



KÜTAHYA İLİNDE SATIŞA SUNULAN BALLARIN BİYOAKTİVİTESİ, BU
BALLARDAN İZOLE EDİLEN AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN
İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Nilay GÖREN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Temmuz – 2017

KÜTAHYA İLİNDE SATIŞA SUNULAN BALLARIN BİYOAKTİVİTESİ, BU
BALLARDAN İZOLE EDİLEN AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN
İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Nilay GÖREN

Dumlupınar Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği Uyarınca

Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman : Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Temmuz - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Nilay GÖREN'in YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “KÜTAHYA İLİNDE SATIŞA SUNULAN BALLARIN BİYOAKTİVİTESİ, BU BALLARDAN İZOLE EDİLEN AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

21/07/2017

Üye: Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK (Danışman)

Üye: Doç. Dr. Tuba İÇA

Üye: Doç. Dr. Serap SAVAŞAN

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/...../..... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasan GÖÇMEZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tezin hazırlanmasında Akademik kurallara riayet ettiğimizi, özgün bir çalışma olduğunu ve yapılan tez çalışmasının bilimsel etik ilke ve kurallara uygun olduğunu, çalışma kapsamında teze ait olmayan veriler için kaynak gösterildiğini ve kaynaklar dizininde belirtildiğini, Yüksek Öğretim Kurulu tarafından kullanılmak üzere önerilen ve Dumlupınar Üniversitesi tarafından kullanılan İntihal Programı ile tarandığını ve benzerlik oranının % 16 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Nilay GÖREN

**KÜTAHYA İLİNDE SATIŞA SUNULAN BALLARIN BİYOAKTİVİTESİ, BU
BALLARDAN İZOLE EDİLEN AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN
İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Nilay GÖREN

Biyoloji, Yüksek Lisans Tezi, 2017

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ferdağ ÇOLAK

ÖZET

Bu çalışmada, Kütahya’da satılan ve menşei çeşitli iller olan süzme ve petekli toplam 44 bal örneği toplanmıştır. Toplanan bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitesi agar kuyucuk yöntemiyle belirlenmiştir. Bu yöntemde 7 adet gram negatif bakteri [*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* serogrup 1(a), *Legionella pneumophila* serogrup 1(b), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(a), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(b), *Legionella* spp.(a) ve *Legionella* spp.(b)] ve 1 adet ise gram pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus*) kullanılmıştır. Bal örnekleri en yüksek aktiviteyi *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(a)’ya karşı göstermiştir.

İkinci aşama olarak toplanan bal örneklerinden 67 adet aerob endospor oluşturan mikroorganizma izole edilmiştir. İzolatlar biyokimyasal identifikasyon testlerine tabii tutulmuş ve bunun sonucunda tümünün *Bacillus* spp. cinsine ait olduğu tespit edilmiştir. İdentifiye edilen izolatların; ağır metal, antibiyotik dirençliliği ve sekonder metabolit üretim yetenekleri araştırılmıştır.

Yapılan ağır metal dirençlilik (MİK) deneyinde, ağır metallere karşı en yüksek MİK değeri referans suş (*B. subtilis* NRRL B-209) ile kıyaslandığında, çalışmamızdaki Basillerin duyarlı oldukları ağır metalleri sıraya koyduğumuzda Co=Cu=Cd>Fe>Pb olduğu görülmüştür. Elde edilen basil izolatlarının %8,95 inin Kanamisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Basil izolatlarının sekonder metabolit oluşumunun belirlenmesinde agar blok yöntemi kullanılmıştır. Bu deneyde ise antimikrobiyal aktivite testinde kullanılan 8 adet mikroorganizma ile çalışılmıştır. İzolatların oluşturduğu sekonder metabolite karşı en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi *L. pneumophila* Sg 1(b) bakterisi göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Ağır Metal ve Antibiyotik Dirençliliği, Antimikrobiyal Aktivite, Bal, *Bacillus* spp.,

**THE BIOACTIVITY OF HONEYS, WHICH IS OFFERED FOR SALE IN THE
PROVINCE OF KÜTAHYA, ISOLATION OF AEROBES FORMING ENDOSPORES
ISOLATED FROM THESE HONEYS AND SPECIFICATION OF SOME FEATURES**

Nilay GÖREN

Biology, M.S.Thesis, 2017

Thesis Supervisor: Asst. Prof. Ferdağ ÇOLAK

SUMMARY

In this study, a total of honey samples of filtered and honeycombed items, which are sold in Kütahya and are of various origins, were collected. The antimicrobial activity of the collected honey samples was determined by the agar well method. In this method, 7 gram negative bacteria [*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* serogrup 1(a), *Legionella pneumophila* serogrup 1(b), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(a), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(b), *Legionella* spp.(a) ve *Legionella* spp.(b)] and 1 gram positive bacteria [*Staphylococcus aureus*] were used. The honey samples revealed that the highest activity against *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 (a).

In the second stage, 67 of the honey samples collected were microorganism isolated, which endospore forming *Bacillus*. The isolates were subjected to biochemical identification tests and as a result of which all of the *Bacillus* spp. belongs to the genus. The identified isolates; Heavy metal, antibiotic resistance and secondary metabolite production ability were analyzed.

In the heavy metal resistance (MIC) test, when compared to the highest MIC value reference strain (*B. subtilis* NRRL B-209) against heavy metals, It was found that the basils in our study are tolerant and When we put heavy metals in order that they are sensitive It is observed that Co=Cu=Cd>Fe>Pb. It has been found that isolates show the highest antibiotic resistance level against the antibiotics of the doxycycline and rifampicin in the resistance test of antibiotic and the antimicrobial resistance of the kanamycin at the lowest antibiotic resistance. Agar block method was used for the formation of secondary metabolite. 8 microorganisms were used in this experiment which is used in the antimicrobial activity test. The highest antimicrobial activity against secondary metabolites produced by the isolates was against *L. pneumophila* Sg 1(b).

Keywords: Antimicrobial Activity, *Bacillus* spp. Heavy Metal and Antibiotic Resistance, Honey

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, tez konumun seçiminde ve yapım aşamasında her türlü desteği ve imkanı bana sağlayan, her konuda sonsuz sabır gösteren ve moral veren sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Deneyisel çalışmalarımda bana yardımcı olan Yüksek Lisans öğrencisi ve değerli arkadaşlarım Özlem Saniye BAYRAKTAR'a ve Eda BOZKURT'a teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca bana hem maddi hem manevi anlamda her zaman destek gösteren sevgili aileme teşekkür ederim. Babam Nihat GÖREN'e, annem Ayşe GÖREN'e ve her zaman yanımda olan kardeşim Mehmet Kutay GÖREN'e teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Bal	1
1.2. Aerob Endospor Oluşturan <i>Bacillus</i> Cinsi'nin Genel Özellikleri	3
1.2.1. Koloni ve hücre morfolojisi	4
1.2.2. <i>Bacillus</i> türlerinde spor oluşum mekanizması.....	4
1.2.3. Taksonomi ve ekoloji	5
1.3. <i>Bacillus</i> Cinsi Tanı Yöntemleri.....	6
1.4. Moleküler Tanımlama Yöntemleri.....	6
1.5. Ağır Metallerle İlgili Genel Bilgi.....	8
1.5.1. Ağır metallerin önemi.....	8
1.5.2. Ağır metallerin toksik etki mekanizması	9
1.5.3. Ağır metal ve antibiyotik dirençlilik mekanizmaları	10
1.6. Çalışmanın Amacı.....	12
2. MATERYAL VE METOD	13
2.1. Materyal	13
2.1.1. Bal örnekleri ve bal örneklerinden endospor oluşturan basillerin izolasyonu.....	13
2.1.2. Biyolojik materyaller.....	13
2.1.3. Kimyasal materyaller	14
2.1.3.1. Ağır metal toleranslılık testinde kullanılan ağır metaller.....	14
2.1.3.2. Kullanılan antibiyotikler	14
2.1.4. Besiyerleri	15
2.1.5. Boyalar	17
2.1.6. Çözeltiler	18
2.2. Metod	19
2.2.1. Bal örneklerinin elde edilmesi ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi	19
2.2.2. Bal örneklerinden endospor oluşturan basillerin izolasyonu ve identifikasyonu ..	20
2.2.3. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi	24
2.2.4. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi	24
2.2.5. <i>Bacillus</i> 'ların sekonder metabolit üretiminin belirlenmesi (agar blok yöntemi)...	25

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.BULGULAR.....	26
3.1. Bal Örneklerinin Toplanması ve Basillerin İzolasyonu	26
3.2. Balların Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi.....	28
3.3. Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu ve İdentifikasyon Test Sonuçları.....	32
3.4. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri.....	38
3.5. Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri	43
3.6. Basillerin Sekonder Metabolit Üretimi	45
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
KAYNAKLAR DİZİNİ	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Balın bileşimi	2
2.1. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar.	14
3.1. Toplanan bal örneklerinin orjini ve izole edilen Basillerin kodları.....	26
3.2. Toplanan balların agar kuyucuk yöntemiyle antimiktobiyal aktivitesi.	31
3.3. Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitelerinin %'lik dağılımı.	32
3.4. İzole edilen basillerin identifikasyon test sonuçları	34
3.5. <i>B.subtilis</i> NRRL B-209 'un ağır metal dirençlilik düzeyi (mM/mL).	38
3.6. İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).	39
3.7. İzole edilen basillerin ağır metal toleranslılıklarının %'lik dağılımı.	43
3.8. Basillerin test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları	44
3.9. NCCLS ve Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) rehberinde Gram pozitif/ aerobik bakteriler için belirtilen zon çapları yorumlama skalası.....	45
3.10. İzole edilen basillerin antibiyotik dirençliliğinin %'lik dağılımı.	45
3.11. Basil izolatlarının agar blok yöntemi ile test organizmalarına karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları	47
3.12. İzole edilen basillerin sekonder metabolit sonuçlarının %'lik dağılımı.	49

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
ATCC	Amerikan Doku ve Hücre Kültür Koleksiyonu
cm	Santimetre
cm^3	Santimetreküp
g	Gram
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	Mililitre
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nm	Nanometre
HCl	Hidroklorik Asit
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
NaOH	Sodyum Hidroksit
Sg	Serogrup

1. GİRİŞ

1.1. Bal

Bal; “bitkilerin çiçeklerinde bulunan nektarların ya da bitkilerin canlı kısımları ile bazı eşkanatlı böceklerin salgıladığı tatlı maddelerin bal arıları (*Apis mellifera*, *Apis mellifica*) tarafından toplanması, organizmalarında bileşimlerinin değiştirilip petek gözlerine depo edilmesi ve buralarda olgunlaşması sonucu meydana gelen koyu kıvamda tatlı bir üründür” şeklinde tanımlanmaktadır (Hışıl ve Börekçioğlu, 1986). Bal arıları, çiçeklerde bulunan veya böcekler tarafından bitkiler üzerinde oluşturulan nektar adlı tatlı sıvıları toplayarak bal elde ederler. Nektar, sindirim sisteminin değişikliğe uğramış bir parçası olan bal midesinde nektarı bala dönüştüren çeşitli enzimlerle muamele edilir. Daha sonra suyu uçurularak bala dönüştürülür. Elde edildiği nektara göre bal, renk, lezzet, koku ve kimyasal kompozisyonu ile çeşitlilik göstermektedir. Bal orijinine göre; çiçek balları (bitki nektarlarından elde edilir) ve salgı balları (bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından veya bitkilerin canlı kısımları üzerinde yaşayan bitki emici böceklerin -*Hemiptera*- salgılarından elde edilir) olarak ikiye ayrılır. Türkiye dünyadaki en önemli salgı balı üreticilerinden biridir. Bu bal, bal arıları tarafından Türkiye’de çam ağaçlarından beslenen *Marchalina hellenica* isimli insektin salgısından yapılmaktadır (Karadal ve Yıldırım, 2012). Balın bileşimi Çizelge 1.1’de özetlenmiştir (Bogdanov, vd., 2008).

Balı ilk defa kimin, ne zaman ve nasıl bulduğu bilinmemekle birlikte, araştırmalar İspanya’da Valencia eyaletinde bulunan Arona mağarasının duvarında bal toplayan kız resminin 16 bin yıl öncesine ait olduğunu göstermektedir. Kendi tarihimize baktığımızda, Kaşgarlı Mahmut’un açıklamalarına göre Türkler ilk zamanlar balı “arı yağı” olarak tanımlamışlar, sonraları Batı Türkleri tarafından günümüzde kullanılan adıyla “bal” demeye başlamışlardır (Ötles, 1999). Günümüzde hastalıkların artması ve sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık yapıcı etkenlerin bu sentetik ilaçlara karşı direnç kazanmasıyla insanlar doğal tedavi yöntemlerine yönelmiştir. Bu yöntemler arasında en popüler olanlardan biri de arı ürünleridir. Bal arısı ürünlerinin tedavi amacıyla kullanılmasına Apiterapi denilmektedir (Hamdy, vd., 1989). Apiterapi bal, propolis, arı sütü, polen ve arı zehri kullanımını kapsar (Zumla ve Lulat, 1989).

Antimikrobiyal özelliğinden dolayı balı Mısırlılar cerrahi pansumanlarda, göz iltihaplarının tedavisinde kullanmışlardır. Çinli ve Hintliler ise çiçek hastalığının yayılmasını engellemek için hasta vücudunu bal ile sarmışlardır (Martos, vd., 1997). Balın antimikrobiyal özelliği ilk kez Van Ketel tarafından 1892 yılında tanınmıştır (Dustmann, 1979).

Çizelge 1.1. Balın bileşimi (Bogdanov, vd., 2008).

	Çiçek Balı		Salgı Balı	
	Ortalama	Min- Max	Ortalama	Min- Max
Su	17,2	15-20	16,3	15-20
Monosakkaritler				
Fruktoz	38,2	30-45	31,8	28-40
Glukoz	31,3	24-40	26,1	19-32
Disakkaritler				
Sukroz	0,7	0,1-4,8	0,5	0,1-4,7
Diğerleri	5,0	2-8	4,0	1-6
Trisakkaritler				
Melezitoz	<0,1		4,0	0,3-22,0
Erloz	0,8	0,5-6	1,0	0,1-6
Diğerleri	0,5	0,5-1	3,0	0,1-6
Tanımlanamayan oligosakkaritler	3,1		10,1	
Mineraller	0,2	0,1-0,5	0,9	0,6-2,0
Aminoasitler	0,3	0,2-0,4	0,6	0,4-0,7
Asitler	0,5	0,2-0,8	1,1	0,8-1,5
pH değeri	3,9	3,5-4,5	5,2	4,5-6,5

Balın antimikrobiyal özelliği, ozmotik etki, asidite, hidrojen peroksit ve fito kimyasal faktörlere bağlıdır. Ozmotik etki, bal şeker eriyiğinde doymuş ya da aşırı doymuştur (fruktoz ve glüköz karışımında %84 oranında). Su balın ağırlığının sadece %15-21'i gibi bir oranında yer alır. Şeker moleküllerinin zorlu interaksiyonları sonucu ayrılan su moleküllerinin su aktivitesi (aw) ortalama olarak 0,562-0,620 arasında değişir. Bununla birlikte birkaç maya çeşidi bal içinde yaşayabilirler ki, bunlar yüksek oranda su muhtevasına sahiptirler. Olgunlaşmış balın su aktivitesi (aw) çok düşüktür; ancak yine de bazı türlerin gelişimini destekleyebilir. Birçok bakteri türü için aw; 0,94-0,99 arasında ise gelişimleri bütünüyle inhibe olur. Bu nedenle sulandırılmamış balın, ozmotik aktivitesi birçok bakteri üzerinde etkilidir (Molan, 1992). Asidite bakımından bal, karakteristik olarak tamamen asidiktir. pH'sı 3,2-4,5 arasındadır ki, bu düşük miktar birçok hayvansal patojen için öldürücüdür. Bu tip türlerin gelişimleri için optimum pH, genellikle 7,2-7,4 arasındadır. Enfeksiyona neden olan bazı türlerin gelişimleri için gerekli olan minimum pH değerleri; *Escherichia coli* için 4,3, *Salmonella* spp. için 4,0, *Pseudomonas aeruginosa* için 4,0, *Streptococcus pyogenes* için 4,5 dir. Böylece su katılmamış balın içindeki asidite önemli bir antibakteriyel faktör olarak karşımıza çıkar. Ancak bal sulandırılmışsa;

özellikle vücut sıvıları vasıtasıyla çok iyi tampon vazifesi görür, balın pH'sı yükselecek ve birçok bakteri türüne karşı inhibitör etki yapamayacaktır (Molan, 1999).

Kaliteli bir **balın** taşınması gereken nitelikler şunlardır

- Nişasta içermemesi,
- Sağlıklı arı kovanlarından elde edilmiş olması,
- Yapısında bulunan doğal maddeler haricinde yabancı maddeler içermemelidir,
- Patojen mikroorganizma bulunmamalıdır,
- İnvert şeker miktarı; salgı balında % 60, çiçek balında % 65 oranından az olmamalıdır,
- Rutubet miktarı % 20'den fazla olmamalıdır,
- Sakkaroz miktarı, salgı balında % 10, çiçek balında % 5 oranından fazla olmamalıdır,
- Balda suda çözünmeyen madde miktarı % 0.1, pres balında ise % 0.5 oranından fazla olmamalıdır,
- Mineral madde (kül miktarı), salgı balında % 1,2' yi, çiçek balında ise % 0,6' yı geçmemelidir,
- Asitlik miktarı 40 meq/kg'dan fazla olmamalıdır,
- Petek levhalarının kalınlığı 3 mm'den fazla olmamalıdır,
- Ticari glikoz içermemelidir, (Anonim, 2000).

1.2. Aerob Endospor Oluşturan *Bacillus* Cinsi'nin Genel Özellikleri

Bacillus cinsi üyeleri gram pozitif bakterilerdir ve vejetatif formları yuvarlak veya köşeli uçlara sahip olabileceği gibi oldukça küçük ($0.5 \times 1.2 \mu\text{m}$) veya nispeten büyük ($2.5 \times 10 \mu\text{m}$) olabilir. Aerobik veya fakültatif aneorobiktir ve oksijen terminal elektron akseptörüdür. *Bacillus* türlerinin hepsi ısıya karşı dayanıklıdır ve aerobik şartlarda spor üretme yeteneğine sahiptirler. Ana hücredeki sporun şekli ve sporangium'un bulunduğu konum *Bacillus* spp. cinsi üyelerinde karakteristik özelliği belirler. Endosporları genellikle silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlak şekildedir.

Hücreler parasporal cisimcikler veya protein kristalleri içerebilir. Katalaz çoğu tür tarafından oluşturulur. Oksidaz pozitif veya negatif olabilir. *Bacillus* cinsinin sıcaklık istekleri çok farklılık gösterir çoğunluğu mezofilik cinsler oluştururken, zorunlu termofilik, psikrofilik, özelliklere sahip türlerde görülmektedir. Bazı suşları tuza toleranslı iken, bazıları tuz için spesifik gereksinimlere sahiptir (Sneath, 1986; Ustaçelebi, 1999; Rygus ve Hillen, 1991; Gordon, 1981; Gültekin, 2009). *Bacillus* türleri tabiatta çürüten organik materyallerde, toz, toprak, yeşil sebze, suda ve bazı türlerde normal vücut florasında bulunur. *Bacillus* türleri

içerisinde nonpatojen türler olmasına karşın *Bacillus anthracis* türü patojenik bir özelliğe sahiptir. *B.anthraxis*'den sonra ikinci öneme sahip *Bacillus* türü *B.cereus*' tur. Baharatlar, süt tozu, tahıl ürünleri, kuru gıdalar, sebzeler, et, soslar, tatlılar bu bakteri sporları ile kontamine olabilirler. *B.cereus* grubu içinde yer alan *B.myocoides* ve *B. thuringiensis*'te ishal oluşturan toksin üretirler ve gastroenteritten sorumlu olabilirler (Logan, 1999; Ustaçelebi, 1999).

1.2.1. Koloni ve hücre morfolojisi

Bacillus türlerinin koloni morfolojisi çevresel koşullara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Koloni morfolojisini etkileyen faktörler arasında en önemlileri kullanılan besiyeri çeşidi ve koloninin yaşıdır. Genel olarak koloni özelliklerine bakılacak olursa, opak, yarı şeffaf, düzgün ya da pürüzlü koloniler şeklinde görülür. Koloni renkleri, kreme yakın beyazdan sarıya çeşitlilik gösterebilir. Çoğu *Bacillus* türünde pigment görülmezken bazı türlerde farklı besiyerlerinde sarı, yeşil, mavi-siyah vb. pigmentler üretebilirler. Bazı *Bacillus* türleri, dış yüzeyinde polisakkarit veya polipeptid yapıda kapsül oluştururlar (Rosovitz, vd., 1998; Ustaçelebi, 1999; Rygus ve Hillen, 1991).

Flagellar antijenler *B. cereus*, *B. thuringiensis* ve *B. sphaericus* ve benzeri türlerin tanımlanması için kullanılır fakat, flagella oluşumu taksonomide kullanılan temel ölçütlerden biri değildir (Rygus ve Hillen, 1991; Sneath, 1986).

1.2.2. *Bacillus* türlerinde spor oluşum mekanizması

Endosporlar; endospor oluşturan bakterilerde, logaritmik büyüme esnasında, glukoz fermente edilir ve organik asitler birikir. Endospor oluşumu sırasında vejetatif hücre büyüemeyen, sıcaklığa dayanıklı yapı olan endospora dönüşür. Bakteriyel sporulasyon, hücrelerin logaritmik olarak büyümeleri temel bir besine bağlı olarak durunca meydana gelir. Böylelikle, tipik endospor oluşturan bir bakteri olan *Bacillus* hücreleri, karbon ve azot gibi esas bir besin sınırlı hale geldiğinde vejetatif büyümeyi durdurur ve sporulasyona geçer.

Mikroorganizmaların çevre şartları sürekli bir koşuldan diğerine değişebilir ve bu nedenle mikroorganizmalar böyle şartlar altında fonksiyon gösteren regülatör mekanizmalara sahiptirler. Stimulan adı verilen bu genler çevre uyarılarına tepkisel olarak aktif hale gelirler. *Bacillus* gibi endospor oluşturan bakterilerde, logaritmik büyüme esnasında, glukoz fermente edilir ve organik asitler birikir. Dolayısıyla pH düşer. Glukoz tükendiği zaman popülasyon fermentatif yol izinden TCA devresi enzimlerini sentezleyerek oksidatif yol izine geçer ve bu durumda organik asitler enerji kaynağı olarak kullanılır. Oksijen alınımında bir artış olur. Organik asitler kullanıldığı için de pH yükselir. Bu safhada spor septumu görünmeye başlar.

Gelişen sporun dışındaki bölgede sitoplazma içindeki proteinler parçalanır ve spor proteinlerini sentezlemede kullanılmak üzere, ayrıca ilave enerji kaynağı olarak aminoasitler salınır. Sporulasyon için gereken enerjinin hepsi endojen kaynaklardan salgılanır, çünkü besin tükenmiştir. Bu endojen kaynaklar proteinler ve PHB'dir. Yeni spor enzimlerinin sentezinden yeni mRNA molekülleri sorumludur. Spor oluşumunun bütün basamakları esnasında logaritmik fazda büyüme spor tamamen olgunlaşıp salıncaya kadar durdurulur. Endospor oluşumunun moleküler temeli üzerindeki çalışmaların çoğu *Bacillus subtilis* ile yapılmıştır. Bu organizmanın spor oluşturmeyen mutantları elde edilmiş ve bu mutantlarla yapılan çalışmalarda en az 45 ayrı sporulasyon lokusu saptanmıştır. Bu lokuslardan bazıları sadece bir gen içerirken bazıları gen gruplarını içermektedir. Gen gruplarını içeren lokus sporulasyon operonu olarak isimlendirilir. Gen seviyesinde vejetatif safhaya ait spesifik mRNA sentezi dururken, spor spesifik genlerin transkripsiyonu başlar. Spor genlerinin aktivasyonu vejetatif hücre faktörlerinin aktivasyonunun azalmasını takip eden, yeni RNA polimeraz σ faktörlerinin üretimi ile gerçekleşir. Bu durum RNA core polimeraza vejetatif σ 'ların bağlanması ile ilişkili olan bir anti σ faktörünün aktive edilmesiyle oluşur.

Bir endospor yıllar boyunca dorman kalabilir. Fakat tekrar vejetatif hücreye, nispeten hızlı bir şekilde dönüşebilir. Bu süreç 3 evreyi içerir: Aktivasyon, çimlenme ve büyüme. Aktivasyon yeni oluşmuş subletal, fakat yüksek sıcaklıkta birkaç dakika ısıtarak veya spor süspansiyonlarını 4°C veya oda sıcaklığında haftalar veya aylarca depolayarak gerçekleştirilir. Aktive olmuş sporlar özel besinlerin varlığında bırakıldıklarında, çimlenmeye şartlanırlar. Çimlenme genellikle hızlı bir süreçtir (birkaç dakika civarında), sporun refraktilite kaybını, boyalarla boyanabilirliğinin arttığı ve ısı ve kimyasallara karşı azalan direnci kapsar. Kalsiyum dipikolinatın ve korteks içeriğinin sporlardan kaybı bu evre boyunca meydana gelir SAPS'ler parçalanır. Bir sonraki evre olan gelişme, su alınımından ve yeni RNA'nın, proteinlerin ve DNA'nın sentezinden kaynaklanan görülür şişmeyi kapsar. Hücre çatlamış spor kabuğundan çıkar ve sonunda büyümeye başlar. Hücre sporulasyonunu etkileyen çevresel sinyaller bir kez daha alınana kadar vejetatif olarak büyümeye devam eder (Uçar, vd., 2008).

1.2.3. Taksonomi ve ekoloji

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, endospor oluşturan *Bacillaceae* familyası bakterilerini 6 bölümde incelemektedir. *Bacillus* cinsi diğer *Bacillaceae* cinslerinden aerob endospor oluşturmaları ve katalaz üretimi ile ayrılır. *Bacillus* cinsinin tanımlanmış 51 türü bilinmesine rağmen taksonomik olarak yeri tam belirlenmemiş gruplarda vardır (Sneath, 1986).

Bacillus cinsindeki bakterilerin sınıflandırılması, temel olarak onların spor oluşturabilmeleri, biyokimyasal, morfolojik ve fizyolojik özellikleri ile yapılmaktadır. Bununla birlikte bu kıstaslar türler arasındaki ilişkiler hakkında bilgi vermemektedir. Numerik taksonomiden ve 16S rRNA (kladistik) analizlerden elde edilen daha fazla bilgi iyi uyum göstermiş ve sonuç olarak *Bacillus* türleri en azından 6 grupta toplanmıştır (Demain ve Davies, 1999).

Bacillus cinsinin termofilik, mezofilik ve psikrofilik türleri bulunur ancak *Bacillus* türlerinin çoğu, mezofilik sıcaklıklarda gelişebilirler. *B. stearothermophilus* gibi zorunlu termofilik türler genellikle 60°C’de gelişir. *B. coagulans* gibi ılımlı termofiller ise 45-50°C’de gelişir. Çok yüksek sıcaklık derecelerinde bile canlı kalırlar. Genellikle 35-37 °C de ve pH 7 civarında ürerler (Kalaylı ve Beyatlı 2003; Rosovitz, vd., 1998). Karakteristik habitatları toprak olmasına rağmen doğada geniş olarak, süt ve süt ürünlerinden hava, su ve yiyecek gibi birçok ortamdaki elde edilebilirler. Bitki materyallerini ve diğer besinlerin üzerinde büyüebilmelerine olanak sağlayan çeşitli biyopolimerleri parçalayan enzimlere sahiptirler. Aerobik spor oluşturmaları topraktan, toz ve diğer yollarla herşeyi kontamine edebilirler. Bazı türleri insan ve hayvan patojeni olmasına karşılık genellikle saprofit toprak mikroorganizmalarıdır (Kalaylı ve Beyatlı 2003; Gordon, 1981).

1.3. *Bacillus* Cinsi Tanı Yöntemleri

Bakterilerin identifikasyonunda morfolojik özelliklerden olan hücre büyüklüğü, hücre şekli, koloni morfolojisi, hareketlilik, gram reaksiyonu, endosporun şekli ve yeri, pigmentasyon özelliklerinden yararlanılır. Mikroorganizmaların fizyolojik ve metabolik özellikleri içerisinde mikroorganizma enzimleri ve transport proteinlerinin yapı ve aktiviteleride girer. Ayrıca, hücre çeperi yapısı, enerji kaynakları, fermentasyon ürünleri, ikincil metabolitler, oksijen istekleri, metabolik inhibitörler ve antibiyotik duyarlılık özellikleride önem taşır. Bunun yanında katalaz üretimi, Voges-Proskauer reaksiyonu, Voges-Proskauer pH’sı, anaerobik ortamda gelişme, 50 ve 65°C’de gelişme, %7’lik NaCl’de gelişme, glikozdan asit ve gaz üretimi, nitratın nitrite redüksiyonu, nişasta hidrolizi ve kazein parçalanması ile türler tanımlanmaya çalışılır (Ustaçelebi, 1999). Şekerli fermente ederler ve sonuçta gaz oluşumu görülmezse asit üretirler. Proteinleri ise, amonyak oluşumu altında parçalarlar ve böylece kokuşmaya neden olurlar. DNA’larındaki G + C mol oranı %32–62’dir (Kalkan ve Halkman, 2006).

1.4. Moleküler Tanımlama Yöntemleri

Moleküler tanımlama yöntemleri gelişmekte olan teknolojinin mikrobiyoloji alanında sunduğu en önemli yeniliklerden biridir. Moleküler tanımlama yöntemlerine her geçen gün

yenisinin eklenmesi, farklı amaçlarla yürütülen bilimsel çalışmalara büyük yarar sağlamaktadır. Bu yöntemlerin yaygın olarak kullanımını etkileyen en önemli faktörler maliyet ve deneyimli personel ihtiyacı olsa da, kendisine özgü avantajlara ve dezavantajlara sahip bu yöntemlerden tüm dünyada yaygın olarak yararlanılmaktadır. Bu bağlamda, son yıllarda ülkemizde de bu tür yöntemlerin kullanıldığı bilimsel araştırmalar hız kazanmıştır.

- PFGE(Pulse Field Gel Electrophoresis- Darbeli Alan Jel Elektrofrez)

Geleneksel jel elektrofrez yöntemleri, DNA örneklerinin katı matrikse (agaroz ya da poliakrilamit) yerleştirilmesi ve jel içindeki moleküllerin statik elektrik alanında göç ettirilmesidir.

- PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

Polimeraz zincir reaksiyonu; bakteri, virüs, fungus, parazit ve protozoon gibi hastalık etkenlerine ait hedef nükleik asit zincirlerinin, primerler (özellik tamamlayıcı oligonükleotitler) ile ısıya dayanıklı enzimleri kullanarak laboratuvar ortamında çoğaltılmasını sağlayan özgün ve güvenilir bir yöntemdir. Üzerinde çalışma yapılan genetik materyal, çok az sayıda ve hatta birçok ilgisiz DNA moleküllerinin arasında bile olsa çoğaltılabilir, homojen bir DNA materyali haline getirilebilir ve böylelikle kolayca tanımlanabilir.

Reaksiyon polimeraz enzimi ve gerekli maddelerin bulunması halinde DNA'nın karşıt sıraları sentezleyebilme yeteneği ile gerçekleşir. Seçilen DNA dizisi çoğaltılırken istenmeyen diziler baskılanabilir. Böylece DNA dizisinin tanımlanması kolaylaşır.

- MLST (Multi-Locus Sequence Typing- Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi)

Bakterilerin mutasyona uğramayan genlerinde görülen farklı yapıların listelenmesi yaklaşımı MLEE (Multi- Locus Enzyme Electrophresis, Çoklu Lokus Enzim Elektrofrez) yöntemiyle saptanmıştır.

- 16S rDNA Dizilim Analizi

Woese ve arkadaşları, bakterilerin ve diğerk yaşam formlarının filogenetik ilişkisinin, genetik şifrenin değışmeyen bir bölgesinin kıyaslanması ile saptanabilir olduğunu ortaya koymuştur. Bakterilerdeki bu genetik alan için uygunluğu incelenmekte olan kısımlar 5S, 16S (küçük alt ünite de denir) ve 23S rDNA'yı şifreleyen genlerden meydana gelmektedir. Bakterilerde taksonomik amaçlar için en çok kullanılan DNA parçası ise 16S rDNA genidir. 16S rDNA geni sadece bakteriler arasında değil aynı zamanda arkebakterilerin 16S rDNA geni ve ökaryotların 18S rDNA geni ile de karşılaştırılabilir.

- MALDI- TOF (Matriks Asisted Later Desorption/ Ionization- Time of Flight – Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/İyonizasyonu- Uçuş Süresi)

Matriks destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyonu (MALDI); proteinler, peptitler ve şekerler gibi biyomoleküllerin ve eski iyonizasyon yöntemleriyle iyonize edildiğinde kırılıp parçalanmaya eğilimli olan polimerler, dendrimerler gibi büyük organik moleküllerin analizine olanak sağlayan, kütle spektrometresinde kullanılan hassas bir tekniktir. Bu yöntem her ne kadar daha az yüklü iyonların meydana gelmesine neden olsa da hem hassasiyet hem de üretilen iyonlar açısından en çok elektrosprey iyonizasyonuna benzemektedir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

1.5. Ağır Metallerle İlgili Genel Bilgi

Ağır metaller, metalik özellikler gösteren elementlerden oluşan, açık ve tam bir tanımlaması yapılmamış olan grupta bulunan elementlere verilen isimdir. Fiziksel özellik açısından yoğunluğu 5 g/cm^3 'ten büyük olan ($p > 5 \text{ g/cm}^3$) metaller için kullanılır. Bu gruba kurşun, krom, demir, kobalt, bakır, kadmiyum, nikel, civa ve çinko olmak üzere 60'tan fazla metal dahildir. Bu elementler doğaları gereği yer kürede genellikle karbonat, oksit, silikat ve sülfür halinde stabil bileşik olarak veya silikatlar içinde hapsolarak ve bakteriyel hücreye girebilenler katyon ve anyon (As, Cr, U) olarak bulunurlar (Sevgi, 2007).

Endüstriyel kaynaklı kirlenmeden dolayı veya toprağın jeolojik yapısında bulunan ağır metallerin su kaynaklarına geçişi, topraktaki ağır metallerin çözünerek doğadaki suyun hareketi ile ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşmasıyla gerçekleşir. Bu özellik, bakteriler gibi çok kısa üreme zamanlarına sahip organizmalar üzerinde güçlü etkilere sahiptir. Doğal veya sentetik kimyasal bileşiklerin, ağır metallerin ve bazı organik bileşiklerin yaygın üretimi ve kullanımı; çeşitli organik bileşikler parçalayabilme yeteneği ile ağır metallere karşı direnç içeren belirli genotipler için seçici olarak bakteriyel çevreyi değiştirir (Wiener, vd., 2003).

1.5.1. Ağır metallerin önemi

Elementlerin elektrokimyasal, katalitik ve yapısal olmak üzere üç fonksiyonu vardır. Elementler, metabolik enerji kaynağı olarak kullanıldıklarında, elektrokimyasal işlevi görürler. Bütün temel elementler enzim aktivatörleri olarak davranırlar ve biyokimyasal tepkimeleri ayarlamaya yardım ederler, böylece katalitik olarak rol alırlar. Protein ve aminoasitler gibi maddelerin, sentezinde pek çok element gereklidir ve element son ürünün vazgeçilmez bileşenidir. Metallerin indirgenmesi; önemli düşük toksisiteli iz elementler (demir, mangan, molibden), orta önemlilikteki toksik iz elementler (çinko, nikel, bakır, vanadyum,

krom, kobalt, tungsten) ve sınırlı faydası olan toksik elementler (gümüş, kadmiyum, civa, kurşun, arsenik, stibium, uranyum) olmak üzere 3 grupta incelenebilir (Bigersson, vd., 1988).

Ağır metaller, biyolojik proseslere katılma derecelerine göre yaşamsal ve yaşamsal olmayan olarak sınıflandırılırlar. Yaşamsal olarak tanımlananların organizma yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik reaksiyonlara katıldıklarından dolayı düzenli olarak besinlerle alınmaları zorunludur. Örneğin, bakır hayvanlarda ve insanlarda kırmızı kan hücrelerinin ve birçok oksidasyon ve redüksiyon sürecinin vazgeçilmez parçasıdır (Bigersson, vd., 1988). Buna karşın yaşamsal olmayan ağır metaller çok düşük konsantrasyonlarda bile yapıyı etkileyerek sağlık problemlerine yol açabilmektedir. Bu gruba en iyi örnek kükürtlü enzimlere bağlanan civadır (John, vd., 1996).

Bir metalin toksisitesi, makromolekül ve hücre organelleriyle birlikte biyolojik sistemlerdeki dinamik yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine bağlıdır. Bir ağır metalin yaşamsal olup olmadığı incelenen organizmaya da bağlıdır. Örneğin; nikel bitkiler açısından toksik etki gösterirken, hayvanlarda iz elementi olarak bulunmaktadır. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki mekanizması derişime bağlı olarak değişir. Örneğin krom başta insan bünyesinde olmak üzere, canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon kademesine, oksidasyon kademesindeki kimyasal özelliklerine ve bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına bağlıdır. Bu tür organizmalarda metalin derişimi göz önüne alınmalıdır. Kalsiyum, kobalt, krom, bakır, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel ve çinko gibi metaller ihtiyaç duyulan besinler olduğu için gereklidir. Bunların dışında kalanların (gümüş, alüminyum, kadmiyum, civa, kurşun) herhangi bir biyolojik fonksiyonu bulunmamaktadır (Bigersson, vd., 1988).

Hücre için en önemli metaller, enzimlerin yapısına katılarak önemli biyolojik reaksiyonların katalizlenmesinde rol alır. Bazıları protein yapısına katılır, bazıları ise bakteri hücre duvarında yer alarak ozmotik balansın korunmasında görev alır (Hughes ve Poole, 1989; Ji ve Silver, 1995). Demir, bakır ve nikel gibi metaller redoks sürecinde görev alır. Bunun dışında magnezyum ve çinko gibileri çeşitli enzimleri ve DNA'yı stabilize eder. Demir, magnezyum, nikel ve kobalt çok çeşitli fonksiyonları olan kompleks moleküllere katılırlar. Sodyum ve potasyum, hücre dışı ozmotik basıncın düzenlenmesinde görev alır (Sevgi, 2007).

1.5.2. Ağır metallerin toksik etki mekanizması

Metallerin yüksek konsantrasyonları mikroorganizmalar ve diğer organizmalara toksik etki yapar. Toksisite gerekli metallerin kendi doğal bağlanma yerlerinin değiştirilmesi sonucu gerçekleştirilir. Gerekli olmayan metaller tiol taşıyan gruplara ve oksijen bulunan bölgelere,

gerekli olan metaller yerine yüksek bir affinite ile bağlanırlar. Nükleik asitlerin ve proteinlerin konformasyonlarının bozulması sonucu hücrede toksisite görülür (Hughes ve Poole, 1989).

Metal katyonlar aminoasitlerde bulunan –SH gruplarını bağlayarak enzimleri inhibe eder. Bir diğer eğilimde, çeşitli metal katyonların toksisitesinin metasülfid çözünürlüğünün ürünü olduğu sonucudur. Katyonik metal, fizyolojik iyonlarla etkileşime girerek toksisiteye etki yapabilir. Cd^{+2} - Zn^{+2} veya Ca^{+2} ile Ni^{+2} ve Co^{+2} ise Fe^{+2} ile Zn^{+2} de Mg^{+2} ile inhibisyona girerek uygun fizyolojik katyonun fonksiyonunu durdurabilir. Anyonlar, krom ve arsenat, sülfat ve fosfat ile etkileşime girebilir (Ahmann, vd., 1994; Laverman, vd., 1995; Newman, 1997; Orelan, vd., 1999).

1.5.3. Ağır metal ve antibiyotik dirençlilik mekanizmaları

Esansiyel ve esansiyel olmayan metallerin çevredeki konsantrasyonları, toksik seviyeye ulaşması durumunda insan ve hayvan sağlığı olumsuz yönde etkilenmektedir. Aynı zamanda birçok mikroorganizmanın çeşitli metallerin varlığında gelişimlerini devam ettirebildikleri de bilinmektedir (Bruins, vd., 2000; Choudhury ve Srivastava, 2001). Yapılan araştırmalarda bazı metallere dirençli mikroorganizmalar tespit edilmiştir. Bu çalışmalar, çoğunlukla *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Bacillus* spp.gibi önemli dirençlilik gösteren Gram-negatif ve Gram-pozitif aerobik bakterileri içermektedir. Toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan etmen, mikroorganizmaların bulunduğu çevrede, toksisiteye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin organizma üzerine yarattığı strestir. Bu direnç mekanizmalarının çoğu da plazmid kökenlidir (Guzzo, vd., 1999).

Metal dirençlilik mekanizmaları, genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir (Harnett, vd., 1984; McEntee, vd., 1986). Çünkü her iki tip direnç de organizmalar arasında konjugasyon veya transdüksiyon ile transfer gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda, metal dirençliliği ile antibiyotik dirençliliği aynı plazmid kökenli olabilmektedir. Metal dirençliliği ise antibiyotik dirençliliğinden önce rapor edilmiştir (Ji ve Silver, 1995). Mikroorganizmalarda metal dirençlilik mekanizmaları; geçirgen bariyer sayesinde metallerin hücre dışına bırakılması, aktif transport ile metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması, intrasellüler ayırım, metallerin enzimatik detoksifikasyon ile daha az toksik hale getirilmesi ve hücrel hedeflerin metal duyarlılıklarının azaltılması şeklinde olabileceği bildirilmiştir (Silver, 1992; Bruins, vd., 2000). Doğal direnç metaller veya hücre membran bileşenlerinde değişiklikler ile etkileşimi önlemek için, hücrel bileşenlerde mutasyonel formlar alabilirler (Rouch, vd., 1995). Mikroorganizmalar bir veya birkaç direnç mekanizmasının bir kombinasyonuna sahip olabilmektedirler. Bir metale karşı birden fazla direnç mekanizmasına

sahip olan bir mikroorganizmanın hangi mekanizmayı seçeceği, oluşacak ara ürün veya son ürünün toksisitesine bağlıdır (Silver, 1998). Normalde bugün bilinenlerden daha fazla direnç mekanizması olduğu savunulmakta fakat bu mekanizmalara sahip mikroorganizmalar henüz izole edilmediğinden ispatlanamadığı ileri sürülmektedir (Bruins, vd., 2000). Ayrıca toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının oluşturulmasında mikroorganizmalarda bulunan plazmid DNA'nın kromozomal DNA'dan daha etkili olduğu belirtilmektedir (Silver, 1992). Geçirgen bariyer sayesinde, metallerin hücre dışında bırakılması; mikroorganizmanın hücre duvarında, membranında veya zarfında bir takım değişiklikler meydana getirilmektedir ve bu mekanizma sayesinde mikroorganizma metale duyarlı olan önemli hücresel komponentlerini korumaktadır.

Hücre içine metal konsantrasyonunu düzenlemek için, ana yol membran taşıma mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir. Normal şartlarda, gerekli olan ve olmayan metal iyonlarının her ikisinde bir organizmanın içine spesifik olmayan alım sistemleri aracılığı ile taşınabilir. Metal iyonları, dış membrana ve kapsüle non-spesifik olarak bağlanabilmektedir. Bu bağlanma, dış membranda yer alan $-NH_2$, $-SH$, $-OH$, $-SO_3H$, $-COOH$ ve PO_3H grupları ile metal iyonları arasındaki spesifik olmayan etkileşim ile gerçekleşmektedir (Gazso, 2001). Bakterilerin doğal olarak sahip oldukları ekstrasellüler polisakkarit tabaka, metal iyonlarını biyosorblama yeteneğine sahiptir ve bu sayede bu iyonların hücre komponentleri ile etkileşime girmesi önlenmektedir. Bağlanma bölgesinin doygunluğa ulaşmasından dolayı metale karşı sınırlı bir koruma sağlamaktadır (Gavrilescu, 2004). Ortamda metal iyonları fazla olduğu durumda gerekli olmayan metallerin, hücre içine alınması spesifik iyon akış sistemler aracılığı ile engellenir. Gerekli olan fosfatların alınımı sırasında, zehirli metal olan arsenatın dışarı bırakılması buna bir örnektir. Hücre, normal mekanizmalardan yüz kat daha büyük bir spesifikite ile fosfat alırken, daha spesifik bir sistemin aracılığı ile arsenatı ayırt edebilir.

Bir hücre, hücresel bileşenlere hassas korumalı metal direnç sistemini bir denemede geliştirebilir. Metal giriş sınırı veya hücresel bileşenlerin değişimi hücrelerin metallere duyarlılığını azaltır. Bir mikroorganizmada direncin boyutunu birkaç faktör belirler. Bunlar; metal alımı için bazı mekanizmalar ve tipleri, her bir metalin normal metabolizmada oynadığı rol ve metal direncinin kontrolündeki plazmidler, kromozomlar veya transpozonlar üzerine yerleşmiş genlerin durumudur (Jensen, vd., 2001).

Düşük konsantrasyonlarda bile toksik etki gösteren kadmiyum nonesansiyel bir metaldir. $Cd(II)$ 'nin enzimatik detoksifikasyon ile daha toksik kadmiyum formları oluşmaktadır. Bu nedenle, $Cd(II)$ için en önemli dirençlilik mekanizması bu metali hücre içinden dışarı pompalayan sistemdir (Jensen, vd., 2001). K^+ , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ni^{+2} , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} , AsO_4^{-3} , AsO_2^- ,

CO^{+2} , Ag^+ ve Pb^{+2} iyonlarının da taşıma sistemleri ile hücreden uzaklaştırıldığı bildirilmektedir. İntrasellüler ayırırda; toksik bazı metaller mikroorganizmalar tarafından üretilen sisteince zengin küçük proteinlere (metalloprotein) bağlanarak, sitoplazmada biriktirilmektedir. Bu sayede önemli hücre bileşenleri toksik metalin etkisinden korunmaktadır. Genellikle Cd(II) , Cu(II) ve Zn(II) 'ye karşı dirençlilikte bazı mikroorganizmalar bu yolu seçmektedir (Nies ve Silver, 1995).

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu çalışma için Kütahya'daki semt pazarlarından bal örnekleri temin edilmiştir. Öncelikli olarak toplanan bal örneklerinin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle ağırlıklı olarak gram negatif bakterilere karşı balın inhibisyon etkisi gözlenmiştir. Çalışmamızın diğerk kısmında ise ballardan elde edilen aerob endospor oluşturan basillerin izolasyonu yapılmıştır.

Çevredeki ağır metallerin toksisite seviyelerinin varlığı bütün canlılar için olumsuz etki oluşturabilmektedir. Bir metalin toksik etki seviyesi, makromolekül, metabolit ve hücre organelleri ile birlikte biyolojik sistemlerdeki yaşam proseslerine zarar verme kapasitesine bağlıdır. Öte yandan ağır metallerin toksisitesine karşı mikroorganizmaların göstermiş olduğu direnç mekanizmaları, antibiyotik dirençliliği ile de bağdaştırılmaktadır. Bu amaçla gıda maddesi içerisinde tükettiğimiz bal örneklerinde bulunan basil izolatların ağır metal, antibiyotik dirençliliği, sekonder metabolit üretim potansiyelleri değerlendirilmiştir.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyal

2.1.1. Bal örnekleri ve bal örneklerinden endospor oluşturan basillerin izolasyonu

Çalışmamızda kullandığımız bal örnekleri 31 örnek peteksiz (süzme) ve 13 örnek petekli halde Kütahya'da bulunan semt pazarlarından temin edilmiştir. Örnekler 2016 Ocak-Mart aylarında toplanmıştır. Bal örnekleri steril koyu renkli cam kavanozlar içerisinde laboratuvara getirilmiştir. Deneyler sırasında bal örnekleri oda sıcaklığında ışık almayan yerde bekletilmiştir.

Bu çalışmada aerob endospor oluşturan basilleri izole etmek amacı ile topladığımız bal örneklerinden izolasyon yapılmıştır. Bal örneklerinden aerob endospor oluşturan basil izolasyonu için 10 g bal örneği aseptik bir şekilde 90 mL fizyolojik tuzlu su ilavesi ile 160rpm de 27°C'de 30 dakika homojenize edilmiştir. Homojen hale gelen örnekler 80°C 'de 15-20 dakika su banyosunda ısıtılmıştır. Aerob endospor izolasyonu için örnekler Nutrient Agar besiyeri üzerine 0,1 mL aktararak yayma plaka yöntemi ile ekim yapılmıştır. Plaklar aerobik olarak 37°C 'de 1-2 gün süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda gelişen tek koloniler Bacillus cinsine ait olduğu kabul edilip yatık Nutrient agar besiyerine aktarılmıştır. İzolasyon sonunda elde edilen izolatların +4 °C 'de yatık agarda stok oluşturarak muhafazası sağlanmıştır.

2.1.2 Biyolojik materyaller

Toplanan bal örneklerinin ve baldan izole edilen basil izolatlarının antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde kullanılan mikroorganizmalar.

Mikroorganizma İsmi	Kodu	Kaynağı
Gram Pozitif Bakteri		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	Amerikan Kültür Koleksiyon
Gram Negatif Bakteri		
<i>Escherichia coli</i>	NRLL 3704	ARS Kültür Koleksiyonu
<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 1(a)		D. P. Ü. Laboratuvar koleksiyonu (Çevresel izolat)
<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 1(b)		Laboratuvar koleksiyonu (Çevresel izolat)
<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 2-15(a)		Laboratuvar koleksiyonu (Çevresel izolat)
<i>Legionella pneumophila</i> serogrup 2-15(b)		Laboratuvar koleksiyonu (Çevresel izolat)
<i>Legionella</i> spp.(a)		Laboratuvar koleksiyonu (Çevresel izolat)
<i>Legionella</i> spp.(b)		Laboratuvar koleksiyonu (Çevresel izolat)

Çalışmamızın diğer basamağı olan ağır metal toleranslılık testinde pozitif kontrol için, *B. subtilis* NRRL B-209 suşu kullanılmıştır.

2.1.3. Kimyasal materyaller

2.1.3.1. Ağır metal toleranslılık testinde kullanılan ağır metaller

Aerob endospor oluşturan Basillerin ağır metal toleranslılık testinde kullanılan ağır metallerin tuzları sırasıyla; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, PbCl_2 , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dur.

2.1.3.2. Kullanılan antibiyotikler

Antibiyotik dirençlilik testinde kullanılan antibiyotikler ise; Doxycycline (30 µg), Rifampicin (30 µg) ve Kanamisin (30µg) şeklindedir.

2.1.4. Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Agar (Fluka 1.05450)

Et özütü	3.0 g
Pepton	5.0 g
Agar	15.0 g
Saf su	1000 ml

İzolatların muhafazasında, izolasyonunda, antibakteriyel aktivite testinde, ağır metal ve antibiyotik dirençlilik testi, sekonder metabolit üretim testinde kullanılmıştır.

Besiyeri 2. Nutrient Broth (Merck 1.05443)

Pepton	5.0 g
Et özütü	3.0 g
Saf su	1000 mL

Mikroorganizmaların üretilmesinde ve identifikasyon testlerinde kullanılmıştır

Besiyeri 3. Anaerobik Agar (Merck 1.05452)

Tripticase	20.0 g
Glikoz	10.0 g
Agar	15.0 g
Sodyum trioglikat	2.0 g
Sodyum formaldehit sulfoksi	1.0 g
Saf su	1000 mL

İdentifikasyon testinde kullanılmıştır (Sneath, 1986).

Besiyeri 4. Metil Red-Voges Proskauer Broth (Merck 1.05712)

Et ekstraktı	7.0 g
D(+) Glikoz	5.0 g
Fosfat tamponu	5.0 g
Saf su	1000 mL

İdentifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Tamer, vd., 1989).

Besiyeri 5. Karbonhidrat Fermentasyon Besiyeri

MR-VP Bazal Besiyeri (Merck)

Polipepton	7.0 g
Dipotasyum fosfat	5.0 g
Glikoz	5.0 g
Saf su	1000 mL

Ticari besiyeri tartılıp saf su içinde homojen bir şekilde çözüldükten sonra % 0,01 oranında Metil red indikatörü eklenip, deney tüplerine 5'er mL olacak şekilde konulur. Besiyeri otoklavda 121°C'de 1.1 atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilir. Daha sonra 2,5 g/ 10

mL' lik karbonhidrat (L (-) arabinoz, D (+) ksiloz, mannitol ve glikoz) çözeltisi hazırlanır ve filtrasyon ile sterilize edilir. Her tüpe 0,1 mL karbonhidrat çözeltisi eklenir. Bu ortam identifikasyon testlerinde kullanılır (Tamer, vd., 1989).

Besiyeri 6. İzolatların Amilaz Aktivitelerinin Belirlenmesi için Modifiye Edilmiş Besiyeri

Na ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0.5 g
MgSO ₄	0.24 g
CaCl ₂	0.01 g
Pepton	3 g
Nişasta	10 g
Agar	15 g
Saf Su	1000 mL

İzolatların amilaz aktivitesini belirlemek için kullanılmıştır (Pembeci, 1998; Bal, 2005; Kıran, vd., 2006).

Besiyeri 7. Jelatin Besiyeri

Jelatin	12.0 g
Nutrient Broth	100.0 mL

İdentifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Çotuk, 2003).

Besiyeri 8. İzolatların Proteaz Aktivitelerinin Belirlenmesi İçin Modifiye Edilmiş Besiyeri

KH ₂ PO ₄	3 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
KCl	1.5 g
Agar	48 g
Yağsız Süt	200 g
Saf Su	1000 mL

Yağsız süt haricinde bütün malzemeler homojen bir şekilde çözündürülüp otoklavda 121°C'de 1.1 atmosfer basınç altında 15 dakika sterilize edilir. Sterilize edilen besiyeri soğuduktan sonra, alevin yanında aseptik şartlar altında sterilize yağsız süt besiyerine eklenir (Pembeci, 1998; Bal, 2005; Kıran, 2006).

Besiyeri 9.Simmons Sitrat Agar (Merck 1.02501)

Amonyum dihidrojen fosfat	1.0 g
Monopotasyum fosfat	1.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Sodyum sitrat	2.0 g
Magnezyum sülfat	0.2 g
Bromtimol mavisi	0.08
Agar-agar	13.0
Saf su	1000 mL

İdentifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Besiyeri 10.Triptonlu Su (Merck 1.10859)

Kazein pepton	10.0 g
NaCl	5.0 g
Saf su	1000 mL

İdentifikasyon testinde kullanılmıştır (Tamer, vd., 1989).

Besiyeri 11. Yarı-Katı Agar

Pepton	5.0 g
Et ekstrakt	3.0 g
Agar	4.0 g
Saf su	1000 mL

Mikroorganizmaların hareketlilik testinde kullanılmıştır.

2.1.5.Boyalar**Boya 1.** Kristal Viyole

Çözelti A

Kristal (Jansiyen) viyole	2.0 g
Etil alkol (%95)	20.0 mL

Çözelti B

Amonyum oksalat	0.8 g
Saf su	80.0 mL

Çözelti A ve B karıştırılmış ve saf su ile 1:10 oranında sulandırılmıştır ve filtre kağıdından süzülmüştür (Özçelik, 1995).

Boya 2. Safranin Boyası

Safranin (%95 lik etanolde %2.5'luk çözelti)	10 mL
Saf su	100 mL

Safranin saf su içerisinde iyice çözülmüştür (Özçelik, 1995).

Boya 3. Malaşit Yeşili

Malaşit yeşili	5.0 g
Saf su	100.0 mL

Boya saf su içinde çözülmüş ve filtre kâğıdında süzölmüştür (Özçelik, 1995).

2.1.6. Çözeltiler**Çözelti 1. Fizyolojik Tuz çözeltisi**

NaCl	8.5 g
Saf su	1000 mL

İzolatların Mc Farland standardına göre bulanıklılığının ayarlanmasında kullanılmıştır.

Çözelti 2. Mc Farland Standardı

BaCl ₂ (%1.175, 0.048 M)	0.5 mL
H ₂ SO ₄ (%1, 0.18 M)	99.5 mL

H₂SO₄ ve BaCl₂ ve karıştırıldığında elde edilen çözelti spektrofotometre de 625 nm dalga boyunda okutulur ve okutulan dalga boyunda absorbans değeri 0.08-0.10 aralığına denk gelir. Spektrofotometrede okutulan bu değer 0.5 Mc Farland standardı olarak kabul edilip, elde edilen bu standardın bulanıklığı ile test mikroorganizma süspansiyonlarının bulanıklığı çıplak göz ile karşılaştırılarak ayarlanır. 0.5 Mc Farland standardı mL'de 10⁸ bakteri varlığını göstermektedir (NCCLS, 1990).

Çözelti 3. Kovacs İndol Çözeltisi (Merck)

Amil veya isoamil alkol (saf)	150.0 mL
Paradimetil-aminobenzaldehid	10.0 g
HCL	50.0 mL

Ticari olarak hazır bulunan çözelti, buzdolabında ve karanlıkta saklanmıştır. Bu madde indol testinde kullanılmıştır (Tamer, vd., 1989).

Çözelti 4. Alfa Naftol Ayıracı

A Çözeltisi

Alfa Naftol	5 g
Absolut alkol	95 mL

B Çözeltisi

KOH	40 g
Kreatin	0.3 g
Damıtık su	1000 mL

Potasyum hidroksit 75 mL damıtık su içinde çözündürülür. Solüsyonun ılık olması için oda sıcaklığında soğumaya bırakılır. Daha sonra kreatin eklenip karıştırılarak çözündürülür. Kalan su ilave edilerek buzdolabında saklanır (Çotuk, 2003).

Çözelti 5. %30'lık H_2O_2 çözeltisi, identifikasyon testi olan katalaz testinde kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Çözelti 6. Yapay Bal Çözeltisi

Çalışmamızda kullanmak üzere laboratuvar ortamında elde edilen yapay bal içeriği aşağıda verilmiştir.

Sukroz	3.0g
Maltoz	15.0g
Fruktoz	80.1g
Glikoz	67g
Steril deiyonize su	34mL

Yukardaki maddeler tartılıp 56°C'de sıcak su banyosunda çözülmüştür (Sherlock, vd., 2010). Bu balın elde edilmesinin nedeni, balda bulunan 4 şeker maddesinden kaynaklanan ozmotik basıncın antimikrobiyal aktiviteye neden olup olmadığını araştırmaktır.

2.2. Metod

2.2.1. Bal örneklerinin elde edilmesi ve antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan bal örnekleri (n:44) çeşitli bölgelerde (Kütahya, Eskişehir, Bolu, Çanakkale, Rize, Siirt, Van, Erzincan, Bursa, Elazığ, Muğla, Aydın, Kars, Artvin, Sivas, Manisa, Ankara, Çorum, Batum, Adana, Balıkesir) üretilen ballar olup Kütahya'da satış yapan toptancılarından temin edilmiştir. Toplanan 44 adet bal örneğinden 31'i (%70,5) süzme, 13'ü (%29,5) petekli baldır.

Toplanan bal örneklerinin antibakteriyel aktivitesini belirlemek için kullanacağımız test bakterileri Çizelge 2.1'de verilmiştir. Çalışmada toplam 8 adet bakteri kullanılmıştır. Bunların 7 adedi Gram- negatif bakterilerden [*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* serogrup 1(a), *Legionella pneumophila* serogrup 1(b), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(a), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(b), *Legionella* spp.(a) ve *Legionella* spp.(b)] ve 1 adet ise Gram-pozitif bakteri (*Staphylococcus aureus*) kullanılmıştır. Bu izolatlar yatık Nutrient agar besiyerinde 37°C de 24 saat inkübe edilerek aktifleştirilmiştir. Test bakterileri için mililitresinde 10^8 (Mc Farland 0,5) olacak şekilde hücre süspansiyonları hazırlanmıştır. Nutrient Agar besiyeri sterilize edildikten sonra steril petri kaplarına dökülmüştür. Besiyeri kuruması için 2 gün süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir. Toplanan bal örneklerinin antimikrobiyal aktivite çalışması agar kuyucuk yöntemine göre belirlenmiştir (Güven, vd., 2008). Test bakterilerinin hazırlanan hücre süspansiyonları, agar plaklarının tüm yüzeyine steril eküvyon yardımı ile sürüldükten sonra agar plaklarına 15mm çapında steril mantar delici yardımı ile oyuklar açılmıştır. Bal örnekleri, oyuklara daha kolay aktarılması için 37°C'de 1 saat bekletilerek daha sıvı hale gelmesi sağlanmıştır. Açılan oyuklara yaklaşık olarak 1 gram bal örneğinden, steril spatül yardımı ile aktarılmıştır. Plaklar, 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş ve 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oyuk çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapları mm olarak ölçülmüştür (Çizelge 3.2).

2.2.2. Bal örneklerinden endospor oluşturan basillerin izolasyonu ve identifikasyonu

Toplanan bal örneklerinden izole edilen basil izolatların agram boyama, endospor boyama, katalaz testi, anaerobik gelişim testi, Voges Proskauer testi, asit oluşumu testleri (L-arabinoz, D- ksiloz, D- mannitol), glikozdan gaz oluşumu testi, hidroliz testleri (kazein testi, jelatin testi, nişasta testi, sitrat testi), indol oluşumu testi, farklı pH'larda gelişme testi, tuza dayanıklılık testi, farklı sıcaklıklarda gelişim testi, hareketlilik testi gibi *Bacillus* cinsi tanımlamasında kullanılan testler Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, esas alınarak yapılmıştır (Sneath, 1986).

Gram boyama: Öze yardımı ile 24 saatlik kültürden bir miktar alınıp su damlası içine dairesel hareketlerle yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyel film önce havada kurutulmuş ve daha sonra bakteriyel film üstte kalacak şekilde lam iki üç kez alevden geçirilerek fiks edilmiştir. Preperat önce kristal viyole ile 1 dakika muameleye bırakılmıştır. Sürenin sonunda boya akıtılarak suyla yıkanmıştır. Daha sonra bakteriyel film tabakası üzerine lügol çözeltisi ilave edilerek 1 dakika bekletildikten sonra, suyla yıkanmıştır. 1-2 saniye alkol ile muamele edilen preperatın alkolü suyla uzaklaştırılmıştır. 30 saniye kadar safraninle muamele

edildikten sonra boya akıtılarak suyla yıkanmıştır. Kurumaya bırakılan preperat immersiyon yağı damlatılarak immersiyon objektifi yardımıyla incelenmiştir. Kristal viyole boyasını tutup mor renkte gözüken basiller Gram- pozitif olarak kaydedilmiştir (Tamer, vd., 1989)

Endospor boyama: Temiz bir lamın ortasına küçük bir su damlası bırakılmış ve öze yardımıyla bir miktar 48 saatlik kültürden alınıp su damlası içine dairesel hareketlerle yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyel film önce havada kurutulmuş ve daha sonra bakteriyel film üstte kalacak şekilde lam iki üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Preperat kaynar su banyosu düzeneği üzerine yerleştirilerek malaşit yeşili boyası ile 5 dakika muamele edilmiştir. Su ile yıkandıktan sonra 30 saniye safranin ile muamele edilmiştir. Uygulanan işlem sonucu sporlar yeşil renkli, vejetatif hücreler ise pembe renkli olarak görülmüştür (Tamer, vd., 1989)

Katalaz testi: Katalaz çoğu bakteride bulunan hemaporfirin yapısında bir enzim olup, mikroorganizmalarda aerobik solunum esnasında üretilen ve biriktiğinde organizmanın ölümüne neden olan hidrojen peroksitin oksijen ve suya parçalanmasını katalize etmektedir. Katalaz üretimi, bir mikroorganizma kültürüne birkaç damla %3'lük H_2O_2 'den ilave edildiğinde, serbest oksijen gazı kabarcıklarının çıkmasıyla fark edilmektedir. Kabarcıkların görülmemesi katalazın mevcut olmadığını, sonucun negatif olduğunu gösterir (Çotuk, 2003).

Anaerobik gelişim: Hazırlanan anaerobik besiyerlerine bakterinin ekimi yapılır, daha sonra anaerob ortam sağlamak için, anaerobik kavanoz içerisine bakteri ekimi yapılmış petriler yerleştirilir ve 24-48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra üreme görülen petriler pozitif, üreme görülmeyen petriler ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Voges Proskauer Testi: Enterik mikroorganizmaların glikoz fermentasyonunun son ürünlerinden asetilmetil- karbinol oluşturma yeteneğinin tayininde kullanılan bir testtir. Asetilmetil- karbinol oluşumu, bu ürünün diasetil bileşiğine okside edildiği gösterilerek saptanır. Bunun için alfa-naftol'ün alkol çözeltisi ve %40'luk potasyum hidroksit solüsyonunun karışımı olan Barritt ayracı kullanılır. Mikroorganizmanın 24 saatlik kültürünün üzerine %5 oranında Barritt ayracından ilave edilir ve tüpler çalkalanır. 2 saat süreyle tüplerdeki renk değişimleri gözlenir. Asetilmetil- karbinol'ün diasetile dönüştüğü besiyerinin renginin pembeleşmesiyle anlaşılır (Çotuk, 2003).

Karbonhidrat fermentasyonu testi: Şekerlerden asit üretimini belirlemek amacıyla L(+)Arabinoz, D(+)ksiloz, mannitol ve glikoz olmak üzere 4 tip şeker, filtre edilerek %0.5

oranında Metil Red içeren steril besiyerine eklenmiş, glikozdan gaz oluşumunu göstermek için ters duran “Durham tüpü” bulunan besiyerleri kullanılmıştır. Tanımlanacak bakteri kültüründen öze ile hazırlanmış olan besiyerine aşılama yapılarak optimum sıcaklıkta 5 güne kadar inkübe edilir. Bu testte kullanılan Metil Red indikatörü pH 6,2’de sarı, pH 4.2 ve altında ise kırmızı bir renk oluşturur. Besiyeri renginin değişmesi asit oluşumunu yani test edilen şekerin kullanıldığını gösterir (Uçan ve Erganiş, 2005; Temiz, 2000).

Kazein Hidrolizi Testi:Kazein, süt proteinidir. Peptid bağları ile birbirine bağlı aminoasit alt birimlerinden ibaret bir makromoleküldür. Bu moleküller proteaz denilen hücre dışı enzimlerle proteolizise uğrarlar ve pepton, polipeptid ve aminoasitlerine ayrılırlar. Bu deneyde ekzoenzimlerin hidrolitik aktivitesini göstermek için milk agar kullanılır. Kazein içeren süt ilave edilmiş nutrient agar içeren besiyerinde, süt kendi rengini ve opasitesini gösterir. Petrideki agar kültürlerine ekim ve 48 saat 37°C’de bekletme sonucunda proteaz salan organizmaların etrafında proteolizis zonu olarak açık renkli bir bölge görülecektir. Bu opasite kaybı pozitif sonuç alındığı anlamına gelirken, opasite olmaması negatif sonuç alındığını gösterir (Çotuk, 2003).

Jelatin Hidrolizi: Jelatin, insan ve hayvanda bağ doku ve tendonların esas yapı taşı olan kolajenin hidrolizi ile oluşan bir proteindir. 25°C’nin altındaki sıcaklıklarda jel özelliğini koruyarak, katı halde bulunur. 25°C’nin üzerindeki sıcaklıklarda jelatin sıvıdır. Bazı mikroorganizmalar jelatinaz denilen hücre dışı enzimleriyle bu proteini aminoasitlerine hidrolize ederek sıvılaştırır. Bu sıvılaşma meydana geldiği zaman 4°C gibi düşük sıcaklıklarda bile jel özelliği tekrar kazanılamaz.

Bu deneyde, jelatinazın hidrolitik aktivitesini göstermek için jelatin besiyeri içeren petriler kullanılır. Kültürler besiyerine ekilip, 48 saat 37°C’de bekletilir. Daha sonra bu petriler 4°C’de 30 dakika bekletilir. Sıvı kalan kültürler jelatinaz oluşturulduğu, jelatinin hızla hidrolize uğratıldığını gösterir ve pozitif sonuç alındığını gösterir. Besiyerinin jel forma gelmesi negatif sonuç alındığını gösterir (Çotuk, 2003).

Nişasta Hidrolizi: Nişasta glikoz moleküllerinin birbirlerine bağlanması ile oluşmuş bir polisakkarit olup, bir bakteriyel ekzoenzim olan amilaz’ın katalizatorlüğünde maltoz ve glikoza parçalanır. Ancak bu aşamadan sonra şekerler bakteri sitoplazmasına alınırlar. Nişasta iyot ile kimyasal reaksiyona girerek mavi-siyah rengin gelişmesine sebep olur. Bu renk, iyotun spiral şekilli nişasta molekülüne yapışması ile ortaya çıkar. Bu reaksiyon sonucunda nişasta mavi ışık dışındaki ışıkları emen ancak maviyi yansıtan bir molekül halini alır. Bu durumda nişasta maltoz ve glikoza parçalanmış ise renk şekillenmeyecektir. Damlatma yöntemiyle Nişasta

Agara ekim yapılır. 37 °C’de 2 gün inkübe edilir. Birkaç damla lügol solüsyonu, üreme görülen bakteri popülasyonu üzerine damlatılır. Kullanılacak lügol solüsyonu miktarı tam olarak üreme alanının üzerini örtecek kadar olmalıdır. Eğer nişasta hidrolize olmuşsa, bakteriyel üreme çevresinde şeffaf bir alan oluşacaktır. Nişastanın parçalanmadığı durumlarda bu alan mavi-siyah bir renk alır (Uçan ve Erganiş, 2005; Temiz 2000).

Sitrat Kullanımı Testi: Simmons sitrat besiyeri sitrat içerir. Bu besiyeri içinde üremenin olması sitrat kullanımının bir göstergesidir. Bakterilerin sitrat kullanımı sonrasında oluşan yan ürünler ortamın pH’sını artırır. Besiyerine katılmış olan indikatör bromtimol mavisi, besiyerinin rengini yeşilden maviye dönüştürmektedir. Sitrat kullanımının araştırılacağı 24 saatlik kültürden eğri Simmons sitrat agara ekim yapılır. 37°C’de 48 saat bekletilir. Bekleme süresi sonunda üremenin olması ve besiyerinin renginin maviden yeşile dönüşmesi pozitif sonuçtur (Çotuk, 2003).

İndol Oluşumu Testi: Bu test mikroorganizmaların triptofan aminoasidini parçalama yeteneğinin tayininde kullanılır. Bazı bakteriler triptofanı triptofanaz enzimiyle parçalayıp; indol, pürivik asit ve amonyak gibi bazı metabolik ürünleri oluştururlar.

İçinde 6 mL %1’lik tripton broth içeren besiyerine 24 saatlik kültürler ekilir. Tüpler üzerine 0,3 mL Kovaks ayracı ilave edilir. Tüpler eller arasında döndürülerek kırmızı halka oluşup oluşmadığına bakılır. Kırmızı halka oluşursa pozitif, oluşmazsa negatif sonuç alındığı anlamına gelir (Çotuk, 2003).

pH Gelişimi Testi: Nutrient broth besiyerlerinin pH’ları 5 M ve 0,01 M HCl ve NaOH ile 5,7 ve 6,8’e ayarlanmıştır. İzolatlar bu besiyerlerine %1 oranında ilave edilip 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda gelişim gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Steril Nutrient broth besiyeri ise kontrol grubu olarak kullanılmıştır (İşleroğlu, vd., 2008).

Tuz Gelişimi Testi: İzole edilen Basil suşlarının hangi tuz konsantrasyonlarında gelişebildiğini belirlemek amacıyla % 2.0, 5.0, 7.0 ve 10.0 tuz konsantrasyonu içeren Nutrient Broth sıvı besiyerine %1 oranında aktif kültürden inoküle edilip 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişme gösterenler pozitif, göstermeyenler ise negatif olarak kabul edilmiştir (İşleroğlu, vd., 2008).

Sıcaklık Gelişimi Testi: İzolatlar Nutrient Broth besiyerine %1 oranında aşılanarak 5, 30, 40, 50 ve 55 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda üreme gösterenler pozitif,

göstermeyenler ise negatif olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak bakteri içermeyen Nutrient Broth sıvı besiyeri kullanılmıştır (İşleroğlu, vd., 2008).

Hareketlilik Testi: Tüplere dağıtılan yumuşak agarlı besiyerinin, sterilizasyondan sonra dik olarak donması sağlanır. Test uygulanacak saf kültürden aseptik olarak ekim iğnesi ile alınan kültür besiyerinin ortasından dibine 5 mm kalacak şekilde ekim yapılır. Kültür 37 °C'da 24-48 saat inkübe edilir. Hareket pozitif kültürlerde tüpteki besiyerinin her tarafında üreme olacağından besiyeri bulanık bir hal alır. Hareket negatif kültürlerde sadece ekim çizgisi boyunca üreme görülür, ortam parlak rengini korur (Uçan ve Erganiş, 2005; Temiz, 2000).

2.2.3. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesi

Baldan izole edilen her basil izolatu için beş farklı ağır metalin ayrı ayrı Minimal İnhibisyon Konsantrasyonlarını (MİK) belirlemek için petrilerde agar dilusyon metodu ile belirlenmiştir (NCCLS, 1997; Masaoka, vd., 2003). Kullanılan 5 farklı (Fe, Co, Pb, Cu ve Cd) ağır metalin Nutrient agar içerisine 0,0625 mM/mL'den 8 mM/mL'e kadar iki katlı seri dilusyonları hazırlanmıştır. Bunun için $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, PbCl_2 , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ağır metallerinin tuzları kullanılmıştır. Hazırlanan ağır metal çözeltileri filtreden geçirilerek, otoklavdan çıkan besiyeri içerisine ilave edilmiştir. Hazırlanan besiyerleri 2-3 gün oda sıcaklığında kurutulmuştur. Test edilecek basil izolatları Nutrient Broth'da aktive edilmiştir. Mc Farland 0,5 bulanıklığına göre ayarlanmış olan aktif bakteri süspansiyonundan damlatma yöntemi ile ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler 24- 48 saat 37°C' de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda üremenin görülmediği en düşük ağır metal konsantrasyonu Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değeri olarak belirlenmiştir (NCCLS, 1990).

2.2.4. Antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi

Elde edilen basil izolatlarının antibiyotik dirençlilik testi, agar disk difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde toplam 3 farklı antibiyotik disk kullanılmıştır. Kullanılan antibiyotikler; doxycycline (30µg), rifampicin (30µg) ve kanamisin (30µg) dir. Sterilizatörde steril edilmiş olan petri kaplarına yaklaşık olarak 25 mL Nutrient Agar besiyerinden dökülmüş ve besiyerlerinin kuruması için 2-3 gün oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen basil izolatları Nutrient Broth'da 37°C'de 18 saat aktive edilmiştir. Aktif bakteri süspansiyonu mL'de 10^8 olacak şekilde steril fizyolojik tuzlu su ilave edilerek Mc Farland 0,5 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Test bakterileri steril eküvyon yardımı ile besiyerinin tüm yüzeyine sürülmüştür. Daha sonrabahsedilen antibiyotiklerden emdirilmiş kağıtdiskler yerleştirilmiştir. Petriler 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra 24 saat

37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda diskin etrafında oluşan inhibisyon zonunun çapı ölçülmüştür (Krumperman, 1985).

2.2.5. *Bacillus*’ların sekonder metabolit üretiminin belirlenmesi (agar blok yöntemi)

Baldan izole edilen 67 adet saf *Bacillus* spp. izolatlarının sekonder metabolit üretim aktivitesini belirlemek için agar blok yöntemi kullanılmıştır. Metabolit üretimine karşı kullanılan test mikroorganizmaları balların antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için kullanılan test bakterileri olan *S. aureus*, *L. pneumophila* Sg 1, *L. pneumophila* Sg 2-15, *Legionella* spp. ve *E. coli* kullanılmıştır. Agar blok yöntemine göre antimikrobiyal aktiviteyi belirlemek için petri kabı içerisine Nutrient Agar besiyerinden 25 mL dökülmüştür. İzole edilen mikroorganizmalar petri kabının her yerine öze yardımı ile sürülmüştür. 72 saat 37° C’de inkübe edilerek inkübasyon sonunda petrinin yüzeyindeki mikroorganizmalar steril bir lam yardımı ile besiyerinin yüzeyinden sıyrılmıştır. Daha sonra 254 nm dalga boylu UV ışığı altında 30 dakika kadar bekletilmiştir. Agarın yüzeyi 15 mm çapındaki steril mantar deliciyi yardımıyla kesilerek, agar bloklar elde edilmiştir (Ichikawa, vd., 1971). Denemede kullanılacak olan bakteri kültürlerini aktifleştirmek için stok kültürlerden alınan bakteri izolatları ayrı ayrı 4-5 mL nutrient broth’da süspanse edilerek, 18 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda bakteri süspanasyonu mL de 10^8 olacak şekilde steril fizyolojik su ilave edilerek Mc Farland 0.5 bulanıklılığına göre test mikroorganizmaları hazırlanmıştır. Bakteriler için 25mLNutrient Agar besiyeri petri kabına dökülmüş ve agarın yüzeyi 35°C’de 2-3 saat kurutulmuştur. Test mikroorganizmaları agarın tüm yüzeyine eküvyon yardımı ile sürülmüş ve daha sonra agar bloklar yerleştirilerek 2 saat kadar buzdolabında +4°C’de bekletildikten sonra 37°C de 24 saat inkübe edilmiştir. Oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür.

3.BULGULAR

3.1. Bal Örneklerinin Toplanması ve Basillerin İzolasyonu

Kütahya ilinden toplam 44 adet bal örneği toplanmıştır. Toplanan bu balların 31'i süzme, kalan 13'ü ise petekli baldır. Toplan balların 8 tanesi Bolu ili, 6 tanesi Erzincan ili, 2'ser tanesi Kütahya, Eskişehir, Rize, Van, Muğla, Aydın, Kars, Adana, Ankara, Balıkesir illeri; 1'er tanesi ise Çanakkale, Siirt, Bursa, Elazığ, Artvin, Sivas, Manisa, Çorum, Trabzon, Batum illeri menşelidir.

Çizelge 3.1. Toplanan bal örneklerinin orijini ve izole edilen Basillerin kodları.

Bal örneği no	Balın menşei ve toplandığı tarih	İzolat kodu
1	Kütahya- Süzme- Çiçek balı Şubat 2016	1a
		1b
		1c
2	Kütahya- Petek- Çiçek balı Şubat 2016	-
3	Eskişehir- Süzme- Çiçek balı Şubat 2016	3a
		3b
4	Eskişehir- Petek- Çiçek balı Şubat 2016	4a
		4b
5	Bolu- Süzme- Çam balı Şubat 2016	5a
		5b
6	Çanakkale- Süzme- Çiçek balı Şubat 2016	6a
		6b
		6c
		6d
		6e
		6f
7	Rize- Süzme- Kestane balı Şubat 2016	-
8	Siirt- Petek- Karakovan balı Şubat 2016	8a
9	Van Gevaş- Petek- Çiçek balı Şubat 2016	9a
		9b
		9c
10	Erzincan- Petek- Çiçek balı Şubat 2016	10a
		10b
11	Van- Süzme- Çiçek balı Mart 2016	11
12	Erzincan- Süzme- Çiçek balı Mart 2016	12a
		12b
		12c

Çizelge 3.1. Toplanan bal örneklerinin orjini ve izole edilen Basillerin kodları (devamı).

Bal örneği no	Balın orjini ve toplandığı tarih	İzolat kodu
13	Erzincan- Süzme- Karakovan Balı Mart 2016	13a
		13b
14	Bursa Kemalpaşa- Süzme- Çiçek balı Mart 2016	-
15	Bolu Rüzgarlar- Süzme - Çiçek Balı- Mart 2016	-
16	Elazığ- Süzme - Çiçek balı Mart 2016	-
17	Bolu Kızık- Petek- Çiçek balı Mart 2016	17a
		17b
18	Bolu Karaköy- Petek- Çiçek Mart 2016	18a
19	Bolu- Petek- Çiçek Mart 2016	19a
		19b
		19c
20	Muğla- Süzme- Çam balı Mart 2016	20a
		20b
		20c
21	Bolu Kıbrısık- Süzme- Çiçek Balı Mart 2016	21a
		21b
		21c
22	Aydın - Süzme- Çiçek balı Mart 2016	22a
23	Kars- Süzme- Çiçek balı Mart 2016	23a
		23b
24	Artvin- Süzme- Kestane balı Mart 2016	-
25	Marmaris - Süzme- Püren balı Mart 2016	-
26	Aydın - Süzme- Çiçek balı Mart 2016	-
27	Bolu Göynük- Süzme- Çiçek Balı Mart 2016	-
28	Erzincan- Petek- Çiçek balı Mart 2016	28
29	Erzincan- Süzme- Çiçek balı Mart 2016	29a
		29b
		29c
30	Sivas Divriği- Petek- Çiçek balı Mart 2016	-
31	Anavarza- Süzme- Çiçek balı Mart 2016	31

Çizelge 3.1. Toplanan bal örneklerinin orjini ve izole edilen Basillerin kodları (devamı).

Bal örneği no	Balın orjini ve toplandığı tarih	İzolat kodu
32	Manisa- Petek- Çiçek balı Mart 2016	32
33	Ankara Karagöl- Süzme- Çiçek Balı Nisan 2016	33a 33b
34	Çorum İskilip- Petek- Çiçek Balı Nisan 2016	34
35	Batum- Süzme- Kestane balı Nisan 2016	-
36	Ankara- Süzme- Çiçek balı Nisan 2016	-
37	Erzincan- Petek- Çiçek balı Nisan 2016	37
38	Adana Sirkeli- Süzme- Çiçek Balı Nisan 2016	-
39	Balıkesir- Süzme- Çiçek Yaz Balı Nisan 2016	39a 39b 39c 39d 39e
40	Balıkesir- Süzme- Çiçek Bahar balı Nisan 2016	-
41	Kars- Süzme- Çiçek balı Nisan 2016	41
42	Bolu- Süzme Çiçek balı Nisan 2016	-
43	Trabzon- Süzme- Deli bal Nisan 2016	43a 43b 43c 43d 43e
44	Rize İkizdere- Süzme- Çiçek Balı Nisan 2016	44a 44b

3.2. Balların Antibakteriyel Aktivitesinin Belirlenmesi

Bal örnekleri agar kuyucuk yöntemi kullanarak antimikrobiyal aktivitesi gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, gram negatif bakterilerden *L. pneumophila* Sg 1(a), *L. pneumophila* Sg 1(b), *L. pneumophila* Sg 2-15 (a), *L. pneumophila* Sg 2-15 (b), *Legionella* spp. (a), *Legionella* spp. (b) ve *E. coli* toplam 8 bakteriye karşı test edilmiştir. Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitesini kıyaslamak için tetrasiklin (30µg) antibiyotığının ve balın antimikrobiyal aktivitesinin içerdiği yoğun şeker miktarından dolayı ozmolaritesinin

antimikrobiyal aktiviteye sebep olabileceği düşüncesiyle yapay bal örneğinde aynı yöntemle antimikrobiyal aktivitesine bakılmıştır.

Bal örnekleri antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde, Çizelge 3.2’de görüldüğü üzere 15mm zon çapına sahip olanlara antimikrobiyal aktivitesi yok (dirençli), 16-19mm zon çapına sahip olanlara zayıf antimikrobiyal aktiviteli, 20-29mm zon çapına sahip olanlara orta derecede antimikrobiyal aktiviteli, 30’dan büyük zon çapına sahip olanlar ise yüksekantimikrobiyal aktiviteye sahip olarak değerlendirilmiştir. Toplanan bal örneklerinin çoğunluğu *S. aureus* mikroorganizmasına karşı zayıf antibakteriyel aktivitede bulunmuştur. Bal örneklerinin 14 tanesi (4, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 38, 39, 40, 41, 42, 43 ve 44) orta derecede aktivite gösterirken 35 nolu bal örneği aktif antibakteriyel etkinlik (32 mm) gösterdiği tespit edilmiştir.

L. pneumophila Sg 1(a)’ye karşı toplanan 2 bal örneği (22 ve 31 nolu) hiçbir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. Buna karşın 4 bal örneği (5, 8, 12 ve 25 kodlu) zayıf antimikrobiyal aktivite göstermiştir. 31 adet örnek orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterirken, 7 adet örnek (7, 14, 17, 21, 35, 38 ve 41) yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

L. pneumophila Sg 1(b)’ye karşı toplanan 2 bal örneği (22 ve 29 nolu) hiçbir antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. 25 nolu örnek zayıf antimikrobiyal etki gösterirken, 18 bal örneği (2, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 13, 16, 18, 19, 23, 24, 25, 28, 32, 34, 42 ve 43 nolu) orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Buna karşın 23 bal örneği (1, 3, 7, 9, 12, 14, 15, 17, 20, 21, 26, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 ve 44 nolu) yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

L. pneumophila Sg 2-15(a)’ya karşı toplanan bal örneklerinden 12 tanesi (10, 12, 15, 16, 22, 25, 27, 28, 32, 37, 39 ve 44) orta seviyede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Kalan diğer bal örnekleri ise yüksek mikrobiyal aktivite göstermiştir.

L. pneumophila Sg 2-15(b)’ye karşı, toplanan 10 bal örneği (31, 32, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42 ve 44 nolu) zayıf antibakteriyel aktivite göstermiştir. 33 adet bal örneği ise (1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 37, 37, 38, 39, 40, 41, 42 ve 44 nolu) orta derecede mikrobiyal aktivite gösterirken, 6 nolu örnek 30 mm çap ile yüksek derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Legionella spp. (a)’ye karşı 3 bal örneği (13, 27 ve 31 nolu) zayıf antibakteriyel aktivite gösterirken, 37 bal örneği (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23,

24, 25, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 25, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 ve 44 nolu) ise orta derecede antimikrobiyal aktivite göstermiştir. Kalan 4 bal örneği (1, 20, 26 ve 43 nolu) yüksek mikrobiyal etki göstermiştir.

Legionella spp. (b)'ye karşı, 16 bal örneği (5, 6, 12, 21, 22, 27, 29, 31, 32, 33, 35, 36, 40, 41, 42 ve 44 nolu) ise zayıf antibakteriyel aktivite gösterirken diğer bal örnekleri orta derecede antibakteriyel etki göstermiştir.

Bal örneklerine karşı denenen diğer test bakteri ise *E. coli* olup bal örneklerinden 2 tanesi (13 ve 31 nolu) antimikrobiyal aktivite göstermemiştir. 22 adet bal örneği denenen test bakterisine karşı zayıf antimikrobiyal etki göstermiştir. Diğer 20 bal örneği (3, 6, 7, 8, 9, 14, 17, 20, 24, 28, 30, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 42, 43 ve 44 nolu) ise orta derecede antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Diğer bakterilerle karşılaştırıldığında en az antimikrobiyal aktivite bu bakteriye karşı görülmüştür.

Çizelge 3.2.Toplanan balların agar kuyucuk yöntemiyle antimiktobiyal aktivitesi (Ø 15 mm).

	Bal örnekleri																						
Test Mikroorganizması	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Gram Pozitif Bakteri																							
<i>S. aureus</i>	16	16	16	20	16	16	16	16	17	18	16	16	16	16	16	16	19	16	16	16	16	16	16
Gram Negatif Bakteri																							
<i>L. pneumophila</i> Sg1 (a)	26	27	29	27	17	22	30	17	22	22	25	18	20	30	27	26	37	25	28	27	30	15	25
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(b)	30	22	38	20	21	22	30	23	32	22	21	30	24	38	38	25	37	25	28	40	31	15	25
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15 (a)	37	32	37	41	33	32	36	30	32	25	30	28	30	30	27	27	30	32	30	35	31	28	30
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15 (b)	22	22	24	21	20	30	22	22	26	25	22	23	20	22	22	20	21	22	21	22	21	21	20
<i>Legionella</i> spp.(a)	30	25	28	25	22	25	28	24	24	25	22	20	18	24	24	20	25	25	25	30	26	20	24
<i>Legionella</i> spp. (b)	21	20	23	23	17	18	25	20	20	22	20	18	20	25	22	20	25	22	20	22	18	16	22
<i>E. coli</i>	18	17	20	18	18	24	24	20	22	18	17	16	15	20	18	16	20	16	18	20	16	15	17
	Bal örnekleri																						
	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	T30	YB
Gram Pozitif Bakteri																							
<i>S. aureus</i>	16	16	16	16	20	16	20	22	26	26	22	32	18	17	25	20	21	28	21	24	22	15	15
Gram Negatif Bakteri																							
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 (a)	22	18	26	22	25	20	23	15	22	22	28	30	23	25	40	24	26	30	25	25	22	25	15
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(b)	23	21	37	18	21	15	40	30	25	34	42	35	37	36	36	38	34	39	22	22	35	18	15
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15 (a)	30	27	40	22	25	30	30	20	25	30	30	35	32	28	30	28	35	30	30	32	20	18	15
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15 (b)	20	22	25	22	24	20	20	16	18	20	20	16	18	17	18	20	18	18	18	20	16	19	15
<i>Legionella</i> spp. (a)	25	25	30	19	20	20	28	18	20	26	20	22	25	24	22	20	25	22	25	30	28	11	15
<i>Legionella</i> spp. (b)	20	20	20	17	22	18	20	16	18	19	20	19	18	20	20	22	18	19	19	20	18	17	15
<i>E. coli</i>	20	16	18	17	20	16	20	15	17	19	25	20	22	21	22	24	18	17	20	23	25	21	15
T(30µg);tetrasiklin,YB: Yapay bal, 15mm; Antimikrobiyal aktivite yok (R),  16-19mm: Zayıf aktivite (Z),  20-29mm:Orta derecede antimikrobiyal aktivite (ODAA),  30-42mm: Yüksek antimikrobiyal aktivite (YA) 																							

Çizelge 3.3. Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitelerinin %'lik dağılımı.

Mikroorganizma	N	R	Z	ODAA	YA	%R	%Z	%ODAA	% YA
<i>S. aureus</i>	44	0	29	14	1	0	65,91	31,82	2,27
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(a)	44	2	4	31	7	4,54	9,09	70,45	15,91
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(b)	44	2	1	18	23	4,54	2,27	40,91	52,27
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15(a)	44	0	0	12	32	0	0	27,27	72,73
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15(b)	44	0	10	33	1	0	22,73	75	2,27
<i>Legionella</i> spp. (a)	44	0	3	37	4	0	6,82	84,09	9,09
<i>Legionella</i> spp.(b)	44	0	16	28	0	0	36,36	63,64	0
<i>E.coli</i>	44	2	22	20	0	4,54	50	45,45	0

Bal örneklerinin en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi sırasıyla %72,73 oranla *L. pneumophila* Sg 2-15(a), %52,27 oranla *L. pneumophila* Sg 1(b) ve %15,91 oranla *L. pneumophila* Sg 1(a)'ya karşı göstermiştir.

3.3.Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu ve İdentifikasyon Test Sonuçları

Çalışmada kullanılan bal örnekleri, Kütahya ilinde satılan balların 31'isüzme ve 13'ü petekli olarak toplanmıştır. 67 adet endospor oluşturan Basil izole edilmiştir. 44 adet bal örneğinden 67 farklı basil izolatu elde edilmiştir. Bu bal örneklerinden en çok basil izolatu elde edilen örnek 6 nolu baldır ve bu örnekten 6 farklı izolat elde edilmiştir. 39 ve 43 nolu örneklerden 5'er farklı izolat elde edilmiştir. 3 farklı izolat elde edilen (1, 9, 12, 19, 20, 21 ve 29 nolu) 7 adet bal örneği vardır. 2 farklı izolat elde edilen (3, 4, 5, 8, 10, 13, 17, 23, 33 ve 44 nolu) 10 adet bal örneği vardır. 1 izolat elde edilen (11, 18, 22, 24, 28, 31, 32, 34, 37 ve 41 nolu) 10 adet bal örneği vardır. Hiçbasil izolatu elde edilemeyen (2, 7, 14, 15, 16, 25, 26, 27, 30, 35, 36, 38, 40 ve 42 nolu) 14 adet bal örneği vardır.

Elde edilen izolatların endospor oluşturan *Bacillus* grubuna dahil edilmesi için aerob şartlarda endospor oluşumları değerlendirilmiş ve endospor oluşturan izolatların gram reaksiyonları, endospor boyama ve katalaz aktivitesine bakılmıştır. Bütün izolatların

mikroskopik inceleme sonucu gram reaksiyonlarının pozitif olduğu ve endospor oluşturdukları görölmüştür.İdentifikasyonda 67 Basil izolatına; katalaz üretimi, sitrat kullanımı, voges proskover, metil red, indol oluşumu, hareketlilik, anerobik gelişme, sıcaklık isteği (5°C, 30°C, 40°C, 50°C, 55°C), pH isteği (pH 5.7, pH 6.8) ve NaCl isteği (%2, %5, %7 ve %10) testlerini içeren morfolojik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır (Çizelge 3.4)



Çizelge3.4. İzole edilen basillerin identifikasyon test sonuçları.

Yapılan Testler	Örnek Kodları																						
	1a	1b	1c	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	6c	6d	6e	6f	8a	8b	9a	9b	9c	10a	10b	11
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobik gelişim	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Voges- proskauer testi	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
L- Arabinoz	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D- Ksiloz	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
D-Mannitol	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glikozdan Gaz Oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kazein	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Jelatin	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Nişasta	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+
Sitrat Kullanımı	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-
İndol oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
pH Gelişimi																							
6,8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5,7	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
Tuz Gelişimi																							
%2	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
%5	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
%7	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
%10	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Sıcaklık Gelişimi																							
5°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
55°C	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hareketlilik	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+

Çizelge3.4. İzole edilen basillerin identifikasyon test sonuçları (devamı).

Yapılan Testler	Örnek Kodları																						
	12a	12b	12c	13a	13b	17a	17b	18	19a	19b	19c	20a	20b	20c	21a	21b	21c	22	23a	23b	24	28	29a
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobik gelişim	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Voges- proskauer testi	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
L- Arabinoz	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
D- Ksiloz	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
D-Mannitol	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
Glikozdan Gaz Oluşumu	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
Kazein	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Jelatin	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nişasta	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Sitrat Kullanımı	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
İndol oluşumu	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
pH Gelişimi																							
6,8	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5,7	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tuz Gelişimi																							
%2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
%5	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
%7	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
%10	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Sıcaklık Gelişimi																							
5°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
55°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Hareketlilik	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+

Çizelge3.4. İzole edilen basillerin identifikasyon test sonuçları (devamı).

Yapılan Testler	Örnek Kodları																				
	29b	29c	31	32	33a	33b	34	37	39a	39b	39c	39d	39e	41	43a	43b	43c	43d	43e	44a	44b
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobik gelişim	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Voges- proskauer testi	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
L- Arabinoz	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
D- Ksiloz	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
D-Mannitol	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
Glikozdan Gaz Oluşumu	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Kazein	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-
Jelatin	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Nişasta	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
Sitrat Kullanımı	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
İndol oluşumu	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
pH Gelişimi																					
6,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5,7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Tuz Gelişimi																					
%2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
%5	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
%7	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
%10	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Sıcaklık Gelişimi																					
5°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50°C	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
55°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Hareketlilik	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-

Basil suşlarına uygulanan biyokimyasal testler sonucunda tüm izolatların Katalaz testine pozitif sonuç verdiği Anaerobik Gelişim testine 6a, 6c, 8b, 9a, 9b, 9c, 10b, 11, 17b, 18, 19a, 19b, 19c, 23b, 37, 43c ve 43d izolatlarının negatif sonuç, diğer 50 izolatın pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Voges Proskauer testine 1a, 1c, 3b, 4a, 4b, 5b, 6d, 8a, 10a, 12a, 12b, 12c, 13a, 13b, 17a, 20a, 20b, 22, 23a, 23b, 24, 28, 29b, 32, 33b, 34, 39a, 39c, 43a, 43b, 43c ve 43d kodlu 32 izolatın pozitif sonuç verdiği, diğer 35 izolatın negatif sonuç verdiği bulunmuştur.

Asit oluşumu testlerinde L- arabinoz şekerinde 31 izolatın (1c, 3a, 4b, 5a, 5b, 8a, 12a, 12b, 17a, 17b, 18, 19a, 19c, 20c, 21a, 21b, 22, 23a, 29b, 32, 33a, 37, 39a, 39b, 39c, 39d, 41, 43a, 43b, 43d ve 43e kodlu) negatif sonuç verip kalan 36 izolatın pozitif sonuç verdiği; D- ksiloz testinde 1b, 1c, 3a, 5a, 6c, 8a, 10a, 10b, 11, 12b, 17b, 18, 19b, 20a, 20c, 21a, 21b, 22, 23a, 32, 33a, 37, 39a, 39b, 39c, 39d, 41, 43a, 43b ve 43d kodlu 30 izolatın negatif kalan izolatların pozitif sonuç verdiği; D- mannitol testinde 29 izolatın (1c, 3a, 4b, 5a, 12a, 12b, 17a, 17b, 18, 19a, 19b, 20c, 21a, 21b, 22, 23a, 23b, 29b, 32, 33a, 37, 39a, 39b, 39c, 39d, 41, 43a, 43b ve 43d kodlu) negatif sonuç verdiği, kalan 38 izolatın pozitif sonuç verdiği bulunmuştur.

Glikozdan gaz oluşumu testinde 6c, 13b, 21c, 23b, 28, 31, 43c ve 44a kodlu izolatların pozitif sonuç verdiği, diğer 59 izolatın negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Hidroliz testlerinde; Kazein testinde 4a, 5a, 6f, 8b, 12c, 13b, 20b, 23b, 29c, 31, 34, 39e, 41, 43b, 43c, 44a ve 44b kodlu 17 izolatın negatif, kalan 50 izolatın pozitif sonuç verdiği; Jelatin testinde 11 izolatın (1a, 1b, 1c, 6c, 10b, 13b, 20b, 29c, 31, 39e ve 44b) negatif sonuç verip, kalan 56 izolatın pozitif sonuç verdiği; Nişasta testinde 25 izolatın (5b, 8a, 9a, 11, 12a, 12b, 13a, 19a, 19c, 20a, 20c, 21a, 21b, 21c, 22, 23a, 24, 29b, 29c, 33a, 33b, 37, 39c, 43a ve 43d) pozitif sonuç verip, kalan 42 izolatın negatif sonuç verdiği bulunmuştur.

Sitrat testinde 30 izolatın (1a, 3a, 3b, 4a, 6b, 6c, 6f, 8b, 9c, 10b, 12a, 12b, 13b, 20a, 20b, 20c, 21a, 21b, 21c, 22, 32, 33a, 39b, 39c, 39d, 43a, 43b, 43d, 44a ve 44b) pozitif sonuç verdiği ve kalan 37 izolatın negatif sonuç verdiği; İndol testinde 9a, 9b, 12b, 29a, 43c kodlu 5 izolatın negatif sonuç verdiği, kalan izolatların pozitif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

pH 6,8 testinde 3a ve 12c kodlu 2 izolatın negatif sonuç verdiği, kalan izolatların pozitif sonuç verdiği ve pH 5,7 testinde 1c, 3a, 4a, 4b, 5a, 6e, 6f, 9a, 9c, 11, 13b, 17b, 44a ve 44b kodlu 14 izolatın negatif sonuç verdiği ve kalan 53 izolatın pozitif sonuç verdiği bulunmuştur.

Tuzluluk testinde; %2 tuzluluk oranında 1c, 5a, 29a, 37, 41 ve 43a kodlu 6 izolatın negatif sonuç verdiği, kalan 61 izolatın pozitif sonuç verdiği; %5 tuzluluk oranında 13 izolatın (1c, 5a, 9b, 17b, 29a, 31, 34, 37, 39c, 41, 43a, 43c ve 44b) negatif sonuç verdiği, kalan 54 izolatın pozitif sonuç verdiği; %7 tuzluluk oranında 1a, 1c, 3b, 4a, 5a, 6a, 6c, 6f, 9b, 12b, 13a,

17b, 18, 19c, 20b, 21a, 29a, 29c, 31, 34, 37, 39c, 41, 43a, 43b, 43c, 44a ve 44b kodlu izolatların negatif sonuç verdiği, diğer 39 izolatın pozitif sonuç verdiği; %10 tuzluluk oranında 24 izolatın (1b, 3a, 6b, 6e, 8b, 9a, 10b, 11, 12a, 12c, 13b, 19a, 20c, 21b, 21c, 22, 23a, 23b, 24, 28, 29b, 33a, 33b ve 43d kodlu) pozitif sonuç verdiği, kalan 43 izolatın negatif sonuç verdiği tespit edilmiştir.

Sıcaklık testlerinde 5°C de 4a, 24, 31, 32, 33a, 33b, 34, 37, 39a, 39b, 39c, 39d, 41, 43a, 43b, 43c, 43e, 44a ve 44b kodlu 19 izolatın negatif, kalan 48 izolatın pozitif sonuç verdiği; 30°C de sadece 9c kodlu izolatın negatif sonuç verdiği, diğer 66 izolatın pozitif sonuç verdiği; 40°C de bütün izolatların pozitif sonuç verdiği; 50°C de 9c, 29c, 31, 34, 37, 39c, 41, 43a, 43c, 44a ve 44b kodlu 11 izolatın negatif, diğer 56 izolatın pozitif sonuç verdiği bulunmuştur. Hareketlilik testinde, 22 izolat (4b, 5a, 5b, 6c, 8b, 9a, 12c, 13a, 17a, 17b, 20a, 21c, 23a, 23b, 24, 29c, 34, 37, 39e, 41, 43a ve 44b kodlu) negatif sonuç vermiştir. Diğer 45 izolat pozitif sonuç vermiştir.

Elde edilen bu izolatların identifikasyonu, ağır metal toleranslılıkları, antibiyotik dirençliliği, sekonder metabolit aktivitesi araştırılmıştır.

3.4. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeyleri

Çalışmamızda ballardan elde edilen endosporlu basillerin ağır metal dirençlilik düzeyleri agar dilüsyon metodu ile belirlenmiştir. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde referans suş olarak *B. subtilis* NRRL B-209 suşu kullanılmıştır. *B. subtilis* NRRL B-209 referans suşunun sahip olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu değerleri Çizelge 3.5.'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. *B.subtilis* NRRL B-209 'un ağır metal dirençlilik düzeyi (mM/mL).

Ağır Metal	MİK Değeri
Demir	2
Kobalt	1
Kurşun	4
Bakır	1
Kadmiyum	0,625

Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde 5 farklı ağır metal tuzu [$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$], $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, PbCl_2 , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$] kullanılmıştır. İzolatların ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde agar dilüsyon metoduna göre gösterdikleri MİK değerleri Çizelge 3.6.'de verilmiştir.

Çizelge 3.6. İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).

No	Ağır metaller						Ağır metaller				
	Demir	Kobalt	Kurşun	Bakır	Kadmiyum		Demir	Kobalt	Kurşun	Bakır	Kadmiyum
1a	2	2	2	2	0,25	20a	2	2	2	2	0,125
1b	2	2	2	1	0,25	20b	4	2	2	1	0,125
1c	2	2	2	1	0,0625	20c	2	2	2	2	0,25
3a	2	2	2	2	0,25	21a	2	2	2	2	0,125
3b	2	2	2	1	0,5	21b	2	2	2	1	0,125
4a	1	2	2	1	0,25	21c	2	2	2	2	0,25
4b	2	2	2	1	0,125	22	2	2	2	2	0,125
5a	2	2	4	1	0,0625	23a	2	2	2	2	0,125
5b	2	2	2	1	0,25	23b	2	4	2	2	0,0625
6a	2	4	2	2	0,5	24	2	4	2	2	0,125
6b	2	4	2	2	0,25	28	2	2	2	2	0,125
6c	2	2	2	2	0,25	29a	2	2	2	2	0,125
6d	2	2	2	2	0,25	29b	2	2	2	2	0,125
6e	2	4	2	1	0,25	29c	2	2	2	2	0,0625
6f	4	2	2	1	0,125	31	2	2	2	2	0,25
8a	2	2	2	2	0,25	32	2	2	2	2	0,25
8b	2	2	2	1	0,25	33a	2	2	2	2	0,25
9a	1	2	2	1	0,0625	33b	2	2	2	2	0,25
9b	2	2	2	1	0,25	34	2	2	2	2	0,125
9c	2	2	2	2	0,25	37	2	2	2	2	0,125
10a	2	2	2	2	0,125	39a	2	2	2	2	0,25
10b	2	2	2	2	0,25	39b	4	2	2	2	0,25
11	2	2	2	2	0,25	39c	2	2	2	2	0,25
12a	2	2	2	2	0,25	39d	2	2	2	2	0,25
12b	2	2	2	2	0,125	39e	4	2	2	2	0,5
12c	4	2	2	1	0,125	41	2	2	2	2	0,25
13a	2	2	2	2	0,25	43a	2	2	2	2	0,25
13b	2	2	2	1	0,125	43b	4	2	2	2	0,25
17a	2	2	2	2	0,125	43c	0,5	2	2	2	0,25
17b	2	2	1	1	0,125	43d	2	2	2	2	0,25
18	2	4	2	2	0,25	43e	2	2	2	2	0,125
19a	2	2	2	2	0,125	44a	4	2	2	2	0,125
19b	2	4	2	2	0,25	44b	4	2	1	2	0,125
19c	2	2	2	2	0,25						

Çizelge 3.6'ya bakıldığında, 1a, 3a, 6c, 6d, 8a, 9c, 10b, 11, 12a, 13a, 19c, 20c, 21c, 31, 32, 33a, 33b, 39a, 39c, 39d, 41, 43a ve 43d kodlu izolatların kurşun ağır metaline gösterdiği MİK değerinin referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken; demir ağır metaline gösterdiği MİK değerinin referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu görülmüştür. Bu izolatların kobalt (2mM), bakır (2mM) ve kadmiyum (0,25 mM) ağır metal sonuçlarının referansımıza göre yüksek çıktığı bulunmuştur.

1b, 5b, 8b ve 9b izolatlarının kurşun ağır metaline gösterdiği MİK değerinin (2mM) referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken; demir ağır metaline gösterdiği MİK değerinin referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu görülmüştür. Bu izolatların kobalt (2 mM), bakır (1 mM) ve kadmiyum (0,25 mM) ağır metal sonuçlarının referansımıza göre yüksek çıktığı bulunmuştur.

1c izolatının kurşun ağır metaline gösterdiği MİK değerinin (2mM) referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken; demir, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerlerinin referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu görülmüştür. 1c izolatının kobalt (2 mM) ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin referans suşumuza göre yüksek olduğu tespit edilmiştir.

3b izolatının kurşun ağır metaline gösterdiği MİK değerinin (2mM) referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülürken; demir ve bakır ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri referans suşlarımız ile aynı değeredir. Bu izolatın kobalt ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM ve 0,5 mM) referans suşlarımıza göre yüksektir.

4a izolatının demir ve kurşun ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (1 mM ve 2 mM) referans suşlara göre daha düşük olduğu görülürken, bakır ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri referans suş ile eşittir. Bu izolatın kobalt ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM ve 0,5 mM) referans suşlarımıza göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4b, 13b ve 21b kodlu izolatların kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2mM) referans suşa göre daha düşükken, demir ve bakır ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değeri referans suşa eşittir ve bu izolatların kobalt ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM ve 0,125 mM) referans suşlara göre daha yüksektir.

5a izolatinın demir, kurşun, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri referans suşlarla aynı iken, kobalt ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2 mM) referans suşa göre daha yüksek olduğu görülmüştür.

5b izolatinın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin (2 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülürken, demir ve bakır ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değeri referans suşla aynıdır. Buna rağmen bu izolatin kobalt ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM ve 0,25 mM) referans suşlara göre daha yüksektir.

6a izolatinın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin (2 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülürken, demir ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri referans suşla aynıdır. Bu izolatin kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM, 2mM ve 0,5 mM) referans suşlara göre yüksektir.

6b, 18 ve 19b kodlu izolatların kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin (2 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülürken, demir ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri referans suşla aynıdır. Buna karşın bu izolatların kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM, 2mM ve 0,25 mM) referans suşlara göre yüksek olduğu görülmüştür.

6e izolatinın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin (2 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülürken, demir ve bakır ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değeri referans suşlarla aynıdır. Bu izolatin kobalt ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM ve 0,25 mM) referans suşlara göre yüksektir.

6f, 12c ve 20b kodlu izolatların kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin (2 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülürken, bakır ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri referans suşla aynıdır. Bu izolatların demir, kobalt ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM, 2 mM ve 0,125 mM) referans suşa göre daha yüksektir.

9a izolatinın demir ve kurşun ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (1 mM ve 2mM) referans suşa göre düşük olduğu görülmüştür. Bu izolatin bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri referans suşlara eşit iken, kobalt ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2 mM) referans suşa göre yüksektir.

10a, 12b, 17a, 19a, 20a, 21a, 22, 23a, 28, 29a, 29b, 34, 37 ve kodlu izolatların kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin (2 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülmüştür. Bu izolatların demir ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerinin referans suşa

eşit olduğu bulunmuşken, kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerlerinin (2 mM, 2mM, 0,125 mM) referans suşlara göre yüksek olduğu bulunmuştur.

17b kodlu izolatin kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (1mM) referans suşa göre düşüken, bu izolatin demir ve bakır ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2mM ve 1mM) referans suşlara eşittir. Bu izolatin kobalt ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM ve 0,25 mM) referans suşlara göre yüksektir.

23b izolatinın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2 mM) referans suşa göre düşüktür. Bu izolatin demir ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri referans suşlara eşitken, kobalt ve bakır ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerlerinin (4 mM ve 2 mM) referans suşlara göre yüksek olduğu bulunmuştur.

24 kodlu izolatin kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2 mM) referans suşa göre düşüken, demir ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri referans suşa eşittir. Bu izolatin kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM, 2 mM ve 0,125 mM) referans suşa göre yüksektir.

29c izolatinın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülmüştür. Bu izolatin demir ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değeri referans suşa eşitken, kobalt ve bakır ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM ve 2 mM) referans suşun MİK değerinden yüksektir.

39b ve 43b kodlu izolatlara kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM) referans suşa göre düşüken, demir, kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM, 2 mM, 2 mM ve 0,25 mM) referans suşların MİK değerlerine göre daha yüksektir.

39e izolatinın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2 mM) referans suşa göre düşüken; demir, kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerlerinin (4 mM, 2 mM, 2 mM ve 0,5 mM) referans suşların MİK değerlerine göre daha yüksek olduğu bulunmuştur.

43c izolatinın demir ve kurşun ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (0,5 mM ve 2 mM), referans suşların MİK değerlerine göre düşüktür. Bu izolatin kobalt ve bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (2 mM, 2mM ve 0,25 mM) referans suşların MİK değerlerinden yüksektir.

44a kodlu izolatın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (2 mM) referans suşa göre düşüktür. Bu izolatın demir, kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM, 2 mM, 2 mM ve 0,125 mM) referans suşların MİK değerlerine göre daha yüksektir.

44b kodlu izolatın kurşun ağır metaline karşı gösterdiği MİK değeri (1 mM) referans suşa göre düşük olduğu görülürken; bu izolatın demir, kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metallerine karşı gösterdiği MİK değerleri (4 mM, 2 mM, 2 mM ve 0,125 mM) referans suşların MİK değerlerine göre daha yüksektir.

Çizelge 3.7. İzole edilen basillerin ağır metal dirençliliklerinin %'lik dağılımı.

Ağır Metal	n	Ağır metal konsantrasyonlarına (mM/mL) göre genel toplam içerisindeki izolatların sayısal dağılımı										Dirençli izolatlar	
		0,0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	n	%	
Demir	67	-	-	-	1	2	56*	8	-	-	64	95.52	
Kobalt	67	-	-	-	-	-*	60	7	-	-	67	100	
Kurşun	67	-	-	-	-	2	64	1*	-	-	1	1.49	
Bakır	67	-	-	-	-	17*	50	-	-	-	67	100	
Kadmiyum	67	23*	-	35	3	-	-	-	-	-	67	100	
*Ağır metallerin referans suş MİK değerleri													

Elde edilen izolatların referans suşa göre, ağır metal yüzde toleranslılık değerlerine bakıldığında; kobalt, bakır ve kadmiyum ağır metaline karşı %100 dirençli olduğu tespit edilmiştir. İkinci sırada %95.52 ile demir ağır metaline, en az ise %1.49 ile kurşun ağır metaline karşı dirençli olduğu görülmüştür.

3.5. Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri

İzole edilen toplam 67 basilin antibiyotik dirençlilik düzeyleri Çizelge 3.8'de verilmiştir. İzole edilen basillerin Doxycycline (30µg), Rifampicin (30µg) ve Kanamisin (30µg) antibiyotiklerine karşı dirençlilik düzeyleri testi agar disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır.

Çizelge 3.8. Basillerin test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları (disk 6 mm).

	Kullanılan antibiyotikler				Kullanılan antibiyotikler		
	Doxycycline (30µg)	Rifampicin (30µg)	Kanamisin (30µg)		Doxycycline (30µg)	Rifampicin (30µg)	Kanamisin (30µg)
1a	40	33	19	19b	30	24	18
1b	44	34	20	19c	40	20	21
1c	34	44	15	20a	40	26	26
3a	37	35	19	20b	42	30	21
3b	40	34	20	20c	37	27	18
4a	42	30	13	21a	39	33	18
4b	37	28	21	21b	36	27	19
5a	40	50	13	21c	40	34	21
5b	41	30	20	22	36	27	20
6a	34	24	17	23a	38	27	22
6b	34	23	18	23b	44	36	21
6c	39	29	18	28	28	30	16
6d	38	30	18	30	40	30	23
6e	39	33	18	31	40	26	18
6f	42	38	18	32	30	25	19
8a	38	29	26	33a	35	27	18
8b	26	26	18	33b	30	25	13
9a	40	30	18	34	26	36	13
9b	26	24	18	37	37	24	16
9c	40	29	16	39a	37	31	20
10a	40	30	20	39b	40	29	21
10b	35	28	17	39c	42	25	18
11	40	26	18	39d	40	30	21
12a	36	22	20	39e	33	26	13
12b	40	25	22	41	38	34	19
12c	40	28	20	43a	30	25	15
13a	40	26	16	43b	30	26	17
13b	40	31	22	43c	26	10	13
17a	40	25	22	43d	34	22	16
17b	32	30	16	43e	31	19	15
18a	33	22	17	44a	32	32	16
19a	38	26	17				

İzole edilen aerobik endospor oluşturan basillerin, antibiyotik dirençlilik düzeyleri NCCLS ve CLSI skalası çizelge 3.9’da Gram- pozitif/aerobik bakteriler için belirtilen zon çapları verilmiştir. Basillerin antibiyotik dirençliliği bu skalaya göre yorumlanmıştır.

Çizelge 3.9. NCCLS ve KlinikLaboratuvarStandartları Enstitüsü (CLSI) rehberinde Gram pozitif/aerobik bakteriler için belirtilen zon çapları yorumlama skalası.

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	Zon Çapı		
		R(Dirençli)	ODA(Orta Derece Aktivite)	YA (Yüksek Aktivite)
Doxycycline	30µg	12≥	13-15	≥16
Rifampicin	30 µg	16≥	17-19	≥20
Kanamisin	30 µg	13≥	14-17	≥18

Çizelge 3.10. İzole edilen basillerin antibiyotik dirençliliğinin %'lik dağılımı.

Antibiyotik	N	R	ODA	YA	%R	%ODA	% YA
Doxycycline (30µg)	67	0	0	67	0	0	100
Rifampicin (30µg)	67	0	0	67	0	0	100
Kanamisin (30µg)	67	6	15	46	8.95	22.39	68,66

Çizelge 3.10'da elde edilen basil izolatlarının %8,95'inin ise Kanamisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Basil izolatlarının Doxycycline ve Rifampicin antibiyotiklerine karşı %100, Kanamisin antibiyotiklerine karşı ise %68.66 yüksek aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

3.6. Basillerin Sekonder Metabolit Üretimi

Basillerin sekonder metabolit üretimi agar blok yöntemi ile gram pozitif (*S. aureus*) ve 7 tane gram negatif [*Escherichia coli*, *Legionella pneumophila* serogrup 1(a), *Legionella pneumophila* serogrup 1(b), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(a), *Legionella pneumophila* serogrup 2-15(b), *Legionella* spp.(a) ve *Legionella* spp.(b)] bakteriye karşı değerlendirilmiştir. Çizelge 3.11'e bakıldığında 8 basil izolatının (18, 20b, 20c, 23b, 29c, 31, 32 ve 43b) *S. aureus*'a karşı zayıf aktivite gösterdiği, diğer 59 izolatın ise dirençli olduğu görülmüştür. En fazla aktiviteyi 13 mm zon çapı ile 18 nolu izolatın gösterdiği görülmüştür.

L. pneumophila Sg 1 (a)'ya karşı 11 izolatın (13b, 17a, 17b, 18, 23a, 24, 28, 32, 39c, 43a ve 43b) zayıf aktivite gösterdiği, 19a nolu izolatın 18 mm zon çapı ile orta derece aktivite gösterdiği ve diğer 55 izolatın dirençli olduğu görülmüştür.

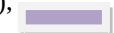
L. pneumophila Sg 1 (b)'ye karşı 12 izolatın (6a, 6b, 6c, 6d, 6e, 8a, 8b, 9c, 11, 12c, 37 ve 44b) direnç gösterdiği, 21 izolatın (1a, 1b, 1c, 3a, 3b, 4b, 5a, 5b, 6f, 9a, 9b, 10a, 10b, 17b, 19a, 28, 39d, 39e, 41, 43c ve 44a) zayıf aktivite gösterdiği, 12 izolatın (4a, 18, 20b, 22, 29a, 29c, 31, 32, 39a, 39c, 43a ve 43c) orta derecede aktivite gösterdiği ve diğer 22 izolatın ise yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu basil izolatlarından en yüksek aktivite gösterenler 25 mm zon çapı ile 13b ve 17a kodlu izolatlardır.

L. pneumophila Sg 2-15 (a)'ya karşı 59 izolatın direnç gösterdiği, 8 izolatın (3a, 6d, 6e, 8b, 9a, 31, 32 ve 44b) ise zayıf aktivite gösterdiği görülmüştür. En yüksek aktiviteyi gösteren izolat 15 mm zon çapı ile 3a kodlu izolatır.

L. pneumophila Sg 2-15 (b)'ye karşı 52 izolat direnç göstermiştir. Bu mikroorganizmaya karşı 15 izolat (1a, 3a, 5a, 6a, 6d, 9a, 10b, 11, 29c, 32, 37, 43a, 43b, 43c ve 44b) zayıf aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite gösteren izolatın 13 mm zon çapı ile 9a kodlu izolat olduğu görülmüştür.

Legionella spp.(a)'ya karşı 52 izolatın direnç gösterdiği ve 8 izolatın (1b, 6f, 12a, 23b, 34, 39e, 44a ve 44b kodlu) zayıf aktivite gösterdiği görülmüştür. Bu mikroorganizmaya karşı 3 izolat (5a, 18 ve 23a kodlu) orta derecede aktivite ve 4 izolat da (1c, 5b, 6b ve 31 kodlu) yüksek aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite gösteren izolat 22 mm zon çapı ile 1c nolu izolatır.

Çizelge 3.11. Basil izolatlarının agar blokyöntemi ile test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (Ø 10 mm).

	1a	1b	1c	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b	6c	6d	6e	6f	8a	8b	9a	9b	9c	10a	10b	11
Gram Pozitif Bakteri																							
<i>S. aureus</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Gram Negatif Bakteri																							
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(a)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(b)	12	12	14	15	15	17	12	12	12	10	10	10	10	10	12	10	10	12	15	10	15	15	10
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15(a)	10	10	10	15	10	10	10	10	10	10	10	10	11	11	10	10	11	11	10	10	10	10	10
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15(b)	11	10	10	12	10	10	10	12	10	11	10	10	11	10	10	10	10	13	10	10	10	12	11
<i>Legionella</i> spp. (a)	10	12	22	10	10	10	10	16	20	10	20	10	10	10	12	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Legionella</i> spp. (b)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	11	10	10	10	10	10	10	17	10	10	10
<i>E. coli</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	11	11	10	10	11	10	10	10	10	10	10
	12a	12b	12c	13a	13b	17a	17b	18	19a	19b	19c	20a	20b	20c	21a	21b	21c	22	23a	23b	24	28	29a
Gram Pozitif Bakteri																							
<i>S. aureus</i>	10	10	10	10	10	10	10	13	10	10	10	10	11	11	10	10	10	10	10	11	10	10	10
Gram Negatif Bakteri																							
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(a)	10	10	10	10	11	14	12	12	18	10	10	10	10	10	10	10	10	10	11	10	14	13	10
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(b)	23	22	10	22	25	25	12	17	15	20	22	20	18	21	22	22	20	18	21	21	20	15	17
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15(a)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15 (b)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>Legionella</i> spp. (a)	12	10	10	10	10	10	10	18	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	16	12	10	10	10
<i>Legionella</i> spp. (b)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	15	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	11
<i>E. coli</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
10mm; dirençli (R),  10-15mm: zayıf aktivite (Z),  16-20mm: orta derecede aktivite (ODA),  21-25mm: yüksek aktivite (YA) 																							

Çizelge 3.11. Basil izolatlarının agar blok yöntemi ile test organizmalarına karşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (Ø 10 mm) (devamı).

	29b	29c	31	32	33a	33b	34	37	39a	39b	39c	39d	39e	41	43a	43b	43c	43d	43e	44a	44b
Gram Pozitif Bakteri																					
<i>S. aureus</i>	10	11	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	12	10	10	10	10	10
Gram Negatif Bakteri																					
<i>L. pneumophila</i> Sg 1 (a)	10	10	10	11	10	10	10	10	10	10	11	10	10	10	12	12	10	10	10	10	10
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(b)	21	18	19	17	20	20	20	10	16	22	18	14	13	12	17	20	15	22	18	11	10
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15 (a)	10	10	11	11	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	13
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15 (b)	10	12	10	11	10	10	10	11	10	10	10	10	10	10	11	12	11	10	10	10	12
<i>Legionella</i> spp. (a)	10	10	20	10	10	10	11	10	10	10	10	10	11	10	10	10	10	10	10	11	11
<i>Legionella</i> spp. (b)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
<i>E. coli</i>	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
10mm: dirençli (R),  10-15mm: zayıf aktivite (Z),  16-20mm: orta derecede aktivite (ODA),  21-25mm: yüksek aktivite (YA) 																					

Legionella spp.(b)'ye karşı 63 izolat direnç göstermiştir ve 3 izolat (6d, 19c ve 29a) zayıf aktivite göstermiştir. Orta derecede aktivite gösteren izolat ise 17 mm zon çapı ile 9c kodlu izolatdır.

E. coli 'ye karşı 64 izolat direnç göstermiştir ve 3 izolat zayıf aktivite göstermiştir. Zayıf aktivite gösteren izolatların zon çapı 11 mm'dir ve bu izolatlar 6d, 6e ve 8b kodlu izolatlardır.

Çizelge 3.12. İzole edilen basillerin sekonder metabolit sonuçlarının %'lik dağılımı.

Antibiyotik	n	R	Z	ODD	D	%R	%Z	%ODD	%D
<i>S. aureus</i>	67	59	8	0	0	88,0 6	11,9 4	0	0
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(a)	67	55	11	1	0	82,0 9	16,4 2	1,49	0
<i>L. pneumophila</i> Sg 1(b)	67	12	21	12	22	17,9 1	31,3 4	17,91	32,84
<i>L. pneumophila</i> Sg2-15(a)	67	59	8	0	0	88,0 6	11,9 4	0	0
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15(b)	67	52	15	0	0	77,6 1	22,3 9	0	0
<i>Legionella</i> spp. (a)	67	52	8	3	4	77,6 1	11,9 4	4,48	5,97
<i>Legionella</i> spp. (b)	67	63	3	1	0	94,0 3	4,48	1,49	0
<i>E. coli</i>	67	64	3	0	0	95,5 2	4,48	0	0

İzole edilen basillerin en yüksek antimikrobiyal aktivitesinin %32.84 ile *L. pneumophila* Sg 1(b)' ye karşı olduğu ve ikinci olarak da%5.89 ile *Legionella* spp. (a)'ya karşı olduğu tespit edilmiştir. Denenen test mikroorganizmalarının izole edilen basillerin sekonder metabolitlerine karşı direncini sıralarsak: *E. coli* (95,52)>*S. aureus*(94,03)>*L. pneumophila* Sg 2-15(a) (88,06) = *Legionella* spp. (b) (88,06)>*L. pneumophila* Sg 1(a) (82,09)>*L. pneumophila* Sg 2-15(b) (77,61) =*Legionella* spp. (a) (77,61)>*L. pneumophila* Sg 1(b) (17,91) olduğu görülür.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bal tüketimi insanlık tarihinde uzun bir geçmişe sahiptir. Bal tatlandırıcı ve lezzet verici olarak sayısız yiyecek ve içecekte kullanılmaktadır. Bal hemen hemen bütün dünyada üretilmektedir. Dünyada yıllık üretimin yılda yaklaşık 1.20 milyon ton olduğu bildirilmiştir. Çin, Türkiye, Arjantin, Ukrayna, Meksika'nın ve Amerika'nın başlıca bal üreticilerinden (Sultan Ayoub Meo, vd., 2017) olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda ilk olarak Kütahya ilinde bulunan semt pazarlarında satışa sunulan bal örnekleri toplanmıştır. Çalışma sırasında petekli ve süzme olmak üzere 44 bal örneği toplanmıştır. Toplanan bal örneklerinin % 70,5 süzme, % 29,5 ise petekli bal olarak incelenmiştir. Bal örnekleri Kütahya, Eskişehir, Bolu, Çanakkale, Rize, Siirt, Van, Erzincan, Bursa, Elazığ, Muğla, Aydın, Kars, Artvin, Sivas, Manisa, Ankara, Çorum, Batum, Adana ve Balıkesir illerinden gelen ballar olup Çizelge 3.1'da belirtilmiştir. Balın bileşimi oldukça değişkendir ve öncelikle toplandığı çiçek türlerine, balın bulunduğu bölge, mevsimsel, çevresel faktörler ve işleme gibi bazı dış faktörler de rol oynamaktadır (Alvarez- Suarez, vd., 2010). Balın bileşimi Çizelge 1.1 de gösterilmiştir. Doğal olarak üretilen en karmaşık gıda maddelerinden biri baldır. Kesinlikle hiçbir işlem yapılmadan, tatlandırıcı madde olarak insanlar tarafından kullanılabilen tek gıda maddesidir (Gheldof, vd., 2002). Beslenme değerinin yüksek olması (303 kcal /100 g bal) ve karbonhidratlarının hızlı emilmesi nedeniyle, bal her yaştaki insan için uygun bir gıdadır. Bal, özellikle çocuklar ve sporculara önerilmektedir. İlaç olarak tek başına bal, hastalar ve yaşlı insanların iyileştirilmesine yardımcı olabilmektedir (Blasa, vd., 2005).

Balın yaklaşık 200 madde içerdiği rapor edilmiştir ve geleneksel tıbbın önemli bir parçası olarak kabul edilir (White 1979). Fenolik asitler ve flavonoidler (Meda, vd., 2005), bazı enzimler (glukoz oksidaz, katalaz) (Molan ve Betts 2004), askorbik asit, protein ve karotenoid (Alvarez-Suarez, vd., 2010) içerir. Bal, ilk insanlardan bu yana etnomedisinde kullanılmıştır ve son zamanlarda yanıklar, mide-bağırsak rahatsızlıkları, astım, enfekte yara ve cilt ülserlerinin tedavisindeki rolü yeniden keşfedilmiştir (Al-Mamary, vd., 2002; Orhan, vd., 2003). Bal, bal arısı tarafından üretilen doğal tatlı bir madde olup bitkilerin nektarından veya bitkilerin canlı kısımlarının salgılarından, bitki salgılarını emen böcekler olan arılar tarafından toplanır, arının topladığı bu maddeleri kendi spesifik maddeleri ile birleştirerek susuz olarak biriktirip, olgunlaşması için bal peteğine bırakır (Redouan El-Haskoury, vd., 2017). Bal, elde edildiği bitkinin adı kullanılarak isimlendirilebilir (Örn: Akasya balı, kestane balı, manuka balı vb.) (Karadal ve Yıldırım, 2012). Balın en önemli bileşeni karbonhidratlardır. Bu karbonhidratlar

balın içinde fruktoz ve glikoz gibi monosakkaritler ve maltoz, izomaltoz, maltuloz, sukroz ve turanoz gibi disakkaritler halinde bulunurlar ve balın tatlılığı bu karbonhidratların varlığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca bal, anderoz ve penoz gibi oligosakkaritler ve amilaz, oksidaz peroksit, katalaz ve asit fosforilaz gibi enzimler de içerir. Dahası, bal aminoasitler ve iz miktarda Vitamin B, Vitamin B6, Vitamin C, niasin, folik asit, mineraller, demir, çinko ve antioksidanlar içerir. (David, 2007; Fatimah, vd., 2013). Bal terapötik amaçlı olarak kullanıcılar tarafından alternatif tıpta kullanıldığı için oldukça değerlidir. Bununla birlikte, bal arısı ürünlerinin tedavilerde kullanılmasının, bal ile metabolizma uyumsuzluğu olan insanlar için güvenli olup olmadığı, bugün literatürde de tartışılmaktadır. Aynı zamanda, bal arısının besin değeri yüksek ve dinamizmin ana kaynağı olduğuna inanılmaktadır. Arı ürünlerinin sağlığa teşvik edici özellikleri çoğunlukla folik asit, tiamin, biyotin, niasin, tokoferol, polifenoller, enzimlerin ve ko-enzimlerin yanında fitosterollerin de bulunduğu çoklu metabolitlerin varlığına bağlıdır. Balın antioksidan, anti bakteriyel, anti-fungisidal, hepatoprotektif etkileri üzerine olumlu bilgiler bilimsel literatürde tekrar tekrar bulunabilir. Prensipde bal sağlıklı nüfus için değerli bir destektir (Denisow ve Denisow-Pietrzyk, 2016). Araştırmalardaki son gelişmeler literatürde balın umut verici bir şekilde sağlığı destekleyici biyolojik faaliyetlere sahip olduğunu vurgulamıştır (Muhammad, vd., 2016).

Çalışma iki kısımda yürütülmüştür; Birincisi toplanan balların antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi olmuştur. Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde en fazla kullanılan yöntemlerden biri olan agar difüzyon metodu ile balın aktivitesi belirlenmiştir. Balın miktarı ve deneyin yapılabilirliği ve daha fazla miktarda madde miktarının kullanılmasının uygun olmasından dolayı oyuk agar yöntemi tercih edilmiştir. Buna göre bal örnekleri gram pozitif bakterilerden; *S. aureus* gram negatif bakterilerden olan *L. pneumophila* serogrup 1 (2 adet), *L. pneumophila* serogrup 2-15 (2 adet), *Legionella* spp. (2 adet) ve *E.coli* kullanılmıştır.

Son araştırmalar göstermiştir ki, baldaki antimikrobiyal aktivite, gastrointestinal sistem, üriner sistem, yara ve yanık enfeksiyonlarına karşı etkilidir (El- Kased, 2016). Bal düşük pH ve yüksek ozmolarite gösterir, enzimatik hidrojen peroksit kompleksi bir araya gelerek antimikrobiyal etki gösterir (Bang, vd., 2003). Yara pansumanında bal uygulaması, balın antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle modern tıpta popülerlik kazanmaktadır (İsmail, vd., 2015). Dahası, bazı özel bal çeşitleri, antibiyotik dirençli bakteriyel patojenlere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahiptir (Blair, vd., 2009; Cooper, vd., 2002a, b; French, vd., 2005). Çiçek kaynakları, antimikrobiyal tip ve seviyedeki farklılıklardan sorumludur (Brady, vd., 2004). Bu çoğunlukla çiçek kaynaklarının çevresel koşullarına ve coğrafi konumuna bağlıdır

(Price and Morgan, 2006; Julie, vd.,2011), balın klinik potansiyele sahip olduğunu ve olası bir terapötik kullanım için geniş bir antibakteriyel aktivite gösterdiğini keşfetmişlerdir. Antibakteriyel etki esas olarak arı tarafından üretilen enzim glikoz oksidaz tarafından oluşturulan hidrojen peroksitten kaynaklanmaktadır. Balın antibakteriyel aktivitesi çoğunlukla peroksit aktivitesi ve nonperoksit mekanizmalarına bağlıdır (Mohd, vd.,2013).

Bal örnekleri ilk önce gram pozitif bakterilerden *S. aureus* 'a karşı denenmiştir. *S. aureus* gram pozitif bir bakteri olup, sporsuz, katalaz pozitif olan, özellikle günümüzde hastane enfeksiyonlarına sebep olan patojen bir mikroorganizmadır (Ustaçelebi, 1999). Bu mikroorganizmaya karşı bal örneklerinin birçoğu orta derecede ve zayıf antimikrobiyal etki gözlenmiştir. Sadece Süzme Kestane bal örneği en yüksek (32 mm) antimikrobiyal aktiviteyi göstermiştir. Balın genel ve nonperoksit aktivitelerden kaynaklanan antibakteriyel etkiye sahip olduğunu bildirmiştir. Balın Gram-pozitif ve negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu aktivite göstermesi gerektiğine dair bulgular vardır (Katrina ve Calvin, 2014).

Kestane balının, astım ve solunum yolu hastalıkları için iyi bir etnik çare olduğuna inanılmaktadır (Orhan, vd., 2003). Kestane balı, bal türünü tanımlamak için bir işaretleyici olarak hizmet veren bir uçucu bileşen, 3-aminoacetophenone içerir (Bonaga ve Giumanini, 1986). Daha sonra *L. pneumophila* Sg 1(a) karşı denen bal örneklerinden en yüksek aktiviteyi petek çiçek balı 40 mm aktivite ile göstermiştir. *L. pneumophila* bakterisi Gram negatif, 0,3-09 µm boyunda, hareketli, çomak şeklinde bakteri olup *Legionellaceae* familyasının mevcut türlerinden biridir. *L. pneumophila*'nın serolojik olarak birbirinden ayırt edilebilen 14 serogrubu olduğu bilinmektedir. Karbonhidratları karbon kaynağı olarak kullanmayan bu bakteri, aktif kömürü karbon kaynağı olarak kullanır. Katalaz ve beta- laktamaz aktivitesi olan *L. pneumophila* bakterisi, jelatini eritme yeteneğine de sahiptir. Bu mikroorganizma topraki doğal su birikintileri ve insan yapımı su sistemlerinde bulunur. Doğada göl, nehir ve küçük su birikintilerinde az sayıda bulunurken, insan yapımı su sistemleri olan soğutma kulesi, su deposu ve su tesisatlarında kolonize olarak yüksek sayılara ulaşır. *L. pneumophila* 20°C- 40°C'de çoğalabilir, optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. Tercih ettiği pH aralığı 6.6-7.2'dir (Türetgen, 1998) *L. pneumophila* Sg1(a)'ya karşı, bal örnekleri orta derecede duyarlı ve duyarlı aktivite göstermişlerdir. Araştırmalar göstermiştir ki bal, büyük ölçüde çiçek kaynağına bağlı olarak insan sağlığını iyileştirici işlevsel özelliklere sahiptir.

L. pneumophila 1(b)'ye karşı denen bal örnekleri orta derecede duyarlı ve duyarlı aktivite göstermişlerdir. En yüksek aktiviteyi petek çiçek balı, 42 mm çap ile göstermiştir. *L. pneumophila* Sg 2-15(a)'ya karşı denen bal örnekleri genellikle orta derecede duyarlı ve

duyarlı aktivite göstermişlerdir. En yüksek aktiviteyi çiçek petek balı (41 mm) göstermiştir. *L. pneumophila* Sg 2-15(b)'ye karşı denenen bal örnekleri genellikle orta derecede duyarlı aktivite göstermişlerdir. En yüksek aktiviteyi 30 mm aktivite ile süzme çiçek balı göstermiştir. *Legionella* spp. (a)' ya karşı denenen bal örnekleri genellikle orta derecede aktivite göstermişlerdir. En yüksek aktiviteyi 4 adet bal örneği 30 mm çap ile göstermiştir. Bu bal örneklerinin 2 adeti süzme çiçek balı iken, biri çam balı, diğeri ise deli baldır.

Deli bal, yüksek oranda grayanotoksin içeren *Sapindaceae* familyası ve *Ericaceae* familyasının *Rhododendron ponticum* ve *Rhododendron luteum* türlerinin nektarının bal arıları tarafından toplanması, dehidre edilip, olgunlaşması sonucu oluşturulan doğal bir üründür (Bölükbaşı, 2010). Halk arasında tutar bal veya acı bal olarak da adlandırılan deli bal belli miktarın üzerinde alındığında zehirlenme belirtileri göstermektedir. Balı yiyen kişide cilt ve boğazda yanma hissi, ağız ve burunda kaşınma, deride ve gözlerde kızarıklık, vertigo ve baş ağrısı, bulantı, kusma, salivasyon, kramp tarzı karın ağrısı, idrar ve gaita kaçırma, gastroenterit, kesiklik hissi, halsizlik, görme bulanıklığı veya geçici körlük, malaryayı andıran ateş nöbetleri, derin bradikardi, hipotansiyon veya kollaps, delirium hatta koma dikkati çeker. Delibal zehirlenmelerinin geçmişi milattan öncesine dayanır. Ksenophon (M.Ö. 434-354), Perslerden kaçan Yunan ordusunda Karadeniz sahillerinde bulundukları sırada, konakladıkları köylerde bulunan kovanlardan petek bal yiyen askerlerin kusma, ishal, halsizlik ve sarhoşluk benzeri belirtiler gösterdiklerini, belirtilerden bazılarının 1 gün sonra bazılarının ise 3-4 gün sonra geçtiğini fakat askerlerden ölen olmadığını belirtmiştir (Avcı, 2004). Silici (2010) Karadeniz Bölgesi'nden temin edilen 14 *Rhododendron* balında bulunan uçucu bileşiklerin belirlenmesine yönelik yaptığı çalışmada, bal örneklerinde toplam 72 bileşik tespit etmiş, tespit ettiği uçucu bileşikler arasında özellikle organik asitler, fenoller, ketonlar ve alkoller saptamıştır. Saptanan bileşiklerden, 1,2 benzendikarboksilik asit, tributil fosfat, stearik sit, propanoik asit, benzen, etilenfenil asetat ve benzofenon'u *Rhododendron* balının spesifikfloral orijin markörleri olarak belirlemiştir. *Rhododendron* ballarının çiçek balından daha fazla oranda Cu, Co, Cr, Ni, Se, Zn, Ca, ve Mg minerallerini içerdiği belirtilmiştir (Silici, vd., 2008).

El Kased (2016) yaptığı çalışmada balın aerob ve anaerob, Gram pozitif ve Gram negatif bakterileri içeren aşağı yukarı 60 bakteri türü üzerinde inhibitör etkisi olduğunu rapor etmiştir (Mandal, 2011). Günümüzde antibiyotiğe dirençli olan mikrobiyal türlerin prevalansı, bal da dahil olmak üzere doğal ilaçların terapötik kullanımının yeniden değerlendirilmesine yol açmıştır (Rayes, 2013). Son yapılan araştırmalar balın gastrointestinal yol, idrar yolu, yara ve yanık enfeksiyonlarının patojen bakterilerine karşı antibakteriyel etkinliğini göstermiştir. Bal,

Escherichia coli, *S. aureus*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Vibrio cholerae* gibi tehlikeli bakteriler üzerinde başarılı büyüme inhibisyon oranları göstermiştir (Boukraa, 2013) ve bu oranların bilinen bir çok antibiyotikten bile daha iyi olduğu görülmüştür. Bal idrar yolu enfeksiyonlu hastaların idrar örneğinden izole edilen patojen mikroorganizmaların üzerinde de başarılı inhibisyon oranlarını göstermiştir (Yassin, 2013).

Çam balı, arıların çiçek nektarı yerine bir aracı böceğin salgısını kullanarak ürettiği bir baldır. Çam balı üretiminde, çam pamuklu böceği (*Marchalina hellenica*) veya halk arasında Basra böceği denilen böceğe gereksinim duyulmaktadır. Bu böcek sadece kızılçam, karaçam ve halep çamında yaşamakta ve çamın öz suyunu emerek beslenmektedirler (Anonim, 2009). Ülkemiz bitki zenginliği ve çeşitliliği ile dünyanın önemli bal üreticisi ülkeleri arasında yer almaktadır. Türkiye’de üretilen balın yaklaşık %40’ını çam balı oluşturmaktadır. Çam balı üretiminde ise yıldan yıla değişiklik göstermekle beraber ortalama 20.000 ton ile ülkemiz dünya birincisidir ve çam balının çok önemli bir kısmı ihraç edilmektedir (Sunay, vd., 2004; Sunay, 2008).

Legionella spp (b)’ye karşı bal örnekleri genellikle orta derecede aktivite göstermişlerdir. Bir süzme çiçek balı örneği, bir petek çiçek balı örneği son olarak bir adet de kestane balı örneği 25 mm çap ile en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir. Bal örnekleri en düşük aktiviteyi *E. coli*’ye karşı göstermişlerdir. 2 adet bal örneği (süzme çiçek ve petek çiçek balları) 25 mm çap ile en yüksek aktiviteyi göstermişlerdir.

Bal, Ortadoğu ve Türkiye’de yaygın olarak üretilen ve tüketilen bir üründür. Bölgenin bitki örtüsü; narenciye, zeytin, çam, ayçiçeği, kekik, kestane, ormangülü ve benzeri ülke çiçekleri ile karakterizedir. Balın çeşitli türleri Türkiye’de üretilmektedir. Ancak, Türkiye’de Karadeniz Bölgesi’nde üretilen kestane ve çiçek ballarının biyolojik özellikleri üzerine ayrıntılı araştırmalar oldukça sınırlıdır (Sorkun, vd., 2001; Küçük, vd., 2007).

Bal örneklerinin antimikrobiyal aktivitesini kıyaslamak için tetrasiklin antibiyotiğinin ve balın ozmolariteden gelen antimikrobiyal aktivitesinin olabileceği düşüncesiyle sentetik bal örneğinin aynı yöntemle aktivitesine bakılmıştır. Sentetik bal örneği test mikroorganizmalarına karşı hiçbir öldürücü etki göstermemiştir. Bu sonucun osmolariteden kaynaklanan antimikrobiyal aktivite olduğu söylenmesine rağmen bizim çalışmamızda böyle bir sonuca ulaşılammıştır.

Çalışmamızda toplanan bal örneklerinden aerob endospor oluşturan *Bacillus* cinsinin başlıca özelliklerini gösteren, endospor oluşturan, aerobik ve gram pozitif çubuk şeklinde

bakteriler izole edilmiştir. Basil endosporları silindirik, elipsoidal, oval veya yuvarlaktır. Endosporlar vejetatif hücrelerden optik kırılma, ince yapı, kimyasal pozisyon, kimyasal ve fiziksel strese dirençlilik gibi pek çok yönden farklıdırlar. *Bacillus* sporları sıcaklığa vejetatif hücrelerden 105 kez, UV ışımaya 7-50 kez daha dayanıklı olduğu gibi, soğuk, kuruluk, yüksek ve düşük pH, kimyasal dezenfektanlar ve diğer bakterilerin metabolik ürünlerine son derece dayanıklıdırlar. Sporu çevreleyen membranlar, korteks ve spor mantosu gibi yapılarla çeşitli kimyasal ajanlara karşı direnç de geliştirilmiştir (Ustaçelebi, 1999).

Ballardan izole edilen 67 adet Basil izolatını tanımlamak için; katalaz üretimi, sitrat kullanımı, voges proskover, metil red, indol oluşumu, hareket, anerobik gelişme, sıcaklık tolerans (5°C, 10°C, 30°C, 40°C, 50°C, 55°C), pH tolerans (pH5.7, pH6.8) ve NaCl tolerans (%2 NaCl, %5 NaCl, %7 NaCl, %10 NaCl) testlerini içeren morfolojik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır (Çizelge 3.4). 67 adet izolatın *Bacillus* spp. cinsinden olduğu tespit edilmiştir.

Mikroorganizmaların yaşamında metallerin bütünüleyici bir rolü vardır. Kalsiyum, kobalt, bakır, krom, demir, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel, çinko gibi bazı metaller esansiyeldir ve besinsel rolleri vardır. Gümüş alüminyum, kadminyum, altın, civa ve kurşun gibi metallerin ise biyolojik rolleri yoktur ve esansiyel değildirler. Esansiyel metaller; biyokimyasal reaksiyonların katalizlenmesi, protein yapısının ve bakteri hücre duvar yapısının stabilize edilmesi, osmotik dengenin korunması, gen ekspresyonunun düzenlenmesi, biyomoleküllerin aktive edilmesi gibi elektron alıcısı veya vericisi olarak enerji metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar (Faulkner, 2000). Bu metaller, esansiyel ve potansiyel olarak toksik olarak sınıflandırılabilirler. Birlikte, insan yaşamının kalitesinin bozulmasına neden olabilir (Munoz-Olivas ve Camara, 2001). Temel elementlerin alımı, belirli bir seviyede vücut için güvenli ve yeterlidir. Potansiyel olarak zehirli elementler düşük konsantrasyonlarda bile çok toksik olabilir. Özellikle bazı gelişmekte olan ülkelerde, insanların toksik elementlere maruz kalmasının başlıca yolu, hava soluması bir başka önemli yol olsa da, diyet alımı olarak düşünülür. Ağır metallerin insanlar tarafından alınmasına ilişkin esaslar, Ulusal Akademiler Enstitüsü, ABD Çevre Koruma Kurumu (US EPA) gibi çeşitli ajanslar ve organizasyonların yanı sıra Ortak Gıda ve Tarım Örgütü / Dünya Sağlık Gıda Katkı Maddeleri Organizasyon Uzmanı Komitesi (JECFA). Bu kılavuzlar, mevcut bilimsel kanıtlara dayalı güvenli alım düzeylerini listeler (COT-Komite Zehirliliği, 2004).

Mikroorganizmanın tolerans yeteneğini kaybettiği dolayısıyla gelişiminin engellendiği en düşük metal konsantrasyonu “Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu” MİK olarak adlandırılır.

Tolerant mikroorganizmaların ekolojik açıdan önemi büyüktür. Çünkü metal kirliliği bulunan ortamlarda ancak metal tolerans yeteneği olan canlılar yaşayabilmektedir. Bu sebepten dolayı bu habitatlarda ekolojik madde döngülerinin devamı organizmanın metal toleranslılık gücüne bağlıdır. Aksi takdirde böyle bölgelerdeki madde döngülerinin durması ile bölgedeki canlılığın azalmasına ve belkide durmasına neden olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, çeşitli habitatlarda yer alan metal tolerant organizmalar, bu ortamlarda yaşamın devamı ve/veya bu ortamların ıslahı için büyük önem arz etmektedir.

Topladığımız ballardan izole edilen Basillerin Çizelge 3.5 ve Çizelge 3.6'da ağır metallere karşı en yüksek MİK değeri referans suş (*B. subtilis* NRRL B-209) ile kıyaslandığında, çalışmamızdaki Basillerin dirençlilik değerlerini sıraya koyduğumuzda $Co=Cu=Cd>Fe>Pb$ olduğu görülmüştür. Basil izolatlarının dirençlilik mekanizmalarını plazmitler aracılığıyla veya tam olarak kanıtlanamamakla birlikte, bazı bakır dirençlilik tiplerinin periplazmik bağlanmaya dayandığı sanılmaktadır (Silver, 1998). Bununla birlikte balda metallerin varlığı insan tüketicilerinin sağlığını tehdit edebilir. Bu metaller, endüstriyel ergitme kirliliği, fabrika emisyonları, demir dışı metalürji, yoğun otoyollardan kurşunlu benzin, bal işleme ve koruma safhalarında hatalı prosedürlerin yanı sıra kadmiyum içeren gübreler, organik civa ve benzeri tarımsal kimyalar gibi dış kaynaklardan gelebilir. Arsenik bazlı böcek ilacı hala bazı ülkelerde kullanılmaktadır (Pisani, vd., 2008; Wang, vd., 2010). Bizim çalışmamızdaki basil izolatlarının ağır metallere karşı yüksek toleransının sebebinin de, balın içerebileceği ağır metaller olduğu düşünülmektedir.

Mikroorganizmalar çevre ile ilişkileri belirlemede en iyi indikatörlerdir (Benzverbnaya, vd., 2005). Mikroorganizmalar genellikle ağır metallerin en düşük konsantrasyonlarına dahi duyarlıdırlar. Bazen plazmidler bakterilere direnç genlerini kodlar, daha sonra bakteriler ağır metallere direnç kazanarak indikatör mikroorganizma olarak kullanılabilirler (Kannan ve Lee, 2008).

Çalışmamızda elde ettiğimiz *Bacillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri 3 farklı antibiyotiğe karşı agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve sonuçlar Çizelge 3.7 ve 3.8'de verilmiştir. Elde edilen basilleri en yüksek antibiyotik dirençliğinin sadece %8,85 ile kanamisine karşı olduğu görülmüştür. Basillerin duyarlılık derecesine göre sıraladığımızda ise; %100'ünün doxycycline ve rifamisin, %68,6'sının kanamisin antibiyotiğine olduğu bulunmuştur.

Yaşam kalitesinin son 50 yıldaki artışı esas olarak antibiyotiklerin antimikrobikrobiyal kemoterapi olarak kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, antibiyotiklere dirençli bakteri, dünya çapında zorlu bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (Odonkor ve Addo, 2011). Bunun nedeni, aşırı duyarlılık reaksiyonları, böbrek sorunları, karaciğer sorunları ve gastrointestinal uyumsuzluk gibi antibiyotik sistemik uygulamayla birlikte görülen yan etkiler olabilir. Doğal sağlık ilaçları ve takviyeleri, antibiyotiklere karşı olan bu bakteriyel direncin üstesinden gelmek ve insan vücudu üzerinde en az olumsuz etkiye sahip alternatif doğal antimikrobiyal ajanlar sunmak için yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Aurongzeb ve Azim, 2011; Mandal, 2010). Antibiyotiklere karşı gelişen dirençlilik, hücre zarı geçirgenliğinin değişimi, metabolik yol ve enzimlerin değişim göstermesi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün kaybolması şeklinde gelişebilmektedir (Viljanen ve Boratynski, 1991).

Mikroorganizmalar kendilerini yok etmek için kullanılan antimikrobik maddelere karşı er ya da geç karşı koyma gücü ile direnç kazanmaktadır. Oluşan bu direnç günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek bir düzeyde, önemli bir sorundur. Günümüzde sadece hastane kökenli değil toplumdan kazanılmış kökenlerde de direnç önemli oranlarda artmakta, sorun ciddi boyutlara ulaşmaktadır (Gür, 1994). Esel, vd.(2003)40 klinik *B.anthraxis* izolatının antimikrobiyal duyarlılık durumunu agar dilüsyon yöntemiyle araştırdıkları çalışmada suşların tamamının penisilin, doksisisilin ve siprofloksasine duyarlı olduğunu belirlemişlerdir. Perçin, 2011 yılında yaptığı çalışmada çalışılan 190 basil suşunun tamamının doksisisiline duyarlı olduğunu belirlemiştir.

Yapılan bir çalışmada *B. stearothermophilus* ve *B. subtilis* bakterisinde kanamisin ya da tetrasikline dirençli genlerden birini kodlayan plazmit DNA'ları varlığı belirtilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada tetrasiklin dirençli *Bacillus thuringiensis* suşlarında bu fonksiyonla ilgili plazmit DNA'lar tespit edilmiş, plazmitlerin *B. cereus* ve *B. anthracis* bakterilerine aktarımı sağlanmıştır (Reddy, vd., 1987).

Kannan ve Lee Güney Kore'de Sunchon Bay Bölgesi'nden izole ettikleri *Bacillus* cinsi bakterilerle yaptıkları çalışmada, genellikle izolatların ampisilin antibiyotiğine karşı yüksek bir direnç sergilediğini bulmuşlardır. Ampisilin direncini sırasıyla tetrasiklin, kanamisin ve streptomisin dirençleri izlemiştir. Yani en yüksek direnç ampisiline, en düşük direnç ise streptomisine karşı olduğu bildirilmiştir. Suşlardan *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'in streptomisin ve ampisiline dirençli olduğu bildirilmiştir (Kannan ve Lee, 2008).Karaoğlu 2003 yılında yaptığı çalışmada, basil izolatlarının rifamisin karşı %53 direnç gösterdiğini, fakat kanamisin antibiyotiğine karşı hiçbir izolatın direnç göstermediğini belirlemiştir.

Yaptığımız bir diğer çalışma bal örneklerinden izole edilen, endospor oluşturan Basillerin sekonder metabolit üretme yetenekleri açısından taranmasıdır. Antimikrobiyal aktiviteye sahip sekonder metabolit ürettiği bilinen mikroorganizmalar aktinomisetler, funguslar ve *Bacillus* genusu üyeleridir (Hussain, vd., 1994). *Bacillus* türleri antibakteriyel ajan olarak kullanılmalarının yanı sıra antifungal (Hussain, vd., 1994; Milner, vd., 1995), antiviral (Steller, vd., 1999), anti-amöbositik (Galvez, vd., 1994; Lebbadi, vd., 1994) ve antimikoplazma (Peypoux, vd., 1999) ajanı olarak da kullanılan geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler.

İzole edilen Basil suşlarının sekonder metabolit aktivitelerinin belirlenmesi için, balların antimikrobiyal aktivitesinin tespitinde kullandığımız gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar kullanmıştır. Bu mikroorganizmaların kullanılmasının sebeplerden biri de test edilen mikroorganizmalara inhibe edici etkinin balın kendisinden mi yoksa balın içinde bulunan basil izolatının oluşturduğu sekonder metabolitten mi kaynaklandığının araştırılmasına yönelik olarak yapılmıştır.

Çalışmamızda agar blok yöntemi ile elde edilen basillerin sekonder metabolit aktivitelerinin sonuçları Çizelge 3.11 ve Çizelge 3.12 de verilmiştir. Elde edilen basillerin ürettiği sekonder metabolitin oluşturduğu en yüksek antimikrobiyal aktivitenin yüzde (%32.84) oranına baktığımızda *L. pneumophila* Sg 1(b) bakterisine, ikinci sırada %5.97 ile *Legionella* spp. bakterisine karşı aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda ilk kısmında yaptığımız elde edilen balların antimikrobiyal aktiviteleri ile basillerden elde edilen sekonder metabolitlerin test edilen mikroorganizmalar arasında genel olarak *Legionella* bakterisine karşı antimikrobiyal aktivitesin olduğu göze çarpmaktadır.

Mikroorganizmalarda sporulasyon ve sekonder metabolit üretimi arasındaki ilişki biyokimyasal ve genetik yollarla araştırılmaktadır. *Bacillus*'larda spor oluşumunun polipeptit antibiyotik üretimi ile doğrudan veya dolaylı olarak ilgisi tespit edilmiştir. Sporulasyon sırasında serin proteazları oluşumunun antibiyotik üretimi ile ilişkili olduğu bildirilmektedir. Peptit antibiyotik üreten *Bacillus* suşlarında sporulasyon sırasında meydana gelen fizyolojik değişiklikler antibiyotik üretiminin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Nam ve Ryu, 1985).

Bacillus türlerinin geç logaritmik faz veya erken sabit fazda ikincil metabolit olarak antibiyotik üretme kapasitesinde olduğu ve sporulasyon olayı başladığında antimikrobiyal madde üretimini de başlattıkları bilinmektedir (Buchanan ve Gibbons, 1974). Bu aşamada sporulasyondaki fonksiyonların düzenlenmesi, gelişme yeteneği, hücre dışı parçalayıcı enzimler ve antimikrobiyal madde üretimi uyarılır. Bu çeşit olaylar *Bacillus* hücrelerinin beslenme

stresine karşılık cevapları olarak yansır ve çevresel değişikliklere hızlı uyum gösterirler. Antimikrobiyal madde üretimi, sınırlı kaynakları olan bir çevrede yaşayan organizma için rekabet şansını arttıran önemli etkidir. Özel metabolitlerin, çevresel uyarıları cevaplamada, bakteri popülasyonunu harekete geçiren hücre içi sinyaller olarak hizmet edebileceği gösterilmiştir (Galvez, vd., 1994).Ghori ve Ahmad (2009) ve Kawaii, vd. (2000) ham bal örneklerinin %100 konsantre solüsyonunun tüm bakteri izolatlarının büyümesini engellediğini bildirmiştir.

Bacillus bakterileri peptit, biyosurfaktant, aminoglikozit ve fosfolipit yapıda antimikrobiyal maddeler üretmektedirler (Marahiel, 1992; Patel, vd., 1995; Desai ve Banat, 1997; Ota, vd., 2000; Tamehiro, vd., 2002). Toprakta izole edilen *Bacillus* suşlarının antibiyotik madde üretim kabiliyetleri incelendiği zaman sadece %25'inin *Micrococcus luteus*'u inhibe ettiği görülmüştür. *Bacillus circulans* ve *Bacillus polymyxa* olarak tanımlanan suşlarda ise ekstrasellüler antibiyotik aktivite gözlenmiştir. *B. polymyxa*'nın *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Aspergillus niger*'e karşı aktivitesi bulunurken, *B. circulans*'ın bu organizmalara karşı aktivitesi bulunmamıştır (Perez, vd., 1993).

Bacillus suşları çeşitli bakteriler tarafından üretilen ve aynı türlerin farklı suşlarına öldürücü veya diğer bakteriler üzerine inhibe edici etkisi olan bakteriyosini de meydana getirmektedirler. *Bacillus subtilis* bakterisinden elde edilen basillosin 22'nin hem *B.cereus* hem de *Listeria monocytogenes* üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Bu madde midedeki peptidaz enzimlerine duyarlı olduğundan gıda kaynaklı patojenlere karşı gıda antimikrobiyal ajanı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle basillosin 22'nin gıda endüstrisi alanında kullanım potansiyelinin yüksek oluşu düşünülmüştür (Zheng ve Slavik, 1999).

Bacillus polymyxa KT-8 suşu ile yapılan diğer bir çalışmada da, bu suşun ürettiği fusarisidin B, C ve D elde edilmiştir. Bunların antimikrobial aktiviteleri fusarisidin A ile karşılaştırılmıştır. Fusarisidin B, C ve D *Staphylococcus aureus* ve *Micrococcus luteus* gibi Gram pozitif bakterilere karşı güçlü aktivite göstermiştir(Kajimura ve Kaneda, 1996; Kajimura ve Kaneda, 1997).*Bacillus* suşlarından izole edilen peptit yapıdaki antimikrobiyal madde olan mersasidinin metisilin'e dirençli stafilokoklar başta olmak üzere bazı Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğu belirlenmiştir (Chatterjee, vd., 1992).

Drablos ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen basitrasin antibiyotığının birçok Gram pozitif ve bazı Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyal aktivitesinin olduğunu tespit etmiştir (Drablos, vd., 1999).

Bacillus circulans J2154'den izole edilen lipopeptit yapıdaki sirkulosinlerin Gram pozitif bakterilere ve piperasiline dirençli streptokoklar ile vankomisine dirençli enterokoklara karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (He, vd., 2001). *Bacillus* bakterilerinin oluşturduğu antimikrobiyal maddelerin yapıları farklı olduğu gibi etki mekanizmaları da birbirinden farklı olabilmektedir. Hücre duvarı sentezini bozan veya hücre membranına zarar veren etkileri yanında protein sentezini de engelleyen antimikrobiyal maddeler bulunmaktadır (Ota, vd., 2000). *Bacillus subtilis* ATCC 39320 suşunun aerobik ve anaerobik organizmalara karşı antibakteriyel etkisi diffisidin ve oksidiffisidin antibiyotiklerinden ileri gelmektedir. Bu antibiyotikler *E. coli*'nin protein sentezini inhibe ettikleri görülmüştür (Zweerink ve Edison, 1987).

Sonuç olarak, çalışmamızda kullanılan 44 adet bal örneğinin en yüksek antimikrobiyal aktiviteyi çoğunlukla *Legionella* grubu bakterilere karşı gösterdiği görülmektedir. Bal örneklerinden izole edilen 67 adet aerob endospor oluşturan mikroorganizmanın *Bacillus* spp. cinsinden olduğu bulunmuştur. İdentifiye edilen bu izolatların yüzdeler olarak dirençliliklerine bakıldığında kobalt, bakır, kadminyum ve demire karşı dirençli olarak bulunurken antibiyotiklerden sadece kanamisinine karşı dirençlilik göstermiştir. Basilerin ürettiği sekonder metabolitlerin test edilen mikroorganizmalar arasında sadece *Legionella* bakterisine karşı aktivite gösterdiği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Ahmann, D., Roberts, L., Krumholz, R. ve Morel, M., (1994), ‘Microbe grows by reducing arsenic’, *Nature*, 371:750-1s.

Al-Mamary, M., Al-Meer, A., Al-Habori, M., (2002), Antioxidant activities and total phenolic of different types of honey. *Nutrition Research*, 22: 1041–1047.

Alvarez-Suarez J.M., Tulipani S., Diaz D., Estevez Y., Romandini S., Giampieri F., Damiani E., Astolfi P., Bompadre S., Battino M., (2010), Antioxidant and antimicrobial capacity of several monofloral Cuban honeys and their correlation with color, polyphenol content and other chemical compounds. *Food Chem Toxicol*, 48: 2490–2499.

Alvarez-Suarez, J.M., Tulipani, S., Romandini, S., Bertoli, E., Battino, M., (2010), Contribution of honey in nutrition and human health: a review. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, 3: 15–23.

Anonim, (2000), Türk Gıda Kodeksi, Bal Tebliği (Tebliğ No: 2000/ 39),Ankara.

Anonim, (2009), Çam balı. http://tr.wikipedia.org/Çam_balı. Erişim Tarihi:25.12.2009

Aurongzeb M., Azim M.K., (2011), Antimicrobial properties of natural honey: a review of literature, *Pak J Biochem Mol Biol*; 44: 118-24.

Avcı M., (2004), Ormangülleri (*Rhododendron L.*) ve Türkiye'deki doğal yayılışı. *Coğrafya Dergisi*. 12:13-29

Bal, H., (2005), Yerel ekosistemlerden izole edilen ve endüstriyel önemi olan proteinleri üreten bakterilerin izolasyonu tanımlanması ve ilgili proteinlerin taranması, Doktora tezi Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalı, 169s.

Bang, L.M., Bunting, C., Molan, P., (2003), The effect of dilution on the rate of hydrogen peroxide production in honey and its implications for wound healing. *J. Altern. Complement Med.* 9, 267–273.

Basualdo C., Sgroi V., Finola M.S., Marioli J.M., (2007), Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Vet Microbiol*; 124: 375-81.

Benzverbnaya, I. P., Buzoleva, L. S. ve Khristoforova, S., (2005), Metal resistant heterotrophic bacteria in Coastal waters of Primorye, *Russ.J. Mar. Biol.*, 31, 73–77s.

Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., *Chemie ve Gesundheit*, (1988), Eine verst 2nd liche einführung in die toxikologie, VCH Verlagsgesellschaft, isbn 3-527-264455-8s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bilandžić, N., Đokić, M., Sedak, M., Kolanović, B.S., Varenina, I., Končurat, A., Rudan, N., (2011), Determination of trace elements in Croatian floral honey originating from different regions. *Food Chem.* 128, 1160–1164.

Bizerra F.C., Da Silva P.I. Jr, Hayashi M.A., (2012), Exploring the antibacterial properties of honey and its potential. *Front Microbiol*; 3: 398.

Blair, S.E., Cokcetin, N.N., Harry, E.J., Carter, D.A., (2009), The unusual antibacterial activity of medical-grade *Leptospermum* honey: antibacterial spectrum, resistance and transcriptome analysis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.* 28, 1199–1208.

Blasa, M., Candiracci, M., Accorisi, A., Piacentini, M.P., Albertini, M.C. ve Piatti, E., (2005), Raw Millefiori honey is packed full of antioxidants. *Food Chemistry*, paper in press.

Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P., (2008), Honey for Nutrition and Health: A Review. *J Am Col Nutr*; 27 (6): 677–689.

Bonaga G., Giumanini A. G., (1986), Chemical composition of chestnut honey: analysis of the hydrocarbon fraction. *Journal of Agricultural Research*, 25: 113–120.

Boukraâ L., (2013), Honey in traditional and modern medicine. Boca Raton: CRC Press; p. 13-20.

Bölükbaşı D.N., (2010), Delibali.

www.duzce.edu.tr/dagem/.../Calistay_Sunum_10_DN_BOLUKBASLI.pdf Erisim: 13.08.2011

Brady, N., Molan, P., Bang, L., (2004), A survey of non-manuka New Zealand honeys for antibacterial and antifungal activities. *J. Apic. Res.* 43, 47–52.

Brenner, D. J., Feeley, J. C., Weaver, R. E., (1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, in KREIG, N., R. (ed.), Cilt 1, 0-683-04108-8, 279 - 288.

Bruins, M.R., Kapil, S. ve Oehme, F.W., (2000), Microbial Resistance to Metals in the Environment, *Ecotox. Environ.Safe.*, 45:198-207s.

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., (1974), *Bergey's Manual of alternative bacteriology*, 8th. Edition, The Williams and Wilkins Company, 1246 p. Maltimore.

Chatterjee, S., Chatterjee, D.K., Jani, R.H., Blumbach, J., Ganguli, B.N., Klesel, N., Limbert, M. ve Seibert, G., (1992), Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*, In vitro and in vivo antibacterial activity, *The Journal of Antibiotics*, 46(6), 839-845s.

Choudhury, R. ve Srivastava, S., (2001), Zinc resistance mechanisms in bacteria, *Curr. Sci.* , 81(7):7s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cooper, R.A., Halas, E., Molan, P.C., (2002a), The efficacy of honey in inhibiting strains of *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *J. Burn Care Rehabil.* 23, 366–370.
- Cooper, R.A., Molan, P.C., Harding, K.G., (2002b.) The sensitivity to honey of Gram-positive cocci of clinical significance isolated from wounds. *J. Appl. Microbiol.* 93, 857–863.
- COT-Committee on Toxicity, (2004), Advise on fish consumption: benefits and risks. Food Standards Agency and the Department of Health, Her Royal Majesty's Stationary Office, Norwich, UK, s. 222.
- Çetinkaya E., Ayhan K., (2012), *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi/ Karaelmas Science and Engineering Journal* 2 (1), Sf: 53-62.
- Çotuk, A., (2003), Genel Mikrobiyoloji Laboratuvar Yöntemleri, Nobel Tıp Kitapevleri.
- David, W.B., (2007), The chemical composition of honey. *J. Chem. Educ.* 84 (10), 1647.
- Demain, A.L. ve Davies, J.L., (1999), *Manual of industrial microbiology and Biotechnology* 2 nd Edition, 392-416s.
- Denisow, B., Denisow-Pietrzyk, M., (2016), Biological and therapeutic properties of bee pollen. A review. *J. Sci. Food Agric.* <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.7729>.
- Desai, J.D. ve Banat, I.M., (1997), Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64s.
- Drablos, F., Nicholson, D. ve Ronning, M., (1999), EXAFS study of zinc coordination in Bacitracin A, *Biochemica at Biophysica Acta*, 1431, 433-442s.
- Dustmann, JH., (1979), Antibacterial effect of honey, *Apiacta*, 14(1), 7-11.
- Effem, S. E. E., (1988), Clinical Observations On The Wound Healing Properties Of Honey. *British Journal of Surgery*, 75: 679–681.
- El- Kased, R. F., (2016), Natural antibacterial remedy for respiratory tract infections, *Asian Pac J Trop Biomed* 2016; 6(3): 270–274.
- Esel D, Doganay M, Sumerkan B., (2003), Antimicrobial susceptibilities of 40 isolates of *Bacillus anthracis* isolated in Turkey, *Int J Antimicrob Agents*;22(1):70-2.
- Fatimah, B., Abubakar, G., Aliyu, S., (2013), Analysis of biochemical composition of honey samples from North-East Nigeria. *Biochem. Anal. Biochem.* 2 (3), 1000139.
- Faulkner, D. J., (2000), Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.*, 17s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- French, V.M., Cooper, R.A., Molan, P.C., (2005). The antibacterial activity of honey against coagulase-negative staphylococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 228–231.
- Galvez, A., Maqueda, M., Cordovilla, P., Martinez-Bueno, M., Lebbadi, M. ve Valdivia, E., (1994), Characterization and biological activity against *Naegleria fowleri* of amonebicin produced by *Bacillus licheniformis* D-13, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(6), 1314-1319s.
- Gavrilescu, M., (2004), Removal of Heavy Metals from the Environmental by biosorption, *Eng.Life.Sci.*, 4(3):219-232s.
- Gazso, L.G., (2001), The key microbial processes in the removal of toxic metals and radionuclides from the environment, *Central Eur. J. Occup. Environ. Med.*, 7: 178-185s.
- Gheldof N., Wang X., Engeseth N. J., (2002), Department of Food Science and Human Nutrition, 259 ERML, 1201 West Gregory Drive, University of Illinois, Urbana, Illinois 61801, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50 (21), s 5870–5877.
- Ghori I., Ahmad S.S., (2009), Antibacterial activities of honey, sandal oil and black pepper. *Pak J Bot*; 41(1): 461-6.
- Gordon, R. E., (1981), One hundred and seven years of the cins *Bacillus*, The aerobic endospor forming bacteria, Academic press, London.
- Guzzo, J., Diorio, D. C., Alexander, D. C. ve Dubow, M. S., (1999), Toward understanding metal stres in enviromental microbial flora, *Proccedins of the 8th İnternational Symposium on Microbiol Ecology*, Canada.
- Gür, D., (1994), Antibiyotiklerde direnç gelişmesi, klinik uygulamalarda antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ilaçlar, Güneş Kitabevi Limited Şirketi. Ankara, 19-37s.
- Güven K., İlhan, S., Mutlu, M. B. ve Çolak F., (2008), Diversity characterization and antimicrobial activities of *Bacillus cereus* strains isolated from soil, *Fres Env Bull*, 17: 303-310s.
- Hamdy, M.H. , El- Banby, M. A., Khafika, K.I., Gad, E.M., Hassenein, E.M., (1989); The Antimicrobial Effect of Honey in The Management of Septic wounds, *Forut International Conferance on Apiculture in Tronical Climates*, Cairo, International Bee Research Association, London, 61-67.
- Harnett, N. M. ve Gyles, C. L., (1984), Resistance to drugs and heavy metals colicin production, and biochemical characteristics of selected bovine and porcine *Escherichia coli* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:930-945s.
- He, H., Shen, B., Korshalla, J., Carter, G. T., (2001), Circulations, new bacterial lipopeptides from *Bacillus circulans* J2124, *Tetrahedron*, 57, 1189-1195s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hışıl, Y., Börekçioğlu N., (1986). Balın Bileşimi ve Bala Yapılan Hileler, Gıda, Gıda Teknolojisi Dernegi Yayın Organı, 2: S.79–82.
- Hughes, M.N., Poole, R.K., (1989), Metals and Micro-organism., Chapman and Hall, London.
- Hussain, S., Lane, S.D. ve Price, D.N., (1994), A preliminary evaluation of the use of microbial culture filtrates for the control of contaminants in plant tissue culture systems, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 36, 45-51s.
- Ichikawa T, Date M, Ishikura T, Ozaki A. Folia Microbiol (Praha), (1971), Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method; 16(3):218-24.
- Ismail, Z.B., Alshehabat, M.A., Hananeh, W., Daradka, M., Ali, J.H., El-Najjar, E.K., (2015), Recent advances in topical wound healing products with special reference to honey: a review. Res. Opin. Anim. Vet. Sci. 5 (2), 76–83.
- İşleroğlu, H., Yıldırım, Z. ve Yıldırım, M., (2008), Yöresel peynirden antimikrobiyal aktiviteye sahip laktik asit bakterisinin izolasyonu ve tanısı, GÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 25(1), 1-6 s.
- Jensen, L. B., Baloda, S., Boye, M. ve Aqrestrup, F. M., (2001), Antimicrobial resistance *Pseudomonas* ssp. and *B.cereus* group isolated from Danish Agricultural soil, Environ.Int., 26:581-587s.
- Ji, G., ve Silver, S., (1995), Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern, J.Ind.Microbiol. 14:61-168s.
- John, H., Howard, G., Worth, J., (1996), Fundamental toxicology for Chemists, Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services.
- Julie, I., Shona, B., Carter, Dee A., (2011), The antibacterial activity of honey derived from Australian Flora. PLoS One 6 (3), e18229.
- Kajimura, Y. ve Kaneda, M., (1997), Fusaricidins B, C and D, new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 Isolation, structure elucidation and biological activity, J. Antibiotics, 50(3), 220-228s.
- Kalaylı, E., Beyatlı, Y., (2003), *Bacillus* cinsi bakterilerin antimikrobiyal aktiviteleri, PHB üretimleri ve plazmid DAN'ları, Orlab On-line Mikrobiyol. Derg., 1 (12), 24-35s.
- Kalkan S., Halkman K., (2006), *Bacillus cereus*'un Standart Analiz Yöntemi, Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, Cilt:4, Sf: 31- 36.
- Kannan, K. S. ve Lee, J. K., (2008), Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Suncheon Bay sediments, College of agriculture and life science, Chonbuk National University, Jeonju, South Korea, 561-756s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karadal F., Yıldırım Y., (2012), Balın Kalite Nitelikleri, Beslenme ve Sağlık Açısından Önemi, Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 9(3) 197-209.
- Karahan, A.G., Cicioğlu Arıdoğan B., Çakmakçı M.F., (2002), Genel Mikrobiyoloji Uygulama Kılavuzu, Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No:24, SDÜ Basımevi, Isparta
- Katrina, B., Calvin, S., (2014), Antibacterial compounds of canadian honeys target bacterial cell wall inducing phenotype changes, growth inhibition and cell lysis that resemble action of b-lactam antibiotics. PLoS One 9 (9), e106967.
- Kawaii S., Tomono Y., Katase E., Ogawa K., Yano M., Koizumi M., Ito C. ve Furukawa H., (2000), Quantitative study of flavonoids in leaves of citrus plants. J Agric Food Chem; 48: 3865-71.
- Kıran, Ö. E., Çömlekçiöğlu, U. ve Dostbil, N., (2006), Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstride kullanım alanları, K. S. Ü. Fen ve Mühendislik dergisi, 9 (1), 12-17s.
- Krumperman, P.H.,(1985), Multiple antibiotic resistance indexing of Escherichia coli to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. App. Environ. Microbiol., 46:165–170.
- Küçük M., Kolaylı S., Karaoğlu S., Ulusoy E., Baltacı C. ve Candan F.,(2007), Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chemistry, 100: 526– 534.
- Lavermanam., Switzer, J., Philips, P., Lovley, D. R., ve OremLand, R. S., (1995), Growth of strain SES-3 with arsenate and other diverse electron acceptors, Applied and environmental Microbiology., 61: 3556-3561s.
- Lebbadi, M., Galvez, A., Valdivia, E., Martinez-Bueno, M. ve Maqueda, M., (1994), Purification of amoebolytic substances from Bacillus licheniformis M-4, Arch. Microbiol., 162, 98-102s.
- Logan N. A, (1999), Turnbull Pcb. Bacillus and Recently Derived Genera, In Murray Pr., Baron Manual Of Clinical Microbiology, American Society For Microbiology, Washington; 357s.
- Mandal MD., Mandal S., (2011), Honey: its medicinal property and antibacterial activity. Asian Pac J Trop Biomed 2011; 1(2): 154-60.
- Mandal S.,(2010), DebMandal M, Pal NK, Saha K. Antibacterial activity of honey against clinical isolates of Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, and Salmonella enterica serovar Thyphi. Asian Pac J Trop Med; 3: 961-4.
- Marahiel, M. A., (1992), Molekular biologie und regulationmechanismen der antibiotika produktion in Bacillus, Naturwissenschaften, 79, 202-212s.
- Martos, I., Cossentini, M., Ferreres, F., Tomas-Barberan, F.A., (1997), Flavanoid Composition of Tunisian Honey and Propolis, J. Agric. Food Chem., 45, 2824-2829.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McEntee, J. D., Woodrow, J. R., ve Quirk, A. V., (1986), Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:515-520s.
- Meda, A., Lamien, C. E., Romito, M., Millogo, J., Nacoulma, O. G., (2005), Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Faso honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 91: 571–577.
- Meo S. A., Al-Asiri S. A., Mahesar A. L., Ansari M. J., (2017), Role of honey in modern medicine, *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Milner, J. L., Raffel, S. J., Lethbridge, B. J. ve Handelsman, J., (1995), Culture conditions that influence accumulation of zwittermicin a by *Bacillus cereus* UW85, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 685-691s.
- Mohd, I., Zainol, K., Mohd, Y., Mohd, Y., Mohd, Y., (2013), Antibacterial activity of selected Malaysian honey. *BMC Complement Altern. Med.* 13, 129.
- Molan, P. C., Betts, J. A., (2004), Clinical usage of honey as a wound dressing: an update. *Journal of Wound Care*, 13: 353–356.
- Molan, P.C., (1992), The Antibacterial Activity of Honey 1. The Nature of the Antibacterial Activity, *Bee World*, 73, 5-28.
- Molan, P.C., (1999), Why Honey is Effective as a Medicine 1. It's Use in Modern Medicine, *Bee World*, 80, 80-92.
- Muhammad, A., Odunola, O.A., Ibrahim, M.A., Sallau, A.B., Erukainure, O.L., Aimola, I.A., Malami, I., (2016), Potential biological activity of acacia honey. *Front. Biosci. (Elite Ed)* 8, 351–357.
- Munoz-Olivas, R., Camara, C., (2001), Speciation related to human health. In: Ebdon, L., Pitts, L., Cornelis, R., Crews, H., Donard, O.F.X., Quevauviller, P. (Eds.), *Trace Element Speciation for Environment, Food and Health*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, s. 331–353.
- Nam, D. H., Ryu, D. D. Y., (1985), Relationship between butirosin biosynthesis and sporulation in *B. circulans*, *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 27, 5, 798-801.
- NCCLS, (1990), National committee for clinical laboratory standards, performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard 4th ed. Document.
- Newman, D. K., Kennedy, E. K., Coates, J. D., Ahmann, D., Ellis, D. J., Lovley, D. R., ve Morel, F. M. M., (1997), Dissimilatory arsenate and sulfate reduction *auripigmentum* sp., *Archives of Microbiology*, 168.380-388s.
- Nies, D. H. , ve Silver S., (1995), Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances, *J. Ind. Microbiol.*, 14(2), 186-199s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Odonkor S. T., (2011), Addo K.K., Bacteria resistance to antibiotics: recent trends and challenges. *Int J Biol Med Res*; 2(4): 1204-10.
- Oreland, R. S., Blum, J. S., Bind, A. B., Dowdle, P. R., Herbel, M., ve Stolz, J. F., (1999), Simultaneous reduction of nitrate and selenate by cell suspensions of selenium respiring bacteris, *Applied and Microbiology*., 65:4385-4392s.
- Orhan, F., Sekerel, B. E., Kocabas, C. N., Sackesen, C., Adalıoğlu, G. ve Tuncer, A., (2003), Complementary and alternative medicine in children with asthma. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 90: 611–615.
- Ota, Y., Tamegai, H., Kudo, F., Kuriki, H., Koike-Tageshita, A., Eguchi, T. ve Kakinuma, K., (2000), Butirosin-biosynthetic gene cluster from *Bacillus circulans*, *Journal of Antibiotics*, 53(10), 1158-1167s.
- Ötles, S., (1999), Balın Tarihçesi, Sağlık Açısından Önemi ve Kullanım Alanları. Gıda Teknolojisi. Ankara.
- Özçelik, S., (1995), Genel Mikrobiyoloji Uygulama Klavuzu, Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak., Yayın No:2, Ders kitapları, Isparta.
- Patel, P. S., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Meyers, E., Fernandes, P. ve Mayerl, F., (1995), Bacillane a novel inhibitor of procaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity, *Journal of Antibiotics*, 48(9), 997-1003s.
- Pembeci, C., (1998), Türkiye'nin dominant mikroflorasındaki *Penicillium* türlerinde bazı enzimatik aktivitelerin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi Gebze İleri teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalı, 57s.
- Perçin D., (2011), Şarbon Basillerinde Antibiyotik Direnci, *ANKEM Derg* 2011;25(Ek 2):97-99
- Perez, C., Suarez, C., Castro, G. R., (1993), Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans*, *Cluster, Folia Microbiol.* 38, 1, 25-28s.
- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. ve Wallach, J., (1999), Recent trends in the biochemistry of surfactin, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 553-563s.
- Pisani, A., Protano, G., Riccobono, F., (2008), Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy). *Food Chem.* 107, 1553–1560.
- Price, J.N., Morgan, J.W., (2006), Variability of plant fitness influences range expansion of *Leptospermum scoparium*. *Ecography* 29, 623– 631.
- Rayes AAH., (2013), Assessment of the anti-bacterial activity of different types of natural and commercial honeys on bacteria isolated from wounds and burns in Saudi Arabia. *Acad Arena*; 5(10): 15-21.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reddy, A. , Batisti, L. and Thome, C. B. , (1987), ‘Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis* subspecies’, *J. Of gen. Microbiol.* , 135: 3035-3041.
- Redouan El-Haskoury, Walid Kriaa, Badiaa Lyoussi, Mohamed Makni, (2017), *Ceratonia siliqua* honeys from Morocco: Physicochemical properties, mineral contents, and antioxidant activities, *Journal of Food and Drug Analysis*, Elsevier.
- Rosovitz, M. J., Voskuil, M. I. ve Chambliss, G. H., (1998), *Bacillus*, Topley and Wilson’s Microbiology and Microbial Infections, Systematic Bacteriology, Oxford University, New York, 709-730s.
- Rygus T. ve Hillen, W., (1991), Inducible High-Level Expression Of Heterologous Genes İn *Bacillus Megaterium* Using The Regulatory Elements Of The Xylose-Utilization Operon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 594-599s.
- Sevgi, E. , (2007), Ağır metalle kontamine olmuş topraklardan metal iyonlarına dirençli bakterilerin izolasyonu ve bu dirençliliğin plazmidlerle olan ilişkisinin araştırılması’, Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi.
- Sherlock O., Dolan A., Athman R., Power A., Gethin G., Cowman S., Humphreys H., (2010), Comparison of the antimicrobial activity of Ulmo honey from Chile and Manuka honey against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Complementary and Alternative Medicine*The official journal of the International Society for Complementary Medicine Research (ISCMR)201010:47.
- Silici S.,(2010). Characterization of volatile compounds of *Rhododendron* honey. *Mellifera* 10-19:17-23.
- Silici S., Uluozlu O.D., Tuzen M. and Soylak M., (2008), Assessment of trace element levels in *Rhododendron* honeys of Black Sea Region, Turkey. *Journal of Hazardous Materials*, 156(1-3): 612-618.
- Silver, S., (1992), Plasmid-Determined Metal Resistance Mechanism, Range and Overview. *Plasmid*, 27 :1-3s.
- Silver, S., (1998), Genes for all metals a bacterial view of the Periodic Table, *J Indust Microbiol Biotechnol.*, 20,1-12s.
- Sneath, P. H. A., (1986), Endospore-forming gram-positive, Rods and Cocci, *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Volume 2, edited by PHA Sneath, N.S., Mair, M.E., Sharpe, J.G., Williams and Wilkins, Holt, 1104-1139s.
- Sorkun, K., Doğan, C. ve Başoğlu, N., (2001), Physicochemical characteristics and composition of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. honey produced in Turkey. *Apiacta*, 36: 182–189.
- Steller, S., Vollenbroich, D., Leenders, F., Stein. T., Conrad, B., Hofemeisterr, J., Jaques, P., Thonart, P. ve Vater, J., (1999), Structural and functional organization of the fengycin synthase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213 and A1/3, *Chemistry & Biology*, 6(1), 31-41s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sunay E. A., Altıparmak, Ö., Doğaroğlu, M. ve Gökçen, J., (2003), Türkiye’de ve dünyada bal üretimi, ticareti ve karşılaşılan sorunlar. II. Marmara Arıcılık Kongresi, Yalova.
- Sunay E.A., (2008), Authenticity and sensorial properties of pine honey from Turkey. 1st World Honeydew Honey Symposium, p.12, Tzarevo, Bulgaria.
- Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. and Ochi, K., (2002), Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 315-320s.
- Tamer A. U., Uçar, F., Ünver, E., Karaboz, I., Bursalıoğlu, M. ve Oğultekin, R., (1989), Microbial ecology (in turkish), *Mikrobiology handbook for 3rd and 4th classes*, Anadolu Üniversty Pres No:74, Eskişehir.
- Temiz, A., (2000), Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri, Hatipoğlu yayınevi, Ankara.
- Türetgen, İ., (1998), Soğutma Kuleleri Suyunda *Legionella* Cinsi Bakterilerin Araştırılması, Yüksek Lisans, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Uçan, U. S. ve Erganiş, O., (2005), Pratik bakteriyoloji, Selçuk Ün. Basımevi, Konya.
- Uçar F., Tamer A. Ü., Yaşa İ., Koçyiğit A., (2008), Prokaryotik Çeşitlilik Ders Kitabı, İzmir Güven Kitabevi, Konak, İzmir.
- Ustaçelebi, P., (1999), Temel ve klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Viljanen, P., Boratynski, J., (1991), The susceptibility of Conjugative Resistance Transfer in Gram Negative Bacteria to Physicochemical and Biochemical Agents. *FEMS Microbiology Rev.* 88:43-54.
- Wang, J., Kliks, M.M., Jun, S., Li, Q.X., (2010), Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions. *Food Res. Int.* 43, 2329–2334.
- White, J. W., (1979), Composition of honey. In E. Crane (Ed.), *Honey: A comprehensive survey* (pp. 157–158). London: Heinemann.
- Wiener, P., Müller-Graf, C., ve Barcus, V., (2003), Bacterial Evolution in Modern Times: Trends and Implications for Research, *Reviews in Undergraduate Research*, Cilt. 2: 1-6s.
- World Health Organization (WHO), (2007), *Legionella and The Prevention of Legionellosis*. ISBN 92 4 156297 8. World Health Organization, Geneva.
- Yassin N.A., (2013), Honey as therapeutic agent for infectious diseases. *Diag Ther Stud*; 2(3): 43-50.
- Zheng, G. ve Slavik, M.F., (1999), Isolation, Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain, *Letters in App. Microbiol.*, 28, 363-367s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zumla ve Lulat, A., (1989), Honey- aremedy rediscovered, Journal of the Royal Society of Medicine 82, 384-385.

Zweerink, M. M. ve Edison, A., (1987), Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*, J. Antibiotics, 12, 1682-1691s.

