



**FARKLI ORTAM KOŞULLARINDA *Bacillus thuringiensis* RSKK 381'İN
ÜREME VE BİYOPLASTİK (PHB) ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ece DUT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

NİSAN 2015

Ece DUT tarafından hazırlanan “FARKLI ORTAM KOŞULLARINDA *Bacillus thuringiensis* RSKK 381’İN ÜREME VE BİYOPLASTİK (PHB) ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ayşe TOSUN
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

İkinci Danışman: Doç. Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Başkan : Prof. Dr. Mübeccel ERGUN
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Üye : Prof. Dr. H. Canan CABBAR
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

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

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Miraç YILMAZ
Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Hacettepe Üniversitesi

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

.....

Tez Savunma Tarihi: 17/04/2015

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

.....

Prof. Dr. Şeref SAĞIROĞLU
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.

Ece DUT

17/04/2015

FARKLI ORTAM KOŞULLARINDA *Bacillus thuringiensis* RSKK 381'İN ÜREME VE BİYOPLASTİK (PHB) ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Ece DUT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Nisan 2015

ÖZET

Biyoteknolojik proseslerde kullanılan bakterilerin, üreme hızları ve üretilen biyokütle miktarları, prosesin maliyeti ve uygulanabilirliği açısından önem taşımaktadır. Buna dayanarak, çalışmanın ilk bölümünde, farklı ortam şartlarında *Bacillus thuringiensis* RSKK 381 suşunun, üreme hızları ve üretilen biyokütle miktarları araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde de, çevre sorunlarının çözümüne yönelik konularda önemli yeri olan polipropilen ve polietilene benzerliği sebebiyle dikkat çeken poli- β -hidroksibütirat (PHB) üretimine yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, *B. thuringiensis* RSKK 381 ile yüksek PHB üretiminin optimizasyonu ve starter suş taramasında izolasyon yapılan alanlardan tarımsal bölgelerin önemi araştırılmıştır. Optimizasyon çalışmalarında bakterinin üretimi ve PHB birikim için pH (3-5-7-11), inkübasyon süresi (1-2-3-gün), sıcaklık (30-37°C) ve karıştırma hızı etkisi (karıştırmasız-350 rpm-650 rpm) incelenmiştir. Ayrıca PHB birikimi arttırmaya yönelik olarak sentetik ve doğal olan farklı azot-karbon kaynaklarının ve metal iyonlarının etkisi araştırılmıştır. Bakteriyel büyüme için optimum pH 7, sıcaklık 30°C, süre 48 saat ve karıştırma hızı 650 rpm olarak tespit edilmiştir. Bu şartlarda farklı karbon kaynaklarında en yüksek biyokütlenin kontrol grubunda (0,685 g/l KHA), en hızlı büyümenin gliserolde (0,854 h⁻¹) ve en yüksek PHB veriminin mannozda (%29,73 g PHB /g KHA) olduğu görülmüştür. Farklı azot kaynaklarında en yüksek biyokütle kontrol grubunda (0,685 g/l KHA), en hızlı büyüme amonyum sülfatta (0,659 h⁻¹) ve en yüksek PHB verimi amonyum nitratta (%27,3 g/KHA) bulunmuştur. C/N oranı açısından incelendiğinde en yüksek biokütle C/N=0,5'te iken en yüksek PHB verimi C/N=1,5'ta elde edilmiştir. Mikrobiyal büyümeye (0,787 g/l KHA) ve PHB verimine (%28,33 g PHB/g KHA) en etkili metal iyonu nikel olarak tespit edilmiş ancak en hızlı büyüme bor ortamında (0,863 h⁻¹) gözlenmiştir. Magnezyum ise biyokütle ve PHB verimi açısından minimum etki göstermiştir. Doğal besiyortamı olarak toprağı kullanan bu bakterinin tarımsal alanlardaki uygulamalara yönelik gösterdiği tepkiyi test etmek amacıyla biyokütle, üreme hızı ve PHB verimi açısından 3 farklı gübre kullanılmıştır. Kullanılan gübrelerle hazırlanan besiyortamlarında bakterinin en yüksek biyokütle ve PHB verimi biyogübrede (organik gübre, 0,240 g/l KHA, %43,3 g PHB/g KHA) tespit edilmiştir. Buna göre PHB üretimi için yaygın olarak kullanılan *Bacillus* sp. türleri içinden starter suş seçiminde izolasyon ortamı olarak biyogübre uygulamalı tarımsal alanların uygun olduğu görülmüştür.

Bilim Kodu : 912.1.037

Anahtar Kelimeler : Biyoplastik, Poli- β -hidroksibütirat, PHB, *Bacillus thuringiensis*, Üreme hızı, Optimizasyon, Gübre

Sayfa Adedi : 129

Danışman : Doç. Dr. Ayşe TOSUN

İkinci Danışman : Doç. Dr. Hikmet (TÜRK) KATIRCIOĞLU

INVESTIGATION OF GROWTH AND BIOPLASTIC (PHB) PRODUCTION IN DIFFERENT CONDITIONS BY *Bacillus thuringiensis* RSKK 381

(M. Sc. Thesis)

Ece DUT

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
April 2015

ABSTRACT

For the bacteria used in biotechnological processes; growth rates and biomass are important in terms of cost and applicability. Based on this, in the first part of the study, in different environment conditions growth rates and biomass production amount of *Bacillus thuringiensis* RSKK 381 strains were investigated. In the second part of the study, poly- β -hydroxybutirat (PHB), which is an important issues for the solution of environmental problems and attention because of the similarity of polyethylene and polypropylene, have been studied for production. Intended things were optimization of high PHB production by *B. thuringiensis* RSKK 381 and examine the importance of the agricultural regions in the areas of insulation starter strains scan. For optimization studies producing bacteria and PHB accumulation, pH (3-5-7-11); incubation time (1-2-3-day); temperature (30-37°C) and the effect of effect of mixing speed (stabile-350 rpm-650 rpm) were investigated. Moreover, the effect of synthetic and naturally different nitrogen-carbon sources and metal ions were investigated to increase PHB accumulation. For bacterial growth optimum pH 7, temperature 30° C, 48 hours and 650 rpm mixing speed were determined. In different carbon sources in these conditions the highest biomass was found in the control group (0,685 g/l DCW), the fastest growth was found in glycerol (0,854 h⁻¹) and the highest yield of PHB was found in mannose (%29,73 g PHB/g DCW). The highest biomass of different nitrogen sources was found in still control group (0,685 g/l DCW), the most rapid growth of ammonium sulfate (0,659 h⁻¹) and the highest PHB yield of ammonium nitrate (%27,3 g PHB/g DCW) were found. About C/N rations; the highest biomass was found while C/N =0,5 but the highest yield of PHB was found while C/N =1,5. Microbial growth (0,787 g/l DCW) and PHB yield (%28,33 g PHB / g DCW) have been identified as most effective metal ion nickel but the most rapid growth in the media of 5 ppm boron (0,863 h⁻¹) was observed. Magnesium has a minimal impact in terms of the efficiency of biomass and PHB. To test the response of these soil bacteria, which use this as my natural medium of, for applications in the agricultural field three different fertilizer were used for biomass, growth rate and PHB production. The highest biomass and PHB yield were found when biofertilizers was used (organic fertilizer, 0,240 g/l DCW, %43,3 g PHB/g DCW). Accordingly, for starter strain selection of PHB-producer *Bacillus* sp. as the isolation medium bio applied to the agricultural sector was found to be suitable.

Science Code : 912.1.037

Key Words : Bioplastic, Poly- β -hydroxybutirat, PHB, *Bacillus thuringiensis*, Growth rate, Optimization, Fertilizer

Page Number : 129

Supervisor : Assoc. Dr. Ayse TOSUN

Co-Supervisor : Assoc. Dr. Hikmet (TURK) KATIRCIOGLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca engin bilgisi ve tecrübesiyle bana yardımcı olan, bocaladığım yerde bana yol gösteren değerli danışman hocalarım Sayın Doç. Dr. Ayşe TOSUN ve Sayın Doç. Dr. Hikmet TÜRK KATIRCIOĞLU'na içtenlikle teşekkür ederim. Çalışmamda bana destek olan, yoldaşlık eden sevgili arkadaşım ve meslektaşım Berna ŞAHİN'e, tezimin önemli bir parçası olan gübrelerin temininde bana yardımcı olan çok sevgili arkadaşım Havsa Ziraat Odası Tarım Danışmanı Ziraat Mühendisi Çiser OCAK'a ve her ihtiyacım olduğunda yanımda olan meslektaşım Ezgi EMÜL'e teşekkür ederim. Her zaman ve her koşulda yanımda olup benden madden ve manen desteklerini esirgemeyen, her zaman beni yüreklendiren çok sevgili annem Çiler DUT'a ve babam Fahreddin DUT'a en içten duygularıyla teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. DÜŞÜK GUANİN-SİTOZİNLİ (GC) BAKTERİ: <i>Bacillus</i> sp.	3
2.1. <i>Bacillus</i> sp. ve <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.2. <i>Bacillus</i> sp. Türlerinin Biyoteknolojik Açıdan Önemi	4
2.3. <i>Bacillus</i> sp.’nin Üreme Şartları ve Üremeyi Etkileyen Faktörler	6
2.3.1. Fiziksel faktörler	8
2.3.2. Kimyasal faktörler.....	10
2.3.3. Biyolojik faktörler.....	11
2.3.4. Mekanik faktörler.....	11
2.4. Büyüme Kinetiği	12
3. BİYOBOZUNUR PLASTİK VE BİYOPLASTİK	19
3.1. Poli-β-hidroksibütirat (PHB).....	21
3.2. PHB’ın Biyokütleden Kazanılması	26
3.3. PHB Üreten Bakteriler	31
3.4. PHB Üretiminde Şartlar ve Kullanılan Kaynaklar.....	33

	Sayfa
3.4.1. PHB üretimi için ucuz kaynaklar	40
3.5. PHB Biosentezi ve Biyobozunması	46
3.6. Kullanım Alanları.....	51
4. DENEYSEL KISIM	55
4.1. Materyal ve Metod	55
4.1.1. Materyal	55
4.1.2. Metod	57
4.2. Bulgular ve Tartışma.....	63
4.2.1. Bakterinin morfolojik olarak tanımlanması	63
4.2.2. Büyüme ve üreme hızı	63
4.2.3. PHB üretimi	97
5. SONUÇLAR	113
KAYNAKLAR	119
ÖZGEÇMİŞ	129

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Endüstride kullanılan başlıca <i>Bacillus</i> sp. ve kullanım alanları	5
Çizelge 3.1. PHB özelliklerinin PP ile karşılaştırılması	23
Çizelge 3.2. PHB'nin özellikleri	23
Çizelge 3.3. Başlıca PHB üreticileri	25
Çizelge 3.4. PHA kazanım metotlarının avantaj ve dezavantajları	29
Çizelge 3.5. PHB üreten mikroorganizmalar ve kaynaklar	31
Çizelge 3.6. <i>Bacillus</i> sp. kullandığı substrata göre PHB biriktirme oranları.....	35
Çizelge 3.7. Sentetik (petrol türevli) ve biyobozunur plastiklerin fiyat karşılaştırması .	41
Çizelge 3.8. Bitkisel yağ ve atıklardan PHB üretimi için kullanılan bakteriler	45
Çizelge 3.9. 2011 yılı itibariyle biyoplastiklerin kullanıldığı sektörler	51
Çizelge 4.1. Bazı hayvansal gübrelerin kimyasal yapıları.....	61
Çizelge 4.2. 1 günlük ve 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı pH'larda elde edilen sonuçlar	66
Çizelge 4.3. pH 7'de, 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sürelerinden elde edilen sonuçlar	68
Çizelge 4.4. pH 7'de, 2 günlük inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sıcaklıklarında elde edilen sonuçlar.....	71
Çizelge 4.5. pH 7'de, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında elde edilen sonuçlar.....	73
Çizelge 4.6. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında elde edilen sonuçlar (N= Pepton)	76
Çizelge 4.7. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı azot kaynaklarında elde edilen sonuçlar (C= Et ekstraktı).....	79
Çizelge 4.8. Farklı hayvan gübresi derişimlerinden elde edilen sonuçlar	83
Çizelge 4.9. Farklı kimyasal gübre derişimlerinden elde edilen sonuçlar	85

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. Farklı organik gübre derişimlerinden elde edilen sonuçlar	88
Çizelge 4.11. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı C/N oranlarından elde edilen sonuçlar	91
Çizelge 4.12. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı metal iyonlarından elde edilen sonuçlar	94
Çizelge 4.13. pH 7'de, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında elde edilen PHB sonuçları.....	98
Çizelge 4.14. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında elde edilen PHB sonuçları (N=Pepton)	99
Çizelge 4.15. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı azot kaynaklarında elde edilen PHB sonuçları (C= et ekstraktı).....	101
Çizelge 4.16. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı derişimlerde hayvan gübrelerinden elde edilen PHB sonuçları	104
Çizelge 4.17. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde elde edilen PHB sonuçları	105
Çizelge 4.18. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı derişimlerdeki organik gübrelerde elde edilen PHB sonuçları.....	106
Çizelge 4.19. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı C/N oranlarında elde edilen PHB sonuçları	107
Çizelge 4.20. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı metal iyonu ilavesi ile edilen PHB sonuçları	109

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tek bir hücre ile başlayan hücre büyümesinin örneği	12
Şekil 2.2. Skala değişiminin grafiğe etkisi.....	14
Şekil 2.3. Bakterilerinin yaşam evreleri.....	14
Şekil 3.1. Bakteriyel PHA genel formülü ve yapısı	20
Şekil 3.2. En yaygın bilinen PHA yapılarından bazıları	21
Şekil 3.3. PHB'ın genel formülü.....	22
Şekil 3.4. PHB kazanım metotlarının şematik gösterimi.....	26
Şekil 3.5. Hücrelerde PHB sentezi mekanizması.....	34
Şekil 3.6. Bakterilerde PHB biyosentez ve bozunmanın döngüsel metabolik doğası	47
Şekil 3.7. (a) P(3HB) tek kristal morfolojisi; (b) P(3HB) tek kristalinin tüm yüzeyi üzerine depolimeraz PHB bağlanması ve (c) P(3HB) kristal kenarının enzimatik hidroliz	48
Şekil 3.8. PHB'ın biyodöngüsü	49
Şekil 4.1. Gram boyama yöntemi (temsili).....	57
Şekil 4.2. Konsantre sülfürik asit içinde izole PHB'ın UV absorpsiyon spektrumu.....	59
Şekil 4.3. Maksimum absorbans-kuru ağırlık kalibrasyon grafiği.....	63
Şekil 4.4. 600 nm dalga boyunda 24 saat ve 30°C sıcaklıkta inkübasyon sonucunda karıştırmasız ortamda farklı pH değerlerinde <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği	64
Şekil 4.5. Farklı pH değerleri için ln (absorbans)-zaman grafiği	65
Şekil 4.6. Spesifik hızların pH ile değişimi	65
Şekil 4.7. 600 nm dalga boyunda pH 7'de 30°C inkübasyon sıcaklığında farklı inkübasyon sürelerinde <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği	67
Şekil 4.8. Farklı inkübasyon süreleri için ln (absorbans)-zaman grafiği	67
Şekil 4.9. Spesifik hızların inkübasyon süresi ile değişimi	68

Şekil	Sayfa
Şekil 4.10. 600 nm dalga boyunda pH 7’de 2 günlük inkübasyon süresinde farklı inkübasyon sıcaklığında <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği	69
Şekil 4.11. Farklı inkübasyon sıcaklıkları için ln (absorbans)-zaman grafiği	70
Şekil 4.12. Spesifik hızların inkübasyon sıcaklığı ile değişimi	70
Şekil 4.13. 600 nm dalga boyunda pH 7’de 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği	71
Şekil 4.14. Farklı karıştırma hızları için ln (absorbans)-zaman grafiği	72
Şekil 4.15. Spesifik hızların karıştırma hızları ile değişimi	73
Şekil 4.16. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği	74
Şekil 4.17. Farklı karbon kaynakları için ln (absorbans)-zaman grafiği.....	75
Şekil 4.18. Spesifik hızların karbon kaynağı ile değişimi	76
Şekil 4.19. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı azot kaynaklarında <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 için büyüme eğrisi grafiği	78
Şekil 4.20. Farklı azot kaynakları için ln (absorbans)-zaman grafiği	78
Şekil 4.21. Spesifik hızların azot kaynağı ile değişimi	79
Şekil 4.22. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı hayvan gübresi derişimlerinde <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği	81
Şekil 4.23. Farklı hayvan gübresi derişimleri için ln (absorbans)-zaman grafiği	82
Şekil 4.24. Spesifik hızların farklı hayvan gübresi derişimleri ile değişimi	83
Şekil 4.25. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı kimyasal gübre derişimlerinde <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği	84
Şekil 4.26. Farklı kimyasal gübre derişimleri için ln (absorbans)-zaman grafiği.....	84
Şekil 4.27. Spesifik hızların farklı kimyasal gübre derişimleri ile değişimi	85

Şekil	Sayfa
Şekil 4.28. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı organik gübre derişimlerinde <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiğı	86
Şekil 4.29. Farklı organik gübre derişimleri için ln (absorbans)-zaman grafiğı.....	87
Şekil 4.30. Spesifik hızların farklı organik gübre derişimleri ile değışimi.....	87
Şekil 4.31. Spesifik hızların, ikilenme sürelerinin ve kuru hücre ağırlıklarının eşit derişimli farklı gübreler ile değışimi.....	88
Şekil 4.32. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı C/N oranlarında <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiğı	89
Şekil 4.33. Farklı C/N oranları için ln (absorbans)-zaman grafiğı	90
Şekil 4.34. Spesifik hızların C/N ile değışimi.....	91
Şekil 4.35. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı metal iyonlarının <i>B. thuringiensis</i> RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiğı	92
Şekil 4.36. Farklı metal iyonları için ln (absorbans)-zaman grafiğı	93
Şekil 4.37. Spesifik hızların metal iyonları ile değışimi.....	93
Şekil 4.38. Kontrol grubu ile değıştirilen şartların karşılaştırılması (Büyüme)	95
Şekil 4.39. PHB standart grafiğı	97
Şekil 4.40. Farklı karıştırma hızlarında PHB üretiminin değışimi	99
Şekil 4.41. Farklı karbon kaynaklarında PHB üretiminin değışimi.....	101
Şekil 4.42. Farklı azot kaynaklarında PHB üretiminin değışimi	103
Şekil 4.43. Farklı derişimlerdeki hayvan gübrelerinin PHB üretiminin değışimi	105
Şekil 4.44. Farklı derişimlerdeki organik gübrede PHB üretiminin değışimi	107
Şekil 4.45. Farklı C/N oranlarında PHB üretiminin değışimi.....	108
Şekil 4.46. Farklı metal iyonu ilavesinin PHB üretiminin değışimi.....	110
Şekil 4.47. Kontrol grubu ile değıştirilen şartların karşılaştırılması (PHB)	111

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Sporlanma sonuna doğru <i>B .thuringiensis</i> elektron mikroskobunda görünümü	4
Resim 3.1. PHB granüllerinin (a) Sudan Black B (b) Nile Blue yöntemiyle görünümü	24
Resim 3.2. Elektron mikroskobu ile karışık kültürdeki PHB-PEG-TS taraması A) Kontrol B) 5 gün sonra C) 10 gün sonra D) 15 gün sonra E) 20 gün sonra	50
Resim 4.1. Gram boyama görüntüsü.....	63
Resim 4.2. Bakterideki PHB üretimi	96
Resim 4.3. Sonikasyon süresinin tespiti	96

SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Simgeler	Açıklamalar
C/N	Kütlece karbon/Azot oranı, g-C/g-N
g	Gram
h	Saat
k	Spesifik üreme hızı (genel), h ⁻¹
K_s	Substrat spesifik sabiti
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molarite
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MPa	Megapaskal
nm	Nanometre
OD	Optik density (yoğunluk)
rpm	Devir/dakika
S	Sınırlayıcı substrat konsantrasyonu, g/l
sp.	Türler (species)
subsp.	Alt tür
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
μ	Spesifik üreme hızı (logaritmik evrede), h ⁻¹
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre

Kısaltmalar**Açıklamalar**

ASTM	American Society for Testing and Materials
DCW	Dry cell weight (kuru hücre ağırlığı)
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC	Gaz kromatografi
HB	Hidroksibütirat
H.G.	Hayvan gübresi
HV	Hidroksivalerat
K.G.	Kimyasal gübre
KHA	Kuru hücre ağırlığı
LPS	Lipopolisakarit
MKŞ	Mısır koçanı şurubu
MS	Kütle spektroskopisi
MCL	Orta zincir uzunluğu
MSM	Minimal tuz ortamı
NMR	Nükleer magnetik rezonans
PE	Polietilen
PEG	Polietilen glikol
PGA	Poliglikolik asit
PHA	Polihidroksialkonatlar
PHB	Poli- β -hidroksibütirat
PHBV	Poli(3-hidroksibütirat-ve-3-hidroksivalerat)
PLA	Polilaktik asit
PP	Polipropilen
PVA	Polivinil alkol
SDS	Sodyum dedosil sülfat
SCL	Kısa zincir uzunluğu
ŞKM	Şeker kamışı melası
TS	Termoplastik nişasta
YEM	Maya ekstraktı-mannitol ortamı

1. GİRİŞ

Sanayi devrimi ile başlayan endüstrideki ilerlemeler, türlü kullanım alanları olan sayısız organik kirleticinin günlük hayatımıza girmesine sebeptir. Bu organik bileşiklerden olan plastik atıklar günümüz için önemli sorunlardandır. Dünya’da 1950’li yıllarda yıllık plastik madde kullanımı 5-6 milyon ton civarındayken 2009’da yıllık kullanım 110 milyon tona kadar ulaşmıştır. Her yıl çevreye bırakılan 3,5 milyon ton kadar plastik torbanın parçalanarak doğada ayrışması için uzun yıllar gerekmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde her sene milyonlarca ton plastik maddenin çevreye atılması çevre kirliliğini hızlandırmaktadır. Örneğin Amerika’da çevreye atılan plastik madde miktarı yılda yaklaşık 33,6 milyon ton kadardır. Dünya genelinde biriken plastik miktarı yıllık 25 milyon ton civarındadır [1-4].

Her alanda karşılaştığımız petrol türevli plastiklerin, cam, metal, kauçuk, ağaç, inorganik maddeler gibi malzemelerin yerine ya da birlikte kullanılarak değerli bir materyal haline gelmiştir. Bunun kanıtı olarak Dünya plastik sektöründe 60 milyon kişiye istihdam sağlanması ve yılda ortalama 700 milyar Avro katma değer yaratılması gösterilebilir. Dünyada 1950’li yıllarda yıllık plastik madde kullanımı 5-6 milyon ton civarındayken 2009’da yıllık kullanım 110 milyon tona kadar ulaşmıştır [4, 5].

Plastiğe dayalı araç gereçlerin kullanımı otomotiv sanayisinde, elektrikli ev aletlerinde, mutfak eşyalarında, park/bahçe alanlarında, inşaat sanayisinde, gıda ambalajlarında, kozmetikte, temizlik malzemelerinde, tarımda, tekstilde, konfeksiyonda ve sağlık alanında gibi birçok alanda karşılaşılmaktadır. Fakat bu malzemenin avantajlar kadar dezavantajları da bulunmaktadır. Avantajları arasında hafiflik, dayanıklılık, yalıtkanlık, hijyen, esneklik ve mukavemet, tokluk, kolay şekillendirilebilme, özelliklerin değiştirilebilmesi, düşük maliyet, tasarımının kolaylığı ve atmosferik koşullara dayanım gibi özellikler sayılabilirken dezavantajlarının başında çoğunun kullanımından sonra işlevselliğini kaybederek atık özelliği kazanması, doğada uzun süre parçalanamadan kalarak toksik madde birikimine neden olmaları sayılabilir. Bu nedenle özellikle doğadan toplanması zor ya da geri kazanılması mümkün olmayan plastikler için alternatif çözümler araştırılmıştır [3, 4, 6-8].

Çevre sorunlarının çözümüne yönelik yapılan çalışmalar içinde biyoplastikler önemli bir yer tutmaktadır. 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. PHA'lar yani mikrobiyal plastikler, 3 üyeli biyobozunur plastikler sınıfının %100 biyobozunan tek üyesidir. Çok farklı türleri olmasına rağmen PHA'ların en yaygın ve en bilinen çeşidi PHB (poli- β -hidroksibütirat)tır. PHB petroplastiklerden en sık kullanılan polipropilene ve polietilene benzerliği sebebiyle dikkat çeken bir alternatiftir. PHB; bozuma özelliği ve bu özelliğinin katkı maddeleri ile ayarlanabilmesi, sık kullanılan petrol türevli plastiklere benzerliği, toksik olmayışı ancak maliyetli üretimi sebebiyle bu çalışmaya konu olmuştur [6, 9]. *Cupriavidus necator*, *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Escherichia coli*, *Burkholderia sacchari* ve *Halomonas boliviensis* PHB üreten başlıca bakteri suşlarından [10]. *Bacillus* sp. bu çalışma için uygun bulunmuştur.

Çalışmada PHB üretimi için kullanılan bakteri *Bacillus thuringiensis*'tir. Bu türün, diğer *Bacillus* türlerinden (*B. subtilis*, *B. megaterium* vb.) farklı olarak primer metabolit olan PHB üretimi açısından yeterince araştırılmadığı görülmüştür. *B. thuringiensis*, primer ve sekonder ürünleri açısından zengin, toprak florasından kolaylıkla izole edilebilen ve kolay üretilebilir, endüstriyel ölçekte ürün eldesinde tercih edilebilecek bir türdür. *B. thuringiensis* günümüzde sekonder metaboliti olan B-kristalin proteini (Bt toksini) nedeniyle biyoinsektisit olarak sıkça kullanılmakta ve endüstriyel ölçekte üretilmektedir.

Bu çalışmanın amacı hem primer hem de sekonder metabolit ürün elde edebileceğimiz *B. thuringiensis* ile yüksek PHB üretimini sağlayan şartların optimizasyonu, üretimle doğrudan ilintili olan bakteri biyokütlesinin artırılması, ekonomik üretim için önemli parametrelerden olan gecikme süresi ve spesifik hızın incelenmesi ve starter suş taramasında izolasyon yapılan alanlardan tarımsal bölgelerin öneminin incelenmesidir. Yapılan çalışmayı farklılaştıran unsur ekonomik substrat olarak çeşitli gübrelerin biyokütle ve PHB üretiminde kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır.

2. DÜŞÜK GUANİN-SİTOZİNLİ (GC) BAKTERİ: *Bacillus* sp.

2.1. *Bacillus* sp. ve *Bacillus thuringiensis*

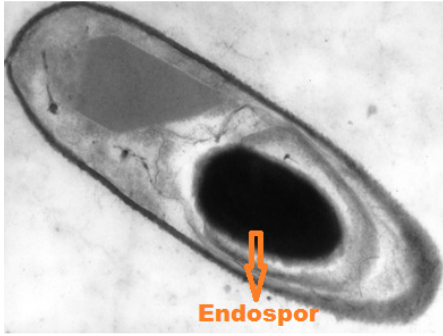
Bacillus cinsi bakteriler *Bacillaceae* familyasına mensup bir tür olup çubuk formu düz hücrelerdir. Kötü ortam şartlarında endospor oluşturma yetenekleri sayesinde dirençli olarak bilinirler. Aerobik ve fakültatif anaerobtur. Ortalama 1-5 µm boyutlu hücreler genellikle açık renkli (krem-beyaz) kolonilere sahiptir. Ortalama 30°C üstünde, 35-37°C aralığında, pH 7 civarında ürerler. Organik asit, alkol, şeker karbon kaynaklarını; amonyum azot kaynağını içeren ortamlarda iyi gelişirler. Tipik habitatları topraktır. Bu cinsteki bakterilerin çoğu patojen değildir [11].

Bacillus cinsi bakterilerin melas gibi ucuz substratlarda hızlı bir şekilde büyüdüleri; yüksek sıcaklık ve yüksek osmotik basınca dayanıklı oldukları, hücre duvarı yapılarının kalın oluşu bildirilmiştir [7].

Bacillus thuringiensis (Bt-Resim 2.1) içinde *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* ve *B. weihenstephaensis* türlerinin de bulunduğu *B. cereus* grubunun bir üyesidir [12]. *B. thuringiensis* çeşitli böcek türlerinde patojenik özellik gösterir [13]. Bu tür spor oluşturabilir, aerobik, gram (+), çubuk formu bir türdür. İlk olarak Japon bir bakteriolog olan Dr. Shigetana Ishiata 1901 senesinde ipek böceğinde “sotto bacillus” hastalığının nedeni olarak hastalıklı ipek böceği larvasından izole edilmiştir [12, 14]. Ancak ilk bilimsel tanımlama 1911 senesinde Berliner tarafından Almanya’da yapılmıştır [15]. İlk kez bu türün sporlarının toksik etkilerinin tespiti Aoki ve Chigasaki adlı araştırmacılar tarafından 1915’te olmuştur [12].

Bu tür hakkında biyoplastik üretimi, biyoinsektisit olarak kullanımı ve çeşitli boyaların renk giderimi üzerinde çalışmalar bulunmaktadır. *Bacillus* cinsi bakteriler melas gibi ucuz substratlarda hızlı bir şekilde büyüdüleri; yüksek sıcaklık ve yüksek osmotik basınca dayanıklı oldukları ancak gram pozitif olmaları sebebiyle hücre duvarının kalın oluşuyla PHB ekstraksiyonunun zor olduğu ve PHB kazanımı için önışlem gerektiği bildirilmiştir [7]. Bu sebeple endüstride genellikle gram negatif bakterilerin kullanımı yaygındır.

PHB üretimini çalışılmasında *Bacillus thuringiensis* türünün seçilmesinin nedenleri içinde bulunduğu cinsin getirdiği nötral pH ve oda sıcaklığında kolay üreyebilmesi, insan için patojenik olmayışı, toprak bakterisi oluşu itibari ile teminin kolaylığı ve boyutları ile ölçüm-gözlem rahatlığı gibi avantajlarının çalışma kolaylığı sağlamasıdır. Bunun yanında *B. thuringiensis*, primer ve sekonder ürünleri açısından zengin, endüstriyel ölçekte ürün eldesinde tercih edilebilecek bir türdür.



Resim 2.1. Sporlanma sonuna doğru *B. thuringiensis* elektron mikroskopunda görünümü [16]

2.2. *Bacillus* sp. Türlerinin Biyoteknolojik Açıdan Önemi

Biyoteknolojik ürünlerin eldesinde genellikle maya, alg, küf ve bakterilerden yararlanılabilmektedir [17]. Bu canlıların primer ve sekonder metabolitleri ticari öneme sahiptir.

Bacillus sp. biyolojik uygulamalarda şu nedenlerden dolayı dikkat çekmiştir: Kolay üretilibilmeleri, spor oluşturabilmeleri ve metabolizmal faaliyetlerinin çeşitlilikleri [6].

Primer metabolitler (logaritmik evrede, duraklama evresine kadar üretilen metabolitler) ve sekonder metabolitler (duraklama evresinde üretilip büyümeden bağımsız olarak üretilen metabolitler) açısından zengin olan *Bacillus* sp. türleri üretimde sıkça kullanılmaktadır (Çizelge 2.1). Örnek olarak çeşitli böceklere karşı bakteriyel kontrol ajanı olarak kullanılırlar. Bunun yanında ürettikleri enzimler (subtilisin, selulaz ve amilazlar vb.), antibiyotikler (bacitrasin, gramicidin s, polimiksinler ve tyrocidin) ve çevreye yönelik ürünlerinden biyoplastikler ile birçok endüstrisi alanı için de kullanılmaktadır [6, 18].

Çizelge 2.1. Endüstride kullanılan başlıca *Bacillus* sp. ve kullanım alanları [19, 20]

Üretici Firma	Ürün İsmi	Kaynak	Uygulama Alanı
Novo Nordisk, Danimarka	Alcalase	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan, ipek
	Savinase	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan, tekstil
	Esparase	<i>B. lentus</i>	Deterjan, gıda, ipek
	Biofeed pro	<i>B. licheniformis</i>	Yem
	Durazym	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
	Novozyme 47 1MP	Belirtilmiyor	Fotoğraf
	Novozyme 243	<i>B. licheniformis</i>	Deri
Gist-Brocades, Hollanda	Nue		
	Subtilisin	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
	Maxacal	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
Solvay Enzymes, Almanya	Maxatase	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
	Opticlean	<i>B. alcalophilus</i>	Deterjan
	Optimase	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan
	Maxapem	<i>Bacillus</i> sp.'nin	Deterjan
	HT-proteolytic	varyantı	
	Protease	<i>B. subtilis</i>	Alkol, içki, ekmek, yem, gıda, deri
		<i>B. licheniformis</i>	Gıda, atık
Amano Pharmaceuticals, Japonya	Proleather	<i>Bacillus</i> sp.	Gıda
	Collagenas	<i>Clostridium</i> sp.	Teknik
	Amano protease S	<i>Bacillus</i> sp.	Gıda
Enzyme Development, ABD	Enzeco alkaline protease	<i>B. licheniformis</i>	Teknik
	Enzeco alkaline protease-L FG	<i>B. licheniformis</i>	Gıda
	Enzeco high alkaline protease	<i>Bacillus</i> sp.	Endüstriyel
JodoShusei, Japonya	Codo Bap	<i>B. licheniformis</i>	Deterjan, gıda

Çizelge 2.1. (devam) Endüstride kullanılan başlıca *Bacillus* sp. ve kullanım alanları [19, 20]

Üretici Firma	Ürün İsmi	Kaynak	Uygulama Alanı
PHB Industrial S.A., Brezilya	Biocycle (PHB)	<i>Bacillus</i> sp.	Enjeksiyon teknolojisi, kalıptan çekme, lif
Genencor International, ABD	Purafact Primatan	<i>B. lentus</i> <i>Bacillus</i> sp.	Deterjan Deri
Nagase Biochemicals, Japonya	Biopraxe concantrate	<i>B. subtilis</i> <i>P. aeruginoso</i>	Kozmetik, farmasötik
	Ps. Protease	<i>P. aeruginoso</i>	Araştırma
	Ps. Elastase	<i>B. subtilis</i> (K2)	Araştırma
	Cryst. Protease	<i>B. subtilis</i>	Araştırma
	Cryst. Protease	(bioteus)	Araştırma
	Biopraxe	<i>B. subtilis</i>	Deterjan, temizlik, gıda
	Biopraxe SP-10		
Rohm, Almanya	Corolase 7089	<i>B. subtilis</i>	Gıda
Wuxi Synder Bioproducts, Çin	Wuxi	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan
Advance Biochemicals, Hindistan	Protosol	<i>Bacillus</i> sp.	Deterjan

2.3. *Bacillus* sp.'nin Üreme Şartları ve Üremeyi Etkileyen Faktörler

Mikroorganizmalar gelişmek ve çoğalabilmek için suya, enerji kaynağına, azot kaynağına, vitaminlere ve minerallere gereksinim duyarlar. Mikroorganizmaların kuru ağırlıklarının %95'inden fazla kısmını bazı temel elementlerin (karbon, oksijen, hidrojen, azot, sülfür, fosfor) oluşturduğu görülür. Bu maddelere, makroelement (makro nütrient) adı verilmektedir ve hücre membranının, proteinlerinin, nükleik asitlerinin, diğer yapılarının yapısına katılması için gereklidir. Mikrobeseinler (potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir vb.) elementlerini içerir. Makrobeseinlere oranlara hücre bu besinlere çok daha düşük miktarda ihtiyaç duyar (%0,1-1). İz elementlerin miktarları hücre içinde çok çok az yani

eser miktardadır (%0,1'den az); ancak hücrelerin görevlerini yerine getirmesi için mutlaka olmalıdır. Kobalt, çinko, molibden, bakır ve nikel örnek iz elementlerdir [21, 22].

Gelişme (büyüme) faktörleri, az miktarlarda ihtiyaç duyulan ve metabolik işlemlerde gerekli moleküllerdir. Bazı mikroorganizmalar bu maddeleri sentezlerken bazıları da dışarıdan hazır olarak alır [21]. Aminoasitler protein sentezinde görevlidir, purinler ve pirimidinler DNA ve RNA gibi nükleik asitlerin sentezinde kullanılır, enzimlerin üretimi için gerekli maddelerden vitaminlerin bir bölümü de koenzim yapısına katılır [21].

Bacillus sp.'nin üremesi ve gelişmesi için minimum şart olan makrobesinler yeterlidir. Bu nedenle bu cins için genel besiyerlerinin kullanımı mümkündür. Fakat belirli derişimler dahilinde mikrobeseinlerin ve iz elementlerin varlığı büyümei desteklemektedir. Kalaylı ve Beyatlı (2003) *Bacillus* sp. türlerinin organik asit, alkol, şeker karbon kaynaklarını içeren ortamlarda iyi geliştiğini bildirmiştir [11].

Mamo ve Gessesse *Bacillus* sp. *WN11* bakterisinin bazal ortamda farklı azot (pepton, tripton, maya ekstraktı, 55°C, pH 5) ve karbon kaynaklarının (glikoz, galaktoz, fruktoz, laktoz, maltoz, sükroz, selüloz, nişasta, 55°C, pH 5) büyüme verimine etkisini incelemişlerdir. En yüksek büyüme verimini azot kaynağı olarak peptonda, karbon kaynağı olarak nişastada tespit etmişlerdir. Maya ekstraktı ve glikozun varlığında büyüme veriminin düşük olduğunu bildirmişlerdir [23].

Singh, Kalia, Kumar ve Purohit'in yaptıkları çalışmada 6 farklı *Bacillus* suşu (*B. cereus* EGU3, *B. cereus* EGU43, *B. thuringiensis* EGU45, *Bacillus* sp EGU75, *B. cereus* EGU520, *B. cereus* EGU44) ile farklı kaynaklarda bakterilerin büyümesini incelemişlerdir. Farklı karbon kaynağı olarak farklı şekerler (glikoz, laktoz, sükroz) ve bezelye kabuğu kullanılmışlardır. Tüm suşların glikoz-maya ekstraktı ortamında en fazla üreme gösterdiğini, *B. thuringiensis* EGU45 için ise maltoz-maya ekstraktı ortamının en iyi üreme ortamı olduğunu bildirmişlerdir [24].

Younis, Hezayen, Nour-Eldein ve Shabeb *B. subtilis* 110 suşunun şeker fabrikası atığı olan melasın (şeker pancarı melası) farklı derişimlerinin büyüme etkisini incelemişler ve %10'luk melas konsatrasyonunun maksimum biyokütle verimi için uygun olduğunu tespit etmişlerdir. En uygun azot kaynağının da amonyum fosfat belirtilmişlerdir [25].

Singh, Kumar, Mittal, Yadav ve Aggarwal *B. subtilis* NG220 bakterisinin diğerk bir şeker endüstrisi atığı olan sularının farklı konsantrasyonlarının büyüme üzerine etkisini incelemişlerdir. Maksimum kuru hücre ağırlığını (KHA) %100 şeker endüstrisinin atık suyunda olduğunu tespit etmiş ve atık suyun seyreltilmesinin C-N kaynaklarını da seyreltiğinden büyüme üzerinde olumsuz yönde etkili olduğunu saptamışlardır [26]. Gomaa ise farklı bir melas türü olan şeker kamışı pekmezinin (melası) *Bacillus subtilis* AJ-3'ün büyümesi üzerine etkisini incelemişlerdir. Melasa $MgSO_4$ ve $CaCl_2$ tuzlarının farklı konsantrasyonlarda ilave ederek çalışmışlardır. $MgSO_4$ ve $CaCl_2$ etkisi *B. subtilis* hücre sel büyüme üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bildirmişlerdir [27].

Bhuwal, Singh, Aggarwal, Goyal ve Yadav karbonhidratlarca zengin ama azot ağışından fakir, C/N oranı ağışından yüksek olan karton endüstrisi atık suyunda *Bacillus* sp. NA10 bakterisinin büyümesini incelemiştir. Atık konsantrasyonu incelemişler ve maksimum büyümenin %100'de olduğunu tespit etmişlerdir [28].

Bakterilerin üremesini etkileyen faktörler 4 ana başlıkta toplanabilir [29];

- ✓ Fiziksel faktörler
- ✓ Kimyasal faktörler
- ✓ Biyolojik faktörler
- ✓ Mekanik faktörler

2.3.1. Fiziksel faktörler

Isı: Sıcaklıkta sınırlara doğru gidildikçe üremenin yavaşladığı ve sınırları geçince üremenin durduğu görölür. Sıcaklık arttııkça veya azaldıkça, enzim aktivitesinde de değişiklik oluşacağından, metabolizma üzerine olumsuz yönde etkiler. Mikroorganizmalar üreme sıcaklığı derecelerine göre başlıca 3 bölüme ayrılırlar: psikrofiller (20 °C'nin altında), mezofiller (20-45°C arasında) ve termofiller (45°C'nin üstünde). Soğukluk –80 °C veya –190 °C olunca canlılıklarını ve infeksiyöz kabiliyetlerini uzun süre (yıllarca) koruyabilmektedirler. Eğer mikroorganizmalar çok kısa süre içinde dondurulur, kurutulur ve havası alınmış ampuller içinde saklanırsa uzun yıllar canlılıklarını ve aktivitesini koruyabilirler (liyofilizasyon) [29].

Çeşitli *Bacillus* türleri üzerinde çalışan Pichhardt, Tamdoğan, Thiele ve Gomaa gibi araştırmacılar çalışmalarında optimum üreme sıcaklığı olarak 30°C'yi bildirmişlerdir [27, 30-32].

Radyasyon: Radyasyonların başlıca iki amacı vardır: Sterilizasyon/dezenfeksiyon ve mutasyon. Ultraviole ışınları bakteride protein sentezini ve diğer mekanizmaları bozarak ölümlere neden olur. Güneş ışınları (UV-ışınları), mikroorganizmaları hem mutasyonlara neden olur hem de sıcaklığı ile etkiler. Ses dalgaları bakteri hücrelerini parçalayabilecek niteliktedirler. Ultrasonik vibrasyonlara gram pozitif ve negatif mikroorganizmalar daha duyarlıdır. İyonizan radyasyonlar da pratikte sterilizasyon amacıyla kullanılırlar [33].

Yüzey geriliminin etkisi: Bakteriye temas eden sıvı yüzeyindeki moleküllerin oluşturduğu gerilim çok fazla olursa membran 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 [29].

Osmotik basıncın etkisi: 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. Bakteri içindeki bu fazla osmotik basınç, içte bulunan organik maddeler ve inorganik tuzlar tarafından oluşturulur. Bu mikroorganizmaların en iyi üreyebildikleri ortam madde giriş ve çıkış rahat olduğundan, osmotik basıncı bakteri içindeki ile aynı ya da yaklaşık olarak aynı olandır [29].

Hidrostatik basıncın etkisi: Her canlının dayandığı belli bir hidrostatik basınç düzeyi mevcuttur. Bu düzeyin altında veya üstündeki hidrostatik basınç değerlerinde canlı yaşayamaz [34].

Su etkisi: 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. Liyofilize edilen mikroorganizmalar uzun süre canlılıklarını korurlar [29].

Elektriğin etkisi: Sıvı ortamlarda suspansiyon halinde bulunan mikroorganizmalardan direkt veya alternatif elektrik akımı geçirilirse, mikroorganizmalar zarar görebilirler [29].

2.3.2. Kimyasal faktörler

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

Oksijen etkisi: 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 [29].

pH: Her mikroorganizmanın sevdiği ve yaşadığı belli bir pH aralığı vardır. Minimal ve maksimal pH limitlerine yanaştıkça üreme azalır ve durur. Mikroorganizmaların çoğunluğu pH 5-9 aralığında (optimum yakalşık 7) uygun şekilde büyürler. Düşük pH'da yaşayanlar asidofilikler olarak adlandırılır. Nötrofilik organizmalar ise pH 6-8 de yaşarlar. pH 10-11 arasında gelişenler ise alkalofiliklerdir [29, 34].

Kalaylı ve Beyatlı ile Keshavarzi, Salimi ve Mirzanamadi *Bacillus* sp. ve *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* ile optimum biyokütle eldesinin pH 7 civarında olduğunu bildirmişlerdir [11, 35]. Pichhardt'un tespitine göre *Bacillus cereus*'un gelişebildiği pH aralığı 4,9-9,3 olup optimum 7'dir [30]. Mevel ve Prieur aşırı termofil izole *Bacillus MS30* bakterisinin enzim aktivitesine bağlı olarak maksimum üreme hızının pH 6,5'da olduğunu gözlemlemişlerdir [36].

2.3.3. Biyolojik faktörler

Canlıların vücudunda özellikle, sindirim, solunum, ürogenital sistemleri ve derilerinde sayısız mikroorganizma (yerleşik mikroflora) bulunmaktadır. Sentezledikleri antagonist etkiye sahip metabolitlerler birbirlerini etkileyerek birbirlerinin üremelerine ve hatta ölmelerine de yol açarlar [29].

2.3.4. Mekanik faktörler

Çalkalama: Çalkalanma üreme üzerine olumlu etkide bulunmaktadır. Eğer çalkalama çok hızlı veya sert olursa mikroorganizmalarda ölümler meydana gelebilir [29]. Baysak, *Rhizobium* suşları üzerine farklı çalkalama hızlarının hücre kuru ağırlıklarında artışa neden olduğunu belirtmiştir [37]. Liu, Wu ve Ho *Phaffia rhodozyma* mayasının 250 rpm’de maksimum biyokütle ürettiğini tespit etmiş ve biyokütlenin çalkalamanın artmasıyla arttığını bildirmiştir [38].

Filtrasyon: Bakterileri tutan ve delik çapları belli olan özel filtreler kullanılır. Bakteri üst yüzeyde tutulduğu için de bir agarın üzerine yatırılarak ekilebilirler [29].

Santrifugasyon: Santrifüj yardımıyla bütün mikroorganizmalar giderilemezler veya sıvı steril hale getirilemez [29].

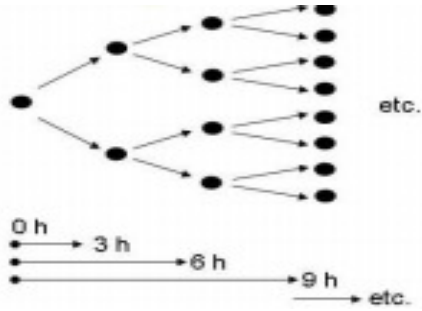
Ezmek: Santrifüj yardımıyla çöktürülen mikroplar bir havana veya ezme aletine konur burada ezilerek parçalanabilir. Bu yöntemle de bütün mikroplar ölmezler [29].

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 [29].

Vibrasyon: Ultrasonik vibrasyonlara maruz bırakılırsa ölebilirler ama tam anlamıyla sterilizasyon sağlamaz [29].

2.4. Büyüme Kinetiği

Tüm besinlerin, oksijenin, optimal sıcaklığın ve pH'ın olduğu bir ortamda bakteri türünden tek bir hücre düşünölsün. Varsayalım ki bu özel türlerin hücreleri optimal koşullarda her 3 saatte bir ikilensin/bölönsün (Şekil 2.1). Böylece ikilenme süresi (jenerasyon süresi) t_d şu şekilde yazılır: $t_d = 3$ saat [39].



Şekil 2.1. Tek bir hücre ile başlayan hücre büyümesinin örneği [39]

Hücrelerin zamanla sayısının artışı tanımlamak için (büyüme eğrisi), zamanın fonksiyonu olarak hücre sayısını ifade eden eşitliği bulmamız gerekir.

Yani bir değişken zaman (bağımsız değişken) ve diğer bir değişken ise hücre sayısı (bağımlı değişken) [39].

Tanımlanan denklem; $N = 2^n$ henüz diğer değişkenleri içermiyor. Denklemden yer alan n bölünme olayının sayısını başka bir deyişle “kardeş” jenerasyonun sıra sayısını gösteriyor. Başlangıçta bir bölünme yani “kardeş” jenerasyon olmadığı için $n=0$ ’dır. 3 saat sonra bir bölüne ve 1 kardeş jenerasyon görülür ve $n=1$ olur. Bölünme sayısı zamanla artar. t_d ’nin t içinde kaç kez geçtiğine bakılarak n bulunabilir [39].

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

$$N = 2^{t/t_d} \quad (2.2)$$

Eğer büyüme herhangi bir hücre sayısı N_0 ile başlarsa [39];

$$N = N_0 2^{t/t_d} \quad (2.3)$$

Bölünme hızı (ikilenme hızı) ϑ [39];

$$\vartheta = 1/t_d \quad (2.4)$$

$$N = N_0 2^{t\vartheta} \quad (2.5)$$

$$2 = e^{\ln 2} \quad (2.6)$$

Eş. 2.6 ve Eş. 2.4, Eş. 2.5'te yerine konduğunda;

$$N = N_0 (e^{\ln 2})^{t/t_d} \quad (2.7)$$

$$\ln 2 = 0,6931 \dots \quad (2.8)$$

$$\frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0,693}{t_d} = \mu \quad (2.9)$$

μ spesifik büyüme hızı ya da daha sık üreme hızı olarak tanımlanır. Denklem şu şekli alır [39];

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (2.10)$$

Büyüme eğrisi grafiği (N-t) için kültürdeki başlangıçtaki ve farklı zaman aralarında hücre sayısı belirlenmeli. Çünkü tüm hacimdeki hücre sayısı N hesaplanamaz. $V_{\text{örnek}}$ hacmi alınır hesaplama yöntemiyle $N_{\text{örnek}}$ hesaplanır. $N_{\text{örnek}}/V_{\text{örnek}} = N/V$ 'dir. Bu oran hacim başına hücre sayısıdır ve hücre yoğunluğunu tanımlamış olur [39].

$$\frac{N}{V} = \frac{N_{\text{örnek}}}{V_{\text{örnek}}} = \text{Hücre yoğunluğu (OD)} \quad (2.11)$$

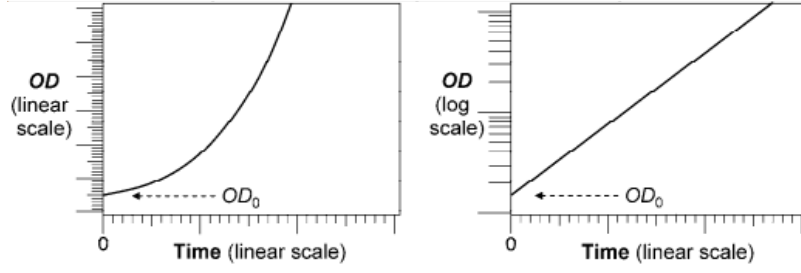
$$\frac{N}{V} = \frac{N_0}{V} e^{\mu t} \quad (2.12)$$

$$\frac{N_{\text{örnek}}}{V_{\text{örnek}}} \cong OD \quad (2.13)$$

Eş. 2.13, Eş. 2.10'da yerine konduğunda;

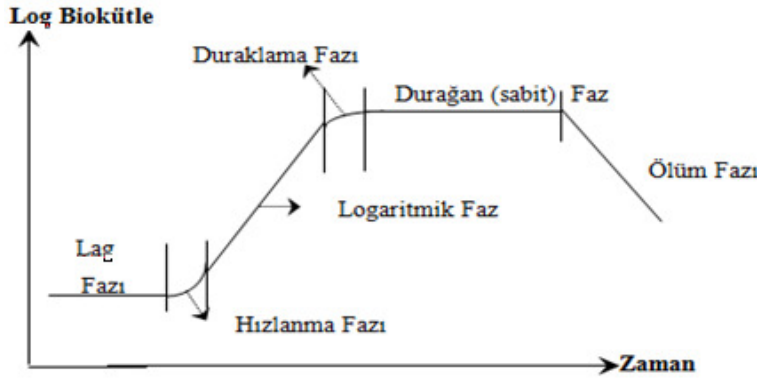
$$OD = OD_0 e^{\mu t} \quad (2.14)$$

Veri hesabı için, OD'yi log skalada çizerek eksponansiyel eğriyi düz bir çizgi ile görebiliriz (Şekil 2.2.) [39].



Şekil 2.2. Skala değişiminin grafiğe etkisi [39]

Diğer yandan kültür sonsuza dek büyümeyecek çünkü ortamdaki besin sınırlılığı ve kültür hacmi kısıtlıdır. Aslında kültürde doğal fazlar gözlenir (Şekil 2.3) [39].



Şekil 2.3. Bakterinin yaşam evreleri [39]

Grafikte $OD_2 = 2 OD_1$ olduğunda geçen süre t_d 'dir [39].

$$\frac{\Delta N}{\Delta t} \cong \frac{dN}{dt} \quad (2.15)$$

$$\frac{dN}{dt} = \mu N \quad (2.16)$$

$t_0 = 0$ ve $N_{t=0} = N_0$ denirse,

$$\ln N = \ln N_0 + t\mu \quad (2.17)$$

$$\ln N - \ln N_0 = t\mu \quad (2.18)$$

Eş. 2.13'te yer alan OD-N ilişkisinden;

$$\ln OD_2 - \ln OD_1 = t_2\mu \quad (2.19)$$

$$\ln OD_1 - \ln OD_0 = t_1\mu \quad (2.20)$$

Eş. 2.20 ile Eş. 2.19'un farkı alındığında;

$$\mu = \frac{2,303(\log OD_2 - \log OD_1)}{t_2 - t_1} \quad (2.21)$$

N hücre sayısı hesaplanması zor olduğundan X hücre konsantrasyonu da kullanılabilir.

Spesifik üreme hızının yüksek olması zamandan ve harcanacak enerjiden tasarruf sağlayarak gereksiz kayıpları önler. Özellikle büyük ölçekli sistemlerde sağlanan tasarruflar ekonomik yükün hafiflemesini de beraberinde getirir.

Kültürdeki gözlenen fazlara bakılacak olursa;

Lag (latent) fazı: Bu fazda yeni ortama ekilen bakterilerde üreme gerçekleşmemektedir. Bakteriler ortama adapte olmaya çalışmaktadır. Bu amaçla enzim üretimi ve metabolizmaları artmaktadır. Ortama adapte olamayan bakterilerinin ölümü nedeniyle bakteri sayısında azalma görülebilmektedir. Lag fazının uzunluğu ya da kısalığı mikroorganizma türüne, çevre koşullarına ve besiyerinin bileşimine bağlıdır. Yapılan bazı çalışmalarda ortama eklenen Mg^{+2} iyonunun lag fazı kısaltabileceği görülmüştür. Çeşitli kimyasallar, ilaçlar, sıcaklık, pH gibi çevresel koşullar lag süresini (t_L) etkileyebilir. Lag süresi mikroorganizma yaşı ile de ilintilidir [40, 41].

Hızlanma fazı: Bu aşamada ortama adapte olan ve yeterli enzim, organik ve inorganik maddeleri hazırlayan bakteriler üremeye başlar ancak yavaştır, artış üssel değildir. A ve B evreleri benzer olduğundan beraber de değerlendirilip lag fazı adını alabilir [22, 40]. Büyüme hızı [41];

$$\frac{dX}{dt} = kX \quad (2.22)$$

k; spesifik üreme hızı (h^{-1})

Logaritmik faz: Yeterli oranda gereken maddeleri biyosentezleyen ve temin eden bakteri belirli jenerasyon süresinde, belli aralıklarla çoğalmaya başlar. Büyüme hızı sabit kabul

edilir. DNA sentezlenmesi RNA sentezlenmesinden çok daha fazladır. Hücre boyutu diğer fazlara göre daha küçüktür [22, 40]. Büyüme hızı [41];

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (2.23)$$

μ şu 3 parametrenin fonksiyonudur: S (sınırlayıcı substurat konsantrasyonu), μ_{max} (maksimum büyüme hızı) ve K_s (substrat spesifik sabiti).

$$\text{Monod Eşitliği: } \mu = \mu_{max} \frac{S}{K_s + S} \quad (2.24)$$

Monod eşitliğinde ortamda bol miktarda substrat varsa $\mu = \mu_{max}$ olacaktır ki logaritmik evrede maksimum büyüme hızı gözlenir [41].

Duraklama (yavaşlama) fazı: Hücrelerinin çoğalma hızı azalsa da hücre sayısında artış yine de gözlenir [40].

Durağan (sabit) faz: Bakterilerin ürediği başlangıç şartlarının değişmesi, ortamdaki enerji ve besinlerin azalması, toksik metabolik artıkların artışı sonucu ölen hücre sayısı çoğalan hücre sayısı ile denge halindedir. Toplamda kültürdeki hücre sayısı sabittir ve değişmez [40]. Büyüme hızı [41];

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (2.25)$$

Ölüm fazı: Durağan fazda gözlenen besinlerin azalması, metabolizmaların yavaşlaması gibi şartlar değişmediği sürece bakteriler ölmeye başlar. Ancak popülasyon hiçbir zaman sıfır olmaz çünkü bazı bakteriler yeni şartlara, ortama adapte olabilir ve yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilir. Ölüm fazı da logaritmik olarak gerçekleşir. Ölen hücreleri sayısı yeni oluşanlardan daha fazladır [22, 40]. Büyüme hızı [40];

$$\frac{dX}{dt} = -kX \quad (2.26)$$

k; spesifik ölüm hızı (h^{-1})

Mevel ve Prieur aşırı termofil izole *Bacillus* MS30 bakterisinin standart ortamda optimum sıcaklıkta büyümenin 30 saat sürdüğünü, ilk 3 saatinde ise büyümenin olmadığını gözlemlemişler. Büyüme dönemi 12 saat sürerken maksimum büyüme hızının 6-9 saatleri (logaritmik evre) arasında olduğunu ve durağan fazın 15. saatte başladığını tespit etmişlerdir [36].

Liu, Huang, Zhang ve Xu, *Bacillus shackletonii* K5 ile yaptığı çalışmada PHB birikiminin büyümenin log fazı ile başladığını ve maksimum kuru hücre ağırlığının (2,16 g/l) 28 saat sonra meydana geldiğini bildirmiştir [42].

Choma, Clavel, Dominguez, Razafindramboa, Soumille ve Nguyen zenginleştirilmiş J ortamında ve kabak suyunda *B. cereus* TZ415 büyümesi üzerine yaptıkları çalışmada 20°C'de kabak suyunda düşük üreme hızı (0,102 h⁻¹) ve 26 saat gibi uzun bir lag fazı tespit etmişlerdi [43].

Valik, Görner ve Laukova, *B. cereus*'un pastörize sütteki büyümesini incelemişler ve farklı sıcaklıklardaki lag fazlarının t_L süresinin en kısa 13°C'de, en uzun ise 5°C'de olduğunu bildirmişlerdir. t_L süresinin yüksek olması pastörize sütün raf ömrü için istenilen bir durumdur. Buradan 5 ve 7°C'lerde sütün raf ömrünün daha uzun olduğu tespit edilmiştir [44].

Valicente, Tuelher, Leite, Freire ve Vieira, *B. thuringiensis* (*B. thuringiensis* sv *tolworthi* 344) büyümek için farklı C, N ve gübre kaynaklarını test etmiş ve bu ortamlardan ticari ve sentetik olan ortamların yanı sıra doğal kaynak olan gübre ortamının da büyümede etkili olduğunu tespit etmişlerdir [45].

Sarrafzadeh ve Hossein, *B. thuringiensis* H14 ile farklı kaynakların (glukoz, gliserol, sodyum asetat, (NH₄)₂SO₄, mısır sıvısı, maya ekstraktı, hidrolize kazein) ve bazı eser elementlerin (Ca²⁺, Mg²⁺, Fe²⁺ ve Mn²⁺) büyüme üzerine etkilerini araştırmışlar ve sodyum asetat, mısır likörü, MnSO₄ ve Fe²⁺ iyonun büyümede etkili olduğunu tespit etmişlerdir [46].

Gültekin, Cd(II) ve Cu(II) iyonlarını ayrı ayrı içeren üreme ortamında PHB üretebilen *Pseudomonas putida*'nın üremesine metal iyonlarının etkisi incelemişler ve üreme

ortamında metal iyon konsantrasyonu arttıkça özgül üreme hızı azaldığını, metal iyonlarını varlığında farklı glikoz konsantrasyonlarında glikoz miktarı arttıkça özgül üreme hızının arttığı belirtmişlerdir [47].

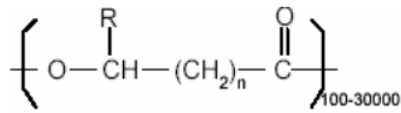
3. BİYOBOZUNUR PLASTİK VE BİYOPLASTİK

American Society for Testing Materials (ASTM) tarafında yapılan tanımına göre, biyobozunur polimerler, doğadaki bakteri, mantar, alg, maya ve diğer mikroorganizmaların etkisi ile bozunabilen polimerlerdir [5].

Biyolojik olarak bozunan, biyobozunur plastikler 3 ana sınıfa ayrılabilirler [9];

- a) *Kimyasal olarak sentezlenenler*: Bu sınıfa örnek olarak PGA (poliglikolik asit), PLA (polilaktik asit), PVA (polivinil alkol) verilebilir. Enzimatik ya da mikrobiyal etkilere karşı duyarlı olan bu sınıf plastiklerin tüm özelliklerini taşımazlar.
- b) *Nişasta bazlı olanlar*: Polimere nişasta dolgu maddesinin ilavesi ile oluşan sınıftır. Nişasta biyolojik olarak parçalandığından polimer matriks de parçalanabilir ve parçalanma süresinde bir azalma gözlenir.
- c) *Polihidroksialkonatlar (PHA/Biyoplastik/Mikrobiyal Plastik)*: Yalnızca bu sınıfta yer alan biyoçözünür plastikler doğada tamamen çözünürler. Çeşitli mikroorganizmalar tarafından üretilirler.

PHA'lar 3-, 4-, 5- ve 6- hidroksialkonik asitlerin poliesteridir. PHA depo materyali olup karbon ve yüksek enerji kaynağı olması nedeniyle insandaki yağ ve bitkideki nişastaya benzetilebilir. PHA mikroorganizmalar tarafından uygun olmayan üreme şartlarında yani, ortamdaki azot, fosfor, oksijenin ve/veya mikroelement sınırlı olduğu durumda canlılığı devam ettirmek adına granüller halinde depo edilir. Bu polimer linear, uzun, 3-hidroksi yağ asidi monomerlerinden ibaret, aktif mikrobiyal polyesterlerdir. Hidroksialkanoatların poliesteri olan PHA'nın formülü Şekil 3.1.'de gösterilmiştir [6, 48, 49]. β -karbonu üzerindeki yan zincir uzunluğu arttıkça PHA'nın fiziksel ve mekanik özellikleri kristalin ve sert yapıdan yumuşak ve yapışkan yapıya doğru değişmektedir [50]. Bakteriyel PHA'ların ortalama molekül ağırlıkları 4×10^6 Da kadar çıkar [10].



n = 1	R = hidrojen	ise	poli-3-hidroksipropiyonat
	metil	ise	poli-3-hidroksibütirat
	etil	ise	poli-3-hidroksivalerat
	propil	ise	poli-3-hidroksiheksanoat
	pentil	ise	poli-3-hidroksioktanoat
	nonil	ise	poli-3-hidroksidodekanoat

Şekil 3.1. Bakteriyel PHA genel formülü ve yapısı [48]

Polihidroksialkonatlar kendi içinde çeşitli kriterlere göre sınıflara ayrılabilir [52];

a) Kökene göre:

- Doğallar
- Yarı sentetikler
- Sentetikler

c) Poliesterde bulunan monomere göre:

- Homopolimerik
- Heteropolimerik

b) Monomerlerin kimyasal yapısına göre:

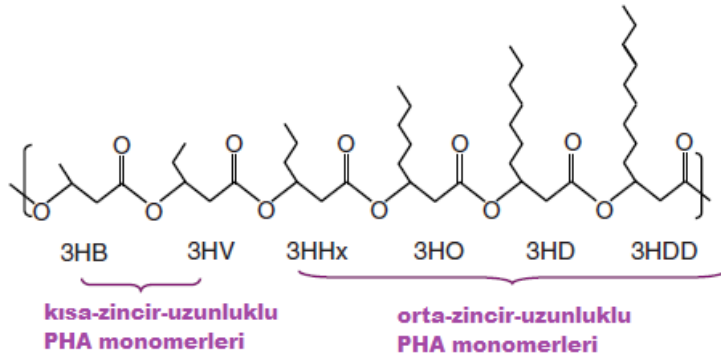
- Alifatik yağ asidi içerenler
- Aromatik yağ asidi içerenler
- Alifatik ve aromatik yağ asidi içerenler
- Değişik bileşikler içerenler

d) Monomer büyüklüğüne göre:

- Kısa zincirli
- Orta zincirli

Bakteriyel PHA sıklıkla monomer boyutuna göre sınıflandırılır. 2 ana grup vardır. Kısa zincirli (SCL) PHA 3-hidroksi monomerde 3-5 arası karbon atomu ve orta zincir uzunluklu (MCL) PHA monomerde 6-14 arası karbon atomu içeren. PHA_{SCL} için poli(3-hidroksibütirat), PHA_{MCL} için poli(3-hidroksioktanoik asit) örnek gösterilebilir [53, 54].

Farklı bakteri türlerinden izole edilmiş, molekül ağırlıkları 50 000-1 000 000 Da arasında değişen yaklaşık 150 farklı PHA çeşidi vardır [49, 55].



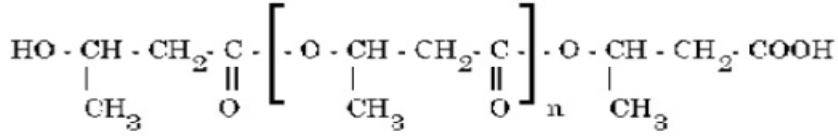
Şekil 3.2. En yaygın bilinen PHA yapılarından bazıları [56]

PHA ilk çalışmalarda bakteri hücrelerinde gözlenen küçük yağ damlacıkları olarak tanımlanmış ancak ilk gerçek tanımlaması 1923 yılında Maurice Lemoigne tarafından *B. subtilis* ile yaptığı çalışmasında olmuştur [6].

Endüstride PHA üretimi *Ralsonia eutropha*, *Pseudomonas oleoverans* gibi saf bakteri kültürlerinden gerçekleştirilir. Proses genellikle 2 adımda gerçekleşir: İlk adım besin kısıtlaması olmaksızın hücrenin çoğaltılması, ikinci adım besin kısıtlaması ile PHA birikimidir [57].

3.1. Poli-β-hidroksibütirat (PHB)

Çok farklı türleri olmasına rağmen PHA çeşitleri arasında en yaygın, en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılan PHB (poli-β-hidroksibütirat)tır (Şekil 3.3) [6]. Oldukça aktif bir bileşik olan hidroksibütirik asitten oluşan PHB polimerinin zincirinde metil yan-grubu bulunmaktadır. Biyopol ticari adıyla bilinen PHB'nin kapalı formülü $(C_4H_6O_2)_n$ olmakla birlikte n'nin alabileceği sayısal değer 35 000'e kadar da ulaşabilir. Polimerin molekül ağırlığı bakteri türü, bakterinin büyüme şartları, hücrenin yaşam döngüsü, izolasyon yöntemi, suş, inkübasyon süresi, substrat tipi ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Ancak molekülün ağırlığının 6×10^4 - 200×10^4 Da aralığında değiştiği tespit edilmiştir [51, 58].



Şekil 3.3. PHB'nin genel formülü [37]

PHB mikrobiyal plastiğin temelini oluşturmaktadır. PHB karbon kaynağının derişiminin yüksek olduğu ortamda azot, oksijen ve mikroelement gibi büyümek için gerekli olan çeşitli maddelerin eksikliğinde, hücre kuru ağırlığının %90'lara varan seviyelerine kadar oluşturulabilinen depo materyalleri olarak biriktirilir. Granüller 2-4 nm kalınlığında zarla çevrili, 100-800 nm çaplı ve %98 PHB-%2 proteinden oluşur. PHB binlerce hidroksibütirat molekülünün ardı ardına zincir gibi eklenmesiyle meydana gelen bir termoplastiktir. Aynı zamanda PHB'nin soldan sağa dönen sıkı sarmal formu, çift dönüş eksenli ve 0,596 nm'de bir ipliklerin tekrarlandığı, hücre içinde de oldukça fazla bir hacim tutar halde olduğu çalışmalarla tespit edilmiştir. PHB hücre içinde sıvı ve amorf formda atmosferde ise kristal katı formda bulunur ve organik çözücü ile hücreden ekstrakte edildiğinde kristalize olmaktadır [9, 51, 58, 59].

Depo maddesi PHB karbon ve enerji kaynağı, redükleyici ekivalentlere elektron havuzu ve lokal oksijen düzenleyici olarak görev yapar [5].

PHB özellikleri açısından petrol türevli plastiklerden polietilen (PE) ve polipropilene (PP) benzemekte olup bu özelliğinden dolayı endüstrinin dikkatini çekmiştir. PP ve PHB'nin farklı kimyasal formlarına karşın kristallik dereceleri ve camsı geçiş sıcaklıkları birbiri ile benzerlik göstermektedir. PP'nin genişleme özelliği %400 iken PHB'nin genişleme özelliği yalnızca %6'dır. PP'ne göre daha sert ve kırılğan yapıları olan PHB buna karşın UV ışığına karşı çok daha fazla dirençlidir. Polietilen (PE) ile kıyaslandığında PHB'nin sertliği ve kırılğanlığı termoplastik özellik taşımasına karşın yaklaşık 4 kat daha yüksektir. Biyopolimerle çalışılırken bilinmesi gereken en önemli nokta termal bozulmadır. 2006'da yapılan örnek bir çalışmada PHB (Biopol)'nin ayrışmasının 246,3°C'de başladığını, PHBV (%20 3-hidroksivalerat monomeri içerir) (Biopol) bu değerin 260,4°C'ye yükseldiğini bulmuştur. Zincirde valerat varlığı polimer stabilitesinin; bunun yanında esnekliğinin arttırdığını göstermiştir [6, 10, 59-61].

Çizelge 3.1. PHB özelliklerinin PP ile karşılaştırılması [10]

Parametre	PHB	PP
Erime sıcaklığı (°C)	177	176
Camsı geçiş sıcaklığı (°C)	2	-10
Kristallik (%)	60	50-70
Çekme mukavemeti (MPa)	43	38
Esneme (%)	5	400

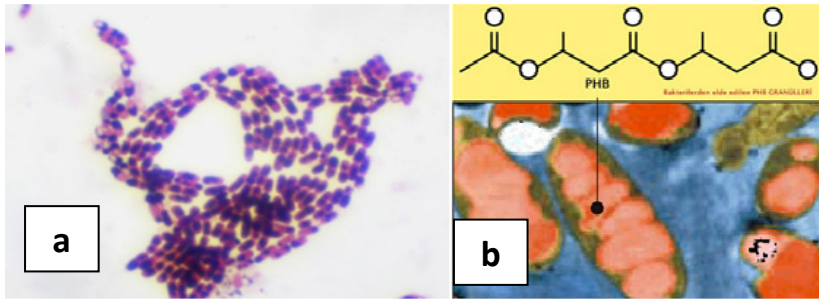
Çizelge 3.2. PHB'nin özellikleri [57]

Olumlu	Olumsuz
+ Suda çözünmez + Neme dirençli + Oksijene karşı dayanıklı + Biyobozunur + UV ışınlarına dirençli + Biyouyumlu + Katı - kırılğan + Sertliği ve dayanıklılığı polipropilene benzer	- Asit ve baz uygulamalarına karşı zayıf - Petrol türevlerine göre maliyetli

Büyüme ve PHB biriktirimi arasında yakın ilişki tespit edilmiştir. Buna göre, büyümenin eksp onansiyel fazında PHB biriktirimi minimal, geç logaritmik dönemde ise maksimum düzeye ulaşmaktadır. Büyüme sırasında bölünme olmayan hücrelerde de PHB miktarının yüksek oranda arttığı bilinmektedir. *B. cereus* T üzerinde yapılan bir çalışma polimer sentezinin büyümenin kesilmesinden sonra başladığı ve maksimum birikiminin sporlanmadan hemen önce olduğu, sporlaşma süresi boyunca bozunduğunu gösterdi [6, 61].

Bakterilerde depolanan PHB'ler faz kontrast ya da elektron mikroskobu ile gözlemlenebilir. PHB depolayan mikroorganizmalar tespit edilmesi için kullanılan metotlardan biri Nile Blue A, Sudan Black B ve Sudan III gibi lipofilik florasen boyalarla boyamadır (Resim 3.1) [6].

Atomik güç mikroskobu ve konfokal Raman spektroskopisi şu anda polihidroksialkanoat PHA-granül analizi için kullanılan tekniklerdir. Biyoplastikler santrifüjleme ile (hücre içermeyen özütler) ya da kloroform, trifloroetanol, dikloroetan, propilen karbonat, metilen klorür veya dikloroasetik asit gibi bir çözücü ile ekstre edilerek izole edilebilir. Bunların molekül ağırlıkları ışık saçılımı, jel geçirim kromatografisiyle, sedimentasyon analizi ve gerçek viskozite ölçümü ile tespit edilir. Bunların monomer yapısı, gaz kromatografi (GC), kütle spektroskopisi (MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) analizleri ile tespit edilir. Kristal yapı, polidispersite, erime sıcaklığı, füzyon entalpisi, cam geçiş sıcaklığı gibi diğer fiziksel özellikleri ve mekanik özellikleri belirlemek için farklı prosedürler hazırlanmıştır [62].



Resim 3.1. PHB granüllerinin (a) Sudan Black B (b) Nile Blue yöntemiyle görünümü [63, 64]

Bakterilerde lipofilik granüller çok daha önceden tanımlanmasına karşın Fransız bilim adamı Maurice Lemoigne tarafından *Bacillus subtilis* bakterisinde β -hidroksibütirik aside benzer bir asit oluşumu gözlemiştir 1923 yılında teşhis edilmiştir [6, 58]. Aynı bilim adamı 1925 yılında *Bacillus megaterium* ile çalışırken PHB'yi ilk kez tanımlamıştır. O zamandan beri, aralarında arkeakteriler, gram pozitif ve gram-negatif bakteri ve siyanobakteriler dahil fotosentetik bakteri olan çeşitli bakteri türlerinin PHB biriktirme tespit edilmiştir. 1958 yılında Macrae ve Wilkinson *Bacillus* hücresi içinde PHB sentezi ve parçalanmasını yönlendiren hücre içi şartları ve mekanizmasını araştırmışlardır [7]. Macrae ve Wilkinson *B. megaterium*'un kültür ortamında glikoz/azot oranı yüksekken PHB homopolimerini biriktirdiğini ve karbon ve enerji kaynağının yokluğunda PHB'nin hücre içinde kullanılmaya başladığını fark etmiştir [53]. PHB'nin nişasta ve glikojen benzeri bakteriyel bir depo polimeri olarak rolünün anlaşılması ve kabulü 1973 yılında olmuştur. PHB'nin petrol bazlı plastiklere alternatif olarak ticari üretimi üzerine çalışmaları 1960'lı yıllarda başlamış, ancak 1970'lerde ortaya çıkan petrol sıkıntısı ile petrolün varil fiyatındaki artış, ticari

üretimin yolları aranmasına ivme katmıştır. 1976'da Imperial Kimya Endüstrisi (ICI) (İngiltere), ilgili araştırmalara başlamış ve farklı bakteri türlerinin PHB üretimi inceleyen ICI endüstride *Alcaligenes eutrophus* kullanmaya başlamıştır. Patenti alınıp ilk endüstriyel üretimi gerçekleşmiş ticari ürün BIOPOL olmuştur [7, 65].

Daha sonraki yıllarda PHB ile ilgili çalışmalar *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Hydrogenomonas*, *Chromatium*, *Bacillus* vb. bakteri cinsleriyle devam etmiştir [7].

Benoit, Wilson ve Baugh, *B. thuringiensis* üzerinde yaptıkları çalışmada, *B. thuringiensis* HD-1 suşunun glikoz-tripton mineral tuz karışımında geliştirildiğinde laktat, piruvat, asetat, aseton ve PHB ürettiği, durgun fazdaki sporulasyon sırasında PHB'ın tüketilmeye başladığını ve PHB'ın spor şekillenmesi sırasında enerji kaynağı olarak kullanıldığını bildirmişlerdir [66]. Liu ve diğerleri *Bacillus shackletonii* K5 karbon kaynağı glikoz (20 g/l)-mineral tuz ortamında (MSM) PHB birikiminin K5 gelişimi ile ilişkili büyümenin log fazı ile başladığını, büyümeden 48 saat sonra glikoz tüketildiği zaman hücre kuru ağırlığı ve PHB içeriğinde önemli bir azalma gözlenmiştir [42]. Bu çalışmaların da ışığında PHB'nin primer metabolit ürünü olduğu söylenebilir.

PHB ve kopolimerleri 1982'den bu yana ulusal ve uluslararası şirketler tarafından ticari olarak üretilmektedir [7]. Başlıca üretici firmalar ve ürünleri Çizelge 3.3'te verilmiştir.

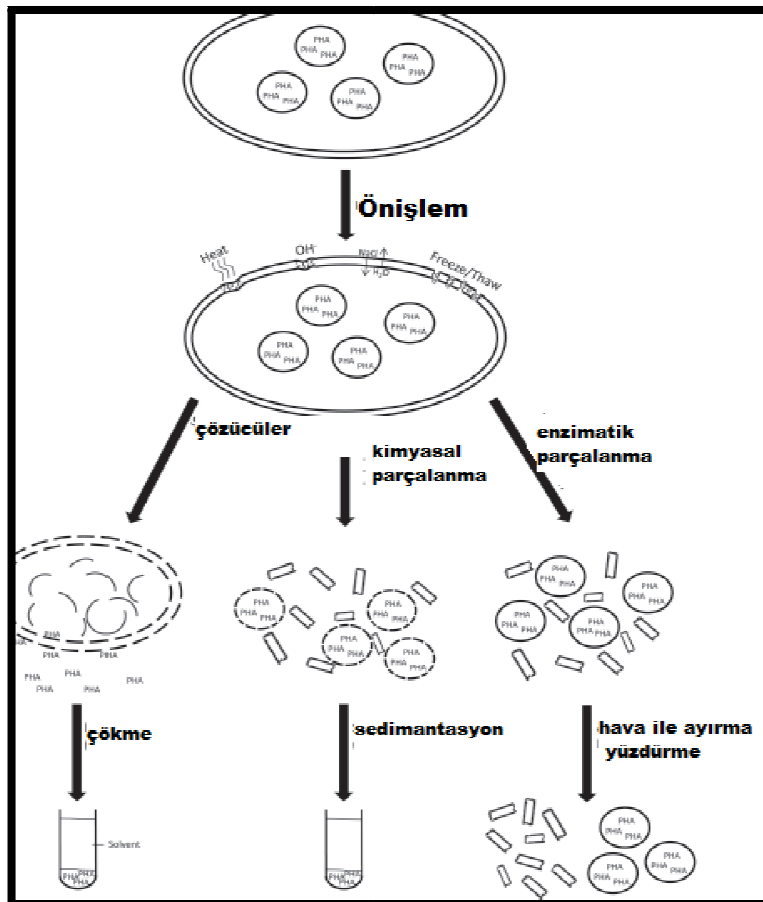
Çizelge 3.3. Başlıca PHB üreticileri [20, 67]

Ürün	Şirket
Biogreen	Mitsubishi Gas Chemical Company Inc. (Japonya)
Mirel	Telles-Metabolix Inc. Ortaklığı (İngiltere)
Biocycle	PHB Industrial Company (Brezilya)
Biomer	Biomer Inc. (Almanya)
Enmat	Tianan Biologic, Ningbo (Çin)
Nodax	Lianyi Biotech (Çin)
Nodax	P&G (İngiltere)
Kaneka PHBH	Kaneka Corporation (Japonya)
Green Bio	Tianjin Gree Bio-Science Co/DSM(Çin)
Meredian	Meredian (İngiltere)
Minerv	Bio-On S.p.A (İtalya)
Biopol	Metabolix (İngiltere)

3.2. PHB'nin Biyokütleden Kazanılması

Antibiyotikler, organik asitler ve teknik enzimler vb biyoteknolojik ürünler hücre dışında üretilirken PHB ise hücre içinde üretilirler. Bunun getirisi olarak yüksek hücre yoğunluğu yetiştirilmesi gerekir çünkü sitoplazmik alanının kullanılabilirliği PHB miktarı ile sınırlıdır. Hücre dışı proseslerde ya da hücreden bağımsız enzimatik katalize bağlı proseslerde bu sınırlama geçerli değildir. Diğer bir sonuç ise hücre içi ürün, hücre dışı üretilen ürünün aksine ürünün kazanımı için ek bir proses basamağının mutlaka gerekli olmasıdır. Dahası, bu PHB'nin hücreden kazanılırken ayrıca diğer hücre bileşenleri de serbest kalacak ve saflaştırma aşaması için daha az homojen bir materyal elde edilecektir. Bu diğer bileşenlerin de ek olarak malzemeden ayrılması gerekir (Şekil 3.4) [54].

PHB için, hücre içi ürün prosesleri kadar iyi, ekonomik olarak mümkün hücre dışı ürün prosesleri henüz yoktur. Hücre içi PHB'nin hücre dışı üretimine dönüştürülmesi için çalışılsa da henüz sonuç alınamamıştır [54].



Şekil 3.4. Bakteri hücresinden PHB kazanımının şematik gösterimi [54]

PHB'nin kazanımı genelde hücrelerin proseten sonra büyüme ortamından ayrılması ile başlar [54].

Başarılı kazanım prosesinin temeli hücre kılıfının etkin parçalanmasıdır. Birçok farklı önışlem çeşidi vardır. Bu işlemler hücre duvarı ve kılıfını, sertliğini zayıflatır ve böylece sonraki ana işlem için PHB'nin daha kolay ve daha etkin kazanımını sağlar. Önışlem zorunlu olmayıp ana yöntemin etkinliğini arttırmak amaçlı uygulanması önerilir [54].

Bacillus cinsi bakterilerin hücre duvarı yapılarının kalın oluşu nedeniyle PHB ekstraksiyonunun zor olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle PHB kazanımı önışlem yapılmasını gerektirir [7].

Isıtma işlemi dış membranın karasızlaştırılması ve hücre proteinlerinin denatürasyonu ile sertliği, dayanıklılığı azaltmaya yöneliktir. Isıtma önışlemi PHB yıkıcı depolimeraz enzimini de denatüre edebilir.

Alkali kullanımı, *Alcaligenes latus* hücrelerinin önışleminde NaOH kullanımı ile rapor edilmiştir.

X M NaCl çözeltisi (1 saat, 60°C) kullanımı metodunun endüstride kullanımı rapor edilmemiştir.

Dondur/çöz döngüsü önışlem olarak ya da ana işlem olarak bile kullanılan bir yöntemdir. Buradaki etki donma sırasında buz kristallerinin oluşumuyla hücrelerin mekanik parçalanması nedeniyle olmaktadır.

PHB'nin çıkarılması için şu zamana kadar 9 farklı yöntem bildirilmiştir. Tüm kazanım yöntemleri çözücü ile ekstraksiyona alternatif olarak doğmuştur [10, 54].

Çözücü ekstraksiyonu kullanılan en eski metottur (1920'lerden). Organik çözücü ekstraksiyonuna dayanır. Tüm çözücü ile ekstraksiyon yöntemleri şu temele dayanır: PHBr suda çözünmez fakat sınırlı sayıda organik çözücüde çözünür. Kloroform, 1,2 dikloretan ve metil klorid gibi bazı klorlu hidrokarbonlarda ya da bazı halkalı karbonatlarda (propilen, etilen) ve ayrıca halkalı karbonikester çözücü olarak başarıyla uygulanmıştır. Çözücü

karışımları da kullanılabilir. Daha sonra çözücü ortamdan muhakkak uzaklaştırılmalıdır. Bir yol basitçe çözücünün buharlaştırılmasıdır. Bir diğer yöntem PHB solüsyonu PHB'nin çözünmediği bir antisolvent ile muameledir. Yüksek oranda antisolvent kullanılır. PHB çöktürülerek santrifüj ya da filtrasyonla ayrılır. Medikal uygulamaları için çözücü ile ekstraksiyonun daha iyi olduğu çünkü yüksek saflık sağladığı bildirilmiştir [10, 54].

Kimyasal parçalamada yüzeyaktifler ve sodyum hipoklorit gibi bazı kimyasallarla mikrobiyal hücreler parçalanabilir. Hipoklorit oksitleyici reaktif olarak davranır. PHA sodyum hipokloritte erimez fakat PHB olmayan yapılar indirgenir. PHB santrifüj ya da filtrasyonla ayrılır. Yüzeyaktiflerle ekstraksiyonda sodyum dedosil sülfat (SDS) gibi yüzeyaktifler hücre duvarındaki sitoplazmik membranın ikili lipid tabakası içine girip birleşerek hücreyi parçalar. Örneğin PHB kazanımı için uygundur. Bunların yanında şelat-hidrojen peroksit ve asit/alkali kimyasallarla da parçalanma uygulanır [54].

Enzimatik hücre parçalanması proteaz, nükleaz ve lipaz gibi bazı enzimlerin bakteriyel hücre kültüründeki proteinler ve diğer polimerler üzerinde yüksek hidrolitik etkileri vardır ve hücre parçalanmasını başlatırlar. Bunun yanında PHB'a zarar vermezler. Enzimlerin kimyasallarla kombinasyonu da kullanılır [54].

Mekanik parçalanma en yaygın ve en bilinen yöntemlerdendir. Küçük skalada kullanılır ancak endüstri için uygun değildir. Değirmende öğütme sonunda boyutlar mikrometre boyutuna gelir. Yüksek basınç ile parçalama büyük skalada kullanılır. Ultrasonikasyon diğer ekstraksiyon yöntemleri ile kombin edildiğinde yüksek ürün saflığı verir [54].

Süperkritik akışkanlar, CO₂ yüksek yoğunluklu, düşük viskoziteli bir süperkritik akışkandır ve ekstraksiyonda çözücü olarak kullanmak için çok uygundur [54].

Hücre kırılabilirliği hücrenin kendi kendini parçalamasını faj (bakteriofaj; bakterileri enfekte eden bir virüs) parçalanması oluşturur. Faj parçalanması endüstriyel ölçekte hiç kullanılmamıştır [54].

Hava ile sınıflandırma için önce mekanik parçalanma uygulanır. Elde edilen süspansiyon kurutulup değirmenle un formuna getirilir. Sonra hava ile farklı partikül boyutları ayrılır. Çökme polimeri oluşturur [54].

Havayla yüzdürme enzimatik parçalanma basamağını takip eder. Sonra granüller kümelenip yüzdürülür [54].

PHA granüllerinin kendiliğinden bırakımı genetik olarak işlenmiş üretim suşları gerektirir. PHB santrifüj ve distile su ile yıkamayla bu doğal olay saflaştırma için kullanılabilir [54].

PHB kazanım yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları Çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. PHB kazanım metotlarının avantaj ve dezavantajları [54]

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
Çözücü ekstraksiyonu	Yüksek ürün saflığı, polimerin bozulmaması	Küçük ölçekte çok çözücü kullanılır, sıklıkla kuru hücre gerekir, ekonomik değil, insan ve çevre için tehlikeli, laboratuvar çalışmaları için uygundur.
Sodyum hipoklorit ile parçalama	Yüksek ürün saflığı, hücrenin kurutulmasına gerek yok, büyük ölçekte uygulanabilir, çevresel örneklerle uygulanabilir.	Hücrenin sindirimi oldukça ekzotermiktir, polimer de sindirilebilir böylece molekül ağırlığı azalır.
Yüzeyaktiflerle parçalama	Polimer kültür ortamından doğrudan kazanılabilir, polimerde sınırlı bozulma, önışleme gerek yoktur.	Yüksek maliyet, SDS geri kazanmak ve izole edilmiş polimerden çıkarmak zordur.
Şelat-hidrojen peroksit uygulaması ile parçalama	Yüksek ürün saflığı	Koşullara bağlıdır, polimer bozunmasıyla molekül ağırlığı azalabilir.
Asitle PHA dışı hücre kütlesinin parçalanması	Ucuz ve çevre dostu, yüksek verim ve ürün saflığı	Asitler PHB'ye zarar verebilir, düşük molekül ağırlığına yol açar.
Enzimatik hücre parçalanması	Yüksek kazanım oranı ve saflık, kolay işletim şartları	Yüksek enzim maliyeti

Çizelge 3.4. (devam) PHB kazanım metotlarının avantaj ve dezavantajları [54]

Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
Bilyeli değirmenle parçalama	Kimyasala gerek yoktur.	Etkin soğutma gerekir, büyütülmesi zordur.
Yüksek basınç homojenizasyonu ile parçalama	Yüksek konsantrasyonunda performans, büyük ölçekte uygulanabilir.	biyokütle iyi sonuç verir. Düşük konsantrasyonunda kötü sonuç verir.
Hava sınıflandırması	Yüksek ürün saflığı	Polimer kurtarmak için sayısız adım
Hava ile yüzdürme	Kimyasal gerekeç	Ardışık kesikli flotasyon adımları gerekli
PHA granüllerinin kendiliğinden bırakımı	Kimyasal gerekmez	Genetik olarak işlenmiş üretim suşları gerekli

PHB'nin saflaştırılması için birçok yöntem bulunur. Kullanılacak yöntem PHB'nin ne şekilde biyokütleden kazanıldığına, organizmaya ve nasıl bir son işlem uygulanacağına göre değişir. Saflaştırma, enzimatik parçalanma ya da ajanlar ile kombinasyonlarda sık sık hidrojen peroksit ile işlem içerir. Hidrojen peroksitin dezavantajı yüksek çalışma sıcaklığı, hücresel biyokütlenin yüksek konsantrasyonda PHB'nin kararsızlığı kadar saflaştırılan PHB'nin moleküler ağırlığında azalma olduğundan bu işlem sıklıkla başka yöntemlerle yer değiştirir. Ozon işlemi artık sık sık, ozonun ağartma ve de koku uzaklaştırma etkisi, yabancı maddeleri çözdürmek avantajlarını da kullanmak için tercih edilir. Bu işlem yabancı maddeleri uzaklaştırmasını artırır. Büyük ölçekli bir polimer üretimi durumunda, üretilen polimer lateksle karışarak peptoglikan, kurtarma süresini etkiler. Oluşan PHB lateks ilave bir çözücü ekstraksiyonu ile yüksek saflık sağlanır. Bunun için, daha düşük tüketimi nedeniyle kloroform tercih edilir [54].

3.3. PHB Üreten Bakteriler

PHB sentezleyebilen bakteriler 2 ana gruba ayrılır. İlk grup; N, P, Mg, ve oksijen vb kısıtlılık ve karbon kaynağı fazlalığında durağanken PHB biriktirir. *Ralstonia eutropha* ve *Bacillus thuringiensis* bu grupta yer alır. İkinci grup, büyüme fazı boyunca ve sınırlı olmayan şartlar altında polimer biriktirebilir. *Alcaligenes latus* ve *A. eutrophus* ikinci grup içinde yer alır [55,68].

PHB üreten başlıca bakteriler: *Cupriavidus necator*, *Bacillus* sp., *Alcaligenes* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas hydrophila*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., *Corynebacterium* sp., *Nocardia* sp., *Burkholderia sacchari*, *Rhodococcus* türleri, *Streptomyces* sp., *Staphylococcus* sp., *Halomonas boliviensis* (Çizelge 3.5) [10, 61].

Çizelge 3.5. PHB üreten mikroorganizmalar ve kaynaklar [10]

Bakteri	Karbon kaynağı
<i>Alcaligenes latus</i>	Malt, soya atıkları, atık süt, sirke atıkları, susam yağı
<i>Bacillus cereus</i>	Glikoz, ε-kaprolakton, şeker pancarı melası
<i>Bacillus</i> spp.	Nutrient broth, glikoz, alkanoatlar, soya melası
<i>Burkholderia sacchari</i> sp. nov.	Adonitol, arabinoz, arabitol, selobiyoz, fruktoz, fukoz, laktoz, maltoz, melibiyoz, rafinoz, ramnoz, sorbitol, sukroz, trehaloz, ksilitol
<i>Burkholderia cepacia</i>	Palm olein, palm stearin, ham hurma yağı, hurma çekirdeği yağı, oleik asit, ksiloz, levulinik asit, şeker pancarı melası
<i>Caulobacter crescentus</i>	Caulobacter ortamı, glikoz
<i>Legionella pneumophila</i>	Nutrient broth
<i>Methylocystis</i> sp.	Metan
<i>Micrococcus phosphovor</i>	Glikoz, asetat

Çizelge 3.5. (devam) PHB üreten mikroorganizmalar ve kaynaklar [10]

Bakteri	Karbon kaynağı
<i>Rhizobium meliloti</i> , <i>R. viciae</i> , <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Glikoz, sükroz, galaktoz, mannitol, trehaloz, ksiloz, rafinoz, maltoz, dekstroz, laktoz, piruvat, şeker pancarı pekmezi, peynir altı suyu
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	Asetat, malat, fumarat, süksinat, propionat, malonat, glukonat, butirat, gliserol, sitrat
<i>Spirulina platensis</i> (cyanobacterium)	Karbondioksit
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Malt, soya atıkları, atık süt, sirke atıkları, susam yağı
<i>Cupriavidus necator</i>	Glukoz, sükroz, fruktoz, valerat, oktanoat, laktik asit, soya fasulyesi yağı
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Hidrojen, karbondioksit

Sathianarayanan, Kiran, Selvin ve Saibabad [64] ve Rodríguez-Contreras, Koller, Miranda-de Sousa Dias, Calafell-Monfort, Braunegg ve Marqués-Calvo [69] *Bacillus* türlerinin %9-70 oranında PHB biriktirebildiğini bildirmişlerdir.

Günümüzdeki çalışmalarda δ -endotoksini biyoinsektisit olarak bilinen *B. thuringiensis*'in maksimum %64,1 PHB biriktirebildiği rapor edilmiştir [70]. Buna karşın Pal, Prabhu, Kumar, Rajagopal, Dadhe, Ponnamma ve Shivakumar, *B. thuringiensis* IAM 12077 suşunun genel besiyortamında 48 saatlik inkübasyon sonucu %10-15 oranında PHB depolayabildiğini belirtmişlerdir [68].

Saadettin, Mercan, Mumcu ve Beyatlı, farklı *Bacillus* sp. suşlarında PHB verimi üzerine yaptıkları çalışmada glisin ve proteaz peptonun PHB verimini arttırdığını belirtmişlerdir [71]. Wu, Huang, Hu, Chen ve Ho, melaslı besiyerinde *Bacillus* sp. Jma5 suşunun, PHB verimini %25-35 olarak tespit etmişlerdir [72]. Rodríguez-Contreras ve diğerleri *B. cereus* türünün nişastalı ortamda kuru hücre ağırlığının %48'i kadar PHB biriktirdiğini ifade etmiştir [69].

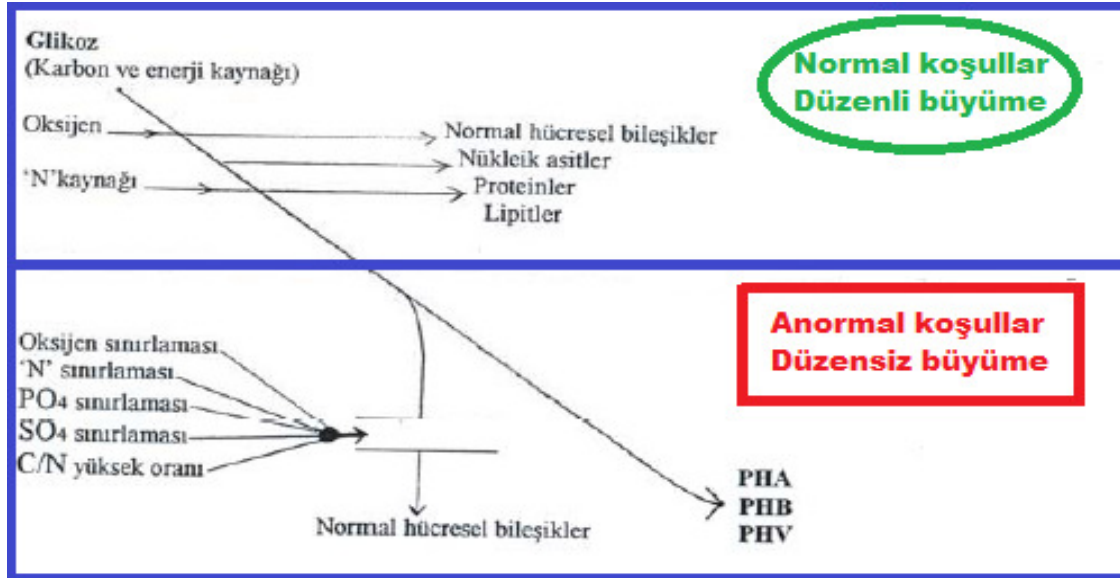
Aslim, Yüksekdağ ve Beyatlı için glikozlu ortamda *B. thuringiensis* D1, D2, D3 suşlarının % 8- 29,41 arasında PHB biriktirebildiklerini bildirmişlerdir [73].

3.4. PHB Üretiminde Şartlar ve Kullanılan Kaynaklar

Aslında biyopolimer depolama, genellikle büyümeye daha baskın bir prosestir (%70 depolama-%30 büyüme). Ancak C dışı substratın ortamda uzun süre var olduğu “rahat” şartlarda, canlıda psikolojik bir uyum gelişerek büyümeye yönelir. Yani *Bacillus* cinsi için ve benzer polimer üretim şekline sahip mikroorganizmalar için C kaynağının bulunduğu ve yeterli besin şartları bölünme, biyokütle oluşumu bir süre sonunda PHB üretimini kısıtlar yani baskılar [9]. PHB’nin birçok mikroorganizma tarafından, uygun olmayan üreme koşullarında, fazlaca karbon ve nitrojen, oksijen ve esansiyel elementler (N, P, S, Mg, K, Fe vb.) gibi maddelerin eksikliğinde gerçekleşmektedir (Şelik 3.5).

PHB oluşumuna neden olan bazı besin maddeleri;

- ✓ Azot kaynağı azlığı
- ✓ Karbon kaynağı fazlalığı
- ✓ Demir azlığı
- ✓ Magnezyum azlığı
- ✓ Manganez azlığı
- ✓ Oksijen azlığı
- ✓ Fosfat azlığı
- ✓ Potasyum azlığı
- ✓ Ağır metal fazlalığı



Şekil 3.5. Hücrelerde PHB sentezi mekanizması [74]

Wu ve diğerleri, melash besiyerindeki oksijen şartlarını değiştirerek yaptıkları çalışmada, oksijen miktarındaki azalmanın sporulasyona neden olduğunu ve PHB üretiminin düştüğünü; nitrojen ve fosforun oranının karbona göre düşük olduğu besiyerlerinde ise PHB üretiminin arttığını bildirmişlerdir. *Bacillus sp.* Jma5 suşunun, PHB verimini %25-35 olarak tespit etmişlerdir [72].

Vaishnavi ve Shivakumar, limitli besin ortamında *B. thuringiensis* IAM 12077'nin PHA üretimi incelenmişlerdir. Aktifleştirilen kültür sınırlı besiyortamına ekilmişlerdir. pH 7, 37°C'de 120 rpm'de 48 saat inkübe edilmiş. Azot sınırlı ortam kuru hücre ağırlığı 2,93 g/l'ye kadar ulaşmış, PHB 1,866 g/l ve birikim %64,16 olmuştur. Kükürt sınırlı ortamda kuru hücre ağırlığı 2,53 g/l'ye kadar ulaşmış, PHB 1,66 g/l ve birikim %65,9 olmuştur. Potasyum sınırlı ortamda kuru hücre ağırlığı 2,73 g/l'ye kadar ulaşmış, PHB 1,66 g/l ve birikim %60,93 olmuştur. Fosfor sınırlı ortamda kuru hücre ağırlığı 2,46 g/l'ye kadar ulaşmış, PHB 1,7 g/l ve birikim %68,93 olmuştur. Tüm sınırlı ortamlarda yüksek verim elde edilmiş ama PHB miktarı için azot sınırlı ortamın daha etkili olduğu görülmüştür [49].

Pal ve diğerleri izole *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 suşunu azot-sınırlı besiyortamına (diğer bileşenleri: %1 glikoz, %0,25 pepton, %0,25 maya ekstraktı ve mikroelementler) eklenmiş, nutrient broth ve azot-kısıtlı besiyortamının verileri karşılaştırıldığında maksimum PHB birikimi azot-kısıtlı ortamda gözlenmiştir. Sonuç olarak azot kısıtlılığının PHB birikimini desteklediği gözlemlenmiştir [68].

C ve N kaynakları: Mikroorganizmalar basit karbonhidratlardan olduğu gibi ucuz, kompleks atıklar, yağlar, yağ asitleri, alkanlar arasında değişen çeşitli karbon kaynaklarından da PHB üretebilir [64]. Pal ve diğerleri *B. thuringiensis* IAM 12077'nin pentozlar ve heksozlar gibi basit şekerler ve nişasta gibi polisakkaritler kullandığında PHB üretebileceğini ve besin çok yönlülüğü hemiselülozlar, nişasta ve peyniraltı suyu kullanılarak ekonomik PHB üretimi için kullanılabilir olduğunu belirtmiştir [68].

Karbon kaynağı olarak nişasta, galaktoz, glikoz, sükroz, mannoz, D-mannitol, arabinoz, yağ asitleri, alkanlar, kloroalkanoik asitler gibi kimyasal bileşenler; ayrıca, bütirik ve pentatonik asit, propiyonik asit, 4-hidroksi hegzanoik asit, L-laktat gibi kaynaklar denenmiştir (Çizelge 3.6) [7, 68, 75]. Mannitol yüksek fiyatı nedeniyle endüstriyel proseslerde çokça tercih edilen bir karbon kaynağı değildir [75].

Çizelge 3.6. *Bacillus* sp. kullandığı substrata göre PHB biriktirme oranları [61]

Bakteri (<i>Bacillus</i> spp.)	PHA dönüşümü (% KHA)	Monomerik birim	Karbon Kaynağı
<i>B. circulans</i> DSM 1529	43,7	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	6,80	3HB, 3HV	Propiyonat
<i>B. sphaericus</i>	30,2	3HB	Sükroz
<i>B. sphaericus</i> DSM 28	4,50	3HB, 3HV	Valerat
<i>B. brevis</i>	32,1	3HB	Sükroz
<i>B. licheniformis</i> DSM394	25,8	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	6,20	3HB, 3HV	Propiyonat
<i>B. amyloliquefaciens</i> DSM7	17	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	5,10	3HB, 3HV	Propiyonat
<i>B. subtilis</i> DSM10	33,5	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	6,60	3HB, 3HV	Valerat

Çizelge 3.6. (devam) *Bacillus* sp. kullanıldığı substrata göre PHB biriktirme oranları [61]

Bakteri (<i>Bacillus</i> spp.)	PHA dönüşümü (% KHA)	Monomerik birim	Karbon Kaynağı
<i>B. thuringiensis</i> DSM2046	47,6	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	7,20	3HB,3HV	Propiyonat
<i>B. mycoides</i> DSM 2048	44,7	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
<i>B. mycoides</i> RLJB-107	69,4	3HB	Sükroz
<i>B. megaterium</i> DSM90	47,2	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	8,20	3HB,3HV	Propiyonat
<i>B. cereus</i> DSM31	41,4	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	7,30	3HB, 3HV	Propiyonat
<i>B. cereus</i> UW85	8,90	3HB, 3HV, 6HHx	e-kaprolakton ve Glukoz
<i>Bacillus</i> sp. INT005	18,8	3HB, 3HV	Valerat
	32,9	3HB, 3HHx	Hekzanoat veya Glukoz
	96,5	3HB, 4HB, 3HHx	4-hydroxybutyrate
	97,3	3HB, 3HHx,	e-kaprolakton
<i>B. cereus</i> ATCC14579	2,20	3HB, 3HHx	Hekzanoat
<i>B. laterosporus</i> DSM335	29,5	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	5	3HB, 3HV	Propiyonat
<i>B. macerans</i> DSM7068	40,5	3HB	Asetat ve 3- hidroksibütirat
	4,70	3HB, 3HV	Propiyonat
<i>Bacillus</i> sp. JMa5	35	3HB	Melas

Azot biyokütledeki PHB birikiminin en önemli faktörlerindendir. Azot elementi biyokütlenin inşasında, oluşumunda görevlidir ve hücrenin temeli olan proteinlerin, nükleik asitlerin, hormon ve ezimlerin yapısına katılır. Azot kaynağı olarak pepton, L-glisin, L-sistin, potasyum nitrat, et ekstresi, üre, asparagin, amonyum sülfat,-amonyum nitrat,-amonyum oksalat-amonyum molybdate-amonyum klorür gibi amonyum tuzları, tripton, maya ekstraktı, kasein, malt ekstrakt gibi kaynaklar denenmiştir [7, 9, 27, 68, 75, 76]. Literatür araştırmalarında değişik mikroorganizmalarla yapılan çalışmalarda amonyum sülfatın iyi bir azot kaynağı olduğu görülmüştür [26].

Karbon- azot kaynakları ile ilgili yapılan bazı çalışmalar aşağıda verilmiştir;

Aslim ve arkadaşları tarafından *B. subtilis* 25 ve *B. megaterium* 12 kullanılmış ve protaz peptonu en yüksek PHB birikimi sağlayan azot kaynağı olarak bulunmuştur [73].

Tamdoğan ve Sıdal, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ile farklı şartlarda PHB üretimini incelemişler ve karbon kaynağı olarak glikoz, sükroz, D-mannitol, arabinoz; azot kaynağı olarak proteaz pepton, L-glisin, L-sistin, amonyum sülfat, potasyum nitrat kullanmışlardır. Maksimum PHB sentezi mannitol ve glisinli ortamda bulmuşlardır [75].

Saadettin ve diğerleri yapmış oldukları çalışmada *Bacillus* sp. bakterilerinin farklı karbon ve azot kaynaklarında PHB üretimleri incelemişlerdir. En yüksek PHB verimi glisin, sükroz ve proteaz pepton içeren besiortamlarında tespit edilmistir [71].

Pal ve diğerleri, *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 suşuyla farklı azot-karbon kaynaklarında PHB üretimini araştırmışlar ve en yüksek PHB üretimini ksilozlu (1,2 g/l) ve NaNO₃'lı ortamda (0,983 g/l) bulmuşlardır [68].

Gomaa, *Bacillus subtilis* AJ-3 ile PHB üretiminde şeker kamışı pekmezinin farklı konsantrasyonlarını denemiş ve maksimum PHB verimini %6'lık melas konsantrasyonunda elde etmişlerdir. Farklı azot katynakları olarak amonyum klorür, maya ekstresi, pepton, malt ekstresi, et ekstresi, kazein proteaz pepton, soya fasulyesi unu, mısır çözültisi, üre, amonyum sülfat, amonyum nitrat, amonyum oksalat, diamonyum hidrojen fosfat, amonyum molybdate, sodyum nitrat, potasyum nitrat, asparagin, sistein ve glisin

kullanmıştır. Amonyum sülfatın büyüme ve PHB üretimi (36,98 g/l) için en iyi destekçi olduğu bildirilmiştir [27].

Zhang, Sun, Wang ve Geng *Bacillus megaterium* R11 suşu ile PHB üretiminde doğal karbon kaynağı olarak palmiye demeti hidrolizati kullanmışlardır. Ortama farklı azot kaynağı olarak da $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tripton, pepton, maya ekstraktı, NH_4Cl eklemişlerdir. Bu düzeneğe göre tüm azot kaynaklarında %40-46 arasında PHB birikimi tespit etmişlerdir [76].

Rohini, Phadnis ve Rawal, *Bacillus thuringiensis* R1 ile en yüksek PHB verimini gliserollü ortamda (1,4 g/l ve %34,18), en düşük etanol ve laktik asitte gözlemlemişlerdir [70]. Liu ve diğerleri *Bacillus shackletonii* K5 ile gliserolun tek karbon kaynağı olarak kullanıldığı ortamda PHB veriminin %52,3 oranında olduğunu tespit etmişlerdir [42].

Raza, Yang, Faheem ve Yousaf, *B.subtilis* ATCC 6633 ile PHB veriminde C-N kaynakları ve ağır metal etkisi incelenmişlerdir. En etkili karbon kaynağı D-mannitol; azot kaynağı glisin olarak tespit edilmiştir. PHB veriminde metal iyonlarının etkisini araştırmak için mannitol-glisin besiyortamına Zn^{++} iyonu için ZnSO_4 , Mn^{++} iyonu için MnSO_4 ve Ni^{++} iyonu için NiCl_3 ilave etmişlerdir. PHB veriminde en etkili metali Ni^{++} iyonu olduğunu bildirmişlerdir [65].

Güngörmedi, *Bacillus megaterium* XyC6'da PHB verimini artırmak amacıyla farklı karbon kaynaklarını (glikoz, fruktoz, mannitol, gliserol, nişasta ve maltoz) kullanmış ve PHB verimlerini glikoz %38,38; maltoz %12,9; sükroz %44,94; nişasta %28,99; gliserol %36,04; fruktoz %27,09; mannitol %36,31 olarak tespit etmiştir [60].

Singh ve diğerleri, 6 farklı *Bacillus* sp. suşu ile farklı karbon kaynaklarında (glikoz, laktoz, sükroz, maltoz, fruktoz) PHB üretimini incelemişler ve *B. thuringiensis* EGU45 suşunun glikozlu ortamda en yüksek PHB ürettiğini (%50) bildirmişlerdir [24].

C/N oranı: C/N oranı PHB birikimi için başlıca kriterlerdendir. Sınırlanan azot konsantrasyonu mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerini yavaşlatmakta ve azalan mikrobiyal büyüme katsayıları ile mikroorganizma konsantrasyonunun azalmasına yol açmaktadır. Azot sınırlaması PHB üretimi için iyi bir strateji olabilir fakat

mikroorganizmaların ihtiyaç duyduğu minimum azot kaynağının sisteme verilmesi önemlidir. Maksimum verimde PHB üretimi için makrobesinlerden olan azotun mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirecek kadar minimum seviyede kullanılması iyi bir stratejidir. Azot sınırlanabileceği gibi fosfor, sülfür, potasyum gibi elementler de sınırlanabilir [9, 49].

Aydoğmuş kesikli biyoreaktör sitsemi kullanarak farklı karbon/azot oranlarında aktif çamurun PHB verimini incelemiştir ve ortama amonyum eklenmediğinde PHB miktarının azaldığını bildirmiştir. Polimer depolama veriminin amonyum arttıkça tersine azaldığını, büyüme veriminin arttığını vurgulamışlardır. C/N oranının ise 100 (mg-C/mg-N) olduğu koşullarda PHB veriminin (%34,6) maksimum olduğunu tespit etmişlerdir [9].

Tamdoğan ve Sıdal *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ile farklı C/N oranlarını (0,5-2,5) incelemiş ve 2,5 C/N (glikoz/glisin)'nin maksimum PHB sentezi için uygun olduğunu tespit etmişlerdir [75].

Zhang ve diğerleri ise *Bacillus megaterium* R11 ile maksimum PHB veriminde C/N oranını 15:1 (palmiye demeti: tripton) olarak tespit etmişleridir [76].

Diğer şartlar (inkübasyon süresi, pH ve inkübasyon sıcaklığı): Kültürasyon sıcaklığı PHB üretimini etkileyen önemli koşullardan biridir. Çok düşük ve yüksek sıcaklıklarda istenilen verimler elde edilememektedir. Bunun en önemli nedeni yüksek/düşük sıcaklıkların enzimlerin çalışması için gerekli optimum sıcaklıkların aşılmasıdır. Aynı durum pH için de geçerlidir, her enzimin çalışabilceği bir pH aralığı ve optimum pH'ı vardır. İyi bir verim için optimum pH'a yakın çalışılmalıdır. Bir diğer önemli şart ise inkübasyon süresidir. Bakterinin yaşı bölünme hızı üzerinde doğrudan etkilidir. Belirli süre inkübe edilme, bölünmek için gerekli enzim vb. şartların oluşması için gereklidir.

Hamieh, Olama, ve Holail yüksek PHB veren *B. thuringiensis* suşunun pH 5,5 iken maksimum PHB verdiğini bildirmiştir [77].

Gomaa, *Bacillus subtilis* AJ-3'nin maksimum PHB üretimi için optimum sıcaklığı 35°C bulmuştur. Aşılama konsantrasyonu %8 çıktığında %82,99; pH 7'de %83,56 PHB verimini bildirmişlerdir [27].

Tamdoğan çalışmasında *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu için optimum sıcaklığı 30°C, inkübasyon süresini 24 saat ve pH'ı 7 (10,4981 µg/ml) tespit etmişlerdir [31].

Shalin, Sindhu, Binod, Soccol ve Pandey, *B. firmus* NII 0830-*L. delbrueckii* NII 0925 karışık kültürü için glikozlu ortamda maksimum PHB üretimini 42. inkübasyon saatinde (%48 PHB) tespit etmiştir. Aşılama oranının etkisi için maksimum PHB verimi (%56), *B. firmus* MSE 0830: *L. delbrueckii* NII 0925 oranı 1:1 olduğunda gözlenmiştir [78].

Güngörmedi, *Bacillus megaterium* XyC6 melas ortamında maksimum PHB üretimi % 75,62 PHB verim ile pH 6 ve 35°C'de gözlenmiş. belirlemiştir. İnkübasyon süresi denemelerinde 48. saatte % 72,19 ve 60. saatte % 78,63 PHB verimi tespit etmiş; 48. saatten sonra PHB üretimindeki artış düşük, zaman kaybı fazla olduğundan en uygun sürenin 48. saat olduğunu bildirmiştir [60].

Bhuwal ve diğerleri, *Bacillus* sp. NA10 ile C/N oranının yüksek olan karton endüstrisi atık suyunun değerlendirilmesinde çalışmıştır. Optimum koşulları 35°C, 72 saat ve 7,5 (4,56 g/l PHB) bulmuştur [28].

Raza ve diğerleri, *B. subtilis* ATCC 6633 ile optimum sıcaklık, pH, inkübasyon süresi incelemiştir. Bu suş için optimum inkübasyon süresi, 30°C'de 48 saat (50,4 mg/l PHB ve %7,52) , inkübasyon sıcaklığı (48 saat inkübasyon ile) 30°C, optimum pH 7'de (51,9 mg/l-%7,75) bulunmuştur [65].

Liu ve diğerleri, *Bacillus shackletonii* K5 hücre kültürü ve PHB üretimi için en uygun pH değerini 7 olarak bildirmişlerdir [42].

3.4.1. PHB üretimi için ucuz kaynaklar

PHB petrol türevleri plastiklere göre maliyetli olması sebebiyle geniş kullanım alanına ulaşamamıştır. Bunun sonucu oluşan fiyat dağılımı Çizelge 3.7'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 3.7. Sentetik (petrol türevli) ve biyobozunur plastiklerin fiyat karşılaştırması [79]

Tür	Fiyat
Sentetik plastikler	< 1 €/kg
Polilaktik asit (PLA)	2-4 €/kg
Polihidroksialkonatlar	>5 €/kg

Bu fiyatın düşürülmesi için çeşitli alternatifler mevcuttur. Bunlardan ikisi eldeki kültürün geliştirilmesi ve proses sisteminin iyileştirilmesidir. Bu iki alternatif de yatırım ve Ar-Ge isteyen yöntemlerdir. Bir diğer yöntemse saf kültür yerine karışık kültür kullanımıdır. Bu yöntem kolay uygulanabilir ve maliyeti düşürür ancak, düşük PHB verimine neden olur [79]. En maliyetsiz ve basit yöntem ise ucuz hammaddelere yönelmektir. Çünkü PHB üretiminde özellikle kullanılan pahalı hammaddelerle %20-50 arasında toplam ürün fiyatının üstüne maliyet eklenmektedir. Bu maliyeti düşürmek için substrat olarak doğal ürünler, endüstri ve tarım atıkları alternatif kaynaklardır [64]. Her yıl büyük miktarda tarım ve gıda işleme sanayisinden gelen bu atıklar PHB üretimi için potansiyel yenilenebilir hammaddeyi temsil eder. Bu değerlendirme substrat maliyetini düşürdüğü gibi atık bertaraf maliyetini de düşürür [53].

Bitkisel kaynaklar

Soya fasulyesi yağı, hurma yağı, palmye yağı, buğday/pirinç kepeği ve mısır yağı gibi bitki yağları PHB üretimi için arzu edilen karbon kaynaklarıdır. Bunlar çoğu şekere göre nispeten daha ucuzdurlar. Şekerlere kıyasla ağırlık başına daha yüksek C içeriğine sahip bitkisel yağlar hem hücre biyokütlesinde hem de PHB üretiminde daha yüksek verim sağlamak üzere öngörülmüşlerdir [53, 80].

Güneydoğu asyada en bol bulunan ekin yağ palmyesidir. Bu ekin %50 oranında selüloz, %20 oranında hemiselüloz içerir. Selüloz ve hemiselüloz, glikoz ve ksiloz gibi şekerlere kadar hidroliz edilebilir. Zhang ve diğerleri *Bacillus megaterium* R11 ile hidrolize palmye demetinden PHB üretmiştir. Eklenen farklı azot kaynakları (tripton, pepton, maya ekstraktı, NH₄Cl) ile tüm ortamlarda PHB üretilebildiği ve verimin %40-46 arasında olduğu bildirilmiştir [76].

Gouda, Swellam ve Omar; Mısır'da yaygın olan şeker kamışı melası (ŞKM) ve mısır koçanı şurubunu (MKŞ) kullanarak *Bacillus megaterium* ile PHB üretmeyi denemişlerdir. C kaynağı olarak %2'lik ŞKM'ın %46,5 PHB ile en iyi verimi verdiğini tespit etmişleridir. Ortamda %2 ŞKM varken ilave edilen N kaynakları (amonyum klorür, buğday kepeği ve MKŞ) içinde amonyum klorürün, PHB birikimi için en iyi (%40) kaynak olduğu ve MKŞ'da verimin %33 olarak tespit edildiği bildirilmiştir. Bunun yanında buğday kepeğinin ümit verici sonuçlar verdiğine de değinilmiştir. %2 ŞKM ile farklı yüzdeli MKŞ denemesinde maksimum PHB verimi %3'lük MKŞ'da, en iyi hücre büyümesi ise %1'lik ŞKM'ında görülmüş ve MKŞ bu çalışmada ucuz ve iyi bir karbon kaynağı olarak adlandırılmıştır [80].

Gliserol

Gliserol biyodizel üretimi sırasında ortaya çıkan ve palmye yağı rafine sürecinin bir yan ürünüdür. Bir nemlendirici olarak kullanıldığı gibi ağız bakım ürünleri, tütün, kozmetik, gıda ve içecek gibi bazı uygulamalarda da plastikleştirici olarak da kullanılır. Bazı mikroorganizmalar tarafından PHA üretimi için cazip bir karbon kaynağı olarak büyük bir potansiyele sahiptir [42, 52].

Rohini ve diğerleri *Bacillus thuringiensis* R1 ile PHB birikimini incelemişlerdir. İçinde maya eksrtaktı, pepton, Na_2HPO_4 ve MgSO_4 olan ortama gliserol ilave edildiğinde gliserollü ortamda maksimum PHB birikimi (1,4 g/l ve %34,18) gözlemlenmiştir [70].

Diğer dikkat çekici yenilenebilir kaynaklar

Peynir altı suyu, ksiloz, pancar melası, şeker kamışı melası, etanol ve hurma şurubu diğer karbon kaynakları üzerinde yapılan çalışmalar, farklı bakteri kullanılarak yapılmıştır [53, 80]. Kavun atığı, elma artığı, bezelye kabuğu ve domates artığı gibi kaynakların kullanımı da mevcuttur [24, 59].

Farklı konsantrasyonlarda etanol gibi düşük alkol ilavesinin etkisi de araştırılmış. Melas ortamı etanol ile takviye edildiğinde, büyüme ve PHA üretimi üzerinde uyarıcı bir etkisi olmuş. PHA üretiminde etanol uyarıcı etkisi etanol ucuz ilave karbon kaynağı olarak PHA üretimi için kullanılabilir olduğunu göstermiş. Etanol büyük ölçüde çok hücre büyümesi

için gerekli olan manganez, demir ve çinko tolerans düzeylerini artırır ve besin dengesini sağlar. Etanol konsantrasyonuna da fazla artış ile büyüme ve PHA üretiminde bir azalma meydana gelmiştir. Bunun nedeni bu ortamda yüksek etanol konsantrasyonda bakteriyel metabolizmayı rahatsız etmesinden kaynaklanıyor olabileceğini bildirmişlerdir [27].

Melas ve mısır koçanı şurubu vitamin ve diğer bileşenleri de bünyesinde bulunduruyor. Şeker kamışı melası C kaynağı; mısır koçanı şurubu N kaynağı açısından daha zengindir [80].

Melas ucuz PHB üretimi için kullanılabilen bir karbon kaynağı olmasının yanı sıra içerdiği vitaminler ve mineraller ile büyüme faktörü kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Melas %4-11 arasında inorganik bileşikler (potasyum, sodyum, demir, sülfat, magnezyum, kalsiyum, klorür ve fosfat) içermektedir. Pancar melasında genellikle potasyum oranı yüksektir. Melasta B grubu vitaminler de vardır. *Bacillus* sp.'lerin melas gibi ucuz substratlarda hızlı bir şekilde büyüdüğü tespit edilmiştir [6, 7].

Bacillus'ların amilaz ve proteinaz enzimlerinin varlığı nedeniyle gıda atık sularından faydalanabileceğini bildiren Law, Leung, Lawford, Chua, Lo ve Yu aktif çamurdan izole ettikleri *Bacillus* sp. suşlarını arpa ve soya atık suyunda geliştirerek PHB verimlerini araştırmışlar ve suşlardan HF-1'in atıklar kullanıldığında %19,22 HF-2'nin ise %10,18 PHB verimine ulaştığını bildirmişlerdir [82].

Bhuwal ve diğerleri, karbonhidratlarca zengin ama azot açısından fakir olan karton endüstrisi atık suyunu değerlendirmek için *Bacillus* sp. NA10 ile PHB üretimini araştırmışlardır. Bu su C/N oranının yüksek olması sebebiyle PHB üretimi için uygun bir ortam sağlayarak %100 atık konsantrasyonu maksimum PHB birikimi vermiş (34 g/l PHB ve 7,4 g/l biyokütle). Araştırmacılar seyreltmenin PHB'yi olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir [28].

Sathiyarayanan, Kiran, Selvin ve Saibabad; Hindistan'daki atık sorunlarından olan tapyoka (tropik bölgelere özgü manyok bitkisinin nişastalı köklerinden hazırlanan yiyecek maddesidir ve puding ve çorba yapımında kullanılır) sanayi atıkları, palmiye şekeri, hourse gram unu (yem ve gıda içi Hindistan'da yetişen bir tropikal baklagil), buğday kepeği, pirinç kepeği, mandıra, bira fabrikası ve mango küspesi gibi endüstriyel atıkları PHB

üretimi için kullanmışlardır. Tapyoka sanayi atığını *Bacillus megaterium* MSBN04 için %52 PHB birikimi ile en uygun kaynak olarak belirtmişlerdir. Tapyoka atığı ile üretimin optimizasyonu için palmiye şekeri, buğday kepeği, pirinç kepeği gibi karbon kaynaklarının bu şartlardaki etkileri araştırılmıştır. Palmiye şekerinin PHB üretimini arttırdığı ve en iyi ek C kaynağı olduğu gözlenmiştir. Çeşitli endüstriyel atıklara palmiye şekerinin eklenmesiyle tapyoka sanayi atığı %55, nişasta sanayi atığı %52 PHB verimi vermiştir. N kaynağı olan house gram unu ve tapyoka sanayi atıkları beraber kullanıldığında PHB miktarında artış olduğu bildirilmiştir (%55) [64].

Tatlıcan, çalışmasında halofilik arke izolatlarının PHB üretimini ucuz karbon kaynağı olarak çözünebilir saf nişasta, mısır nişastası, sakaroz, peynir altı suyu, domates artığı, elma artığı ve kavun artığı olan ortamda incelemiştir. Karbon kaynağına göre maksimum PHB verimlerinin sırasıyla sakkarozda % 4,11; peynir altı suyunda %47,69; kavun artığında %21,19; elma artığında %15,25; domates artığında %31,17; mısır nişastasında %53,14 olduğu bildirmiştir [59].

Singh ve diğerleri, yaptığı çalışmada *Bacillus* EGU45 suşu ile Hindistan için büyük bir atık olan bezelye kabuğunun karbon kayağı olduğu besi ortamda PHB üretimini incelemiştir. Maya ekstraktı-mikroelement içeren ortam (azotlu ortam) ve maya ekstraktı-mikroelement-kasein (kaseinli ortam) içeren ortama bezelye kabuğu bulamacı ilave edildiğinde azotlu ortam kaseinsiz ortamda *B. thuringiensis* EGU45 510 mg/l ve %25 PHB ile en iyiyken; kaseinli ortamda 1205 mg/l ve %55 PHB en iyi olmuş [24].

Güngörmedi, çalışmasında, *Bacillus megaterium* XyC6 türünde PHB üretiminde karbon kaynağı olarak melas, vinas, zeytin kara suyu ve peynir altı suyunu denemiştir. Denenen karbon kaynaklarına göre üretilen PHB miktarları; melas %48,7, zeytin kara suyu %0,61, peyniraltı suyu %0,76 ve vinas %1,03 olarak bildirilmiştir [60].

Hamieh ve diğerleri, *B. thuringiensis* ile PHB üretiminde sanayi yan ürünlerini kullanılmıştır. Çalışmada 5 farklı ortamı kullanılmış: 1. ortam (peyniraltı suyu-pepton-maya ekstraktı), 2. ortam (peynir altı suyu-pepton-sükroz), 3. ortam (peyniraltı suyu-pepton-maya ekstraktı-glikoz), 4. ortam (hurma pekmezi-nutrient broth) ve 5. ortam (hurma pekmezi-glikoz -nutrient broth). En yüksek PHB miktarı (50 ml'de 0,367g) 4. ortamda tespit edilmiştir [77].

Singh ve diğerleri, *B. subtilis* NG220 bakterisinin şeker endüstri atık suyundaki PHB üretimi incelemiştir. %100 (seyreltmesiz) şeker endüstrisi atık suyunda maksimum 4,928 g/l PHB elde etmişlerdir. PHB optimizasyonu için ekstra karbon (dektroz, ksiloz, sükroz, ramnoz, manitol, maltoz, laktoz, mannoz, galaktoz, nişasta, rafinoz) ve azot kaynağı (üre, tripton, peptone, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, $\text{NH}_4\text{S}_2\text{O}_8$) eklenerek deneyi tekrarladıklarında maltoz ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 'ın en iyi PHB birikimini veren ilave olduğunu tespit etmişlerdir [26].

Hamid, talaş atığından selüloz ekstrakte edilip *B. cereus* türü tarafından karbon kaynağı olarak kullanımı ile PHB üretimi incelenmiştir. Çalışmada %1,29-3,42 arasında PHB birikimi tespit edilmiş ve odun talaşından düşük verimli olsa da PHB üretimin mümkün olduğunu bildirmiştir [83].

Çeşitli bitkisel yağ ve atıklardan PHB üretimi için kullanılan bakteriler Çizelge 3.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8. Bitkisel yağ ve atıklardan PHB üretimi için kullanılan bakteriler [53]

Türler	Substrat	% PHA içeriği
<i>Alcaligenes latus</i> DSM 1124	Soya atığı, malt atığı	33,71
<i>Bacillus megaterium</i>	Pancar atığı, hurma şurubu	≈50
<i>Burkholderia</i> sp. USM (JCM 15050)	Palmiye yağı türevleri, yağ asitleri, gliserol	22-70
<i>Comamonas testosteroni</i>	Hint yağı, hindistan cevizi yağı, hardal yağı, pamuk tohumu yağı, yer fıstığı yağı, zeytin yağı, susam yağı	79-88
<i>Cupriavidus necator</i>	Küspe hidrolisatları	54
<i>Cupriavidus necator</i> H16	Ham hurma çekirdeği yağı, zeytinyağı, ayçiçeği yağı, hurma çekirdeği yağı, kızartma yağı, hurma oleini, ham hurma yağı, hindistan cevizi yağı + sodyum propionat	65-90

Çizelge 3.8. (devam) Bitkisel yağ ve atıklardan PHB üretimi için kullanılan bakteriler [53]

Türler	Substrat	% PHA içeriği
<i>Cupriavidus necator</i> DSM 545	Atık gliserol	50
Rekombinant <i>Cupriavidus necator</i>	Hurma çekirdeği yağı, hurma oleini, ham hurma yağı, palmiye asit yağı	40-90
Rekombinant <i>Escherichia coli</i>	Soya yağı	6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 3924	Palmiye yağı	39
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCIB 40045	Atık kızartma yağı	29
<i>Pseudomonas guesennei</i> <i>biovar. tikehau</i>	Hindistancevizi yağı	63
<i>Thermus thermophilus</i> HB8	Peynir altı suyu	36

3.5. PHB Biyosentezi ve Biyobozunması

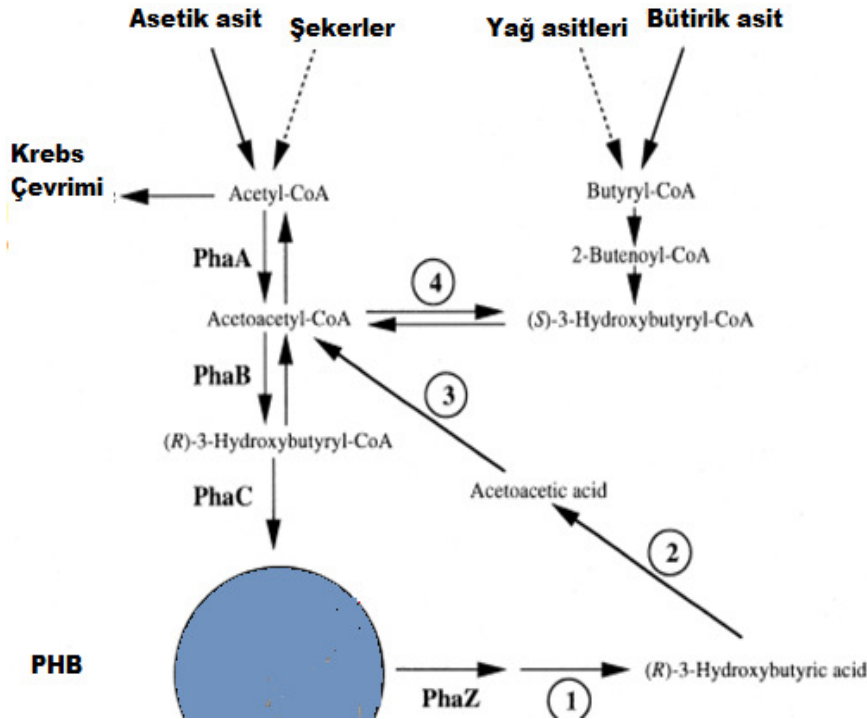
Bakteriler üç biyosentetik enzim ile PHB'ye dönüştürülen asetil-koenzim-A üretir [10]. PhaCBA kümesi üçlü protein kodlar: asetil-CoA dan asetoasetil-CoA sentezini katalize eden PhaA (b-ketotiyolaz), asetoasetil CoA'yı (R)-3-hidroksibutiril-CoA'ya stereospesifik olarak azaltan PhaB (NADPH-oksidoreduktazı) ve büyüyen polimer içinde (R)-3-hidroksibutiril-CoA'dan enantiomerlerinin katılımını teşvik eden PhaC (PHB polimeraz) [62].

İlk aşamada, 3-ketotiyolaz (PhaA) asetoasetil-CoA oluşturmak için 2 asetil-CoA molekülünü birleştirir. Asetoasetil-CoA redüktaz (PhaB), NADH tarafından asetoasetil-CoA 3-hidroksibutiril-CoA'ya indirilmesini sağlar. Son olarak, PHB sintaz (PhaC) 3-hidroksibutiril-CoA'yı PHB'ye polimerize eder, Koenzim-A açığa çıkar. Enzim polimerizasyonu için sadece (R) izomerleri substratlar olarak kabul edilir [10].

Hücre içinde PHB birikiminin artması için, yüksek NAD(P)H, yüksek asetil-CoA ve düşük serbest CoA düzeyinin olması gerekmektedir [10].

Normal bakteri üremesi sırasında, 3-ketotiyolaz (PhaA) Krebs döngüsüyle çıkan serbest koenzim-A tarafından inhibe edilir. Ancak Krebs döngüsüne, asetil-CoA girişi sınırlı olduğunda (karbon olmayan besin sınırlaması sırasında), fazla asetil-CoA PHB biyosentezine kanalize olur [10].

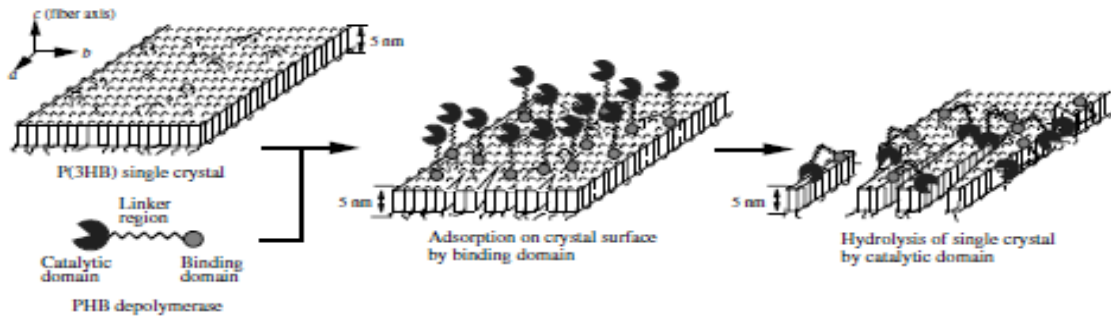
İki ilave protein, PhaZ ve PhaP (phaZ ve PhaP gen ürünleri), ayrıca PHB granüllerinin ya katabolizmasına (PhaZ) ya da stabilizasyona (PhaP) katılırlar. PhaZ bir depolimeraz olup (R) polimerden (ya da dimerlerden daha uzun oligomerlerden) R-3-hidroksibütirat bırakımını katalizler. PhaP (phasin) granüllere bağlanarak PHB üretimini arttıran düşük molekül ağırlıklı bir proteindir [62]. PHB fazla karbon için bir depolama bileşiği olduğundan, bu mikroorganizmaların saklanan karbon kurtarmak için bir depolimerizasyon sistemi ile donatılmıştır doğaldır. PHB'nin çeşitli araştırma grupları tarafından incelenmiş ve detaylı gözden geçirilmiş döngüsel metabolizması için genel bir şema Şekil 3.6'da gösterilmektedir [84].



Şekil 3.6. Bakterilerde PHB biyosentez ve bozunmanın döngüsel metabolik doğası [84]

PHB'ların önemli bir özelliği biyolojik olarak bozunabilirliğidir. Doğadaki mikroorganizmaların PHA hidrolazlar ve PHA depolimerazlar kullanarak PHA'ları parçalayabilmesi mümkündür. Bu enzimlerin aktiviteleri polimer kompozisyonu ve çevre koşullarına bağlıdır ve değişebilir. PHB'nin bir parçasının bozunma hızı katkı maddesine göre tipik olarak birkaç ayla (anaerobik kanalizasyon) yıllar (deniz suyunda) arasındadır. UV ışığı bozulmayı hızlandırabilir [10]. PHB malzemelerin biyolojik olarak bozunma hızı birçok faktöre özellikle de çevre ile ilgili (sıcaklık, nem seviyesi, pH ve besin kaynağı) ve bu PHB malzemelerinin kendileri ile ilgili (bileşim, kristal, katkı maddeleri ve yüzey alanı) faktörlere bağlıdır. Bozunmanın enzimatik hidroliz (yüzey erozyonu) tarafından yüzeyde meydana geldiği ortaya konulmuştur [84].

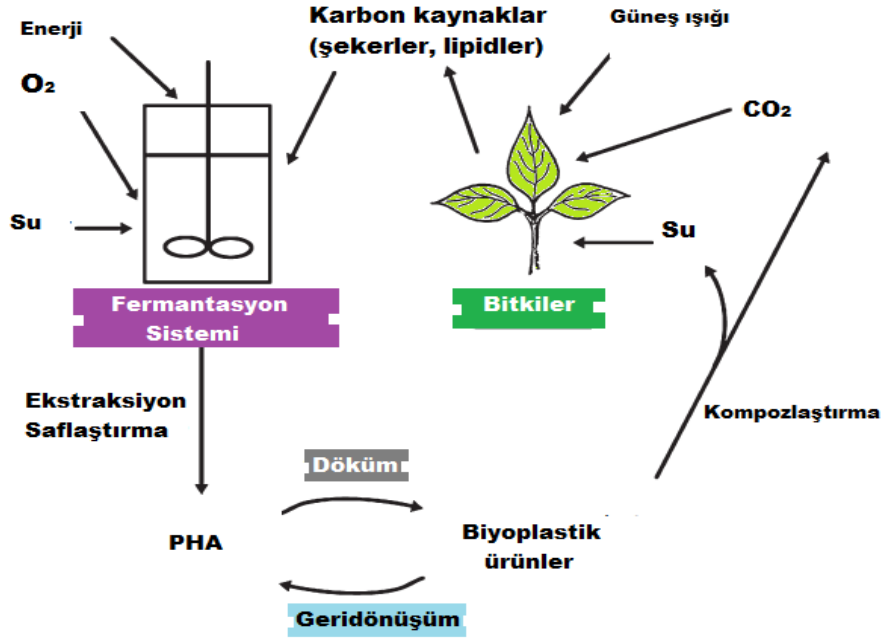
Birçok hücre dışı PHB depolimeraz farklı mikroorganizma saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir [84]. PHB depolimeraz tarafından PHB için kristal bölgenin enzimatik bozunma mekanizması aydınlatmak için, bakteri ve mantar izole PHB depolimeraz ile PHB tek kristal enzimatik olarak parçalanması incelenmiştir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. P(3HB) tek kristal morfolojisi; (b) P(3HB) tek kristalinin tüm yüzeyi üzerine depolimeraz PHB bağlanması ve (c) P(3HB) kristal kenarının enzimatik hidrolizi [84]

PHA'ların biyoyumlu oluşu yani canlı organizmalar üzerinde toksik etkileri olmadığı kanıtlanmıştır. PHA sentezi ve biyolojik ayrışma karbon döngüsü tamamen uyumludur (Şekil 3.8) [10].

PHB'nin aerobik ortamda bozunma ürünleri karbondioksit ve su iken anaerobik ortamda ise metandır [10].



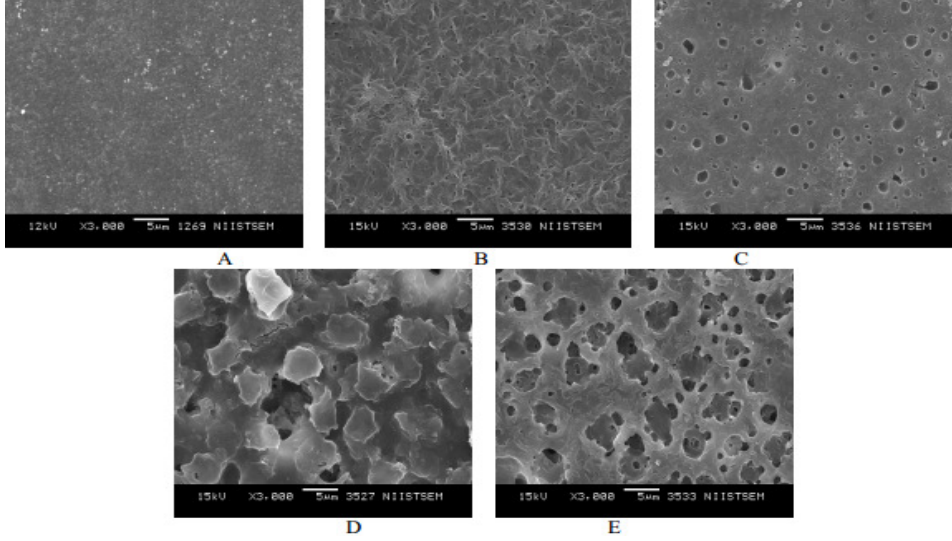
Şekil 3.8. PHB'nin biyodöngüsü [10]

PHB'ın bozunmasında topraktaki bazı gram negatif mikroorganizmalar, gram pozitif bakteriler, streptomycetler ve küf mantarları görev alır. *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas lemoignei*, *Pseudomonas stutzeri*, *Comamonas* sp., *C. acidovorans*, *C. teststeroni* ve *Streptomyces exfoliatus* örnek olarak sayılabilir [10].

Memeliler içinde, polimer yavaş hidrolize edilir. Farelere uygulanan implant uygulamasından 6 ay sonra, implattaki kütle kaybı %1,6 (% w/w)'dan daha az olmuştur [10].

Shalin ve diğerleri, PHB'nin biyobozunması üzerine çalışmışlardır. 6 farklı polimerlerden hazırlanan karışım kullanılmış: PHB film, PHB-PLA, PHB-TS (termoplastik nişasta), PHB-PLA-TS, PHB-PEG-TS. Termoplastik nişasta (TS) 50:50 PHB ile karıştırılmıştır. PHB-PLA-TS için PHB ve PLA 50:50 çözülmüştür. TS oranı 50:50 karıştırılıp elde edilmiştir. PHB-PEG-TS için PHB ve polietilen glikol (PEG) 50:50 kloroform içinde çözülmüştür. TS 50:50 karıştırılıp elde edilmiştir. Asgari ortam elde edilmiş, *L. delbrueckii* MSE 0925 saf kültürleri ve % 2 süt endüstrisi çamurundan konsorsiyum aşılanmıştır. Steril filmler ortama konulmuş ve 30°C'de 7 gün süreyle inkübe edilmiştir. 7 gün sonra, PHB-PEG-TS en çok bozulmayı göstermiş, onu PHB-PLA-TS izlemiştir. Saf PHB filmi hiç bozulma göstermemiştir. PHB karışımları, saf PHB filminden daha iyi ve daha fazla bozulma göstermiştir. Ayrıca organizmaların bir konsorsiyumunun tek bir organizmadan daha hızlı

bozulumla sağladığı tespit edilmiştir. PHB karışımlarında biyolojik bozunması çalışmaları %87 bozulmasına göstermiştir [78].



Resim 3.2. Elektron mikroskobu ile karışık kültürdeki PHB-PEG-TS taraması A)Kontrol B) 5 gün sonra C) 10 gün sonra D) 15 gün sonra E) 20 gün sonra [78]

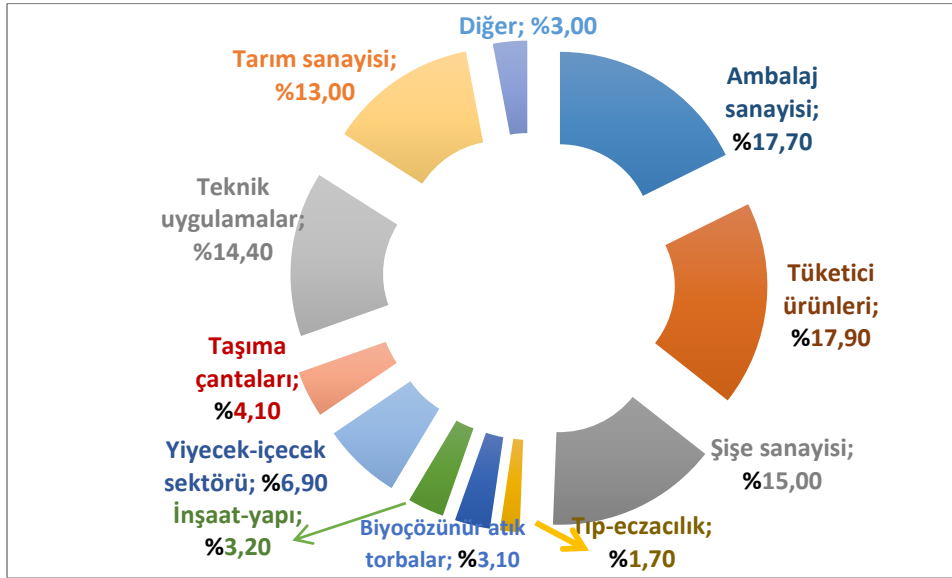
3.6. Kullanım Alanları

Biyoplastikler yeni olarak görülse de aslında 19. yy başlarında sadece şekerleme ambalajı olarak kullanılmış ama ek maliyet getirdiğinden çok da önemsenmemiştir [8].

Biyoplastik üretimi, %30'luk yıllık büyüme oranı %5 olan geleneksel plastiklerden daha hızlı bir büyüme oranına sahiptir. Araştırmalar üretim miktarının 2020'de 3,45 milyon tona erişebileceği yönündedir ve yıllık ortalama büyüme oranı 2013'den 2020 yılına kadar %6 olarak belirlenmiştir. Üretim ve tüketim miktarları karşılaştırıldığında üretimin talebi karşılayamadığı söylenebilir. Ayrıca biyoplastik endüstrisinin 2020 yılına kadar 20 milyar dolar değerinde olabileceği tahminler arasında yer almaktadır [8].

Çizelge 3.9'da 2011 yılı itibariyle biyoplastiklerin kullanıldığı sektörler payları ile gösterilmektedir.

Çizelge 3.9. 2011 yılı itibariyle biyoplastiklerin kullanıldığı sektörler [8]



Şekilden de görüleceği üzere en yaygın kullanım ambalaj sanayi ve kozmetik, oyuncak gibi sanayilerin yer aldığı tüketici ürünleri segmentidir.

ICI tarafından üretilen PHB başlangıçta böyle Wella -Almanya tarafından şampuan şişeleri ve ambalaj malzemeleri gibi günlük eşyaları yapmak için kullanıldı. O zamandan beri, esas olarak, alışveriş poşetler, kaplar ve kağıt kaplama ambalaj filmleri olarak geliştirilmiştir. Jilet, mutfak eşyaları, çocuk bezleri ve ambalajları, kadın hijyen ürünleri, kozmetik kaplar ve bardak gibi biyolojik olarak parçalanabilir tek kullanımlık ürünlerde sıklıkla kullanılır. PHB yazdırma uygulamaları için tonerlerde ve yapıştırıcı uygulamalarında da kullanılmıştır. PHB günümüzde P & G, BioMers, Metabolix ve Wella gibi uluslararası şirketler tarafından çeşitli bakteriler kullanılarak ticari ölçekte üretilebilmektedir [8, 10, 56].

Yavaş salınım için gübre kapsüllenmesi, tohum kapsülleme, ekin koruması olarak biyobozunur plastik filmler ve sera tesisleri için biyolojik olarak parçalanabilir kapları içeren potansiyel tarım uygulamalarıdır [10].

Çok sayıda da tıbbi uygulamalar vardır. Tıp alanında en önemli avantajı, bir biyobozunur plastik insan vücudunun içine yerleştirilebilir olması ve yeniden çıkarılmasına gerek olmamasıdır. PHB'nin çeşitli kompozitleri özel fizyolojik koşullar altında arzu edilen zaman dilimlerinde içinde olumlu mekanik özellikleri, biyoyumluluk ve bozulma süreleri

sağlar [56]. PHA ideal bir biyouyumluluğu vardır çünkü hücre metabolizmasının bir ürünüdür ve ayrıca, 3-hidroksi butirik asit (bozunma ürünü) 0,3-1,3 mmol/l arasındaki konsantrasyonlarda kanda normal olarak mevcut bulunmaktadır [10]. Gram (-) bakterilerin izole edilen polimerler dış zar lipopolisakarit (LPS) endotoksinleri içerir. LPS varlığı kuvvetli bağışıklık reaksiyonu neden olur ve bu nedenle, PHA'ların biyomedikal uygulamaları için istenmeyen bir durumdur. Gram (+) bakteriler LPS'ten yoksundur dolayısıyla biyomedikal uygulamalar için kullanılmak üzere potansiyel olarak daha iyi kaynaklarıdır [61].

PHB dikiş ve dikiş elemanları, yamalar, ortopedik pimleri, yapışma bariyerleri, stentler, adezyon bariyerleri, kemik kaplama sistemleri, eklem kıkırdak onarım cihazları, sinir rehberleri ve kemik iliği, iskele malzemesi, cerrahi kafes, kardiyovasküler yamalar, olarak kullanılır. PHA iskelelerinin ilginç yönü ise, doku mühendisliği yardımıyla düzenlenmiş hücreler destekleyici iskeleler ile implante edilebilir oluşudur. Araştırma PHA malzemelerinin kemik iyileşme işlemlerinde yararlı olabileceğini göstermektedir. PHB'nin çeşitli kompozitleri özel fizyolojik koşullar altında arzu edilen zaman dilimlerinde içinde olumlu mekanik özellikleri, biyouyumluluk ve bozulma süreleri sağlar [10, 56, 61].

FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından implant biyomalzeme olarak başarılı onayı alan PHB ile yakında daha fazla PHA-tabanlı biyomalzemelerin klinik çalışmalarına yönelmesi beklenmektedir [56]. Hedefli ilaç salınımı için şimdiye kadar, sadece PHB ve PHBV incelenmiştir [85].

PHA nanopartikülleri (PhbP proteini) çoğunlukla hidrofobik ilaçlar paketlemek için kullanılmıştır. Ligand PHAP-PHA özel ilaç verme sistemi, in vitro ve in vivo olarak etkin bir kanıtlanmıştır [85].

(R)-(-)-hidroksi karboksilik asitler, büyük oranda antibiyotikler, vitaminler, aromatikler ve feromonlar gibi ince kimyasalların sentezi için kiral yapı blokları olarak kullanılabilirler. Birçok ilaç, sadece bir kiral formda aktiftir ve bunların organik sentezinde bir çimento bloğu gibi kullanılır. Organik kimyada asimetrik sentez işlemi için enantiomerik saf bileşikler revaçtadır. Bu gruptaki D-(-)-3 -hidroksibütirik asit olduğundan saf maddelerin eldesinde PHB'nin kullanılması önem kazanmaktadır [7].

Bunun yanında döşemelerde, halılarda da uygulanmaktadır. Biyoplastik kompozitler zaten cep telefonları gibi elektronik ürünlerde kullanılmaktadır [10, 56].

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Materyal ve Metod

4.1.1. Materyal

Bakteri

Yapılan çalışmalarda basil formu *Bacillus thuringiensis* RSKK 381 suşu kullanılmıştır. Bu suş T.C. Sağlık Bakanlığı Türk Halk Sağlığı Merkezi'nden (Eski Refik Saydam Hıfzıssıhha) liyofilize formda temin edilmiştir.

Kullanılan besiyerleri

Temel minimal besiyeri olarak Merck marka nutrient broth (NB) ve yine Merck marka nutrient agar hazır besi yerleri kullanılmıştır. Kullanılan bu 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 [86];

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 çözdürülmüştür.

- 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.

PHB standart grafiğinin çizilmesinde Sigma-Aldrich marka kimyasal PHB ve kloroform kullanılmıştır.

Farklı C kaynaklarının incelenmesi için Sigma gliserol, Merck glikoz, Carlo Erba ksiloz, Sigma mannoz, Sigma D-mannitol eklenerek besiortamları hazırlanmıştır. Farklı N kaynaklarının etkisini incelemek için Merck malt ekstrakt, Merck amonyum sülfat, Fluka maya ekstraktı, Merck amonyum nitrat ve Fluka glisin eklenerek besiortamları hazırlanmıştır.

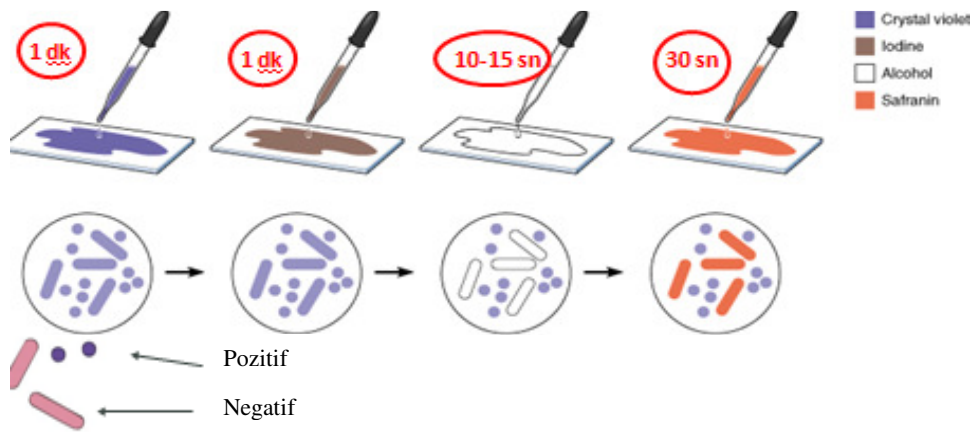
Metal iyonlarının etkisinin incelenmesinde Merck $ZnSO_4$, Merck $MgSO_4$, Surechem Products $NiCl_3$ ve Sigma H_3BO_3 kullanılmıştır.

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 hayvan gübresi (koyun) kullanılmıştır.

4.1.2. Metod

Bakterilerin kimliklendirilmesi

Bakterilerin kimliklendirme işlemi gram boyama yöntemi ile Gazi Üniversitesi Biyoloji bölümünde yapılmıştır. Gram boyama işlemi için 5 ml sıvı besi ortamında 30°C'de 24 saat inkübatörde (The NuAire DH AutoFlow NU-5500 CO₂) inkübe edilmiş pH 7'deki kültür kullanılmıştır. Kimliklendirmenin yapıış yöntemi Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Lamin ortasına 1 damla su konup sıvı besi ortamını ve bakteriyi içeren tüpten numune alınmıştır. Öze lame sürülüp lam tutacakla bek alevine fazla yaklaştırmadan alevden geçirilerek lam kuruyuncaya kadar beklenmiş, gram boyamaya hazırlanmıştır. Lamlar önce 1 dakika violette kalmış sonra çeşme suyunda fazlası yıkanmıştır. Arkasından lamlar 1 dakika lugolde bekletilip tekrar çeşme suyunda fazlası yıkanmıştır. Lamların üzerine alkol damlatılıp 10-15 saniye bekletilip yıkanmıştır. Bu işlemden sonra lam üzerine safranin dökülerek 30 saniye beklenmiş lamlar yıkanmıştır. Bir damla immersiyon yağı damlatılarak lamlar mikroskopla incelenmiştir.



Şekil 4.1. Gram boyama yöntemi (temsili) [86]

Bakterinin optimum büyüme şartlarının belirlenmesi

0,8 gram nutrient broth hassas terazide (Denver Instruments TP-214) tartılıp pH 7'de 100 ml deiyonize suda çözülerek sıvı besiyeri hazırlanmıştır. 1 gün inkübatörde inkübasyona bırakılan *Bacillus thuringiensis* RSKK 381 kültüründen alınan 30°C'deki aktif kültür hacimce %1 olacak şekilde steril edilen sıvı besi ortamına ekilmiş sıfır anından başlamak

üzere zamana karşı numune alınarak spektrofotometre cihazında (PG Instruments Ltd - T80+ UV/VIS) 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur.

Uygun pH için erlenlere 100'er ml sıvı besi ortamı hazırlanmış ve erlenlerin pH değerleri 3-5-7-11 olacak şekilde 1M HCl, 1M NaOH ve pH metre (Hach EC30) ile ayarlanmıştır. Sterilizasyon için erlenlerin ağzı pamukla tikanıp daha sonra folyoyla sarılmış ve 121°C'de otoklavda (mode: agar) sterilize edilmiştir. Aktif kültürden ekilen bakterinin büyüme eğrisi çizilmiştir.

Uygun inkübasyon süresi için pH 7'de 1-2-3 günlük inkübasyon süreleri denenerek bakterinin büyüme eğrileri çizilmiştir.

Uygun inkübasyon sıcaklığı için pH 7'de 30 ve 37°C inkübasyon sıcaklıkları denenerek bakterinin büyüme eğrileri çizilmiştir.

Karıştırma hızının etkisinin incelenmesi için 150 ml nutrient broth ortamına 30°C'de 2 gün inkübe edilmiş aktif kültürden pH 7'de % 4'lük çözelti hazırlanmış, karıştırıcılı ısıtıcıda (Ika C-mag HS7) 350 rpm ve 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C büyüme eğrileri çizilmiştir.

PHB üretiminin tespiti ve boyanması

Bakterinin PHB üretiminin tespiti Verma, Sindhu, Suneja ve Goyal [87]'in çalışması baz alınarak Nile Blue A boyama yöntemi ile yapılmıştır. Nile Blue Sülfat 0,01 g/ml olarak hazırlanmış, katı besi ortamına %1 oranında ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamına sterilizasyon sonrası önaktifleştirilmiş kültür ekilmiştir. 30°C'de bekletilen petri ler UV kabin (Ultraviolet Viewer UV1 kabin) ile gözlenmiştir.

PHB ekstraksiyonu için sonikasyon süresinin tespiti

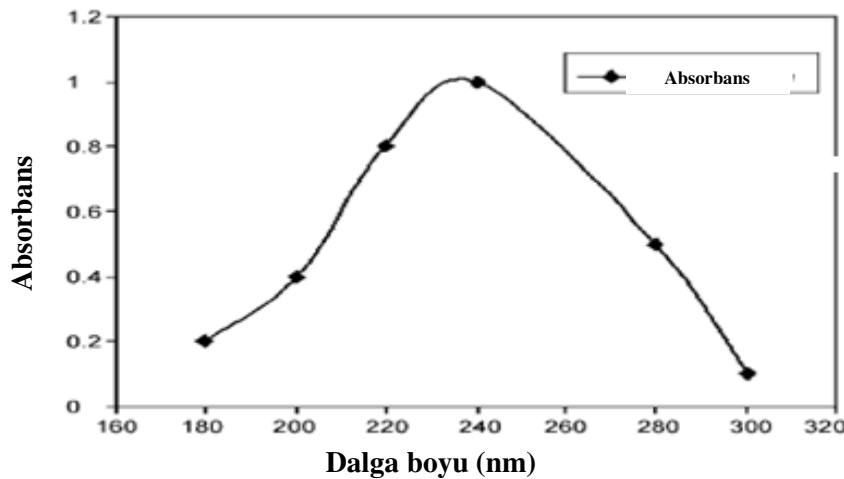
5 ml steril besiyerine, katı agardan alınan 1 öze bakteri ekilmiş ve 30°C'de 2 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda 10 ml'lik sıvı besiyeri olan steril sonikasyon tüpüne %1 oranında aktif kültür ilave edilmiştir. Logaritmik faz sonunda ultrasonikatör (Bandalin Sonoplus UW 2070) %94-95 güçte iken sonikasyon tüpü 5-7-10-12-15-20-25-30 dakika

sonike edilmiştir. Tüplerden alınan örnekler petrilere ekilerek 1 gün 30°C inkübe edilmiş, koloni sayımı ile bakterinin hücre duvarının parçalanma süresi tespit edilmiştir.

PHB ekstraksiyonu için PHB standart grafiğinin çizilmesi

10-30-60-80-100-150-200 µg/ml'lik PHB standartları, Sigma-Aldrich marka kimyasal PHB ve kloroform kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu standart örneklerinin 60°C'lik etüvde (Nüve FN 300) kloroformları uçurulmuştur. Kuruyan örnekler 5 ml saf sülfürik asit ilave edilmiştir. PHB'ın krotonik aside dönüşmesini sağlamak için örnekler 95°C'lik çalkalamalı su banyosunda (Memmert WB 14 SV 1422) yarım saat bekletilmiş, su banyosundan alınan örneklerin oda sıcaklığına soğuması beklenmiş ve spektrofotometre cihazında 235 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur.

Dalga boyu, Pal ve diğerlerinin çalışmasından yola çıkarak PHB'nin absorbans taramasındaki en yüksek adsorbans değeri bu dalga boyunda olduğundan seçilmiştir (Şekil 4.2) [68].



Şekil 4.2. Konsantre sülfürik asit içinde izole PHB'nin UV absorpsiyon spektrumu [68]

PHB granüllerinin ekstraksiyonu ve miktar ölçümü

Ekstraksiyon işlemi için Bonartseva ve Myskina'ya ait yöntem baz alınmıştır [88]. *Bacillus* steril 5 ml'lik sıvı besiortamına aktive edilmiş 30°C inkübasyon sıcaklığında 2 gün inkübe edilmiştir. Bu aktif kültürden alınan numune daha önceden steril edilen 150 ml'lik sıvı

besiyerine hacimce %4 olacak şekilde tekrar aktifleştirilmiştir. Logaritmik fazının sonu, durağan faza geçiş anında numune alınmış önce 6000 rpm'de 15 dakika, sonra yetersiz görüldüğünden 8000 rpm 15 dakika daha santrifüjde (Biobase TG16-WS) santrifüjlenmiştir. Santrifüj tüpünde kalan pellet kurutulmak üzere 12 saat 45°C'lik etüvde bırakılmıştır. Kuru katı tartılarak kuru hücre ağırlığı bulunmuştur. Katı 5 ml deiyonize suda homojen olarak çözündürülmüş ve tespit edilen sonikasyon süresi kadar (12 dakika) sonikasyon uygulanmıştır. Kalan kültüre hacimce bire bir oranında olacak şekilde 2 M HCl eklenmiş 95°C'lik su banyosunda 2,5 saat ısıtılmıştır. Karışım tekrar 8000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiş ve katı kısım alınmıştır. Katı kısma 5 ml kloroform konarak ağzı sıkıca kapatılmış ve 28°C'lik çalkalamalı su banyosunda PHB'nin kloroformda iyice çözünebilmesi için 12 saat bırakılmıştır. Sürenin sonunda önce 6000 rpm 15 dakika, sonra 8000 rpm 15 dakika santrifüjlenmiş ve PHB dışı maddelerin çökmesi sağlanmıştır. Sıvı kısımdan 100 µl alınarak 60°C'lik etüvde kloroform uçurulmuş ve PHB'nin kalması sağlanmıştır. Kuru örnek üzerine 5 ml saf sülfürik asit ilave edilmiş, 95°C'lik su banyosunda yarım saat bekletilerek PHB'nin krotonik aside dönüşmesi sağlanmış ve örneklerin UV'de 235 nm'de absorbands değerleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre standart grafiğinden PHB'nin miktarı tespit edilmiştir.

Farklı karbon ve azot kaynaklarının bakterinin büyümesine ve PHB üretimine etkisi

Farklı C kaynakları için 100'er ml 5 adet deiyonize suya N kaynağı olarak 0,5 g (%0,5) peptonun varlığında hacimce ya da kütlece %0,3 olacak şekilde gliserol, glikoz, ksiloz, mannoz, D-mannitol eklenerek besiortamları hazırlanmıştır. Farklı N kaynakları için 100'er ml 5 adet deiyonize suya C kaynağı olarak 0,3 g (%0,3) meat ekstraktın varlığında hacimce ya da kütlece %0,5 olacak şekilde malt ekstrakt, amonyum sülfat, maya ekstraktı, amonyum nitrat ve glisin eklenerek besiortamları hazırlanmıştır. Tüm besiortamları 121°C 15 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. 30°C'de 2 gün inkübe edilmiş aktif kültürden pH 7'de %4'lük bakteri çözeltisi besiortamlarına eklenmiş, karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C büyüme eğrileri çizilmiştir.

Gübrelerin bakterinin büyümesine ve PHB üretimine etkisi

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 hayvan gübresi (koyun) kullanılmıştır.

Kompoze gübre ürün içeriği: %20 azot (N), %20 amonyum azotu (NH₄-N), %20 fosfor (P₂O₅)'dur. Ülkemizde iki besin içeren kompoze gübreler içinde en çok kullanılan gübre çeşididir. İçerdiği azotun tamamı ve fosforun tamamına yakını suda çözündüğü için bitkiler tarafından kolaylıkla alınır. Bünyesindeki azot, amonyum ve üre formunda olduğu için yağış veya sulamayla topraktan kolay kolay yıkanmaz. Ayrıca 20.20.0 kompoze gübrede azot kaynağı olan amonyum sülfattan dolayı kükürt de bulunmakta olup, bu gübre ile bitkilerin kükürt ihtiyacı da karşılanabilmektedir. 20.20.0 gübresi potasyum bakımından zengin ancak fosfor ve azot bakımından fakir, her cins toprakta rahatlıkla kullanılabilir [89].

Hayvan gübresinde ortalama %75 su, %17 organik madde, %6 inorganik madde bulunmaktadır [90]. Bazı hayvansal gübrelerin kimyasal yapıları Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Bazı hayvansal gübrelerin kimyasal yapıları [90]

Cinsi	H ₂ O (%)	Kuru Madde (%)	N (%)	P ₂ O ₅ (%)	K ₂ O (%)	CaO (%)
Sığır	83,2	16,2	0,29	0,17	0,10	0,34
At	75,7	24,3	0,44	0,35	0,35	0,15
Koyun	65,5	34,8	0,55	0,31	0,15	0,46
Kaz-Ördek	75	25	0,80	1	0,80	1,30
Güvercin-Tavuk	62,5	38	1,70	1,60	0,90	2,00

Superdoll organik gübre içeriği; %20 yosun (*Ascophyllum nodosum*), %10 aminoasit, %4 K₂O, %2 organik azot %2,5 alginik asit ve kalanı sudan oluşmaktadır. *Ascophyllum nodosum* kahverengi bir deniz yosunudur. Alginik asit, kahverengi alglerin hücre duvarlarından ekstre edilen bir karbonhidrattır. Deniz yosunlarından elde edilen ürünlerin,

toprağın yapısını düzenlediği ve toprağın su tutma kapasitesini arttırdığı bilinmektedir. Bu durum, büyük oranda deniz yosunlarının içerdiği alginik asitlerin topraktaki metalik türler ile etkileşmesine atfedilmektedir. Topraktaki metallerle etkileşen alginik asit nemli ortamda şişer ve bu sayede toprağa daha tanecikli bir yapı kazandırır. Kısacası deniz yosunları toprakta iki önemli görevi yerine getirir: Toprağın tanecikli yapısını geliştirme ve toprağın su tutma kapasitesini artırma. Bu sayede bitkilerin kök sistemleri daha da gelişir, topraktaki yararlı mikroorganizmaların sayısı artar ve toprak daha havadar bir yapı kazanır [91, 92].

100'er ml kütlece oranları %0,5-1-5-10-25 olacak şekilde kimyasal gübre ve hayvansal gübre; hacimce oranları %0,5-1-5-10-25 olacak şekilde organik gübre çözeltileri hazırlanmış, 2 kere süzülerek süzüntüsü kullanılmıştır. 30°C'de 2 gün inkübe edilmiş aktif kültürden %4'lük bakteri çözeltisi besiortamlarına eklenmiştir. Karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C büyüme eğrileri çizilmiştir.

C/N oranının bakterinin büyüme eğrisine ve PHB üretimine etkisi

100'er ml 4 adet deiyonize su ortamına en yüksek verimi veren N ve C kaynağı ile C/N oranı 0,5-1-1,5 olacak şekilde makrobeyinler konmuş ve 121°C 20 dakika otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır. 30°C'de 2 gün inkübe edilmiş aktif kültürden pH 7'de %4'lük bakteri çözeltisi besi ortamlarına eklenmiştir. Karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C büyüme eğrileri çizilmiştir. Karbon kaynağı olarak mannoz, azot kaynağı olarak amonyum nitrat kullanılmıştır.

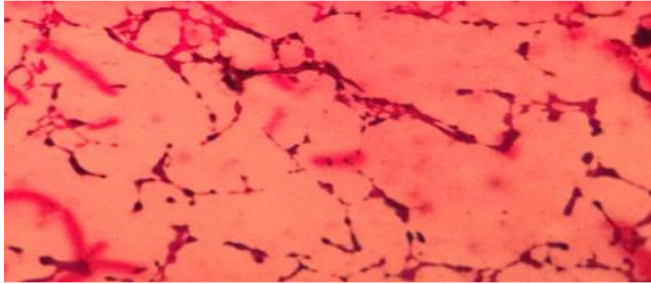
Metal iyonlarının bakterinin büyüme eğrisine ve PHB üretimine etkisi

100'er ml 5 adet Nutrient Broth ortamında 5'er ppm Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ni^{+3} , B^{+3} olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunun için $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $NiCl_3$ ve H_3BO_3 kullanılmıştır. 30°C'de 2 gün inkübe edilmiş aktif kültürden pH 7'de %4'lük bakteri çözeltisi besi ortamlarına eklenmiştir. Karıştırıcılı ısıtıcıda 650 rpm karıştırma hızlarında 30°C büyüme eğrileri çizilmiştir.

4.2. Bulgular ve Tartışma

4.2.1. Bakterinin morfolojik olarak tanımlanması

Gram boyama ile morfolojik kimliklendirme işleminde Resim 4.1'deki görüntü elde edilmiştir. *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun gram pozitif (mor renk) ve çubuk basil olduğu Resim 4.1'de açık şekilde görülmektedir.

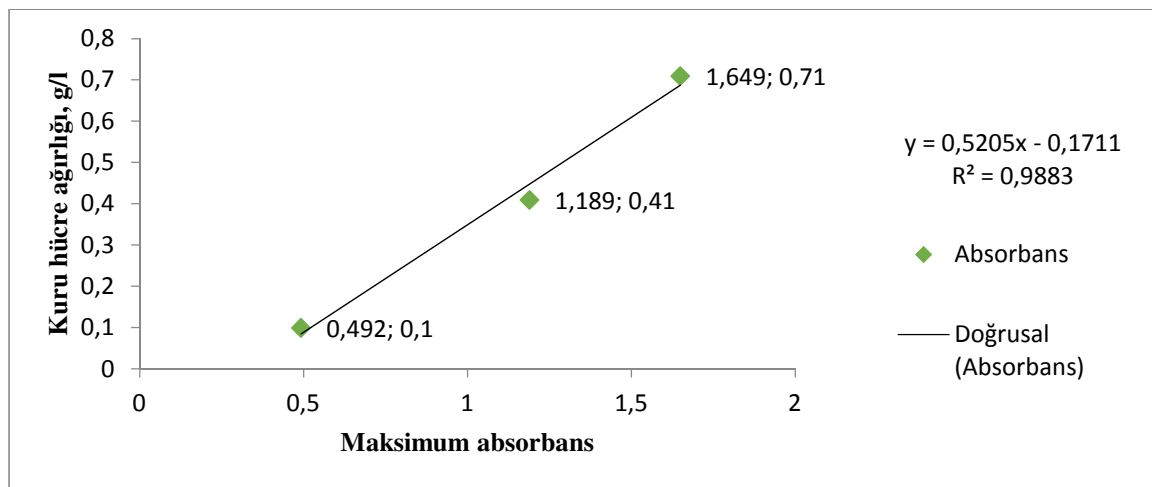


Resim 4.1. Gram boyama görüntüsü

4.2.2. Büyüme ve üreme hızı

Kalibrasyon grafiği

pH 7'de nutrient broth (NB) ortamında maksimum absorbans-kuru hücre ağırlığı grafiği çizilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.3).

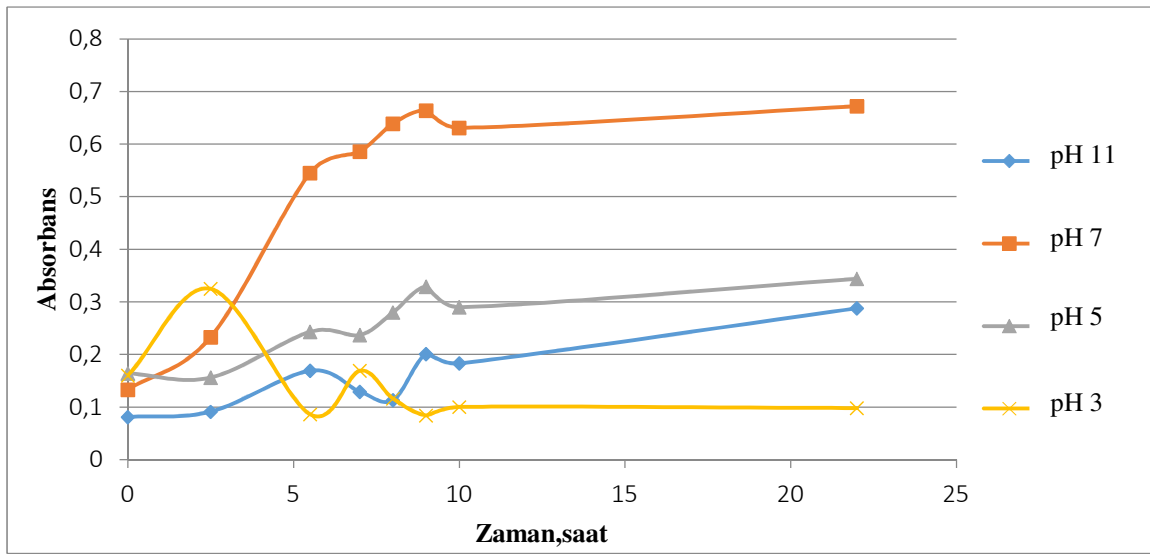


Şekil 4.3. Maksimum absorbans-kuru ağırlık kalibrasyon grafiği

Maksimum absorbans ve kuru hücre ağırlığı arasındaki ilişkinin tespiti için bir kalibrasyon grafiği oluşturulduğunda aradaki ilişkinin doğru orantılı olduğu bulunmuştur.

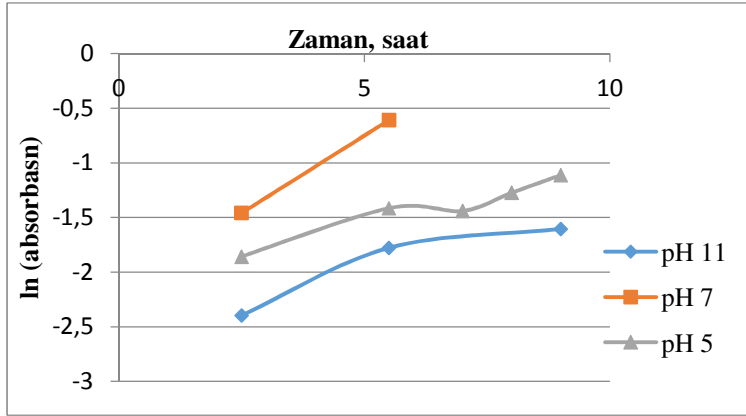
pH tespiti

Çalışılacak pH'ı tespiti için 30°C ve 24 saat inkübe edilmiş aktif kültür farklı pH dereceli Nutrient broth ortamına aşılanmış, karıştırmasız ortamda zamana karşı absorbans değerleri okunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 600 nm dalga boyunda 24 saat ve 30°C sıcaklıkta inkübasyon sonucunda karıştırmasız ortamda farklı pH değerlerinde *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı pH ortamlarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.5'teki ln (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.5. Farklı pH değerleri için ln (absorbans)-zaman grafiği

Tüm hesaplanabilir pH'lar için t_L süresi aynı ve 2,5 saat olarak bulunmuştur. Logaritmik evre ise pH 7 için 2-5,5 saat, pH 5 ve pH 11 için 2,5-9 saatleri arasında görülmüştür.

pH 5 için;

$$\mu = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1} = \frac{-1,1117 - (-1,8579)}{9 - 2,5} = 0,115 \text{ h}^{-1}$$

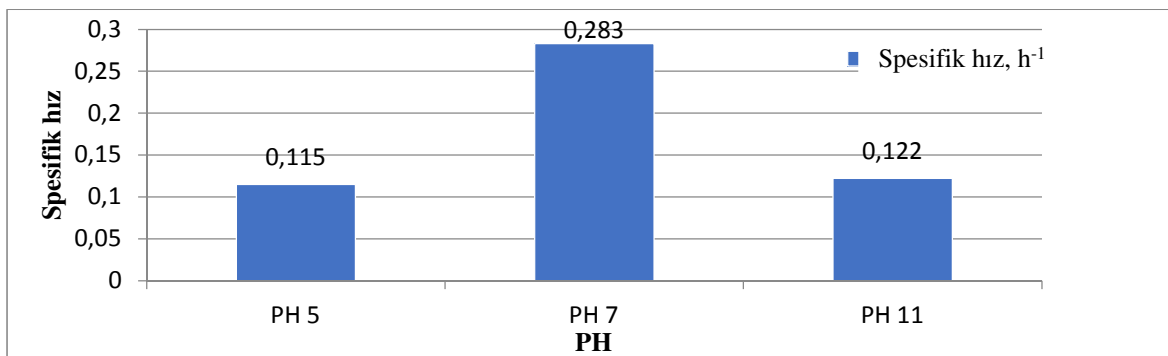
$$\mu = \frac{0,693}{t_d} \rightarrow t_d = 6,03 \text{ saat}$$

pH 7 için $\mu = 0,283 \text{ h}^{-1} - t_d = 2,45 \text{ saat}$

pH 11 için $\mu = 0,122 \text{ h}^{-1} - t_d = 5,68 \text{ saat}$

Farklı pH'larda spesifik üreme hızları Şekil 4.6'da karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir.

Farklı pH ortamlarında elde edilen tüm veriler Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.6. Spesifik hızların pH ile değişimi

Çizelge 4.2. 1 günlük ve 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı pH'larda elde edilen sonuçlar

Durum	Ortam	Absorbans (600 nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{\max}$	İkilenme süresi, t _d
PH 3	NB	0,098	-	-	-
PH 5	NB	0,344	0,008	0,115	6,03 saat
PH 7	NB	0,664	0,174	0,283	2,45 saat
PH 11	NB	0,201	-	0,122	5,68 saat

Yapılan çalışma sonucunda, 24 saatlik inkübasyonda *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için en yüksek biyokütle ve üreme hızı pH 7'de tespit edilmiş ve optimum pH 7 olarak belirlenmiştir.

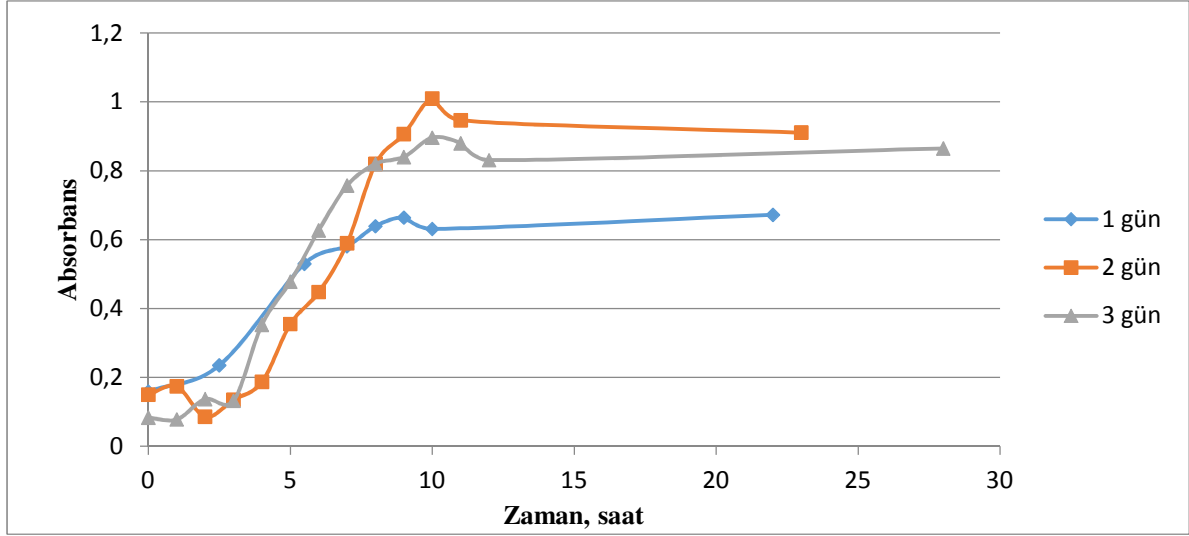
Düşük pH'lı ortamda (pH 3) bakteri ortama adapte olamamış ve üreme gözlenmemiştir. Nötr ortamda bakteri ortama uyum sağlayarak “normal” büyüme göstermiş ve yüksek bir absorbans değeri vermiştir. Ancak yoğun bazik şartlarda (pH 11), pH 5 ile aynı etkinin olduğu görülmüştür. Asidik ve bazik ortamın büyüme için uygun olmamasının sebebi enzim aktivitesinin pH ile doğrudan etkilenmesi ve bu pH'ların üremede etkili enzimin optimum çalışma pH'ına uzak olması ile enzimin düzgün/yeterli çalışmamasıdır. Elde edilen sonuç literatür ile uyumludur.

Kalaylı ve Beyatlı, çalışmalarında *Bacillus* sp. için optimum pH'ı 7 olarak bildirmektedir [11]. Keshavarzi ve diğerleri de *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* ile yaptıkları çalışmada en yüksek biyokütle üretimini pH 7'de tespit etmişlerdir [35].

Çalışmaların devamında pH 7 kullanılmıştır.

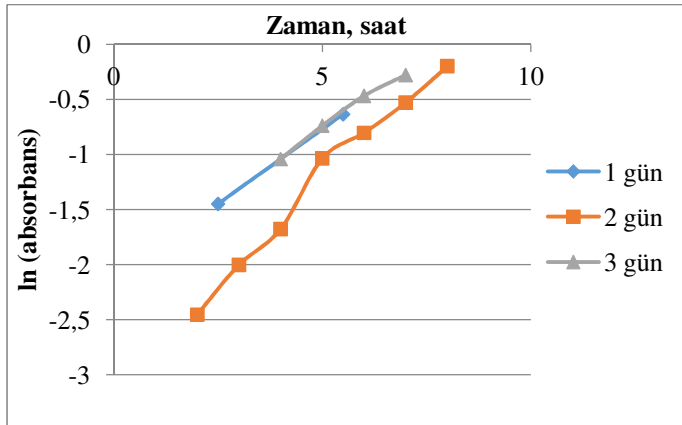
İnkübasyon süresi tespiti

Farklı inkübasyon sürelerinin üremeye olan etkisi araştırılırken pH 7'de 30°C'de 1-3 gün arasında değişen inkübasyon süreleri denenmiştir. Deneme ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.7'deki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.7. 600 nm dalga boyunda pH 7'de 30°C inkübasyon sıcaklığında farklı inkübasyon sürelerinde *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı inkübasyon sürelerinde *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.8'deki $\ln$ (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.8. Farklı inkübasyon süreleri için $\ln$ (absorbans)-zaman grafiği

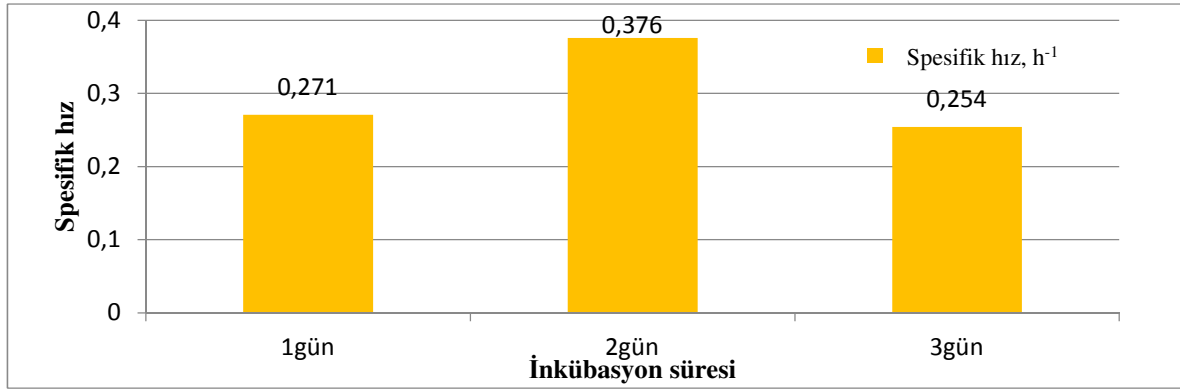
İnkübasyon süreleri karşılaştırıldığında gözlenen lag dönemi (t_L) en kısa 2 günlük inkübasyonda ve 2 saattir. 1 günlük ve 3 günlük inkübasyon sürelerinde lag dönemi (t_L) daha uzundur (sırasıyla 2,5 saat ve 4 saat). 2 günlük inkübasyon sonrası bir miktar bakteri ölümü gerçekleşse de en yüksek absorbans değeri gözlenmiştir.

1 günlük inkübasyon için $\mu = 0,271 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,56$ saat

2 günlük inkübasyon için $\mu = 0,376 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,84$ saat

3 günlük inkübasyon için $\mu = 0,254 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,73$ saat

Farklı inkübasyon sürelerindeki spesifik üreme hızları Şekil 4.9’da karşılaştırmalı şekilde verilmiştir. Farklı inkübasyon sürelerinde elde edilen tüm veriler Çizelge 4.3’te gösterilmiştir.



Şekil 4.9. Spesifik hızların inkübasyon süresi ile değişimi

Çizelge 4.3. pH 7’de, 30°C sıcaklıktaki inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sürelerinden elde edilen sonuçlar

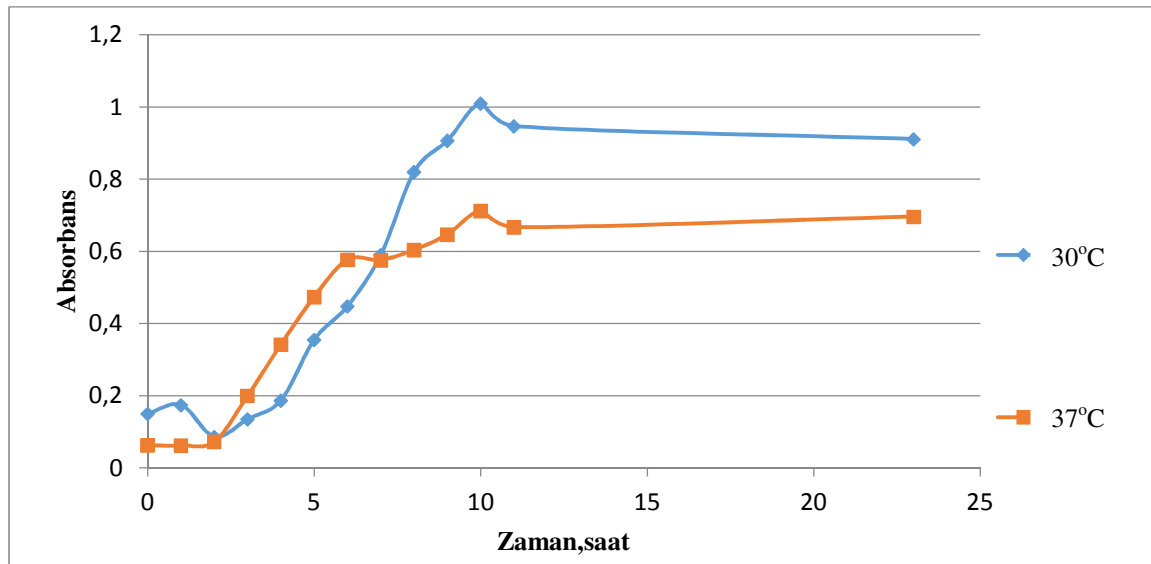
Durum	Ortam	Absorbans (600 nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{\max}$	İkilenme süresi, t_d
1 gün	NB	0,631	0,157	0,271	2,56 saat
2 gün	NB	1,01	0,354	0,376	1,84 saat
3 gün	NB	0,896	0,295	0,254	2,73 saat

Sonuçlara bakıldığında inkübasyon süresinin büyüme ve çoğalma üzerine oldukça etkili olduğu görülmüştür. *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için en uygun inkübasyon süresi 2 gün olarak tespit edilmiştir. İnkübasyon süresinin etkinliğini gösteren çalışmalardan biri Baysak’ın *Rhizobium* suşlarının farklı inkübasyon sürelerindeki (24, 48, 72, 96 saat) kuru hücre ağırlıklarını karşılaştırdığı çalışmasıdır. Araştırmacı her sürede farklı sonuçlar elde etmiş, 96 saat sonunda ise en yüksek hücre kuru ağırlığını elde ettiğini bildirmiştir [37].

1 günlük inkübasyonun bakteri adaptasyonu ve çoğalması için yeterli bir süre olmadığı görülmüştür. 3 günlük inkübasyonun hızının bu denli düşük olması ise zamanla hücrelerin hücre duvarının kalınlaşması ile ilintilidir.

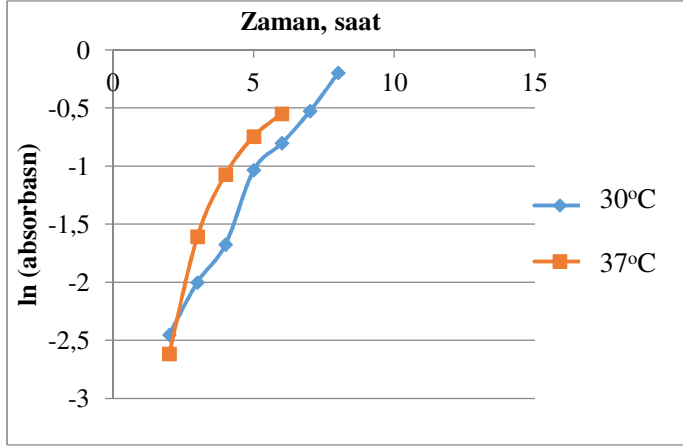
İnkübasyon sıcaklığının tespiti

Çeşitli *Bacillus* sp. türleri üzerinde çalışan Pichhardt, Tamdoğan, Thiele ve Gomaa gibi araştırmacılar çalışmalarında optimum üreme sıcaklığı olarak 30° C'yi bildirmişlerdir [27, 30-32]. Uygun inkübasyon sıcaklığı için denenen sıcaklıklar bu çalışmalar baz alınarak seçilmiş, 30 ve 37°C kullanılmıştır. Bulgular Şekil 4.10'daki gibidir.



Şekil 4.10. 600 nm dalga boyunda pH 7'de 2 günlük inkübasyon süresinde farklı inkübasyon sıcaklığında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı inkübasyon sıcaklıklarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.11'deki ln (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



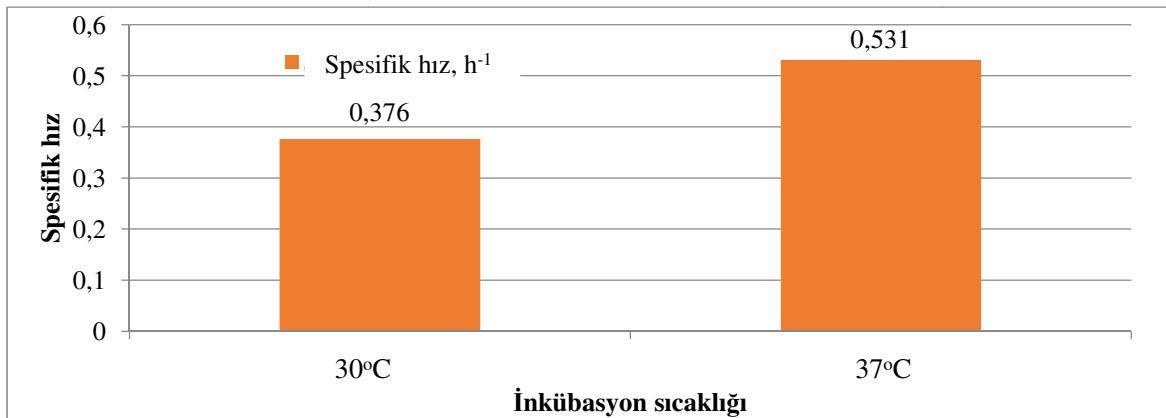
Şekil 4.11. Farklı inkübasyon sıcaklıkları için ln (absorbans)-zaman grafiği

İki sıcaklıkta da yapılan deneme sonucunda t_L süreleri eşit ve 2 saat olarak bulunmuştur. 30°C’de bir miktar bakteri ölümü gerçekleşmiş, logaritmik evre daha uzun olmuş ve eksponansiyel dönem 2-8 saatleri arasında bulunmuştur. 37°C’de eksponansiyel dönem 2-6 saatleri arasında tespit edilmiştir.

30°C inkübasyon için $\mu = 0,376 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,84$ saat

37°C inkübasyon için $\mu = 0,531 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,30$ saat

Farklı inkübasyon sıcaklıklarında spesifik üreme hızları Şekil 4.12’de karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Elde edilen tüm veriler Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Spesifik hızların inkübasyon sıcaklığı ile değişimi

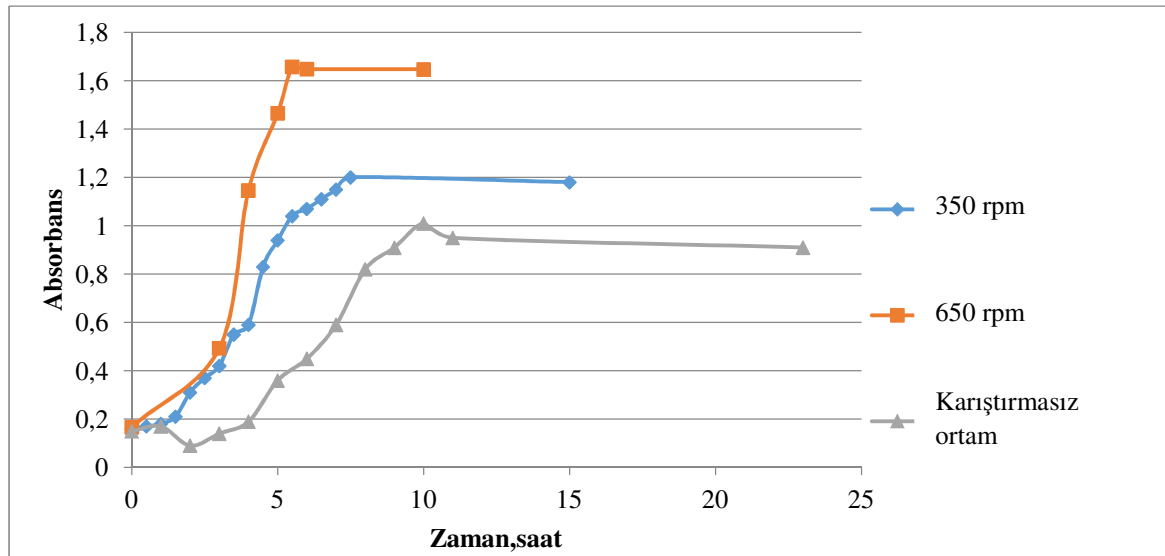
Çizelge 4.4. pH 7'de, 2 günlük inkübasyonda, karıştırmasız ortamda farklı inkübasyon sıcaklıklarında elde edilen sonuçlar

Durum	Ortam	Absorbans (600 nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{\max}$	İkilenme süresi, t_d
30°C	NB	1,01	0,355	0,376	1,84 saat
37°C	NB	0,712	0,200	0,531	1,30 saat

Spesifik hızlara bakıldığında 37°C inkübasyonda bakterinin hızlı üreme gösterdiği ancak kuru hücre ağırlığının düşük olduğu görülmüştür. Sıcaklıklar arasında hız açısından fark olduğu görülmüş ancak 54 dakikalık süre uzamasına karşın %77,5'lik biyokütle artışı nedeni ile inkübasyon sıcaklığı 30°C seçilmiştir.

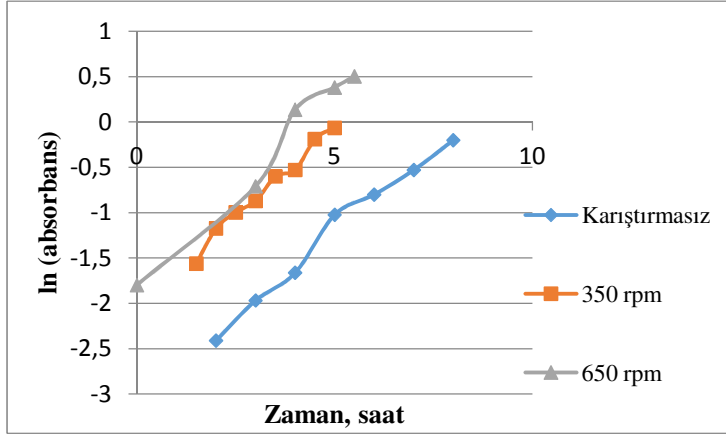
Karıştırma hızının etkisi

pH 7, 48 saatlik ve 30°C inkübasyon koşullarında karıştırma hızının etkisi incelenmiştir. Bunun için karıştırmasız ortam ve 2 farklı karıştırma hızı kullanılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.13'de görüldüğü gibidir.



Şekil 4.13. 600 nm dalga boyunda pH 7'de 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı karıştırma hızlarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.14'teki ln (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.14. Farklı karıştırma hızları için ln (absorbans)-zaman grafiği

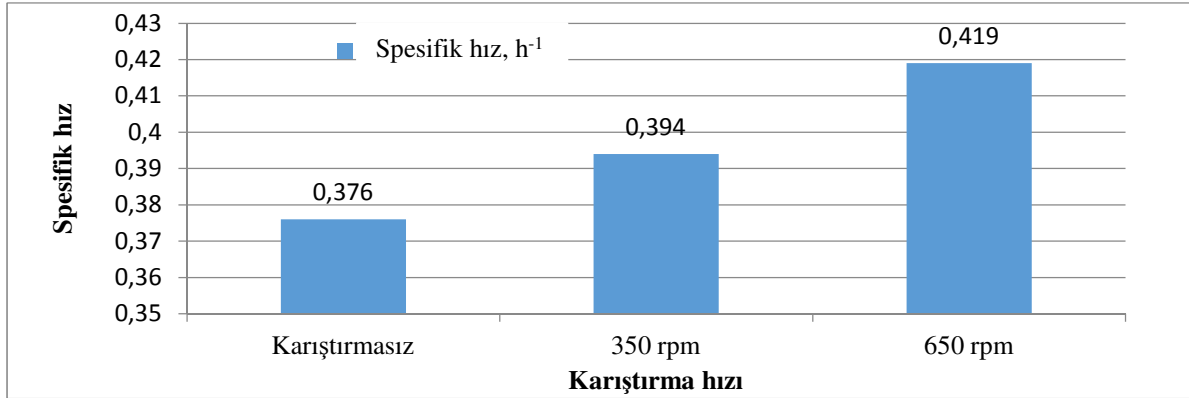
Karıştırmasız ortamda t_L 2, logaritmik evre 6 saattir. Mervel ve Prieur [36], *Bacillus* MS30'un standart ortamda (15 mM asetat ve 2,5 mM $(NH_4)_2SO_4$) optimum sıcaklıkta t_L süresini 3 saat, üstel fazını 12 saat; Liu ve diğerleri [42], *Bacillus shackletonii* K5'in glikoz ve mineral tuz çözeltisi ortamında t_L süresini 4 saat, üstel fazını 28 saat bulmuşlardır. Karıştırmasız ortamda t_L süresi 2 saat iken 350 rpm karıştırma hızında bu değer aynı kalmış ancak absorbans değerinde artış gözlenmiştir. 650 rpm'de ise t_L süresi gözlenmemesinin yanında en yüksek absorbans değerine ulaşılmıştır. Karıştırmasız ortamda logaritmik evre 2-8 saat; 350 rpm hızında 2-4,5 saat; 650 rpm'de 0-5,5 saatleri arasında tespit edilmiştir.

Karıştırmasız ortam için daha önce $\mu = 0,376 \text{ h}^{-1}$ ve $t_d = 1,84$ saat olarak bulunmuştur.

350 rpm için $\mu = 0,394 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,76$ saat

650 rpm için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,65$ saat

Farklı karıştırma hızlarında spesifik üreme hızları Şekil 4.15'te karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı karıştırma hızlarında elde edilen tüm veriler Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.



Şekil 4.15. Spesifik hızların karıştırma hızları ile değişimi

Çizelge 4.5. pH 7'de, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında elde edilen sonuçlar

Durum	Ortam	Absorbans (600 nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{max}$	İkilenme süresi, t _d
Karıştırmasız	NB	1,01	0,355	0,376	1,84 saat
350 rpm	NB	1,18	0,443	0,394	1,76 saat
650 rpm	NB	1,648	0,685	0,419	1,65 saat

Karıştırma ile besiyortamındaki çözülmüş oksijen miktarının, bakteri-substrat etkileşiminin ve bakteri-oksijen etkileşiminin artmasının yanı sıra mekanik etki ile substrat parçalanması da gerçekleşmektedir.

Karıştırma üreme üzerine olumlu etkide bulursa da eğer çok hızlı veya sert olursa mikroorganizmalarda ölümler de meydana gelebilmektedir.

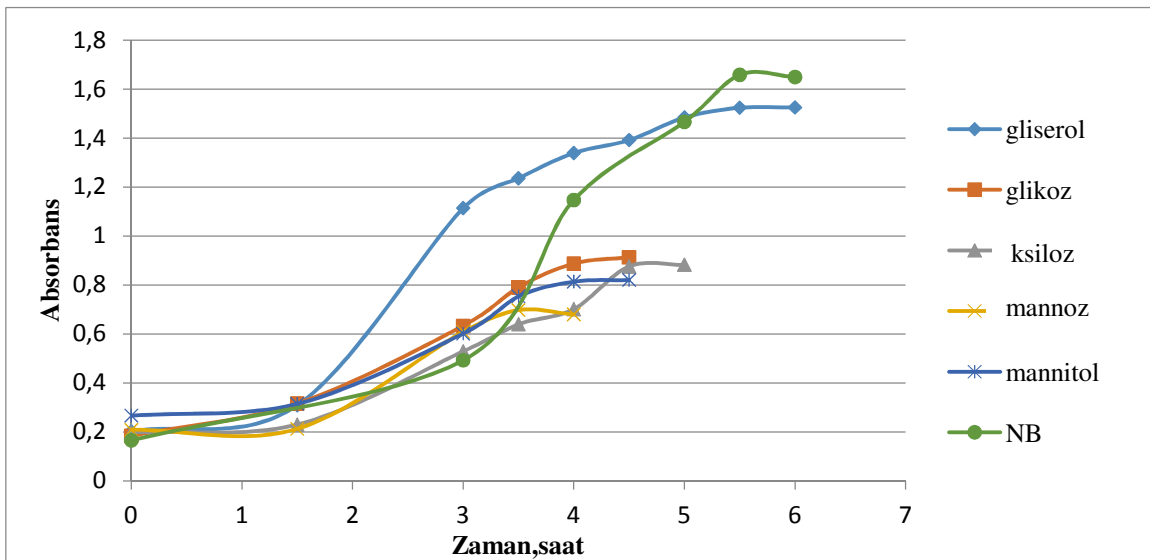
Karıştırma hızındaki artışın büyüme eğrisindeki logaritmik evreyi hızlandırdığı; bunun da süreyi kısalttığı görülmüştür. Şekil 4.14'teki logaritmik evredeki eğimine bakıldığında; karıştırma hızının artışına paralel olarak biyokütlenin arttığı tespit edilmiştir. Bunun yanında 650 rpm karıştırmanın olduğu ortam diğer ortamlarla karşılaştırıldığında; t_L süresinin 2 saat kadar kısaldığı belirlenmiş, böylece enerji ve zaman tasarrufu sağlandığı tespit edilmiştir. Adaptasyon süresinin azalarak bakteri sayısının artmasının nedeni olarak ortamdaki homojenizasyonun sağlanmasıdır. Artan çözülmüş oksijen, substrat-bakteri etkileşimi ve oksijen-bakteri etkileşimi büyüme üzerinde olumlu bir etki yapmaktadır.

Hızlara ve biyokütleyle bakılarak en iyi büyüme sırasıyla 650 rpm>350 rpm>karıştırmasız ortamda tespit edilmiştir. Baysak, *Rhizobium* suşlarının karıştırma hızlarındaki artışa paralel olarak hücre kuru ağırlıklarında da arttığını bildirmiştir [37]. Liu ve diğerleri de *Phaffia rhodozyma* mayası ile çalışırken 200 rpm’de 8 g kuru hücre/l, 250 rpm’de 10 g kuru hücre/l biyokütle ürettiğini tespit etmiş ve biyokütlenin karıştırmanın artmasıyla arttığını bildirmiştir [38]. Sonuçlar literatür araştırması ile uyumludur.

Farklı azot ve karbon kaynaklarının incelenmesi

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.

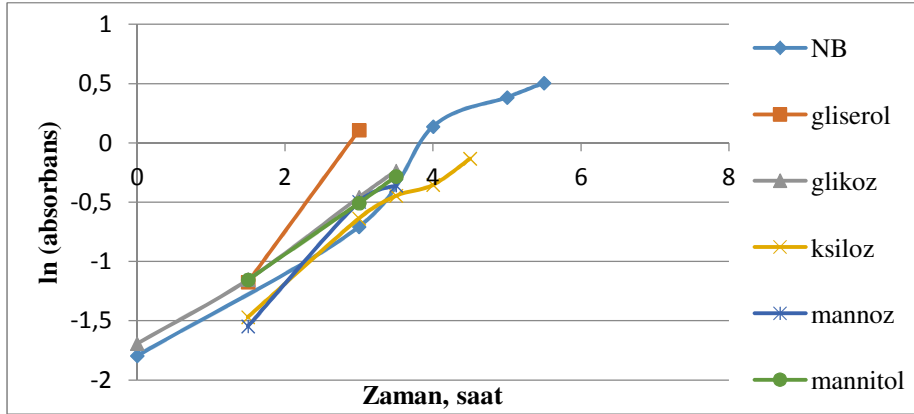
Pepton azot kaynağının varlığında karbon kaynağı olarak gliserol, glikoz, ksiloz, mannoz, D-mannitol kullanılmış; bulunan sonuçlar kontrol grubu olarak kabul edilen aynı şartlardaki nutrient broth (NB) ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.16’da görüldüğü gibidir.



Şekil 4.16. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı karbon kaynaklarının varlığında *B.thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.17’deki ln (absorbans)-zaman

grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.17. Farklı karbon kaynakları için ln (absorbans)-zaman grafiği

Glikoz ortamı hariç diğer tüm şartlarda t_L süreleri yaklaşık aynı ve 1,5 saat civarındadır. Tüm ortamların absorbans değerleri farklılık göstermektedir.

Nurtient broth için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1} - t_d = 1,65 \text{ saat}$

Gliserol için $\mu = 0,854 \text{ h}^{-1} - t_d = 0,81 \text{ saat}$

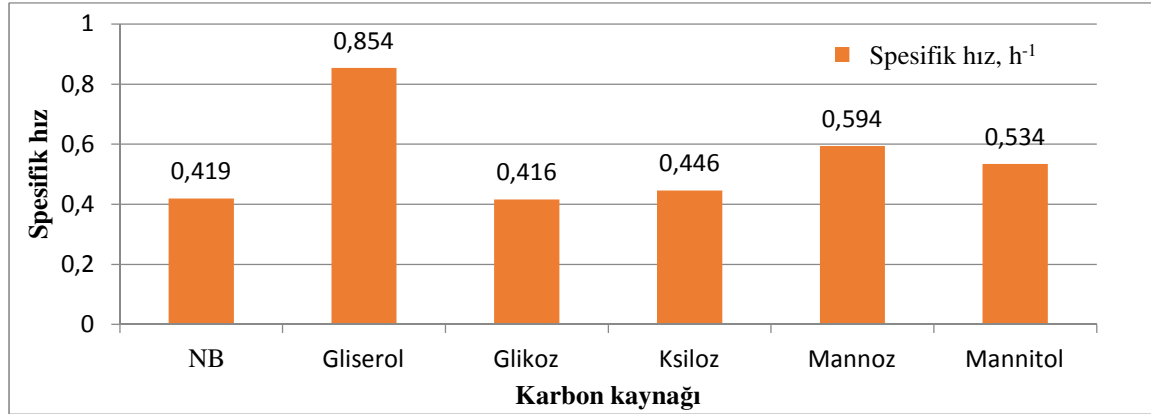
Glikoz için $\mu = 0,416 \text{ h}^{-1} - t_d = 1,67 \text{ saat}$

Ksiloz için $\mu = 0,446 \text{ h}^{-1} - t_d = 1,55 \text{ saat}$

Mannoz için $\mu = 0,594 \text{ h}^{-1} - t_d = 1,17 \text{ saat}$

Mannitol için $\mu = 0,436 \text{ h}^{-1} - t_d = 1,59 \text{ saat}$

Farklı karbon kaynaklarında spesifik üreme hızları Şekil 4.18'de karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı karbon kaynaklarında elde edilen tüm veriler Çizelge 4.6'da gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Spesifik hızların karbon kaynağı ile değişimi

Çizelge 4.6. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında elde edilen sonuçlar (N= Pepton)

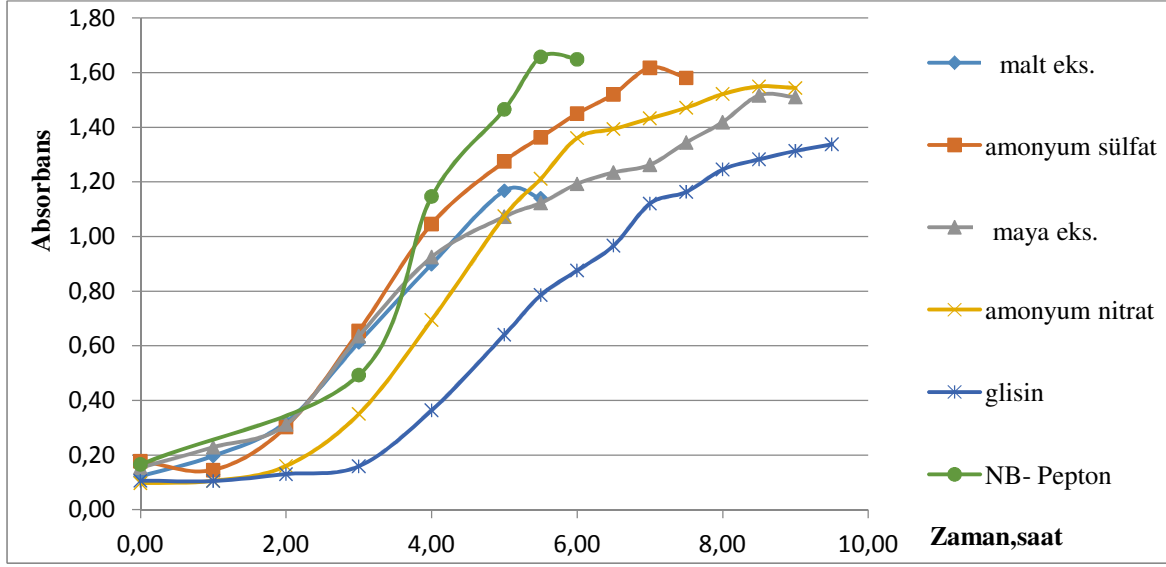
Ortam	Absorbans (600nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{max}$	İkilenme süresi, t_d
NB	1,648	0,685	0,419	1,65 saat
Gliserol	1,525	0,625	0,854	48,6 dk
Ksiloz	0,883	0,300	0,446	1,55 saat
Mannitol	0,821	0,258	0,436	1,59 saat
Glikoz	0,913	0,305	0,416	1,67 saat
Mannoz	0,680	0,183	0,594	1,17 saat

Kontrol grubu ile karşılaştırmalar yapıldığında gliserolün kullanımı ile büyümenin 2 kat kadar hızlı ancak biyokütleinin bir miktar az olduğu belirlenmiştir. Gliserol ortamında büyümenin bu denli verimli olması dehidrasyonun şiddetini azaltarak bakteriyi korumasından ve büyüme için elverişli ortam sağlamasından kaynaklanmaktadır [93]. Zaten gliserol sıklıkla büyüme ortamı olarak kullanılmaktadır. Örneğin Oh, Kim, ve Park; *B. subtilis* DB104 spoIIG'in büyümesini incelemek için gliserol stok çözeltisinde inkübe edip bu kültürden fermentör ortamına transfer etmiştir [94]. Gliserol (gliserin) biyodizel üretimi sırasında ortaya çıkan ve palmiye yağı rafine sürecinin bir yan ürünüdür [42, 52]. Bu nedenle yan ürünlerin değerlendirilmesinde ve ucuz bakteri üretiminde başvurulabilecek uygun bir karbon kaynağıdır.

Çalışmada kullanılan C kaynakları için elde edilen sonuçlara göre glikozda, mannozda, ksilozda ve mannitolde benzer sonuçların görülmesinin nedeni; mannoz, glikoz ve ksilozün monosakkarit, karbonhidrat alkolü olan mannitolün de ve genellikle glikozdan elde edilmesidir. Bu kaynaklar büyüme ortamında birbirinin yerine kullanılabilir ancak mannitol yüksek fiyatı nedeniyle endüstriyel proseslerde tercih edilen bir karbon kaynağı değildir. Büyüme ortamı olarak en düşük biyokütle mannoz ortamında bulunmuştur. Shing ve diğerleri 37°C’de 48 saat inkübe edimiş *B. thuringiensis* EUG45 ile farklı şeker ortamlarını (glikoz, sükroz, laktoz) çalıştıklarında, suşun en fazla %1 glikoz-%1 maya ekstraktı içeren ortamda büyüdüğünü bildirmişlerdir [24]. Rohini ve diğerleri, *B. thuringiensis* R1 için besi ortamına (%1 maya ekstraktı; %1 pepton; %0,1 Na₂HPO₄; %0,02 MgSO₄) %1 farklı C kaynakları (gliserol, glikoz, melas, sofr şeker, maltoz, laktoz, fruktoz, asetik asit, laktik asit, etanol, β-hidroksibütirik asit) koyduğunda maksimum kuru hücre ağırlığını (3,90 g/l) gliserolde tespit etmişlerdir [70].

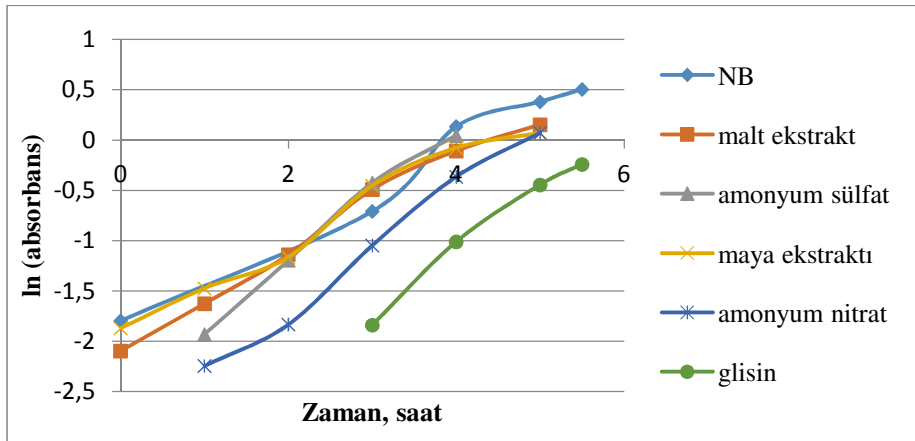
Birçok çalışmada; *Bacillus* sp.’nin organik asit, alkol, şeker karbon kaynaklarını içeren ortamlarda iyi geliştirdiği bildirilmiştir [11]. *B. cepacia* ATCC 17759, *Bacillus* sp. WN11 ve *B. megaterium* suşunun ksilozda; *B. thuringiensis* HD-1, *B. thuringiensis* D1 ve D2’nin glikozlu ortamda maksimum büyüme tespit edilmiştir [23, 53, 58, 68]. Literatür, çalışmanın sonuçlarını desteklemektedir.

Bu çalışmada; azot kaynağı olarak malt ekstrakt, amonyum sülfat, maya (yeast) ekstraktı, amonyum nitrat ve glisin kullanılmıştır. Bulunan sonuçlar kontrol grubu olarak kabul edilen aynı şartlardaki nutrient broth ile karşılaştırılmış ve Şekil 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.19. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı azot kaynaklarında *B. thuringiensis* için büyüme eğrisi grafiği

Farklı azot kaynaklarının varlığında *B. thuringiensis* RSKK 381’in spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.20’deki $\ln$ (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel’in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.20. Farklı azot kaynakları için $\ln$ (absorbans)-zaman grafiği

Amonyum sülfat ve amonyum nitratta 1 ve glisinde 3 saatlik t_L süresi gözlenmiştir. Maya ekstraktı ve malt ekstraktta ise t_L süresi gözlenmemiştir.

Nutrient broth için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,65$ saat

Malt ekstraktı için $\mu = 0,451 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,54$ saat

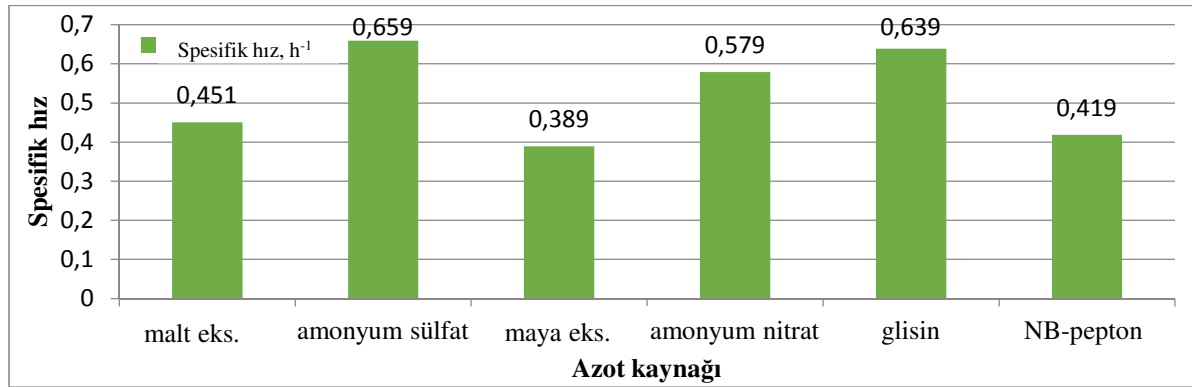
Amonyum sülfat için $\mu = 0,659 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,05$ saat

Maya ekstraktı için $\mu = 0,389 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,78$ saat

Amonyum nitrat için $\mu = 0,579 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,2$ saat

Glisin için $\mu = 0,639 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,09$ saat

Farklı azot kaynaklarında spesifik üreme hızları Şekil 4.21’de karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı azot kaynaklarında elde edilen tüm veriler Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.21. Spesifik hızların azot kaynağı ile değişimi

Çizelge 4.7. pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı azot kaynaklarında elde edilen sonuçlar (C= Et ekstraktı)

Ortam	Absorbans (600 nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{\max}$	İkilenme süresi, t_d
Nutrient broth	1,648	0,685	0,419	1,65 saat
Malt ekstraktı	1,141	0,423	0,451	1,54 saat
Maya ekstraktı	1,511	0,615	0,389	1,78 saat
Amonyum sülfat	1,580	0,65	0,659	1,05 saat
Amonyum nitrat	1,544	0,633	0,579	1,2 saat
Glisin	1,138	0,421	0,639	1,09 saat

Azot elementi hücreninin temeli olan proteinlerin, nükleik asitlerin, hormon ve enzimlerin yapısına katılır [9]. Sınırlanan azot konsantrasyonu mikroorganizmaların biyolojik aktivitelerini yavaşlatmakta ve azalan mikrobiyal büyüme katsayıları ile mikroorganizma konsantrasyonunun azalmasına yol açmaktadır [9, 49]. Oh, Kimand ve Park; *B. subtilis* DB104 spoIIG'in glikoz-pepton ortamında (pH 6,8 ve 37°C) büyümesini incelemişlerdir. Ortamda azot kaynağı olmadığında büyümenin yavaş, ortama pepton eklendikçe hücre konsantrasyonunun da arttığını bildirmişlerdir [93].

Kullanılan tüm azot kaynaklarında bakteri büyüme evreleri boyunca yüksek absorbans değerleri gösterirken glisin ortamında büyüme evreleri boyunca düşük absorbans değerleri elde edilmiştir. Özellikle yüksek B vitamini, aminoasit, peptid, vitamin, karbonhidrat ve mineral madde içeriği ile mikroorganizmaların gelişimini teşvik edici özelliği olan maya ekstraktı ve amonyum tuzları olan amonyum sülfat ve amonyum nitratın biyokütle değerleri kontrol ortamına (nutrient broth) oldukça yakındır. Bu 3 kaynak içinde amonyum tuzlarının oldukça yüksek üreme hızlarına ulaştığı görülmüştür. Özellikle amonyum sülfat, topraktaki azotun da genellikle sülfat formu olmasından dolayı bir toprak bakteri olan bu tür için en iyi büyüme ortamını sağlamıştır. Artan üreme hızı ile zamandan ve enerjiden tasarruf sağlanabilir. Malt ekstrakt ve glisin olan ortamlarda düşük absorbans değerleri gözlenmiş ve her ikisi de kontrol grubunun altında kalmıştır. Ancak amonyum sülfat ve glisin hemen hemen aynı hızları vermiş, en yavaş ve en az üreme malt ekstrakt ortamında gerçekleşmiştir.

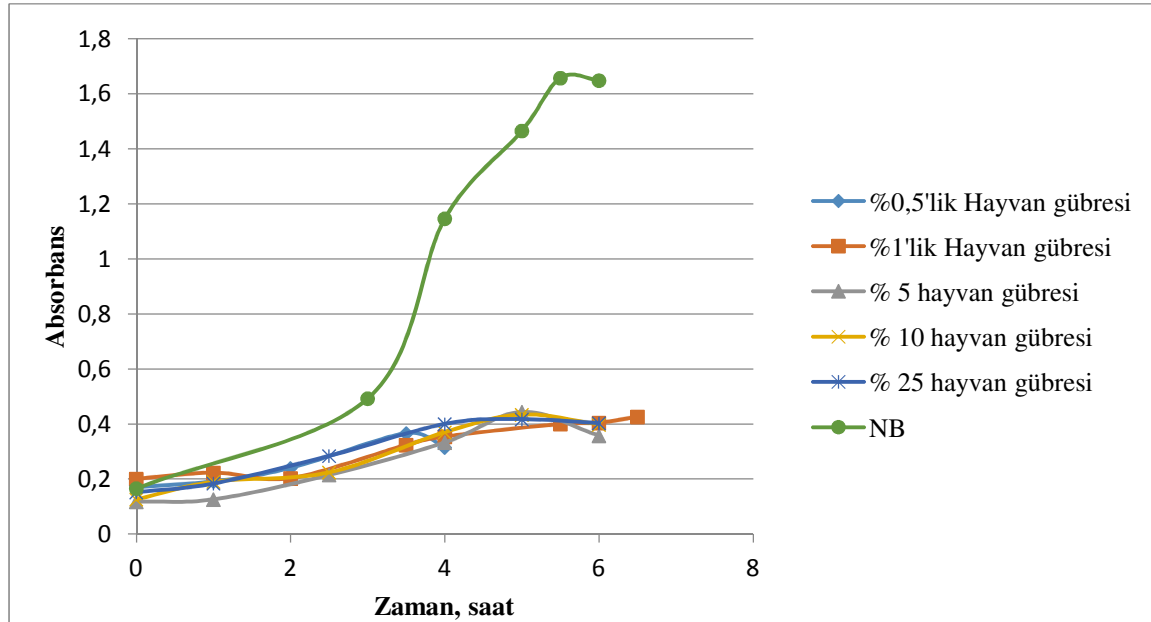
Literatür çalışmasında *Bacillus* sp.'nin azot kaynağı olarak amonyum içeren ortamlarda iyi geliştikleri görülmüştür [11]. Birçok çalışmada *Bacillus* sp. için azot kaynağı olarak kullanılan inorganik kimyasalların (amonyak ya da amonyum tuzları gibi) büyüme fazında biyokütleyi arttırmak için gerekliliği rapor edilmiştir [27]. Gomaa, *Bacillus subtilis* AJ-3 için amonyum sülfatın (36,98 g/l KHA) en iyi azot kaynağı olduğunu bildirmiştir [27]. Mamo ve Gessesse, bazal ortamda farklı azot kaynaklarının (pepton, trypton, maya ekstraktı) *Bacillus* sp. WN11'in büyüme eğrisine etkisini incelemişler ve en uygun azot kaynağının pepton olduğunu ve maya ekstraktının büyümede yeterli azot desteğini sağlayamadığını tespit etmişlerdir [23].

Gübrelerin büyüme eğrisine etkisi

Çeşitli metabolitlerin eldesi için mikroorganizmaların izole edildiği ortamlar da endüstriyel proseslerde önemlidir. PHB gibi primer bir metabolite yönelik PHB üreticisi *Bacillus* sp.'lerin de izolasyonu için en uygun ortam topraktır. Bu çalışmada kullanılan *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu da bir toprak izolatıdır. Bu suşun tarımsal uygulamaların yapıldığı topraklardaki büyüme ve PHB üretme kapasitesini belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik çeşitli gübrelerin (hayvansal, kimyasal ve organik gübre) farklı konsantrasyonları denenmiştir (pH=7, 650 rpm karıştırma ve 30°C 48 saat inkübasyon şartında).

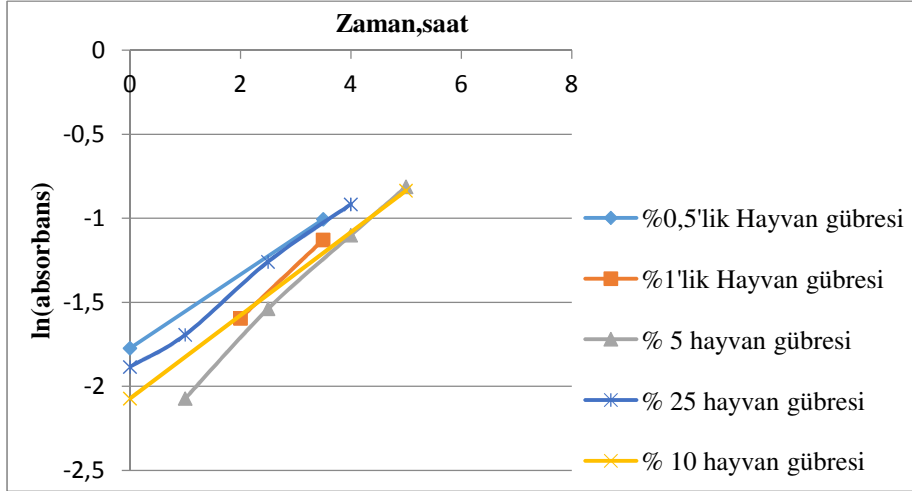
Hayvansal gübre içerisinde (H.G.-koyun gübresi) firma beyanına yönelik su, organik madde (azot vb.)ve inorganik madde (fosfor, kalsiyum, potasyum vb.) bulunmaktadır. Çalışmada koyun gübresi kullanılmıştır.

Havyan gübresi denemeleri için %0,5-1-5-10-25 konsantrasyonları hazırlanmıştır. Veriler Şekil 4.22'de gösterilmiştir.



Şekil 4.22. 600 nm dalga boyunda pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı hayvan gübresi derişimlerinde *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Bu şartlara *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.23'teki $\ln$ (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır. Veriler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır [39].



Şekil 4.23. Farklı hayvan gübresi derişimleri için $\ln$ (absorbans)-zaman grafiği

%0,5'lik hayvan gübresi içeren besiyerinde t_L süresi gözlenmemiş ve logaritmik evre 0-3,5 saat arasında görülmüştür. %1'lik hayvan gübresi içeren besiyerinde t_L 2 saat bulunmuş, logaritmik evrenin 2-3,5 saat arasında olduğu tespit edilmiştir. %5'lik hayvan gübresi içeren besiyerinde t_L 1 saate inmiştir. Logaritmik evrenin 1-5 saat olduğu bulunmuştur. %10'lik hayvan gübresi içeren besiyerinde ise t_L tespit edilememiştir ve logaritmik evrenin 0-5 saat arasında olduğu tespit edilmiştir. %25'lik hayvan gübresi içeren besiyerinde de t_L belirlenmemiş ve logaritmik evre 0-4 saat arasında bulunmuştur. Bu veriler ışığında %5'lik hayvan gübresi içeren besiyeri en uygun olarak belirlenmiştir.

Nutrient broth için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,65$ saat

%0,5'lik hayvan gübresi için $\mu = 0,219 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 3,16$ saat

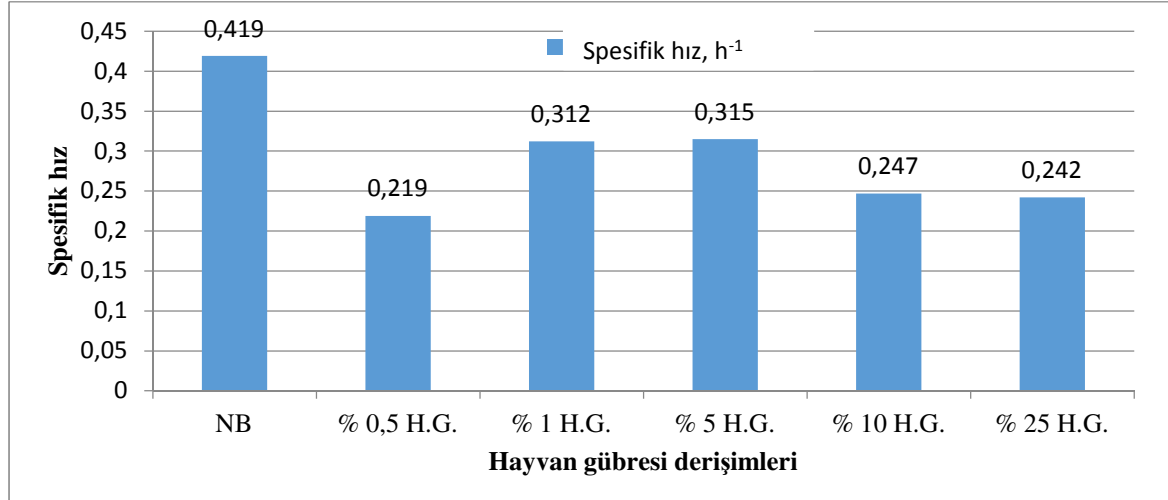
%1'lik hayvan gübresi için $\mu = 0,312 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,22$ saat

%5'lik hayvan gübresi için $\mu = 0,315 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,2$ saat

%10'luk hayvan gübresi için $\mu = 0,247 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,81$ saat

%25'lik hayvan gübresi için $\mu = 0,242 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,86$ saat

Farklı derişimlerdeki hayvan gübrelere spesifik üreme hızları Şekil 4.24’de karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı derişimlerdeki hayvan gübrelere elde edilen tüm veriler Çizelge 4.8’de gösterilmiştir.



Şekil 4.24. Spesifik hızların farklı hayvan gübresi derişimleri ile değışimi

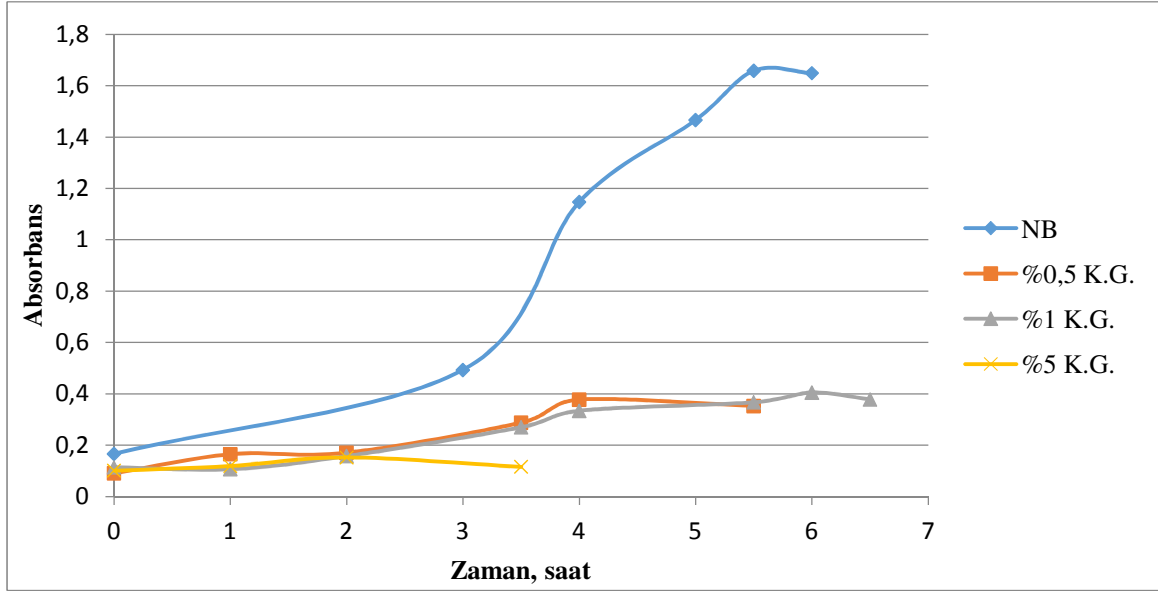
Çizelge 4.8. Farklı hayvan gübresi derişimlerinden elde edilen sonuçlar

	Bileşimi	Hacim, ml	pH	Absorbans (600 nm)	Kuru ağırlık, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{max}$	İkilenme süresi, t _d
	NB	100	7	1,648	0,685	0,419	1,65 saat
Hayvan gübresi	% 0,5 (w/v)	90	6,9	0,366	0,0298	0,219	3,16 saat
	% 1 (w/v)	92	7	0,426	0,05	0,312	2,22 saat
	% 5 (w/v)	80	7,0	0,444	0,068	0,315	2,2 saat
	% 10 (w/v)	75	7,2	0,434	0,055	0,247	2,81 saat
	% 25 (w/v)	68	7,3	0,417	0,046	0,242	2,86 saat

Derişimle absorbans doğru orantılı gözükse de %5’lik derişimden yüksek derişime geçilince absorbansın ve spesifik hızın azaldığı Çizelge 4.8’de görülmektedir.

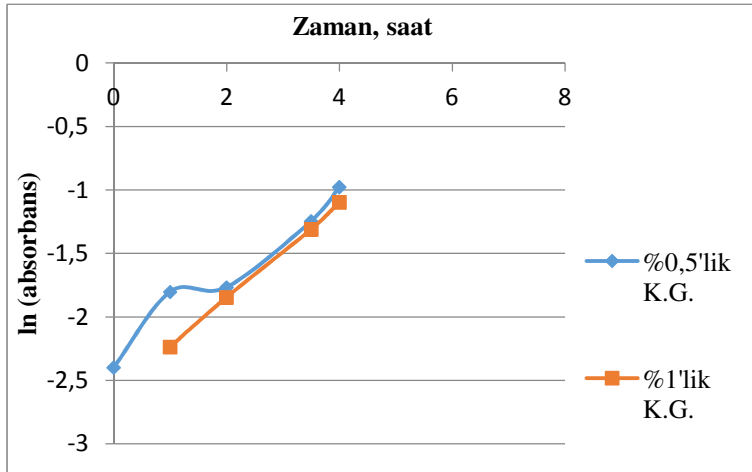
Kimyasal gübre olarak Toros marka 20.20.0 kompoze kimyasal gübre içerisinde; %20 azot (amonyum azotu ve üre azotu), %20 fosfor (P₂O₅) bulunmaktadır. 20.20.0 gübresi fosfor ve azot bakımından zengin ancak potasyum bakımından fakirdir [89].

Kimyasal gübre (K.G.) konsantrasyonları %0,5-1-5-10-25 değişen oranlarda hazırlanmıştır. Veriler Şekil 4.25’de verilmiştir. %1’lik konsantrasyondan sonra büyüme gözlenmemiştir.



Şekil 4.25. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı kimyasal gübre derişimlerinde *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırtmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.26’daki ln (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel’in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.26. Farklı kimyasal gübre derişimleri için ln (absorbans)-zaman grafiği

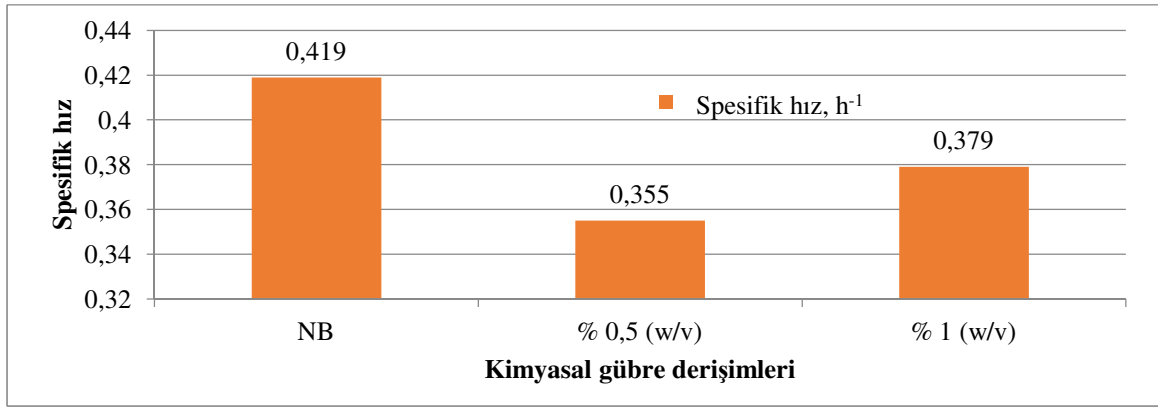
%0,5'lik gübre içeren besiyerinde t_L süresi hesaplanamamış, %1'lik gübre içeren besiyerinde t_L 1 saat olarak gözlenmiştir.

Nutrient broth için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,65$ saat

%0,5'lik kimyasal gübre için $\mu = 0,355 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,95$ saat

%1'lik kimyasal gübre için $\mu = 0,379 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,83$ saat

Farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde spesifik üreme hızları Şekil 4.27'de karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde elde edilen tüm veriler veriler Çizelge 4.9'da gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Spesifik hızların farklı kimyasal gübre derişimleri ile değişimi

Çizelge 4.9. Farklı kimyasal gübre derişimlerinden elde edilen sonuçlar

Gübre	Bileşimi	Hacim, ml	PH	Abs (600 nm)	Kuru ağırlık, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{\max}$	İkilenme süresi, t_d
	NB	100	7	1,648	0,685	0,419	1,65 saat
Kimyasal gübre	% 0,5 (w/v)	92	7,5	0,377	0,03	0,355	1,95 saat
	% 1 (w/v)	96	7,5	0,405	0,04	0,379	1,83 saat

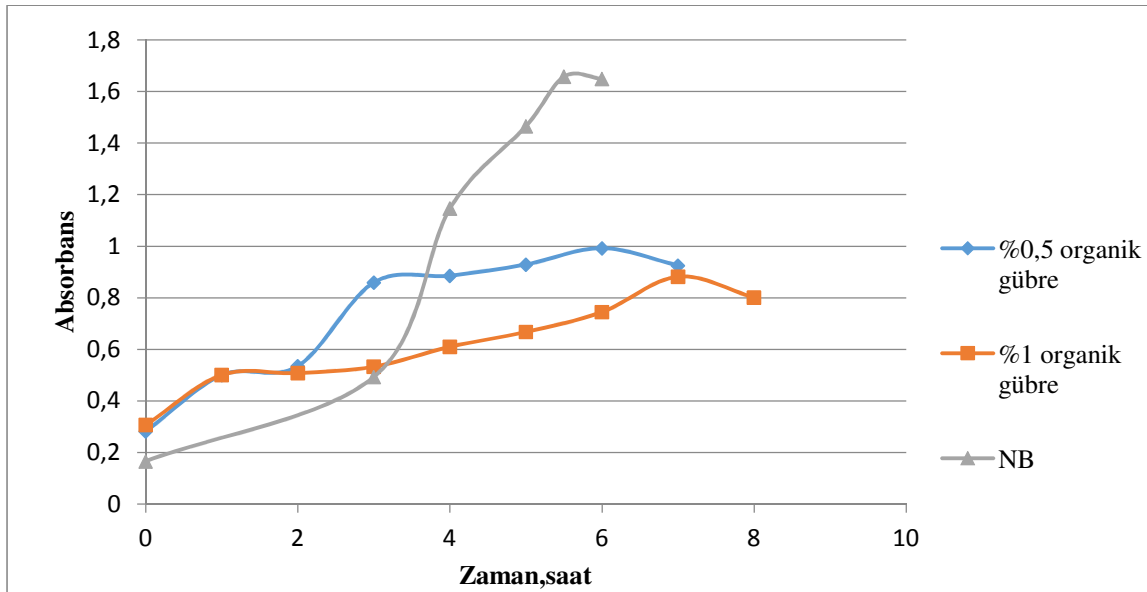
Kimyasal gübre derişimindeki artış başta olumlu etki yapsa da %1'den %5'e geçilince bakteri üzerinde toksik etki gözlenmiş ve büyüme gözlenmemiştir. Düşük derişimli

kimyasal gübrenin varlığı bakteri büyümesi için yeterli görülmüştür. Absorbans ve spesifik üreme hız göz önüne alınarak optimum derişim %1 olarak bulunmuştur.

Superdoll marka organik gübre içeriğı; %20 yosun (*Ascophyllum nodosum*), %10 aminoasit, %4 K₂O, %2 organik azot %2,5 alginik asit ve sudan oluşmaktadır. 100'den fazla yosun türü içerdikleri protein, karbonhidrat, vitamin ve minerallerin varlığından dolayı dünyanın çeşitli yerlerinde besin kaynağı olarak kullanılırlar. Deniz yosunları değişik oranlarda biyolojik uyarıcılar, besleyiciler ve karbonhidratlar içerir [91].

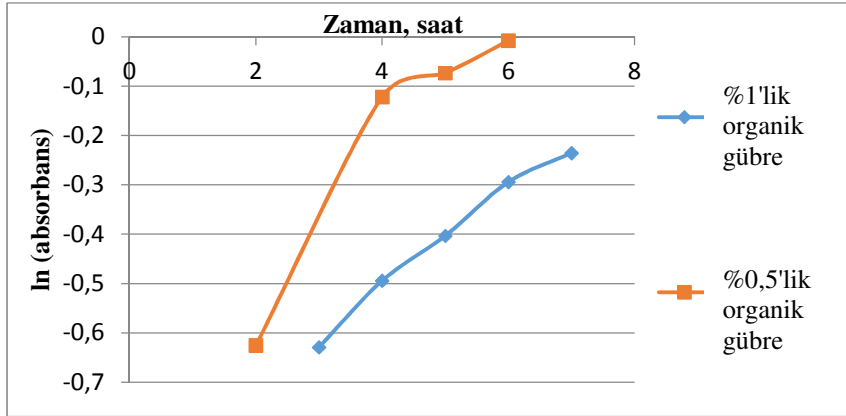
Organik gübreler farklı konsantrasyonlarda (%0,5-1-5-10-25) hazırlandıktan sonra 2 kez filtreden geçirilmiş ve absorbans değerleri okunmuştur. Veriler Şekil 4.28'de verilmiştir.

%5, %10 ve %25'te bir büyüme tespit edilememiştir. Bunun sebebi ise yoğun besiyortamının bakteri üzerinde substrat inhibisyonuna neden olmasındandır.



Şekil 4.28. 600 nm dalga boyunda pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı organik gübre derişimlerinde *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiğı

Farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde *B. thuringiensis* RSKK 381'in spesifik üreme hızları da araştırtmıştır. Hızlar ikilenme süreleri Şekil 4.29'deki ln (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır. Veriler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır [39].



Şekil 4.29. Farklı organik gübre derişimleri için ln (absorbans)-zaman grafiğı

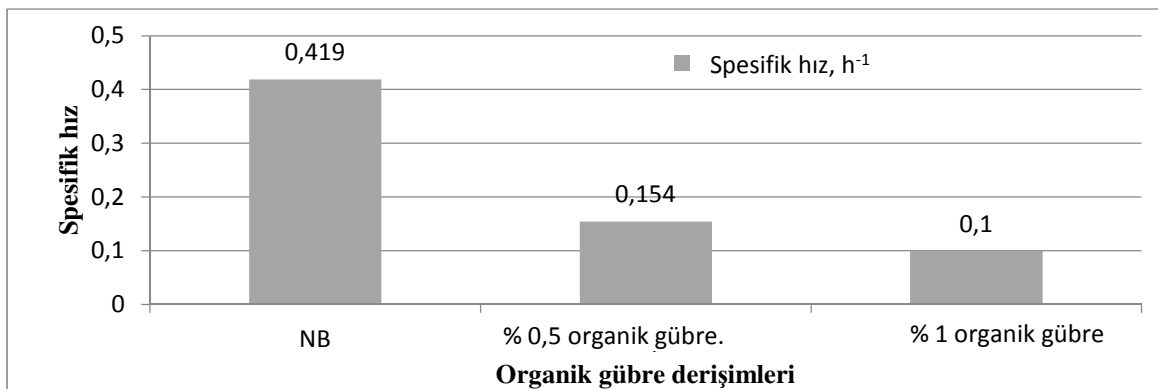
%0,5'lik ortamda t_L süresi 2 saat olarak bulunmuştur. Derişim artışı ile t_L süresi artmıştır. %1 derişimli organik gübrede %0,5'lik ortama kıyasla absorbans değerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

Nutrient broth için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,65$ saat

%0,5'lik organik gübre için $\mu = 0,154 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 4,5$ saat

%1'lik organik gübre için $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 6,93$ saat

Farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde spesifik üreme hızları Şekil 4.30'da karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde elde edilen tüm veriler veriler Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.



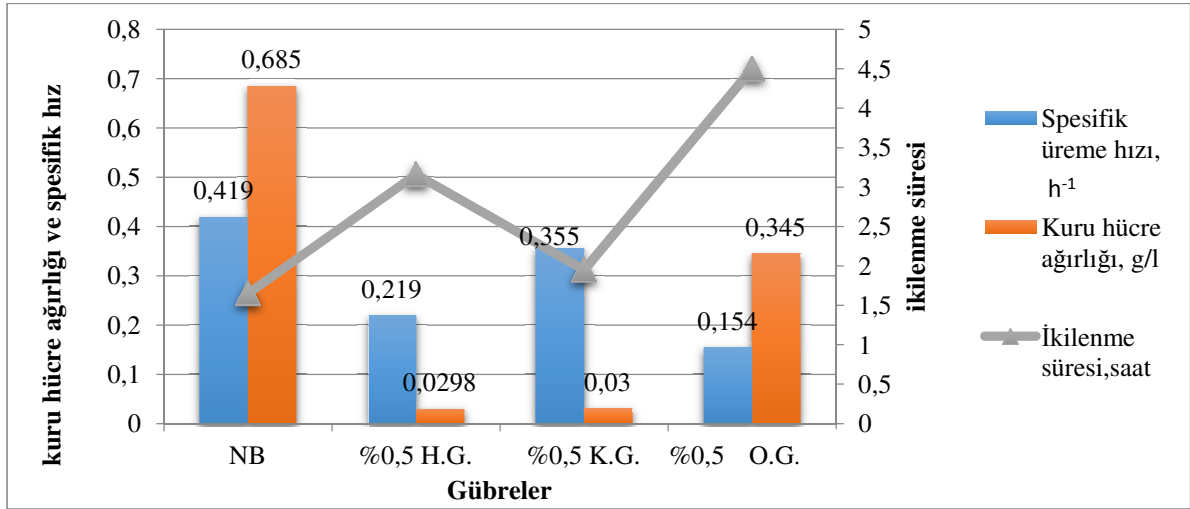
Şekil 4.30. Spesifik hızların farklı organik gübre derişimleri ile değişimi

Çizelge 4.10. Farklı organik gübre derişimlerinden elde edilen sonuçlar

Gübre	Bileşimi	Hacim, ml	pH	Abs (600nm)	Kuru ağırlık, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{max}$	İkilenme süresi, t_d
	NB	100	7	1,648	0,685	0,419	1,65 saat
Organik gübre	% 0,5(v/v)	97	7,5	0,992	0,345	0,154	4,5 saat
	% 1 (v/v)	89	7,9	0,801	0,288	0,100	6,93 saat

Organik gübrede % 1 üzerindeki derişimlerde büyüme tespit edilmemiştir. Bunun sebebi substratın fazlalığının bakteri üzerinde toksik etki yapması olabilir.

Aynı şartlardaki gübreler kendi aralarında karşılaştırıldığında Şekil 4.31’de yer alan sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.31. Spesifik hızların, ikilenme sürelerinin ve kuru hücre ağırlıklarının eşit derişimli farklı gübreler ile değişimi

Aynı derişimli farklı gübreler içinde en hızlı büyüme kimyasal gübrede olmasına karşın en yüksek kuru hücre ağırlığı organik gübrede tespit edilmiştir.

Kompoze gübreler bitkiye yönelik tasarlandığından bünyesinde bolca azot ve fosfor bulundurur. Belli oranlarda azot ve fosfor; bakteri büyümesini desteklemiş ve

hızlandırmıştır. Azotça zengin ancak karbonca fakir olan kimyasal gübrede C/N oranının azlığı ve potasyum gibi mikrobelerin fakir olması hücre oluşumunu kısıtlamıştır. Hayvan gübresi, kimyasal gübreyle oranla azotça daha zengin, mikrobelerden olan Ca K, P'ca da desteklidir. Bu nedenle kimyasal gübreyle oranla bir miktar daha fazla üreme tespit edilmiştir.

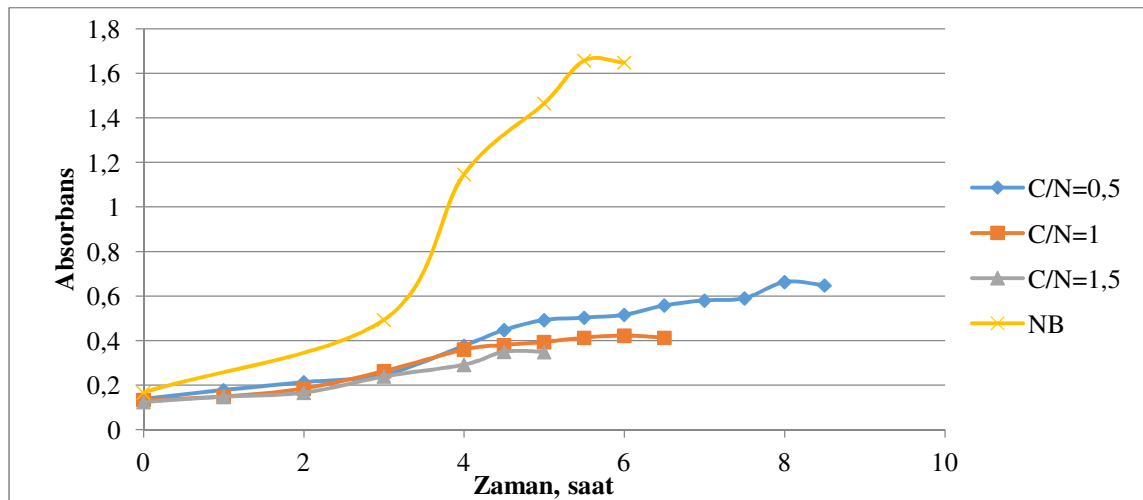
Organik gübre ise diğer gübrelere oranla makro ve mikrobelerin açısından daha zengindir. Bu nedenle bakteri büyümesini de desteklemiştir.

Büyüme hızı açısından kullanılan gübreler karşılaştırıldığında büyüme hızı en yüksek kimyasal gübrede ($0,355 \text{ h}^{-1}$) bulunmuştur. Kuru hücre ağırlığı açısından ise organik gübrenin ($0,345 \text{ g/l}$) daha verimli olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen verilere göre organik tarım uygulamalı toprakların bakteri büyümesi için daha elverişli olduğu söylenebilir.

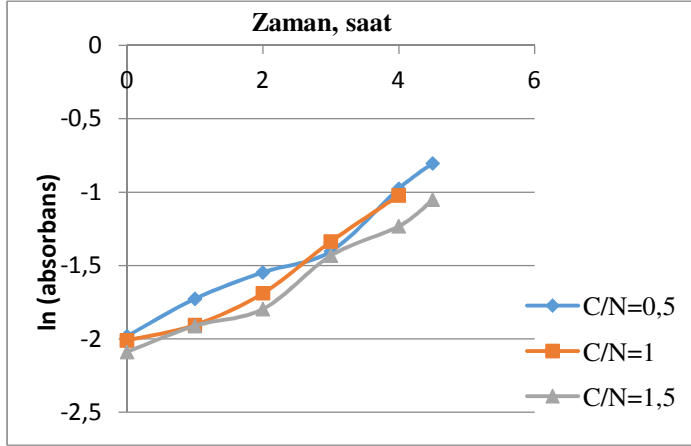
C/N oranının etkisinin tespiti

Azot ve karbon kaynağı farklı oranlarda denenmiştir. Bunun için amonyum nitrat ve mannoz ve C/N=0,5-1-1,5 kullanılmıştır. Elde edilen eğriler Şekil 4.32'deki gibidir. Veriler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.32. 600 nm dalga boyunda pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı C/N oranlarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı C/N oranlarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.33'deki ln (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel'in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.33. Farklı C/N oranları için ln (absorbans)-zaman grafiği

C/N=0,5 için t_L hesaplanamamıştır. Bu oran için logaritmik evre 0-4,5 saat aralığında belirlenmiştir. C/N=1 için t_L süresi dakikalar boyutunda olmuş ve hızla 4 saat süren logaritmik döneme girilmiştir. C/N=1,5 için de t_L süresi hesaplanamamış olup 4,5 saatlik bir logaritmik dönem tespit edilmiştir. En düşük C/N oranında en yüksek kuru hücre ağırlığı ve spesifik hız bulunurken bu oranın artması ile büyümenin olumsuz etkilendiği gözlenmiştir.

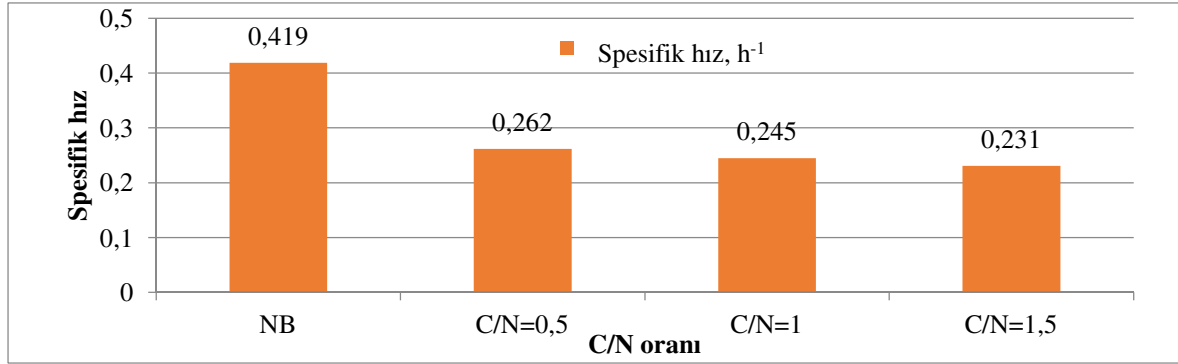
Nutrient broth için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 1,65$ saat

C/N = 0,5 için $\mu = 0,262 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,65$ saat

C/N = 1 için $\mu = 0,245 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,83$ saat

C/N = 1,5 için $\mu = 0,231 \text{ h}^{-1}$ – $t_d = 2,77$ saat

Farklı C/N oranlarında spesifik üreme hızları Şekil 4.34'de karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı C/N oranlarında elde edilen tüm veriler Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.34. Spesifik hızların C/N ile değişimi

Çizelge 4.11. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı C/N oranlarından elde edilen sonuçlar

Ortam	Absorbans (600 nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{\max}$	İkilenme süresi, t_d
NB	1,648	0,685	0,419	1,65 saat
C/N=0,5	0,648	0,166	0,262	2,65 saat
C/N=1	0,413	0,045	0,245	2,83 saat
C/N=1,5	0,349	0,012	0,231	2,77 saat

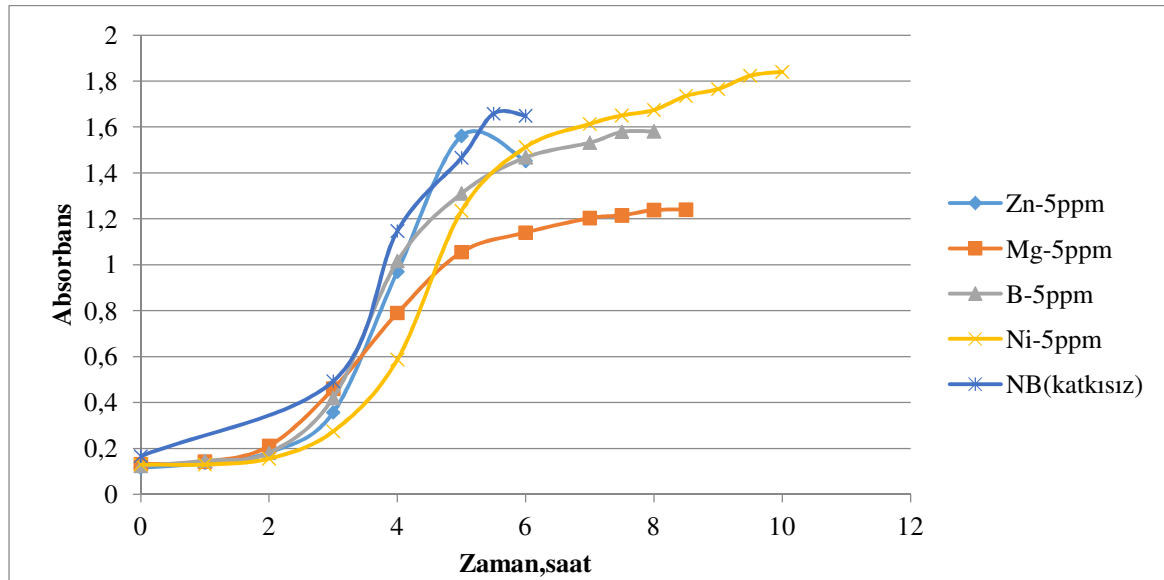
Azot büyüme adına, karbon ise depolama adına önemli birer makroelementtir. *Bacillus* sp. karbon dışındaki substratın ortamda olduğu “rahat” şartlarda depo yapmak yerine büyümeye yönelir. C/N oranındaki azalma yani ortamdaki azotun artışı büyümeyi destekleyici bir unsurdur yani, kuru hücre ağırlığı C/N oranı ile ters orantılıdır. Literatür taraması da bu çıkarımı desteklemektedir. Zhang ve diğerleri karbon kaynağı hidrolize palmye demeti ve azot kaynağı tripton varlığında *Bacillus megaterium* R11 ile 15:1-15:6 arasındaki C/N oranlarını denemiş, en düşük kuru hücre ağırlığını C/N 15:1 olduğunda bulmuşlardır [76]. Yine Aydoğmuş, aktif çamur ile biyoreaktörde 15-50-100-∞ mg-asetat/mg-amonyum oranlarını incelemiş ve amonyum miktarı azaldıkça büyüme veriminin de azaldığını tespit etmiştir [9].

Spesifik hız ve biyokütle miktarı göz önünde bulundurularak, çalışmada büyüme için en uygun ortam C/N=0,5 tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuç literatürle uyumludur.

Metal iyonlarının büyüme eğrisine etkisi

Metal iyonlarının büyüme eğrisine olan etkisini incelemek için çeşitli metal iyonları 5 ppm derişimde nutrient broth ortamına eklenerek kontrol grubu ile karşılaştırılmışlardır. Metallerin seçiminde, toprakta bulunan ve bir toprak bakterisinin karşılaştığı mikrobelerin ve iz elementler göz önüne alınmıştır. Tek derişim çalışılarak hangi katkının ne oranda etkili olduğunu tespit etmek amaçlanmıştır. Düşük derişimin kullanılmasında kullanılacak ilaveler içinde iz elementlerin oluşu etkili olmuştur.

Deney boyunca 650 rpm karıştırma hızında, pH 7’de, 30°C inkübasyon sıcaklığında ve 48 saat inkübasyon süresinde çalışılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.35’de verilmiştir.



Şekil 4.35. 600 nm dalga boyunda pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 30°C ve 2 günlük inkübasyonda farklı metal iyonlarının *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için büyüme eğrisi grafiği

Farklı metal katkılı ortamlarda *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun spesifik üreme hızları da araştırılmıştır. Hızlar ve ikilenme süreleri Şekil 4.36’daki ln (absorbans)-zaman grafiğinin eğimi kullanarak hesaplanmıştır. Sonuçlar Widdel’in çalışması baz alınarak Eş. 2.9 ve Eş. 2.21 ile hesaplanmıştır [39].



Şekil 4.36. Farklı metal iyonları için ln (absorbans)-zaman grafiği

Tüm iyonların ilavesi ile 1-2 saatlik t_L süreleri (5 ppm Mg 1 saat, diğerleri 2 saat) bulunmuştur. Nikel ilaveli ortamda absorbans değerinin kontrol grubundan yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunların dışında kalan tüm ilave iyonlar absorbansı düşürüp büyümeyi kötüleştirmiştir.

Nutrient broth için $\mu = 0,419 \text{ h}^{-1} - t_d = 1,65 \text{ saat}$

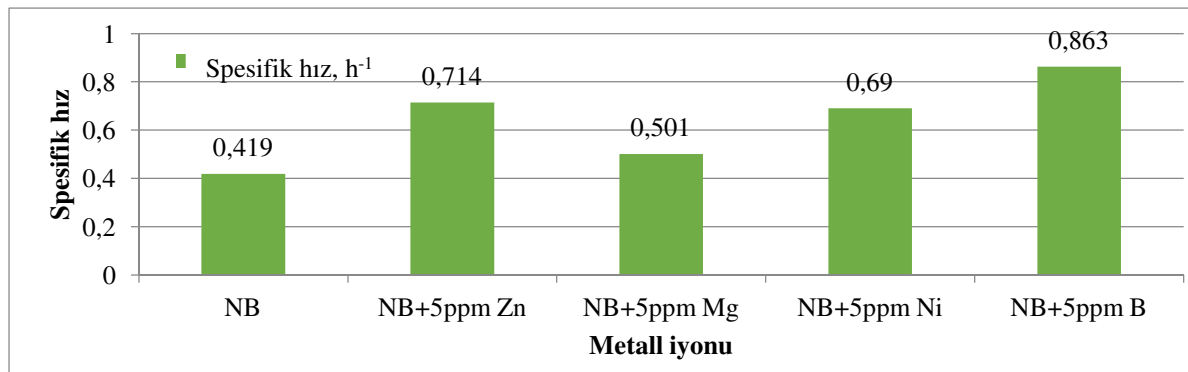
NB + 5 ppm çinko ilavesi için $\mu = 0,714 \text{ h}^{-1} - t_d = 0,97 \text{ saat}$

NB + 5 ppm magnezyum ilavesi için $\mu = 0,501 \text{ h}^{-1} - t_d = 1,38 \text{ saat}$

NB + 5 ppm bor ilavesi için $\mu = 0,863 \text{ h}^{-1} - t_d = 0,8 \text{ saat}$

NB + 5 ppm nikel ilavesi için $\mu = 0,690 \text{ h}^{-1} - t_d = 1 \text{ saat}$

Farklı metal iyonları varlığında spesifik üreme hızları Şekil 4.37'de karşılaştırmalı şekilde gösterilmiştir. Farklı metal iyonları varlığında elde edilen tüm veriler Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Spesifik hızların metal iyonları ile değişimi

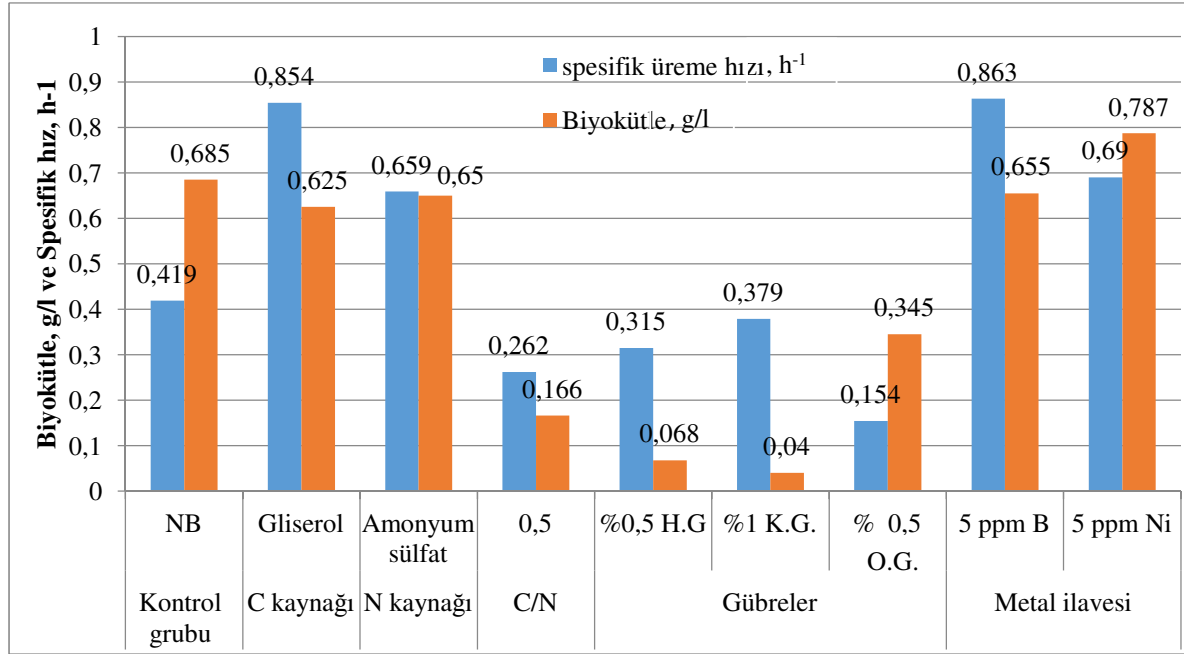
Çizelge 4.12. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı metal iyonlarından elde edilen sonuçlar

Ortam	Absorbans (600 nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	Spesifik üreme hızı, $\mu=\mu_{\max}$	İkilenme süresi, t_d
NB	1,648	0,685	0,419	1,65 saat
NB	5 ppm Zn	1,561	0,714	58,24 dk
	5 ppm Mg	1,241	0,501	1,38 saat
	5 ppm Ni	1,840	0,690	1 saat
	5 ppm B	1,580	0,863	48 dk

Tüm metal iyonlarının ilavesinden spesifik hızlar olumlu etkilenmiştir. Ortama eklenen nikel ve bor üreme hızını yaklaşık 2 kat arttırmıştır. Bunun yanında çinko ilavesinin de hız üzerinde oldukça etkili olduğu görülmüştür.

Metallerden yalnızca nikel absorbans değerinde artış sağlamıştır, diğer tüm metal ilavelerinin absorbans değerleri kontrol grubunun altında kalmıştır. Magnezyum ve bor mikrobelerin grubunda yer alır ve genellikle büyümeyi destekleyici elementlerdir. Ancak yapılan çalışmada *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için bu durumun geçerli olmadığı saptanmıştır. Özellikle magnezyum ilaveli ortam en düşük biyokütleli ve en yavaş büyüme ortamı olmuştur. Nikel ve çinko iz elementler olup mikroorganizma için eser miktarda kullanılmaları yeterlidir. Çalışmada *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu için düşük derişimin kullanılması iz elementlerin olumlu sonuçlar vermesini sağlamıştır. Özellikle nikel hem biyokütleyi hem de hızı yükseltmiştir.

Kontrol grubuna karşı değiştirilen tüm şartlar (C ve N kaynakları, metal iyonları, gübre kullanımı, C/N oranı) ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.38'de gösterilmiştir.



Şekil 4.38. Kontrol grubu ile değiştirilen şartların karşılaştırılması (Büyüme)

Tüm değiştirilen ortam şartları göz önüne alındığında metal iyonlarının kullanımının en iyi sonuçları verdiği görülmüştür. Bor ilavesi ile biyokütle aynı kalsa da hızda büyük oranda gelişme gözlenmiştir. Metal iyonları içinde en yüksek biyokütle miktarını veren nikel tüm değiştirilen şartlar içinde de en yüksek biyokütleyle sahiptir. C kaynağı olarak gliserol ve N kaynağı olarak amonyum sülfat kullanımının spesifik üreme hızını yükselttiği, biyokütlede ise bariz bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir. Biyokütle üzerinde ise amonyum nitrat ve gliserol kullanımı kontrol grubunu yakalamış olsa da en yüksek biyokütle kontrol grubunda gözlenmiştir.

4.2.2. PHB üretimi

PHB'in tespiti

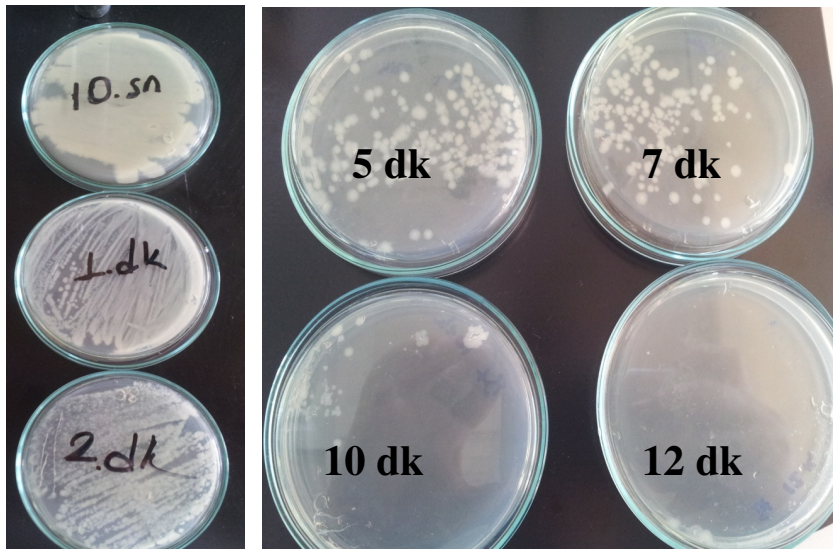
Bakterinin PHB üretiminin tespiti florasan özellikli Nile Blue A boyası ile yapılmıştır. Boyalı koloniler UV kabin ile incelenmiştir. Bakterinin PHB üretimi, PHB'lerin parlaması ile nitel olarak gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Resim 4.2. *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun PHB üretimi

Sonikasyon süresinin tespiti

Sonikasyon süresinin tespiti için ultrasonikatör %94-95 güçte iken sonikasyon tüpü 5-7-10-12-15-20-25-30 dakika sonike edilmiştir. Alınan örnekler petrilere ekilerek 1 gün 30°C inkübe edilmiş ve koloni sayımı ile bakterinin hücre duvarının parçalanma süresi tespit edilmiştir. İnkübe edilen petrideki kolonilerin durumuna göre sonikasyon süresi 12 dakika olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonuçları Resim 4.3'te gösterilmiştir.



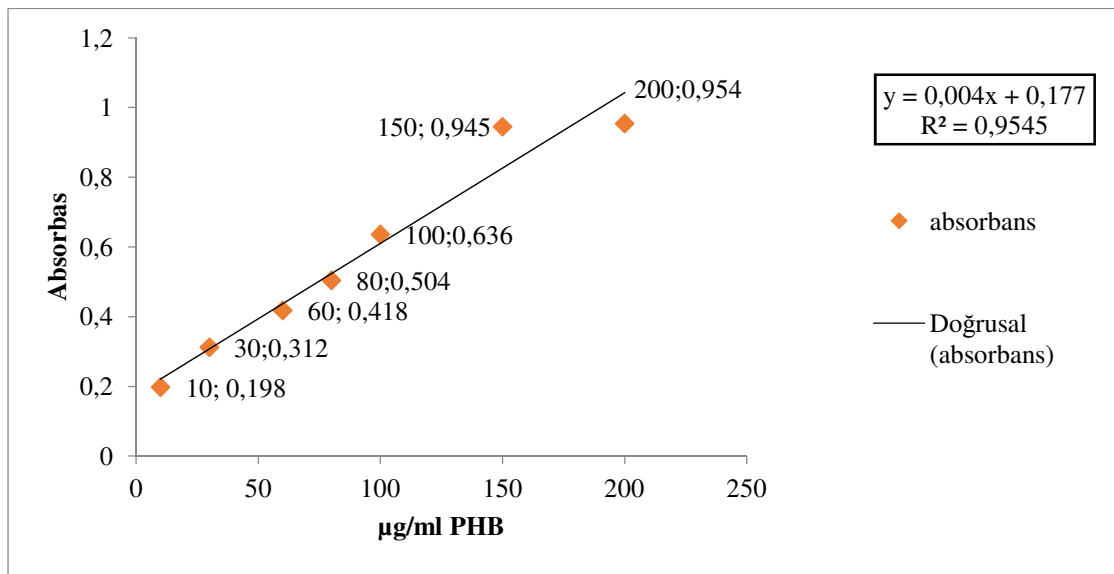
Resim 4.3. Sonikasyon süresinin tespiti

Rohini ve diğerleri *Bacillus thuringiensis* R1 suşunun hücre duvarını parçalamak için 15 dakika (5'er dakikalık 3 döngü) boyunca sonike etmişlerdir [70].

Tamdoğan, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşu için sonikasyon süresini 10 dakika olarak tespit etmiştir [31].

PHB standart grafiğinin hazırlanması

PHB standart grafiği için 10-30-60-80-100-150-200 µg/ml'lik PHB standartlarının spektrofotometre cihazında 235 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Okunan tüm değerler zamana karşı grafiğe geçirilerek Şekil 4.39'da verilmiştir.



Şekil 4.39. PHB standart grafiği

PHB birikimine karıştırma hızının etkisi

Karıştırma hızının PHB üretimine etkisini incelemek amacı ile belirlenen optimum şartlarda (pH 7, 30°C inkübasyon sıcaklığı ve 2 gün inkübasyon) 650 rpm ve 350 rpm karıştırma hızlı ortamlar karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi 350 rpm için 7,5. saatin, 650 rpm için 6. saatin sonunda yapılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.13'de görülmektedir.

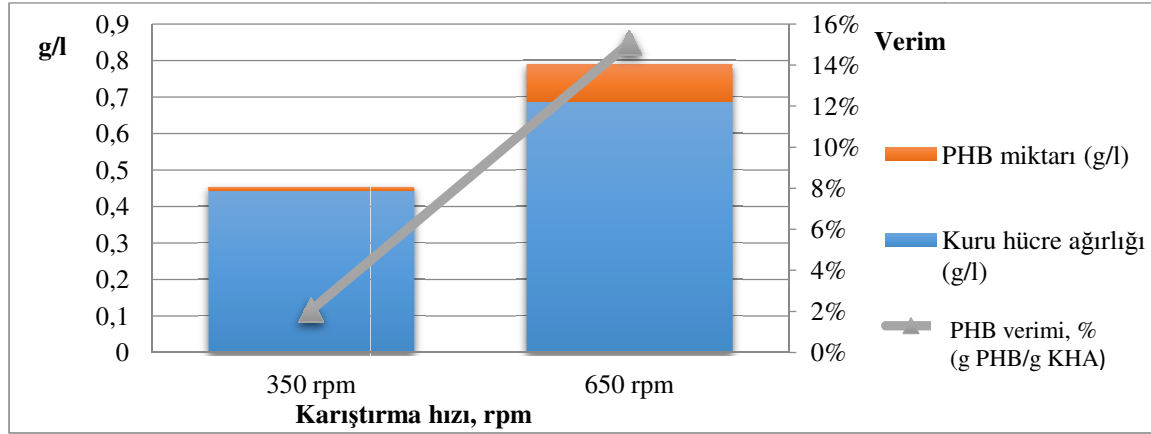
Çizelge 4.13. pH 7'de, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karıştırma hızlarında elde edilen PHB sonuçları

Durum	Ortam	Abs (600 nm)	Abs (235 nm)	Kuru hücre ağırlığı (KHA), g/l	PHB miktarı, µg/ml	PHB verimi, % (g PHB/g KHA)
350 rpm	NB	1,18	0,180	0,443	9,1	2,06
650 rpm	NB	1,648	0,591	0,685	103,5	15,07

Karıştırma ile besiyerindeki çözünmüş oksijen miktarının, bakteri-substrat etkileşiminin ve bakteri-oksijen etkileşiminin artmasının yanı sıra mekanik etki ile substrat parçalanması da gerçekleşmektedir. Bu durum bakterinin çokça üremesi ile depolama yapabilecek bakteri sayısında meydana gelen artış ile ilgilidir. Bakteri sayısındaki artış PHB miktarındaki artışı da beraberinde getirmiştir. Baysak, *Rhizobium* suşlarının maya ekstrakt manitol (YEM) sıvı besiyerinde PHB üretimine karıştırma hızının etkilerini incelemiş ve farklı hızlarında (50-200 rpm) PHB üretiminin 0,0242-0,0651 g/l arasında değiştiğini, karıştırma hızının kuru hücre ağırlığı ile PHB miktarını arttırdığını bildirmiştir [37].

650 rpm karıştırma hızında en yüksek PHB birikimi (103,5 g PHB/g KHA) ve en yüksek PHB verimi (%15,07) elde edilmiştir. Bu verim literatür ile uyumlu bir sonuçtur. Çeşitli çalışmalarda *B. thuringiensis* IAM 12077 suşunun 48 inkübasyonda nutrient broth besiyerinde kuru hücre ağırlığının %10-15'i oranında PHB depolayabildiği daha önceden bildirilmiştir [68].

Karıştırma hızının etkisi ile hem PHB miktarında hem de PHB veriminde gözlenen değişim Şekil 4.40' gösterilmiştir.



Şekil 4.40. Farklı karıştırma hızlarında PHB üretiminin değişimi

Farklı azot ve karbon kaynaklarının PHB üzerine etkisinin incelenmesi

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

Merck marka pepton azot kaynağının varlığında karbon kaynağı olarak gliserol, glikoz, ksiloz, mannoz, D-mannitol kullanılmış; bulunan sonuçlar kontrol grubu olarak kabul edilen aynı şartlardaki nutrient broth (NB) ile karşılaştırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi kontrol grubunda ve gliserollü ortamda 6. saatin, ksilozlu ortamda 5. saatin, glikozlu ve mannitolü ortamlarda 4,5. saatin, mannozlu ortamda 4. saatin sonunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.14’te görülmektedir.

Çizelge 4.14. pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı karbon kaynaklarında elde edilen PHB sonuçları (N=Pepton)

Ortam	Abs (600 nm)	Abs (235 nm)	Kuru hücre ağırlığı (KHA), g/l	PHB miktarı, µg/ml	PHB verimi, % (g PHB/g KHA)
NB	1,648	0,591	0,685	103,5	15,07
Gliserol	1,525	0,608	0,625	107,8	17,3
Ksiloz	0,883	0,430	0,300	63,25	21,08
Mannitol	0,821	0,380	0,258	50,75	19,71
Glikoz	0,913	0,410	0,305	58,25	19,10
Mannoz	0,680	0,394	0,183	54,25	29,73

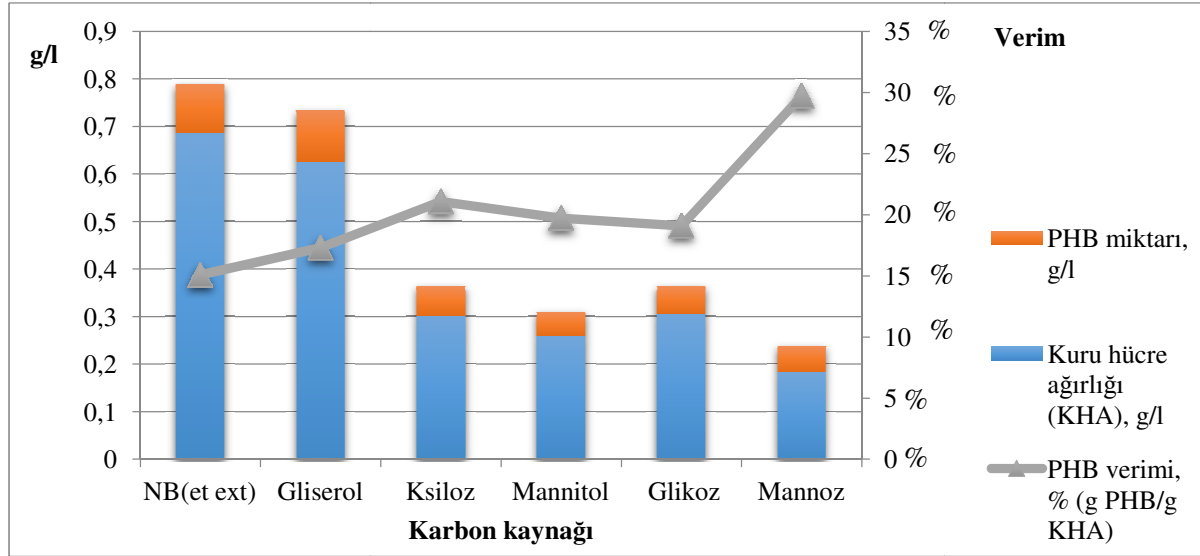
Kullanılan tüm C kaynaklarında PHB birikimi mümkün olmuş ve tüm verimler kontrol grubunda elde edilenden yüksek olmuştur. Yapılan çalışmada glikoz, mannitol ve gliserol ortamlarının sırasıyla %19,1; %19,7 ve %17,3 PHB verimi ile yakın değerler verdiği görülmüştür. Güngörmedi, *Bacillus megaterium* XyC6 ile PHB üretimi verimini farklı karbon kaynakları (glikoz, mannitol, gliserol) ile çalışmış, PHB verimlerini glikoz %38,38, gliserol %36,04, mannitol %36,31) birbirine oldukça yakın bulmuştur [60]. Mannitol yüksek fiyatı nedeniyle endüstriyel proseslerde çokça tercih edilen bir karbon kaynağı değildir [93].

Pal ve diğerleri, *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 ile yaptığı çalışmada pepton-maya ekstraktı içeren besi ortamında farklı karbon kaynaklarının (mannoz, ksiloz, glikoz) PHB üretimine etkisini incelemiş ve yüksek PHB miktarını (1,2 g/l) ksilozda tespit etmiştir. Ksilozu mannoz, glikoz içeren ortam takip etmiştir [68]. Yapılan deneylerde ksiloz ortamında PHB miktarı 0,06325 g/l olmuş, mannoz ve glikoz kaynaklarında yüksek PHB miktarı elde edilmiştir.

Gliserol-pepton ortamı sahip olduğu yüksek biyokütle ile en yüksek PHB miktarını (107,8 µg/ml) vermiştir. Rohini ve diğerleri da karbon kaynağı olarak gliserol ya da glikoz içeren besi ortamında (maya eksrtaktı, pepton, Na₂HPO₄ ve MgSO₄ içerikli) *Bacillus thuringiensis* R1'in maksimum PHB miktarını (1,4 g/l) gliserolde verdiğini bildirmişlerdir [70]. Çeştili proseslerde bir yan ürün olan gliserolün ekonomik ve kullanılabilir bir karbon kaynağı olduğu görülmüştür.

B. thuringiensis RSKK 381 suşu için PHB üretiminde en verimli ortamın mannoz-pepton ortamı (%29,73) olduğu tespit edilmiştir. Bu oranın yüksekliği bakterinin mannozu büyümede kullanamayıp depolamaya yani PHB üretimine yönelmesi ile açıklanabilir.

Farklı karbon kaynakları ile elde edilen veriler Şekil 4.41'de gösterilmiştir.



Şekil 4.41. Farklı karbon kaynaklarında PHB üretiminin değişimi

Bu çalışmada; azot kaynağı olarak malt ekstrakt, amonyum sülfat, maya (yeast) ekstraktı, amonyum nitrat ve glisin kullanılmıştır. Bulunan sonuçlar kontrol grubu olarak kabul edilen aynı şartlardaki nutrient broth ile karşılaştırılmış ve Çizelge 4.15’de verilmiştir. Ekstraksiyon işlemi kontrol grubunda 6. saatin, malt ekstraktlı ortamda 5,5. saatin, amonyum sülfatlı ortamda 7,5. saatin, amonyum nitratlı ve maya ekstraktlı ortamlarda 9. saatin ve glisinli ortamda 9,5. saatin sonunda yapılmıştır.

Çizelge 4.15. pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı azot kaynaklarında elde edilen PHB sonuçları (C= et ekstraktı)

Ortam	Absorbans (600 nm)	Absorbans (235 nm)	Kuru hücre ağırlığı (KHA), g/l	PHB miktarı, µg/ml	PHB verimi, % (g PHB/g KHA)
NB	1,648	0,591	0,685	103,5	15,07
Malt eks.	1,141	0,609	0,423	108	25,56
Maya eks.	1,511	0,436	0,615	64,75	9,96
Amonyum sülfat	1,580	0,659	0,65	120,5	18,59
Amonyum nitrat	1,544	0,867	0,633	172,5	27,3
Glisin	1,138	0,527	0,421	87,5	20,8

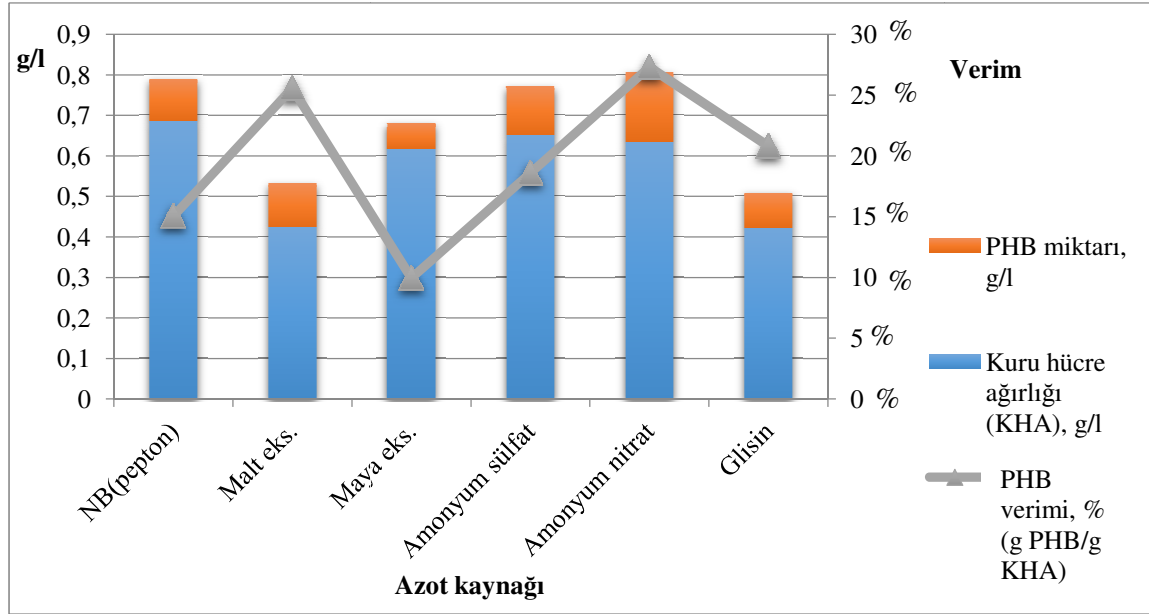
Tüm azot kaynaklarında PHB üretimi gerçekleşmiştir. En yüksek PHB miktarı ve PHB verimi (172,5 µg/ml ve %27,3) amonyum nitratlı ortamda tespit edilmiştir.

Önceki çalışmalarda malt ekstraktı gibi rafine edilmemiş kaynakların PHB verimi eldesi için iyi ve PHB oluşumunu destekleyen kaynaklar olduğu bildirilmiştir [95]. Alınan sonuçlar da bu bilgiyi doğrulayan niteliktedir. Malt ekstraktı amonyum tuzlarından sonra en yüksek PHB miktarını veren kaynak olmuştur.

Gomaa karbon kaynağı şeker kamışı pekmeziyken *Bacillus subtilis* AJ-3 ile PHB üretimine farklı azot kaynaklarının etkisini incelemiştir. Bu amaçla amonyum klorür, maya ekstraktı, malt ekstraktı, pepton, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve glisin kullanılmış ve amonyum sülfat (22,98 g/l) en iyi azot kaynağı bulunmuştur [27]. Singh ve diğerlerinin *B. subtilis* NG 220 bakterisinin şeker endüstri atık suyundaki PHB üretime azot kaynaklarının (pepton, (NH₄)₂SO₄) etkisini incelemiş ve en iyi PHB birikimini (NH₄)₂SO₄'ta tespit etmişlerdir [26]. Yapılan çalışmada amonyum sülfatın amonyum nitrat dışındaki tüm azot kaynaklarında daha çok PHB biriktirdiği tespit edilmiştir.

Gouda ve diğerleri, *Bacillus megaterium* ile şeker kamışı melası varken maya ekstraktı, pepton gibi kompleks kaynakların PHB miktarını azalttığını rapor etmişlerdir [80]. Deneyler sonucunda maya ekstraktlı ortam en düşük PHB miktarlı ve verimli ortam olduğu tespit edilmiştir [80].

Elde edilen deneysel veriler Şekil 4.42'de gösterilmiştir.



Şekil 4.42. Farklı azot kaynaklarında PHB üretiminin değişimi

PHB kaynağı olarak gübrelerin incelenmesi

Bu çalışmada kullanılan *B. thuringiensis* RSKK 381 suşu da bir toprak izolatıdır ve gübrelere işlem görmüş topraklardan izole edilebilmektedir. Bu bölümünün amacı çeşitli gübrelere (hayvansal, kimyasal ve organik gübre) ve bu gübrelere farklı konsantrasyonlarının bakterinin primer metaboliti olan PHB'nin birikimine olan etkisinin araştırılmasıdır. Bunun yanı sıra ekonomik ve çevre dostu üretim için toprakta çok sık karşılaşılan gübrelere kaynak olma potansiyelleri de konu edilmiştir (pH 7, 650 rpm karıştırma ve 30°C, 48 saat inkübasyon şartında).

Hayvansal gübre içerisinde (H.G., koyun gübresi) firma beyanına yönelik su, organik madde (azot vb.) ve inorganik madde (fosfor, kalsiyum, potasyum vb.) bulunmaktadır. Çalışmada koyun gübresi kullanılmıştır. Hayvan gübresi denemeleri için %0,5-1-5-10-25 konsantrasyonları hazırlanmış ancak %0,5 ve %1'lik derişimlerde ölçüm yapılamamıştır. Ekstraksiyon işlemi %0,5'lik derişim için 4. saatin, diğerleri için ise 6. saatin sonunda yapılmıştır. Veriler Çizelge 4.16'de gösterilmiştir.

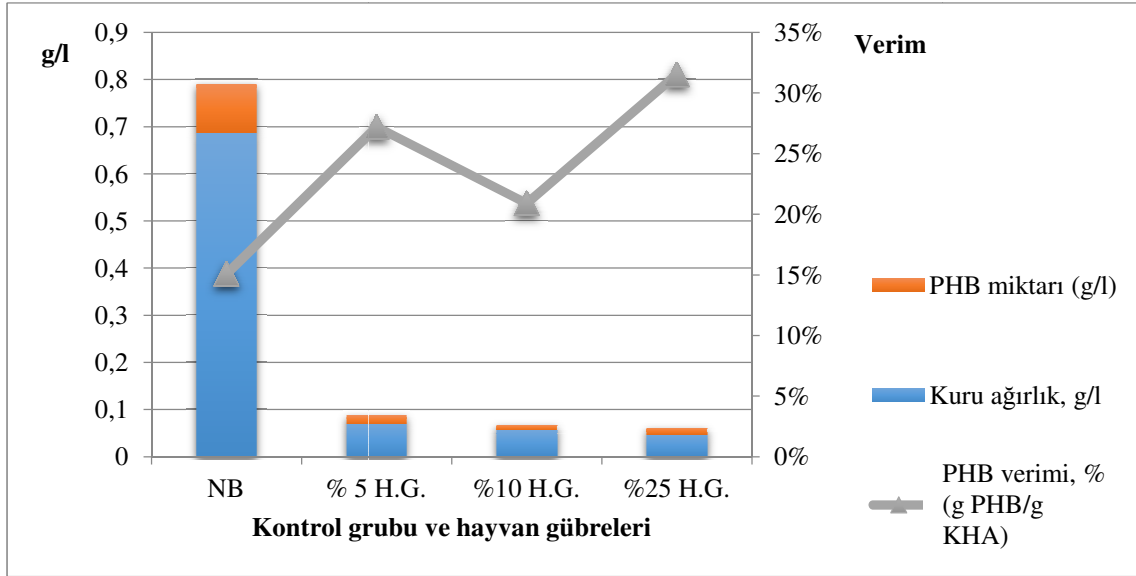
Çizelge 4.16. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı derişimlerde hayvan gübrelereinden elde edilen PHB sonuçları

Gübre	Bileşimi	Hacim, ml	PH	Abs (600 nm)	Kuru ağırlık, g/l	Abs (235 nm)	PHB miktarı (µg/ml)	PHB verimi, % (g PHB /g KHA)
	NB	100	7	1,648	0,685	0,591	103,5	15,07
Hayvan gübre	% 5	80	7	0,444	0,068	0,251	18,5	27,2
	% 10	75	7,2	0,434	0,055	0,223	11,5	20,9
	% 25	68	7,3	0,417	0,046	0,235	14,5	31,52

Bu çalışma ile hayvan gübresinden %30'lara varan oranlarda PHB elde edilebileceği görülmüştür. Yüksek kütlede yüksek PHB miktarı görülmüş ve en yüksek PHB miktarı %5'lik derişimde görülmüştür. Bunun yanında PHB verimi en yüksek %25'lik hayvan gübresinde görülmüştür. Bunun nedeni baskılanan büyüme ile PHB depolanmasıdır. Derişim artışı ile biyokütlede ve PHB miktarında artış gözlenmiştir. Ancak derişimin değişmesi ile PHB veriminde dalgalanmalar görülmüştür. En yüksek PHB verimi %25 derişimdeki ortamda (%31,52) elde edilse de en yüksek PHB miktarı %5 derişime sahip ortamda (18,5 µg/ml) tespit edilmiştir.

Kullanılan hibir derişimde PHB verimi kontrol grubunun altında kalmamış olsa da PHB miktarları biyokütleyle bağlı olarak oldukça düşüktür.

Elde edilen deneysel veriler Şekil 4.43'de gösterilmiştir.



Şekil 4.43. Farklı derişimlerdeki hayvan gübrelerinin PHB üretiminin değışimi

Kimyasal gübre olarak Toros marka 20.20.0 kompoze kimyasal gübre kullanılmıştır. Gübre içerisinde; %20 azot (amonyum azotu ve üre azotu), %20 fosfor (P_2O_5) bulunmaktadır. 20.20.0 gübresi fosfor ve azot bakımından zengin ancak potasyum bakımından fakirdir [89]. Kimyasal gübre (K.G.) konsantrasyonları %0,5-1-5-10-25 değışen oranlarda hazırlanmış ancak %1 üzerinde üreme olmadığından %0,5 ve %1 derişimleri kullanılmıştır. Ekstraksiyon işlemi %0,5'lik derişim için 5,5. saatin, %1'lik derişim için ise 6,5. saatin sonunda yapılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.17. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı derişimlerdeki kimyasal gübrelerde elde edilen PHB sonuçları

Gübre	Bileşimi	Hacim, ml	PH	Abs (600nm)	Kuru ağırlık, g/l	PHB miktarı, µg/ml
	NB	100	7	1,648	0,685	103,5
Kimyasal gübre	% 0,5	92	7,5	0,353	0,03	-
	% 1	96	7,5	0,378	0,04	-

C/N oranı PHB birikimi için önemli bir kriterdir. C/N oranı ne kadar yüksek ise PHB birikimi de o denli yüksek olmaktadır. Ancak kimyasal gübrede azot miktarı yüksek ve

karbon miktarı tek kaynak üre olduğu için düşüktür. C/N oranının düşüklüğü sebebi ile kimyasal gübrede PHB birikimi hiçbir derişimde tespit edilememiştir.

Superdoll marka organik gübre içeriğı: %20 yosun (*Ascophyllum nodosum*), %10 aminoasit, %4 K₂O, %2 organik azot %2,5 alginik asit ve sudan oluşmaktadır. Deniz yosunları değışik oranlarda biyolojik uyarıcılar, besleyiciler ve karbonhidratlar içerir [91]. Organik gübreler farklı konsantrasyonlarda (%0,5-1-5-10-25) hazırlandıktan sonra 2 kez filtreden geçirilip kullanılmıştır. %5 %10 ve %25'te bir büyüme tespit edilemediğinden %5 derişimin altındaki organik gübrelerin PHB miktarları ölçülmüştür. Ekstraksiyon işlemi %0,5'lik derişim için 7. saatin, %1'lik derişim için ise 8. saatin sonunda yapılmıştır. Elde edilen veriler Şekil 4.18'de verilmiştir.

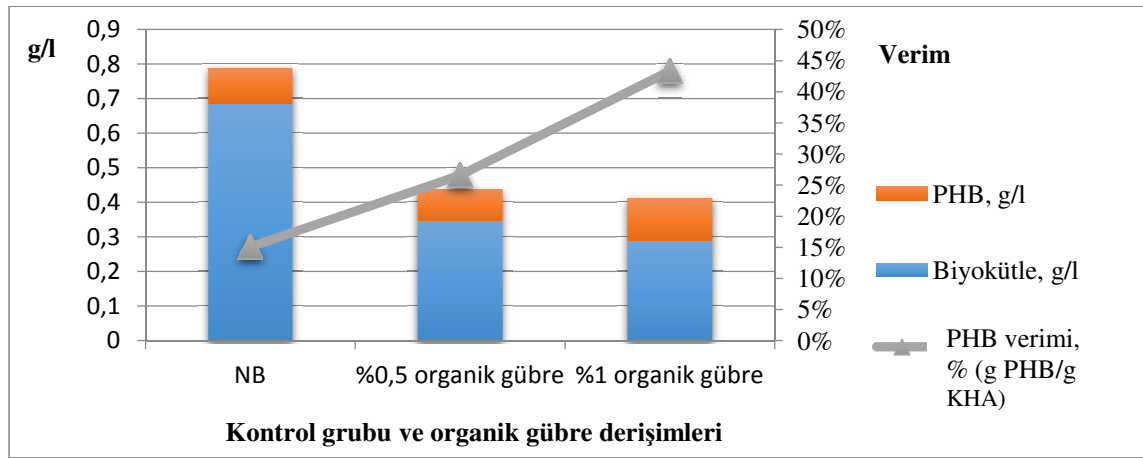
Çizelge 4.18. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı derişimlerdeki organik gübrelerde elde edilen PHB sonuçları

Gübre	Bileşim	Hacim, ml	PH	Abs (600 nm)	Kuru ağırlık g/l	Abs (235 nm)	PHB miktarı (µg/ml)	PHB verimi, % (g PHB /g KHA)
	NB	100	7	1,648	0,685	0,591	103,5	15,07
Organik gübre	% 0,5	97	7,5	0,991	0,345	0,504	91,75	26,59
	% 1	89	7,9	0,801	0,288	0,675	124,5	43,3

Organik gübrelerin düşük derişimlerinde (%0,5 ve %1) PHB birikimi tespit edilmiştir. Daha yüksek derişimlerde ise substrat inhibisyonundan dolayı bakteri büyümesi gerçekleşmediğinden PHB miktarı hesaplanamamıştır. En yüksek PHB birikimi %1'lik derişimde gözlenmiştir. Biyokütledeki artışa paralel olarak PHB miktarında da artış gerçekleşmiştir. Derişimdeki artış veriminde de artış sağlamıştır.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında her iki derişimin de veriminin PHB yüksek ancak PHB miktarının düşük olduğu gözlenmiştir. Bunun sebebi kontrol grubundaki biyokütle fazlalığıdır.

Elde edilen deneysel veriler Şekil 4.44'te gösterilmiştir.



Şekil 4.44. Farklı derişimlerdeki organik gübrede PHB üretiminin değışimi

C/N oranının PHB birikimine etkisinin tespiti

Mannoz-amonyum nitrat ortamında farklı C/N oranlarının (0,5-1-1,5) PHB birikimine etkisi araştırılmıştır. Ekstraksiyon işlemi C/N=0,5 için 8,5. saatin, C/N=1 için 6,5. saatin ve C/N=1,5 için 5. saatin sonunda yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.19'da verilmiştir. Veriler kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 4.19. pH 7'de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı C/N oranlarında elde edilen PHB sonuçları

Ortam	Absorbans (600 nm)	Absorbans (235nm)	Kuru hücre ağırlığı, g/l	PHB miktarı, µg/ml	PHB verimi, % (g PHB/g KHA)
NB	1,648	0,591	0,685	103,5	15,07
C/N=0,5	0,648	0,317	0,166	36,5	21,99
C/N=1	0,413	0,228	0,045	14,25	31,7
C/N=1,5	0,349	0,188	0,012	4,5	37,5

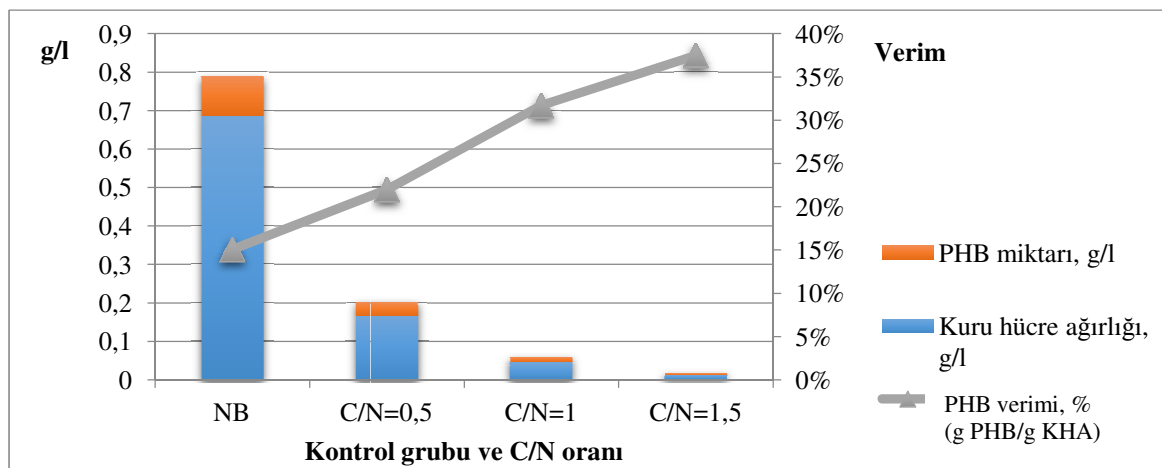
C/N oranı PHB birikimi için başlıca kriterlerdendir. C/N oranının artması ile hücre büyümesi yavaşlar ancak PHB üretimi artar. Tamdoğan çalışmasında *Bacillus subtilis* ATCC 6633 suşunun PHB verimliliğini araştırmış. Karbon/azot (C/N 0,5-2,5) oranının

kültür ortamına karbon kaynağı olarak glikoz, azot kaynağı olarak da L-glisin ilave ettiklerinde en yüksek PHB birikimini karbon/azot oranı 2,5 olan besiyerinde (3,2481 $\mu\text{g/ml}$) tespit etmişlerdir [31]. Pal ve diğerleri *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 ile yaptığı çalışmada maksimum PHB birikimini azot-kısıtlı ortamda gözlemlemiş ve azot kısıtlılığının PHB birikimini desteklediği bildirmişlerdir [68]. Zhang ve diğerleri *Bacillus megaterium* R11 ile palmye demetinden-tripton oranını 15:1-15:6 arasında değiştirerek C/N oranının PHB üretimine etkisini incelemişlerdir. C/N 15:1 (azot kısıtlı ortam) olduğunda en düşük kuru hücre ağırlığı alınsa da PHB oranının %50 olduğunu bildirmişlerdir [76].

Sınırlanan azot konsantrasyonu mikroorganizmaların biyolojik aktiviteleri yavaşlatmakta ve mikroorganizma konsantrasyonunun azalmasına yol açmaktadır. Maksimum verimde PHB üretimi için makrobeseinlerden olan azotun mikroorganizmaların yaşamlarını devam ettirecek minimum seviyede kullanılması iyi bir stratejidir [9, 40].

C/N oranı 1,5 olduğunda biyokütle azot sınırlılığından en düşük değerini almış ancak PHB verimi en yüksek değere çıkmıştır. Azotu kullanıp çoğalamayan bakteri ortamdaki karbonu depo için kullanmıştır. C/N oranı azadıkça rahatlamayan başlayan ortam koşulları ile bakteri büyümeye yönelmiş ve PHB verimi hızla azalmıştır. Bunun yanında biyokütlenin yüksek olduğu C/N=0,5 ortamında PHB miktarı en yüksek bulunmuştur. Yani C/N=0,5 iken yüksek biyokütle kaynaklı, en yüksek PHB miktarı olan 36,5 $\mu\text{g/ml}$ elde edilmiş ancak en yüksek verim %37,5 ile C/N=1,5 ortamında elde edilmiştir.

Elde edilen deneysel veriler Şekil 4.45’de gösterilmiştir.



Şekil 4.45. Farklı C/N oranlarında PHB üretiminin değişimi

Farklı iyonların PHB birikimine etkisi

Metal iyonlarının PHB birikimine olan etkisini incelemek için çeşitli metal iyonları 5 ppm derişimde nutrient broth ortamına katılmıştır. Metallerin seçiminde, toprakta bulunan ve bir toprak bakterisinin karşılaştığı mikrobelerin ve iz elementler göz önüne alınmıştır. Bu çalışma için çeşitli metal iyonları Nutrent Broth ortamına eklenerek kontrol grubu ile karşılaştırılmışlardır. Deney boyunca 650 rpm karıştırma hızında, pH 7’de, 30°C inkübasyon sıcaklığında ve 48 saat inkübasyon süresinde çalışılmıştır. Ekstraksiyon işlemi çinko katkılı ortam için 6. saatin, magnezyum katkılı ortam için 8,5. saatin, bor katkılı ortam için 8. saatin ve nikel katkılı ortam için 10. saatin sonunda yapılmıştır. Elde edilen veriler Çizelge 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.20. pH 7’de, 650 rpm karıştırma hızında, 2 günlük ve 30°C inkübasyonda farklı metal iyonu ilavesi ile elde edilen PHB sonuçları

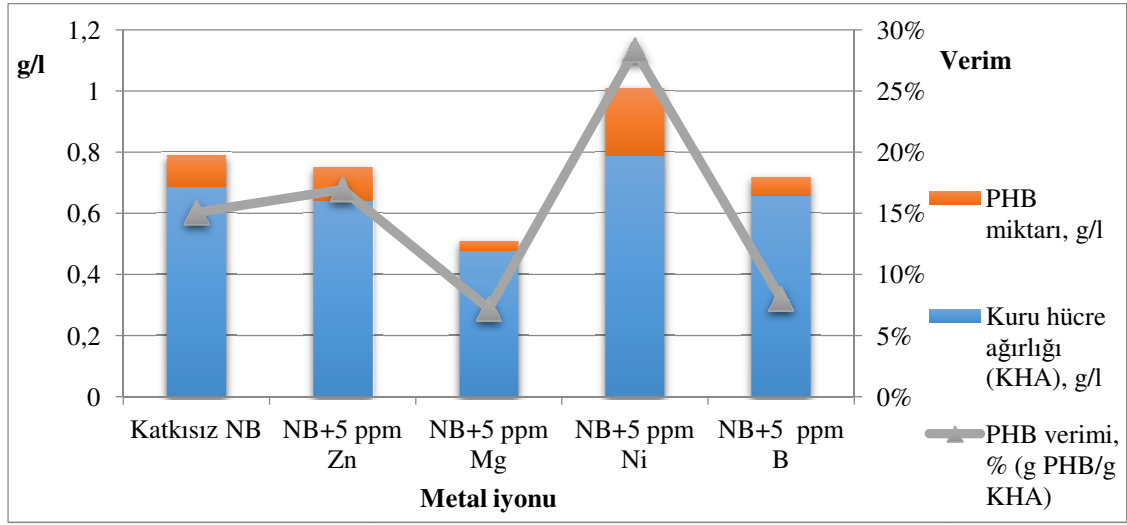
Ortam	Absorbans (600 nm)	Absorbans (235nm)	Kuru hücre ağırlığı (KHA), g/l	PHB miktarı $\mu\text{g/ml}$	PHB verimi, % (g PHB/g KHA)
NB	1,648	0,591	0,685	103,5	15,07
5 ppm Zn	1,561	0,612	0,641	108,75	16,96
5 ppm Mg	1,241	0,402	0,475	34,13	7,18
5 ppm Ni	1,840	1,069	0,787	223	28,33
5 ppm B	1,580	0,783	0,655	63	8,01

En yüksek PHB verimi nikel katkılı ortamda tespit edilmiştir. Onu çinko ilaveli ortam izlemiştir. Ni, Zn gibi ağır metal iyonları büyümeyi baskılayacak nitelikte olduğundan PHB birikimini olumlu etkilediği düşünülmektedir. Bor ve magnezyum ilavensi PHB birikimi üzerinde olumsuz etki yaptığı tespit edilmiştir.

Raza ve diğerleri *B. subtilis* ATCC 6633’ün PHB birikimi üzerine ağır metal etkisi incelenmişlerdir. Besiortamları D-mannitol-glisin ortamına Zn^{++} iyonu için ZnSO_4 (100-350 μM) ve Ni^{++} iyonu için NiCl_2 (50-200 μM) eklenerek oluşturulmuş. En etkili metal iyonu 100 μM konsantrasyonda Ni^{++} iyonunda (PHB birikimi 82 mg/l, kuru ağırlık başına %10,93) kontrol grubuna göre %55’e varan PHB artışı bildirilmiştir. Zn^{++} 300 μM (PHB birikimi 76,5 mg/l, kuru ağırlık başına %16,89) ilavesi ile kontrol grubuna göre %44’e

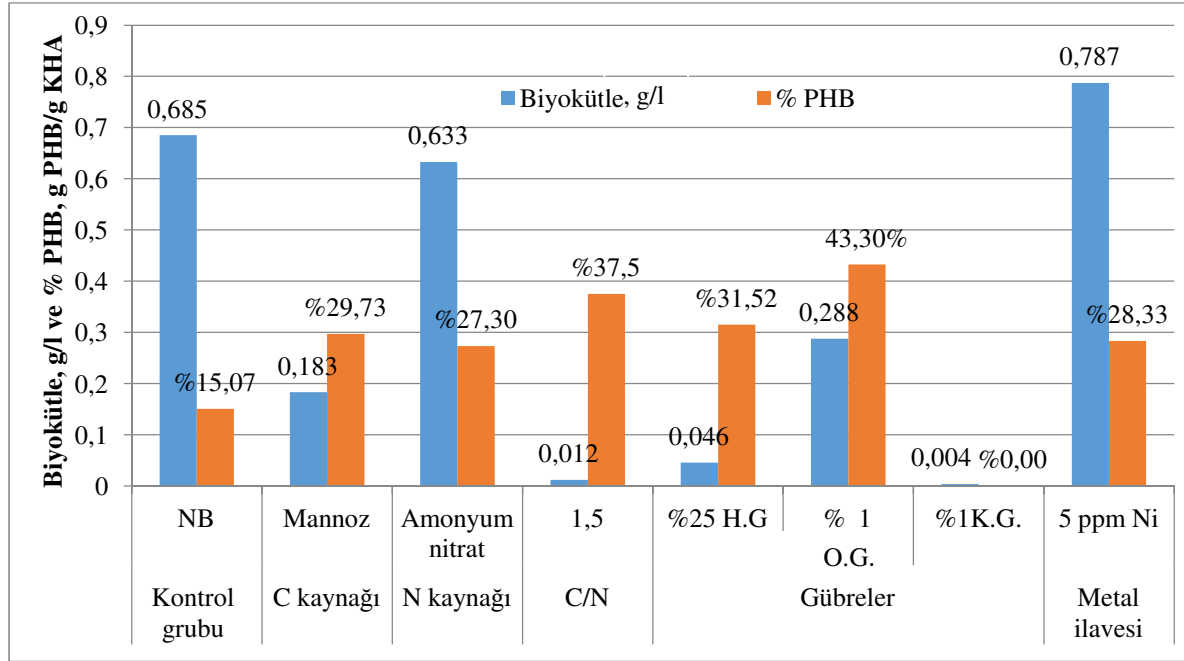
varan PHB artışı bildirilmiştir [65]. Elde edilen sonuçlara göre 5 ppm çinko ilavesi kontrol grubuna göre %5,07; 5 ppm nikel ilavesi ilavesi kontrol grubuna göre %100'e varan PHB artışı sağlamıştır. Metal iyonlarının PHB birikimini nasıl arttırıp azalttığının mekanizması henüz tam olarak ortaya konamamıştır.

Elde edilen deneysel veriler Şekil 4.46'da gösterilmiştir.



Şekil 4.46. Farklı metal iyonu ilavesinin PHB üretiminin değişimi

Kontrol grubuna karşı değiştirilen tüm şartlar (C ve N kaynakları, metal iyonları, gübre kullanımı, C/N oranı) ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.47'de gösterilmiştir.



Şekil 4.47. Kontrol grubu ile değiştirilen şartların karşılaştırılması (PHB)

Tüm değiştirilen ortam şartları göz önüne alındığında metal iyonlarının varlığının en yüksek biyokütle vermesine karşın en yüksek PHB verimi organik gübre kullanımında elde edilmiştir (%43,3). C/N oranının 1,5 olarak ayarlanması ile de yüksek PHB verimi (%37,5) tespit edilmiştir. Kimyasal gübre kullanımı dışında her şartta PHB verimleri kontrol grubunun üzerindedir.

5. SONUÇLAR

Biyoteknolojik proseslerde kullanılan bakterilerin üreme hızları ve üretilen biyokütle miktarları, prosesin maliyeti ve uygulanabilirliği açısından önem taşımaktadır. Özellikle büyük ölçekli sistemlerde sağlanan tasarruflar ekonomik yükün hafiflemesini de beraberinde getirir. Buna dayanarak, çalışmanın ilk bölümünde, farklı ortam şartlarında *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun, üreme hızları ve üretilen biyokütle miktarları araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde de çevre sorunlarının çözümüne yönelik konularda önemli yeri olan, polipropilene ve polietilene benzerliği sebebiyle dikkat çeken PHB üretimine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

İlk olarak *B. thuringiensis* RSKK 381 suşunun optimum üreme şartları optimum pH 7, sıcaklık 30°C, inkübasyon süresi 48 saat ve karıştırma hızı 650 rpm olarak tespit edilmiştir. Bu şartlarda biyokütle miktarı (0,685 g/l) ve üreme hızı (0,419 h⁻¹) maksimumdur. Fiziksel faktörlerin biyokütle üzerine etkisi inceleyen Baysak [37] maksimum 200 rpm kullandığı karıştırma hızının artması ile *Rhizobium* türlerinin biyokütle miktarının arttığını bildirmiştir. Pichhardt, Tamdoğan ve Gomaa, çalışmalarında çeşitli *Bacillus* türleri için optimum üreme sıcaklığını 30° C olarak bildirmişlerdir [27, 30-32, 75].

B. thuringiensis RSKK 381 suşunun büyüme davranışları üzerine farklı karbon kaynakları (gliserol, glikoz, ksiloz, mannoz ve D-mannitol) incelendiğinde en yüksek biyokütle miktarı (0,625 g/l) ve üreme hızı (0,854 h⁻¹) gliserol-pepton ortamında tespit edilmiştir. Rohini, Phadnis ve Rawal *Bacillus thuringiensis* R1 ile yaptıkları çalışmada gliserol işe ilgili benzer sonuçlar elde etmişlerdir [70]. Çeşitli proseslerde yan ürün olan gliserolün biyokütle eldesinde ekonomik ve kullanılabilir bir kaynak olduğu bulunmuştur. Amonyum tuzlu ortamda artan üreme hızı ile zamandan ve enerjiden tasarruf sağlanarak proseste ekonomikleşme sağlanabileceği tespit edilmiştir.

Kullanılan suş için farklı azot kaynakları (malt ekstrakt, amonyum sülfat, maya ekstraktı, amonyum nitrat ve glisin) içinde en yüksek biyokütle miktarını (0,625g/l) ve üreme hızını (0,854 h⁻¹) amonyum sülfatlı ortamın verdiği belirlenmiştir. Gomaa, amonyum tuzlarının *Bacillus subtilis* bakterisinin büyüme davranışı üzerine etkisini belirlemiş ve yapılan çalışma ile paralel sonuçlar bildirmişlerdir [27]. Amonyum tuzlarının kullanıldığı büyüme

ortamında artan üreme hızı ile zamandan ve enerjiden tasarruf sağlanarak proste ekonomikleşme sağlanabileceği tespit edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarında hayvan gübresinin biyokütle ve üreme hızına etkisi incelendiğinde maksimum biyokütle (0,068 g/l) ve hız (0,315 h⁻¹) değerlerine ulaşılan %5'lik derişimin optimum olduğu görülmüştür. Toprakla karıştırılan hayvan gübresi, topraktaki mikroorganizma sayısını ve etkinliğini artırır, biyolojik değişimlerin hızlandırılmasını sağlar. Kimyasal gübre için en yüksek biyokütle (0,04 g/l) ve üreme hızı (0,379 h⁻¹) %1' lik gübre ortamında tespit edilmiştir. Fakir C kaynağı olan bu ortamın, düşük biyokütle vermesi sebebiyle uygun bir büyüme ortamı olmadığı belirlenmiştir. Organik gübrelerde ise maksimum üreme hızına (0,154 h⁻¹) ve biyokütle miktarına (0,345 g/l) %0,5'lik derişimde ulaşılmıştır. Gübrenin içerdiği yosun biyolojik uyarıcılar, besleyiciler ve karbonhidratlar içerirdiğinden bakteriyel büyümeyi destekmiş ancak yüksek derişilerde substrat inhibisyonu gözlenmiştir.

Üç çeşit gübrenin aynı derişimli örnekleri karşılaştırıldığında düşük derişim ile maksimum biyokütle miktarı ile organik gübrelerin daha verimli olduğu görülmüştür. Tüm gübre çeşitleri arasında organik gübrenin kullanıldığı tarımsal alandan yapılacak starter suş izolasyonunun daha uygun ve yararlı olacağı tespit edilmiş, kimyasal gübrenin kullanıldığı alanların ise uygun olmadığı bulunmuştur.

Büyüme için optimum C/N oranı için mannoz-amonyum nitrat ikilisi kullanılmış, büyüme için en uygun ortam C/N=0,5 (0,166 g/l ve 0,262 h⁻¹) tespit edilmiştir. Zhang, Sun, Wang ve Geng, *Bacillus megaterium* R11 ile yaptıkları çalışmada benzer bir sonuca vararak düşük C/N oranının uygun bir strateji olduğunu belirtmişlerdir [76].

Büyüme ortamına yapılan çeşitli metal iyonu ilavesinin büyüme eğrisine etkisi incelendiğinde ağır metallerin (Ni ve Zn) daha etkili olduğu gözlenmiştir. Bor ilavesi ile iyi bir biyokütleyle beraber büyüme hızında (0,863 h⁻¹) büyük oranda gelişme gözlenmiş, nikel ise yüksek hızla en yüksek biyokütle miktarını (0,787 g/l) vermiştir. Çinko ilavesinin hızı büyük orada arttırdığı ve iyi bir biyokütle verdiği tespit edilmiştir. Magnezyum en düşük biyokütle değerini (0,475 g/l) vermiş ancak lag süresini kısaltarak zamandan ve enerjiden tasarruf sağlamıştır. Nikel gibi iz element ilavesinin doğru konsantrasyonlarda uygulandığında büyüme üzerinde olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir.

Tüm değiştirilen ortam şartları (C ve N kaynakları, metal iyonları, gübre kullanımı, C/N oranı) göz önüne alındığında metal iyonlarının kullanımının kontrol grubu ile kıyaslandığında üreme hızı ve biyokütle miktarında en yüksek sonuçları verdiği görülmüştür. C kaynağı olarak gliserol ve N kaynağı olarak amonyum sülfat kullanımının da spesifik üreme hızını yükselttiği, biyokütlede ise bariz bir değişime neden olmadığı tespit edilmiştir.

Optimum şartlarda (pH 7, 30°C inkübasyon sıcaklığı ve 2 gün inkübasyon) 650 rpm karıştırma hızında en yüksek PHB birikimi (103,5 g PHB/g KHA) ve en yüksek PHB verimi (%15,07) elde edilmiştir. Literatür taramasında *B.thuringiensis* IAM 12077 suşunun genel besi ortamında 48 saatlik inkübasyon sonucu %10-15 oranında PHB depolayabildiği görülmüştür [68]. Baysak, maksimum 200 rpm kullandığı karıştırma hızının *Rhizobium* türlerinin PHB üretimi üzerine etkisini incelediğinde çalışmada elde edilen sonuçlarla benzer sonuçlar bildirmiştir [37].

Farklı karbon kaynaklarının PHB birikimine etkisi incelenmiş; çalışmada gliserol, glikoz, ksiloz, mannoz, D-mannitol kullanılmıştır. Gliserol-pepton ortamı sahip olduğu yüksek biyokütle ile en yüksek PHB mikratını (107,8 µg/ml) vermiştir. En yüksek verim ise mannoz ortamında (%29,73) bulunmuştur. Gliserolün yüksek verimi Rohini, Phadnis ve Rawal'ın çalışmasında da tespit edilmiştir [70]. Çeşitli proseslerde yan ürün olan gliserol, PHB üretimi için ekonomik ve kullanılabilir bir karbon kaynağı olarak tavsiye edilmektedir.

Farklı azot kaynaklarında (malt ekstrakt, amonyum sülfat, maya ekstraktı, amonyum nitrat ve glisin) bakterinin PHB üretimi incelendiğinde en yüksek PHB miktarı ve PHB verimi (172,5 µg/ml ve %27,3) amonyum nitratlı ortamda tespit edilmiştir. Singh, Kumari, Mittal ve Yadav; *B. subtilis* NG220 bakterisinin şeker endüstri atık suyundaki PHB üretime azot kaynaklarının (pepton, (NH₄)₂SO₄) etkisini incelemiş ve en iyi PHB birikimini (NH₄)₂SO₄'ta tespit etmişlerdir [26].

Ekonomik PHB üretimi için farklı gübre türlerinin çeşitli konsantrasyonları kullanılmıştır. Yüksek C/N oranına sahip hayvansal gübre için en yüksek PHB verimi %25 derişimdeki ortamda (%31,52) tespit edilmiştir. Bu çalışma ile hayvan gübresinden %30'lara varan oranlarda PHB elde edilebileceği tespit edilmiştir. Kimyasal gübrelerde PHB birikimi

incelendiğinde hiçbir derişiminde PHB birikimi tespit edilememiştir. Bu gübredeki C/N oranının düşüklüğü PHB birikimini engellemiştir. Organik gübrelerde ise en yüksek PHB birikimi %1’lik derişimde gözlenmiştir (124,5 µg/ml ve % 43,3). Literatür taramasında *Bacillus thuringiensis* R1 için en yüksek PHB verimi olarak %34,18 görölmüş, organik gübre kullanımı ile bu oran geçilmiştir [70].

Üç çeşit gübre kaşılaştırıldığında, PHB üretimi için kimyasal gübrenin kullanımının uygun olmadığı, organik gübrenin ise daha düşük derişimde daha yüksek PHB verimi vermesiyle hayvansal gübreye göre daha iyi bir polimer ortamı olduğıu tespit edilmiştir. Ucuz substrat olarak hayvansal ve organik gübrenin kullanımı önerilmektedir.

PHB birikimi için başlıca kriterlerden olan C/N oran araştırıldığında C/N=1,5 için azot sınırlılığı ve zengin karbon varlığının etkisi ile PHB verimi en yüksek değeri almıştır (%37,5). Zhang, Sun, Wang ve Geng de *Bacillus megaterium* R11 ile yaptıkları çalışmada C/N oranı için benzer veriler elde etmişlerdir [76].

Metal iyonlarının PHB birikimine etkisi incelendiğinde en yüksek PHB verimi nikel katkılı ortamda tespit (223 µg/ml ve %28,33) edilmiş, onu çinko ilaveli ortam (103,5 µg/ml ve %16,96) izlemiştir. Bor ve magnezyum ilavensi ise PHB birikimini olumsuz etkilemiştir. Raza, Yang, Faheem ve Yousaf; *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ve çeşitli iyonlarla yaptıkları çalışmalarında benzer sonuçlar almışlardır [65]. Bu sonuçlar göz önüne alındığında Ni, Zn gibi ağır metal iyonları büyümeyi baskılayacak nitelikte olduğundan PHB birikimini olumlu etkilediğı düşünölmektedir.

PHB birikimi için tüm değıştirilen ortam şartları göz önüne alındığında metal iyonlarının varlığının en yüksek biyokütleyi vermesine karşın organik gübre kullanımında en yüksek PHB verimi tespit edilmiştir (%43,3). C/N oranının 1,5 olarak ayarlaması ile de yine yüksek bir PHB verimi elde edilmiştir (%37,5). Kimyasal gübre kullanımı dışında her şartta PHB verimleri kontrol grubunun üzerine çıkmıştır. Sonuçlar değeriendirildiğinde PHB üretimi için organik gübrelerin ekonomik ve verimli kaynaklar olduğı görölmüş, büyük ölçekli üretimler için tavsiye edilebilir kaynaklar olmuştur.

Sonuç olarak; endüstriyel proseslerde önemli olan starter suş seçiminde, PHB verimi açısından izolasyon alanlarının organik gübre uygulaması yapılan tarım arazilerine ait

toprak numuneleri tavsiye edilebilir. Üreme hızı ve biyokütle miktarı açısından da uygun besiyeri olarak gliserol, amonyum sülfat, bor, nikel ve çinkonun kullanımı; PHB verimi göz önüne alındığında ise substrat seçiminde mannoz, amonyum nitrat, nikel ve çinko kullanımının uygun olduğu söylenebilir. Bunun yanısıra yüksek C/N oranı ve homojenizasyonun önemi de ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR

1. Taşkaya, B. (2004). Tarım ve Çevre. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü-Bakış*, 5(1), 1-8.
2. Ediz, N. (2004). *Bazı Bacillus Cinsi Bakterilerin Melas Besi ortamında PHB Üretimleri, Toplam Protein Profilleri ve Plazmid DNA'larının İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1.
3. İnternet: Akbulut, U. Plastik Yaşamın Ayrılmaz Bir Parçası Ancak. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.uralakbulut.com.tr%2Fwp-content%2Fuploads%2F2014%2F01%2FPlastikler_Yasamin_Ayrilmaz_Parcasi_Ancak.pdf&date=2015-04-04, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
4. Lee, S.Y. (1996). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology And Bioengineering*, 49(1), 1-14.
5. İnternet: Hazer, B. Biyobozunur Plastik Ambalaj Malzemeleri 'Çerçeve Çalışması'. *Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Kimya Bölümü*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.bioplasttr.com%2FBIOPLASTICS.pdf&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
6. Ediz, N., Beyatlı, Y. (2005). *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(5), 1-22.
7. Yılmaz, M., Beyatlı, Y. (2003). Biyoplastik: Poli- β -Hidroksibütirat (PHB). *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(9), 1-33.
8. Özdemir, N., Erkmén, J. (2013). Yenilenebilir Biyoplastik Üretiminde Alglerin Kullanımı. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi / The Black Sea Journal of Sciences*, 3(8), 89-104.
9. 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 Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, Özet, 4, 11, 33.
10. Verlinden, R.A.J., Hill, D.J., Kenward, M.A., Williams, C.D. and Radecka I. (2007). Bacterial Synthesis of Biodegradable Polyhydroxyalkanoates, *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449.

11. 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.
12. Katı, H. (2003). *Doğal Ortamlardan İzole Edilen Bacillus Thuringiensislerin Karakterizasyonu Ve İnsektisidal Özelliklerinin Belirlenmesi*, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, 3-4.
13. Çiçek, N. (2003). *Krom ve Kurşum Metalinin Bacillus Thuringiensisin İnsektisidal Aktivitesi Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Niğde Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Niğde, 5.
14. Tekin, S. (2011). *Kahramanmaraş İli Sınırları İçerisindeki Değişik Habitatlardan İzole Edilen Bacillus thuringiensis Suşlarının Karakterizasyonu ve Tarımsal Zararlılar Üzerindeki Etkinliklerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 3.
15. Beegle, C.C., Yamamoto, T. (1992). Invitation Paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner Research And Development, *Canadian Entomologist*, 124, 587-616.
16. İnternet: Sanchis, V. (1999). *Bacillus thuringiensis*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.komunich.de%2Fvince-nt-sanchis%2Ffrance%2Fbacillus-thuringiensis.html&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
17. İnternet: *Biyoteknolojide Kullanılan Biyolojik Sisemler*. Celal Bayar Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü Biyoteknoloji Ders Notları. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww2.bayar.edu.tr%2Fmuhendislik%2Fgida%2Fdocs%2Fdatabank%2Fbiyotek3.pdf&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015
18. Yılmaz, M., Beyatlı, Y. (2003). *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(7), 35-49.
19. Gheorghiu Alpan, L. (2008). *Bazı Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin Alkaliproteazlarının Özelliklerinin Belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Ankara, 10.
20. Chen, G.Q. (2009). A Microbial Polyhydroxyalkanoates (PHA) Based bio- and Materials Industry, *Chemical Society Reviews*, 38(8), 2434-2446.

21. İnternet: Gürsoy, A., *Mikroorganizmaların Beslenmesi ve Gelişimi*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Süt Teknolojisi Bölümü. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.agri.ankara.edu.tr%2Fsut%2F1334__mikroorganizma_beslenme.pdf&date=2015-04-04, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
22. İnternet: Çoban, S. (2006). *Mikrobiyal Büyüme Kinetiği*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.cevremuhendisleri.net%2Fkonu%2Fcevre-mikrobiyolojisi-2-ders-notu.6646%2Fhttp%3A%2F%2Fwww.slideserve.com%2Fcain%2Fm-krob-yal-b-y-me-k-net&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
23. Mamo, G., Gessesse, A. (1999). Effect Of Cultivation Conditions On Growth And α -Amylase Production By Thermophilic *Bacillus* sp, *Letters in Applied Microbiology*, 29, 61-65.
24. Singh, M., Kumar, T., Purohit, H. J. and Kalia, V.C. (2009). Potential Of *Bacillus* sp. To Produce Polyhydroxybutyrate From Biowaste, *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 2017-2023.
25. Younis, M.A.M., Hezayen, F.F., Nour-Eldein, M.A. and Shabeb, M.S.A. (2010). Optimization Of Cultivation Medium And Growth Conditions For *Bacillus subtilis* KO Strain Isolated From Sugar Cane Molasses, *American Eurasian Journal Of Agricultural And Environmental Science*, 7(1), 31-37.
26. Singh, G., Kumari, A. , Mittal, A., Yadav, A. and Aggarwal, N.K. (2013). Poly B-Hydroxybutyrate Production By *Bacillus subtilis* NG220 Using Sugar Industry Waste Water, *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International*, 1-10.
27. 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.
28. Bhuwal, A.K., Singh, G., Aggarwal, N.K., Goyal, V. and Yadav, A. (2014). Poly-B-Hydroxybutyrate Production And Management Of Cardboard Industry Effluent By New *Bacillus* sp. NA10, *Bioresources and Bioprocessing*, 1(9), 2-11.
29. Arda, M. (2000). *Temel Mikrobiyoloji*. (Genişletilmiş İkinci Baskı). Ankara: Medisan Yayınevi Serisi No:46, 9.Bölüm.
30. Pichhardt, K. (2004). *Gıda Mikrobiyolojisi Gıda Endüstrisi İçin Temel Esaslar ve Uygulamalar* (çev. Y.Sekin ve N.Karagözlü). (4. Baskı). Manisa: Literatür Yayınları, 176-178.
31. Tamdoğan, N. (2008), *Bacillus Subtilis Kültürlerinde PHB (Poli-B-Hidroksibütirat) Üretimi*, Yüksek lisans tezi, Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji, Balıkesir, Özet.

32. İnternet: University of Missouri-St. Louis (Thiele). (1999). *Optimum Temperatures For Growth Of Common Laboratory Microorganisms*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.ums1.edu%2F%7Emicrobes%2Fpdf%2Foptimumtemperatures.pdf&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
33. Willey, J., Sherwood, L. and Woolverton, C.J. (2009). *Prescott's Principles Of Microbiology*. (7. Baskı). McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 7. Bölüm, 126-152.
34. İnternet: Şakar, S. (2004). *Yıldız Teknik Üniversitesi 2004-2005 Öğretim Yılı Çevre Mikrobiyolojisi-II Ders Notları*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.cevremuhendisleri.net%2Fkonu%2Fcevre-mikrobiyolojisi-2-ders-notu.6646%2F&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
35. Keshavarzi, M., Salimi, H. and Mirzanamadi, F. (2005). Biochemical And Physical Requirements Of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* For High Biomass Yield Production, *Journal of Agricultural Science and Technology*, 7, 41-47.
36. Mevel, G., Prieur, D. (2000). Heterophic Nitrification By A Thermophilic *Bacillus* Species As Influenced By Different Culture Conditions, *Canada Journal Microbial*, Vol.46, 465-473.
37. Baysak, M.İ. (2008). *Bazı Rhizobium Türlerinin Polihidroksibütirat (PHB) Verimleri Üzerine Farklı Ortam Sartlarının Etkileri*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Özet.
38. Liu, Y.S., Wu, J.Y. and Ho, N.P. (2006). Characterization Of Oxygen Transfer Conditions And Their Effects On *phaffia Rhodozyma* Growth And Carotenoid Production In Shake-Flask Cultures, *Biochemical Engineering Journal*, 27(3), 331-335.
39. Widdel, F. (2010). Theory And Measurement Of Bacterial Growth. *Grundpraktikum Mikrobiologie, 4. Sem. (B.Sc.) Universität Bremen*, 1-11.
40. Akbal, A., Balık, H. (2011, 7-8 Ekim). *Elektromanyetik Dalgaların Bakteri Gelişimi Üzerine Etkisi*, Emanet 2011 Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri Sempozyumunda sunuldu, İstanbul.
41. Perkin, B. (1980). *Biyokimya Mühendisliği: Temel İlkeler*. (Birinci Baskı). Türkiye: Ege Üniversitesi Matbaası, 564-579.
42. Liu, Y., Huang, S., Zhang, Y. and Xu, F. (2014). Isolation And Characterization Of A Thermophilic *Bacillus shackletonii* K5 From A Biotrickling Filter For The Production Of Polyhydroxybutyrate, *Journal of Environmental Sciences*, 26(2014), 1453-1462.

43. Choma, C., Clavel, T., Dominguez, H., Razafindramboa, N., Soumille, H., Nguyen, C. and Schmitt, P. (2000). Effect Of Temperature On Growth Characteristics Of *Bacillus Cereus* TZ415, *International Journal of Food Microbiology*, 55(1), 73-77.
44. Valik, L., Görner, F. and Laukova, D. (2003). Growth Dynamics Of *Bacillus cereus* And Shelf-life Of Pasteurised Milk, *Czech Journal of Food Sciences*, 21(6), 195-202.
45. Valicente, F.H., De Souza Tuelher, E., Santos Leite, M.I., Lyon Freire, F. and Macedo Vieira, C. (2010). Production Of *Bacillus thuringiensis* Biopesticide Using Commercial Lab Medium And Agricultural By-Products As Nutrient Sources, *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*, 9(1), 1-11.
46. Sarrafzadeh, M.H. (2012). Nutritional Requirements of *Bacillus thuringiensis* During Different Phases Of Growth, Sporulation and Germination Evaluated By Plackett-Burman Method, *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 31(4), 131-136.
47. Gültekin, G. (2005). Kadmiyum (II) Ve Bakır (II) İyon Karışımlarını İçeren Atıksuların *Pseudomonas Putida*'ya Biyoakümülyasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, Elazığ, 75-77.
48. Dinigüzel, Ö. (2007). *PHB Üreticisi Halofilik Bakterilerin İzolasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 4, 37-38.
49. Vaishnavi, G., Shivakumar, S. (2013). Poly(3)hydroxybutyrate (PHB) Production In *Bacillus thuringiensis* IAM 12077 Under Varied Nutrient Limiting Conditions And Molecular Detection Of Class IV PHA Synthase Gene By PCR, *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 4(1), 794 – 802.
50. Kılıçay, E. (2010). *Biyokimyasal Olarak Modifiye Edilmiş Bakteriyel Poliester Esaslı Mikro Ve Nano Boyutlu İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Karaelmas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Zonguldak, 33.
51. Türkoğlu, Z. (2009). *Bazı Rhizobium Bakterilerinin Melas Besi ortamında Poly-β-Hidroksibütirat (PHB) Üretimlerinin İncelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Elazığ, Özet, 8, 13.
52. Luengo, M.J., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, R.E. (2003). Bioplastics From Microorganisms, *Current Opinion in Microbiology*, 6, 251-260.
53. Chee, J.Y., Yoga, S.S., Lau, N.S., Ling, S.C., Abed, R.M.M. and Sudesh, K. (2010). Bacterially Produced Polyhydroxyalkanoate (PHA): Converting Renewable Resources Into Bioplastics, *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, Microbiology Book Series, Vol. 2, 1395-1404.
54. Madkour, M.H., Heinrich, D., Alghamdi, M.A., Shabbaj, I.I. and Steinbüchel, A. (2013). PHA Recovery From Biomass, *Biomacromolecules*, 14(9), 2963–2972.

55. Keshavarz, T., Roy, I. (2010). Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda, *Current Opinion in Microbiology*, 13(3), 321–326.
56. Chen, G.Q., Wu, Q., Jung, Y.K. and Lee, S.Y. (2011). *Comprehensive Biotechnology*. (İkinci Baskı). Volume 3: Industrial Biotechnology and Commodity Products/ 3.21.PHA/PHB, 217-227.
57. İnternet: Kaya, S., Akman, N. ve Karakaya, H. *Bacillus Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi sunumu*. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.cilginbiyologlar.com%2Fforum%2Fviewthread.php%3Fthread_id%3D7505%26getfile%3D994&date=2015-04-04, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
58. Mercan, N., Beyatlı, Y. (2004). Bakteriyel Biyoplastikler ve Kullanım Potansiyelleri. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 2(4), 2-18.
59. Tatlıcan, P. (2010). *Polihidroksi Butiratın Halofilik Arke İzolatlarında Üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı-Biyokimya, İstanbul, 7-8, 41.
60. Güngörmedi, G. (2012). *Hidrokarbonla Kirli Topraklardan İzole Edilmiş Mikroorganizmaların Biyoplastik Üretim Yeteneklerinin Belirlenmesi ve Biyoplastiğin Karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, Özet, 7.
61. Valappil, S.P., Boccaccini, A.R., Bucke, C. and Roy, I. (2007). Polyhydroxyalkanoates in Gram-positive bacteria: insights from the genera *Bacillus* and *Streptomyces*, *Antonie van Leeuwenhoek*, 91(1), 1-17.
62. Luengo, J.M., Garcia, B., Sandoval, A., Naharro, G. and Olivera, E.R. (2003). Bioplastics From Microorganisms, *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 251-260.
63. Bin Baharudin, M.K.N. (2012). *Study The Reaction Mechanism Of The Production Of Novel Biopolymer {Poly (3-Hydroxybutyrate) [PHB]} From The Palm Oil Seed*, Lisans Tezi, University Malaysia Pahang Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources, Pekan, Malezya, 4.
64. Sathiyarayanan, G., Kiran, G.S., Selvin, J. and Saibaba, G. (2013). Optimization Of Polyhydroxybutyrate Production By Marine *Bacillus megaterium* MSBN04 Under Solid State Culture, *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 253-261.
65. Raza, W., Yang, W., Faheem, M. and Yousaf, S. (2013). Optimization And Effect Of Zn^{2+} , Mn^{2+} And Ni^{2+} On Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) Synthesis By *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Open Access Journals*, 1(1), 5-8.
66. Benoit, T. G., Wilson, G.R. and Baugh, C.L. (1990). Fermentation During Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Letters in Applied Microbiology*, 10, 15-18.

67. Chanprateep, S. (2010). Current Trends In Biodegradable Polyhydroxyalkanoates, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 110(6), 621–632.
68. Pal, A., Prabhu, A., Kumar, A.A., Rajagopal, B., Dadhe, K., Ponnammam, V. and Shivakumar, S. (2009). Optimization Of Process Parameters For Maximum Poly(-Beta-)Hydroxybutyrate (PHB) Production By *Bacillus thuringiensis* IAM 12077, *Polish Journal of Microbiology*, 58(2), 149-154.
69. Rodríguez-Contreras, A., Koller, M., Miranda-de Sousa Dias, M., Calafell-Monfort, M., Braunegg, G. and Marqués-Calvo, M.S. (2013). High Production Of Poly(3-Hydroxybutyrate) From A Wild *Bacillus megaterium* Bolivian Strain, *Journal of Applied Microbiology*, 114(5), 1378-1387.
70. Rohini, D., Phadnis, S. and Rawal, S.K. (2006). Synthesis And Characterization of Poly-B-Hydroxybutyrate From *Bacillus thuringiensis* R1, *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 276-283.
71. Saadettin, S., Mercan, N., Mumcu, Z.N. ve Beyatlı, Y. (2001). *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Poli- β -hidroksibütirat Üretim Yeteneklerinin İncelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25(2), 67-76.
72. Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K. and Chen, G. (2001). Production Of Poly-3-hydroxybutyrate By *Bacillus* sp. Jma5 Cultivated In Molasses Media, *Antonie van Leeuwenhoek*, 80, 111-118.
73. Aslim, B., Yüksekdağ, Z.N. ve Beyatlı, Y. (2002). Determination Of PHB Growth Quantities Of Certain *Bacillus* Species Isolated From Soil, *Turkish Electronic Journal of Biotechnology*, 24–30.
74. Ateş, M. (1997), *Batık Kültür Fermentasyonu Yöntemiyle Bazı Bakterilerden PHB Üretimi*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, İzmir.
75. Tamdoğan, N., Sıdal, U. (2011). Investigation of Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB) Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 Under Different Conditions, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17, 173.
76. Zhang, Y., Sun, W., Wang,, H. and Geng, A. (2013). Polyhydroxybutyrate Production From Oil Palm Empty Fruit Bunch Using *Bacillus megaterium* R11, *Bioresource Technology*, 147, 307-314.
77. Hamieh, A., Olama, Z. and Holail, H. (2013). Microbial Production of Polyhydroxybutyrate, A Biodegradable Plastic Using Agro Industrial Waste Products, *Global Advanced Research Journal of Microbiology*, 2(3), 54-64.
78. Shalin, T., Sindhu, R., Binod, P., Soccol, C.R. and Pandey, A. (2014). Mixed Cultures Fermentation For The Production of Poly- β - hydroxybutyrate, *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, 57(5), 644-652.

79. İnternet: URL:
http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Fresearch%2Fenergy%2Fpdf%2Fgp%2Fgp_events%2Fbiorefinery%2Fbs2_04_serafim_en.pdf&date=2015-04-09. Son Erişim Tarihi: 10.04.2015.
80. Gouda, M.K., Swellam, A.E. and Omar, S.H. (2001). Production of PHB By a *Bacillus megaterium* Strain Using Sugarcane Molasses And Corn Steep Liquor As Sole Carbon And Nitrogen Sources, *Microbiological Research*, 156(3), 201-207.
81. Huang, T.Y., Duan, K.J., Huang, S.Y. and Chen, C.W. (2006). "Production Of Polyhydroxyalkanoates From Inexpensive Extruded Rice Bran And Starch By *Haloferax mediterranei*", *The Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 701-706.
82. Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W. And Yu, P.H. (2001). Production Of Polyhydroxybutyrate by *Bacillus* Species Isolated From Municipal Activated Sludge, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91-93, 515-524.
83. Hamid, F.B. (2013). *Production Of PHB From B. cereus By Sawdust As A Substrat*, Lisans Tezi, Universi Malasia Pahang Faculty Of Chemical & Natural Resources Engineering, Malezya, Abstract.
84. Sudesh, K., Abe, H. and Doi, Y. (2000). Synthesis, Structure And Properties Of Polyhydroxyalkanoates: Biological Polyesters, *Progress in Polymer Science*, 25(10), 1503-1555.
85. İnternet: Chen, G.Q. (2010). Plastics Completely Synthesized by Bacteria: Polyhydroxyalkanoates. URL:
http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fyunus.hacettepe.edu.tr%2F%7Edamlacetin%2Fkmu407%2Findex_dosyalar%2F11.%2520makale.pdf&date=2015-04-04, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
86. İnternet: Gram Boyama Metodu, URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fcevre.beun.edu.tr%2Fdersnotu%2Fcevre mikrobiyolojisi%2Fgram boyama.pdf&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
87. Verma, N., Sindhu, S.S., Suneja, S. and Goyal, S. (2011). Influence of Nutritional and Environmental Conditions on Production of Poly- β -hydroxybutyrate by *Bacillus* sp., *Research Journal of Microbiology*, 6, 873-883.
88. Bonartseva, G. A., Myskina, V.L. (1985). Fluorescence Intensty Of Strains Of Nodule Bacteria (*Rhizobium Melliloti*, *R. Phaseoli*) Differing In Activity, Grown In The Presence Lipophilic Vital Stain Phosphine 3R, *Microbiology*, 54(4), 535-541.
89. İnternet: Toros 20.20.0 kompoze gübre URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.toros.com.tr%2F%C3%9Cr%C3%BCnler%2FBitkiBesleme%2FKlasikG%C3%BCbreler%2F20200%28Komo poze%29.aspx&date=2015-04-12>, Son Erişim Tarihi: 12.04.2015.

90. Yetgin, M.A., (2010, Nisan). *Organik Gübreler ve Önemi Kitapçığı*, T.C. Samsun Valiliği İl Tarım Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayını, Samsun, 1-17.
91. İnternet: *Organik Tarımda Deniz Yosunu*. URL: http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.organikseram.com%2F%3Fpage_id%3D50&date=2015-04-04, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
92. İnternet: Akbulut, A., *Alglerin Ekolojik ve Ekonomik Önemleri*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fyunus.hacettepe.edu.tr%2F%7Eakbulut%2Fsayfalar%2Falg.html&date=2015-04-04>, Son Erişim Tarihi: 04.04.2015.
93. İnternet: *Mikroorganizmaların Gelişme Şartları*. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.oocities.org%2Fmdigrak%2Fgelisme.htm&date=2015-04-12>, Son Erişim Tarihi: 12.04.2015
94. Oh, J.S. , Kim, B.G. and Park, T.H. (2002). Importance Of Specific Growth Rate For Subtilisin Expression In Fed-Batch Cultivation Of *Bacillus subtilis spoIIG* Mutant, *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 747-751.
95. Page, W.J. and Knosp, O. (1989). Hyperproduction of Poly-beta-Hydroxybutyrate during Exponential Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD, *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1334-1339.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : DUT, Ece

Uyruğu : T.C.

Eğitim

Derece

Eğitim Birimi

Yüksek lisans Gazi Üniversitesi /Kimya Müh. ABD

Lisans Ankara Üniversitesi/ Kimya Müh

Yabancı Dil

İngilizce

Bilgisayar Beceri ve Yeterlilikleri

Matlab ChemCad

AutoCad MS Word, Excel, PowerPoint



GAZİ GELECEKTİR..