



***Bacillus subtilis* BAKTERİSİNİN ÜREMESİNE ORTAM KOŞULLARININ
ETKİSİ**

Berna ALICI

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2018

Berna ALICI tarafından hazırlanan “*Bacillus subtilis* BAKTERİSİNİN ÜREMESİNE ORTAM KOŞULLARININ ETKİSİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Mübeccel ERGUN

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Başkan: Prof. Dr. H. Canan CABBAR

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Üye: Doç. Dr. Suna ERTUNÇ

Kimya Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

Tez Savunma Tarihi: 25/12/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,
- bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Berna ALICI

25/12/2018

Bacillus subtilis BAKTERİSİNİN ÜREMESİNE ORTAM KOŞULLARININ ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Berna ALICI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2018

ÖZET

Günümüzde plastiklerin çevreye verdiği sorunlar neticesinde doğa dostu plastik üretimine yönelinmiş ve biyobozunur plastik olan PHB üretimi önem kazanmıştır. *Bacillus* cinsi bakteriler PHB üretimi açısından önemli bir yere sahiptir ve bazı *Bacillus* suşlarının hücre kuru kütlelerinin %50 den fazlasını PHB şeklinde biriktirebildiği bildirilmektedir. Biyoteknolojik prosesler için bakterinin üreme miktarı, hızı ve ortama adaptasyon süresi büyük önem taşımaktadır. Prosesin maliyetine ve sürdürülebilirliğine bu değerler ele alınarak karar verilmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun büyümesine ortam şartlarının etkisi incelenmiş, büyüme miktarı ve hızını artırmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Atık maddeler denenerek ekonomik büyüme ortamı oluşturulmaya çalışılmıştır. Böylelikle PHB üretiminden önceki basamak olan bakteri üremesi için uygun koşullar araştırılmıştır. Bakterinin üremesi için uygun olan inkübasyon süresinin (48 ve 72 saat), inkübasyon sıcaklığının (30 ve 37°C), pH'ın (3,7,8,9) ve karıştırma hızının (karıştırmasız ortam, 375 ve 650 rpm) etkisi incelenmiştir. Üreme için uygun olduğu görülen şartlarda farklı karbon (mannoz, gliserol, ksiloz) ve azot (amonyum sülfat, malt ekstraktı, glisin) kaynaklarının, doğal ve yapay gübrelerin, farklı melas konsantrasyonlarının ve bor metalinin etkisi araştırılmıştır. Bakteriyel büyüme için uygun inkübasyon süresi 48 saat, sıcaklığı 30°C, pH 7, karıştırma hızı 650 rpm olarak belirlenmiştir. Bu şartlarda farklı karbon kaynaklarında en yüksek biyokütle birikimi (0,023 g/L) ve en yüksek üreme hızı (0,264 saat⁻¹) mannoz ortamında görülmüştür. Farklı azot kaynaklarında ise en yüksek biyokütle birikimi (0,016 g/L) ve en yüksek üreme hızı (0,548 saat⁻¹) glisin varlığında gözlenmiştir. Doğal besi ortamı toprak olan *B. subtilis* ATCC 6633 suşuna tarımsal alanlarda kullanılan organik ve yapay gübrelerin etkisi incelenmiş ve spesifik üreme hızı en yüksek kimyasal gübrede, biyokütle birikimi en yüksek organik gübrede gözlenmiştir. Farklı melas konsantrasyonlarının etkisi incelenmiş, en yüksek üreme hızı ve en yüksek biyokütle birikimine % 6 melas içeren ortamda rastlanmıştır. Ülkemiz topraklarında yüksek miktarlarda bulunan ve bir toprak bakterisinin büyümesinde önemli yeri olan bor metali konsantrasyonu araştırılmış ve en yüksek spesifik hız ile biyokütle birikimine 14 ppm bor konsantrasyonunda ulaşılmıştır.

Bilim Kodu : 91203
Anahtar Kelimeler : *Bacillus subtilis*, Üreme hızı, Biyokütle, Optimizasyon, Bor
Sayfa Adedi : 65
Danışman : Prof. Dr. Mübeccel ERGUN

EFFECTS OF DIFFERENT CONDITIONS ON THE GROWTH OF *Bacillus subtilis*

BACTERIA

(M. Sc. Thesis)

Berna ALICI

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

December 2018

ABSTRACT

Nowadays, as a result of the problems caused by the plastics to environment, PHB production, which is biodegradable plastic, has gained importance. In biotechnological processes, amount of biomass and rate of growth of the bacterium and period of adaptation to the medium are really important values. These values ensure the cost and sustainability of the process. In this study, effects of medium conditions on the growth of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 were examined and amount of biomass, rate of growth were tried to improve. To provide an economic growth medium for bacterium, waste materials were studied. Thus, suitable conditions for bacterial growth which are the steps before PHB production were investigated. To determine the appropriate conditions of bacterial production, effects of incubation time (48 and 72 hours), incubation temperature (30 and 37°C), pH (3, 7, 8, 9) and rate of stirring (no stirring, 375 and 650 rpm) were investigated. After optimizing these values, effects of different carbon (mannose, glycerol, xylose) and nitrogen (ammonium sulphate, malt extract, glycine) sources, natural and artificial fertilizers, different concentrations of molasses and boron metal were searched. For bacterial growth, appropriate incubation time, incubation temperature, pH, rate of stirring were determined as 48 h, 30°C, 7, 650 rpm, respectively. In this conditions, maximum amount of biomass (0,023 g/L) was seen in mannose, maximum rate of growth (0,264 h⁻¹) was seen in xylose source. For different nitrogen sources, maximum amount of biomass (0,016 g/L) and maximum rate of growth (0,548 h⁻¹) were seen in glycine source. In searching natural and artificial fertilizer effects, maximum amount of biomass was in natural fertilizer and maximum rate of growth was in artificial fertilizer. After searching effects of different molasses concentrations, maximum amount of biomass and maximum rate of growth were in 6 % molasses concentration. Boron metal, which exist high amounts in our country lands and are important in the growth of bacterium, was searched. Maximum amount of biomass and maximum rate of growth was seen in 14 ppm boron concentration.

Science Code : 91203

Key Words : *Bacillus subtilis*, Rate of growth, Biomass, Optimization, Boron

Page Number : 65

Supervisor : Prof. Dr. Mübeccel ERGUN

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli yardım ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, beni her zaman sabırla dinleyen, yol gösteren, yönlendiren, moral ve motivasyon veren, engin deneyimlerinden faydalandığım canım hocam Doç. Dr. Ayşe TOSUN'a teşekkür ederim. Genç yaşta kaybettiğimiz sevgili hocamı saygı, minnet, özlem ve rahmetle anıyorum. Tez yazım süresince benden yardımlarını esirgemeyen, görüşleri ve tavsiyeleriyle tezime katkıda bulunan değerli tez danışmanım Prof. Dr. Mübeccel ERGUN hocama teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarımda bana her zaman yardımcı olan, desteğini esirgemeyen arkadaşım ve meslektaşım Ece DUT'a teşekkür ederim. Benim bugünlere gelmemde tartışmasız en büyük emekleri olan, sabırla ve ilgiyle hep bana destek olan, çalışmalarım boyunca beni motive edip yüreklendiren canım anneme, babama ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim. Maddi ve manevi her türlü yardım ve desteğini benden esirgemeyen eşim Ogün ALICI'ya teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. BAKTERİLER VE ÖZELLİKLERİ	3
2.1. Bakteri.....	3
2.2. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler ve <i>Bacillus subtilis</i>	6
2.3. <i>Bacillus</i> ların Ticari Önemi ve Kullanımı	8
2.4. Bakterilerin Büyümesine Etki Eden Faktörler	9
2.4.1. Fiziksel faktörler.....	9
2.4.2. Kimyasal faktörler	10
2.4.3. Biyolojik faktörler	11
2.4.4. Mekanik faktörler	11
2.5. Kesikli Fermantasyon Üreme Kinetiği	12
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	15
4. DENEYSEL KISIM	21
4.1. Materyal ve Metod	21
4.1.1. Materyal.....	21
4.1.2. Metod.....	22
5. BULGULAR VE TARTIŞMA	27

	Sayfa
5.1. Bakterinin Kimliklendirilmesi	27
5.2. Büyüme ve Üreme Hızı.....	27
5.3. İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	28
5.4. Sıcaklığın Etkisi	30
5.5. Karıştırma Hızının Etkisi	32
5.6. pH Değerinin Etkisi	35
5.7. Farklı Karbon Kaynaklarının Üremeye Etkisi	38
5.8. Farklı Azot Kaynaklarının Üremeye Etkisi	41
5.9. Farklı Konsantrasyonlardaki Nutrient Broth'un Etkisi.....	44
5.10. Doğal ve Yapay Gübrelerin Üremeye Etkisi	47
5.11. Melas Konsantrasyonunun Etkisi.....	50
5.12. Farklı Konsantrasyonlardaki Bor Metalinin Etkisi	53
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	65

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 5.1. pH=7'de, 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sürelerinden elde edilen sonuçlar	29
Çizelge 5.2. pH=7'de, 48 saatlik inkübasyonda karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sıcaklıklarında elde edilen sonuçlar.....	31
Çizelge 5.3. pH=7'de, 30°C'de ve 48 saat inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında elde edilen sonuçlar.....	34
Çizelge 5.4. 48 saat ve 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı pH'larda elde edilen sonuçlar.....	37
Çizelge 5.5. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında elde edilen sonuçlar (Azot kaynağı= Pepton)	40
Çizelge 5.6. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı azot kaynaklarında elde edilen sonuçlar (Karbon kaynağı= Et ekstraktı).....	43
Çizelge 5.7. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı konsantrasyonlardaki N.B. çözeltisinde elde edilen sonuçlar	46
Çizelge 5.8. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda organik ve kimyasal ortamlarda elde edilen sonuçlar	49
Çizelge 5.9. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı melas konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar	52
Çizelge 5.10. pH=7'de, 48 saat ve 30°C inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı bor konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar	55

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bakterilerin genel yapısı	3
Şekil 2.2. Gram (+) (A) ve gram (-) (B) hücre duvarları yapısı.....	4
Şekil 2.3. <i>Bacillus subtilis</i> bakterisi	8
Şekil 2.4. Mikroorganizmaların üreme evreleri	12
Şekil 4.1. Bakteri kimliklendirilmesi	23
Şekil 5.1. Absorbans-kuru hücre ağırlığı kalibrasyon grafiği.....	27
Şekil 5.2. 600 nm dalga boyunda pH=7’de 30°C inkübasyon sıcaklığında farklı inkübasyon sürelerinde <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği.....	28
Şekil 5.3. Farklı inkübasyon süreleri için ln (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği	29
Şekil 5.4. 600 nm dalga boyunda pH 7’de 48 saatlik inkübasyon süresinde farklı inkübasyon sıcaklığında <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 suşu için büyüme eğrisi grafiği.....	30
Şekil 5.5. Farklı inkübasyon sıcaklığında ln(kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği	31
Şekil 5.6. 600 nm dalga boyunda pH=7’de 30°C ve 48 saatlik inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği.....	32
Şekil 5.7. Farklı karıştırma hızlarında kuru hücre ağırlığı grafiği	33
Şekil 5.8. Farklı karıştırma hızları için ln (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği	33
Şekil 5.9. Farklı karıştırma hızlarındaki spesifik hızların grafiği	34
Şekil 5.10. 600 nm dalga boyunda 48 saat ve 30°C sıcaklıkta inkübasyon, 650rpm karıştırma hızında farklı pH değerlerinde <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği.....	35
Şekil 5.11. Farklı pH değerlerinde kuru hücre ağırlığı grafiği.....	36
Şekil 5.12. Farklı pH değerleri için ln (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği.....	36
Şekil 5.13. Farklı pH değerlerinde spesifik hızların grafiği.....	37
Şekil 5.14. 600 nm dalga boyunda pH=7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 48 saat inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği.....	38

Şekil	Sayfa
Şekil 5.15. Farklı karbon kaynaklarında kuru hücre ağırlığı grafiği.....	39
Şekil 5.16. Farklı karbon kaynakları için ln (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği.....	39
Şekil 5.17. Farklı karbon kaynaklarında spesifik hız grafiği	40
Şekil 5.18. 600 nm dalga boyunda pH=7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 48 saat inkübasyonda farklı azot kaynaklarında <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 için üreme eğrisi grafiği	41
Şekil 5.19. Farklı azot kaynaklarında kuru hücre ağırlığı grafiği	42
Şekil 5.20. Farklı azot kaynakları için ln (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği	42
Şekil 5.21. Farklı azot kaynaklarında spesifik hızlar	43
Şekil 5.22. 600 nm, pH=7’de, 48 saat ve 30°C inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı konsantrasyonlardaki Nutrient Broth çözeltilisinin inhibisyon etkisi grafiği	44
Şekil 5.23. Farklı konsantrasyonlardaki nutrient broth çözeltilisindeki kuru hücre ağırlıkları.....	45
Şekil 5.24. Farklı konsantrasyonlardaki N.B. çözeltilisi için ln (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği	45
Şekil 5.25. Farklı konsantrasyonlardaki N.B. çözeltilisinde spesifik hızlar	46
Şekil 5.26. 600 nm’de, pH=7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda organik ve kimyasal ortamlardaki üreme eğrisi grafiği.....	47
Şekil 5.27. Organik ve kimyasal ortamlardaki kuru hücre ağırlığı.....	48
Şekil 5.28. Organik ve kimyasal ortamlarda ln (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği.....	48
Şekil 5.29. Organik ve kimyasal ortamlardaki spesifik üreme hızı	49
Şekil 5.30. 600 nm’de, pH=7, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı melas konsantrasyonlarında üreme eğrisi grafiği	50
Şekil 5.31. Farklı melas konsantrasyonlarında kuru hücre ağırlığı	51
Şekil 5.32. Farklı melas konsantrasyonlarında ln(kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği ...	51
Şekil 5.33. Farklı melas konsantrasyonlarında spesifik üreme hızları	52
Şekil 5.34. 600 nm dalga boyunda pH=7’de 48 saat ve 30°C inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı Bor konsantrasyonlarındaki <i>B.subtilis</i> ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği.....	53
Şekil 5.35. Farklı bor konsantrasyonlarında kuru hücre ağırlığı	54

Şekil	Sayfa
Şekil 5.36. Farklı bor konsantrasyonlarında $\ln(\text{kuru hücre ağırlığı})$ -zaman grafiği	54
Şekil 5.37. Farklı bor konsantrasyonlarında spesifik hız	55

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 5.1. Gram boyama sonrası görüntü.....	27

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
μ	Spesifik üreme hızı (logaritmik evrede), h^{-1}
C/N	Kütlece karbon/Azot oranı, g-C/g-N
g	Gram
h	Saat
k	Spesifik üreme hızı (genel), h^{-1}
L	Litre
M	Molarite
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
OD	Optik density (yoğunluk)
rpm	Devir/dakika
sp.	Türler (species)
t_d	İkilenme süresi
t_L	Lag süresi, h
v/v	Hacimce oran
w/v	Kütle/hacim oranı
w/w	Kütlece oran
X	Mikroorganizma konsantrasyonu, g/L
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
DCW	Dry cell weight (kuru hücre ağırlığı)
GC	Gaz kromatografi
KHA	Kuru hücre ağırlığı

Kısaltmalar**Açıklamalar****MS**

Kütle spektroskopisi

NB

Nutrient Broth

NMR

Nükleer magnetik rezonans

PHA

Polihidroksialkonatlar

PHBPoli- β -hidroksibütirat

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin en büyük değişim süreçleri arasında yer alan Endüstri Devrimi, 18. yüzyıl sonlarında emeğin verimliliğini artırıp, kitlesel üretime geçişi sağlamıştır. Toplumsal hayatın bütün dinamikleri üzerinde etken olan bu değişimin temelinde bilimin uzun ve birikimsel geçmişi yatmaktadır (Güngörmedi, 2012).

Sanayi devrimi ile başlayan endüstrideki ilerlemeler ve hızla gelişen tarım teknolojileri türlü kullanım alanları olan sayısız organik kirleticinin günlük hayatımıza girmesine başlıca sebeptir (Taşkaya, 2004). Plastik endüstrisi ve diğer endüstriyel alanlarındaki gelişmeler insanların yaşam standartlarını yükseltirken beraberinde çevresel sorunları da oluşturmaya başlamıştır. Aslında, ortaya çıkmaya başlayan ve çevresel etkileri azda olsa görülmeye başlanılan bu olumsuz gelişmeler 19. yy sonlarında ve 20. yy başlarında sorun olarak kabul edilmemiştir. Doğanın bu tür çevresel sorunların üstesinde gelebileceğine inanılmıştır. Fakat hızla gelişen endüstrileşme ile birlikte artan atık ve artık miktarı doğanın mücadele edebileceği sınırı aşmıştır (Güngörmedi, 2012). Özellikle gelişmiş ülkelerde her sene milyonlarca ton kadar plastik maddenin çevreye atılması çevre kirliliğini hızlandırmaktadır. Örneğin ABD’de çevreye atılan plastik madde miktarı yılda yaklaşık 33,6 milyon ton kadardır. Dünya genelinde biriken plastik miktarı yıllık 25 milyon ton civarındadır (Lee, 1996). Bunun sonucunda insanoğlu bu sorunun çözümü için yeni yollar aramaya başlamıştır.

Khanna ve Srivastava’ya (2005) göre parçalanmayan plastik atıkların yarattığı çevre kirliliği problemine karşı bir kaç çözüm yolu bulunmaktadır. Bunlar yakarak yok etme, geri dönüşüm uygulamaları ya da biyolojik olarak parçalanabilen plastikleri üretilip kullanmaktır. Petrol kökenli plastikleri yakarak yok etme iyi bir çözüm gibi görünse de işlem sırasında hidroklorik asit ve hidrojen siyanür gibi zararlı gazların ortaya çıkması nedeni ile çevre ve insan sağlığını riske atan bir yöntemdir. Geri dönüşüm uygulaması da uygun bir çözüm gibi görünse de bu yöntemin de ekonomik olmayışı ve insan gücüne olan gereksinimleri nedeni ile dezavantajları vardır. Ayrıca, pigment, kaplama, dolgu maddesi gibi çeşitli katkı maddelerinin varlığı atık plastiklerin yeniden kullanılabilirliğini sınırlandırmaktadır (Dinigüzel, 2007).

Çevre sorunlarının çözümüne yönelik polimer biliminde yapılan çalışmalar içinde biyopolimerler (mikrobiyal termoplastikler) önemli bir yer tutmaktadır (İrsath ve diğerleri,

2015). Mikroorganizmaların stres altında enerji ve karbon kaynağı olarak depoladıkları lipid granüllerinin plastiğe benzer özellikte olması ve bunun yanında bu depo maddesinin doğada mikroorganizmalarca parçalanabilmesi mikroorganizmalarla plastik eldesini bir sektör haline getirmiştir. Polihidroksialakanat (PHA) biyobozunur olması nedeniyle ilgi çekici polimer haline gelmiştir. Fakat bu artıların yanında kullanılan besi yerinin maliyetli oluşu son yıllarda yapılan çalışmaların da ucuz hammadde kullanımı üzerine yoğunlaşmasına neden olmaktadır (Hazer, 2015).

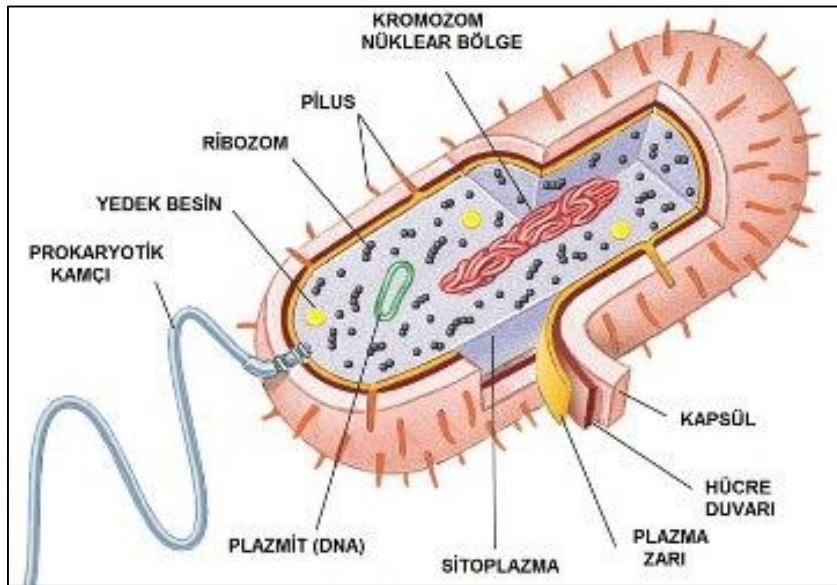
Bu çalışmada, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun farklı ortam koşulları altında büyümesi ve büyüme kinetiği, farklı azot ve karbon kaynakları ile bor metalinin etkisi incelenmiştir. Endüstriyel proseslerde verimliliği ve ekonomikliği sağlamak amacıyla biyokütle miktarının ve üreme hızının artırılması, adaptasyon sürecinin kısaltılması hedeflenmiş, substrat olarak organik ve kimyasal atıklar kullanılarak ucuz besiyeri ortamı oluşturulması hedeflenmiştir. Böylece mikrobiyal biyoplastik üretiminde üst sıralarda yer alan *Bacillus subtilis* bakterisinin biyobozunur polimer olan Poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretiminden önceki aşamaları optimize edilmeye çalışılmıştır. Bakteri bazlı hammadde olan PHB polimeri, polietilene eş değer olarak görülmektedir. Yaygın olarak kullanılan birçok polimere göre üstün özelliklerinin olması ve biyobozunur olması nedeniyle gündelik yaşamda ihtiyaç duyulan birçok plastiğin üretiminde kullanılmaktadır.

2. BAKTERİLER VE ÖZELLİKLERİ

2.1. Bakteri

Canlılar ökaryot, prokaryot ve virüsler olmak üzere 3 ana sınıfa ayrılır. Bakteriler prokaryot sınıfına mensuptur.

Bakteriler ilk 17. yy. da mikroskopun keşfiyle Antony Van Lövenhuk tarafından bulunmuş olmasına karşın daha önce 10. yy. da İbn-i Sina ve 15. yy. da Akşemseddin gibi düşünürler bakterilerin olduğu kabulünü yapıp hastalıkların sebebi olarak göstermişlerdir. Bakteriler dünyada en çok bulunan canlılar olup bulunmadığı yer yok gibidir. Bakterilerin genel olarak yapısı Şekil 2.1’ de verilmiştir. Çoğunluğu faydalı veya zararsızdır ancak bazıları hastalıklara neden olurlar. Bakteriler hava ve su damlacıklarıyla uzak mesafelere taşınabilirler (Hacettepe Üniversitesi, 2011).



Şekil 2.1. Bakterilerin genel yapısı

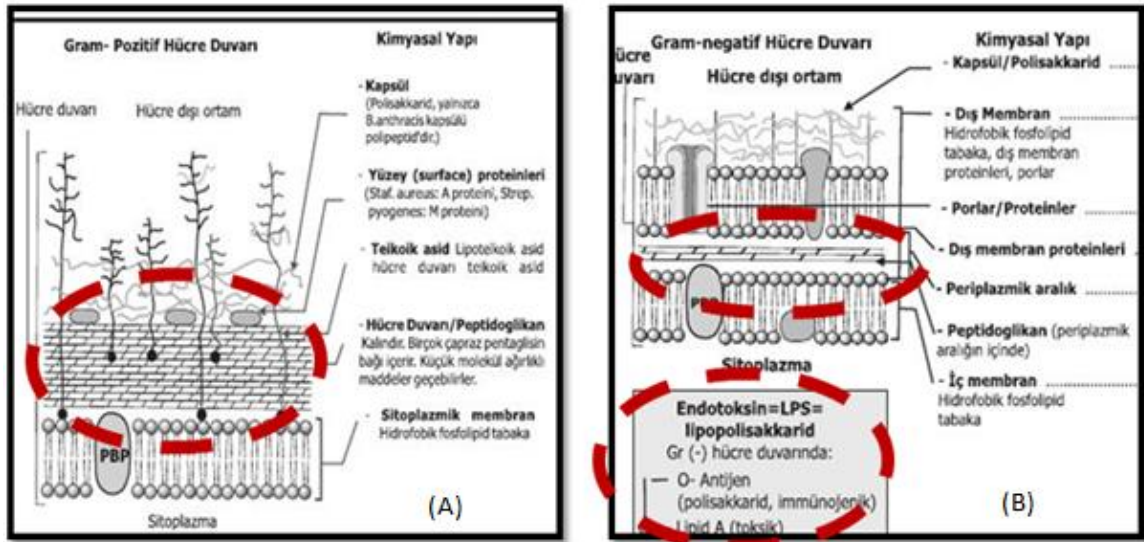
Bakteriler bütün hayatsal olayların gerçekleştiği en basit canlılardır. Prokaryot olduklarından zarla çevrilidirler. Hepsı mikroskopik ve tek hücrelidir. Ribozom dışında gelişmiş bir organelleri olmadığından diğer organellerin görevlerini yapabilen basit zar sistemleri bulunur. DNA, RNA, canlı hücre zarı ve sitoplazma bütün bakterilerin temel yapısını oluşturur. Hücre çeperi aminoasit ve glikoz türevinden (peptidoglikan) oluşur ve kimi hücre

çeperinin dışında kapsül bulunur. Kapsül bakterinin dayanıklılığını, patojenliğini artırır (Hacettepe Üniversitesi, 2011).

Yuvarlak (coccus), çubuk (bacil), spiral (spirillum) ve virgül (vibrio) şekillerinde olabilirler. Oksijene duydukları ihtiyaca göre aerob (oksijenli ortamda yaşayan), fakültatif anaerob ve anaerob bakteriler (oksijensiz ortamda yaşayanlar) olarak ayrılırlar.

Beslenme şekillerine göre hetetrof (besinlerini hazır olarak dışarıdan alan), ototrof (besinleri kendileri sentezleyen), kemoototrof (organik bileşikleri sentezlemek için gerekli enerjiyi kükürt, demir, havadaki hidrojen ve azot gibi bileşikleri oksitleyerek sağlarlar) ve fotoototrof bakteriler (organik bileşikleri sentezlemek için gerekli enerjiyi güneş ışınlarından elde ederler) olarak sınıflandırılırlar (Milli Eğitim Bakanlığı, 2011).

Bakteriler hücre duvarlarındaki farklılıklarından dolayı gram boyası ile boyandıklarında farklı renkler alırlar. Gram boyasına göre bakteriler gram (+) bakteriler ve gram (-) bakteriler diye 2'ye ayrılır (Milli Eğitim Bakanlığı, 2011). Gram (+) ve gram (-) bakterilere ait hücre yapısı Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Gram (+) (A) ve gram (-) (B) hücre duvarları yapısı

Gram-pozitif bakterilerin kristal viyole/iyot kompleksini tutma özelliğine sahip kalın peptidoglikan hücre duvarları vardır. Hücre duvarlarının ağı ve kat kat peptidoglikandan oluşan yapısı boya parçacıklarını tutar. Gram-negatif bakterilerin hücre

duvarı ise sadece ince bir peptidoglikan katmanında oluşur ve boyaları tutamaz (Arda, 2009).

Mikroorganizmaların beslenmesi ve üremesi için gerekli maddeler

Mikroorganizmaların beslenmesi ve üremesi için ortamda uygun besin maddelerinin bulunması gerekmektedir. Bunların başlıcaları su, karbon ve azot kaynağı, mineraller, hidrojen verici ve alıcı maddeler, vitaminler, oksijen ve karbondioksittir (Arda, 2009).

Su: Bakterilerin %70 -90'ını oluşturan su, beslenme ve üreme için gerekli temel maddedir. Ortamdaki besin maddelerinin kullanımı, suda çözülmüş olarak sağlanır. Enzimatik ve metabolik aktivitelerin devamı için su gereklidir.

Karbon Kaynağı: Bütün mikroorganizmaların bir karbon kaynağına gereksinimleri vardır. Bu amaçla farklı karbon kaynakları kullanılabilir. Ototrof mikroorganizmalar, CO₂ veya karbonatlardan, heterotroflar, organik karbon kaynaklarından yararlanırlar.

Azot Kaynağı: Mikroorganizmaların protein, nükleik asit ve enzim yapılarında yer alan azot için, bazı mikroorganizmalar atmosfer azotunu kullanırlar. Birçoğu ise, amonyum tuzları veya nitrat, nitrit ve amino asitlerde yer alan azottan yararlanırlar.

Mineraller: Yapı maddelerinin sentezi ve enzim aktiviteleri için bazı minerallerin ortamda bulunması gerekir. Başlıcaları S, P ile Ca, Mg, Fe, K, Mn, CO, Cl, Cu, Zn vb. gibi maddeleri içeren minerallerdir.

Hidrojen Verici ve Hidrojen Alıcı Maddeler: Hidrojen alıcı maddeler; oksidoredüksiyon reaksiyonları için gereklidir. Hidrojen alıcı madde, aerob üreme özelliğindeki mikroorganizmalar için oksijen, anaeroblar için inorganik veya organik maddelerdir. Hidrojen verici maddeler; tüm mikroorganizmalar için gerekli olan okside olabilen özelliktedirler ve enerji sağlarlar.

Gelişme Faktörleri ve Vitaminler: Mikroorganizmalardan bazılarının gelişmesi için gerekli olup, sentez edilmediğinden dışarıdan eklenen organik maddelerdir. Bazı mikropların çok sayıda gelişme faktörüne ihtiyaçları vardır. Pantotenik asit, biyotin, nikotinik asit, p-

aminobenzoik asit (PABA), folik asit, glutamik asit, riboflavin, yağ asitleri, hematin v.b. örnek olarak verilebilir.

Oksijen: Mikroorganizmaların biyolojik oksidasyonları için; ya atmosfer oksijeni reaksiyona katılır ya da dehidrojenasyon yolu kullanılır. Aeroblar üremeleri, yaşamaları için havadaki oksijene ihtiyaç duyarlar. Aerobik mikroorganizmalar arasında *B. anthracis*, *B. subtilis* vb. sayılabilir. Fakültatif mikroorganizmalar hem aerobik ve hem de anaerobik koşullarda üreyebilme mekanizmasına (enzimatik sisteme) sahiptirler. Anaerobik mikroorganizmalar oksijenin bulunmadığı ortamlarda gelişebilirler. Oksijen bunlar için zehirleyici tesir yapar.

Karbondioksit: Heterotrof bakterilerin çoğu atmosferdeki CO₂ ile üreyebilirler. Bazıları için ise CO₂ oranının % 10-20' ye çıkarılması gereklidir. Ototrof bakteriler de, karbon kaynağı olarak CO₂ 'i kullanırlar.

2.2. *Bacillus* Cinsi Bakteriler ve *Bacillus subtilis*

Bacillus adı, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından ilk defa kullanılmıştır (Lin, 1997). *Bacillaceae* familyasına dâhil olup, gram pozitif (bazı türleri değişken), aerobik veya fakültatif anaerobik, spor oluşturan, çubuk şeklinde bakterilerdir. Çoğunlukla mezofilik olmakla birlikte psikrotrof ve termofilik türleri de vardır (Ayhan, 2000).

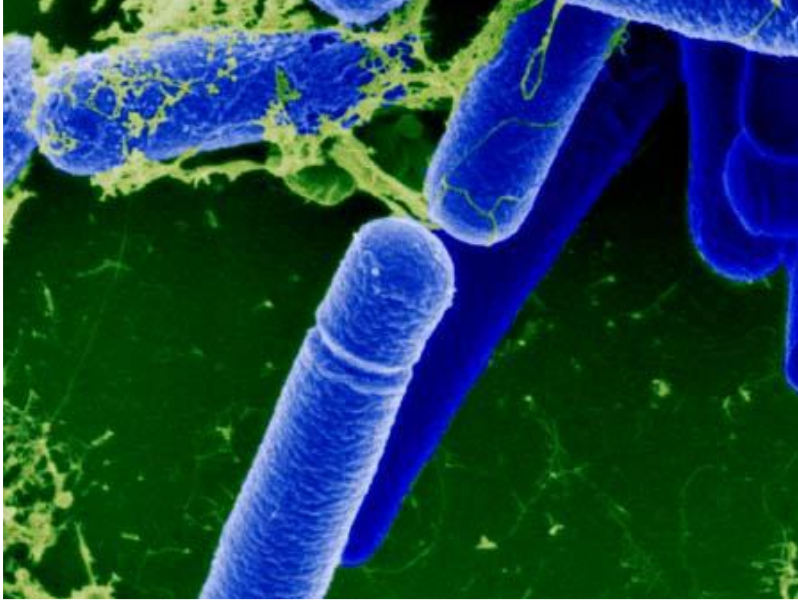
Bacillus'ların termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37 °C da ve pH 7 civarında ürerler. Tipik habitatları topraktır ve çoğu patojen değildir (Beyatlı, 2005). Endospor oluşturmaları. Vejetatif hücreler 0,5x1,2 µm ile 2,5x10 µm çapındadır. *Bacillus* cinsinin koloni morfolojisi çeşitlilik gösterir. Elliye yakın türü bulunan *Bacillus* 'larda, endosporun hücre içindeki yeri farklıdır. Spor, hücre merkezinde veya uçta, ayrıca, vejetatif hücreden daha dar olabildiği gibi, daha geniş de olabilir. Şekerleri fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşturarak parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA'larındaki G+C mol oranı %32-62'dir (Çon ve Gökalp, 1997). Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürer. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; azot kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Altun ve diğerleri, 2002).

Bacillus türlerinin tanımlanması ve türler arasındaki farklılıkların belirlenmesi için spor ve sporangium morfolojileri temel alınmıştır. Buna göre *Bacillus* türleri 3 grupta toplanmıştır (Kalaylı ve Beyatlı, 2003). Birinci grup *Bacillus* türleri kendi içlerinde A ve B olmak üzere ikiye ayrılır. Her iki grupta sporangia şişmemiştir. Gram pozitif, sporlar elips veya silindirik şekilli, santral veya terminal konumludur. A grubu ve B grubu arasındaki fark ise A alt grubunda hücre genişliği 1 µm'den küçük, B alt grubunda ise 1 µm'den büyüktür. A alt grubuna örnek olarak *B. cereus*, *B. megaterium*, B alt grubuna örnek olarak ise *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus* ve *B. coagulans* verilebilir.

İkinci grupta yer alan *Bacillus* türlerinde sporangia şişmiştir. Sporları elips, santral ve terminaldir. Bu grupta yer alan türlere örnek olarak *B. polymyxa*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B. stearothermophilus*, *B. alvei*, *B. laterosporus* ve *B. brevis* verilebilir. Üçüncü grupta yer alan *Bacillus* türlerinde de sporangia şişmiştir. Sporlar küresel, subterminal ve terminal konumludur. *B. sphaericus* bu gruba örnektir (Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

Bacillus subtilis, aerobik, fakültatif anaerobik olan etken 20-30°C'de ürer ve vejetatif şekilleri dayanıksız olup, sporları bazen kaynama derecelerinde birkaç saat dayanabilirler. Toz, toprak, su ve her yerde bulunduklarından besin maddelerine kolaylıkla bulaşırlar. Özellikle sütte çoğaldıkları zaman kazeini parçalayarak zehirli maddeler açığa çıkarırlar. Diğer besin maddelerinde üredikleri zaman toksin oluştururlar. Kuluçka süresi 2-18 saattir (Arda, 2009). Bir *B. subtilis* bakterisinin mikroskopik görünümü Şekil 2.3. te gösterilmiştir.

Saprofit bir bakteri olmakla beraber doku içinde veya göz içine bulaşarak enfeksiyonlara ve bazı besin zehirlenmelerine neden olabilir (Arda, 2009).



Şekil 2.3. *Bacillus subtilis* bakterisi

2.3. *Bacillus*ların Ticari Önemi ve Kullanımı

Bacillus cinsi bakteriler, antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizmalardandır (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Birçok biyoteknolojik çalışmada kullanılan *Bacillus* 'lar, ürettikleri proteinler nedeniyle ticari öneme sahiptirler. *Bacillus* 'ların ürettiği endüstriyel enzimlerden olan subtilisin, selulaz ve amilazlar deterjan endüstrisinde; nötral proteazlar süt endüstrisinde; farklı amilaz ve pullulanazlar besin ve meyve suyu endüstrisinde kullanılmaktadır (Ediz ve Beyatlı, 2005). *Bacillus* 'ların diğer bir özelliği de çeşitli böceklere karşı bakteriyel kontrol ajanı olarak kullanılmalarıdır.

Bacillus cinsi bakteriler PHB üretimi açısından da önemli bir yere sahiptir. PHB günümüzde yenilenebilir ve çevre dostu olması özelliğiyle polimer bazlı plastiklerin yerini almaya başlamıştır. Yapılan araştırmalarda bazı *Bacillus* suşlarının hücre kuru kütlelerinin % 50 den fazlasını PHB şeklinde biriktirebildiği bildirilmektedir (Dave et al, 1996; Chen et al, 1991; Beyatlı ve diğerleri, 1999).

Chen ve arkadaşları (1991), zenginleştirilmiş besiyerinde büyütülen *Bacillus* bakterilerinde hücre kuru kütlelerine göre % 5-20 arasında PHB biriktirildiğini bildirmektedirler.

2.4. Bakterilerin Büyümesine Etki Eden Faktörler

Mikroorganizmalar gelişmek ve çoğalabilmek için suya, enerji kaynağına, azot kaynağına, vitaminlere ve minerallere gereksinim duyarlar (Arda, 2000). Bakterilerin üremesinde fiziksel, kimyasal, biyolojik ve mekanik faktörler etkilidir.

2.4.1. Fiziksel faktörler

Sıcaklık: Mikroorganizmalar, gelişmiş canlıların yaşadıkları sıcaklıklarda iyi gelişirler. Ancak bazı bakteriler, gelişmiş organizmaların aksine çok düşük ve çok yüksek sıcaklıklarda bile gelişme yeteneğindedir. Mikroorganizmalar sıcaklık tercih sınırları dikkate alındığında; psikrofiller (20°C'nin altında), mezofiller (20-45°C arasında) ve termofiller (45°C'nin üstünde) olmak üzere üç gruba ayrılırlar; kendilerine has en düşük, en uygun, en yüksek gelişme sıcaklık dereceleri vardır. En düşük (minimum) gelişme sıcaklığı, cins veya türlerin gelişebildikleri en düşük sıcaklık derecesidir. En uygun (optimum) gelişme sıcaklığı, cins veya türlerin gelişebildikleri en uygun sıcaklık derecesidir. En yüksek (maksimum) gelişme sıcaklığı ise cins veya türlerin gelişebildikleri en yüksek sıcaklık derecesidir. Bazı bakteri türleri çok geniş sıcaklık sınırları içinde gelişme gösterirler. Örneğin; toprak ve bitki materyallerinden üretilen bakterilerin büyük bölümü 30-40°C'lik sıcaklık farkında bile gelişme yeteneğindedir. Toprak ve bitki materyallerinde sıcaklık, mevsimlere göre hatta günün değişik saatlerinde farklılık gösterebildiğinden, mevcut bakteriler de bu duruma uymaktadır. Eğer mikroorganizmalar çok kısa süre içinde dondurulur, kurutulur ve havası alınmış ampuller içinde saklanırsa (liyofilizasyon) uzun yıllar canlılıklarını ve aktivitesini koruyabilirler (Güven ve Zorba, 2013: 60).

Radyasyon: Radyasyonların başlıca iki amacı vardır: Sterilizasyon/dezenfeksiyon ve mutasyon. Ultraviolet ışınları bakteride protein sentezini ve diğer mekanizmaları bozarak ölümlere neden olur. Güneş ışınları (UV-ışınları), mikroorganizmada hem mutasyonlara neden olur hem de ışınların sıcaklığından mikroorganizma etkilenir. Ses dalgaları bakteri hücrelerini parçalayabilecek niteliktedirler (Willey ve diğerleri, 2009).

Yüzey gerilimi: Bakteriye temas eden sıvı yüzeyindeki moleküllerin oluşturduğu gerilim çok fazla olursa meydana gelen membran etkisi nedeniyle sıvı ortamdan bakteriye gıda maddelerinin girişi çok güç olur ve bakteri beslenemez. Aksine, gerilim zayıf olursa sıvı

içindeki maddelerin bakteri yüzeyinde toplanmasına sebep olur. Buna bağlı olarak bakteri içinden dışarı ve dışardan içeri gıdaların akışı güçleşir ve bakteri yine beslenemez. Bu nedenlerle bakteri yüzeyi ile buna temas eden sıvı ortamın yüzeysel moleküler geriliminin dengede bulunması zorunludur (Arda, 2000).

Osmotik basınç: Mikroorganizmalar hücre membranları yardımıyla, besiyerinin osmotik basıncı ile hücre içindeki osmotik basınç arasında denge kurmuşlardır. Ortamın osmotik basıncı azalmış ise bakteri içine giren fazla sıvı bakteriyi şişirip patlatır, tersi ortamlarda ise bakterinin içinden çıkan fazla sıvı sitoplasmik membranın hücre duvarından ayrılarak büzüşmesine neden olur (Arda, 2000).

Hidrostatik basınç: Her canlının dayandığı belli bir hidrostatik basınç düzeyi mevcuttur. Bu düzeyin altında veya üstündeki hidrostatik basınç değerlerinde canlı yaşayamaz.

Su: Su olmayan ya da yetersiz olan ortamlarda gıda alışverişi, bakteri içinde sentezlenen enzimlerin ve oluşan metabolitlerin dışarı çıkması güçleşir hatta durabilir. Sıvı besi yerlerinden suyun buharlaşması, bu besiyerinde bulunan kimyasal maddelerin konsantrasyonunu artırır. Bu durum üremeyi olumsuz etkiler (Arda, 2000).

Elektrik: Sıvı ortamlarda suspansiyon halinde bulunan mikroorganizmalardan doğru veya alternatif elektrik akımı geçirilirse, mikroorganizmalar zarar görebilirler.

2.4.2. Kimyasal faktörler

Kimyasal faktörler arasında oksijen, karbondioksit, pH, redoks potansiyeli, kullanılan antibiyotik, kemoterapötik maddeler ile çeşitli dezenfektanlar da bulunmaktadır (Arda, 2000).

Oksijen: Aeroblar üremeleri, yaşamaları için havadaki oksijene ihtiyaç duyarlar. Aerobik mikroorganizmalar arasında *B. anthracis*, *B. subtilis* vb. sayılabilir. Fakültatif mikroorganizmalar hem aerobik ve hem de anaerobik koşullarda üreyebilme mekanizmasına (enzimatik sisteme) sahiptirler. Anaerobik mikroorganizmalar oksijenin bulunmadığı ortamlarda gelişebilirler. Oksijen bunlar için zehirleyici tesir yapar.

pH: Her mikroorganizmanın sevdiği ve yaşadığı belli bir pH aralığı vardır. Minimum ve maksimum pH limitlerine yanaştıkça üreme azalır ve durur. Mikroorganizmaların çoğunluğu pH 5-9 aralığında (optimum yaklaşık 7) uygun şekilde büyürler. Düşük pH'da yaşayanlar asidofilikler olarak adlandırılır. Nötrofilik organizmalar ise pH 6-8 aralığında yaşarlar. pH 10-11 arasında gelişenler ise alkalofiliklerdir.

2.4.3. Biyolojik faktörler

Canlıların vücudunda özellikle, sindirim, solunum, ürogenital sistemleri ve derilerinde sayısız mikroorganizma (yerleşik mikroflora) bulunmaktadır. Sentezledikleri antagonist etkiye sahip metabolitler birbirlerini etkileyerek birbirlerinin üremelerine ve hatta ölmelerine de yol açarlar (Arda, 2000).

2.4.4. Mekanik faktörler

Çalkalama: Karıştırma veya çalkalama havalandırma ile birlikte akla gelir. Çünkü, havaya açık sıvılar karıştırılırken sıvıdaki çözünmüş oksijen konsantrasyonu artar. Bu nedenle, çalkalamanın üreme üzerine olumlu bir etkisi olduğu bilinmektedir. Fakat çalkalama çok hızlı veya sert bir şekilde olursa mikroorganizmalarda ölümler de meydana gelebilir. Bu yüzden üreme üzerine olumlu etki etmesi için çalkalanmanın belli bir hızda olması gerekir (Güven ve Zorba, 2013: 69).

Filtrasyon: Filtrasyon, bir sıvı veya gazın mikroorganizmaların geçemeyeceği kadar küçük delikli filtrelerden geçirilmesidir. Filtrasyon bazen mikroorganizma sayısını azaltmak üzere, daha çok ise ısıya hassas materyallerin, örneğin; kültür besiyerleri, enzimler, antibiyotik çözeltiler vb. sterilizasyonunda kullanılmaktadır (Güven ve Zorba, 2013: 84).

Santrifugasyon: Santrifüj yardımıyla bütün mikroorganizmalar giderilemezler veya sıvı steril hale getirilemez.

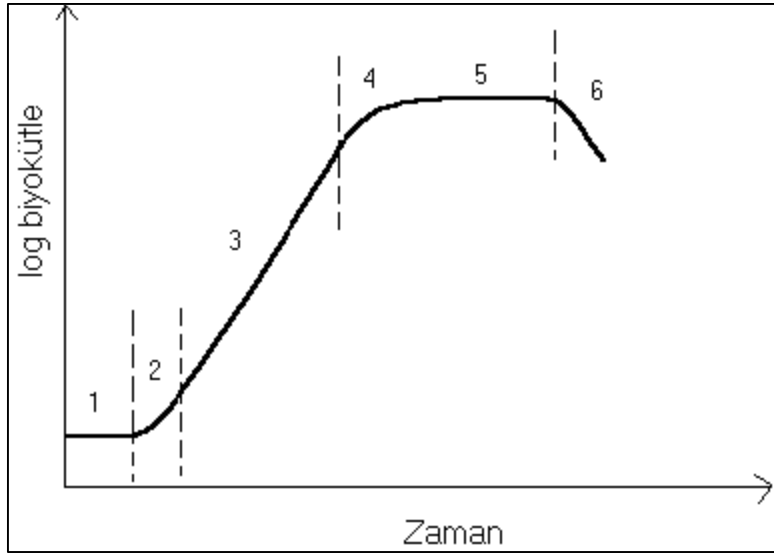
Ezmek: Santrifüj yardımıyla çöktürülen mikroplar bir havana veya ezme aletine konur burada ezilerek parçalanabilir. Bu yöntemle de bütün mikroplar ölmezler.

Basınç uygulama: Devamlı ve yüksek basınç altında bazı mikroplar ölebilirler. Ancak hepsi ölmez. Mikropların sertçe ve devamlı çalkalanması bazılarının ölümüne neden olabilir. Fakat büyük bir kısmı canlı kalabilir (Arda, 2000).

Vibrasyon: Ultrasonik vibrasyonlara maruz bırakılırsa ölebilirler ama tam anlamıyla sterilizasyon sağlamaz.

2.5. Kesikli Fermantasyon Üreme Kinetiği

Genellikle belirli düzeyde ve istenilen tür ya da türlerde mikroorganizmayı içeren besin ortamına kültür ortamı denilmektedir. Kesikli kültürlemede mikroorganizmaların çoğalması ortamdaki gerekli besin maddeleri tükeninceye kadar sürer. Kültüre alınan mikroorganizmaların değişmeyen pH, sıcaklık, iyon kuvveti ve basınç gibi dış koşullar altında belirli substrat derişiminde gelişme ve üremeleri çeşitli evrelerden oluşmaktadır (Okur, 2011). Bu evreler Şekil 2.4'te görülmektedir. Üreme kinetiği ile ilgili bilgilere genel olarak Okur'un Doktora Tezi'nden ulaşılmıştır.



Şekil 2.4. Mikroorganizmaların üreme evreleri

1. Gelişme evresi (lag fazı) : Belirli bir besin ortamına ekilen mikroorganizmalar yeni ortama uyum (adaptasyon) gösterip çoğalmaya başlayıncaya kadar belirli bir süre geçer. Bu sırada hücre sayısında hemen hemen hiçbir artış gözlenmez. Mikrobiyal teknolojide bu sürenin kısaltılması ekonomik yönden büyük yararlar sağlar.

2. Geçiş Evresi: Gelişme evresinden sonra mikroorganizma sayısı yavaş yavaş artmaya başlar. Bu kısma hızlandırılmış ya da hızlandırılma evresi denir.

3. Logaritmik Evre: Mikroorganizma sayısı ya da derişimi belirli bir düzeye ulaşınca logaritmik evreye varılır. Bu evreye eksponansiyel faz da denilmektedir. Bu evrede mikroorganizmaların canlı, genç ve dinç olduğu kabul edilir. Logaritmik evrede mikroorganizmalar üssel (eksponansiyel) olarak arttığı için kesikli kültürlemede ortamdaki besinler giderek azalır.

4. Duraklama Evresi: Logaritmik evreden sonra mikroorganizmaların yaşlanması ve ölüm olayının belirginleşmesi nedeni ile çoğalmada yavaşlama yani logaritmik evreye kıyasla üreme hızında azalma gözlenir. Buna duraklama evresi denilmektedir.

5. Sabit Evre: Kesikli kültürlemede duraklama evresini sabit evre izler. Bu evrede kimi mikroorganizmalar ürer, kimileri ölür ve bazıları da üremeden yaşamlarını sürdürürler. Bu üç olay birbirini dengelediği için mikroorganizmalarda zamana göre net artış ya da azalış gözlenmez.

6. Ölüm ya da Göçüş Evresi: Mikrobiyal kinetiğin son kısmında mikroorganizmaların ölüm hızları arttığı için zamanla derişimlerinde azalma gözlenir. Bu evreye ölüm fazı denilir. Bu evrede mikroorganizmaların dışa salgıladıkları enzimlerden ötürü hücre zarlarında hidroliz ve parçalanma olayları belirgin bir hal alır. Hidrolitik ve lipolitik enzimlerin meydana getirdiği bu olaya genel olarak lisis (lysis) adı verilir.

Mikrobiyal kinetik bağıntıları genellikle bakteriler üzerindeki incelemelere dayanılarak türetilmiştir. Ancak bu bağıntılar genellikle tüm mikroorganizmalar için geçerli sayılmaktadır [Pekin, 1979]. Mikrobiyal hücrelerin büyümesi otokatalitik bir olaydır. Bu nedenle hücre kuru ağırlığındaki artma hızı, başlangıçtaki hücrelerin derişimiyle orantılıdır. Mikroorganizma derişiminin başlangıçtaki miktarının iki katı olması için geçen süreye ikilenme süresi adı verilmektedir ve t süre sonra iki katına çıkma sayısı:

$$n = t/t_d \quad (2.1)$$

şeklindedir. Burada n ; iki katına çıkma sayısı, t ; geçen süre(saat), t_d ; kültürün iki katına çıkma zamanı (saat) dır.

Kültürdeki hücrelerin kuru ağırlığı t zaman sonra, başlangıç hücre yoğunluğuna bağlı olarak şu şekilde ifade edilir:

$$X = X_0 2^n = X_0 2^{t/t_d} \quad (2.2)$$

Eşitliğin logaritması alınarak, düzenlenirse:

$$\ln \left(\frac{X}{X_0} \right) = \ln 2 \cdot \frac{t}{t_d} \quad (2.3)$$

$$\ln \left(\frac{X}{X_0} \right) = 0,693 \cdot \frac{t}{t_d} \quad (2.4)$$

Bu eşitlikte X, t anındaki mikroorganizma derişimini (g/L), X_0 t=0 anındaki mikroorganizma derişimini (g/L) ifade etmektedir. Zamana karşı $\ln(X/X_0)$ grafiğı, eğimi $0,693/t_d$ olan düz bir doğru verir ki bu doğrunun eğimi özgül üreme hızı, μ olarak tanımlanır. Özgül üreme hızı, μ sadece üstel üreme evresinde üremeyi tanımlar ve bu evre boyunca sabittir (steril besleme için). Mikroorganizmalar için kesikli sistemde, kütle denklığı şu şekildedir:

$$\frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu \quad (2.5)$$

Özgül üreme hızı, μ (saat⁻¹) Eş. 2.4.'teki tanımıyla aynıdır. Eş. 2.5'in sınır koşullarına göre integralinin alınmasıyla

$$\int_{X_0}^X \frac{1}{x} dX = \mu \int_{t=0}^t dt \quad (2.6)$$

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu * t \quad (2.7)$$

eşitliği elde edilir. t'ye karşı $\ln(X/X_0)$ grafiğinin eğiminden özgül üreme hızı (μ) hesaplanır.

Mikroorganizma derişiminin 2 katına çıktığı durumda ($X=2.X_0$);

$$\ln 2 = \mu * t \quad (2.8)$$

olacaktır.

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bakterilerin üremesi ve üreme kinetiği ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmış, yapılan çalışmalarda genel olarak üreme ortamını etkileyen parametrelerin değiştirilmesiyle üremenin nasıl değiştiği gözlenmeye çalışılmıştır. Araştırmaların birçoğunda değişen parametrelerin üremeye etkisiyle birlikte PHB birikimine etkisinin de incelendiği gözlenmiştir.

Gouda ve arkadaşları çalışmalarında (2016), atık arıtma tesisinden izole edilen *Bacillus megaterium* bakterisinin karbon ve azot kaynağı olarak melas ve mısır likörünün kullanıldığı ortamda PHB üretimini araştırmışlardır. PHB üretimi için bakterinin kültür ortamını kesikli sistemde 30°C ve pH=7 ve 130 rpm karıştırma hızı olarak ayarlamışlardır. Bu koşullarda karbon kaynağı olarak şeker melası ve glukoz kullanıldığında en yüksek PHB üretimi gözlenmiştir. Maksimum PHB verimi % 2 melas kullanıldığında elde edilmesine rağmen bakteri en iyi üremeyi % 3 melas kullanıldığında göstermiştir. Azot kaynağı olarak mısır likörü PHB üretimi için en iyisi iken, bakteri en iyi üremeyi amonyum klorür, amonyum sülfat ve amonyum fosfat kaynaklarında göstermiştir.

Uttatree ve Charoenponich çalışmalarında (2016), *Bacillus subtilis* 'ten elde edilen proteaz enziminin karakterizasyonunu incelemişlerdir. Kullanılan *B. subtilis* deniz tortularından izole edilmiştir. Tortular sterilize su ile yıkandıktan sonra *B. subtilis* kolonileri elde etmek için pH'ı 7.2 olan ortamda 30°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu koşullar altında üretilen bakteri kültürlerinde proteaz aktivitesinin maksimum olduğu gözlenmiştir.

Chaijomrus ve Udpuay çalışmalarında (2008), *Bacillus megaterium* ATCC 6748 kullanarak melas ve mısır liköründen PHB üretimini araştırmışlardır. Karbon ve azot kaynağı olarak yenilenebilir ham madde kaynaklarından sırasıyla melas ve mısır likörü kullanmışlardır. Kesikli sistemde bakterinin inkübasyon ortamı 30°C ve 130 rpm'de 50 saat karıştırmalı olacak şekilde ayarlanmıştır. Melas ve mısır likörü konsantrasyonundaki artış mikrobiyal üremede de artış sağlarken PHB birikiminde azalışa neden olmuştur. Maksimum mikrobiyal üreme (7,2 g/L) melas konsantrasyonunun % 4 (w/w) ve likör konsantrasyonunun % 6 (v/v) olduğu ortamda saptanmıştır.

Tamdoğan ve Sidal çalışmalarında (2011), *Bacillus subtilis* ATCC6633 suşunun farklı şartlar altındaki PHB üretimini incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda *B.subtilis* ATCC6633 suşunda en yüksek PHB birikiminin pH'ı 7 olan ortamda, 30°C'de, 24 saatlik inkübasyon sonucunda olduğu görülmüştür. Karbon kaynakları olarak sükroz, glukoz, d-mannitol ve arabinoz kullanılmış ve en fazla mikrobiyal üremenin sükroz ortamında fakat en yüksek PHB veriminin d-mannitol kullanılması durumunda olduğu görülmüştür. Azot kaynağı olarak en yüksek verim ise glisinle elde edilmiştir. C/N oranlarının etkisi çalışılmış ve çalışılan koşullardaki en uygun kaynakların (d-mannitol ve glisin) oranının 2,5 olduğu durumda PHB üretiminin en fazla olduğu görülmüştür.

Elsayed ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda (2013), P173 izole bakterisi *Azomonas macrocytogenes* ile PHB üretiminin optimizasyonunu incelemişlerdir. Maksimum PHB üretimi 37°C inkübasyon sıcaklığında 24 saat inkübe edilen, pH'ı 7,5 olan ortamda elde edilmiştir. Karbon ve azot kaynağı olarak % 0,7 glukoz ve 100 mg/L potasyum nitrat kullanılmıştır. Kullanılan bu karbon ve azot kaynakları varlığında PHB birikimi % 42 değerine (kuru ağırlık olarak) ulaşmıştır.

Pal ve arkadaşları çalışmalarında (2009), bahçe toprağından izole edilen *Bacillus thuringiensis* bakterisini nutrient broth ortamında 37°C'de 48 saat süreyle inkübe etmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda; kuru hücre ağırlığı ve PHB birikiminin azot kaynağının eksik olduğu ortamda nutrient broth ortamına göre daha fazla olduğunu, maksimum birikimin eksik azot ortamlı 24 saatlik inkübasyon sonucunda olduğunu görmüşlerdir.

Irsath ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (2015), atık sudan izole ettikleri *Bacillus subtilis* BP1 bakterisinde PHB üretimi ve optimizasyonunu incelemişlerdir. Çalışmalarında inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH değerlerinin yanı sıra ucuz üretim ortam şartlarını araştırmışlardır. FTIR ve NMR'da, üretilen PHB'nin yapısını incelemişlerdir. Çalışmalar sonucunda 48 saat inkübasyon süresinin, 37°C inkübasyon sıcaklığının ve pH'ı 7,5 olan ortamın, bakterinin üremesi için optimum olduğunu saptamışlardır. Atık ortamların değerlendirilmesinde en yüksek PHB verimlerine %50'lik sapota kabuğı ekstraktında ve % 60'lık şeker endüstrisi atık suyunda rastlamışlardır.

Martinez ve arkadaşları çalışmalarında (2007), *Bacillus cereus* ATCC 7004 suşunun büyüme kinetiğine çevresel parametrelerin etkilerini incelemişlerdir. 90°C’de 10 dakika ısıtma işlemi gören bakteriye pH değerinin, sodyum klorür konsantrasyonunun ve sıcaklığın etkilerini çalışmışlardır. pH değerini düşürüp sodyum klorür değerini artırdıklarında üreme hızının yavaşladığını ve lag fazının uzadığını görmüşlerdir. *B.cereus*’un 10°C ve 50°C’de ve pH değerinin 4 olması durumunda üreme göstermediğini saptamışlardır.

Otari ve Ghosh çalışmalarında (2009), *Bacillus megaterium* NCIM2475 bakterisi ile PHB üretimini araştırmışlardır. Bakterinin üremesinde kültür ortamı % 2 sükröz içermektedir. 72 saat 30°C’de ve 125 rpm karıştırılmalı ortamda inkübe edilen *B.megaterium*’da biriken PHB’nin yapısı UV, FTIR ve NMR’da incelenmiştir.

Yüksekdağ ve arkadaşları çalışmalarında (2004), *Bacillus subtilis* 25 ve *Bacillus megaterium* 12 bakterileri ile PHB sentezine karbon ve azot kaynakları ile inkübasyon süresinin etkisini araştırmışlardır. Nutrient broth ortamında en iyi PHB birikiminin 45 saatlik inkübasyon sonucu olduğunu görmüşlerdir. Proteaz pepton kullanılan ortamda en yüksek PHB birikimine ulaşılmış, yüzde PHB verimi *B. subtilis* 25 için % 78,69, *B. megaterium* 12 için % 77,00 olarak saptanmıştır.

Adwitiya ve arkadaşları yaptığı çalışmada (2009), PHB üretimini artırmak için *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 suşunun mutasyonunu araştırmışlardır. 48 saatlik inkübasyonda, 37°C’de, pH=7’de ve 12-150 rpm karıştırma hızında % 10-15 kuru hücre ağırlığında PHB ürettiği gözlenmiştir. Fiziksel (UV) ve kimyasal (akridin oranj) mutasyonlara tabi tutulan bakterinin PHB üretimi incelenmiştir.

Shivakumar çalışmasında (2012), substrat olarak endüstriyel atıkları kullanarak *Bacillus thuringiensis* IAM12077 tarafından PHB üretimini incelemiştir. Karbon kaynağı olarak saf glukoz kullandığında optimum PHB üretimi 24 saatlik inkübasyon ve pH’ı 7,5 olan ortamda gerçekleşmiştir. Farklı atıklar kullanılmış ve maksimum üretimin karbon kaynağı olarak 10 g/L soya unu kullanılan 30°C’de pH’ı 7,5 olan ve 24 saat süreyle inkübe edilmiş ortamda olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu ortamdaki bakteri hücrelerinde PHB içeriği 0,89 g/L (% 25,28) olarak hesaplanmıştır.

Özşahin yaptığı tez çalışmasında (2006), toprak, su ve atık örneklerinden izole ettiği *Bacillus* sp. suşlarının selüloz aktivitelerini araştırmıştır. Ekim yapılan besi yeri 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve koloni oluşumu sağlanmıştır. Bakterinin enzim ürettiği optimum pH değeri 10 ve sıcaklık 40°C olarak tespit edilmiştir.

Boustanabadimoralan tez çalışmasında (2014), *Bacillus thuringiensis* ile çeşitli boyaların renk giderimlerini araştırmıştır. *B. thuringiensis*'in üremesi için, 37°C'de 48 saat süreyle inkübe etmiştir. Boya gideriminde kullanılmak üzere Metil oranj, Akridin oranj, Anilin sarısı, Bismarck Brown Y, Evans blue, Tripkan mavisi, Metilen mavisi ve Metilen kırmızısı sentetik boyaları kullanılmıştır. En iyi giderim Metil oranj ve Evans blue boyalarında gözlenmiştir. Boya gideriminde ortam sıcaklığı 35°C olarak saptanmıştır. En yüksek giderim pH değeri Metil oranj için 6, Evans blue için 7,5 olduğunda sağlanmıştır. 56 saatlik inkübasyonun sonunda % 100 giderim elde edilmiştir.

Gomaa yaptığı çalışmasında (2014), *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli* tarafından PHA üretimini araştırmıştır. Substrat olarak melas kullanmış ve optimum substrat konsantrasyonu *B. subtilis* için % 6, *E. coli* için % 8 melas olarak saptanmıştır. Bu melas konsantrasyonlarında maksimum PHA üretim verimi *B. subtilis* için % 54,1, *E. coli* için % 47,16 olarak belirlenmiştir. Ayrıca PHA üretiminde optimum pH değerinin 7, sıcaklığın ise 35°C olduğu gözlenmiştir.

Wu ve arkadaşları çalışmalarında (2013), kesikli sistemde *Bacillus subtilis*'in üretim ve molekül ağırlığına etki eden faktörleri incelemişlerdir. Kültür ortamında farklı konsantrasyonlarda süktroz kullanmışlardır. En yüksek verime, 250 g/L süktroz konsantrasyonunda, pH değeri 7, 37°C'de, 24 saat inkübasyon ve 175 rpm karıştırma hızında ulaşılmış ve verim 61 g/L, üretim hızı ise 3,4 g/L.h olarak tespit edilmiştir. Kesikli reaktöre süktroz beslenmesi durumunda verim 100 g/L değerine ulaşmıştır.

Zhang ve arkadaşları (2014) çalışmalarında, kesikli beslemeli sistem kullanarak jeean peptit (JAA) üretimini etkileyen *Bacillus subtilis* hücre büyümesinin optimizasyonunu çalışmışlardır. Glukoz, toplam azot ve maksimum kuru hücre ağırlığı arasındaki ilişkiyi görmek için öncelikle kesikli sistem kullanmışlardır. 30°C, 300 rpm karıştırma hızında, 20 saat inkübe edilen kültür ortamındaki optimum glukoz ve azot konsantrasyonu sırasıyla 30,70 g/L ve 1,68 g/L olarak saptanmıştır. Beslemeli kesikli sistemde bakteri kuru hücre

ağırlığı 77,5 g/L iken kesikli sistemde 20,37 g/L olarak gözlenmiştir. Bu durum JAA üretiminin de artmasını sağlamıştır.

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Materyal ve Metod

4.1.1. Materyal

Bakteri

Yapılan çalışmalarda basil formu *Bacillus subtilis* ATC 6633 suşu kullanılmıştır. Bu suş T.C. Sağlık Bakanlığı Türk Halk Sağlığı Merkezi'nden (Eski Refik Saydam Hıfzıssıhha) liyofilize formda temin edilmiştir.

Kullanılan besiyerleri

Temel besiyeri olarak Merck marka nutrient broth (NB) ve Merck marka nutrient agar hazır besi yerleri kullanılmıştır. Kullanılan besi yerleri istenilen şarta ve ölçüye bağlı olarak üzerlerinde yazan oranlarda deiyonize su ile hazırlanmış ve 121°C 15 dakika otoklavda (HMC Hirayama HV-85L) steril edildikten sonra kullanılmıştır.

Nutrient broth (Merck) içeriği; 3 g/L beef ekstrakt, 5 g/L pepton

Nutrient agar (Merck) içeriği; 3 g/L beef ekstrakt, 5 g/L pepton, 12 g/L agar-agar

Kullanılan kimyasallar

Gram boyamada kullanılan kimyasallar aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır:

Kristal violet: Kristal viyole ve fenol kristali üzerine etil alkol yavaşça eklenmiştir.

- 1 gram kristal viyole
- 2 gram asit – fenik kristali (fenol kristali)
- 10 ml etil alkol (% 96)
- 100 ml distile su

Lugol: İyot ile KI iyice ezilip deiyonize su ile iyice karıştırılmıştır.

- 1 gram iyot
- 2 gram KI
- 300 cc distile su

%95'lik etil alkol

Safranin: Safranin deiyonize su içinde çözülmüştür.

- 0,25 gram safranin
- 90 ml distile su

Nile Blue yöntemi için Sigma marka Nile Blue Sülfat 0,01 g/ml olarak hazırlanmış, katı besiortamına % 1 oranında ilave edilmiştir.

Farklı karbon kaynaklarının incelenmesi için Sigma gliserol, Carlo Erba ksiloz, Sigma mannoz istenilen oranlarda eklenerek besiortamları hazırlanmıştır. Farklı azot kaynaklarının etkisini incelemek için Merck malt ekstrakt, Merck amonyum sülfat, Fluka glisin istenilen oranlarda eklenerek besiortamları hazırlanmıştır.

Bor iyonunun etkisini incelemek için ETİ Maden Enstitüsü'nden elde edilen Boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) bileşiği kullanılmıştır.

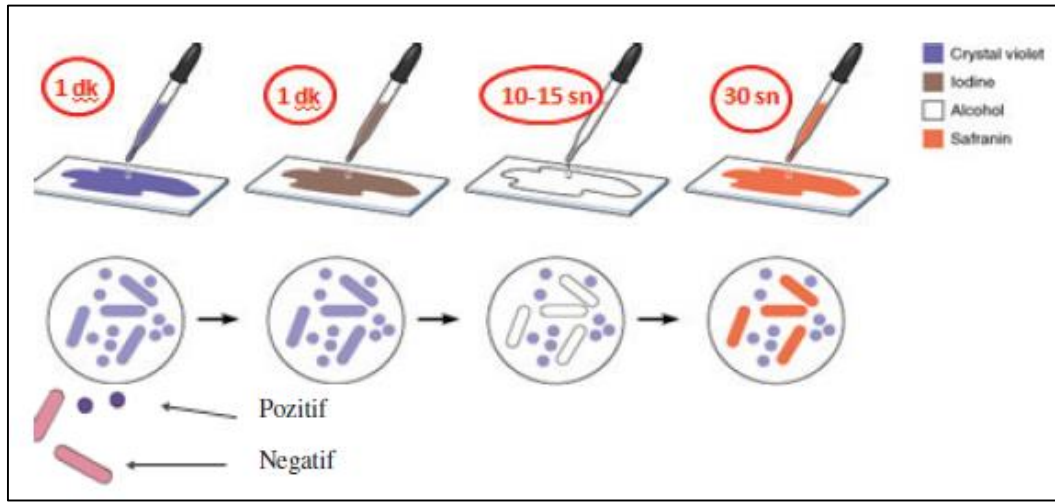
Doğal hammadde olarak Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden temin edilen Superdoll marka organik gübre, melas ve Havsa Ziraat Odası'ndan temin edilen Toros marka 20.20.0 kompoze kimyasal gübre kullanılmıştır.

4.1.2. Metod

Bakterilerin kimliklendirilmesi

Bakterilerin kimliklendirme işlemi Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümünde gram boyama yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Gram boyama işlemi için 5 ml sıvı besiortamında 30°C'de 24 saat inkübatörde (The NuAire DH AutoFlow NU-5500 CO₂) inkübe edilmiş pH'ı 7 olan kültür kullanılmıştır. Kimliklendirmenin yapıış yöntemi Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Lamın ortasına 1 damla su koyduktan sonra sıvı besiortamını ve bakteriyi içeren tüpten öze ile

numune alınmıştır. Öze lama sürülüp lam tutacakla bek alevine fazla yaklaştırmadan alevden geçirilerek lam kuruyuncaya kadar beklenmiştir. Lamlar öncelikle 1 dakika violette kaldıktan sonra çeşme suyunda fazlası yıkanmıştır. Ardından lamlar 1 dakika lugolde bekletilmiş ve tekrar çeşme suyunda fazlası yıkanmıştır. Lamların üzerine alkol damlatılıp 10-15 saniye bekletilip yıkanmıştır. Bu işlemten sonra lam üzerine safranin dökülerek 30 saniye beklenmiş ve lamlar yıkanmıştır. Bir damla immersiye yağı damlatıldıktan sonra lamlar mikroskopta incelenmiştir.



Şekil 4.1. Bakteri kimliklendirilmesi (Dut, 2015)

Bakteri için uygun büyüme şartlarının belirlenmesi

0,8 gram nutrient broth hassas terazide (Denver instruments TP-214) tartıldıktan sonra pH 7'de 100 ml deiyonize suda çözülmesi sağlanmış ve sıvı besiyeri hazırlanmıştır. 24 saat inkübatörde inkübasyona bırakılan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşundan alınan 30°C'deki aktif kültür hacimce % 4 olacak şekilde steril edilen sıvı besiyerine ekildikten sonra zamana karşı numune alınarak spektrofotometre cihazında (PG Instruments Ltd - T80+ UV/VIS) 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur.

Optimum pH tespiti için erlenlere 100'er ml sıvı besiyerini konulmuş ve erlenlerin pH değerleri, 3, 7, 8 ve 9 olacak şekilde 1M HCl, 1M NaOH ve pH metre (Hach EC30) ile ayarlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamukla tıkanıp folyoyla sarıldıktan sonra sterilizasyon için 121°C'de otoklavda bekletilmiştir. İşlem sonrasında aktif kültürden ekilen bakterinin

büyüme eğrisi çizilmiştir. Daha sonra pH=7’de 48 ve 72 saatlik inkübasyon süreleri için ve pH=7’de 30 ve 37°C inkübasyon sıcaklıkları için bakterinin büyüme eğrileri çizilmiştir.

Karıştırma hızının etkisinin incelenmesi için 150 ml nutrient broth ortamına 30°C’de 48 saat inkübe edilmiş aktif kültürden 6 ml alınarak pH=7’de çözelti hazırlanmış, karıştırıcılı ısıtıcıda (Ika C-mag HS7) 375 rpm ve 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C’de büyüme eğrileri çizilmiştir.

Farklı karbon ve azot kaynaklarının etkisinin incelenmesi

Farklı karbon kaynakları için 100’er ml 3 adet deiyonize suya azot kaynağı olarak 0,5 g (% 0,5 w/v) peptonun varlığında hacimce % 0,3 gliserol, kütlece % 0,3 olacak şekilde ksiloz ve mannoz, eklenerek besiortamları hazırlanmıştır. Farklı azot kaynakları için 100’er ml 3 adet deiyonize suya karbon kaynağı olarak 0,3 g (% 0,3 w/v) meat ekstraktın varlığında hacimce % 0,5 olacak şekilde glisin, kütlece % 0,5 olacak şekilde malt ekstrakt ve amonyum sülfat eklenerek besiortamları hazırlanmıştır. Ayrıca bu ortamlara ilaveten kontrol çözeltisi olarak 100 ml nutrient broth çözeltisi hazırlanmıştır. Tüm besiortamlarının pH’ı 7’ye ayarlanıp steril edildikten sonra 30°C’de 2 gün inkübe edilmiş aktif kültürden 4 ml bakteri çözeltisi alınarak besiortamlarına eklenmiş ve karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızında 30°C’de büyüme eğrileri çizilmiştir.

Doğal ortamların etkisinin incelenmesi

Doğal hammadde olarak Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nden temin edilen Superdoll marka organik gübre; Havsa Ziraat Odası’ndan temin edilen Toros marka 20.20.0 kompoze kimyasal gübre ve melas kullanılmıştır.

150’şer ml deiyonize su konulan erlenlerde 0,2 g ve 2 g kimyasal gübre ile, 2 ml ve 3 ml organik gübre ilave edilerek çözeltiler hazırlanmış, hazırlanan çözeltiler 2 kere süzülerek süzüntüsü kullanılmıştır. 30°C’de 48 saat inkübe edilmiş aktif kültürden 6 ml bakteri çözeltisi besiortamlarına eklenmiştir. Karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C’de büyüme eğrileri çizilmiştir.

Melas çözeltileri hazırlanırken kullanılan ve yaklaşık olarak % 50 sükroz içeren şeker melası hidroliz edilmiştir. Melas çözeltisi (1/3 katı-sıvı) hazırlanmış ve pH=2 olacak şekilde H₂SO₄

ile muamele edilmiştir. Daha sonra 90°C’de 5 dakika kaynatılıp, 2000 rpm devirde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen çözelti pH’ı 6 olacak şekilde 10 M NaOH çözeltisi ile muamele edilmiş ve 2000 rpm devirde 5 dk santrifüj edilmiştir (Okur ve Saraçoğlu, 2014). Bu işlemler sonunda hidrolize edilmiş olan 138 g/L şeker içeren çözelti stok çözeltisi olarak kullanılmış ve istenilen melas konsantrasyonları bu çözeltiden hazırlanmıştır. 30°C’de 48 saat inkübe edilmiş aktif kültürden 6 ml bakteri çözeltisi melas ortamlarına eklenmiş, karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C’de büyüme eğrileri çizilmiştir.

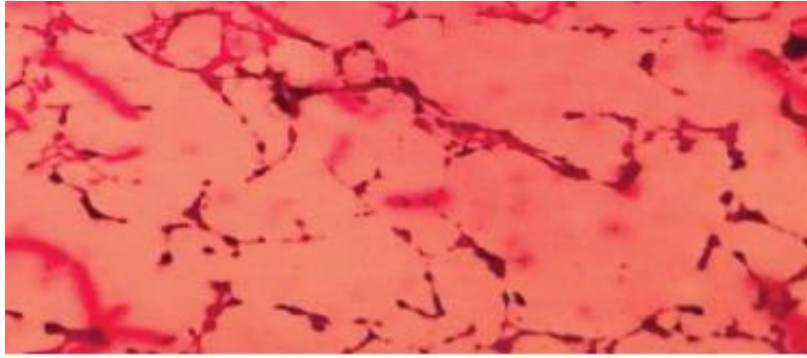
Bor metalinin etkisinin incelenmesi

Boraks bileşiğinden farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 150 ml besi yerlerine 30°C’de 48 saat inkübe edilmiş aktif kültürden pH=7’de 6 ml bakteri çözeltisi besi ortamlarına eklenmiş ve karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C’de büyüme eğrileri çizilmiştir.

5. BULGULAR VE TARTIŞMA

5.1. Bakterinin Kimliklendirilmesi

Gram boyama yöntemi ile yapılan kimliklendirme işlemi sonucunda Resim 5.1 elde edilmiştir. Resim 5.1’de görülen koyu pembe renkler bakterinin gram pozitif olduğunu ve uzun çubuk şekiller ise çubuk basil olduğunu göstermektedir.

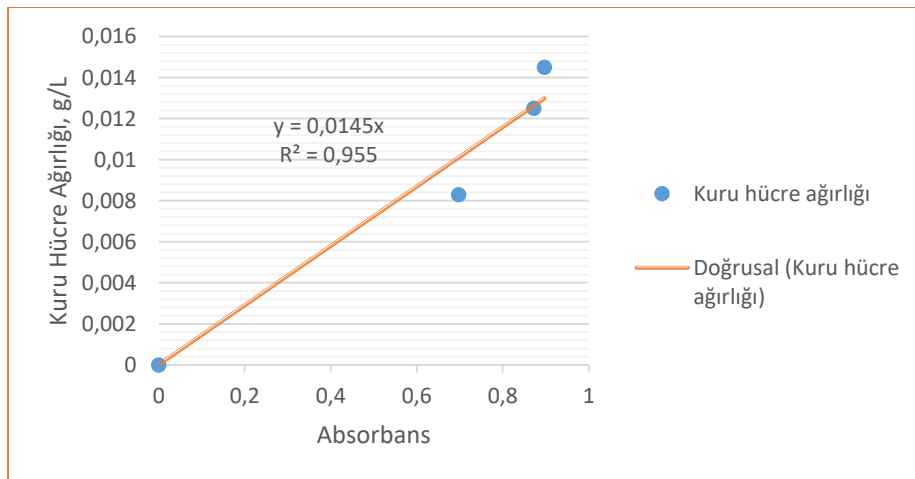


Resim 5.1. Gram boyama sonrası görüntü

5.2. Büyüme ve Üreme Hızı

Absorbans-kuru hücre ağırlığı kalibrasyon grafiği

pH=7 değerindeki Nutrient Broth ortamında absorbans değerlerine karşı kuru hücre ağırlığı verileri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği (Şekil 5.1) oluşturuldu.



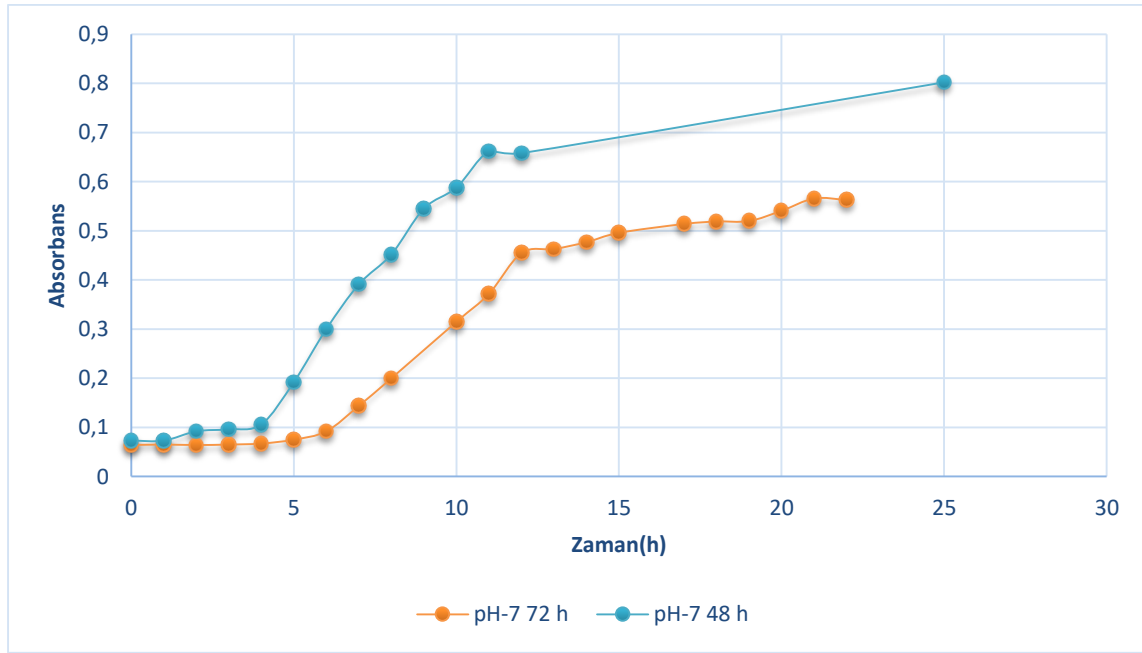
Şekil 5.1. Absorbans-kuru hücre ağırlığı kalibrasyon grafiği

Kalibrasyon grafiği verilerine göre absorbans değerindeki artış ile kuru hücre ağırlığı değerlerinin de arttığı görülmüştür.

5.3. İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Yapılan çalışmada aktiveleştirilen bakteri 48 ve 72 saat süreyle inkubatörde 30°C’de inkübe edildi ve inkübasyon süresi boyunca ölçülen absorbans değerleri zamana karşı grafiğe geçirildi ve Şekil 5.2 elde edildi.

Yapılan çalışmada ve daha sonraki aşamalarda maksimum kuru hücre ağırlık değerleri, eksponansiyel dönemdeki maksimum absorbans değerlerinin kalibrasyon grafiğinde (Şekil 5.1) yerine konulmasıyla elde edilmiştir.

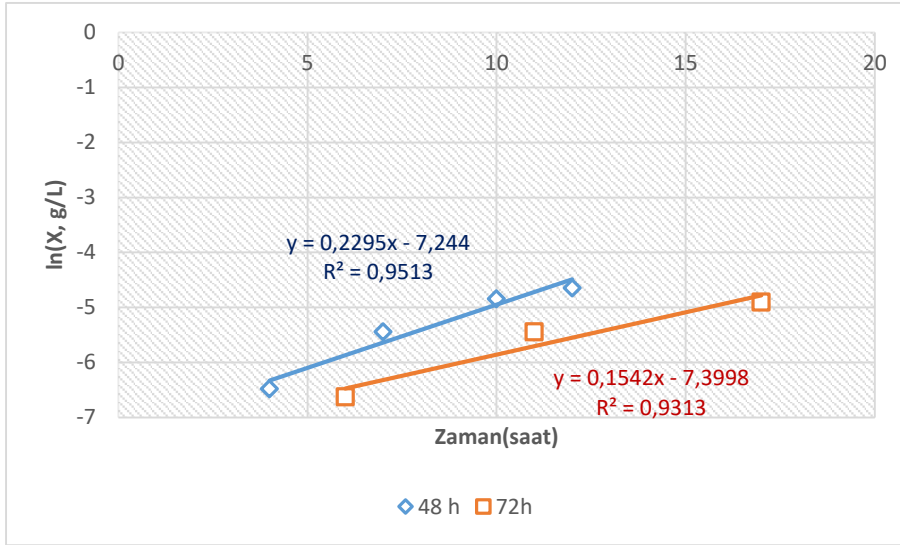


Şekil 5.2. 600 nm dalga boyunda pH=7’de 30°C inkübasyon sıcaklığında farklı inkübasyon sürelerinde *B. subtilis* ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği

Bulgular incelendiğinde inkübasyon süresinin bakterinin büyüme ve üremesinde etkili olduğu gözlenmiştir. 48 saatlik inkübasyonda eksponansiyel dönemin 4-12 saatleri arasında ve maksimum absorbansın 0,658 değerinde olduğu görülmüştür. 72 saatlik inkübasyonda ise eksponansiyel dönemin 5-15 saatleri arasında ve maksimum absorbansın 0,514 değerinde olduğu tespit edilmiştir. Her iki inkübasyon sürelerine ait lag fazı (t_L) ele alındığında 48

saatlik için daha kısa olduğu (3 saat) ve bakterinin ortama adaptasyonun daha çabuk olduğu görülmüştür.

Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızlarına da bakıldı. Hızlar Şekil 5.3'teki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplandı ve eğim baz alınarak ikilenme süreleri bulundu.



Şekil 5.3. Farklı inkübasyon süreleri için $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği

48 saatlik inkübasyon için; eğimden $\mu = 0,229 \text{ saat}^{-1}$ ve $\mu = 0,693/t_d$ eşitliğinden, $t_d = 3,03$ saat olarak bulunmuştur. 72 saatlik inkübasyon için bu değerler sırasıyla; $0,154 \text{ saat}^{-1}$ ve 4,50 saat olarak hesaplanmıştır. Farklı inkübasyon sürelerinde kuru hücre ağırlığı ve spesifik hızlar incelendiğinde, 48 saatlik inkübasyon süresine ait değerlerin daha yüksek olduğu görülmektedir. 48 saatlik inkübasyonda bakteri daha hızlı üremiştir. Çizelge 5.1' de değerler karşılaştırılmış ve uygun inkübasyon süresinin 48 saat olduğu görülmüştür.

Çizelge 5.1. pH=7'de, 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sürelerinden elde edilen sonuçlar

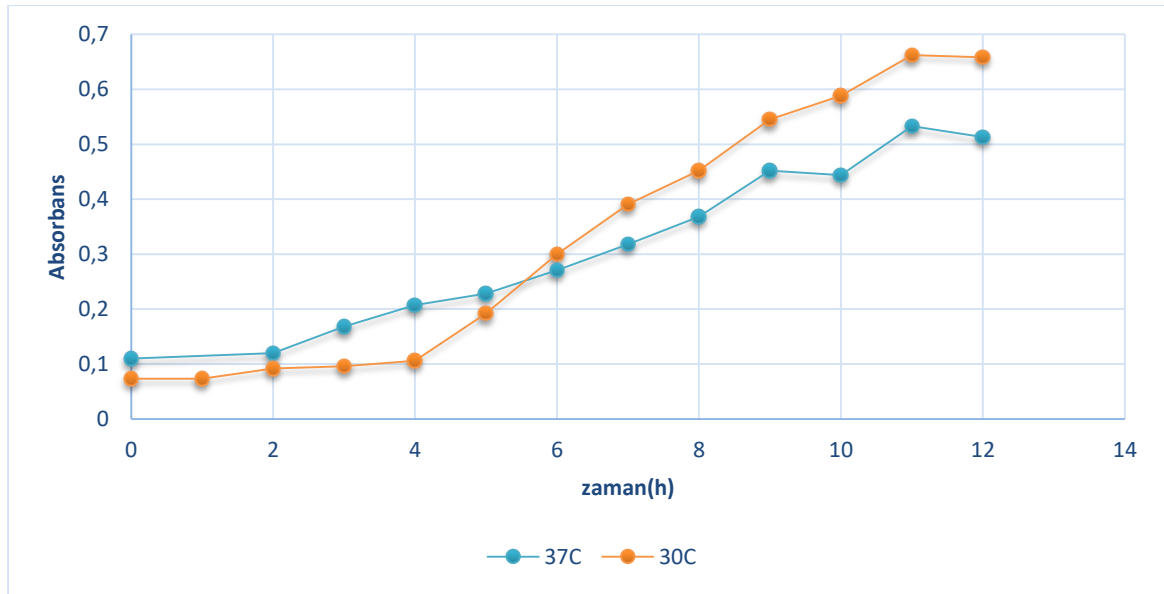
İnkübasyon süresi (saat)	Ortam	Kuru hücre ağırlığı, g/L	Spesifik üreme hızı, $\mu(\text{saat}^{-1})$	İkilenme süresi, $t_d(\text{saat})$
48	Nutrient Broth	0,009	0,229	3,03
72	Nutrient Broth	0,007	0,154	4,50

Sonuçlar inkübasyon süresinin bakterinin büyümesi üzerinde oldukça etkili olduğunu göstermektedir. *Bacillus subtilis* ATC 6633 suşu için uygun inkübasyon süresinin 48 saat olduğu tespit edilmiştir. Hossain ve Anantharaman (2006), inkübasyon süresinin etkisini *B. subtilis*'in bakteriyel üremesi için yaptıkları çalışmada gözlemlemiş ve 12, 24, 36, 48, 60 ve 72 saatlik değerleri test etmişlerdir. Kurşun gideriminde kullanılan mikroorganizmanın 48 saat inkübe edilmesi sonucunda kurşun gideriminin daha verimli olduğu gözlenmiştir.

Bu çalışmada, inkübasyon süresinin etkisi için yapılan deneyler sonucunda en iyi değerlere 48 saat inkübasyon süresinde ulaşılmış ve bundan sonraki çalışmalar için bu değer baz alınmıştır.

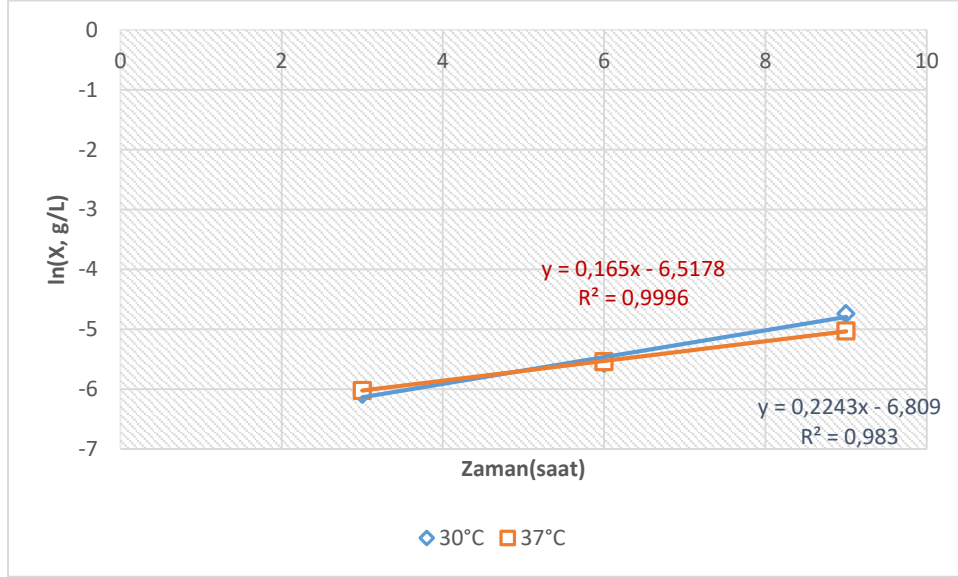
5.4. Sıcaklığın Etkisi

Uygun inkübasyon sıcaklığının belirlenmesi için literatür araştırması sonucu elde edilen veriler göz önüne alınmış ve *Bacillus* cinsi bakterilerin 30°C üstünde 35-37°C aralığında üredikleri görülmüştür (Kalaylı ve Beyatlı, 2003). Bu doğrultuda 30 ve 37°C'ler denenmiş ve bulgular Şekil 5.4'te gösterilmiştir.



Şekil 5.4. 600 nm dalga boyunda pH 7'de 48 saatlik inkübasyon süresinde farklı inkübasyon sıcaklığında *B. subtilis* ATCC 6633 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızlarına da bakılmıştır. Hızlar Şekil 5.5’deki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmış ve eğim baz alınarak ikilenme süreleri bulunmuştur.



Şekil 5.5. Farklı inkübasyon sıcaklığında $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği

30°C ve 37°C inkübasyon sıcaklığı için hesaplanan μ ve t_d değerleri Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Her iki sıcaklık değerinde yapılan çalışmalar sonucunda t_L sürelerinin yaklaşık olarak eşit ve Şekil 5.4’te görüldüğü gibi 4 saat civarında olduğu gözlenmiştir. Ekspansiyel dönemin her iki sıcaklık değeri için 4-11 saatleri arasında olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışma sonucunda 30°C’lik inkübasyon sıcaklığında absorbans değerinin daha yüksek ve maksimum değerin 0,747 olduğu görülmüştür. Ayrıca her iki sıcaklık değeri için kuru hücre ağırlığı, spesifik üreme hızları ve ikilenme süreleri hesaplanmış ve Çizelge 5.2’de gösterilmiştir.

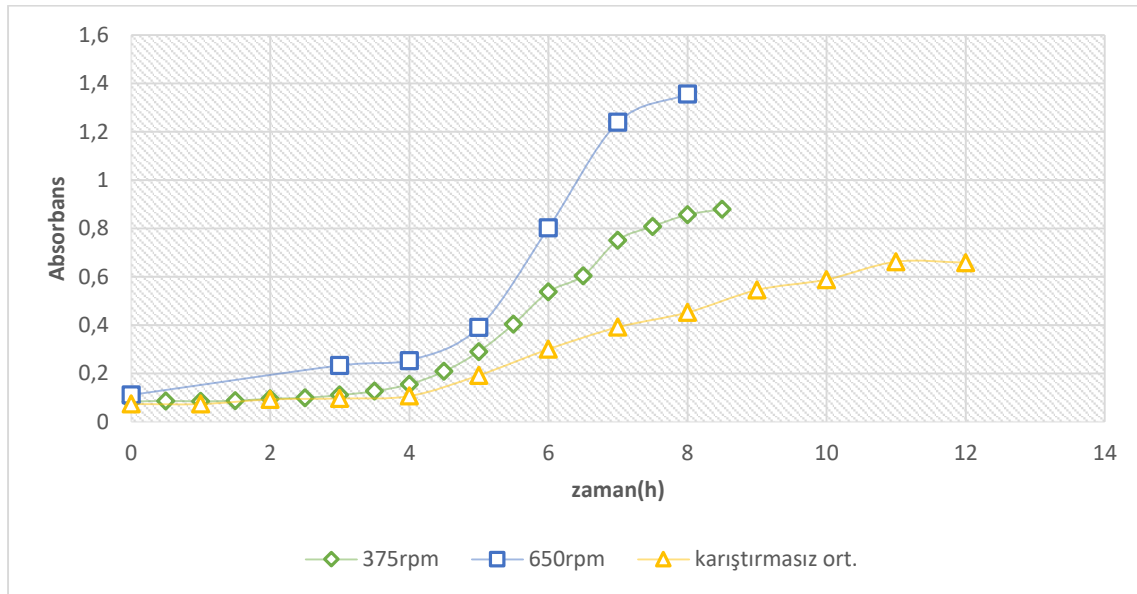
Çizelge 5.2. pH=7’de, 48 saatlik inkübasyonda karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sıcaklıklarında elde edilen sonuçlar

Sıcaklık	Ortam	Kuru hücre ağırlığı, g/L	Spesifik üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	İkilenme süresi, t_d (saat)
30°C	Nutrient Broth	0,008	0,224	3,09
37°C	Nutrient Broth	0,006	0,165	4,20

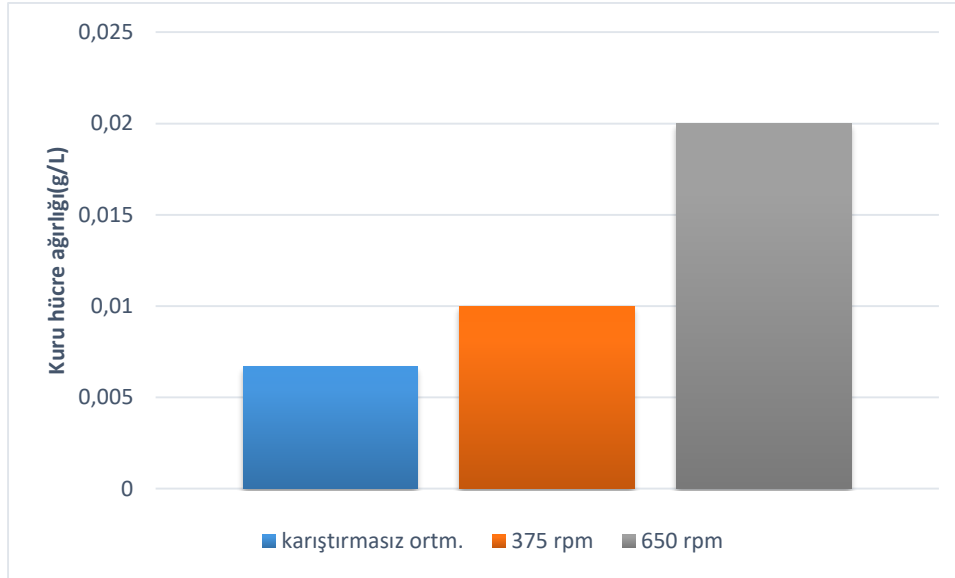
Çalışmalar sonucunda elde edilen değerler sıcaklıklar arasında büyük farkın olmadığını göstermiş, daha fazla üreme olduğu ve enerji tasarrufu da göz önüne alındığı için uygun inkübasyon sıcaklığı olarak 30°C seçilmiş ve bundan sonraki çalışmalarda bu değer baz alınmıştır. Payne ve arkadaşları (1992) yaptıkları çalışmada, *Francisella tularensis* ATCC 6223 suşunun büyümesine inkübasyon sıcaklığının etkisini incelemişler ve 25, 35 ve 42°C değerlerini ele almışlardır. Çalışma sonucunda bakteri için optimum sıcaklığın 35°C olduğunu 42°C’de büyümenin yavaş, 25°C’de ise hemen hemen olmadığını tespit etmişlerdir. Tamdoğan ve Sidal (2011) yaptıkları çalışma sonucunda *B. subtilis* ATCC 6633 suşu için optimum koşulları pH 7, inkübasyon süresi 24 saat ve sıcaklığı 30°C olarak tespit etmiştir. Pichhardt (2004) ve Gomaa (2014), çalışmalarında çeşitli *Bacillus* türleri için optimum üreme sıcaklığını 30°C olarak bildirmiştir. Literatür araştırması ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler paralellik göstermiştir.

5.5. Karıştırma Hızının Etkisi

Karıştırma hızının etkisini görmek için pH=7’de, 30°C’de ve 48 saat inkübasyon süresince aktiveleştirilen bakteri, karıştırmasız ortamda, 375 ve 650 rpm karıştırma hızlarında kullanılmış ve elde edilen bulgular Şekil 5.6’da gösterilmiştir. Farklı karıştırma hızlarına ait kuru hücre ağırlığı değerleri Şekil 5.7’de verilmiştir.



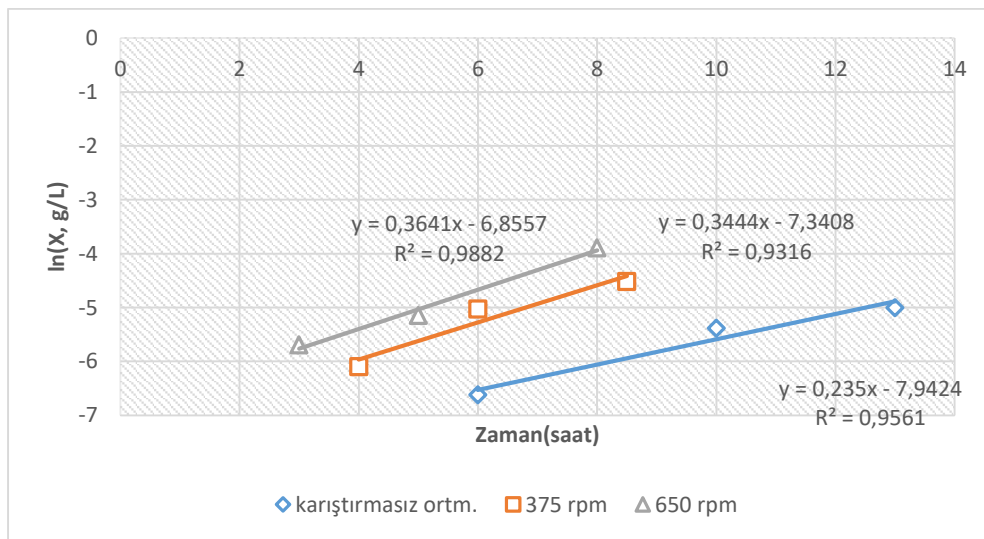
Şekil 5.6. 600 nm dalga boyunda pH=7’de 30°C ve 48 saatlik inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında *B. subtilis* ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği



Şekil 5.7. Farklı karıştırma hızlarında kuru hücre ağırlığı grafiği

Karıştırmasız ortamda t_L süresi 6 saat iken, 375 ve 650 rpm karıştırma hızlarında sırasıyla 4 ve 3 saat olarak gözlenmiştir. 650 rpm karıştırma hızında en kısa t_L süresinin gözlenmesinin yanı sıra en yüksek üreme olduğu da gözlenmiştir. Logaritmik evre süresinin karıştırmasız ortamda 6-13 saatleri arasında, 375 ve 650 rpm hızlarda sırası ile 4-9, 3-8 saatleri arasında olduğu tespit edilmiştir. Eksponansiyel dönemdeki maksimum absorbans değerlerinin 375 rpm için 0,802 ve 650 rpm için 1,201 olduğu görülmüştür.

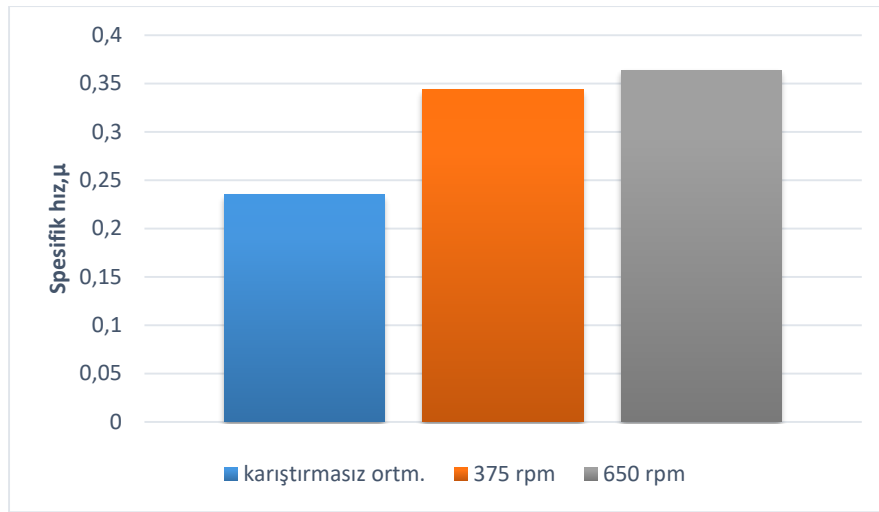
Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızlarına da bakılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 5.8'deki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.8. Farklı karıştırma hızları için $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği

Karıştırmasız ortam için; eğimden $\mu=0,235 \text{ saat}^{-1}$ ve $0,693/t_d = \mu$ eşitliğinden $t_d=2,95 \text{ saat}$ olarak bulunmuştur. 375 ve 650 rpm değerleri için μ değeri sırasıyla 0,344 ve 0,364 saat^{-1} olarak, t_d değeri ise 2,01 ve 1,90 saat olarak hesaplanmıştır.

Farklı karıştırma hızlarına ait spesifik üreme hızları Şekil 5.9’da gösterilmiştir. Değerler incelendiğinde en yüksek hıza (0,364 saat^{-1}) 650 rpm karıştırma hızında ulaşıldığı anlaşılmaktadır.



Şekil 5.9. Farklı karıştırma hızlarındaki spesifik hızların grafiği

Spesifik hız değerlerini karşılaştırdığımızda en yüksek değer 650 rpm karıştırma hızında olduğu ve bu değeri sırasıyla 375 rpm karıştırma hızı ile karıştırmasız ortamın takip ettiği görülmüştür. Elde edilen değerler Çizelge 5.3’te gösterilmektedir. Yapılan çalışma sonucunda uygun karıştırma hızının 650 rpm olduğu saptanmıştır.

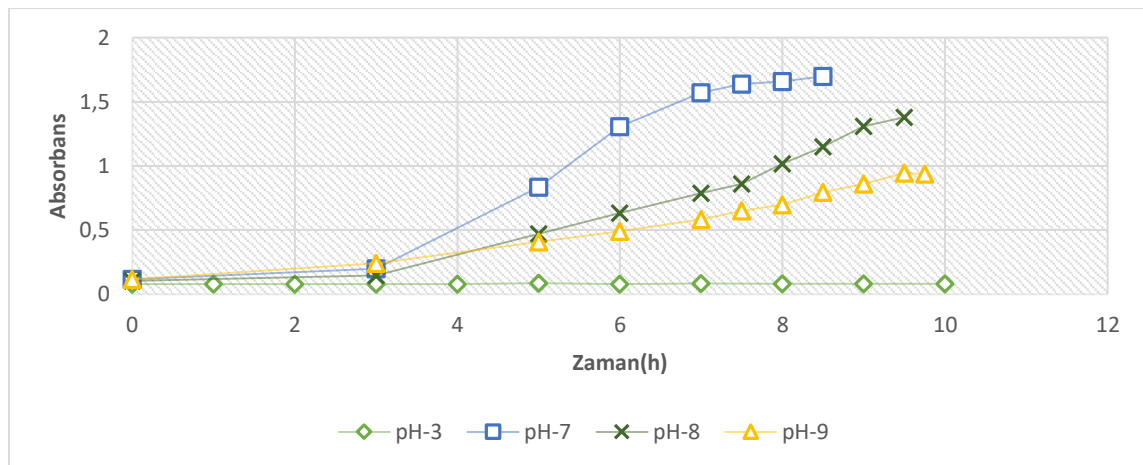
Çizelge 5.3. pH=7’de, 30°C’de ve 48 saat inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında elde edilen sonuçlar

Karıştırma Hızı	Ortam	Kuru hücre ağırlığı g/L	Spesifik üreme hızı, $\mu(\text{saat}^{-1})$	İkilenme süresi, $t_d(\text{saat})$
Karıştırmasız ortam	Nutrient Broth	0,006	0,235	2,95
375 rpm	Nutrient Broth	0,011	0,344	2,01
650 rpm	Nutrient Broth	0,020	0,364	1,90

Karıştırma (çalkalama), üreme üzerinde olumlu bir etki yaratmıştır. Karıştırma hızındaki artış ile bakterinin üremesinde yani absorbans değerinde bir artış meydana geldiği görülmüştür. Aynı şekilde durağan faz, 375 rpm ve 650 rpm değerlerindeki kuru hücre ağırlığı miktarına bakıldığında en yüksek değerin 650 rpm karıştırma hızında olduğunu görülmektedir. Karıştırma hızının artması spesifik üreme hızını artırmış ve ikilenme süresini kısaltmıştır. Karıştırma hızının artışıdaki bu etki, ortamdaki çözünmüş oksijenin bakteri ile temasını artırdığını ve böylece üremenin arttığı yönünde yorumlanabilir. Karıştırma ile birlikte ortamda homojenizasyon da sağlanmıştır. Ancak karıştırma hızı fazla veya sert olursa mikroorganizmada mekanik etkiye bağlı olarak ölümler olabilir. Feng ve arkadaşları (2003), *Bacillus licheniformis* NK-27 suşu ile yaptıkları çalışmada optimum karıştırma hızını 600 rpm olarak tespit etmişlerdir. Johns ve diğerleri (1994) ise *Streptococcus zooepidemicus* tarafından hiyorilonik asit üretimini çalışmış ve bakteri için 600 rpm çalkalama hızının 300 rpm hıza göre daha verimli olduğunu görmüştür. Baysak (2008), *Rhizobium* suşlarının karıştırma hızlarındaki artışla birlikte kuru hücre ağırlıklarında da artış olduğunu bildirmiştir.

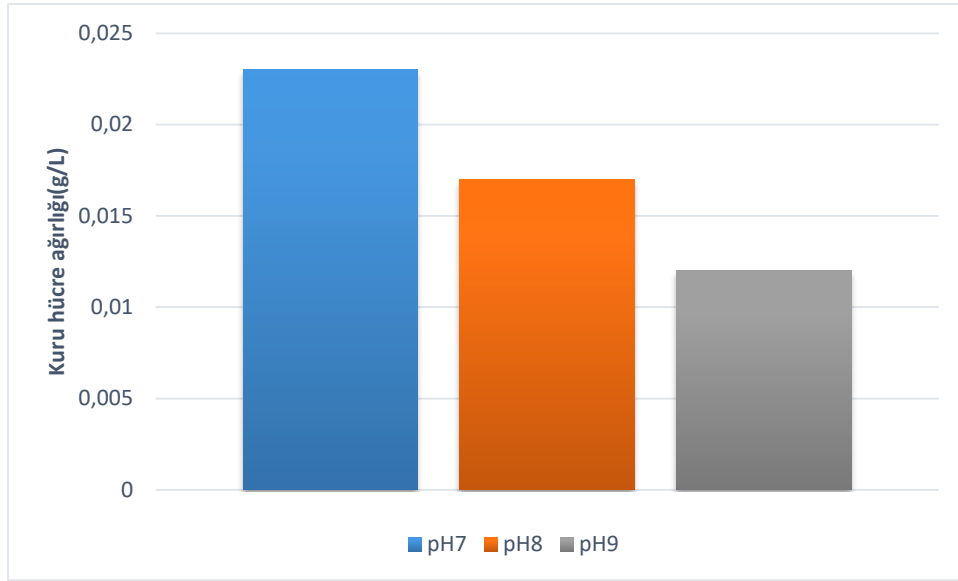
5.6. pH Değerinin Etkisi

pH tespiti için yapılan çalışmada 650 rpm karıştırma hızında 48 saat inkübasyon süresi sonrasında ve 30°C sıcaklıkta zamana karşı veriler alınmış ve 600 nm dalga boyunda UV'de absorbans değerleri ölçülmüştür. pH değerleri 3-9 aralığında değiştirilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 5.10'da yer almaktadır.



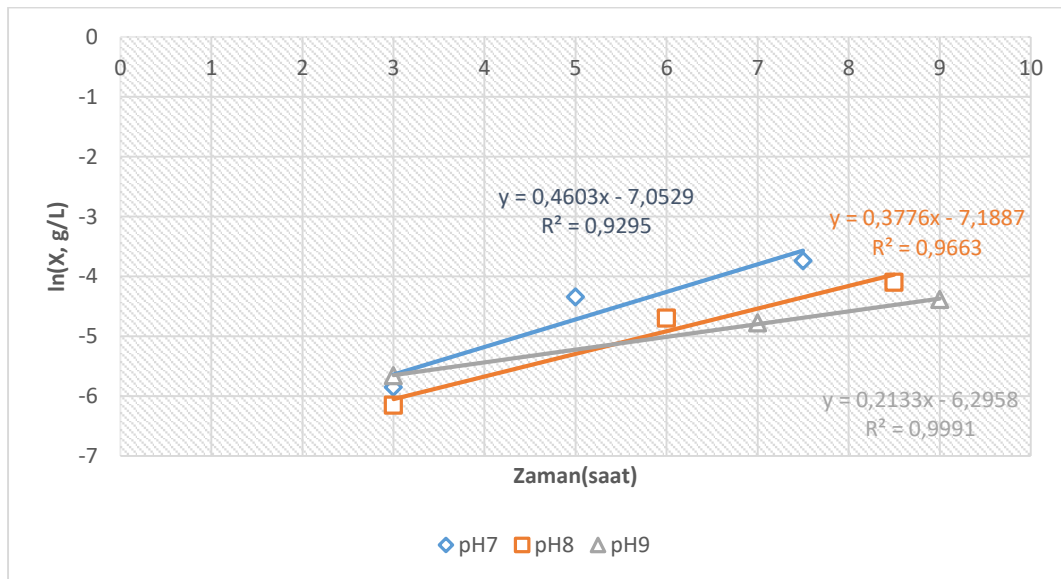
Şekil 5.10. 600 nm dalga boyunda 48 saat ve 30°C sıcaklıkta inkübasyon, 650rpm karıştırma hızında farklı pH değerlerinde *B. subtilis* ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği

Yapılan çalışmada *Bacillus subtilis*'in üremesi için uygun ortamın nötr ortam (pH=7) olduğu tespit edilmiştir. Asidik ortamda bakteri büyüme gösterememiştir. Bazik ortamda ise bakterinin üremesi azalmış ve adaptasyon süresi uzamıştır. Şekil 5.11'deki veriler incelendiğinde kuru hücre ağırlığı değerinin pH'ı 7 olan ortamda en yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 5.11. Farklı pH değerlerinde kuru hücre ağırlığı grafiği

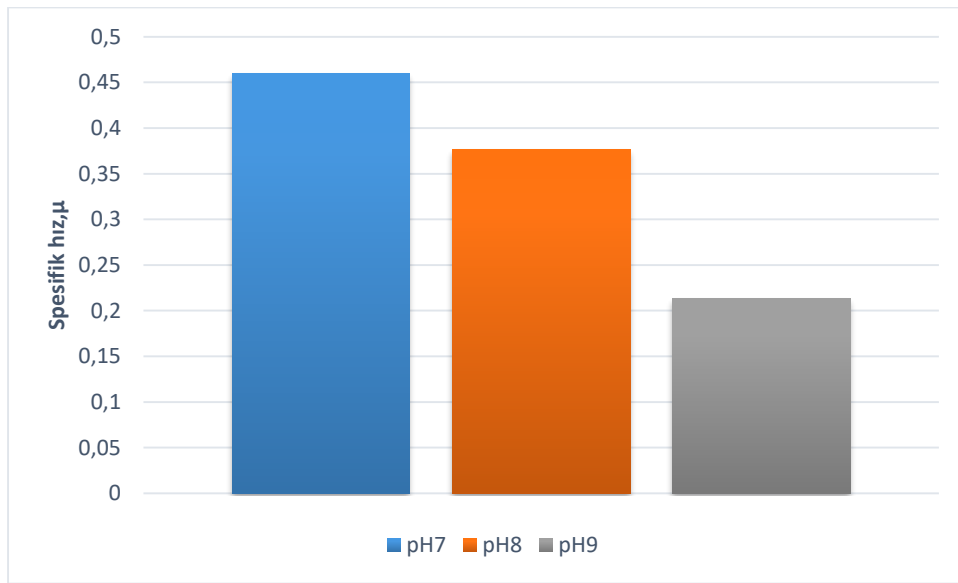
Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızları Şekil 5.12'deki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplandı, eğim baz alınarak ikilenme süreleri bulundu.



Şekil 5.12. Farklı pH değerleri için $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği

pH'ı 7, 8 ve 9 olan ortamlar için μ değerleri sırasıyla 0,460, 0,377 ve 0,213 saat⁻¹ olarak; t_d değerleri ise 1,51, 1,84 ve 3,25 saat olarak hesaplanmıştır.

Farklı pH değerlerinde t_L sürelerine bakıldığında, pH 7 ve 8 değerlerinde 3 saat, pH 9 değerinde ise 4 saat olarak tespit edilmiştir. Logaritmik evrenin pH 7 için 3-8 saatleri, pH 8 için 3-9,5 ve pH 9 için 4-10 saatleri arasında olduğu görülmüştür. Farklı pH değerine ait spesifik hızlar Şekil 5.13'te ve çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Çizelge 5.4'te gösterilmektedir.



Şekil 5.13. Farklı pH değerlerinde spesifik hızların grafiği

Çizelge 5.4. 48 saat ve 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı pH'larda elde edilen sonuçlar

pH	Ortam	Kuru hücre ağırlığı,g/L	Spesifik üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	İkilenme süresi, t_d (saat)
pH=7	Nutrient Broth	0,023	0,460	1,51
pH=8	Nutrient Broth	0,017	0,377	1,84
pH=9	Nutrient Broth	0,012	0,213	3,25

Elde edilen veriler incelendiğinde *B. subtilis* için uygun pH değerinin 7 olduğu görülmektedir. Asidik ortamda (pH=3) bakteri ortama adapte olup üreme gösterememiştir. Bazık ortamda (pH=9) ise bakterinin ortama adaptasyon süresi ve logaritmik evresi uzun sürmüş, üreme hızı pH 7 ve 8 değerlerine göre daha düşük olmuştur. pH 7 ve 8 değerlerine

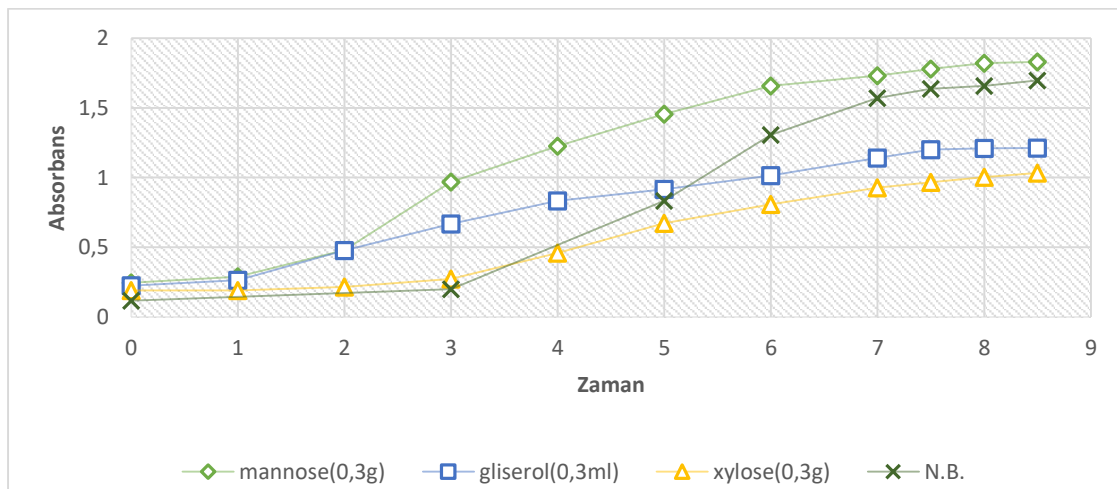
ait verilerin birbirine yakın olduğu görülmektedir. Tamdoğan ve Sidal (2011), *B. subtilis* ATCC 6633 suşu ile yaptıkları çalışmada bakterinin üremesi için optimum pH değerini 7 olarak belirlemişlerdir. Elsayed ve arkadaşları (2013), *Azomonas macrocytogenes* ile PHB üretimini araştırmış ve bakterinin en yüksek üremeyi pH=7,5 değerinde gösterdiğini tespit etmişlerdir. Kalaylı ve Beyatlı (2003), çalışmalarında *Bacillus* sp. için optimum pH değerini 7 olarak bildirmişlerdir.

Literatür araştırması sonucunda *Bacillus* cinsi bakteriler için ortam uygun pH değerinin 7 olduğu, bu değer elde edilen verilerle de paralellik gösterdiği ve çalışma kolaylığı sağlayacağı da göz önüne alınarak uygun pH değeri 7 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, pH değerindeki değişimin bakterinin enzim aktivitesini etkilediğini, büyüme ve çoğalmayı sağlayan enzimin nötr ortamda en verimli çalıştığını göstermektedir.

5.7. Farklı Karbon Kaynaklarının Üremeye Etkisi

650 rpm karıştırma hızında, pH=7’de, 30°C inkübasyon sıcaklığında ve 48 saat inkübasyon süresinde farklı azot ve karbon kaynaklarında bakterinin büyüme eğrisi incelenmiştir.

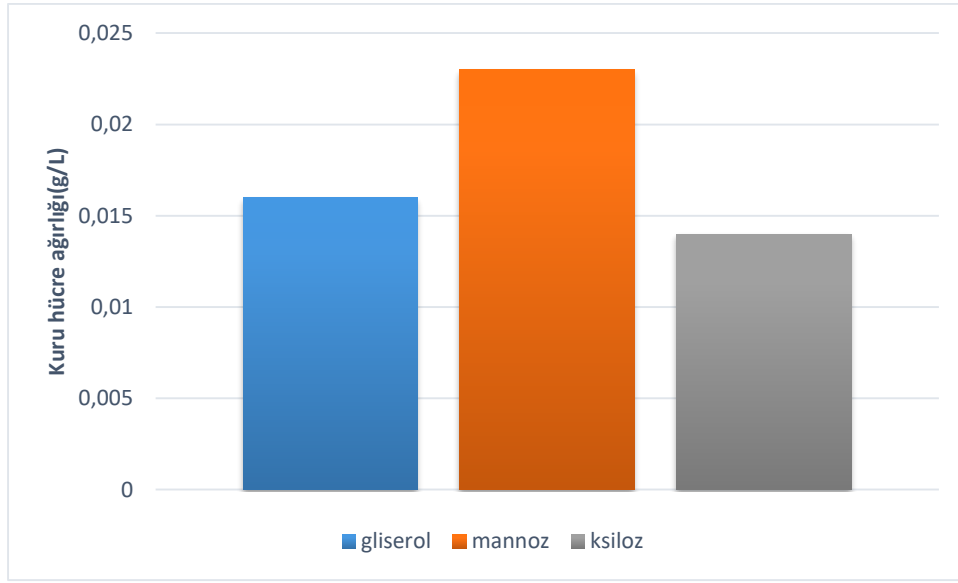
Farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemek için mannoz, gliserol ve ksiloz kullanılmış ve elde edilen veriler N.B. (nutrient broth) ortamı verileri ile grafiğe geçirilmiş ve Şekil 5.14 elde edilmiştir. Farklı karbon kaynaklarının etkisini incelemek için azot kaynağı olarak pepton kullanılmıştır.



Şekil 5.14. 600 nm dalga boyunda pH=7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 48 saat inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında *B. subtilis* ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği

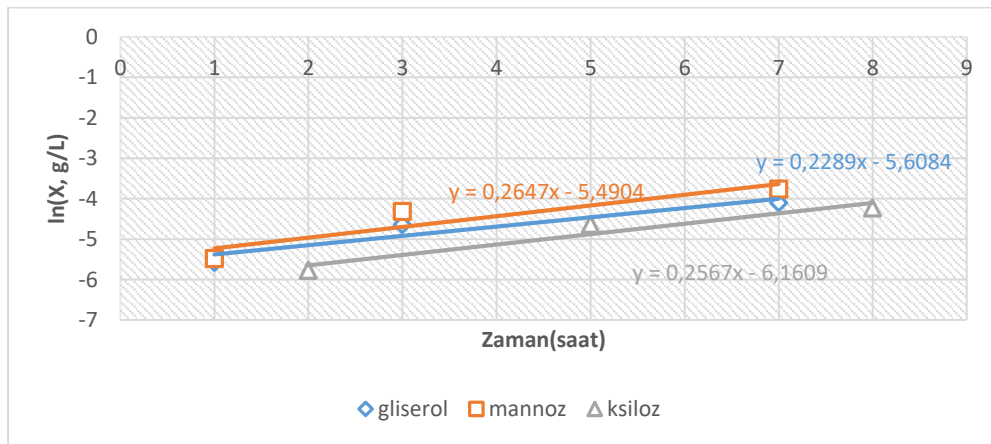
Farklı karbon kaynaklarının varlığında kuru hücre ağırlıkları da hesaplanmış ve elde edilen veriler Şekil 5.15'te gösterilmiştir.

Ksiloz ve N.B. varlığında t_L süreleri 3 saat iken mannoz ve gliserol varlığında t_L sürelerinin yaklaşık 2 saat sürdüğü görülmektedir.



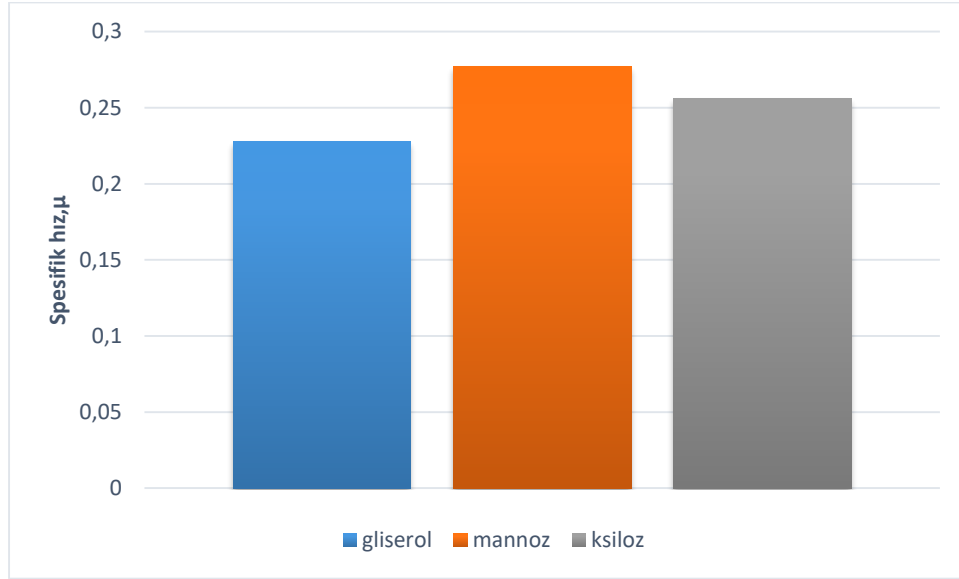
Şekil 5.15. Farklı karbon kaynaklarında kuru hücre ağırlığı grafiği

Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızları, Şekil 5.16'da ki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplandı ve eğim baz alınarak ikilenme süreleri bulundu. Hesaplanan spesifik hızlar Şekil 5.17'de gösterilmektedir.



Şekil 5.16. Farklı karbon kaynakları için $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği

Mannoz, gliserol ve ksiloz ortamları için μ değerleri sırasıyla 0,264, 0,228 ve 0,256 saat⁻¹ olarak; t_d değerleri ise 2,62, 3,04 ve 2,70 saat olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.17. Farklı karbon kaynaklarında spesifik hız grafiği

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 5.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 5.5. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında elde edilen sonuçlar (Azot kaynağı= Pepton)

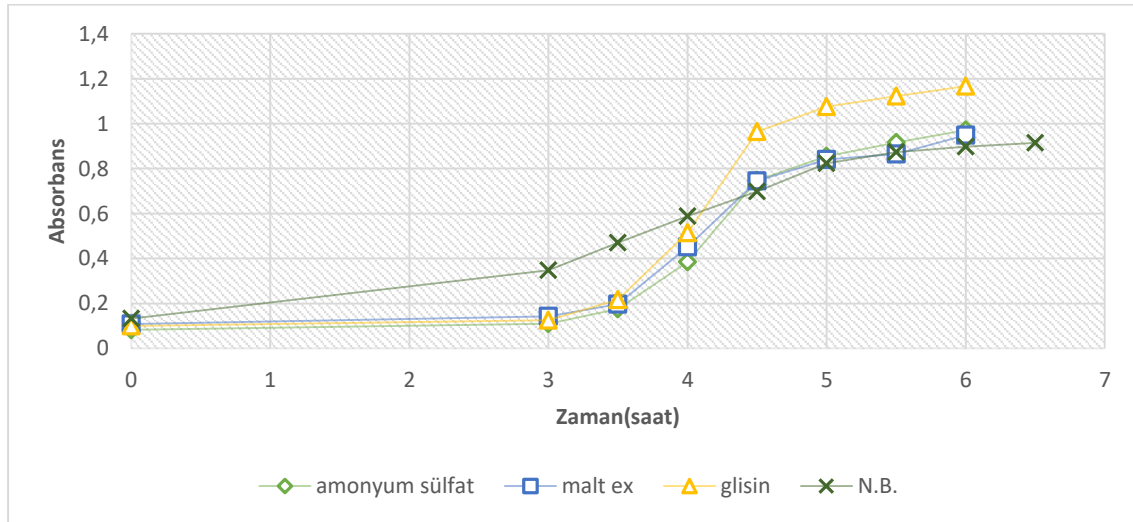
Karbon Kaynağı	Kuru hücre ağırlığı g/L	Spesifik üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	İkilenme süresi, t_d (saat)
Mannoz	0,023	0,264	2,62
Gliserol	0,016	0,228	3,04
Ksiloz	0,014	0,256	2,70

Elde edilen veriler incelendiğinde karbon kaynağı olarak mannazonun en yüksek kuru hücre ağırlığı değerine sahip olduğu görülmektedir. Mannoz ve gliserol ortamında t_L süresinin hemen hemen eşit olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ksiloz varlığında spesifik üreme hızı gliserol kaynağına göre daha fazla ve t_d değeri daha kısa olsa da, kuru hücre ağırlığı olarak gliserol kaynağının daha yüksek değere sahip olduğu görülmüştür. Maanoz kaynağında kuru hücre ağırlığı ve spesifik üreme hızı değerlerinin daha yüksek olması sebebiyle, en uygun karbon kaynağının mannoz olduğu tespit edilmiştir.

Yüksekdağ ve arkadaşları (2003), *Bacillus subtilis* 25 ve *Bacillus megaterium* 12 ile PHB üretimi çalışmalarında karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz, arabinoz ve mannitolü denemişlerdir. En yüksek PHB verimini glukoz, en yüksek kuru hücre ağırlığını ise mannitolün varlığında elde etmişlerdir. Tamdoğan ve Sidal (2011) tarafından yapılan çalışmada, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 tarafından PHB birikimine etki eden koşullar araştırılmış ve karbon kaynağı olarak glukoz, sukroz, arabinoz ve mannitol denenmiştir. En yüksek bakteri hücre birikimine karbon kaynağı olarak sukroz kullanıldığında rastlanmıştır. Rohini ve diğerleri (2006) yaptıkları çalışmada, *B. thuringiensis* R1 için besiyortamına %1 farklı C kaynakları (gliserol, glikoz, melas, sofr şeker, maltoz, laktoz, fruktoz, asetik asit, laktik asit, etanol, β -hidroksibütirik asit) koyduklarında maksimum kuru hücre ağırlığını (3,90 g/L) gliserolde tespit etmişlerdir.

5.8. Farklı Azot Kaynaklarının Üremeye Etkisi

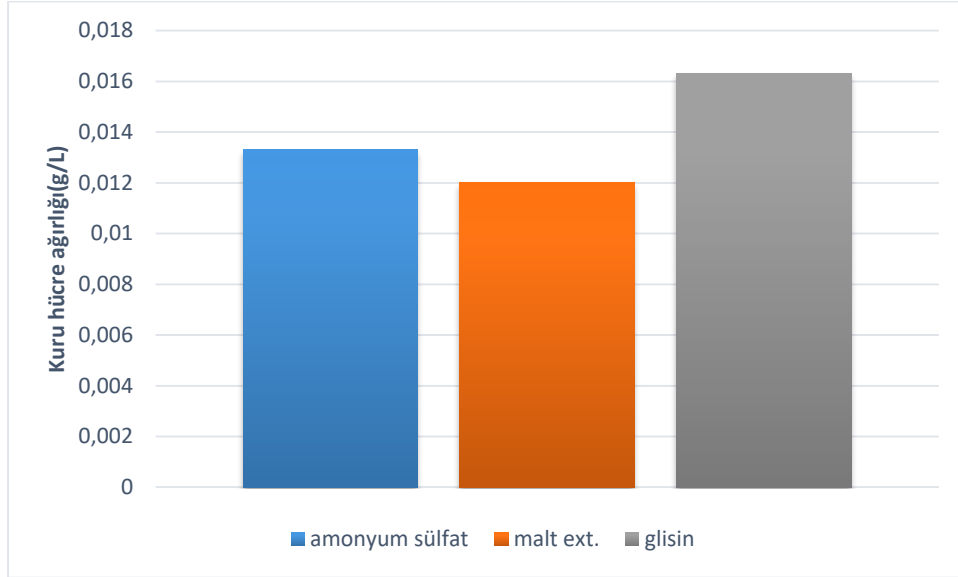
Farklı azot kaynaklarının etkisini incelemek için amonyum sülfat, malt ekstraktı ve glisin kullanılmış ve elde edilen veriler nutrient broth ortamı verileri ile birlikte grafiğe geçirilmiş ve Şekil 5.18 elde edilmiştir. Farklı azot kaynaklarının etkisini incelerken karbon kaynağı olarak sığır eti ekstraktı kullanılmıştır.



Şekil 5.18. 600 nm dalga boyunda pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 48 saat inkübasyonda farklı azot kaynaklarında *B. subtilis* ATCC 6633 için üreme eğrisi grafiği

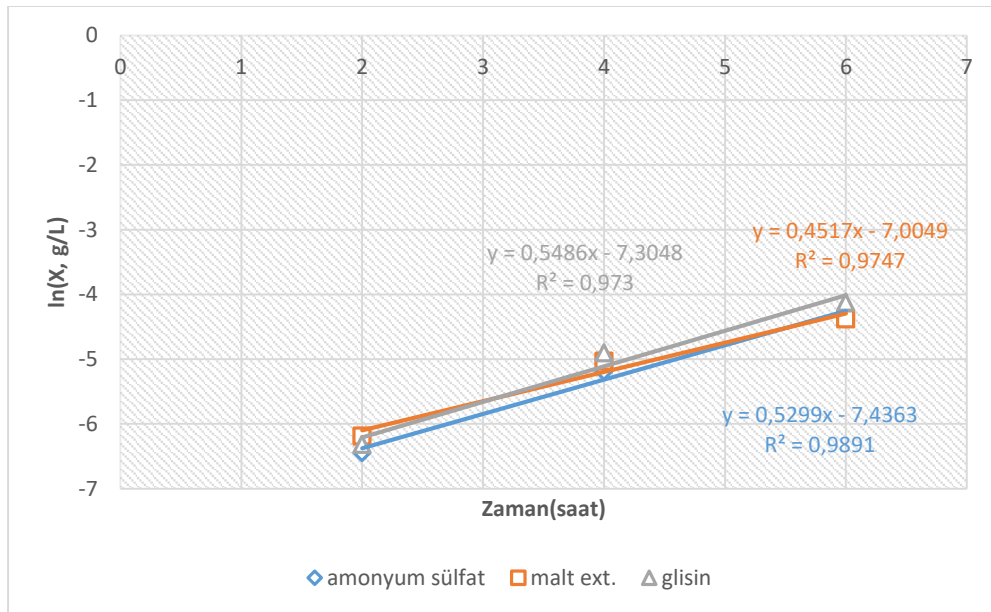
Kullanılan tüm azot kaynaklarında bakteri büyüme göstermiştir. Azot kaynakları varlığında t_L sürelerinin eşit ve 3 saat olduğu görülmektedir.

Farklı azot kaynaklarının varlığında kuru hücre ağırlıkları da hesaplanmış ve elde edilen veriler Şekil 5.19’da gösterilmiştir.



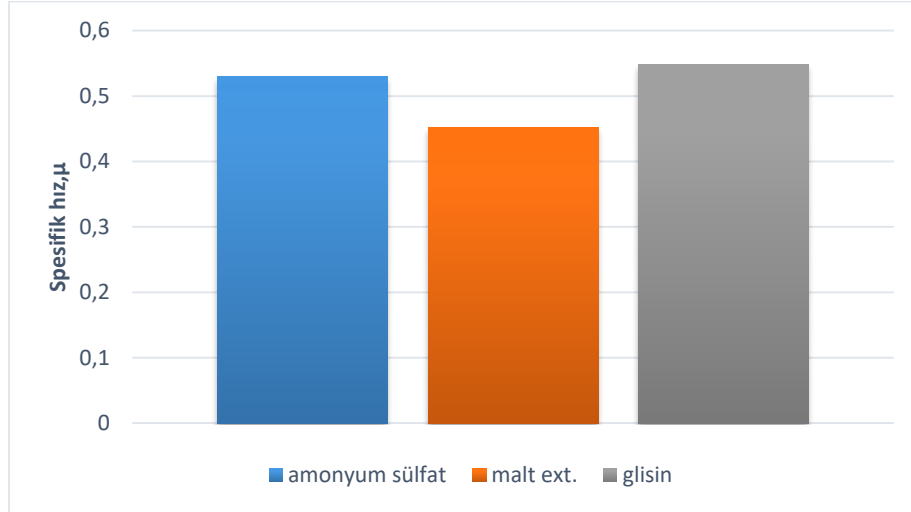
Şekil 5.19. Farklı azot kaynaklarında kuru hücre ağırlığı grafiği

Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızları şekil 5.20’de ki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplandı ve eğim baz alınarak ikilenme süreleri bulundu. Hesaplanan spesifik hız değerleri Şekil 5.21’de gösterilmiştir.



Şekil 5.20. Farklı azot kaynakları için $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği

Amonyum sülfat, malt ekstraktı ve glisin ortamları için μ değerleri sırasıyla 0,529, 0,451 ve 0,548 saat⁻¹ olarak; t_d değerleri ise 1,31, 1,54 ve 1,26 saat olarak hesaplanmıştır.



Şekil 5.21. Farklı azot kaynaklarında spesifik hızlar

Yapılan çalışma sonucunda elde edilen veriler Çizelge 5.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.6. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı azot kaynaklarında elde edilen sonuçlar (Karbon kaynağı= Et ekstraktı)

Azot Kaynağı	Kuru hücre ağırlığı (g/L)	Spesifik üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	İkilenme süresi, t_d (saat)
Amonyum sülfat	0,013	0,529	1,31
Malt Ekstraktı	0,012	0,451	1,54
Glisin	0,016	0,548	1,26

Azot elementi hücrenin temeli olan proteinlerin, nükleik asitlerin, hormon ve enzimlerin yapısına katıldığı için büyük önem taşımaktadır (Aydoğmuş, 2011). Azot konsantrasyonu sınırlandığında mikroorganizmaların biyolojik faaliyetleri yavaşlar ve ortamdaki mikroorganizma konsantrasyonunun azalmasına sebep olur.

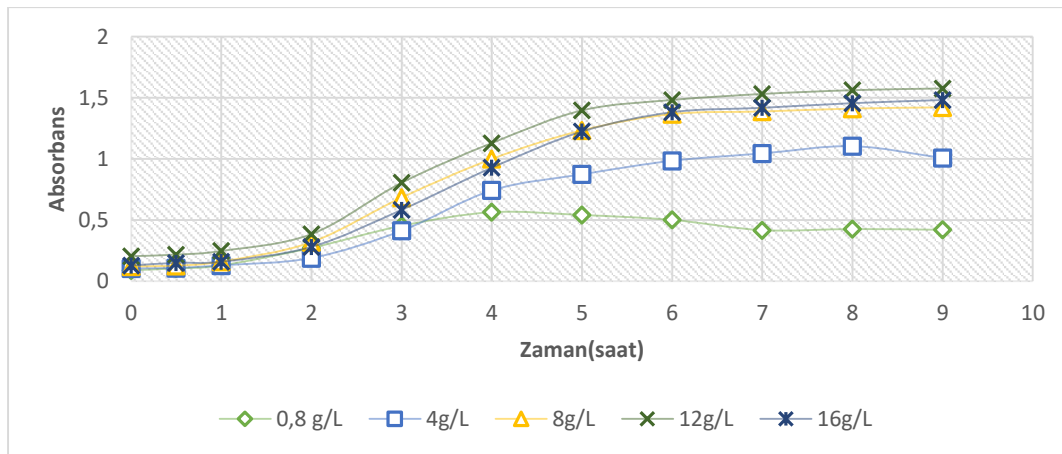
Elde edilen veriler incelendiğinde *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu için en yüksek kuru hücre ağırlığına glisin olan ortamda ulaşıldığı görülmektedir. Spesifik üreme hızı ve ikilenme süreleri değerleri incelendiğinde, amonyum sülfat ve glisin ortamına ait verilerin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Her üç azot kaynağı varlığında t_L sürelerinin

hemen hemen eşit ve 3 saat olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Logaritmik evreler incelendiğinde, glisin için log fazının 3-5 saatleri, malt ekstrakt ve amonyum sülfat için ise 3-6 saatleri arasında olduğu görülmektedir. Elde edilen veriler sonucunda en uygun azot kaynağının glisin olduğu tespit edilmiştir. Glisini, amonyum tuzlarından olan amonyum sülfat takip etmektedir. Toprakta bulunan azotun genellikle amonyum sülfat formunda olmasından dolayı toprak bakterisi *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu amonyum sülfat azot kaynağı varlığına da kolayca adapte olmuş ve iyi üreme göstermiştir. Amonyum sülfat ve malt ekstrakta ait değerlerin birbirine oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir.

Literatür araştırması sonucunda birçok çalışmada *Bacillus* sp. için azot kaynağı olarak kullanılan inorganik kimyasalların (amonyak ya da amonyum tuzları gibi) büyüme fazında biyokütleleri arttırmak için gerekliliği rapor edilmiştir (Gomaa, 2014). Tamdoğan ve Sidal (2011) çalışmalarında, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu için en yüksek hücre yoğunluğunu amonyum sülfat varlığında, en yüksek PHB verimini ise glisin varlığında elde etmişlerdir. Literatür araştırması amonyum tuzlarının *Bacillus* suşları için genel olarak üreme hızını artırdığını, böylelikle büyük ölçekli proseslerde enerji ve zamandan tasarruf edilebileceğini bildirmektedir.

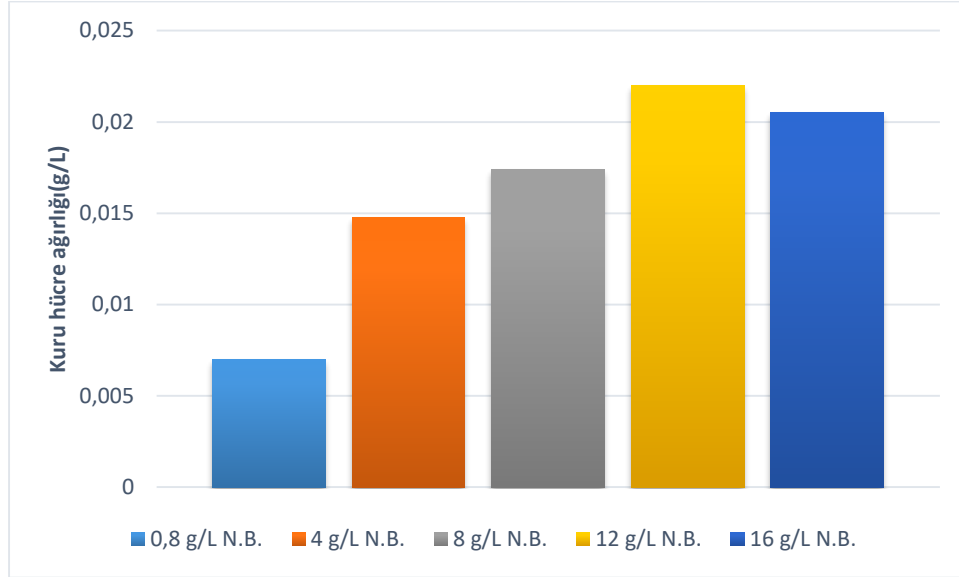
5.9. Farklı Konsantrasyonlardaki Nutrient Broth'un Etkisi

Nutrient Broth ortamının bakteri üzerindeki inhibisyon etkisini incelemek için farklı konsantrasyonlarda besi ortamları denenmiştir. Elde edilen veriler Şekil 5.22'de görülmektedir.



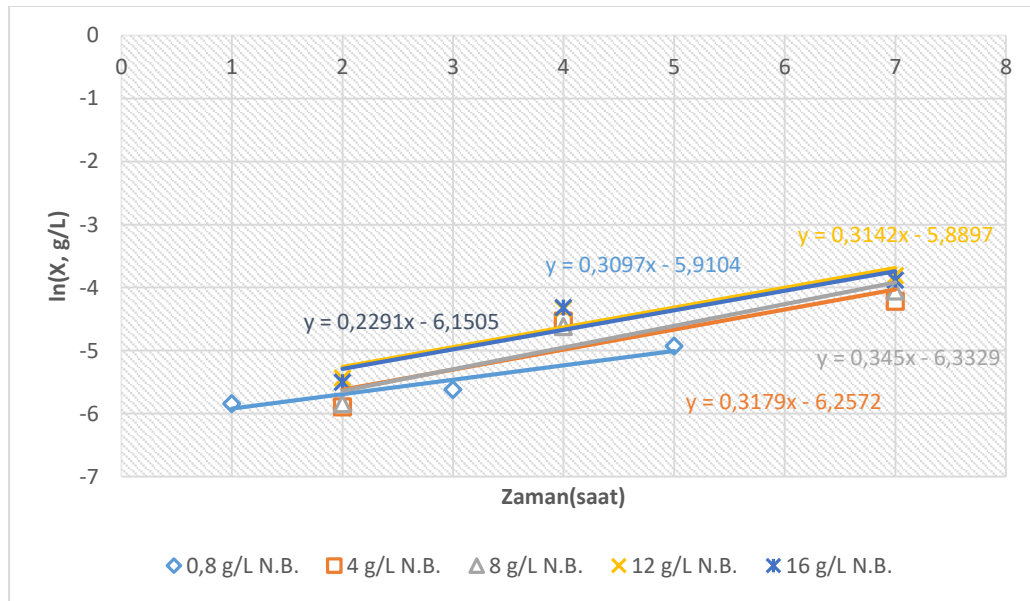
Şekil 5.22. 600 nm, pH=7'de, 48 saat ve 30°C inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı konsantrasyonlardaki Nutrient Broth çözeltisinin inhibisyon etkisi grafiği

Farklı konsantrasyonlardaki Nutrient Broth çözeltisinin etkisini incelemek için kuru hücre ağırlıkları hesaplanmış ve Şekil 5.23'te gösterilmiştir.

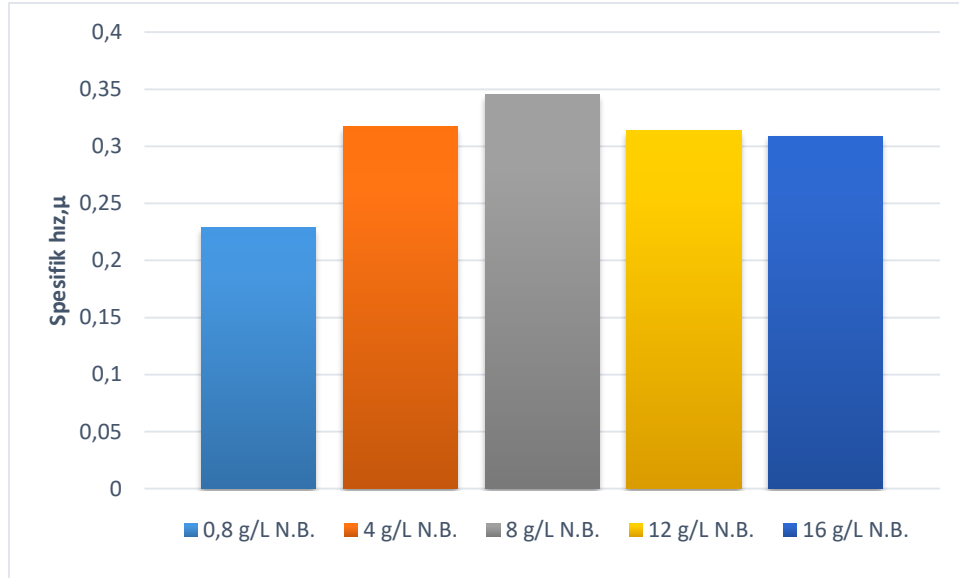


Şekil 5.23. Farklı konsantrasyonlardaki nutrient broth çözeltisindeki kuru hücre ağırlıkları

Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızları ve ikilenme süreleri Şekil 5.24'teki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplandı. Hesaplanan spesifik hız ve ikilenme süresi değerleri Şekil 5.25 ve Çizelge 5.7'de gösterilmiştir.



Şekil 5.24. Farklı konsantrasyonlardaki N.B. çözeltisi için $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği



Şekil 5.25. Farklı konsantrasyonlardaki N.B. çözeltilisinde spesifik hızlar

Elde edilen veriler incelendiğinde en yüksek spesifik üreme hızı ve en kısa ikilenme süresi Nutrient Broth konsantrasyonunun 8 g/L olduğu ortamda görülmektedir. 12 g/L Nutrient Broth konsantrasyonunda bakterinin üremesi yavaşlamış fakat kuru hücre ağırlığında artış olduğu gözlenmiştir. 12 g/L'den büyük konsantrasyonlarda kuru hücre ağırlığı değerinde azalış meydana gelmiştir. Daha düşük konsantrasyon değerlerinde ise bakteri üreme göstermesine rağmen maksimum üreme hızını 8 g/L de göstermiştir ve düşük değerlerde yeterli besin ortamının sağlanamadığı görülmüştür. Yapılan çalışma için 8 g/L'den büyük Nutrient Broth konsantrasyonunun bakteri için inhibisyon etkisi gösterebileceği, sınır değer 12 g/L olabileceği düşünülmüştür. Nutrient Broth konsantrasyonunun 8 g/L'den fazla olması durumunda inhibisyona yol açabileceğini spesifik üreme hızındaki azalış göstermektedir.

Çizelge 5.7. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı konsantrasyonlardaki N.B. çözeltilisinde elde edilen sonuçlar

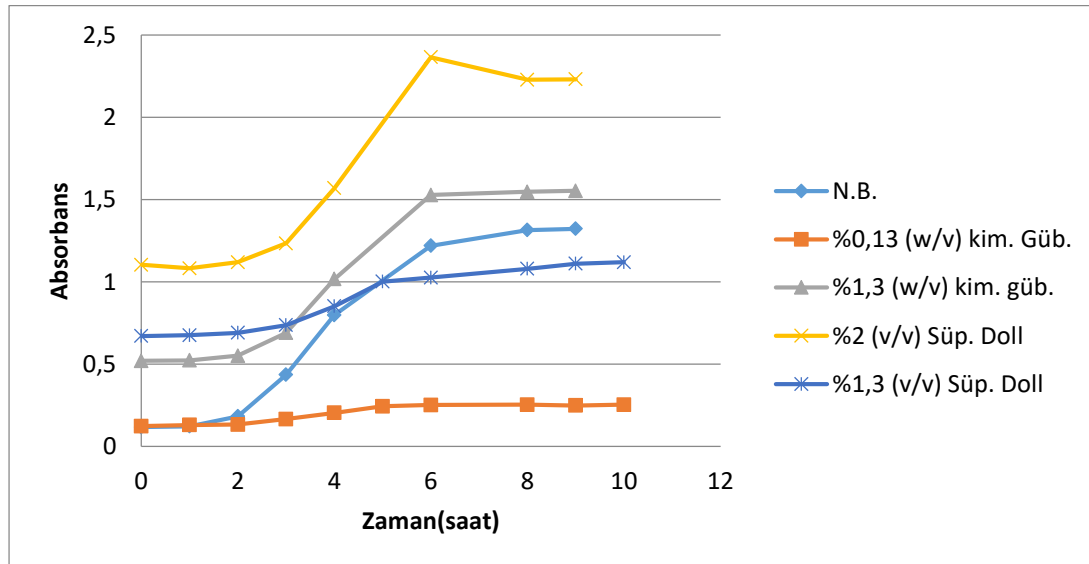
Nutrient Broth Konsantrasyonu(g/L)	Kuru hücre ağırlığı g/L	Spesifik üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	İkilenme süresi, t_d (saat)
0,8	0,007	0,229	3,03
4	0,015	0,317	2,18
8	0,017	0,345	2,00
12	0,021	0,314	2,21
16	0,020	0,309	2,24

Siddique ve Vardo-Zalik (2012) çalışmalarında, *Escherichia coli* kültürü üzerine glikoz konsantrasyonunun etkisini incelemişlerdir. Bakteri için hazırladıkları N.B. ortamına % 1, 0,5 ve 0,25 değerlerinde glikoz ilave etmişler ve artan glikoz varlığında bakterinin büyümesinin yavaşladığını, hücre sayısının azaldığını tespit etmişler, glikozun inhibisyon etkisi gösterdiğini saptamışlardır.

5.10. Doğal ve Yapay Gübrelerin Üremeye Etkisi

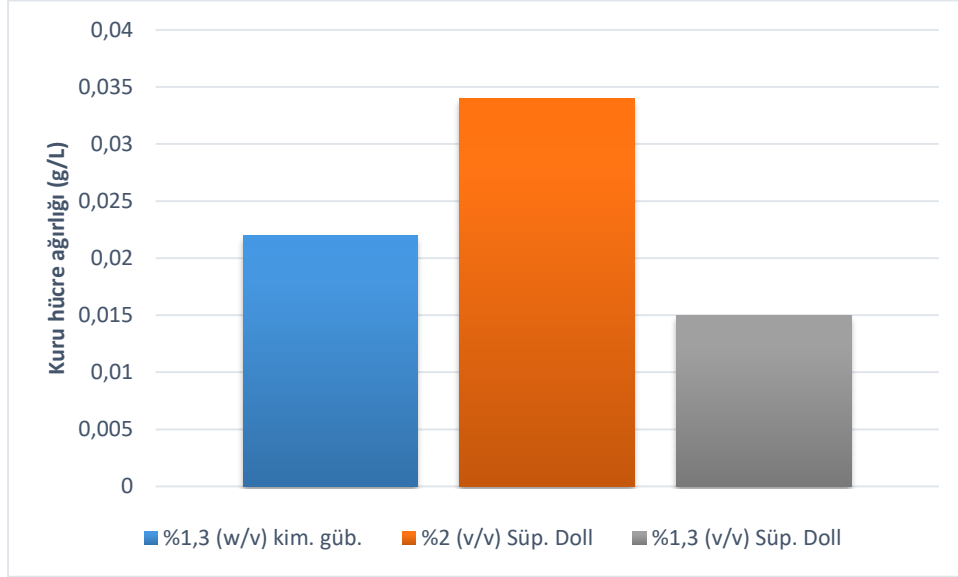
Bacillus subtilis ATCC 6633 suşu bir toprak bakterisidir. Bu nedenle toprakta bulunabilecek kimyasal ve organik gübre ortamlarının etkisi incelenmiştir. Organik gübre olarak Superdoll kullanılmıştır. Organik ve kimyasal ortamların etkisi ile farklı melas konsantrasyonlarının etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmalar 30°C’de, 48 saat inkübasyon süresinde, nötr ortamda (pH=7) ve 650 rpm çalkalama hızında gerçekleştirilmiştir.

Kimyasal gübre olarak Toros marka 20.20.0 kompoze kimyasal gübre içerisinde; % 20 azot (amonyum azotu ve üre azotu), % 20 fosfor (P_2O_5) bulunmaktadır. Superdoll marka organik gübre içeriği; % 20 yosun (*Ascophyllum nodosum*), % 10 aminoasit, % 4 K_2O , % 2 organik azot % 2,5 alginik asit ve sudan oluşmaktadır. Bu ortamlarda elde edilen absorbans-zaman grafiği Şekil 5.26’da ve kuru hücre ağırlıkları Şekil 5.27’de verilmiştir.



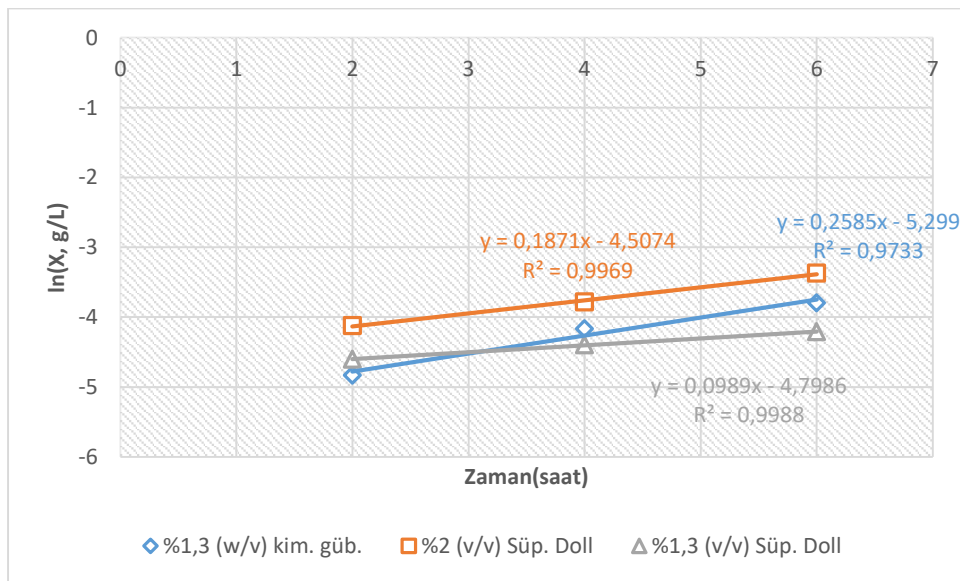
Şekil 5.26. 600 nm’de, pH=7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda organik ve kimyasal ortamlardaki üreme eğrisi grafiği

Şekil 5.26’da görüldüğü üzere % 0,13(w/v, 0,2 g) kimyasal gübre kullanılan ortamda bakteri büyüme gösterememiş, absorbans değerinde bir artış olmamıştır. Bu sebeple sonraki hesaplarda bu değer dikkate alınmamıştır.

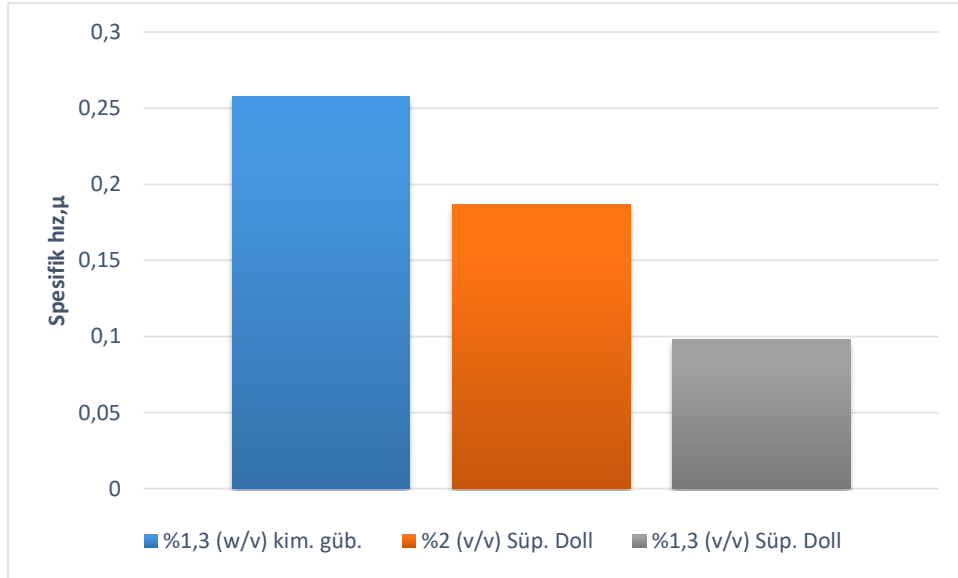


Şekil 5.27. Organik ve kimyasal ortamlardaki kuru hücre ağırlığı

Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızlarına da bakılmıştır. Hızlar Şekil 5.28’deki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmış ve eğim baz alınarak ikilenme süreleri bulunmuştur. Hesaplanan spesifik hız değerleri Şekil 5.29’da gösterilmiştir.



Şekil 5.28. Organik ve kimyasal ortamlarda $\ln$ (kuru hücre ağırlığı)-zaman grafiği



Şekil 5.29. Organik ve kimyasal ortamlardaki spesifik üreme hızı

Organik ve kimyasal ortamlara ait elde edilen veriler Çizelge 5.8.'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.8. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda organik ve kimyasal ortamlarda elde edilen sonuçlar

Ortam	Kuru hücre ağırlığı, g/L	Spesifik üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	İkilenme süresi, t_d (saat)
%1,3(w/v) Kim. Güb	0,022	0,258	2,68
%1,3(v/v) Süp.Doll	0,015	0,098	7,07
%2(v/v) Süp.Doll	0,034	0,187	3,70

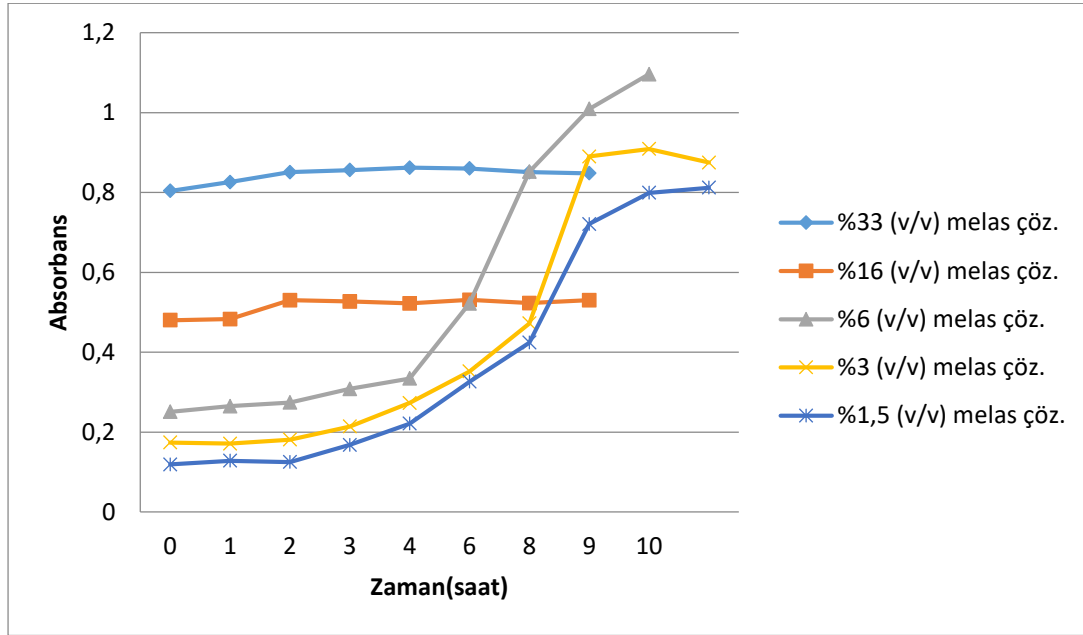
Organik ve kimyasal gübrelerin bakterinin büyümesi üzerine etkileri incelendiğinde aynı şartlar altında *B. subtilis*'in kimyasal(sentetik) ortamda daha iyi üreme gösterdiği gözlenmiştir. Her ne kadar süper doll kullanılan ortamda absorbans değeri yüksek çıkmış olsa da üreme hızı kimyasal gübreye göre daha düşük ikilenme süresi ise daha yüksek çıkmıştır. Kuru hücre ağırlıklarını incelediğimizde ise en yüksek değerin süper doll kullanılan ortamda olduğu gözlenmiştir.

Kompoze gübreler azot ve fosfor bakımından zengin olmalarından dolayı bakteri gelişim göstermiştir. Organik gübrelerin bünyesinde ise makro ve mikro besinler bulunmaktadır ki bu da bakteri gelişimini desteklemiştir.

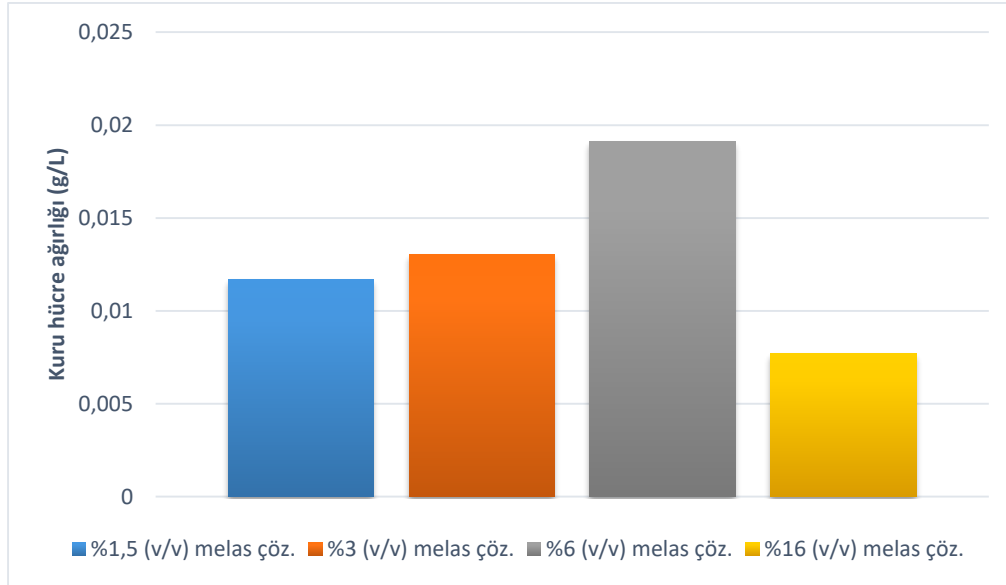
Çalışmalar sonucunda elde edilen değerler, prosesin amacına göre organik veya kimyasal ortamların kullanılabilirliğini göstermektedir. Enerji ve zamandan tasarruf gerektiren prosesler için kimyasal gübre, biyokütle miktarının önemli olduğu proseslerde Süper doll kullanımının öne çıkabileceği düşünülmüştür. Toprak bakterisi olan *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun, prosesin içeriğine göre organik veya kimyasal gübrenin kullanıldığı tarım alanlarından elde edilebileceği tespit edilmiştir.

5.11. Melas Konsantrasyonunun Etkisi

Farklı melas konsantrasyonlarının bakterinin üremesine etkisi incelenmiştir. Toplam çözelti miktarı 150 ml olacak şekilde 2, 5, 10, 20 ve 50 ml melas kullanılarak çalışılmıştır. Absorbans-zaman grafiği Şekil 5.30'da ve kuru hücre ağırlıkları Şekil 5.31'de verilmiştir.

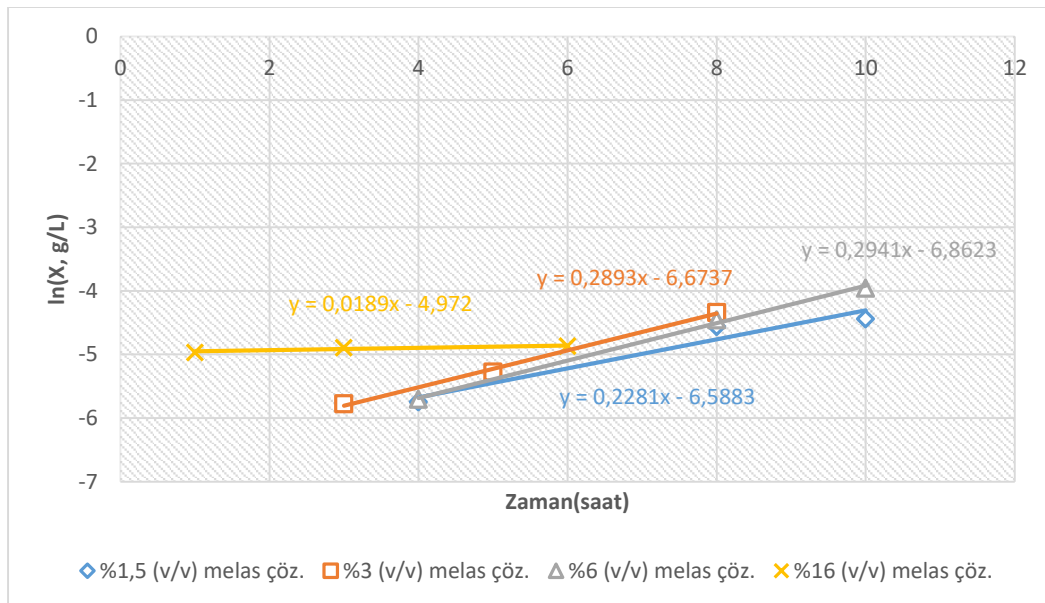


Şekil 5.30. 600 nm'de, pH=7, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı melas konsantrasyonlarında üreme eğrisi grafiği

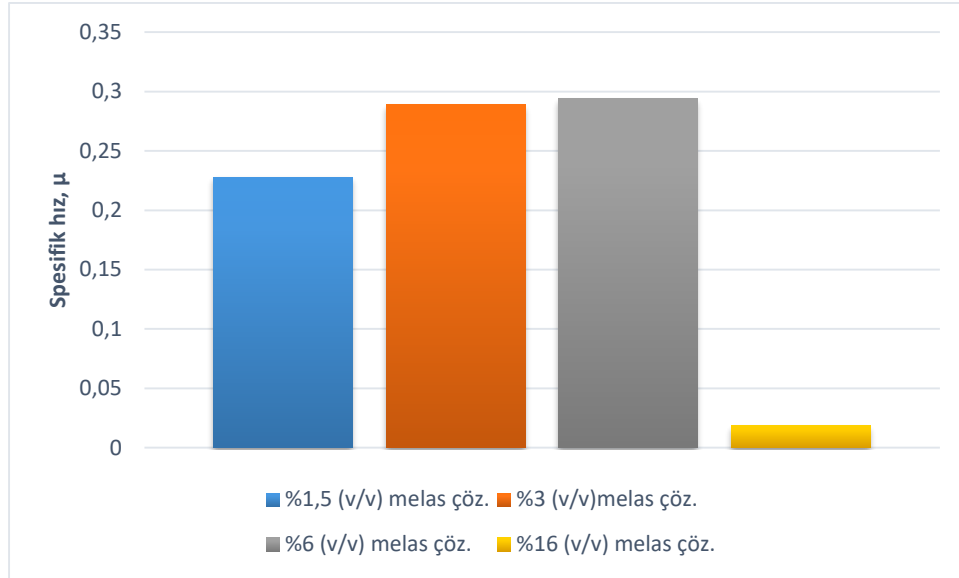


Şekil 5.31. Farklı melas konsantrasyonlarında kuru hücre ağırlığı

Logaritmik evredeki spesifik üreme hızlarına da bakılmıştır. Hızlar Şekil 5.32'deki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmış ve eğim baz alınarak ikilenme süresi bulunmuştur. Spesifik üreme hızları Şekil 5.33'te görülmektedir. 50 ml melas kullanılan ortamda bakteri üreme gösteremediği ve 25 ml melas kullanılan ortamda çok düşük miktarda üreme gösterebildiği için bu değerler sonraki hesaplamalarda kullanılmamıştır.



Şekil 5.32. Farklı melas konsantrasyonlarında $\ln(\text{kuru hücre ağırlığı})$ -zaman grafiği



Şekil 5.33. Farklı melas konsantrasyonlarında spesifik üreme hızları

Çalışmalar sonucu elde edilen veriler Çizelge 5.9.'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.9. pH=7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 48 saat ve 30°C inkübasyonda farklı melas konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar

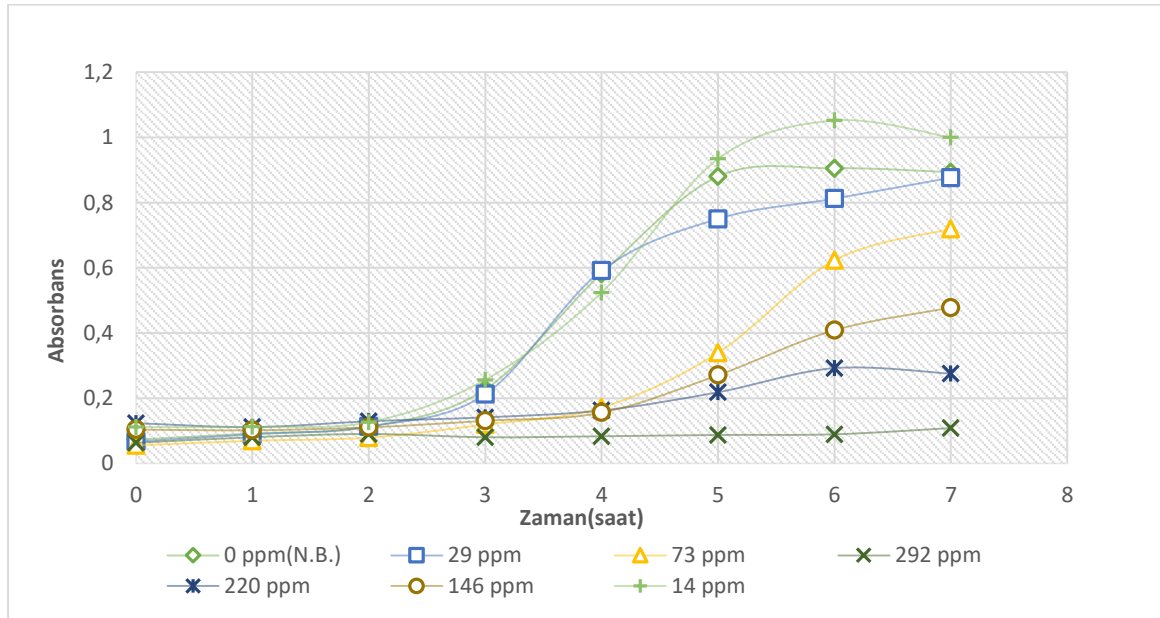
Ortam	Kuru hücre ağırlığı,g/L	Spesifik üreme hızı, μ (saat ⁻¹)	İkilenme süresi, t_d (saat)
%1,5(v/v) melas çöz.	0,012	0,228	3,04
%3(v/v) melas çöz.	0,013	0,289	2,39
%6(v/v) melas çöz.	0,019	0,294	2,35
%16(v/v) melas çöz.	0,007	0,019	36,5

Yapılan çalışmalar; bakteri için en uygun melas konsantrasyonunun 5 ml melaslı ortam (% 3, v/v) olduğunu göstermiştir. 25 (% 16, v/v) ve 50 (% 33, v/v) ml melas kullanılan ortamlarda bakteri üreme gösteremezken 10 ml (% 6, v/v) ve 2 ml (% 1,5, v/v) melas kullanılan ortamlarda daha az üreme göstermiş ve 2 ml melas ortamında daha düşük absorbans değerleri elde edilmiştir. En yüksek kuru hücre ağırlığı değerine % 6 (v/v) melas ortamında ulaşılırken, 50 ml melas kullanılan ortamdaki kuru hücre ağırlığı eser miktarda saptandığından kuru hücre ağırlığı grafiğinde yer verilmemiştir. En yüksek spesifik üreme hızı 0,294 saat⁻¹ değeri ile en kısa ikilenme süresi de %6 (v/v) melas ortamında elde edilmiştir.

Gomaa çalışmasında (2014), *Bacillus subtilis* ve *Escherichia coli*'nin melas ortamında büyümesini ve PHA üretimini araştırmıştır. *B. subtilis* için 48 saat inkübasyon ve 35°C sıcaklıkta en yüksek kuru hücre ağırlığını % 8 melas ortamında en yüksek PHA verimini ise % 6 melas ortamında elde etmiştir. % 8 melas değerinin üstünde kuru hücre ağırlığında önemli bir düşüş gözlemlenmiştir. *E. coli* için aynı ortam koşullarında en yüksek kuru hücre ağırlığı ve PHA verimini % 8 melas ortamında elde etmiştir. Çalışmalar literatür araştırması ile paralellik göstermiştir. Elde edilen veriler melasın da organik ve kimyasal gübreler gibi büyük ölçekli proseslerde besi ortamı olarak kullanılabileceğini göstermiş, atıkların değerlendirilmesi sağlanarak daha ekonomik proseslerin oluşturulabilmesi hedeflenmiştir.

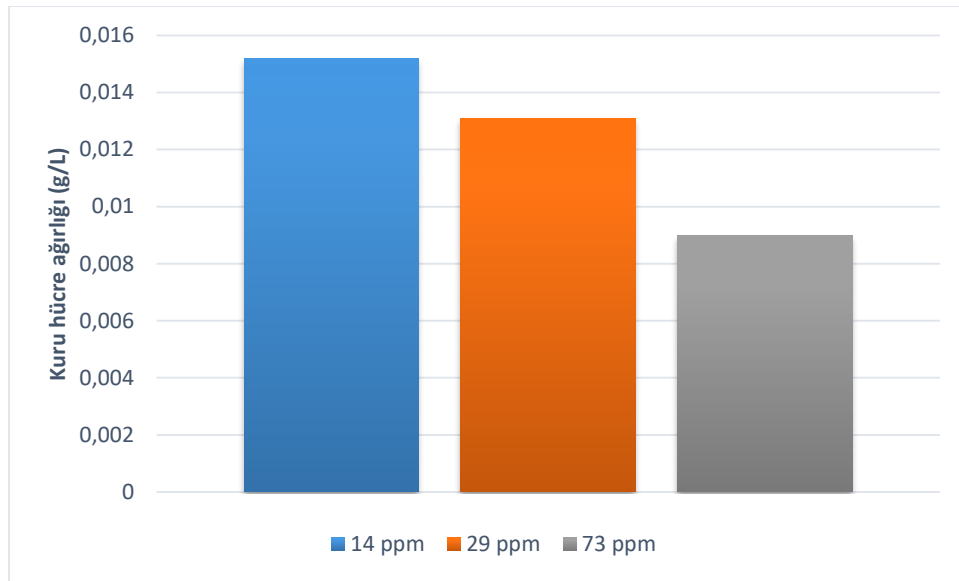
5.12. Farklı Konsantrasyonlardaki Bor Metalinin Etkisi

Yapılan çalışmada kullanılan *B. subtilis* ATCC 6633 suşu bilindiği gibi toprak bakterisidir. Toprağın bileşeninde de bor metali bulunmaktadır. Bu çalışma bor konsantrasyonunun bakterinin büyümesine etkisini görmeyi hedeflemiştir. Elde edilen veriler Şekil 5.34'te görülmektedir. 73 ppm değerinin üstündeki değerlerde bakterinin üremesi çok yavaş olduğu hatta hemen hemen hiç üreme olmadığı için kuru hücre ağırlığı değerleri hesaplanamamıştır ve bu değerler sonraki hesaplamalarda ele alınmamıştır.



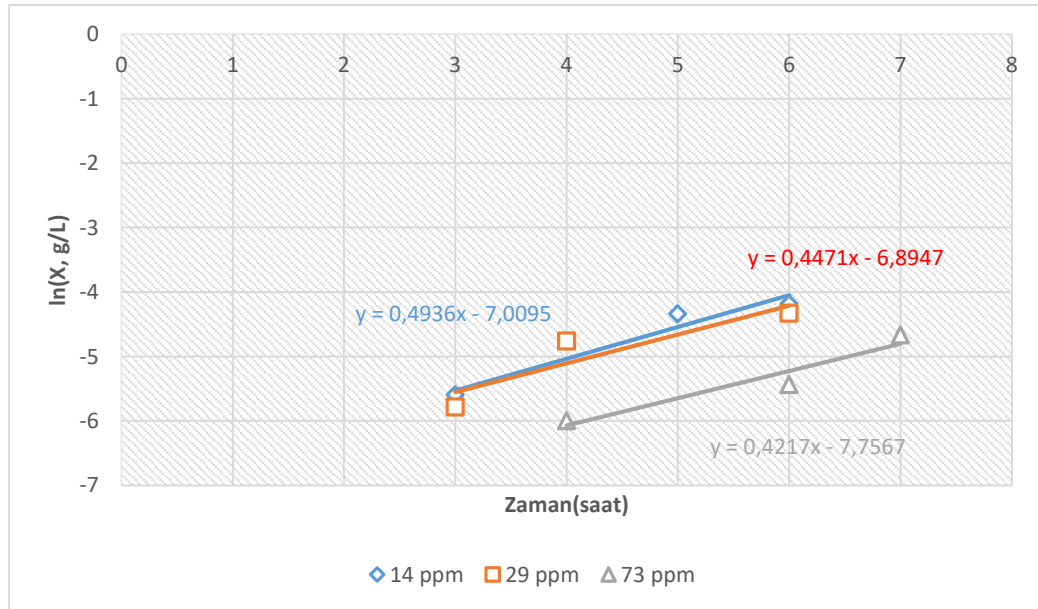
Şekil 5.34. 600 nm dalga boyunda pH=7'de 48 saat ve 30°C inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı Bor konsantrasyonlarındaki *B. subtilis* ATCC 6633 suşu için üreme eğrisi grafiği

Elde edilen verilerle hesaplanan kuru hücre ağırlığı değerleri Şekil 5.35'te gösterilmiştir.

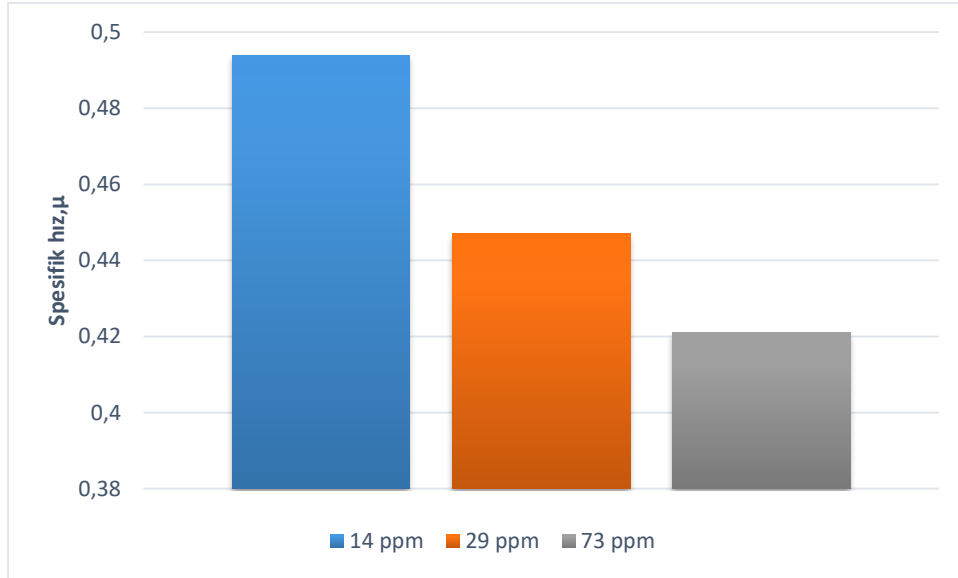


Şekil 5.35. Farklı bor konsantrasyonlarında kuru hücre ağırlığı

Logaritmik dönemdeki spesifik üreme hızlarına da bakılmıştır. Hızlar Şekil 5.36'daki $\ln(X)$ -zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmış ve eğim baz alınarak ikilenme süresi bulunmuştur. Hesaplanan spesifik hız değerleri Şekil 5.37'de gösterilmiştir.



Şekil 5.36. Farklı bor konsantrasyonlarında $\ln(\text{kuru hücre ağırlığı})$ -zaman grafiği



Şekil 5.37. Farklı bor konsantrasyonlarında spesifik hız

Çalışmalar sonucunda elde edilen veriler Çizelge 5.10.'da gösterilmiştir.

Çizelge 5.10. pH=7'de, 48 saat ve 30°C inkübasyonda, 650 rpm karıştırma hızında farklı bor konsantrasyonlarında elde edilen sonuçlar

Bor Konsantrasyonu	Kuru hücre ağırlığı, g/L	Spesifik üreme hızı, $\mu(\text{saat}^{-1})$	İkilenme süresi, $t_d(\text{saat})$
14 ppm	0,015	0,494	1,40
29 ppm	0,013	0,447	1,55
73 ppm	0,009	0,421	1,65

Bor bileşiklerinin birçok mikroorganizma için gerekli bir mikro besin maddesi olduğu bilinmektedir. Fakat yüksek miktarlardaki bor bileşikleri toksik etki de yaratabilmektedir. Ülkemiz topraklarında bol miktarda bulunan bor bileşiklerinin toprak bakterisi olan *B. subtilis* ATCC 6633 suşu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda değerler göstermektedir ki 14 ppm üstündeki bor konsantrasyonlarında bakterinin büyümesi yavaşlamıştır. 73 ppm'in üstünde denenen değerlerde (146, 220, 292 ppm) ise büyüme hiç olmamış hatta ölümlerin gerçekleştiği görülmüştür. En yüksek spesifik hız ve kuru hücre ağırlığı değerleri $0,494 \text{ saat}^{-1}$ ve $0,015 \text{ g/L}$ ile 14 ppm Bor metali kullanılan ortamda gözlenmiştir. Bu değerlerin aynı şartlar altındaki N.B. ortamından da daha yüksek olduğu görülmektedir.

Yılmaz yaptığı çalışmasında (2012), borik asit ve boraks bileşiklerinin farklı bakteriler üzerindeki toksik olabilecek minimum konsantrasyonlarını çalışmıştır. Çalışma sonucunda borik asit ve boraks için bu değerleri sırasıyla *E. coli* için 7,60 ve 47,60 mg/ml, *S. aureus* için 3,80 ve 23,80 mg/ml olarak tespit etmiştir.

Ülkemiz toprakları bor bakımından zengindir. *Bacillus subtilis*'in doğal büyüme ortamı olan toprakta belli bir miktar bor bulunması üremesini pozitif yönde etkileyecektir. Çalışma sonucunda 14 ppm bor konsantrasyonundaki biyokütle birikiminin N.B. ortamından daha yüksek çıkması, bakteri için Bor içeren ortamın doğal büyüme ortamına daha yakın ve adaptasyonunun daha kolay olduğunu göstermektedir. 14 ppm Bor değerinin üstünde bakterinin üremesinin yavaşlamasının sebebi borun toksik etki yaratıp inhibisyona sebebiyet verdiğini göstermektedir. Borun yeryüzünde ortalama miktarı 2-100 (ppm) arasında değişmektedir (Swaine, 1955). Bakteriler için suda bulunması gereken kritik bor miktarı 18 mg/L (ppm) olarak söylenmiştir (World Health Organization, 1998). Bu da 14 ppm Bor kullanılan ortamın en yüksek değerleri verip üstündeki değerlerde düşüşlerin gözlenmesini kanıtlamış, yapılan çalışma literatür ile paralellik göstermiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Biyoteknolojik prosesler için kullanılan bakterinin büyüme hızı ve elde edilen biyokütle miktarı prosesin maliyeti, uygulanabilirliği ve sürdürülebilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaç doğrultusunda *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu için uygun ortam koşulları çalışılmış ve besi ortamı olarak atık maddeler denenerek üremenin ekonomik ortamlarda olup olmadığı araştırılmıştır.

Öncelikle *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu için uygun ortam koşulları araştırılmıştır. İnkübasyon süresini tespiti için 48 ve 72 saat değerleri denenmiş ve uygun sürenin 48 saat olduğu tespit edilmiştir. İnkübasyon ortamının sıcaklığını tespit etmek için 30°C ve 37°C değerlerinde çalışılmış ve 30°C'nin daha uygun olduğu gözlenmiştir. pH değerinin tespiti için 3, 7, 8 ve 9 değerleri çalışılmış ve bakterinin pH=7 değerinde daha iyi üreme gösterdiği görülmüştür. Karıştırma hızının etkisini görmek için karıştırmasız ortam, 375 rpm ve 650 rpm karıştırma hızı verileri incelenmiştir. Artan karıştırma hızına bağlı olarak *B. subtilis*'in üreme hızında da artış gözlenmiş ve çalışmaların devamında 650 rpm karıştırma hızında çalışılmıştır. İnkübasyon süresinin 48 saat, sıcaklığını 30°C, ortam pH değerinin 7 ve karıştırma hızının 650 rpm olduğu koşullarda maksimum üreme hızı 0,460 saat⁻¹ ve biyokütle miktarı 0,023 g/L olarak bulunmuştur.

Farklı karbon kaynaklarının *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun üremesine etkisi incelenmiş ve karbon kaynağı olarak mannoz, gliserol ve ksiloz denenmiştir. En yüksek biyokütle miktarına 0,023 g/L değeri ile mannoz varlığında ulaşılmıştır. En yüksek spesifik üreme hızı (0,264 saat⁻¹) ve en kısa ikilenme süresi de (2,62 saat) mannoz varlığında görülmüştür.

Farklı azot kaynaklarının *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun üremesine etkisi incelenmiş ve azot kaynağı olarak amonyum sülfat, malt ekstraktı ve glisin denenmiştir. En yüksek biyokütle miktarına 0,016 g/L değeri ile glisin varlığında ulaşılmıştır. En yüksek spesifik üreme hızı (0,548 saat⁻¹) ve en kısa ikilenme süresi de (1,26 saat) glisin varlığında görülmüştür.

Farklı konsantrasyonlardaki Nutrient Broth çözeltisinin *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun üremesine etkisi incelenmiş ve 0,8, 4, 8, 12 ve 16 g/L konsantrasyonlarındaki N.B. çözeltileri denenmiştir. En yüksek biyokütle birikimine (0,022 g/L) N.B. konsantrasyonunun 12 g/L

olduğu durumda ulaşılmıştır. En yüksek spesifik hız değerine ($0,345 \text{ saat}^{-1}$) N.B. konsantrasyonunun 8 g/L olduğu ortamda rastlanmıştır. N.B. konsantrasyonunun 16 g/L olduğu durumda biyokütle birikiminde ve spesifik hızda azalma meydana gelmiştir.

Organik (Süper Doll) ve kimyasal (kimyasal gübre) ortamlarının *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun üremesine etkisi incelenmiştir. Bunun için 150 'şer ml organik ve kimyasal ortamlar hazırlanmıştır. Elde edilen veriler sonucunda en yüksek biyokütle birikimi ($0,034 \text{ g/L}$) % 2 (v/v) derişimdeki süper doll ortamında gözlenmiştir. Kimyasal gübre kullanılan ortamda ise biyokütle birikimi daha az olmasına rağmen spesifik hız değeri ($0,258 \text{ saat}^{-1}$) daha yüksek, ikilenme süresi ($2,68 \text{ saat}$) daha kısa çıkmıştır.

Farklı melas konsantrasyonlarının *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun üremesine etkisi incelenmiştir. Bu çalışma için, toplamda 150 ml çözelti olacak şekilde $2, 5, 10, 25$ ve 50 ml melas kullanılmıştır. En yüksek biyokütle birikimine ($0,019 \text{ g/L}$) ve en yüksek spesifik hıza ($0,294 \text{ saat}^{-1}$) 10 ml (% 6) melas kullanılan ortamda ulaşılmıştır.

Farklı Bor metali konsantrasyonunun *B. subtilis* ATCC 6633 suşunun üremesine etkisi incelenmiştir. Bor konsantrasyonu $14, 29, 73, 146, 220$ ve 292 ppm olacak şekilde çözeltiler hazırlamak için Boraks bileşigi kullanılmıştır. En yüksek biyokütle miktarı ($0,015 \text{ g/L}$) ve spesifik hız ($0,494 \text{ saat}^{-1}$) değeri 14 ppm Bor konsantrasyonunda görülmüştür. Bor konsantrasyonu 14 ppm değerinin üzerine çıktıkça kuru hücre ağırlığı ve spesifik üreme hızında azalış gözlenmiştir.

Yapılan çalışmada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun üremesine ortam koşullarının etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, starter suş olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633 seçilen endüstriyel proseslerde, organik veya kimyasal gübrelerin kullanıldığı toprakların numune olarak seçilebileceği, bazı endüstriyel atıkların besi ortamı olarak değerlendirilebileceği görülmüştür. Böylece ekonomik ve sürdürülebilir büyük ölçekli prosesler oluşturularak, plastiğe alternatif olarak üretilen çevre dostu mikrobiyal biyoplastik tesisleri kurulabilecektir.

Bacillus subtilis ATCC 6633 suşunun üremesini daha verimli bir hale getirebilmek için aşağıdakiler önerilebilir:

- Toprakta bulunabilecek farklı metal komplekslerinin etkisi çalışılabilir.
- Ortama farklı enzimler ilave edilerek biyokütle miktarına ve spesifik üreme hızına etkisi incelenebilir.
- Mikrobiyal besin ortamı olarak farklı karbon ve azot kaynakları kullanılabilir.
- Karbon/Azot (C/N) oranındaki değişimin üreme üzerine etkileri çalışılabilir.
- Kesikli sistemde bakterinin üremesi deneyleri gerçekleştirilirken, ortama oksijen ilavesinin etkisi incelenebilir ve ortam parametreleri değiştirilebilir.

KAYNAKLAR

- Adwitiya, P., Ashwini, P., Avinash, K.A., Badri, R., Kajal, D., Vomsı, P. ve Srividya, S. (2009). Mutagenesis of *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 for increasing poly (- β -) hydroxybutyrate (PHB) production. *TÜBİTAK*, 33, 225-230.
- Akbal, A., Balık, H. (2011). *Elektromanyetik dalgaların bakteri gelişimi üzerine etkisi*, Emanet 2011 Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri Sempozyumunda sunuldu, İstanbul.
- Arda, M. (2000). *Temel mikrobiyoloji*. (Genişletilmiş İkinci Baskı). Ankara: Medisan Yayınevi Serisi.
- Aydoğmuş, D. (2011). *Aerobik dinamik beslemeli aktif çamurun farklı karbon/azot oranlarında PHB depolama yeteneğinin değerlendirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kahramanmaraş, 11, 33.
- Baysak, M.İ. (2008). *Bazı rhizobium türlerinin polihidroksibütirat (PHB) verimleri üzerine farklı ortam şartlarının etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığt.
- Boustanabadimaralan, N. (2014). *Bacillus thuringiensis ile çeşitli boyaların renk giderimlerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Chaijamrus, S. ve Uduay, N. (2008). Production and characterization of Polyhydroxybutyrate from molasses and corn steep liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal*, 10, 7-20
- Dut, E. (2015). *Farklı ortam koşullarında Bacillus thuringiensis RSKK 381'in üreme ve biyoplastik (PHB) üretiminin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Ediz, N., Beyatlı, Y. (2005). *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından biyoplastik üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(5), 1-22.
- Elsayed, S.N., Aboshanab, K.M., Aboulwafa, M.M. ve Hassouna N.A. (2013). Optimization of bioplastic (poly- β -hydroxybutyrate) production by a promising *Azomonas macrocytogenes* bacterial isolate P173. *African Journal of Microbiology Research*, 7(43), 5025-5035.
- Gomaa, Z.E. (2014). Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) by *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* grown on cane molasses fortified with ethanol, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(1), 145-154.
- Gouda, K.M., Swellam, E.A. ve Omar, H.S. (2001). Production of PHB by a *Bacillus megaterium* strain using sugarcane molasses and corn steep liquor as sole carbon and nitrogen sources. *Microbiological Research*, 156, 201-207.

- Güngörmedi, G. (2012). *Hidrokarbonla kirli topraklardan izole edilmiş mikroorganizmaların biyoplastik üretim yeteneklerinin belirlenmesi ve biyoplastiğin karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 1-2.
- Güven, S., Zorba, N. (2013). *Genel mikrobiyoloji ve laboratuvar kılavuzu* (4. Baskı). Türkiye: Nobel Akademik Yayıncılık, 60-69, 84.
- Hossain, M., Anantharaman, N. (2006). Studies on bacterial growth and lead(IV) biosorption using *Bacillus subtilis*. *Indian Journal of Chemical Technology*, 13, 591-596.
- Irsath, H., Santhosh, S., Hemalatha, V., Vikramathithan, M., Dhanasekar, R. ve Dhandapani, R. (2015). Production and optimization of polyhydroxybutyrate using *Bacillus subtilis* BP1 isolated from sewage sample. *International Journal Of Pure & Applied Bioscience*, 3(1), 158-166.
- İnternet: Arda, M. *Bakterilerin özellikleri*, URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.mikrobiyoloji.org%2FTR%2FGenel%2FBelgeGoster.aspx%3FF6E10F8892433CFFAAF6AA849816B2EF506ACF58093CAB42&date=2017-12-18>, Son Erişim Tarihi: 18.12.2017
- İnternet: Hacettepe Üniversitesi. *Bakteri hücre yapısı*, URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fhacettepemikrobiyoloji.com%2Fogrenci%2Fcumhur%2Fcell-not.pdf&date=2017-12-18>, Son Erişim Tarihi:18.12.2017
- İnternet: Milli Eğitim Bakanlığı, *Gıda teknolojisi*, URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Ffiratozel.files.wordpress.com%2F2016%2F10%2Fgenel-mikrobiyoloji.pdf&date=2017-12-18>, Son Erişim Tarihi: 18.12.2017
- Kalaylı, E., Beyatlı, Y. (2003). *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DNA 'ları. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(12), 24-35.
- Lee, S.Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology And Bioengineering*, 49(1), 1-14.
- Martínez, S., Borrajo, R., Franco, I. ve Carballo, J. (2007). Effect of environmental parameters on growth kinetics of *Bacillus cereus* (ATCC 7004) after mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 223–227.
- Okur, M. (2011). *Tekstil atıksularındaki metal-kompleks boyarmaddelerin ve krom iyonlarının Saccharomyces cerevisiae ve Candida tropicalis mayalarıyla biyobirikiminin araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Okur, M., Saraçoğlu, N. (2014). Use of response surface methodology for the bioaccumulation of Violet 90 metal-complex dye by *Candida tropicalis*. *Turkish Journal of Engineering & Environmental Sciences*, 38, 217-230.

- Otari, S.V. ve Ghosh, J.S. (2009). Production and characterization of the polymer polyhydroxy butyrate-copolyhydroxy valerate by *Bacillus megaterium* NCIM 2475. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 1(2), 23-26.
- Özşahin, D.A. (2006). *Kahramanmaraş ili kağıt fabrikaları çevresinden izolasyonu yapılan bacillus sp. suşlarından elde edilen selüloz enziminin karakterizasyonu ve biyoteknolojide kullanılabilirliğinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Pal, A., Prabhu, A., Kumar, A.A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Ponnammam, V. ve Shivakumar, S. (2009). Optimization of process parameters for maximum Poly(β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *Polish Journal of Microbiology*, 58(2), 149-154.
- Pekin, B. (1979). *Biyokimya Mühendisliği*, İzmir: Ege Üniversitesi Matbaası, 417-430.
- Pichhardt, K. (2004). *Gıda mikrobiyolojisi gıda endüstrisi için temel esaslar ve uygulamalar* (çev. Y. Sekin ve N. Karagözlü). (4. Baskı). Manisa: Literatür Yayınları, 176-178.
- Rohini, D., Phadnis, S. ve Rawal, S.K. (2006). Synthesis and characterization of poly- β -hydroxybutyrate from *Bacillus thuringiensis* R1. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 276-283.
- Shivakumar, S. (2012). Polyhydroxybutyrate (PHB) production using agro-industrial residue as substrate by *Bacillus thuringiensis* IAM 12077. *International Journal of ChemTech Research*, 4(3), 1158-1162.
- Siddique, S.H., Vardo-Zalik, A.M. (2012). The effects of available glucose concentration on the population dynamics of growing *Escherichia coli* cultures. *John T. and Paige S. Smith Undergraduate Science Research Symposium Proceedings*. 5, 7-12.
- Tamdoğan, N. (2008), *Bacillus Subtilis Kültürlerinde PHB (Poli- β -Hidroksibütirat) Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi, Balıkesir.
- Tamdoğan, N. ve Sidal, U. (2011). Investigation of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 under different conditions. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17, 173-176.
- Taşkaya, B. (2004). Tarım ve çevre. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış*, 5(1), 1-8.
- Uttatree, S. ve Charoenpanich, J. (2016). Isolation and characterization of a broad pH- and temperature-active, solvent and surfactant stable protease from a new strain of *Bacillus subtilis*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 8, 32-38.
- Widdel, F. (2010). *Theory and measurement of bacterial growth. Grundpraktikum mikrobiologie*, Bremen: Universität Bremen, 1-11.
- Willey, J., Sherwood, L. ve Woolverton, C.J. (2009). *Prescott's Principles Of Microbiology*. (7. Baskı). N.Y: McGraw-Hill, 126-152.

- Wu, F., Chou, S. ve Shih, I. (2013). Factors affecting the production and molecular weight of levan of *Bacillus subtilis* natto in batch and fed-batch culture in fermenter. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44, 846–853.
- Yılmaz, M., Beyatlı, Y. (2003). Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(9), 1-33.
- Yılmaz, M.T. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains, *TÜBİTAK*, 42, 1423-1429.
- Yüksekdağ, Z., N., Aslım, B., Beyatlı, Y. ve Mercan, N. (2004). Effect of carbon and nitrogen sources and incubation times on poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) synthesis by *Bacillus subtilis* 25 and *Bacillus megaterium* 12. *African Journal of Biotechnology*, 3(1), 63-66.
- Zhong, J., Zhang, X., Ren, Y., Yang, J., Tana, H. ve Zhou, J. (2014). Optimization of *Bacillus subtilis* cell growth effecting jiean-peptide production in fed batch fermentation using central composite design. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 132–136.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ALICI, Berna
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 25.11.1990, Ankara
 Medeni hali : Evli
 e-mail : bernasahin_90_@hotmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Müh. ABD	Devam ediyor
Lisans	Gazi Üniveristesi/Kimya Müh.	2013
Lise	Dr. Binnaz-Rıdvan EGE Anad. Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-Halen	DHMI	Hava Trafik Kontrolörü

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Şahin, B. (2015, 25-26 Nisan). *Farklı ortam koşullarının bacillus subtilis türü bakterinin büyüme eğrisine ve spesifik üreme hızına etkisi*. 6. Ulusal Çevre Ekoloji Öğrenci Kongresinde sunuldu, Ankara.

Hobiler

Kitap okumak, Müzik dinlemek



GAZİ GELECEKTİR..