



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**DİAZOTROFİK KOŞULLARDA
ÇOĞALTILAN *RHODOBACTER*
SPHAEROIDES O.U.001 İLE HİDROJEN
ÜRETİMİ VE *nifH* GEN İFADE ANALİZİ**

Merve SERT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Temmuz-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİAZOTROFİK KOŞULLARDA ÇOĞALTILAN *RHODOBACTER SPHAEROIDES* O.U.001 İLE HİDROJEN ÜRETİMİ VE *nifH* GEN İFADE ANALİZİ

Merve SERT

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gökhan KARS

2022, 77 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Gökhan KARS

Doç. Dr. Buğrahan EMSEN

Dr. Öğretim Üyesi Tuğba Nur ASLAN

Fotosentetik bakteri grubundan olan mor kükürtsüz (PNS) bakteriler hidrojen (H_2) üretimi, azot (N_2) ve karbondioksit (CO_2) fiksasyonu gibi zengin metabolik aktivitelere sahip olduklarından farklı fizyolojik koşullarda yaşamlarını sürdürebilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı PNS bakterileri temel metabolik olayların araştırılmasında model organizma olarak kullanılmıştır. Fotosentetik ve mor kükürtsüz bakterilerden biri olan *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 de N_2 fiksasyonu, H_2 ve polihidroksibutirat (PHB) üretimi gibi çok yönlü metabolizmaya sahip olup tüm genom dizisinin bilinmesi nedeniyle araştırmalarda sıkça kullanılan model bir bakteridir. Bu çalışmanın amacı, diazotrofik (N_2 'nin sabitlendiği) koşullarda kültüre edilen *R. sphaeroides* ile hidrojen üretimi gerçekleştirmektir. Bu kapsamda bakteriler karbon kaynağı olarak malat'ın (15 mM) ve azot kaynağı olarak N_2 'nin kullanıldığı besiyerinde çoğaltılmıştır. Kontrol grubu olarak ise karbon kaynağı olarak malat'ın (15 mM) ve azot kaynağı olarak glutamat'ın (2 mM) kullanıldığı besiyeri (non diazotrofik ortam) kullanılmıştır. Hidrojen üretimlerine ek olarak azot fiksasyonu sonucu oluşan amonyum miktarları da ölçülmüştür. Ayrıca, bu iki koşul altında çoğaltılan bakterilerde *nifH* geninin ekspresyon seviyesi kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile tespit edilmiştir. Ek olarak, bu iki farklı fizyolojik koşulun bakteri morfolojisine etkisi alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile incelenmiştir. Sonuçlara göre, diazotrofik koşullarda 13,95 mL hidrojen üretilirken, non diazotrofik koşullarda 11,05 mL hidrojen üretimi tespit edilmiştir. Bu sonuca paralel olarak, diazotrofik koşullardaki *nifH* gen ekspresyonu non diazotrofik koşullardaki gen ekspresyonunun 2,3 katı olarak hesaplanmıştır. Diazotrofik ve non diazotrofik kültürlerde ölçülen amonyum miktarları da sırasıyla 5,05 mg/L ve 3,38 mg/L olarak bulunmuştur. Bu iki koşulda çoğaltılan bakterilerin FE-SEM görüntüleri incelendiğinde ise bakterilerin morfolojilerinde belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. Sonuç olarak, diazotrofik büyüme koşullarında kültüre edilen *R. sphaeroides* ile daha yüksek miktarlarda hidrojen, *nifH* gen ifadesi ve sabitlenmiş amonyum tespit edilmiştir. Bu sonuç, azotun hidrojen üretiminden sorumlu olan nitrojenaz enziminin aktivite veya miktarını stimüle ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Gelecekteki çalışmalarda enzim miktar ve aktivite tayinleri ile bu bulguların desteklenmesi öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Azot; Diazotrofik; Hidrojen; *Rhodobacter sphaeroides*

ABSTRACT

MS THESIS

HYDROGEN PRODUCTION BY *RHODOBACTER SPHAEROIDES* O.U 001 GROWN UNDER DIAZOTROPHIC CONDITIONS AND EXPRESSION ANALYSIS OF *nifH* GENE

Merve SERT

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN MOLECULAR BIOLOGY
AND GENETICS

Advisor: Prof. Dr. Gökhan KARS

2022, 82 Pages

Jury

Prof. Dr. Gökhan KARS

Assoc. Prof. Dr. Buğrahan EMSEN

Assist. Prof. Dr. Tuğba Nur ASLAN

Purple nonsulfur (PNS) bacteria from the photosynthetic bacteria group can survive in different physiological conditions as they have rich metabolic activities such as hydrogen (H₂) production, nitrogen (N₂) and carbon dioxide (CO₂) fixation. Because of these properties, PNS bacteria have been used as a model organism in the investigation of basic metabolic events. *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001, one of the photosynthetic and purple nonsulphur bacteria, is frequently used in research as a model bacterium because it has a versatile metabolism such as N₂ fixation, H₂ and polyhydroxybutyrate (PHB) production and its whole genome sequence is known. The aim of this study is to perform hydrogen production with *R. sphaeroides* cultured under diazotrophic (N₂ fixation) conditions. In this context, bacteria were propagated in a medium using malate (15 mM) as a carbon source and N₂ as a nitrogen source. As the control group, medium (non-diazotrophic medium) containing malate (15 mM) as carbon source and glutamate (2 mM) as nitrogen source was used. In addition to hydrogen production, ammonium amounts formed as a result of nitrogen fixation were also measured. In addition, the expression level of the *nifH* gene in bacteria grown under these two conditions was determined by quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR). Finally, the effects of these two different physiological conditions on bacterial morphology were investigated by field emission scanning electron microscopy (FE-SEM). According to the results, 13.95 mL of hydrogen was produced under diazotrophic conditions, while 11.05 mL of hydrogen was produced under non-diazotrophic conditions. In parallel with this result, *nifH* gene expression in diazotrophic conditions was calculated as 2.3 times the gene expression in non-diazotrophic conditions. Ammonium amounts measured in diazotrophic and non-diazotrophic cultures were found to be 5.05 mg/L and 3.38 mg/L, respectively. When the FE-SEM images of bacteria grown in these two conditions were examined, no significant difference was observed in the morphology of the bacteria. As a conclusion, higher amounts of hydrogen, *nifH* gene expression and fixed ammonium were detected in *R. sphaeroides* cultured under diazotrophic growth conditions. This result was interpreted as nitrogen stimulating the activity or amount of nitrogenase enzyme, which

is responsible for hydrogen production. In future studies, it is projected that these findings will be supported by enzyme amount and activity tests.

Keywords: Diazotrophic; Hydrogen; Nitrogen; *Rhodobacter sphaeroides*

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında desteklerini esirgemeyen yüksek lisans danışman hocam Prof. Dr. Gökhan Kars'a, tezime katkılarından dolayı Arş. Gör. Dr. Gülizar Kurtoğlu Akkaya'ya, değerli tez jüri üyeleri Doç. Dr. Buğrahan Emsen ve Dr. Öğretim Üyesi Tuğba Nur Aslan'a, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvar arkadaşlarıma, çalışmalarımı birlikte yürüttüğüm ve en zor anlarımı paylaştığım Kader Çakır, Kübra Danış ve Buse Nur Bingöl'e, hayatımın her aşamasında bana motivasyon ve destek veren arkadaşlarım Tuğba Aydın ve Tutku Dilara Akkaya'ya teşekkür ederim. Tüm hayatım boyunca yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, varlığıyla yaşama tutunduğum anneme, yoluma hep ışık tutan, hakkını asla ödeyemeyeceğim ablam Gül'e, üzerimde çok emeği olan ablam Bahar'a, biricik kardeşim Murat'a teşekkür ederim. Bu tezi; yokluğunu derinden hissettiğim, her anımda özlemle andığım, rahmetli babacığma ithaf ediyorum.

Merve SERT
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Hidrojen	6
2.2. Hidrojen Üretimi.....	8
2.2.1. Biyofotoliz	10
2.2.1.1. Doğrudan biyofotoliz	11
2.2.1.2. Dolaylı biyofotoliz	11
2.2.2. Biyolojik yolla suyun gaza dönüşümü.....	12
2.2.3. Fermantasyon.....	13
2.2.3.1. Karanlık fermantasyon.....	13
2.2.3.2. Fotofermantasyon	14
2.2.4. İki basamaklı hidrojen üretimi	15
2.3. Fotosentetik Bakteride Hidrojen Üretimi	16
2.4. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001.....	18
2.5. Hidrojen Üretim Mekanizması	20
2.5.1 Hidrojenaz.....	20
2.5.2. Nitrojenaz.....	21
2.6. Nitrojenazın Transkripsiyonel Regülasyonu	23
2.7. Gen Ekspresyon Analizleri	23
2.7.1 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.....	25
2.7.2. RNA izolasyonu.....	26
2.7.3. Revers Transkripsiyon ve qRT-PCR ilişkisi.....	27
2.7.4. PCR amplifikasyonu	27
2.7.5. PCR'ın gerçek zamanlı izlenmesi.....	29
2.7.6. Gerçek zamanlı PCR'de relatif gen ekspresyon verilerinin analizinde kullanılan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu	30
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001.....	32
3.2. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> O.U.001'in Kültür Koşulları	32
3.2.1. Non diazotrofik kültür ortamı	32

3.2.2. Diazotrofik kültür ortamı	35
3.3. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri	37
3.4. Toplam Amonyum Miktarının Belirlenmesi	37
3.5. Diazotrofik ve Non-diazotrofik Büyüme Şartlarında Hidrojen Üretimi.....	39
3.6. Gaz Kromatografisiyle Hidrojen Saflık Analizi	41
3.7. Genomik DNA İzolasyonu	41
3.8. Toplam RNA İzolasyonu	42
3.9. Primer Tasarımı ve Validasyonu	44
3.9.1. Primer tasarımı.....	44
3.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	44
3.9.3. Agaroz jel elektroforezi	45
3.10. <i>nifH</i> Gen Ekspresyon Analizi	46
3.10.1. cDNA sentezi.....	47
3.10.2. Gerçek Zamanlı PCR.....	47
3.11. Taramalı Elektron Mikroskopu Analizleri.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	50
4.1. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri	50
4.1.1. Büyüme eğrileri	50
4.1.2. pH analizleri.....	51
4.2. Toplam Amonyum Analizleri.....	53
4.3. Diazotrofik ve Non Diazotrofik Koşullarında Hidrojen Üretimi.....	54
4.4. Gaz Kromatografisi Analizi.....	56
4.5. Primer Tasarımı ve Primerlerin Validasyonu	56
4.5. Diazotrofik ve Non Diazotrofik Koşullarındaki <i>nifH</i> Ekspresyon Analizi.....	57
4.6. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskopu Analizleri.....	59
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
5.1. Sonuçlar	60
5.2. Öneriler	61
6. KAYNAKLAR	62

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Hidrojenin yakıt özellikleri.	7
Tablo 2.2. Biyohidrojen üreten mikroorganizma çeşitleri ve türleri.	9
Tablo 2.3. <i>Rhodobacters sphaeroides</i> 'in sistematik sınıflandırılması.	18
Tablo 3.1. B&P minimal besiyeri (15 mM Malat/2mM Na Glutamat) içeriği.	33
Tablo 3.2. Eser element çözeltisi.	34
Tablo 3.3. Vitamin çözeltisi.	34
Tablo 3.4. Modifiye edilmiş B&P besiyeri bileşimi.	36
Tablo 3.5. Tasarlanan primerler.	44
Tablo 3.6. PCR içeriği.	45
Tablo 3.7. PCR döngüsü.	45
Tablo 3.8. Gerçek zamanlı PCR içeriği.	48
Tablo 3.9. Gerçek zamanlı PCR programı.	48
Tablo 4.1. <i>Rhodobacter sphaeroides</i> 'ten elde edilen DNA'nın absorbands ve konsantrasyonu.	56

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. 1. Enerji kaynaklarının sınıflandırılması.	1
Şekil 2. 1 Doğrudan biyofotoliz ile biyohidrojen üretimi.	11
Şekil 2. 2. Dolaylı biyofotoliz ile biyohidrojen üretimi.	12
Şekil 2. 3. Fotofermantasyonla hidrojen üretimi	15
Şekil 2. 4 Fotofermantasyon işleminde hidrojen üretim şeması	17
Şekil 2. 5. <i>R. sphaeroides</i>	19
Şekil 2. 6. Mo-nitrojenaz enzim yapısı.	22
Şekil 2. 7. Gen ifade basamakları	24
Şekil 3. 1. <i>R. sphaeroides</i> 'in non dizotrofik ortamda büyüme aşamaları.	35
Şekil 3. 2. <i>R. sphaeroides</i> 'in modifiye sıvı besiyerindeki görüntüsü.	37
Şekil 3. 3. Santrifüjlenen bakteri peletleri ve hidrojen üretim düzeneği.	40
Şekil 4. 1 Farklı azot kaynaklarıyla büyüyen bakterinin zamana bağlı OD değerler.	51
Şekil 4. 2. Zamana bağlı pH değişimleri.	52
Şekil 4. 3. Bakteri bünyesindeki amonyum miktarının zamana bağlı değişimi.	54
Şekil 4. 4 Diazotrofik ve nondiazotrofik büyüme ortamlarında çoğaltılan <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ile hidrojen üretimi.	55
Şekil 4. 5 <i>nifH</i> ve 16S rRNA PCR ürünleri.	57
Şekil 4. 6 <i>nifH</i> geninin diazotrofik koşullarda zamana bağlı gen ifadesi (Gen ifadesi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ olarak hesaplanmıştır).	58
Şekil 4. 7 Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu görüntüleri A) Non diazotrofik besiyeri B) Diazotrofik besiyeri.	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

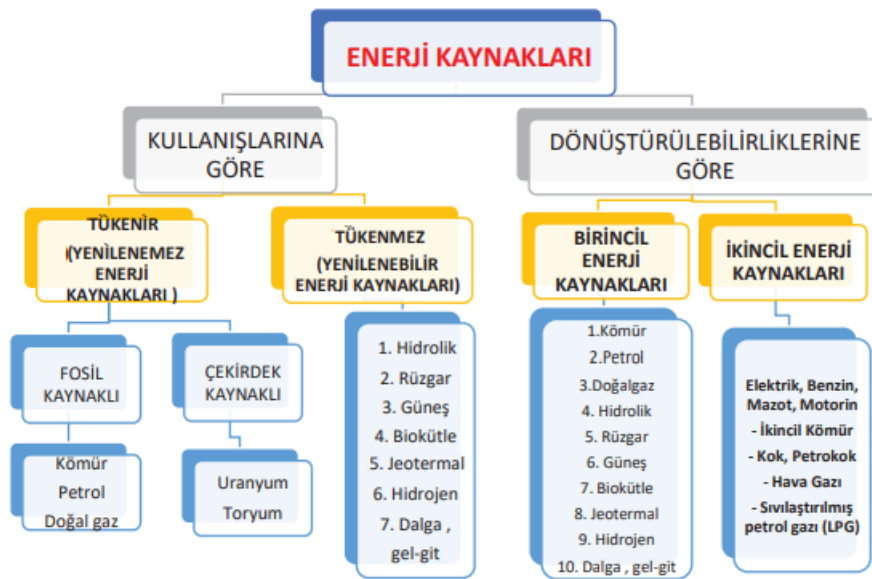
nm	Nanometre
bp	Baz çifti
Ct	Döngü sayısı
µL	Mikrolitre
µM	Mikromolar
mM	Milimolar
µg	Mikrogram

Kısaltmalar

ATP	Adenozin Trifosfat
cDNA	Komplementer DNA
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Trifosfat
GC	Gaz Kromatografisi
mRNA	Mesajcı RNA
NAD/NADH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
<i>nifH</i>	Mo-Nitrogenaz geni
OD	Optik Yoğunluk
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PSI	Fotosistem I
PSII	Fotosistem II
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RNAzH	Ribonükleaz H
TCA	Tri Karboksilik Asit Döngüsü
tRNA	Taşıyıcı RNA

1. GİRİŞ

Enerji doğa ve insan yaşamı için gerekli bir unsurdur. Dünya nüfusunun artışı, ekonomik ve sosyal yaşam standartlarının yükselmesiyle nedeniyle enerjiye olan talep büyük ölçüde artmıştır. Toplam enerji tüketiminin 2040 yılına kadar %40 oranında artacağı tespit edilmiştir (Cronshaw, 2015) Bu nedenle enerjinin hangi kaynaktan ve nasıl elde edildiği önem teşkil etmektedir. Enerji kaynakları doğada dönüşüm süreçlerine göre birincil ve ikincil enerji kaynakları, kullanımlarına göre yenilenebilir ve yenilenemez olarak sınıflandırılır (Şekil 1.1). Birincil enerji kaynakları doğada kendiliğinden oluşan kaynaklardır. Bu kaynaklara örnek olarak petrol, kömür, doğal gaz, nükleer, hidrolik, biyokütle, dalga-gelgit, güneş ve rüzgâr enerjileri verilebilir. Birincil enerji kaynaklarının dönüşümü ile ikincil enerji oluşur. Elektrik, benzin, mazot, motorin, hayvansal ve bitkisel atıklar, hava gazı ve sıvılaştırılmış petrol gazı (LPG) ikincil enerji kaynaklarıdır Yenilenemez enerji kaynakları fosil kökenlidir, yeniden üretilmesi milyonlarca yıl alır. Sanayileşmiş ülkelerin enerji ihtiyacının büyük çoğunluğu kömür, doğal gaz gibi fosil kökenli kaynaklardan elde edilmektedir. Ancak yapılan araştırmalar fosil yakıtların gelecekte artan nüfusa ve sanayileşmeye paralel olarak yetersiz kalacağını göstermektedir (Stupar ve ark., 2021).



Şekil 1. 1. Enerji kaynaklarının sınıflandırılması (Koç ve ark., 2015).

Fosil yakıtlarının kullanımı ile birlikte atmosfere sera gazı salınımı gerçekleşir. Atmosferde, başta karbondioksit olmak üzere biriken sera gazları küresel ısı artışına neden olur. Bu durum yenilenebilir enerji kaynaklarına olan ihtiyacı artırmıştır. Yenilenebilir enerji kaynaklarına yeşil enerji veya sürdürülebilir enerji de denir. Bu kaynaklara örnek olarak; hidrolik, Güneş, biyokütle, rüzgâr, jeotermal, dalga, gelgit ve hidrojen verilebilir (Koç ve ark., 2015)

Atmosferin yaklaşık % 0,07'si, toprak yüzeyinin ise yaklaşık % 0.14'ü hidrojen içerir. Hidrojenin enerji içeriği (149.1 kJ/g), yaygın fosil yakıtların çoğundan çok daha yüksektir. Hidrojen, en hafif element olup yandığında doğaya zarar vermez. Yanma ürünü olarak su buharı oluşturur. Fosil yakıtlardan olan doğal gaz ve kömüre göre alevlenme sıcaklığı (570°C) yüksektir. Çevre dostu ve verimlidir. Yenilenebilir bir kaynak olan hidrojen, gelecekte güvenilir bir enerji taşıyıcısı olarak görülmektedir (Baykara, 2018). Hidrojen gazı üretiminde atık sorununu en aza indirmek için biyolojik hidrojen üretimi tercih edilir. Biyohidrojen, biyolojik yöntemlerin kullanılmasıyla sürdürülebilir enerji kaynaklarından elde edilir. Biyolojik hidrojen üretiminde katma değeri yüksek yan ürünler de üretilir. Bunlara örnek olarak B12 vitamini, karotenoidler, biyoplastik (poli-β-hidroksi bütirat, PHB), 5-Aminolevulinik asit (5-ALA) verilebilir (Kars ve Gündüz, 2010). Hidrojen, mikroorganizmalarda; bazı algler, anaerobik bakteriler ve fotosentetik bakteriler ile üretilmektedir (Adessi ve De Philippis, 2014).

Fotosentetik bakteriler biyohidrojen üretiminde diğer bakterilere göre daha çok verim elde edilmektedir. Fotosentetik bakteri grubuna giren mor kükürtsüz (PNS) bakteriler değişen çevre şartlarına uyum sağlayarak, çeşitli metabolik aktiviteler göstermektedirler (Das ve Veziroglu, 2008). Bu özellikleri birçok çalışmada model organizma olarak kullanılmalarına sebep olmuştur. Azot ve karbon fiksasyonu oksijensiz fotosentez ve membran biyo enerjisi gibi metabolik olayların çalışılmasında model organizma olarak kullanılmıştır. Elektron donörü olarak kükürdü kullanmadıklarından kükürtsüz bakteri olarak tanımlanırlar. PNS bakteri grubundan olan *R. sphaeroides* biyohidrojen ve yüksek katma değerli birçok ürünün üretiminde konak hücre olarak kullanılmıştır (Kars ve Gündüz, 2010). Ayrıca, *R. sphaeroides*'in

bazı suşlarının (Örneğin, *R. sphaeroides* 2.4.1) tüm genom dizilerinin bilinmesi bilimsel çalışmalardaki genetik manipülasyonları kolaylaştırmıştır. Ayrıca, *E.coli* ve diğer birçok gram negatif bakteriye kıyasla sistemik immün reaksiyonlara neden olmayışı, bu bakterinin kullanılmasında tercih sebebi olmuştur. *R. sphaeroides*, mor kükürtsüz bir bakteri olup gram negatif ve proteobakterilerin α -altbölümü içerisinde yer alır. Oksijenli ve oksijensiz ortamda büyüyebilir. İzole edilme yerleri derin göl ve durgun sulardır. *R. sphaeroides* metabolik özellikleri açısından farklılık gösterir. Fotoototrof, fotoheterotrof, oksijenli ve oksijensiz solunum, fermantasyon gibi mekanizmalarla enerjiyi elde edebilir. Önemli özellikleri arasında moleküler azotu sabitleme, klorofil ve B12 vitaminini sentezleme örnek gösterilebilir. Morfolojik olarak genellikle küresel, oval şekillidirler. *R. sphaeroides*'in büyüebilmesi için ortam pH'ı 6-8.5 ve sıcaklık 29-30 °C olmalıdır (Kars ve Alparslan, 2013).

R. sphaeroides'de, hidrojen üretimini katalizleyen temel enzim nitrojenaz enzimidir (Kars ve Gündüz, 2010). Bu enzimin birincil görevi atmosferdeki serbest azotun amonyaka dönüştürülmesidir. Bu özelliği azotun canlılar tarafından kullanılabilir hale getirilmesinde ve aynı zamanda doğadaki fiksasyon mekanizmasının işleminde önemlidir. Doğada genetik olarak üç farklı nitrojenaz enzim sistemi (nif, vnf, anf) olduğu bilinmektedir. En yaygın olarak karakterize edilen sistem, tüm diazotroflarda bulunan Mo içeren nitrojenazdır (nif). Üç nitrojenaz sisteminin hepsi, iki ayrışabilir metalloprotein bileşen içerir; bileşen 1 dinitrojenaz (MoFe proteini, VFe proteini, FeFe proteini) ve bileşen 2 dinitrojenaz redüktaz (Fe proteini). Tek bir [Fe₄S₄] kümesi tarafından köprülenen iki özdeş alt birimin bir dimeri olan bileşen 2, tüm nitrojenaz sistemlerinde özdeş bir yapıya sahiptir. Alternatif nitrojenazların bileşen 1'i (VFe proteini ve FeFe proteini), geleneksel tetramerik MoFe proteininden farklı olarak α ve β alt birimlerine ek olarak içerdiği 14 kDa γ alt birimi ile heksamerik yapıya ($\alpha_2\beta_2\gamma_2$) sahiptir. Bu enzim iki oksijene duyarlı metalloproteinden oluşur, tek bir [4Fe-4S] merkezi içeren ve MoFe proteinine spesifik ATP'ye bağımlı elektron donörü görevi gören ve *nifH* geni tarafından kodlanan bir Fe proteini ve *nifDK* genleri tarafından kodlanan MoFe proteini. Nitrojenaz enzimlerinin ana görevi azot fiksasyonu ile moleküler azotu amonyuma dönüştürmektir. Ancak, N₂

gibi herhangi bir substratın yokluğunda nitrojenaz, ATP'ye bağımlı hidrojenaz gibi davranır ve tüm elektronlar, hidrojen üretiminde kullanılır. Nitrojenaz enzimi sıkı genetik kontrol altında olup iç (intrinsic) ve dış (extrinsic) faktörlerden etkilenmektedir. Nitrojenaz enzim aktivitesini etkileyen başlıca dış/çevresel faktörler; ortamdaki oksijen, sabitlenmiş azot (NH_4) varlığı ve miktarı, ışık, moleküler nitrojen varlığı ve ortamda bulunan metal iyonlarının (demir ve molibden) miktarıdır. Ek olarak, hücrelerin redoks durumu, iç (intrinsic) bir faktör olarak nitrojenaz aktivitesini etkiler. *R. sphaeroides* bir çeşit nitrojenaz enzimi (Mo-Fe proteini içeren nitrojenaz) bulunur. Azot fiksasyonunda ve hidrojen üretiminde görev alan enzim Mo-Nitrojenaz enzimidir ve *nifHDK* operonu tarafından kodlanmaktadır (Souza ve ark., 1999)

Nitrojenaz enzim aktivitesini etkileyen önemli bir faktör ortamda moleküler azot (N_2) bulunmasıdır. Moleküler azot varlığında nitrojenaz enzimi azotu sabitler ve bu nedenle bu işlemde çok fazla enerji ve elektron kullanılır. Moleküler nitrojen varlığında, elektronların yaklaşık %75'i nitrojen fiksasyonu için ayrılır ve kalan %25'i ise H_2 'nin oluşumu için kullanılır (Rey ve ark., 2007; Burris, 1991). Bu nedenle hidrojen üretim çalışmalarının çoğu ortamda moleküler azot olmadan gerçekleştirilmektedir. Ancak, N_2 gazı birincil olarak nitrojenaz enziminin substratı olduğu için, N_2 'nin nitrojenaz enzimini stimüle ettiği düşünülmektedir (Das ve Veziroglu 2008).

Bu çalışmada, literatürde pek rastlanmayan diazotrofik (N_2 gazının amonyağa dönüştürüldüğü veya sabitlendiği şartlar) büyüme koşullarında *R. sphaeroides* ile hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Bunun için bakteriler öncelikle azot kaynağı olarak N_2 gazının ve karbon kaynağı olarak malatın (15 mM) kullanıldığı diazotrofik koşullarda çoğaltılarak nitrojenaz enzimi stimüle edilmiştir. Daha sonra bakteriler hidrojen üretimi için non-diazotrofik ortama transfer edilerek hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak ise karbon kaynağı olarak malatın (15 mM) ve azot kaynağı olarak glutamatın (2 mM) kullanıldığı besiyeri (non diazotrofik ortam) kullanılmıştır (Kars ve Alparslan 2013). Bu tezin hipotezi şu şekilde kurulmuştur;

moleküler azot (N₂) substratı olduğu nitrojenaz enzimini stimüle ederek (pozitif indüksiyon) hücre içinde yüksek miktarlarda enzim üretimini tetikler ve bu indüksiyondan sonra non diazotrofik ortama transfer edilen bakterilerin hidrojen üretim verimliliği artar. Hidrojen üretimi verimliliği nitrojenaz enzim aktivitesinin bir sonucu olduğu için hücre içi nitrojenaz enziminin stimüle edildiği koşullarda hidrojen üretiminin de fazla olması beklenmektedir. Tez kapsamında bu hipotezin desteklenmesi sağlayacak deney düzenekleri de kurulmuştur. Bu doğrultuda, hidrojen üretiminin gerçekleştirildiği diazotrofik ve non-diazotrofik koşullarında nitrojenaz alt birimi olan Fe-protenini kodlayan *nifH* gen ifade analizi yapılmıştır. Böylece *nifH* geninin hangi koşullarda daha aktif olduğu ortaya çıkarılmıştır. Buna ek olarak, diazotrofik ve non-diazotrofik koşullarında hücre içi amonyum miktar analizi de yapılarak nitrojenaz enzim aktivitesi test edilmiştir. Son olarak, diazotrofik ve non-diazotrofik koşulların hücre morfolojisine etkisi alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile çalışılmıştır. Bu tez kapsamında, diazotrofik şartlar altında hidrojen üretimi ve *nifH* gen ekspresyon seviyesinin kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) ile belirlenmesi ile literatüre özgün katkı sunmuştur. Ayrıca, diazotrofik koşulların hücre morfolojisine etkisi de ilk defa bu tez kapsamında çalışılarak literatüre özgün katkı sunulmuştur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Hidrojen

Günümüzde enerji, insan yaşamı için vazgeçilmez bir unsurdur. Nüfusun artışı, teknolojinin ilerlemesi ile enerjiye olan gereksinim artmaktadır. Fosil kökenli kaynakların tükenebilir olması ve kullanımı ile ortaya çıkan çevresel sorunlar ele alındığında, hidrojen bir enerji taşıyıcı olarak bu sorunların çözümü için potansiyel oluşturmaktadır (Ren ve ark., 2017). Hidrojen, evrende en bol bulunan; kokusuz, renksiz ve tatsız bir elementtir. Periyodik cetvelde en başta yer alır. Hidrojen, en hafif element olup, 1 litrelik (L) hacmi 0.09 grama (g) eşittir. Dünya'da bulunan yerçekimi kuvveti etkisi, hidrojen moleküllerini tutamadığı için atmosferde düşük oranda bulunur. Atmosfer yaklaşık %0.07 hidrojen içerirken, dünya yüzeyi yaklaşık %0.14 hidrojen içerir (Baykara, 2018). Atmosfer basıncında hidrojenin $-253\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulmasıyla sıvı hale gelir. Difüzyon kat sayısının yüksek olması ve düşük yoğunlukta olduğundan, fazla yer kaplaması depolanabilirliğini kısıtlar. Hidrojen gaz ve sıvı halde tanklarda, metal hidrit şeklinde depolanabilir. Taşınım boru hatları veya tankerler kullanılarak gerçekleştirilir. Gelecekte ekonomi için potansiyel olarak uygun, maliyetli temiz yakıt olarak kabul edilmektedir. Yüksek enerji içeriğine sahiptir. Çekirdeğinde bir proton bulundurur ve çevresinde yalnız bir elektronu vardır. Toksik özelliği yoktur. Hidrojen; rüzgâr enerjisi, dalga enerjisi, güneş enerjisi, biyokütle ve jeotermal enerji kaynakları gibi yenilenebilir kaynaklardan üretilir. Ayrıca kömür, doğal gaz ve nükleer enerji kaynakları gibi yenilenemeyen kaynaklardan da üretilir. Yakıt olarak depolanabilir ve ulaşımda kullanılabilir. Hidrojen yüksek enerji depolama kapasitesine sahiptir (Jain, 2009). Hidrojenin yakıt özellikleri Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Hidrojenin yakıt özellikleri (Demirbaş, 2009; Şahin, 2006).

Özellik	Birim	Değer
Kaynama noktası	Kelvin (K)	20.41
Donma noktası	K	13.97
Yoğunluk (sıvı)	kg/m ³	70.80
Yoğunluk (gaz)	kg/m ³	1.34
Kritik nokta sıcaklığı (T _K)	K	33
Kritik nokta basıncı (P _K)	Bar	12.9
Kritik sıcaklıktaki yoğunluk(d _K)	g/L	31.4
Hava ile tutuşma bölgesi	%	4.0-77.0
Tutuşma sıcaklığı	°C	560
25°C ve 1 bardaki ısı iletkenliği	Watt (W)/cmK	1.9
Difüzyon katsayısı	cm ² /s	0.61
Sabit basınçta spesifik ısı	Kilo Joule (kJ)/kg K	14.89
Havadaki patlama limiti	% (vol.)	4-75
Havadaki ateşleme enerjisi	Mili Joule (mJ)	0.02
Ateşleme sıcaklığı	K	585
Havadaki alev alma sıcaklığı	K	2318

Dünya ülkeleri enerji ihtiyacını karşılayabilmek için hidrojeni kullanmaya başlamıştır. Su bir döngü içerisinde herhangi bir birincil enerji kaynağı kullanılarak hidrojen ve oksijene ayrıştırılır, daha sonra elektrik üretmek için bir yakıt hücresinde birleştirilir. Bu şekilde üretilen temiz enerjiler ekonomiye katkıda bulunmaktadır (Rosen ve Koohi-Fayegh, 2016). Hidrojen yakıt pil teknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yakıt pili teknolojisi, elektriğin doğrudan üretildiği teknolojilerde, ulaşım araçlarında ısıtma amaçlı, taşıtlarda ve savunma sanayinde tercih edilir. Yakıt pilinde anotta hidrojen bir polimer membrandan geçerken bir elektron verir ve katotta oksijen ile reaksiyona girerek su oluşturur. Hidrojen tanklarda veya malzemelerde absorpsiyon ve adsorpsiyon yollarıyla ve metal hidritler kullanılarak depolanabilir. Metal hidrit yöntemi, kimyasal bağlanma yoluyla büyük miktarlarda hidrojeni tutabilen çeşitli metallerin kullanılmasıyla gerçekleşir (Rusman ve Dahari, 2016). Metal hidritler, belirli basınç ve sıcaklıklarda hidrojene maruz kaldıklarında, büyük miktarlarda hidrojen gazı depolar. İçten yanmalı motorun çalıştırılmasında, yemek pişirme, ısıtma, soğutma ve elektrik üretimi gibi ev içi enerji üretiminde kullanılabilir (Abe ve ark., 2019). Hidrojen yenilenebilir ve temiz bir alternatif enerji kaynağı olarak aşağıda maddeler halinde verilen değerlendirmeler yapılabilir.

- Yerli ve milli enerji kaynaklarının geliştirilmesi enerjide dışa bağımlılığı azaltabilir.
- Hidrojene dayalı enerji taşınım sistemi ile kalıcı, bilimsel ve endüstriyel iş potansiyelleri oluşabilir.
- Fosil yakıtların artan nüfusa ve enerji ihtiyacına kıyasla hızla tükenmesiyle yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımının teşviki yapılır.
- Motorlu taşıtların hava kirliliğine yol açması toksik olmayan ve çevreci hidrojen yakıtına yönelimi sağlamıştır.
- Petrolün kullanımının ekosisteme zararı göz önüne alındığında hidrojenin yan ürün olarak su oluşturması ile besin zincirine zararlı bir etkisi olmadığı anlaşılmaktadır (Agrafiotis ve ark., 2015; Fontana ve ark., 1996)

2.2. Hidrojen Üretimi

Hidrojen üretiminde kullanılan kaynaklar çok çeşitlidir. Bunlar yenilenebilir enerji kaynakları, nükleer enerji ve fosil kökenli kaynaklardır. Bu kaynaklardan biyolojik ve kimyasal (termokimyasal ve elektrokimyasal) yollarla hidrojen üretilir. Fosil kökenli kaynakların sınırlı rezervi olması, kullanıldığında çevreye zarar vermesi ve çok daha fazla enerji gerektirmesi nedeniyle hidrojen üretimi için farklı kaynaklar tercih edilir. Bununla birlikte günümüzde sanayide kullanılan hidrojen büyük miktarlarda, fosil kökenli kaynaklardan elde edilmektedir. Hidrojenin üretildiği yenilenebilir enerji kaynakları ise biyokütle, jeotermal güneş ve rüzgâr enerjisidir (Demirbas ve ark., 2009)

Hidrojenin termokimyasal yöntemler kullanılarak elde edilmesi sırasında sera gazları oluşur. Üretim sırasında yüksek sıcaklık (800-900 °C) ve basınç gerekir. Elektrokimyasal yöntemler için yüksek seviyede enerji gerekir. Termokimyasal ve elektrokimyasal yöntemler ele alındığında daha fazla maliyet gerektirir ve çevreye zarar veren yöntemlerdir. Elektrokimyasal yöntemlerden biri olan suyun

elektrolizinde, doğru akım kullanılarak suyun hidrojen ve oksijenlerine ayrılması işlemi yapılır. Bu yöntem çok fazla enerji gerektirdiğinden yenilenebilir enerji kaynakları kullanılarak yapılmadığı sürece maliyetlidir (Rand ve Dell, 2009).

Çeşitli fotosentetik mikroorganizmalar yenilenebilir enerji kaynaklarını (güneş, su, biyokütle) kullanarak, çevresel koşullar ve enzim aktiviteleri ile hidrojen üretirler. Üretilen hidrojene ise “biyohidrojen” denir. Biyohidrojen üretimi yapan fotosentetik mikroorganizmalara örnek olarak; yeşil algler, mavi-yeşil algler (Cyanobacteria), fermantatif bakteriler ve fotosentetik bakteriler verilebilir (Levin ve Chahine, 2010). Aşağıda biyohidrojen üretiminde görev alan çeşitli mikroorganizmalar listelenmektedir (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Biyohidrojen üreten mikroorganizma çeşitleri ve türleri (Das ve Veziroğlu, 2001).

Mikroorganizma Çeşitleri	Türleri
Yeşil Algler	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> <i>C. moewusii</i> <i>Scenedesmus obliquus</i>
Siyanobakteriler	<i>Anabaena azollae</i> <i>Anabaena CA</i> <i>A. variabilis</i> <i>A. cylindrica</i>
Heterocystous	<i>Nostoc muscorum</i> <i>N. spongiaeforme</i> <i>Westiellopsis prolifica</i>
Fotosentetik Bakteriler	<i>Chlorobium limicola</i> <i>Chloroexu aurantiacus</i> <i>Chromatium sp. Miami PSB 1071</i> <i>Halobacterium halobium</i> <i>Rhodobacter sphaeroides</i> <i>R. capsulatus</i> <i>R. sulidophilus</i> <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> <i>R. capsulata</i> <i>R. palustris</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i> <i>Thiocapsa roseopersicina</i>

Fermantatif Bakteriler

Citrobacter intermedius
Clostridium butyricum
C. pasteurianum
Desulfovibrio vulgaris
Enterobacter aerogenes
E. cloacae
Escherichia coli
Megasphaera elsdenii

Her geçen gün artan enerji talebi ülkeleri alternatif enerji kaynaklarına yöneltmiştir. Hidrojen önemli ve gelecek vaat eden temiz enerji kaynakları arasındadır ancak, hidrojen, geleceğin enerji taşıyıcısı olarak sürdürülebilir enerji kaynaklarının kullanılmasında iyileştirici bir seçenek olabilir. Fosil kökenli yakıtlar gibi bölgesel çapta üretilmediğinden ülkeler arası rekabeti oluşturmaz ve her ülkenin kendi özgün yaklaşımı ile hidrojen üretilebilir (Jäger ve ark., 2016)

Biyolojik yöntemlerle hidrojen üretimi günümüzde halen endüstriyel üretim ölçeğinde değildir ancak çeşitli prosesler kullanılarak geliştirme süreçleri gerçekleştirilmektedir (Kalinci ve ark., 2009). Bu prosesler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1)Biyofotoliz

- Doğrudan biyofotoliz
- Dolaylı biyofotoliz

2) Biyolojik yolla suyun gaza dönüşümü

3) Fermantasyon

- Karanlık fermantasyon
- Fotofermantasyon

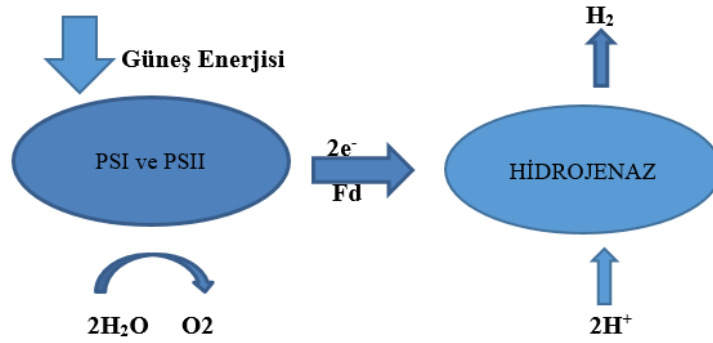
4) İki Basamaklı Hidrojen Üretimi

2.2.1. Biyofotoliz

Bu yöntem suyun oksijen ve hidrojenlerine ayrışma sürecidir. Mavi-yeşil algler tarafından gerçekleştirilir. Doğrudan biyofotoliz ve dolaylı biyofotoliz olarak iki şekilde biyofotoliz yapılabilir (Levin ve Chahine, 2010).

2.2.1.1. Doğrudan biyofotoliz

Doğrudan biyofotoliz güneş enerjisinin fotosistem I (PSI) ve fotosistem II (PSII) sistemlerinin kullanılarak su moleküllerindeki oksijen ve hidrojeni ayrıştırarak hidrojenin üretildiği sistemlerdir. Bu sistemde, güneş enerjisi PSII’ de absorbe edilir ve kimyasal enerjiye dönüştürülür. Bu kimyasal enerji ile suyun oksijen ve hidrojenlerine ayrılması gerçekleştirilir. Sonuçta iki elektron meydana gelir. Bu elektronlar ferrodoksine (Fd) iletilir (Kim ve ark., 2012). Bu işlem sırasında hidrojenaz enzimi aktivitesiyle elektronlar hidrojen iyonları ile birleşir ve hidrojen üretilir (Şekil 2.1).



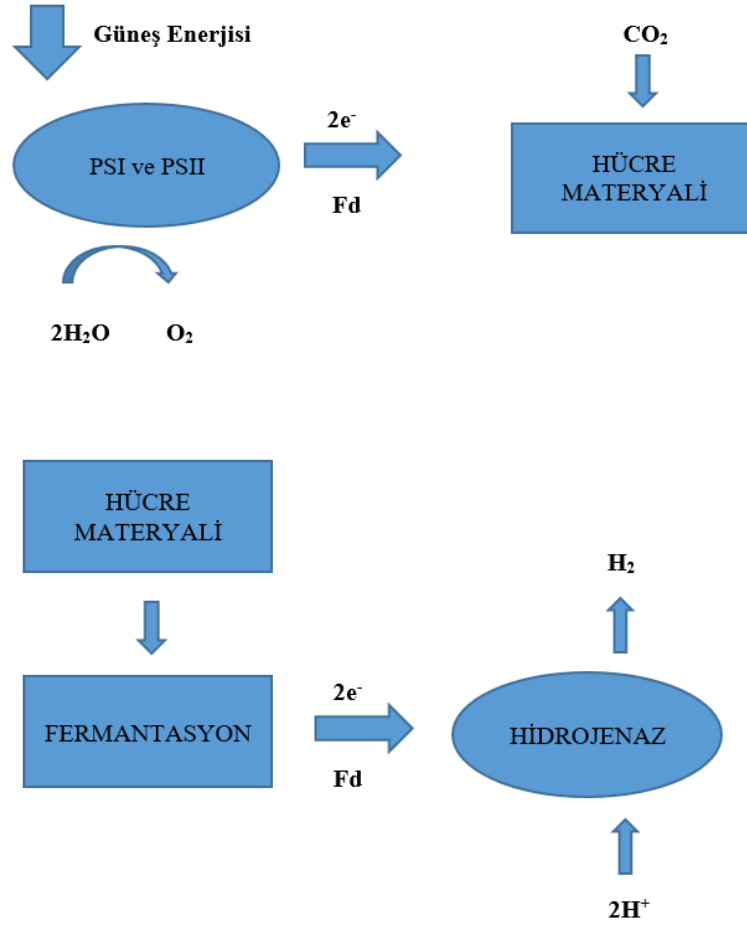
Şekil 2. 1 Doğrudan biyofotoliz ile biyohidrojen üretimi (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010).

Hidrojenaz enzimi oksijene duyarlı bir enzim olup, ferrodoksinden aktarılan elektronlar hidrojen iyonlarıyla birleşerek hidrojen gazını oluşturur. Hidrojen üretiminin gerçekleşmesi için anaerobik ortam veya oksijen miktarı % 0.1’den az olduğu ortamlar tercih edilmelidir (Wendt ve Bauer, 1988). Doğrudan biyofotoliz yavaş gerçekleşir ve verimliliği düşüktür.

2.2.1.2. Dolaylı biyofotoliz

Dolaylı biyofotoliz, siyanobakterilerin (mavi-yeşil alglerin) fotosentez ile biyokütle üretmesi, üretilen biyokütleden de hidrojen elde ettiği sistemdir. Biyokütle üretildikten sonra aerobik karanlık fermantasyon yolu ile 2 mol asetat/mol glukoz ve 4 mol hidrojen/mol glukoz oluşur. Elde edilen 2 mol asetat/mol glukozdan

fotofermantasyon ile hidrojen üretilerek üretim miktarı yükseltilir (Şekil 2.2). Bu işlem atmosferde bulunan CO_2 'nin kullanıldığı bir sistem olduğundan çevre dostu bir sistemdir. Fakat hidrojenaz enzimi oksijene duyarlı olduğundan ve hidrojen üretim verimi düşük olduğundan daha az tercih edilmektedir (Figen ve Baykara, 2018).



Şekil 2. 2. Dolaylı biyofotoliz ile biyohidrojen üretimi (Şentürk ve Büyükgüngör, 2010).

2.2.2. Biyolojik yolla suyun gaza dönüşümü

Bazı fotoheterotrofik bakterilerin substrat kaynağı olarak karbonmonoksit (CO) kullanmasıyla ışık kaynağı kullanılmadan H_2 üretimi gerçekleştirilebilir. Fotoheterotrofik bakteriler bu işlem ile CO_2 ve H_2 üretimi gerçekleştirirler. Anaerobik ortamda CO , bazı proteinlerin (CO dehidrojenaz, Fe-S protein ve CO 'e-toleranslı

hidrojenaz) sentezlenmesinde rol oynar. CO oksidasyonu ile elde edilen elektronlar biyohidrojen üretiminde kullanılmak üzere Fe-S proteini aracılığıyla hidrojenaza iletilir (Ensign ve Ludden, 1991).

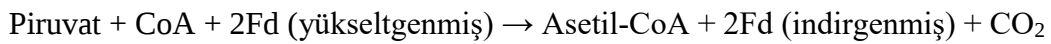
2.2.3. Fermantasyon

2.2.3.1. Karanlık fermantasyon

Karanlık fermantasyon anaerobik büyüyen bakterilerin ışık enerjisine ihtiyaç duymadan zengin karbonhidrat içeren substratları biyohidrojene dönüştürme işlemidir. Hidrojen üretimi prosesi oksijensiz (anoksik, anaerobik koşullar, oksijenin elektron alıcısı olarak kullanılmadığı durumlar) altında gerçekleşir (Zheng ve ark., 2022) Substrat kaynağı olarak basit şekerler kullanır. Basit şeker kullanımı maliyetleri yükseltir. Yüksek maliyetli ve insan gıdası olabilecek karbon kaynakları yerine bu substrat kaynaklarına alternatif olarak evsel atıklar önerilebilir. Bu kaynaklar ön işlemlere tabi tutularak basit şekerler elde edilir. Alternatif olarak sanayi ve ziraat atıkları da substrat olarak kullanılabilir. Alternatif karbon kaynaklarındaki polisakkaritler yapılan ön işlemler sonucu basit şekerlere parçalanır (Adessi ve De Philippis, 2014). Bu şekerler daha sonra bakteriler tarafından kolaylıkla metabolize edilir. Sıcaklık karanlık fermantasyon için önemli etkenlerden birisidir. Hidrojen üretim performansını etkiler. Mikroorganizmaların hidrojen üretebildiği en verimli sıcaklık değeri mikroorganizma türüne göre değişmektedir. Fermantasyon işlemi bakterinin büyüebildiği sıcaklığa göre mezofilik (25-40°C), termofilik (40-65°C), aşırı termofilik (65-80°C) ve hiper termofilik (>80°C) sıcaklıklarında gerçekleşebilmektedir. pH karanlık fermentasyonda önemli bir diğer çevresel etkindir. Mikroorganizmalarca hidrojen üretimi enzimler aracılığıyla gerçekleşmektedir ve pH ile sıcaklık mikroorganizmalarda sorumlu enzimlerin aktivitesine etki eder ve böylece hidrojen üretim verimlilikleri etkilenmektedir (Fascetti ve ark., 1998). Fermentasyon esnasında organik asit oluşur. Organik asit oluşumu ile pH düşer ve hidrojen üretimi azalır. Hidrojen üretim verimini artırmak için pH kontrol edilmelidir. Hidrojen üretim veriminin en çok elde edildiği pH aralığı 5.2 ile 7 aralığıdır. Verimli hidrojen üretimi için besiyerindeki besin maddelerinin oranı dengeli olmalıdır. Makro (N, C) ve mikro

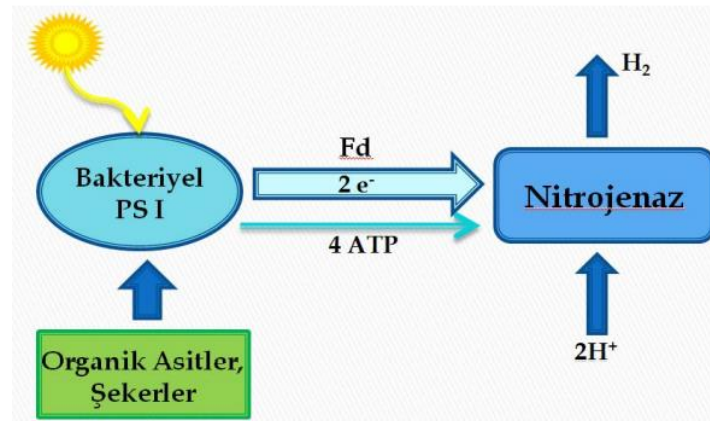
besi maddelerin (Fe, Zn, Ni, Mg vb.) bulunması gerekir. Makro besin maddeleri mikroorganizmanın büyümesine etki ederken, mikro besin maddeleri enzim sistemlerinin yapısında yer alır. Karanlık fermentasyon ile hidrojen üretiminde kullanılan mikroorganizma türü de önemlidir. Saf kültür veya karışık kültür kullanılarak hidrojen üretimi yapılabilir (Kars ve Alparslan, 2013).

Karanlık fermentasyonda H_2 saf olarak üretilmez. H_2 ile beraber karbondioksit, metan, hidrojen sülfid gazları ile basit uçucu yağ asitleri gibi farklı gazlar ile zengin biyokütle üretilir. Biyokütle fermentatif işlemlerde kullanılabilmesi için biyolojik olarak kolaylıkla parçalanabilir yüksek karbonhidrat ve enerji içeriğine sahip, erişilebilir ve ucuz olmalıdır (Demirbas 2009). Glikolitik yol izinde glikoz pirüvata dönüştürülür. Piruvat, asetilCoA'ya okside olur. Asetil-CoA, metabolik yol kullanılarak asetil-fosfata dönüşür. Bu dönüşüm sonucunda ATP elde edilir, yan ürün olarak asetat oluşur. Ferrodoksinin (Fd) indirgenmesi piruvatın, asetil-CoA'ya oksidasyonunda gereklidir. Hidrojenaz enzimi indirgenmiş ferrodoksini oksidasyona uğratarak moleküler hidrojen üretimi gerçekleştirir. Fermentatif hidrojen üretiminde karbon kaynağı olarak karbonhidratlar kullanılabilir. Üretim sırasında yan ürün olarak asetat ve bütirat gibi yan ürünler oluşur (Das ve Veziroglu 2008). Reaksiyon kısaca aşağıda özetlenmiştir;



2.2.3.2. Fotofermantasyon

Fotofermantasyon, fotosentetik bakteriler tarafından güneş enerjisi veya bir ışık kaynağı kullanılarak hidrojen üretim sürecidir (Şekil 3.2). Kaynak olarak organik asitler veya biyokütle kullanılır. Fotofermantasyon yapan bakterilerde fotosistem II olmadığından su parçalanamaz ve oksijen açığa çıkmaz. Bu durum anaerobik ortamın korunmasını sağlar. Hidrojen üretiminde fotosentetik bakterilerde hidrojenaz ve nitrojenaz enzim sistemleri rol alır. Ancak, hidrojen üretiminde kullanılan temel enzim nitrojenaz enzimidir. Hidrojenaz enzimi ise üretilen hidrojen molekülünün elektron ve protona parçalanmasını sağlar (Adessi ve De Philippis, 2014).



Şekil 2. 3. Fotofermantasyonla hidrojen üretimi (Benemann ve Hallenbeck, 2002).

Fotofermantasyonda organik asit kullanılarak hidrojen üretiminde elde edilen hidrojen miktarları farklılık gösterir. Besiyerinde bulunan, karbon ve azot kaynağı, metal iyonları (Fe, Mg) ve amonyak varlığı, nitrojenaz ve hidrojenaz enzimlerinin aktivitesi ile ışık yoğunluğu gibi faktörler fotofermantasyonla biyohidrojen üretimini etkiler. Besiyerinde bulunan amonyum miktarı fototofermentatif bakterinin hidrojen üretim performansını etkiler (Lee ve ark., 2002). Hidrojen üretiminden sorumlu temel enzim nitrojenaz enzimidir. Moleküler azottan amonyum sentezler. Ancak amonyumun ortamda birikimi nitrojenaz enzimini baskılayarak hidrojen üretim performansını düşürür. Bu nedenle besiyerinde bulunan amonyum miktarı baskılayıcı miktarın altında bulunmalıdır (Kim ve ark., 2012).

2.2.4. İki basamaklı hidrojen üretimi

İki basamaklı sistem, karanlık fermentasyon ve fotofermantasyon süreçlerinin birlikte yürütülmesi ile gerçekleştirilir. Fotosentetik ve fotosentetik olmayan bakterilerin hidrojenaz ve nitrojenaz enzim sistemlerini kullanması hidrojen üretimini artırır. İki basamaklı hidrojen üretim süreçlerinde kullanılan karbon kaynağı daha verimli bir şekilde hidrojene dönüşmektedir. Anaerobik bakteriler metabolizmaları gereği karbonhidratları kullanarak enerji elde eder ve organik asitler oluşur. Organik asitler fotosentetik bakteriler ışığı kullanarak glikozu hidrojen ve karbondioksit kadar

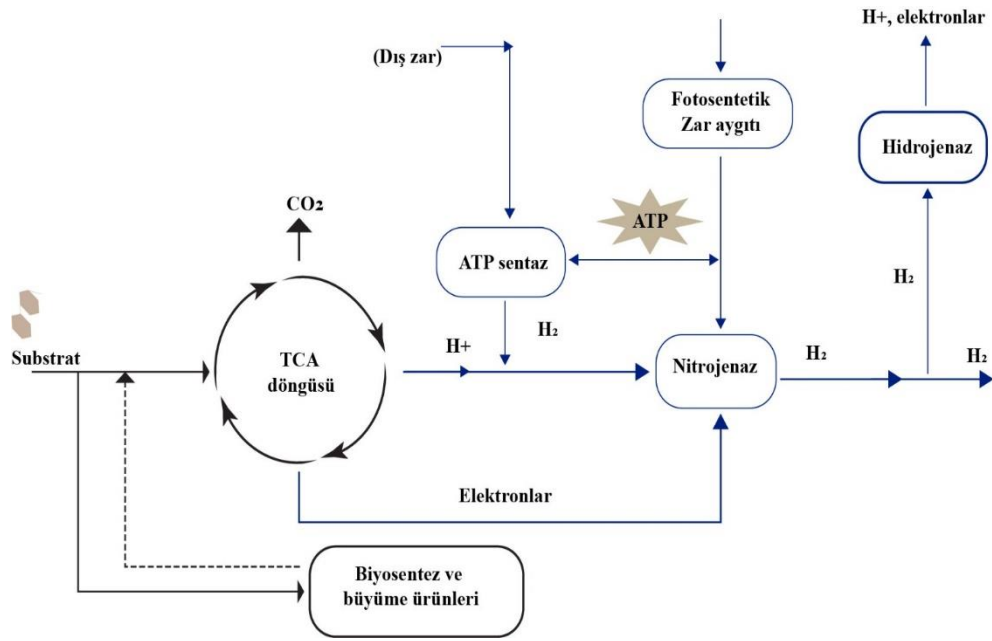
parçalar. Oluşan bu kombinasyonla substrattan daha çok faydalanılarak ve daha az ışık enerjisi kullanılarak, hidrojen üretimi arttırılmış olur (Cheng ve ark., 2022).

2.3. Fotosentetik Bakteride Hidrojen Üretimi

Fotofermantasyonda kullanılan fotosentetik bakteriler hidrojen üretebilen mezofilik bakterilerdir. Üremeleri için gerekli sıcaklık 30-35 °C olup pH ise 6.8-7.0 da maksimum büyüme eğrisi oluştururlar. Fotosistem II'leri olmadığından oksijen açığa çıkarmazlar. Aerobik ve anaerobik ortamlarda yaşamlarını sürdürürler. Aerobik ortamda oksijenin nitrojenaz enzimini inhibe etmesiyle hidrojen üretimi görülmez. Fotosentetik bakteriler hidrojen üretimi ile birlikte yan ürünler (PHB, 5-ALA) de üretebilirler. Atık biyokütleden ve atık sulardan hidrojen üretimi yaparak atıkların değerlendirilmesi sağlanır (Kumar ve ark., 2000).

Hidrojen üretimi aşamalarında görevli yapılar; fotosentetik zar aygıtı, karbon akışı (TCA döngüsü) ve enzim sistemleridir. Fotosentetik zar aygıtı güneş enerjisinin kimyasal enerjiye (ATP) dönüştüğü ve bakterinin üremesinde kullanıldığı sistemdir (Kim ve ark., 2006). Bu kimyasal enerji bakterinin üremesine katkı sağlayarak, nitrojenaz enzimi aktivitesinde biyohidrojen üretiminde kullanılır. Bakterinin fotosentetik zar aygıtı, ışık toplama kompleksi (LHC) veya antenler, reaksiyon merkezi (RM) ve sitokrom *bc₁* olarak üç adet transmembran protein içerir (Jungas ve ark., 1999). Işık toplama komplekslerinde bakteriyoklorofil ve karotenoid molekülleri bulunur. Anten sistemlerini tekli oksijenin zararlı etkilerinden korurlar. Karotenoidler, görünür dalga boyundaki ışığı absorbe eder. Mor bakterilerde ışık toplama kompleksleri LH1 ve LH2 yapılarından oluşur. Reaksiyon merkezi (RM) ise üç alt birimden oluşur. Bunlar; L, M ve H polipeptitleridir. Yapısı incelendiğinde dört molekül bakteriyoklorofil a, iki molekül bakteriyofeofitin a, iki molekül ubiquinon (Q_A, Q_B) ve iki molekül karotenoid pigmenti görülür (Seifert, 2012).

Işık toplama komplekslerinde ışık absorbe edildikten sonra fotonlardan elde edilen enerji reaksiyon merkezine aktarılarak bakteriyofil uyarılır. Elektron aktarımı bakteriyofeofitin a, ubikinon, Fe_2S_2 , sitokromlar ve reaksiyon merkezi üzerinden gerçekleşir. Oluşan proton gradienti ile, ATPaz kullanımı ile ATP üretilir. Trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde organik substrat CO_2 'ye parçalanır ve bu parçalanma sonucu elektronlar oluşur. Elektronlar NAD ve ferrodoksin gibi elektron taşıyıcılarıyla nitrojenaz enzimine iletilir. Nitrojenaz enzim aktivitesiyle moleküler hidrojen üretilir (Seifert, 2012). Hidrojenaz enziminin görevi ise moleküler hidrojeni protona ve elektronlara parçalamaktır. Fotofermantasyon işleminde hidrojen üretim şeması Şekil 2.4'te verilmektedir.



Şekil 2. 4 Fotofermantasyon işleminde hidrojen üretim şeması (Kars ve Alparslan 2013).

Fotofermentatif hidrojen üretiminde kullanılan model organizmalardan mor kükürtsüz bakteriler (PNS bakterileri) kullanılır. PNS bakteriler enerji kaynağı olarak ışığı kullanır. Geniş dalga boyu (520-860 nm) aralığında ışık absorbe ederek elektron transfer sistemiyle hidrojen üretimi yapar. Hidrojen üretiminde en çok kullanılan bakteriler mor kükürtsüz bakterilerdir (Kars ve Alparslan, 2013). Bitki ve alglerden farklı olarak fotosistem II'leri yoktur. Renkleri kahverengidir. Oksijenle teması sonucu

renkleri pembe rengine döner. Mor kükürtsüz (PNS) bakteriler farklı çevre şartlarında zengin metabolik aktiviteler gösterir. Elektron donörü olarak sülfürü kullanmadıklarından kükürtsüz bakteri olarak tanımlanırlar. Zengin metabolik aktiviteleri azot ve karbon fiksasyonu, oksijensiz fotosentez ve membran biyo enerjisi gibi birçok temel metabolik olayın araştırılmasında kullanımını sağlamıştır. Karanlık ve aydınlık ortamlarda büyüyebilirler. α -proteobacteria ve β -proteobacteria sınıflarında bulunurlar (Demirbas, 2009).

2.4. *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001

Önceleri *Rhodopseudomonas sphaeroides* olarak adlandırılan *Rhodobacter sphaeroides*'in güncel adı *Cereibacter sphaeroides* olarak önerilmiştir ve NCBI taksonomi veri tabanında de güncel ismi ile listelenmektedir (Hördt ve ark., 2020). Mor kükürtsüz bakterilerden olan *Rhodobacter sphaeroides* CO₂'nin indirgenmesinde elektron donörü olarak sülfidi kullanmaz. Bazı mor-kükürtsüz bakteriler ise fermentatif veya anaerobik solunum metabolizmasını kullanarak karanlıkta anaerobik olarak büyüydikler gibi birçoğu da karanlıkta solunum yaparak aerobik olarak büyüebilmektedirler. Çizelge 2.3'te bakteri sistematigi verilmiştir.

Tablo 2.3. *Rhodobacters sphaeroides*'in sistematik sınıflandırılması.

Alem	Bacteria
Şube	<i>Proteobacteria</i>
Sınıf	<i>Alphaproteobacteria</i>
Takım	<i>Rhodobacterales</i>
Aile	<i>Rhodobacteraceae</i>
Cins	<i>Rhodobacter</i>
Tür	<i>Rhodobacter sphaeoides</i>

Rhodobacter sphaeroides gram negatif ve proteobakterilerin α -altbölümü içerisinde yer alır. Enerjiyi elde etme açısından çeşitlilik gösterir. Fotoototrof, fotoheterotrof, oksijenli ve oksijensiz solunum, fermentasyon gibi mekanizmalarla enerjiyi elde edebilir. Oksijenli ve oksijensiz ortamda büyüyebilir (Dubbs ve Tabita 2004). Derin göl ve durgun sularda bulunur. *R. sphaeroides* metabolik özellikleri açısından da farklılık gösterir. Önemli özellikleri arasında moleküler azotu bağlama,

klorofil ve B12 vitaminini sentezleme örnek gösterilebilir. Morfolojik olarak genellikle küresel, oval şekillidirler (Şekil 2.5). Flagellaları ile aktif hareket edebilirler. Bu özellikleri sayesinde sıvı besiyerinde karıştırmaya gerek duymadan sıvıda asılı olarak, dibe çökmeden kalabilmektedirler. Biyoteknolojik proseslerde karıştırmaya gerek duymadığı için karıştırma maliyeti ortadan kalkmaktadır. Bu nedenle *R. sphaeroides* ile gerçekleştirilen biyoteknolojik proseslerin maliyeti daha düşük olması nedeniyle tercih edilen bir model bakteri olarak değerlendirilmektedir. *R. sphaeroides*'in optimum büyüme ortamı pH: 6.8 ve 28-30 °C aralığındaki sıcaklıkta gerçekleşmektedir (Kars ve Alparslan, 2013).



Şekil 2. 5. *R. sphaeroides* (Igarashi ve ark., 2003).

R. sphaeroides bünyesinde yaklaşık 0,9 Mbç ve 3 Mbç büyüklüğünde iki adet kromozom ve beş adet ekstra kromozomal plazmit bulundurur (Suwanto and Kaplan, 1989). Oksijenli ve oksijensiz ortamda büyüyen bakteriler sahip oldukları renk pigmentlerine göre oksijenli ve oksijensiz ortamda farklı renkte görünürler. Oksijenli ortamda pembe renk alırken oksijensiz ortamda büyümesiyle rengi kahverengi olur. *R. sphaeroides* yenilenebilir enerji kaynaklarını (güneş, biyokütle) kullanılarak hidrojen üretimini gerçekleştirilir. Üretim ışık kaynağı ile çeşitli organik bileşenler kullanılarak

gerçekleştirilir. Hidrojen üretim metabolizması fotosentetik zar aygıtı, karbon akışı (TCA döngüsü) ve enzim sistemlerine bakılarak araştırılabilir (Koku ve ark., 2002).

2.5. Hidrojen Üretim Mekanizması

Günümüzde kullanılan enerji kaynaklarının fosil kökenli olması sera gazlarının birikmesine ve küresel ısınmaya yol açmaktadır. Bu yüzden alternatif enerji kaynaklarına yönelim artmıştır. Yenilenebilir enerji kaynakları hem çevre dostu hem de kolay elde edilebilir olduğundan tercih sebebidir. *R. sphaeroides* çeşitli yenilenebilir karbon kaynaklarını kullanarak hidrojen üretir. Üretim ışık altında ve anaerobik ortamda gerçekleşir. Hidrojen üretim prosesleri fotosentetik zar aygıtı, karbon akışı (TCA döngüsü) ve enzim sistemleri olarak 3 grupta incelenebilir. Enzim sistemlerinde nitrojenaz ve hidrojenaz enzim aktiviteleriyle hidrojen üretimi gerçekleşir. Enzim aktivitesini karbon ve azot kaynağı, ışık yoğunluğu, metal iyonları (Fe, Mg), amonyak gibi etkenler etki eder (Kim ve ark., 2012). Bu faktörler dikkate alınarak hidrojen üretim süreçlerinde optimum koşullar tespit edilerek bu koşullar altında verimli hidrojen üretimi gerçekleştirilebilir. Hidrojen üretiminde görev alan başlıca iki çeşit enzim bulunmaktadır. Bunlar hidrojenaz ve nitrojenaz enzimleridir (Srivastava ve ark., 2021). Mor kükürtsüz bakterilerde hidrojen üretiminden sorumlu enzim nitrojenaz enzimidir. Hidrojenaz enziminin bir çeşidi olan gerialım hidrojenazı (uptake hydrogenase) ise bu bakterilerde üretilen hidrojeni proton ve elektrona çevirerek hidrojen üretim verimini düşürücü yönde çalışmaktadır. Bu iki enzim aşağıda daha detaylı olarak incelenmektedir.

2.5.1 Hidrojenaz

Hidrojenazlar hidrojen üreten ve aynı zamanda tüketebilen enzimlerdir. Moleküler oksijen tarafından aktivasyonu engellenebilir. Aynı zamanda hidrojen tüketen bir enzim olduğundan “uptake” enzim de denir. Bünyesinde bulunan metal içeriğine göre sınıflandırılır. Bunlar; [NiFe]-hidrojenazlar, [FeFe]-hidrojenazlar ve

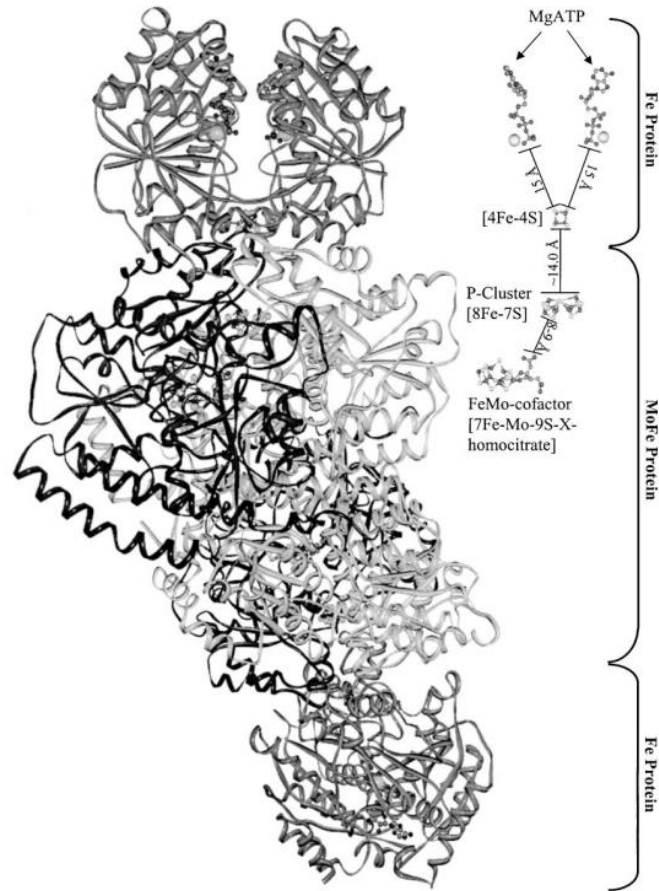
metal içermeyen hidrojenazlardır. “Uptake hydrogenase” olarak bilinen hidrojenaz çeşidi [NiFe]-hidrojenazları grubundan olup *Rhodobacter sphaeroides*’de de bulunur ve bakteride nitrojenaz enzimi tarafından üretilen hidrojeni parçalayarak yeniden proton ve elektrona dönüştür. Böylece bakteride bulunan aktif bir enzim olan “uptake” hidrojenazı hidrojen üretim verimliliğini düşürmektedir (Ayhan ve Demirbas, 2009). Hidrojenazlar aerobik ve anaerobik mikroorganizmalarda bulunur. Saf kültürlerde veya anaerobik kültürlerin bulunduğu karışık kültürlerde karanlık fermantasyon aşamalarında hidrojenaz enzimleri aracılığıyla hidrojen üretilebilir. Bu proseslerde kompleks polisakkaritlerden hidrojen üretimi ve organik asit üretimi gerçekleşir (Kars ve Alparslan 2013). [NiFe]-hidrojenazlar hidrojen üretiminde etkili bir enzim çeşididir. Hidrojenden elektronları aldıktan sonra nikotinamid adenin dinükleotid fosfatı (NADP) indirger. [NiFe] hidrojenazlar, heterodimer proteindir. Küçük (S) ve büyük (L) alt birimlerinden oluşur. Küçük alt birim üç demir- kükürt kompleksi içerirken büyük alt birim, bir nikel-demir aktif kompleksini içerir. Moleküler hidrojen üretiminde [NiFe] hidrojenazlarla karşılaştırıldığında hidrojen üretim performansı daha iyidir. [Fe] hidrojenazlar yalnızca bazı metanojenik arkelerde bulunur (Das ve Veziroğlu, 2001).

2.5.2. Nitrojenaz

Nitrojenaz enzimi 1960 yılında *Clostridium pasterianum* kullanılarak izole edilmiştir (Das ve Veziroğlu, 2008). Azot, birçok biyomolekülde bulunan, yaşamın devamlılığı için gerekli bir elementtir. Bu element atmosferde 2 atomlu halde bulunur. Ama çoğu organizma inert yapıda olduğu için N_2 ’yi metabolizma edemez. Bazı bakteriler moleküler azotu amonyağa çevirirler. Yaşamı sürdürmek için gerekli olan bu durum N_2 fiksasyonu olarak bilinir. N_2 fiksasyonu jeokimyasal süreçlerle ve biyolojik süreçlerde nitrojenaz enzimi ile gerçekleştirilebilir. Biyolojik azot fiksasyonu azot fikse eden birçok farklı cins bakteri tarafından gerçekleştirilir. Bu bakteriler çok çeşitli metabolik stratejiler kullanırken hepsinde ortak bulunan enzim nitrojenazdır. Azotu amonyağa bakterilerde bulunan nitrojenaz enzimi dönüştürür ve bu enzim *nif* genleri tarafından kodlanmaktadır. *nif* genlerini de içeren gen bölgeleri

yaklaşık olarak 20 protein kodlar ve 7 operon içerir. Yaklaşık 20-24 kb büyüklüğünde bir grupta bulunur (Nandi ve Sengupta, 1998).

Nitrojenazların işlevi temel olarak moleküler nitrojeni amonyağa dönüştürerek yeryüzündeki nitrojen döngüsüne katkıda bulunmaktır, bu döngü diğer canlılar için de gereklidir. Genetik olarak farklı üç tip nitrojenaz sistemi vardır. Bunlar: *nif*, *vnf*, *anf* sistemleridir. Üç nitrojenaz sistemi, iki ayrışabilir bileşen metal bileşen 1, dinitrojenaz (MoFe proteini, VFe proteini, FeFe proteini) ve bileşen 2, dinitrojenaz redüktazdan (Fe proteini) oluşur. En yaygın bulunan Mo içeren nitrojenazdır. Yapılan çalışmalar tüm diazotrofların *nifHDK* genleri tarafından kodlanan Mo-nitrojenaz'a sahip olduğunu göstermektedir. Genom dizisinden *R. sphaeroides*'in sadece molibden nitrojenazına (Mo-nitrojenaz) sahip olduğu bilinmektedir (Das ve Veziroglu, 2008). Mo-nitrojenaz enzim yapısı Şekil 2.6'da verilmektedir.



Şekil 2. 6. Mo-nitrojenaz enzim yapısı (Igarashi and Seefeldt, 2003).

2.6. Nitrojenazın Transkripsiyonel Regülasyonu

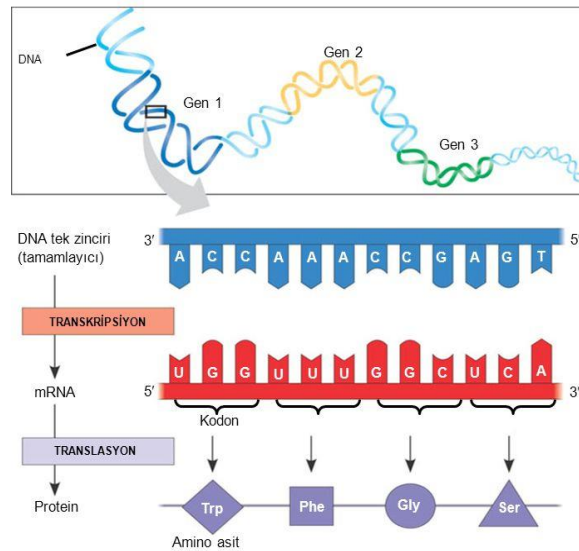
Biyolojik azot fiksasyonunu katalizleyen enzim olan nitrojenaz, oksijene duyarlı bir enzim olup, azot fiksasyon aşamaları için gerekli enerjiyi karbon ve azot kaynaklarından elde eder. Azot fiksasyon mekanizmasında görevli genler transkripsiyon düzeyinde regülasyon mekanizmalarına sahiptir. Nitrojenaz enzimi yapısal genlerinin (*nifHDK*) ifadesi alternatif sigma faktörü olan σ^{54} tarafından kontrol edilip aktivasyonu *nifA* geni tarafından gerçekleştirilir. NifA proteinleri en az üç farklı alandan oluşur; düzenleyici bir N terminal alanı, merkezi bir ATP bağlayıcı aktivatör alanı, bir DNA bağlayıcı C Substrat indirgeme bölgesi, terminal alanı (Paschen ve arkadaşları, 2001). Dinitrojenaz olarak da bilinen nitrojenaz enzim alt birimi molibden-demir (MoFe) proteinidir (Dixon ve Kahn, 2004).

MoFe proteini, *nifD* ve *nifK* genleri tarafından kodlanan iki farklı polipeptitten oluşur; Fe proteini, *nifH* geni tarafından kodlanır. MoFe proteininin zorunlu elektron vericisi, dinitrojenaz redüktaz olarak da bilinen nitrojenaz demir (Fe) proteinidir. Sabitlenmiş azotun (Örneğin; amonyum) yokluğu veya varlığı, nitrojenazın kontrolünde rol oynayan faktörlerden biridir (Einsle ve ark., 2002). *nif* genlerinin transkripsiyonu *NtrBC* iki bileşenli regülatör sistemiyle de kontrol edilir. Transkripsiyonel düzeyde, NtrB/NtrC iki bileşenli sistem *nifA* transkripsiyonunu kontrol eder. Buna karşılık NifA proteini, Mo-nitrojenaz yapısal genleri dahil olmak üzere diğer *nif* genlerinin ekspresyonunu indükler (Wang ve ark., 2014).

2.7. Gen Ekspresyon Analizleri

Genin ifadesi, genlerden protein oluşumu sürecidir. Genler üçlü nükleotit içeren kodonlarda işlevsel proteinlerin bilgilerini bulundurur. Her bir üçlü kodon bir amino asiti belirler. Bir aminoasit birden fazla kodon tarafından kodlanabilir. Fakat ökaryotlarda bir genin proteine dönüşümü birden çok basamakta gerçekleşir. Bunun sebebi DNA'nın çekirdekte olmasıdır. RNA çekirdekte sentezlendikten sonra protein sentezi için ribozoma taşınır. Sentezlenen RNA miktarı protein miktarı ile orantılıdır.

Bu bilgiler ışığında gen iki basamakta proteine dönüşür: transkripsiyon ve translasyon (Brazma ve Vilo, 2000). Şekil 2.7’de gen ifade süreçleri gösterilmiştir. Transkripsiyon (okuma), genetik şifrenin DNA’dan RNA’ya dönüştürüldüğü basamaktır. Kalıp zincir kullanılarak proteindeki bilgi RNA’ya aktarılır. Sonuçta üretilen RNA molekülü bünyesinde barındırdığı bilgiyi ribozoma taşıdığı için mesajcı RNA (mRNA) olarak adlandırılır (Jeong ve ark., 2020). Translasyon, mRNA’daki genetik şifreden polipeptit sentezlenmesidir. mRNA ribozoma bağlanır ve kodonlar aminoasitler halinde anlam kazanır. Translasyon sırasında tRNA molekülleri kullanır. Bu molekülün bir ucundaki antikodon mRNA üzerindeki kodona hidrojen bağlarıyla bağlanır. Böylece tRNA taşıdığı amino asiti polipeptit zincirine ekler. Son ürün olan proteinler üç boyutlu konformasyon kazanır (Tichopad ve ark., 2003).



Şekil 2. 7. Gen ifade basamakları (Reece ve ark., 2011).

Sürekli ilerleyen teknoloji, araştırmacıların binlerce gen için ekspresyon seviyelerini aynı anda, farklı zaman ve farklı koşullarda ölçmelerine olanak tanır. Gen ekspresyonu niceleme yöntemleri, insan hastalıklarının altında yatan moleküler olayların anlaşılmasında ve teşhis ve tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önemli araçlardır. Gen anlatımı analiz yöntemleri genel olarak; dizileme temelli, hibridizasyon temelli, kombine temelli ve PCR temelli yöntemleridir. Bu analiz

yöntemleri, gen fonksiyonu düzenleyici mekanizmalar ve genlerin biyolojik olaylara verdiği potansiyel bilgileri içerir (Lekanne Deprez ve ark., 2002).

2.7.1 Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

Gerçek zamanlı PCR, geleneksel PCR'ın çalıştığı alanları genişletirken, PCR ile ilgili sorunlara da çözüm bulmuştur. Bu yöntem ile nükleik asit örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak zaman tasarruf sağlayarak analiz edilmekte ve kontaminasyon riskini daha aza indirmektedir. Bu reaksiyon esnasında oluşan ürünleri görünür kılan ve monitorize edebilen floresan işaretli prob ve boyalar kullanılır. Ortaya çıkan floresan, nükleik asit miktarına bağlı olarak artar. Reaksiyon sırasında sonuçlar izlenir. Bu işlemler tek bir tüp içerisinde gözlenebilmektedir (Dixon ve ark., 2000). Gerçek zamanlı qPCR teknolojisi, PCR boyunca spesifik nükleik asit dizilerinin eşzamanlı amplifikasyonu ve nicelleştirilmesini kolaylaştırarak qRT-PCR üzerine gelişmiştir (Wang ve Brown, 1999). qRT-PCR'ın en önemli yararlarından birisi de az miktarda nükleik asit miktarlarından gen ekspresyon seviyesinin belirlenmesini sağlar. Gerçek zamanlı (Real time) PCR gen ifade metotları arasında küçük ifade farklılıklarının analizini yapabildiğinden günümüzde daha çok tercih edilen yöntemdir (Jahn ve ark., 2008). Amplifikasyon ve analiz eş zamanlı olduğu için ismini bu özelliğinden alır. Yüksek verimli ve hassas bir yöntemdir. Floresan işaretli boyaların gözlemlenmesi ile genin ifade olması doğru orantılıdır. Hedef bölgenin saptanması aynı tüp içinde sıcaklık döngülerinin ve floresan okuması ile gerçekleşir. Saptama kısa süre içinde ve elektroforeze gerek kalmadan yapılmış olunur. Aynı anda hem ürün meydana gelir hem de işlem anlık izlenebilir. Bu durum yöntemin tercih edilmesini sağlar (Heid ve ark., 1996).

Normal PCR yöntemine göre en büyük avantajı son ürüne bakılmaksızın reaksiyon sırasında amplifikasyon döngü oranının artışına göre ürün miktarının izlenmesidir. İşlem tüp açılmadan tamamlandığından kontaminasyon oluşumu engellenir. Genel kullanım alanları patojenlerin tespiti, gen ifade analizleri, tek nükleotit polimorfizm analizi, kromozom anomalilerinin saptanması ve protein tespiti

örnek olarak verilebilir. Kinetik PCR, homojen PCR, kantitatif Real-time PCR gibi isimlerle adlandırılır. Az miktarda numune ile analiz yapılabilir. Yöntem başlangıçtaki nükleik asit miktarını hassas bir şekilde tespit edebildiğinden tercih sebebi bir yöntemdir (Dixon ve Kahn, 2004).

2.7.2. RNA izolasyonu

Saflaştırılmış RNA'nın bütünlüğü gen ekspresyon analizleri için büyük öneme sahiptir. Düşük kaliteli RNA çalışmanın uzun sürmesine ve aynı zamanda pahalı deneysel uygulamaların tehlikeye atılmasına neden olabilir. Gen ekspresyonu çalışmalarında başarılı olmak için izlenecek ilk adım DNA'dan arındırılmış saf RNA elde etmektir. Gen ifade analizlerinde kullanılacak RNA genomik DNA ve protein içermemelidir. Saflaştırılmış RNA kararsız yapıdadır (Wang ve Brown, 1999). Özellikle 10 kb'ye kadar olan uzun mRNA fragmentleri bozulmaya karşı çok duyarlıdır (Nault ve ark., 2015). RNA'nın bütün olarak elde edildiğini anlamak için çeşitli yöntemler kullanılır. Bu yöntemler klasik jel elektroforezi, absorbans ölçümü, NanoDrop™ ve benzeri cihazlar ile modern absorbans ölçümü, eski bir teknik olan denatüre edici agaroz jel elektroforezi gibi yöntemler örnek olarak gösterilebilir. UV spektrofotometrede absorbans ölçümleri 240 nm, 260 nm, 280 nm ve 320 nm'de yapılmalıdır. Olası kontaminasyona karşı OD 260 esas alınarak, OD 260/280'in optik yoğunluğunun (OD) miktarı ve kalitesi, OD 260/240 veya OD 260/320 ölçümleri ile ekstraksiyon performansı doğrulanabilir. 1.8'den büyük bir OD 260/280 oranı genellikle iyi RNA kalitesinin kabul edilebilir bir göstergesi olarak kabul edilir. Doku ya da hücrelerle çalışırken kontaminasyon riskini engellemek için DNaz ile işleme tabi tutulur. Bu işlemden sonra RNA'nın bütünlüğü açısından DNaz uzaklaştırılır. Aynı işlem ticari kitler sayesinde de yapılabilir (Tichopad ve ark., 2003).

2.7.3. Revers Transkripsiyon ve qRT-PCR ilişkisi

Revers transkripsiyon yoluyla RNA'dan tamamlayıcı (komplementer) kopya olarak cDNA elde edilir. RT-PCR çalışma prensibinde başlangıç olarak mRNA'dan tamamlayıcı DNA (cDNA) oluşturulur. Bu dönüşüm için kimyasal bir faktör gereklidir. Bu faktör revers transkriptaz enzimidir. Revers transkriptaz DNA polimerazına benzer, sadece tek sarmallı bir DNA tamamlayıcıyı sentezlemek için RNA'yı kalıp olarak kullanır. RNaz H, RNA'yı cDNA şeridinden çıkarmak için ilave edilmesi gereken bir endonükleazdır. Bu noktadan sonra, DNA polimeraz ilavesiyle cDNA'yı tamamlayıcı bir başka DNA zinciri oluşturulur (Dheda ve ark., 2004).

Gerçek zamanlı PCR ile mRNA ifade analizinde revers transkripsiyon ve PCR amplifikasyonu olarak iki ayrı tüpte gerçekleştirilebilir. Tek aşamada gerçekleşen PCR'da enzimatik reaksiyonlar tek tüp içinde gerçekleştiği için deneysel varyasyonun en aza indirildiği düşünülmektedir. Dezavantajı bozunmaya meyilli olmasıdır. İki aşamalı PCR'a göre daha hassastır. İki aşamalı gerçek zamanlı PCR tek aşamalı yöntemle karşılaştırıldığında tekrarlanabilir oluşu bir avantaj sağlar. Dikkat edilmesi gereken nokta DNA kontaminasyonudur. İki aşamalı gerçek zamanlı PCR, revers transkripsiyon reaksiyonunu, gerçek zamanlı PCR testinden ayırır ve tek bir cDNA'nın seyreltileri üzerinde birkaç farklı gerçek zamanlı PCR testine izin verir (Wong ve Medrano, 2005).

2.7.4. PCR amplifikasyonu

Real time PCR'deki PCR aşaması çalışılan nükleik asitin çoğalması prensibine dayanır. Diziye özgü kullanılan primerler sayesinde belirli bir DNA veya RNA'nın sekansa bağlı kopya sayısı ölçülür. PCR döngüsü sırasında amplifiye olan ürünün gözlemlenebilmesi için floresana ihtiyaç duyulur. DNA bağlayıcı boyalar ve probalar kullanılır. PCR üç adımda yapılır. Denatürasyon aşamasında yüksek sıcaklıkla çift zincirli DNA'nın erimesi gerçekleşir. Sıcaklığın düşürülmesiyle primer eşleşmesi

meydana gelir. Ardından sıcaklığın polimeraz çalışma sıcaklığına yükseltilmesi ile primerlerin uzaması gerçekleşir (Nolan ve ark., 2006). Primerler oligo (dT) primeri, rastgele dizi primerleri ve gene spesifik primerler olabilir. PCR işlemi yapılırken örnekte reaksiyonu inhibe edici madde varlığı, çevre kaynaklı kontaminasyon, kullanılan bileşenlerin miktarının yanlışlığı da PCR işleyişini etkiler. Taq polimeraz enziminin çalışabildiği optimum sıcaklık yaklaşık 72 °C'dir; bu, çoğu üç aşamalı PCR protokolünde kullanılan uzama sıcaklığıdır. Ancak ve bazı protokollerde, özellikle de Taqman problemleriyle yapılan çalışmalarda 60 °C optimum sıcaklık olabilir (Heid ve ark., 1996). PCR sıcaklıklarının ayarlanmasında ikincil yapıların oluşumunun engellenmesi göz önünde bulundurulur. Real time PCR da ampliconlar genelde kısadır. Aynı diziler, primerlerde de bulunuyorsa primerlerin özellikle 3' uçlarında, primer-dimer adı verilen anormal PCR ürünleri oluşturmaya neden olur. Bu durum hedef PCR ve primer-dimer ürünlerinin rekabetini arttırır. Klasik PCR'da yapılan işlemlerden sonra üretilen amplicon miktarı gözlenir ancak real time PCR'da bilinen bir sekansın mutlak ve nispi miktarı belirlenir (Jahn ve ark., 2008).

PCR dört ana aşamaya ayrılabilir. Bunlar doğrusal zemin fazı, erken üstel faz, log-doğrusal (üstel olarak da bilinir) faz ve plato fazlarıdır. Doğrusal zemin fazı genellikle ilk 10-15 döngüden oluşur. Bu aşamada PCR yeni başlamaktadır ve her döngüdeki floresan emisyonu arka planın gerisinde kalmıştır. Erken üstel fazda, floresans miktarı, arka plan seviyesinden daha yüksek olduğu bir eşiğe ulaşır. Bu oran genellikle taban çizgisinin standart sapmasının 10 katı kadardır. Bunun meydana geldiği döngü C_t olarak bilinir. Bu değer başlangıç kopya sayısı olup deneyin sonuçlarını hesaplamada kullanılır. Log-lineer faz sırasında, her döngüden sonra PCR ürünü iki katına çıkarak optimum amplifikasyon süresine ulaşır. Son olarak, reaksiyon bileşenleri sınırlı hale geldiğinde ve floresans yoğunluğu artık veri hesaplaması için yararlı olmadığına plato aşamasına ulaşılır (Tichopad ve ark., 2003).

2.7.5. PCR'ın gerçek zamanlı izlenmesi

Real time (gerçek zamanlı) PCR'de oluşan ürünlerin arasına giren, varlığını belli eden veya ürünü işaretleyen faktörlerle PCR'nin izlenmesi gerçekleştirilebilir. Bu faktörler floresan işaretlerdir. Çift zincirli yapının arasına giren boyalar ve yerinin belirlenmesini sağlayan problemler PCR reaksiyonunun gerçek zamanlı izlenmesini sağlar (Nolan ve ark., 2006). Gerçek zamanlı PCR tespiti için dört kategoriye ayrılabilen çeşitli floresan bazlı kimyasallar mevcut olup bunlar; TaqMan kimyası gibi hidroliz problemleri, moleküler işaretler gibi saç tokası problemleri, floresan etiketli hibridizasyon problemleri ve DNA'ya entegre olan boyalardır (Ståhlberg ve ark., 2004). Çift zincirli PCR ürününe bağlanan boyalar floresan ışık yayar. Bu boyalar, çözelti içinde DNA'ya bağlanmadan önce sistemdeki elektronik uyarma enerjisi nedeniyle titreşim halindedirler ve serbest halde hareket ederler. Bu şekilde sistem içinde ışıma görülmez. Boyalar DNA'ya bağlandığında parlak floresana dönüşürler. Bağlanmayla sistemde serbestçe hareketi sınırlanmış olur. Ürün oluşumu ve veri toplama, floresan ışımanın yoğunluğu ve PCR ürün bolluğu arasında güçlü bir uyum sağlayan floresan kimyasalları kullanılarak gözlemlenebilir. Yöntemde kullanılan floresan boya sadece çift sarmallı DNA'ya bağlandığından ürün biriktiğinde "real-time" PCR cihazında okunan floresanın yoğunluğu da aynı zamanda artar (Wang ve ark., 2006). Genellikle "SYBR Green I" en çok tercih edilen boyalardandır. 497 nm dalga boyunda uyarılır ve 520 nm dalga boyunda emisyon yapar. Nükleik asit primerlerle bağlanmaya başladığında boya çift zincirli DNA'ya bağlanır ve floresan ışıma görülür. Döngü miktarı arttıkça floresan miktarı artar. Yöntemin dezavantajı ortamda hedef DNA dizisi bulunmadığında primerlerin birbirine bağlanmasıyla primer-dimerlerin oluşumu ve floresan ışımanın görülmesidir. Çözümü ise primerlerin iyi tasarlanmasıdır. Çoğaltılan ürünün istenilen bölge olup olmadığını anlamak için DNA'ların erime eğrilerine bakılır. Her DNA'nın kendine özgü erime sıcaklığı vardır. Erime sıcaklığı içeriğinde bulunan GC/AT oranına ve uzunluğuna bağlıdır. Analizi için PCR cihazı tüplerin sıcaklığını arttırır. Bu sırada birbirinden ayrılan çift zincirli DNA'lar arasındaki boya açığa çıkar. Her DNA'nın erime sıcaklığı birbirinden farklı olduğundan bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmış olunur. Çoğunlukla bu

yöntemle dizisi bilinmeyen iki DNA dizisi karşılaştırılmak istendiğinde yöntemin kullanılması tercih sebebidir (Shively ve ark., 2003).

Prob bazlı kimyalar PCR primerleri tarafından sağlanan sekans spesifikliğini sağlarken, genellikle tasarlanması ve optimize edilmesi daha zordur ve toplam maliyetlere önemli ölçüde katkıda bulunurlar. Ürün miktarı arttıkça katlanan sinyal oluşur. Başlangıç döngüleri sırasında sinyal zayıftır ve arka plandan ayırt edilemez. Ürün miktarı biriktikçe başlangıçta katlanarak artan bir sinyal gelişir. Daha sonra sinyal doyurulur. Sinyal doygunluğu, bazı kritik bileşenlerden kaynaklanan reaksiyondan kaynaklanır. Bu primerler, raportör veya dNTP'ler olabilir. Ayrıca polimeraz moleküllerinin sayısı sınırlayıcı olabilir, bu durumda üstel amplifikasyon doğrusal amplifikasyona geçer (Faria ve ark., 2006).

2.7.6. Gerçek zamanlı PCR'de relatif gen ekspresyon verilerinin analizinde kullanılan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi olarak da bilinen delta-delta Ct yöntemi (Livak ve Schmittgen, 2001), gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilirken numunelerin rölatif kat gen ekspresyonunu hesaplamak için kullanılan basit bir formüldür. En yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hedef gen ile referans geninin Ct değerlerinin hesaplanmasıyla işlem başlar. Ct, numunenin döngü eşiğini temsil eder (Jahn ve ark., 2008). Bu değer qPCR reaksiyonundan sonra ortaya çıkar. Basitçe, her bir PCR ürünü tarafından üretilen floresansın arka plan gürültüsünden ayırt edilebildiği döngü sayısıdır. Eşik döngüsü (Ct) floresan seviyesinin belli bir miktarda olduğu döngü olup gen ekspresyonunun hesaplanması için eşik döngüsü verilerini kullanır. Δ sembolü deltayı ifade eder. Delta, iki sayı arasındaki farkı tanımlamak için kullanılan matematiksel bir terimdir. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerini hesaplamak için öncelikle $\Delta\Delta Ct$ değeri aşağıda verilen formül ile hesaplanır.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{deney grubu}) - \Delta Ct (\text{kontrol grubu})$$

$\Delta\Delta C_t$, deney grubunun ΔC_t 'si ile kontrol grubunun ΔC_t 'si arasındaki fark olarak tanımlanabilir. ΔC_t ise belirli bir örnek için çalışılan genin ve referans genin C_t değerlerindeki farktır. Bu işlem bir normalizasyon işlemidir.

$$\Delta C_t = C_t (\text{çalışılan gen}) - C_t (\text{referans geni})$$

ΔC_t değeri deney ve kontrol grubu için ayrı ayrı hesaplanmalıdır. qPCR ürününün boyu genellikle 150 bp'den küçük tutulmaktadır. Reaksiyonun optimizasyonu önemlidir. Bu yöntem standart eğri gerektirmez (Wong ve Medrano, 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001

Bu çalışmada biyolojik hidrojen üretimi için yabancı tip *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001 (DSM5864) kullanılmıştır. *Rhodobacter sphaeroides*, mor kükürtsüz bir bakteridir. Gram negatif ve proteobakterilerin α -altbölümü içerisinde yer alır. Oksijenli ve oksijensiz ortamda büyüyebilir. Çeşitli suşları derin göllerden, durgun sulardan izole edilmişlerdir. *R. sphaeroides* metabolik özellikleri açısından zenginlik gösterir. Fotoototrof, fotoheterotrof, oksijenli ve oksijensiz solunum, fermantasyon gibi mekanizmalar farklı oranlarda enerjiyi elde edebilir. Önemli özellikleri arasında moleküler azotu bağlama, krolofil ve B12 vitaminini sentezleme örnek gösterilebilir. Morfolojik olarak genellikle küresel, oval şekillidirler. *R. sphaeroides*'in optimum büyüme ortamı pH: 6-8.5 ve 28-30 °C aralığındaki sıcaklıklarda olmalıdır (Kars ve Alparslan, 2013).

R. sphaeroides O.U. 001, bakterisinde hidrojen üretimini katalizleyen temel enzim Mo-nitrojenaz enzimidir. Bu enzimin esas görevi atmosferdeki serbest azotu amonyağa dönüştürerek azotu kullanılabilir hale getirmektir. Bu özelliği azotun canlılar tarafından kullanılabilir hale getirilmesinde ve aynı zamanda doğadaki fiksasyon mekanizmasının işleminde önemlidir. *Rhodobacter sphaeroides*'te bir çeşit nitrojenaz enzimi (Mo – Fe proteini içeren nitrojenaz) bulunur (Uyar ve ark., 2009)

3.2. *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001'in Kültür Koşulları

3.2.1. Non diazotrofik kültür ortamı

Bu çalışmada, literatürde pek rastlanmayan diazotrofik (N₂ gazının amonyağa dönüştürüldüğü veya sabitlendiği şartlar) büyüme koşullarında *Rhodobacter*

sphaeroides O.U.001 ile hidrojen üretimi, *nifH* gen ifade analizi, N₂ fiksasyon miktarı ve Fe-SEM ile bakteri morfoloji analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların yapılabilmesi için bakteriler öncelikle azot kaynağı olarak N₂ gazının ve karbon kaynağı olarak malatın (15 mM) kullanıldığı diazotrofik koşullarda kültive edilmiştir. Tez çalışmasında kontrol grubu olarak non-diazotrofik ortam seçilmiştir ve yukarıda bahsedilen çalışmalar non-diazotrofik ortamda da tekrar edilmiştir. Kontrol grubu olan non-diazotrofik ortamda karbon kaynağı olarak malat (15 mM) ve azot kaynağı olarak glutamat (2 mM) kullanılmıştır. Bu doğrultuda tez kapsamında non-diazotrofik ve diazotrofik koşulların sağlandığı iki farklı besiyeri tasarlanmıştır. Çalışılan bakterinin aktifleştirilmesi için Biebl ve Pfenning (B&P) minimal besiyeri kullanılmıştır (Biebl ve Pfenning, 1981). Besiyeri karbon kaynağı olarak malat ve azot kaynağı olarak glutamat (15mM/2mM) içerir. Besiyerinin genel içeriği Tablo 3.1’de verilmiştir. Tablo 3.1’de verilen içerik hazırlandıktan sonra ortam sterilizasyonu 15 dakika boyunca 121 °C’de otoklavlama ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek sıcaklık ortamında vitaminlerin yapısı zarar göreceğinden, sterilizasyonu sterilizasyonu 0.22 µm gözenekli filtreden geçirilerek sağlanmıştır. Otoklavdan işleminin ardından B&P besiyerine eser element ve demir sülfat çözeltisi ilave edilmiştir. B&P besiyerinin 30 °C’ye kadar soğumasından sonra ise vitamin çözeltisi eklenmiştir (Kars ve Alparslan, 2013).

Tablo 3.1. B&P minimal besiyeri (15 mM Malat/2mM Na Glutamat) içeriği.

İçerik	g/L
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
L- Malik Asit	2
Na Glutamat.H ₂ O	0,37
NaCl	0,4
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,05
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

Eser element çözeltisi (20X): Tablo 3.2.’de besiyeri için gerekli kimyasallar verilen miktarda tartılarak 50 mL distile suda çözündürülmüş ve böylece 20X eser element çözeltisi

hazırlanmıştır. Bu eser element çözeltisinden Tablo 3.1’de verilen miktarlar kullanılarak besiyerleri hazırlanmıştır.

Tablo 3.2. Eser element çözeltisi.

İçerik	mg/L
ZnCl ₂	70
MnCl ₂ .4H ₂ O	100
H ₃ BO ₃	60
CoCl ₂ .6H ₂ O	200
CuCl ₂ .2H ₂ O	20
NiCl ₂ .6H ₂ O	20
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	40
HCl (% 37 [v/v])	0,675 mL

B&P minimal besiyerinin hazırlanması için gerekli olan bir diğer çözelti vitamin çözeltisidir. Tablo 3.3’te vitamin çözeltisinin içeriği gösterilmektedir. Bu çözelti hazırlandıktan sonra Tablo 3.1’de belirtilen miktarlar kullanılarak besiyerleri hazırlanmıştır.

Tablo 3.3. Vitamin çözeltisi.

Vitaminler	mg/L
Thiamin	500
Nikotinik asit (Niasin)	500
Biotin	15

Birçok enzimin yapısında bulunan ve özellikle nitrojenaz enziminin yapısında da bulunan demir besiyerlerinin en önemli bileşenlerinden biridir. Besiyerlerinde kullanılmak üzere hazırlanan demir çözeltisi 0,5 gram Fe (III) Citrate.Hydrate’ın 100 mL suda çözündürülüp otoklav ile steril edilmesiyle hazırlanmıştır.

R. sphaeroides’in çoğaltılmasında kullanılan katı besiyeri, B&P minimal besiyerine otoklavdan önce agar (%1,5) eklenerek hazırlanmıştır. Katı besiyerlerinin

hazırlanmasında otoklavdan sonra eser element, demir ve vitamin çözeltileri eklenerek karıştırılarak homojen bir çözelti hazırlanmıştır. Sonrasında, bu besiyeri petri kaplarına dökülerek katılaştırılması beklenmiştir. Tez çalışmalarında, bakterileri aktifleştirmek amacıyla stoklanmış *R. sphaeroides*'den öncelikle katı besiyerlerine ekim yapılmıştır (Şekil 3.1). Sonrasında katı besiyerlerinden tek koloni alınarak sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Hazırlanan katı besiyerlerinin kuru kalmaması için petri kaplarının kenarları parafilm ile sarılmıştır. Katı besiyerlerine stoktan ekilen bakteriler 3-4 gün sonra görülmeye başlanmış ve buradan alınan tek koloniler sıvı besiyerlerine ekim yapılmıştır.



Şekil 3. 1. *R.sphaeroides*'in non dizotrofik ortamda büyüme aşamaları.

Bakteriler katı besiyerlerinde, aerobik ve ışıksız veya ışıklı ortamda, 29°C'de inkübatörde (Nüve 055/120) 3-4 gün çoğaltıldıktan sonra sıvı besiyerine ekim yapılmıştır. Sıvı besiyerleri aerobik koşullarda, ışık kaynağı altında (60-100 watt Tungsten lambası) ve 29°C'de iki gün bekletilerek kültive edilmiştir.

3.2.2. Diazotrofik kültür ortamı

Diazotrofik büyüme veya çoğalma koşulları bakterinin azot gazını amonyuma dönüştürebildiği kültür şartlarıdır. Diazotrofik kültürasyonun iki şartı vardır. Birincisi besiyeri kompozisyonudur. İkinci şart ise bakteri üreme ortamının sağlanmasıdır. Birinci şartta bahsedilen besiyeri olarak modifiye edilmiş B&P minimal besiyeri kullanılacak olup azot kaynağı olarak glutamat yerine N₂ gazı kullanılmıştır (Tablo

3.4). Diğer tüm içerik aynı kalmıştır. Kültür ortamı 3 dakika boyunca N_2 gazı ile muamele edilerek gerek besiyeri sıvısı gerekse kültür atmosferi N_2 gazı ile doygunluğa ulaşmıştır (Şekil 3.2). Böylece bakteriler karbon kaynağı olarak malat kullanırken azot kaynağını da N_2 gazını amonyuma (NH_4) çevirmek suretiyle sağlamıştır. Makro ve mikro elementler B&P besiyeri içeriğindeki gibi kullanılmıştır. Karbon kaynağı, azot kaynağı ve elementler sağlanarak diazotrofik büyüme ortamının besiyeri şartı sağlanmıştır. Tez çalışmasında kültür kabı olarak 100 mL'lik penisilin şişeleri kullanılmıştır.

Tablo 3.4. Modifiye edilmiş B&P besiyeri bileşimi.

İçerik	g/L
K_2HPO_4	0,5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
L- Malik Asit	2
N_2	(3 dk boyunca)
NaCl	0,4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,05
Vitamin çözeltisi	1 mL
Eser element çözeltisi	1 mL
Demir sitrat	5 mL

Diazotrofik büyümenin kültür ortamı şartı ise bakterileri anaerobik koşullarda ve ışık altında inkübe ederek sağlanmıştır (Şekil 3.2). N_2 gazı bakterilere hem azot kaynağı olarak görev yapacak hem de anaerobik koşulların sağlanmasında rol alacaktır. Bakteriler N_2 'yi amonyuma (NH_4) çevirmek suretiyle kullanmaktadır. Işık kaynağı olarak 100 Watt veya 60 Watt tungsten filamentli akkor lambalarla sağlanacaktır. Böylece büyümenin ışık altında gerçekleşmesi sağlanacaktır. Kültürler kullanılan bakteri için optimum sıcaklık olan $29^\circ C$ de inkübatörde (Nüve EN 055/120) bekletilmiştir. İstatiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edebilmek için deneyler iki tekrarlı ($n=2$) olarak yapılmıştır.



Şekil 3. 2. *R. sphaeroides*'in modifiye sıvı besiyerindeki görüntüsü.

3.3. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri

Tez kapsamında öncelikle *R. sphaeroides*'in diazotrofik ve non diazotrofik koşullarda ve kesikli (batch) sistemde büyüme ve pH değişim eğrileri çıkarılmıştır. Diazotrofik ve non diazotrofik kültür ortamları hazırlandıktan sonra % 1' lik ekim yapılarak bakteri üreme ve pH değişimleri takip edilmiştir. Bunun için kültür ortamlarından her gün aynı saatte 2 mL örnek alınmıştır. Alınan örneklerin öncelikle pH metre (Apera pH 850) ile pH değerleri ölçülmüştür. Bu değerlerle kültürlerin pH değişim eğrileri oluşturulmuştur. Daha sonra spektrofotometrede (Agilent, Cary 60 UV-Vis) 660 nm'de ölçüm yapılarak alınan verilerden *R. sphaeroides*'in büyüme eğrileri çıkarılmıştır. Burada da istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edebilmek için deneyler iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

3.4. Toplam Amonyum Miktarının Belirlenmesi

Tezin bu aşamasında bakterilerin diazotrofik koşullar altında N₂'yi amonyuma çevirme aktivitesinin ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu aktivite aslında bakteride bulunan ve hidrojen üretiminden de sorumlu olan Mo-nitrojenaz enzim aktivitesinin bir sonucudur. Dolayısıyla bakterilerde tespit edilen amonyum miktarları aslında enzim aktiveleriyle doğru orantılı olması beklenmektedir. Bakterilerde bulunan Mo-

nitrojenaz enzimi üretilen amonyum ve hidrojenenden sorumlu olduğu için amonyum ve hidrojen üretim miktarlarının paralel olması da beklenmektedir. Ayrıca, amonyumun ortamda birikmesi halinde nitrojenaz enzimini baskılayıcı özelliği de bulunmaktadır (Kars ve Gündüz, 2010). Dolayısıyla besiyerindeki miktarı ve bakteri bünyesinde biriken amonyum miktarının Mo-nitrojenaz enzimini baskılayıcı miktarın altında olması gerekir. Aksi halde üretilen hidrojen miktarı azalacaktır. Bakterinin bünyesindeki amonyum miktarının belirlenebilmesi için hücrelerin parçalanması gerekir. Parçalama işlemlerinde kimyasal lizis protein yapılarını değiştirebilirken enzimatik lizis uzun inkübasyon süreleri gerektirebilir. Tercih edilen ultrasonik parçalama yöntemi, hızlı bir hücre parçalama yöntemidir. Kimyasal madde eklemeye gerek kalmadan bakteri hücre duvarını mekanik kuvvetle parçalar (Gu ve ark., 2008). Bu nedenle tez kapsamında bu yöntem tercih edilmiştir.

Ultrasonik prob tipi homojenizatörler yaklaşık saniyede 20.000 devir (20 kHz'de) ve sıvılarda veya süspansiyonlarda kavitasyona neden olur. Cihaz bünyesinde kavitasyon basınç ve yüksek sıcaklıkla gerçekleşir. Kavitasyon hacminin küçüklüğü süreci yüksek sıcaklıktan korur. Sıcaklık kontrolü numuneyi önceden soğutarak ve sonikasyon sırasında numuneyi buz üzerinde tutarak gerçekleştirilir. Numunenin ısı bozunması önlenir. Süspansiyonun buz üzerinde tutulması ve 5-10 saniyelik birkaç kısa ultrasonik darbe ve 5-10 saniyelik duraklamalarla sonikasyon yapılması önerilir (Abo-Hashesh ve ark., 2011). Bu doğrultuda bu çalışmada da sonikasyon işlemi bakteriler buz üzerinde tutularak gerçekleştirilmiştir.

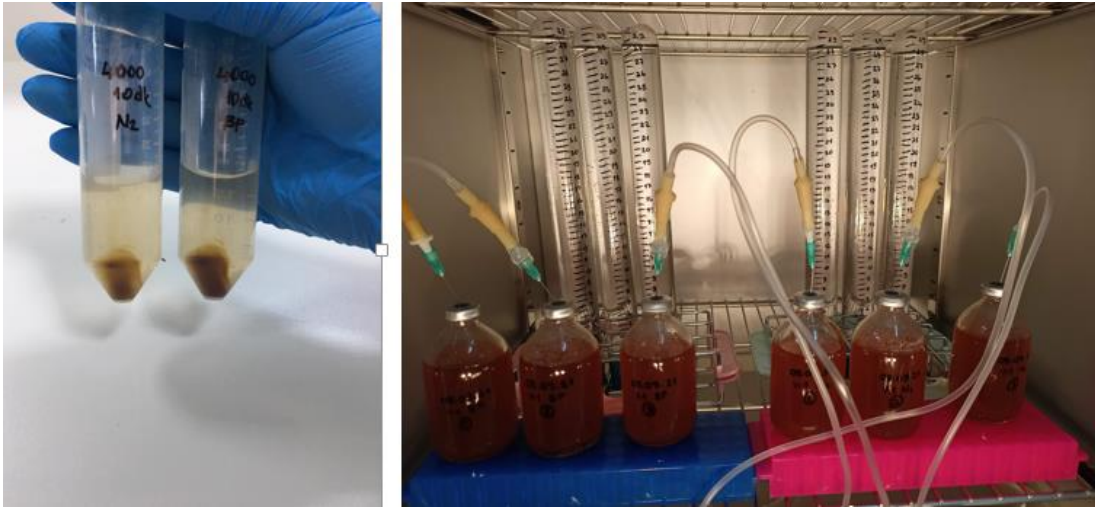
Analiz sırasında besiyerinde ve bakteri bünyesindeki amonyum miktarı ayrı ayrı ölçülmüştür. Amaç biriken amonyumun en verimli şekilde tespit edilmesidir. Besiyerindeki amonyum miktarını ölçmek için 100 mL'lik penisilin şişelerde 72 saat büyütülen bakteriler 50 mL'lik falkonlara alınmıştır. İki defa 14000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilip filtreden geçirilmiştir. Böylece bakteriden arınmış bir besiyeri elde edilmiştir. Bakteri bünyesindeki amonyum miktarını ölçmek için ise homojenizasyon (Bandelin Sonoplus UW 3200) işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 100 mL'lik şişelerde büyütülen bakteriler 50 mL'lik falkonlarda iki kez 14000 rpm'de santrifüj edildikten sonra bakteri peleti 2 mL'lik ependorf tüpe alınmıştır. Homojenizatörün

MS72 probu ile 10 dakika boyunca bakterinin homojenizasyonu yapılmıştır. Homojenizasyon, probun fazla ısınmasını önlemek amacıyla 5 saniye homojenizasyon, 5 saniye duraksama şeklinde yapılarak buzda gerçekleştirilmiştir. Amonyum miktarının ölçümü için HACH LCK303 (2,0-47,0 mg/L) test kiti kullanılmıştır. Kit içeriğindeki ölçüm küvetlerine 200 µL örnek ilave edilmiştir. Ölçüm kit talimatlarına uygun olarak 15 dakika beklendikten sonra yapılmıştır. Ölçüm yöntemi indofenol mavisi yöntemi olup, spektrofotometre (DR 5000™ UV-Vis Laboratory Spectrophotometer, HACH) ile 690 nm dalga boyunda absorbanslar ölçülmüştür. Derişim değerleri mg/L cinsinden sunulmuştur. Ölçümler 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.5. Diazotrofik ve Non-diazotrofik Büyüme Şartlarında Hidrojen Üretimi

Tez çalışmasının bu bölümünde *R. sphaeroides*'in diazotrofik ve non diazotrofik kültür ortamlarındaki hidrojen üretim performansları araştırılmıştır. Diazotrofik koşullarda hidrojen üretimi için bakteriler öncelikle hazırlanan diazotrofik besiyerinde 72 saat boyunca büyütülmüştür. Sonrasında, bakteri kültürü 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek çöktürülerek oluşan bakteri peleti taze olarak hazırlanan non-diazotrofik besiyerine aktarılmıştır (Şekil 3.3). Anaerobik ortam sağlamak için her bir besiyerinin içinden 3 dakika boyunca argon gazı geçirilmiş ve sonrasında hidrojen üretim düzeneği kurulmuştur (Şekil 3.3). Bakterilerin diazotrofik kültür ortamında 72 saat büyütülmesinin amacı bakterilerde bulunan Mo-nitrojenaz enziminin hidrojen üretimi başlamadan önce N₂ gazı ile stimüle edilmesi ve sonrasında hidrojen üretimi ortamına transfer edilmesidir. Bakteriyel büyüme diazotrofik şartlarda gerçekleştirilip sonrasında non-diazotrofik koşullardaki hidrojen üretim düzeneğine geçirilmesi sağlanmıştır. Önceki çalışmalardan elde edilen bilgilere göre *R. sphaeroides* OU001'in yaklaşık 72 saat sonra biyohidrojen üretimine başladığı tespit edilmiştir. Bu nedenle transfer işlemi 72. saati geçirmeden yapılmıştır. Tez hipotezinde de belirtildiği gibi diazotrofik koşullarda kültüre edilen bakterilerdeki Mo-nitrojenaz enzimi N₂ ile indüklendikten sonra hidrojen üretim performansının daha yüksek olması beklenmektedir.

Çalışmalarda 100 mL hacimdeki penisillin şişeleri kullanılmıştır. Hidrojen üretimi 60-100 Watt tungsten filamentli akkor lambalar ile sağlanan ışık kaynağı ile ve anaerobik koşullar altında 29 °C’de gerçekleştirilmiştir. Üretilen hidrojen gazı ince borular aracılığıyla içi su dolu cam tüplerde toplanmıştır. Zamana bağlı hidrojen üretim miktarları kayıt altına alınıp hidrojen üretim eğrileri oluşturulmuştur. Hidrojen üretim düzeneği Şekil 3.3’te verilmektedir.



Şekil 3. 3. Santrifüjlenen bakteri peletleri ve hidrojen üretim düzeneği.

Hidrojenin üretiminde 30 cm uzunluğundaki deney tüpleri kullanılmıştır (Şekil 3.3). Bu deney tüplerinin üzerine, cetvel kullanılarak her cm işaretlenmiştir. Sonrasında işaretlenen kısımlardan herhangi 2 aralık belirlenerek bu iki aralık arasında kaç mL su bulunduğu belirlenmiştir. Her tüp için 2 değer ölçülüp bunların ortalaması alınmıştır. Daha sonra deney tüplerinin tamamı saf su ile doldurularak ağızları plastik tıpalarla kapatılmıştır. Bu deney tüpleri ağız kısımları aşağı gelecek şekilde sporlara yerleştirilmiştir. Daha sonra üretilen hidrojenin ince borular yardımıyla cam tüplerde toplanması sağlanmıştır. Hidrojen gazı üretim miktarı 24 saat aralıklarla 10 gün boyunca takip edilerek sonuçları mL hidrojen üretimi olarak verilmiştir.

3.6. Gaz Kromatografisiyle Hidrojen Saflık Analizi

R. sphaeroides tarafından üretilen gazın hidrojen gazın saflığı ve miktarı gaz kromatografisi ile belirlenmiştir (Shimadzu-GC 2010). Deney tüplerinde biriken gazdan, şırınga ile 100 µL örnek alınarak gaz kromatografisine enjekte edilmiştir. Analiz sırasında, termal iletkenlik dedektörü (TCD) kullanılıp, taşıyıcı gaz olarak 22.3 mL/dk akış hızında argon gazı kullanılmıştır. Enjeksiyon bloğu, kolon ve dedektör sıcaklıkları sırasıyla 200 °C, 50 °C ve 250 °C olarak ayarlanmıştır.

3.7. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu *nifH* gen ifade analizi için tasarlanan primerlerin test edilmesi ve PCR programının optimizasyonunu gerçekleştirmek için yapılmıştır. Toplam DNA için non-diazotrofik ortamda büyütülen bakteri kültürü kullanılmıştır. Hidrojen üretiminden sorumlu Mo-nitrojenaz enziminin alt birimini (Fe-protein) kodlayan gen olan *nifH* geninin ifade analizi için *nifH* ve 16S *rRNA*'ya spesifik primerler tasarlanmıştır. DNA izolasyonu 'ZymoBIOMICS DNA Miniprep' kiti kullanılarak aşağıda verilen protokole göre gerçekleştirilmiştir.

- Bakteri örneklerinden 1500 µl alınarak 1,5 mL' lik tüplere aktarılır. 7000 rpm'de 5 dakika santrifüjlenerek hücre pelleti oluşturulur ve süpernatant kısım atılır.
- Bakteri peletlerinin bulunduğu tüpe 750 µL ZymoBiomics Lizis solüsyonu eklenir. Pipetaj yapıldıktan sonra örnekler ZymoBiomics Bashing Bead Lizis tüpüne aktarılır. Maksimum hızda 20 dakika vortekslenir.
- Toplama tüpü üzerine Zymo - Spin III-F filtresi yerleştirilir. Önceki basamakta santrifüj sonunda oluşan süpernatanttan yaklaşık 400 µl alınarak hazırlanan filtre üzerine aktarılır ve 1 dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edilir.
- Santrifüjün ardından Zymo Spin III-F filtresi atılır (Toplama tüpü ve içeriğini atmayınız). 1200 µl ZymoBiomics DNA Binding Buffer eklenir ve pipetaj yapılır.
- Toplama tüpü üzerine Zymo-Spin II-CR kolonu yerleştirilir ve bir önceki

basamakta elde edilen karışımın 800 µl'si bu kolona aktarılır. 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenir.

- Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı dökülür ve bir önceki basamak tekrar edilir.
- Yeni bir toplama tüpüne aynı Zymo Spin II-CR kolonu yerleştirilir ve kolon üzerine 400 µl Zymo BIOMICS DNA Wash Buffer-1 eklenir.
- Ardından 1 dakika boyunca 10,000 rpm'de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı atılır.
- Toplama tüpündeki Zymo Spin IICR kolonu üzerine 700 µl BIOMICS DNA Wash Buffer-2 eklenir ve 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı atılır.
- Toplama tüpündeki Zymo Spin IICR kolonu üzerine 200 µl BIOMICS DNA Wash Buffer-2 eklenir ve 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda toplama tüpünde biriken sıvı atılır.
- Zymo Spin IICR kolonu temiz bir 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılır ve kolon matriksine 100 µl Zymo BIOMICS DNaz / RNaz içermeyen su eklenir 1 dakika beklenir ve 10,000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Yeni bir toplama tüpüne Zymo Spin III HRC Filtresi yerleştirilir ve 600 µl Zymo BIOMICS HRC Hazırlama solüsyonu eklenir. 8000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir.
- Temiz bir 1,5 ml'lik ependorf tüpüne hazırlanmış Zymo Spin III HRC filtresi yerleştirilir ve üzerine önceki basamakta elde edilen DNA eklenir. 3 dakika boyunca 14,000 rpm'de santrifüj edilir.
- Filtrelenen DNA bu aşamadan sonra PCR ve sonraki uygulamalar için hazırdır.
- Elde edilen DNA'nın spektrofotometrik ölçümü (Thermo Scientific Multiskan Go) 260/280 nm'de: 2,100 ng/uL olarak ölçülmüştür.

3.8. Toplam RNA İzolasyonu

nifH gen ifade analizlerinde kullanılmak üzere diazotrofik ve non diazotrofik ortamda büyütülen bakterilerden toplam RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA

izolasyonu TRI Reagent protokolü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TRI Reagent solüsyonu; insan, hayvan, bitki, maya, bakteri biyolojik örneklerinden DNA, RNA ve protein izolasyonu için kullanılan tek fazlı bir solüsyonda guanidin tiyosiyanat ve fenol solüsyonundan oluşan bir karışımdır. RNaz aktivitesini inhibe eder. TRI Reagent, RNA, DNA veya proteinlerin ekstrakte edildiği biyolojik numuneyi homojenize etmek için kullanılır. *nifH* gen ifade analizleri zaman bağılı olarak yapılmıştır bu nedenle RNA izolasyonları 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde büyütülen bakteriler kullanılarak yapılmıştır. Bakterilerin parçalanması için 5 mg lizozim içeren TES Buffer (10mM Tris-HCL pH 7.5, 1Mm EDTA pH 7.5, 100Mm NaCl) - lizozim çözeltisi hazırlanmıştır. İzolasyon için aşağıdaki aşamalar izlenmiştir.

- Boş 1,5 mL'lik ependorf tüpler tartılıp daraları alınır. 1,5 mL bakteri eklenerek 13.000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilir. Süpernatantlar atılır.
- 25 µl hazırlanan lizozim+TES Buffer karışımından her bir tüpteki pellete eklenir ve karıştırılır. Karışım 15 dakika oda sıcaklığında beklenir. Her 5 dakikada bir pipetaj yapılır.
- Karışıma 1 mL Tri Reagent eklenir. Pipetaj yapılır ve karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- Karışıma 200 µl kloroform eklenir, 15 saniye karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında beklenir. Sonrasında, karışım 12000 x g'de +4 °C'de 15 dakika santrifüj yapılır.
- 1,5 mL'lik ependorf tüplere üst şeffaf faz alınır. 500 µl izopropanol eklenir, pipetaj yapılır ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Karışım 12000 x g'de 14 dakika santrifüjlenir. Süpernatant atılır.
- Santrifüj sonrası oluşan pellete 1 mL %70 lik etil alkol eklenir ve 12000 x g'de 5 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant atılarak 30 µl DNaz ve RNaz içermeyen su eklenir.
- 50 °C'ye ayarlanan inkübatöre tüpler yerleştirilerek 5 dakikada bir pipetaj yapılarak 10 dakika inkübatörde bekletilir. Bu şekilde RNAların çözünmesi sağlanır.
- İzole edilen RNA -20°C'de saklanır.

3.9. Primer Tasarımı ve Validasyonu

3.9.1. Primer tasarımı

Diazotrofik ve non-diazotrofik koşullardaki gen ekspresyon çalışmalarında hidrojen üretim mekanizmasında görevli *nifH* geni ile hücrede sürekli ekspresyonu yapılan ve evrensel olarak korunan 16S rRNA geni kullanılmıştır. 16S rRNA geni referans gen olarak kullanılmıştır. NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gen Bankası'ndan *R. sphaeroides*'e ait *nifH* ve 16S rRNA gen dizileri elde edilerek primer tasarımında kullanılmıştır. Bu sekanslar kullanılarak Primer3 (Primer Design) programı ile primer tasarımı gerçekleştirilmiştir. Primerler PCR işlemi sırasında kullanılmıştır. Tasarlanan bu primerler firmaya gönderilerek sentezletirilmiştir. Primerlerle ilgili temel bilgiler ve dizileri Tablo 3.5'te yer almaktadır.

Tablo 3.5. Tasarlanan primerler.

Primer Adı	Nükleotit Dizisi	Tm (°C)	GC Oranı (%)	Uzunluk (bp)
<i>nifH</i> Sol Primer	5'-GCCAACAAACATCGCCAAGG-3'	53.25	%58	19
<i>nifH</i> Sağ Primer	5'-TCGGTCTTGCGCTCGTTG-3'	52.60	%61	18
16S rRNA Sol Primer	5'-GATGGTTCCTTCAGTTCGGC-3'	53.83	%55	20
16S rRNA Sağ Primer	5'-CAGTTTCCCTAGAGTGCCCA-3'	53.83	%55	20

3.9.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR, DNA'nın DNA Polimeraz enzimi kullanılarak çoğaltıldığı işlemdir. Bu işlemde sıcaklığın hızlı azaltılıp artırılması esastır. PCR işlemi döngüler ile gerçekleşir. Döngüler 3 aşamalıdır. Birinci aşama denatürasyon aşamasıdır ve 95°C'de gerçekleşir. İkinci aşama bağlanma aşamasıdır. Zincirler ayrılırken karşı zincirlere çoğalması istenilen gen bölgeleri bağlanır. Üçüncü aşamada DNA polimeraz enzimi kullanılarak kalıp DNA zincirinin karşı bölgesine yani zincir sentezlenerek zincir uzar.

PCR için reaksiyon üretici firmanın (Solis Biodyne hot firepol DNA Polimeraz) tarifi üzerine Tablo 3.6.'da verilmiştir. Bu çalışmada izole edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılmıştır. Buradaki amaç, tasarlanan primerlerin validasyonu ile PCR programının optimizasyonudur. Bu aşamada optimize edilen koşullarda (Tablo 3.6 ve Tablo 3.7) RT-qPCR ile gen ifade analizleri gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.6. PCR içeriği.

İçindekiler	Hacim (µl)
Su	17,3
10X Buffer B1	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,5
dNTP (10 mM)	0,5
Primer, (25 pmol/µl)	1+1
DNA	1
DNA polimeraz	0,2

Tablo 3.7. PCR döngüsü.

Döngü ismi	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denaturasyon	95	12 dakika	1
Denaturasyon	95	30 saniye	40
Bağlanma	57	15 saniye	40
Sentez	72	10 saniye	40
Son sentez	72	5 dakika	1

3.9.3. Agaroz jel elektroforezi

Genomik DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı PCR sonrası oluşan PCR ürünleri, agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiştir. PCR ürünleri jel elektroforezinde yürütülmüştür. Bunun için %1,5'luk (w/v) agaroz jel hazırlanmıştır. Bu aşamada tasarlanan primerlerin validasyonunun yapılması sağlanmıştır. Jelin hazırlanması sırasında 25x20 cm ebatlarında jel tankı kullanılmıştır. Jeli (%1,5'luk) hazırlamak için, 1,5 g agaroz, 100 ml 1X TAE tamponuna (0,04 M Tris, 0,04 M Acetate ve 0,001 M EDTA (Etilendiamintetraasetikasit pH 8) kullanılmıştır. Mikrodalga fırın kullanılarak agarozun tamamen erimesi sağlanmıştır. Karışım

yaklaşık 60°C'ye kadar soğutulmuştur. PCR ürünlerinin UV ışık altında görünür olması için 5 ml Red Safe (Nucleic Acid Staining Solution-20,000x) eklenmiştir. İşlem sonunda jel tankı ilave edilmiştir ve soğumaya bırakılmıştır. Jel soğudukça katılaştıktan sonra elektroforez cihazına yerleştirilmiştir. PCR ürünlerinin takibini sağlamak için yoğunluğu yüksek 6x yükleme boyası (10 mM Tris-HCl, % 0,03 bromophenolblue, % 0,03 xylene cyanol FF, %60 gliserol, 60 mM EDTA) 2 µl olacak şekilde PCR ürünleri ile karıştırılmıştır. PCR ürünleri otomatik pipet (Thermo Scientific marka) kullanılarak 10 µl olarak jeldeki kuyulara yüklenmiş ve istenilen gen fragmanının boyunu anlamak amacıyla örneklerden önceki kuyucuğa DNA merdiveni olarak SiZer™-100 DNA Marker Solution yüklenmiştir. Bir ucu negatif (-), diğer ucu pozitif (+) kutup olan elektroforez tankının (-) yüklü tarafında yüklü bulunan DNA örnekleri konsantrasyonlarına göre zıt yüklü pozitif kutba doğru ilerler. Fragmanların boyları, örneklerle birlikte yürütülen uzunluğu belli standart DNA merdiveni kullanılarak belirlenir. Jelde PCR ürünleri, elektrik akımı kullanılarak (90 V) 60 dakika yürütülmüştür. Yürütme işlemi sona erince jeldeki bantlar görüntüleme cihazı (BIORAD ChemiDoc Touch Imaging System) ile UV ışığı altında görüntülenmiştir. Elde edilen görüntüler TIFF/JPEG dosyası şeklinde saklanmıştır.

3.10. *nifH* Gen Ekspresyon Analizi

Tezin bu aşamasında diazotrofik ve non-diazotrofik koşullarda çoğaltılan *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001'deki *nifH* gen ekspresyon analizi yapılmıştır. Referans gen olarak 16S rRNA geni kullanılmıştır. Kullanılan hedef gen olan *nifH* geni atmosferdeki serbest azotun amonyağa çevrilmesinde görevli enzim olan Mo-nitrojenaz enziminin alt birimini (Fe protein) kodlar. Gen ifade analizi iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Birinci aşamada *nifH* mRNA'sından cDNA sentezlenmiş ve ikinci aşamada da sentezlenen cDNA kullanarak qPCR gerçekleştirilmiştir. Aşağıda bu iki aşama detaylı olarak verilmektedir.

3.10.1. cDNA sentezi

Gen ekspresyon analizlerinde kullanılacak cDNA'yı elde etmek amacıyla Jena Bioscience Script Reverse Transcriptase cDNA sentez kiti kullanılmıştır. Diazotrofik ve non-diazotrofik koşullarda çoğaltılan *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001'ten farklı saat aralıklarında (48, 72, 96, 120. ve 144. saatler) total RNA izole edilerek cDNA sentezinde kullanılmıştır. Her bir cDNA sentez reaksiyon için 1 µg RNA ve 1 µl *nifH* primeri kullanılmıştır. Referans gen olarak kullanılan 16S rRNA primerleri ile de aynı işlemler yapılmıştır. İlk olarak RNA'nın yapısında bulunabilecek olan katlanmaların açılması ve tasarlanan primerlerin bağlanması için 70°C'de 5 dakika inkübe edilen örnekler daha sonra 4 µl 5x reaksiyon tamponu, 1 µl 10 mM dNTP karışımı, 1 µl DTT, ve 1 µl Revers transkriptaz enzimi eklenmiştir. Örnekler ilk önce 50°C'de 60 dakika ve sonrasında 70°C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Sentezlenen cDNA'lar sonraki basamakta kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.10.2. Gerçek Zamanlı PCR

Gerçek zamanlı PCR, nükleik asit amplifikasyonu ile aynı anda artış gösteren floresans sinyalinin ölçülmesi prensibiyle, kantitatif olarak sonuç veren PCR yöntemidir. Yöntem çift zincirli DNA'ya bağlanıp floresans ışıma veren SYBR Green I adlı boya kullanılması ve ışıma vermesi şeklinde gerçekleşir. Amplifikasyonun artmasına bağlı olarak DNA artışı gözlemlenmektedir (Jahn ve ark., 2008). Primerin bağlanmasıyla uzama aşamasında hedef DNA'nın çift zincirli hale gelir. DNA'ya bağlanan SYBR Green miktarı artar ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarı artmaktadır. Bu aşamada *nifH* ve *16S rRNA* genleri için tasarlanan primerler kullanılarak diazotrofik ve non-diazotrofik koşullar için gerçek zamanlı PCR gerçekleştirilmiştir. PCR içeriği ve PCR programı sırasıyla Tablo 3.8 ve Tablo 3.9'da verilmektedir.

Tablo 3.8. Gerçek zamanlı PCR içeriği.

İçindekiler	Hacim (µl)
2X SYBR-Green karışımı	10 µl
ROX boya	0,4 µl
İleri primer	1 µl
Geri primer	1 µl
cDNA	5 µl
dH ₂ O	2,6 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3.9. Gerçek zamanlı PCR programı.

Döngü	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95	12 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	40
Bağlanma	57	15saniye	40
Sentez	72	10 saniye	40
Son sentez	72	5 dakika	1

3.11. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizleri

Tez çalışmasının bu aşamasında diazotrofik ve non-diazotrofik koşullarda çoğaltılan *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001'in morfolojik yapısının Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM – Hitachi SU 510) ile analizi gerçekleştirilmiştir. Besi yeri kompozisyonun bakteri morfolojisine etkisi bu çalışma ile ortaya çıkarılmıştır. FE-SEM analizi için izlenen yöntem aşağıda verilmektedir.

- Biebl Pfenning (B&P) ve azot kaynağı olarak azot gazının kullanıldığı (modifiye edilmiş BP) besiyerlerinde 3 kez pasajlanarak büyütülen bakteriler 1,5 mL'lik ependorf tüplere alınmıştır.
- Bakteri kültürü 7000 rpm de 5 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant atılmıştır.
- Bakteri peletinden 5 µl alınarak nokta şeklinde örnek platformuna (stab) yerleştirilmiştir. Sonra, Ependorf tüplerine 1mL steril saf su eklenip karıştırılmıştır.

- Karışımdan numune platformlarının farklı bölgelerine 5 µl, 2,5 µl ve 1 µl konmuştur. 2.5 µl ve 1 µl olarak platforma eklenen örneklerin üzerine 2.5 µl steril saf su eklenerek seyreltme yapılmıştır.
- Örnek platformları 50°C de 10 dakika bekletilerek kurutulmuştur.
- Kurutulan örnekler 4,15 nm İridyum ile kaplanarak FE-SEM analizleri yapılmıştır.

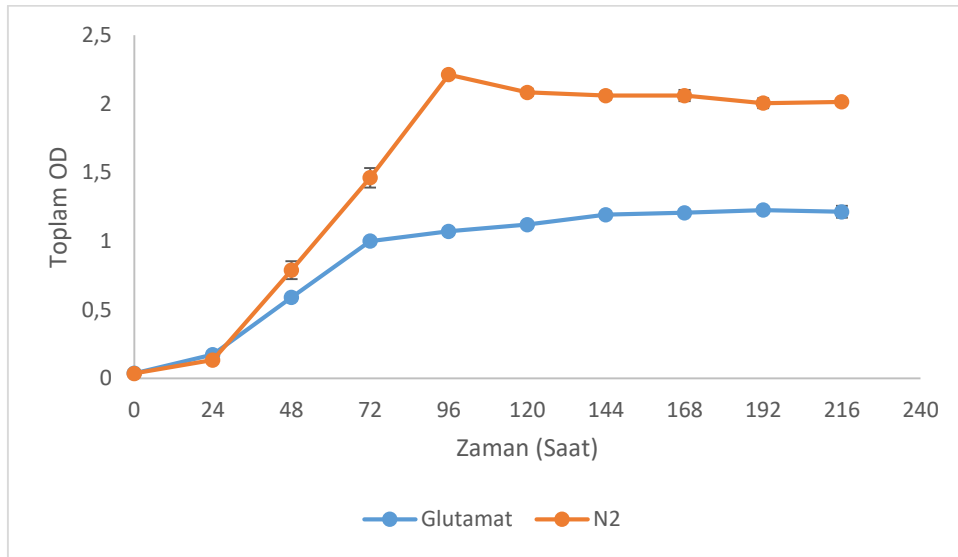
Hücrelerin morfolojik yapılarında herhangi bir değişim olmaması için, doğal yapılarının korunması için hücrelere herhangi bir kimyasal işlem yapılmamış olup üreme sonrası (yaklaşık 96. saat) doğrudan FE-SEM görüntüleri alınmıştır. Böylece besiyeri kompozisyonunun hücre yapısında meydana getirdiği değişimler tespit edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Büyüme Eğrileri ve pH Analizleri

4.1.1. Büyüme eğrileri

Glutamat, hidrojen üretimi için iyi bir azot kaynağı olsa da, N₂ gazının fotosentetik bakterilerin büyümesi ve hidrojen üretimi üzerindeki etkisini incelemek için N₂ gazı azot kaynağı olarak kullanılabilir. PNS bakterilerinden olan, *R. sphaeroides*, biyoteknolojik uygulamalarda hidrojen üretim performansı yüksektir. Ayrıca, *E.coli* ve diğer birçok gram negatif bakterilerin tersine *R. sphaeroides*'in sistemik immün reaksiyonlara neden olmaması tercih sebebidir (Wu ve ark., 2022). *R. sphaeroides*'in en önemli özelliği, çeşitli karbon kaynaklarının kullanılmasıyla biyohidrojen üretebilmesidir. Hidrojen, bir ışık kaynağı varlığında anaerobik koşullar altında *R. sphaeroides*'de bulunan Mo-nitrojenaz enziminin aktivitesiyle üretilir. *R. sphaeroides* O.U 001'in farklı azot kaynaklarında anaerobik büyütmek ve hidrojen üretimini incelemek için N₂ gazı ve glutamat kullanıldı. Azot kaynağının farklılığına bağlı olarak bakteriyel büyüme sırasında optik yoğunlukları farklılık göstermiştir. Bunun için hazırlanan besiyerlerinde çoğaltılan bakteri kültürlerinden 24 saat arayla örnekler alınmıştır. Bakteri kültürlerinin absorbansları 660 nm'de spektrofotometrede ölçülerek hesaplanmıştır. İstatiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edebilmek için deneyler iki kez tekrarlandı ve hata çubukları grafiklere eklendi. Kontrol grubu olarak azot kaynağının (2mM) glutamat olduğu B&P minimal besiyerleri kullanılmıştır. Şekil 4.1.'de farklı azot kaynaklarında büyütülen bakterilerin zamana bağlı optik yoğunluk değerleri gösterilmiştir.



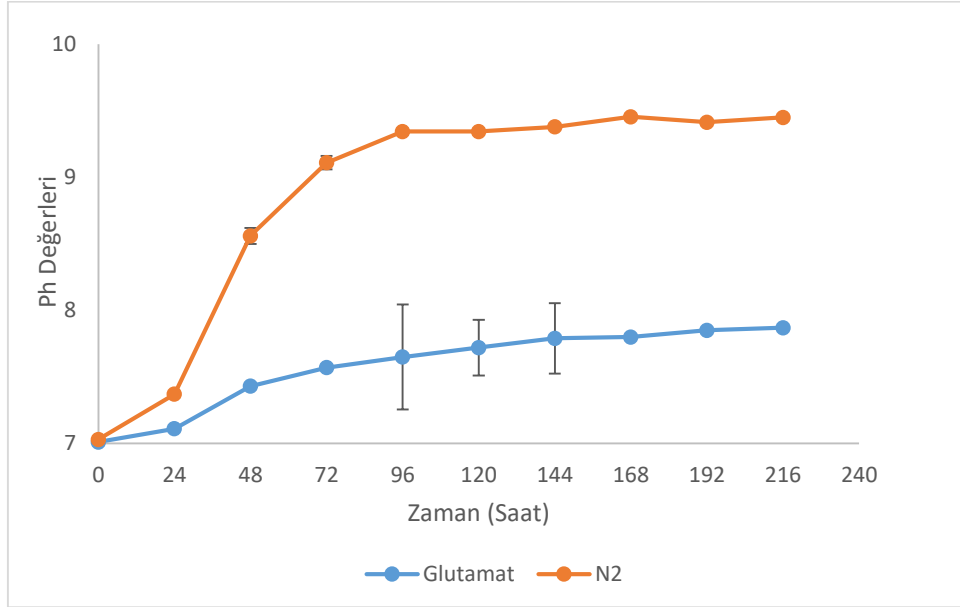
Şekil 4. 1 Farklı azot kaynaklarıyla büyüyen bakterinin zamana bağlı OD değerleri (n=2).

Optik yoğunlukları karşılaştırıldığında N_2 gazının amonyuma (NH_4) çevrilerek kullanıldığı diazotrofik büyüme şartlarında, non diazotrofik ortama göre daha fazla hücre yoğunluğunun olduğu gözlemlenmiş ve daha hızlı bir büyüme elde edilmiştir. Diazotrofik ve non diazotrofik koşullarda çalışılan kültürlerin spektrofotometre ile 660 nm’de ölçülen optik yoğunlukları sırasıyla 2,02 ve 1,21 olarak kaydedilmiştir. Buradan, genel olarak N_2 fiksasyonun bakterilerin üremelerine olumlu etki yaptığı gözlemlenmiştir. Üreme eğrileri göz önüne alındığında, non diazotrofik ortamda çoğalan bakteriler 72. saatte durağan faza girerken, diazotrofik koşullarda çoğalan bakteriler 144. saatte durağan faza girmiştir. N_2 fiksasyonu ile üretilen amonyumun bakteride hücre materyali sentezini tetiklediği ve böylece hücrelerin hem çok hızlı çoğaldığı hem de yüksek hücre sayılarına ulaşıldığı değerlendirilmektedir.

4.1.2. pH analizleri

Çalışma başlangıcında bakteri kültürünün pH’sı 6.8’e ayarlanmıştır, ancak bakteri çoğalma süreci boyunca kültürlerin pH değişimleri takip edilmiştir. Bunun için kültürden 24 saat aralıkla örnekler alınıp pH metre ile ölçümler yapılarak takip edilmiştir (Şekil 4.2). pH eğrileri incelendiğinde diazotrofik kültürün pH’sının 9,45’e kadar yükseldiği ve non diazotrofik kültürün pH değerinin ise en fazla 7,87’e kadar

çıktığı görülmüştür. Bu durum moleküler azotun amonyağa çevrildiği koşullarda biriken amonyum miktarına bağlı olarak pH' nın artış gösterdiği ve belirli bir seviyeden sonra sabit kaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Zamana bağlı pH değişimleri (n=2).

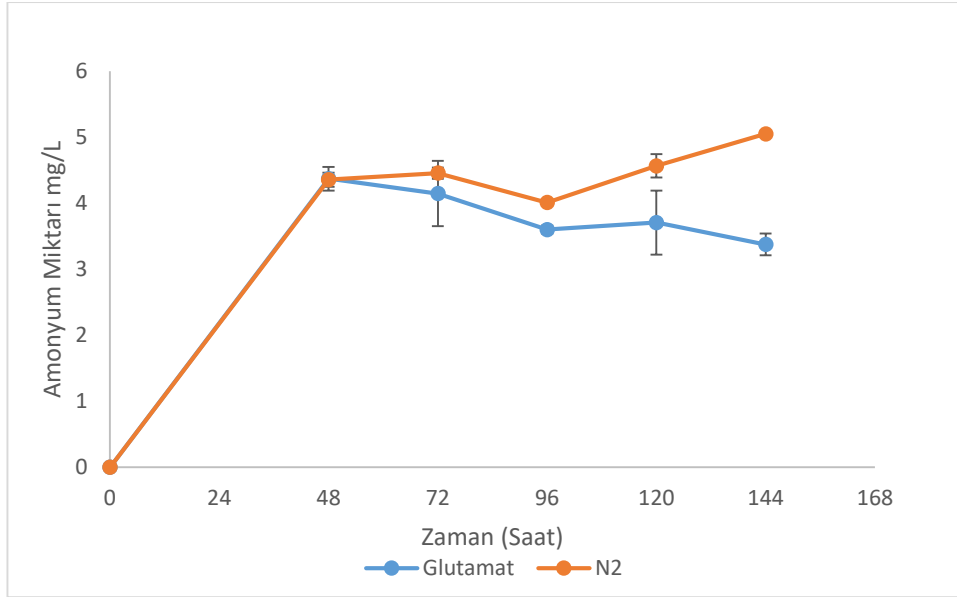
Hidrojen üretiminde kültür ortamının pH'sı hidrojen üretimi açısından son derece önemlidir (Zagrodnik ve Laniecki, 2015). Birkaç çalışmada, alkali pH'sının nitrojenaz aktivitesi ve fototrofik H₂ üretimi üzerindeki olumsuz etkisini ortaya koymuştur. *Anabaena variabilis* tarafından foto-hidrojen üretimi sırasında alkali pH seviyelerinde nitrojenaz aktivitesinin önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. *Rhodobacter sphaeroides*'in nitrojenaz aktivitesi 6,5 ile 7,0 arasındaki bir pH seviyesinde en yüksek iken, çalışmamızda azot gazının azot kaynağı olarak kullanıldığı koşullarda biriken amonyum oranı fazla olduğundan pH bu değerin üzerine çıkmıştır. Yüksek pH değerlerine rağmen, bu çalışmada diazotrofik koşullarda da H₂ üretimi gözlemlenmiştir.

4.2. Toplam Amonyum Analizleri

Rhodobacter sphaeroides'te moleküler azotun amonyuma dönüştürülmesinden sorumlu olan enzim Mo-nitrojenaz enzimidir. N_2 'nin olmadığı ortamlarda Mo-nitrojenaz enzimi ATP ve indirgeyici güçleri (reducing power) hidrojen üretiminde kullanır. Nitrojenaz enzimi, 1 mol N_2 'nin indirgenmesi için 8 mol elektron transferi ve 20 ila 30 mol MgATP'nin hidrolizini gerçekleştirir. Bu son derece enerji gerektiren bir süreçtir. Dolayısıyla, yüksek miktarlarda ATP ve indirgeme gücü gerektiren nitrojenazın sentezi ve aktivitesi, çevresel uyaranlara yanıt olarak transkripsiyonel düzeyde ve translasyon sonrası düzeyde sıkı bir şekilde düzenlenir (Li ve ark., 2010). Tez kapsamında diazotrofik ve non diazotrofik koşullarda hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya paralel olarak ve destekleyici bir deney seti olarak aynı koşullarda amonyum miktar analizleri de yapılmıştır. Hidrojen üretimi ve amonyum sentezlenmesi bakteride bulunan nitrojenaz enzim aktivitesinin bir sonucu olup nitrojenaz enzim miktar ve aktivitesinin yüksek olduğu koşullarda hidrojen üretimine paralel olarak amonyum miktarının da yüksek olması beklenmektedir. Bu kapsamda tez çalışmasının bu bölümünde hücre için amonyum miktar tayini yapılmıştır. Sulu bir çözeltide, nötr pH'larda hem amonyak (NH_3) hem de amonyum (NH_4) mevcuttur. Basitleştirmek için, "amonyum" terimi hem amonyak hem de amonyum için kullanılmıştır. Şekil 4.3'de diazotrofik ve non diazotrofik ortamda büyütülen bakterilerin içerdiği amonyum miktarı zamana bağlı olarak gösterilmiştir.

Bu çalışmada bakteriden arındırılmış besiyeri ve bakterinin parçalanması sonucu oluşan homojenatın amonyum içerikleri analiz edilmiş ve bakteriden arındırılmış boş besiyerinde amonyum tespit edilememiştir. Bu sonuç tespit edilen amonyumun tamamının bakteri bünyesinden kaynaklandığını ispat etmiştir. Amonyum analizi diğer analizler gibi zamana bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde farklı besiyerlerinde büyütülen bakteriler sonikasyon ile parçalanmış ve bu homojenatlarda amonyum miktar analizleri yapılmıştır (Şekil 4.3). Analiz sonuçlarına göre, diazotrofik ortamda çoğalan bakterilerden elde edilen lizatlarda non-diazotrofik ortamda çoğalan bakteri lizatlarına göre daha fazla

amonyum tespit edilmiştir. Moleküler azotun amonyuma çevrildiği koşullarda daha bakterilerin daha fazla amonyum ürettiği tespit edilmiştir. Yüksek miktarlarda amonyum birikimi yüksek nitrojenaz aktivitesinin bir göstergesidir. Ayrıca, yüksek miktarlarda amonyum birikimi hem yüksek *nifH* gen ifadesini hem de yüksek hidrojen üretimini desteklemektedir.

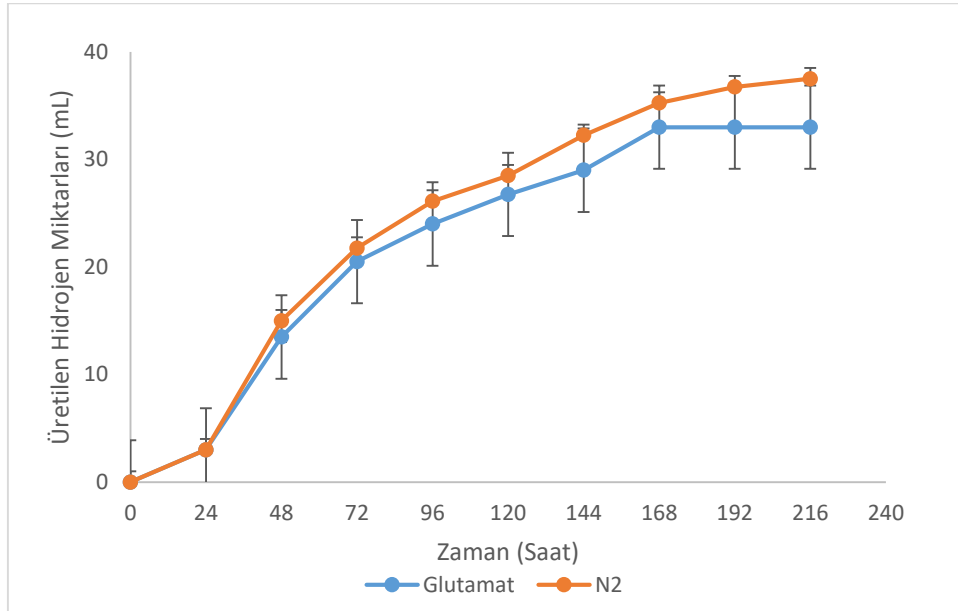


Şekil 4. 3. Bakteri bünyesindeki amonyum miktarının zamana bağlı değişimi (n=2).

4.3. Diazotrofik ve Non Diazotrofik Koşullarında Hidrojen Üretimi

Günümüzde biyohidrojen üretim verimliliği ve miktarı yeterli seviyelerde olmadığı için enerji çeşitliliğine henüz katkı sağlamamaktadır. Ancak, hidrojen üretiminin hem miktar hem de verimlerinde iyileştirmeler çeşitli yollarla gerçekleştirilebilir. Örneğin, etkili biyoreaktör tasarımı, ışık enerjisinin daha verimli kullanılmasına yol açabilir. Metabolik modelleme ile bakterinin besiyeri içeriğini, içerik miktarının ve hidrojen üretimine etki eden çevresel koşulları optimize ederek verimli hidrojen üretim prosesleri elde edilebilir (Chen ve ark., 2011). Bu tez kapsamında da biyohidrojen üretim verimliliği ve miktarını arttırmaya yönelik bir tasarım ve yaklaşım gerçekleştirilmiştir. Buradaki yaklaşım N_2 gazı ile (diazotrofik koşullar altında) nitrojenaz enzim miktarı ve aktivitesini uyararak daha çok hidrojen

üretimini sağlamaktır. Bu çerçevede biyohidrojen üretimi farklı azot kaynakları kullanılarak (diazotrofik ve non-diazotrofik ortam) büyütülen bakterilerde test edilmiştir. Bunun için bakteriler öncelikle azot kaynağı olarak N_2 gazının ve karbon kaynağı olarak malatın (15 mM) kullanıldığı diazotrofik koşullarda çoğaltılarak nitrojenaz enzimi stimüle edilmiştir. Daha sonra bakteriler hidrojen üretimi için non-diazotrofik ortama transfer edilerek hidrojen üretimi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu olarak ise karbon kaynağı olarak malatın (15 mM) ve azot kaynağı olarak glutamatın (2 mM) kullanıldığı besiyeri (non diazotrofik ortam) kullanılmıştır. Hidrojen gazı üretim miktarı 24 saat aralıklarla takip edilmiştir ve sonuçları mL hidrojen üretimi olarak verilmiştir (Şekil 4.4). Elde edilen sonuca göre diazotrofik ortamda büyütülen bakterinin daha fazla hidrojen ürettiği görülmüştür. Diazotrofik koşullarda 13,95 mL hidrojen üretilirken, non diazotrofik koşullarda 11,05 mL hidrojen üretimi tespit edilmiştir. Bu çalışma ile tezin başında kurulan hipotezin geçerliliği doğrulanmıştır. Çalışmanın doğruluğunu sağlamak için deneyler iki kez tekrarlanmıştır.



Şekil 4. 4 Diazotrofik ve nondiazotrofik büyüme ortamlarında çoğaltılan *Rhodobacter sphaeroides* ile hidrojen üretimi (n=2).

4.4. Gaz Kromatografisi Analizi

Hidrojen üretim düzeneğinde üretilen toplam saf hidrojen miktarını ölçmek için gaz kromatografisi (GC) kullanılmıştır. Gaz kromatografisi analiz sonuçlarına göre azot kaynağı olarak azot gazının kullanıldığı diazotrofik koşullarda, toplama borularında biriken hidrojen gazı miktarı 13,95 olarak tespit edilmiştir. Azot kaynağı olarak glutamatın kullanıldığı non diazotrofik ortamda büyüyen bakterilerin ürettiği saf hidrojen gazı miktarı 11,05 olarak ölçülmüştür.

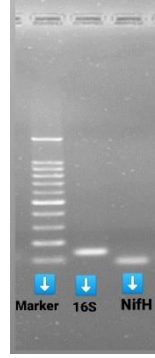
4.5. Primer Tasarımı ve Primerlerin Validasyonu

DNA izolasyonu ‘ZymoBIOMICS DNA Miniprep’kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA, tasarlanan primerlerin çalışıp çalışmadığının kontrol edilmesi (validasyon) için PCR aşamasında kullanılmıştır. İzole edilen DNA’nın özellikleri ve konsantrasyonu Tablo 4.1.’de verilmiştir.

Tablo 4.1. *Rhodobacter sphaeroides*’ten elde edilen DNA’nın absorbans ve konsantrasyonu.

Örnek	230nm	260nm	280nm	320nm	Konsantrasyon	260/280	260/230
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	0,113	0,060	0,049	0,040	19,12	2,143	0,2664

Yukarıda elde edilen DNA ile gerçekleştirilen PCR sonucunda elde edilen ürünler agaroz jelde yürütülmüştür (Şekil 4.5). PCR ürünlerinin boyunu tespit etmek amacıyla jele DNA merdiveni de (SiZer™-100 DNA Marker Solution) yüklenmiştir. Soldan sağa doğru kuyucuklarda SiZer™-100 DNA Marker Solution, 16S *rRNA* ve *nifH* primerleri ile yapılan PCR ürünleri görülmektedir. (Şekil 4.5). Bu sonuca göre, tasarlanan primerler ile gerçekleştirilen PCR sonucunda beklenen uzunlukta ürünler elde edilmiştir. 16S *rRNA* PCR ürünü 146 bp ve *nifH* PCR ürünü 90 bp olarak tespit edilmiştir.



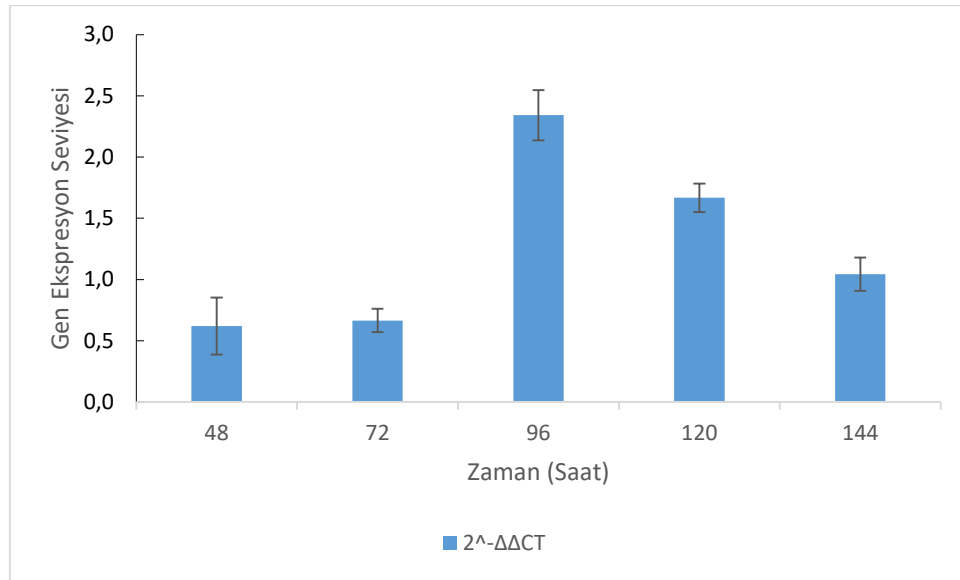
Şekil 4. 5 nifH ve 16S rRNA PCR ürünleri.

Bu PCR sonucuyla tasarlanan primerlerin çalıştığı doğrulanmıştır ve bu primerler sonraki aşama olan diazotrofik ve non diazotrofik koşullarında *nifH* ekspresyon analizinde de kullanılmıştır.

4.5. Diazotrofik ve Non Diazotrofik Koşullarındaki *nifH* Ekspresyon Analizi

Bu çalışmada diazotrofik ve non-diazotrofik koşullarda çoğaltılan *R. sphaeroides* O.U.001’de bulunan *nifH* gen ifade analizi gerçekleştirilmiştir. *nifH* geni bakteride bulunan Mo-nitrojenaz enziminin alt birimi (Fe-Protein) kodlayan bir gendir. Hücre içi gen ifade oranları genellikle protein miktarlarıyla doğru orantılıdır. Her ne kadar bakterilerde post-transkripsiyonel ve post-translasyonel gen regülasyonları ile birtakım düzenlemeler yapılsa da yüksek gen ekspresyonu yüksek nitrojenaz enziminin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Bu çalışmada da N₂ gazının (diazotrofik koşulların) nitrojenaz enzim miktarına etkisi gen ifade analizi düzeyinin incelenmesi ile araştırılmıştır. Burada kantitatif PCR (qPCR) yöntemiyle rölatif *nifH* gen ifade analizi yapılmıştır. Rölatif veya göreceli gen ifade analizinde hedef genin ifade düzeyi seçilen bir referans gene (housekeeping gene) oranlanmasıyla elde edilir. Ayrıca, çalışmada kontrol grubu olarak non-diazotrofik şartlarda çoğaltılan kültürler kullanılmıştır. Bu çalışmada hedef gen *nifH* ve referans gen ise 16S rRNA olarak seçilmiştir. Kantitatif PCR (qPCR) ile rölatif gen ifade analizinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi en çok tercih edilen yöntemdir. $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kararlı ve basit bir yöntemdir. Bu yöntem de *nifH* gen ifadesi hem referans gene göre hem de kontrol grubuna göre oranlanmıştır.

Böylece *nifH* gen ifadesinin diazotrofik koşullardaki gen ifadesinin non-diazotrofik koşullara göre kaç kat değiştiği tespit edilmiştir. Gen ifadesi kontrol grubu olan non diazotrofik koşullardaki *nifH* ve 16S referans gen ifadesine normalize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplanmıştır. Gen ifade analizleri 48, 72, 96, 120 ve 144. saatlerde kültür ortamlarından numuneler alınarak zaman bağılı olarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.6). Sonuçlara göre, en yüksek *nifH* gen ifadesi her iki koşulda da 96. saatte elde edilmiştir. Gen ifadesi 96. saate kadar önce artış göstermiş sonra azalmıştır. 96. saatte, diazotrofik koşullardaki *nifH* gen ekspresyonu non diazotrofik koşullardaki gen ekspresyonunun 2,3 katı olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlarla hidrojen üretimi sonuçları tamamen uyumaktadır ve birbirini desteklemektedir. Amonyum miktar analizi, hidrojen üretimi ve gen ifade analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde şu sonuca ulaşılmıştır. Amonyum artışı besiyerindeki pH'ı arttırmaktadır. N₂ gazı nitrojenaz enzimini kodlayan gen ifadesini arttırarak veya stimüle ederek hücrede daha fazla nitrojenaz enzimi sentezlenmesini sağlamıştır. Bunun sonucu olarak da diazotrofik koşullarda daha çok amonyum ve hidrojen üretimi gerçekleşmiştir.

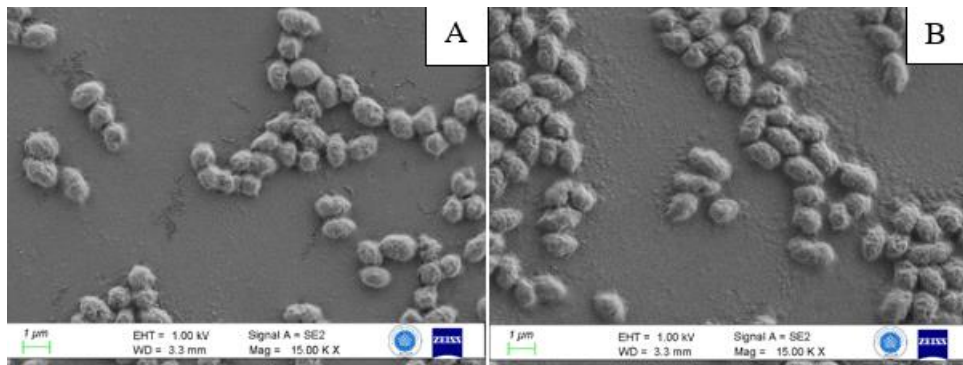


Şekil 4. 6 *nifH* geninin diazotrofik koşullarda zamana bağılı gen ifadesi (Gen ifadesi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ olarak hesaplanmıştır) (n=2).

Bu çalışma ile besiyerinde bulunan azot kaynaklarının nitrojenaz enzimini kodlayan gen ifadesine etkisi araştırılmıştır. Gen ifade düzeyi ile ayrıca hücre içi amonyum birikimi ve H_2 üretimi ile de pozitif bir ilişki tespit edilmiştir. Nitrojenaz enzim miktarının diazotrofik ortamda büyütülen bakterilerde non diazotrofik ortamda büyütülen bakterilere göre daha fazla olduğu yüksek *nifH* gen ekspresyon seviyeleri ile doğrulanmıştır.

4.6. Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu Analizleri

Diazotrofik ve non-diazotrofik besiyerlerinde büyütülen *R. sphaeroides*'in morfolojik yapısı Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FESEM – Hitachi SU 1510) ile yapılmıştır. Hücrelerin morfolojik yapılarında herhangi bir değişim olmaması için, doğal yapılarının korunması için hücrelere herhangi bir işlem yapılmamış olup üreme sonrası (yaklaşık 96. saat) doğrudan FE-SEM görüntüleri alınmıştır. Sonuçta besiyeri kompozisyonunun bakteri morfolojiside gözle görülebilir bir farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 4.7). FE-SEM analizlerinde belirgin bir farklılık gözlenmemiştir ancak iki farklı ortamda çoğaltılan kültürler çok farklı absorbans değerleri göstermiştir (Şekil 4.1). Bu sonuca göre, hücreler farklı besiyerlerinde farklı metabolik aktiviteler göstermektedir ve farklı metabolitler üretilmektedir, dolayısıyla bu metabolizma çeşitliliğinin de absorbansa yansıdığı düşünülmektedir.



Şekil 4. 7 Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu görüntüleri A) Non diazotrofik besiyeri B) Diazotrofik besiyeri.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Rhodobacter sphaeroides O.U.001 N₂ fiksasyonu, H₂ ve polihidroksibutirat (PHB) üretimi gibi çok yönlü metabolizmaya sahip olup moleküler biyoloji ve biyoteknoloji araştırmalarında sıkça kullanılan model bir bakteridir. Bu tez çalışmasında, literatürde pek rastlanmayan diazotrofik (N₂ gazının amonyağa dönüştürüldüğü veya sabitlendiği şartlar) kültür koşullarının *Rhodobacter sphaeroides* O.U.001’de *nifH* gen ifadesine, hidrojen üretimine ve amonyum sentezine etkisi araştırılmıştır. Kontrol grubu olarak ise karbon kaynağı olarak malat’ın (15 mM) ve azot kaynağı olarak glutamat’ın (2 mM) kullanıldığı besiyeri (non diazotrofik ortam) kullanılmıştır. Ayrıca, bu koşulların hücre morfolojisine etkisi alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) ile çalışılmıştır. Bu tez çalışması ile N₂ gazı ile stimüle edilen hücrelerin hidrojen üretim performansları ortaya çıkarılmıştır.

Sonuç olarak, diazotrofik ortamda büyütülen bakteriler diğer ortamda kültüre edilen bakterilere göre daha fazla hidrojen ürettiği görülmüştür. Diazotrofik koşullarda 13,95 mL hidrojen üretilirken, non diazotrofik koşullarda 11,05 mL saf hidrojen üretimi tespit edilmiştir. *nifH* gen ifade çalışmalarında bu sonucu destekleyen bulgular elde edilmiştir. Rölatif gen ifade analiz sonuçlarına göre, diazotrofik koşullardaki *nifH* gen ekspresyonu non diazotrofik koşullardaki gen ekspresyonunun 2,3 katı olarak hesaplanmıştır. Amonyum miktar analizleri ile diazotrofik ve non diazotrofik kültürlerde ölçülen amonyum miktarları sırasıyla 5,05 mg/L ve 3,38 mg/L olarak bulunmuştur. Tez kapsamında gerçekleştirilen hidrojen üretimi, gen ifade analizi ve amonyum miktar analizi sonuçları birlikte değerlendirildiğinde N₂ gazının nitrojenaz enzimini kodlayan gen ifadesini arttırarak veya stimüle ederek hücrede daha fazla nitrojenaz enzimi sentezlenmesini sağladığı değerlendirilmiştir. Tez kapsamında tasarlanan tüm deney sonuçları birbirine paralel ve destekleyici nitelikte bulunmuştur. Bu da tez çalışmasının doğru kurgulandığını ve sonuçlarının tutarlı olduğunu ispatlamıştır. Bu çalışma ile tezin başında kurulan hipotezin geçerliliği de doğrulanmıştır. Gelecekteki çalışmalarımızda enzim miktar ve aktivite tayinleri ile bu

bulguların desteklenmesi öngörülmektedir. Bu tez çalışması, N₂ ile stimüle edilmiş bakterilerle biyohidrojen üretimi ve FE-SEM ile hücre morfolojisi analizi çalışmalarıyla literatüre özgün katkılar sunmuştur.

5.2. Öneriler

Aşağıda maddeler halinde öneriler sıralamaktadır.

- ❖ Bu çalışma kapsamında N₂ ile stimüle edilen *R. sphaeroides* O.U.001 ile kontrol grubuna göre daha çok hidrojen üretimi elde edilmiştir. Hidrojen üretim çalışmaları kesikli (batch) proseslerle yapılmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda daha büyük ölçekte aynı yaklaşımla hidrojen üretimi gerçekleştirilebilir.
- ❖ Bu çalışmada nitrojenaz enzim miktarı dolaylı olarak *nifH* gen ifadesi ile ilişkilendirilmiştir. Sonraki çalışmalarda N₂ ile stimüle edilen *R. sphaeroides* O.U.001'deki nitrojenaz enzim miktarları Western blot ile belirlenebilir.
- ❖ Bu tez çalışmasında N₂ ile stimüle edilen *R. sphaeroides* O.U.001'de kontrol grubuna göre daha çok amonyum tespit edilmiştir. Bu sonuca göre, N₂ ile stimüle edilen *R. sphaeroides* O.U.001'in amonyum kaynağı olarak tarımda gübre olarak kullanım potansiyeli araştırılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Abe, J. O., Popoola, A. P. I., Ajenifuja, E. ve Popoola, O.M., 2019, Hydrogen energy, economy and storage: Review and recommendation, *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(29), 15072–1586.
- Abo-Hashesh, M., Ghosh, D., Tourigny, A., Taous, A. ve Hallenbeck, P.C., 2011, Single stage photofermentative hydrogen production from glucose: An attractive alternative to two stage photofermentation or co-culture approaches, *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13889–95.
- Adessi, A., ve Philippis, R.D., 2014, Photobioreactor design and illumination systems for H₂ production with anoxygenic photosynthetic bacteria: A review, *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(7), 3127–41.
- Agrafiotis, C., Roeb, M. ve Sattler, C., 2015, A review on solar thermal syngas production via redox pair-based water/carbon dioxide splitting thermochemical cycles, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, 254–85.
- Baykara, S. Z., 2018, Hydrogen: A brief overview on its sources, production and environmental impact, *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(23), 10605–14.
- Brazma, A., ve Vilo, J., 2000, Gene expression data analysis, *FEBS Letters*, 480(1), 17–24.
- Chen, C. Y., Liu, C. H., Lo, Y. C., ve Chang, J. S., 2011, Perspectives on cultivation strategies and photobioreactor designs for photo-fermentative hydrogen production, *Bioresource Technology*, 102(18), 8484–92.
- Cheng, D., Ngo, H. H., Guo, W., Chang, S. W., Nguyen, D. D., Deng, L., Chen, Z., Ye, Y., Bui, X. T., ve Hoang, N. B., 2022, Advanced strategies for enhancing dark fermentative biohydrogen production from biowaste towards sustainable environment, *Bioresource Technology*, 351, 127045.
- Cronshaw, I., 2015, World Energy Outlook 2014 projections to 2040: natural gas and coal trade, and the role of China.
- Das, D. ve Veziroglu, T. N., 2008, Advances in biological hydrogen production processes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046–57.
- Das, D., Veziroğlu, T. N., 2001, Hydrogen production by biological processes: a survey of literature, *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), 13–28.
- Demirbas, A., 2009, *Biohydrogen* (pp. 163-219).

- Demirbas, A., 2009, Chapter 2 Fuels from Biomass. *Biohydrogen for future engine fuel demand*, 7, 276.
- Demirbas, A., 2009, *Biohydrogen* (pp. 163-219).
- Deprez, R. H. L., Fijnvandraat, A. C., Ruijter, J. M., ve Moorman, A. F., 2002, Sensitivity and accuracy of quantitative real-time polymerase chain reaction using SYBR green I depends on cDNA synthesis conditions, *Analytical biochemistry*, 307(1), 63-69.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G., ve Zumla, A., 2004, Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR, *Biotechniques*, 37(1), 112-119.
- Dixon, A. K., Richardson, P. J., Pinnock, R. D., ve Lee, K., 2000, Gene-expression analysis at the single-cell level. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(2), 65-70.
- Dixon, R., ve Kahn, D., 2004, Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621-631.
- Dua, A., ve Cherayil, B. J., 2003, Polymer dynamics in linear mixed flow, *The Journal of chemical physics*, 119(11), 5696-5700
- Dubbs, J. M., ve Robert Tabita, F., 2004, Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of CO₂ assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation, *FEMS microbiology reviews*, 28(3), 353-376.
- Dyer, C. K., Moseley, P. T., Ogumi, Z., Rand, D. A., ve Scrosati, B. (Eds.), 2009, *Encyclopedia of electrochemical power sources*, Elsevier Science & Technology.
- Einsle, O., Tezcan, F. A., Andrade, S. L., Schmid, B., Yoshida, M., Howard, J. B., ve Rees, D. C., 2002, Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: a central ligand in the FeMo-cofactor, *Science*, 297(5587), 1696-1700.
- Ensign, S. A., ve Ludden, P. W., 1991, Characterization of the CO oxidation/H₂ evolution system of *Rhodospirillum rubrum*. Role of a 22-kDa iron-sulfur protein in mediating electron transfer between carbon monoxide dehydrogenase and hydrogenase, *Journal of Biological Chemistry*, 266(27), 18395-18403.
- Faria, A. M., Levay, A., Wang, Y., Kamphorst, A. O., Rosa, M. L., Nussenzweig, D. R., ve Fontoura, B. M., 2006, The nucleoporin Nup96 is required for proper expression of interferon-regulated proteins and functions, *Immunity*, 24(3), 295-304.

- Fascetti, E., D'addario, E., Todini, O., ve Robertiello, A., 1998, Photosynthetic hydrogen evolution with volatile organic acids derived from the fermentation of source selected municipal solid wastes, *International Journal of Hydrogen Energy*, 23(9), 753-760.
- Faye, O., Szpunar, J., & Eduok, U., 2022, A critical review on the current technologies for the generation, storage, and transportation of hydrogen, *International Journal of Hydrogen Energy*.
- Figen, H. E., ve Baykara, S. Z., 2018, Effect of ruthenium addition on molybdenum catalysts for syngas production via catalytic partial oxidation of methane in a monolithic reactor, *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(2), 1129-1138.
- Fontana, J. D., Czczuga, B., Bonfim, T. M. B., Chociai, M. B., Oliveira, B. H., Guimaraes, M. F., ve Baron, M., 1996 Bioproduction of carotenoids: the comparative use of raw sugarcane juice and depolymerized bagasse by *Phaffia rhodozyma*, *Bioresource Technology*, 58(2), 121-125.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., ve Lilburn, T., 2005 Class I. Alphaproteobacteria class. nov. In *Bergey's manual of systematic bacteriology* (pp. 1-574),
- Gu, Z., Deming, C., Yongbin, H., Zhigang, C., ve Feirong, G., 2008, Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*, *LWT-Food Science and Technology*, 41(6), 1082-1088.
- Hallenbeck, P. C., & Benemann, J. R., 2002, Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International journal of hydrogen energy*, 27(11-12), 1185-1193.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., ve Williams, P. M., 1996, Real time quantitative PCR, *Genome research*, 6(10), 986-994.
- Igarashi, R. Y., & Seefeldt, L. C. 2003, Nitrogen fixation: the mechanism of the Mo-dependent nitrogenase. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 38(4), 351-384.
- Jäger, N., Conti, R., Neumann, J., Apfelbacher, A., Daschner, R., Binder, S., ve Hornung, A., 2016, Thermo-catalytic reforming of woody biomass, *Energy & Fuels*, 30(10), 7923-7929.
- Jahn, C. E., Charkowski, A. O., ve Willis, D. K., 2008, Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation, *Journal of microbiological methods*, 75(2), 318-324.
- Jain, I. P., 2009, Hydrogen the fuel for 21st century, *International journal of hydrogen energy*, 34(17), 7368-7378.

- Jeong, E. L., Broad, S. J., Moody, R. G., ve Phillips-Jones, M. K., 2020, The adherence-associated Fdp fasciclin I domain protein of the biohydrogen producer *Rhodobacter sphaeroides* is regulated by the global Prr pathway, *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(51), 26840-26854.
- Jungas, C., Ranck, J. L., Rigaud, J. L., Joliot, P., ve Vermeglio, A., 1999, Supramolecular organization of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*, *The EMBO Journal*, 18(3), 534-542.
- Kalinci, Y., Hepbasli, A., ve Dincer, I., 2009, Biomass-based hydrogen production: a review and analysis. *International journal of hydrogen energy*, 34(21), 8799-8817.
- Kars, G., ve Alparslan, Ü., 2013, Valorization of sugar beet molasses for the production of biohydrogen and 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* OU 001 in a biorefinery concept, *International journal of hydrogen energy*, 38(34), 14488-14494.
- Kuki, Á., Nagy, L., Zsuga, M., ve Kéki, S., 2011, Fast identification of phthalic acid esters in poly (vinyl chloride) samples by direct analysis in real time (DART) tandem mass spectrometry, *International Journal of Mass Spectrometry*, 303(2-3), 225-228.
- Kim, M. S., Kim, D. H., ve Cha, J., 2012, Culture conditions affecting H₂ production by phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* KD131, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(19), 14055-14061.
- Kim, M. S., Kim, D. H., ve Cha, J., 2012, Culture conditions affecting H₂ production by phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* KD131, *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(19), 14055-14061.
- Koç E., ve Kadir, K., 2015, Enerji kaynakları–Yenilenebilir Enerji Durumu, *Mühendis ve Makina*, 56(668), 36-47.
- Koku, H., Eroğlu, I., Gündüz, U., Yücel, M., ve Türker, L., 2002, Aspects of the metabolism of hydrogen production by *Rhodobacter sphaeroides*, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1315-1329.
- Kopp, M., Coleman, D., Stiller, C., Scheffer, K., Aichinger, J., &ve Scheppat, B., 2017, Energiepark Mainz: Technical and economic analysis of the worldwide largest Power-to-Gas plant with PEM electrolysis, *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(19), 13311-13320
- Kumar, N., Monga, P. S., Biswas, A. K., ve Das, D., 2000, Modeling and simulation of clean fuel production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08, *International Journal of Hydrogen Energy*, 25(10), 945-952.

- Lee, C. M., Chen, P. C., Wang, C. C., ve Tung, Y. C., 2002, Photohydrogen production using purple nonsulfur bacteria with hydrogen fermentation reactor effluent, *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1309-1313.
- Li, X., Liu, T., Wu, Y., Zhao, G., ve Zhou, Z., 2010, Derepressive effect of NH on hydrogen production by deleting the *glnA1* gene in *Rhodobacter sphaeroides*, *Biotechnology and bioengineering*, 106(4), 564-572.
- Nandi, R., & Sengupta, S., 1998, Microbial production of hydrogen: an overview, *Critical reviews in microbiology*, 24(1), 61-84.
- Nault, J. C., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., ve Zucman-Rossi, J., 2015, Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas, *Nature genetics*, 47(10), 1187-1193.
- Nolan, T., Hands, R. E., ve Bustin, S. A., 2006, Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*, 1(3), 1559-1582.
- Reece, j. B., Urry, l. A., Cam, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Jackson, R. B. 2011. *Campbell Biyoloji*. Palme.
- Ren, J., Musyoka, N. M., Langmi, H. W., Mathe, M., & Liao, S., 2017, Current research trends and perspectives on materials-based hydrogen storage solutions: a critical review, *International journal of hydrogen energy*, 42(1), 289-311.
- Rosen, M. A., & Koohi-Fayegh, S., 2016, The prospects for hydrogen as an energy carrier: an overview of hydrogen energy and hydrogen energy systems, *Energy, Ecology and Environment*, 1(1), 10-29.
- Rusman, N. A. A., & Dahari, M., 2016, A review on the current progress of metal hydrides material for solid-state hydrogen storage applications, *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(28), 12108-12126.
- Shively, L., Chang, L., LeBon, J. M., Liu, Q., Riggs, A. D., & Singer-Sam, J., 2003, Real-time PCR assay for quantitative mismatch detection, *Biotechniques*, 34(3), 498-504.
- Souza, E. M., Pedrosa, F. O., Drummond, M., Rigo, L. U., & Yates, M. G., 1999, Control of *Herbaspirillum seropedicae* NifA activity by ammonium ions and oxygen, *Journal of bacteriology*, 181(2), 681-684.
- Srivastava, N., Alhazmi, A., Mohammad, A., Haque, S., Srivastava, M., Pal, D. B., ... & Gupta, V. K., 2021 Biohydrogen production via integrated sequential fermentation using magnetite nanoparticles treated crude enzyme to hydrolyze sugarcane bagasse, *International Journal of Hydrogen Energy*.

- Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H., & Kubista, M., 2004, Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification, *Clinical chemistry*, 50(3), 509-515.
- Şentürk, İ. G., ve Büyükgüngör H., 2010, An examination of used different waste materials and biohydrogen production methods. *Sigma*, 28, 369-395.
- Stupar, A., Šeregelj, V., Ribeiro, B. D., Pezo, L., Cvetanović, A., Mišan, A., & Marrucho, I., 2021, Recovery of β -carotene from pumpkin using switchable natural deep eutectic solvents, *Ultrasonics Sonochemistry*, 76, 105638.
- Tichopad, A., Dilger, M., Schwarz, G., & Pfaffl, M. W., 2003, Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up, *Nucleic acids research*, 31(20), e122-e122.
- Wang, T., ve Brown, M. J., 1999, mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection, *Analytical biochemistry*, 269(1), 198-201.
- Wang, X., Yang, H., Zhang, Y., ve Guo, L., 2014, Remarkable enhancement on hydrogen production performance of Rhodobacter sphaeroides by disrupting spbA and hupSL genes, *international journal of hydrogen energy*, 39(27), 14633-14641.
- Wang, Y., Zhu, W., ve Levy, D. E., 2006, Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR, *Methods*, 39(4), 356-362.
- Wendt, H., & Bauer, G. H., 1988, Water-splitting methods. In *Hydrogen as an Energy Carrier* (pp. 166-208), Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wong, M. L., ve Medrano, J. F., 2005, One-step versus two-step real-time PCR, *Biotechniques*, 39, 75-85.
- Wu, D., Zhao, Z., Zhang, L., Wang, L., ve Zhou, Y., 2022, Metagenomic assembled genomes unravel purple non-sulfur bacteria (PNSB) involved in integrating C, N, P biotransformation, *Science of The Total Environment*, 830, 154591.
- Zagrodnik, R., ve Laniecki, M., 2015, The role of pH control on biohydrogen production by single stage hybrid dark-and photo-fermentation, *Bioresource Technology*, 194, 187-195.
- Zheng, Y., Zhang, Q., Zhang, Z., Jing, Y., Hu, J., He, C., ve Lu, C., 2021, A review on biological recycling in agricultural waste-based biohydrogen production: Recent developments, *Bioresource Technology*, 126595.