



**BACILLUS SP. SUŞLARININ PATOJEN BAKTERİLERE
KARŞI ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ,
ANTİMİKROBİYAL MADDE ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI
BESİNSEL VE FİZİKSEL FAKTÖRLERİN ETKİSİ,
KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU**

Alev USTA AK



T.C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***BACILLUS* SP. SUŞLARININ PATOJEN BAKTERİLERE KARŞI
ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ, ANTİMİKROBİYAL MADDE ÜRETİMİ
ÜZERİNE BAZI BESİNSEL VE FİZİKSEL FAKTÖRLERİN ETKİSİ, KİSMİ
SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU**

Alev USTA AK

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

BURSA-2017

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Alev USTA AK tarafından hazırlanan “*Bacillus* sp. Suşlarının Patojen Bakterilere Karşı Antimikrobiyal Aktivitesi, Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Bazı Besinsel ve Fiziksel Faktörlerin Etkisi, Kısmi Saflaştırılması ve Karakterizasyonu” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN



İmza

Başkan: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye: Doç. Dr. Ferda ARI
Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Biyoloji Anabilim Dalı



İmza

Üye: Doç. Dr. Murat CENGİZ
Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı



İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Gökçe TANER
Bursa Teknik Üniversitesi, Doğa Bilimleri,
Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Anabilim Dalı



İmza

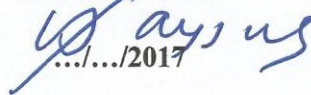
Üye: Yrd. Doç. Dr. Münevver Müge ÇAĞAL
Bursa Teknik Üniversitesi, Doğa Bilimleri,
Mimarlık ve Mühendislik Fakültesi,
Biyomühendislik Anabilim Dalı



İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali BAYRAM
Enstitü Müdürü



.../.../2017

tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.../... /2017

imza

Alev USTA AK

ÖZET

Doktora Tezi

BACILLUS SP. SUŞLARININ PATOJEN BAKTERİLERE KARŞI ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTESİ, ANTİMİKROBİYAL MADDE ÜRETİMİ ÜZERİNE BAZI BESİNSEL VE FİZİKSEL FAKTÖRLERİN ETKİSİ, KİSMİ SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Alev USTA AK

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

Bu çalışmada, yüksek lisans tez çalışmamızdan elde edilen 5 adet antibiyotik potent *Bacillus* sp. suşları 16S rRNA analizi ile adlandırılmıştır. Bu suşlardan 4 tanesi *Bacillus thuringiensis* ile ve 1 tanesi *Brevibacillus laterosporus* ile %100 sekans benzerliği göstermiştir. Bu türlerin antimikrobiyal madde üretme kapasiteleri agar kuyu difüzyon yöntemi ile saptanmıştır. *Brevibacillus laterosporus* EA62 olarak adlandırılan bakteri en büyük inhibisyon zonunu (19 mm) göstermiş ve çalışmalara bu bakteri ile devam edilmiştir.

B. laterosporus EA62' den antimikrobiyal madde üretimi için besinsel (aminoasit, karbon, azot, metal kaynakları) ve bazı fiziksel faktörlerin (pH ve sıcaklık) etkileri araştırılmış ve besi ortamının optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu yeni izolat antimikrobiyal madde üretiminde glutamik asit varlığında 19 mm, glukoz varlığında 19 mm, tripton varlığında 20 mm, MgSO₄+CaCO₃ varlığında 19 mm ile en geniş inhibisyon zonları göstermiştir. En geniş inhibisyon zonları pH 7.0'de 19 mm ve 37 °C'da sıcaklık 19 mm olarak bulunmuştur. Modifiye ortamda antimikrobiyal madde üretimi ise kontrol ortamına göre artış göstermiştir.

Kısmi olarak saflaştırılan antimikrobiyal maddenin SDS-PAGE ile moleküler ağırlığı 6,3 kDa olarak belirlenmiştir. *B. laterosporus* EA62'den elde edilen yeni bileşenin MİK değeri >256 µg/mL olarak saptanmıştır. *B. laterosporus* EA62 tarafından üretilen antimikrobiyal maddenin Rf değerleri, standart antibiyotik (streptomisin ve basitrasin) Rf değerleri ile karşılaştırılmıştır.

B. laterosporus EA62 endüstriyel ölçekte antimikrobiyal ajan üretmek için büyük bir potansiyele sahip olabilir.

Anahtar Kelimeler: *Bacillus*, *Brevibacillus*, Antimikrobiyal madde, Optimizasyon, Kısmi saflaştırma.

2017, xiii + 116 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

ANTIMICROBIAL ACTIVITIES AGAINST SOME PATHOGEN BACTERIA OF *BACILLUS* SPECIES STRAINS, EFFECT OF THE CERTAIN NUTRITIONAL AND PHYSICAL PARAMETERS ON THE PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL SUBSTANCES, PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION

Alev USTA AK

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

In this study, 5 antibiotic potent *Bacillus* sp. strains were identified based on 16S rRNA analysis. Four of these strains showed 100% sequence similarity with *Bacillus thuringiensis* and 1 of them with *Brevibacillus laterosporus*. The antimicrobial substance production capacities of these species were determined by agar well diffusion method. The bacteria as named *Brevibacillus laterosporus* EA62 showed the greatest inhibition zone (19 mm) and studies have been continued with this bacterium.

The effects of nutritional (amino acid, carbon, nitrogen, metal sources) and some physical factors (pH and temperature) on the production of antimicrobial agent of *B. laterosporus* EA62 were investigated, and optimization of the medium was performed. This new isolate were showed the widest inhibition zone with 19 mm in the presence of glutamic acid, with 19 mm in the presence of glucose, with 20 mm in the presence of tripton, with 19 mm in the presence of MgSO₄+CaCO₃ in antimicrobial agent production. The largest inhibition zones were found to be 19 mm at pH 7.0 and 19 mm at 37 °C. The production of antimicrobial substance in modified media were showed increase compared to the control medium.

The molecular weight of the partially purified antimicrobial substance was determined to be 6,3 kDa by SDS-PAGE. The new component from *B. laterosporus* EA62 the MIC value was determined as >256 µg/mL. The Rf values of the antibiotic produced by *B. laterosporus* EA62 was compared with standard antibiotic (streptomycin and bacitracin) Rf values.

B. laterosporus EA62 may have a great potential for producing antimicrobial agents on the industrial scale.

Key Words: *Bacillus*, *Brevibacillus*, Antimicrobial substances, Optimization, Partial purification.

2017, xiii + 116 page.

TEŞEKKÜR

Engin tecrübe ve bilgi birikimiyle beni yönlendiren, çalışmalarımın her aşamasında deneyimlerimden faydalanmam için imkan sunan, sadece tez çalışmamda değil her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen, her zaman örnek aldığım sabırlı ve anlayışlı danışman hocam Sayın Prof. Dr. Elif DEMİRKAN' a,

Çalışmalarında kullandığım test mikroorganizmalarını temin etmemde yardımcı olan ve çalışmamda yaptığım bir deney için laboratuvarını kullanmama imkan sağlayan Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Murat CENGİZ'e, yine çalışmamda kullandığım test mikroorganizmalarının bir kısmını temin etmemde yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Cüneyt Özakın' a,

Çalışkanlığı, güler yüzü, iyi niyeti ve güzel kalbiyle her ihtiyacımdayan yanımda olduğunu hissettiren, desteğini hiç esirgemeyen sevgili arkadaşım Araş. Gr. Tuba SEVGİ' ye,

Tez çalışmam boyunca yardım eden, disiplinli davranışları ve çalışkanlıklarıyla bilime katkı sağlayacaklarına inandığım genç arkadaşlarım Baran Enes GÜLER, Büşra ÖZALPAR ve Behice ZEREN' e,

AYP(F)-2015/20 no'lu proje olarak bu çalışmayı destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi'ne,

Sonsuz sevgisiyle ve hoşgörüsüyle hayallerimi gerçekleştirmem için beni hayatımın her anında destekleyen canım eşim Salih AK'a,

Her zaman yanımda olduklarını hissettirerek bana güven veren canım ailem annem, babam ve kardeşime en içten dileklerle teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Alev USTA AK

.../.../.....

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	5
2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi.....	5
2.2. Mikrobiyal Metabolitler.....	9
2.2.1. Primer Metabolitler.....	9
2.2.2. Sekonder Metabolitler.....	9
2.3. Antibiyotik Üretim Mekanizmaları.....	11
2.3.1. Ribozomal Sentez Mekanizması.....	11
2.3.2. Nonribozomal Sentez Mekanizması.....	14
2.4. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması.....	19
2.4.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılması.....	19
2.4.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması.....	19
2.5. Antibiyotik Üreten Mikroorganizmalar.....	20
2.5.1. <i>Bacillus</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	21
2.5.2. <i>Brevibacillus</i> Hakkında Genel Bilgiler.....	22
2.6. <i>Bacillus</i> ve <i>Brevibacillus</i> ' lar Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler.....	25
2.6.1. Basitrasin.....	25
2.6.2. Gramisidin.....	26
2.6.3. Mikobasilin.....	27
2.6.4. Tirosidin.....	28
2.6.5. Sürfaktin.....	28
2.6.6. Basilisin.....	29
2.6.7. Subtilin.....	30
2.6.8. İturin.....	30
2.6.9. Zwittermisin.....	31
2.6.10. Cerein.....	32
2.6.11. Polimiksinler.....	32
2.6.12. Laterosporamin, Laterosporin, Loloatin A ve Tauramamid.....	32
2.7. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları.....	33
2.7.1. Enfeksiyon Hastalıklarının Tedavisinde Kullanımı.....	33
2.7.2. Hayvancılıkta Kullanımı.....	33
2.7.3. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı.....	34
2.7.4. Araştırma Materyali Olarak Kullanımı.....	34

2.8. Antimikrobiyal Madde Tarama Yöntemleri.....	35
2.8.1. Karşıt-Çizgi Yöntemi	35
2.8.2. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi	35
2.8.3. Agar Disk Difüzyon Yöntemi	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1. Materyal	38
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri	39
3.2.2. 16S rRNA Analizi	39
3.2.3. Karşıt-Çizgi Yöntemi ile Antimikrobiyal Madde Taranması	40
3.2.4. Antimikrobiyal Madde Üretimi İçin Kullanılan Besiyeri	40
3.2.5. Bakteri Üretim Koşulları.....	41
3.2.6. Bakteri Üremesinin Ölçülmesi	41
3.2.7. Antimikrobiyal Madde Üretiminin Tayini	41
3.2.8. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi	42
3.2.9. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi	42
3.2.10. Antimikrobiyal Maddenin Kısmi Saflaştırılması	42
3.2.11. Amonyum Sülfat Çöktürmesi	43
3.2.12. Diyaliz	43
3.2.13. Ultrafiltrasyon ile Diyalizatın Konsantr Edilmesi.....	43
3.2.14. Antimikrobiyal Maddenin Moleküler Ağırlığının Tespiti	43
3.2.15. Çözeltilerin ve Jelin hazırlanması	43
3.2.16. Örneklerin Hazırlanması ve Elektroforez Koşulları	46
3.2.18. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi.....	46
3.2.19. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC-Biyootografi).....	47
4. BULGULAR	49
4.1. 16S rRNA Analizi	49
4.2. Karşıt-Çizgi Yöntemi ile Antimikrobiyal Madde Taraması	60
4.3. Agar Kuyu Difüzyon Metodu ile Antimikrobiyal Madde Taranması.....	62
4.4. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi	64
4.4.1. Aminoasit Kaynaklarının Etkisi.....	65
4.4.2. Karbon Kaynaklarının Etkisi.....	69
4.4.3. Azot Kaynaklarının Etkisi.....	73
4.4.4. Metal Kaynaklarının Etkisi	75
4.5. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi	80
4.5.1. pH' nın Etkisi	80
4.5.2. Sıcaklığın Etkisi	83
4.6. Maksimum Antimikrobiyal Madde Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması.....	86

4.7. Antimikrobiyal Maddenin Moleküler Ağırlığının Tespiti	87
4.8. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	88
4.9. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC-Biyootografi).....	89
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	91
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	116



SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklamalar
%	Yüzde Orantı
°C	Santigrat Derece
α	Alfa
BaCl ₂	Baryum Klorür
C	Sitozin
cm	Santimetre
CaCl ₂	Kalsiyum klorür
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
dk	Dakika
FeSO ₄	Demir sülfat
g	Gram
G	Guanin
HCl	Hidroklorik asit
H ₂ O	Su
KCl	Potasyum Klorür
L	litre
LiSO ₄	Lityum sülfat
mL	Mililitre
mN/m	Milnewton/metre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
mg/mL	Miligram/mililitre
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
MnSO ₄	Manganaz sülfat
NaCl	Sodyum klorür
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Diamonyum hidrojen fosfat
(NH ₄) ₂ NO ₃	Amonyum nitrat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
OD	Optik Dansite
rpm	Revolutions Per Minute
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
TEMED	Tetramethylethylenediamine
MgSO ₄ .7H ₂ O	Magnezyum sülfat heptahidrat
V	Volt
μ l	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
μ g/mL	Mikrogram/mililitre

Kısaltmalar

Açıklamalar

AMP

Adenozinmonofosfat

ATP

Adenozintirifosfat

DNA

Deoksiribonükleik Asit

kb

Kilo Baz

kDa

Kilo Dalton

mRNA

Mesajcı Ribonükleik Asit

MİK

Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

NRPS

Nonribozomal Peptid Sentetaz

PPİ

Prifosfat

RNA

Ribonükleik Asit

tRNA

Transfer Ribonükleik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. 1930 ve 2010 yılları arasında kullanılan antibiyotik sınıfları	8
Şekil 2.2. Mikroorganizmalardaki üreme eğrisi.....	10
Şekil 2.3. Ribozomal sentez mekanizması.....	11
Şekil 2.4. Ribozomal sentezde aminoasitin aktivasyon aşaması	12
Şekil 2.5. Ribozomal sentezde başlama aşaması	12
Şekil 2.6. Ribozomal sentezde uzama aşaması	13
Şekil 2.7. Ribozomal sentez sonlanma ve ribozomlardan bırakılma aşaması	13
Şekil 2.8. Nonribozomal peptid sentetazlardaki modüller	15
Şekil 2.9. Aminoasitin aktivasyon aşaması.....	16
Şekil 2.10. Başlama ve uzama aşaması.....	17
Şekil 2.11. Sonlanma aşaması.....	17
Şekil 2.12. Nonribozomal sentez mekanizması	18
Şekil 2.13. Paenibacillaceae familyasını oluşturan sekiz cinse ait 195 türün tip soylarından 16S rRNA gen dizilerinin filogramı	23
Şekil 2.14. Basitrasin	26
Şekil 2.15. Gramisidin	27
Şekil 2.16. Mikobasilin	27
Şekil 2.17. Tirosidin.....	28
Şekil 2.18. Sürfaktin.....	29
Şekil 2.19. Basilisin	29
Şekil 2.20. Subtilin.....	30
Şekil 2.21. İturin.....	31
Şekil 2.22. Zwittermisin.....	31
Şekil 2.23. Polimiksin	32
Şekil 2.24. Tauramamid	33
Şekil 2.25. Karşıt-çizgi yöntemi	35
Şekil 2.26. Agar kuyu difüzyon yöntemi	36
Şekil 2.27. Agar disk difüzyon yöntemi.....	37

Şekil 3.1. Toprak örneklerinin alındığı iller.....	38
Şekil 4.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> A14, A1, A15, A17 ve <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı.....	49
Şekil 4.2. Karşıt-çizgi yöntemiyle antimikrobiyal madde taraması.....	61
Şekil 4.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> A1, A14, A15, A17 ve <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin besi ortamlarında zamana bağlı üreme değerleri.....	63
Şekil 4.4. Agar kuyu difüzyon metodu ile 5 test bakterisine karşı bakterilerin inhibisyon zonları.....	64
Şekil 4.5. <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin antimikrobiyal madde üretimi üzerine inkübasyon zamanının etkisi.....	65
Şekil 4.6. 72. saatte farklı aminoasit kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları.....	67
Şekil 4.7. 72. saatte farklı aminoasit kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları.....	68
Şekil 4.8. 72. saatte farklı karbon kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları.....	71
Şekil 4.9. 72. saatte farklı karbon kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması.....	72
Şekil 4.10. 72. saatte farklı azot kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları.....	75
Şekil 4.11. 72. saatte farklı azot kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması.....	76
Şekil 4.12. 72. saatte farklı metal kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları.....	79
Şekil 4.13. 72. saatte farklı metal kaynakları varlığında <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması.....	79

- Şekil 4.14. 72. saatte farklı pH değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları..... 82
- Şekil 4.15. 72. saatte farklı pH değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması 82
- Şekil 4.16. 72. saatte farklı sıcaklık değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları..... 85
- Şekil 4.17. 72. saatte farklı sıcaklık değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması 85
- Şekil 4.18. 72. saatte modifiye oramda üretilen *Brevibacillus laterosporus* EA62'den elde edilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları 87
- Şekil 4.19. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bantlarının görünümü..... 88
- Şekil 4.20. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan biyootografi yöntemi sonucu *S. aureus*' a karşı oluşan inhibisyon zonları 89
- Şekil 4.21. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan biyootografi yöntemi sonucu elde edilen inhibisyon zonlarının Rf değerleri..... 90

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Primer (Birincil) metabolitlere örnekler	9
Çizelge 2.2. Sekonder (İkincil) metabolitlere örnekler	10
Çizelge 2.3. Ribozomal yolla sentezlenen antibiyotiklerden bazıları	14
Çizelge 2.4. Nonribozomal yolla sentezlenen bazı antibiyotikler.....	18
Çizelge 2.5. <i>Bacillus ve Brevibacillus</i> ' lar tarafından üretilen bazı antibiyotikler ..	25
Çizelge 3.1. Test bakterileri ve katalog numaraları	38
Çizelge 3.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri.....	39
Çizelge 3.3. Antimikrobiyal madde üretiminde kullanılan besiyeri	40
Çizelge 4.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> A14' ün 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	50
Çizelge 4.2. <i>Bacillus thuringiensis</i> A14' ün 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi	51
Çizelge 4.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> A1' in 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	52
Çizelge 4.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> A1' in 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi	53
Çizelge 4.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> A15' in 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	54
Çizelge 4.6. <i>Bacillus thuringiensis</i> A15' in 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi	55
Çizelge 4.7. <i>Bacillus thuringiensis</i> A17' nin 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi.....	56
Çizelge 4.8. <i>Bacillus thuringiensis</i> A17' nin 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi	57
Çizelge 4.9. <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi	58

Çizelge 4.10. <i>Breviacillus laterosporus</i> EA62' nin 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi	59
Çizelge 4.11. <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62 ve <i>Bacillus thuringiensis</i> A14, A1, A15, A17' nin test bakterilerine karşı inhibisyon zon çapları	60
Çizelge 4.12. Besi ortamlarında üretilen <i>Bacillus thuringiensis</i> A1, A14, A15, A17 ve <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin üremelerinin karşılaştırılması	62
Çizelge 4.13. Besi ortamlarında üretilen <i>Bacillus thuringiensis</i> A1, A14, A15, A17 ve <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin inbisyon zonlarının karşılaştırılması	63
Çizelge 4.14. 72. saatte farklı aminoasit kaynaklarının, <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri .	66
Çizelge 4.15. 72. saatte farklı karbon kaynaklarının, <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri	70
Çizelge 4.16. 72. saatte farklı azot kaynaklarının, <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin antimikrobiyal madde ve üreme üzerine etkileri.....	74
Çizelge 4.17. 72. saatte farklı metal kaynaklarının, <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri	78
Çizelge 4.18. 72. saatte farklı pH değerlerinin, <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri	81
Çizelge 4.19. 72. saatte farklı sıcaklık değerlerinin, <i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62' nin antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkileri.....	84
Çizelge 4.20. Modifiye ortamdaki bakteri üremesi ve test bakterilerine karşı inhibisyon zon çapları	86
Çizelge 4.21. Standart antibiyotikler (Ampisilin ve Gentamisin) ve yeni bileşenin MİK değerleri.....	88

1.GİRİŞ

Antimikrobiyaller veya antibiyotikler, bazı mikroorganizmalar tarafından sentezlenen ve yine mikroorganizmalar üzerinde öldürücü veya gelişimini engelleyici faaliyet gösteren bileşiklerdir.

20. yüzyılın başlarında çağın en büyük keşiflerinden biri olan antibiyotiklerin bulunması ve üretimi, tıp tarihindeki en büyük başarılarından birini teşkil etmektedir (Van Hoek ve ark. 2011). Fakat antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımları, hatalı ve akılcı olmayan kullanımlarını da beraberinde getirmiştir. Gelişmiş ülkelerde en fazla satılan ilaçlar içinde antibiyotikler ikinci sırada iken, ülkemizde ve gelişmekte olan ülkelerde birinci sıradadır. Antibiyotiklerin yaygın kullanımları beraberinde direnç sorununu gündeme getirmiştir. Bu durum gözönüne alındığında bir enfeksiyon hastalığı karşısında akılcı antibiyotik seçimi kaçınılmaz olmaktadır (Tabak 1997).

Antibiyotik kullanımının sıklığı ve kullanımdaki artış ile direnç gelişiminin engellenmesi bir tarafa, mikroorganizmalar bu duruma direncin birçok çeşidini geliştirerek cevap vermişler ve antimikrobiyal ilaç kullanımı arttıkça, bakteriyel patojenlerin sahip oldukları direnç mekanizmalarının seviyesi ve karmaşıklığı da artmıştır (Tenover 2006).

Antibiyotiklere erişimin düzenlenmemiş olması, antibiyotiklere dirençli patojenlerin ve onların direnç genlerinin göç etmesinin ve yayılmasının temel nedenidir (Takeuchi 1984). Sadece Avrupa' da 25 bin hastanın yaygın kullanılan antibiyotiklerin tedavi etmediği bakteri enfeksiyonları sebebiyle öldüğü rapor edilmiştir (Simirnova ve ark. 1996). Bu nedenle, yeni antimikrobiyal ajanların keşfi ve geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Doğal kıtlıklarına rağmen, yeni antimikrobik ajanlar, potansiyel olarak bu tür ajanlar üreten mikroorganizmaların tarama ve izolasyon işlemlerine tabi tutulmasıyla keşfedilebilir (Barsby ve ark. 2002, Ren ve ark. 2007)

İlaç firmaları, geniş spekturumlu yaklaşım yerine, tek bir bakteri türü veya cinsi ile dar spekturumlu antimikrobiyallerin elde edilmesi için çalışmalar yürütmektedirler (Mincey 2001). Ancak yapılan çalışmalar sonucu mikroorganizmalardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin büyük bir kısmı klinik deneyleri geçememekte, sadece birkaç tanesi tıbbi olarak faydalı bulunarak ticari olarak üretilmektedir (Eltem ve Uçar 1998,

Muhammad ve ark. 2009). 1980 sonrası, antibiyotik madde arayan birçok kurum finansal zorluklar nedeni ile çalışmalarını sonlandırmışlardır ve bu konuda sadece önemli araştırmalar devam etmiştir (Varaldo 2002). Ancak yine de sürekli olarak yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi beklenmediğinden günümüzde halen *Streptomyces*, *Bacillus*, *Brevibacillus* ve *Penicillium* gibi birkaç cinse ait türlerden halen günümüzde antimikrobiyal madde aranmaktadır ve yeni antibiyotiklerin bulunuşu oldukça azalmıştır (Wise 1998). Bunlar arasında yer alan *Bacillus* ve *Brevibacillus* türleri, antimikrobiyal madde üretme kapasitesi yönünden en çok incelenen organizmalar arasına girmiştir (Perez ve ark. 1993, Eltem ve Uçar 1998).

Brevibacillus cinsi, daha önce *Bacillus brevis* olarak tanınan suşların genetik olarak 1996 yılında yeniden sınıflandırılması ile belirlenmiştir. O zamandan bu yana, *Brevibacillus*' tan antibakteriyel ve antifungal özellikle birçok biyoaktif bileşik izole edilmiştir (Favret ve Yousten 1985, Rivers ve ark. 1991, Orlova ve ark. 1998, Huang ve ark. 2005). *Brevibacillus laterosporus* suşunun, *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Alternaria* gibi farklı mantar türlerinin gelişimini inhibe ettiği (Zhang ve ark. 2013) ve bir *B. laterosporus* A60 suşunun, *Pseudomonas* cinsinin Gram negatif bakterilerine karşı aktif olduğu bulunmuştur (Dai ve ark. 2000). Ayrıca *B. laterosporus* suşunun bir kültüründe Tauramamid olarak belirtilen bir lipopeptit antibiyotiği keşfedilmiştir (Wu ve ark. 2013).

Bacillus cinsinin birkaç türü polipeptid sınıfından antibiyotikler üretmektedir. Antibiyotik *Bacillus* türleri arasında, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *Brevibacillus laterosporus* bulunmaktadır (Tagg ve ark. 1976, Katz ve Demain 1977, Jack ve ark. 1995, Shida ve ark. 1996, Sanders ve ark. 2003). Birçoğu basitrasin, polimiksin ve subtilin gibi peptid antibiyotikler üretmektedirler (Morikawa ve ark. 1992, Perez ve ark. 1993, Drablos ve ark. 1999).

Bacillus cinsine ait birçok türün yanı sıra diğer Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin bakteriyosinler veya bakteriyosin benzeri maddeler ürettiği de gösterilmiştir (James ve ark. 1991). Nitekim, çoğunlukla soy serilerinin savunma mekanizmalarının bir parçası olarak en az bir bakteriyosin ürettiği gösterilmiştir (Riley 1998, 2003). Bakteriyosinlerin başlangıçta sadece *Lactobacillus* tarafından üretildiği tespit edilse de,

sonradan farklı türler ve çoklu suşlar tarafından üretildiği gösterilmiştir. Aynı şekilde, *Bacillus* cinsine ait birçok türün bakteriosinler ve/veya bakteriosin benzeri maddeler ürettiği bildirilmiştir (James ve ark. 1991).

Bacillus cinsi üyelerinin, çoğunlukla sınıf II bakteriosinler içine yerleştirilmiş antibiyotikler olarak sınıflandırılan bakteriyosinler ürettiği bilinmektedir (Svetoch ve ark. 2005, Le Marrec ve ark. 2000). *Bacillus*'dan başka, *Paenibacillus* cinsinde polimiksinler gibi antimikrobiyal maddeler ürettiği bilinmektedir. Bununla birlikte, *Brevibacillus* ve *Geobacillus* gibi diğer cinslere ait türler antimikrobiyaller için araştırılmaktadır (Hyung ve ark. 2001, Faheem ve ark. 2007, Ren ve ark. 2007, Chawawisit ve Lertcanawanichakul 2008, Pokusaeva ve ark. 2009). Bu nedenle, bu cins ve diğer yakınlarını, antimikrobik maddeler için araştırma, bu alandaki bilgiyi arttırmanın yanı sıra, çeşitli uygulamalar için yeni bakteriyosinlerin izolasyonu da sağlayabilir.

Bacillus ve *Paenibacillus* cinslerine ait çeşitli türlerin farklı bakteriosinler ürettiği gösterilse de, birkaç *Brevibacillus* taksonu tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmemiştir. Dahası, *B. brevis* (Hyung ve ark. 2001, Faheem ve ark. 2007) ve *B. laterosporus*'un (Ren ve ark. 2007) geniş pH ve sıcaklık kararlılığına sahip bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler ürettiği gösterilmiştir (Chawawisit ve Lertcanawanichakul 2008).

B. laterosporus suşunun bir kültüründe Tauramamid olarak belirtilen bir lipopeptit antibiyotiği keşfedilmiştir. Bir lipopeptid genellikle bir peptid zincirine bağlanmış spesifik bir lipofilik kısımdan oluşur. Bu kategori, potansiyel olarak antibakteriyel, antifungal ve antiviral ajanlar olarak yararlı antimikrobiyal maddeleri içerir. Makovitzki tarafından sentezlenen bir dizi lipopeptid, hedef patojenlerle etkileşime girmiş ve hücre membranının sızmasına ve parçalanmasına yol açmıştır (Makovitzki ve ark. 2014).

Kimyasal insektisit ve pestisitlerin çevre kirliliği yaratmasından ve doğal bakteriyel antagonist ajanlarla biyolojik kontrol sağlamanın öneminden dolayı *Bacillus* bakterileri ciddi potansiyele sahiptir ve bitki hastalıklarını baskılayan birçok antibiyotik üretmektedirler (Hiraoka ve ark. 1992, Stabb ve ark. 1994, Milner ve ark. 1996). Ayrıca birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla ve mantarların neden olduğu bazı

bitki hastalıklar ile mücadelede *Bacillus*'lar tarafından üretilen antibiyotikler kullanılmaktadır. *Bacillus*' ların diğer bir özelliği de çeşitli böcek türlerine karşı etkin bakteriyel kontrol ajanı olmalarıdır. *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus larvae* ve *Bacillus popillae*, Lepidoptera larvalarına patojenik etki göstermektedirler (Rosovitz ve ark. 1998).

Uluslararası ilaç endüstrisinin araştırma-geliştirme çalışmaları her yıl arttığı halde, yeni keşfedilen ve patenti alınan ilaç sayısında ciddi bir düşüş olduğu bildirilmektedir (Pollack 2002). Bu nedenle, *Bacillus* türünün sahip olduğu biyokontrol aktivitesi, dirençli suşlara karşı etkili yeni doğal antimikrobiyal ajanların ortaya çıkarılması açısından ilaç endüstrisi için önem taşımaktadır.

Genel olarak mikroorganizmalardan yüksek oranda verim elde etmek için ya mikroorganizma doğrudan izole edilmekte ya da üretim ortamının değiştirilmesi yoluna gidilmektedir. Özellikle besin ortamında bulunan karbon ve nitrojen kaynakları, inorganik tuzlar ve diğer büyüme faktörleri, bakterilerin antimikrobiyal madde üretme kapasiteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir.

Bu tez çalışmasında, daha önce Yüksek Lisans tez çalışmamızda doğal kaynaklarımız olan topraklardan izole edilmiş olan ve antimikrobiyal madde üretme potansiyeline sahip 5 adet *Bacillus* sp. seçilerek 16S rRNA analizi ile tür seviyesinde tanımlanması, bu *Bacillus* türlerinin sıvı üreme ortamında üretilmesi, farklı patojen bakteriler üzerine etkisi incelenerek antimikrobiyal madde üretim kapasitesinin belirlenmesi, üretim ortamında farklı besinsel ve fiziksel faktörlerin antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerinin araştırılması, antimikrobiyal maddenin kısmi saflaştırılarak Moleküler Ağırlığının SDS-PAGE ile saptanması, MİK ve tanımlama (TLC-Biyootografi) gibi özelliklerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Antibiyotiklerin Tarihçesi

1889 yılında Lous Pasteur' un öğrencisi Paul Vuillemin tarafından Yunanca anti (karşı), biyos (yaşam) kelimelerinin birleştirilmesiyle türetilen antibiyotik kelimesi, yaşama karşı anlamına gelmektedir (Awais ve ark. 2007).

Eski Mısırlılar, Çinliler ve Orta Amerika yerlileri enfekte yaraların tedavisinde küfleri kullanmışlardır, fakat küflerin antibakteriyel özelliklerini ve hastalıkların tedavisi arasındaki ilişkiyi o zamanlar anlayamamışlardır. 2500 yıl önce Çinlilerin, küflü soya fasülyesinden yapılan ilaçları tedavi amacıyla kullandıklarını, Yunanlıların ise yara enfeksiyonlarına karşı şarap ve tuzları kullandıklarını göstermektedir (Yıldırım 2004).

1877 yılında Pasteur ve Joubert mikroorganizmalardan tedavi amacıyla yararlanılabileceğini düşünmüşler ve 1880'lerde zararsız bakterileri, hastalık yapan bakterilere karşı kullanmak için araştırmalar yapmışlardır. Buna göre "Replacement" adı verilen tedavi yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin temelini, bir hastalık etkeninin üremesini *in vitro* koşullarda inhibe edebilen, ancak kendisi patojen olmayan bir bakteriyi, tedavi amacıyla hastalara enjekte etmek oluşturmaktaydı. Bu yöntem tüberküloz, difteri, veba, kolera ve şarbon gibi hastalıklarda kullanılmıştır (Versalovic ve Vilson 2008).

1881 yılında John Tiyndall, bulanık olan kültür ortamının yüzeyinde üreyen küfler tarafından berraklaştırıldığını gözlemlemiştir.

1899 yılında Rudolf Emmerich ve Oscar Löw, *Pseudomonas aeruginosa*' dan elde ettikleri ve piyosinaz olarak adlandırdıkları ilk etkili ilacı yapan araştırmacılarıdır. Bu ilaç, hastanelerde kullanılan ilk antibiyotik olmuştur, fakat genellikle istenilen etkiyi gösterememiştir (Emmerich ve Löw 1899).

1920' li yıllarda "Replacement" adı verilen yöntem ile bazı bağırsak enfeksiyonlarının tedavisinde *Lactobacillus acidophilus*'un, streptokok taşıyıcılığına karşı ise *Staphylococcus aureus*' un sık olarak kullanıldığı bildirilmektedir (Versalovic ve Vilson 2008).

1928 yılında Alexander Fleming *Staphylococcus aureus* kolonilerinin, bir rastlantı sonucu kültür ortamına bulaşan *Penicillium notatum* nedeniyle üreyemediklerini görmüştür. Bu mantarın kültür filtratları, deneysel enfeksiyonlarda birçok bakteriye karşı güçlü biçimde etkin bulunmuş ve Fleming, üreyen küf mantarlarının *Penicillium* türünden oluşundan esinlenerek etkili maddeye penisilin adını vermiştir (Derderian 2007).

1932 yılında Klarer ve Mietzsch adlı araştırmacılar, birçok azo boyasının patentini almış, içlerinde prontosilin de bulunduğu bu maddelerin *in vitro* deneylerde antibakteriyel özellik gösterdiklerini bildirmişlerdir (<http://en.wikipedia.org/wiki/Prontosil>, 2017).

1935 yılında Alman kimyager Gerhard Domagh, prontosili *in vivo* koşullarda streptokoklara karşı denemiştir. Çok etkili olduğunu saptayarak, enfeksiyon hastalıklarının tedavisini sülfonamidlerle başlatmış ve prontosil üzerinde yaptığı çalışmalardan dolayı 1938 yılında Nobel ödülünü kazanmıştır (Domagh 1935).

1940 yılında Florey, Chain ve Abraham penisilin konusunda tekrar çalışmalara başlamış, bu antibiyotiğin farelerde oluşturulan streptokok enfeksiyonlardaki yüksek etkinliğini deneysel olarak kanıtlamış ve sonuçlarını 1940'da yayınlamışlardır (Manson ve Pollocmk 1953). Penisilin'in insanlar üzerindeki ilk başarısı 1941 yılında gerçekleşmiştir (Balkar 2007).

1943 yılında Waksman ve arkadaşları, *Streptomyces griseus* kültürlerinden streptomisin adını verdikleri bir madde elde etmişlerdir. Streptomisin, yan etkileri fazla olmasına rağmen tüberküloz gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Kresge ve ark. 1942).

1944 yılında tedavi alanına giren streptomisin, birçok Gram pozitif ve Gram negatif mikroorganizma yanında *Mycobacterium*'lara karşı da çok etkili olmuştur. Sonraları direnç gelişmelerine yol açmıştır ve daha dar alanlarda daha bilinçli olarak kullanılmaya başlanmıştır.

1947 yılında Amerika'da *Bacillus polymyxa* kültürlerinden, polimiksin adı verilen antibiyotik bulunmuş ve İngiltere'de aerosporin adıyla yayımlanan bu antibiyotiğin

(Ainsworth ve ark. 1947) daha çok Gram negatif mikroorganizmalara etkili olduğu belirtilmiştir (Stansly ve ark. 1947).

1950 ve 1960' lı yıllarda çok sayıda antibakteriyal ve antifungal keşfedilmiş, bu dönem antibiyotik keşifleri için "Altın Çağ" olarak adlandırılmıştır (Oskay ve Tamer 2009).

1950 yılında Japonya'da *Bacillus colistinus* kültürlerinden elde edilen ve Gram negatif bakterilere karşı etkili kolistin adı verilen yeni bir madde elde edildiği bildirilmiştir (Kumazawa ve Yagisawa 2002).

1952 yılında McGuire ve arkadaşları, *Streptomyces erythreus* kültürlerinden eritromisin adı verilen yeni bir antibiyotik elde etmişlerdir. Bu antibiyotik *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Treponema*, *Mycoplasma*, *Chlamydia* ve *Rickettsia*'lara karşı yüksek düzeyde aktivite göstermekteydi. Eritromisin ve türevleri geniş spektrumlu antibiyotikler olmakla birlikte genel olarak penisilinlerin ilk alternatifleri olarak kullanılmaktadırlar (McGuire ve ark. 1952).

1955 yılında Amerika Birleşik Devletler'inde Lloyd Conover tarafından en çok reçete edilen geniş spektrumlu antibiyotik olan tetrasiklinin patenti alınmıştır (http://www.invent.org/hall_of_fame/32.html, 2017).

1957 yılında Umezawa ve arkadaşları *Streptomyces kanamyceticus* kültürlerinden kanamisin adını verdikleri antibiyotiği elde etmişlerdir (Umezawa 1958). Bu aminoglikozidin *Pseudomonas* ve *Bacteroides* grupları dışında kalan diğer Gram negatif bakterilere karşı çok etkili, *Staphylococcus aureus* dışındaki Gram pozitif bakterilere karşı etkisiz, *Mycobacterium tuberculosis*'e karşı etkili olduğu ifade edilmektedir (Kumazawa ve Yagisawa 2002).

1963 yılında Weinstein ve arkadaşları *Micromonospora purpurea* kültürlerinden, aminoglikozid grubuna ait yeni bir antibiyotik olan gentamisini izole etmişlerdir (Weinstein ve ark. 1963). Gentamisin uzun yıllardır Gram negatif bakteri enfeksiyonlarına karşı kullanılmaktadır.

1970'li yıllarda İspanya'da izole edilen *Streptomyces cattleya* kültürlerinden yeni bir β -laktam antibiyotiği elde edilmiştir. Tienamisin adı verilen bu madde karbapenemlerin

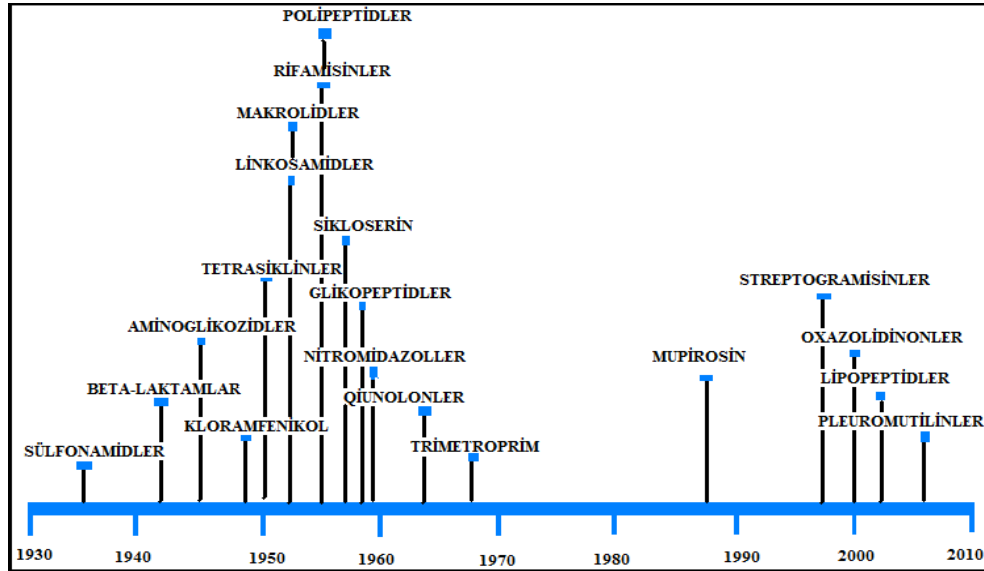
ilk örneğini oluşturmaktadır (Balkar 2007). Aynı yıl Preston ve Wick, *Streptomyces tenebrarius* kültürlerinden nebramisin diğer adıyla tobramisin adı verilen aminoglikozid grubuna ait yeni bir antibiyotik izole etmişlerdir (Preston ve Wick 1971).

1972 yılında Kawaguchi ve arkadaşları aminoglikozid grubundan ilk sentetik ürün olan amikasinı tıp dünyasına tanıtmışlardır (Kwaguchi ve Nakagawa 1978).

1981 yılında Smith Kline Beecham'ın, yarı sentetik antibiyotik olan amoksisillinin patentinin alındığı ve ilk olarak 1998 yılında amoksisilin, amoksil ve trimoks ticari adı altında satışa sunulduğu bildirilmektedir (<http://en.wikipedia.org/wiki/GlaxoSmithKline#History>, 2017).

Görüldüğü gibi insanlık mikroorganizmalarla savaş halindedir. Yüzyıllar boyunca mikroorganizmaların dediği olmuş; mikrobiyolojide ulaşılan noktalar, aşı ve serumlar bu savaşta dengeyi sağlamış; kemoterapötik ve antibiyotiklerin keşfiyle üstünlük insanlara geçmiştir. Ancak doğada bir canlının diğerini tümüyle yok edemediği de ortadadır (Aktuğlu 1997).

1990' lı yıllardan günümüze yeni antibiyotikler keşfedilmiş ve bunlar bir tablo haline getirilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. 1930 ve 2010 yılları arasında kullanılan antibiyotik sınıfları (www.rff.org/RFF/Documents/ETC-06.pdf, 2017)

2.2. Mikrobiyal Metabolitler

Canlı mikroorganizmalardaki metabolizma sonucu ortaya çıkan ürünler mikrobiyal metabolitler olarak adlandırılmaktadır. Bu metabolitler primer (birincil) ve sekonder (ikincil) olmak üzere iki grup olarak incelenmektedir.

2.2.1. Primer Metabolitler

Mikroorganizmanın gelişmesi için gerekli olan ve logaritmik faz (gelişme fazı) boyunca ortaya çıkan bu ürünler, trofofaz denilen fazda üretilmekte (Şekil 2.2) ve bu fazın ürünleri primer metabolitler (Çizelge 2.1) olarak adlandırılmaktadır (http://www.ensymm.com/pdf/ensymm_fermentation_abstract.pdf, 2005).

Çizelge 2.1. Primer (Birincil) metabolitlere örnekler

PRİMER METABOLİTLER
Sitrik asit
Etanol
Amino asitler
Aseton
Vitaminler

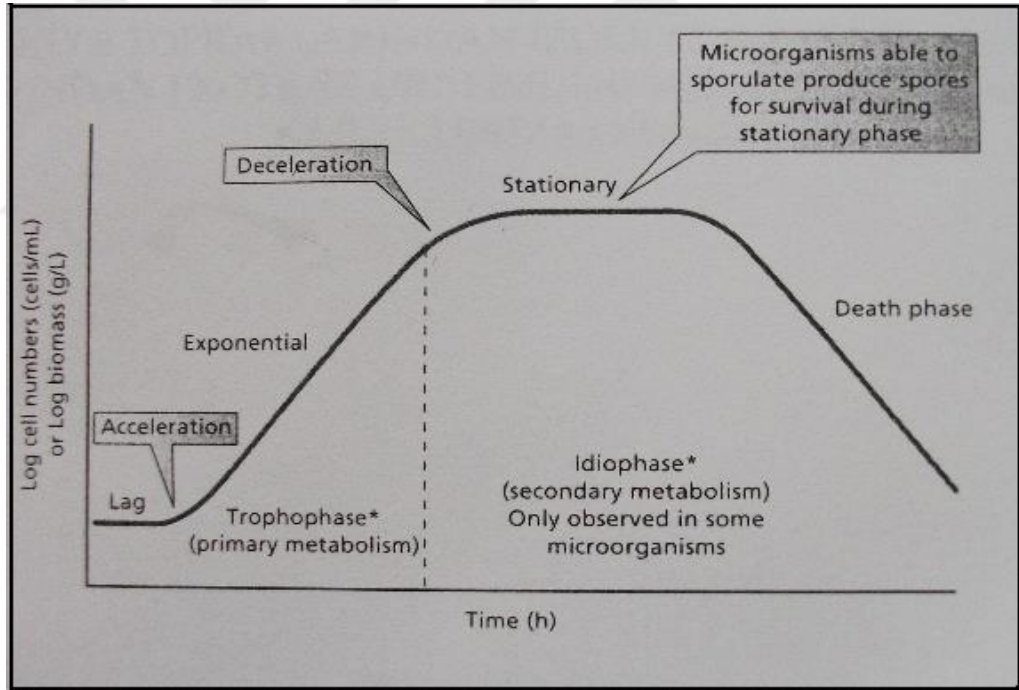
2.2.2. Sekonder Metabolitler

Ortamda bulunan bir veya daha fazla esas besin maddesinin tüketilmesi ile büyüme durduğunda, mikroorganizma idiofaz denen üretim periyoduna (bkz. Şekil 2.2) girmektedir. Bu fazda üretilen ürünler de sekonder metabolitler olarak adlandırılmaktadır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Sekonder (İkincil) metabolitlere örnekler

SEKONDER METABOLİTLER
Antibiyotikler
Toksinler
Enzim inhibitörleri

Sekonder metabolitler primer metabolitlerden farklı olarak; daha az organizma tarafından sentezlenir, üreme/gelişme için gerekli değildirler, sentezleri indüklenebilmektedir ve çok miktarlarda üretilmeleri mümkündür.



Şekil 2.2. Mikroorganizmalardaki üreme eğrisi (Waites 2006).

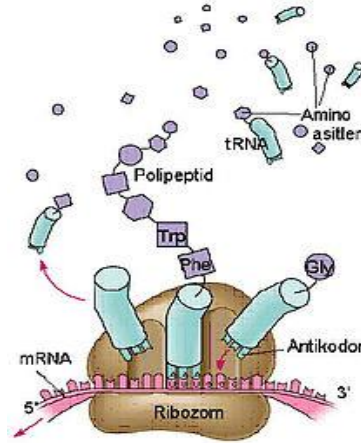
2.3. Antibiyotik Üretim Mekanizmaları

Antibiyotikler, ribozomal ve nonribozomal olmak üzere iki farklı mekanizma ile sentezlenmektedir.

2.3.1. Ribozomal Sentez Mekanizması

Biyolojik aktiviteye sahip oligo ve polipeptid yapısındaki antibiyotiklerden bazıları ribozomal sentez mekanizması denilen ve bilinen normal protein sentezi ile üretilmektedir (Şekil 2.3).

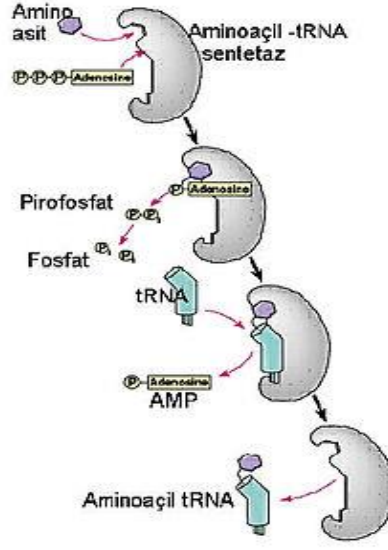
Ribozom, protein sentezinin yapıldığı mRNA ile tRNA'lar arasındaki bağlantının kurulduğu, büyük ve küçük alt birim olmak üzere iki kısımdan meydana gelen bir organeldir. Protein sentezi sırasında büyük ve küçük alt birim birleşmektedir. Her bir ribozomda bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Polipeptide eklenmek için bekleyen aminoasit-tRNA, A yüzeyinde beklerken, sentezlenen polipeptid P yüzeyinde durmaktadır. Yükünü boşaltan tRNA ise ribozomdan çıkmak için ribozomun E bölgesine geçmektedir. Bu işlemlerin olabilmesi için mRNA kodonları ile tRNA antikodonları arasındaki eşleşmelerin uygun olarak gerçekleşmesi gerekmektedir.



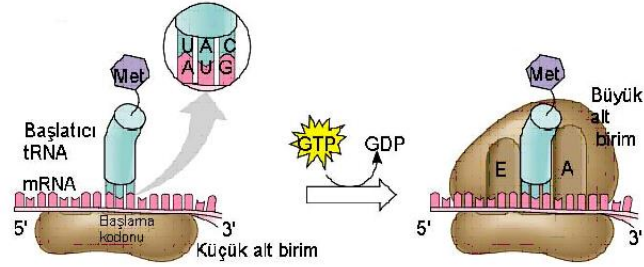
Şekil 2.3. Ribozomal sentez mekanizması

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2017)

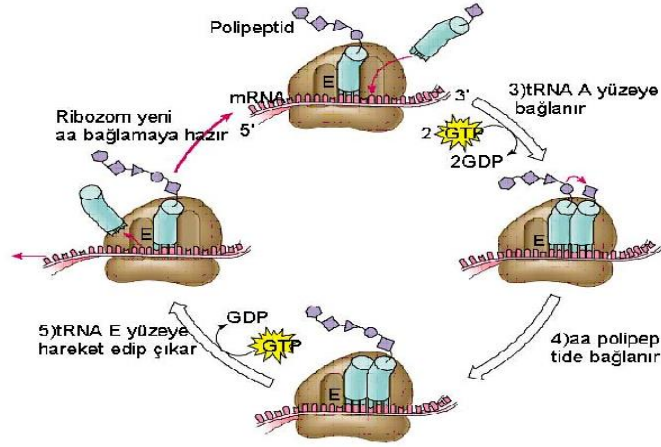
Ribozomlarda protein sentezi; aktivasyon aşaması (Şekil 2.4), başlama aşaması (Şekil 2.5), uzama aşaması (Şekil 2.6), sonlanma ve ribozomlardan bırakılma aşamalarından (Şekil 2.7) oluşmaktadır.



Şekil 2.4. Ribozomal sentezde aminoasitin aktivasyon aşaması
(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2017)

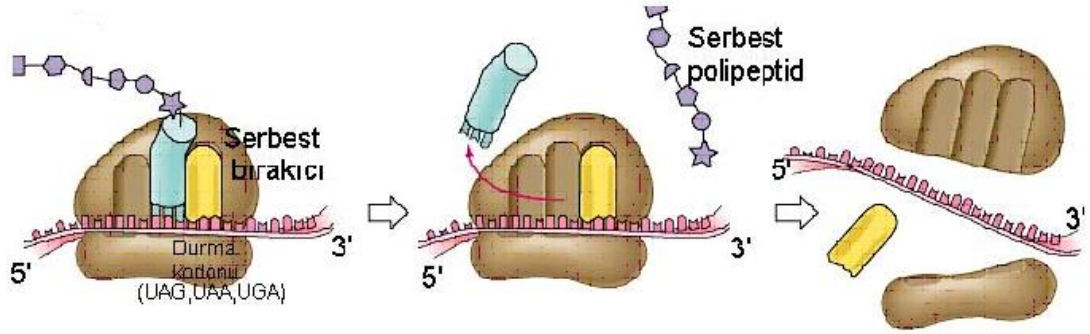


Şekil 2.5. Ribozomal sentezde başlama aşaması
(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2017)



Şekil 2.6. Ribozomal sentezde uzama aşaması

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2017)



Şekil 2.7. Ribozomal sentez sonlanma ve ribozomlardan bırakılma aşaması

(http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi, 2017)

Bu aşamalar sonucu oluşan polipeptid özgül üç boyutlu yapısını alacak şekilde katlanır ve çeşitli enzim ve kofaktörlerin rol aldığı sentez sonrası modifikasyonlar yardımıyla olgun protein molekülü oluşmaktadır (Nelson 2000). Ribozomal yolla sentezlenen antibiyotiklere örnekler Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Ribozomal yolla sentezlenen antibiyotiklerden bazıları (Stein 2005)

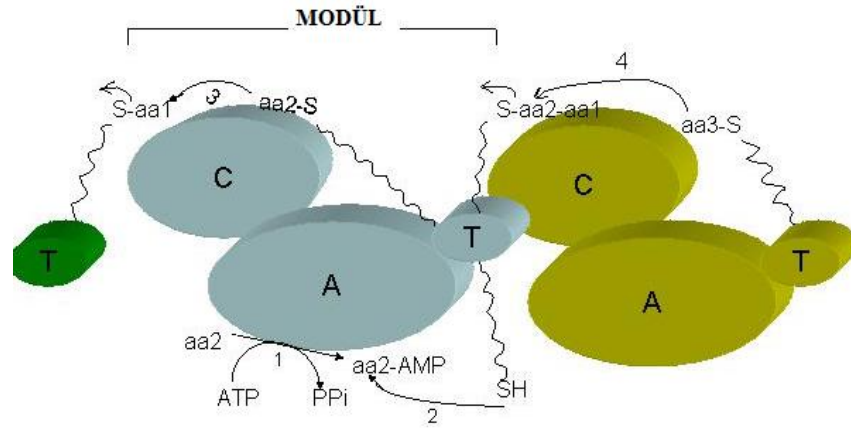
ANTİBİYOTİK	MİKROORGANİZMA
Subtilin	<i>Bacillus subtilis</i>
Ericin	<i>Bacillus subtilis</i>
Sublancin	<i>Bacillus subtilis</i>
Subtilosin	<i>Bacillus subtilis</i>
Mersacidin	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>

2.3.2. Nonribozomal Sentez Mekanizması

Nonribozomal sentez mekanizması 1971 yılında, Fritz Lipmann tarafından öne sürülmüş ve “thiotemplat mekanizması” olarak adlandırılmıştır (Lipmann 1971). Buna göre, nonribozomal sentez mekanizmasında, peptidler yüksek molekül ağırlıklı multienzimler olan nonribozomal peptid sentetazlar (NRPS) aracılığıyla sentezlenmektedirler.

Nonribozomal Peptid Sentetazlar; Adenilasyon (A), Tiyolasyon (T) ya da peptidil taşıyıcı protein (PCP) ve Kondensasyon (C) domainlerinden oluşmuş büyük multifonksiyonel enzimlerdir. Bunların dışında Nonribozomal Peptid Sentetazlar, yeni sentezlenen peptidin salınmasında görev yapmakta olan Tiyooesteraz (TE) ve L-'yi D-amino asite çevirme görevini üslenen Epimeraz (E) domaini de içerebilmektedirler.

Domainler bir araya gelerek modül olarak adlandırılan alt birimleri oluşturmaktadır (Şekil 2.8). Yaklaşık 1000 aminoasit içeren ve molekül ağırlığı 120 kDa civarında olan her bir modül, belirli bir aminoasitin eklenmesi için özgüdür ve peptid sentetazda bulunan modül sayısı, genellikle oluşan peptiddeki aminoasitlerin sayısına eşittir. Modüllerin sırası sentezlenen peptiddeki yapı taşlarının dizilişini belirler. Peptid sentetazları kodlayan genler 20 kb ve üstü büyüklükte gen kümeleri halinde düzenlenmektedirler ve tek bir modülü kodlayan gen 3 kb civarındadır.

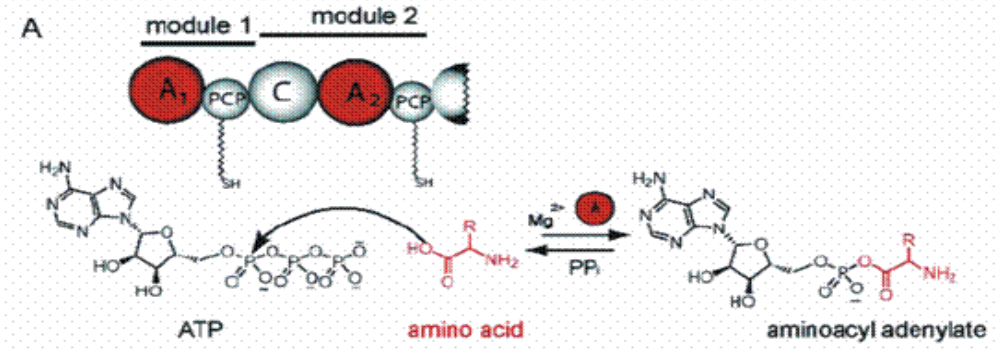


Şekil 2.8. Nonribozomal peptid sentetazlardaki modüller
(<http://linux1.nii.res.in/~zeeshan/nrps.html>, 2017)

Nonribozomal sentez mekanizmasında da ribozomal sentez mekanizmasına benzer olarak; aktivasyon, başlama, zincir uzaması ve sonlanma aşamaları bulunmakta ve gerekli enerji ATP hidrolizinden sağlanmaktadır. Fakat ribozomal sentez mekanizmasından farklı olarak kalıp görevini mRNA yerine peptid sentetazlar üstlenmekte ve oluşan ürünlerde standart L-aminoasitlere ek olarak D-aminoasitler, çok çeşitli sıra dışı ve modifiye aminoasitler de bulunabilmektedir.

Nonribozomal peptid sentezi; aminoasitlerin aktivasyonu, başlama, uzama ve sonlanma olmak üzere dört aşamada gerçekleşmektedir.

1-Aminoasitin Aktivasyonu: Adenilasyon bölgesi, aminoasitin tanıdığı özgül bir diziyeye sahiptir. Aminoasit bu özgül dizi tarafından tanıdığı zaman, ATP'deki adenil grupları kullanılarak adenilasyon reaksiyonu gerçekleşmekte ve böylece aminoaçiladenilat oluşarak, aminoasit aktive olmaktadır (Şekil 2.9).

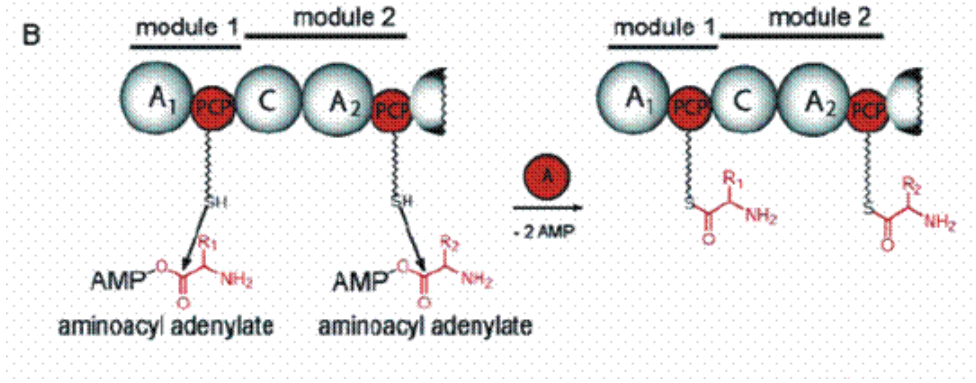


Şekil 2.9. Aminoasitin aktivasyon aşaması (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2017)

2- Başlama ve uzama: Bu aşamada adenilasyon bölgesindeki aminoasit, Tiyolasyon (T)/peptidil taşıyıcı protein (PCP) bölgesine bağlanır. 4'-fosfopantotein grubu bu bölgedeki bir serinin hidrosiline kovalan olarak bağlanmakta ve ileri geri hareket ederek, aminoasitleri adenilasyon bölgesinden kondensasyon bölgesine taşımaktadır. Adenilasyon yoluyla aktive olmuş olan aminoasitler, tiyoester oluşturmak üzere peptidil taşıyıcı protein bölgesindeki fosfopantotein grubunun ucundaki sülfhidril (-SH) grubuna kovalan olarak bağlanırlar ve aminoasitlerin üzerindeki AMP'ler serbest bırakılır.

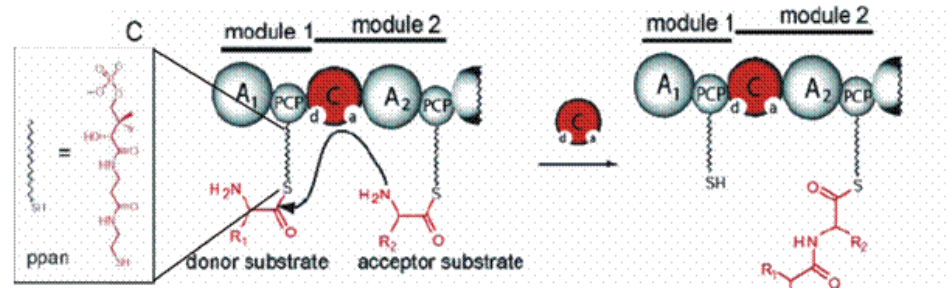
Peptid bağı oluşumu kondensasyon (C) bölgesinde gerçekleşmektedir. Aminoasit, fosfopantotein grubunun ileri geri salınım yapan kolu yardımıyla bir kondensasyon bölgesindeki alıcı konumuna taşınmakta ve bir önceki modülün fosfopantotein taşıyıcısı tarafından verici konumuna yerleştirilmiş olan aminoasit veya peptidil grubu ile kondensasyon, yani peptid bağı oluşumu gerçekleşmektedir.

Yeni oluşan peptid tiyoesteri, yine fosfopantotein grubu tarafından bir sonraki modüldeki alıcı konumuna taşınarak burada diğer modül tarafından getirilmiş aminoasit ile aralarında peptid bağı oluşturulmakta ve bu şekilde zincir uzaması devam etmektedir (Şekil 2.10).

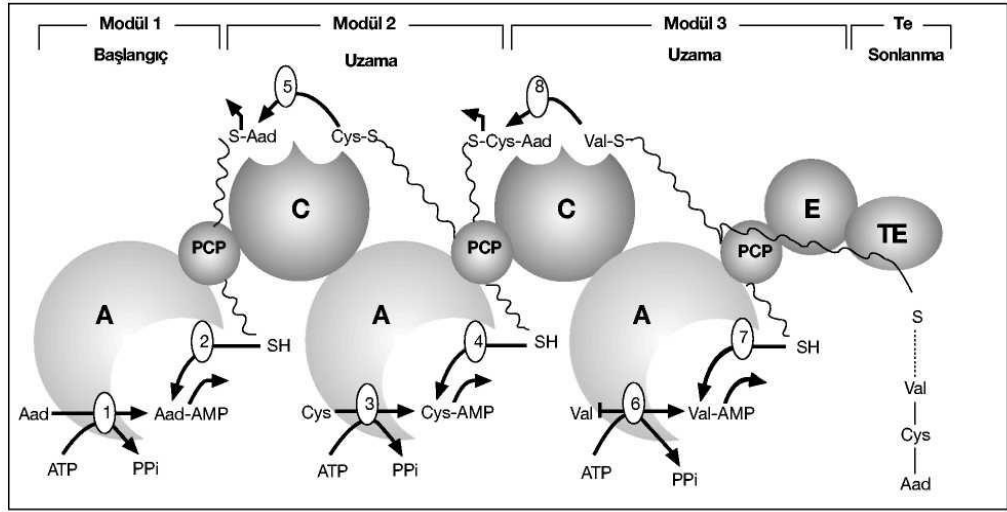


Şekil 2.10. Başlama ve uzama aşaması (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2017)

3- Sonlanma: Peptid sentezinin sonlanması ve oluşan peptidin sentetazdan ayrılması en sonda yer alan tyoesteraz (TE) bölgesi tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.11). Sentez tamamlanıp ürün serbest bırakıldıktan sonra da bazı yapı modifikasyonları gerçekleşebilmektedir.



Şekil 2.11. Sonlanma aşaması (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2017)



Şekil 2.12. Nonribozomal sentez mekanizması (Büber ve Açan 2004)

Nonribozomal yolla (Şekil 2.12) sentezlendiği gösterilen ilk antibiyotikler Gramisidin S ve Tirosidindir (Gevers ve ark. 1969, Roskoski 1970). Diğer nonribozomal yolla sentezlenen antibiyotiklerden bazıları Çizelge 2.4’de verilmiştir.

Çizelge 2.4. Nonribozomal yolla sentezlenen bazı antibiyotikler (Büber ve Açan 2004)

ANTİBİYOTİK	ORGANİZMA
Aktinomisin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Basitrasin	<i>Bacillus licheniformis</i>
Daptomisin	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Enniatin	<i>Fusarium oxysporum</i>
Eksokelin	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
Fengisin	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramisidin S	<i>Bacillus brevis</i>
Lovastatin	<i>Aspergillus terreus</i>
Pristinamisin I	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Siklosporin	<i>Tolypocladium niveum</i>
Siringomisin	<i>Pseudomonas syringae</i>
Surfaktin	<i>Bacillus subtilis</i>
Mycobacillin	<i>Bacillus subtilis</i>
Tirosidin	<i>Bacillus brevis</i>

2.4. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler birçok kritere göre sınıflandırılmaktadır fakat günümüzde en yaygın bilimsel sınıflandırma etki güçleri ve etki mekanizmalarına göre yapılan sınıflandırmadır.

2.4.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki farklı gruba ayrılmaktadırlar. Bunlardan birincisi mikroorganizmaların üremelerini durduran statik (durdurucu) etkili olanlardır (bakteriyostatik/fungustatik vb.). Tetrasiklinler, sülfonamidler ve makrolidler bu sınıfta bulunmaktadır. Bunların ikinci grubu ise mikroorganizmaları öldürerek yok eden sidal (öldürücü) etkili olanlardır (bakteriyosidal/fungusidal vb.). Penisilin, sefalosporin gibi beta-laktamlar, vankomisin ve rifamisinler bu grupta yer almaktadır.

2.4.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre 5 farklı şekilde sınıflandırılmaktadır.

1. Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eden ve otolitik enzimleri aktive eden antibiyotikler; penisilinler, basitrasinler, sefalosporinler ve vankomisinler bu grup içerisinde bulunmaktadır.
2. Hücre zarı işlevini bozan antibiyotikler: Hücre zarının geçirgenliğini arttırıp sitoplazma içindeki aminoasit, nükleotitler gibi bileşiklerin dışarı çıkmasına ve dolayısıyla mikroorganizmanın ölümüne sebep olurlar. Polimiksinler, amfoterisin B ve gramisidin bu grupta bulunmaktadır.
3. Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler: Aminoglikozidler ve tetrasiklinler ribozomların protein sentezi sırasında kullandıkları 30S bölgelerine tutunarak; eritromisin, klindamisin ve kloramfenikolün ribozomların protein sentezi sırasında kullandıkları 50S bölgelerine tutunarak protein sentezini durdurmaktadırlar.
4. Bakterilerin Nükleik asid sentezini bozan antibiyotikler: Bu grupta yer alan Rifamisinler, DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin β alt birimine bağlanarak

mRNA sentezini engellemektedirler. Kinolonlar, metronidazoller ve nitrofurantoinler de bu grupta yer almaktadırlar.

5. Bakteriyel antimetabolitler denilen ve intermedier metabolizmayı bozan antibiyotikler: Bunlar yapıca substratlara benzerler ve enzimlerin üzerindeki etkin yerler için onlarla yarışarak bakterilerin metabolizması için gerekli bazı maddelerin yapısını bozarlar. Sülfonamidler, sülfonlar, izoniazid, trimetoprim ve ethambutoller bu grupta yer alırlar.

2.5. Antibiyotik Üreten Mikroorganizmalar

Antibiyotikler Bacillaceae, Paenibacillaceae, Actinomycetales ve Mycophyta grubundaki canlılar tarafından üretilmektedir. 1990' larda mikroorganizmalardan yılda 200-300, 1997'de ise yaklaşık 500 yeni biyoaktif ürün elde edildiği bildirilmektedir (Demain 1999). Buna rağmen, yeni antibiyotiklerin keşfedilmesi beklenmekte ve bu sebeple de *Streptomyces*, *Bacillus*, *Tolypocladium*, *Fusarium*, *Mycobacterium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* gibi birkaç cinse ait türler antimikrobiyal madde üretme yetenekleri bakımından doğadan incelenmektedirler. Bunlar arasında yer alan *Bacillus* türleri, antibiyotik üretme kapasitesi yönünden en çok incelenen organizmalar arasındadır (Perez ve ark. 1993, Eltem ve Uçar 1998). *Bacillus* bakterilerinin oluşturduğu polipeptit antibiyotikler, çalışmalar sonucunda önem kazanmaktadır. Antibiyotik üreten *Bacillus* türleri, *B. subtilis*, *B. polymyxa*, *B. brevis*, *B. licheniformis*, *B. circulans*, *B. cereus*, *B. Thuringiensis* ve *Brevibacillus laterosporus*' tur (Tagg ve ark. 1976, Katz ve Demain 1977, Jack ve ark. 1995, Shida ve ark. 1996, Sanders ve ark. 2003). Daha önce *Bacillus laterosporus* olarak sınıflandırılan *Brevibacillus laterosporus*, parasporal kapsül üretme kabiliyeti ile karakterize edilen aerobik bir spor oluşturuvcu bakteridir. Türlerin, belirli omurgasız organizmalar için toksik olan suşları içerdiği bilinmektedir (Favret ve Yousten 1985, Rivers ve ark. 1991, Orlova ve ark. 1998, Huang ve ark. 2005). Buna ek olarak *B. laterosporus*'un bazı suşları, spergualin (Nemoto ve ark. 1987, Umezawa ve Takeuchi 1987) ve bacithrocins A, B ve C' yi üretmektedirler (Kamiyama ve ark. 1994).

B. laterosporus suşunun bir kültüründe tauramamid olarak belirtilen bir lipopeptit antibiyotiği keşfedilmiştir. Bir lipopeptid genellikle bir peptit zincirine bağlanmış

spesifik bir lipofilik kısımdan oluşur. Bu kategori, potansiyel olarak antibakteriyel, antifungal ve antiviral ajanlar olarak yararlı antimikrobiyal maddeleri içerir. Makovitzki tarafından sentezlenen bir dizi lipopeptid, hedef patojenlerle etkileşime girmiş ve hücre membranının sızmasına ve parçalanmasına yol açmıştır (Makovitzki ve ark. 2014). Mevcut çalışmalar, insan kaynaklı patojenik mikroorganizmalarının yanı sıra tercihen de ilaca dirençli suşlara karşı etkili yeni doğal antimikrobiyal ajanların ortaya çıkarılması için başlatılmıştır (Yang ve ark. 2014).

2.5.1. *Bacillus* Hakkında Genel Bilgiler

Bacillaceae ailesi içerisinde *Bacillus* ve *Clostridium* olmak üzere iki ana alt grup bulunmaktadır (Garrity 2004). Carl Woese tarafından 16 ve 18S rRNA dizilerinin karşılaştırılmasıyla oluşturulmuş sınıflandırmaya göre *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar Eubakteri domanini içerisine dahil edilmiştir (Woese ve Wolfe 1985, Woese 1999).

Başlangıçta *Bacillus* türleri arasında yer alan bazı bakteriler, DNA yapılarındaki G+C oranlarına göre ayrı cinsler olarak tanımlanmıştır. Bunlar; *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus* ve *Halobacillus* cinsleridir. *Bacillus* grubu içerisinde en iyi bilinen türler *B. subtilis*, *B. anthracis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. sphaericus* ve *B. thuringiensis*'tir (Logan ve Turnbull 1999).

Bacillus türleri tabiatta çürüyen organik materyallerde, toz, toprak, yeşil sebzelerde, suda ve bazı türlerde de normal vücut florasında bulunmaktadır. Bazı türler, insanlarda, hayvanlarda, diğer memelilerde ve böceklerde zorunlu patojen veya fırsatçı enfeksiyon etkenidirler (Berkeley ve Logan 1997, Logan ve Turnbull 1999). *Bacillus*'lar arasında *B. anthracis* ve *B. cereus* insan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturmaları açısından en önemli türlerdir. Bunların dışında kalan *Bacillus* türleri insanlarda ve hayvanlarda nadiren enfeksiyon etkenidirler (Banwart 1983).

Bacillus hücreleri çubuk şeklinde ve düz, 0,5-2,5 µm eninde 1,2-10 µm boyundadırlar, uçları yuvarlak ya da kare şeklinde, Gram pozitif bakterilerdir. *Bacillus*'lar peritriköz kamçıya sahip ve hareketlidirler. Hepsi endospor oluşturmaktadırlar. Endosporlar oval, yuvarlak veya silindirik şekilde olabilirler. Bu cinste yer alan bakteriler aerobik ve

fakültatif anaerobik koşullarda üreyebilmektedirler. Yüksek fizyolojik yetenekleri nedeniyle sıcaklık, pH ve tuzluluğa karşı toleranslıdırlar. Gelişebildikleri minimum sıcaklık derecesi 25°C ila 75°C arasındayken, minimum pH değeri ise bazı asidofilik karakterli türler için 7,5 ila 8,0'e kadar çıkmaktadır. Katalaz pozitif ve fermentatif ya da oksijenli solunum gösteren bir metabolizmaya sahiptirler. Kolayca kültüre alınabilirler ve yapılarında heterojenlik bulunmamaktadır (Holt ve ark. 1994).

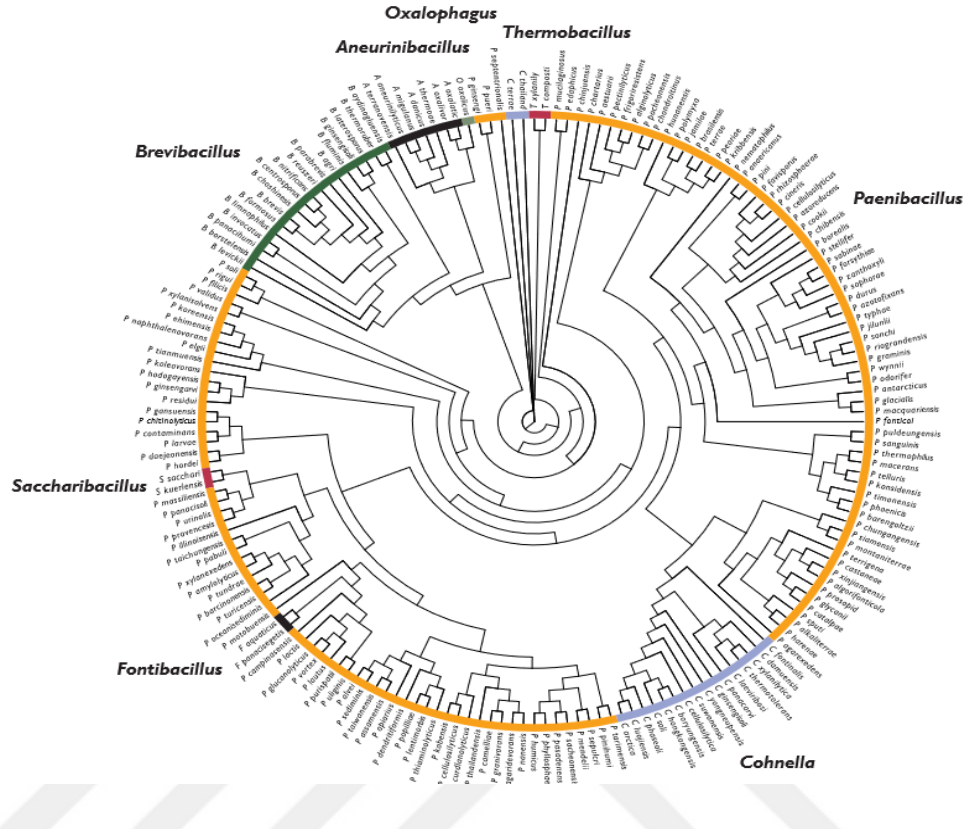
Antibiyotik, enzim ve toksin üretimi gibi metabolik özellikleri ile endüstriyel öneme sahip olmaları ve kolay üretilebilmeleri sebebiyle, bakteriler arasında dikkat çeken mikroorganizma grubudur (Rosovitz ve ark. 1998, Wipat ve Harwood 1999).

Bacillus'lar çok çeşitli metabolik özelliklerinin yanı sıra geniş fizyolojik yetenekleri ile endüstriyel uygulamalarda kullanılma potansiyelleri yüksektir. Ayrıca spor oluşturma yetenekleri ve metabolik faaliyetlerinin çeşitliliğinin, geniş bir çevreye yayılmalarında önemli avantajlar sağladığı da belirtilmektedir (Sneath 1986, Rosovitz ve ark. 1998).

2.5.2. *Brevibacillus* Hakkında Genel Bilgiler

Paenibacillaceae ailesi, 16S rRNA gen dizilerinin analizine dayanarak oluşturulmuş olup tür açısından zengin olan bu aile, *Paenibacillus*, *Ammoniphilus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Cohnella*, *Oxalophagus* ve *Thermobacillus*, *Fontibacillus* ve *Saccharibacillus* cinslerini kapsamaktadır (Şekil 2.13). Bu ailenin oval-elipsoit sporları bulunmaktadır. Birçok türü Gram pozitif olmakla birlikte bazıları Gram negatiftir. Taksonomik öneme sahip diğer özellikleri ise hareketlilik, oksijenle olan ilişki ile katalaz oluşumudur. Ailenin üyeleri sıklıkla çeşitli toprak habitatları, kompost ve çeşitli bitki materyalleri ile aynı zamanda tatlı su, kan ve dışkılarından da izole edilmektedir (Mayilraj ve Stackebrandt 2014).

Paenibacillaceae Ailesi



Şekil 2.13. Paenibacillaceae familyasını oluşturan sekiz cins'e ait 195 türün tip soylarından 16S rRNA gen dizilerinin filogramı (Zeigler, 2013)

Paenibacillaceae ailesi içerisinde çok bilinen *Brevibacillus* cinsi, daha önce *Bacillus brevis* olarak tanımlanmaktaydı. 1996 yılında Shida ve arkadaşları tarafından *Bacillus* cinsindeki *Bacillus brevis*, *laterosporus*, *thermoruber*, *agri*, *centrosporus*, *choshinensis*, *borstelensis*, *formosus* ve *reuszeri* bakterilerini yeniden sınıflandırarak, bu türleri Paenibacillaceae ailesindeki yeni bir cins olan *Brevibacillus* cinsine dahil etmiştir (Claus ve Berkeley 1986, Migula 1900, Shida ve 1996).

Bu türlerin geçerli isimlerini bu cins içerisinde: *Brevibacillus invocatus*, *limnophilus*, *levickii*, *ginsengisoli*, *panacihumi*, *fluminis*, *aydinogluensis* ve *nitrificans* olarak belirtmiştir (Allan ve ark. 2005, Kim ve ark. 2009, Inan ve ark. 2012). Bu cinsin üyeleri çubuk biçimli, Gram pozitif veya Gram değişken, peritrik kamçısıyla hareketli ve zorunlu aerobiktirler. Cinsin üyelerinin G+C içeriği %42,8 ile 57,4 arasında değişmektedir.

Brevibacillus cinsinin önemli üyelerinden *Brevibacillus laterosporus* (Shida ve ark. 1996), daha önce *Bacillus laterosporus* olarak sınıflandırılmış olup Gram pozitif ve aerobik özellik göstermektedir. Spor oluşturan bir bakteridir ve tipik bir kano şekilli parasporal gövde ile karakterize edilmektedir. Sporangiumun lizisinden sonra spor, parasporal kristalin (çeşitli şekil ve boyutlarda kristal mürekkepleri), hücre dışı proteaz (Huang ve ark. 2005) ve lipopeptid antibiyotikler (Desjardine 2007) gibi farklı virülans faktörleri üretmektedir. Ayrıca, laterosporulin (Singh 2012), loloatin A gibi bir peptid antibiyotiği de içeren geniş antibiyotik spektrumu ile kısa sekans peptidlerinin (bakteriyosin) salınımı ve spergualin (Nemoto ve ark. 1987, Umezawa ve Takeuchi 1987), bakotropinler A, B ve C15 gibi tıbben önemli maddeler üretmektedirler (Chawawisit ve Lertcanawanichakul 2014).

Brevibacillus laterosporus, *Bacillus thuringiensis* ve *Bacillus sphaericus* suşlarına karşı çok geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi sergileyen bir biyolojik kontrol potansiyeline sahiptir (Olivera ve ark. 2004). Ayrıca *Brevibacillus laterosporus*'un, belirli omurgasız organizmalar için toksik olan suşları içerdiği bilinmektedir (Favret ve Yousten 1985, Rivers ve ark. 1991, Orlova ve ark. 1998, Huang ve ark. 2005).

Brevibacillus'tan antibakteriyel ve antifungal dahil biyolojik olarak etkin birçok biyoaktif bileşikler izole edilmiştir. *Brevibacillus laterosporus* suşunun, *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Alternaria* da dahil olmak üzere bir dizi mantar gelişimini inhibe ettiği ve bir *B. laterosporus* A60 suşunun, *Pseudomonas* cinsinin Gram negatif bakterilerine karşı aktif olduğu bulunmuştur (Dai ve ark. 2000).

Bacillus ve *Paenibacillus* cinslerine ait çeşitli türlerin farklı bakteriosinler ürettiği gösterilse de, birkaç *Brevibacillus* tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmemiştir. Dahası, *Bacillus brevis* (Hyung ve ark. 2001, Faheem ve ark. 2007) ve *B. laterosporus* (Ren ve ark. 2007), geniş pH ve sıcaklık kararlılığına sahip bakteriyosin benzeri inhibitör maddeler ürettiği gösterilmiştir. Bu suş ayrıca toksik bir bileşik olan arsenatın, arsenite redüksiyonunu katalizleyerek arsenat redüktaz aktivitesi de göstermektedir. Yine, bakterinin sahip olduğu sistatinyonin beta-lizaz proteini, önemli aliminyum direnci sağlamaktadır ve bu bilgi bu suşun asidik topraklar gibi metalle kontamine olmuş arazilerde tarımsal ürün yetiştirilmesinde hayatsal bir öneme sahip olabileceğini önermektedir. Burada belirtilen değerli

ürünlerinin yanısıra *Brevibacillus* cinsi amilaz, ksilanaz, laktaz gibi birçok değerli endüstriyel enziminde kaynağıdır (Bozoğlu 2014).

2.6. *Bacillus* ve *Brevibacillus*' lar Tarafından Üretilen Bazı Antibiyotikler

Bacillus ve *Brevibacillus* cinsleri biyolojik aktiviteleri ile çok sayıda peptid antimikrobiyal madde üretmektedirler. Daha önce yapılan çalışmalar bu cinslerin birçok üyesinin biyokontrol ajan olarak kullanıldığını göstermiştir (Oliveira ve ark. 2004). *Bacillus subtilis* ve *Bacillus brevis*'ten 167 adet peptid antibiyotiğin üretildiği ifade edilmiştir. Bunlardan, 66 farklı peptid antibiyotik *Bacillus subtilis* suşlarından, 23 tanesi ise *Bacillus brevis*' ten elde edilmiştir (Berdy 1974). *Bacillus* ve *Brevibacillus*' lar tarafından üretilen antibiyotiklerden bazıları Çizelge 2.5'te verilmiştir.

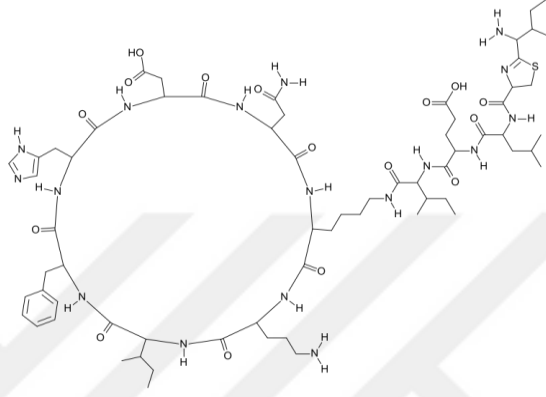
Çizelge 2.5. *Bacillus* ve *Brevibacillus*' lar tarafından üretilen bazı antibiyotikler

<u>BAKTERİLER</u>	<u>ANTİBİYOTİKLER</u>
<i>Bacillus cereus</i>	Cerein, zwittermisin
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Tochisin
<i>Bacillus subtilis</i>	Subtilin, mikobasilin, basilasin, iturin, sürfaktin
<i>Bacillus megaterium</i>	Megasin
<i>Bacillus licheniformis</i>	Basitrasin
<i>Bacillus polymyxa</i>	Polimiksin
<i>Bacillus coagulans</i>	Coagulin
<i>Bacillus brevis</i>	Gramisidin, tirosidin
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	Laterosporamin, lattersoprin, loloatin A, tauramamid

2.6.1. Basitrasin

Basitrasin (Şekil 2.14), *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen 12 aminoasitten oluşan (Ishihara ve Shimura 1988) siklik polipeptidlerin bir karışımıdır (Laland ve Zimmer 1984, Hughes ve Poole 1989, Azevedo ve ark. 1993). BA1, BA2 ve BA3 olmak üzere üç multifonksiyonel enzim tarafından sentezi katalizlenen bu antibiyotik, nonribozomal yolla üretilmektedir.

Basitrasin Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı sentezi sırasında peptidoglikanın polimerizasyonunu bloke ederler. Basitrasin, *Enterobacter*'ler ve *Pseudomonas*'lara karşı etkisiz olmasına karşın, A grubu beta-hemolitik streptokoklar bu antibiyotiğe çok duyarlıdır ve bu bakterilerin identifikasyonunda Basitrasine duyarlılık aranmaktadır (Yücel ve ark. 1998, Drablos ve ark. 1999).



Şekil 2.14. Basitrasin (<http://www.fi.wikipedia.org/wiki/Tiedosto:Bacitracin.png>, 2017)

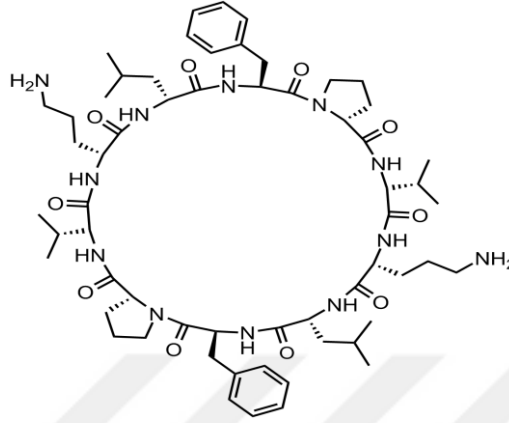
2.6.2. Gramisidin

Bacillus brevis 'den elde edilen siklik dodekapeptid antibiyotik olan gramisidinin A, B, C ve D olmak üzere 4 formu vardır. 1946 yılında gramisidin üreticisi olan suş, ilk olarak, Moskova yakınlarında topraktan izole edilmiştir ve *B. brevis* var. G.B. olarak tanımlanmıştır (Brazhnikova ve ark. 1973).

Küçük siklik bir peptid olan gramisidin (Şekil 2.15), thiotemplate mekanizması olarak adlandırılan multienzimler aracılığıyla nonribozomal yolla sentezlenmektedir. Gramisidin sentetaz 1 (GS1) ve gramisin sentetaz 2 (GS2)' den oluşan enzim kompleksi gramisidin sentezini katalizlemektedir (Lipmann ve ark. 1986).

15 aminoasitten oluşan bu antibiyotiğin, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Agathos ve Demain 1988, Tunç 1995). Bakterilerin hücre duvarına karşı etkilidirler ve hücreleri hemolize uğratmaktadırlar. Özellikle bel soğukluğu hastalığına sebep olan *Neisseria* cinsine karşı etkili olduğu

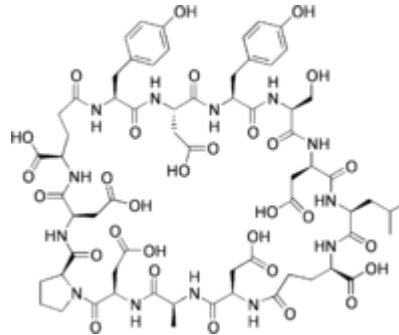
bildirilmektedir. Gramisidin, cerrahide yaraların temizlenmesinde ve jinekolojide de yaygın olarak kullanılmaktadır (Sarışeker 1983, Tunç 1995).



Şekil 2.15. Gramisidin (<http://www.usermeds.com/medications/gramicidin>, 2017)

2.6.3. Mikobasilin

1958 yılında ilk defa *B. subtilis* bakterisinden izole edilmiştir. 13 aminoasitlik antibiyotik olan mikobasilin (Şekil 2.16) thiotemplate mekanizması denilen multienzimler aracılığıyla nonribozomal olarak sentezlenmektedir. Mikobasilin sentezini katalizleyen enzim kompleksi üç bölümden oluşmaktadır. Bunlar: A, ilk pentapeptidin sentezi sırasında düzenleyen; B, nonapeptid sentezini katalizleyen ve C, son ürünün sentezini katalizleyen mikobasillin antifungal aktiviteye sahip olmakla beraber, hemolitik aktiviteye de sahip olduğu bildirilmektedir (Banerjee 1977).



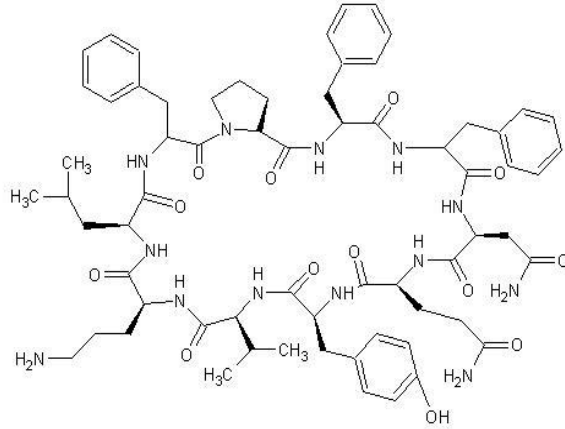
Şekil 2.16. Mikobasilin (<http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacillin>, 2017)

2.6.4. Tirosidin

Tirosidin, ilk defa 1939 yılında, *Bacillus brevis* kültüründen elde edilen, 10 aminoasitlik bir antibiyotiktir (Şekil 2.17).

Tirosidin biyosentez mekanizması, tirosidin sentetaz 1 (TY1), tirosidin sentetaz 2 (TY2) ve tirosidin sentetaz 3 (TY3) olmak üzere üç enzim tarafından katalizlenmektedir.

Tirosidin Gram pozitif ve negatif bakterilerin hücre duvarına etki gösterdiği ancak zehirli olduğundan sadece çok güçlü antiseptik olarak kullanılabilirdiği bildirilmektedir (Sarışeker 1983, Tunç 1995).



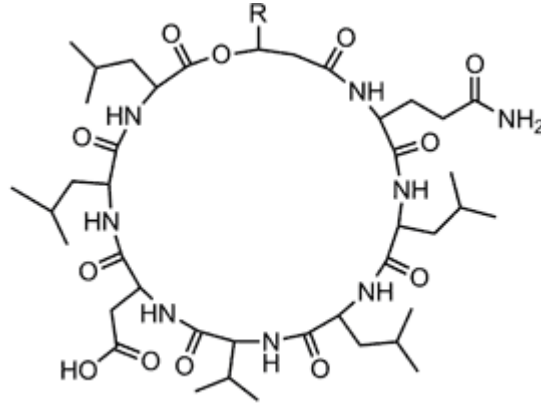
Şekil 2.17. Tirosidin (<http://chem257.pbworks.com/w/page/15645836/Tyrocidine>, 2017)

2.6.5. Sürfaktin

Sürfaktin, ilk olarak *Bacillus subtilis* ATCC 1332 kültüründen izole edilen (Cooper 1981) ve 7 aminoasitten oluşan bir antibiyotiktir (Şekil 2.18). Nonribozomal sentez mekanizmasıyla sentezlenmektedir.

Sürfaktin güçlü bir biyosürfaktan olarak bilinir ve deterjan etkisi göstererek hücre membranının geçirgenliğini bozmaktadır (Desai ve Banat 1997).

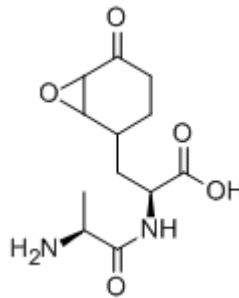
Antibakteriyel, antifungal ve antimikoplazma aktivitelerine ek olarak hemolitik aktivite de göstermektedir. Diğer yandan, bakterilerde biyofilm oluşumunu önlediği bildirilmektedir (Romero ve ark. 2007).



Şekil 2.18. Sürfaktin (http://www.acschemtox.org/inside/Pages/newsletter_12-09.aspx, 2017)

2.6.6. Basilisin

Basilisin, basit yapılı ve ribozomal yolla sentezlenen peptid yapılı mantarlar üzerinde etkili bir antibiyotiktir (Şekil 2.19). *Bacillus subtilis* Marburg 168 suşu tarafından üretildiği ve L-alanin ve sıra dışı bir aminoasit olan L-antikapsin içeren bir dipeptid olduğu ifade edilmektedir (Walker ve Abraham 1970).

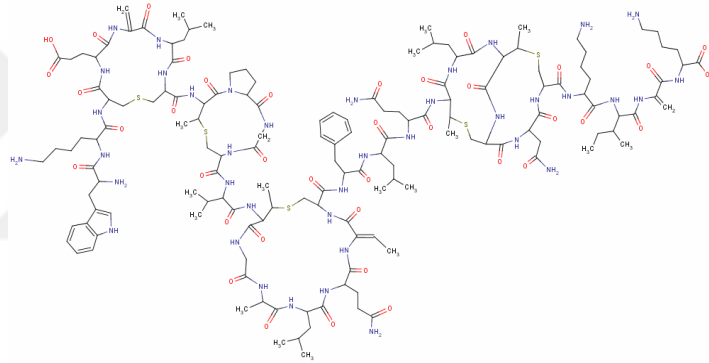


Şekil 2.19. Basilisin (<http://www.guidechem.com/dictionary/1395-22-8.html>, 2017)

2.6.7. Subtilin

Subtilin iyi bilinen ribozomal yolla sentezlenen bir antibiyotiktir (Şekil 2.20). Subtilin öncülü, ribozomlarda sentezlenir ve threonin ve serin dehidrasyonu gibi translasyon sonrası modifikasyonlarla dehidroformuna dönüşür. Bunlar subtilin polipeptit zincirinde sistin birimlerine katılır ve sonuç olarak 32 aminoasitlik subtilin oluşur (Klein ve ark. 1992).

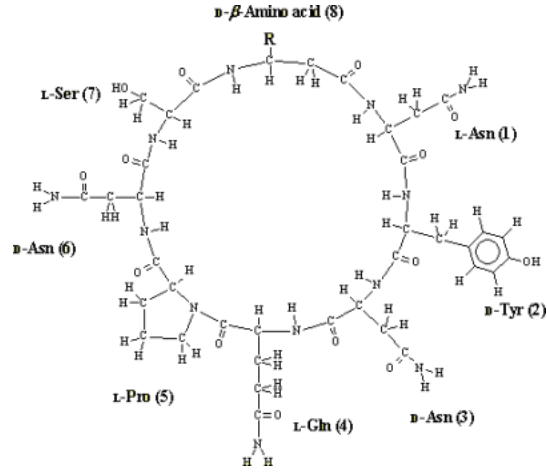
Gram pozitif bakterilerden özellikle *Neisseria catarrhalis* ve *Neisseria gonorrhoeae* ve çeşitli patojen mantarlara karşı etkili olduğu bildirilmektedir. Subtilinin yüksek sıcaklık ve düşük pH değerlerinde stabil olduğu ve otoklav edilse dahi tamamen antibakteriyel aktivitesi korumakta olduğu bildirilmektedir (Nakano ve Zuber 1990).



Şekil 2.20. Subtilin (<http://www.guidechem.com/cas-139/1393-38-0.html>, 2017)

2.6.8. İturin

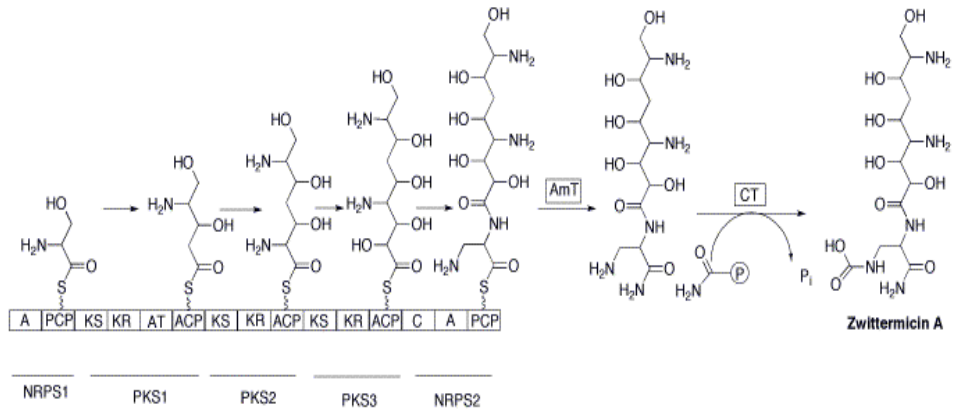
Bacillus subtilis tarafından nonribozomal yolla üretilen iturin, 7 aminoasitten oluşmaktadır (Şekil 2.21). İturin, hücre membranının geçirgenliğini bozarak, nükleotit, protein, polisakkarit ve lipitlerin hücre dışına çıkmasına neden olmaktadır. Birçok mantar ve mayanın neden olduğu hastalıklarla mücadelede kullanılmaktadır. Bitkilerde külleme denilen hastalığa sebebiyet veren *Podosphaera fusca* mantarına karşı kullanılan bir antibiyotik olduğu bildirilmektedir (Romero ve ark. 2007). Diğer yandan, *Saccharomyces cerevisiae*'ya (Latoud ve ark. 1987) ve *Penicillium notatum*'a karşı da etkili olduğu da bildirilmektedir (Xianqing ve ark. 2010).



Şekil 2.21. Îturin (<http://blogs.princeton.edu>, 2017)

2.6.9. Zwittermisin

B. cereus tarafından nonribozomal olarak sentezlenen zwittermisin, 5 aminoasitten oluşan bir antibiyotiktir (Şekil 2.22). Mantarların neden olduğu bazı bitki hastalıklarında etkili olduğundan dolayı tarım endüstrisi için önemli bir antibiyotik olduğu bildirilmektedir (Rosovitz ve ark. 1998). Bir çalışmada, *Phytophthora medicaginis*'in gelişimini inhibe ederek sebep olduğu hastalığın engellendiği bildirilmektedir (Silo-Suh ve ark. 1994).



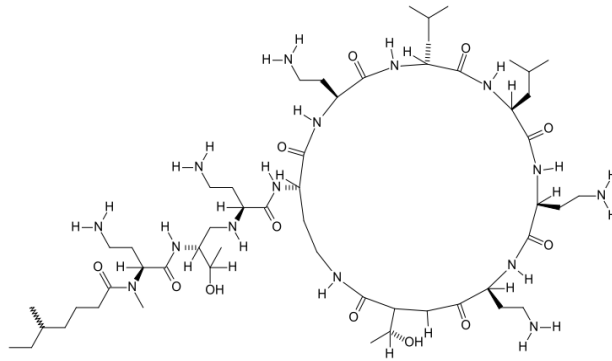
Şekil 2.22. Zwittermisin (http://en.wikipedia.org/wiki/Zwittermicin_A, 2017)

2.6.10. Cerein

B. cereus tarafından üretilen cereinin, Gram pozitif bakterilerin geniş bir bölümüne etki eden bir antibiyotik olduğu bildirilmektedir (Oscáriz ve ark. 1999). Cereinin özellikle *Listeria innocua*'ya karşı etkili olduğu ifade edilmektedir (Sebei ve ark. 2007). *Micrococcus luteus*'a karşı da etkili olduğu ifade edilen (<http://bactibase.pfba-lab-tun.org>) bu antibiyotiğin, Gram negatif bakterilere karşı inaktif olduğu bildirilmiştir (Oscáriz ve Pisabarro 2000).

2.6.11. Polimiksinler

Bacillus cluster ve özellikle *Bacillus polymyxa*'dan elde edilen, polipeptid antibiyotiklerden olan polimiksinler, A, B, C, D, E olmak üzere beş çeşitten oluşan 10 aminoasitlik nonribozomal yolla üretilen bir antibiyotiktir (Şekil 2.23). Katyonik sürfaktanlar gibi etki eden ve hücre zarının yapısını bozan polimiksinlerin, tedavide daha çok B ve E tipinin kullanıldığı bildirilmektedir. Gram pozitif bakterilere ve anaeroblara etkisiz olan polimiksinler, Gram negatif bakterilere, özellikle *Pseudomonas aeruginosa* 'ya karşı etkilidir.



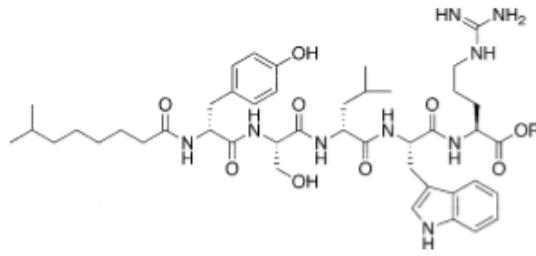
Şekil 2.23. Polimiksin (<http://www.antibioticslist.com/polymyxin-m.html>, 2017)

2.6.12. Laterosporamin, Laterosporin, Loloatin A ve Tauramamid

Laterosporamin ilk olarak *Brevibacillus laterosporus* 340-19 kültüründen izole edilmiştir. Bu antibiyotik in vitro ve in vivo olarak Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı aktif, suda çözünen bazik bir maddedir (Shoji ve ark. 1976).

Laterosporin ise ilk olarak 1949 yılında Barnes tarafından *Brevibacillus laterosporus* kültüründen izole edilmiştir. Laterosporin A ve B olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Suda çözünebilen basit polipeptitlerdir. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkilidir (Barnes 1949).

Tauramamid, patojenik *Enterococcus* sp.'ye karşı aktif bir lipopeptit antibiyotiktir (Şekil 2.24), Loloatin A ise bir siklik dekapeptit olarak tanımlanmış ve deniz habitatından izole edilen bir *Brevibacillus laterosporus* suşu tarafından üretilen antimikrobiyal maddedir. Bu antimikrobiyal madde, *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium* gibi Gram pozitif bakterilere, ayrıca *Escherichia coli* ve *Pseudomonas putrefaciens* gibi Gram negatif bakterilere karşı yüksek aktiviteye sahiptir (Ren ve ark. 2007).



Şekil. 2.24. Tauramamid (Desjardine ve ark. 2007)

2.7. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları

Antibiyotiklerin sıklıkla klinik tedavide antimikrobiyal madde olarak (Cruger 1984) çiftlik hayvanları ve bitkilerdeki hastalıkların tedavisinde, besinlerin korunmasında, biyokimyasal ve kültür ortamlarında seçici ajan olarak kullanılmaktadırlar (Waksman 1967, Porter 1976, Berdy 1986, Lancini ve ark. 1995).

2.7.1. Enfeksiyon Hastalıklarının Tedavisinde Kullanımı

Mikrobiyal kaynaklı hastalıkların iyileştirilmesi için antibiyotikler günümüzde çok yaygın bir kullanım alanı bulmuştur (Lancini ve ark. 1995).

2.7.2. Hayvancılıkta Kullanımı

Hayvanların çeşitli enfeksiyon hastalıklarında antibiyotikler tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bu alanda medikal amaçlı olarak penisilin, tetrasiklin, eritromisin,

streptomisin gibi antibiyotikler birçok ülkede kullanılmıştır. Diğer yandan besin değeri olan hayvanlarda pek çok antibiyotiğin kullanımına sınırlandırmalar getirilmiştir. Hayvancılıkta kullanılan antibiyotikler arasında monensin, rumensin ve salinomisin örnek verilebilir (Berdy 1986).

2.7.3. Antibiyotiklerin Ziraat Alanında Kullanımı

Kültür bitkileri, bakteriler, virüsler, böcek ve parazitlerin sebep olduğu bitkisel hastalıklardan korumak amacıyla birçok antibiyotik kullanılmaktadır (Waksman 1967, Arai ve ark. 1976, Drautz ve ark. 1985, Berdy 1986, Lancini ve ark. 1995).

Bakteriyal enfeksiyonların kontrolü amacıyla, özellikle *Erwina sp.* ve *Xhantomonas sp.* enfeksiyonlarına karşı streptomisin, fungal enfeksiyonların kontrolünde blastisidin S, siklohegzimid ve kasugamisin gibi antibiyotikler kullanılmaktadır. Antibiyotik özellik gösteren çok sayıda sentetik bileşiklerden bazıları bitki zararlılarının kontrolünde herbisit olarak kullanılmaktadırlar (Lancini ve ark. 1995).

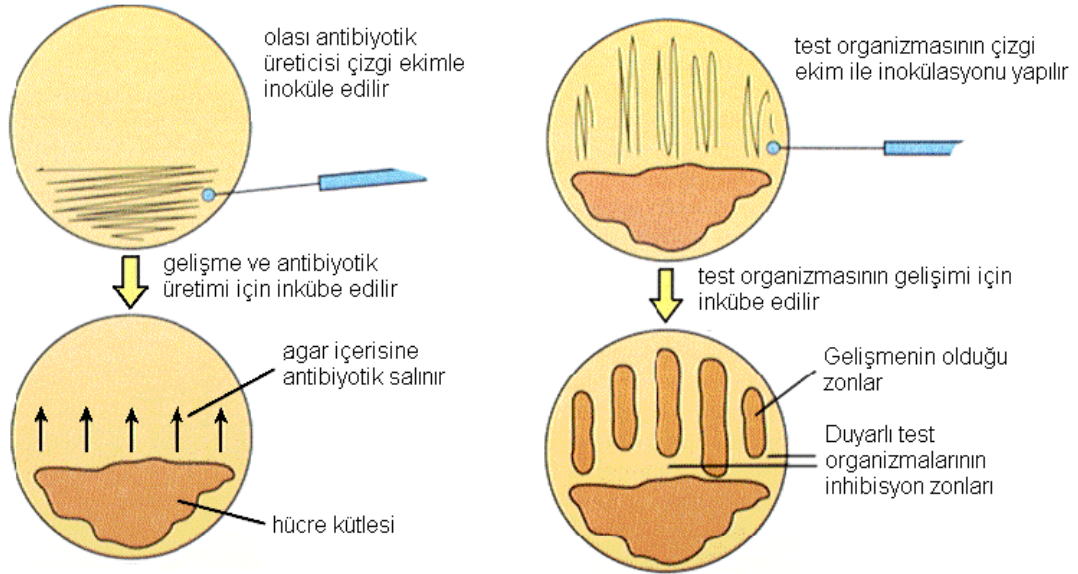
2.7.4. Araştırma Materyali Olarak Kullanımı

Tedavi edici olmayan fakat bilimsel araştırmalarda biyokimyasal araçlar olarak birçok antibiyotik kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları enzim inhibitörü olarak kullanılıp hücrel metabolizmada görev alan bir molekülün işlevinin saptanmasında kullanılmaktadır. Örneğin, protein sentezinde birçok bilgi, kloramfenikol ve siklohegzimidin inhibitör olarak kullanılması ile ortaya çıkarılmıştır (Waksman 1967, Umezawa ve ark. 1972, Lancini ve ark. 1995). Bunun yanısıra, prokaryot ve ökaryotların RNA polimerazları arasındaki farklılık rifamisin kullanılarak belirlenmiştir. Bunların yanında antibiyotikler, marker olarak veya konjugasyon denemelerinde verilen karakterlerdeki mikroorganizmaları seçmek amacı ile hedef enzimin genetik haritada gen pozisyonunun belirlenmesinde, bir veya daha çok antibiyotik direnç geni taşıyan vektörlerin gen transferi için kullanıldığı genetik mühendisliğinin bütün işlemlerinde, rekombinant klonların seçiminde kullanılmaktadır (Lancini ve ark. 1995). 1948 yılında Leben ve Keitt tarafından bulunan ve *Streptomyces* cinsine ait türler tarafından üretilen antimisin, solunumun elektron taşıma sisteminde, oksidatif inhibitör olarak kullanılmaktadır (Berdy 1986).

2.8. Antimikrobiyal Madde Tarama Yöntemleri

2.8.1. Karşıt-Çizgi Yöntemi

Mikrobiyal izolatlardan antimikrobiyal madde taramak amacıyla karşıt-çizgi (cross-streak) metodu uygulanabilmektedir (Şekil 2.25). İlk kez Alexander Fleming tarafından kullanılmış olan bu yöntemde, olası antimikrobiyal madde üreticisi olan mikroorganizma, petrinin üçte birlik kısmına ekilir ve uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra sıvı besi yerinde geliştirilmiş olan test bakterileri, olası antimikrobiyal madde üreticisi olan bakteri hücre kütesine dikey olacak şekilde çizgi ekim yapılarak uygun sıcaklıkta inkübe edilir. İnkübasyon sonunda ortaya çıkan inhibisyon zonları, test bakterilerinin üreyemediğini ve bu da bakterinin etkili bir antimikrobiyal madde ürettiğini göstermektedir (Madigan ve ark. 2000).

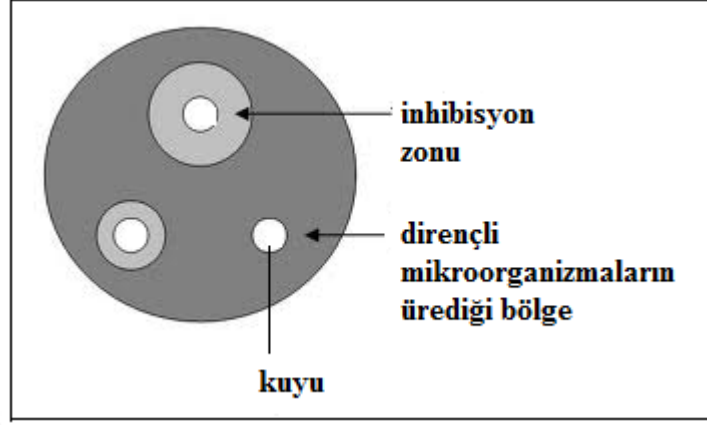


Şekil 2.25. Karşıt-çizgi yöntemi (Madigan ve ark. 2000)

2.8.2. Agar Kuyu Difüzyon Yöntemi

Agar kuyu difüzyon yönteminde, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyon agar plakları yüzeyine yayılır ve üzerine steril koşullarda kuyucuklar açılır. Daha sonra antimikrobiyal maddenin bulunduğu örnek, kuyucuklara belirli miktarlarda doldurulur. Böylelikle, antimikrobiyal madde agar içerisine yayılacak ve test bakterisine

etkili olduğu düzeylerde üremesini engelleyecektir. Bunun sonucunda, Şekil 2.26' da görüldüğü gibi kuyucukların çevresinde bakterilerin üremediğı dairesel bir inhibisyon zonu oluşacaktır (Nathan ve ark. 1978).

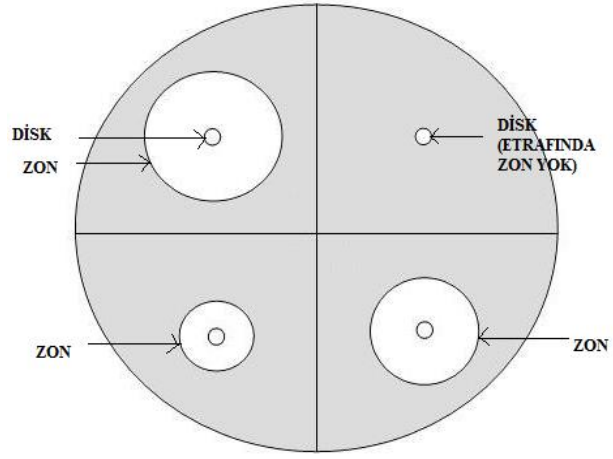


Şekil 2.26. Agar kuyu difüzyon yöntemi

(<http://archive.microbelibrary.org/edzine/details.asp?id=1796&Lang=>, 2017)

2.8.3. Agar Disk Difüzyon Yöntemi

Agar disk difüzyon yöntemi, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi olarak bilinmektedir. Belirli miktarlarda antimikrobiyal madde emdirilmiş diskler, test bakterilerinden hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve etkili olduğu düzeylerde test bakterilerinin üremesini engeller. Bunun sonucunda, Şekil 2.27' de görüldüğü gibi disk çevresinde bakterilerin üreyemediğı dairesel bir inhibisyon zonu oluşur (Kirby ve ark. 1957, Bauer ve ark. 1959).



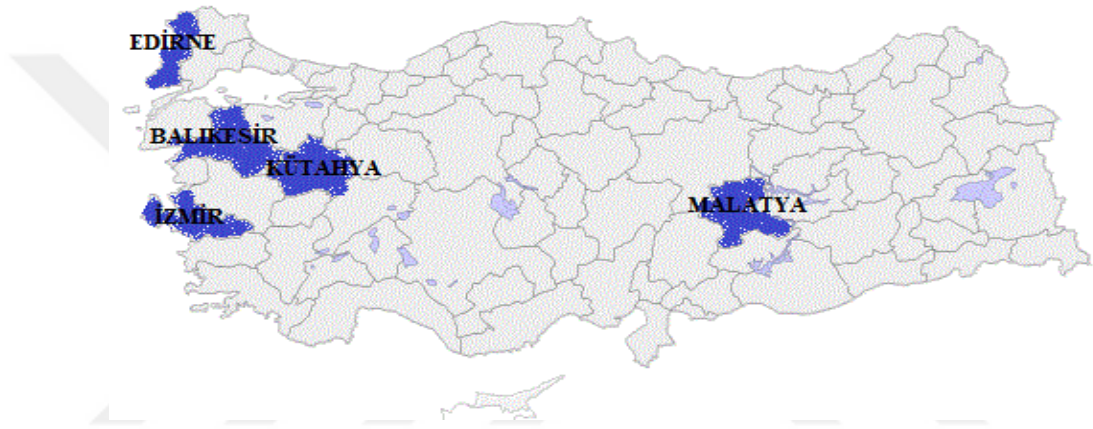
Şekil 2.27. Agar disk difüzyon yöntemi

(<http://www.kmle.co.kr/search.php?Search=disk+diffusion+method&Page=2>, 2017)

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tez çalışmasında daha önce Uludağ Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvar'ında Yüksek Lisans tez çalışmasında doğal kaynaklarımız olan topraklardan izole edilmiş olan antimikrobiyal madde üretme potansiyeline sahip 5 adet *Bacillus* sp. kullanılmıştır. Kullanılan toprak örneklerinin alındığı iller; Kütahya, İzmir, Malatya, Edirne ve Balıkesir' dir. (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Toprak örneklerinin alındığı iller (<https://www.mgm.gov.tr>, 2017)

Antimikrobiyal madde taranmasında kullanılmış olan test bakterileri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü ve Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Bölümü'nden temin edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Test bakterileri ve katalog numaraları

Test Bakterileri	Katalog Numaraları
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25212
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteri Üretiminde Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanılan bakterilerin saklanması ve geliştirilmesi amacıyla Çizelge 3.2' de verilen besiyerleri kullanılmıştır. Bakteri kültürleri, 30 günde 1 kez yeniden hazırlanan agarlı besiyerine aşılanarak korunmuştur. Kullanılacak *Bacillus* sp.'ler ve test bakterileri, Çizelge 3.2' de verilen bakteri geliştirme besiyerinde geliştirilmiştir.

Çizelge 3.2. Bakteri üretiminde kullanılan besiyerleri

İÇERİK	KÜLTÜR SAKLAMA BESİYERİ (%g)	BAKTERİ GELİŞTİRME BESİYERİ (%g)
Nutrient Broth	0.8	0.8
NaCl	0.8	-
Agar	2.0	-
pH	7.0	7.0

3.2.2. 16S rRNA Analizi

Antimikrobiyal madde üretme potansiyeline sahip 5 adet *Bacillus* sp. suşunun hizmet alımı ile 16S rRNA analizi yapılmış (RefGen, Ankara) ve bakteriler tür düzeyinde adlandırılmıştır. Bakteriyel tanımlama ve filogenetik analiz için genomik DNA izolasyonu, Qiagen Blood&Tissue kiti (Qiagen, Montreal, PQ, Canada) kullanılarak yapılmıştır. 16S rRNA gen amplifikasyonu evrensel primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunlar; 27F: 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' ve 1492R: 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. Amplifiye sekanslar ABI 3100 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) Genetik Analiz cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Sekanslar BLAST kullanılarak GenBank database (NCBI) ile karşılaştırılmıştır (Altschul 1990). Suşların 16S rRNA gen sekansı CLUSTAL W programı kullanılarak *Bacillus* türleri ile hizalandırılmıştır (Thompson 1994). MEGA 6.0 software (Tamura 2007) ile filogenetik analiz tamamlanmış ve Neighbour joining yöntemi ile ilişkili organizmalar analiz edilerek filogenetik ağaç çizilmiştir (Saitou ve Nei 1987).

3.2.3. Karşıt-Çizgi Yöntemi ile Antimikrobiyal Madde Taranması

Bacillus sp.'lerin antimikrobiyal madde üretilip üretilmediğini belirlemek için karşıt-çizgi (cross-streak) testi kullanılmıştır (Madigan ve ark. 2000). Bu amaçla *Bacillus* sp. Nutrient agarlı petri kabının yarısına yatay bir şekilde ekilmiş ve 37 °C'de 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda Nutrient Broth besiyeri yerinde bir gecelik kültür olarak üretilen test bakterileri (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* ve *Staphylococcus aureus*) *Bacillus* sp. hücre kitlesine karşıt olacak şekilde çizgi ekim yapılarak 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan inhibisyon zonları mm olarak ölçülmüştür.

3.2.4. Antimikrobiyal Madde Üretimi İçin Kullanılan Besiyeri

Bacillus sp.'lerin antimikrobiyal madde üretim kapasitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılan besiyeri Çizelge 3.3'te belirtilmiştir. Besiyeri pH' sı 7.0' ye ayarlandıktan sonra 121 °C'de 15 dk. boyunca otoklavda sterilize işlemi yapılmıştır. Glukoz besiyeri ortamına otoklav işleminden sonra filtrasyon (0,45 µm) ile sterilize edilerek ilave edilmiştir.

Çizelge 3.3. Antimikrobiyal madde üretiminde kullanılan besiyeri (Ilić ve ark. 2010)

¹ Besiyerinde Soy Bean yerine Yeast Ekstrakt kullanılmıştır.

İÇERİK	BESİYERİ (g/L)(Ilić ve ark. 2010)
Glukoz	15
MgSO₄	0,5
Soy Bean¹	1
CaCO₃	3
(NH₄)₂HPO₄	0,5
pH	7.0

3.2.5. Bakteri Üretim Koşulları

Bacillus sp.'ler, içerisinde 30 ml bakteri geliştirme besiyeri (bkz. Çizelge 3.2) bulunan 100 mL' lik erlene inoküle edilmiş, 37 °C'de 150 devir/dk çalkalama hızına sahip inkübatörde 18 saat süre ile üretilmiştir.

Bakterinin 18 saatlik gecelik kültürünün 600 nm'deki optik yoğunluğu (OD) spektrofotometre (Beckman Coulter-DU 700) kullanılarak, bir standart elde edebilmek amacıyla, steril fizyolojik tuzlu su ile 0,3'e (10^7 hücre/mL) ayarlanmıştır. 100 ml antimikrobiyal madde üretim besiyeri (bkz. Çizelge 3.3) bulunan 250 ml'lik erlenlere %10 oranında aşılansarak 30 °C'de 150 devir/dk' da 96 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bakteri üremesi ve antimikrobiyal üretim tayini 24, 48, 72 ve 96. saatlerde yapılarak bakterinin gelişme grafiği çıkarılmış ve maksimum antimikrobiyal madde üretim zamanı belirlenmiştir.

3.2.6. Bakteri Üremesinin Ölçülmesi

Bakteri üremesinin belirlenmesi amacıyla, besiyerinin bulanıklığı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. 3.2.5' te belirtildiği üzere inkübasyona bırakılan besiyerlerinden, belirlenen saatlerde (24, 48, 72 ve 96) örnek alınarak, 600 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur. Antimikrobiyal madde üretiminde kullanılan besiyeri kör olarak kullanılmıştır ve optik yoğunluk (OD) değerlerinin okunmasıyla bakteri üreme miktarı belirlenmiştir. Elde edilen optik yoğunluk (OD) değişimleri, zamana karşı grafiklenerek gelişme eğrileri oluşturulmuştur.

3.2.7. Antimikrobiyal Madde Üretiminin Tayini

Antimikrobiyal madde üretiminin tayini için Agar Kuyu Difüzyon Metodu (Agar Well Diffusion Method) kullanılmıştır (Sen ve ark. 1995). Antimikrobiyal madde üretim besiyerlerinden 24 saatte bir örnek alınarak 0,22 µm çapa sahip filtreden geçirilmiş ve steril ependorf tüplerde +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Test bakterileri Nutrient Broth'ta 24 saat boyunca üretilmiş ve yoğunlukları McFarland standardı kullanılarak 0,5 olarak ayarlanmıştır. Bu kültürler Nutrient agarlı petri kabının tamamına steril pamuk uçlu eküvyon çubuk ile yayılmıştır. Petri kaplarında steril şartlarda 7 mm' lik kuyucuklar açılarak filtre edilen örneklerden bu kuyucuklara

100 µl doldurulmuştur. Ardından 24 saat boyunca 37 °C' de inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda kuyucuklar etrafında meydana gelen inhibisyon zonları cetvelle ölçülmüştür.

3.2.8. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi

Üretim ortamında bulunan aminoasit, karbon, azot ve metal kaynakları yerine aynı oranlarda olmak üzere farklı aminoasit, karbon, azot ve metal kaynakları denenmiştir.

Aminoasit olarak alanin, fenilalanin, valin, tirozin, lizin, histidin, sistin, arginin ve glutamik asit kullanılmıştır.

Karbon kaynağı olarak glukoz (kontrol), sukroz, maltoz, nişasta ve buğday kepeği kullanılmıştır.

Organik azot kaynağı olarak yeast ekstrakt (kontrol) corn steep liquer, tripton, skim milk ve inorganik azot kaynağı olarak $(NH_4)_2NO_3$ ve $(NH_4)_2SO_4$ kullanılmıştır.

Metal kaynağı olarak $MgSO_4+CaCO_3$ (kontrol), $CaCl_2$, $FeSO_4$, $LiSO_4$, $NaCl$, KCl , $MnSO_4$ ve $MgSO_4$ kullanılmıştır.

3.2.9. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi

Üretim ortamının pH' sı (4.0, 5.0, 6.0, 7.0 (kontrol), 8.0 ve 9.0) ve sıcaklığı (30, 37 (kontrol), 40, 45, 50 ve 55) farklı değerlerde ayarlanmış ve antimikrobiyal madde üretimi için optimum pH ve sıcaklık değeri saptanmıştır.

Ayrıca maksimum antimikrobiyal madde sentezinin gözlemlendiği besinsel ve fiziksel koşullar kombine edilerek, yeni oluşturulacak olan modifiye ortamda antimikrobiyal madde veriminin artması sağlanması amaçlanmıştır.

3.2.10. Antimikrobiyal Maddenin Kısmi Saflaştırılması

Antimikrobiyal madde üretim ortamında maksimum üretimin elde edildiği saate kadar yapılan üretim sonucu bakteriler santrifügasyonla (5000 rpm, 15 dk., +4 °C) uzaklaştırılmış ve süpernatant kullanılmıştır. Süpernatant birbirini takip eden 3 basamakta kısmi olarak saflaştırılmıştır. Tüm saflaştırma adımları +4 °C'de yapılmıştır.

3.2.11. Amonyum Sülfat Çöktürmesi

Süpernatant buz dolu bir kap içinde manyetik karıştırıcı kullanılarak, havanda toz haline getirilmiş %80 amonyum sülfat eklenerek +4 °C'de çok yavaş bir şekilde çöktürülmüştür. Bu şekilde hazırlanan karışım yine +4 °C'de manyetik karıştırıcıda karıştırılarak bir gece bekletilmiştir. Presipitat santrifügasyonla (10.000 rpm, 20 dk., +4 °C) toplanmış ve 20mM fosfat tamponunda (pH 6,8) çözdürülmüştür.

3.2.12. Diyaliz

Amonyum sülfat çöktürmesi sonucu elde edilen presipitat 20mM fosfat (pH 6,8) tamponunda çözdürülmüştür. Yarı geçirgen bir membrandan oluşan diyaliz tüpü (Selüloz membran, Sigma-Aldrich, MWCO-Molecular Weight Cut Off 3,5 kDa, 25 mm x 16 mm) uygun uzunlukta kesilmiş ve bir ucu sıkıca bağlanmıştır. Örnek, diyaliz tüpüne aktarılmış ve diğer ucu da ip ile bağlanmıştır. Hazırlanan diyaliz tüpü, aynı tampon içeren 1 L'lik beherin içine alınmış ve karışımın sürekli hareketi sağlanmıştır. Diyaliz işlemi manyetik karıştırıcı üzerinde tampon sık sık değiştirilerek +4 °C'de gerçekleştirilmiştir. Amonyum sülfatın tamamen uzaklaşıp uzaklaşmadığını anlamak için diyalizde olan tampondan 1-2 damla alınmış ve üzerine 0,1 N HCl ve doygun BaCl₂ çözeltisinden 1-2 damla damlatılmıştır. Bulanıklık görülmemesi halinde diyaliz işlemine son verilmiştir (Trautwein ve Kuhlmann 1982).

3.2.13. Ultrafiltrasyon ile Diyalizatın Konsantre Edilmesi

Diyalizat, ultrafiltrasyon (Centricon YM-3 MW cut-off 3,000) tüpüne alınmış ve 4°C'de 5000 rpm'de 15 dakika sürelerle istenilen hacme kadar konsantre edilmiştir.

3.2.14. Antimikrobiyal Maddenin Moleküler Ağırlığının Tespiti

Antimikrobiyal maddenin moleküler ağırlığının belirlenmesi için Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır (Laemmli 1970).

3.2.15. Çözeltilerin ve Jelin hazırlanması

- a) Polimer matriksi kurmak için akrilamid ve N,N'-metilen-bisakrilamid kullanılmıştır. Bunun için; 28,8 g akrilamid ve 1,2 g bis akrilamid tartılıp distile su ile toplam 100 mL içerisinde çözdürülmüş ve Whatman No:1 filtre kâğıdından süzülerek,

kahverengi bir şişede 0-5 °C’de muhafaza edilmiştir. Bu çözelti 2 ay süreyle bozulmadan saklanabilmektedir (Sarıkaya 1995).

b) 1 M Tris-HCl (pH 6,8)

Çözeltiyi hazırlamak için 12,11 g Tris Base tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra pH 6,8’ e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.

c) 1 M Tris-HCl (pH 8,8)

Çözeltiyi hazırlamak için 12,11 g Tris Base tartılmış, bir miktar suda çözüldükten sonra pH 8,8’e ayarlanmış ve distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.

d) %10’ luk Amonyum Per Sulfat (APS)

10 g APS tartılmış ve hacmi distile su ile 100 mL’ye tamamlanmıştır.

e) Örnek Tamponu

100 mL için stok solüsyon:

1 M Tris-HCl (pH 6.8)	6,5 mL
Gliserol	10 mL
SDS	2 g
dH ₂ O	100 mL

Her bir örnek için 100 µl stok solüsyondan alınmış ve üzerine 5 µl β-merkaptotanol eklenmiştir. Spatül ucu kadar Bromfenol Mavisi eklenip karıştırılmıştır.

f) Yürütme Tamponu (Running Buffer)

Tris Base	3g
Glisin	14,4 g
SDS	1g
dH ₂ O	1L

g) Yıkama Çözeltisi

İzopropil alkol	250 mL
Asetik asit	100 mL
dH ₂ O	650 mL

h) Boyama Çözeltisi

1,5 g Commassie-brilliant R- 250 mavisi 250 mL izopropil alkolde çözülmüş, daha sonra üzerine 100 mL asetik asit ve 650 mL distile su eklenmiştir.

Jelin Hazırlanması

SDS-PAGE için 2 tip jel hazırlanır.

1) % 12,5 Ayırma Jeli hazırlanışı (2 jel için)

dH ₂ O	2,0 mL
1M Tris-HCl (pH:8.8)	4,4 mL
%1 SDS	1,2 mL
%30 Akrilamid	4,2 mL
%3 Amonyum Persülfat	0,2 mL
TEMED	8 µL

2) % 4 Yükleme Jeli hazırlanışı (2 jel için)

dH ₂ O	3,06 mL
1M Tris-HCl (pH:6.8)	1260 µL
%1 SDS	50 µL
%30 Akrilamid	660 µL
%3 Amonyum Persülfat	100 µL
TEMED	5 µL

Jellerin hazırlanmasında dikkat edilmesi gereken en önemli nokta TEMED'in eklenmesidir. TEMED polimerleştirici ajan olduğundan, eklendikten sonra pipet ile iyice karıştırmalı ve vakit kaybetmeden çözelti cam plakalar arasına dökülmelidir. Örnekler hazırlandıktan sonra, cam plakalar elektroforez (Bio-Rad) mandalına yerleştirilmiş ve sızma olmayacak şekilde iyice sabitlenmiştir. Ayırma jeli, mikropipet yardımıyla cam plakaların arasına yavaşça dökülmüştür. Jel içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmiştir. Jel yüzeyinin düzgün olması için üzerine izopropil alkol dökülerek ince bir tabaka oluşturulmuştur. Polimerleşme tamamlandıktan sonra (yaklaşık 30 dakika) alkol distile su ile yıkanmış, ardından plakaların arasında kalan su, kurutma kağıdı ile kalan su plakaların arasından alınmıştır. Daha sonra sıkıştırma jeli de aynı yöntemle plakaların arasından dökülmüş ve polimerleşmesi beklenmeden elektroforez tarağı dikkatlice yerleştirilmiştir. Polimerleşme tamamlandıktan sonra (yaklaşık 30 dakika) tarak kuyucukların arasının bozulmamasına dikkat ederek

çıkarılmıştır. Kuyucuklar önce saf suyla sonra da tank tamponu ile enjektör yardımıyla yıkanmıştır.

3.2.16. Örneklerin Hazırlanması ve Elektroforez Koşulları

Antimikrobiyal maddenin moleküler ağırlığının belirlenmesi amacıyla 11 farklı protein içeren (Cell Signalling Technology Prestained Protein Marker 13953S) çözelti standart olarak kullanılmıştır. Diyaliz sonrası konsantre edilen örneklerden 75 µl, ependorf tüplerine konularak üzerlerine 25 µl örnek tamponu (bkz. 3.2.15.e) eklenerek hacim 100 µl' ye tamamlanmıştır. Örnekler 5 dakika süreyle kaynar suda bekletilmiştir. Daha önce hazırlanmış olan jel, elektroforez tankına oturtularak alt ve üst hazneleri yürütme tamponu (bkz. 3.2.15.f) ile doldurulmuştur. Tankın her iki tarafına da konmuş olan jellerdeki kuyucukların içerilerine, mikropipet yardımıyla 15 µl örnek konmuş ve tanka akım verilerek elektroforez işlemi başlatılmıştır. İzleme boyası jelin 1 cm altında kalacak hale geldiğinde ise elektroforez işlemi sonlandırılmıştır. Jele, örneklerin düzgün sırada ilerlemesi için önce 80 V, örnekler ayırma jeline geçtikten sonra 150 V sabit akım verilmiştir. Elektroforez işlemi yaklaşık 2,5 saat sürmüştür.

3.2.17. Boyama ve Boyanın Uzaklaştırılması

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel dikkatli bir şekilde plakaların arasından çıkarılmıştır. Sıkıştırma jeli, ayırma jelinden ayrılmış ve marker yüklenen kuyucuğun kenarı işaretlenmiştir. Plakların arasından çıkarılan jel, içerisine boyama çözeltisi (bkz. 3.2.15.h) bulunan kaba konarak 1 gece çalkalayıcıda bekletilmiştir. Boyanan jel, içinde yıkama çözeltisi (bkz. 3.2.15.g) bulunan başka bir kaba alınarak boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır. Örneğin molekül ağırlıkları, standart proteinler baz alınarak belirlenmiştir.

3.2.18. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

MİK, mikroorganizma gelişimini engelleyen en düşük antimikrobiyal konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır (Çakı 2009). *Bacillus* sp.'lerin ürettiği potansiyel antimikrobiyal bileşiğin MİK değerleri test bakterilerine karşı araştırılmıştır. 18-24 saat boyunca Müller Hilton besiyerinde üretilen test bakterilerinin yoğunlukları McFarland

standartı kullanılarak 0,5 olarak ayarlanmıştır. Elde edilen antimikrobiyal bileşimin MİK değerlerini belirlemek amacıyla Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsünün belirlediği yönerge (CLSI 2009)'ye göre 96 kuyucuklu mikropalakalar kullanılarak mikrodilüsyon yöntemi gerçekleştirilmiş ve standart antibiyotik olarak ampisilin ve gentamisin kullanılmıştır. Kullanılan standart antibiyotikler ve bileşik 256-0.008 µg/mL arasında olacak şekilde 16 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır.

Standart antibiyotiklerin hazırlanışı: Antibiyotiklerden 1000 µg/mL'lik ana stok solüsyon hazırlamak için 5 mg tartılıp 0,5 mL metanol ilave edilerek çözünmesi sağlanmış, ardından PBS (fosfat tuzlu tampon) ile 5 mL' ye tamamlanmıştır. 0,22 µm'lik mikrofiltreden geçirilerek sterilizasyon işlemi yapılmıştır. Antibiyotik stok solüsyonlarının ve yeni bileşenin dilüsyonları için Müller Hilton besiyeri kullanılmıştır.

Antibiyotiklerin MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla kuyulara 50'şer µL dilüe edilen antibiyotik çözeltisi ve 50'şer µL test bakterileri ilave edilmiştir. Yeni bileşenin MİK değerinin belirlenmesi amacıyla ise 50 µL dilüe edilen yeni bileşen ve 50 µL test bakterileri ilave edilmiştir. Ardından mikropalakalar, 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda 595 nm'de absorbans değerleri ölçülerek (BİORAD İMARK Spektrofotometre) sonuçlar kaydedilmiştir.

3.2.19. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC-Biyootografi)

İnce tabaka kromatografisi Bharti ve ark. (2012) tarafından yapılmış olan TLC-biyootografi yönteminden modifiye edilerek uygulanmıştır. Bu yöntemde göre TLC plakası (Silikagel 60, 20x20) 3 şerite bölünmüştür. Her bir şeride 10 µL standart antibiyotikler (streptomisin ve basitrasin) ve antimikrobiyal madde örneği emdirilerek havada kurutulmuştur. Kurutulan plakalar çözücü sistemde (Kloroform:Metanol; 9:1) yürütülmüştür. Plakanın sonuna kadar çözücü geçişinden sonra plaka şeritleri alınarak 60 °C' de 30 dk. pastör fırınında kurutulmuştur. İçerisinde 5 mL üremiş kültür bulunan 20 mL soft agar (%1) petri kaplarına dökülmüştür. Plaka şeritleri ters olarak petri kaplarının ortasına yerleştirilmiş ve petri kapları düz bir şekilde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bileşenlerin gösterdiği inhibisyon zonları tespit edilmiştir.

Yapılan diğer biyootografik analizde (Panda ve ark. 2011) ise 10 µL standart antibiyotikler (streptomisin ve basitrasin) ve örnek, TLC plakalarının tabanından 2 cm

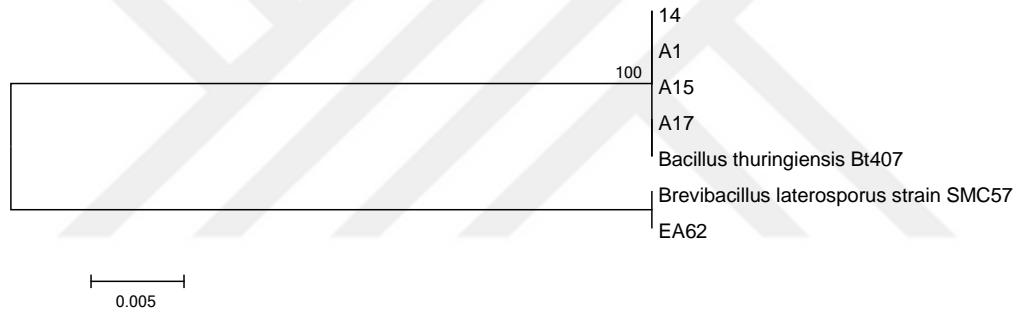
yukarı olacak şekilde uygulanmış ve havada kurutulmuştur. Kurutulan plakalar çözücü sistemde (Kloroform:Metanol; 9:1) yürütülmüştür. Plaka üsten 2 cm kalacak şekilde çözücü geçişinden sonra 110 °C'de 30 dk. pastör fırınında kurutulmuştur. İçerisinde 5 mL üremiş kültür bulunan 20 mL soft agar (%1) steril koşullarda TLC plakası üzerine yayılmış ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu örneklerin gösterdiği Rf değerleri hesaplanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. 16S rRNA Analizi

Daha önce Yüksek Lisans Tez çalışması sonucu elde edilen antimikrobiyal madde üretim potansiyeli olan 5 adet *Bacillus* sp. suşlarının 16S rRNA gen sekansına dayalı bir filogenetik ağaç ile tür düzeyinde isimlendirilmesi yapılmış ve bunlardan 4 tanesi *Bacillus thuringiensis* ve 1 tanesi *Brevibacillus laterosporus* ile %100 sekans benzerliği göstermiştir (Şekil 4.1). Bu 5 bakterinin 1492R ve 27F primerleri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizileri Çizelge 4.1, Çizelge 4.2, Çizelge 4.3, Çizelge 4.4, Çizelge 4.5, Çizelge 4.6, Çizelge 4.7, Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.1. *Bacillus thuringiensis* A14, A1, A15, A17 ve *Brevibacillus laterosporus* EA62' nin 16S rRNA bölgelerinin filogenetik ağacı

Çizelge 4.1. *Bacillus thuringiensis* A14' ün 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A14-1492R_E08

```
CCTCATTCTTCTTGTACACCATAGGCGGCTGGCTCCAAAGGTTACCCAC
CGACTTCGTTCGGTAGTTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTAC
AAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCG
ATTCCAGCTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGAACG
GTTTTATGAGATTAGCTCCACCTCGCGGTCTTGCAGCTCTTTGTACCGTC
CATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACG
TCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCC
AACTTAATGATGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCAC
TCTGCTCCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTTTTCAGAGGATGTCAA
GACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACC
GCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTA
CTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGCGGAA
ACCTTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTAT
CTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAGAC
CAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTCA
CCGCTACACATGGAATTCCACT
```

Çizelge 4.2. *Bacillus thuringiensis* A14' ün 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A14-27F_A06

```
TTTGCAGTAGGCGACGTGCTATACATGCAGTCGAGCGATGGATTAGAGCT
TGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATA
TTTTGAACTGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTAT
GGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGA
GACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT
GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGG
TCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGG
CACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG
CCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTACA
GCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACC
GTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGG
AATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTG
GCCAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCGTGG
AGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGT
GCTAAGTGTTAGAG
```

Çizelge 4.3. *Bacillus thuringiensis* A1' in 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A1-1492R_G08

```
CCCAGGACTCTAGTACCACCATAGAGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCC  
CACCGACTTCCGGGAGTTCCAAACTCTCGGGGGGGGACGGGGGGGGGGTA  
CAAGGCCCGGAAACGTATTCCCCGGGGATTGTTGATCCGGGATTACTAGC  
GATTCCAGTTTCTTGTAGGGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAAAAC  
GGTTTTATGAAATTACTTCCACCTCGGGGTCTTGCAGTTCTTTGTACCGT  
CCATTGAAGCACGGGGGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGAC  
GTCTTCCCCACCTTCTCCGTTTGTACCCGGAAGTCACCTTAAAGGGCC  
CAACTAAAGGAGGGCAACTAAAATCAAGGGTTGCGCTCGTTGGGGAACTT  
ACCCACCATCTCACGACACGAGTTGACAACAACCATGCACCACCTGTCA  
CTCTGTTCCCGAAGGAAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAAAGAATGTCA  
AAACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAACCACATGTTCCAC  
CGCTTGGGCGGGCCCCGTC AATTCTTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGA  
ACTCCCCAGGCGGAGGGCTAATGGCGT TAACTTCAGCACTAAAGGGCGGA  
AACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGGGTGGGACTACCAGGGT  
ATCTAATCCTGGTTGGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTACA  
GACCAGAAAGTCGCCTCCGCCACTGGGTGTCCCTCCATAATCTCTACGCA  
TTTCACCGCTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTCTTGGCACTCA
```

Çizelge 4.4. *Bacillus thuringiensis* A1' in 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A1-27F_C01

```
CACACATCGCACTCGAGCGACTGGATTAAGAGCTTGCTCTTATCCAGTTA
GCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATAGGAGTGGGAT
AACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGT
TCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAGCGGGTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCACACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACG
GAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTG
TTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTT
TCTTAAGTCTGATGTGAGAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCT
GGTCTGTAAGTACTGACTG
```

Çizelge 4.5. *Bacillus thuringiensis* A15' in 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A15-1492R_D08

```
CTCTGTCTCTTGTACACTATAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCCCACC
GACTTCGGTAGTTACAAACTCTCGGGGGGGGACGGGGGGGGGGTACAAGG
CCCGGGAACGAATTCACCGCGGAATGTTGATCCGCGATTACTAGCGATTC
CAGTTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAAAACGGTTT
TATGAAATTAGTTCCACCTCGGGGTCTTGCAGTTCTTTGTACCGTCCATT
GTAGCACGGGGGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAAAGGGCCCAACT
AAATGATGGCAACTAAAATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGAACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGTTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTG
TTCCCGAAGGAAAAGCCCTATCTCTAGGGTGGTCAAAGGATGTCAAGACC
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GGGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCC
CCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGGCGGAAAC
CCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGGCGTGGACTACCAGGGTATC
TATTCCTTGTTTGGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAG
ACCAGAAAGTCGCCTTCCGCCACTGGTGTCTCCATATCTCTACGCATTT
CACCGCTTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGGCACTCCAAGG
```

Çizelge 4.6. *Bacillus thuringiensis* A15' in 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A15-27F_D08

```
CTCTGTCTCTTGTACACTATAGGCGGCTGGCTCCAAAAGGTTACCCCACC
GACTTCGGTAGTTACAAACTCTCGGGGGGGGACGGGGGGGGGGTACAAGG
CCCGGGAACGAATTCACCGCGGAATGTTGATCCGCGATTACTAGCGATTC
CAGTTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAAAACGGTTT
TATGAAATTAGTTCCACCTCGGGGTCTTGCAGTTCTTTGTACCGTCCATT
GTAGCACGGGGGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCACCTTAAAGGGCCCAACT
AAATGATGGCAACTAAAATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGAACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGTTGACGACAACCATGCACCACCTGTCATTCTG
TTCCCGAAGGAAAAGCCCTATCTCTAGGGTGGTCAAAGGATGTCAAGACC
TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCAAATTAACCACATGCTCCACCGCTT
GGGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGTACTCC
CCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTAACTTCAGCACTAAAGGGGCGGAAAC
CCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGGCGTGGACTACCAGGGTATC
TATTCCTTGTTTGGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTCAGTTACAG
ACCAGAAAGTCGCCTTCGCGCACTGGTGTCTCCATATCTCTACGCATTT
CACCGCTTACACATGGAATTCCACTTTCCTCTTCTGGCACTCCAAGG
```


Çizelge 4.7. *Bacillus thuringiensis* A17' nin 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A17-1492R_F08

```
CCTAGACTGTCAGCACTATAGGCGCCTGGCTCCGACTGGTTACCCACCG
CCTTCGGTAGTGCAAACCTCTCGGGGGGGGACGGGGGGGGGGTCCAAGGCC
AGGGAACGTATTCCCCGGGGATTGTTGATCCGCGATTACTAGCAATTCCA
GTTTCTTGTAGGGGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAAAACGGTTTTA
TGAAATTAGTTCCCCCTCGGGGCCTTGCAGTTCTTTGTACCGCCATTGA
AGCACGGGGGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCTTCC
CCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGAAGTCACCTTAAAGGGCCCAACTAA
AGGAGGGCAACTAAAATCAAGGGTTGCGTTCGTTGGGGAACTTAACCCAA
CATCTCACGACACGAGTTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGTT
CCCGAAGGAGAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAAAGAATGTCAAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGGGTTGCTTCAAATTAACCACATGTTCCACCGTTTGG
GGGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGGCCGAACTCCCC
AGGGGGAGGGCTTATGGCGTTACCTTCAGCACTAAAGGGCGGAAACCCTC
TACCACTTAGCATTTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTATTC
CTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGTCAGTACCAGACCAGAA
AGTCGCCTCCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTACGCATTTCCACCGC
TACAC
```

Çizelge 4.8. *Bacillus thuringiensis* A17' nin 27F primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>A17-27F_B06

```
ACTGACTATGCTAGAGCAGAGTTGCTAGTCGAGTCGGTGGATCTAGACGC
TGTGCTCTCTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAAC
CTGCCATAAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATA
ACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACT
TATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC
AAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGAC
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGC
AATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTC
GGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGC
TGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGT
AAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCA
ACCGTGAGGGTTCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCA
GTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACTGACTGAGGCGCGAAAGCG
TGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
AGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCG
```

Çizelge 4.9. *Brevibacillus laterosporus* EA62' nin 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>EA62-1492R_C08

```
CCAAGCTACTACCCACCATACGGCGGCTGGCTCCTTACGGTTACCTCACC
GACTTCGGGTGTTGCAACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGC
CCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCC
GACTTCATGTAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAACTGAGATTGGTTTT
AAGAGATTAGCATCTTCTCGCGAAGTAGCATCCCGTTGTACCAACCATTG
TAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATC
CCCGCCTTCTCCGTCTTGTGACGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCCAACTG
AATGCTGGCAACTAAAGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCA
ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCACTG
CCCCGAAGGGAAGCTCTATCTCTAGAGCGGTCAGTGGGATGTCAAGACCT
GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTG
TGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCACTCTTGCGAGCGTACTCCC
CAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGGCACTAAGGGTATTGAAACCC
CTAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT
CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGTCAGTTACAGGGCCAGA
AAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGC
TACACGTGGAATACCACTTTCCTCTCCTGCACTCAAGCTACACAGTTTCC
AATGCGAACCGAGGTTGAGCCTCGGGCTTTAACATCAGA
```

Çizelge 4.10. *Brevibacillus laterosporus* EA62' nin 1492R primeri kullanılarak okunan 16S rRNA geninin kısmi DNA dizisi

>EA62-27F_G05

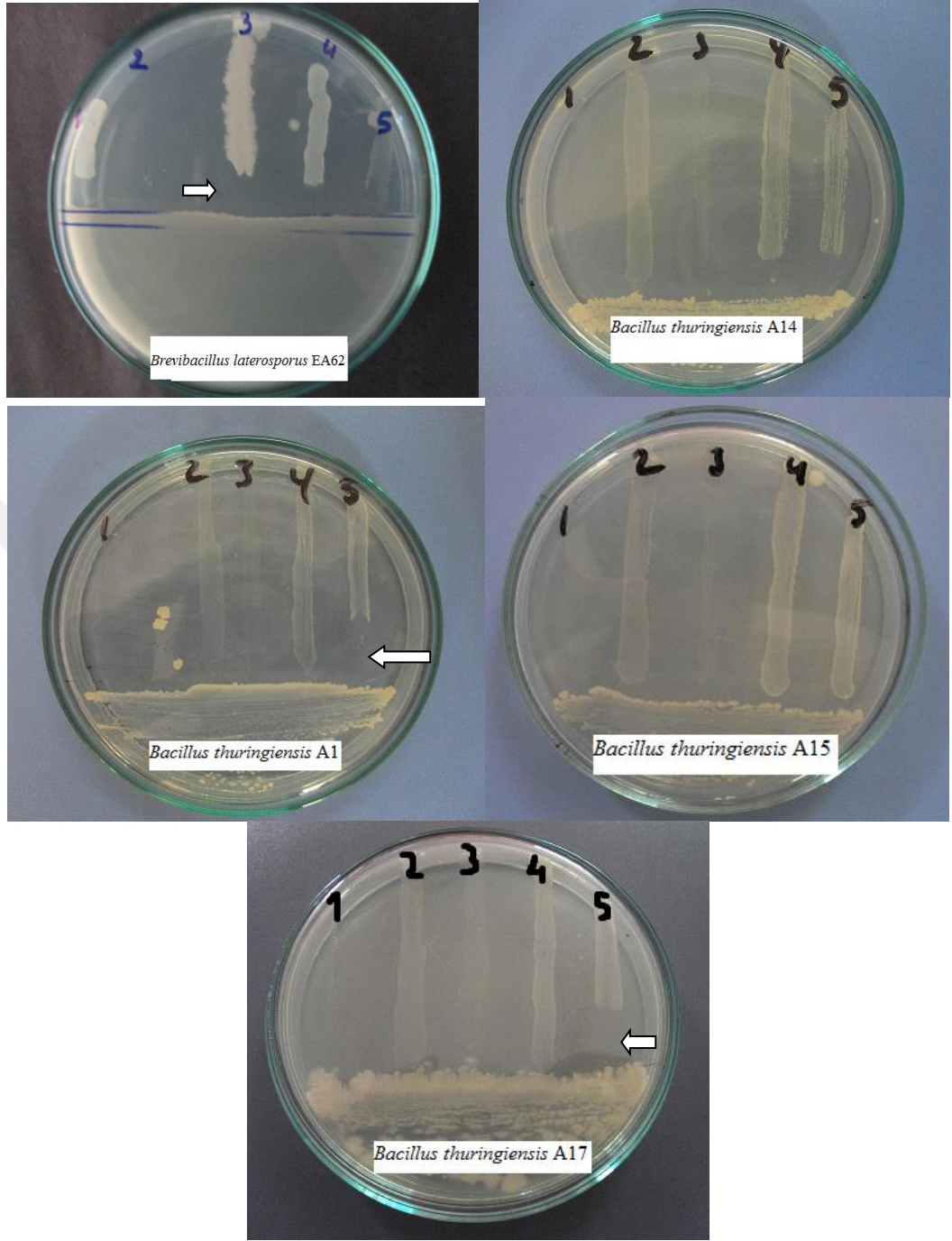
```
CTGCACTAGGCGCGTGCTATACTGCAGTCGAGCGAGGGTCTTCGGACCCT
AGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTAGGCAACCTGCCTGTGAGACTGGGA
TAACATAGGGAACTTATGCTAATACCGGATAGGGTTTTGCTTCGCCTGA
AGCGAAACGGAAAGATGGCGCAAGCTATCACTTACAGATGGGCCTGCGGC
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGGAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC
CGACCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACT
CCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGACGAAAGTCTGAT
GGAGCAACGCCGCGTGAACGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTT
GTTAGGGAAGAAACAGTGCTATTTAAATAAGGTAGCACCTTGACGGTACC
TAACGAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGC
TATGTAAGTCTGATGTTAAAGCCCGAGGCTCAACCTCGGTTTCGCATTGGA
AACTGTGTAGCTTGAGTGCAGGAGAGGAAAGTGGTATTCCACGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCT
GGGCCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGT
TTCAATACCCTTAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCCGCCTGGGG
GAGTACGCTCGCAAGAAGTGAAA
```

4.2. Karşıt-Çizgi Yöntemi ile Antimikrobiyal Madde Taraması

Bacillus thuringiensis A1, A14, A15, A17 ve *Brevibacillus laterosporus* EA62 ile yapılan karşıt-çizgi yöntemiyle antimikrobiyal madde taraması 3.2.3'e göre yapılmıştır. Çizelge 4.11'de görüldüğü üzere en büyük inhibisyon zonları *Bacillus thuringiensis* A1, A17 ve *Brevibacillus laterosporus* EA62 bakterilerinde görülmüştür. Kütahya ilinden alınan topraktan izole edilen *Bacillus thuringiensis* A1 ve Edirne'den alınan topraktan izole edilen *Bacillus thuringiensis* A17 en büyük inhibisyon zonunu (10 mm) *Escherichia coli*'ye karşı göstermiştir. Balıkesir ilinden alınan topraktan izole edilen ve *Brevibacillus laterosporus* EA62 olarak adlandırılan bakteri ise en büyük inhibisyon zonunu (10 mm) *Yersinia enterocolitica*'ya karşı göstermiştir (Şekil 4.2).

Çizelge 4.11. *Brevibacillus laterosporus* EA62 ve *Bacillus thuringiensis* A14, A1, A15, A17' nin test bakterilerine karşı inhibisyon zon çapları

Karşıt-Çizgi Yöntemiyle Antimikrobiyal Madde Taraması Sonucu Elde Edilen İnhibisyon Zon Çapları (mm)					
	<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	<i>Yersinia enterocolitica</i> (3)	<i>Enterococcus faecalis</i> (4)	<i>Escherichia coli</i> (5)
<i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62 (Balıkesir)	8	8	10	8	6
<i>Bacillus thuringiensis</i> A14 (İzmir)	-	-	6	8	8
<i>Bacillus thuringiensis</i> A1 (Kütahya)	-	-	-	-	10
<i>Bacillus thuringiensis</i> A15 (Malatya)	-	-	4	-	-
<i>Bacillus thuringiensis</i> A17 (Edirne)	-	-	-	-	10



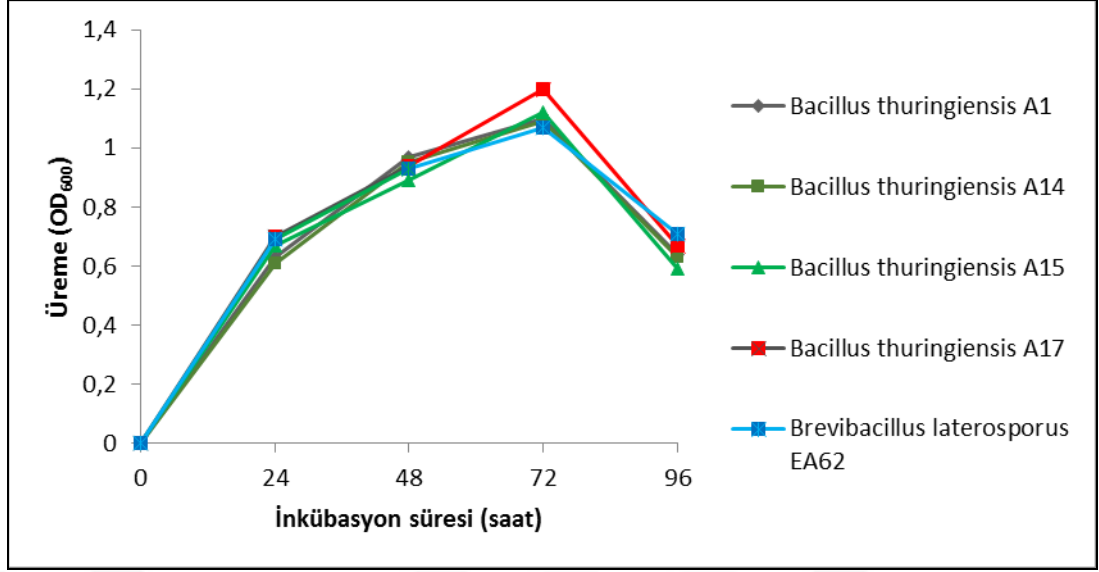
Şekil 4.2. Karşıt-çizgi yöntemiyle antimikrobiyal madde taraması. 1. *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, 2. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 3. *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610, 4. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, 5. *Escherichia coli* ATCC 25212

4.3. Agar Kuyu Difüzyon Metodu İle Antimikrobiyal Madde Taranması

Bakteriler 3.2.4'te belirtilen besiyeri ve kültür şartlarında üretilmiştir. Her 24 saatte bir alınan örneklerden bakteri üremesine bakılmış ve tüm bakterilerin en yüksek üreme saati 72. saat olarak saptanmıştır (Çizelge 4.12 ve Şekil 4.3). Agar kuyu difüzyon çalışmalarında yapılan antimikrobiyal madde üretimleri için çizelge ve şekillerde 72. saatteki sonuçlar verilmiştir. Bu sonuçlara göre *Brevibacillus laterosporus* EA62 ve *Bacillus thuringiensis* A14'ün test bakterilerine karşı inhibisyon zonu gösterdiği, diğerlerinde ise bakteri üremesi gözlenmesine rağmen antimikrobiyal madde üretmedikleri tespit edilmiştir. *Brevibacillus laterosporus* EA62 bakterisinin 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde yapılan inhibisyon zon analizinde 72. saatte en yüksek inhibisyon zonu (19 mm) elde edilmiştir (Çizelge 4.13 ve Şekil 4.4), bu saat üreme eğrisinin durağan fazı olan saattir. 96. saatte ise inhibisyon zonunda (12 mm) bir azalma görülmüştür (Şekil 4.5). 72. saatte görülen en iyi inhibisyon zonu 19 mm ile *Brevibacillus laterosporus* EA62'de ölçüldüğünden bundan sonraki çalışmalara bu bakteri ile devam edilmiştir. Tüm çalışmalarda bakteri 72.saatte kadar üretilerek elde edilen süpernatant antimikrobiyal madde kaynağı olarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.12. Besi ortamlarında üretilen *Bacillus thuringiensis* A1, A14, A15, A17 ve *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin üremelerinin karşılaştırılması

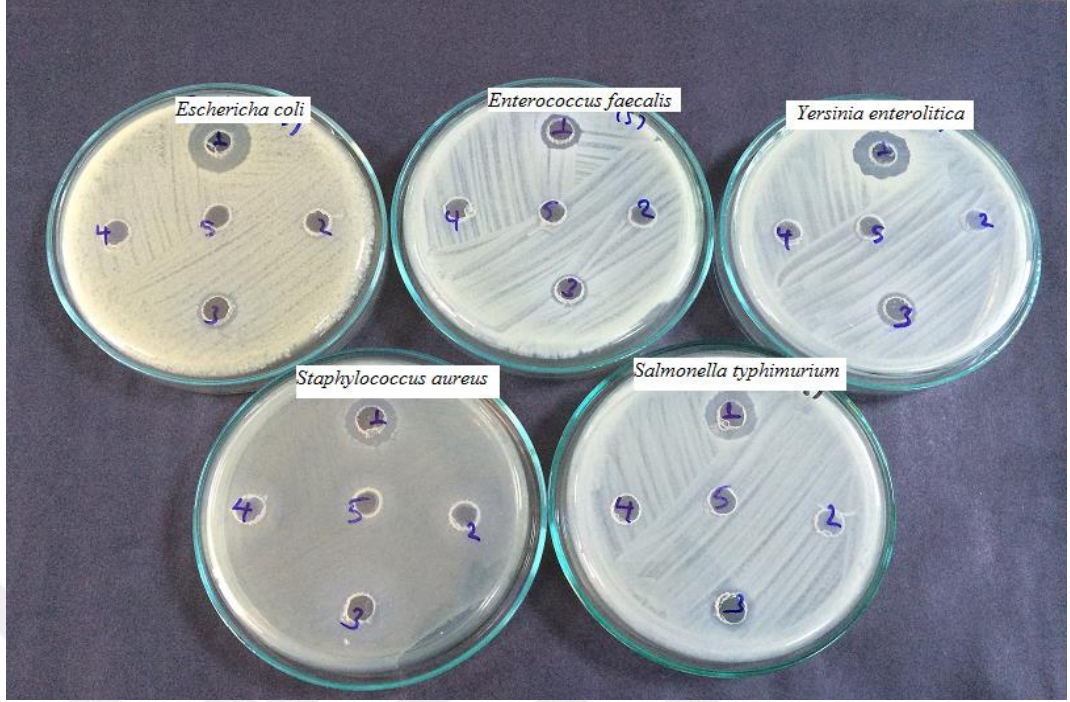
İnkübasyon Süresi	<i>Bacillus thuringiensis</i> A1	<i>Bacillus thuringiensis</i> A14	<i>Bacillus thuringiensis</i> A15	<i>Bacillus thuringiensis</i> A17	<i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62
	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀	OD ₆₀₀
24.saat	0,63	0,61	0,67	0,70	0,69
48.saat	0,97	0,95	0,89	0,94	0,93
72.saat	1,10	1,09	1,12	1,20	1,07
96. saat	0,64	0,63	0,59	0,67	0,71



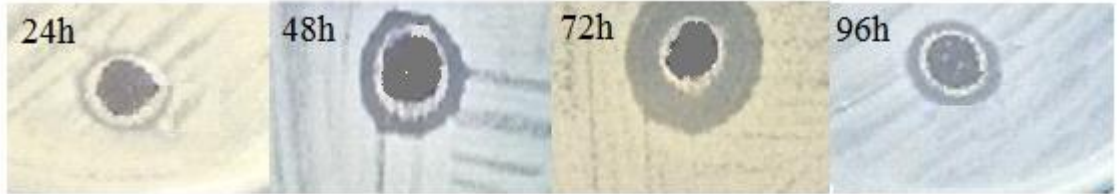
Şekil 4.3. *Bacillus thuringiensis* A1, A14, A15, A17 ve *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin besi ortamlarında zamana bağlı üreme değerleri

Çizelge 4.13. Besi ortamlarında üretilen *Bacillus thuringiensis* A1, A14, A15, A17 ve *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin inbisyon zonlarının karşılaştırılması

TEST BAKTERİLERİ	<i>Bacillus thuringiensis</i> A1	<i>Bacillus thuringiensis</i> A14	<i>Bacillus thuringiensis</i> A15	<i>Bacillus thuringiensis</i> A17	<i>Brevibacillus laterosporus</i> EA62
	İnhibisyon Zon Çapları (mm)	İnhibisyon Zon Çapları (mm)	İnhibisyon Zon Çapları (mm)	İnhibisyon Zon Çapları (mm)	İnhibisyon Zon Çapları (mm)
<i>Escherichia coli</i>	-	12	-	-	19
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	11	-	-	13
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	12	-	-	15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	12	-	-	17
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	15



Şekil 4.4. Agar kuyu difüzyon metodu ile 5 test bakterisine karşı bakterilerin inhibisyon zonları. *Brevibacillus laterosporus* EA62 (1), *Bacillus thuringiensis* A1 (2), *Bacillus thuringiensis* A14 (3), *Bacillus thuringiensis* A15 (4), *Bacillus thuringiensis* A17 (5)



Şekil 4.5. *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi üzerine inkübasyon zamanının etkisi

4.4. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Besinsel Faktörlerin Etkisi

Bakterilerin antimikrobiyal madde üretimleri buldukları ortama bağlı olduğundan, ortam şartlarının değiştirilmesi üretim miktarına etki etmektedir. Bu nedenle çalışmada besinsel olarak aminoasit, karbon, azot ve metal olmak üzere dört besinsel faktörün antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

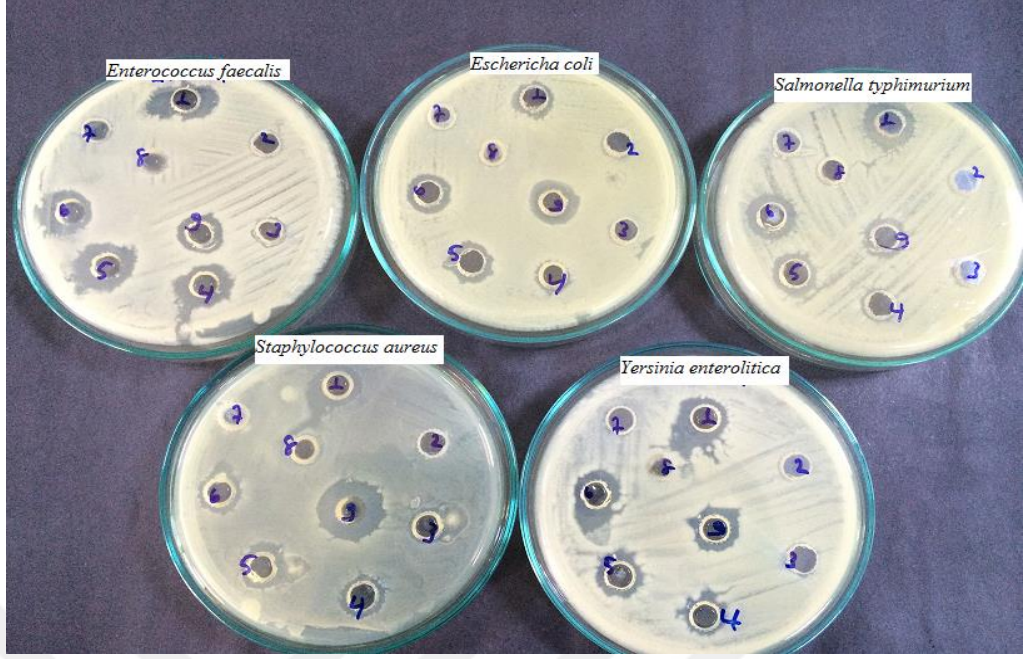
4.4.1. Aminoasit Kaynaklarının Etkisi

Aminoasit kaynaklarının bakteri gelişmesi ve antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerini araştırmak üzere her bir üretim ortamına %0,5 oranında farklı aminoasit kaynağı (alanin, fenilalanin, valin, tirozin, lizin, histidin, sistin, arginin ve glutamik asit) ilave edilmiştir. Maksimum antimikrobiyal madde sentezinin sağlandığı 72. saatte örnekler alınarak agar kuyu difüzyon metodu ile etkisi araştırılmıştır ve üreme tayini yapılmıştır (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7).

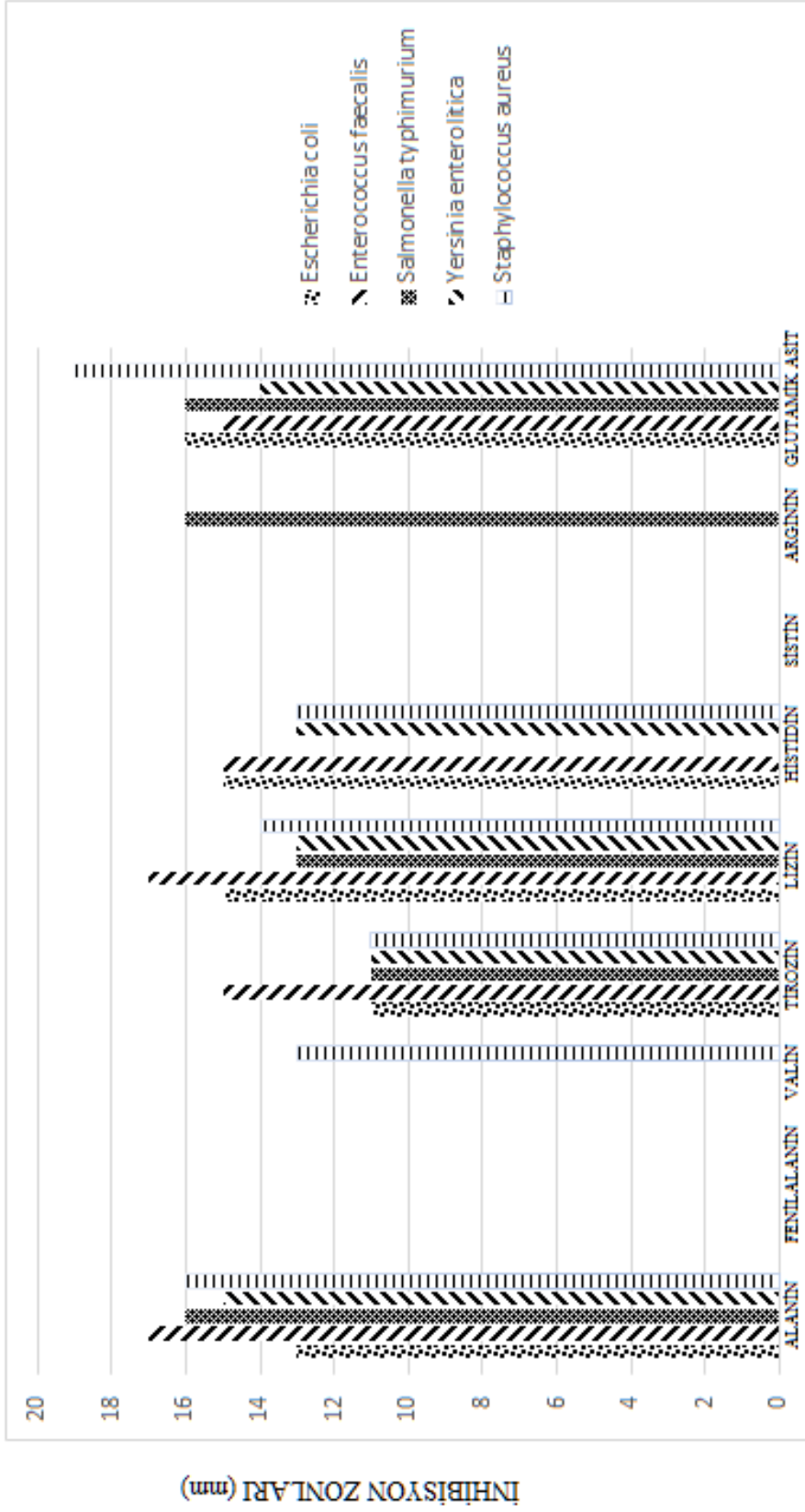
Elde edilen sonuçlara göre, maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 19 mm ile Glutamik asit ilave edilen ortamda *Staphylococcus aureus*'a karşı ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.14 ve Şekil 4.6'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.14. 72. saatte farklı aminoasit kaynaklarının, *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri

		AMİNOASİT KAYNAKLARI (% 0.5)																
	Alamin		Fenilalanin		Valin		Tirozin		Lizin		Histidin		Sistin		Arginin		Glutamik asit	
	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀
<i>Escherichia coli</i>	13		-		11		15		15		15		-		16		16	
<i>Enterococcus faecalis</i>	17		-		15		17		15		15		-		15		15	
<i>Salmonella typhimurium</i>	16	1,07	-	1,01	11	1,21	13	1,12	-	1,05	-	1,06	16	1,11	16	1,04	16	1,04
<i>Yersinia enterocolitica</i>	15		-		11		13		13		13		-		14		14	
<i>Staphylococcus aureus</i>	16		13		11		14		13		13		-		19		19	



Şekil 4.6. 72. saatte farklı aminoasit kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları. 1-Alanin, 2-Fenilalanin, 3-Valin, 4-Tirozin, 5-Lizin, 6-Histidin, 7-Sistin, 8-Arginin, 9-Glutamik asit



Şekil 4.7. 72. saatte farklı aminoasit kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62' den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

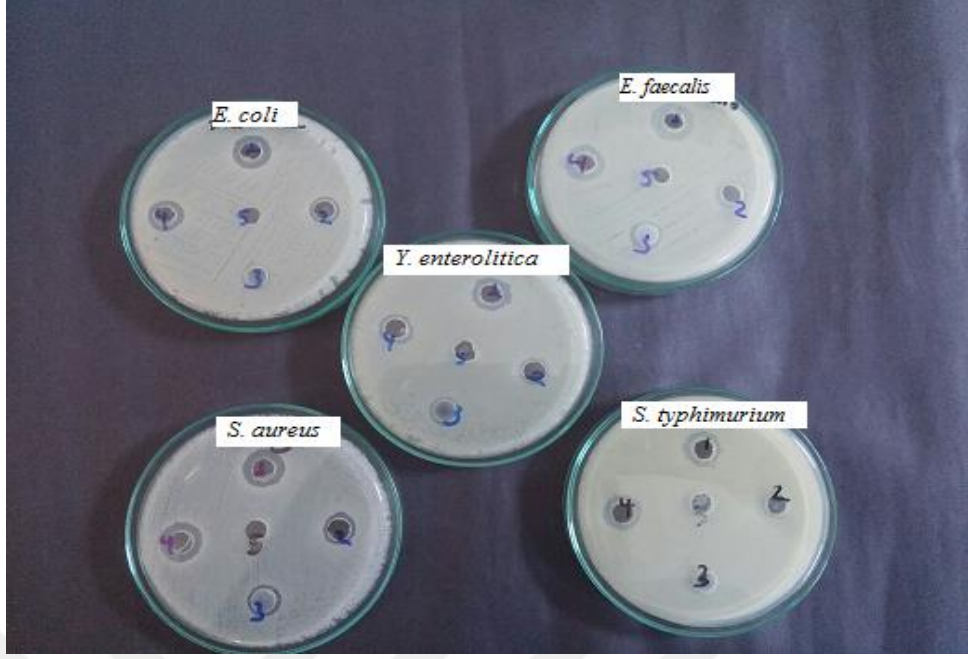
4.4.2. Karbon Kaynaklarının Etkisi

Farklı karbon kaynaklarının antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla besi ortamında karbon kaynağı olarak bulunan Glukoz, %1,5 oranında farklı karbon kaynakları ile değiştirilmiştir. Bu amaçla, besi ortamına aynı oranda Sukroz, Nişasta, Maltoz ve Buğday kepeği olmak üzere farklı karbon kaynakları ilave edilmiştir. Maksimum antimikrobiyal madde sentezinin sağlandığı 72. saatte örnekler alınarak agar kuyu difüzyon metodu ile etkisi araştırılmıştır ve üreme tayini yapılmıştır (Çizelge 4.15, Şekil 4.8).

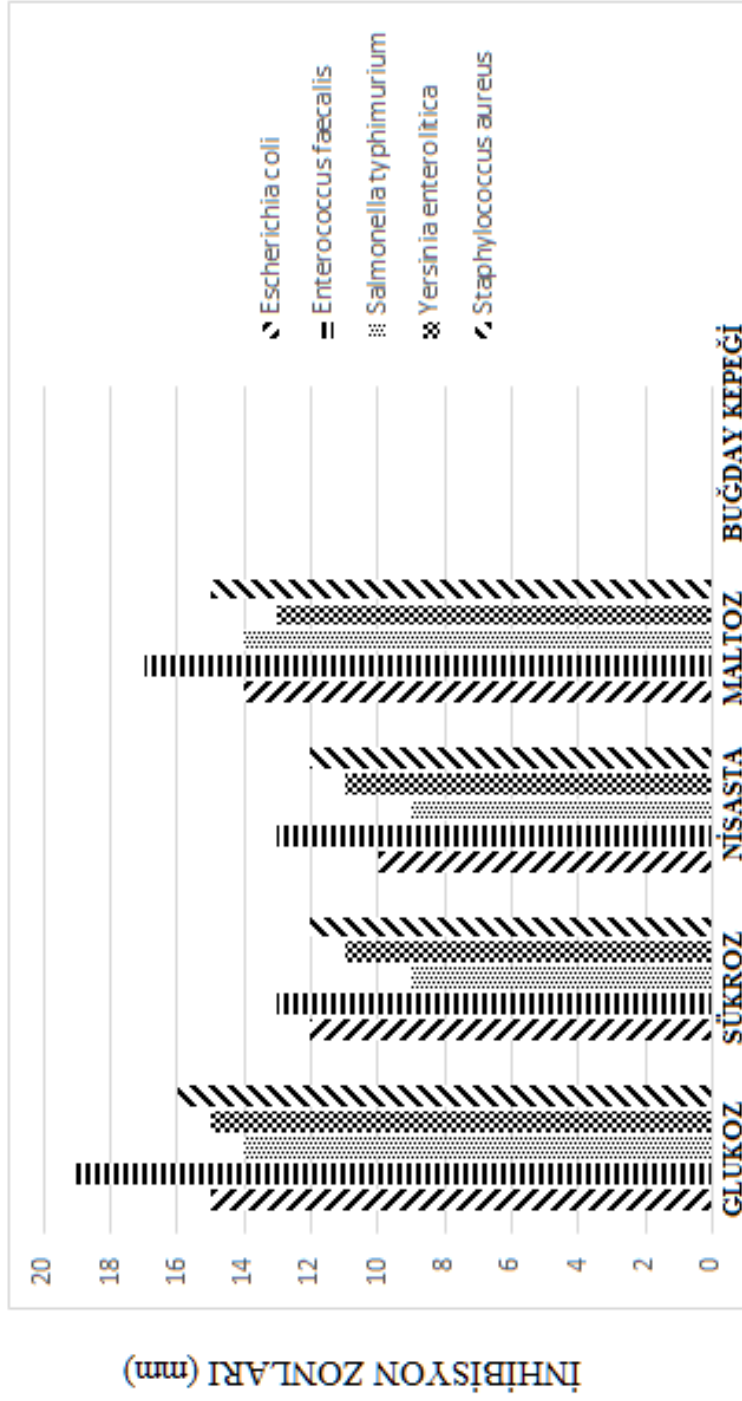
Elde edilen sonuçlara göre, maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 19 mm ile içerisinde Glukoz bulunan ortamda *Enterococcus faecalis*'e karşı ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.15, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.15. 72. saatte farklı karbon kaynaklarının, *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri

KARBON KAYNAKLARI (%1,5)										
	GLUKOZ (kontrol)		SÜKROZ		NIŞASTA		MALTOZ		BUĞDAY KEPEĞİ	
	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀
<i>Escherichia coli</i>	15		12		10		14		-	
<i>Enterococcus faecalis</i>	19		13		13		17		-	
<i>Salmonella typhimurium</i>	14	1,11	9	1,01	9	1,03	14	1,13	-	1,10
<i>Yersinia enterocolitica</i>	15		11		11		13		-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	16		12		12		15		-	



Şekil 4.8. 72. saatte farklı karbon kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları. 1-Glukoz, 2-Sükroz, 3-Nişasta, 4-Maltoz, 5-Buğday kepeği



Şekil 4.9. 72. Saatte farklı karbon kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62' den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

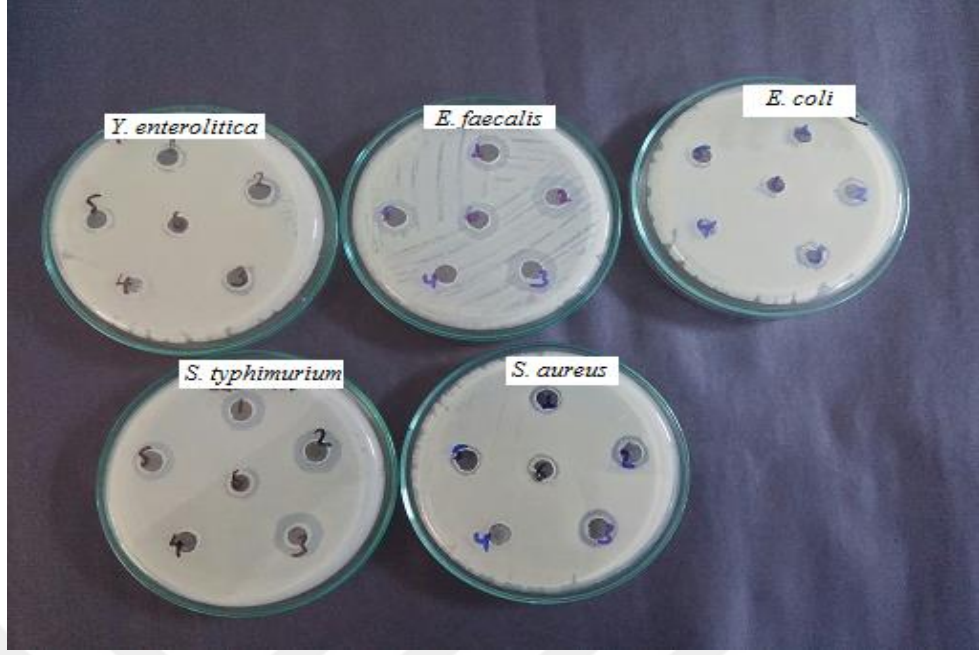
4.4.3. Azot Kaynaklarının Etkisi

Farklı azot kaynaklarının antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla besi ortamında azot kaynağı olarak bulunan Yeast ekstrakt (%0,1) ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%0,05)'in farklı azot kaynakları ile değişimine gidilmiştir. Bu amaçla, besi ortamına aynı oranda organik azot kaynağı % 0,1 olarak corn steep liquer, tripton, skim milk ve inorganik azot kaynağı olarak %0,05 $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır. Maksimum antimikrobiyal madde sentezinin sağlandığı 72. saatte örnekler alınarak agar kuyu difüzyon metodu ile etkisi araştırılmıştır ve üreme tayini yapılmıştır (Çizelge 4.16).

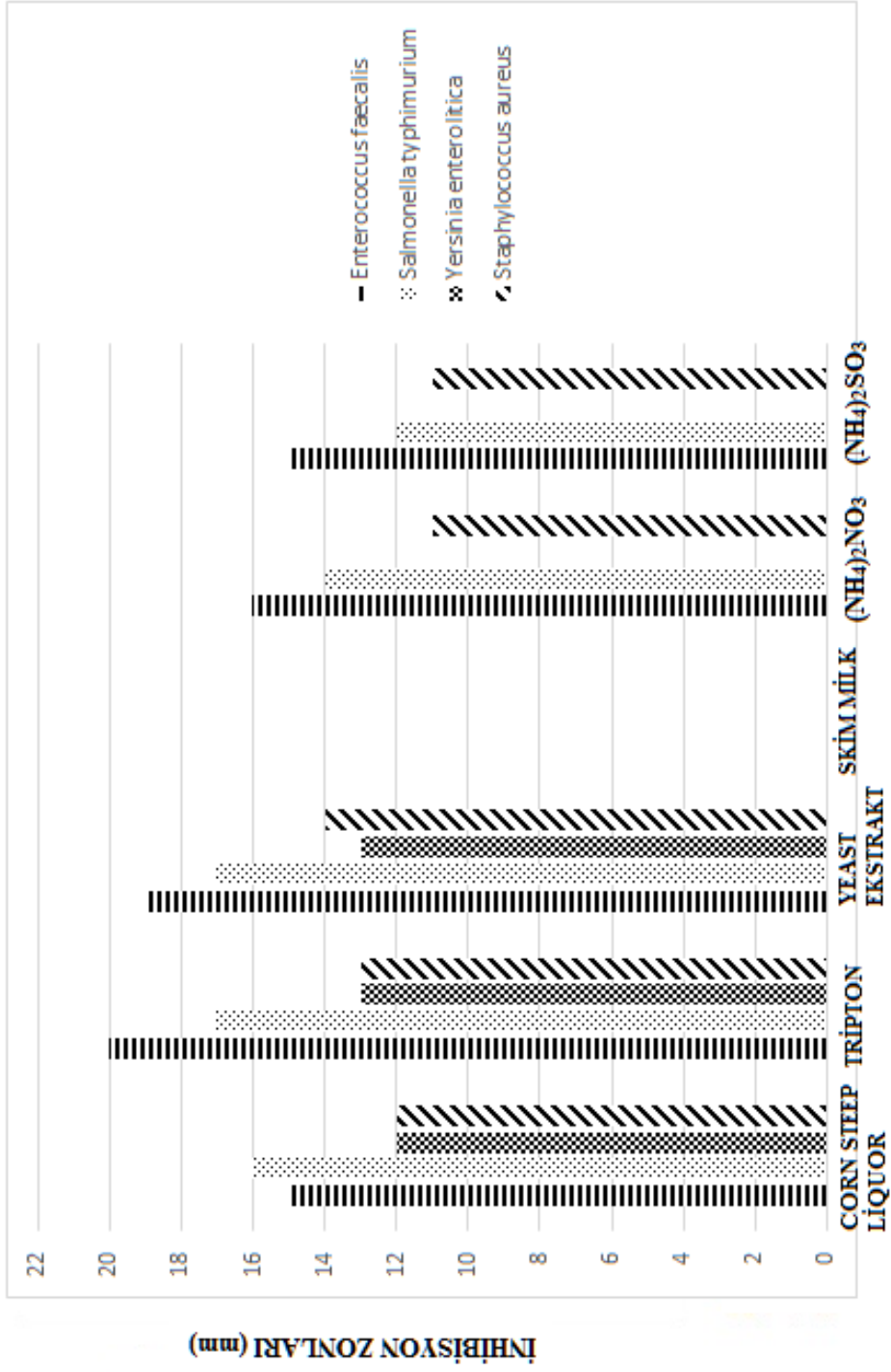
Elde edilen sonuçlara göre, maksimum inhibisyon zonu 72. saatte *Enterococcus faecalis*'e karşı 20 mm ile içerisinde Tripton bulunan besi ortamında ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.16, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.16. 72. saate farklı azot kaynaklarının, *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri

AZOT KAYNAKLARI (%0,15)												
	CORN STEEP LIQUOR		TRIPTON		YEAST EKSTRAKT		SKİM MİLK		(NH ₄) ₂ NO ₃		(NH ₄) ₂ SO ₃	
	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀
<i>Escherichia coli</i>	-		12		12		-		-		-	
<i>Enterococcus faecalis</i>	15		20		19		-		16		15	
<i>Salmonella typhimurium</i>	16	1,10	17	0,99	17	1,17	-	1,11	14	1,01	12	1,03
<i>Yersinia enterocolitica</i>	12		13		13		-		-		-	
<i>Staphylococcus aureus</i>	12		13		14		-		11		11	



Şekil 4.10. 72. saatte farklı azot kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları. 1-Corn steep Liquor, 2-Tripton, 3-Yeast Ekstrakt, 4- Skim milk, 5- $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$, 6- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$



Şekil 4.11. 72. saatte farklı azot kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62' den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

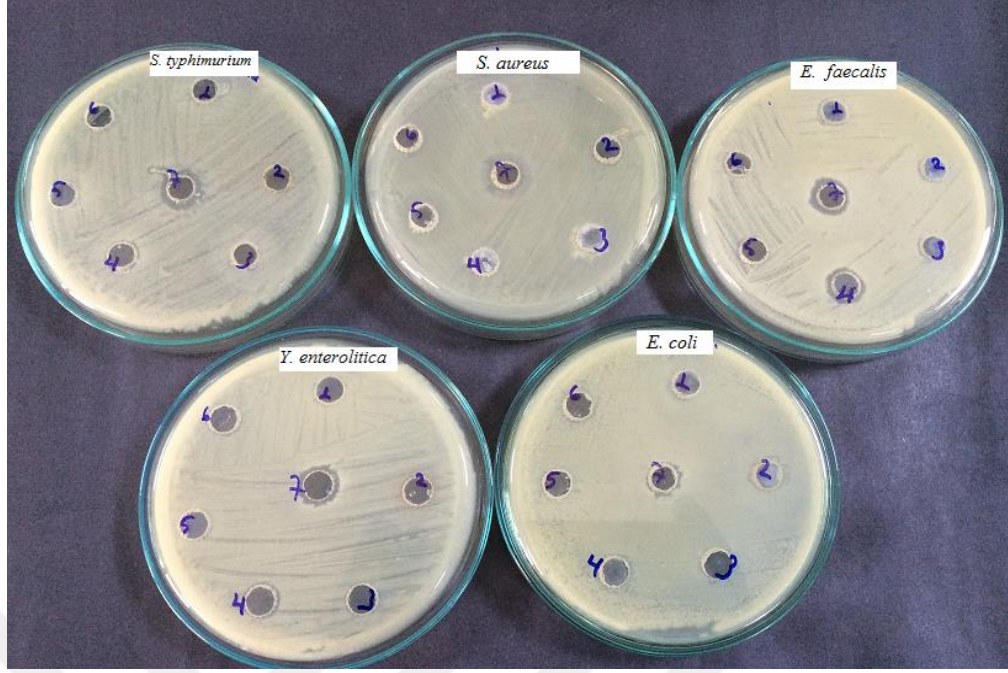
4.4.4. Metal Kaynaklarının Etkisi

Farklı metal kaynaklarının antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkisini araştırmak amacıyla besi ortamında metal kaynağı olarak bulunan $MgSO_4$ ve $CaCO_3$ 'ın toplam miktarı (%0,35) ile farklı metal kaynaklarının değişimine gidilmiştir. Bu amaçla, besi ortamına %0,35 oranında $CaCl_2$, $FeSO_4$, $LiSO_4$, $NaCl$, KCl , $MnSO_4$ ve $MgSO_4$ ilave edilmiştir. Maksimum antimikrobiyal madde sentezinin sağlandığı 72. saatte örnekler alınarak agar kuyu difüzyon metodu ile etkisi araştırılmıştır ve üreme tayini yapılmıştır (Çizelge 4.17).

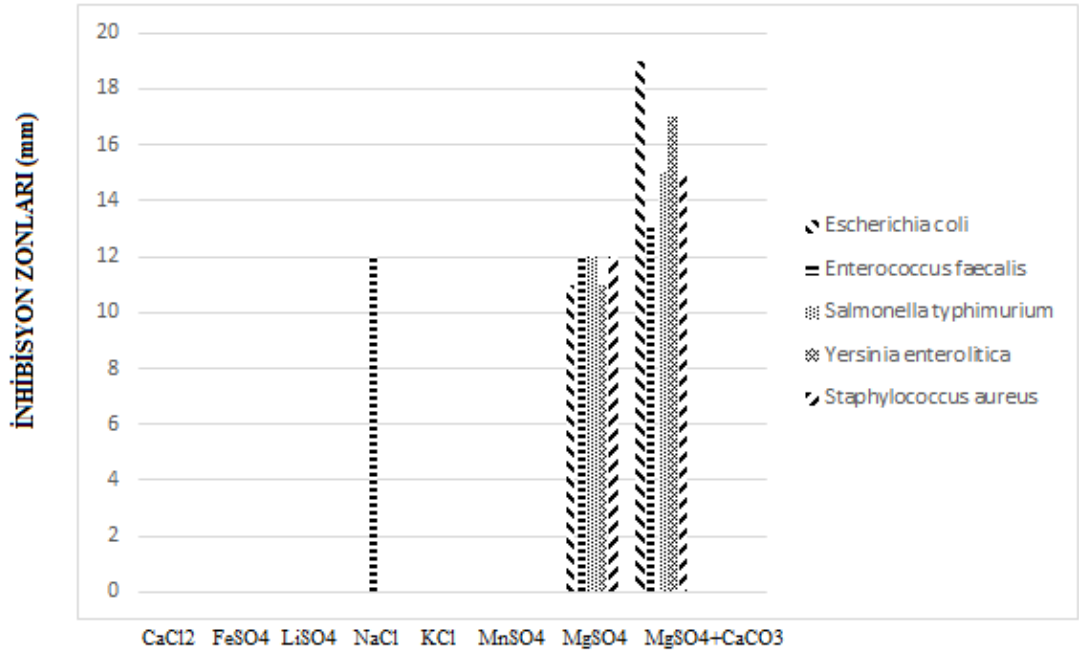
Elde edilen sonuçlara göre, maksimum inhibisyon zonu (19 mm) 72. saatte bütün test bakterilerine karşı inhibisyon zonu veren $MgSO_4+CaCO_3$ kaynaklarında ölçülmüştür. Diğer metal kaynaklarında ise $NaCl$ 'de *Enterococcus faecalis*'e karşı 12 mm çapında inhibisyon zonu görülmüştür. $MgSO_4$ tek başına kullanıldığında test bakterileri üzerine 11-12 mm arasında inhibisyon zonu göstermiştir (Çizelge 4.17 , Şekil 4.12, Şekil 4.13).

Çizelge 4.17. 72. saatte farklı metal kaynaklarının, *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri

METAL KAYNAKLARI (% 0,35)																
	CaCl ₂		FeSO ₄		LiSO ₄		NaCl		KCl		MnSO ₄		MgSO ₄		MgSO ₄ + CaCO ₃ (Kontrol)	
	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀
<i>Escherichia coli</i>	-		-		-		-		-		-		11		19	
<i>Enterococcus faecalis</i>	-		-		12		-		-		-		12		13	
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	1,12	-	0,99	-	1,19	-	1,08	-	1,18	-	1,05	12	1,13	15	1,15
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-		-		-		-		-		-		11		17	
<i>Staphylococcus aureus</i>	-		-		-		-		-		-		12		15	



Şekil 4.12. 72. saatte farklı metal kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları. 1- CaCl_2 , 2- FeSO_4 , 3- LiSO_4 , 4- NaCl , 5- KCl , 6- MnSO_4 , 7- MgSO_4 .



Şekil 4.13. 72. saatte farklı metal kaynakları varlığında *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

4.5. Antimikrobiyal Madde Üretimi Üzerine Fiziksel Faktörlerin Etkisi

Bakterilerin antimikrobiyal madde üretimleri buldukları ortam koşullarına bağlı olduğundan, bu koşullar değiştirildiği takdirde antimikrobiyal madde üretim miktarı da bu durumdan etkilenmektedir. Bu nedenle çalışmada pH (4.0, 5.0, 6.0, 7.0(kontrol), 8.0 ve 9.0) ve sıcaklık (30, 37(kontrol), 40, 45, 50 ve 55) olmak üzere iki fiziksel parametrenin antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

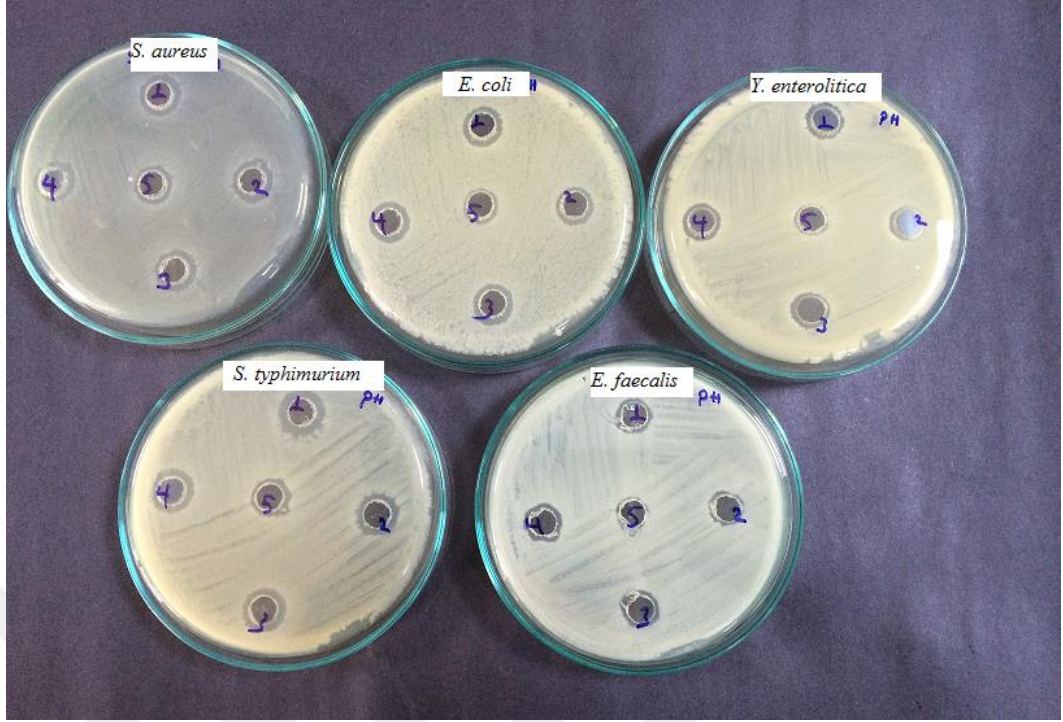
4.5.1. pH' nın Etkisi

Bakteri gelişmesi ve antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerini araştırmak üzere üretim ortamının pH' sı 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0 olarak ayarlanmıştır. Maksimum antimikrobiyal madde sentezinin sağlandığı 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile farklı pH'ların antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.14) ve üreme tayini yapılmıştır (Çizelge 4.18).

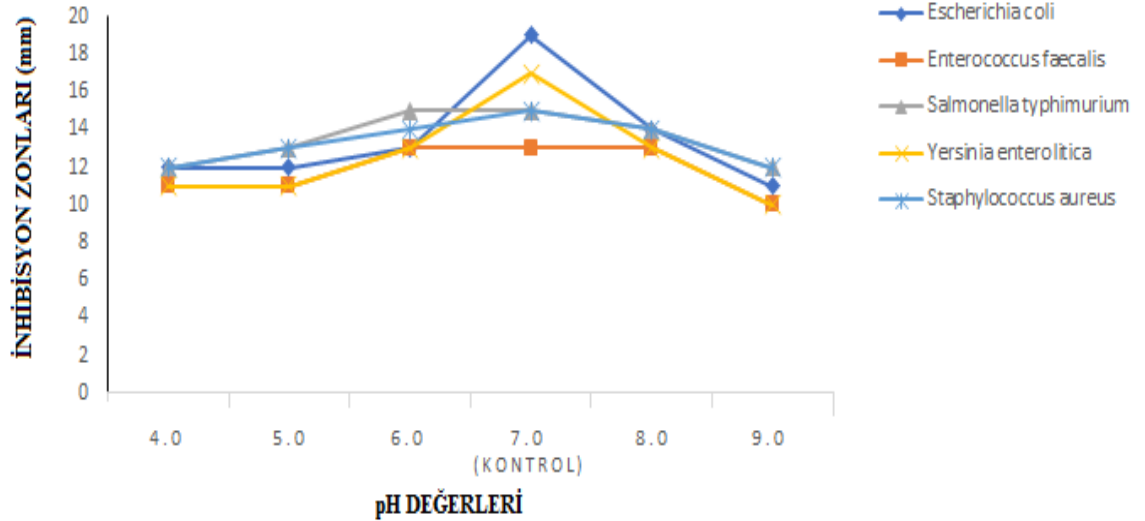
Elde edilen sonuçlara göre, farklı pH değerlerinde antimikrobiyal madde üretimleri karşılaştırıldığında maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 19 mm ile pH 7.0'da *Escherichia coli*'ye karşı ölçülmüştür. Diğer pH değerlerinde ise 10-15 mm arasında inhibisyon zonları gözlemlenmiştir (Çizelge 4.18, Şekil 4.14, Şekil 4.15).

Çizelge 4.18. 72. saatte farklı pH değerlerinin *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri

pH DEĞERLERİ												
	pH 4.0		pH 5.0		pH 6.0		pH 7.0 (kontrol)		pH 8.0		pH 9.0	
	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀
<i>Escherichia coli</i>	12		12		13		19		14		11	
<i>Enterococcus faecalis</i>	11		11		13		13		13		10	
<i>Salmonella typhimurium</i>	12	0,98	13	0,99	15	1,09	15	1,21	14	1,20	12	1,19
<i>Yersinia enterocolitica</i>	11		11		13		17		13		10	
<i>Staphylococcus aureus</i>	12		13		14		15		14		12	



Şekil 4.14. 72. saatte farklı pH değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları. 1-pH 4.0, 2-pH 5.0, 3-pH 6.0, 4-pH 8.0, 5-pH 9.0



Şekil. 4.15. 72. saatte farklı pH değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

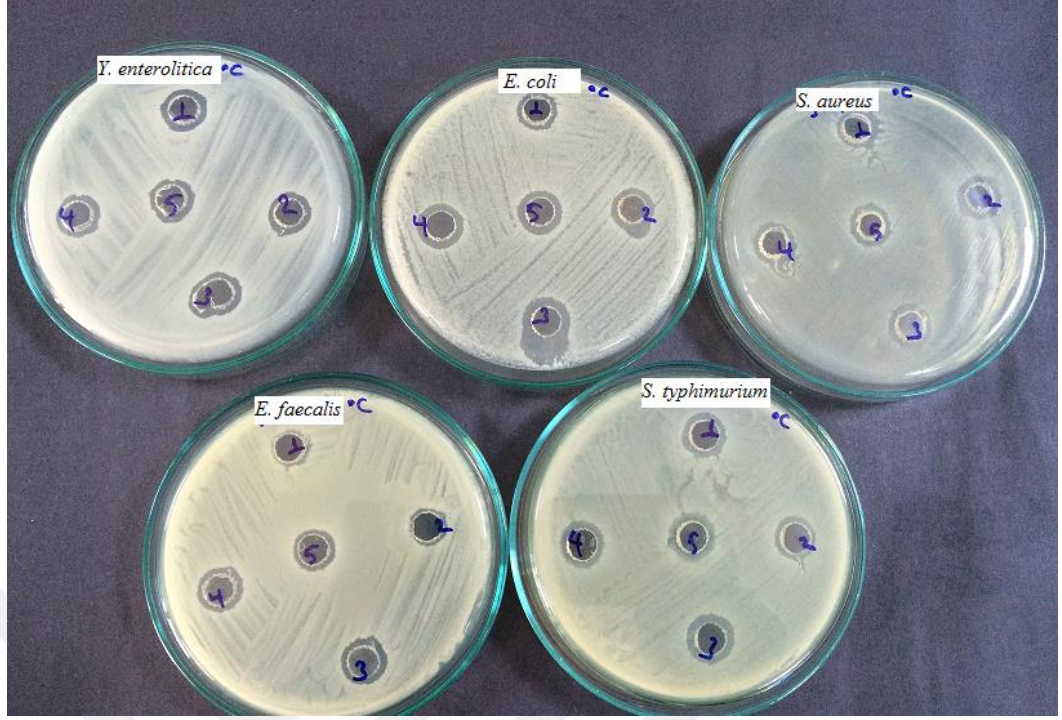
4.5.2. Sıcaklığın Etkisi

Bakteri gelişmesi ve antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerini araştırmak üzere üretim ortamları farklı sıcaklık değerlerinde (30, 37(kontrol), 40, 45, 50 ve 55) inkübasyona bırakılmıştır. Maksimum antimikrobiyal madde sentezinin sağlandığı 72. saatte agar kuyu difüzyon metodu ile farklı sıcaklık değerlerinin antimikrobiyal madde üzerine etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.16) ve üreme tayini yapılmıştır (Çizelge 4.19).

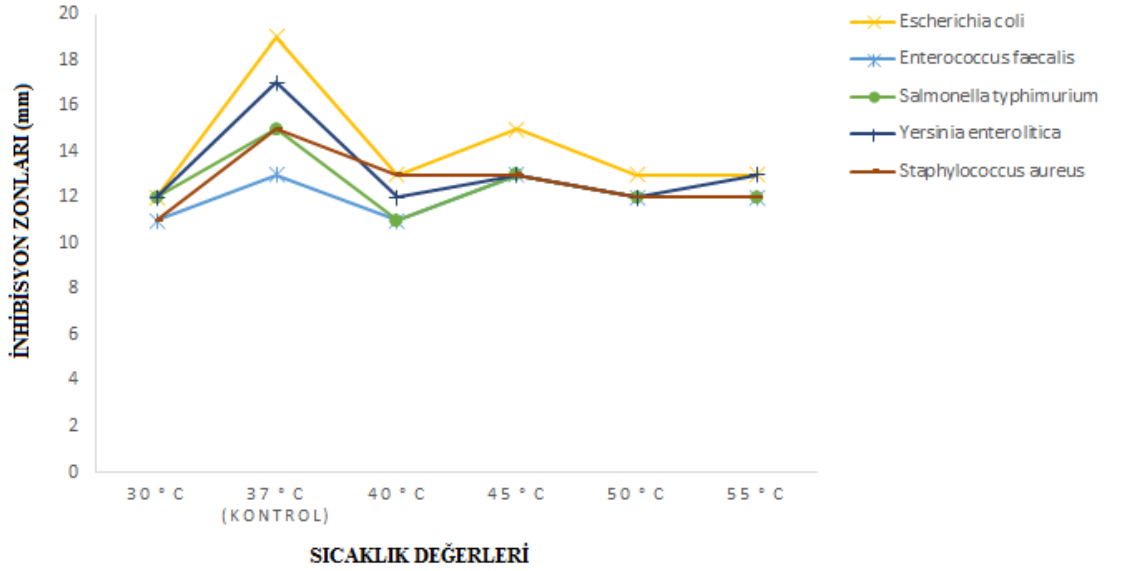
Elde edilen sonuçlara göre, farklı sıcaklık değerlerinde antimikrobiyal madde üretimi karşılaştırıldığında maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 19 mm ile 37 °C'de *Escherichia coli*'ye karşı ölçülmüştür. Diğer sıcaklık değerlerinde büyük bir değişiklik görülmemiştir (Çizelge 4.19, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17).

Çizelge 4.19. 72. saatte farklı sıcaklık değerlerinin *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi ve üreme üzerine etkileri

SICAKLIK DEĞERLERİ												
	30 ° C		37 ° C (kontrol)		40 ° C		45 ° C		50 ° C		55 ° C	
	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀	Inhibisyon Zonu (mm)	OD ₆₀₀
<i>Escherichia coli</i>	12		19		13		15		13		13	
<i>Enterococcus faecalis</i>	11		13		11		13		12		12	
<i>Salmonella typhimurium</i>	12	1,15	15	1,17	11	1,10	13	1,18	12	1,11	12	1,02
<i>Yersinia enterocolitica</i>	12		17		12		13		12		13	
<i>Staphylococcus aureus</i>	11		15		13		13		12		12	



Şekil 4.16. 72. saatte farklı sıcaklık değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları. 1-30°C, 2-40°C, 3-45 °C, 4-50 °C, 5-55 °C



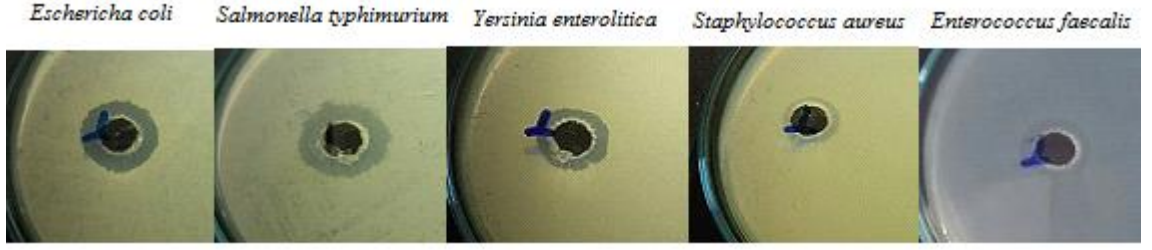
Şekil 4.17. 72. saatte farklı sıcaklık değerlerinde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den üretilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonlarının karşılaştırılması

4.6. Maksimum Antimikrobiyal Madde Üretimi İçin Modifiye Ortamın Hazırlanması

Maksimum antimikrobiyal madde sentezinin saptandığı pH ve sıcaklık değerlerinde ve yine maksimum sentezin elde edildiği aminoasit, karbon, azot ve metal iyonlarını içeren yeni oluşturulmuş bir modifiye ortamda antimikrobiyal madde veriminin sağlanması yoluna gidilmiştir. Modifiye ortamda en iyi pH değeri 7.0, sıcaklık değeri 37 °C, aminoasit kaynağı olarak Glutamik asit, karbon kaynağı olarak Glukoz, azot kaynağı olarak Tripton ve metal iyonları olarak MgSO₄+CaCO₃ kullanılmıştır. 72. saatte alınan örneklerden elde edilen sonuçlara göre modifiye ortamdaki bakteri üremesi kontrol ortamına göre artmıştır. Modifiye ortamda antimikrobiyal madde üretimi ise kontrol ortamına göre denenen herbir test bakterisine göre artış göstermiştir (Çizelge 4.20 ve Şekil 4.18). *Escherichia coli* için %5, *Salmonella typhimurium* için %20, *Yersinia enterocolitica* için %5, *Staphylococcus aureus* için %6, *Enterococcus faecalis* için ise %7' lik bir artış sağlanmıştır.

Çizelge 4.20. Modifiye ortamdaki bakteri üremesi ve test bakterilerine karşı inhibisyon zon çapları

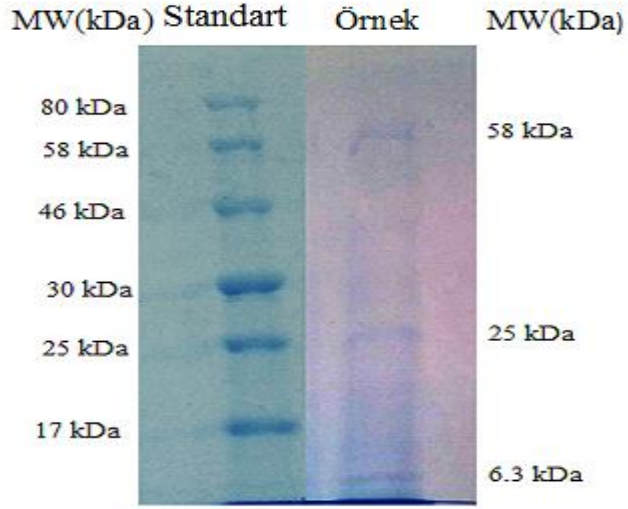
Kontrol Ortam içeriği	Üreme (OD ₆₀₀)	Test bakterileri ve İnhibisyon Zon Çapı (mm)	Modifiye Ortam içeriği	Üreme (OD ₆₀₀)	Test bakterileri ve İnhibisyon Zon Çapı (mm)
Glukoz MgSO ₄ + CaCO ₃ Yeast ekstrakt pH 7.0 37 °C Aminoasit kaynağı yok	1,03	<i>Escherichia coli</i> için 19 <i>Salmonella typhimurium</i> için 15 <i>Yersinia enterocolitica</i> için 17 <i>Staphylococcus aureus</i> için 15 <i>Enterococcus faecalis</i> için 13	Glukoz MgSO ₄ + CaCO ₃ Tripton pH 7.0 37 °C Glutamik asit	1,15	<i>Escherichia coli</i> için 20 <i>Salmonella typhimurium</i> için 18 <i>Yersinia enterocolitica</i> için 18 <i>Staphylococcus aureus</i> için 16 <i>Enterococcus faecalis</i> için 14



Şekil 4.18. 72. saatte modifiye oramda üretilen *Brevibacillus laterosporus* EA62'den elde edilen antimikrobiyal maddenin test bakterilerine karşı oluşturduğu inhibisyon zonları

4.7. Antimikrobiyal Maddenin Moleküler Ağırlığının Tespiti

Antimikrobiyal madde sırasıyla amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve ultrafiltrasyon basamakları ile kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra moleküler ağırlığının tespiti işlemine geçilmiştir. Moleküler ağırlığını belirlemek amacıyla, bölüm 3.2.14.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan SDS poliakrilamid jel elektroforezine örnek uygulanmıştır. İlk kuyucuğa da moleküler ağırlıkları bilinen standart protein çözeltisi (marker) konulmuş ve elektroforez işlemi bitiminde oluşan bantların (Şekil 4.19) Rf değerlerinden faydalanılarak formüle göre antimikrobiyal madde ve standart protein çözeltisinin göreceli hareketlilik değerleri hesaplanmıştır ($R_f = \text{Proteinin aldığı yol (cm)} / \text{İzleme boyasının aldığı yol (cm)}$). Protein bantları içeren jellerin görüntüleri fotoğraflanmıştır (Şekil 4.19). Jel boyanması sonucu 3 band görülmüştür, moleküler ağırlıkları 6,3, 25 ve 58 kDa olarak hesaplanmıştır. Yapılan literatür taramasında *Brevibacillus laterosporus* tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin moleküler ağırlıklarının 1-11 kDa arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada da *Brevibacillus laterosporus* EA62 bakterisinin ürettiği antimikrobiyal maddenin de düşük ağırlıklı 6,3 kDa olduğu düşünülmektedir.



Şekil 4.19. SDS-PAGE sonrası elde edilen jelde protein bantlarının görünümü

4.8. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)

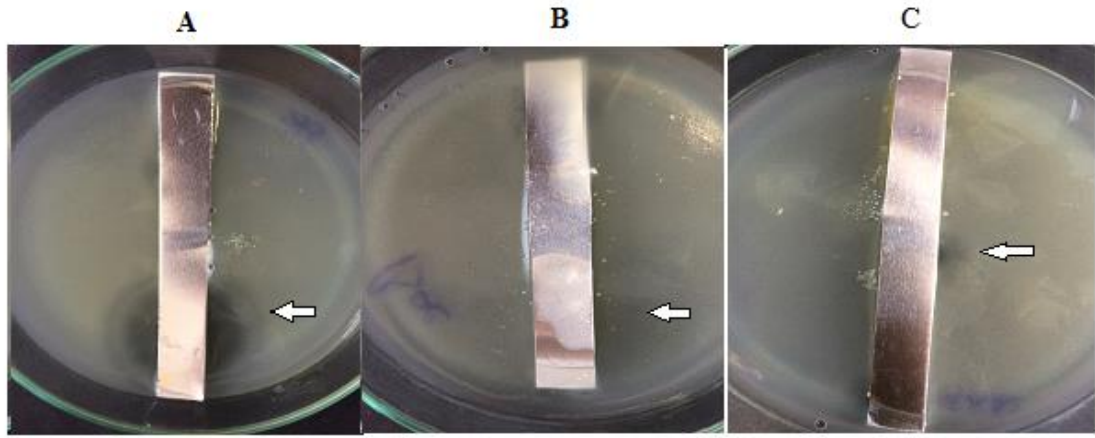
Minimum inhibisyon konsantrasyonunu belirlemek için yapılan çalışma sonucunda *B. laterosporus* EA62'den elde edilen yeni bileşenin MİK değeri 256 µg/mL'den büyük olarak saptanmıştır. Standart antibiyotiklerin MİK değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Çizelge 4.21. Standart antibiyotikler (Ampisilin ve Gentamisin) ve yeni bileşenin MİK değerleri

	MİK DEĞERLERİ				
	<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Escherichia</i>
	<i>typhimurium</i>	<i>aureus</i>	<i>enterolitica</i>	<i>faecalis</i>	<i>coli</i>
	ATCC 14028	ATCC 25923	ATCC 9610	ATCC 29212	ATCC 25212
Ampisilin	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL	2 µg/mL	>256 µg/mL
Gentamisin	2 µg/mL	2 µg/mL	4 µg/mL	16 µg/mL	1 µg/mL
Yeni bileşen	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL	>256 µg/mL

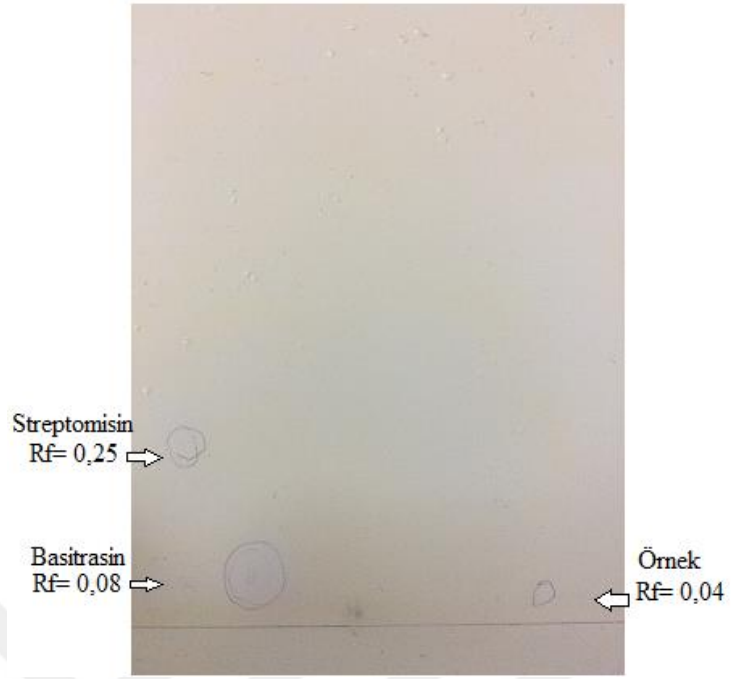
4.9. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC-Biyootografi)

TLC-Biyootografi yöntemi bölüm 3.2.19’ da Bharti ve ark. (2012)’nin yönteminden modifiye edilerek yapılmıştır. Sonuçlara göre streptomisin ve basitrasin standart antibiyotikleri ile *Brevibacillus laterosporus* EA62’ den elde edilen örnek antimikrobiyal madde Şekil 4.20’de görüldüğü gibi *S. aureus*’a karşı inhibisyon zonu göstermişlerdir.



Şekil 4.20. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan biyootografi yöntemi sonucu *S. aureus*’ a karşı oluşan inhibisyon zonları. A-Streptomisin, B- Basitrasin, C- Örnek antimikrobiyal madde

Yapılan diğer biyootografik analiz ise Panda ve ark. (2011)’nin yöntemine göre yapılmıştır (bkz. 3.2.19). TLC plakasının üzerindeki agarda *S. aureus*’ a karşı meydana gelen açık zonların yürüme mesafesi ölçülmüştür ve her birinin Rf değeri hesaplanmıştır. Streptomisin antibiyotiğinin Rf değeri 0,25, Basitrasin antibiyotiğinin Rf değeri 0,08 ve örnek antimikrobiyal maddenin ise Rf değeri 0,04 olarak bulunmuştur (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. İnce tabaka kromatografisi ile yapılan biyootografi yöntemi sonucu elde edilen inhibisyon zonlarının Rf değerleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsanlar ile hastalıklara sebep olan mikroorganizmalar arasında tarih boyunca sürekli bir savaş olmuştur. Bu savaş çok sayıda kişiyi etkileyerek, hastalık ve ölümlere sebep olmuştur. 1940' ların başlarında penisilinin bulunması ve antibakteriyel ilaçlarla ilgili gelişmeler durumu düzeltse de antibakteriyel ajanların yaygın kullanılmaya başlanmasından hemen sonra bakteriler çeşitli direnç formları kazanmıştır. Antimikrobiyallerin kullanımı artıkça patojenler tarafından ortaya konan direnç mekanizmaları daha da artmış ve karmaşık bir hal almıştır (Kuyucu 2007). Antimikrobiyallere dirençli suşların ortaya çıkması, antibiyotiklerin bilinçsiz kullanımı ve ekonomik boyut düşünüldüğünde, çalışmalar doğal madde arayışına yönelmiştir (Çakı 2009). Bu nedenle, etki alanı geniş ve güçlü antibiyotik üreten yeni mikroorganizmaların doğadan araştırılması önem kazanmaktadır.

Antibiyotik üreten mikroorganizmalar daha çok *Streptomyces*, *Bacillus*, *Brevibacillus* ve *Penicillium* gibi birkaç cinse ait türlerdir (Wise 1998). Bunlar arasında yer alan *Bacillus* ve *Brevibacillus* türleri, antimikrobiyal madde üretme kapasitesi yönünden çok incelenen organizmalar arasında bulunmaktadır (Perez ve ark. 1993, Eltem ve Uçar 1998).

Yapılan bu çalışmada daha önce Yüksek Lisans tez çalışmamızda Türkiye topraklarından elde edilen 5 adet antimikrobiyal madde üretme potansiyeline sahip *Bacillus* sp. kullanılmıştır. Antimikrobiyal madde üretme potansiyeline sahip 5 adet *Bacillus* sp. suşunun hizmet alımı ile 16S rRNA analizi yapılmış (RefGen, Ankara) ve bakteriler tür düzeyinde adlandırılmıştır. Bunlardan 4 tanesi *Bacillus thuringiensis* ve 1 tanesi *Brevibacillus laterosporus* ile %100 sekans benzerliği göstermiştir.

Tür düzeyinde tespit ettiğimiz bakterilerde ilk olarak karşıt çizgi yöntemi ile antimikrobiyal madde taraması yapılmıştır. Bu test sonucunda en iyi inhibisyon zonu gösteren bakteriler 10 mm ile *Bacillus thuringiensis* A1, A17 ve *Brevibacillus laterosporus* EA62 olmuştur. Ardından agar kuyu difüzyon yöntemi ile ikinci bir tarama yapılarak 2 tanesinin çalışmada kullanılan farklı test bakterilerine karşı inhibisyon zonu verdiği gözlenmiştir. Sonuçlara göre *Brevibacillus laterosporus* EA62 (19 mm) ve *Bacillus thuringiensis* A14 (12 mm)'ün test bakterilerine karşı inhibisyon zonu

gösterdiği, diğerlerinde ise bakteri üremesi gözlenmesine rağmen antimikrobiyal madde üretmedikleri tespit edilmiştir. Bakteriler arasında *Brevibacillus laterosporus* EA62 en iyi inhibisyon zonu (19 mm) göstermiştir. Yapılan çalışma sonuçlarına göre bakteri üremesinin ve antimikrobiyal madde üretiminin maksimum olduğu zaman 72. saat olarak belirlenmiştir. Bakterinin antimikrobiyal madde üretimi 24. saatte başladığı ancak durağan faz olan 72. saatte maksimuma ulaştığı (19 mm), 96. saatte ise üretimin azaldığı (12 mm) saptanmıştır. Dolayısıyla 72. saatin bakteri üremesinin durağan ve 96. saatin ise ölüm fazı olduğu saptanmıştır. Benzer sonuçlar Kalpana ve ark. (2010) *Bacillus laterosporus*' ta ve Hasan ve ark. (2009) *Bacillus pumilus*'te maksimum antibiyotik üretim zamanını 72. saat olarak belirtilmiştir. Kalpana ve ark. (2010), antibakteriyel aktivitenin ilk olarak 24. saatte gözlemlendiğini, 72. saatte maksimuma ulaştığını ve 96-120 saatleri arasında ise bir düşüş olduğunu bildirmişlerdir. Hosoya ve ark. (1998), antibiyotik sentezinin logaritmik faz sonu ile durağan faz arasında başladığını belirtmektedir. Hasan ve ark. (2009)'da çalışmalarında 72. saate kadar üretim yapmış ve maksimum antibiyotik üretiminin serbest *Bacillus pumilus* SAF1 hücresinde *M. luteus* (ATCC 10240)'a karşı 24 mm ve immobilize *Bacillus pumilus* SAF1 hücresinde ise *S. aureus* (ATCC 6538)'a karşı 22 mm'lik inhibisyon zonu ile 72. saatte olduğunu bildirmişlerdir. Buna karşın, Awais ve ark. (2007) ise, *Bacillus pumilus*' ta Basitrasin antibiyotiğinin 0-144 saatleri arasında üretimi yaparak inkübasyon zamanının etkisini araştırmışlardır. Çalışmamızdan farklı olarak maksimum inhibisyon zonlarını *Staphylococcus aureus* (19 mm) ve *Micrococcus luteus* (17 mm)'a karşı 24. saatte elde ettiklerini ve 24. saatten 144. saate kadar kademeli bir şekilde giderek düştüğünü belirtmişlerdir. Haavik (1974), *Bacillus licheniformis* ATCC 14580'nin sadece logaritmik faz sırasında Basitrasin ürettiğini rapor etmiştir. Buna karşın Egorov ve ark. (1986), basitrasin sentezinde maksimum verimin logaritmik faz sonunda ve sporulasyonun başlangıcında elde edildiğini bildirmişlerdir. 20 saatlik *B. licheniformis* kültürü maksimum basitrasin ürünü vermiştir (Yousaf 1997). Diğer yandan, Muhammad ve ark. (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 düşüş olduğunu belirtmişlerdir. Benzer olarak Muazz ve ark. (2007), *Bacillus subtilis* MZ-7' de inhibitör bileşiklerin konsantrasyonunun 48. saatte

maksimuma ulaştığını bildirmişlerdir. Genel olarak *Bacillus* ve *Brevibacillus*'larda antimikrobiyal madde üretim zamanı 24-72 saatlerde olmaktadır. Maksimum antimikrobiyal madde üretim zamanlarının farklı saatlerde bulunması çalışmada kullanılan bakteri türüne göre değişmektedir.

Üretim ortamının içeriği, ortamın pH'sı ve inkübasyon sıcaklığının antimikrobiyal madde üretimi üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Leifert ve ark. 1995). Özellikle besi ortamı içeriğinde bulunan aminoasit, karbon, azot ve metal kaynakları antimikrobiyal madde üretim verimini etkilemektedir.

Besi ortamlarında kullanılan aminoasit kaynakları hızlıca tüketilen kaynaklardır ve mikrobiyal metabolizma için önemlidirler. Çünkü protein ve polipeptidlerin yapı taşlarını oluşturmaktadırlar (Egorov 1985). Aminoasit kaynağı olarak Glutamik asit ve Alanin' in antimikrobiyal madde üretimini arttırdığı bildirilmiştir. Farklı aminoasit kaynaklarının antimikrobiyal madde üretiminde etkisi bilinmekle beraber yapılan farklı bir çalışmada aminoasit konsantrasyonunun artışı ile antimikrobiyal madde üretiminin azaldığı ifade edilmiştir. Bunun bakteri hücrelerine girebilmek için membran reseptörlerindeki aminoasit molekülleri arasındaki rekabetten dolayı olduğu bildirilmiştir (Al-Khafaji 1990). Bu amaçla *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi üzerine farklı aminoasit kaynaklarının etkilerini araştırmak üzere besiyeri içeriğine %0,5 oranında alanin, fenilalanin, valin, tirozin, lizin, histidin, sistin, arginin ve glutamik asit ilave edilmiştir. Yapılan çalışmada maksimum inhibisyon zonu 72. saatte 19 mm ile glutamik asit ilave edilen ortamda *Staphylococcus aureus*' a karşı ölçülmüştür. Aminoasit tercih sırası her bir test bakterisi için farklılık göstermiştir. Muhammad ve ark. (2009), termofilik *Bacillus* türlerinde besi ortamında kullandığı glutamik asitin farklı konsantrasyonlarının (% 0.25, 0.5, 1, 1.5 ve 2) antibiyotik üretimi üzerine etkisini araştırmıştır ve en iyi aktivitenin %1.5 glutamik asit konsantrasyonunda ve maksimum inhibisyon zonunun *Staphylococcus aureus* (22 mm) ve *Micrococcus luteus*'a karşı (26 mm) olduğunu gözlemlemişlerdir. Hanlon ve Hodges (1981), yaptıkları çalışmada *B. licheniformis*'in 0,01 M glutamik asit konsantrasyonu içeren besi ortamında maksimum antibiyotik ürettiğini bildirirken, Haddar ve ark. (2007) ise maksimum antibiyotik aktivitesini (134,3 units mL⁻¹) % 0,05 glutamik asit konsantrasyonunda elde etmişlerdir.

Aminoasit kaynağının yanı sıra besiyeri içeriğinde karbon ve azot kaynakları da antimikrobiyal madde üretiminde önemli kaynaklardır (Gupte ve Kulkarni 2002). Yapılan bir araştırmada ise antimikrobiyal madde üretiminin genellikle üretim ortamındaki kolay tüketilen karbon kaynakları ortamda bittiği zaman aktive edildiği ifade edilmiştir (Iwai ve Omura 1982). Kolayca parçalanabilen karbon kaynaklarının etkisinin enzimatik süreçlerin katabolit represyonu tarafından kontrol edildiği ve bunların yüksek konsantrasyonlarının polipeptid antibiyotiklerin enzimatik sentezini azalttığı ya da inhibe ettiği bildirilmiştir (Haavik 1974). Bazı mikroorganizmalarda ise, glukozun inhibitör etkisi, pH'daki azalma ile ilgili görülmüştür. Bu azalma, organik asitlerin ortamda birikmesi sonucu oluşan asidifikasyondan dolayı meydana geldiği belirtilmiştir (Espeso ve ark. 1993). Karbon kaynağı olarak kullanılan glukozun antibiyotik üretiminde en iyi kaynak olduğu ifade edilmektedir (Yousaf 1997). Bu amaçla *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi üzerine farklı karbon kaynağının etkisini araştırmak üzere %1,5 oranında glukoz, sükroz, nişasta, maltoz ve buğday kepeği kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda 72. saatte *Enterococcus faecalis*'e karşı en büyük inhibisyon zon çapı 19 mm ile içerisinde glukoz bulunan ortamda gözlenmiştir. Karbon kaynağı tercih sırası herbir test bakterisi için farklılık göstermiştir. Benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir. Yang ve ark. (2014), yapmış oldukları çalışmada maltoz, glukoz, laktoz, sükroz ve nişasta gibi farklı karbon kaynaklarının etkisini araştırmış ve en fazla etkiyi 30 mm ile içerisinde glukoz bulunan besi ortamında gözlemlemiştir. Ripa ve ark. (2009), sükroz, glukoz, früktoz, mannitol, galaktoz, ksiloz, laktoz, mannoz, mannitol ve maltoz gibi farklı karbon kaynaklarının antimikrobiyal metabolitler üzerine etkisinin araştırılması üzerine yaptıkları çalışmada en iyi inhibisyon zonunu 23 mm ile glukoz kaynağında elde etmişlerdir. Haddar ve ark. (2007) yapmış oldukları çalışmada basitrasın üretimi için gliserol, glukoz, sükroz, sitrik asit ve nişasta gibi farklı karbon kaynakları kullanmıştır. En fazla etkiyi %2 gliserol ile elde ettiklerini bildirmişlerdir. Kamat ve ark. (2011), maksimum antibiyotik üretimini, karbon kaynağı olarak dekstroz içeren ortamda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bunlardan farklı olarak, Hasan ve ark. (2009), serbest ve immobilize *Bacillus pumilus* tarafından antimikrobiyal bileşiklerin üretimi üzerine farklı glukoz konsantrasyonlarının (%1-5) etkisini incelemiş ve maksimum inhibisyon zonlarının *S. aureus* (32 mm) ve *M. luteus*'a karşı (24 mm) %3' lük glukoz

konsantrasyonunda elde etmişlerdir. Srinivasulu ve ark. (2003) ise, kalsiyum alginatta immobilize olmuş *Streptomyces marinensis* NUV-5 hücrelerinde neomisin üretiminin %3 maltoz konsantrasyonunda daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Awais ve ark. (2007) tarafından *Bacillus pumilus* ve *B. subtilis*'te basitrasin antibiyotiğinin üretimi üzerine farklı glukoz miktarlarının (%1-5) etkisi incelenmiştir. En iyi aktivitenin (26 mm) *M. luteus* 'a karşı %5' lik glukoz konsantrasyonunda, *S. aureus* 'a karşı ise (21 mm) %4'lük glukoz konsantrasyonunda elde edildiği ifade etmişlerdir. Bunların yanı sıra *B. subtilis* 'te, *M. luteus* 'a karşı %1'lik glukoz konsantrasyonunda en iyi aktivite (19 mm) elde edilirken, *S. aureus* 'a karşı bir inhibisyonun olmadığı bildirilmiştir. Muhammad ve ark. (2009), termofilik *Bacillus* türlerinde farklı glukoz konsantrasyonlarının (%0,25-3,0) antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkisini araştırmıştır. En iyi antimikrobiyal aktivitenin *Staphylococcus aureus* (22 mm) ve *Micrococcus luteus* 'a karşı (26 mm) %2 glukoz konsantrasyonunda olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda artan glukoz konsantrasyonlarında antimikrobiyal madde üretimi üzerine pozitif bir etkinin olduğunu ifade etmektedirler. Farklı karbon kaynaklarının antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkisini araştıran çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesi, kullanılan mikroorganizma çeşidine ve ortamdaki diğer bileşenlerin etkileşimlerine bağlı olarak değişmektedir. Dolayısıyla bu da göstermektedir ki, mikroorganizmaların kullandığı metabolik yollar farklı olabilmektedir. Çünkü, biyosentetik yollardaki farklılık antimikrobiyal madde üretimini etkileyebilmektedir.

Besiyeri içeriğinde azot kaynakları antimikrobiyal madde üretiminde önemli kaynaklardır (Gupte ve Kulkarni 2002). Bu amaçla *Brevibacillus laterosporus* EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi üzerine farklı azot kaynaklarının etkisini araştırmak üzere besi ortamında azot kaynağı olarak bulunan yeast ekstrakt (%0,1) ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (%0,05)'in farklı azot kaynakları ile değişimine gidilmiştir. Bu amaçla, besi ortamına aynı oranda organik azot kaynağı olarak corn step liquer, tripton, skim milk ve inorganik azot kaynağı olarak $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kullanılmıştır. Yapılan çalışmada maksimum inhibisyon zonu 72. saatte *Enterococcus faecalis*'e karşı 20 mm ile içerisinde tripton bulunan besi ortamında ölçülmüştür. Azot kaynağı tercih sırası her bir test bakterisi için farklılık göstermiştir. Hu ve Gulari (1996) ise yapmış oldukları bir araştırmada en iyi antimikrobiyal aktiviteyi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bulunan ortamda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızdan farklı olarak Ripa ve ark. (2009), yeni izole

ettikleri *Streptomyces* sp.'den antimikrobiyal metabolit üretiminde optimal koşulların belirlenmesi amacıyla yaptıkları çalışmada en iyi azot kaynağını yeast ekstrakt olarak bildirmiştir. Gupta ve ark. (2013), yeni izole edilen *Bacillus cereus*'un antimikrobiyal potansiyelinin değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları çalışmada en iyi azot kaynağını pepton olarak belirlediklerini ifade etmişlerdir. Mohan ve ark. (2013) ise *Streptomysis cheonanensis* bakterisinde antimikrobiyal aktivitenin saptanması amacıyla yaptıkları çalışmada $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ 'ün kullanılan diğer azot kaynaklarına göre daha iyi aktivite gösterdiğini belirlemişlerdir.

Brevibacillus laterosporus EA62'nin antimikrobiyal madde üretimi üzerine farklı metal kaynaklarının etkisini araştırmak amacıyla besi ortamında metal kaynağı olarak bulunan MgSO_4 ve CaCO_3 'ün (%0,35) farklı metal kaynakları ile değişimine gidilmiştir. Bu amaçla, besi ortamına aynı oranda CaCl_2 , FeSO_4 , LiSO_4 , NaCl , KCl , MnSO_4 ve MgSO_4 ilave edilmiştir. Antimikrobiyal madde üretimleri karşılaştırıldığında maksimum inhibisyon zonu 72. saatte bütün test bakterilerine karşı inhibisyon zonu veren $\text{MgSO}_4 + \text{CaCO}_3$ (kontrol) kaynaklarında ölçülmüştür. Diğer metal kaynaklarından ise sadece NaCl 'de *Enterococcus faecalis*'e karşı 12 mm çapında inhibisyon zonu görülmüştür. MgSO_4 tek başına kullanıldığında test bakterileri üzerine 11-12 mm arasında inhibisyon zonu göstermiştir. CaCO_3 yerine CaCl_2 kullanıldığında ise inhibisyon zonları görülmemiştir. Joo ve ark. (2007)'nin yapmış oldukları çalışmada da antimikrobiyal aktivitenin NaCl bulunan ortamda diğer metal kaynaklarına göre daha fazla olduğu ifade edilmiştir. Metal iyonlarının antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkisi hakkında literatür bilgisine fazla rastlanılmamıştır. Dolayısıyla elde ettiğimiz sonuçlar literatür bilgisine katkı sağlayacaktır.

Mikroorganizmalardan antimikrobiyal madde üretimi üzerine ortam pH'ının etkisinin önemli olduğu ve pH değişiklikleri sekonder metabolitlerin biyosentezinin düzenlenmesi gibi çoğu hücresel işlemleri etkileyebildiği bildirilmiştir (Solé ve ark. 1997). Çalışmamızda, pH değerinin antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla farklı pH değerlerinde (4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 ve 9.0) ortamlar hazırlanmış ve elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek antimikrobiyal madde üretimi *Escherichia coli*'ye karşı 19 mm inhibisyon zonu ile pH 7.0'de gözlenmiştir. Diğer pH değerlerinde de inhibisyon zonlarının çok büyük değişiklikler göstermemesi, çalışmada

kullanılan mikroorganizmanın hem asidik hem de bazik ortamda da üretim yapabildiğini göstermektedir. Asidik ve bazik koşulların antimikrobiyal madde üretimi üzerine negatif bir etki etmediği gözlenmektedir. Yaptıkları bir çalışmada Chiba ve ark. (1999), antimikrobiyal madde üretiminin genel olarak 6.0-7.5 pH aralığında gerçekleştiğini ve alkali ortamın asidik ortama nazaran daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Anker ve ark. (1947), maksimum basitrasın üretimin pH 7.8 ve 8.0 olduğunu belirtirken, Iglewski ve Gerhardt (1978), *Bacillus subtilis*'te, *Proteus vulgaris*'e karşı 5.7 ile 6.8 pH aralıklarında antimikrobiyal aktivite elde ettiklerini bildirmişlerdir. Diğer yandan Saikia ve ark. (2011), *Brevibacillus laterosporus*' tan elde ettikleri biyokontrol ajanının pH 8.5'te maksimum inhibisyon zonu (27 mm) gösterdiğini bildirmişlerdir. Benzer sonuçlar Yang ve ark. (2014) tarafından da elde edilmiştir. Yaptıkları çalışmaya göre *Brevibacillus laterosporus* BL-21'den elde ettikleri antimikrobiyal maddenin pH 8.5'te en büyük inhibisyon zonu gösterdiğini ifade etmişlerdir. Awais ve ark. (2007), *Bacillus pumilis*, *M. luteus*'a karşı pH 8.0' de maksimum aktivite gösterirken (18 mm) ve *Bacillus subtilis*' in ise pH 9.0 değerinde (15 mm) gösterdiği bildirilmektedir. Hasan ve ark. (2009), serbest ve immobilize *Bacillus pumilus* SAF1 tarafından antimikrobiyal bileşiklerin üretimi üzerine farklı pH değerlerinin etkisini araştırmıştır. Maksimum inhibisyon zonunu *M. luteus* (30 mm) ve *S. aureus* (32 mm) karşı pH 7.0'de elde ettiklerini bildirmişlerdir. Benzer olarak Yousaf (1997)' da *B. licheniformis*'ten maksimum basitrasın üretiminin pH 7.0'de olduğunu bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada, pH'nın antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerini araştırmak üzere 5.5-8.0 pH aralıklarını kullanmıştır. Antimikrobiyal madde üretimi için optimum pH' nın 7.0-7.5'te 32 mm'lik inhibisyon zonu ile *Staphylococcus aureus*'a karşı gözlemlemişlerdir (Kalpana ve ark. 2010). pH 4.0-9.0 aralıklarında antimikrobiyal madde üretimi yapan Muhammad ve ark. (2009) ise, en iyi aktivitenin sırasıyla pH 5.0 ve 4.0'te olduğunu bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra, pH' nın artmasıyla beraber aktivitede düşüş olduğunu ve minimum aktiviteyi pH 9.0'da elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Mikroorganizmalardan antimikrobiyal madde üretimi üzerine inkübasyon sıcaklığının etkisi de önemli bir parametredir. Bu amaçla çalışmamızda, sıcaklık değerinin antimikrobiyal madde üretimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla farklı sıcaklık

değerlerinde (30, 37, 40, 45, 50 ve 55) ortamlar inkübasyona bırakılmış ve elde ettiğimiz sonuçlara göre en yüksek antimikrobiyal madde üretimi 19 mm inhibisyon zonu ile *Escherichia coli*'ye karşı 37 °C' de gözlenmiştir. Joshi ve ark. (2012), *Bacillus* sp.'den peptit antibiyotik üretimi ile ilgili yaptıkları çalışmada en iyi sıcaklık değerinin 40 °C olduğunu bildirmişlerdir. *Bacillus licheniformis*'in mutant suşundan elde ettikleri basitrasinin optimizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmalarında Aftab ve ark. (2010), optimum sıcaklık değerini 37 °C belirlemişlerdir. Benzer sonuçlar Bisht ve ark. (2011) tarafından da bildirilmiştir ve *Bacillus* sp.'den basitrasinin üretimi için yapmış oldukları çalışmada optimum sıcaklık değerini 37 °C olarak bulduklarını ifade etmişlerdir. Başka bir çalışma olarak Saikia ve ark. (2011), *Brevibacillus laterosporus* BPM3'ten elde ettikleri biyokontrol ajanının 30 °C'de maksimum inhibisyon zonu (28,5 mm) gösterdiğini bildirmişlerdir. Mohan ve ark. (2013), *Streptomyces cheonanensis*'in göstermiş olduğu antimikrobiyal aktivite ile ilgili yapmış oldukları çalışmada optimum sıcaklık değerini 30 °C olarak saptadıklarını belirtmişlerdir. Benzer sonuçlar Yang ve ark. (2014) tarafından da bildirilmiş ve *Brevibacillus laterosporus* BL-21'den elde ettikleri antimikrobiyal maddenin maksimum inhibisyon zonunu 30 °C'de verdiğini ifade etmişlerdir. Farklı olarak Gupta ve ark. (2013), ekstrem çevre koşullarından izole edilen *Bacillus cereus*'un antimikrobiyal potansiyelinin değerlendirilmesi adlı çalışmalarında en iyi aktiviteyi 60 °C'de elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

Besinsel ve fiziksel faktörlerden en iyi sonuçların elde edildiği koşullar biraya getirilmiş ve yeni bir modifiye ortam oluşturulmuştur. Bu ortamda antimikrobiyal üretim kontrole göre *Escherichia coli* için %5, *Salmonella typhimurium* için %20, *Yersinia enterocolitica* için %5, *Staphylococcus aureus* için %6, *Enterococcus faecalis* için ise %7'lik bir artış sağlamıştır.

Çalışmamızda fiziksel ve besinsel faktörlerin etkisi araştırıldıktan sonra *Brevibacillus laterosporus* EA62'den elde edilen antimikrobiyal madde kısmi olarak saflaştırılmış ve SDS-PAGE yöntemi ile moleküler ağırlığı tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramasında *Brevibacillus laterosporus* tarafından üretilen antimikrobiyal maddelerin moleküler ağırlıklarının 1-11 kDa arasında olduğu rapor edilmiştir (Zhao ve ark. 2012, Singh ve ark. 2013, Somsap ve ark. 2013). Elde edilen sonuçlara göre antimikrobiyal maddenin moleküler ağırlığı 6,3 kDa olarak bulunmuştur. Somsap ve ark. (2013),

havadan izole ettikleri *Brevibacillus laterosporus* SA14' ten üretilen bakteriyosinin moleküler ağırlığının 6,9 kDa olduğunu ifade etmişlerdir. Diğer bir çalışmada Singh ve ark. (2012)'in *Brevibacillus* sp. GI-9 tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiğin saflaştırılması ve karakterizasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmalarında moleküler ağırlığı 10,1 kDa olarak tespit ettiklerini bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise Zhao ve ark. (2012) *Brevibacillus laterosporus* A60 suşundan elde ettikleri yeni antimikrobiyal peptidin moleküler ağırlığının 1,6020469 kDa olduğunu belirtmişlerdir.

Minimum inhibisyon konsantrasyonunu belirlemek için yapılan çalışma sonucunda *B. laterosporus* EA62'den elde edilen yeni bileşenin MİK değeri >256 µg/mL olarak saptanmıştır. *B. laterosporus*' dan elde edilen antimikrobiyal madde ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda MİK değerine bakıldığında Jiang ve ark. (2015), küflere karşı MİK değerinin 12,5 µg/mL olduğunu ifade etmişlerdir. Chunglok ve Lertcanawanichakul (2013) ise yaptıkları çalışmada metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'a karşı 0,003-0,049 mg/ml arasında değişen MİK değerleri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Singh ve ark. (2012) *Brevibacillus* sp. Strain GI-9' dan elde ettikleri antimikrobiyal maddenin MİK değerini 500 µg/ml olduğunu belirtmişlerdir.

TLC-biyootografi yönteminde *Brevibacillus laterosporus* EA62'den elde edilen antimikrobiyal maddenin *Staphylococcus aureus*'a karşı Rf değeri 0,04 olarak bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada Saikia ve ark. (2011) ise Rf değerini 0,22 olarak bulduklarını ifade etmişlerdir. Farklı olarak Panda ve ark. (2011) *S. epidermidis*'e karşı Rf değerini 0,72 olduğunu bildirmişlerdir.

Görüldüğü gibi literatürlerde *Bacillus* ve *Brevibacillus* türlerinden elde edilen antimikrobiyal maddeler ile ilgili çok çeşitli sonuçlar bildirilmektedir ve bu da bize bu türlerin çok çeşitli özelliklerde antimikrobiyal madde üretme yeteneklerine sahip olduklarını göstermektedir.

Bu çalışmada sonuç olarak antimikrobiyal potent olan *Brevibacillus laterosporus* EA62, 16S rRNA analizi ile tür düzeyinde adlandırılmıştır. Antimikrobiyal madde üretimi üzerine bazı parametrelerin etkisine bakılmış bu amaçla, pH ve sıcaklık, aminoasit,

karbon, azot ve metal kaynakları denenmiştir. Seçilen izolattan antimikrobiyal madde üretimi için optimum koşullar glutamik asit (19 mm), glukoz (19 mm), tripton (20 mm), $MgSO_4+CaCO_3$ (19 mm), pH 7.0 (19 mm) ve sıcaklık 37 °C (19 mm) olarak bulunmuştur. Moleküler ağırlığı 6,3 kDa olarak tespit edilmiştir. MİK değeri >256 $\mu g/mL$ olarak saptanmıştır. TLC-biyootografi yönteminde ise Rf değeri 0,04 olarak bulunmuştur.

Elde edilen bu yeni izolatın yüksek oranda antimikrobiyal madde üretim kapasitesi saptanmıştır. Bu çalışma ilaç endüstrisine ışık tutacak katkılar sağlayabilir ve daha sonraki yapılacak kapsamlı çalışmalara öncülük edebilir.



KAYNAKLAR

Aftab, M.N., Haq, I.U., Baig, S. 2010. Optimization of different parameters for the production of Bacitracin in synthetic medium by *Bacillus licheniformis* mutant strain Uv-Mn-Hn-8. *Pakistan Journal of Science*, 62(2).

Agathos, S.N., Demain, A.L. 1988. The In Vivo Longevity of Antibiotic Synthetases, Horizons of Biochemical Engineering, edited by S. Aiba, Oxford University Press, Oxford.

Ainsworth, G.C., Brown, A.M., Brownlee, G. 1947. Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer, *Nature*, 160:263.

Aktuğlu, Y., 1997. İstanbul Üniversitesi Cerahpasa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu 2-3 Mayıs, İstanbul, 11-25.

Al-Khafaji, Z.M. 1990. Growth and nutritional requirements for industrially important microorganisms in biotechnology. University of Baghdad.

Allan, R.N., Lebbe, L., Heyrman, J., De vos, P., Buchanan, C.J., Logan, A., 2005. *Brevibacillus levickii* sp. nov. and *Aneurinibacillus terranovensis* sp. nov., two novel thermoacidophiles isolated from geothermal soils of northern Victoria Land, Antarctica. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55: 1039-1050.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215,403-410.

Anker, H.S., Johnson, B.A., Goldberg, J., Meloney, F.L. 1947. Bacitracin: methods of production, concentration, and partial purification. *Bacteriology*, 55: 251-249.

Anonim, 2005. Fermentation technology, http://www.ensymm.com/pdf/ensymm_fermentation_abstract.pdf- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2008. The antibiotic pipeline, www.rff.org/RFF/Documents/ETC-06.pdf- Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Protein biyosentezi, http://tr.wikipedia.org/wiki/Protein_biyosentezi- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Prontosil, <http://en.wikipedia.org/wiki/Prontosil>- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Hall of Fame, http://www.invent.org/hall_of_fame/32.html- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. GlaxoSmithKline, <http://en.wikipedia.org/wiki/GlaxoSmithKline#History>- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Nonribosomal Peptide Synthetases, <http://linux1.nii.res.in/~zeeshan/nrps.html>- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Functional genome analysis of the plant-growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42; characterizing its production and regulation of nonribosomal peptide synthetases, <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Tiedosto: Bacitracin, <http://www.fi.wikipedia.org/wiki/Tiedosto: Bacitracin.png>- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Gramicidin, <http://www.usermeds.com/medications/gramicidin->(Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Mycobacillin, <http://en.wikipedia.org/wiki/Mycobacillin-> (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Tyrocidine, <http://chem257.pbworks.com/w/page/15645836/Tyrocidine-> (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Quarterly Chemical Report: Lichenysin A and Surfactin http://www.acschemtox.org/inside/Pages/newsletter_12-09.aspx- (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Bacilycin, <http://www.guidechem.com/dictionary/1395-22-8.html-> (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Subtilin, <http://www.guidechem.com/cas-139/1393-38-0.html-> (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. İturins, <http://blogs.princeton.edu> - (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Zwittermicin, http://en.wikipedia.org/wiki/Zwittermicin_A - (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Bactibase, <http://bactibase.pfba-lab-tun.org-> (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Polymyxin, <http://www.antibioticslist.com/polymyxin-m.html> - (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. <http://archive.microbelibrary.org/edzine/details.asp?id=1796&Lang=-> (Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Disc Diffusion method, <http://www.kmle.co.kr/search.php?Search=disk+diffusion+method&Page=2->(Erişim Tarihi: 2017).

Anonim, 2017. Türkiye İl Haritası <https://www.mgm.gov.tr/>- (Erişim Tarihi: 2017).

Arai, T., Kuroda, S., Mikami, Y. 1976. Classification of Actinomycetes with Reference to Antibiotics Production In Actinomycetes. The Boundary Microorganisms. Editors: T. Arai, Toppan Company Limited, Tokyo-Singapor, pp:543-651.

Awais, M., Shah, A.A., Hameed, A., Hasan, F. 2007. Isolation, Identification and Optimization of Bacitracin Produced by *Bacillus* sp. Department of Microbiology,

Faculty of Biological Sciences, Quaid-i-Azam University, Islamabad, Pakistan. *Pak. J. Bot.*, 39(4): 1303-1312.

Azevedo, E.C., Rios, E.M., Fukushima, K., Campos-Takaki, G.M. 1993. Bacitracin Production by a new strain of *Bacillus subtilis*, Applied of Biochemical and Biotechnology., 42:1-6.

Balkar, N. 2007. Topraktan İzole Edilen Actinomycet'lerin Antimikrobiyal Aktivitesinin Saptanması. *Yüksek Lisans Tezi*, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.

Banerjee, P.C. 1977. Lytic effect of mycobacillin and its derivatives on erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 12(1):124-5.

Banwart, G.J. 1983. Basic Food Microbiology Avi. Publishing Company Inch. P: 118-120.

Barnes, E. M. 1949. Laterosporin A ve laterosporin B, antibiotics produced by *B. laterosporus*. *Brith. J. Exp. Patol.*, 30:100.

Barsby, T., Michael, T., Kelly, M.T. 2002. Tupuseleiamides and Basiliskamids, new acyldipeptides produced in culture by a *Bacillus laterosporus* isolate obtained from a tropical marine habitat. *Journal of Neuroscience Research.* 65(10), 1447-1451.

Bauer, A.W., Perry, D.M., Kirby, W.M.M. 1959. Single Disc Antibiotic Sensitivity Testing of *Staphylococci*. *A.M.A. Arch. Intern. Med.* 104:208–216.

Berdy, J. 1974. Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.*, 18: 309-406.

Berdy, J. 1986. Further antibiotics with practical application. Editors: H. Pape and H.J. Rhem, VCH Verlag, Weinheim. *Biotechnology* 4:487-505.

Berkeley, R.C.W., Logan, N. 1997. *Bacillus, Alicyelobacillus* and *Paenibacillus*. Editors: Emmerson, A.M., Hawkey, P.M., Gillespie S.H. Principles and practise of Clinical Bacteriology. Chichester: Wiley, 185 p. *Biotechnol.*, 45: 327-332.

Bharti, P., Anand, V., Chander, J., Singh, I. P., Singh, T. V., Tewari, R. 2012. Heat stable antimicrobial activity of *Burkholderia gladioli* OR1 against clinical drug resistant isolates. *Indian J Med Res.*, 666-671.

Bisht, S.S., Praveen, B., Panda, A., Rajakumar, V. 2011. Solation, purification and Characterization of Bacitracin from *Bacillus* sp. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3.

Bozoğlu, C. 2014. Ağrı diyadin kaplıcasından izole edilen termofilik *Brevibacillus* sp.(Z1) bakterisinden lakkaz enziminin saflaştırılıp, karakterize edilmesi ve endüstride kullanılabilirliğinin araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi*, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri nstitüsü. Erzurum.

Brazhnikova, M.G., Zbarskii, V.B., Kudinova, M.K. 1973. Antibiotiki, 678.

Büber, E., Açıan, N.L. 2004. Ribozom Dışı Yolla Sentezlenen Biyoaktif Peptidler *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:43-48.

Chawawisit, K., Lertcanawanichakul, M. 2008. Minimum inhibitory concentration (MIC) of crude preparations of *Brevibacillus laterosporus* SA14 bioactive material compared to vancomycin and oxacillin, against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *World J Microbiol Biotechnol.*, 24:2199–2204.

Chawawisit, K., Lertcanawanichakul, M. 2014. Purification of Bioactive Compounds Produced by *Brevibacillus laterosporus* Sa14 and Its Anti-Mrsa Activity. *Int J Pharm Bio Sci.*, 5(2): (B) 955 – 961.

Chiba H., Agematu H., Kanito R., Terasawa T., Sakal K., Dobashi, K., Yoshioka, T. 1999. Rhodopeptins (Mer-N 1033), Novel cyclic tetra peptides with antifungal activity from rhodococcus species. *J. Antibiol.*, 52 (8): 695-699.

Chunglok, W., Lertcanawanichakul, M. 2013. Characterization of bioactive crude from culture broth of *Brevibacillus laterosporus* SA14 against clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and in vitro cytotoxicity to human colon cancer HT-29 cells. *Journal of Agricultural Technology.* 9(6): 1485-1495.

Claus, D., Berkeley, R.C.W., 1986. Genus Bacillus Cohn 1872: 1105–1140.

Clinical Laboratory Standards Institute 2003. Approved standard M7-A6. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.* 6th edn. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne.

Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S. J.B., Kosaric, N. 1981. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42:408.

Cruger, W., Cruger, A. 1984. Biotechnologie-Lehrbuch der angewandten Microbiologie, R. Oldenbourg Verlag München Wien., 197-242.

Çakı, Z. 2009. Ege Denizi Kıyılarında Bulunan Bazı Makro Alg Türlerinin antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin saptanması. *Doktora Tezi*, Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.

Dai, L., Dai, W., Song, X. 2010. A comparative study of competitiveness between different genotypes of weedy rice and cultivated rice. *Pest management science*, 70(1):113-122.

Demain, A.L. 1999. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52:455-463.

- Derderian, S.L. 2007.** Alexander Fleming's Miraculous Discovery of Penicillin Undergraduate Student, B.A. in Mathematics Program, Rivier College *Rivier Academic Journal*, 3(2).
- Desai, J.D., Banat, I.M. 1997.** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1):47-64.
- Desjardine, K., Pereira, A., Wright, H., Maitainaho, T., Kelly, M., Andersen, R.J. 2007.** Tauramamide, a lipopeptide antibiotic produced in culture by *Brevibacillus laterosporus* isolated from a marine habitat: structure elucidation and synthesis. *J Nat Pro*, 70: 1850-1853.
- Domagh, G. 1935.** Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Dtsch Med Wochenschr* 829: 61.
- Drablos, F., Nicholson, D., Ronning, M. 1999.** EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1431:433-442.
- Drautz, H., Reuschenbach, P., Zahner, H. 1985.** Metabolic Products of Microorganisms. 225 Elloramycin. A new anthracyclin-like antibiotic from *Streptomyces olivaceus*. Isolation Characterization Structure and Biological Properties. *The Journal of Antibiotics*, 38:1291-1301.
- Egorov, N.S. 1985.** Antibiotics: A Scientific Approach. Mir Publishers. Moscow.
- Egorov, N.S., Loria, Z., Khamrun V.S.N. 1986.** Effect of culture medium composition on bacitracin synthesis and sporulation in *Bacillus licheniformis* 28 KA. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 22:107-111.
- Eltem, R., Uçar, F. 1998.** Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl'den izole edilmiş 23 *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması, *KÜKEM Dergisi*, 21, 1, pp:57-64.
- Espeso, E.A., Tilburn, J., Arts, H.N., Peñalva, M.A. 1993.** pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. *EMBO J.*, 12: 3947-3956.
- Emmerich, R., Löw, O. 1899.** Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. *Zeitschr. F. Hygiene* 31:1-65.
- Faheem, F., Saeed, S., Rasool, S.A. 2007.** Studies on brevicin AF01: a bacteriocin like inhibitory substance active against methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Pakistan J Bot.*, 39:1293-1302.
- Favret, M.E., Yousten, A.A. 1985.** Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J. Invertebr. Pathol.*, 45:195-203.

Garrity, G.M. 2004. Taxonomic Outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Second Edition, Release 5.0, *Springer-Verlag*, New York. PP:529-531.

Gevers, W., Kleinkauf, H., Lipmann, F. 1969. Peptidyl transfers in gramicidin S biosynthesis from enzyme bound thioester intermediates. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 63:35-42.

Gupta, M. K., Gauri, S., Shrivastava, A. 2013. Assessment of antimicrobial potential of *Bacillus cereus* isolated from extreme environmental condition. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 3 (2):58-63.

Gupte, M.D., Kulkarni, P.L. 2002. A study of antifungal antibiotic production by *Streptomyces chattanoogensis* MTCC 3423 using full factorial design. *Lett. Appl. Microbiol.*, 35:22–26.

Haddar, H.O., Aziz, G.M., Al-Gelawi, M.H. 2007. Optimization of Bacitracin Production by *Bacillus licheniformis* B5. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(6):927-976.

Hanlon, G. W., Hodges, N. A. 1981. Requirement for glucose during production of extracellular serine protease by cultures of *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letters*, 11:51-54.

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.

Haavik, H.I. 1974. Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus licheniformis*: Role of catabolite repression and organic acids. *J. Gen. Microbiol.*, 84: 321-326.

Hiraoka, H., Asaka, O., Ano, T., Shoda, M. 1992. Characterization of *Bacillus subtilis* RB14, coproducer of peptide antibiotics iturin a and surfactin, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38:635-640.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition. pp:559.

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

Hu, Z., Gulari, E. 1996. Extraction of Aminoglycoside Antibiotics with Reverse Micelles. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 65:45-48.

Hughes, M.N., Poole, R.K. 1989. Manganese transport in Bacteria, Ions and Microorganisms, Metals and Micro-organisms, Chapman and Hall, London.

Hyung, M.J., Kwang-Soo, K., Jong-Hyun, P., Myung-Woo, B., Young-Bae, K., HanJoon, H. 2001. Acteriocin with a broad antimicrobial spectrum, produced by *Bacillus* sp. isolated from Kimchi. *J Microbiol Biotech*, 11:577–584.

Huang, X., Tian, B., Niu, Q., Yang, J., Zhang, L., Zhang, K. 2005. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *J Res Microbiol*, 156: 719-727.

Iglewski, W.J., Gerhardt, N.B. 1978. Identification of an antibiotic-producing bacterium from the human intestinal tract and characterization of its antimicrobial product. *Antimicrob. Agents Chem.*, 13: 81-89.

Ilić, S., Konstantinović, S., Veljković, V.B., Savić D.S., Gojgić-Cvijović, G.D. 2010. The impact of different carbon and nitrogen sources on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus* CH-7, *Current Research Technology and Education Topics Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*.

Inan, K., Canakci, S., Belduz, A.O. Sahin, F., 2012. *Brevibacillus aydinogluensis* sp. nov., a moderately thermophilic bacterium isolated from Karakoc hot spring. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 62: 849–855.

Ishihara, H., Shimura, K. 1988. Further evidence for the presence of a thiazoline ring in the isoleucylcysteine dipeptide intermediate in bacitracin biosynthesis. *FEBS Lett.*, 226, 319.

Iwai, Y., Omura, S. 1982. Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiotics*, 35:123-141.

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.

James, R., Lazdunski, C., Pattus, F. 1991. Bacteriocins, Microcins and Lantibiotics. New York: Springer-Verlag Vol 65: 519.

Jiang, H., Wang, X., Xiao, C., Wang, W., Zhao, X., Sui1, J., Sa1, R., Guo, T.L., Liu, X. 2015. Antifungal activity of *Brevibacillus laterosporus* JX-5 and characterization of its antifungal components. *World J Microbiol Biotechnol.*, 31:1605–1618.

Joo M.H., Sung-Ho, H., Yong-Soo, H., Kim, J.Y. 2007. Isolation, Identification, and Characterization of *Bacillus* strains from the Traditional Korean Soybean-fermented Food, Chungkookjang. *J. Appl. Biol. Chem*, 50(4):202-210.

Joshi, R. D., Hamde, V.S., Umrikar, A.M., Kulkarni, S.S., Bhate, M.A. 2012. Studies on production of peptide antibiotic by thermotolerant *Bacillus* sp. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(6):30-33

Kalpana, 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*, 24(1): 2134 – 2139.

Kamat, T.K., Kiran, S., Kerkar, S. 2011. Antimicrobial potential of *Bacillus maiismortui*, a salt pan isolate of cavellosim, goa, India. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 2(3):321-328.

Kamiyama, T., Umino, T. Nakamura, Y., Itezono, Y., Sawairi, S., Satoh, T., K. Yokose. 1994. Bacithrocins A, B and C, novel thrombin inhibitors. *J. Antibiot.*, 47:959–968.

Katz, E., Demain, A.C. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriol. Rev.*, 41, 449.

Kim, M.K., Sathiyaraj, S., Pulla, R.K., Yang, D.C., 2009. *Brevibacillus panacihumi* sp. nov., a-glucosidase-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59:1227–1231.

Kirby, W.M.M., Yoshihara, G.M., Sundsted, K.S., Warren, J.H. 1957. Clinical usefulness of a single disc method for antibiotic sensitivity testing. *Antibiotics Annu.* 892:1956-1957.

Klein, C., Kaletta, N., Entain, K.D. 1992. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1:132.

Kresge, N., Simoni, R.D., Hill, R.H. 1942. Selman Waksman: the Father of Antibiotics The Chemical Nature of Actinomycin, an Anti-microbial Substance Produced by *Actinomyces Antibioticus* (Waksman, S.A., and Tishler, M.) *J. Biol. Chem.* 142:519-528.

Kumazawa, J., Yagisawa, M. 2002. The history of antibiotics: The Japanese story. *J Infect Chemother* 8:125–133.

Kuyucu, N. 2007. Antibiyotik Direnci. *Çocuk Enf. Dergisi, Özel Sayı 1*: 33-8.

Kwaguchi, H., Naito, T., Nakagawa, S. 1978. BBK 8, a new semisynthetic aminoglycoside antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 25: 925.

Laemmli, D.K., 1970. Cleavage of structural proteins during in assembly of the heat of bacteriophage, T4. *Nature*, 227: 680-685.

Laland, S.G., Zimmer, T. 1984. Synthesis of peptid antibiotics by the thiotemplate mechanism, *Biologically Active Principles of Natural Products*, editors: W. Voelter and D. G. Daves, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Lancini, G., Parenti, F., Gallo, G.G. 1995. *Antibiotics: A Multidisciplinary Approach*. Plenum Pres, New York and London.

Latoud, C., Peypoux, F., Michel, G. 1987. Action of iturin A, an antifungal antibiotic from *Bacillus subtilis*, on the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: modifications of membrane permeability and lipid composition. *The Journal of antibiotics*, 40(10):1588-1595.

Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigeo, D., Epton, H. A. S., Harbour A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. *Journal of Applied Microbiology*, 78(2):97-108.

Le Marrec, C., Hyronimus, B., Bressollier, P., Verneuil, B., Urdaci, M.C. 2000. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I4. *Appl Environ Microbiol*, 66, 5213–5220.

Lipmann, F. 1971. Attempts to map a process evolution of peptide biosynthesis. *Science*, 173:75-84.

Lipmann, F., Gevers, W., Kleinkauf, H., Roskoski, R. 1986. *Enzymology*, 9:908.

Logan, N.A., Turnbull, P.C.B. 1999. *Bacillus* and a recently derived genera. Editors: Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C., Tenover, R.H. *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, pp: 357-358.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 2000. Brock Biology of Microorganisms. Ninth Edition. pp:393-394.

Manson, E.E.D., Pollocmk, R. 1953. The Thermostability of Penicillinase National Institute for Medical Research, Mill Hill, N. W. 7. *J. gen. Microbiol.*, 8:163-167.

Makovitzki, A., Avrahami, D., Shai, Y. 2006. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:15997–16002.

Mayilraj, S., Stackebrandt, E. 2014. The Prokaryotes. The Family Paenibacillaceae pp:267-280.

McGuire J.M., Bunch R.L., Anderson R.C., Boaz H.E., Flynn E.H., Powell H.M., Smith J.W. 1952. Ilotycin, a new antibiotic. *Antibiot Chemother (Northfield)*, 2(6):281-3.

Migula, W. 1900. System der bakterien, Gustav Fischer, Jena, Germany, 2.

Milner, J.L., Silo-Suh, L., Lee, L. C., He, H., Clardy, J., Handelsman, J. 1996. Production of kanosamine by *Bacillus cereus* UW85, *Applied and Environmental Microbiology*, 62(8):3061-3065.

Mincey, B.A., Parkulo, M.A. 2001. Current Concepts. Antibiotic Prescribing Practices in a Teaching Clinic: Comparison of resident and staff physicians. *Southern Medical Journal* 94:365-369.

Mohan, J., Sirisha, B. Ramana, T. 2013. Antimicrobial activity and characterization of marine *Streptomysis cheonanensis*. *International Journal of Advanced Research*, 2(1): 634-647.

Morikawa, M., Ito, M., Imanaka, T. 1992. Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74(5):255-261.

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.

Nakano, M.M., Zuber, P. 1990. Molecular biology of antibiotic production in *Bacillus*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 3:223.

Nathan, P., Law, E.J., Murphy, D.F., MacMillan, B.G. 1978. A laboratory method for selection of topical antimicrobial agents to treat infected burn wounds. *Burns*, 4:177-187.

Nelson, D.L., Cox, M.M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. Third edition. *New York: Worth Publishers*, 10:35-56.

Nemoto, K., Abe, F., Nakamura, T. 1987. Effects of spergualin and 15deoxyspergualin on the development of graft-versus-host disease in mice. *Transplant Proc*, 19: 3520-3521.

Oliveira, E.J., Rabinovitch, L., Monnerat, R.G., Passos, L.K.J., Zahner, V. 2004. Molecular Characterization of *Brevibacillus laterosporus* and Its Potential Use in Biological Control. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11): 6657–6664.

Orlova, M.V., Smimova, T.A., Ganushkina, L.A., Yacubovich, V.Y., Azizbekyan, R.R. 1998. Insecticidal activity of *Bacillus laterosporus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:2723–2725.

Oskay, M., Tamer, A.U. 2009. Streptomyces Kökenli Antibiyotiklerin Dünü, Bugünü ve Yarını. *e-Journal of New World Sciences Academy Ecological Life Sciences*, 4(2):48-60.

Oscáriz, J.C., Lasa, I., Pisabarro, A. 1999. Detection and characterization of cerin 7, a new bacteriocin produced by *Bacillus cereus* with a broad spectrum of activity, *FEMS Microbiology Letters*, 178, 337-341.

Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G. 2000. Characterization and mechanism of action of cerein 7, a bacteriocin produced by *Bacillus cereus* Bc7. *Journal of Applied Microbiology*, 89(2):361-9.

Panda, S. K., Padhi, L.P., Mohanty, G. 2011. Antibacterial activities and phytochemical analysis of *Cassia fistula* (Linn.) leaf. *J. Adv. Pharm. Tech. Res.*, 2(1).

Perez, C., Suarez, C., Castro, G.R. 1993. Antimicrobial Activity Determined in Strains of *Bacillus circulans* Cluster. *Folia Microbiol.* 38(1):25-28.

Pokusaeva, K., Kuisiene, N., Jasinskyte, D., Rutiene, K., Saleikiene, J. 2009. Novel bacteriocins produced by *Geobacillus stearothermophilus*. *Cent Eur J Biol.*, 4:196–203.

Pollack, A. 2002. Drug research yields a decreasing return, *The New York Times*, April 20.

Porter, J.N. 1976. Antibiotics In Industrial Microbiology. Ed.by B.M Miller & W. Litsky, Mc Graw- Hill BookCompany. pp: 460-478.

Preston, R.A., Wick W.E. 1971. Pre-clinical assesment of the antibacterial activity of Nebramycin factor 6. *Antimicrob Agents Chemother*, 1970: 322.

Ren, Z.Z., Zheng, Y., Sun, M. 2007. Purification and properties of an antimicrobials substance from marine *Brevibacillus laterosporus* LH-1. *Acta Micobiological Slinica*, 47(6):997-1001.

Riley, M.A. 1998. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Ann Rev Genet* 32, 255–278.

Riley, M.A. 2003. A Phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J Evol Biol* 16:690–697.

Ripa, F. A., Nikkon, F., Zaman, S., Khondkar, P. 2009. Optimal Condition for Antimicrobial Metabolites Production from a New *Streptomyces* sp. RUPA-08PR Isolated from Bangladeshi Soil. *The Korean Society of Mycology*, 37(3):211- 214.

Rivers, D. B., Vann, C. N., Zimmack, H.L., Dean, D.H. 1991. Mosquitocidal activity of *Bacillus laterosporus*. *J. Invertebr. Pathol.* 58:444–447.

Romero, D., Vicente, A., Rakotoaly, R.H., Dufour, S.E., Veening, J.W., Arrebola, E., Cazorla, F.M., Kuipers, O.P., Paquot, M., Pérez-García, A. 2007. The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca* MPMI. *The American Phytopathological Society*, 20(4):430–440.

Roskoski, R. Jr., Kleinkauf, H., Gevers, W., Lipmann, F. 1970. Isolation of enzyme-bound peptide intermediates in tyrocidine biosynthesis. *Biochemistry*, 9:46-51.

Rosovitz, M., Voskuil, M., I., Chambliss, G., H. 1998. *Bacillus*, Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, Editors: L. Collier, A. Balows and M. Sussman, Oxford University Press, Ninth Edition, Vol: 2, New York.

Saikia, R., Gogoi, D.K., Mazumder, S., Yadav, A., Sarma, R.K. 2010. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam. India. *Microbiol Res (Elsevier)*, 166:216–225.

Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 4:406-425.

Sanders, M.E., Morelli, L., Tompkins, T.A. 2003. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus* and *Brevibacillus*. *Comp Rev Food Sci Food Safety*, 2:101-110.

Sarıkaya, E., 1995. α -amilaz Üreten Bazı *Bacillus* Suşlarının Gelişme Parametreleri, Enzim Özellik ve Üretim Koşullarının Optimizasyonu. *Doktora Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Sarışeker, N. 1983. Fermentasyon Yolu ile Antibiyotik Üretimi, Endüstriyel Mikrobiyoloji, editör: E. T. Çetin, İstanbul Üniversitesi Vakfı, pp:280-304.

Sebei, S., Zendo, T., Boudabous, A., Nakayama, J., Sonomoto, K. 2007. Characterization, N-terminal sequencing and classification of cerein MRX1, a novel bacteriocin purified from a newly isolated bacterium: *Bacillus cereus* MRX1. *J Appl Microbiol*. 103(5):1621-31.

Sen, K.S., Haque, F.S. and Pal, C.S. 1995. Nutrient optimization for production of broad spectrum antibiotics by *Streptomyces antibioticus* Str. 15.4. *Acta. Microbiol. Hung.* 42:155-162.

Shida, O., Takagi, B., Kadowaki, K. And Komagata, K. 1996. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46:939–946.

Shoji, J. Sakazaki, R., Wakisaka, Y., Koizumi, K., Mayama, M. Matsuura, S. Matsumoto, K. 1976. Isolation of A New Antibiotic, Laterosporamine. *The Journal of Antibiotics*.

Simirnova, T.A., Minenkova, I.B., Orlova, M.V. 1996. The crystal-forming strains of *Bacillus laterosporus*. *Research in microbiology*, 147:343-350.

Silo-Suh, L.A., Lethbridge, B.J., Raffel, S.J., He, H., Clardy, J., Handelsman, J. 1994. Biological Activities of two fungistatic Antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85, *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(6):2023-2030.

Singh, P.K., Chittputna, A., Sharma, V., Patil, P.B., Korpole, S. 2012. Identification, purification and characterization of Laterosporulin, a novel bacteriocin produced by *Brevibacillus* sp. strain GI-9. *PLoS ONE*, 7:1-8.

Singh, A.P., Mishra, S. 2013. Studies on Antibiotic Production by Soil Microflora and their Biochemical Characterization from Different Industrial Waste Polluted Soil Samples in (Uttar Pradesh & Uttarakhand) India. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 7(4):32-43.

Sneath, P.H.A. 1986. Endospore-forming gram positive rods, and cocci, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Editörler: P.H.A. Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G. Holt", Williams and Wilkins, Baltimore, 2:1104-1139.

Solé, M., Francia, A., Rius, N., Lorén, J.G. 1997. The role of pH in the "glucose effect" on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 25:81-84.

Somsap, O., Lertcanawanichakul, M. 2013. Characteristic and the mode of action of Bacteriocin produced by *Brevibacillus laterosporus* SA14 which isolated from the air. *Journal of Agricultural Technology*, 9(5): 1319-1331

Srinivasulu, B., Adinarayana, K., Ellaiah, P. 2003. Investigations on neomycin production with immobilized cells of *Streptomyces marinensis* NUV-5 in calcium alginate matrix. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 21:57-60.

Stabb, E.V., Jacobson, Lynn, M., Handelsman, J. 1994. Zwittermicin A-Producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(122):4404-4412.

Stansly, P.G., Shepard, R.G., White, H.J. 1947. Polymyxin: new chemotherapeutic agent. *Bulletin of the Johns Hopkins Hosp.*, 81:43-45.

Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Institut für Mikrobiologie, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Marie-Curie-Str. 9, 60439 Frankfurt/Main, Germany. *Mol Microbiol.*, 56(4):845-57.

Svetoch, E.A., Stern, N.J., Eruslanov, B.V. 2005. Isolation of *Bacillus circulans* and *Penibacillus polymyxa* strains inhibitory to *Campylobacter jejuni* and genomic sequence comparison with *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acid Res.*, 28:4317-4331.

Tabak, F. 1997. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu. İstanbul, 81-90.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.K. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol Rev.*, 40:722-756.

Takeuchi, T. 1984. Spergualin a novel antitumor antibiotic produced by *Bacillus laterosporus*. *Gan to Kagaku Ryoho.*, 11:2633-2639.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007.** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution.*, 24:1596-1599.
- Tenover, C.F. 2006.** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American Journal of Medicine.* 119, 3-10.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.1994.** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22,4673-4680.
- Trautwein, G., Kuhlmann, K.P. 1982.** Immunofluoreszenz, Theorie and Praxis, Hannover, pp:52.
- Tunç, K. 1995.** Biyoteknoloji, Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi, Ankara, pp: 80-86.
- Umezawa, H. 1958.** Kanamycin: It's discovery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 76:20-26.
- Umezawa, H., Tsuchiya, T., Muto, R., Umezawa, S., 1972.** Studies on Aminosugars XXIX. The synthesis of 3'-O-Methylkanamycin. *Microbiology Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 45:2842-2847.
- Umezawa, K., Takeuchi, T. 1987.** Spergualin: a new antitumour antibiotic. *Biomed Pharmacother*, 41:227-232.
- Van Hoek, A., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, P.A., Aarts, J.M.H. 2011.** Acquired antibiotic resistance: an overview. *Frontiers in Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy.* 2:203.
- Varaldo, P.E., 2002.** Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50:1-4.
- Versalovic, J., Vilson, M. 2008.** Therapeutic Microbiology: Probiotics and related strategies. *American Society for Microbiology Washington D.C.* pp:62.
- Waite, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., Higton, G. 2006.** Industrial Microbiology An Introduction. Blackwell Science. pp:24.
- Waksman, S.A. 1967.** Actinomycetes: A Summary of Current Knowledge. The Ronald Pres Company, New York.
- Walker, J.E., Abraham, E.P. 1970.** The structure of bacilysin and other products of *Bacillus subtilis*. U.S.A. *Biochem J.*, 118(4): 563-570.
- Weinstein, M.J., Leedeman, G.M., Oren, E.** Gentamicin: a new broad spectrum antibiolytic complex. *Antimicrob Agents.*

- Wipat, A., Harwood, C. R. 1999.** The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology Ecology*, 28:1-9.
- Wise, R. 1998.** Science, medicine, and the future: the development of new antimicrobial agents. *British Medical Journal*, 4:317, 643.
- Woese, C. R., Wolfe, R. S. 1985.** The bacteria, Volume VII, Academic Press, USA, ISBN: 0-12-307208-5.
- Woese, C.R. 1999.** Prokaryote systematics. The evolution of a science in: The prokaryotes. A handbook on the biology of Bacteria: Ecophysiology, isolation, identification, applications, 3rd. Edt., (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H. and Stackebrandt, E., Eds). Springer-Verlag, New York (electronic publication).
- Wu, Y.Y., Ma, D.R., Li, J.Y. 2013.** Nutrient competition of weedy rice and cultivated rice under whole control. *Southeast China Journal of agricultural sciences*, 26(6):2312-2315.
- Xianqing, H., Yufen, W., Yanhong, C., Xie, H. 2010.** Optimization of Antifungal Effect of Surfactin and Iturin to *Penicillium notatum* in Syrup of Peach by RSM. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 16(2):63-69.
- Yang, Z., Xu, D., Du, C. 2014.** Studies on fermentation conditions of antimicrobial substances produced by *Brevibacillus laterosporus* BL-21. *Agricultural Science and Technology*, 15(11):1852-1856.
- Yıldırım, A., 2004.** Topraktan izole edilen bazı aktinomiset izolatlarının antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. *Yüksek Lisans Tezi*, Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Yousaf, M. 1997.** Studies on the cultural conditions for the production of antibiotic bacitracin by *B. licheniformis*. PhD Thesis, Islamia University, Bahawalpur.
- Yücel, A., Tabak, F., Öztürk, R., Mert, A. 1998.** Günümüzde Antimikrobik Tedavi, İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayını, No 12, İstanbul.
- Zeigler, D.R. 2013.** The Family Paenibacillaceae, *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains Part 5, Ph.D. BGSC Director.
- Zhang, Z., Dai, W., Song, X. 2013.** A model of relationship between weedy rice seed-bank Dynamics and rice-crop infestation and damage in Jiangsu Province, China. *Pest management science*, 3649.
- Zhao, J., Guo, L., Zeng, H., Yang, X., Yuan, J. Shi, H., Xiong, Y., Chen, M., Han, L., Qju, D. 2012.** Purification and characterization of a novel antimicrobial peptide from *Brevibacillus laterosporus* strain A60. Elsevier.33:206-211.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Alev USTA AK

Doğum Yeri : Osmangazi

Doğum Tarihi : 29.07.1988

Eğitim Durumu

Lise : Bursa Atatürk Lisesi / 2002-2006

Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2006-2010

Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi / 2010-2012

Çalıştığı Kurum : Milli Eğitim Bakanlığı/ Biyoloji Öğretmeni

İletişim (e-posta) : alevusta@gmail.com

Yayınları:

Usta, A., Demirkan, E. 2013. The Effect of Growth Parameters on the Antibiotic Activity and Sporulation in *Bacillus* spp. Isolated from Soil. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(5):2310-2313.

Demirkan, E., Baygın, E., Usta, A. 2014. Screening of phytate hydrolysis *Bacillus* sp. isolated from soil and optimization of the certain nutritional and physical parameters on the production of phytase. *Turkish Journal of Biochemistry*, 39(2):206–214.

Aybey, A., Usta, A., Demirkan, E. 2014. Effects of Psychotropic Drugs as Bacterial Efflux Pump Inhibitors on Quorum Sensing Regulated Behaviors. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 4(2):128-131.