008).

1.7.5. Özel Uygulamalarda Kullanımı

PHB, çok aktif bir bileşik olmakla birlikte onu oluşturan her bir hidroksibütirat ve hidroksivalerat monomer ünitesi kiral bir karbon atomuna sahip olup D(-) konfigürasyonundadır. Polimerlerin hidroliz olmasıyla elde edilen çok sayıda ilaç, yalnız bir kiral formda aktiftir ve bu materyal böyle bileşiklerin sentezinde çimento görevi yapar (Holmes, 1985; Mercan, 2002).

Paketleme filmleri ve bir kez kullanılıp atılan eşyaların üretiminde de PHB ve kopolimerleri kullanılmaktadır. PHB filmleri, PET (polyethylene terephthalate) kadar dayanıklı değildir, ancak polipropilen filmleri kadar güçlüdür. Cam ilaveli PHB kalıpları ise naylona göre dayanıklı ve daha serttir (Holmes, 1985; Tamdoğan, 2008).

PHB; kopolimerleri kadar iyi bir şekilde preslenebilir, biçimlendirilebilir, lif haline dönüştürülebilir, filmleri yapılabilir ve klorine edilmiş polietilen gibi başka sentetik polimerlerle heteropolimer üretiminde kullanılabilir (Lafferty ve ark., 1988; Tamdoğan, 2008).

Son yıllarda yapılan araştırmalar sonucunda tekstil sanayinde de, PHB'dan yararlanılabileceği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada; *A. eutrophus*'dan izole edilen genlerin pamuk bitkisine (*Gossypium hirsutum* L.Cv DP50) aktarılması ile transgenik pamuğun lif lümenleri içinde PHB üretimi gerçekleştirilmiştir. PHB granülleri ile yüksek ısı kapasitesi ve düşük termal geçirgenliği olan transgenik

liflerin tekstil sanayisinde kullanımının avantaj sağladığı bildirilmektedir (Chowdhury ve John, 1998; Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Lateks benzeri kağıt örtüler, günlük krem öncül maddeler ve gıdalarda kullanılan unun dağılımını sağlayan ajanların üretiminde de PHB'den yararlanılmaktadır (Madison ve Huisman, 1999; Weber, 2000; Lootz ve ark., 2001; Dinigüzel, 2007).

Ayrıca çeşitli poşet, torba, jilet, çatal, bıçak, tabak, mutfak kapları, tek kullanımlık çocuk bezi, şampuan ve meşrubat şişeleri, karton süt kutularının iç yüzey kaplamalarının yapımında da PHB kullanılmaktadır (Hajikhani, 2003; Türkoğlu, 2009).

Yine çok sayıda alanda özellikle; taze balık, et ve et ürünleri, peynir, kurutulmuş ürünler, orta nemli gıdalar, yağlı tohumlar, kurutulmuş pastacılık ürünleri, cipsler, şekerlemeler gibi gıdalarda nem ve oksijene karşı korumak ya da parlaklık sağlamak, aroma kaybını önlemek için PHB'nin kullanıldığı bildirilmektedir (Lee, 1996; Baysak, 2008).

1.8. PHB'nin Üretilmesinde Kullanılan Substratlar

PHB ve çeşitli PHA'ların üretimi amacıyla genellikle karbon kaynağı olarak; glukoz, sükroz ve yağ asitleri ile alkanlar ve kloroalkanoik asitler gibi substratlar kullanılmaktadır. Yine bütirik ve pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit, L-Laktat gibi karbon kaynaklarının kullanımı da araştırılmıştır. (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Baysak, 2008).

PHB'nin ticari üretimini ve pazarlanmasını, üretimde gerekli olan karbon substratının özellikle de kullanılan şekerin fiyatı sınırlandırmaktadır. Üretimin her bir tonu için 3 ton glukoz gerektiği belirtilmektedir (Page, 1992a; Ediz ve Beyatlı, 2005). Maliyeti azaltmak için rekombinant türler ile çalışılmakla birlikte değişik ve ucuz karbon kaynakları kullanılarak yüksek miktarda PHB üreten suşlar araştırılmaktadır (Witholt, B., Kessler, 1999; Ediz ve Beyatlı, 2005). Ayrıca melas, ksiloz, arpa ve soya atık suları ile peynir altı suyu kullanılarak düşük maliyetli biyoplastik üretimi de amaçlanmaktadır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003; Uruç, 2006).

Page (1992b), *A. vinelandii* UWD suşunun, şeker pancarı melasında üretildiğinde, glukozun üçte biri maliyete mal olduğunu ve ortama valerat eklenince PHV kopolimerinin meydana geldiğini tespit etmiş ve melastan polimer üretimini arttırmak amacıyla ortama azot bileşenlerinin de eklenebileceğini bildirmiştir.

P. pseudoflava ile yapılan bir araştırmada ise; karbon kaynağı olarak glukoz ve ksiloz kullanılırsa PHB veriminin %22, arabinoz kullanılırsa %17 olabileceğini belirlenmiştir (Bertrand ve ark.. 1990).

Yine farklı bir substrat kullanılarak yapılan başka bir çalışma da ise; rekombinant *E. coli*'den peynir altı suyu kullanarak yüksek PHB verimi elde edildiğini Ahn ve arkadaşları (2000) tespit etmişlerdir.

Aynı substratla yapılan diğer bir araştırmada; Kim (2000), rekombinant *E. coli* türünü peynir altı suyunda geliştirerek %20 ve *Azotobacter chroococcum* türünü ise nişasta içeren besi ortamında geliştirip oksijeni sınırlandırılmış şartlarda %46 PHB verimi sağladığını bildirmiştir.

1.9. PHB Üretiminde Melasın Kullanımı

Melas, kristalize şeker elde edildikten sonra ortaya çıkan şeker imali ve rafinesinin son ürünüdür. Bitki çeşitine, hasata, toprak ve mevsim koşullarına, şeker rafinasyon işlemlerine ve depolama şartlarına göre melasın bileşimi farklılık gösterebilmektedir. Dünyada bulunan melasın %75'i şeker kamışından, geri kalanının büyük bir kısmı ise şeker pancarından üretilmekte olup 100 ton şeker kamışından 3-4 tonü, 100 ton şeker pancarından ise 4-6 ton melas ortaya çıkmaktadır. Melasın esas içeriğini ise sükroz disakkariti oluşturmaktadır (Yılmaz, 2003; Ediz ve Beyatlı, 2005).

Azotlu maddeler (aminoasitler, amidler vb.), organik asitler, nişasta ve pentozanlar gibi karbohidratlar melasta şeker dışında bulunan organik maddelerdir. Tüm bunlara ilaveten; mumsu maddeler, steroller ve pigmentler az da olsa bulunmaktadır. Şeker pancarı melasındaki belirgin azotlu maddeler betain ile glutamik asittir ve bunlar melasın kendine özgün koku ve lezzetinin ortaya çıkmasında rol oynarlar. Mikroorganizmalar melasta bulunan azotun sadece % 40-

60'ını kullanılabildikleri için amonyum tuzları, sıvı amonyak ya da üre besiyerine eklenerek azot zenginleştirilmesi yapılabilmektedir (Katırcıoğlu ve Aksöz, 1996; Göksungur, 1998; Mercan, 2002).

Melasın yapısında; biyotin, inositol, riboflavin, tiyamin, pantotenik asit, nikotinik asit, pridoksin ve kolin gibi B grubu vitaminler bulunmakla birlikte pancar melasında ise çoğunlukla potasyum miktarı fazladır. Pancar melasının bileşiminin; kuru madde-%78-85; Toplam Şeker-%48-58; Sakaroz-%51; Glukoz--; Fruktoz--; Rafinoz-%>1; Toplam Azot-%02.8; α -Amino azot-%0.36; Fosfor, P₂O₅-%0.02-0.07; Kalsiyum, CaO- %0.15-0.7; Magnezyum, MgO- %0.01-0.1; Potasyum, K₂O- %2.2-5.0; Çinko, Zn-30-50 μ g/g; Toplam Karbon, C-%2834; Toplam inorganik madde-%4-11; Kükürt, SO₃ -%0.3-0.4; Biyotin-0.01-0.13 μ g/g; Kalsiyum pantotenat-40-100 μ g/g; İnositol-5000-8000 μ g/g; Tiamin-1-4 μ g/g; Pridoksin-2.3-5.6 μ g/g; Riboflavin-0-0.75 μ g/g; Nikotinamid-37-51 μ g/g; Folik asit-0.21 μ g/g'den oluştuğu bildirilmektedir (Ediz, 2004; Türkoğlu, 2009).

Melas, fazla miktarda fermente edilebilir şeker içerdiği için çok sayıda endüstriyel ürünün fermantasyon ile üretilmesinde hammadde kaynağıdır (Cleasby, 1963; Srikanth ve ark., 2014; Ergene, 2015). Bu özelliğinden dolayı; pigment, enzim, aminoasit, etanol, bütanol, biyopolimer, biyohidrojen, polihidroksialkonatlar ve organik asit üretiminde düşük fiyatlı substrat olarak da yararlanılmaktadır (Hsu ve ark., 2014; Nakata ve ark., 2014; Srikanth ve ark., 2014; Shen ve ark., 2015; Ergene, 2015). Ayrıca kimya endüstrisinde; yakıt, lastik, baskı, gıda ve içecek üretiminde farklı amaçlarla kullanıldığı da belirtilmektedir (Yılmaz, 2006; Ergene, 2015).

Liu ve ark. (1998), rekombinant *E. coli*'nin tek karbon kaynağı olarak yüksek melas konsantrasyonlarında PHB üretiminin arttığını tespit etmişlerdir. Bu amaçla yapılan çalışmada; 35 saat sonra bakteri kuru ağırlığının %80'inin PHB olduğunu bildirmişler ve glukoz yerine melas kullanımının daha ucuz ve ekonomik olacağını ortaya koymuşlardır.

B. megaterium'da PHB üretimini araştıran Gouda ve ark. (2001); şeker kamışı melası ve mısır suyunu karbon ve azot kaynağı olarak kullanarak en yüksek PHB miktarını melas ve glukoz içeren besiyerinden elde etmişlerdir. Hücre gelişiminin en

fazla olduğu melas yüzdesi %3 olarak belirlenirken en yüksek PHB veriminin %46.2'lik oran ile %2'lik melas içeren besiyerinden elde edildiğini saptamışlardır.

1.10. Sideroforların Genel Özellikleri

Demir dünyada en çok bulunan ikinci metaldir. Fe (II) ve Fe (III) olarak iki iyonize şekilde bulunabildiği için genellikle oksidasyon-redüksiyon enzimlerinin kofaktörü olarak görev yapmaktadır (Byers ve Arceneaux, 1998; Howard, 1999; Seyer, 2009; Sezen, 2017). Fotosentez, solunum, oksijen salınımı, TCA (trikarboksilik asit) döngüsü, nitrat sentezi, gen regülasyonu, azot fiksasyonu, ATP ve DNA sentezi gibi metabolik olaylarda ve diğ er biyolojik reaksiyonlarda çok sayıda mikroorganizma (bazı laktobasiller hariç) için önemli bir elementtir (Neilands, 1995; Ratledge ve Dover, 2000; Skaar, 2010; Hammer ve Skaar, 2011; Erdem, 2013; Sezen, 2017).

Ökaryotik organizmalar demiri çok zor ayrıştırdıkları halde bakteriler çeşitli yöntemler geliştirerek kendilerine gerekli olan demiri kullanabilmektedirler (Erdem, 2013). Bu yöntemlerden en iyi araştırılmış olanı sideroforlardır. Molekül ağırlıkları 1000 Da'dan az olan sideroforlar, demir bağlamaya yüksek eğilim gösterirler. Çok sayıda enterik bakteri (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Enterobacter* spp.) tarafından;

- Enterobaktin (fenolat) ve
- Aerobaktin (hidroksamat)

olmak üzere iki tip siderefor üretilmektedir (Tekin, 1998; Yalçın, 2010). En yaygın grup fenolat tipi sideroforlardır ve bunlar arasında en çok bilinen türü ise enterobaktindir. Ancak bu sideroforun bakteriyel virülanstaki görevi kesin olarak tespit edilememiştir (Nassif ve Sansonetti, 1986; Podschun ve Ulman, 1998; Yalçın, 2010). Aerobaktin üretimi ise bakteriyel virülansta önem taşımaktadır (Podschun ve Ulman, 1998; Yalçın, 2010).

Winkelman ve Dreschel (1997) bakteriyal sidereforları;

- Katekolatlar,
- Hidroksamatlar,
- Peptid sidereforları,
- Mikobaktin ve
- Sitrat hidroksamatlar

şeklinde 5 tipte gruplandırmıştır (Sezen, 2017).

Kimyasal olarak ise siderofor; demirin yeterli olmadığı ortamda ökaryotik, prokaryotik ve yüksek organizmalarca salınan düşük molekül ağırlıklı metal şelat bileşikler olarak tanımlanmaktadır (Miethke ve Marahiel, 2007; Güney, 2014; Sezen, 2017). Önceleri siderofor; siderokrom, sideramin, sideromisin ve ionofor olarak ifade edilmiş olup daha sonraları bu terimler yerine Yunanca sideros: demir ve phores: taşıyıcı anlamındaki siderofor terimi kullanılmıştır (Thomashow ve Weller, 1995; Güney, 2014).

Sideroforlar çok farklı uygulama alanında özellikle de biyoteknolojide önemli bir yere sahiptir Sağlık, tarım, kozmetik gibi alanlarda, özellikle çeşitli kanserler ile Malarianın tedavisinde demir taşıyıcısı ve antibiyotik olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Bergeron ve Brittenham, 1993; Winkelman, 2002; Diaz de Villegas, 2007; Miethke ve Marahiel, 2007; Erdem, 2013).

Sideroforlar önemli enzimlerin görevlerini yapmasını sağlayan metal gruplarının elde edilmesinde kullanılırlar. Canlıların metal kıtlığı yaşadığı şartlarda metalleri kullanılabilir duruma getirirler ve hücrel homeostazisin sağlanmasında görev yaparak bakterileri fazla metalin toksik etkisinden de korurlar. Aerobik şartlarda yaşayan mikroorganizmalar; oksijenin indirgenerek ATP elde edilmesi, DNA'daki ribotid öncülerinin indirgenmesi, "heme" formasyonu ile farklı reaksiyonların gerçekleşmesi için demir ve diğer metallere gereksinim duymaktadır. Sideroforlar da bu metallerin hücreye kazandırılmasında rol oynamaktadır (Aydın, 2014).

Demir iyonlarına bağlanmadan sideroforlar önce kararlı bir formda bulunmaktadır. Demir iyonları (Fe^{+3}) ile karşılaşan oktahedral (düzgün sekizyüzlü)

yapıya sahip bir siderofor, demir kompleksi oluşturup ona güçlü bir şekilde bağlanır ve mikroorganizmalar, Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye dönüştürerek sideroforlar sayesinde demirin alınımını gerçekleştirirler. Sideroforların hücre içine yeniden hücre dışından alınabilmesi amacıyla hücre zarında özel reseptörler vardır. Bunlar tarafından tanınan sideroforlar reseptörlere bağlanarak hücre zarının içinden farklı mekanizmalar ile hücre içine taşınmaktadırlar (Martinez ve ark., 2003; Raymond ve Denz, 2004; Miethke ve Marahiel, 2007; Güney, 2014; Sezen, 2017). Mikroorganizmalarda demir alınımında dış zar reseptörü, periplazmik siderofor bağlayıcı protein (PBP) ve iç membranda ATP'ye bağlı kaset (ABC) taşıyıcıların siderofor taşıma sisteminde görev aldığı saptanmıştır (Ratul ve ark., 2012; Erdem, 2013).

Mikroorganizmaların değişik kimyasal özellikler gösteren yüzlerce siderofor ürettiği bildirilmektedir (Ratledge ve Dover, 2000; Güney, 2014). Günümüze kadar yaklaşık 500 farklı sideroforun çeşitli mikroorganizmalardan elde edildiği belirtilmektedir (Boukhalfa ve Crumbliss, 2002; Güney, 2014).

Siderofor üreten rizobakteriler çeşitli düzeylerde bitki sağlığını ve demir beslenmesini geliştirirler. Antibiyotik moleküllerini serbest bırakarak ve patojenler için var olan demirin sınırlandırılmasıyla patojenlerin büyümesine engel olup diğer mikroorganizmaların büyümesini kısıtlatırlar (Jha ve ark., 2015; Sezen, 2017).

Toprak bakterisi olan *Rhizobium* türlerinin konakçısı olan bitki ile simbiyotik bir ilişkisi vardır. Bu ilişki; nodül oluşumunda, leghemoglobin sentezinde, nitrogenaz kompleksi, ferrodoksin ve simbiyozis sırasında nitrogenaz sisteminin enerjisini sağlayan diğer elektron transport proteinlerinde, demire ihtiyaç duyulduğundan dolayı demire bağlıdır. Konakçı bitkinin dokusu içinde bulunan *Rhizobium* türlerinin hayat döngüsünün bir bölümünde invazyon, büyüme ve farklılaşmaya ihtiyaç olmakta ve bu aşamada ise bitki mikrop etkileşimi için önemli olan demirin elde edilmesinde sideroforün rol oynamaktadır (O'Hara ve ark., 1988; Gill ve ark., 1991; Guerinot 1991; Datta ve Chakrabarty, 2014).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. PHB ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Tüm dünyada PHB üretimiyle ilgili çalışmalar özellikle de son yıllarda hızlı bir ivme kazanmış olup bu çalışmada yoğun olarak mikroorganizmalar hatta özellikle de bakteriler tercih edilmektedir.

Azospirillum brasiliense Cd süşunun; eksponansiyel fazın son safhasında, yüksek C/N oranında ve oksijenin sınırlandırıldığında %5 olan PHB veriminin, %40'a yükseldiğini Tal ve Okon (1985) tespit etmişlerdir.

Lillo ve Rodriguez-Valera (1990) yaptıkları çalışmada; *Halobacter mediterranei*'nin, karbon kaynağı olarak glukoz ve nişasta kullanıldığında ve fosfatı sınırlandırılmış koşullarda %60 PHB verimi elde etmişlerdir.

Fotosentetik bakteriler olan *Rhodospirillum* ve *Rhodobacter* cinsleri üzerinde Brandl ve ark., (1991) tarafından yapılan çalışmada; bunların n-alkanoik asitlerden polimer depo ettiği ve nitrojenin sınırlandırıldığında % PHB veriminin hücre kuru ağırlığının %60- %70'i kadar olabildiği saptanmıştır.

Zenginleştirilmiş besiyerinde çoğaltılan *Bacillus* cinsi bakterilerin hücre kuru ağırlığına göre %5- %20 arasında PHB biriktirebildiği Chen ve ark., (1991) tarafından yapılan çalışmada belirlenmiştir.

Page (1992a) yaptığı bir çalışmada; *A. vinelandii* UWD süşunun glukoz, fruktoz, sakkaroz, maltoz karbon kaynakları ile şeker kamışı melası, şeker pancarı melası, mısır şurubu, malt ekstraktı gibi karbon kaynaklarında yüksek PHB verimi elde etmiştir.

E. coli'de PHB üretimi için, *A. eutrophus* PHB sentez genleri taşıyan plazmidleri kullanan Lee ve ark., (1994) plazmid stabilitesinin yüksek olduğunu ve PHB veriminin %80.1'e ulaştığını belirtmişlerdir.

PHB içeriğinin nitrogenaz enzimi aktivitesi ile ters, hidrogenaz enzimi aktivitesi ile doğru orantılı olduğunu ortaya koyan Bonartseva ve ark., (1994) *R.*

leguminosarum, *R. trifoli*, *R. galega*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* türlerinin PHB üretimlerinin suşa ve kültürel ortama bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Sükroz içeren besiyerinde, farklı azot kaynakları kullanarak yaptıkları çalışmada en yüksek PHB verimini KNO₃'lü besiyerinde %65 ile *R. phaseoli*'den elde etmişlerdir.

P. extorquens'te PHB üretimi incelenmiş ve üç farklı içeriğe sahip besiyerinde yeast ekstrakt içeren temel ortam; %1 gliserinli iken %22, %1.5 glukozlu iken %15 ve %0.5 metanollü iken ise %27 oranında PHB üretildiği Karaboz ve Umay (1994) tarafından bildirilmiştir. Ayrıca 0.81 µg/ml hücre kuru ağırlığından %1 gliserinde 0.18 µg/ml, 0.93 µg/ml hücre kuru ağırlığından %1.5'lük glukozda 0.14 µg/ml ve 1.18 µg/ml hücre kuru ağırlığından %0.5'lik metanolde 0.32 µg/ml PHB elde edildiği de bildirilmiştir.

R. meliloti'de; ortamda karbon kaynağı olmasına rağmen gelişme için gerekli nitrojen gibi elementler sınırlı tutulduğunda ve fruktozlu ortamda üretildiğinde büyük miktarda PHB'nin depo edildiği Jan ve ark., (1996) tarafından tespit edilmiştir.

Gomez ve ark., (1996) toprak bulunan Gram negatif bakterilerin sükroz, fruktoz ve glukoz ile propiyonik asitten PHB üretimini araştırmışlar ve %50-80 arasında verim elde etmişlerdir.

Farklı karbon ve nitrojen kaynaklarının *R. meliloti*'deki PHB üretimine etkilerini araştıran Tavernier ve ark., (1997) glukoz ve fruktoz içeren besi ortamında bakterilerin farklı geliştiklerini ve yeast ekstrakt içeren fruktozlu ortamda hücre kuru ağırlığının %85'nin PHB olduğunu tespit etmişlerdir.

A. beyerinckii 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 üretebileceği Bormann ve ark., (1998) yaptıkları çalışmada tespit etmişlerdir. Araştırmacılar PHB'nin büyüme şartlarından etkilendiğini ve kazein-pepton içeren besiyerinde büyümenin durgun fazında en yüksek PHB üretiminin gerçekleştiğini, oksijeni sınırlandırılmış koşullarda PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir.

10 adet *B. sphaericus* suşunun PHB üretimlerini inceleyen Mercan ve Beyatlı (2001); *B. sphaericus* suşlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretim miktarlarının %5- %25.88 arasında olduğunu bildirmişlerdir. %2 et ekstraktı konsantrasyonunda *B. sphaericus* ATCC 7055, ATCC 12300 ve 34-2 suşlarının hücre kuru ağırlıklarının sırasıyla %32.50, %31.64, %30.63'ünün PHB olduğunu tespit etmişlerdir.

Lebuzek ve Radecka (2001); *B. cereus* UW85 suşunu nitrojeni sınırlandırılmış koşullarda geliştirdiklerinde PHB veriminin %9 olduğunu gözlemlemişlerdir.

B. megaterium'da PHB üretimine farklı karbon kaynaklarının etkisini araştıran Mona ve ark., (2001); glukoz kullanıldığında PHB üretiminin en yüksek olduğunu saptamışlardır. En iyi gelişme %3 melasta olurken PHB'nin maksimum verimini (%46.2), %2 melas ortamında elde etmişlerdir.

B. sphaericus, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *Bacillus* spp. bakterilerinin PHB üretim yeteneklerini araştıran Saadettin ve ark., (2001); 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, *B. licheniformis* suşunda %46.66 olarak bulmuşlardır.

Substrat olarak pancar melası kullanılan ortamlarda, batık kültür fermantasyonu ile *P. extorquens* DSM 1337 ve *A. chroococcum* (TEM)'in PHB üretimlerini araştıran Ateş ve Ekmekçi (2001); optimum koşullarda sakkarozlu ve melaslı mineral ortamda PHB üretim verimini de karşılaştırmışlardır. PHB üretim verimi pancar melaslı mineral ortamda *P. extorquens* DSM 1337'de %22.98 ve *A. chroococcum* (TEM)'de %12.10 olarak bulmuşlar ve en iyi PHB üretiminin sakkarozlu mineral ortamdan elde edildiğini bildirmişlerdir.

Mercan (2002) doktora çalışmasında; *R. meliloti*, *B. japonicum*, *R. phaseoli*, *R. legüminosarum*, *R. viciae* ve *Rhizobium* spp. türlerine ait 31 adet suş kullanarak bakterilerin PHB üretimlerinin hücre kuru ağırlıklarına göre %5.37- %57.09 arasında olduğunu bildirmiştir. Maksimum PHB üreten *R. viciae* F111 (%57.09), *R. meliloti* Y11 (%39.25) ve *B. japonicum* S Irat Fab (%34.43) suşlarının farklı karbon ve azot

kaynaklarında PHB üretimlerini incelemiştir. *R. meliloti* Y11 (%87.75) ve *B. japonicum* S Irat Fab (%34.31) suşlarından glukoz besi ortamında maksimum PHB sağlanırken, *R. viciae* F111 suşundan mannitol içeren besiyerinde yüksek oranda (%41.22) PHB elde edilmiştir. Suşların azot kaynaklarında (F111 dışında) PHB verimlerinin yüksek olmadığı saptanmıştır. Azot kaynağı olarak proteaz pepton içeren besi ortamında *R. meliloti* Y11 suşu maksimum %26.23 ve *B. japonicum* S Irat Fab suşu %26.78 PHB üretirken *R. viciae* F111 suşunun asparajin azot kaynağında maksimum %48.13 PHB ürettiğini tespit etmiştir.

27 adet *Streptomyces* izolatının %80'inin PHB'yi %0.3-7.6 oranında sentezlediği Uğur ve ark., (2002) tarafından bildirilmiştir.

Aslım ve ark., (2002) Ankara topraklarından izole ettikleri *Bacillus* cinsi bakterilerin PHB üretimlerini incelemiştir. Aldıkları altı farklı toprak örneğinden 40 adet bakteri izole etmişler, 27 suş ile çalışmışlar ve hepsinde PHB saptamışlardır. En yüksek PHB veriminin *B. megaterium* Y6 (%43.13)'da iken, hücre kuru ağırlığına göre en düşük PHB veriminin *B. subtilis* K1 (%6.53)'de olduğunu belirtmişlerdir

Melas besi ortamında iki adet *R. japonicum*, bir adet *B. japonicum* ile iki adet *Rhizobium* spp. suşunun PHB üretimleri, Ali (2002) tarafından araştırılmış ve bakterilerin PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre %2.2- %51.1 arasında olduğu bulunmuştur. Yüksek PHB verimine sahip *Rhizobium* spp. 3172 suşu ile orta derece PHB verimi gösteren *Rhizobium* spp. MR90 suşunun asparajin, glisin, KNO₃ ve proteaz peptonda PHB üretim yetenekleri araştırılmıştır. *Rhizobium* spp. MR90 suşunun karbon kaynağı olarak glukoz kullanıldığında PHB veriminin en yüksek (%10.7) ve azot kaynağı olarak asparajin kullanıldığında en yüksek (%41.1) olduğu, *Rhizobium* spp. 3172 suşunun karbon kaynağı olan sukrozda en yüksek (%23.8) ve azot kaynağı olarak proteaz peptonda (%21.6) olduğunun saptandığı bildirilmiştir.

Mercan ve ark., (2002) bir adet *R. japonicum*, altı adet *R. cicer*, sekiz adet *Rhizobium* spp. ve *B. japonicum* USDA C110 suşunda PHB üretimini araştırmışlardır. Suşların PHB içeriklerinin 0.01-0.5 g/l ve PHB verimlerinin hücre kuru ağırlıklarına göre %1.36- %40.0 arasında değiştiğini saptamışlardır. 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 incelemişlerdir. Yine suşların Yeast Mannitol Broth (YMB) besiyerinde düşük, L-sistein ve Glisin içeren besiyerinde yüksek miktarda PHB ürettiğini bildirmişlerdir. L-sistein ve Glisin ortamında *Rhizobium* spp. 640 suşunun PHB verimi sırasıyla %13.40 ve %56.67, *Rhizobium* spp. 2426 suşunun sırasıyla %70.0 ve %61.43 olduğunu da belirtmişlerdir.

Lactobacillus, *Lactococcus* ve *Streptococcus* cinslerine dahil olan bazı laktik asit bakterilerinin PHB üretimlerini araştıran Yüksekdağ ve ark., (2003) hücre kuru ağırlığına göre PHB veriminin *Lactobacillus* türlerinde %0.52- %25.55, *Lactococcus* türlerinde %0.61- %14.81 ve *Streptococcus* türlerinde %1.20- %13.69 olduğunu saptamışlar ve *Streptococcus*'un bir, *Lactococcus*'un altı suşunun PHB üretmediğini bildirmişlerdir.

Nutrient Broth besiyerinde yüksek oranda PHB üreten *B. subtilis* F1 ve *B. megaterium* P1 suşlarını çeşitli melas konsantrasyonlarında ve çeşitli inkübasyon sürelerinde inceleyen Ediz (2004) PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre *B. subtilis* F1 suşunda %15.80- %84.71 ve *B. megaterium* P1 suşunda %12.00- %85.00 arasında değiştiğini saptamıştır. *B. subtilis* F1 suşunda %0.5 melas konsantrasyonunda inkübasyonun 36. saatinde en yüksek PHB verimi (%84.71) ve *B. megaterium* P1 suşunda %2 melas konsantrasyonunda inkübasyonun 24. saatinde en yüksek PHB verimi (%85.00) elde ettiğini belirtmiştir.

R. phaseoli CIAT 899 ve *R. leguminosarum* Le 735 suşlarının YMB besiyerinde PHB üretimlerini araştıran Uruç (2006) PHB üretimlerinin kuru ağırlıklarına göre *R. phaseoli* suşlarında %17.23- %26.04 ve *R. leguminosarum* suşlarında %8.69- %18.91 arasında olduğunu bildirmiştir.

Toprak, çamur, su ve tuz örneklerinden halofilik bakteriler izole eden Dinigüzel (2007) PHB üretenleri Sudan Black B boyası ile belirlediği bakterilerin PHB miktarlarını 0.123-0.519 g/l ve PHB verim yüzdelerini hücre kuru ağırlıklarının %2.03- %29.48'i arasında bulmuştur. AG 27 kodlu izolat %29.48 verimle en yüksek, TG 24 kodlu izolat %2.03 verimle en az PHB ürettiğini tespit etmiştir. AG 27

izolatının PHB veriminin; besiyeri %1 oranında galaktoz içerdiğinde %43.47, %2 oranında galaktoz içerdiğinde %42.09, %5 oranında galaktoz içerdiğinde %42.69, %0.3 oranında yeast ekstrakt içerdiğinde %52.20'ye yükseldiğini, %0.00375 oranında KH₂PO₄ içerdiğinde ise %27.14'e düştüğünü bildirmiştir. Ayrıca besiyerine %1 oranında galaktoz ve %0.3 oranında yeast ekstrakt birlikte eklendiğinde AG 27 izolatının PHB veriminin %59.19'a yükseldiğini saptamıştır.

Tekin (2008) tuzla topraklarından izole ettiği 14 izolatın fenotipik ve genotipik analizlerini yaparak PHB üreten izolatları belirlemek için Nile Blue A boyası kullanmış ve en iyi PHB üreticisi olarak 10 no'lu izolatu seçmiştir. PHB üretici kontrol grubu olarak *Haloferax mediterranei* ATCC 33500 tip straini kullanmıştır. Fosfat sınırlaması olan %1 asetat, %2 glikoz içeren ortamda 10 no'lu izolatın hücre kuru ağırlığının %6.53'ü, *H. mediterranei* ATCC 33500'ün %40.3'ü; fosfat sınırlaması olan %2 glikozlu ortamda 10 no'lu izolatın hücre kuru ağırlığının %5.34'ü, *H. mediterranei* ATCC 33500'ün %38.59'u; %1 glikoz ve %0.1 yeast ekstrakt içeren temel ortamda 10 no'lu izolatın toplam hücre kuru ağırlığının %4.48'i, *H. mediterranei* ATCC 33500'ün %54.26'si oranında PHB ürettiğini bildirmiştir.

R. phaseoli bakterilerinin YMB besiyerinde PHB üretimlerini araştıran Baysak (2008) farklı şeker konsantrasyonları, çalkalama hızları ve inkübasyon sürelerinin PHB üretimine etkisini incelemiştir. *R. phaseoli* suşlarının farklı şeker konsantrasyonlarında PHB üretimlerini kuru ağırlıklarına göre %16.08- %26.84, farklı çalkalama hızlarında %16.88- %26.38 ve farklı inkübasyon sürelerinde %2.5- %31.16 arasında bulunduğunu belirtmiştir.

B. subtilis ATCC 6633 suşunun PHB verimini araştıran Tamdoğan (2008) inkübasyon süresi, sıcaklık, pH, farklı karbon kaynakları, farklı azot kaynakları ve (C/N) oranının PHB sentezine etkisini incelemiştir. En yüksek PHB birikimini, 24 saat inkübasyonda (10.4981 µg/ml), pH 7'de (10.4981 µg/ml), karbon kaynağı olarak D-mannitol içeren besiyerinde (23.6623 µg/ml), azot kaynağı olarak L-glisin içeren besiyerinde (14.6217 µg/ml), karbon/azot oranı 2.5 olan besiyerinde (3.2481 µg/ml) ve 30 °C sıcaklıkta (10.4981 µg/ml) tespit etmiştir.

Melasın farklı konsantrasyonlarında spektrofotometrik metot yardımıyla *Rhizobium* suşlarının PHB üretimlerini inceleyen Türkoğlu (2009) kontrol grubu olarak Ankara Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü'nden *R. phaseoli* CIAT 899 suşunu temin etmiştir. *R. phaseoli* CIAT 899 suşunda %0.5'lik melas konsantrasyonunda, 96 saatlik inkübasyonda hücre kuru ağırlıklarına göre en yüksek PHB verimi (%29.43) elde edilmiştir. Diğer *Rhizobium* suşlarının PHB verimlerinin farklı melas konsantrasyonlarında %5.90- %60.23 arasında değiştiği saptanmıştır. Farklı melas konsantrasyonlarındaki en yüksek PHB verimi %1.5 melas konsantrasyonunda 15F kodlu izolattan (%60.23) sağladığını bildirmiştir.

PZR yöntemi ile çoğaltılan *A. latus* DSM 1124 ırkında yer alan PHB biyosentez genlerinin pSP 72, pUC 19 ve pQE 40 plazmitlerine aktarımı Ensari (2012) tarafından sağlanmıştır. Rekombinant plazmitler 10 farklı *E. coli* ırkına aktararak PHB üretimi için en uygun olan ırk ve plazmit olarak pQEAL1124 plazmitini taşıyan *E. coli* Rosetta ırkı belirlenerek PHB üretiminin artırılması için besiyeri, karbon kaynağı, sıcaklık, karıştırma hızı etkisi incelenmiş ve %60'ın üzerinde verim elde edilmiştir.

B. thuringiensis RSKK 381 ile PHB üretimi ve starter suş taramasında izolasyon yapılan alanlardan tarımsal bölgelerin önemi Dut (2015) tarafından incelenmiştir. Bakterinin üretimi ve PHB birikimi için; ph (3-5-7-11), inkübasyon süresi (1-2-3-gün), sıcaklık (30-37 °C) ve karıştırma hızı (karıştırmasız-350 rpm-650 rpm) etkisi araştırılmıştır. PHB birikimini arttırmak için sentetik ve doğal farklı azot- karbon kaynaklarının ve metal iyonlarının etkisi de incelenmiştir. Bakteriyel büyüme için optimum pH 7, sıcaklık 30 °C, süre 48 saat ve karıştırma hızının 650 rpm olduğu belirlenmiştir. Bu koşullarda farklı karbon kaynaklarında en yüksek biyokütle kontrol grubunda (0.685 g/ l KHA), en hızlı büyüme gliserolde (0.854 h-1) ve en yüksek PHB verimi mannozda (%29.73 g PHB / g KHA) saptanmıştır. Farklı azot kaynaklarında en yüksek biyokütlenin kontrol grubunda (0.685 g/l KHA), en hızlı büyümenin amonyum sülfatta (0.659 h-1) ve en yüksek PHB veriminin amonyum nitratla (%27.3 g/ KHA) olduğu tespit edilmiştir. C/N oranı açısından en yüksek biokütle C/N =0.5'te en yüksek PHB verimi C/N =1.5'ta gözlemlenmiştir. Mikrobiyal büyüme (0.787 g/ KHA) ve PHB verimi (%28.33 g PHB/ g KHA) için en

etkili metal iyonunun Nikel olduğu fakat en hızlı büyümenin Bor ortamında (0.863 h-1) gerçekleştiği ve Magnezyumun biokütle ve PHB verimi açısından minimum etki gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca bakterinin tarımsal alanlardaki uygulamaya yönelik gösterdiği tepkiyi belirlemek için biyokütle, üreme hızı ve PHB verimi açısından 3 farklı gübre kullanılarak hazırlanan besiortamlarında bakterinin en yüksek biyokütle ve PHB verimi biyogübreden (organik gübre, 0.240 g/ l KHA, %43.3 g PHB/ g KHA) elde edildiği bildirilmiştir.

Küçük ve ark., (2016) *Vicia sativa L.*'nin kök nodül bakterilerinde PHB üretimlerini araştırmışlardır. İzolatların PHB üretimi, hücre kuru ağırlığına göre 0.100-0.428 g/l (w/v) arasında olup en yüksek PHB verimi V1 izolatında (%77.3) belirlenmiştir. İzolatlarda PHB döngüsünde rol oynayan iki enzimin aktivitesi incelendiğinde en yüksek β -ketothiolaz aktivitesinin V15 izolatında, en yüksek β -hidroksibütirat dehidrogenaz aktivitesinin ise V3 izolatında tespit edildiği belirtilmiştir.

2.2. Siderofor ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Melioidozisli hastalardan izole ettikleri 84 *P. pseudomallei* izolatında siderofor üretimini CAS agar kullanarak araştıran Yang ve ark., (1991) bütün *Pseudomonas* türlerinde siderofor üretimi olduğunu bildirmişlerdir.

Monjanatha ve ark., (1992) 6 referans suşun (3'ü yavaş gelişen *B. japonicum* ve 3'ü hızlı gelişen *R. fredii*) siderofor üretimini ve *R. fredii* mutantının (aşırı siderofor üretimi için Tn5 ilavesiyle geliştirilen) alkali toprakta gelişme yeteneğini araştırmış ve *B. japonicum* referans suşlarını (BDTB 110, 123 ve 135) "Neilands" yöntemine göre CAS Agar solüsyonu kullanarak sıvı kültürde incelemiştir. Daha fazla siderofor üretimi için Tn5 transpozunun kullanılmasıyla Çin *R. fredii* suşu geliştirilmiştir. Yavaş gelişen 3 *Bradyrhizobia* arasında BDTB 135'nin demir miktarının düşük olduğu sıvı besiyerinde siderofor üreten tek suş olduğunu bildirmişlerdir. Sera şartlarında nodül oluşumu incelendiğinde siderofor üreten iki mutant *R. fredii* suşu ile üretim oranı %3 ve %4 olurken yabani türde bu oranın %19 olduğu belirtilmiştir.

Topraktan izole ettikleri 2 *P. fluorescens* ve 2 *P. chlororaphis* izolatının siderofor üretimini ve gıda patojenleri üzerindeki antimikrobiyal etkilerini araştıran Laine ve ark., (1996) 4 izolatın da siderofor ürettiğini bildirmişlerdir.

Vachee ve ark., (1997) kaynaklardan şişelenme öncesinde topladıkları maden sularından izole ettikleri ve %29'unu tür seviyesinde tanımladıkları 382 izolatın siderofor üretimini araştırdıkları çalışmalarında 120 *Pseudomonas* spp. tanımlamışlardır. İdentifiye edilemeyen, floresan özellikteki *Pseudomonas*'ların 99'unda (%82.5); izole edilen *P. fluorescens*'lerin 35'inde (%70), *P. chlororaphis*'lerin 1'inde (%25), *P. stutzeri* ve *P. alcaligenes*'lerin tamamında siderofor üretimini saptamışlardır. King B besiyerinde pyoverdin üretimi tespit ettikleri halde CAS Agar'da siderofor üretmeyen suşların %35 oranında olduğunu belirtmişlerdir.

Tekin (1998) yaptığı çalışmada; İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi hastalarına ait idrar örneklerinden izole ettiği 95 *Klebsiella pneumoniae* suşunun 93'ünün (%97.8), 29 *K. oxytoca* suşunun ise 28'inin (%96.5) siderofor ürettiğini tespit etmiştir.

R. ciceri suşlarının kültürel şartlarda siderofor üretimini araştıran Dhul ve ark., (1998) mutant Ca401RW5 dışındaki tüm suşların siderofor üreticisi olduklarını tespit etmiştir. Yüksek oranda siderofor üreticisi olduğu belirlenen nohut bitkisine standart Ca181 suşu aşılanarak siderofor üretimindeki şartları ayarlama kullanılmış ve sadece hidroksamat tip sideroforları ürettiği saptanmıştır. Hidroksamat üretim seviyesi, doğrusal olarak günlük gelişme evresi boyunca 8 güne kadar arttırılmıştır. Orta seviyedeki demir takviyesi, hidroksamat üretiminde düşüşle sonuçlanmış ve 500J.IM demir seviyesinde, hidroksamat seviyesi % 40 kadar düşmüştür. Test edilen diğer suşlar içinde, hidroksamat seviyesindeki düşüş %30- %75 arasında değişiklik göstermiştir. Ca85A23 suşundaki bu demir seviyesi tamamen hidroksamat üretimini durdurmuştur. Demir takviyesinin, neredeyse teste tabi tutulan tüm suşlarda nodül taze ağırlığını uyardığını belirtmiştir. Ayrıca, bu uyarı bakteriyel sušta çeşitlilik gösterse de, her bitkideki nitrojen kazancının simbiyotik yeterliliğin artışı yönünde olduğu bildirilmektedir.

Mahmoud ve ark., (2001) rizosfer mikroflorasından izole ettikleri 84 izolatin siderofor üretimini kimyasal yollarla araştırmışlardır. CAS Agar'da pozitif sonuç veren 42 izolat içindeki *P. aeruginosa* izolatlarının tamamının güçlü pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır.

Anđ-Küçüker ve ark., (2002) üriner sistem infeksiyonlu hastalardan izole ettikleri 20'si *K. pneumoniae* ve 6'sı *K. oxytoca* olmak üzere toplam 26 suşun tümünde siderofor üretimi tespit etmişlerdir. İzolatların %54'ünün enterobaktin, %8'inin ise aerobaktin ürettiği ve aerobaktin üreten suşların hepsinin *K. pneumoniae* olduğunu belirtmişlerdir.

El-sukhon (2002) süt ve süt ürünlerinden izole ettiği 346 *Klebsiella* türünün 96'sının (%27.7) siderofor ürettiğini saptamıştır.

Huston ve ark., (2004) *P. aeruginosa*'da tanımlanan 2 tip siderofor olan pyosiyalin ve piyoverdin üretimini King A ve King B ortamlarında incelemişlerdir. Çalışmalarında 35 klinik *Pseudomonas* spp. izolatu kullanmışlar ve 4 suş hariç tüm izolatlarda King B ortamında piyoverdin tipi siderofor üretildiğini bildirmişlerdir.

30 rizosfer örneğinden izole ettikleri floresan özellikteki *Pseudomonas*'ların in vitro koşullarda siderofor üretimi King B ortamında Paez ve ark., (2005) tarafından araştırılmıştır. Sıvı ve katı ortamda 24 saat inkübe ettikleri *P. aeruginosa*, *P. putida biovar B* ve *P. marginalis* izolatlarında sarı-yeşil pigment oluşumunu siderofor varlığı olarak yorumlamışlardır.

Hindistan'da National Collection of Industrial Microorganisms (NCIM) ve National Chemical Laboratory (NCL) merkezlerinden temin ettikleri *P. fluorescens* NCIM5096 ve *P. putida* NCIM 2847 suşlarında siderofor üretimini spektrofotometrik metot ile araştıran Sayyed ve ark., (2005) CAS Agar'da sonuçlarını doğrulamışlardır. CAS Agar'da *P. fluorescens*'in %87 ve *P. putida*'nın %83 oranında siderofor ürettiğini bildirmişlerdir.

Değişik klinik örneklerden elde edilmiş 120 *Klebsiella* spp. izolatinın %30.8'inin aerobaktin, %91.7'sinin enterobaktin sentezlediği Kaleli ve ark., (2006) tarafından bildirilmiştir.

Çalışmasında izole ettiği *Pseudomonas*'ların siderofor tayinlerini Schwyn ve Neilands yöntemine göre belirleyen Aydın (2010) TSB besiyerine ekerek 24 saat inkübasyona bıraktığı kültürlerden 2-3 koloni alıp CAS agara inoküle etmiştir. 30-35°C'de 24 saatlik inkübasyon sonrasında mavi-turkuaz renkteki CAS agarın sarı-turuncuya dönmesini siderofor varlığı olarak yorumlamış ve tüm izolatlarda siderofor üretiminin olduğunu bildirmiştir.

Ankara'da tüketime sunulan etleri *Klebsiella* türleri açısından inceleyen Yalçın (2010) izole ettiği 45 *Klebsiella* spp. izolatını CAS Agar kullanarak Schwyn ve Neilands yöntemine göre araştırmış ve 20 adedinin (%44) siderofor üreticisi olduğunu belirtmiştir.

Bazı *Bacillus* türlerinde siderofor üretimini ve *B. cereus* DSM 4312 suşunda siderofor üretiminin optimizasyonu araştıran Güney (2014) tüm suşlarda Payne'nin (1994) çalışmasını referans alarak CAS Agar'da siderofor üretimi gözlemlemiş ve CAS sıvı deneyleri sonucunda sadece *B. cereus* DSM 4312 suşunda siderofor üretimi saptamıştır. En yüksek siderofor üretimini *B. cereus* DSM 4312 bakterisinde (8 mm), en düşük ise *B. cereus* / *B. thuringiensis* A77/K-1 (4 mm) bakterisinde tespit etmiştir.

Aydın (2014) yaptığı çalışmasında; Payne'nin (1994) çalışmasını referans alarak *Brevibacillus laterosporus*'un siderofor üretimini ve çeşitli metallerin (Fe, Co, Ni, Hg) siderofor üretimine etkilerini araştırmıştır. CAS analizi ile siderofor varlığını ve Arnow (1937) analizi ile *B. laterosporus*'un ürettiği sideroforun katekol tipi olduğunu tespit etmiştir. *B. laterosporus* 01/İK3-2 bakterisinde zon çapınının 10 mm olduğunu belirlemiştir.

Erzurum ve çevresindeki tuz içeriği yüksek habitatlardan izole ettiği halofilik rizobakterilerin siderofor üretme potansiyellerini inceleyen Sezen (2017) TSB besiyerinde 24 saat geliştirdiği bakteri kültürlerini 15.000 rpm'de 15 dk. santrifüj ettikten sonra yaklaşık $0,5-1 \times 10^9$ CFU/ml OD₆₀₀ olacak şekilde ayarlamış ve CAS Agar'da açtığı kuyucuklara inoküle ederek 30°C'de 7 gün inkübasyona bırakmıştır. İnkübasyon sonucunda siderofor üreten izolatların zon çaplarını 0.5-1.2 cm olarak tespit etmiştir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Bakteri Kùltürleri

Çalışmada Kırşehir il merkezi ve ilçelerdeki (Kaman, Mucur, Akpınar, Akçakent, Çiçekdağı, Boztepe) yabani baklagil bitkilerinden (fiğ (*Vicia cracca* L.) ve taş yoncası (*Melilotus officinalis* (L.) Desr.)) daha önce izole edilmiş *Rhizobium* spp. izolatları kullanılmıştır (Tablo 3.1.).

Ayrıca kontrol suşu olarak ise; Institute of Fermentation, Ojaka, Japonya'dan temin edilen *R. leguminosarum* IFO 14778 türü kullanılmıştır.

Tablo 3.1. *Rhizobium* spp. İzolatlarının Toplandığı Bitkiler

İzolat No:	Toplanan Bitkiler	İzolat No:	Toplanan Bitkiler
HR 1	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 45-1	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 2-1	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 48-1	<i>Vicia cracca</i>
HR 2-2	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 48-2	<i>Vicia cracca</i>
HR 4	<i>Vicia cracca</i>	HR 49	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 7a	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 50-1	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 7b	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 50-2	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 14	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 51	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 16-1	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 52-2	<i>Vicia cracca</i>
HR 16-2	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 59-1a	<i>Vicia cracca</i>
HR 19	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 59-1b	<i>Vicia cracca</i>
HR 28	<i>Vicia cracca</i>	HR 59-2	<i>Vicia cracca</i>
HR 29	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 102-1	<i>Vicia cracca</i>
HR 31	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 102-2	<i>Vicia cracca</i>
HR 33-2a	<i>Vicia cracca</i>	HR 103	<i>Vicia cracca</i>
HR 33-2b	<i>Vicia cracca</i>	HR 104-2b	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 33-3a A	<i>Vicia cracca</i>	HR 105-2	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 36-1	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 106-1	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 36-2	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 106-2	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 37	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 107	<i>Vicia cracca</i>
HR 38-1a	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 109	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 38-2	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 111	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 40-1a	<i>Vicia cracca</i>	HR 123	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 40-1b	<i>Vicia cracca</i>	HR 124	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 40-2	<i>Vicia cracca</i>	HR 125	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 41-1	<i>Vicia cracca</i>	HR 132-2a	<i>Vicia cracca</i>
HR 41-2	<i>Vicia cracca</i>	HR 138-1	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 42	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 143-1	<i>Melilotus officinalis</i>
HR 43-2	<i>Melilotus officinalis</i>	HR 143-2	<i>Melilotus officinalis</i>

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada *Rhizobium* cinsi bakterilerin geliştirilmesinde YMB besiyeri, PHB üretimlerinin belirlenmesinde ise melasın farklı konsantrasyonları kullanılmıştır.

Yeast Ekstrakt Mannitol (YEM) Sıvı Besiyeri

<u>Maddeler</u>	<u>Miktar (g/L)</u>
Mannitol	10.0
KH ₂ PO ₄	0.5
MgSO ₄ H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Tripton	2.5
Pepton	2.5
Yeast Ekstrakt	2.5

Yukarıda belirtilen maddeler 1 litre distile suda çözdürüldükten sonra 0.01N HCl ve 0.01N NaOH ile besiyerinin pH değeri 7'ye ayarlanarak 100 ml'lik erlenlere 50'şer ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Otoklavda 121⁰C'de 15 dk. steril edilmiştir.

YMA'nın hazırlanması sırasında ortama %2 oranında agar ilave edilerek besiyeri otoklavda 121⁰C'de 15 dk. steril edilmiş ve aseptik şartlarda steril petrilere dökülüp kontaminasyonunu kontrol etmek için bir gece 37⁰C'de etüvde inkübe edilmiştir.

Kırşehir Şeker Fabrikasından temin edilen melas ise; saf su ile %0.5, %1, %1.5'lik konsantrasyonlara ayarlanarak otoklavda 121⁰C'de 15 dk. steril edilmiştir.

3.1.3. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Otoklav (Nüve OT 40L)
- Etüv (Nüve EN 500)
- Çalkalamalı Etüv (MAXQ 4450)
- Pastör Fırını

- Mikroskop
- Santrifüj (Thermo MR 23 İ)
- Hassas Terazı
- Buzdolabı
- -80 (Nüve DF 490)
- Vortex
- Su Banyosu (Clifton)
- Distile Su Cihazı
- Ultrasonik Banyo
- pH metre (Hanna HI 221)
- Spektrofotometre (Thermo Genesys 10S UV-VIS)
- Mikropipet

3.2. Metod

3.2.1. İzolatların Kültürel ve Biyokimyasal Özelliklerinin Tespiti

Rhizobium spp. izolatlarının özelliklerini belirlemek amacıyla Gram boyama yapıldıktan sonra katalaz, oksidaz ve hareket testleri uygulanarak Bromthymol Mavili besiyerinde ve Kongo Kırmızılı YMA'da üreme özellikleri belirlenmiştir (Öğütçü ve Algur, 2014).

3.2.1.1. Gram Boyama

Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin duvar yapıları arasındaki farklılıkların, Gram boyama tepkimesindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Gram boyama sırasında hücre içinde kristal viyole-iyot kompleksi meydana gelmektedir. Bu kompleks, alkol ile Gram negatif bakteriden uzaklaşmakta ancak Gram pozitif bakteride kalmaktadır. Gram pozitif bakterilerin birkaç tabakalı peptidoglikandan oluşan çok kalın duvarı vardır. Duvar alkol ile muamele edildiği zaman su kaybetmektedir. Bu durum duvardaki porların kapanmasına yol açarak çözünmeyen kristal viyole-iyot kompleksinin hücre dışına çıkmasına engel olmaktadır. Gram negatif bakteride ise alkol, lipid açısından zengin dış duvardan hızla içeri girerek kristal viyole-iyot kompleksini hücreden özütleyip uzaklaştırmaktadır (Madigan ve Martinko 2010; İpek-Erbey, 2015).

Gram boyama için 28°C'de YMA'da gelişen kültürlerden preparat hazırlanmıştır. Preparat fikse edildikten sonra kristal viyole ile boyanarak 1 dk. bekletilmiştir. Daha sonra bol su ile yıkanan preparat lügol solüsyonu ile 1 dk. muamele edilmiştir. Preparat bol su ile yıkanarak üzeri %96'lık etil alkol ile kaplanmış ve 10-15 saniye içerisinde alkolde boya giderimi sağlanmıştır. Preparat su ile yıkanarak safranin boyası ile kaplanmış ve 30-45 saniye bekletilmiştir. Preparat süre sonunda bol su ile yıkanmış ve kurutma kağıdıyla kurutulmuştur. Işık mikroskopunun 100x objektifinde preparat üzerine immersiyon yağı damlatılarak hücreler incelenmiştir. Mor renkte görülen bakteriler Gram pozitif, pembe renkte görülenler Gram negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2010).

3.2.1.2. Hareketlilik Testi

Birçok bakteri, flagella adı verilen hücre organelleri ile aktif hareket edebilmektedir. Bakterilerde hareket flagella varlığının belirlenmesi yerine hareketin gösterilmesi olarak ortaya çıkmaktadır (İpek-Erbey, 2015).

Hareketlilik tespitinde yarı katı besiyeri kullanılmıştır. İçerisinde %0.4-0.5 oranında agar bulunan YMA besiyerine iğne uçlu öze ile dibe kadar düz bir hat boyunca ekim yapılmış ve 24-48 saat 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda, besiyerinin yüzeyinde ve inokülasyon hattı boyunca üreme olurken, sağa veya sola doğru bir dallanma ve yayılma olmaz ise, bakteri hareketsiz; inokülasyon hattından etrafa agarın içine doğru bir yayılma ve dallanma olur ise bakteri hareketli olarak değerlendirilir (Çelebi, 2012; Orhan, 2013; Öğütçü ve Algur, 2014).

3.2.1.3. Katalaz Testi

Aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların sahip olduğu katalaz enzimi, hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene ayrıştırmaktadır. Katı ya da sıvı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne eklendiği zaman, serbest oksijenin gaz kabarcıkları şeklinde gözlenebilmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını ve bu ise ortamdaki bakteride katalaz enziminin bulunduğunu göstermektedir (Temiz, 2010).

28°C'de 24 saat yatık YMA'da geliştirilen kültürlerin üzerine %3'lük 1 ml hidrojen peroksit çözeltisi damlatılıp gaz kabarcıklarının çıkıp çıkmadığına bakılmış

ve gaz kabarcıklarının çıkışı pozitif sonuç olarak kabul edilmiştir (Gerhardt, 1981; Tamer ve ark. 1989; Temiz, 1994).

3.2.1.4. Oksidaz Testi

Bu test Sitokrom C oksidaz enziminin varlığını ortaya koymaktadır. Bu enzim demir içeren bir hemoprotein olup aerobik solunuma katılmaktadır (Aydın, 2004; Adıgüzel ve ark., 2010; İpek-Erbey, 2015).

Bir parça filtre kağıdı, Tetrametil-p-fenilendiamin-diklorür'ün %1'lik solüsyonunun birkaç damlası ile ıslatılarak 24 saatlik YMA kültüründen bir öze dolusu organizma alınarak filtre kağıdının üzerine yayılmıştır. 10 saniye içerisinde mavi-menekşe bir renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmiştir (Gerhardt, 1981; Saygılı, 2012; Karaman, 2017).

3.2.1.5. Brom Tyhmol Mavili YMA'da Gelişim

0.5 g Bromo thymol blue 100 ml Etil alkol içerisinde çözdürüldükten sonra 121°C'de 15 dk. otoklavda steril edilmiştir. 5 ml alınıp 1 litre YMA ortamına eklenerek pH, 1 N NaOH ve 1N HCl ile 6.8'e ayarlanıp steril edilmiştir ve aseptik şartlarda steril petrilere dökülmüştür (Vincent, 1970; Yao ve ark., 2002; Yıldız, 2007). Stok kültürlerden alınan *Rhizobium* izolatları YMA ortamında aktifleştirildikten sonra bromthymol mavili YMA'ya çizgi ekimi ile inoküle edilerek 28°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Yavaş gelişen *Rhizobium* izolatları alkali reaksiyon vererek ortamı mavi renge, hızlı gelişen *Rhizobium* izolatları ise asit reaksiyon vererek ortamı sarıya dönüştürmüştür (Ülgen,1980; Yıldız, 2007; Öğütçü ve ark., 2010; Öğütçü ve Algur, 2014).

3.2.1.6. Kongo Kırmızılı YMA'da Gelişim

2.5 g Kongo kırmızı 100 ml distile suda çözdürüldükten sonra otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir. %0.25 suda çözülmüş 10 ml karışım 1 litre YMA besiyerine eklenmiş ve steril edilerek aseptik şartlarda steril petrilere dökülmüştür. Stok kültürlerden alınan izolatlar YMA besiyerinde aktifleştirildikten sonra Kongo kırmızılı YMA besiyerine çizgi ekimi ile inoküle edilmiştir. 28°C'de 1 hafta boyunca

izolatların boyayı absorblama yeteneğine bakılmıştır. *Rhizobium* türleri genellikle karanlıkta inkübe edildiğinde Kongo kırmızısını absorbe etmezler ve koloniler beyaz, opak veya bazen pembe kalmaktadır. Buna karşılık ışıktaki inkübe edildiğinde ise boyayı absorblayarak kırmızı renkli koloniler oluşturmaktadırlar (Vincent, 1970; Ögütçü ve ark., 2010; Ögütçü ve Algur, 2014).

3.2.2. İzolatların Muhafaza Edilmesi

YMA içeren yatık tüplere üç paralel şekilde inoküle edilen izolatlar 28°C’de beş gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda +4°C’de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Stoklar iki ayda bir yenilenmiştir (Ateş ve Ekmekçi, 2001; Türkoğlu, 2009). Ayrıca katı besiyerlerinde geliştirilen kültürlerden birer koloni alınarak %20’lik gliserol içeren YMB’li besiyerine aktarılarak - 80°C’de muhafaza edilmiş ve altı ayda bir yenilenmiştir.

3.2.3. PHB Granüllerinin Nile Blue A ile Boyanması

PHB üreten ve üretemeyen bakterileri ayırt etmek amacıyla Nile Blue A boyası kullanılmıştır. Bu amaçla 0.01 g/ml Nile Blue A stok çözeltisinden %1 olacak şekilde YMA besiyerine eklenmiş ve besiyerinin pH değeri 7.0±0.2’ye 0.01 N NaOH ve 0.01 N HCl ile ayarlanarak otoklavda 121°C’de 15 dk. steril edilmiştir. Agarın yüzeyine önceden aktifleştirilmiş olan *Rhizobium* izolatlarından tek koloni ekimi yapılarak, 30±1°C’de 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda koloniler UV ışığı altında incelenmiştir. PHB sentezleyen bakterilerin kolonilerinin Nile Blue A ile boyanarak turuncu renk oluşturduğu gözlenmiştir (Ostle ve Holt, 1982; Pierce ve Schroth, 1994; Mercan, 2002; Dut, 2015).

3.2.4. Analitik Ölçüm için PHB Metodu

Rhizobium izolatlarının ürettikleri PHB miktarı, Bonartseva ve Myshkina’nın (1985) metoduna göre belirlenmiştir (Mercan ve ark., 2002; Uruç, 2006; Dinigüzel, 2007; Baysak, 2008; Tamdoğan, 2008; Türkoğlu, 2009; Dut, 2015; Küçük ve ark., 2016).

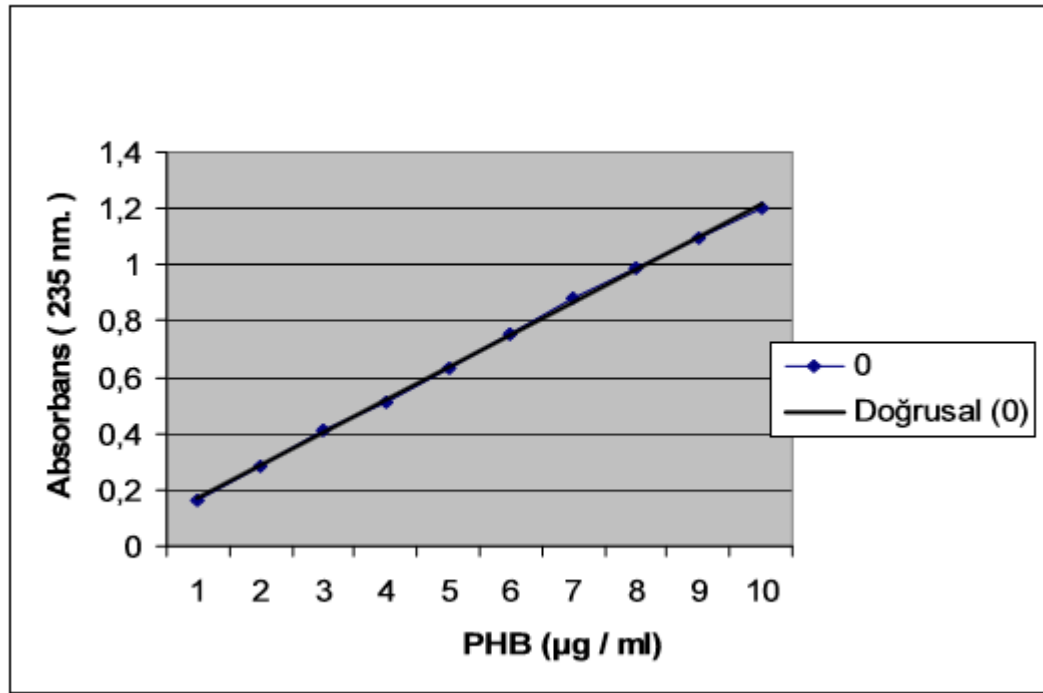
- Stok kültürden öze ile alınan inokulum içerisinde 50 ml YMB bulunan bir erlene aktararak ön zenginleştirme yapılmıştır.
- Bu erlenden, içerisinde 100'er ml %0.5, %1, %1.5 oranlarında seyreltilmiş melas bulunan dört ayrı erlene %4 oranında kültür aşılantmıştır.
- Erlenler 28°C'de 96 saat kalmak şartıyla çalkalamalı etüve kaldırılmıştır.
- İnkübasyon sonucunda erlenlerdeki kültürler, darası alınmış olan santifüj tüplerine alınarak 12.000 rpm'de 20 dk. santrifüj edilmiştir.
- Sıvı kısım (süpernatant) atıldıktan sonra tüplerde bulunan pelet, 35°C'de 24 saat kurutulmuştur.
- Tüpler tartılarak 100 ml'lik kültürdeki hücre kuru ağırlığı hesaplanmıştır.
- Örnekler, tartım işleminden sonra 5 ml distile suyla homojenize edilmiştir.
- Homojenize olan örnekler, 1 saat ultrasonik banyoda tutulmuştur. Bu örneklerden 2'şer ml alınarak yeni santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- 2 ml örneklerin üzerine 2 ml 2 N HCl eklenerek 100°C'de su banyosunda 2 saat tutulmuştur.
- Daha sonra örnekler, 7500 rpm'de 25 dk. santrifüj edilmiş, sıvı kısım atılarak kalan pelet üzerine 5 ml kloroform eklenmiştir. Tüplerin kapakları kapatılarak bir gece 28°C'de çalkalamalı etüvde bekletilmiştir.
- Tüplerin kapakları açılmış ve 7500 rpm'de 40 dk. santrifüj edilmiştir. Kloroform kısmından 0,1 ml alınmış ve 40°C'de 15 dk. bekletilerek kloroform uçurulmuştur.
- Sonrasında 5 ml konsantre H₂SO₄ eklenerek 100°C'de su banyosunda 20 dk. tutulmuştur.
- Su banyosundan çıkarılan örneklerin soğuması beklenmiş ve 235 nm. dalga boyunda spektrofotometrede okutulmuştur.

3.2.5. PHB'nin Standart Grafiğinin Hazırlanması

Standart grafiğın hazırlanması için Sigma-Aldrich Cheme'den temin edilen saflaştırılmış ve toz haline getirilmiş standart PHB kullanılmıştır. PHB, krotonik asite dönüştürülmüş ve spektrofotometrede absorbans taraması yapılarak maksimum absorbans gösterdiği dalga boyunun 235 nm. olduğu tespit edilmiştir (Uruç, 2006;

Dinigüzel, 2007; Baysak, 2008; Tekin, 2008; Tamdoğan, 2008; Türkoğlu, 2009; Ensari, 2012; Dut, 2015).

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 hazırlanmış ve 100°C 'de su banyosunda 10 dk. tutularak krotonik asite dönüştürülmüştür. Maksimum absorbands gösterdiği dalga boyunda absorbandsı ölçülerek PHB'nin $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'ye karşılık gelen standart grafiği elde edilmiştir (Uruç, 2006; Dinigüzel, 2007; Baysak, 2008; Tekin, 2008; Tamdoğan, 2008; Türkoğlu, 2009; Ensari, 2012; Dut, 2015).



Şekil 3.1. Krotonik asit formundaki standart PHB'nin 235 nm. dalga boyunda miktara bağlı standart grafiği

3.2.6. İzolatlarda Siderofor Varlığının Tespiti

Rhizobium izolatlarının siderofor tayinleri CAS Agar kullanılarak Schwyn ve Neilands'ın (1987) yöntemine göre yapılmıştır;

Chrome Azurol Sulphate (CAS) Agar

CAS indikatör solüsyonunun hazırlanması;

Chrome Azurol S (CAS)	: 60.5 mg
Demir-III klorid heksahidrat (Iron(III) chloride hexahydrate)	: 27 mg
Hidroklorik asit (HCl)	: 83.3 µl
Hexadecyltrimethylammonium bromide (HDTMA)	: 72.9 mg

CAS indikatör solüsyonunu hazırlamak amacıyla; 60.5 mg CAS 50 ml distile suda çözdürülmüş ve üzerine 10 ml Iron III solüsyonu eklenmiştir (IronIII solüsyonu 100 ml distile suya ilave edilerek 83.3 µl konsantre HCl üzerine 27 mg FeCl₃.6H₂O eklenip hazırlanmıştır). Hazırlanan solüsyona 40 ml distile suda çözdürülmüş 72.9 mg HDTMA karıştırılarak yavaşça eklenmiş ve otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir.

Bazal agarın hazırlanması;

3-(N-morpholino)propane sulfonic asit (MOPS)	: 3.0 gr
Agar	: 1.5 gr
Sodyum klorür (Sodium chloride)	: 0.05 gr
Potasyum fosfat (Potassium phosphate)	: 0.03 gr
Amonyum klorür (Ammonium chlorure)	: 0.01 gr
L-asparjin (L-asparagine)	: 0.5 gr
Distile su	: 83 ml
% 50 NaOH	: 5 ml

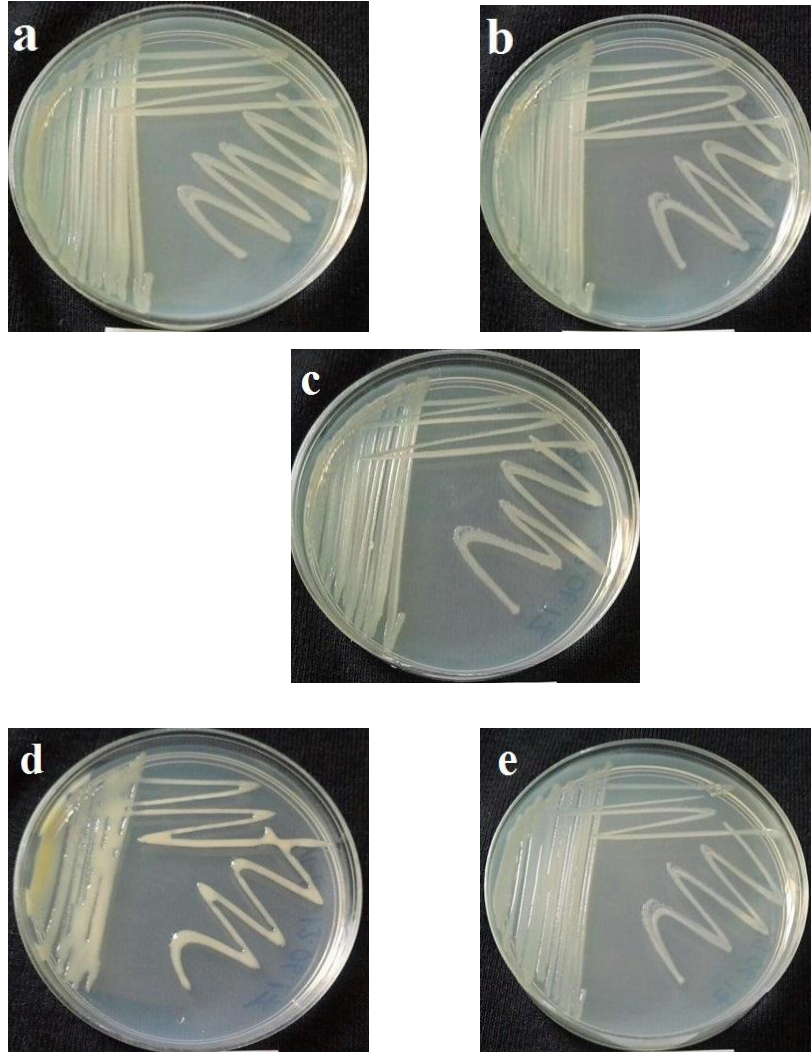
100 ml basal agar hazırlamak amacıyla agar dışında yukarıda belirtilen tüm maddeler 83 ml distile suda eritilmiş ve besiyerinin pH'sı NaOH solüsyonu ile 6.8'e ayarlanmıştır. Sonra 1.5 gram agar eklenerek karışım otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edilmiştir. Steril edilmiş basal agar ve CAS indikatörü 50°C sıcaklıktaki bir su küvetinde soğutulmuştur. 2 ml %50'lik glukoz solüsyonu basal agar üzerine karıştırılarak ilave edilmiştir. CAS indikatörü de bu karışım üzerine yavaşça ve karıştırılarak eklenmiştir. Son olarak bu karışım steril plaklara dökülmüştür.

YMA besiyerine ekilerek 24 saat inkübasyona bırakılan kültürlerden 2-3 koloni alınmış ve CAS agara nokta ekimi yapılmıştır. 28°C'de 1 haftalık inkübasyon sonrasında mavi-turkuaz renkteki CAS agarda sarı-turuncu zon oluşması siderofor varlığı olarak değerlendirilmiştir (Schwyn ve Neilands, 1987; Aydın, 2010; Yalçın, 2010; Sezen, 2017).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İzolatların Kültürel ve Biyokimyasal Özellikleri

Toplam 56 adet *Rhizobium* spp. izolatu kullanılmış olup hepsi Gram negatif ve çubuk şeklindedir. Bu izolatlar YMA besiyerinde krem ve mukozlu koloniler oluşturmuş ancak HR 41-1 izolatu sarı renkli koloni oluşturmuştur. İzolatların katalaz ve oksidaz enzimlerine sahip ve hareketli oldukları belirlenmiştir. Aynı zamanda Kongo Kırmızılı YMA'da beyaz, Bromtimol mavili YMA'da ise sarı renkli koloniler oluşturdukları tespit edilmiştir. İzolatların YMA'da üreme fotoğrafları Resim 4.1.'de, kültürel ve biyokimyasal test sonuçları ise Tablo 4.1. ve Tablo 4.4.'te gösterilmiştir.



Resim 4.1. İzolatların YMA'da üreme fotoğrafları

a. HR 36-2 **b.** HR 37 **c.** HR 38-1a **d.** HR 41-1 **e.** HR 51

Tablo 4.1. İzolatların Gram Boyama, Bakteri Morfolojisi, Koloni Rengi ve Mukoz Oluşturma Özellikleri

<i>İzolat No:</i>	<i>Gram Boyama</i>	<i>Bakteri Morfolojisi</i>	<i>Koloni Rengi</i>	<i>Mukoz Oluşturma</i>
<i>HR 1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 2-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 2-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 4</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 7a</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 7b</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 14</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 16-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 16-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 19</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 28</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 29</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 31</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 33-2a</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 33-2b</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 33-3a A</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 36-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 36-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 37</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 38-1a</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 38-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 40-1a</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 40-1b</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 40-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 41-1</i>	-	Çubuk	Sarı	+
<i>HR 41-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 42</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 43-2</i>	-	Çubuk	Krem	+

Tablo 4.2. İzolatların Gram Boyama, Bakteri Morfolojisi, Koloni Rengi ve Mukoz Oluşturma Özellikleri (Devamı)

<i>İzolat No:</i>	<i>Gram Boyama</i>	<i>Bakteri Morfolojisi</i>	<i>Koloni Rengi</i>	<i>Mukoz Oluşturma</i>
<i>HR 45-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 48-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 48-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 49</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 50-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 50-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 51</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 52-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 59-1a</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 59-1b</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 59-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 102-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 102-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 103</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 104-2b</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 105-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 106-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 106-2</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 107</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 109</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 111</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 123</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 124</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 125</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 132-2a</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 138-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 143-1</i>	-	Çubuk	Krem	+
<i>HR 143-2</i>	-	Çubuk	Krem	+

Tablo 4.3. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları

<i>İzolat No:</i>	<i>Brom Thymol Blue besiyerinde koloni rengi</i>	<i>Congo Red besiyerinde koloni rengi</i>	<i>Hareket Testi</i>	<i>Katalaz Testi</i>	<i>Oksidaz Testi</i>
<i>HR 1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 2-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 2-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 4</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 7a</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 7b</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 14</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 16-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 16-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 19</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 28</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 29</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 31</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 33-2a</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 33-2b</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 33-3a A</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 36-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 36-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 37</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 38-1a</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 38-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 40-1a</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 40-1b</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 40-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 41-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 41-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 42</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 43-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+

Tablo 4.4. İzolatların Biyokimyasal Test Sonuçları (Devamı)

<i>İzolat No:</i>	<i>Brom Thymol Blue besiyerinde koloni rengi</i>	<i>Congo Red besiyerinde koloni rengi</i>	<i>Hareket Testi</i>	<i>Katalaz Testi</i>	<i>Oksidaz Testi</i>
<i>HR 45-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 48-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 48-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 49</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 50-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 50-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 51</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 52-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 59-1a</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 59-1b</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 59-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 102-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 102-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 103</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 104-2b</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 105-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 106-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 106-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 107</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 109</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 111</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 123</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 124</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 125</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 132-2a</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 138-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 143-1</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+
<i>HR 143-2</i>	Sarı	Beyaz	+	+	+

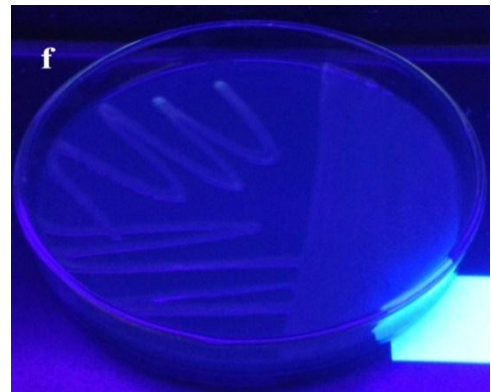
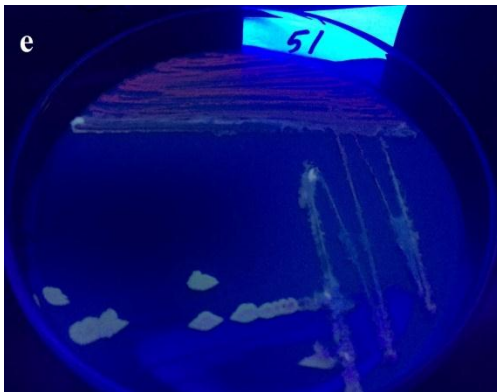
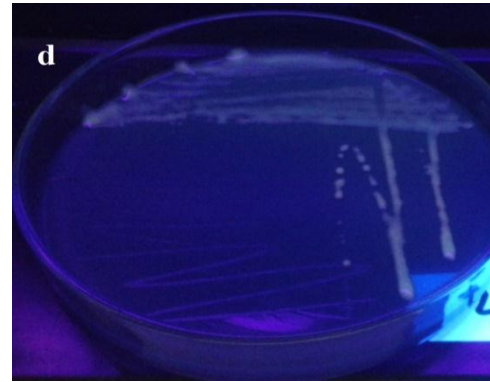
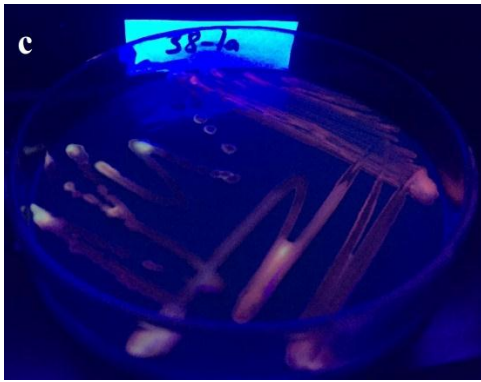
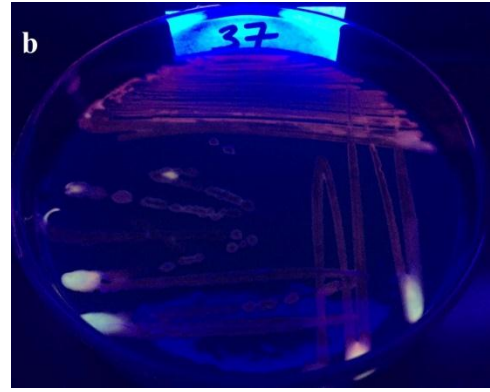
4.2. PHB Granüllerinin Nile Blue A ile Boyanması

İzolatların PHB üretme yeteneklerini belirlemek amacıyla Sudan Siyahı B'den daha fazla affiniteye ve spesifikliğe sahip olan Nile Blue A boyası kullanılmış ve 56 izolattan 43 adetinin PHB üretebildiği (turuncu renk oluşturanlar) ancak 13 adetinin PHB üretme yeteneğine sahip olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. İzolatların PHB Üretebilme Yetenekleri

<i>İzolat No:</i>	<i>PHB Üretimi</i>	<i>İzolat No:</i>	<i>PHB Üretimi</i>
<i>HR 1</i>	+	<i>HR 45-1</i>	+
<i>HR 2-1</i>	-	<i>HR 48-1</i>	-
<i>HR 2-2</i>	+	<i>HR 48-2</i>	-
<i>HR 4</i>	-	<i>HR 49</i>	+
<i>HR 7a</i>	+	<i>HR 50-1</i>	-
<i>HR 7b</i>	+	<i>HR 50-2</i>	+
<i>HR 14</i>	+	<i>HR 51</i>	+
<i>HR 16-1</i>	+	<i>HR 52-2</i>	+
<i>HR 16-2</i>	+	<i>HR 59-1a</i>	+
<i>HR 19</i>	+	<i>HR 59-1b</i>	+
<i>HR 28</i>	+	<i>HR 59-2</i>	+
<i>HR 29</i>	+	<i>HR 102-1</i>	+
<i>HR 31</i>	+	<i>HR 102-2</i>	+
<i>HR 33-2a</i>	-	<i>HR 103</i>	+
<i>HR 33-2b</i>	-	<i>HR 104-2b</i>	+
<i>HR 33-3a A</i>	-	<i>HR 105-2</i>	-
<i>HR 36-1</i>	+	<i>HR 106-1</i>	+
<i>HR 36-2</i>	+	<i>HR 106-2</i>	+
<i>HR 37</i>	+	<i>HR 107</i>	+
<i>HR 38-1a</i>	+	<i>HR 109</i>	+
<i>HR 38-2</i>	+	<i>HR 111</i>	+
<i>HR 40-1a</i>	+	<i>HR 123</i>	+
<i>HR 40-1b</i>	+	<i>HR 124</i>	+
<i>HR 40-2</i>	-	<i>HR 125</i>	+
<i>HR 41-1</i>	+	<i>HR 132-2a</i>	+
<i>HR 41-2</i>	-	<i>HR 138-1</i>	+
<i>HR 42</i>	+	<i>HR 143-1</i>	-
<i>HR 43-2</i>	+	<i>HR 143-2</i>	-

Çalışmamızda PHB sentezleme yeteneğinde olan 43 izolattan 5 adeti (HR 36-2, HR 37, HR 38-1a, HR 41-1, ve HR 51) seçilmiş (Resim 4.2.) ve kontrol suşu (*R. leguminosarum* IFO 14778) ile birlikte melasın %0.5, %1, %1.5'lik konsantrasyonlarında kuru ağırlıkları ve PHB üretim verimleri incelenmiştir.



Resim 4.2. İzolatların Nile Blue A'lı YMA'daki fotoğrafları

a. HR 36-2 (+)

b. HR 37 (+)

c. HR 38-1a (+)

d. HR 41-1 (+)

e. HR 51 (+)

f. HR 4 (-)

4.3. Hücre Kuru Ağırlıklarının Belirlenmesi

İzolatların aşılandığı 100'er ml'lik melasın; %0.5, %1, %1.5'lik konsantrasyonlarda 28°C'de 96 saat inkübasyona bırakılması sonucu elde edilen kültürler santrifüj edildikten sonra sıvı kısım atılmış ve pelet kurutulmuştur. Çalışma üç paralel olarak düzenlenmiş her birisinin tek tek kuru ağırlıkları tartılarak ortalamaları alınmış ve standart sapmaları hesaplanmıştır.

Tablo 4.6. İzolatların %0.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıkları (g/l)

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel</i>	<i>2.paralel</i>	<i>3.paralel</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>
<i>R. leguminosarum</i> IFO 14778	0.524	0.555	0.581	0.553	± 0.028
<i>HR 36-2</i>	1.289	0.973	1.191	1.151	± 0.161
<i>HR 37</i>	0.889	0.925	1.337	1.050	± 0.248
<i>HR 38-1a</i>	0.875	1.494	1.931	1.433	± 0.530
<i>HR 41-1</i>	0.320	0.309	0.356	0.328	± 0.024
<i>HR 51</i>	0.666	0.874	0.705	0.748	± 0.110

Tablo 4.6.'da görüldüğü üzere *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %0.5 melas konsantrasyonunda hücre kuru ağırlığı 0.553 g/l olarak tespit edilmiştir. Ancak izolatlardan biri hariç (HR 41-1) diğer izolatlarda kontrol suşundan daha yüksek hücre kuru ağırlığı ölçülmüştür. İzolatların kuru ağırlıkları 0.328-1.433 g/l olarak bulunmuştur. HR 38-1a kod'lu izolat en yüksek hücre kuru ağırlığına (1.433 g/l) sahip iken, en düşük hücre kuru ağırlığı (0.328 g/l) HR 41-1 kod'lu izolata aittir.

Tablo 4.7. İzolatların %1 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıkları (g/l)

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel</i>	<i>2.paralel</i>	<i>3.paralel</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>
<i>R. leguminosarum</i> IFO 14778	1.585	1.539	1.781	1.635	± 0.128
<i>HR 36-2</i>	2.491	2.304	2.530	2.441	± 0.120
<i>HR 37</i>	2.328	2.304	2.723	2.451	± 0.235
<i>HR 38-1a</i>	1.327	0.657	1.126	1.036	± 0.343
<i>HR 41-1</i>	0.655	0.659	0.659	0.657	± 0.002
<i>HR 51</i>	1.592	0.937	1.250	1.259	± 0.327

Tablo 4.7.'de görülen veriler incelendiğinde; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %1 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığı 1.635 g/l olarak bulunmuştur. İzolatlardan 2 adetinin (HR 36-2, HR 37) kontrol suşundan daha yüksek, 3 adetinin (HR 38-1a, HR 41-1, HR 51) ise daha düşük hücre kuru ağırlığına sahip olduğu saptanmıştır. İzolatların kuru ağırlıkları 0.657-2.451 g/l olarak tespit edilmiştir. HR 37 kod'lu izolat en yüksek hücre kuru ağırlığına (2.451 g/l) sahip iken, en düşük hücre kuru ağırlığı (0.657 g/l) HR 41-1 kod'lu izolata aittir.

Tablo 4.8. İzolatların % 1.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıkları (g/l)

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel</i>	<i>2.paralel</i>	<i>3.paralel</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>
<i>R. leguminosarum IFO 14778</i>	2.454	2.545	2.577	2.525	± 0.063
<i>HR 36-2</i>	1.203	1.119	1.258	1.193	± 0.070
<i>HR 37</i>	1.243	1.216	1.279	1.246	± 0.031
<i>HR 38-1a</i>	0.778	0.789	1.115	0.894	± 0.191
<i>HR 41-1</i>	1.127	1.132	1.117	1.125	± 0.007
<i>HR 51</i>	0.945	0.896	0.952	0.931	± 0.030

Tablo 4.8.'de incelendiğinde; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %1.5 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığı 2.525 g/l olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda bütün izolatların hücre kuru ağırlığının kontrol suşundan daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İzolatlarının kuru ağırlıkları 0.894-1.246 g/l arasında bulunmuştur. HR 37 kod'lu izolat en yüksek hücre kuru ağırlığına (1.246 g/l) sahipken, en düşük hücre kuru ağırlığı (0.894 g/l) HR 38-1a kod'lu izolata aittir.

R. leguminosarum IFO 14778 suşunun hücre kuru ağırlığı %0.5 melas konsantrasyonunda en düşük (0.553 g/l), %1.5 melas konsantrasyonunda en yüksek (2.525 g/l) olarak bulunmuştur (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.). İzolatlarının hücre kuru ağırlıkları; %0.5 melas konsantrasyonunda 0.328-1.433 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.657-2.451 g/l, %1.5 melas konsantrasyonunda 0.894-1.246 g/l arasında değişiklik göstermiştir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Doktora çalışmasında Mercan (2002); YMB'de 48 saatlik inkübasyon sonunda hücre kuru ağırlıklarını *R. phaseoli* suşlarında 0.095-0.260 g/l, *R. leguminosarum* suşlarında 0.155-0.470 g/l, *R. cicer* suşlarında 0.100-1.805 g/l, *R. meliloti* suşlarında 0.320-0.950 g/l ve *Bradyrhizobium japonicum* suşlarında 0.225-0.540 g/l olarak belirlemiştir. Araştırmacının bulduğu hücre kuru ağırlıkları, çalışmamızdaki sonuçlara göre oldukça düşük olup bu farklılıkta kullandığımız melasın ve inkübasyon süresinin etkili olduğu düşünülmektedir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Yine başka bir çalışmada Uruç (2006); çalışmasında YMB'de 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını *R. phaseoli* suşlarında 0.0982-0.2424 g/l olarak ve *R. leguminosarum* suşlarında ise 0.2544-0.4424 g/l arasında bulmuştur. Bu sonuçların çalışmamızdaki değerlere göre düşük olmasında, kullandığımız melasın ve inkübasyon süresinin etkili olduğu kanaatindeyiz (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Rhizobium cinsi bakterilerle yapmış olduğu çalışmasında Baysak (2008), *R. phaseoli* suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını; %0.5 şeker konsantrasyonunda 0.0745-0.2267 g/l, %1 şeker konsantrasyonunda 0.0978-0.2430 g/l ve %1.5 şeker konsantrasyonunda 0.1129-0.2546 g/l olarak bulmuştur. Bu sonuçların araştırmamızdaki değerlere oranla düşük olmasında, kullanılan melasın ve düşük inkübasyon süresinin etkili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çalışmasında, *R. phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını, 1.6002-4.0128 g/l arasında bulmuştur. Bu değerler ise araştırmamızda bulduğumuz değerlere göre yüksektir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Yine *Rhizobium* türleri ile yaptığı çalışmada Türkoğlu (2009), *R. phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını, %0.5 melas konsantrasyonunda 0.8594-1.9482 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.5283-2.9511 g/l ve %1.5 melas konsantrasyonunda 0.8907-3.1166 g/l arasında bulmuştur. Araştırmamızdaki değerler bu çalışmadaki hücre kuru ağırlık değerlerine benzerlik göstermektedir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Küçük ve ark.(2016), yaptıkları çalışmalarında; *Rhizobium* izolatlarının YMB'de 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını 0.26-1.90 g/l arasında bulmuşlardır. Bu sonuçların çalışmamızdaki değerlere göre düşük olmasında, kullanılan melasın ve inkübasyon süresinin etkili olduğu düşünülmektedir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Saadettin ve ark. (2001), yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus* cinsine ait bakterilerin Nutrient Broth besiyerinde hücre kuru ağırlıklarını 0.15-2.67 g/l arasında bulmuşlardır. Bu değerler ise araştırmamızdaki sonuçlar ile uygunluk göstermektedir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Çalışmasında *Bacillus* cinsi bakterileri kullanan Ediz (2004); 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını *B. subtilis* F1 suşunda %0.5 melas konsantrasyonunda 0.01-0.19 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.01-0.22 g/l ve %1.5 melas konsantrasyonunda 0.01-0.35 g/l olarak bulmuştur. *Bacillus megaterium* P1 suşunda ise %0.5 melas konsantrasyonunda 0.00-0.10 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.01-0.09 g/l ve %1.5 melas konsantrasyonunda 0.02-0.22 g/l arasında bulmuştur. Bu değerler araştırmamızdaki değerlere göre oldukça düşük olup farklı bakteri türünün kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

Halofilik bakterilerin PHB üretimlerini inceleyen Dinigüzel (2007), %6 oranında NaCl içeren Nutrient Broth besiyerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarını 0.24-5.86 g/l arasında bulmuştur. Maksimum hücre kuru ağırlığı çalışmamızdaki değerlere göre yüksektir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

4.4. PHB Üretimlerinin Belirlenmesi

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

Tablo 4.9. İzolatların %0.5 Melas Konsantrasyonunda PHB Üretimi (g/l)

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel</i>	<i>2.paralel</i>	<i>3.paralel</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>
<i>R. leguminosarum IFO 14778</i>	0.129	0.136	0.138	0.134	± 0.004
<i>HR 36-2</i>	0.521	0.539	0.439	0.499	± 0.053
<i>HR 37</i>	0.511	0.441	0.402	0.451	± 0.055
<i>HR 38-1a</i>	0.582	0.566	0.510	0.552	± 0.037
<i>HR 41-1</i>	0.095	0.113	0.233	0.147	± 0.075
<i>HR 51</i>	0.290	0.534	0.429	0.417	± 0.122

Tablo 4.9.'da belirtildiği üzere; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %0.5 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0.134 g/l olarak tespit edilmiştir. Yine tablo incelendiğinde; bütün izolatlarda PHB üretiminin kontrol suşundan daha yüksek hatta bazı izolatlarda bu oranın 3-4 kat fazla (HR 36-2, HR 37, HR 38-1a; sırasıyla 0.499, 0.451, 0.552) olduğu belirlenmiştir. İzolatların kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0.147-0.552 g/l olarak bulunmuştur. En yüksek PHB üretimine (0.552 g/l) HR 38-1a kod'lu izolatta, en düşük PHB üretimine (0.147 g/l) HR 41-1 kod'lu izolatta rastlanmıştır.

Tablo 4.10. İzolatların % 1 Melas Konsantrasyonunda PHB Üretimi (g/l)

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel</i>	<i>2.paralel</i>	<i>3.paralel</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart Sapma</i>
<i>R. leguminosarum IFO 14778</i>	0.166	0.187	0.241	0.198	± 0.038
<i>HR 36-2</i>	0.685	0.763	0.751	0.733	± 0.042
<i>HR 37</i>	0.792	0.794	0.821	0.802	± 0.016
<i>HR 38-1a</i>	0.796	0.760	0.701	0.752	± 0.047
<i>HR 41-1</i>	0.066	0.050	0.028	0.048	± 0.019
<i>HR 51</i>	0.051	0.545	0.140	0.245	± 0.263

Tablo 4.10.'daki veriler incelendiğinde; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %1 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0.198 g/l olarak belirlenmiştir. İzolatlardan biri hariç (HR 41-1) diğer izolatlarda kontrol suşundan daha yüksek PHB üretimi saptanmış olup hatta 3 izolatın (HR 36-2, HR 37, HR 38-1a; sırasıyla 0.733, 0.802, 0.752) 3-4 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. İzolatların kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0.048-0.802 g/l olarak bulunmuştur. En yüksek PHB üretimine (0.802 g/l) HR 37 kod'lu izolatta, en düşük PHB üretimine (0.048 g/l) HR 41-1 kod'lu izolatta rastlanmıştır.

Tablo 4.11. İzolatların % 1.5 Melas Konsantrasyonunda PHB Üretimi (g/l)

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel</i>	<i>2.paralel</i>	<i>3.paralel</i>	<i>Ortalama</i>	<i>Standart sapma</i>
<i>R. leguminosarum IFO 14778</i>	0.446	0.256	0.214	0.305	± 0.123
<i>HR 36-2</i>	0.707	0.716	0.715	0.712	± 0.004
<i>HR 37</i>	0.753	0.654	0.792	0.733	± 0.071
<i>HR 38-1a</i>	0.660	0.642	0.610	0.637	± 0.025
<i>HR 41-1</i>	0.455	0.371	0.351	0.392	± 0.055
<i>HR 51</i>	0.573	0.575	0.556	0.568	± 0.010

Tablo 4.11.'de görüldüğü üzere; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %1.5 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi 0.305 g/l olarak bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde ise; tüm izolatlarda PHB üretiminin kontrol suşundan daha yüksek özellikle de 4 izolatın (HR 36-2, HR 37, HR 38-1a, HR 51; sırasıyla 0.712, 0.733, 0.637, 0.568) yaklaşık 2 kat fazla orana sahip olduğu tespit edilmiştir. İzolatların kuru ağırlıklarına göre PHB üretimleri 0.392-0.733 g/l olarak belirlenmiştir. En yüksek PHB üretimine (0.733 g/l) HR 37 kod'lu izolatta, en düşük PHB üretimine (0.392 g/l) HR 41-1 kod'lu izolatta rastlanmıştır.

R. leguminosarum IFO 14778 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi % 0.5 melas konsantrasyonunda en düşük (0.134 g/l), %1.5 melas konsantrasyonunda en yüksek (0.305 g/l) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.). İzolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimi; %0.5 melas konsantrasyonunda 0.147-0.552 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.048-0.802 g/l, %1.5 melas konsantrasyonunda 0.392-0.733 g/l arasında değişiklik göstermiştir (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

Doktora çalışmasında Mercan (2002); YMB'de 48 saatlik inkübasyon sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini *R. phaseoli* suşlarında 0.024-0.060 g/l, *R. leguminosarum* suşlarında 0.024-0.106 g/l, *R. cicer* suşlarında 0.007-0.142 g/l,

R. meliloti suşlarında 0.068-0.365 g/l ve *B. japonicum* suşlarında 0.029-0.105 g/l olarak bulmuştur. Araştırmacının tespit ettiği maksimum ve minimum PHB üretimleri çalışmamızdaki sonuçlara göre düşüktür (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

Uruç (2006), yapmış olduğu tez çalışmasında; YMB'de 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini, *R. phaseoli* suşlarında 0.0248-0.0553 g/l olarak ve *R. leguminosarum* suşlarında ise 0.0271-0.0601 g/l arasında bulmuş olup bu değerler çalışmamızdaki sonuçlara göre oldukça düşüktür (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

Rhizobium cinsi bakterilerle yapmış olduğu çalışmasında Baysak (2008); *R. phaseoli* suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini %0.5 şeker konsantrasyonunda 0.0199-0.0518 g/l, %1 şeker konsantrasyonunda 0.0246-0.0554 g/l ve %1.5 şeker konsantrasyonunda 0.0271-0.0562 g/l olarak bulmuştur. İnkübasyon süresini 96 saate çıkardığında ise bu değerler 0.4858-1.1280 g/l arasında olmuştur. Çalışmamızda olduğu gibi inkübasyon süresinin arttırılması değerleri oldukça yükseltmiştir. Yüksek inkübasyon süresi sonunda bulduğu PHB üretim değerleri çalışmamızdaki PHB üretim değerleriyle benzerlik göstermektedir (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

Türkoğlu (2009), *R. phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini, %0.5 melas konsantrasyonunda 0.0584-0.6121 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.2434-0.5536 g/l ve %1.5 melas konsantrasyonunda 0.2639-0.6170 g/l arasında bulmuştur. Araştırmamızdaki değerler bu çalışmadaki PHB üretim değerleriyle benzerlik göstermektedir (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

Küçük ve ark.(2016), çalışmalarında *Rhizobium* izolatlarının YMB'de 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0.100-0.428 g/l arasında bulmuşlardır. Bu sonuçlar çalışmamızdaki değerlere göre biraz düşüktür (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

Saadettin ve ark. (2001), yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus* cinsine ait bakterilerin Nutrient Broth besiyerinde hücre kuru ağırlıklarına göre PHB

üretimlerini 0.030-0.310 g/l arasında bulmuşlardır. Bu değerlerin araştırmamızdaki sonuçlara göre biraz düşük olduğu görölmektedir (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

Çalışmasında *Bacillus* cinsi bakterileri kullanan Ediz (2004); 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini, *B. subtilis* F1 suşunda %0.5 melas konsantrasyonunda 0.03-0.06 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.00-0.04 g/l ve %1.5'lik melas konsantrasyonunda 0.01-0.25 g/l arasında bulmuştur. *B. megaterium* P1 suşunda ise %0.5 melas konsantrasyonunda 0.00-0.03 g/l, %1 melas konsantrasyonunda 0.02-0.05 g/l ve %1.5 melas konsantrasyonunda 0.03-0.08 g/l arasında tespit etmiştir. Bu değerler araştırmamızdaki sonuçlara göre oldukça düşüktür (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

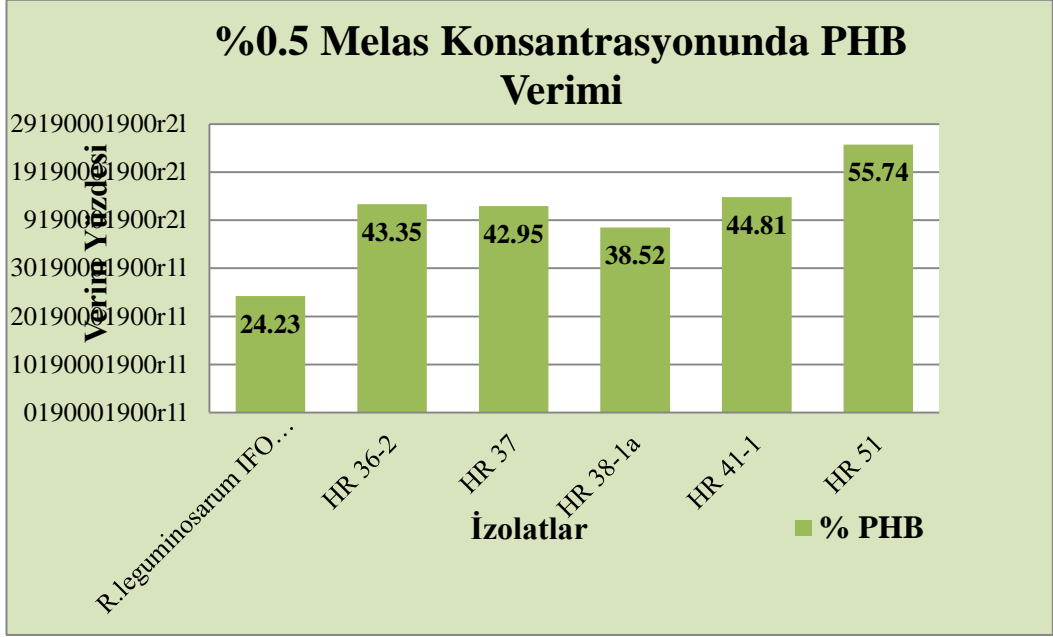
Halofilik bakterilerin PHB üretimlerini inceleyen Dinigüzel (2007); %6 oranında NaCl içeren Nutrient Broth besiyerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimlerini 0.022-0.519 g/l arasında bulmuştur. Bu sonuçların çalışmamızdaki değerlere oldukça yakın olduğu görölmektedir (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

4.5. PHB Verimlerinin Belirlenmesi

Suşların PHB üretimleri tespit edildikten sonra elde edilen değerler kullanılarak PHB verimleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.12. İzolatların %0.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıklarına Göre % PHB Verimleri

<i>İzolat No:</i>	<i>Kuru ağırlık (g/l)</i>	<i>PHB üretimi (g/l)</i>	<i>% PHB</i>
<i>R. leguminosarum</i> <i>IFO 14778</i>	0.553	0.134	24.23
<i>HR 36-2</i>	1.151	0.499	43.35
<i>HR 37</i>	1.050	0.451	42.95
<i>HR 38-1a</i>	1.433	0.552	38.52
<i>HR 41-1</i>	0.328	0.147	44.81
<i>HR 51</i>	0.748	0.417	55.74

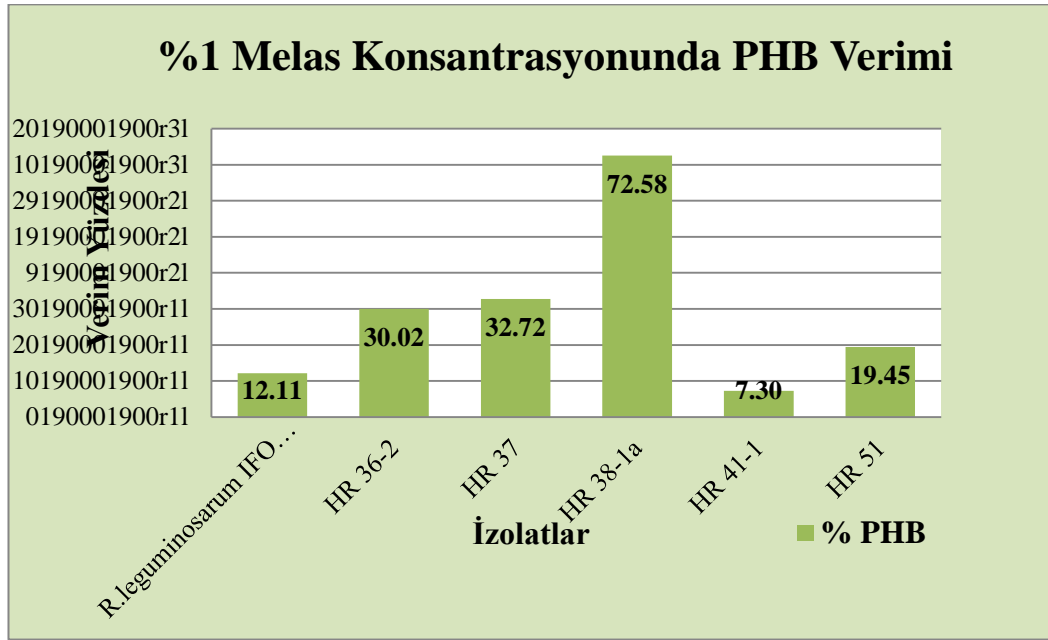


Şekil 4.1. İzolatların %0.5 melas konsantrasyonunda % PHB verimleri

Tablo 4.12. ve Şekil 4.1. incelendiğinde; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %0.5 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi %24.23 olarak bulunmuştur. Aynı zamanda tablo ve şekil’de de görüldüğü üzere; bütün izolatlarda PHB veriminin kontrol suşundan daha yüksek hatta yaklaşık 2 kat daha fazla orana sahip olduğu saptanmıştır. İzolatların kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri %38.52- %55.74 olarak belirlenmiştir. HR 51 kod’lu izolat %55.74 verimle en yüksek değere sahipken, %38.52 ile HR 38-1a kod’lu izolat en düşük PHB verimine sahiptir.

Tablo 4.13. İzolatların % 1 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıklarına Göre % PHB Verimleri

<i>İzolat No:</i>	<i>Kuru ağırlık (g/l)</i>	<i>PHB üretimi (g/l)</i>	<i>% PHB</i>
<i>R. leguminosarum IFO 14778</i>	1.635	0.198	12.11
<i>HR 36-2</i>	2.441	0.733	30.02
<i>HR 37</i>	2.451	0.802	32.72
<i>HR 38-1a</i>	1.036	0.752	72.58
<i>HR 41-1</i>	0.657	0.048	7.30
<i>HR 51</i>	1.259	0.245	19.45



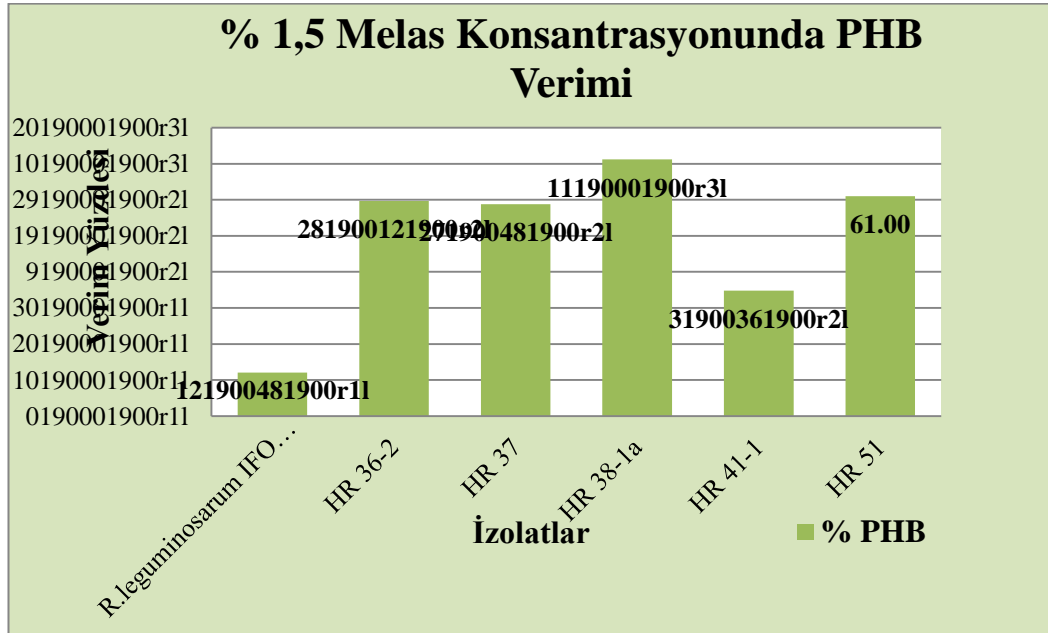
Şekil 4.2. İzolatların % 1 melas konsantrasyonunda % PHB verimleri

Tablo 4.13. ve Şekil 4.2.'deki veriler incelendiğinde; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %1 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi %12.11 olarak belirlenmiştir. Bu oranlara bakıldığında; izolatlardan biri hariç (HR 41-1) diğerlerinin kontrol suşundan daha yüksek PHB verimine sahip olduğu

tespit edilmiştir. İzolatların kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri %7.30- %72.58 arasındadır. HR 38-1a kod'lu izolat %72.58 verimle en yüksek değere sahipken, %7.30 ile HR 41-1 kod'lu izolat en düşük PHB verimine sahiptir.

Tablo 4.14. İzolatların %1.5 Melas Konsantrasyonunda Hücre Kuru Ağırlıklarına Göre % PHB Verimleri

<i>İzolat No:</i>	<i>Kuru ağırlık (g/l)</i>	<i>PHB üretimi (g/l)</i>	<i>% PHB</i>
<i>R. leguminosarum IFO 14778</i>	2.525	0.305	12.07
<i>HR 36-2</i>	1.193	0.712	59.68
<i>HR 37</i>	1.246	0.733	58.82
<i>HR 38-1a</i>	0.894	0.637	71.25
<i>HR 41-1</i>	1.125	0.392	34.84
<i>HR 51</i>	0.931	0.568	61.00



Şekil 4.3. İzolatların %1.5 melas konsantrasyonunda % PHB verimleri

Tablo 4.14. ve Şekil 4.3.'de belirtildiği üzere; *R. leguminosarum* IFO 14778 suşunun %1.5 melas konsantrasyonundaki hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi %12.07 olarak bulunmuştur. Ayrıca tablo ve şekil incelendiğinde; tüm izolatlarda PHB veriminin kontrol suşundan oldukça yüksek yaklaşık 3 ile 6 kat daha fazla orana sahip olduğu saptanmıştır. İzolatlarının kuru ağırlıklarına göre PHB verimleri %34.84- %71.25 arasında hesaplanmıştır. HR 38-1a kod'lu izolat %71.25 verimle en yüksek değere sahipken, %34.84 ile HR 41-1 kod'lu izolat en düşük PHB verimine sahiptir.

R. leguminosarum IFO 14778 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi; %0.5 melas konsantrasyonunda en yüksek (%24.23), %1.5 melas konsantrasyonunda en düşük (%12.07) olarak belirlenmiştir. İzolatların hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimi, %0.5 melas konsantrasyonunda %38.52- %55.74, %1 melas konsantrasyonunda %7.30- %72.58, %1.5 melas konsantrasyonunda %34.84- %71.25 arasında değişiklik göstermiştir (Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Yaptığı çalışmada Mercan (2002), YMB'de 48 saatlik inkübasyon sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, *R. phaseoli* suşlarında %23.08- %28.70, *R. leguminosarum* suşlarında %14.22- %25.85, *R. cicer* suşlarında %5.71- %16.71, *R. meliloti* suşlarında %7.82- %39.25 ve *B. japonicum* suşlarında %5.37- %34.43 olarak bulmuştur. Araştırmacının tespit ettiği maksimum ve minimum PHB verimlerinin çalışmamızdaki sonuçlara göre düşük olduğu görülmektedir (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Uruç (2006), yapmış olduğu çalışmasında; YMB'de 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, *R. phaseoli* suşlarında %17.23- %26.04 olarak ve *R. leguminosarum* suşlarında ise %8.69- %18.91 arasında bulmuştur. Bu sonuçlar çalışmamızdaki değerlere göre düşüktür (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Rhizobium cinsi bakterilerle yapmış olduğu çalışmasında Baysak (2008), *R. phaseoli* suşlarının 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, %0.5 şeker konsantrasyonunda %16.08- %26.84, %1 şeker konsantrasyonunda %17.15- %20.00 ve %1.5'lik şeker konsantrasyonunda %19.28-

%25.01 olarak bulmuştur. 96 saatlik inkübasyon süresinde ise %25.80- %31.16 arasında bulmuştur. Araştırmamızdaki sonuçlar bu çalışmadaki PHB verimlerine uygunluk göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda oldukça yüksek PHB verimleri de elde edilmiştir (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Yine başka bir çalışmada Türkoğlu (2009), *R.phaseoli* suşlarının 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, %0.5 melas konsantrasyonunda %5.90- %37.93, %1 melas konsantrasyonunda %8.50- %52.65 ve %1.5 melas konsantrasyonunda %9.51- %60.23 arasında bulmuştur. Araştırmamızdaki değerler bu çalışmadaki hücre kuru ağırlık değerlerine benzerlik göstermekte olup yüksek PHB verimleri de bulunmaktadır (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Küçük ve ark., (2016) çalışmalarında *Rhizobium* izolatlarının YMB'de 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini %12.00- %77.30 arasında bulmuşlardır. Elde ettikleri maksimum ve minimum PHB verimleri, çalışmamızdaki sonuçlar ile uygunluk göstermektedir (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Başka bir çalışmada ise Saadettin ve ark., (2001) yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus* cinsine ait bakterilerin Nutrient Broth besiyerinde hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, %4.93- %57.40 arasında bulmuşlardır. Araştırmamızdaki sonuçlar bu çalışmadaki PHB verimlerine uygunluk göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda oldukça yüksek PHB verimleri de elde edilmiştir (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Yaptığı çalışmada *Bacillus* cinsi bakterileri kullanan Ediz (2004); 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, *B. subtilis* F1 suşunda %0.5 melas konsantrasyonunda %29.47- %84.71, %1 melas konsantrasyonunda %15.91- %81.33 ve %1.5 melas konsantrasyonunda %52.00- %82.00 arasında bulmuştur. *B. megaterium* P1 suşunda ise farklı inkübasyon süreleri sonunda %0.5 melas konsantrasyonunda %30.00- %42.50, %1 melas konsantrasyonunda %45.26- %82.50 ve %1.5 melas konsantrasyonunda %35.00-

%72.00 arasında tespit etmiştir. Araştırmamızdaki sonuçlar bu çalışmadaki değerlere yakındır (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

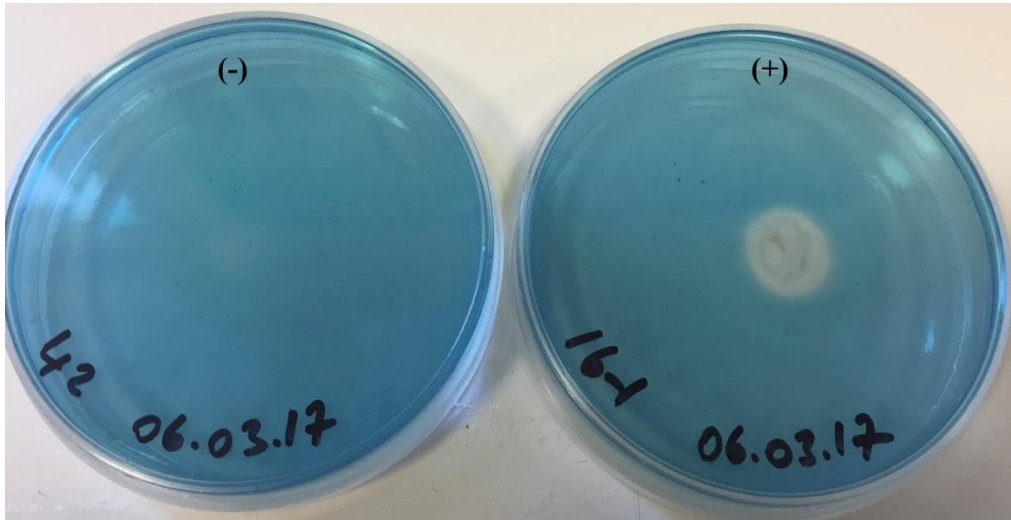
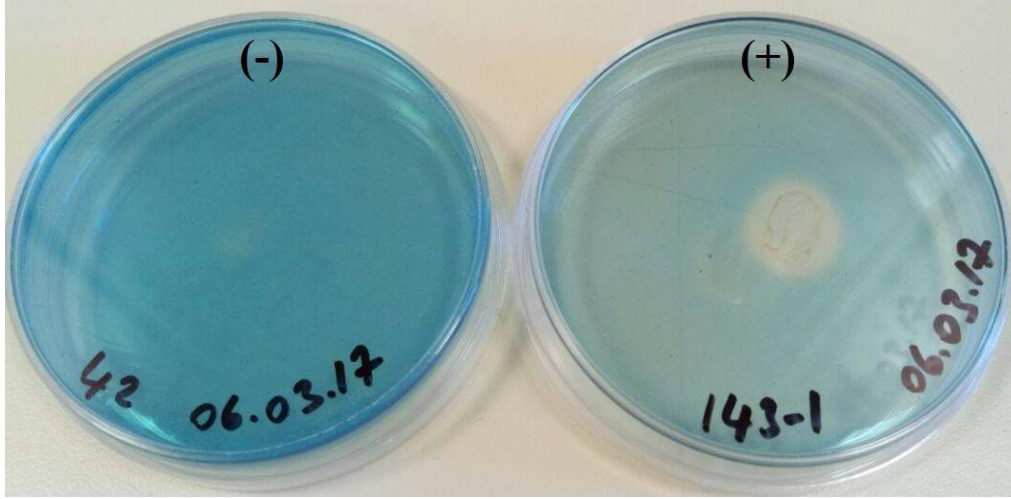
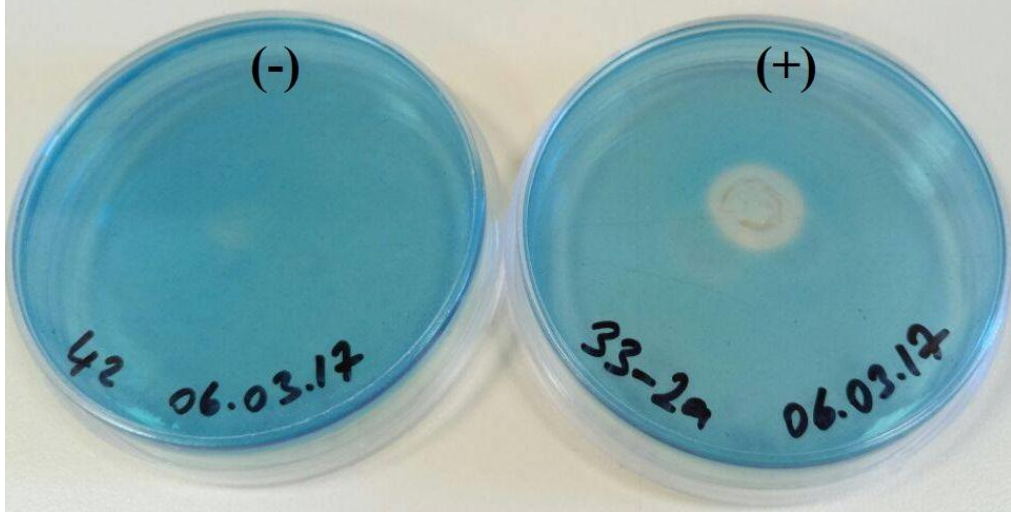
Halofilik bakterilerin PHB üretimlerini inceleyen Dinigüzel (2007), %6 oranında NaCl içeren Nutrient Broth besiyerinde 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimlerini, %2.09- %29.48 arasında bulmuştur. Bu sonuçlar çalışmamızdaki değerlere göre oldukça düşüktür (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Nair ve ark., (1993) yaptıkları çalışmada; *Rhizobium* türlerinin PHB içeriklerindeki farklılığın izolata spesifik olduğunu bildirmektedirler. Buradan yola çıkılarak bizim çalışmamızda türler, Kırşehir merkez ve ilçelerinin farklı lokasyonlarındaki yabancı bitkilerden elde edildiği için görülen farklılığın hem izolatlardan hem de lokasyonlardan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

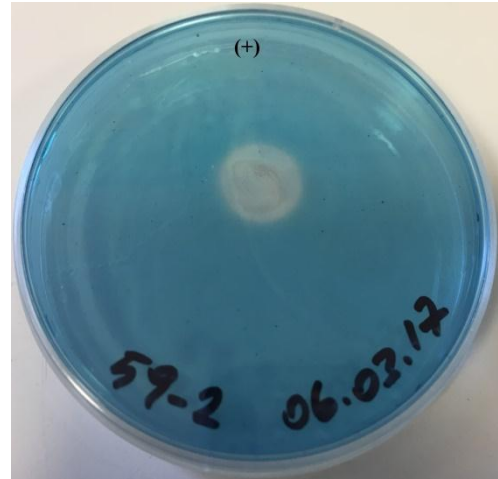
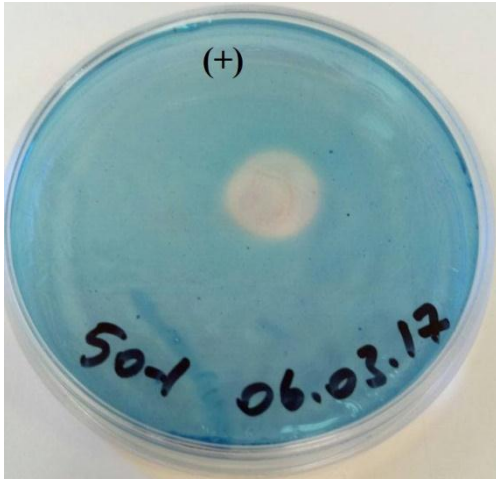
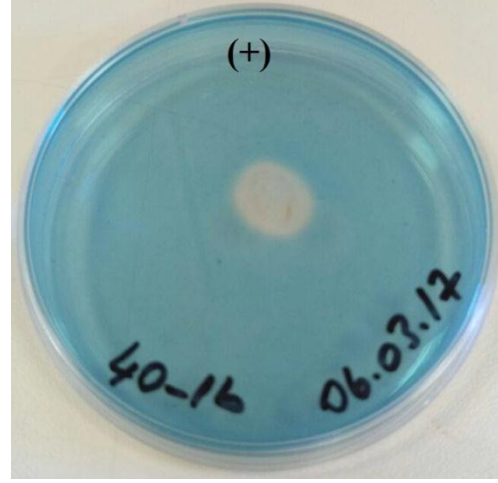
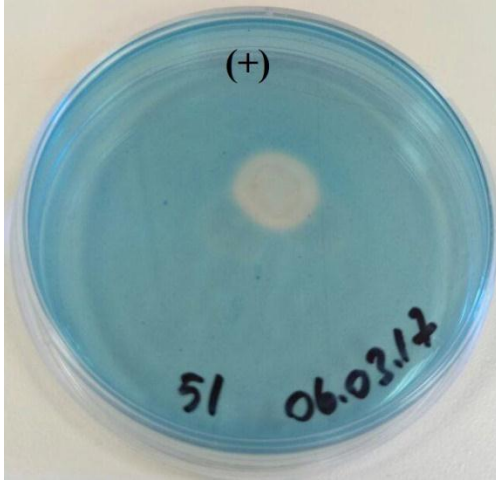
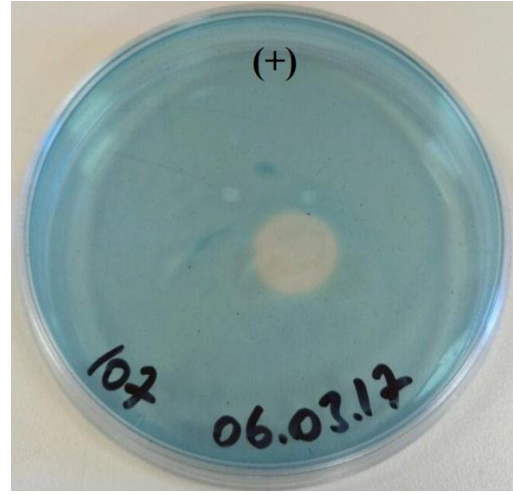
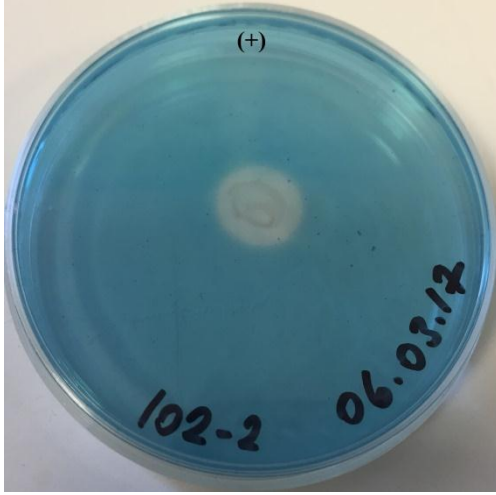
4.6. İzolatlarda Siderofor Varlığının Tespiti

Çalışmamızda *Rhizobium* spp. izolatlarının siderofor tayinleri Chrome Azurol Sulphate (CAS) Agar kullanılarak Schwyn ve Neilands'ın (1987) yöntemine göre yapılmış ve 56 izolattan 6 adetinin siderofor üretmediği (zon oluşturamayan), diğer 50 adet izolatın ise siderofor ürettiği (zon oluşturan) tespit edilmiştir. Çalışma 2 paralel şekilde yapılmış olup zon çapları ölçülerek ortalamaları alınmıştır. Zon çapları 8.5-12.5 mm arasında bulunmuş ve Tablo 4.15.- 4.16.'da gösterilmiştir.

Rhizobium spp. izolatlarının CAS Agar'da oluşturdukları zonlar Resim 4.3.'de gösterilmiştir.



Resim 4.3. İzolatların CAS Agar'da oluşturdukları zonlar



Resim 4.4. İzolatların CAS Agar'da oluşturdukları zonlar (Devamı)

Tablo 4.15. İzolatların Siderofor Üretme Potansiyelleri ve Zon Çapları

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel (mm)</i>	<i>2.paralel (mm)</i>	<i>Ortalama (mm)</i>
<i>HR 1</i>	13	11	12
<i>HR 2-1</i>	-	-	-
<i>HR 2-2</i>	14	9	11.5
<i>HR 4</i>	14	9	11.5
<i>HR 7a</i>	12	8	10
<i>HR 7b</i>	10	10	10
<i>HR 14</i>	11	11	11
<i>HR 16-1</i>	12	12	12
<i>HR 16-2</i>	13	11	12
<i>HR 19</i>	11	9	10
<i>HR 28</i>	9	10	9.5
<i>HR 29</i>	11	8	9.5
<i>HR 31</i>	13	11	12
<i>HR 33-2a</i>	12	12	12
<i>HR 33-2b</i>	11	10	10.5
<i>HR 33-3a A</i>	9	9	9
<i>HR 36-1</i>	13	10	11.5
<i>HR 36-2</i>	11	10	10.5
<i>HR 37</i>	10	9	9.5
<i>HR 38-1a</i>	12	10	11
<i>HR 38-2</i>	11	10	10.5
<i>HR 40-1a</i>	13	10	11.5
<i>HR 40-1b</i>	14	11	12.5
<i>HR 40-2</i>	11	9	10
<i>HR 41-1</i>	10	9	9.5
<i>HR 41-2</i>	11	8	9.5
<i>HR 42</i>	-	-	-
<i>HR 43-2</i>	10	8	9

Tablo 4.16. İzolatların Siderofor Üretme Potansiyelleri ve Zon Çapları (Devamı)

<i>İzolat No:</i>	<i>1.paralel (mm)</i>	<i>2.paralel (mm)</i>	<i>Ortalama (mm)</i>
<i>HR 45-1</i>	10	9	9.5
<i>HR 48-1</i>	13	8	10.5
<i>HR 48-2</i>	-	-	-
<i>HR 49</i>	12	10	11
<i>HR 50-1</i>	12	12	12
<i>HR 50-2</i>	15	10	12.5
<i>HR 51</i>	10	11	10.5
<i>HR 52-2</i>	9	8	8.5
<i>HR 59-1a</i>	11	10	10.5
<i>HR 59-1b</i>	13	11	12
<i>HR 59-2</i>	12	11	11.5
<i>HR 102-1</i>	14	10	12
<i>HR 102-2</i>	11	11	11
<i>HR 103</i>	10	8	9
<i>HR 104-2b</i>	-	-	-
<i>HR 105-2</i>	10	8	9
<i>HR 106-1</i>	12	8	10
<i>HR 106-2</i>	13	8	10.5
<i>HR 107</i>	12	11	11.5
<i>HR 109</i>	11	9	10
<i>HR 111</i>	10	9	9.5
<i>HR 123</i>	10	9	9.5
<i>HR 124</i>	11	8	9.5
<i>HR 125</i>	-	-	-
<i>HR 132-2a</i>	-	-	-
<i>HR 138-1</i>	10	10	10
<i>HR 143-1</i>	11	13	12
<i>HR 143-2</i>	11	8	9.5

Tablo 4.15-4.16’da görüldüğü üzere; HR 1 (12 mm), HR 16-1 (12 mm), HR 16-2 (12 mm), HR 31 (12 mm), HR 33-2a (12 mm), HR 40-1b (12.5 mm), HR 50-1 (12 mm), HR 50-2 (12.5 mm), HR 59-1b (12 mm), HR 102-1 (12 mm), HR 143-1 (12 mm) izolatları önemli derecede siderofor üreterek, CAS Agar’da sarı-turuncu zon oluşturmuşlardır. Buna karşılık HR 2-1, HR 42, HR 48-2, HR 104-2b, HR 125, HR 132-2a izolatları ise zon oluşturmamış ve dolayısıyla siderofor üretmedikleri tespit edilmiştir. Ayrıca bu izolatlar dışındaki diğer 39 izolatta önemli derecede siderofor ürettikleri ölçülen zon çapından belirlenmiştir.

Güney (2014), çalışmasında tüm suşlarda CAS Agar’da siderofor üretimi saptamış ve en yüksek siderofor üretimini *Bacillus cereus* DSM 4312 bakterisinde (8 mm), en düşük siderofor üretimini ise *B. cereus* / *B. thuringiensis* A77/K-1 (4 mm) bakterisinde tespit etmiştir. Araştırmamızdaki sonuçlar bu çalışmadaki değerlere göre oldukça yüksektir (Tablo 4.15-4.16).

Brevibacillus laterosporus’un siderofor üretimini ve çeşitli metallerin (Fe, Co, Ni, Hg) siderofor üretimine etkilerini araştıran Aydın (2014), CAS analizi ile siderofor varlığını tespit ettiği *B. laterosporus* 01/İK3-2 bakterisinde zon çapınının 10 mm olduğunu bildirmiştir. Araştırmacının tespit ettiği zon çapı çalışmamızda elde ettiğimiz zon çaplarına uygunluk göstermektedir (Tablo 4.15-4.16).

Sezen (2017), Erzurum ve çevresindeki tuz içeriği yüksek habitatlardan izole ettiği halofilik rizobakterilerde siderofor üreten izolatların zon çaplarınınını 0.5-1.2 cm arasında bulmuştur. Çalışmada ölçülen zon çapları tespit ettiğimiz ölçümler ile uygunluk göstermektedir (Tablo 4.15-4.16).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

PHB, kök nodül bakterilerinde ve prokaryotik mikroorganizmalarda karbon depo polimeri olup yaygın olarak bulunmaktadır (Ratcliff ve ark., 2008; Trainer ve Trevor, 2006). PHB ve PHA biyolojik olarak ayrışabilen biyoplastikler oldukları için son yıllarda ticari olarak da önem kazanmışlardır (Gao ve ark., 2011). PHB granülleri çok sayıda mikroorganizmada zarla çevrili şekilde olup bu granüllerin mikroorganizmalarda karbon ve enerji kaynağı olarak rol aldıkları bildirilmektedir (Nair ve ark., 1993; Küçük ve ark., 2016).

Yaptığımız çalışmada, yabancı baklagil bitkilerinden daha önce izole edilmiş *Rhizobium* spp. izolatlarının, PHB üretim verimlerinin ve siderofor üretimlerinin belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla ilk olarak toplam 56 adet *Rhizobium* spp. izolatına morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal testler uygulanarak izolatların özellikleri belirlenmiştir.

İzolatların PHB üretme yeteneklerini belirlemek amacıyla Nile Blue A boyası kullanılmış ve 56 izolattan 43 adetinin PHB üretebildiği saptanmıştır. Bu 43 izolattan 5 adeti (HR 36-2, HR 37, HR 38-1a, HR 41-1, ve HR 51) seçilmiş ve *Rhizobium leguminosarum* IFO 14778 kontrol suşu ile birlikte melasın %0.5, %1, %1.5'lik konsantrasyonlarında 96 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre kuru ağırlığı, PHB üretimi, PHB verimleri incelenmiştir.

R. leguminosarum IFO 14778 suşunun hücre kuru ağırlığı %0.5'lik melas konsantrasyonunda en düşük (0.553 g/l), %1.5'lik melas konsantrasyonunda en yüksek (2.525 g/l) bulunurken, izolatlarının hücre kuru ağırlıkları ise; %0.5'lik melas konsantrasyonunda 0.328-1.433 g/l, %1' lik melas konsantrasyonunda 0.657-2.451 g/l ve %1.5'lik melas konsantrasyonunda 0.894-1.246 g/l olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.6.-4.7.-4.8.).

R. leguminosarum IFO 14778 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB üretimi %0.5'lik melas konsantrasyonunda en düşük (0.134 g/l), %1.5'lik melas konsantrasyonunda en yüksek (0.305 g/l) bulunurken, izolatlarının hücre kuru ağırlıklarına göre PHB üretimi ise; %0.5'lik melas konsantrasyonunda 0.147-0.552

g/l, %1'lik melas konsantrasyonunda 0.048- 0.802 g/l ve %1.5'lik melas konsantrasyonunda 0.392-0.733 g/l olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.9.-4.10.-4.11.).

R. leguminosarum IFO 14778 suşunun hücre kuru ağırlığına göre PHB verimi; %0.5'lik melas konsantrasyonunda en yüksek (%24.23), %1.5'lik melas konsantrasyonunda en düşük (%12.07) olarak belirlenirken, izolatların hücre kuru ağırlıklarına göre PHB verimi, %0.5'lik melas konsantrasyonunda %38.52 - %55.74, %1'lik melas konsantrasyonunda %7.30- %72.58 ve %1.5'lik melas konsantrasyonunda %34.84- %71.25 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

Sonuç olarak uygulanan 3 konsantrasyon karşılaştırıldığında en yüksek verim %1.5 melas konsantrasyonunda elde edilmiştir. İzolatlar açısından bir değerlendirme yapıldığında ise yüksek verim değerlerinin HR 38-1a'ya ait olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.12, 4.13., 4.14., Şekil 4.1., 4.2., 4.3.).

İnkübasyon süresi ve kullandığımız melas çalışmamızda yüksek oranda verim elde etmemizde önemli bir unsur olmuştur. Ayrıca yapılan bir çalışmada PHB üretimindeki farklılığın *Rhizobium* spp.'den kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Nair ve ark., 1993). Bu bağlamda bizim çalışmamızın da bu fikri destekler nitelikte olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde; PHB üretiminde kullanılan *Rhizobium* bakterilerinin kültür bitkilerinden veya topraktan izole edildiği, yabani baklagil bitkilerinden izole edilen *Rhizobium* bakterilerinden PHB üretimiyle ilgili çalışmaların sayısının birkaç tane ile sınırlı olduğu görülmektedir. Bizim çalışmamız bu yönüyle farklılık göstermekte olup, kullanılan *Rhizobium* bakterileri yabani baklagil bitkilerinden ve Kırşehir yöresinin farklı lokalitelerinden izole edilmiştir. Bu yönüyle araştırmamız özgün bir değer taşımakta olup Kırşehir ilinde yapılan ilk çalışmadır. Ayrıca bu alanda yapılacak çalışmalara ışık tutacağı da öngörülmektedir.

Çalışmamızda *Rhizobium* spp. izolatlarının siderofor üretme potansiyelleri Schwyn ve Neilands yöntemine göre CAS Agar kullanılarak araştırılmış ve toplam 56 adet izolattan 50 adetinin siderofor üretebildiği belirlenmiştir. Çalışma 2 paralel şekilde yapılarak zon çapları ölçülmüş ve ortalamaları alınmıştır. Zon çapları 8,5

mm-12,5 mm arasında bulunmuş; HR 1 (12 mm), HR 16-1 (12 mm), HR 16-2 (12 mm), HR 31 (12 mm), HR 33-2a (12 mm), HR 40-1b (12.5 mm), HR 50-1 (12 mm), HR 50-2 (12.5 mm), HR 59-1b (12 mm), HR 102-1 (12 mm), HR 143-1 (12 mm) izolatlarının önemli derecede siderofor ürettiği tespit edilmiştir (Tablo 4.15-4.16.).

Son yıllarda petrol kaynaklarının azalması ve buna bağlı olarak fiyatlarının yükselmesinden dolayı biyoteknolojik yöntemlerle üretilen biyoplastikler oldukça önem kazanmıştır. Ayrıca biyoplastiklerin biyoçözünür ve biyoyumlu olmalarından dolayı çevre dostu olmaları onları daha cazip hale getirmektedir. Bu çalışmalarda ise bakterilerin kullanılmasının diğer organizmalara göre daha avantajlı olduğu bilinmekte olup bunlar kullanılarak çeşitli koşullarda daha yüksek verim elde etmek amacıyla araştırmalar yoğun olarak sürmektedir. Bu bağlamda yukarıda belirtilen özelliklere sahip türlerin biyoplastik üretim çalışmalarında kullanılmasının ekosistemin dengesinin düzenlenmesine de büyük katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, H.; Kikkawa, Y.; Iwata,T.; Aoki, H.; Akehata,T.; Doi, Y. *Microscopic Visualization on Crystalline Morphologies of Thin Films for Poly[(R)-3-Hydroxybutyric Acid)] and Its Copolymer*, Polymer, **2000**, 41, 867-874.
- Adıguzel, A.; Ögütcü, H.; Baris, O.; Karadayi, M.; Gulluce, M.; Sahin, F. *Genetic diversity of Rhizobium Strains Isolated from Wild Vetch Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey*, Romanian Biotechnological Letters, **2010**, 15(1),5017-5024.
- Ahn, W.S.; Park, S.J.; Lee, S.Y. *Production of Poly(3-hydroxybutyrate) by Fedbatch Culture of Recombinant Escherichia coli with A Highly Concentrated Whey Solution*, Applied and Environmental Microbiology, **2000**, 66, 8, 3624-3627.
- Al, G. *Nanopartikül İlaveli PLA ve PHB Biyokompozitlerinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Bartın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Orman Endüstri Mühendisliği Anabilim Dalı, **2015**, 1-156.
- Ali, E. *Bazı Rhizobium Bakterilerinin Melas Besiortamında Poli-βhidroksibütirat (PHB) Üretimi İle Protein Profil ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2002**, 1-76.
- Anderson, A.J.; Dawes, E.A. *Occurrence, Metabolizm, Metabolic Role and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Microbiol. Reviews, **1990**, 54, 4, 450-472.
- Anğ-Küçükler, M.; Küçükbasmacı, Ö.; Tekin, M.; Akbulut, D.; Büyükbaba-Boral, Ö.; Anğ, Ö. *Üropatojen Klebsiella Suşlarının Serotiplendirilmesi, Siderofor Sentezi, Serum Direnci ve Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz Tayini*, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, **2002**, 33:265-269.
- Aslım, B.; Yüksekdağ, Z.N.; Beyatlı, Y. *Determination of PHB Growth Quantities of Certain Bacillus Species Isolated from Soil*, Turkish Electronic Journal of Biotechnology, Special Issue, **2002**, 24-30.

Ateş, M.; Ekmekçi, S. *Pancar Melası Kültüründe Pseudomonas extorquens DSM 1337 ve Azotobacter chroococcum (TEM)'dan PHB Üretimi*, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, **2001**, 25, 3, 61, 70.

Atıcı, Ö.; Öğütçü, H.; Algur., Ö.F. *Effect of Putrescine on Inducing Symbiosis in Chickpea and Vetch Inoculated with Standard or Wild Strains of Rhizobium Symbiosis*, **2005**, 38, 163-174.

Aydın, B. *Brevibacillus laterosporus Türündeki Siderofor Üretiminin Belirlenmesi ve Civa, Nikel, Kobalt, Demir Ağır Metalleri Varlığındaki Değişimi*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Gebze, **2014**, 1-68.

Aydın, G. *Çeşitli Gıda Ürünlerinden İzole Edilen Pseudomonas Türlerinde Siderofor Varlığı, Serum Direnci, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Üretimi ve Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2010**, 1-104.

Aydın, M. *Bakteri İdentifikasyonunda Kullanılan Standart, Biyokimyasal ve Fizyolojik Testler*, Güneş Yayınevi Ankara, **2004**, 91-110.

Aydoğmuş, D. *Aerobik Dinamik Beslemeli Aktif Çamurun Farklı Karbon/Azot Oranlarında PHB Depolama Yeteneğinin Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, **2011**, 1-65.

Bahar, H. *Topraktan İzole Edilen Bakterilerden PHB Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2003**, 1-69.

Barham, P.J.; Keller, A.; Otun, E.L.; Holmes, P.A. *Crystallization and Morphology of A Bacterial Thermoplastic: Poly-3-Hydroxybutyrate*, *Journals of Materials Science*, **1984**, 19, 2781-2794.

Baysak, İ.M. *Bazı Rhizobium Türlerinin Polihidroksibütirat (PHB) Verimleri Üzerine Farklı Ortam Şartlarının Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, **2008**, 1-54.

Beaulieu, M.; Beaulieu, Y.; Melinard, J.; Pandian, S.; Goulet, J. *Influence of Ammonium Salts and Cane Molasses on Growth of Alcaligenes eutrophus and Production of Polyhydroxybutyrate*, Applied and Environmental Microbiology, **1995**, 61(1): 165-169.

Beck, D.P.; Materon, L.A.; Afandi, F. *Practical Rhizobium-Legume Technology Manual*, International Center for Agricultural Research in The Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria, **1993**, 1-54.

Benoit, T.G.; Wilson, G.R.; Baugh, C.L. *Fermentation During Growth and Sporulation of Bacillus thuringiensis*, HD-1. Let. Appl. Microbiol., **1990**, 10: 15-18.

Bergeron, R.J.; Brittenham, G.M. (Editors). *The Developmentn of Iron Chelators for Clinical Use*, CRC Press, Boca Raton, Fla, **1993**.

Bertrand, J.L.; Ramsay, B.A.; Ramsay, J.A.; Chavarie, C. *Biosynthesis of Poly- β -Hydroxyalakoates from Pentoses by Pseudomonas pseudoflava*, Applied and Environmental Microbiology, **1990**, 56, 10, 3133-3138.

Beyatlı, Y. *Mikrobiyal Termoplastik Üretimi*, Kükem Dergisi, **1996**, 19, 2, 23-32.

Bluhm, T.L.; Hamer, G.K.; Sundararajan, P.R. *Isodiorporism in Poly(β -Hydroxybutyrate-Co- β -Hydroxyvalerate) Copolyesters*, Polymer Prepr., **1998**, 29, 603.

Bonartseva, G.A.; Myskina, V.L.; Zagreba, E.D. *Poly-C-hydroxybutyrate Content in Cells of Various Rhizobium Species During Growth with Different Carbon and Nitrogen Sources*, Microbiol., **1994**, 63, 1, 45-48.

Bordes, P.; Pollett, E.; Averous, L. *Nano-biocomposites: Biodegradable Polyester/Nanoclay Systems*, Progress in Polymer Science, **2009**, 34: 125-155.

Bormann, E.J.; Leissner, M.; Beer, B. *Growht-Associated Production of PolyHydroxybutyric Acid by Azotobacter beyerninckii from Organic Nitrojen Substrates*, Appl. Microbiol, Biotechnol, **1998**, 49, 84-88.

Boukhalfa H.; Crumbliss A.L. *Chemical Aspects of Siderophore Mediated Iron Transport*, BioMetals, **2002**, 15(22), 325-339.

Brandl, H.; Gross, R. A.; Lenz, R. W.; Lloyd, R.; Fuller, R. C. *The Accumulation of Poly-3-Hydroxyalkanoates in Rhodobacter sphaeroides*, Arch. Microbiol., **1991**, 155, 337-340.

Braunegg, G.; Lefebeure, G.; Genser, K.F. *Polyhydroxyalkanoates, Biopolyesters from Renewable Resources: Physiological and Engineering Aspects*, Journal of Biotechnology, **1998**, 65, 127-161.

Byers BR.; Arceneaux JEL. *Microbial Iron Transport: Iron Acquisition by Pathogenic Microorganisms*, Met Ions Biol Syst, **1998**, 35: 37-66.

Chen, G.Q.; König, K.H.; Lafferty, R.M. *Occurrence of Poly-D(-)-3-Hydroxyalkanoates in The Genus Bacillus*. FEMS Mic. Lett., **1991**, 84, 174-176.

Chowdhury, B.; John, M. *Thermal Evaluation of Transgenic Cotton Containing Polyhydroxybutyrate*, Thermochemica Acta., **1998**, 313: 43-53.

Cleasby, T.G. *The feeding value of molasses*, Proceedings of The South African, Sugar Technologists, Association, **1963**, 3, 113-117.

Çelebi, Ö. *Eurygaster integriceps (Put.) (Hemiptera: Scutelleridae)'in Bakteriyal Florasının ve Mikrobiyal Mücadele Etmenlerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, **2012**, 1-83.

Çetin-Karaca, Ü. *Konya Yöresinde Yetiştirilen Kuru Fasulyeden İzole Edilen Rhizobium Bakterilerinin Etkinliklerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, Konya, **2010**, 1-148.

- Datta, B.; Chakrabartty, P.K. *Siderophore Biosynthesis Genes of Rhizobium spp. Isolated from Cicer arietinum L.* DOI 10.1007/s13205-013-0164-y, 3 Biotech, **2014**, 4: 391–401.
- Dave, H.; Ramakrishna, C.; Desai, J.D. *Production of Polyhydroxybutyrate by Petrochemical Activated Sludge and Bacillus spp.* IPCB-403. Ind. Jour. Exp. Bio., **1996**, 34: 216-219.
- Dhul, M.; Suneja, S.; Dadarwal, K.R. *Role of Siderophores in Chickpea (Cicer arietinum L.) - Rhizobium Symbiosis*, Microbiological Research, **1998**, 153, 1, 47-53.
- Diaz de Villegas, M.E. *Biotechnological Production of Siderophores*, Soil Biol, **2007**, 12: 199-231.
- Dinigüzel, Ö. *Türkiye' den PHB Üreticisi Halofilik Bakterilerin İzolasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2007**, 1-49.
- Dunlop, W.F.; Robards, A.W. *Ultrastructural Study of Poly-β-Hydroxybutyrate Granules from Bacillus cereus*, J. of Bacteriol, **1973**, 114, 3, 127-1280.
- Dut, E. *Farklı Ortam Koşullarında Bacillus thuringiensis RSKK 381'in Üreme ve Biyoplastik (PHB) Üretiminin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, **2015**, 1-147.
- Ediz, N. *Bazı Bacillus Cinsi Bakterilerin Melas Besiortamında PHB Üretimleri, Toplam Protein Profilleri ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, **2004**, 1-112.
- Ediz, N.; Beyatlı, Y. *Bacillus Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi*, Gazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, **2005**, 3, 5, 1-22.
- El-Sukhon, SN. *Identification and Characterization of Klebsiellae Isolated from Milk Products in Jordan*, Food Control, **2002**, 20: 225–230.

Ensari, Y. *Alcaligenes latus phbCAB (poli-3-hidroksibütirikasit biyosentez) Genleri Klonlanmış Escherichia coli'de PHB Üretimi ve İzolasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2012**, 1-92.

Erdem, B. *Mikrobiyal Sideroforlar ve Biyoteknolojideki Uygulama Alanları*, *The Black Sea Journal of Sciences*, **2013**, 3(8):77-88.

Ergene, E. *Bazı Bacillus Suşları ile Melastan Ekzopolisakkarit Üretim Koşullarının Optimizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, **2015**, 1-56.

Findlay, R.H.; White, D.C. *Polymeric Beta-Hydroxyalkanoates from Environmental Samples and Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol*, **1983**, 45 (1): 71-78.

Gerhardt, P. *Manual of Methods for General Bacteriology*, *American Society for Microbiology*, Washington, D.C., **1981**, 791.

Gill, P.R.; Barton L.L.; Scoble M.D.; Neilands J.B. *A High Affinity Iron Transport System of Rhizobium meliloti May Be Required for Efficient Nitrogen Fixation in Planta*, In: Chen Y, Hadar Y (eds) *Iron Nutrition and Interactions in Plants*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, **1991**, pp 251–257.

Guerinot, M.L. *Iron uptake and Metabolism in The Rhizobia/ Legume Symbioses*, *Plant Soil*, **1991**, 130: 199–209.

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. *Evaluation of Soil Gram-Negative Bacteria Yielding Polyhydroxyalkanoic Acids from Carbohydrates and Propionic Acid*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **1996**, 45, 785-791.

Gouda, M.K.; Swellam, A.E.; Omar, S.H. *Production of PHB by a Bacillus megaterium Strain Using Sugarcane Molasses and Corn Step Liquor as Sole Carbon and Nitrogen Sources*, *Microbiological Research*, **2001**, 156 (3): 201-207.

Göksungur, Y. *Melastan Laktik Asit Üretiminde Farklı Üretim Tekniklerinin Kullanılabilirliği ve Ortam Şartlarının Optimizasyonu*, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, **1998**, 19-63.

Grimm, S.S.; Jones, J.W.; Boote, K.J.; Herzog, D.C. *Modeling The Occurrence of Reproductive Stages After Flowering for Four Soybean Cultivars*, Published in Agron, J., **1994**, 86, 31-38.

Güney, E. *Bacillus sp. Türlerinde Siderofor Üretimi ve Bacillus cereus DSM 4312'de Siderofor Üretiminin Optimizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, **2014**, 1-75.

Gür, K. *Toprak Biyolojisi*, Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Konya, **1987**, Yayın No:10.

Hajikhani, R. *Poli- β -Hidroksibütirat Üretimi*, Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, Ankara, **2003**, 1, 10-18,

Hammer, N.D.; Skaar, E.P. *Molecular Mechanisms of Staphylococcus aureus Iron Acquisition*, Annu. Rev. Microbiol, **2011**, 65: 129–147.

Holmes, P.A. *Applications of PHB-A Microbially Produced Biodegradable Thermoplastics*, Phys. Technol., **1985**, 16: 32-36.

Holt J.G.; Krieg, N.R.; Sneath H.A.; Staley J.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, **1994**, (9 nd ed): p 5–98.

Howard DH. *Acquisition, Transport and Storage of Iron by Pathogenic Fungi*, Clin Microbiol Rev, **1999**, 12 (3): 394-404.

Hsu, C.W.; Li, Y.C.; Chu, C.Y.; Liu, C.M.; Wu, S.Y. *Feasibility Evaluation of Fermentative Biomass-derived Gas Production from Condensed Molasses in A*

Continuous Two-Stage System for Commercialization, International Journal Of Hydrogen Energy, **2014**, 39, 19389 -19393.

Huston, W.M.; Potter, A.J.; Jennings, M.P.; Rello, J.; Hauser, A.R.; McEwan, A.G. *Survey of Ferroxidase Expression and Siderophore Production in Clinical Isolates of Pseudomonas aeruginosa*, J.Clin.Microbiol., **2004**, 42(6): 2806-2809.

İpek-Erbey, Y. *Bazı Curculonidae (Coleoptera) Familyası Bireylerinin Sindirim Sistemlerindeki Bakteri Florasının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, **2015**, 1-63.

Jafari Barani, A. *Acipenser persicus Borodin, 1897 Larvalarının Poli- β -hydroxybutyrate (PHB) ile Zenginleşmiş Artemia ile Beslenmesi Üzerine Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Su Ürünleri Yetiştiricilik Anabilim Dalı, **2014**, 1-74.

Jan, S.; Roblot, C.; Courtois, J.; Courtois, B.; Barbotin, J. N.; Seguin, J. P. *¹NMR Spectroscopic Determination of Poly-3-Hydroxybutyrate Extracted From Microbial Biomass*, Enzyme and Microbial Technol., **1996**, 18, 195-201.

Jha, C.K.; Saraf, M. *Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A review*, E3 Journal of Agricultural Research and Development, **2015**, 5, 108-119.

Jordan, D.C. Family III. *Rhizobiaceae*, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, William and Wilkins, Baltimore, London, **1984**, 235–244 s.

Jung, Y.M.; Lee, Y.H. *Utilization of Oxidative Pressure For Enhanced Production Of Poly- β -Hydroxybutyrate and Poly (3- Hydroxybutyrate-3-Hydroxyvalerate)*, **2000**.

Kaleli, İ.; Demir, M.; Cevahir, N.; Yıldırım, U. *Klebsiella Suşlarında Siderofor ve Serum Direncinin Araştırılması*, İnfeksiyon Dergisi, **2006**, 20(2): 97-101.

Kantar, F.; Elkoca, E.; Ögütçü, H.; Algur, Ö.F. *Chickpea Yields in Relation to Rhizobium Inoculation from Wild Chickpea at High Altitudes*, J. Agronomy Crop Science, **2003**, 189, 291-297.

Karaboz, İ.; Umay, F.B. *Pseudomonas extorquens'den PHB Üretiminde Farklı Karbon Kaynaklarının Etkisi*, XII. Ulusal Biyoloji Kongresi, **1994**.

Karaman, M.Y.E. *Endüstriyel Atıklarla Kirlenmiş Alanlardan Petrol Türevi Hidrokarbonların Biyodegradasyonunu Yapan Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Bazı Özelliklerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ahi Evran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, **2017**, 1-159.

Katırcıoğlu, H.; Aksöz, N. *Tek Hücre Proteini Eldesi ve Bunun Drosophila Gelişimine Etkisi*, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, **1996**, 16 (2): 37-44.

Khanna, S.; Srivastava, A.K. *Recent Advances in Microbial Polyhydroxyalkanoates*. Process Biochemistry, **2005a**, 40: 607-619.

Khanna, S.; Srivastava, K.A. *Statistical Media Optimisation Studies for Growth and PHB Production By Ralstonia eutropha*, Process Biochemistry, **2005b**, 40, 6, 2173-2182.

Kıvanç, M.; Yücel, E. *Çevre ve İnsan*, Anadolu Üniversitesi Yayınları, **1998**.

Kızıloğlu, F.T. *Erzurum Yöresinde Üretilen Yeşil Mercimek (Lens clunaris) Bitkisinin Etkili Rhizobium leguminosarum Suşlarının Seçimi Üzerine Bir Araştırma*, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Dergisi, **1992**, 23 (1), 39-52.

Kızıloğlu, F.T. *Toprak Mikrobiyolojisi ve Biyokimyası*, Atatürk Üniversitesi Yayınları, Erzurum, **1995**, Yayın No: 180.

Kim, B.S. *Production of Poly(3-hydroxybutyrate) from Inexpensive Substrates*, Enzyme and Microbial Technology, **2000**, 27, 774-777.

Küçük, Ç.; Cevrehi, C.; Avcı, M. *Vicia Sativa L. 'nin Kök Nodül Bakterilerinin Poli-β-Hidroksibütirik Asit (PHB) Üretimi*, Harran Üniv Vet Fak Derg, **2016**, 5 (1) 57-60.

- Labuzek S.; Radecka, I. *Biosynthesis of PHB Tercopolymer by Bacillus cereus UW85*, J. Appl. Microbiol., **2001**, 90, 353-357.
- Lafferty, R.M.; Korsatko, B.; Korsatko, W. *Microbial Production of Poly- β -Hydroxybutyric Acid*. *Biotechnology*, edited by H.J. Rehm and G. Reed, Volume 6b, Special Microbial Processes, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, **1988**.
- Laine, M.H.; Karwoski, M.T.; Raaska, L.B.; Sandholm, T.M. *Antimicrobial Activity of Pseudomonas spp. Against Food Poisoning Bacteria and Moulds*, Letter in Applied Microbiology, **1996**, 22: 214-218.
- Lee, S.Y.; Yim, K.S.; Chang, H.N.; Chang, Y.K. *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, **1994**, 32, 203-211.
- Lee, S.Y. *Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Biotechnology and Bioengineering, **1996**, 49, 1-14.
- Lillo, J.G.; Rodriguez-Valera, F. *Effects of Culture Conditions on Poly- β -Hydroxybutyric Acid Production by Haloferax Mediterranei*, Applied and Environmental Microbiology, **1990**, 56, 8, 2517-2521.
- Liu, F.; Li, W.; Ridgway, D.; Gu, T. *Production of Poly- β -Hydroxybutyrate or Molasses by Recombinant Escherichia coli*, Biotechnology Letters, **1998**, 20(4): 345-348.
- Lootz, D.; Behrend, D.; Kramer, S.; Freier, T.; Haubold, A.; Benkiesser, G.; Schmitz, K.P.; Becher, B. *Laser Cutting Influence on Morphological and Physicochemical Properties of Polyhydroxybutyrate*, Biomaterials, **2001**, 22, 2447-2452.
- Luengo, M.J.; Garcia,B.; Sandoval,A.; Naharro,G.; Olivera, R.E. *Bioplastics from Microorganisms*, Current Opinion in Microbiology, **2003**, 6, 251-260.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. *Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi*, Palme Yayıncılık.

Madison, L.L.; Huisman, G.W. *Metabolic Engineering of Poly(3Hydroxyalkanoates): from DNA to Plastics*, Mic. Mol. Bio. Reviews, **1999**, 63: 21-53.

Mahmoud, A.L.; ABD-Alla, M.H. *Siderophore Production by Some Microorganisms and Their Effect on Bradyrhizobium-Mung Bean Symbiosis*, Int. J. of Agriculture&Biology, **2001**, 3(2):157-162.

Manjanatha, M.G.; Loynachan, T.E.; Atherly, A.G. *Tn5 Mutagenesis of Chinese Rhizobium fredii for Siderophore Overproduction*, Soil Biology and Biochemistry, **1992**, 24, 2, 151-155.

Martinez J.S.; Franklin J.N.C.; Mann E.L.; Martin J.D.; Haygood M.G.; Butler A. *“Structure and Membrane Affinity of A Suit of Amphiphilic Siderophores Produced by A Marine Bacterium”* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **2003**, 100, 3554-3759.

Matur, S. *Farklı Yaşlardaki Rhizobium Kültürleri ile Aşılamanın Mercimek Bitkisinin Verim Unsurları Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Anabilim Dalı, Erzurum, **2009**, 1-63.

McCool, G.J.; Fernandez, T.; Li, N.; Cannon, M.C. *Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body growth and Proliferation in Bacillus megaterium*, FEMS Microbiol. Lett., **1996**, 138, 41-48.

McKirahan, J.N. Jr. *Processing Research and Development of „Green“ Polymer Nanoclay Composites Containing A Polyhydroxybutyrate, Vinyl Acetates, and Modified Montmorillonite Clay*. Doktora Tezi, Indiana State University, Terre Haute, **2013**, 151 s.

Mercan, N. *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, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2002**, 1-174.

- Mercan, N.; Beyatlı Y. *Bacillus sphaericus* Suşlarının Poli- β -Hidroksibütirat Üretimlerinin İncelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, **2001**, 25, 2, 1-7.
- Mercan, N.; Beyatlı, Y. *Bakteriyal Biyoplastikler ve Kullanım Potansiyelleri*, *Orlab On- Line Mikrobiyoloji Dergisi*, **2004**, 2, 4, 2-18.
- Mercan, N.; Aslım, B.; Yüksekdağ, Z.N.; Beyatlı, Y. *Production of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) by Some Rhizobium Bacteria*, *Turk J. Biol.*, **2002**, 26, 215-219.
- Miethke M.; Marahiel M.A. *Siderophore-Based Iron Acquisition and Pathogen Control*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2007**, 71(55), 413-451.
- Mona, K.G.; Azza, E.S.; Sanaa, H.O. *Production of PHB by a Bacillus megaterium Strain Using Sugarcane Molasses and Corn Steep Liquor as Sole Carbon and Nitrogen Sources*, *Microbiol. Res.*, **2001**, 156, 201–207.
- Nair S.; Jha PK.; Babu CR.; *Variation in Poly- β -Hydroxybutyrate Synthesis in Rhizobia Reflect Strain Differentiation and Temperature Regulation*, *JBasic Microbiol*, **1993**, 33, 35-39.
- Nakata, H.; Tamura, M.; Shintani, T.; Gomi, K. *Evaluation of Baker's Yeast Strains Exhibiting Significant Growth on Japanese Beet Molasses and Compound Analysis of The Molasses Types*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2014**, 117, 715-719.
- Nassif, X.; Sansonetti, P.J. *Correlation of The Virulence of Klebsiella pneumoniae K1 and K2 with The Presence of A Plasmid Encoding Aerobaktin*, *Infection and Immunity*, **1986**, 54: 603-608.
- Nickerson, K.W.; Zarnick W.J.; Kramer, V.C. *Poly- β -Hydroxybutyrate Parasporal Bodies in Bacillus thuringiensis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **1981**, 12: 327-331.
- O'Hara, G.W.; Hartzook, A.; Bell, R.W.; Loneragan, J.F. *Response to Bradyrhizobium Strain of Peanut Cultivars Grown Under Iron Stress*, *J Plant Nutr*, **1988**, 11: 6–11.

Orhan, F. *Doğu Anadolu Bölgesindeki Tuzlu Topraklardan İzole Edilen Tuza Dayanıklı Bakterilerin Moleküler Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, **2013**, 1-201.

Ostle, A.G.; Holt, J.G. *Nile Blue A as A Fluorescent Stain for Poly-β-Hydroxybutyrate*, Applied and Environmental Microbiology, **1982**, 44, 1, 238-241.

Öğütçü, H.; Adıgüzel, A.; Güllüce, M.; Karadayı, M.; Şahin, F. *Molecular Characterization of Rhizobium Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum-Turkey*, Romanian Biotechnological Letters, **2009**, 14(2), 4294-4300.

Öğütçü, H.; Algur., Ö.F.; Elkoca, E.; Kantar, F. *The Determination of Symbiotic Effectiveness of Rhizobium Strains Isolated from Wild Chickpeas Collected from High Altitudes in Erzurum*, Turk. J. Agric. For., **2008**, 32, 241-248.

Öğütçü, H.; Algur, Ö.F.; Gulluce, M.; Adıguzel, A. *Mikrobiyal Gübre Olarak Kullanılan ve Yabani Bitkilerden İzole Edilen Rhizobium Suşlarının Farklı Sıcaklık Şartlarında Azot Bağlama Potansiyellerinin Araştırılması*, BİBAD; Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi, **2010**, 3(1): 47-52, ISSN: 1308-3961, www.nobel.gen.tr.

Öğütçü, H.; Kasımoğlu C.; Elkoca, E. *Influence of Rhizobium Strains Isolated from Wild Chickpeas on the Growth and Symbiotic Performance of Chickpea (Cicer arietinum L.) under Salt Stress*, Turk. J. Agric. For., **2010**, 34, 361-371.

Öğütçü, H.; Algur, Ö. F. *Yabani Baklagil Bitkilerinden, Mikrobiyal Gübre Olarak Kullanılan Rhizobium spp. Bakterilerinin İzolasyonu*, Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, **2014**, 2(4):181-184.

Öğütçü, H. *Yabani Baklagil Bitkilerinden İzole Edilen Rhizobium Türlerinin Kültür Bitkilerinde Nodül Oluşturma ve Azot Bağlama Potansiyellerinin Araştırılması*, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, **2000**, 1-111.

Özdemir, N.; Erkmen, J. *Yenilenebilir Biyoplastik Üretiminde Alglerin Kullanımı*, *The Black Sea Journal of Sciences*, **2013**, 3(8):89-104.

Özdemir, Ş. *Aerobik Dinamik Beslemeli Sistemlerde Farklı Döngü Sürelerinin PHB Üretim Verimine Etkisinin Değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, **2012**, 1-62.

Özey, R. *Çevre Sorunları*, Aktif Yayınevi, İstanbul, **2001**, 21.

Paez, M.; Martinez-Nieto, P.; Bernal-Castillo, J. *Siderophore Producing Pseudomonas as Pathogenic Rhisoctonia Solani and Botrytis Cinerea Antagonists*, *Universitas Scientiarum*, **2005**, 10 (1): 65-74.

Page, W.J. *Production of Polyhydroxyalkanoates by Azotobacter vinelandii UWD in Beet Molasses Culture*, *FEMS Microbiology Reviews*, **1992b**, 103, 149-158.

Page, W.J. *Suitability of Commercial Beet Molasses Fractions as Substrates for Polyhydroxalkanoate Production by Azotobacter vinelandii UWD*, *Biotechnol. Lett.*, **1992a**, 14, 5, 385-390.

Page, W.J. *Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Natural Biodegradable Plastics with a Great Future*, *Can. J. Microbiol.*, 141 (Suppl.1), **1995**, 1-3.

Pierce, L.; Schroth, M.N. *Detection of Pseudomonas Colonies That Accumulate Poly-β-Hydroxybutyrate on Nile Blue A Medium*, *Plant Disease*, **1994**, 78, 7, 683-685.

Podschun, R.; Ullman, U. *Klebsiella spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors*, *Clinical Microbiology Review*, October, **1998**, 589–603.

Rajendran, N.; Puppala, S.; Sneha Raj, M.; Ruth Angeeleena B.; Rajam, C. *Seaweeds Can Be a New Source for Bioplastics*, *Journal of Pharmacy Research*, **2012**, 5 (3): 1476-1479.

Ratledge, C.; Dover, L.G. *Iron Metabolism in Pathogenic Bacteria*, Annu. Rev. Microbiol, **2000**, 54: 881–941.

Ratul. S.; Nabaneeta, S.; Robert. S.D.; Lorelle, L.B. *Microbial Siderophores. J. Basic Microbiol*, **2012**, 52: 1– 15.

Raymond K.M.; Denz E. “*Biochemical and Physical Properties of Siderophores*”, Iron Transport in Bacteria, **2004**, 10, 3-17.

Reddy, M.M.; Misra, M.; Mohanty, A.K. *Bio-Based Materails in The New Bio-Economy*, American Institue of Chemical Engineering (AIChE), Chemical Engineering Proses (CEP), **2012**, www.aiche.org/cep (online erişim Haziran 2012).

Saadettin, S.; Mercan, N.; Mumcu, Z.N.; Beyatlı, Y. *Bacillus Cinsi Bakterilerin Poli- β -Hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin İncelenmesi*, Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi, **2001**, 25, 2, 67-76.

Savaşçı, Ö.T.; Uyanık, N.; Akovalı, G. *Plastikler ve Plastik Teknolojisi*, Çantay Kitabevi, **1998**, 505s.

Saygılı, B. *Asenaften ve Floren Biyoparçalama Kapasitesindeki Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanılanması ve Parçalama Etkinliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, **2012**, 1-81.

Sayyed, R.Z.; Badgujar, M.D.; Sonawane, H.M.; Mhaske, M.M.; Chincholkar, S.B. *Production of Antimicrobial Iron Chelators (siderophores) By Fluorescent Pseudomonads*, Indian Journal of Biotechnology, **2005**, 4: 484-490.

Schwyn, B.; Neilands, J.B. *Universal Chemical Assay for the Detection and Determination of Siderophores*, Analytical Biochemistry, **1987**, 160: 47-56.

Seyer, A. *Bazı Mantarlarda Siderofor Varlığının Gösterilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2009**, 1-97.

Sezen, A. *Bitki Büyümesine Teşvik Edici Halofilik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Buğday Tarımında Kullanılma Potansiyellerinin Belirlenmesi, Doktora Tezi*, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Botanik Biyoloji Bilim Dalı, Erzurum, **2017**, 1-212.

Shen, Q.; Hui Lin, H.; Wanga, Q.; Fan, X.; Yang, Y.; Zhao, Y. *Sweetpotato Vines Hydrolysate Promotes Single Cell Oils Production of Trichosporon Fermentans in High-Density Molasses Fermentation*, Bioresource Technology, **2015**, 176, 249–256.

Skaar, E.P. *The Battle for Iron Between Bacterial Pathogens and Their Vertebrate Hosts. PLoS Pathog*, **2010**, 6,e1000949.

Srikanth, S.; Swathi, M.; Tejaswini, M.; Sharmila, G.; Muthukumaran, C.; Jaganathan, M.K.; Tamilarasan, K. *Statistical Optimization of Molasses Based Exopolysaccharide and Biomass Production by Aureobasidium pullulans MTCC 2195*, Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, **2014**, 3, 7–12.

Şama, E. *Öğretmen Adaylarının Çevre Sorunlarına Yönelik Tutumları*, Gazi Üniversitesi, Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, Ankara, **2003**, 23, 2, 107.

Taidi, B.; Anderson, A.; Dawes, E.A.; Byrom, D. *Effect of Carbon Source and Concentration on The Molecular Mass of Poly(3-Hydroxybutyrate) Produced by Methylobacterium extorquens and Alcaligenes eutrophus*, Appl. Microbiol. Biotechnol., **1994**, 40: 786-790.

Tal, S.; Okon, Y. *Production of the Reserve Material Poly-β-Hydroxybutyrate and its Function in Azospirillum brasilense Cd*, Can. J. Microbiol., **1985**, 31, 608-613.

Tamdoğan, N. *Bacillus subtilis Kültürlerinde PHB (Poli-β-hidroksibütirat) Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Manisa, **2008**, 1-60.

Tamer, A.Ü.; Uçar, F.; Ünver, E.; Karaboz, İ.; Bursalıoğlu, M.; Oğultekin, R. *Mikrobiyoloji Laboratuvar Klavuzu*, 3. Baskı, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Teksirler Serisi No:55, İzmir, **1989**, 260.

Tanaka, K.; Katamune, K.; Ishizaki, A. *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., **1993**, 15, 12, 1217-1222.

Tavernier, P.; Portais, J.C.; Saucedo, J.E.N.; Courtuis, J.; Courtios, B.; Barbotion, J.N. *Exopolysaccharide and Poly- β -Hydroxybutyrate Coproduction in Rhizobium meliloti Strains*, Appl. Environ. Microbiol., **1997**, 63, 1, 21-26.

Tekin, E. *İzmir Çamaltı Tuzlası'ndan Polibetahidroksibütirat (PHB) Üreticisi Halofilik Mikroorganizmaların İzolasyonu, Fenotipik Karakterizasyonu ve PHB Üretim Verimliliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, **2008**, 1-121.

Tekin, M. *Üropatojen Klebsiella Suşlarında Tür Tayini, Siderofor Tipleri, Fimbriya Tipleri ve Serum Direncinin Araştırılması*, Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul, **1998**, 3.

Temiz, A. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **1994**, 266.

Temiz, A. *Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri*, Hatipoğlu Yayıncılık, Ankara, **2010**, 277.

Thomashow L.S.; Weller D.M. *Current Concepts in The Use of Introduced Bacteria for Biological Disease Control: Mechanisms and Antifungal Metabolites*, Molecular Plant-Microbe Interactions, **1995**, 1, 187-235.

Tokiwa, Y.; Calabia, P.B. *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)*, Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan, **2004**, 305-8566.

Türk, A. *Çevre Nedir*, Anadolu Üniversitesi Yayınları, **1998**.

Türkoğlu, Z. *Bazı Rhizobium Bakterilerinin Melas Besiortamında Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Üretimlerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, **2009**, 1-36.

Uçar, F.; Öner, M. *Nohut Kök Nodüllerinden İzole Edilen Rhizobium Suşlarının Morfolojik ve Biyokimyasal Karakterleri*, Doğa Turk Biyol(Genetik Mikrobiyoloji, Moleküler Biyoloji, Sitoloji), **1988**, 12 (2), 135-141.

Uğur, A.; Şahin, N.; Beyatlı, Y. *Accumulation of Poly-β-Hydroxybutyrate in Streptomyces Species During Growth With Different Nitrogen Sources*, Turk. J. Biol., **2002**, 26: 171-174.

Uruç, A. *Bazı Rhizobium Türlerinin Poli-β-hidroksibütirat (PHB) Üretimleri Üzerine Bir Araştırma*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, **2006**, 1-26.

Ülgen, H. *Bakteri Kültürü ve Aşılamanın Baklagil Bitkilerin Ürün Miktrana ve Azot Kapsamına Etkisi*, Köy İşleri Bakanlığı, Toprak Su Genel müdürlüğü. Toprak ve Gübre Araştırma Enstitüsü, Ankara, **1980**, Yayın No:94.

Vachee, A.; Mossel, D.A.A.; Leclerc, H. *Antimicrobial Activity Among Pseudomonas and Related Strains of Mineral Water Origin*, J.of Applied Microbiology, **1997**, 83: 652-658.

Vincent, J.M. *A Manual For The Practical Study of The Root-Nodule Bacteria*. IBP. Handbook. No:15. Blackwell Scientific Publications. Oxford. England. **1970**.

Vroman, I.; Tighzert, L. *Biodegradable Polymers*. *Materials*, **2009**, 2: 307-344.

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

Williams, S.F.; Martin, D.P. *Applications of PHAs in Medicine and Pharmacy*, *Medicine*, **1996**, 1-38.

Winkelman, G.; Dreschel H. *Microbial Siderophores. In: Rehm HJ, Reed G (Eds.) Biotechnology*, VCH Publishers, Weinheim, **1997**, pp. 199-245.

Winkelmann, G. *Microbial Siderophore Mediated Transport*. Biochem. Soc. Trans, **2002**, *30*: 691–696.

Witholt, B.; Kessler, B. *Perspectives of Medium Chain Length Poly(hydroxyalkanoates), a Versatile set of Bacterial Bioplastics*, Current Opinion in Biotechnology, **1999**, *10*: 279-285.

Wu, Q.; Huang, H.; Hu, G.; Chen, J.; Ho, K.; Chen, G. *Production of Poly-3hydroxybutyrate by Bacillus sp. Jma5 Cultivated in Molasses Media*, Antonie Van Leeuwenhoek, **2001**, *80*: 111-118.

Yalçın, E. *Etlerden İzole Edilen Klebsiella Türlerinde Siderofor Oluşumu, Serum Direnci, Hemolitik Aktivite ve Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretiminin Belirlenmesi*, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, **2010**, 1-80.

Yang, H.; Chaowagul, W.; Sokul, P. A. *Siderophore Production by Pseudomonas pseudomallei*, Infection and Immunity, **1991**, *59* (3): 776-780.

Yao, Z.Y.; Kan, F.L.; Wang, E.T.; Wei, G.H.; Chen, W.X. *Characterization of Rhizobia That Nodulate Legume Species of The Genus Lespedeza and Description of Bradyrhizobium yuanmingense sp. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **2002**, *52* (6): 2219–2230.

Yıldız, K.; Sipahioğlu, Ş.; Yılmaz, M. *Çevre Bilimi*, Gündüz Eğitim ve Yayıncılık. Ankara, **2000**.

Yıldız, M. *Van Gölü Havzasındaki Bazı Yabani Mercimek ve Nohut Bitki Kök Nodüllerinden Rhizobium Bakterilerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Van, **2007**, 1-76.

Yılmaz, M. *Bazı Bacillus Türlerinin Ekzopolisakkarid (EPS) Üretimi*. Niğde Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, **2006**.

Yılmaz, M.; Beyatlı, Y. *Biyoplastik Poli-β-Hidroksibütirat*, Ortaokul On- Line Mikrobiyoloji Dergisi, **2003**, 1, 9, 1-33.

Yılmaz, M. *Toprakta İzole Edilen Bacillus Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2003**.

Yüce, Ç. *Bacillus megaterium 'dan Elde Edilen PHB (Poli-β-hidroksibütirat) ile Sulu Çözeltideki Tekstil Boyarmadde ve Cr⁶⁺ İyonu Gideriminin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, **2014**, 1-87.

Yüksekdağ Z.N.; Beyatlı Y.; Aslım B. *Determination of Poly-β-Hydroxybutyrate (PHB) Production by Some Mesophilic and Thermophilic Lactic Acid Bacteria*, Turk J Biol, **2003**, 27: 37-42.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : AVŞAR, Hülya
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 11.11.1991 KIRŞEHİR
e-mail : hul_ya_avsar@hotmail.com

Eğitim

Lise : Akpınar Lisesi
Lisans : Ahi Evran Üniversitesi
Lisans Derecesi : 2009-2013 Biyoloji Bölüm Üçüncüsü
Yüksek Lisans : Ahi Evran Üniversitesi
Yüksek Lisans Tezi : Yabani Baklagil Bitkilerinden İzole Edilen *Rhizobium* spp. Türlerinin Siderofor Üretimi ve Melas Besiortamında PHB (Poli-β-Hidroksibütirat) Üretim Veriminin Araştırılması

Yabancı Dil : İngilizce