

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RİZE İLİ TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN
BACILLUS TÜRLERİNİN BAKTERİYOSİN
İÇERİKLERİNİN, AKTARILABİLİR ANTİBİYOTİK ve
AĞIR METAL DİRENÇLERİNİN BELİRLENMESİ**

Şeyma ŞENSOY KARAOĞLU

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Elif SEVİM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

RİZE 2013

T.C.
RECEP TAYYIP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE İLİ TOPRAKLARINDAN İZOLE EDİLEN *BACILLUS* TÜRLERİNİN
BAKTERİYOSİN İÇERİKLERİNİN, AKTARILABİLİR ANTİBİYOTİK ve AĞIR
METAL DİRENÇLERİNİN BELİRLENMESİ

Şeyma ŞENSOY KARAOĞLU

TEZLİ YÜKSEK LİSANS

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 28/03/2013

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 22/04/2013

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Elif SEVİM

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Cemal SANDALLI

Jüri Üyesi : Doç. Dr. Şevki KAYIŞ

Enstitü Müdürü: Doç.Dr. Fatih YILMAZ



RİZE, 2013

ÖNSÖZ

Rize İli Topraklarından İzole Edilen Basillerin Bakteriyosin İçeriklerinin, Aktarılabılır Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlerinin Belirlenmesi isimli çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızın bir kısmı TÜBİTAK 2209- Üniversite Öğrencilerini Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projelerini Destekleme Programı ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (RTEÜ-BAP 2012.102.03.6) tarafından desteklenmiştir.

Tezimin konusunu belirleyip bana yol gösteren; bilgilerinden ve deneyiminden tezimin her aşamasında faydalandığım; ilgisinden, özverisinden, hoşgörüsünden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Elif SEVİM hocama minnetimi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim. Yüksek lisans öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her durumda yanımda olan sevgili eşim Arş. Gör. Kaan KARAOĞLU'na sevgilerimi sunar, sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca üzerimde büyük emekleri olan, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli aileme çok teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Şeyma ŞENSOY KARAOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET	VII
SUMMARY.....	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
TABLolar DİZİNİ.....	X
SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	XI
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.2. Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı.....	1
1.3. Bakteriyolojinin Tarihçesi.....	2
1.4. Prokaryotik Hücreler.....	2
1.5. Bakterilerin Genel Özellikleri.....	3
1.6. Toprak Mikroflorası	4
1.7. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakteriler ve Özellikleri	4
1.7.1. Hücre Morfolojileri.....	5
1.7.2. Koloni Morfolojileri.....	5
1.7.3. Hücre Duvar Yapıları	6
1.7.4. Endospor Yapıları.....	6
1.7.5. Beslenme ve Gelişmeleri	6
1.7.6. Ekolojileri	7
1.7.7. Ekstrasellüler Enzimleri.....	7
1.7.8. Endüstriyel Alanda Kullanılan Enzimler	8
1.8. Antibiyotik ve Ağır Metal Direnci	10
1.8.1. Antibiyotik Direnci	10
1.8.2. Ağır Metal Direnci.....	11
1.9. Bakteriyosin	12
1.9.1. Gram Pozitif Bakterilerden Elde Edilen Bakteriyosinler.....	13
1.9.1.1. Grup I Bakteriyosinler	14

1.9.1.2.	Grup II Bakteriyosinler	15
1.9.1.3.	Grup III Bakteriyosinler	15
1.9.1.4.	Grup IV Bakteriyosinler.....	16
1.9.2.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ve Bakteriyosinleri	16
1.9.3.	Bakteriyosinlerin Kullanım Alanı	17
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR	19
2.1.	Materyal	19
2.1.1.	Kullanılan Besiyerleri	19
2.1.1.1.	Hareket Besiyeri.....	19
2.1.1.2.	Nitrat Besiyeri	19
2.1.1.3.	Kligler Agar Besiyeri	19
2.1.1.4.	Jelatinaz Besiyeri	19
2.1.1.5.	Üre Agar Besiyeri	19
2.1.1.6.	İndol Besiyeri.....	20
2.1.1.7.	Metil Red- Voges Proskauer Besiyeri	20
2.1.1.8.	Citrat Agar Besiyeri	20
2.1.1.9.	Müller Hinton Besiyeri	20
2.1.1.10.	Koagulaz Besiyeri	20
2.1.1.11.	Lesitinaz Besiyeri.....	21
2.1.1.12.	Lüría Bertani (LB) Besiyeri	21
2.1.1.13.	Nütrient Broth Besiyeri.....	21
2.1.1.14.	Amilaz Besiyeri	21
2.1.1.15.	Proteaz Besiyeri	21
2.1.1.16.	Selülaz Besiyeri	22
2.1.1.17.	Lipaz Besiyeri	22
2.1.1.18.	Tryptic Soy Sıvı Besiyeri	22
2.1.1.19.	Brain Heart Infusion Sıvı Besiyeri.....	22
2.1.1.20.	Modified Competence Sıvı Besiyeri	22
2.1.2.	Kullanılan Ayıraçlar	23
2.1.2.1.	Nitrat Ayırıcı.....	23
2.1.2.2.	Kovaks Ayırıcı	23

2.1.2.3.	Metil Red Ayıracı	23
2.1.2.4.	Voges – Proskauer Ayıracı	24
2.1.2.5.	Oksidaz Ayıracı	24
2.1.2.6.	Gram Boyama	24
2.1.2.7.	Spor Boyama.....	24
2.1.2.8.	Kongo Kırmızısı.....	24
2.1.2.9.	1N NaCl	24
2.1.3.	Kullanılan Kimyasallar	25
2.1.3.1.	50X TAE (Tris-Asetik-Asit EDTA tamponu)	25
2.1.3.2.	% 30 Akrilamid/Bis Akrilamid Solüsyonu	25
2.1.3.3.	%10'luk APS (Amonyum per Sülfat)	25
2.1.3.4.	Örnek Yükleme Tamponu (5X).....	25
2.1.3.5.	Elektroforez Tamponu.....	25
2.1.3.6.	Jel Boyama Solüsyonu	25
2.1.3.7.	Jelden Boyayı Uzaklaştırma Solüsyonu.....	25
2.1.3.8.	Ayırma ve Toplama Jellerinin Hazırlanması.....	25
2.2.	Metot	26
2.2.1.	Mikroorganizmalar.....	26
2.2.2.	<i>Bacillus</i> Türlerinin Toprakta İzolasyonu.....	26
2.2.3.	<i>Bacillus</i> Türlerinin Morfolojik İdentifikasyonu.....	27
2.2.3.1.	Nütrient Agar ve Sıvı Besiyerlerine Ekim	27
2.2.3.2.	Gram Boyama	27
2.2.3.3.	Endospor Boyama	28
2.2.3.4.	Kapsül Boyama	28
2.2.3.5.	Hareket Testleri	28
2.2.4.	<i>Bacillus</i> Türlerinin Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi.....	28
2.2.4.1.	Jelatin Hidroliz Testi	28
2.2.4.2.	İndol Testi.....	29
2.2.4.3.	Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer Testleri (MRVP).....	29
2.2.4.4.	Sitrat Testleri	29
2.2.4.5.	Hidrojen Sülfür (H ₂ S) Üretim Testleri	29

2.2.4.6.	Üre Hidroliz Testler.....	30
2.2.4.7.	Nitrata İndirgeme Testleri	30
2.2.4.8.	Katalaz Testi.....	30
2.2.4.9.	Oksidaz Testi.....	31
2.2.4.10.	Koagülaz Testi.....	31
2.2.4.11.	Lesitinaz Testi	31
2.2.5.	<i>Bacillus</i> Türlerinin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	31
2.2.5.1.	İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi	31
2.2.5.2.	İzolatların Büyüyebildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi	31
2.2.5.3.	İzolatların NaCl Toleranslarının Belirlenmesi	32
2.2.6.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu	32
2.2.6.1.	Genomik DNA İzolasyonu.....	32
2.2.6.2.	16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması	33
2.2.6.3.	Veri Analizi	34
2.2.7.	<i>Bacillus</i> Türlerinin Ekstrasellüler Enzim Üretimlerinin Belirlenmesi.....	34
2.2.7.1.	Amilaz Enzim Üretimlerinin Belirlenmesi	34
2.2.7.2.	Proteaz Enzim Üretimlerinin Belirlenmesi	34
2.2.7.3.	Selülaz Enzim Üretimlerinin Belirlenmesi	34
2.2.7.4.	Lipaz Enzim Üretimlerinin Belirlenmesi	35
2.2.8.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	35
2.2.9.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Ağır Metal Direnç Profillerinin Belirlenmesi.....	37
2.2.10.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Plazmit Profillerinin Belirlenmesi.....	37
2.2.11.	Aktarılabılır Antibiyotik ve Ağır metal Direncinin Tespiti İçin <i>Bacillus subtilis</i> W168 Suşundan Kompatent Hücre Hazırlama ve Transformasyon	38
2.2.12.	Transformantların Antibiyotik ve Ağır Metal İçeriklerinin Belirlenmesi.....	38
2.2.13.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi	39
2.2.14.	En iyi Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi	39
2.2.15.	Antibakteriyal Etki Spektrumlarının Kuyucuk Yöntemiyle Belirlenmesi	40
2.2.16.	Bakteriyosin Karakterizasyonu	40
2.2.16.1.	Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi	40
2.2.16.2.	Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Enzimlerin Etkisi.....	40

2.2.16.3.	Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi	41
2.2.16.4.	Bazı Organik Çözücülerin ve Deterjanların Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi....	41
2.2.17.	İzolatin Büyüme Eğrisinin ve Bakteriyosin Üretim Evrelerinin Belirlenmesi ...	41
2.2.18.	Bakteriyosinin Kısmen Saflaştırılması	42
2.2.19.	Bakteriyosinin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi.....	42
3.	BULGULAR.....	43
3.1.	Gram-pozitif Basillerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	43
3.2.	Gram-pozitif Basillerin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi	44
3.3.	Gram-pozitif Basillerin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	44
3.4.	Gram-pozitif Basillerin Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi.....	47
3.5.	Gram-pozitif Basillerin İdentifikasyonu	49
3.6.	<i>Bacillus</i> İzolatların Ekstrasellüler Enzim İçerikleri	50
3.7.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilleri	52
3.8.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Ağır Metal Direnç Profilleri	55
3.9.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Plazmit Profillerinin Belirlenmesi.....	56
3.10.	<i>Bacillus</i> İzolatlarının Aktarılabılır Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençleri.....	57
3.11.	Gram Pozitif Bakterilerden Bakteriyosin Özelliğinin Taranması	58
3.12.	En iyi Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi	60
3.13.	B13 Bakteriyosinin Antimikrobiyal Etki Spektrumu.....	62
3.14.	B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi.....	63
3.15.	B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Enzimlerin Etkisi	64
3.16.	B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi.....	64
3.17.	B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin/Deterjanların Etkisi	65
3.18.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> B13 İzolatının Büyüme Eğrisinin ve Bakteriyosin Üretim Evrelerinin Belirlenmesi.....	66
3.19.	B13 Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması ve Moleküler Büyüklüğünün Tespiti	67
4.	TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	70
5.	ÖNERİLER.....	77
6.	KAYNAKLAR.....	78
EKLER	88
ÖZGEÇMİŞ.....	89

ÖZET

Yapılan bu çalışmada topraktan izole edilen Gram-pozitif sporlu basiller kullanılmıştır. Toprakten izole edilen 15 adet *Bacillus* cinsi bakteri izolatlarının morfolojik, biyokimyasal, moleküler ve fizyolojik karakterizasyonları yapılarak tanımlanmaya çalışılmıştır. Yapılan karakterizasyon sonucunda 1 izolat *Bacillus pumilis*, 1 izolat *Bacillus majovensis*, 3 izolat *Bacillus thuringiensis*, 1 izolat *Bacillus cereus*, 1 izolat *Bacillus amyloliquefaciens* olarak tür seviyesinde tanımlanırken 8 izolat *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde tanımlanmıştır.

İzolatların direnç profillerini belirlemek amacı ile çeşitli gruplara ait antibiyotikler kullanılmıştır. Yapılan antibiyogramlar sonucunda izolatların büyük çoğunluğunda bir veya birden fazla antibiyotiğe karşı direnç tespit edilmiştir. İzolatların ağır metal direnç profilleri sıvı dilüsyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırma sonucunda izolatların Bakır (CuSO_4), kurşun ($\text{Pb}(\text{NO}_2)_2$), krom (CrCl_2), demir (FeSO_4) ve mangan (MnCl_2) ağır metallerine karşı yüksek bir direnç profili tespit edilmiştir. Yapılan plazmit izolasyonları sonucunda 7 izolatın bir veya birden fazla plazmit taşıdığı ve *Bacillus subtilis* W168 suşuna yapılan transformasyon sonucu, 2 izolatın taşıdığı plazmitin antibiyotik ve ağır metal direncini aktarabildiği tespit edilmiştir.

İzolatların bakteriyosin içerikleri agar damlatma metodu ile gerçekleştirilmiştir. B13 izolatı diğer tüm izolatlar üzerine aktivite gösterirken, en etkili aktivitesi B17 izolatı üzerine olmuştur. B13 bakteriyosininin Gram pozitif, Gram negatif ve mayalar üzerine antimikrobiyal etkisi belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda B13 bakteriyosininin en iyi aktivitesi pH 7,0'da tespit edilmiştir. Optimum bakteriyosin aktivitesi 30°C – 37°C arasında göstermiştir. Proteinaz K, lizozim, tripsin, lipaz ve katalaz enzimlerinin 5 mg/mL son hacimdeki konsantrasyonlarında aktivitenin tamamen inhibe olduğu gözlenmiştir. Etil alkol, eter ve hekzan organik çözücüleri enzim aktivitesini düşürürken, formaldehit, kloroform, aseton, propanol, metanol, tween-80, triton X-100 organik çözücüleri ve deterjanlar aktiviteyi tamamen inhibe etmiştir. B13 bakteriyosininin kısmi saflaştırılması neticesinde yaklaşık olarak 5 kDa ağırlığında bir protein olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, Antibiyotik direnci, Ağır metal direnci, Bakteriyosin.

SUMMARY

Bacteriocin Contents of *Bacillus* Isolated From Soil of Rize Province, Determination of Transferable Antibiotic and Heavy-metal Resistance

In this study, bacillus with Gram-positive spore isolated from soil were used. 15 *Bacillus* species bacteria isolated from soil characterized based on morphological, biochemical, molecular and physiological. Results have shown that level of species characterization can be made for 1 isolate *Bacillus pumilis*, 1 isolate *Bacillus majovensis*, 3 isolate *Bacillus thuringiensis*, 1 isolate *Bacillus cereus*, 1 isolate *Bacillus amyloliquefaciens* while 8 isolate *Bacillus* sp.

Some antibiotics were used in order to determine resistance profile of isolates. Results of antibiograms have shown a large number of isolates have resistance toward one or more antibiotics. Heavy-metal resistance profiles of isolates have been investigated by dilution method. Investigations have shown that isolates have high resistance profile toward copper (CuSO_4), lead ($\text{Pb}(\text{NO})_2$), chrome (CrCl_2), iron (FeSO_4) and manganese (MnCl_2). Plasmid isolation investigations have shown 7 isolate have one or more plasmid and transformation to *Bacillus subtilis* W168 strain from that of 2 isolate have transferable antibiotic and heavy-metal resistance.

Bacteriocin contents of isolates were investigated via agar drop method. B13 isolate have shown activity on others, B17 isolate have the highest activity. Antimicrobial effect of B13 bacteriocin to Gram-negative, Gram-positive and fungi have been determined. Optimum activity for B13 bacteriocine determined at pH 7,0 and 30-37 °C. Final concentration of 5 mg/mL for proteinase K, lysosime, tripsine, lipase, and catalase enzymes have inhibited activity. While ethyl alcohol, ether, and hexane organic solvents reduces activity, formaldehyde, chlororform, acetone, propanol, methanol, tween-80, triton X-100 organic solvents and detargents inhibited activity definetely. Purification of B13 bacteriocin have shown weight of protein is 5 kDa.

Keywords: *Bacillus*, Antibiotic resistance, Heavy-metal resistance, Bacteriocin.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Topraktan izole edilen Gram Pozitif Basillerin filogenetik analizi.	48
Şekil 2. Amilaz test sonuçları.....	50
Şekil 3. Proteaz test sonuçları.	51
Şekil 4. Selülaz testi sonuçları.	51
Şekil 5. Lipaz test sonuçları.	52
Şekil 6. Bacillus izolatlarından elde edilen plazmitlerin agaroz jel görüntüsü.	57
Şekil 7. Agar damlatma metodu ile optimum bakteriyosin aktivitesinin tespiti.	62
Şekil 8. MHB besiyerinde 35°C’de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ’in büyüme eğrisi ve antimikrobiyal aktivitesi.	67
Şekil 9. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında görülen B13 bakteriyosin aktivitesi. ..	68
Şekil 10. B13 bakteriyosinin SDS-PAGE jelinde görüntülenmesi.....	69
Şekil 11. B13 bakteriyosininin agar aktivitesi.	69

TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. MC besiyerinin bileşenleri, son konsantrasyonları ve sterilizasyon yöntemleri. 23	
Tablo 2. Tris-glisin SDS-poliakrilamid Jel Elektroforezi için çözünme jeli bileşenleri. ... 26	
Tablo 3. NCCLS rehberinde Gram pozitif / aerobik bakteriler için belirtilen zon çapları yorumlama standartları. 36	
Tablo 4. İzolatların morfolojik özellikleri. 43	
Tablo 5. İzolatların biyokimyasal özellikleri. 44	
Tablo 6. İzolatların farklı pH, NaCl ve ısı ortamlarında üreme durumları. 46	
Tablo 7. İzolatlar ile diğer bakterilerin 16S rRNA genlerinin yüzde benzerlikleri. 47	
Tablo 8. Morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve filogenetik analizler sonucunda <i>Bacillus</i> izolatlarının identifikasyonu. 49	
Tablo 9. <i>Bacillus</i> izolatlarının ekstrasellüler enzim aktiviteleri. 52	
Tablo 10. <i>Bacillus</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri. 54	
Tablo 11. İdentifiye edilen <i>Bacillus</i> 'ların antibiyotik direnç oranları. 55	
Tablo 12. <i>Bacillus</i> izolatlarının ağır metal direnç profilleri ($\mu\text{g/mL}$). 56	
Tablo 13. Transformat hücrelerin antibiyotik direnç profilleri. 58	
Tablo 14. Transformat ve yaban tip hücrelerin ağır metal direnç profilleri ($\mu\text{g/mL}$). 58	
Tablo 15. Gram-pozitif basillerden bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi. 60	
Tablo 16. En iyi bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü koşullar. 61	
Tablo 17. B13 bakteriyosinin antimikrobiyal etki spektrumu. 63	
Tablo 18. Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi. 64	
Tablo 19. Bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi. 64	
Tablo 20. B13 Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi. 65	
Tablo 21. B13 Bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi. 66	
Tablo 22. Antibiyotik direnç zonları (mm). 88	

SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

°C	: Santigrad derece
µg	: Mikro gram
µL	: Mikro litre
µM	: Mikro molar
µmol	: Mikro mol
Da	: Dalton
dH ₂ O	: Distile su
d.i.H ₂ O	: Deiyonize su
dk	: Dakika
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
kDa	: Kilo Dalton
L	: Litre
M	: Molarite
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
OD	: Optical Density
PAGE	: Poli Akrilamid Jel Elektroforezi
s	: Saat
SDS	: Sodyum dedosilsülfat
sn	: Saniye
UV	: Ultra Viole

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

1.2. Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Mikroskobun keşfinden önce doğadaki bütün canlı yaratıkların hayvan ya da bitki olduğu düşünülürdü. İlk insanlar ürkütücü doğa olayları ve bulaşıcı hastalıklarla karşılaşınca korkmuşlar ve doğal afetlerin tanrıların kendilerine verdiği cezalar olduğunu düşünerek hastalıklardan korunma çarelerini tapınaklarda aramışlardır (Mutlu vd., 1999).

İlk olarak tıbbın kurucusu ve babası kabul edilen Hipokrat topraktan çıkan kötü havanın hastalıklara yol açtığını bildirmiştir. Rönesans döneminde (1453-1600) tıp alanında pek çok gelişme meydana gelmiş ve ilk mikroskop Hollandalı Antony Von Leeuwenhoek tarafından yapılmıştır. Bu nedenle modern mikrobiyolojinin kurucusu kabul edilir. Bir bilim olarak mikrobiyolojinin gerçek anlamda gelişmesi ise Louis Pasteur'un fermentasyonda mikroorganizmaların rolünü göstermiş, ismi ile anılan Pastörizasyon işlemini, şarbon ve kuduz aşılarını bulmuştur. 1866 yılında Haeckel mikroorganizmaların bitki ve hayvanlardan farklı olduğunu görerek Protista adını verdiği yeni bir aleme dahil etmiştir (Mutlu vd., 1999).

Yurdumuzda mikrobiyoloji alanındaki ilk çalışmalar ise aşı yapmakla başlamış ve buna da çiçek hastalığı ve aşı hazırlama çabaları önderlik etmiştir. Bu yöndeki aktiviteler, 1840 yılından sonra giderek gelişmiş ve çiçek aşısı hazırlanarak başarı ile kullanılmıştır (URL-1).

Mikrobiyoloji bilim dalı, biyolojinin sayısız alt kollarından yalnızca birisi olmasına karşın biyolojinin temelini oluşturduğunu söyleyebiliriz. Mikroorganizmalar mikroskobun icadından sonra keşfedilmesine karşın yalnızca mikroskopla görülebilen canlılardır. Mikroorganizmalardan tıp alanında, endüstride, tarımda ve gıda sanayisinde kullanılan çok önemli canlılardır. Diğer bilinenleri ise algler, tek hücreli yosunlar, tatlı su mikroorganizmaları, mayalar ve virüslerdir (Madigan vd., 2009).

1.3. Bakteriyolojinin Tarihçesi

Bakteriler ilk defa 1676'da Antonie van Leeuwenhoek tarafından, kendi tasarımı olan tek mercekli bir mikroskopla gözlemlenmiştir. Onlara “animalcules” (hayvancık) adını takmış, gözlemlerini Kraliyet Akademisi'ne yazılmış bir dizi mektupla yayımlamıştır (Mutlu vd., 1999).

Bacterium adı çok daha sonra, 1838'de Christian Gottfried Ehrenberg tarafından kullanıma sokulmuş, eski Yunanca “küçük asa” anlamına gelen bacterion'dan türetilmiştir. Latince kullanımıyla Bacteria bakteri sözcüğünün çoğulu, bacterium ise tekildir (URL-2).

1.4. Prokaryotik Hücreler

Zarla çevrili gerçek bir çekirdeği, endoplazmik retikulumu, plastitleri ve mitokondrileri gibi organelleri bulunmayan hücredir. Bakteriler, mavi-yeşil algler bu canlılara örnektir. Elektron mikroskobunun geliştirilmesiyle birlikte, biyologlar hücre içi yapıları inceleme fırsatı buldular. Bu araştırmalar sonunda canlılar aleminde iki temel hücre tipi olduğu ortaya çıktı; Prokaryotik ve Ökaryotik hücre. Yapısal olarak daha basit olan prokaryotik hücre yapısı sadece bakterilerde bulunur. Diğer bütün organizmalar yani protista, mantarlar (fungi), bitkiler ve hayvanlar, daha karmaşık olan ökaryotik hücre yapısına sahiptir.

Prokaryotlar ya da Prokaryota; bakteriler, mavi-yeşil algler, riketsiyalar, aktinomisetler ve mikoplazma gruplarının dahil olduğu; gerçek çekirdek zarları ve membrana bağlı organelleri olmayan, fosfolipid barındıran hücre duvarı ve tek helezonlu DNA molekülü hücre içinde serbest halde bulunan mikroorganizmaları kapsayan canlılar üst alemdir. Organeller ve karmaşık sitoplazma yapısı bu canlılarda bulunmaz. Mavi-yeşil algler çekirdeksiz hücrelerin en gelişmiş kolunu oluşturur. Hemen hemen hepsi kromozom olarak çember şeklinde bir DNA zinciri içerirken, mitoz bölünme yapmazlar. Her hücrede haploit olan tek kromozom, açılarak bir hücrenin bir ucundan diğer ucuna hareket ederek kendini eşlediğinde, hücre bölünür (Madigan vd., 2009).

1.5. Bakterilerin Genel Özellikleri

Bakteriler taksonomik olarak sınıflandırılırken “Prokaryot” sınıfına dahil edilirler. Prokaryot sınıfındaki canlıların vücutları yalnızca bir hücreden oluşur. Prokaryotik hücrelerde belirgin bir çekirdek yoktur. Tek kromozomlu nükleoid olup sirküler bir DNA molekülü şeklindedir ve histon proteini bulunmaz. Kendisini sitoplazmadan ayıran nükleer membranı bulunmaz (Mutlu vd., 1999).

Bakteri sitoplazmasının içinde RNA, DNA, glikojen, protein, yağ tanecikleri, ribozomlar görülür. Mitokondri, çekirdek, endoplazmik retikulum, golgi aygıtı gibi zarla çevrili özel yapılar yoktur. Oksijenli solunum yapan bakterilerde mezozom denilen zar katlantıları vardır. Mezozom, ökaryot hücrelerdeki mitokondrinin görevini yapar. Solunum enzimleri mezozom zarlarında ve sitoplazmada bulunur.

Bakteriler ışık mikroskobu ile görülebilecek kadar küçük canlılardır. Büyüklükleri mikron ile ölçülür. Genellikle 2–10 mikron boyunda, 1–2 mikron genişliğinde olabilir. Bakteriler iki hücre örtüsüne sahiptir. İç kısımda hücre zarı, hücre zarının üstünde ise protein, karbonhidrat ve yağlardan oluşan hücre duvarı (çeper) vardır. Bazı bakterilerde hücre duvarına ek olarak, polisakkaritlerden oluşmuş, koruyucu bir kapsül bulunur (URL-3).

Bakteriler sitoplazmalarında mevcut plazmit denilen kromozomdan bağımsız küçük DNA parçası şeklindeki yapılarla bakteriler arası genetik bilgi değişimi yapabilirler. Örneğin; antibiyotik direnç genleri taşıyan plazmide sahip bakteriler, plazmitlerini yakın çevresindeki bakterilere aktararak antibiyotik tedavisine dirençli bakteri populasyonlarının oluşmasını sağlar. Bakteriler hareketlerini kamçı (flajella) denilen uzantılarla sağlarlar. Yuvarlak bakterilerde kamçı yoktur, hareketleri pasiftir. Daha çok çubuk ve spiral bakteriler kamçılıdır. (Mutlu vd., 1999) Bakterilerin bazı türleri uygun olmayan ortamlarda ısıya, kuraklığa dayanıklılığı sağlamak amacı ile “ Spor “ veya “Kist” adı verilen yapılar oluştururlar. Bakteriler, kendilerini bu yapılar sayesinde uzun süre dış ortamdan izole edebilirler. Şartlar uygun olduğunda kist veya sporlarını kırarak tekrar hücre içi metabolik faaliyetlerini harekete geçirirler. (URL-3).

Bakteriler çok geniş bir yaşama alanına sahiptirler. Antartika’da 0 derecedeki buzulların içerisinde yaşadıkları gibi, “Gayzer” adı verilen ve 100 derece sıcaklıktaki kaynar su püskürten kuyularda bile yaşarlar (URL-4). Toprakta, deniz suyunda, okyanusun

derinliklerinde, yer kabuğunda, deride, hayvanların bağırsağında, asitli sıcak su kaynaklarında, radyoaktif atıklarda büyüeyebilen tipleri vardır. Mikroorganizmaların o kadar çok türü vardır ki bu türlerin yalnızca % 1'i insan ve diğer canlılar üzerinde hastalık meydana getiriler. Geriye kalan % 99'luk çoğunluğa sahip türler ise doğada simbiyotik ya da kommensal olarak yaşarlar (URL-4). Tipik olarak bir gram toprakta bulunan bakteri hücrelerinin sayısı 40 milyon, bir mililitre tatlı suda ise bir milyondur. Toplu olarak dünyada beş milyon ton bakteri bulunmaktadır. Bu da dünyadaki biokütlenin çoğunu oluşturur (URL-2). Bu büyük biokütlenin büyük bir kısmı toprakta yaşamını sürdürmektedir. (Berkeley ve Logan, 1997).

1.6. Toprak Mikroflorası

Topraklarda hem mikroskobik boyutlarda ve hem de makroskobik nitelikte karmaşık bir canlılar dünyası bulunmaktadır. Bakteriler toprakta bulunan en küçük ve en bol mikroorganizmalardır. İncelendiğinde bir gram toprakta milyonlarca bakteri bulunabilir. Toprak mikroflorasında bulunan bazı bakteri türler toprak ortamındaki çok küçük değişikliklerden bile etkilenebilirken, bazı türler ise şiddetli soğuk, sıcak ve kurak ortam gibi çok zor toprak koşullarında bile canlı kalabilirler. Bazı bakteriler oluşturdukları sporlar vasıtasıyla toprakta uzun süre spor formları oluşturarak canlı kalabilirler (URL-5).

1.7. *Bacillus* Cinsi Bakteriler ve Özellikleri

Üst alem	: Bacteria
Alem	: Eubacteria
Şube	: Firmicutes
Sınıf	: Bacili
Takım	: Bacillales
Familya	: Bacillaceae
Cins	: <i>Bacillus</i>
Tür	: <i>B.subtilis</i> , <i>B.cereus</i> , <i>B.mycoides</i> , <i>B.amyloqueluquefaciens</i>

Toprak mikroflorasının önemli bir mikroorganizması *Bacillus* cinsi bakterilerdir. “*Bacillaceae*” ailesi içerisinde yer alırlar. *Bacillus*’lar, aerop ve fakültatif anaerop, gram pozitif basillerdir. Beklemiş kültürlerde bakterinin gram ile boyanma özelliği değişken olabilir veya bazen de gram negatif olabilir. Bakterilerin çevresindeki peritriş flajellalar bulunması nedeni ile birçok tür hareketlidir (Topçal, 2010).

1.7.1. Hücre Morfolojileri

Bacillus’lar tek veya çok sayıda hücreden oluşan uzun zincirler meydana getirebilirler. Hücreler parabazal kısım ve protein kristalleri içerebilir. Ana hücrede bulunan sporun şekli ve sporogoniumun yeri, *Bacillus* sp. türlerinde karakteristik bir özellik gösterir. Endosporlar genellikle silindirik, elipsoidal, oval ya da yuvarlaktır. Sporlar, sporogonium’un içinde merkezde, merkeze yakın, uca yakın, uçta veya lateralde bulunurlar (Lennete vd., 1985). Bazı türleri kapsül oluşturabilme özelliğine sahiptir. Oluşturulan kapsül çoğunlukla poli-D ya da L-glutamik asit yönünden zengindir. *B. circulans*, *B. megaterium*, *B. mycoides* ve *B. pumilis* gibi diğer *Bacillus* türleri karbohidrat içerikli kapsül oluşturabilirler (URL-1).

1.7.2. Koloni Morfolojileri

Bacillus suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüleri genellikle çevresel koşullara bağlı olarak değişir. Bu koşullardan en önemli olanları mikroorganizma kültürünün bağlı bulunduğu besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel şartların farklılaşması ile kültürün kendisinde de bazı farklılaşmalar meydana gelir. Sadece küçük koloni formlarına sahip suşların dışında koloninin çapı, besiyeri ve içerisindeki agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. *Bacillus* kolonileri genellikle şeffaf ya da parlak renklidir. Bazen krem renkli kolonilerde oluşabilir. *Bacillus* türlerinin birçoğunda pigment üretimi yoktur. Fakat *Bacillus megaterium* suşları özellikle kazein içeren agarda sarı renkte pigment oluştururlar (Lennete vd., 1985).

1.7.3. Hücre Duvar Yapıları

Gram-pozitif bakterilerde yaygın olan hücre duvar yapısı değişkenliği *Bacillus*'larda meydana gelmez. *Bacillus*'larda vejetatif hücre duvar yapısı peptidoglukan tabakadan oluşur. Teikoik asit tipleri *Bacillus* türleri arasında ve tür içerisinde bile değişiklik gösterebilmektedir. Teikoik asit yapısı birçok *Bacillus* türünde hücre membranlarında lipoteikoik asit olarak ortak formda bulunmaktadır (URL-1).

Bacillus suşlarında peptidoglukan tabaka yoğun halde bulunan murein tipi doğrudan birbirine bağlı mezo-diamino pimelik asit şeklindedir. Bazı *Bacillus* türlerinde ise hücre duvarı teikoik asit yapısına sahiptir (Özçelik, 1995).

1.7.4. Endospor Yapıları

Bacillus subtilis'te ısıya dirençli endosporlar ilk olarak Cohn tarafından tanımlanmıştır. Daha sonra Koch endospor yapısını patojen *Bacillus anthracis*'te göstermiştir. Endosporlar, doğada birçok dayanıklı hücrenin bulunduğu bir kanıttır. *Bacillus*'lar ekstrem şartlarda vejetatif hücreden spor formuna geçerek uzun yıllar boyunca canlı kalabilirler. Sporlar genellikle aerobik veya anaerobik koşullarda olgun basillerde, ortamda gıda maddelerinin veya mineral, üreme, nitrojen, karbon ve üreme kaynaklarının azaldığı durumlarda oluşmaktadır. Sporlar fiziksel ve kimyasal şartlar olumsuz olduğunda da hücre tarafından oluşturulurlar. Hücre sporları tüm bu olumsuzlara vejetatif hücreden çok daha fazla dayanıklıdır. Sporum şekli, büyüklüğü ve yüzey biçimi türlere göre değişiklik gösterir. Spora sertliğini kalsiyum ve dipikolinik asit sağlar. Sporulasyonda her safha türe göre değişiklik göstermekle birlikte 5–13 saat spor oluşumu için gereklidir. Spor oluşumu tahminen 50 den fazla gen tarafından idare edilen genetik düzeyde bir olaydır ve türe karakteristiktir (URL-1).

1.7.5. Beslenme ve Gelişmeleri

Birçok *Bacillus* türü basit organik bileşikleri (şekerler, aminoasitler, organik asitler) kullanabilen, kemoheterotrof canlılardır. *B. megaterium* gibi birkaç tür organik olmayan daha spesifik gelişim faktörlerine ihtiyaç duyarlar. çoğu tür optimum 30–40°C arasındaki (mezofil) sıcaklıklarda gelişir. Fakat cins optimum 65°C'nin üzerine kadar sıcaklıkta

üreyebilen türlerde içerir (URL-1).

1.7.6. Ekolojileri

Genel olarak aerobik endospor oluşturan basiller için birinci habitat topraktır. Toprakta bakteri uygun çevre koşullarında ve yeterli besini sağlayabildiğinde büyüme faaliyetlerini gerçekleştirir. Kötü çevre koşullarında ve besin tükendiği zaman ise spor oluşturlar (URL-1).

Endosporlu aerobik *Bacillus* türleri hemen hemen bütün doğal habitatlardan ve diğer pek çok kaynaklardan izole edilebilirler. Bunlar çok yaygın olarak toprakta ve bitki döküntülerinin olduğu yerlerde bulunurlar. Kutup bölgeleri, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, tatlı ve tuzlu sular, çöl toprakları bu cinsin yaşayabildiği alanlardır. Karbon ve azot döngüsünde önemli rol oynarlar. Diğer habitatları ise, derin deniz suyu sedimentleri, peynir süt gibi yiyecekler ve patojen olanlar için ise insanlar verilebilir (Earl vd., 2008).

1.7.7. Ekstrasellüler Enzimleri

Enzimler kimyasal tepkimelerde katalizör görevi yapan hayvan, bitki ve mikroorganizmalardan salgılanan protein yapısında veya bir kısmı protein olan biyomoleküllerdir (Bhart, 2000; Smith, 1996).

Endüstriyel kaynaklı enzimler genellikle mikroorganizmalardan elde edilmektedir. Bunun nedeni mikroorganizma kaynaklı enzimlerin bitkisel veya hayvansal kaynaklı enzimlere göre katalitik aktivitelerinin çok yüksek olmaları, istenmeyen yan ürün oluşturmamaları, daha stabil ve ucuz olmaları ve fazla miktarda elde edilebilmeleridir (Wiseman, 1987). Mikroorganizmalar, biyokimyasal çeşitlilikleri ve genetik manipülasyonlara uygunluğu gibi sebeplerden dolayı da mükemmel bir enzim kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Rao vd., 1998). Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin yaklaşık %90'ı mikroorganizmaların fermantasyonu ile üretilmektedir (Godfrey ve West, 1996).

Salgılama şekillerine göre enzimler intrasellüler ve ekstrasellüler olmak üzere iki kısma ayrılırlar. Ekstrasellüler enzimler, besiyeri ve hücre yapılarının dış kısmı ile bağlantı halinde olan enzimler olarak tanımlanır. Gram-negatif bakterilerde proteinler iç ve dış

membran arasındaki periplazmik boşluk arasında kalırlar. Gram-pozitif bakterilerde ise enzimler doğrudan besiyerinde salgılanırlar. İntrasellüler enzimlerin aksine, ekstrasellüler enzimlerin stabilitesi yüksek olup, çevre koşullarında aktivitelerini uzun süre koruyabilirler (John, 1987).

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kökenlidir. Günümüzde mikrobiyal enzimlerin çoğu, önemli araştırma konusu olmuştur, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye ve sanayi, endüstri alanında kullanılmaya başlanmıştır. Endüstri alanında kullanılan pek çok mikrobiyal enzimin *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir (Kalisz, 1988).

1.7.8. Endüstriyel Alanda Kullanılan Enzimler

Mikrobiyal enzimler arasında en yaygın olarak kullanılanlar α -amilaz, glikoamilaz, glikoizomeraz ve proteazlardır. α -amilaz enzimi gıda endüstrisinin farklı alanlarında, meyve suyu endüstrisinde, deterjan üretiminde, eczacılıkta ve tekstil endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ticari olarak kullanılan enzimlerin %59'unu proteazlar, %28'ini karbonhidratazlar, %3'ünü lipazlar ve %10'unu ise diğer enzimler oluşturmaktadır. Karbonhidratazlar grubuna giren α -amilaz enzimi %13'lük oran ile önemli bir yer tutmaktadır (Wiseman, 1987).

Amilazlar, nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden ekstrasellüler enzimlerdir. Bu enzimler hayvanlar ve bitkiler tarafından da sentezlenmesine rağmen uygun koşullarda kısa sürede elde edilmesinden dolayı mikroorganizmalar asıl kaynağı oluşturmaktadır (Wiseman, 1987). α -Amilazın uygulama alanı oldukça geniş ve çeşitlidir. Bu enzimler tekstil ve kağıt endüstrisinde, nişastanın sıvılaştırılmasında, alkol fermantasyonunda, ekmek, glikoz ve früktoz şuruplarının yanı sıra tutkal üretiminde de kullanılmaktadırlar (Bailey ve Ollis, 1987; Igarashi vd., 1998; Bajpai ve Bajpai, 1989). Meyve suyu endüstrisinde de uygulama alanı bulan enzim, özellikle elma ve armut sularının berraklaştırılmasında kullanılmaktadır (Ekşi, 1989).

Endüstriyel uygulamalarında sıklıkla rastlanan enzimlerden biri de proteaz enzimidir. Proteazlar, uygun koşullarda proteinlerin peptid bağlarının hidrolizini katalizlemektedirler. Ayrıca, proteazlar kullanım alanlarının fazlalığı ile sanayi enzimlerinin en geniş kısmını oluşturmaktadır. Proteaz enzimi; deterjan sanayinde, deri sanayinde, çeşitli klinik

uygulamalarda, kozmetik ve ilaç sanayinde, gümüş eldesinde, gıda sanayinde, peynir yapımında, bira yapımında, fırıncılıkta, sığır yemi üretiminde, atık işleme sanayinde, D, L-amino asitlerin sentez ve çözündürülmesinde kullanılmaktadır (Kasavi, 2006).

Selülazlar, selülozu glikoza parçalayabilme kapasitesindeki hidrolitik enzim grubudurlar. Mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlar (memeliler hariç) tarafından üretilirler ve genellikle bir selülaz sistemi olarak birden fazla farklı enzimden oluşurlar. Selülazlar endüstriyel olarak kullanılan enzimler içerisinde, proteaz ve amilazlardan sonra üçüncü önemli biyoteknolojik enzimlerdir. Selülozu hidrolize eden enzimler geniş çapta mantar ve bakterilerden elde edilmektedir. Ticari alanda en fazla tercih edilen selülaz enzimi *Trichoderma reseei* (Teeri vd., 1998) suşundan elde edilmektedir. Bu organizma dışında *Aspergillus*, *Penicillium*, *Basidiomycetes* ve *Bacillus* suşlarından da farklı özellikleri olan selülaz enzimleri üretilmiştir (Tomme vd., 1995).

Selülotik enzimler, sıvı kazancını arttırmak ve iyi bir renk elde etmek için alkol üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca selülaz kot pantolonların biyolojik olarak taşlanması kullanılmaktadır (Niehaus vd., 1999). Aynı zamanda meyve sularının berraklaştırılması, zeytinyağların ekstraksiyonunda da kullanılmaktadır, bununla beraber fırıncılık ürünlerinin kalitesinin artırılmasında kullanılmaktadır. Öte yandan bira mayalanmasında ve şarap üretiminde de rol oynarlar (Galante vd., 1998).

Lipazlar (EC.3.1.1.3, triaçilgliserol açıl hidrolaz) hayvansal ve bitkisel yağların normal koşullar altında tersinir hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bunun dışında esterifikasyon, transesterifikasyon gibi reaksiyonları da katalizlemektedir. Bu enzim dünya çapındaki enzim satışlarının sadece %4'lük kısmına sahiptir (Paiva vd., 2000; Balcao ve Malcata, 1998).

Lipaz enzimi gıda sanayi de dahil olmak üzere pek çok sektörde kullanıma sahiptir. Bu enzimin kullanım alanları unlu mamul ve içecek sektörlerinde, özellikle temizlik ve kozmetik sektörlerinde, kâğıt ve eczacılık sektörlerinde oldukça fazla kullanılmaktadır (URL-3).

1.8. Antibiyotik ve Ağır Metal Direnci

1.8.1. Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyallar, bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılan, bakteri, virüs ve parazit gibi mikroorganizmaları öldürmek ya da baskılamak için kullanılan ilaçlardır. Antibiyotikler, sadece bakterilere karşı etki gösteren antimikrobiyal alt gruplarıdır. Antibiyotikler; (i) hücre duvarı sentezini engelleyerek, (ii) protein sentezini inhibe ederek (iii) hücre membran fonksiyonunu inhibe edenler, (iv) DNA/RNA sentezini inhibe ederek, etkilerini gösterirler (Walsh, 2003).

I- Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler

a) β - laktam grubu antibiyotikler

- i- Penisilinler
- ii- Sefalosporinler
- iii- Karbapenemler
- iv- β - laktam inhibitörleri

b) β - laktam grubu içermeyen antibiyotikler

- i- Glikopeptidler: Vankomisin, teikoplanin
- ii- basitrasin
- iii- Sikloserin

II- Hücre Membran Fonksiyonunu İnhibe Edenler

a) Polimiksinler

b) Nistasin ve Amfoterisin B

III- Protein Sentezini İnhibe Edenler

a) Ribozomun 50 S alt ünitesinin fonksiyonunu bozanlar

- i- Makrolidler: Kloramfenikol, Eritromisin, Azitromisin,

b) Ribozomun 30 S alt ünitesinin fonksiyonunu bozanlar

- i- Tetrasiklinler
- ii- Aminoglikozidler: Gentamisin, Amikasin, Netilmisin

IV- Nükleik Asit Sentezini İnhibe Edenler

- a) RNA polimeraza etki edenler: Rifampisin, Aktinomisinler
- b) DNA replikasyonunu inhibe edenler: Kinolonlar
- c) Prokürsör sentezini inhibe edenler: Sulfonamidler, Trimetoprim

1.8.2. Ağır Metal Direnci

Birçok mikroorganizmanın çeşitli metallerin varlığında gelişimlerini devam ettirebildiği bilinmektedir (Bruins vd., 2000; Choudhury ve Srivastava 2001). Metaller ve metalloidler hem prokaryotik hemde ökaryotik olmak üzere tüm mikroorganizmalar için toksiktir ve bu organizmalar metallere karşı dirençlik mekanizmaları geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu direnç mekanizması ile bazı mikroorganizmalar çok yüksek metal konsantrasyonlarında bile çoğalabilme yeteneğine sahiptirler (Ellis vd., 2003).

Yapılan araştırmalarda bazı metallere dirençli mikroorganizmalar teşhis edilmiştir. Bu çalışmalar, çoğunlukla, *Staphylococcus* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* sp. gibi önemli dirençlilik gösteren Gram-negatif ve Gram-pozitif aerobik bakterileri içermektedir. Toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan etmen, mikroorganizmaların bulunduğu çevrede, toksisiteye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin organizma üzerinde yarattığı strestir (Guzzo vd., 1999).

Metal dirençlilik sistemlerinin büyük bir kısmını aktif transport veya taşıma sistemleriyle metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplâzmalarından uzaklaştırmak için aktif transportu kullanırlar. Non-esansiyel metaller normal olarak besin taşıma sistemleri ile hücre içine girmektedir. Fakat hızlı bir şekilde hücre dışına taşınmaktadır. ATPaz bağımlı olan veya ATPaz bağımlı olmayan bu taşıma sistemleri katyon veya anyonlara karşı oldukça spesifiktir (Silver 1998; Nies ve Silver 1995).

Düşük konsantrasyonlarda bile toksik olan kadmiyum non-esansiyel bir metaldir. Cd(II)'nin enzimatik detoksifikasyon ile daha toksik kadmiyum formları oluşmaktadır. Bu nedenle, Cd(II) için en önemli dirençlilik mekanizması bu metali hücre içinden dışarı pompalayan sistemdir (Bruins vd., 2000).

Ayrıca K^+ , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} , AsO_4^{-3} , AsO^{-2} , Co^{+2} , Ag^+ ve Pb^{+2} iyonlarının da taşıma sistemleri ile hücreden uzaklaştırıldığı bildirilmektedir (Silver 1998,

Nies ve Silver 1995).

Bacillus, Escherichia, Klebsiella, Micrococcus, Pseudomonas, Salmonella, Sarcina, Shigella, Staphylococcus ve *Streptococcus*, Hg(II)'ye karşı direnç gösteren cinsler olarak bilinmektedir (Sadhukhan vd., 1997).

1.9. Bakteriyosin

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından üretilen antibakteriyal aktiviteye sahip, protein ya da proteinlerle birlikte bazı yan gruplar da içerebilen metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Klaenhammer, 1993; Jack vd., 1995). İlk bakteriyosin 1925 yılında Gratia tarafından tanımlanmıştır. *Escherichia coli* tarafından üretilen protein yapısındaki bu inhibitör madde kolisin olarak isimlendirilmiştir (Gratia, 1925). Kolisin bulunmasını takiben 1928 yılında çeşitli laktik asit streptokokların (laktokokların) bazı laktik asit bakterileri üzerine inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (Rogers ve Whittir, 1928). Bundan beş yıl sonra Whitehead, (1933) protein yapısında inhibitör bir madde tanımlamıştır (Mattick ve Hirsch, 1947). Gıda kaynaklı patojenlerin inhibisyonunu da, fermantasyonun kontrolünde, gıdanın raf ömrünün uzatılmasında ve mikrobiyolojik güvenirliliğin sağlanmasında rol alan maddelerdir (Andersson, 1989; Foegeding vd., 1992). Genel olarak bakteriyosinlerin özelliklerini aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

Protein yapısındadırlar.

Bakterisidal aktiviteye sahiptirler.

Etki mekanizmaları dardır ve genellikle gram (+) mikroorganizmalara karşı etkilidirler.

Bakteri hücrelerini parçalamadan inhibe ederler.

Proteolitik enzimlerle inaktive olurlar.

Etki mekanizmaları, hücre duvarının çift yönlü geçirgenliğini artırarak ve sitoplazmik maddelerin hücre dışına çıkmasına neden olmasına dayanmaktadır. Bakteriyosinlerin hücreye karşı etkisi ele alındığında, bakteriyosin molekülleri hücre yüzeyindeki özel alıcılara saldırırlar, sadece bakteriyosine duyarlı hücre bu bağlantıyı yapabilir ve hücre duvarındaki makromoleküllerin değişmesine neden olur. Böylece diğer moleküller için geçirgen hale gelir. Bakteriyosin molekülleri ve diğer moleküller hücre duvarından içeri girerek ve sitoplazmik membran ile temas haline gelirler. Sitoplazmik

membranın dengesini bozarak canlılık kaybına neden olurlar (Erem ve Pur, 1994).

Bakteriyosinler, benzer aktivite özelliklerinden dolayı, birçok kaynakta antibiyotiklerle karıştırılmaktadır. Bakteriyosinleri antibiyotiklerden ayıran temel ölçüt; bakteriyosinlerin antibiyotiklere nazaran çok daha dar bir etki spektrumuna sahip olmaları ve sadece yakın akraba türler üzerinde bakteriyosidal ya da bakteriyostatik etkiye sahip olmalarıdır (Uymaz, 2009). Bunun yanı sıra; bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenen ürünlerdir, antibiyotikler ise enzimatik işleme sonucu aktif formlarını kazanırlar. Her bakteriyosinin kendi bağışıklık proteini vardır. Bu bağışıklık proteinini kodlayan genler, bakteriyosinlerin yapısal genleri ile bağlantılıdır. Antibiyotik bağışıklığını yöneten determinantlar ise yapısal antibiyotik genleri ile bağlantılı değildir. Bakteriyosinler genellikle gelişme fazında üretilir ve iki bileşenli bir sistem tarafından regüle edilir. Antibiyotikler ise gelişimin durma fazında üretilen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır (Nes vd., 2002).

Bakteriyosin sentezleme yeteneğine sahip bakteriler incelendiğinde, oldukça geniş bir yelpaze ile karşılaşılmaktadır. Başta *Laktobacillus* ve *Lactococcus* olmak üzere *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pediococcus* ve *Leuconostoc* cinsi bakterilere ait pek çok tür, bakteriyosin üretme yeteneğine sahiptir (Gorris, 1996). Gram negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler genel olarak mikosinler olarak adlandırılmaktadır. Mikosinler; protein büyüklükleri, mikrobiyal hedefleri, etki mekanizmaları ve direnç sistemler açısından farklılıklar içermektedir (Gouaux vd., 2005). Bakteriyosinleri çoğu gram pozitif bakteriler tarafından üretildiği bilinmektedir. Fakat son araştırmalar bazı Arkea üyeleri tarafından da bakteriyosinlerin üretildiğini göstermiştir (Riley ve Wertz, 2002).

1.9.1. Gram Pozitif Bakterilerden Elde Edilen Bakteriyosinler

Gram pozitif bakteriler bakteriyosinlere özgü regülasyonlara sahiptir. Gram pozitif bakterilerde bakteriyosin üretimi genellikle logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında gerçekleşmektedir. Nisin üretimi logaritmik fazın ortalarında başlar ve hücrenin durağan faza girmesi ile en yüksek düzeye ulaşır. Ekspresyonun yoğunluğu hücre döngüsüne değil kültür yoğunluğuna bağlıdır (Hammami vd., 2007). Evrensel bakteriyosin veri tabanında 39 adet lantionin içeren bakteriyosin (sınıf I) 40 adet lantionin içermeyen bakteriyosin

(sınıf II) ve sınıflandırılmayan türler olmak üzere 145 bakteriyosin yer almaktadır (Linda vd., 2008). Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler dört gruba altında toplanmıştır. Gram negatif bakteriler tarafından sentezlenen bakteriyosinler bu sınıflandırmada yer almamaktadır. Zira gram negatif bakterilerin ürettiği bakteriyosinler ayrı bir sınıf olarak kabul edilmektedir (Klaenhammer, 1993; Nes vd., 1996; Ennaher vd., 2000). Gram pozitif bakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklerin sınıflandırılmasında pek çok farklı özellik kullanılmaktadır. Peptitler, disülfid ve monosülfid (lantionin) bağları ile etki spektrumları esas alındığında 4 gruba ayrılır. En iyi çalışılmış bakteriyosin grubu gıda korumasında kullanım potansiyellerinden dolayı laktik asit bakterileri (LAB) tarafından üretilen bakteriyosinlerdir. Klaenhammer bu bakteriyosinleri; moleküler ağırlıkları ısı duyarlılıkları, enzimatik duyarlılıkları, translasyon sonrası modifiye edilen amino asitlerin olup olmaması ve etki mekanizmalarını esas alarak dört grup altında sınıflandırmıştır (Klaenhammer, 1998).

1.9.1.1. Grup I Bakteriyosinler

Lantibiyotikler olarak da adlandırılan bu grup içerisinde yer alan bakteriyosinler, translasyon sonrasında modifiye edilen küçük peptitleri içermektedir. Bu bakteriyosinler lantionin ve F-metillantionin gibi modifiye olmuş tioether amino asitleri ve karakterize edilirler. Grup I bakteriyosinlerin moleküler ağırlıkları 1,9 kDa ile 4,6 kDa arasında değişmektedir (Oscariz ve Pisabarro, 2001; O'Sullivan vd., 2002). Lantibiyotikler grubuna dahil bakteriyosinler, olgunlaşmış peptitlerin amino asit kompozisyonu esas alınarak 6 kategoriye ayrılmıştır. Söz konusu kategoriler; nisin alt grubu (nisin A ve nisin Z), laktisin 481 alt grubu (laktisin ve J49), laktisin3147 alt grubu (PlwF ve Ltn A2), mersaisin alt grubu (plantarasin C, Ltn A1 ve PlwG), sitolisin alt grubu (CylL1 ve CylL2) ve laktosin S alt grubunu adını almaktadır (Twomey vd., 2002). Bu gruptaki bakteriyosinler kimyasal yapılarına ve antimikrobiyal aktivitelerine göre ise IA ve IB antibiyotikleri olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Grup IA: Bu gruptaki bakteriyosinler net pozitif yüke sahip ve hidrofobik polipeptid yapısındadırlar. Membran aktif peptidler olup bakteri zarında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedirler. Grup IB'deki bakteriyosinlere kıyasla daha esnek bir yapıya sahiptirler (Chen ve Hoover, 2003).

Grup IB: Bu gruptaki bakteriyosinler yüksüz veya negatif yüklü olup, globüler peptid yapısındadır. Spesifik enzimleri inhibe ederek antimikrobiyal aktivite göstermektedirler (Twomey vd., 2002).

1.9.1.2. Grup II Bakteriyosinler

Bu gruptaki bakteriyosinler Grup I'den farklı olarak lantionin içermezler ve 10 kDa'dan küçük genelde ısı sabit ve translasyon sonrasında modifiye olmayan bakteriyosinleri içeren oldukça geniş bir gruptur (Ennahar vd., 2000). Bu grup da kendi aralarında üç gruba ayrılmıştır (Callewaert vd.,1999).

Grup IIA: Bu gruptakiler özellikle *Listeria*'ya karşı aktif olup, yapılarında bulunan peptid'in N-terminalinin sonunda Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys amino asit dizisine sahiptirler (Chen ve Hoover, 2003). Genellikle sitoplazmik membran üzerinde iyonik dengeyi bozmak ve organik fosfatın hücre dışına akmasını sağlamak suretiyle inhibitör etkilerini gösterir. Pediocin AcH/PA1, mesentericin Y105, sakacin A ve P, carnobactericin B2 bu alt gruba dahil başlıca bakteriyosinlerdir (Oscariz ve Pısabarro, 2001).

Grup IIB: Bu gruptaki bakteriyosinler primer yapıları birbirinden farklı iki polipeptid içerirler. Aynı ayrı aktivite gösterebildikleri gibi, etkin bir şekilde aktif hale gelebilmeleri için her ikisinin de aktif olması gerekmektedir. İki polipeptidin aktif hale gelmesiyle, hücre membranında gözenek oluşturarak antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Bu grubun en önemli temsilcileri L50A-enteocin L50B, Lactococcin M-Lactococcin N ve plantaricin JK ikili bakteriyosinlerdir (Hechard ve Sahl, 2002).

Grup IIC: Bu gruptaki bakteriyosinler, Grup II'deki bakteriyosinlerin özelliklerini gösteren, Grup IIA ve IIB dışındaki diğer bakteriyosinlerdir. Bu gruptakilerin birçoğu sistein amino asit rezidüsü içermekte ve bu bakteriyosinlere thiolbiotic'ler veya cystibiotic'ler denilmektedir. Tiyo-aktif bakteriyosinler olup, aktiviteleri için indirgenmiş sistidin rezidüsüne gereksinim duyarlar (De Martinis vd., 2002).

1.9.1.3. Grup III Bakteriyosinler

Grup III bakteriyosinler Büyük moleküler ağırlığına sahip (>30kDa) ve ısıya duyarlı proteinlerden oluşmaktadır. Bu grupta yer alan bakteriyosinlerin büyük bir kısmı *Lactobacillus* cinsi bakteriler tarafından sentezlenmektedir. Helvetisin J, laktisin A, laktisin

B, helvetisin V-1829 ve enterolisin A bu grubun en bilinen üyeleridir. Grup III üyesi bakteriyosinlerin çoğu ısıya duyarlı proteinler olmasına rağmen, helvetisin-J gibi ısı stabil üyeleri de bulunmaktadır (Klaenhammer, 1993).

1.9.1.4. Grup IV Bakteriyosinler

Dördüncü grup altında sınıflandırılan bakteriyosinler, polipeptit yapısında, lipoprotein veya glikoprotein gibi ilave bazı yapılar içermeleri ile karakterize edilmektedir. Plantarasin-S, laktosin 27 ve leukonosin S bu gruba dahil bazı bakteriyosinlerdir (Klaenhammer, 1993; Nes vd., 1996; Ennahar vd., 2000; Nes ve Holo, 2002). Bu sınıflandırma bakteriyosin aktivitesinin protein dışı yan gruplardan da kaynaklanabileceğine işaret eden sınırlı sayıda literatür verisi esas alınarak yapılmıştır. Ancak yan grupların bakteriyosin aktivitesi hiçbir araştırmada kesin bir şekilde tanımlanamamıştır (Oscar ve Pisabarro, 2001; Madera vd., 2003).

1.9.2. *Bacillus amyloliquefaciens* ve Bakteriyosinleri

Bacillus amyloliquefaciens BamHI restriksiyon enziminin kaynağı olan bir *Bacillus* türüdür. *Bacillus amyloliquefaciens* 1943 yılından Japon bilim adamı Fukumoto tarafından topraktan tanımlanmıştır (URL-7).

B. amyloliquefaciens'de, aerobik, katalaz pozitif, Gram-pozitif çubuk şeklinde ve hareketli bir organizmadır. Doğada bol miktarda toprak örneklerinde bulunur. *Bacillaceae* ailesinin diğer üyeleri olduğu endospor oluşturabilir. *Bacillus amyloliquefaciens* daha düşük G + C içerikli organizma olarak sınıflandırılır (URL-8).

Bakteriyosinlerin büyük çoğunluğu özellikle et ve süt ürünleri gibi gıdalar ile yakın ilişkili olan laktik asit bakterilerinde çalışılmıştır. Oysaki *Bacillus*'lar birçok sanayiye uygun tür içermeleri ve gıda endüstrisinde güvenli kullanım geçmişleri ile antimikrobiyal peptitlerin araştırılmasında alternatif bir genusdur. *Bacillus*'lar tarafından üretilen bir çok bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddeler tanımlanmıştır (Halimi vd., 2010). *Bacillus amyloliquefaciens* türü tarafından üretilen bakteriyosinler son yıllarda bazı çalışmalarda incelenmiştir (Sutyak vd., 2008; Halimi vd., 2010; Lisboa vd., 2006).

1.9.3. Bakteriyosinlerin Kullanım Alanı

Bakteriyosinler gıdaların biyokimyasında, terapötik amaçlarla, bitki patolojisine karşı kanser gelişimini önleyici potansiyelleri ile ilgili yapılmış çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki, gıdaların korunmasında bakteriyosinlerin kullanımı pek çok yarar sağlamaktadır (Cleveland vd., 2001). Bakteriyosinler genel olarak gıdaların korunmasında kullanılsa da lantibiyotiklerin toksik etkilerinin olmayışı ve Gram-pozitif insan ve hayvan patojenlerine karşı aktiviteye sahip olmaları klinik etkilerinin de araştırılmasına öncülük etmektedir. Bakterileri grupları içerisinde laktik asit bakterilerini (LAB) oluşturan; *Lactobacillus*, *Laktococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* ve *Streptococcus* cinsleri tarafından üretilen bakteriyosinler antibiyotiklerin geliştirilmesi açısından en umut verici gruptur. LAB'lar uzun yıllardır probiyotik ve gıda koruyucu olarak kullanılmaları nedeniyle LAB kökenli bakteriyosinlerin oral ve gastrointestinal antibiyotikler olarak kullanılması olasıdır (De Vuyst ve Leroy, 2007; Sit ve Venderas, 2008). Bazı lantibiyotiklerin etki mekanizmalarının kesin olarak belirlenmesi ve yeni tanımlanan bir mekanizma ile çoklu-ilaç dirençliliğine sahip patojenlere karşı aktiviteye sahip olmaları, tedavi amacı ile kullanımlarına olanak sağlamaktadır. Örneğin iki peptidil laktisin 3147 *Staphylococcus aureus* (methisilin dirençli *S.aureus* da dâhil), enterokoklar (VRE dâhil), streptokoklar (*S. pneumoniae*, *Streptococcus mutans*), *Clostridium botulinum* ve *Propionibacterium acnes* gibi bakteri türlerine karşı in vitro etkinliğe sahiptir (Sit ve Vederas, 2008).

Gıda uygulamalarında kullanılmak üzere bakteriyosin araştırmaları yapıldığında izole edilen bakteriyosinin kullanıma uygun olması için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Üretici suş GRAS statüsünde bakteriyosin patojen bakterileri de kapsayan geniş bir etkinliğe ya da spesifik patojenlere karşı inhibisyon etkinliğe sahip ısıya dayanıklı, sağlık açısından risk taşımayan, kaliteyi ve aromayı arttırıcı özellikte olmalıdır (Holzepfel vd., 1995). Bakteriyosinler gıdaların raf ömrünü uzatmaktadır. Sıcaklığın zararlı olacağı şartlar altında ekstra koruma sağlamaktadırlar. Gıda zinciri boyunca, gıda kaynaklı patojenlerin bulunma riskini azaltmaktadır. Bakteriyosinler sayesinde, gıdaların bozulmasından kaynaklanan ekonomik kayıplar azalmaktadır ve kimyasal koruyucular daha az kullanılmaktadır. Isı işlem daha az kullanıldığı için gıdalardaki besleyici maddeler ve vitaminler daha az zarar görür. Ayrıca “yeni” (daha az asidik, daha düşük tuz

konsantrasyonuna sahip, yüksek su içerikli) gıdaların pazarlanmasını sağlamaktadırlar (Ünlütürk ve Turantas, 1999). Her ne kadar bakteriyosinlere karşı mikroorganizmaların direnç kazanması nadir ise de özellikle *Listeria monocytogenes*' in nisin ve pediosin gibi geleneksel bakteriyosinlere karşı toleransının arttığı bildirilmiştir (Rosch ve Knochel, 1998; Van Schaik vd., 1999). Bu sebeple, antimikrobiyal aktiviteye sahip yeni bakteriyosinlerin araştırılması ve etki mekanizmalarının açığa çıkarılması oldukça önemli bir alan haline gelmiştir (Galvin vd., 1999).

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Kullanılan Besiyerleri

2.1.1.1. Hareket Besiyeri

3 g Sığır eti özütü, 10 g Jelatin, 5 g Sodyum Klorür alınıp 1000 mL dH₂O'da karıştırıldı ve 121°C' de 15 dk. otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra 5 mL steril deney tüplerine bölünerek hareket besiyeri hazırlandı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.2. Nitrat Besiyeri

3 g Sığır eti özütü, 5 g Pepton, 1 g Potasyum Nitrat alınıp 1000 mL dH₂O'da karıştırıldı. Karışım 3 mL olarak tüplere dağıtıldı ve 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildi. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.3. Kligler Agar Besiyeri

5,5 g toz halindeki Kligler Agar besiyeri tartılıp 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra 6 mL olarak tüplere dağıtıldı. Yatık agar olacak şekilde soğutuldu. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.4. Jelatinaz Besiyeri

3 g Sığır eti özütü, 5 g Pepton, 120 g Jelatin alınıp 1000 mL dH₂O'da karıştırıldı ve 121°C' de 15 dk. otoklavda steril edildi. Otoklavdan sonra 4 mL olarak tüplere dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.5. Üre Agar Besiyeri

2,1 g toz halindeki Üre Agar Base besiyeri tartıldı ve 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü. 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu ve 50 °C' ye kadar soğutulduktan sonra steril su ile steril şartlarda %1 lik hazırlanmış üre solüsyonundan %5 ilave edildikten sonra steril tüplere 3 mL dağıtıldı. Kullanılacağı süreye

kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.6. İndol Besiyeri

2 g Pepton, 0,5 g NaCl tartıldı ve 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 2 mL olarak tüplere dağıtıldı. 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.7. Metil Red- Voges Proskauer Besiyeri

0,7 g Polypepton, 0,5 g Glukoz, 0,5 g K₂HPO₄ tartıldı ve 100 mL dH₂O'da çözüldü. Çözünen besiyeri 4 mL olarak tüplere dağıtıldı ve 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.8. Citrat Agar Besiyeri

22,5 g toz halindeki Citrat Agar besiyeri tartılıp 1000 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Otoklavdan sonra tüplere 5 mL olarak dağıtıldı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.9. Müller Hinton Besiyeri

34 g toz halindeki Müller Hinton besiyeri tartılıp 1000 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121 °C' de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Gerekli olduğunda içerisine % 1,5 agar ilavesi ile Müller Hintor agar besiyeri hazırlandı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.10. Koagulaz Besiyeri

Steril plazma 2 mL olacak şekilde steril tüplere bölündü ve kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.11. Lesitinaz Besiyeri

20 g Kazein, 5 g Yeast Extract, 2,5 g NaCl, 20 g Agar tartılıp 1000 mL dH₂O'da çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon aşamasından sonra besiyerinin 50°C'ye kadar soğutulması sağlandı. Dış yüzeyi dezenfekte edilen (antibiyotik ile beslenmeyen tavuk yumurtası olmalıdır) dikkatli bir şekilde steril ortamda sarı kısımları ayrıldı. Steril olarak elde edilen yumurta sarısında 100 mL (yaklaşık olarak 2 adet yumurtadan sağlanabilmektedir) besiyeri içerisine ilave edildi ve homojen bir şekilde karışması sağlandı. Petri kaplarına dökülerek soğuması beklendi. Lesitinaz besiyeri uzun süre +4°C'de muhafaza edilemez. Besiyerinin 2 gün içerisinde kullanılması gerekmektedir.

2.1.1.12. Lüria Bertani (LB) Besiyeri

1 g Tryptone, 0,5 g YeastExtract, 0,75 g NaCl tartılıp 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121 °C'da 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. Gerekli olduğunda içerisine % 1,5 agar ilavesi ile LB agar besiyeri hazırlandı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.13. Nütrient Broth Besiyeri

8 g toz hâlindeki Nütrient Broth besiyeri tartılıp 1000 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121°C' de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. Gerekli olduğunda içerisine % 1,5 agar ilavesi ile Nütrient agar besiyeri hazırlandı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.14. Amilaz Besiyeri

0,3 g Beef Extract, 0,1 g Soluble Starch, 1,2 g agar tartıldı ve 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü. 1,1 atm basınçta 121°C' de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. Steril petri kaplarına dağıtılıp, kurumaması beklendi. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.15. Proteaz Besiyeri

1 g süt tozu, 0,1 g Yeast Extract, 2,6 g Agar tartılıp 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121°C' de 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. Steril petri

kaplarına dağıtılıp, kuruması beklendi. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.16. Selülaz Besiyeri

1 g CMC (Karboksi Metil Selülaz), 1 g Yeast Extract, 1 g NaCl, 1 g Tripton , 1,5 g Agar tartılıp 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121°C' da 15 dk. otoklavlanarak steril edildi. Besiyeri steril petri kaplarına dökülerek donması beklendi. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.17. Lipaz Besiyeri

2 g Agar, 0,8 g Nütrient Broth, 0,4 g NaCl, 1 g Gum Arabic tartılıp 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü ve 1,1 atm basınçta 121°C' da 15 dk. otoklavlanarak steriledildi. Otoklavdan çıkan besiyerinin 55°C'ye kadar kadar soğuması beklendi. Daha sonra içerisine %2,5 steril Zeytin Yağı ve 1 mg/ml Rhodomin B ayracından 10 mL eklenerek homojen bir şekilde karışması sağlandı. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edildi.

2.1.1.18. Tryptic Soy Sıvı Besiyeri

30 g toz halindeki Tryptic Soy Sıvı besiyeri tartıldı 1000 mL dH₂O içinde çözüldü ve 1,1 atm basınç 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabii tutuldu.

2.1.1.19. Brain Heart Infusion Sıvı Besiyeri

30 g toz halindeki Brain Heart Infusion Sıvı besiyeri tartıldı 1000 mL dH₂O içinde çözüldü ve 1,1 atm basınç 121 °C'de 15 dk. otoklavda sterilizasyon işlemine tabii tutuldu.

2.1.1.20. Modified Compentence Sıvı Besiyeri

Stok solusyonlar hazırlandı ve belirtilen yöntemler ile sterilize edildi. (Tablo 1). Bu solusyonlar daha sonra oda sıcaklığında saklanırken, hazırlanan MC besiyeri ise filtre ile steril edildikten sonra kullanılmak üzere +4°C'de saklandı.

Tablo 1. MC besiyerinin bileşenleri, son konsantrasyonları ve sterilizasyon yöntemleri.

Ana solüsyon	Son Konsantrasyon	50 ml için	Sterilizasyon Yöntemi
1 M Potasyum fosfat buffer	100 mM	5 mL	Otoklav ile
1 M trisodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$)	3 mM	150 μL	Otoklav ile
1 M Magnezyum sülfat (MgSO_4)	3 mM	150 μL	Otoklav ile
% 50 Glukoz	% 2	2 mL	Filtre ile
% 50 Potasyum glutamat ($\text{KC}_5\text{H}_8\text{NO}_4$)	% 0.2	200 μL	Filtre ile
% 10 Kazein hidrolizat	% 0.1	500 μL	Filtre ile
22 mg/mL demir amonyum sitrat ($\text{C}_6\text{H}_5+4y\text{Fe}_x\text{N}_y\text{O}_7$)	22 $\mu\text{g/ml}$	50 μL	Filtre ile
2 mg/mL triptofan ($\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$)	50 $\mu\text{g/ml}$	1,25 mL	Filtre ile (ışığa hassas)
Steril dH ₂ O		46,7 mL	Filtre ile (ışığa hassas)

2.1.2. Kullanılan Ayıraçlar

2.1.2.1. Nitrat Ayırıcı

Ayıraç A: 0,5 g Alpha Naphthylamine %30'luk 100 mL Acetic Asit (SN) ile karıştırıldı.

Ayıraç B: 0,8 g Sulfanik Asit %30'luk 100 mL Asetic Asit(SN) ile karıştırıldı.

Ayıraç C: Çinko Tozu

2.1.2.2. Kovaks Ayırıcı

10 g p-Dimethylaminobenzaldehyde, 150 mL izoamyloalko, 50 mL HCl ile çözülüp ışık geçirmeyen şişeye dolduruldu ve kullanılıncaya kadar +4 °C' de muhafaza edildi.

2.1.2.3. Metil Red Ayırıcı

0,015 g metil kırmızısı %95'lik 150 mL etil alkolde çözüldü ve üzerine 100 mL dH₂O ilave edildi. Kullanılıncaya kadar +4 °C' de muhafaza edildi.

2.1.2.4. Voges – Proskauer Ayıracı

Solüsyon A: 6 g α -naphthol 100 mL %95'lik ETOH ile çözüldü.

Solüsyon B: 40 g Potasyum hidroksit 100 mL dH₂O ile çözüldü.

2.1.2.5. Oksidaz Ayıracı

1 g dimethyl-*p*-phenylenediamine hydrochloride 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü (Taze hazırlanıp kullanılmalıdır).

2.1.2.6. Gram Boyama

Amonyum oksalat Kristal Viyole için; 20 mL Sol X ve 80 mL Sol Y karıştırılıp istenilen boya elde edildi.

Sol X: 10 g kristal viyole ile 100 mL % 55 lik etanol karıştırıldı.

Sol Y: Amonyum oksalatın %1'lik çözeltisi hazırlandı.

İyot Solüsyonu için; 1g İyot, 2g Potasyum iyodür 300 mL dH₂O ile çözüldü.

Safranin için; 0,25 g safranin %95 lik 10 mL etanol içerisinde çözüldü ve dH₂O ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

2.1.2.7. Spor Boyama

Malaşit Yeşili için; 5 g malaşit yeşili 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü.

Safranin için; 0,25 g safranin %95 lik 10 mL etanol içerisinde çözüldü ve dH₂O ile son hacim 100 mL olacak şekilde tamamlandı.

2.1.2.8. Kongo Kırmızısı

0,1 g Kongo Red tartıldı ve 100 mL dH₂O içerisinde çözüldü.

2.1.2.9. 1N NaCl

58,5 g NaCl tartıldı ve 1000 mL dH₂O içerisinde çözüldü.

2.1.3. Kullanılan Kimyasallar

2.1.3.1. 50X TAE (Tris-Asetik-Asit EDTA tamponu)

242 g Trisma Base, 57,1 mL Glasial Asetik Asit, 100 mL 0,5 M EDTA (pH: 8,0) son hacim dH₂O ile 1000 mL'ye tamamlandı.

2.1.3.2. % 30 Akrilamid/Bis Akrilamid Solüsyonu

29,2 g akrilamid, 0,8 g bisakrilamid bir miktar dH₂O çözülür ve son hacim 100 mL olacak şekilde dH₂O ile ayarlama yapılır.

2.1.3.3. %10'luk APS (Amonyum per Sülfat)

0,1 g APS 1 mL dH₂O içerisinde çözülerek hazırlanır. Bu solüsyon taze olarak hazırlanmalıdır.

2.1.3.4. Örnek Yükleme Tamponu (5X)

0,6 mL 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 5 mL Gliserol (% 50), 2 mL % 10 w/v SDS, 0,5 mL beta-merkaptotanol, 1 mL % 1 w/v Bromfenol mavisi 0,9 mL dH₂O ile karıştırılarak hazırlandı.

2.1.3.5. Elektroforez Tamponu

3 g Tris, 14,4 g Glisin, % 0.1'lik 10 mL SDS 1000 mL dH₂O ile karıştırıldı.

2.1.3.6. Jel Boyama Solüsyonu

0,2 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 mL Metanol, 10 mL Glasial asetik asit 100 mL dH₂O ile karıştırıldı.

2.1.3.7. Jelden Boyayı Uzaklaştırma Solüsyonu

5 mL Metanol, 7 mL Glasial asetik asit 100 mL dH₂O ile karıştırıldı.

2.1.3.8. Ayırma ve Toplama Jellerinin Hazırlanması

Ayırma ve toplama jellerinin hazırlanmasında Tris-glisin SDS-poliakrilamid jeli kullanılmış ve kullanılan jel bileşimi Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2. Tris-glisin SDS-poliakrilamid Jel Elektrofrezisi için çözünme jeli bileşenleri.

	Jel dökümü başına bileşen hacmi (mL)							
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
% 10								
H ₂ O	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
% 30 akrilamid karışımı	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10 amonyum persülfat	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
% 12								
H ₂ O	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
% 30 akrilamid karışımı	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10 amonyum persülfat	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
% 15								
H ₂ O	1,1	2,3	3,4	4,6	5,7	6,9	9,2	11,5
% 30 akrilamid karışımı	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
1,5 M Tris (pH 8,8)	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
% 10 SDS	0,05	0,2	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
% 10 amonyum persülfat	0,05	0,2	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02

2.2. Metot

2.2.1. Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan indikatör organizmalar Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezinden ve Amerikan Tıp Kültür Koleksiyon (ATCC) Merkezinden temin edilmiştir. Çalışmada *Escherichia. coli* ATCC 25922, *Yersinia pseudotuberculosis* ATCC 709, *Bacillus cereus* Roma 709, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas auroginosa* ATCC 43288, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, *Listeria monocytogenes* ATCC 43251 indikatör bakterileri ve *Candida tropicalis* ATCC 13803, *Candida albicans* ATCC 60193, *Saccharomyces cerevisia* ATCC 96581 indikatör mayaları kullanıldı.

2.2.2. *Bacillus* Türlerinin Toprakta İzolasyonu

Rize ilinin Fener, Pazar, Güneysu, Engindere, Çayeli, Derepaşarı, Çamlıhemşin, Kalkandere ve Alipaşa bölgelerinden toprak yüzey materyali süpürüldükten sonra steril bir spatula ile toprak yüzeyinden 2–5 cm derinlikten yaklaşık 10 g toprak steril cam kavanozların içerisine alınarak en kısa sürede laboratuara getirildi.

Alınan toprak örneklerinden 1 g tartılıp steril 9 mL serum fizyoloji içeren erlenmayerlerin içerisine eklenildi, karıştırıcı üzerinde 5 dk. hızlı bir şekilde karıştırılması

sağlandı. Örnekler su banyosunda 65 °C'de 60 dk. Tutularak, vejetatif bakteri formlarının ölmesi ve ortamda bu bakterilerin sporlu formlarının kalması sağlandı. Örneklerden seri dilüsyonlar hazırlanarak Nutrient Agar besiyerlerine ekimleri yapıldı ve 35°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra saf bakteri kültürleri kullanılmak üzere gliserol stok yöntemiyle -20 °C'de muhafaza edildi. Tüm bu işlemlerde çalışmanın tam verimliliği için aseptik koşullara çok dikkat edildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.3. *Bacillus* Türlerinin Morfolojik İdentifikasyonu

2.2.3.1. Nütrient Agar ve Sıvı Besiyerlerine Ekim

Daha önce % 20 gliserol stok halinde saklı tutulan bakteri kültürleri, Nütrient agar besiyerine aseptik koşullarda tek koloni ekimleri yapılarak 37 °C'de 24 saat etüvde inkübe edildi. Elde edinilen saf kültürlerden bakteri koloni rengi, tipi ve büyüklüğü gibi morfolojik karakterleri belirlenerek çalışmaya dahil edildi. Aynı zamanda saf kültürler Nütrient Sıvı Besiyerlerinde de inkübe edilerek sıvı besiyerinde üreme şekli tespit edildi.

2.2.3.2. Gram Boyama

Gram boyama bakterilerin tanımlanması ve sınıflandırılması için kullanılan en faydalı metotlardan biridir (Claus 1992). Bu farklılaştırıcı bir boyama olup bakterileri ya gram olumlu (+) ya da gram olumsuz (-) olarak ikiye ayırır.

Temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyoloji damlatıldı. Steril öze ile bakteri kolonilerinden alındı ve lam üzerine konan serum fizyoloji içerisinde homojen bir şekilde çözüldü. Havada kurutulup, alevde tespit edildi. Soğuduktan sonra;

- a) Lam üzerindeki materyal 1 dk. Kristal Viyole içerisinde bekletildi.
- b) dH₂O ile yıkandı.
- c) 1,5- 2 dk. Lugol içerisinde bekletildi.
- d) Alkolle renk gidinceye kadar yıkandı.
- e) dH₂O ile yıkandı.

Kuruduktan sonra mikroskopta immersiyon yağı yardımıyla gözlendi. Mor renkle boyanan bakteriler gram pozitif, pembe renkle boyanan bakteriler gram negatif olarak değerlendirildi.

2.2.3.3. Endospor Boyama

Endospor boyama işlemi Prescott (Prescott, 1996)'un belirttiği yönteme göre yapıldı. Buna göre; taze kültürleri hazırlanan bakteriler, lam üzerine 1 damla dH₂O ile iyice yayılarak havada kurutuldu, ardından 3 kez alevden geçirilerek fikse edildi. Örnekler 5 dakika malaşit yeşili ile alevde etkiye bırakıldı ve buharlaştıkça boya ilave edildi. dH₂O ile yıkanan örnekler 30 sn safranin ile boyandı ve dH₂O ile tekrar yıkayıp havada kurutulduktan sonra bakteri sporlarının morfolojileri, mikroskopta incelendi.

2.2.3.4. Kapsül Boyama

İzolatların kapsül yapısına sahip olup olmadıklarının belirlenmesi için her bir izolat Nutrient Agar besiyerine ekilerek, 35°C'de 24–48 s inkübasyona bırakıldı. Bakteriyel smear hazırlandı ve açık havada kurutuldu. Kristal viyole boyası ile 5–7 dk boyandı. %20'lik CuSO₄ ile yıkandı ve açık havada kurutularak mikroskop altında incelendi. Kapsül boyama negatif bir boyama yöntemidir. Buna göre, mavi renkli bir sahada, mor-eflatun renkli boyanmış hücrelerin etrafında boyanmamış şeffaf bir bölgenin olması, kapsülün varlığını gösterir (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.3.5. Hareket Testleri

İzolatların hareketli olup olmadıklarının araştırılması için “lam-lamel arası preparasyon” tekniği kullanıldı. İzolatların hareketli olup olmadığını belirlemek için, hazırlanan 24 saatlik kültürlerden bir öze dolusu alındı ve temiz bir lam üzerine konulup lamelle kapatıldı. Hazırlanan bu preparat mikroskopta incelendi ve izolatların hareketli olup olmadığına karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4. Bacillus Türlerinin Biyokimyasal Özelliklerin Belirlenmesi

2.2.4.1. Jelatin Hidroliz Testi

Jelatinin izolatlar tarafından hidroliz edilip edilmediğinin ortaya çıkarılması amacıyla hazırlanan jelatinaz besiyeri, steril deney tüplerine döküldü. İzolatların her biri, bu deney tüplerine ekildi ve sonra 35°C'de, 72–96 s inkübe edildi. Bu sürenin sonunda inkübe edilen tüpler etüvden alındı, 20°C'ye ayarlı yeni bir etüve aktarıldı. Burada 4 saat inkübe edildikten sonra besiyerinin sıvı oluşuna göre testin pozitif, katı oluşuna göre

negatif olduğuna karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.2. İndol Testi

İndol testi için daha önce hazırlanan besiyerlerine her bir izolattan ekim yapıldı. 35 C°'de gece boyu inkübe edildi. Daha sonra tüplere ayıraç olarak 1 mL Kovaks kimyasalı ilave edildi. Tüpün üst kısmında kırmızı bir halkanın oluşması pozitif sonuç, sarı halkanın oluşumu negatif sonuç olarak değerlendirildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.3. Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer Testleri (MRVP)

Bu test için MRVP broth besiyeri hazırlandı. Her bir izolattan iki ayrı tüp olacak şekilde, besiyeri içeren tüplere ekim yapıldı. 35°C'de, 48 s inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her bir izolatanın bir tüpüne, 250 µL metil kırmızısı ilave edildi. Kırmızı renk oluşumu MR testi için pozitif, sarı renk oluşumunun negatif sonuç olduğuna karar verildi.

Her bir izolatanın diğer tüplerine ise, 600 µL VP-I kimyasalından ve 200 µL VP-II kimyasalından ilave edildi. Tüplerin kapakları açık bırakılarak 15–20 dk bekletildi. Pembe-kırmızı arası renk oluşumu VP testi için pozitif, açık kahverengi renk oluşumu negatif sonuç olarak değerlendirildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.4. Sitrat Testleri

Bazı bakteriler ortamda fermente edebilecekleri maddeler (glukoz, laktoz gibi) bulunmadığı durumlarda, sitratı karbon ve enerji kaynağı olarak kullanabilirler. İzolatların sitratı fermente edip etmediklerini belirlemek için, “Simmon’s sitrat besiyerinden” slantlar hazırlandı. Her bir izolattan slantlara ekim yapıldı ve 35°C'de, 48–72 s inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından besiyerinin renginin yeşilden maviye dönüşüp dönüşmemesine göre testin sonucuna karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.5. Hidrojen Sülfür (H₂S) Üretim Testleri

İzolatların hidrojen sülfür (H₂S) üretip üretmediklerinin belirlenmesi amacıyla Kligler Iron Agar (KIA) besiyeri kullanıldı. Her bir izolat, KIA besiyerinden hazırlanan slantlara ekildi ve 35°C'de 48–72 s inkübe edildi. İzolatlar sülfat kaynağı olarak besiyeri

içerisinde bulunan sodyum tiosülfattan H₂S üretirlerse, oluşan H₂S yine besiyeri içerisinde indikatör olarak bulunan demir sülfat ile reaksiyona girerek siyah bir çökelek oluşturur. İnkübasyonun ardından slantların alt kısmında siyah rengin oluşup oluşmamasına göre testin sonucuna karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.6. Üre Hidroliz Testleri

Bazı bakteriler üreaz enzimi üreterek, üreyi alkalik bir son ürün olan amonyak ve CO₂'e dönüştürürler. İzolatlarda üreaz enziminin varlığının belirlenmesi amacıyla üreaz besiyeri hazırlandı. Her bir izolattan besiyerine ekim yapıldı, 35°C'de 48–72 s inkübe edildi. Eğer izolatlar üreaz enzimi üretiyorlarsa, ürenin amonyağa parçalanması sonucu alkali bir ortam oluşur. Bu besiyeri içerisinde indikatör olarak bulunan fenol kırmızısının, besiyerinin rengini koyu pembeye dönüştürmesine yol açar. İnkübasyonun sonucunda besiyerinin koyu pembeye dönüşüp dönüşmediğine bakılarak testin sonucuna karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.7. Nitratı İndirgeme Testleri

İzolatların nitratı nitrite indirgeyip indirgemediklerinin ortaya çıkarılması amacıyla Nitrat Broth Besiyeri hazırlandı ve steril tüplere 3'er mL döküldü. Her bir izolattan tüplere ekim yapıldı ve 35°C'de 48–72 s inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda izolatların nitratı indirgeyip indirgemedikleri ortama iki farklı çözeltinin ilavesiyle belirlendi. Ortama Ayıraç-A ve Ayıraç-B'den 250'şer µL eklenmesi sonucu, koyu kırmızı renk oluşumu gözlenip gözlenilmemesine göre testin sonucuna karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.8. Katalaz Testi

İzolatların katalaz enzimi oluşturup oluşturmadıklarının ortaya çıkarılması amacıyla Nutrient Agar Besiyeri hazırlandı. İzolatlar bu besiyerini içeren petrilere ekildikten sonra, 24–48 s 35°C'de inkübe edildi. İnkübasyonun ardından petrilere %3'lük H₂O₂ çözeltisi ilave edildi ve oluşan gaz kabarcıklarına göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.9. Oksidaz Testi

İzolatların oksidaz enzimi üretilip üretilmediğinin belirlenmesi amacıyla Nutrient Agar Besiyerleri hazırlandı. Her bir izolattan petrilere çizgi ekim yapıldı. 35°C'de 24–48 s inkübe edildikten sonra petrilere oksidaz testi ayracı ilave edildi. Oluşan koyu mavi renge göre testin pozitif olduğuna karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.10. Koagülaz Testi

Steril tüplere 2 mL olacak şekilde dağıtılan plazma üzerine, agar besiyerinde üreyen kolonilerden bir öze dolusu veya 0,1 mL broth besiyeri sıvısından alınarak ilave edildi. 35°C'de yaklaşık 16 s inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplerde pıhtılaşma oluşması mikroorganizmaların koagülaz salgıladığının göstergesi olarak kabul edildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.4.11. Lesitinaz Testi

Yumurta sarısında bulunan lipoprotein komplekslerinin bakteriler tarafından oluşturulan lesitinaz enzimleri ile hidrolize edilebilme durumunu belirlemek için yapılan teste lesitinaz besiyeri kullanıldı. Bakteri izolatları yumurta sarılı besiyerine ekildikten sonra 35°C de 1 gün inkübe edildi. Koloniler etrafında lesitin hidroliz zonu oluşan açılmalar ve opaklaşmalar pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

2.2.5. *Bacillus* Türlerinin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

2.2.5.1. İzolatların Optimum Büyüme Sıcaklıklarının Belirlenmesi

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla Nutrient Broth besiyeri içinde 16–24 s büyüyen kültürlerden, OD600 = 0,1 olacak şekilde yeniden Nutrient Broth besiyerine ekim yapıldı. Hazırlanan kültürler 10, 15, 30, 37, 45, 50 ve 55°C'de 18 s sallayıcıda inkübe edildi. Optimum olarak büyüdüğü sıcaklıklar ortaya çıkarıldı (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.5.2. İzolatların Büyüyebildikleri pH Aralıklarının Belirlenmesi

İzolatların büyüyebildiği pH aralığının belirlenmesi için izolatlar değişik pH değerlerine (3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12) sahip Nutrient Broth besiyerlerine inoküle edildi ve

35°C'ye ayarlı su banyosunda gece boyu inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon neticesinde üreme olup olmadığına spektrofotometrede (OD600 nm'de) ölçümler yapılarak karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.5.3. İzolatların NaCl Toleranslarının Belirlenmesi

İzolatların NaCl ihtiyaçlarının belirlenmesi amacıyla %3, 5, 7, 8, 10, 12 ve 15 oranında NaCl ihtiva eden LB Broth besiyerleri hazırlandı. Bu besiyerlerinden 3'er mL deney tüplerine alınarak her bir izolattan ekim yapıldı. Gece boyu 35°C'ye ayarlı su banyosunda inkübe edildi. Üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verildi (Prescott ve Harley, 2001).

2.2.6. *Bacillus* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu

2.2.6.1. Genomik DNA İzolasyonu

Bacillus izolatları, genomik DNA izolasyonu için LB Broth besiyerinde çalkalamalı su banyosunda 37 °C'de bir gece inkübe edildi. Genomik DNA izolasyonu, Sambrok ve ark., (1989)'nin genomik DNA izolasyon prosedürlerine göre aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

- Gece kültürleri 13.000 rpm'de 3-4 dk santrifüj edilerek çöktürüldü.
- Tüplerdeki pelletlerin üzerine 500 µL TE tamponu eklenerek (10 mM Tris pH 8; 1 mM EDTA pH 8) çözüldü.
- Her bir tüpe 50 µL lizozim enzimi konularak vortekslendi (1/4 mercimek büyüklüğünde lizozim).
- Tüpler 37 °C'de 1 s bekletildi.
- Her bir tüpe 50 µL % 10'luk SDS eklenerek 5-6 defa alt üst edildi ve 37 °C'de 30 dk bekletildi.
- Sonra her tüpe 3 M'lık 1/10 hacim sodyum asetat (Na-Ac pH 5.2) eklendi ve 65 °C'de 10-30 dk beklenerek her 10 dk bir alt üst edildi.
- Her tüpe 500 µL fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edildi, vortekslendi ve 5 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- Tüplerin üst kısmındaki sıvı kısım temiz ependorf tüplerine aktarıldı.
- Tüplere tekrar 500 µL kloroform ilave edildi ve tüplerine alt üst edilerek 13.000

rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı.

- Tüplere tekrar 500 µL kloroform ilave edildi. Tüpler alt üst edilerek 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı kısım temiz tüplere aktarıldı. Böylece bu işlem üç defa tekrarlandı. Bu tüplere 1/10 hacim sodyum asetat ve 2 hacim (yaklaşık 900 µl) % 96'lık soğuk EtOH ilave edilerek -20 °C'de 45 dk bekletildi.
- Daha sonra tüpler 13.000 rpm'de 15 dk santrifüj edildi ve üst kısımdaki sıvılar atıldı.
- Kalan pelletlerin üzerine 500 µL % 70'lik soğuk EtOH ilave edilerek tekrar 13.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi.
- Pelletler 37 °C'de kurutulduktan sonra 75 µL TE içerisinde çözüldü.

İzole edilen DNA'lar % 1'lik etidyum bromür içeren agaroz jelde yürütülerek UV ışığı altında görüntülendi. Elde edilen DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.2.6.2. 16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

16S rRNA genleri, her bir izolattan elde edilen genomik DNA'dan 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') ileri ve 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') geri primerleri kullanılarak PCR yardımı ile çoğaltıldı. Primerler MACROGEN (Hollanda) firmasından elde edildi. PCR reaksiyon şartları: 12 ng kalıp DNA, 5 µL 10X PCR tamponu (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM steril KCl), 1,5 mM MgCl₂, 1 U *Taq* DNA Polimeraz, 0,25 mM ileri primeri, 0,25 mM geri primeri, 170 mM dATP, 170 mM dCTP, 170 mM dGTP ve 170 mM dTTP olacak şekilde hazırlandı ve bu karışımı steril saf su ile 50 µL'ye tamamlandı. Çoğaltma işlemi 200 µL'lik tüplerde ve Thermocycler (Eppendorf)'de gerçekleştirildi. Reaksiyon sıcaklıkları ve süreleri ise; ilk denatürasyon basamağı 95°C'de 4 dk olarak gerçekleştirildikten sonra, 36 döngü 94 °C'de 1 dk (denatürasyon için), 56 °C'de 1 dk (hibridizasyon için) ve 72 °C'de 2 dk (polimerizasyon için) şeklinde gerçekleştirildi. Elde edilen PCR ürünlerinin 5µL'si % 1,1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür boyası (0,5µg/ml) ile boyandıktan sonra UV ışığı altında görüntülendi. Elde edilen PCR ürünleri sekans edilmek üzere MACROGEN (Hollanda) firmasına gönderildi (Sevim vd., 2010).

Sekanslama işleminde ise 518F (5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3') ve 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') primerleri kullanıldı (MACROGEN).

2.2.6.3. Veri Analizi

Elde edilen bütün 16S rRNA dizileri BioEdit (Hall, 1999, version 7.09) programı ile düzenlendi ve NCBI GenBank'ta BLAST'lanarak GenBank'ta yer alan diğer 16S rRNA dizileri ile yüzde benzerlikleri belirlendi. Buradan elde edilen veriler izolatların morfolojik tanımlamalarını doğrulamak için kullanıldı. 16S rRNA dizilerinin Cluster analizi aynı şekilde BioEdit programını kullanarak ClustalW programı ile yapıldı ve buradan elde edilen veriler MEGA (Tamura vd., 2011, version 5) filogenetik programı yardımıyla neighbor-joining (NJ) analizinde kullanıldı. Aligment boşlukları kayıp veri olarak değerlendirildi. Oluşturulan dendrogramların güvenilirliği MEGA 5.0 programı kullanarak seç-bağla (bootstrap) analizi ile 1.000 tekrarlı olacak şekilde test edildi.

2.2.7. *Bacillus* Türlerinin Ekstrasellüler Enzim Üretimlerinin Belirlenmesi

2.2.7.1. Amilaz Enzim Üretiminin Belirlenmesi

İzolatların amilaz enzimine sahip olup olmadığı Amilaz Besiyerine ekimleri yapılarak incelendi. Ekimleri yapılan petri kapları 35°C'de 2 gün inkübasyona tabi tutuldu ve daha sonra iyot solüsyonu ile petri yüzeyleri kaplandı. Amilaz üreten izolatlar kolonilerin etrafında oluşan beyaz zonla belirlendi (Akbalık, 2003).

2.2.7.2. Proteaz Enzim Üretiminin Belirlenmesi

Bacillus türlerinin proteaz enzimi üretimleri Proteaz Besiyerinde test edildi. İzolatların besiyerine ekimleri yapıldı ve 35°C'de inkübasyona tabi tutuldu. Düzenli aralıklarda kontrol edilerek petri etrafında açık zon oluşturan koloniler proteaz pozitif olarak kabul edildi (Carlisle ve Falkinham, 1989).

2.2.7.3. Selülaz Enzim Üretiminin Belirlenmesi

Bacillus türlerinin selülaz enzim üretimleri hazırlanan Selülaz Besiyerinde test edildi. İzolatların besiyerine ekimleri yapıldı ve 35°C'de 24 s inkübe edildi. Daha sonra selülaz aktivitesinin belirlenmesi için petri kapları Kongo kırmızısı boyası ile kaplandı ve rengin açılması için 1N NaCl ilave edilip 15 dk beklendi. Zemin kırmızı renge boyanırken selülaz üreten kolonilerin çevresinde boyanmayan şeffaf zonların varlığı selülaz pozitif olarak değerlendirildi (Hols vd., 1994).

2.2.7.4. Lipaz Enzim Üretimini Belirlenmesi

Bacillus türlerinin lipaz enzim aktiviteleri hazırlanan Lipaz Besiyeri ile test edildi. İzotların besiyerine ekimleri yapıldı ve 35°C'de 48 s üremeleri için beklendi. Daha sonra petri kapları UV 354 nm ışığı altında kontrol edildi ve parlak turuncu renk gözlenen koloniler lipaz pozitif olarak değerlendirildi (Jette ve Ziomek, 1994).

2.2.8. *Bacillus* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profillerini Belirlenmesi

Antimikrobiyal hassasiyet testleri National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) standartlarında Gram pozitif- aerobik bakteriler kriterlerine uygun olarak, standart disk difüzyon yöntemi ile yapıldı ve değerlendirildi.

Bu çalışmada, bakteriyel hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotiklerden ampisilin (A, 10µg), metisilin (ME, 5µg), amoksisilin (AX, 25µg), oksasilin (OX, 1µg), sefalotin (KF, 30µg), vankomisin (VA 30µg); bakteriyel protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerden eritromisin (E, 15µg), streptomisin (S, 10µg), tobramisin (TOB, 10µg), neomisin (N, 30µg), gentamisin (CN, 10µg), kanamisin (K, 30µg), tetrasiklin (TE, 30µg), kloramfenikol (C, 30µg); bakteriyel nükleik asit sentezini inhibe eden antibiyotiklerden norfloksasin (NOR, 10µg), siproflaksain (CIP, 5µg), trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 1,25µg/23,75µg), rifampisin (RF, 30µg) ve novabiosin (NV, 30µg) kullanıldı.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri için izolatlar LB Agar besiyerinde bir gecelik kültürleri gerçekleştirildi. İnkübasyondan sonra her bir izolatdan steril serum fizyoloji içerisinde bulanıklık değeri 0,5 McFarland olacak şekilde sulandırıldı. Bu bulanıklık düzeyinde yaklaşık olarak $1,5 \times 10^8$ bakteri/mL bakteri olduğu varsayıldı. Üretici firmanın tarifine göre hazırlanıp steril petri plaklarına 4 mm kalınlığında dökülmüş Mueller-Hinton agar (pH 7,2-7,4) yüzeyi kurutuldu. Steril bir eküvyon çubuğu yardımı ile bulanıklığı ayarlanmış kültürlerin Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeylerine yayma ekimleri yapıldı. Ekim yapıldıktan sonra agar yüzeyi tekrar kurutuldu. Dört derece sıcaklıkta saklanmakta olan antibiyotik diskleri alınarak, agar yüzeyine temas edecek şekilde ve disk aralarında en az 24 mm olacak şekilde yerleştirildi. Disklerin yerleştirilmesinden sonra petri kapları 35°C bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra antibiyotik diskleri etrafında oluşan zonların çapları ölçülerek değerlendirildi.

Çıplak göz ile değerlendirilerek tam inhibisyonun gözle görüldüğü alanın çapı (disk çapı dahil) bir cetvel yardımıyla ölçüldü. İnhibisyon sınırı çıplak gözle görülebilir üremenin

bittiği çizgi olarak kabul edildi. Ölçülen zon çapları NCCLS kitapçığındaki ilgili tablolardaki değerler ile karşılaştırılarak bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "duyarlı" veya "dirençli" olarak değerlendirildi. Orta hassas duyarlılığa sahip suşlar "duyarlı" olarak değerlendirildi. İlgili değerler Tablo 3'de gösterilmektedir. NCCLS kriterlerine uyularak kullanılan MH agar, antibiyotik diskleri ve yapılan deneyin geçerliliğini göstermek için kontrol bakteri suşu olarak *B. subtilis* W168 suşu kullanıldı.

Tablo 3. NCCLS rehberinde Gram pozitif / aerobik bakteriler için belirtilen zon çapları yorumlama standartları.

Antibiyotik	Disk İçeriği (µg)	Zon Çapı		
		R (Dirençli)	I(Orta Hassas)	S(Hassas)
Tetrasiklin	30	14≥	15–18	≥19
Gentamisin	10	12≥	13–14	≥15
Eritromisin	15	13≥	14–17	≥18
Kloramfenikol	30	12≥	13–17	≥18
Tobramisin	10	12≥	13–17	≥18
Streptomisin	10	11≥	12–14	≥15
Neomisin	30	12≥	13–17	≥18
Kanamisin	30	13≥	14–17	≥18
Ampisilin	10	13≥	14–16	≥17
Metisilin	5	9≥	10–15	≥15
Amoksisilin	25	13≥	14–16	≥17
Oksasilin	1	10≥	11–15	≥16
Norfloksasin	10	12≥	13–15	≥16
Novabiosin	30	16≥	17–19	≥20
Rifampisin	30	16≥	17–19	≥20
Sefalotin	30	14≥	15–17	≥18
Siproflaksasin	5	15≥	16–18	≥19
Vankomisin	30	14≥	15–18	≥19
Trimetoprim/ sülfametoksazol	1.25/23.75	10≥	11–15	≥16

2.2.9. *Bacillus* İzolatlarının Ağır Metal Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Bacillus izolatlarının ağır metal direnç profilleri sıvı dilüsyon testi ile gerçekleştirildi (Turnidge vd., 2003). İzolatlar LB agar besiyeri içerisinde 35°C’de bir gecelik kültürleri yapıldı. Kültürlerden ertesi gün LB sıvı besiyeri içerisinde 600 nm’de OD 0,4 olacak şekilde sulandırma yapıldı ve belirli konsantrasyonlarda ağır metal içeren 96’lık mikroyayın her bir kuyucuğuna 20 µL damlatıldı. Mikroyayınlar isimlendirilerek 35°C’de çalkalamalı inkübatörde 1 gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra yayınlar, spektrotometrede 600 nm hücre yoğunluğu ölçülerek üremenin olduğu ve olmadığı konsantrasyonlar belirlendi. Üremenin olmadığı son konsantrasyon MIC (minimum inhibisyon konsantrasyonu) olarak tespit edildi.

Bu çalışmada ağır metal olarak bakır, kurşun, demir, krom, çinko, civa, nikel, kobalt, mangan ve kadmiyum metalleri kullanıldı. Bu ağır metallerin suda çözülebilir tuzlu formları kullanıldı. Bakır için; bakır klorür ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), kurşun için; kurşun nitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), demir için; demir sülfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), krom için; krom klorür ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), çinko için; çinko sülfat ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), civa için; civa klorür (HgCl_2), nikel için; nikel klorür ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), kobalt için; kobalt klorür (CoCl_2), mangan için; mangan klorür (MnCl_2), kadmiyum için; kadmiyum nitrat ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) tuzları kullanıldı.

Tüm tuzlar steril dH_2O içerisinde çözülürken, civa klorür DMSO içerisinde çözülerek kullanıldı. Ağır metal tuzlarının konsantrasyonları 0- 4000 µg/mL olacak şekilde belirli konsantrasyonlarda hazırlandı.

2.2.10. *Bacillus* İzolatlarının Plazmit Profillerinin Belirlenmesi

Plazmit profillerinin belirlenmesinde (Voskuil ve Chambliss, 1993) PAL miniprep prosedürü uygulandı. Herbir izolat 10ml LB Sıvı besiyeri içerisinde 37 °C’de 1 gecelik inkübasyona bırakıldı. Gece kültürleri 10.000 rpm de 5 dk santrifüjlendi ve süpernetant kısmı uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 200 µL SET (% 25 sükröz, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl [pH 8,0]) ve 1 mg lizozim ilave edilerek vorteks yardımı ile homojen karışımı sağlandı. Mikrosantrifüj tüplerine aktarılan homojenizat 10 dk 37 °C’de inkübe edildi. Taze hazırlanmış 350 µL NaOH sodyum dodesil sülfat çözeltisi (0,2 N NaOH, %1 sodyum dodesilsülfat) eklendi ve mikrosantrifüj tüpü süspansiyon kaybolana kadar çalkalandı. Süspansiyona 350 µL soğuk 3M K^+ ve 5 M asetat çözeltisi eklendi. Bu çözelti vakit kaybetmeden orta hızda 10 sn vorteksledi. Süspansiyon mikro santrifüjde 5 dk son hızda

santrifüjlendi ve 750 µL süpernetant yeni santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 650 µL soğuk fenol-kloroform-izoamil alkol (25:24:1) karışımı eklenerek 1 dk vorteksledi. Karışım 5 dk santrifüjlendi ve 620 µL sulu faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, bu faza 620 µL soğuk kloroform-izoamil alkol (24:1) eklendi ve 30 sn vorteksledi. Karışım 3 dk en yüksek hızda santrifüjlendi ve 550 µL sulu faz yeni santrifüj tüpüne aktarıldı. Plazmit DNA eşit miktarda soğuk (-20 °C) izopropanol ilavesi ve çalkalama ile çöktürüldü. Süspansiyon 5 dk santrifüjlendi ve izopropanol uzaklaştırıldı. Pellet 1 mL %70'lik etanol ile yıkandı ve 2 dk santrifüjlendi. Daha sonra etanol havalandırma ile uzaklaştırıldı ve 37 °C'de 5 dk kurutuldu RNaz (20 µg/mL) içeren 50 µL d.i.H₂O ile çözüldü.

İzole edilen plazmitler etidyum bromür boyası içeren % 0,7'lik agaroz jelde yürütüldü ve U.V ışığı altında görüntüledi.

2.2.11. Aktarılabilir Antibiyotik ve Ağır metal Direncinin Tespiti İçin *Bacillus subtilis* W168 Suşundan Kompatent Hücre Hazırlama ve Transformasyon

Kompotent hücre hazırlamak için, *B. subtilis* W168 suşu 1 mL Luria Bertani (LB) Broth içerisinde 37 °C'de gece boyu büyütüldü. Bir gecelik kültürden 5mL MC (Modified Competence) besiyerine 1:100 oranında ekim yapıldı. Hücreler 37 °C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,6 olacak şekilde büyütüldü.

Hücre yoğunluğu 600 nm'de 0.6 olunca, 1 mL hücreye 10 µL izole edilen plazmit DNA'sı eklendi ve 1 saat 37 °C'de çalkamalı inkübatörde büyütüldü. Hücreler 1 saat büyütüldükten sonra 10 000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi ve pellet 100 µL süpernetant içerisinde çözüldü. Hücreler ampisilin içeren LB Agar besiyerine yayıldı ve petri kapları koloniler, belli oluncaya kadar, 1-2 gün 37 °C'de inkübe edildi.

2.2.12. Transformantların Antibiyotik ve Ağır Metal İçeriklerinin Belirlenmesi

Transformasyon petrisinde gözlenen koloniler, seçilerek ampisilinli sıvı ve katı besiyerlerine inokülasyonları sağlandı. Transformant kolonilerdeki antibiyotik direncinin tespiti National Committee for Clinical Laboratory Standarts (NCCLS) standartlarında Gram pozitif- aerobik bakteriler kriterlerine uygun olarak, standart disk difüzyon yöntemi ile Bölüm 2.12'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Transformant kolonilerdeki ağır metal dirençlerinin tespiti, sıvı dilüsyon test (Turnidge vd., 2003) metodu ile Bölüm 2.13'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

2.2.13. *Bacillus* İzolatlarının Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

Topraktan izole edilen ve identifikasyonları sonucunda *Bacillus* cinsine ait 15 adet izolatın bakteriyosin içerikleri incelendi. İzolatlar MHB besiyerinde 35 °C’de 16 s inkübasyona tabi tutuldu. Daha sonra hücreler, 12 000 rpm’de santrifüj edilerek toplandı. Bakteriyosin içerdiği düşünülen süpernatant kısımları kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edildi. Bakteriyosin aktiviteleri “Agar Damlatma Yöntemi” ile test edildi. Bu yöntemde MacFarland 0.5 bulanıklık değerinde ayarlanan, 15 adet *Bacillus* suşu MHA içeren petri kaplarına steril eküvyon çubuklar ile yayıldı. Daha sonra her bir petri üzerine toplanan süpernatant kısımlarından yaklaşık 20 µL damlatılarak, 35°C’de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında petri yüzeylerindeki inhibisyon zonları ölçülerek hangi izolatın bakteriyosin aktivitesine sahip olduğu ve hangi izolatın bu bakteriyosin aktivitesi için en hassas indikatör izolat olduğu tespit edildi.

2.2.14. En iyi Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesi belirlenen izolatın en iyi bakteriyosin aktivitesini hangi şartlarda oluşturduğunu tespit edebilmek için, izolat 10 mL MHB, BHI, TSB ve NB Broth besiyerlerinde 35°C büyütüldü ve hücreler 16, 24, 36 ve 48. s’lerde santrifüj edilerek uzaklaştırıldı (9000Xg, 10 dk). Süpernatantlar 0,45 µm çapında filtrelerden süzülerek hücre serbest süpernatantı (CFS, cell free süpernatant) elde edildi ve antimikrobiyal aktivite için kullanıldı. Bakteriyosin aktivitesi agar-spot (Motta ve Brandalli, 2002) yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu yöntemde 200 µL MHB besiyeri içerisinde erken logaritmik faza (OD600 0,3–0,4) kadar büyütülmüş, antagonistik izolat kültürünün üzerine 4 mL MHB yumuşak agar (% 0,6) ilave edilip homojen karışması sağlandı ve ince dökülmüş MHA petrilerinin üzerine dökülerek yayıldı. Daha sonra bu yumuşak agar petrisi üzerinde steril delici yardımı ile kuyucuklar açıldı. Bu kuyucuklar içerisine 100 µL hücre serbest süpernatantında ilave edildi ve petri kapları 35°C’de inkübe edildi. Bakteriyosin inhibisyonu agar üzerinde berrak zonların tespiti ile belirlendi. Böylece bakteriyosin aktivitesi görülen izolatda aktivitesinin hangi besiyerinde ve hangi inkübasyon zamanında gerçekleştiği bu şekilde tespit edildi. Bundan sonraki aşamalardaki deneylerde en iyi antimikrobiyal aktivitenin belirlendiği şartlar kullanılarak devam edildi.

2.2.15. Antibakteriyal Etki Spektrumlarının Kuyucuk Yöntemiyle Belirlenmesi

Antibakteriyal aktivite denemeleri 12 farklı indikatör bakteri ve 3 indikatör maya suşu kullanılarak gerçekleştirildi. Bakterilerin agar ortamındaki 16 s'lik kültürlerinden, dH₂O 0,5 MacFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlandı ve bu süspansiyonlardan steril eküvyon çubukları vasıtasıyla MHA besiyeri üzerine homojen bir şekilde yayıldı. Petri yüzeyleri kuruduktan sonra 5 mm çaplı steril agar delici ile besi ortamlarında kuyucuklar açıldı. Hazırlanan kuyucuklara, CFS'lerden 100 µL konularak petriler +4 °C'de 2 s bekletildikten sonra, plaklar suşların gelişebildiği sıcaklık derecelerinde inkübe edildi. Ertesi gün oluşan zonların çapları ölçülerek bakteriyosinin etki spektrumu belirlendi.

2.2.16. Bakteriyosin Karakterizasyonu

2.2.16.1. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini denemek amacıyla en iyi aktivitenin tespit edildiği izolatdan MHB besiyerinde 24 s inkübe edildi. İnkübasyondan sonra santrifüj işlemine tabi tutuldu ve CFS'lerin bulunduğu süpernatant kısım ayrıldı. Sıcaklığın bakteriyosin üzerine etkisini tespit etmek için CFS'ler 30, 45, 60 ve 95 °C'de 30 dk ve 2 s inkübe edildi ve 121 °C'de 20 dk otoklavlandı. Oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra CFS'ler en hassas indikatör izolata karşı kuyucuk yöntemiyle denendi. İşlem görmemiş CFS'ler kontrol olarak kullanıldı. İndikatör bakterinin bulunduğu plaklar uygun sıcaklıkta 24 s inkübe edildikten sonra zon çapları ölçülerek aktivite değerlendirildi (Powell vd., 2007). Tüm denemeler iki tekrarlı yapıldı.

2.2.16.2. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Enzimlerin Etkisi

Bakteriyosin aktivitesi üzerine çeşitli enzimlerin etkisini denemek amacıyla elde edilen CFS'ler kullanıldı. CFS'ler proteinaz K, lizozim, tripsin, lipaz ve katalaz enzimleriyle son konsantrasyonları 0,5 mg/ mL ve 5 mg/mL olacak şekilde karıştırıldı ve 37 °C de 1 s inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, enzim aktivitesini durdurmak için CFS'ler su banyosunda 95–97 °C de 5 dk tutuldu. Karışımlar, en hassas indikatöre karşı kuyucuk yöntemiyle test edildi. 1 s 37 °C de inkübasyondan sonra enzimle muamele edilmiş CFS'ler ve kontrol gruplarından (tek başına enzimler, enzimlerin hazırlandığı

tampon ve enzimlerle muamele edilmemiş CFS) 100 µL kuyucuklara dolduruldu ve inkübasyona bırakıldı. Zon çaplarına bakılarak aktiviteleri değerlendirildi (Riosen vd., 2005). Tüm denemeler iki tekrarlı yapıldı.

2.2.16.3. Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

Aktivite üzerine pH'nın etkisini araştırmak için, MHB besiyerinde 24 s büyütülmüş kültür süpernatantlarının pH'ları, steril 1 M NaOH ya da steril 1 M HCl ile, 3-11 arasında ayarlandı. pH'ları ayarlanan CFS'ler 2 s oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, kültür süpernatantlarının pH'ları tekrar 7'ye ayarlandıktan sonra kuyucuk yöntemiyle en hassas indikatör suşa karşı agar kuyucuk yöntemi ile denendi. pH'sı 3–11 arasında ayarlanmış MHB ortamları da pH'ları 7'ye ayarlandıktan sonra negatif kontrol olarak kullanıldı. Tüm denemeler iki tekrarlı yapıldı (Deraz vd., 2005).

2.2.16.4. Bazı Organik Çözücülerin ve Deterjanların Bakteriyosin Aktivitesine Etkisi

Çeşitli organik çözücülerin (Bizani ve Brandelli, 2002) ve deterjanların (Todorov ve Dicks, 2006) bakteriyosin aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak için organik çözücülerden formaldehit, kloroform, aseton, propanol, metanol, etil alkol, hekzan, etil eter, Tween 80 ve Triton X-100'den % 20 olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. Bu stok çözeltiler, CFS'ler ile son konsantrasyon % 10 olacak şekilde karıştırıldı ve 37 °C de 1 s inkübe edildi. İnkübasyondan sonra örneklerin antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk metodu ile en hassas indikatör suşa karşı denendi. Pozitif kontrol olarak işlem görmemiş CFS (dH₂O ile seyreltilmiş), negatif kontrol olarak ise organik çözücülerin ve deterjanların dH₂O ile hazırlanmış stok çözeltileri, son konsantrasyonları aynı olacak şekilde eklenip denendi. Tüm denemeler iki tekrarlı yapıldı.

2.2.17. İzolatın Büyüme Eğrisinin ve Bakteriyosin Üretim Evrelerinin Belirlenmesi

Bakteriyosin aktivitesi gösteren izolatın büyüme eğrileri ve bakteriyosin üretim evreleri bu izolat için en iyi aktivitenin görüldüğü MHB besiyeri içerisinde büyütülmesi ile gerçekleştirildi. *Bacillus* izolatı MHB besiyeri içerisinde 35°C'de çalkalamalı inkübatörde 16 s inkübe edildi. İnkübasyondan sonra izolat taze MHB besiyeri içerisine 600 nm'de OD: 0,1 olacak şekilde yeniden inokülasyonu sağlandı ve 35°C'de inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyona bırakılan örnekden belirli aralıklarda hem absorbans ölçümleri alınarak

büyüme eğrileri çıkartıldı, hemde bu aralıklarda alınan örneklerden bakteriyosin aktiviteleri agar kuyucuk yöntemi ile tespit edildi.

İzolatlardaki bakteriyosin üretiminin gelişimin hangi evresinde başladığı ve maksimum aktiviteye hangi saatte ulaştığı belirlendi.

2.2.18. Bakteriyosinin Kısmen Saflaştırılması

Bakteriyosin aktivitesi belirlenen izolat 300 mL MHB besiyeri içeren 1L erlenmayer içerisinde 35°C’de 24 s inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrasında kültür 9000 rpm’de 30 dk santrifüj edilerek hücreler uzaklaştırıldı. Hücre içermeyen süpernatanta yavaş yavaş % 70 oranında amonyum sülfat ilave edildi ve 4°C’de gece boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde karışması sağlandı. Karışım santrifüj edildikten sonra (4°C’de 8000 g/ 60 dk), yüzeyde ve altta biriken pellet toplanarak 10 mL sodyum fosfat tamponunda (pH 6,5) yeniden çözüldü. Süspansiyon 2L aynı tampon içerisinde bir gece diyaliz edilerek kontaminantların uzaklaştırılması sağlandı.

2.2.19. Bakteriyosinin Molekül Ağırlığının Belirlenmesi

Bakteriyosinin molekül ağırlığı SDS-PAGE (Sodyum dodecil sülfat- Poliakrilamid jel) kullanılarak saptandı. Diyaliz edilmiş örnek SDS-PAGE jeline yüklenerek elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez işleminden sonra jel iki kısma bölündü ve jellerden birisi Coomassie blue G-250 ile 1 s boyanıp, boyayı uzaklaştırma işlemine tabi tutuldu. Antimikrobiyal aktivite testi için diğer jel 1 s süresince steril d.i. H₂O su ile yıkandı ve bunu takiben büyük petri kutusunda bulunan agar üzerine, bu jel dikkatlice konuldu. Jel üzerine indikatör suşu içeren 45°C’deki yumuşak agar dökülüp 30°C’de 24 s inkübasyon işlemine tabi tutuldu. İnkübasyon işleminden sonra zonun görüldüğü bölge Coomassie blue ile boyanmış jel ile karşılaştırılarak moleküllere ağırlığı belirlenmeye çalışıldı.

3. BULGULAR

Bu çalışmada Rize ilinin belirli 9 bölgesindeki topraklardan alınan örneklerden 15 adet Gram pozitif basil izole edilmiştir. Yapılan Gram ve spor boyama deneyleri ile bu bakterilerin Gram pozitif, spor oluşturabilen basil şeklinde bakteriler olduğu gözlemlenmiştir. İzole edilen bakteriler LB agar besiyerinde çizgi ekim yöntemiyle üretildikten sonra, diğer çalışmalarda kullanılmak üzere gliserol stokları yapılmış ve bundan sonraki çalışmalarda bu stoklar kullanılmıştır.

3.1. Gram-pozitif Basillerin Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Gram pozitif basiller morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacı ile Nutrient Broth ve Agar besiyerlerine ekimleri yapılmış ve gram boyama, spor boyama, Nutrient Agarda koloni tipi, koloni rengi, koloni büyüklüğü, hareket özellikleri ve Nutrient Broth içerisinde üreme özellikleri gibi çeşitli morfolojik özellikleri tespit edilmiştir (Tablo 4). Elde edilen bu veriler tür analizlerinde kullanılmıştır.

Tablo 4. İzolatların morfolojik özellikleri.

No	Koloni Rengi	Koloni Tipi	Koloni Büyüklüğü	N.B Üreme Özelliği	Gram Boyama	Spor	Spor Şekli	Hareket
B1	Krem	P	Küçük	Bulanık	+	+	Merkezi	+
B2	Krem	P-M	Orta	Tortu	+	+	Merkezi	-
B5	Krem	P	Orta	Bulanık	+	+	Merkezi	+
B4	Krem	P	Büyük	Tortu	+	+	Merkezi	+
B5	Krem	P	Yaygın	Tortu	+	+	Merkezi	+
B6	Krem	P-M	Orta	Bul.-Tor.	+	+	Merkezi	+
B7	Krem	P-M	Orta	Tortu	+	+	Merkezi	+
B9	Krem	P	Orta	Bul.-Tor.	+	+	Terminal	+
B12	Krem	D-M	Orta	Tortu	+	+	Terminal	-
B13	Krem	P-M	Büyük	Bul.-Tor.	+	+	Merkezi	+
B15	Krem	P	Orta	Bulanık	+	+	Terminal	+
B16	Krem	P	Orta	Bulanık	+	+	Merkezi	-
B17	Krem	P	Orta	Bulanık	+	+	Terminal	+
B19	Krem	P	Orta	Bulanık	+	+	Merkezi	+
B20	Krem	P	Küçük	Bulanık	+	+	Terminal	+

P: Pürtüklü, M: Mukoid, D: Düz, +: Pozitif, -:Negatif

3.2. Gram-pozitif Basillerin Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Topraktan izole edilen Gram-pozitif basiller biyokimyasal özelliklerinin tespit edilmesi için çeşitli birçok farklı biyokimyasal test besiyerlerine inokülasyonları yapılmıştır. İnkübasyon neticesinde izolatların biyokimyasal test sonuçları tespit edilmiş (Tablo 5) ve tür analizlerinin yapılması için kullanılmıştır.

Tablo 5. İzolatların biyokimyasal özellikleri.

No	Oksidaz	Katalaz	MR/VP	KIA*											
				D	Y	G	H ₂ S	İndol	Citrat	Nitrat	Üreaz	Jeletnaz	Koagülaz	Lesitinaz	
B1	+	+	+/+	A	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B2	+	+	-/-	Alk	A	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
B3	+	+	+/-	A	Alk	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
B4	+	+	-/-	Alk	Alk	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B5	+	+	-/-	Alk	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B6	+	+	-/-	Alk	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
B7	+	+	-/-	A	A	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
B9	+	+	+/-	A	Alk	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
B12	+	+	-/-	Alk	Alk	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
B13	+	+	-/-	Alk	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
B15	-	+	+/-	A	Alk	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
B16	-	+	+/+	A	A	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
B17	-	+	+/+	A	Alk	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
B19	-	+	+/-	Alk	A	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
B20	-	+	+/-	A	Alk	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+

*: KIA; Kligler Iron Agar besiyeri, D: Dip, Y: Yüzey, G; Gaz, H₂S: Hidrojen sülfür, +: Pozitif, -:Negatif, +/-:Zayıf pozitif

3.3. Gram-pozitif Basillerin Fizyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların fizyolojik özellikleri olarak üreyebildiği pH aralıkları (3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 ve 12), ısı ve NaCl toresansları belirlenmiştir. İzolatların hepsi 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0 pH değerlerinde üreme özelliği gösterirken, bazı izolatlar pH 10,0 değerinde de üreme özelliği göstermişlerdir (Tablo 6).

NaCl toleransının belirlenmesi için izolatlar % 3'ten % 15'e kadar değişen değişik

NaCl'li LB Broth besiyerlerinde üretilmişlerdir. Bu besiyerlerine inokülasyonları sağlanan izolatlar gece boyu 35°C'ye ayarlı su banyosunda inkübe edilmişlerdir. Üreme olan ve olmayan tüpler belirlenerek, izolatların hangi oranlarda tuzu tolere edebildiklerine karar verilmiştir. Tüm izolatların % 3, % 5 ve % 7'lik tuz içeren ortamlarda ürerken, bazı izolatlar % 10'luk ortamda üremişlerdir. B12 izolatı ise % 12'lik NaCl konsatrasyonunda üreme özelliği gösteren tek izolattır (Tablo 6).

İzolatların optimum büyüme sıcaklıklarının belirlenmesi amacıyla LB Broth besiyerine ekim yapılmıştır. Hazırlanan kültürler 10, 15, 30, 37, 45, 50 ve 55°C'de gece boyu inkübe edilerek ısı toleransları tespit edilmiştir. İzolatların ısı toleranslarında çok geniş bir yelpaze göstermişlerdir. İzolatlar 15°C'den 55°C'ye kadar ulaşan farklı sıcaklıklarda büyüme özelliği göstermişlerdir (Tablo 6).

Tablo 6. İzolatların farklı pH, NaCl ve ısı ortamlarında üreme durumları.

Uygulama	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B9	B12	B13	B15	B16	B17	B19	B20
pH															
3,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10,0	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
11,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaCl (%)															
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	+	Z	-	+	-	Z	-	+	-	Z	-	-	-	-	-
12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isı (°C)															
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
55	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+

Z: Zayıf, +: Pozitif, -: Negatif

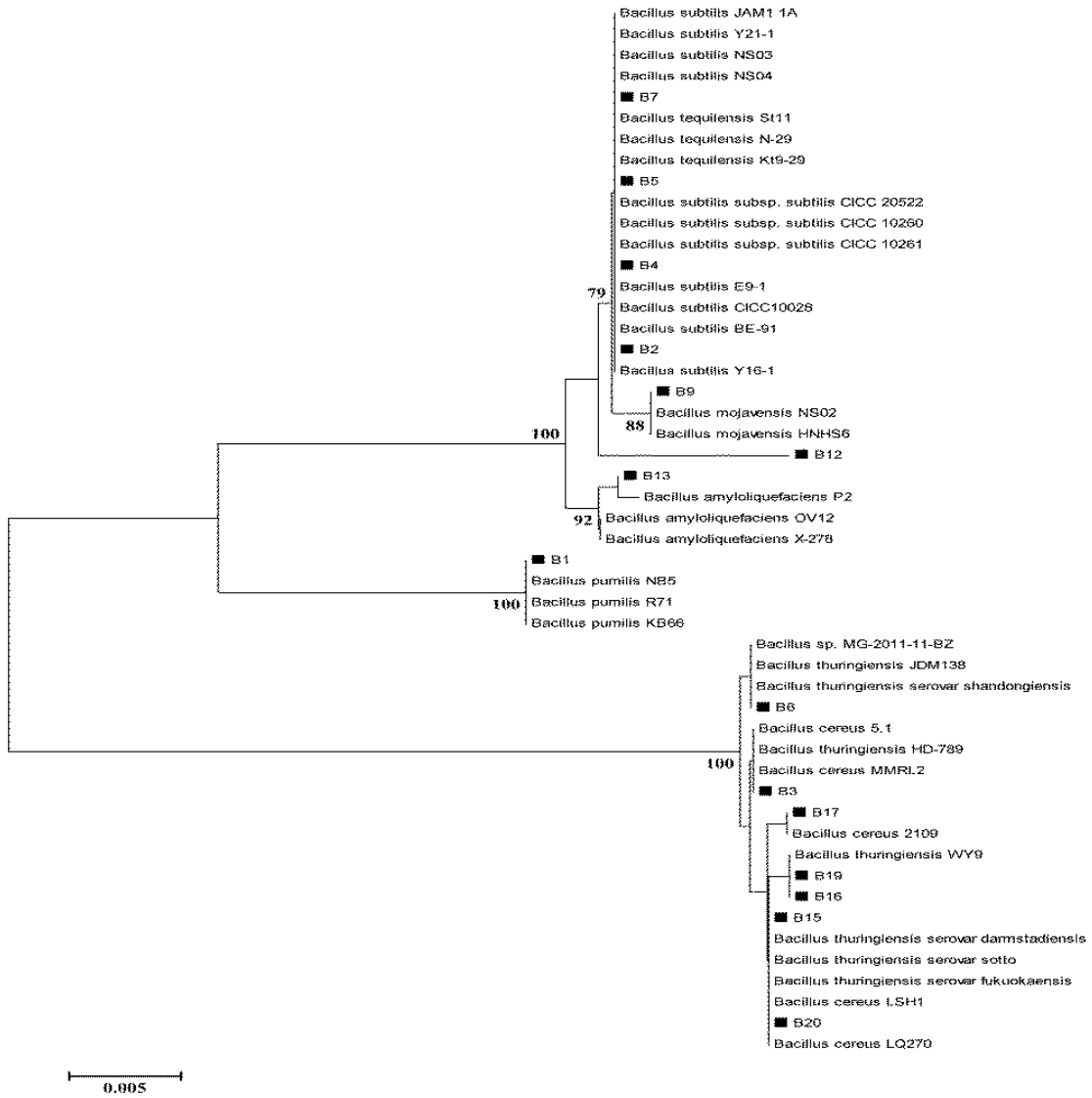
3.4. Gram-pozitif Basillerin Moleküler Özelliklerinin Belirlenmesi

İzolatların MACROGEN firmasına yaptırılan 16S rRNA dizi analizleri sonucunda sekanslar Gen Bank'ta var olan diğer bakterilerin 16S rRNA genleriyle karşılaştırılarak yüzde benzerlikler tespit edildi (Tablo 7).

Tablo 7. İzolatlar ile diğer bakterilerin 16S rRNA genlerinin yüzde benzerlikleri.

İzolat	Benzer olduğu bakteriler	Gen Bank No	Örtüşme (%)	Benzerlik (%)
B1	<i>Bacillus pumilus</i> NB5	JQ768260.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus pumilus</i> R71	JQ428828.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus pumilus</i> KB66	JF327485.1	% 100	% 99
B2	<i>Bacillus subtilis</i> BE-91	GQ845009.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis</i> CICC10028	AY881638.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis</i> E9-1	FJ573171.1	% 100	% 99
B3	<i>Bacillus cereus</i> MMRL2	HM804296.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789	CP003763.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus cereus</i> 5.1	JX444509.1	% 100	% 99
B4	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> CICC10261	GQ375238.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> CICC 10260	GQ375237.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i> CICC 20522	GQ375215.1	% 100	% 99
B5	<i>Bacillus tequilensis</i> St11	JN700073.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus tequilensis</i> Kt9-29	JF460757.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus tequilensis</i> N-29	JF798376.1	% 100	% 99
B6	<i>Bacillus thuringiensis serovar shandongiensis</i>	AB617498.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus sp.</i> MG-2011-11-BZ	FR872470.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> JDM138	JX035961.1	% 100	% 99
B7	<i>Bacillus tequilensis</i> N-29	JF798376.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis</i> NS04	JX126865.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis</i> NS03	JX126864.1	% 100	% 99
B9	<i>Bacillus mojavensis</i> NS02	JX126863.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus mojavensis</i> HNHS6	JN999835.1	% 100	% 99
B12	<i>Bacillus subtilis strain</i> JAM1_1A	JN644507.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis</i> Y21-1	AB300819.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus subtilis</i> Y16-1	AB300818.1	% 100	% 99
B13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> P2	JQ715455.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> OV12	HE681733.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> X-278	JN866600.1	% 100	% 99
B15	<i>Bacillus thuringiensis serovar darmstadiensis</i>	AB617485.1	% 100	% 100
	<i>Bacillus thuringiensis serovar sotto</i>	AB617478.1	% 100	% 100
	<i>Bacillus thuringiensis serovar fukuokaensis</i>	AB617477.1	% 100	% 100
B16	<i>Bacillus thuringiensis</i> WY9	JQ936681.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789	CP003763.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus cereus</i> LSH1	JX129893.1	% 100	% 99
B17	<i>Bacillus cereus</i> 2109	JF947356.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789	CP003763.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus cereus</i> LSH1	JX129893.1	% 100	% 99
B19	<i>Bacillus thuringiensis</i> WY9	JQ936681.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789	CP003763.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-771	CP003752.1	% 100	% 99
B20	<i>Bacillus cereus</i> LQ270	EF472265.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-789	CP003763.1	% 100	% 99
	<i>Bacillus cereus</i> LSH1	JX129893.1	% 100	% 99

Topraktan izole edilen gram pozitif basiller ve bu izolatların yakın ilişkili olduğu bakteriler ile filogenetik benzerlikleri belirlenmiştir. Elde edilen dendrogram'a göre B1 nolu izolat *Bacillus pumilis* suşları ile, B6, B16 ve B19 izolatları *Bacillus thuringiensis* suşları ile, B9 izolatı *Bacillus mojavensis* suşları ile, B13 izolatı *Bacillus amyloliquefaciens* suşları ile, B17 izolatı *Bacillus cereus* suşları ile, B2, B3, B4, B5, B7, B12, B15 ve B20 izolatları ise *Bacillus* sp. suşları ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Topraktan izole edilen Gram Pozitif Basillerin filogenetik analizi.

3.5. Gram-pozitif Basillerin İdentifikasyonu

Yapılan morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler Bergeys Manuel of Systematics (Kaynak) kitabındaki sınıflandırma kriterleri ele alınarak sınıflandırılmıştır. Yapılan identifikasyon sonucunda 9 izolat tür seviyesinde, 6 izolat ise cins seviyesinde identifiye edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda *B. pumilis*, *B. mycoides*, *B. circulans*, *B. sp.*, *B. cereus*, *B. amyloliquifaciens* tanımlanan *Bacillus* cinsleridir (Tablo 8).

Yapılan filogenetik çalışmalar sonucunda ise *Bacillus* izolatlarından 7 izolat tür seviyesinde karakterize edilirken, 8 izolat sadece cins seviyesinde karakterize edilebilmiştir (Tablo 8).

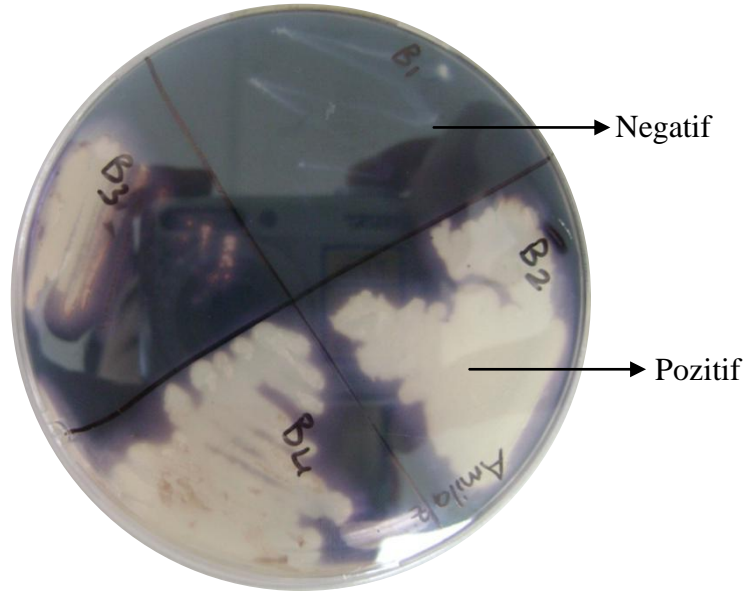
Tablo 8. Morfolojik, biyokimyasal, fizyolojik ve filogenetik analizler sonucunda *Bacillus* izolatlarının identifikasyonu.

İzolat	Geleneksel yöntemlere göre	Filogenetik analize göre
B1	<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Bacillus pumilis</i>
B2	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus sp.</i>
B3	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus sp.</i>
B4	<i>Bacillus circulans</i>	<i>Bacillus sp.</i>
B5	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>
B6	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
B7	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>
B9	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>
B12	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus sp.</i>
B13	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>
B15	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus sp.</i>
B16	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
B17	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
B19	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
B20	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus sp.</i>

3.6. *Bacillus* İzolatlarının Ekstrasellüler Enzim İçerikleri

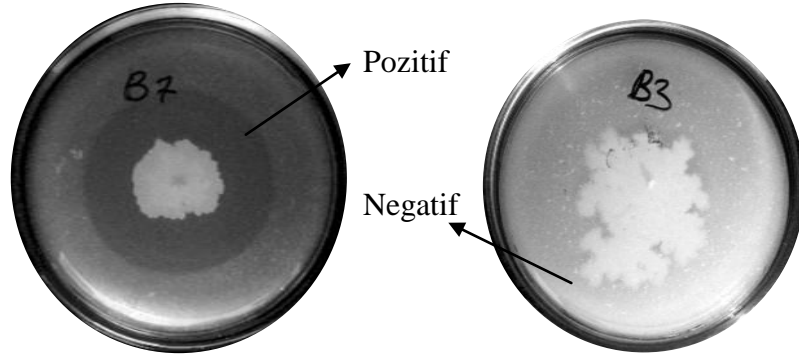
İzolatların enzim aktivitelerini belirlemek amacıyla amilaz, proteaz, selülaz, lipaz besiyerleri hazırlanmıştır.

Amilaz üretimini tespit etmek için izolatlar amilaz besiyerinde ekimleri yapılmış ve inkübasyondan sonra enzim üretimi agar petrilerinin yüzeyine lügol solüsyonu damlatılarak belirlenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda B1 ve B19 izolatları hariç tüm izolatların amilaz pozitif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2, Tablo 9).



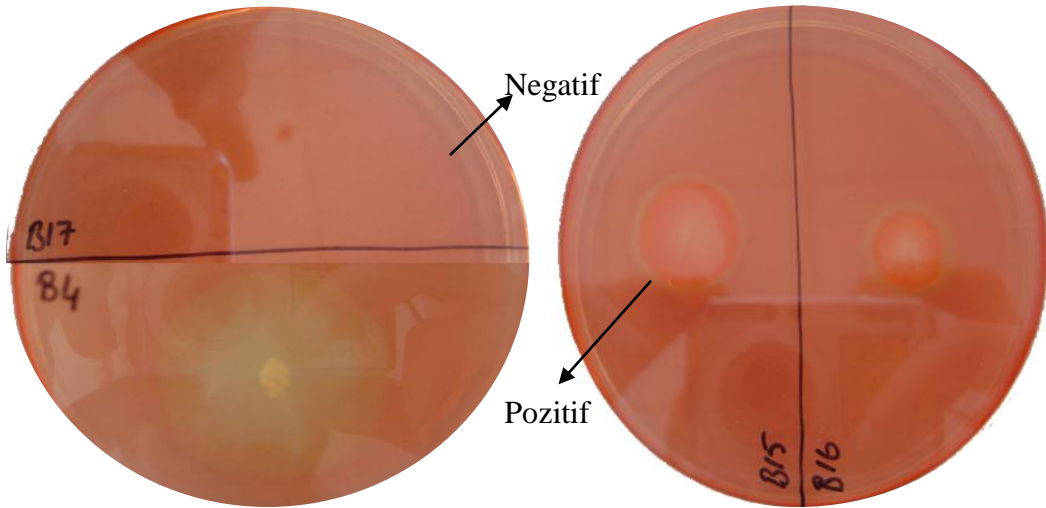
Şekil 2. Amilaz test sonuçları.

Proteaz üretimini tespit etmek için izolatlar proteinaz besiyerine ekimleri yapılmıştır ve inkübasyonları gerçekleştirilmiştir. İnkübasyondan sonra petri yüzeyinde meydana gelen opak zonlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda B3 izolatı hariç tüm izolatlar pozitif olarak belirlenmiştir (Şekil 3, Tablo 9).



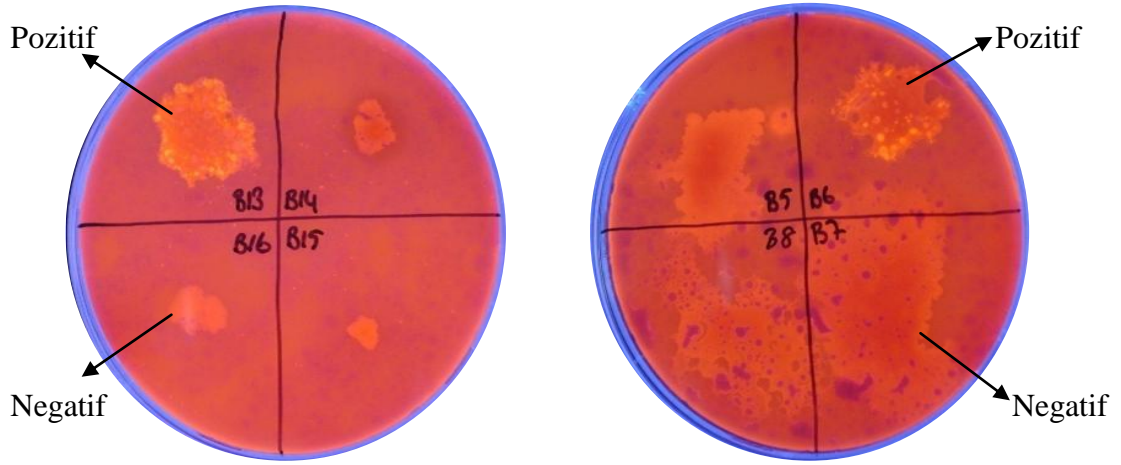
Şekil 3. Proteaz test sonuçları.

Selüloz üretimini tespit etmek için izolatlar selüloz besiyerine ekimleri sağlanmıştır. İnkübasyondan sonra petri kapları Kongo kırmızısı ile boyanmış ve NaCl ile yıkanarak sonuçlar tespit edilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda B17 ve B19 izolatı negatif, B15, B16 ve B20 izolatları ise zayıf pozitif olarak tespit edilmiştir. Diğer tüm izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**, Tablo 9).



Şekil 4. Selüloz testi sonuçları.

Lipaz üretimini tespit etmek için izolatlar lipaz besiyerine ekimleri yapılmıştır. Lipaz besiyerine ekimleri yapılan izolatlar inkübasyondan sonra UV ışığı altında incelenerek parlak zonlar oluşturan izolatlar pozitif, oluşturmayanlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda B6 ve B13 izolatları pozitif diğer izolatlar ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 5, Tablo 9).



Şekil 5. Lipaz test sonuçları.

Tablo 9. *Bacillus* izolatlarının ekstrasellüler enzim aktiviteleri.

Örnek No	Amilaz	Proteaz	Selüloz	Lipaz
B1	-	+	+	-
B2	+	+	+	-
B3	+	-	+	-
B4	+	+	+	-
B5	+	+	+	-
B6	+	+	+	+
B7	+	+	+	-
B9	+	+	+	-
B12	+	+	+	-
B13	+	+	+	+
B15	+	+	Z	-
B16	+	+	Z	-
B17	+	+	-	-
B19	-	+	-	-
B20	+	+	Z	-

Z: Zayıf, +: Pozitif, -: Negatif

3.7. *Bacillus* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilleri

Bacillus izolatlarının antibiyotik direnç profilleri agar disk difüzyon metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Direnç profillerini belirlemek amacı ile çeşitli gruplara ait 22 adet antibiyotik kullanılmıştır. Yapılan antibiyogramlar sonucunda Basitrasin, Optokin ve Klindamisin antibiyotiklerine karşı tüm izolatların (% 100) dirençli oldukları tespit

edilmiştir (Tablo 10). Amoksisilin antibiyotiğine 12 izolatın (% 80), metisilin ve rifampisin antibiyotiklerine 8 izolatın (% 53), oksasilin antibiyotiğine 7 izolatın (% 47), ampisilin ve sefalotin antibiyotiğine 6 izolatın (% 40), tobramisin ve trimetoprim/sülfametaksazol antibiyotiğine 4 izolatın (% 27), tetrasiklin, vankomisin ve kanamisin antibiyotiğine 2 izolatın (% 13) direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Norfloksasin, gentamisin, sifroflaksin, streptomisin, kloramfenikol, neomisin ve novabiyosin antibiyotiklerine karşı ise herhangi bir direnç tespit edilememiştir (Tablo 10,Tablo 11).

Tablo 10. *Bacillus* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.

Antibiyotikler	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B9	B12	B13	B15	B16	B17	B19	B20
Ampisilin (AMP)	H	H	D	H	H	H	H	H	H	H	D	D	D	D	D
Metisilin (ME)	H	H	D	D	H	H	H	D	H	H	D	D	D	D	D
Eritromisin (E)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Basitrasin (B)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Klindamisin (CLD)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Norfloksasin (NOR)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Sefalotin (KF)	H	H	D	H	H	H	H	H	H	H	D	D	D	D	D
Gentamisin (G)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Siproflaksin (CIP)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Streptomisin (S)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Tobramisin (TOB)	D	H	D	H	D	H	H	H	H	H	D	H	H	H	H
Amoksisilin (AX)	D	D	D	D	D	D	H	D	H	H	D	D	D	D	D
Kloramfenikol (C)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Trimethoprim /Sulfametaksazol (SXT)	H	H	D	H	H	H	H	H	H	H	D	D	D	H	H
Tetrasiklin (TE)	H	H	D	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	H
Vankomisin (VA)	H	H	D	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	H
Oksasilin (OX)	H	H	D	H	H	H	H	D	H	H	D	D	D	D	D
Optakin (OP)	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
Rifampisin (RF)	H	D	D	D	D	H	H	D	H	H	D	D	H	D	H
Neomisin (N)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
Kanamisin (K)	H	H	D	H	H	H	H	H	H	H	D	H	H	H	H
Novabiosin (NV)	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H

H: Hassas, D: Dirençli

Antimikrobiyal test sonuçlarına göre antibiyotiklere karşı en az direnç gösteren *Bacillus* izolatı B7, B12 ve B13 izolatlarıdır. En fazla direnç gösteren izolat ise B3 ve B15 olarak tespit edilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. İdentifiye edilen *Bacillus*'ların antibiyotik direnç oranları.

	<i>B. pumilis</i> (D/N) ^a	<i>B. thuringiensis</i> (D/N)	<i>B. mojavensis</i> (D/N)	<i>B. cereus</i> (D/N)	<i>B. amy.</i> ^b (D/N)	<i>B. sp</i> (D/N)	Toplam	%
AMP ^c	0/1	2/3	0/1	1/1	0/1	3/8	6/15	40
ME	0/1	2/3	1/1	1/1	0/1	4/8	8/15	53
E	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0
B	1/1	3/3	1/1	1/1	1/1	8/8	15/15	100
CLD	1/1	3/3	1/1	1/1	1/1	8/8	15/15	100
NOR	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0
KF	0/1	2/3	0/1	1/1	0/1	3/8	6/15	40
G	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0
CIP	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0
S	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0
TOB	1/1	0/3	0/1	0/1	0/1	3/8	4/15	27
AX	1/1	3/3	1/1	1/1	0/1	6/8	12/15	80
C	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0
SXT	0/1	1/3	0/1	1/1	0/1	2/8	4/15	27
TE	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	2/8	2/15	13
VA	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	2/8	2/15	13
OX	0/1	2/3	1/1	1/1	0/1	3/8	7/15	47
OP	1/1	3/3	1/1	1/1	1/1	8/8	15/15	100
RF	0/1	2/3	1/1	0/1	0/1	5/8	8/15	53
N	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0
K	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	2/8	2/15	13
NV	0/1	0/3	0/1	0/1	0/1	0/8	0/15	0

^a: D: Dirençli izolat sayısı, N: toplam izolat sayısı

^b: *B. amy.*: *Bacillus amyloliquifaciens*

^c: AMP: Ampisilin, ME: Metisilin, E: Eritromisin, B: Basitrasin, CLD: Klindamisin, NOR: Norfloksasin, KF: Sefalotin, G: Gentamisin, CIP: Siproflaksasin, S: Streptomisin, TOB: Tobramisin, AX: Amoksasilin, C: Kloramfenikol, SXT: Trimetoprim/sülfametaksazol, TE: Tetrasiklin, VA: Vankomisin, OX: Oksasilin, OP: Optokin, RF: Rifampisin, N: Neomisin, K: Kanamisin, NV: Novabiosin

3.8. *Bacillus* İzolatlarının Ağır Metal Direnç Profilleri

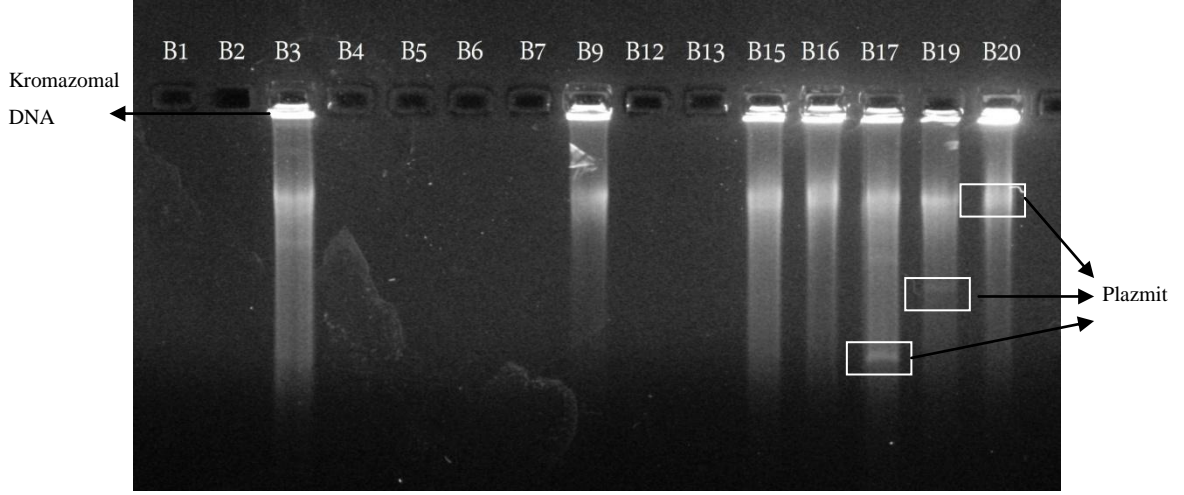
Bacillus izolatlarını ağır metal direnç profilleri sıvı dilüsyon test metodu uygulanarak yapılmıştır. Direnç profillerinin belirlemek için farklı ağır metallerin suda çözülebilir tuz formları kullanılmıştır. Yapılan araştırma sonucunda izolatların bakır (CuSO₄), kurşun (Pb(NO₂)₂), krom (CrCl₂), demir (FeSO₄) ve mangan (MnCl₂) ağır metallerine karşı yüksek bir direnç profili tespit edilmiştir (Tablo 12). En düşük direnç oranı ise civa (HgCl₂), daha sonra ise kadminyum (Cd(NO₂)₂) ve kobalt (CoCl₂) metallerine karşı olduğu belirlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. *Bacillus* izolatlarının ağır metal direnç profilleri ($\mu\text{g/mL}$).

	CuSO ₄	Pb(NO ₂) ₂	CoCl ₂	CrCl ₂	ZnSO ₄	FeSO ₄	HgCl ₂	Cd(NO ₂) ₂	MnCl ₂	NiCl
B1	1000	2000	250	1000	2000	1500	0	250	1000	250
B2	1000	2000	50	1000	250	1500	0	25	750	250
B3	1500	3000	100	2000	2000	2000	25	500	1000	1000
B4	1500	2000	100	1000	250	1500	0	12	750	500
B5	1500	2000	100	1000	250	1500	0	12	750	500
B6	1000	2500	100	1000	250	1000	0	250	1500	500
B7	1500	2500	50	1000	250	1500	0	25	500	500
B9	1500	2500	50	1000	250	1500	25	500	1000	500
B12	1000	1500	100	1000	250	1500	0	25	750	500
B13	1000	3000	100	1000	250	1500	0	50	1500	250
B15	1500	3000	100	1000	500	1000	25	500	1000	1000
B16	1500	2500	250	1000	500	1000	25	500	1000	2000
B17	1000	2500	250	1000	500	1000	0	250	1000	1000
B19	1000	1000	100	1000	750	1000	12	500	1500	1000
B20	1000	1000	50	1000	250	750	0	12	750	250

3.9. *Bacillus* İzolatlarının Plazmit Profillerinin Belirlenmesi

Bacillus izolatlarından yapılan plazmit izolasyonu sonucunda; 15 izolattan 7'sinin (B3, B9, B15, B16, B17, B19, B20) bir veya birden fazla plazmit taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 6).



Şekil 6. Bacillus izolatlarından elde edilen plazmitlerin agaroz jel görüntüsü.

3.10. Bacillus İzolatlarının Aktarılabilir Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençleri

İzole edilen plazmitler *Bacillus subtilis* W168'e transformasyon tekniği ile aktarılmıştır. Yapılan transformasyon deneyi sonucunda; B15 ve B16 izolatlarından elde edilen plazmitlerin, transformant olarak ampisilin içeren petrielerde büyüdüğü tespit edilmiştir. Transformant B15 ve B16 hücrelerinde yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre; yaban tip B15'den izole edilen plazmitler üzerinde oksasilin, tetrasiklin, metisilin, vankomisin, trimethoprim sülfametaksazol, amokasilin, sefalotin, tobramisın, rifampisin, kanamisin, ampisilin direnç genlerinin bulunduğu ve bu genlerin transformasyon ile *B. subtilis* W168 hücresine aktarıldığı tespit edilmiştir (Tablo 13).

Yaban tip B16'dan izole edilen plazmitler üzerinde ise oksasilin, metisilin, trimethoprim sülfametaksazol, amokasilin, sefalotin, rifampisin, ampisilin direnç genlerinin bulunduğu ve bu genlerin transformasyon ile *B. subtilis* W168 hücresine aktarıldığı tespit edilmiştir (Tablo 13).

Transformasyon deneyinde kullanılan *B. subtilis* W168 hücresinin ise optakin, basitrasın ve klindamisın antibiyotiklerine karşı doğal dirençli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).

Tablo 13. Transformat hücrelerin antibiyotik direnç profilleri.

Yaban tip	Yaban Tipin Antibiyotik Profili	Transformant	Transformat Antibiyotik Profili
B15	Amp, Me, B, Cld, Kf, Tob, Ax, Sxt, Te, Va, Ox, Op, Rf, K	<i>Bacillus subtilis</i> W168 (B15)	Amp, Me, Kf, Tob, Ax, Sxt, Te, Va, Ox, Rf, K
B16	Amp, Me, B, Cld, Kf, Ax, Sxt, Ox, Op, Rf	<i>Bacillus subtilis</i> W168 (B16)	Amp, Me, Kf, Ax, Sxt, Ox, Rf
W168	B, Cld, Op		

Amp: Ampisilin, Me: Metisilin, B: Basitrasin, Cld: Klindamisin, Kf: Sefalotin, Tob: Tobramisin, Ax: Amoksasilin, Sxt: Trimethoprim Sülfametaksazol, Te: Tetrasiklin, Va: Vankomisin, Ox: Oksasilin, Op: Optakin, Rf: Rifampisin, K: Kanamisin

Yapılan transformasyon deneyleri sonucunda yaban tip B15 ve B16 izolatlarından izole edilen plazmitlerin Krom (CrCl_3), Çinko (ZnSO_4), Demir ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), Kadmiyum ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) ve Nikel (NiCl_2) metallerine karşı direnç oluşumunu sağlayan genleri taşıdığı ve W168 hücresine aktarılan bu plazmitlerin hücreyi ağır metallere karşı dirençli duruma getirdiği tespit edilmiştir (Tablo 14).

Tablo 14. Transformat ve yaban tip hücrelerin ağır metal direnç profilleri ($\mu\text{g/mL}$).

	Yaban Tip		Kontrol	Transformat	
	B15	B16	W168	B15	B16
CuSO_4	1500	1500	100	100	100
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	3000	2500	1000	1000	1000
CoCl_2	100	250	100	100	100
CrCl_3	1000	1000	100	1000	1000
ZnSO_4	500	500	100	500	500
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	1000	1000	100	1000	1000
HgCl_2	25	25	0	0	0
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$	500	500	25	500	500
MnCl_2	1000	1000	1000	1000	1000
NiCl_2	1000	2000	100	1000	2000

3.11. Gram Pozitif Bakterilerden Bakteriyosin Özelliğinin Taranması

Rize ilinden belirli lokalizasyonlardan alınan toprak örneklerinden 15 adet gram pozitif basil izole edilmiştir. Yapılan Gram ve Spor boyama deneyi ile bu bakterilerin Gram pozitif, spor oluşturabilen basil şeklinde bakteriler olduğu gözlemlenmiştir. Bu gram pozitif bakterilerden bakteriyosin özelliğini taramak için tüm izolatlar MHB besiyerinde

bir gece kültüre edilmiş ve süpernatant kısımları santrifüj yardımı ile elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu süpernatant kısımlar diğer bakteriler üzerinde bakteriyosin etkisinin olup olmadığı agar damlatma yöntemi ile tespit edilmiştir. Steril serum fizyoloji içerisinde 0,5 MacFarland bulanıklıkta hazırlanan hücre süspansiyonları MHA besiyeri üzerine steril eküvyon çubukları ile homojen bir şekilde yayılmış ve süpernatant kısımlar bu petri yüzeylerine damlatılarak inkübasyona bırakılmıştır. Oluşan zon çapları incelenerek bakteriyosin aktivitesinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Yapılan apraz deney sonucunda B13 izolatının nerdeyse tüm izolatların büyümesini inhibe ettiği görülmüştür (Tablo 15). Bunun yanı sıra B17 izolatının en hassas izolat olduğu ve en fazla sekonder metabolitlerden etkilendiği tespit edilmiş ve B17 nolu izolat en hassas organizma olarak seçilmiş ve bundan sonraki deneylerde B13 izolatının bakteriyosin karakterizasyonları B17 izolatı üzerinde gerçekleştirilerek yapılmıştır.

Yapılan morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler karakterizasyon deneyleri sonucunda, B13 izolatı tür seviyesinde *Bacillus amyloliquefaciens* olarak, B17 izolatı ise *Bacillus cereus* olarak tanımlanmıştır.

Tablo 15. Gram-pozitif basillerden bakteriyosin aktivitesinin belirlenmesi.

Lizat	Konak Hücre															
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B9	B12	B13	B15	B16	B17	B19	B20	
B1	■															
B2	+	■														
B3	+		■													
B4	+	+		■												
B5		+			■											
B6						■										
B7	+						■									
B9								■								
B12	+					+	+	+	■							
B13	+++	++	+++	++	++		+++	++	++	■						
B15											■					
B16												■				
B17													■			
B19														■		
B20															■	

+: 5 mm, ++: 7 mm, +++: >10 mm

3.12. En iyi Bakteriyosin Aktivitesinin Belirlenmesi

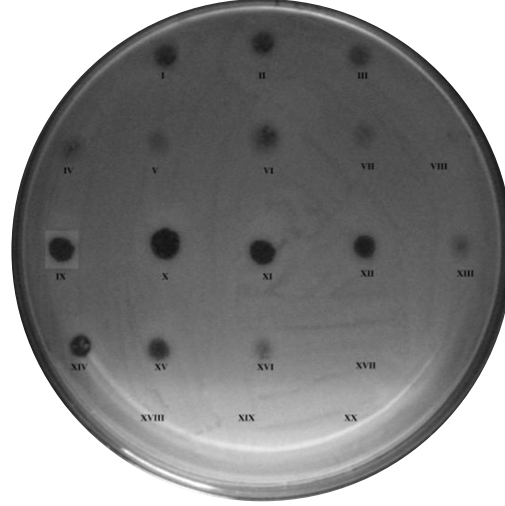
Bakteriyosin aktivitesi olduğu tespit edilen *B. amyloliquefaciens* B13 izolatının en iyi bakteriyosin aktivitesinin hangi koşullarda oluşturduğunu bulmak için, B13 izolatı MHB (Müller Hilton Broth), BHI besiyeri (Brain Heart Infusion), TSB besiyeri (Tryptic Soy Broth) ve NB (Nutrient Broth) besiyerlerinde 16, 24, 36 ve 48 s çalkalamalı inkübatörde inkübasyona bırakılmıştır. Belirlenen saatler sonunda kültürlerden 1mL alınarak santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısımlar elde edilmiş ve B13 izolatın hangi besiyerinde en iyi bakteriyosin ürettiği ve optimum bakteriyosin aktivitesi tespit edilmiştir. En hassas izolat olarak seçilen B17 izolatı steril serum fizyoloji içerisinde 0,5 MacFarland bulanıklığa ayarlanıp, MHA besiyerine homojen olarak yayılmış ve kuruması beklenmiştir. B17 izolatının üzerine belirli saat aralıklarında alınan farklı besiyeri ortamlarındaki CFS (Cell Free Süpernatant)'ler damlatılmıştır. Petri kapları 35°C'de bir gece inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyondan sonra petri yüzeyinde oluşan inhibisyon zonları ölçülerek optimum bakteriyosin üretim koşulları tespit edilmiştir (Tablo 16).

Oluşan zon çapları ölçüldüğünde en iyi bakteriyosin aktivitesinin MHB besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda oluştuğu gözlemlenmiştir (Tablo 16, Şekil 7). Projemizin bundan sonraki deneylerinde bu koşullar uygulanarak deneyler gerçekleştirilmiştir.

Tablo 16. En iyi bakteriyosin aktivitesinin görüldüğü koşullar.

Besiyeri	Saat	Zon çapı (mm)
BHI	16	5
	24	5
	36	2
	48	-
	Kontrol*	-
TSB	16	-
	24	4
	36	2
	48	-
	Kontrol*	-
MHB	16	14
	24	22
	36	15
	48	15
	Kontrol*	-
NB	16	2
	24	5
	36	3
	48	2
	Kontrol*	-

* Kontroller sadece besiyerlerinden oluşmaktadır.



Şekil 7. Agar damlatma metodu ile optimum bakteriyosin aktivitesinin tespiti.

I: BHI-16s, II: BHI-24a, III: BHI-36s, IV: BHI-48s, V: TSB-16s, VI: TSB-24s, VII: TSB-36s, VIII: TSB-48s, IX: MHB-16s, X: MHB-24s, XI: MHB-36s, XII: MHB-48s, XIII: NB-16s, XIV: NB-24s, XV: NB-36s, XVI: NB-48s, XVII: BHI-Kontrol, XVIII: TSB- Kontrol, XIX: MHB-Kontrol, XX: NB-Kontrol

3.13. B13 Bakteriyosinin Antimikrobiyal Etki Spektrumu

B13 bakteriyosinin antimikrobiyal etki spektrumunu belirlemek için 8 indikatör bakteri ve 3 indikatör maya kullanılmıştır. Agar kuyucuk yöntemi ile yapılan deney sonucunda B13 bakteriyosinin *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenesis* bakterileri ve *Candida tropicalis* ve *Candida albicans* mayaları üzerinde antimikrobiyal ve antifungal etki gösterdiği tespit edilmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. B13 bakteriyosinin antimikrobiyal etki spektrumu.

İndikatör Organizma	İnhibisyon zonu (mm)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ATCC 709	-
<i>Bacillus cereus</i> Roma 709	20
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	15
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	17
<i>Pseudomonas auroginosa</i> ATCC 43288	-
<i>Klebsiella pneumonia</i> ATCC 13883	-
<i>Listeria monocytogenesis</i> ATCC 43251	9
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	13
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	13
<i>Saccharomyces cerevisia</i> ATCC 96581	-

3.14. B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Sıcaklığın Etkisi

B13 bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek için CFS'ler 30, 45, 60 ve 95 °C'de 30 dk ve 2 s inkübe edilmiş, aynı zamanda 121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır. Kontrol olarak ise ısıya maruz bırakılmamış CFS'ler kullanılmıştır. Yapılan deney sonucunda 30 dk sonunda bakteriyosin aktivitesinde önemli bir azalmanın olmadığı, 2 s inkübasyonda ise 60°C'de belirli azalma gözlenirken 90°C'de ise hiç aktivitenin kalmadığı gözlemlenmiştir. Aynı şekilde 120°C'de 20 dk sonrasında da aktivitenin olmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 18).

Tablo 18. Bakteriyosin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

Uygulanan sıcaklık (°C)	İnhibisyon zonu (mm)	
	30 dk	2 s
30	21	20
45	18	15
60	18	10
90	16	-
Otoklav*	-	-
Kontrol B13	22	22

*1 atm basınç 121°C 20dk

3.15. B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Enzimlerin Etkisi

B13 bakteriyosin aktivitesi üzerine çeşitli enzimlerin etkisini denemek amacıyla CFS'ler proteinaz K, lizozim, tripsin, lipaz ve katalaz enzimleriyle, son konsantrasyonları 0,5 mg/ mL ve 5 mg/mL olacak şekilde karıştırılmış ve 37 °C de 1 s inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında ısı ile inaktive edilen enzimler ve kontrol olarak ise enzim ve tamponlar kullanılarak deney gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda 0,5 mg/mL konsantrasyonlardaki enzimlerin bakteriyosin aktivitesini azalttığı, 5 mg/mL konsantrasyondaki enzimlerin ise aktiviteyi tamamen yok ettiği tespit edilmiştir (Tablo 19). Kontrolde ise yalnız başına enzim ve tamponların B17 bakterisinin üremesi üzerine herhangi bir etki göstermediği tespit edilerek deneyin doğruluğu tespit edilmiştir.

Tablo 19. Bakteriyosin aktivitesi üzerine enzimlerin etkisi.

Enzimler	İnhibisyon zonu (mm)	
	0,5mg/mL	5mg/mL
Proteinaz K	12	-
Lizozim	9	-
Tripsin	12	-
Lipaz	12	-
Katalaz	12	-

3.16. B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine pH'nın Etkisi

B13 bakteriyosinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi incelemek için B13 bakteriyosini içeren süpernatant kısmının (CFS kısımları) pH'sı 3–11 arasında birer kademe artırılarak 2 s oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra CFS'lerin

pH'ları yeniden 7,0'a ayarlandı ve pH'ın bakteriyosin aktivitesi üzerine etkisi tespit edilmiştir. Yapılan inceleme sonucunda bakteriyosin aktivitesinin asidik pH'dan bazik pH'ya göre daha az etkilendiği belirlenmiştir. pH 3'ten 7'e doğru gittikçe bakteriyosin aktivitesinde de artmanın olduğu, optimum aktivitenin ise pH 7,0'da olduğu tespit edilmiştir. pH'nın 7,0'dan bazığe doğru ilerledikçe ise aktivitenin azaldığı, pH10 ve pH11' de ise hiç aktivitenin olmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 20). Kontrol olarak ise pH'ları ayarlanmış besiyeri ortamı kullanılmıştır.

Tablo 20. B13 Bakteriyosin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

pH'nın etkisi (oda sıcaklığında)	İnhibisyon zonu (mm) 2 saat
3.0	5
4.0	10
5.0	12
6.0	18
7.0	21
8.0	17
9.0	5
10.0	-
11.0	-

3.17. B13 Bakteriyosin Aktivitesi Üzerine Organik Çözücülerin/Deterjanların Etkisi

B13 bakteriyosin aktivitesinin üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi incelemek için organik çözücülerden formaldehit, kloroform, aseton, propanol, metanol, etil alkol, hekzan, etil eter, deterjanlardan ise Tween 80 ve Triton X-100 son konsantrasyonda % 10'luk olacak şekilde hazırlanmış ve B18 bakterisi üzerine aktivitesine bakılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda formaldehit, kloroform, aseton, propanol, methanol, tween-80 ve triton X-100'ün bakteriyosin aktivitesini bozduğu tespit edilmiştir. Etil alkol, hekzan ve etil eter'in ise bakteriyosin aktivitesini az miktarda etkilediği tespit edilmiştir (Tablo 21).

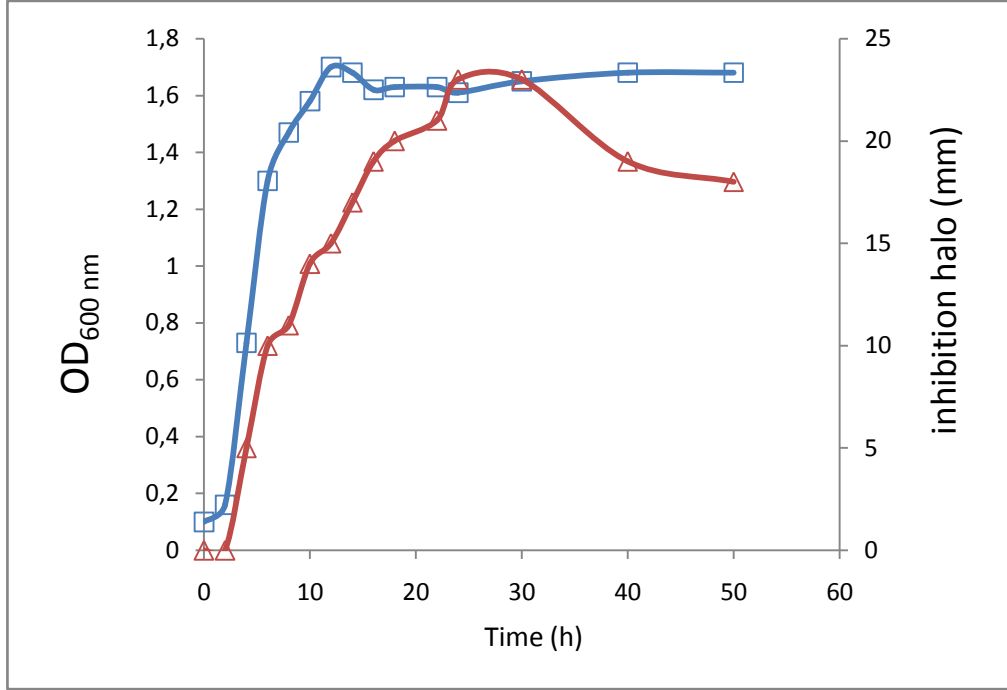
Tablo 21. B13 Bakteriyosin aktivitesi üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi.

Organik Çözücüler/Deterjanlar	İnhibisyon zonu (mm) % 10 (vol/vol)
Etil Alkol	15
Hekzan	15
Etil Eter	10
Formaldehit	-
Kloroform	-
Aseton	-
Propanol	-
Methanol	-
Tween-80	-
Triton x-100	-

3.18. *Bacillus amyloliquefaciens* B13 İzolatının Büyüme Eğrisinin ve Bakteriyosin Üretim Evrelerinin Belirlenmesi

Bacillus amyloliquefaciens hücresi bakteriyel büyüme evresinin ve büyüme periyodu içerisinde bakteriyosin üretim evrelerinin belirlenmesi amacı ile MHB besiyerinde bir gecelik kültürden 600 nm’de OD 0,1 olacak şekilde yeniden inokülasyonu sağlanmış ve 35°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübasyona taabi tutulmuştur. İnkübasyon süresince belirli zaman aralıklarında alınan örnekler ile hem absorbans ölçümleri hem de bakteriyosin içeriği belirlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Yapılan deney sonucunda *Bacillus amyloliquefaciens* B13 izolatının 10 saatlik süre zarfında logaritmik büyüme fazının sonuna geldiği ve durgun faza giriş yaptığı tespit edilmiştir. Bakteriyosin üretimi logaritmik fazla birlikte artmış ve durgun fazda maksimum seviyeye çıkmıştır. *Bacillus amyloliquefaciens* B13 izolatı için maksimum bakteriyosin üretimi 24–30. saatler arasında olmuştur (Şekil 8). Durgun faz ilerledikçe bakteriyosin aktivitesinde azalma meydana gelmiştir.

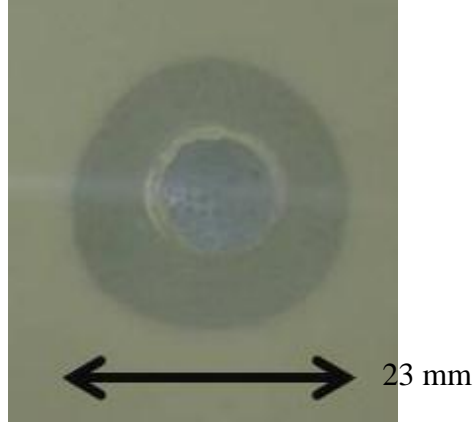


Şekil 8. MHB besiyerinde 35°C’de *Bacillus amyloliquefaciens*’in büyüme eğrisi ve antimikrobiyal aktivitesi.

□: Büyüme eğrisi, Δ: Antimikrobiyal aktivitesi.

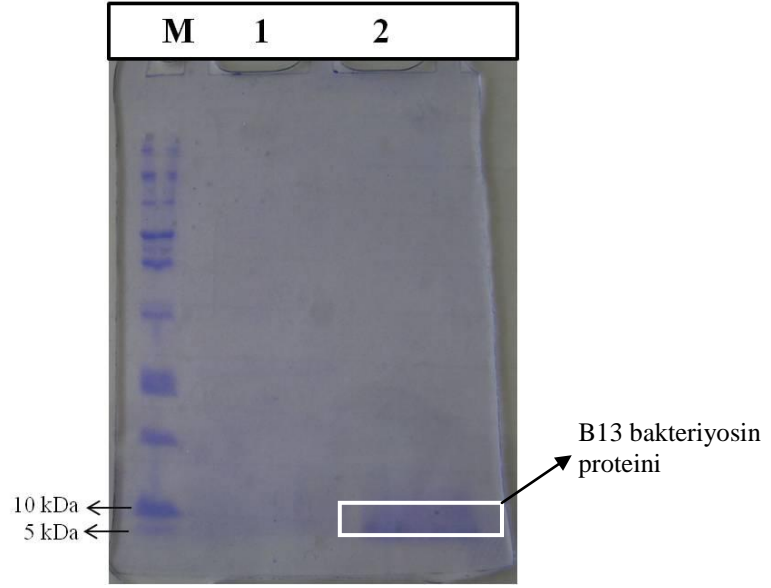
3.19. B13 Bakteriyosinin Kısmi Saflaştırılması ve Moleküler Büyüklüğünün Tespiti

Bacillus amyloliquefaciens B13 bakteriyosinin kısmi saflaştırılması % 70 amonyum sülfat çöktürülmesi ile gerçekleştirilmiştir. Çöktürme işlemi sonucunda protein çökelti 20 mM fosfat tamponu içerisinde çözülmüş ve aynı tampon içerisinde bir gece diyaliz edilmiştir. Diyaliz işleminden sonra elde edilen bakteriyosin aktivitesi B17 izolatu üzerine agar kuyucuk yöntemi ile test edilmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Amonyum sülfat çöktürmesi sonrasında görülen B13 bakteriyosin aktivitesi.

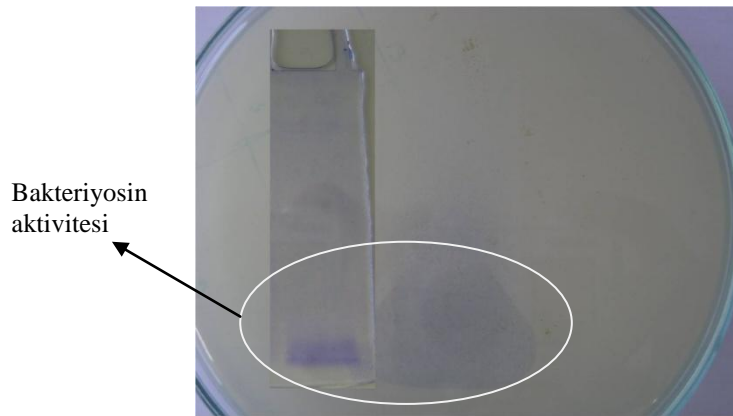
Aktivitenin görülmesinden sonra kısmi olarak saflaştırılan B13 bakteriyosini SDS-PAGE jeline yüklenmiş ve elektroforez işlemine taabi tutulmuştur. Jele örnekler iki kopya halinde yüklenmiş ve bir kopyanın başına protein markır ilave edilmiştir. Elektroforez işleminden sonra jel ikiye kesilmiş ve protein markırın olduğu kısım Coomassi Brilliant Blue ile boyanarak protein bantları gözlemlenmiştir (Şekil 10). Yapılan boyama işlemi sonucunda, jelde yaklaşık olarak 5 kDa ağırlığında bir proteinin yoğunlaştığı tespit edilmiştir. Bu protein bandının B13 bakteriyosin proteini olduğu düşünülmüş ve direkt olarak jel aktivite deneyi yapılarak doğrulanmaya çalışılmıştır.



Şekil 10. B13 bakteriyosinin SDS-PAGE jelinde görüntülenmesi.

M: Markır (Fermentas, Page Ruler TM Unstained Board Range Protein Ladder), 1: CFS kısım, 2: Amonyum sülfat çöktürülmesinden sonra diyaliz edilmiş B13 bakteriyosin proteini.

Elektrofoz işleminden sonra kesilen jelin diğer kısmı ise MHA içeren petri kabının üzerine koyulmuş ve üzeri indikatör (B17) organizmanın bulunduğu yumuşak agar ile kaplanmıştır. İnkübasyon sonucunda agar yüzeyinde yaklaşık 5kDa proteinin olduğu hizada bir inhibisyon zonu oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 11). Bu sonuçlar neticesinde *Bacillus amyloliquefaciens* 13 izolatının sahip olduğu bakteriyosinin yaklaşık olarak 5 kDa ağırlığında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 11. B13 bakteriyosininin agar aktivitesi.

4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

4.1. Topraktan İzole Edilen Gram-pozitif Basillerin İdentifikasyonu

Bu çalışma Rize bölgesindeki topraklarda bulunan Gram pozitif basillerin identifikasyonunun, ekstrasellüler enzim aktivetelerinin, antibiyotik ve ağır metal dirençlerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada izole edilen 15 bakteri türünün *Bacillus* cinsine ait olduğu ortaya çıkarılmıştır. *Bacillus* cinsi büyük bir grup olup, Gram-pozitif, aerobik, endospor oluşturan çubuk şekilli bakterilerin heterojen bir grubunu içine almaktadır. Cins içerisinde büyük oranda fenotipik çeşitlilik ortaya çıkarılmış olup, tür içerisinde veya türler arasında önemli miktarda fenotipik farklılıklar ortaya çıkarılmıştır. Genelde *Bacillus* cinsine ait olan türler Gram pozitif olarak boyanır ve spor yapısı gözlenir. Ancak sporlanma özelliğinin *Bacillus* türlerinde çok çabuk kaybolabildiği bilinmektedir (Sneath, 1986; Claus ve Fatz, 1989; Gordon, 1981). Yapılan çalışmada elde edilen izolatların hepsi aerobik, Gram-pozitif, basil morfolojisine sahip ve çoğu hareketli bakteriler olarak tespit edilmiştir. Yapılan spor boyama deneyleri sonucunda izolatların tümünün spor oluşturduğu ve sporların merkezi ve terminal olarak hücre içinde konumlandığı gözlenmiştir (Tablo 4).

Bacillus türleri katalaz ve asit üretirler ama gaz oluşturmazlar. Bütün türleri Nutrient Agar, Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion ve Kanlı Agar gibi besiyerlerinde oldukça iyi ürerler. Karbon kaynağı olarak organik asit, şeker ve alkol içeren; nitrojen kaynağı olarak da amonyum bulunduran sentetik ortamlarda çok iyi gelişirler (Bonwart, 1989). Elde edilen izolatların bazı biyokimyasal ve büyüme özellikleri bakımından birbirlerine göre farklılıklar göstermiş ve bazı özellikler bakımından mevcut olan *Bacillus* türlerinden ayrıldıkları tespit edilmiştir. İzolatlarının tamamının katalaz testi sonucunun pozitif olduğu ve KIA besiyerinde gaz oluşturmadıkları gözlenmiştir (Tablo 5).

Bacillus cinsine ait türler genellikle 30-37 °C sıcaklıkta ve pH 6,7- 7,0 aralığında optimum üreme özelliği gösterirler (Taubman, 1992). Yapılan çalışmada *Bacillus* cinsine ait türlerin optimum üreme sıcaklık aralığı 30-45 °C ve pH 5-9, NaCl tolerans değeri aralıkları % 3-7 olarak belirlenmiştir. Bu aralıklarda izolatların tümünün ürettiği görülmüştür. NaCl konsantrasyonu % 15-20 düzeylerine çıkarıldığında ise her hangi bir üreme gözlenmemiştir (Tablo 6).

Bacillus'lar topraktan, toprağın üst kısmındaki emilmemiş yağmur sularından, çöplerden, enfekte olmuş bitki materyallerinde olmak üzere çevreden kolaylıkla izole edilebilirler. Sporlarının çevre şartlarına olağanüstü dirençli olmaları ve dormansilerinden dolayı her habitatta uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahiptirler (İnce Yılmaz, 2003). Çalışmamızda kullanılan; 7 izolat *B. pumilis*, *B. mojavensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. amyloliquifaciens* tür düzeyinde, 8 izolat ise *Bacillus* sp. olmak üzere cins seviyesinde izole edilmiştir (Tablo 8).

4.2. *Bacillus* İzolatlarının Ekstrasellüler Enzim İçerikleri

Endüstriyel olarak kullanılan enzimlerin çoğu mikrobiyal kökenlidir. Günümüzde mikrobiyal enzimlerin çoğu, önemli araştırma konusu olmuştur, dünyanın hemen her yerinde üretilmeye devam edilmekte, sanayi ve endüstri alanında kullanılmaktadır. Endüstri alanında kullanılan pek çok mikrobiyal enzimin *Bacillus* cinsine ait türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir (Kalisz, 1988). Gram pozitif organizmalar arasında amilaz, selülaz ve antibiyotik üretme yeteneği oldukça yaygındır. Özellikle *Bacillus stearothermophilus*, *Zymomonas mobilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* ve *Thermoactinomyces* sp. bu özelliğe sahip organizmalardır (Smith vd., 1986). İzolatlarda yapılan testlerde ekstrasellüler enzim aktivitesinin amilaz için % 87, proteaz için % 93, selülaz için % 87 pozitif olduğu görülmüştür. Lipaz enzimi varlığı ise % 13'de kalmıştır. Yapılan bu testlerde Lipaz enzimi üretiminin pozitif olduğu B6 ve B13 izolatlarının, amilaz, protez ve selülaz içinde pozitif sonuç gösterdiği görülmüştür (Tablo 9). *Bacillus* cinsi üyelerinin salgıladıkları ve dış ortama verdikleri çeşitli enzimlerinin endüstriyel öneme sahip olduğu daha önce yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Ito, 1997; Mawadza vd., 2000).

4.3. *Bacillus* İzolatlarının Antibiyotik ve Ağır Metal Direnç Profilleri ve Bu Direncin Aktarılabirliği

Antibiyotik duyarlılık testlerinde izole edilen tüm bakteriler basitrasin, optokin ve klindamisin antibiyotiklerine karşı dirençli bulunmuştur (Tablo 10). Bazı *Bacillus* türleri basitrasin, polimiksin ve subtilin gibi peptid antibiyotikleri üreterek çeşitli mikroorganizmaların üremesini engellerken, kendilerini bu antibiyotiklere karşı koruma

mekanizmalarını geliştirirler. Basitrasin, *Bacillus subtilis* Tracy 1 suşu ve *B. licheniformis* tarafından üretilir ve peptidoglikanın sentezini inhibe ederek etkili olur. (Ohki vd., 2003). Optokin pnemokokların tedavisinde etkin kullanılan bir antibiyotik olup, diğer α -hemolitik suşlarda etkili değildir (URL-4). Klindamisin antibiyotiği ise daha çok anaerobik bakteri enfeksiyonlarında ve bazı protozoa enfeksiyonlarında etkili olan bir antibiyotiktir (URL-5).

Çalışmada ampisiline ve sefalotine direnç oranı % 40, oksasiline direnç % 47, metisiline direnç oranı % 53, amoksisiline direnç oranı % 80 olarak tespit edilmiştir (Tablo 11). Penisilin türevi antibiyotikler ve ampisilin hücre duvar sentezinin inhibe eden antibiyotikler olup dünya çapında tüketilen antibiyotiklerin % 50'sinden fazlasını bu grup antibiyotikler oluşturmaktadır. Bu grup antibiyotiklere karşı oluşan direnç genellikle transfer edilebilir direnç plazmitleri (R-plazmit) üzerinde bulunmakta ve bu da direncin aynı tür veya farklı mikroorganizmalar arasında hızlıca yayılmasına sebep olmaktadır (Nwosu, 2001).

Çalışmada aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisin, kanamisin, neomisin, tobramisin, streptomisin, glikopeptidlerden vankomisin kullanılmıştır. Bu antibiyotiklerden neomisin, streptomisin ve gentamisine karşı hiçbir suşta direnç bulunamamıştır. Banerjee vd., (2004) tarafından yapılan çalışmada da aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı düşük oranda direnç belirlenirken, vankomisine direnç belirlenememiştir.

Kloramfenikole karşı direnç, kloramfenikol asetiltransferaz enziminin varlığı sonucu görülmektedir. Gram pozitif ve negatif bakterilerde bu enzimin sentezlenmesi genellikle plazmid, bazen de kromozomal kontrol ile gözlenmektedir (Öztürk, 1997). Yapılan çalışmada kloramfenikole karşı direnç belirlenememiştir.

Çalışmada kullanılan makrolid grubu antibiyotiklerden olan eritromisine direnç belirlenememiştir. Kinolon grubu antibiyotiklerden siproflaksasin, norfloksasin ve novabiosine karşı direnç belirlenemezken, rifampisine karşı % 53 gibi yüksek bir direnç oranı belirlenmiştir.

Çalışmada sulfonamid grubu antibiyotiklerden trimethoprim/sülfometakzasol ve tetrasikline karşı % 27 ve % 13 gibi bir direnç oranı belirlenmiştir (Tablo 11).

Aslım vd., (2002) tarafından topraktan izole edilen 30 adet *Bacillus*'u çoktan aza doğru sırasıyla *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* ve *Bacillus* sp. olarak tanımlamışlar ve gentamisin, sulbaktam-ampisilin,

kloramfenikol, eritromisin, tetrasiklin, vankomisin, sefalotin, penisilin G'ye karşı antibiyotik duyarlılıklarına bakmışlardır. Tüm suşların penisiline dirençli, vankomisine duyarlı, suşların %76'sının ampisiline, %20'sinin eritromisine, %3'ünün kloramfenikole ve %7'sinin tetrasikline karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Ağır metal iyonları taşıdıkları teknolojik önem nedeniyle çeşitli endüstrilerde yaygın olarak kullanılmakta ve bu endüstrilerden gelen atık sular kalıcı toksik etkiye sahip ağır metal iyonlarını önemli miktarlarda içermektedirler (Norberg ve Persson, 1984; Wehrheim ve Wettern, 1994; Bhide vd., 1996). Çalışmanın bu kısmında ülkemiz endüstrisinde sıklıkla kullanılan ve bu nedenden dolayı gerek toprak ve gerekse atıksularda bol miktarda bulunan ağır metallere karşı *Bacillus*'ların direnç profilleri incelenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda endüstride oldukça sıklıkla kullanılan bakır, krom ve demir gibi metallere karşı yüksek oranda direnç tespit edilmiştir. Bu sonuç bize göstermektedir ki mikroorganizmalar olumsuz şartlara kuvvetli bir biçimde adaptasyon sağlamaktadırlar.

4.4. *Bacillus* İzolatlarının Bakteriyosin İçeriği

Bakteriyel izolatların antimikrobiyal aktiviteleri araştırılırken pek çok farklı metot kullanılmaktadır. Bu metotlar arasında, agar ortamında yapılanlara örnek olarak, damlatma testi ve kuyucuk testi (Hernandez vd., 2005), agar disk difüzyon yöntemi (Motta ve Brandelli, 2002), ve üçlü agar tabakası (Todorov, 2000) yöntemleri verilebilir. Yaptığımız bu çalışmada topraktan izole edilen Gram-pozitif bakterilerin ürettikleri bakteriyosin aktivitesi ilk olarak agar damlatma yöntemi ile belirlenmiştir. *B. amyloliquefaciens* B13 izolatının etkin bakteriyosin ürettiği tespit edildikten sonra diğer tüm aşamalardaki bakteriyosin etkisi agar kuyucuk yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Bakteriyosinler, bakteriler tarafından doğrudan ribozomal olarak sentezlenen, ekstraselüler peptid veya proteinlerdir ve genelde üretici organizmaya yakın akraba türlere karşı antibakteriyal aktivite gösterirler. Örneğin, Gram pozitif bakterilerin ürettiği bakteriyosinlerin büyük bir kısmı, daha çok Gram pozitif bakteriler üzerine etkilidir. Bununla birlikte hem Gram pozitif, hem de Gram negatif temsilcilerin gelişimini engelleyen bakteriyosinler de bulunmaktadır (Tablo 15) (De Vuyst ve Vandamme, 1992; Riley ve Wertz, 2002b). B13 bakteriyosinin antimikrobiyal etki spektrumu incelendiğinde genel olarak gram-pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğu gram-negatif

organizmaları ise etkilemediği tespit edilmiştir. Aynı zamanda B13 bakteriyosininin antifungal aktiviteye de sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 17).

Bütün mikroorganizmaların hayati aktivitelerini devam ettirdikleri üç çeşit sıcaklık vardır; minimum, optimum ve maksimum. En düşük ve en yüksek sıcaklık dereceleri arasındaki aralık çoğalma aralığıdır. Sıcaklık isteklerine göre mikroorganizmalar; psikrofil (soğucu seven), mezofil (orta derece sıcaklığı seven) ve termofil (sıcacı seven) olarak üç gruba ayrılır. Termofillerin çoğu *Actinomyces* ve *Bacillus* cinslerindedir. Az miktarda termofil küf mantarı da vardır. *Bacillus stearothermophilus* ve *Bacillus coagulans* vb. bakteriler sıcaklığa dayanıklı sporlarından dolayı konserve endüstrisinde önemli bir yere sahiptirler (Özşahin, 2006). B13 bakteriyosini 30 dk da 30°C, 45°C, 60°C ve 90°C da aktivite gösterirken, 2 s ısıtma işleme koşullarında ise inhibitör aktivitede azalma gözlenmiştir. 90°C da hiçbir aktivite görülmemiştir. Yüksek derecelerde uygulanan ısıtma işleme dayanıklı olması bu proteinin yapısından kaynaklandığı ve söz konusu bakteriyosinin yapısında ikincil ve üçüncül yapıların olmadığını, daha çok globüler yapıda olduğunu ortaya koymaktadır (Tablo 18).

B13 bakteriyosin aktivitesi üzerinde enzimlerin etkisini denemek amacıyla CFS'ler proteinaz K, lizozim, tripsin, lipaz ve katalaz enzimleri kullanılmıştır. Bu enzimler farklı konsantrasyonlarda kullanılarak oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. B13 bakteriyosini 0,5 mg/mL son hacim konsantrasyondaki enzimler ile muamele edildiğinde, antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Fakat son hacimdeki konsantrasyon 5 mg/mL'ye çıkarıldığında antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Bu sonuçlar B13 tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin, farklı konsantrasyondaki enzimler uygulamasından etkilendiğini ve aktivitesini kaybettiğini göstermiştir. Bakteriyosin aktivitesinin lipazdan etkilenmesi, bakteriyosinin aktivitesinde karbonhidrat ve lipid bileşenlerinin etkisi olduğunu; katalazdan etkilenmesi, inhibitör aktivitesinin H₂O₂'den kaynaklandığını göstermektedir. Üretilen antimikrobiyal maddenin protein doğasında olup olmadığı, uygulanan enzim aktivitelerince belirlenmiştir. Bakteriyosin aktivitesinin proteolitik enzimlerden tripsin, proteinaz K ile muamelesinden sonra kaybetmesi, bu molekülün protein tabiatında olduğunu ortaya koymaktadır. Bazı karbonhidrat veya lipid yan grupları da içerebilmelerine rağmen, bakteriyosinlerin tümünde antibakteriyel etkinlik ana protein yapıdan kaynaklanmaktadır (Tablo 19) (Dobrzanski vd., 1982; Van Belkum vd., 1989; Jimenez-Diaz vd., 1990; Piard vd., 1990; Dieye vd., 2001).

Topraktan izole edilen *B. amyloliquefaciens* B13 bakteriyosinin üzerine pH'nin etkisi incelendiğinde, asidik ortamda bakteriyosin aktivitesinin düşük olduğu pH 7'ye yaklaştıkça aktivitenin maksimum seviyeye çıktığı, fakat ortamın pH'sı 10 olduğunda herhangi bir aktivitenin kalmadığı tespit edilmiştir. Bakteriyosinler üzerine yapılan birçok çalışmada aynı sonuçlar gözlemlenmektedir. Çoğunlukla bakteriyosinler asidik ortamlarda düşük aktiviteye sahip iken, pH değeri 9 ve üzerine çıktığı zaman aktivitede büyük düşüş veya tamamen bozulma görülmüştür (Tablo 20) (Lisboa vd., 2006; Naclerio vd., 1993; Bizani ve Bradelli, 2002).

Bakteriyosin aktivitesi üzerinde deterjanların etkisi, aktif molekülün yapısı hakkında bilgi vermektedir. Organik deterjanların proteinlerin doğal yapılarındaki hidrofobik merkezle kompleks oluşturarak, proteinin açılmasına ve üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Deterjan uygulaması ile bakteriyosin aktivitesinde bir kayıp meydana gelmesi bakteriyosinin kısmi denatürasyonu yada aktivitesi üzerinde stabilizasyon etkisi olan diğer moleküllerle birlikteliğinin bozulmasından kaynaklanmaktadır (Ivanova vd., 1998). Bundan yola çıkarak çalıştığımız Gram-pozitif basillerin bakteriyosin proteininin üç boyutlu yapısını bozan kimyasallar farklılık göstermektedir. Etil alkol, hekzan ve etil eterin bakterilerde olumsuz bir etki göstermeyişindeki sebep, hidrofobik merkezlerine etki edememiş olmasıdır (Tablo 21).

Bakteriyosinlerin üretimi genelde, bakteriyel gelişimle yakından ilgilidir. Çünkü bakteriyosinler sadece üretici organizmanın gelişimi sırasında sentezlenirler. Bakteriyosin aktiviteleri, gelişme fazının sonunda, proteazların degradasyonundan dolayı azalmaktadır (Kim vd., 2006). B13 bakteriyosini için yapılan bakteriyel büyüme grafiği ve bakteriyosin üretim safhalarının belirlenmesi deneyinde, B13 bakteriyosinin bakteriyel büyüme safhasındaki logaritmik fazla beraber artmaya başladığı ve maksimum seviyeye durgun fazda geldiği tespit edilmiştir. Durgun fazın sonuna doğru bakteriyosin aktivitesinde bir düşüş olduğu görülmüştür. Bu da proteaz degradasyonundan dolayı olduğu düşünülmüştür.

Amonyum sülfat (% 70) çöktürme esasına göre kısmi saflaştırması yapılan *B. amyloliquefaciens* B13 bakteriyosinlerinin sodyum dodezil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) sistemi kullanılarak yapılan analizleri sonucu; moleküler büyüklüğü yaklaşık 6 kDa olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda belirlenen izolataın ürettiği bakteriyosinin moleküler büyüklüğü,

literatür bulgularında bu tür için tanımlanan moleküler büyüklüklerle uyumlu bulunmuştur (Lisboa vd., 2006). Bakteriyosinlerin bazı tiplerinde görülen üreme ortamlarında dimer, trimer ya da tetramer oluşturma özellikleri (Anastasiadou vd., 2008; Millette vd., 2007) SDS-PAGE sistemlerinde doğru moleküler büyüklüklerin saptanmasında sorunlara yol açmaktadır. Diğer yandan izolasyon yöntemine bağlı olarak yaygın bir şekilde ortaya çıkan bakteriyosin yan gruplarının kaybı da, elektroforetik sistemlerde kesin moleküler büyüklük tanısını güçleştirmektedir. Bu nedenle SDS-PAGE sistemlerinde gerçekleştirilen ön tanıların ileri biyokimyasal analizler yapılarak desteklenmesi zorunludur.

5. ÖNERİLER

Topraktan izole edilen gram-pozitif basillerin bakteriyosin içeriklerinin, antibiyotik ve ağır metal dirençliliklerinin belirlenmesi isimli çalışmada Rize ilinden çeşitli bölgelerden toprak örnekleri alınmış, bu örneklerden Gram-pozitif basiller izole edilmiş ve morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerinden yararlanılarak identifiye edilmişlerdir, identifiye edilen izolatların ekstrasellüler enzim üretimleri ve ağır metal ve antibiyotik direnç profilleride belirlenmiştir. Daha sonra Gram-pozitif basillerden izole edilmiş ve bakteriyosin içerikleri taranarak, kısmi saflaştırılmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmanın devamı ve daha ayrıntılı olarak gerçekleştirilebilmesi için aşağıda önerilen maddeler yapılmalıdır.

Araştırmalar sonucunda elde edilen kapsüllü bakteri sayıları azda olsa, halk sağlığı açısından bu bakterilerin herhangi bir patojeniteye sahip olup olmadıkları araştırılmalıdır.

Çalışmada izolatlardan belirlenen ekstrasellüler enzimlerin karakterizasyonları daha ayrıntılı olarak incelenmelidir.

Karakterizasyonu yapılan enzimlerin endüstriyel kullanım için uygunluğu araştırılmalıdır.

İzolatların antibiyotik direnç mekanizmaları moleküler olarak karakterize edilmelidir.

İzolatlarda ağır metal direncinin oluşumunu sağlayan mekanizma ve genler ayrıntılı olarak açıklanmalıdır.

Bakteriyosin proteinini kodlayan gen bölgesi bulunarak bakteriyosin içeriği daha iyi aydınlatılmalıdır.

B13 bakteriyosinin etki spektrumu incelendiğinde Gram-pozitif organizmalar ve mayalar üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. Yalnız çalışmada kullanılan indikatör organizmalar belirli sayıdadır. Etki spektrumunun belirlenebilmesi için özellikle patojen bakterilerden oluşan daha fazla indikatör organizma kullanılmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- Akbalık G. 2003. Screening for Industrially Important Extracellular Enzymes from Alkalophilic *Bacillus* Genus. Yüksek Lisans Tezi. İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü. İzmir.
- Anastasiadou S, Papagianni M, Filioussis G, Ambrosiadis I and Koidis P. 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627: production conditions, purification and characterization. *Bioresour Technol*, 99:5384-5390.
- Andersson R. 1989. Biopreservation of Foods by means of Starter Cultures. International Seminar 'Progress in Food Microbiology'. Wiesbaden.
- Aslım B, Sağlam N and Beyatlı Y. 2002. Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil. *Turk J Biol*, 26:41-48.
- Bailey JE and Ollis DF. 1977. Biochemical engineering fundamentals: International student Edition, Chapter 1-7, s. 39-50.
- Bajpai P and Bajpai PK. 1989. High-temperature alkaline alpha-amylase from *Bacillus* *iicheniformis* TCRDC-B13. *Biotechnol Bioeng*, 33:72-78.
- Balcao VM and Malcata FX. 1998. Lipase catalyzed modification of milkfat. *Biotechnol Adv*, 16:309-41.
- Banerjee M and Sarkar P K. 2004. Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. *Food Microbiol*, 21:335-342.
- Bennik MMJ, Verheul A, Abee T, Naaktgeboren-Stoffels G, Gorris LGM and Smid EJ. 1997. Interactions of Nisin and Pediocin PA-1 with Closely Related Lactic acid Bacteria That Manifest Over 100-Fold Differences in Bacteriocin Sensitivity. *Appl. Environ. Microbiol*, 63:3628-3636.
- Berkeley RCW and Logan N. 1997. *Bacillus*, *Alicyclobacillus* and *Paenibacillus* (Emmerson A, Hawkey MPM, Gillespie SH editors). Principles and Practice of Clinical Bacteriology. Chichester: Wiley; s. 185.
- Bhat MK. 2000. Cellulase and related enzymes in biotechnology. *Biotechnolgy Advances*, 18:355-383.
- Bhide JV, Dhakephalkar PK and Paknikar KM. 1996. Microbiological Process for the Removal of Cr(VI) From Chromate-Bearing Cooling Tower Effluent. *Biotech. Lett.*, 18:667-72.
- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji, Barış yayınları, Fakülteler Kitapevi, İzmir, 1995.

- Bizani D and Brandelli A. 2002. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J. Appl Microbiol*, 93:512–519.
- Bonwart GJ. *Basic Food Microbiology*, Van Nostrand Reinhold, 773p, New York, 1989.
- Bruins MR, Kapil S and Oehme FW. 2000. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*, 45:198-207.
- Callewaert R, Holo H, Devreese B, Van Beeumen J, Nes I and De Vuyst L. 1999. Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method. *Microbiology*, 145:2559-2568.
- Carlisle GE and Falkinham JO, 3rd. 1989. Enzyme activities and antibiotic susceptibility of colonial variants of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Appl Environ Microbiol* 55:3026-3028
- Chen H and Hoover DG. 2003. Bacteriosins and their food applications. *Comprehensive Reviews In Food Science and Food Safety*, 2:82-100.
- Choudhury R and Srivastava S. 2001. Zinc Resistance Mechanisms in Bacteria. *Curr. Sci.*, 81:7.
- Claus D and Fatz D. *Bacillus*, En CR Harwood, Plenum Press, New York, 1989.
- Claus M. 1992. A standardized gram staining procedure. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 8:451–452.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF and Chikindas ML. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International J Food Microbiol*, 71:1-20.
- De Martinis ECP, Alves VF and Franco BDGM. 2002. Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 18:191-208.
- De Vuyst L and Leroy F. 2007. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J. Mol Microbiol Biotechnol*, 13:194-199.
- De Vuyst L and Vandamme EJ. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J Gen Microbiol*, 138:571-578.
- Deraz SF, Karlssoni EN, Hedstörn M, Andersson MM and Mattiasson B. 2005. Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*, 117:343-354.
- Dieye Y, Usai S, Clier F, Gruss A, Piard JC. 2001. Design of a Protein-Targeting System for Lactic Acid Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 183:4157-4166.

- Dobrzanski WT, Bardowski J, Kozak W, Zajdel JK. 1982. Lactostrepcins. Bacteriocin of Lactic Streptococci. Pp. 225-229. In: D. Schlessinger (Editor) Microbiology. American Society for Microbiology, Washington DC, s. 420.
- Earl AM, Losick R and Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. Trends Microbiol, 16:269-275.
- Ekşi A. 1988. Meyve Suyu Durultma Tekniği. Gıda Teknolojisi Derneği, Yayın No: 9, s. 127.
- Ellis RJ, Morgan P, Weightman AJ and Fry JC. 2003. Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. Appl Environ Microbiol, 69:3223-3230.
- Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K and Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiol Rev, 24:85-106.
- Erem ZH ve Pur B. 1994. Laktik Bakteriosinler ve Uygulamaları. Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Müh. Fak., Gıda Müh. Böl., İzmir.
- Foegeding PM, Thomas AB, Pilkington DH and Klaenhammer TR. 1992. Enhanced control of *Listeria monocytogenes* by in situ-produced pediocin during dry fermented sausage production. Appl Environ Microbiol, 58:884-90.
- Galante Y, De Conti A and Monteverdi R. 1998. Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. In *Trichoderma and Gliocladium*. Volume 2. Edited by: Harman GE, Kubicek CP. London: Taylor and Francis, 327-342.
- Galvin M, Hill C and Ross RP. 1999. Lacticin 3147 displays activity in buffer against gram positive bacterial pathogens which appear insensitive in standard plate assays. Lett Appl Microbiol, 28:355-358.
- Godfrey T and West S. 1996. Introduction to Industrial Enzymology. (T. Godfrey and S. West editör) Industrial Enzymology, 2nd Edition, Stockton Press, New York.
- Gordon RE. The Aerobik Endospore Forming Bacteria- Classification and Identification. Berkeley CW and Goodfellow M. Academic Press, London, 1981.
- Gorris GML. 1996. Bacteriocins potential applications in food preservation. Food preservation by combined processes. Final Report Flair. Concerted Action No: 7 Subgroup B.
- Gouaux E, Hill C and Ross RP. 2005. Food microbiology: Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology, 3:777.
- Gratia A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colilbacille. Comp Rend Soc Biol, 93:1040-1041

- Guzzo J, Diorio DC, Alexander DC and DuBow MS. 1999. Toward understanding metal stress in environment microbial flora. *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*, Canada.
- Halimi B, Dortu C, Arguelles-Arias A, Thonart P, Joris B and Fickers P. 2010. Antilisterial Activity on Poultry Meat of Amylolysin, a Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *Probiotics & Antimicro. Prot.* DOI 10.1007/s12602-010-9040-9.
- Hammami R, Zouhir A, Ben Hamida J and Fliss I. 2007. BACTIBASE: a new web-accessible database for bacteriocin characterization. *BMC Microbiology*, 7:89.
- Hécharde Y and Sahl HG. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84:545-557.
- Hernandez D, Cardell E and Zarate V. 2005. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *J Appl Microbiol*, 99:77-84.
- Hill C. 1995. Bacteriocins: Natural Antimicrobials from Microorganisms: New methods for food preservation, Blackie Academic & Professional, London, s. 457.
- Hols P, Ferain T, Garmyn D, Bernard N and Delcour J. 1994. Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for alpha-amylase and levanase expression. *Appl Environ Microbiol*, 60:1401-1413.
- Holzepfel WH, Geisen R, Schillinger U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int J Food Microbiol*, 24:343-362.
- Igarashi K, Hatada Y, Hagihara H, Saeki K and Takaiwa M. 1998. Enzymatic properties of a novel liquefying alpha-amylase from an alkaliphilic *Bacillus* isolate and entire nucleotide and amino acid sequences. *Appl Environ Microbiol*, 64:3282-3289.
- Ishib T and Ohba M. 1993. Characterization of Mosquito specific *Bacillus thuringiensis* strains Coisolated from a soil population. *Syst. Appl. Microbiol*, 16:494-499.
- Ito S. 1997. Alkaline Cellulases from Alkaliphilic *Bacillus* Enzymatic Properties, Genetics, and Application to Detergents. *Extremophiles*, 1:61-66.
- Ivanova I, Miteva V, Stefanova T, Pantev A and Budakov I. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *Int J Food Microbiol*, 42:147-158.
- İnce Yılmaz E. 2003. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Res Microbiol*, 154:409-415.

- Jack RW, Tagg JR and Ray B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59:171-200.
- Jette JF and Ziomek E. 1994. Determination of lipase activity by a rhodamine-triglyceride-agarose assay. *Anal Biochem*, 219:256-60.
- Jiménez-Díaz R, Piard J.C, Ruiz-Barba J.L, Desmazeaud, M.J. 1990. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain from a green olive fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, 87:91.
- John FK. 1987. *Enzyme Technology* (H.J.Rehm ve G.Reed editör). *Biotechnology*, Vol.7A. New York s. 37-62.
- Kalisz HM. 1988. Microbial enzymes. *Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 36:3-61.
- Kasavi C. 2006. Kovalent Bağlanma ve Fiziksel Adsorpsiyon Metotları İle Proteaz Enziminin İmmobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. İstanbul.
- Kim MH, Kong YJ, Baek H and Hyun HH. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin G05 by *Micrococcus* sp. G05. *Journal of Biotechnology*, 121:54-61.
- Klaenhammer TR. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 12:39-85.
- Klaenhammer TR. 1998. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70:337-349.
- Kuleaşan H ve Çakmakçı ML. 2003. Bakteriyosinlerin özellikleri, gıda mikrobiyolojisinde kullanım alanları ve ileri dönemlerdeki kullanım potansiyelleri. *Gıda*, 28:123-129.
- Lenette EH, Balows A, Hausler J and Shadomy JH. 1985. *Manual of Clinical Microbiology*. Vol. 4, Amerika s.1149.
- Linda A, Ross NR, Avis EG, Di L, Blecha F and Melgarejo T. 2008. Innate Immunity and Host Defense Peptides in Veterinary Medicine. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22:247- 265.
- Lisboa MP, Bonatto D, Bizani D, Henriques JA and Brandelli A. 2006. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Int Microbiol*, 9:111-8.
- Madera C, Garcia P, Janzen T, Rodriguez A and Suarez JE. 2003. Characterisation of technologically proficient wild *Lactococcus lactis* strains resistant to phage infection. *Int J Food Microbiol*, 86:213-22.
- Madigan M., Martinko J and Dunlap P. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, 12 th.

Edition, New York.

- Mattick AT and Hirsch A. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, 2:5-8.
- Mawadza C, Kaul RH, Zvauya R and Mattiason B. 2000. Purification and Characterization of Cellulases Produced by Two *Bacillus* Strains. *Journal of Biotechnology*, 83:177-187.
- Millette M, Dupont C, Archambault D and Lacroix M. 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. *J Appl Microbiol*, 102:274-282.
- Motta AS and Brandelli A. 2002. Characterization of an antimicrobial peptide produced by *Brevibacterium linens*. *J Appl Microbiol*, 92:63-70.
- Naclerio G, Ricca E, Sacco M and De Felice M. 1993. Antimicrobial activity of a newly identified bacteriocin of *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, 59:4313-4316.
- NCCLS. 2003. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne.
- Nes IF and Holo H. 2000. Class II Antimicrobial Peptides from Lactic Acid Bacteria. *Biopolymers (Peptide Science)*, 55:50-61.
- Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Brurberg MB, Eijsink V and Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70:113-128.
- Nes IF, Holo H, Fimland G, Hauge HH and Nissen-Meyer J. 2002. Unmodified peptide-bacteriocins (class II) produced by lactic acid bacteria. In *Peptide Antibiotics, Discovery, Modes of Action and Application*. Edited by C. J. Dutton, M. A. Haxell, H. A. I. McArthur & R. G. Wax. New York: Marcel Decker.
- Nicholson WL and Law JF. 1999. Method for purification of bacterial endospores from soils: UV resistance of natural sonoran desert soil populations of *Bacillus* spp. with reference to *B. subtilis* strain 168. *Journal of Microbiological Methods*, 35:13-21.
- Niehaus F, Bertoldo C, Kahler M and Antranikian G. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *App Microbiol Biotechnol*, 51:711-729.
- Nies DH and Silver S. 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol*, 14:186-199.
- Norberg AB. and Persson H. 1984. Accumulation of Heavy Metal Ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotech. and Bioeng.*, 26:239-246.
- Nwosu VC. 2001. Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Res Microbiol*, 152:421-430.

- O'Sullivan L, Ross RP and Hill C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.*, 84:593-604.
- Ohki R, Tateno K, Okada Y, Okajima H, Asai K, Sadaie Y, Murata M and Aiso TA. 2003. Bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter. *J Bacteriol*, 185(1):51-59.
- Oscariz JC and Pisabarro A. 2001. Classification and mode of action of membrane active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Springer-Verlag and SEM.*, 12:123-127.
- Özçelik S. 1995. Genel Mikrobiyoloji, Isparta s. 1-33.
- Özşahin AD. 2006. Kahramanmaraş İli Kağıt Fabrikaları Çevresinden İzole Edilen *Bacillus Sp.*' den Elde Edilen Selüloz Enziminin Karakterizasyonu ve Biyoteknolojide Kullanılabilirliğinin Araştırılması KSU Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş s.1-37.
- Öztürk R. 1997. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları, Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişmesi ve günümüzde direnç durumu, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, 1997.
- Paiva AL, Balcao VM and Malcata FX. 2000. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol*, 27:187-204.
- Perry JJ, Staley JT and Lory S. 2002. *Microbial Life*, First Edition, New York.
- Piard JC, Delorme F, Giraffa G, Commissaire J, Desmazeaud M. 1990. Evidence for a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* CNRZ 481. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 44:143-158.
- Powell JE, Witthun RC, Todorov SD and Dicks LMT. 2007. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal*, 17:190–198.
- Prescott LM, Harley JP and Klein DA. 1996. *Microbiology*. Wm. C. Brown Publishers, England s. 390.
- Prescott M and Harley JP. *Laboratory Exercises in Microbiology*, McGraw-Hill | Fifth edition (July 2001) s. 449.
- Rao MB, Tanksale AM, Gathe MS and Deshpande W. 1998. Molecular and Biotechnological aspect of Microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62:597-635.
- Rasch M and Knochel S. 1998. Variations in tolerance of *Listeria monocytogenes* to nisin pediocin PA-1 and bavaricin A. *Lett Appl Microbiol*, 27:275-278.

- Riley MA and Wertz JE. 2002a. Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Ann. Rev. Microbiol*, 56:117-137.
- Riley MA and Wertz JE. 2002b. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84:357-64.
- Riosen PA, Ronning P, Hegna IK and Kolsto AB. 2005. Characterization of a broad range antimicrobial substance from *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 96:648-655.
- Rogers LA and Whittier EO. 1928. Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *J Bacteriol*, 16:211-229.
- Rosovitz MJ, Voskuil MI, Chambliss GH: *Bacillus*. In Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9th edition. Edited by Hausler WJ, Sussman M. London: Hodder Arnold; 1998:709-729.
- Sadhukhan PC, Ghosh S, Chaudhuri J, Ghosh DK and Mandal A. 1997. Mercury and organomercurial resistance in bacteria isolated from freshwater fish of wetland fisheries around Calcutta. *Environ Pollut*, 97:71-78.
- Silver S. 1992. Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanisms: Range and Overview. *Plasmid.*, 27:1-3.
- Sit CS and Vederas JC. 2008. Approaches to the discovery of new antibacterial agents based on bacteriocins. *Biochem Cell Biol*, 86:116-123.
- Smith EL, Hill RL, Lehman UR, Lefkowitz JR, Handler P and White A. 1983. Principles of Biochemistry. McGraw-Hill International Edition
- Smith JE. 1996. Biotechnology. Cambridge University Press, Cambridge s. 233.
- Sneath AP. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2, Sneath AP, Mair NS, Sharpe MS, Holt JG, Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.
- Sneath PHA. 1986. Endospore-forming Gram-Positive Rods and Cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", Volume 2, edited by PHA Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Williams and Wilkins, Holt s. 1104-1139.
- Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA and Chikindas ML. 2008. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *J Appl Microbiol*, 104:1067-1074.
- Taubman S. 1992. Genus *Bacillus*. Contemporary Oral Microbiology and Immunology, 355-356.
- Teeri TT, Koivula A, Linder M, Wohlfahrt G, Divne C and Jones TA. 1998. Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose? *Biochem Soc*

Trans, 26:173-178.

Temiz A. 1998. Gıdalarda Mikrobiyal Gelişmeyi Etkileyen Faktörler. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir s. 605.

Todorov SD and Dicks LMT. 2006. Medium components effecting bacteriocin production by two strains of *Lactobacillus plantarum* ST414BZ and ST664BZ isolated from boza. *Biologia, Bratislava (Section Cellular and Molecular Biology)*, 61:269–274.

Todorov, S.D. 2000. Purification and characterization of bacteriocins isolated from *Lactobacillus plantarum* ST31. PhD thesis, Sofia University, Sofia, Bulgaria.

Tomme P, Warren RA and Gilkes NR. 1995. Cellulose hydrolysis this bacteria and fungi. *Adv. Microbiology Physiol*, 37:1-81.

Topçal F. Bazı Yem Bitkilerinin Toprak Mikroflorasına Etkisi, Topraktan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Haziran, 2010.

Turnidge JD, Ferraro MJ and Jorgensen JH. 2003. Susceptibility Test Methods: General Considerations. In PR Murray, EJ Baron, JH Jorgensen, MA Pfaller, RH Tenover, R Tenover. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington. American Society of Clinical Microbiology.

Twomey D, Ross RP, Ryan M, Meany B and Hill C. 2002. Lantibiotics produced by actin acid bacteria: structure, function and application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82:165-185.

URL-1. 2012. http://textbookofbacteriology.net/Bacillus_2.html (10.08.2012, 14:30)

URL-2. 2012. http://www.austincc.edu/microbugz/bacitracin_optochin.php (11.08.2012, 13:19)

URL-3. 2012. <http://en.wikipedia.org/wiki/Clindamycin> (7.08.2012, 13:20)

URL-4. 2012. <http://www.turkcebilgi.com/ansiklopedi/mikrobiyoloji> (10.08.2012, 14:30)

URL-5. 2012. <http://www.genbilim.com/content/view/1913/> (10.08.2012, 14:35)

URL-6. 2012. <http://www.gidacilar.net/sutteki-mikroorganizmalar/bacillus-cereus-ve-icme-sutunde-olusturdugu-sorunlar-523.html> (12.08.2012, 14:30)

URL-7. 2012. http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus_amyloliquefaciens (12.08.2012, 14:30)

URL-8. http://web.mst.edu/~microbio/BIO221_1998/B_amylo.html (15.08.2012, 13:00)

Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö. Temel ve Klinik

- Mikrobiyoloji, Edt. Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, Güneş Kitabevi, Sıhhiye Ankara s. 3.
- Uymaz B. Gıda ve İnsan Kaynaklı Laktobasillerin İzolasyonu, Tanımlaması, Probiyotik Özelliklerinin Belirlenmesi ve Bakteriyosin Üretim Yeteneklerinin Karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
- Ünlütürk A ve Turantas F. 1999. Gıda Mikrobiyolojisi. Mengi Tan Basımevi s. 73.
- Ünlütürk A. 1998. Mikrobiyal Gelişmenin İnhibisyonu. Gıda Mikrobiyolojisi, Mengi Tan Basımevi, İzmir s. 605.
- Van Belkum MJ, Hayema BJ, Geis A, Kok J, Venema, G. 1989. Cloning of Two Bacteriocin Genes from a Lactococcal Bacteriocin Plasmid. Applied and Environmental Microbiology, 55:1187-1191.
- Van Schaik W, Gahan CG and Hill C. 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lacticin 3147. J Food Prot, 62:536-539.
- Voskuil MI and Chambliss GH. 1993. Rapid Isolation and Sequencing of Purified Plasmid DNA from *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 59:1138-1142.
- Walsh C. 2003, Antibiotics: Actions, origins, resistance. 345pp. ASM Press, Washington, DC.
- Wehrheim B and Wettern M. 1994. Biosorption of Cadmium, Copper and Lead by Isolated Mother Cell Walls and Whole Cells of *Chlorella fusca*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 41:425-428.
- Whitehead HR. 1933. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. Biochem J, 27:1793-1800.
- Wiseman A. 1987. Handbook of enzyme biotechnology. Second Edition. Chapter 3. The application of enzymes in industry, s. 274-373.
- Young CS, Lethbridge G, Shaw LJ and Burns RG. 1995. Survival of inoculated *Bacillus cereus* spores and vegetative cells in nonplanted and rhizosphere soil. Soil Biol. Biochem, 27:1017-1026.

EKLER

Tablo 22. Antibiyotik direnç zonları (mm).

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20
Ampisilin (AMP)	21	19	0	25	20	20	16	19	25	19	20	20	22	20	0	0	0	0	0	0
Metisilin (ME)	19	19	0	0	12	20	17	20	0	20	20	21	15	15	0	0	0	0	0	0
Eritromisin (E)	28	33	21	25	25	35	30	23	25	30	31	29	25	27	25	25	25	25	19	25
Basitrasin (B)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Klindamisin (CLD)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0
Norflaksasin (NOR)	30	27	21	32	35	25	30	25	35	35	35	35	25	30	23	25	30	27	27	25
Sefalotin (KF)	25	31	0	28	35	30	20	29	25	28	30	30	35	27	0	0	0	15	0	0
Gentamisin (GM)	25	15	16	23	22	24	25	23	23	25	20	24	25	25	16	20	20	17	20	15
Siproflaksin (CIP)	35	32	24	35	35	35	35	35	35	35	35	34	36	30	21	25	30	25	28	25
Streptomisin (S)	23	12	15	15	14	16	14	15	19	19	0	19	15	13	14	20	20	18	19	15
Tobramisin (TOB)	12	24	11	25	0	25	25	30	21	26	29	28	25	23	10	20	20	18	17	15
Amoksisilin (AX)	11	0	0	12	0	9	15	15	0	25	15	17	15	14	0	0	0	0	0	0
Kloramfenikol (C)	15	32	16	29	19	35	35	29	26	30	30	30	30	25	18	23	25	25	26	22
Trimethoprimm Sülfametaksazol (SXT)	35	27	0	26	30	35	30	29	33	30	32	30	34	30	0	0	0	0	17	17
Tetrasiklin (TE)	24	16	11	15	15	15	22	16	25	25	30	30	15	27	10	20	25	22	20	18
Vankomisin (VA)	19	16	14	21	15	17	20	19	27	19	20	24	21	12	13	16	15	20	17	15
Oksasilin (OX)	17	15	0	19	19	18	17	21	0	24	15	19	20	20	0	0	0	0	0	0
Optakin (OP)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rifampsin (RF)	21	0	13	0	15	24	20	18	0	25	20	22	21	15	15	15	20	20	12	17
Neomisin (N)	17	17	15	20	21	21	20	25	23	25	20	23	18	22	18	17	17	17	19	16
Kanamisin (K)	22	20	10	25	15	25	25	27	27	25	30	32	25	25	11	21	21	20	17	20
Novabiosin (NV)	23	21	18	25	23	29	23	25	19	25	25	26	24	20	20	21	25	24	22	17
Ampisilin (AMP)	19	19	0	0	12	20	17	20	0	20	20	21	15	15	0	0	0	0	0	0

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İstanbul ilinde doğdu. İlkokulu Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulu'nda okudu. Lise eğitimini Eyüp Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Rize- Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladı. 2009 yılında mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yüksekisansa başladı. 2010 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Yabancı Diller Meslek Yüksek Okulu'ndan mezun oldu. 2011 yılında Rize Üniversitesi'ne yatay geçiş yaptı.