



HAVASAL AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN İZOLASYONU VE BAZI
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra TORU ALTIN

Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Ekim 2017

HAVASAL AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN İZOLASYONU VE
BAZI ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra TORU ALTIN

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

Danışman: Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK

Ekim-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Esra TORU ALTIN 'ın Yüksek Lisans Tezi Olarak Hazırladığı HAVASAL AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI başlıklı bu çalışma, jürimizce Dumlupınar Üniversitesi lisansüstü eğitim öğretim ve sınav yönetmeliğın ilgili maddeleri uyarınca değeriendirilerek kabul edilmiştir.

26 /10 /2017

Üye : Prof. Dr. Asım OLGUN

Üye : Doç. Dr. Tuba İÇA

Üye : Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK (Danışman)

Fen Bilimleri Enstitüsünün 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 %24 çıktığını beyan ederiz. Aykırı bir durum ortaya çıktığı takdirde tüm hukuki sonuçlara razı olduğumuzu taahhüt ederiz.

Doç.Dr. Ferdağ ÇOLAK

Esra TORU ALTIN

HAVASAL AEROB ENDOSPOR OLUŞTURAN BASİLLERİN İZOLASYONU VE BAZI ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Esra TORU ALTIN

Biyoloji Bölümü, Yüksek Lisans Tezi, 2017

Tez Danışmanı: Doç.Dr.Ferdağ ÇOLAK

ÖZET

Bu çalışmada, Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinin 5 ayrı yerinden toplanan havasal örneklerden 14 adet aerob endospor oluşturan Basil izole edilmiştir. İzole edilen Basillus izolatları biyokimyasal ve VITEK identifikasyon sistemi ile tanımlanmıştır. İzolatların 4'ü *B. subtilis*, 4'ü *B. pumilus*, 1'er adet *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. licheniformis* ve 2 izolat ise tanımlanamamıştır. İzole edilen suşların ağır metal ve antibiyotik dirençliliği bunun yanında sekonder metabolit üretimi araştırılmıştır.

Ağır metal dirençlilik testi, agar difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) deneyinde, ağır metallere karşı en yüksek MİK değeri referans suş (*B. subtilis* NRRL B-209) ile kıyaslanmıştır. Elde edilen izolatların referans suşa göre, ağır metal yüzde dirençlilik değerlerine bakıldığında; %100 bakır ve kadmilyum'a, karşı olduğu tespit edilmiştir. İzolatların antibiyotik dirençliliklerine disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Buna göre izolatların antibiyotiklerden oksasiline (%100), ampisiline (%50) ve eritromisine (%7.1) oranında dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Basil izolatlarının sekonder metabolit üretme yeteneklerinin belirlenmesinde Gram negatif bakterilerden *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 ve *Legionella* spp. izolatları kullanılmıştır. Basil izolatlarının sekonder metabolit üretme yetenekleri sadece bu iki gram negatif bakteri üzerinde agar blok yöntemi ile belirlenmiştir. Basil izolatların *Legionella* spp.'e karşı antimikrobiyal aktivite oluşturmazken, *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 karşı farklı etki spektrumunda antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Havasal, *Bacillus* spp, Ağır metal ve antibiyotik dirençliliği, Sekonder metabolit.

ISOLATION AND INVESTIGATION OF SOME PROPERTIES OF AIRBONE AEROBIC ENDOSPORES BASIL

Esra TORU ALTIN

Department of Biology, Master of Science Thesis, 2017

Thesis Supervisor: Assoc. Prof. Ferdağ ÇOLAK

SUMMARY

In this study, 14 aerobic endospore forming bacilli were isolated from aerial specimens which were collected from 5 different spots of Bigadiç district of Balıkesir province. Obtained *Bacillus* isolates were identified by biochemical and VITEK identification systems. 4 out of these isolates were *B. subtilis*, 4 of them were *B. pumilus*, 1 of them was *B. polymyxa*, *B. megaterium*, *B. brevis*, *B. licheniformis* and 2 of them were not possible to be identified. Besides heavy metal and antibiotic resistance the secondary metabolite production of isolated strains were investigated.

Heavy metal resistance test is executed by agar dilution method. In minimal inhibition concentration (MIC) test, the highest MIC value against heavy metals was comparable with reference strain (*B. subtilis* NRRL B-209). When heavy metal percent resistivity values of obtained isolates to reference strain were examined and it is detected that %100 were against copper and cadmium. Antibiotic resistance of isolates were determined with disc diffusion method. As a result, the isolates were resistant to oxacillin (%100), ampicillin (%50) and erythromycin (%7.1).

Legionella pneumophila serogrup 2-15 and *Legionella* spp. isolates from gram negative bacteria were used to determine. The ability of producing secondary metabolites of basileic isolates. The ability of producing secondary metabolites of basileic isolates were detected by agar bloc method over these two gram negative bacteries only. Although basileic isolates do not produce antimicrobial activity against *Legionella* spp., they have shown antimicrobial activity against *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 with different effect range.

Key words: Aerial, *Bacillus* spp., Heavy metal and antibiotic resistance, Secondary metabolite.

TEŞEKKÜR

Çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen, tez konumun seçimimde, yazım aşamasında ve yapımında her türlü desteği bana sağlayan ve her konuda sonsuz sabır gösteren sevgili danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ferdağ ÇOLAK' a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Çalışmam boyunca bana her türlü maddi ve manevi desteği gösteren sevgili aileme ne kadar teşekkür etsem azdır. Her zaman beni destekleyen moral kaynağı olan çok sevgili eşim veyol arkadaşım Tolga Başar ALTIN' a ve ablam Doç. Dr. Ümran TORU' ya, ailemin diğer fertlerine beni sonuna kadar destekledikleri için ne kadar teşekkür etsem azdır.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
SUMMARY	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Aerob Endospor Oluşturan Bacillus Cinsi'nin Temel Özellikleri	1
1.1.1. Bacillus türlerinde spor oluşum mekanizması	2
1.2. Taksonomi	4
1.3. Bacillus Cinsi Tanı Yöntemleri	5
1.4. Ağır Metaller ve toksik etki mekanizmaları	5
1.5. Ağır metal ve antibiyotik dirençlilik mekanizmaları	7
1.6. Çalışmanın Amacı	8
2. MATERYAL VE METOD	10
2.1. Materyal	10
2.1.1. Kimyasal materyaller	10
2.1.1.1. Ağır metal toleranslılık testinde kullanılan ağır metaller	10
2.1.1.2. Kullanılmış antibiyotikler	10
2.1.1.3. Sekonder (İkincil) Metabolit Aktivite Belirlenmesinde Kullanılan Mikroorganizmalar	11
2.1.2. Besiyerleri	11
2.1.3. Çözeltiler	13
2.1.4. Boyalar	15
2.2. Metod	15
2.2.1. Endospor oluşturan basillerin İzolasyonu ve identifikasyonu	15
2.2.2. Biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon	18
2.2.3. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin tespit edilmesi	19

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.4. Antibiyotik dirençliliklerinin tespit edilmesi.....	19
2.2.5. <i>Bacillus</i> 'ların sekonder (ikincil) metabolit üretiminin belirlenmesi (agar blok yöntemi)	20
3.BULGULAR.....	21
3.1. Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu.....	21
3.2. <i>Bacillus</i> Suşlarının İdentifikasyon Test Sonuçları.....	21
3.3. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi	25
3.4. Endospor Oluşturan Basillerin Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri	30
3.5.Basillerin Sekonder (İkincil) Metabolit Üretimi	32
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ**Şekil****Sayfa**

1.1. Bazı <i>Bacillus</i> türlerine ait Endospor Oluşumu.....	3
---	---



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Basillerin biyokimyasal test sonuçları	22
3.2. Basillerin VITEK sistemine göre test sonuçları.....	23
3.3.VITEK ve Biyokimyasal özelliklerine göre izolatların identifikasyonu.....	25
3.4. Ağır metal dirençlilik düzeyi <i>B.subtilis</i> NRRL B-209 için(mM/mL).....	26
3.5.İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).....	26
3.6.İzole edilen basillerin ağır metal toleranslılıklarının %'lik dağılımı.....	29
3.7.NCCLS'ye e göre gram pozitif (+) - aerobik bakteriler için antibiyotiklerin dirençli (R), orta derecede duyarlı (ODD) ve duyarlılık değerleri (D).....	30
3.8. Basillerin test edilen antibiyotiklere karşı gösterdikleri inhibisyon zon çapları (disk 6 mm).....	31
3.9. Havasal örneklerden elde edilenBasil izolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları.....	32
3.10.Havasal örneklerden elde etmiş olduğumuz Basil izolatlarının agar blok yöntemi ile test organizmalarına karşı oluşturdıkları inhibisyon zon çapları(Ø9mm).....	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
µg	Mikrogram
°C	Santigrat Derece
ATCC	Amerikan Hücre Tip Kültür Koleksiyonu
cm ³	Santi metreküp
g	Gram
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
mL	Mililitre
UV	Mor ötesi
pH	Asitlik veya Bazlık Ölçüsü Birimi
NaCl	Sodyum klorür
mm	Milimetre
µM	Mikromolar
µg	Mikrogram

1. GİRİŞ

1.1. Aerob Endospor Oluşturan *Bacillus* Cinsi'nin Temel Özellikleri

Bacillus grubuna ait üyeler gram boyama reaksiyonları olumlu (pozitif) olup vejetatif formlarının boyutları bakımından yuvarlak veya küt uçlara sahip olabileceği gibi $0.5 \times 1.2 \mu\text{m}$ veya büyük $2.5 \times 10 \mu\text{m}$ 'de görülebilir. Mikroskopik muayenede tek tek veya uzun zincirler halinde görünürler. Basillerin oksijen istekleri fakültatif veya aneorobik olup terminal elektron akseptörleri oksijendir (Sneath, 1986).

Bacillus cinsi üyeleri aerobik şartlarda endospor üretme yeteneğindedirler. Ana hücrede bulunan sporun biçimi ve sporangium'un bulunduğu bölge bu cinsin üyelerinde karakteristik özellik olarak ortaya çıkar. Türlerinde karakteristik özelliğini belirler. Endosporlar genellikle elipsoidal, silindirik, yuvarlak veya oval şekildedir.

Katalaz çoğu tür tarafından oluşturulur. Oksidaz pozitif veya negatiftir. Hücreler parasporal cisimcikler veya protein kristalleri içerebilir.

Bacillus cinsinin fizyolojik özellikleri oldukça fazla değişiklik gösterebilirler ancak büyük bir bölümünü mezofilik cinsler oluştururken, psikrofilik, zorunlu termofilik, asidofilik ve alkalik niteliklere sahip cinslerde tespit edilmiştir. Bazı streinleri (suşları) tuza toleranslı iken, bazı streinler (suşları) ise tuz için özel gereksinimlere sahiptirler (Gordon, 1981; Sneath, 1986; Hillen ve Rygus 1991; Ustaçelebi, 1999 ve Gültekin, 2009).

Bacillus türleri tabiatta toprak, suda, toz, çürüyen organik materyallerde ve yeşil sebzelerde, bazı streinlerde (suşları) ise normal vücut florasında bulunurlar. *Bacillus* türleri içerisinde çoğunluk nonpatojen (Patojen olmayan) olmasına karşılık *B.anthraxis* türüpatojenik özellik gösterir. Bu cins içerisinde en tehlikeli üyedir. Bu cinsin diğer öneme sahip türü ise *B.cereus* olup süt tozu, tahıl ürünleri, baharatlar, sebzeler, soslar, kuru gıdalar, et bu bakterinin sporları ile bulaşma ihtimalleri yüksektir. *B.myocoides* ve *B. thuringiensis* ise canlılarda ishal (gastroenterit) sebep olan toksin üretirler ve ishalden (gastroenterit) sorumlu olabilmektedirler (Logan, 1999; Ustaçelebi, 1999).

Bacillus türlerinin koloni morfolojisi çevresel şartlara bağlı olarak değişmektedir. Genel olarak petrideki makroskopik olarak kolonilerin görüntüsü, yarı opak, opak, düzgün ya da pürüzlü koloniler şeklindedir. Petri kabındaki koloni renkleri, krem renginde beyazdan sarıya, kremden beyazaçalan renkler şeklinde olabilir.

Bacillus'ların çoğu türü pigment oluşturmaz iken, ancak bazı türler farklı besiyerlerinde yeşil, mavi-siyah, sarı vb. renkteki pigment maddeleri üretirler. Koloni morfolojisini etkileyen faktörler; besiyeri çeşidi, koloninin yaşı önemlidir. Bazı *Bacillus* türleri, en dış yüzeylerinde polipeptid yapıda veya polisakkarit yapıda kapsül oluştururlar. Örneğin *B. circulans* bir glukoz ve glukuronik asit ekstrasellüler polimeri oluşturur. *B. anthracis*'de poli D-glutamik asitten oluşan kapsül bulunmakta ve bu virulans faktör taşımaktadır (Rosovit ve ark., 1998; Ustaçelebi, 1999; Rygus ve Hillen, 1991).

Bacillus türlerinin çoğu peritirik flagella (Kamçı) taşırlar ve bununla hareket ederler. Flagellar (Kamçı) antijenler *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *s* ve *B. sphaericus* gibi türlerin identifikasyonu için kullanılmakla birlikte, flagella (kamçı) oluşumu taksonomide temel unsurlardan biri olarak görülmemektedir (Sneath, 1986; Rygus ve Hillen, 1991).

1.1.1. *Bacillus* türlerinde spor oluşum mekanizması

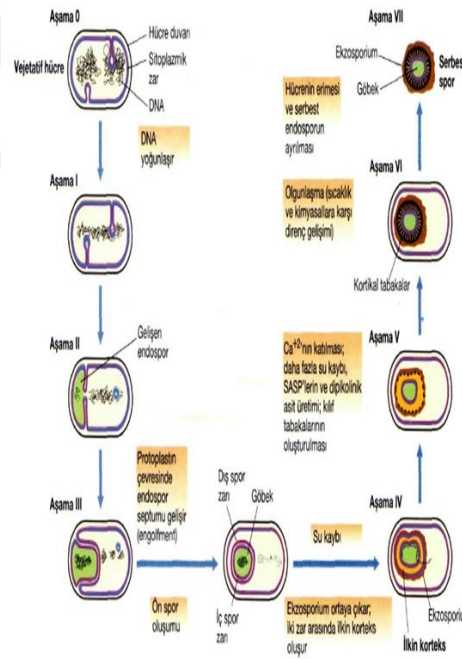
Bacillus türlerinin karakteristik özelliklerinden biriside büyüme evrelerinin durgun fazında besin maddelerinin azalmasına bağlı olarak endospor oluşturabilmelidir. Endospor oluşumu, spor oluşturan hücrelerin şekli ve sporangiyumlar bu tür için önemli bir özelliktir (Gordon, 1981; Ustaçelebi, 1999). Spor yapısı çoğunlukla bir mikroorganizmanın ortasında, bazen de subterminal olarak yerleşebilir ve bu yapı spor mikroorganizmayı şişirerek şeklinde değişikliğe neden olmaz (Gültekin, 2009).

Spor oluşumu sırasında bakteri hücresi içirışinde birtakım değişiklikler meydana gelir. Vejetatif hücrede aktif olan bazı genler aktivitelerini kaybederlerken sporların oluşmasında etkili olan genler aktivite olurlar. İlk olarak sporun oluşacağı yerde çekirdek meydana gelir. Çekirdeğin etrafını ise çepeçevre saran çöküntü oluşturan katlanan sitoplazmik zar yapıları çevreler ve bunu bakteri içerisinde ayrı bir alanda ayırır. Oluşmuş olan bu çift zarın sentezlenmesi ilede spora ait diğer bölümler oluşur. Bu şekilde oluşmakta olan sporlarda şu bölümler bulunmaktadır bunlar; birinci olarak çekirdek kısmıdır ve bu sporun protoplastını oluşturur. İçerisinde ise tam bir nukleus, protein sentezi için gerekli olan bütün bileşikler ve bir enerji yapıcı sistem bulunmaktadır. Sitokrom bulunmaz, fakat çeşitli enzimler içerisinde yer almaktadır. Sporların sıcaklığa dirençli olmalarının sebebi ise yapılarında bol kalsiyum dipikolinat maddesinin bulunmasından dolayıdır. Sporlarda bulunan ikinci kısım ise spor duvarıdır. Spor protoplastını çevreleyerek, yapısında peptidoglikan bulundurur ve oluşacak bakterinin hücre çeperi ise buradan gelişir. Sporlarda bulunan üçüncü kısım ise kabuk (korteks) kısmıdır. Bu kısım ise sporun en kalın tabakasıdır. Değişik yapıda bir peptidoglikan tabakası vardır. Kabuk kısmının dış kısmında keratine benzeyen ve proteinden yapılmış olan bir kılıf

bulunmaktadır. En dışında ise karbonhidratlı bir protein zar (ekzosporiyum) bulunur (James ve Young, 1969; Gültekin, 2009).

Bacillus cinsinin endospor yapıları kimyasal dezenfektanlara, kimyasal uyarılara yüksek ve düşük pH seviyesine, soğuk, ısı dalgalandırmaları, kuruluk, diğer bakterilerin metabolik ürünlerine sıcaklığa vejetatif hücrelerden 105 kez ve ultra viole ışınlarına 7-50 kez ve kimyasal ajanlara karşı daha dayanıklıdır. Ayrıca bu spor yapısını çevreleyen spor mantosu, membranlar ve korteks (kabuk) gibi yapılar ile çeşitli kimyasal maddelere karşı direnç geliştirilmiştir (Ustaçelebi, 1999).

B. anthracis bakterisinin sporları 140°C’ de yarım saat, 180°C’ de 2 dakikada etkisiz (inaktif) hale gelir. Pratikte kullanılmakta olan dezenfektanlara karşı dirençlidir. Ancak yüksek konsantrasyonlar da perasetik asit, gluteraldehit, formaldehid (%5-10), hidrojen peroksit etkilidir (Gültekin, 2009).



Şekil 1.1. Bazı *Bacillus* türlerine ait Endospor Oluşumu (www.google.com.tr).

1.2. Taksonomi

Bakterilerin taksonomisinde kullanılan Bergey's Manual of Systematic Bacteriology endospor oluşturan *Bacillaceae* familyası üyesi bakterilerini 6 bölümde incelenmiştir. Basiller diğer *Bacillaceae* bulunan diğer cinslerinden aerobik koşullar altında endospor oluşturmaları ve aynı zamanda katalaz üretmeleri yönünden ayrılırlar (Sneath, 1986).

Bacillus cinsi bakterilerin temel olarak sınıflandırılması, onların fizyolojik özellikleri, morfolojik, spor oluşturabilmeleri ve biyokimyasal testler ile günümüzde yapılmaktadır. Bununla birlikte bu kriterler aynı zamanda türler arasındaki durum hakkında ayrıntılı olarak malumat vermemektedir. Numerik (Sayısal) taksonomiden ve 16S rRNA (kladistik) analizlerinden de elde edilmiş olan daha fazla bilgi birbiri ile iyi uyum sağlamış ve sonuç olarak *Bacillus* türleri 6 grup olarak toplanabilmektedir (Demain ve Davies, 1999). *Bacillus* 'ların mezofilik, psikrofilik ve termofilik türleri bulunur ancak *Bacillus* türlerinin birçoğunun, mezofilik sıcaklıklarda da gelişebildikleri yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir.

B. stearothermophilus gibi mecburi termofilik türler ise genel olarak 60°C sıcaklıkta gelişmektedir. *B. coagulans* gibi daha ılımlı termofil türler ise 45-50°C sıcaklıkta gelişmektedir. 50°C sıcaklığın üzerinde bile canlı kalabildikleri gözlemlenmiştir. Genellikle 35-37 °C sıcaklık aralığında ve pH 7 dolaylarında üremektedirler (Kalaylı ve Beyatlı 2003, Rosovitz ve ark., 1998).

Tipik olarak yaşam ortamları toprak ortamında yaşamasına rağmen doğada yaygın olarak, hava, su, süt ve süt ürünlerinden ve yiyecek gibi birçok çeşitli ortamdan izole edilebilmektedirler. Gıda maddeleri ve bitkisel ortamlar üzerinde büyüebilmelerini sağlayan biyopolimerleri parçalayan enzim sistem yapıları mevcuttur.

Bazı *Basil* türleri ise hayvanlarda ve insanlarda patojen olmasına karşılık genellikle saprofitik (Çürükçül) toprakta bulunan mikroorganizmalardır. (Gordon, 1981; Kalaylı ve Beyatlı, 2003).

1.3. *Bacillus* Cinsi Tanı Yöntemleri

Bakterilerin tanımlanmasında fiziksel özellikleri olan hücre şekli, tutundurma, koloni yapısı, hücre büyüklüğü, endosporun şekli ve hücredeki yeri, gram boyama reaksiyonu, hareketlilik, pigment oluşturma özelliklerinden faydalanılır.

Bakterilerin fizyolojik ve mikroorganizma enzim yapısı, metabolik özellikleri içerisine transport (taşıma) proteinlerinin yapısı ve bunların aktiviteleride girer.

Ayrıca bakterinin hücre duvarı yapısı, enerji kaynakları, fermentasyon sonucu oluşan ürünleri, oksijen ihtiyacı, sekonder (ikincil) metabolitler, metabolik inhibe ediciler ve antibiyotik duyarlılık özellikleri önem taşır. Bunun yanında Voges-Proskauer reaksiyonu, katalaz enzimi üretimi, Voges-Proskauer pH'sı, anaerobik (oksijensiz) agarda büyüme, 50°C-65°C' de sıcaklıkta gelişebilme, %7'lik NaCl' de gelişebilme, glikozdan asit üretimi, gaz üretimi, nitratın nitrite redüksiyonu (dönüştürülmesi), nişasta parçalanması ve kazein parçalanması ile türler tanımlanmaya çalışılır (Ustaçelebi, 1999). Şeker içeren maddeleri mayalandırarak, sonucunda isegaz oluşumu görülmeksizin asit üretirler. Protein içeren maddeleri ise, amonyak (NH₄) oluşumu altında parçalayabilirler ve böylece kokuyasebep olurlar. DNA'larındaki G (Guanin) + C (Sitozin) mol oranı yüzde 32–62 oranlarındadır (Kalkan ve Halkman 2006).

1.4. Ağır Metaller ve toksik etki mekanizmaları

Ağır metallerin günümüzde birden fazla tanımı yapılmaktadır bunlardan biri ise; metalik özellik gösteren elementlerden oluşan, açık, detaylı ve tam bir identifikasyonu yapılamamış olan grup içerisinde yer alan elementlere verilmiş olan addır. Morfolojik özellik bakımından konsantrasyonu 5 g/cm³'ten büyük olan metalleri içermektedir. Bu grupta ise; kadmiyum, demir, kurşun, krom, çinko, kobalt, nikel, ve bakır da dahil olmak üzere 60' tan fazla metal yer almaktadır. Bu maddeler habitatları sebebi ile yeryüzünde genellikle silikat, oksit, karbonat, ve sülfür halinde sabit (stabil) bileşik olarak veya silikatlar içerisinde tutulan ve bakteriyel hücreye giriş yapabilen anyon ve katyonlar olarak bulunurlar (Sevgi, 2007).

Metalleri toksisite özelliklerine göre sınıflandıracak olur isek; az toksisite özelliği olan eser elementler (mangan, molibden, demir), orta önemlilikteki toksik özelliğe sahip eser elementler (çinko, bakır, nikel, vanatyum, krom, kobalt, tungsten) ve sınırlı aynı zamanda faydası olan toksik özelliğe sahip elementler (gümüş, kurşun, kadmiyum, stibium, arsenik ve uranyum) olarak 3 gruba toplanabilirler (Bigersson ve ark., 1988).

Ağır metallerin yaşamsal süreçlerde rol alma özelliklerine göre yaşamsal (biyolojik) ve yaşamsal olmayan (biyolojik olmayan) olarak gruplandırılırlar. Yaşamsal olarak belirlenen ağır metallerin canlıların yapısında belirli bir konsantrasyonda bulunmaları gereklidir ve bu metaller biyolojik tepkimelerde rol almalarından dolayı düzenli olarak besinler ile birlikte alınmaları gereklidir. Örnek verecek olur isek, bakır ağır metali insanlarda ve hayvanlarda kırmızı kan hücrelerinin (alyuvar) ve birçok oksidasyon (yanma) ve redüksiyon (indirgeme) işleyişinin vazgeçilmez unsurudur (Bigersson ve ark., 1988). Buna karşılıklı yaşamsal olmayan ağır metaller oldukça düşük konsantrasyonlarda bile biyolojik yapıyı etkileyerek sağlık sorunlarını beraberinde getirebilirler. (John ve ark., 1996).

Bir metalin toksik özelliği, büyük moleküllere ve hücre organelleriyle birlikte canlı sistemlerdeki aktif yaşam işleyişine zarar verme oranına bağlı olarak belirlenir. Bazı sistemlerde ağır metallerin etki spektrumunu konsantrasyona bağlı olarak değişir. Örnek verilecek olur ise krom ağır metali ilk başta insan metabolizmasında dahil olmak üzere, canlı organizmalardaki davranışı oksidasyon (yanma) kademesine ve oksidasyon (yanma) kademesindeki kimyasal özelliklerine ve aynı zamanda da bulunduğu ortamdaki fiziksel yapısına da bağlıdır. Bu tür organizmalarda metalin konsantrasyonunda dikkate alınmalıdır. Kalsiyum, krom, kobalt, demir, bakır, potasyum, magnezyum, sodyum, nikel ve çinko gibi metaller ihtiyaç duyulan maddeler olduğu için gereklidirler. Bunlar haricinde kalanların (kadmium, gümüş, alüminyum, kurşun) herhangi bir yaşamsal süreçte etkisi bulunmamaktadır (Bigersson ve ark., 1988).

Hücre içinen değeri yüksek metaller, enzimlerin yapısına katılarak önemli yaşamsal reaksiyonların ilerlemesinde aktif olarak rol alırlar. Bir kısmı ise bakteri hücre çeperinde bulunarak ozmotik dengenin korunmasında ve protein yapısında bulunur. Demir, nikel ve bakır gibi metaller de redoks işleyişinde görev alır. Bunların dışında ise çinko ve magnezyum gibi maddeler ise çeşitli enzimleri ve DNA'nın yapısını ve işleyişini korur. Demir, nikel, kobalt ve magnezyum, çok çeşitli fonksiyonları olan birleşik yapıdaki moleküllerin yapısına katılırlar. Potasyum ve sodyum, hücre dışı ozmotik basıncın düzenlenmesinde rol alır (Hughes ve Poole, 1989; Ji ve Silver, 1995; Sevgi, 2007).

Bu metallerin yüksek orandaki konsantrasyonları mikroorganizmalar ve diğer canlılara da toksik etkide bulunur. Toksik özellik ise metallerin hücrede olağan bağlanma yerlerinin değişmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Gerekli görülmeyen (non-esansiyel) metaller oksijen bulunan bölgelere ve tiol taşıyan gruplara gerekli olan metaller (esansiyel) yerine daha yüksek bir istek ile bağlanmaktadır.

Hücrede bulunan nükleik asitlerin ve protein yapısının bozulması (denatüre) sonucu hücrede toksisiteye eğilim görülmektedir (Hughes ve Poole, 1989).

1.5. Ağır metal ve antibiyotik dirençlilik mekanizmaları

Metallerin, gerekli (esansiyel) ve gerekli olmayan (nonesansiyel) yoğunluğunun, toksik seviyeye ulaşması durumunda canlıların sağlığını tehdit etmektedir. Bunun yanında birçok mikroorganizmanın (bakteri, maya, küf) çeşitli metallerin varlığında canlılık özelliklerini devam ettirebildikleri de görülmektedir (Bruins ve ark., 2000; Choudhury ve Srivastava, 2001). Yapılan çalışmalar sonucunda ise bazı metallere dirençli mikroorganizmalar bulunmuştur. Çalışmalar sonucunda ise, çoğunlukla *Escherichia coli*, *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi önemli dirençlilik gösteren Gram-pozitif (+) aerobik ve Gram-negatif (-) bakteriler görülmüştür. Toksik özelliğe sahip metallere karşı direnç mekanizmalarının geliştirilmesine yol açan en önemli etki ise, mikroorganizmaların bulunduğu ortamda, toksik etkiye sebep olan metalin varlığı ve bu metalin mikroorganizma üzerinde yaratmış olduğu strestir. Gelişen bu direnç mekanizmalarının çoğunun ise plazmid kökenli olduğu yapılan çalışmalarda görülmüştür (Guzzo ve ark., 1999). Mikroorganizmalarda metale karşı dirençlilik mekanizması; aktif transport ile metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması, geçirgen bariyer sayesinde metallerin hücre dışına atılması, intrasellüler (hücre içi) ayırım, metallerin enzimler yardımı ile etkisizleştirilmesi sayesinde daha az toksik hale getirilmesi ve hücresel hedeflerinin metal duyarlılıklarının azaltılması şeklinde de olabileceği yapılan çalışmalarda görülmüştür (Silver, 1992; Bruins ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalarda metal dirençlilik mekanizmaları ile genellikle antibiyotik direnç mekanizmaları ilişkilendirilmiş olup direnç mekanizmaları organizmalar arasında transdüksiyon veya konjugasyon ile transfer plazmid kökenli olarak gerçekleştirilmektedir (Harnett ve ark., 1984; McEntee ve ark., 1986). Yapılan çalışmalarda mikroorganizmalarda metal dirençliliği, antibiyotik dirençliliğinden önce yapılan çalışmalar ile kayıtlara geçmiştir (Ji ve Silver, 1995). Mikroorganizmalar bir veya birden fazla direnç mekanizmalarına sahip olabilirler. Direnç mekanizma yapısına sahip olan mikroorganizmanın bir metale karşı hangi mekanizmayı seçeceğini, oluşacak olan ara ürün veya son ürünün toksisite özelliğine bağlıdır (Silver, 1998). Günümüzde bilinenlerden daha fazla sayıda direnç mekanizması olduğu fikri savunulmaktadır fakat bu mekanizmalara sahip mikroorganizmalar izole edilip çalışmalar yapılamadığından dolayısıpatlanamamıştır (Bruins ve ark., 2000). Bunun yanında toksik metallere karşı direnç mekanizmalarının oluşturulmasında plazmid DNA' nın kromozomal DNA' dan mikroorganizmalarda daha etkili olduğu görülmüştür (Silver, 1992).

Hücre içinde metal yoğunluğunu düzenleyebilmek için öncelikli yol membran taşıma sistemleri ile gerçekleşmektedir. Normal şartlar altında, gerekli olan (esansiyel) veya gerekli olmayan (non-esansiyel) metal iyonlarının organizmanın içerisine özel olmayan alım mekanizmaları aracılığı ile taşınabilme özelliğine sahiptirler. Metal iyonları, kapsül yapısına ve hücrenin dış membrana non - spesifik olarak bağlanabilmektedirler. Bu bağlanma mekanizması, hücrenin dış membranında bulunan -OH, -SO₃H, -NH₂, -COOH, -SH, ve PO₃H grupları ile metal iyonları arasındaki özel olmayan bir etkileşim ile gerçekleşir (Gazso, 2001). Bakterilerin dış yapısında bulunan polisakkarit tabaka, metal iyonlarını bünyelerine alma özelliğine sahiptirler, bu sayede çevrede bulunan metal iyonların hücre yapısı ile etkileşime girmesi engellenmektedir. Hücre bağlanma bölgesinin metal iyonlarına karşı doygunluğa ulaşması neticesinde metale karşı sınırlı bir koruma sağlamaktadır (Gavrilescu, 2004). Mikroorganizmanın bulunduğu ortamda metal iyonlarının fazla olduğu durumda ise mikroorganizma için gerekli olmayan metaller iyonlarının, hücre içine alınabilmesi özel iyon sistemleri sayesinde engellenir.

Hücre için yararı olan fosfatların hücre içerisine alınımı esnasında, toksik bir metal olan arsenatın hücre dışına atılması buna oldukça güzel bir örnektir. Hücre, normal işleyişinden yüz kat daha büyük bir özellik ile fosfat alırken, daha özel bir mekanizma aracılığı ile arsenatı ayırt edebilme özelliğine sahiptir. Metal iyonlarını bağlayabilme özelliğine sahip bakterilere *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* ve *Arthrobacter viscosus* örnek olarak verilebilir (Emtiaza ve ark., 2004).

Düşük yoğunlukta olsa dahi zehir etkisi gösteren kadminyum ise non-esansiyel (gerekli olmayan) bir metaldir. Kadminyum (Cd(II))'un enzimatik detoksifikasyon ile daha toksik özellikte kadminyum formları oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu metal için en önemli dirençlilik mekanizması bu metali hücre içinden dışarı doğru pompalayan sistemdir (Jensen ve ark., 2001). Aynı şekilde Mg⁺², K⁺, AsO₄⁻³, Zn⁺², Ni⁺², PO₄⁻³, SO₄⁻², AsO₂⁻, CO⁺², Ag⁺ ve Pb⁺² iyonlarının da taşıma sistemleri aracılığı ile hücreden uzaklaştırıldığı görülmektedir. İntrasellüler (hücre dışında) ayırma; organizmalar tarafından üretilen toksik bazı metaller ise sistenince zengin küçük proteinlere (metalloprotein) bağlanarak, organizmanın sitoplazması içerisinde tutulmaktadır. Bu yapı sayesinde önemli hücre komponentleri toksik metalin zararlı etkisinden korunmaktadır. Bu yol ile mikroorganizmalar Zn (II), Cu (II) ve Cd (II), 'ye dirençli hale gelirler (Nies ve Silver, 1995).

1.6. Çalışmanın Amacı

Yapmış olduğumuz bu çalışmada, Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinin 5 farklı yerinden, Nisan ayında toplanan havasal örneklerden elde edilen endospor oluşturan 14 (on dört) adet

Bacillus cinsi bakteri identifiye edilerek bazı özellikleri ortaya konmaya çalışılmıştır. Çalışma örneklerini toplamış olduğumuz bu bölgede, endüstriyel ve sanayi kaynaklı kirlilik sebebiyle veya toprağın jeolojik yapısında bulunan ağır metallerin su kaynaklarına geçişi, topraktaki ağır metallerin çözünerek doğadaki suyun sürekli hareketi ile ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşması gerçekleşmektedir. Çevrede bulunan ağır metallerin toksik etki düzeyleri ekosistemde bulunan mikro ve makro seviyedeki canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Bir metalin toksik etki seviyesi biyolojik proseslerde zarar verme potansiyelleri birbirinden farklıdır. Diğer taraftan mikroorganizmaların ağır metal ve antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç mekanizmaları şaşırtıcıdır. Toprak ve diğer habitatlardan izole edilen basillerin sekonder metabolit üretme potansiyelleri araştırılmış olup havasal mikroorganizmalar fazla çalışılmamaktadır. Yapmış olduğumuz bu çalışmada basillerin ağır metal dirençliliği, antibiyotik dirençliliği ve sekonder (ikincil) metabolit üretim yeteneklerinin tespitine yönelik çalışmalar yapılmıştır.

2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Materyal

Çalışmamızda endospor oluşturan Basillerin izole etmek amacı ile Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinden 5 farklı yerinden havasal örnekler toplanmıştır. Havasal ortamdan basil izolasyonu için Triptic soy agar besiyeri kullanılmıştır. Standart petrilere 15mL steril besiyeri dökülmüş ve bu petriler kullanılmıştır. Örnekler Nisan ayında toplanmıştır. Hazırlanan petrilerin ağzı açık olarak 30 dakika kadar bırakılmıştır. Daha sonra ağzı kapatılıp laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen petriler 37°C sıcaklıkta 2 gün (48 saat) süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyonsonrasında üreyen koloniler tek tek işaretlenip 5 mL nutrient broth içeren tüplere aşılama yapılmıştır. Aşılama tüpler 37°C sıcaklıkta 1 gün (24 saat) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında üreyen mikroorganizmalar 80°C sıcaklıkta 10 - 20 dakika süre ile su banyosunda bekletilmiştir. Aerob endospor basillerin izolasyonu için örnekler Nutrient Agar besiyeri üzerine 0.1 mL aktarılarak yayma plaka yöntemine göre drigalski spatülü ile ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan plaklar aerobik olarak 37°C sıcaklıkta 2 gün (24 saat) süreyle inkübasyona bırakılmışlardır. İnkübasyon sonucunda gözlenen mikroorganizma kolonilerinin *Bacillus* cinsine ait olduğu kabul edilmiştir. Daha sonra bu koloniler stok kültür yapımı için yatık Nutrient agar besiyerine geçirilmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilmiş olan izolatlar +4°C' de yatık agarda ve -18°C sıcaklıkta %20' lik gliserol içeren ependorf tüplerinde stok kültür oluşturarak muhafaza edilmiştirler. Ağır metal toleranslılık testi için isepozitif kontrol amacı ile seçilen mikroorganizma, *B. subtilis* NRRL B-209 saf kültür (strain) ile çalışılmıştır.

2.1.1. Kimyasal materyaller

2.1.1.1. Ağır metal toleranslılık testinde kullanılan ağır metaller

Basil izolatlarının ağır metal toleranslılık testinde kullanılan ağır metal tuzları ise sırasıyla aşağıda belirtildiği gibidir:

$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
 $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

2.1.1.2. Kullanılmış antibiyotikler

Basil izolatlarının antibiyotik dirençlilik testi için kullanılan antibiyotikler ise aşağıdaki gibidir:

Eritromisin (15µg), Kloromfenikol (30µg), Kanamisin (30µg), Ampisilin,(10 µg), Oksasilin (1µg), Vankomisin (30µg) ve Gentamisin (10µg) şeklindedir.

2.1.1.3. Sekonder (İkincil) Metabolit Aktivite Belirlenmesinde Kullanılan

Mikroorganizmalar

Basil izolatlarının sekonder (ikincil) metabolitüretim potansiyellerinin tespit edilmesinde kullanılan mikroorganizmalar gram negative (-) bakterilerden olan *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 ve *Legionella* spp. Bu iki izolat Dumlupınar Üniversitesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji laboratuvarındaki koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.1.2. Besiyerleri

Besiyeri 1. Nutrient Agar

Pepton	5.0 g
Maya(Yeast) ekstraktı	2.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	15.0 g
Et ekstraktı	1.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri 2. Nutrient Broth

Et ekstrakt	3.0 g
Pepton	5.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri 3. Triptik Soy Agar (Fluka)

Soya pepton	5.0 g
Kazein pepton	5.0 g
Agar	15.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri 4. Anaerobik Agar (Merck 1.05452)

Glikoz	10.0 g
Agar	15.0 g
Triptikaz	20.0 g
Sodyumformaldehit sulfoksi	1.0 g
Sodyum trioglikat	2.0 g
Saf su	1000 mL

Besiyeri 5. Triptonlu Su (Merck 1.10859)

Ticari olarak bulunan besiyeri istenilen ölçüde tartılıp hazırlandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Bileşiminde bulunan kazein peptonu (tripton) oldukça fazla oranda triptofan içermektedir. Triptofan, indol pozitif (+) mikroorganizmalar aracılığı ile parçalanarak ortaya çıkan indol, Kovacs çözeltisi aracılığı ile belirlenir. İdentifikasyon testinde kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

Besiyeri 6. Methyl (Metil) Red-Voges Proskauer Broth (MR-VP)

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

Ticari olarak bulunan besiyeri istenilen ölçüde tartılıp hazırlandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. İnkübasyon süresi sonrasında kültüre ayrı ayrı Metil Red ve Voges Proskauer testleri uygulanır. İdentifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

Besiyeri 7. Simmons Sitrat (Citrate) 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

Ticari olarak bulunan bu besiyeri litrede 22.3 g olacak şekilde tartılıp saf suda çözülüp, kaynar su banyosunda tam olarak çözülür. Besiyeri henüz sıvı iken, deney tüplerine 7' şer mL olarak dağıtılıp, otoklavda steril edilir. Tüpler yatık agar olacak şekilde katılaşması sağlanmıştır. Hazırlanan bu besiyeri duru, parlak ve yeşil renge sahip olup, 25°C sıcaklıkta pH'sı 6.6±0.2' dir. İdentifikasyon testlerinde kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Besiyeri 8. Yarı-Katı Nutrient Agar

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

Ticari olarak bulunan besiyeri istenilen ölçüde tartılıp hazırlandıktan sonra otoklavda steril edilmiştir. Otoklav çıkışında tüpler dik konumda sabitlenerek besiyerinin katılaşması beklenir. Mikroorganizmaların hareketlilik testinde kullanılmıştır (Sneath, 1986).

2.1.3. Çözeltiler

Çözelti 1. Fizyolojik Tuz çözeltisi

NaCl 8.5 g tartılıp, 1000 mL saf su ile karıştırıldıktan sonra tüplere 5 ml aktarılmıştır. Otoklavda 121°C' de 15 dakika sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

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

BaCl₂ ve H₂SO₄ karıştırıldığı zaman elde edilen çözeltiye spektrofotometre de 625 nm dalga boyunda okuma yapılmıştır. Okumanın yapıldığı dalga boyunda absorbens değeri 0.08-0.10 aralığına denk gelmektedir. Spektrofotometrede okutulan bu değer 0.5 Mc Farland standardı olarak kabul edilmiştir. Elde ettiğimiz bu standardın bulanıklılığı ile test mikroorganizma karışımlarının bulanıklılığı çıplak göz ile karşılaştırma yapılarak ayarlanmıştır. 0.5 Mc Farland standardı da bize mL' de 10⁸ bakteri varlığını göstermiştir (NCCLS, 1990).

Çözelti 3. Lügol Çözeltisi

İyot	1.0 g
Potasyum iyodür	2.0 g
Saf su	300.0 mL

İçerikteki maddeler tek tek tartılarak distile su içerisinde çözülmüş ve iyot ve potasyum iyodür'ün çözülmesi için ise 1 gün (24 saat) beklenmiştir (Özçelik, 1995).

Çözelti 4. Potasyum Hidroksit Solüsyonu

KOH	40.0 g
Kreatin	0.3 g
Saf su	100.0 mL

İlk önce KOH' i distile suda karıştırılarak ve soğutularak çözdürülür, sonra ise kreatin eritilir ve solüsyon hazırlanır (Özçelik, 1995).

Çözelti 5. Kovacs İndol Çözeltisi

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

Amil alkol su banyosunda aracılığı ile 60°C sıcaklıkta ısıtılarak, içerisine paradimetil amino benzaldehit ilave edilir. Tamamen eriyinceye kadar ısıtma işlemine devam edilir. Erime işlemi tamamlandığı zaman ise soğutulur, bu çözeltiye hidroklorik asit (HCl) azar azar ilave edilir. Kovacs ayırıcının rengi altın sarısı renge sahip olmalıdır. Ticari olarak hazır formda bulunan kovacs çözeltisi, buzdolabında ve karanlıkta saklanmıştır. Bu madde etkili madde üreten *Bacillus*'ların identifikasyonunda indol testi için kullanılmıştır (Tamer vd., 1989).

Çözelti 6. Metil Red pH İndikatörü

Metil red	0.1 g
Etil alkol (%96)	300.0 mL
Saf su	200.0 mL

Metil Red 0.1 g, %96' lık etil alkol 300 mL, distile su 200 mL bileşimindedir. İndikatör ise ilk önce alkol içerisinde çözülür ve sonra bu karışıma distile su ilave edilir (Uçan ve Erganiş, 2005).

Çözelti 7. %96' lık Etanol çözeltisi gram boyama reaksiyonu için kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Çözelti 8. %30' lık H₂O₂ çözeltisi, tanımlama testi olan katalaz için kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

2.1.4. Boyalar

Boya 1. Kristal Viyole

Çözelti A

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

Çözelti B

Amonyum oksalat	0.8 g
Saf su	80.0 mL

Çözelti A ve B'nin ikisi karıştırılmış ve saf su ile 1/10 oranında sulandırılarak ve filtre kağıdından geçirilip süzildükten sonra kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

Boya 2. Safranin Boyası

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

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

Boya 3. Malaşit Yeşili

Malaşit yeşili	5.0 g
Saf su	100.0 mL

Boya saf su içerisinde çözülmüş ve filtre kâğıdından geçirilip süzildükten sonra kullanılmıştır (Özçelik, 1995).

2.2. Metod

2.2.1. Endospor oluşturan basillerin İzolasyonu ve identifikasyonu

Çalışmamız için toplanmış olan havasal örneklerden izole edilen basil izolatlarının gram boyama reaksiyonu özellikleri, endospor oluşumu, katalaz ve sitrat testi, voges proskaver, indol oluşumu gözlemlenmesi, hareketlilik, anaerobik gelişme, farklı sıcaklıkta gelişme, farklı pH'da gelişme ve farklı tuz konsantrasyonunda gelişme gibi *Bacillus* cinsinin identifikasyonunda yukarıda belirtilen testler Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, kitabı temel alınarak çalışmalar yürütülmüştür (Sneath, 1986).

Gram boyama reaksiyonu: Lam üzerineince bir film tabakası halinde hazırlanan 24 saati tamamlamamış genç kültür örnekleri ilkönce Kristal Viyole boyası ile 1 dakika süre muamele edilmiştir. Sürenin sonunda boya su ile akıtılarakpreparatyıkanmıştır, Daha sonra bakteriyal film tabakası üzerine Lügol çözeltisi ilave edilerek 1 dakika bekledikten sonra, suyla ile akıtılarak preparat yıkanmıştır. 3-4 saniye alkol ile muamele edilip boyanın aktığı gözlendikten sonra su ilepreparat yıkanmıştır, yaklaşık 30-40saniye kadar safranin boyası ile muamele edildikten sonra boya su ile akıtılarak preparat yıkanmıştır. Kurumaya bırakılan preperatlar, kuruduktan sonra üzerine 1 damla immersiyon yağı damlatılarak ‘‘100’’ oküler yardımıyla mikroskobik olarak incelenmiştir. Mikroskopta yapılan incelemede kristal viyole boyasını tutup mavi-mor renkte gözüken mikroorganizmalar Gram (+) pozitif olarak kaydedilmiştir. Diğer taraftan pembe-kırmızı renkte gözlenen mikroorganizmalar ise Gram (-) negatif olarak kaydedilmiştir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Endospor boyama: Gram boyaması pozitif (+) çıkan basil izolatları yatık Nutrient Agar ekim yapılmıştır. 37°C’de 3 gün (72 saat) inkübasyonabırakılmıştır. Temiz ve birkaç kez alevden geçirilmiş temiz lamın tam ortasına küçük bir su damlası bırakılmış ve öze yardımıyla bir miktar 3 gün (72 saat) kültürden alınıp su damlası içine dairesel hareketlerle yapılarak iyice yayılmıştır. Bu şekilde hazırlanan bakteriyal film tabakası önce kurutulmuş ve daha sonra bakteriyal film üstte kalacak şekilde lam iki yada üç kez alevden geçirilerek tespit edilmiştir. Preperat kaynar su banyosu düzeneği üzerine yerleştirilerek 5 - 6 dakika süre malaşit yeşili boyası ile muamele edilmiştir. Lamdan daha küçük boyutta olucak şekilde hazırlanmış olan kurutma kağıdı yerleştirilir. Kurutma kağıdı boya çözeltisini çekerek ıslanır. Su ile yıkama yapıldıktan sonra 30 - 40 saniye kadar safranin boyası ile muamele edilmiştir. Boya ile boyanmış preparatlar su ile tekrar yıkanıp açık havada kurutulduktan sonra üzerlerine 1 damla immersiyon yağı damlatılarak ‘‘100 ‘‘ oküler yardımı ile mikroskop objektifinde incelemeleri yapılmıştır. Yapılan işlem sonrasında mikroskobik olarak incelenen mikroorganizma boyalamalarında sporlar yeşil renkli olarak, vejetatif hücreler ise pembe renkli olarak görülmüştür (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Katalaz testi: Çoğunluk ile aerobik ve fakültatif anaerobik mikroorganizmaların sahip olduğu katalaz enzimi, ortamdaki hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırıştırır. Sıvı veya katı besiyerinde geliştirilen bakteri kültürüne H₂O₂ (Hidrojen Peroksit) ilave edildiğinde, serbest oksijenin gaz kabarcıkları halinde gözlenebilmesi, hidrojen peroksitin ayrışmasını, dolayısıyla katalaz enziminin varlığını bize göstermektedir. Temiz bir lamın ortasına bir öze dolusu su konulmuştur. Öze yardımı ile 1 günlük (24 saat) kültürden bir miktar alınıp su damlası ile iyice karıştırılıp süspanse edilmiştir.

Bunun üzerine 1 öze dolusu %30' luk H_2O_2 (Hidroje Peroksit) ilave edilip preparat hafif karıştırıldığında, hava kabarcıkların çıkışının gözlemlenmesi testin pozitif (+) olduğunu göstermiştir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Sitrat testi: Sitrat testi, organizmanın tek karbon (C) kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmayacağını belirlemek amacı ile yapılmaktadır. Kültür karışımından, Simon's Sitrat Yatık Agar besiyerine öze ile çizgi ekim yapıldıktan sonra 37 °C sıcaklıkta 2-5 gün (48-120 saat) süre ile inkübasyon için bırakılır. Orijinal olarak rengi yeşil olan ve indikatör olarak %0.2 Bromo Timol Mavisi kullanılmış besiyerinde, fiziksel olarak bakıldığında besiyerinin renginin maviye dönüşmesi ve ekim hattı boyunca üreme gözlenmesi pozitif (+) sonuç olarak değerlendirilir. Fiziksel olarak bakıldığında besiyerinin rengi değişmemiş ise sonuç negatiftir(-) (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Voges Proskauer testi: 10 mL MR-VP besiyeri öze ile ekim yapılarak en elverişli sıcaklıkta 4 gün (96 saat)süre ile inkübe edilir. İnkübasyon sonrası ise üzerine 5 mL %40'lık Potasyum Hidroksit (KOH) solüsyonu ilave edilerek karıştırılır. Böylece ortamdaki diasetil asetoine okside olur. Bunun üzerine çok az miktarda α -naftol çözeltisi (0,6 mL /mL kültür süspansiyonu) damlatılarak karıştırılır. 15 dakika içinde üst kısımda fiziksel olarak bakıldığında pembeden parlak kırmızıya kadar değişen halka oluşumu pozitif (+), eğer fiziksel olarak bakıldığında halka oluşmaması ise negatif (-) reaksiyon olarak değerlendirilir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

İndol testi: İçerisinde 5 mL Triptofanbesiyeri içeren tüplere ekim yapılmış en elverişli sıcaklıkta 3 gün (72 saat) süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonrası tüplere 0.2 – 0.3 mL Kovacs ayırıcı damlatılmıştır. Fiziksel olarak tüplerin üst kısmında kırmızı renkte halka oluşumu pozitif (+) reaksiyonun, sarı-kahverengi renk oluşumu ise negatif (-) olarak değerlendirilir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Hareketlilik testi: Tüplere dağıtılan yarı katı agarlı besiyerinin, sterilizasyondan işlemi sonrasında deney tüpü içerisinde besiyerinin dik olarak katılaşp soğuması sağlanır. Test uygulanacak saf kültürden aseptik (mikroptan arındırılmış) olarak ekim iğnesi ile alınan kültür besiyerinin tam ortasından dibine 3 mm kalacak şekilde inokülasyon yapılır. Kültür 37°C sıcaklıkta 1-2 gün (24-48 saat) süre ile inkübe edilir. Hareketli olan pozitif kültürlerde, fiziksel olarak bakıldığında ekim çizgisinden yanlara doğru mikroorganizma gelişmesi olduğu görülmüştür. Hareketsiz olan kültürlerde ise sadece ekim çizgisi boyunca üreme gözlemlenmiştir (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Anaerobik gelişimin gözlemlenmesi: Hazırlanmış olan anaerobik besiyerlerine bakterilerinin ekimi yapılır, besiyerlerinde çözünmüş olarak bulunan oksijen ile kimyasal reaksiyona girerek mikroorganizmalar tarafından kullanılmasını engelleyen bir ortam sağlamasına yardımcı olan bir besiyeridir. Bakteriler için anaerob ortam sağlamak amacı ile anaerobik kavanoz içerisine bakteri ekimi yapılmış olan petriler yerleştirilmiştir daha sonra anaerobik kavanoz 48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Temiz, 2000; Uçan ve Erganiş, 2005).

Farklı sıcaklıklarda gelişme testi: Basil izolatları Nutrient Broth sıvı besiyerine %2 oranında eklenerek 5°C, 30°C, 40°C ve 50 °C sıcaklıklarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonunda fiziksel olarak bakıldığında gelişme gösterenler ise pozitif (+), göstermeyenler ise negatif (-) olarak işaretlenmiştir (İşleroğlu vd., 2008).

Farklı pH'larda gelişme testi: Basil izolatları 5M ve 0,01 M HCl ve NaOH ile pH'ları 5.7 ve 6.8'e ayarlanan Nutrient Broth sıvı besiyerlerine % 2 oranında kültürden ilave edilip 37°C sıcaklıkta 1 gün (24 saat) süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonucunda gelişme gösterenler pozitif (+), göstermeyenler ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Sneath, 1986; İşleroğlu vd., 2008).

Tuza dayanıklılık testi: Çalışmamız sırasında Basil suşlarının hangi tuz yoğunluğunda gelişebildiklerini belirlemek amacı ile % 2.0, 5.0, ve 7.0 tuz yoğunluğu içeren Nutrient Broth' a % 2 oranında taze kültürden aşılanıp 37°C sıcaklıkta 1-2 gün (24 – 48 saat) süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda ise gelişme gösteren izolatlar pozitif (+) , göstermeyen izolatlar negatif (-) olarak değerlendirilmiştir (Sneath, 1986; İşleroğlu vd., 2008).

2.2.2. Biyokimyasal özelliklere dayalı identifikasyon

İdentifikasyon işlemi, biyokimyasal özellikleri esas alan VITEK sisteme ait *Bacillus* biyokimyasal kartı (Biomeriux VITEK, Hazehwood, MO, USA) ile yapılmıştır. Bu identifikasyonla izolatlara çeşitli biyokimyasal testler uygulanmıştır. Bu testler, negatif kontrol, galaktoz, amigdalin, sorbitol, oleandomycin, trehaloz, sukroz, arabinoz, inulin, N-asetil D-glukozamin, sodyum asetat, tetrazolyum kırmızısı, ksilol, riboz, amylopektin, arabitol, tagatose, mannitol, maltoz, potasyum thionat, polyamidohygro streptin, glukoz, rafinoz, trehaloz, %7 NaCl, nalidixic asit, inositol, salisin, platinose, mandelik asit, eskulin olmak üzere 31 adetten oluşmaktadır. İdentifikasyonu yapılacak izolatların saf kültürlerini elde etmek amacıyla Triptik Soy Agar'a ekimleri yapılmıştır. Bu plaklar 30°C sıcaklıkta 1gün (24 saat) süre ile inkübe edilmiştir. Saf kolonilerden 0,5 Mc Farland'a karşılık gelen yoğunlukta hücre süspansiyonu hazırlanıp VITEK kartlarına inokülasyonu sağlanmış ve inkübatöre yerleştirilmiştir.

24 saat sonunda optik okuyucu sayesinde alınan sonuçlar VITEK bakteri veri tabanındaki kayıtlara göre değerlendirilmiştir.

2.2.3. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin tespit edilmesi

Elde etmiş olduğumuz bakteri izolatları için 7 (yedi) farklı ağır metalin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları, agar dilusyon yöntemi ile belirlenmiştir (NCCLS, 1997; Masaoka ve ark., 2003). Kullanılmış olan 7 (yedi) farklı (Krom (Cr), Kurşun (Pb), Bakır (Cu), Kadmiyum (Cd), Nikel (Ni), Çinko (Zn) ve Kobalt (Co)) ağır metallerinin Nutrient Agar içerisine 0,0625 mM/mL'den 8 mM/mL'e kadar iki katlı olmak üzere seri dilusyonları hazırlanmıştır. Bunun için aşağıdaki ağır metal tuzları kullanılmıştır.

- 1) $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 2) $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 3) $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 4) PbCl_2
- 5) $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
- 6) $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 7) $\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Ağır metal çözeltileri şırınga filtrelerden geçirilerek, otoklavdan çıkan ve soğuyan besiyerleri içerisine eklenmiştir. Ağır metal içeren besiyerlerinin 2-3 gün (48-72 saat) oda sıcaklığında kurumaları için beklenmiştir. Ağır metal testi yapılacak olan basil izolatları Nutrient Broth' besiyerinde aktif hale getirilmişlerdir. Mc Farland 0,5 bulanıklılığına göre ayarlanmış olan taze basil süspansiyonundan 20 µL damlatılarak besiyerlerine ekim yapılmıştır. Ekimi yapılan petriler 1- 2 gün 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon işlemi sonrasında herhangi üremenin gözlemlenmediği en düşük ağır metal konsantrasyonu Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değeri olarak tespit edilmiştir (NCCLS, 1990).

2.2.4. Antibiyotik dirençliliklerinin tespit edilmesi

Elde ettiğimiz basil izolatlarının antibiyotik dirençlilik testi ise, agar disk difüzyon yöntemi (Krumperman, 1985) kullanılarak tespit edilmiştir. Antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi için toplam 7 (yedi)farklı antibiyotik disk kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz antibiyotikler; Eritromisin (15µg), Kloromfenikol (30 µg), Kanamisin (30 µg), Ampisilin (10 µg), Oksasilin (1 µg), Vankomisin (30 µg) ve Gentamisin (10 µg) şeklindedir.

Steril petri kaplarına yaklaşık olarak 25 mL kadar Nutrient Agar besiyerinden dökülmüş ve besiyerlerikuruması için 2-3 gün (24-48 saat) kadar oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde

edilen basil izolatları Nutrient Broth'da zenginleştirilmiştir. Taze kültür süspansiyonu mL'de 10^8 olacak şekilde steril fizyolojik su ilave edilerek Mc Farland 0,5 bulanıklılığına göre ayarlanmıştır. Test bakterileri steril eküvyon çubuk yardımı ile besiyerinin tüm yüzeyine iyice sürülmüştür. Daha sonra antibiyotik diskler tek tek petri yüzeyine yerleştirilmiştir. Petriler 2-3 saat kadar oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 gün (24 saat) 37°C sıcaklıkta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda petrilerdeki her bir diskin çevresinde oluşan inhibisyon zonlarının çapı kumpas yardımı ile ölçülmüştür (Krumperman, 1985).

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

Havasal ortamdan elde ettiğimiz Basil izolatlarının sekonder (ikincil) metabolit üretim aktivitesini belirlemek için agar blok yöntemi kullanılmıştır. Sekonder (ikincil) metabolit üretiminde kullanılan mikroorganizmalar 2 adet olup gram negatif bakterilerdir. Kullanılan 2 test mikroorganizmaları olarak *Legionella pneumophila* serogrup 2-15 ve *Legionella* spp. kullanılmıştır.

Agar blok yöntemine göre antimikrobiyal (mikroorganizmaları öldüren ya da mikroorganizmaların gelişimini baskılayan) faaliyeti belirlemek için petri kabı içerisine Nutrient Agar besiyerinden 25 mL her bir petri kabına dökülmüştür. İzole edilen basil izolatları petri kabının her yerine öze yardımı ile sürülmüştür. 37°C sıcaklıkta 3 gün (72 saat) inkübe edilmiş ve inkübasyon sonunda petrinin yüzeyindeki mikroorganizmalar steril bir lam yardımı ile besiyerinin yüzeyinden sıyrılmıştır. Petri kabındaki agarın yüzeyi 9 mm çapındaki mantar delicisi (tirbişön) aracılığı ile kesilerek, böylelikle agar bloklar elde edilmiştir (Ichikawa ve ark., 1971). Çalışmamızdaki bakteri kültürlerini aktifleştirmek için stok kültürlerden alınan bakteri izolatları ayrı ayrı 4-5 mL nutrient broth'da karışım haline getirilerek, 18 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda ise bakteri süspansiyonu mL de 10^8 olacak şekilde steril fizyolojik su ilave edilerek Mc Farland 0.5 bulanıklılığına göre test mikroorganizmaları hazırlanmıştır. Bakteriler için 25mL Nutrient Agar besiyeri petri kabına dökülmüş ve agarın yüzeyi 35°C sıcaklıkta 2-3 saat süre etüvde kurutulmuştur. Test mikroorganizmaları agarın bütün yüzeyine eküvyon çubuk yardımı ile iyice sürülmüş ve daha sonra agar bloklar yerleştirilerek 2 saat kadar buzdolabında $+4^{\circ}\text{C}$ ' de bekletildikten sonra 37°C sıcaklıkta 1 gün (24 saat) boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında petri kaplarında oluşan inhibisyonzonları mm olarak kumpas yardımı ile ölçümleri yapılmıştır.

3.BULGULAR

3.1. Endospor Oluşturan Basillerin İzolasyonu

Çalışmamızdaki havasal örnekler Balıkesir'in Bigadiç ilçesinden alınmıştır. On dört (14) adet endospor oluşturan Basil izolasyonu yapılmıştır. Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz izolatlar endospor oluşturan *Bacillus* olarak kabul edilebilmesi için aerob koşullarda endospor oluşumları değerlendirilmiş aynı zamanda endospor oluşturan izolatların ise gram boyama reaksiyonları ile katalaz testi aktiviteleri incelenmiştir. Çalışmamızın sonucunda elde edilen tüm izolatların mikroskopik incelemesi sonucunda gram reaksiyonlarının pozitif (+) olduğu ve tüm izolatların mikroskopik incelemesi sonucunda endospor oluşturdıkları görülmüştür.

Elde edilen bu kültürlerin tanımlanması, ağır metal dirençliliği, antibiyotik dirençliliği ve sekonder (ikincil) metabolit üretim potansiyelleri araştırılıp değerlendirilmiştir.

3.2. *Bacillus* Suşlarının İdentifikasyon Test Sonuçları

Tanımlanması yapılan 14(on dört) adet Basil kültürüne; katalaz üretimi aktivitesi, sitrat kullanım aktivitesi, voges proskover, metil red, indol oluşum reaksiyonu, hareketlilik testi, anerobik ortamda 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 ve %7), testlerini içeren fizyolojik ve biyokimyasal testler yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Basil kültürlerine uygulanmış olan biyokimyasal testler sonucunda; bütün kültürlerin katalaz testine pozitif sonuç verdiği, sitrat testine ise E4, E7, E11, E12 pozitif sonuç verdiği diğer kültürlerin ise negatif sonuç verdiği, voges proskaver testine E4 ve E5 izolatının negatif, diğer tüm izolatların pozitif sonuç verdiği, indol testine tüm izolatların negatif sonuç verdiği, hareketlilik testinde E2, E3, E4, E8, E9, E11, E12, E13, E14 izolatının pozitif, diğer izolatların negatif sonuç verdiği, anaerobik gelişme testinde E1 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği bulunmuştur.

Sıcaklık istekliliğinde 30°C, 40°C, 50°C sıcaklıkta tüm izolatların pozitif sonuç verdiği, 55°C sıcaklıkta E7 ve E9 izolatının pozitif, diğer tüm izolatların negatif sonuç verdiği, 5°C sıcaklıkta ise tüm izolatlarının negatif sonuç verdiği bulunmuştur.

PH 5.7 testinde, E4 izolatları negatif, diğer tüm izolatlar ise pozitif sonuç vermiştir. PH 6,8 testinde, tüm izolatlar ise pozitif sonuç vermiştir.

%2 NaCl testinde E12 izolatlarının negatif diğer tüm izolatların ise pozitif sonuç verdiği, %5 NaCl testinde E2,E4,E5 ve E11 izolatlarının negatif diğer tüm izolatların pozitif sonuç verdiği, %7 NaCl testinde ise E2,E4,E5 ve E11 izolatlarının negatif diğer tüm izolatların pozitif sonuç verdiği bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Basillerin biyokimyasal test sonuçları.

		E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14
Katalaz üretimi		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sitrat kullanımı		-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
Vogesproskover		+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
İndol oluşumu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hareket		-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Anerobik gelişme		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Çeşitli sıcaklıkta gelişme	5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	55°C	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	pH 5,7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	pH 6,8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Farklı tuz konsantrasyonu nda gelişme	%2 NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	%5 NaCl	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	%7 NaCl	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Çizelge 3.2. Basillerin VITEK sistemine göre test sonuçları.

Yapılan testler	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14
1. Negatif Kontrol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Galaktoz	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3. Amigdalın	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. Sorbitol	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
5. Oleandomycin	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
6. Trehaloz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7. Sukroz	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8. Arabinoz	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
9. Inulin	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
10. N-asetil D-glukozamin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
11. Sodyum Asetat	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12. Tetrazolyum Kırmızısı	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
13. Ksilol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
14. Riboz	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
15. Amylopektin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16. Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17. Tagatose	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
18. Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19. Maltoz	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
20. Potasyum thionat	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
21. Polyamidohygro streptin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22. Glukoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23. Rafinoz	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
24. Trehaloz	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
25. %7 NaCl	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26. Nalidixic asit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27. Inositol	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
28. Salisin	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29. Platinose	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
30. Mandelik asit	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31. Eskulin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Basil streinlerine uygulanan VITEK testleri sonucunda; galaktoz testinde E2, E4, E6 ve E12 izolatlarının pozitif diğer tüm izolatların negatif sonuç verdiği tesbit edilmiştir. Amigdalın testinde E1, E2 ve E3 izolatlarının pozitif diğer izolatların negatif sonuç verdiği, sorbitol testinde E1, E3, E4, E6, E7 ve E10 izolatlarının pozitif diğer izolatların negatif sonuç verdiği bulunmuştur.

Oleandomycin testinde E7 ve E11 izolatlarının pozitif, diğer izolatların negatif sonuç verdiği, trehaloz testinde tüm izolatların negatif sonuç verdiği, sükroz testinde E5 izolatlarının

negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği, arabinoz testinde E5, E13 ve E14 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği, inulin testinde E7, E8, E9, E11, E12, E13 ve E14 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği görülmüştür.

N asetil glukazamin testinde E9, E13 ve E4 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; sodyum asetat testinde E2 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; tetrazolyum kırmızısı testinde E4, E5, E6 ve E10 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; ksilol testinde E5, E10, E13 ve E14 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; riboz testinde E5, E10, E13 ve E14 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği tesbit edilmiştir. Amylopektin testinde izolatların tümünün negatif sonuç verdiği; arabitol testinde izolatların tümünün negatif sonuç verdiği; tagatose testinde E7, E8, E9, E11, E12, E13 ve E14 izolatlarının pozitif, diğer izolatların negatif sonuç verdiği; mannitol testinde E5 izolatının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; maltoz testinde E5, E9, E13 ve E14 izolatının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; potasyum thionat testinde E10 izolatının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; polyamidohygro streptin testinde E2 izolatının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği analiz edilmiştir.

Glukoz testinde bütün izolatların pozitif sonuç verdiği; rafinoz testinde E1, E2, E3, E4, E6 ve E12 izolatlarının pozitif, diğer izolatların negatif sonuç verdiği; trehaloz testinde E5 ve E9 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; %7 NaCl testinde E2 ve E5 negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; nalidixic asit testinde bütün izolatların negatif sonuç verdiği; inositol testinde E1, E3, E6, E7, E10 ve E11 izolatlarının pozitif, diğer izolatların negatif sonuç verdiği; salisin testinde E4 ve E5 izolatlarının negatif, diğer izolatların pozitif sonuç verdiği; platinose testinde E1, E2, E3, E4, E6, E7 ve E10 izolatlarının pozitif, diğer izolatların negatif sonuç verdiği; mandelik asit testinde izolatların tümünün pozitif sonuç verdiği; eskülin testinde mandelik asit testinde izolatların tümünün pozitif sonuç verdiği bulunmuştur.

Çizelge 3.3. VITEK veBiyokimyasal özelliklerine göre izolatların identifikasyonu.

Suşlar	İsimleri
E1	<i>B. subtilis</i>
E2	<i>B. polymyxa</i>
E3	<i>B. subtilis</i>
E4	<i>B. megaterium</i>
E5	<i>B. brevis</i>
E6	<i>B. subtilis</i>
E7	<i>B. licheniformis</i>
E8	<i>B.pumilus</i>
E9	<i>B.pumilus</i>
E10	<i>B.subtilis</i>
E11	İdentifiye edilememiştir
E12	İdentifiye edilememiştir
E13	<i>B. pumilus</i>
E14	<i>B. pumilus</i>

Çizelge 3.3' e bakıldığında VITEK ve biyokimyasal testlere göre E1, E3, E6 ve E10 izolatının *B.subtilis* olduğu, E2 izolatının *B. polymyxa* olduğu, E4 izolatının *B. megaterium* olduğu, E5 izolatının *B. brevis* olduğu, E7 izolatının ise *B. licheniformis* olduğu, E8, E9, E13 ve E14 izolatının *B.pumilus* olduğu, tespit edilmiştir. E11 ve E12 izolatları identifiye edilememiştir.

3.3. Endospor Oluşturan Basillerin Ağır Metal Dirençlilik Düzeylerinin Belirlenmesi

Yapmış olduğumuz bu çalışmada havasal örneklerden elde edilmişolan basillerin (endosporlu) ağır metal dirençlilik düzeyleri agar dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenebilmesindepozitif kontrol referansı olarak *B. subtilis* NRRL B-209 saf kültürü kullanılmıştır. *B. subtilis* NRRL B-209 referans suşunun sahip olduğu Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri Çizelge 3.4.' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Ağır metal dirençlilik düzeyi *B.subtilis* NRRL B-209 için (mM/mL).

Ağır Metal	MİK Değeri
Kurşun	4
Bakır	1
Krom	2
Kadmiyum	0,0625
Nikel	1
Çinko	2
Kobalt	1

Çalışmamızda ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenebilmesi için 7 farklı ağır metal tuzları [$\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, PbCl_2 , $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$,) ve $\text{Co}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] kullanılmıştır. Çalışmamızdaki izole edilen basil kültürlerinin ağır metal dirençlilik düzeylerinin belirlenmesinde agar dilüsyon yöntemine göre gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu(MİK)değerleri aşağıda Çizelge 3.5.' de verilmiştir.

Çizelge 3.5. İzolatların ağır metallere karşı gösterdikleri MİK değerleri (mM/mL).

	Krom	Kurşun	Bakır	Kadmiyum	Nikel	Çinko	Kobalt
E1	2	4	4	0.125	1	0.5	1
E2	2	4	4	0.25	1	1	1
E3	2	4	4	0.125	1	0.5	1
E4	2	2	2	0.25	1	1	1
E5	2	4	2	0.125	1	0.5	1
E6	1	4	4	0.25	1	0.5	1
E7	2	4	2	0.25	1	1	1
E8	1	4	2	0.25	1	1	0.5
E9	2	2	4	0.25	1	1	1
E10	1	2	4	0.25	1	1	1
E11	2	2	2	0.125	1	1	1
E12	2	2	2	0.25	1	1	0.5
E13	2	4	2	0.25	1	1	1
E14	2	4	4	0.25	1	1	1

E1 (*B.subtilis*) izolatının çinko, ağır metallere karşı gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile karşılaştırıldığı zaman düşük olduğu görülürken, aynı izolatın kobalt, krom, kurşun, nikel, izolatın ağır metallerine karşı gösterdiği

MİK değeri referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu bulunmuştur. E1 izolatu kadmiyum ve bakır ağır metalleri sonuçlarının referansımıza göre yüksek çıktığı görülmüştür.

E2 (*B. polymyxa*) izolatinin krom, nikel, kurşunve kobalt ağır metaline gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile karşılaştırıldığında aynı değerde olduğu bulunmuştur. E2 izolatu kadmiyum ve bakır ağır metal sonuçlarının; referansımıza göre yüksek olduğu görülmüştür.

E3 (*B. subtilis*) izolatu çinko ağır metaline gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile karşılaştırıldığı zaman düşük olduğu görülürken, aynı izolatin kurşun, krom, kobalt ve nikel ağır metaline karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu bulunmuştur. E3 izolatinin bakır ve kadmiyum ağır metal sonuçlarının referansımıza göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E4 (*B. megaterium*) izolatinin çinko ve kurşun ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile karşılaştırıldığı zaman düşük olduğu görülürken, aynı izolatin krom, kobalt ve nikel ağır metaline karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman aynı değerde olduğu bulunmuştur. E4 izolatinin bakır ve kadmiyum ağır metal sonuçlarının; referansımıza göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E5 (*B. brevis*) izolatinin çinko, ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans kültür ile kıyaslandığı zaman düşük olduğu gözlemlenir iken, aynı izolatin krom, kurşun nikel ve kobalt ağır metaline karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman ise aynı değerde olduğu bulunmuş olup. E5 izolatinin bakır ve kadmiyum metal sonuçlarının referansımıza göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E6 (*B. subtilis*) izolatinin krom ve çinko ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile kıyaslandığı zaman düşük olduğu görülür iken, aynı izolatin kurşun, nikel ve kobalt ağır metaline karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman ise aynı değerde olduğu bulunmuş olup. E6 izolatinin bakırve kadmiyum ağır metal sonuçlarının referansımıza göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E7 (*B. licheniformis*) izolatinin çinko, ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile kıyaslandığı zaman düşük olduğu

görülür iken, aynı izolatin krom, kurşun, kobalt ve nikel ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile karşılaştırıldığı zaman aynı değerde olduğu gözlemlenmiştir. E7 izolatinın bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referans kültüre göre ise yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E8 (*B.pumilus*) izolatinın krom, çinko ve kobalt ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile karşılaştırıldığı zaman düşük olduğu görülür iken, aynı izolatin kurşun, nikel ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman ise aynı değerde olduğu gözlemlenmiştir. Aynı izolatin ise bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referans kültüre göre yüksek çıktığı bulunmuştur.

E9 (*B.pumilus*) izolatinın kurşun, çinko ağır metallerine karşı gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile kıyaslandığında düşük olduğu görülür iken, aynı izolatin krom, nikel ve kobalt ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman aynı değerde olduğu gözlemlenmiştir. E9 izolatinın bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referans kültüre göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E10 (*B.subtilis*) izolatinın krom, kurşun ve çinko ağır metallerine karşı gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile kıyaslandığı zaman düşük olduğu görülür iken, aynı izolatin ise nikel, kobalt ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman aynı değerde olduğu gözlemlenmiştir. E10 izolatinın bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referans kültüre göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E11 (-) izolatinın kurşunve çinko ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile kıyaslandığı zaman düşük olduğu görülür iken, aynı izolatin krom, nikel ve kobalt ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman aynı değerde olduğu gözlemlenmiştir. E11 izolatinın bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referans kültüre göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E12 (-) izolatinın kurşun, çinko ve kobalt ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile kıyaslandığı zaman düşük olduğu görülür iken, aynı izolatin ise krom, nikel ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman aynı değerde olduğu

gözlemlenmiştir. E12 izolatının bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referans kültüre göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

E13 (*B. pumilus*) izolatının çinko ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile karşılaştırıldığı zaman düşük olduğu görülürken, aynı izolatın krom, kurşun, nikel ve kobalt ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığında aynı değerde olduğu bulunmuştur. E13 izolatının bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referansımıza göre yüksek değerde çıktığı gözlemlenmiştir.

E14 (*B. pumilus*) izolatının çinko ağır metallerine gösterdikleri Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin referans suş ile kıyaslandığı zaman düşük olduğu görülürken, aynı izolatın krom, kurşun, nikel ve kobalt ağır metallerine karşı gösterdiği Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri referans suş ile kıyaslandığı zaman aynı değerde olduğu gözlemlenmiştir. E13 izolatının bakır ve kadminyum ağır metal sonuçlarının referans kültüre göre yüksek çıktığı gözlemlenmiştir.

Çizelge 3.6. İzole edilen basillerin ağır metal toleranslılıklarının yüzdelik 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	%	
Nikel	14	-	-	-		14	-*	-	-	-	0	0.0	
Çinko	14	-	-	-	4	10	-	-*	-	-	0	0.0	
Kobalt	14	-	-	-	2	12	-*	-	-	-	0	0.0	
Krom	14	-	-	-	-	3	11	-*	-	-	0	0.0	
Kurşun	14	-	-	-	-	-	5	9	-*	-	0	0.0	
Bakır	14	-	-	-	-	-	7*	7	-	-	14	100	
Kadminyum	14	-	4*	10	-	-	-	-	-	-	14	100	
*Ağır metallerin referans suş Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerleri													

Elde edilmiş izolatların referans kültür ile karşılaştırıldığı zaman, ağır metallere karşı yüzde toleranslılık değerlerine bakıldığında; %100 bakır ve kadminyum' a karşı olduğu tespit edilmiştir. Diğer ağır metallere karşı ise herhangi bir direnç çalışmamızda gözlemlenmemiştir.

3.4. Endospor Oluşturan Basillerin Antibiyotik Dirençlilik Düzeyleri

Havasal örneklerden elde etmiş olduğumuz basil izolatlarının yedi antibiyotiğe karşı dirençlilik düzeyleri incelenmiştir. Antibiyotik dirençlilikleri ise NCCLS'ye göre yorumlanmıştır.

Çizelge 3.7. NCCLS'ye göre yorumlanan gram pozitif (+) - aerobik bakteriler için antibiyotiklerin dirençli (R) , orta derecede duyarlı (ODD) ve duyarlılık (D)değerleri.

Antibiyotik	Disk içeriği (µg)	R (Dirençli)	ODD (Orta Derecede Duyarlı)	D (Duyarlı)
Eritromisin	15	13≥	14-17	≤18
Kloromfenikol	30	12≥	13-17	≤18
Kanamisin	30	13≥	14-17	≤18
Ampisilin	10	13≥	14-16	≤17
Oksasilin	1	10≥	11-15	≤16
Vankomisin	30	14≥	15-18	≤19
Gentamisin	10	12≥	13-14	≤15

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

İzolat	Testte Kullanılmış Olan Antibiyotikler						
	Eritromisin	Kloremfenikol	Kanamisin	Ampisilin	Oksasilin	Vankomisin	Gentamisin
E1	33	30	30	13	-	22	30
E2	30	25	25	17	-	25	30
E3	40	30	30	14	-	21	35
E4	30	23	23	-	-	24	30
E5	32	30	30	16	-	25	30
E6	30	30	30	15	-	26	30
E7	7	26	26	9	-	27	30
E8	30	25	25	16	8	21	30
E9	35	26	26	10	-	27	32
E10	24	20	20	-	-	21	30
E11	28	25	25	9	-	21	30
E12	25	22	22	11	-	20	28
E13	30	25	25	15	-	21	32
E14	30	25	25	16	-	25	33
(-); Antimikrobiyal aktivite gözlemlenmemiştir.							

Havasal örneklerden izole edilen toplam 14 (on dört) adet basilin antibiyotik dirençlilik seviyeleri Çizelge 3.8’ de verilmiştir.

Çizelge 3.9. Havasal örneklerden elde edilen Basil izolatlarının antibiyotik dirençlilik sonuçları.

Antibiyotik	n	R	ODD	D	%R	%ODD	%D
Eritromisin	14	1	0	13	7.1	0	92.8
Kloromfenikol	14	0	0	14	0	0	100
Kanamisin	14	0	0	14	0	0	100
Ampisilin	14	7	6	1	50.0	42.9	7.1
Oksasilin	14	14	0	0	100	0	0
Vankomisin	14	0	0	14	0	0	100
Gentamisin	14	0	0	14	0	0	100
R; Dirençli. ODD; Orta derecede duyarlı. D; Duyarlı.							

Yapmış olduğumuz bu çalışma sonucunda disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik dirençliliğinin oksasilin ve ampisilin antibiyotiklerine karşı olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen Basil izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri 7 (yedi) farklı antibiyotiğe karşı agar disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir ve ilgili veriler Çizelge 3.9’ da sunulmuştur. Çizelge 3.9’ da elde edilmiş olan basillerin en yüksek antibiyotik dirençlilik düzeylerini en yüksek seviyeden en düşük seviyeye doğru sıraladığımız zaman ise; %100 oksasilin, %50 oranında ise ampisiline ve %7.1 oranında eritromisine karşı dirençli olduğuyaptığımız bu çalışmada gözlemlenmiştir. Havasal örneklerden elde edilen Basil izolatlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ele alındığı zaman ise; kloromfenikol, kanamisin, vankomisin ve gentamisine karşı %100, eritromisine ise %92.8 oranında ise duyarlı olduğu yapılan bu çalışmada gözlemlenmiştir.

3.5.Basillerin Sekonder (İkincil) Metabolit Üretimi

Havasal örneklerden elde etmiş olduğumuz Basil izolatlarının sekonder (ikincil) metabolit üretimi ise agar blok yöntemi ile gram negatif (-) bakterilerden *Legionella pneumophila* serogrup 2-15, *Legionella* spp. mikroorganizmalarına karşı değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.10. Havasal örneklerden elde etmiş olduğumuz Basil izolatlarının agar blok yöntemi ile test mikroorganizmalarınakarşı oluşturdukları inhibisyon zon çapları (Ø 9mm).

	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10	E11	E12	E13	E14
Gram Negatif (-) Bakteri														
<i>L. pneumophila</i> Sg 2-15	31	30	29	17	31	28	14	17	13	14	17	15	23	22
<i>Legionella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10-15mm: zayıf antimikrobiyal aktivite 														
16-25mm: orta derecede antimikrobiyal aktivite, 														
25-31mm: Yüksek antimikrobiyal aktivite 														

Çizelge 3.10' a bakıldığı zaman havasal örneklerden elde edilmiş olan 14 (on dört) adet basil izolatının *Legionella* spp. mikroorganizmasına karşı herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye rastlanmamıştır. Basil izolatlarının ise *L. pneumophila* serogrup 2-15 bakterisine karşı ise sekonder (ikincil) metabolit üreterek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür. Çizelge 3.10' a bakıldığı zaman ise 10-15 mm zayıf antimikrobiyal aktiviteye sahip olan E7 (*B. licheniformis*), E9 (*B. pumilus*), E10 (*B. subtilis*) ve E12 (identifikasyon edilememiştir.) basil örnekleri olduğu gözlemlenmiştir.

Basil izolatlarının 16-20mm arasında orta derecede antimikrobiyal aktiviteye sahip olanlar ise E4 (*B. megaterium*), E8 (*B. pumilus*), E13 (*B. pumilus*) ve E14 (*B. pumilus*), E11 izolatı ise identifiye edilemeyen basil olduğu tesbit edilmiştir.

Basil izolatlarının 25-31mm arasında yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olanlar ise E1 (*B. subtilis*) , E3 (*B. subtilis*) ve E6 (*B. subtilis*), E2 (*B. polymyxa*), E5 (*B. brevis*) olduğu tespit edilmiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Mikroorganizmaların bilindiği üzere yaşam alanlarının başında toprak ve su gelmektedir. Mikroorganizmaların asıl yaşam alanları hava olarak kabul edilmemekle birlikte mikroorganizmaların başka ortamlara taşınmasında ara bir yaşam ortamı olarak kabul edebiliriz. Solumakta olduğumuz havada aynı zamanda, nefes alabilmemiz ve hayatta kalabilmemiz için gerekli bir olan bazı maddeleri içerir iken, küçük büyük partiküller halinde yabancı bazı maddeleri ve mikroorganizmaları da beraberinde barındırmaktadır. Ortamda bulunan havada serbest şekilde veya maddelere bağlı olarak bulunan bu mikroorganizmalar aynı zamanda bir başka deyişle Bioaerosol olarak da adlandırılmaktadırlar. En önemlisi ise vegetatif hücreler bakteri sporlarına, göre ortamda daha uzun süre canlı kalabilmeleri için, özellikle gıda ve sağlık sektörü açısından risk teşkil etmektedirler (<http://www.diatek.com.tr>).

Çalışmamızda Balıkesir ilinin Bigadiç ilçesinin 5 farklı yerinden toplanmış olan, havasal örnekler kültür yöntemi ile alınmıştır. Kültür tekniğinde ise örnekleme yapabilmek için özel bir ekipmana gerek yoktur ve uygulanması da oldukça kolaydır. Havada bulunan mikroorganizmalar canlılık özelliklerini sürdürebilirler fakat ağır stres altında olmaları sebebi ile koloni oluşturma yeteneklerini kaybetmiş olabilirler. İşte bu sebepten dolayı tahmin edilen seviyenin altında koloni sayısı ile karşılaşılabilir (Heidelberg ve ark., 1997). Havasal örneklerden elde edilenaerobik endospor oluşturan *Bacillus* izolatları, basit, kolay ve ucuz bir yöntem olduğundan dolayı kültür yöntemi tercih edilerek izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. *Bacillus* cinsi mikroorganizmalar aerobik (ya da fakültatif aerobik) koşullarda endospor oluşturan, gram pozitif çubuk şeklinde bakterilerdir. Basillerin endospor yapıları sayesinde, uygun ortam şartlarında uzun yıllar canlılık özelliğini korumaları ve bu nedenle her ortam koşullarında canlılık özelliği göstermesinden dolayı önem taşıyan mikroorganizma grubu içerisinde yer alırlar. Bu bakteri grubunu çalışmamızda seçmemizdeki en büyük etken; hava ortamının olumsuz şartlarında dahi canlılıklarını muhafaza edebilmeleri ve uygun ortam koşullarında canlılıklarını devam ettirebilme özelliğine sahip olmalarından dolayıdır.

Yapılmış olan bu çalışmamızda izole ettiğimiz 14 (on dört) adet Basil izolatının tanımlama işlemini yapabilmek için; sitrat kullanımı, katalaz üretimi, indol oluşumu testi, voges proskover, hareket testi, anerobik koşullarda gelişme, sıcaklık toleranslılığı (5°C, 10°C, 30°C, 40°C, 50°C, 55°C), pH toleranslılığı (pH 5.7, pH 6.8) ve NaCl toleranslılığı (%2 NaCl, %5 NaCl, %7 NaCl, %10 NaCl) testlerini içeren morfolojik ve biyokimyasal testleri yapılmıştır (Çizelge 3.1) ayrıca VITEK otomatik identifikasyon (tanımlama) sistemi ile 14 (on dört) adet izolatın türleri tespit edilmiştir (Çizelge 3.2).

Geleneksel yöntemler morfolojik özelliklere dayanır ve iki dallı anahtar kullanılır, ancak bu büyük oranda yerini bilgisayara dayalı sistemlere bırakmıştır. Bunlardan bir tanesi de VITEK (biyokimyasal test sistemi) bu tür sistemde aerobik şartlarda 31 klasik fenotipik testlerden oluşan yaygın kullanılan sistemlerden bir tanesidir. Çizelge 3.3' e bakıldığında VITEK ve biyokimyasal testlere göre 4 izolatın (E1, E3, E6 ve E10) *B.subtilis*, 1 izolat (E2) *B.polymyxa*, 1 izolat (E4) *B. megaterium*, 1 izolat (E5) *B. brevis*, 1 izolat (E7) *B. licheniformis*, 4 izolatın (E8, E9, E13 ve E14) *B.pumilus* olduğu tespit edilmiştir. 2 izolat (E11 ve E12) ise tanımlanamamıştır.

Basillerin esas yaşam alanı topraktır. Toprak, yerleşme yeri, besin gereksinimi ve yaşam ortamı olarak biyosferin en önemli unsurlarından birisidir. Doğal unsurlardan biri olan toprak ise; tortul ve kayaçların, organik atıkların uzun bir süreç içinde birçok kimyasal, fiziksel, ve biyolojik olaylar ve etkenler ile parçalanıp ayrışması sonucu meydana gelmektedir. Bunun için toprağın dolaylı veya dolaysız olarak kirlenmesi, canlılar açısından son derece önemli sorunları da beraberinde getirmektedir. Ancak günümüzde endüstriyel ve diğer nedenlerden dolayı özellikle topraklarda, başta ağır metal olmak üzere birçok kirlilik unsurları ile karşı karşıya gelinmiştir (Ting ve ark., 1991).

Toprakta yaşayan mikroorganizmaların bir kısmı toprağın yapısı itibarı ile ya da sonradan endüstriyel atıklar nedeniyle metalle kirlenmiş olabilirler bu nedenden dolayı ortamda bulunan mikroorganizmalarda kendilerince bazı direnç mekanizmaları geliştirerek ağır metal toksisitelerini belirli bir konsantrasyona kadar bertaraf etme yeteneği kazanmışlardır. Bu mekanizmalara bakıldığında mikroorganizmaların biyolojik tepkimelerle bazı metal bileşiklerini daha az toksik hale getirebildikleri, metal iyonlarını solüsyondan uzaklaştıran intraselüler polimerler sentezleyebildikleri, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını tutabilen proteinler bulundurdıkları, hücre yüzeylerinde metal iyonlarını çözülemez metal kompleksleri halinde çöktürebilen mekanizmalara sahip oldukları ve difüzyon mekanizmasını kullanarak metal bileşiklerini hücre dışına atabildikleri bilinmektedir. Ancak bu tolere etme yeteneği de belirli bir konsantrasyona kadar geçerliliğini sürdürebilmektedir (Ehrlich, 1997). Metal dirençlilik sistemlerinin büyük bir kısmını aktif transport veya taşıma sistemleriyle metalin mikroorganizmadan uzaklaştırılması oluşturmaktadır. Mikroorganizmalar toksik metalleri sitoplazmalarından uzaklaştırmak için aktif transportu kullanırlar. Non-esansiyal metaller normal olarak besin taşıma sistemleri ile hücre içine girmektedir. Fakat hızlı bir şekilde hücre dışına taşınmaktadır. ATPaz bağımlı veya ATPaz bağımlı olmayan bu taşıma sistemleri katyon veya anyonlara karşı oldukça spesifiktir (Nies ve Silver, 1995).

Bakterilerin tolerans yeteneklerini kaybettikleri dolayısı ile gelişimlerinin engellendiği en düşük metal konsantrasyonu (yoğunluğu) “Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu” MİK olarak isimlendirilir. Ağır metale dirençli bakterilerinyaşamsal açıdan ise önemi büyüktür. Çünkü metal yönünden kirliliği bulunan ortamlarda ise ancak metal tolerans yeteneği yüksek olan organizmalar yaşayabilmektedir. Bu nedenden dolayı ile bu yaşam alanlarında doğal madde döngülerinin devamı organizmaların metal toleranslılık güçlerine bağlıdır. Dolayısı ile böyle yerlerdeki madde döngülerinin durması ile canlılığın azalması, belkide bu yerlerde canlılığın durmasına neden olması kaçınılmazdır. Özellikle de biyosferi kullanarak hava yolu ile bir yerden başka yere taşınabilen sporlu bakterilerin sahip oldukları dirençlilik unsuru olan genetik materyallerinin bir yerden başka yere taşınmasında da önemli bir unsur olabileceği kanısındayız.

Yaptığımız bu çalışmalarda havasal basillerin ağır metal dirençlilik yüzdelereferans suşa göre, kıyaslandığında; %100 bakır ve kadminyum’a karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Diğer ağır metallere karşı herhangi bir direnç görülmemiştir.

Ağır metallerden bakır’a karşı en yüksek MİK değeri 4mM olup (E1, E3, E6 ve E10) izolatlarının *B.subtilis*, E2 izolatının *B.polymyxa*, (E9 ve E14)’ün ise *B.pumilus* olduğu tespit edilmiştir. Diğer izolatların ise 2mM MİK değerine sahip olduğu bulunmuştur. Tam olarak ispatlanamamak ile birlikte, bazı bakır dirençlilik tiplerinin periplazmik bağlanmaya dayandığı savunulmaktadır (Silver, 1998). Ağır metallerin ise doğaya ve çevreye yayılmasında etkisi olan en önemli endüstriyel faaliyetler ise; termik santraller, çimento sanayi,cam üretim sanayi,demir çelik sanayi, çöp ve atık çamur yakma tesisleridir. Diğer çalışmalardan elde edilen bilgilere göre tarım alanlarından izole edilen mikroorganizmaların bakır dirençliğinin fazla çıkması fungusit olarak kullanılan ilaçların bileşiminde bakır bulunmasından kaynaklanmaktadır.

Endüstriyel ve sanayi kaynaklı kirlilik sebebiyle veya toprağın jeolojik yapısında bulunan ağır metallerin su kaynaklarına geçişi, topraktaki ağır metallerin çözünerek doğadaki suyun sürekli hareketi ile ırmak, göl ve yeraltı sularına ulaşması ile gerçekleşmektedir. Bu özellik mikroorganizmalar gibi çok kısa süreli üreme periyotlarına sahip organizmalar üzerinde ise oldukça etkilidirler. Doğal veya sentetik (yapay) kimyasal bileşiklerin, ağır metallerin ve bazı organik bileşiklerin yaygın üretimi ve kullanımı; çeşitli organik bileşikleri parçalayabilme yeteneği ile ağır metallere karşı direnç gösteren belirli tip bakteriler için seçici olarak organizma ortamını değiştirir (Wiener ve ark., 2003).

Ağır metallerden kadminyum’ a karşı en yüksek MİK değeri 0.25 mM olup (E6 ve E10) izolatlarının *B.subtilis*, E2 izolatının *B.polymyxa*, (E8, E9, E13 ve E14)’ün ise *B.pumilus*, E7 izolatının *B. licheniformis*, E4 izolatının *B. megaterium* olduğu, E12 izolatının identifiye

edilemediği tespit edilmiştir. Diğer 4 izolatın ise 0.125 mM MİK değerine sahip olduğu bulunmuştur.

Bakteriler ortam ile ilişkileri belirlemek için enyatkın indikatörlerdir (Benzverbnaya ve ark., 2005). Bakteriler genellikle ağır metallerin en düşük yoğunluklarına dahi duyarlılık gösterirler. Bazen ise plazmidler bakterilere direnç genlerini kodlar, daha sonra bakteriler ağır metallerle karşı direnç kazanarak indikatör mikroorganizma olarak kullanılabilirler (Kannan ve Lee, 2008).

Samanta ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, belediye atıklarından elde edilen *Bacillus* suşlarının ağır metallerle karşı geniş bir tolerans gösterdiklerini bulmuşlardır. Gösterilen toleransın $Cd > Cr > Ni > Co$ şeklinde olduğunu en yüksek toleransın kadmiyuma karşı olduğunu ve bakteriler üzerinde en fazla kobaltın toksik etki yarattığını bildirmişlerdir (Samanta ve ark., 2012).

Timaney ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, New York Bight Bölgesi'nden izole edilen *Bacillus* suşlarının bakır ağır metaline karşı MİK değeri 20 µg olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca suşların elde edildiği bölgenin kirliliği az olan bir bölge olmasına rağmen *Bacillus*' ların ağır metallerle karşı direnç geliştirdiğini savunmuşlardır. Ayrıca ağır metal direncin ampisilin antibiyotiği ile kombine hale getirildiğinde, *Bacillus* suşlarının çok yüksek bir dirence ulaştığını bildirmişlerdir (Timaney ve ark., 1978).

Yaptığımız bu çalışmamızda elde ettiğimiz 14 adet (on dört) *Bacillus* izolatının 7 (yedi) farklı antibiyotiğe karşı dirençlilikleri ise agar disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş olup ve çalışma sonuçları Çizelge 3.8 ve 3.9'da verilmiştir. Basillerin en yüksek antibiyotik dirençlilik düzeylerini yüksekten düşüğe doğru sıraladığımız zaman ise; %100 oksasilin, %50 oranında ise ampisiline ve %7.1 oranında eritromisine karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada elde edilen Basillerin antibiyotik dirençlilik profillerinin düşük olmasının nedeni ise izolatların elde edildiği ortamlarda antibiyotikle karşılaşma olasılıklarının düşük olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Evsel nitelikteki atıklardan elde edilen izolatlar ve tarım alanlarından elde edilen izolatlar antibiyotik dirençliliği gösteren mikroorganizmaların en önemli kaynaklarını oluşturmaktadır. Bakteriler yeni antibiyotiklere karşı dirençli duruma geldikçe, değişik ortam koşullarında kolayca uyum sağlayabilmektedirler, bu uyumun meydana gelmesinde plazmit adı verilen ekstrasözomal DNA yapılarının taşıdığı oldukları dirençlilik bilgisi de önemli rol almaktadır (Saunders, 1984; Karakayar vd., 2004). İnsan ve hayvanlar, R plazmitlerinin (dirençlilik plazmitlerinin) en önemli rezervuarını oluştururlar. Özellikle gıda amaçla kullanılan hayvanları gerek gıda

zinciri aracılığı ile gerekse hayvansal atıklar aracılığı ile direnç genlerinin oluşmasında önemli bir rezervuar kaynağını meydana getirmektedir (Jensen ve ark., 2001).

Yılmaz, yaptığı çalışmada ağır metal içeren topraktan elde ettiği *Bacillus* spp. izolatının ampisilin, sefazolin, sefotaksim, mezlosilin, piperacilin antibiyotiklerine karşı dirençli olduğunu göstermiştir (Yılmaz, 2003). Güven ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada topraktan izole edilen *B.cereus* suşlarının antibiyotiklere dirençliliklerini ve bu izolatların hücre proteinlerinin analizini çalışmışlardır. Elde edilen *B. cereus* suşlarının kanamisine duyarlı, ampisilin ve sefotaksime dirençli olduğu bulunmuştur (Güven vd., 2008).

B.cereus' ta tetrasikline dirençli küçük bir plazmitin olduğu rapor edilmiştir (Bernhard ve ark., 1978). Yine aynı çalışmada topraktan izole edilen *B.cereus* suşlarının amfisiline yüksek direnç gösterdikleri, *B.subtilis* suşlarının da streptomisine dirençli olduğu tespit edilmiştir.

Ombui ve arkadaşları, yaptıkları bir başka çalışmada *B.cereus*'un ampisiline dirençli, streptomisine duyarlı, gentamisin'e de % 7 dirençli olduğunu belirtilmiştir (Ombui ve ark., 1996). Benzer sonuçları veren bir diğer çalışma ise yine topraktan izole edilen *B.cereus* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin tespiti üzerine yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *B.cereus* suşlarının ampisilin ve sefotaksime dirençli oldukları, izolatların bir kısmının ise basitrasin ve eritromisine de dirençlilik gösterdikleri tespit edilmiştir (Aslım vd., 2002).

Kannan ve Lee Güney Kore'de Sunchon Bay Bölgesi'nden izole etmiş oldukları *Bacillus* cinsi bakterilerde, genellikle elde ettikleri izolatların ampisilin antibiyotiğine karşı oldukça yüksek direnç gösterdiklerini bulmuşlardır. Ampisilin direncini sırasıyla kanamisin, tetrasiklin ve streptomisin dirençleri izlemiştir. Yani en yüksek direnç ampisiline, en düşük direnç ise streptomisine karşı olduğu çalışmaları sonucunda bildirilmiştir. Suşlardan ise *B. subtilis* ve *B. amyloliquefaciens*'in ise streptomisin ve ampisiline dirençli olduğu yapılan çalışma sonucunda bildirilmiştir (Kannan ve Lee., 2008).

Yapmış olduğumuz çalışmada bizim elde ettiğimiz izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ele alındığında zaman ise; kloromfenikol, kanamisin, vankomisin ve gentamisine karşı %100, eritromisine ise %92.8 oranında duyarlı olduğu görülmüştür.

Aslım ve arkadaşları yaptığı çalışmada topraktan izole ettikleri *Basillus* izolatlarının antibiyotik dirençlilik düzeyleri araştırılmıştır. Bütün suşların vankomisin'e duyarlı olduğunu, izolatların %97' sinin ise kloromfenikole ve %93' ünün de tetrasikline duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir.

Yapmış olduğumuz bir diğer çalışmada ise; havasal basil izolatlarının sekonder (ikincil) metabolit üretme yetenekleri ile ilgilidir. Mikroorganizmalar kendi yaşamsal faaliyetleri için ürettikleri metabolitlere primer metabolit adını verirken, kendilerini savunmak amacı, yer edinmek istekleri hayatta kalma mücadelesi içerisinde ürettikleri metabolitlerin tamamına ise sekonder metabolit adı verilmektedir. Bu bağlamda özellikle antimikrobiyal aktiviteye sahip metabolit ürettiği bilinen mikroorganizmalar funguslar, *Bacillus* ve aktinomisetler genusu üyeleridir (Hussain ve ark., 1994). *Bacillus* türleri antibakteriyel olarak kullanımlarının yanı sıra antiviral (Steller ve ark., 1999), anti-möbositik (Galvez ve ark., 1994; Lebbadi ve ark., 1994) antifungal (Hussain ve ark., 1994; Milner ve ark., 1995), ve antimikoplazma (Peypoux ve ark., 1999) ajanı olarak da kullanılırlar ve geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler.

Bakterilerde sekonder (ikincil) metabolit üretimi ve sporulasyon arasındaki ilişki genetik ve biyokimyasal yollar ile araştırılmaktadır. *Bacillus*'larda spor oluşumunun polipeptit antibiyotik üretimi ile dolaylı veya doğrudan 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).

Çizelge 3.10' a bakıldığında 14 (on dört) basil izolatının *Legionella* spp. izolatına karşı herhangi bir antimikrobiyal aktiviteye rastlanmamıştır. Basil izolatlarının ise *L. pneumophila* Sg 2-15 bakterisine karşı sekonder metabolit üreterek antimikrobiyal aktivite gösterdiği görülmüştür.

Legionella cinsi bakterilerin; Gram boyama reaksiyonları negatif (-), sporsuz, kapsülsüz, hareketli ve Giemsa boyası ile iyiboyanabilen bakterilerdir. Ekimleniyapılan bakteriler 37°C sıcaklıkta 3-7gün (72-168 saat) inkübasyon için bekletilir ve petrideki görüntüleri genellikle küçük 3-4 mm çapında, küçük, konveks yapıda, buzlu cam görünümünde gri ve kaygan koloniler görüldüğü zaman identifikasyon (tanımlama) için biyokimyasal testler yapılır. Katalaz (+), oksidaz (+), jelatin hidrolizasyon testi (+), üreeaz (-), hippurat hidrolizi (+), nitrat redüksiyon testinde (-) özelliklerin görülmesi ise tanı koydurur (<http://www.mikrobiyoloji.org>). Bu bakterinin 58 türü vardır ve Lejyoner hastalığının yüzde doksandan fazlasının etkeni *Legionella pneumophila*'dır. Hastalık insandan insana bulaşmaz. *Legionella* ile kolonize suların aspirasyonu veya inhalasyonu (solunum) ile bulaşır. Yaşam alanları genelde musluk ve duş başlıkları, atıl alanlarda kalmış su fıskiye gibi yerlerdir. Sulu, nemli alanları severler ve yaşarlar. *Legionella* bakterisinin gelişebilmek için ortamda yaklaşık olarak %5 atmosferik neme ihtiyaç duyar. Makrolidler ve kinolonlar tedavide ilk seçenek olarak

kullanılan ilaçlardır. Penisilinlerin ise hastalığın tedavisinde yer almamaktadır (<https://www.wikipedia.org>).

Tanı için flerosanlı antikorlar kullanılabilir. Örneklerden direkt preparatlar yapılarak ve kültürlerden üretilen koloniler kullanılarak Floresan antikor tekniği ile erken tanı konulabilir. Ayrıca Latex aglütinasyonu, EIA yöntemi ve PCR yöntemleri ile erken tanı konulabilir (<http://www.mikrobiyoloji.org>).

Basil izolatlarından *L. pneumophila* Sg 2-15 bakterisine karşı yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olanlar ise E1, E3 ve E6 (*B. subtilis*), E2 (*B. polymyxa*), E5 (*B. brevis*) olduğu tespit edilmiştir. Basil izolatlarının *L. pneumophila* Sg 2-15 bakterisi üzerine etkili olması önem arz etmektedir.

Bilindiği gibi gram negatif (-) bakterilerin hücre duvar yapılarının gram pozitif (+) bakterilere oranla farklı bir yapıya sahiptir. Gram negatif (-) bakterilerin hücre duvarı yapısındaki dışta bulunan lipittabakasının varlığı onları birçok öldürücü ajana karşı ikinci bir bariyer görevi görerek onları dirençli bir organizma haline getirir. Bu özellik sayesinde gram negatif (-) bakterilerin herhangi bir ortamdan elimine edilmesini zorlaştırır.

Bacillus türlerinin geç logaritmik faz veya erken sabit fazda sekonder (ikincil) metabolit olarak antibiyotik üretme kapasitesinde olduğunda ve sporulasyon olayı başladığı zaman antimikrobiyal madde üretimini de başlattıkları bilinmektedir (Bunchonon ve Gibbons, 1974). Bu sırada sporulasyondaki fonksiyonların düzenlenmesi, gelişme yetenekleri, hücre dışı parçalayıcı enzimler ve antimikrobiyal madde üretimleri de uyarılmaktadır. Bu çeşit olaylar *Bacillus* hücrelerinin beslenme stresine karşılık cevapları olarak yansır ve çevresel değişikliklere hızla uyum sağlayabilirler. Antimikrobiyal madde üretimi, sınırlı kaynakları olan bir ortamda yaşayan organizma için rekabet şansını arttıran önemli unsurdur.

Özel metabolitlerin, ortam uyarılarını cevaplamak için, bakteri topluluğunu harekete geçiren hücre içi sinyaller olarak hizmet sunabileceği gösterilmiştir (Galvez ve ark., 1994).

Bacillus cinsi bakteriler biyosurfaktant, aminoglikozit, peptit ve fosfolipit yapıda antimikrobiyal maddeler üretmektedirler (Marahiel 1992; Patel ve ark., 1995; Desai ve Banat, 1997; Ota ve ark., 2000; Tamehiro ve ark., 2002).

Bacillus izolatları çeşitli bakteriler tarafından üretilen ve aynı türlerin farklı suşlarına öldürücü veya diğer bakteriler üzerinde inhibe edici (durdurucu) etkisi olan bakteriyosini de meydana getirebilmektedirler. *Bacillus subtilis* bakterisinden elde edilen basillozin 22

maddesinin hem *Bacillus cereus* hem de önemli bir patojen olan *Listeria monocytogenes* üzerinde de etki ettiği görülmüştür (Zheng ve Slavik, 1999).

Perez ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *Bacillus* cinsinin yabani tip suşlarını antimikrobiyal aktivite için seçmiş, iki adet suşun *B. circulans* MIR 13 ve *B. polymyxa* MIR 23' ün *Micrococcus luteus*'a karşı aktivite gösterdiği ve ayrıca *B. polymyxa* MIR 23' ün *P. Aeruginosa*, *E. coli*, , *A. niger*'e karşı aktivite gösterdiğini belirlemiş, diğer suşun ise bu mikroorganizmalara karşı aktif olmadığını bildirmişlerdir (Perez ve ark., 1993).

Antibiyotiklere karşı gelişen gösterilen dirençlilik, enzimlerin değişim göstermesi hücre metabolik yol ve hücre zarı geçirgenliğinin değişimi veya antibiyotiklerin etki edecekleri molekülün yok olması ile gelişebilmektedir (Viljanen ve Boratynski, 1991). Mikroorganizmaların kendilerini yok etmek için kullanılan antimikrobik (mikrop önleyici) maddelere karşı, karşı koyma gücü ile direnç kazanmaktadırlar. Böylelikle oluşan bu direnç ise günümüzde bütün insanlığı tehdit edecek boyutta veciddi bir sorundur. Günümüzde ise artık sadece hastane kökenli değil toplumdan kazanılmış kökenlerde de direnç önemli oranlarda artmakta, sorun ciddi boyutlara ulaşmaktadır (Gür, 1994).

Drablos ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, *Bacillus subtilis* ve *Bacillus licheniformis* tarafından üretilen basitrasın antibiyotiğinin birçok Gram pozitif (+) ve bazı Gram negatif (-) (mikrop önleyici) bakterilere karşı antimikrobiyal (mikrop önleyici) aktivitesinin olduğunu gözlemlemişlerdir (Drablos ve ark., 1999).

Bacillus subtilis' in 3 (üç) suşundan izole edilen aminokoumasin A ve noaminokoumasin adlı antibiyotikler kronik gastrit, ülser ve mide kanserine yol açan *Helicobacter pylori* bakterisi üzerinde etkili olması önemli bir gelişme olarak değerlendirilmektedir (Pinchuk ve ark., 2001).

Bacillus cinsi bakterilerin oluşturduğu antimikrobiyal maddelerin yapılarının farklı olduğu gibi etki mekanizmaları da birbirinden farklı olabilmektedir. Hücre çeperi sentezini bozan veya hücrenin membranına zarar veren etkileri yanında protein sentezini de engelleyen antimikrobiyal maddeler bulundurmaktadırlar (Ota ve ark., 2000).

Bacillus subtilis ATCC 39320 saf kültürünün aerobik (oksijenli) ve anaerobik (oksijensiz) organizmalara karşı antibakteriyel etkisi oksidifisidin, diffisidin antibiyotiklerinden ileri gelmektedir. Bu antibiyotikler *E. coli*' nin protein sentezini inhibe etmektedirler (Zweerink ve Edison, 1987).

Yapmış olduğumuz bu çalışmada; havasal örneklerden elde etmiş olduğumuz Basil izolatlarının ağır metallere özellikle bakır ve kadminyum ağır metallerine karşı dirençli olması, çeşitli ortamlardan ağır metal giderim çalışmalarında da kullanılabileceği gibi, sekonder (ikincil) metabolit üretim yeteneklerinin özellikle gram negatif (-) bakterilerden *L. pneumophila* serogrup 2-15'e karşı olması ise önem taşımaktadır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahmann, D., Roberts, L., Krumholz, R. ve Morel, M., (1994), 'Microbe grows by reducing arsenic', *Nature*, 371:750-1s.
- Anderson, A. ve Dawes, E., (1990), Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates, *Microbiological Reviews*, 54:4, 450-472s.
- Aslım, B., Sağlam, N. ve Beyatlı, Y., (1998), Toprakta izole edilen bazı *Bacillus* türlerinin poly- β -hydroxybutyrate (PHB) üretim miktarlarının belirlenmesi, *Biyoteknolojide Üniversite-Sanayi İşbirliği Sempozyumu*, Anadolu Üniv. ve Biyoteknoloji Derneği, Eskişehir.
- Aslım, B., Sağlam, N., Beyatlı, Y., (2002), Determination of some properties of *Bacillus* isolated from soil, 26, 41-46s.
- Austin, C.B., Wringht, M.S., Stepanauskas, R. ve McArthur, J.V., (2006), Co-selection of antibiotic and metal resistance, *Trends in Microbiology*, 14,4:176-182s.
- Azevedo, E.C., Rios, E.M., Pukushima, K. ve Campos-Takaki, G.M., (1993), Bacitracin production by a new strain of *Bacillus subtilis*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 42:1, 1-7s.
- 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.
- Benoit, T.G., Wilson, G.R. ve Baugh, C.L., (1990), Fermentation during growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* HD-1, *Letters in Applied Microbiology*, 10, 15-18s.
- Benzverbnaya, I. P., Buzoleve, L. S. ve Khristoforova, S., (2005), Metal resistant heterotrophic bacteria in Coastal waters of Primorye, *Russ.J. Marr. Biol.*, 31, 73-77s.
- Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, (1994), <http://www.springer.com/series/4157>.
- Berkeley, Rcw, Logan, N., (1997), *Bacillus, Alicyclobacillus and Paenibacillus, Principles And Practice Of Clinical Bacteriology*, Chichester:Wiley, 185 .
- Bernhard, K., Schremph, H. ve Roebel, W., (1978), Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in *B.cereus* and *B. Subtilis*, *J. Bacteriol*, 133:897-903s.
- Bigersson, B., Sterner, O., Zimerson, E., *Chemie and Gesundheit*, (1988), Eine verst 2nd liche einföhrung in die toxikologie, VCH Verlagsgesellschaft, isbn 3-527-264455-8s.
- Bruins, M.R., Kapil, S. ve Oehme, F.W., (2000b), Microbial Resistance to Metals in the Environment, *Ecotox. Environ. Safe.*, 45:198-207s.
- Buchanan, R.E., Gibbons, N.E., (1974), *Bergey's Manual of alterminative bacteriology*, 8th. Edition, The Wiliams and Wilkins Company, 1246 s. Maltimore.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- 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.
- Chen, G. Q., König, K. H. ve Lafferty, R. M., (1991), Occurrence of poly-D(-)-3-hydroxyalkanoates in the genus *Bacillus*, *FEMS Mic. Lett.*, 84, 174-176s.
- Choudhury, R. ve Srivastava, S., (2001), Zinc resistance mechanisms in bacteria, *Curr. Sci.* , 81(7):7s.
- Dave, H., Ramakrishna, C. ve Desai, J. D., (1996), Production of polyhydroxybutyrate by petrochemical activated sludge and *Bacillus sp. IPCB-403*, *Ind. Jour. Exp. Bio.*, 34:216-219s.
- Demain, A.L. ve Davies, J.L., (1999), Manual of industrial microbiology and Biotechnology 2 nd Edition, 392-416s.
- 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.
- Ehrlich, H.L., (1997), Microbes and metals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 48: 687-692s.
- Eisinger, B., Yasbin, E. R. ve Robleto, A. E., (2010), Antibiotic resistance in *Bacillus subtilis* as affected by transcriptional derepression and the stringent response, University of Nevada, Las Vegas.
- Eltem, R. ve Uçar, F., (1998), Bir soda gölü olan Denizli Acıgöl 'den izole edilmiş *Bacillus* suşunun antimikrobiyal aktivite spektrumlarının saptanması, *KÜKEM Dergisi*, 21(1), 57-64s.
- Emtiaza, G., Ethemadifar, Z. and Habibi, M. H., (2004), Production of extra-celluler polymer in *Azotobacter* and Biosorption of Metal By Exopolymer, *Afr. J. Biotech.*, 3(6):330-333s.
- Errington, J., (2003), Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*, *Nature Reviews: Microbiology*, 1:117-127s.
- Faulkner, D. J., (2000), Marine natural products, *Nat. Prod. Rep.*, 17s.
- Findlay, R. H. ve White, D. C., (1983), Polymeric beta-hydroxyalkanoates from Environmental Samples and *Bacillus megaterium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1, 71-78s.
- Galvez, A., Maqueda, M., Cordovilla, P., Martinez-Bueno, M., Lebbadi, M. and 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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.

Gebhardt, K., Schimana, J., Oland, J., Fiedler, H. P, Kallenborn, G. H., Holzenkampfer, M., Krastel, P., Zeeck, A., Vater, J., Höltzel, A., Schmid, G. D., Rheinheimer, J. and Dettner, K., (2002), Screening for biologically active metabolites with endosymbiotic bacilli isolated from arthropods, Fems Microbiology Letters, 217,199-205s.

Genç, E., Valentini, S., Agostino, D., (2011), Kuriki Höyük Archaeological Project 2010, 33. Uluslararası Araştırma ve Arkeometri Sempozyumu Toplantısı, Malatya, 463-480s.

Gordon, R. E., (1981), One hundred and seven years of the cins *Bacillus*, The aerobic endospore forming bacteria, Academic press, London

Guzzo, J., Diorio, D. C., Alexander, D. C. ve Dubow, M. S., (1999), Toward understanding metal stress in environmental microbial flora, Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology, Canada.

Gültekin A., (2009), Sentetik reseptörlere dayalı nano algılama sistemleri, Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Edirne.

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.

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.

[http:// www.mikrobiyoloji.org/](http://www.mikrobiyoloji.org/)

<https://www.wikipedia.org/>

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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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), 1-6s.

Jensen, L. B., Baloda, S., Boye, M. ve Aqrestrup, F. M., (2001), Antimicrobial resistance *Pseudomonas* ssp. and *B.cereus* group isolated from Danish Aricultural soil, Environ. Int., 26:581-587s.

Ji, G., ve Silver, S., (1995), Bacterial resistance mechanism for heavy metals of enviromental concern, J. Ind. Microbiol. 14:61-168s.

John, H., Howard, G., Worth, J., (1996), Fundamental toxicology for Chemists, Cambridge, VK:Royal Society of Chemistry Information Services.

Kajimura, Y. ve Kaneda, M., (1996), Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8 Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity, J. Antibiotics, 49(2), 129-135s.

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.

Kannan, K. S. ve Lee, J. K., (2008), Metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* species isolated from Sunchon Bay sediments, College of agriculture and life science, Chonbuk National University, Jeonju, South Korea, 561-756s.

Karakayar, F., Ay, Ö. ve Cicik, B., (2004), Mersin kıyı şeridinden alınan su örneklerinden izole dilen *Escherichia coli* suşlarının bazı antibiyotiklere karşı plazmid kökenli dirençliliğinin saptanması, Eko. Çev. Kor. 13,52:28s.

Kato, N., Konishi, H., Shimao, M. ve Sakazawa, C., (1992), Production of 3-hydroxybutyric acid trimer by *Bacillus megaterium* B-124, Journal of Fermentation and Bioengineering, 73(3), 246-247s.

Kıran, Ö. E., Çömlekçioğlu, U. ve Dostbil, N., (2006), Bazı mikrobiyal enzimler ve endüstride kullanım alanları, K. S. Ü. Fen ve Mühendislik dergisi, 9 (1), 12-17s.

Labuzek S., ve Radecka, I., (2001), Biosynthesis of PHB tercopolymer by *Bacillus cereus* UW85, Journal of Applied Microbiology, 90, 353-357s.

Laland, S. G., Zimmer, T., (1984), Synthesis of peptid antibiotics by the thiotemplate mechanism, Biologically Active Principles of Natural Products, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

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 enviromental Microbiology., 61: 3556-3561s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Law, K., Leung, Y., Lawford, H., Chua, H., Lo, W. ve Yu, P. H., (2001), Production of polyhydroxybutyrate by *Bacillus* species isolated from municipal activated sludge, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 91(93), 515-524s.
- 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.
- Lee, S. Y., Yim, K. S., Chang, H. N., Chang, Y.K., (1994), Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology*, 32, 203-211s.
- Li, X. Z., Nikaido, H. ve Williams, K. E., (1997), Silver-resistance Mutants of *Escherichia coli* Display Active Efflux of Ag^+ and are Deficient in Porin., *J. Bacteriol.*, 179(19): 6127-6132s.
- 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.
- Madison, L. L., Huisman, G. W., (1999), Metabolic Engineering of Poly-3-Hydroxyalkanoates From DNA to Plastic, *Mic. Mol. Bio. Reviews*, 63, 21-53s.
- Marahiel, M. A., (1992), Molekular biologie und regulationmechanismen der antibiotika produktion in *Bacillus*, *Naturwissenschaften*, 79, 202-212s.
- McCool, G. J., Fernandez, T., Li, N., Cannon, M. C., (1996), Polyhydroxyalkanoate Inclusion Body growth and proliferation in *Bacillus megaterium*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 138, 41-48s.
- McEntee, J. D., Woodrow, J. R., ve Quirk, A. V., (1986), Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp., *Appl. Environ. Microbiol.*, 51:515-520s
- Mercan, N. ve Beyatlı, Y., (2001), *Bacillus sphaericus* suşlarının poli-β-hidroksibütirat (PHB) üretimlerinin incelenmesi, *Biyoteknoloji (KÜKEM) Dergisi*, 25(2), 1-7s.
- Milner, J. L., Raffel, S. J., Lethbridge, B. J. ve Handelsman, J., (1995), Culture conditions that influence accumulation of zwittermixin a by *Bacillus cereus* UW85, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 685-691s.
- Morikawa, M., Ito, M., Imanaka, T., (1992), Isolation of a new surfactin producer *Bacillus pumilus* A-1, and cloning and nucleotide sequence of the regulator gene, psf-1, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 74, 5, 255-261s.
- Nakagawa, A., Konda, Y., Hatano, A. ve Omura, S., (1988), Structure and biosynthesis of novel antibiotics, aurantinins A, and B by *Bacillus aurantinus*, *J. Org. Chem.*, 53, 2660-2661s.
- 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.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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.

Nickerson, K. W., Zarnick W. J. ve Kramer, V. C., (1981), Poly-B-Hydroxybutyrate parasporal bodies in *Bacillus thuringiensis*, FEMS Microbiology Letters, 12: 327-331s.

Nies, D. H. , ve Silver S., (1995), Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances, J. Ind. Microbiol., 14(2), 186-199s.

Ombui, J. N, Mathenge, J. M., Kimotho, A. M., Macharia, J. K. ve Nduhiu, G., (1996), Frequency of antimicrobial resistance and plasmid profiles of *B.cereus* strains isolated from milk, East Afr.Med. J.,73:380-384s.

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.

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.

Öner, M., (2002), Mikrobiyal ekoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, No:100; 282s, İzmir.

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.

Perez, C., Suarez, C. ve Castro, G. R., (1992), Production of antimicrobials by *Bacillus subtilis* MIR 15, Journal of Biotechnology, 26, 331-336s.

Perez, C., Suarez, C., Castro, G. R., (1993), Antimicrobial activity determined in strains of *Bacillus circulans*, Cluster, Folia Microbiol. 38, 1, 25-28s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Peypoux, F., Bonmatin, J. M. ve Wallach, J., (1999), Recent trends in the biochemistry of surfactin, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(5), 553-563s.
- Pinchuk, I. V., Bressollier, P., Verneuil, B., Fenet, B., Sorokulova, I. B., Megraud, F. ve Urdacı, M., (2001), In vitro anti-*Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), 3156-3161s.
- Poirier, Y., (2002), Polyhydroxyalkanoate synthesis in plants as a tool for biotechnology and basic studies of lipid metabolism, *Progress in Lipid Research*, 41, 2, 131-155s.
- Reddy, A., Batisti, L. ve Thome, C. B., (1987), Identification of self-transmissible plasmids in four *Bacillus thuringiensis subspecies*, *J. Of gen. Microbiol.*, 135: 3035-3041s.
- Rosado, A. S. ve Seldin, L., (1993), Production of a potentially novel anti-microbial substance by *Bacillus polymxa*, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(5), 521-528s.
- 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.
- Rouch, D. A., Lee, B. T. D., ve Morby, A. P., (1995), Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance, *J. Ind Microbiol.*, 14:132-141s.
- Rygu 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.
- Samanta, A., Bera, P., Khatun, M., Sinha, C., Pal, P., Lalee, A. ve Mandal, A., (2012), An investigation on heavy metal tolerance and antibiotic resistance properties of bacterial strain *Bacillus sp.* isolated from municipal waste, *J. Microbiol. Biotech. Res.*, Division of Microbiology, Department of Pharmaceutical Technology, Jadavpur University, Kolkata, India, 2 (1), 178-189s.
- Sarışeker, N., (1983), Fermentasyon yolu ile antibiyotik üretimi, *Endüstriyel Mikrobiyoloji*, editör E. T. Çetin, İstanbul Üniversitesi Vakfı, 280-304s.
- Saunders, J. R., (1984), Genetics and evolution of antibiotic resistance, *British medical Bulletin*, 40:54-60s.
- Savenkova, L., Gercberga, Z., Nikolaeva, V., Dzene, A., Bibers, I. ve Kalnin, M., (2000), Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films, *Process Biochem.*, 35, 573-579s.
- Schlegel, H., (1992), Produktion sekundärer metabolite, *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg-Tehieme Verlag, 362-371s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Selen, V., (2006), *Bacillus amyloliquefaciens* ile α -amilaz üretiminin katı substrat fermentasyonu ile incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Mühendisliği Anabilim dalı, 72s.

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.

Sevim, E. Ç., Karaoğlu, A. Ş., Sevim, A. ve Özgümüş O. B., (2006), İçme sularından izole edilen *Bacillus* suşlarının identifikasyonları ve antibiyotiklere direnç profilleri, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 36 (4), 219 – 223s.

Silo-Suh, L., Letbridge, B. J., Raffel, S. J., He, H., Clardy, J. ve Handelsman, J., (1994), Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85, Appl. Environ. Microbiol., 60(6), 2023-2030s.

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.

Stabb, E. V., Jacobsen, L. M. ve Handelsman, J., (1994), Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils, Applied and Environmental Microbiology, 60(12), 4404-4412s.

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.

Takahashi, A., Saito, N., Hotta, K., Okami, Y. ve Umezawa, H., (1986), Bagougeramines A and B, new nucleoside antibiotics produced by a strain of *Bacillus circulans* I. Taxonomy of the producing organism and isolation and biological properties of the antibiotics, J. Antibiot., 39(8), 1033-1040s.

Tamehiro, N., Okamoto-Hosoya, Y., Okamoto, S., Ubukata, M., Hamada, M., Naganawa, H. ve 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 clases, Anadolu Univercity Pres No:74, Eskişehir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tavernier, P., Portais, J.C., Saucedo, J. E. N., Courtois, J., Courtois, B., Barbotin, J. N., (1997), Exopolysaccharide and poly- β -hydroxybutyrate coproduction in two *Rhizobium meliloti* strains, Applied and Environmental Microbiology, 63, 1, 21-26s.

Temiz, A., (2000), Genel mikrobiyoloji uygulama teknikleri, Hatipoğlu yayınevi, Ankara.

Timoney, J. F., Port, J., Giles, J. ve Spanier, J., (1978), Heavy-Metal and Antibiotic Resistance in the Bacterial Flora of Sediments of New York Bight, Applied and Environmental Microbiology, New York State College of Veterinary Medicine, Cornell University, Department of Microbiology, 465-472s.

Ting, Y. P., Lawson, F. ve Prince, I. G., (1991), Uptake of Cadmium and Zinc by the Alga *Chlorella vulgaris* II, Multi-ion situation, Biotech. Nd Bioeng. , 37:445-55s.

Tunç, K., (1995), Biyoteknoloji, Gazi Üniversitesi İletişim Fakültesi Basımevi, Ankara, 80-86s.

Ustaçelebi, P., (1999), Temel ve klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara.

Uçan, U. S. ve Erganiş, O., (2005), Pratik bakteriyoloji, Selçuk Ün. Basımevi, Konya.

Vollenbroich, D., Özel, M., Vater, J., Kamp, R.M. ve Pault, G., (1997), Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*, Biologicals, 25, 289-297s.

Viljanen, P., Boratynski, J., (1991), The susceptibility of Conjugative Resistance Transfer in Gram Negative Bacteria to Physicochemical and Biochemical Agents, FEMS Microbiology Rev. 88:43-54s.

Wiener, P., Müller-Graf, C., ve Barcus, V., (2003), Bacterial Evolution in Modern Times: Trends and Implications for Research, Reviews in Undergraduate Research, Vol. 2: 1-6s.

Wu, Q., Huang, H., Hu, G., Chen, J., Ho, K., Chen, G., (2001), Production of poly-3-hydroxybutyrate by *Bacillus sp. Jma5* cultivated in molasses media, Antonie van Leeuwenhoek, 80, 111-118s.

Yılmaz, M., Soran, H. ve Beyatlı, Y., (2005), Antimicrobial activities of some *Bacillus spp.* strains isolated from the soil, Microbial Reserch, Vol 161, Issue 2, s. 127-131s.

Yılmaz E. I., (2003), Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1, Research in microbiology, 154:409-415s.

Yüce, K., (1988), Antibiyotiklerin Etkileri, Antibiyotikler ve Enfeksiyon Hastalıklarında Tedavi Prensipleri, Bilgehan Basımevi, İzmir.

Yücel, A., Tabak, F., Öztürk, R., Mert, A., (1998), Günümüzde antimikrobik tedavi, İstanbul Bulaşıcı Hastalıklarla Savaş Derneği Yayını, No 12, İstanbul.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

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.

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



