

YABANI *Vicia aintabensis* BOISS. & HAUSSKN. EX BOISS KÖK NODÜLLERİNDEN İZOLE EDİLEN *Rhizobium* FRANK İZOLATLARININ TUZ TOLERANSI VE PHB ÜRETİMİ

Çiğdem KÜÇÜK

Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Şanlıurfa
Corresponding author: e-mail: ckucuk@harran.edu.tr

Alınış (Received): 18 Kasım 2016, Kabul (Accepted): 2 Aralık 2016, Erken Görünüm (Online First): 6 Nisan 2017, Basım (Published): 15 Haziran 2017

Özet: Bu çalışmada, yabancı *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* Frank izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarına (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 ve 450mM) toleranslarının ve bu tuz konsantrasyonlarının izolatların poli-β-hidroksibütirik asit (PHB) üretimlerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, izolatların farklı tuz toleransına sahip olduklarını ortaya koymuştur. Tuz konsantrasyonlarından en fazla etkilenen V4.6 izolatı olmuştur. İzolatların PHB verimi (kuru hücre ağırlığına göre) %0,62-27 arasındadır. Artan tuz konsantrasyonları izolat gelişimini inhibe ederken, PHB depolanmasını teşvik etmiştir. Kök nodül izolatları tarafından tuz stres koşullarında PHB üretimi tartışılmıştır.

Anahtar kelimeler: Poli-β-hidroksibütirik asit, yabancı *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss, izolat, tuz konsantrasyonu.

Salt tolerance and PHB production of *Rhizobium* Frank isolates of root nodules of wild *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss

Abstract: This study was performed in order to determine the tolerance of *Rhizobium* Frank isolates obtained from root nodules of wild *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss to different NaCl concentrations (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 and 450mM) and to determine the effects of these different salt concentrations on poly-β-hydroxybutyric acid (PHB) production of the isolates. The results showed that the isolates showed different salt tolerance responses. V4.6 isolate was found to be the most affected isolate by salt concentrations. The PHB yield of the isolates (in terms of cell dry weight) was between 0.62-27%. Increasing salt concentrations inhibited isolate growths but stimulated PHB accumulation. PHB production by root nodule isolates under salt-stress conditions was discussed.

Key words: Poly-β-hydroxybutyric acid, wild *Vicia aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss, isolate, salt concentration.

Giriş

Dünyada karasal alanların yaklaşık %40 kadarının tuzluluk problemi gösterdiği açıklanmıştır (Gorji ve ark. 2015). Özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde, üretimi sınırlandıran en önemli abiyotik stres faktörlerinden biri olan tuzluluk ile ülkemizde de, yaklaşık 1,5 milyon hektar alanda savaşılmaktadır (Çullu 2011). Sulama için kullanılan su kaynakları veya topraklarda tuzluluğun artması, birçok tarımsal ürünün verimini azaltmakta, bitkilerin gelişimlerinde değişikliklere yol açmaktadır (Cordovilla ve ark. 1994). Osmotik stres gibi direk toksik etkiye sahip, artan tuz konsantrasyonları toprak mikrobiyal popülasyonunu olumsuz etkilemekle birlikte (Tate 1995), baklagil bitkileri gelişme dönemlerinde tuzdan etkilenmektedirler (Cordovilla ve ark. 1994, Zahran 1991). Baklagil bitkileri arasında da tuza toleranslılık bakımından farklılıklar incelenmiştir (Zahran 1991). *Vicia faba* Moench, *Phaseolus vulgaris* Alef, bazı *Vicia* sp. türleri (Zahran ve Sprent 1986), *Glycine max*

Merrill gibi bazı baklagillerin diğer baklagil türlerine göre tuza daha toleranslı oldukları, *V. faba* Moench'in toleranlı hatlarının tuzlu koşullarda da azot fiksasyonunu gerçekleştirdiği bildirilmiştir (Zahran ve Sprent 1986).

Buna karşın, *Rhizobium* Frank ve *Bradyrhizobium* Jordan cinsi kök nodül bakterileri konukçuları olan baklagillere göre tuza karşı daha toleranslı olmalarına rağmen, bu bakteri izolatlarının tuza karşı dirençlilikleri farklılık göstermektedir (Abdel-Wahab ve Zahran 1979).

Rhizobium leguminosarum Frank izolatlarının sıvı kültürde 350mM NaCl konsantrasyonuna toleranslı olduğu bildirilmiştir (Abdel-Wahab ve Zahran 1979). Soya fasulyesi ve nohutta kök nodülleri oluşturan *Rhizobium* izolatlarının 340mM NaCl'e toleranslı oldukları ayrıca hızlı gelişen izolatların yavaş gelişenlere göre tuza daha dirençli olduğu yapılan bir çalışmada açıklanmıştır (El-Sheikh ve Wood 1990). Özellikle yabancı baklagillerden izole edilen *Rhizobium* Frank

izolatlarının tuz toleransının yüksek olduğu, 1,8M NaCl üzerindeki yüksek tuz konsantrasyonlarında bile gelişme gösterdikleri bildirilmiştir (Tate 1995). Baklagil yem bitkilerinden izole edilen *R. meliloti* Dangeard, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* Frank (El-Mokadem ve ark. 1991) ile soya fasulyesi (El-Sheikh ve Wood 1995) ve yoncadan izole edilen *Rhizobium* Frank izolatlarının (Mashhady ve ark. 1998) tuzlu koşullarda gelişme gösterdikleri saptanmıştır. Mikroorganizmalar; ozmotik basıncı dengeleyebilmek için karbonhidratları, betainleri, aminoasitleri ve potasyum gibi inorganik iyonları depolayabilmektedirler (Hua ve ark. 1982).

Poli-β-hidroksibütiratın (PHB), bakteri hücrelerinde en çok bulunan mikrobiyal poliestерlerden olduğu Anderson ve Dawes (1990), Junior ve ark. (2011) tarafından açıklanmıştır. *Rhizobium* Frank bakterilerinin hücre kuru ağırlıklarının %55'inden daha fazla PHB ürettiği rapor edilmiştir (Lakshmi ve ark. 2012, Tombolini ve Nuti 1989). Bu mikrobiyal poliestерler, uygun olmayan koşullarda gelişme sırasında intrasellüler inklüzyonlar olarak oluşmaktadır (Anderson ve Dawes 1990).

Stres koşullarında *Rhizobium* Frank bakterilerinde depolanan PHB'nin kök enfeksiyonu sırasında önemli karbon ve enerji kaynağı olduğu açıklanmıştır (Charles ve ark. 1997). Stam ve ark. (1986) PHB'nin nodüllerde oksijen konsantrasyonunun artması ile nitrojenazı koruduğu, nodül dışında besin yetersizliğinde ise karbon ve enerji kaynağı olarak bakteri gelişimine hizmet ettiğini bildirmişlerdir. Çalışmada tarımsal açıdan önemli olan *Rhizobium* Frank bakterilerinin tuz stresine karşı PHB'nin olası rolünü belirlemek için, daha önce yabancı *Vicia aintabensis* kök nodüllerinden izole edilen 10 *Rhizobium* sp. Frank izolatının farklı NaCl konsantrasyonlardaki gelişimleri ve PHB üretimleri üzerine farklı NaCl konsantrasyonlarının etkisi incelenmiştir.

Materyal ve Metot

Kullanılan mikroorganizmalar

Çalışmada Şanlıurfa ve çevresinde doğal olarak yetişen yabancı *Vicia aintabensis* (antep fiği) kök nodüllerinden daha önce izole edilmiş ve tanımlamaları yapılmış olan *Rhizobium* sp. Frank izolatları kullanılmıştır (Küçük ve ark. 2011). İzolatlar Harran Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarından sağlanmıştır. İzolatların bazı morfolojik ve fizyolojik özellikleri Jordan (1984)'a göre yapılmış ve Tablo 1'de verilmiştir.

İzolatların farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişmeleri

Yeast ekstrakt mannitol broth (YEM) besiyerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450mM) NaCl eklenerek hazırlanan besiyeri ortamları 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Sterilizasyon sonrası, 10ml besiyeri içeren tüplere 10⁹kob/ml içeren bakteri kültüründen 0,5ml ayrı ayrı inokule edilmiştir. Bakteriyal izolatlar 27±2°C'de 48saat süre ile geliştirilmiştir. İzolatların gelişimleri 620nm

dalgı boyunda spektrofotometrede ölçülmüştür (Abdelmoumen ve ark. 1999, Fauturi ve ark. 2001).

İzolatların Poli-β-hidroksibütirik asit üretimlerinin belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlarda NaCl içeren yeast ekstrakt mannitol sıvı besiyerinde 150rpm, 27±2°C'de 48saat geliştirilen izolatlar, 40000xg'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış ve 50°C'de kurutulup tartımı yapılan pelletlerin üzerine, 5'er ml steril distile su eklenerek 3dakika sonikasyona bırakılmıştır. Hücre süspansiyonuna 2ml HCl (2N) eklenerek, 2saat boyunca 100°C'lik su banyosunda bekletilmiştir. 6000xg'de 20dk santrifüj sonrası elde edilen pelletlere; 5ml kloroform eklenmiş ve vorteklenmiştir. Daha sonra içerikler, 30°C'de 150rpm'de 24saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ise içerik, 6000xg'de 30dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası içerikten 0,1ml alınıp temiz tüpe aktarılmış ve 100°C'de kloroformun uçurulması sağlanmıştır. 5ml sülfirik asit eklenerek 100°C'de 10-20dk bekletilmiş, 235nm dalgı boyunda spektrofotometrede okuma yapılmıştır (Bonartseva ve Myshkina 1985). İzolatların kuru hücre ağırlıklarında depolanan PHB miktarı, PHB standart grafiği kullanılarak hesaplanmıştır (Bonartseva ve Myshina 1985).

İstatistiki analiz; MS Excel'de varyans analizine göre izolatlar arası, uygulamalar ve kendi aralarında karşılaştırılarak yapılmıştır (Yurtsever 1984).

Sonuçlar ve Tartışma

Yabancı *Vicia aintabensis* kök nodül izolatları bazı morfolojik ve fizyolojik özelliklerine göre incelenmiş ve izolatların koloni büyüklüklerinin agar ortamında 0,8-2,4mm arasında değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. İzolatların tümü çubuk şekilli ve hareketli olup, Gram negatiftir (Tablo 1). İzolatların koloni vizkoziteleri değişiklik göstermekle birlikte; V4.2 ve V4.5 nolu izolatlar oldukça yüksek mukoid koloni oluşturmuşlardır. Sıcaklığa toleranslılıklarında ise, değişiklik göstermişlerdir. Sekiz izolat 42°C'de, iki izolat 38°C'de gelişmiştir. Oksidaz reaksiyonu pozitifdir ve izolatlar test edilen karbon kaynaklarını (glukoz, mannitol, maltoz, ksiloz, mannan, sukroz, sakkaroz, galaktoz) asimile etmişlerdir. İzolatların gösterdikleri bu reaksiyonlar Bergeys'e göre *Rhizobium* bakterileri grubuna girmekle birlikte tür tanısında kesin veriler vermemektedir (Jordan 1984). Çalışmada amaç kök nodül izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişmelerinin incelenmesi ve PHB üretimlerinin belirlenmesi olduğundan tür düzeyindeki tanımlamaları bu çalışmada yapılmamıştır.

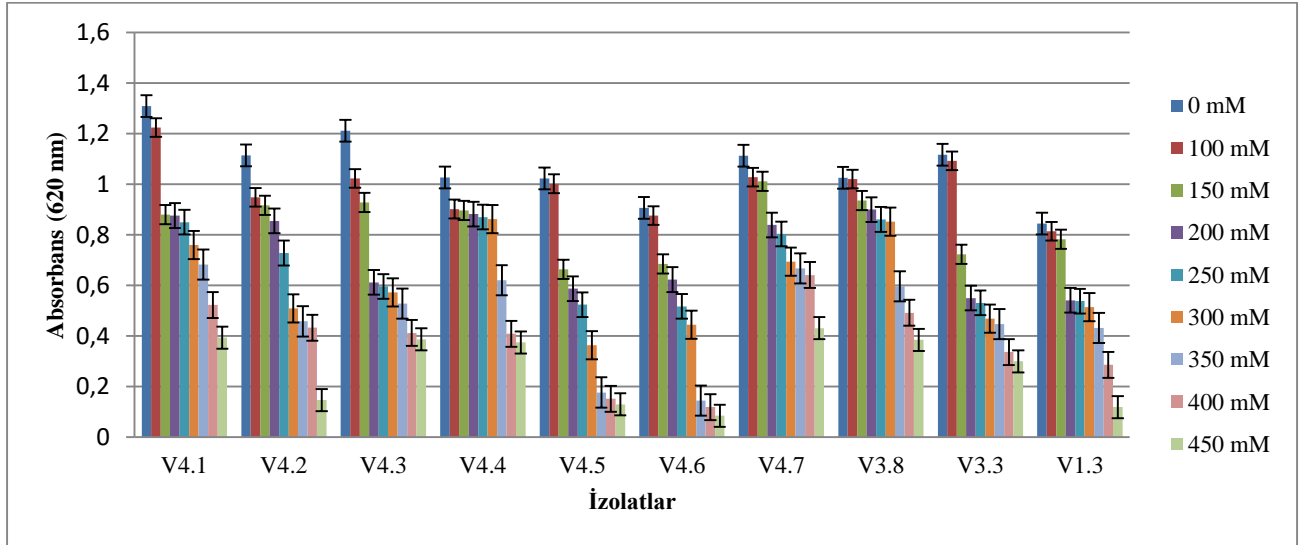
Çalışmada test edilen ve yabancı *Vicia aintabensis* kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* Frank izolatlarının farklı tuz konsantrasyonları içeren ortamlarda farklı gelişme sergiledikleri tespit edilmiştir (Şekil 1).

Yapılan benzer bir çalışmada da, 300mM'den fazla tuz konsantrasyonlarında *Sinorhizobium meliloti* Dangeard'ın gelişme gösterdiği rapor edilmiştir (Sauvage ve ark. 1983). Kassem ve ark. (1985) ise 750mM NaCl'e

Tablo 1. Yabani *Vicia aintabensis* kök nodül izolatlarının bazı morfolojik ve fizyolojik özellikleri.

Özellikler	İzolatlar									
	V4.1	V4.2	V4.3	V4.4	V4.5	V4.6	V4.7	V3.8	V3.3	V1.3
Gram boyama reaksiyonu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
YEMA'da Koloni büyüklüğü (mm)	2,1	2,0	1,5	0,8	1,1	2,2	2,4	2,0	2,2	1,6
Hücre şekli	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk	çubuk
Mukoz oluşumu	yüksek	çok yüksek	orta	düşük	çok yüksek	yüksek	orta	yüksek	düşük	orta
Farklı pH'larda üreme	5,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	6,5-8,5	5,5-8,5	5,5-8,5	6,5-8,5	5,5-8,5	5,5-8,5	6,5-8,5
Sıcaklık toleransı (°C)	42	42	42	42	42	38	42	38	42	42
Spor oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oksidaz reaksiyonu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Litmus milkte alkali reaksiyon	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kongo kırmızısı içeren YEMA da üreme	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: pozitif, -: negatif

**Şekil 1.** Farklı tuz konsantrasyonlarında *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının gelişimleri ($p < 0.05$).

Rhizobium Frank izolatlarının toleranslı olduğunu, 900mM NaCl içeren ortamda ise izolatların gelişmelerinin inhibe olduğunu saptamışlardır. El-Sheikh ve Wood (1990), nohut kök nodüllerinden izole ettikleri *Rhizobium* Frank izolatlarının Na₂SO₄, NaCl, MgSO₄, K₂SO₄ ve KCl gibi farklı tuzların %1 ve %1,5 düzeylerindeki konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda gelişebildiklerini belirlemişlerdir. İzolatlar arasında gelişimi en fazla inhibe olan V4.6 nolu izolat olarak saptanmıştır. Bunu sırası ile V4.5 ve V4.2 nolu izolatlar izlemiştir (Şekil 1). Farklı tuz

konsantrasyonlarının bulunduğu ortamlarda izolatlarımızın tuza karşı toleranslılıklarında belirlenen farklılıklarını, izolatların birbirlerinden farklı olmalarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Yapılan benzer çalışmada da, soyafasulyesi ve nohut kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının 340mM NaCl'e, börülce kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının ise 450mM NaCl'e toleranslı oldukları saptanmıştır (Abdal 2016). Saf kültürde ve toprak gibi kompleks ortamda

Tablo 2. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen yabancı *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının kuru hücre ağırlıkları ($g\ l^{-1}$), PHB içerikleri ($g\ l^{-1}$) ve varyans analizi.

İzolatlar	Kuru hücre ağırlıkları (KHA) ($g\ l^{-1}$)								
	0mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	350mM	400mM	450mM
V4.1	0,31	0,29	0,20	0,21	0,20	0,18	0,16	0,17	0,09
V4.2	0,26	0,22	0,21	0,20	0,17	0,12	0,10	0,29	0,03
V4.3	0,29	0,24	0,22	0,14	0,14	0,13	0,12	0,17	0,09
V4.4	0,24	0,22	0,21	0,20	0,20	0,20	0,15	0,09	0,08
V4.5	0,23	0,24	0,15	0,13	0,12	0,08	0,04	0,03	0,03
V4.6	0,22	0,21	0,16	0,14	0,12	0,16	0,03	0,02	0,02
V4.7	0,27	0,24	0,24	0,19	0,19	0,20	0,15	0,15	0,10
V3.8	0,25	0,24	0,22	1,14	0,21	0,21	0,14	0,11	0,09
V3.3	0,27	0,26	0,17	0,13	0,12	0,11	0,10	0,08	0,07
V1.3	0,12	0,19	0,18	0,12	0,12	0,12	0,10	0,06	0,02
Ortalama	0,236	0,235	0,196	0,26	0,159	0,151	0,109	0,117	0,062
İzolatlar	PHB içeriği ($g\ l^{-1}$)								
	0mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	350mM	400mM	450mM
V4.1	0,021	0,0057	0,0063	0,0067	0,0078	0,0098	0,0086	0,0071	0,0064
V4.2	0,018	0,0025	0,0052	0,0058	0,0062	0,0075	0,0104	0,0121	0,0035
V4.3	0,02	0,0048	0,0071	0,0076	0,008	0,0087	0,008	0,0073	0,0042
V4.4	0,008	0,0032	0,0045	0,0077	0,0083	0,0096	0,0106	0,0096	0,0045
V4.5	0,018	0,0043	0,0051	0,0056	0,0058	0,0074	0,0053	0,0025	0,0022
V4.6	0,021	0,0031	0,0047	0,0068	0,0092	0,0117	0,0081	0,0052	0,0047
V4.7	0,006	0,0015	0,0034	0,0045	0,0086	0,0092	0,0114	0,0098	0,0062
V3.8	0,012	0,0018	0,0031	0,0038	0,0042	0,0079	0,0077	0,0065	0,004
V3.3	0,009	0,0016	0,0044	0,0047	0,0061	0,0074	0,008	0,0082	0,0033
V1.3	0,013	0,0022	0,0028	0,0034	0,0038	0,005	0,0056	0,005	0,0021
Ortalama	0,015	0,0032	0,0051	0,0061	0,0074	0,0092	0,0092	0,0082	0,004
V.K.	S.D.	Kareler ortalaması (KHA)			Kareler ortalaması (PHB)				
Tekerrür	1	0,0004			0,00001				
Uygulama (U)	8	0,08**			0,29**				
Kontrol ve diğerleri	1	0,1**			0,14**				
Diğerleri	7	0,07**			0,31**				
Hata 1	8	0,002			0,0006				
İzolat (İ)	9	0,04*			0,01**				
İ x U	72	0,02*			0,005**				
Hata 2	161	0,0001			0,00003				

*, **: %5 ve %1'e göre önemli (sırasıyla)

mikroorganizmaların gelişimi, farklılık göstermektedir (Elsheikh ve Wood 1990). Rhizobial izolatların abiyotik strese dayanıklılıklarının farklı olduğu, tuz stresine maruz kaldıklarında ozmotik adaptasyon için farklı mekanizmaları kullandıkları bildirilmiştir (Arora ve ark.

2006). Tuza toleranslılığın, artan tuz düzeylerine toleranslı *Rhizobium* Frank izolatlarının nodül iletkenliğinin oksijenin yüksek stabilitesi ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Cordovilla ve ark. 1994, Ltaief ve ark. 2007).

Kurak bölge topraklarında yetişen baklagil kök nodüllerinden izole edilen *Rhizobium* Frank bakterilerinin yüksek tuz konsantrasyonlarında geliştiği Singleton ve ark. (1982) ve Ventorino ve ark. (2012) tarafından rapor edilmiştir. Arora ve ark. (2006) ise; dört *Sinorhizobium* Scholla & Elkan izolatının farklı tuz konsantrasyonlarında gelişmelerinde farklılık olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda farklı düzeylerde NaCl içeren ortamlarda izolatlarımızın gelişmelerinde belirlenen farklılık araştırmacıların bulguları ile benzerlik göstermektedir.

İzolatların PHB üretimi, farklı tuz konsantrasyonlarında incelenmiş ve her bir tuz konsantrasyonlarında depoladıkları PHB içeriğinde farklılık saptanmıştır (Tablo 2). En yüksek PHB içeriği 400mM NaCl içeren ortamda V4.2 izolatında $0,0121\text{gl}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. İzolatlardan V4.6 izolatı 300mM'de ($0,0117\text{gl}^{-1}$) en yüksek PHB üretmiştir. V4.4 ($0,0106\text{gl}^{-1}$), V4.7 ($0,0114\text{gl}^{-1}$) ve V1.3 ($0,0056\text{gl}^{-1}$) izolatları ise 350mM NaCl içeren ortamda yüksek PHB üretmişlerdir (Tablo 2).

İzolatların PHB üretimi, farklı tuz konsantrasyonlarında incelenmiş ve her bir tuz konsantrasyonlarında depoladıkları PHB içeriğinde farklılık saptanmıştır (Tablo 2). En yüksek PHB içeriği 400mM NaCl içeren ortamda V4.2 izolatında $0,0121\text{gl}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. İzolatlardan V4.6 izolatı 300mM'de ($0,0117\text{gl}^{-1}$) en yüksek PHB üretmiştir. V4.4 ($0,0106\text{gl}^{-1}$), V4.7 ($0,0114\text{gl}^{-1}$) ve V1.3 ($0,0056\text{gl}^{-1}$) izolatları ise 350mM NaCl içeren ortamda yüksek PHB üretmişlerdir (Tablo 2). İzolatların tümünde en düşük PHB içeriği tuz içermeyen ortamda (kontrol) tespit edilmiştir. İzolatların depoladıkları PHB, ortamdaki tuz konsantrasyonuna ve izolata göre farklılık göstermiştir. Kontrolle karşılaştırıldığında PHB içeriğindeki en yüksek artış; 250mM, 300mM, 350mM, 400mM ve 450mM NaCl içeren ortamlarda V4.7 nolu izolattan alınmıştır. Bu da, tuzlu koşullarda V4.7 bakteri izolatının PHB depolayabildiğini göstermektedir. Her bir izolatta PHB depolanması farklı tuz konsantrasyonlarında artmış, V4.2 izolatında ise en yüksek artış 400mM NaCl'de belirlenmiştir. İzolatların ürettiği PHB içerikleri ile geliştikleri ortamlarda yüksek ozmotik basınca tepki olarak biyopolimer sentezledikleri ve yüksek PHB üretilen tuz düzeyleri de izolatlar için optimum tuz konsantrasyonları olarak düşünülebilir. Bu değerleri daha iyi tahmin etmek için, ortamların optimizasyonları için ayrıntılı bir çalışma yapılması gerekmektedir. Belirli NaCl konsantrasyonlarında izolatlar tarafından üretilen PHB içeriklerinde düşüş meydana gelmiştir. Bu sonuç, PHB oluşumu için PHB biyosentez mekanizmasında inhibisyon oluşumunun meydana geldiğini göstermekte olup, artan tuz konsantrasyonuyla üretilen PHB içeriğinin düşük olması da ozmotik strese cevap olabilir.

PHB depolanmasının, tuza dayanıklı izolatlara göre değişiklik gösterebileceği açıklanmıştır (Ali ve ark. 2014, Arora ve ark. 2006, Kassem ve ark. 1985). Benzer olarak, tuz gölünden izole edilen *Bacillus megaterium* deBary uyuni S29 izolatının farklı tuz konsantrasyonları içeren ortamlardaki üreme durumları incelenmiştir (Rodriguez-

Contreras ve ark. 2016). S29 izolatı 45gl^{-1} NaCl, 100gl^{-1} NaCl ve 250gl^{-1} NaCl içeren ortamlarda gelişebilmiş ve PHB üretebilmişlerdir. Araştırmacılar tuz konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak biyomas ve PHB üretiminde bir azalma belirlemişlerdir (Rodriguez-Contreras ve ark. 2016). Araştırmacılar, S29 izolatının en iyi üreme gösterdiği 45gl^{-1} NaCl konsantrasyonunda en yüksek PHB depoladığını bildirmişlerdir. Yapılan bir araştırmada *Cupriavidus necator* Davis ve *Rhizobium* Frank DDSS-69'un maruz kaldıkları tuz stresi biyomas üretimlerini etkilememiş ve kontrole göre PHB depolanmasını arttırmıştır (Obruca ve ark. 2010). Çalışmamızda da artan tuz konsantrasyonlarında izolatlarımızın PHB içeriklerinde belirlenen artış, araştırmacıların sonuçları ile uyumludur.

Arora ve ark. (2006); yüksek ozmotik stres sırasında ortamda artan tuz düzeyinden dolayı, bakteriyal hücrelerin azot, potasyum veya diğer iyonları absorblamalarının zorlaşmasının hücre içinde PHB'nin depolanmaya başlamasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir. Kim ve ark. (1999) ise potasyumun azaldığı durumlarda bakteriyal hücrelerin PHB depoladıklarını yaptıkları çalışmalarında kanıtlamışlardır. Passanha ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, beş farklı (3, 5, 6, 5, 9, 12 ve 15gl^{-1}) NaCl konsantrasyonunun *Cupriavidus necator* Davis tarafından polialkonat (PHA) üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Ortamda tuz konsantrasyonunun artmasıyla, hücre içinde daha fazla miktarda PHB granülünün biriktiğini belirlemişlerdir. Bu çalışmada da Passanha ve ark. (2016)'nın bulgularına benzer olarak artan tuz konsantrasyonuna göre izolatlarda depolanmış PHB içeriklerindeki artış farklılık göstermiştir. Bu çalışmada araştırılan bakteri izolatları toplam kuru hücre ağırlığının %0,62-27'si arasında PHB üretmişlerdir (Tablo 3). Tuzlu koşullarda endofitik bakterilerden *Enterobacter aerogenens* Hormaeche & Edwards ET 101, *E. gergoviae* Hormaeche & Edwards ET 111, *E. aerogenens* Hormaeche & Edwards ET102 ve *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* Frank'ın pirinç gelişimi üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, bakteriyal izolatların ayrıca tuz içeren ortamda PHB ürettikleri saptanmıştır. Ozmotik koşullara toleranslı izolatların üretilen PHB %19,66-39,09 arasında değişiklik göstermiştir (Ali ve ark. 2014). Araştırmacılar özellikle en yüksek PHB üreten *E. aerogenens* Hormaeche & Edwards ET 101 izolatının tuzlu toprak koşullarında pirinç bitkisinin tuz stresine toleranslılığının artırılmasında etkili olduğunu belirlemişlerdir. Tablo 4'de farklı bakteri izolatlarının tuzlu içeren ortamlarda ürettikleri PHB miktarı verilmiştir. Üretilen PHB'nin bakteri türüne göre değişiklik gösterdiği ve aynı türün farklı izolatları arasında da PHB miktarının değiştiği görülmektedir (Tablo 4).

Sonuç olarak; yabani *Vicia aintabensis* kök nodül izolatlarının farklı konsantrasyonlardaki NaCl içeren ortamlarda gelişimleri farklılık göstermekle birlikte, yüksek tuz içeriği izolatların gelişmelerini sınırlandırmıştır. İzolatlar yüksek NaCl

Tablo 3. Farklı tuz konsantrasyonlarında geliştirilen yabancı *Rhizobium* sp. Frank izolatlarının PHB verimi (%).

İzolatlar	NaCl konsantrasyonları varlığında PHB verimi (%)								
	0mM	100mM	150mM	200mM	250mM	300mM	350mM	400mM	450mM
V4.1	6,77	1,96	3,15	3,19	3,9	5,44	5,4	4,17	7,11
V4.2	6,92	1,13	2,47	2,9	3,64	3,94	4	4,17	11,67
V4.3	6,89	2	3,22	5,42	5,71	6,69	6,47	4,29	4,67
V4.4	3,33	1,45	2,14	3,85	4,15	4,8	7,1	10,7	5,63
V4.5	7,82	1,79	3,4	4,30	4,83	9,25	13,3	8,3	7,33
V4.6	9,54	1,47	2,94	4,85	7,67	7,3	27	26	23,5
V4.7	2,22	0,63	1,42	2,36	4,52	4,6	7,6	6,53	6,2
V3.8	4,8	0,75	1,40	1,58	2	3,7	5,5	5,90	4,44
V3.3	3,33	0,62	2,58	3,62	5,08	6,7	8	10,25	4,71
V1.3	10,83	1,16	1,56	2,83	3,17	4,2	5,6	8,33	10,5

Tablo 4. Farklı bakteri izolatlarının farklı tuz konsantrasyonlarındaki PHB üretimleri

PHB üretici izolatlar	Tuz düzeyi	Kuru hücre ağırlığı (gl ⁻¹)	PHB (gl ⁻¹)	Kaynak
<i>Sinorhizobium</i> JB1 Dangeard	700mM		0,00136	Arora ve ark. 2006
<i>S.meliloti</i> MTCC 3402 Dangeard	500mM		0,00121	Arora ve ark. 2006
<i>S.meliloti</i> RMP5 Dangeard	300mM		0,00115	Arora ve ark. 2006
<i>Sinorhizobium</i> sp. Dangeard	300mM		0,00091	Arora ve ark. 2006
<i>B.megaterium</i> uyuni S29 deBary	5gl ⁻¹	2,60	1,17	Rodriguez-Contreras ve ark. 2014
<i>B.megaterium</i> uyuni S29 deBary	45gl ⁻¹	5,42	2,22	Rodriguez-Contreras ve ark. 2014
<i>B.megaterium</i> uyuni S29 deBary	100gl ⁻¹	3,20	0,72	Rodriguez-Contreras ve ark. 2014
<i>Enterobacter aerogenens</i> Hormaeche & Edwards	8gl ⁻¹	1,10	0,430	Ali ve ark. 2014
<i>E.gergovise</i> Hormaeche & Edwards	8gl ⁻¹	1,15	0,422	Ali ve ark. 2014
<i>E.aerogenens</i> (L.) Hormaeche & Edwards	8gl ⁻¹	1,20	0,236	Ali ve ark. 2014
<i>R.leguminosarum</i> Frank	8gl ⁻¹	0,308	0,308	Ali ve ark. 2014
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.1	300mM	0,18	0,098	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.3	300mM	0,13	0,0087	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.5	300mM	0,08	0,0074	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.6	300mM	0,16	0,0117	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V3.8	300mM	0,21	0,0079	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.4	350mM	0,15	0,0106	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.7	350mM	0,15	0,0114	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V1.3	350mM	0,10	0,0056	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V4.2	400mM	0,29	0,0121	Bu çalışmada
<i>Rhizobium</i> sp. Frank V3.3	400mM	0,08	0,0082	Bu çalışmada
<i>Cupriavidus necator</i> Davis	2gl ⁻¹	10,1	6,36	Obruca ve ark. 2010
<i>C. necator</i> Davis	5gl ⁻¹	9,3	5,16	Obruca ve ark. 2010

konsantrasyonlarında en yüksek PHB sentezini yapmışlardır. İzolatların tümünde, kontrol (NaCl içermeyen) uygulamasında depolanan PHB içeriği, artan tuz düzeylerinde depolanan PHB içeriğine göre oldukça düşük bulunmuştur. Tuzlu koşullarda PHB depolamasının tuza toleranslı izolatlarla bağlı olduğu düşünülmektedir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, tuzlu koşullarda bakteriyal hücrelerin korunmasında PHB'nin rolünü

desteklemiştir. Tuzlu çevrelerde *Rhizobium* izolatlarının tuza toleranslı simbiyotik izolatları ile aşılama, konukçu baklagillerin strese toleranslılığını arttırabilecektir. Çalışmada test edilen izolatların tuzlu toprakların ıslahında da kullanılabileceği ve tuza toleranslı olan bu izolatların PHB üreterek canlılıklarını koruyabildikleri saptanmıştır.

Kaynaklar

1. Abdelmoumen, H., Filali-Maltouf, A., Belabed, A. & Missbah El-Idrissi, M., 1999. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 889–898.
2. Abdel-Wahab, H.H. & Zahran, H.H. 1979. Salt tolerance of *Rhizobium* species in broth culture. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, 19: 681-685.
3. Aldal, H.K.H. 2016. Effect of different salt concentrations and pH on the growth of *Rhizobium* isolated from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *International Journal of Advanced Research*, 4: 444-448.
4. Ali, A., Shaban, K.A. & Tantawy, E.A. 2014. Effect of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) and glycogen producing endophytic bacteria on yield, growth and nutrient contents in rice cultivated in saline soil. *Applied Science Reports*, 8: 134-142.
5. Anderson, A.J. & Dawes, E.A. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54: 450-472.
6. Arora, N.K., Singhal, J. & Maheshwari, D.K. 2006. Salinity induced accumulation of poly- β -hydroxybutyrate in rhizobia indicating its role in cell protection. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22: 603-606.
7. Bonartseva, G.A. & Myshkina, V.L. 1985. Fluorescence intensity of strains of nodule bacteria (*Rhizobium meliloti*, *R. phaseoli*) different in activity, grown in the presence of the lipophilic vital strain phosphine R. *Translation of Microbiologiya*, 54(4): 535-541.
8. Charles, T.C., Cai, G.Q. & Aneja, P. 1997. Megaplasmid and chromosomal loci for the PHB degradation pathway in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Genetics*, 146:1211-1220.
9. Cordovilla, M.P., Ligerio, F. & Lluch, C. 1994. The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany*, 45:1483-1488.
10. Çullu, M.A. 2011. *Toprak tuzlulaşması. T.C. Kalkınma Bakanlığı Güneydoğu Anadolu Projesi Bölge Kalkınma İdaresi Başkanlığı, Şanlıurfa* 96 sayfa.
11. El-Mokadem, E.A.E., Helemis, F.A., Abdel-Wahab, S.M. & Abou-El-Nour, M.M. 1991. Salt response of clover and alfalfa inoculated with salt tolerant strains of *Rhizobium*. *Ain Shams Science Bulletin*, 28: 441-468.
12. El-Sheikh, E.A.E. & Wood, M. 1990. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, 22: 343-347.
13. El-Sheikh, E.A.E. & Wood, M. 1995. Nodulation and N₂ fixation by soybean inoculated with salt tolerant rhizobia or salt-sensitive bradyrhizobia in saline soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 27: 657-661.
14. Fauturi, M.Y., El-Mahi, Y.E. & El-Hassan, G.A. 2001. Effects of some salts and sodicity on the growth of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain isolated from a salt affected soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 807-812.
15. Gorji, T., Tanık, A. & Sertel, E. 2015. Soil salinity prediction, monitoring and mapping using modern Technologies. *Procedia Earth and Planetary Science*, 15:507-512.
16. Hua, S.T., Tsai, V.Y., Lichens, G.M. & Noma, A.T. 1982. Accumulation of aminoacids in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 44: 135-140.
17. Jordan, D.C. 1984. *Genus I. Rhizobium Frank 1889. In: Krieg, NR, Holt JG (Eds.), Bergeys Manual of Systemic Bacteriology*, Vol.1 Williams & Wilkins, Baltimore, pp 136-139.
18. Junior, P.I.F., de Oliveira, P.J., Rumjanek, N.G. & Xavier, G.R. 2011. Poly- β -hydroxybutyrate and exopolysaccharide biosynthesis by bacterial isolates from pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Mill sp.) root nodules. *Applied Biochemistry Biotechnology*, 163: 473-484.
19. Kassem, M., Cappelano, A. & Gounot, A.M. 1985. Effet du chlorure de sodium sur la croissance in vitro, l'infectivité et l'efficience de *Rhizobium meliloti*. *Mircen Journal*, 1: 63 75.
20. Kim, J., Shin, T.K., Choi, H.J. & Jhon, M.S. 1999. Miscibility of biodegradable synthetic aliphatic polyester and poly(epichlorohydrin) blends. *Polymer*, 40: 6873–6876.
21. Küçük, Ç., Cevheri, C. & Çetin, E. 2011. Şanlıurfa'daki doğal baklagillerin *Rhizobium* potansiyellerinin belirlenmesi. Sayfa 445-452. I. Ali Numan Kırarç Tarım Kongresi ve Fuarı Bildiriler Kitabı 27-30 Nisan 2011, Eskişehir.
22. Lakshmi, R.S., Hema, T.A., Divya, T.R. & Starin, S.T. 2012. Production and optimization of polyhydroxybutyrate from *Rhizobium* sp. present in root nodules. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 3: 21-25.
23. Ltaief, B., Sifi, B., Zaman-Allah, M., Drevon, J. & Lachaal, M. 2007 Effect of salinity on root–nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum*–*Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *Journal Plant Physiology*, 164:1028–1036.
24. Mashhady, A.S., Salem, S.H., Barakh, F.N. & Heggo, A.M. 1998. Effect of salinity on survival and symbiotic

- performance between *Rhizobium meliloti* and *Medicago sativa* in Arabian soils. *Arid Soil Research Rehabilitation*, 12: 3-14.
25. Obruca, S., Marova, I., Svoboda, Z. & Mikulikova, R. 2010. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiology*, 55: 17-22.
 26. Passanha P., Kedia, G., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. & Esteves, S.R. 2014. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology*, 163: 287–294.
 27. Rodriguez-Contreras, A., Koller, M., Braunegg, G., & Marquez-Calvo, M.S. 2016. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] production under different salinity conditions by a novel *Bacillus megaterium* strain. *New Biotechnology*, 33: 73-77.
 28. Sauvage, D., Hamelin, J. & Larher, F. 1983 Glycine betaine and other structurally related compounds improve the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Plant Science Letters*, 31: 291-302.
 29. Singleton, P.W., Singleton, S.A., El-swaifi, B.B. & Bohlool, B. 1982. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Applied Environmental Microbiology*, 44: 884–890.
 30. Stam, H., van Verseveld, H.W., de Vries, W. & Stouthamer, A.H. 1986. Utilisation of poly- β -hydroxybutyrate in free living cultures of *Rhizobium* ORS571. *FEMS Microbiology Letters*, 35: 215-220.
 31. Tate, R.L. 1995. *Soil Microbiology (Symbiotic Nitrogen Fixation)*, p. 307-333. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
 32. Tombolini, R. & Nuti, M.P. 1989. Poly-(β -hydroxyalkanoate) biosynthesis and accumulation by different *Rhizobium* species. *FEMS Microbiology Letters*, 60: 299-304.
 33. Ventorino, V., Caputo, R., De Pascale, S., Fagnano, M., Pepe, O. & Moschetti, G. 2012. Response to salinity stress of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strains in the presence of different legume host plants. *Annals of Microbiology*, 62: 811-823.
 34. Yurtsever, N. 1984. *Deneysel istatistik metodları*. Tarım Orman ve Köy Hizmetleri Genel Müdürlüğü Yayın No: 121, 623 sayfa, Ankara.
 35. Zahran, H.H. 1991. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biology Fertility Soils*, 12:73-80.
 36. Zahran, H.H. & Sprent, J.I. 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* 167: 303-309.