



HAVA KAYNAKLI BASİLLERİN İZOLASYONU VE
BAZI YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ

Tuğba MENTEŞ

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Eylül - 2018

HAVA KAYNAKLI BASİLLERİN İZOLASYONU VE BAZI YETENEKLERİNİN
İNCELENMESİ

Tuğba MENTEŞ

Kütahya Dumlupınar Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca
Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Eylül-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tuğba MENTEŞ'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "HAVA KAYNAKLI BASİLLERİN İZOLASYONU VE BAZI YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ" başlıklı bu çalışma, jürimizce Kütahya Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

12/09/2018

Prof. Dr. Önder UYSAL

Enstitü Müdürü, Fen Bilimleri Enstitüsü

.....

Prof. Dr. Hayri DAYIOĞLU

Anabilim Dalı Başkanı, Biyoloji Bölümü

.....

Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Danışman, Biyoloji Bölümü

.....

Sınav Komitesi Üyeleri

Prof. Dr. Tuba İÇA

Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Ceylan AYADA

Fizyoloji Bölümü, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi

.....

Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Biyoloji Bölümü, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi

.....

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Kütahya Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 26 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Tuğba MENTEŞ

HAVA KAYNAKLI BASİLLERİN İZOLASYONU VE BAZI YETENEKLERİNİN İNCELENMESİ

Tuğba MENTEŞ

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

ÖZET

Bu çalışmada Kütahya iline bağlı Seyitömer beldesindeki havasal ortamdan izole edilen aerob endospor oluşturan Basil grubu bakteriler identifiye edilerek bazı yetenekleri araştırılmıştır. Yer çekimine dayalı petri plak yöntemiyle aerob endospor oluşturan 15 adet bakteri izole edilmiştir. İzole edilen bakterilerin biyokimyasal testler yardımıyla *Bacillus* sp. olarak cins düzeyinde identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Enzim üretim yeteneğine baktığımızda, 14 tane izolatin proteaz enzimi, 6 tane izolatin da amilaz enzimini üretebildiği tespit edilmiştir. Yapılan ağır metal dirençlilik deneyinde, ağır metallere karşı en yüksek MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri referans suş (*Bacillus subtilis* NRRL B-209) ile kıyaslandığında, çalışmamızdaki Basillerin %93,33 oranında bakır ağır metale karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Antibiyotik dirençlilik testi, agar disk difüzyon yöntemiyle sekiz farklı antibiyotik (amfisilin, kloramfenikol, siproflaksin, eritromisin, kanamisin, oksasilin, streptomisin, vankomisin) kullanılarak belirlenmiştir. Test sonuçlarına göre Basillerin %100'ü oksasilin, %46,66'sı amfisilin antibiyotiğine karşı dirençli bulunmuştur.

Basil izolatlarından elde edilen süpernatant kısımlar kendilerine ve diğer basillere karşı agar damlatma yöntemi ile denenerek metabolit üretim yetenekleri belirlenmiştir. Basil izolatları içerisinde S6 izolatu aktivitesi en iyi izolat, S4 izolatu ise en hassas izolat olarak tespit edilmiştir. Ayrıca S6 izolatından elde edilen süpernatantın antimikrobiyal aktivitesi gram pozitif ve negatif mikroorganizmalara ve ayrıca maya'ya karşı denenmiştir. S6 izolatu en yüksek aktiviteyi *Legionella pneumophila* Sg 2-15'e karşı göstermiştir. S6 izolatının metabolit aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, organik çözücü ve deterjanların etkisi araştırılmıştır. S6 izolatının süpernatant kısmının 80, 95 ve 121°C sıcaklıklarında aktivite göstermediği, denenen farklı pH (2, 4, 6, 8 ve 10) aralıklarından ve organik çözücülerden az miktarda etkilendiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağır metal dirençliliği, Antibiyotik dirençliliği, *Bacillus* sp., Enzim, Metabolit.

THE ISOLATION OF AIR BORNE BACILLI AND INVESTIGATION OF SOME CAPABILITIES OF THESE BACTERIA

Tuğba MENTEŞ

Department of Biology, Post Graduate Thesis, 2018

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Ferdağ ÇOLAK

SUMMARY

In this study, aerobic endospore forming Bacilli group, isolated from the airborne environment in Seyitömer district of Kütahya province, were identified and some capabilities were investigated. Fifteen aerobic endospores producing bacteria were isolated by petri plate method based on gravity. Identification of isolated bacteria was carried out by biochemical tests at the genus level as *Bacillus* sp. When we look at the ability of enzyme production, it is determined that 6 isolates can produce amylase enzyme, while 14 isolates show protease activity. The highest MIC (Minimal Inhibition Concentration) value against heavy metals in comparison with reference strain (*Bacillus subtilis* NRRL B-209), by conducting the heavy metal resistance test, 93,33% of the bacilli tested were found to be resistant to copper heavy metal. Antibiotic resistance testing was performed using agar disc diffusion method against eight different antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, kanamycin, oxacillin, streptomycin, vancomycin). According to the test results, 100% of Bacilli were found to be resistant to oxacillin and 46,66% to ampicillin antibiotics.

Supernatant fractions obtained from *Bacillus* isolates were tested against them self and other bacilli by agar drip method to determine metabolite production capabilities. S6 isolate activity was the best isolate in Bacilli group and S4 isolate was the most sensitive isolate. In addition, the antimicrobial activity of the supernatant obtained from the S6 isolate was tested against gram positive and negative microorganisms and yeast. S6 isolate showed the highest activity against *Legionella serogroup* 2-15. The effect of temperature, pH, organic solvent and detergents on the metabolic activity of S6 isolate was investigated. It has been determined that the S6 isolate is not active at temperatures of 80, 95 and 121°C in the supernatant, but is effected at different pH ranges (2, 4, 6, 8 ve 10) and in a small amount of organic solvents.

Key Words: Antibiotic resistance, *Bacillus* sp., Enzyme, Heavy metal resistance, Metabolite.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince her zaman benden yardımlarını esirgemeyen, tezimin bütün aşamalarında her türlü desteği sağlayan ve her konuda sonsuz sabır gösteren sevgili Sayın Hocam Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK'a içtenlikle teşekkür eder saygılarımı sunarım. Biyoloji bölümünde üzerimde emeği olan tüm hocalarıma, ayrıca deneysel çalışmalarında bana yardımcı olan Özlem Saniye BAYRAKTAR'a teşekkür ederim. Çalışma hayatım boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği gösteren sevgili aileme ne kadar teşekkür etsem azdır. Her zaman beni destekleyen ve moral veren annem Sultan MENTEŞ'e, babam Yaşar MENTEŞ'e ve okul hayatımdaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Hava ve Mikroorganizmalar	1
1.2. Araştırma Bölgesinin Özellikleri	3
1.3. <i>Bacillus</i> Cinsi	4
1.3.1. Hücre ve koloni morfolojisi	4
1.3.2. Hücre çeperi ve zar yapıları.....	5
1.3.3. Kapsül yapısı	6
1.3.4. Flagella yapısı	6
1.3.5. Spor yapısı ve oluşumu	6
1.3.6. Genetik özellikleri	8
1.4. Ekoloji ve Habitatları.....	8
1.5. Taksonomisi.....	9
1.6. <i>Bacillus</i> 'ların Önemi ve Endüstriyel Kullanımı	10
1.7. <i>Bacillus</i> 'larda Enzim Aktivitesi	11
1.7.1. Amilaz enzimi aktivitesi.....	11
1.7.2. Proteaz enzimi aktivitesi	12
1.8. Ağır Metallerin Kullanım Alanları ve Önemi.....	12
1.8.1. Ağır metallerin toksik etki mekanizması.....	13
1.8.2. Ağır metal dirençlilik mekanizmaları.....	13
1.9. <i>Bacillus</i> Cinsi Bakterilerin Ürettikleri Metabolitler	14
1.9.1. Antibiyotikler	15
1.9.2. Bakteriyosinler	17
1.10. Çalışmanın Amacı.....	18
2. MATERYAL VE METOD	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.1. Materyal.....	20
2.1.1. Biyolojik materyaller.....	20
2.1.2. Kimyasal materyaller	20
2.1.3. Kullanılan besiyerleri	21
2.1.4. Kullanılan çözeltiler	27
2.1.5. Kullanılan boyalar	30
2.2. Metod.....	31
2.2.1. Havasal örneklerin alınması ve endospor oluşturan basillerin izolasyonu.....	31
2.2.2. Endospor oluşturan bakterilerin identifikasyonu.....	31
2.2.3. İzole edilen basillerin amilaz ve proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi	36
2.2.4. Ağır metal toleranslılık düzeylerinin belirlenmesi	36
2.2.5. İzole edilen basillerin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi.....	36
2.2.6. İzole edilen basillerin metabolit üretim yeteneklerinin belirlenmesi	37
3. BULGULAR.....	42
3.1. Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu	42
3.2. <i>Bacillus</i> Suşlarının İdentifikasyon Test Sonuçları	42
3.3. Basillerin Enzim Aktivitesi.....	45
3.4. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri	46
3.5. Basillerin Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri	47
3.6. Basillerin Metabolit Üretim Aktivitesinin Belirlenmesi	49
3.6.1. İzolatın test mikroorganizmalarına karşı metabolit aktivitesinin belirlenmesi	52
3.6.2. S6 izolatının büyüme eğrisi ve metabolit üretim zaman aralığı	53
3.6.3. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.....	54
3.6.4. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi	55
3.6.5. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine organik çözücü ve deterjanların etkisi.....	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	58
KAYNAKLAR DİZİNİ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Bakterilerde endospor oluşumu.....	7
3.1. Basillerin antibiyotik dirençlilik düzeyleri.....	47
3.2. İzolatların agar damlatma metodu ile metabolit üretim aktivitesinin belirlenmesi.	49
3.3. S6 izolatının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi.....	52
3.4. S6 izolatının büyüme eğrisi ve antimikrobiyal aktivitesi.	54



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. <i>Bacillus</i> cinsi bakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotikler.	16
2.1. Metabolit aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları.....	20
2.2. Antibiyotik dirençlilik testlerinde kullanılan antibiyotikler.....	21
2.3. NCCLS rehberinde Gram pozitif, aerobik bakteriler için belirlenen zon çaplarına göre yorumlama standartları.....	37
3.1. Basillerin biyokimyasal test sonuçları.	43
3.2. Basillerin amilaz ve proteaz enzim aktiviteleri (Ø:6 mm).	45
3.3. <i>B. subtilis</i> NRRL B-209 'un ağır metal dirençlilik düzeyi (mM/mL).....	46
3.4. Basillerin ağır metallerle karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).	46
3.5. İzole edilen Basillerin ağır metal toleranslılıklarının %'lik dağılımı.....	47
3.6. Basil izolatlarının test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları (disk 6 mm).	48
3.7. Basil izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.....	48
3.8. Basil izolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları.....	49
3.9. Basil izolatlarının agar damlatma metodu ile kendi aralarındaki metabolit aktivitesinin belirlenmesi (Ø:8mm).	50
3.10. S6 izolatının agar kuyucuk metodu ile test organizmalarına karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları (Ø:8mm).	53
3.11. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (Ø:8mm).	55
3.12. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (Ø:8mm).	56
3.13. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi. (Ø:8mm) Organik çözücü süpernatant ile eşit hacimde, deterjanla ise %1 oranında hazırlanmıştır...	56

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
°C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar

<u>Kısaltma</u>	<u>Açıklama</u>
ATCC	Amerikan Kültür Koleksiyonu
CFS	Hücre Serbest Süpernatantı
cm	Santimetre
cm ³	Santimetreküp
g	Gram
kg	Kilogram
km	Kilometre
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MTA	Maden Tetkik Arama
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NRL	ARS Kültür Koleksiyon
OD	Optical Density (Optik Yoğunluk)
rpm	Round per minute (Dakikadaki devir sayısı)

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar denizlerin en alt kısımlarından gökyüzünün en üst tabakalarına kadar geniş bir alan üzerinde yayılmış durumdadırlar (Başkaya ve Kocabaş, 2016). Mikroorganizmalar gelişme ve üreme için gerekli olan ideal şartların oluşturulduğu ekolojik ortamların dışında ekstrem çevre koşullarında ve çok farklı habitatlarda gelişim gösterebilmektedir. Dünya atmosferinde, biyoaerosollerini bulunduran havanın, mikroorganizmaları çok yüksek oranda ihtiva ettiği bildirilmektedir. Bunların çoğu toprak, su kaynakları, hayvan ve insanlar gibi doğal ortamlardan kaynaklanmaktadır. Bir ekosistemde havada yayılım gösteren mikroorganizmalar esas biyolojik bileşenler olup, ekolojik denge ile doğrudan ilişki halinde ve doğadaki birçok yaşam formları üzerinde çeşitli fonksiyonlara sahiptirler. Mikroorganizmaların çevremizde bu kadar yaygın bulunmaları; hava ve su ile yayılabilecek kadar küçük boyutta olmaları, uygun olmayan şartlara adapte olmaları ve metabolik olarak esnek ve çok yönlü olabilme yetenekleri ile ilgilidir (Tikveşli, 2013; Hanoğlu, 2013).

Bacillaceae familyasına ait olan *Bacillus* türleri, genellikle aerop (bazı türleri fakültatif anaerop), gram pozitif, çubuk şeklinde olan endosporlu bakterilerdir. Doğada yaygın olarak buldukları alan toprak olmasına rağmen hava, su, çeşitli gıdalar, bitki rizosferi ve bazı canlıların bağırsak sistemlerinde bu cins bakterilere rastlanabilmektedir. *Bacillus* cinsi içerisinde yer alan türlerin çoğu güvenli mikroorganizmalar olup tarım ve endüstriyel amaçlarda başarılı bir şekilde kullanılacak bir çok maddeyi sentezleyebilme yeteneğine sahiptirler. *Bacillus* cinsine ait bakteriler, enzim, antibiyotik ve toksin maddelerin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilibilmeleri nedeniyle dikkat çeken mikroorganizmalar arasındadır. Ayrıca endospor kabiliyeti ve çeşitli metabolizma faaliyetlerinin olması geniş bir çevreye yayılmalarını da sağlamaktadır (Topçal vd., 2014; Sertel, 2016).

1.1. Hava ve Mikroorganizmalar

Canlıların yaşamında çok önemli bir yeri olan havanın bileşimine bakıldığında; %78,084'ü Azot, %20,946'sı Oksijen, % 0,934'ü Argon, %0,033'ü Karbondioksit ve geri kalan %0,003'ü ise Ksenon, Hidrojen Helyum, Neon ve Metan gibi gazlardan oluşmaktadır (Köksal, 2008). Bunların dışında havaya su buharı, ozon, kükürt dioksit ve azot dioksit de karışmaktadır. Dünyamızı saran ve yüksekliği 1000 km kadar olan gazlar kısmına atmosfer, bunu oluşturan gazlar karışımına da hava denilmektedir (Unat, 1993).

Yetişkin bir insanın günde 2,5 kg kadar suya, 1,5 kg kadar besine ihtiyacı varken yaklaşık olarak 15 kg kadar havaya gereksinimi bulunmaktadır. Yine yetişkin bir insan susuzluğa 6 gün, açlığa 6 hafta dayanabilirken havasızlığa 6 dakikadan fazla dayanmamaktadır.

Hava, mikroorganizmalara taşınma olanağı sağladığı için mikrobiyolojide önemlidir. Mikroorganizmalar havaya çeşitli şekillerde karışır ve etrafa yayılırlar. Havadaki mikroorganizmalar iklim koşullarına, yılın mevsimlerine ve günün saatlerine göre değişebilen dağılımlar gösterirler. Bu mikroorganizmalar toprak yüzeyinden kalkan tozlar ve insanların çeşitli aktiviteleri ile atmosferde sürekli sirkülasyon halindedir. İnsanlar havada bulunan bu mikroorganizmalarla sürekli temas içerisinde. Öte yandan insanlar çevresindeki canlı ve cansızlardan etkilenmekte ve onları etkileyebilmektedir (Örgev, 2000).

Havada bulunan mikroorganizma konsantrasyonu ise çevreye bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Mikrobiyal konsantrasyonun açık denizlerde düşük, karada biraz yüksek, şehir ve zirai çevrelerde ise çok daha yüksek seviyede olduğu bilinmektedir. Suların yüzeyindeki mikroorganizmalar derinliklerdekine oranla daha fazla olup buradan rüzgarlar yoluyla oluşan damlacıklarla havaya karışırlar. Diğer taraftan havadaki mikroorganizmalar kapalı ve açık yerlerde farklılık göstermektedir. Kapalı alanlardaki mikroorganizmalar, havalanma derecesine, insan sayısına ve faaliyetine göre değişir. Açık yerlerdeki havanın mikroorganizma kökeni topraklar ve sulardır. Mikroorganizmaların spor formları hava ile vejetatif formları ise kirli partiküller üzerinde ve su damlacıkları şeklinde taşınmaktadır (Di Giorgio, vd., 1995; Unat, 1993; Örgev, 2000).

Mikroorganizmalar havada bulunan partiküllerin bir kısmını oluşturur. Diğer partiküller, toz partikülleri, sıvı aerosoller ve küçük damlacıklardır. Biyoaerosol olarak isimlendirilen havada asılı halde bulunan biyolojik kökenli materyaller; bakteriler, fungus sporları, polenler, virüsler, çeşitli hayvan ve bitki parçalarından oluşur. Biyolojik kökenli partiküller, tek ya da mikroorganizma kümeleri şeklinde havayla taşınırken, cansız partiküller ise farklı boyutlarda olabilir. Hava kökenli mikroorganizmaların sayısı ve türü çevreye göre büyük değişiklik gösterebilmektedir (Tikveşli, 2013; Örgev, 2000). Biyoaerosollerin çoğu, toprak, su, hayvan ve insanlardan kaynaklanan doğal bileşenler olmaları nedeniyle her ortamda bulunabilirler. Biyoaerosolun seviyeleri ve türleri ise; coğrafi konum, mevsim, sıcaklık, rüzgar ve bağıl nem gibi faktörlerden etkilenmektedir (Menteşe vd., 2009). Havada bulunan mikroorganizmaların canlı kalabilmeleri atmosferin nisbi rutubeti, sıcaklığı, güneş ışınları gibi

koşullara ve mikroorganizmanın dayanıklılığına göre değişir. Bazıları havada uzun süre canlı kalabilirken bazıları ise birkaç saniyede ölür. Atmosferin, yüksek derecede ışık yoğunluğu, aşırı sıcaklık değişiklikleri, organik madde konsantrasyonu ve kullanılabilir suyun azlığı ile hava mikroorganizmaların üremesine uygun bir ortam değildir. Ayrıca atmosferik kirlenme (CO, NO, NO₂, SO₂ hidrokarbonlar) ve hava şartları (sıcaklık, rüzgar, nem, iklim) da havayla taşınan mikroorganizmaların yaşamlarını etkilemektedir (Unat, 1993; Rosas vd., 1993).

Atmosferin alt tabakalarında bol miktarda mikroorganizma ve onlara ait sporlar bulunmaktadır. Hava ve tozlarda en çok bulunan mikroorganizmalar, Basilluslar, Mikrokoklar, Stafilkoklar ve besin zehirlenmesi bakımından önemli olan Salmonella cinsi bakterilerdir (Mahdy ve El Sehravi, 1997; Ünver ve Baykan, 1981). Kalabalık bölgelerde 100-150 metre yükseklikte açık havada *Bacillus* ve *Clostridium* gibi bakterilerin sporları, küf mantarlarının konidileri, mikrokoklar ve bazı Enterobacteriaceae türleri bulunabilir (Unat, 1993). Spor teşkil eden bakteri ve mantarlar atmosferde çok uzun süre canlı kalıp yaşayabilirler. Şartlar normale döndüğünde spor veya kist yırtılarak vejetatif hücre gelişir (Örgev, 2000). Mikroorganizmalar solunan hava ile insanların ve hayvanların solunum yollarına girmektedir. Bunlar infeksiyonlara ve çeşitli alerji olaylarına sebebiyet verebilirler (Unat, 1993). Birçok hastalık yapan mikroorganizmalar havada toz parçacıkları veya tükürük damlacıkları aracılığıyla havadan besinlere ve insanlara bulaşabilirler (Ünver ve Baykan, 1981). Buna rağmen havayla taşınan bu mikroorganizmaların birçoğu kendi replikasyonunu yapmakta ayrıca çeşitli hastalıklara da sebep olabilmektedir (Karabıyık, 2002).

1.2. Araştırma Bölgesinin Özellikleri

Kütahya ili, Ege Bölgesi'nin İç Batı Anadolu Bölümü'nde yer almakta olup, Seyitömer, Kütahya'ya bağlı, merkeze yaklaşık 30 km uzaklıkta bulunan bir beldedir. Kütahya, kuzeyinde Bursa, kuzey doğusunda Bilecik, güneyinde Uşak, doğusunda Eskişehir ve Afyon, batısında Manisa ve Balıkesir illerimizle çevrilidir. 38° 70' ve 39° 80' kuzey enlemleri ile 29° 00' ve 30° 30' doğu boylamları arasında yer alan Kütahya ili 11.875 km² lik yüz ölçümüne sahiptir (<http://mebk12.meb.gov.tr>). Kütahya ilinde yıllık sıcaklık ortalaması 10,5°C dir. En sıcak aylar temmuz ve ağustos, en soğuk aylar ise ocak ve şubatır. Kütahya ilinde ölçülen en yüksek sıcaklık 38,6°C'dir. En düşük ölçülen sıcaklık değeri ise -28,1°C'dir (<http://www.kutahya.gov.tr/cografi-yapi>).

Bölgede geniş linyit yatakları bulunmaktadır. Kütahya'nın kuzeyinde bulunan Seyitömer beldesi buna en iyi örnektir (Darkot ve Tuncel, 1995). Seyitömer, eski yerleşim yerinin altında linyit yataklarının olması sebebiyle, yerleşim yerinin 5 kilometre kuzeybatısına taşınarak 1972 yılında belde haline getirilmiştir. Beldenin nüfusu yaklaşık olarak 2000-2500 arasında değişmektedir (https://www.turkcebilgi.com/seyitomer._kütahya). Seyitömer alanı 205 milyon tonluk kömür potansiyeli ile Kuzeybatı Anadolu'nun ekonomik odak noktalarından biridir (MTA, 1986). Kütahya ilinin 28 km kuzey doğusunda Seyitömer Termik Santrali yer almaktadır (Oruç, vd., 1999).

1.3. *Bacillus* Cinsi

Bacillus cinsi bakteriler toprak, su, hava, besin, çeşitli araç ve gereçlerden rahatlıkla izole edilebilirler. Doğada yaygın olarak bulunan *Bacillus* cinsi bakteriler hava mikroflorasının önemli bir mikroorganizma grubunu oluşturur (Kalkan, 2006). Bazı türleri zorunlu aerobik olup (*B. brevis*, *B. megaterium*, *B. firmus*, *B. sphaericus* ve *B. subtilis* gibi) değişen oksijen gereksinimine göre fakültatif anaerobik de olabilirler (Akan, 2010). *Bacillus*, diğer Bacillaceae familyasına ait cinslerden katalaz enzimi üretimi ve aerop şartlarda endospor oluşturmaları ile ayrılmaktadır (Barredo, 2005).

Bacillus cinsi içerisinde mezofilik yaşayan türler çoğunlukta olsada termofilik, asidofilik, psikrofilik ve halofilik yaşayanları da bulunmaktadır. *Bacillus* cinsinin üyelerinin hepsi spor oluşturma yeteneğine sahiptir. Yaklaşık 95 türü bulunan *Bacillus*'larda, endosporun hücre içindeki yeri farklıdır (Logan ve Vos, 2015; Ustaçelebi, 1999).

1.3.1. Hücre ve koloni morfolojisi

Bacillus cinsi bakteriler, gram pozitif, çubuk şeklinde, aerob veya fakültatif aerob, katalaz pozitif endospor oluşturabilen mikroorganizmalardır (Tekin, 2008). *Bacillus* türlerinin şekilleri çomak biçiminde, vejetatif formları düz iken, kenarları birbirine paralel olup uç kısmı yuvarlak ya da küt bitmektedir. Hücreleri çubuk şeklinde, gram boyama sonucunda tek tek ve çiftler halinde, bazıları zincirler ya da uzun filamentler olarak görülürler. Vejetatif hücreler 0,5x1,2 µm eninde ve 2,5x10 µm uzunluğundadır (Rodriguez, vd., 2000a). Basil çubukları yuvarlak ya da kare şekilli ve oldukça küçük olabilir (Bilgin, 2007). *Bacillus* türünün çubuk şekilli hücreleri genellikle yuvarlak uçludur ancak *Bacillus cereus* grubunun üyeleri genellikle kare olarak tanımlanmıştır (Logan ve Vos, 2015).

Bacillus suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüsü, kültürün bulunduğu besiyeri ortamının bileşimi ve inkübasyon sıcaklığı gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişebilir. Sadece küçük koloni formlarını içeren suşların dışında koloni çapı, besiyeri ve içerisindeki agar yoğunluğuna bağlı olarak değişir (Lennete vd., 1985). Katı besiyerlerinde üzeri ve kenarları pürüzlü, granüller yapıda olan koloniler meydana getirirler (Kaya, 2011). Bazı *Bacillus* türleri katı besiyerinde, inokülasyondan önce ortamdaki nem uzaklaştırılmadığı sürece kümeler halinde bulunma eğilimi gösterirler (Bilgin, 2007).

Genellikle R tipi koloni özelliği göstermekle birlikte (Rodriguez, vd., 2000a), koloniler, tutkal veya kremi gri ile kirli beyaz arasında değişmektedir. Suşlar, bazen siyah, kahverengi, turuncu, pembe veya sarı pigmentler üretebilir. *Bacillus* türlerinin çoğu pigment üretmez. Ancak *Bacillus megaterium* gibi bazı suşları özellikle kazein agarda sarı renkte pigment oluştururlar (Lennete, vd., 1985).

1.3.2. Hücre çeperi ve zar yapıları

Bacillus türlerinin hücre duvarları, sitoplazmik zarı koruyan ve saran, dinamik olarak değişken ve esnek yapıdadır. *Bacillus*'ların hücre duvarı kalınlığı 20-50 nm arasında değişmektedir. *Bacillus* hücrelerinde genelde sitoplazmik zar üzerinde teikoik asitler gibi anyonik polimer ve birkaç peptidoglikan tabaka ile sarılmış hücre duvarı bulunmaktadır (Sneath, 1986). Bu anyonik polimerler duvara ampifilik özellikler katmaktadır. Buna ek olarak peptidoglikan-anyonik polimer kompleksine kovalent bağlarla veya kovalent olmayan etkileşimlerle bağlı değişik oranlarda protein, nötral polisakkarit, lipoteikoik asit ve hücre duvarı kompleksinin polielektrolit jel yapısının parçası olan katyonlar hücre duvarında bulunurlar (Yılmaz, 2008). *Bacillus* türlerinin çoğunda peptidoglikan tabakası kalın yapıdadır (Rodriguez, vd., 2000b). *Bacillus* suşlarında yoğun halde bulunan mürein tipi direkt birbirine bağlı mezo-diamino pimelik asit yapısındadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda *Bacillus* hücrelerinin, çoğu prokaryot hücrede olduğu gibi, hücre duvar yüzeyi tabakalarının parakristal şeklinde olduğu ve hücre yüzeyini tamamen kapladığı tespit edilmiştir. Bu tabakaların protein veya glikoproteinden oluştuğu ve düzenli bir yapıya sahip olduğu belirlenmiştir (Lennete, vd., 1985).

Hücre zarı besinlere karşı yarı geçirgen özelliktedir. Bu zarın başlıca bileşimi %50 protein, %28 yağ, %15-20 karbonhidrat içeren iki katmanlı bir yapıya sahiptir. Sitoplazmik membran proteinler ve fosfolipitlerce zengindir. *B. subtilis*'in de içinde olduğu çoğu *Bacillus*

türlerinde, fosfotidil etanolamin esas fosfolipit olup toplam lipit ağırlığının %20-40'ını oluşturur. Diğer fosfolipitler, kardiolipin ve fosfotidil gliserol içerirler (Harwood vd., 1990).

1.3.3. Kapsül yapısı

Kapsül maddesi sitoplazmik zar tarafından oluşturulur (Öner, 1992). Bazı *Bacillus* türlerinde hücre duvarından ayrı olarak ve hücre duvarının dışında bulunan jelatinöz, viskoz, elastik veya mukoid karakterde olan kapsül bulunmaktadır (Sneath, 1986). Kapsülün kimyasal yapısı genellikle türden türe değişmektedir (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2001). Bazı *Bacillus* türleri, dış yüzeyinde polisakkarit veya polipeptid yapıda kapsül oluştururlar.

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. Örneğin *B. anthracis*'de poli D-glutamik asitten oluşan kapsül bulunmakta ve bu virulans faktör taşımaktadır. *B. circulans* bir glükoz ve glukuronik asit ekstrasellüler polimeri oluşturmaktadır (Ryguş ve Hillen, 1991). İnsan ve hayvanlarda şarbon hastalığının etkeni olan *Bacillus anthracis*, in-vivo ortamda, anaerop koşullarda ve ortamda bikarbonat varlığında polipeptid kapsül oluşturur. Hazırlanan yayma polikrom metilen mavisi ile boyandığında mavi boyanan basillerin etrafında pembe boyanan kapsüllerin gösterilmesi tanımlamada çok önemlidir (Perçin, 2011).

1.3.4. Flagella yapısı

Bacillus türlerinin çoğunda, hareket yeteneği peritrik kamçılar tarafından sağlanır. Bazı türlerde birkaç tane kamçı olabilir. Bu türlerin sayısı fazla değildir. *Bacillus* cinsinde kamçı taksonomik sınıflandırmada kullanılan bir karakter değildir (Lennete vd., 1985). *Bacillus anthracis*'de hiç flagella bulunmazken *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* bakterilerinde birden fazla flagella bulunmaktadır (Kaynar ve Beyatlı, 2006).

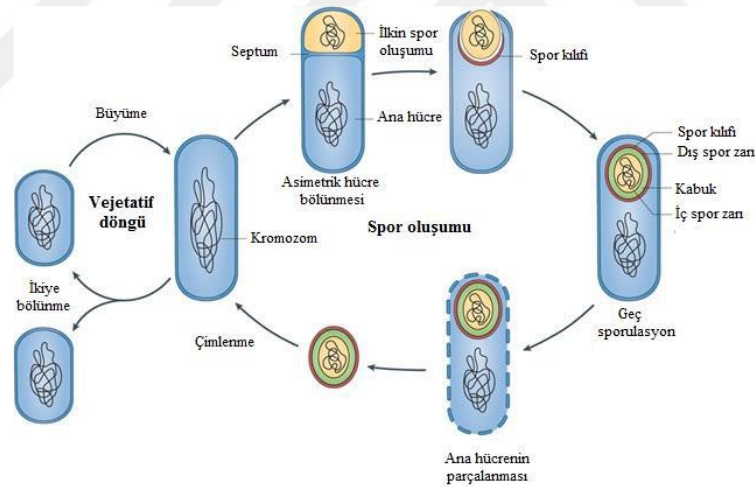
1.3.5. Spor yapısı ve oluşumu

Endosporlar, ısıya, soğuğa, kurumaya dayanıklı olması sebebiyle uzun zamandan beri birçok araştırmacı tarafından inceleme konusu olmuştur. Sporulasyon, kötü koşullara ulaşıldığında organizmanın bir savunma mekanizmasıdır (Öner, 1992). Spor oluşumunu tetikleyen en önemli faktör ise besin yetersizliği olup *Bacillus* türlerinin probiyotik olarak değerlendirilmeleri, özellikle oluşturdukları sporelerden kaynaklanmaktadır (Erem, vd., 2013).

Ana hücrede bulunan sporun şekli ve konumu, *Bacillus* sp. türlerinde karakteristik bir yapı gösterir. En sık görülen, alt uç yerleşimdir ve pozisyon merkezi santral, terminal ve alt terminal arasında değişebilir. En yaygın spor biçimi elipsoidal veya ovaldır, ancak şekiller kısmen silindirikten küresel şekildedir ve bazı türlerde böbrek veya muz şeklinde düzensiz spor formları görülebilir (Priest, 2002).

Birçok bakteri genusu bulunmasına rağmen endosporlar sadece *Clostridium* ve *Bacillus* cinslerinde prensip olarak görülür (Öner, 1992). *Bacillus* sporları çok kompleks bir yapı göstermekte olup, vejetatif hücrede kolayca görülür. *Bacillus* sporları içten dışarıya doğru sıralandığında öz, iç spor ceket, dış spor ceket, korteks ve ekzosporiyum yapılarından oluşur (Tekin, 2008).

Sporilasyon oluşumu bakteri üremesinin durgunluk fazında gerçekleşmektedir. Sporlar genellikle oval veya yuvarlak şekilde olup, hücrenin çeşitli yerlerinde bulunabilirler (Arda, 2000).



Şekil 1.1. Bakterilerde endospor oluşumu (MEB, 2015).

Sporulasyonda ilk aşamada bakteri kromozomunu çoğaltır ve asimetrik bölünme ile ilkin spor oluşumunu gerçekleştirir. İlkin spor oluşumundan sonra endosporun etrafında onu olumsuz etkilerden koruyacak yapılar oluşturulur. Ana hücrenin parçalanması ile endospor yapısı serbest hale geçer. Ortam koşulları eski haline gelinceye kadar dormant durumda bekler. Dış ortam koşulları çoğalmaya için uygun hale geldiğinde çimlenme olayı ile tekrar vejetatif hücreyi oluşturur ve vejetatif yaşam döngüsüne devam eder. Bakteriler için endospor

neslini devam ettirme yapısı değil olumsuz koşullardan korunma yapısıdır (Milli Eğitim Bakanlığı, 2015).

1.3.6. Genetik özellikleri

Bacillus cinsinin genetik çalışmalarında çoğunlukla kullanılan *B. subtilis* türü oldukça iyi tanımlanmış olup, genom büyüklüğünün 4,2 Mbp olduğu ve 4100 protein kodlama genini içerdiği bildirilmiştir. Genel ve özel transdüksiyon, plazmid DNA aktarımı, plazmid ve bakteriyofaj vektörleri ile ilgili moleküler genetik araştırmalarında *B. subtilis* türünün yanı sıra, *B. cereus*, *B. brevis*, *B. coagulans* gibi türler de kullanılmaktadır (Ediz ve Beyatlı, 2005).

Plazmid DNA'lar metallere, antibiyotiklere ve ilaçlara dirençlilik, toksin formasyonları, virülens faktörleri, pilus oluşumu, fermantasyon özellikleri, nitrojen fiksasyonu gibi bazı özel karakterleri taşıdıkları için bakterilere avantajlar sağlamaktadırlar. Bazı *Bacillus* türlerinin antibiyotiklere karşı dirençli olmasını sağlayan plazmitleri taşıması, rekombinant DNA çalışmalarında vektör organizma olarak kullanılabilmelerine ve birçok çalışma için tercih edilen mikroorganizmalar olmalarını sağlamıştır (Demeli, 2012). *Bacillus subtilis* 168 suşunun düşük ve yüksek kopya sayıda plazmid DNA bulundurduğu tespit edilmiştir. *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki HD-1 kültürünün iki plazmid içerdiği ve moleküler ağırlığının 0,8-4,2 kb olduğu bulunmuştur (Kaynar ve Beyatlı, 2006).

Bacillus cinsi içindeki DNA baz kompozisyonunun dağılımı, cinsin genetik dağılımı açısından değişik sonuçlar vermektedir. Doğal bir cinste en fazla % 10-15 aralığında olması gereken % mol G+C oranı *Bacillus* cinsi içinde G+C mol oranı % 32-69 arasında değişmektedir (Çon ve Gökalp, 1997). Bu oranın aynı türdeki değişik suşlarda % 40-50 arasında olabildiği bildirilmektedir. Bu bilgiler belki de cinsin yeni cinslere bölünebileceğini işaret etmektedir (Ediz ve Beyatlı, 2005).

1.4. Ekoloji ve Habitatları

Fizyolojik sınırları geniş olan *Bacillus* türleri çok farklı habitatlarda bolca bulunabilmektedir. Çoğunlukla saprofit olmakla birlikte doğada en yaygın olarak toprakta bulunur ve toz partikülleri ile sulara, hayvan ve bitki materyallerine bulaşır (Akan, 2010; Barredo, 2005). Bu bakterilerin yağ ve proteinleri parçalama yetenekleri çok yüksektir. Bu nedenle de Basiller, çoğunlukla çürüme ve bozulma ortamında bulunurlar (Ediz ve Beyatlı, 2005). *Bacillus*'lar, sporları sebebiyle biyosferde değişik çevrelerden izole edilebilirler. Bazı

Bacillus'lar ise ekstrem şartlarda büyüyebilme kapasitesindedirler ve uç pH değeri olan, üre içeren, asitli veya yüksek ısıli ortamlardan izole edilebilmektedirler (Telefoncu, 1997; John, 2009).

Doğada geniş olarak, hava, süt ve süt ürünlerinden, su ve yiyecek gibi birçok ortamdan elde edilirler (Ediz ve Beyatlı, 2005). Kutup bölgeleri, sıcak su kaynakları, kaplıcalar, tatlı ve tuzlu sular, çöl toprakları bu cinsin yaşayabildiği alanlardır. Karbon ve azot döngüsünde önemli rol oynarlar (Earl vd., 2008). Çoğu *Bacillus* türü doğal ortamda yaygın olarak bulunan dağılımlı saprofitlerdir, ancak bazı türleri omurgalı ve omurgasız hayvanlar için patojen olabilmektedir. Örneğin *Bacillus anthracis*, hayvanlar ve insanlar için patojen olan bir *Bacillus* türüdür (Logan ve Vos, 2015).

1.5. Taksonomisi

Bacillus cinsi, 1872 yılında Ferdinand Cohn tarafından sporülasyonu dikkate alınmadan çubuk şeklindeki üç bakteri çeşidi ile (*Bacillus subtilis* (tip türü), *Bacillus anthracis* ve *Bacillus ulna*) oluşturulmuştur. *Bacillus* cinsinin, aerobik, endospor oluşturan, çubuk şeklindeki bakteriler olarak tanımlanması, 1920'li yıllarda olmuştur. Ayrıca Amerikan Bakteriyoloji Derneği Komitesi tarafından *Bacillus* 'un, Bacillaceae familyasındaki endospor oluşturan diğer bir cins olan *Clostridium* cinsinden aerobik solunum yapması ve sporangiyum şekli ile ayrılabilirliği önerilmiş olup bu açıklama, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology kitabının birinci ve ikinci basımlarında uygulanmıştır (Logan ve Vos, 2015).

Biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik tekniklere göre spor oluşturabilen Gram pozitif *Bacillus*'ların taksonomik sınıflandırması aşağıdaki gibi verilmiştir (Tekin, 2008).

Üst alem: Bacteria

Alem: Eubacteria

Şube: Firmicutes

Sınıf: Bacilli

Takım: Bacillales

Aile: Bacillaceae

Cins: *Bacillus*

Cins seviyesini tanımlamada spor oluşumu en önemli özelliktir. Sporların şekilleri, sitoplazmik görünümü, taksonomik araştırmalarda yararlı olup sporangial karakterler tanımlama için oldukça değerlidir. Buna göre *Bacillus* türleri üç grupta toplanmıştır. Birinci grupta, sporangia şişmemiş, silindirik-oval sporları içermektedir. Bu gruba örnek, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus cereus* grupları, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus lentus* ve *Bacillus firmus* verilebilir. İkinci grupta sporangia şişmiş ve oval sporları içermektedir. Bunlar arasında *Bacillus alvei*, *Bacillus laterosporus*, *Bacillus macerans*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans* ve *Bacillus polymyxa* yer alır. Üçüncü grupta sporangiyalar belirgin olarak şişmiş ve yuvarlak sporları içermektedir. Bu gruba örnek olarak *Bacillus pasteurii* ve *Bacillus sphaericus* türleri verilebilir (Logan ve Vos, 2015).

1.6. *Bacillus*'ların Önemi ve Endüstriyel Kullanımı

Bacillus cinsi bakteriler, enzim, antibiyotik ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstride büyük önem arz ederler. Bu cinse ait bakteriler kolay üretilebilmeleri nedeniyle de çalışmalarda sıklıkla tercih edilirler. Olumsuz koşullara dayanıklılık, metabolizma çeşitliliği, geniş bir çevrede dağılım göstermeleri önemli avantajları arasında sayılmaktadır (Shimizu, 1992). *Bacillus* türleri yaklaşık elli yıldır tıbbi destek ürünü olarak kullanılıyor olsada bu konudaki bilimsel çalışmalar yaklaşık son 15 yıldır yapılmaktadır. Üzerinde en çok çalışılan *Bacillus* türleri; *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus laterosporus*'tur (Erem vd., 2013).

Bacillus 'ların ürettiği endüstriyel enzimlerden olan selülaz, subtilisin ve amilazlar deterjan endüstrisinde; nötral proteazlar süt endüstrisinde kullanılmaktadır.

Bazı *Bacillus* türleri ise proteolitik, sakkarolitik ve lipolitik enzimleri nedeniyle besin endüstrisinde önem taşımaktadır. Birçok *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi de ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır (Ediz ve Beyatlı, 2005).

B. polymyxa, polimiksin antibiyotiği, *B. licheniformis* ise basitrasin antibiyotiklerinin üretiminde kullanılır. *B. amiloliquefaciens*, *B. subtilis* ve *B. stearothermophilus* bakteriyel α -amilaz enzim üretiminde kullanılmakta olup amiloz ve amilodekstrini dekstrinlere parçalamaktadır. *B. mesentericus*, *B. subtilis* ve *B. stearothermophilus* ise bakteriyel proteinaz enzimi üretiminde kullanılmaktadır. Bu enzim ise et ürünleri ve balık etlerinin yumuşatılmasında, şarap ve bira endüstrisinde protein bulanıklığının giderilmesinde stabilize edici olarak kullanılmaktadır (Ayhan, 2000).

Tarım ve endüstriyel alanlarda başarılı bir şekilde kullanılan pek çok maddeyi sentezleyebilme yeteneğine sahiptirler (Topçal vd., 2014). *Bacillus* cinsine ait türlerin çoğunun patojenik potansiyeli azdır veya hiç yoktur. Ancak bazı türleri insanlarda ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olur. *Bacillus anthracis* insan ve hayvanlarda şarbon hastalığının etkenidir. *Bacillus anthracis* biyolojik savaşlarda yıllarca potansiyel bir madde olarak kullanılmıştır (Logan ve Vos, 2015). *B. cereus* 'un bazı suşları insanlarda gıda zehirlenmesine neden olur. *B. stearothermophilus* ve *B. coagulans* düşük pH değerlerinde gelişebilirler ve özellikle konserve gıdalarda bozulmalara neden olurlar. *B. larvae*, *B. lentimorbus*, *B. thuringiensis*, *B. popilliae* ve *B. sphaericus* 'un bazı türleri böcek patojenidir ve *B. thuringiensis* biyoinsektisit olarak kullanılmaktadır (Ayhan, 2000).

1.7. *Bacillus* 'larda Enzim Aktivitesi

Enzimler, tepkimelerin biyolojik katalizörüdürler. Reaksiyonlar, enzimler ile diğer katalizörlerden daha çabuk katalizlenmekte ve dengeye ulaşmaktadır. Biyokimyasal açıdan katalizör, tepkimenin aktivasyon enerjisini düşüren, dolayısıyla tepkime hızını arttıran bir maddedir. Katalizörler tepkimeleri kolaylaştırır, ancak tepkime sırasında tüketilmez ya da değişikliğe uğratılmazlar (Aehle, 2004).

Bazı hayvanların ve bitkilerin enzimleri kullanılmakla birlikte çoğu ticari enzim, mikrobiyal kökenlidir. Bu ekstraselüler enzimlerin büyük bir çoğunluğu *Bacillus* 'un çeşitli türlerinden elde edilmektedir. Bunların proteazları ve amilazları en yaygın kullanılanlardandır ve bu cinsin bazı türlerinin ürettiği termostabil enzimler için yoğun bir talep vardır. Bütün ticari enzimlerin %34'ü deterjan endüstrisi, %14'ü süt ürünleri, %12'si nişasta işletmeleri ve %11'i tekstil uygulamaları için kullanılmaktadır (Waites vd., 2001).

Bacillus 'lar amilaz, lipaz, proteaz, kitinaz, ksilanaz, pektinaz ve selüloz gibi farklı ekstraselüler enzimleri üretme yeteneğine sahiptirler. Bir karbohidraz olan α -amilaz ekstraselüler enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir (Katı vd., 2016).

1.7.1. Amilaz enzimi aktivitesi

Amilazlar en önemli enzimler arasında sayılmakta olup endüstriyel ve biyoteknoloji uygulamalarında önemli bir yer tutmaktadırlar. Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilmelerine rağmen mikrobiyal kökenli enzimler endüstriyel alanda daha önemlidirler (Burhan vd., 2003).

Nişasta, yüksek moleköl ağırlığına sahip bir moleköl olup, glikoz moleküllerinin glikozidik bağlarla bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bu moleküllerin parçalanması için ilk olarak ekstrasellüler enzime (amilaz) ihtiyaç duyulur. Amilaz enzimi, nişastayı parçaladığında küçük polisakkaritler (dekstrin) ve maltoz molekülleri oluşur (Demirbağ ve Demir, 2000).

α -amilazlar amiloz zincirindeki glikoz birimleri arasında bulunan α -1,4 bağlarını rastgele parçalayarak; glikoz, maltoz ve maltotirioz birimlerine çeviren ekstrasellüler enzimlerdir (Bano vd., 2011). α -amilazlar endüstriyel alanda nişasta hidrolizinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Buchholz ve Seibel, 2008).

1.7.2. Proteaz enzimi aktivitesi

Proteazlar, toplam endüstriyel enzim ticaretinin büyük bir bölümünü oluşurmaktadır. Proteazlar, gıda başta olmak üzere pek çok alanda kullanılmaktadır. Bakteriyel proteazların diğer proteazlarla kıyaslandığı zaman daha etkili olduğu görölmektedir (Banerjee, 1999). Birçok mikroorganizma grubundan proteaz izole edilse de izolasyonunun daha kolay olması sebebiyle biyoteknolojide en fazla *Bacillus* cinsi bakteriler kullanılmaktadır (Katı vd., 2016).

Proteazlar; proteinlerdeki peptid bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimlerin bir çeşidir. Proteazlar, büyük polipeptidleri ve proteinleri hücreler tarafından absorblanabilen daha küçük moleküllere hidroliz ederler (Salleh vd., 2006). Proteazlar; prokaryot, hayvan, bitki ve mantarları içeren dünyadaki tüm yaşam formlarının gerekli bileşiklerdir. Yaşayan tüm organizmalarda bulunan proteolitik enzimler, hücre gelişimi ve farklılaşması için gereklidir (Gupta vd., 2002). Proteazlar endüstriyel enzimlerin üç büyük grubundan birini temsil eder ve dünya çapındaki toplam enzim satışının yaklaşık %60'ını oluşturarak endüstriyel enzim platformunda büyük bir yere sahiptirler (Ahmetoğlu, 2011).

1.8. Ağır Metallerin Kullanım Alanları ve Önemi

Ağır metaller yoğunluğu 5 g/cm³ den yoğun olmakla birlikte canlılar üzerinde zararlı etki gösterebilen metallerdir. Demir, bakır, çinko, kobalt, arsenik, civa, kadmiyum, krom ve kurşun gibi metallerle birlikte 60'a yakın metal ağır metal olarak kabul edilmektedir.

Ağır metaller çoğunlukla otomobil endüstrisi, metal kaplama endüstrisi, elektriksel ve elektronik materyallerin üretilmesi ve kullanılması, boya, boru, lastik ve silah endüstrilerinde kullanılmaktadır.

Endüstriyel işlemler sonucunda hava, toprak ve su ortamlarına dağılan ağır metaller besin zinciri yoluyla ya da havadan aerosol olarak solunmaları sonucunda insan ve hayvanların bünyesine ulaşarak etkili olurlar. Diğer kirleticilere göre kıyaslandığında metallerin daha önemli olması bu maddelerin sulu ortamda biyolojik olarak ayrışamamasından kaynaklanır. Ağır metaller, biyolojik süreçlere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak sınıflandırılanların, organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunması gereklidir. Ancak yüksek dozda olması insan sağlığını olumsuz etkiler. Hemen hemen bütün metaller; su içinde yaşayan organizmaların dışında maruz kalma düzeyi yeterince yüksek ise insanlar için de toksik etki gösterir. İnsan sağlığı ve su ekosistemleri üzerindeki olumsuz etkilerinden korunmak için metal iyonları çeşitli tekniklerle su ve atık sularından giderilmelidir (Demiroğlu, 2010; Kahvecioğlu vd., 2006).

1.8.1. Ağır metallerin toksik etki mekanizması

Toksosite, organizmadan organizmaya değişebildiği gibi, metalden metale göre de değişebilmektedir. Olumlu veya olumsuz etkiler sadece elementin tipi ve konsantrasyonuna bağlı olmayıp değişik türlerin genetik esaslı fizyolojik davranışları ile de ilgilidir (Haktanır ve Arcak, 1998).

Metaller, mikroorganizmalar için membran fonksiyonlarını engellemeleri, enzimatik aktivitelerini inhibe etmeleri (engelleme) ve nükleik asitlerine zarar vermelerinden dolayı toksiktir. Önemli fonksiyonel grupların engellemesi, temel metal iyonlarının yerine geçmesi veya biyolojik moleküllerin aktif konformasyonlarının modifikasyonu ile mikroorganizmalar üzerine inhibe edici etki gösterirler. Çevrede bulunan çeşitli formlardaki ağır metaller mikrobiyal yoğunluk ve aktivitelerde önemli modifikasyonlara neden olabilirler (Akkan, 2009).

1.8.2. Ağır metal dirençlilik mekanizmaları

Ağır metal kirliliği mikroorganizmaların hücre duvarı, protein yapısı, nükleik asit ve yaşamsal sistemleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır. Ağır metal kirliliğine maruz kalan bölgelerde yaşayan mikroorganizmalar ölüm, biyoçeşitliliğin bozulması ve türün tamamen ortadan yok olması gibi tehditlerle karşı karşıya kalmaktadır. Ancak bazı mikroorganizmalar geliştirdikleri farklı sistemler ile bu metallerin olumsuz etkilerinden korunabilmektedir. Mikroorganizmalar ağır metallere karşı oluşan direnci, temel hücre bileşenlerinde yaptıkları yapısal değişiklikler veya sentezledikleri yeni hücre bileşenleri ile

sağlarlar. Yapılmış çalışmalarda ağır metal kirliliğine maruz kalmış ortamlarda dirençli farklı türlerin bulunabildiği tespit edilmiştir (Yavuz ve Sarıgül, 2016).

Mikroorganizmalar direnç sistemleri geliştirerek ağır metallerin yoğun olduğu ortamlarda yaşamaya uyum sağlamışlardır. Mikroorganizmalarda ağır metallerle karşı gösterilen direnç genleri kromozom ya da plazmidler üzerinde bulunup çoğunlukla plazmid kodlu spesifik sistemlerle ağır metallerle direnç göstermektedirler. Ağır metal direnci ile ilgili çalışmalar 1970'li yılların başlarında birkaç mikroorganizmanın ağır metal direnci gösterdiğinin belirlenmesiyle başlamıştır. Bu mikroorganizmalar çoğunlukla aerobik grupta yer alan *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Bacillus* sp. türleridir. İlk olarak gözlenen direnç civa ve organomerküryellere karşıdır. Ağır metal direnci genellikle antibiyotik direnci ile ilişkilidir. Bazı durumlarda belirli ağır metal ve antibiyotik direnci aynı plazmid üzerinde bulunur. Bazı mikroorganizmalar adaptasyondan başka ortamdaki ağır metal kirliliğine karşı ortamı temizleyici organizmalar olarak görev yapmaktadırlar. Uzun süre ağır metallerle maruz kalan bakterilerde bu metallerle karşı çeşitli dirençlilik mekanizmaları gelişmiştir. Mikrobiyal metal dirençliliği mekanizmalarını sıraladığımızda metallerin fosfat, karbonat ve sülfat olarak presipitasyonları; etil veya metil gruplarının eklenmesi ile metallerin buharlaşması; membrandaki elektronegatif bileşenler ve ekzopolimerler tarafından fiziksel çıkarılma; enerji gerektiren metal sistemleri ve düşük moleküler ağırlıklı sisteminde zengin proteinler ile intraselüler müdahale sayılabilir. Bu dirençliliğin bakteriler arasında hızla yayılmasında değişen çevre koşullarına uyumu kolaylaştıran plazmidlerin etkisi çok büyüktür. Çeşitli habitatlarda yapılan birçok çalışmada metal dirençlilik genlerinin konjugatif plazmidler ve konjugatif transpozonlar üzerinde kodlandığı gösterilmektedir. Bunun yanı sıra bazı metaller (Cu, Co, Zn, Ni) mikroorganizmalar için düşük konsantrasyonlarda gereklidir ve mikroorganizmaların bazı metalloproteinleri ve enzimleri için çok gerekli kofaktörlerdir. Bu nedenden dolayı ağır metal direnci ve ağır metal dirençli mikroorganizmalar çevre için çok önemlidir. Mikroorganizmaların bu metallerle farklı kromozomal, transpozon, plazmid kodlu sistemler ile adapte olduğu tespit edilmiştir (Yavuz ve Sarıgül, 2016; Akkan, 2009).

1.9. *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Ürettikleri Metabolitler

Mikrobiyal metabolitler, mikroorganizmaların metabolizmaları sonucunda oluşturdukları ürünlerdir. Bu metabolitler primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olmak üzere iki şekilde adlandırılmaktadır. Primer metabolitler, mikroorganizmanın gelişmesi için gerekli olan ürünler

olup canlıda logaritmik faz (gelişme fazı) boyunca düzenli olarak üretilen maddelerdir. Primer metabolitlere, etanol, sitrik asit, aseton, bütanol, amino asitler ve vitaminler örnek verilebilir.

Sekonder metabolitler ise ortamda bulunan bir veya daha çok esas besinin tüketilmesi ile büyüme durduğunda, mikroorganizmanın idiofaz denen üretim periyoduna girmesiyle oluşturduğu ürünlerdir. Sekonder metabolitlerin sentezinde hem yapısal hem de düzenleyici genler hizmet etmektedir. Sekonder metabolitlere, antibiyotikler, enzim inhibitörleri ve toksinler örnek olarak verilebilir. Sekonder metabolitlerin primer metabolitlerden farklı özellikleri bulunmaktadır (Usta, 2012). Bunlar:

Az organizma tarafından sentezlenir.

Üreme ya da gelişme için gerekli değildirler.

Sentezleri üreme şartlarına bağlıdır, indüklenebilir.

Birkaç ara üründen üretilir.

Çok miktarlarda üretilmesi mümkündür.

Antimikrobiyal maddeler ise çok az yoğunlukta dahi mikroorganizma gelişimini engelleyen, biyolojik kökenli olan ikincil (sekonder) metabolitlerdir. Bu metabolitler, mikroorganizmanın çoğalmasını engelleyici 'bakteriostatik' veya 'fungostatik' olabildikleri gibi; mikroorganizmanın ölümüne sebep olan 'bakterisit' ve 'fungisit' gibi maddeler de olabilirler. Mikroorganizmalar tarafından üretilen, düşük moleküler ağırlıklı, organik doğal ürünler olan antimikrobiyal maddeler, seçici toksik özelliğe sahip olduklarından, çok düşük konsantrasyonlarda bile mikroorganizmaya zarar verebilirler (Yılmaz ve Beyatlı, 2003).

Bacillus'ların ürettikleri metabolitler antimikrobiyal aktivite açısından oldukça araştırılmaktadır. *Bacillus*'ların tercih edilmesinde izolasyonunun kolay olması, üretiminde kompleks besiyerine ihtiyaç duyulmaması, kısa sürede gelişebilmesi ve geniş metabolik aktiviteye sahip oluşu gibi nedenler yer almaktadır (Usta, 2012).

1.9.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler daha çok Bacillaceae, Mycophyta ve Actinomycetales grubundaki canlılar tarafından üretilmektedir. Bunlar içerisinde yer alan *Bacillus* türleri, antibiyotik üretme kapasitesi açısından en çok çalışılan organizmalar arasına girmiştir. Çünkü *Bacillus* türleri biyolojik aktiviteleri sonucunda çok sayıda peptid üretmektedirler. *Bacillus brevis* ve *Bacillus*

subtilis' ten 167 adet peptid antibiyotiğin üretildiği bildirilmiştir. Bunlardan, 66 farklı peptid antibiyotik *Bacillus subtilis* suşlarından, 23 tanesi de *Bacillus brevis*' ten üretilmiştir. *Bacillus*' lar tarafından elde edilen antibiyotiklerden bazıları Çizelge 1.1'de verilmiştir (Usta, 2012).

Çizelge 1.1. *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından üretilen bazı antibiyotikler.

Bakteriler	Ürettikleri Antibiyotikler
<i>Bacillus cereus</i>	cerein, zwittermisin
<i>Bacillus thuringiensis</i>	tochisin
<i>Bacillus brevis</i>	gramisidin, tirosidin
<i>Bacillus circulans</i>	circulin
<i>Bacillus laterosporus</i>	laterosporin
<i>Bacillus licheniformis</i>	basitrasin
<i>Bacillus polymyxa</i>	polimiksin
<i>Bacillus subtilis</i>	subtilin, mikobacilin, bacilin, difficidin, fengisin
<i>Bacillus megaterium</i>	megasin
<i>Bacillus coagulans</i>	coagulin

Antibiyotikler, ribozomal ve nonribozomal olmak üzere iki farklı mekanizma ile sentezlenmektedir. *Bacillus*'larda; subtilin, ericin, sublancin, subtilosin, basilisin *Bacillus subtilis* tarafından, mersacidin *Bacillus amyloliquefaciens* tarafından ribozomal sentez mekanizması yoluyla üretilmektedir. Basitrasin *Bacillus licheniformis* tarafından, fengisin, surfaktin, mikobasilin, iturin *Bacillus subtilis* tarafından, gramisidin S, tirosidin *Bacillus brevis* tarafından, zwittermisin *Bacillus cereus* tarafından nonribozomal olarak sentezlenen bazı antibiyotiklerdir (Usta, 2012).

Bacillus türlerinde besinsel stresler (açlık) hayatta kalma yeteneğini arttırmada birçok işlemlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu aktivasyonlar genetik yetkinliğin gelişmesini, sporulasyonu, bazı parçalayıcı enzimlerin sentezlenmesini ve antibiyotik üretimini kapsamaktadır. Bu işlemlerdeki fonksiyonel genler logaritmik fazdan durağan faza geçiş sırasında aktive edilmekte ve bu genlerin transkripsiyonu başlangıç seviyesinde bazı mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir. *Bacillus* türlerinin, geç logaritmik faz veya erken durağan fazda sekonder (ikincil) metabolit olarak antibiyotik üretme yeteneğinde olduğu ve sporulasyon olayı başladığında, antimikrobiyal madde üretimine de başladıkları ifade edilmektedir (Usta, 2012).

1.9.2. Bakteriyosinler

Bakteriyosinler kapsamlı olarak bakteriler tarafından üretilen doğal antimikrobiyal metabolitlerdir. Protein yapısında olup, genellikle kısa zincirli, küçük molekül ağırlığına sahiptirler. Birçoğu ısı stabilitesine sahip olup, asidik gıdalarda aktivite gösterebilmekte ve sindirim sistemi kökenli proteolitik enzimler ile parçalanabilmektedir (Kurt ve Zorba, 2005).

Bakteriyosinlerin aktiviteleri geniş ya da dar spektrumlu olmakla birlikte aynı türden veya farklı cinsten bakterileri öldürücü veya inhibe edici etkisi olabilmektedir (Jenssen vd., 2006). Bakteriyosinler, çoğu bakteri grubu tarafından ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptitler olup aynı ya da farklı bakteri grupları tarafından sentezlenen yüzden fazla bakteriyosin çeşidi bulunmaktadır (Klaenhammer, 1993). Bakteriyosinler, çok güçlü yapıları olan spesifik toksinlerdir. Genellikle stres altındaki koşullarda sentezlenirler ve bağışıklık kazanmış ya da dirençli olan komşu bakteriler dışındaki bakterilerin elimine olmasını sağlarlar (Feldgarden ve Riley, 1999).

Laktik asit bakterileri başta olmak üzere, *Bacillus*, *LactoBacillus*, *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Mycobacteria*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Sarcina*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Streptomyces* gibi pek çok cinse ait üyelerin bakteriyosin ürettiği bulunmuştur (Tagg vd., 1976). *Bacillus* türleri genel olarak, patojenik bakteri ve funguslara karşı terapötik ajanlar olarak peptitler, lipopeptitler, fosfolipitler ve polienler üretirler ve üretilen antimikrobiyal bileşenlerin çoğu peptit kökenlidir (Topçal vd., 2014).

Bacillus cinsi içinde *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*, *B. megaterium* ve *B. thermoleovorans* gibi birçok *Bacillus* türü için bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri önleyici maddelerin (BLIS) üretildiği bildirilmiştir (Hyronimus vd., 1998). *Bacillus cereus*'dan seresin, *Bacillus megaterium*'dan megasin bakteriyosinleri elde edilebilmektedir (Öner, 1987).

Gram pozitif bakterilerden Bacillaceae familyasında, bakteriyosin üretimine yönelik genetik belirleyiciler plazmit ya da kromozomal kökenli olarak belirlenmiştir. *B. subtilis* tarafından üretilen subtilinin belirleyicilerinin kromozomal olarak kodlandığı bildirilmiştir. Ayrıca sırasıyla *B. stearothermophilus*, *B. megaterium* ve *B. coagulans* I₄ tarafından üretilen termosin, megasin ve koagülin plazmitle kodlanmıştır (Hyronimus vd., 1998).

Bakteriyosinler duyarlı mikroorganizmalar üzerinde değişik etki mekanizmalarına sahiptirler. Hücrenin sitoplazmik mebrana bağlanarak, hücre içerisine girip zarda gözenekler oluştururlar. Böylece düşük molekül ağırlığına sahip hücre bileşenlerinin hücre dışına sızmasına neden olurlar. Hücrede meydana gelen bu değişimler, DNA ve RNA gibi hücre için hayati önemi taşıyan makro moleküllerin degradasyonuna, bu moleküllerle birlikte protein ve peptidoglikan gibi biyolojik proseslerin inhibisyonuna yol açmaktadır (De Martinis vd., 2002).

Birçok kaynakta antibiyotikler ile bakteriyosinler karıştırılmaktadır. Elde edilen veriler ışığı altında günümüz sınıflandırılmasında bakteriyosinler antibiyotiklerden tamamen farklı moleküller olarak kabul edilmektedir. Temel farklılıklara bakıldığında;

Bakteriyosinler çoğunlukla gelişme fazında sentezlenirken, antibiyotikler gelişimin durma fazında sentezlenen ikincil metabolitler olarak tanımlanmaktadır. Bakteriyosinler ribozomal olarak sentezlenirken, antibiyotikler enzimatik bir işleme sonucu aktif hale gelmektedirler.

Bakteriyosinler pre-peptitler olarak sentezlendikten sonra posttranslasyonel işlemlerle N-terminal lider peptidin uzaklaştırılmasıyla aktif form olan olgun bakteriyosinlere dönüşürler. Üretici mikroorganizmalar kendi bakteriyosinlerine karşı genetik olarak bağışıklık kazanmışlardır. Bu bağışıklık proteinlerini kodlayan genler bakteriyosinin yapısal genleriyle bağlantılı olup, antibiyotik bağışıklığını yöneten genetik belirleyiciler yapısal antibiyotik genleriyle bağlantılı değildir (Biler, 2009). Bakteriyosinlerin antibiyotiklerden farklı olan en göze çarpan özelliği dar bir spektruma etki etmeleri ve çoğu zaman üretici suşa yakın bakteri türlerine etki etmeleridir (Feldgarden ve Riley, 1999).

1.10. Çalışmanın Amacı

Mikroorganizmalar toprak, hava, içme ve kullanma suları gibi pek çok ortamlarda yaşayabilmektedirler. Bu ortamlarda yaşayan mikroorganizmalardan birisi de Basil grubu bakterilerdir. Toprak ve diğer ortamlardan izole edilen Basillerin antibiyotik ve ağır metal dirençliliği, metabolit üretme potansiyelleri gibi çoğu özellikleri araştırılmış olup havasal mikroorganizmalar fazla çalışılmamaktadır. Bu çalışmada, Kütahya il merkezine yaklaşık 30 km mesafede bulunan Seyitömer beldesindeki hava kaynaklı örneklerden elde edilen 15 adet *Bacillus* cinsine ait bakteriler izole edilerek bazı yeteneklerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Enzimler bazı canlı gruplarından elde edilerek günümüzde gıda, kozmetik, boya, ilaç vb. alanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Elde edilen Basillerin enzim aktivitesine bakılarak üretebileceği enzimler hakkında bilgi sahibi olmaya çalışılmıştır.

Ortamda bulunan ağır metallerin toksik etki değeri ekosistemde barınan canlıların yaşamını olumsuz yönde etkilemektedir. Bir metalin toksik etki düzeyi biyolojik proseslerde zarar verme potansiyelleri birbirinden farklıdır. Antibiyotikler, bakterilere karşı etki gösteren antimikrobiyal alt gruplarıdır. Antibiyotikler çok çeşitli mekanizmalarla etkilerini gösterirler. Diğer taraftan mikroorganizmaların ağır metal ve antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç mekanizmaları şaşırtıcıdır. İzole edilen Basillerin ağır metal dirençliliği ve antibiyotik dirençliliği araştırılmıştır.

Antimikrobiyal maddeler, mikroorganizmalar tarafından üretilen düşük yoğunlukta dahi olsa mikroorganizmanın gelişimine zarar veren metabolitlerdir. Çalışmamızda izole edilen Basillerin ürettikleri metabolitler antimikrobiyal aktivite açısından yakın akraba türleri üzerinde denenerak etkileri incelenmiş ve en iyi aktivite gösteren izolat seçilerek diğer test bakterilerine karşı aktivitesi belirlenmiştir.

Ayrıca seçilen izolattan elde edilen süpernantant'ın aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, organik çözücü ve deterjanların etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada havasal kaynaklı basillerin çeşitli endüstriyel alanlarda kullanılabilir olacak bakteri strainleri incelenmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Biyolojik metaryaller

Bu çalışmada endospor oluşturan *Bacillus* cinsi mikroorganizmaları izole etmek amacı ile Kütahya iline bağlı bulunan Seyitömer beldesinden petri kutuları yardımıyla hava kaynaklı örnekler alınmıştır. Petri kutuları en kısa sürede laboratuvara getirilmiştir.

Metal toleranslılık testlerinde pozitif kontrol olarak *B. subtilis* NRRL B- 209 suşu kullanılmıştır. Metabolit aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları Çizelge 2.1’ de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Metabolit aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan test mikroorganizmaları.

Mikroorganizma İsmi	Kodu	Kaynağı
Gram Pozitif Bakteri		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Amerikan Kültür Koleksiyonu
<i>Bacillus cereus</i>	ATCC 7064	Amerikan Kültür Koleksiyon
<i>Bacillus subtilis</i>	NRLL B - 200	ARS Kültür Koleksiyonu
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC- 29112	Amerikan Kültür Koleksiyon
Gram Negatif Bakteri		
<i>Esherichia coli</i>	NRLL 3704	ARS Kültür Koleksiyonu
<i>Legionella pneumophilia</i> Sg 2-15	-	Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Bölümü Koleksiyonu
Maya		
<i>Sachoromyces baulardii</i> (Yabani)	Yabani	Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Bölümü Koleksiyonu

2.1.2. Kimyasal metaryaller

Ağır metal dirençlilik testinde kullanılan ağır metaller

Ağır metal dirençlilik testinde kullanılan ağır metallerin tuzları aşağıda verilmiştir.

- 1) FeSO₄.7H₂O
- 2) PbCl₂

3) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$

Kullanılan antibiyotikler

İzolatların antibiyotik dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde OXOID (İngiltere) marka antibiyotik diskleri kullanılmış olup adları ve içerdikleri antimikrobiyal madde miktarı Çizelge 2.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 2.2. Antibiyotik dirençlilik testlerinde kullanılan antibiyotikler.

İsmi	Miktar	Grup	Etki Mekanizması
Amfisilin (AMP)	10 µg	Aminopenisilin	Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder.
Oksasilin (OX)	1 µg	Penisilinaza dayanıklı penisilinler	Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder.
Vankomisin (VA)	30 µg	Aminoglikozit	Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eder.
Kloramfenikol(C)	30 µg	Kloramfenikol	Protein sentezini inibe eder.
Streptomisin (S)	10 µg	Aminoglikozit	Protein sentezini inibe eder.
Eritromisin (E)	15 µg	Makrolid	Protein sentezini inibe eder.
Kanamisin (K)	30 µg	Aminoglikozit	Protein sentezini inhibe eder.
Siproflaksasin (CIP)	5 µg	Florokinolin	Nükleik Asit sentezini inhibe eder.

2.1.3. Kullanılan besiyerleri

Bacillus cinsi bakterilerin izolasyonunda, üretiminde, saklanması ve diğer çalışmalar için kullanılan besiyerleri otoklavda 1.1 atmosfer basınç altında 121°C’de 20 dakika süreyle steril edilmiştir.

Besiyeri 1. Nutrient Agar (Fluka 1.05450)

Pepton	5,0 g
Et ekstrakt	3,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari satılan besiyeri, 20 g olarak tartılarak 1000 mL saf suda çözülmüştür (Sneath, 1986). Endospor oluşturan basillerin izolasyonunda ve muhafazasında kullanılmıştır (Çotuk, 2003).

Besiyeri 2. Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Et ekstrakt	3,0 g
Pepton	5,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak satılan besiyeri 8 g olarak tartılarak 1000 mL saf suda çözülmüştür. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir (Sneath, 1986). Endospor oluşturan basillerin üretilmesinde ve identifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Gücin ve Dülger, 1995).

Besiyeri 3. Müller Hinton Broth (Merck 1.10293)

Et ekstrakt	5,0 g
Nişasta	1,5 g
Kazein hidrolizati	17,5 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak satılan besiyerinden 21 g tartılıp 1000 mL saf su içerisinde çözülmüş ve otoklavda steril edilmiştir. Gerekli olduğunda içerisine % 1,5 agar ilave edilerek Müller Hinton Agar besiyeri hazırlanmıştır. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir (Demirbağ ve Demir, 2000).

Besiyeri 4. Yarı-Katı Agar Besiyeri

Nutrient broth	8,0 g
Agar	4,0 g
Saf su	1000 mL

Hareketlilik testleri için hazırlanmıştır. Nutrient Broth besiyeri 8 g olarak tartılarak 1000 mL saf suda çözülmüş sonra da %0,3-0,5 oranında Agar ilave edilerek 100°C su

banyosunda agarın erimesi sağlanmıştır. Besiyeri henüz sıvı halde iken, standart deney tüplerine 5 mL olarak dağıtılmış ve tüpler sterilize edilerek, dik olarak katılaştırılmıştır (Gücin ve Dülger, 1995).

Besiyeri 5. Nutrient Jelatin Ortamı

Nutrient broth	2,3 g
Jelatin	120,0 g
Saf su	100 mL

Jelatin hidroliz testi için hazırlanmıştır. Nutrient Broth besiyeri 2,3 g tartılarak 100 mL saf su içerisinde çözülmüştür.

12 gr jelatin ilave edilerek 100°C su banyosunda besiyeri karışımının erimesi sağlanmıştır. Besiyeri henüz sıvı halde iken, standart deney tüplerine 5 mL olarak dağıtılıp, otoklavda sterilize edildikten sonra dik bir şekilde dondurulmuştur. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir (Gücin ve Dülger, 1995).

Besiyeri 6. Anaerobik Agar (Merck 1.05452)

Triptikaz	20,0 g
Glikoz	10,0 g
Sodyumformaldehit sulfoksi	1,0 g
Sodyum trioglikat	2,0 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 51 g olacak şekilde tartılarak hazırlanmıştır. İdentifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Sneath, 1986).

Besiyeri 7. Hidrojen Sülfür (H₂S) Besiyeri

Nutrient agar	2,0 g
Demir sülfat	0,3 g
Sodyum tiosülfat	0,3 g
Fenol red	0,024 g
Saf su	100 mL

İzolatların hidrojen sülfür üretim yeteneklerini belirlemek amacıyla hazırlanmıştır. Nutrient agar besiyerinden 2 g tartılarak 100 mL saf suda çözülmüştür. İçerisine 0,3 gr sodyum tiosülfat, 0,024 gr fenol red, 0,3 gr demir sülfat ilave edilerek 100°C su banyosunda besiyeri karışımının erimesi sağlanmıştır. Besiyeri sıvı halde iken, standart tüplere 4 mL olarak dağıtılıp, otoklavda sterilize edildikten sonra yatık agar olacak şekilde katılaşması beklenmiştir. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Besiyeri 8. Üre Agar Besiyeri

Jelatin	1,5 g
Dekstroz	1,0 g
Potasyum fosfat	2,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Fenol kırmızısı	0,015 g
Üre (%40'lık)	50 mL
Agar	15,0 g
Saf su	950 mL

İzolatların üreaz enzimini üretilip üretilmediğini belirlemek amacıyla hazırlanmıştır. Besiyerini hazırlamak için üre hariç diğer maddeler belirtilen miktarda tartılıp 950 mL saf su içerisinde çözülmüştür. Otoklavda sterilize edilen besiyeri 50 °C' ye kadar soğutulmuştur. İçerisine %40'lık hazırlanan steril üre solusyonundan 50 mL ilave edilip steril petri kutularına dağıtılarak katılaşması sağlanmıştır (Anonim, 1984).

Besiyeri 9. Simmons Sitrata Agar (Merck 1.02501)

Sodyum sitrat	2,0 g
Magnezyum sülfat	0,2 g
Monopotasyum fosfat	1,0 g
Amonyum dihidrojen fosfat	1,0 g
Sodyum klorür	5,0 g
Bromtimol mavisi	0,08 g
Agar	15,0 g
Saf su	1000 mL

İzolatlara karbon kaynağı olarak sitratı kullandıklarının belirlenmesi için hazırlanmıştır. Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 24 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözüldükten sonra 100°C su banyosunda besiyeri karışımının erimesi sağlanmıştır. Besiyeri sıvı halde iken, standart tüplere 4 mL olarak dağıtılıp, tüpler otoklavda sterilize edilerek yatık agar olacak şekilde katılaşması için beklenmiştir. Kullanılacağı süreye kadar +4°C' de muhafaza edilmiştir (Anonim, 1984; Çotuk, 2003).

Besiyeri 10. Modifiye Edilmiş Nişasta Agar Besiyeri

Nutrient agar	2,0 g
Nişasta	3,0 g
Saf su	100 mL

İzolatlara amilaz aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Besiyeri ortamını hazırlamak için öncelikle nişasta tartılıp 10 mL saf su içerisinde çözülmüş daha sonra Nutrient agar ve saf su eklenerek tekrar çözülmüştür. Otoklavda sterilize edildikten sonra steril petri kaplarına dağıtılıp, kuruması sağlanmıştır (Sneath, 1986; Şensoy Karaoğlu, 2013).

Besiyeri 11. Modifiye Edilmiş Milk (Süt) Agar Besiyeri

Nutrient agar	3,0 g
Yağsız süt	50 mL
Saf su	100 mL

İzolatların proteaz aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Nutrient agar besiyeri 3 g olarak tartılarak saf su içerisinde çözülüp otoklavda steril edilmiştir. Otoklavdan çıkan besiyeri yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra alevin yanında aseptik şartlar altında yağsız süt besiyerine ilave edilmiştir. Sütün besiyeri içinde homojen karışması sağlandıktan sonra steril petri kaplarına dağıtılıp, kuruması sağlanmıştır (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Besiyeri 12. Triptonlu Su (Merck 1.10859)

Kazein pepton	10,0 g
NaCl	5,0 g
Saf su	1000 mL

Triptofandan indol oluşum aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Ticari olarak satılan besiyeri litrede 15 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülmüş ve tüplere 5 mL olarak dağıtılıp otoklavda sterilize edilmiştir. Bileşimde bulunan kazein peptonu (tripton), indol pozitif mikroorganizmalar tarafından parçalanır ve ortaya çıkan indol, kovacs çözeltisi ile tespit edilir. İdentifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Tekin, 2008).

Besiyeri 13. Metil Red- Voges Proskauer Broth (Merck 1.05712)

Et ekstraktı	7,0 g
D(+) Glikoz	5,0 g
Fosfat tamponu	5,0 g
Saf su	1000 mL

Bu ortam glikoz fermentasyonu sonucu oluşan nötral veya asidik ürünlerin varlığını belirlemek amacı ile kullanılmıştır. Ticari olarak bulunan besiyeri litrede 17 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülmüş ve tüplere 5 mL olarak dağıtılıp otoklavda sterilize edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kültüre ayrı ayrı MR ve VP testleri uygulanmıştır (Tamer vd., 1989).

Besiyeri 14. Modifiye Edilmiş Lesitinaz Besiyeri

Nutrient agar	2,0 g
Yumurta sarı kısmı	10 mL
Saf su	100 mL

İzolatların lesitinaz aktivitesini belirlemek için hazırlanmıştır. Nutrient agar besiyeri tartılıp saf su içerisinde çözülüp otoklavda steril edilmiştir. Dış yüzeyi dezenfekte edilen tavuk yumurtasının sarı kısmı steril ortamda dikkatli bir şekilde ayrılmıştır. Otoklavdan çıkan besiyeri yaklaşık 50°C'ye kadar soğutulduktan steril olarak elde edilen yumurta sarısından 10 mL besiyeri içerisine ilave edilmiş ve homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra petri kutularına dağıtılıp, kuruması sağlanmıştır (Şensoy Karaoğlu, 2013).

2.1.4. Kullanılan çözeltiler

Çözelti 1. Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi

Sodyum klorür	8,5 g
Saf su	1000 mL

Sodyum klorür 8,5 g tartılmıştır. 70 mL saf suda çözülerek 1000 mL olacak şekilde tamamlanmış ve otoklavda 121°C'de 20 dakika süreyle steril edilmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti 2. Mc Farland Standardı

H ₂ SO ₄ (% 1, 0,18 M)	99,5 mL
BaCl ₂ (% 1,175, 0,048 M)	0,5 mL

BaCl₂ ve H₂SO₄ maddeleri karıştırıldığında elde edilen bulanık çözelti spektrofotometrede 625 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Bu dalga boyunda absorpsiyon değeri 0,08-0,10 aralığına denk gelmiştir. Ölçülen bu değer 0.5 Mc Farland standardı olarak kabul edilmiştir. Standardın bulanıklılığı ile test mikroorganizma süspansiyonlarının bulanıklılığı çıplak göz ile kıyaslanarak ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland standardı mL'de 10⁸ bakteri varlığını göstermiştir (NCCLS, 1990).

Çözelti 3. Kovacs İndol Çözeltisi (Merck)

Amil veya isoamil alkol (saf)	75,0 mL
p-dimetilaminobenzaldehid	5,0 g
HCl	25,0 mL

Tripton broth'da indol oluşumunu belirlemek için kullanılmıştır (Özçelik, 1998). Amil alkol su banyosunda 60°C'ye ısıtılıp, içine paradimetil amino benzaldehit ilave edilmiştir. Çözünene kadar ısıtmaya devam edilmiştir. Çözünme tamamlanınca soğutulup, hidroklorik asit damla damla olarak ilave edilmiştir. Kovacs ayırıcı altın sarısı renkte olmalıdır. Ticari olarak hazır bulunan çözelti, buzdolabında ve karanlıkta saklanmıştır. Bu madde *Bacillus*'ların identifikasyonunda indol testinde kullanılmıştır (Demirbağ ve Demir, 2000).

Çözelti 4. Voges – Proskauer Ayırıcı

Solüsyon A: α - Naftol Çözeltisi

α -Naftol	5,0 g
Etanol %95' lik	100 mL

α - Naftol, % 95'lik etanolde çözülerek hazırlanmıştır.

Solüsyon B: Potasyum Hidroksit Solüsyonu

KOH	40,0 g
Saf su	100,0 mL

Potasyum hidroksit tartılarak saf suda karıştırarak ve soğutarak çözülmüştür. Bu çözeltiler, Voges Proskauer testinde nötral ürünlerin varlığını belirlemek için kullanılmıştır (Wistreich ve Lechtman, 1980).

Çözelti 5. Metil Red Ayracı

Etil alkol (%96)	60,0 mL
Metil red	0,015 g
Saf su	40,0 mL

İndikatör önce alkol içerisinde çözülmüş, sonra distile su ilave edilmiştir. Metil Red testinde asidik ürünlerin varlığını belirlemek için kullanılmıştır (Demirbağ ve Demir, 2000).

Çözelti 6. %96'lık Etanol çözeltisi gram boyamada kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Çözelti 7. %3'lük H₂O₂ Çözeltisi

Hidrojen peroksidin su ile %3'lük solüsyonu hazırlanmıştır. Katalaz testi için kullanılmıştır (Demirbağ ve Demir, 2000).

Çözelti 8. 1 M Sodyum Hidroksit (NaOH) Çözeltisi

1 M Sodyum hidroksit çözeltisi izolatların identifikasyon testinde ve metabolit aktivite deneylerinde pH'ların ayarlanması için kullanılmıştır (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Çözelti 9. 1 M Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi

1 M Hidroklorik asit çözeltisi, izolatların identifikasyon testinde ve metabolit aktivite deneylerinde pH'ların ayarlanması için kullanılmıştır (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Çözelti 10. Lügol Çözeltisi (Gram İyodür)

Potasyum iyodür	2,0 g
İyot	1,0 g
Saf su	300,0 mL

İyot ve potasyum iyodür havanda iyice karıştırılarak toz haline getirilmiş, üzerine yavaş yavaş distile su ilave edilerek hazırlanmıştır. Bu çözelti gram boyama metodu için kullanılmıştır (Gücin ve Dülger, 1995; Özçelik, 1998).

2.1.5. Kullanılan boyalar

Boya 1. Kristal Viyole

Çözelti A

Kristal (Jansiyen) viyole	2,0 g
Etil alkol (%95)	20,0 mL

Çözelti B

Amonyum oksalat	0,8 g
Saf su	80,0 mL

Çözelti A ve B karıştırılmış ve saf su ile 1:10 oranında sulandırılmıştır ve daha sonra filtre kağıdından süzülmüştür. Bu çözelti gram boyama metodu için kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Boya 2. Safranin Boyası

Safranin (%95 lik etanolde %2,5'luk çözelti)	0,25 g
Etanol (%95 lik)	10 mL
Saf su	100 mL

Safranin önce %95'lik etanol içerisinde çözülmüş sonra saf su eklenerek iyice çözünmesi sağlanmıştır. Gram boyama ve endospor boyama için kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Boya 3. Malaşit Yeşili

Malaşit yeşili	5,0 g
Saf su	100,0 mL

Boya saf su içerisinde çözülerek hazırlanmıştır. Bu boya endospor boyama işleminde kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

2.2. Metod

2.2.1. Havasal örneklerin alınması ve endospor oluşturan basillerin izolasyonu

Havadaki mikroorganizmaların incelenmesi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunların içerisinde basit olması ve kullanım kolaylığı sağlaması açısından en iyi yöntemlerden biri Yer Çekimine Dayalı Petri Plak yöntemidir. Havadaki mikroorganizmaları incelemek için başka yöntemler de mevcuttur. Bunlar çöktürme, süzme, sıvı ortamlara püskürtme, katı besiyerine çarpma gibi temel ilkelere dayanmaktadır (Unat, 1993).

Hava kaynaklı basillerin izolasyonu için Kütahya il merkezinin yaklaşık 30 km uzaklığında bulunan Seyitömer beldesinden, 2016-2017 yılları Mayıs-Haziran ve Kasım-Aralık ayları arasında örnekler alınmıştır.

Seyitömer bölgesindeki havasal kaynaklı aerob endospor oluşturan mikroorganizmaların izolasyonu için, Yer Çekimine Dayalı Açık Petri Plak yöntemi kullanılmış olup nutrient agar besiyeri içeren petri kutularının ağzı açık olarak yerden 100 cm yükseklikte 60 dakika süreyle bekletilmiştir. Bu yöntemle alınan örnekler en kısa sürede laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen petri kutuları 35°C sıcaklıkta 2-4 gün süreyle etüvde inkübe edilmiştir. Bakterilerin izolasyonu için hava örneklerinden inkübasyon sonunda gelişen farklı kolonilerden öze yardımıyla alınıp Nutrient Agar stoklarına çekilmiştir. Daha sonra her bir koloniden öze yardımı ile alınıp Nutrient Broth besiyeri içeren tüplere ekimleri yapılmış 24 -48 saat 35°C de etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Üreme, tüplerde oluşan bulanıklılığın gözlenmesiyle belirlenmiştir. Aerob Endospor oluşturan bakterilerin izolasyonu için tüpler, 80°C 'de 20 dakika süreyle sıcak su banyosunda tutulmuş daha sonra tüplerden alınan örneklerin Nutrient Agar besiyerine ekimi yapılmıştır. Petri plakları 35°C de 1-2 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen izolatların 80°C de 20 dakika süreyle sıcak su banyosunda tutulması, izolatların vegetatif yapıya sahip olan hücrelerin ölümüne yol açacağından ortamda sadece endosporlu mikroorganizmalar canlı kalmıştır (İmamoğlu, 2008). İnkübasyondan sonra saf bakteri kültürlerinin +4 °C'de Nutrient Agar besiyerinde stok oluşturarak muhafazası sağlanmıştır.

2.2.2. Endospor oluşturan bakterilerin identifikasyonu

Elde edilen izolatların tanımlanması için gram boyama, endospor oluşumu, katalaz testi başta olmak üzere *Bacillus* cinsinin identifikasyon testlerinde Bergey's Manual of Systematic Bacteriology esas alınmıştır (Sneath, 1986).

Gram boyama: Gram boyama, bakterilerin tanımlanma ve sınıflandırılması için kullanılan en önemli boyama yöntemidir. Gram boyama 1884’ Hans Christian tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem bakterileri gram pozitif ya da gram negatif olarak ikiye ayırır.

Gram negatif boyanan bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabaka, gram pozitif boyanan bakterilere göre çok daha incedir. Bu boyama dört basamak halinde uygulanır. Öncelikle steril öze ile taze kültürden bir miktar alınmış ve üzerinde su damlası bulunan temiz bir lamda homojen olarak yayılmıştır. Havada kurutulup, alevden geçirilerek tespit edilmiştir.

1-Önceden hazırlanmış ve alevde tespit edilmiş mikroorganizma preparatı 1dakika boyunca kristal viyole ile boyanmış daha sonra boya suyla akıtılarak yıkanmıştır. Bu boya preparattaki bütün hücrelerin mor renge boyanmasını sağlar.

2-Boyanın etkisini arttırmak ve sabitleştirmek için 1 dakika süreyle iyot çözeltisi (lugol) ile bekletilmiş daha sonra suyla yıkanmıştır. İyot kristal viyole ile birleşerek hücre içerisinde bir kompleks oluşturur.

3-Preparat üzerine renk giderici olarak alkol uygulanmıştır. Gram pozitif organizmalarda kristal viyole hücrede sabit kalırken, gram negatif mikroorganizmalarda ise kristal viyole yıkanarak uzaklaşır. Dolayısıyla gram negatifler bu devrede renksiz hale gelirken gram pozitifler mor rengi korurlar.

4-Preparata son olarak yaklaşık 1 dakika boyunca safranin boyası uygulanmış sonra suyla güzelce yıkanmıştır. Kurumaya bırakılan preperat, immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi yardımıyla incelenmiştir. Gram negatif mikroorganizmalar kırmızı renkte görülürken, kristal viyole boyasını tutup mor renkte görülen Basiller Gram pozitif olarak kaydedilmiştir (Hasenekoğlu ve Yeşilyurt, 2001).

Endospor boyama: En az 48 saat gelişme gösteren kültürlerden bir öze dolusu alınmış ve üzerinde su damlası bulunan temiz bir lamda dairesel hareketlerle yayılmıştır. Hazırlanan bakteriyal film önce havada kurutulmuş ardından üç kez alevden geçirilerek fikse edilmiştir. Preperat alev düzeneğinde 5 dakika boyunca malaşit yeşili ile etkiye bırakılmış ve buharlaştıkça boya ilave edilmiştir. Su ile yıkandıktan sonra 30 saniye süreyle safranin ile boyanmış ve su ile tekrar yıkanıp havada kurutulduktan sonra immersiyon yağı kullanılarak mikroskopta incelenmiştir. Uygulama sonunda sporlar yeşil renkli, vejetatif hücreler ise pembe renkli görülmüştür (Çolak, 2008).

Hareketlilik testi: İzolatların hareket yeteneğini belirlemek için yapılmış olup test için dik konumda dondurularak hazırlanan yarı katı nutrient agar besiyeri kullanılmıştır. Nutrient Broth besiyerinde aktifleştirilmiş kültürlerden iğne öze ile alınmış, hareket besiyerinin ortasından dibine doğru dik olarak batırma kültürü yöntemiyle ekimleri yapılmış 37°C’ de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Hareket pozitif kültürlerde ekim çizgisi boyunca yayılma şeklinde üreme olup besiyeri bulanık görülürken negatif kültürlerde sadece ekim çizgisi boyunca üreme görülmüştür (Koneman vd., 1997).

Anaerobik gelişim: İzolatların oksijensiz ortamda gelişebildiğini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Anaerobik agar besiyeri içeren petrilere bakterilerin öze ile ekimi yapılmıştır. Daha sonra anaerob ortam sağlamak için anaerobik kavanoz içerisine petrilere yerleştirilmiş, 24-48 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler negatif olarak değerlendirilmiştir (Sneath, 1986).

Katalaz testi: İzolatların katalaz enzim aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Nutrient agar besiyerinde geliştirilen bakteri kolonileri üzerine %3’lük hidrojen peroksit (H₂O₂) solüsyonu damlatılmıştır. Katalaz enzimini oluşturabilen bakteriler hidrojen peroksiti oksijen ve suya ayırır. Ortamdaki oksijen çıkışı ise kabarcık oluşumu ile belirlenmiştir. Kültürlerin yüzeyinde hava kabarcığının oluşması, hidrojen peroksitin ayrışmasını dolayısıyla katalaz testinin pozitif olduğunu göstermiştir (Demirbağ ve Demir, 2000).

Jelatin hidrolizi testi: İzolatların jelatinaz enzim aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Jelatinaz, jelatinin amino asitlere hidrolizini sağlar. Jelatin besiyerine, bakteri kültüründen iğne uçlu öze ile alınarak besiyerinin ortasına gelecek şekilde inoküle edilmiş 37°C’de 2-4 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kültür buzdolabında 4°C’de 30 dakika süreyle bekletilmiştir. Besiyerinin sıvı halde görülmesi jelatinaz üretimi için reaksiyonun pozitif olduğunu, katı halde olması ise negatif olduğunu göstermiştir (Çotuk, 2003).

Üreaz testi: İzolatların üreaz enzim aktivitesini belirlemek için yapılmıştır. Bu enzime sahip bakteriler, besiyerindeki üreyi parçalayarak amonyak oluşturur. Amonyak ortamın alkali olmasını sağlar. Bakteri, üre ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısı içeren bir besiyerinde üretildiği zaman üreaz enziminin varlığı, ortamın koyu pembe renge dönüşmesini sağlar. İnkübasyon sonucunda ortamda bulunan fenol red indikatöründeki renk değişimi (sarıdan kırmızı-pembeye dönüşüm) pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Çotuk, 2003).

Lesitinaz testi: İzolatların lesitinaz enzim aktivitesini belirlemek için lesitin içeren agar besiyeri kullanılmıştır. Besiyeri üzerine, Mc Farland 0.5 bulanıklılığına göre ayarlanan bakteri süspansiyonundan 20 µL inoküle edilmiş 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Lesitinaz enzim aktivitesi, inkübasyon sonunda üreyen bakterileri kolonilerinin etrafında oluşan şeffah hidroliz zonunun oluşmasıyla değerlendirilmiştir (Sneath, 1986).

Hidrojen sülfür oluşum testi: İzolatların kükürlü bileşiklerden H₂S oluşturma yeteneğini belirlemek için yapılmıştır. H₂S renksiz bir gazdır. Bunu tespit etmek için besiyerine indikatör olarak (demir sülfat) ilave edilmiştir. Aynı zamanda besiyeri içinde sülfat kaynağı olarak da sodyum tiosülfat mevcuttur. Yatık agar şeklinde hazırlanmış hidrojen sülfür besiyerine, izolatların öze ile ekimleri yapılmış, 37°C'de 2-7 gün arasında inkübe edilmiştir.

Bakteri H₂S meydana getirdiğinde, FeS oluştuğu için besiyerinde siyahlaşma meydana gelmekte ve sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir. FeS'in oluşmadığı durumda besiyeri renginde herhangi bir değişim olmaz ve test negatif olarak yorumlanmıştır (Çökmüş, 1989).

İndol testi: Bu test mikroorganizmaların triptofan amino asidini parçalama yeteneğinin tayininde kullanılmıştır. Bazı bakteriler triptofanı triptofanaz enzimiyle parçalayıp indol, pürvik asit ve amonyak gibi metabolik ürünleri oluştururlar. Triptofan besiyeri içeren tüplere bakteriler inoküle edilip 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerine 0,3 mL kovaks ayırıcı damlatılmış sonra incelenmiştir. Ayırıcının bulunduğu fazda kırmızı bir halkanın meydana gelmesi triptofandan indol oluştuğunu, sarı kahverengimsi renk ise negatif sonuç olarak değerlendirilmiştir (Çotuk, 2003).

Metil Kırmızısı ve Voges-Proskauer testleri (MRVP): MRVP besiyeri glikoz içeren Nutrient Broth olup, Metil Red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri için kullanılmıştır. MRVP besiyeri içeren tüplere bakteri izolatları inoküle edilerek 37°C'de de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Metil kırmızısı ve Voges Proskauer testleri için bakteri izolatları içeren tüpler ikiye ayrılarak kullanılmıştır.

Metil kırmızısı testi: İzolatların glikozu okside ederek asit son ürünlerini üretebilme yeteneğini belirlemek için yapılmıştır. Düşük asit ortamında metil kırmızısı indikatörü kırmızı renk verir, bu reaksiyon pozitif demektir. Fermentasyon sonunda nötr maddeler üretilirse, metil kırmızısı sarıya dönüşür. Tüplere 250 µl metil kırmızısı ayırıcı ilave edildiğinde tüpte kırmızı rengin meydana gelmesi durumunda test pozitif olarak değerlendirilmiştir (Demirbağ ve Demir, 2000).

Voges-Prosskauer Testi: İzolatların glikoz fermentasyonunun son ürünlerinden asetilmetil-karbinol oluşturma yeteneğinin tayininde kullanılan bir testtir. Aseton üretimi ise potasyum hidroksit (KOH) ve alfa naftol ilavesi ile tespit edilir. Tüplere, 250 µl α-naftol çözeltisinden ve 200 µl %40'lık KOH çözeltisinden ilave edilmiş ve 5–10 dakika süre beklenmiştir. Eğer ortamda aseton mevcut ise besiyerinin üst kısmı kırmızıya dönüşür ve sonuç pozitif olarak yorumlanır. Negatif sonuç ise VP besiyerinin açık kahverengi renge dönüşmesi ile anlaşılır (Demirbağ ve Demir, 2000).

Sitrat testi: İzolatların, karbon ve enerji kaynağı olarak sitratı kullandığını belirlemek için yapılmıştır. Nutrient Broth besiyerinde aktifleştirilmiş kültürden Simmons Sitrat Yatık Agar besiyerine öze ile ekimleri yapılmış 37°C' de 2-7 gün süreyle inkübe edilmiştir. Orijinal rengi yeşil olan ve indikatör olarak %0,2 Bromo Timol Mavisini kullanan besiyerinde, besiyeri renginin maviye dönüşmesi ve ekim çizgisi boyunca üreme gözlenmesi pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Besiyeri renginin değişmemesi durumu ise negatif sonuçtur (Sipahi, 2012).

Farklı sıcaklıklarda gelişme testi: İzolatların farklı sıcaklık aralıklarında gelişme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bakteri kültüründen öze ile alınarak Nutrient Broth sıvı besiyerine inoküle edilmiş ve farklı sıcaklıklarda (5°C, 30°C, 40°C, 50°C, 55°C) 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sonuçlar; inkübasyon süresi sonunda gelişme varlığı yönünden pozitif veya negatif, zayıf gelişimler ise z (zayıf) olarak belirlenmiştir. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen Nutrient Broth sıvı besiyeri kullanılmıştır (Osmanağaoğlu 2003).

Farklı pH'larda gelişme testi: İzolatların farklı pH aralıklarında gelişme yeteneklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Nutrien Broth sıvı besiyeri hazırlanarak 1 M HCl ve NaOH ile pH'ları 5.7 ve 6.8'e ayarlanmıştır. Bakteri kültüründen öze yardımıyla alınarak besiyerlerine ekimleri yapılmış ve 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Bakteri içermeyen Nutrient Broth sıvı besiyeri negatif kontrol olarak kullanılmıştır (İşleroglu vd., 2008).

Farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme testi: İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarında gelişme yeteneklerini belirlemek amacıyla % 2.0, 5.0, 7.0 ve 10 oranında NaCl içeren Nutrient Broth besiyeri tüpleri hazırlanmıştır. Bakteri kültüründen öze yardımıyla alınarak bu besiyerlerine inoküle edilmiş 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon

sonunda gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak kabul edilmiştir. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen Nutrient Broth sıvı besiyeri kullanılmıştır (Osmanağaoğlu 2003).

2.2.3. İzole edilen basillerin amilaz ve proteaz enzim aktivitelerinin belirlenmesi

İzolatların amilaz ve proteaz enzim üretme yeteneklerinin belirlenmesi için ayrı olarak hazırlanan özgül besiyerleri steril petri kutularına paylaştırılmıştır. Besiyeri üzerine, Mc farland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanan bakteri süspansiyonundan 20 µL inoküle edilmiş ve 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İzolatların enzim üretme yetenekleri, inkübasyon sonunda üreyen bakteri kolonilerinin etrafında opak hidroliz zonunu oluşturması ve bu zon çapının ölçülmesi ile değerlendirilmiştir (Demirbağ ve Demir, 2000; Adinarayana vd, 2003).

2.2.4. Ağır metal toleranslılık düzeylerinin belirlenmesi

İzole edilen Basillerin ağır metal dirençlilik testleri agar dilisyon metodu ile belirlenmiş olup deneyde kullanılan üç farklı ağır metalin ayrı ayrı Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) hazırlanmıştır. Deneyde, FeSO₄.7H₂O, PbCl₂ ve Cu(CH₃COO)₂.H₂O ağır metallerinin tuzları kullanılmıştır.

Fe, Pb ve Cu ağır metallerinin 0,0625 mM/mL'den 16 mM/mL'e kadar iki katlı seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Otoklavdan çıkan Nutrient Agar besiyeri içerisine, hazırlanan ağır metal çözeltileri filtreden geçirilerek eklenmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan ağır metal içeren NA besiyeri steril petri kaplarına 25 mL kadar dökülmüş ardından kuruması için 1-2 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ağır metal toleranslılığın belirlenmesi için elde edilen Basil izolatları Nutrient Broth besiyerinde aktifleştirilmiştir. Aktiflenen bakteri kültürü steril fizyolojik su ile Mc farland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonundan 10 µL alınarak petrilere damlatma yöntemi ile ekimi yapılmış ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üremenin görülmediği en düşük ağır metal konsantrasyonu MİK (Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu) değeri olarak belirlenmiştir. Deneyler 2 paralel halinde çalışılmıştır (Yeşiltaş, 2014).

2.2.5. İzole edilen basillerin antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

İzole edilen Basillerin antibiyotik dirençlilik testleri, agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir (Bauer vd., 1966). Deneyde, 8 farklı antibiyotik diski (Oxoid marka) kullanılmıştır. Bu antibiyotikler; amfisilin (AMP, 10 µg), kloramfenikol (C, 30 µg), siproflaksin

(CIP, 5µg), eritromisin (E, 15µg), kanamisin (K, 30µg), oksasilin (OX, 1µg), streptomisin (S, 10 µg) ve vankomisin (VA, 30 µg) antibiyotikleridir.

Otoklavdan çıkan Nutrient Agar besiyeri steril petri kaplarına yaklaşık 25 mL kadar dökülmüş ve kuruması için 2-3 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Nutrient Broth sıvı besiyerinde aktiveleştirilen bakteri kültürleri steril fizyolojik su ile Mc farland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonundan steril eküvyon çubuk yardımıyla alınarak besiyerinin tüm yüzeyine sürülmüştür. Daha sonra petri yüzeyine antibiyotik diskler belirli aralıklarla yerleştirilmiştir. Petriler 1- 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 37°C’de 24-48 saat inkübe edilmiştir (Yeşiltaş, 2014). İnkübasyon süresi sonunda diskin etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı cetvel yardımıyla ölçülmüştür. Ölçülen zon çapları NCCLS kitapçığındaki ilgili tablolardaki değerler ile kıyaslanarak bakteri test edilen antibiyotiğe karşı "hassas" veya "dirençli" olarak, orta hassas duyarlılığa sahip suşlar ‘orta dercede hassas’ olarak değerlendirilmiştir. İlgili değerler Çizelge 2.3’de gösterilmektedir (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Çizelge 2.3. NCCLS rehberinde Gram pozitif, aerobik bakteriler için belirlenen zon çaplarına göre yorumlama standartları (NCCLS, 2003).

Antibiyotik	Disk İçeriği (µg)	Zon Çapı(mm)		
		R (Dirençli) S(Hassas)	I(Orta Hassas)	
Amfisilin	10	13≥	14–16	≥17
Kloramfenikol	30	12≥	13–17	≥18
Siproflaksin	5	15≥	16–18	≥19
Eritromisin	15	13≥	14–17	≥18
Kanamisin	30	13≥	14–17	≥18
Oksasilin	1	10≥	11–15	≥16
Streptomisin	10	11≥	12–14	≥15
Vankomisin	30	14≥	15–18	≥19

2.2.6. İzole edilen basillerin metabolit üretim yeteneklerinin belirlenmesi

Havasal kaynaktan elde edilen izolatların metabolit üretim yeteneği incelenmiştir. Müller Hinton Broth sıvı besiyeri hazırlanarak tüplere 5 mL olacak şekilde dağıtılmış ve otoklavda steril edilmiştir. Mc farland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanan bakteri izolatlarından 100 µL alınarak MHB sıvı besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiş ve 37°C’de 16 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda bu tüplerden 1000 µL kültür alınarak

eppendorf tüplerine aktarılmış ve 12000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilerek biyokütlenin ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. Santrifüjden sonra elde edilen hücre serbest süpernatantı (CFS, cell-free supernatant) steril tüplere toplanmış ve antimikrobiyal aktivite için kullanılmıştır (Cladera-Olivera vd., 2004). Metabolik aktiviteye sahip süpernatant kısımlar kullanılıncaya kadar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

İzolatlardan elde edilen süpernatantlar, kendilerine ve diğer basillere karşı agar damlatma yöntemi ile denenerek metabolit üretim yeteneği belirlenmeye çalışılmıştır. Bu yöntemde Mc farland 0.5 bulanıklık değerinde ayarlanan bakteri izolatları Müller Hinton Agar besiyeri içeren petri kaplarına steril eküvyon çubuklar ile yayılmıştır. Daha sonra her bir petri yüzeyine bütün izolatlardan elde edilen süpernatant kısımlarından yaklaşık 20 µL olarak damlatılmış ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır (Cladera-Olivera vd., 2004). İnkübasyon sonrasında petri yüzeylerindeki inhibisyon zonları cetvel yardımıyla ölçülerek hangi izolatın metabolit aktivitesine sahip olduğu ve hangi izolatın bu metabolit aktivitesi için en hassas indikatör izolat olduğu tespit edilmiştir.

İzolatın test mikroorganizmalara karşı metabolit aktivitesinin belirlenmesi

Seçilen basil izolatının metabolit üretim yeteneği gram pozitif bakterilere (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*), gram negatif bakterilere (*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* Sg 2-15) ve maya (*Sacharomyces baulardi*) türüne karşı etkisi araştırılmıştır. Stoklanmış olan Basil izolatı Nutrient Agar besiyerine alınarak canlandırılmış, steril fizyolojik su ile Mc farland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Kültür süspansiyonundan 1 mL (%2 oranında) alınarak 50 mL Müller Hinton Broth sıvı besiyeri içeren 250 mL'lik erlenlere aşılama yapılmış ve 37°C'de 130 rpm çalkalamalı inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürden 1000 µL alınarak eppendorf tüplerine aktarılmış ve 12000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilerek biyokütlenin ortamdan uzaklaşması sağlanmıştır. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatant steril şırınga yardımıyla alınarak 0,45 µm milipore çaplı filtreden geçirilmiştir. Hücre serbest süpernatantı (CFS) steril tüplere toplanmış ve antimikrobiyal aktivite için kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. NA besiyerinde aktiflenen test mikroorganizmaları steril fizyolojik su ile Mc farland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanmış ve eküvyon çubuk yardımı ile MHA besiyeri içeren petri yüzeyine sürülmüştür. Agar yüzeyinde 8 mm çapında kuyucuklar açılmıştır. Açılan kuyuculara basil izolatından elde

edilen süpernatanttan 50 µL konulmuştur. Petriler 1-2 saat oda ısısında bekletilmiş ve daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları cetvel ile mm olarak ölçülmüştür (Şensoy Karaoğlu, 2013).

İzolatin büyüme eğrisinin ve metabolit üretim zamanının belirlenmesi

Metabolit aktivitesi gösteren izolatin büyüme eğrisi ve metabolit üretiminin hangi zaman aralıklarında başladığı ve maksimum aktiviteye hangi saatte ulaştığı araştırılmıştır (Köseoğlu, 2007). En iyi aktivitenin tespit edildiği bakteri izolatu Mc farland 0.5 bulanıklığına göre ayarlanmış ve 50 mL olarak hazırlanan MHB besiyerine 1 mL (%2 oranında) olarak inoküle edilmiştir. Kültür 37°C'de 130 rpm'de çalkalamalı inkübatörde 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 40, 44, 48, 50 saat aralıklarla inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyona bırakılan kültürden belirtilen aralıklarda hem absorbans ölçümleri alınarak büyüme eğrileri çıkartılmış hem de bu aralıklarda alınan örneklerin metabolit aktivitesi agar kuyucuk yöntemi ile tespit edilmiştir. Büyüme eğrisi için inkübasyon süresince izolatin MHB besiyeri içerisinde 600 nm'de OD 0,1 olacak şekilde absorbans ölçümleri alınmıştır.

Metabolit üretim zaman aralıklarının belirlenmesi için ise belirtilen zaman aralıklarında kültürden 1000 µL alınarak eppendorf tüplerine aktarılmış ve 12000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilerek biyokütlenin ortamdaki uzaklaşması sağlanmıştır. Santrifüjden sonra, kültür süpernatantları steril şırıngalarla çekilerek 0,45 µm por çaplı filtreden süzülerek elde edilen hücre serbest süpernatantı kısmı kullanılmıştır. Daha sonra Mc farland 0.5 bulanıklık değerinde ayarlanan en hassas indikatör izolat, MHA besiyerine eküvyon çubukla yayılmıştır. Agar yüzeyinde pipet ucuyla 8 mm çapında oyuklar açılmış ve izolattan elde edilen süpernatanttan bu kuyucuklara 50 µL damlatılmıştır. Petriler 1-2 saat oda ısısında bekletilmiş ve daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları mm olarak ölçülerek aktivite değerlendirilmiştir (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Metabolitin (süpernatant) elde edilmesi

Metabolit ürettiği bilinen, en yüksek aktivitenin tespit edildiği izolat MHB sıvı besiyeri bulunduran tüplere inoküle edilmiş ve 37°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonunda bu tüplerden 1000 µL kültür alınarak eppendorf tüplerine aktarılmış ve 12000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilerek biyokütlenin ortamdaki uzaklaşması sağlanmıştır. Santrifüjden sonra elde edilen süpernatant steril şırınga yardımıyla alınarak 0,45

um por çaplı filtreden geçirilmiştir. Hücre serbest süpernatantı (CFS, cell free süpernatant) steril tüplere toplanmış ve antimikrobiyal aktivite için kullanılmıştır (Cladera-Olivera vd., 2004).

Metabolitin aktivitesi üzerine sıcaklığın, pH'ın, organik çözücülerin ve deterjanların etkisini araştırmak için en yüksek aktivitenin tespit edildiği izolattan elde edilen metabolitler (kültür süpernatantları) en hassas indikatör izolata karşı agar kuyucuk yöntemiyle denenmiştir.

Metabolitin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin belirlenmesi

Metabolitin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini araştırmak için en yüksek aktivitenin tespit edildiği izolattan elde edilen süpernatantlar, 45, 60, 80 ve 95 °C sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilmiş ve 121°C'de 20 dk otoklavda bekletilmiştir. Mc farland 0.5 bulanıklık değerinde ayarlanan en hassas indikatör izolat, Müller hinton agar besiyerine eküvyon çubukla yayılmıştır. Agar yüzeyinde steril pipet ucu ile 8 mm çapında oyuklar açılmış ve oda sıcaklığına gelen izolattan elde edilen süpernatanttan bu kuyukculara 50 µL damlatılmıştır. Petriler 1-2 saat oda ısısında bekletilmiş ve daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları mm olarak ölçülerek aktivite değerlendirilmiştir. İşlem görmemiş süpernatantlar kontrol olarak kullanılmış olup tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Metabolitin aktivitesi üzerine pH'nın etkisinin belirlenmesi

Metabolitin aktivitesi üzerine pH'ın etkisini araştırmak için en yüksek aktivitenin tespit edildiği izolattan elde edilen süpernatantın pH'ları, steril 1 M NaOH ve 1 M HCl ile, 2,4,6,8,10 arasında ayarlanmış ve 2 saat oda sıcaklığında (25°C) inkübe edilmiştir. Bundan sonraki aşamada iki yöntem kullanılmıştır. Birincisinde pH'ları 2,4,6,8,10 arasında direkt ayarlanan kültür süpernatantları, indikatör suşa karşı agar kuyucuk yöntemi ile denenmiştir (Lisboa vd., 2006). İkinci yöntemde ise süpernatantların pH'ları 2,4,6,8,10 arasında ayarlanıp 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra pH'ları yeniden 7,0'a ayarlanmış ve indikatör suşa karşı agar kuyucuk yöntemi ile denenmiştir (Cladera-Olivera vd., 2004). Daha sonra Mc farland 0.5 bulanıklık değerinde ayarlanan en hassas indikatör izolat, Müller hinton agar besiyerine eküvyon çubukla yayılmıştır. Agar yüzeyinde pipet ucuyla 8 mm çapında oyuklar açılmış ve izolattan elde edilen süpernatanttan bu kuyukculara 50 µL damlatılmıştır. Petriler 1-2 saat oda ısısında bekletilmiş ve daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları mm olarak ölçülerek aktivite

değerlendirilmiştir (Şensoy Karaoğlu, 2013). İşlem görmemiş süpernatantlar kontrol olarak kullanılmış olup tüm denemeler iki tekrarlı yapılmıştır.

Metabolitin aktivitesi üzerine bazı organik çözücü ve deterjanların etkisinin belirlenmesi

Metabolitin aktivitesi üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi araştırılmıştır. Organik çözücü ve deterjanlardan kloroform, aseton, metanol, etil alkol, çamaşır suyu ve yağ çözücü kullanılmıştır. Bu deneyde çözeltiler iki farklı konsantrasyonlarda hazırlanmıştır. Birincisinde organik çözücü ve deterjanlardan % 10 olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler süpernatant ile son konsantrasyon % 10 olacak şekilde karıştırılmış ve 25°C de 1 saat inkübe edilmiştir (Bizani ve Brandelli, 2002). İkincisinde ise organik çözücüler süpernatant ile eşit hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. Deterjanlar süpernatant ile son konsantrasyon % 1 oranında olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 37°C de 5 saat inkübe edilmiştir (Perumal ve Venkatesan, 2017). Daha sonraki aşamada Mc Farland 0.5 bulanıklık değerinde ayarlanan en hassas indikatör izolat, Müller hinton agar besiyerine eküvyon çubukla yayılmıştır.

Agar yüzeyinde pipet ucu ile 8 mm çapında oyuklar açılmış ve izolattan elde edilen süpernatanttan bu kuyukculara 50 µL damlatılmıştır. Petriler 1-2 saat oda ısısında bekletilmiş ve daha sonra 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuk çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları mm olarak ölçülerek aktivite değerlendirilmiştir (Şensoy Karaoğlu, 2013).

Pozitif kontrol olarak işlem görmemiş süpernatant, negatif kontrol olarak ise organik çözücülerin ve deterjanların steril su ile hazırlanmış stok çözeltileri aynı final konsantrasyonda olacak şekilde eklenip denenmiştir. Tüm çalışmalar iki tekrarlı yapılmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu

Bu çalışma için havasal örnekler Kütahya iline yaklaşık 30 km mesafede bulunan Seyitömer beldesinden alınmıştır. Endospor oluşturan 15 adet Basil (S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14, S15) izole edilmiştir. Elde edilen izolatların endospor oluşumları değerlendirilmiş ve endospor oluşturan izolatların gram boyama reaksiyonları ve katalaz aktivitesi incelenmiştir. Bütün izolatların gram (+), endospor oluşturan, katalaz pozitif bakteri morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen izolatların tümüne Bergeys Manuel'e göre öngörülen çeşitli identifikasyon testleri yapılmıştır. Daha sonrasında elde edilen izolatların enzim üretim yetenekleri (amilaz ve proteaz), ağır metal dirençliliği, antibiyotik dirençlilik düzeyleri, metabolit üretim yetenekleri araştırılmıştır.

3.2. *Bacillus* Suşlarının İdentifikasyon Test Sonuçları

Çalışmamızda elde edilen 15 izolatın identifikasyon testleri için; gram boyama, endospor boyama, hareketlilik, anaerobik gelişme, katalaz, jelatinaz, üreaz, lesitinaz, H₂S oluşumu, İMViC (İndol, Metil Red, Voges Proskauer, Sitrat) testleri, farklı sıcaklıklarda gelişme isteği (5°C, 30°C, 40°C, 50°C, 55°C), farklı pH'larda gelişme isteği (pH 5.7, pH 6.8) ve farklı NaCl konsantrasyonlarında gelişme isteği (%2, %5, %7 ve %10), testlerini içeren biyokimyasal testler uygulanmıştır (Çizelge3.1).

Çizelge 3.1. Basillerin biyokimyasal test sonuçları.

TESTLER	İZOLATLAR															
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15	
Gram boyama	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Endospor boyama	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Hareketlilik	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	
Anaerobik gelişme	+	+	+	Z	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Katalaz üretimi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Jelatinaz üretmi	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
Üreaz üretimi	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	
Lesitinaz üretimi	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
H ₂ S oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
İndol oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Metil Red testi	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Voges Proskover testi	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	
Sitrat kullanımı	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Sıcaklık, pH ve tuz istekleri	5 °C	-	-	-	Z	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	30 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	40 °C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	50 °C	-	-	-	-	-	-	-	Z	-	-	-	-	-	+	
	55 °C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	pH 5,7	-	-	-	-	-	-	Z	Z	-	-	-	-	-	Z	+
	pH 6,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	%2 NaCl	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	%5 NaCl	-	-	-	Z	-	+	Z	+	-	+	Z	+	+	-	+
	%7 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
	%10 NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+:pozitif, -:negatif, z: zayıf gelişme																

Havasal kaynaktan izole edilen aerob endospor oluşturan gram pozitif bakterilerin identifikasyonunda çeşitli biyokimyasal testler yapılmış olup elde edilen test sonuçlarına göre;

S1, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S10, S12, S13, S14 ve S15 izolatlarının hareket yeteneklerinin olduğu, S2, S9 ve S11 izolatlarının ise hareket yeteneğinin olmadığı görülmüştür.

S4 zayıf derecede olmak kaydıyla tüm basil izolatlarının anaerobik ortamda ürediği tespit edilmiştir. İzole edilen tüm izolatların katalaz pozitif olduğu belirlenmiştir.

Jelatinaz testinde S2, S5, S6, S9, S11 ve S15 izolatlarının pozitif, diğerlerinin negatif sonuç verdiği, Üreaz testinde, S2, S6, S12 ve S15 izolatlarının pozitif sonuç, diğerlerinin negatif sonuç verdiği, Lesitinaz testinde ise S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S12, S13, S14 ve S15 izolatların pozitif sonuç, S4 ve S11 izolatlarının negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

S2, S6 ve S15 izolatlarının katalaz, jelatinaz, üreaz ve lesitinaz enzimlerinin hepsini üretebildiği belirlenmiştir.

Bütün izolatların H₂S oluşumu ve indol oluşumu testlerinde negatif sonuç verdiği gözlenmiştir.

Metil red testine S1, S3, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14 ve S15 izolatlarının pozitif sonuç, S2 izolatının negatif sonuç verdiği, Voges Proskover testine S7, S8, S9, S11 ve S14 izolatlarının pozitif sonuç diğer izolatların ise negatif sonuç verdiği bulunmuştur.

Sitrat testinde ise S1, S3, S5, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14 ve S15 izolatları pozitif sonuç, S2, S4 ve S6 izolatları negatif sonuç vermiştir.

İzolatların farklı sıcaklıklardaki gelişimlerine bakıldığında 5°C'de sadece S4 izolatının zayıf seviyede gelişebildiği diğer izolatların negatif sonuç verdiği, 30°C ve 40°C sıcaklıklarda tüm izolatların pozitif sonuç verdiği, 50°C sıcaklıkta S15 izolatının pozitif sonuç verdiği, S8 izolatının zayıf seviyede gelişebildiği, diğer izolatların ise negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. 55°C sıcaklıkta tüm izolatların negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir. Tüm izolatlar için optimum üreme sıcaklığı 30-40°C arasında bulunmuştur.

İzolatların farklı pH aralıklarındaki gelişimi incelendiğinde, pH 5.7 de, S15 izolatının pozitif sonuç, S7, S8 ve S14 izolatlarının zayıf seviyede gelişebildiği diğer izolatların ise negatif sonuç verdiği gözlenmiştir. pH 6.8 aralığında ise tüm izolatların pozitif sonuç verdiği belirlenmiştir.

İzolatların farklı tuz konsantrasyonlarındaki gelişimine bakıldığında, %2 NaCl aralığında S1, S4, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13 ve S15 izolatlarının pozitif sonuç, geriye kalan izolatların ise negatif sonuç verdiği görülmüştür. %5 NaCl aralığında, S6, S8, S10, S12, S13 ve S15 izolatlarının pozitif sonuç verdiği S4, S7 ve S11 izolatının zayıf seviyede geliştiği diğer izolatların ise negatif sonuç verdiği belirlenmiştir. %7 NaCl aralığında, S10 ve

S13 izolatlarının pozitif sonuç verdiği diğer izolatların negatif sonuç verdiği bulunmuştur. %10 NaCl aralığında ise tüm izolatların negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Bacillus türlerinin identifikasyon test sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de belirtilen sonuçlara göre değerlendirilerek yapılmıştır (Jin vd, 1990). Çalışmamızda elde edilen 15 bakteri izolatı *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde karakterize edilmiştir.

3.3. Basillerin Enzim Aktivitesi

Basillus izolatlarının amilaz ve proteaz aktiviteleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Amilaz üretiminde S2, S5, S6, S9, S11 ve S15 izolatları aktivite gösterirken geriye kalan izolatlar ise aktivite göstermemiştir. Yapılan inceleme sonucunda yüksek aktiviteye sahip izolatların 14 mm zon çapı ile S6 ve 12 mm zon çapı ile S11 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Basillerin amilaz ve proteaz enzim aktiviteleri (Ø:6 mm).

	Amilaz Aktivitesi	Proteaz Aktivitesi
S1	-	16
S2	8	18
S3	-	14
S4	-	-
S5	8	14
S6	14	18
S7	-	14
S8	-	14
S9	8	10
S10	-	16
S11	12	18
S12	-	14
S13	-	16
S14	-	14
S15	10	18

Proteaz üretiminde S4 izolatı hariç tüm izolatlar pozitif olarak değerlendirilmiştir. Proteaz aktivitesi en yüksek izolatların 18 mm zon çapı ile S2, S6, S11 ve S15 olduğu belirlenmiştir. Hem amilaz hemde proteaz üreten Basiller S2, S5, S6, S9, S11 ve S15 olarak bulunmuştur. S4 izolatının ise hem amilaz hemde proteaz aktivitesi göstermediği tespit edilmiştir.

3.4. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri

Çalışmamızda hava kaynaklı izole edilen endosporlu Basillerin ağır metal dirençlilik düzeyleri agar dilüsyon metodu ile tespit edilmiştir. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde referans suş olarak *B. subtilis* NRRL B-209 suşu belirlenmiştir. *B. subtilis* NRRL B-209 referans suşunun sahip olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. *B. subtilis* NRRL B-209 'un ağır metal dirençlilik düzeyi (mM/mL).

Ağır Metal	MİK Değeri
Demir	2
Kurşun	4
Bakır	1

Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde 3 farklı ağır metal tuzu [$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 ve $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$] kullanılmıştır. İzolatların ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde agar dilüsyon metoduna göre gösterdikleri MİK değerleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Basillerin ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).

	Demir	Kurşun	Bakır
S1	2	2	2
S2	2	2	2
S3	2	2	2
S4	2	1	1
S5	2	2	2
S6	2	2	2
S7	2	2	2
S8	2	2	2
S9	2	2	2
S10	2	2	2
S11	2	2	2
S12	2	2	2
S13	2	2	2
S14	2	2	2
S15	2	2	2

İzolatlardan 14 tanesinin (S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14 ve S15) kurşun ağır metaline gösterdikleri MİK değerlerinin referans suş ile kıyaslandığında düşük

olduğu görülürken, aynı izolatların demir ağır metale gösterdiği MİK değeri referans suş ile karşılaştırıldığında aynı değerde olduğu bulunmuştur. Yine aynı izolatların bakır (2 mM) ağır metal sonuçlarının; referansımıza göre yüksek çıktığı belirlenmiştir.

S4 izolatının kurşun ağır metale gösterdiği MİK değerleri referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken, aynı izolatın demir ve bakır ağır metallerine gösterdiği MİK değeri referans suş ile karşılaştırıldığında aynı değerde olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.5. İzole edilen Basillerin ağır metal toleranslılıklarının %'lik dağılımı.

Ağır Metal	n	Ağır metal konsantrasyonlarına (mM/mL) göre genel toplam içerisindeki izolatların sayısal dağılımı										Toleranslı izolatlar	
		0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	n	%	
Demir	15	-	-	-	-	-	15	-*	-	-	0	0,0	
Kurşun	15	-	-	-	-	1	14	-	-*	-	0	0,0	
Bakır	15	-	-	-	-	1	14*	-	-	-	14	93,33	

*Ağır metallerin referans suş MİK değerleri

İzole edilen Basillerin ağır metal toleranslılıklarının %'lik dağılımı Çizelge 3.5'de verilmiştir. Elde edilen izolatların referans suşa göre, ağır metal yüzde toleranslılık değerlerine bakıldığında; %93,33 bakır ağır metale karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların demir ve kurşun ağır metallerine karşı herhangi bir dirence sahip olmadığı bulunmuştur.

3.5. Basillerin Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri

Çalışmamızda elde edilen 15 adet *Bacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilik düzeyleri, çeşitli gruplara ait 8 farklı antibiyotik kullanılarak agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.



Şekil 3.1. Basillerin antibiyotik dirençlilik düzeyleri.

Elde edilen havasal kaynaklı olan 15 adet *Bacillus* izolatlarının antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. Basil izolatlarının test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları (disk 6 mm).

İzolatlar	AMP	C	CIP	E	K	OX	S	VA
S1	19	21	36	37	26	-	22	19
S2	22	38	40	36	33	-	27	25
S3	8	26	37	30	25	-	21	19
S4	-	33	36	28	30	-	25	27
S5	14	30	35	35	32	-	18	21
S6	13	31	36	38	31	-	21	21
S7	12	24	33	27	26	-	22	20
S8	13	24	35	28	29	-	21	21
S9	15	30	36	36	31	-	25	21
S10	12	22	35	27	25	-	20	18
S11	17	27	38	33	31	-	18	20
S12	16	21	36	27	26	-	21	18
S13	11	19	34	28	26	-	21	18
S14	19	24	33	28	28	-	21	18
S15	18	29	33	32	31	-	19	19

(-)Antibiyotik disk etrafında inhibisyon zon çapı yoktur, AMP: Amfisilin (10 µg), C: Kloramfenikol (30 µg), CIP:Siproflaksin (5 µg), E: Eritromisin (15 µg), K: Kanamisin (30 µg), OX: Oksasilin (1 µg), S: Streptomisin (10 µg), VA: Vankomisin (30 µg).

Çizelge 3.7. Basil izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.

İzolatlar	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
Antibiyotikler															
Amfisilin	S	S	R	R	I	R	R	R	I	R	S	I	R	S	S
Kloramfenikol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Siproflaksin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromisin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamisin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Oksasilin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Streptomisin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Vankomisin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	I	I	S

S: Hassas, R: Dirençli, I: Orta derecede hassas

Çizelge 3.8. Basil izolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları.

Antibiyotik	n	R	I	S	%R	%I	%S
Amfisilin	15	7	3	5	46,66	20,00	33,33
Kloramfenikol	15	0	0	15	0	0	100
Siproflaksin	15	0	0	15	0	0	100
Eritromisin	15	0	0	15	0	0	100
Kanamisin	15	0	0	15	0	0	100
Oksasilin	15	15	0	0	100	0	0
Streptomisin	15	0	0	15	0	0	100
Vankomisin	15	0	4	11	0	26,66	73,33

Çizelge 3.8’de gösterildiği gibi elde edilen Basillerin en yüksek antibiyotik dirençliğinden en düşüğe doğru sıraladığımızda; %100’ü oksasiline (15 izolat), %46,66’sı amfisiline (7 izolat) karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Orta derecede hassas olan izolatları sıraladığımızda %26,66’sı vankomisin (4 izolat), %20’si amfisilin (3 izolat) antibiyotiklerine karşı orta derecede hassasiyet göstermişlerdir.

İzolatların, kloramfenikol, siproflaksin, eritromisin, kanamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı tamamen duyarlı (hassas) olduğu bulunmuştur.

3.6. Basillerin Metabolit Üretim Aktivitesinin Belirlenmesi

Seyitömer beldesinden alınan hava örneklerinden 15 adet endospor oluşturan *Bacillus* cinsi bakteri izole edilmiştir. Basillerden elde edilen süpernatantlar kendilerine ve yakın akrabası olan diğer basil izolatlarına karşı denenerek inhibe edici etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.



Şekil 3.2. İzolatların agar damlatma metodu ile metabolit üretim aktivitesinin belirlenmesi.

Çizelge 3.9. Basil izolatlarının agar damlatma metodu ile kendi aralarındaki metabolit aktivitesinin belirlenmesi (Ø:8mm).

Süpernatant	Basil İzolatları														
	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12	S13	S14	S15
S1		++	+	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
S2				+	+		+	+	+			+		+	
S3		+		+			+								
S4															
S5	+	+	+	+++			+	+		+	+	++	+		
S6	++	+++		+++			+++	+			+		+	+++	
S7	+	++	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	
S8		++	+	++	+	+	+		+		+	+	+	+	+
S9	+	+	++	+++	+	+	+	+		+		+	+	+	
S10		+		+	+	+	+	+	+		+				
S11	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+			+	+	
S12	+	+		+											
S13		+		+	+		+	+	+						
S14		+	+	++	+		++	+	+			++			
S15	+	+	+	+++	++		+	+	+	+		++	++	+	
+: 10-12, ++: 13-14, +++> 14															

Basil izolatlarının kendi akrabası olan izolatlara karşı gösterdikleri inhibitör etki Çizelge 3.9’da verilmiştir. Basil izolatlarından elde edilen süpernatantların test edilen diğer basil izolatlarına karşı inhibe edici aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Sadece izole edilen S4 izolatından elde edilen süpernatantın diğer basil izolatlarına karşı inhibe edici etkisinin olmadığı belirlenmiştir.

S1 izolatının süpernatantı S2 ve S4 suşları üzerinde 13-14 mm arasında inhisbasyon zonu oluştururken, S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14 ve S15 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S2 izolatının süpernatantı S4, S5, S7, S8, S9, S12 ve S14 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S3 izolatının süpernatantı S2, S4 ve S7 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur.

S5 izolatının süpernatantı S4 suşu üzerinde 15 mm ve üzeri, S12 suşunda 13-14 mm arasında, S1, S2, S3, S7, S8, S10, S11 ve S13 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S6 izolatının süpernatantı S2, S4, S7 ve S14 suşları üzerinde 15 mm ve üzeri, S1 suşunda 13-14 mm arasında, S8, S11 ve S13 suşlarında 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S7 izolatının süpernatantı S2 suşunda 13-14 mm arasında, S1, S3, S4, S5, S6, S8, S9, S10, S11, S12, S13 ve S14 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S8 izolatının süpernatantı S2 ve S4 suşlarında 13-14 mm arasında, S3, S5, S6, S7, S9, S11, S12, S13, S14 ve S15 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur.

S9 izolatının süpernatantı S4 suşunda 15 mm ve üzeri, S3 suşunda 13-14 mm arasında, S1, S2, S5, S6, S7, S8, S10, S12, S13 ve S14 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S10 izolatının süpernatantı S2, S4, S5, S6, S7, S8, S9 ve S11 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S11 izolatının süpernatantı S4 suşunda 15 mm ve üzeri, S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S13 ve S14 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur.

S12 izolatının süpernatantı S1, S2 ve S4 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S13 izolatının süpernatantı S2, S4, S5, S7, S8 ve S9 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur. S14 izolatının süpernatantı S4, S7 ve S12 suşlarında 13-14 mm arasında, S2, S3, S5, S8 ve S9 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhisbasyon zonu oluşturmuştur.

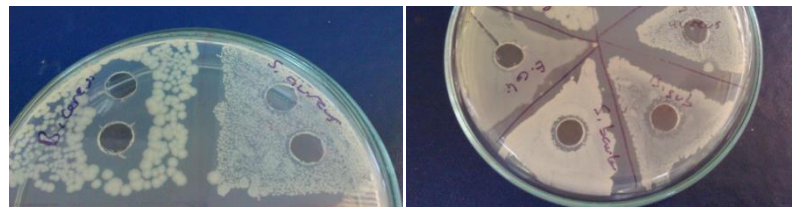
S15 izolatının süpernatantı S4 suşunda 15 mm ve üzeri, S5, S12 ve S13 suşlarında 13-14 mm arasında, S1, S2, S3, S7, S8, S9, S10 ve S14 suşları üzerinde 10-12 mm arasında inhibisyon zonu oluşturduğu bulunmuştur.

Metabolit aktivitesi gösteren S5, S6, S9, S11 ve S15 numaralı izolatların süpernatantları diğer suşlar üzerinde 15 mm ve üstü inhibisyon zonları oluşturmuştur. Bu izolatların süpernatantların aktivitesine bakıldığında; S5 izolatının 1 farklı suşta (S4), S6 izolatının 4 farklı suşta (S2, S4, S7, S14), S9 izolatının 1 farklı suşta (S4), S11 izolatlarının 1 farklı suşta (S4) ve S15 izolatının 1 farklı suşta (S4) süpernatant kısımlarının 15 mm ve üstü inhibisyon zonu oluşturduğu tespit edilmiştir. Metabolit ürettiği tespit edilen *Bacillus* izolatları arasından biyokontrol ajanı seçmek için izolatların aktivitesine bakıldığında S6 izolatı 4 farklı suşta (S2, S4, S7, S14) en yüksek antimikrobiyal zon çapı oluşturduğu için biyokontrol ajanı olarak seçilmiştir. S4 numaralı izolatın ise süpernatantlardan en fazla etkilendiği ve en hassas izolat olduğu tespit edilmiştir. Yüksek aktivite gösterdiği için seçilen S6 izolatından elde edilen metabolitlerin aktivitesi bir takım test mikroorganizmalarına karşı denenmiştir.

Çalışmalara S6 izolatının büyüme eğrisi ve metabolitin üretim zaman aralığı belirlenerek devam edilmiş ve metabolitin aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, organik çözücü ve deterjanların etkisi araştırılmıştır.

3.6.1. İzolatın test mikroorganizmalarına karşı metabolit aktivitesinin belirlenmesi

S6 izolatının süpernatantının, gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*), gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* Sg 2-15) ve maya (*Sacharomyces baulardi*) türü üzerinde antibakteriyal ve antifungal etkisi Çizelge 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3.3. S6 izolatının test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktivitesi.

Çizelge 3.10. S6 izolatının agar kuyucuk metodu ile test organizmalarına karşı oluşturduğu inhibisyon zon çapları (Ø:8mm).

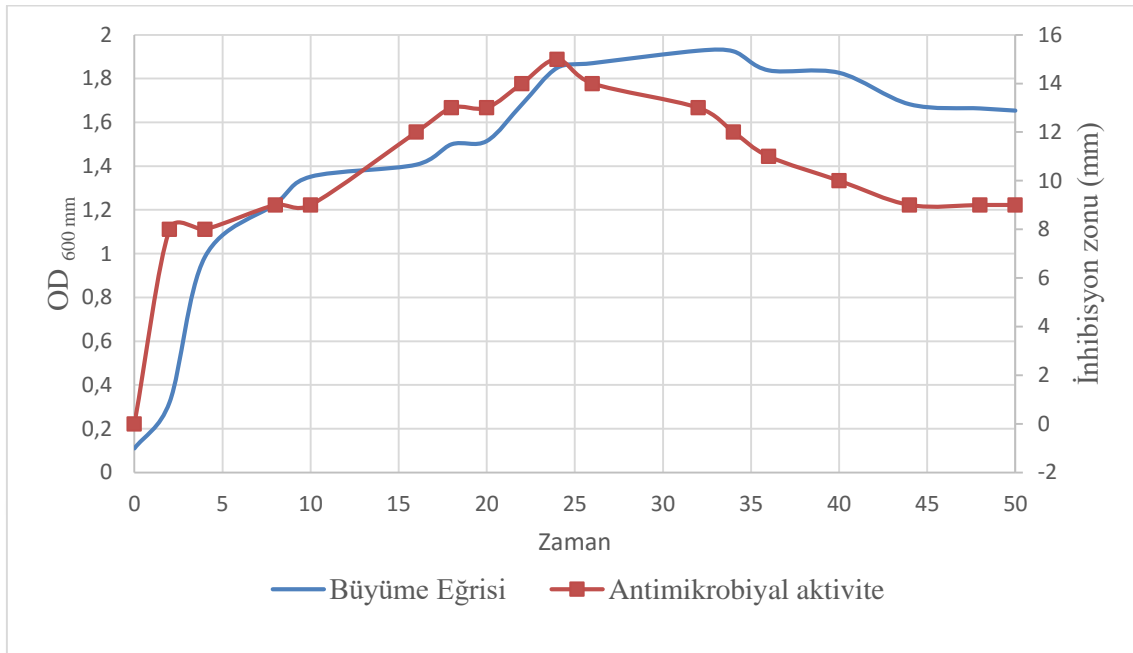
İndikatör Organizma	İnhibisyon Zonu (mm)
Gram pozitif bakteri	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Bacillus cereus</i>	16
<i>Bacillus subtilis</i>	12
<i>Enterococcus faecalis</i>	12
Gram negatif bakteri	
<i>Escherichia coli</i>	10
<i>Legionella pneumophilia</i> Sg 2-15	20
Maya	
<i>Saccharomyces baulardi</i>	11

S6 izolatı, bütün test mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal aktivite göstermiştir. S6 izolatı gram pozitif bakteriler içerisinde en fazla antimikrobiyal aktiviteyi *B. cereus*'a daha sonra *B. subtilis* ve *E. faecalis*'e karşı göstermiştir. *S. aureus*' a karşı ise en az aktivite göstermiştir.

S6 izolatı gram negatif bakterilerden ise en fazla aktiviteyi *L. pneumophilia* Sg 2-15 türüne sonra *E. coli*'ye karşı göstermiştir. S6 izolatı, *S. baulardi* maya türüne karşı da aktivite göstermiştir. S6 izolatı, test mikroorganizmaları içerisinde en yüksek aktiviteyi 20 mm zon çapı ile gram negatif bakterilerden olan *L. pneumophilia* Sg 2-15'e karşı göstermiş olup en düşük aktiviteyi ise *S. aureus* ve *E. coli* türlerine karşı göstermiştir.

3.6.2. S6 izolatının büyüme eğrisi ve metabolit üretim zaman aralığı

Metabolit aktivitesi gösterdiği tespit edilen S6 izolatından belirtilen zaman aralıklarında absorbans ölçümleri alınarak büyüme eğrisi çıkartılmış ve metabolit üretim zaman aralıkları belirlenmiştir. S6 izolatının büyüme eğrisi ve antimikrobiyal aktivitesi Şekil 3.4'de verilmiştir.



Şekil 3.4. S6 izolatının büyüme eğrisi ve antimikrobiyal aktivitesi.

S6 izolatının gelişimin yaklaşık 24 saatlik süresinde logaritmik büyüme fazının sonuna geldiği ve durgun faza giriş yaptığı tespit edilmiştir. Metabolit üretimi ise logaritmik fazın yaklaşık 8. Saatlerinde başlamış ve fazın sonlarına doğru 24. saatlerinde maksimum seviyeye çıkmıştır. Gelişimin yaklaşık 48 saatler sonrasında ise metabolit aktivitesi görülmemiştir. S6 izolatu için en yüksek metabolit aktivitesinin değeri 15 mm zon çapı ile inkübasyonun yaklaşık 24. saat zaman aralığında olduğu belirlenmiştir.

3.6.3. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

S6 izolatının süpernatantı içindeki metabolit'in aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi incelenmiştir. Bunun için seçilen izolatın süpernatantları 45, 60, 80 ve 95 °C sıcaklıklarda 1 saat inkübe edilmiştir. Diğer taraftan 121°C'de 20 dk otoklavlanmıştır.

Çizelge 3.11. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi (Ø:8mm).

Uygulanan sıcaklık (°C)	İnhibisyon zonu (mm)
45	14
60	13
80	-
95	-
Otaklav (1 atm basınç 121°C 20 dk)	-
Kontrol (S6)	15

Yapılan deney sonuçları Çizelge 3.11’ de verilmiş olup 45 ve 60 °C sıcaklıklarında metabolitin aktivitesinde önemli derecede bir azalmanın olmadığı, 80, 95 ve 121°C’de ise aktivitenin kalmadığı tespit edilmiştir.

3.6.4. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine pH’nın etkisi

S6 süpernatant’ın içinde bulunan metabolit’in aktivitesi üzerine pH’nın etkisi hassas olarak seçilen indikatör izolat (S4) üzerinde incelenmiştir. Bu deney iki yöntemle yapılmıştır. Birincisi süpernatantın pH’sı 2, 4, 6, 8 ve 10 olarak ayarlanarak 2 saat oda sıcaklığında (25°C) bekletilmiştir. İkinci yöntemde ise süpernatant 2 saat bekletildikten sonra pH’ları 7,0’a ayarlanarak nötrlenmiştir.

İki farklı yöntemle yapılan pH deney sonuçlarına göre, süpernatant aktivitesinin farklı pH aralıklarında aktivitesini sürdürdüğü, asidik pH’dan bazik pH’ya göre daha az etkilendiği belirlenmiştir. pH 2’den pH 6’ya doğru gidildikçe metabolitin aktivitesinde artma olduğu, pH 6’dan pH 10’a doğru ise metabolitin aktivitesinde azalma olduğu bulunmuştur. Optimum aktivitenin de pH 6’da gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 3.12. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi (Ø:8mm).

pH'nın etkisi (oda sıcaklığında)	İnhibisyon zonu (mm)	İnhibisyon zonu (mm) (pH'ları 7.0 ayarlı)
2	13	13
4	14	13
6	15	14
8	14	13
10	13	12
Kontrol	15	14

İki farklı yol izlenerek yapılan deney sonuçlarına bakıldığında, sonuçlar arasında önemli derecede bir fark olmadığı ikisinde de benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür.

3.6.5. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine organik çözücü ve deterjanların etkisi

S6 metabolitinin aktivitesi üzerine çeşitli organik çözücü ve deterjanların etkilerini araştırmak için kloroform, aseton, metanol, etil alkol, çamaşır suyu ve yağ çözücü kullanılmıştır. Çalışma farklı konsantrasyonlarda denenmiştir. Birincisinde organik çözücü ve deterjanlardan süpernatantlar ile son konsantrasyon %10 olacak şekilde karıştırılmıştır. Buna göre deney sonucuna bakıldığında, metabolitin aktivitesinde önemli derece bir değişiklik olmadığı görülmüştür.

Çizelge 3.13. S6 metabolitinin aktivitesi üzerine organik çözücülerin ve deterjanların etkisi. (Ø:8mm) Organik çözücü süpernatant ile eşit hacimde, deterjanla ise %1 oranında hazırlanmıştır.

Organik Çözücüler/ Deterjanlar	İnhibisyon zonu (mm)
Kloroform	12
Aseton	13
Metanol	11
Etil alkol	12
Çamaşır suyu	13
Yağ çözücü	13
Kontrol S6	15

İkincisinde izlenen yolda ise organik çözücüler süpernatant ile eşit hacim olacak şekilde, deterjan ise son konsantrasyon % 1 oranında kullanılarak hazırlanmış ve sonuçlar Çizelge 3.13'de verilmiştir. Bu şekilde hazırlanan konsantrasyonlarda ise metabolitin aktivitesini az miktarda etkilediği tespit edilmiştir.



4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikrobiyal hayat toprak, hava, su kaynakları, buzullar, yanardağlar, tuz gölleri, sodalı sular ve yüksek asitli ortamlara kadar yayılmış durumdadır (Ercan Akkaya ve Kıvanç, 2008). Bu yaşam alanlarından biri olan hava, mikroorganizmalara taşınma olanağı sağladığı için mikrobiyolojide önemlidir.

Hava ve tozlarda en çok bulunan mikroorganizmalar, Basillus, Mikrokok, Stafilokok ve Salmonella cinsi bakterilerdir (Ünver ve Baykan, 1981). Özellikle kalabalık bölgelerde 100-150 metre yükseklikte açık havada *Bacillus* ve *Clostridium* gibi bakterilerin sporları, küf mantarlarının konidileri, Mikrokoklar ve bazı Enterobacteriaceae türleri bulunabilir (Unat, 1993). *Bacillus*'lar havadan, topraktan, sulardan, çöplerden, enfekte olmuş bitki materyallerinden olmak üzere çevreden kolaylıkla izole edilebilirler. Havada yaygın olarak bulunan mikroorganizmalardan biri olan *Bacillus* cinsi bakteriler, sporlarının çevre şartlarına oldukça dirençli olması ve dormansilerinden dolayı atmosferde uzun süre canlı kalıp yaşayabilirler (Örgev, 2000; Çelik Sevim vd., 2006).

Bu çalışmada, Küyahya iline bağlı Seyitömer beldesindeki farklı istasyonlardan elde edilen havasal örnekler, Nutrient Agar besiyeri içeren petri kutuları yardımıyla Yer Çekimine Dayalı Açık Petri Plak yöntemiyle izole edilmiştir. Kullanılan bu yöntem havadaki partiküller üzerinde bulunan mikroorganizmaların alınmasında pratik ve maliyeti az olan bir yöntem olmasından dolayı tercih edilmiştir. Bu yöntemi çalışmalarında kullanan başka araştırmacılar da mevcuttur. Kırbağ ve Cengiz, Yerçekimine Dayalı Petri-Plak Metodunu kullanılarak Elazığ ilinin ev dışı havasının mikrofungal florasını çalışmışlardır (Kırbağ ve Cengiz, 2010). Yine benzer olarak Karabıyık (2002), yaptığı bir çalışmada Edirne ilindeki beş farklı ilkokul ortamındaki hava kaynağından Yerçekimine Dayalı Petri Plak metodunu kullanarak içlerinde *Bacillus* cinsinin de bulunduğu 19 adet bakteri cinsini izole etmiştir. Yassin, 2010 yılındaki çalışmasında, kentsel yerleşim alanlarında bulunan halka açık parklarda iç ve dış ortam hava kalitesini araştırırken Açık Petri Plak yöntemini kullanmıştır (Yassin, 2010).

Bacillus'ların vejetatif hücreleri çubuk şekilli, endospor üretebilen, Gram pozitif, zorunlu veya fakültatif aerob, hareketli ya da hareketsiz olan bakterilerdir. Hücreler, tekli veya kısa zincirler halinde bulunabilmektedir (Katı vd., 2016). *Bacillus* cinsine ait sporlar, vejetatif hücre formlarına nazaran uygun olmayan ısı, besin yetersizliği, osmosise, kurumaya, zehirli kimyasal maddelere, radyasyon, dezenfektanlar ve H₂O₂ gibi okside edici ajanlarla muameleye karşı daha dayanıklıdır (Öner, 1992). Basiller, oluşturduğu endosporlar sayesinde yıllarca canlılık özelliklerini koruyabilirler.

Endospor oluşturan *Bacillus* türlerini tespit etmek amacıyla örneklerin bulunduğu tüpler, 80°C'de 20 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Endospor oluşturan Basillerin izolasyonu için bakteri izolatlarının 80°C'de 20 dakika süreyle sıcak su banyosunda tutulması, örneklerde bulunan vegetatif yapıya sahip olan hücrelerin ölümüne yol açacağından ortamda sadece endosporların canlı kalmasını sağlayacaktır (İmamoğlu, 2008). Farklı noktalardan alınan hava örneklerinden 15 adet endospor oluşturan bakteriler izole edilmiştir. Mikroorganizmalar, özel tanımlayıcı biyokimyasal karakterlere sahiptirler. Bu biyokimyasal karakterler enzimatik aktivite, biyoenerjetik olaylar, biyosentez ve biyodegradasyon olayları ile kontrol edilirler. Bu reaksiyonların tamamı metabolizma olarak adlandırılır. Hücre içinde ve dışında meydana gelen bu biyokimyasal değişimler enzimler tarafından kontrol edilirler. Mikroorganizmaların tanınmaları, suşların izolasyonu, seçimi ve taksonomik amaçlarla biyokimyasal aktivitelerin karşılaştırılması gibi birçok sebepten dolayı oldukça önemlidir (Demirbağ ve Demir, 2000). Bakterilerin identifikasyonunda morfolojik karakterlerden hücre şekli, hücre büyüklüğü, koloni morfolojisi, gram reaksiyonu, hareketlilik, endosporun şekli ve yeri, pigmentasyon özelliklerinden yararlanılır. Bunun yanında, hücre çeperi yapısı, enerji kaynakları, fermantasyon ürünleri, oksijen istekleri, ikincil metabolitler, metabolik inhibitörler ve antibiyotik duyarlılık özellikleri de önem taşır (Yazıcıoğlu, 2010). Çalışmamızda elde edilen 15 adet bakteri izolatlarını tanımlamak için, gram boyama reaksiyonları, endospor oluşumu, hareketlilik, anaerobik gelişme, katalaz üretimi, jelatinaz üretimi, üreaz üretimi, lesitinaz üretimi, H₂S oluşumu, İMVİC (İndol, Metil Red, Voges Proskauer, Sitrat) testleri, farklı sıcaklıklara (5°C, 30°C, 40°C, 50°C, 55°C) toleransı, pH toleransı (pH 5.7, pH 6.8), NaCl toleransı (%2, %5, %7, %10) testlerini içeren morfolojik ve biyokimyasal testler yapılmış olup sonuçlar Çizelge 3.1'de belirtilmiştir. Tüm izolatların gram pozitif, endospor oluşturan, katalaz pozitif, anaerobik ortamda yaşayabilen türler olduğu belirlenmiştir. Havasal kaynaklardan izole edilen gram pozitif Basillere yapılan morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları Bergey's Manual of Systematic Bacteriology esas alınarak değerlendirilmiş ve bu izolatlar *Bacillus* sp. olarak cins seviyesinde tanımlanmıştır (Sneath, 1986).

Mikroorganizmaların tanınmaları, hastalıkların sebebi olan çeşitli patojenlerin tahlili, endüstriyel fermentasyon ürünlerini (antibiyotikler, organik asitler, endüstriyel enzimler, alkoller, çözücüler ve vitaminler) oluşturan mikrobiyal suşların izolasyonu ve seçimi ile taksonomik amaçlarla biyokimyasal aktivitelerin karşılaştırılması gibi birçok sebepten dolayı oldukça önemlidir (Demirbağ ve Demir, 2000).

Toru Altın (2017), çalışmasında Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinin 5 farklı yerinden kültür yöntemiyle aldığı havasal örneklerden endospor oluşturan 14 (on dört) adet *Bacillus* cinsi bakteriler elde etmiştir. Elde edilen 4 izolatu *B.subtilis*, 1 izolatu *B.polymyxa*, 1 izolatu, *B. megaterium*, 1 izolatu, *B. brevis*, 1 izolatu, *B. licheniformis*, 4 izolatu, *B.pumilus* olarak tespit etmiştir. 2 izolat ise identifiye edilememiştir. Yeşiltaş (2014), yaptığı çalışmasında Arkeolojik kazı toprağından 27 adet endospor oluşturan *Bacillus* grubu bakteri izole etmiştir. Bu bakterilere biyokimyasal testler uygulayarak 8 izolatu *Brevibacillus borstelensis*, 7 izolatu *B. cereus*, 6 izolatu *B. subtilis*, 1 izolatu *Paenibacillus macerans*, 1 izolatu *B. popillia*, 1 izolatu *B. polymyxa*, 2 izolatu *B. coagulans*, 1 izolatu *B. larvae* olarak belirlemiştir. Bir başka çalışmada Çolak (2008), seçtiğı Elektromanyetik dalga içeren baz istasyonları yakınlarından aldığı toprak örneklerinden 15 adet *Bacillus cereus* straini izole etmiştir.

Menteşe ve arkadaşları, Ankara ilinin farklı semtlerinden dış hava biyoaerosol örnekleri olarak bakteri ve mantar seviyeleri ile türlerinin mekânsal değışimini incelemiştir. Bakteriler bakımından tüm semtlerde en sık karşılaştıkları türler, *Micrococcus* ve *Bacillus* iken; fungus türleri ise *Penicillium*, *Aspergillus*, *Exophiala* ve *Cladosporium* olarak bulunmuştur. Ayrıca bakteri ve fungus seviyelerinin değışiminde meteorolojik faktörlerin de etkisinin olduğunu tespit etmişlerdir (Menteşe vd., 2009). Sarıca ve arkadaşları yaptığı çalışmada Trakya Üniversitesi hastanesinin 6 farklı bölümünden hava orjinli örnekler olarak ev içi küf mantarı ve bakterilerin yoğunluklarını ve dağılımlarını gözlemlemiştir. 6 aylık periyod süresince hastane atmosferinden 10 bakteri cinsi (*Bacillus*, *Listeria*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacteria*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Micrococcus* ve *Streptococcus*), 7 mantar cinsi (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Alternaria*, *Scopulariopsis* ve *Trihothecium*) ve 33 mantar türünün izolasyonunu ve tanılanmasını yapmışlardır (Sarıca vd., 2002). Demir, yaptığı bir çalışmada, Kahramanmaraş ilinin organik çözücülerle kirlenen bölgelerinden toprak örnekleri toplamıştır. Petri kutularında gelişen farklı özellikteki 88 adet koloni elde etmiştir. Bunların içerisinde de gelişme gösteren 57 izolata biyokimyasal, morfolojik, kültürel ve fizyolojik testler uygulayarak 32 tanesini *Bacillus*, 25 tanesini ise *Pseudomonas* cinsine dahil etmiştir (Demir, 2007).

Günümüzde endüstride kullanılan enzimlerin büyük bir kısmı mikrobiyal kaynaklıdır. Mikroorganizma kaynaklı enzimlerin katalitik aktiviteleri, bitkisel ve hayvansal kaynaklı enzimlere göre çok yüksektir. Mikroorganizma kaynaklı enzimler stabilitelelerinin daha yüksek olmasının yanında ucuz ve fazla miktarda elde edilebilmektedirler. Bu özellikleri dolayısıyla mikrobiyal kaynaklı enzimlerin endüstriyel alanda kullanımı cazip kılınmaktadır. Bu alanlarda

kullanılan enzimlerin yüksek aktiviteye sahip olmaları, spesifik olmaları ve stabil olmaları arzu edilmektedir (Erkan, 2014).

Bir karbohidraz olan α -amilaz ekstrasellüler enzimi ticari olarak kullanılan ilk enzimdir. Yapılan bir çalışmada *Bacillus subtilis*'tan izole edilen amilaz saflaştırılmış ve karakterize edilmiştir. Gıda başta olmak üzere pek çok alanda kullanılan proteazlar ise toplam endüstriyel enzim ticaretinin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Bakteriyel proteazların diğer proteazlara göre daha etkili olduğu bildirilmektedir. Birçok mikroorganizmadan proteaz enzimi izole edilse de izolasyonu daha kolay olduğu için *Bacillus* cinsi biyoteknolojide en fazla kullanılan bakteriler arasındadır (Katı vd., 2016).

Çalışmamızda elde edilen Basil izolatlarının amilaz ve proteaz enzim üretim yetenekleri incelenmiş olup deney sonuçları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Buna göre, amilaz aktivitesi en yüksek izolat 14 mm zon çapı ile S6 izolatı olmuştur. Proteaz aktivitesi en yüksek izolatların ise 18 mm zon çapı ile S2, S6, S11 ve S15 olduğu belirlenmiştir. Yapılan testlerde izolatların %40'ı amilaz, %93,33'ü proteaz aktivitesi göstermiştir. S2, S5, S6, S9, S11 ve S15 izolatlarının ise hem amilaz hem de proteaz aktivitesini gösterdiği tespit edilmiştir.

Türker (2014), yaptığı çalışmada Erzin sınırları içerisinde bulunan Burnaz Çayı kıyı kesimlerinden topladığı toprak örneklerinden sıcaklığa dirençli α -amilaz enzimleri üreten üç adet termofilik *Bacillus* sp. izole ederek enzimlerin kısmi karakterizasyonunu gerçekleştirmiştir. Tanaka ve Hoshino (1999), deterjanlardan kirliliklerin uzaklaştırılmasına katkı sağlamak amacıyla α -amilazların substrat özgüllükleri üzerine çalışmalar yapmışlardır.

Tekin (2008), Çeşitli bölgelerden izole ettiği *Bacillus* suşlarını Skim Milk Agar besiyerinde inkübe etmiştir. İnkübasyon sonunda proteaz aktivitesine sahip izolatları, yağsız süt tozunun hidrolizi sonucunda koloni çevresinde oluşturdukları proteolitik zonun varlığına bağlı olarak belirlemiştir. Akan (2010), tavuk üretim çiftliği toprağından 21 proteolitik (skim-milk agarda) *Bacillus* suşu izole etmiştir. Ghorbel vd. (2003), balık endüstrisinin atık suyundan izole edilen *Bacillus cereus*'tan organik çözücülerde stabil olan proteaz enzimi üzerine çalışmalar yapmışlardır. Gerze (2003), *Bacillus subtilis megaterium* ve *Bacillus polymxa* türünden elde ettiği proteaz enzimini kısmi saflaştırmış ve özelliklerini incelemiştir. Elde edilen proteaz enziminin de optimum pH, optimum sıcaklık, pH kararlılığı, sıcaklık kararlılığı gibi özelliklerini ve molekül ağırlığı tayinini yapmıştır. Kaya (2011), Tarımsal atıkların substrat olarak kullanıldığı, katı substrat fermantasyon tekniğı ile *B. licheniformis* ATCC 14580 türünden proteaz üretimi üzerine çeşitli parametrelerin etkisini incelemiştir. Bir başka çalışmada ise Doddapaneni ve arkadaşları, mezbaha atık örneklerinden izole edilen *B. cereus*'tan proteaz

enziminin saflaştırılmasını ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir (Doddapaneni vd., 2009).

Elde edilen bu veriler çalışmamız açısından önem arz etmektedir. İlerleyen zamanlarda *Bacillus* izolatları üzerinde besiyeri ortamı, sıcaklık, pH gibi çevresel şartlar değiştirilerek ürün verme niteliği arttırılabilir ve çeşitli yöntemlerle enzim saf olarak elde edilip deterjan, gıda, tekstil, yem vb. alanlarda ticari olarak piyasada kullanılabilir.

Çevredeki ağır metallerin toksik seviyelerinin varlığı canlılar üzerinde olumsuz etkiler meydana getirebilmektedir. Bazı mikroorganizmalar bu metallere maruz kaldığında kromozom, plazmid veya transpozon üzerinde kodlanmış metal dirençlilik mekanizmaları aracılığı ile başarılı bir şekilde uyum mekanizmalarına sahiptirler. Bu mekanizmalara bakıldığında, mikroorganizmaların biyolojik tepkimeler ile bazı metal bileşiklerini daha az toksik hale getirebildikleri, metal iyonlarını solüsyondan uzaklaştıran intraselüler polimerler üretebildikleri, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını tutabilen proteinler taşıdıkları, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını çözülemez metal kompleksleri şeklinde çöktürebilen mekanizmalara sahip oldukları ve difüzyon mekanizması yoluyla metal bileşiklerini hücre dışına verebildikleri söylenebilmektedir. Günümüzde metal dirençliliği hakkında biyokimyasal ve biyokimyasal olmayan mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmaların kullanılmasıyla günümüzün önemli bir çevresel sorunu olan ağır metal kirliliğine çözümler üretilmektedir (Şenkaya, 2014).

Bakterilerin dirençlilik yeteneklerini kaybettikleri dolayısıyla gelişimlerinin önlendiği en düşük metal konsantrasyonu 'Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu' MİK olarak ifade edilir. Metal yönünden kirliliği olan ortamlarda ancak metal tolerans yeteneği olan organizmalar canlılığını sürdürebilmektedir. İşte bu yüzden ağır metallere karşı dirençli olan bakterilerin ekolojik açıdan önemi büyüktür. Bu nedenlerden dolayı bu ortamlarda ekosistemdeki madde döngülerinin sürekliliği organizmaların metal toleranslılık güçlerine bağlıdır. Aksi takdirde madde döngülerinin durması o bölgede yaşayan canlıların azalmasına ve belki de durmasına sebep olur. Bu nedenle, çeşitli habitatlarda yer alan metallere toleransı olan organizmalar, bu ortamlarda yaşamın devamı ve bu ortamların ıslahı için büyük önem arz etmektedir.

Özellikle de biyosferde hava yolu ile bir yerden başka yere taşınabilen sporlu bakterilerin sahip oldukları dirençlilik etmeni olan genetik materyallerinin de bir yerden başka yere taşınmasında da önemli bir unsur olabileceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızda hava kaynağından elde edilen Basillerin ağır metal toleranslılık sonuçları Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'de verilmiştir. Ağır metallere karşı en yüksek MİK değeri referans

suş (*Bacillus subtilis* NRRL B-209) ile kıyaslandığında, Basillerin %93,33 oranında bakır ağır metaline karşı dirençli olduğu bulunmuştur. Suşların bakırın bulunduğu ortamda üreyebildikleri görülmüştür. Çalışmamızdaki Basillerin toleranslılık düzeyine göre ağır metalleri sıraladığımızda $Cu > Fe = Pb$ olduğunu söyleyebiliriz. Basil izolatlarının ağır metallere karşı göstermiş olduğu en yüksek MİK değeri bakır ağır metaline karşı bulunmuş diğer ağır metaller ise izolatlar üzerinde oldukça toksik etkiye sahip olmuşlardır. Kesin olarak ispatlanamamakla birlikte, bazı bakır dirençlilik tiplerinin periplazmik bağlanmayla sağlandığı düşünülmektedir (Silver, 1998). Ayrıca bizim çalışmamızdaki sonuç, örneklerin alındığı havanın bakır ağır metaliyle karşılaşmış olma ihtimalini dolayısıyla da suşların bakıra karşı direnç kazanmış olması ihtimalini göstermektedir.

Benzer sonuçlar elde edilen başka bir çalışmada ise Toru Altın (2017), Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinin 5 farklı yerinden topladığı havasal örneklerden elde ettiği *Bacillus* izolatlarının ağır metal dirençliliğini incelemiştir. Ağır metal dirençlilik yüzdelerini referans suşa göre kıyasladığında; %100'ünün bakır ve kadmiyum'a karşı dirençli olduğunu tespit etmiştir. Yeşiltaş (2014), Arkeolojik kazı toprağından izole ettiği 27 adet endospor oluşturan *Bacillus* grubu bakterilerin çeşitli ağır metallere karşı dirençliliğini değerlendirmiştir. Buna göre Basillerin toleranslı ve duyarlı oldukları ağır metalleri sırasıyla $Mn > Cd > Fe = Ni = Pb = Cr = Cu = Zn = Co$ olduğunu görmüştür. Şenkaya (2014), Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinde toprak örneklerinden elde ettiği 13 izolatın ağır metal dirençliliğini belirlemek için *B. subtilis* NRRL B-209 referans suşu ile kıyasladığında dirençliliği sırasıyla % 84,61 kadmiyum, % 76,92 mangan, % 38,46 bakır ve % 30,76 nikel olarak bulmuştur. Yazıcıoğlu (2010), Farklı toprak örneklerinden izole ettiği endospor oluşturan *Bacillus* sp. izolatlarının ağır metal toleranslılığını belirlemiştir. Buna göre *B. subtilis* NRRL B-209 referans suşu ile kıyaslandığında elde edilen 161 suşun % 98,13'ü kurşun, % 89,44'ü bakır, % 55,27'si nikel, % 50,93'ü çinko, % 29,8'i kadmiyum ve % 4,34'ü civa ağır metaline karşı dirençli olduğunu bulmuştur. Sevim ve Sevim (2015), yaptıkları çalışmada Rize ilindeki toprak örneklerinden izole ettikleri 15 adet *Bacillus* suşunun 10 ağır metale karşı dirençliliğini belirlemişlerdir. Bakır, krom, çinko, demir ve nikel'e karşı direnç belirlenmesine rağmen, civa direnci gösteren 3 suş hariç civa ve kobalta karşı direnç belirlenmemiştir. Nithya ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada sedimentlerden izole edilen *Bacillus arsenicus* türünün Co, Se, Hg, As, Cu, Zn, Mg, Cd, Pb ağır metallerine karşı direnç gösterdiğini tespit etmiştir (Nithya vd., 2011).

Ağır metallere karşı dirençli izolat sayısının en yüksek olduğu metal % 93,33 oranı ile bakır olarak saptanmıştır. Elde edilen izolatların 14 tanesinin bakır'a karşı en yüksek MİK değeri 2 µM olarak bulunmuştur. Ağır metallerin çevreye yayılımında etken olan en önemli

endüstriyel faaliyetler demir çelik sanayi, termik santraller, çimento üretimi, cam üretimi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Diğer çalışmalardan elde edilen bilgilere göre tarım alanlarından izole edilen mikroorganizmaların bakır dirençliğinin yüksek çıkması fungusit olarak kullanılan ilaçların içeriğinde bakır bulunmasından kaynaklanmaktadır (Yazıcıoğlu, 2010). Bizim çalışmamızda bu bilgiler doğrultusunda sonuç bulunmuştur. Ayrıca bakıra dirençli bakterilerin bakır seviyelerinin yüksek olduğu endüstriyel veya tarımsal aktivitelerin yoğun olduğu alanlardan izole edilebileceği, bakteri türlerinin yüksek bakır seviyesini tolere ettiği bildirilmiştir (Trevors, 1987).

Ağır metal dirençliliği mekanizmalarının tam olarak anlaşılması ile kirletilmiş olan çevrelerin etkin olarak temizlenmesi, çevre dostu teknolojilerin kullanımının artmasıyla düşük cevher içerikli madenlerden yüksek kalitede ürünlerin elde edilmesi ve patojen mikroorganizmalara karşı etkili olan yeni ilaçların üretilmesi sağlanabilir (Yavuz ve Sarıgül, 2016).

Günümüzde kullanılan antibiyotikler A. Fleming tarafından 1928'de *Penicillium chrysogenum*'dan elde edilen Penisilin antibiyotiği ile başlamıştır. Diğer yandan hem sağlık alanında hem de diğer alanlarda antibiyotiklerin gereksiz yere kullanılması antibiyotiklere karşı bakterilerin giderek dirençli hale gelmesini sağlamıştır.

Antibiyotiklere karşı oluşan dirençlilik, hücre zarı geçirgenliğinin değişmesi, metabolik yol ve enzimlerin değişim göstermesi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün kaybolması biçiminde gelişebilmektedir (Yazıcıoğlu, 2010). Doğal çevrede bakteriler arasındaki gen transferi konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Dirençli bakterilerin bu kabiliyeti ve direnç genlerinin bir ekosistemden diğerine taşınmaları rapor edilmiştir. Doğadaki çoğul antibiyotik direncinin varlığı toprak ve onun birebir temas ettiği su ve diğer habitatlarındaki bakteriler arasında direncin yayılımına sebep olmaktadır (Çelik Sevim vd., 2006).

Antibiyotik dirençlilik testi, agar disk difüzyon yöntemiyle sekiz farklı antibiyotik (amfisilin, kloramfenikol, siproflaksin, eritromisin, kanamisin, oksasilin, streptomisin, vankomisin) kullanılarak belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.6, Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8'de gösterilmiştir. Antimikrobiyal hassasiyet testleri The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) önerileri dikkate alınarak değerlendirilmiştir (Çelik Sevim vd., 2006).

Çalışmada kullanılan; amfisilin, vankomisin ve oksasilin antibiyotikleri bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek ve otolitik (bakteri hücrelerini parçalayan) enzimleri aktive ederek etki göstermektedir. Streptomisin, eritromisin, kloramfenikol ve kanamisin antibiyotikleri bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Siproflaksin antibiyotiği ise bakterilerin DNA ve RNA sentezini (nükleik asit sentezini) bozarak etki etmektedir (Usta, 2012).

Elde edilen Basillerin oksasilin ve amfisilin antibiotiklerine karşı direnç gösterdiği bulunmuştur. Oksasilin antibiyotiğine karşı tüm izolatların (% 100) dirençli oldukları bulunurken amfisilin antibiyotiğine karşı 7 izolatın (% 46,66) direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Oksasilin antibiyotiği penisilinaza dayanıklı penisilinler grubundan olan bir antibiyotiktir. Penisilin türevi antibiyotikler ve amfisilin hücre duvarı sentezini 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 bulunmaktadır. Bu da direncin aynı tür veya farklı mikroorganizmalar arasında hızlıca yayılmasına sebep olmaktadır (Çelik Sevim vd., 2006; Şensoy Karaoğlu, 2013).

Diğer çalışmalara bakıldığında Toru Altın (2017), Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinin 5 farklı yerinden kültür tekniği ile topladığı havasal örneklerden elde edilen *Bacillus* izolatlarının antibiyotik dirençliliğini incelemiştir. Basillerin antibiyotik dirençlilik düzeylerini sırasıyla; %100 oksasilin, %50 amfisiline ve %7,1 eritromisine karşı dirençli olarak bulmuştur. Sevim ve Sevim (2015), Rize ilindeki toprak örneklerinden izole ettiği 15 adet *Bacillus* suşunun 17 antibiyotiğe karşı dirençliliğini belirlemişlerdir. Toplam olarak 11 suşu (%67) en azından bir antibiyotiğe karşı dirençli olarak bulmuşlardır. En fazla oluşan antibiyotik direnci ise metisilin ve oksasilin'e karşı olmuştur.

Çalışmamızda kullanılan kloramfenikol, eritromisin, siproflaksin, kanamisin ve streptomisin antibiyotiklerine karşı ise herhangi bir direnç tespit edilememiştir. Elde edilen Basillerin bazı antibiyotiklere karşı direnç profillerinin düşük olmasının nedeni izolatların elde edildiği ortamlarda antibiyotiklerle karşılaşma olasılıklarının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şenkaya (2014), yaptığı çalışmasında Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinde toprak örneklerinden elde ettiği 13 izolatın antibiyotik dirençliliğini belirlemiştir. Oluşan en yüksek dirençlilik sırasıyla; sefotaksim (%53,84), oksasilin (%53,84), metisilin (%46,15), amfisilin ve

sulbaktam (%30,76), eritromisin ve kloromfenikol (%7,69) antibiyotiklerine karşı olarak bulunmuştur. Yazıcıoğlu (2010), Farklı toprak örneklerinden izole ettiği endospor oluşturan *Bacillus* sp. izolatlarının antibiyotik dirençliliğini belirlemiştir. Buna göre izolatları sırasıyla %47,82'si sefotaksim, %21,11'i amfisilin, %10,55'inin tetrasiklin, %8,07'sinin klindamisin, %7,45'i vankomisin, %6,83'ü rifamisin, %4,96'sı streptomisin, %3,72'si eritromisin, %2,48'i kloramfenikol ve %0,62'si imipenem antibiyotiklerine karşı dirençli olarak bulunmuştur. Aslım vd. (2002), tarafından yapılan bir çalışmada, topraktan izole edilen 30 adet *Bacillus* izolatlarını, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *B. pumilus* ve *Bacillus* spp. olarak tanımlamış ve bu izolatların amfisilin, kloramfenikol, eritromisin, gentamisin, sefalotin, tetrasiklin, sulbaktam, vankomisin, penisilin G'ye karşı antibiyotik duyarlılıklarını incelemişlerdir. Sonuçlara göre tüm suşların penisiline dirençli, vankomisine duyarlı olduklarını, izolatların %76'sının amfisiline, %20'sinin eritromisine, %3'unun kloramfenikole ve %7'sinin tetrasikline karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Luna vd. (2007), 95 tane *Bacillus* spp. izolatının 24 farklı antibiyotiğe karşı duyarlılık durumunu sensititre otomatize mikrodilüsyon ve E-test yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışılan 18 tane *B. anthracis* suşunun 3'ünün eritromisine azalmış duyarlı, suşların tamamının amfisilin, penisilin, tetrasiklin, kloramfenikol, vankomisin, gentamisin, rifampisin, klindamisin, kunipristin/dalfopristin ve kinolonlara duyarlı, kotrimoksazole karşı dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Bacillus'ların insan ve hayvanlar için patojen olmaları, hava, su ve toprakta yaygın olarak bulunmaları, plazmid veya kromozomal orjinli direnç genlerini taşımaları ve bu genleri aktarabilmelerinden dolayı antibiyotik direncinin çevreye yayılması önem arz etmektedir (Çelik Sevim vd., 2006).

Mikroorganizmalar arasında birbirinin gelişimini engelleyen ve destekleyen etkileşimler olmaktadır. *Bacillus* türlerinin 45'ten fazla antimikrobiyal madde ürettiği bildirilmiştir. Bunların bir kısmı klinik önem taşırken bir kısmı gıdaların üretiminde, bir kısmı da bitki hastalıklarının kontrol edilmesinde kullanılmaktadır. Bu antimikrobiyal maddeler, ribozomal olarak sentezlenen, protein yapısındaki bakteriyosinler ve bakteriyosin benzeri maddeler ile enzimatik olarak sentezlenen küçük peptitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. *Bacillus* türlerinin ürettiği bakteriyosinler, Gram pozitif ve negatif bakterilerden maya ve küflere kadar geniş bir inhibisyon alanına sahiptir (Erem vd., 2013).

Bacillus türlerinin biyolojik kontrol mekanizmalarını aydınlatmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Antagonistik aktivite antibiyotik özellikli sekonder metabolitlerin üretimiyle çoğunlukla ilişkilidir (Katı vd., 2016). Ayrıca birçok mantar ve mayanın neden olduğu

hastalıklarla mücadelede *Bacillus*' lar tarafından üretilen antibiyotikler kullanılmaktadır (Usta, 2012). Günümüzde birçok mikroorganizma antibiyotiklere karşı direnç kazandığı için yeni izole edilen mikroorganizmaların antimikrobiyal madde üretmesi ve ürettikleri bu metabolitlerin geniş antimikrobiyal aktiviteye sahip olması önemlidir (Katı vd., 2016). Bazı *Bacillus* türleri basitrasın, polimiksin ve subtilin gibi peptid antibiyotikleri üreterek çeşitli mikroorganizmaların üremesi engellenirken, kendileri de bu antibiyotiklere karşı koruma mekanizmaları geliştirirler (Çelik Sevim vd., 2006).

Bacillus cinsi bakterilerin ürettikleri enzimler, antibiyotikler, bakteriyosin veya bakteriyosin benzeri maddeler, endüstriyel önemi olan çeşitli metabolitler gıda, ilaç ve deterjan gibi birçok endüstriyel alanda kullanılmaktadır (Katı vd., 2016). Ayrıca kimyasal insektisit ve pestisitlerin oluşturduğu çevre kirliliği ve doğal bakteriyel antagonist ajanlarla biyolojik kontrolü sağlamanın öneminden dolayı *Bacillus* bakterileri önemli derecede potansiyele sahiptir. Bitki hastalıkları ve balık üretim merkezlerindeki ticari kayıplara karşı da *Bacillus*'ların ürettiği antibiyotikler kullanılmaktadır (Usta, 2012).

İzole edilen 15 izolatın kendilerine ve diğer Basil izolatlarına karşı metabolit üretim aktivitesi ilk olarak agar damlatma yöntemi ile tespit edilmiştir. S1, S2, S3, S5, S6, S7, S8, S9, S10, S11, S12, S13, S14 ve S15 izolatlarının metabolit aktivitesi gösterdiği belirlenmiş olup sadece S4 bakterisi antibakteriyal aktivite göstermemiştir. Metabolit üretim aktiviteleri belirlenen *Bacillus* izolatları arasında, S6 numaralı izolattan elde edilen süpernatant'ın diğer izolatlar üzerinde en yüksek inhibisyon zon çapı oluşturduğu, S4 numaralı izolatın ise en hassas izolat olduğu ve metabolitlerden en fazla etkilendiği tespit edilmiştir.

Antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolit ürettiği bilinen endospor oluşturan *Bacillus* izolatları içerisinde en iyi aktiviteye sahip olan S6 izolatından elde edilen metabolitlerin aktivitesi 6 bakteri (gram pozitif ve negatif) ve 1 maya türüne karşı denenmiştir. Test mikroorganizmaları olarak gram pozitif bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*), gram negatif bakteriler (*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* Sg 2-15) ve maya (*Sacharomyces baulardi*) kullanılmıştır. Genel olarak bakıldığında S6 izolatu test edilen mikroorganizmaların hepsine karşı antimikrobiyal aktivite göstermiştir. S6 izolatu gram pozitif bakterilerden en fazla aktiviteyi *B. cereus*'a (16mm) karşı göstermiştir. *B. subtilis* ve *E. faecalis*'e karşı ise düşük miktarda (12mm) etki göstermiştir. *S. aureus*' a karşı ise en az aktiviteyi göstermiştir. S6 izolatu gram negatif bakterilerden ise en fazla aktiviteyi *L. pneumophila* Sg 2-15'e karşı (20mm) göstermiştir. Test edilen mikroorganizmalar içerisinde ise en fazla aktiviteyi 20 mm zon çapı ile *Legionella pneumophila* Sg 2-15'e karşı

göstermiştir. Lejyoner hastalığı etkeni olan *Legionella pneumophila* Gram negatif bir bakteri türüdür. Oksijen gereksinimi yönünden aerobiktir. Mikroskopik olarak çomak şeklinde görülür. Göller, göletler ve akarsu gibi doğal su kaynaklarında oldukça yaygın olarak bulunmakla birlikte duş başlığı, buz makinaları, soğutma kulesi, nebülizörler, nemlendiriciler ve jakuzi gibi su sistemlerine geçtiklerinde oluşan uygun koşullar nedeniyle çoğalabilmektedir. *Legionella* ile kontamine olmuş su sistemlerinden yayılan aerosollerin solunum sistemiyle alınması insanlarda enfeksiyona neden olur (Yazıcı, 2006).

Toru Altın (2017), tarafından yapılan çalışmada havadan izole edilen Basil izolatlarının *L. pneumophila* Sg 2-15 bakterisine karşı sekonder metabolit üreterek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bulunmuştur. Emmerling ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 83 tane *Bacillus* suşundan 14'ünün *L. pneumophila* üzerinde inhibe edici etki gösterdiğini belirtmişlerdir (Emmerling vd., 1983). Carrington (1979), tarafından yapılan çalışmada ise solunum yolu flora bakterisi olan 5 bakteri türünün (*Bacillus* spp, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus viridans*), *L. pneumophila* üzerinde inhibe edici etkiye sahip olduklarını bildirmiştir. Rowbotham (1980), ağız flora üyesi olan *Bacillus* türlerinin katı besiyerinde *L. pneumophila*'nın üremesini engellediğini belirten çalışmasının sonucu da bizim bulgularımızı desteklemektedir. Yazıcı (2006), İnsan yapımı su sistemlerinden izole ettiği örneklerden çeşitli cinsleri içeren bakteriler elde etmiştir. Bu örneklerden elde ettiği *Legionella* haricindeki 24 adet bakteri suşunun, yine aynı örneklerden izole edilen 2 adet *L. pneumophila* Sg 2-14 suşunun üremesi üzerindeki etkilerini incelemiştir. Bunlardan *B. pumilus* suşlarının her iki *L. pneumophila* suşunun üremesini inhibe ettiğini, meydana getirdiği inhibisyon zonunun ise ölçülemeyecek kadar büyük olduğunu bildirmiştir.

Bacillus türlerinin, antimikrobiyal aktivitesi araştırıldığında farklı temel kimyasal formları temsil eden çok sayıda peptit yapıda madde ürettiği bildirilmektedir (Tagg vd., 1976).

Cladera-Olivera ve arkadaşları *Leporinus* sp. balığının bağırsak içeriklerinden izole ettikleri *Bacillus licheniformis* P40 suşunun ürettiği antimikrobiyal aktiviteyi değerlendirmişlerdir. *Bacillus licheniformis* P40 suşunun ürettiği antimikrobiyal maddenin *Listeria monocytogenes* türü üzerinde bakterisidal etki gösterdiğini bulmuştur. Ayrıca bu çalışma sonucunda *Bacillus licheniformis* P40 tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiğin patojenik ve bozulma etkeni olan birçok mikroorganizmalarının kontrol edilmesinde doğal bir biyokoruyucu madde olarak kullanılmasının uygunluğunu göstermektedir (Cladera-Olivera vd., 2004). Topçal vd. (2014), Topraktan izole ettikleri *Bacillus* spp. tarafından üretilen metabolitlerin, *Escherichia coli* ve *Micrococcus luteus*'un gelişmesini engellediğini tespit

etmişlerdir. Yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bulgular *Bacillus* türlerinin antimikrobiyal maddeler sentezlediğini ayrıca bu maddelerin patojen mikroorganizmaların gelişmesini engellediğini göstermiştir. Yaptığımız bu çalışmada da elde edilen bulgular önceki yapılan çalışmaları destekler özelliğindedir.

S6 izolatının etkili metabolit ürettiği tespit edildikten sonra izolatın büyüme eğrisi ve metabolit üretim zaman aralığı belirlenmiş olup Şekil 3.4’de verilmiştir. S6 izolatının gelişimin yaklaşık 24. saatin sonunda logaritmik safhanın sonuna geldiği görülmüştür. Bu safhada S6 izolatından elde edilen metabolitin en yüksek aktiviteye (15mm) ulaştığı tespit edilmiştir.

Şensoy Karaoğlu (2013), yaptığı çalışmasında Rize ili topraklarından izole ettiği *Bacillus amyloliquefaciens* B13 izolatının 10 saatlik süre zarfında logaritmik büyüme fazının sonuna geldiğini ve durgun faza giriş yaptığı tespit etmiştir. Cladera-Olivera ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada *Bacillus licheniformis* P40 suşunun büyüme eğrisinin, 12 saatlik ekim işleminde sonra durağan faza ulaştığını ve 15. saate kadar maksimum antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Cladera-Olivera vd., 2004).

Usta (2012), Türkiye topraklarından *Bacillus* cinsi bakteriler izole ederek antibiyotik aktivite taraması yapmış ve 25 tanesinin çalışmada kullanılan farklı test bakterilerine karşı inhibisyon zonu oluşturduğunu gözlemlemiştir. Deney sonuçlarına göre bakteri üremesinin ve antibiyotik üretiminin maksimum olduğu zamanı 72. saat olarak belirlemiştir. İnhibisyon zonunu *Shigella sonnei*’ye karşı 15 mm olarak ölçmüştür. Yapılan bir başka çalışmada Kalpana vd. (2010), *Bacillus laterosporus*’ta ve Hasan vd. (2009), *Bacillus pumilus*’te maksimum antibiyotik üretim zamanını 72. saat olarak bulmuştur. Kalpana ve arkadaşları antibakteriyel aktivitenin ilk önce 24. saatte gözlemlendiğini, 72. saatte maksimuma ulaştığını ve 96-120 saatleri arasında ise azaldığını bildirmişlerdir. Hosoya ve arkadaşları ise antibiyotik üretiminin logaritmik faz sonu ile durağan faz arasında başladığını belirtmişlerdir (Hosoya vd., 1998).

Diğer yandan, Muhammad vd. (2009), yaptıkları bir çalışmada termofilik *Bacillus* türlerinde maksimum inhibisyon zonlarını *Staphylococcus aureus* (24 mm) ve *Micrococcus luteus* (22 mm)’a karşı 48. saatte elde ettiklerini ve 48. saatten sonra ise kademeli bir şekilde düştüğünü bildirmişlerdir. Benzer olarak Muaaz vd. (2007), *Bacillus subtilis* MZ-7’de inhibitör bileşiklerin konsantrasyonunun 48. saatte maksimuma ulaştığını tespit etmiştir.

Genel olarak *Bacillus*’larda antibiyotik üretim zamanı 24-72 saatlerde olmaktadır. Bizim çalışmamızda ise maksimum antimikrobiyal metabolit üretimi logaritmik fazın sonlarında (24. Saat) görülmekte olup durağan fazda azalmaktadır. Maksimum antibiyotik üretim

zamanlarının farklı saatlerde bulunması *Bacillus* türüne göre değişmektedir. Bu da metabolik yollarının farklı oluşu ile ifade edilebilir.

S6 izolatından elde edilen metabolitin aktivitesi üzerine; sıcaklık, pH, organik çözücü ve deterjanların etkisi agar kuyucuk yöntemi ile araştırılmıştır. Özellikle ısı işleme bırakılan metbolitlerin, üretimlerde yüksek sıcaklıklara karşı gösterdikleri stabilite ve farklı pH aralıklarındaki aktiviteleri de karakterizasyonlarında temel basamakları oluşturmaktadır.

S6 izolatından elde edilen metabolit aktivitesinin üzerine sıcaklığın etkisi incelendiğinde, 45 ve 60°C sıcaklıklarında metabolit aktivitesinde önemli bir azalmanın olmadığı, 80, 95 ve 121°C'de ise aktivitenin kaybolduğu gözlenmiştir. Yüksek derecelerde 1 saat boyunca uygulanan ısı işleminin metabolitin yapısını bozduğu görülmüştür.

Cladera-Olivera ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Bacillus licheniformis* P40 suşundan elde edilen süpernatanat 60, 80 ve 100 °C'de 30 dk bekletildiğinde aktivitesi stabil iken, 121°C'de 15 dk bekletildiğinde ise aktivitesini kaybettiği bildirilmiştir (Cladera-Olivera vd., 2004). Benzer bir çalışmada Şensoy Karaoğlu (2013), Rize ili topraklarından izole ettiği *Bacillus amyloliquefaciens* B13 izolatından elde ettiği antimikrobiyal maddenin 2 saatlik inkübasyon süresinin sonunda 60°C sıcaklığında aktivitesinin azaldığını, 90 ve 121°C sıcaklıklarda aktivitenin olmadığını bildirmiştir.

Havadan izole edilen S6 izolatının metabolit aktivitesi üzerine pH'ın etkisi araştırılırken yapılan literatür taramasında farklı yollar izlendiği görülmüş bizim çalışmamızda da deney iki farklı yol izlenerek yapılmıştır. Her iki izlenen yolda da benzer sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Buna göre, pH 2'den pH 6'ya ve pH 10'dan pH 6'a doğru yaklaştıkça metabolit aktivitesinin arttığı, optimum aktivitenin pH 6'da gerçekleştiği tespit edilmiştir. Asidik ve bazik ortamda metabolit aktivitesinin genel olarak azaldığı ancak asidik pH'dan bazik pH'ya göre daha az etkilendiği belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan bakterilerin ürettikleri metabolitler bazik pH'larda aktif olmasının yanısıra, asidik pH'larda da aktif olması nedeniyle fermente gıdalarda da rahatlıkla kullanılabilir. Yine metabolitin geniş bir pH aralığında aktif olması onu endüstriyel açıdan avantajlı kılmaktadır.

Cladera-Olivera vd. (2004), yaptığı çalışmada *Bacillus licheniformis* P40 suşundan elde edilen süpernatanatı farklı pH değerlerinde (pH 3-11) 25°C'de 2 saat süreyle inkübe ettikten sonra pH'ı nötrleştirmiştir. Çalışma sonunda antimikrobiyal maddenin test edilen tüm pH aralıklarında kararlı olduğunu bulmuşlardır. Şensoy Karaoğlu (2013), ise Rize ili topraklarından izole ettiği *Bacillus amyloliquefaciens* B13 izolatından elde ettiği antibakteriyel bir bileşik olan

bakteriyosinin aktivitesinin pH 3'den 7'ye doğru arttığını, optimum aktivitenin pH 7'de olduğunu tespit etmiştir. pH 7'den bazıya doğru gittikçe bakteriyosin aktivitesinin azaldığını, pH 10 ve pH 11'de ise hiç aktivitenin kalmadığını bildirmiştir. Usta (2012), yaptığı bir çalışmada toprak örneklerinden izole edilen *Bacillus* suşunun en yüksek antibiyotik üretimini *Shigella sonnei*'ye karşı 23 mm inhibisyon zonu ile pH 7,5' de olduğunu gözlemlemiştir.

S6 izolatının metabolitinin aktivitesi üzerine organik çözücü ve deterjanların etkisi araştırılırken yapılan literatür taramasında bu maddelerin farklı konsantrasyonlarda hazırlandığı görülmüş bizim çalışmamızda da deney iki farklı konsantrasyon izlenerek yapılmıştır. Organik çözücü ve deterjanların son konsantrasyonu %10 olarak hazırlanan süpernatantların aktivitesinde, metabolitin aktivitesinde önemli derecede bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Organik çözücülerin (kloroform, aseton, metanol ve etil alkol) süpernatant ile eşit hacimde deterjanların (çamaşır suyu ve yağ çözücü) ise %1 oranında hazırlandığı deneyde ise metabolitin aktivitesinin az miktarda etkilendiği tespit edilmiştir.

Cladera-Olivera ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Bacillus licheniformis* P40 suşundan elde edilen süpernatant organik çözücülerle (aseton, kloroform, metanol bütanol) eşit hacimde deterjanla (Tween 20 ve Tween 80) % 10 hazırlandığında, süpernatantın bütanol ile aktivitesini yitirdiği, kullanılan diğer kimyasalların ise antimikrobiyal aktivite üzerinde herhangi bir etkiye neden olmadığını bulmuştur (Cladera-Olivera vd., 2004). Şensoy Karaoğlu (2013), topraktan izole ettiği *Bacillus amyloliquefaciens* B13 izolatından elde edilen bakteriyosinlerin aktivitesi üzerine organik çözücü ve deterjanların etkisini incelemiştir. Çalışma sonucunda formaldehit, kloroform, aseton, propanol, methanol, tween-80 ve triton X-100'ün bakteriyosin aktivitesini bozduğunu, etil alkol, hekzan ve etil eter'in ise bakteriyosin aktivitesini az miktarda etkilediğini tespit etmiştir.

Basillerden elde edilen antimikrobiyal bileşiklerle ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında, Risoen ve arkadaşları *Bacillus cereus* tarafından üretilen bakteriyosin benzeri bileşiğin aktivitesi üzerine organik çözücülerin etkisini değerlendirmişlerdir. Aseton, asetonitril, butanol, etanol, metanol ve isopropanol çözücülerinin arasından yalnızca asetonun aktiviteyi azaltıcı yönde etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Başbülül, 2009).

S6 numaralı izolatın ürettiği antimikrobiyal bileşiğin oldukça geniş bir pH aralığında (2-10) aktivitesini koruduğu, yüksek derecede uygulanan ısı işlemlerde (80-95 °C'de 1saat) aktivitesini kaybettiği, kloroform, aseton, etil alkol ve yağ çözücü gibi organik çözücü ve deterjanlardan ise aktivitesini az da olsa sürdürdüğü saptanmıştır.

Bacillus cinsi, endüstriyel olarak önemlidir. Gıda teknolojisinde ve çeşitli amaçlarla endüstriyel alanda güvenli bir şekilde kullanılabilir (Paik vd., 1997). Biyo muhafaza olarak tanımlanan bu yöntem, gerekli koruyucu madde ile birlikte kullanıldığı zaman, gıdaların raf ömrü uzar ve güvenli gıda üretimi sağlanmış olur. Ayrıca gıdaların bozulmasının engellenmesini sağlamanın yanında kalitenin artırılması amacı ile de gıdalara ilave edilebilmektedir (Eckner, 1992).

Elde edilen Basil izolatlarının göstermiş olduğu enzim aktivitesi sayesinde gıda, deterjan, sağlık gibi pek çok endüstriyel alanda kullanılabilir. Ağır metaller içerisinde izolatların özellikle bakır ağır metallerine karşı dirençli olması, bu mikroorganizmaların çeşitli ortamlarda ağır metal giderim çalışmalarında kullanılarak metal kirliliğini azaltabileceği düşünülmektedir. Basillerin antibiyotik dirençlilik testinde en yüksek antibiyotik dirençliliğini oksasilin antibiyotiğine karşı gösterdiği tespit edilmiştir. Basil izolatlarında bakır ağır metaline ve oksasilin antibiyotiğine karşı gösterilen direncin plazmit veya kromzomal kökenli olduğu ve direncin oluşmasını sağlayan genlerin bulunduğu lokusların yakınlığı araştırılarak çalışma daha ileri boyutlara götürülebilir.

Ayrıca çalışmamızdaki Basiller iyi derecede metabolit aktivitesi göstermiştir. Elde edilen Basil izolatları içerisinde aktivitesi yüksek olan izolat seçilerek çalışmalara devam edilmiştir. Seçilen izolatla birlikte diğer *Bacillus* izolatlarından elde edilen süpernatant'ların da metabolit aktivitesi farklı mikroorganizma türleri üzerinde test edilebileceği gibi metabolitin aktivitesi üzerine sıcaklık, pH, organik çözücü ve deterjanların etkisi, farklı besiyeri ortamları gibi çevresel şartların etkisi araştırılarak metabolitin karakterizasyon çalışmaları yapılabilir. Çalışmamızda S6 izolatının özellikle gram negatif (-) bakterilerden *Legionella pneumophila* serogrup 2-15'e karşı iyi derecede inhibe edici etkisinin olması da büyük önem taşımaktadır. *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 türü insanlarda Lejyoner hastalığının etkenidir. Bu bakımdan S6 izolatı tür seviyesinde tanımlanabilir ve ürettiği metabolitlerin bileşimi araştırılarak profil çalışmaları yapılabilir. Zira bu mikroorganizmanın aktivitesi diğer patojenik türler üzerine de denenerek sağlık başta olmak üzere gıda, kozmetik gibi çoğu endüstriyel alanda başarılı bir şekilde kullanılabilirliği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adınarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, S. D., (2003), Purification and Partial Characterization of Thermostable Serine Alkaline Protease from A Newly Isolation *Bacillus subtilis* PE-11, AAPS PharmSciTech, India, 4(4): 56.
- Aehle, W., (2004), Enzymes in Industry, Production and Applications, Wiley-VCH Verlag GmbH and Co, KGaA, 1-35.
- Ahmetoğlu, N., (2011), *Bacillus cereus* KG5' in Proteaz Enzimi Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 9s .
- Akan, S., (2010), Keratinolitik *Bacillus* sp. Suşlarının İzolasyonu, Keratinaz Üretimi ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 21-72s.
- Akkan, T., (2009), İskenderun Körfezi'ndeki Gr (-) Bakterilerin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri ve Plazmid Profillerinin Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 15s.
- Anonim, (1984), Difco Manuel, Dehydrate Culture Media and Reagents for Microbiology, Detroit, Michigan, USA, pp, 1155.
- Arda, M., (2000), Temel mikrobiyoloji, Medisan Yayınları, Ankara, s:548.
- Aslım B., Sağlam N., Beyatlı Y., (2002), Determination of some properties of Bacillus isolated from soil. Turk J Biol 2002; 26: 41-48.
- Ayhan, K., (2000), Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar ve Bulaşma Kaynakları, Gıdalarda Bulunan Mikroorganizmalar Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölüm Yayını, Sim Matbaacılık Ltd, Ankara, 43- 44.
- Banerjee, U. C., Sani, R. K., Azmi, W., Soni, R., (1999), 'Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its Characterization as a Laundry Detergent Additive' Process Biochemistry, sayı 35, pp. 213-219.
- Bano, S., Qader, S. A. U., Aman, A., Syed, M. N., Azhar, A., (2011), Purification and characterization of novel α -amylase from *Bacillus subtilis* KIBGE HAS, AAPS PhamSci Thec, 12:255-261.
- Barredo, J. L., (2005), Microbial Enzymes and Biotransformations, Humana Pres, Totowa, New Jersey, 306.
- Başbülbul, G., (2009), Çeşitli Doğal Kaynaklardan İzole Edilen Termofilik Bakterilerin Ürettikleri Bakteriyosinlerin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması, Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 12-13s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Başkaya, Y., Kocabaş, A., (2016), Toprakta İzole Edilen Mikroorganizmaların Antimikrobiyal Madde Üretim Potansiyellerinin Belirlenmesi, Araştırma Makalesi, KSÜ Doğa Bil. Derg., 19(4), 393-398.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., Turck, M., (1966), Antibiotic Susceptibility Testing By a Standardized Single Disk Method, Am J Clin Path 45: 493–496.
- Biler, B., (2009), *Pediococcus acidilactici* PBF Suşu Tarafından Üretilen Bakteriyosinin Karakterizasyonu ve Saflaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 27-32s.
- Bilgin, E., (2007), Toprak Bakterilerinden İzole Edilen Fitazların Özellikleri, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 11-13s.
- Bizani, D., Brandelli, A., (2002), Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. Strain 8 A, Journal of Applied Microbiology 2002, 93, 512–519.
- Buchholz, K., Seibel, J., (2008), Industrial carbohydrate biotransformations, Carbohydrate Research, 343:1966-1979.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G., (2003), Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated ANT-6, Process Biochemistry, 38:1397-1403.
- Carrington, G. O., (1979), Legionnaire's disease *Bacillus*: inhibition by normal flora, Clin. Microbiol. Newslet., 1, 7-8.
- Cladera-Olivera, F., Caron, G. R., Brandelli A., (2004), Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40, Letters in Applied Microbiology, 38, 251–256.
- Çelik Sevim, E., Alpay Karaoğlu, Ş., Sevim, A., Özgümüş, O. B., (2006), İçme sularından izole edilen *Bacillus* suşlarının identifikasyonu ve antibiyotiklere direnç profilleri, Türk Mikrobiyol Cem Derg. 36 (4) : 219-223.
- Çolak, C., (2008), Elektromanyetik Dalgaların *Bacillus cereus* İzolatları Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 41-66s.
- Çon, A. H., Gökalp, H. Y., (1997), Gıda Mikrobiyolojisi, Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Ders Notları Yayın No: 007, Mühendislik Fakültesi Basım Ünitesi, Denizli, 23.
- Çotuk, A., (2003), Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Nobel Tıp Kitabevleri, s.81:85.
- Çökmüş, C., (1989), *Bacillus sphaericus*'un Sivrisineklere Etkisi Üzerinde Bir Araştırma, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 30s.
- Darkot, B., Tuncel, M., (1995), Ege Bölgesi Coğrafyası, İstanbul, s. 85.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

De Martinis, E. C. P., Alves, V. F., Franco, B. D. G. M., (2002), Fundamentals and perspectives for the use of bacteriocins produced by lactic acid bacteria in meat products. *Food Reviews International*, 18(2-3): 191-208.

Demeli, M., (2012), Fındık ve Tahıl Ambarlarından *Bacillus* İzolasyonu, Karakterizasyonu ve İzolatların İnsektisidal Özelliklerinin Araştırılması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 10s.

Demir, B., (2007), Kahramanmaraş İlinden Toplanan Toprak Örneklerinden Organik Solvent Tolere Edebilen Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanması, Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş, 37-42s.

Demirbağ, Z., Demir, İ., (2000), Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Trabzon Birinci Baskı s.46:48, 54:56, 114;116.

Demiroğlu, A., (2010), Basil Türü Bazı Mikroorganizmalar Üzerine Ağır Metallerin Biyosorpsiyonu, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 22s.

Di Giorgio, C., Krempff, A., Guiraud, H., Binder, P., Tiret, C., Dumenil, G., (1995), Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles, *Atmos, Environ*, 30:155-160.

Doddapaneni, K. K., Tatineni, R., Vellanki, R. N., Rachcha, S., Anabrolu, N., Narakuti V., Mangamoori L. N., (2009), Purification and Characterization of A Solvent And Detergent-Stable Novel Protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*, 164: 383-390.

Earl, A. M., Losick, R., Kolter, R., (2008), Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*, *Trends Microbiol*, 16:269-275.

Eckner, K. F., (1992), Bacteriosins and Food Applications, *Dairy, Food Environ, Sanit.*, 12: 204-209.

Ediz, N., Beyatlı, Y., (2005), *Bacillus* Cinsi Bakteriler Tarafından Biyoplastik Üretimi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi Cilt: 03 Sayı: 05: 1-22s.*

Emmerling, P., Sticht-Groh, V., (1983), In vitro growth inhibition of *Legionella pneumophila* by different gram positive and gram negative organisms, Abstracts of the 39th meeting of the Section Medical Microbiology and Immunology, *Zbl. Bact. Hyg. A.*, 256, 413.

Ercan Akkaya, S., Kıvanç, M., (2008), Termofil Bakteriler; Sıcak Su Kaynaklarında Yaşayan Gr (+) Basillerin İzolasyon ve İdentifikasyon Yöntemleri, *AKÜ Fen Bilimleri Dergisi 02: 61-70.*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Erem, F., Küçükçetin, A., Certel, M., (2013), *Bacillus* Türlerinin Probiyotik Olarak Değerlendirilmesi, Derleme, Gıda, Akdeniz Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Antalya, 38 (4): 247-254.

Erkan, K., (2014), Mikrobiyal Fitaz Üretimine ve Aktivitesine Etkili Parametrelerin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1s.

Feldgarden, M., Riley, M. A., (1999), The phenotypic and fitness effects of colicin resistance in *Escherichia coli* K-12, *Evolution*, 53(4), 1019-27.

Gerze, A., (2003), Proteaz Enziminin *Bacillus subtilis magatherium* ve *Bacillus polymxa* Bakteri Türlerinden Kısmı Saflaştırılması ve Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstannul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 66-69s.

Ghorbel, B., Sellami-Kamoun, A., Nasri, M., (2003), Stability Studies of Protease From *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 513–518.

Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P., (2002), Bacterial Alkaline Proteases: Molecular Approaches and Industrial Applications, *Appl Microbiol Biotechnol*, 59: 15–32.

Gücin, F., Dülger, B., (1995), Genel Mikrobiyoloji Laboratuar Kılavuzu, Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Ders Notları, Yayın No: 3, Bursa, 155s.

Haktanır, K., Arcak, S., (1998), Çevre Kirliliği. Ankara Üni. Ziraat Fak. Toprak Bölümü, Ankara Üni. Yayın No: 1503, Ankara, Ders Kitabı: 457.

Hanoğlu, Ş., (2013), Farklı Kaynaklardan *Bacillus* sp. İzolasyonu ve Biyokimyasal Karakterlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 1s.

Harwood, C. R., Rosemary, D. C., Ian, C. H., (1990), The *Bacillus* Cell Envelope and Secretion, In: *Molecular Biology Methods for Bacillus*, Harwood, C. R. and Cutting, S. M. (Editors), John Wiley & Sons Ltd, New York, 581.

Hasan, F., Khan, S., Shah, A. A., Hameed, A., (2009), Production of Antibacterial Compounds by Free and Immobilized *Bacillus pumilus* SAF1. Department of Microbiology, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1499-1510.

Hasenekoğlu, İ., Yeşilyurt, S., (2001), Mikrobiyoloji, Erzurum, s. 43-44: 84-85.

Hosoya Y., Okamoto S., Muramatsu H ve Ochik., (1998), Acquisition of certain streptomycin resistance (Str.). *Antimicro. Agents and Chemother.* 42(8): 2041-2047.

<http://www.kutahya.gov.tr/cografi-yapi>

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

http://mebk12.meb.gov.tr/meb_iys_dosyalar/43/01/244336/dosyalar/2012_12/06075207_konum_u.pdf)

https://www.turkcebilgi.com/seyitomer._kütahya

Hyronimus, B., Le Marrec, C., Urdaci, M. C., (1998), Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* L4, Journal of Applied Microbiology, 85, 42–50.

İmamoğlu, Ö., (2008), Çeşitli Kaynaklardan İzole Edilen *Bacillus* sp, İzolatlarının Kitosanaz Aktivitesinin ve Antifungal Etkisinin Belirlenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 67s.

İşleroğlu, H., Yıldırım, Z., Yıldırım, M., (2008), Yöresel Peynirden Antimikrobiyal Aktiviteye Sahip Laktik Asit Bakterisinin İzolasyonu ve Tanısı, G.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1), 1-6s.

Jenssen, H., Hamil, P., Hancock, R. E. W., (2006), Peptide antimicrobial agents, Clinical Microbiology Reviews, 19 (3): 491-511.

John, E. S., (2009), Biotechnology 5th, ed, University of Strathclyde, 14-16.

Jin, F., Cheng, X., Shi, Y., Zhang, C., (1990), Isolation of New Thermophilic Aerobic Bacteria Which Produce Thermostable α -Amylase, J. Gen. Appl. Microbiol, 36:415-424.

Kahvecioğlu, Ö., Kartal, G., Güven, A., Timur, S., (2003), Metallerin Çevresel Etkileri-I, Metalurji Dergisi, 136, 47-53.

Kalkan, S., (2006), Çiğ Sütte *Bacillus cereus* Sayılması İçin Yöntem Modifikasyonları Üzerine Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 17s.

Kalpna, S., Bagudo, A. I., Aliero, A. A., (2010), Effect of Inhibitory Spectrum and Physical Conditions on the Production of Antibiotic Substance from *Bacillus laterosporus* ST-1. Nigerian Journal of Microbiology, vol. 24(1): 2134 – 2139.

Karabıyık, H., (2002), Edirne İlindeki Beş Farklı İlköğretim Okulunun İç Havaındaki Bakterial ve Fungal Flora, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 2-73s.

Katı, H., Karaca, B., Gülşen, Ş. H., (2016), Toprakta İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Biyolojik Özelliklerinin Araştırılması, SAÜ Fen Bil, Der, 20, Cilt, 2, Sayı, s: 281-290.

Kaya, S., (2011), Katı Faz Fermantasyon Yöntemi İle *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'den Proteaz Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 16-56s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kaynar, P., Beyatlı, Y., (2006), Balıklardan İzole Edilen *Bacillus* Cinsi Bakterilerin Bazı Metabolik Özelliklerinin Belirlenmesi, Plazmid DNA ve Protein Profillerinin İncelenmesi, Ortaokul On Line Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt: 04 Sayı: 03 Sayfa: 1-30.

Kırbağ, S., Cengiz, F., (2010), Elazığ'ın Ev Dışı Havaasının Fungal Florası, e-Journal of New World Sciences Academy Ecological Life Sciences, 5A0049, 5, (4), 297-306.

Klaenhammer, T. R., (1993), Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Reviews, 12, 39–86.

Koneman, E. W., Allen, S.D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C., (1997), Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th edition, Lippincott-Raven Publisher, New York, 1296-1395.

Köksal, S., (2008), Çevre Sağlığı, Halk Sağlığı Ders Kitabı Altıncı Bölüm İstanbul Üniversitesi Yayınları: 4747, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları: 261. s:605-650.

Köseoğlu, V. K., (2007), Model Sistemlerde Laktik Asit Bakterilerinin Bazı Patojenler Üzerine Antibakteriyel Etkilerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 15s.

Kurt, Ş., Zorba, Ö., (2005), Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanım Olanakları, YYÜ Veterinerlik Fakültesi Dergisi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, 65080-Van 16 (1):77-83.

Lenette, E. H., Balows, A., Hausler, J., Shadomy, J. H., (1985), Manual of Clinical Microbiology, Vol, 4, Amerika s:1149.

Lisboa, M. P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J. A. P., Brandelli, A., (2006), Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest, International Microbiology 9:111-118.

Logan, N. A., Vos, P. D., (2015), Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria s:1-163.

Luna V. A., King D. S., Gullede J., Cannons A. C., Amuso P. T., Cattani J., (2007), Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycolides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etest agar gradient diffusion methods, J Antimicrob Chemother 2007; 60(3):555-67.

Mahdy, H. M., El Sehravi, M. H., (1997), Airborne bacteria in the atmosphere of El-Taif region, Saudi Arabia, Water Air Soil Pollut, 98:317-324.

Menteşe, S., Rad, A.Y, Arısoy, M., Güllü, G., (2009), Ankara Şehir Atmosferinde Biyoaerosol Seviyelerinin Mekansal Değişimi. Ekoloji 19 (73): 21-28.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Milli Eğitim Bakanlığı, (2015), T. C. Milli Eğitim Bakanlığı Gıda Teknolojisi Temel Mikrobiyoloji, Ankara, s. 39-40.

MTA, (1986), Türkiye Linyit Envanteri, Maden Tetkik Ve Arama Genel Müdürlüğü, No 196, Ankara, 81.

Muaaz, M. A., Sheikh, M. A., Ahmad, Z., Hasnain, S., (2007), Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium. *Microbial Cell Fact.*, 10: 6-17.

Muhammad, S. A., Ahmad, S., Hameed, A., (2009), Antibiotic Production by Thermophilic *Bacillus* Specie SAT-4. *Microbiology Research Laboratory, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan, Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(3):339-345.

NCCLS, (1990), National Committee for Clinical Laboratory Standards, performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, Approved Standard 4th ed, Document, 1990.

NCCLS, (2003), National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Eighth Edition, NCCLS, Wayne, PA USA: NCCLS document M100-S13 (M2), 2003.

Nithya, C., Gnanalakshmi, B., Karutha Pandian, S. K., (2011), Assessment and charecterization of heavy metal resistance in palk bay sediment bacteria, *Marine environmental research* 71, 283-294.

Oruç, N., Tatlı, A., Ölçer H., Bingöl N., Akan, A., (1999), Seyitömer Termik Santralının Çevreye Etkisi, 1st International Symposium on Protection of Natural Environment & Ehrami Karaçam, 23 – 25 Eylül, Bildiriler Kitabı, Kütahya, s:604 – 610.

Osmanağaoğlu, Ö., (2003), Behaviour and biological control of bacteriocin-producing *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum-packaged sucuk, *Tr, J, Vet, Anim, Sci.*, 27; 471-480.

Öner, M., (1987), Mikrobial Ekoloji, Ege Üniveristesi Basımevi, Bornova-İzmir, 127s.

Öner, M., (1992), Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova-İzmir, 26-45s.

Örgev, C., (2000), Çevre Mikrobiyolojisi, Değişim yayınları, 79-80s.

Özçelik, S., (1995), Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuzu, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No:2, Ders kitapları, Isparta, 1-35s.

Özçelik, S., (1998), Genel Mikrobiyoloji, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No: 1, İkinci Basım, Isparta, 1-91s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Paik, H. D., Bae, S. S., Park, S. H., Pan, J. G., (1997), Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp, tochigiensis, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 19, 294–298.

Perçin, D., (2011), Şarbon Basillerinde Antibiyotik Direnci, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, ANKEM Dergi; 25 (Ek 2):97-99.

Perumal, V., Venkatesan, A., (2017), Antimicrobial, cytotoxic effect and purification of bacteriocin from vancomycin susceptible *Enterococcus faecalis* and its safety evaluation for probiotization, LWT - Food Science and Technology 78: 303-310.

Priest, F. G., (2002), *Bacillus sphaericus* and its insecticidal toxins, In Berkeley, Heyndrickx, Logan and De Vos (Editors), Applications and Systematics of *Bacillus* and its Relatives, Blackwell Science, Oxford, pp. 190–205.

Rodriguez, E., Mullaney, E., Lei, X. G., (2000a), Expression of the *Aspergillus fumigatus* gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme, Biochemical and Biophysics, 268,373–378.

Rodriguez, E., Wood, Z. A., Karplus, P. A., Lei, X. G., (2000b), Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2,5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*, Biochemical and Biophysics, 382,105–112.

Rosas, I., Calderon, C., Ulloa, M., Lacey, J., (1993), Abundance of airborne *Penicillium* CFU in relation to urbanisation in Mexico City, Appl Environ, Microbiol, 59: 2648-2652.

Rowbotham, T. J., (1980), Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and solid amoeba, J. Clin. Pathol., 33, 1179-1183.

Ryguş, T., Hillen, W., (1991), Inducible High-Level Expression Of Heterologous Genes In *Bacillus Megaterium* Using The Regulatory Elements Of The Xylose-Utilization Operon, Appl, Microbiol, Biotechnol, 35, 594-599.

Salleh, A. B., Rahman, R. N. Z. R. A., Basrı, M., (2006), Protease:Introduction, New Lipases and Proteases, Nova Bimedical, New York, 23-39.

Sarıca S., Asan A., Tatman Otkun, M., Türe, M., (2002), Monitoring indoor airborne fungi and bacteria in the different parts of Trakya University Hospital (Edirne-Turkey). Indoor Built Environ. 11: 285-292.

Sevim, A., Sevim, E., (2015), Plasmid Mediated Antibiotic and Heavy Metal Resistance in *Bacillus* Strains Isolated from Soils in Rize, Turkey, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 19(2), 133-141.

Sertel, A., (2016), İzmit ve Çevresindeki Topraklardan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Moleküler Yöntemlerle Tanımlanması ve Biyokimyasal Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli, 1s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shimizu, M., (1992), Purification and characterization of a phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77, *Journal of Biosciences and Biotechnology*, 56,1266-1269.
- Silver, S., (1998), Genes for all metals a bacterial view of the Periodic Table, *J Indust Microbiol Biotechnol.*, 20,1-12s.
- Sipahi, N., (2012), Giresun İlinde Tüketime Sunulan Balıklardan İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri, Yüksek Lisans Tezi, Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Giresun, 34s.
- Sneath, P. H. A., (1986), Endospore-forming gram positive rods, and cocci, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2: 1104-1139.
- Şenkaya, F., (2014), Borlu Topraklardan Elde Edilen Endospor Oluşturan Basillerin İdentifikasyonu ve Bazı Yeteneklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 17-67s.
- Şensoy Karaoğlu, Ş., (2013), Rize İli Topraklarından İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Bakteriyosin İçeriklerinin, Aktarılabılır Antibiyotik ve Ağır Metal Dirençlerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Rize, 19-75s.
- Tagg, J. R., Dajani, A. S., Wannamaker, W. L., (1976), Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria, *Bacteriological Reviews*, 40 (3): 722-756.
- Tamer, A. U., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, İ., Bursalıoğlu, M., Oğultekin, R., (1989), Mikrobiyoloji Laboratuvar klavuzu, 3. Baskı Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Tekn. Ser. No: 55, İzmir, s:260.
- Tanaka A., Hoshino E., (1999), Study on the Substrate Specificity of α -Amylases That Contribute to Soil Removal in Detergents. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2:193-199.
- Tekin, N., (2008), Türkiye Kaynaklı *Bacillus* spp.'lerin Alkalen Proteaz Üretim Kapasiteleri ve Enzimlerin Kısmen Karakterizasyonu Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 3-5s.
- Telefoncu A., (1997), Enzimlerin Endüstriyel Uygulamaları, Marmara Araştırma Merkezi, Lisans Üstü Yaz Okulu (E,M,T,U) Kuşadası, Aydın, 1: 5-8.
- Tikveşli, M., (2013) Edirne'de Üç Ayrı Camideki Halı ve Havadaki Mikrobiota, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne, 1-11s.
- Topçal, F., Dığrak, M., Gündoğan, R., (2014), Toprakdan İzole Edilen *Bacillus* Türlerinin Tanımlanması ve Bakteriosin Üretimlerinin Belirlenmesi, *Adıyaman Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 4 (2) (2014) 57-67.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Toru Altın, E., (2017), Havasal Aerob Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu ve Bazı Özelliklerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 66s.

Trevors, J. T., (1987), Copper resistance in bacteria, *Microbiology Science*, 4:29-31.

Türker, C., (2014), α -amilaz Enzimlerini Üreten Termofilik *Bacillus* Suşlarının İzolasyonu ve Enzimlerin Kısmi Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Osmaniye, 16-42s.

Unat E. K., (1993) Temel Mikrobiyoloji, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, İstanbul, s, 534-535.

Usta, A., (2012), Toprakta Antibiyotik Üreten *Bacillus* sp.'lerin Taranması, Antibiyotik Üretimi Üzerine Bazı Parametrelerin Etkisi ve Sporulasyonla İlişkinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, 10-75.

Ustaçelebi, Ş., (1999), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitapevi, Ankara, s:411-418.

Ünver, B., Baykan, S., (1981), Besin Mikrobiyolojisi (Temel ders kitabı) Milli Eğitim Basımevi, İstanbul, s:40.

Yassin, M. F., Almouqateas, S., (2010), Assessment of Airborne Bacteria and Fungi in an Indoor and Outdoor Environ. *Inter J Environ Sci Tech.* 7 (3): 535-544.

Yavuz, O., Sarıgül, N., (2016), Toprak ve Sucul Ortamlardaki Ağır Metal Kirliliği ve Ağır Metal Dirençli Mikroorganizmalar, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Burdur, Derleme Makale 7(1): 44-51.

Yazıcı, A., (2006), *Legionella pneumophila* serogrup 2-14 Suşları İle Aynı Ortamı Paylaşan Bakterilerin Birbirleriyle Etkileşimi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 5-51s.

Yazıcıoğlu, D., (2010), Toprak Örneklerinden İzole Edilen Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal ve Antibiyotik Direnç Düzeylerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 5-66s.

Yeşiltaş Y., (2014), Arkeolojik Kazı Toprağından İzole Edilen, Endospor Oluşturan Basillerin Bazı Özelliklerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 33-69s.

Yılmaz, M., Beyatlı, Y., (2003), *Bacillus* Cinsi Bakterilerde Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyotik Üretimi, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, Cilt:01 Sayı:07 s:35-49.

Yılmaz, Ö. D., (2008), Metabolik Mühendislik ve Reaksiyon Mühendisliği Prensipleriyle Hücre-Dışı Rekombinant İnsan Büyüme Hormonu Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 39-41s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., Higton, G., (2001), Industrial Microbiology: an introduction, Blackwell Science Ltd, 133-135.

Wistreich, G. A., Lechtman, M. D., (1980), Laboratory Exercises in Microbiology, 4th, Edition, Mc Milan Publishing Co, Inc, New York, 7-234.

